

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31日現在

機関番号：82401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22791154
 研究課題名（和文） EFHC1変異による小胞体カルシウム貯蔵量の調節を介したてんかん発症機序の解明
 研究課題名（英文） Understanding the pathology of epilepsy through the regulation of endoplasmic reticulum calcium homeostasis
 研究代表者
 鈴木 俊光 (SUZUKI TOSHIMITSU)
 独立行政法人理化学研究所・神経遺伝研究チーム・研究員
 研究者番号：20373318

研究成果の概要（和文）：
 本研究では、細胞内 Ca²⁺調節機構で myoclonin1 が果たす役割を解析する事で、EFHC1 変異が引き起こすてんかん発症メカニズムの解明することを目的とした。myoclonin1 が IP₃R1 との結合を介して細胞内 Ca²⁺動態に影響を及ぼすことを見いだした。これらの結果は、EFHC1 遺伝子変異により誘発される細胞内 Ca²⁺動態の異常がてんかんの分子基盤である可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：
 We found that myoclonin1 modulates ER-Ca²⁺ homeostasis through interaction with C-terminal of IP₃R1. Our results suggest that impaired intracellular Ca²⁺ mobilization may be the molecular basis for epilepsy caused by EFHC1 mutations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：

てんかん、EFHC1、IP₃レセプター、小胞体カルシウム

1. 研究開始当初の背景

若年性ミオクロニーてんかん (JME) は、思春期(8-20歳)に発症し、ミオクロニー発作、強直間代発作などを特徴とする最も頻度の高い特発性てんかん(てんかん発作のみを症状とし、脳内病変を特定することが出来ない機能性てんかん)の一つである。申請者らは、遺伝的連鎖解析、ポジショナルクローニ

ングにより、第6番染色体短腕 6p12 から原因遺伝子の一つとして新規の遺伝子 EFHC1 の同定に成功した。この遺伝子から家系内で連鎖を示す5種類のミスセンス変異をメキシコのJME6家系から発見した (Suzuki *et al.* Nature Genetics, 2004)。さらに、申請者を含む研究チームは、新たな4種類のJME疾患変異(2種類のミスセンス変異、1つのナンセンス変異と1つのフレームシフト変異)を

発見し報告した (Medina *et al.*, Neurology, 2008)。また、*EFHC1* の疾患変異は、複数のグループより報告が続いている。それらの疾患変異は、ヨーロッパ人の JME 家系、イタリア人の JME 家系、白人の若年性欠伸てんかん、潜因性の側頭葉てんかん、さらに非分類型の特発性全般てんかんから見ついている。このことより、*EFHC1* は JME 発症に関与しているだけでなく、特発性全般てんかんの痙攣誘発に広く関与している可能性もでてきている (Ma *et al.*, 2006, Annesi *et al.*, 2006, Stogmann *et al.*, 2007)。

現在までに同定されている特発性てんかん原因遺伝子のほとんどがイオンチャネルをコードしているが、*EFHC1* はイオンチャネルをコードしない機能未知のタンパク myoclonin1 をコードしている。Myoclonin1 には 2 種類のアイソフォームがある。一つは、DM10 と呼ばれる機能不明のドメインを 3 つ、更に EF-hand と呼ばれる、カルシウム結合蛋白でよく見られるカルシウムイオン (Ca^{2+}) 結合モチーフを 1 つ持つ、640 アミノ酸からなる蛋白 (long フォーム) で、もう一つは、DM10 を 1 つだけ持ち 278 アミノ酸からなる蛋白 (short フォーム) である。Myoclonin1 はクラミドモナスの軸糸、マウス精子の鞭毛のような運動性を持つ繊毛で発現していると報告され (Ikeda *et al.*, 2005)、申請者らも、このタンパクが胎生期には脳室内の脈絡叢の細胞で、出生後は気管や脳室の内壁を覆う細胞の繊毛で多く発現がみられる事を報告した (Suzuki *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008)。

2009 年、申請者らは、*Efhc1* 遺伝子改変マウスを作製・解析し、遺伝子改変マウス (ヘテロおよびホモ接合体) において自然誘発的なミオクローヌス発作が野生型と比べ 7-8 倍多く出現すること、このミオクローヌス発作出現時に異常な活動電位が脳波に出現すること、痙攣誘発剤の一つペンチレンテトラゾル (PTZ) に対し高い感受性を示すことなど、てんかん患者と類似の症状を示すことを発見し、*Efhc1* の欠損がてんかんを引き起こすことを示唆する直接的な生物学的証拠として報告した (Suzuki *et al.*, Hum. Mol. Genet., 2009)。さらに、遺伝子改変マウスで脳室壁の上皮細胞繊毛の運動機能の低下が観察されるなどいくつかの特異的な異常症状を示すことも明らかにし、併せて報告した (Suzuki *et al.*, Hum. Mol. Genet., 2009)。しかしながら現在までのところ、分子レベルでの JME 発症メカニズムは明らかとされていない。

参考文献

Suzuki T, Miyamoto H, Nakahari T, *et al.*, (2009) *Efhc1* deficiency causes

spontaneous myoclonus and increased seizure susceptibility. Hum. Mol. Genet. 18:1099-109.

Suzuki T, Inoue I, Yamagata T, *et al.* (2008) Sequential expression of *Efhc1/myoclonin1* in choroid plexus and ependymal cell cilia. Biochem. Biophys. Res. Commun. 367(1):226-33.

Medina MT, Suzuki T, Alonso ME *et al.*, (2008) Novel mutations in myoclonin1/*EFHC1* in sporadic and familial juvenile myoclonic epilepsy. Neurology 70:2137-44.

Annesi F, Gambardella A., Michelucci R, *et al.* (2007) Mutational analysis of *EFHC1* gene in Italian families with Juvenile Myoclonic Epilepsy. Epilepsia 48:1686-1690.

Stogmann E, Lichtner P, Baumgartner C, *et al.*, (2006) Idiopathic generalized epilepsy phenotypes associated with different *EFHC1* mutations. Neurology 67:2029-31.

Ma S, Blair MA, Abou-Khalil B *et al.*, (2006) Mutations in the *GABRA1* and *EFHC1* genes are rare in familial juvenile myoclonic epilepsy. Epilepsy Res. 71(2-3):129-134.

Ikeda T, Ikeda K, Enomoto M, *et al.*, (2005) The mouse ortholog of *EFHC1* implicated in juvenile myoclonic epilepsy is an axonemal protein widely conserved among organisms with motile cilia and flagella. FEBS Lett. 579:819-822.

Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Aguan K, *et al.* (2004) Mutations in *EFHC1* cause juvenile myoclonic epilepsy. Nature Genetics 36:842-849.

2. 研究の目的

Myoclonin1 の機能は、細胞レベルにおいて、a) myoclonin1 をマウス海馬の初代培養神経細胞に強制発現させると、細胞死を誘導する効果が見られるが、疾患変異を導入した myoclonin1 (変異型) を強制発現させると、野生型で見られた細胞死の効果が有意に減少する、b) R-タイプ・カルシウムチャネル ($\text{Ca}_v2.3$) が myoclonin1 に結合する、c) $\text{Ca}_v2.3$ を安定的に発現させた細胞株に myoclonin1 の野生型を強制発現させると $\text{Ca}_v2.3$ の電流を特異的に増加させるが、変異型を強制発現させると、野生型で見られるほどの電流増加を起ささない、などが分かっている (Suzuki *et al.*, 2004)。しかし、 $\text{Ca}_v2.3$ 阻害剤を使用しても、野生型 myoclonin1 を過剰発現させた細胞で見られた細胞死の効

果を完全には抑制できない事から、細胞外からのカルシウムイオン(Ca²⁺)の流入量の増加のみでなく、細胞内の小胞体からのCa²⁺放出の関与が推測される。申請者を含む研究グループは、myoclonin1 がイノシトール三リン酸(IP₃)受容体の機能調節に重要な C 末尾部に結合する事で小胞体内のCa²⁺貯蔵量を調節している事を見い出しており(未発表データ)、また、申請者はmyoclonin1 とIP₃受容体両者に結合するタンパクを発見しており、さらに免疫沈降実験の結果から、さらなるタンパクの関与も想定している。本研究課題では、IP₃受容体を中心としたmyoclonin1 を含む複合体を解析することで、細胞内Ca²⁺調節機構でmyoclonin1 が果たす役割を詳細に解析する事で、*EFHC1* 変異が引き起こすてんかん発症メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 結合領域の特定

IP₃受容体とmyoclonin1 の両タンパクに結合するタンパクとIP₃受容体およびmyoclonin1 との結合領域を特定するために、それぞれのタンパクの部分欠損変異タンパクを哺乳細胞で発現させるための発現コンストラクトの作製を行った。これらのコンストラクトを哺乳動物細胞株に導入し変異タンパクを発現させ、この細胞抽出液を用いた免疫沈降法により結合領域の絞り込みを行った。初めそれぞれの変異タンパクを作製し、おおよその結合領域を特定し、そこからさらに領域を狭めるための部分欠損変異タンパクを設計した。IP₃R1 上のmyoclonin1 結合領域に関しては、どのアミノ酸が結合に重要なのかを決定するために、複数のアミノ酸置換変異タンパクを作成し、検討を行った。

(2) 相互作用が直接結合によるものか、他のタンパクを介して複合体を形成しているのかどうかの検討

グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST) およびマルトース結合タンパク質(MBP)タグ融合タンパク質を発現させるための大腸菌用発現コンストラクトの作製を行い、融合タンパクを大腸菌で発現させ、大腸菌破碎液からカラム精製した融合タンパク同士で結合実験を行った。

(3) myoclonin1 とIP₃受容体を含む複合体との結合阻害実験

myoclonin1 が相互作用するタンパクの結合領域の蛍光タンパクと融合したペプチドを発現するコンストラクトを作製した。このペプチドを細胞内に導入することで

myoclonin1 とIP₃受容体を含む複合体間の結合を阻害し、その影響を観察した。小胞体のCa²⁺貯蔵量は、fura-2 蛍光Ca²⁺インジケータを用いたCa²⁺イメージングにより測定した。また、この結合阻害がIP₃誘発Ca²⁺放出(IICR)に対して影響を及ぼすかどうかATPでIP₃を誘導し、小胞体からのCa²⁺放出をCa²⁺イメージングにより測定した。

4. 研究成果

EFHC1 遺伝子のコードするタンパクmyoclonin1 がIP₃R1 に結合する領域をIP₃R1 の部分欠損変異タンパクを用いた免疫沈降法により詳細に決定した。また、myoclonin1 上のIP₃R1 結合部位も同様の方法を用いて決定した。IP₃R1 上のmyoclonin1 結合領域に関しては、複数のアミノ酸置換変異タンパクを作成し、どのアミノ酸が両タンパクの結合に重要なのかを決定した。myoclonin1 とIP₃R1 のc末端のタンパクを精製し、この両タンパク間の結合が直接結合であることを確認した。*Efhc1* ノックアウトマウス由来の細胞と野生型マウス由来の細胞を用いたCa²⁺イメージング法で、細胞内Ca²⁺動態の違いがあることを確認した。myoclonin1 が相互作用するIP₃R1 の結合領域と蛍光タンパクとを融合したペプチドをHeLa細胞内で過剰発現させることにより、myoclonin1 とIP₃R1 の結合阻害を誘導し、Ca²⁺イメージング法により細胞内Ca²⁺を測定した結果、この結合阻害が細胞内Ca²⁺動態に影響を及ぼすことを見いだした。さらに、IP₃R1 結合部位におけるmyoclonin1 との結合に必要なアミノ酸のアラニン変異タンパクを用いて検討する事で、Ca²⁺イメージングで得られた細胞内Ca²⁺の変化が、myoclonin1 とIP₃R1 の結合阻害によるものであるとさらに確認した。

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0件)

[学会発表] (計1件)

① Toshimitsu Suzuki, Kripamoy Aguan, Hideaki Mizuno, Takeshi Nakamura, Ikuyo Inoue, Katsuhiko Mikoshiba, Atsushi Miyawaki and Kazuhiro Yamakawa, Epilepsy protein myoclonin1 dysfunction causes altered intracellular Ca²⁺ signaling, Society for Neuroscience, 13th Nov. 2011, Washington, DC, USA

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 俊光 (SUZUKI TOSHIMITSU)
独立行政法人理化学研究所・神経遺伝研究チ
ーム・研究員
研究者番号：20373318