

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18971

研究課題名(和文) eEF1B L欠損によるてんかん様発作の分子病態解明

研究課題名(英文) A study on the molecular mechanisms of epileptic phenotype in eEF1BdeltaL knockout mice

研究代表者

貝塚 拓 (KAITSUKA, Taku)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：00435926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではeEF1B L欠損マウス(以下 L欠損マウス)で音刺激により誘発されるけいれん発作の分子病態の解明を目的として研究を進めた。その結果 L欠損マウスではてんかん原因遺伝子であるCacna1aなどの発現量が減少していること、また音刺激に対する脳での分子シャペロンの誘導が抑えられること。さらに L欠損マウスはストレス暴露により脳の萎縮が生じることを突き止めた。分子シャペロンはストレスから細胞を保護するタンパク質である。本研究で得られた成果はeEF1B Lが脳内でストレスに対する防御装置の一端を担うことを示唆する知見であり、ストレスに起因する精神疾患を考える上でも有用な基礎知見となりつる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the molecular mechanism of audiogenic seizure observed in eEF1BdeltaL knockout (KO) mouse. We found that epilepsy-related gene Cacna1a was significantly decreased in the brain of eEF1BdeltaL KO mice. Furthermore, induction of molecular chaperones was suppressed in the brain of these mice. After auditory stress, the brain atrophy was observed in KO mice. Molecular chaperones protect cells from various stresses. Our study suggests that eEF1BdeltaL might function as a safeguard against excessive response to environmental stress and gives new insight into molecular mechanism of stress-related psychiatric disorders.

研究分野：分子生理学

キーワード：てんかん 恐怖条件付け 熱ショックタンパク質 ストレス スプライシング

1. 研究開始当初の背景

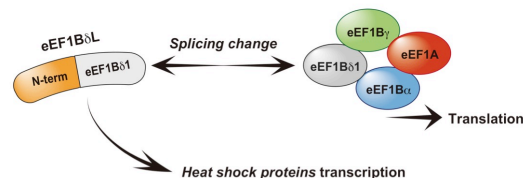
(1) てんかん原因遺伝子

てんかんは一般人口の約3%が一回は発作を経験すると言われており比較的頻度の高い症状である。てんかんの発症には腫瘍や外傷など外因性によるものや自閉症や発達障害の一つの症状として現れることもあるが、多くの症例ではその原因は不明である。一部の家族性のてんかんで原因遺伝子が同定されており、そのほとんどが Na<sup>+</sup>チャネルや GABA 受容体などの中枢神経系に発現する膜蛋白質をコードする遺伝子である。一方で LG11 や BRD2 などの非チャネル蛋白質をコードする遺伝子も同定されており、てんかん発作にはイオンチャネル以外の関与も示唆されている。

(2) 研究代表者のこれまでの研究

研究代表者らは蛋白質翻訳因子である eEF1B $\delta$  (eukaryotic elongation factor 1B $\delta$ ) が既存のアイソフォームである eEF1B $\delta$ 1 と長鎖のアイソフォームである eEF1B $\delta$ L を発現すること、また eEF1B $\delta$ L は翻訳因子である eEF1B $\delta$ 1 とは機能が全く異なり、分子シャペロンである Hsp70 などの熱ショック蛋白質の転写を誘導する転写制御因子であることを発見した (EMBO Reports, 2011) (図1)。さらに興味深いことに eEF1B $\delta$ L は脳に豊富に存在していることを見出している。そこで eEF1B $\delta$ L の生体における機能を調べるために、eEF1B $\delta$ L の欠損マウスを作成し、その表現型、特に脳・神経系の機能に関する行動解析を行なった。その結果、一般的な活動性や情動・不安行動および学習機能は野生型に比べ顕著な差はなかったが、解析の過程で恐怖条件付け試験における音刺激に対して強直発作に似た激しいけいれんを起こすことがわかった。さらに驚くべきことに、欠損マウスでは試行後、自発運動量が著しく低下し、14匹中3匹が死に至った。しかしながら、eEF1B $\delta$ L の欠損マウスがなぜこのような表現型を呈するのか、その分子メカニズムは明らかにできていなかった。

図1. 翻訳因子eEF1B $\delta$ はスプライシングにより熱ショック応答性の転写因子に変化する



(3) 分子シャペロンとてんかんの関連性

Hsp70 などの分子シャペロンはストレス環境下で起こる蛋白質の変性・凝集から細胞を保護する働きをもつ。神経細胞でてんかん発作により Hsp70 の発現が誘導されることが報告されており、さらに発作によって起こる神経細胞死に保護的に働くことがわかっている。さらに分子シャペロンの誘導に最も重要

とされている Hsf1 の欠損マウスは胎仔期の刺激に敏感で、生後のけいれんが起きやすくなるとの報告もある。これらのことから神経細胞で分子シャペロンの誘導が抑制される場合、けいれんが起きやすくなる可能性は十分考えられる。つまり eEF1B $\delta$ L の欠損マウスでは分子シャペロンの誘導が抑えられけいれんを引き起こしているのかもしれない。

2. 研究の目的

前述の通り eEF1B $\delta$ L の欠損マウスは音刺激に対してけいれんを呈することから、eEF1B $\delta$ L は脳の正常な情報処理機構に重要な役割をもつのではないかと考えられる。そこで本研究では eEF1B $\delta$ L 欠損マウスでの音刺激によるてんかん様発作が如何に起こるのか、その分子病態を明らかにすることを目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) けいれん誘発性の解析

てんかん発作のモデルとして一般的に広く用いられるペンチレンテトラゾール (PTZ) によるけいれん誘発性を調べた。野生型と eEF1B $\delta$ L 欠損マウスに PTZ を 5~35 mg/kg まで段階的な濃度で投与し、けいれんが誘発される閾値を調べた。

(2) チャネル・受容体の発現量解析

eEF1B $\delta$ L 欠損マウスを音刺激によりけいれんを呈したグループとそうでないグループに分け、それぞれ脳を摘出し、Na<sup>+</sup>チャネル、Ca<sup>2+</sup>チャネル、GABA 受容体などの発現量を qPCR 法により遺伝子レベルで解析した。

(3) 脳内熱ショックタンパク質発現解析

野生型と eEF1B $\delta$ L 欠損マウスの正常時または恐怖条件付け試験を行った後に脳を摘出し、Hsp70 などの遺伝子発現が変動しているか否か qPCR 法により定量解析した。

(4) けいれん誘発時の eEF1B $\delta$ L の活性化解析

eEF1B $\delta$ L は熱ストレスに応答したスプライシング変化により発現量が増加することがわかっている。そこで野生型マウスで正常時および音刺激を与えた後の脳で eEF1B $\delta$ L の発現が増加するか否かスプライシングバリエーションを区別できるプライマーを用いた RT-PCR 法により検討した。

(5) 脳組織学的解析

脳の器質的な異常はてんかんを生ずる一因となる。まず野生型と eEF1B $\delta$ L 欠損マウスの脳を摘出しその重量を比較した。続いてホルマリンで固定後、パラフィン切片を作製して HE 染色を行なった。得られた染色結果から大脳皮質および海馬などの領域の細胞層の形態を比較した。

### (6) スプライシング調節因子の解析

eEF1B  $\delta$  L をコードする遺伝子 Eef1d は長鎖 (eEF1B  $\delta$  L) と短鎖 (eEF1B  $\delta$  1) のアイソフォームを発現する。これらの発現調節は選択的スプライシング機構により制御されている。さらに選択的スプライシングはスプライシング調節因子と呼ばれる RNA 結合蛋白質により制御される。通常、スプライシングを受けるエクソンとその前後 300 bp 付近にスプライシング調節因子が結合するコンセンサス配列が存在している。Eef1d 遺伝子でエクソンスキッピングが起こる exonIII と前後 300 bp のイントロン領域には Nova や Mbn1 が結合するコンセンサス配列が含まれている。そこで、上記スプライシング調節因子の siRNA を Neuro-2a 細胞又は HEK293 細胞にトランスフェクトし、eEF1B  $\delta$  1 と eEF1B  $\delta$  L の発現量の変化を RT-PCR 法により解析した。さらに上記スプライシング調節因子の発現プラスミドをトランスフェクトした細胞で同様の解析を行なった。

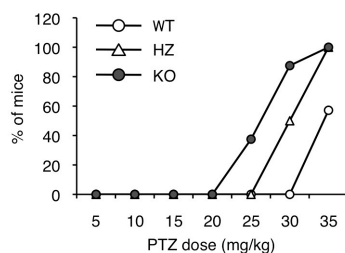
## 4. 研究成果

### (1) 主な成果

#### ① eEF1B $\delta$ L 欠損マウスでのけいれん易誘発性

図 2 に示す通り、eEF1B  $\delta$  L 欠損マウスでは 25 mg/kg のペンチレンテトラゾール (PTZ) で全身性強直性間代性発作を呈するマウスが現れ、35 mg/kg の濃度では全てのマウスで出現した。PTZ は GABA 受容体遮断薬であることから本結果から eEF1B  $\delta$  L 欠損マウスは GABA 受容体遮断によるけいれん誘発に易感受性があることがわかった。

図2. ペンチレンテトラゾール誘発性けいれん

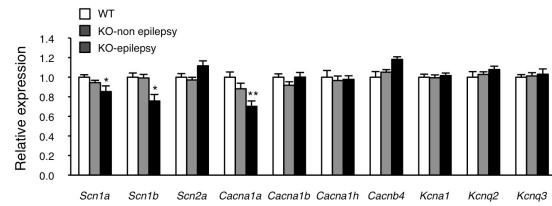


\*縦軸はけいれんを呈したマウスの割合を示す

#### ② てんかん原因遺伝子の発現減少

図 3 に示す通り、音刺激でけいれんを呈したグループ (epilepsy) はけいれんを呈していないグループ (non epilepsy) に比べて、Scn1a、Scn1b、Cacna1a の有意な減少が認められた。特に Cacna1a の減少が顕著であった。Scn1a 及び Scn1b は Na<sup>+</sup>チャネルをコードする遺伝子で Cacna1a は Ca<sup>2+</sup>をコードする遺伝子である。これらの遺伝子発現レベルの減少がけいれん易誘発性の原因である可能性が高い。

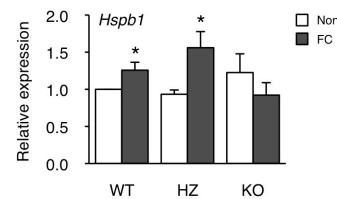
図3. てんかん原因遺伝子発現レベル



#### ③ 熱ショックタンパク質誘導の抑制

図 4 に示す通り、音刺激を含む恐怖条件付け試験を経た野生型マウスの脳で熱ショックタンパク質 (Hspb1) 遺伝子の有意な増加が認められた。一方でこの増加は eEF1B  $\delta$  L 欠損マウスでは観察されなかった。この結果から eEF1B  $\delta$  L 欠損マウスは音刺激などのストレスに対する防御反応が弱くなっている可能性が示唆された。

図4. 恐怖条件づけ後の脳内Hspb1遺伝子発現



#### ④ けいれん誘発時の eEF1B $\delta$ L 活性化

野生型マウスでけいれんを誘発する刺激により脳内の eEF1B  $\delta$  L のスプライシング変化またはリン酸化状態の変化が起こるか調べたところ、両者とも顕著な差は見られなかった。今後は eEF1B  $\delta$  L の細胞内での核移行性など調べる必要がある。

#### ⑤ ストレス負荷後の脳萎縮

音刺激を経験したマウスの脳を摘出し、その重量を比較したところ eEF1B  $\delta$  L 欠損マウスで有意に減少していた。一方で音刺激を経験していないマウスの脳重量は両者の間で差は認められなかった。続いて HE 染色により組織学的変化を調べたところ、音刺激を経験した eEF1B  $\delta$  L 欠損マウスで大脳皮質層の縮小および海馬の萎縮が認められた。この部位での萎縮がけいれん発作後の自発運動量の低下を招いている可能性がある。

#### ⑥ Nova スプライシング調節因子

eEF1B  $\delta$  L をコードする遺伝子 Eef1d にはスプライシング調節因子 Nova の認識配列が多数存在し、Neuro-2a 細胞での Nova の阻害は eEF1B  $\delta$  L の発現量を減少させた。一方 HEK293 細胞で Nova を過剰発現させたところ eEF1B  $\delta$  L の発現量が増加した。これらのことから、Nova が Eef1d のスプライシングを制御することが示唆された。

### (2) 国内外における位置づけとインパクト

てんかんは人口の約 3% という頻度で発症する疾患であり、その原因解明や治療薬の

開発などが求められている。てんかんの原因の多くはチャネルなどの膜タンパク質の異常に起因すると言われているが、今回の研究で核タンパク質である eEF1B  $\delta$ L の欠損がてんかん様症状を呈した点で非常に新規性があり、有用な成果である。さらに eEF1B  $\delta$ L は Na<sup>+</sup>チャネルや Ca<sup>2+</sup>チャネルの遺伝子発現を制御することからてんかん治療薬の標的となる可能性も示唆している。また本研究では驚いたことに eEF1B  $\delta$ L 欠損マウスは音刺激などのストレスに脆弱になることも分かった。上記マウスではストレスを経験すると脳萎縮が起こり、その後の行動抑制が起こる。さらに脳萎縮はストレス負荷後の分子シャペロンの誘導が抑制されていることにより起こっている可能性が示唆された。本成果はうつ病や心的外傷後ストレス障害 (PTSD) などのストレス性疾患の原因を考える上でも有用な知見であり、国内外の本分野に関する研究にインパクトを与えるものと確信する。

### (3) 今後の展望

今後は eEF1B  $\delta$ L がチャネル遺伝子のどの領域に結合するのか、さらにどのようなタンパク質と複合体を形成しているのかについて分子レベルでの詳細な研究が必要である。また、eEF1B  $\delta$ L で見られた脳萎縮や行動抑制をどのような方法で回復できるのか、具体的には Hsp70 などの分子シャペロンを活性化する方法などを試行し、治療薬開発を視野に入れた研究を進めていきたい。

### 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 5 件)

- ① Kaitsuka, T., Tomizawa, K. Cell-Penetrating Peptide as a Means of Directing the Differentiation of Induced-Pluripotent Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 26667-26676, 2015. 査読有 doi: 10.3390/ijms161125986.
- ② Chen, J., Kaitsuka, T.\*, Fujino, R., Araki, K., Tomizawa, K., Yamamoto, T. Mutation of the key residue for extraribosomal function of ribosomal protein S19 cause increased grooming behaviors in mice. *Neurosci. Lett.*, 629, 221-226, 2016. \*Corresponding author. 査読有 doi: 10.1016/j.neulet.2016.07.022.
- ③ Takeda, H.\*, Kurioka, T.\*, Kaitsuka, T.\*, Tomizawa, K., Matsunobu, T., Hakim, F., Mizutani, K., Miwa, T., Yamada, T., Ise, M., Shiotani, A., Yumoto, E., Minoda, R. Protein transduction therapy into cochlea via the round window niche in guinea pigs. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 3, 16055, 2016. \*These authors

contributed equally. 査読有 doi: 10.1038/mtm.2016.55.

- ④ Jamiruddin, M. R. \*, Kaitsuka, T.\*, Hakim, F., Fujimura, A., Wei, F. Y., Saitoh, H., Tomizawa, K. HDAC9 regulates the alternative lengthening of telomere (ALT) pathway via the formation of ALT-associated PML bodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 481, 25-30, 2016. \*These authors contributed equally. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.026.
- ⑤ Kaitsuka, T., Kobayashi, K., Otsuka, W., Kubo, T., Hakim, F., Wei, F. Y., Shiraki, N., Kume, S., Tomizawa, K. Erythropoietin facilitates definitive endodermal differentiation of mouse embryonic stem cells via activation of ERK signaling. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 312, C573-C582, 2017. 査読有 doi: 10.1152/ajpcell.00071.2016.

#### [学会発表] (計 4 件)

- ① 小林 幸平、貝塚 拓、ハキム ファルザナ、魏 范研、富澤 一仁、マウス胚性幹細胞の内胚葉への分化にはエリスロポエチンによる MAPK 経路の活性化が有効である、第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月 22 日～24 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- ② ジャミルッディン モハマドリード、貝塚 拓、富澤 一仁、HDAC9 によるテロメア維持の組換え依存的経路の制御、第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月 22 日～24 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- ③ Taku Kaitsuka, Taketo Nakashima, Kazuhito Tomizawa, The role of histone deacetylase 11 in the pluripotency of the mouse pluripotent stem cells, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting-Mechanisms of Aging, 2017 年 9 月 27 日、コールドスプリングハーバー (米国)
- ④ 金子 瞳、貝塚 拓、富澤 一仁、ヒト iPS 細胞の内胚葉へのヘテロ分化の要因に関する研究、第 94 回日本生理学会大会、2017 年 3 月 28 日～30 日、浜松アクティビティコンgresセンター (静岡県浜松市)

#### [その他]

ホームページ等

researchmap

<http://researchmap.jp/read0108060>

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

貝塚 拓 (KAITSUKA, Taku)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号: 00435926