

平成27年12月

近藤健人 学位論文審査要旨

主 査 西 村 元 延

副主査 久 留 一 郎

同 山 本 一 博

主論文

Characterization of the novel mutant A78T-HERG from a long QT syndrome type 2 patient: instability of the mutant protein and stabilization by heat shock factor 1

(QT延長症候群2型患者に認められた新規変異A78T-HERGの特性：その変異蛋白質の不安定性と熱ショック因子1による安定化)

(著者：近藤健人、久留一郎、吉村将一、Endang Mahati、野津智美、李佩俐、飯塚和彦、加藤克、小倉一能、三明淳一郎、相庭武司、清水渉、倉田康孝、坂田晋史、仲宗根眞恵、二宮治明、中井彰、檜垣克美、河田康志、白吉安昭、吉田明雄、山本一博)

平成27年 Journal of Arrhythmia 掲載予定

参考論文

1. Impact of postprocedural antiarrhythmic drug therapy with bepridil on maintaining sinus rhythm after catheter ablation for persistent atrial fibrillation

(持続性心房細動に対するカテーテルアブレーション後の洞調律維持におけるベプリジルによる術後抗不整脈薬療法の効果)

(著者：近藤健人、三明淳一郎、加藤克、小倉一能、飯塚和彦、山本一博)

平成27年 Journal of Cardiology 掲載予定

学位論文要旨

Characterization of the novel mutant A78T-HERG from a long QT syndrome type 2 patient: instability of the mutant protein and stabilization by heat shock factor 1

(QT延長症候群2型患者に認められた新規変異A78T-HERGの特性：その変異蛋白質の不安定性と熱ショック因子1による安定化)

Human ether-a-go-go related gene (HERG) は心筋細胞の再分極に関与する電位依存性カリウムチャネル (IKr) の α サブユニットをコードする遺伝子で、本遺伝子の変異はQT延長症候群2型 (LQT2) の原因となる。HERGチャネル蛋白は粗面小胞体上のリボソームにおいて合成された後、小胞体、ゴルジ体での成熟化過程を経て細胞膜へと輸送される。この変異はIKr電流の減少をもたらすことが知られており、またその多くが細胞内での成熟化、細胞膜への輸送過程に障害をもたらすことが報告されている。

分子シャペロンである熱ショック蛋白 (HSP) は新たに合成された蛋白質のfolding、変性蛋白質のre-foldingを介した蛋白質の成熟化、および細胞膜への輸送過程に関与している。これまでの報告においてHSP90が野生型HERG (WT-HERG) チャネル蛋白の成熟化に必須であることや、HSP70が細胞膜への輸送障害を起こす変異型HERGチャネル蛋白の成熟化を促進できることが明らかとなっているが、それらの調節因子であるheat shock factor 1 (HSF-1) がHERGチャネル蛋白の発現に及ぼす影響については検討されていない。

今回、本研究はLQT2患者から新規の変異型HERG (A78T) を発見した。本遺伝子を導入したHEK293細胞に発現する変異型A78T-HERGチャネル蛋白の特性を解析し、HSF-1のA78T-HERG蛋白の発現に及ぼす影響に関して検討を行った。

方法

LQT2患者のゲノムDNAをダイレクトシーケンス法により精査した結果、本患者の変異はHERG遺伝子のN末端より232番目の塩基がグアニンからアデニンに置換することにより78番目のアミノ酸がアラニンからスレオニンに変化する新規のミスセンス変異 (A78T-HERG) であることが明らかとなった。また本遺伝子変異は、HERGチャネルのN末端側細胞内ドメインに存在していた。

WT-HERG、A78T-HERG遺伝子をそれぞれHEK293細胞に導入し発現した蛋白の特性を、ウェスタンブロット法、免疫沈降法、免疫蛍光抗体染色、パッチクランプ法により解析した。

またHSF-1の共発現がA78T-HERG蛋白の発現、HERG電流に及ぼす影響をウェスタンブロット法、パッチクランプ法を用いてそれぞれ検討した。

結 果

ウェスタンブロット法の結果、WT-HERGにおいては135kDa、155kDaの両バンドが検出された。なお135kDaのバンドは小胞体でコア糖鎖修飾を受けた後のサブユニット(未成熟蛋白)、155kDaのバンドはゴルジ体で糖鎖修飾が完了したサブユニット(成熟蛋白)であることが確認されている。A78T-HERGを発現させた場合、135kDaの未成熟蛋白は検出されたが、155kDaの成熟蛋白は検出できなかった。

免疫沈降法によりWT-HERG、A78T-HERG蛋白のユビキチン化を比較した結果、A78T-HERG蛋白はWT-HERGと比べより多くユビキチン化されていることが明らかとなった。またプロテアソーム阻害剤を作用させることでA78T-HERG蛋白の未成熟蛋白の発現が有意に増加した。

免疫蛍光抗体染色と共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察の結果、WT-HERGのシグナルは細胞膜上に局在する一方、A78T-HERGのシグナルは細胞膜に発現しないことが明らかとなった。

パッチクランプ法によるHERGチャネル活性の比較では、WT-HERGでは時間依存性の外向きIKr電流と末尾電流を確認できた一方、A78T-HERGでは確認できなかった。

HSF-1の共発現がA78T-HERG蛋白の発現、HERGチャネル活性に及ぼす影響をウェスタンブロット法、パッチクランプ法を用いてそれぞれ検討した。その結果、HSF-1の共発現やその誘導薬GGAにより155kDaの成熟蛋白発現が有意に増加した。またHSF-1の共発現下で行ったパッチクランプ法の結果、HERGチャネル活性の有意な上昇が認められた。

考 察

以上の結果より、変異A78T-HERG蛋白は成熟化障害のためユビキチン・プロテアソーム系により分解されること、細胞膜への輸送が阻害されチャネル活性の喪失を来していることが示唆された。またその成熟化障害は分子シャペロンの調節因子であるHSF-1の共発現により改善し、成熟蛋白の発現、チャネル活性の上昇が確認された。

結 論

新規変異A78T-HERG蛋白の成熟化障害はHSF-1の共発現で改善することが明らかとなった。本研究の結果よりHSF-1の誘導による変異HERG蛋白の成熟化の改善がLQT2に対する新たな治療のターゲットとなり得ると考えられた。