

様式2

平成30年度研究助成報告書

平成31年4月2日

NPO法人レット症候群支援機構

代表理事 谷岡 哲次 殿

氏名 片山 将一



1. 研究課題 レット症候群治療を目指した Cyclin-dependent kinase-like 5 の活性を回復する化合物の探索
2. 研究期間 平成30年 4月 1日 ～ 平成31年 3月 31日
3. 研究（経過・成果）の概要

Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) は非定型レット症候群の原因遺伝子の一つであり、その転写産物はタンパク質リン酸化酵素をコードする。非定型レット症候群患者さんに見られる CDKL5 変異の多くはその触媒領域中に存在するため、CDKL5 活性の消失が、非定型レット症候群の発症を導くと考えられる。そのため、CDKL5 の活性を直接的もしくは間接的にカバーする化合物を探索することは非定型レット症候群の治療に向けた重要な課題である。本研究では以下の二つのアプローチから研究を進めた。

・ CDKL5 の新規酵素活性検出法の確立

CDKL5 の酵素活性を直接的に回復させる化合物の探索の為には簡便かつ大規模に CDKL5 の活性を検出する手法を用いる必要がある。そのため、始めに申請者らは CDKL5 の新規活性検出法の確立を試みた。その結果、大腸菌において CDKL5 を発現させた際に見られる自己リン酸化活性と、リン酸基を特異的に認識する分子である Phos-tag を利用することによって、CDKL5 の活性を簡便に評価できる手法を確立した。また、この手法は実際の非定型レット症候群患者さんに見られる CDKL5 変異体の活性を評価するために有用であることを明らかにした。この結果はレット症候群支援機構より助成を受けたことを明記した上で、Analytical Biochemistry 誌に掲載されている。

今後は確立した活性検出法を使用して、CDKL5 の活性を回復させる化合物を探索していきたいと考えている。

・ CDKL5 ノックアウト細胞における抑肝散の効果検討

CDKL5 の変異は神経細胞の成熟不全を導く。従って、神経細胞の分化を促進させる化合物は、CDKL5 の機能を間接的にカバーすることができると考えられる。申請者らのグ

ループではこれまでに、抑肝散と呼ばれる漢方薬が神経細胞分化を促進することを見出している。抑肝散は7つの生薬から構成されており、神経症、不眠症や小児夜泣きなどに処方されており、安全性の高い薬物であると見なされている。このことから、申請者らは、抑肝散が将来的に非定型レット症候群の治療薬候補になるのではないかと考え、CDKL5をノックアウトした非定型レット症候群モデル細胞に対し効果を示すかを検討した。モデル細胞株として、神経分化能をもつ胚性腫瘍細胞株であるP19細胞を使用した。CRISPR-Cas9法によってCDKL5のノックアウトを試みたところ、タンパク質レベルでCDKL5の発現が消失したP19細胞株を取得した。この細胞株を神経分化させる際に抑肝散を添加したところ、野生株と同様に神経分化が促進されることが明らかになった。

今後は個体レベルでの抑肝散の神経分化作用の検討を行っていきたいと考えている。

様式1

助成金収支報告書

平成 31 年 4 月 2 日

NPO 法人レット症候群支援機構

代表理事 谷岡 哲次 殿

氏名 片山 将一



1. 研究課題名 レット症候群治療を目指した Cyclin-dependent kinase-like 5 の活性を回復する化合物の探索

2. 助成金交付額 1,000,000 円

3. 費目別使用実績

(単位 円)

項目	金額	備考
【消耗品】 pBAsi-mU6 Pur DNA	33,966	
【消耗品】 D-MEM(グルコース不含)(L-グルタミン、フノールレッド含有) 他	3,715	
【消耗品】 Kinase Screening Library(96-Well)	162,000	
【消耗品】 Phos-tag アクリルアミド、TrueLine100mm Culture Dish 他	135,486	
【消耗品】 VORTEX-GENIE2	41,040	
【消耗品】 ホスファターゼ阻害剤カクテル	10,044	
【消耗品】 プロッティング用ろ紙、カルチャープレート 他	138,120	
【消耗品】 PKCEPSILON、PKCZETA	81,226	
【消耗品】 Alkaline Phosphatase、プレステインドタンパク質マーカー 他	69,967	
【消耗品】 Phos-tag アクリルアミド AAL-107 他	114,242	
【消耗品】 ケミルミ ワン スーパー、LB 培地、Lennox	29,200	
【消耗品】 Anti-mouse IgG、HRP-linked Antibody 他	92,232	
【消耗品】 マウス(SPF)C57BL/6J	18,144	

