

# 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	三國生臣
Partial restoration of the long QT syndrome associated KCNQ1 A341V mutant by the KCNE1 $\beta$ -subunit (QT 延長症候群に関連する A341V 型突然変異 KCNQ1 の KCNE1 $\beta$ サブユニットによる部分的復元)			
共著者名 Carlos G. Torres, Martin W. Bienengraeber, Wai-Meng Kwok			
Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects 2011 December (1810) 1285-1293			
研究目的			
<p>QT 延長症候群 (long QT syndrome; LQTS) は心電図における QT 間隔延長を特徴とする症候群で不整脈による失神発作や突然死をもたらすこともあり、先天的又は後天的要因にて発症する。緩徐活性化遅延整流カリウム電流 (slowly activating delayed-rectifier potassium current; IKs) は心筋活動電位の再分極を仲介し、IKs チャンネルの機能不全は先天的 LQTS の主要な原因の 1 つである。IKs チャンネルは少なくとも 2 つのサブユニット、即ちチャンネルポアを形成する <math>\alpha</math> サブユニットと、それに付属する <math>\beta</math> サブユニットから成り、それぞれ KCNQ1、KCNE1 という遺伝子によってコードされる。<math>\alpha</math> サブユニットは 6 つの膜貫通領域 (S1~S6) から成り、一方 <math>\beta</math> サブユニットは 1 つの膜貫通領域から成る。<math>\alpha</math> サブユニットのみでも機能的チャンネルとして電流活動が観察されるが、<math>\alpha</math> サブユニットと <math>\beta</math> サブユニットが結合することで生体で見られる生理的 IKs が発生する。KCNQ1 の突然変異による LQTS は QT 延長症候群 1 型 (long QT syndrome type 1; LQT1) と呼ばれ、先天的 LQTS において最も頻度が高いことが知られている<sup>1</sup>。LQT1 に関する突然変異のうち、これまでで最も多くの報告がなされているものの 1 つに KCNQ1 の S6 領域上の position 341 のアラニンがバリンに置き換わった A341V 型突然変異がある<sup>2</sup>。A341V は LQT1 に関する他の突然変異型と比較して重篤な臨床症状を呈することで知られているが<sup>3</sup>、A341V によって引き起こされる電気生理学的変化は未だに不明のままである。本研究では A341V 型 IKs の電気生理学的特徴、特に A341V 型 <math>\alpha</math> サブユニットに対する <math>\beta</math> サブユニットの役割について調査した。</p>			
材料・方法			
<p>マウス心筋細胞由来の培養細胞である HL-1 cell に野生型 IKs チャンネル、又は A341V 型 IKs チャンネルのヒト cDNA を導入し、IKs チャンネル発現後、パッチクランプ法 Whole-cell mode で IKs を記録し比較した。また、緑色蛍光蛋白 (green fluorescent protein; GFP) を A341V 型 <math>\alpha</math> サブユニットの C 末端に融合させ、野生型 <math>\beta</math> サブユニットの存在下・非存在下で共焦点顕微鏡にて観察し、細胞内における A341V 型 <math>\alpha</math> サブユニットの局在に対する <math>\beta</math> サブユニットの影響を調査した。また <math>\alpha</math> サブユニットとの接続部位が変異した変異型 KCNE1 (T58A) を用いて、<math>\alpha</math> サブユニット・<math>\beta</math> サブユニット</p>			

間の連結が A341V 型 IKs に与える影響を調査した。A341V が心筋活動電位に与える影響についても、実験から得られた結果を基にコンピューターシミュレーションにて解析した。統計には Unpaired Student's t-test と One-way ANOVA (事後比較には Scheffe's test) を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 成 績

A341V 型 KCNQ1 のみを HL-1 cell に発現させた場合には IKs は発生しなかった。しかし野生型 KCNE1 とともに A341V 型 KCNQ1 を発現させた場合には IKs が発生し、野生型 KCNE1 が A341V 型 IKs を復元することが示唆された。しかし野生型 IKs と比較すると A341V 型 IKs の電流密度は小さく、チャンネルの活性化速度も遅く、活性化曲線においては脱分極性変位がみられた。共焦点顕微鏡による A341V 型  $\alpha$  サブユニットの局在観察では、野生型  $\beta$  サブユニットの存在下・非存在下のどちらにおいても細胞表面における GFP の局在が認められた。このことから A341V 型 KCNQ1 を単独で発現させたときのチャンネル機能不全は、蛋白質の細胞内輸送の異常によるものではなく A341V 型  $\alpha$  サブユニットの機能的欠陥によるものであることが示唆された。また T58A 型 KCNE1 を A341V 型 KCNQ1 と共発現させても IKs は発生せず、KCNE1 が A341V 型 IKs を復元するためには A341V 型  $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニット間の連結が不可欠であることが分かった。次に野生型 KCNE1 の存在下で A341V 型 KCNQ1 と野生型 KCNQ1 を共発現させたヘテロ接合体と、それに対応する野生型 KCNQ1 のホモ接合体との電気生理学的比較を行ったが、この実験においてもヘテロ接合体では野生型 KCNQ1 のホモ接合体に比べて前述の小さな電流密度、遅いチャンネル活性化速度、活性化曲線の脱分極性変位が認められた。また A341V 型 KCNQ1 と野生型 KCNQ1 を共発現させたヘテロ接合体では A341V による優性阻害効果も認められた。コンピューターシミュレーションによる心筋活動電位の解析では 2.8Hz の心拍において、野生型 KCNQ1 ホモ接合体では心筋活動電位が正常に保たれたのに対し、ヘテロ接合体ではシミュレーション開始後 6 秒程度で心筋活動電位が破綻することが示された。この際ヘテロ接合体においてホモ接合体では認められないナトリウム電流の漸進的な減少が発生していることもコンピューターシミュレーションから判明した。

## 考 案

本研究から野生型 KCNE1 が、単独ではチャンネルとしての機能を持たない A341V 型  $\alpha$  サブユニットの機能を復元することが分かった。またその復元に関しては細胞膜における A341V 型  $\alpha$  サブユニットと野生型  $\beta$  サブユニットの連結が必要であることが分かった。過去の報告から突然変異による蛋白質の細胞内輸送の異常が LQTS におけるチャンネル機能不全の原因の一つであることが分かっているが、今回の GFP 融合 A341V 型  $\alpha$  サブユニットの共焦点顕微鏡による局在観察により A341V 型 IKs チャンネルでは蛋白質の細胞内輸送は正常であることが示唆された。しかしながら野生型 KCNE1 によって復元された A341V 型 IKs は野生型 IKs と異なる電気生理学的特徴を有し、野生型 IKs に比べ電流密度の減少、遅いチャンネル活性化速度、活性化曲線の脱分極性変位が認められた。position 341 のアラニンは  $\alpha$  サブユニットの中心孔の壁の一部を構成すると考えられており、この部位の突然変異が

チャンネルポアの構造的崩壊や不安定化をもたらし、野生型 IKs と異なる電気生理学的特徴を引き起こしたものと考えられる。これらの電気生理学的特徴は A341V 型 KCNQ1 と野生型 KCNQ1 のヘテロ接合体においても認められ、A341V 型 KCNQ1 を持つ患者に見られる重篤な臨床症状を引き起こしているものと考えられる。それを証明するかのようにコンピューターシミュレーションにおいて A341V 型 KCNQ1 によりナトリウム電流にも影響がおよび心筋活動電位が破綻を来たすことが示された。

#### 結 論

野生型 KCNE1 は、単独ではチャンネルとしての機能を持たない A341V 型  $\alpha$  サブユニットの機能を復元するが、復元後の IKs の電気生理学的特徴は野生型 IKs とは異なるものである。その特徴は電流密度の減少、遅いチャンネル活性化速度、活性化曲線の脱分極性変位であり、これらの特徴により A341V 型 KCNQ1 を持つ患者に見られる重篤な臨床症状が引き起こされているものと考えられる。










#### 引 用 文 献

1. Morita H, Wu J, Zipes DP. The QT syndromes: long and short. *Lancet* 2008; 372: 750-63
2. Crotti L, Monti MC, Insolia R, Peljto A, Goosen A, Brink PA, Greenberg DA, Schwartz PJ, George AL Jr. NOS1AP is a genetic modifier of the long-QT syndrome. *Circulation* 2009; 120: 1657-63
3. Crotti L, Spazzolini C, Schwartz PJ, Shimizu W, Denjoy I, Schulze-Bahr E, Zaklyazminskaya EV, Swan H, Ackerman MJ, Moss AJ, Wilde AA, Horie M, Brink PA, Insolia R, De Ferrari GM, Crimi G. The common long-QT syndrome mutation KCNQ1/A341V causes unusually severe clinical manifestations in patients with different ethnic backgrounds: toward a mutation-specific risk stratification. *Circulation* 2007; 116: 2366-75

#### 参 考 論 文

1. Mikuni I, Hirai H, Toyama Y, Takahata O, Iwasaki H. Efficacy of intrathecal morphine with epidural ropivacaine infusion for postcesarean analgesia. *J Clin Anesth* 2010; 22: 268-73
2. Mikuni I, Suzuki A, Takahata O, Fujita S, Otomo S, Iwasaki H. Arytenoid cartilage dislocation caused by a double-lumen endobronchial tube. *Br J Anaesth* 2006; 96: 136-8

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号														
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	三國 生臣												
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 40%; border-bottom: 1px solid black;">審査委員長</td> <td style="width: 30%; border-bottom: 1px solid black;">高井 章</td> <td style="width: 10%; text-align: center;"></td> <td style="width: 10%;"></td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black;">審査委員</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;">長谷部 直幸</td> <td style="text-align: center;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black;">審査委員</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;">岩崎 寛</td> <td style="text-align: center;"></td> <td></td> </tr> </table>				審査委員長	高井 章			審査委員	長谷部 直幸			審査委員	岩崎 寛		
審査委員長	高井 章														
審査委員	長谷部 直幸														
審査委員	岩崎 寛														
<p style="margin: 0;">学 位 論 文 題 目</p> <p style="margin: 0;">Partial restoration of the long QT syndrome associated KCNQ1 A341V mutant by the KCNE1 <math>\beta</math>-subunit</p> <p style="margin: 0;">「QT 延長症候群に関連する A341 型突然変異 KCNQ1 の KCNE1<math>\beta</math>サブユニットによる部分的復元」</p> <p style="margin: 0;"><i>Biochimica et Biophysica Acta</i> <b>1810</b>: 1285-1293 (2011)に掲載済</p>															
<p>【目的】QT 延長症候群(LQTS) は、心電図における QT 間隔延長を特徴とする症候群であり、不整脈による失神発作や突然死をひきおこすこともある。LQTS の主因のひとつに、緩徐活性化遅延整流カリウム電流(IKs)の異常がある。IKs の発生に関わるカリウムチャネル分子は、pore を形成する<math>\alpha</math>サブユニットとそれに附属する<math>\beta</math>サブユニットからなり、それぞれ KCNQ1、KCNE1 と呼ばれる遺伝子によってコードされている。LQTS のうち最高頻度に見られるのは KCNQ1 の突然変異によるもので、LQTS1 型と称される。なかでも、KCNQ1 S6 ドメイン上の A341V 変異を伴うタイプは最多の報告があり、LQTS1 に関連する他の変異と比較して、重篤な臨床症状を呈する。しかし A341V 変異が LQTS につながる詳細なメカニズムについては不明である。本研究では、KCNQ1 の A341V 変異にともなう IKs の電気生理的特性の変化を調べ、そのような変化の発生における KCNE1 の関与を検討した。</p> <p>【方法】マウス心筋由来の培養細胞の一種である HL-1 に、正常型または変異型の KCNQ1-KCNE1 の cDNA を導入後、全細胞パッチクランプ法にて IKs を記録・比較した。細胞内における導入したチャネル蛋白遺伝子の発現と局在の確認のため、cDNA の C 末端に緑色蛍光蛋白(GFP) の配列を導入し、共焦点顕微鏡観察を行った。</p>															

## 【主な結果】

1. KCNQ1 と KCNE1 を HL-1 に同時に発現させると IKs が観察された。一方のみの発現では IKs は発生なかった。KCNE1 とともに、A341V 変異型 KCNQ1 を発現させた場合の IKs は、正常型 KCNQ1 を発現させた場合に比べ、電流密度が 1/3 と小さくなり、固定電位を矩形波状に脱分極側に与えた時の活性化の時定数が 3 倍と遅くなった。また、最大活性化レベルの膜電位依存性も脱分極側にシフトした。
2. 共焦点顕微鏡による A341 型 KCNQ1 の局在観察では、野生型 KCNE1 の存在・非存在にかかわらず、細胞表面における GFP の局在が確認された。これは、A341V 変異によるチャネルチャネル特性の変化は、蛋白の細胞内輸送の異常によるものでなく、A341V 型 KCNQ1 そのものの機能不全によるものであることを示唆する。
3.  $\alpha$ - $\beta$ サブユニット相互作用の重要部位とされる 58T を A に変異させた KCNE1 を発現させた HL-1 では、正常型または A341V 型 KCNQ1 を共発現させても、IKs は観察できなかった。
4. 正常型 KCNE1 存在下で、正常型と A341V 型 KCNQ1 をともに共発現させたヘテロ接合体の場合には、おなじく正常型 KCNE1 存在下で、正常 KCNQ1 だけを共発現させた場合と、A341V 型 KCNQ1 だけを共発現させた場合との中間的な、電位密度、活性化の電位・時間依存性を示す IKs が観察された。
5. 電気生理学的に測定されたチャネルパラメータを用いて心筋活動電位のコンピュータシミュレーションをおこなったところ、心拍 2.8 Hz の設定のもとで、正常型 KCNQ1 ホモ接合体では正常波形の活動電位が生じたのに対し、正常/A341V ヘテロ接合体ではシミュレーション開始後 6 s で、活動電位の破綻が観察された。また、ヘテロ接合体ではホモ接合体では認められないナトリウム電流の漸進的な不活性化が起こることが示唆された。

## 【評価】

この研究は、LQTS1 の最も重要な遺伝子変異として知られる IKs チャネルの $\alpha$ サブユニット KCNQ1 の A341V 変異が、 $\beta$ サブユニット KCNE1 との相互作用の不全を介して IKs 電流の機能不全をひき起こすことを証明した優れた研究である。

論文提出者は、3名の審査員による個別の口頭試問において、本論文の内容とその重要性について明確に説明し、また、関連領域についての試問でも適切な回答を与えた。それにより、当人がこの領域において十分な知識と経験を有することを確認できた。

以上より、本審査委員会は、本論文が学位授与に値するものと判定した。