

ヒトの心臓突然死の原因となる新たな Na⁺および K⁺イオンチャネル変異の解析

西谷 友重¹, 中川 修¹, William A Coetzee²

¹国立循環器病センター研究所分子生理部, ²New York University, Langone Medical Center

概要 乳幼児突然死症候群(SIDS)は、生後 1 歳までに乳児が突然死亡する病気であり、世界的にも問題となっている。その原因の1つとして心臓における様々なイオンチャネル変異が指摘されている。私達は、ニューヨーク監察医事務所との共同研究により、心臓突然死で亡くなったヒトの心筋サンプルを用いて、不整脈関連遺伝子(Na⁺, K⁺, Ca²⁺チャネルおよびその制御因子)について遺伝子解析を行い、未同定変異を同定した。その中で、心臓の活動電位の長さや発火頻度に重要な役割を担う Na⁺チャネル Nav1.5 に関し未同定変異が生後5週齢で亡くなった乳児で見つかった。そこで本研究では、これら変異に関し、チャネルの活性異常が起こるのか、その分子・細胞メカニズムは何かについて明らかにすることを目的とした。変異は Na⁺チャネルタンパク質をコードする遺伝子 SCN5A の C 末端で 2 箇所、点突然変異として見出された(変異 A, 変異 B)。変異体 B はストップコドン形成のため truncation mutant となった。そこで、HEK293 細胞にそれぞれの変異体 A, ダブル変異体 A+B を発現させ、解析を行った。まず変異体 A では電流密度の顕著な低下および不活性化の遅延が認められた。しかし、活性化のキネティクスや電位依存性、また不活性化からのリカバリー時間、持続電流の大きさに関しては、野生型(WT)と比べ、有意な差は認められなかった。変異体 A の電流密度減少の分子メカニズムを探るため、アビジン・ビオチンシステムを用いて HEK293 細胞の形質膜上および全細胞中の Na⁺チャネルタンパク質の量を WT と比較した。その結果、変異体 A において細胞表面上の Na⁺チャネルタンパク量が減少していることがわかった。一方、全細胞中の Na⁺チャネルタンパク質の量は変化無かったことから、変異体で転写や翻訳異常、分解促進が生じたのではなく、主に形質膜への移行が抑制された可能性が示唆された。一方、変異体 B および変異体 A+B では、電流密度がわずかに減少する以外、ほとんどのパラメータ関し WT と変わらなかった。以上の結果より、今回見つかった Na⁺チャネル変異は、電流量が減少することから突然死の原因であった可能性が高い。

1. 研究目的

乳幼児突然死(SIDS)は、生後 1 歳までに原因不明で亡くなる突然死である。この 50 年で SIDS の割合は減少したものの、昨日まで元気だった家族が急に亡くなるといった悲しい出来事であるため世界的にも大きな問題となっている。呼吸障害が認められることが多いため、その原因として、子どものうつぶせ寝や親の喫煙・飲酒などが考えられている。また心機能障害も多く認められているが、心臓の構造には異常がないことから、SIDS の原因の1つとして心臓における様々なイオンチャネルの変異が寄与するのではないかと近年指摘されている。

イオンチャネルは心筋において必須の膜タンパク質である。心臓の活動電位の形や細胞内 Ca²⁺の流出入に直

接寄与することから、心拍数や心収縮に大きく影響を与える。従って、イオンチャネルの変異は、わずかな機能異常であっても活動電位に異常を与え、致命的な不整脈をもたらす場合がある。例えば電位依存性 Na⁺チャネルや K⁺チャネルの活性は、心臓の活動電位の長さや発火頻度に影響するため、その活性異常は QT 延長症候群やブルガダ症候群、またカテコラミン誘発性多形性心室頻拍(CPVT)などを引き起こし、失神発作や突然死の原因となる^(1,2)。そこでニューヨーク監察医事務所では、8 年前より心臓突然死で亡くなった乳幼児の心筋サンプルを用いて、不整脈関連遺伝子(Na⁺, K⁺, Ca²⁺チャネルおよびそれら制御因子、具体的には SCN5A, KCNQ1, KCNH2, KCNE1, KCNE2 および RYR2)について遺伝子解析を行

い、未同定の変異をいくつか見出している。申請者らは、共同研究によりその情報を共有し、その変異がチャネル活性にどのような影響をもたらすか調べてきた。そして、電位依存性 Na⁺チャネル(SCN5A/Nav1.5)に関し、2箇所の未同定変異が生後5週齢で睡眠中に亡くなった乳児で見つかった。しかし、この変異体により形成される Na⁺チャネルの活性が、野生型(WT)と異なるのか、また異なる場合その分子メカニズムは何なのか明らかでない。そこで本研究の目的は、これら Na⁺チャネルにおいて見つかった未同定の変異に関し、①チャネルの活性異常が起こるのか、②その分子・細胞メカニズムは何かについて、生理学的、分子・細胞生物学的手法を用いて明らかにすることである。

2. 研究方法

2.1 部位特異的変異体の作製

電位依存性 Na⁺チャネル変異は C 末端に 2 箇所あり、これら、それぞれの変異体(変異体 A, 変異体 B)および両方を有する変異体(変異体 A+B)を作製した。ヒト Nav1.5 cDNA/pcDNA3.1 は University of Copenhagen の Dr. Nicole Schmitt よりいただき、部位特異的変異体作製キット(Quickchange II XL, Aligent Technologies, Santa Clara, CA)および下記2つのプライマーを用いて PCR 法にて作製した。

変異体 A 作製用プライマー:

5'-GCCAAGCCCAACGAGATAAGCCTC-3'

変異体 B 作製用プライマー:

5'-AGGATGCCCTGAGTGAGAGGGCCTC-3'

なお、変異体 B はストップコドンを形成するため、切断型変異体となっている。

変異はシークエンスにて確認した。

2.2 細胞培養および遺伝子導入

HEK293 細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS)およびペニシリン・ストレプトマイシン入りの Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)にて培養した。細胞は、35 mmの培養皿中で 70-80%コンフルエントになるまで培養し、Lipofectamine 2000 試薬(Life Technologies, Carlsbad, CA)を用いて 2 μg の DNA を遺伝子導入した。2 μg のうち、1.8 μg はヒト Nav1.5-pcDNA3.1 であり、0.2 μg は GFP プラスミ

ドである。後者はパッチクランプの際、どの細胞が遺伝子導入されたか確認するため導入した。

2.3 パッチクランプ法を用いた電気生理学的解析

HEK293 細胞は遺伝子導入後、48 時間でパッチクランプ法による電気生理学的解析に用いた。全細胞(ホールセル)電流を 8-pole Bessel ローパスフィルターにてフィルタリングした後(-3dB @ 1 Hz; Frequency Devices Inc.)、デジタル化(3 kHz; DigiData 1550A, Axon Instruments)することにより測定した(Axopatch 200B; Axon Instruments)。内径 1.5 mm のホウケイ酸ガラス(World Precision Instruments)で 1.5-2.5 MΩ の抵抗値を持つパッチ電極を作製し、下記の組成のピペット内液を充填した。(mmol/L): 10 KCl, 105 CsF, 10 NaCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 10 TEA-Cl を含む溶液を 2N CsOH で pH=7.2 に合わせた。外液は(mmol/L): 137 NaCl, 5.4 KCl, 10 HEPES, 0.5 MgCl₂, 1.8 CaCl₂ を含む溶液を 2N NaOH で pH=7.4 に合わせた。3.3 mV の液間電位差の補正は行っていない。全細胞の静電容量および直列抵抗は 80%以上に補正を行った。電流は、細胞の大きさの指標である電気容量で割ることにより、電流密度として補正した。

得られたデータは全て pClamp 10.5 ソフトウェアにて解析し OriginPro 9(OriginLab, Northampton, MA)を用いてグラフ化した。電流-電圧曲線(I-V カーブ)は測定した電圧を横軸に最大電流量を縦軸にプロットした。定常状態における活性化および不活性化カーブは、ピーク電流を駆動力(すなわち、測定した時の電圧—Na⁺の逆転電位)で割ることによりコンダクタンス(電気伝導力)を求め、これを、最大コンダクタンスを1として標準化することによりプロットした。このようにして得られた活性化および不活性化カーブに対し、下記のボルツマン方程式によりカーブフィッティングを行った。 $y = 1 / \{1 + \exp[(V_m - V_{1/2})/k]\} + A$ 、ここで、y は標準化された Na⁺のコンダクタンスまたは電流、V_m は先行パルス電位、V_{1/2}は活性化または不活性化の中間値を与える電位、そして k は傾き、A はベースラインで常に 0 に固定してある。減少する電流は、2次指数関数の方程式 $I_{Na} = [A_f * \exp(-t/\tau_f)] + [A_s * \exp(-t/\tau_s)]$ によりカーブフィッティングを行った。不活性化からのリカバリーカーブは、-20 mV で測定したピーク電流を、同じく-20 mV の条件パルスの際、得られたピーク値で割り、条件パルスからの時間に対してプロットした。標準化した電流値は2次指

数関数方程式でカーブフィッティングを行った。ここで、 τ はリカバリータイムの時定数である。

2.4 ビオチン化法

WT および変異型 Nav1.5 チャンネル遺伝子を HEK293 細胞に導入し、48 時間後に 0.5 mg/mL of EZ Link Sulfo-NHS-SS-Biotin/PBS (Pierce Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を添加することにより (30 min, 4°C), 細胞表面タンパク質をビオチン化した。その後、100 mM glycine を添加することにより (10 min, 48°C), 余剰のビオチンを消去した。さらに、Lysis buffer を加えて細胞を可溶化した (1 h, 48°C)。遠心後 (14,000 g, 30 min, 4°C), 上清を NeutrAvidin beads (Pierce) で固定化した (一晚, 4°C)。ビオチン化されたタンパク質を遠心により沈殿させ、洗浄後、2x Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA+ 5% β -Mercaptoethanol) で溶出した (室温, 1 時間)。ビオチン化されたタンパク質は Western blot により解析を行った。

2.5 Western Blotting

同量のタンパク量を含むサンプルを sample buffer+5% β -Mercaptoethanol に溶解し、4-15% polyacrylamide gel にアプライして電気泳動を行った。PVDF 膜に転写後、5% milk in TBS-Tween (0.05%) で 1 時間ブロッキング、その後、1次抗体 (4°C, 一晚)、2次抗体 (室温, 1時間) を加えてインキュベートし、化学発光法によりシグナルを検出した。

2.6 蛍光免疫法

ガラスカバースリップ上に HEK-293 細胞を培養し、48 時間後、4% paraformaldehyde で固定化した (15 min, 室温)。0.1% Triton X-100 /PBS で 10 分間、透過処理を行った後、5% normal goat serum でブロッキングした (室温, 30 分)。その後、1次抗体でインキュベートし (4°C, 一晚)、蛍

光タンパク質結合型2次抗体で処理を行った (室温, 1時間, 暗所)。十分洗浄後、共焦点ユニットのついた倒立型顕微鏡 (Olympus 1X81, equipped with 60 \times /1.42 oil immersion objective lens) を用いて細胞を観察した。イメージは FV10-ASW imaging software を用いて取得し、Adobe Photoshop を用いてさらなる解析を行った。

2.6 抗体

使用した次抗体は、マウスモノクローナル抗電位依存性 Na⁺チャンネル抗体 (1:5,000; K58/35, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), マウスモノクローナル抗 GAPDH 抗体 (1:10,000; GAPDH-71.1, Sigma), ウサギポリクローナル抗ビオチン抗体 (1:10,000; ab53494, Abcam, Cambridge, MA) である。2次抗体は、IRDye 800CW 標識ヤギ抗マウス抗体 (1:10,000; LI-COR Biosciences, Lincoln, NE), HRP 標識ロバ抗ウサギ抗体 (1:20,000; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) ならびに Cy3-標識ヤギ抗マウス抗体 (1:400; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) である。

2.6 統計解析

得られた結果は $\text{mena} \pm \text{SEM}$ で表した。統計学的解析は2つのグループ間での比較は unpaired Student's t-test により、また2つより多いグループ間での比較は ANOVA を用いた。p < 0.05 のものを統計学的に有意と判定した。

3. 研究結果

3.1 Nav1.5 チャンネル遺伝子配列の変異

睡眠中に突然死した生後 5 か月の女の子の Nav1.5 チャンネルをコードする遺伝子 SCN5A の配列をチェックしたところ、2つの点突然変異 (Fig. 1 の変異 A および変異 B) を発見した (論文投稿前なので、変異の位置は A および

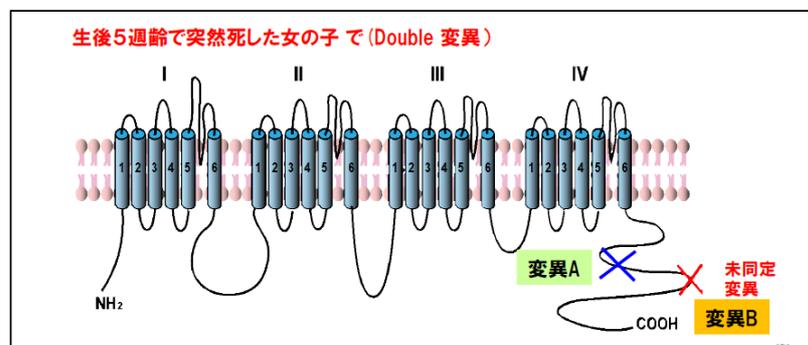


Fig. 1. 心臓突然死を起こした少女の Nav1.5, alpha-subunit に認められた変異 A および変異 B の位置

Bとした)。変異 A はシトシンがグアニンに、また変異 B はシトシンがチミンに変異していた。その結果、変異体 A は C 末端の 3 番目のアルファヘリックスの領域でグルタミン残基がグルタミン酸に、変異体 B はストップコドンを形成するため以降の配列が欠失した truncation mutant になることがわかった。

3. 2 Nav1.5 チャンネルピーク電流の大きさ

これら変異が Nav1.5 チャンネルの活性にどのような影響を及ぼし、それが乳幼児突然死に関連するかどうかについて、WT および変異体を HEK293 細胞に発現させてホールセル電流を測定した。変異体に関しては、変異体 A および変異体 B、さらに両方の変異を持つ変異体 A+B を作製して検討を行った。Na⁺チャンネル電流は、-120 mV の保持電位からテストパルス電位 (-80 mV から +60 mV まで 10 mV ごとに設定) を 175 ms 間アプライすることにより活性化した (Fig. 2 A)。そして各テスト電位におけるピーク電流をテスト電位に対してプロットし、電流-電圧曲線を

得た (Fig. 2 B)。WT に比べ、変異体 A の Na⁺チャンネル電流は -30 mV 以上のテスト電位において著しくピーク電流の大きさが減少していた。例えば、-20 mV でのピーク電流の値は、WT で -705.3 ± 78.83 pA/pF (n=17) に対し変異体 A では -312.2 ± 35.89 pA/pF (n=6; p<0.05) であった。一方、変異体 B 及び変異体 A+B に関しては、わずかに減少傾向が認められたものの (変異体 A で -549.0 ± 81.19 , pA/pF, n=14, 変異体 A+B で -581.3 ± 71.41 , pA/pF (n=8)), 統計学的な有意差は無かった。

3. 3 Nav1.5 持続電流

別の実験で、不活性化の起こらない持続電流 (sustained current, または late current) についても検討を行った。持続電流は、-20 mV で活性化後 175 ms における電流で、しかも Nav1.5 チャンネル阻害剤であるテトロドトキシン (TTX) 感受性の電流として、WT と変異体で比較した。Table 1 に示すように、不活性化しない持続電流は不活性化するピーク電流の 0.9-1.7% であり、これらは WT と変異

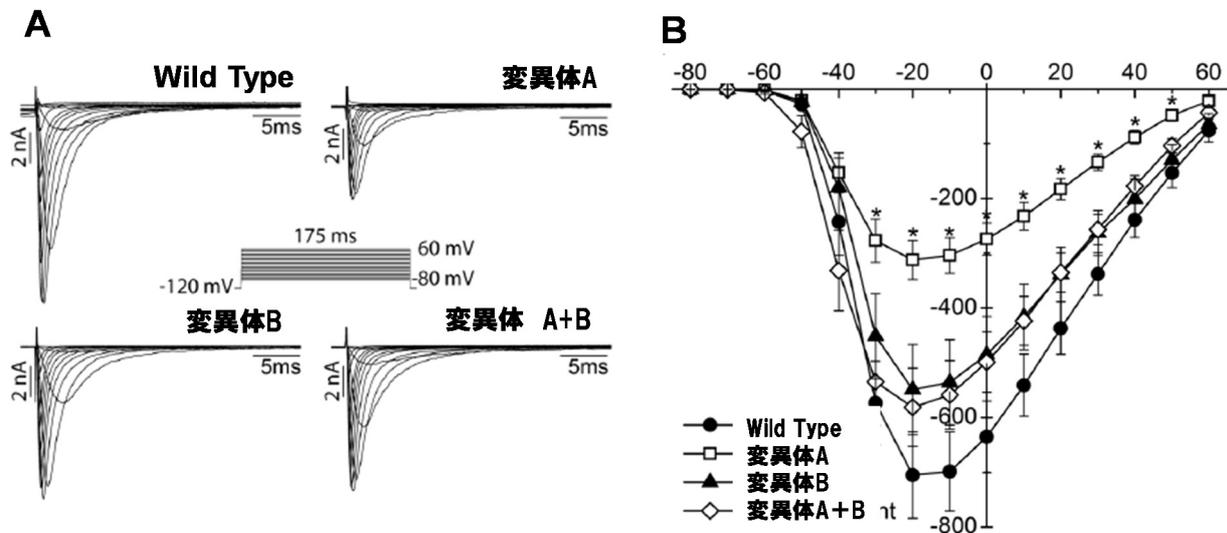


Fig. 2. A:野生型(WT), 変異体 A, 変異体 B および変異体 A+B による Na⁺電流。B: 電流-電圧曲線。

Table 1

Nav1.5	Peak Current (pA/pF)	n	Persistent Current (% of max peak I _{Na})	n	Steady-state Inactivation V _{1/2} (mV)	Slope (mV)	n	Steady-state Activation V _{1/2} (mV)	Slope (mV)	n	Recovery Fast Time Constant (ms)	Recovery Slow Time Constant (ms)	n
WT	-705±79	17	1.4±0.7	5	-79±3.2	5.9±0.5	7	-33±1.7	-5.3±0.3	16	-5.7±0.9	34±12	6
変異体 A	-312±36	6	0.9±0.5	5	-83±1.9	5.5±0.3	6	-35±1.8	-5.8±0.6	5	-5.9±1.2	39±19	6
変異体 B	-549±82	14	1.7±0.8	5	-77±3.2	6.1±0.4	9	-33±1.6	-5.5±0.5	12	-5.2±0.7	56±28	5
変異体 A+B	-581±71	8	0.6±0.3	5	-81±2.2	5.6±0.2	7	-35±1.7	-6.1±0.3	8	-5.2±0.6	69±27	7

体でほとんど変わらないことがわかった (Table 1)。

3.4 活性化と不活性化のキネティクス (速度論的解析)

Na⁺チャンネル活性化および不活性化速度を WT と変異体で比較するため、まず電流のピーク値を 1 として normalize した (Fig. 3 A)。活性化に関し、ピークまでの時間を各テスト電位で調べたところ、いずれも WT と変異体で統計学的差は認められなかった (Fig. 3 B)。一方、不活性化に関しては、変異体 A は WT に比べ遅延していたようなので (Fig. 3 A) 2次指数関数方程式でカーブフィットを行ったところ、早いコンポーネント (構成成分) はいずれの電位でも変化は無かったが、遅いコンポーネントにおいて +20 mV で有意な遅延が認められた (Fig. 3 C)。

また定常状態の活性化における電位依存性について、各電位におけるコンダクタンスを電位に対してプロットし、ボルツマン方程式でカーブフィットすることにより求めた。その結果、WT では Na⁺チャンネルは -60 mV 付近から活性化されはじめ、0 mV でピークに達し、V_{1/2} (最大電流の 50% の電流を与える電位) は -33 mV であった。どの変異体もほとんど活性化の電位依存性は変わらなかった (Fig. 4 A)。

定常状態の不活性化の電位依存性についても、「方法」に従って解析を行った (Fig. 4 B)。WT の Na⁺チャンネルは -100 mV から -30 mV で不活性化され、V_{1/2} (最大不活性化の 50% の電流を与える電位) は -79 mV であった。変異体 A およびダブル変異体 A+B でわずかな脱分極方向の電位依存性のシフトが認められたが、統計学的には有意差は無かった (Fig. 4 B および Table 1)。

不活性化からのリカバリータイムに関して通常用いる 2 パルスプロトコールで調べた結果、WT と変異体でほとんど違いは認められなかった (Fig. 5 および Table 1)。

3.5 Nav1.5 チャンネルの形質膜へのトラフィッキング

変異体 A において、活性化・不活性化のキネティクスがほとんど変化していないにもかかわらず、著しい Na⁺チャンネル電流の低下が認められたことから、変異体 A では形質膜におけるチャンネルの数が減少している可能性が浮上した。私達はこの可能性について検討するため、形質膜のビオチン化実験を行った。HEK293 細胞に WT および変異体 A を遺伝子導入し、細胞表面タンパク質をビオチン化した後、溶解し、NeutrAvidin agarose beads にて回

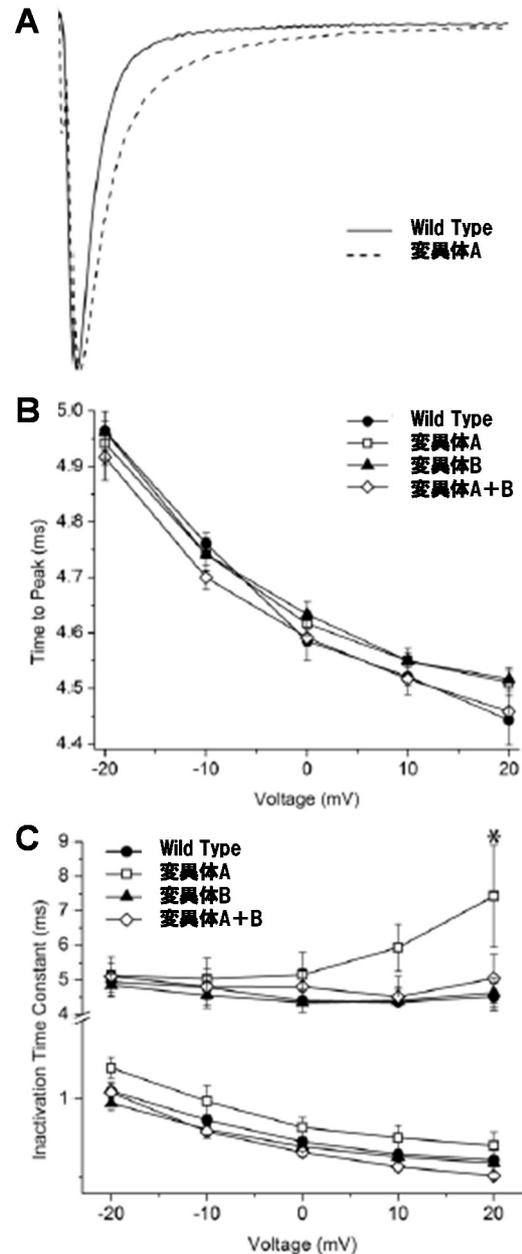


Fig. 3. Na⁺チャンネル活性化, 不活性化のキネティクス

収した。全細胞溶解液およびビオチン化されたタンパク質溶解液の Nav1.5 に対するイムノブロットは、それぞれトータルおよび形質膜における Nav1.5 チャンネル量を反映している (Fig. 6 A)。トータル量は変わらないものの、形質膜における Nav1.5 チャンネル量は WT に比べて変異体 A で著しく減少していた (Fig. 6 A)。一方、ハウスキーピングタンパク質である GAPDH の量は、全細胞溶解液では WT と変異体で変わらなかったため、総タンパク量はそれほど変わらない事、またビオチン化群で GAPDH が認められなかったことから、ビオチン化群が細胞表面タンパク質に特異的なも

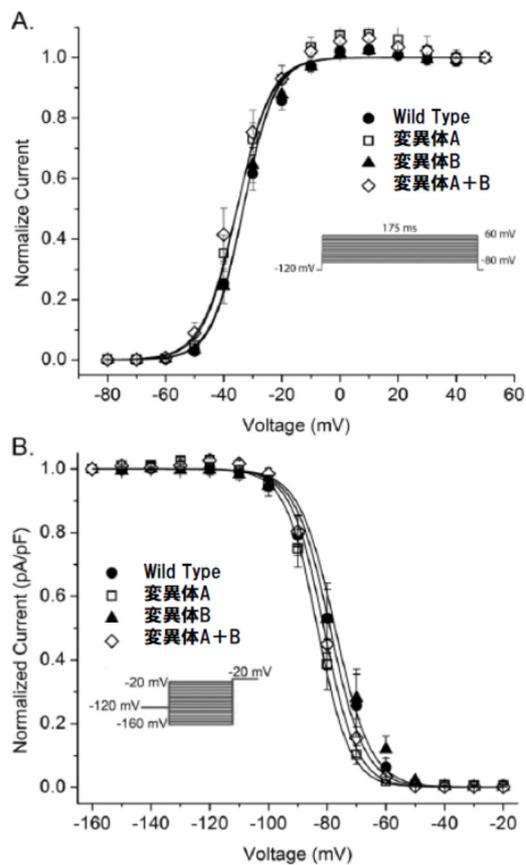


Fig. 4. A:Steady-state activation および B:Steady-state inactivation の電位依存性

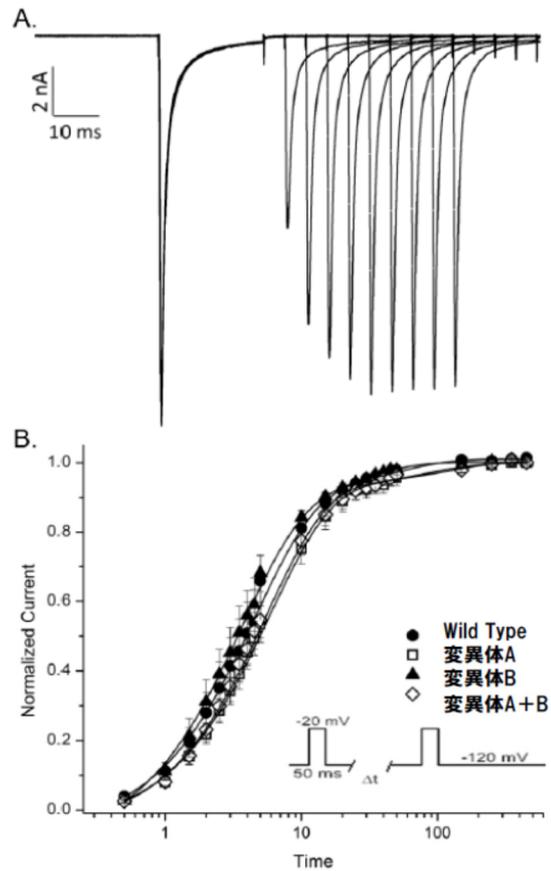


Fig. 5. Recovery from inactivation

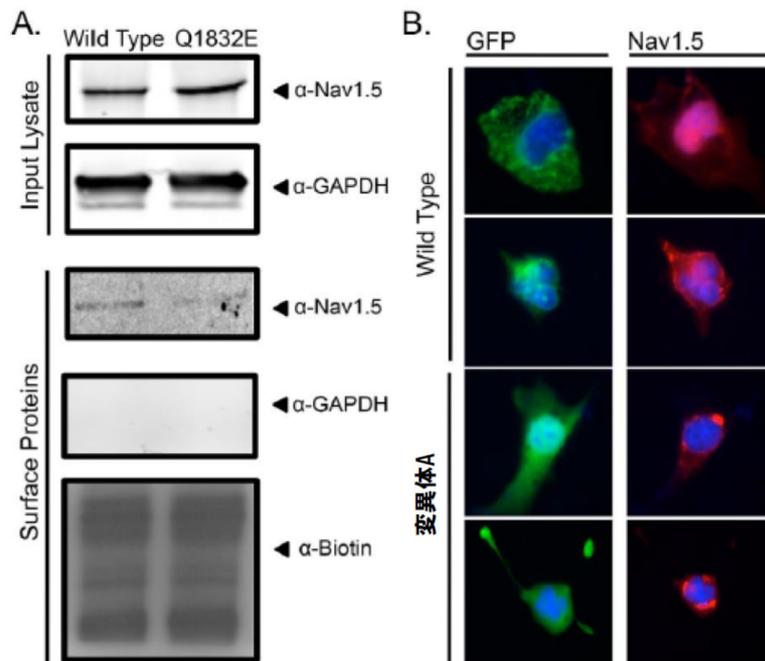


Fig. 6. A:ビオチン化したタンパク質および総タンパク質の Western Blotting. B:免疫蛍光法。HEK293 細胞に WT または変異体 A を遺伝子導入し, Nav1.5 のタンパク質の局在をみたもの。

のであることが示唆された。また、ビオチンに対するイムノブロットも等量のサンプルがイムノブロットに用いられたことを示している。一方、変異体Bおよび変異体A+Bではこのような細胞表面におけるNa⁺チャンネルタンパク量の違いは認められなかった(データ示さず)。

そこで、WTおよび変異体Aについて細胞内局在を蛍光免疫法で調べた。WTのNa⁺チャンネルは、形質膜に強いシグナルが検出された。一方、変異体Aは形質膜というよりもむしろ細胞質内にシグナルが認められた(Fig. 6 B)。ビオチン化の実験と合わせて考えると、変異体Aは細胞表面にあるNa⁺チャンネルの数が少ないため、電流量が減少したのではないかと考えられた。

4. 考察

NY監察事務所は、生後5か月で睡眠中に突然死した女兒のNa⁺チャンネルにおいて、2つの点突然変異を見つけた。私達は、これら変異体について解析を行った。電位依存性Na⁺チャンネル以外、他の不整脈に関連するどのイオンチャンネルにも変異は認められなかった⁽³⁾。Na⁺チャンネル変異はバイオインフォーマティクスの観点から、非常に有害であると予測されていたが、実際の機能解析はされていなかった。私達は、Nav1.5変異チャンネルのゲイティングについて解析を行った。変異体Aでは、不活性化の遅い方の時定数が顕著に増加していたが、その他のパラメータ、すなわち不活性化からのリカバリー時間、定常状態における活性化・不活性化の電位依存性、また持続電流に関し、WTとほとんど差は認められなかった。また、他の変異体(BおよびA+B)は、どのパラメータもWTとほとんど差は認められなかった。以上の結果より、これらのC末端変異はNa⁺チャンネルの開閉にはあまり強い影響を与えないのではないかと推測される。

生物学的に最も興味深いのは、変異Aによる著しい電流密度の減少(44%)である。ビオチン化実験の結果から、この点突然変異が形質膜のチャンネル数の減少によるものであることが示された。Nav1.5チャンネルの総タンパク量はWTと変異体とで変わらなかったことから、転写や翻訳の変化、あるいはタンパク質の分解ではないことが示された。すなわち、形質膜へのトラフィッキング(移行)が阻害されたことが示唆される。免疫蛍光法の結果から、変異体Aのチャンネルタンパク質が形質膜から減少したことのみにらず、

細胞質内に大きな集積が認められた。これは、ミスfoldしたタンパク質によく認められる現象である⁽⁴⁾。変異体Aはブルガダ症候群でも認められた変異であり、今回認められた突然死も、それが原因である可能性がある。変異体Aがなぜ、トラフィッキング異常を起こしているかは不明である。しかし、A領域を含むNa⁺チャンネルのC末端領域(1773-2016残基)は、様々な制御因子と結合することが知られている。例えば、FHF(fibroblast growth factor homologous factor)やカルモジュリンなどが結合することが報告されている^(5, 6)。このうち、FHFは実際、Nav1.5チャンネルの機能とトラフィッキングを制御すること、またFHFのノックダウンにより、Na⁺チャンネルの形質膜発現が抑制されることによりNa⁺電流が減少することが報告されている⁽⁷⁾。

Nav1.5チャンネルはPDZドメインを介してシントロフィンやチロシン脱リン酸化酵素であるPTPH1やSAP97などと結合し、Na⁺チャンネルの生物学的特性を決定していることが知られている⁽⁸⁾。従って、今回、変異体Bがこういったタンパク質と結合しないにもかかわらず、WTとそれほど電流密度も変わらず、キネティクスも変わらなかったのは驚きである。先行研究では、Nav1.5のC末端がチャンネルの活性化、不活性化の電位依存性、また持続電流に大きな役割を担っていることが報告されている。しかし、これらの研究ではC末端の大部分が欠損している。一方、Cormierらの報告では、L1921がストップコドンになると、変異体Bと同様、電流密度の減少以外、キネティクスに変化は無かったことから欠損領域の大きさに依存している可能性がある。

C末端にストップコドンをもたらす変異Bにより、わずかに電流密度が減少した(WTの~73%)。興味深いのは、変異体A+Bが変異体Aのみで認められた顕著な電流密度の減少を示さない事である。このことは、C末端が無いことがNa⁺チャンネルのトラフィッキング欠陥を補填することを意味する。このような例は他にも報告されている。例えば、よくある遺伝子多形であるH558RやQ1077欠損は、SIDSやLQT3症候群、拡張型心筋症、またブルガダ症候群におけるNav1.5チャンネル活性をやわらげる働きが有ることが報告されている^(9,10)。

NY監察事務所から得られる情報だけでは、この2つの変異が同じ染色体上に有るのか、異なる染色体上に有るのか明らかでない。いずれにしても、変異体Aも変異体B

も電流密度が低下しており、また、変異体A+Bも低下している。これらが突然死を起こした患者に悪影響を及ぼさないはずはない。

他の研究同様、私達の実験系も異種発現系であり、実際の心筋細胞とは異なる。心臓に発現している他の制御因子や結合タンパク質が、さらに変異体の性質を変える可能性がある。本研究で見いだされた Na⁺チャンネルの変異は、心臓突然死の原因の1つであると示唆されるが、そのメカニズム解明には更なる研究が必要である。

5. 文献

- 1 Kass, R. S. The channelopathies: novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease. *J Clin Invest* **115**, 1986-1989, doi:10.1172/JCI26011 (2005).
- 2 Brugada, J., Brugada, R. & Brugada, P. Channelopathies: a new category of diseases causing sudden death. *Herz* **32**, 185-191, doi:10.1007/s00059-007-2976-1 (2007).
- 3 Wang, D. *et al.* Cardiac channelopathy testing in 274 ethnically diverse sudden unexplained deaths. *Forensic Sci Int* **237**, 90-99, doi:10.1016/j.forsciint.2014.01.014 (2014).
- 4 Markossian, K. A. & Kurganov, B. I. Protein folding, misfolding, and aggregation. Formation of inclusion bodies and aggresomes. *Biochemistry (Mosc)* **69**, 971-984 (2004).
- 5 Abriel, H. Cardiac sodium channel Na(v)1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 2-11, doi:10.1016/j.yjmcc.2009.08.025 (2010).
- 6 Abriel, H. & Kass, R. S. Regulation of the voltage-gated cardiac sodium channel Nav1.5 by interacting proteins. *Trends Cardiovasc Med* **15**, 35-40, doi:10.1016/j.tcm.2005.01.001 (2005).
- 7 Wang, C. *et al.* Fibroblast growth factor homologous factor 13 regulates Na⁺ channels and conduction velocity in murine hearts. *Circ Res* **109**, 775-782, doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.247957 (2011).
- 8 Petitprez, S. *et al.* SAP97 and dystrophin macromolecular complexes determine two pools of cardiac sodium channels Nav1.5 in cardiomyocytes. *Circ Res* **108**, 294-304, doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.228312 (2011).
- 9 Ye, Y. W. *et al.* Fibroblast growth factor receptor 4 regulates proliferation and antiapoptosis during gastric cancer progression. *Cancer* **117**, 5304-5313, doi:10.1002/cncr.26207 (2011).
- 10 Cheng, J. *et al.* SCN5A rare variants in familial dilated cardiomyopathy decrease peak sodium current depending on the common polymorphism H558R and common splice variant Q1077del. *Clin Transl Sci* **3**, 287-294, doi:10.1111/j.1752-8062.2010.00249.x(2010).

Novel Na⁺ and K⁺ Channel Mutations Responsible for Human Cardiac Sudden Death

Tomoe Nishitani¹, Shigeo Wakabayashi¹, William A. Coetzee²

¹Department of Molecular Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute

²New York University, Langone Medical Center, Departments of Pediatrics

Summary

Sudden infant death syndrome (SIDS), defined as the death of an individual before his or her first birthday, is a major concern in the world. In Japan, the infant mortality rate is 1 death per 6000-7000 live birth. One of the mechanisms underlying SIDS is various mutations in ion channels, because ion channels determine action potential shape, intracellular Ca²⁺ influx/efflux and contractility, thus mutation of ion channels is often responsible for cardiac arrhythmia. By collaboration with the New York City Office of the Chief Medical Examiner, we discovered genetic variation in the SCN5A gene, coding for the Nav1.5 Na⁺ channel, to be associated with a case of SIDS of a five month-old girl who died suddenly in her sleep. Two point mutations occurred at the C terminus of SCN5A gene (mutation A and mutation B). Mutation B results in introduction of a premature stop codon and truncation of the C-terminus. We examined the effects of these mutations when expressed in HEK293 cells, individually or combined, on Nav1.5 channel function and trafficking. The mutation A drastically reduced the Na⁺ channel current density (~ 44% of wild type) and slowed the Na⁺ current inactivation rate. On the other hand, the mutation B and double mutation had negligible effects. None of the mutations affected the voltage dependence of steady-state activation and inactivation or influenced the late Na⁺ current or the recovery from inactivation. Our data with biochemical and immunofluorescent approaches demonstrated that the mutation A decrease the amount of Na⁺ channel protein at the plasma membrane without changing them in whole cells. These results suggest that mutation A caused trafficking defects rather than transcription or translation defects, or enhancement of degradation. Taken together, these data demonstrate that mutation A was sufficient to produce a severely dysfunctional Nav1.5 channel, which likely is a major contributing factor to the sudden death of this SIDS victim.