

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 29 年 4 月 28 日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 秋田大学医学系研究科微生物学講座  
 職 名 助教  
 研究代表者名 江口賢史

下記のとおり平成28年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号: 281023 )

1. 共同利用研究 課題名	PKN2 ノックアウト初期胚を用いた生理的意義の解析			
2. 共同利用研究 目的	PKN2 は細胞内において RhoA や Rac1 を活性化させるキナーゼとしてよく知られているが、個体での生理的意義についてはまだ良くわかっていない。本課題では初期胚における PKN2 の生理的意義を組織学的に検討する。			
3. 共同利用研究 期間	平成 28 年 7 月 1 日 ~ 平成 29 年 4 月 1 日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者)	秋田大学医学系研究科 微生物学講座	助教	研究の遂行	
(分担研究者)				
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル機能制御研究 部門・生体膜機能研究 分野	氏 名	向井秀幸

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号: 281023 )

#### 6. 共同利用研究計画

胚発生において PKN2 がどのような生理機能を担っているのかを、申請者が出張して、神戸大学にて向井准教授とともに組織学的に検討する。具体的には神戸大学にて飼育されている PKN2 ノックアウトマウスを E6.5、E8.5、E9.5 で解剖し、初期胚を取り出して PCR をかけることにより、致死の時期を探る。その上で、実体顕微鏡下での観察およびパラフィンブロックを作製し、HE 染色(組織学検討)、BrdU 染色(増殖解析)、TUNEL 染色(細胞死)等を行うことにより、どの発生過程(原腸陥入や神経管閉鎖等)で異常が認められるか解析を行う。想定よりも早く致死になっていた blastocyst を取り出し、培養することで増殖への寄与を明らかにする。

#### 7. 共同利用研究の成果

PKN2 ノックアウトマウスの初期胚を組織学的に解析した結果、E10.5 以前で胎生致死を引き起こしていることが示唆された。そこで初期胚を解剖し PCR により胎生致死の時期を解析した。E8.5 では PCR でノックアウトマウスを検出できるが、メンデリアン比通りには検出できず吸収された胚が認められる。一方、E7.5 は吸収された初期胚が検出できない事から E7.5-8.5 前後の時期で異常を引き起こしていると考えられる。原腸陥入および胚葉形成が進行する中胚葉マーカーである brachyury 抗体で染色したところ、E8.5 胚では染色に顕著な減弱が認められた。この結果は中胚葉分化の遅延・異常を示していると考えられる。この異常の原因を探るため、初期胚からノックアウト MEF を作製し、細胞増殖を解析した。その結果、PKN2 欠損 MEF は著しい増殖抑制を示した。これらの結果から PKN2 欠損により細胞増殖が抑制された結果、胚葉形成不全を呈し、胎生致死に至った事が明らかになった。

#### 8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

タンパク質リン酸化酵素 PKN2 はマウスの初期発生に必須である。團野紗莉、崎村健司、江口賢史、Mona Mehruba、窪内康二、向井秀幸 第 39 回日本分子生物学会年会

**PKN2 is essential for mouse embryonic development and proliferation of mouse fibroblasts.** Danno, S., Kubouchi, K., Mehruba, M., Abe, M., Natume, R., Sakimura, K., Eguchi, S., Oka, M., Hirashima, M., Yasuda, H., Mukai, H. Genes Cells 22, 220-236, 2017

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。