

平成 27 年度研究助成報告書

平成 28 年 5 月 31 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 田中輝幸



1. 研究課題 CDKL5 遺伝子変異によるレット症候群のシナプス分子病態機序と治療法の解明

2. 研究期間 平成 27 年 4 月 8 日 ~ 平成 28 年 3 月 31 日

3. 研究（経過・成果）の概要

私は、平成 27 年度レット症候群支援機構研究助成金を得て、非定型レット症候群原因遺伝子 *CDKL5* (*Cyclin-dependent kinase-like 5*) 変異による病態機序解明を大きな目的として、*CDKL5* 機能欠失によるシナプス機能異常の分子機構の解明に焦点を当てた研究を推進した。

我々のこれまでの研究で、我々が独自に作製した *Cdkl5* KO マウスでは大脳の興奮性ニューロンのシナプス後肥厚部 (PSD) において NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニット蛋白 *GluN2B* の異常集積を来し、記憶、学習、情動、及び興奮毒性に重要な役割を果たす NMDA 型受容体の機能異常を起こす事が明らかになった。よって次に解決すべき重要な問題は、PSD における *GluN2B* の異常集積の原因と、NMDA 受容体機能異常の正常化の方法の解明である。そこで我々はまず、*CDKL5* が生理的条件下で大脳ニューロンのシナプス後部において PSD 関連蛋白をリン酸化し、*GluN2B* と関連蛋白の輸送動態を制御するという仮説を立て、(1) *CDKL5* 相互作用・リン酸化蛋白の同定と、(2) *CDKL5* によるリン酸化の機能同定、による検証を行った。方法として、NMDA 受容体サブユニット蛋白とその相互作用蛋白を網羅的に抽出、大腸菌及び小麦胚芽抽出系を用いて組み換え蛋白を発現・精製し、pull-down アッセイ、in vitro キナーゼアッセイ、Pho-tag PAGE 解析などによって、*CDKL5* 相互作用とリン酸化の同定を進めた。その結果、NMDA 受容体サブユニット蛋白 *GluN2B* と親和性の高い足場蛋白 *SAP102* に結合し、細胞内輸送に重要な役割を果たす蛋白の一つを基質として同定し、更にその *CDKL5* によるリン酸化が、*SAP102* との結合性を調節する事を明らかにした。逆に *CDKL5* 蛋白の欠失は、その蛋白のリン酸化が欠失した脱リン酸化

状態を生じ、SAP102-GluN2B 複合体のシナプス輸送を異常亢進すると考えられ、*CDKL5* 変異に伴う異常のメカニズムが、リン酸化欠失による SAP102-GluN2B 複合体シナプス輸送の障害である事が示唆された。

本年度の研究の最も重要な成果は、*CDKL5* のこれまで未知のリン酸化基質をシナプス後部において同定し、そのリン酸化がシナプス NMDA 受容体サブユニット蛋白の動態制御を担う事を初めて見出した事である。*CDKL5* 遺伝子変異に伴う病態は、*CDKL5* リン酸化の欠失によるシナプス受容体蛋白動態調節異常によるシナプス機能不全である事が強く示唆され、これは神経発達障害の分子基盤、病態機序解明のための大きな進歩と考えられる。このシナプス蛋白輸送異常の正常化が、*CDKL5* 変異に伴う病態の治療に結びつくと考えられ、更なる研究を進めている。現在これらの新規知見を学術誌に投稿中であり、出来るだけ早く世界に発信し、より根本的、効果的な治療に向けた研究を推進する。

様式 1

助成金収支報告書

平成 28 年 5 月 31 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 田中輝幸



1. 研究課題名 CDKL5 遺伝子変異によるレット症候群のシナプス分子病態機序と治療法の解明

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
消耗品費	966,485 円	試薬等
通信運搬費	1,871 円	宅配便送料
その他委託費	31,644 円	DNA シーケンスカイセキ等
合計	1,000,000 円	

※詳細につきましては、受払簿（事務委任をしておりました東京大学が作成したもの）を添付いたします。