

シナプス小胞蛋白質 SV2A のてんかん原性調節機能に関する薬理研究

2016

徳留 健太郎

目次

緒言	1
第1章 <i>Sv2a^{L174Q}</i> ラットの行動表現型解析	3
1 緒言	
2 実験方法	
2-1 使用動物	
2-2 Western blot 法による脳内 SV2A の発現解析	
2-3 SV2A の免疫組織化学染色 (酵素抗体法)	
2-4 薬物誘発けいれんに対する感受性の評価	
2-5 Pentylentetrazole の累積投与方法によるけいれん感受性の評価	
2-6 キンドリング形成に対する感受性評価	
2-6-1 Pentylentetrazole キンドリング形成に対する感受性評価	
2-6-2 扁桃核キンドリング形成に対する感受性評価	
2-6-2-1 刺激電極および脳波記録電極の慢性埋め込み手術	
2-6-2-2 扁桃核電気刺激によるキンドリング形成に対する感受性評価	
2-7 統計学的処理	
3 結果	
3-1 <i>Sv2a^{L174Q}</i> ラットの遺伝子変異	
3-2 <i>Sv2a^{L174Q}</i> 変異による脳内および海馬における SV2A の発現変動	
3-3 <i>Sv2a^{L174Q}</i> 変異による薬物誘発けいれんに対する感受性の変化	
3-3-1 Pentylentetrazole 誘発けいれんに対する感受性の変化	
3-3-2 Pilocarpine 誘発けいれんに対する感受性の変化	

- 3-3-3 4-Aminopyridine 誘発けいれんに対する感受性の変化
- 3-3-4 Pentylentetrazole の累積投与に対するけいれん感受性の変化
- 3-4 *Sv2a*^{L174Q} 変異によるキンドリング形成に対する感受性の変化
 - 3-4-1 Pentylentetrazole の反復投与によるキンドリング形成に対する感受性評価
 - 3-4-2 扁桃核電気刺激によるキンドリング形成に対する感受性評価
- 4 考察
- 5 結語

第2章 *Sv2a*^{L174Q} ラットにおける pentylentetrazole 誘発けいれんの 発作焦点部位の探索・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 17

- 1 緒言
- 2 実験方法
 - 2-1 実験動物
 - 2-2 Fos 蛋白を指標とした脳内興奮部位の探索
 - 2-3 統計学的処理
- 3 結果
 - 3-1 けいれん発作閾値における脳内興奮部位の探索
 - 3-1-1 大脳皮質領域における Fos 蛋白発現解析
 - 3-1-2 大脳辺縁系および大脳基底核における Fos 蛋白発現解析
 - 3-1-3 間脳における Fos 蛋白発現解析
- 4 考察

5 結語

第3章 *Sv2a^{L174Q}* 変異による神経伝達物質の

シナプス遊離機能の変動解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 22

1 緒言

2 実験方法

2-1 実験動物

2-2 *In vivo* microdialysis 法を用いた GABA およびグルタミン酸遊離の評価

2-2-1 ガイドカニューレ埋め込み手術

2-2-2 GABA およびグルタミン酸遊離の変動解析

2-3 統計学的処理

3 結果

3-1 *Sv2a^{L174Q}* 変異による GABA およびグルタミン酸のシナプス遊離変化

3-1-1 扁桃核における GABA およびグルタミン酸遊離の変化

3-1-2 海馬における GABA およびグルタミン酸遊離の変化

4 考察

5 結語

第4章 *Sv2a^{L174Q}* 変異によるけいれん感受性亢進メカニズムの解析・・・・・・・・ 29

1. 緒言

2 実験方法

- 2-1 使用動物
- 2-2 蛍光抗体法による二重免疫染色
- 2-3 Western blot 法による海馬における開口分泌調節蛋白質の発現解析
- 2-4 統計学的処理
- 3 結果
 - 3-1 *Sv2a*^{L174Q} 変異による扁桃核 SV2A の発現パターンへの影響
 - 3-2 *Sv2a*^{L174Q} 変異による海馬 SV2A の発現パターンへの影響
 - 3-3 海馬における開口分泌調節蛋白質の発現に対する
Sv2a^{L174Q} 変異の影響

4 考察

5 結語

総括	37
結語	39
論文目録	40
謝辞	41
引用文献	42
図および表	48

緒言

てんかんは種々の成因而もたらされる慢性的な脳疾患であり、脳神経の異常興奮に基づく反復性のてんかん発作を呈する。一般に、脳腫瘍、脳血管障害、脳外傷など何らかの原因で起こる症候性てんかんと、原因不明の特発性てんかんに分けられ、さらにその発作のタイプから、全般発作（強直―間代性発作、欠神発作、ミオクロニー発作など）と部分発作（単純発作、複雑部分発作、二次性発作など）に分類されている。多くのてんかん患者は、抗てんかん薬によって発作をコントロールしているが、難治性のてんかん患者の割合も高い¹⁾。また、既存の抗てんかん薬の多くは単に神経の興奮反応を抑制する神経遮断薬（Na⁺チャンネル遮断薬、GABA神経促進薬など）であり、てんかんの発症および進展（てんかん原性）を抑制できる根本的な治療薬は見出されていない²⁻⁴⁾。また、てんかんの病因や発症メカニズムなどに関しても不明な点が多く、新たなてんかん治療薬の開発が必要とされている⁵⁾。

近年、てんかん治療における新たなターゲット分子として、神経終末のシナプス小胞膜に存在する synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) が注目されている (Fig. 1)。一般に、シナプス小胞膜蛋白質 SV2 には SV2A、SV2B、SV2C の3種のアイソフォームが存在するが、このうち SV2A が最も高い脳内分布を示し、大脳皮質、海馬、小脳などの脳部位において高い分布を示す⁶⁾。SV2A は12回膜貫通型の糖蛋白質であり、その構造は、膜貫通領域、N-末端領域に存在する synaptotagmin 1 (Syt1) 結合部位、糖鎖結合部位（ボツリヌス毒素結合部位）、C-末端配列から構成されている⁷⁻¹¹⁾。これまでの報告から、SV2A は 1) シナプス小胞に形態変化を起こすことなく、神経伝達物質の放出を促進すること、2) シ

ナプス開口分泌蛋白である soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) complex (Fig. 2) の形成を促進することなどが知られている¹²⁻¹⁶⁾。また、3) SV2A をノックアウトした動物は、生後まもなく重篤なけいれん発作を発現し、死に至ることが報告されている^{12,13)}。さらに、種々のてんかん病態においても、SV2A の脳内発現が変動することがヒトおよびモデル動物を用いた研究から示されている¹⁷⁻²²⁾。このような知見から、SV2A はてんかんの発症や進展過程において非常に重要な役割を果たしていると考えられてきた。しかし、SV2A をノックアウトした動物は生後間もなく死亡するため、十分な研究はなされておらず、SV2A の詳細な機能メカニズムについては不明な点が多い。

そこで、本研究では、SV2A 遺伝子にミスセンス変異を導入した新たな動物モデルである *Sv2a^{L174Q}* ラット を作出し、てんかんの発症調節における SV2A の役割とメカニズムについて検討を行った。第 1 章では「*Sv2a^{L174Q}* ラットの行動表現型解析」、第 2 章では「*Sv2a^{L174Q}* ラットにおける pentylenetetrazole 誘発けいれんの脳内発作焦点の探索」、第 3 章では「*Sv2a^{L174Q}* 変異による神経伝達物質のシナプス遊離機能の変動解析」、第 4 章では「*Sv2a^{L174Q}* 変異によるけいれん感受性亢進メカニズムの解析」について検討した。

第1章 Sv2a^{L174Q} ラットの行動表現型解析

1 緒言

SV2A はシナプス小胞膜に存在する膜 12 回貫通型の糖蛋白質であり、活動電位依存的な神経伝達物質およびホルモンの遊離調節機能を有している^{6,9,12,13}。SV2A のシナプス遊離調節メカニズムに関しては不明な点も多いが、SV2A は神経伝達物質の遊離における Ca²⁺ のセンサー蛋白として知られている Syt1 や他の開口分泌調節蛋白質 (e.g. SNARE complex) の発現や輸送を調節することや^{14,23}、シナプス小胞の開口分泌に対する Ca²⁺ 感受性を亢進させること¹⁶ が報告されている。さらに、SV2A はラセタム系抗てんかん薬である levetiracetam (LEV) の結合蛋白質であることが知られており、SV2A は抗てんかん薬の創薬ターゲット分子として注目されてきた²⁴⁻²⁷。

一方、臨床では、内側側頭葉てんかんおよび難治性てんかん患者などにおいて、SV2A の発現が低下していることが報告されている¹⁹⁻²²。さらに、最近の研究で、SV2A 遺伝子のホモ接合体変異 (R383Q) が難治性てんかんや不随意運動、小頭症、発達遅滞を引き起こすことが報告された²⁸。これらの報告からも、SV2A がてんかんの発症に深く関係していることが強く示唆される。しかしながら、てんかん病態における SV2A の詳細な機能メカニズム (e.g. 神経伝達物質遊離の特異性、てんかん病態時のシナプス遊離調節など) については未だ不明である。

以前に、SV2A をノックアウトした動物は成長不全や重度のけいれん発作を示し、3 週間以内に死亡することが報告されている^{12,13}。そのため、現在までに SV2A 関連の動物を用いた詳細な行動特性ならびに表現型解析をすることは困難であった。そこで、我々は SV2A の機能メカニズムを探る目的で、京都大学医学部附属動物実験施設と共同し、SV2A 遺伝子にミスセンス変異を持つ新たな

動物モデルを作成した。これら動物は N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) mutagenesis/Mu transposition pooling method with sequencer (MuT POWER) 法²⁹⁾により作出され、SV2A の第 1 膜貫通領域にミスセンス変異 (L174Q) を有している (Fig. 3, 4A, 4B)。本研究では、この *Sv2a*^{L174Q} ラットの行動表現型について、行動薬理学的手法および免疫組織学的手法を用いて解析した。

2 実験方法

2-1 使用動物

実験には、雄の *Sv2a*^{L174Q} ラットおよび対照動物として F344 ラット (日本 SLC) を使用した。*Sv2a*^{L174Q} ラットは、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(拠点: 京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設) より提供を受けた。入手した動物は、一定の照明サイクル (明期: 08:00 時より 12 時間)、恒温 (24 ± 1 °C)、恒室 (55 ± 5 %) の飼育室において、標準固形飼料 (オリエンタル酵母社製) および水道水を自由に摂取させた環境下で一週間以上予備飼育した後、実験に供した。

2-2 Western blot 法による SV2A の解析

Sv2a^{L174Q} および F344 ラットをペントバルビタール (80 mg/kg, i.p.) にて深麻酔した後、断頭し脳を摘出した。摘出した脳は、前頭葉皮質、頭頂-側頭葉皮質、後頭葉皮質、海馬、線条体、視床、視床下部、中脳、橋・延髄、小脳の 10 部位に分離し、それぞれに lysis buffer (Tris-HCl 20 mM、NaCl 150 mM、MgCl₂ 10 mM、EDTA 1.0 mM、EGTA 1.0 mM、1 % Triton X-100、プロテアーゼインヒビターカクテル (2.0 mM leupeptin、0.08 mM aprotinin、1.5 mM E-64、1.0 mM pepstatin A、5.0 mM bestatin) および 100 mM 4-(2-aminoethyl) benzensulfonyl fluoride

hydrochloride, Nacalai Tesque) を加え、テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズし、20 % ホモジネート溶液を調製した。次いで、ホモジネート液を 4 °C、15,000 × g にて 30 分間遠心分離し、得られた上清を摘出脳各部位の抽出液とした。

Western blot 法は、一定量のサンプル抽出試料と sample buffer (4 % sodium dodecyl sulfate、20 % glycerol、0.2 mM dithiothreitol、0.02 % bromophenol blue を含む 0.5 mM Tris-HCl, pH 6.8) を 2:3 の割合で混和し、加熱処理 (95 °C、5 分間) を行った。得られた試料を 7.5 % SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動 (定電流 : 40 mA) した後、セミドライ式転写装置 (AE-6677, ATTO) を用いて、PVDF 膜 (Hybond-P, Amersham Biosciences) へ転写 (定電流 : 50 mA、60 分間) した。次いで、転写後の膜を 3 % skim milk (Nacalai Tesque) を含む Tris buffered saline with tween 20 (TTBS; 0.1 M NaCl、0.1 % tween 20 を含む 10 mM Trizma base, pH 7.5) blocking buffer 中に浸し、室温にて 1 時間ローテートすることによりブロッキングを行った。ブロッキング後、膜を一次抗体と 4 °C 下で 1 晩反応させた。一次抗体としては、goat anti-SV2A antibody (1:2000, Santa Cruz Biotechnology) および mouse anti-β-actin antibody (1:2000, SIGMA) を用いた。一次抗体反応後、膜を TTBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄し、二次抗体と室温にて 1 時間反応させた。SV2A に対する二次抗体として、donkey anti-goat IgG-HRP conjugate (1:2000, Santa Cruz Biotechnology) を用い、β-actin に対する二次抗体として、sheep anti-mouse IgG-HRP conjugate (1:2000, GE Healthcare) を用いた。二次抗体反応後、TTBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄した後、膜に発光基質 (EDLTM Western Blotting Detection Regents, Amersham Biosciences) を添加し 1 分間反応させ、ルミノ・イメージアナライザー (LAS-3000, FUJIFILM) を用いて発光検出を行った。その後、Science Lab (Multi Gauge Version2.2, FUJIFILM) を用いて検出バンドを定量した。

負荷タンパク質量を標準化するために、SV2A の検出バンドは β -actin の検出バンドで補正した相対光学密度 (ROD) として数値化した。

2-3 SV2A の免疫組織化学染色 (酵素抗体法)

海馬における SV2A の発現に対する *Sv2a*^{L174Q} 変異の影響を酵素抗体法による海馬切片の免疫組織化学染色により評価した。*Sv2a*^{L174Q} および F344 ラットをペントバルビタール (80 mg/kg, i.p.) にて深麻酔し、正中切開による開胸後、心臓左室から phosphate buffered saline (PBS (-)) および 4 % パラホルムアルデヒド溶液を灌流し、脳を固定した後、摘出した。灌流固定後、摘出した脳を脱水処理し、パラフィン包埋機 (千代田製作所) を用いて、パラフィン包埋ブロックを作成した。パラフィン包埋ブロックからリトラーム (REM-700, YAMATO) を用いて、厚さ 4 μ m のパラフィン切片を作成し伸展させた後、切片をスライドガラスに移し乾燥させた (Fig. 5)。作成した切片に脱パラフィン処理を行った後、水洗し、オートクレーブ (SS-240, TOMY) を用いて賦活化処理 (10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液, pH 6.0) を 10 分間行った。賦活化処理後、冷却し PBS (-) で洗浄後、3 % 過酸化水素水 (Wako) に 10 分間浸漬し、不活化処理を行った。不活化処理後、PBS (-) により洗浄、5 % skim milk (Nacalai Tesque) でブロッキングを 30 分間室温で行った。ブロッキング後、室温にて一次抗体 goat anti-SV2A antibody (1:100, Santa Cruz Biotechnology) と 4 °C 下で 1 晩反応させた。その後、PBS (-) で洗浄し、二次抗体 rabbit anti-goat IgG biotinylated antibody (1:500, Vector Laboratories) を滴下し、室温で 1 時間反応させた後、PBS (-) で洗浄し、アビジン-ビオチン標識酵素複合体 (Avidin-Biotinylated enzyme Complex, Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories) と室温で 1 時間反応させた。その後 PBS (-) で洗浄し、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 溶液 (DAB substrate kit, Vector

Laboratories) を滴下し遮光条件下、室温で 10 分間反応させた後、水洗した。その後、脱水、透徹を行い、カナダバルサム (Wako) で封入を行った。

SV2A の解析部位については海馬歯状回門 (dentate gyrus (DG))、CA3-透明層 (stratum lucidum)、CA3-錐体細胞層 (pyramidal cell layer)、CA1-錐体細胞層 (pyramidal cell layer) の各部位についての光学密度を解析した。撮影には光学顕微鏡 (BH-2, OLYMPUS) にて撮影した。撮影後、SV2A 発現を定量化するために、画像解析ソフト Image J software (version 1.42, the National Institute of Health) を用いた。

2-4 薬物誘発けいれんに対する感受性の評価

Sv2a^{L174Q} ラットのけいれん感受性を評価する目的で、けいれん誘発剤によるけいれん感受性の評価を行った。実験には、*Sv2a^{L174Q}* および F344 ラットを用いた。けいれん誘発剤として、GABA_A 受容体拮抗薬である pentylenetetrazole (PTZ: 30, 35, 40 mg/kg; *Sv2a^{L174Q}* ラット、35, 40, 45, 50 mg/kg; F344 ラット)、ムスカリン性アセチルコリン受容体刺激薬である pilocarpine (50, 100, 200, 400 mg/kg)、電位依存性カリウムチャネル遮断薬である 4-aminopyridine (4-AP: 1, 2, 4, 8 mg/kg) を腹腔内に投与した。PTZ 誘発けいれんは投与後 20 分間、pilocarpine および 4-AP 誘発けいれんは投与後 60 分間、Racine の 6 段階けいれんスコア³⁰⁻³²⁾ を用い、けいれん発作強度を評価した (0: 反応なし、1: 顔面の自動症や耳やひげの攣縮、2: 体軸の引きつり、3: 遅発性のミオクローヌス発作、4: 間代性痙攣、5: 反復性の強直-間代痙攣もしくは致死的なけいれん)。また、けいれん誘発率は、動物がけいれんスコア 3 以上を示した時に、けいれん有と判定した。

2-5 Pentylenetetrazole の累積投与法によるけいれん感受性の評価

Sv2a^{L174Q} 変異による PTZ 誘発けいれんの発作閾値に対する影響を評価する目的で、*Sv2a^{L174Q}* および F344 ラットに対して PTZ の累積投与を行った。それぞれの動物に対して、PTZ (10, 20, 30 mg/kg) を低用量より順に 30 分間隔で腹腔内投与を行った。PTZ 誘発けいれんは投与後 10 分間、2-4 項で示した 6 段階けいれんスコアを用い、けいれん発作強度を評価した。また、けいれん誘発率も 2-4 項と同様の方法で評価した。

2-6 キンドリング形成に対する感受性評価

2-6-1 Pentylentetrazole キンドリング形成に対する感受性評価

Sv2a^{L174Q} ラットのキンドリング形成に対する感受性を評価する目的で、全般発作モデルである PTZ キンドリングモデルにより評価を行った。*Sv2a^{L174Q}* および F344 ラットに対して、PTZ を低用量である 30 mg/kg で、1 日 1 回腹腔内に投与した。PTZ 投与後 20 分間の行動観察を行い、けいれん強度を 2-4 項で示したけいれんスコアを用いて評価した。また、けいれん誘発率も 2-4 項と同様の方法で評価した。

2-6-2 扁桃核キンドリング形成に対する感受性評価

2-6-2-1 刺激電極および脳波記録電極の慢性埋め込み手術

Sv2a^{L174Q} および F344 ラットにペントバルビタール麻酔 (40 mg/kg, i.p.) を施し、頭部を脳定位固定器 (SR-6, Narishige) に固定した。次いで、頭皮を正中線切開して頭蓋骨を露出した後、記録電極を刺入する扁桃体外側基底核 (bregma より後方に 2.2 mm、左横に 4.8 mm、脳硬膜より深さ 7.2 mm の位置) にドリルで小穴を開け、4 極電極を刺入した。また、前頭葉皮質上の頭蓋骨に小穴をあけ、記録用銀電極を留置した。不関電極は頭蓋骨上に留置し、さらに、アース電極

は動物の皮下に挿入した。それぞれの電極はミニチュアソケットに接着し、その周囲をデンタルセメントで頭蓋骨上に固定した (Fig. 6A)。それぞれの動物を約 1 週間の術後回復期を経てから実験に使用した。

2-6-2-2 扁桃核電気刺激によるキンドリング形成に対する感受性評価

手術後から回復期間後に、電気シールドを施した測定ケージ (28 cm × 45 cm × 20 cm) に動物を置き、無麻酔・非拘束下で脳波測定を行った。大脳皮質および扁桃核の脳波信号は、高感度増幅器 (MEG-6108, Nihon Kohden) を用いて増幅し、サーマルアレイレコーダー (RTA-1100, Nihon Kohden) 上に記録した。高頻度刺激 (持続時間 1 msec, 60 Hz, 1 sec) を扁桃核に留置した電極より与え、後発射が誘発されるまで、5 分毎に 50 μ A ずつ電流を上昇させた。刺激閾値電流は、後発射 (少なくとも 5 sec の持続時間) が誘発される最小電流値と定義した。扁桃核の電気刺激によるキンドリング形成に対する感受性を評価するために、それぞれの動物で測定した閾値電流の 130 % 値で、平日 2 週間毎日扁桃核に電気刺激を行った (Fig. 6B)。それぞれの電気刺激時に、扁桃核の電気刺激後よりけいれん強度を Racine のスコア^{33,34)} を用いて評価した (1: 無動、閉眼、ひげの攣縮もしくは顔面の間代性けいれん、2: 顔面の間代性けいれんを伴った頭部攣縮、3: 片前肢の間代発作、4: 立ち上がりが見られる両前肢の間代発作、5: 立ち上がりおよび転倒が見られる全般化間代発作)。さらに、後発射持続時間をけいれん強度と併せて評価した。

2-7 統計学的処理

実験結果は、平均値 \pm 標準誤差で示した。2 群間のけいれんスコアの比較は Mann-Whitney's U 検定 (ノンパラメトリック)、脳内および海馬における SV2A

の発現レベルおよび扁桃核キンドリングにおける後発射持続時間の比較は Student's t-test (パラメトリック)、けいれん発現率の比較はカイ二乗検定により行った。以上の検定において、 $p < 0.05$ のとき、有意差ありと判定した。

3. 結果

3-1 *Sv2a*^{L174Q} ラットの遺伝子変異

京都大学医学部附属動物実験施設と共同し、SV2A 遺伝子に変異を導入した *Sv2a*^{L174Q} ラットを作出した。*Sv2a*^{L174Q} ラットは、通常の飼育環境下の異常行動 (e.g. 発作や運動障害、興奮および鎮静) を示さない。雌雄両方とも *Sv2a*^{L174Q} ラットは生殖可能であり、通常の発達を示した (e.g. 体重の増加)。遺伝子解析の結果から、*Sv2a* に導入された変異は T521A の一塩基変異であることが明らかとなり、この変異により SV2A の第一膜貫通領域に L174Q のミスセンス変異が起こった (Fig. 4A, 4B)。この 174 番目のロイシンは全ての脊椎動物で高く保存されているアミノ酸であり、ラット SV2B においても保存されている (Fig. 4C)。以前報告された SV2A のノックアウト-レスキュー実験より、第一貫通膜領域の隣接する極性アミノ酸 (D179, E182) は正常な SV2A の機能 (抑制性伝達物質の遊離) とシナプス小胞膜への局在に不可欠であることが示されており¹⁶⁾、*Sv2a*^{L174Q} ラットの変異も SV2A の機能に影響を及ぼすと推察された。実際に、*Sv2a*^{L174Q} 変異による影響を *in silico* SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) 予測により解析した結果 (<http://sift.jcvi.org/>)、L174Q 変異は "intolerant (機能異常)" と判定され、蛋白の構造や機能に大きな影響を与えることが予測された。

3-2 *Sv2a*^{L174Q} 変異による脳内および海馬における SV2A の発現変動

脳内における SV2A の発現に対する *Sv2a*^{L174Q} 変異の影響を Western blot 法によ

り検討した。*Sv2a^{L174Q}* および F344 ラットのいずれの脳部位においても SV2A は約 90 kDa 付近にシングルバンドとして検出された (Fig. 7)。SV2A の発現レベルは線条体および海馬、中脳、小脳において比較的 low、大脳皮質および視床、視床下部、橋・延髄において比較的多く見られた (Fig. 7)。次に、各脳部位における SV2A の発現量を *Sv2a^{L174Q}* および F344 ラットの両群間で比較検討した結果、各脳部位における SV2A の発現において両群間で有意な変化は認められなかった (Fig. 7)。

さらに、てんかんの病態生理と深く関わる海馬に着目し、海馬における SV2A 発現量を細胞レベルで検討する目的で、*Sv2a^{L174Q}* および F344 ラットの海馬切片を用いて抗 SV2A 抗体による免疫組織染色を行った。

Sv2a^{L174Q} および F344 ラットの海馬薄切片における SV2A 免疫染色の結果、以前の報告と同様に、いずれの動物においても SV2A は主として歯状回門部、CA3 領域の透明層および錐体細胞層の細胞体周囲、CA1 領域の錐体細胞層の細胞体周囲において、高い発現分布を示した¹⁷⁾ (Fig. 8)。さらに、これら領域における SV2A 発現量を *Sv2a^{L174Q}* および F344 ラットの両群間で比較した結果、いずれの部位においても、SV2A 発現レベルおよび発現パターンに有意な変化は認められなかった (Fig. 9)。

3-3 *Sv2a^{L174Q}* 変異による薬物誘発けいれんに対する感受性の変化

3-3-1 Pentylentetrazole 誘発けいれんに対する感受性の変化

Sv2a^{L174Q} 変異によるけいれん感受性を調べる目的で、けいれん誘発剤である PTZ に対する発作感受性を単回投与実験により評価した。その結果、*Sv2a^{L174Q}* ラットは PTZ 誘発けいれんに対して高い感受性を示した。特に、35 および 40 mg/kg の PTZ において有意に高いけいれんスコア (35 mg/kg : $U(17) = 20.5, p <$

0.05, 40 mg/kg : $U(17) = 12.0, p < 0.01$)、加えて、40 mg/kg の PTZ を処置した場合では有意に高いけいれん誘発率を示した ($X^2 = 6.34, p < 0.01$) (Fig. 10)。

3-3-2 Pilocarpine 誘発けいれんに対する感受性の変化

3-3-1 項同様に、 $Sv2a^{L174Q}$ 変異による pilocarpine 誘発けいれんに対する発作感受性を単回投与実験により評価した。その結果、 $Sv2a^{L174Q}$ 変異は pilocarpine 誘発けいれんに対する発作感受性に有意な影響を与えないことが明らかとなった (Fig. 11)。

3-3-3 4-Aminopyridine 誘発けいれんに対する感受性の変化

3-3-1 項および 3-3-2 項同様に、 $Sv2a^{L174Q}$ 変異による 4-AP 誘発けいれんに対する発作感受性を単回投与実験により評価した。その結果、 $Sv2a^{L174Q}$ 変異は 4-AP 誘発けいれんに対する発作感受性に有意な影響を与えないことが明らかとなった (Fig. 12)。

3-3-4 Pentylentetrazole の累積投与に対する感受性の変化

PTZ 誘発けいれんの発作閾値に対する $Sv2a^{L174Q}$ 変異の影響を評価する目的で、PTZ の累積投与によりけいれん発作発現閾値の変化を評価した。その結果、 $Sv2a^{L174Q}$ および F344 ラットの両群とも、10 mg/kg および 20 mg/kg の PTZ の累積投与では、PTZ により誘発される運動興奮症状は認められなかった。しかし、30 mg/kg の PTZ を累積投与した際に、 $Sv2a^{L174Q}$ ラットはスコア 3 以上のけいれん発作を 7 個体中 5 個体で誘発した。一方、F344 ラットではけいれん発作を示さず、 $Sv2a^{L174Q}$ ラットは有意に高いけいれん誘発率 ($X^2 = 5.00, p < 0.05$)、発作スコア ($U(12) = 7.00, p < 0.05$) および持続時間 ($t(12) = 2.90, p < 0.05$) を示した

(Fig. 13, 14)。

3-4 *Sv2a*^{L174Q}変異によるキンドリング形成に対する感受性の変化

Sv2a^{L174Q}変異によるキンドリング形成に対する影響を、全般化発作モデルである PTZ キンドリングモデルおよび焦点発作モデルである扁桃核キンドリングモデルにより評価した。

3-4-1 Pentylentetrazole の反復投与によるキンドリング形成に対する感受性評価

3-3-1 項における PTZ の単回投与による PTZ 誘発けいれんに対する感受性評価の結果をうけ、低用量である 30 mg/kg の PTZ を、1 日 1 回 PTZ を腹腔内に投与した。その結果、*Sv2a*^{L174Q}ラットはキンドリング形成に対して高い感受性を示した。PTZ 投与 2 日目までは、*Sv2a*^{L174Q}ラットおよび F344 ラット間でけいれんスコアに有意な変化が見られなかった。しかしながら、*Sv2a*^{L174Q}ラットのけいれんスコアの上昇は、PTZ 投与 3 日目より F344 ラットと比較して、有意に上昇し、9 日目において 3.38 ± 0.26 を示した (c.f. F344 ラット: 1.38 ± 0.26)。PTZ 誘発けいれん発現率もまた、F344 ラットと比較して *Sv2a*^{L174Q}ラットではるかに高い値を示した ($X^2 = 11.58, p < 0.01$)。一方で、F344 ラットにおいては PTZ 投与期間内で、けいれん発作を示した個体はいなかった (Fig. 15)。

3-4-2 扁桃核の電気刺激によるキンドリング形成に対する感受性評価

3-4-1 項に加え、扁桃核の電気刺激によるキンドリング形成の感受性に対する *Sv2a*^{L174Q}変異の影響を評価した。無麻酔・非拘束下状態の動物の扁桃核に高頻度の電気刺激を加えると、一般症状に影響を与えることなく、発作性の後発射が誘発されたが、*Sv2a*^{L174Q}および F344 ラット間で後発射閾値電流に有意な変化

が認められなかった ($Sv2a^{L174Q}$ ラット: $252.00 \pm 45.42 \mu\text{A}$, $n = 12$, F344 ラット: $252.08 \pm 39.58 \mu\text{A}$, $n = 11$)。しかし、 $Sv2a^{L174Q}$ 変異はキンドリング形成を有意に促進させ、 $Sv2a^{L174Q}$ ラットは F344 ラットと比較して、より急速かつ高いけいれんスコアの上昇を示した (Fig. 16, 17)。また、後発射持続時間も $Sv2a^{L174Q}$ 変異により有意に延長し、特にキンドリングの後期において、有意な後発射の延長が認められた (Fig. 16, 17)。

4 考察

本研究では、 $Sv2a^{L174Q}$ 変異を持つ SV2A に関連したてんかん病態の新たなモデルラットを作成することに成功した。この L174Q 変異は第一膜貫通領域に位置しており、174 番目のロイシンは様々な種で高く保存されている領域である (Fig. 4C)。従って、この 174 番目のロイシンは SV2A の機能に重要な役割を果たすアミノ酸であることが考えられる。以前のノックアウト-レスキュー技術を用いた研究¹⁶⁾では、第一膜貫通領域の隣接する 2 つの極性アミノ酸の変異 (D179A, E182A) は、SV2A の神経細胞内におけるシナプス小胞への局在や抑制性のシナプス伝達機能に大きな影響を与えることが示されていた。 $Sv2a^{L174Q}$ ラットの変異アミノ酸であるロイシンは酸性アミノ酸ではないものの、極性を有するアミノ酸であるため、以前の報告と同様に、 $Sv2a^{L174Q}$ 変異はその蛋白構造の変化などによって、小胞膜への移動や局在に影響を与えうることが考えられる。また、これらの報告と一致して、*in silico* SIFT 予測の結果より、 $Sv2a^{L174Q}$ 変異が “intolerant (機能異常)” と判定され、蛋白の構造および機能に大きな影響を与えることが予測された。

行動表現型解析より $Sv2a^{L174Q}$ 変異は PTZ に対するけいれん感受性を上昇させ、さらに、キンドリングモデルにおいて、全般発作モデル (PTZ キンドリング) お

よび焦点発作モデル (扁桃核キンドリング) の両方でてんかん原性を顕著に促進させることが明らかとなった。以前の研究より、SV2A をノックアウトした動物は生後 3 週間以内で激しい発作を起こして死亡することが報告されている^{12,13)}。一方で、SV2A ヘテロ欠損マウスは自然発症のけいれん発作を示さないが、薬物誘発けいれんおよびキンドリング形成に対して高い感受性を示すことが報告されている²⁵⁾。これらの動物と比較すると、Sv2a^{L174Q} 変異ラットの行動表現型は、SV2A 欠損マウスのものと類似しており、Sv2a^{L174Q} 変異による SV2A 機能の部分的な損失によるものである可能性があることが考えられた。

本研究で、SV2A とてんかん原性の関連が明らかとなった。臨床研究において、ヒトにおいても SV2A とてんかん原性の関連が報告されており、内側側頭葉てんかん患者および難治性てんかん患者、てんかん原性の原因となる皮質異形成症および海馬硬化症において、SV2A の発現が低下していることが報告されている^{19-22,28)}。さらに、SV2A のミスセンス変異 (R383Q) は難治性てんかんや不随意運動、小頭症、発達遅滞を引き起こすことが報告され²⁸⁾、ヒトのてんかん患者においても SV2A の遺伝子変異がてんかんの発症と関連することが示された。これらの知見からも、本モデルが SV2A の機能異常に起因するてんかんの研究に有用であることが考えられる。しかし、SV2A の機能異常が部分発作 (単純発作、複雑部分発作、二次性発作など) あるいは全般発作 (強直—間代性発作、欠神発作、ミオクロニー発作など) のどのタイプの発作の病態生理に関与しているのかについては未だ不明な点が多く、さらなる臨床研究が必要と考えられる。さらに、SV2A に作用点を有する LEV などのラセタム系抗てんかん薬の作用メカニズムを詳細に解析する上でも、本モデルは有用であることが考えられる。

5 結語

本研究結果より、*Sv2a*^{L174Q}変異は、脳内における SV2A の発現に影響を与えることなく、けいれん感受性を著しく亢進させ、さらに、てんかん原性を促進させることが明らかとなった。

第2章 *Sv2a^{L174Q}* ラットにおける pentylenetetrazole 誘発けいれんの

発作焦点部位の探索

1 緒言

第1章の3-3-4項で、*Sv2a^{L174Q}* ラットは30 mg/kgのPTZを累積投与した際に、有意に高いけいれん感受性を示し、*Sv2a^{L174Q}* 変異がPTZにより誘発されるけいれん発作の発現閾値を低下させることを見出した。

そこで、本章では、PTZ誘発けいれんの発作発現閾値において、脳内の発作焦点部位を、神経の興奮マーカーとして広く使用されているFos蛋白を指標とした免疫組織化学的手法により、さらなる検討を加えた。

2 実験方法

2-1 使用動物

実験には、雄の*Sv2a^{L174Q}* ラットおよび対照動物としてF344ラット（日本SLC）を使用した。*Sv2a^{L174Q}* ラットは、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」（拠点：京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設）より提供を受けた。入手した動物は、一定の照明サイクル（明期：08:00時より12時間）、恒温（ 24 ± 1 °C）、恒室（ 55 ± 5 %）の飼育室において、標準固形飼料（オリエンタル酵母社製）および水道水を自由に摂取させた環境下で一週間以上予備飼育した後、実験に供した。

2-2 Fos蛋白を指標とした脳内興奮部位の探索

第1章の3-3-4項に引き続き、30 mg/kgのPTZを腹腔内に投与してから2時間後に、動物をペントバルビタール（80 mg/kg, i.p.）にて深麻酔し、次いで開胸後、心室より4%ホルムアルデヒド液を灌流して脳を固定し、摘出した。

摘出脳より 30 μm の冠状切片をマイクロスライサー (DK-3000, Dosaka EM Co., Ltd., Kyoto) により作成し、抗 Fos 抗体 (1:4000; Santa Cruz Biotechnology) を用いて ABC 法に従い、浮遊法により Fos 蛋白を免疫染色した。Fos 発現の解析では、1) 大脳皮質領域: mPFC (内側前頭前皮質)、CgC (帯状回皮質)、MC (大脳皮質運動野)、SC (大脳皮質体性感覚野)、AIC (無顆粒島皮質)、Pir (梨状葉皮質)、AuC (聴覚皮質)、PRh-Ent (嗅覚-嗅内皮質)、2) 大脳基底核および大脳辺縁系領域: AcC (側坐核コア領域)、AcS (側坐核シェル領域)、dlST (背外側線条体)、dmST (背内側線条体)、GP (淡蒼球)、LS (外側中隔核)、CA (海馬アンモン角)、DG (海馬歯状回門部)、PMCo (扁桃体内側皮質核)、BMA (扁桃体基底内側核)、BLA (扁桃体基底外側核)、3) 間脳領域: LHb (外側手綱核)、PT (視床紐傍核)、AM (視床前内側核)、CM (視床正中中心核)、VM (腹内側視床核)、AH (視床下部前核)、PH (視床下部後核)、DMH (視床下部背内側核) の全 34 か所について、 $350 \times 350 \mu\text{m}^2$ の grid 内に含まれる Fos 免疫陽性細胞数を計測した (Fig. 18)。

2-3 統計学的処理

実験結果は、平均値 \pm 標準誤差で示した。2 群間の Fos 発現の比較には Student's t-test (パラメトリック) を行った。以上の検定において、 $p < 0.05$ のとき、有意差ありと判定した。

3 結果

3-1 けいれん発作閾値における脳内興奮部位の探索

第 1 章の 3-3-4 項において、PTZ を累積投与した動物の各脳部位における Fos 免疫陽性細胞数の計測を行った。

3-1-1 大脳皮質領域における Fos 蛋白発現解析

けいれんスコア 3 以上を呈した *Sv2a^{L174Q}* ラットの 大脳皮質領域においては、F344 ラットのものと比較して、大脳皮質体性感覚野 (SC) および梨状葉皮質 (Pir) において、Fos 免疫陽性細胞数の有意な発現上昇が認められた。また、有意差は認められないものの、前頭葉、頭頂葉、後・側頭葉にわたる広範囲で Fos 蛋白発現の上昇傾向が認められた (Fig. 19)。

3-1-2 大脳辺縁系および大脳基底核における Fos 蛋白発現解析

大脳辺縁系領域である扁桃体基底内側核 (BMA) および扁桃体皮質核 (PMCo) において、Fos 陽性細胞数の有意な発現上昇が認められた (Fig. 20, 21)。

大脳基底核領域である外側中隔核 (LS) のみ、Fos 免疫陽性細胞数の増加傾向が認められたが、この変化は有意なものではなかった (Fig. 21)。

3-1-3 間脳における Fos 蛋白発現解析

間脳領域である外側手綱核 (LHb)、視床下部後核 (PT) および視床下部前 (AH) において、Fos 免疫陽性細胞数の増加傾向が認められたが、この変化は有意なものではなかった (Fig. 22)。

4 考察

第 1 章の 3-3-4 項において、*Sv2a^{L174Q}* 変異は PTZ 誘発けいれんの発作発現閾値を低下させることが示された。さらに本章において、けいれんスコア 3 以上のけいれん発作を誘発した *Sv2a^{L174Q}* ラットおよびけいれん発作を示さなかった F344 ラットを用い、けいれん発作閾値における脳内の発作焦点部位を探索した結果、扁桃核領域、SC および Pir が脳内興奮部位であることが明らかとなった。

本研究で使用した Fos 蛋白は最初期遺伝子の転写産物であり、内因的な要因 (e.g. 記憶学習、報酬、ストレス、疼痛、薬物刺激など) あるいは病態生理的な要因 (てんかん、パーキンソン病や本態性振戦などの運動疾患など) などにより遺伝子の転写および翻訳が活性化されるため、Fos 蛋白は有用な神経興奮マーカーとして幅広く使用されている³⁵⁾。以前の報告では、PTZ を処置した動物の脳内における興奮部位は、海馬 DG、CgC や Pir などの大脳皮質領域、扁桃体尾側核、視床、分界条床核、傍小脳脚外側核、孤束核において Fos 蛋白の発現上昇が認められた^{36, 37)}。これらの報告と比較すると、部分発作の 1 つに分類される側頭葉てんかんと関連する扁桃核および Pir などの大脳皮質領域で共通して Fos 蛋白の発現上昇が認められた³⁸⁾。一方、本研究では側頭葉てんかんと関連している海馬や欠神発作と関連している視床領域においては Fos 蛋白の有意な発現上昇が認められなかった。本研究で用いた PTZ の累積投与はけいれん発作が起り始めである発作閾値を評価する手法であり、海馬および視床の神経を十分興奮させるほどの PTZ の用量ではなかったことが考えられた。

扁桃核は、側頭皮質や視床などへは直接的に、海馬へは間接的に神経の興奮を出力しており、扁桃核が焦点となる内側側頭葉てんかんの場合は、扁桃核神経は異常興奮を示し、その異常な神経興奮は側頭皮質や視床、さらには海馬や大脳皮質領域へと伝播し、発作の全般化を引き起こすことが知られている^{39, 40)}。つまり、以前の報告で見られた海馬や視床などで認められた PTZ 誘発けいれんにおける Fos 蛋白の発現上昇は、本研究で同定した扁桃核および Pir を発作焦点として扁桃核および Pir などの領域を焦点とし、海馬や視床、さらには大脳皮質領域へと神経の過剰興奮が進展したものと考えられた。また、本研究で有意な Fos 発現の上昇を示した SC は強直間代発作などで見られる筋硬直と関連する脳部位であることが知られており⁴¹⁾、本章の結果は第 1 章 3-3-4 項における行

動薬理実験の結果とも相関している。しかし、SCで見られた有意な Fos 発現の上昇は、上述したようにけいれん発作の全般化に伴う神経の興奮を反映していると考えられる。

5 結語

本研究結果より、PTZ 誘発けいれん発現閾値における脳内の発作焦点部位は扁桃核および梨状葉皮質であることが明らかとなった。

第3章 Sv2a^{LI74Q}変異による神経伝達物質のシナプス遊離の変動解析

1 緒言

第1章の3-3および3-4項において、Sv2a^{LI74Q}ラットが高いけいれん感受性およびてんかん原性を示すことを見出した。

そこで、本章では、Sv2a^{LI74Q}変異による脳内における神経伝達物質の遊離に対する影響を評価した。具体的には、てんかん病態の発症および進展に関わる脳領域であると考えられている扁桃核および海馬における神経伝達物質の遊離機能を、微小透析法 (*in vivo* microdialysis 法) により検討を行った。

2 実験方法

2-1 使用動物

実験には、雄の Sv2a^{LI74Q}ラットおよび対照動物として F344 ラット (日本 SLC) を使用した。Sv2a^{LI74Q}ラットは、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(拠点: 京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設)より提供を受けた。入手した動物は、一定の照明サイクル (明期: 08:00 時より 12 時間)、恒温 (24 ± 1 °C)、恒室 (55 ± 5 %) の飼育室において、標準固形飼料 (オリエンタル酵母社製) および水道水を自由に摂取させた環境下で一週間以上予備飼育した後、実験に供した。

2-2 *In vivo* microdialysis 法を用いた GABA およびグルタミン酸遊離の評価

2-2-1 ガイドカニューレ埋め込み手術

Sv2a^{LI74Q} および F344 ラットにペントバルビタール麻酔 (40 mg/kg, i.p.) を施し、頭部を脳定位固定器 (SR-6, Narishige 製) に固定した。次いで、頭皮を正中

線切開して頭蓋骨を露出した後、ガイドカニューレ (AG-10, Eicom) を刺入する扁桃核 (bregma より後方に 2.8 mm、左横に 4.8 mm、脳硬膜より深さ 6.1 mm の位置)、もしくは、海馬歯状回門部-CA3 領域 (bregma より後方に 5.5 mm、左横に 4.6 mm、脳硬膜より深さ 4.2 mm の位置) にドリルで小穴を開け、ガイドカニューレを刺入した。ガイドカニューレはデンタルセメントで頭蓋骨上に固定した (Fig. 23A, 24A)。

2-2-2 GABA およびグルタミン酸遊離の変動解析

ガイドカニューレの埋め込み手術を施した動物は約 1 週間の術後回復期を経たから microdialysis 実験に用いた。非麻酔下において、膜長 2.0 mm のマイクロダイアリシスプローブ (AI-10-02, Eicom) をガイドカニューレ先端より透析膜部分が突出するように挿入し、artificial cerebrospinal fluid (CSF: NaCl 140 mM, KCl 2.4 mM, MgCl₂ 1.0 mM, CaCl₂ 1.2 mM, NaHCO₃ 5.0 mM) を 2 時間灌流させ、馴化した。測定では、CSF をマイクロシリンジ (2.5 mL, HAMILTON) に充填し、マイクロシリンジポンプ (EPS-32, Eicom) を用いて、流速を 1 μ L/min で灌流した。灌流液は 10 分間毎に収集した。

扁桃核における GABA およびグルタミン酸の遊離機能評価では、CSF を馴化後に 1 時間灌流させた後、100 mM 高カリウム溶液 (NaCl 42.4 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 1.0 mM, CaCl₂ 1.2 mM, NaHCO₃ 5.0 mM) を透析プローブより 1 時間灌流投与した。その後、灌流液を CSF に戻し、1 時間灌流した (Fig. 23B)。

また、海馬における GABA およびグルタミン酸の遊離機能評価では、CSF を馴化後に 1 時間灌流させた後、50 mM 高カリウム溶液 (NaCl 92.4 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.0 mM, CaCl₂ 1.2 mM, NaHCO₃ 5.0 mM) を扁桃核の時と同様に、1 時間の灌流投与を行なった。そして、灌流液を CSF に戻し、1 時間灌流した。さ

らにその後、100 mM 高カリウム溶液を同条件下1時間灌流投与した後、さらにCSFを1時間灌流した (Fig. 24B)。得られたダイアリシスサンプル内のGABAおよびグルタミン酸の濃度を *o*-phthalaldehyde (OPA) プレカラム誘導体化法により定量した。

OPA 溶液は、20 mM OPA 10 mL に 20 μ L 2-mercaptoethanol (2-ME) を加えた後、0.5 M K_2CO_3 溶液で希釈し、4 mM OPA 誘導体化試薬とした。測定溶液と OPA 誘導体化試薬を 3:1 の割合で混合し、150 秒間反応させた後にオートサンプリングインジェクター (Eicom, M-500) により HPLC システムへの注入を行い、測定した。HPLC システムは液体クロマトグラフポンプ (EP-700, Eicom)、分離カラム (SC-5 ODS, 3.0 ϕ ×150 mm, Eicom)、恒温槽 (AS ONE)、電気化学検出器 (ECD-100, Eicom) から構成されており、検出データは Date Processor (EPC-500, Eicom) によりコンピュータに送信され、解析には Power Chrom 2.6.2 (eDAQ) を使用した。扁桃核については、サンプル回収3点のピークエリア面積の平均値を100とした時の相対値で評価した。また海馬については、絶対検量線法によりサンプル内のGABAおよびグルタミン酸濃度を算出し、評価した。

2-3 統計学的処理

得られた結果は、平均値 \pm 標準誤差で表した。Microdialysis による定常状態の海馬アミノ酸濃度の比較は、Student's t-test (パラメトリック) により行った。また、扁桃核および海馬のGABAおよびグルタミン酸遊離 (*in vivo* microdialysis) は、まずは2元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合には Tukey 多重比較検定 (パラメトリック) を行った。以上の検定において、 $p < 0.05$ のとき、有意差ありと判定した。

3 結果

3-1 *Sv2a^{L174Q}* 変異による GABA およびグルタミン酸のシナプス遊離変化

3-1-1 扁桃核における GABA およびグルタミン酸遊離の変化

扁桃核における GABA およびグルタミン酸のシナプス遊離に対する *Sv2a^{L174Q}* 変異の影響を評価する目的で microdialysis 実験を行った。

細胞外 GABA レベルは、100 mM カリウム刺激に対して、F344 ラットでは定常状態より約 80 - 100 倍程度まで増加した。一方、*Sv2a^{L174Q}* ラットでは定常状態より約 25 - 30 倍程度まで増加することが明らかとなり、F344 ラットの結果と比較して有意な低下を示した (Fig. 25)。

また、細胞外グルタミン酸レベルは、100 mM カリウム刺激に対して、F344 ラットでは定常状態より約 6.9 - 10.3 倍程度増加した。一方、*Sv2a^{L174Q}* ラットでは、定常状態より約 6.1 - 7.9 倍程度増加し、F344 ラットと比較して約 0.77 - 0.88 倍程度の値を示した。しかしながら、有意な変化は認められなかった (Fig. 26)。

3-1-2 海馬における GABA およびグルタミン酸遊離の変化

海馬における GABA およびグルタミン酸のシナプス遊離に対する *Sv2a^{L174Q}* 変異の影響を、3-1-1 項同様に microdialysis 実験により評価した。

定常状態の細胞外 GABA およびグルタミン酸レベルを比較検討した結果、*Sv2a^{L174Q}* ラットの細胞外 GABA レベルは 28.1 ± 18.9 nM であり、F344 ラットのもの (42.3 ± 13.4 nM) と比較した場合に有意な変化は認められなかった。同様に、*Sv2a^{L174Q}* ラットにおける細胞外グルタミン酸レベルは 640.2 ± 295.1 nM であり、F344 ラットのもの (689.0 ± 151.3 nM) と比較した場合に有意な変化は認められなかった (Table 1)。

続いて、脱分極刺激により誘発される GABA およびグルタミン酸のシナプス

分泌機能を評価する目的で、高カリウム (50 および 100 mM) 溶液灌流時の細胞外 GABA およびグルタミン酸レベルを比較検討した。

脱分極刺激により誘発される GABA 遊離を比較検討した結果、F344 ラットは低用量 (50 mM) の高カリウム刺激に対して、細胞外 GABA レベルが約 410 - 490 nM 程度まで増加した。一方、*Sv2a^{L174Q}* ラットでは細胞外 GABA レベルが約 170 - 290 nM 程度まで増加し、F344 ラットと比較した場合、低下傾向は認められたものの、有意な差ではなかった。さらに、高用量 (100 mM) の高カリウム刺激に対して、F344 ラットの細胞外 GABA レベルは約 1990 - 2110 nM 程度まで増加した。一方、*Sv2a^{L174Q}* ラットでは、細胞外 GABA レベルが約 1080 - 1250 nM 程度まで増加し、F344 ラットの結果と比較して有意に低いものであった。この結果より、*Sv2a^{L174Q}* ラットは F344 ラットと比較して、高用量の高カリウム刺激に対する GABA のシナプス遊離機能が約 0.55 - 0.60 倍程度に低下していることが明らかとなった (Fig. 27)。

また、脱分極刺激により誘発されるグルタミン酸遊離について比較検討した結果、F344 ラットは低用量の高カリウム刺激に対して、細胞外グルタミン酸レベルが約 1140 - 1280 nM 程度まで増加した。一方、*Sv2a^{L174Q}* ラットでは、細胞外グルタミン酸レベルは約 800 - 1050 nM 程度まで増加し、F344 ラットと比較した場合、両群間に有意な変化は認められなかった。さらに、高用量の高カリウム刺激に対して、F344 ラットの細胞外グルタミン酸レベルは約 3120 - 4920 nM 程度まで増加した。一方、*Sv2a^{L174Q}* ラットでは、細胞外グルタミン酸レベルは約 3250 - 4170 nM 程度まで増加し、F344 ラットの結果と比較して約 0.85 - 1.05 倍程度の値を示した。しかしながら、両群間に有意な変化は認められなかった (Fig. 28)。

4 考察

Sv2a^{L174Q} 変異は、扁桃核および海馬の両部位において、定常状態レベルに影響を及ぼすことなく、脱分極刺激により誘発される GABA の遊離機能を抑制することが明らかとなった。一方、脱分極刺激によって誘発されるグルタミン酸の遊離機能は *Sv2a*^{L174Q} 変異の影響を示さなかった。以前の報告で、SV2A をノックアウトした動物の海馬 CA3 領域において、活動電位依存的な抑制性シナプス後電流の低下を引き起こされることが示されており¹²⁾、今回の研究結果のそれとよく一致した。SV2A は神経伝達物質のシナプス遊離機構において、1) SNARE complex の形成および維持^{12, 13)}、2) Ca²⁺センサー蛋白質である Syt1 の発現および局在の調節^{16, 23)}、3) シナプス前膜に結合したシナプス小胞の成熟^{16, 23)}、および 4) シナプス前終末における即時小胞プールの維持¹⁴⁻¹⁶⁾ に関与することが報告されており、*Sv2a*^{L174Q} 変異がこれらいずれかの過程を障害するかに関しては、今後さらなる検討を行う必要がある。

Sv2a^{L174Q} 変異は、GABA 遊離の場合とは異なり、扁桃核および海馬の両部位において脱分極により誘発されるグルタミン酸遊離に影響を与えなかった。この結果は、SV2A がマウスの海馬においてグルタミン酸神経のマーカである vesicular glutamate transporter1 (VGLUT1) とほぼ共染色されないという以前に報告した結果と一致している²⁰⁾。一方、扁桃核における SV2A の発現パターンについては未検討であり、さらなる検討が必要と思われる。

本研究より、内側側頭葉てんかんの発作焦点とされている扁桃核および海馬において、*Sv2a*^{L174Q} 変異は SV2A 自身のシナプス遊離機能障害をもたらすこと、さらに、そのシナプス遊離機能障害が GABA 特異的であることを見出した。以前に、我々はマウスの海馬における SV2A の発現パターンを蛍光二重染色法により検討した結果、SV2A が GABA 神経のマーカ蛋白質である glutamate

decarboxylase 1 (Gad 1) と特異的に共発現することを報告しており¹⁸⁾、この知見は、本研究結果で得られた *Sv2a^{L174Q}* 変異で見られる特異的な GABA 遊離機能の障害を裏付ける結果であった。しかしながら、SV2A がほぼすべての神経に発現しているという以前からの概念¹³⁾ と我々の研究結果との間には差異があり、今後さらに、*Sv2a^{L174Q}* ラットの扁桃核および海馬における SV2A の発現パターン (e.g. 発現レベルおよび局在パターン) について、検討する必要がある。

5 結語

本研究結果より、*Sv2a^{L174Q}* 変異は、扁桃核および海馬において、定常状態における GABA およびグルタミン酸の遊離機能に影響を与えることなく、脱分極刺激によって誘発される GABA 遊離を特異的に障害することが明らかとなった。

第4章 *Sv2a^{L174Q}* 変異によるけいれん感受性亢進メカニズムの解析

1. 緒言

第1章において、SV2A 遺伝子にミスセンス変異を有する新たな動物モデルの作成に成功し、これら動物が PTZ に対して高いけいれん感受性を示すこと、さらに、てんかん原性の促進を示すことを明らかにした。さらに、第3章では、*Sv2a^{L174Q}* 変異が扁桃核および海馬において、定常状態における GABA およびグルタミン酸の遊離機能に影響を与えることなく、脱分極刺激により誘発される GABA 遊離の特異的な障害を引き起こすことが示された。

本章では、*Sv2a^{L174Q}* 変異によるてんかん原性の促進メカニズムを明らかとする目的で、免疫組織学的手法によりさらなる検討を加えた。具体的には、扁桃核および海馬のグルタミン酸神経および GABA 神経における SV2A の発現パターンを蛍光二重免疫染色により評価した。さらに、海馬において *Sv2a^{L174Q}* 変異による開口分泌調節蛋白質の発現変動を Western blot 法により解析した。

2. 実験方法

2-1. 使用動物

実験には、雄の *Sv2a^{L174Q}* ラットおよび対照動物として F344 ラット (日本 SLC) を使用した。*Sv2a^{L174Q}* ラットは、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(拠点: 京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設)より提供を受けた。入手した動物は、一定の照明サイクル (明期: 08:00 時より 12 時間)、恒温 (24 ± 1 °C)、恒室 (55 ± 5 %) の飼育室において、標準固形飼料 (オリエンタル酵母社製) および水道水を自由に摂取させた環境下で一週間以上予備飼育した後、実験に供した。

2-2 蛍光抗体法による二重免疫染色

扁桃核および海馬における SV2A と GABA 作動性神経あるいはグルタミン酸作動性神経との共存を調べる目的で、SV2A と GABA 作動性神経のマーカーである Gad 1 あるいはグルタミン酸作動性神経のマーカーである VGLUT1 との蛍光二重染色を行った。

第 1 章の 2-3 項の手順に従い、*Sv2a^{L174Q}* ラットおよび F344 ラットの摘出脳より、厚さ 4 μm のパラフィン切片を作成し、抗原賦活化および 3 % 過酸化水素水による不活化処理を行った。不活化処理後、PBS (-) で洗浄し、8 % normal rabbit serum (NRS) 液でブロッキングを 30 分間室温で行った。ブロッキング後、室温にて一次抗体 goat anti-SV2A antibody (1:500, Santa Cruz Biotechnology) と mouse anti-Gad 1 antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) もしくは mouse anti-VGLUT1 (1:500, Merck Millipore) の混合溶液を滴下し、4 °C 下で約 42 時間反応させた。その後、PBS (-) で洗浄し、二次抗体 rabbit anti-goat antibody FITC conjugate (1:500, Sigma)、rabbit anti-mouse antibody TRITC conjugate (1:500, Sigma) の混合溶液を滴下し、遮光条件下、室温で 3 時間反応させた後、PBS (-) で洗浄した。その後、FluoromountTM (Diagnostic BioSystems) で封入を行い、共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡 (LSM-700 ZEN, Carl Zeiss) により染色像を観察および撮影した。撮影後、SV2A および Gad 1、VGLUT1 の発現を定量化するために、画像解析ソフト Image J software (version 1.42, the National Institute of Health) を用いた。解析部位は、扁桃体外側基底核 (BLA) および海馬歯状回門 (DG) とした。

2-3 Western blot 法による海馬における開口分泌調節蛋白質の発現解析

Sv2a^{L174Q} 変異による海馬での開口分泌調節蛋白質の発現に対する影響を

Western blot 法により解析した。

第 1 章 2-2 項の手順に従い、*Sv2a*^{L174Q} および F344 ラットの海馬抽出試料を調整し、一定量のサンプル抽出試料と sample buffer を 2:3 の割合で混和し、加熱処理 (Syt1 測定時: 95 °C、5 分間; SNARE complex, syntaxin binding protein 1 (Stxbp1), N-ethylmaleimide-sensitive factor alpha (Napa), N-ethylmaleimide-sensitive factor (Nsf), β -actin 測定時: 37 °C、30 分間; SNARE complex 確認時: 100 °C、10 分間) を行った。得られた試料を 7.5 % SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動 (定電流: 40 mA) した後、セミドライ式転写装置 (AE-6677, ATTO) を用いて、PVDF 膜 (Hybond-P, Amersham Biosciences) へ転写 (定電流: 50 mA、60 分間) した。次いで、第 1 章 2-2 項の手順に従い、ブロッキングを行い、ブロッキング後、膜を一次抗体と 4 °C 下で 1 晩反応させた。一次抗体としては、神経伝達物質遊離関連蛋白に対する標識として mouse anti-Syntaxin-1 antibody (1:2000, Santa Cruz Biotechnology)、mouse anti-Stxbp1 antibody (1:2000, Synaptic Systems)、mouse anti-Nsf antibody (1:2000, Synaptic Systems)、mouse anti-Napa antibody (1:2000, Santa Cruz Biotechnology)、mouse anti-Syt1 antibody (1:5000, Synaptic Systems) もしくは mouse anti- β -actin antibody (1:2000, SIGMA) を用いた。一次抗体反応後、膜を TTBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄し、二次抗体と室温にて 1 時間反応させた。 β -actin, Syntaxin-1, Stxbp1, Nsf, Napa, Syt1 に対する二次抗体として、sheep anti-mouse IgG-HRP conjugate (1:2000, GE Healthcare) を用いた。二次抗体反応後、TTBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄した後、膜に発光基質 (EDLTM Western Blotting Detection Regents, Amersham Biosciences) を添加し 1 分間反応させ、ルミノ・イメージアナライザー (LAS-3000, FUJIFILM) を用いて発光検出を行った。その後、Science Lab (Multi Gauge Version2.2, FUJIFILM) を用いて検出バンドを定量した。SNARE complex の測定は、Matveeva EA らの方法⁴²⁾に従って行った。すなわち、

SNARE complex のバンドを SNARE complex を形成している Syntaxin-1 の抗体によって検出し、100 °C による煮沸処理によって消失するバンド成分を SNARE complex と判定した。また、負荷蛋白質量を標準化するために、SNARE complex, Stxbp1, Nsf, Napa および Syt1 のそれぞれの検出バンドは β -actin の検出バンドで補正した相対光学密度 (ROD) として数値化した。

2-4 統計学的処理

得られた結果は、平均値 \pm 標準誤差で表した。Western blot 法および免疫組織化学染色法によるタンパク発現率の比較は、Student's t-test (パラメトリック) により行った。また、全ての検定において、 $p < 0.05$ の場合、有意差ありと判定した。

3 結果

3-1 *Sv2a*^{L174Q} 変異による扁桃核 SV2A の発現パターンへの影響

第3章 3-1-1 項において、*Sv2a*^{L174Q} ラットの扁桃核において、脱分極刺激により誘発される GABA 遊離機能の特異的な障害を見出した。そこで、扁桃核における SV2A の発現パターンに対する *Sv2a*^{L174Q} 変異の影響を蛍光二重免疫染色法により確認した。

初めに、扁桃核における SV2A と GABA 作動性神経との共存を明らかにする目的で、SV2A と GABA 作動性神経マーカーである Gad 1 の二重染色を行った。その結果、*Sv2a*^{L174Q} および F344 ラットの扁桃核では、SV2A は介在神経の核を除く細胞体およびその周囲の軸索に発現が分布していた。Gad 1 においても SV2A と類似した発現様式を示し、merge させた写真から SV2A と Gad 1 の共染色像が認められ、GABA 神経細胞において SV2A が発現していることが確認された (Fig. 29A)。さらに、SV2A および Gad 1 の発現レベルに対する *Sv2a*^{L174Q}

変異の影響を評価した。その結果、*Sv2a^{L174Q}*変異はSV2A および Gad 1 の発現に対して影響を与えないことが確認された (SV2A: *Sv2a^{L174Q}* ラット; 0.14 ± 0.03 , F344 ラット; 0.11 ± 0.03 , Gad 1: *Sv2a^{L174Q}* ラット; 0.16 ± 0.02 , F344 ラット; 0.14 ± 0.02) (Fig. 29B)。

続いて、扁桃核におけるSV2A とグルタミン酸作動性神経との共存を明らかにする目的で、SV2A とグルタミン酸作動性神経マーカーであるVGLUT1の二重染色を行った。その結果、VGLUT1はグルタミン酸作動性の神経終末に染色像を認めたが、SV2Aとの共染色像は得られなかった (Fig. 30A)。同様に、SV2A および Gad 1 の発現レベルに対する *Sv2a^{L174Q}* 変異の影響を評価した。その結果、*Sv2a^{L174Q}* 変異はSV2A および Gad 1 の発現に影響を与えないことが確認された (SV2A: *Sv2a^{L174Q}* ラット; 0.09 ± 0.01 , F344 ラット; 0.12 ± 0.02 , VGLUT1: *Sv2a^{L174Q}* ラット; 0.15 ± 0.01 , F344 ラット; 0.14 ± 0.01) (Fig. 30B)。

3-2 *Sv2a^{L174Q}* 変異による海馬SV2Aの発現パターンへの影響

第3章3-1-2項において、*Sv2a^{L174Q}*ラットの海馬において、脱分極刺激により誘発されるGABA遊離機能の特異的な障害を見出した。そこで、3-1項と同様に、海馬におけるSV2Aの発現パターンに対する *Sv2a^{L174Q}* 変異の影響を蛍光二重免疫染色法により確認した。

歯状回門部におけるSV2A と GABA 作動性神経との共存を明らかにする目的で、SV2A と GABA 作動性神経マーカーである Gad 1 の二重染色を行った。その結果、SV2A は歯状回門部において介在神経の核を除く細胞体およびその周囲の軸索に発現が分布していた。Gad 1 においてもSV2A と類似した発現様式を示し、mergeさせた写真からSV2A と Gad 1 の共染色像が認められ、GABA神経細胞においてSV2Aが発現していることが確認された (Fig. 31A)。また、

SV2A および Gad 1 の発現レベルに対する *Sv2a^{L174Q}* 変異の影響を評価した。その結果、*Sv2a^{L174Q}* 変異による SV2A および Gad 1 の発現に影響を与えないことが確認された (SV2A: *Sv2a^{L174Q}* ラット; 0.15 ± 0.03 , F344 ラット; 0.15 ± 0.04 , Gad 1: *Sv2a^{L174Q}* ラット; 0.11 ± 0.01 , F344 ラット; 0.12 ± 0.01) (Fig. 31B)。

3-3 海馬における開口分泌調節蛋白質の発現に対する *Sv2a^{L174Q}* 変異の影響

第 3 章の 3-1-2 項で、*Sv2a^{L174Q}* 変異は海馬において、特異的な GABA 遊離機能の低下を引き起こすことが明らかとなった。そこで、*Sv2a^{L174Q}* 変異によるシナプス遊離機能異常の原因を明らかとするために、シナプス開口分泌調節蛋白質の発現に着目し、シナプス開口分泌調節蛋白質 (SNARE complex, Stxbp1, Nsf, Napa および Syt1) の発現に対する *Sv2a^{L174Q}* 変異の影響を Western blot 法により検討した。その結果、Syntaxin-1 の抗体によって検出された SNARE complex は、約 70 - 200 kDa 付近に連続的なバンドとして現れた。一方、Stxbp1 (70 kDa 付近)、Nsf (80 kDa 付近)、Napa (30 kDa 付近)、Syt1 (65 kDa 付近) はシングルバンドとして検出された (Fig. 32)。

Sv2a^{L174Q} ラットの海馬における開口分泌関連蛋白質の発現量を F344 ラットと比較した結果、*Sv2a^{L174Q}* ラットの Syt1 発現量は有意に低下しており、その発現レベルは約 0.6 倍程度であった。一方で、SNARE complex、SNARE complex の形成を促進する Stxbp1^{43, 44}、SNARE complex を解離に導く Nsf および Napa^{43, 44} については、*Sv2a^{L174Q}* および F344 ラットの両群間で有意な変化は認められなかった (Fig. 32)。

4 考察

本章において、SV2A が扁桃核および海馬において、グルタミン酸作動性神経ではなく、GABA 作動性の介在神経に特異的に発現分布することが確認された。さらに、*Sv2a^{L174Q}* 変異が扁桃核および海馬における SV2A の発現レベルおよび発現パターンに影響を与えないことが明らかとなった。

Sv2a^{L174Q} および F344 ラットの海馬 DG および扁桃核において、SV2A は GABA 作動性神経マーカーである Gad 1 と共染色されることが確認された。所属研究室では、以前に SV2A はマウスの海馬 DG において大部分が Gad 1 と共染色されることを報告しており、本研究結果と一致している¹⁸⁾。

一方、*Sv2a^{L174Q}* および F344 ラットの扁桃核において、SV2A はグルタミン酸神経のマーカーである VGLUT1 とほとんど共染色されなかった。以前に、グルタミン酸作動性神経線維である苔状線維の投射を受けるマウスの海馬 CA3 領域の透明層において、SV2A が VGLUT1 とほとんど共染色されなかったことを確認している¹⁸⁾。本研究により、扁桃核でも海馬と同様に、SV2A はグルタミン酸神経に発現しないことが明らかとなった。従って、第 3 章で得られた、*Sv2a^{L174Q}* 変異による扁桃核および海馬における特異的な GABA 遊離機能の障害は、SV2A の特異的な GABA 作動性神経への特異的な発現分布によるものと考えられた。

さらに、*Sv2a^{L174Q}* 変異は、海馬において Ca^{2+} 依存的なシナプス小胞の膜融合に関わる Ca^{2+} センサー蛋白の Syt1 の発現を特異的に低下させることが明らかとなった。SV2A によるシナプス遊離の調節に関わる分子メカニズムについては未だ明らかとなっていないが、SV2A は Ca^{2+} センサー蛋白質である Syt1 の発現を調節し、 Ca^{2+} に対する小胞分泌の感受性を変化させる可能性があることを示唆されている^{16, 23)}。従って、*Sv2a^{L174Q}* 変異は、少なくとも部分的に Syt1 の発現低下を介して、GABA 遊離を低下したものと考えられた。*Sv2a^{L174Q}* 変異による SV2A

と Syt1 の相互作用の変化に関しては、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

5 結語

本研究結果より、SV2A は扁桃核および海馬 DG において、GABA 介在神経に特異的な発現を示し、Sv2a^{L174Q} 変異で見られる特異的な GABA 遊離機能障害を裏付ける結果となった。さらに、Sv2a^{L174Q} 変異は海馬における Syt1 の発現を特異的に低下させ、この Syt1 レベルの低下が GABA 遊離機能の障害に関与していることが示唆された。

総括

本研究では、ENU mutagenesis/MuT POWER 法によって作出した新たな動物モデル *Sv2a^{L174Q}* ラットを用いて、てんかんの発症制御における SV2A の役割について検討した。これら *Sv2a^{L174Q}* ラットは、通常飼育下においては何ら異常行動を示さないが、PTZ 誘発けいれんに対して特異的かつ有意な感受性の亢進を示した。さらに、てんかん原性のモデルである PTZ キンドリング (全般性発作型) および扁桃核キンドリング (部分発作型) において、いずれも顕著なキンドリング形成の促進を示した。*Sv2a^{L174Q}* ラットの PTZ 誘発けいれんおよびキンドリング形成に対する感受性の亢進は、以前報告された SV2A ヘテロノックアウトマウスの行動表現型²⁵⁾ と類似するものであった。これらの結果から、*Sv2a^{L174Q}* 変異は、SIFT 解析による機能予測の結果と一致して、機能異常を示す変異であることが個体レベルで明らかとなった。この第一膜貫通領域の 174 番目のロイシンは、哺乳類だけでなく多くの種で高く保存されており、SV2A の機能に必須なアミノ酸であることが考えられる。

SV2A をノックアウトした動物は、発達不全ならびにけいれん発作が認められ、生後数週間で死亡する^{12, 13)}。そのため、SV2A ノックアウトマウスを用いた詳細な行動変化は今まで評価することができなかった。しかし、今回の *Sv2a^{L174Q}* ラットの開発により、てんかん病態における SV2A の機能メカニズムをさらに理解することが可能となった。*Sv2a^{L174Q}* 変異は、脳内の SV2A 発現に影響を及ぼすことなく、側頭葉てんかんの焦点と考えられている扁桃核や海馬において脱分極性の GABA 遊離機能抑制を示した。扁桃核あるいは海馬で見られた GABA 遊離の機能不全は、以前報告された SV2A ノックアウト動物のした海馬神経細胞を用いた電気生理学的検討の結果 (抑制性シナプス後電位の低下¹²⁾) と一致

しており、SV2A の欠損あるいは遺伝子変異が抑制性の GABA 神経伝達を障害することが示される。またこの結果は、扁桃核および海馬において SV2A が GABA 介在神経に特異的な発現を示すことによって裏付けられた。さらに、*Sv2a^{L174Q}* 変異は Ca^{2+} 依存的なシナプス小胞とシナプス前膜の膜融合に関わる Syt1 の発現を特異的に低下させることが明らかとなった。これまでの報告から、Syt1 は SV2A の N 末端領域に結合して相互作用することや、SV2A が Syt1 の発現を調節していることが知られている^{16, 23)}。よって、*Sv2a^{L174Q}* 変異は、海馬において Syt1 の発現を低下させることで、GABA の遊離機能障害を引き起こしていると考えられた。しかし、SV2A-Syt1 間の相互作用に対する *Sv2a^{L174Q}* 変異の影響について、さらなる検討が必要である。

SV2A の発現低下や機能障害は、ヒトの難治性側頭葉てんかんや焦点皮質異形成てんかんと関連があることが示唆されてきた¹⁹⁻²²⁾。さらに、最近の臨床研究では、SV2A 遺伝子のエクソン 5 に含まれる 383 番目のアルギニンからグルタミンのホモ接合体変異が難治性てんかんや重度の精神遅滞を惹起することが示された²⁸⁾。この結果は、SV2A 遺伝子のミスセンス変異がヒトにおいてもてんかん原性を促進させることを示すものであり、*Sv2a^{L174Q}* ラットはヒトのてんかん原性調節における SV2A の機能を解析する上で有用なモデルになりうると考えられる。加えて、SV2A は LEV やその類似化合物 (e.g. brivaracetam, seletracetam) の特異的な作用部位であることが知られており²⁴⁻²⁷⁾、*Sv2a^{L174Q}* ラットはラセタム系化合物の作用機序解析あるいは SV2A に作用する新たな薬物候補をスクリーニングする上で有用なモデル動物である可能性が示された。

結語

てんかん原性調節における SV2A の機能メカニズムを調べる目的で、SV2A 遺伝子にミスセンス変異を導入した *Sv2a^{L174Q}* ラットを作出した。*Sv2a^{L174Q}* ラットは、1) PTZ 誘発けいれんに対する高い感受性、2) キンドリングモデル (e.g. PTZ キンドリング、扁桃核キンドリング) におけるキンドリング形成の促進、3) 扁桃核および海馬における脱分極性 GABA 遊離の特異的な障害や、4) 開口分泌調節に関わる Ca^{2+} センサー蛋白質として知られる Syt1 の特異的な発現低下を示した。本研究から、SV2A は扁桃核および海馬において脱分極性の GABA 遊離を特異的に調節しており、SV2A-GABA 系がてんかん原性に対して抑制的に制御することで、てんかんの発症および進展を抑制していることが明らかとなった。今後、SV2A-GABA 系を促進する薬物が新たなてんかん原性制御系となりうることが期待される。

論文目録

以下に報告論文を記載する。

- 1) Synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) regulates kindling epileptogenesis via GABAergic neurotransmission.

Tokudome K, Okumura T, Shimizu S, Mashimo T, Takizawa A, Serikawa T, Terada R, Ishihara S, Kunisawa N, Sasa M, Ohno Y.

Sci. Rep. 6:27420 (2016).

- 2) A Missense Mutation of the Gene Encoding Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A (SV2A) Confers Seizure Susceptibility by Disrupting Amygdalar Synaptic GABA Release.

Tokudome K, Okumura T, Terada R, Shimizu S, Kunisawa N, Mashimo T, Serikawa T, Sasa M, Ohno Y.

Front. Pharmacol. 7:210 (2016).

以上

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始懇切なる御指導ご鞭撻を賜りました、大野 行弘 教授 (大阪薬科大学 薬品作用解析学研究室) に深甚なる謝意を表します。

また、日常の議論を通じて種々お力添えを頂きました河合 悦子 講師ならびに清水 佐紀 助手 (大阪薬科大学 薬品作用解析学研究室) に深く感謝致します。

また、本研究の遂行に際し、御協力頂きました芹川 忠夫 教授 (疾患モデル研究所、大阪薬科大学 薬品作用解析学研究室)、真下 知士 准教授 (京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設、大阪大学大学院医学研究科附属動物実験施設)、笹 征史 院長 (渚クリニック、広島大学名誉教授)、京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設の先生方ならびに *Sv2a^{L174Q}* ラットを提供して頂いたナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」 (文部科学省) に深謝致します。

最後に、本研究に多大なるご協力を頂戴しました、大阪薬科大学 薬品作用解析学研究室員の皆様に心から感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Remy S, Beck H. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain*. 129: 18-35 (2006).
- 2) Macdonald RL, Kelly KM. Mechanisms of action of currently prescribed and newly developed antiepileptic drugs. *Epilepsia*. 35 Suppl 4: S41-50 (1994).
- 3) Macdonald RL, Greenfield LJ Jr. Mechanisms of action of new antiepileptic drugs. *Curr. Opin. Neurol*. 10: 121-128 (1997).
- 4) Holmes GL, Zhao Q. Choosing the correct antiepileptic drugs: from animal studies to the clinic. *Pediatr. Neurol*. 38: 151-162 (2008).
- 5) Temkin NR, Jarell AD, Anderson GD. Antiepileptogenic Agents: how close are we? *Drugs*. 61: 1045-1055 (2001).
- 6) Bajjalieh SM, Frantz GD, Weimann JM, McConnell SK, Scheller RH. Differential expression of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. *J. Neurosci*. 14: 5223-5235 (1994).
- 7) Bajjalieh SM, Peterson K, Shinghal R, Scheller RH. SV2, a brain synaptic vesicle protein homologous to bacterial transporters. *Science*. 257: 1271-1273 (1992).
- 8) Fancy MB, Lee S, Edwards RH, Buckley KM. The synaptic vesicle protein SV2 is a novel type of transmembrane transporter. *Cell*. 70: 861-867 (1992)
- 9) Bajjalieh SM, Peterson K, Linial M, Scheller RH. Brain contains two isoforms of synaptic vesicle protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:2150-2154 (1993).
- 10) Dong M, Yeh F, Tepp WH, Dean C, Johnson EA, Janz R, Chapman ER. SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science*. 312: 592-596 (2006).

- 11) Jahn R. Neuroscience. A neuronal receptor for botulinum toxin. *Science*. 312: 540-541 (2006).
- 12) Crowder KM, Gunther JM, Jones TA, Hale BD, Zhang HZ, Peterson MR, Scheller RH, Chavkin C, Bajjalieh SM. Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A (SV2A). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 15268-15273 (1999).
- 13) Janz R, Goda Y, Geppert M, Missler M, Südhof TC. SV2A and SV2B function as redundant Ca^{2+} regulators in neurotransmitter release. *Neuron*. 24: 1003-1016 (1999).
- 14) Xu T, Bajjalieh SM. SV2 modulates the size of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Nat. Cell Biol.* 3: 691-698 (2001).
- 15) Custer KL, Austin NS, Sullivan JM, Bajjalieh SM. Synaptic vesicle protein 2 enhances release probability at quiescent synapses. *J. Neurosci.* 26: 1303-1313 (2006).
- 16) Chang WP, Südhof TC. SV2 renders primed synaptic vesicles competent for Ca^{2+} -induced exocytosis. *J. Neurosci.* 29: 883-897 (2009).
- 17) Ohno Y, Ishihara S, Terada R, Kikuta M, Sofue N, Kawai Y, Serikawa T, Sasa M. Preferential increase in the hippocampal synaptic vesicle protein 2A (SV2A) by pentylentetrazole kindling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390: 415-420 (2009).
- 18) Ohno Y, Okumura T, Terada R, Ishihara S, Serikawa T, Sasa M. Kindling-associated SV2A expression in hilar GABAergic interneurons of the mouse dentate gyrus. *Neurosci. Lett.* 510: 93-98 (2012).

- 19) Feng G, Xiao F, Lu Y, Huang Z, Yuan J, Xiao Z, Xi Z, Wang X. Down-regulation of synaptic vesicle protein 2A in the anterior temporal neocortex of patients with intractable epilepsy. *J. Mol. Neurosci.* 39: 354–359 (2009).
- 20) Toering ST, Boer K, de Groot M, Troost D, Heimans JJ, Spliet WG, van Rijen PC, Jansen FE, Gorter JA, Reijneveld JC, Aronica E. Expression patterns of synaptic vesicle protein 2A in focal cortical dysplasia and TSC-cortical tubers. *Epilepsia.* 50: 1409–1418 (2009).
- 21) van Vliet EA, Aronica E, Redeker S, Boer K, Gorter JA. Decreased expression of synaptic vesicle protein 2A, the binding site for levetiracetam, during epileptogenesis and chronic epilepsy. *Epilepsia.* 50: 422–433 (2009).
- 22) Crevecoeur J, Kaminski RM, Rogister B, Foerch P, Vandenplas C, Neveux M, Mazzuferi M, Kroonen J, Poulet C, Martin D, Sadzot B, Rikir E, Klitgaard H, Moonen G, Deprez M. Expression pattern of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms in patients with temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 40: 191–204 (2014).
- 23) Nowack A, Yao J, Custer KL, Bajjalieh SM. SV2 regulates neurotransmitter release via multiple mechanisms. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 299: C960–C967 (2010).
- 24) Lynch BA, Lambeng N, Nocka K, Kensel-Hammes P, Bajjalieh SM, Matagne A, Fuks B. The synaptic vesicle protein 2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 9861–9866 (2004).
- 25) Kaminski RM, Matagne A, Leclercq K, Gillard M, Michel P, Kenda B, Talaga P, Klitgaard H. SV2A protein is a broad-spectrum anticonvulsant target: functional correlation between protein binding and seizure protection in models of both partial and generalized epilepsy. *Neuropharmacology.* 54: 715–720 (2008).

- 26) Pollard JR. Seletracetam, a small molecule SV2A modulator for the treatment of epilepsy. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 9: 101–107 (2008).
- 27) Correa-Basurto J, Cuevas-Hernández RI, Phillips-Farfán BV, Martínez-Archundia M, Romo-Mancillas A, Ramírez-Salinas GL, Pérez-González ÓA, Trujillo-Ferrara J, Mendoza-Torreblanca JG. Identification of the antiepileptic racetam binding site in the synaptic vesicle protein 2A by molecular dynamics and docking simulations. *Front. Cell. Neurosci.* 9: 125 (2015).
- 28) Serajee FJ, Huq AM. Homozygous Mutation in Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A Gene Results in Intractable Epilepsy, Involuntary Movements, Microcephaly, and Developmental and Growth Retardation. *Pediatr. Neurol.* 52: 642–646 (2015).
- 29) Mashimo T, Yanagihara K, Tokuda S, Voigt B, Takizawa A, Nakajima R, Kato M, Hirabayashi M, Kuramoto T, Serikawa T. An ENU-induced mutant archive for gene targeting in rats. *Nat. Genet.* 40: 514–515 (2008).
- 30) Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32: 281–294 (1972).
- 31) Franke H, Kittner H. Morphological alterations of neurons and astrocytes and changes in emotional behavior in pentylenetetrazol-kindled rats. *Pharmacol Biochem Behav* 70: 291–303 (2001).
- 32) Kudryashov IE, Pavlova TV, Kudryashova IV, Egorova LK, Gulyaeva NV. Kindling in the early postnatal period: Effects on the dynamics of age-related changes in electrophysiological characteristics of hippocampal neurons. *Neurosci. Behav. Physiol.* 37: 765–772 (2007).
- 33) Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32: 269–279

- (1972).
- 34) Gonzalez-Trujano ME, Lopez-Meraz L, Reyes-Ramirez A, Aguillon M, Martinez A. Effect of repeated administration of *Annona diversifolia* Saff. (ilama) extracts and palmitone on rat amygdala kindling. *Epilepsy Behav.* 16: 590–595 (2009).
 - 35) Iha HA, Kunisawa N, Tokudome K, Mukai T, Kinboshi M, Shimizu S, Ohno Y. Immunohistochemical analysis of Fos protein expression for exploring brain regions (foci) related to central nervous system (CNS) disorders and drug actions. In Philippu A, editor. *In vivo neuropharmacology and neurophysiology*. New York: Springer (2016) p.p.389-408.
 - 36) Shehab S, Coffey P, Dean P, Redgrave P. Regional expression of fos-like immunoreactivity following seizures induced by pentylentetrazole and maximal electroshock. *Exp. Neurol.* 118: 261-274 (1992).
 - 37) Dragunow M, Robertson HA. Generalized seizures induce c-fos protein(s) in mammalian neurons. *Neurosci. Lett.* 82: 157-161 (1987).
 - 38) McIntyre DC, Gilby KL. Mapping seizure pathways in the temporal lobe. *Epilepsia.* 49 Suppl 3: 23-30 (2008).
 - 39) Bartolomei F, Wendling F, Bellanger JJ, Régis J, Chauvel P. Neural networks involving the medial temporal structures in temporal lobe epilepsy. *Clin. Neurophysiol.* 112: 1746-1760 (2001).
 - 40) Bertram EH. Temporal lobe epilepsy: where do the seizures really begin? *Epilepsy Behav.* 14 Suppl 1: 32-37 (2009).
 - 41) Mareš P, Tichá K, Mikulecká A. Anticonvulsant and behavioral effects of GABA(B) receptor positive modulator CGP7930 in immature rats. *Epilepsy Behav.* 28: 113-120 (2013).

- 42) Matveeva EA, Vanaman TC, Whiteheart SW, Slevin, JT. Asymmetric accumulation of hippocampal 7S SNARE complexes occurs regardless of kindling paradigm. *Epilepsy Res.* 73: 266-274 (2007).
- 43) Jahn R, Scheller RH. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 631-643 (2006).
- 44) Südhof TC, Rothman JE. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science.* 323: 474-477 (2009).

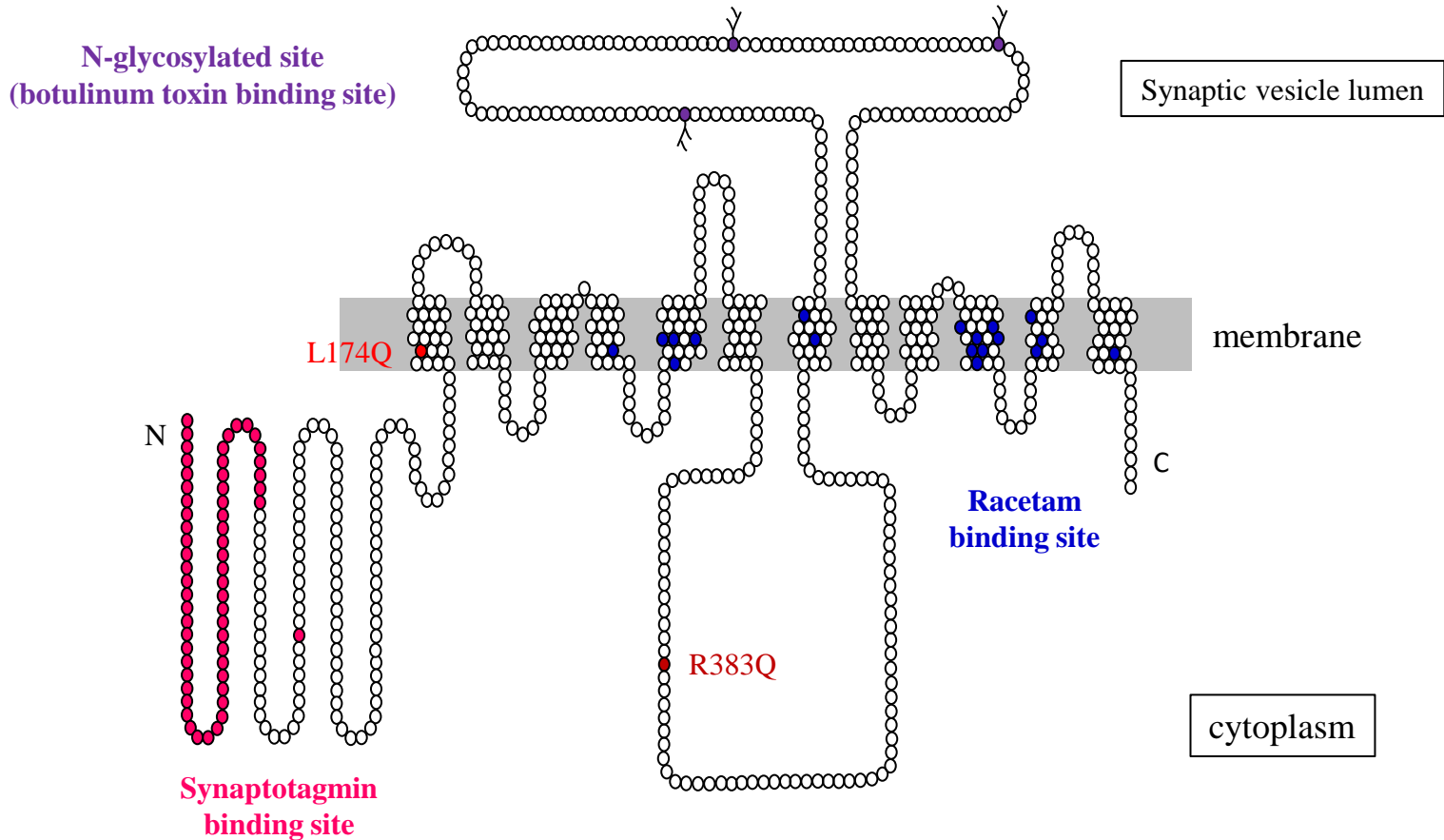


Fig. 1 Structure of synaptic vesicle glycoprotein SV2A.

The SV2A proteins contain 12 transmembrane regions (TMRs) with N- and C-terminal cytoplasmic sequences and a large intravesicular loop that is N-glycosylated. SV2, an integral membrane protein present on synaptic vesicles, is a small gene family consisting of three isoforms, designated SV2A, SV2B, and SV2C. SV2A is the most widely distributed isoform, being nearly ubiquitous in the CNS, as well as being present in endocrine cells.

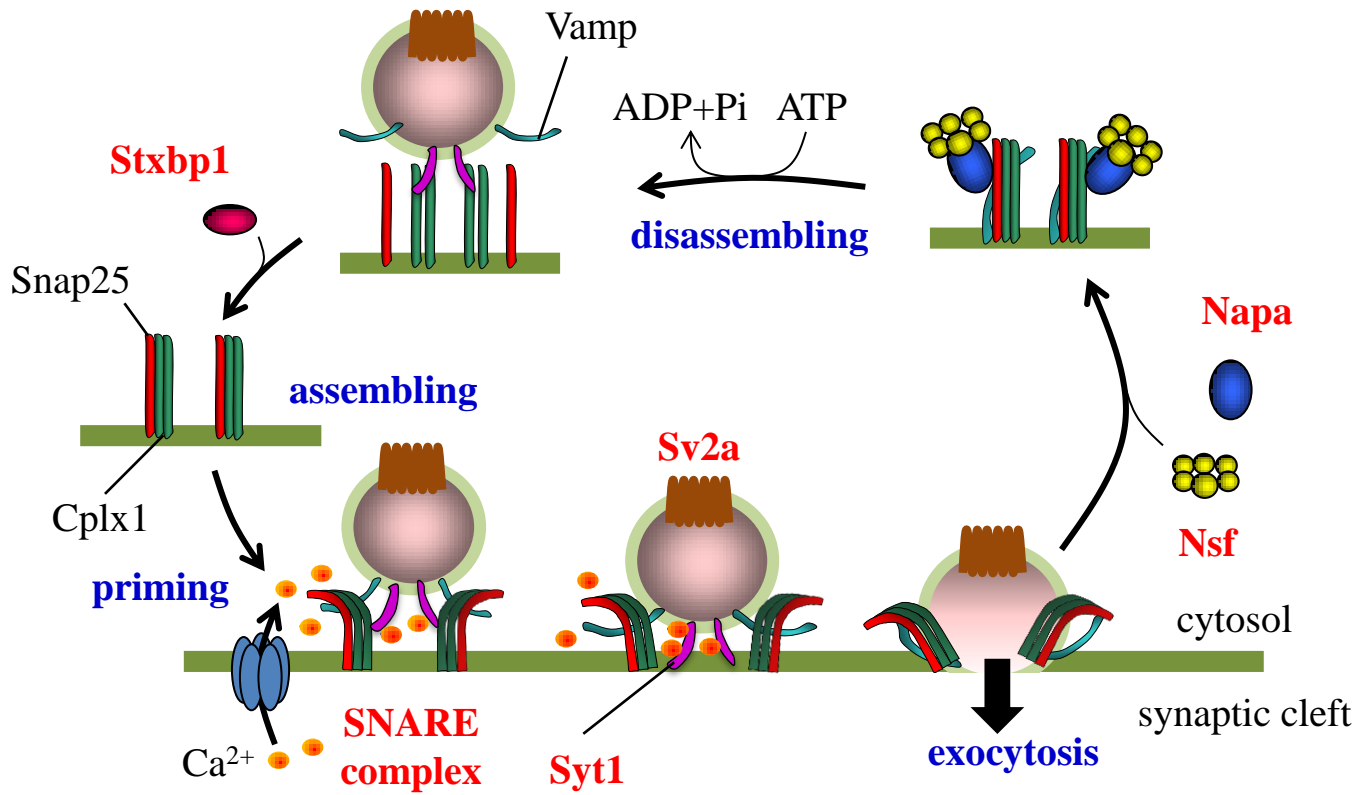


Fig. 2 Exocytosis modulator proteins

Schematic illustrations showing exocytotic process and modulatory proteins. SNARE complex: soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex, Stxbp1: syntaxin binding protein 1, Nsf: N-ethylmaleimide sensitive factor, Napa: N-ethylmaleimide-sensitive factor alpha and Syt1: synaptotagmin1.

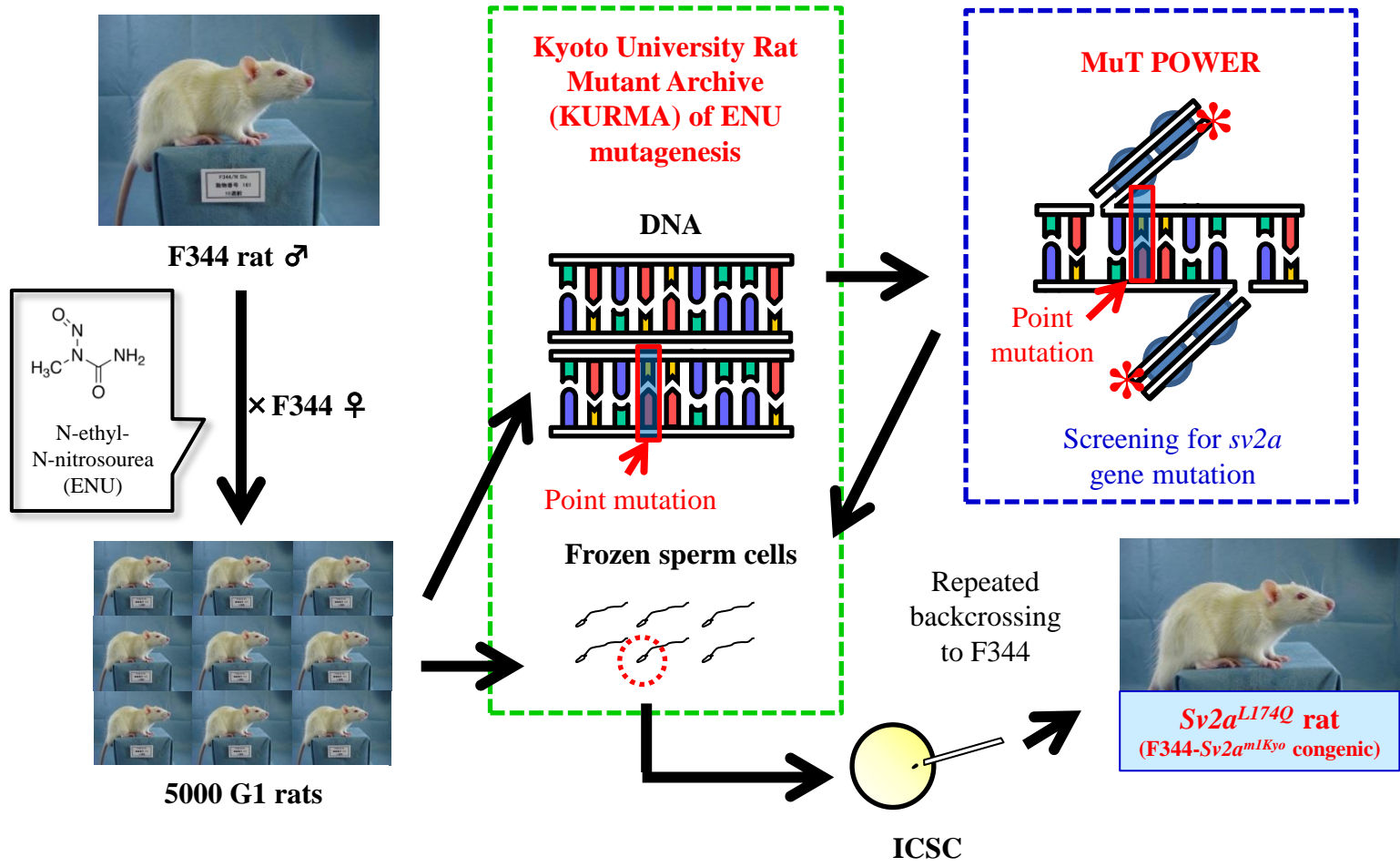
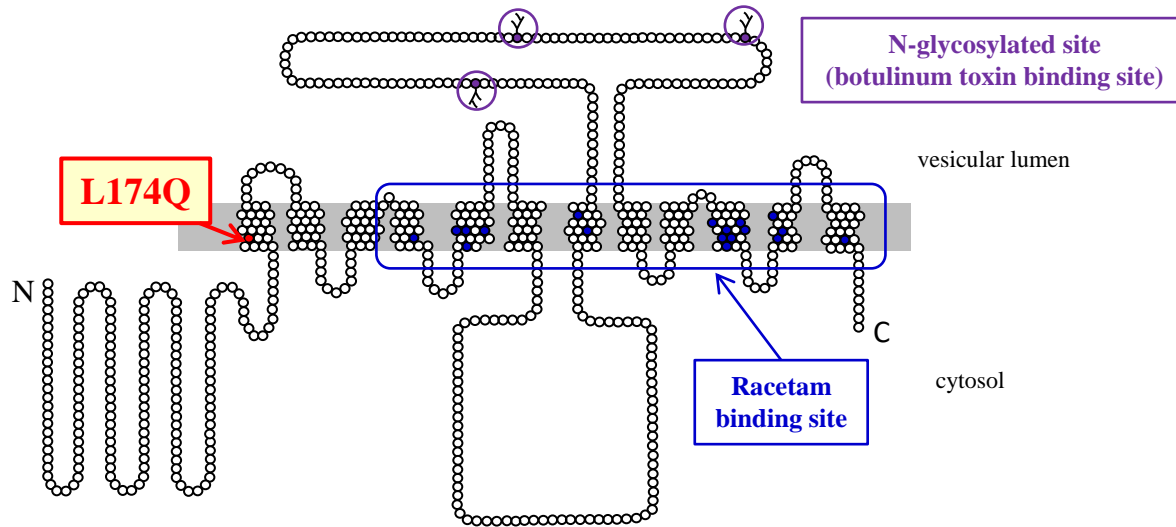
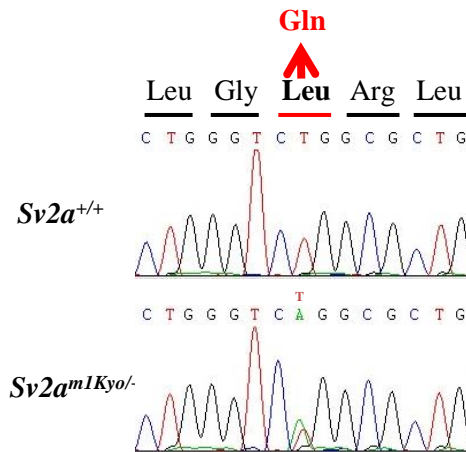


Fig. 3 Generation of *Sv2a*^{L174Q} rats

Diagram showing the process for *Sv2a*^{L174Q} rats. *Sv2a*^{L174Q} rats were generated by ENU mutagenesis / MuT POWER technique (*Nat. Genet.* 40, 514–515). Kyoto University Rat Mutant Archive (KURMA) was constructed by rat DNA with gene mutation and frozen sperm cells from 5000 G1 rats derived from male F344 rats treated with N-nitrosourea and female F344 rats (ENU mutagenesis technique). Then, *Sv2a* gene with point mutation was screened by using MuT POWER technique. After that, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) was conducted by using frozen sperms from the male G1 rat which has *Sv2a* gene mutation. Finally, *Sv2a*^{L174Q} rats (F344-*Sv2a*^{m1Kyo} congenic) were obtained by repeated backcrossing to F344 rats.

A**B****C**

Transmembrane domain

190	170
Rat_Sv2a	FVLGLA I MADGVEVFVVG FVL
Mouse_Sv2a	FVLGLA I MADGVEVFVVG FVL
Human_Sv2a	FVLGLA I MADGVEVFVVG FVL
Bovin_Sv2a	FVLGLA I MADGVEVFVVG FVL
Rabbit_Sv2a	FVLGLA I MADGVEIFVVG FVL
Frog_Sv2a	FVLGLA I MADGVEIFVVG FVL
Fugu_Sv2a	FVLGLA I MADGVEIFVVG FVL
Rat_Sv2a	FVLGLA I MADGVEVFVVG FVL
Rat_Sv2b	FVLVLA I MADGVEVFVVS FAL
Rat_Sv2c	FVLGMA I MADGVEVFVVG FVL

Fig. 4 SV2A structure of Sv2a^{L174Q} rats.

A: SV2A structure showing the mutation site L174Q of Sv2a^{L174Q} rats. Glycosylation sites in a long intravesicular loop (purple) and putative binding sites for levetiracetam (blue) are also indicated. **B:** Sequence analysis for the point mutation of the Sv2a gene, illustrating the presence of a single nucleotide mutation T521A. **C:** Alignment analysis of SV2A amino acid sequences in various vertebrate species and in the rat SV2 family.

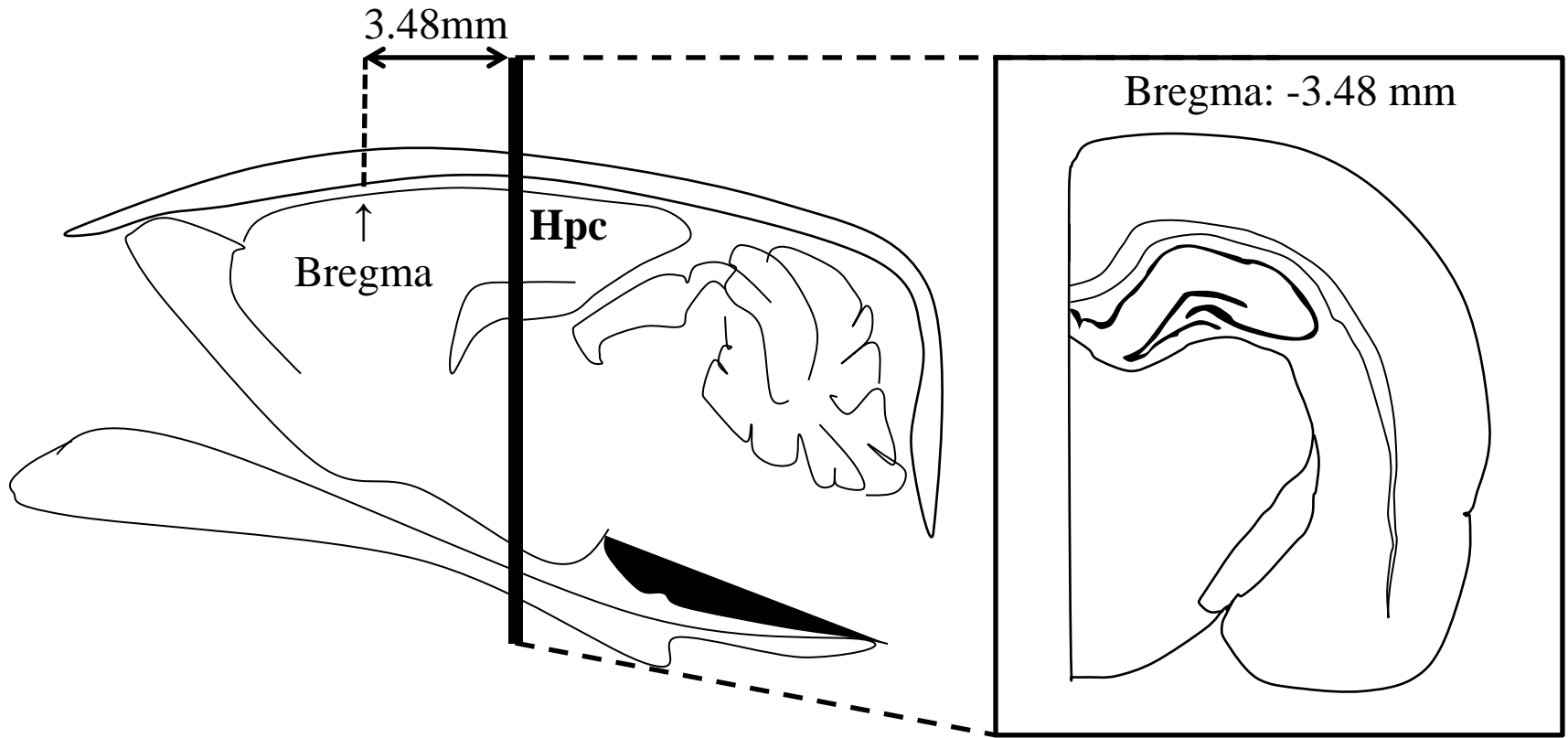
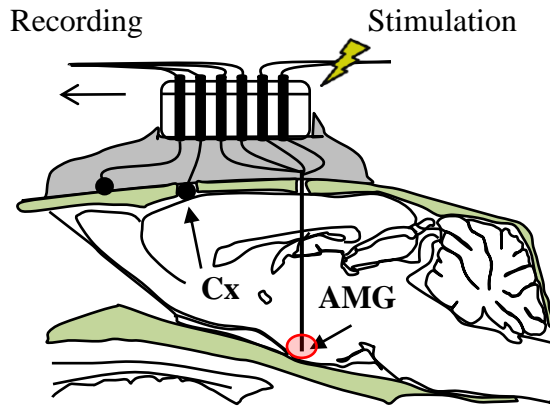


Fig. 5 Schematic illustrations of the brain sections used for immunohistochemical staining for the hippocampus (Hpc).

An anterior-posterior coordinate (a distance from the Bregma) is shown. SV2A was immunohistochemically stained using the ABC method .

A



Coordinate of electrodes Amygdala (AMG)

Posterior : 2.2 mm
Lateral : 4.8 mm
Horizontal : -7.2 mm
from the bregma

B

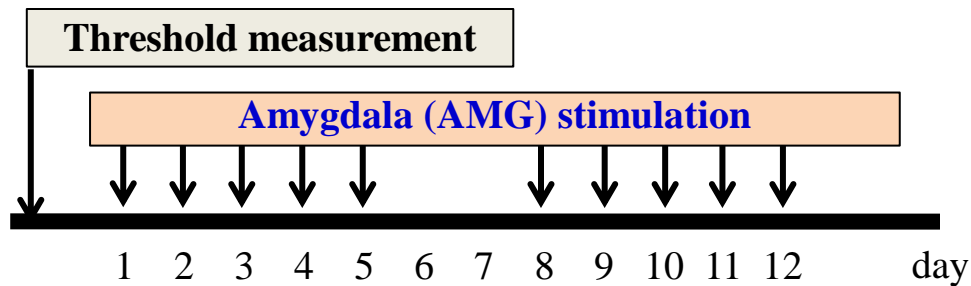


Fig. 6 Protocol of kindling stimulation of amygdala (AMG).

A: Coordinate of electrodes in amygdala. B: Protocol of kindling stimulation and method of amygdala (AMG) afterdischarge recording are also shown.

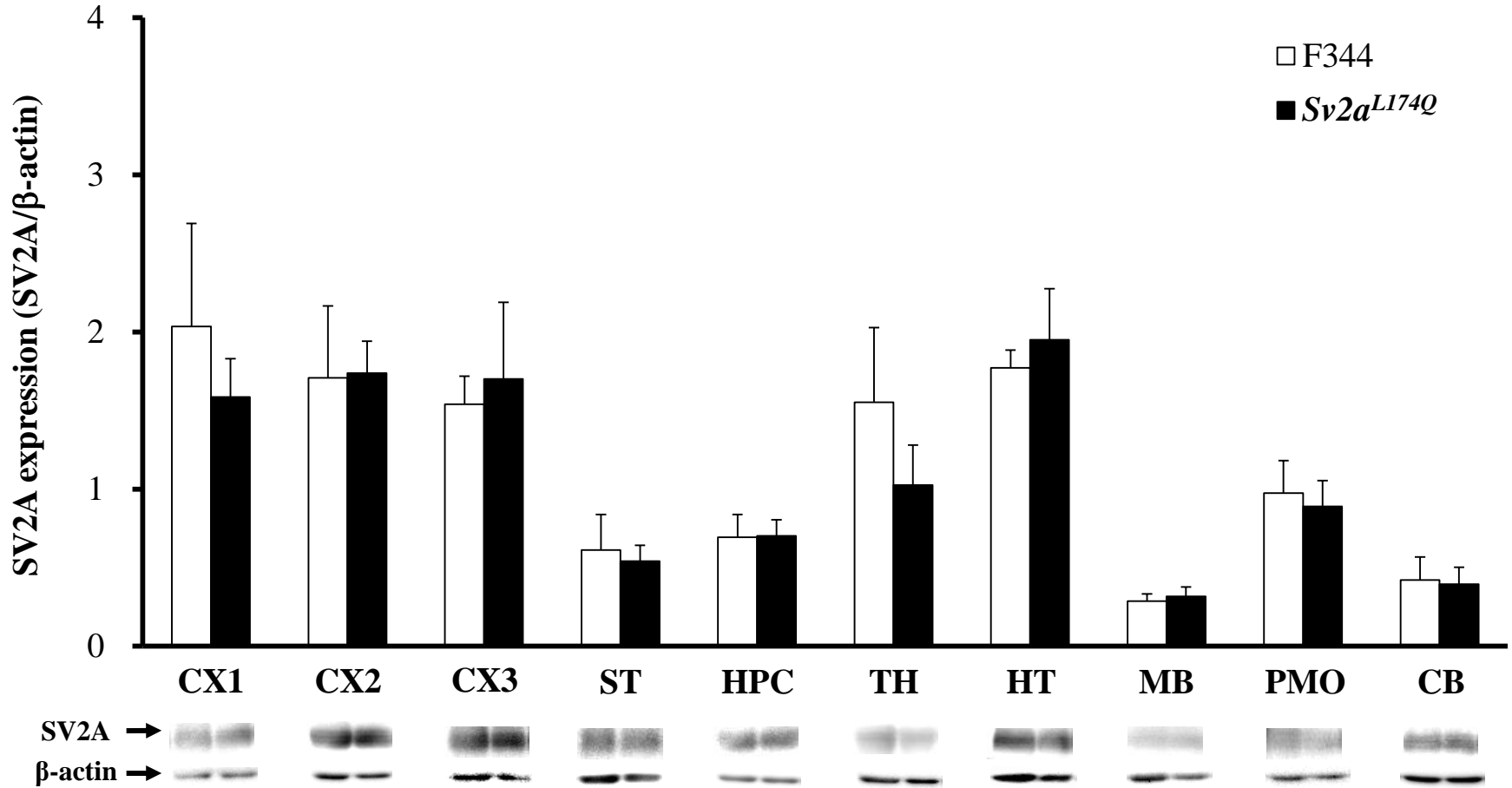


Fig. 7 Expression levels of SV2A in *Sv2a*^{L174Q} and F344 rat brain. (Western blot analysis)

Expressions of SV2A is shown as the ratio to β -actin. Brain sample preparation and Western blot analysis were performed with *Sv2a*^{L174Q} and F344 rats. CX1: frontal cortex, CX2: parietal-temporal cortex, CX3: occipito-temporal cortex, HPC: hippocampus, ST: striatum, TH: thalamus, HT: hypothalamus, MB: midbrain, PMO: pons and medulla oblongate, CB: cerebellum. Each column shows the mean \pm S.E.M.

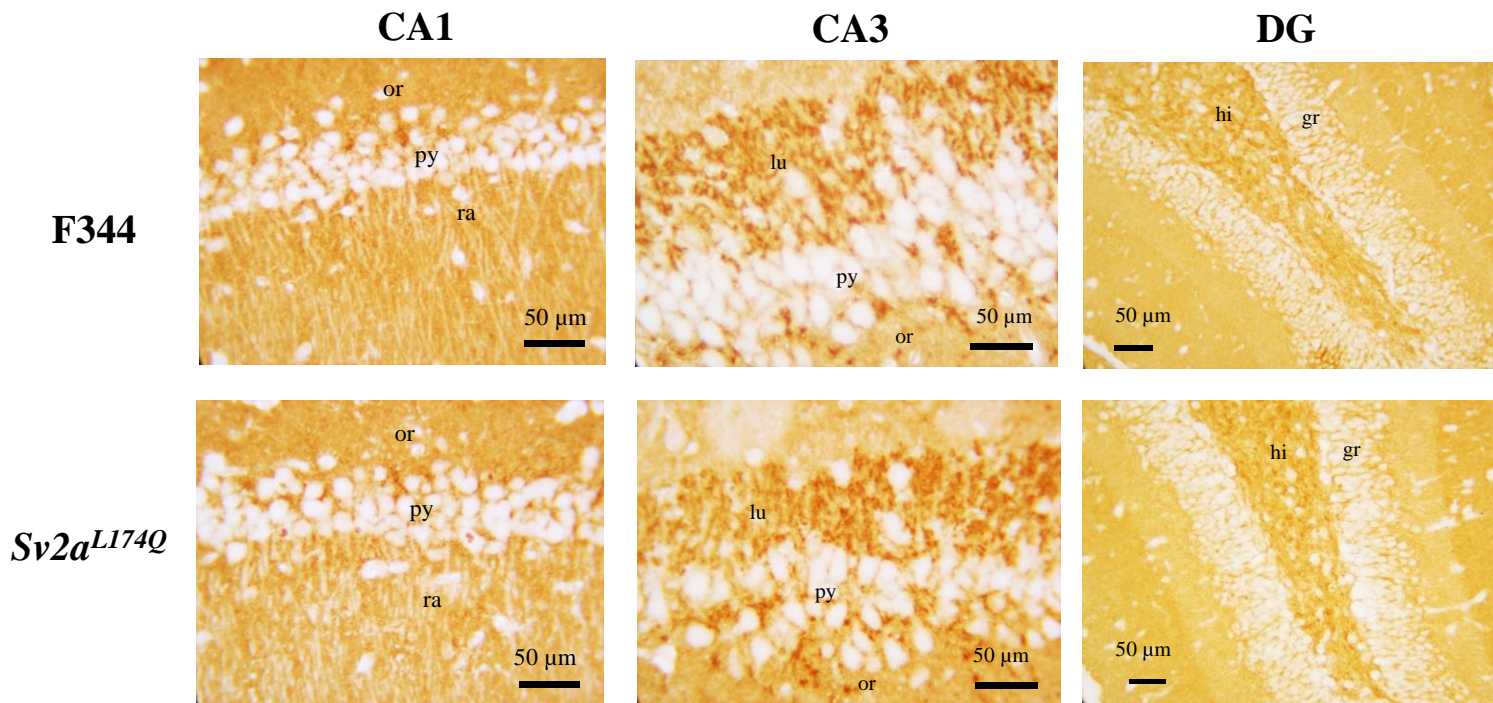


Fig. 8 SV2A expression in the hippocampus of *Sv2a^{L174Q}* and F344 rat.

Representative photos illustrating the SV2A immunoreactivity in the hippocampus from *Sv2a^{L174Q}* and F344 rats. gr: granule cell layer, hi: dentate hilus, lu: stratum lucidum, or: stratum oriens, py: pyramidal cell layer, ra: stratum radiatum.

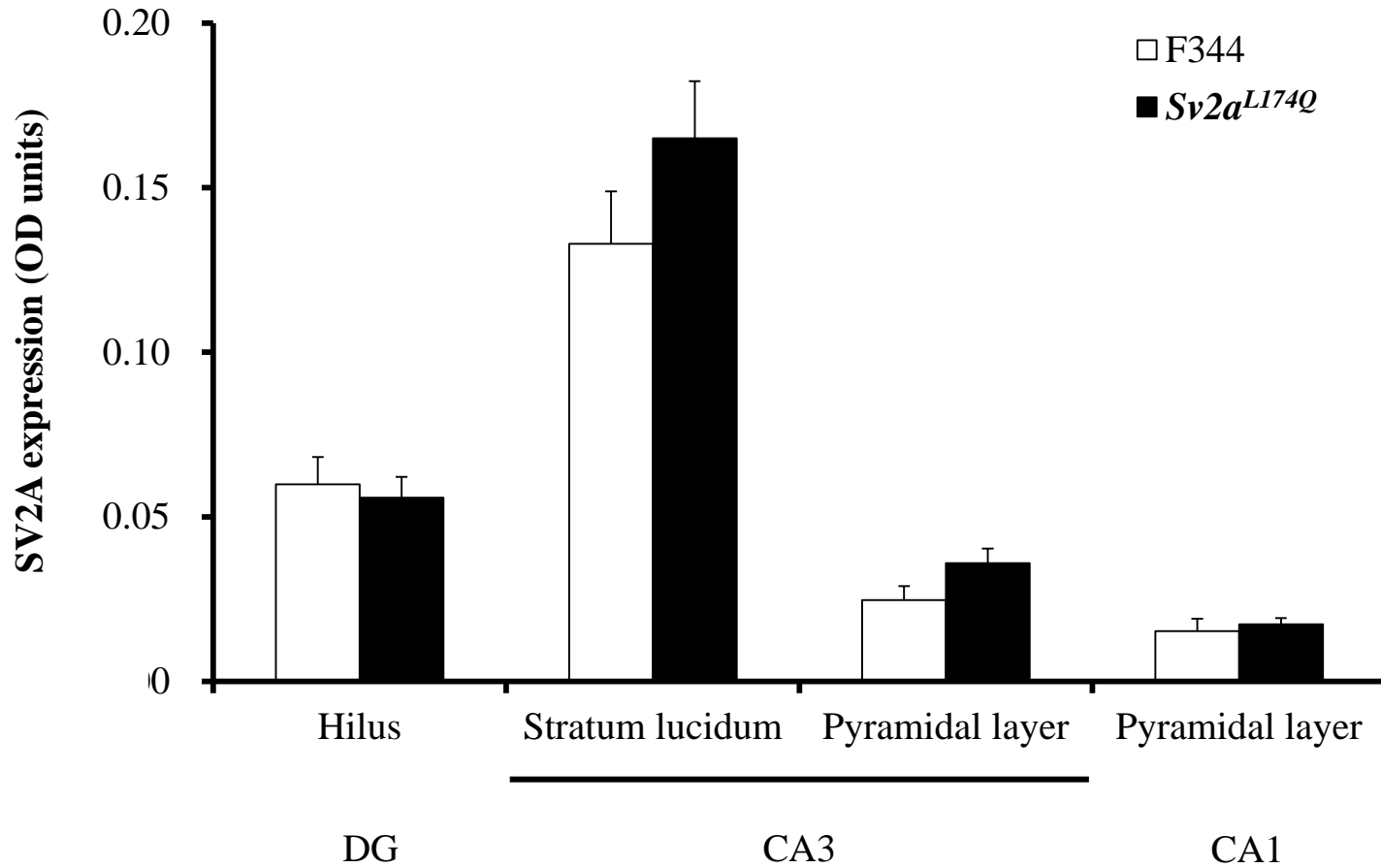
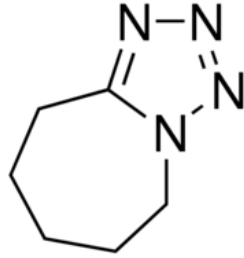


Fig. 9 Changes in hippocampal SV2A expression by the *Sv2a*^{L174Q} mutation.

Immunohistochemical analysis of SV2A expression level in the hippocampus of *Sv2a*^{L174Q} and F344 rats. ROD: relative optical density. Each column represents the mean \pm S.E.M. of 5 animals.



Pentylentetrazole (PTZ)
(GABA_A receptor antagonist)

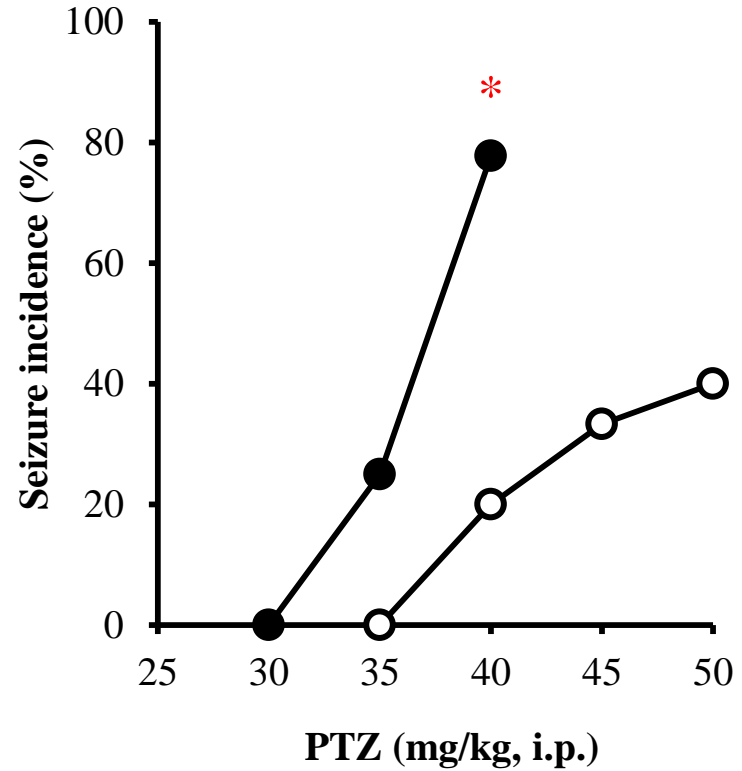
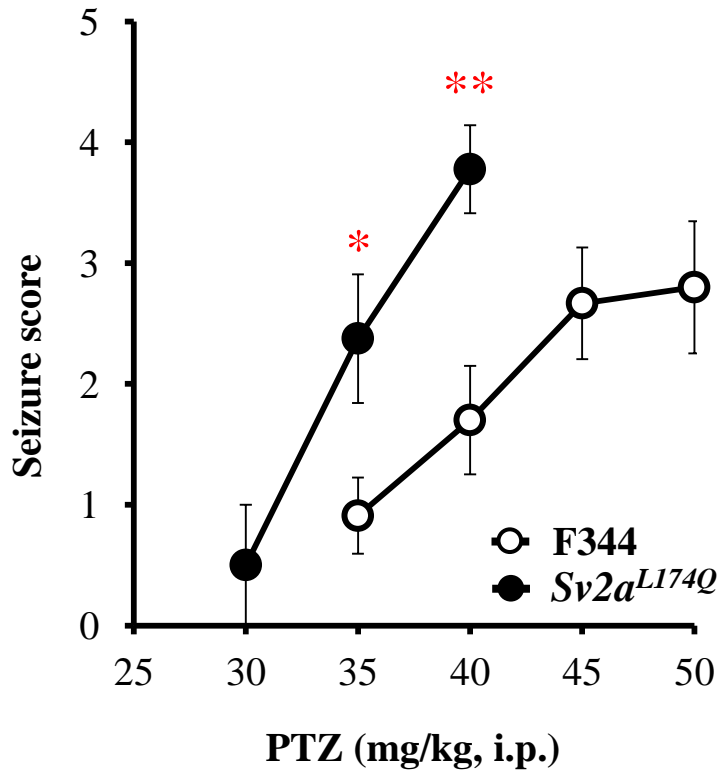
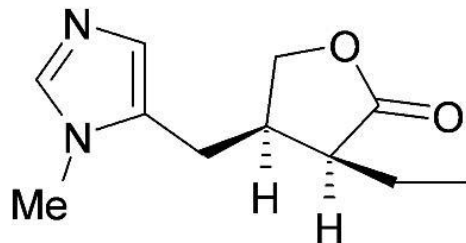


Fig. 10 Susceptibility of *Sv2a*^{L174Q} rats to pentylentetrazole (PTZ)-induced seizures.

Each point represents the mean \pm S.E.M of 8 - 11 animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significantly different from F344 rats.



Pilocarpine
(mACh receptor agonist)

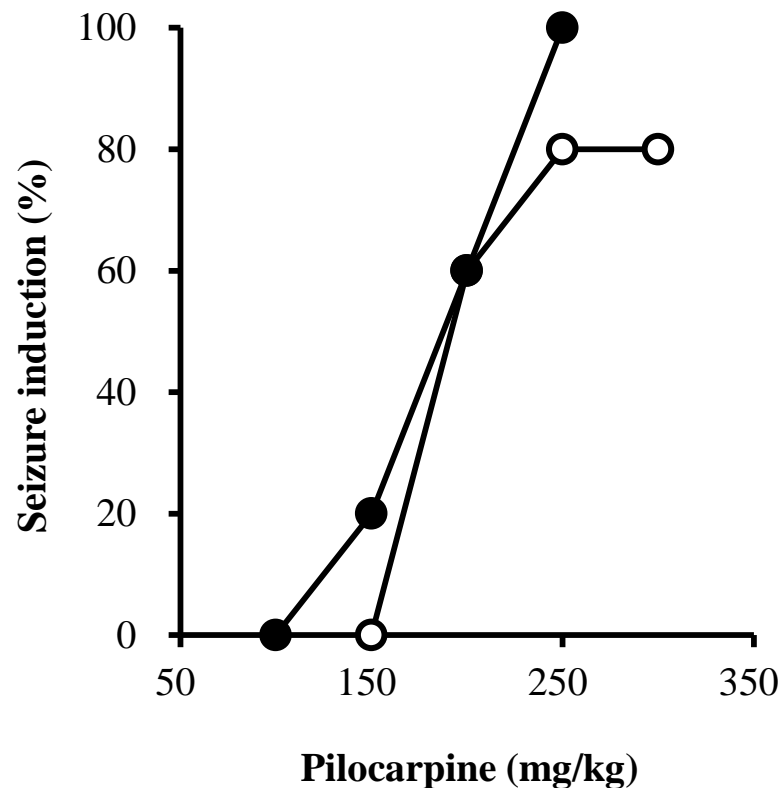
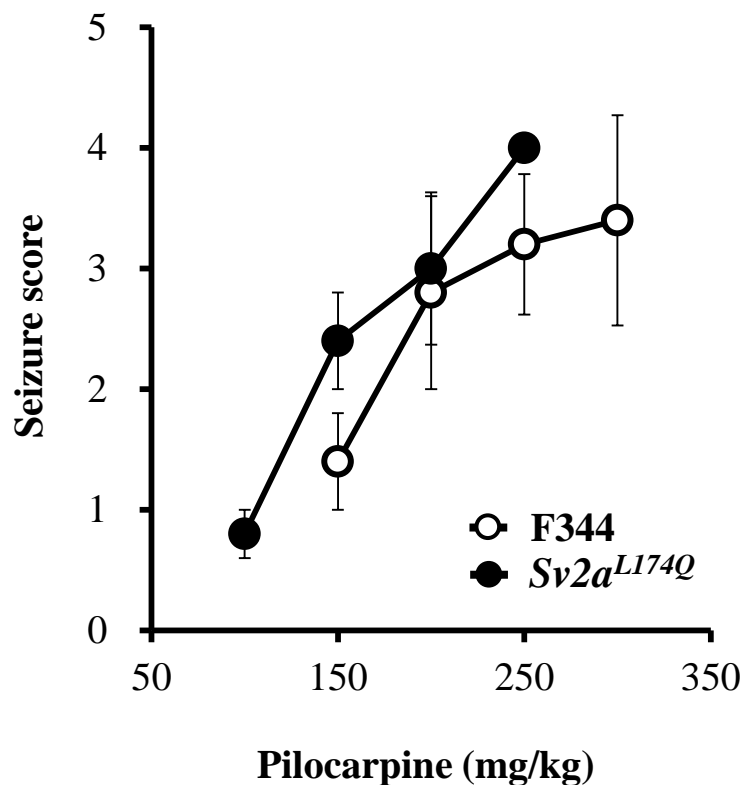
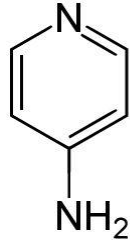


Fig. 11 Susceptibility of *Sv2α^{L174Q}* rats to pilocarpine-induced seizures.
Each point represents the mean \pm S.E.M of 8 - 11 animals.



4-Aminopyridine (4-AP)
(K_v channel blocker)

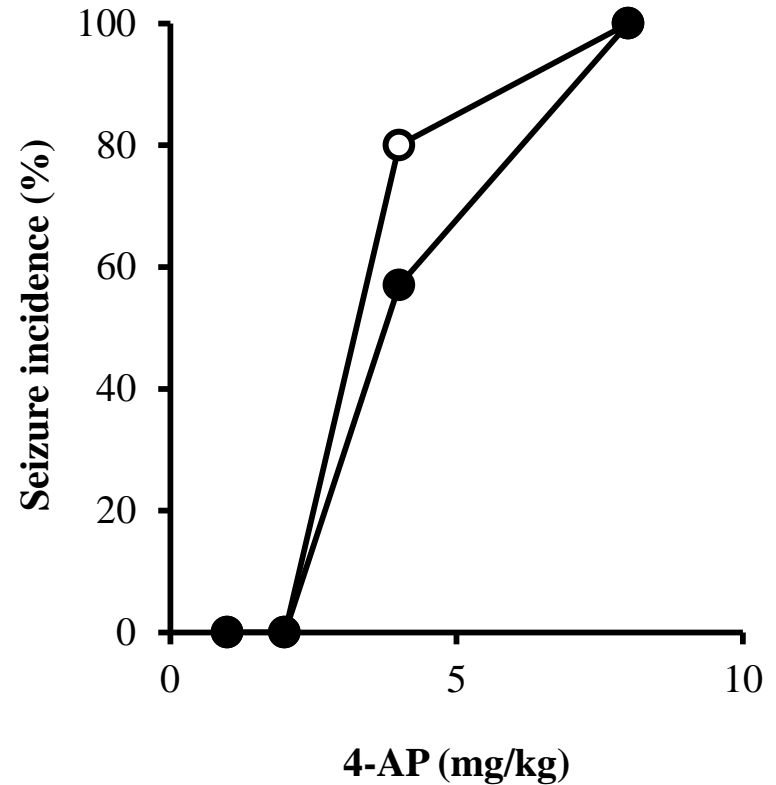
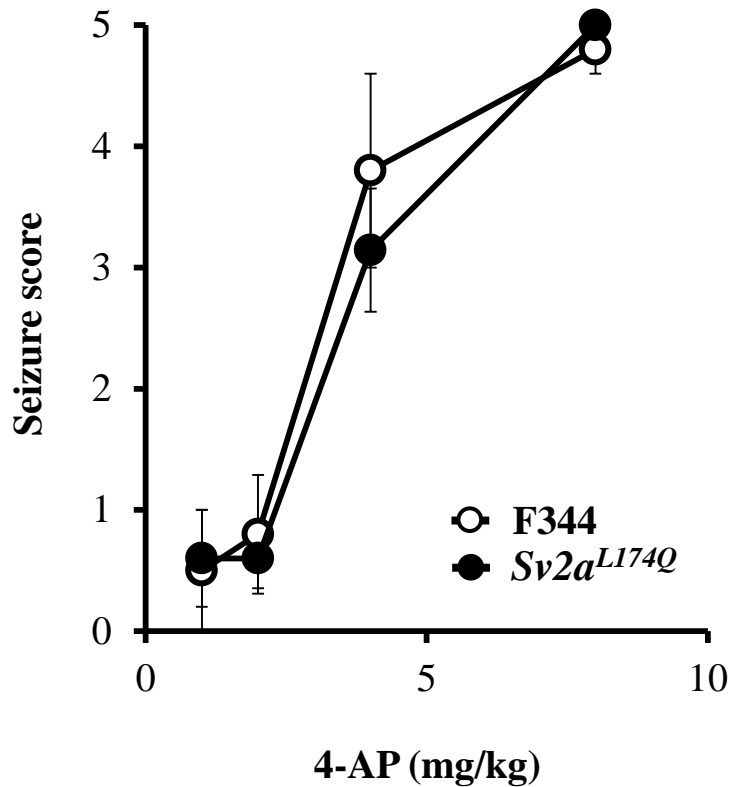


Fig. 12 Seizure susceptibility of Sv2a^{L174Q} rats to 4-aminopyridine (4-AP)-induced seizures. Each point represents the mean \pm S.E.M of 8 - 11 animals.

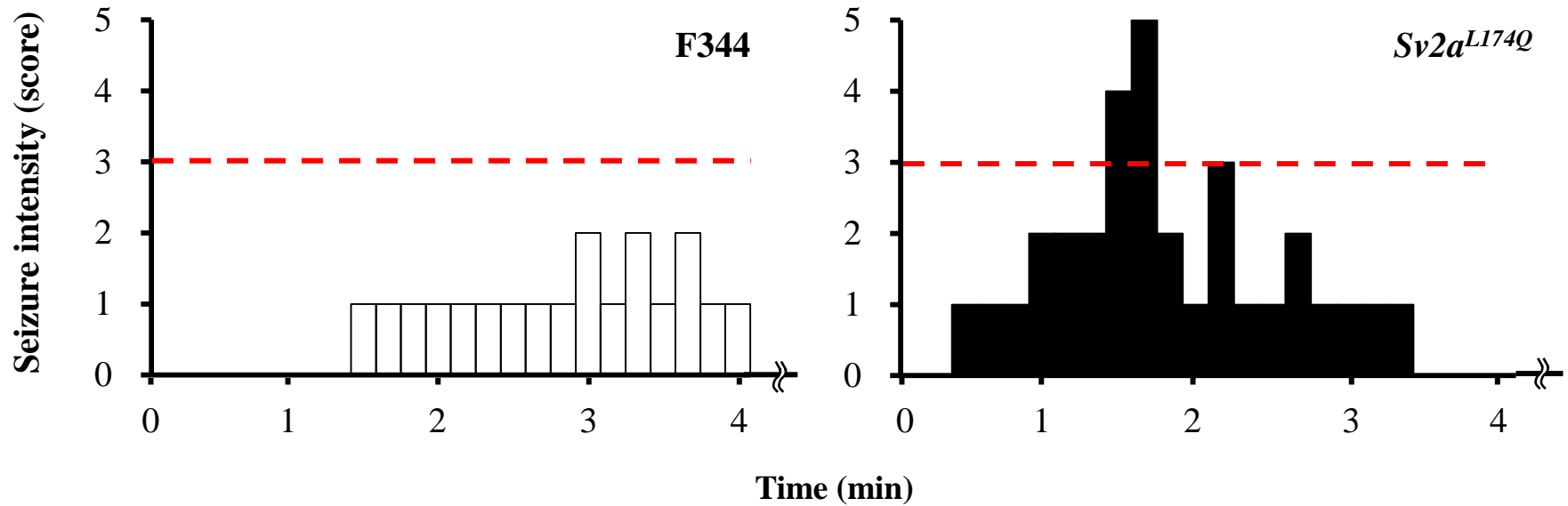


Fig. 13 Time course of seizure induction in *Sv2a^{L174Q}* rats following cumulative injection of pentylenetetrazole (PTZ)

Typical time course (from 0 to 4 min) of PTZ-induced excitatory behaviors and seizures evaluated by the time-sampling method (scored every 10 sec). *Sv2a^{L174Q}* and F344 rats were treated with an increasing dose of PTZ (10, 20 and 30 mg/kg, i.p., each 30 min interval) in a cumulative fashion. At 30 mg/kg (i.p.), PTZ induced clonic seizures in *Sv2a^{L174Q}* rats usually within 5 min after PTZ injection while PTZ showed no seizures in F344 rats.

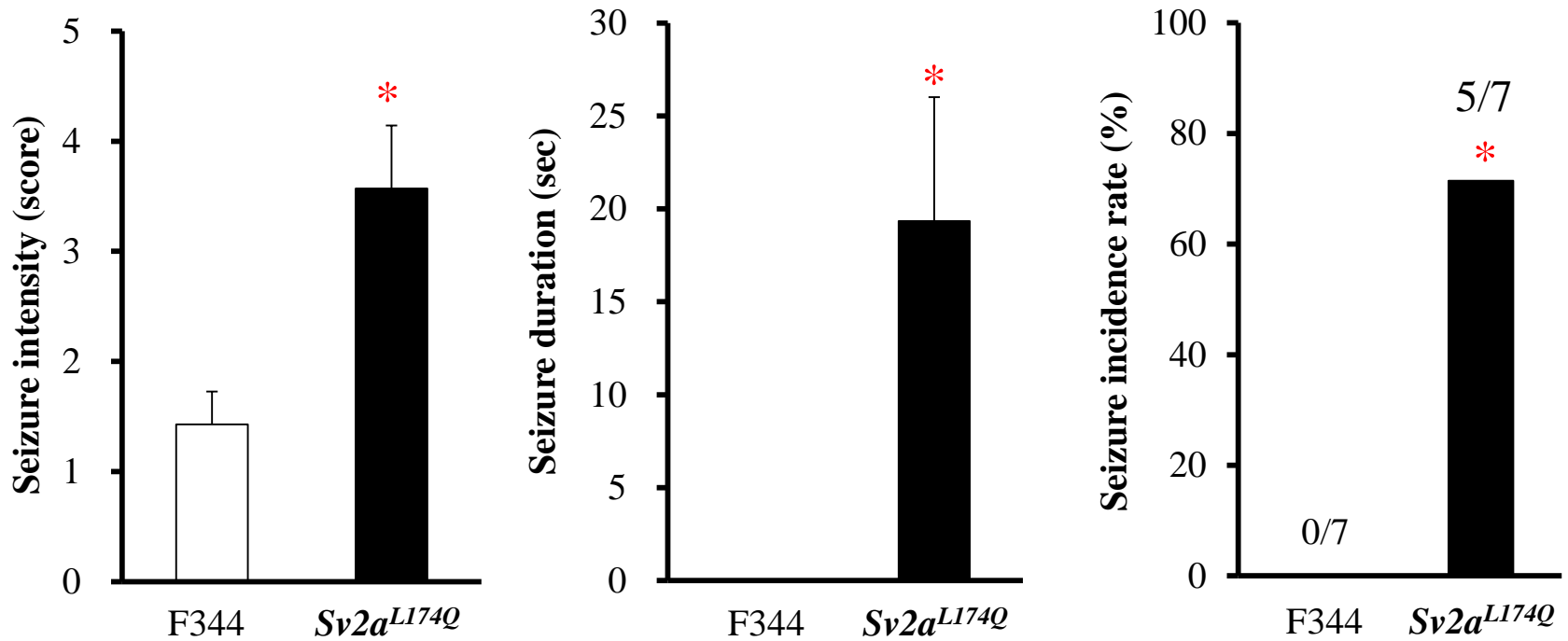


Fig. 14 Seizure susceptibility of *Sv2a^{L174Q}* rats to cumulative injection of pentylenetetrazole (PTZ)
Comparison of seizure intensity (maximal seizure score), total seizure duration and incidence rate. Each column represents the mean \pm S.E.M or 7 rats. * $p < 0.05$, Significantly different from F344 rats.

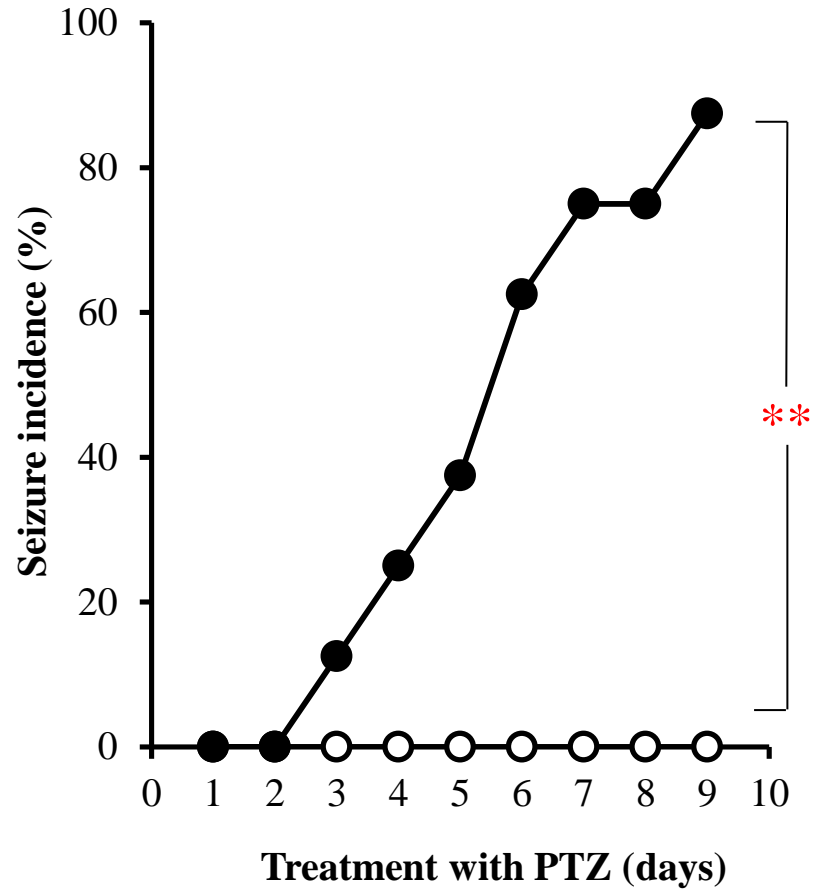
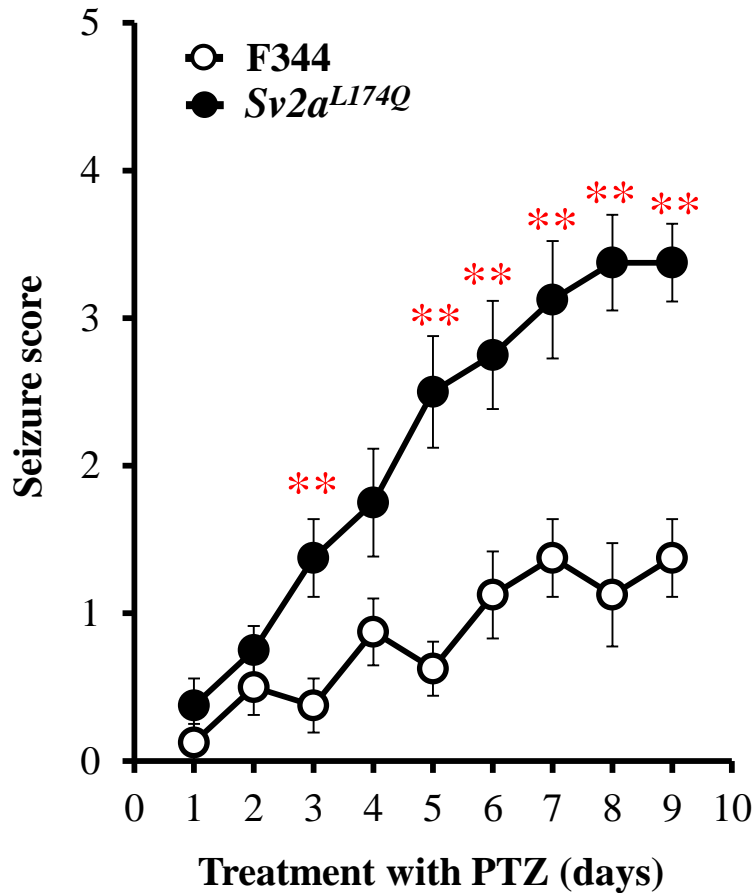
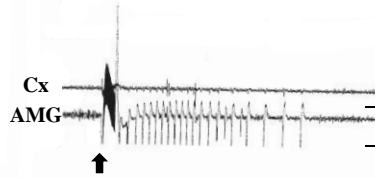


Fig. 15 Susceptibility of *Sv2a*^{L174Q} rats to pentylenetetrazole (PTZ)-kindling.

Susceptibility to PTZ kindling was evaluated following repeated treatments of animals with a sub-convulsive dose (30 mg/kg/day) of PTZ. Left; Seizure intensity. Right; Seizure incidence rate (score of 3 or more). Each point represents the mean \pm S.E.M. of 8 animals. ** $p < 0.01$, Significantly different from F344 rats.

F344

Day 1



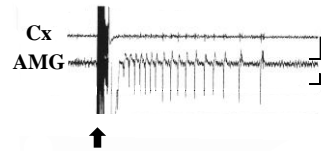
Day 12



AMG stimulation

Sv2a^{L174Q}

Day 1



Day 12



AMG stimulation

Fig. 16 Afterdischarge induced by electrostimulation of amygdala (AMG) in *Sv2a*^{L174Q} and F344 rats. Representative AMG afterdischarge patterns recorded from *Sv2a*^{L174Q} and F344 rats following kindling stimulation (Day 1 and 12). Cx: cerebral cortex. Calibration: 1 mV, 1 s.

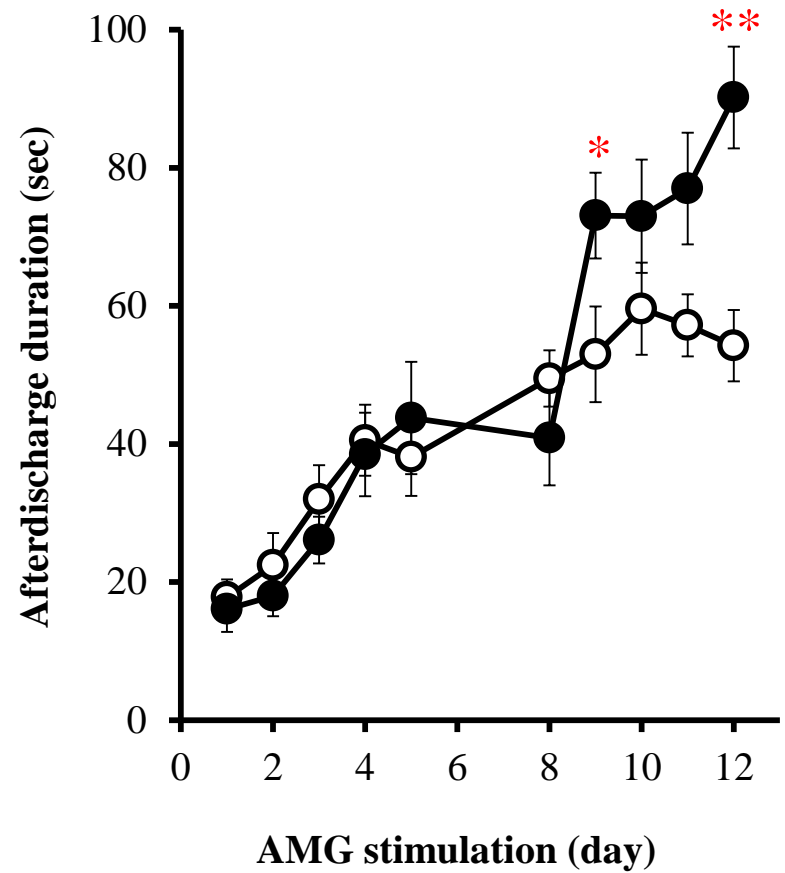
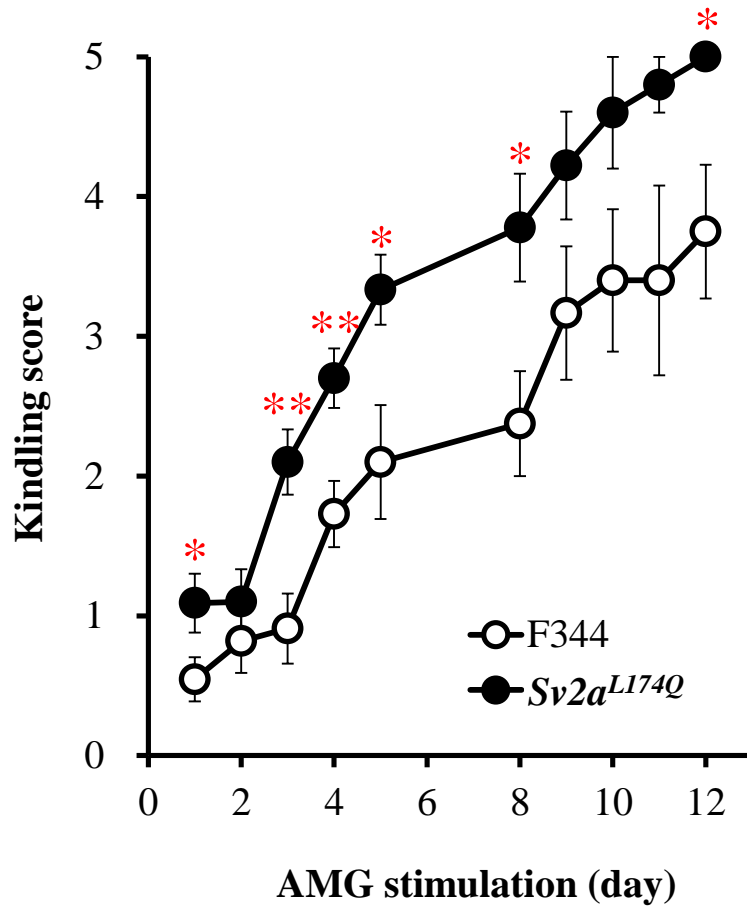


Fig. 17 Susceptibility of *Sv2a*^{L174Q} rats to Amygdala kindling.

Susceptibility to amygdala (AMG) kindling following repeated AMG kindling stimulation. Left: Kindling intensity. Right: Duration of AMG afterdischarge. Each point represents the mean \pm S.E.M. of 11 animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Significantly different from F344 rats.

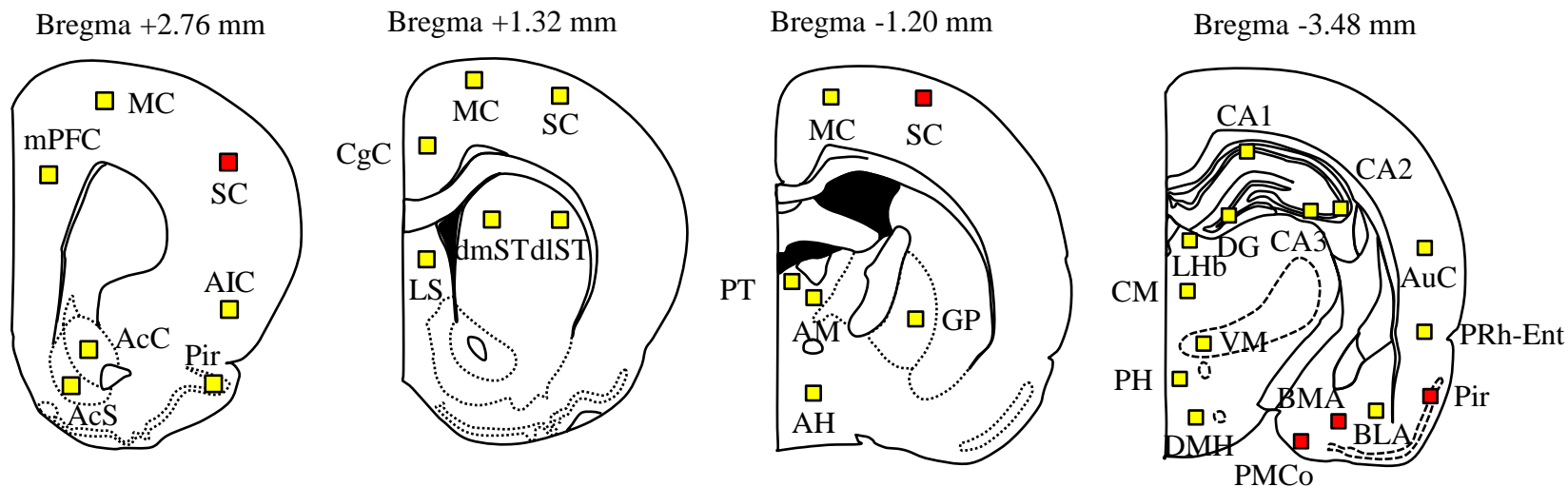


Fig. 18 Analysis of topographical Fos expression analysis following pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizures. Schematic illustrations of the brain sections selected for quantitative analysis of Fos protein expression. Filled boxes in each section indicate the sample areas analyzed. Red boxes represent the regions where Fos expression was significantly elevated by PTZ treatments. AcC, core region of nucleus accumbens; AcS, shell region of nucleus accumbens; AIC, agranular insular cortex; AH, anterior hypothalamus; AM, anteromedial thalamic nucleus; AUC, area under the curve; AuC, auditory cortex; BLA, anterior basolateral amygdaloid nucleus; BMA, anterior basomedial amygdaloid nucleus; CA, Cornu Ammonis area of hippocampus; CgC, cingulated cortex; CM, centromedial thalamic nucleus; DG, dentate gyrus of the hippocampus; dlST, dorsolateral striatum; DMH, dorsomedial hypothalamic nucleus; dmST, dorsomedial striatum; GP, globus pallidus; LHB, lateral habenular nucleus; LS, lateral septum; MC, motor cortex; mPFC, the medial prefrontal cortex; Pir, piriform cortex; PH, posterior hypothalamus; PMCo, posteromedial cortical amygdaloid nucleus; PRh-Ent, perirhinal-entorhinal cortex; PT, paratenial thalamic nucleus; SC, sensory cortex; VM, ventromedial thalamic nucleus.

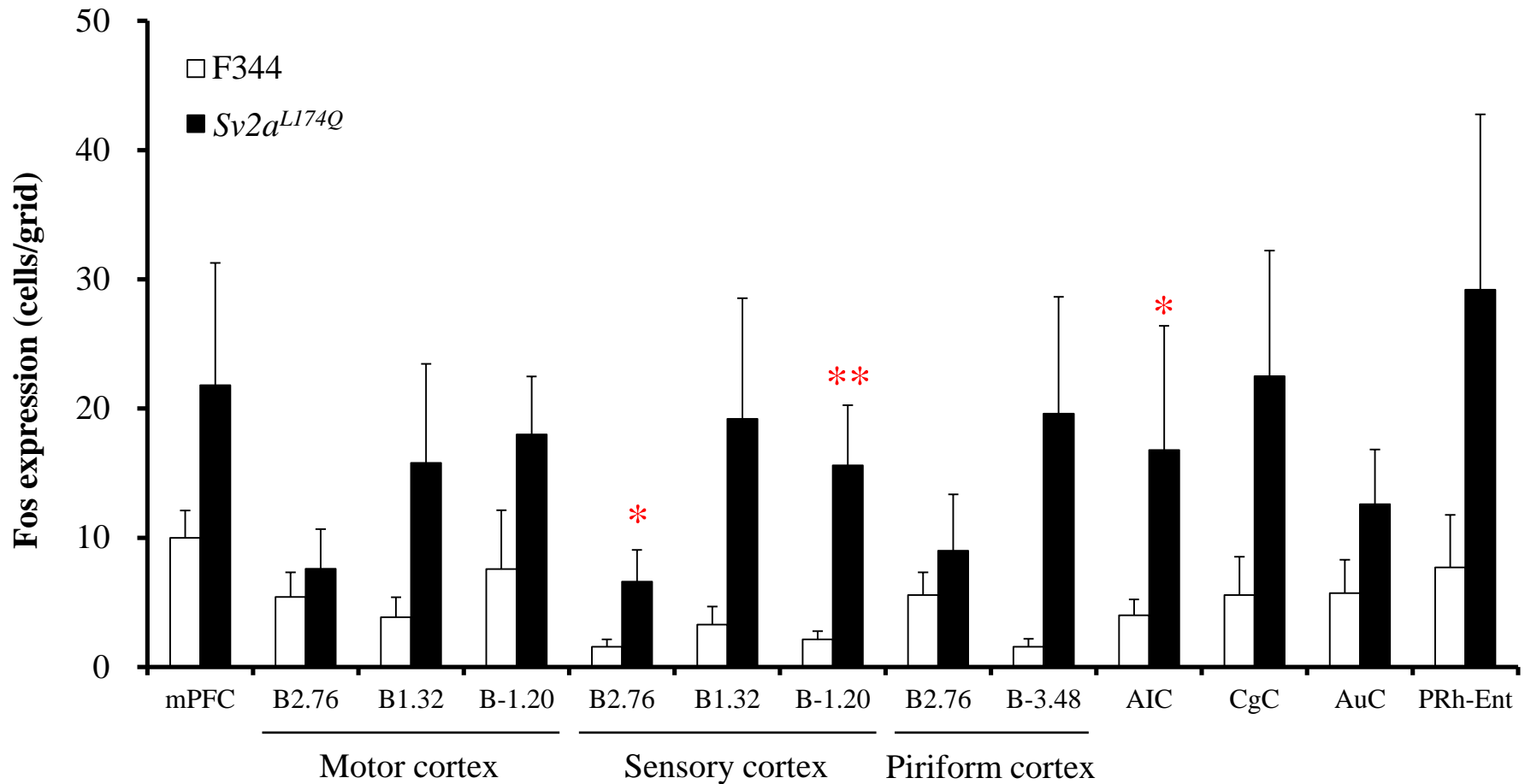
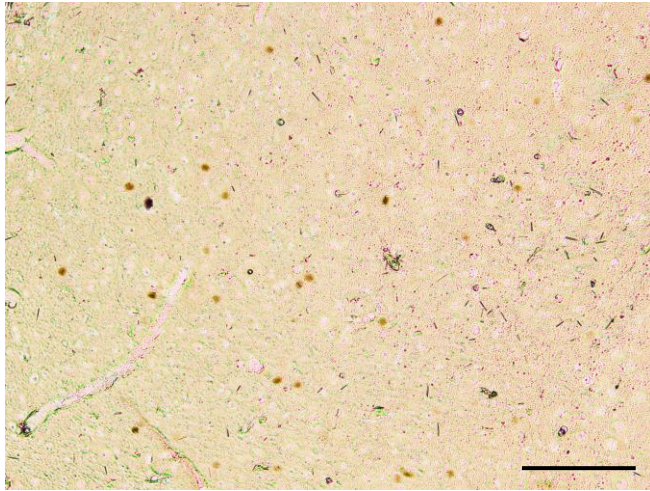


Fig. 19 Changes in Fos expression levels in the cerebral cortex by the seizure threshold level of pentylenetetrazole (PTZ).

Graph shows Fos expression in the cerebral cortical regions. Each column represents the mean \pm S.E.M. of *Sv2a^{L174Q}* (PTZ seizure-positive) (n = 5) and F344 (PTZ seizure-negative) rats (n = 7). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significantly different from F344 rats.



F344

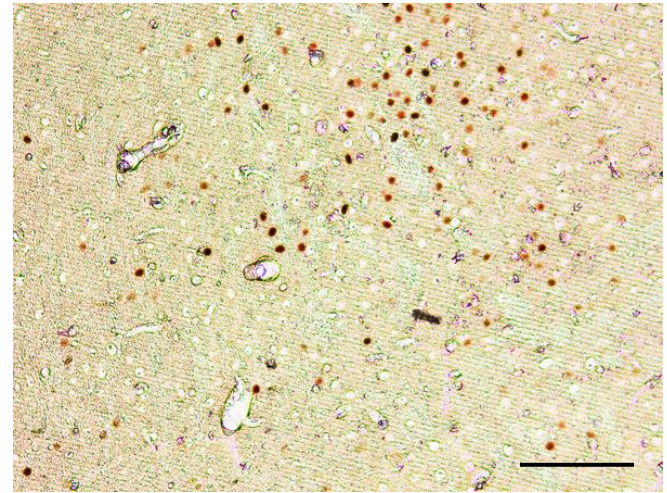
*Sv2 α^{L174Q}*

Fig. 20 Fos-immunoreactivity positive neurons in the amygdala following the seizure threshold level of pentylenetetrazole (PTZ) injection.

Typical photos of Fos expression in the basomedial amygdaloid nuclei (BMA). Scale bar: 100 μm .

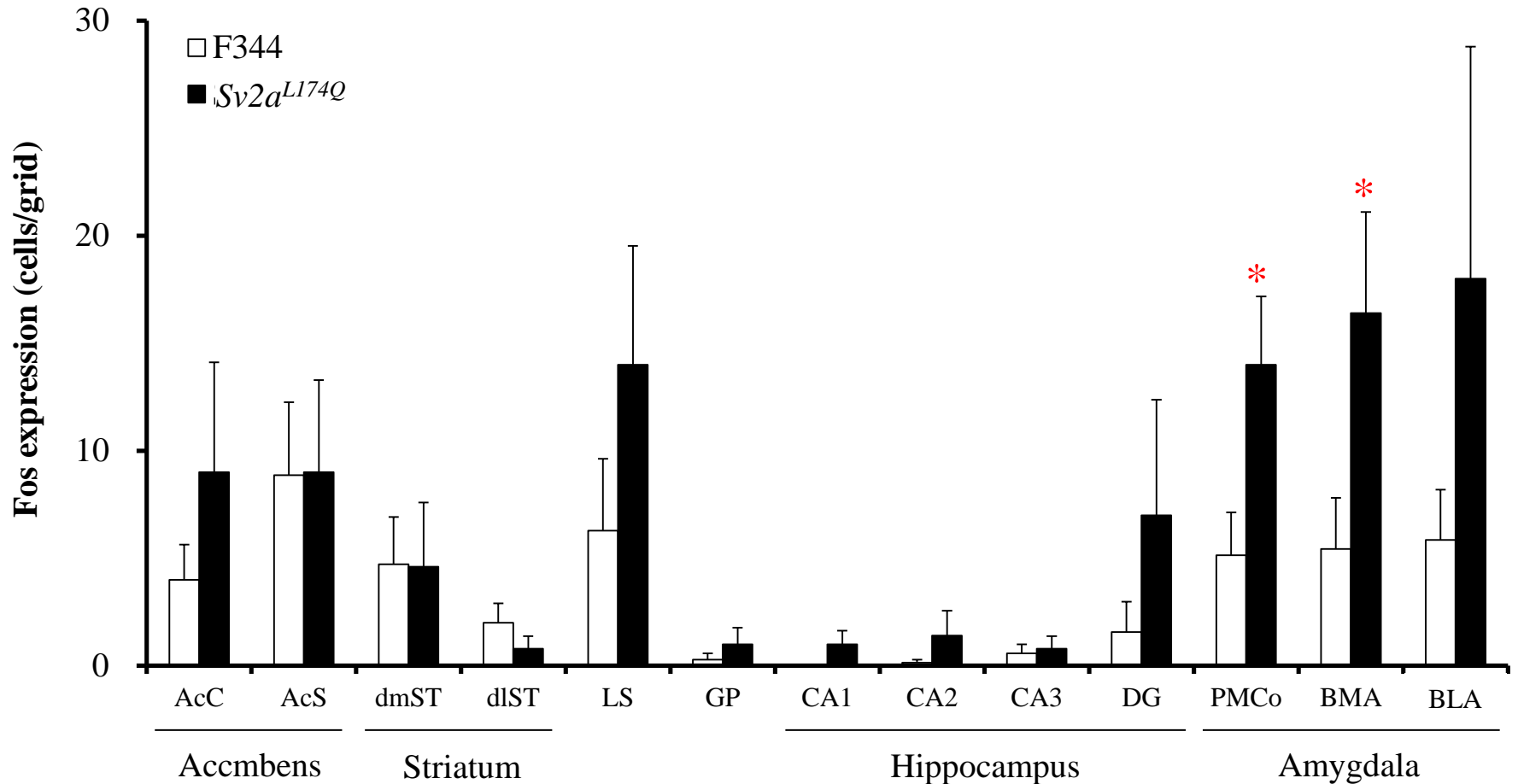


Fig. 21 Changes in Fos expression levels in the limbic region and basal ganglia by the seizure threshold level of pentylenetetrazole (PTZ).

Graph shows Fos expression in the basal ganglia and limbic regions. Each column represents the mean \pm S.E.M. of *Sv2a*^{L174Q} (PTZ seizure-positive) (n = 5) and F344 (PTZ seizure-negative) rats (n = 7). * $p < 0.05$ significantly different from F344 rats.

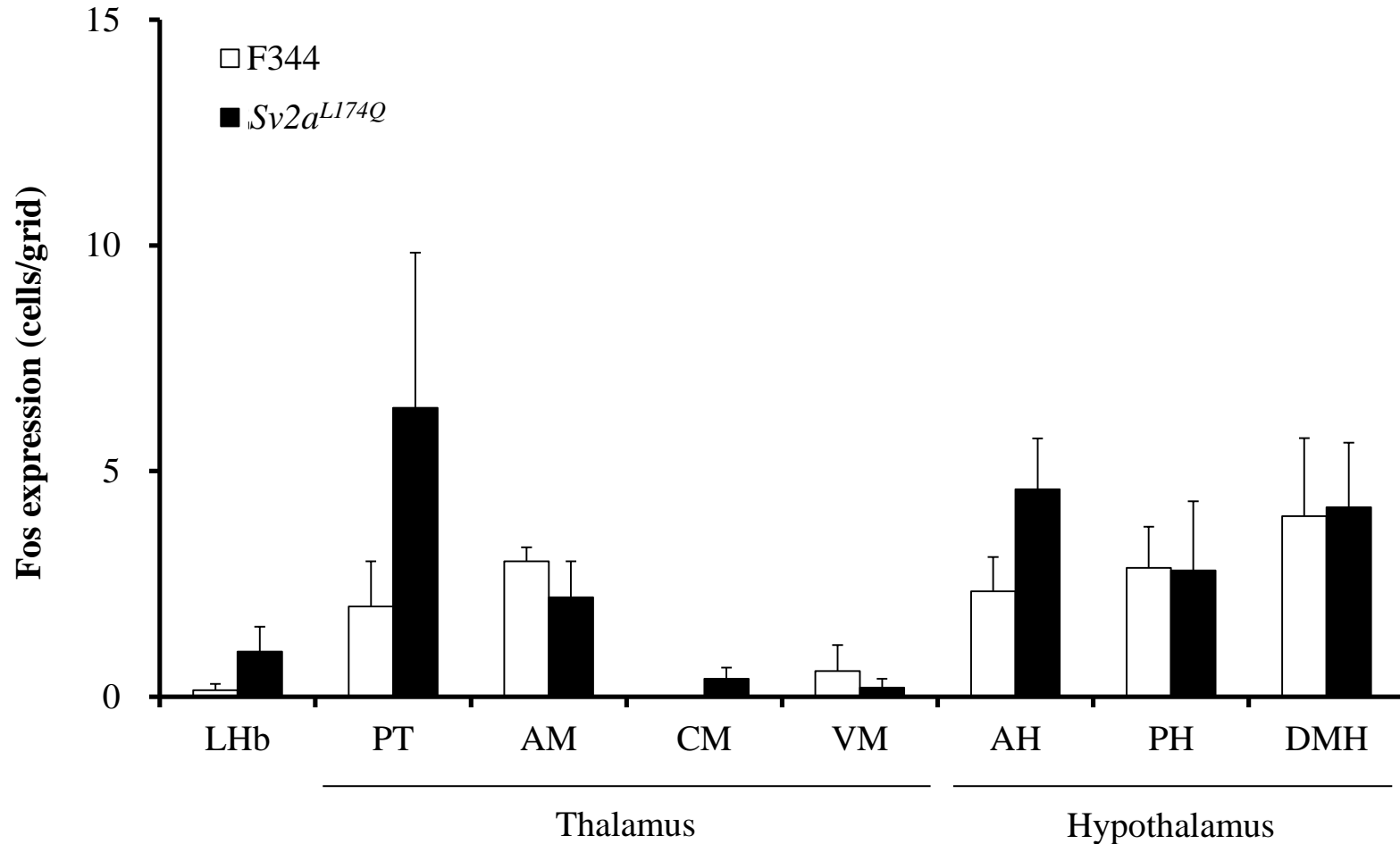


Fig. 22 Changes in Fos expression levels in the diencephalon by the seizure threshold level of pentylenetetrazole (PTZ).

Graph shows Fos expression in diencephalon. Each column represents the mean \pm S.E.M. of *Sv2a*^{L174Q} (PTZ seizure-positive) (n = 5) and seven F344 (PTZ seizure-negative) rats (n = 7).

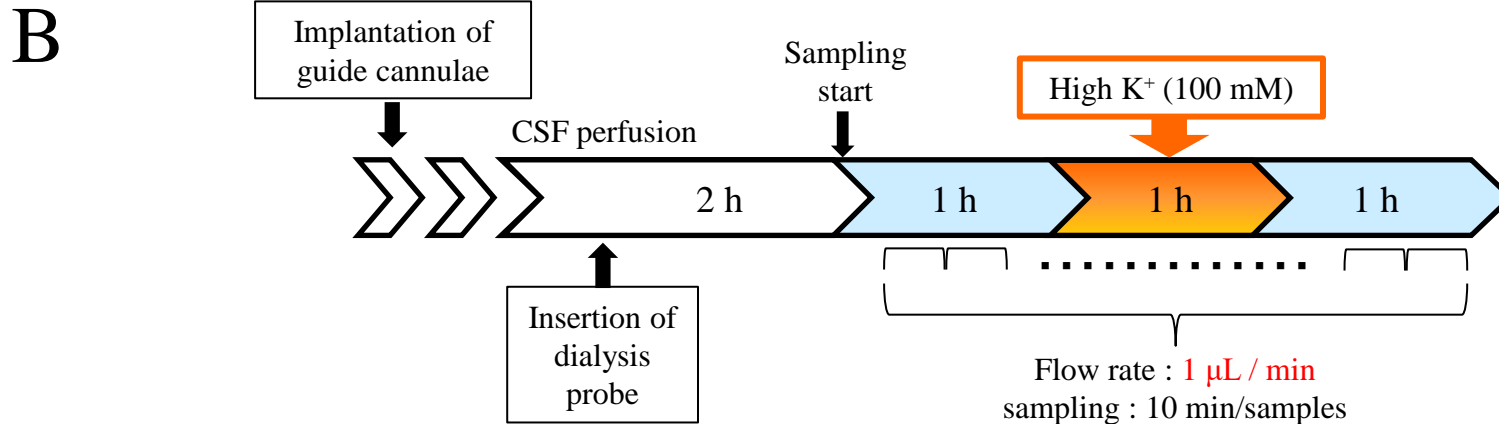
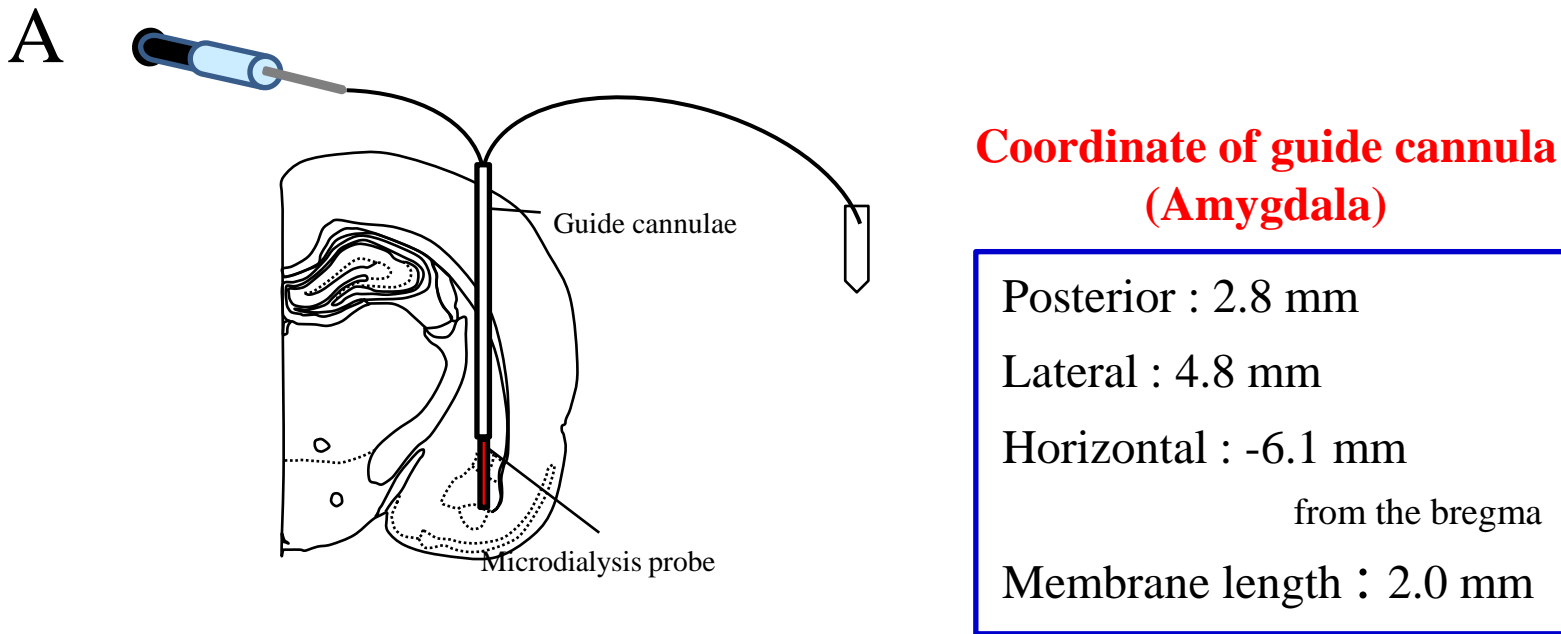


Fig. 23 Protocol of *in vivo* microdialysis studies in the amygdala.

A: Coordinate of guide cannula and microdialysis probe in amygdala. B: Animals were implanted microdialysis probe, and 2 hour later, samples were collected. Cerebrospinal fluid (CSF) and high potassium solution (100 mM) were perfused according to above at a flow rate of 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. Every dialysate samples were collected for 10 min.

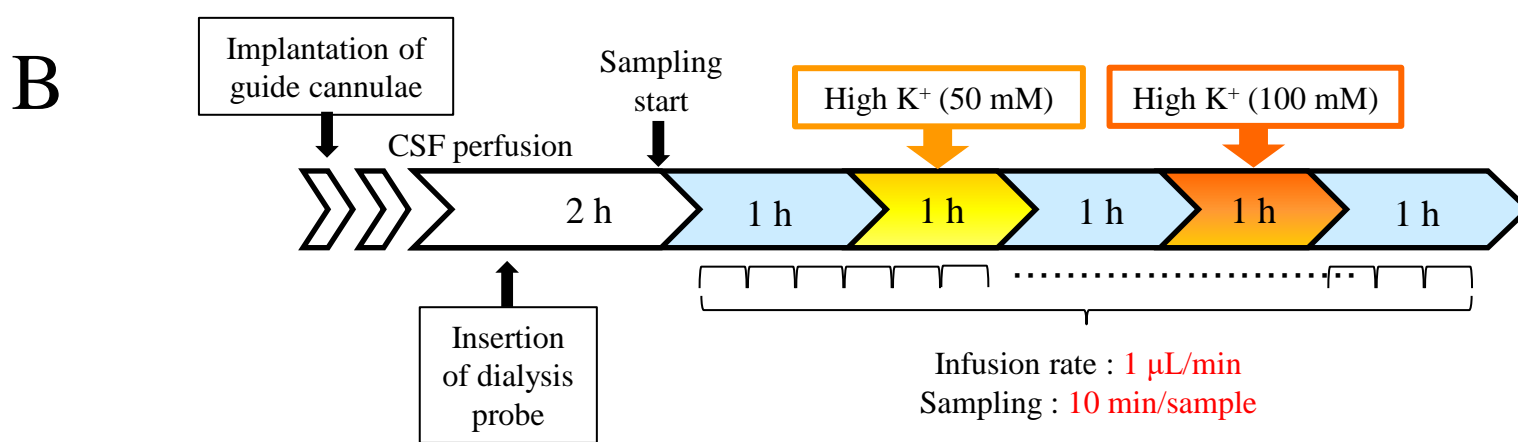
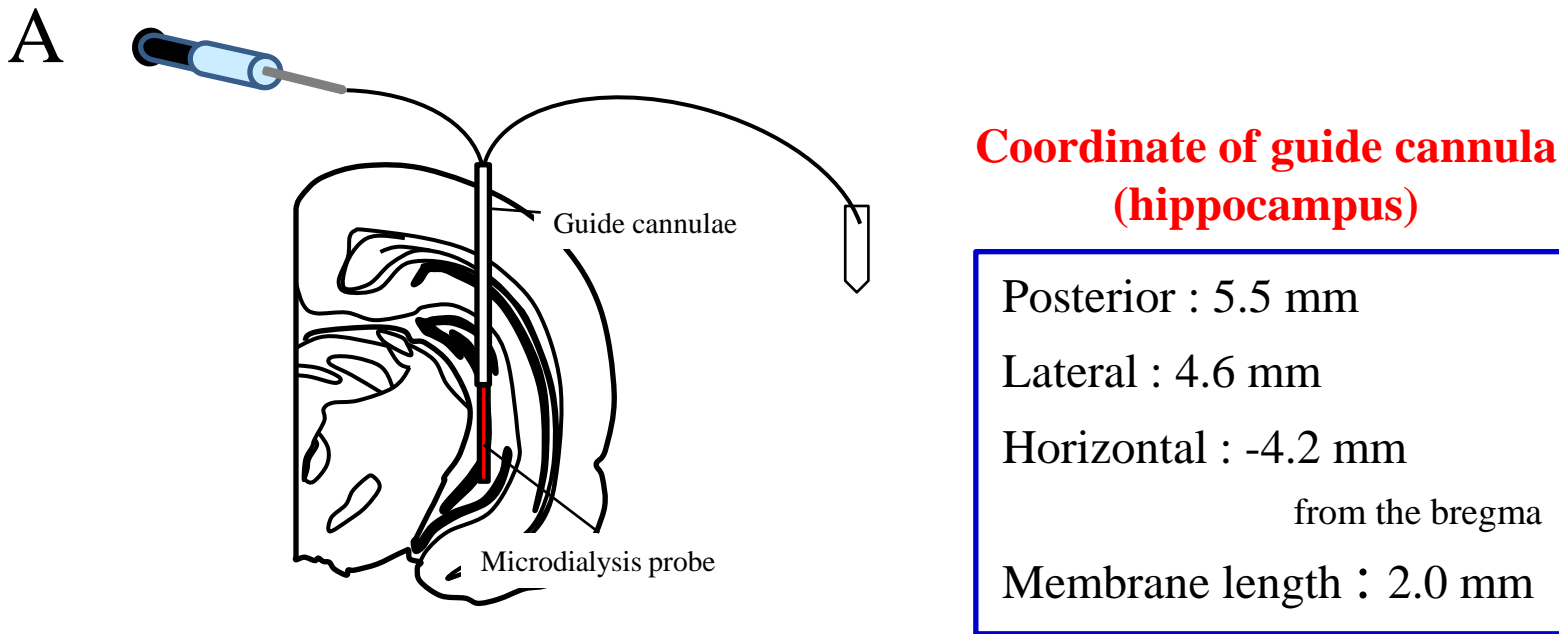


Fig. 24 Protocol of *in vivo* microdialysis studies in the hippocampus.

A: Coordinate of guide cannula and microdialysis probe in hippocampus. B: Animals were implanted microdialysis probe, and 2 hour later, samples were collected. Cerebrospinal fluid (CSF) and high potassium solution (50 mM and 100 mM) were perfused according to above at a flow rate of 1 μ L/min. Every dialysate samples were collected for 10 min.

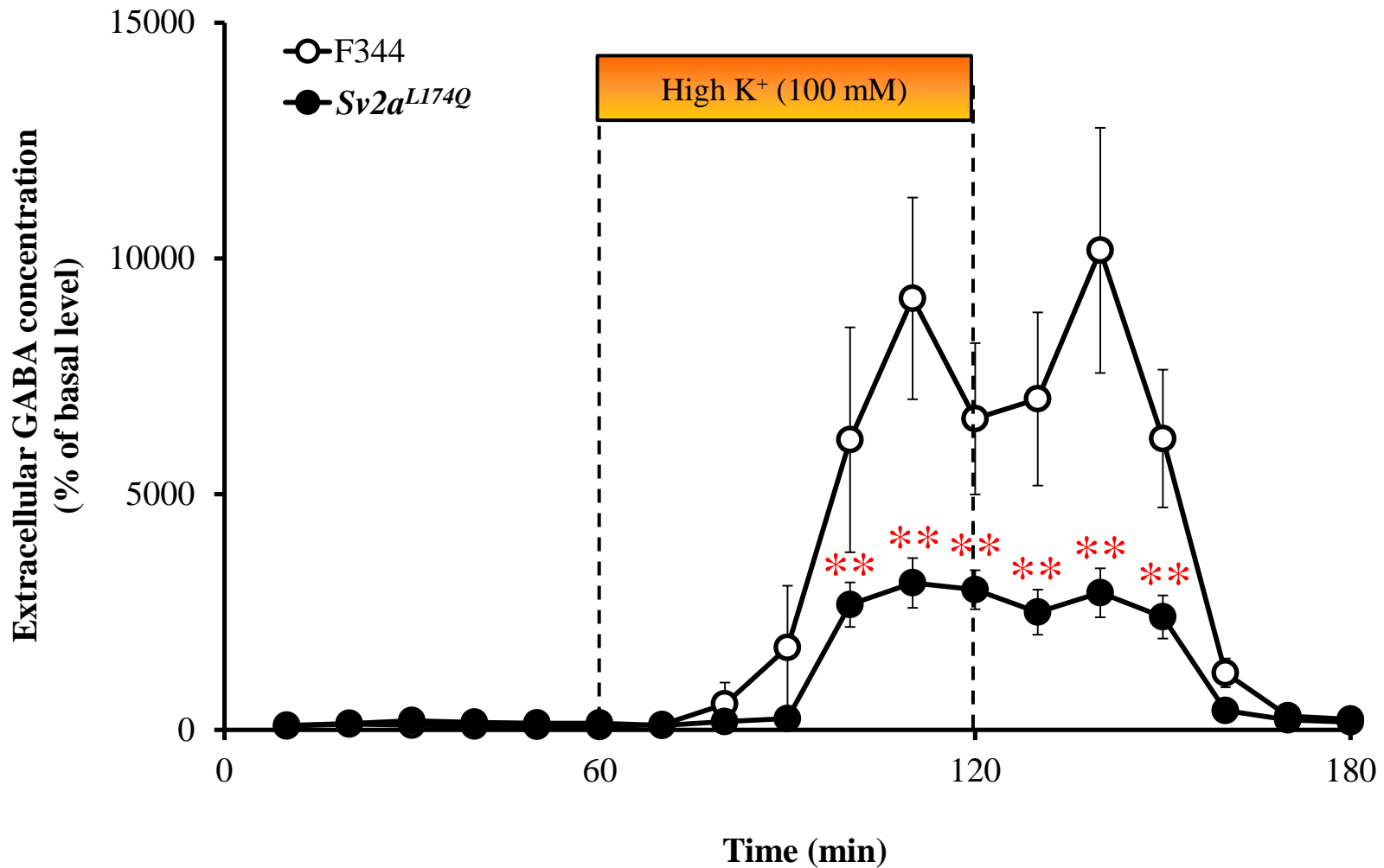


Fig. 25 Synaptic GABA release in the amygdala of *Sv2a*^{L174Q} and F344 rats.

Each point represents the mean \pm S.E.M. of 10 or 5 animals. Depolarization stimulation was given by applying high concentration (100 mM) K⁺-containing CSF (High K⁺) for 60 min through the dialysis probe. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significantly different from F344 rats.

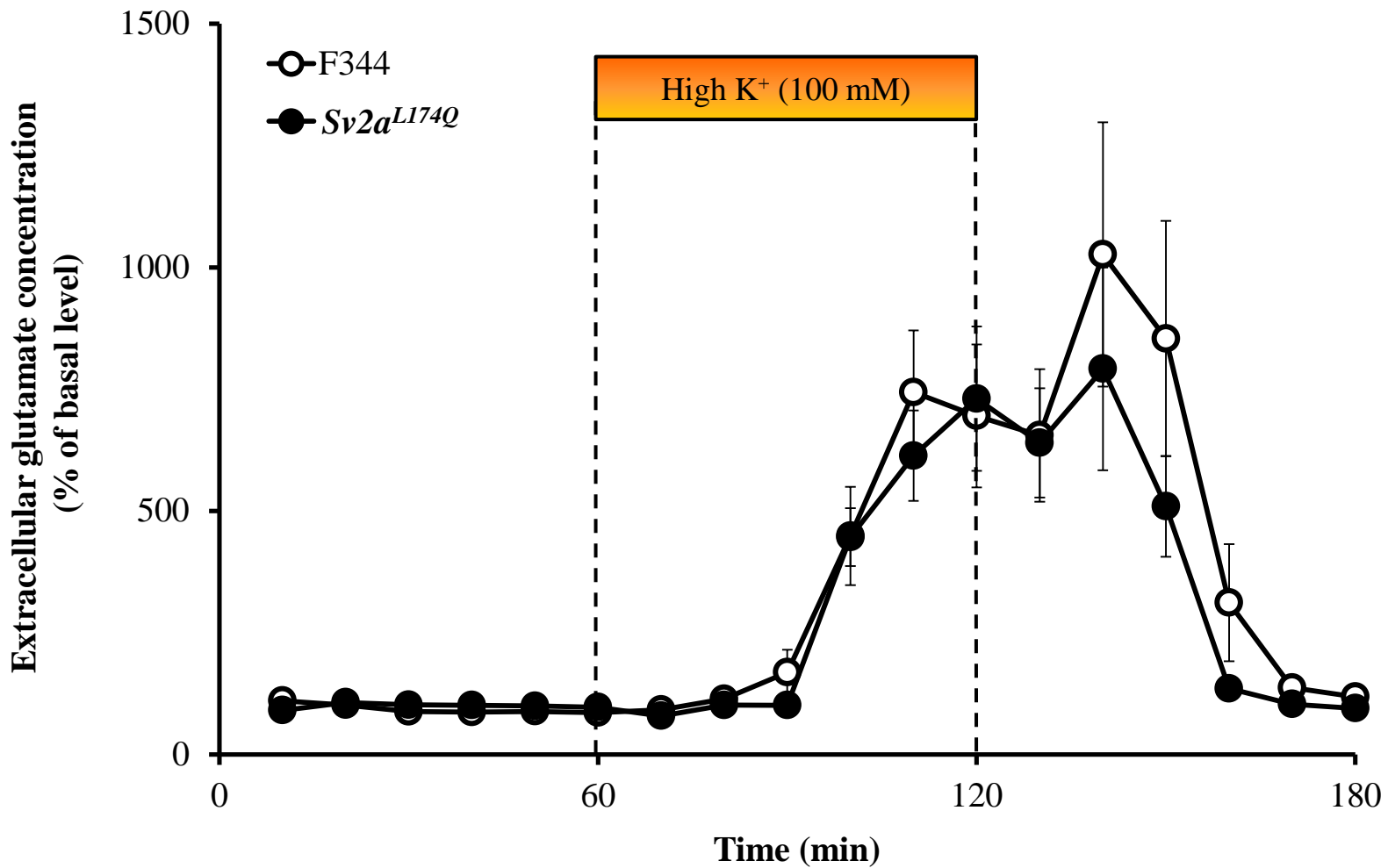


Fig. 26 Synaptic glutamate release in the amygdala of *Sv2α^{L174Q}* and F344 rats.

Each point represents the mean \pm S.E.M. of 10 or 5 animals. Depolarization stimulation was given by applying high concentration (100 mM) K⁺-containing CSF (High K⁺) for 60 min through the dialysis probe. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significantly different from F344 rats.

Table 1 Basal level of extracellular glutamate and GABA in the hippocampus of *Sv2a^{L174Q}* and F344 rats.

	Average concentration (nM)		
	F344 rat	<i>Sv2a^{L174Q}</i> rat	
GABA	42.3 ± 13.4	28.1 ± 18.9	n.s.
Glutamate	689.0 ± 151.3	640.2 ± 295.1	n.s.

Data are the means ± S.E.M. n.s.: no significance

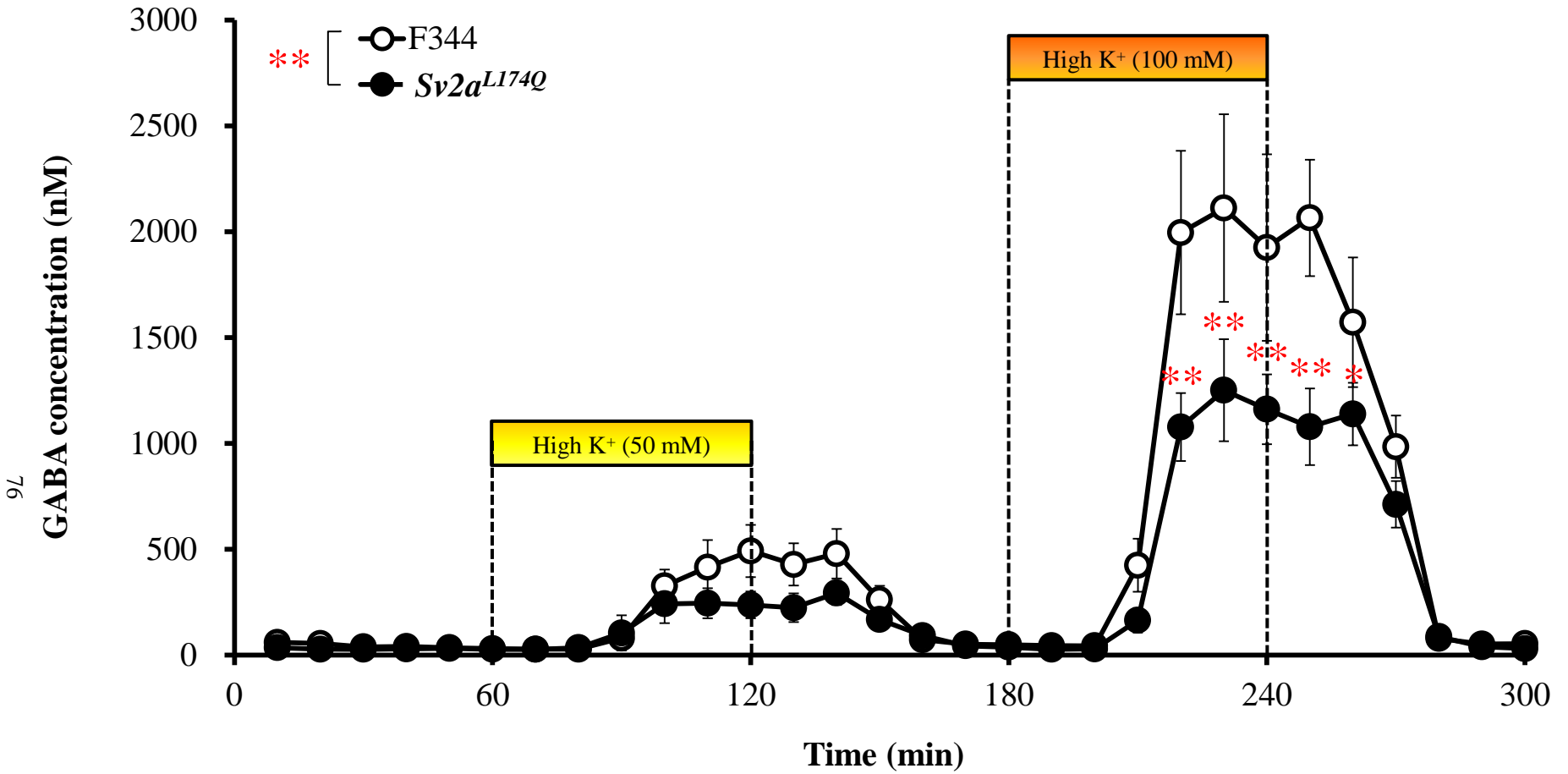


Fig. 27 Synaptic GABA release in the hippocampus of *Sv2α*^{L174Q} and F344 rats.

Each point represents the mean \pm S.E.M. of 6 or 10 animals. Two-way ANOVA analysis revealed statistically significant difference ($p < 0.01$) between *Sv2α*^{L174Q} and F344 rats. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Significantly different from F344 rats. Yellow and orange boxes represent the period of each depolarization stimulus with 50 and 100 mM K⁺, respectively.

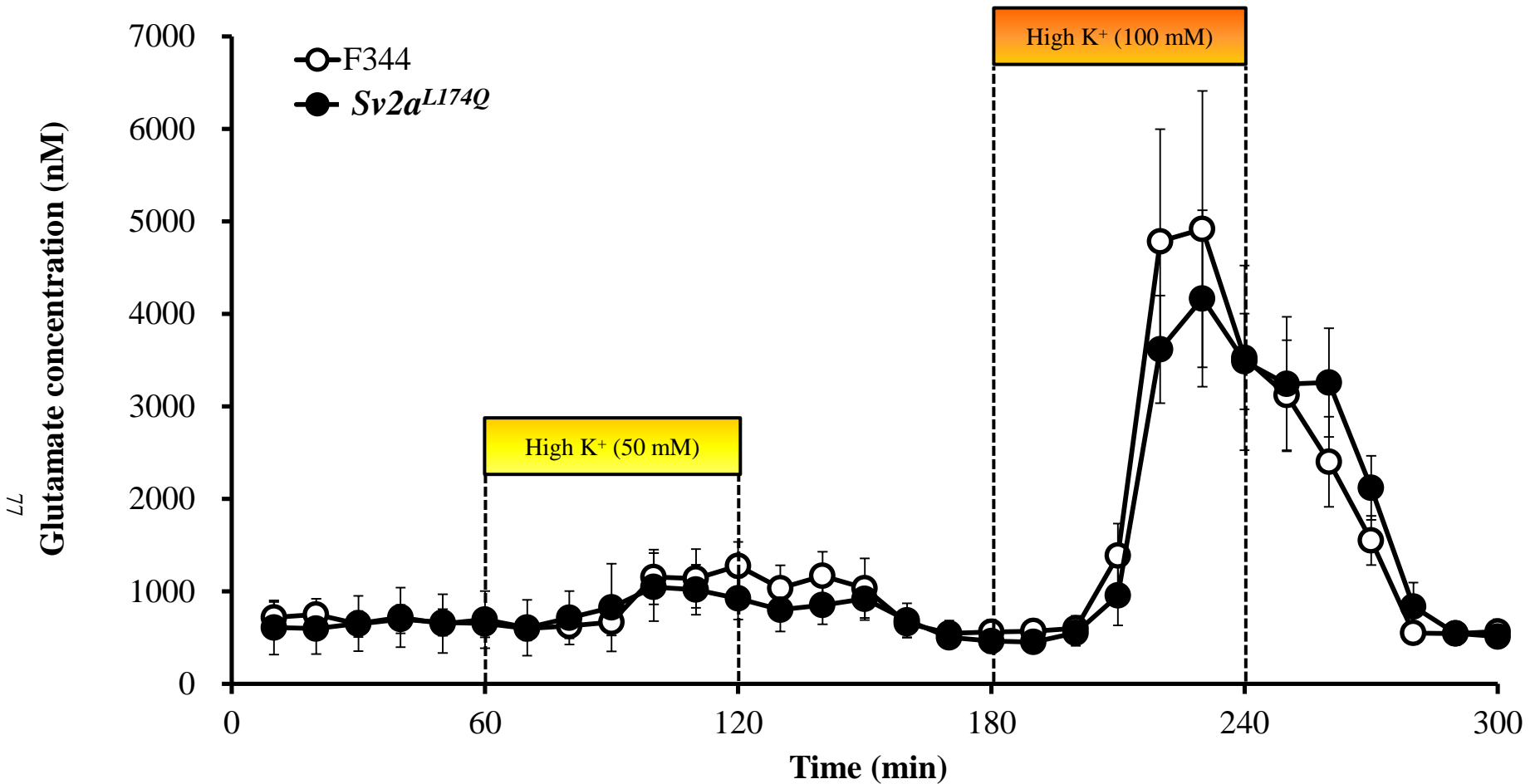


Fig. 28 Synaptic glutamate release in the hippocampus of *Sv2a*^{L174Q} and F344 rats.

Each point represents the mean \pm S.E.M. of 6 or 10 animals. There were no significant differences between *Sv2a*^{L174Q} and F344 rats. Yellow and orange boxes represent the period of each depolarization stimulus with 50 and 100 mM K⁺, respectively.

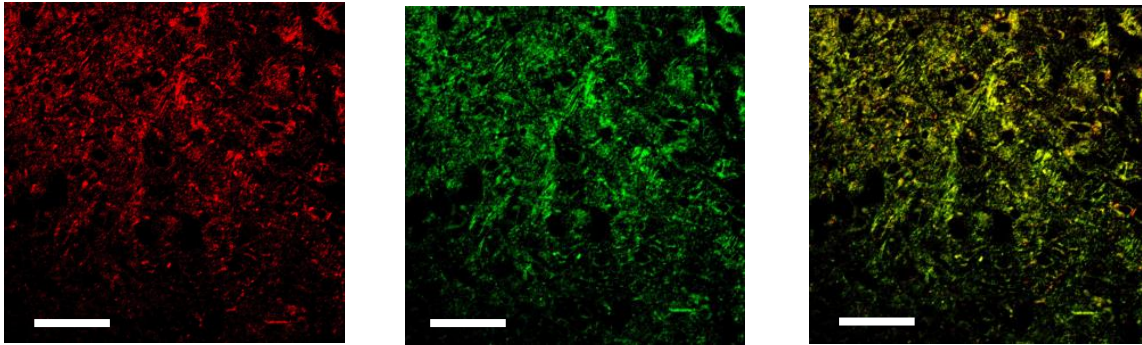
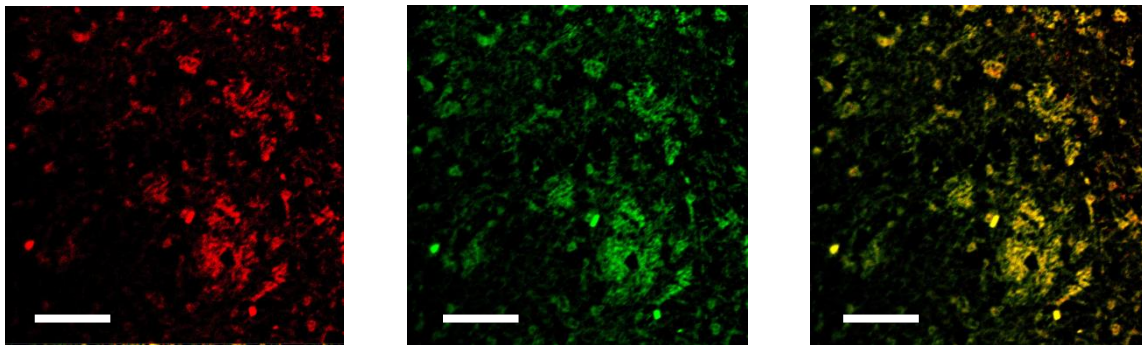
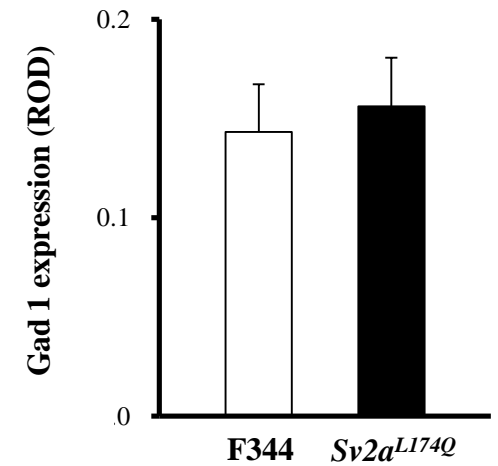
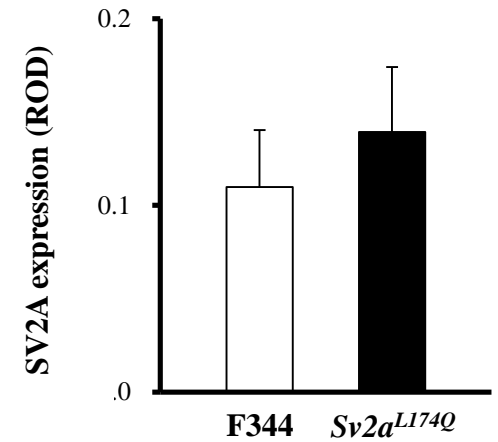
A**F344*****Sv2a*^{L174Q}****B**

Fig. 29 SV2A and Gad 1 double staining in the amygdala.

A: Photos showing representative double staining of Gad 1 (left: red), SV2A (center: green) in the amygdala of *Sv2a*^{L174Q} and F344 rats. Merged photos (right) revealed a predominant co-expression of SV2A with Gad 1 (GABAergic neurons) in the amygdala. B: Expression levels of SV2A and Gad 1 in *Sv2a*^{L174Q} and F344 rats. ROD, relative optical density. Each column represents the mean \pm S.E.M. of 4 animals. Scale bar: 50 μ m.

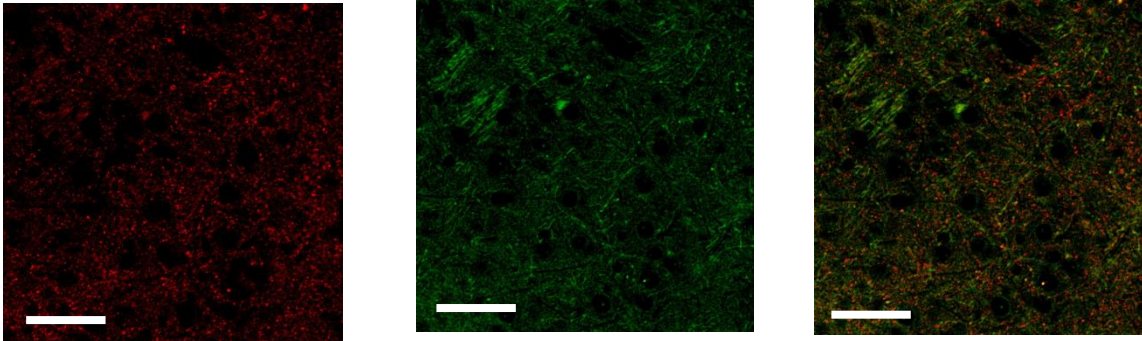
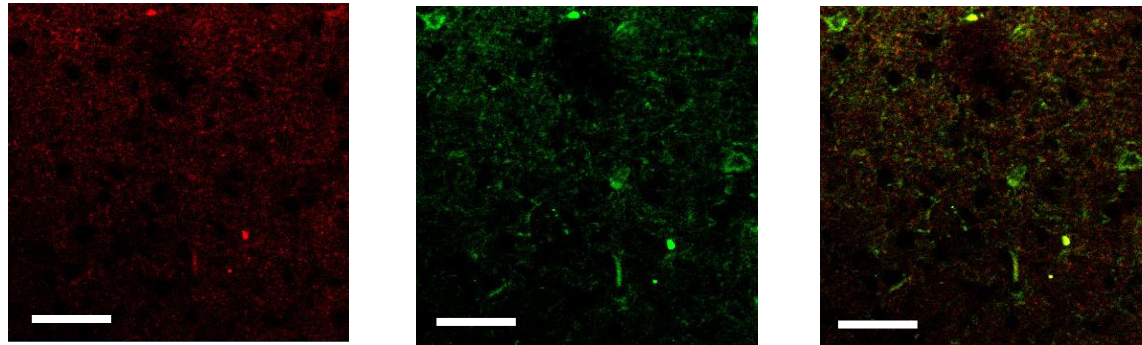
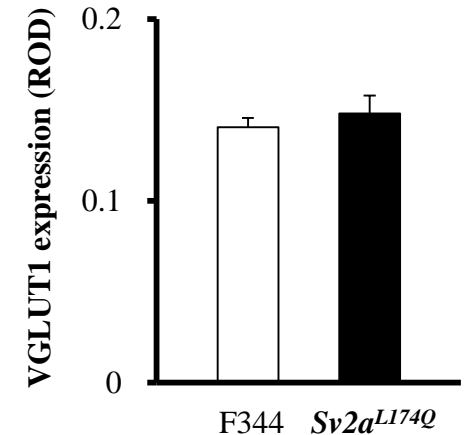
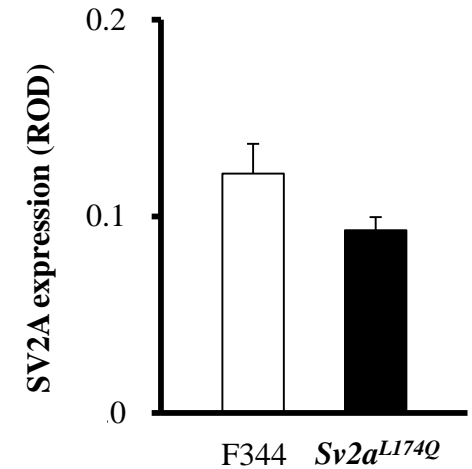
A**F344*****Sv2a^{L174Q}*****B**

Fig. 30 SV2A and VGLUT1 double staining in the amygdala.

A: Photos showing representative double staining of VGLUT1 (left: red), SV2A (center: green) in the amygdala of *Sv2a^{L174Q}* and F344 rats. Merged photos (right) revealed a predominant co-expression of SV2A with VGLUT1 (glutamatergic neurons) in the amygdala. B: Expression levels of SV2A and VGLUT1 in *Sv2a^{L174Q}* and F344 rats. ROD, relative optical density. Each column represents the mean \pm S.E.M. of 4 animals. Scale bar: 50 μ m.

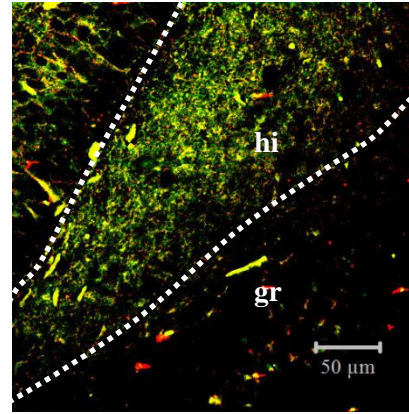
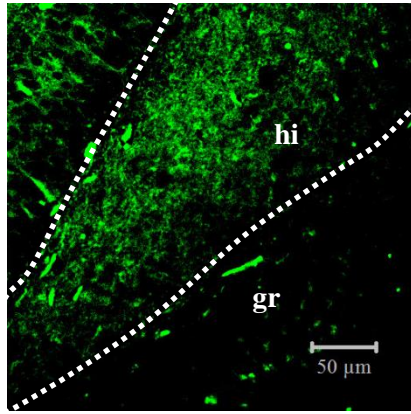
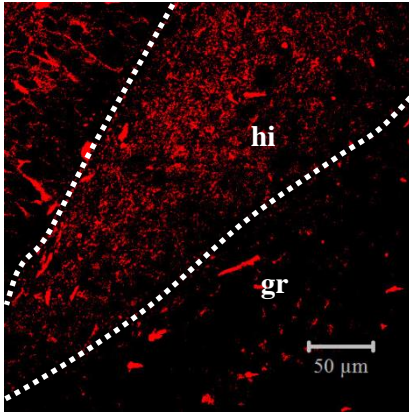
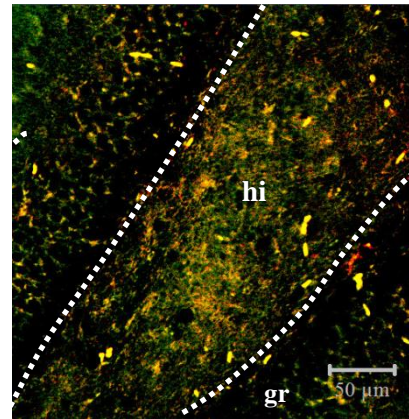
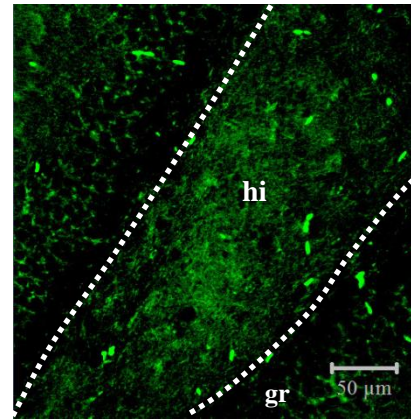
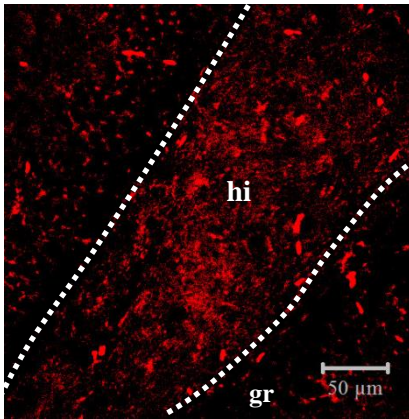
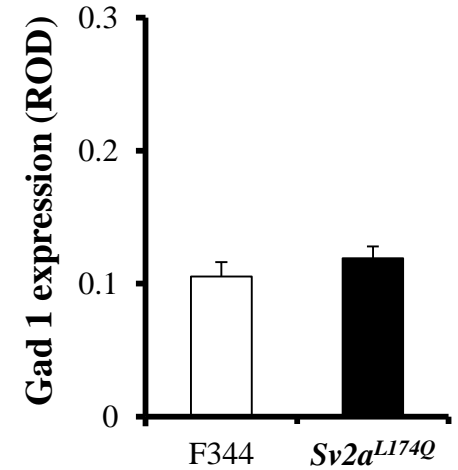
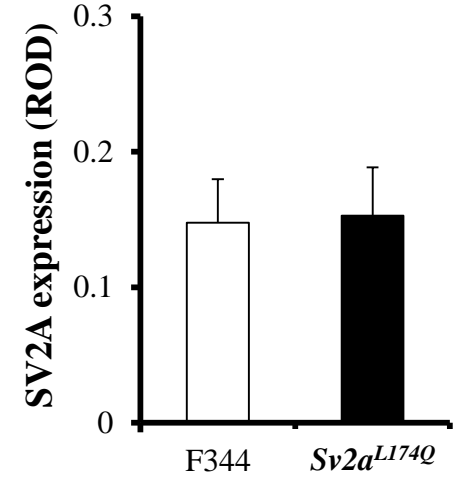
A**F344***Sv2a^{L174Q}***B**

Fig. 31 Double immunofluorescence staining of SV2A and Gad 1 in the hippocampal dentate gyrus.

A: Representative photos illustrating double immunofluorescence staining of Gad1 (left panel: red) and SV2A (center panel: green) in the hippocampal dentate region of F344 (upper panel) and *Sv2a^{L174Q}* (lower panel) rats. The left panel represents a merged image of SV2A- and Gad1-immunoreactivity. hi: hilus, gr: granular cell layer. B: Expressional levels of SV2A and Gad1 expression in the dentate hilus of *Sv2a^{L174Q}* and F344 rats. ROD: relative optical density. Each column represents the mean \pm S.E.M. of 4 animals.

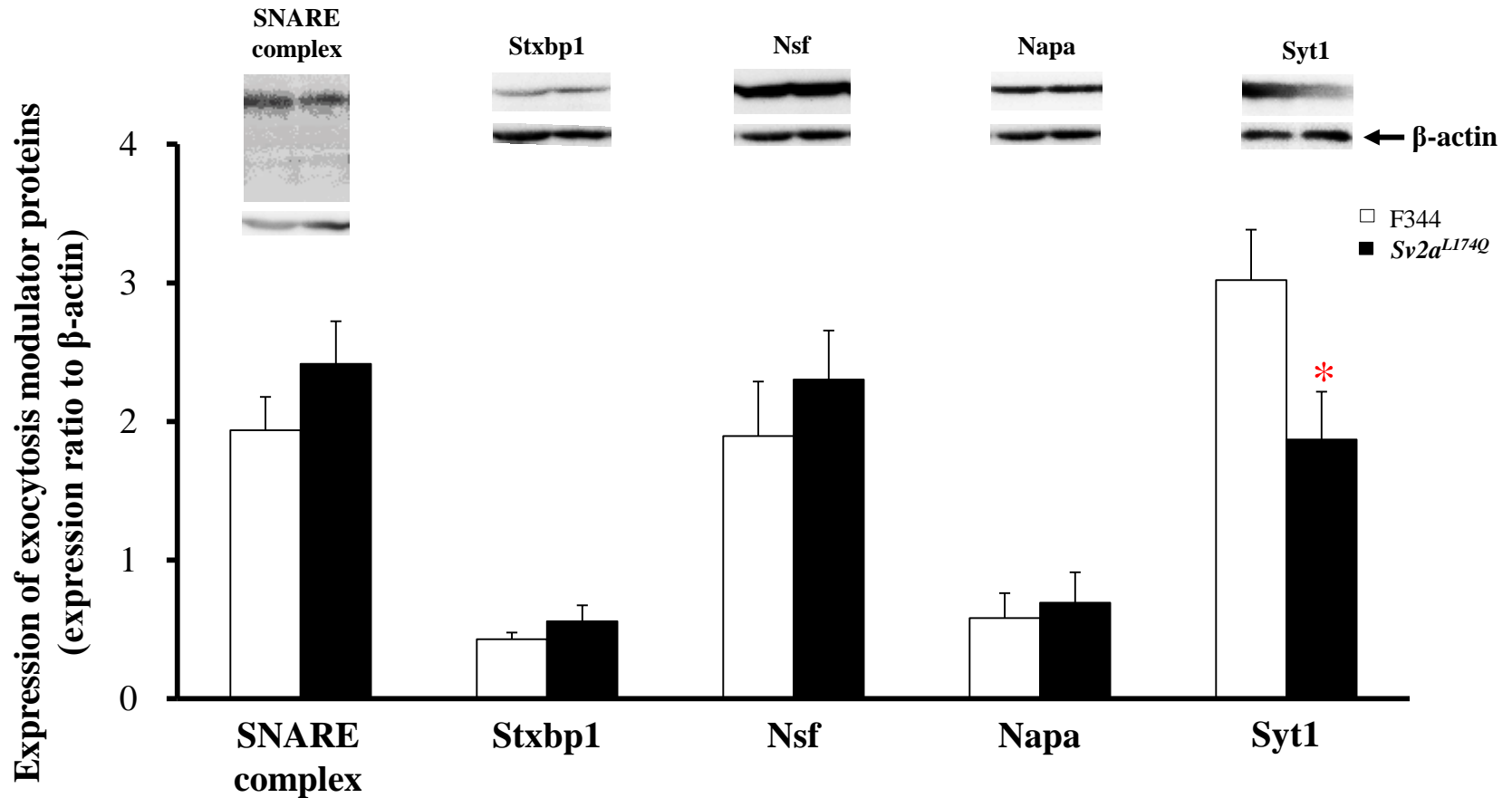


Fig. 32 Expressional changes in exocytosis modulator proteins by the *Sv2α^{L174Q}* mutation.

Western blot analysis of hippocampal Stxbp1, Nsf, Napa and Syt1 in *Sv2α^{L174Q}* and F344 rats. Expression level of each exocytotic modulatory protein is expressed as the relative optical density ratio to β -actin. Each column represents the mean \pm S.E.M. of 5 or 6 animals. SNARE complex: soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex, Stxbp1: syntaxin binding protein 1, Nsf: N-ethylmaleimide-sensitive factor, Napa: N-ethylmaleimide-sensitive factor alpha and Syt1: synaptotagmin1. * $p < 0.05$, Significantly different from F344 rats.