

—— 研究助成報告 ——

KCNQ2遺伝子変異の海馬GABA作動性 ニューロンネットワーク構築への影響

A *Kcnq2* mutation associated with early-onset epilepsy modulates the GABAergic neurotransmitter system in the neonatal hippocampus

内 田 琢¹⁾, 廣 瀬 伸 一^{1,2)}

要旨：電位依存性K⁺チャネルサブユニットをコードする*KCNQ2*遺伝子変異は新生児発症てんかんの原因として知られており、*KCNQ2*が構成するM-channelの機能低下による神経細胞の過剰興奮が疾患に関与していると考えられてきた。一方これらの発症時期は神経伝達物質γ-アミノ酪酸（GABA）が興奮性として働く時期と一致するため、GABA作動性ニューロンネットワークの変化がてんかん発作に関与する可能性がある。そこで患者から発見された変異（p.Y284C）と同様の遺伝子変異を持つknock-inマウスを作成し、幼若齢マウス海馬CA1領域のGABA神経ネットワークに関する電気生理学研究を行った。その結果GABA作動性神経細胞におけるM-channelの機能が*Kcnq2*遺伝子変異によって低下し、GABA放出を亢進することを発見した。過剰なGABAは幼若期錐体細胞の過剰発火に寄与すると考えられる。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2016 ; 27 : 77-86

Key Words : *KCNQ2*, GABAergic interneuron, neonatal epilepsy, knock-in mouse

【序論】

良性家族性新生児てんかん（benign familial neonatal epilepsy）患者およびその家族からアミノ酸置換を伴う*KCNQ2*遺伝子変異が発見されている¹⁾（BFNE, OMIM #121200）。BFNEに見られる変異は常染色体優先遺伝形式をとり、症状は生後一週齢以内に発作を開始し、3～4か月で自然に寛解する。

*KCNQ2*遺伝子は電位依存性カリウムチャネルサブユニットである*KCNQ2*をコードしており、*KCNQ2*は*KCNQ3*とともにヘテロ4量体を形成し、M-channelを形成する²⁾。M-channelは神経細胞軸索起始部に多く存在しており³⁻⁵⁾、活

動電位の発生制御に寄与していると考えられる⁶⁻⁸⁾。M-channelは海馬を含む中枢神経細胞の興奮抑制に関与しており⁹⁾、神経伝達物質GABAが抑制性ではない未熟な神経細胞ではこの機能が低下することで神経細胞の興奮性が高まり、てんかんが発症すると考えられてきた。

これまで*KCNQ2*遺伝子と小児てんかんの関連性を調べるためにknock-outやknock-inマウスが作出されており、*Kcnq2* knock-outマウスのホモ変異マウス^{8,10)}やtruncation変異マウス¹¹⁾は生後致死性であるが、てんかんと関連性は不明である。knock-outやknock-inマウスのヘテロ変異マウスは生後3週齢以降で薬剤誘

¹⁾福岡大学 基盤研究所 てんかん分子病態研究所

²⁾福岡大学 医学部 小児科学講座

〒814-0180 福岡県福岡市城南区七隈7-45-1]

Taku Uchida¹⁾, Shinichi Hirose^{1),2)}

¹⁾Central Research Institute for the Pathomechanisms of Epilepsy, Fukuoka University, Fukuoka 814-0133, Japan

²⁾Department of Pediatrics, Fukuoka University School of Medicine, Fukuoka 814-0133, Japan

発によるてんかん発作への脆弱性が認められている¹²⁻¹⁴⁾。

新生児期の未熟な神経細胞では塩素イオントランスポーター機能のバランスが成熟した神経細胞と異なるため、GABAが興奮性に働くことが知られている¹⁵⁾。この興奮性は神経が発達するうえで重要な働きを担っているが、過剰なGABAによる興奮性はてんかん原性になりうる^{16,17)}。そこで我々はBFNEで見つかった*KCNQ2*遺伝子変異がGABAに関与する神経伝達機構に何らかの影響を与えるのではないかと考えた。これまで*Kcnq2*遺伝子変異マウス新生仔およびそのGABA神経伝達機構に注目した報告はなかった。そこで本研究は幼若期マウス海馬において*Kcnq2*遺伝子変異がGABA神経伝達機構に与える影響について電気生理学的に調べた。生理条件下でGABA作動性神経細胞を同定するためにGABA作動性神経細胞特異的にVenus蛍光タンパクを発現するVGAT-Venusマウス¹⁸⁾を用い、*Kcnq2*遺伝子変異 (p.Y284C) マウス^{14,19)}と交配して実験を行った。

【方法】

1. 動物

本研究における遺伝子組み換え実験計画および動物実験計画は福岡大学動物実験倫理委員会により承認され (承認番号1510880)、すべての実験手順は福岡大学アニマルセンターガイドラインに従って行われた。使用する動物の数や苦痛は最小限に抑えられるよう実験が行われた。

Kcnq2 (p.Y284C) 変異マウスおよびVGAT-VenusマウスはC57BL/6のバックグラウンドを持ち、福岡大学医学部アニマルセンターにて繁殖された。実験は生後1週齢 (P6-8) のマウスを使用した。すべての動物はVGAT-Venusのhomozygousであり、*Kcnq2*遺伝子変異は実験後採取した尾より抽出した遺伝子をpolymerase chain reaction (PCR) 法により増幅しアガロース電気泳動パターンにより遺伝子型を確認した。

2. RT-qPCR

マウスはペントバルビタールナトリウム (50mg/kg⁻¹, 腹腔内投与) により深麻酔を施

し、断頭後フィルター済み氷冷PBS内で素早く海馬を取り出した。水気を取り除いた海馬は液体窒素により急速に冷凍し-80℃で保存した。半解凍した組織は遠心フィルターBioMasher[®] (Nippi Inc., Ibaragi, Japan) によりホモジナイズした後Sepasol[®]-RNA I Super G (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) によりTotal RNAを抽出した。RNAはDEPC処理水に溶解した後にSuperScript[®] VILO[™] Master Mix (Life technologies Japan Inc., Tokyo, Japan) を用いて逆転写反応を行いcDNAを合成した。

リアルタイムPCR反応はLightCycler 480 Instrument II (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) にてSYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Takara) を使用して行い、それぞれの反応のCp値はsecond-derivative maximum法により求めた。

3. 免疫組織化学染色

深麻酔を施したマウスは心臓にカニユーレを挿入し、かん流によりPBS/クエン酸緩衝液で血液を取り除いた後に4%パラフォルムアルデヒド/PBSによってかん流固定した。その後脳を取り出し20%スクロース水溶液に浸潤して冷蔵庫に保管した。Leica CM3050 S (Leica) により厚さ10-20μmの横断面に凍結脳切片を作成し、MASコート済みスライドグラスに付着させた。免疫組織染色には一次抗体として抗KCNQ2抗体 (ab22897, abcam, 7.2 μg/ml, orまたは SP5352P, Acris Antibodies GmbH, 1-10 μg/ml) および抗GFP抗体 (ab13970, abcam, 10 μg/ml) を使用した。二次抗体は抗ウサギCy3接合抗体と抗ニワトリ AlexaFluor 488 接合抗体を使用した。また、4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI; 1 μg/ml; Dojindo) を用いて細胞核を染色した。蛍光染色をした組織はFluoView FV1000 confocal laser scanning microscope system (Olympus) を用いて観察・撮影した。

4. 急性脳スライス作成

深麻酔を施したマウスから断頭後に脳を取り出し、氷冷かつ95%/5% O₂/CO₂で十分バブリングした高浸透圧人口脳脊髄液 (in mM: 250 Sucrose, 26 NaHCO₃, 11 Glucose, 2.5 KCl, 10

MgSO₄, 0.2 CaCl₂, and 1.25 NaH₂PO₄) に浸潤した。脳は振動刃ミクロトーム (VT1200S; Leica) を用いて350-450 μ mの厚さの横断面にスライスし、人工脳脊髄液 (in mM: 126 NaCl, 26 NaHCO₃, 10 Glucose, 2.5 KCl, 2.0 MgSO₄, 2.0 CaCl₂, and 1.25 NaH₂PO₄) 内で実験まで30分以上温置 (32 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C) した。

5. 電気生理記録

電気生理記録は正立落射蛍光顕微鏡BX51WI (Olympus) 上で行い、細胞の赤外微分干渉像および蛍光画像は40倍水浸レンズを通してCMOSセンサーカメラ (ORCA-Flash2.8, Hamamatsu Photonics) で撮影し、専用ソフトにてPC上で観察した。電気生理記録に用いたガラス電極borosilicate glass capillaries (Sutter Instrument) はFlaming-Brown micropipette puller (P-97; Sutter Instrument Co.) にて作成した。記録はMultiClamp 700B amplifier (Molecular Devices) にて増幅され、Axon Digidata 1440A digitizer (Molecular Devices) にてデジタル変換された後にPCに保存された。得られたデータはpCLAMP 10 (Molecular Devices) により解析された。

M-電流記録は海馬CA1領域Venus蛍光タンパク発現細胞に対して行われた。Amphotericin B (Sigma-Aldrich, 0.45–0.5 mg/mL) を電極内液 (in mM: 150 K-methane sulfonate, 10 Hepes, 5 KCl, 1 EGTA, and 3 MgCl₂ at pH 7.3 adjust pH with KOH) に溶解し使用した。人工脳脊髄液にはpicrotoxin (50 μ M; Sigma-Aldrich) と6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX; 10 μ M) を溶解して使用した。記録は電位固定モード, 5 kHzで行い、固定電位-20 mVから-40, -50, -60, and -70 mVに変化させたときに生ずるテール電流の大きさを解析した。電流値をそれぞれの細胞の膜容量で除算した値 (電流密度 pA/pF) を群間で比較した。

細胞接着法はVenus蛍光タンパク発現細胞に対して行われた。電極内液は150 mM NaClを用いた。記録は電位固定モード, 20-50 kHzで行い、固定電位は0 mVに固定した。活動電位発生頻度およびイベント間隔はそれぞれの細胞

180秒間の記録を解析し、頻度 (Hz) を群間で比較した。

ホールセルパッチクランプはVenus蛍光タンパク非発現細胞かつ形状より判断した錐体細胞に対して行われた。電極内液は以下の組成を使用した (in mM: 120 Cs-methane sulfonate, 3 MgCl₂, 0.07 CaCl₂, 4 EGTA, 10 HEPES, 1 Mg-ATP, 4 Na-GTP, and 10 Phosphocreatine di (tris), pH was adjusted with CsOH at 7.3)。人工脳脊髄液にはCNQX (10 μ M; Sigma-Aldrich), D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5, 50 μ M), および CGP55845 (3 μ M; Sigma-Aldrich) を溶解して使用した。記録は電位固定モード0 mV, 20-50 kHzで行った。自発的GABA性後シナプス電流の半値幅 (ms), 減衰時間 (ms), 振幅 (pA), 頻度 (Hz) はそれぞれの細胞180秒間の記録を解析し、群間で比較した。

細胞外電位記録には以下の組成の電極内液を使用した (in mM: 150 NaCl, 10 HEPES, adjusted pH with NaOH at 7.3)。低Mg²⁺濃度人工脳脊髄液は以下の組成 (in mM: 126 NaCl, 26 NaHCO₃, 10 Glucose, 2.5 KCl, 3.3 CaCl₂, and 1.25 NaH₂PO₄) で30分経過後てんかん性バースト発火が見られるまで観察した。てんかん性バースト発火が見られた脳スライスにはbicuculline methiodide (BMI, 50 μ M) を溶解した低Mg²⁺濃度人工脳脊髄液を使用してさらに20分間記録した。記録は電流固定モード, 20kHzにて行われた。

【結果】

生後1週齢 (P6-7) マウスの海馬における*Kcnq2*遺伝子発現量をRT-qPCRにて確認したところ遺伝子変異による影響は確認されなかった (Fig. 1A)。また、海馬CA1領域においてGABA作動性神経細胞にKCNQ2の発現を免疫蛍光染色により確認した (Fig. 1B)。

GABA作動性神経細胞におけるM-channel機能を調べるために、急性脳スライスを作成してVenus発現細胞 (Fig. 2A) に対してアンホテリシンBを用いて穿孔パッチクランプを行った。電位固定-20mVから-40-70mVの幅で電位

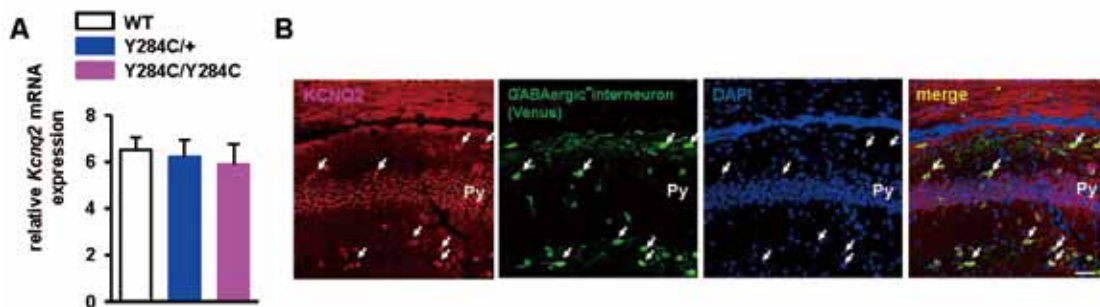


Fig. 1 *Kcnq2* mRNA and protein in the neonatal hippocampus.

(A), At P6-P8, *Kcnq2* mRNA levels were comparable between wild-type (WT) and *Kcnq2*-Y284C knock-in animals. Data are means $\pm$ SEM, $N=5$. (B), Confocal imaging of immunofluorescent staining for *KCNQ2* (red), GABAergic interneurons (green), and nuclei (blue) in the CA1 region of neonatal hippocampus of the mutant mouse. Arrow heads point GABAergic interneurons. Scale bar: 20 μ m.

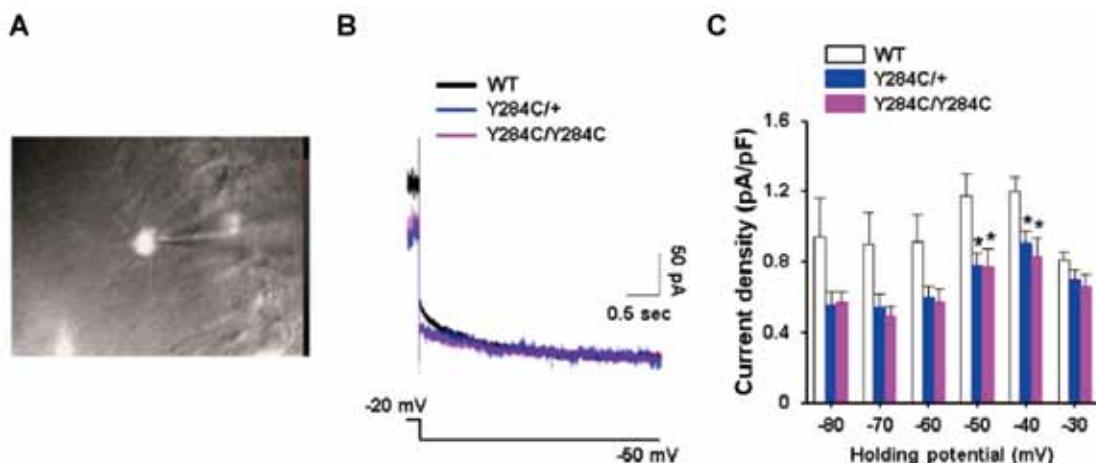


Fig. 2 M-channel function of GABAergic interneurons was decreased by the *Kcnq2* mutation.

(A), An image of patch to a Venus fluorescence positive neurons in the hippocampus. (B), Representative traces of M-current of WT and *Kcnq2* mutant mice. (C), Current densities of M-current of WT and *Kcnq2* mutant mice. WT_{holding -50mV}, 1.17 ± 0.12 pA / pF, WT_{holding -40 mV}, 1.20 ± 0.078 pA / pF, $n=12$, $N=4$; Y284C/_{holding -50 mV}, 0.776 ± 0.070 pA / pF, Y284C/_{holding -40 mV}, 0.907 ± 0.066 pA / pF, $n=15$, $N=6$; Y284C / Y284C_{holding -50 mV}, 0.772 ± 0.10 pA / pF, Y284C / Y284C_{holding -40 mV}, 0.832 ± 0.099 pA / pF, $n=10$, $N=3$. Data are means $\pm$ SEM. $p < 0.01$, one-way ANOVA with *post-hoc* Tukey-Kramer.

を変化させたところ-50mVのところでは最大のM電流が観察された (Fig. 2B)。 *Kcnq2*遺伝子変異マウスではGABA作動性神経細胞のM電流密度は対照群に比べて有意に減少していた (Fig. 2C)。

M-channelの機能低下による神経細胞の興奮性への影響を調べるためにVenus発現細胞に対

して細胞接着法を用いて活動電位電流 (Fig. 3A) の単位時間当たりの発生頻度を調べたところ、 *Kcnq2*遺伝子変異マウスではこれが対照群に比べて有意に増加していた (Fig. 3B, C)。このことから *Kcnq2*遺伝子変異によりGABA作動性神経細胞の興奮性が亢進したと考えられる。

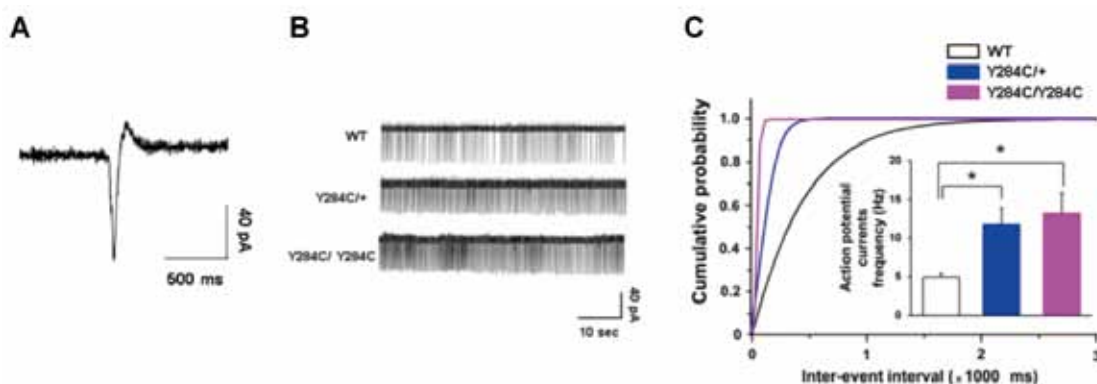


Fig. 3 *Kcnq2* mutation increased spontaneous firing frequency of GABAergic interneurons. (A), A representative trace of an action potential (AP) current. (B), Representative traces of AP currents in WT and *Kcnq2* mutant mice. (C), The spontaneous firing frequency of Venus positive GABAergic CA1 hippocampal neurons of WT and the *Kcnq2* mutant mice. WT, 4.91 ± 0.56 Hz, $n=33$, $N=7$; Y284C/+, 11.8 ± 2.0 Hz, $n=42$, $N=11$; Y284C/Y284C, 13.5 ± 2.7 Hz, $n=32$, $N=6$. Data are means $\pm$ SEM. $p < 0.05$ vs. WT, Kruskal-Wallis ANOVA with *post hoc* Steel-Dwass test.

GABA作動性神経細胞の興奮性が亢進した結果、シナプス前からのGABA放出が影響を受けるか調べるために、海馬CA1領域錐体細胞に対してホールセルパッチクランプを行い、自発的GABA性シナプス後電流 (GABAergic post-synaptic current; GPSC) を記録した (Fig. 4)。*Kcnq2*遺伝子変異マウスGPSCの半値幅、減衰時間、振幅は対照群と比べて差がなかったが、単位時間当たりの電流発生頻度は有意に増加していた (Fig. 4B, C, D, E)。このことから後シナプス機能は変化せず前シナプスからのGABA放出頻度が影響を受けたと考えられる。

内因性GABAが幼若マウスの海馬CA1領域におけるてんかん性発火にどのような影響を与えるか調べるために、*Kcnq2*遺伝子変異マウス脳スライスに対して人工脳脊髄液中のマグネシウムイオン濃度を取り除き急性脳スライスてんかんモデルを作成した。てんかん性バースト発火が見られた脳スライスモデルに対してGABA_A受容体アンタゴニストを細胞外液に加えたところ、てんかん性発火の持続時間が短縮した (Fig. 5B)。このことから内因性GABAは幼若期マウス海馬CA1領域におけるてんかん性発火の持続時間に関与していると考えられる。

【考察】

脳発達期のGABAによる神経細胞の過剰興奮はてんかんに寄与する^{20,21)}。加えて、未熟な神経ネットワークでは、グルタミン酸性シナプス入力 はてんかん原性となるには十分ではないことが示唆されている²²⁾。KCNQ2はGABA作動性神経細胞のみならず錐体細胞にも多く発現していたが (Fig. 1B)、幼若期の中枢神経においては成熟した神経ネットワークとは別の機序でてんかんが起こる可能性がある。ヒトの中枢神経では妊娠22-24週の胎児ですでにKCNQ2遺伝子は発現している²³⁾が、げっ歯類では出産後に同遺伝子の発現が開始される。諸説あるが、ヒトでの新生児期はマウスではおおむね1-2週齢であると考えられている^{24,25)}。したがって、本研究で使用されたマウスの週齢はヒト新生児期を模したものであると考えられる。

本研究で使用されたY284C変異はM-channelのイオン通過孔に位置し、これによってM電流が減少することはすでに知られている^{26,27)}。培養細胞の発現実験この変異によるheterozygousとhomozygousの間には有意な差があった。しかしながら、マウスの結果ではheterozygousとhomozygousの間に有意な差はなかった (Fig. 2)。これは*Kcnq2*と*Kcna3*の発

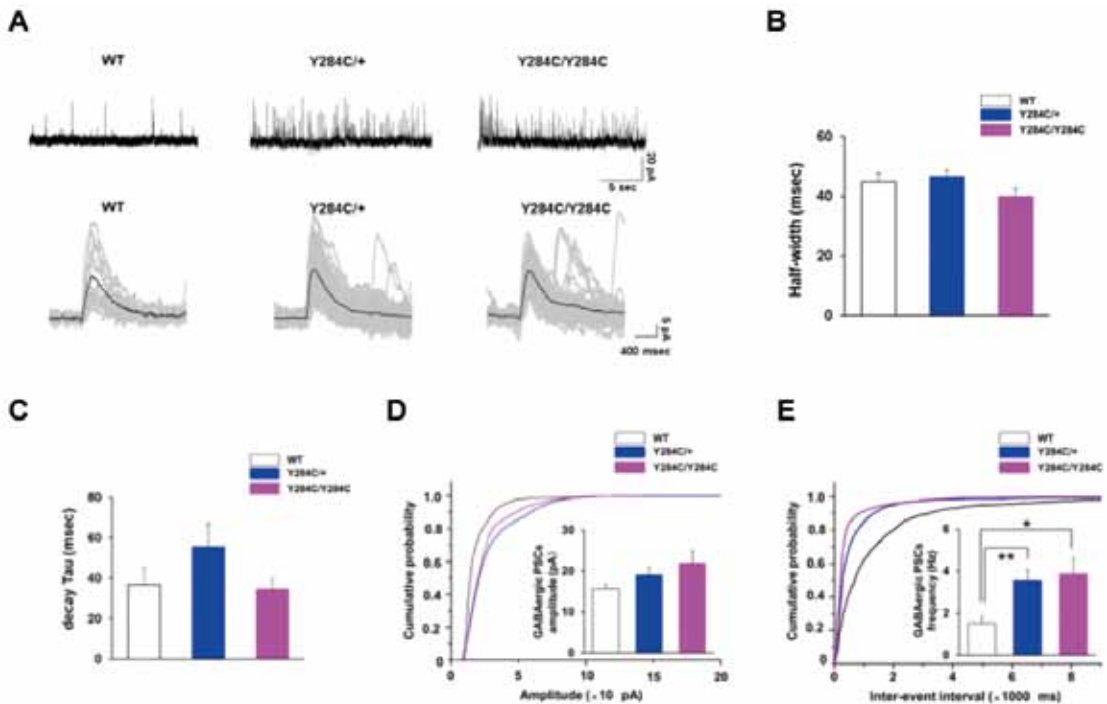


Fig. 4 The frequency of spontaneous GABAergic postsynaptic current was higher in *Kcnq2* mutant mice. (A), Representative traces of spontaneous GABAergic postsynaptic current (sGPSC) of in WT and *Kcnq2* mutant mice. (B), The mean shape of sGPSCs (Black) and each currents (gray) in WT and *Kcnq2* mutant mice. (C, D), The mean $\pm$ SEM graph of Half-width. (C) WT, 44.8 $\pm$ 2.8 msec; Y284C/+, 46.5 $\pm$ 1.9 msec; Y284C / Y284C, 39.9 $\pm$ 2.5 msec, and decay tau. (D) of sGPSC. WT, 37.0 $\pm$ 7.9 msec; Y284C/+, 55.5 $\pm$ 11 msec; Y284C/Y284C, 34.5 $\pm$ 5.0 msec. (E, F), The cumulative curve and mean $\pm$ SEM graph of amplitude (E) WT, 15.7 $\pm$ 0.97 pA; Y284C/+, 19.1 $\pm$ 1.8 pA; Y284C / Y284C, 22.0 $\pm$ 3.0 pA, and frequency (F) of sGPSC. WT, 1.52 $\pm$ 0.33 Hz; Y284C/+, 3.54 $\pm$ 0.54 Hz; Y284C/Y284C, 3.75 $\pm$ 0.97 Hz. WT, n=23, N=3; Y284C/+, n=32, N=7; Y284C/Y284C, n=13, N=4. $p < 0.05$ vs. WT, Kruskal-Wallis ANOVA with *post hoc* Steel-Dwass test.

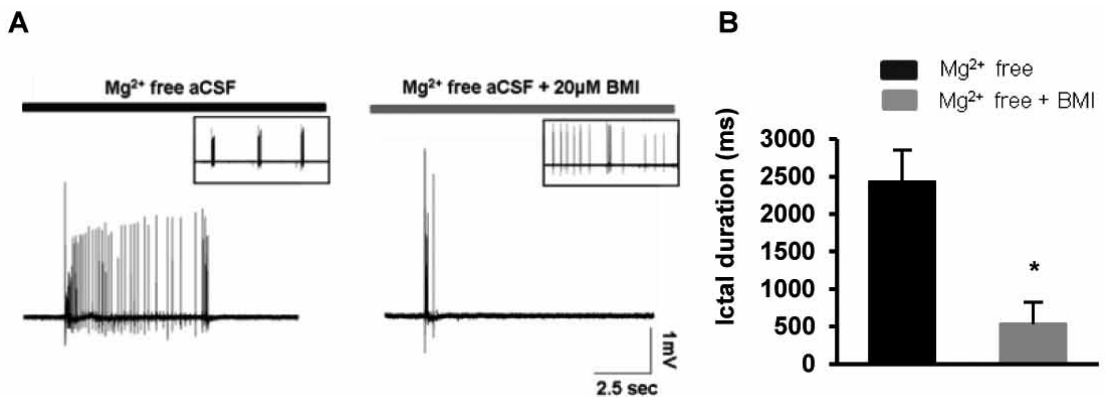


Fig. 5 Ictal burst duration was suppressed by GABA_A receptor antagonist in vitro epilepsy model of the *Kcnq2* mutant mice. (A), Representative traces of ictal-burst evoked by Mg^{2+} free solution. The duration of burst was decreased by blocking with 20 μ M of BMI bath application. (B), The mean $\pm$ SEM graph of ictal-burst duration. Mg^{2+} free aCSF, 2433 $\pm$ 423 msec; Mg^{2+} free aCSF+BMI, 537.2 $\pm$ 288 msec, n=4, N=4. $p < 0.05$, paired t-test.

現バランスやそれぞれのサブユニットによるヘテロ4量体の形成パターンがin vitroとin vivoで異なることに由来するドミナントネガティブ効果によるものであると考えられる。

M-channelの機能低下による細胞の興奮性の亢進がGABA作動性神経細胞で観察された (Fig. 3)。我々は神経細胞の興奮性を評価するために細胞接着法を用いた。M-channel機能はホールセルパッチクランプによる細胞内液かん流に非常に敏感であるため、細胞内をインタクトな状態に保ったまま実験を行うためにこの方法を使用した。

M-channel機能は前シナプス細胞からのGABAを含む神経伝達物質放出に影響する^{28,29)}。この傾向は幼若期により強い傾向がみられる³⁰⁾。したがって*Kcnq2*遺伝子変異マウスに見られる自発的GPSC頻度の増加はGABA作動性神経細胞上のM-channel機能低下によるものであると考えられる (Fig. 4)。また、半値幅、減衰時間、振幅には影響が見られなかったことから後シナプスのGABA_A受容体の機能には影響がないと考えられる。

急性脳スライス上でてんかんを再現するために、低Mg²⁺濃度人工脳脊髄液を使用して細胞外電位記録を行った (Fig. 5)。通常このモデルは同時にカリウムチャネルをブロックして作成することが多いが²⁵⁾、本研究では*Kcnq2*遺伝子変異マウスを使用することでこれを補完した。てんかん性バースト発火の発生率は必ずしも高くなかった (36%) が、これは急性脳スライス作成による神経ダメージおよびネットワーク切断によるシナプス入力低下の影響が考えられる³¹⁾。スライス培養サンプルを用いることでこの問題を解決できる可能性がある。GABA_A受容体アンタゴニストによりてんかん性バースト発火持続時間が短縮したことから、GABAがこの時期のてんかん性バースト発火に関与していることが考えられる。

【結論】

本研究では幼若期*Kcnq2*遺伝子変異マウスの海馬CA1領域におけるGABA作動性神経細胞のM-channel機能の低下による同細胞の興奮性更

新とGABA放出増加を示した。また、急性脳スライスモデルで幼若期におけるGABA興奮性のてんかん性バースト発火への寄与を示した。MarguetらによるとNKCC1トランスポーター阻害剤であるブメタニドにより、細胞内塩素イオン濃度の低下、すなわちGABAの作用を興奮性から抑制性にすることで*Kcnq2*遺伝子変異マウスの海馬における異常を回復することができた³²⁾。このことは*KCNQ2*遺伝子変異によるてんかんがGABAの興奮性と関係することを強く示唆する。また、Miceliらは新生児てんかん性脳症患者からM-channel機能亢進型の*KCNQ2*変異を発見した³³⁾。このことは*KCNQ2*遺伝子変異によるM-channel機能変化が神経ネットワークを介しててんかんを発症する可能性を示している。今後はさらに別の*Kcnq2*遺伝子変異について継続して変異マウスの研究を進めていく必要があると考える。

【謝辞】

福岡大学弟子丸正伸准教授 (*Kcnq2*遺伝子変異マウス作成)、群馬大学柳川右千夫教授 (VGAT-Venusマウス提供)、第一薬科大学小山進教授 (電気生理実験指導)、並びに実験を補佐いただいた福岡大学医学部小児科、同てんかん分子病態研究所、同医学部アニマルセンターの皆に深謝の意を表する。また、本研究を遂行するに当たり多大な助成を頂いたてんかん治療研究振興財団に深謝の意を表する。

【参考文献】

- 1) Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, et al., A novel potassium channel gene, *KCNQ2*, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genetics* 1998; **18**: 25-29.
- 2) Wang HS, Pan Z, Shi W, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, et al., *KCNQ2* and *KCNQ3* potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 1998; **282**: 1890-1893
- 3) Pan Z, Kao T, Horvath Z, Lemos J, Sul JY, Cranstoun SD, et al., A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV

- channels at electrically active domains of the axon. *J Neurosci* 2006 ; **26** : 2599-2613.
- 4) Rasmussen HB, Frøkjær-Jensen C, Jensen CS, Jensen HS, Jørgensen NK, Misonou H, et al., Requirement of subunit co-assembly and ankyrin-G for M-channel localization at the axon initial segment. *J Cell Sci* 2007 ; **120** : 953-963.
 - 5) Trimmer JS. Subcellular localization of K⁺ channels in mammalian brain neurons: remarkable precision in the midst of extraordinary complexity. *Neuron* 2015 ; **85** : 238-256.
 - 6) Rogawski MA. *KCNQ2/KCNQ3* K⁺ channels and the molecular pathogenesis of epilepsy: implications for therapy. *Trends Neurosci* 2000 ; **23** : 393-398.
 - 7) Jentsch TJ. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci* 2000 ; **1** : 21-30.
 - 8) Soh H, Pant R, LoTurco JJ, Tzingounis AV. Conditional deletions of epilepsy-associated *KCNQ2* and *KCNQ3* channels from cerebral cortex cause differential effects on neuronal excitability. *J Neurosci* 2014 ; **34** : 5311-5321.
 - 9) Cooper EC, Harrington E, Jan YN, Jan LY. *J Neurosci* 2001 ; **21** : 9529-9540.
 - 10) Watanabe H, Nagata E, Kosakai A, Nakamura M, Yokoyama M, Tanaka K, et al., Disruption of the epilepsy *KCNQ2* gene results in neural hyperexcitability. *J Neurochem* 2001 ; **75** : 28-33.
 - 11) Robbins J, Passmore GM, Abogadie FC, Reilly JM, Brown DA. Effects of *KCNQ2* gene truncation on M-type Kv7 potassium currents. *PLoS One* 2013 ; **8** : e71809.
 - 12) Singh NA, Otto JF, Dahle EJ, Pappas C, Leslie JD, Vilaythong A, et al., Mouse models of human *KCNQ2* and *KCNQ3* mutations for benign familial neonatal convulsions show seizures and neuronal plasticity without synaptic reorganization. *J Physiol* 2008 ; **586** : 3405-3423.
 - 13) Otto JF, Singh NA, Dahle EJ, Leppert MF, Pappas CM, Pruess TH, et al., Electroconvulsive seizure thresholds and kindling acquisition rates are altered in mouse models of human *KCNQ2* and *KCNQ3* mutations for benign familial neonatal convulsions. *Epilepsia* 2009 ; **50** : 1752-1759.
 - 14) Tomonoh Y, Deshimaru M, Araki K, Miyazaki Y, Arasaki T, Tanaka Y, et al., The kick-in system: a novel rapid knock-in strategy. *PLoS One* 2014 ; **9** : e88549.
 - 15) Ben-Ari Y. The GABA excitatory/inhibitory developmental sequence: a personal journey. *Neuroscience* 2014 ; **279** : 187-219.
 - 16) Ben-Ari Y, Holmes GL. Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. *Lancet Neurol* 2006 ; **5** : 1055-1063.
 - 17) Ben-Ari Y, Khalilov I, Kahle KT, Cherubini E. The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neuroscientist* 2012;18:467-486.
 - 18) Wang Y, Kakizaki T, Sakagami H, Saito K, Ebihara S, Kato M, et al., Fluorescent labeling of both GABAergic and glycinergic neurons in vesicular GABA transporter (VGAT)-venus transgenic mouse. *Neuroscience* 2009 ; **164** : 1031-1043.
 - 19) Ihara Y, Tomonoh Y, Deshimaru M, Zhang B, Uchida T, Ishii A, et al., Retigabine, a Kv7.2/Kv7.3-Channel Opener, Attenuates Drug-Induced Seizures in Knock-In Mice Harboring *Kcnq2* Mutations. *PLoS One* 2016 ; **11** : e0150095.
 - 20) Dzhala VI, Staley KJ. Excitatory actions of endogenously released GABA contribute to initiation of ictal epileptiform activity in the developing hippocampus. *J Neurosci* 2003 ; **23** : 1840-1846.
 - 21) Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, et al., NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med* 2005 ; **11** : 1205-1213.
 - 22) Khalilov I, Le Van Quyen M, Gozlan H, Ben-Ari Y. Epileptogenic actions of GABA and fast oscillations in the developing hippocampus. *Neuron* 2005 ; **48** : 787-796.
 - 23) Kanaumi T, Takashima S, Iwasaki H, Itoh M,

- Mitsudome A, Hirose S. Developmental changes in *KCNQ2* and *KCNQ3* expression in human brain: possible contribution to the age-dependent etiology of benign familial neonatal convulsions. *Brain Dev* 2008 ; **30** : 362-369.
- 24) Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 1979 ; **3** : 79-83.
- 25) Qiu C, Johnson BN, Tallent MK. K⁺ M-current regulates the transition to seizures in immature and adult hippocampus. *Epilepsia* 2007 ; **48** : 2047-2058.
- 26) Schroeder BC, Kubisch C, Stein V, Jentsch TJ. Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated *KCNQ2/KCNQ3* K⁺ channels causes epilepsy. *Nature* 1998 ; **396** : 687-690.
- 27) Singh NA, Westenskow P, Charlier C, Pappas C, Leslie J, Dillon J, et al., *KCNQ2* and *KCNQ3* potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. *Brain* 2003 ; **126** : 2726-2737.
- 28) Peretz A, Sheinin A, Yue C, Degani-Katzav N, Gibor G, Nachman R, et al., Pre- and postsynaptic activation of M-channels by a novel opener dampens neuronal firing and transmitter release. *J Neurophysiol* 2007 ; **97** : 283-295.
- 29) Martire M, Castaldo P, D'Amico M, Preziosi P, Annunziato L, Tagliatela M. M channels containing *KCNQ2* subunits modulate norepinephrine, aspartate, and GABA release from hippocampal nerve terminals. *J Neurosci* 2004 ; **24** : 592-597.
- 30) Okada M, Zhu G, Hirose S, Ito KI, Murakami T, Wakui M, et al., Age-dependent modulation of hippocampal excitability by KCNQ-channels. *Epilepsy Res* 2003 ; **53** : 81-94.
- 31) Heinemann U, Staley KJ. What is the clinical relevance of in vitro epileptiform activity? *Adv Exp Med Biol* 2014 ; **813** : 25-41.
- 32) Marguet SL, Le-Schulte VT, Merseburg A, Neu A, Eichler R, Jakovcevski I, et al., Treatment during a vulnerable developmental period rescues a genetic epilepsy. *Nat Med* 2015 ; **21** : 1436-1444.
- 33) Miceli F, Soldovieri MV, Ambrosino P, De Maria M, Migliore M, Migliore R, et al., Early-onset epileptic encephalopathy caused by gain-of-function mutations in the voltage sensor of Kv7.2 and Kv7.3 potassium channel subunits. *J Neurosci* 2015 ; **35** : 3782-3793.

Summary

A *Kcnq2* mutation associated with early-onset epilepsy modulates the GABAergic neurotransmitter system in the neonatal hippocampus

Taku Uchida, Shinichi Hirose

Mutations of the *KCNQ2* gene, which encodes a subunit of the voltage-gated M-type potassium channels (M-channels), have been associated with epilepsy in the neonatal period. This developmental stage is special, in that the normally inhibitory neurotransmitter GABA temporarily becomes excitatory. To examine whether *KCNQ2*-related neuronal hyperexcitability has ties to this unusual neonatal GABA physiology, we closely examined 1-week old knock-in mice expressing the *KCNQ2* variant p.Tyr284Cys (Y284C). Brain slice electrophysiology revealed that CA1 hippocampal GABAergic interneurons in the mutant pups had higher spontaneous firing rates as well as more frequent postsynaptic GABA currents than their wild-type (WT) controls. What is more, addition of the GABA_A receptor antagonist bicuculline methiodide decreased the ictal burst duration. This suggests that the *Kcnq2*-mutant animals experienced facilitated GABA-induced interneuron firing, and, in consequence, elevated GABA release onto pyramidal neurons. We conclude that excitatory GABA contributes to ictal events in the neonatal CA1 hippocampus, which constitutes a heretofore little explored pathomechanism for neonatal epilepsy.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2016 ; 27 : 77-86