

## 論文の内容の要旨

論文題目 ヒト神経系における電位依存性カルシウムチャネルの部位別発現カ

タログの作成及び単一神経細胞における解析

指導教官 辻省次教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 高橋祐二

### 1. 序論

ヒトの神経細胞は多様性を持っている。神経変性疾患においては、特定の神経細胞が、選択的に脱落していく。個々の神経細胞の多様性を反映する分子として電位依存性カルシウムチャネル(VGCC) $\alpha$ 1,  $\beta$ サブユニットを題材にし、ヒト神経系における発現を系統的かつ網羅的に検討した。

### 2. 方法

ヒト神経組織から抽出した mRNA を鋳型にして、VGCC  $\alpha$ 1 サブユニットに共通の塩基配列を用いて Degenerate primer を作製し、RT-PCR によるスクリーニングを行い、制限酵素切断パターンにより各クローンを同定した。

さらに、ヒト神経組織の各部位から抽出した total RNA を鋳型とし、VGCC  $\alpha$ 1,

$\beta$ サブユニットの各サブタイプに特異的なプライマーを作成し RT-PCR を行って部位別の発現カタログを作成した。得られた結果を、LightCycler™ system を用いた real-time RT-PCR によって定量的に分析した。

一方、PCR クローニングによりヒト神経系に発現する VGCC  $\alpha 1S$  の塩基配列を確認した。ヒト及びラット VGCC  $\alpha 1S$  に対するノザンブロットティング、in situ hybridization を行い、神経系での発現を検討した。レーザーダイセクターを用いた単一神経細胞の切り出し及び Single cell RT-PCR の系を用い、ヒト線条体中型神経細胞における、VGCC  $\alpha 1S$  及びリアノジンレセプター(RYR)の単一神経細胞レベルでの発現の検討を行った。

### 3. 結果

#### 3-1 VGCC $\alpha 1$ サブユニットのスクリーニング

神経組織及び非神経組織から得られた各クローンを解析し、神経系で新に骨格筋型 VGCC  $\alpha 1S$  を検出した。非神経組織においても複数のサブタイプを得た。新規遺伝子は検出できなかった。

#### 3-2 ヒト神経系における VGCC $\alpha 1$ , $\beta$ サブユニットの部位別発現カタログ

##### (1) $\alpha 1$ サブユニット

神経系では $\alpha 1A$ ,  $B$ ,  $C$ ,  $G$ ,  $H$  の発現量が多く、 $\alpha 1D$ ,  $E$ ,  $S$  の発現量が比較的少ない。 $\alpha 1I$  の発現量は少ない。各サブタイプの発現パターンは、 $\alpha 1A$  は小脳に多い一方で、 $\alpha 1B$  は比較的基底核に多い。L型 VGCC では、 $\alpha 1C$  は基底核及び小脳の発現レベルが高い一方で、 $\alpha 1D$  は大脳皮質、小脳に多いが、基底核には比較的少ない。 $\alpha 1S$  は神経系では基底核に多い。T型 VGCC では、 $\alpha 1G$  は大脳皮質、海馬、黒質、小脳に多い一方で、基底核での発現レベルは少ない。 $\alpha 1H$  は基底核に発現が多い一方で、大脳皮質、海馬、黒質、小脳では発現レベルは少なく、 $\alpha 1G$  と対照的な発現パターンを呈している。

##### (2) $\beta$ サブユニット

神経系では $\beta 1$ ,  $\beta 4$ が多く, それについて $\beta 2$ の発現量が多く,  $\beta 3$ は比較的少ない.  $\beta 1a$ の発現は筋肉のみであり,  $\beta 1b$ は神経系に広範に発現しているが, 特に小脳, 後根神経節に多い.  $\beta 1c$ は大脳皮質, 海馬に多いが, 小脳での発現はほとんど見られない.  $\beta 2$ は比較的大脳皮質, 小脳に多く,  $\beta 3$ は小脳, 黒質, 後根神経節での発現が見られる.  $\beta 4$ は神経系に広範に発現しているが, 後根神経節には少ない.

### 3-3 神経系における VGCC $\alpha 1S$ の発現の検討

脳に発現する VGCC  $\alpha 1S$  の塩基配列は, 筋肉で報告されている配列と同一であった. ノザンブロットイングでは, ヒトでは骨格筋, 骨髄, ラットでは骨格筋, 脾臓, 小腸, 肺, さらに神経系では大脳皮質, 小脳, 海馬, 脊髄に発現が認められた. *In situ* hybridization では, ヒトにおいては, 尾状核において発現が多く認められた. ラットにおいては, 線条体及び海馬の一部の細胞に強い発現が認められた. Single cell RT-PCR による発現の解析では, 線条体の GABA 陽性中型神経細胞において $\alpha 1S$  と RYR が共発現している可能性が示唆された.

## 4. 考察

本研究の成果としては, 以下のような点が挙げられる.

1. VGCC  $\alpha 1$ ,  $\beta$ サブユニットすべてのサブタイプを網羅し, 定量的な解析を含めた体系的な部位別発現カタログを, ヒトにおいて初めて構築した.
2. ヒト神経系において, これまで実験動物において報告されていた発現パターンと異なる発現パターンを呈するサブタイプの存在が明らかになった.
3. 神経系において, これまで発現が確認されていなかった骨格筋型 VGCC  $\alpha 1S$  が, 基底核に発現していることを明らかにした.

本研究において電気生理学的に同じ性質を示すサブタイプの発現パターンの差異が認められたことは興味深い. VGCC が神経細胞の個性を反映する重要な

分子であると考えられる。一方、大脳基底核、小脳など部位による発現プロファイルの違いも明らかになった。VGCC が各部位の機能的な特徴を分子レベルで規定する因子であることが示唆された。

今回の研究は、実験動物における結果と多くの点で整合性が認められ、これまでの様々な実験モデルの結果をヒトに適用することの妥当性が示された。しかし一方では、実験動物での結果と異なる部分も見られており、ヒトでの探索の重要性を裏付ける結果と考えられた。特に $\alpha 1H$ 、 $\alpha 1I$ 、 $\beta 1b$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ の各サブユニットの発現パターンに差異が認められた。

一方、本研究では骨格筋型 VGCC  $\alpha 1S$  が神経系において大脳基底核、特に線条体の GABA 陽性中型神経細胞に選択的に発現していることを明らかにした。線条体における  $\alpha 1S$  とドーパミン情報伝達系との関連、 $\alpha 1S$  が RYRs と共役して calcium-induced calcium release を司っている可能性、悪性高熱と悪性症候群の共通の病態メカニズムを探る端緒に関して考察した。

ヒトにおける VGCC  $\alpha 1$ 、 $\beta$  サブユニットの発現を系統的に検索した本研究の成果は、チャンネル分子の異常によって生じる疾患の病態生理の理解と、神経系の部位特異的に作用する薬剤の開発とに寄与しうると思われる。