

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.07.0873

• 综 述 •

兰尼碱受体 1 结构及其通道门控机制的研究进展

顾嘉伟¹, 邓宇晨², 徐 拯³, 肖 良^{4*}

1. 第二军医大学临床医学专业学员十一队, 上海 200433

2. 第二军医大学海军临床医学专业学员三队, 上海 200433

3. 第二军医大学科研部, 上海 200433

4. 第二军医大学海军医学系海洋生物技术教研室, 上海 200433

[摘要] 兰尼碱受体(ryanodine receptor, RyR)是位于肌浆网膜上的细胞内 Ca^{2+} 释放通道,在骨骼肌和心肌兴奋收缩耦联等生理过程中发挥重要作用。随着单粒子冷冻电镜技术的应用以及数据分析能力的提高,近期来自中国、美国以及德国的 3 个课题组分别获得了整体分辨率为 3.8 Å ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)、4.8 Å 和 6.1 Å 的高清晰 RyR1 结构图片,相关研究同时发表于 2015 年第 1 期的 *Nature* 上,是近年来 RyR 结构及其门控研究的重要进展。RyR1 为相对分子质量 $>2\,200\,000$ 的同源四聚体离子通道,主要包括由 NTD、SPRY、P1、P2、B-sol 以及 C-sol 等结构域组成的胞质区和由 S1~S6、VSL 以及 CTD 等结构域组成的通道区。 Ca^{2+} 作为 RyR1 门控的主要影响因子,能够与胞质区 EF-hand 亚结构域结合,引起通道构象的变化并最终导致通道的开放。

[关键词] 兰尼碱受体;钙;通道;冷冻电镜;结构

[中图分类号] R 341

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2016)07-0873-06

Ryanodine receptor 1 and its potential gating mechanism: recent progress

GU Jia-wei¹, DENG Yu-chen², XU Zheng³, XIAO Liang^{4*}

1. No. 11 Student Team, Clinical Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. No. 3 Student Team, Naval Clinical Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

3. Division of Scientific Research Administration, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

4. Department of Marine Biotechnology, Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] The ryanodine receptors (RyRs) are intracellular Ca^{2+} releasing channels on the sarcoplasmic reticulum membrane and play a pivotal role in the excitation-contraction coupling of skeletal and cardiac muscles as well as other physiological processes. With the recent development of Cryo-EM and the improvement of data analysis technique, scientists from China, the United States and Germany have acquired high-quality RyR1 images at the total resolutions of 3.8 Å ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$), 4.8 Å and 6.1 Å, respectively, which have been published in the same issue of *Nature* in 2015. RyR1s are homotetrameric complexes with a molecular mass of more than 2 200 000, mainly containing a cytoplasmic region composed of NTD, SPRY, P1, P2, B-sol and C-sol domains and a channel region composed of S1-S6, VSL and CTD domains. As the most common factor affecting the condition of RyR1, Ca^{2+} is able to bind the EF-hand subdomain in the cytoplasmic region, which further causes the conformational change and finally leads to the channel opening.

[Key words] ryanodine receptor; calcium; channel; cryo-electronic microscopy; structure

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(7): 873-878]

兰尼碱受体(ryanodine receptor, RyR)是细胞内 Ca^{2+} 释放通道,负责将肌浆网内的 Ca^{2+} 快速释放

[收稿日期] 2016-03-15 **[接受日期]** 2016-06-07

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81470518), 2015 年度第二军医大学大学生创新基金面上项目(MS2015014, MS2015028). Supported by National Natural Science Foundation of China (81470518) and Innovation Fund for Students of Second Military Medical University of 2015 (MS2015014, MS2015028).

[作者简介] 顾嘉伟, 第二军医大学临床医学专业 2013 级本科学员. E-mail: lantianguzhixin@sina.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871129, E-mail: hormat830713@hotmail.com

到胞质中,在骨骼肌和心肌兴奋-收缩偶联(excitation-contraction coupling, ECC)、突触间的信息传递以及胰岛β细胞的分泌功能等多种生理过程中发挥重要作用^[1-3]。目前已发现哺乳动物机体内的RyR有3种亚型,其序列相似性约70%,其中RyR1分布于骨骼肌,RyR2主要在心肌中表达,而RyR3则最初发现于大脑^[4-5]。RyR是目前已知的最大离子通道,相对分子质量>2 200 000,由4个相同的长度超过5 000个氨基酸残基的三角形单体聚合形成。多种金属离子如Ca²⁺、Mg²⁺和结合蛋白如Cav1.1、CaM、Sorcin、FKBP12/12.6(Calstabin1/2)等可以通过复杂的门控机制调节RyR对各种刺激产生不同的应答反应^[6-7]。

电镜技术是研究RyR结构的重要手段^[8-9],事实上,RyR本身即是负染肌细胞时通过电镜观察发现T管和肌浆网之间的“足”而被鉴定出来的^[10]。近期随着单粒子冷冻电镜技术的应用以及数据分析能力的

提高^[11],使得研究者能够在近原子大小分辨率的基础上进一步分析RyR的结构。利用FKBP12与RyR1高特异性结合的特性^[12],由来自中国、美国以及德国的3个课题组分别利用亲和层析的方法从兔骨骼肌中得到纯的RyR1,采用冷冻电镜技术获得了整体分辨率为3.8 Å(1 Å=10⁻¹⁰ m)^[13]、4.8 Å^[14]和6.1 Å^[15]的高清晰RyR1结构图片,相关研究同时发表于2015年第1期的*Nature*上,是近年来RyR结构及其门控研究的重要进展。

1 RyR1 的整体结构及其区域分布

RyR1四聚体呈锥形,底部为1个边长为270 Å的正方形,锥体高160 Å。研究发现,结构上RyR1包括1个巨大的“蘑菇状”胞质部分(80%)和1个与Kv2.1通道结构类似的跨膜结构域(20%)^[4, 16],如图1^[14]所示。

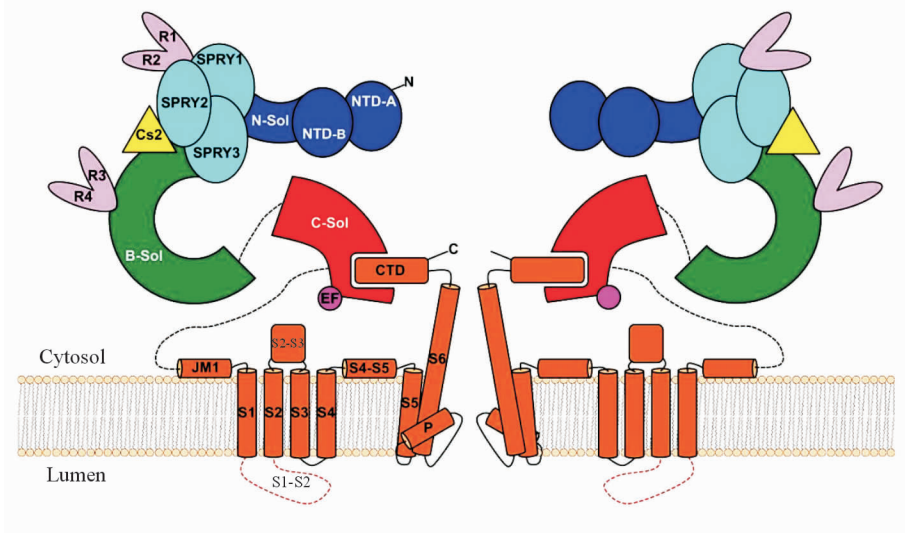


图1 RyR1 结构示意图^[14]

Fig 1 Schematic diagram of RyR1 structure^[14]

RyR1: Ryanodine receptor 1

1.1 胞质区结构 每个RyR1单体胞质区结构主要包括1个N末端结构域(N-terminal domain, NTD)、3个SPRY结构域、P1和P2结构域(phosphorylation 1 and phosphorylation 2 domain, P1 and P2)、桥接solenoid(bridging solenoid, B-sol)以及中央solenoid(core solenoid, C-sol)各1个^[14]。

NTD位于RyR1胞质侧的顶部前庭区,包括A、B(1~394 aa)和C(395~590 aa)3个亚结构^[15]。

其中NTD-A和NTD-B富含β片层结构,NTD-C则为1个由12个α-螺旋折叠而成的armadillo重复折叠结构(armadillo repeat fold)。Armadillo重复折叠结构属于α-solenoid超家族,可以与许多辅助因子相结合并具有其固有的构象适应性,因此NTD-C又被称为N末端solenoid(N-terminal solenoid, N-sol)^[17]。NTD发挥连接通道中央前庭区(central cytosolic vestibule)和RyR1外侧边缘3个SPRY结构域的功能。

NTD向外侧延伸为包括3个SPRY结构域和1个P1结构域的SPRY区域。其中P1结构域(850~1 055 aa)是位于SPRY1(643~794 aa)和SPRY2(1 073~1 205 aa)之间向外突出的区域,并可以和SPRY2相作用;SPRY3(1 419~1 567 aa)位于SPRY1和SPRY2之后,连接B-sol。根据其他蛋白SPRY结构域的研究表明,SPRY结构域多位于连接酶的中心结构域、调节蛋白的结合位点,可以容纳1个包含2个反向平行的7- β 片层或8- β 片层的 β -sandwich结构,发挥促进大分子复合物聚集的作用。RyR1中SPRY结构域连接NTD-C和B-sol这2个 α -solenoid结构并可以为P1结构域提供支架,因而很可能也发挥保持RyR1结构完整性的功能。

SPRY区域之后连接B-sol区域,包括Br-A、Br-B、Br-C以及P2结构域。Br-A又称为把手区(handle domain),由16个 α 螺旋组成,其中有5对 α 螺旋属armadillo重复折叠结构,在一级序列和空间排布上与Br-B相互连接。Br-A是FKBP12(calstabin1)的结合区域,FKBP12通过与Br-A-SPRY1-SPRY2之间的相互作用而发挥稳定RyR1胞膜区结构域和孔道之间连接的作用。Br-B和Br-C共同构成螺旋区(helical domain),由17个 α 螺旋发夹和位于羧基端的7个 α 螺旋组成,形成1个右手超螺旋结构。Br-C则是B-sol的羧基端部分,与相邻RyR1亚单位的SPRY3作用紧密。P2结构域(2 734~2 940 aa)位于Br-B和Br-C之间,为螺旋区第10个 α 螺旋发夹后(即在Br-B区域)向外突出的部分。P2结构域与P1结构域具有29%的相同序列以及相同的“V”形折叠结构。P2结构域位于RyR1的“钳制”区域^[18],具有1个蛋白激酶A(protein kinase A)的磷酸化位点Ser2843,并且在该区域已经发现了7个致病突变,提示P2结构域的功能非常重要,这可能与P2结构域直接介导了RyR1和Ca_v1.1之间的相互作用有关^[6]。

B-sol区域之后连接C-sol。C-sol又称为中心区(central domain),序列主干包括1个含有19个armadillo重复折叠样 α 螺旋组成的马蹄形(horseshoe-shaped)亚结构域^[17]和1个EF-hand(4 071~4 131 aa)亚结构域^[19]。EF-hand亚结构域位于马蹄形亚结构域之后,在空间结构上靠近邻近单体通道结构域S2-S3之间的片段以及其同一单体

的C末端(C-terminal domain, CTD, 4 957~5 037 aa)。此外,EF-hand亚结构域在所有RyRs中都是高度保守的,并且和人类钙调蛋白C叶有26%的序列相同,提示EF-hand亚结构域可能发挥RyR1 Ca²⁺感受器的功能。C-sol结构域的C末端为1个被称为U-模体(U-motif)的U形亚结构域。U-模体位于armadillo重复折叠的凹面,包括1个 β -发夹、1个 α -螺旋发夹以及连接两者的1个短 α 螺旋3部分。

1.2 通道区结构 通道区(channel domain)包括S1~S6跨膜段、类电压感受器(voltage-sensor like domain, VSL, 4 545~4 821 aa)以及CTD等亚结构。孔道区域S1~S6跨膜段具有6次跨膜电压门控离子通道超家族的结构特点,如电压门控Na⁺和K⁺通道等。

延伸的长S6片段高度保守,一半位于肌浆网膜内,另一半则分布于胞质中,目前发现仅存在于pH敏感的原核K⁺通道KscA中发挥门控调节作用。RyR1跨膜区同样具有电压门控和pH调节的特点,提示S6片段也可能发挥类似门控调节的作用。S6片段中间靠膜胞质面的Gly4934又被称为“GLY折点”(Glycine-hinge),可以使S6片段在胞质区的延伸部分和中心轴之间形成24°的转折,在其他电压门控离子通道中可以通过改变S6片段的螺旋方向而引起通道开口的变化^[20]。4个长S6片段形成1个右手螺旋束,在肌浆网膜胞质区边缘形成交叉点,并被S4-S5之间的连接(S4-S5 linker)螺旋缠绕。交叉点处的氨基酸为Ile4937,关闭状态下半径小于1 Å,对Ca²⁺不通透,是控制RyR1通道开关的瓶颈点(bottleneck)^[16, 21]。此外,S6片段向胞质区的延伸长度约为30 Å,并与由5个短 α -螺旋组成的CTD相连。4个相同CTDs分布类似于风车的4个叶片,每个CTD靠近中心位置都含有1个由2个半胱氨酸(Cys4958、Cys4961)和2个组氨酸(His4978、His4983)构成的C2H2型锌指结构(zinc-finger motif),是CTD与S6片段相连的位点,发挥限制S6和CTD之间相对运动的功能。

S2和S3之间的序列在胞质区折叠形成VSL,但VSL缺少类似于电压门控离子通道S4跨膜段的电压感受元件,因而又被称为假电压敏感结构域(pseudo voltage-sensor domain, pVSD)。VSL的

部分序列(4 663~4 787 aa)在胞质侧折叠形成1个VSL胞质亚结构域(cytoplasmic subdomain in the VSL, VSC),包括S2片段在胞质区延伸形成的S2'片段,通过紧密转角(tight turn)连接S3片段的S3'螺旋,以及3个位于S2'和S3'之间的短螺旋C-1、C-2和C-3。此外,跨膜片段S1~S4空间上非常接近,形成1个排列紧密的螺旋束,与VSL和CTD相连。VSC、CTD和C-sol共同构成胞质区“RyR1圆柱体”结构^[8-9]。

离子传导通道由S6片段和S5-S6之间延伸的P-肽段(P-segment)组成。P-肽段富含带负电荷的酸性氨基酸^[22],结构上与 Na_v 、 K_v 以及TRPV1等电压门控离子通道的选择性滤器(selectivity filter, SF)相类似,包括肌浆网腔内部发夹环(luminal loop)和沿S6片段分布的P-螺旋(Pore-helix, P-helix)2部分。SF前庭长约10 Å,突向肌浆网腔的内部发夹环位于S5和P-螺旋之间,其转角处7个氨基酸残基中有6个为带负电荷的Asp或Glu,可能与SF前庭对 Ca^{2+} 的吸附有关^[23]。每个P-螺旋在SF的入口处形成一个螺旋转角,由Asp4899和Glu4900残基侧链C=O构成外部离子结合位点。此外,在SF的内部可能还存在一个由Ala4893、Gly4894和Gly4895残基侧链C=O组成的内部离子结合位点^[24-26],这与 Ca^{2+} 通道蛋白TRPV1^[27]或 Ca_vAb ^[28]的结构类似,说明 Ca^{2+} 通道具有类似的 Ca^{2+} 渗透机制。由于存在长S6片段和SF上方的肌浆网腔内部环,使得RyR1的离子传导通道特别长,从肌浆网到胞质区跨度约90 Å。在SF下方的S6跨膜段是一个与 K_v 、 Na_v 以及TRPV1等门控离子通道类似的保守的疏水性孔道。与SF类似,S6向胞质区延伸的部分同样富含Asp/Glu残基^[29],这种由疏水性孔道和富含酸性氨基酸残基组成的胞质前庭区结构有利于 Ca^{2+} 的快速释放。

2 RyR1的层次结构及其相互作用

四聚体RyR1具有明显的结构层次,大体上可以划分为中心塔状部分(central tower)、周围冠状区域(corona)和外围部分(peripheral domain)3个部分^[13]。中心塔状部分又分为3层:跨膜区为第1层,通道区胞质部分和中心区构成第2层,由4个NTD-As和NTD-Bs相互作用形成的中央前庭区为

第3层^[30]。由把手区和螺旋区组成的不连续冠状结构围绕在中心塔的中下2层,其间隙由SPRY2填充。冠状结构和中心塔之间的联系非常紧密,并为外围部分的结构域以及RyR1的结合蛋白如FKBP12等提供支点。外周部分由3个SPRY结构域、P1以及P2结构域连接冠状部分而成,有利于RyR1单体之间的相互作用并扩大了RyR1胞质区域的面积。胞质区的主要结构特征是存在4个由NTDs外边缘、SPRY结构域内边缘以及邻近单体的B-Sol构成边界的开口。从内部结构上看,RyR1存在以armadillo样重复结构为主的2个超螺旋结构支架,第1个超螺旋结构由NTD、把手区以及中心区相互连接形成,另1个超螺旋结构则包括螺旋区、把手区以及中心区。来自于胞质区任何位置的刺激都可以通过这两个超螺旋支架,引起RyR1中心区、通道区的构象变化并最终影响通道的功能状态。

NTDs相互间以及与其他结构域之间存在的广泛相互作用是维持RyR1胞质区聚集状态的关键因素。如NTD-A的Arg76和Glu177与邻近单体中心区第5个螺旋之间,NTD-A的121~134氨基酸残基环、Pre195、Met196和Ser175与邻近单体Br-B第6个重复螺旋之间,以及NTD-A的Glu156、NTD-B的Asp385与邻近单体NTD-B之间都存在明显的相互作用。NTD-C的Arg392和Glu465则提供了1个与中心区相互作用的接触面。相比之下,中心区是唯一与通道区直接作用的胞质结构,并且各单体中心区之间没有直接相互作用,其功能与RyR1胞质区构象变化和通道开关之间的偶联有关。在RyR1通道区,S5和S6之间、S4-S5连接螺旋和孔道区之间、VSL和孔道区之间以及VSC和CTD之间都存在由范德华力介导的相互作用,在通道区内部产生适应性构象变化并可以影响通道的功能状态。CTD、VSC以及S6片段胞质延伸部分构成的1个环形结构为中心区U-模体提供了1个最基本的连接装置。中心区armadillo样重复结构的凹面和CTD之间的相互作用则可以进一步增大中心区和通道区胞质区域的相互作用界面,这种广泛的相互作用界面为胞质区到通道区构象变化的传递发挥支点作用。此外,在中心区EF-hand亚结构域与VSC尖端相接触则可能是 Ca^{2+} 激活RyR1机制

的1个重要结构基础。当胞质内 Ca^{2+} 浓度升高时, EF-hand 亚结构域结合 Ca^{2+} 后发生构象变化, 通过与 S2-S3 发夹环和(或)CTD 之间的相互作用, 引起通道构象变化而导致 RyR1 的开放, 从而将肌浆网中的 Ca^{2+} 释放到胞质中^[31]。

3 Ca^{2+} 诱导的 RyR1 构象变化及其门控机制

通过比较无 Ca^{2+} 和饱和 Ca^{2+} (10 mmol/L) 条件下 RyR1 冷冻电镜图的差异研究发现, 周边区域的“聚集”运动(collective motion)是 Ca^{2+} 诱导 RyR1 构象的最大变化之一^[15]。在 Ca^{2+} 诱导下, “钳制”区和“把手”区外缘产生 $\sim 5 \text{ \AA}$ 向下旋转运动, 引起中心区产生 $\sim 4^\circ$ 旋转并导致 S4-S5 连接螺旋、VSC 以及 CTD 的变化, U-模体发生约 $\sim 1.5 \text{ \AA}$ 的位移, 进一步带动 S6 孔道螺旋约 $\sim 8^\circ$ 旋转并导致 RyR1 孔道产生 2 \AA 的扩张而开放。

进一步分析发现, RyR1 存在 3 种不同的关闭构象和 4 种不同的开放构象。其中关闭状态的 RyR1 主要以“球摆运动”(global rocking motion)的方式发生构象变化, RyR1 外缘的运动幅度可以达到 8 \AA , 这与 Ca^{2+} 诱导的“聚集”运动非常相似, 但这种构象变化不涉及 EF-hand 及其周围结构的重排, 也不涉及到通道的开放。在 Ca^{2+} 存在下的 4 种构象中包括 2 种运动方式, 较为普遍的方式为放射状收缩(radial contraction)运动, 包括 RyR1 外周在水平和垂直方向分别产生 12 \AA 的位移, 中央前庭区 NTD-A 和 NTD-B 则产生 6.6 \AA 的向上运动。整体上, RyR1 在肌浆网膜胞质面围绕水平轴产生了 $\sim 3.4^\circ$ 的旋转运动。S1~S4 跨膜螺旋束则产生了 $\sim 2 \text{ \AA}$ 的扩张。第 2 种运动方式涉及到把手区表面向上 $\sim 6 \text{ \AA}$ 的运动以及同时出现的 S1~S4 跨膜螺旋束产生的 $\sim 2 \text{ \AA}$ 的向下扩张。这 2 种运动方式都影响到 EF-hand 结构的重排, 并最终导致通道的开放。

4 小结

RyR1 近原子大小的高分辨率冷冻电镜图像揭示的 RyR1 整体空间结构对于理解与 RyR1 相关的生理过程及相关疾病的发病机制具有重要作用。尽管如此, 针对 RyR 各个单体及其具体结构域的结构与功能仍有待于进一步的实验验证, 如 *Nature* 2015

年 1 月发表的 3 篇文章中都重点提到 Ca^{2+} 能够结合于 EF-hand 亚结构域并影响 RyR1 通道的功能状态^[13-15], 但最近采用 RyR2 突变 EF-hand 亚结构域的实验研究发现其在 Ca^{2+} 介导的 Ca^{2+} 释放作用中并不发挥作用^[32], 说明结构域的功能在不同亚型 RyR 之间存在明显的差异, 不能简单地将 RyR1 的结构功能应用到 RyR2 或 RyR3 上。无论如何, 已获得的 RyR1 结构知识为后续的深入研究奠定了基础, 是近年来 RyR 的结构功能关系研究的重要进展。

[参考文献]

- [1] INUI M, SAITO A, FLEISCHER S. Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle[J]. *J Biol Chem*, 1987, 262: 1740-1747.
- [2] LAI F A, ERICKSON H P, ROUSSEAU E, LIU Q Y, MEISSNER G. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle[J]. *Nature*, 1988, 331: 315-319.
- [3] ZALK R, LEHNART S E, MARKS A R. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium[J]. *Annu Rev Biochem*, 2007, 76: 367-385.
- [4] TAKESHIMA H, NISHIMURA S, MATSUMOTO T, ISHIDA H, KANGAWA K, MINAMINO N, et al. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor[J]. *Nature*, 1989, 339: 439-445.
- [5] ROSSI D, SORRENTINO V. Molecular genetics of ryanodine receptors Ca^{2+} -release channels [J]. *Cell Calcium*, 2002, 32(5/6): 307-319.
- [6] LANNER J T, GEORGIU D K, JOSHI A D, HAMILTON S L. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2: a003996.
- [7] VAN PETEGEM F. Ryanodine receptors: allosteric ion channel giants[J]. *J Mol Biol*, 2015, 427: 31-53.
- [8] SAMSÓ M, WAGENKNECHT T, ALLEN P D. Internal structure and visualization of transmembrane domains of the RyR1 calcium release channel by cryo-EM[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12: 539-544.
- [9] SERYSHEVA I I, LUDTKE S J, BAKER M L, CONG Y, TOPF M, ERAMIAN D, et al. Subnanometer-resolution electron cryomicroscopy-based domain models for the cytoplasmic region of

- skeletal muscle RyR channel[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 9610-9615.
- [10] FRANZINI-ARMSTRONG C. Studies of the triad; I. Structure of the junction in frog twitch fibers[J]. *J Cell Biol*, 1970, 47: 488-499.
- [11] FERNÁNDEZ I S, BAI X C, HUSSAIN T, KELLEY A C, LORSCH J R, RAMAKRISHNAN V, et al. Molecular architecture of a eukaryotic translational initiation complex[J]. *Science*, 2013, 342: 1240585.
- [12] LI X, MOONEY P, ZHENG S, BOOTH C R, BRAUNFELD M B, GUBBENS S, et al. Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM[J]. *Nat Methods*, 2013, 10: 584-590.
- [13] YAN Z, BAI X C, YAN C, WU J, LI Z, XIE T, et al. Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR1 at near-atomic resolution[J]. *Nature*, 2015, 517: 50-55.
- [14] ZALK R, CLARKE O B, DES GEORGES A, GRASSUCCI R A, REIKEN S, MANCIA F, et al. Structure of a mammalian ryanodine receptor [J]. *Nature*, 2015, 517: 44-49.
- [15] EFREMOV R G, LEITNER A, AEBERSOLD R, RAUNSER S. Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor [J]. *Nature*, 2015, 517: 39-43.
- [16] SAMSÓ M, FENG W, PESSAH I N, ALLEN P D. Coordinated movement of cytoplasmic and transmembrane domains of RyR1 upon gating [J]. *PLoS Biol*, 2009, 7: e85.
- [17] TEWARI R, BAILES E, BUNTING K A, COATES J C. Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures[J]. *Trends Cell Biol*, 2010, 20: 470-481.
- [18] YUCHI Z, LAU K, VAN PETEGEM F. Disease mutations in the ryanodine receptor central region: crystal structures of a phosphorylation hot spot domain [J]. *Structure*, 2012, 20: 1201-1211.
- [19] XIONG H, FENG X, GAO L, XU L, PASEK D A, SEOK J H, et al. Identification of a two EF-hand Ca^{2+} binding domain in lobster skeletal muscle ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channel[J]. *Biochemistry*, 1998, 37: 4804-4814.
- [20] JIANG Y, LEE A, CHEN J, RUTA V, CADENE M, CHAIT B T, et al. X-ray structure of a voltage-dependent K^{+} channel[J]. *Nature*, 2003, 423: 33-41.
- [21] SMITH J S, CORONADO R, MEISSNER G. Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Activation by Ca^{2+} and ATP and modulation by Mg^{2+} [J]. *J Gen Physiol*, 1986, 88: 573-588.
- [22] TRIPATHY A, XU L, MANN G, MEISSNER G. Calmodulin activation and inhibition of skeletal muscle Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor)[J]. *Biophys J*, 1995, 69: 106-119.
- [23] PALADE P, MITCHELL R D, FLEISCHER S. Spontaneous calcium release from sarcoplasmic reticulum. General description and effects of calcium [J]. *J Biol Chem*, 1983, 258: 8098-8107.
- [24] ZHAO M, LI P, LI X, ZHANG L, WINKFEIN R J, CHEN S R. Molecular identification of the ryanodine receptor pore-forming segment[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 25971-25974.
- [25] GAO L, BALSHAW D, XU L, TRIPATHY A, XIN C, MEISSNER G. Evidence for a role of the luminal M3-M4 loop in skeletal muscle Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) activity and conductance [J]. *Biophys J*, 2000, 79: 828-840.
- [26] DU G G, GUO X, KHANNA V K, MACLENNAN D H. Functional characterization of mutants in the predicted pore region of the rabbit cardiac muscle Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor isoform 2) [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 31760-31771.
- [27] CAO E, LIAO M, CHENG Y, JULIUS D. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms[J]. *Nature*, 2013, 504: 113-118.
- [28] TANG L, GAMAL EL-DIN T M, PAYANDEH J, MARTINEZ G Q, HEARD T M, SCHEUER T, et al. Structural basis for Ca^{2+} selectivity of a voltage-gated calcium channel[J]. *Nature*, 2014, 505: 56-61.
- [29] XU L, WANG Y, GILLESPIE D, MEISSNER G. Two rings of negative charges in the cytosolic vestibule of type-1 ryanodine receptor modulate ion fluxes[J]. *Biophys J*, 2006, 90: 443-453.
- [30] TUNG C C, LOBO P A, KIMLICKA L, VAN PETEGEM F. The amino-terminal disease hotspot of ryanodine receptors forms a cytoplasmic vestibule[J]. *Nature*, 2010, 468: 585-588.
- [31] BEZPROZVANNY I, WATRAS J, EHRlich B E. Bell-shaped calcium-response curves of $Ins(1,4,5)P_3$ - and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum[J]. *Nature*, 1991, 351: 751-754.
- [32] GUO W, SUN B, XIAO Z, LIU Y, WANG Y, ZHANG L, et al. The EF-hand Ca^{2+} binding domain is not required for cytosolic Ca^{2+} activation of the cardiac ryanodine receptor[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291: 2150-2160.