

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05133

研究課題名（和文）睡眠恒常性の時間タンパク質学：Nemuri複合体の同定とその物性理解

研究課題名（英文）Chronoproteiniology of Sleep homeostasis: Identification and Understanding of Nemuri complex and their physical property

研究代表者

戸田 浩史 (Toda, Hirofumi)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教

研究者番号：80862010

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 25,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、新規睡眠誘引遺伝子「nemuri」に着目し、Nemuriの詳細な分子機構についての理解を深めることを目的とする。特に本研究では、Nemuriタンパク質が司ると考えられるタンパク質複合体形成活性に着目し、Nemuri凝集体構造に含有される因子を網羅的に同定し、その機能を解析する。また、Nemuriの構造・その物性を予想することで、睡眠誘引活性との関連を紐解く。以上をを通して、Nemuriをモデルポリペプチドとした時間タンパク質の備えるべき特性を生化学的・構造的に明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

睡眠はヒトを含む動物が有する高次の生理現象であるが、その本質的な意義や分子・神経メカニズムは謎に包まれたままである。モデル生物であるショウジョウバエを用いて無作為・ゲノム規模でおこなった行動スクリーニングによって睡眠を強く誘引する新規の遺伝子が同定された。この新規遺伝子Nemuriの機能を解明することで、睡眠の分子・神経メカニズムに対する理解を深める重要な学術的意義があり、特に先進国でもっとも睡眠に悩まされている我が国の国民にとっては、睡眠の制御メカニズムを解き明かすことは社会的にも非常に重要な意義がある。

研究成果の概要（英文）：This study aims to deepen the understanding of the detailed molecular mechanism of the novel sleep-inducing gene "nemuri." Specifically, this study focuses on the protein complex formation and the activity governed by the Nemuri protein. We tried to comprehensively identify proteins contained within Nemuri aggregate structures and analyzes their functions. Furthermore, by predicting the structure and physical properties of Nemuri, the study aims to unravel its association with sleep-inducing activity. Through these approaches, we aim to elucidate the biochemical and structural properties of Nemuri as a model polypeptide.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：睡眠 ショウジョウバエ タンパク質

1. 研究開始当初の背景

我々ヒトを含む神経系を持つあらゆる動物は、睡眠をすることが知られているが、なぜ睡眠をしなければいけないのか、進化的になぜ睡眠という生理現象が保存されているのか、という本質的な問いに、現代生物学は答えられていない。その生理的機能だけでなく、どのような分子・神経メカニズムで睡眠が調節されているのか、という根本的な理解すら不十分になされていないというのが現状である。ただし、現象論的な観点から、睡眠は大きく 2 つのメカニズムによって調節されていることが知られている。すなわち、「体内時計」(いつ寝るのか)と「恒常性」(どのくらい深く・長く寝るのか)である。

「体内時計」を司る分子は、ショウジョウバエ研究をはじめとして多くのモデル生物を用いて同定されてきた。さらにそれぞれの因子がどのように相互作用をして細胞内で振舞うのか、脳神経細胞でそのような体内時計遺伝子がどこに発現しているのかといった主要な理解が進み、「ネガティブフィードバックループモデル」が提唱されてきたという経緯がある。

一方で、睡眠が司る「恒常性」の分子メカニズムに関しては、ほとんど理解が進んでいない。これは睡眠研究を推進する上で、重要な分子遺伝学的モデル生物が存在しなかったことに起因するといえる。そこで、ショウジョウバエをモデル生物として睡眠研究に用いることができないだろうかという考えの元、行動学的に睡眠を規定するという方法を用いることで、ショウジョウバエにも睡眠様の行動があることが西暦 2000 年に米国の 2 つの研究室から発表された。行動学的に睡眠を規定するには、以下の 4 つが挙げられる。すなわち、1) 静止状態からの可逆性。2) 覚醒閾値の上昇 3) 典型的な睡眠姿勢 3) 断眠後の恒常性維持反応 4) 継続的な断眠による致死性、である。この結果、静止状態が 5 分かそれ以上連続で続くと、どうやら上記の行動学的な睡眠に当てはまることが判明した。これによりショウジョウバエを用いて睡眠を計測可能で分子遺伝学的解析手法が可能となった。これ以降、多くの欧米の研究者によって睡眠を維持するのに重要な因子の同定がショウジョウバエの順遺伝学的スクリーニングから進められた。具体的には、薬剤による変異原の導入によりショウジョウバエの変異体系統を樹立したり、RNAi ノックダウンによる睡眠への影響を計測するのである。順遺伝学的スクリーニングから、様々な睡眠に重要な因子が同定され、そのシグナル経路も明らかになった。しかし、その殆どの変異体では睡眠をしようとするも睡眠を維持できない変異体であることがわかってきた。つまり、睡眠の恒常性には異常がないが、覚醒が高すぎるために睡眠を維持できないのである。

このことから睡眠の恒常性に直接かかわる重要な因子が見逃されており、真に睡眠に関わっている因子があるのではないかと申請者は考察した。真に睡眠に寄与する遺伝子は、以下の 3 つのクライテリアを満たすことが期待される。すなわち、1) 遺伝子の働きが上昇すれば、睡眠誘導が起きる(誘引)。2) その遺伝子の働きが弱まれば、睡眠の質あるいは長さが低下する(重要)。3) 個体の睡眠圧が上がったとき、その遺伝子の活性化もしくは発現上昇が起こる(相関)、である。そこで、申請者はショウジョウバエを用い、ゲノム規模、且つ、無作為の「機能獲得」行動スクリーニングを独自におこなうことで、睡眠誘引に重要な因子の同定をまず試みた。その結果、新規の睡眠誘引遺伝子「*nemuri*」を同定することに成功した。*Nemuri* は睡眠を強く「誘導」し、細菌感染などのストレスによって睡眠を誘引する睡眠に「重要」であり、さらにはストレスによって *nemuri* 遺伝子が引き起される「相関」関係があることを明らかにした。これにより、*nemuri* は「睡眠」に重要な因子であると考えられる。

さらに、*Nemuri* は抗菌ペプチドであることも明かにした。つまり、*Nemuri* は睡眠と生体防御システムとの重要な分子生物学的基盤となる因子であることを強く示唆しているのである。しかしながら、*Nemuri* が細胞内・外で他のどのような因子とどのように振舞い、最終的に睡眠を誘導するのかという重要な課題が、未だ残されたままである。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、*Nemuri* の機能解明理解へ向けて、*Nemuri* タンパク質の特徴を様々な角度から取り組み、明らかにすることを目的とする。特に *Nemuri* タンパク質が司ると考えられる高次構造体形成活性に着目し、*Nemuri* 凝集体構造に含有される因子を網羅的に同定し、その機能を解析する。また、*Nemuri* ペプチドの物性を制御・設計することにより、睡眠誘導活性(どのくらい深く・長く寝るのか)を操作する。これを通して、*Nemuri* をモデルポリペプチドとした時間タンパク質の備えるべき特性を生化学的・構成的に明らかにする。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、生化学、モデリング、遺伝学、行動学を組み合わせた分野横断的なアプローチをとりながら、*Nemuri* の包括的な機能解明を目指す。具体的には以下の方法を取る。

(1) 生化学的手法：これまでに *Nemuri* 近傍にあるタンパク質を同定するために *Nemuri*-TurboID をもつ遺伝子組み換え体の作出をしており、*Nemuri*-TurboID は八工の脳神経細胞内のタンパク質をビオチン化すること、睡眠誘引能力を保持していることは既に確かめてある(未発表データ)。そこで、質量分析機器を用いて、ビオチン化される因子を網羅的に同定する。さ

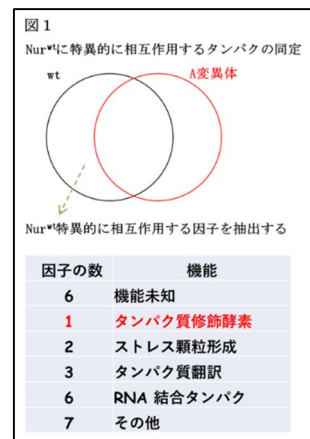
らに Nemuri 相互作用因子として同定されたタンパク質を精製し、相互作用因子として同定されたタンパク質が、実際に Nemuri 顆粒内に含まれるかを *in vitro* の液-液相分離実験にて検証する。

(2)モデリング：Nemuri が凝集体を構成することに注目すると、Nemuri は多量体形成能や、凝集体形成能に深くかかわることが知られている天然変性領域の存在、あるいは多量体形成に伴うコンフォメーション変化などが生じる可能性がある。Nemuri ペプチドに対する構造予測から、Nemuri の凝集体形成能を説明しうる物性を探索する。

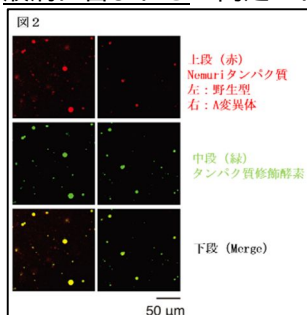
(3)遺伝・行動学：上記の Nemuri 相互作用因子に対するノックアウト系統もしくは RNAi ノックダウンを脳神経細胞特異的に発現させ行動解析により睡眠を計測する。特に Nemuri は感染や熱ショックによって引き起こされるストレス誘因性の睡眠に重要な役割を果たすことが明らかになっているので、同定された Nemuri 相互作用因子が通常の睡眠に影響を及ぼすだけでなく、ストレス誘因性の睡眠に重要かも合わせて検証する。ショウジョウバエの睡眠計測には、キロショウジョウバエの行動を計測する DAM システムを用いて、5 分がそれ以上の活動が見られない状態を睡眠とみなす標準的な評価方法にて睡眠時間の計測をする。

4. 研究成果

(1)Nemuri 相互作用因子の網羅的同定：Nemuri-TurboID 及び Nemuri の睡眠誘引を越さない変異体である AGG 変異体に TurboID を付加した Nemuri A mutant-TurboID をそれぞれ脳神経特異的に発現するハエにピオチンを食べさせ、脳を集め、質量分析計にサンプルをかけた。Nemuri A mutant とは相互作用せず、Nemuri の野生型に特異的に相互作用する因子が睡眠誘引と関連していると考えられる。そういったタンパク質を抽出したところ、6 つの機能未知の新規タンパク質、6 つの RNA 結合因子、2 つのストレス顆粒形成タンパク質、3 つのタンパク質翻訳因子、2 つの酵素、1 つのタンパク質修飾酵素を含む合計 23 のタンパク質を同定することに成功した(図 1)。

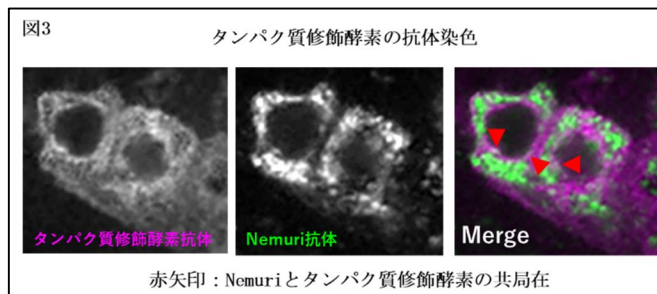


(2)Nemuri 相互作用因子の一つであるタンパク質修飾酵素は Nemuri 液滴に含まれる：同定された因子の一つにタンパク質修飾酵素があるが、この酵素は過去に睡眠と関係があるという知見がなく、新規性が高い



と考えられるため、この酵素に焦点を絞って解析をした。まず、このタンパク質修飾酵素を大腸菌にて発現・精製をおこなった。その後、Nemuri の野生型もしくは A 変異体と混合し、同じ液滴も含まれるかを検討したところ、タンパク質修飾酵素は Nemuri 液滴に含まれることが判明した。A 変異体では液滴形成能が低下することが過去の申請者らの先行研究から明らかになっているが(未発表)、A 変異体の液滴中に含まれるタンパク質修飾酵素も同時に減少していることもわかった(図 2)。

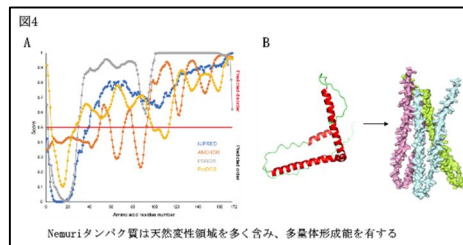
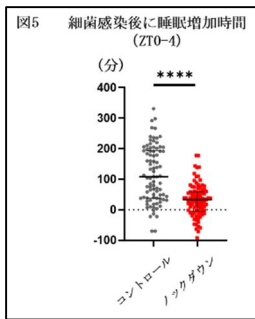
(3)タンパク質修飾酵素の発現・細胞内局在解析：Nemuri 相互作用因子として同定されたタンパク質修飾酵素の発現解析は、キロショウジョウバエにおいて、詳細になされていなかった。そこでまず、このタンパク質修飾酵素における抗体を精製すべく大腸菌内で発現・精製し、これをウサギに打ち込むことで抗体の生成をおこなった。血清を集めタンパク質修飾酵素を結合した結合カラムを作成し、これを用いてタンパク質修飾酵素特異的に認識する抗体を精製した。次に、ハエ由来の S2 培養細胞やハエの頭からタンパク質抽出液を調整し、SDS-PAGE 後、Western blotting をおこなった。その結果、培養細胞及びハエの頭から抽出したタンパク質に対して、非常に特異的にタンパク質修飾酵素に対して検出することがわかった。そこで、この抗体を用いて、免疫染色法によって、ハエの脳内の神経細胞に広範囲に発現している事、特に PI、キノコ体などの特異的な脳神経細胞の部位で発現が強く検出した。先行研究から、どちらの部位も睡眠に重要な役割を果たしていることが知られている神経細胞群である。ハエの神経細胞内での局在を詳細に観察したところ、タンパク質修飾酵素は細胞質や膜状に局在が見られることが判明した。そこで、Nemuri を発現させ、このタンパク質修飾酵素と共局在するかを共焦点顕微鏡を用いて観察したところ、細胞内の一部において顆粒状に共局在していることが判明した(図 3)。



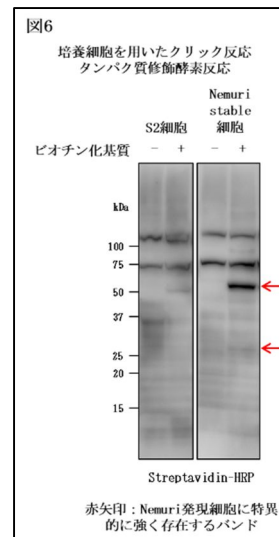
(4)Nemuri の複合体予測：Nemuri が顆粒状のタンパク質凝集体/複合体を形成することと一致して、Nemuri 配列は天然変性領域を多く含むことが予想された(図 4A)。また、AlphaFold2 を用いた複合体構造予測からは、多量体形成時に、非変性領域同士が相互作用する可能性が示された(図 4B)。ただし、これはあくまでも予測であるため、実験的な検証、さらには、ごく最近発表

されたタンパク質相互作用の解析に大きな発展が得られている AlphaFold3 を用いた検証を多角的に進める基盤となる結果である。

(5) 同定されたタンパク質修飾酵素の睡眠における影響：このタンパク質修飾酵素が睡眠に関わっているかを検証するため、脳神経特異的に RNAi を発現しノックダウンをし、睡眠を計測した。RNAi を発現しないコントロールと比較して、通常の睡眠に対する影響はみられなかった。そこで次に、細菌感染誘引性の睡眠に影響があるかを調べるため、セラチア菌を感染させた後の睡眠誘引を計測したところ、コントロールのハエでは感染後の睡眠が上昇するものの、タンパク質修飾酵素遺伝子でのノックダウンでは細菌感染後に誘発される睡眠は著しく減少した。このことから、タンパク質修飾酵素は Nemuri と同様に、ストレス誘因性の睡眠に重要であると考えらる(図 5)。



(6) Nemuri はタンパク質修飾酵素によって修飾されるタンパク質を変化させる：タンパク質修飾酵素が Nemuri によってその標的タンパク質の修飾を変化させるのかを検証するため、S2 培養細胞を用いてクリック反応をおこない修飾されたタンパク質をビオチン化させた。またそのビオチン化が Nemuri のあるなしで変化するのかを検証した。まず Western blotting によって、ビオチン化が進んでいることを確かめた。また Nemuri を恒常的に発現させる Stable 培養株を樹立したところ、Nemuri を発現しない通常の S2 細胞と比較してビオチン化が多く検出されるバンドがあることを見出した(図 6)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	大出 晃士 (Ode Koji) (40612122)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師 (12601)	

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