

小児けいれん感受性遺伝子マウスホモログのポジショナルクローニング

●三澤 日出巳

(財) 東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所

〈研究の目的と進め方〉

マウスの第10染色体にコードされる遺伝子 (MALS-1: mammalian homologue of LIN-7) のノックアウトマウスを作製して解析する過程で、まったくの偶然から、聴源性てんかん (audiogenic seizure: AGS) の感受性に関与する新規遺伝子座を同定した。Black Swiss マウスは100%の浸透率で聴源性てんかん発作をおこすが、この感受性は生後21日目をピークとして、以後成長に伴って消失する。このてんかん感受性は劣性遺伝様式をとり、連鎖解析によって約1センチモルガン (cM) の遺伝子領域に絞り込み、jams1 (juvenile audiogenic monogenic seizures) と名付け発表した (J Neurosci 2002)。興味深いことに、この領域はヒトの家族性熱性けいれんで報告されている遺伝子座 (19p13.3) と相同 (syntenic) であり、jams1は本疾患のマウスホモログの可能性が高い。本研究ではjams1のポジショナルクローニングを行い、その成果に基づいて、ヒトの家族性熱性けいれんの原因遺伝子の同定を試みる。

〈研究開始時の研究計画〉

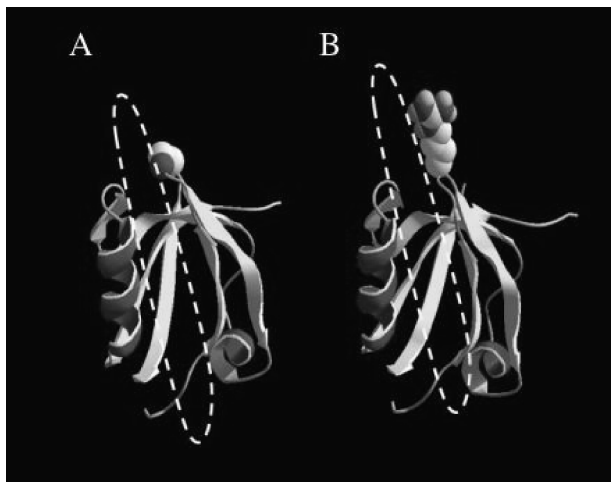
公開されているマウスのゲノム情報 (C57BL/6のエクソン情報) をもとに、Black SwissのゲノムDNAの当該領域 300 kbの配列のうち、全てのエクソンとエクソン-イントロンの境界部をPCRにて増幅して塩基配列を決定する。また、定常状態でのmRNAの発現量はNorthern blotにて検討する。現在までに上記の解析の約2割程度が終了しているが、残り8割の解析を鋭意進める。責任遺伝子 (候補) を絞り込んだ後は、C57BL/6由来の当該遺伝子領域をBlack Swissに遺伝子導入して、AGSに関する表現型がレスキューされるか否かを検討する。

〈研究期間の成果〉

マウス多型マーカーを用いた連鎖解析 (3,000匹以上) により絞り込んだ約300 kb領域 (jams-1 critical region) に存在が推定される全遺伝子 (総数25) の定常状態でのmRNAの発現レベルおよび全てのエクソンとエクソン-イントロンの境界領域の塩基配列をBlack SwissとC57BL/6で比較したところ、GIPC3 (GAIP interacting protein, C-terminal: ENSMUSG00000034872) のPDZドメイン内で1箇所のアミノ酸変異 (G117R) が見つかった。このグリシン残基は線虫からヒトに至るまで保存されており、この箇所の変異はPDZドメイントリガンドとの結合を阻害する可能性が高い (図1)。In-situ hybridizationにより脳におけるGIPC3の発現細胞を検索したところ、GIPC3は広範な神経細胞で発現することが認められたが、興味深いことに、聴覚伝導路である蝸牛神経核や下丘での強い発現が認められた。酵母ツーハイブリッド法とco-immunoprecipitation法を用いて変異GIPC3のPDZドメインの機能解析を行ったところ、この変異によりPDZドメインのリガンド結合能が実際に消失することが判明した。さらに、C57BL/6のBAC DNAをBlack Swissに導入したところ、AGSの表現型が消失した。一方で、C57BL/6

のGIPC3のエクソン領域をneomycin cassetteで置換したコンストラクトではAGSの表現型はレスキューされなかった。

図1: GIPC3の正常 (A) とBlack Swissで見つかった変異 (B) をもつPDZドメインの立体構造。点線はリガンド結合部位。



〈国内外での成果の位置づけ〉

現在までに、けいれん感受性が高まっている複数の変異マウスが同定されているが、多くが歩行失調 (ataxia) や神経変性の所見を伴っているため、けいれん感受性の変化は2次的なものと考えられている。この点、Black Swissマウスには病的な神経変性の兆候は見られず、GIPC3はけいれん発作を直接に制御している遺伝子である可能性が高い。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

ヒトの家族性熱性けいれん (FEB2) 家系のDNAサンプルを米国のDr. Erik W. Johnsonから供与してもらい、GIPC3の変異について解析したが、翻訳領域にはいかなる変異も検出されなかった。現在はGIPC3のプロモーター領域に変異がある可能性を考え、ゲノムDNAの解析とプロモーター活性の解析をおこなっている。患者由来の培養細胞株 (線維芽細胞など) が入手できれば、研究の進展に大きく貢献することが期待できるが、そのような研究材料は皆無であり、その点もヒトの原因遺伝子の同定を困難にしている。

〈今後の課題〉

Black SwissマウスにおけるAGS感受性の責任遺伝子としてGIPC3を同定した。これを突破口として、ヒトの家族性熱性けいれん (FEB2) の原因遺伝子に迫りたいと考えている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

論文投稿中