

論文の内容の要旨

| | |
|---|---------------------------|
| 論文提出者氏名 | Enas Ahmed Fathalla Kasem |
| 論文審査担当者 | 主査 古庄知己 副査 沢村達也 ・ 関島良樹 |
| 論文題目 Deficiency of calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK) disrupts the excitatory-inhibitory balance of synapses by down-regulating GluN2B. (CASK 欠損で GluN2B の発現低下による興奮性・抑制性シナプスのバランス異常をきたす) | |
| (論文の内容の要旨) <p>〔背景と目的〕 シナプス足場タンパク質である CASK は、シナプスの形成や機能に関わっていると考えられている。近年、CASK が MICPCH 症候群の原因遺伝子であることが判明している。MICPCH 症候群は、小脳・橋の低形成を特徴とする X 連鎖性神経発達障害で、知的障害や點頭てんかんを伴う症例が多く、患者のほとんどは女児である。X 染色体上の遺伝子は、女性では X 染色体不活性化を受け、2 本ある染色体の一つが細胞ごとにランダムに不活性化されることが知られている。本研究で、MICPCH 症候群の神経病態を解明すべく、CASK のメスヘテロノックアウトマウスを疾患モデルとして、CASK 欠損ニューロンの状態を電気生理学的、形態学的に解析した。</p> <p>〔方法〕 CASK メスヘテロノックアウトマウスから急性脳スライスを作成し、大脳皮質のニューロンから patch pipette で mRNA を吸引し、single-cell RT-PCR によりニューロンごとのジェノタイプングを行い、CASK 発現ニューロンと、CASK 欠損ニューロンを区別した。patch clamp 法により、CASK 発現ニューロンと、CASK 欠損ニューロンでのニューロンの発火様式、興奮性および抑制性シナプスの自発的活動 (mEPSC と mIPSC)、電気刺激によるシナプス応答 (eEPSC と eIPSC) を解析した。子宮内エレクトロポレーション法を用いて、CASK および CASK の制御下にあると予測される GluN2B に対する shRNA、野生型および変異型 CASK、野生型 GluN2B のコンストラクトをマウス大脳皮質 2/3 層の錐体ニューロンに導入し、patch clamp 法によりシナプス伝達機能を測定した。</p> <p>〔結果〕 single-cell RT-PCR により、CASK メスヘテロノックアウトマウスの脳は、CASK 発現ニューロンと CASK 欠損ニューロンが、ランダムなモザイク状に分布していることが確認された。patch clamp 法により CASK 欠損ニューロンの電気的活動を解析した結果、mEPSC の頻度が上昇し、mIPSC の頻度が低下するという興奮性・抑制性シナプス機能のバランス異常が認められた。子宮内エレクトロポレーション法によりマウスの大脳皮質 2/3 層の錐体ニューロンに CASK の shRNA を導入し、CASK の発現を抑制 (knockdown) したものに対し、CASK の各種変異コンストラクトでレスキューを試みたところ、CASK のグアニレートキナーゼドメインを欠損したコンストラクトでは CASK 欠損の表現型がレスキューされなかった。CASK のグアニレートキナーゼドメインの、TBR1 という転写調節因子との結合部位に変異を加えた T704A 変異でもレスキューできなかった。CASK-TBR1 複合体は、NMDA 受容体サブユニットである GluN2B の転写を促進することが知られているため、CASK を knockdown したニューロンに GluN2B を過剰発現すると、CASK 欠損で見られた興奮性・抑制性シナプスのバランス異常がレスキューされた。このことから、この表現型は CASK の TBR1 との結合を介した GluN2B の転写が、ニューロンの発達過程で正常に機能しないために起こっていることによっておこることが示唆された。</p> <p>〔結論〕 CASK メスヘテロノックアウトマウスをモデルとした研究から、MICPCH 症候群の脳では、X 染色体不活性化によって CASK 欠損ニューロンがモザイク状の分布をし、CASK 欠損ニューロン特異的な興奮性・抑制性シナプスのバランス異常が起きていることを見出した。そして、これは CASK-TBR1 複合体による GluN2B の転写の異常によることが示唆された。</p> | |