

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22650

研究課題名(和文) PKA 局在を抑制する中枢神経特異的な短鎖ペプチドの機能解明

研究課題名(英文) Elucidation of the physiological function of Akain1, a central nerve system-specific expressed protein kinase A-binding microprotein

研究代表者

藤井 一希 (Fujii, Kazuki)

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：10881609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗Akain1モノクローナル抗体及びAkain1レポーターマウスを用いた免疫染色によって、Akain1タンパクが大脳皮質、小脳などの介在神経に特異的に発現していることが明らかになった。加えて、Akain1欠損マウスの脳組織を用いた遺伝子発現解析の結果、Akain1欠損マウスの脳内で自閉症関連遺伝子の発現が低下していることが明らかになった。また、Akain1欠損マウスでは神経細胞内のPKA調節サブユニットの局在が野生型マウスと比較して変化していることが明らかになり、以前に培養細胞系で確認されていたPKA局在を打ち消す作用が実際に生体内でも機能していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた結果は、マイクロタンパクであるAkain1が生体内で確かに存在・機能し文脈弁別や社会性行動といった高次脳機能に重要な役割を果たしていることを示すものである。今後、Akain1欠損マウスが示した文脈弁別障害や社会性行動の低下などの行動表現型にPKA局在制御がどのように関与するかを明らかにしていくことができれば、PKAシグナル伝達の全容の理解とPKA-AKAPシグナル伝達の破綻を要因とする疾患の病態解明及び治療標的の探索へ大きく寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The results of immunostaining by Akain1 monoclonal antibody and Akain1 reporter knock-in mice revealed that Akain1 protein expressed in interneurons in the central nerve system(e.g., cortex, thalamus, cerebellum).

In Akain1-deficient mice, the localization of PKA regulatory subunits was different compared to wild-type mice. These results suggested that Akain1 regulate PKA localization in vivo and in specific cell types. The misregulation of PKA localization may contribute to the behavioral phenotypes of Akain1-deficient mice.

研究分野：神経科学

キーワード：短鎖ペプチド PKA AKAP 神経科学 ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な生物のゲノム配列が解読された現在、配列情報から未知の遺伝子の探索・機能予測が進められている。特に RNA-リボソーム複合体を回収し、翻訳を受けうる RNA 配列を網羅的に検出するリボソームプロファイリングにより未知のタンパクをコードする多数の Open reading frame (ORF) の存在が報告されている (Zur et al., *Sci Rep*, 2016)。このような新規 ORF は従来見逃されていた全長 100 アミノ酸以下の短鎖 ORF を多く含んでいる (Chugunova et al., *J Proteome Res*, 2018)。研究代表者らはリボソームプロファイリングデータ (Gonzalez et al., *J Neurosci*, 2014) を基に、脊椎動物間の進化的保存度が高く、中枢神経系に限局して発現する短鎖 ORF を複数見出ししている (未発表)。このような短鎖 ORF は脳機能において重要な役割を担うがゆえに種を超えて保存されてきたことが推察される。研究代表者はこのような神経限局発現を示す高保存短鎖 ORF を欠損するマウスを独自に作製し、網羅的行動試験によりその機能の解析を行っており、本研究では、その中で行動表現型に異常が見られた A-kinase anchor protein inhibitor 1 (Akain1) 遺伝子に着目した。Akain1 は当初 ノンコーディング RNA に分類されたが、リン酸化酵素プロテインキナーゼ A (PKA) 結合配列を含む全長 69 アミノ酸からなるペプチドをコードすることが近年示された (Fukuda et al., *Genes Cells*, 2015)。PKA 結合配列を持つタンパクは一般的に PKA 足場タンパク (AKAP) と呼ばれ、結合した PKA を細胞内の特定の場所へ誘導することでシグナル伝達を制御する。一方で Akain1 は、強制発現系において PKA 局在を逆に打ち消す (Fukuda et al., *Genes Cells*, 2015, 図 1)。すなわち Akain1 は、AKAP 様の構造を持つが、内在性唯一の AKAP 阻害を行う“負の PKA シグナル制御因子”である。研究代表者らが Akain1 ノックアウト (KO) マウスの網羅的な行動表現型のスクリーニングを行った結果、Akain1 KO マウスは文脈弁別など複数の行動表現型で異常を示すことが明らかとなった (未発表)。しかし、培養細胞系で観察された Akain1 による PKA 局在の消去が生体内、特に脳内のどこで機能し、どのようなメカニズムによりこれらの行動表現型に関わる高次脳機能を制御しているのかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は短鎖ペプチド Akain1 が PKA シグナルを介して高次脳機能に果たす役割とその分子メカニズムの解明である。研究代表者らが見出した Akain1 は PKA 局在を逆に打ち消すという特異な機能を有し、独自に作製した欠損マウスは行動表現型に異常を示す。これらのデータは、脳という高等生物の最上位中枢が進化の過程で獲得・保存してきた機能に短鎖 ORF が非常に重要な役割を担うことを世界に先駆けて示すものである。PKA を介した細胞内シグナル伝達は多くのカスケードで利用され、中枢神経系においても神経可塑性の調節を含む様々な細胞プロセスの制御に関わる (Wong W, Scott JD. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004)。しかし、PKA 局在を逆に打ち消す内因性因子は Akain1 以外に発見されていない。PKA の局在を打ち消す“負の制御”という視点から PKA シグナルの重要性に迫る研究はユニークであり、PKA シグナル伝達の全容の理解に大きく寄与すると期待される。

3. 研究の方法

Akain1 ペプチドの脳内での発現部位・細胞種を特定するため、抗 Akain1 抗体及び Akain1 ペプチド領域にエピトープタグ配列をノックインした Akain1 レポーターマウスの作成し、それぞれを用いて、Akain1 の生体内発現様式を解析した。また、Akain1 欠損がどのような脳内表現型をマウスにもたらしているかを明らかにするため Akain1 欠損マウスの脳組織を用いた DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析と各種 PKA サブユニットの免疫染色を行った。加えて、組織・細胞種特異的な Akain1 の機能解析のために、Cre-loxP システムによる Akain1 コンディショナルノックアウトマウスの作出を試みた。

4. 研究成果

作製した抗 Akain1 モノクローナル抗体及び Akain1 レポーターマウスを用いた免疫染色によって、Akain1 タンパクが大脳皮質、小脳などの介在神経に特異的に発現していることが明らかになった。加えて、Akain1 欠損マウスの脳組織を用いた遺伝子発現解析の結果、Akain1 欠損マウスの脳内において自閉症関連遺伝子の発現が低下していることが明らかになった。また、Akain1 欠損マウスでは神経細胞内の PKA 調節サブユニットの局在が野生型マウスと比較して変化していることが明らかになり、以前に培養細胞系で確認されていた PKA 局在を打ち消す作用が実際に生体内でも機能していることが示唆された。更に、特定した Akain1 発現細胞種特異的な機能解析を行うため、CRISPR/Cas9 ゲノム編集により、Akain1 コンディショナルノックアウトマウスを作出した。本研究で得られた結果は、マイクロタンパクである Akain1 が生体内で確かに存在・機能し文脈弁別や社会性行動といった高次脳機能に重要な役割を果たしていることを示すものである。今後、Akain1 欠損マウスが示した文脈弁別障害や社会性行動の低

下などの行動表現型に PKA 局在制御がどのように関与するかを明らかにしていくことができれば、PKA シグナル伝達の全容の理解と PKA-AKAP シグナル伝達の破綻を要因とする疾患の病態解明及び治療標的の探索へ大きく寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakayori Nobuyuki, Katakura Masanori, Hamazaki Kei, Higuchi Oki, Fujii Kazuki, Fukabori Ryoji, Iguchi Yoshio, Setogawa Susumu, Takao Keizo, Miyazawa Teruo, Arita Makoto, Kobayashi Kazuto	4. 巻 3
2. 論文標題 Maternal dietary imbalance between omega-6 and omega-3 fatty acids triggers the offspring's overeating in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 473-473
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01209-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅野雄輝, 藤井一希, 長谷川昌也, 廣林茂樹, 高雄啓三.
2. 発表標題 非調和解析 (NHA) を用いたマウス呼吸の時間周波数解析.
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤村耕平, 仙道水月, 藤井一希, 吉田知之, 高雄啓三.
2. 発表標題 共母体免疫活性化は胎児の脳における Ptprd 遺伝子微小 エクソン選択調節を攪乱する.
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 先端モデル動物支援プラットフォーム (AdAMS)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 320
3. 書名 マウス・ラットモデル作製・解析プロフェッショナル	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------