

## 総説 (第7回徳島医学会賞受賞論文)

### Ca<sup>2+</sup>チャンネル病マウスにおける小脳の異常と運動失調

澤田 和彦, 坂田 ひろみ, 福井 義浩

徳島大学医学部解剖学第二講座

(平成13年10月24日受付)

#### はじめに

電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャンネルは,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  の4つのサブユニットから成り<sup>1)</sup>, 神経細胞の興奮や神経伝達物質の放出に重要な役割を果たしている<sup>2)</sup>。細胞内に Ca<sup>2+</sup>が流れ込む“ポア”を構成する  $\alpha_1$ サブユニットは,  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{1E}$ ,  $\alpha_{1S}$ ,  $\alpha_{1G}$  の7種のサブタイプが知られていて, このチャンネルを通る Ca<sup>2+</sup>イオンを選択し, 膜電位を感知している<sup>1)</sup>。Ca<sup>2+</sup>チャンネルは,  $\alpha_1$ のサブクラスの違いにより, 生理学的, 薬理学的特性が異なり,  $\alpha_{1A}$ を持つ Ca<sup>2+</sup>チャンネルは, P/Q型に分類される<sup>3,4)</sup>。

$\alpha_{1A}$  サブユニットをコードする遺伝子は, ヒトでは19番染色体の *CACNL1A4* 遺伝子座に存在し, この遺伝子の異常による疾患には, 反復発作性運動失調2型 (EA 2) や家族性片麻痺性偏頭痛 (FHM), 脊髄小脳失調症6型 (SCA6) などがあり, いずれも優性遺伝する<sup>5,6)</sup>。マウスでは,  $\alpha_{1A}$  サブユニット遺伝子は8番染色体の *tottering* (*Cchl1a4*) 遺伝子座に存在する。この遺伝子に変異があるミュータントは *tottering*, *leaner*, ローリング, *rocker* が知られているが, ホモ個体は運動失調を呈する。Ca<sup>2+</sup>チャンネルに異常がある疾患を総称して, Ca<sup>2+</sup>チャンネル病と呼ぶ。本稿では, Ca<sup>2+</sup>チャンネル病マウスの発見, 遺伝子異常, 小脳の形態学的異常, 小脳の異常と運動失調との関連について概説する。

#### 運動失調を伴うミュータントマウスの発見

1962年に Green と Sidman により報告された *tottering* マウス<sup>7)</sup>は, 軽度の運動失調, 欠神発作, ミオクローヌス様発作を呈する。更に, その後10年間に, 同じ *tottering* 遺伝子座に変異を持つ *leaner* とローリングが報告された。Tsujii と Meier により発見された *leaner* マウス<sup>8)</sup>は

運動失調と欠神発作を示し, 運動失調の症状は重く, 自力で餌を食べることができず, 離乳後間もなく死に至る。1969年に織田によって発見されたローリングマウス<sup>9,10)</sup>は, 運動失調と後肢の過伸展を示す (図1)。運動失調の症状は *tottering* マウスよりもやや重い, *leaner* マウスに比べると軽く, その寿命は正常マウスと変わらず, 長いもので2年近く生きる。2001年には, Zwingman らにより4種目のミュータントとして *rocker* マウス<sup>11)</sup>が報告された。*rocker* マウスは, 軽度の運動失調と欠神発作を示す。表1に, これらマウスの運動失調の程度, 行動異常, 小脳の異常をまとめた。

#### Ca<sup>2+</sup>チャンネル病マウスにおける遺伝子の異常

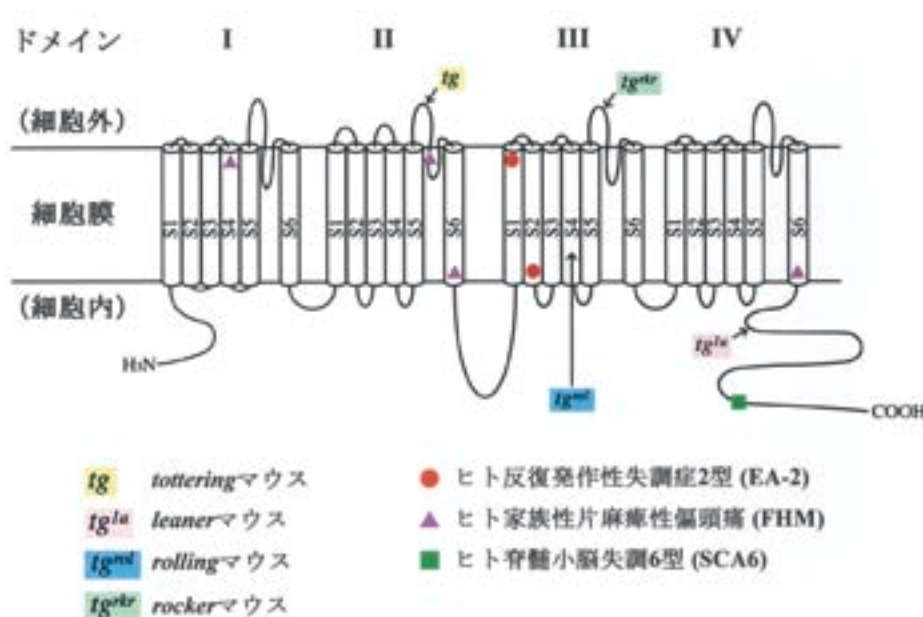
1996年になって *tottering* マウスと *leaner* マウスで Ca<sup>2+</sup>チャンネル  $\alpha_{1A}$  サブユニット遺伝子に点変異が生じ, そのアミノ酸配列に異常が起きていることが明らかになった<sup>12)</sup>。2000年にはローリングマウスで<sup>13)</sup>, 2001年には *rocker* マウスで<sup>11)</sup>,  $\alpha_{1A}$  サブユニットの遺伝子変異とアミノ酸配列の異常が報告された。図2に,  $\alpha_{1A}$  サブ



図1 ローリングマウスにみられた運動失調と後肢の過伸展。

表1 Ca<sup>2+</sup>チャンネル病マウスの運動失調，行動異常及び小脳の異常

	<i>tottering</i>	<i>leaner</i>	<i>rolling</i>	<i>rocker</i>
発見年	1962年 <sup>7)</sup>	1971年 <sup>8)</sup>	1969年 <sup>9)</sup>	2001年 <sup>11)</sup>
遺伝形式	常染色体劣性遺伝	常染色体劣性遺伝	常染色体劣性遺伝	常染色体劣性遺伝
運動失調の発症時期	生後21~28日	生後8~10日	生後10~14日	生後21~28日
運動失調の程度	軽度	重度	中程度	軽度
欠神発作の有無	+	+	-	+
ミオクローヌス様発作の有無	+	-	-	-
プルキンエ細胞でのTH発現の	+ <sup>21,22)</sup>	+ <sup>21,22)</sup>	+ <sup>23)</sup>	- <sup>11)</sup>
プルキンエ細胞のP型Ca <sup>2+</sup> 電流	約40%減少 <sup>18)</sup>	約60%減少 <sup>19,20)</sup>	約60%減少 <sup>13)</sup>	?
登上線維終末でのCRF	?	?	<sup>32)</sup>	?
苔状線維終末でのCRF	?	?	<sup>32)</sup>	?

図2 Ca<sup>2+</sup>チャンネル  $\alpha_{1A}$  サブユニットの構造と各種疾患における遺伝子異常の部位。

ユニットの構造と各ミュータントにおける異常部位を示した。 $\alpha_{1A}$  サブユニットは分子内に4個の繰り返し構造(ドメイン)を持ち、各ドメインは膜貫通部位(S1~S6)を有する。*tottering* マウスでは、 $\alpha_{1A}$  サブユニット遺伝子の1802番目のシトシンがチミンに変異している。この変異により $\alpha_{1A}$  サブユニットのドメインIIのS5-S6領域間の細胞外ループのアミノ酸配列の1つがプロリンからロイシンに置換している<sup>12)</sup>。*leaner* マウスでは、イントロンの5'末端スプライスドナー部位の1塩基変異(グアニンがアデニンに変異)によるスプライシングの異常がC末端細胞内領域のアミノ酸配列を変化させている<sup>12)</sup>。ローリングマウスでは、 $\alpha_{1A}$  サブユニット遺伝子の3784番目のシトシンがグアニンに変異し、その結

果、 $\alpha_{1A}$  サブユニットのドメインIIIのS4領域の1つのアミノ酸がアルギニンからグリシンに置換している<sup>13)</sup>。*rocker* マウスでは、 $\alpha_{1A}$  サブユニット遺伝子の3929番目のシトシンのアデニンへの変異により、ドメインIIIのS5-S6領域間の細胞外ループのアミノ酸配列の1つがスレオニンからリジンに置換している<sup>11)</sup>。

$\alpha_{1A}$  サブユニットは、中枢神経系の小脳や海馬、嗅球などで強い発現が認められ<sup>14)</sup>、マウス的小脳では全てのプルキンエ細胞の細胞体と一次および二次樹状突起、一部の顆粒細胞の細胞体と軸索(平行線維)で多く発現している<sup>15,17)</sup>。*leaner* マウス、ローリングマウス的小脳皮質での $\alpha_{1A}$  サブユニットの発現パターンは正常マウスと変わらない<sup>16,17)</sup>。しかし、 $\alpha_{1A}$  サブユニットの異常によ

り、ブルキンエ細胞で P/Q 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入 (P 型  $\text{Ca}^{2+}$  電流) が減少していると考えられる<sup>13, 18, 20)</sup>。

### ブルキンエ細胞におけるチロシン水酸化酵素 (TH) の発現異常

TH は、カテコールアミン合成酵素の 1 つで、チロシンを L-DOPA に変換する。小脳にはカテコールアミンニューロンは存在しないが、マウスでは一部のブルキンエ細胞で低レベルではあるが TH の発現が認められる<sup>21, 23)</sup>。Hess と Wilson は、*tottering* マウスと *leaner* マウスの小脳で多くのブルキンエ細胞が TH の発現異常を示すことを報告した<sup>21)</sup>。最近我々はローリングマウスのブルキンエ細胞でも TH の発現異常が起こることを明らかにした<sup>23)</sup>。ブルキンエ細胞での TH 発現異常は、他の遺伝子座に変異を持つ運動失調ミュータント、*dilute-lethal* マウス<sup>23)</sup> や *pogo* マウス<sup>24)</sup> でも認められるため、特定のミュータント遺伝子とは関係がないと考えられる。

Austin らは、*tottering* マウスおよび *leaner* マウスの小脳で発現している TH mRNA のサイズが 2.1kb であり、カテコールアミンニューロンが発現する TH mRNA のサイズと同じであることを示した<sup>22)</sup>。しかし、これらミュータントの小脳では、L-DOPA の産生はみられず、カテコールアミン合成に関与する他の酵素の発現も認められない<sup>21)</sup>。また、小脳のノルアドレナリン含量も正常マウスと変わらないことから<sup>25)</sup>、ミュータントマウスの小脳における TH は、カテコールアミンの合成に関与しないと思われる。

*tottering* マウス<sup>22, 26)</sup>、*leaner* マウス<sup>22, 26)</sup> およびローリングマウス<sup>15, 23, 27)</sup> の小脳では、TH 陽性ブルキンエ細胞は帯状の分布を呈する。虫部前葉では、TH 陽性ブルキンエ細胞のバンドが正中線を中心に左右対称に 5 本みられる (図 3B)。虫部後葉では、前葉に比べて多くのブルキンエ細胞が TH 陽性反応を示し、TH 陽性ブルキンエ細胞のバンドも太くなり、より複雑な分布を呈する (図 3D)。小脳半球でも TH 陽性ブルキンエ細胞の帯状の分布が観察される。このような TH 陽性ブルキンエ細胞の分布は、糖鎖分解酵素の 1 つである Zebrin II (aldolase C) の分布と一致することが知られている<sup>26)</sup>。

ローリングマウスでは、運動失調発症直後の 14 日齢で既に虫部 IX、X 葉で TH 陽性ブルキンエ細胞が観察され

る。21 日齢では、虫部の I ~ III 葉と VIII ~ X 葉にも TH 陽性ブルキンエ細胞が出現し、その帯状分布が明瞭になる。その後、TH 陽性ブルキンエ細胞は数を増し、4 ヶ月齢までには小脳の全ての小葉に分布するようになる<sup>23)</sup>。

### 小脳における corticotropin-releasing factor (CRF) 陽性神経線維の分布

小脳の主要な求心性投射線維は、登上線維と苔状線維である。登上線維は脳幹の腹側部にある下オリーブ核に由来し、苔状線維は脊髄の胸髄核や脳幹の副楔状束核、網様体核、外側網様核、橋核、前庭神経核、舌下神経前位核などに由来する。登上線維と苔状線維は神経伝達物質としてグルタミン酸やアスパラギン酸を持つが、この他に corticotropin-releasing factor (CRF)、コレシトキニン、ソマトスタチンなどの神経ペプチドを投射路固有の神経修飾因子として持っている。

CRF は、1981 年に Vale らにより下垂体前葉からの副腎皮質刺激ホルモン分泌を促す神経ホルモンとして単離された<sup>28)</sup>。その後、脳の様々な領域の神経細胞で CRF が発現され<sup>29, 30)</sup>、神経修飾因子として働いていることが明らかになった。小脳では、一部の登上線維終末と苔状線維終末が CRF を持ち<sup>31, 32)</sup>、ブルキンエ細胞や顆粒細胞のグルタミン酸への感受性を高めたり<sup>33, 34)</sup>、平行線維 - ブルキンエ細胞間のシナプス伝達効率の長期抑制 (LTD) を誘導したりする<sup>35)</sup>。このため CRF は、小脳における運動の学習・記憶形成に重要な役割を果たしていると考えられている。また、二次前庭小脳路に属する苔状線維が CRF を持つことや<sup>36, 37)</sup>、harmaline 投与により振戦を誘導されたラット<sup>38)</sup> や片側内耳を破壊されたラット<sup>39)</sup> の下オリーブ核尾側部の神経細胞で CRF mRNA の発現増加がみられることから、CRF の平衡感覚調節への関与が示唆されている。

正常マウスでは、CRF 陽性登上線維は小脳の全ての小葉にみられ、帯状の分布を示す。CRF 陽性苔状線維は虫部 I ~ X 葉、単小葉、係蹄小葉第 I 脚および第 II 脚、正中傍小葉、片葉に分布する<sup>31, 32)</sup>。小脳では、CRF 陽性の登上線維と苔状線維の分布は、ローリングマウスと正常マウスで変わらなかったが、両線維終末の CRF 陽性反応はローリングマウスの方が強かった (図 4)。ローリングマウス小脳では、一部の登上線維終末と苔状線維終末での CRF 量が高く、これらの線維が投射するブルキンエ細胞や顆粒細胞の興奮性を高められていると考えられ

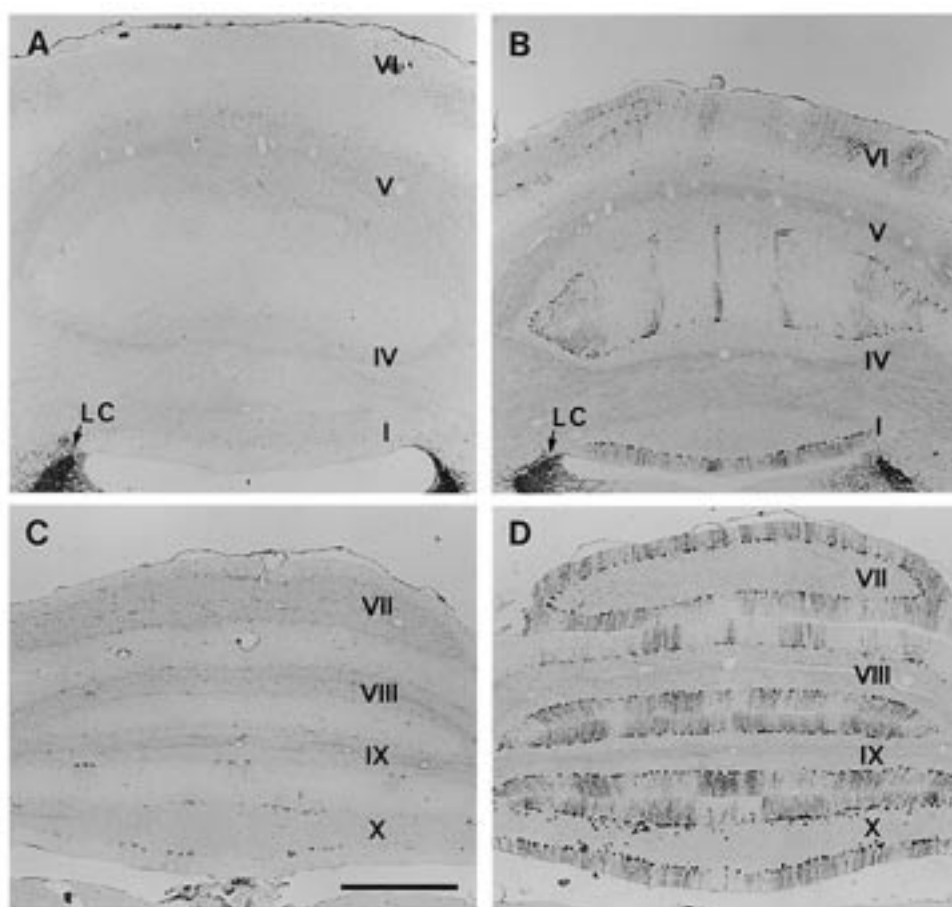


図3 ローリングマウスの小脳における TH の免疫染色。ローリングマウスの小脳では、一部のプルキンエ細胞で TH の発現異常がみられ、TH 陽性プルキンエ細胞は、帯状分布を示した。  
 A : 正常マウスの虫部前葉。TH 陽性プルキンエ細胞は認められない。  
 B : ローリングマウスの虫部前葉  
 C : 正常マウスの虫部後葉。弱い TH 陽性反応が少数のプルキンエ細胞で認められる。  
 D : ローリングマウスの虫部後葉  
 LC : 青斑核  
 スケール = 500 $\mu$ m

る。また、CRF 以外にもアセチルコリンやコレシトキニン、セロトニンなど求心性線維に含まれる神経伝達物質、或いは神経修飾因子による小脳皮質神経細胞の興奮性調節異常が運動失調発症に関与している可能性がある。

#### チロシン水酸化酵素 (TH) 発現と運動失調との関連

TH はカテコールアミン合成酵素の 1 つである。しかし、TH プロモーター遺伝子には Ca<sup>2+</sup> 応答配列が存在し、細胞内への過剰な Ca<sup>2+</sup> 流入により一部の非カテコールアミンニューロンでも TH 発現が引き起こされる<sup>40)</sup>。このため、プルキンエ細胞での TH 発現異常は、細胞内

Ca<sup>2+</sup> 濃度増加によるニューロンの機能異常を示唆している。運動失調発症直後 (14 日齢) のローリングマウスでは、虫部 IX, X 葉で TH 陽性プルキンエ細胞が観察される<sup>23)</sup>。また、*dilute-lethal* マウスでは、運動失調の発症と虫部 IX, X 葉での TH 陽性プルキンエ細胞の出現に関連性がある<sup>41)</sup>。虫部 IX, X 葉は前庭小脳に属し、平衡感覚の維持に働く部位であるため、前庭小脳のプルキンエ細胞の機能異常が運動失調の発症に関与していると考えられる。

*tottering* マウスのプルキンエ細胞では、P/Q 型 Ca<sup>2+</sup> チャンネルの機能異常を代償して、L 型 Ca<sup>2+</sup> チャンネル  $\alpha_{1C}$  サブユニットの発現増加がみられる<sup>42)</sup>。ローリングマウスでは、CRF 陽性登上線維が投射するプルキン

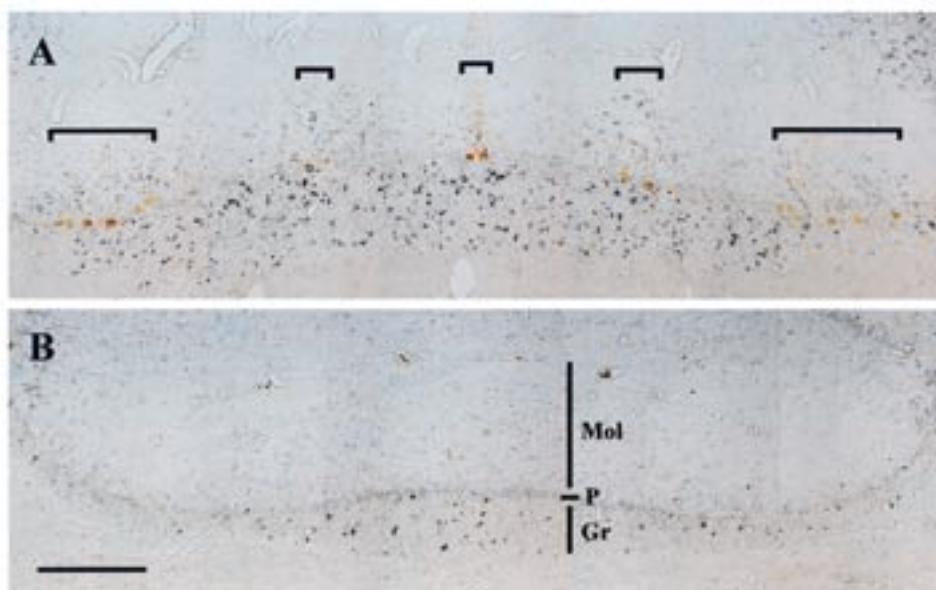


図4 ローリングマウスの小脳虫部前葉におけるCRFとTHの二重染色。ローリングマウスの小脳では、正常マウスに比べて登上線維と苔状線維の終末でのCRF陽性反応（青色）が強かった。また、ローリングマウスでは、CRF陽性登上線維が投射するプルキンエ細胞で、THの発現（茶褐色）異常がみられた。  
A：ローリングマウス，B：正常マウス，Mol：分子層，P：プルキンエ細胞層，Gr：顆粒細胞層，スケール=200 $\mu$ m

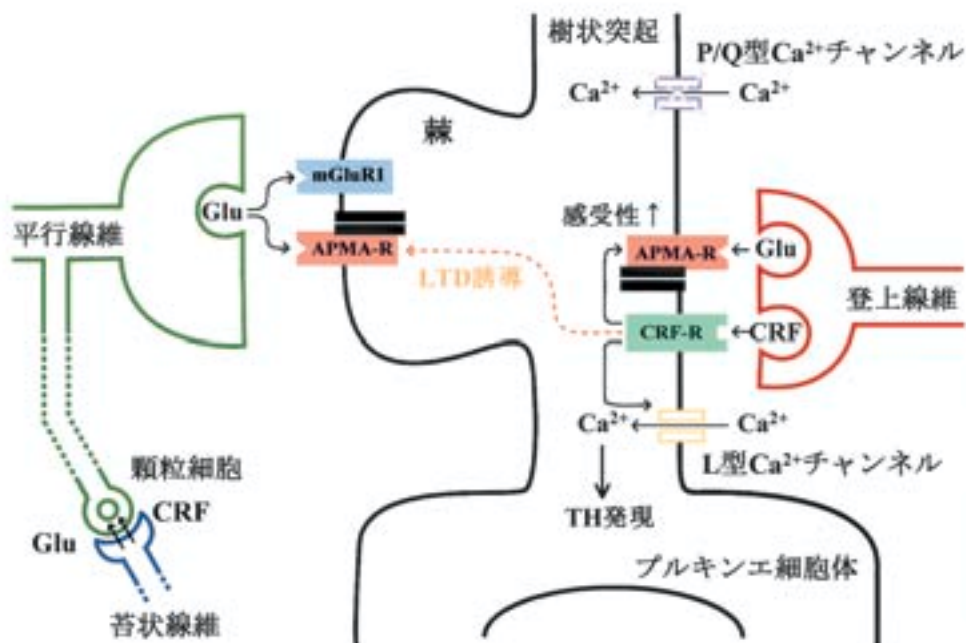


図5 小脳プルキンエ細胞におけるCRF陽性登上線維の働きに関する模式図。ローリングマウスでは、登上線維終末のCRF量が多く、CRFによるプルキンエ細胞の興奮性調節とLTD誘導に異常が生じていると考えられる。また、CRFは、L型Ca<sup>2+</sup>チャンネルを活性化し、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を増加させる。L型Ca<sup>2+</sup>チャンネルを介して流入したCa<sup>2+</sup>は、THプロモーター遺伝子に作用し、TH発現を引き起こすと考えられる。

工細胞でTH発現異常が観察され(図4A), また, *tottering* マウス小脳のTHmRNA発現はL型Ca<sup>2+</sup>チャンネル阻害剤の投与により抑制される<sup>43)</sup>。CRFはL型Ca<sup>2+</sup>チャンネルを活性化させる作用をもつことから<sup>44)</sup>, Ca<sup>2+</sup>チャンネル病マウスでは, 登上線維のCRFがL型Ca<sup>2+</sup>チャンネルからのCa<sup>2+</sup>流入を促進してプルキンエ細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度を増加させ, THの発現異常を引き起こすと考えられる(図5)。

## まとめ

P/Q型Ca<sup>2+</sup>チャンネル $\alpha_{1A}$ サブユニット遺伝子に変異を持つCa<sup>2+</sup>チャンネル病マウス(*tottering* マウス, *leaner* マウス, ローリングマウス, *rocker* マウス)は, いずれも小脳性運動失調を呈する。これらミュータントの小脳でみられる異常, すなわち, プルキンエ細胞でのTH発現異常や, 一部の登上線維と苔状線維の終末でのCRF陽性反応の増加は, Ca<sup>2+</sup>チャンネル病の病態, および小脳性運動失調の発症メカニズムを解明する上で重要な手掛かりになると考えられ, 今後の更なる研究が期待できる。

## 謝辞

本研究で用いたローリングマウスを供与して頂いた名古屋大学大学院生命農学研究科織田銃一博士に深謝する。この研究の一部は, 平成13年度科学研究費補助金(No.12671139)により行われた。

## 文献

- 1) Sather, W.A., Tanabe, T., Zhang, J.F., Mori, Y., et al.: Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel  $\alpha_1$  subunits. *Neuron*, 11 : 291-303, 1993
- 2) Miller, R.J.: The control of neuronal Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Prog. Neurobiol.*, 37 : 255-285, 1991
- 3) Mintz, I.M., Venema, V.J., Swiderek, K.M., Lee, T.D., et al.: P-type calcium channels blocked by the spider toxin  $\omega$ -Aga-IVA. *Nature*, 355 : 827-829, 1992
- 4) Teramoto, T., Kuwada, M., Niidome, T., Sawada, K., et al.: A novel peptide from funnel web spider venom,  $\omega$ -Aga-TK, selectively blocks P-type calcium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 196 : 134-140, 1993
- 5) Ophoff, R.A., Terwindt, G.M., Vergouwe, M.N., van Eijk, R., et al.: Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4. *Cell*, 87 : 543-552, 1996
- 6) Doyle, J.L., Stubbs, L.: Ataxia, arrhythmia and ion-channel gene defects. *Trends Genet.*, 14 : 92-98, 1998
- 7) Green, M.C., Sidman, R.L.: Tottering - a neuromuscular mutation in the mouse. *J. Hered.*, 53 : 233-237, 1962
- 8) Tsuji, S., Meier, H.: Evidence for allelism of leaner and tottering in the mouse. *Genet. Res. Camb.*, 17 : 83-88, 1971
- 9) Oda, S.: The observation of rolling mouse Nagoya (*rol*), a new neurological mutant, and its maintenance. *Exp. Anim.*, 22 : 281-286, 1973
- 10) Oda, S.: A new allele of the tottering locus, rolling mouse Nagoya, on chromosome no. 8 in the mouse. *Jpn. J. Genet.*, 56 : 295-299, 1981
- 11) Zwingman, T.A., Neumann, P.E., Noebels, J.L., Herrup, K.: Rocker is a new variant of the voltage-dependent calcium channel gene *Cacna1a*. *J. Neurosci.*, 21 : 1169-1178, 2001
- 12) Fletcher, C.F., Lutz, C.M., O'Sullivan T.N., Shaughnessy J.D. Jr., et al.: Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects. *Cell*, 87 : 607-617, 1996
- 13) Mori, Y., Wakamori, M., Oda, S., Fletcher, C.F., et al.: Reduced voltage sensitivity of activation of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels is associated with the ataxic mouse mutation *rolling Nagoya (tg<sup>rol</sup>)*. *J. Neurosci.*, 20 : 5654-5662, 2000
- 14) Tanaka, O., Sakagami, H., Kondo, H.: Localization of mRNAs of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup>-channels: four subtypes of  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -subunits in developing and mature rat brain. *Mol. Brain Res.*, 30 : 1-16, 1995
- 15) Sawada, K., Haga, H., Fukui, Y.: Ataxic mutant mice with defects in Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha_{1A}$  subunit gene: morphological and functional abnormalities in cerebellar cortical neurons. *Cong. Anom.*, 40 : 99-107, 2000
- 16) Sawada, K., Sakata-Haga, H., Ando, M., Takeda, N., et al.: An increased expression of Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha_{1A}$  subunit immunoreactivity in deep cerebellar neurons of roll-

- ing mouse Nagoya. *Neurosci. Lett.*, 316 : 87-90, 2001
- 17) Lau, F.C., Abbott, L.C., Rhyu, I.J., Kim, D.S., et al. : Expression of calcium channel  $\alpha_{1A}$  mRNA and protein in the leaner mouse ( $tg^{la}/tg^{la}$ ) cerebellum, *Mol. Brain Res.*, 59 : 93-99, 1998
- 18) Wakamori, M., Yamazaki, K., Matsunodaira, H., Teramoto, T., et al. : Single tottering mutations responsible for the neuropathic phenotype of the P-type calcium channel. *J. Biol. Chem.*, 273 : 34857-34867, 1998
- 19) Lorenzon, N.M., Lutz, C.M., Frankel, W.N., Beam, K.G. : Altered calcium channel currents in Purkinje cells of the neurological mutant mouse *leaner*. *J. Neurosci.*, 18 : 4482-4489, 1998
- 20) Dove, L.S., Abbot, L.C., Griffith, W.H. : Whole-cell and single-channel analysis of P-type calcium currents in cerebellar Purkinje cells of leaner mutant mice. *J. Neurosci.*, 18 : 7687-7699, 1998
- 21) Hess E.J., Wilson M.C. : Tottering and leaner mutations perturb transient developmental expression of tyrosine hydroxylase in embryologically distinct Purkinje cells. *Neuron* 6 : 123-132, 1991
- 22) Austin, M.C., Schultzberg, M., Abbott L.C., Montpie P., et al. : Expression of tyrosine hydroxylase in cerebellar Purkinje neurons of the mutant tottering and leaner mouse. *Mol. Brain Res.*, 15 : 227-240, 1992
- 23) Sawada, K., Komatsu, S., Haga, H., Sun, X.-Z., et al. : Abnormal expression of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in cerebellar cortex of ataxic mutant mice. *Brain Res.*, 829 : 107-112, 1999
- 24) Jeong, Y.-G., Kim, M.-K., Hawkes, R. : Ectopic expression of tyrosine hydroxylase in Zebrin II immunoreactive Purkinje cells in the cerebellum of the ataxic mutant mouse, *pogo*. *Dev. Brain Res.*, 129 : 201-209, 2001
- 25) Muramoto, O., Kanazawa, I., Ando, K. : Neurotransmitter abnormality in Rolling mouse Nagoya, an ataxic mutant mouse. *Brain Res.*, 215 : 295-304, 1981
- 26) Abbott, L.C., Isaacs K.R., Heckroth, J. A. : Co-localization of tyrosine hydroxylase and zebrin II immunoreactivities in Purkinje cells of the mutant mice, tottering and tottering/leaner. *Neuroscience* 71 : 461-475, 1996
- 27) Sawada, K., Fukui, Y. : Expression of tyrosine hydroxylase in cerebellar Purkinje cells of ataxic mutant mice : its relation to the onset and/or development of ataxia. *J. Med. Invest.*, 48 : 5-10, 2001
- 28) Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., Rivier, J. : Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and  $\beta$ -endorphin. *Science* 213 : 1394-1397, 1981
- 29) Merchenthaler, I., Vigh, S., Petrusz, P., Schally, A.V. : Immunocytochemical localization of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat brain. *Am. J. Anat.*, 165 : 385-396, 1982
- 30) Olschowka, J.A., O'Donohue, T.L., Mueller, G.P., Jacobowitz, D.M. : The distribution of corticotrophin releasing factor-like immunoreactive neurons in the rat brain. *Peptides* 3 : 995-1015, 1982
- 31) King, J.S., Madtes, P. Jr., Bishop, G.A., Overbeck, T. L. : The distribution of corticotropin-releasing factor (CRF), CRF binding sites and CRF<sub>1</sub> receptor mRNA in the mouse cerebellum. *Prog. Brain Res.*, 114 : 55-66, 1997
- 32) Sawada, K., Sakata-Haga, H., Hisano, S., Fukui, Y. : Topological relationship between corticotropin-releasing factor-immunoreactive cerebellar afferents and tyrosine hydroxylase-immunoreactive Purkinje cells in a hereditary ataxic mutant, rolling mouse Nagoya. *Neuroscience* 102 : 925-935, 2001
- 33) Bishop, G.A. : Neuromodulatory effects of corticotropin releasing factor on cerebellar Purkinje cells : an *in vivo* study in the cat. *Neuroscience* 39 : 251-257, 1990
- 34) Bishop, G.A., King, J.S. : Differential modulation of Purkinje cell activity by enkephalin and corticotropin releasing factor. *Neuropeptides* 22 : 167-174, 1992
- 35) Miyata, M., Okada, D., Hashimoto, K., Kano, M., et al. : Corticotropin-releasing factor plays a permissive role in cerebellar long-term depression. *Neuron* 22 : 763-775, 1999
- 36) Errico, P., Barmack, N.H. : Origins of cerebellar mossy and climbing fibers immunoreactive for corticotropin-releasing factor in the rabbit. *J. Comp. Neurol.*, 336 : 307-320, 1993
- 37) Ikeda, M., Houtani, T., Ueyama, T., Sugimoto, T. : Distribution and cerebellar projections of cholinergic and corticotropin-releasing factor-containing neurons in the caudal vestibular nuclear complex and adjacent brainstem structures. *Neuroscience* 49 : 635-651, 1992

- 38 ) Cummings, S., Hinds, D., Young, W.S. III : Corticotropin-releasing factor mRNA increases in the inferior olivary complex during harmaline-induced tremor. *Brain Res.*, 660 : 199 208 ,1994
- 39 ) Kaufman, G.D., Anderson, J.H., Beitz, A.J. : Hemilabyrinthectomy causes both an increase and a decrease in corticotropin releasing factor mRNA in rat inferior olive. *Neurosci. Lett.*, 165 : 144 148 ,1994
- 40 ) Nankova, B., Hiremagalur, B., Menezes, A., Zeman, R., et al. : Promoter elements and second messenger pathways involved in transcriptional activation of tyrosine hydroxylase by ionomycin. *Mol. Brain Res.*, 35 : 164 172 ,1996
- 41 ) Sawada, K., Komatsu, S., Haga, H., Oda, S., et al. : Abnormal expression of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in Purkinje cells precedes the onset of ataxia in *dilute-lethal* mice. *Brain Res.*, 844 : 188 191 ,1999
- 42 ) Campbell, D.B., Hess, E.J. : L-type calcium channels contribute to the tottering mouse dystonic episodes. *Mol. Pharmacol.*, 55 : 23 31 ,1999
- 43 ) Fureman, B.E., Campbell, D. B., Hess E.J. : L-type calcium channel regulation of abnormal tyrosine hydroxylase expression in cerebella of tottering mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 868 : 217 219 ,1999
- 44 ) Kanno, T., Suga, S., Nakano, K., Kamimura, N., et al. : Corticotropin-releasing factor modulation of Ca<sup>2+</sup> influx in rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes* 48 : 1741 1746 ,1999



## *Cerebellar abnormalities in relation to the onset and/or development of ataxia in mice with Ca<sup>2+</sup> channelopathy*

*Kazuhiko Sawada, Hiromi Sakata-Haga, and Yoshihiro Fukui*

*Department of Anatomy, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima, Japan*

### SUMMARY

This review summarizes recent studies on the morphological abnormalities of cerebella in four ataxic mutant mice, i.e., *tottering* mouse, *leaner* mouse, rolling mouse Nagoya (RMN) and *rocker* mouse. These mutants carry mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha_{1A}$  subunit gene, and become useful models for human Ca<sup>2+</sup> channelopathy such as episodic ataxia type-2 and familial hemiplegic migraine. Abnormal expression of tyrosine hydroxylase (TH) in some Purkinje cells has been observed in *tottering* mice, *leaner* mice and RMN, but not in *rocker* mice. However, Purkinje cells did not seem to synthesize catecholamines. Since the transcription of the TH gene is facilitated by Ca<sup>2+</sup>, TH expression in the mutant Purkinje cells indicates functional abnormality by alterations in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations. Corticotropin-releasing factor (CRF) immunoreactivity in some climbing or mossy fibers was higher in RMN than in controls. Double immunostaining for CRF and TH revealed a correspondence in the distribution of TH-positive Purkinje cells to terminal fields of CRF-positive climbing fibers in RMN. Therefore, CRF seems to alter granule and Purkinje cell functions, such as abnormal TH expression, indicating the possible expression of ataxic symptoms.

Key words : mutant mouse, ataxia, Ca<sup>2+</sup> channelopathy, tyrosine hydroxylase, corticotropin-releasing factor