

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 教授

田邊 勉

「Ca チャネル遺伝子の変異と神経疾患」

1. 研究実施の概要

基本構想

脳組織においては多種多様な神経細胞がそれぞれ連絡し複雑で絶妙なネットワークを形成しているが、個々の神経細胞の種類によって、発現している Ca チャネルのタイプ、発現量は著しく異なる。神経組織に特異的に発現する Ca チャネル α_1 サブユニットとしてこれまでに α_{1A} , α_{1B} , α_{1E} の 3 種類の遺伝子が明らかにされている。これらのサブユニットはそれぞれ P/Q 型、N 型、R 型 Ca チャネルをコードしている。Ca チャネルは神経細胞間の情報伝達そして、神経細胞と標的器官（筋肉、感覚器等）との情報伝達に必須の要素として機能している。一方、電位依存性 Ca チャネルを通して流入する Ca は個体発生に伴って構築される神経ネットワークの形成にも関与しているが、ある特定の Ca チャネルが特異的にこの機能を担っているのかどうかは不明である。一般的に複数種の Ca チャネルが一つの神経細胞に共存しているのが普通であり Ca チャネル活性化にともなって引き起こされる種々細胞機能における個々のチャネルの貢献度の解釈は困難である。P/Q 型チャネルは脳全体に広く発現しており、中枢および末梢神経系の伝達物質放出機構において中心的役割を果たしている。最近 α_{1A} 遺伝子が脊髄小脳失調症 6 型 (spinocerebellar ataxia type 6: SCA6)、家族性片麻痺性偏頭痛 (familial hemiplegic migraine: FHM)、反復発作性失調症 2 型 (episodic ataxia type 2: EA2) の原因遺伝子として、さらには欠神発作 (absence epilepsy) のモデル動物として知られている *tg* マウスおよびそのアレルでより重篤な *tg^{la}* マウスの原因遺伝子として同定された。しかしながら、個々の疾患において検出される α_{1A} チャネル遺伝子変異の詳細はそれぞれ異なる。単一イオンチャネル遺伝子内部の種々の変異が上記の様に多彩な神経疾患とそれぞれ独立にリンクしているということは、チャネル分子の発現制御と生理機能の多様性の分子的基盤を考える上において非常に興味深い。

本研究は (I) 個々の Ca チャネルの生理機能とその特性を明らかにし、複数種のチャネルが一つの神経細胞に共存していることの生理的意義を明らかにする、(II) 遺伝子変異と疾患との関係を、変異 α_{1A} チャネルの発現制御、電流特性、活性制御などの側面から明らかにする、(III) 以上の解析結果から得られた情報を基盤にして疾患モデルマウスを作製する、の項目からなり、これらを有機的に繋げることにより α_{1A} チャネル遺伝子疾患の治療法を模索しようとするものである。本研究成果は‘イオンチャネル疾患’全般の原因究明と治療法開発に格好のモデルを提供することになると期待される。

実施・研究成果

I. 遺伝子ノックアウトマウスを用いた Ca チャネルの生理機能とその特性の解明 (①遺伝子変異マウス解析グループ、②変異導入チャネル解析グループ)。

これまで、クローン化した脳 Ca チャネルの構造機能連関の研究は、それらが本来発現している自然環境とは異なる細胞環境で行われてきた。これは発現させようという細胞に内在している Ca チャネル活性とクローン化チャネルのそれとが区別できなければならな

いという必要性からであり、あるいは本来 Ca チャネルが発現していない細胞に発現させれば内在性チャネルをブロックする手間が省けるという理由からであった。これらの発現系はチャネル分子の生物物理学的諸性質の解析においては非常に有用であるがチャネル制御の多様性の解析には不十分である。なぜならばチャネル活性制御の特異性は個々のチャネルそれ自身の構造上の差異のみならずその発現環境に依存しているところが非常に大きいからである。一方、患者において見いだされた遺伝子変異を正常遺伝子に人為的に導入し、種々の細胞に発現させて解析しても生体において観察される異常を全て説明できない場合が多い。これらの問題を解決するには、変異導入遺伝子をそれが本来発現している環境において発現させ構造機能関連の解析を行うことが必須である。種々の脳 Ca チャネル遺伝子をノックアウトしたマウスはこれまで不可能であった生理的条件下での脳 Ca チャネルおよび種々の変異チャネルの発現実験を可能にし、骨格筋 Ca チャネル遺伝子ノックアウトマウスが骨格筋興奮収縮関連機構の解明、骨格筋 Ca チャネルの構造機能関連の解明に大きく貢献したように、これまで不明瞭であった種々の神経機能に及ぼす個々のチャネルの関与の特異性及び貢献度の解明さらにはチャネル変異に基づく病態の解明と治療法の開発に役立つことが期待される。我々は種々の神経特異的 Ca チャネル遺伝子変異マウスの解析から、外部からの侵害性刺激や体内の病変に対する生体防御機構として働き、生命維持に重要な警告反応である急性の生理的な侵害受容性疼痛には P/Q 型チャネルが、そして病的な疼痛であり、治療を必要とする慢性の侵害受容性疼痛には N 型および R 型チャネルが、さらに神経因性疼痛には N 型チャネルが重要な働きをしていることを明らかになり種々難治性疼痛に対する特異的治療薬の開発に繋がる成果が得られた。このように痛覚伝達一つをとっても個々の Ca チャネルは、ある種の痛み伝達においては特異的に、別の種類の痛み伝達においては共同的に働いていることが明らかになり、これらチャネルの機能的差違をうまく利用することにより神経細胞の Ca ホメオスタシスを正常状態に維持できる可能性が示唆された。一方 N 型チャネルと R 型チャネルノックアウトマウスは情動に関与する行動学的解析においてまったく反対の性質（恐怖心欠落傾向 VS 怖がり傾向）を示した。両チャネルの脳内における分布は非常にオーバーラップしており、今後これらチャネル欠損による情動異常の分子的基盤に解明に興味が持たれる。

II. P/Q 型チャネル遺伝子変異と脊髄小脳失調症 6 型 (SCA6) の病態との関係の解析 (① 遺伝子変異マウス解析グループ、②変異導入チャネル解析グループ、③疾患遺伝子解析グループ)。

1. 我が国における常染色体性優性遺伝性の純粋小脳失調症の家系を対象として連鎖解析を行い、それらが遺伝的に異質な複数の疾患より成ること、その約半数が第 19 番染色体 13.1 に遺伝子座を有することを明らかにした。
2. SCA6 の原因遺伝子産物である P/Q 型チャネルにはスプライシングの差によってポリグルタミン (ポリ Q) 領域を持つものと持たないものの 2 グループが存在するが、ポリ

Q 領域を持つ P 型チャネルが、SCA6 において特異的に変性脱落する小脳プルキンエ細胞において、高濃度に発現していることを明らかにした。

3. SCA6 の患者プルキンエ細胞の細胞質内に P 型チャネルの aggregate を見い出した。これらの封入体はユビキチン化されておらず、他の多くの CAG リピート病において見い出されている封入体とは性質を異にするものであることが明らかとなった。一方、長い異常ポリ Q 鎖のみを認識する抗体 1C2 を用いて解析すると、多くのプルキンエ細胞の細胞質内に顆粒状の小封入体の多発が見いだされた。核内にも存在する可能性があり、原因遺伝子産物からなる封入体が細胞質のみに認められるのとは異なった分布を示した。これにより組織切片のみでも SCA6 の確定診断が可能になった。
4. 患者由来 P 型および Q 型スプライスバリエントチャネルを作製しその電気生理学的特性を解析したところ、ポリ Q 伸長に伴い P 型チャネルが不活性化しやすくなるのに対し Q 型は不活性化しにくくなることが明らかとなった。臨床的に SCA6 は純粋小脳失調を特徴とし、病理学的には P 型チャネルが主に発現しているプルキンエ細胞が大きく消失するのに対し、P 型、Q 型チャネルが共に発現している小脳顆粒細胞が比較的保たれている特徴がある。したがってこれらチャネルを通して細胞内に流入する Ca 量の変動が SCA6 の疾患症状の原因であることが示唆された。
5. SCA6 変異を導入した P 型チャネルを stable に発現させた培養細胞系を作製した。正常な培養環境では導入細胞は異常を示さないものの、ストレス下においては正常な遺伝子を入れた対照に比べアポトーシスによる細胞死（カスパーゼ依存性）をきたしやすくなることを見出した。
6. SCA6 患者の臨床症候の分析にて他の脊髄小脳失調症にはあまりない特徴として、めまいや動揺視を伴う垂直性眼振が多いことや反復発作性の症候が多いことを明らかにした。さらに、遺伝子解析と神経病理学的解析により SCA6 の CAG リピートはきわめて安定で somatic mosaicism はないこと、CAG 数 20 は明瞭に疾患レンジであることを明らかにした。

Ⅲ. モデルマウスの作製（①遺伝子変異マウス解析グループ、④遺伝子変異マウス作製グループ）

SCA6 においては、原因遺伝子が Ca チャネルであるということから、もし疾患の原因が Ca チャネル活性の上昇／低下にある場合、発現量を生理的レベルに保つことができない通常のトランスジェニックマウスはモデルとなりえない。そこで P/Q 型チャネル遺伝子座の native プロモーターの下流にヒト疾患 Ca チャネル遺伝子をシングルコピー導入できるターゲットベクターを構築した。そしてこれを ES 細胞に導入し相同遺伝子組換えがおきた変異 ES 細胞クローンの単離に成功した。続いて疾患 P 型チャネル遺伝子を含む組み換え用ベクターを構築し、これを上記 ES 細胞に導入し SCA6 変異を有するヒト型 P 型チャネルを有する変異 ES 細胞クローンの単離に成功した。そしてこの ES 細胞をブラストシスト内

インジェクションすることによりキメラマウスを作製した。さらにこのキメラマウスを B6 マウスとかけあわせジャームライントランスミッションしたマウス（ノックインマウス）の取得に成功した。一方、本チャネル遺伝子の他の変異が、SCA6 同様難治性疾患である EA2 および FHM の原因遺伝子としても同定されている。単一イオンチャネル遺伝子内部の種々の変異がこのように多彩な神経疾患とそれぞれ独立にリンクしているということは驚きであるとともに大きなチャンスでもある。すなわちこれら疾患を包括的に考えることにより、個々の疾患症状の原因究明、治療法開発が加速度的に早まることが期待される。そこで我々は同様の手法で EA2 モデルマウス、FHM モデルマウスの作製を試み両方ともに完成した。ヒトにおいて EA2 は比較的若年から、FHM はそれに遅れてそして、SCA6 はかなり高齢になってから発症するというような時間経過を経るが個々の患者さんによって非常にばらつきが大きく、何かほかに発症を誘引するような因子の存在を強く示唆させる。モデル動物においては発症前段階から老齢に至るまで詳しく解析が可能であり、モデル動物にさまざまな“負荷”をかけることにより、発症誘引因子を同定することが可能であり、疾患遺伝子変異を有するヒトにおいてはこれら避けるような予防法の開発につながるも知れない。

2. 研究構想

研究開始時に目指した目標

α_{1A} (P/Q)型 Ca チャネル遺伝子の種々の変異は多彩な神経疾患とリンクしている。本研究では、遺伝性皮質性小脳萎縮症の一つ SCA6 の病態とチャネル遺伝子変異との関係を明らかにするとともに、変異 P 型チャネルおよび共存する他のタイプの Ca チャネル機能の調節、制御機構の活用により神経細胞の変性脱落の阻止をはかる。そして Ca 依存性の神経細胞死を最終局面とする多くの神経変性疾患の治療法開発の基盤確立を目指す。

立案した5年間の研究計画・進め方の概要、その後の新展開から生まれた目標

上記目標を達成するために（Ⅰ）個々の Ca チャネルの生理機能とその特性を明らかにし、複数種のチャネルが一つの神経細胞に共存していることの生理的意義を明らかにする、（Ⅱ）遺伝子変異と疾患との関係を、変異 P チャネルの発現制御、電流特性、活性制御などの側面から明らかにする、（Ⅲ）以上の解析結果から得られた情報を基盤にして疾患モデルマウスを作製する、という個別テーマを設け、それぞれのテーマに対し4つの研究グループがそれぞれの特長を生かし全て共同研究として個々の課題研究を行ってきた。

まず（Ⅰ）に関しては平成9年研究助成開始時に以前から着手していた神経系において P 型 Ca チャネルと共存する R 型 Ca チャネル、N 型 Ca チャネル遺伝子欠損マウスの作製をより推進させ、R 型 Ca チャネルに関しては、平成10年に、N 型 Ca チャネルに関しては平成11年にその作製に成功した。それ以降、平成14年10月31日に至るまでこれら遺伝子欠損マウスの解析を通じて R 型、N 型 Ca チャネルの個体レベルにおける生理機能、そしてそれらの分子的基盤を明らかにしてきた。P/Q 型 Ca チャネルに関しては本チャネル

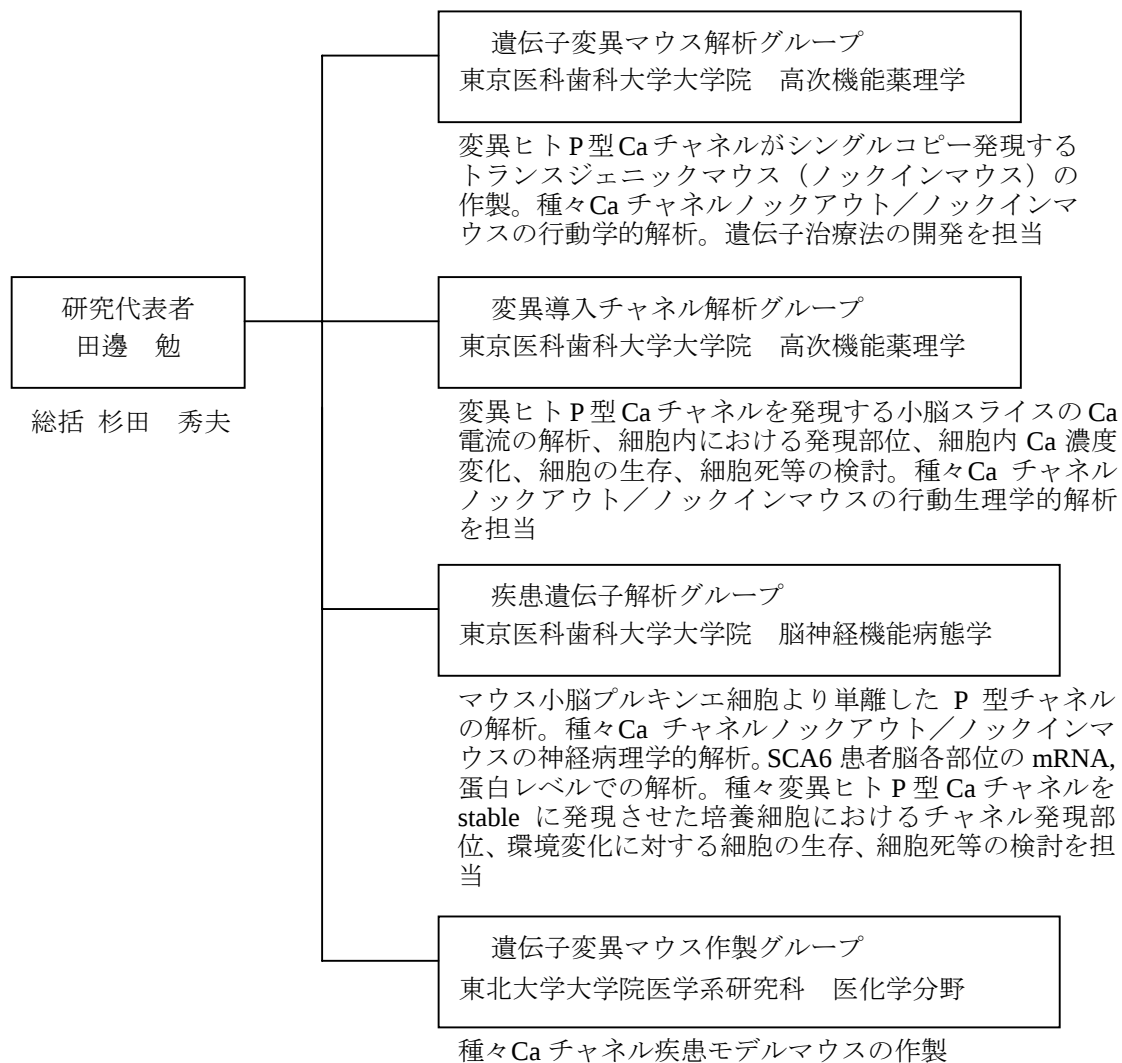
の遺伝子変異マウス的一种であり、小脳プルキンエ細胞の P 型 Ca チャネル電流が 20%以下になっており、P/Q 型 Ca チャネル遺伝子欠損マウスと類似の臨床症状を示す tg^{la} マウスを用いて、同様の解析を行った。

(Ⅱ) に関してはまず平成 9 年研究助成開始時より患者剖検脳組織より取得した mRNA よりヒト P/Q 型 Ca チャネル遺伝子を単離し、その遺伝子構造を正常ヒトのものと詳細に比較検討した。というのも SCA6 における CAG リピートの延長はきわめて軽微であり、これまでの CAG リピート病のように単に翻訳された延長ポリグルタミンが毒性を持つという機序では説明が困難であるためである。一方、平成 10 年後半から単離した疾患患者 P/Q 型 Ca チャネルを培養細胞に発現させ電気生理学的諸性質に及ぼす変異の影響を観察した。SCA6 の原因遺伝子である α_{1A} は P 型、Q 型の両方のチャネルをコードしており、特異的に変性脱落する小脳プルキンエ細胞においては P 型のみしか発現していない。P 型、Q 型の差異の理由として mRNA のオルタナティブスプライシングが考えられている。そこで平成 12 年より小脳プルキンエ細胞より P 型バリエーションの単離を試みこれに成功し、平成 13 年より、その電気生理学的症性質の検討をスタートし平成 14 年にこれを終了した。

(Ⅲ) SCA6 においては、原因遺伝子が Ca チャネルであるということから、もし疾患の原因が Ca チャネル活性の上昇/低下にある場合、発現量を生理的レベルに保つことができない通常のトランスジェニックマウスはモデルとなりえない。そこで平成 10 年より α_{1A} チャネル遺伝子座の native プロモーターの下流に疾患 Ca チャネル遺伝子をシングルコピー導入できるターゲットベクターの構築に取り掛かった。そしてこれを ES 細胞に導入し相同遺伝子組換えがおきた変異 ES 細胞クローンの単離に成功した。さらに (Ⅱ) の検討から疾患モデルとして機能するにはヒト P 型チャネルを導入する必要があることが明らかになったので、ヒト P 型チャネル cDNA を含む組み換え用ベクターの構築に取り掛かり、ひき続きこれを上記変異 ES 細胞クローンに導入し最終的にノックインマウスを平成 13 年に完成させた。一方、本チャネル遺伝子の他の変異が、SCA6 同様難治性疾患である EA2 および FHM の原因遺伝子としても同定されている。すなわちこれら疾患を包括的に考えることにより、個々の疾患症状の原因究明、治療法開発が加速度的に早まることが期待される。そこで EA2、FHM に関しても SCA6 と同様なストラテジーで作製に取り掛かり平成 14 年に全て完成した。

3. 研究実施体制

(1) 体制



4. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

なし

5. 主な研究成果

(1) 論文発表

(国内 50 件、海外 44 件)

[国内]

1. 村越隆之 (1997) ニューロサイエンスの新しい研究方法 : DiI と DiO. *Clinical Neuroscience*, 15 (3): 10-11. 中外医学社
2. 村越隆之、田邊勉 中枢シナプス機能と Ca^{2+} チャネル 1997 年日薬理誌 109: 213-222.
3. 田邊勉 Ca^{2+} チャネル型受容体 1997 年 Bio Science 用語ライブラリー、脳神経 78-79.
4. 三枝弘尚、田邊勉 電位依存性カルシウムチャネルの構造と機能 1998 年 脳の科学 20: 489-495.
5. 栗原崇、田邊勉 電位依存性カルシウムチャネルの分子的多様性 : 構造-機能相関と組織特異的発現 1998 年 循環器科 44:1-12.
6. 栗原崇、田邊勉 電位依存性 Ca^{2+} チャネル 1998 年蛋白質核酸酵素 43:1579-1588.
7. 村越隆之、栗原崇、三枝弘尚、田邊勉 イオンチャネルの分子生物学 1998 年 羊土社 実験医学バイオサイエンスシリーズ
8. 水澤英洋 (1998) 脊髄小脳失調症 6 型-電位依存性 Ca チャネル α 1A サブユニット遺伝子の CAG リピート異常伸長-, 脳の科学.20:505-510.
9. 水澤英洋 (1998) 脊髄小脳失調症 6 型 (SCA6) は新しいタイプの CAG リピート病か?, *Current Insights in Neurological Science*. 6(2):10-11.
10. 水澤英洋 (1998) 遺伝性脊髄小脳変性症の遺伝子と臨床像 Spinocerebellar ataxia type5 (SCA5), 神経内科. 49:233-237.
11. 水澤英洋 (1998) 遺伝性神経変性疾患, *MolecularMedicine*.35:560-562.
12. 村越隆之 (1999) 縦糸と横糸の織り成す綾. 細胞、31(8)、302-303.
13. 村越隆之 (1999) スライス標本を用いた皮質局所回路の解析.細胞、31(8)、309-313.
14. 水澤英洋、山田正仁 (1999) 脊髄小脳変性症の定義と歴史,全国脊髄小脳変性症友の会ニュース. 117:5-8.
15. 水澤英洋、山田正仁 (1999) 脊髄小脳変性症の定義と歴史, 全国脊髄小脳変性症友の会ニュース. 117:5-8.
16. 高島実、水澤英洋 (1999) 遺伝性脊髄小脳変性症 SCA5. *Clinical Neuroscience* 17:39.
17. 高島実、石川欽也、水澤英洋 (1999) 遺伝性脊髄小脳変性症 SCA6. *Clinical Neuroscience* 17:40-42.
18. 水澤英洋 (1999) イオンチャネル異常と神経疾患. 現代医療 31:1025-1030、1999.
19. 水澤英洋 (1999) 神経変性疾患. 内科学書改訂第 5 版 (島田馨、編)、中山書店 pp2100-2109.
20. 水澤英洋 (1999) 中枢変性疾患. 21 世紀耳鼻咽喉科領域の臨床 8、めまい・平衡障害 (野村恭也、小松崎篤、本庄巖、編)、中山書店 pp443-453.
21. 水澤英洋 (1999) 脊髄小脳変性症. 別冊.医学のあゆみ、神経疾患-state of arts (中村重信、編)、医歯薬出版 pp500-503.
22. 水澤英洋 (1999) Holmes 型皮質性小脳萎縮症. 別冊日本臨床領域別症候群シリーズ 27、神経症候群. pp231-234.
23. 水澤英洋 (1999) Spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6). 別冊日本臨床領域別症候群シリーズ 27、神経症候群 II. pp235-238.

24. 水澤英洋 (1999) 小脳オリブ核萎縮症. 別冊日本臨床領域別症候群シリーズ 27、神経症候群Ⅱ. pp239-242.
25. 長岡詩子、水澤英洋 (1999) ヒトの反復発作性失調症 2 型、家族性片麻痺性片頭痛 1 型、脊髄小脳失調症 6 型、“進行性小脳失調症”. 脳の科学 1999 増刊号、pp95-99.
26. 長岡詩子、水澤英洋 (1999) カルシウムチャンネル β サブユニットの変異. 脳の科学 1999 増刊号、pp195-199.
27. 小山内実、田邊勉 電位依存性カルシウムチャンネルの分子薬理学 2000 年 Clinical Calcium, **10**(3) 268-274.
28. 栗原崇、田邊勉 痛みと Ca^{2+} チャンネル 2000 年 東京都歯科医師会雑誌 **48**: 473-481.
29. 石川欽也、融衆太、水澤英洋 (2000) 脊髄小脳失調症 6 型. Clinical Neuroscience **18**(3): 50-53.
30. 水澤英洋 (2000) イオンチャンネル病と発作性神経疾患 発作性神経筋疾患を見たらイオンチャンネル病を疑う. 医学のあゆみ **193**(6): 575-580.
31. 水澤英洋 (2000) 脊髄小脳変性症. Bio Clinica **15**(12): 33-37.
32. 水澤英洋 (2000) 遺伝性運動失調症の臨床. 神経研究の進歩 **44**(6): 999-1007.
33. 石川欽也、水澤英洋 (2000) 運動失調性歩行. 田代邦雄、廣瀬源二郎、山本悌司 (編集), 誤診しやすい神経疾患, 南江堂, p163-165.
34. 栗原崇、横山和明、田邊勉 脊髄の伝達物質 2001 年 Clinical Neuroscience **19**: 761-763.
35. 三枝弘尚、田邊勉 カルシウムチャンネルの分子構造と機能 2001 年 医薬ジャーナル社 “カルシウム拮抗薬” p50-59.
36. 松田嘉弘、田邊勉 カルシウムチャンネルの機能 2001 年 Clinical Calcium, **11**(11) 1440-1444.
37. 水澤英洋: 遺伝性脊髄小脳変性症. (杉田秀夫、福内靖男、柴崎 浩、平井俊策、山口武典、金澤一郎、田代邦雄、糸山泰人、小林祥泰、祖父江 元 編集) 先端医療シリーズ 14. 神経・筋疾患神経・筋疾患の最新医療、先端医療技術研究所 2001 年 169-174.
38. 石川欽也、水澤英洋: 脊髄小脳失調症 6 型. 2001 年 Clinical Calcium **11**: 59-63.
39. 富満弘之、水澤英洋: 反復発作性失調症 2 型. 2001 年 Clinical Calcium **11**: 64-67.
40. 水澤英洋: 脊髄小脳変性症: Spinocerebellar ataxia type 6. 2001 年 内科 **87**: 678-681.
41. 水澤英洋: 《神経・筋》脊髄小脳変性症. 2001 年 内科 **87**(6): 1488-1492.
42. 水澤英洋: 脊髄小脳変性症 -SCA6、その他-. 2001 年 最新医学 **56**: 67-71.
43. 松田嘉弘、田邊勉 神経変性とイオンチャンネル 2002 年 Clinical Neuroscience **20**: 233.
44. 三枝弘尚、松田嘉弘、田邊勉 T 型カルシウムチャンネルの構造と機能 2002 年 Clinical Calcium, **12**(6) 94-98.
45. 安部理寛、栗原崇、韓文華、四宮謙一、田邊勉 神経根性疼痛モデルラット後根神経節における電位依存性イオンチャンネルサブユニットの発現変化 2002 年 臨床整形外科 **37**: 343-349.
46. 栗原崇、田邊勉 Ca^{2+} チャンネルと脳機能 2002 In “感覚器官と脳内情報処理” 御子柴克彦、清水孝雄 編 共立出版 pp 51-63.
47. 水澤英洋: 核封入体を伴わないポリグルタミン病. 神経進歩 **46**(5): 637-646, 2002
48. 水澤英洋: Triplet repeat 病研究の進歩. 組織培養工学 **28**(2): 50-51, 2002
49. 融 衆太、水澤英洋: 核封入体を作らない CAG リピート病 —脊髄小脳失調症 6 型—. 組織培養工学、**28**(2): 11-14, 2002
50. 常深泰司、水澤英洋: ポリグルタミン病—脊髄小脳失調症 6 型を中心に—. 週刊 医学

[海外]

1. Adams, B.A. & Tanabe, T. (1997). Structural regions of the cardiac Ca channel α_{1C} subunit involved in Ca-dependent inactivation. *J. Gen. Physiol.* **110**: 379-389.
2. Urayama, O., Murakoshi, T., Kubota, M., Hara, Y., Chihara, J. and Ikawa, Y. (1997) Coincident induction of Krev-1/rap 1A, rap 1B and H-ras mRNAs in the rat spinal cord by noxious stimulation. *Molecular Brain Research*, **45**: 331-334.
3. Ishikawa K, Tanaka H, Saito M, Watanabe M, Ohkoshi N, Fujita T, Yoshizawa K, Takiyama Y, Nishizawa M, Nakano I, Matsubayashi K, Miwa M, Shoji S, Kanazawa I, Tsuji S, and Mizusawa H (1997) Japanese families with autosomal dominant pure cerebellar ataxia map to chromosome 19p, and show strong association with mild CAG expansions in the spinocerebellar ataxia type 6 gene in chromosome 19 p13. 1. *Am J Hum Genet* **61**: 336-346.
4. H. Hashida, J. Goto, H. Kurisaki, H. Mizusawa, and I. Kanazawa (1997) Brain Regional Differences in the Expansion of a GAG Repeat in the Spinocerebellar Ataxias: Dentatorubral-Pallidoluysian Atrophy, Machado-Joseph Disease, and Spinocerebellar Ataxia Type 1. *Ann Neurol* **41**: 505-511.
5. T. Yokota, T. Gotoda, M. Araki, H. Araki, T. Ohga, T. Kanda, J. Suzuki, T. Imai, H. Matsumoto, S. Harino, M. Kiyosawa, H. Mizusawa, and K. Inoue (1997) Friedreich-Like Ataxia with Retinitis Pigmentosa Caused by the His 101 Gln Mutation of the α -Tocopherol Transfer Protein Gene. *Ann Neurol* **41**: 826-83 2.
6. Takiyama, Y., Sakoe, K., Namekawa, M., Soutome, M., Esumi, E., Ogawa, T., Ishikawa, K., Mizusawa, H., Nakano, I. and Nishizawa, M. (1998). A Japanese family with spinocerebellar ataxia type 6 which includes three individuals homozygous for an expanded CAG repeat in SCA6/CACNL1A4 gene. *Journal of the Neurological Sciences*. **158**: 141-147.
7. Tsuchiya, K., Ishikawa, K., Watabiki, S., Tone, O., Taki, K., Haga, C., Takashima, M., Ito, U., Okeda, R., Mizusawa, H. and Ikeda, K. (1998). A clinical, genetic, neuropathological study in a Japanese family with SCA 6 and a review of Japanese autopsy cases of autosomal dominant cortical cerebellar atrophy. *Journal of the Neurological Sciences*. **160**: 54-59.
8. Minabe-Saegusa, C., Saegusa, H., Tsukahara, M., and Noguchi, S. (1998). Sequence and expression of a novel mouse gene PRDC (protein related to DAN and cerberus) identified by a gene trap approach. *Dev. Growth & Differ.* **40**: 343-353.
9. Neuhuber, B., Gerster, U., Döring, F., Glossmann, H., Tanabe, T. & Flucher, B.E. (1998). Association of calcium channel α_{1S} and β_{1a} subunits is required for the targeting of β_{1a} but not of α_{1S} into skeletal muscle triads. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5015-5020.
10. Nakai, J., Tanabe, T., Konno, T., Adams, B.A. & Beam, K.G. (1998). Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling. *Journal of Biological Chemistry*, **273**: 24983-24986.
11. Ishikawa, K., Watanabe, M., Yoshizawa, K., Fujita, T., Iwamoto, H., Yoshizawa, T., Harada, K., Nakamagoe, K., Komatsuzaki, Y., Satoh, A., Doi, M., Ogata, T., Kanazawa, I., Shoji, S. and Mizusawa, H. (1999) Clinical, neuropathological, and molecular study in two families with spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6). *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. **67**(1): 86-89.

12. Ishikawa, K., Fujigasaki, H., Saegusa, H., Ohwada, K., Fujita, T., Iwamoto, H., Komatsuzaki, Y., Toru, S., Toriyama, H., Watanabe, M., Ohkoshi, N., Shoji, S., Kanazawa, I., Tanabe, T. & Mizusawa, H. (1999). Abundant expression and cytoplasmic aggregations of $\alpha 1A$ -voltage-dependent calcium channel protein associated with neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6). *Hum. Molec. Genet.*, **8**: 1185-1193.
13. Masumura, M., Satake, S., Saegusa, H., and Mizoguchi, A. (2000). Glucose stimulates the release of bombyxin, an insulin-related peptide of the silkworm *Bombyx mori*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **118**: 393-399.
14. Yang Q, Hashizume Y, Yoshida M, Goto Y, Mitsuma N, Ishikawa K, Mizusawa H (2000). Morphological purkinje cell changes in spinocerebellar type6. *Acta Neuropathol* **100**: 371-376.
15. Toru, S., Murakoshi, T., Ishikawa, K., Saegusa, H., Fujigasaki, H., Uchida, T., Nagayama, S., Osanai, M., Mizusawa H. and Tanabe, T. (2000). Spinocerebellar ataxia type 6 mutation alters P-type calcium channel function. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 10893-10898.
16. Saegusa, H., Kurihara, T., Zong, S., Minowa, O., Kazuno, A., Han, W., Matsuda, Y., Yamanaka, H., Osanai, M., Noda, T. & Tanabe, T. (2000). Altered pain responses in mice lacking α_{1E} subunit of the voltage-dependent Ca^{2+} channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 6132-6137.
17. Fujigasaki, H., Uchihara, T., Koyano, S., Iwabuchi, K., Yagishita, S., Makifuchi, T., Nakamura, A., Ishida, K., Toru, S., Hirai, S., Ishikawa, K., Tanabe, T. & Mizusawa, H. (2000) Ataxin-3 is translocated into the nucleus for the formation of intranuclear inclusions in normal and Machado-Joseph disease brains. *Experimental Neurology* **165**: 248-256.
18. Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R.W. and Catterall, W.A. (2000) Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channels. *Neuron* **25**: 533-535.
19. Takenoshita H, Shizuka IM, Mitoma H, Song S, Harigaya Y, Igeta Y, Yaguchi M, Ishida K, Shoji M, Tanaka M, Mizusawa H, Okamoto K (2001). Presynaptic inhibition of cerebellar GABAergic transmission by glutamate decarboxylase autoantibodies in progressive cerebellar ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **70**: 386-389.
20. Fujigasaki H, Uchihara T, Takahashi J, Matsushita H, Nakamura A, Koyano S, Iwabuchi K, Hirai S, Mizusawa H (2001). Preferential recruitment of ataxin-3 independent of expanded polyglutamine: an immunohistochemical study on Marinesco bodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **71**: 518-520.
21. Sakashita Y, Kurihara T, Uchida D, Tatsuno I, Yamamoto T. (2001) Involvement of PACAP receptor in primary afferent fibre-evoked responses of ventral roots in the neonatal rat spinal cord. *Br J Pharmacol.* **132**: 1769-76.
22. Tateyama, M., Zong, S. Tanabe, T. & Ochi, R. (2001). Properties of α_{1E} Ca^{2+} channel currents expressed in cultured adult rabbit ventricular myocytes. *American J. Physiol., Cell Physiol.* **280**: C175-C182.
23. Ishikawa, K., Owada, K., Ishida, K., Fujigasaki, H., Li, M., Tsunemi, T., Ohkoshi, N., Toru, S., Mizutani, T., Hayashi, M., Arai, N., Hasegawa, K., Kawanami, T., Kato, T., Makifuchi, T., Shoji, S., Tanabe, T. & Mizusawa, H. (2001). Cytoplasmic and nuclear polyglutamine-aggregates in SCA6 Purkinje cells. *Neurology* **56**: 1753-1756.
24. Kubota, M., Murakoshi, T., Saegusa, H., Kazuno, A., Zong, S., Hu, Q., Noda, T. & Tanabe, T.

- (2001) Intact LTP and fear memory but impaired spatial memory in mice lacking $\text{Ca}_v2.3$ ($\alpha 1E$) channel. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **282**: 242-248.
25. Saegusa, H., Kurihara, T., Zong, S., Matsuda, Y., Nonaka, T., Han, W., Toriyama, H. & Tanabe, T. (2001). Suppression of neuropathic pain symptoms in mice lacking N-type Ca^{2+} channel. **The EMBO J.** **20**: 2349-2356.
 26. Murakoshi, T., Song, S., Konishi, S. & Tanabe, T. (2001) Multiple G-protein-coupled receptors mediate presynaptic inhibition at single excitatory synapses in the rat visual cortex. **Neuroscience Letters** **309**: 117-120.
 27. Sakata, Y., Saegusa, H., Zong, S., Osanai, M., Murakoshi, T., Shimizu, Y., Noda, T., Aso, T. & Tanabe, T. (2001) Analysis of Ca^{2+} currents in spermatocytes from mice lacking $\text{Ca}_v2.3$ ($\alpha 1E$) Ca^{2+} channel. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **288**: 1032-1036.
 28. Ogasawara, M., Kurihara, T., Hu, Q. & Tanabe, T. (2001). Characterization of acute somatosensory pain transmission in P/Q-type Ca^{2+} channel mutant mice, *leaner*. **FEBS Letters** **508**: 181-186.
 29. Matsuda, Y., Saegusa, H., Zong, S., Noda, T. and Tanabe, T. (2001) Mice lacking $\text{Ca}_v2.3$ ($\alpha 1E$) calcium channel exhibit hyperglycemia. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **289**: 791-795.
 30. Ito K, Komazaki S, Sasamoto K, Yoshida M, Nishi M, Kitamura K, Takeshima H. (2001) Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. **J. Cell Biol.** **154**(5): 1059-67.
 31. Yoshida M, Sugimoto A, Ohshima Y, Takeshima H. (2001) Important role of junctophilin in nematode motor function. **Biochem Biophys Res Commun** **289**(1): 234-9.
 32. Ohara S, Iwahashi T, Oide T, Hayashi R, Nakajima T, Ishikawa K, Mizusawa H: Spinocerebellar ataxia type6 with motor neuron loss: A follow-up autopsy report. **J. Neurol** **294**: 633-635, 2002
 33. Mizusawa H: Spinocerebellar ataxia type 4. (Pulst S, ed), Genetics of Movement Disorders, Academic Press, San Diego, p71-73, 2002
 34. Sakata, Y., Saegusa, H., Zong, S., Osanai, M., Murakoshi, T., Shimizu, Y., Noda, T., Aso, T. & Tanabe, T. (2002) $\text{Ca}_v2.3$ ($\alpha 1E$) Ca^{2+} channel participates in the control of sperm function. **FEBS Letters** **516**: 229-233.
 35. Toriyama, H., Wang, L., Saegusa, H., Zong, S., Osanai, M., Murakoshi, T., Noda, T., Ohno, K. & Tanabe, T. (2002) Protective function of $\text{Ca}_v2.3$ ($\alpha 1E$) Ca^{2+} channel in ischemic neuronal injury. **Neuro Report** **13**: 261-265.
 36. Tsunemi, T., Saegusa, H., Ishikawa, K., Nagayama, S., Murakoshi, T., Mizusawa, H. & Tanabe, T. (2002). Novel $\text{Cav}2.1$ splice variants isolated from Purkinje cells do not generate P-type Ca^{2+} current. **Journal of Biological Chemistry** **277**: 7214-7221.
 37. Abe, M., Kurihara, T., Han, W., Shinomiya, K. & Tanabe, T. (2002). Changes in expression of voltage-dependent ion channel subunits in dorsal root ganglia of rats with radicular injury and pain. **Spine** **27**: 1517-1525.
 38. Saegusa, H., Matsuda, Y., and Tanabe, T. (2002) Effects of ablation of N-and R-type Ca^{2+} channels on pain transmission **Neuroscience Research** **43**: 1-7.
 39. Komazaki S, Ito K, Takeshima H, Nakamura H. (2002) Deficiency of triad formation in developing skeletal muscle cells lacking junctophilin type 1. **FEBS Lett** **524**(1-3): 225-9.
 40. Nishi M, Hashimoto K, Kuriyama K, Komazaki S, Kano M, Shibata S, Takeshima H. (2002)

Motor discoordination in mutant mice lacking junctophilin type 3. *Biochem Biophys Res Commun* **292**(2): 318-24.

41. Uehara, M. Yasukochi, I. Imanaga, M. Nishi, H. Takeshima (2002) Store-operated Ca^{2+} entry uncoupled with ryanodine receptor and junctional membrane complex in heart muscle cells *Cell Calcium* **31**, No.2, pp.89-96
42. Eiraku M, Hirata Y, Takeshima H, Hirano T, Kengaku M (2002) Delta/notch-like epidermal growth factor (EGF)-related receptor, a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons. *Journal of Biological Chemistry* **277**(28): 25400-7.
43. Pan Z, Yang D, Nagaraj RY, Nosek TA, Nishi M, Takeshima H, Cheng H, Ma J. (2002) Dysfunction of store-operated calcium channel in muscle cells lacking $\text{Ca}_v2.3$. *Nature Cell Biol.* **(5)**: 379-83.
44. Han, W., Saegusa, H., Zong, S. and Tanabe, T. (2002) Altered Cocaine Effects in Mice Lacking $\text{Ca}_v2.3$ (α_{1E}) Calcium Channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **299**: 299-304.

(2) 特許出願（国内 2 件、海外 1 件）

①国内

特 許 の 名 称	出 願 番 号	出願日	出 願 人	発 明 者
電位依存性 Ca^{2+} チャンネル $\alpha 1B$ 遺伝子欠損非ヒト動物	特願 2001-204107	平成 13 年 7 月 4 日	科学技術振興事業 団	田邊 勉
$\alpha_{1E}\text{Ca}^{2+}$ チャンネル機能障害に起因する疾病の予防・治療薬のスクリーニング方法	特願 2000-333621	平成 12 年 10 月 31 日	科学技術振興事業 団	田邊 勉、 三枝弘尚

②海外

特 許 の 名 称	出願番号	出願日	出 願 人	発 明 者
電位依存性 Ca^{2+} チャンネル $\alpha 1B$ 遺伝子欠損非ヒト動物	PCT/JP02/ 04404	平成 14 年 5 月 2 日	科学技術振興事業 団	田邊 勉

(3) 新聞報道等

なし

(4) その他特記事項

なし