

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08284

研究課題名（和文）電位依存性ナトリウムチャンネル複合体を標的とする難治性てんかん治療戦略の開発

研究課題名（英文）Proteins interacting with Nav1.1 may be potential therapeutic targets for epilepsy

研究代表者

荻原 郁夫 (Ogiwara, Ikuo)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30373286

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ドラベ症候群は頻回するけいれん発作と発達遅滞を特徴とする乳児期発症のてんかんです。この疾患の原因は神経活動に関わる電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 1$ の機能低下です。本研究は、 $\alpha 1$ と複合体を形成するタンパク質について解析しました。そして、 $\alpha 1$ の細胞内ループに結合するタンパク質として線維芽細胞増殖因子相同因子とシナプス関連タンパク質を見出しました。線維芽細胞増殖因子相同因子は $\alpha 1$ の活性を変化させませんでした。これらタンパク質が細胞内ループを介して $\alpha 1$ 機能を調節する可能性が示唆されます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドラベ症候群は重篤な乳児期発症のてんかんです。新しい治療薬の開発が求められていて、その一つとして、電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 1$ を標的とする分子戦略を挙げることができます。本研究は、 $\alpha 1$ と相互作用するタンパク質として、線維芽細胞増殖因子相同因子とシナプス関連タンパク質を見出しました。そして、本研究は $\alpha 1$ 内にタンパク質間相互作用領域を同定しました。この領域は $\alpha 1$ 機能を調節できるドラベ症候群治療開発の標的となりうるかと期待されます。

研究成果の概要（英文）：Dravet syndrome is an infantile epileptic encephalopathy characterized with intractable epileptic seizures and developmental delay. Dravet syndrome is associated with loss of function mutations of the gene encoding voltage-gated sodium channel alpha 1 subunit. This study aimed to characterize protein complexes composed of sodium channel alpha 1. We found that sodium channel alpha 1 interacted with fibroblast growth factor homologues factor and synaptic protein. Although fibroblast growth factor homologues factor did not significantly altered properties of sodium channel alpha 1, these protein-protein interactions may regulate functions of sodium channel alpha 1.

研究分野：神経科学

キーワード：てんかん 電位依存性ナトリウムチャンネル タンパク質複合体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 乳幼児期に発症する治療抵抗性てんかん症候群はてんかん性脳症とよばれ、頻回する発作と異常脳波が精神運動発達遅延あるいは退行を引き起こす。てんかん性脳症の発症に多数の遺伝子が関わっていることが、近年の遺伝子解析技術の発展によって明らかにされた。

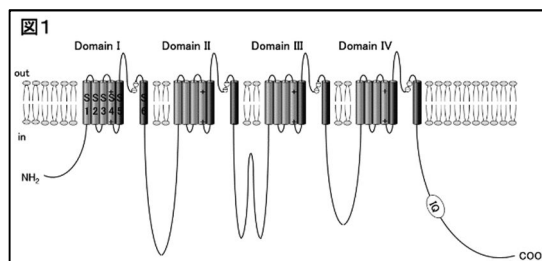
(2) Dravet 症候群はてんかん性脳症に含まれる難治な乳児期発症てんかんである。Dravet 症候群の主因は電位依存性ナトリウムチャンネル 1 の機能不全であり、8 割の患者に電位依存性ナトリウムチャンネル 1 をコードする SCN1A 遺伝子上の変異が認められている。Dravet 症候群の SCN1A 遺伝子変異と相同の遺伝子変異を有するマウスは、ヒト病態を忠実に再現する。この病態マウスモデルを用いた研究から、電位依存性ナトリウムチャンネル 1 の機能不全が抑制性神経細胞の活動性低下を招いて脳の興奮性を高め、その結果、てんかんと精神運動発達遅滞が引き起こされることが分かった (Ogiwara et al. 2007; Ito et al. 2013; Ogiwara et al. 2013; Tatsukawa et al. 2018)。これらの知見から、電位依存性ナトリウムチャンネル 1 の機能を回復させる、あるいは、抑制性神経細胞の活動性を上昇させる、という Dravet 症候群治療戦略の開発を進めている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Dravet 症候群の治療開発に貢献することである。本研究は、電位依存性ナトリウムチャンネル 1 と複合体を形成するタンパク質に注目し、電位依存性ナトリウムチャンネル 1 内にそれらタンパク質が相互作用する領域を同定した。また、複合体形成が電位依存性ナトリウムチャンネル 1 の電気生理学的性質に与える影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 電位依存性ナトリウムチャンネル 1 は6回膜貫通セグメントから成るドメインが4回繰り返した膜タンパク質であり、N末端とC末端、そして膜貫通ドメイン間の3つのループが細胞内にある(図1)。これら細胞内ループ部分タンパク質をコードするcDNAにHA-tagを付加した発現ベクターを構築した。



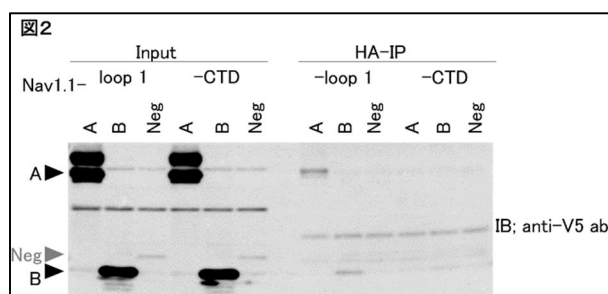
(2) 電位依存性ナトリウムチャンネル 1 と複合体を形成するタンパク質について、シナプス関連タンパク質と線維芽細胞成長因子のcDNAにV5-tagを付加した発現ベクターを構築した。電位依存性ナトリウムチャンネル 1 のC末端のIQドメインに結合することが既知のカルモジュリンについても、V5-tagを付加した発現ベクターを構築した。

(3) 電位依存性ナトリウムチャンネル 1 の細胞内ループ部分タンパク質とシナプス関連タンパク質、線維芽細胞成長因子、あるいはカルモジュリンを培養細胞に共発現させ、細胞溶解液に抗tag抗体を混合して免疫沈降法によりタンパク質を回収した。次に、免疫沈降産物について、ウエスタンブロット法を用いて電位依存性ナトリウムチャンネル 1 やシナプス関連タンパク質、線維芽細胞成長因子、カルモジュリンの有無を解析した。

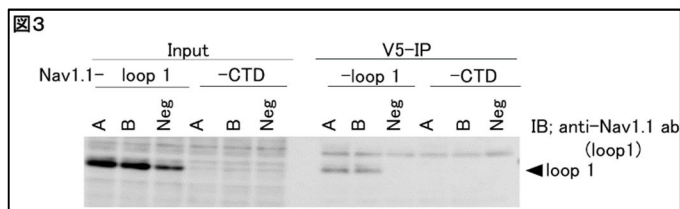
(4) 電位依存性ナトリウムチャンネル 1 と線維芽細胞成長因子を共発現させた培養細胞におけるナトリウム電流の電位依存性やゲート開閉について、ホールセルパッチクランプ法を適用して解析した。

4. 研究成果

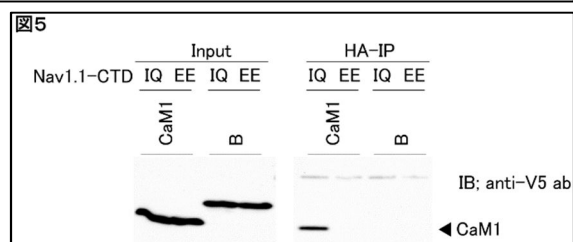
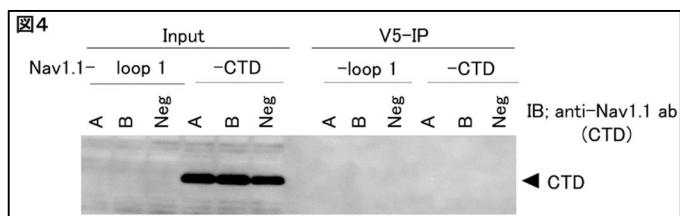
(1) HA-tagを付加した電位依存性ナトリウムチャンネル 1 部分タンパクとV5-tagを付加したシナプス関連タンパク質(A)、あるいは線維芽細胞成長因子(B)を培養細胞に共発現させ、細胞溶解液を調整して抗HA抗体を用いた免疫沈降と抗V5抗体を用いたウエスタンブロット法を実施した。シナプス関連タンパク質(A)と線維芽細胞成長因子(B)が電位依存性ナトリウムチャンネル 1 のループ1に結合することを見出した(図2)。



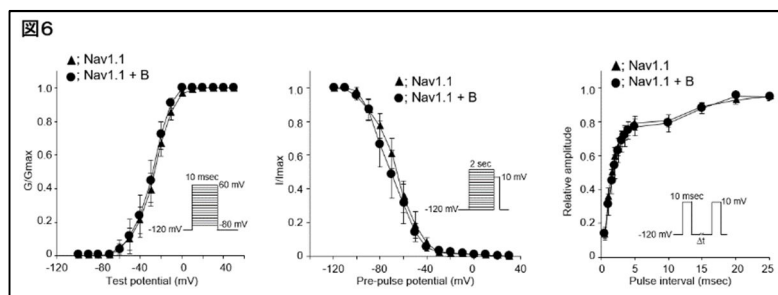
(2) 上述の(1)の方法とは逆に、抗 V5 抗体を用いて免疫沈降を行い、抗 HA 抗体を用いてウエスタンブロット法を実施し、シナプス関連タンパク質 (A) と線維芽細胞成長因子 (B) が電位依存性ナトリウムチャンネル 1 のループ 1 に結合することを再確認した (図 3, 4)。



(3) 上述の(1)と(2)の結果は、線維芽細胞成長因子が電位依存性ナトリウムチャンネル 1 の C 末端には結合しないことを示唆した。しかしながら、電位依存性ナトリウムチャンネル 1 の C 末端には線維芽細胞成長因子が結合すると推察できる配列がカルモジュリン結合 IQ ドメインの上流にあった。カルモジュリンとの結合が線維芽細胞成長因子の C 末端への結合を妨げていると仮定し、IQ EE に変異を導入してカルモジュリンとの結合を妨げた電位依存性ナトリウムチャンネル 1 の C 末端と線維芽細胞成長因子を培養細胞に共発現させて免疫沈降とウエスタンブロットを実施したが、依然として、結合は検出されなかった (図 5)。



(4) 線維芽細胞成長因子と電位依存性ナトリウムチャンネル 1 の複合体形成が電気生理学的性質に与える影響を検討するため、共発現細胞にホールセルパッチクランプ法を適用した。図 6 に示すように、線維芽細胞成長因子 (B) は、電位依存的な活性化 (左パネル)、電位依存的な不活性化 (中間パネル)、そして不活性化からの回復 (右パネル) を変化させなかった。



(5) シナプス関連タンパク質と線維芽細胞増殖因子が共に電位依存性ナトリウムチャンネル 1 のループ 1 に結合することから、ループ 1 が治療標的の候補になりうるが示唆された。また電位依存性ナトリウムチャンネル 1 に結合する分泌タンパク質も見出し、細胞外から電位依存性ナトリウムチャンネル 1 の機能を調節できる手掛かりになる可能性が示唆された。

< 引用文献 >

- Ito et al. *Neurobiology of Disease*, 49: 29-40, 2013.
 Ogiwara et al. *Journal of Neuroscience*, 27(22): 5903-5914, 2007.
 Ogiwara et al. *Human Molecular Genetics*, 22(23): 4784-4804, 2013.
 Tatsukawa et al. *Neurobiology of Disease*, 112: 24-34, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamagata Tetsushi, Ogiwara Ikuo, Tatsukawa Tetsuya, Otsuka Yuka, Mazaki Emi, Inoue Ikuyo, Tokonami Natsuko, Hibi Yurina, Itohara Shigeyoshi, Yamakawa Kazuhiro	4. 巻 2021
2. 論文標題 Scn1a-GFP transgenic mouse revealed Nav1.1 expression in neocortical pyramidal tract projection neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 437794
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.03.31.437794	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Rai Dilip, Akagi Takumi, Shimohata Atsushi, Ishii Toshiyuki, Gangi Mie, Maruyama Takuma, Wada Kiyama Yuko, Ogiwara Ikuo, Kaneda Makoto	4. 巻 158
2. 論文標題 Involvement of the C terminal domain in cell surface localization and G protein coupling of mGluR6	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 837 ~ 848
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jnc.15217	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamagata Tetsushi, Raveau Matthieu, Kobayashi Kenta, Miyamoto Hiroyuki, Tatsukawa Tetsuya, Ogiwara Ikuo, Itohara Shigeyoshi, Hensch Takao K., Yamakawa Kazuhiro	4. 巻 141
2. 論文標題 CRISPR/dCas9-based Scn1a gene activation in inhibitory neurons ameliorates epileptic and behavioral phenotypes of Dravet syndrome model mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 104954 ~ 104954
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nbd.2020.104954	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Miyamoto Hiroyuki, Tatsukawa Tetsuya, Shimohata Atsushi, Yamagata Tetsushi, Suzuki Toshimitsu, Amano Kenji, Mazaki Emi, Raveau Matthieu, Ogiwara Ikuo, Oba-Asaka Atsuko, Hensch Takao K., Itohara Shigeyoshi, Sakimura Kenji, Kobayashi Kenta, Kobayashi Kazuto, Yamakawa Kazuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Impaired cortico-striatal excitatory transmission triggers epilepsy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1917
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-09954-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

[学会発表] 計19件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ogiwara I, Yin C, Shimohata A, Gangi, M, Kaneda M.
2. 発表標題 Analysis of interaction between voltage-gated sodium channel Nav1.1 and fibroblast growth factor homologous factor
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akagi T, Shimohata A, Ogiwara I, Kaneda M.
2. 発表標題 Role of N-linked glycosylation on the extracellular domain in mGluR6 cell surface localization
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荻原郁夫、立川哲也、眞崎恵美、Maurice Montal、山川和弘
2. 発表標題 自閉症モデルとしての電位依存性ナトリウムチャネル 2 マウスの解析
3. 学会等名 第251回 生理学東京談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ogiwara I.
2. 発表標題 Identification of interacting proteins with the voltage-gated sodium channel Nav1.1
3. 学会等名 第53回日本てんかん学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ogiwara I.
2. 発表標題 Screening of interacting proteins with voltage-gated sodium channel Nav1.1
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shimohata A, Rai D, Akagi T, Ishii T, Gangi M, Maruyama T, Kiyama Y, Ogiwara I, Kaneda M.
2. 発表標題 The C-terminal domain is required for mGluR6 cell-surface localization
3. 学会等名 Experimental Biology meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ogiwara I.
2. 発表標題 Analysis of protein candidates interacting with voltage-gated sodium channel Nav1.1
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤木 巧, Rai Dilip, 下畑 充志, 石井 俊行, 雁木 美衣, 丸山 拓真, 木山 裕子, 荻原 郁夫, 金田 誠
2. 発表標題 代謝型グルタミン酸6型受容体の細胞膜発現におけるC末端領域の役割
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ogiwara I.
2. 発表標題 Identification of proteins that interact with voltage-gated sodium channel Nav1.1
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下畑 充志, 赤木 巧, 荻原 郁夫, 金田 誠
2. 発表標題 代謝型グルタミン酸6型受容体C末端領域と相互作用するタンパク質の探索
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤木 巧, 下畑 充志, 荻原 郁夫, 金田 誠
2. 発表標題 初代培養網膜双極細胞における代謝型グルタミン酸受容体6型の細胞内局在および膜発現の解析
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ogiwara I.
2. 発表標題 Identification of binding partners of the voltage-gated sodium channel Nav1.1
3. 学会等名 第97回日本生理学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shimohata A, Rai D, Akagi T, Ishii T, Gangi M, Maruyama T, Kiyama Y, Ogiwara I, Kaneda M.
2. 発表標題 Involvement of the C-terminal domain in cell surface expression and G-protein coupling of mGluR6
3. 学会等名 第97回日本生理学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akagi T, Shimohata A, Ogiwara I, Kaneda M.
2. 発表標題 Membrane expression of mGluR6 transfected cultured retinal bipolar cells
3. 学会等名 第97回日本生理学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ogiwara I.
2. 発表標題 Identification of proteins that interact with the voltage-gated sodium channel Nav1.1
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamakawa K, Miyamoto: H, Tatsukawa T, Yamagata T, Raveau M, Ogiwara I.
2. 発表標題 Impaired excitatory neurotransmission in epilepsy, intellectual disability, autism and schizophrenia caused by sodium channel gene SCN2A mutations
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Middleton SJ, Kneller EM, Chen S, Ogiwara I, Yamakawa K, McHugh TJ.
2. 発表標題 Altered hippocampal replay underlies memory impairments in SCN2A heterozygous mice
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akagi T, Dilip R, Shimohata A, Ishii T, Gangi M, Maruyama T, Ogiwara I, Kaneda M.
2. 発表標題 Roles of the C-terminal domain in cell surface expression of mGluR6
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荻原 郁夫
2. 発表標題 遺伝子変異マウスを用いたSCN2A遺伝子関連てんかんの発症機序解明
3. 学会等名 第7回日本医科大学包括てんかん診療ミーティング (NMS-ENM) 学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>PRESS RELEASE - 名古屋市立大学 https://www.nagoya-cu.ac.jp/media/20200525.pdf てんかん発症の新たな神経回路を発見 https://www.riken.jp/press/2019/20190516_1/</p>

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
研究協力者	尹 成珠 (Yin Chengzhu)	日本医科大学・システム生理学・助教 (32666)	
研究協力者	下畑 充志 (Simohata Atsushi)	日本医科大学・感覚情報科学・ポストドクター (32666)	
研究協力者	雁木 美衣 (Gangi Mie)	日本医科大学・システム生理学・助教 (32666)	
研究協力者	金田 誠 (Kaneda Makoto)	日本医科大学・感覚情報科学・教授 (32666)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関