

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料  
〔令和2（2020）年度 研究進捗評価用〕

平成29年度採択分  
令和2年3月31日現在

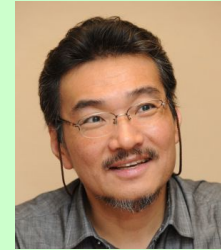
フォワード・ジェネティクスによる睡眠覚醒制御機構の解明

Elucidation of sleep/wakefulness regulation using forward genetic approach

課題番号：17H06095

柳沢 正史（YANAGISAWA, MASASHI）

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・機構長/教授



研究の概要

研究代表者らがフォワード・ジェネティクス研究によって見出した SIK3 および NALCN を切り口として遺伝学、生理学、生化学、分子生物学、形態学等の手法を駆使し、睡眠と覚醒、ノンレム睡眠とレム睡眠を制御する細胞内分子機構の解明を目指す。さらに、フォワード・ジェネティクス研究により新たな睡眠制御分子を同定する。

研究分野：神経科学

キーワード：睡眠 マウス遺伝学 神経生理学 生化学

1. 研究開始当初の背景

睡眠は動物に普遍的に認められる行動であるが、睡眠覚醒行動を制御する神経科学的メカニズムは不明である。研究代表者らは睡眠制御機構の解明を目指し、世界で類を見ない、哺乳類を用いた睡眠のフォワード・ジェネティクス研究を推進した。その結果、睡眠増大をもたらす遺伝子変異をリン酸化酵素 SIK3 に、レム睡眠の短縮をもたらす遺伝子変異を非選択的陽イオンチャネル NALCN に見出した（Funato, Yanagisawa et al., Nature 2016）。

2. 研究の目的

本研究では、1) 睡眠の大規模フォワード・ジェネティクス研究を推進し、睡眠覚醒を制御する新規遺伝子を同定するとともに、2) 睡眠覚醒を制御する SIK3 シグナルカスケードを解明し、3) レム睡眠を制御する細胞内シグナル伝達系を明らかにする。

3. 研究の方法

1) *Sik3* 変異マウス脳を用いたリン酸化プロテオミクス解析

野生型マウス、睡眠遮断した野生型マウスおよび *Sik3* 変異マウスの脳組織におけるリン酸化蛋白質の解析を行った。安定同位体タンデム MS タグ処理後に、LC-MS/MS でのリン酸化蛋白質の定量的解析を行った。

2) ランダム点突然変異マウスの睡眠スクリーニング

筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構内でランダム点突然変異マウス生産から責任

遺伝子同定までのステップを行える体制を整え、睡眠異常の優性スクリーニングを実施し継続している。

3) *Nalcn* 遺伝子改変マウスによる睡眠覚醒制御ニューロン集団の同定

Cre リコンビナーゼ依存的に、野生型 NALCN と DRL 変異型 NALCN の発現がスイッチする *Nalcn* (*Drl*) *FLEX* マウスが確立し、各種 Cre ドライバーマウスと交配後睡眠覚醒を検討した。並行して、生化学的研究および電気生理学的検討も実施した。

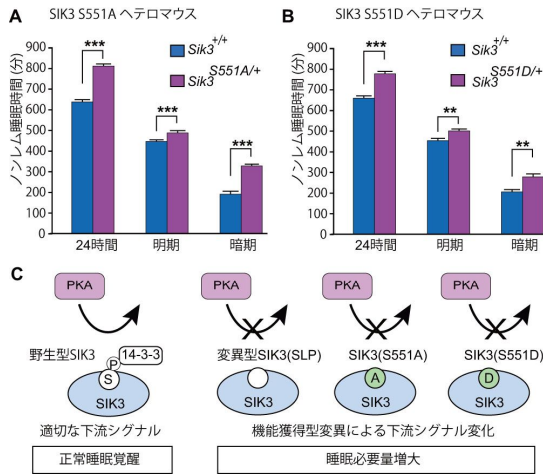
4. これまでの成果

睡眠要求を規定するリン酸化蛋白質群同定

*Sik3* (*Slp*) 変異マウスを遺伝学的過眠モデルとして用い、生理学的に睡眠要求が高まった状態である野生型断眠マウスと共通して変化する蛋白質を検討した。その結果、蛋白質が有意に変化するものは認められなかったが、80 のリン酸化蛋白質がこの2つの「眠気」の高まった脳に共通した変化として見いだされた。これらのリン酸化蛋白質群は、睡眠必要量の増大と相関してリン酸化状態の亢進を示したことから SNIPPs (sleep-need-index phosphoproteins) と名付けた。この80種のリン酸化蛋白質のうち、69がシナプスの機能や構造に関わるものであった。次頁に示すように、プレシナプスおよびポストシナプスの両方でリン酸化蛋白質の新参加状態の亢進が、「眠気」を規定していると考えられ、覚醒から睡眠へと駆動する役割を担っていることが示唆された。

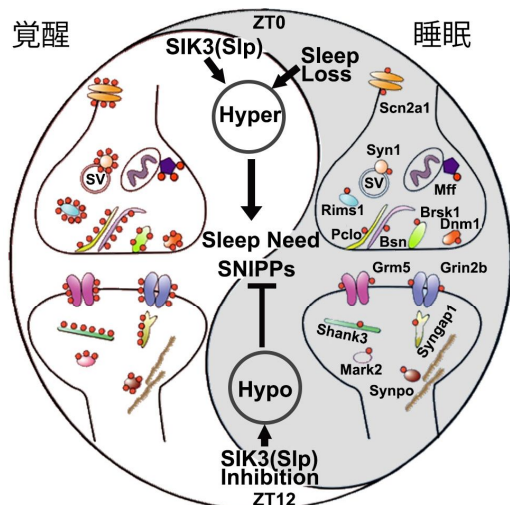
## SIK3 の PKA リン酸化セリン残基の睡眠必要量決定における役割解明

系統的に保存された PKA リン酸化セリン残基である S551 をアラニンやアスパラギン酸に置換すると、ヘテロ接合型であっても顕著にノンレム睡眠量が増大した。



SIK3 S551 と睡眠量 (A,B) S551 をアラニンに置換したヘテロ変異マウス(A)および S551 をアスパラギン酸に置換したヘテロ変異マウス(B)はノンレム睡眠時間が延長する。(C) 野生型 SIK3 蛋白は PKA によるリン酸化を受けるが、PKA によるリン酸化を受けない SIK3 の発現によって睡眠量は増大する。(Honda, Yanagisawa, Funato et al. PNAS 2018)

## 新規睡眠制御分子 CACNA1A の発見



断眠後野生型脳と SIK3 変異脳に共通するリン酸化状態変化を示す分子群 SNIPPs はシナプスに多い。(Wang, Funato, Yanagisawa, Liu et al. Nature 2018)

ランダム点突然変異マウススクリーニングによりノンレム睡眠量の増加を示すマウスに、膜電位依存性カルシウムチャネル *Cacna1a* 遺伝子変異を見出した。

## 5. 今後の計画

当初の計画通り、SIK3, NALCN に着目した生理学、遺伝学、生化学、形態学等を駆使した統合的研究を推進していく。

さらに、優性スクリーニングを中心としてフォワード・ジェネティクスのアプローチによる睡眠制御分子の同定を進めていく。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)  
(研究代表者は二重線、研究分担者は一重線、連携研究者は点線)

(1) Miyazaki T, Kanda T, (6 名略) Yanagisawa M. Dynamics of Cortical Local Connectivity during Sleep-Wake States and the Homeostatic Process. *Cereb Cort* in press

(2) Kashiwagi M, Kanuka M, (8 名略) Yanagisawa M, Hayashi Y. *Curr Biol* in press.

(3) Seol J, Fujii Y, (9 名略) Yanagisawa M. Distinct effects of orexin receptor antagonist and GABA agonist on sleep and physical/cognitive functions after forced awakening. *Proc Natl Acad Sci USA* 116, 24353-24358 (2019)

(4) Miyoshi C, Kim SJ, (7 名略) Yanagisawa M\*, Funato H\*. Methodology and theoretical basis of forward genetic screening for sleep/wakefulness in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 116, 16062-16067 (2019)

(5) Kakizaki M, Tsuneoka Y, (6 名略) Yanagisawa M\*, Funato H\*. Differential roles of each orexin receptor signaling in obesity. *iScience* 20, 1-13 (2019)

(6) Honda T, Fujiyama T, (6 名略) Takahashi S, Funato H\*, Yanagisawa M\*. A single phosphorylation site of SIK3 regulates daily sleep amounts and sleep need in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, 10458-10463 (2018)

(7) Iwasaki K, Haruna Komiya, (4 名略) Funato H\*, Yanagisawa M\*. Ablation of central serotonergic neurons decreased REM sleep and attenuated arousal response. *Front Neurosci* 12, 535, 1-12 (2018)

(8) Wang Z, Ma J, (17 名略) Takahashi S, Peng J, Yu Y, Funato H\*, Yanagisawa M\*, Liu Q\*. Quantitative phosphoproteomic analysis of the molecular substrates of sleep need. *Nature* 558, 435-439 (2018)

(9) Komiya H, Miyoshi C, (9 名略) Funato H\*, Yanagisawa M\*. Sleep/wakefulness behaviors in mice during pregnancy and pregnancy-associated hypertensive mice. *SLEEP* 41, zsx209, 1-14 (2018)

(10) Kaushik MK, Aritake K, (5 名略) Yanagisawa M. Continuous intrathecal orexin delivery inhibits cataplexy in a murine model of narcolepsy. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, 6046-6051 (2018)

2018年 慶應医学賞

2019年 文化功労者顕彰

7. ホームページ等

<https://wpi-iiis.tsukuba.ac.jp/japanese/>  
<http://sleepymouse.tsukuba.ac.jp/index.html>