

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15887

研究課題名(和文)ブルガダ症候群のSCN5Aドミナントネガティブ変異の機序に関する研究

研究課題名(英文)Research project for SCN5A dominant-negative mechanism

研究代表者

加藤 浩一 (Kato, Koichi)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：70736983

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文):ブルガダ症候群患者の変異Naチャンネルの一部が、ドミナントネガティブ作用(DN作用)を起こす仕組みについて、SCN5A-F355I,-D356N,そしてA364Gの三変異を用いて検討した。これらの変異は、ブルガダや、類縁疾患の家系で見つかった。電気生理実験ではDN作用をもつF355Iチャンネルは正常チャンネル電流を減少させることが確認できている。タンパク発現解析では、F355Iチャンネルは、正常チャンネルと比べ細胞膜への発現量は変わらないことが確認された。引き続き他の変異で細胞膜への蛋白発現量を検討する。また、DN効果を打ち消すS460A変異チャンネルを正常チャンネルの代わりに用いた際の変化も観察する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブルガダ症候群の患者の中には、生涯にわたり不整脈発作に見舞われない例から、繰り返す致死性不整脈発作で命を落としたり重度の脳障害を負う症例まで重症度に著しいバラつきが見られる。患者を不整脈のリスクで層別化する試みは、家族歴やこれまでの不整脈歴などを参考に行われているが、非常にうまく行っているとは言い難い。この研究によって、ブルガダ症候群の患者の中で、心臓ナトリウムチャンネルにどのような変異を持っている症例がより重症な不整脈発作を来しやすいかについて、一定の知見が得られることとなる。患者のリスク層別化に分子生物学的な側面から貢献できる研究である。

研究成果の概要(英文):We confirmed that Dominant-Negative F355I variant provoke obvious current decrease when co-expressed with WT Nav1.5. This effect was not observed in D356N mutated channel. Western-blot analysis demonstrated no significant difference of the membrane expression level of Nav1.5 between SCN5A-F355I and SCN5A-WT. We will perform the same assay for D356N and A364G variants, the latter of whom was identified in a family with idiopathic ventricular fibrillation. We will also analyse the effect when using SCN5A-S460A instead of WT, which was reported to cancel the dominant negative effect of some loss-of-function SCN5A variants.

研究分野：遺伝性致死性不整脈

キーワード：ブルガダ症候群 SCN5A ドミナントネガティブ効果

1. 研究開始当初の背景

ブルガダ症候群とその重症度

ブルガダ症候群は、器質的心疾患を持たない青壮年者に心室細動による突然死を引き起こす常染色体優性の遺伝性不整脈疾患である。心臓に発現する Na チャネル遺伝子 SCN5A の変異が患者の 2 割に同定され、電気生理学的には Na チャネルの機能低下が特徴とされる。本疾患に有効な薬物治療はなく、突然死予防の唯一有効な手立ては植え込み型除細動器の植え込みであるが、植え込み後に一度も作動しない症例から心室細動を繰り返し頻回に除細動器が作動する症例まで患者の重症度は多岐にわたる。この為、ブルガダ患者の突然死リスクの評価と真に除細動器が必要な患者の抽出は医療経済的にも患者の QOL 面においても重要な課題である。

SCN5A のドミナントネガティブ変異

ブルガダ症候群を引き起こす SCN5A の機能喪失型変異の中でも、これまで幾つかの DN 変異が共発現させた野生型チャネルの電流を減少させ、より重い病型を引き起こしうるとして報告されている。DN 効果を有する変異は、変異アレル由来の α サブユニットが野生型アレル由来の α サブユニットと多量体を形成して 1 つのポア (孔) を形成する場合は高頻度に認められるが、単独の α サブユニットでイオンチャネルのポアを形成する Na チャネルでは数が少なく、その機序もよくわかっていない。

Mercier らは、N 結合型糖鎖付加が Na チャネルタンパクの成熟に必須であり、DN 効果を有する L325R 変異ではこの糖鎖付加が障害され成熟型チャネルが生成されないと報告している。(Mercier et al, Biochim Biophys Acta 2015)

一方 Clatot らは、SCN5A においても α サブユニット同士が実は N 末端を介して結合しており、互いに補助する形で安定した膜発現を実現していること、さらにこの部位 (N 端) の変異 R104W と R121W においてこの相互補助作用が障害されてしまうことで DN 効果が見られることを報告した。(Clatot J et al, Cardiovasc Res 2012)

SCN5A D356N と F355I

我々は、独立した二つのブルガダ症候群家系において SCN5A-D356N と F355I の隣接する 2 変異を上記の L325R 近傍で同定した。D356N に関しては 2005 年に我々のグループから報告済み (Makiyama et al. J Am Coll Cardiol. 2005) であり、比較的高齢発症、電気生理学実験にて機能喪失型変異であったが DN 効果は認められていない。一方 F355I はフランスで若年発症女兒のサンプルから同定され、(本疾患患者は 9 割が男性であり、10 代の女兒例は稀である) パッチクランプにてチャネル機能喪失及び明らかな DN 効果が認められている (図)。

両変異ともに、奇しくも SCN5A の隣接するアミノ酸の置換を引き起こすミスセンス変異を有しており、かつ糖鎖付加を受ける L325 に近いことに着目した我々は、上述の 2 グループの報告を足がかりにしつつ 2 変異の比較を通して DN 効果の機序の解明を試みることにした。具体的には、F355I, D356N の変異チャネルにおいて N 結合型糖鎖付加は L325R 同様に障害されているのか。もし糖鎖付加障害があるのなら、それは DN 効果を有する F355I 変異におけるみなのか (DN 効果を有さない D356N では障害されていないのか)、SCN5A-F355I における DN 効果は、N 末端変異同様に α サブユニット同士の相互結合によって引き起こされているのか。以上のような疑問を提起した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、SCN5A F355I 変異によるドミナントネガティブ効果の機序を明らかにすることである。

3. 研究の方法

隣接する SCN5A の二つの変異イオンチャネルの機能が野生型に対してどう変化したかと、DN 効果の有無をパッチクランプ法による機能解析 () で明らかにし、続いて野生型チャネルと変異チャネルの細胞膜への発現量が異なるかどうかの比較・評価をピオチン法・ウエスタンブロットを用いて行う ()。また同じくウエスタンブロットの Na チャネルのバンドのパターンから、発現している Na チャネルが糖鎖修飾を受けて成熟しているものが多いのか、未成熟なチャネル

が多いのか、が判別できるためこれを比較・解析して明らかにする()。Naチャンネルのサブユニット同士の結合は、タグ付けしたNaチャンネルのプラスミドを用いて共免疫沈降・ウエスタンブロットで比較し()野生型のNaチャンネル同士に比べて2つの変異チャンネルではそれぞれαサブユニット同士の結合の強弱に変化は見られるか、もし見られるのならそれとチャンネルタンパクの膜への発現量との間に何らかの相関はあるのか、上述の結果と併せて評価を行う。

パッチクランプ法による機能解析 HEK293細胞を用いた Voltage clamp 法で行う。すでに SCN5A-F355I の機能解析は終了、DN 効果が確認されている。D356N の報告は 2006 年のものでありプラスミドベクターも F355I 変異に用いたものとは異なるため改めてプラスミドを作成しパッチクランプを行い、(1)チャンネル機能低下、(2)野生型と共発現して DN 効果を有さないこと、の二点を確認する。

ビオチン法・ウエスタンブロットによる細胞膜へのチャンネル発現レベルの比較 DN 変異では細胞膜へのチャンネルタンパク輸送が障害されているか、アビジン・ビオチンシステムを用いて評価する。WT 及び変異 Na チャンネルをトランスフェクションした HEK293 細胞をビオチン処理しタンパクを抽出、ビオチン結合膜タンパク分画をアビジンビーズで分離し発現量をウエスタンブロット法で比較する。

成熟(糖鎖修飾後)Naチャンネルの発現量の比較 ウエスタンブロット法で Na チャンネルは 2本のバンドとして確認され、この内高分子量のバンドが糖鎖付加後の成熟チャンネルであるとされる。我々は DN 効果の有無と高分子量バンドの発現レベルの相関について評価を行う。

共免疫沈降による Na チャンネルαサブユニット同士の結合の有無の評価 FLAG-SCN5A WT、GFP-SCN5A WT 及び FLAG-SCN5A-MT(F355I と D356N)の各プラスミドを用意し、様々な組み合わせ(FLAG-WT/GFP-WT, WT/F355I, WT/D356N)で HEK293 細胞に共発現させタンパクを抽出する。タグに応じた抗体で共免疫沈降を行い、共発現したプラスミド由来のチャンネルタンパクとの相互作用を確認、比較する

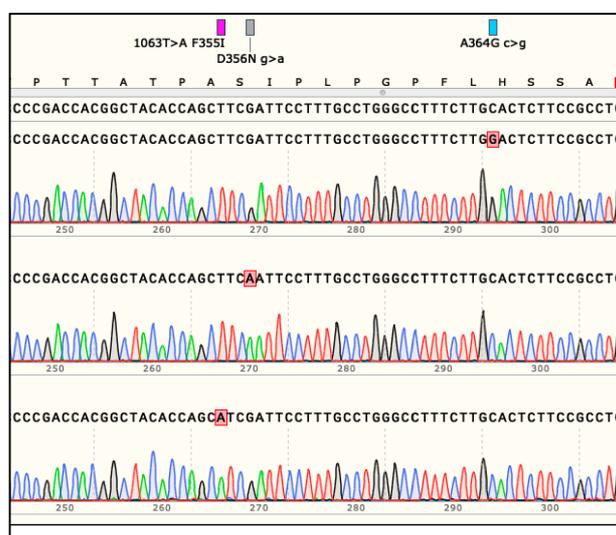
4. 研究成果

本研究の進行中に、新たに特発性心室細動の家系に SCN5A-A364G の遺伝子変異を同定した。本研究の対象となる D356N F355I の 2 変異の近傍に位置する変異であることから、この変異も解析対象に含めて実験を進めることとした。

また、Naチャンネル分子2分子が結合することを実証した Clatot らの報告で、S460A 変異を SCN5A に組み込むとこの結合が解除されドミナントネガティブ効果がキャンセルされるという現象が観察されたため、この S460A の変異体も新たに用意することとなった。

・変異プラスミド作成:新たに同定した SCN5A-A364G と、SCN5A-S460A の変異プラスミドは作成を完了した。(図1 SCN5A-F355I/D356N/A364G プラスミド塩基配列)

図1 SCN5A-F355I/D356N/A364G プラスミド塩基配列



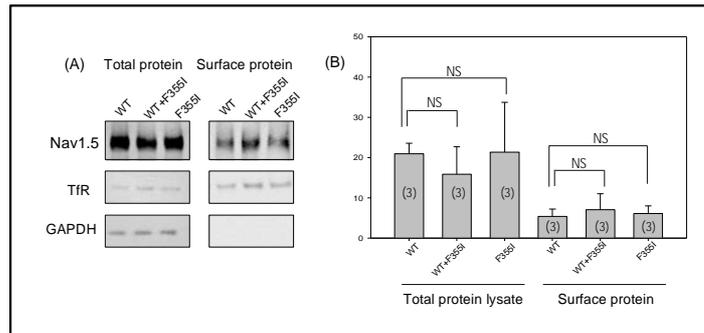
・ビオチン法・ウエスタンブロットによる細胞膜へのチャンネル発現レベルの比較:現在 D356N と F355I のビオチン法によるチャンネル発現比較実験は完了した。この変異による Nav1.5 チャンネルの細胞膜発現への影響は乏しいことが確認された。(図2:SCN5A-F355I と野生型の WB 比較)引き続き A364G の変異についても確認を進めていく。(図2 野生型と SCN5A-F355I ウエスタンブロット)

・成熟(糖鎖修飾後)Naチャンネルの発現量の比較:今回我々が実施したウエスタンブロット法では、成熟 Na チャンネルのバンドと未成熟 Na チャンネルのバンドははっきりと分離されず、これら

を別個に評価することは困難であった。泳動条件を種々に変化させて再検しているが、現在のところ安定した結果を得ることができずにいる。

・電気生理学実験：培養細胞を用いた電流解析は、F355I 単独、D356N 単独、野生型 + F355I, 野生型 + D356N, の4つのコンディションで実施しており、D356N では見られなかったドミナントネガティブ効果が F355I では明らかに観察された。A364G 単独、野生型 + A364G のパッチクランプ解析も同様に行い、また、野生型を S460A の変異体で置き換えた場合にドミナントネガティブ効果がキャンセルされるかについても実験による検討を行う。

図 2: SCN5A-F355I と野生型の WB 比較



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----