

# Molecular Genetic Analysis of Long-QT Syndrome with Mutations in HERG

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9502">http://hdl.handle.net/2297/9502</a>

## HERG 遺伝子変異に伴う遺伝性QT延長症候群の分子遺伝学的研究

金沢大学医学部医学科内科学第二講座 (主任：馬淵 宏教授)

林 研 至

QT延長症候群 (long-QT syndrome, LQTS) は、心電図上QT時間の延長を認め、多形性心室頻拍や心室細動などの心室性不整脈により失神や突然死をきたす心疾患である。遺伝性QT延長症候群は、常染色体優性遺伝で先天性難聴を伴わないRomano-Ward症候群と、常染色体劣性遺伝で先天性難聴を伴うJervell, Lange-Nielsen症候群とに分類される。最近の分子遺伝学的解析により、心筋の電位依存性Kチャンネルのサブユニットをコードする*KVLQT1*, *HERG*, *KCNE1*, *KCNE2*と、心筋の電位依存性Naチャンネルのサブユニットをコードする*SCN5A*の遺伝子変異が順次同定され、遺伝性QT延長症候群の原因であると報告されている。本研究では、QT延長症候群患者において*HERG*遺伝子変異を同定し、遺伝子変異によるカリウムチャンネル機能異常について、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて変異遺伝子の電流特性を検討した。対象者の末梢白血球より分離した高分子DNAを用いて、*HERG*遺伝子の膜貫通領域とポア領域においてプライマーを設計し、PCRによりDNA断片を増幅させてPCR一本鎖構成体多型 (PCR-single strand conformational polymorphism) 法および直接塩基配列決定法 (direct sequence) を用いて遺伝子変異の同定を行った。さらに、PCR制限酵素切断多型 (PCR-restriction fragment length polymorphism) 法により遺伝子変異を確認した。部位特定突然変異導入法を用いて、変異型cDNA、さらにcRNAを合成した。合成したcRNAをアフリカツメガエルの卵母細胞に注入し、卵母細胞に発現した膜電流を2本の電極を用いた電位固定法で記録し、電気生理学的に検討した。

臨床的に診断されたQT延長症候群106症例の検討の結果、1家系3名において、*HERG*遺伝子S4領域534番目のアミノ酸アルギニンをコードするコドンCGCがシステインをコードするコドンTGCへと変化する変異Arg534Cysを検出した。遺伝子変異を認めた3人ともQT時間の有意な延長を認め、臨床的にLQTSと考えられた。電気生理学的検討の結果、Arg534Cys変異は*HERG*電流を多少抑制するとともに*HERG*チャンネルの脱活性化を促進させていた。また、別の1家系3名において、*HERG*遺伝子S5-S6リンカー内S6近傍の637番目のアミノ酸であるグルタミン酸をコードするコドンGAGがリジンをコードするコドンAAGへと変化する変異Glu637Lysを検出した。この変異は、これまでに報告がなく、新変異であった。遺伝子変異を認めた3人ともQT時間の有意な延長を認め、臨床的にLQTSと考えられた。電気生理学的検討の結果、Glu637Lys変異は優性的阻害をきたし、*HERG*電流を著しく抑制した。

**Key words** long QT syndrome, human *ether-a-go-go*-related gene, potassium channel, gene mutation, dominant negative suppression

QT延長症候群 (long QT syndrome, LQTS) は、体表面心電図上QT時間の延長を認め、多形性心室頻拍 (torsade de pointes, TdP) や心室細動などの心室性不整脈により失神や突然死をきたす心疾患である<sup>1)</sup>。

LQTSは、病因別に遺伝性と二次性に分類される。遺伝性QT延長症候群は、常染色体優性遺伝で先天性難聴を伴わないRomano-Ward症候群<sup>2)</sup>と、常染色体劣性遺伝で先天性難聴を伴うJervell, Lange-Nielsen症候群<sup>3)</sup>とに分類される。一方、二次性QT延長症候群は、薬剤<sup>4)</sup> (抗不整脈薬, 向精神薬, 抗菌薬, 抗ヒスタミン薬など), 徐脈, 電解質異常, 脳血管障害などによりQT時間の著明な延長とTdPをひきおこす症候群である。

遺伝性QT延長症候群の病因として、以前は心臓に対して左

交感神経の緊張が優位であるために膜電位脱分極からの再分極異常がもたらされるとする外因説が提唱されていた。この“sympathetic imbalance”理論の根拠として、実験的に左星状神経節刺激と右星状神経節ブロックによりQT時間の延長が認められること<sup>5)</sup>, 左星状神経節ブロックやβ遮断薬がLQTSの治療に有効であること<sup>7)</sup>などがあげられてきた。これに対し、1980年代後半より、心筋細胞イオンチャンネルの異常によって再分極障害がもたらされるとする内因説が提唱されるようになった。1991年、Keatingら<sup>8)</sup>はRomano-Ward症候群の遺伝子異常について報告し、第11番染色体短腕15.5上のHarvey ras-1遺伝子の近傍のDNAマーカーと連鎖するLQTS家系を初めて報告した。この遺伝子座は、その後彼ら<sup>10)</sup>によってさらに正確にク

平成12年11月27日受付, 平成12年12月25日受理

Abbreviations: APD, action potential duration; Arg, arginine; Cys, Cysteine; dd, dideoxy; Glu, glutamic acid; *HERG*, human *ether-a-go-go*-related gene; IKr, rapidly activating delayed rectifier potassium current; LQTS, long-QT

ローニングされ、1996年心筋細胞イオンチャネルのサブユニットをコードする遺伝子であると報告されてLQT1と分類されるようになった。現在までに、Romano-Ward症候群に関しては、LQT1 (染色体11p15.5, *KVLQT1*), LQT2 [7q35-36, *HERG*, (human *ether-a-go-go*-related gene)]<sup>11)</sup>, LQT3 (3q21-24, *SCN5A*)<sup>12)</sup>, LQT4 (4q25-27)<sup>13)</sup>, LQT5 (21q22.1-22.2, *KCNE1*)<sup>14)</sup>, LQT6 (21q22.1-22.2, *KCNE2*)<sup>15)</sup>の6種、またJervell, Lange-Nielsen症候群に関しては、JLN1 (染色体11p15.5, *KVLQT1*)<sup>16)17)</sup>, JLN2 (21q22.1-22.2, *KCNE1*)<sup>18)</sup>の2種が報告されている。*KVLQT1*, *HERG*, *KCNE1*, *KCNE2*は、心筋の電位依存性Kチャネルのサブユニットをコードする遺伝子である。*KVLQT1*は $\alpha$ サブユニットで、 $\beta$ サブユニットである*KCNE1*と合して心筋の遅延整流K電流の遅い成分である $I_{Kr}$  (slowly activating delayed rectifier potassium current)を形成する。同様に、 $\alpha$ サブユニットである*HERG*は $\beta$ サブユニットである*KCNE2*と合して心筋の遅延整流K電流の速い成分である $I_{Ks}$ を形成する。一方*SCN5A*は、心筋の電位依存性Naチャネルのサブユニットをコードする遺伝子である。イオンチャネル遺伝子における変異が実際にどのような機能異常をもたらしているのかを検討するため、変異チャネルをアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させてイオンチャネル電流を直接測定し、その機能解析が行われた。その結果、LQTSでは、電位依存性Kチャネルの機能喪失異常 (loss of function; LQT1, LQT2, LQT5, LQT6)による外向き電流の減少、あるいはNaチャネルの機能獲得異常 (gain of function; LQT3)による内向き電流の増加により心筋活動電位持続時間が延長し、QT時間が延長することが証明された。

LQTSの遺伝子解析が進むにつれて、心電図上のT波の形態<sup>19)</sup>や失神発作の誘因<sup>20) 22)</sup>、あるいは患者の予後<sup>23)24)</sup>が遺伝子型により異なるといった遺伝子型と臨床病型の関連、さらには遺伝子型により有効な治療法が異なることが報告<sup>25) 26)</sup>された。したがって、個々の遺伝子変異における電流特性の解析ならびに臨床病型の解明が急務となっている。そこで本研究では、我々のもつ遺伝性QT延長症候群患者について*HERG*遺伝子変異の検索を行い、2つの特徴ある変異を見出した。さらにそれらの変異の電気生理学的特性および臨床的特徴について検討した。

## 対象および方法

### I. 対象

対象は、心電図上QTc時間の有意な延長 (男性450ミリ秒以上、女性460ミリ秒以上)が認められた患者106名である。QTc時間は、12誘導心電図でIIあるいはV<sub>5</sub>誘導においてQT時間を測定し、Bazettの式により心拍数補正した修正QT時間とした。また、Schwartzら<sup>30)</sup>によるLQTSの診断基準に従ってLQTスコアを算出した。これら臨床診断されたLQTS患者を*HERG*遺伝子変異の検索・同定とそれに伴うLQTSの臨床病型について、さらにアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた変異遺伝子の電流特性について検討の対象とした。

### II. 方法

#### 1. 高分子DNA抽出

対象者全例から検査に先だって十分な説明に基づく同意を得た後、末梢静脈血10 mlをEDTA-2Naを抗凝固剤として採取し4℃にて移送、-20℃にて保存した。この末梢血を室温にて解凍後Triton X-100融解変法<sup>31)</sup>にて高分子DNAを単離した。すなわち融解液 (320 mM ショ糖液, 1% Triton X-100, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6)にて赤血球を溶血させ、遠心により沈澱として白血球を集めた。これをプロテアーゼ (Sigma, St. Louis, USA)にて消化後、フェノール-クロロホルム (1:1)で1回、続いてクロロホルム-イソアミルアルコール (24:1)にて2回抽出し、最後にエタノール沈澱によりDNAを分離した。こうして得られたDNAをTris-EDTA緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA-2Na, pH 8.0)に溶解の上260 nmにおける吸光度測定により濃度を求めた。

#### 2. PCR

Curranら<sup>11)</sup>の報告を参考に、GenBankのデータベースに登録されているヒト*eag*関連遺伝子 (*HERG*)配列から、膜貫通領域とポアを含むエクソンについて19-25塩基長のプライマー計6組を作成した (図1)。

プライマーはDNA合成機モデルABI381A (Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA)を用いベータシアノエチルホスホアミダイド法<sup>32)</sup>にて合成した。アンモニア水に溶解し55℃で一晩静置したうえで-20℃に冷却、真空下で遠心して乾燥、再滅菌蒸留水1 mlに溶解しカラムNAP-5 (Pharmacia-LKB, Uppsala, Sweden)に通して精製した。その後200倍に希釈し260 nmでの吸光度より濃度を測定し10  $\mu$ Mになるように濃度を調整した。

DNA断片の増幅にはSaikiら<sup>33)</sup>によるPCR法を用いた。高分子DNA 1  $\mu$ gを鋳型DNAとして40  $\mu$ Mのプライマー1セットと終濃度200  $\mu$ Mの各デオキシヌクレオチド (dATP, dCTP, dGTP, TTP)と2.5単位のTaqポリメラーゼ (Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, USA)を、0.01%ゼラチンを含む緩衝液 [終濃度10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>]に加え、再滅菌蒸留水を計50  $\mu$ lとなるように加え攪拌した。遠心して反応液を集め50  $\mu$ lのミネラルオイルを滴下して蒸発を防ぎ、94℃ 1分、それぞれのプライマーのT<sub>m</sub>で1分、74℃ 1分を基本にそれぞれのセット毎に決定した温度条件のもと、30サイクルの反応を行った。

増幅したDNA断片は1%の通常のアガロースゲルに鎖長マーカーとして $\phi$ -X174/*Hae*III消化物 (東洋紡, 東京)と共に泳動して断片長を確認した。

#### 3. PCR一本鎖構成体多型 (PCR-single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP) 法

泳動用緩衝液としてTris-HCl 54 g, ホウ酸27.5 g, 0.5 M EDTA 20 mlに蒸留水を加え3 Lにしたものを保存用の5  $\times$  TBE (Tris-boric acid-EDTA) 泳動用緩衝液とし泳動直前に1  $\times$ の濃度に希釈した。

0.5 mM EDTA 2  $\mu$ l, 5 N NaOH 10  $\mu$ l, 滅菌再蒸留水88  $\mu$ lを混合したアルカリ溶液を作り、PCR産物8  $\mu$ lにアルカリ溶液2  $\mu$ lを加え42℃ 3分、95℃ 2分加熱後、0℃に急冷し一本鎖に変性させた。そのうえで、10%ポリアクリルアミドゲル (アトー, 東京)を用いてTBE緩衝液中で4℃のもと40 V, 12-16時

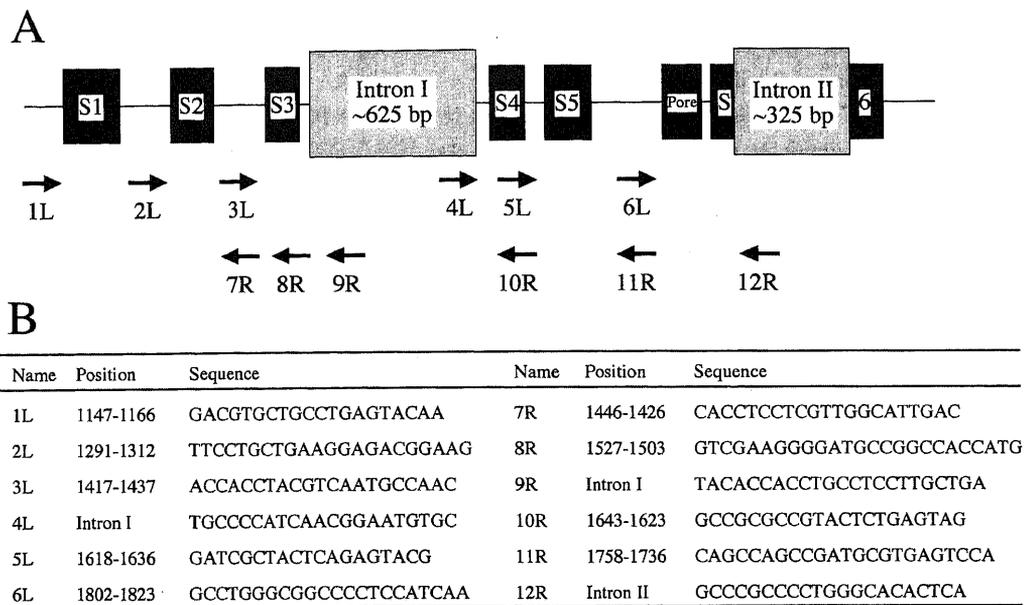


Fig. 1. Partial genomic structure of *HERG* and location of PCR primers used in this study. (A) Regions encoding the predicted membrane-spanning domains (S1-S6) and the pore domain are indicated. The DNA sequences for the intron-exon boundaries are as follows (small letters indicate intron): intron I, 5'-AGGAGgtgggg...ccccagCTGATC-3'; intron II, 5'-TGGCTgtgagt...ccccagCCCTC-3', (B) *HERG* PCR primers. All primers are shown in 5' to 3' direction. Sense strand oligonucleotides are indicated with an L and antisense oligonucleotides are indicated with an R.

間で泳動した。

染色には Bio-Rad 銀染色キット (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA) を用い、プロトコールに従って銀染色を行った。すなわち 10% エタノール, 5% 酢酸混合液 200 ml にて 15 分間ゲルの固定を行い、酸化剤 100 ml にて 5 分間酸化させた。蒸留水で 15 分間に 3 回水を換えながらすぎ余分な酸化剤を除き、銀染色溶液を加え 20 分間振盪させた。その後 30 秒以内に洗浄し現像液を加えバンドの出現を確認した。ある程度以上バンドが濃くなった時点で蒸留水で 1 分間すすいだ後、5% 酢酸 100 ml を加え反応を停止させた。30% エタノール, 5% 酢酸混合液 200 ml を保存液とし、30 分以上保存液内にゲルを浸した後、ゲルをセルロースフィルム内に入れて保存した。

#### 4. 自動化直接塩基配列決定法 (direct sequencing)

PCR で増幅した DNA 断片を 1% の通常のアガロースゲルに鎖長マーカーとして  $\phi$ -X174/*Hae*III 消化物 (東洋紡, 東京) と共に泳動し、断片長を確認した上で、目的とする DNA 断片のバンドを含む部分を切り出した。マイクロピュアとマイクロコン-50 (Amicon) を組み合わせてこの DNA 断片を 10,000 rpm で 10 分間遠心した。再滅菌蒸留水 25  $\mu$ l を加えて再度遠心し、濃縮すると同時に余分なプライマー, およびヌクレオチドを除去し鋳型 DNA とした。これにダイ・ターミネーター・サイクルシークエンス・キット (Perkin-Elmer) を用いサイクルシークエンス法を行った。

自動化直接塩基配列決定法として ABI PRISM TM310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer) を用いた。これは、キャピラリー型の塩基配列解析装置で、読み取られたデータはパーソナルコンピューター Power Macintosh G3 (Apple Computer, USA) 本体内蔵の固定ディスクに数値データとして保存された。反応終了後に塩基配列解析を自動的に行い、配列を文字データおよび波形のグラフとして出力した。

#### 5. PCR制限酵素切断多型 (PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 法

変異配列が決定された後、変異の存在の確認およびスクリーニングのため特定の制限酵素で切断部位が生じるようにプライマーを設計した。一侧に通常のプライマーを、反対側に変異プライマーを用い、温度条件を再度調節したうえで PCR 法により強制的に変異配列を導入した DNA 断片を増幅した。その上でピペットにてミネラルオイルの下層より PCR 産物を取り出し、切断部位に応じた制限酵素とその反応用緩衝液を加え酵素の至適温度条件下にて 6 時間反応させた。反応産物の染色には Bio-Rad 銀染色キットを用い、プロトコールに従って銀染色を行った。

#### 6. 部位特定突然変異導入法および cRNA 合成

変異を導入する野生型 *HERG* cDNA は pGH 19 ベクターの *Bam* HI-*Eco* RI 部位にサブクローニングしたものであり、Dr Gail A Robertson (University of Wisconsin-Madison Medical School, Madison, USA) より供与された。変異を導入した合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて組み替え PCR 法を行い、目的の変異を含む cDNA 断片を作成し、さらにカセット変異法により元のプラスミドの相当部分と置き換えた<sup>30)</sup>。 *HERG* 遺伝子 534 番目の Arg を Cys へ変える塩基置換については、2 組のプライマー (HGUPP と HG534AS および HG534S と HGLow) (表 1) を用い、それぞれ 531 bp と 440 bp のミスマッチを持つ cDNA 断片を作成した。引き続き、2 つの PCR 産物を HGUPP と HGLow を用いて増幅、結合させた。970 bp の PCR 産物を *Eco*O65I と *Bgl* II により切断し、野生型 *HERG* cDNA の *Eco*O65I-*Bgl* II 部位と置き換えた。 *HERG* 遺伝子 637 番目の Glu を Lys へ変える塩基置換については、1 組のプライマー (HGUPP と HG637AS) (表 1) を用いて 840 bp のミスマッチを持つ cDNA 断片を作成した。引き続き PCR 産物を *Eco*O65I と

Table 1. Oligonucleotide primers for constructing R534C and E637K *HERG* mutant

Name	Position	Sequence
HGUPP	1058-1082	CCAGTGACCGTGAGATCATAGCACC
HGLOW	2049-2028	GAACTCCCGCACCCGAGCATC
HG534S	1589-1611	TGCGGCTGGTGTGCGTGGCGCGG
HG534AS	1611-1589	CCGCGCCACGC <u>A</u> CACCAGCCGCA
HG637AS	1923-1895	GGAGAAGATCTTCTT <u>T</u> TGAGTTGGTGTGG

The mutated bases are underlined

*Bgl* IIにより切断し、野性型*HERG* cDNAの*Eco*O65I-*Bgl* II部位と置き換えた。

野性型および変異型cDNAを*Not* Iを用いて切断し、mMESSAGE mMACHINE T7 Kit (Ambion)のT7ポリメラーゼを用いてそれぞれのcRNAを合成した。

7. アフリカツメガエルでの導入遺伝子の発現

1) cRNAのアフリカツメガエル卵母細胞への注入

アフリカツメガエル(北日本生物教材, 青森)を水中で低温麻酔し下腹部より卵巣を取り出して、Barth変法培養液(modified Barth's solution, MBS)(87.4 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES, 0.82 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.66 mM NaNO<sub>3</sub>, 0.74 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>Oを10 N NaOHでpH 7.6に調整したもの)に移し洗浄した。鋭利ピンセットを用いて房を開け、卵母細胞を1個ずつ丁寧に取り出した。卵母細胞はDumont分類のV~VI相で、動物極と植物極の境界の鮮明なものを選んだ。

Romano-Ward症候群は常染色体優性遺伝形式のLQTSであり、一方の対立遺伝子は正常型*HERG*、他方は変異型*HERG*である。従って、野性型*HERG*単独のcRNA(0.036 ng/ nl)と変異型*HERG*単独のcRNA(0.036 ng/ nl)に加え、両者を等量混合したcRNA(0.072 ng/ nl)を乾熱滅菌(200℃、2時間)したガラス毛細管を用いて卵母細胞に50 nl/ 個ずつ注入した。cRNAを注入した卵母細胞を50 μg/ mlペニシリン・ストレプトマイシンを含んだMBSに移し、16℃で3日間培養した。

2) 電気生理学的アッセイ

卵母細胞の膜電流を、2本の電極を用いた電位固定法で増幅器(Axoclamp 2A, Axon Instruments, Foster City, USA)を用いて記録した。2本の電極(電流を注入する電極と電位を測定する電極)は、3 M KClで充填し、抵抗を0.5-2.0 MΩとしたガラス微小電極(Glass IBBL)(World Precision Instruments, New Haven, USA)を用いた。外液はND 96緩衝液(96 mM NaCl, 2 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPESを含み、NaOHでpH 7.6に調節したもの)を用いて室温(18~20℃)で測定した。静止膜電位が-40 mVより深い卵母細胞のみを用いた。

コントロールはH<sub>2</sub>Oを注入した卵母細胞を用いた。その膜電流の大きさは、0.4 μA以下でリーク電流と変わらなかった。

データの収集および解析は、pCLAMP software (version5.5.1)とDigi DATA 1200 A/D converter (Axon Instruments, Foster City, USA)を用いてパーソナルコンピュータ上で行った。測定された末尾電流を、Delta Graph(日本ポラロイド, 東京)を用いて以下の式に示すボルツマン関数に一致させた。

$$I=I / [1+\exp\{(V_{1/2}-V) / K\}]$$

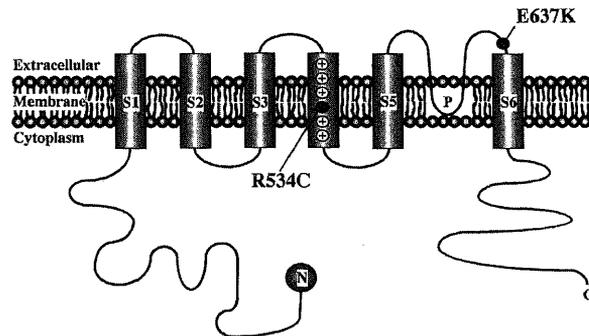


Fig. 2. Scheme of predicted topology of *HERG* and locations of LQTS-associated mutations. *HERG* consists of 6 putative transmembrane segments (S1 to S6) and a pore (P) region. Closed circles indicate the locations of LQT-associated mutations in this study.

ここで、Iは比末尾電流を、V<sub>1/2</sub>は1/2の大きさの電流が活性化されるのに必要な電位を、V<sub>i</sub>はテスト電位を、Kはスローブファクターを示す。

成 績

I. *HERG* 遺伝子解析結果

LQTS発端者106例(男性40例, 女性66例, 平均QTc時間497 ms)に対して*HERG*遺伝子解析を行った。そのうち、プライマー対4L-10Rおよび6L-12Rを用いて行ったPCR-SSCP法において、各々1例ずつ異常バンドが認められた。引き続き直接塩基配列決定法による変異の同定を行ったところ、*HERG*遺伝子S4領域およびS5-S6リンカ-内のS6近傍においてミスセンス変異が同定された(図2)。前者は534番目のArg, RをCys, Cへ変える変異(R534C)で、1998年Itohら<sup>29)</sup>によって報告された変異と同じであった。一方、後者は637番目のGlu, EをLys, Kに変える変異(E637K)で、今までに報告のない新しい遺伝子変異であった。以下に、それぞれのミスセンス変異の臨床的特徴および電気生理学的特徴について記述する。

II. *HERG* 遺伝子R534C変異の検討

1. 臨床像の検討

発端者は28才の男性で、これまでに睡眠中に全身痙攣を伴う意識障害を2度認めたことがある。安静時心電図上QTc時間は0.49秒と延長していた(図3)。また、トレッドミル運動負荷にて心拍数は191拍/分まで上昇し、負荷後の回復期にQTc時

間のさらなる延長を認めた(図4)。なお、聴力、血清電解質はともに正常であった。先天性QT延長症候群の診断基準のスコアは合計5点で、確診例と考えられた。発端者の一卵性双生児である兄と母親にもQTc時間の延長が認められた(図3)が、両者とも失神の既往は認めなかった。なお、一卵性双生児の兄と母親のLQTSスコアはそれぞれ5点および4点でいずれも診断

確定と考えられた。

## 2. HERG遺伝子解析の結果

プライマー4L-10Rを用いて行ったPCR-SSCP法において、発端者、一卵性双生児である兄、母親において異常バンドが検出された(図5A)。引き続き直接塩基配列決定法による遺伝子変異配列を決定したところ、異常バンドが認められた3人にお

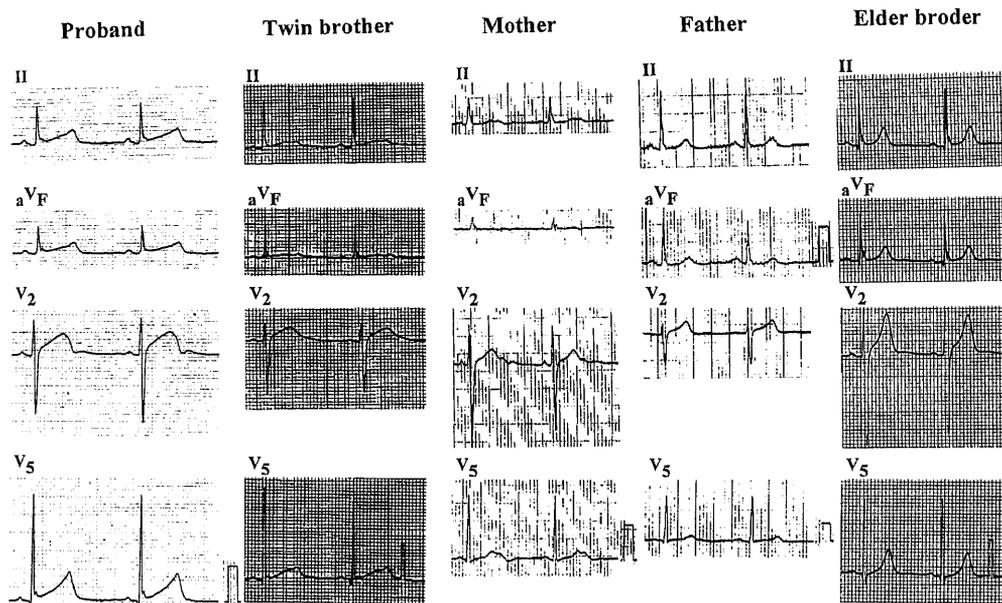


Fig. 3. Electrocardiograms (leads II, aVF, V<sub>2</sub>, V<sub>5</sub>) from the LQTS family members. The proband, his identical twin brother, and his mother had QTc intervals of 0.49, 0.51 and 0.47 sec, respectively. The QTc intervals of the father and elder brother of the proband were within normal limits. Scale bars are illustrated in electrocardiograms.

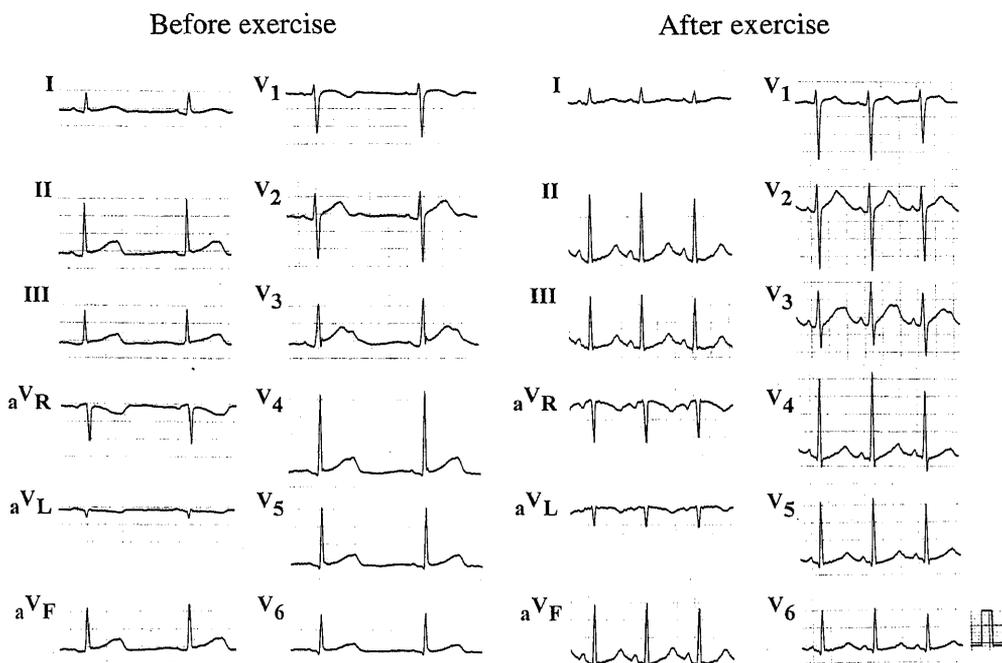


Fig. 4. Twelve-lead electrocardiograms of the proband at rest and after treadmill exercise test. The QTc interval increased from 0.47 sec at rest to 0.60 sec after exercise. Scale bars are illustrated in electrocardiograms.

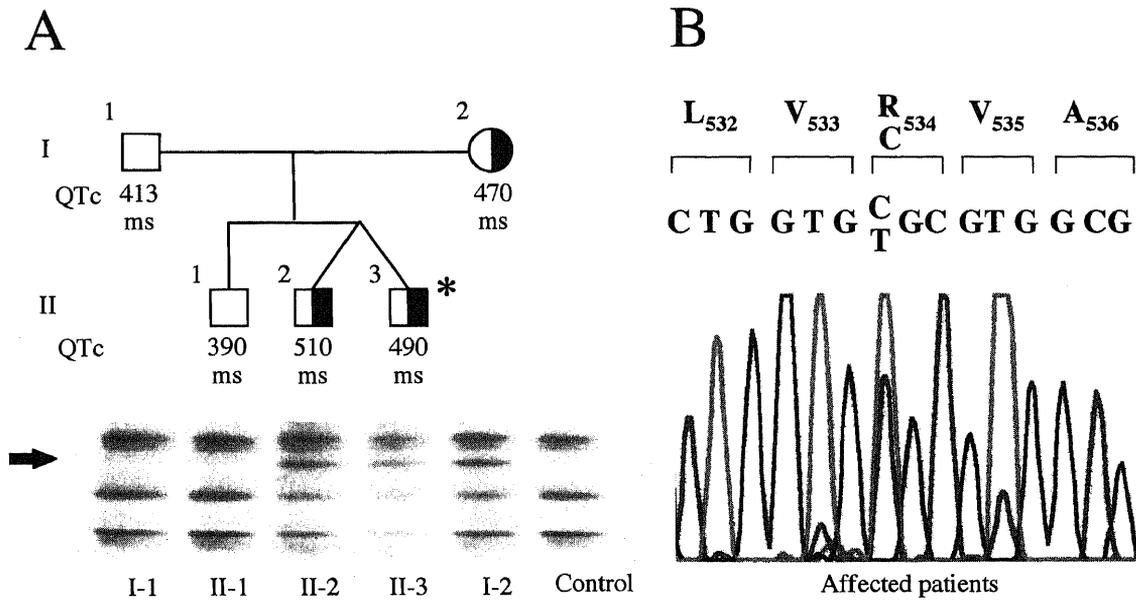


Fig. 5. Mutation analysis. (A) The pedigree and PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analyses using primer pair 4 L-10R. The bars along the right side indicate the control pattern. The aberrant conformer in I-2, II-2, and II-3 is indicated by an arrow. The asterisk (\*) in the pedigree indicates the proband. The square (□) and the circle (○) in the pedigree indicate male and female, respectively. I, II, indicate generations. Half-closed squares (◐) indicate affected male, and half-closed circle (◑) indicates affected female. B. DNA sequence analysis of aberrant conformers reveals a nucleotide substitution in the proband, his mother, and his twin brother. Transition occurs in the fourth membrane-spanning domain of the *HERG* protein, leading to a missense mutation.

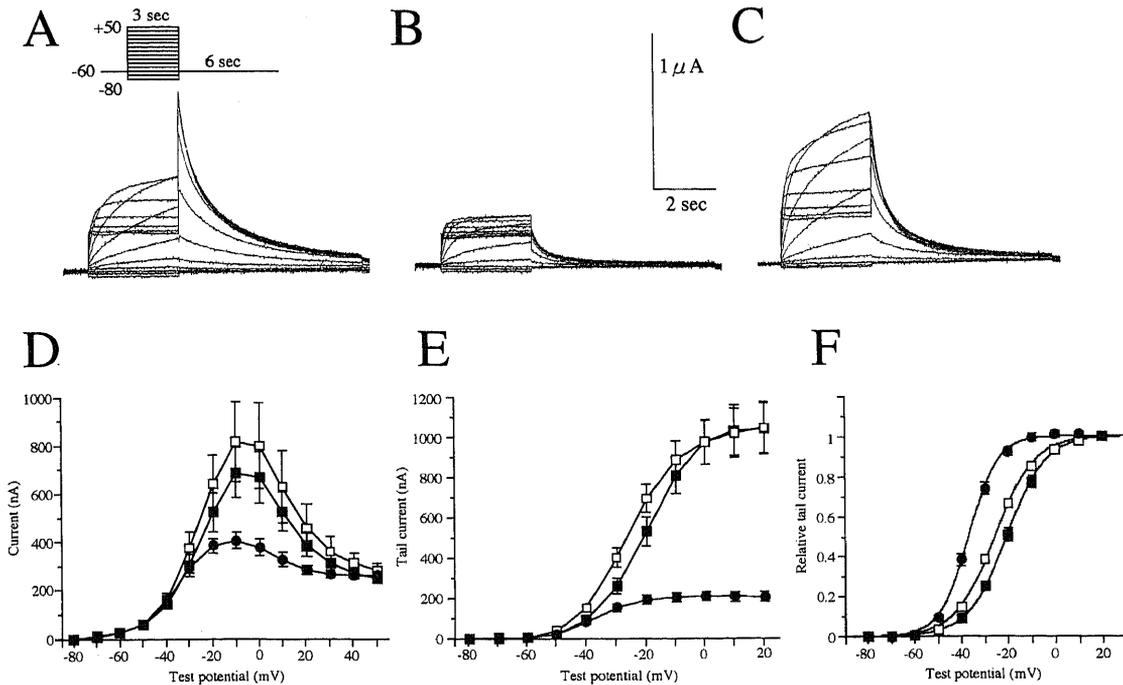


Fig. 6. Voltage-dependent activation of expressed currents in oocytes injected with wild type (WT) cRNA, R534C cRNA, and a combination of WT cRNA and R534C cRNA. (A-C) Expressed currents in oocytes injected with 1.8 ng WT cRNA (WT 1.8) (A), 1.8 ng R534C cRNA (R534C 1.8) (B), 1.8 ng WT cRNA and 1.8 ng R534C cRNA (R534C/WT) (C). Depolarizing test pulses were applied from a holding potential of -60 mV to various potentials between -80 mV and +50 mV in 10 mV increments for 3 seconds, followed by hyperpolarizing pulse to -60 mV for 6s. The voltage protocol is illustrated in the inset in panel (A). (D) Current-voltage (I-V) relationships for peak currents recorded during depolarizing pulses in oocytes injected: ■, WT 1.8 (n=9); ●, R534C 1.8 (n=8); □, R534C/WT (n=10). (E) I-V relationships for amplitudes of tail currents in oocytes injected: ■, WT 1.8 (n=8); ●, R534C 1.8 (n=8); □, R534C/WT (n=10). (F) Normalized I-V relationships for amplitudes of tail currents in oocytes injected: ■, WT 1.8 (n=8); ●, R534C 1.8 (n=7); □, R534C/WT (n=10). Amplitudes of tail currents as a function of the test potentials were fitted to a Boltzmann function as described in Methods.

いて *HERG* 遺伝子 S4 領域の 534 番目の Arg をコードする CGC から Cys をコードする TGC への変異が認められた (図 5B)。変異した T のバンドと正常な C のバンドは共存しており、変異 Arg 534 Cys のヘテロ接合体であった。

### 3. 電気生理学的検討

#### 1) 発現電流の定量的検討

図 6 の A ~ C に、cRNA を卵母細胞に注入して記録した代表的な発現電流を示す。注入した cRNA はいずれも 1.8 ng である [A, 野性型 (wild type, WT) (WT 1.8); B, R534C (R534C 1.8); C, 両者を等量混合した cRNA (R534C / WT) である.]。A の WT においては、野性型 *HERG* 電流はピーク電流に引き続いて大きな末尾電流が記録された。ピーク電流は電位依存的に大きくなったが、テスト電位が -10 mV を超えると逆に小さくなった。一方、末尾電流は電位依存的に大きくなった。B の R534C においては、単独でも発現電流が記録されており、機能的なチャンネルが形成されていることが示唆された。C の R534C / WT においては、発現電流の大きさは野性型単独とほぼ同じであったが、末尾電流の曲線の傾きが野性型と比べて急峻であった。

図 6 D に WT 1.8, R534C 1.8, R534C / WT の脱分極中のピーク電流の電流-電圧曲線を示す。電流値は -10 mV 付近で最大となり、それよりプラス側では減少する内向き整流性を呈してい

た。

図 6 E に、WT 1.8, R534C 1.8, R534C / WT の各テスト電位に対する末尾電流の大きさをプロットしたグラフを示す。-60 mV ののち +20 mV の脱分極テストパルスを与えた時に測定された末尾電流の大きさは、WT 1.8 が  $1045 \pm 129$  nA (n=8), R534C 1.8 が  $205 \pm 25$  nA (n=10), R534C / WT が  $1045.3 \pm 126$  nA (n=8) であった。このように、R534C 変異は野性型 *HERG* チャンネルの機能 (電流値) を優性阻害的には抑制しなかった。

#### 2) キネティクスの検討

図 6 F に、各テスト電位に対する末尾電流の相対的な大きさをプロットしたグラフを示す。比電流が 1/2 に達する電位 ( $V_{1/2}$ ) は、WT 1.8 が  $-20.5 \pm 3.1$  mV (n=8), R534C / WT が  $-27.1 \pm 1.3$  mV (n=7), R534C 1.8 が  $-36.0 \pm 2.8$  mV (n=10) であった。スロープファクター (K) は、WT 1.8 が  $8.0 \pm 0.9$  mV (n=8), R534C / WT が  $7.8 \pm 0.9$  mV (n=7), R534C 1.8 が  $6.2 \pm 1.1$  mV (n=10) であった。R534C 1.8 と R534C / WT の  $V_{1/2}$  は、WT 1.8 と比較して有意に陰性電位にシフト ( $p < 0.01$ , R534C 1.8, R534C / WT versus WT 1.8) し、R534C 1.8 の K は WT 1.8 に比して有意に低下 ( $p < 0.01$ , R534C 1.8 versus WT 1.8) していた。以上のように、R534C 変異は *HERG* チャンネルの活性化の電位依存性に影響を与えていた。

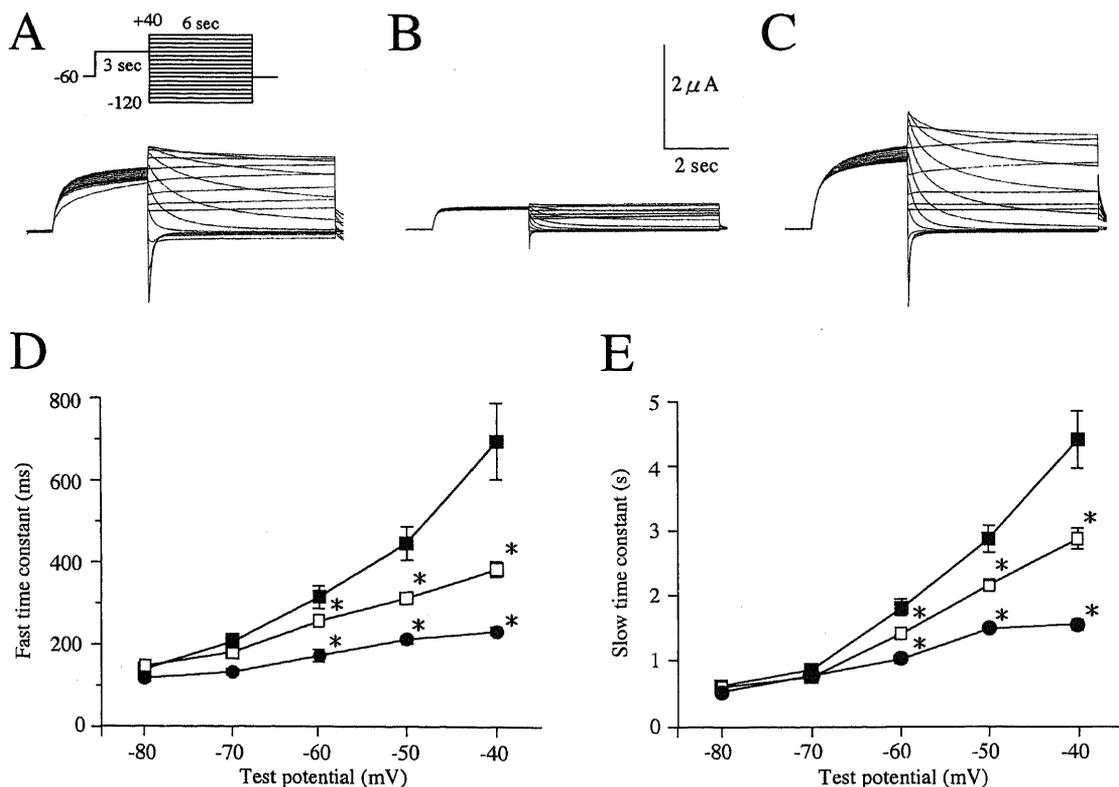


Fig. 7. Deactivation time course of expressed currents in oocytes injected with WT 1.8, R534C 1.8 and R534C/WT. A conditioning pulse to +0 mV for 3 s from a holding potential of -60 mV was applied, followed by various test pulses between -120 mV and +40 mV in 10 mV increments for 6 s. The voltage protocol is illustrated in the inset in panel (A). (A-C) Representative current traces are those from oocytes injected with WT 1.8 (A), with R534C (B) and with R534C/WT (C). Deactivation time constants were measured by fitting deactivating currents during test pulses between -80 and -40 mV with double exponentials. (D) Fast and (E) slow components of deactivation time constants as a function of test potentials. ■, WT 1.8 (n=6); ●, R534C 1.8 (n=9); □, WT/R534C (n=6). \* $p < 0.05$ , R534C 1.8, R534C/WT versus WT 1.8.

次に脱分極パルスのあと長い過分極パルスを与え、脱活性化の経過を検討した(図7A~C)。テストパルス中の脱活性化電流は2成分の指数関数によく一致し、それぞれの指数関数より時定数を求めた。テスト電位-60から-40 mVにおける、R534C

1.8とR534C / WTの2種類の時定数は、WT 1.8の時定数と比較して有意に小 ( $p < 0.05$ , R534C 1.8, R534C / WT versus WT 1.8) であった(図7D, E)。このように、R534C変異はHERGチャネルの脱活性化を促進していた。

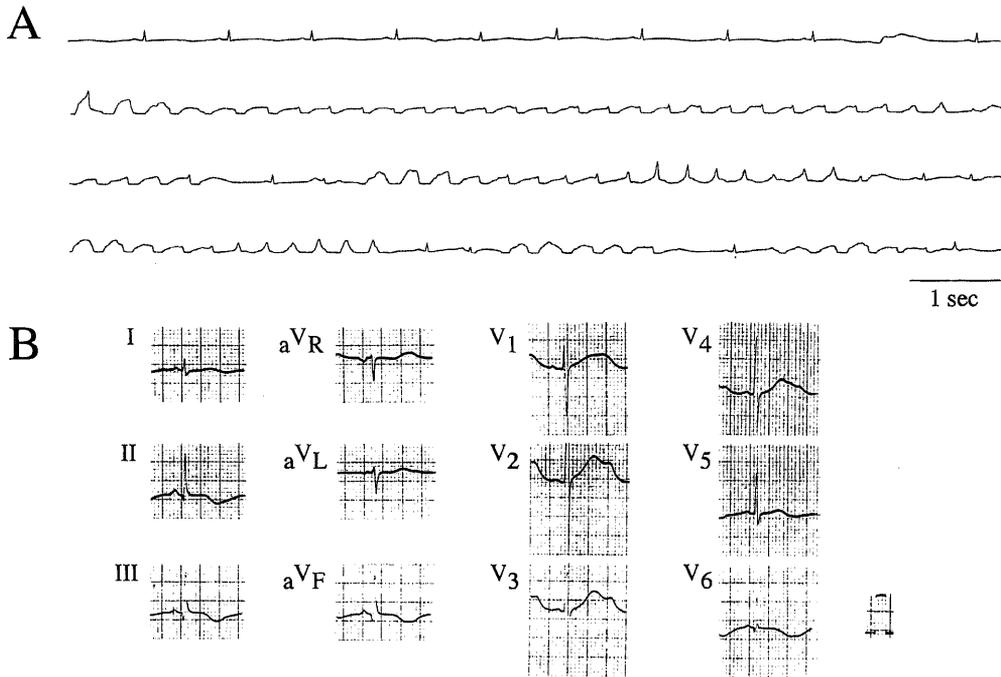


Fig. 8. Torsade de pointes (TdP) and 12-lead ECG of the proband, (A) Continuous traces of ECG monitoring during electroencephalogram recording. Typical features of TdP are seen in 30 seconds. (B) Twelve-lead ECG shows a markedly prolonged QTc (0.61 s) with notched T waves. Scale bars are illustrated in electrocardiograms.

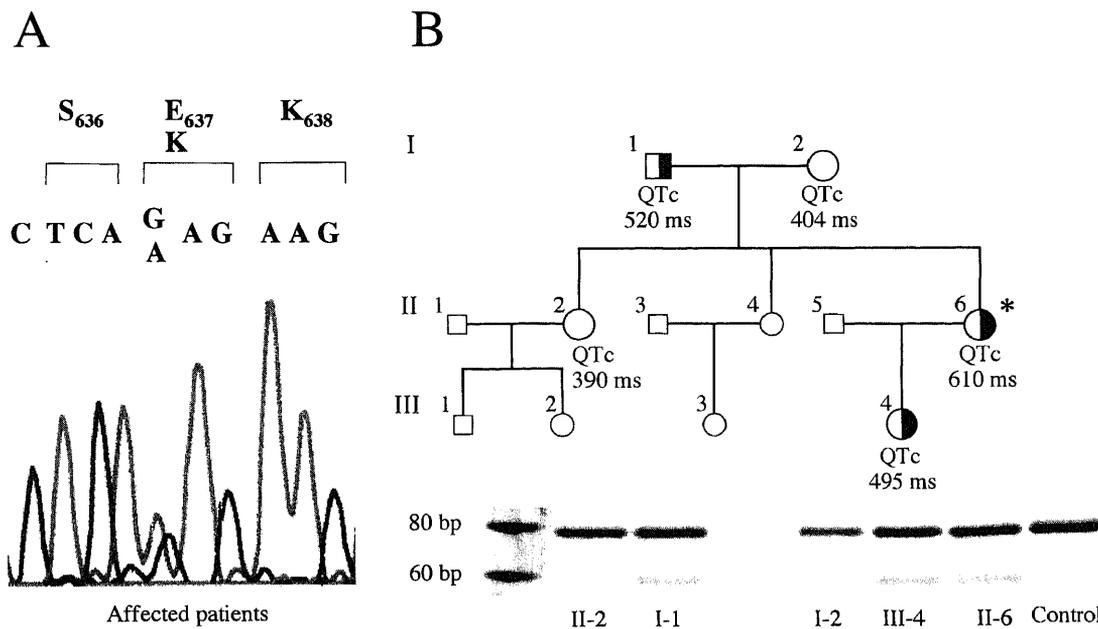


Fig. 9. Mutation analysis. (A) DNA sequence analysis in the proband. Transition occurs in the S5-S6 linker of the HERG protein, leading to a missense mutation. (B) The pedigree and result of PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis. The asterisk (\*) in the pedigree indicates the proband. The square (□) and the circle (○) in the pedigree indicate male and female, respectively. I, II, III indicate generations. Half-closed (◻) square and half-closed circles (◐) indicate heterozygous male and female patients with Glu637Lys mutation in the HERG, respectively. Digestion of the PCR products with *Tth* HB8I generates polymorphic restriction fragments of 79 bp and / or 60 bp. All of the individuals with Glu637Lys mutation show both 79 bp and 60 bp fragments which indicate a heterozygote for the mutation.

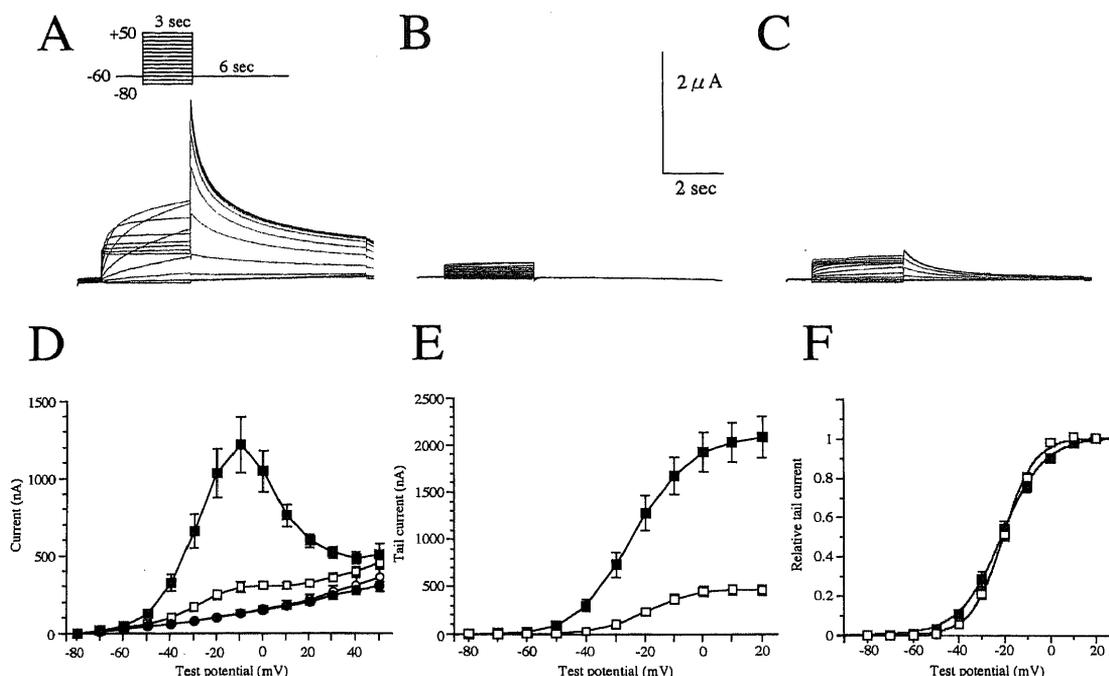


Fig. 10. Voltage-dependent activation of expressed currents in oocytes injected with wild type (WT) cRNA, E637K cRNA, and a combination of WT cRNA and E637K cRNA (A-C) Expressed currents in oocytes injected with 1.8 ng WT cRNA (WT 1.8; A), 1.8 ng E637K cRNA (E637K 1.8; B), 1.8 ng WT cRNA and 1.8 ng E637K cRNA (E637K/WT; C). Depolarizing test pulses were applied from a holding potential of -60 mV to various potentials between -80 mV and +50 mV in 10 mV increments for 3 seconds, followed by hyperpolarizing pulse to -60 mV for 6 s. The voltage protocol is illustrated in the inset in panel (A). (D) Current-voltage (I-V) relationships for peak currents recorded during depolarizing pulses in oocytes injected: ■, WT 1.8 (n=7); ●, E637K 1.8 (n=7); □, E637K/WT (n=7); ○, water (n=6). (E) I-V relationships for amplitudes of tail currents in oocytes injected: ■, WT 1.8 (n=8); □, E637K/WT (n=6). (F) Normalized I-V relationships for amplitudes of tail currents in oocytes injected: □, WT 1.8 (n=8); ■, E637K/WT (n=6). Amplitudes of tail currents as a function of the test potentials were fitted to a Boltzmann function as described in Methods.

### Ⅲ. HERG 遺伝子 E637K 変異の検討

#### 1. 臨床像の検討

発端者は32才の女性で中学生より安静時に意識消失を認めており、精神科にててんかんと診断されて投薬治療が行われていた。32才時、脳波測定中の心電図モニターで多形性心室頻拍が認められ(図8A)、胸部不快感が出現した。安静時心電図上QTc時間は0.61秒と延長しており、胸部誘導のT波にノッチを認めた(図8B)。なお、聴力、血清電解質はともに正常であった。先天性QT延長症候群の診断基準のスコアは合計8点で、診断確実と考えられた。発端者の父親と娘の心電図においてもQTc時間の延長が認められたが、失神の既往は認めなかった。なお、父親と娘のLQTSスコアはそれぞれ4点および5点で、いずれも診断確実と考えられた。

#### 2. HERG 遺伝子解析の結果

プライマー6L-12Rを用いて行ったPCR-SSCP法において、発端者、父親、娘に異常バンドが検出された。引き続き直接塩基配列決定法による遺伝子変異配列を決定したところ、異常バンドが認められた3人においてHERG遺伝子S5-S6リンカ内のS6近傍の637番目のGluをコードするGAGからLysをコードするAAGへの変異が認められた(図9A)。変異したAのバンドと正常なGのバンドは共存しており、変異Glu 637 Lysのヘテロ接合体であった。この変異はこれまでに報告されていない新しいミスセンス変異であった。

プライマー6LM (TCTCTCCCAACCAACTCG) と12Rの組

み合わせによるPCR産物(79 bp)は、遺伝子変異Glu 637 Lysがある場合のみ制限酵素 *Tth* HB8Iにより60 bpと19 bpに切断される。図9Bに発端者の家系図とPCR-RFLP法による変異の確認結果を示した。発端者を含めて3名に正常バンドと切断されたバンドの両方が認められ、いずれも変異Glu 637 Lysのヘテロ接合体であることが確認された。

#### 3. 電気生理学的検討

##### 1) 発現電流の定量的検討

図10のA~Cに、cRNAを卵母細胞に注入して記録した代表的な発現電流を示す。注入したcRNAはいずれも1.8 ngである[A. 野生型(WT 1.8); B. E637K (E637K 1.8); C. 両者を等量混合したcRNA (E637K / WT) である。]。E637K cRNAを1.8から9 ngまで注入した卵母細胞における発現電流値は、H<sub>2</sub>Oを注入した卵母細胞の発現電流値と変わらず(図10B, D)、変異単独では機能的なチャネルを形成しないと考えられた。また、E637K / WTの発現電流値は、WT 1.8の発現電流値と比べて大きく抑制されていた。

図10Dに、WT 1.8, E637K 1.8, E637K / WTそしてH<sub>2</sub>Oの脱分極中のピーク電流の電流-電圧曲線を示す。

図10Eに、WT 1.8とE637K / WTの末尾電流の大きさをプロットしたグラフを示す。-60 mVののち+20 mVの脱分極テストパルスを与えた時に測定された末尾電流の大きさは、WT 1.8が $2091 \pm 216$  nA (n=8)、E637K / WTが $466 \pm 51$  nA (n=6)であった。このように、E637K変異は野生型HERGチャネルの機能

を優性阻害的に抑制していた。

## 2) 両チャネルの電位依存性

図10Fに、各テスト電位に対する末尾電流の相対的な大きさをプロットしたグラフを示す。比電流が1/2に達する電位( $V_{1/2}$ )は、WT  $1.8 \pm 21.1 \pm 3.4$  mV (n=8), E637K / WTが  $20.4 \pm 2.1$  mV (n=6)であった。スロープファクター(K)は、WT  $1.8 \pm 9.1 \pm 0.59$  mV (n=8), E637K / WTが  $6.9 \pm 0.65$  mV (n=6)であった。E637K / WTの $V_{1/2}$ はWTとほぼ同じ値であったが、E637K / WTのKはWTに比べて有意に小 ( $p < 0.01$ , E637K / WT versus WT1.8)であった。

## 考 察

近年の遺伝子連鎖解析の急速な進歩により、遺伝性QT延長症候群の複数の家系において、心筋イオンチャネルをコードする遺伝子異常が同定された。現在までに同定された遺伝子は、心筋の電位依存性KチャネルのサブユニットをコードするKVLQT1<sup>30)</sup>, HERG<sup>31)</sup>, KCNE1<sup>32)</sup>, KCNE2<sup>33)</sup>と心筋の電位依存性NaチャネルのサブユニットをコードするSCN5A<sup>34)</sup>である。本研究では、特にHERG遺伝子の異常による遺伝性QT延長症候群の臨床的特徴と変異遺伝子の発現産物であるKチャネルの電流特性について検討した。

### I. HERG遺伝子変異による遺伝性QT延長症候群の臨床的特徴

遺伝性QT延長症候群では特徴的な心電図所見を示す。すなわち、QTc時間の延長(男性450ミリ秒以上、女性460ミリ秒以上)、多形性心室頻拍<sup>35)</sup>、T波の交代現象<sup>36)</sup>、ノッチを有するT波<sup>37)</sup>、年齢に比し相対的な徐脈<sup>38)</sup>、1.2秒以上の洞停止<sup>39)</sup>、運動時のQTcの異常反応<sup>40)~42)</sup>などである。このうちT波形態、運動時QT時間の反応について、遺伝子型別に比較検討した報告がある。1995年、Mossら<sup>39)</sup>は各遺伝子型に特徴的なT波形態を報告し、LQT1では幅広いT波、LQT2ではノッチを伴う平低T波、LQT3ではST部分の長いT波が特徴的であるとした。また、1999年Swanら<sup>40)</sup>はLQT1とLQT2患者に対して運動負荷試験を行い、QT時間の変化および運動負荷に対する心拍数の反応について検討した。彼らの報告によると、運動負荷によって短縮するQT時間の程度はLQT1に比べLQT2でより大きく、運動負荷に対する心拍数の増加の程度はLQT1で有意に小さかった。また、運動負荷後の回復期に延長するQT時間の程度はLQT1とLQT2はともにコントロールに比べて大きく、特にLQT1において著明であった。本研究の対象患者の心電図を検討してみると、R534CとE637Kの安静時心電図ではともにノッチが認められており、この点はLQT2に特徴的な所見といえる。また、R534Cの運動負荷心電図では最大心拍数191拍/分と負荷に対して正常な心拍数の増加が認められ、回復期にQT時間の延長が認められたことはLQT2に特徴的な所見といえる。

LQTSはTdPや心室細動を引き起こし、失神発作や突然死の原因となる疾患である。遺伝子型によりTdPや失神発作の誘因が異なるという報告<sup>20)~22)</sup>もなされている。LQT1患者では運動中や直後、精神的ストレスがTdP、失神発作の誘因とされ、特に水泳中の心事故が多い。それに対してLQT2患者は、夜間睡眠中に聴覚刺激(目覚まし時計、電話のベル、サイレンなど)で覚醒したときに発作が多いのが特徴である。LQT3患者では、発作は夜間睡眠中や安静時に多く、徐脈が増悪因子である。本

研究の2症例のうちR534C症例は睡眠時に、またE637K症例は安静時にTdP、失神発作が出現していた。ともに、聴覚刺激による急激な交感神経緊張によって発作が出現した可能性が高く、これまでの報告と合致する。

遺伝型と表現型の関連性について、1999年Prioriら<sup>43)</sup>はLQTSの疾患浸透率が低いことを報告した。すなわち、遺伝子異常が同定された発端者およびその家族20人の中で臨床的にQT延長症候群と診断された患者は5人であり、疾患浸透率は25%であった。それに対し、本研究におけるR534CおよびE637Kの疾患浸透率はともに100%と高率であった。

R534C変異が認められた症例は、一卵性双生児であった。一卵性双生児のLQTS患者に関する報告<sup>44)~46)</sup>はいくつかあり、その中で、Russellら<sup>47)</sup>が、KvLQT1遺伝子変異を認めた一卵性双生児を報告している。しかし、HERG遺伝子変異についてはこれまで報告はなく、我々の症例が初めての報告と考えられる。

### II. HERG遺伝子変異の電流特性

心筋細胞には多くのイオンチャネルが存在し、それを介するイオン電流によって心筋活動電位が形成される。心筋活動電位の持続時間(action potential duration; APD)は心電図のQT時間に反映され、再分極を起こす外向き電流が減少するか、あるいは脱分極を維持する内向き電流が増加すればAPDは延長してQT時間は延長すると考えられる。本研究の対象であるHERG遺伝子は、KCNE2遺伝子と会合して $I_{Kr}$ チャネルを形成する。 $I_{Kr}$ チャネルは心筋活動電位再分極相(第3相)における大きな外向き電流に関与し、APDを規定する最も重要なチャネルのひとつである。従って、HERG遺伝子の異常により $I_{Kr}$ がどのように変化するかを電気生理学的に検討することは重要である。本研究では、アフリカツメガエルの卵母細胞発現系を用いて発現実験を行った。アフリカツメガエルの卵母細胞は、外来性のmRNAを効率良く正確にタンパク質に翻訳する有用な生体系である<sup>48)</sup>。また、卵母細胞の直径は1mmを超え、mRNAの注入および細胞内記録が容易なため遺伝子の発現系として広く用いられている。本研究では、HERG遺伝子のcRNAを発現させてその電流特性を検討した。HERG電流と固有のKチャネルである $I_{Kr}$ は厳密には異なる電流であるが、両者の電位依存性活性化や内向き整流性はきわめて類似しており、HERG電流は $I_{Kr}$ を十分に反映するものと考えられる。1996年、Sanguinettiら<sup>49)</sup>は、HERG遺伝子の変異についてアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて電気生理学的特性を検討した。HERG遺伝子S5領域のミスセンス変異A561Vおよびボア領域のミスセンス変異G628Sでは単独では発現電流は記録されなかったのに対し、S2領域のミスセンス変異N470Dでは単独でも発現電流が記録された。また、野性型cRNAとA561VあるいはG628SのcRNAを等量混合注入して発現させた電流の大きさは、野性型HERG cRNAを単独で注入した発現電流値に比べて有意に小さく、優性的阻害をきたした。一方N470Dは、発現電流の抑制の程度が小さく、明らかな優性的阻害はきたさなかった。優性的阻害とは、野性型cRNAと変異型cRNAを等量ずつ卵母細胞に注入した発現電流の大きさが正常遺伝子ホモ接合体の1/2よりはるかに小さくなってしまふことで、ミスセンス変異において多く認められる様式である。そのメカニズムは、以下のように説明される。HERGチャネルは4つのサブユニット(4量体)により構成されるが、ミスセンス変異では通常アミノ酸1個の置換を

もたらずにすぎず、変異サブユニット蛋白の立体構造変化は軽微で野性型サブユニットと会合しうる。正常型サブユニットと変異型サブユニットが異種4量体を構成する場合、両者がランダムに会合するならば正常型サブユニットだけから構成されるチャンネルの出現確率は1/16であり、残りの15/16のチャンネルには少なくとも1つの変異型サブユニットが加わる。異種4量体のなかで変異型サブユニットは正常型サブユニットの機能を抑制するため、チャンネル機能は正常遺伝子ホモ接合体の1/2以下となる。正常型サブユニットの機能を抑制する程度は変異部位により異なると考えられ、変異部位によって臨床像・重症度が異なることが予想される。*HERG*遺伝子変異は現在までに84種類が報告<sup>50</sup>されているが、すべての遺伝子変異に対してその遺伝子産物の電流特性が計測されてはいない。そこで本研究では、*HERG*遺伝子S4領域およびS4-S5リンカー内のS6近傍において同定されたミスセンス変異に対し、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて電気生理学的特性を検討した。

#### 1) R534C変異の電気生理学的特徴

電位依存性K<sup>+</sup>チャンネルのS4領域には正電荷を有する塩基性アミノ酸が3残基ごとに並ぶ特徴的な構造が認められ、この領域は電位センサーとして機能している場所と考えられている。Shaker K<sup>+</sup>チャンネルのS4領域の7つの塩基性アミノ酸に変異を導入し、チャンネルの電位依存性活性化について検討した報告<sup>51</sup>によれば、7つの塩基性アミノ酸がすべて等しくゲート電流に関わっているわけではなかった。その後の研究<sup>52</sup>により、Shaker K<sup>+</sup>チャンネルにおいてはS2領域の293番目のGluとS4領域の365番目、368番目および371番目のそれぞれのArgがゲート電流に大きく関与していることが報告された。このShaker K<sup>+</sup>チャンネルの371番目のArgは、本研究で遺伝子変異が認められた*HERG*チャンネルの534番目のArgに相当する。このように、*HERG*チャンネル534番目のArgは、膜電位の変化を感知してチャンネルを活性化させる電位センサーとして主要な役割を有していると考えられる。本研究の電気生理学的検討においても、R534Cのチャンネル活性化曲線は野性型と比較して有意に負電位側にシフトし、チャンネル脱活性化速度は促進しており、電位依存性活性化の促進および脱活性化の促進が確認された。

R534C変異による*HERG*チャンネルの抑制のメカニズムとして、いくつかの要因が考えられた。R534C変異によって抑制される発現電流の大きさの程度は著しいとはいえず、他のミスセンス変異の多くで認められる優性的阻害を認めなかった。従って、チャンネルを抑制する他の要因が存在すると考えられ、R534C変異によるキネティクスの変化について検討した結果、前述したようにR534C変異のチャンネル活性化曲線の負電位側へのシフトと脱活性化の促進が認められた。前者は脱分極時の定常電流を外向きの方に促し、後者は再分極中の外向き電流を減少させる方向に働く。すなわち、キネティクスの変化のうちAPDを延長させる要因として考えられるのは脱活性化の促進のみであり、活性化の促進はむしろAPDを短縮する要因となる可能性がある。ただし、*HERG*チャンネルは活性化に比べて不活性化がきわめて速いため、脱分極中は多くのチャンネルが不活性化状態にあり、チャンネル活性化の促進がAPDに与える影響はそれ程大きいものではないと考えられる。一方、活動電位第3相で流れる大きな外向き電流は心筋の再分極に大きく寄与していると考えられ、脱活性化の促進がAPDに与える影響は大きいと考えられる。このように、R534C変異による*HERG*電流は、

チャンネルの脱活性化の促進が加わることによって大きく抑制されると考えられた。

#### 2) E637K変異の電気生理学的特徴

E637K変異によって発現された電流は著しく抑制され、優性的阻害が認められた。*HERG*遺伝子の637番目のグルタミン酸は、イオン透過孔(ポア)の細胞外口の外側<sup>53</sup>に存在し、種を通じてよく保存されているアミノ酸である。また、最近になり、S5およびS6領域近傍のアミノ酸残基間の水素結合が、チャンネル開口状態の安定化に寄与していることが明らかになった<sup>54,55</sup>。すなわち、本研究において遺伝子変異を認めた637番目のGluはチャンネル開口状態の安定化に重要な役割を果たしていると考えられ、E637K変異によってアミノ酸残基の荷電状態が変化し、分子間相互作用が阻害された結果チャンネルが機能しなくなり、*HERG*電流が抑制されたと考えられた。

## 結 論

日本人LQTS患者において、遺伝子*HERG*変異をPCR-SSCP法、直接塩基配列決定法およびPCR-RFLP法を用いて検索し、さらにアフリカツメガエル卵母細胞系を用いて*HERG*遺伝子産物の電流特性を検討して以下の結果を得た。

1. 1家系3名において、*HERG*遺伝子S4領域534番目のアミノ酸ArgをコードするコドンCGCがCysをコードするコドンTGCへと変化する変異Arg534Cysを検出した。遺伝子変異を認めた3人とも臨床的にLQTSと診断された。R534C変異は、*HERG*電流を多少抑制するとともに*HERG*チャンネルの脱活性化を促進させていた。
2. 1家系3名において、*HERG*遺伝子S5-S6リンカー内S6近傍の637番目のアミノ酸GluをコードするコドンGAGがLysをコードするコドンAAGへと変化する変異Glu637Lysを検出した。この変異はこれまでに報告がなく、新変異であった。遺伝子変異を認めた3人とも臨床的にLQTSと診断された。E637Kは、優性的阻害をきたし、*HERG*電流を著しく抑制した。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師 馬淵 宏教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を直接御指導、御教示頂きました金沢大学医学部医学科内科学第二講座の清水 賢巳助教授に心から謝意を表します。また、*HERG* cDNAを供与して下さったUniversity of Wisconsin-Madison Medical SchoolのDr Gail A Robertson、および発現実験に関する御指導、御教示を頂きました金沢大学大学院細胞遺伝子学講座の星 直人助手に深謝致します。また、御助言、御協力を頂きました金沢大学医学部医学科内科学第二講座の井野 秀一助手、山口 正人助手に厚く御礼申し上げます。また、多大なる御協力を頂きました医学部医学科内科学第二講座第四研究室の各位、ならびに高分子DNAの採取等に際し御協力を頂いた山本幸夫氏、池多亜沙子氏、谷口尊子氏に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Moss AJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Tzivoni D, Locati EH, MacCluer J, Hall WJ, Weitkamp L, Vincent GM, Garson A, Robinson JL, Benhorin J, Choi S. The long QT syndrome prospective longitudinal study of 328 families. *Circulation* 84: 1136-1144, 1991
- 2) Romano C, Gemme G, Pongiglione R. Aritmie cardiache rare dell'eta' pediatrica. *Clin Pediatr* 45: 656-683, 1963
- 3) Jervell A, Lange-Nielsen F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the QT interval and

sudden death. *Am Heart J* 54: 59-68, 1957

- 4) Viskin S. Long QT syndromes and torsade de pointes. *Lancet* 354:1625-1633, 1999
- 5) Reilly JG, Ayis SA, Ferrier IN, Jones SJ, Thomas SHL. QTc-interval abnormalities and psychotropic drug therapy in psychiatric patients. *Lancet* 355: 1048-1052, 2000
- 6) Yanowitz F, Preston JB, Abildskov JA. Functional distribution of right and left stellate innervation to the ventricles: production of neurogenic electrocardiographic change by unilateral alteration of sympathetic tone. *Circ Res* 18: 416-428, 1966
- 7) Schwartz PJ, Periti M, Malliani A. The long Q-T syndrome. *Am Heart J* 89: 45-50, 1975
- 8) Schwartz PJ. Idiopathic long QT syndrome: progress and questions. *Am Heart J* 109: 399-411, 1985
- 9) Keating M, Atkinson D, Dunn C, Timothy K, Vincent GM, Leppert M. Linkage of a cardiac arrhythmia, the long QT syndrome, and the Harvey ras-1 gene. *Science* 252: 704-706, 1991.
- 10) Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Towbin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT. Positional cloning of a novel potassium channel gene: *KVLQT1* mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 12: 17-23, 1996.
- 11) Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: *HERG* mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80: 795-803, 1995.
- 12) Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT. *SCN5A* mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 80: 805-811, 1995.
- 13) Schott J, Charpentier F, Peltier S, Foley P, Drouin E, Bouhour J, Donnelly P, Vergnaud G, Bachner L, Moisan J, Le Marec H, Pascal O. Mapping of a gene for long QT syndrome to chromosome 4q25-27. *Am J Hum Genet* 57: 1114-1122, 1995.
- 14) Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC, Keating MT. Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress  $I_{Ks}$  function. *Nat Genet* 17: 338-340, 1997.
- 15) Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SAN. MiRP1 forms  $I_{Kr}$  potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 97: 175-187, 1999.
- 16) Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, Leibovici M, Donger C, Barhanin J, Faure S, Gary F, Coumel P, Petit C, Schwartz K, Guicheney P. A novel mutation in the potassium channel gene *KvLQT1* causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet* 15:186-189, 1997.
- 17) Chen Q, Zhang D, Gingell RL, Moss AJ, Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, Kehoe E, Robinson JL, Schulze-Bahr E, Wang Q, Towbin JA. Homozygous deletion in *KvLQT1* associated with Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Circulation* 99: 1344-1347, 1999.
- 18) Schulze-Bahr E, Wang Q, Wedekind H, Haverkamp W, Chen Q, Sun Y, Rubie C, Hordt M, Towbin JA, Borggrefe M, Assmann G, Qu X, Somberg JC, Breithardt G, Oberti C, Funke H. *KCNE1* mutations cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat Genet* 17: 267-269, 1997
- 19) Moss AJ, Zareba W, Benhorin J, Locati EH, Hall WJ, Robinson JL, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Lehmann MH, Keating MT, MacCluer JW, Timothy KW. ECG T-wave patterns in genetically distinct forms of the hereditary long QT syndrome. *Circulation* 92: 2929-2934, 1995.
- 20) Schwartz PJ, Priori SG, Locati EH, Napolitano C, Cantu F, Towbin JA, Keating MT, Hammoude H, Brown AM, Chen LK, Colatsky TJ. Long QT syndrome patients with mutations of the *SCN5A* and *HERG* genes have differential responses to Na<sup>+</sup> channel blockade and to increases in heart rate. Implications for gene-specific therapy. *Circulation* 92: 3381-3386, 1995.
- 21) Ackerman MJ, Tester DJ, Porter CJ. Swimming, a gene-specific arrhythmogenic trigger for inherited long QT syndrome. *Mayo Clin Proc* 74: 1088-1094, 1999.
- 22) Wilde AAM, Jongbloed RJE, Doevendans PA, Duren DR, Hauer RNW, van Langen IM, van Tintelen JP, Smeets HJM, Meyer H, Geelen JLMC. Auditory stimuli as a trigger for arrhythmic events differentiate HERG-related (LQTS<sub>2</sub>) patients from KVLQT1-related patients (LQTS<sub>1</sub>). *J Am Coll Cardiol* 33: 327-332, 1999.
- 23) Locati EH, Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ, Vincent GM, Lehmann MH, Towbin JA, Priori SG, Napolitano C, Robinson JL, Andrews M, Timothy K, Hall WJ. Age- and sex-related differences in clinical manifestations in patients with congenital long-QT syndrome. Findings from the international LQTS registry. *Circulation* 97: 2237-2244, 1998.
- 24) Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ, Vincent GM, Robinson JL, Priori SG, Benhorin J, Locati EH, Towbin JA, Keating MT, Lehmann MH, Hall WJ, for the international Long-QT syndrome registry research group. Influence of the genotype on the clinical course of the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 339: 960-965, 1998.
- 25) Priori SG, Napolitano C, Cantu F, Brown AM, Schwartz PJ. Differential response to Na<sup>+</sup> channel blockade,  $\beta$ -adrenergic stimulation, and rapid pacing in a cellular model mimicking the *SCN5A* and *HERG* defects present in the long-QT syndrome. *Circ Res* 78: 1009-1015, 1996.
- 26) Shimizu W, Antzelevitch C. Differential effects of beta-adrenergic agonists and antagonists in LQT1, LQT2 and LQT3 models of the long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 35: 778-786, 2000.
- 27) Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Benhorin J, Vincent GM, Locati EH, Lehmann MH, Towbin JA, Priori SG, Napolitano C, Medina A, Zhang L, Robinson JL, Timothy K. Effectiveness and limitations of  $\beta$ -blocker therapy in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 101: 616-623, 2000.
- 28) Shimizu W, Antzelevitch C. Sodium channel block with mexiletine is effective in reducing dispersion of repolarization and preventing torsade de pointes in LQT2 and LQT3 models of the long-QT syndrome. *Circulation* 96: 2038-2047, 1997.

- 29) Shimizu W, Kurita T, Matsuo K, Suyama K, Aihara N, Kamakura S, Towbin JA, Shimomura K. Improvement of the repolarization abnormalities by a K<sup>+</sup> channel opener in the LQT1 form of congenital long-QT syndrome. *Circulation* 97: 1581-1588, 1998.
- 30) Schwartz PJ, Moss AJ, Vincent GM, Crampton RS. Diagnostic criteria for the long QT syndrome an update. *Circulation* 88: 782-784, 1993.
- 31) Vandenplas S, Wild I, Rabie AG, Brebner K, Ricketts M, Wallis G, Bester A, Boyd C, Mathew C, Blot hybridization analysis of genomic DNA. *J Med Genet* 21: 164-172, 1984
- 32) Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleoside phosphoramidites- a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett* 22: 1859-1862, 1982
- 33) Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified  $\beta$ -globin and HLA-DQA DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166, 1986
- 34) Nakajima T, Furukawa T, Hirano Y, Tanaka T, Sakurada H, Takahashi T, Nagai R, Itoh T, Katayama Y, Nakamura Y, Hiraoka M. Voltage-shift of the current activation in HERG S4 mutation (R534C) in LQT2. *Cardiovasc Res* 44: 283-293, 1999.
- 35) Itoh T, Tanaka T, Nagai R, Kamiya T, Sawayama T, Nakayama T, Tomoike H, Sakurada H, Yazaki Y, Nakamura Y. Genomic organization and mutational analysis of *HERG*, a gene responsible for familial long QT syndrome. *Hum Genet* 102: 435-439, 1998.
- 36) Dessertenne F. La tachycardia ventriculaire a deux foyers opposes variables. *Arch Mal Coeur Vaiss* 59: 263-272, 1966.
- 37) Schwartz PJ, Malliani A. Electrical alteration of the T wave: clinical and experimental evidence of its relationship with the sympathetic nervous system and with the long QT syndrome. *Am Heart J* 89: 378-390, 1975.
- 38) Malfatto G, Beria G, Sala S, Bonazzi O, Schwartz PJ. Quantitative analysis of T wave abnormalities and their prognostic implications in the idiopathic long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 23: 296-301, 1996
- 39) Vincent GM. The heart rate of Romano-Ward syndrome patients. *Am Heart J* 112: 61-64, 1986
- 40) Schwartz PJ. The long QT syndrome. In Kulbertus HE, Wellens HJJ (eds), *Sudden Death*, The Hague, M Nijhoff, 1980, 1st ed, p358-378.
- 41) Vincent GM, Jaiswal D, Timothy KW. Effects of exercise on heart rate, QT, QTc and QT / QS2 in the Romano-Ward inherited long QT syndrome. *Am J Cardiol* 68: 498-503, 1991.
- 42) Swan H, Viitasalo M, Piippo K, Laitinen P, Kontula K, Toivonen L. Sinus node function and ventricular repolarization during exercise stress test in long QT syndrome patients with *KvLQT1* and *HERG* potassium channel defects. *J Am Coll Cardiol* 34: 823-829, 1999.
- 43) Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ. Low penetrance in the long-QT syndrome. *Circulation* 99: 529-533, 1999.
- 44) Greenspon AJ, Kidwell GA, Barrasse LD, Hessen SE, Giudici M. Hereditary long QT syndrome associated with cardiac conduction system disease. *PACE* 12: 479-485, 1989.
- 45) Jacobson J, Jacobson C, Francis P. Congenital hearing loss in Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *J Am Acad Audiol* 1: 171-173, 1990.
- 46) Wilkison C, Gyaneshwar R, Mccusker C. Twin pregnancy in a patient with idiopathic long QT syndrome. Case report. *Br J Obstet Gynaecol* 98: 1300-1302, 1991.
- 47) Russell MW, Dick MII, Collins FS, Brody LC. KVLQT1 mutations in three families with familial or sporadic long QT syndrome. *Hum Mol Genet* 5: 1319-1324, 1996.
- 48) Dascal N. The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem*. 22:317-387, 1987.
- 49) Sanguinetti MC, Curran ME, Spector PS, Keating MT. Spectrum of HERG K<sup>+</sup>-channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2208-2212, 1996.
- 50) Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori SG, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes, *KVLQT1*, *HERG*, *SCN5A*, *KCNE1*, and *KCNE2*. *Circulation* 102: 1178-1185, 2000.
- 51) Papazian DM, Timpe LC, Jan YN, Jan LY. Alteration of voltage-dependence of shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 349: 305-310, 1991.
- 52) Seoh S, Sigg D, Papazian DM, Bezanilla F. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* 16: 1159-1167, 1996.
- 53) Gross A, Mackinnon R. Agitoxin footprinting the *Shaker* potassium channel pore. *Neuron* 16: 399-406, 1996.
- 54) Perozo S, Cortes DM, Cuello LG. Structural rearrangements underlying K<sup>+</sup>-channel activating gating. *Science* 285: 73-78, 1999.
- 55) Larsson HP, Elinder F. A conserved glutamate is important for slow inactivation in K<sup>+</sup> channels. *Neuron* 27: 573-583, 2000.

**Molecular Genetic Analysis of Long-QT Syndrome With Mutations in *HERG*** Kenshi Hayashi, The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **109**, 448 — 461 (2000)

**Key words** long QT syndrome, human *ether-a-go-go*-related gene, potassium channel, gene mutation, dominant negative suppression

#### Abstract

Long-QT syndrome (LQTS) is a cardiovascular disorder characterized by a prolonged QT interval on the surface ECG and causes syncope and sudden death as a result of torsade de pointes and ventricular fibrillation. Two major clinical syndromes have been characterized based on the pattern of transmission of the disease: a more common autosomal dominant form with a pure cardiac phenotype (Romano-Ward) and a rare autosomal recessive form characterized by the coexistence of cardiac abnormalities and congenital deafness (Jervell and Lange-Nielsen). Five disease genes have been identified. *KVLQT1*, *HERG*, *KCNE1*, and *KCNE2* encode potassium channel subunits, and *SCN5A* encodes the cardiac sodium channel. In this study, we described two missense mutations of the *HERG* channel found in Japanese families affected by long-QT syndrome and characterized the electrophysiological properties of these mutations using the heterologous expression system in *Xenopus* oocytes. Regions encoding membrane-spanning domains and the pore domain of the *HERG* gene were amplified by PCR, and variant conformers were detected by PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). Subsequent direct sequencing of the PCR products confirmed their mutations. The mutations were confirmed by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Site-directed mutagenesis was performed, and cRNAs were synthesized. Membrane currents were recorded from oocytes injected with cRNAs by the two-microelectrode voltage-clamp technique. Two missense mutations in the *HERG* gene were identified from two probands with LQTS. The first mutation was a C-to-T transition in the S4 region of *HERG*, resulting in amino acid substitution of Arg to Cys at the codon 534 (Arg534Cys). This mutation was identified in three individuals of the family. Three individuals had a prolonged QTc interval, and in them a diagnosis of LQTS was confirmed based on the LQTS criteria. In the electrophysiological study, quantitative analyses revealed that the R534C mutation did not cause apparent dominant-negative suppression, while kinetic analyses revealed that this mutation shifted the voltage-dependence of *HERG* channel activation to a negative direction and accelerated the deactivation time course. The second mutation was a G-to-A transversion in the S5-S6 linker of *HERG*, resulting in amino acid substitution of Glu to Lys at the codon 637 (Glu637Lys). This was a novel mutation. This mutation was identified in three individuals of the family. Three individuals had a prolonged QTc interval, and in them a diagnosis of LQTS was confirmed based on the LQTS criteria. The electrophysiological study revealed that the E637K mutation caused a marked reduction of  $I_{Kr}$  via a dominant negative effect.