

「脳を守る」

平成9年度採択研究代表者

田邊 勉

(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 教授)

「Ca チャネル遺伝子の変異と神経疾患」

1. 研究実施の概要

α_{1A} Ca チャネルは脳全体に広く発現しており、中枢および末梢神経系の伝達物質放出機構において中心的役割を果たしている。近年、本遺伝子の種々の変異が多様な神経疾患とリンクしていることが明らかにされてきた。脊髄小脳失調症6型(SCA6)はその一つであり、本邦の遺伝性脊髄小脳変性症において SCA3 に次いで多く社会的ニーズの高い難治疾患である。本研究においては、SCA6 の病態とチャネル遺伝子変異との関係を明らかにするとともに、変異 α_{1A} チャネルおよび共存する他のタイプの Ca チャネル機能の調節、制御機構の活用により神経細胞の変性脱落の阻止をはかる。そして Ca 依存性の神経細胞死を最終局面とする多くの神経変性疾患の治療法開発の基盤確立を目指す。現在、2種のチャネルノックアウトマウスの作製を終了し、これらマウスの機能解析を行っている。一方 SCA6 の病態とチャネル遺伝子変異との関係を変異 α_{1A} チャネルの発現制御、電流特性、活性制御などの側面から明らかにしつつある。今後、種々ノックアウトマウスの解析から得られた結果、さらに現在計画している変異 Ca チャネル遺伝子をシングルコピー導入したノックインマウスの解析から α_{1A} チャネル遺伝子疾患の治療法を模索する。本研究成果は‘イオンチャネル疾患’全般の原因究明と治療法開発に格好のモデルを提供することになると期待される。

2. 研究実施内容

- i 計画している3種のノックアウトマウスのうち2種の作製を終了した。現在これらマウスの機能解析を行っているところである。一方、種々の疾患 Ca チャネル遺伝子を Cre リコンビナーゼ活性を利用してシングルコピー導入できるようにしたターゲットベクターを構築した。そしてこれを ES 細胞へ導入し相同遺伝子組換えがおきた変異 ES 細胞クローンの単離に成功した。
- ii SCA6 の原因遺伝子産物である P 型チャネルにはスプライシングの差によってポリグルタミン領域を持つもの(3種)と持たないもの(3種)の2グループが存在するが、これらを区別して認識できる抗体を用いて免疫染色を行ったところ、

- ポリグルタミン領域を持つ P 型チャネルが、SCA6 において特異的に変性脱落する小脳プルキンエ細胞において、高濃度に発現していることが明らかになった。
- iii SCA6 の患者剖検脳組織を P 型チャネルのポリグルタミン領域を認識する抗体を用いて免疫染色法で解析したところ、プルキンエ細胞の細胞質内に P 型チャネルの aggregate が見い出された。さらにこれらの封入体はユビキチン化されていなかった。この知見は、これまで CAG リpeat病において見い出されてきた知見とは大きく異なる。
 - iv SCA6 の患者において見い出される変異 (CAG リpeat伸長) を導入した α_{1A} チャネルを作製し、これを培養細胞に発現させ現在その電気生理学的特性の解析を行っている。
 - v SCA6 の患者において見い出される変異を導入した α_{1A} チャネルを種々の培養細胞 (神経系および非神経系の両方) に stable に発現させ、細胞内における局在、環境変化に対する細胞の生存、細胞死 (apoptosis, necrosis) 等を検討している。
 - vi 小脳スライス培養系および、小脳初代培養系を確立した。現在これら細胞に種々の変異導入 α_{1A} チャネルを発現させ、細胞内局在、細胞内 Ca 濃度変化、細胞の生存、細胞死 (apoptosis, necrosis) 等を検討している。
 - vii 摘出脊髄標本、大脳皮質、海馬、小脳の脳スライスを材料として用い、野生型マウスの電気生理学的基本データの蓄積を行っている。今後ノックアウトマウスより調製したこれら標本の機能解析を行い、野生型との比較検討を行う予定である。一方、これらの標品を用いて G 蛋白質を中心にしたチャネル活性制御機構の解析、種々刺激に対する細胞内 Ca 濃度変化と神経細胞死の解析も行っている。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Neuhuber, B., Gerster, U., Döring, F., Glossmann, H., Tanabe, T. & Flucher, B. E. (1998). Association of calcium channel α_{1S} and β_{1A} subunits is required for the targeting of β_{1A} but not of α_{1S} into skeletal muscle triads. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5015-5020.
- Nakai, J., Tanabe, T., Konno, T., Adams, B.A. & Beam, K.G. (1998). Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 24983-24986.
- Ishikawa, K., Fujigasaki, H., Saegusa, H., Ohwada, K., Fujita, T., Iwamoto, H., Komatsuzaki, Y., Toru, S., Toriyama, H., Watanabe, M., Ohkoshi, N., Shoji, S., Kanazawa, I., Tanabe, T. & Mizusawa, H. (1999). Abundant expression and cytoplasmic aggregations of α_{1A} -voltage-dependent calcium channel

protein associated with neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6). *Hum. Molec. Genet.*, 8:1185-1193.

- 三枝弘尚、田邊勉 (1998) 電位依存性 Ca^{2+} チャネルの構造と機能 脳の科学 20: 489-495.
 - 栗原崇、田邊勉 (1998) 電位依存性カルシウムチャネルの分子的多様性：構造・機能相関と組織特異的発現 循環器科 44:1-12.
 - 栗原崇、田邊勉 (1998) 電位依存性 Ca^{2+} チャネル 蛋白質核酸酵素 43:1579-1588.
 - 村越隆之、栗原崇、三枝弘尚、田邊勉 (1998) イオンチャネルの分子生物学 羊土社 実験医学バイオサイエンスシリーズ
- 他 11 件