

平成 10 年度

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

神経疾患の克服に関する研究

—Ca チャンネル異常による小脳失調症の発症機序の解明—

(H09—脳—09)

研究報告書

主任研究者 水澤 英洋

神経疾患の克服に関する研究(Caチャンネル異常による小脳失調症の発症機序の解明)

主任研究者 水澤英洋 東京医歯科大学医学部神経内科学講座教授

研究要旨:本邦の遺伝性皮質性小脳萎縮症の約半数を占める第19番染色体連鎖小脳失調症すなわちSCA6について、mRNAがプルキンエ細胞に特段に高発現し、異常蛋白も核内封入体ではない特有の異常パターンで発現することを明らかにした。また異常遺伝子を導入した培養細胞も、特徴的な異常な蛋白発現パターンを示しアポトーシスを呈しており、プルキンエ細胞の選択的障害と関連するものと思われた。また、培養細胞でのパッチクランプ法によるCaチャンネル機能の解析を行い、ヒト型のトランスジェニックマウスの作製も進化した。さらに、臨床的にSCA6と区別出来ないnon-SCA6について、新しい遺伝子座の同定に成功するという大きな進展がみられた。

分担研究者 田邊 勉 東京医科歯科大学医学部薬理学
講座教授

A. 研究目的

本研究の目的は、 $\alpha 1A$ -Caチャンネル遺伝子のCAGリピート伸長によって生ずるSCA6におけるCaチャンネルの機能障害ならびに小脳プルキンエ細胞のほぼ選択的な細胞死の機構を解明することである。

B. 研究方法

1) 患者剖検脳を用いて、神経病理学的検索とCAGリピート数の体細胞モザイシズムを明らかにする。2) ヒト脳におけるmRNAの発現量・パターンを明らかにする。3) 特異抗体を作製し異常蛋白の発現パターンを明らかにする。4) 異常遺伝子を培養細胞に導入しパッチクランプ法によりCaチャンネル機能を解析する。5) 異常遺伝子を培養細胞に導入し、異常蛋白の発現と細胞死の有無・関連を明らかにする。6) SCA6と臨床的には区別できず、患者数も多いnon-SCA6の連鎖解析を行う。

C. 研究結果

1) 剖検脳の神経病理学的検索では、プルキンエ細胞がほぼ選択的に障害されるが、ユビキチン化核内封入体はみられなかった。
2) 脳の各部位間でCAGリピート数はきわめて安定していた(J Neurol Neurosurg Psychiatr, 印刷中)。
3) mRNAはヒト脳に広汎に発現するが、特にプルキンエ細胞に高度であった。
4) 抗 $\alpha 1A$ -Caチャンネル特異抗体にて遺伝子産物はプルキンエ細胞に特異的に異常発現していた(論文投稿中)。
5) 異常遺伝子導入HEK細胞などにてCaチャンネル機能をパッチクランプ法により解析した(論文投稿準備中)。
6) 異常遺伝子導入培養細胞は、異常蛋白を特徴的なパターンで発現し神経細胞死に至った(論文投稿中)。
7) ヒト型トランスジェニックマウスの作製を進めた。
8) non-SCA6について連鎖解析によりその大部分の原因と思われる新しい遺伝子座を同定した(論文投稿中)。

D. 考察

患者剖検脳の検索から、小脳プルキンエ細胞の選択的障害が初めて定量的に確認された。CAGリピート数は神経系内で全く同一で、mRNAの発現は広汎ではあるがプルキンエ細胞にとくに多く病理所見と一致するものと思われる。また異常蛋白の発現も核内封入体とは異なる特徴的なパターンでありプルキンエ細胞の選択性を裏付けて

いる。異常遺伝子を導入した培養細胞でも同様の異常蛋白の異常発現がみられ、アポトーシスとの関連が示唆された。機能解析との対応が判明すればこの意義はさらに重要となる。さらに、新しい遺伝子座は本邦のnon-SCA6の大部分を説明しており、大きな進展であった。

E. 結論

1) $\alpha 1A$ -CaチャンネルmRNAの発現はプルキンエ細胞に多く選択的障害の背景と思われる。2) 変異蛋白の発現もプルキンエ細胞に特異的な異常パターンを示す。3) 変異蛋白発現のパターンの異常は培養細胞でも確認され、細胞死と関係していると思われる。4) このようにSCA6は他のCAGリピート病とは異なる特徴を持つと思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・水澤英洋: 脊髄小脳失調症6型-電位依存性Caチャンネル $\alpha 1A$ サブユニット遺伝子のCAGリピート異常伸長-. 脳の科学 1998;20:505-510.
- ・Takiyama Y, K Sakoe K, Namekawa M, Soutome M, Esumi E, Ogawa T, Ishikawa K, Mizusawa H, Nakano I, Nishizawa M: A Japanese family with spinocerebellar ataxia type 6 which includes three individuals homozygous for an expanded CAG repeat in SCA6/CACNL1A4 gene. J Neurol Sci 1998;158:141-147.
- ・Tsuchiya K, Ishikawa K, Watabiki S, Tone O, Taki K, Haga C, Takashima M, Ito U, Okeda R, Mizusawa H, Ikeda K: A clinical, genetic, neuropathological study in a Japanese family with SCA 6 and a review of Japanese autopsy cases of autosomal dominant cortical cerebellar atrophy. J Neurol Sci 1998;160:54-59.
- ・Nakai J, Tanabe T, Konno T, Konno T, Adams BA and Beam KG, Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling. J Biol Chem 1998;273: 24983-24986.
- ・Neuhuber B, Gerster U, Doering F, Glossmann H, Tanabe T, Flucher BE: Association of calcium channel $\alpha 1S$ and $\beta 1A$ subunits is required for the targeting of $\beta 1A$ but not $\alpha 1S$ into skeletal muscle triads. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:5015-5020.

G. 知的所有権の取得状況 とくになし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

神経疾患の克服に関する研究（Caチャンネル異常による小脳失調症の発症機序の解明）

分担研究者 田邊 勉 東京医科歯科大学医学部薬理学講座 教授

研究要旨：種々CAGリピート伸長を有する α_{1A} チャンネル遺伝子を作成し、これをHEK293細胞に発現させ、その電気生理学的特性を比較している。ウサギ α_{1A} チャンネル遺伝子にリピート伸長を導入したコンストラクトでは、これまでに調べた限りでは差異は見い出されていない。一方、 α_{1A} Caチャンネル上の種々の遺伝子変異と疾患症状との関係を系統立って解析することを目的として、変異導入Lox配列を含み、種々の疾患Caチャンネル遺伝子をCreリコンビナーゼ活性を利用してシングルコピー導入できるようにしたターゲットベクターを構築した。そしてこれをES細胞へ導入し相同遺伝子組換えがおきた変異ES細胞クローンの単離に成功した。

A. 研究目的

本研究は、SCA6の病態と α_{1A} Caチャンネル遺伝子変異との関係を明らかにするとともに、小脳プルキンエ細胞のほぼ選択的な細胞死の機構を解明することを目的とするものである。

B. 研究方法

(1)CAGリピート伸長をクローン化した α_{1A} Caチャンネル遺伝子に導入しこれをHEK293細胞に発現させ、Ca電流の電気生理学的特性を調べる。(2)小脳プルキンエ細胞より α_{1A} mPNAを単離しP型チャンネルの分子構造を明らかにする。(3)P型チャンネル遺伝子にCAGリピート伸長を導入しこれを発現するトランスジェニックマウスを作成する。

C. 研究結果

(1)種々のCAGリピート伸長を有する α_{1A} チャンネル遺伝子を作成し、これをHEK細胞に発現させ、その電気生理学的特性を比較している。ウサギ α_{1A} チャンネル遺伝子にリピート伸長を導入したコンストラクトでは、これまでに調べた限りでは差異は見い出されていない。今後さらに検討項目を増やす予定である。(2)マウス小脳スライスを作成し顕微鏡下でプルキンエ細胞を吸い取り、これより α_{1A} mPNAを単離した。現在N末とC末領域の塩基配列の決定を残すのみとなっている。今後、ヒトP型遺伝子も単離しCAGリピート伸長を導入し電気生理学的解析を行う。(3)変異導入Lox配列を含み、種々の疾患Caチャンネル遺伝子をCreリコンビナーゼ活性を利用してシングルコピー導入できるようにしたターゲットベクターを構築した。そしてこのターゲットベクターをES細胞へ導入し相同遺伝子組換えがおきた変異ES細胞クローンの単離に成功した。

D. 考察

α_{1A} チャンネル遺伝子はP型およびQ型Caチャンネルをコードしている。現在知られている α_{1A} チャンネル

遺伝子はP型およびQ型のキメラ遺伝子である可能性が高い。小脳プルキンエ細胞には α_{1A} 遺伝子産物としてP型Caチャンネルのみが発現している。したがってP型チャンネルにおいてCAGリピート伸長がおこった場合にチャンネル機能異常が見い出され、Q型チャンネルにおいてリピート伸長がおこっても正常のままの特性を示す可能性がある。

変異ES細胞クローンの作成に成功したので、ヒト変異P型チャンネル遺伝子をこれに導入しトランスジェニックマウスを作成する。このマウスは通常のトランスジェニックマウスよりも自然に近いかたちで遺伝子変異による機能異常を評価できる。

E. 結論

α_{1A} Caチャンネル遺伝子変異のチャンネル機能におよぼす影響に関しては、 α_{1A} Caチャンネル遺伝子が神経組織に幅広く発現しているにもかかわらず小脳プルキンエ細胞が特異的に変性、脱落するという点と、プルキンエ細胞に α_{1A} Caチャンネル遺伝子は発現しているもののチャンネル特性はP型でQ型チャンネル成分は存在しない（同じ小脳の神経細胞でもグラニューール細胞はP型とQ型チャンネルを1：3の割合で持つ）という点を考慮すると、P型チャンネルを取得して実験を行うまではまだ簡単に結論を出すことはできない。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Neuhuber, B., Gerster, U., Döring, F., Glossmann, H., Tanabe, T. & Flucher, B. E. (1998). Association of calcium channel α_{1S} and β_{1A} subunits is required for the targeting of β_{1A} but not of α_{1S} into skeletal muscle triads. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5015-5020.
- ・ Nakai, J., Tanabe, T., Konno, T., Adams, B.A. & Beam, K.G. (1998). Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling. *Journal of Biological Chemistry* 273: 24983-24986.