

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

2020年4月18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 佐賀大学・医学部
職 名 教授
研究代表者名 安田 浩樹

下記のとおり2019年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号: 191006)

1. 共同利用研究 課題名	PKN2による中枢シナプス伝達可塑性の制御			
2. 共同利用研究 目的	蛋白リン酸化酵素 PKN2 の、中枢神経系シナプス伝達やシナプス可塑性における機能を解明するために、貴研究所・向井秀幸准教授と共同で中枢神経特異的 PKN2 ノックアウトマウスを作成するとともに、生化学的実験を共同で行う。			
3. 共同利用研究 期間	2019年7月1日 ～ 2020年3月31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) 安田 浩樹	佐賀大学医学部	教授	研究の立案・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6～9の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6～9の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同利用研究計画

これまで PKN1 ノックアウトマウスを用いて、PKN1 が神経型グルタミン酸トランスポーターの機能亢進を通じてシナプス伝達長期抑圧を抑制して、シナプス発達を促進する作用を明らかにした。また行動学的実験で PKN1 ノックアウトマウスでは不安が低下している結果が得られたが、PKN は PKN1 の他に PKN2 も発現しているため、PKN1 と PKN2 の両方をノックアウトすればより明確な行動学的変化が観察されるのではと考えている。ただ、全身 PKN2 ノックアウトマウスは致死性であることから、中枢神経系 PKN2 を特異的にノックアウトされたマウスが必要である。そのため本研究課題では、向井准教授が作成された PKN2 flox/flox, Emx1-Cre+/+マウスを使用する予定であり、向井准教授から譲渡されてこちらでコロニーを作成しつつあるが、genotype や生化学的実験も含めて技術的な支援を向井准教授に依頼している。また PKN2 ノックアウトによる、代謝型グルタミン酸受容体や神経型グルタミン酸トランスポーター発現の変化を生化学的に明らかにするように依頼している。

7. 共同利用研究の成果

本年度は、向井准教授より提供された(1) Emx1-Cre+/+ x Emx1-Cre+/+ マウス、(2) PKN2 flox/flox x PKN2 flox/flox マウス、(3) (PKN2 flox/flox, Emx1-Cre+/+) x (PKN2 flox/flox, Emx1-Cre+/+)マウス、(4) (PKN2 flox/flox, Emx1-Cre+/+, PKN1 KI/KI) x (PKN2 flox/flox, Emx1-Cre+/+, PKN1 KI/KI)マウスの 4 系統コロニーを佐賀大学で増やしているところである。

本年度は本研究課題の先行研究である、「PKN1a ノックアウト(KO)マウスの海馬興奮性シナプス伝達の異常」について論文投稿し、現在その論文のリバイス中であるため、先行研究のための実験に多くの時間が費やされた。先行研究は、タンパクリン酸化酵素 protein kinase N1 (PKN1)をノックアウトされたマウスでは、神経型グルタミン酸トランスポーターの機能が低下してシナプス間隙のグルタミン酸濃度が上昇するため、通常は誘発されない代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) 依存成長期抑圧が誘発される、という内容である。論文投稿した際にレビューアーからリクエストがあった追加実験とその結果の概要は、

①ゴルジ染色によるスパインの種類別の解析をしたところ、filopodia と mushroom 型スパインが減少していること、

②KO マウスでは海馬 CA1 シナプスにおいて低頻度刺激(LFS)により、グループ 1 mGluR である mGluR5 に依存した長期抑圧が誘発されるが、シナプス間隙のグルタミン酸濃度が上昇する二発低頻度刺激(paired-pulse LFS)では、mGluR5 のみならず mGluR1 も活性化されて長期抑圧を誘発する、

③長期増強(LTP)に関しては、誘発後 1 時間程度の長期増強のみならず、誘発後数時間維持される late-phase LTP も野生型と KO マウス間で差がない、

ことである。先行研究に関しては、レビューアーがリクエストしたこれらの実験に関して論文に追加し、再投稿をする予定である。

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。)

・PKN1 controls the aggregation, spheroid formation, and viability of mouse embryonic fibroblasts in suspension culture. Mehruba M, Siddique SM, Mukai H. *Biochem Biophys Res Commun.* 523: 398-404 (2020).

・PKN1 kinase-negative knock-in mice develop splenomegaly and leukopenia at advanced age without obvious autoimmune-like phenotypes. Siddique SM, Kubouchi K, Shinmichi Y, Sawada N, Sugiura R, Itoh Y, Uehara S, Nishimura K, Okamura S, Ohsaki H, Kamoshida S, Yamashita Y, Tamura S, Sonoki T, Matsuoka H, Itoh T, Mukai H. *Sci Rep.* 27:13977 (2019)

・高齢 PKN1 キナーゼネガティブノックインマウスは、高齢 PKN1 ノックアウトマウスと異なった表現型を示す Mahmud Siddique Salman, 向井秀幸

第 66 回日本生化学会近畿支部例会 令和元年 5 月 25 日、京都

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。

本研究課題に関連した研究として、基盤研究 C 「ストレス誘発性不安緩衝における海馬歯状回抑制性細胞の重要性」を 2018~2020 年度を遂行している。