

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500399

研究課題名(和文) てんかんモデルラットを用いたてんかん発症の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying the epilepsy using a mutant model with seizures

## 研究代表者

田谷 真一郎 (Taya, Shinichiro)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 病態生化学研究部・室長

研究者番号：60362232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：イハラてんかんラット(IER)は、原因不明の自然発症ラット突然変異体である。このIERをてんかんのモデル動物として解析することで、てんかん発症の分子メカニズムを明らかにする。これまでに私共は、IERの原因遺伝子を同定することに成功し、遺伝子名をEpi-IERとした。そして、IERでEpi-IERのゲノムを調べた結果、イントロン上にSNPを見出した。このSNPにより、Epi-IERは転写の際にスプライシングに異常が生じ、発現が著しく低下することを明らかにした。さらに、Epi-IERの発現低下が原因で、IERの神経細胞の形態異常を引き起こされることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The Ihara epileptic rat (IER) is a mutant model with limbic-like seizures whose pathology and causative gene remain elusive. We identified the responsible gene for IER, Epi-IER, which is expressed in neurons of various brain regions. A single base mutation in Epi-IER caused abnormal splicing leading to lack of Epi-IER protein in IER. Our gain- and loss-of function experiments in vivo and in vitro showed that Epi-IER is involved in neurite extension and branching. These findings help to understand the pathology of epilepsy caused by a malformed neural network and how Epi-IER functions to prevent such disorder.

研究分野：神経科学

キーワード：てんかん 発達障害

### 1. 研究開始当初の背景

高度な脳機能を司る複雑な神経回路網は、精巧な遺伝子プログラムの基に、様々な発生段階を経て創り上げられる。一方、神経回路網形成の過程で異常が生じると、てんかん、精神遅滞、自閉症などの様々な精神・神経疾患が惹起されると考えられている。すなわち、「正常な神経回路網形成の分子・遺伝子機構」を調べることが、直接的に精神・神経疾患の病態の理解につながり、ひいてはその診断や治療法の開発にも展開しうると考えられる。しかしながら、神経回路網形成の分子機構はその複雑さ故に未解明の部分が多い。また、それらの研究が、特定の精神・神経疾患の病態解明に大きく貢献しているという事例は、国内外を通じて少ない。とくに、我が国でも患者数が多いてんかんは、その発症機構の解明が進んでおらず、それ故に難治性のもものも少なくない。

### 2. 研究の目的

長らく、“てんかん”の発症に至る分子機構は不明な点が多い。本研究では自然発症ラット突然変異体として報告されている“イハラてんかんラット(IER)”を研究題材として、てんかん発症の分子機構を解明する。すでに申請者らはIERのてんかん発症原因遺伝子を同定することに成功している。本研究期間内で、IER原因遺伝子産物の分子機能を明らかにする。また、IER原因遺伝子産物は分子間相互認識に関与するモチーフを含む細胞膜蛋白質であるので、その細胞内へのシグナル伝達系にも着目し解析をする。最終的に、IER原因遺伝子産物が関与するてんかん発症の分子機構を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) イハラてんかんラット(IER)でみられる異常部位の特定とてんかんの関連

IERでは一部の神経細胞に形態学的に明らかかな異常がみられる。組織レベルでは、海馬介在神経細胞での異常な細胞の密集などがみられる。また、in vitroの海馬初代培養神経細胞では、樹状突起の伸長阻害などが認められる。そこで、てんかん発症と神経細胞の形態学的な異常の因果関係を調べるために、IERでみられる異常部位を全て特定する。

#### (a) 組織レベルでの解析

てんかん発作後であると、異常がてんかんの原因か結果か不明であるので、発作以前の生後30日のラットを検討対象にする。各種マーカー分子の抗体(神経細胞(NeuN、Hu)、興奮性神経細胞(Glutaminase)、抑制性神経細胞(GAD67)、介在神経細胞(Somatostatin)、グリア細胞(GFAP、NG2)等)を用いて、切片を免疫染色する。さらに、ニューロルシダ(解析ソフト)を用いて解析することで、定量的に細胞の数・分布等の差異を検討することが可能になる。

(b) 海馬初代培養神経細胞での解析

組織切片であると、細胞1個あたりの微細な形態変化を見つけるのは困難である。そこで、in vitroの培養系を用いる。現在、樹状突起の伸長阻害がみられているが、最終的にシナプス形成にどのような影響を与えるのか検討する。興奮性・抑制性神経細胞のプレシナプス・ポストシナプスのマーカー分子が免疫染色でワークすることは確認済みであるので、これらを用いてシナプス形成が少ないのか遅れているのか調べる。また、タイムラプスシステムも立ち上げたので、樹状突起の伸長や分岐についてliving cellを用いて観察する。

(2) IER原因遺伝子産物の細胞内へのシグナル伝達系の解析

(a) IER原因遺伝子産物への結合分子の探索

IER原因遺伝子産物は細胞内ドメインが長いので、細胞外ドメインでの相互作用情報が細胞内ドメインを介して細胞内へと適切に伝えていると考えられる。この分子間相互作用機構を知るために、申請者はこの細胞内ドメインと

Glutathione-S-transferase (GST)あるいはMaltose binding protein (MBP)との融合蛋白質を作製した。そして、Ratの脳抽出液中からIER原因遺伝子産物へと結合する分子を精製し、液体クロマトグラフィーと質量分析(Lc/Ms/Ms)による同定(ショットガン解析)を試みる。これまでに申請者は、この手法を用いて研究を遂行してきているので技術的には問題ない。

(b) IER原因遺伝子産物に対する結合候補分子の選択

ショットガン解析の問題点としては、同定した分子が直接結合するのか、あるいは複合体の一部の分子として間接結合するかが不明である。そこで、精製した蛋白質を用いてin vitroの結合実験を行う。また、結合する意味合いを明確にするため、ある分子に対し結合できなくなるような特異的なIER原因遺伝子産物ポイントミュータントを作製する。さらに時間的・空間的に結合しうることを確認するために免疫染色や免疫沈降による確認をする。

(c) IER原因遺伝子産物の細胞内へのシグナル伝達系の解析

IER由来の脳組織・海馬初代培養神経細胞に、上記(3b)で作製したIER原因遺伝子産物ポイントミュータントを過剰発現させる。そして、上記(1)で特定した形態的な異常のどの部分をレスキューできるのか検討する。

### 4. 研究成果

(1) イハラてんかんラット(IER)でみられる異常部位の特定とてんかんの関連

In situ hybridization法や免疫染色法により、Epi-IERは脳全体に発現しており、特に扁桃体、海馬で高発現していた。さらに、発現している細胞種を調べた結果、神経細胞全般に発現しており、グリア細胞ではほとんど発現が確認できなかった。

次に、IERのてんかん発作の焦点部位を調べた。海馬・扁桃体・大脳皮質に電極を刺し、最初に発火する部位の同定を試みた。その結果、いずれの部位でも発火は確認できたが、特に扁桃体での発火が頻発していた。扁桃体領域を抑制性神経細胞のマーカー分子の抗体を用いて免疫染色を行った結果、抑制性神経細胞の発達異常や配置異常が確認できた。さらに、inhibitory postsynaptic current (IPSC) を測定した結果、抑制性神経細胞の神経活動の機能低下が認められた。

さらに、海馬由来の初代培養神経細胞を観察した結果、IERでは発生初期段階の海馬領域で神経細胞の発達が未成熟(樹状突起の伸長阻害・分岐抑制)であることを見出した。また、軸索と樹状突起が束化してしまう細胞も認められた。この海馬領域での神経細胞異常が、精神遅滞の原因の一部ではないかと考えている。

(2) IER原因遺伝子産物の細胞内シグナル伝達系の解明: Epi-IERのシグナル伝達系の解析をするために、マウス脳抽出液中からEpi-IERへと結合する分子を免疫沈降法により精製し、液体クロマトグラフィーと質量分析による同定(ショットガン解析)を試みた。その結果、約300ものEpi-IER結合分子候補の同定に成功した。また、結合候補分子のノックアウトマウスで、IERに非常によく似た表現型を示す分子を見出した。

#### 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4件)

1. Cytoskeletal regulation by AUTS2 in neuronal migration and neurogenesis. Hori K, Nagai T, Shan W, Sakamoto A, Taya S, Hashimoto R, Hayashi T, Abe M, Yamazaki M, Nakao K, Nishioka T, Sakimura K, Yamada K, Kaibuchi K, Hoshino M. *Cell Rep.* 9, 2166-2179, 2014, doi: 10.1016/j.celrep.2014.11.045.
2. 14-3-3 and Regulate Neurogenesis and Differentiation of Neuronal Progenitor Cells in the Developing Brain. Toyo-Oka K, Wachi T, Hunt RF, Baraban SC, Taya S, Ramshaw H, Kaibuchi K, Schwarz QP, Lopez AF, Wynshaw-Boris A. *J. Neurosci.*, 34, 12168-12181, 2014, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2513-13.2014.

3. Yamada Y, Seto Y, Taya S, Owa T, Inoue Y, Inoue T, Kawaguchi Y, Nabeshima Y, Hoshino M. Specification of spatial identities of cerebellar neuronal progenitors by Ptf1a and Atoh1 for proper production of GABAergic and glutamatergic neurons. *J. Neurosci.*, 34, 4786-4800, 2014, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2722-13.2014.
4. Seto Y, Nakatani T, Masuyama N, Taya S, Kumai M, Minaki Y, Hamaguchi A, Inoue Y, Inoue T, Miyashita S, Fujiyama T, Yamada M, Chapman H, Campbell K, Magnuson M, Wright C, Kawaguchi Y, Ikenaka K, Takebayashi H, Ishiwata S, Ono Y, Hoshino M. Temporal identity transition from Purkinje cell progenitors to GABAergic interneuron progenitors in the cerebellum. *Nature Communications*, 5:3337, doi: 10.1038/ncomms4337, 2014

[学会発表](計3件)

1. 田谷真一郎、有村奈利子、早瀬ヨネ子、西原有紀、柳川右千夫、星野幹雄: Functional analyses of a Down syndrome-associated gene, 第37回日本分子生物学会, 2014年11月
2. 田谷真一郎、早瀬ヨネ子、山田真弓、初山俊彦、西条琢真、三浦義記、大野行弘、今奥琢士、伊原信夫、天野殖、星野幹雄: Anatomical and physiological analyses of a rat mutant line with limbic-like seizures, 第36回日本分子生物学会, 2013年12月
3. 田谷真一郎、大輪智雄、西岡朋生、貝淵弘三、星野幹雄: Roles of Atoh1 and Atoh1-interacting molecules in cerebellar development, 第35回日本分子生物学会, 2012年12月

[図書](計1件)

1. 田谷真一郎、星野幹雄: 培養皿上の成熟神経細胞への遺伝子導入、131-136、実験医学別冊「遺伝子導入プロトコール」

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

[http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r\\_diag/index.html](http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_diag/index.html)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

田谷 真一郎 (Taya, Shinichiro)

独立行政法人

国立精神・神経医療研究センター

神経研究所・病態生科学研究部・室長

研究者番号：6 0 3 6 2 2 3 2