

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591689

研究課題名(和文) Efhc1 コンディショナルノックアウトマウスを用いたてんかん発症機序の解明

研究課題名(英文) Characterization of Efhc1 conditional knockout mouse and understand the pathology of epilepsy

研究代表者

鈴木 俊光 (SUZUKI, TOSHIMITSU)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：20373318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、てんかんモデルマウスとしてEfhc1コンディショナルノックアウトマウスを用い、てんかん発症機序を解明することを目的とした。目的の細胞種でCreリコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスを用いることで、Efhc1遺伝子のコードするタンパクmyoclonin1の発現が細胞特異的に減少していることを確認した。この変異マウスを用い、自然誘発性のけいれん発作の頻度、ペンチレンテトラゾールにより誘導されるけいれんに対する感受性について検討し、今回標的とした組織で、組織特異的にmyoclonin1タンパクの発現を減少させることに成功した。痙攣感受については、結果を検証中である。

研究成果の概要(英文)：To address the putative relevance of EFHC1 in epilepsies, we characterized Efhc1-conditional knock-out mice. Efhc1 gene encodes a protein of 648 amino acids in mouse, named as myoclonin1 that harbors three tandemly repeated DM10 domains and one EF-hand motif at the C-terminus. We obtained mice with a floxed Efhc1 allele, containing two loxP cassettes placed on either side of coding exon. We next generated mice with heterozygous Efhc1 deletion in specific cell type by crossing Efhc1 floxed and Cre transgenic mouse that is expressed Cre recombinase in specific cell type. We confirmed that expression level of myoclonin1 was reduced at targeted cells. We next investigated the frequency of spontaneous myoclonus and the threshold of seizures induced by pentylentetrazol. We are validating the result of seizure susceptibility in mutant mice.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：てんかん EFHC1 若年性ミオクローニーてんかん マウスモデル

## 1. 研究開始当初の背景

若年性ミオクロニーてんかん (JME) は、思春期(8~20歳)に発症し、ミオクロニー発作、強直間代発作などを特徴とする最も頻度の高い特発性てんかん(てんかん発作のみを症状とし、脳内病変を特定することが出来ない機能性てんかん)の一つである。申請者は、遺伝的連鎖解析、ポジショナルクローニングにより、第6番染色体短腕 6p12 から原因遺伝子の一つとして新規の遺伝子 *EFHC1* の同定に成功した。この遺伝子から家系内で連鎖を示す5種類のミスセンス変異をメキシコの JME 6家系から発見した (Suzuki *et al.*, **Nature Genetics**, 2004)。さらに、申請者を含む研究チームは、新たな4種類の JME 疾患変異(2種類のミスセンス変異、1つのナンセンス変異と1つのフレームシフト変異)を発見し報告した (Medina *et al.*, **Neurology**, 2008)。また、*EFHC1* の疾患変異は、複数のグループより報告が続いている。それらの疾患変異は、ヨーロッパ人の JME 家系、イタリア人の JME 家系、白人の若年性欠神てんかん、潜因性の側頭葉てんかん、さらに非分類型の特発性全般てんかんから見つかっている。このことより、*EFHC1* は JME 発症に関与しているだけでなく、特発性全般てんかんの痙攣誘発に広く関与している可能性もでてきている (Ma *et al.*, 2006, Annesi *et al.*, 2006, Stogmann *et al.*, 2007)。

現在までに同定されている特発性てんかん原因遺伝子のほとんどがイオンチャネルをコードしているが、*EFHC1* はイオンチャネルをコードしない機能未知のタンパク myoclonin1 をコードしている。Myoclonin1 には2種類のアイソフォームがある。一つは、DM10 と呼ばれる機能不明のドメインを3つ、更に EF-hand と呼ばれる、カルシウム結合蛋白でよく見られるカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 結合モチーフを1つ持つ、640 アミノ酸からなる蛋白 (long フォーム) で、もう一

つは、DM10 を1つだけ持ち 278 アミノ酸からなる蛋白 (short フォーム) である。Myoclonin1 はクラミドモナスの軸系、マウス精子の鞭毛のような運動性を持つ繊毛で発現していると報告され (Ikeda *et al.*, 2005)、申請者らも、このタンパクが胎生期には脳室内の脈絡叢の細胞で、出生後は気管や脳室内壁を覆う細胞の繊毛で多く発現がみられる事を報告した (Suzuki *et al.*, **Biochemical & Biophysical Research Communications**, 2008)。

2009年、申請者は、*Efhc1* 遺伝子改変マウスを作製・解析し、遺伝子改変マウス (ヘテロおよびホモ接合体) において自然誘発的なミオクロニー発作が野生型と比べ7~8倍多く出現すること、このミオクロニー発作出現時に異常な活動電位が脳波に出現すること、痙攣誘発剤の一つペンチレンテトラゾール (PTZ) に対し高い感受性を示すことなど、てんかん患者と類似の症状を示すことを発見し、*Efhc1* の欠損がてんかんを引き起こすことを示唆する直接的な生物学的証拠として報告した (Suzuki *et al.*, **Human Molecular Genetics**, 2009, 科学研究費補助金 若手研究 (B)、平成20年度~21年度の研究成果)。さらに、遺伝子改変マウスで脳室壁の上皮細胞繊毛の運動機能の低下が観察されるなどいくつかの特異的な異常症状を示すことも明らかにし、併せて報告した (Suzuki *et al.*, **Human Molecular Genetics**, 2009)。しかしながら現在までのところ、分子レベルでの JME 発症メカニズムは明らかとされていない。

## 2. 研究の目的

若年性ミオクロニーてんかん (JME) は、思春期に発症する最も頻度の高い特発性てんかんの一つである。申請者は、原因遺伝子の一つとして *EFHC1* 遺伝子の同定に成功し、これまでにマウスにおける myoclonin1 タンパクの発現は、申請者らが作成した抗

myoclonin1 マウスモノクローナル抗体を用いた免疫組織染色の結果より、マウスの胎生期には脳室内の脈絡叢の細胞、出生後は気管支や脳室の内壁を覆う上皮細胞の繊毛、精子の鞭毛のような運動性を持つ繊毛・鞭毛で多く発現していることが確認されているが、上皮細胞の myoclonin1 タンパク機能喪失がてんかん症状と関連しているのかどうかは不明である。本研究課題では、myoclonin1 タンパクの機能喪失によるてんかん症状の発症起源を *Efhc1* コンディショナルノックアウトマウスと目的の細胞種で Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスを用いることで、myoclonin1 を細胞種特異的に機能喪失させててんかん症状の発症起源を探索する。*Efhc1* コンディショナルノックアウトマウスおよび興奮性神経細胞、抑制性神経細胞などの細胞それぞれで Cre リコンビナーゼを発現するマウスはすでに導入済みである。これらマウスの交配により得られる Cre/LoxP システムで細胞種特異的に myoclonin1 タンパクが喪失しているマウスにおける、自然誘発的なミオクロニー発作の頻度や痙攣誘発剤に対する痙攣感受性などを検討し、以前報告した *Efhc1* 遺伝子改変マウス (Suzuki *et al.*, **Human Molecular Genetics**, 2009) から得られた結果と比較する事により、どの種の細胞が病態と大きく関わっているのかを見だし、*EFHC1* 遺伝子変異によるてんかん発症メカニズムの解明につなげる知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞特異的に myoclonin1 の発現が抑制されたマウスの交配

本研究で使用する *Efhc1* コンディショナルノックアウトマウスは、以前解析・報告した *Efhc1* 遺伝子改変マウス (Suzuki *et al.*, **Hum. Mol. Genet.**, 2009) とは異なる新たなマウスの系統で、マウスのバックグラウンドをさら

に C57BL/6J に近づけるために戻し交配を行った。本マウスは、遺伝子改変の技法により *Efhc1* 遺伝子内のエクソンの前後に loxP 配列が挿入されており、Cre リコンビナーゼを発現するマウスと交配する事で、Cre/LoxP システムにより *Efhc1* 遺伝子を特定の細胞種で発現抑制させる事が可能である。Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスと *Efhc1* コンディショナルノックアウトマウスとを交配し、得られた子孫を本研究に用いた。ジェノタイプがホモ接合体(ホモ)の flox マウスおよび flox ヘテロ接合体(ヘテロ)で Cre リコンビナーゼを持つマウスを得た。

(2) floxホモマウスにおける myoclonin1 発現の確認

ホモの flox マウスを用い、myoclonin1 の発現をウエスタンブロット解析および免疫組織染色法により確認した。

(3) floxホモ/Cre (+)マウスにおける myoclonin1 発現低下の確認

ホモの flox/Cre (+) マウスの脳における myoclonin1 の発現を免疫組織染色法により確認した。

(4) 自然誘発性のけいれん発作の観察

以前 *Efhc1* 遺伝子改変マウスで自然誘発性のけいれん発作を観察した際に、脳波および筋電図を測定しているとミオクロニー発作の判断が容易であったので、本研究課題でも脳波および筋電図を測定しながら12時間程度ビデオで撮影し、ミオクロニー発作の頻度を求め、統計的に対照群と比較検討した。

(5) 痙攣誘発剤によるけいれん感受性上昇の検証

マウス(5ヶ月齢)は、floxホモ/Cre (+)マウス、および対照群として、floxホモ/Cr

e ネガティブ(-)マウスおよび野生型/ Cre (+)マウスを用いた。ペンチレンテトラゾール(PTZ)をマウスへ腹腔内投与しけいれん感受性を評価した。けいれん感受性の評価は、けいれん誘発剤投与からミオクローニー発作、間代発作、全身性の強直・間代発作が観察されるまでのそれぞれの時間を測定し、統計的に対照群と比較検討した。

#### 4. 研究成果

マウスのバックグラウンドをさらに C57BL/6J に近づけるために戻し交配を行った上で、ヘテロ接合体 (ヘテロ) 同士の間交配によりホモ接合体 (ホモ) の flox マウスを作出した。得られたホモマウスと同腹の野生型マウスの脳組織を用い、myoclonin1 の発現をウエスタンブロット解析および免疫組織染色法により検討し、ホモマウスで野生型マウスの脳で観察されるのと同様の myoclonin1 の発現を観察し、イントロンに導入した loxP サイトが myoclonin1 の発現に影響していないことを確認した。次に、ヘテロ接合体 (ヘテロ) の flox : Cre (+)マウスを得て、さらにヘテロの flox マウスと交配し、ホモ接合体 (ホモ) の flox マウス:Cre (+)と野生型マウスを得た。得られたマウスの組織を用い、myoclonin1 の発現をウエスタンブロット解析および免疫組織染色法により検討し、ホモ Cre (+)マウスで myoclonin1 の発現が細胞特異的に減少していることを観察し、導入している loxP サイトが目的通りに働いていること、また、Cre リコンビナーゼが目的の細胞で発現していることを確認した。さらに、ヘテロ接合体 (ヘテロ) の flox : Cre (+)における自然誘発性のけいれん発作の頻度を脳波、筋電図およびビデオで撮影し観察することで検討し、統計的に対照群と比較した。また、けいれん誘発剤の一つであるペンチレンテトラゾール(PTZ)により誘導されるけいれんに対する感受性についてもヘ

テロ接合体、ホモ接合体の flox : Cre (+)マウスおよび対照群のマウスを用いて検討した。けいれん感受性の評価は、けいれん誘発剤投与からミオクローニー発作、間代発作、全身性の強直・間代発作が観察されるまでのそれぞれの時間を測定し、統計的に対照群と比較検討した。今回標的とした組織で、組織特異的に myoclonin1 タンパクの発現を減少させることに成功した。痙攣感受性については、結果を検証中である。

#### < 引用文献 >

- Annesi F., Gambardella A., Michelucci R., *et al.* (2007) Mutational analysis of *EFHC1* gene in Italian families with Juvenile Myoclonic Epilepsy. *Epilepsia* 48: 1686-1690.
- Ikeda T., Ikeda K., Enomoto M., *et al.*, (2005) The mouse ortholog of *EFHC1* implicated in juvenile myoclonic epilepsy is an axonemal protein widely conserved among organisms with motile cilia and flagella. *FEBS Lett.* 579:819-822.
- Ma S., Blair M.A., Abou-Khalil B. *et al.*, (2006) Mutations in the *GABRA1* and *EFHC1* genes are rare in familial juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Res.* 71(2-3):129-134.
- Medina M.T., Suzuki T., Alonso M.E. *et al.*, (2008) Novel mutations in myoclonin1/*EFHC1* in sporadic and familial juvenile myoclonic epilepsy. *Neurology* 70:2137-2144.
- Stogmann E., Lichtner P., Baumgartner C., *et al.*, (2006) Idiopathic generalized epilepsy phenotypes associated with different *EFHC1* mutations. *Neurology* 67:2029-2031.
- Suzuki T., Miyamoto H., Nakahari T., *et al.*,

(2009) *Efhc1* deficiency causes spontaneous myoclonus and increased seizure susceptibility. Hum. Mol. Genet. 18:1099-1109.

Suzuki T., Inoue I., Yamagata T., et al. (2008) Sequential expression of *Efhc1/myoclonin1* in choroid plexus and ependymal cell cilia. Biochem. Biophys. Res. Commun. 367(1):226-233.

Suzuki T., Delgado-Escueta A.V., Aguan K., et al. (2004) Mutations in *EFHC1* cause juvenile myoclonic epilepsy. Nature Genetics 36:842-849.

#### 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)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 俊光 (SUZUKI, TOSHIMITSU)  
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：20373318