

氏名	とく だ さと こ 徳 田 智 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3046 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 病 理 系 専 攻
学位論文題目	The ataxic groggy rat has a missense mutation in the P/Q-type voltage-gated Ca^{2+} channel $\alpha 1A$ subunit gene and exhibits absence seizures (運動失調 groggy ラットは、電位依存型 P/Q タイプカルシウムチャンネル $\alpha 1A$ サブユニット遺伝子にミスセンス変異を有し欠神発作を示す)
論文調査委員	(主 査) 教 授 高 橋 良 輔 教 授 大 森 治 紀 教 授 金 子 武 嗣

論 文 内 容 の 要 旨

Groggy (GRY) ラットは、運動失調と歩行のふらつきを特徴とする神経系ミュータントラットである。神経症状は離乳期ごろより観察されるが、肉眼的或いは病理組織学的な異常は認められない。成熟個体では軽度の小脳萎縮が観察され、病理組織学的に小脳プルキンエ細胞のプレシナプスや軸索終末の変性が観察される。これらの変異表現型は常染色体性劣性遺伝し、原因遺伝子は *groggy* (*gry*) と名付けられているが、これまで詳細な遺伝解析はなされていなかった。本研究は、GRY ラットのヒト疾患モデル動物としての位置づけを明確にすることを目的に、1) GRY の遺伝学的解析および、2) 新たに発見した GRY の欠神様発作について詳細な解析を行った。

連鎖解析により、*gry* 遺伝子をラット第19番染色体上の *D19Rat122* と *D19Rat120* の間約 2.61cM の領域にマップした。物理地図を作成し、*gry* マップ領域に存在する遺伝子の中から最も有力な候補遺伝子として、*Cacna1a* 遺伝子に注目した。*Cacna1a* 遺伝子は、電位依存型 P/Q タイプカルシウムチャンネルの Cav2.1 $\alpha 1A$ サブユニットをコードし、小脳プルキンエ細胞および顆粒細胞に多く発現している。シークエンス解析により *Cacna1a* 遺伝子コーディング領域にアデニンからチミンへの点突然変異を発見した。この変異により、CACNA1A 蛋白の第251番目のアミノ酸残基であるメチオニン（疎水性/中性）がリジン（親水性/塩基性）へと置換される。変異部位はカルシウムイオンチャンネルのポアを形成する P-loop 細胞外領域に相当し、さらにこの付近のアミノ酸配列は脊椎動物間でよく保存されていることから、当該変異は *gry* 表現形質に関与することが示唆された。HEK tsA-201 細胞再構成系において、変異型 Cav2.1 チャンネルの電気生理学的な機能変化を調べた結果、変異型 Cav2.1 チャンネルは、野生型チャンネルと比較して、不活化からの回復速度が増加することが示された。

ヒトで CACNA1A 遺伝子の異常は、家族性片麻痺性偏頭痛、反復発作性失調症2型および脊髄小脳失調症6型の原因として知られる。近年では、運動失調と欠神発作を示す患者から当該遺伝子の変異が報告されている。*Cacna1a* ミュータントマウスとして知られる *tottering*, *leaner* および *rocker* マウスは運動失調と欠神様発作を示す。

GRY ラットについて欠神様発作が観察されるか検討した。30週齢 GRY ラットの行動観察と脳波記録を行った結果、全ての個体で、動作の停止と一致して、脳波上に両側同期性 7-8Hz の棘徐波複合を特徴とする欠神様発作が観察された。慢性記録電極を用いて 6, 8, 10, 14 および 20 週齢時に脳波を記録し、発作の経時的推移を解析した。その結果、GRY の欠神様発作は頻度および持続時間ともに 6 週齢から 8 週齢にかけて増加し、14 週齢以降少なくとも 30 週齢までに安定した値となった。既知の抗てんかん薬を用いた発作抑制試験では、ヒト欠神発作に有効なエトスクシミドおよびバルプロ酸により GRY の欠神様発作は投与後速やかに抑制された。一方、ヒト強直発作に有効なフェニトインでは GRY ラットの発作は投与後も抑制されなかった。これらの結果から、GRY の欠神様発作はヒトの欠神発作に相当することが示唆された。

以上より、GRY ラットは、*Cacna1a* 関連疾患モデルであるとともに、新たな遺伝性の欠神様発作モデルラットとして、病態解明研究や予防、治療薬の開発研究に有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者は、運動失調と歩行異常を特徴とする groggy (GRY) ラットの原因遺伝子の同定と欠伸様発作の解析を行った。まず、戻し交雑子を用いた連鎖解析によって、原因遺伝子は第19番染色体上に位置することを示した。次いで、マップ領域に位置する電位依存型 P/Q タイプカルシウムチャンネル $\alpha 1A$ サブユニット (*Cacna1a*) 遺伝子を候補遺伝子として見出した。シークエンス解析により、GRY ラットには、そのチャンネルポアを形成する P ループの細胞外領域に相当し、脊椎動物間で高いアミノ酸保存性を示す部位にミスセンス変異 (M251K) があることを見つけた。HEK tsA-201 細胞再構成系を用いた電気生理学的試験において、この変異を導入した Cav2.1 チャンネルは機能的変異が生じることを示した。*Cacna1a* 遺伝子は、ヒトで家族性片麻痺性片頭痛や反復発作性失調症 2 型の原因遺伝子として知られている。GRY ラットの行動と脳波の検査により、活動の一時停止に伴い全般性棘徐波複合が大脳皮質と海馬から検出されることが明らかになった。さらに、この欠伸様発作は、ヒトの欠伸発作と同様の抗てんかん薬に対する反応性をもつことが示された。

以上の研究は、*CACNA1A* の機能解明、関連疾患の病態解明および予防、治療法の開発研究に貢献するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成19年1月16日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。