

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 22 日現在

機関番号： 32202
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2009 ～ 2011
 課題番号： 21590239
 研究課題名(和文) Na ポンプ $\alpha 3$ サブユニット遺伝子の生体機能とジストニアパーキンソニズムの分子病態
 研究課題名(英文) Physiological function of Na pump $\alpha 3$ subunit gene and involvement in pathophysiology of dystonia parkinsonism.
 研究代表者
 川上 潔 (KAWAKAMI KIYOSHI)
 自治医科大学・医学部・教授
 研究者番号： 10161283

研究成果の概要 (和文) : ジストニアは自分の意思に反して、筋肉の収縮や硬直が持続する病気である。遺伝性ジストニアである DYT12 はナトリウムポンプ $\alpha 3$ サブユニット遺伝子(ATP1A3)の機能喪失変異が原因である。DYT12 の病態解明を目的に *Atp1a3* 遺伝子欠損マウスを解析した。当該マウスはジストニアを引き起こしやすく、小脳の抑制性神経の伝達効率亢進が観察された。この結果から、*Atp1a3* の機能喪失が抑制性神経の機能に影響し、ジストニアを引き起こすと考えられた。

研究成果の概要 (英文) : Dystonia is characterized by excessive involuntary and prolonged simultaneous contractions of both agonist and antagonist muscles. One hereditary form of dystonia, *DYT12*, is caused by loss of function mutations of the gene for $\alpha 3$ isoform of Na pump (*ATP1A3*). To provide insight into the molecular etiology of *DYT12*, we generated and analyzed knockout heterozygous mice (*Atp1a3^{+/-}*). *Atp1a3^{+/-}* mice showed increased sensitivity to kainate-induced dystonia than wild-type littermates (WT). Electrophysiological studies showed enhanced response of Purkinje cells in *Atp1a3^{+/-}* at cerebellar inhibitory synapses. Our results shed light on the role of *Atp1a3* in inhibitory synapse, and its potential involvement in the expression of dystonia symptoms of *DYT12*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 病態生理学

科研費の分科・細目： 基礎医学・生理学一般

キーワード： ナトリウムポンプ $\alpha 3$ サブユニット、小脳、プルキンエ細胞、シナプス伝達
 電気生理学、抑制性ニューロン

1. 研究開始当初の背景

Na ポンプは、細胞の Na イオン勾配を形成維持し、神経興奮の基礎となる能動輸送酵素である。同酵素は α と β の2つのサブユニッ

トからなる膜タンパク質で、ATP 水解のエネルギーを用いて K イオンを細胞内に取り込み、Na イオンを細胞外に放出する。ほ乳類には4種の α サブユニットと3種の β サブユニット

が存在し、各々特徴的な発現パターンを示す。神経組織においては $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ の3種類のアイソフォームが発現しているが、それらの機能分担や機能重複については未解明な点が数多く残されている。これらの点を解明する第一歩として、私たちは $\alpha 2$ サブユニット遺伝子の欠損マウスを作製し、ヘテロマウスにおける恐怖不安行動の亢進、中年期以降の肥満を観察した。また、ホモマウスは生直後に死亡するが、扁桃体や梨状野における神経興奮の亢進、脳幹呼吸中枢における呼吸リズム形成不全と神経ネットワークの異常を見いだした。さらに、こうした現象が神経伝達物質の再吸収の低下および神経細胞のCl⁻イオン濃度の上昇と関連しており、グルタミン酸輸送体と $\alpha 2$ サブユニット、KCC2と $\alpha 2$ サブユニットとの機能共役がそれらの分子基盤であることを見いだした。これに続いて近年 $\alpha 3$ サブユニット遺伝子*Atp1a3*欠損マウスの作出を行い、神経機能にかかわるいくつかの異常を示す予備的な結果を得た。従って同遺伝子欠損マウスを用いて $\alpha 3$ サブユニットの生体機能の解明を遂行できると考えられた。

神経病のなかでもジストニアは患者の負担が大きく病態がほとんど不明であり、根本治療も難しい疾患の一つである。近年、急性発症型ジストニアパーキンソン病(RDP)の患者にナトリウムポンプ $\alpha 3$ サブユニット遺伝子の変異がみつき、本疾患の原因であることが示唆された(de Carvalho Aguiar, P. et al. 2004)。さらに、患者で見つかる $\alpha 3$ サブユニット遺伝子の変異を導入した $\alpha 1$ サブユニット遺伝子の機能解析から、ナトリウムイオンへの親和性が当該変異によって低下することが報告された(Rodacker et al. 2006)。RDPの原因遺伝子がNaポンプ $\alpha 3$ サブユニットの変異であり、患者で見つかる変異が $\alpha 3$ サブユニットの酵素活性を障害したり、タンパク質の安定性を低下させたりする変異であることから、 $\alpha 3$ サブユニットの神経における機能障害と、ジストニアの発症とが密接に関連すると考えられる(de Carvalho Aguiar, P. et al. 2004)。最近、 $\alpha 3$ サブユニットの機能はプロテオグリカンであるアグリンによって阻害され、シナプスにおける神経伝達の機能がアグリンとの相互作用によって調節されることが明らかにされた(Hilgenberg et al. 2006)。アグリ

ンは神経細胞間のシナプスに高濃度に局在し、シナプスの形成や維持に重要であり、神経-筋接合部のシナプスではアセチルコリン受容体の集合に関与する。アグリンはアルツハイマー病やパーキンソン病の病態との関連が指摘されているので(Liu et al. 2005)、申請者は $\alpha 3$ サブユニットとRDPの病態とをつなぐ鍵となる分子であるとの仮説を立てた。近年、神経変性疾患で神経細胞の新生(adult neurogenesis)が障害されているという報告がある。 $\alpha 3$ サブユニットは海馬や脳室下層の細胞に発現が多いため、RDPでは、神経細胞の新生が障害されている可能性もある。申請者が昨年度樹立した*Atp1a3*欠損マウスがRDPのモデルマウスとして活用できるか否かは、病態解明や治療法解明にとってきわめて重要である。*Atp1a3*欠損ホモマウスは、生直後に呼吸不全および心不全で死亡する。RDPは*ATPIA3*の優性変異であり、ヘテロマウスで症状が現れる可能性が高いが、自発的に症状が現れるまでに長時間かかる事も考えられるため、実験系を工夫する必要がある。

2. 研究の目的

本研究においては、*Atp1a3*欠損マウスの神経機能に関わる表現型を詳しく解析し、その生体機能を明らかにするとともに、RDPモデルマウスとしての有効性を確立する事を目的として、次の諸点を明確にする。

(1)*Atp1a3*欠損ヘテロマウスにおいて、筋力、運動性や新規探索傾向、驚愕反応、バーンズ迷路などの行動テストを行い異常の有無を検証する。異常が見いだされた場合、神経の興奮の状況との相関を解析する。神経新生の異常の有無についても検証する。

(2)*Atp1a3*欠損ホモマウスにおける中枢神経系シナプスの形成異常、興奮性神経および抑制性神経の機能異常の有無を組織学的、電気生理学的に明らかにする。さらに中枢神経系におけるアグリンの量や分布の変化が生じているのか、神経機能の変化が認められた場合アグリンが関与するのかどうかについて明確にする。

(3)RDPはストレスなどを受けた場合に発症することが知られている。*Atp1a3*ヘテロマウ

スに強制運動などのストレスを課し、その後の反応を野生型と比較することで、ジストニア様の症状が見られるかどうかを解析する。

3. 研究の方法

(1) *Atp1a3* 欠損ヘテロマウスの代謝および行動異常の解析

- ①ヘテロマウスは野生型に比べて、有意に体重が小さかった。その原因を知るために、ホームケージ活動量及び摂食量の測定を行う。
- ②恐怖不安行動、新規探索傾向などの行動テスト、統合失調症の解析に使われる驚愕反応、筋力テスト、運動能力や危機回避を調べる。ロタロッド、バランストビームを行い、野生型とヘテロマウスの違いがあるかどうかをテストする。
- ③上記行動テストで差が生じた場合、脳内での神経活動にどのような差があるのかを明確にするために、各テスト後1時間で脳を摘出し、連続組織切片を作成する。神経活動の指標としてc-Fosの発現を抗体染色で精査し、行動の違いに関与する脳の部位を解析する。
- ④神経新生を観察するためにBrdUを投与し、その蓄積を脳組織切片にて観察する。

(2) *Atp1a3* 欠損ホモマウスの神経活動の異常

- Atp1a3* 欠損ホモマウスは生直後に呼吸不全と心不全を引き起こし死亡する。これらの原因を特定するために下記の点を解析する。
- ①神経伝達物質の脳内含量を測定し、野生型、ヘテロマウス、ホモマウスでの相違があるかどうかを検証する。
 - ②生直後のマウスから脳を摘出し、灌留固定の後、組織切片を作成する。c-Fos抗体を用いた抗体染色を行い、野生型とホモマウスとで神経活動にどのような違いがあるのかを脳の全領域にわたって精査する。
 - ③生直後の呼吸不全の原因を解明する目的で、脳幹脊髄ブロック標本をE18.5日の胚から単離し、呼吸リズムの形成に異常があるかどうかを電気生理学的および光学的に測定する。

(3) RDPモデルマウスとしての有効性の検証

RDPは運動過多やストレスの後に、ナトリウムポンプの活性の不足が生じる結果神経

の異常な活動が起きることで誘起されると考えられている。*Atp1a3*欠損ヘテロマウスはストレスに反応してジストニアが誘起されたり、薬物によるジストニア誘起への感受性が高いことが考えられる。下記の2つの方法でこれらを検証する。

- ①*Atp1a3*欠損ヘテロマウスに強制水泳をさせ、水泳の様子やその後の毛づくろいの様子を観察し、野生型マウスと、ヘテロマウスに差があるのかどうかを観察する。
- ②小脳にカイニン酸を注入し、ジストニアを誘起できることが報告された(Pizoli et al 2002)。本方法を用いて、ジストニアの程度や時間経過、およびカイニン酸に対する感受性が野生型とヘテロマウスで異なるのかどうかを測定し、ジストニアの起こし易さを評価する。
- ③上記の方法によってジストニアが誘起できる場合には、その分子的な基盤—*Atp1a3*欠損ヘテロマウスの行動及び神経活動の異常とジストニア発症との関連—をさらに同定する。

(4) *Atp1a3*欠損ヘテロマウスの神経活動の電気生理学的解析

平成21年度において実施する行動テストにおける異常およびc-Fosの発現量の違いを見いだした場合には、*Atp1a3*欠損ヘテロマウスの神経活動の様相を電気生理学的に解析する。神経発火が野生型との違いが見られた部位を中心に脳スライス標本を作製し、IPSPおよびEPSP、テタヌス刺激によるLTPやLTDを解析し、野生型とヘテロマウスとの神経機能の相違を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) *Atp1a3*欠損ヘテロマウスの行動に関わる表現型として下記の点を明らかにした。
- ①ホームケージ活動量は、*Atp1a3*欠損ヘテロマウスにおいて、野生型よりも有意に増加していたが、摂食量については、有意差が認められなかった。
 - ②恐怖不安行動や新規探索傾向には有意差がなかったが、活動量はヘテロマウスで増加していた。また、ロタロッドやバランストビームでは、ヘテロマウスはより早期に学習が成立するが、最終的な運動能力には有意差がな

かった。ホームケージでの運動量の差と関係する可能性も考えられた。

③行動テスト後に脳を採取し、連続切片を作成後c-fosの発現を抗体染色にて観察したところ、顕著な違いは見られず、行動の違いがどのような神経基盤によるのかについては、別のアプローチが必要であると考えられた。

④カイニン酸を脳内投与し、ジストニアを誘起したところ、ヘテロマウスのほうが野生型よりもジストニアの強度が強く、また持続時間が長くなった。

⑤Caチャンネルのアゴニスト BayK8644 を投与してジストニアを誘起したところ、同様の効果が観察され、ジストニアの誘起にカルシウムが関わることが示唆された。

(2) *Atp1a3*欠損ヘテロマウスの神経機能に関わる表現型として下記の点を明らかにした。

①小脳のLTDには違いが見られなかったが、平行繊維からプルキンエ細胞へのPPFやI=0関連の結果には違いがあり、ヘテロマウスでは、神経伝達物質の放出効率が低下していると考えられた。

②*Atp1a3*欠損ヘテロマウスで小脳のスライス標本作製し、プルキンエ細胞へ投射するニューロンの電気生理学的解析を行った結果、抑制性シナプス伝達が野生型に比べて亢進していることが観察された。抑制性シナプス伝達の亢進は、GABAの放出効率の上昇または、シナプス接続の増加によると考えられた。

③小脳におけるナトリウムポンプ $\alpha 3$ サブユニット遺伝子は、プルキンエ細胞および、分子層に存在するバスケット細胞とステレート細胞に発現が見られた。 $\alpha 3$ サブユニットタンパク質は、プルキンエ細胞への抑制性シナプスが集積するピンスー構造に豊富に観察された。

(3) *Atp1a3*欠損ホモマウスの異常については下記の2点が明確にできた。

①神経伝達物質のうちドーパミンとノルアドレナリンについては、ホモマウスの脳内含量が有意に増加していた。

②E15.5以降の胚においては、ホモマウスの脳においてc-Fosの発現が亢進する領域が見られる。また、脳室の拡大などの形態的な違いも、みつかりつつある。特に $\alpha 2\alpha 3$ 二重欠損マウスにおいては、この傾向が顕著であった。

③*Atp1a3*が脳内のどの部位で豊富に発現しているかを、in situ ハイブリダイゼーションと抗体染色とで解析したところ、嗅球、梨状野、海馬、小脳で強い発現が観察された。

④胎生期のマウスから脳を摘出し灌留固定の後、組織切片を作成した。c-Fos抗体を用いた抗体染色を行い、野生型とホモマウスとで神経活動に違いのある領域として、小脳の辺縁部が特定できた。

⑤*Atp1a2Atp1a3*二重欠損マウスの胎生期の脳を単離し、野生型および単独欠損マウスと比較したところ、脳室の拡大が観察された。

(4) *Atp1a3*欠損ホモマウスの呼吸に関する神経活動の異常

①*Atp1a3*は呼吸中枢の存在する脳幹においては、呼吸中枢ニューロンで発現していた。*Atp1a2*はグリア細胞に発現しており、呼吸機能への関与の仕組みが*Atp1a3*と*Atp1a2*で異なると考えられた。

②呼吸リズム形成細胞および二酸化炭素濃度感受性の細胞の特異的マーカーであるPhox2bが陽性の細胞数は、野生型マウスと*Atp1a3*欠損ホモマウスとで差がみられなかった。

③*Atp1a3*欠損マウス脳幹標本を用いて、呼吸リズム形成の解析を開始し、 $\alpha 2$ サブユニットと $\alpha 3$ サブユニットとの機能的な違いの基盤解明を行いつつある。

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3件)

Onimaru, H., Ikeda, K. and Kawakami, K. (2012) Postsynaptic mechanisms of CO₂ responses in parafacial pre-inspiratory neurons of newborn rats. *J. Phys.* 590, 1615-24, 査読有

Tani, M., Onimaru, H., Ikeda, K., Kawakami, K. and Homma, I. (2010) Menthol inhibits respiratory rhythm in the brainstem preparation of newborn rats. *Neuro Rep.* 21, 1095-1099, 査読有

Onimaru, H., Ikeda, K., and Kawakami, K. (2009) Phox2b, RTN/pFRG neurons and respiratory rhythmogenesis. 168, 13-18, 査読有

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 潔 (KAWAKAMI KIYOSHI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号： 10161283

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

池田 啓子 (IKEDA KEIKO)

兵庫医科大学・医学部・主任教授

研究者番号： 10265241

尾仲 達史 (ONAKA TATSUSHI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号： 90177254