HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on neuronal function using votage-gated Ca2+ channel Cav2.1α1 subunit mutant mice [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	金, 泰延
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第6998号
Issue Date	2016-09-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/63573
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Tae_Yeon_Kim_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：Tae Yeon Kim

審査委員	主査　教授	木　村　享　史
	副査　教授	木　村　和　弘
	副査　准教授	乙　黒　兼　一
	副査　ユニットリーダー	高　橋　英　機（理化学研究所）

学位論文題名

Studies on neuronal function using voltage-gated Ca^{2+} channel $Cav2.1\alpha_1$ subunit mutant mice

（Cav2.1 チャネルの神経機能における役割に関する研究

- Cav2.1α1 遺伝子変異マウスを用いて-）

電位依存性カルシウムチャネル（Cav）は神経細胞の電気的興奮を Ca^{2+}依存性の生理応答に変換する役割を担い、α1、α2/δ、β、γサブユニットで構成される。Cav2.1 は主に中枢神経系に存在し、グルタミン酸などの神経伝達物質の放出や遺伝子発現などの神経機能の制御に関与している。グルタミン酸は中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質であり、記憶や学習などの高次脳機能に中心的な役割を果たしている。他方、過剰なグルタミン酸は神経が過剰に興奮するてんかんなどの原因となり、さらにはアポトーシス、壊死などを含む神経細胞障害を惹起する。グルタミン酸受容体としては、イオンチャネル内臓型の AMPA（α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid）型、カイニン酸型、NMDA（N-methyl-D-aspartate）型受容体があり、また、G タンパク共役型である代謝型受容体が知られている。Cav2.1α1 サブユニット遺伝子の変異は、ヒトでは家族性片麻痺性偏頭痛 1 型、脊髄小脳性失調症 6 型、反復発作性失調症 2 型、特発性全般てんかんなどの原因として報告されている。実験動物としては複数の Cav2.1α1 変異マウスが系統化されており、運動失調、てんかん、記憶障害などを示すが、それらの症状並びに表現型は様々である。

本研究では、Cav2.1 チャネルの神経機能における役割を解明する目的で、以下の異なる 2 系統の Cav2.1α1 変異マウスを用いて実験を行った。一つは Cav2.1α1 遺伝子内に変異がある *rolling Nagoya* マウスを用いて、カイニン酸誘発

性てんかんの感受性や神経細胞変性への抵抗性について検索した。他の一つは新規に Cav2.1α1 遺伝子変異マウスとして見出された *tottering-6j* マウスを用いて、てんかんや小脳における遺伝子発現について調べた。

Rolling Nagoya マウスは、Cav2.1α1 サブユニットのドメイン III 内の電位センサーS4 領域内に変異があるため Ca^{2+}電流が野生型より 40%低下し、運動機能障害を示すが、てんかん発作は示さない常染色体劣性の系統である。この一見正常なヘテロマウスでは、加齢依存的に変異型 Cav2.1α1 サブユニット遺伝子の発現が上昇し、野生型マウスに比べカイニン酸投与によるてんかん発作は加齢依存的に抵抗性を示した。これの組織病理学的解析からは、海馬 CA1 および CA3 において変性錐体細胞並びに反応性アストロサイトの減少が認められ、ウエスタンブロット法ではリン酸化 p38 の発現の減少が認められた（1 章）。また、このホモマウスに凍結脳損傷を起こして解析した結果、野生型マウスに比べ損傷領域における変性神経細胞並びに反応性アストロサイトの減少が損傷後 1 日目および 7 日目で認められ、ウエスタンブロット法によりリン酸化 p38 の発現が減少していた（2 章）。*Rolling Nagoya* マウスを用いたこれらの結果から、Cav2.1 チャネル依存性 p38 シグナルカスケードは、カイニン酸誘発性てんかん並びに神経細胞変性への抵抗性に関与していることが示された。

Tottering-6j マウスは Cav2.1α1 サブユニットのドメイン I 内の S4 から S6 の領域が一部欠損した運動機能障害を示す常染色体劣性の系統である。これのホモマウスを電気生理学的並びに薬理学的に解析した結果、これの薬理学的な特徴としては、このマウスはヒトに類似した欠神発作を示すことが明らかになった。小脳では野生型マウスに比べ tyrosine hydroxylase、zebrin II、ryanodine receptor 3 の発現が高く、calretinin の発現が低くかった（3 章）。以上の結果から、*tottering-6j* マウスはヒトの欠神性発作の疾患モデル動物になること、小脳における遺伝子発現機能に Cav2.1 チャネルを介した Ca^{2+}シグナリングが関与していることが示唆された。

Rolling Nagoya マウスを用いた本研究により、Cav2.1 チャネルは p38 シグナルカスケードを介した神経細胞の保護作用に関与していることが明らかとなった。また、Cav2.1 チャネル阻害剤や p38 リン酸化阻害剤はてんかんや脳損傷に対する治療剤として有用である可能性が示唆された。他方、*tottering-6j* マウスを用いた研究によっては、Cav2.1 チャネルの変異部位の違いによる機能変化は、てんかんの発症に影響を与えること、小脳における遺伝子発現には Cav2.1 チャネルを介したシグナル伝達経路が関与していることが明らかとなった。よって *tottering-6j* マウスは、Cav2.1 チャネルの機能解析に有用なモデル動物であることが示唆された。さらに本研究からは、Cav2.1α1 サブユニット遺伝子の変異によって表現型が異なるのは、その変異部位の違いによってチャネル機能に異なる

変化を起こし、中枢神経系機能を支えている複雑な神経回路ネットワークの制御を多様に乱すことが示唆された。

これら一連の研究は、シナプス前細胞に存在する電位依存性 Cav2.1 チャネルが神経回路の構成素子である神経細胞とグリア細胞の両方の活性を制御していること、さらにその変異部位の違いより異なる多様な表現型を示すことをモデル動物を用いて基礎獣医学的に明らかにしたものである。ヒトにおける Cav2.1 も変異部位の違いによりてんかんや偏頭痛などの異なる疾患を示すため、本研究で得られた知見は、神経回路の動作機能に関連した研究、Cav2.1 遺伝子変異疾患のメカニズム解明や治療法の開発などヒトの臨床的応用にもつながることが期待される極めて重要な知見である。

よって，審査委員一同は，上記学位論文提出者 Tae Yeon Kim 氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。