

論文内容要旨

Autosomal recessive Andersen-Tawil syndrome
with a novel mutation L94P in Kir2.1

(Kir2.1 に新規ミスセンス変異 (L94P) を認める
常染色体劣性遺伝形式の Andersen-Tawil 症候群)

Neurology and Clinical Neuroscience, 1 : 131–137, 2013

主指導教員：松本 昌泰 教授

(応用生命科学部門 脳神経内科学)

副指導教員：栗栖 薫 教授

(応用生命科学部門 脳神経外科学)

副指導教員：丸山 博文 准教授

(応用生命科学部門 脳神経内科学)

竹田 育子

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

論文内容要旨

【背景】 Andersen-Tawil 症候群 (ATS) は周期性四肢麻痺、心室性不整脈、形態異常を 3 徴とする稀な疾患である。ATS は内向き整流カリウムチャネル Kir2.1 をコードする *KCNJ2* の dominant negative 変異を原因とし、通常は常染色体優性遺伝形式を示す。我々は常染色体劣性遺伝が示唆される c. 281T>C の変異を有する ATS の家系を見出し、Kir2.1 の機能解析を通じてその発症機序を解析した。

【方法】 予め遺伝子研究に関して十分な説明を行い、同意を得た後、患者および症状のない母親、兄の DNA を白血球より抽出し、Andersen-Tawil 症候群の原因遺伝子である *KCNJ2* の DNA シークエンスを行った。両親の血縁関係を確認するため、CytoScan HD Array を用いて患者染色体のホモ接合性を検討した。また、機能解析のため患者と非罹患者からそれぞれ Wild type の Kir2.1 チャネル (WT)、L94P を有する変異型 Kir2.1 チャネル (L94P) をコードする遺伝子をサブクローンし、WT-Enhanced green fluorescent protein (EGFP)、L94P-EGFP と WT 用発現ベクターを作成、これらを各種培養細胞にトランスフェクトし以下の実験を行った。細胞内局在に関しては HEK293 細胞を用いて蛍光染色を行い、phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) を細胞膜の指標とし、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。更に Plasma membrane sheet assay で HEK293 細胞の細胞膜を抽出し、ウエスタンブロット法で Kir2.1 の膜での発現量を検討した。最後に CHO 細胞を用いたパッチクランプ法にて K チャネルの特性を評価した。全細胞記録でイオン電流を記録し、-150 mV から +60 mV へ膜電位を変化させ、チャネルの電流-電圧特性を解析した。WT と L94P を共発現した細胞の解析には発現ベクターとして L94P-EGFP と WT を用いた。統計学的手法は Dunnett 法を用い、有意水準 5%とした。

【結果】 新規遺伝子変異 c. 281T>C が患者はホモ接合体で、母親はヘテロ接合体で認められた。患者では第 17 染色体上に *KCNJ2* を含む 11.4 Mb に及ぶホモ接合部位を認めた。また 5 Mb 以上のホモ接合部位が常染色体全体の 3.4%を占めており、両親の血縁関係が示唆された。蛍光染色では WT-EGFP は PIP₂ と共局在しており、細胞膜表面に高い発現が認められたが、L94P-EGFP は主に細胞内に局在し、細胞膜表面ではわずかに発現しているのみであった。一方、L94P-EGFP と WT を共発現させた細胞では L94P-EGFP も膜へ移行した。HEK293 細胞の蛍光強度を測定したところ、WT-EGFP と L94P-EGFP+WT は膜に強いシグナルを認めたが、L94P-EGFP 単独では膜でのシグナルは低下していた。膜分画を用いたウエスタンブロット法においても L94P が WT や L94P+WT と比べて発現量が低下していた。パッチクランプ法では、L94P (-332.9 ± 47.9 pA, n=16) は L94P+WT (-1482.6 ± 304.1 pA, n=16) や WT (-2217.4 ± 337.4 pA, n=16) と比べ、有意に内向き電流が低下していた ($p < 0.001$)。

【考察】 Kir2.1 ヘテロ 4 量体は膜移行性・チャネル機能ともに保たれるものの、ホモ接合体では Kir2.1 の膜移行性が低下し、細胞膜における Kir2.1 の発現が減少することにより ATS を発症したと推定された。本知見は常染色体劣性遺伝形式を呈する一部のチャネロパチーの発症機序を普遍的に説明するものと考えられた。