

		あいざわ よしやす
氏名		相澤 義泰
学位		博士 (医学)
学位記番号		新大院博(医)第30号
学位授与の日付		平成17年 3月23日
学位授与の要件		学位規則第4条第1項該当
博士論文名		Truncated KCNQ1 mutant, A178fs/105, forms hetero-multimer channel with wild-type causing a dominant-negative suppression due to trafficking defect (不完全型 KCNQ1 変異 (A178fs/105) は野生型と多量体を形成し移送障害によるドミナント・ネガティブ抑制をもたらす)
論文審査委員	主査 教授	木南 凌
	副査 教授	相澤 義房
	副査 教授	林 純一

博士論文の要旨

【背景】 遺伝性 QT 延長症候群は、主に K チャネルおよび Na チャネルをコードする遺伝子の変異によることが明らかとなった。これまでに 300 以上の遺伝子変異が報告されているが、その背景にあるチャネルの機能異常は各遺伝子変異により様々である。我々は本症において、新たな KCNQ1 (KvLQT1) 変異を同定し、その K チャネルの機能解析等により、チャネル蛋白の細胞膜への移送障害によるドミナント・ネガティブ抑制が本疾患の背景にあることを明らかにした。

【対象と方法】 症例は水泳中に心肺停止となった既往のある 13 歳の女兒で、安静時の QTc 時間は 520msec と延長し、運動により最大 620msec まで延長した。家族歴の詳細は得られなかった。

本患者に対し、PCR-SSCP 法にて QT 延長症候群関連遺伝子の変異スクリーニングを行った。変異の同定後の機能解析として、野生型および変異型 KCNQ1 コンストラクトを作成し、チャネル蛋白をリポフェクション法にて COS-7 細胞に一過性に発現させ、全細胞電流をパッチクランプ法にて測定した。次いで、野生型および変異型 KCNQ1 チャネル N 端を CFP または YFP 蛍光蛋白にて標識し、細胞内チャネル蛋白発現分布を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

【結果】 PCR-SSCP 法および塩基配列決定法により KCNQ1 チャネル S2-S3 細胞内ループの部位にフレームシフト変異が同定された。この Ala178fs/105 変異は、フレームシフトにより KCNQ1 チャネルの S3-S6 および C 端を除去してしまう変異で不完全なチャネル蛋白が形成されることが予想された。

次いで、COS-7 細胞に一過性に発現させたチャネル電流を全細胞電流パッチクランプ

法により測定した。野生型 KCNQ1 および β サブユニットである KCNE1 との共発現により I_K に特徴的な緩徐に活性化される外向き電流が観察され、一方、変異型 KCNQ1 および KCNE1 との共発現では電流は観察されず機能的なチャネルは形成されなかった。野生型 KCNQ1 および変異型 KCNQ1 との共発現により、野生型 KCNQ1 単独に比較して電流は減少しドミナント・ネガティブ効果が明らかとなった。

野生型および変異型 KCNQ1 チャネルの N 端を CFP または YFP 蛍光蛋白にて標識しそれぞれを発現させ共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、野生型 KCNQ1 チャネルは細胞膜表面に沿った発現がみられたが、変異型 KCNQ1 チャネルでは細胞膜表面にはみられず、細胞内貯留が著明であった。更に CFP 標識野生型 KCNQ1 チャネルおよび YFP 標識変異型 KCNQ1 チャネルを共発現させ観察したところ、野生型 KCNQ1 チャネルは細胞膜に発現せず細胞内に留まった。これは変異型が野生型蛋白と多量体を形成し細胞膜への移送を障害し、電気生理学にみられた電流のドミナント・ネガティブ効果をもたらすことを支持する所見であった。

【結語】以上、我々が新たに同定した Ala178fs/105 変異とそのチャネル蛋白の機能解析により、細胞膜移送障害によるドミナント・ネガティブ効果が本症例の K チャネルの電流の抑制と QT 延長症候群の表現型に寄与し、致死的不整脈の発症のメカニズムであると考えられた。

審査結果の要旨

遺伝性 QT 延長症候群の大半は K チャネルおよび Na チャネルをコードする遺伝子の変異による。申請者らは本症において、新たな KCNQ1 (KvLQT1) 変異 (Ala178fs/105 フレームシフト変異) を同定しており、この変異により遺伝子は N 末端側の約半分の蛋白のみを産生させる。いくつかの発現プラスミドを作製し、その K チャネルの機能解析、細胞内局在などを詳細に調べている。同時に、チャネル蛋白をリポフェクション法により COS-7 細胞に一過性に発現させ、全細胞電流をパッチクランプ法で測定している。その結果、チャネル蛋白の細胞膜への移送障害によるドミナント・ネガティブ抑制が本疾患の背景にあることを明らかにしている。

以上、申請者は新しいチャネル蛋白変異の同定と機能解析を行い、その変異が本症の K チャネルの電流抑制と QT 延長症候群の表現型に寄与し、致死的不整脈発症をもたらす機構であると議論している。緻密に検討された結果を示し、今後の進展に期待される。

以上の結果を明らかにし、考察している点に、博士論文としての価値を認める。