

## 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 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：12401  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22500353  
 研究課題名（和文）シナプスにおける Munc18 の機能とその異常によるてんかんの分子生理学的研究  
 研究課題名（英文）Functional study of Munc18 mutations associated with epilepsy  
 研究代表者  
 安藤 恵子 (ANDO KEIKO)  
 埼玉大学・脳科学融合研究センター・特任准教授  
 研究者番号：40221741

研究成果の概要（和文）：難治性てんかん（大田原症候群）の分子病態を解明する目的で、てんかん患者で同定されたヒト Munc18-1 遺伝子変異を導入した線虫モデルを作成し、表現型解析を行った。これらの動物モデルは、運動麻痺、けいれんなどの行動異常とシナプス伝達異常を示すことが明らかになった。また、生体イメージングおよびオプトジェネティクス技術を用いて、神経機能の定量的評価法を確立した。本研究で開発された動物モデルと光学的技術は、難治性てんかんの分子病態解明と創薬開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the molecular mechanism of intractable epilepsy, we developed *C. elegans* models having Munc18-1 mutations associated with Ohtahara syndrome (OS) known as early infantile epileptic encephalopathy (EIEE). We found that the Munc18-1 mutations resulted in behavioral defects such as paralysis and epileptic-like convulsions, and abnormalities in synaptic transmission. We also developed the optical measurement system of neural function using *in vivo* imaging and optogenetics. These disease models and optical technique can contribute to the understanding of the molecular pathogenesis and drug discovery for epilepsy.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：ニューロン・シナプス・神経回路・線虫

## 1. 研究開始当初の背景

てんかんは脳の神経細胞の異常な興奮に伴ってけいれんや意識障害が発作的に起こる慢性の脳神経疾患の一つであり、発症率が非常に高く、我が国においても約100万人の

てんかん患者が存在すると言われている。しかし、未だにてんかんの原因、発症メカニズムは不明な点が多く、有効な治療法の確立していない難治性てんかんも数多く存在する。

大田原症候群は、新生児期から生後3カ

月以前の乳児早期に発症する難治性てんかんで、てんかん発作に加えて重度の精神運動発達遅滞を呈するてんかん性脳症であり、持続的にサプレッションバーストという特徴的な脳波が認められることから、早期乳児てんかん性脳症あるいは EIEE : early infantile epileptic encephalopathy with suppression burst とも呼ばれている。近年、大田原症候群の患者複数例において、Munc18-1 遺伝子変異が同定され、Munc18-1 遺伝子の異常がてんかん発症に深く関与する可能性が示唆されている。Munc18-1 は、神経伝達物質の開口分泌を制御するシナプス機能分子であり、Munc18-1 欠損変異体では、開口分泌が阻害され重篤な神経機能障害を起こすことが知られている。しかし、Munc18-1 変異によっててんかん発作が引き起こされる分子メカニズムについては現在までほとんど不明である。

遺伝子変異による生体への影響を明らかにするためには、動物モデルを用いた機能解析が非常に有効である。我々は、Munc18-1 変異動物モデルを作成する上で、以下の点で、線虫を用いるメリットがあると考えている。(1)ヒト Munc18-1 と線虫ホモログ *unc-18* は機能的互換性がある、(2) Munc18-1 ノックアウトマウスは呼吸機能不全により出生後すぐに死亡するのに対して、線虫 *unc-18* ノックアウト体はシナプス伝達遮断による強い運動麻痺を示すものの生存可能であるため、機能低下型の変異の解析が容易である、(3)線虫神経系には Munc18-1 以外の多くのシナプス機能分子や神経伝達物質が保存されている、(4)遺伝子改変動物の作成が容易であり、さまざまな遺伝学的ツールが充実している。(5)体が透明でありイメージング技術を用いた神経活動の光学的測定に適している。本研究では、以上のような研究背景から、線虫モデルを開発するとともに表現型解析を行い、Munc18-1 遺伝子変異による興奮性・抑制性シナプスの異常、神経回路と行動の異常を統合的に理解することを目指した。

## 2. 研究の目的

本研究は難治性てんかんで変異の同定されたシナプス関連分子 Munc18-1 の線虫疾患モデルを用いて、シナプス・回路異常を解析し分子病態メカニズムを明らかにすることを目的としており、具体的には以下の3つから成っている。

- (1) Munc18-1 変異を導入した遺伝子改変動物を確立する。
- (2) 光学的手法による神経機能の定量的な評価法を確立する。
- (3) Munc18-1 変異によるシナプス—ニューロ

ン—行動の異常を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究は3年の計画であり、(1)線虫てんかんモデルの作成、(2)イメージングとオプトジェネティクスを用いた神経機能評価法の開発、(3)線虫モデルの行動・薬理・生理学的解析、の3つから成っている。

### (1) ヒトてんかん変異を導入した実験動物モデルの作成

ヒトと同じ変異を線虫 Munc18-1 (*unc-18*) クローンに導入し、マイクロインジェクション法でトランスジェニック体を作成した。紫外線照射により外来遺伝子をゲノムに挿入し、安定な組換え体を確立した。さらに、組換え体の遺伝的バックグラウンドを *unc-18* ノル型変異に置き換え、変異蛋白質を発現するトランスジェニック系統を作成した。

(2) イメージングとオプトジェネティクスを用いた神経機能評価法の開発。オプトジェネティクスとイメージングを用いて *in vivo* におけるシナプス伝達異常を光学的測定により定量的に評価する系を確立する。

#### ① 神経・筋活動のイメージング

カルシウムセンサー G-CaMP (図 1) を発現するトランスジェニック体を作成し、高速共焦点レーザー顕微鏡を用いて、15-30fps の速度で蛍光画像を撮像し、Nikon NIES-element ソフトで蛍光強度変化を定量的に解析した。

#### ② オプトジェネティクス

光駆動性陽イオンチャネルであるチャネルロドプシンを発現するトランスジェニック体を作成し、青色光照射により人為的に神経活動を活性化した。

#### (3) 表現型の解析

##### ① 行動解析

水中における体の屈曲頻度、固形培地上に

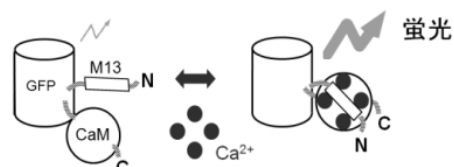


図1: 蛍光 Ca<sup>2+</sup>プロブ G-CaMP の模式図。Ca<sup>2+</sup>が結合すると強い蛍光を発する。

おける移動速度および運動パターンを解析した(図2)。

## ②薬理的解析

コリン作動性薬剤および痙攣誘発剤による感受性を解析した。線虫培養用の固形培地に

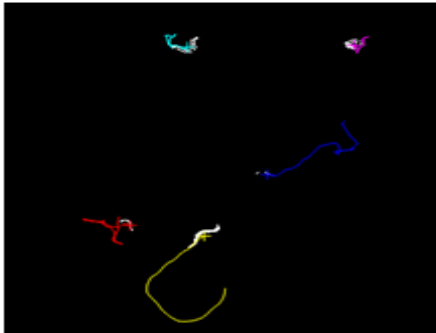


図 2: 線虫の行動解析例。固形培地上の線虫の軌跡を示す。

薬剤を添加し、発生に対する影響を評価する方法および液体培地に薬剤を添加し、運動に対する影響を評価する方法を用いた。

## ③形態学的解析

変異蛋白質-GFP 融合蛋白質の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で可視化・解析した。

## 4. 研究成果

### (1) てんかんモデルの開発と運動解析

大田原症候群で同定された 3 種類のヒト Munc18-1 ミスセンス変異 (G544D/C180Y/V84D) をそれぞれ unc-18 遺伝子に導入した遺伝子改変動物の作成に成功した。これらの動物は、生存に大きな影響はないが、正常遺伝子を導入したコントロールに比べて運動性が有意に低いことがわかった。また、液体中での swimming 運動にお

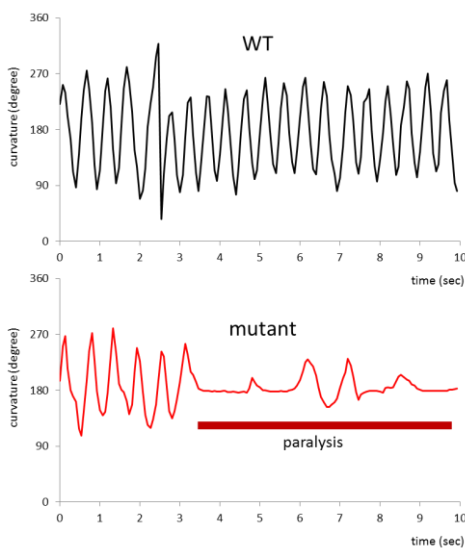


図 3: Swimming 運動パターンの解析。体の屈曲角度をプロットした。

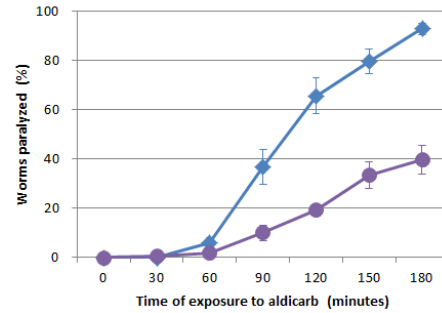


図 4: アセチルコリンエステラーゼ阻害剤に対する感受性。青: WT、紫: mutant

いて、体が硬直する運動麻痺表現型を示すことが明らかになった (図 3)。

### (2) 薬剤に対する感受性

野生型線虫は、ペンチレンテトラゾール 5mg/ml に対してけいれんが誘発されないが、Munc18-1 変異導入株では、いずれも同濃度においてペンチレンテトラゾール誘発性けいれんが認められた。次いで、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤に対する感受性を調べた。Munc18-1 変異によって、抵抗性を示すものと高感受性を示すものがありさらに詳細な解析を進めている (図 4)。これらの結果から、GABA およびコリン作動性ニューロンにおいて、シナプス伝達異常が起こっているものと考えられた。

(3) ニューロンにおける変異蛋白質の発現  
運動ニューロンにおける変異蛋白質の発現について検討した。ヒト Munc18-1 変異を導入した UNC-18::GFP 融合蛋白質を運動ニューロン特異的に発現するトランスジェニック体を作成し、GFP 蛍光を観察した。変異蛋白質では、神経突起およびシナプスでの発現が低下していることが明らかになった。

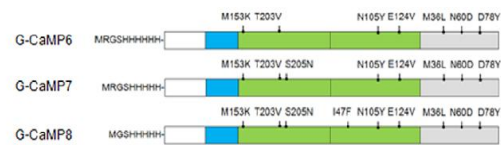


図 5: 新たに開発した高性能蛍光カルシウムセンサーG-CaMP6-8 の模式図。(Ohkura et al., PLoSOne 2012)

### (4) 光学的手法による神経機能の定量的な評価法の開発

#### ① 蛍光カルシウムセンサーG-CaMP6~8 の開発

我々は新たに高感度高性能な緑色蛍光カルシウムセンサーG-CaMP6~8 の開発に成

功した (図 5)。また線虫の神経細胞に発現させたところ行動中の線虫の神経細胞の活動を既存のセンサー以上の性能で可視化することができた (図 6)。これらの結果をまとめ、学術論文として発表した (Ohkura et al., PLoS One 2012)。

## ②神経機能評価法の開発

光刺激とカルシウムイメージングを同時併用する技術開発を行った。チャンネルロドプシンと G-CaMP を同時に発現する線虫において光刺激とともにレーザー顕微鏡による G-CaMP の蛍光カルシウムイメージングを同時に行う事が可能な実験・測定系を開発した。

線虫の筋活動はコリン作動性運動ニューロンの興奮作用と GABA 作動性運動ニューロンの抑制作用の制御を受けている。運動ニューロンにチャンネルロドプシンを発現させ、青色光の照射によりシナプス前ニューロンにチャンネルロドプシン、シナプス後細胞にカルシウムセンサーを発現させ、シナプス前ニューロンを光刺激で活性化した時のシナプス後細胞のカルシウム応答をイメージングで測定する系を確立した。この系を用いることにより、生体でのシナプス機能の光学測定への応用が可能であると考えられる。

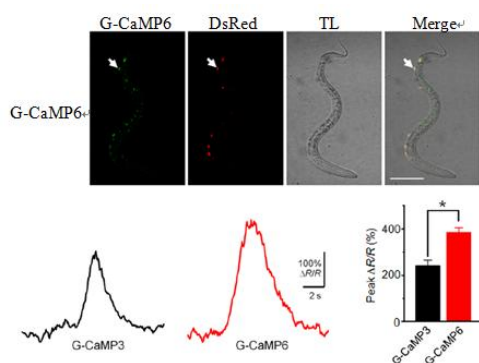


図 6: 線虫の DA ニューロンに G-CaMP6 を発現させた。G-CaMP6 は既存の G-CaMP3 と比較し、より大きなシグナルが観察された。(Ohkura et al., PLoSOne 2012)

## 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

大田原症候群のヒト Munc18-1 変異を導入した実験動物モデルの報告は今までになく、本研究で開発された実験モデル動物は、てんかんの分子病態解明および創薬開発に有用であると考えられる。今までに同定されたてんかんの責任遺伝子はチャンネルや受容体をコードするものが多く、抗てんかん薬もこれらの蛋白質をターゲットとしたものがほとんどである。Munc18-1 はこれらの蛋白質とは働きの全く異なる開口分泌制御因子であり、Munc18-1 をターゲットとした創薬研究は、シ

ナプス伝達修飾による新しいタイプの抗てんかん薬の開発に発展する可能性がある。また、Munc18-1 はヒトから線虫まで保存される分泌の重要な機能分子であり、Munc18-1 変異によるシナプス・回路異常の分子病態が明らかになれば、てんかんの発症メカニズムだけではなく、普遍的な分泌メカニズムの理解にもつながると考えられる。

## 今後の展望

本研究で、難治性てんかんのヒト Munc18-1 変異をもつ実験動物モデルが開発された。今後、分子遺伝・光生理・行動解析を融合させた詳細な解析を行うことにより、難治性てんかんの遺伝子変異による分子病態が明らかになっていくものと期待される。

## 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 17 件)

- (1) Ohkura M, Sasaki T, Sadakari J, Gengyo-Ando K, Kagawa-Nagamura Y, Kobayashi C, Ikegaya Y, Nakai J. Genetically encoded green fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicators with improved detectability for neuronal Ca<sup>2+</sup> signals. PLoS One. (査読有) 2012;7(12):e51286. doi: 10.1371/journal.pone.0051286.
- (2) Matsunaga Y, Nakajima K, Gengyo-Ando K, Mitani S, Iwasaki T, Kawano T. A Caenorhabditis elegans insulin-like peptide, INS-17: its physiological function and expression pattern. Biosci Biotechnol Biochem. (査読有) 2012;76(11):2168-72.
- (3) Tada M, Gengyo-Ando K, Kobayashi T, Fukuyama M, Mitani S, Kontani K, Katada T. Neuronally expressed Ras-family GTPase Di-Ras modulates synaptic activity in Caenorhabditis elegans. Genes Cells. (査読有) 2012;17(9):778-89. doi:10.1111/j.1365-2443.2012.01627.x.
- (4) Lee HC, Kubo T, Kono N, Kage-Nakadai E, Gengyo-Ando K, Mitani S, Inoue T, Arai H. Depletion of mboa-7, an

- enzyme that incorporates polyunsaturated fatty acids into phosphatidylinositol (PI), impairs PI 3-phosphate signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells*. (査読有) 2012 :17(9):748-57. doi:10.1111/j.1365-2443.2012.01624.x.
- (5) Matsunaga Y, Gengyo-Ando K, Mitani S, Iwasaki T, Kawano T. Physiological function, expression pattern, and transcriptional regulation of a *Caenorhabditis elegans* insulin-like peptide, INS-18. *Biochem Biophys Res Commun*. (査読有) 2012 :423(3):478-83. doi: 10.1016/j.bbrc.
- (6) Yoshina S, Sakaki K, Yonezumi-Hayashi A, Gengyo-Ando K, Inoue H, Iino Y, Mitani S. Identification of a novel ADAMTS9/GON-1 function for protein transport from the ER to the Golgi. *Mol Biol Cell*. (査読有) 2012 :23(9):1728-41. doi: 10.1091/mbc.E11-10-0857.
- (7) Murata D, Nomura KH, Dejima K, Mizuguchi S, Kawasaki N, Matsuishi-Nakajima Y, Ito S, Gengyo-Ando K, Kage-Nakadai E, Mitani S, Nomura K. GPI-anchor synthesis is indispensable for the germline development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell*. (査読有) 2012 :23(6):982-95. doi: 10.1091/mbc.E10-10-0855.
- (8) Kage-Nakadai E, Kobuna H, Funatsu O, Otori M, Gengyo-Ando K, Yoshina S, Hori S, Mitani S. Single/low-copy integration of transgenes in *Caenorhabditis elegans* using an ultraviolet trimethylpsoralen method. *BMC Biotechnol*. (査読有) 2012:12:1. doi: 10.1186/1472-6750-12-1.
- (9) 中井淳一, 永村ゆう子, 大倉正道, 清宮はるな, 藤田孝, 松永祐, 長谷川登志夫, 安藤恵子: 香りの評価法の検討: バイオアッセイを用いた香り評価の試み. *アロマリサーチ* (査読有) 2012:13, 126-131.
- (10) Nomura KH, Murata D, Hayashi Y, Dejima K, Mizuguchi S, Kage-Nakadai E, Gengyo-Ando K, Mitani S, Hirabayashi Y, Ito M, Nomura K. Ceramide glucosyltransferase of the nematode *Caenorhabditis elegans* is involved in oocyte formation and in early embryonic cell division. *Glycobiology*. (査読有) 2011:21(6):834-48. doi: 10.1093/glycob/cwr019.
- (11) Kobuna H, Inoue T, Shibata M, Gengyo-Ando K, Yamamoto A, Mitani S, Arai H. Multivesicular body formation requires OSBP-related proteins and cholesterol. *PLoS Genet*. (査読有) 2010 :6(8). doi:pil: e1001055. 10.1371/journal.pgen.1001055.
- (12) Klassen MP, Wu YE, Maeder CI, Nakae I, Cueva JG, Lehrman EK, Tada M, Gengyo-Ando K, Wang GJ, Goodman M, Mitani S, Kontani K, Katada T, Shen K. An Arf-like small G protein, ARL-8, promotes the axonal transport of presynaptic cargoes by suppressing vesicle aggregation. *Neuron*. (査読有) 2010 : 66(5):710-23. doi: 10.1016/j.neuron.2010.04.033.
- (13) Dejima K, Murata D, Mizuguchi S, Nomura KH, Izumikawa T, Kitagawa H, Gengyo-Ando K, Yoshina S, Ichimiya T, Nishihara S, Mitani S, Nomura K. Two Golgi-resident 3'-Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters play distinct roles in heparan sulfate modifications and embryonic and larval development in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*. (査読有) 2010 : 285(32):24717-28. doi:10.1074/jbc.M109.088229.
- (14) Nakae I, Fujino T, Kobayashi T, Sasaki A, Kikko Y, Fukuyama M, Gengyo-Ando K, Mitani S, Kontani K, Katada T. The arf-like GTPase Arl8 mediates delivery of endocytosed macromolecules to lysosomes in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell*. (査読有) 2010 : 21(14):2434-42. doi: 10.1091/mbc.E09-12-1010.
- (15) Ogura K, Okada T, Mitani S,

Gengyo-Ando K, Baillie DL, Kohara Y, Goshima Y. Protein phosphatase 2A cooperates with the autophagy-related kinase UNC-51 to regulate axon guidance in *Caenorhabditis elegans*. *Development*. (査読有) 2010 : 137(10):1657-67. doi: 10.1242/dev.050708.

- (16) Kage-Nakadai E, Kobuna H, Kimura M, Gengyo-Ando K, Inoue T, Arai H, Mitani S. Two very long chain fatty acid acyl-CoA synthetase genes, *acs-20* and *acs-22*, have roles in the cuticle surface barrier in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. (査読有) 2010 : 5(1):e8857. doi: 10.1371/journal.pone.0008857.
- (17) 安藤恵子「モデル生物線虫から見た低分子重量G蛋白質Rab」細胞 (査読無) 2010: 42(3):pp104-107.

[学会発表] (計6件)

- (1) Osawa A, Gengyo-Ando K, Nakai J. Functional analysis of de novo Munc18-1 mutations in epilepsy using *Caenorhabditis elegans* as a model organism. RIKEN BSI RETREAT 2012 2012年11月12日~13日軽井沢
- (2) Gengyo-Ando K, Usami A, Kagawa-Nagamura Y, Ohkura M, Ikegaya Y, Matsuki N, Nakai J. Dynamic neuromuscular regulation in freely crawling *C. elegans*: multicellular  $Ca^{2+}$  imaging using GCaMPs. 第35回神経科学学会年会 (招待講演) 2012年9月18日~21日, 名古屋
- (3) 安藤恵子 モデル動物線虫を利用したゲノム創薬 埼玉バイオ III 研究交流会 (招待講演) 2012年3月21日 埼玉
- (4) Gengyo-Ando K, Usami A, Kagawa-Nagamura Y, Yoshida Y, Matsuki N, Ikegaya Y, Nakai J. Functional analysis of neuromuscular circuit using high-resolution *in vivo*  $Ca^{2+}$  imaging in *C. elegans*. 第34回日本分子生物学会年会 (招待講演), 2011年12月13日-16日. 横浜
- (5) Usami A., Gengyo-Ando K., Nagamura Y., Yoshida Y., Matsuki N., Ikegaya Y. and Nakai J. : Dynamic neuromuscular

regulation in freely crawling *C. elegans*: high-resolution and large-scale *in vivo*  $Ca^{2+}$  imaging, Neuro 2011、2011年9月16日、横浜

- (6) Gengyo-Ando K., Usami A., Kagawa-Nagamura Y., Yoshida Y., Matsuki N., Ikegaya Y., and Nakai J. : High-resolution *in vivo*  $Ca^{2+}$  imaging of neuromuscular system in *Caenorhabditis elegans*. 18<sup>th</sup> International *C. elegans* Meeting, 2011年6月22-26日、ロサンゼルス (アメリカ)

[その他]  
ホームページ等  
埼玉大学脳科学融合研究センター  
<http://subsi.saitama-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
安藤 恵子 (ANDO KEIKO)  
埼玉大学・脳科学融合研究センター・特任准教授. 研究者番号 : 40221741
- (2) 研究分担者  
中井 淳一 (NAKAI JUNICHI)  
埼玉大学・脳科学融合研究センター・教授  
研究者番号 : 80237198
- (3) 研究分担者  
大倉 正道 (OHKURA MASAMICHI)  
埼玉大学・脳科学融合研究センター・准教授. 研究者番号 : 70369172