



Cnpy3 2xHA mice reveal neuronal expression of Cnpy3 in the brain

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2023-11-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Islam, Md. Monirul メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/0002000042

論文審査の結果の要旨

Cnpy3 (Canopy FGF Signaling Regulator 3) は、免疫細胞 Toll-like receptor 4 (TLR4) のフォールディングと輸送を制御するシャペロンとして知られ、小胞体に局在している。*Cnpy3* ノックアウトマウスでは、免疫細胞における複数の TLR の表面発現が減少し、発作を誘発するポリリポサッカライド抵抗性を示すことが報告されている。申請者のグループは近年、難治性てんかん（ウエスト症候群）患者における *CNPY3* 変異を見出し、*Cnpy3* ノックアウトマウスは脳波異常を引き起こすことを示してきた。しかしながら、*Cnpy3* の内在性タンパク質動態を捉えることは困難で、脳内における基本的性質は不明であった。

申請者は *Cnpy3* の 2xHA ノックイン (KI) マウス (*Cnpy3*^{2xHA}) を i-GONAD (improved-genome editing via oviductal nucleic acids delivery) 法により作製し、*Cnpy3* の脳内発現と機能を検討した。*in vitro* での発現解析は、*Cnpy3*、*Cnpy3*-2xHA の発現ベクターを HEK293T 細胞へトランスフェクションして実施された。なお、すべての実験プロトコルは、本学動物実験委員会、DNA 組換え委員会の承認を得て実施された (2020093, 3-25)。

Cnpy3^{2xHA/2xHA} KI マウスでは mRNA 発現量は減少していないにもかかわらず、*Cnpy3* のタンパク質量の発現低下が見られた。その原因を解明するために、*in vitro* でシクロヘキシミドチェイスアッセイを行ったところ、*Cnpy3*-2xHA はタグのない *Cnpy3* と比較して劇的に分解されやすいことがわかった。これは C 末端の ER 局在化シグナルより末端にタグを付加したことが原因であった。また、*Cnpy3*-2xHA の脳内発現パターンを調べたところ、*Cnpy3*-2xHA は神経細胞に発現していた。また、遠心分離による分画では、膜画分 (P3HDM) とシナプトソーム画分 (LP1) に集積することが明らかとなった。

審査委員会では、*Cnpy3* 遺伝子に HA タグを挿入した動物を作出し、脳内での *Cnpy3* の免疫染色を可能にしたこと、*Cnpy3* の C 末端に HA タグを付けると *in vivo* および *in vitro* で *Cnpy3* タンパク質の分解が促進されることを明らかにしたことを評価した。

以上により、本論文は博士 (医学) の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者

主査 山岸 覚

副査 北川 雅敏

副査 佐藤 康二