

—— 研究助成報告 ——

発達性てんかん性脳症（乳幼児てんかん性脳症）に関わる *KCNQ2* 遺伝子変異に対する、遺伝子発現制御機構の解析

木 村 雄 一

要旨：電位依存性カリウムチャネルをコードする*KCNQ2* 遺伝子に存在する遺伝子変異は、自然終息性家族性新生児てんかんおよび発達性てんかん性脳症の原因の1つであることが知られている。先行研究から両病態に関わる一塩基多型は少なくとも40変異以上報告されているが、遺伝子変異部位に規則性が見られないため、なぜ病態が二分されるのか明らかにされていない。本研究では、発達性てんかん性脳症を引き起こす遺伝子変異に着目して、遺伝子発現制御機構の解析を行なった。その結果、*KCNQ2* が細胞膜上で切断されることを見出した。また、切断された*KCNQ2* の発現レベルは健常型と比較して変異型では有意に低いことが明らかになった。さらに、*KCNQ2* のタンパク質切断はマウスからヒトまで進化上保存されたメカニズムであることが示唆された。これらの結果から切断された*KCNQ2* がカリウムチャネルの機能調節に関わっている可能性が考えられた。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2023；34：21-26

Key Words：KCNQ2, 発達性てんかん性脳症, 遺伝子発現制御, タンパク質切断

序論

自然終息性家族性新生児てんかん (Self-limited familial neonatal epilepsy; SLFNE) は生後数日で発症するが、数週間で治まり予後は良好である。一方で、発達性てんかん性脳症 (Developmental and epileptic encephalopathies; DEE) は生後数日から数週間で発症し、発達障害を伴う難治のてんかんである。両病態の共通した原因の一つとして電位依存性カリウムチャネル Kv7.2 をコードする *KCNQ2* 遺伝子の遺伝子変異が挙げられる。*KCNQ2* は6回膜貫通タンパク質であり、チャネルとしての機能にはホモ四量体もしくは Kv7.3 として知られている *KCNQ3* とヘテロ四量体を構成することが必要とされ、後者のときにカリウムイオンの透過が最大になる。また、*KCNQ3* の遺伝子変異も SLFNE の原因であることが報告されている。先行研究から SLFNE および DEE は異常な神経活動を示

すこと、そしてゲノム解析から *KCNQ2* の遺伝子変異が起因していることが報告されており、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs) に着目しても40ヶ所以上の SNPs が報告されている¹⁾。遺伝子変異による原因の多くが *KCNQ2* の機能低下であり、その具合によってハプロ不全もしくはドミナントネガティブに分類されている。また、ハプロ不全の場合は SLFNE、ドミナントネガティブの場合は DEE を罹患することも知られている¹⁾。しかしながら、例えば284番目のチロシンがシステインに置換された場合はハプロ不全となり SLFNE を発症することが知られているが、アスパラギン酸に置換された場合は DEE を発症することが報告されている²⁾。このように同じアミノ酸残基に対しても置換されるアミノ酸に病態が分かれる。さらには、遺伝子変異部位に対しても規則性が見られないため、なぜ病態が二分化されるのか、その分子病態は未だ明らかにされていない。

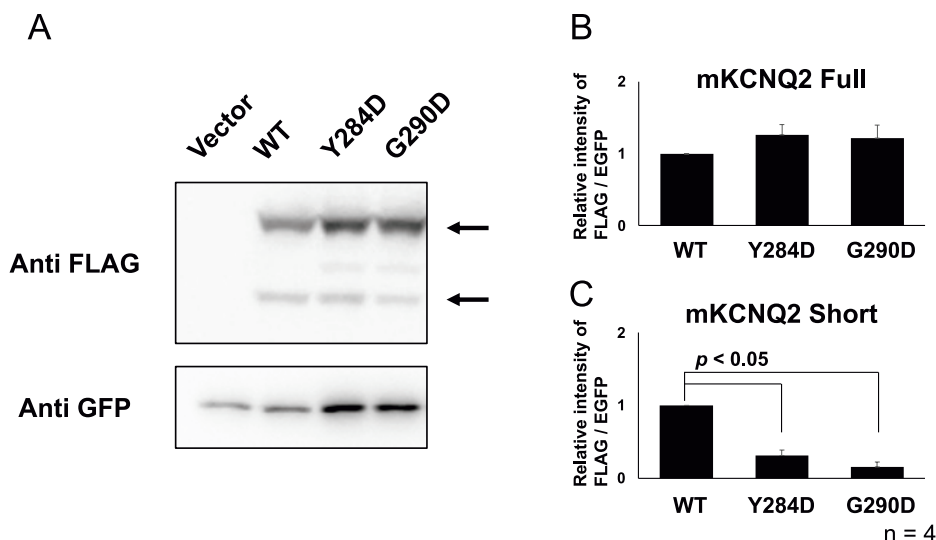


Fig. 1 mKCNQ2のタンパク質発現量の比較

(A) 健常型と変異型mKCNQ2のタンパク質発現量比較のためウエスタンブロッティングを行った。上の矢印は完全長、下の矢印は短鎖mKCNQ2を示す。(B, C) 完全長および短鎖mKCNQ2の発現量の比較。

先行研究を踏まえ、遺伝子発現の段階で遺伝子変異が影響しているのではないかと仮定し、本研究ではマウスをモデルとして、未だ根治薬や治療法が確立されていないDEEの原因とされている、KCNQ2の284番目のチロシンがアスパラギン酸(Y284D)、290番目のグリシンがアスパラギン酸(G284D)変異を標的として、遺伝子発現制御の解析を行った。

方法

マウス*Kcnq2* (*mKcnq2*) およびヒト*KCNQ2* (*hKCNQ2*) のクローニング

Mouse Brain QUICK-Clone™ cDNA (Clontech社) および Human Fetal Brain QUICK-Clone™ cDNA (Clontech社) を鋳型にPCRを行った。In-Fusion HD Cloning Kit (TaKaRa) を用いて pIRES2-EGFP vector (Clontech) に増幅した遺伝子を挿入しプラスミドを作製した。遺伝子変異の導入には KOD-Plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO) を使用した。mKCNQ2のN末端には1xMyc, C末端には3xFLAGをエピトープタグとして融合させた。

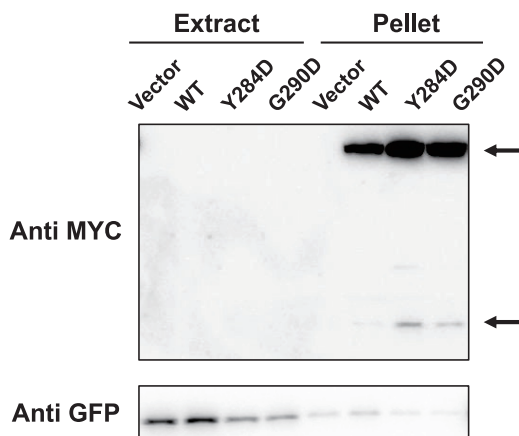


Fig. 2 短鎖mKCNQ2の解析

C末端側だけでなくN末端側のバンドも検出されたことから、mKCNQ2は細胞膜上で切断される可能性が示された。

細胞培養およびトランスフェクション

本研究ではマウス由来神経芽腫細胞株 Neuro2A を使用し、DMEM-10% FBS 培地で 37℃, 5% CO₂ の環境下で培養した。6well plate に播種後、1well 当たり 1μg の DNA を Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific)

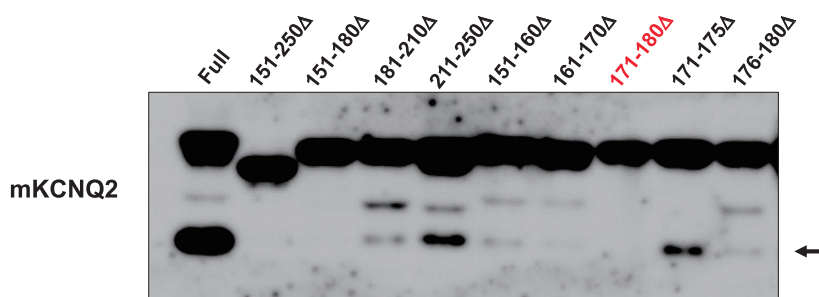


Fig. 3 mKCNQ2切断部位の解析
171番目から180番目のアミノ酸残基を欠失させた場合、短鎖mKCNQ2が全く検出されなかった。

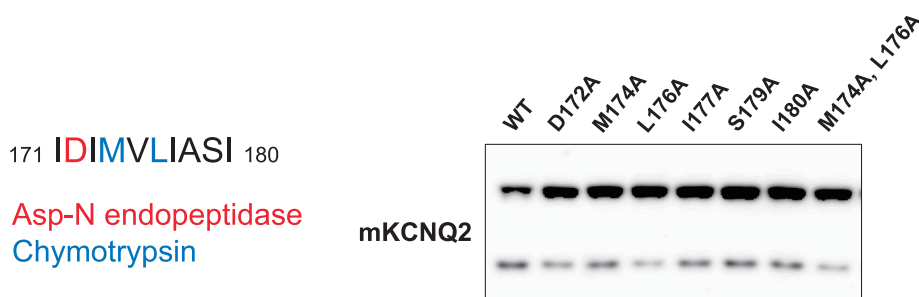


Fig. 4 mKCNQ2切断領域の解析
任意のアミノ酸残基をアラニンに置換したが、どの部位においても切断は抑制されなかった。

を使用して、遺伝子導入を行った。遺伝子導入24時間後に200μlのSDSサンプルバッファーで細胞を回収した。

ウエスタンブロットティングおよび解析

回収したサンプルはSDS-PAGEでタンパク質を分離し、PVDF膜に転写した。その後、ウエスタンブロットティング法にて目的のタンパク質を検出し、解析を行った。ローディングコントロールとしてGFPを使用した。タンパク質発現量の比較にはクラスカルウォリス検定および多重比較の統計学的手法を用い、5%有意水準とした。

結果

mKCNQ2の健常型と変異型ではタンパク質の発現パターンが異なる

まず、健常型、Y284D、G290Dでタンパク質の発現量を比較する目的でウエスタンブロッ

ティングを行った (Fig. 1A)。その結果、各遺伝子型によるタンパク質の発現量に有意な差は認められなかった (Fig. 1B)。一方で、ウエスタンブロットティングの結果から短いバンドも検出されたことから、これについても発現量の比較を行った。その結果、この短いバンドに対しては健常型と比較して両者の変異型はタンパク質の発現量が有意に低かった (Fig. 1C)。

mKCNQ2は細胞膜上で切断される

ウエスタンブロットティングの結果から短いバンドが検出されたため、このバンドがmKCNQ2由来であるか、またその場合に異常な翻訳によって、もしくは切断されて生じたものであるのか検証する目的で回収した細胞の粗抽出液を細胞質画分と膜画分に分離し、抗Myc抗体でウエスタンブロットティングを行った。その結果、細胞質画分ではなく膜画分から完全長mKCNQ2および短いバンドが検出された (Fig. 2)。さら

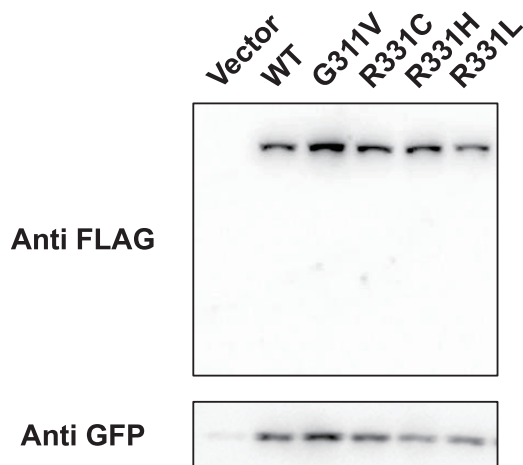


Fig. 5 mKCNQ3は切断されない
mKCNQ3に対してもタンパク質発現パターンを解析したが、遺伝子型に関係なくmKCNQ2のような切断は見られなかった。

に、この短いバンドはFig. 1で示した短いバンドと発現パターンが類似していた。これらのことから、短いバンドはmKCNQ2由来と考えられ、興味深いことにmKCNQ2は細胞膜上で切断されている可能性が示された。

次に、mKCNQ2の切断部位を解析する目的で150番目から250番目のアミノ酸残基に対して任意の領域を欠損させて、タンパク質の切断レベルを検討した。その結果、171番目から180番目のアミノ酸配列が切断に重要な領域であることが示された (Fig. 3)。データベースより、この領域に関わるタンパク質分解酵素はアスパラギン酸エンドペプチダーゼおよびケモトリプシンが挙げられたことから、これらの酵素活性に必要なmKCNQ2のアミノ酸残基をアラニンに置換し解析を行った。その結果、いずれの遺伝子型においても切断型mKCNQ2が検出された (Fig. 4)。このことから、mKCNQ2は新規のメカニズムによって切断されている可能性が示された。

mKCNQ3はmKCNQ2とは異なった分子メカニズムを有する

mKCNQ2はmKCNQ3とヘテロ四量体を形成

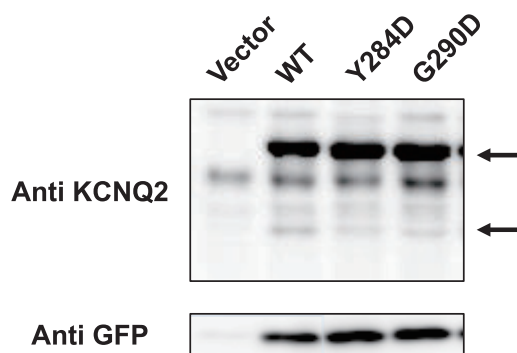


Fig. 6 hKCNQ2も切断される
hKCNQ2に対してもタンパク質の発現パターンを解析を行った結果、mKCNQ2と同様に短鎖が検出された。上の矢印は完全長、下の矢印は短鎖hKCNQ2を示す。

することでカリウムイオンの透過量が最大になること、そして両者のタンパク質構造は非常に類似している。またmKCNQ3の遺伝子変異もSLFNEの原因であることが報告されていることから、両者の関係性は強いことが推察される。そこで、mKCNQ3もタンパク質の切断が起きるのか検討した。しかしながら、mKCNQ3のタンパク質切断は見られなかった (Fig. 5)。このことからmKCNQ2はmKCNQ3とは異なる分子メカニズムを有することが明らかにされた。

KCNQ2のタンパク質切断は進化上保存されている

これまでマウスを対象として解析を行ってきたが、mKCNQ2の切断はマウス特異的な現象であるかどうかを確認する目的で、ヒトKCNQ2 (hKCNQ2) に対しても解析を行った。その結果、mKCNQ2と同様にhKCNQ2でも切断が見られた (Fig. 6)。このことから、KCNQ2のタンパク質切断はマウスからヒトまで進化上保存されたメカニズムであることが示唆された。

考察

これまでKCNQ2が起因するてんかんの分子病態メカニズムの研究は電気生理学的手法による解析はよくされているが、遺伝子発現制御に着目した研究は少なく、特になぜ病態が二分されるかに対してはほとんど研究されていない³⁻⁵⁾。本研究の結果から、KCNQ2が細胞膜上で切断されること、その切断レベルは遺伝子型によって異なることが明らかにされ、そしてこのメカニズムはマウスからヒトまで進化上保存されている可能性も示された。切断領域の解析から、171番目～180番目のアミノ酸残基が切断に必要な領域と推察されたが、この領域はドメイン上に位置することから一般的なプロテアーゼによる分解は考えられにくい。疎水性領域におけるタンパク質分解については、シェディングや膜内切断プロテアーゼによる切断などが知られている⁶⁻⁷⁾。これらのメカニズムはアルツハイマー病やパーキンソン病などの脳神経疾患に関与していることが知られており、KCNQ2の切断が病態に影響する可能性は十分に考えられる。

KCNQ2の結合因子として知られているKCNQ3ではタンパク質切断は見られなかった。KCNQ3のタンパク質構造はKCNQ2と非常に類似しており、相同性も高いにも関わらず、タンパク質切断に対しては異なったメカニズムを有する点は興味深い。もしKCNQ2の切断レベルが病態に影響していると仮定した場合、KCNQ3の遺伝子変異が起因となるてんかんの分子病態はKCNQ2のそれとは異なることが推測され、カリウムイオンチャネルが関わるてんかんの分子病態メカニズムのさらなる理解に貢献できるものと考えられる。

本研究で、KCNQ2が切断されるという新規のメカニズムの存在を示す結果を得られたが、それに関わる因子の同定には至らず、切断メカニズムの解明にはまだ多くの課題が残される。また、切断レベルに対しては本研究で標的とした以外の遺伝子型でも影響するかどうかの解析も必要であり、この分子メカニズムの解明および切断されることの生理学的意義について引き

続き検討していきたい。

参考文献

- 1) Nappi P, Miceli F, Soldovieri MV, Ambrosino P, Barrese V, Taglialatela M. Epileptic channelopathies caused by neuronal Kv7 (KCNQ) channel dysfunction. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 2020 ; **472** : 881-898.
- 2) Hortigüela M, Fernández-Marmiesse A, Cantarín V, Gouveia S, García-Peñas JJ, Fons C, et al. Clinical and genetic features of 13 Spanish patients with KCNQ2 mutations. *Journal of human genetics* 2017 ; **62**(2) : 185-189.
- 3) Orhan G, Bock M, Schepers D, Ilina EI, Reichel SN, Löffler H, et al. Dominant - negative effects of KCNQ2 mutations are associated with epileptic encephalopathy. *Annals of neurology* 2014 ; **75**(3) : 382-394.
- 4) Abidi A, Devaux JJ, Molinari F, Alcaraz G, Michon FX, Sutura-Sardo J, et al. A recurrent KCNQ2 pore mutation causing early onset epileptic encephalopathy has a moderate effect on M current but alters subcellular localization of Kv7 channels. *Neurobiology of Disease* 2015 ; **80** : 80-92.
- 5) Uchida T, Lossin C, Ihara Y, Deshimaru M, Yanagawa Y, Koyama S, Hirose S. Abnormal γ -aminobutyric acid neurotransmission in a Kcnq2 model of early onset epilepsy. *Epilepsia* 2017 ; **58**(8) : 1430-1439.
- 6) 檜作洋平. 膜内切断プロテアーゼの基質認識・切断機構. *生物物理* 2019 ; **59**(2) : 79-83.
- 7) 富田泰輔. タンパク質膜内配列切断の制御と機能. *生化学* 2014 ; **86**(1) : 28-40.

