

平成30年 5月29日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15564

研究課題名(和文)細胞内輸送局在制御機構を基盤とする新しい作用機序のてんかん分子治療戦略の開発

研究課題名(英文)Analysis of interacting-partners of Nav1.1 in premature mouse brain

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) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：Dravet症候群は電位依存性ナトリウムチャンネルNav1.1をコードするSCN1A遺伝子の変異を主因とする難治性てんかんである。本研究は、Nav1.1の細胞内輸送と局在性発現の制御機構解明を目的に、免疫沈降法と質量分析法を組み合わせ、乳児期マウス脳内においてNav1.1と相互作用するタンパク質の同定を行った。そして、抑制性神経細胞に発現してNav1.1と相互作用する3種類のタンパク質を新規に同定した。

研究成果の概要(英文)：Dravet syndrome is an epileptic encephalopathy, mainly caused by mutations in the SCN1A gene encoding a voltage-gated sodium channel Nav1.1. This study was aimed to identify interacting-partners of Nav1.1. Using co-precipitation and tandem-mass spectrometry, this study reported three novel interacting-partners of Nav1.1 in premature mouse brain, which seemed to be expressed in inhibitory neurons as Nav1.1 did.

研究分野：神経科学

キーワード：てんかん ナトリウムチャンネル 脳・神経

1. 研究開始当初の背景

(1) Dravet 症候群はてんかん性脳症であり、その特徴は乳児期発症の難治性てんかんとそれに合併する自閉症スペクトラムと注意欠陥性多動を含む精神運動発達障害である。電位依存性ナトリウムチャンネル 1 サブユニット (Nav1.1) をコードする *SCN1A* 遺伝子上のヘテロ接合性の *de novo* 変異が Dravet 症候群の主因である。

(2) 申請者は、Dravet 症候群患児に認められた変異を導入した *SCN1A* ノックインマウスを作製した (Ogiwara ら 2007; Cao ら 2012; Ito ら 2013)。ヘテロ接合体は生後 3 週より自発けいれんを発症した。けいれんは体温上昇で容易に誘発された。行動バッテリー解析は、多動や自閉症様社会性行動異常、空間記憶学習低下を認めた。免疫組織化学染色は、乳幼児期マウス脳において、Nav1.1 がパルプアルブミン陽性抑制性ニューロンの軸索に主局在することを認め、さらに、電気生理学的解析は、Nav1.1 がパルプアルブミン陽性 Fast-spiking 細胞の持続応答性活動の維持を担うことを明らかにした (Ogiwara ら 2007)。近年、申請者は、パルプアルブミン陽性抑制性ニューロン特異的に *SCN1A* 遺伝子を破壊したコンディショナルノックアウトマウスを作製し、てんかんや多動、空間記憶障害がこの神経細胞の Nav1.1 機能低下が原因であり (Ogiwara ら 2013; Tatsukawa ら 2018)、興奮性神経細胞の Nav1.1 機能不全は、逆に、てんかん症状軽減に寄与することを見出した (Ogiwara ら 2013)。以上の知見は、抑制性神経細胞の発火減弱が脳の興奮性を高め、発作が発現することを示唆した。

2. 研究の目的

(1) Dravet 症候群は極めて治療抵抗性で治療開発が必要とされている。また、従来の抗てんかん薬とは異なる作用機序の治療が見出されれば、治療の選択性の幅が広がることが期待される。

(2) 申請者は、Nav1.1 の局在性発現量半減による抑制性神経細胞の発火減弱は、正常アリル由来 Nav1.1 の細胞内輸送促進と局在性発現安定化によって解決できると考えた。本研究は、この分子基盤を探るため、Nav1.1 と相互作用するタンパクの同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) 生後 15 日齢マウスの全脳を界面活性剤不含の緩衝液でホモジナイズして遠心分離し、不溶性画分を界面活性剤不含の緩衝液に溶解させて膜画分を調整した (Ogiwara ら 2007; Ogiwara ら 2013)。次に、市販の抗 Nav1.1 抗体 (Alomone 社など) を加えて数時間インキュベートし、磁気ビーズ結合 Protein G (医学生物学研究所社) を加えて抗 Nav1.1 抗体結合成分を精製した。精製画分について、抗

Nav1.1 抗体を用いたウエスタンブロット法と銀染色法を施行した。精製画分は、同時に、繰り返し洗浄して界面活性剤を除去し、アセトン沈殿法にて濃縮・溶解させた後に Modified Trypsin (Promega 社) を加えて一晩、37 でインキュベートした。そして、プロテアーゼ分解産物について、SCX-Tip で再精製した後にタンデム質量分析法を施行した (EASY-nLC1000, Thermo Fisher Scientific 社)。

次に、タンデム質量分析法から得られたデータについて、パイオインフォマティクス解析技術を用いて分析し、候補タンパク質を選定した。

(2) 候補タンパク質を抗原とする抗体を購入し (Abcam 社など)、生後 15 日齢マウス全脳膜画分をについて免疫沈降法を施行した。続いて、免疫沈降産物について抗 Nav1.1 抗体、あるいは抗候補タンパク抗体を用いたウエスタンブロット法を施行した。

(3) ヒト Nav1.1 発現ベクター (Sugiura ら 2012) を改変し、N 末端に HA-tag を付加した。候補タンパク質のヒト cDNA を入手し (ダナフォーム社、Sino Biological 社)、N 末端に V5-tag を付与し、pIRES2-AcGFP1 Vector ベクター (TaKaRa 社) にサブクローニングした。ヒト Nav1.1 発現ベクターと候補タンパク質発現ベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションし (Lipofectamine3000, Thermo Fisher Scientific 社)、膜画分を調整した。そして、その膜区分について、抗 HA 抗体 (医学生物学研究所社) あるいは抗 V5 抗体 (医学生物学研究所社) を用いた免疫沈降法と施行し、免疫沈降産物について、さらにウエスタンブロット法を施行した。

4. 研究成果

(1) マウス脳膜画分について、抗 Nav1.1 抗体を用いて免疫沈降を行い、得られた免疫沈降産物について、さらにウエスタンブロット法 (図 1) ならびに銀染色法を施行し、Nav1.1 が濃縮されたことを確認した。

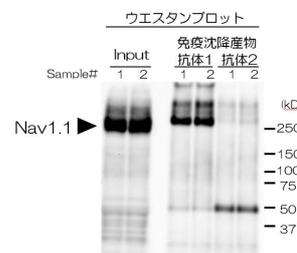


図 1、マウス脳について、抗 Nav1.1 抗体を用いて免疫沈降し、沈降産物を電気泳動法で分離し、抗 Nav1.1 抗体を用いてウエスタンブロットした。

免疫沈降産物 (抗体 1、sample#1, 2) について、タンデム質量分析法を行い、Nav1.1 を含む多数のタンパクが同定された (図 2)。

Accession	Description
A2AP19	Sodium channel protein type 1 subunit alpha OS=Mus musculus GI=50114 PE=1 SV=1 [SCN1A_MOUSE]
Q9W101	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 2 OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=2 [MAG2_MOUSE]
P04170	Nuclein basic protein OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=2 [MBP_MOUSE]
P03157	Microtubule-associated protein 2 OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=2 [MAP2_MOUSE]
P62702	40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Mus musculus GI=48422 PE=2 SV=2 [RPS4_MOUSE]
P27546	Microtubule-associated protein 4 OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=3 [MAP4_MOUSE]
Q99163	29S ribosomal protein L16, mitochondrial OS=Mus musculus GI=48422 PE=2 SV=1 [RPL16_MOUSE]
Q91186	35S ribosomal protein L14, mitochondrial OS=Mus musculus GI=48422 PE=2 SV=1 [RPL14_MOUSE]
P68372	Tubulin alpha-1C chain OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=1 [TBA1C_MOUSE]
Q88361	Zinc finger C2HC domain-containing protein 2A OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=1 [ZC2HC2_MOUSE]
P14106	Complement C1q subcomponent subunit B OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=2 [C1QB_MOUSE]
P05213	Tubulin alpha-1B chain OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=2 [TBA1B_MOUSE]
P97351	40S ribosomal protein S3a OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=3 [RPS3A_MOUSE]
Q92265	Sodium channel protein type 1 subunit alpha OS=Mus musculus GI=50114 PE=1 SV=2 [SCN1A_MOUSE]
P62270	40S ribosomal protein S18 OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=3 [RPS18_MOUSE]
P16330	7,7'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=3 [CN3P_MOUSE]
P62260	60S ribosomal protein L23 OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=1 [R23_MOUSE]
P28798	Granulin OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=2 [GRN_MOUSE]
P61979	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=1 [HRPK_MOUSE]
Q96A07	Sodium channel subunit beta-2 OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=1 [SCN2B_MOUSE]
Q918C3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L1 OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=1 [HRPL1_MOUSE]
Q77849	Tubulin beta-2A chain OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=1 [TBB2A_MOUSE]
Q92105	Complement C1q subcomponent subunit C OS=Mus musculus GI=48422 PE=2 SV=2 [C1QC_MOUSE]
Q919C5	Sodium potassium transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=1 [AT1A3_MOUSE]
P51410	60S ribosomal protein L9 OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=2 [R9_MOUSE]
P01027	Complement C3 OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=2 [C3_MOUSE]
Q92265	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Mus musculus GI=48422 PE=1 SV=1 [AT7A_MOUSE]

図2、抗 Nav1.1 抗体で免疫沈降した沈降産物中のタンパク質をタンデム質量分析した。ここに同定されたタンパクの一例を示す。

質量分析で同定したタンパクのうち、リボソームやミトコンドリア、免疫、細胞骨格に関連するタンパク質は候補から除外した。次に、ナトリウムチャンネル サブユニットやカルモジュリンといった Nav1.1 との相互作用が報告されているタンパク質も除外した。残りのタンパク質のうち、データベース検索により (mouse.brain-map.org) マウス海馬において抑制性神経細胞に発現しているものを4種 (候補タンパク A-D) 選んだ。

(2) マウス脳膜画分について、候補タンパク質に対する抗体を用いて免疫沈降を行い、次に、免疫沈降産物について、抗 Nav1.1 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。候補タンパク質 A については、ウエスタンブロットで Nav1.1 が検出されなかったため、擬陽性と判断した (図3A)。候補タンパク質 B については、抗体 B1 では Nav1.1 が検出されなかったが、抗体 B2 では Nav1.1 が検出されなかった (図3B)。抗体 B1 と B2 では抗原部位が異なるため、候補タンパク配列中の抗体 B1 認識部位が結合に重要な領域であることが示唆された。候補タンパク質 C については、Nav1.1 が検出された (図3C)。候補タンパク質 D については、抗体が免疫沈降に使用できなかった。

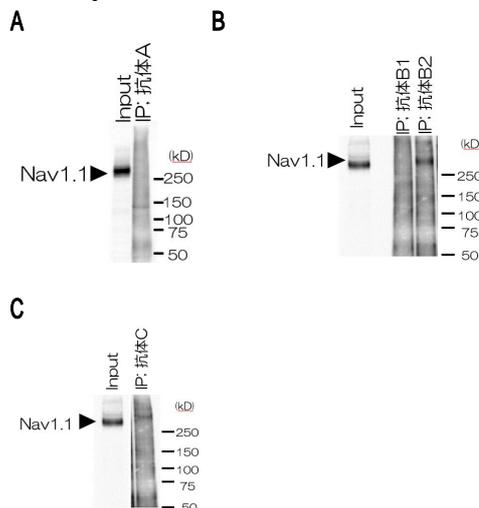


図3、候補タンパク質 A-C に対する抗体で免疫沈降した沈降産物 (IP) を電気泳動で分離し、抗 Nav1.1 抗体を用いてウエスタンブロットした。

(3) HA で標識した Nav1.1 と V5 で標識した候補タンパク質 B-D をトランスフェクションして HEK293 細胞に強制発現させ、タンパク質間相互作用を免疫沈降法とウエスタンブロット法で解析した。抗 HA 抗体を用いた免疫沈降産物からは候補タンパク質 B-D のいずれもが検出された (図4)。

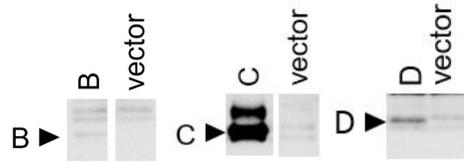


図4、HA で標識した Nav1.1 と V5 で標識した候補タンパク質 B-D を HEK293 細胞に強制発現させ、膜画分について、抗 HA 抗体を用いて免疫沈降し、次に、沈降産物について、抗 V5 抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した。

しかしながら、抗 V5 抗体を用いた免疫沈降産物の抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロット解析は Nav1.1 を検出しなかった。そこで、トランスフェクションされた HEK293 細胞の input について、抗 Nav1.1 抗体を用いたウエスタンブロットを行い、定性的な分析ではあるが、Nav1.1 発現量を脳と比較すると非常に低レベルであることが分かった。今後は、培養細胞での Nav1.1 発現レベルを上昇させる工夫が必要である。

<引用文献>

Cao, Ogiwara ら . Epilepsia . 53 : 1140-1145 (2012)
 Ito, Ogiwara ら . Neurobiology of Disease . 49 : 29-40 (2013)
Ogiwara ら . The Journal of Neuroscience . 27 : 5903-5914 (2007)
Ogiwara ら . Human Molecular Genetics . 22 : 4784-4804 (2013)
 Sugiura, Ogiwara ら . Epilepsia . 53:e111-114 (2012)
 Tatsukawa, Ogiwara ら . Neurobiology of Disease , 112 : 24-34 (2018)

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)

Middleton SJ, Kneller EM, Chen S, Ogiwara I, Montal M, Yamakawa K, McHugh TJ . Altered hippocampal replay is associated with memory impairment in mice heterozygous for the SCN2A gene . Nature Neuroscience , 査読有, 印刷中

Tatsukawa T, Ogiwara I, Mazaki E, Shimohata A, Yamakawa K . Impairments in social novelty recognition and spatial memory in mice with conditional deletion

of *Scn1a* in parvalbumin-expressing cells .
Neurobiology of Disease ,査読有 ,112:24-34 ,
2018 .
Doi : 10.1016/j.nbd.2018.01.009.

Yamagata T ,Ogiwara I ,Mazaki E ,Yanagawa
Y ,Yamakawa K ,Nav1.2 is expressed in caudal
ganglionic eminence-derived
disinhibitory interneurons : Mutually
exclusive distributions of Nav1.1 and
Nav1.2 . Biochemical and Biophysical
Research Communications , 査読有 , 491 :
1070-1076 , 2017 .
Doi : 10.1016/j.bbrc.2017.08.013.

〔学会発表〕(計 6件)

赤木巧、代謝型グルタミン酸受容体6型の
膜発現に関わるシグナル領域の解明、第95
会日本生理学会大会、平成30年

荻原郁夫、電位依存性ナトリウムチャンネル
Nav1.1 と相互作用するタンパクの探索、第
51回日本てんかん学会学術集会、平成29年

荻原郁夫、*Scn1a* 変異マウスを用いた病態
研究(Dravet 症候群のモデルとして)、第51
回日本てんかん学会学術集会、平成29年

赤木巧、代謝型グルタミン酸受容体6型の
極性輸送・膜発現に関わる分子機構の解析、
第94会日本生理学会大会、平成29年

荻原郁夫、研究褒賞受賞記念報告、SCN1A
遺伝子変異マウスを用いた Dravet 症候群発
症機序解明、てんかん治療研究振興財団第29
回研究報告会、平成29年

荻原郁夫、Dravet 症候群発症機構解明のた
めの SCN1A 遺伝子発現可視化マウスの開発、
てんかん治療研究振興財団第28回研究報告
会、平成29年

〔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〕(計 3件)

Ogiwara I ,Tatsukawa T ,Mazaki E ,Yamakawa
K . Generation of transgenic mouse lines
that express the green fluorescent protein
under the control of the *Scn1a* promoters .
Annual Report of the Japan Epilepsy
Research Foundation , 査読無 , 28 : 47-54 ,
2017 .

Ogiwara I . Dravet syndrome
pathophysiology: lessons from mouse models .
Annual Report of the Japan Epilepsy
Research Foundation , 査読無 , 28 : 11-20 ,
2017 .

Tatsukawa T ,Ogiwara I ,Mazaki E ,Yamakawa
K . Transplantation of medial ganglionic
eminence derived GABAergic interneurons
in Dravet syndrome model mice . Annual
Report of the Japan Epilepsy Research
Foundation , 査読無 , 27 : 93-100 , 2016 .

ホームページ等

<http://www.riken.jp/research/labs/cbs/neurogen/>

<http://www.brain.riken.jp/jp/faculty/details/51>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

金田 誠 (KANEDA, Makoto)
日本医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30214480

石井 俊行 (ISHII, Toshiyuki)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：10643140

赤木 巧 (AKAGI, Takumi)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：50192878

(4)研究協力者

碓井 澄子 (USUI, Sumiko)

鈴木 千晶 (Suzuki, Chiaki)