

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23500461

研究課題名(和文) 海馬シナプスのメタ可塑性におけるプロテインキナーゼPKNの役割

研究課題名(英文) PKN1 regulates metaplasticity in hippocampus

研究代表者

安田 浩樹 (Yasuda, Hiroki)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60294071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：プロテインキナーゼPKN1はPKN1aノックアウトマウスの解析から、神経型グルタミン酸トランスポーター(EAAT3)を活性化することによってシナプス間隙や細胞外グルタミン酸濃度を低下させ、主に代謝型グルタミン酸受容体機能を正常化していることを明らかにした。不必要な代謝型グルタミン酸受容体依存性長期抑圧を抑制するとともに、動物がストレスを受けたときにグルタミン酸トランスポーターの活性が低下し、細胞外グルタミン酸濃度が上昇して神経の興奮性が上昇する現象に抑制的に働く。またPKN1は、先行刺激によるグルタミン酸シナプス伝達のプライミング現象を保護していることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：I investigated the roles of protein kinase N1 (PKN1) using PKN1a knockout mice and found that PKN1 activates neuronal glutamate transporter (EAAT3), reduces synaptic and extracellular glutamate, and normalizes metabotropic glutamate receptor (mGluR) function. PKN1 suppresses unnecessary mGluR5-dependent long-term depression (LTD) of glutamate synaptic transmission in the developing hippocampus. Stress inhibited EAAT3 presumably through reducing PKN1 activity and elevates neuronal excitability. So elevating PKN1 activity could activate EAAT3 and reduce epileptic neuronal activity. I also found that priming of glutamate synaptic transmission by prior activity was induced in wild-type mice but that the priming was not induced in PKN1a KO mice, suggesting that PKN1 is needed in priming of excitatory synaptic transmission.

研究分野：神経生理

キーワード：protein kinase N 代謝型グルタミン酸受容体 グルタミン酸トランスポーター シナプス可塑性 ストレス 海馬

1. 研究開始当初の背景

海馬・大脳皮質や小脳における長期増強・抑圧といったシナプス伝達長期可塑性は、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。シナプス可塑性は、これら脳組織のスライス標本や *in vivo* 動物を用いた電気生理学的技術によって解析することが可能であるが、長期可塑性を誘発・制御している分子の検索は薬理学的手法、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)を併用することによって、多くの情報が集積されてきている。これらの可塑性研究のための電気生理学的実験では、記憶のリハーサルを模した可塑性誘発刺激を一回行ったあとのシナプス伝達変化を解析することが多い。一方、動物の脳では活動しているあいだ餌や敵の在処等いつも学習している筈であり、それに伴って海馬は常に活動している。我々ヒトにおいても物を覚えるときには、直前に記憶したものと類似した物は覚えやすかったり、逆に多くの事柄を記憶したあとにはさらに物を覚えることが出来にくいなど、直前の学習がその後の記憶獲得に影響を与えることは容易に想像できる。記憶獲得が直前の学習に左右される現象の *in vitro* モデルとしては、シナプス可塑性が直前の神経活動に影響を受ける「**メタ可塑性**」が考えられる。メタ可塑性は 1996 年より公に使われるようになった(Abraham & Bear, 1996) 比較的新しい用語で、分子メカニズムも上記のシナプス長期可塑性に比べて知見がかなり少なく、リサーチされるべき現象であると考えられた。

2. 研究の目的

神経活動の後にメタ可塑性が誘発されるメカニズムとして、神経活動による NMDA 受容体や代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)活性化がトリガーとなることが報告されている。NMDA 受容体によるメタ可塑性では長期増強が抑制されるのに対し、group1 mGluR 依存的メタ可塑性では長期増強は促進される。group1 mGluR については、活性化によって海馬 CA1 シナプス長期抑圧が誘発されることが既に明らかになっている。申請者は、

連携研究者である神戸大学・向井秀幸准教授らが発見したセリン・スレオニン蛋白キナーゼ・PKN1a のノックアウト(KO)マウスにおいて、野生型では見られない、mGluR に依存した異シナプス性長期抑圧が発現していることを見いだした。PKN1 は mGluR の機能を抑制的に制御している可能性がある。そこで mGluR 依存性メタ可塑性が PKN によって制御されているかを PKN KO マウスや向井准教授らが開発した PKN 阻害ペプチドで解析することにした。

3. 研究の方法

本研究課題では、

(1) PKN が group1 mGluR 機能を直接制御しているか、PKN KO マウスやキナーゼ機能のない PKN をノックインした(PKN KI)マウスや PKN 阻害剤等を用いて、研究代表者が海馬スライス標本を用いて電気生理学的に解析した。

(2) メタ可塑性の誘発における mGluR および PKN1 の関与を、研究代表者が電気生理学的に解析した。

4. 研究成果

(1) PKN1 による mGluR 機能制御のメカニズム

PKN1a ノックアウトマウスを電機生理学的に解析したところ、海馬CA1において代謝型グルタミン酸受容体依存性シナプス伝達長期抑圧が亢進して周囲のシナプスにも広がる、

海馬歯状回において代謝型グルタミン酸受容体依存性興奮が亢進し、ストレス負荷と同じ効果があった。これらのフェノタイプはグルタミン酸トランスポーター阻害剤で再現され、また神経型トランスポーター excitatory amino acid transporter 3 (EAAT3)活性が、キナーゼ活性のないPKN1強制発現によって低下する。PKN1は正常脳においては神経にのみ発現していることから、PKN1は神経型グルタミン酸トランスポーターを活性化することによってシナプス間隙や細胞外グルタミン酸濃度を低下させ、主に代謝型グルタミン酸トランスポーター機能を正常化していると考えられる。現在はPKN1が神経型グルタミン酸トランスポーターを活性化するメカニズムを検索し

ているが、特に細胞表面への発現を制御しているか否かを調べるため、細胞膜上のEAAT3定量を試みている。

(2) メタ可塑性の誘発におけるmGluRおよびPKN1の関与

メタ可塑性については、野生型マウスではGABAA受容体抑制しない状態で、先行刺激によって海馬シナプス長期増強が増大する「プライミング現象」が見られるが、PKN1ノックアウトマウスではこの先行刺激によるプライミング現象がないことを見いだした。GABAA受容体抑制のない状態でのプライミング現象は、抑制性シナプスでの代謝型グルタミン酸受容体・内因性カンナビノイド受容体依存性長期抑圧が先行刺激によって誘発され、このあと局所的に興奮性が増大する事によって、興奮性シナプス伝達の長期増強が増大すると考えられている。そこで、PKN1ノックアウトマウスでは抑制性シナプス伝達可塑性の異常が想定されるので、今後はその原因を究明したいと考えている。

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12件)

Hiroki Yasuda and Hideyuki Mukai, Turning off of GluN2B subunits and turning on of CICR in hippocampal LTD induction after developmental GluN2 subunit switch. *Hippocampus*, 査読有り 2015, in press

Naoko H. Tomioka, Hiroki Yasuda, Hiroyuki Miyamoto, Minoru Hatayama, Naoko Morimura, Yoshifumi Matsumoto, Toshimitsu Suzuki, Maya Odagawa, Yuri S. Odaka, Yoshimi Iwayama, Ji Won Um, Jaewon Ko, Yushi Inoue, Sunao Kaneko, Shinichi Hirose, Kazuyuki Yamada, Takeo Yoshikawa, Kazuhiro Yamakawa, Jun Aruga, Elnf1 recruits presynaptic mGluR7 in trans and its loss results in seizures. *Nature Communications*, 査読有り 2014, 5: 4501

Mizui T, Sekino Y, Yamazaki I, Yuta Ishizuka H, Takahashi H, Kojima N, Kojima M and

Shirao T. Myosin II ATPase activity mediates the long-term potentiation-induced exodus of stable F-actin bound by drebrin A from dendritic spines *PLoS ONE*. 査読有り 9(1):e85367 (2014)

Yamazaki H, Kojima N, Kato K, Hirose H, Iwasaki T, Mizui T, Takahashi H, Hanamura K, Roppongi RT, Koibuchi N, Sekino Y, Mori N, Shirao T. Spikar, a novel drebrin-binding protein, regulates the formation and stabilization of dendritic spines. *J Neurochem*. 査読有り 128:507-522 (2014)

Roppongi RT, Kojima N, Hanamura K, Yamazaki H, Shirao T. Selective reduction of drebrin and actin in dendritic spines of hippocampal neurons by activation of 5-HT_{2A} receptors. *Neurosci Lett*. 査読有り 547: 76-81 (2013)

Hideto Takahashi, Kei-ichi Katayama, Kazuhiro Sohya, Hiroyuki Miyamoto, Tuhina Prasad, Yoshifumi Matsumoto, Maya Ota, Hiroki Yasuda, Tadaharu Tsumoto, Jun Aruga & Ann Marie Craig, Selective control of inhibitory synapse development by Slitrk3-PTPδ trans-synaptic interaction. *Nature Neuroscience*, 査読有り 2012, 15(3): 389-398

Singh NK, Kundumani-Sridharan V, Kumar S, Verma SK, Kotla S, Mukai H, Heckle MR, Rao GN., Protein kinase N1 is a novel substrate of NFATc1-mediated cyclin D1-CDK6 activity and modulates vascular smooth muscle cell division and migration leading to inward blood vessel wall remodeling. *J. Biol Chem*. 査読あり 2012, 287: 36291-36304.

Noriyuki Akahoshi, Yasuki Ishizaki, Hiroki Yasuda, Yoshiya L. Murashima, Toshikazu Shinba, Kaoru Goto, Toshiyuki Himi, Jerold Chun, Isao Ishii, Frequent spontaneous seizures followed by spatial working memory/anxiety deficits in mice lacking sphingosine 1-phosphate

receptor 2. *Epilepsy & Behavior* 査読有り2011, 22(4): 659-665.

Tanaka K, Sato K, Yoshida T, Fukuda T, Hanamura K, Kojima N, Shirao T, Yanagawa T, and Watanabe H. Evidence for cell density affecting C2C12 myogenesis: possible regulation of myogenesis by cell-cell communication. *Muscle and Nerve*, 査読有り 2011, 44:968-977.

Han W, Takamatsu Y, Yamamoto H, Kasai S, Endo S, Shirao T, Kojima N, Ikeda K. Inhibitory role of inducible cAMP early repressor (ICER) in methamphetamine-induced locomotor sensitization *PLoS ONE* 査読有り 2011, 6: e21637

Kambe T, Motoi Y, Inoue R, Kojima N, Tada N, Kimura T, Sahara N, Yamashita S, Mizoroki T, Takashima A, Shimada K, Ishiguro K, Mizuma H, Onoe H, Mizuno Y, Hattori N Differential regional distribution of phosphorylated tau and synapse loss in the nucleus accumbens in tauopathy model mice. *Neurobiol Dis.* 査読有り 2011, 42:404-414.

Kajimoto K, Shao D, Takagi H, Maceri G, Zablocki D, Mukai H, Ono Y, Sadoshima J. (2011). Hypotonic swelling-induced activation of PKN1 mediates cell survival in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 査読あり 2011, 300: 191-200.

〔学会発表〕(計30件)

窪内 康二、辻本 翔、神田 勇輝、木戸 友絵、小野 祐輝、喜多 綾子、佐藤 亮介、西田 升三、椿 正寛、向井 秀幸、杉浦 麗子 プロテインキナーゼPKN3 ノックアウトマウスにおけるがん転移抑制メカニズムの解析 第37回日本分子生物学会大会(横浜)平成26年11月27日

富岡 直子、安田 浩樹、宮本 浩行、山田 一之、吉川 武男、山川 和弘、有賀 純 Elnf1

はmGluR7をシナプス前部に集積させ、てんかんや多動症の発症に関与する 第37回日本分子生物学会年会(横浜)2014年11月26日

竹林 輝、野田 陽平、吉崎 尚良、向井 秀幸、早野 俊哉 細胞分裂期におけるPKNの基質の網羅的同定 第37回日本分子生物学会大会(横浜)平成26年11月26日

Tomoaki Shirao, Toshiyuki Mizui, Noriko Koganezawa, Hideo Shimizu, Hiroki Yasuda, Yuko Sekino, Myosin II ATPase activity mediates the biphasic movement of stable F-actin bound by drebrin A between dendritic spines and the parent dendrite in long-term potentiation. Neuroscience 2014 (44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience), (Washington, DC, USA) November 19, 2014.

Anggraeini Puspitasari, Noriko Koganezawa, Nobuhiko Kojima, Mayu Isono, Yukari Yoshida, Tomoaki Shirao, Acute effect of X-irradiation and carbon ion-irradiation on fear memory formation and its underlying mechanism. Neuroscience 2014 (44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience), (Washington DC, USA) Nov. 15-19.

J. ARUGA, N. H. TOMIOKA, H. YASUDA, H. MIYAMOTO, Elnf1 recruits presynaptic mGluR7 in trans and its loss cause epilepsy, hyperactivity, and attention deficit. Neuroscience 2014 (44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience), (Washington, DC, USA) November 16, 2014.

辻本 翔、窪内 康二、神田 勇輝、小野 祐輝、木戸 友絵、西田 升三、椿 正寛、向井 秀幸、杉浦 麗子 PKN3 遺伝子ノックアウトマウスを用いたがん転移抑制メカニズムの探索 第126回日本薬理学会近畿部会(和歌山)平成26年10月24日

團野 紗莉、崎村 建司、向井 秀幸 タンパク質リン酸化酵素 PKN2 のマウス個体に

おける機能解析 第 87 回日本生化学会大会
(京都)平成 26 年 10 月 18 日

真柳 平, 安田 浩樹, 祖父江 憲治
PSD-Zip70によるRap2活性調節を介したシナ
プス形成制御 第87回日本生化学会大会 (京
都) 2014年10月16日

Koganezawa, N., Puspitasari, A., Kojima, N.,
Isono, M., Yoshida, Y., Shirao, T., The
time-dependent effects of radiation on fear
memory and synaptic proteins. 第57回日本神経
化学大会 (奈良) 2014年9月29日 ~ 10月1日
(invited in Symposium “The dawn of Radiation
Neurobiology”)

Tomoaki Shirao, Noriko Koganezawa, Yuki
Kajita, Nobuhiko Kojima, Kenji Sakimura,
Primary cultured neurons prepared from drebrin
knockout mice have a few MAP2 positive
dendrites. 第57回日本神経化学大会 (奈良)
2014年9月29日 ~ 10月1日

A. Puspitasari, N. Koganezawa, M. Shuchuan,
N. Kojima, M. Isono, Y. Yoshida, T. Kanai, T.
Shirao, Acute effect of Carbon Ion Irradiation on
hippocampal neuron and fear memory formation.
The 6th ISN Special Conference (Tokyo)
September 20-22, 2014.

安田 浩樹, 山本 光, 川又 敏夫, 向井秀
幸 グルタミン酸トランスポーターを介した
PKN1による代謝型グルタミン酸受容体機能
制御 第37回日本神経科学学会 (横浜) 2014
年9月11日

Angraeini Puspitasari, Noriko Koganezawa,
Nobuhiko Kojima, Mayu Isono, Yukari Yoshida,
Tomoaki Shirao, Acute effect of carbon ion
irradiation on hippocampal neuronal cell death
and fear memory formation. 第 37 回日本神経
科学大会 (横浜) 2014 年 9 月 11 日 ~ 13 日

Noriko Koganezawa, Yuki Kajita, Nobuhiko
Kojima, Kenji Sakimura and Tomoaki Shirao,

“Primary cultured hippocampal neurons prepared
from drebrin knockout mouse shows the decrease
of MAP2 positive dendrites at late developmental
stage. 第 37 回日本神経科学大会 (横浜) 2014
年 9 月 11 日 ~ 13 日

Yuki Kajita, Nobuhiko Kojima, Kenji
Sakimura, Tomoaki Shirao, Drebrin knockout
mice show the olfaction impairment caused by
delayed neural exchange in olfactory bulb. 第 37
回日本神経科学大会 (横浜) 2014 年 9 月 11 日
~ 13 日

野田 陽平, 吉崎 尚良, 向井 秀幸, 早野 俊
哉 PKN シグナル伝達のリン酸化プロテオ
ム解析 第 37 回日本分子生物学会大会 (横
浜) 2013 年 11 月 25 日

Angraeini Puspitasari, Noriko Koganezawa,
Nobuhiko Kojima, Tomoaki Shirao, Acute effects
of X-irradiation on learning, adult neurogenesis
and the accumulation of drebrin. Society for
Neuroscience 40th Annual Meeting, (San Diego,
CA) Nov. 9-13, 2013.

Y Kajita, N Kojima, K Sakimura, T Shirao,
Drebrin knockout mice show the impairment of
olfactory acuity via affecting adult neurogenesis.
第 56 回日本神経化学会大会 (京都) 2013 年 6
月 20 日 ~ 23 日

A Puspitasari, N Koganezawa, N Kojima, T
Shirao, Effect of X-irradiation on learning, cell
death and synaptic proteins. 第 56 回日本神経化
学会大会、京都、2013 年 6 月 20 日 ~ 23 日

21 N Koganezawa, A Puspitasari, N Kojima, T
Shirao, Acute effect of X-irradiation on adult
mouse brain. 第 90 回日本生理学会大会、2013
年 3 月 27 日 ~ 29 日

22 N Koganezawa, A Puspitasari, N Kojima, T
Shirao, Time-dependent effect of X-irradiation on
fear conditioning and its underlying cellular
mechanism. In the Symposium “Effect on the

neural cells and plasticity of the central nervous system.”, Third Conference of International Society of Radiation Neurobiology, (Naha) Jan 26, 2013 (invited)

23 A Puspitasari, N Koganezawa, N Kojima, T Shirao, Acute effect of X-irradiation on adult mouse brain” Third Conference of International Society of Radiation Neurobiology, (Naha) Jan 26, 2013

24 N. MORIMURA, H. YASUDA, K. YAMAGUCHI, K.-I. KATAYAMA, K. YAMADA, N. TOMIOKA, M. OTA, J. ARUGA, Lrfr2/SALM1-deficient mice show neuropsychiatric disorder-like behavior phenotypes and synaptic changes of hippocampus Neuroscience 2012 (42nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience) (New Orleans) October 13, 2012.

25 児島 伸彦、安田 浩樹、花村 健次、白尾 智明 マウス脳におけるドレブリンアイソフォームの特異的分布と機能 第35回日本神経科学学会 (名古屋) 2012年9月20日

26 Yuki Kajita, Nobuhiko Kojima, Yuta Ishiduka, Tomoaki Shirao. Differential role of drebrin in neuronal cell proliferation and migration in adult neurogenesis. 第35回日本神経科学大会 (名古屋) 2012年9月18日～21日

27 Tomoaki Shirao, Hiroyuki Yamazaki, Nobuhiko Kojima, Yuko Sekino, Myosin-II-dependent translocation of drebrin at the early phase of synaptic plasticity 第85回日本薬理学会年会 (京都) 2012年3月14日～16日

28 安田 浩樹 発達期海馬長期抑圧誘発におけるカルシウムソースのスイッチ 第34回日本神経科学学会 (横浜) 2011年09月16日

29 守村 直子 安田 浩樹 山田 一之 富岡 直子 片山 圭一 山口 和彦 太田 摩耶

神谷 明子 有賀 純 Lrfr2/SALM1 による海馬興奮性シナプスの機能制御とその遺伝子欠損マウスにみられた行動異常 第34回日本神経科学学会 (横浜) 2011年09月15日

30 Shirao, T., Hanamura, K., Yasuda, H., Kajita, Y., Kamata, Y., Sekino, Y. and Kojima, N. REGULATORY ROLE OF DREBRIN IN HIPPOCAMPUSDEPENDENT LEARNING. ISN-ESN-2011 (International Society for Neurochemistry and European Society for Neurochemistry) 23rd Biennial Meeting (Athens, Greece), 2011年8月30日

〔図書〕(計1件)

Hiroki Yasuda and Hideyuki Mukai
Electrophysiological technique for analysis of synaptic function of PKN1 in hippocampus. Protein Kinase Technologies, Neuromethods vol.68, (Mukai H, eds.) Springer, 2012: 349-360

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：60294071

(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：80252758

児島 伸彦 (KOJIMA NOBUHIKO)
東洋大学・生命科学部・教授
研究者番号：80215251