

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791048

研究課題名（和文）KCNQ2 ノックインマウスを用いた予後不良型 BFNC の病態解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms developing BFNC with poor outcome using KCNQ2 knock-in mouse model

研究代表者

中村 友紀（NAKAMURA YUKI）

福岡大学・てんかん分子病態研究所・研究員

研究者番号：90535072

研究成果の概要（和文）：熱性けいれん患者 96 人の遺伝子スクリーニングを行い、過分極活性化環状ヌクレオチド依存性チャンネル(HCN)2 の変異(S126L)を発見した。熱性けいれんの病態に近づけるため灌流温度を室温から 38 度に上昇させると、変異型の $V_{1/2}$ が野生型と比べ有意に大きく脱分極側に移動し、開口速度が短縮した。サイクリック AMP (cAMP) に対する反応性は野生型と変異型で有意差は認められなかった。以上のことからこの変異は発熱によって神経の興奮性を変化させることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：A novel missense mutation (S126L) in *HCN2* was identified from febrile seizure (FS) patients. As bath temperature was raised at 38 °C, $V_{1/2}$ of mutant channels shifted depolarized side and fast time constant of mutant channels accelerated compared with wild-type channels. There was no significant difference between wild-type and mutant channels about responses to cyclic AMP (cAMP). These results suggest that this mutation might alter neuronal excitability during hyperthermia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生理学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：てんかん、イオンチャンネル、遺伝子、電気生理、変異体、カリウムチャンネル、過分活性化環状ヌクレオチド依存性チャンネル、熱性けいれん

1. 研究開始当初の背景

良性家族性新生児けいれん(Benign Familial Neonatal Convulsions,以下 BFNC と略す)は生後 2～3 日のけいれん発作にて発症する疾患であり、*KCNQ2* と *KCNQ3* の変異によって発症する、いわゆるチャンネル病であることが遺伝子解析により発見され、今日まで多くの遺伝子変異が報告されている。

当初我々は BFNC 患者を模した *KCNQ2* ノックインマウスの作成と機能解析を実施し発表する予定であったが、同時に検討を進めていた *HCN2* の遺伝子解析において興味深い結果を得られたのでここでは当研究室において発見された熱性けいれん患者の *HCN2* 変異の機能解析について報告する。熱性けいれんは生後 6 ヶ月から 5 歳ごろに

好発する、38度以上の発熱に伴って発症するけいれん疾患である。本邦での発症率は8~10%であり、よく遭遇する救急疾患のひとつであるが、詳細なメカニズムについては未だ明らかにされていない。近年、熱性けいれん家系の解析より *SCN1A*, *SCN9A*, *GABRG2* などナトリウムチャンネルや GABA を構成する遺伝子が原因遺伝子として同定されているが、大多数の熱性けいれん患者においてはこれらの異常が確認されておらず熱性けいれんの発症機序、成因は未だに明らかにされていない。

2. 研究の目的

我々は熱性けいれんと過分活性化環状ヌクレオチド依存性チャンネル(HCN)を構成する遺伝子である *HCN2* の関係に注目した。HCN チャンネルの働きは細胞内にナトリウム・カリウムイオンを流入させることであり(I_h 電流と呼ばれる)、神経細胞の静止膜電位の決定に大きく関与していると考えられている。近年、神経の異常興奮に I_h 電流が関係しているという報告が相次いでいる。また熱性けいれん以外のけいれん疾患にも HCN チャンネルが関与しているという報告もある。このようにけいれん疾患と HCN チャンネルには何らかの因果関係があると推測されるが、孤発型の熱性けいれんにおける *HCN2* の寄与については未だに明らかにされていない。以上の事項を解明するため、我々は熱性けいれん患者血液より *HCN2* 遺伝子をスクリーニングし、変異を同定後、同型の点変異体を作成した。更に培養細胞を用いて発現実験を行い、変異体の機能解析を行った。

3. 研究の方法

(1) DNA スクリーニング

96名の日本人熱性けいれん患者血液よりゲノム DNA を抽出後、*HCN2* 遺伝子を PCR 法にて増幅した。PCR にて増幅した遺伝子産物の塩基配列をオートシーケンサーにて解析した。

(2) 点変異体の作成

スクリーニングによって同定された変異と同じ変異を持つ DNA を、オーバーラップ PCR 法により作成した。

(3) HCN チャンネルの電流測定

培養細胞は HEK293 を使用した。トランスフェクションには Lipofectamine2000 (Invitrogen) を使用した。トランスフェクション後 24~48 時間後に、-40 mV に電位固定し全細胞電流測定を行った。電流測定・取り込み・解析にはそれぞれ EPC8 (HEKA, Germany), PCI-6221 (National Instruments, Toronto, Ont., Canada), Whole Cell Analysis Program version 4.1.0 (John Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, UK) を使用した。

還流液の温度調節には TC-324B (Warner Instruments, Hamden, CT) を使用した。還流液組成は、(単位 mM): 110 NaCl, 30 KCl, 0.5 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, and 5 HEPES, であり pH は NaOH で 7.4 に調整した。電極内液組成は、(単位 mM): 130 KCl, 10 NaCl, 0.5 MgCl₂, 1 EGTA, and 5 HEPES, であり pH は KOH で 7.4 に調整した。

4. 研究成果

(1) 変異体の発見

96名の日本人熱性けいれん患者の *HCN2* を解析したところ、うち1名からセリンからロイシンへの変異 (S126L) を発見した。変異は細胞内 N 末端に位置し、多くの動物種で保存されていた。

(2) HCN 野生型と変異型の機能解析

HCN2 DNA 内に S126L を持つ点変異体を作成し、これと GFP 遺伝子を HEK293 にトランスフェクションした。

HEK293 細胞に強制発現した *HCN2* 蛋白によって構成された野生型 *HCN2* ホモチャンネル (以下野生型 *HCN2* と略す) を室温 (25°C) にて電流測定し解析を行った。また変異型 *HCN2* ホモチャンネル (以下変異型 *HCN2* と略す) についても同様の実験・解析を行った。上記の実験においては、野生型と変異型で Half maximum activation voltage (以下 $V_{1/2}$)、Slope factor の値に有意差は認めなかった。しかし速い成分の時定数解析を行うと、-100 と -90 mV において変異型が有意に増加していた (図 1a, b)。

図 1 a 25°C 下での野生型 (Wild-type) と変異型 (S126L) の電流トレース

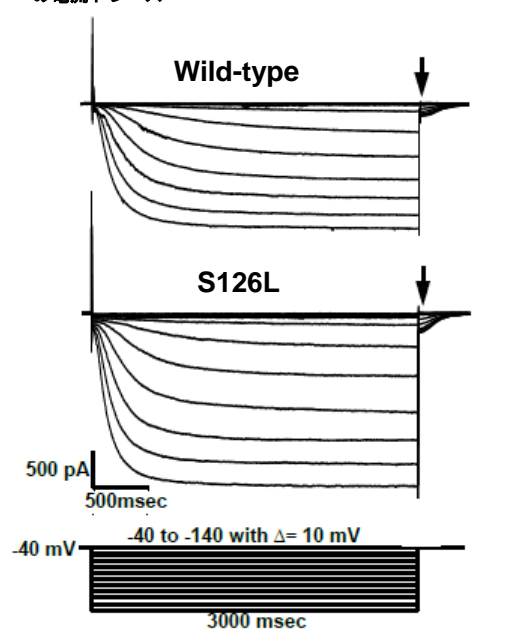
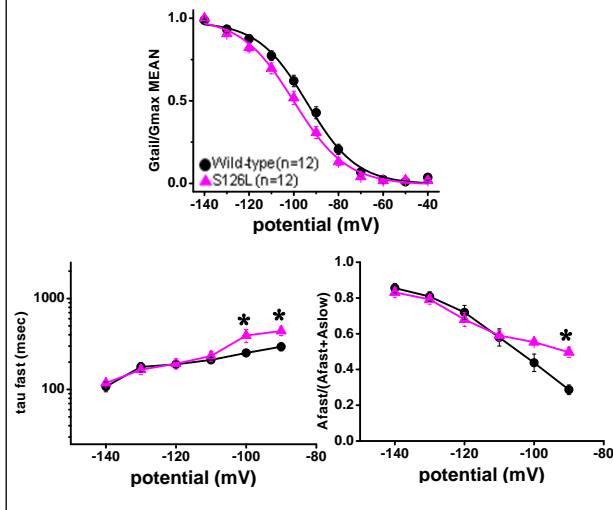
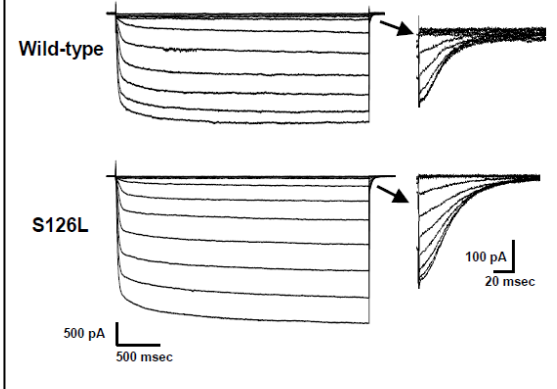


図 1 b 25°C 下での野生型 (Wild-type) と変異型 (S126L) の機能解析



次に熱性けいれん発症時の状態に近づくため、細胞外灌流液の温度を 38°C に設定し 25°C と同様の実験を行ったところ、野生型と比べ変異型 HCN2 ではすべての電位で速い成分の時定数が減少しており、また速い成分における Relative amplitude が増加していた。さらに 25°C と 38°C の $V_{1/2}$ を比較すると、野生型 HCN2 では有意差が認められなかったが、変異型では温度上昇により $V_{1/2}$ が脱分極側に有意に移動した(図 2a, b)。

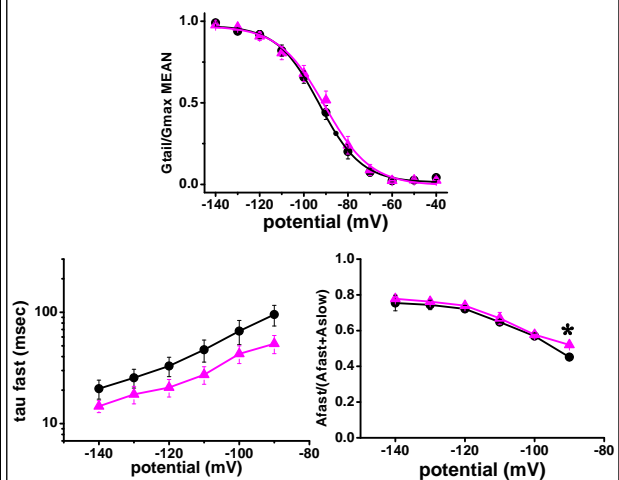
図 2 a 38°C 下での野生型 (Wild-type) と変異型 (S126L) の電流トレース



(3) cAMP の変異型 HCN2 に対する効果
cAMP は HCN チャンネルに対して直接作用し活性化曲線を右方 (脱分極側) にシフトさせることが知られている。我々は温度上昇時に cAMP が変異型 HCN2 に対してどのような効果をもたらすか検討した。25°C での実験において変異型 HCN2 の活性化曲線は野生型と同様に脱分極側にシフトしたが、変異型のほうがより低濃度の cAMP にて反応した。また、2 μ M の cAMP で比較した場合、灌流温度を上昇させると変異型の $V_{1/2}$ は野生型と比

べより大きく脱分極側へ移動した。
上記(1)(2)(3)の実験結果より、今回発見された変異型(S126L)の性質をまとめると、
(1) S126L を持つ HCN2 チャンネルは野生型とは異なる温度感受性がある。
(2) 温度上昇することで野生型よりも早く活性化する。
(3) S126L における活性化過程の変化は、cAMP 依存性によるものではなく、電位依存性や温度感受性に依るところが大きいと考えられる。
以上の本研究結果から、HCN2・S126L によって構成される電流は人体において発熱時、神経細胞の興奮性を増大させる可能性があることが示唆された。

図 2 b 38°C 下での野生型 (Wild-type) と変異型 (S126L) の機能解析



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① 廣瀬伸一、日暮憲道、中村友紀、黄壽卿、石井敦士、てんかんと遺伝子、Modern Physician、査読なし、Vol.32、No.3、2012、p282-288

② 廣瀬伸一、日暮憲道、中村友紀、黄壽卿、石井敦士、てんかん遺伝子診療は臨床に役立つか?、神経内科、査読なし、Vol.74、No.5、2011、p460-466

③ 中村友紀、廣瀬伸一、熱性けいれん患者において発見された HCN2 遺伝子変異の機能解析、Research、査読なし、Vol.16、No.4、2011、p24-26

[学会発表] (計 4 件)

① 中村友紀、石秀玉、沼田朋大、森泰生、井上隆司、廣瀬伸一、熱性けいれん患者において発見された HCN2 変異は温度依存的な活性を変化させる、第 89 回日本生理学会、2012 年 3 月 29 日、長野県松本文化会館

② Yuki Nakamura、Functional analysis of

mutant hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 2 (HCN2) found in febrile seizure patients、The 1st international symposium of research institute for the molecular pathomechanisms of epilepsy、2011年7月26日、Fukuoka University

③ 中村友紀、石秀玉、井上隆司、廣瀬伸一、熱性けいれん患者において発見された HCN2 変異は温度依存的な活性を変化させる、第 88 回日本生理学会、2011 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜

④ 中村友紀、石秀玉、井上隆司、廣瀬伸一、熱性けいれん患者において発見された HCN2 遺伝子変異体の機能解析、第 87 回日本生理学会、2010 年 5 月 19 日、盛岡市民文化ホール

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

「福岡大学てんかん分子病態研究所ホームページ」

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/epilepsy/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 友紀 (NAKAMURA YUKI)

福岡大学・てんかん分子病態研究所・研究員

研究者番号：90535072

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：