

特発性 QT 延長症候群における冠動脈内
アセチルコリン投与試験および三量体
GTP 結合タンパク遺伝子の解析

新潟大学医学部内科学第一教室（主任：相澤義房教授）

柴 正 美

Intracoronary Acetylcholine Administration and Analysis
of Heterotrimeric GTP Binding Protein Gene
in Long QT Syndrome

Masami SHIBA

*The First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine
(Director. Prof. Yoshifusa AIZAWA)*

Abnormal genes were reported in the idiopathic long QT syndrome (LQT) but the pathogenesis and the aggravating factors of the QT interval on the occurrence of life-threatening ventricular tachyarrhythmias are to be determined. Following a case report in which intracoronary acetylcholine (ACh) induced QT prolongation, the effect of ACh on the QT interval was studied. QTc interval was significantly prolonged by ACh: $0.519 \pm 0.029 \text{sec}^{1/2}$ to $0.688 \pm 0.067 \text{sec}^{1/2}$ in QT syndrome but not in the healthy control group. We, then, analyzed the gene of G protein in the blood samples from the patients with LQT using RT-PCR followed by direct nucleotide sequencing. One of 12 patients had 129bp deletion in G protein $\beta 3$ subunit. Another patient had four point mutations. They showed C to T transition at codon 12, G to T transition at codon 27, C to T transition at codon 53 and C to T transition at codon 60, which substituted cysteine (TGC) for arginine (CGC), asparagine (AAT) for lysine (AAG), leucine (CTA)

Reprint requests to: Masami Shiba,
The First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine
Niigata City, 951-8122 JAPAN

別刷請求先：〒951-8122 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部第一内科学教室 柴 正美

for proline (CCA) and tryptophan (TGG) for arginine (CGG), respectively. Though these changes suspected splicing abnormality and polymorphism, analysis of the gene of G protein needs to be studied further in a large number of patients with LQT.

Key words: long QT syndrome, Heterotrimeric GTP binding protein gene, mutation, RT-PCR, direct nucleotide sequencing
QT 延長症候群, 三量体 GTP 結合タンパク遺伝子, 変異, RT-PCR, ダイレクトシーケンシング

1. はじめに

QT 延長症候群 (LQT) は心電図で QT 延長と失神発作や突然死をきたす Torsades de Pointes (TdP) と呼ばれる心室性不整脈を特徴とする症候群である^{1)~5)}. LQT は薬剤, 血清電解質異常, 筋虚血, 高度の徐脈などによる二次性的なもの, 原因不明の特発性のものなどに分類される. 特発性 LQT のうち明らかな遺伝性を示す一群として, 常染色体優性遺伝形式の Romano-Ward 症候群 (RW)^{1) 6)} と常染色体劣性遺伝形式で先天性の聴力障害を伴う Jervell and Lange-Nielsen 症候群 (JLN)^{7) 8)} とがある. 近年, RW の分子遺伝学連鎖解析により LQT 1 (11p15.5)⁹⁾, LQT 2 (7q35-36)¹⁰⁾, LQT 3 (3p21-24)¹⁰⁾, LQT 4 (4q25-27)¹¹⁾ の 4 つの原因遺伝子座が報告され, ポジショナルクローニングの手法で原因遺伝子が単離されてきている. LQT 1 と LQT 2 は, それぞれ KVLQT1 と HERG と呼ばれる電位依存性の K^+ チャネルの遺伝子異常により^{12) 13)}, LQT 3 は SCN5A という電位依存性 Na^+ チャネルの遺伝子異常によることが明らかにされた¹⁴⁾. 一方, JLN においても KVLQT1 遺伝子に変異が認められている^{15) 16)}. KVLQT1 と会合し遅延整流 K^+ 電流の遅い成分 (I_{Ks}) を形成する $minK$ ^{17) 18)} の遺伝子の変異が, JLN¹⁹⁾ と, RW²⁰⁾ でも認められている. これらの知見は, 心筋の再分極に関与する心筋イオンチャネルの機能異常によって再分極の遷延がもたらされ, 特発性 LQT をきたすとイオンチャネル異常説^{3) 21)} を支持する.

一方, 生体内でも電位依存性イオンチャネルやリガンド感受性 K^+ チャネルが, 様々なシグナル分子により複雑に調節されていることが知られており²²⁾, これらの分子の遺伝学的異常が K^+ イオンチャネルを中心に影響し特発性 LQT をきたしている可能性も考えられる. 以前, われわれは, 正常者では冠動脈内アセチルコリン

(ACh) 投与で QT 間隔は変化しないが, 特発性 LQT 患者において QT 間隔がさらに延長することを報告した²³⁾. この結果は, LQT 患者では ACh が心筋のムスカリン受容体と結合し何らかのセカンドメッセンジャーの機能異常を介して心筋の再分極過程に影響を与え QT 間隔を延長させている可能性を示唆している. われわれは, 心筋活動電位持続時間を決める遅延整流 K^+ 電流, Ca^{2+} 電流, Cl^- 電流が三量体 GTP 結合タンパク質 (G タンパク) による制御を受けることから^{22) 24) 25)}, セカンドメッセンジャーである G タンパクの異常を想定し, LQT 患者の血小板において G タンパク (G_s と G_i) の活性を測定したところ G_i の活性低下を LQT で認めた²⁶⁾.

三量体 G タンパクは, α , β , γ サブユニットの三量体からなり, レセプターと電位依存性イオンチャネルなどのエフェクターとの間に存在しエフェクター機能を修飾する. その機能的特異性は, 主に α サブユニットに由来するとされている^{22) 27)}. G_i タンパクの α サブユニットは 354 個のアミノ酸からなる $G_{i1\alpha}$ と $G_{i2\alpha}$, および 355 個のアミノ酸からなる $G_{i3\alpha}$ に分けられ, 全身の臓器に広く分布している²⁸⁾. 近年, 成長ホルモン分泌下垂体腫瘍で G_s タンパクの α サブユニット遺伝子の変異²⁹⁾ が, 副腎腫瘍および卵巣腫瘍で G_i タンパクの α サブユニット遺伝子の変異³⁰⁾ が発見され, G タンパクの α サブユニット遺伝子の遺伝学的異常を原因とする疾患の発見と病態の解明が進行している.

一方, β と γ サブユニットも複数が同定されてきているが, 様々なサブユニットと結合して存在し, その機能の差は明らかではない^{22) 27)}. 哺乳類で 5 種類のおよそ 340 個のアミノ酸からなる β サブユニットが単離されてきているが, ヒトでは $\beta 1$ ³¹⁾, $\beta 2$ ^{32) 33)}, $\beta 3$ ³⁴⁾ サブユニット遺伝子の cDNA が単離されており, 全身の臓器に広く分布していることが確認されている. γ サブユニットはおよそ 70 個のアミノ酸からなり, 現在までに

表 1 先天性 QT 延長症候群の臨床像

症 例	解析時年齢	姓	症 状	QT 間隔 (sec)	QTc 間隔 (sec 1/2)	診 断
Nm II - 6	77	女	失神	0.52	0.58	RW
Nm IV - 3	24	女	失神	0.68	0.58	RW
Kt II - 2	21	男	失神	0.60	0.58	RW
Km I - 2	35	女	(-)	0.46	0.50	RW
Km II - 1	16	男	(-)	0.48	0.52	RW
Km II - 2	14	男	(-)	0.48	0.52	RW
Km II - 3	10	男	(-)	0.48	0.48	RW
Nk II - 4	80	女	(-)	0.60	0.51	RW
Nh II - 3	23	女	(-)	0.78	0.69	弧発性
Ne II - 1	22	男	(-)	0.54	0.57	弧発性
Ne III - 3	57	女	失神	0.68	0.69	RW
Tn VI - 1	24	女	失神	0.48	0.51	JLN
平均±偏差	33.5 ± 24.2			0.57 ± 0.10	0.56 ± 0.07	

QTc 間隔, 修正 QT 間隔, RW; Romano-Ward 症候群, JLN; Jervell and Lange-Nielsen 症候群

11種類報告されているが、ヒトでは $\gamma 4$, $\gamma 10$, $\gamma 11$ サブユニット遺伝子の cDNA 塩基配列が明らかになっているのみである³⁵⁾。

われわれは、特発性 LQT と Gi タンパクの関連を明らかにするため、12名の特発性 LQT 患者を対象として、ACh 冠動脈内投与試験を施行し、さらに Gi タンパクの α サブユニットである Gi1 α , Gi2 α , Gi3 α の遺伝子を中心に数種類の β , γ サブユニットの遺伝子の翻訳配列を reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法および直接塩基配列決定法を用いて解析した。

2. 対象と方法

対 象

血縁関係のない8家族からの12名(男性5例, 女性7例)の特発性 LQT 患者を対象とした(表 1, 図 1)。LQT の診断は Schwartz らの診断基準にしたがった³⁶⁾。家族の心電図検査により4家系(Nm 家系, Kt 家系, Km 家系, Nk 家系)からの患者は RW と診断された。Na III - 3は、同胞に LQT を認め、叔母に突然死を認め、先天性難聴を認めないことから RW が強く疑われた。一方, Nh II - 3, Ne II - 1は、弧発性であった。聴力検査は正常であり、両親の心電図も QT 間隔は正常であり、de novo の RW と考えられた。T

n VI - 1は先天性難聴を認め、同胞の突然死、両親の血族婚を認め JNL と診断された。

全例基礎心疾患を有さず、血清電解質異常や著しい徐脈を認めず、QT 延長をきたす薬剤は服用していなかった。年齢は10歳から80歳までの平均33.5±24.2歳であった。QTc は平均0.56±0.07 sec と延長していた(表 1)。Nm II - 6, Nm IV - 3, Tn VI - 1, Na III - 2は失神発作時に TdP が捉えられた。Km 家系の患者, Na II - 1は無治療であったが、Nm II - 6, Tn VI - 1, Nk II - 4, Nh II - 3, Na III - 2では β 遮断薬による治療が、Nm IV - 3, Kt II - 2では β 遮断薬とメキシレチンの治療が行われていた。

方 法

(1) ACh 冠動脈内投与試験

既報の Nm II - 6に加えて²³⁾, 4家系4例(Nm IV - 3, Kt II - 2, Na III - 2, Nh II - 3)において ACh 冠動脈内投与試験を施行した(図 1)。冠動脈造影で有意の狭窄のない事を確認し、ACh 25 μ g, 50 μ g および 100 μ g の各用量を生理食塩水 10ml に溶解し、30秒かけて投与した。Vehicle として ACh を含まない同量の生理食塩水の投与も行った。各用量投与前後の QT 間隔, 洞周期および血圧を測定した。各用量 ACh 投与は心電図および血圧が元に復することを確認して行っ

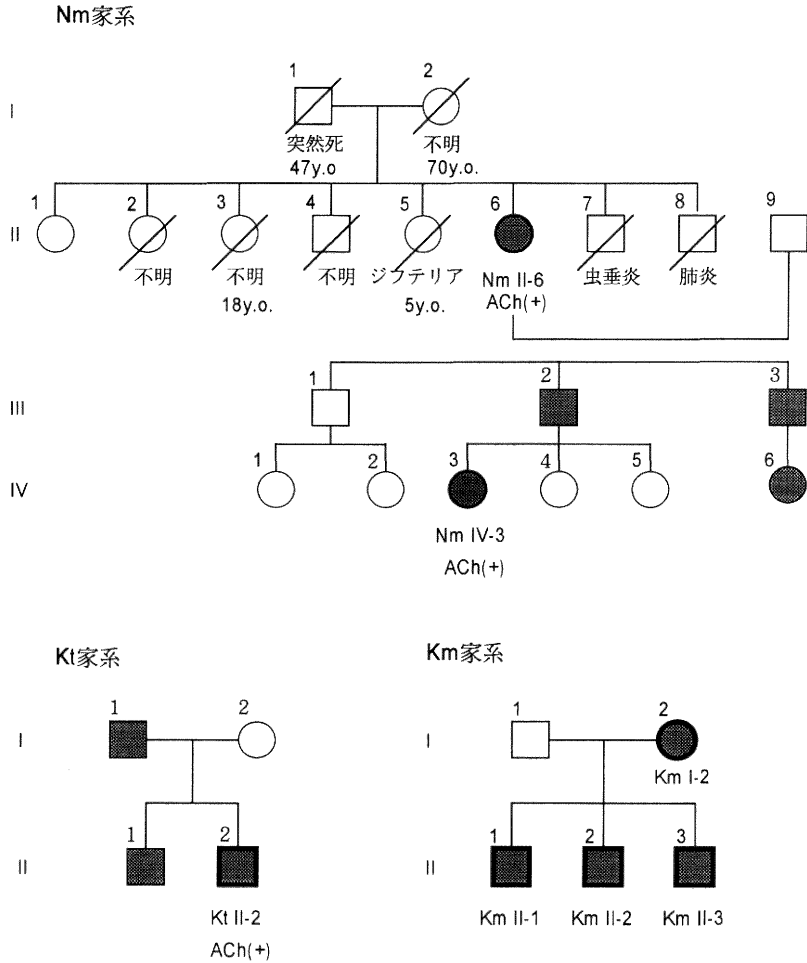


図 1-1

た、冠動脈スパズムを除外するために施行したアセチルコリンによるスパズム誘発試験で、冠動脈造影に異常がなくかつスパズムが誘発されなかった12例を対照群とし、QT 間隔、洞周期および血圧を測定し患者群と比較検討した。QT 間隔、洞周期と血圧は平均±SD で表し、統計学的検定は t-検定を用い、P 値0.05未満を有意とした。

(2) 三量体 G タンパク・サブユニット遺伝子翻訳領域の解析

cDNA 塩基配列が明らかとなっているヒト三量体 G タンパク・サブユニット遺伝子 (Gi 1 α, Gi 2 α, Gi 3 α 遺伝子および β 1, β 2, β 3, γ 4, γ 10, γ 11 サブユニット遺伝子) を解析した。ゲノム構造が不明であ

るため、total RNA から 1st strand cDNA を作成し polymerase chain reaction (PCR) 法で各遺伝子の cDNA を増幅し、直接塩基配列決定法を施行した。全12症例 (表 1, 図 1) より末梢静脈血 10 ml を採血し、白血球より ISOGEN (Nippon Gene Inc., Tokyo, Japan) を用い酸性フェノール法にて total RNA を抽出した。それぞれの total RNA を鋳型に random hexamer primer を用いて 1st strand cDNA を作成した。反応液は全量 20 μl で 1 μg total RNA, 1 μM random hexamer primer, 50 mM Tris-HCl (pH8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 μM 各 dNTP, 200 U Malony murine leukemia virus reverse transcriptase (Clontech Laboratories Inc. CA, USA) を含み42℃で1時間反応させた。

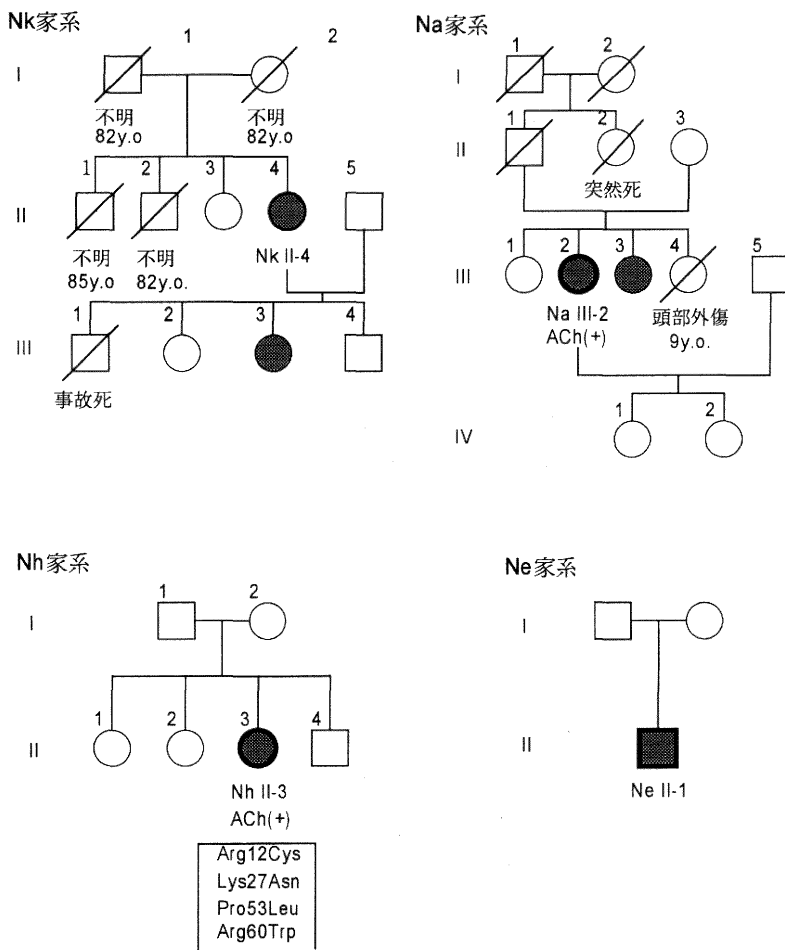


図 1-2

1) $Gi1\alpha$, $Gi2\alpha$, $Gi3\alpha$ 遺伝子 cDNA の増幅. ヒト $Gi1\alpha$ 遺伝子 cDNA は部分配列しか報告されていなかったため²⁸⁾, これを基にプライマー-1 α F1および1 α R1(表 2)を作成し, 379 bp の DNA フラグメント ($Gi1\alpha$ cDNA no.-76-303番²⁸⁾)を増幅した. $Gi2\alpha$, $Gi3\alpha$ 遺伝子 cDNA の増幅には nested-PCR 法を用い, それぞれ全翻訳領域を含む 1208 bp の DNA フラグメント ($Gi2\alpha$ cDNA no.-97-1111番²⁸⁾) および 1178 bp の DNA フラグメント ($Gi3\alpha$ cDNA no.-53-1125番²⁸⁾) を増幅した. $Gi2\alpha$ 遺伝子 cDNA の 1st PCR はプライマー 2 α F1と2 α R1を用い, 2nd PCR はプライマー 2 α F2と2 α R2を用いた(表 2). $Gi3\alpha$ 遺伝子 cDNA の 1st PCR はプライマー 3 α F1と3 α R1を用い, 2nd

PCR はプライマー 3 α F2と3 α R2を用いた(表 2).

PCR 反応液, 2 ul の 1st strand cDNA 反応液または 1st PCR 反応液を鋳型として, 各 20 pmol のセンスおよびアンチセンスプライマーを用いて全量 20 μ lで行った. 反応液は 200 μ M 各 dNTP, 40mM Tricine-KOH (pH 9.2), 15mM KOAc, 3.5mM Mg (OAc)₂, 75ug/ml bovine serum albumin, 1 \times Klen Taq polymerase Mix (Clontech Laboratories Inc. CA, USA)を含み, 96 $^{\circ}$ C 30sec., 72 $^{\circ}$ C 4min.を5サイクル, 96 $^{\circ}$ C 30sec., 70 $^{\circ}$ C 4min.を5サイクル, 96 $^{\circ}$ C 30sec., 68 $^{\circ}$ C 4min.を25サイクルで PCR を行った.

2) $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ サブユニット遺伝子 cDNA 増幅. $\beta 1$, $\beta 2$ サブユニット遺伝子 cDNA は全翻訳領域を含む 1111 bp ($\beta 1$ サブユニット cDNA no.-36

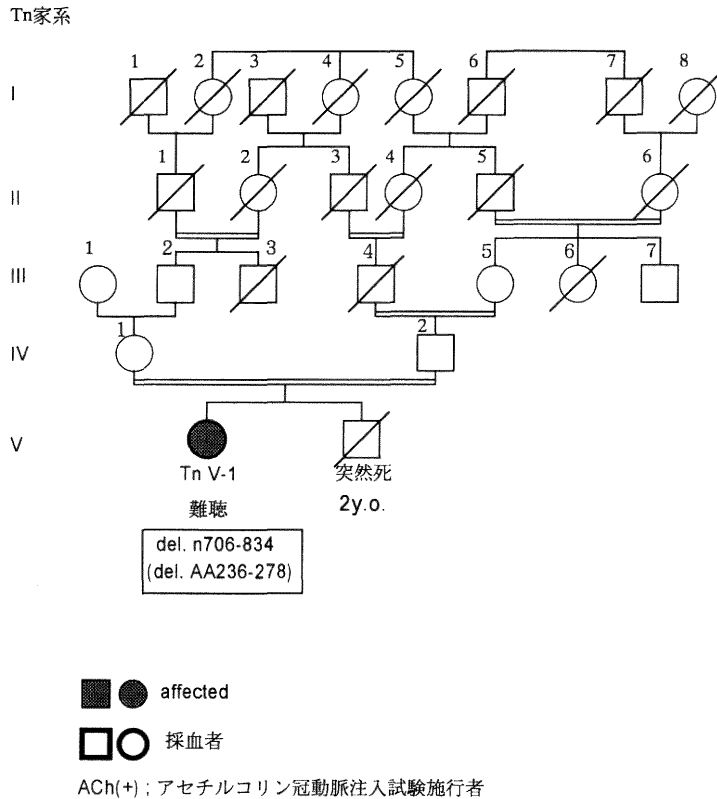


図 1-3

-1075 番³¹⁾ 1100bp (β 2 サブユニット cDNA no. 37-1063番³²⁾ の DNA フラグメントとして増幅した。 β 3 サブユニット cDNA は 1071 bp (β 3 サブユニット cDNA no. 1-1071番³⁴⁾ の DNA フラグメントとして増幅し、これは翻訳領域の98%を含んでいた。PCR は上記と同様に nested-PCR 法を用いた。 β 1 サブユニット遺伝子 cDNA の 1st PCR はプライマー 1 β F1 と 1 β R1 を用い、2nd PCR ではプライマー 1 β F2 と 1 β R2 を用いた (表 2)。 β 2 サブユニット遺伝子 cDNA の 1st PCR はプライマー 2 β F1 と 2 β R1 を用い、2nd PCR ではプライマー 2 β F2 と 2 β R2 を用いた (表 2)。 β 3 サブユニット遺伝子 cDNA の 1st PCR はプライマー 3 β F1 と 3 β R1 を用い、2nd PCR ではプライマー 3 β F2 と 3 β R2 を用いた (表 2)。

3) γ 4, γ 10, γ 11 サブユニット遺伝子 cDNA の増幅。 γ 4, γ 11 サブユニット遺伝子 cDNA は全翻訳領域を含む 291 bp (γ 4 サブユニット cDNA no. 65-

355 番³⁵⁾), 357bp (γ 11 サブユニット cDNA no. 12-368 番³⁵⁾) の DNA フラグメントとして増幅した。 γ 10 サブユニット遺伝子は 281 bp (γ 10 サブユニット cDNA no. 12-292 番³⁵⁾) の DNA フラグメントとして増幅し、これは翻訳領域の96%を含んでいた。 γ 4 サブユニット遺伝子 cDNA の PCR はプライマー 4 γ F1 と 4 γ R1 を、 γ 10 サブユニット遺伝子 cDNA はプライマー 10 γ F1 と 10 γ R1 を、 γ 11 サブユニット遺伝子 cDNA はプライマー 11 γ F1 と 11 γ R1 を用いた (表 2)。PCR 反応は 2 μ l の 1st strand cDNA 反応液を鋳型とし、各 20 pmol のセンスプライマーとアンチセンスプライマーを用いて全量 25 μ l で行った。反応液は 100 mM Tris-HCL (pH8.3), 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 250 μ M 各 dNTP, 2.5U Taq DNA polymerase を含み、96 $^{\circ}$ C 30sec., 62 $^{\circ}$ C 1 min., 72 $^{\circ}$ C 1.5min. を 40 サイクルで PCR を行った。

4) PCR 産物の回収と塩基配列解析。上記で得られた PCR 産物を 1% アガロースゲル電気泳動により分

表 2 PCR 並びにシーケンス解析に用いた oligonucleotide primer

G タンパク	Primer	sequence	cDNA 番号	参考文献
Gi1 α	1 α F 1 *	5'-GAGAAAGGATTCCCCGTGCTTG-3'	-76~54	(28)
	1 α R 1 *	5'-CGCCCGGGCTGAGTCACCAAA-3'	303~283	(28)
Gi2 α	2 α F 1	5'-TCCCGCAGTCGCTCGGAAGTCC-3'	-138~-116	(28)
	2 α R 1	5'-GGAGCTGAGAACAAGAGAGAAAGAGG-3'	1208~1181	(28)
	2 α F 2 *	5'-AGAGGGCTGGTGGTGGGAGCGG-3'	-97~-76	(28)
	2 α R 2 *	5'-TACAAATTCGGCGGTGGCCCATCC-3'	1111~1087	(28)
	2 α F 3 *	5'-ACACACTTCACCTTCAAGGACC-3'	562~583	(28)
	2 α R 3 *	5'-CCACTTCTCCGCTCAGACC-3'	636~617	(28)
Gi3 α	3 α F 1	5'-GCGCTAAGGGAGCTGACGAGAGG-3'	-120~-97	(28)
	3 α R 1	5'-CTGCATGCTGCTGCCATTCCCTGG-3'	1183~1160	(28)
	3 α F 2 *	5'-AGTTTCCGTGGTGTGAGTGAGTCCG-3'	-53~-29	(28)
	3 α R 2 *	5'-CAAAGGTGTCTGGTCTCAACACTCC-3'	1125~1100	(28)
	3 α F 3 *	5'-GTACAAGCTTGCTTCCAGCAG-3'	406~425	(28)
	3 α R 3 *	5'-CTGTGGTCTTCACTCTCGTC-3'	547~528	(28)
G β 1	1 β F 1	5'-TTACATGTATTGGAGACCAGACCAG-3'	-89~-65	(31)
	1 β R 1	5'-GCTCTTGGTTTCATAGGATATGAGC-3'	1192~1168	(31)
	1 β F 2 *	5'-CTTGAAGGTGGCATTGAAGAGCAC-3'	-36~-13	(31)
	1 β R 2 *	5'-GTCCAAGTTGGAATGGTCTTCCAG-3'	1075~1052	(31)
	1 β F 3 *	5'-ACAGGTTACCTGTCTGCTG-3'	427~446	(31)
	1 β R 3 *	5'-AAGGCTCATGACATCTCCAG-3'	570~551	(31)
G β 2	2 β F 1	5'-AGCGACCTCCGCCGAGAGTCC-3'	-117~-96	(32)
	2 β R 1	5'-GGCCTGTAGTGTGGGCATGGCAG-3'	1083~1061	(32)
	2 β F 2 *	5'-CCAGCCGCCCAACCCTGC-3'	-37~-18	(32)
	2 β R 2 *	5'-CAGGGCCCTCCTGGCCTGG-3'	1063~1044	(32)
	2 β F 3 *	5'-GGCAACGTCAGGGTCAGC-3'	391~408	(32)
	2 β R 3 *	5'-CTGTCCGCACATGGAATC-3'	660~643	(32)
G β 3	3 β F 1	5'-GGGTGCATGGGGGAGATGGAG-3'	-6~15	(34)
	3 β R 1	5'-CAGTCCCATGCTCCCCACTGC-3'	1168~1148	(34)
	3 β F 2 *	5'-ATGGGGGAGATGGAGCAACTGC-3'	1~22	(34)
	3 β R 2 *	5'-GGCTGCTGAGTGTGTTCACTGC-3'	1071~1050	(34)
	3 β F 3 *	5'-GCTCACACAGGTTATCTC-3'	421~438	(34)
	3 β R 3 *	5'-GCCAGTGAAGTCTGACG-3'	672~655	(34)
G γ 4	4 γ F 1 *	5'-TGTCACACACGGCTGACTCTCAG-3'	65~85	(35)
	4 γ R 1 *	5'-AAAAGGAGGCGTTTTTCATCACAC-3'	355~333	(35)
G γ 10	10 γ F 1 *	5'-AGCGCCGCCCATGTCCTC-3'	12~31	(35)
	10 γ R 1 *	5'-AGGCAGTCATTCATCACTTTGTGC-3'	292~269	(35)
G γ 11	11 γ F 1 *	5'-GTGCCGGCCTCAGTTGTTTCG-3'	12~33	(35)
	11 γ R 1 *	5'-CTAGTTCTTCCACTTAGGATGCAG-3'	368~345	(35)

*の付いた primer はシーケンス反応に用いた

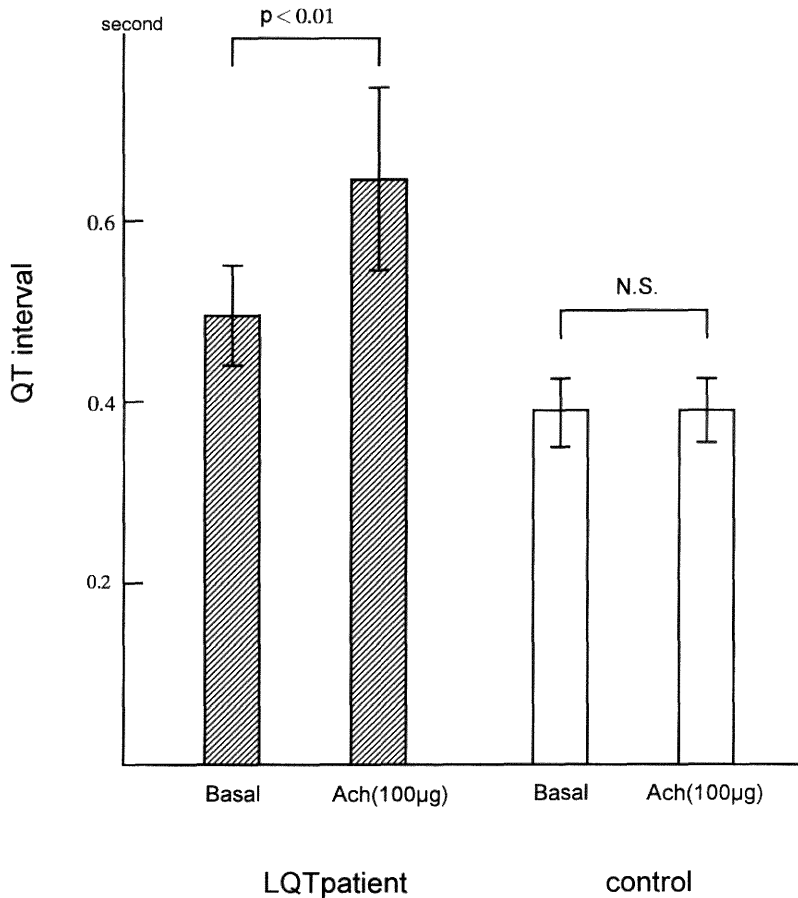


図2 アセチルコリンによる QT 間隔の変化

離し, QIA quick gel extraction kit (Qiagen) を用い精製し, 以下のプライマーを用いて dedeoxy 法により直接塩基配列を決定した. $Gi1\alpha$ 遺伝子 cDNA では PCR に用いたプライマーを使用し, $Gi2\alpha$, $Gi3\alpha$ 遺伝子 cDNA ではさらに内部プライマー $2\alpha F3$, $2\alpha R3$, $3\alpha F3$, $3\alpha R3$ を使用した. $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ サブユニット遺伝子 cDNA では PCR に用いたプライマーおよび内部プライマー $1\beta F3$, $1\beta R3$, $2\beta F3$, $2\beta R3$, $3\beta F3$, $3\beta R3$ を用いた. $\gamma 4$, $\gamma 10$, $\gamma 11$ サブユニット遺伝子 cDNA では PCR に用いたプライマーを使用した. 塩基配列を決定には, Taq FS Dye Terminator cycle sequencing kit 及び ABI 377 sequencer (Applied Biosystems and Perkin-Elmer) を使用した.

3. 結 果

(1) ACh 冠動脈内投与試験

患者群では, ACh 投与前の洞周期は 898 ± 128 msec で, 最大 $100\mu g$ の ACh 投与でも 888 ± 94 msec と不変であったが, QT 間隔は 0.496 ± 0.054 sec から 0.644 ± 0.01 sec へと有意に延長した ($P < 0.01$) (図2). 洞周期で補正した QTc も 0.519 ± 0.029 sec^{1/2} から 0.688 ± 0.067 sec^{1/2} へと有意な延長がみられた ($P < 0.01$). NmII-6 と NhII-3 で $100\mu g$ の ACh 投与で, QT 間隔の延長に引き続き TdP が発生し, DC 通電にて洞調律に復した. この間, 血圧は 153 ± 32 (収縮期) / 73 ± 9 (拡張期) mmHg から 152 ± 32 (収縮期) / 76 ± 9 (拡張期) mmHg と不変であった. 対象群12例では, $100\mu g$ の ACh 投与前後での, QT 間隔

は 0.388 ± 0.038 sec と 0.389 ± 0.035 sec と有意な変化はなく、洞周期も 883 ± 164 msec と 934 ± 196 msec であり有意の変化を示さなかった。

(2) 三量体 G タンパク・サブユニット遺伝子翻訳領域の解析

1) $G_i\alpha$ 遺伝子遺伝子翻訳領域. $G_i1\alpha$, $G_i2\alpha$, $G_i3\alpha$ 遺伝子 cDNA の PCR 産物は12例全例においてアガロースゲル電気泳動で予測される大きさで認められた。塩基配列変化は認められなかった。

2) β サブユニット遺伝子翻訳領域. $\beta 1$ サブユニット遺伝子 cDNA の PCR 産物は $NkII-4$ と $NhII-3$ を除く10例において、アガロースゲル電気泳動で予測される大きさで認められた。Nm 家系の $NmII-6$, $NmIV-3$ と $KtII-2$ で232番目のコドンにアミノ酸置換を伴わない1塩基置換 ($ATA(IIe) \rightarrow ATT(IIe)$) をホモ接合体で認めた。その他に塩基配列変化は認めなかった。 $\beta 2$ サブユニット遺伝子 cDNA の PCR 産物は $NmII-6$, $KtII-2$, $TnVI-1$, $KmII-2$, $KmII-3$, $NeII-1$, $NaIII-2$ で予測される大きさで認められ、塩基配列変化を認めなかった。 $\beta 3$ サブユニット遺伝子 cDNA の PCR 産物は $NmII-6$, $KtII-2$, $KmII-2$, $NeII-1$, $TnVI-1$ に予測される大きさで認められた。 $TnVI-1$ で706-834 bp のイン・フレーム欠失 (アミノ酸236-278番) をホモ接合体で認めた (図1)。その他には塩基配列変化を認めなかった。

3) γ サブユニット遺伝子翻訳領域, $\gamma 4$, $\gamma 10$, $\gamma 11$ サブユニット遺伝子 cDNA の PCR 産物は $NkII-4$ を除く11例でアガロースゲル電気泳動で予測される大きさで認められた。 $\gamma 4$ サブユニット遺伝子 cDNA では Nm 家系の $NmII-6$, $NmIV-3$ と $KtII-2$ で38番目のコドンにアミノ酸置換を伴わない1塩基置換 ($GCC(Ala) \rightarrow GCT(Ala)$) をホモ接合体で認めた。 $\gamma 10$ サブユニット遺伝子 cDNA では $NhII-3$ に4箇所以下のミスセンス変異を認めた。12番目のコドンに $CGC(Arg) \rightarrow TGC(Cys)$ を、27番目のコドンに $AAG(Lys) \rightarrow AAT(Asn)$ を、53番目のコドンに $CCA(Pro) \rightarrow CTA(Leu)$ を、60番目のコドンに $CGG(Arg) \rightarrow TGG(Trp)$ をホモ接合体で認めた (図1)。その他には塩基配列変化は認めなかった。

4. 考 察

ACh 冠動脈内投与試験では、以前検討された患者 Nm

II-6²³⁾に加えて、新たに4例においても ACh 投与で QT 間隔がさらに延長する所見が得られ、これは特発性 LQT 患者にのみ観察された。この結果は、特発性 LQT 患者では共通に、ACh が心筋ムスカリン受容体と結合し、何らかのセカンドメッセンジャーの機能異常を介して心筋の再分極過程に影響を与え QT 間隔を延長させている可能性を示唆している。

われわれは、このセカンドメッセンジャーの機能異常として遺伝的な G_i タンパクの機能異常を考え、LQT 患者において三量体 G タンパク・サブユニット遺伝子の翻訳領域の解析を行った。現在までにヒト三量体 G タンパク・サブユニット遺伝子としては、 $G_i1\alpha$, $G_i2\alpha$, $G_i3\alpha$ 遺伝子および $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 4$, $\gamma 10$, $\gamma 11$ サブユニット遺伝子の cDNA が明らかとなっている。しかしながら、そのゲノム構造は不明であったため、ゲノム DNA からの解析は困難と考えられる。われわれは、これらの遺伝子が比較的全身臓器で発現していることから、患者末梢静脈血白血球から抽出した total RNA から RT-PCR を利用し、翻訳領域を解析することが可能であると考えた。一部の患者からの RNA サンプルを除いて、ほぼ全例においてこれらの遺伝子の cDNA を増幅することができ、これらの遺伝子の翻訳領域の解析においては有効かつ効率的な方法であると考えられた。

三量体 G タンパクの機能は、主に α サブユニットに由来するとされている。今回 LQT で G_i タンパクの機能異常が推定されたため、われわれは $G_i\alpha$ の解析を中心におこなった。 $G_i1\alpha$, $G_i2\alpha$, $G_i3\alpha$ 遺伝子は、全例において cDNA は増幅され、塩基配列に異常を認めなかったことから、これらの遺伝子の変異が特発性 LQT の原因となっている可能性は低いと考えられる。しかしながら、 $G_i1\alpha$ 遺伝子においてはアミノ端3分の1ほどの翻訳配列を解析したのみであるので、カルボキシ端に変異が存在する可能性はある。また、われわれの解析は PCR を用いているため mRNA の量的異常を検出することは困難であるため、転写制御領域の異常や対立遺伝子の一方に大きな欠失があった場合、これらを検出することはできないと予測される。

β , γ サブユニットは、その機能的特異性については不明な部分が多いが、 $G_i\alpha$ と結合して三量体 G タンパクを構成することから、 G_i タンパクの機能に影響を与えることは十分に考えられる。今回、われわれはアミノ酸の変化を伴う塩基配列の変化を2人の LQT 患者において見出した。 $TnVI-1$ で $\beta 3$ サブユニット遺伝

子 cDNA の 706 - 834 bp の欠失をホモ接合体の状態 で認めた. この cDNA における欠失が, スプライシング部位変異によるスプライシング異常によるものか, ゲノム DNA における欠失かは不明である. しかしながら, この欠失により $\beta 3$ サブユニットのアミノ酸 236 - 278 番の欠失が予想され, このためタンパクの機能不全を来しうると考えられる. また, この患者が両親の血族結婚によって生じた常染色体劣性遺伝性 LQT である JLN であることを考慮すると, この $\beta 3$ サブユニット遺伝子 cDNA の変異がこの例においては LQT の原因である可能性が示唆される. さらに JLN 患者において $\beta 3$ サブユニット遺伝子を検討する必要があるだろう. 一方, NhII-3 においては $\gamma 10$ サブユニット遺伝子 cDNA に 4 箇所のミスセンス変異を認めたが, タンパクの機能に及ぼす効果は明らかでなく多型の可能性がある. これらの変異が多型なのか病因なのかは, 今後多数の正常と比較検討することで明らかになると思われる.

結 語

特発性 LQT と Gi タンパクの関連を明らかにするため, 特発性 LQT 患者を対象として ACh 冠動脈内投与試験を施行し, 特発性 LQT 患者において特異的に QT 間隔の延長を認めた. さらに Gi タンパクの α サブユニットである Gi1 α , Gi2 α , Gi3 α の遺伝子および数種類の β , γ サブユニットの遺伝子の翻訳配列を解析し, Gi α 遺伝子に異常は検出できなかった. しかしながら, $\beta 3$ サブユニット遺伝子 cDNA の部分欠失および $\gamma 10$ サブユニット遺伝子 cDNA のミスセンス変異がそれぞれ 1 人の患者に認められ, 本症における意義をさらに検討する必要があると考えられた.

謝 辞

本稿を終えるにあたり, 直接御指導いただいた新潟大学脳研究所神経内科 辻省次教授および高野弘基先生に深謝いたします. また研究指導ならびに本論文の御校閲を賜りました新潟大学医学部第一内科 相澤義房教授にも心から御礼を申し上げます.

参 考 文 献

- 1) Romano, C., Gemme, G. and Pongiglione, R.: Aritomie cardiache rare dell'eta' pediatrica. Clin Pediatr., 45: 656~683, 1963.
- 2) Schwartz, P.J.: Idiopathic long Q-T syndrome:

Progress and question. Am. Heart J., 109: 399~411, 1985.

- 3) Moss, A.J., Schwartz, P.J., Crampton, R.S., Locati, F. and Carieed, E.: The long QT syndrome: A prospective international study. Circulation, 71: 17~21, 1985.
- 4) Jackman, W.M., Friday, K.J., Anderson, J.L., Aliot, E.M., Clark, M. and Lazzara, R.: The long QT syndrome: a critical review, new clinical observations and unifying hypothesis. Prog, Cardiovasc. Dis., 31: 115~172, 1988.
- 5) Zipes, D.P.: The long QT interval syndrome: a Rosseta stone for sympathetic related ventricular tachyarrhythmias. Circulation, 84: 1414~1419, 1991.
- 6) Ward, O.C.: A new familial cardiac syndrome in children. J. Irish Med. Assoc., 54: 103~106, 1964.
- 7) Jervell, A. and Lange-Nielsen, F.: Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the QT interval, and sudden death. Am. Heart J., 54: 59~68, 1957.
- 8) Fraser, G.R., Froggatt, P. and James, T.N.: Congenital deafness associated with electrocardiographic abnormalities, fainting attacks and sudden death: a recessive syndrome. Q. J. Med., 33: 361~385, 1964.
- 9) Keating, M., Atkinson, D., Dunn, C., Timothy, K., Vincent, G.M. and Leppert, M.: Linkage of a cardiac arrhythmia, the long QT syndrome, and Harvey ras-1 gene. Science, 252: 704~706, 1991.
- 10) Jiang, C., Atkinson, D., Towbin, J.A., Splawski, I., Lehmann, M.H., Li, H., Timothy, K., Taggart, R.T., Schwartz, P.J., Vincent, G.M., Moss, A.J. and Keating, M.T.: Two long QT syndrome loci map to chromosomes 3 and 7 with evidence for further heterogeneity. Nature Genetics, 8: 141~147, 1994.
- 11) Schott, J., Charpentier, F., Peltier, S., Foley, P., Drouin, E., Bouhour, J.B., Donnelly, P., Vergnaud, G., Bachner, L., Moisan J.P., Marec, H.L. and Pascal, O.: Mapping of a gene for long QT syndrome to chromosome 4q25-27. Am. J. Hum. Genet., 57: 1114~1122, 1995.
- 12) Wang, Q., Curran, M.E., Splawski, I., Burn, T. C., Millholland, J.M., VanRaay, T.J., Shen, J.,

- Timothy, K.W., Vincent, G.M., Jager, T.D., Schwartz, P.J., Towbin, J.A., Moss, A.J., Atkinson, D., Landes, G.M., Connors, T.D. and Keating, M.T.: Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature Genetics*, **12**: 17~23, 1996.
- 13) Curran, M.E., Splawski, I., Timothy, K.W., Vincent, G.M., Green, E.D. and Keating, M.T.: A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell*, **80**: 795~803, 1995.
- 14) Wang, Q., Shen, J., Splawski, I., Atkinson, D., Li, Z., Robinson, J.L., Moss, A.J., Towbin, J.A. and Keating, M. T.: SCN 5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell*, **80**: 805~811, 1995.
- 15) Neyroud, N., Tesson, F., Denjoy, I., Leibovici, M., Donger, C., Barhanin, J., Faure, S., Gary, F., Coumel, P., Petit, C., Schwartz, K. and Guicheney, P.: A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nature Genetics*, **15**: 186~189, 1997.
- 16) Splawski, I., Timothy, K.W., Vincent, G.M., Atkinson, D.L. and Keating, M.T.: Molecular basis of the long-QT syndrome associated with deafness. *N. Engl. J. Med.*, **336**: 1562~1567, 1997.
- 17) Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M. and Romey, G.: KvLQT1 and I_{SK} (min K) proteins associate to form I_{KS} cardiac potassium current. *Nature*, **384**: 78~80, 1996.
- 18) Sanguinetti, M.C., Curran, M.E., Zou, A., Shen, J., Spector, P.S., Atkinson, D.L. and Keating, M. T.: Coassembly of KvLQT1 and min K (I_{SK}) proteins to form cardiac I_{KS} potassium channel. *Nature*, **384**: 80~82, 1996.
- 19) Schulze-Bahr, E., Wang, Q., Wedekind, H., Haverkamp, W., Chen, Q. and Sun, Y.: KCNE1 mutations cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nature Genetics*, **17**: 267~268, 1997.
- 20) Splawski, I., Tristani-Firouzi, M., Lehmann, M. H., Sanguinetti, M.C. and Keating, M.T.: Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress I_{SK} function. *Nature Genetics*, **17**: 338~340, 1997.
- 21) Schwartz, P.J., Locati, E.H., Napolitano, C. and Prior, S.G.: The long QT syndrome. In: *Cardiac Electrophysiology. From Cell to Bedside. II Edition*. Zipes DP, Jalife J Eds. WB Saunders CO., Philadelphia.: 788~811.
- 22) Brown, A.M. and Birnbaumer, L.: Ionic channel and their regulation by G protein subunit. *Annu. Rev. Physiol.*, **52**: 197~213, 1990.
- 23) Aizawa, Y., Matsubara, T., Higuti, K., Washizuka, T., Tamura, Y., Uchiyama, H., Igarashi, Y. and Shibata, A.: Intracoronary acetylcholine-induced prolongation of the QT interval and Torsade de Pointes in long QT Interval syndrome. *Jpn. Heart J.*, **35**: 683~688, 1994.
- 24) Fleming, J.W., Wisler, P.L. and Watanabe, A.M.: Signal transduction by G proteins in cardiac tissue. *Circulation*, **85**: 420~433, 1992.
- 25) Kurachi, Y.: G-protein control of cardiac potassium channels. *Trends Cardiovasc. Med.*, **4**: 64~69, 1994.
- 26) Washizuka, T., Aizawa, Y., Fuse, I. and Shibata, A.: Abnormal function of platelet G proteins in long QT syndrome. *Jpn. Heart J.*, **37**: 85~93, 1996.
- 27) 伊藤 宏: G 蛋白質を介するシグナル伝達. *医学のあゆみ*, **171**: 337~342, 1994.
- 28) Itoh, H., Toyama, R., Kozasa, T., Tsukamoto, T., Matsuoka, M. and Kaziro Y.: Presence of three distinct molecular species of G_i protein α subunit. *J. Biol. Chem.*, **263**: 6656~6664, 1988.
- 29) Landis, C.A., Masters, S.B., Spada, A., Pace, A. M., Bourne, H.R. and Vallar, L.: GTPase inhibiting mutations activate the α chain of G_s and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumors. *Nature*, **340**: 692~696, 1989.
- 30) Lyons, J., Landis, C.A., Harsh, G., Vallar, L., Grünwald, K., Feichtinger, H., Duh, Q.Y., Clark, O.H., Kawasaki, E., Bourne, H.E. and McCormick, F.: Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science*, **249**: 655~659, 1990.
- 31) Codina, J., Stengel, D., Woo, S.L.C. and Birnbaumer, L.: β -subunits of the human liver G_s/G_i signal-transducing proteins and those of bovine retinal

- rod cell transducin are identical. FEBS Lett., **207**: 187~192, 1986.
- 32) **Fong, H.K.W., Amatruda, T.T., Birren, III, B.W. and Simon, M.I.**: Distinct forms of the β subunits of GTP-binding regulatory proteins identified by molecular cloning. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **84**: 3792~3796, 1987.
- 33) **Gao, B., Gilman, A.G. and Robishaw, J.D.**: A second form of the β subunits of signal-transducing G proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **84**: 6122~6125, 1987.
- 34) **Levine, M.A., Smallwood, P.M., Moen, Jr. P.T., Helman, L.J. and Ahn, T.G.**: Molecular cloning of β 3 subunit, a third form of the G prote in β - subunit polypeptide, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **87**: 2329~2333, 1990.
- 35) **Ray, K., Kunsch, C., Bonner, L.M. and Robishaw, J.D.**: Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein gamma subunits, including three novel forms designated the gamma 4, gamma 10, and gamma 11 subunits.: J. Biol. Chem., **270**: 21765~21771, 1995.
- 36) **Schwartz, P.J. Moss, A.J., Vincent, G.M. and Crampton, R.S.**: Diagnostic Criteria for the long QT syndrome an update. Circulation, **88**: 782~784, 1993.

(平成10年 2 月 9 日 受付)
