

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15006

研究課題名（和文）PKA 局在の負の制御因子が高次脳機能に果たす性特異的な役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the sex-specific roles of PKA-signal endogenous inhibitor in brain function

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） 3,600,000 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の結果、Akain1が脳皮質、小脳などの特異的な細胞種に発現していることを特定した。加えて、Akain1欠損マウス脳組織の遺伝子発現解析の結果、雌雄共通して炎症関連遺伝子群の発現が変動していた。加えて、Akain1欠損マウスでは炎症関連転写因子であるNF- κ Bのリン酸化が増加することが明らかになった。これらの結果は、Akain1によるリン酸化制御が炎症関連シグナル伝達に重要な役割を果たすことを示唆している。

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、社会性行動といった高次脳機能に性特異的な役割を果たすマイクロプロテインAkain1が生体内のどこでどのようなシグナル制御に関与するかを示すものである。また、Akain1欠損によって行動表現型には雌雄差が認められたが、遺伝子発現レベルでは雌雄で共通するシグナル制御に関与する可能性が示唆された。今後、これらのシグナル経路とAkain1によるPKA局在制御、そして行動表現型がどのように関連するかを明らかにすることができれば、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）：Using the monoclonal antibody against Akain1 and Akain1 reporter mice, we identified the specific cell types expressing Akain1 in the cerebral cortex, cerebellum, and other regions. Additionally, RNA sequence analysis of Akain1-deficient male and female mice in brain tissue revealed that the expression of inflammation-related genes differed consistently in both sexes compared to wild-type mice. Furthermore, the phosphorylation state of NF- κ B, an inflammation-related transcription factor, was increased in Akain1-deficient mice. These findings suggest that Akain1 plays a crucial role in the inflammation-related signal pathway via phosphorylation regulation.

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 性差

1. 研究開始当初の背景

ヒト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しうる多数の読み取り枠 (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)。我々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 を複数見出している (未発表)。このような短鎖 ORF は生命現象に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。研究代表者はこれらの神経限局発現を示す高保存短鎖 ORF 翻訳産物を欠損するマウスを作出し、網羅的行動解析によりその機能解明を目指している。本計画では、その中で行動表現型が見られた A-kinase anchor protein inhibitor 1 (Akain1) 遺伝子に着目する。

Akain1 は当初 ノンコーディング RNA に分類されたが、プロテインキナーゼ A (PKA) 結合配列を含む全長 69 アミノ酸の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、細胞内で強制発現させると PKA 局在を逆に打ち消す (Fukuda et al., *Genes Cells*, 2015)。すなわち Akain1 は、AKAP 様の構造を持つが、PKA-AKAP 結合を阻害する内在性唯一の“負の PKA シグナル制御因子”である。研究代表者が Akain1 欠損 (KO) マウスの行動表現型のスクリーニングを行った結果、いくつかの行動試験において性別により異なる行動表現型を示すことが明らかとなった。例えば、自閉症傾向・社会性行動の評価に使用される 3 チャンバー社会性テストにおいて、Akain1 KO マウスはメスにおいてのみ社会的新奇性への嗜好性が消失した。また、うつ様行動の評価を行う強制水泳試験においては、Akain1 欠損によってオスではうつ様行動が増加し、メスでは逆に減少するという結果を得ている。これらの結果は、Akain1 が高次脳機能に重要な役割を担うとともに、性別の違いによって異なる機能を持つ可能性を示唆する。様々な疾患において、有病率や発症リスクに性差が報告されており、近年では病態や治療への反応性においても性別は重要な因子とされている (Mauvais-Jarvis F et al., *Lancet*, 2020)。Akain1 欠損の表現型で性差が見られた行動に関連する自閉症やうつ病においても発症リスクや臨床症状に性差があることが報告されている (LeGates TA et al., *Neuropsychopharmacology*, 2019, Ferri SL et al., *Curr Psychiatry Rep*, 2018)。しかしながらこのような発達障害やうつ病で見られる性差がどのようなメカニズムによるものなのかは殆ど明らかになっておらず、適切な動物モデルなども確立されていない。培養細胞系で観察された Akain1 による PKA 局在の消去がどのように機能し、これらの性特異的な行動表現型を引き起こしているか明らかにできれば、性差に着目した精神疾患モデルとして Akain1 KO マウスを利用し、新たな治療方法の探索などへの応用も期待できる。

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性差のメカニズムの解明である。PKA を介した細胞内シグナル伝達は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り、脳機能とその性差の理解に PKA によるシグナル伝達は重要な経路の一つである。また、PKA-AKAP シグナル伝達の破綻は、神経変性疾患や精神疾患の治療標的としても期待されている。PKA シグナルの中で、内在性 AKAP 阻害因子は Akain1 以外に発見されておらず、“負の PKA 制御機構”の存在は見逃されてきたといえる。Akain1 欠損マウスが示す性特異的な行動表現型を軸に、PKA シグナルの重要性とその性差のメカニズムに迫る本研究は PKA による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、そしてその性差を明らかにするため、Akain1 欠損マウスの脳組織を用いた RNA シーケンスによる遺伝子発現解析を実施した。組織・細胞種特異的な Akain1 の機能解析のために、アデノ随伴ウイルスによる選択的な Akain1 発現の誘導を試みた。

4. 研究成果

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の結果、

Akain1 が大脳皮質、小脳などの特異的な細胞種に発現していることを特定した。特に発現が高かった小脳を用いて、Akain1 欠損マウス遺伝子発現解析を実施した。その結果、雌雄に共通して炎症関連遺伝子群の発現が変動していることが明らかになった。

Akain1 欠損による生体内の細胞レベルの表現型を探索したところ、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パターンが野生型マウスとことなることが明らかになり、先行研究において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。加えて、Akain1 を発現するプルキンエ細胞において、Akain1 の欠損が炎症関連転写因子である NF- κ B のリン酸化を増加させることが明らかになった。これらの結果は、Akain1 によるリン酸化制御が炎症関連シグナル伝達に重要な役割を果たすことを示唆している。

更に、アデノ随伴ウイルスを用いて Akain1 欠損マウスのプルキンエ細胞に特異的 Akain1 発現を誘導し、欠損マウスで認められた行動表現型がレスキュー実験を実施した。その結果、一部の表現型について、プルキンエ細胞での Akain1 の発現で行動表現型がレスキューされることを見出している。

以上により、Akain1 の負の PKA シグナル制御が細胞種特異的な機能を介してマウスの行動表現型を制御していることが示唆された。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3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamashita Akira, Shichino Yuichi, Fujii Kazuki, Koshidaka Yumie, Adachi Mayumi, Sasagawa Eri, Mito Mari, Nakagawa Shinichi, Iwasaki Shintaro, Takao Keizo, Shiina Nobuyuki	4. 巻 26
2. 論文標題 ILF3 prion-like domain regulates gene expression and fear memory under chronic stress	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106229 ~ 106229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106229	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 -

1. 著者名 Arime Yosefu, Saitoh Yoshito, Ishikawa Mikiko, Kamiyoshihara Chikako, Uchida Yasuo, Fujii Kazuki, Takao Keizo, Akiyama Kazufumi, Ohkawa Noriaki	4. 巻 49
2. 論文標題 Activation of prefrontal parvalbumin interneurons ameliorates working memory deficit even under clinically comparable antipsychotic treatment in a mouse model of schizophrenia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 720 ~ 730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41386-023-01769-z	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 -

1. 著者名 Kurabayashi Nobuhiro, Fujii Kazuki, Otobe Yuta, Hiroki Shingo, Hiratsuka Masaharu, Yoshitane Hikari, Kazuki Yasuhiro, Takao Keizo	4. 巻 26
2. 論文標題 Neocortical neuronal production and maturation defects in the TcMAC21 mouse model of Down syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 108379 ~ 108379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.108379	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21件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大橋りえ、藤井一希、高雄啓三、椎名伸之
2. 発表標題 Arf GEF, GAPファミリー-mRNAの神経樹状突起局在制御がシナプス形成に与える影響
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuki Fujii, Yusuke Moriwaki, Yumie Koshidaka, Mayumi Adachi, Yuko Yanagibashi, Shoko Hongo, Yasunori Aizawa, Keizo Takao
2. 発表標題 Loss of non-canonical open reading frame within lncRNA TUNAR increased pre-pulse inhibition and depression-related behavior in mice
3. 学会等名 51st Annual meeting of Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuki Fujii, Yusuke Moriwaki, Yumie Koshidaka, Mayumi Adachi, Yuko Yanagibashi, Shoko Hongo, Yasunori Aizawa, Keizo Takao
2. 発表標題 Loss of non-canonical open reading frame within lncRNA TUNAR increased pre-pulse inhibition and depression-related behavior in mice
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 NEURO 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yosefu Arime, Yoshito Saitoh, Yasuo Uchida, Mikiko Ishikawa, Chikako Kamiyoshihara, Kazuki Fujii, Keizo Takao, Noriaki Ohkawa
2. 発表標題 A novel therapeutic strategy for cognitive dysfunctions under clinically relevant antipsychotic treatment in a mouse model of schizophrenia
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 NEURO 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nobuyuki Sakayori, Kazuki Fujii, Masanori Katakura, Kazuto Kobayashi, Keizo Takao, Makoto Sugita
2. 発表標題 Dietary imbalance in polyunsaturated fatty acids during pregnancy affects dopaminergic neurogenesis in their embryos and is associated with offspring's various behavioral abnormalities
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 NEURO 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mei Hayashi, Hirotaka Asai, Reiko Okubo-Suzuki, Ryosuke Kaneko, Kazuki Fujii, Keizo Takao, Takeshi Yagi, Kaoru Inokuchi
2. 発表標題 The latent neuronal ensembles constructed by Pcdhs function as fundamental units in allocating information
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 NEURO 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井一希, 森脇雄介, 腰高由美恵, 安達真由美, 柳橋裕子, 本郷翔子, 相澤康則, 高雄啓三
2. 発表標題 lncRNA TUNAR 内非古典的ORF欠損マウスは プレパルス抑制の増強とうつ関連行動の増加を示す
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井一希, 腰高由美恵, 安達真由美, 柳橋裕子, 松尾美奈, 相澤康則, 高雄啓三
2. 発表標題 プロテインキナーゼA (PKA) 結合マイクロプロテインAkain1 欠損マウスは類似条件の分別に異常を示す
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤井一希, 森脇雄介, 腰高由美恵, 安達真由美, 柳橋裕子, 本郷翔子, 相澤康則, 高雄啓三
2. 発表標題 Loss of non-canonical ORF within lncRNA TUNAR increased pre-pulse inhibition and depression-related behavior in mice
3. 学会等名 文部科学省学術変革領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤井 一希, 腰高 由美恵, 安達 真由美, 柳橋 裕子, 松尾 美奈, 西園 啓文, 黒田 信幸, 相澤 康則, 高雄 啓三
2. 発表標題 プロテインキナーゼ A (PKA) 結合配列を持つマイクロプロテイン Akain1 欠損マウスは 類似条件弁別障害を示す
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム 2021年度 成果発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中輝幸, 安藤さくら, 阿部学, 崎村健司, 藤井一希, 高雄 啓三
2. 発表標題 Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) キナーゼ活性欠損ノックインマウスの作製と網羅的行動解析
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム 2021年度 成果発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安達貴弘, 藤井一希, 高雄啓三, 永石宇司
2. 発表標題 免疫グロブリンAの欠損により免疫および神経機能の破綻
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム 2021年度 成果発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yosefu Arime, Yoshito Saitoh, Yasuo Uchida, Mikiko Ishikawa, Chikako Kamiyoshihara, Kazuki Fujii, Keizo Takao, Noriaki Ohkawa
2. 発表標題 Chemogenetic activation of prefrontal parvalbumin interneurons in combination with clinically comparable antipsychotic treatment restores working memory deficits in a mouse model of schizophrenia.
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井 一希, 森脇 雄介, 腰高 由美恵, 安達 真由美, 柳橋 裕子, 本郷 翔子, 相澤 康則, 高雄 啓三
2. 発表標題 lncRNA TUNAR 内の非古典的 ORF 欠損マウスはプレパルス抑制の増強とうつ関連行動の増加を示す
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 藤井 一希, 泉川 友美, 腰高 由美恵, 安達 真由美, 柳橋 裕子, 本郷 翔子, 吉田 沙織, 安川 二千穂, 高雄 啓三
2. 発表標題 糖鎖硫酸基転移酵素 Chst9 欠損マウスは、不安様行動の増加と社会的行動の異常を示す
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム 2023年度 成果発表会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Kazuki Fujii, Yumie Koshidaka, Mayumi Adachi, Yuko Yanagibashi, Mina Matsuo, Shoko Hongo, Hirofumi Nishizono, Ichiro Takasaki, Nobuyuki Kurosawa, Yasunori Aizawa, Keizo Takao
2. 発表標題 Loss of Akain1, an endogenous micropeptide that inhibits PKA localization, attenuates contextual discrimination and behavioral flexibility in mice
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akira Yamashita, Yuichi Shichino, Kazuki Fujii, Yumie Koshidaka, Mayumi Adachi, Eri Sasagawa, Mari Mito, Shinichi Nakagawa, Shintaro Iwasaki, Keizo Takao, Nobuyuki Shiina
2. 発表標題 ILF3 prion-like domain regulates gene expression and fear memory under chronic stress.
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 K. FUJII, Y. KOSHIDAKA, M. ADACHI, Y. YANAGIBASHI, M. MATSUO, S. HONGO, H. NISHIZONO, I. TAKASAKI, N. KUROSAWA, Y. AIZAWA, K. TAKAO
2. 発表標題 Loss of Akain1, an endogenous micropeptide that inhibits PKA localization, attenuates contextual discrimination and behavioral flexibility in mice
3. 学会等名 53rd Annual Meeting of Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木村 公洋、水品 純太、藤井 一希、腰高 由美恵、安達 真由美、柳橋 裕子、本郷 翔子、相澤 康則、高雄 啓三
2. 発表標題 長鎖ノンコーディングRNA Tincrにコードされたユビキチン様タンパク欠損マウスにおける行動表現型解析
3. 学会等名 第70回 日本実験動物学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤井 一希、腰高 由美恵、安達 真由美、松尾 美奈、柳橋 裕子、木村 公洋、斉藤 貴志、西道 隆臣、高雄啓三
2. 発表標題 卵巣摘出処置はC57BL6/J及びAPPノックインマウスのアルツハイマー病関連行動表現型を緩和する
3. 学会等名 第70回 日本実験動物学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 酒寄信幸、藤井一希、片倉賢紀、高雄啓三、杉田誠
2. 発表標題 妊娠期における必須脂肪酸の摂取バランスが仔の行動に及ぼす影響の網羅的解析
3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------