

氏名	ふじい かずき 藤井 一希
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	富生命博甲第116号
学位授与年月日	令和2年3月24日
専攻名	認知・情動脳科学専攻
学位授与の要件	富山大学学位規則第3条第3項該当
学位論文題目	Comprehensive behavioral analysis of the mice deficient in Akain1, a novel protein kinase A-binding protein. (新規プロテインキナーゼ A 結合タンパク質 Akain1 欠損マウスの網羅的行動解析)
論文審査委員	
(主査)	教授 井ノ口 馨
(副査)	教授 森 寿
(副査)	教授 黒田 敏
(副査)	教授 嶋田 豊
指導教員	教授 高雄 啓三

論 文 要 旨

論 文 題 目

Comprehensive behavioral analysis of
the mice deficient in Akain1,
a novel protein kinase A-binding protein.
(新規プロテインキナーゼ A 結合タンパク質
Akain1 欠損マウスの網羅的行動解析)

氏 名 藤井 一希

- 備考 ① 論文要旨は，2,000 字程度とする。
② A4 判とする。

[目的] サイクリックAMP (cAMP) 依存性プロテインキナーゼ (PKA) は、cAMP を介して活性化され、セリンないしスレオニン残基をリン酸化する酵素である。セカンドメッセンジャーである cAMP と PKA を介した細胞内シグナル伝達は、Gタンパク質共役受容体を介したシグナルを始めとする様々なカスケードで利用される。Aキナーゼアンカータンパク質 (AKAP) と呼ばれる一連のタンパク質群は、PKA の足場となることで、PKAの細胞局在の制御を担う。このような AKAP-PKA 相互作用による PKA 活性の時空間的制御は、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ことが報告されているがその全容は明らかになっていない。神経変性疾患、精神疾患において PKA-AKAP による適切なシグナル伝達の障害が生じていることが報告されており、AKAP を介した複合的な経路が新しい創薬標的としても注目されている。

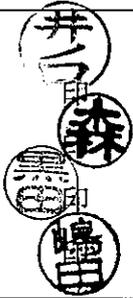
A kinase inhibitor 1 (Akain1) は PKAシグナルの伝達において特異的な機能を持つ新規のPKA 結合タンパク質であり、他の AKAP と競合して PKA の細胞内局在を打ち消すことが報告されている。Akain1 は特に神経組織で顕著に発現しているが、脳機能においてどのような役割を果たすかは不明である。そこで、Akain1 の機能を明らかにするために、CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムによりC57BL/6J系統を背景とする Akain1ノックアウト (KO) マウスを作出した。本研究では、網羅的行動テストバッテリーを用いてこのマウスの行動特性を解析し、脳における Akain1 の生理学的機能を明らかにする。

[方法並びに成績] 野生型マウス (WT: ♂, ♀ = 20, 12), Akain1 欠損マウス (KO: ♂, ♀ = 20, 15), を用いて、9週齢から網羅的行動テストバッテリーによる行動表現型解析を行った。比較的マウスへのストレスが低いとされる試験から順に、一般身体所見・神経学的スクリーニング、明暗選択テスト、オープンフィールドテスト、高架式十字型迷路試験、ホットプレートテスト、社会性テスト (新規環境, three-chamber), ロータロッドテスト、プレパルス抑制テスト、ポーソルト強制水泳テスト、ビームテスト、物体位置再認テスト、パターン弁別試験、T字迷路試験、バーンズ迷路試験、新規物体位置認識試験を実施した。一般身体所見・神経学的スクリーニングにおいては、雌雄ともに WT と Akain1 KO の間で明らかな違いは見られなかった。痛覚感受性を評価するホットプレート試験において、オスでは KO マウスの疼痛反応出現の潜時が WT マウスに比べ有意に延長しており、Akain1 KO マウスのオスは WT マウスと比較して痛覚感受性が低いことが示唆された。また、社会性を評価する three-chamber テストにおいては、Akain1 KO のメスにおいてのみ社会的な新奇性に対する嗜好性が障害されていた。うつ様行動を評価するポーソルト強制水泳テストにおいて、Akain1 KO のオスでは不動時間が有意に増加していた。一方で、メスでは不動時間が減少する傾向がみられ、遺伝子型と性別による効果の間に有意な交互作用が認

められた。また、パターン弁別試験において、2つの異なる空間パターン（文脈）を弁別する課題を行ったところ、WT マウスは1日目に馴化されたのと同じ文脈では活動量が低下し、異なる文脈では活動量が低下しなかった。一方、Akain1 KOマウスは馴化時との文脈の違いによる活動量に変化が見られなかった。すなわち、Akain1 KO マウスは空間パターンの弁別に障害があることが示唆される。バーンズ迷路試験では、逃避箱位置の学習及び学習後のプローブテストにおいて Akain1 KO マウスと WT マウスの間には雌雄共に有意な差は見られなかった。次に、逃避箱の位置を反転した逆転学習を行った。オスでは逆転学習時には WT と KO マウスの間には有意な差は見られなかった。しかしながら、逆転学習後に行ったプローブテストで、WT マウスは逆転学習時の逃避箱の位置を逆転前の逃避箱の位置より有意に長く探索するが、Akain1 KOマウスでは両者を探索した時間に有意な差は見られなかった。メスにおいて逆転学習のプローブテストにおいては WT と KO マウスの間には有意な差は見られなかったが、WT と比較して KO マウスは学習が遅れる傾向がみられた。

〔総括〕 Akain1 欠損により、雌雄ともに学習の柔軟性に障害がみられた。また、Akain1 欠損は痛覚感受性、社会性行動やうつ様行動には性別により異なる影響を示した。これらの結果は、Akain1 が文脈の弁別や行動の柔軟性、そして行動様式の性差に重要であることが示唆された。本研究により明らかになった Akain1 欠損マウスの特徴的な行動表現型は、PKA - AKAP シグナル伝達を理解するための基礎データとなるとともに、Akain1 が PKAシグナル伝達を介した発達障害や精神疾患の性差を考慮した新しい標的となる可能性を示唆している。(2045字)

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

報 告 番 号	富生命博甲第 号 富生命博乙第 号	氏 名	藤井 一希
論文審査委員	職 名	氏 名	
	(主査) 教授	井ノ口 馨	
	(副査) 教授	森 寿	
	(副査) 教授	黒 田 敏	
(副査) 教授	嶋 田 豊		
指 導 教 員	教授	高 雄 啓 三	
(論文題目) Comprehensive behavioral analysis of the mice deficient in Akain1, a novel protein kinase A-binding protein. (新規プロテインキナーゼ A 結合タンパク質 Akain1 欠損マウスの網羅的行動解析)			(判定) 合格
(論文審査の要旨) <p>〔目的〕 サイクリック AMP (cAMP) 依存性プロテインキナーゼ (PKA) は、cAMP を介して活性化され、セリンないしスレオニン残基をリン酸化する酵素である。セカンドメッセンジャーである cAMP と PKA を介した細胞内シグナル伝達は、Gタンパク質共役受容体を介したシグナルを始めとする様々なカスケードで利用される。Aキナーゼアンカータンパク質 (AKAP) と呼ばれる一連のタンパク質群は、PKA の足場となることで、PKA の細胞局在の制御を担う。このような AKAP-PKA 相互作用による PKA 活性の時空間的制御は、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ことが報告されているがその全容は明らかになっていない。神経変性疾患、精神疾患において PKA-AKAP による適切なシグナル伝達の障害が生じていることが報告されており、AKAP を介した複合的な経路が新しい創薬標的としても注目されている。</p> <p>A kinase inhibitor 1 (Akain1) は PKA シグナルの伝達において特異的な機能を持つ新規の PKA 結合タンパク質であり、他の AKAP と競合して PKA の細胞内局在を打ち消すことが報告されている。Akain1 は特に神経組織で顕著に発現しているが、脳機能においてどのような役割を果たすかは不明である。そこで、Akain1 の機能を明らかにするために、CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムにより C57BL/6J 系統を背景とする Akain1 ノックアウト (KO) マウスを作出した。本研究では、網羅的行動テストバッテリーを用いてこのマウスの行動特性を解析し、脳における Akain1 の生理学的機能を明らかにすることを目的とした。</p> <p>〔方法〕 野生型マウス (WT: ♂, ♀ = 20, 12), Akain1 欠損マウス (KO: ♂, ♀ = 20, 15), を用いて、9 週齢から網羅的行動テストバッテリーによる行動表現型解析を行った。比較的マウスへのストレスが低いとされる試験から順に、一般身体所見・神経学的スクリーニング、明暗選択テスト、オープンフィールドテスト、高架式十字型迷路試験、ホットプレートテスト、社会性テスト (新規環境, three-chamber), ロータロッドテスト、プレパルス抑制テスト、ポーソルト強制水泳テスト、ビームテスト、物体位</p>			

置再認テスト、パターン弁別試験、T字迷路試験、バーンズ迷路試験、新規物体位置認識試験を実施した。

〔結果〕 一般身体所見・神経学的スクリーニングにおいては、雌雄ともに WT と Akain1 KO の間で明らかな違いは見られなかった。痛覚感受性を評価するホットプレート試験において、オスでは KO マウスの疼痛反応出現の潜時が WT マウスに比べて有意に延長しており、Akain1 KO マウスのオスは WT マウスと比較して痛覚感受性が低いことが示唆された。また、社会性を評価する three-chamber テストにおいては、Akain1 KO のメスにおいてのみ社会的新奇性に対する嗜好性が障害されていた。うつ様行動を評価するポーツルト強制水泳テストにおいて、Akain1 KO のオスでは不動時間が有意に増加していた。一方で、メスでは不動時間が減少する傾向がみられ、遺伝子型と性別による効果の間に有意な交互作用が認められた。また、パターン弁別試験において、2つの異なる空間パターン（文脈）を弁別する課題を行ったところ、WT マウスは1日目に馴化されたのと同じ文脈では活動量が低下し、異なる文脈では活動量が低下しなかった。一方、Akain1 KO マウスは馴化時との文脈の違いによる活動量に変化が見られなかった。すなわち、Akain1 KO マウスは空間パターンの弁別に障害があることが示唆された。バーンズ迷路試験では、逃避箱位置の学習及び学習後のプローブテストにおいて Akain1 KO マウスと WT マウスの間には雌雄共に有意な差は見られなかった。次に、逃避箱の位置を反転した逆転学習を行った。オスでは逆転学習時には WT と KO マウスの間に有意な差は見られなかった。しかしながら、逆転学習後に行ったプローブテストで、WT マウスは逆転学習時の逃避箱の位置を逆転前の逃避箱の位置より有意に長く探索するが、Akain1 KO マウスでは両者を探索した時間に有意な差は見られなかった。メスにおいて逆転学習のプローブテストにおいては WT と KO マウスの間に有意な差は見られなかったが、WT と比較して KO マウスは学習が遅れる傾向がみられた。

〔総括〕 Akain1 欠損により、雌雄ともに学習の柔軟性に障害がみられた。また、Akain1 欠損は痛覚感受性、社会性行動やうつ様行動において性別により異なる影響を示した。これらの結果は、Akain1 が文脈の弁別や行動の柔軟性、そして行動様式の性差に重要であることを示唆している。本研究により明らかになった Akain1 欠損マウスの特徴的な行動表現型は、PKA - AKAP シグナル伝達を理解するための基礎データとなるとともに、Akain1 が PKAシグナル伝達を介した発達障害や精神疾患の性差を考慮した新しい標的となる可能性を示唆している。

以上より、藤井君は、新規の PKA 結合たんぱく質 Akain1 が行動の柔軟性、そして行動様式の性差に重要であることを明らかにした点が、新規性が高いと評価された。また、Akain1 が発達障害や精神疾患の性差を考慮した新しい創薬標的となる可能性を示したことは医学における重要性も高いと評価された。以上から本審査委員会は本論文を価値の高いものであると評価し、博士（医学）の学位に十分値するものと判定した。