

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500354

研究課題名（和文）プロテインキナーゼPKNによる小脳シナプス発達の制御

研究課題名（英文）Regulation of the maturation of cerebellar synapses by PKN

研究代表者

安田 浩樹（YASUDA HIROKI）

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：60294071

研究成果の概要（和文）：PKN1の中枢神経系シナプス伝達、およびシナプス可塑性における役割を、PKN1aノックアウト(KO)マウスを用いて主に電気生理学的に解析した。KOマウスの発達期海馬ではシナプス伝達長期抑圧(LTD)が亢進しており、かつ通常見られない異シナプス性長期抑圧(hetero LTD)が見られた。同時に、シナプス伝達の発達に遅れが見られたことから、PKN1はLTDを抑制することによって、シナプス発達を促進していることがわかった。

研究成果の概要（英文）：I investigated the role of PKN1 in synaptic transmission and synaptic plasticity in the central nervous system electrophysiologically using PKN1a knockout (KO) mice. I found LTD was enhanced and heterosynaptic LTD was induced in the hippocampus of developing PKN1a KO mice and synaptic transmission was more immature. I concluded that PKN1 is promoting synaptic maturation by inhibiting LTD during development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：神経生理

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：PKN1、シナプス可塑性、長期抑圧、海馬、小脳、電気生理

## 1. 研究開始当初の背景

海馬・大脳皮質や小脳におけるシナプス伝達の長期可塑性は記憶や運動学習の分子メカニズムであると考えられており、これまで精力的に研究されてきた。たとえば海馬シナプスの長期増強を誘発する、あるいは制御している分子の検索はこれまで薬理学的手法、さ

らにその遺伝子を欠失ないし強制発現した遺伝子改変動物(主にマウス)を使用することによって、多くの情報が集積されてきている。近年申請者と本研究課題の連携研究者である神戸大学・向井秀幸准教授は、向井准教授らが発見した、セリン・スレオニン蛋白キナーゼ・PKNの脳における機能に注目している。PKN

は、PKC と触媒領域において高い保存性を有しているが、アラキドン酸等の不飽和脂肪酸および低分子量GTPase・Rho によって活性化される酵素であり、海馬、小脳をふくめ脳全体に広く分布している。

## 2. 研究の目的

そこで本研究課題では、小脳や海馬などの中枢神経系における PKN1 のシナプス伝達、およびシナプス可塑性における役割を、連携研究者・向井准教授が開発した PKN1a ノックアウトマウス (KO マウス) を用いて電気生理学的に解析することにした。また、学習・記憶や、運動機能等における PKN1 の役割を明らかにするために、KO マウスを使って行動実験も行った。

## 3. 研究の方法

PKN1a KO マウスは、群馬大学にて繁殖して利用した。野生型および KO マウスから海馬、あるいは小脳のスライス標本を作成して、電気生理学的解析を行った。行動実験は、向井准教授が行った。

## 4. 研究成果

PKN1a KO マウス海馬 CA1 領域では、長期増強は野生型と差はなく保たれていた。KO マウスでは長期抑圧の亢進が見られたとともに、野生型では見られない、別のシナプスにも長期抑圧が広がる「異シナプス性長期抑圧」が誘発された(図)。

PKN の長期抑圧制御における役割を詳しく検討したところ、

### (1) PKN はシナプス後部で長期抑圧を抑制している。

新規開発された PKN 阻害ペプチドをシナプス後細胞に注入すると、長期抑圧亢

進が見られなくなるので、PKN はシナプス後部で作用している、

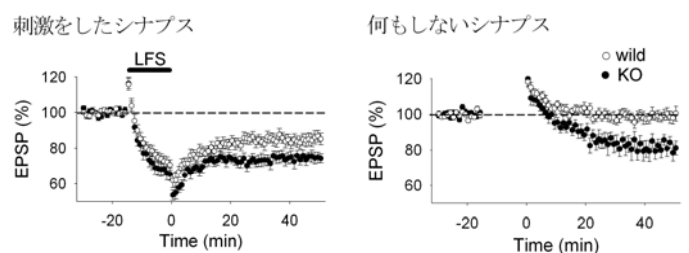
### (2) PKN1 KO マウスで見られる異シナプス性長期抑圧は、シナプス後性の発現である。

KO マウスで見られる、大きな長期抑圧と異シナプス性長期抑圧には、paired-pulse ratio の変化が無く、かつ silent synapse が増加することから、両者はともにシナプス後性の発現であることがわかった。

### (3) PKN1 KO マウスにおける、異シナプス性長期抑圧はポストシナプスにおけるエンドサイトーシスが関与している。

パッチ電極からエンドサイトーシス阻害剤をポストシナプス細胞に導入すると、KO マウスで見られる長期抑圧亢進と異シナプス性長期抑圧が消失することから、両者にポストシナプスのエンドサイトーシスによって起こることがわかった。

よって PKN は PI3 キナーゼと同様に (Daw et al., *Nature Neurosci.*, 2002)、シナプス抑圧が活動のないシナプスにまで広がるのを、シナプス後部で防いでいることが示唆された。



以上海馬における PKN の役割を紹介したが、現在小脳シナプス可塑性における PKN の役割を検討している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

① 向井秀幸、小野功貴、他、Hypotonic Swelling-Induced Activation of Pkn1 Mediates Cell Survival in Cardiac Myocytes、Am J Physiol Heart Circ Physiol.、査読あり、Vol.300、No.1、2010、pp. 191-200

② 向井秀幸、小野功貴、他、Accumulation of tumor-suppressor PTEN in Alzheimer neurofibrillary tangles、Neurosci Lett.、査読あり、Vol.471、No.1、2010、pp.20-24

③ 志賀一博、小野功貴、向井秀幸、他、Development of an intracellularly acting inhibitory peptide selective for PKN. Biochem J.、査読あり、Vol.425、No.2、2009、pp.445-543

④ 小野功貴、向井秀幸、他、A peptidyl-prolyl isomerase, FKBP12, accumulates in Alzheimer neurofibrillary tangles、Neurosci. Lett.、査読あり、Vol.459、No.2、2009、pp.96-99

⑤ 黄艶、安田浩樹、アブドルラハン・サリヒ、津本忠治、Roles of endocannabinoids in heterosynaptic long-term depression of excitatory synaptic transmission in visual cortex of young mice、Journal of Neuroscience、査読あり、Vol.28、No.28、2008、pp.7074-7083

⑥ 安田浩樹、黄艶、津本忠治、Regulation of excitability and plasticity by

endocannabinoids and PKA in developing hippocampus、Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America、査読あり、Vol.105、No.8、2008、pp.3106-3111

⑦ 吉川潮、向井秀幸、他、Calcineurin-mediated dephosphorylation of c-Jun Ser-243 is required for c-Jun protein stability and cell transformation、Oncogene、査読あり、Vol.27、No.17、2008 pp.2422-2429

[学会発表] (計7件)

① 児島伸彦、安田浩樹、他、ドレブリンのアイソフォーム変換は海馬依存的学習とシナプス可塑性に必要である、第84回日本薬理学会2011.3.23、パシフィコ横浜(神奈川県)

② 児島伸彦、安田浩樹、他、Neuron-specific drebrin isoform is necessary for hippocampus dependent learning in adulthood but not in young age of mice、Neuroscience 2010 Society for Neuroscience 40<sup>th</sup> Annual Meeting、2010.11.16、サンディエゴコンベンションセンター(サンディエゴ、米国)

③ 児島伸彦、安田浩樹、他、ドレブリンアイソフォーム変換不全マウスにおける海馬シナプス可塑性と海馬依存的学習の障害、Neuro2010 第33回日本神経科学学会、2010.9.4、神戸国際会議場(兵庫県)

④ 守村直子、安田浩樹、他、Lrfrn2/SALM1, a synaptic leucine-rich repeat transmembrane molecule is required for

proper synapse maturation and brain function、第 32 回日本神経科学学会、2009. 9. 17、名古屋国際会議場 (愛知県)

⑤ 安田浩樹、他、Synaptic maturation by PKN during development、第 32 回日本神経科学学会、2009. 9. 17、名古屋国際会議場 (愛知県)

⑥ 児島伸彦、安田浩樹、他、SPECIFIC ROLE OF NEURONAL ISOFORM OF DREBRIN IN HIPPOCAMPAL SYNAPTIC PLASTICITY AND FEAR MEMORY、The XXXVI International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009)、2009. 7. 28、京都国際会議場 (京都府)、

⑦ 守村直子、安田浩樹、他、LRR 膜貫通分子 Lrln2/SALM1 は海馬興奮性シナプスの形態や機能調節および可塑性に関与する、*BMB2008* (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、2008. 12. 10、神戸ポートアイランド (兵庫県)

[図書] (計 1 件)

① 安田浩樹、向井秀幸、Springer、*Neuromethods: Protein Kinase Technologies*、in press

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安田 浩樹 (YASUDA HIROKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：6 0 2 9 4 0 7 1

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

向井 秀幸 (MUKAI HIDEYUKI)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：8 0 2 5 2 7 5 8