

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17314

研究課題名（和文）KCNQ2が起因する2つのてんかんの分子病態解析

研究課題名（英文）Molecular pathology analysis of two type epilepsy caused by KCNQ2

研究代表者

木村 雄一（KIMURA, Yuichi）

東京農業大学・農学部・助教

研究者番号：40755691

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：自然終息性家族性新生児てんかんと発達性てんかん性脳症は電位依存性カリウムチャネルKCNQ2の遺伝子変異が起因することが知られているが、なぜ遺伝子変異によって病態が分かれてしまうのか明らかにされていない。本研究ではKCNQ2の遺伝子変異が遺伝子発現にどのような影響を及ぼすのか解析した。その結果、KCNQ2は細胞内で切断されること、そしてその切断レベルは遺伝子型によって有意に異なることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性のてんかんは未だに根本的な治療法は確立されておらず、また根治薬も存在しない。その原因のひとつとして、てんかんの分子病態の多くが明らかにされていないことが挙げられる。てんかんの分子病態を明らかにするために分子基盤の構築が望まれる。本研究で、KCNQ2は細胞内で切断されることを新規に明らかにした。本研究の成果はてんかんの分子病態の理解、新たな治療法の確立および創薬に貢献できるものである。

研究成果の概要（英文）：“Self-limited familial neonatal epilepsy” and “Developmental and epileptic encephalopathies” are caused by genetic mutations of Voltage-gated potassium channel, KCNQ2. However, it is unknown that how genetic mutations lead to two type pathology. In this study, we focused the gene expression of KCNQ2. Our results revealed KCNQ2 protein is cleaved in a cell, and the cleavage level shows significantly different due to genotypes.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子発現制御 翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

てんかんは神経活動の電氣的刺激の乱れによって、発作が引き起こされる。良性とされるてんかんは小児期から若年期に発症し一定の年齢で発作が治ることも知られている。一方で脳障害に伴い運動機能や知能への発達障害を伴う重篤なてんかんもある。しかしながら、どうして異常な神経活動が引き起こされるのかは明らかにされていない。また治療においては、抗てんかん薬の投薬によって神経活動を安定化させることで発作を抑えることができるが、根本的な治療法は未だ確立されていない。

自然終息性家族性新生児てんかん（“良性家族性新生児てんかん”から総称変更）と発達性てんかん性脳症（“早期乳幼児てんかん性脳症”から総称変更）は遺伝子変異が起因する場合もあることが知られている。前者は生後数日で発症するが、数週間で治り、予後も良好である。一方で、後者は難病指定されておりてんかん性脳症を引き起こし、発達障害を伴う。これまでの報告から、電位依存性カリウムイオンチャネルをコードする *KCNQ2* の遺伝子変異（一塩基多型・SNP）が原因であることが明らかにされている。さらに、両者に関わる SNPs は少なくとも 40 変異以上報告されている (Orhan et al., 2014)。

KCNQ2 が起因するてんかんは患者のゲノムスクリーニングのデータを基に世界中から報告されており、多くの症例報告が論文やウェブサイトを通じて公開されている。これらの報告を基にして、生理学的解析から SNPs が異常な神経活動を引き起こすことが明らかにされている。しかしながら、両病態を区別するような変異部位の規則性が見られないことも含め、遺伝子変異によってなぜ病態が分かれるのか、分子レベルで何が起きているのか、分子レベルと病態をつなぐ機構は未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

先行研究から、*KCNQ2* のいくつかの遺伝子変異はタンパク質レベルで発現量に差が生じることや、タンパク質の翻訳後修飾において、リン酸化が *KCNQ2* の機能制御に関わることが報告されている (Salzer et al., 2017)。しかしながら、なぜタンパク質レベルで発現量が異なったのか、また、翻訳後修飾による *KCNQ2* の機能変化と病態との関連性については明らかにされていない。そこで、*KCNQ2* が起因するてんかんの分子病態を明らかにすることを目標として、本研究では遺伝子発現制御に着目し、遺伝子変異によって生じる分子レベルでの変化を解析することを目的とした。

所属機関では自然終息性家族性新生児てんかんモデルマウス 2 系統 (No.2, 5)、発達性てんかん性脳症モデルマウス 3 系統 (No.1, 3, 4) の遺伝子改変マウスを樹立していることから、将来的な *in vivo* での解析を見据えて、この 5 つの遺伝子変異（非同義置換）に着目した。

3. 研究の方法

(1) m*KCNQ2* の遺伝子発現レベルの検討

遺伝子発現レベルを解析するにあたり、マウス *Kcnq2* 遺伝子 (*mKcnq2*) をクローニングしたのち、C 末端に 3xFLAG エピトープタグを融合したプラスミドを健常型として作製した。この健常型を鋳型として、人為的操作によって各遺伝子変異を施した計 5 つの変異型 m*KCNQ2* プラスミドを作製した。

マウス神経芽腫細胞株 Neuro2A 細胞に各遺伝子型の m*KCNQ2* プラスミドを導入し、24 時間後に回収した細胞から RNA およびタンパク質を抽出した。抽出した RNA はリアルタイム PCR 法で *mKcnq2* mRNA の発現量を検討した。抽出したタンパク質は FLAG 抗体を使用してウエスタンブロット法にて m*KCNQ2* の発現量を検討した。

(2) m*KCNQ2* のリン酸化レベルの検討

先行研究から *KCNQ2* はリン酸化を介して活性調節がされている。そこで、リン酸化レベルを簡易的に調べることができる Phos-tag を加えたアクリルアミドゲルを用い、FLAG 抗体を使用してウエスタンブロット法にて、遺伝子変異が *KCNQ2* のリン酸化レベルに影響するのかが検討した。

(3) m*KCNQ2* の切断および切断部位の検討

初めに作製した m*KCNQ2* プラスミドを鋳型に、m*KCNQ2* の N 末端に 1xMYC エピトープタグを追加したプラスミドを作製し、MYC 抗体を用いてウエスタンブロット法を行なった。また、人為的操作によって任意のアミノ酸配列を欠損させた m*KCNQ2* プラスミドを作製し、ウエスタンブロット法を行なった。

4. 研究成果

(1) mKCNQ2 の発現パターンは遺伝子型によって異なる

リアルタイム PCR 法による解析から、*mKcnq2* mRNA の発現量は遺伝子型間において有意な差は認められなかった。一方で、ウエスタンブロット法の解析結果から mKCNQ2 タンパク質の発現量に対しても有意な差は認められなかったが、全長よりも短いと推察される mKCNQ2 (mKCNQ2S) の発現が検出された。さらに、この KCNQ2S の発現量は健常型と比較して、No. 1, 2, 5 は有意に高く、No. 3, 4 は有意に低いことが明らかにされた (図 1)。

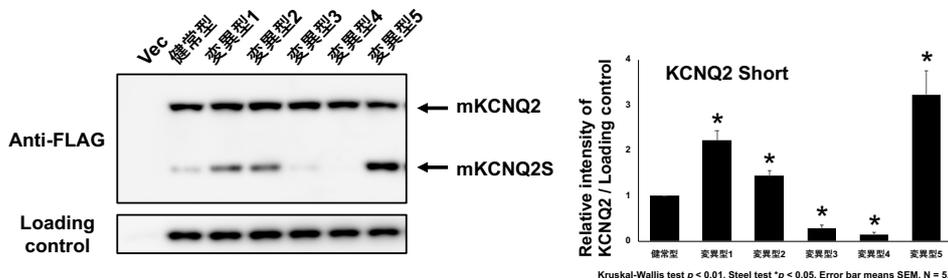


図 1. mKCNQ2 の発現および発現量の比較

(2) mKCNQ2 のリン酸化レベルは変化しない

KCNQ2 のリン酸化が機能調節に寄与していることが報告されていることから、Phos-tag ゲルでウエスタンブロット法を行なった。しかしながら、健常型と比較して各遺伝子型に対するリン酸化レベルの変化は見られなかった。このことから、少なくとも今回着目した遺伝子変異は mKCNQ2 のリン酸化レベルに影響を及ぼすわけではなく、別のメカニズムで病態に関わることが示された。

(3) mKCNQ2 は細胞内で切断もしくは分解されている

これまでに KCNQ2S に対する報告はされていない。また、本研究で明らかにされた KCNQ2S は、異常な翻訳によって合成されたものなのか、タンパク質の切断や分解によって生じたものであるのかはわからない。そこで、どちらの原因か明らかにする目的で N 末端に MYC タグを融合した mKCNQ2 プラスミドを使用してウエスタンブロット法を行なった。もし、異常な翻訳によって合成された場合、短い mKCNQ2 は検出されるが完全長は検出されないことが推測される。また、切断や分解によって生じた場合は、完全長と mKCNQ2S よりもさらに短いタンパク質が検出されることが想定される。解析の結果、完全長と mKCNQ2S よりも短い mKCNQ2 が検出された。さらに、この短い mKCNQ2 の発現パターンは図 1 で得られた結果と類似していることから、mKCNQ2S は異常な翻訳によって合成されたものではないことが考えられた。

(4) mKCNQ2 は新規のメカニズムによって切断される mKCNQ2 と mKCNQ2S の分子量の差から、切断されていると予測される領域を欠損させた欠損型 mKCNQ2

プラスミドを作製し、ウエスタンブロット法を行なった。その結果、任意の領域を欠損させた場合、mKCNQ2S の発現が抑制された (図 2)。

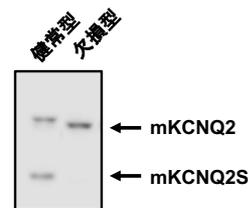


図 2. mKCNQ2S の発現が抑制される

(5) KCNQ2 の切断は進化上保存されている

これまでに明らかにしてきた mKCNQ2 の切断は、マウスのみで生じるのか、ヒトでも保存されている現象であるのか検討する目的で、ヒトの KCNQ2 遺伝子 (*hKCNQ2*) をクローニングした。hKCNQ2 プラスミドを作製し、ウエスタンブロット法を行なった。その結果、mKCNQ2 と同様に、hKCNQ2 でも切断されていることが確認された。さらに興味深いことに、hKCNQ2S の発現量においても、mKCNQ2S と同様なパターンを示した (図 3)。このことから、KCNQ2 の切断は進化上保存されたメカニズムであることが示唆された。

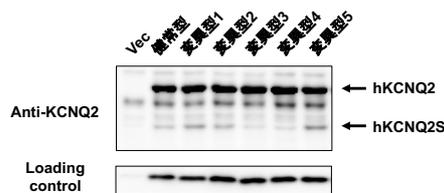


図 3. hKCNQ2 の発現パターン

これまで KCNQ2 の遺伝子発現に着目した報告は少数であったが、以上の研究成果から、KCNQ2 は未知のメカニズムによって切断されること、その切断レベルも遺伝子型によって異なること、さらには KCNQ2 のタンパク質切断が進化上保存されたメカニズムであることが明らかにされ

た。本研究では切断された **KCNQ2S** と病態との関連性を明らかにするには至らなかったが、今後は **KCNQ2S** の機能解析および病態との関連性について引き続き解析していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村雄一，廣瀬伸一
2. 発表標題 電位依存性カリウムチャネルKCNQ2の遺伝子発現制御機構の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------