

令和元年6月16日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15570

研究課題名(和文) 睡眠覚醒制御機構に関する新たな細胞内シグナル伝達経路の解明

研究課題名(英文) Identification of intracellular signal transduction pathways in the regulation of sleep/wakefulness states

研究代表者

松岡 妙子 (Matsuoka, Taeko)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：90781617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ランダム点突然変異マウスの睡眠覚醒スクリーニングにより、顕著な睡眠時間延長を示すSleepy家系を樹立し、原因となる遺伝子変異がリン酸化酵素SIK3にあることを明らかにした(Funato et al., 2016)。さらに我々のグループはノンレム睡眠の延長を示すSleepy2家系を樹立した。本研究ではSleepy2タンパクはSIK3によってリン酸化されることを確認した。新規睡眠覚醒制御関連遺伝子であるSIK3とSleepy2が互いに酵素と基質の関係になっていたということは、このカスケードが睡眠量を規定する重要な細胞内シグナル伝達機構であることが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

睡眠障害の適切な予防や診断、治療法を確立することは極めて今日的な課題である。本研究では、新規に同定された遺伝子と睡眠覚醒との密接な関係性を解明するとともに、睡眠覚醒を制御する新規細胞内シグナル伝達ネットワークを探求するものである。個々に同定された2つの睡眠制御関連遺伝子が一連のシグナル伝達経路で説明が可能となれば、睡眠障害の発症機序の理解が進み、将来的に臨床創薬に発展する可能性を秘めている。そのため、睡眠量を決定する新しい遺伝子であるSleepy(sik3)、Sleepy2の機能的役割を解明し、睡眠覚醒を制御する分子機構の包括的理解に迫ることは非常に意義深いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In a recent report, we established Sleepy mutant pedigree showing longer sleep time. SIK3, a member of AMP activated protein kinase (AMPK) family, was identified as a novel sleep-regulating molecule (Funato et al., Nature 2016). And also, we further found a new mutant mouse pedigree exhibiting abnormal sleep behavior, named Sleepy2, characterized by long NREM sleep time. In this study, we showed that SIK3 can phosphorylate Sleepy2 in vitro. It is suggested that SIK3-Sleepy2 signaling pathway plays an important role in regulating sleep.

研究分野：分子遺伝学 分子細胞生物学 睡眠障害 泌尿器科学

キーワード：睡眠障害 リン酸化 シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

睡眠障害はうつ病や不安症などの精神疾患の発症と関連するだけでなく、高血圧、肥満、糖尿病などの生活習慣病の危険因子にもなることが知られている。睡眠障害を克服していくためには、睡眠覚醒制御の根本メカニズムを理解することが不可欠である。これまでに睡眠と覚醒を切り替えるスイッチの役割をなす神経回路や伝達物質は徐々に明らかとなりつつあるが (Waber F, Nature. 2016)、その「切り替えスイッチを押すのは何物か」については未だ明確な答えが出せていない。そのスイッチングに働く因子を明らかにするためには「眠気」の分子実体にせまり、睡眠覚醒調節に関わる細胞内の分子機構を解明する必要がある。

当研究室では候補遺伝子からではなく、睡眠異常という表現型をもとにして原因遺伝子を探る手法により、これまでにランダムに突然変異を生じた 8000 匹以上のマウスの睡眠を調べ、遺伝性に睡眠異常を示す家系を複数樹立し、Sleepy(Sik3)、Dreamless(Nalcn)、Sleepy2(投稿準備中)という 3 つの新規睡眠覚醒制御関連遺伝子を同定した(Funato H et.al, Nature. 2016)。Sleepy(SIK3)は蛋白リン酸化酵素であり、機能獲得型変異と考えられる Sleepy 変異マウスではノンレム睡眠が増加し、覚醒時間が短縮する睡眠表現型を示した。SIK3 が睡眠覚醒を制御する分子メカニズムの詳細については未だ明らかとなっていないが、Sleepy2 は SIK3 によるリン酸化を受け、機能が制御されるという研究結果が近年報告されている。独立して見つかった新規睡眠覚醒制御関連遺伝子である Sik3 と Sleepy2 が互いに酵素と基質の関係になっていたということは、このカスケードが睡眠量を規定する細胞内シグナル伝達系の解明への足掛かりになると考えた。

2. 研究の目的

睡眠障害という問題を克服するため、近年では遺伝子に着目した分子レベルの研究が進展している。しかし、睡眠覚醒を制御する細胞内シグナル伝達経路は全く解明されていない。本研究では当研究室で同定した Sleepy 変異および Sleepy2 変異について、リン酸化シグナルによる調節機構に着目し、睡眠障害の新たな創薬標的の発見にもつながりうる細胞内シグナル伝達経路の解明を目指す。そのために、分子レベル、細胞レベルで蛋白リン酸化酵素 SIK3 による Sleepy2 の活性制御の詳細を明らかにし、将来的には個体レベルでこの細胞内シグナル経路が睡眠量を制御していることを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

1) リン酸化特異的抗体を用いた SIK3-Sleepy2 タンパクの相互作用解析

多くの動物細胞において Sleepy2 は内在性に高発現している。培養細胞株に HA tagged SIK3 発現プラスミドをトランスフェクションし、リン酸化部位特異的 Sleepy2 抗体を用いた Western blot を行い、SIK3 の発現による内在性 Sleepy2 のリン酸化について検討した。

2) 免疫沈降法を用いた SIK3-Sleepy2 タンパクの相互作用解析

SIK3 と Sleepy2 が酵素基質複合体を形成しているかどうかを確認するため、myc5 タグ-Sleepy2 マウスの脳のライセートを抗 myc 抗体で免疫沈降を行い、Western blot での SIK3 の検出を行った。

3) ペプチドを用いた Sleepy2 に対する SIK3 のキナーゼ活性の解析

Sleepy2 のリン酸化領域を含むペプチドを作製、それを基質とした SIK3 のキナーゼ活性を検討した。キナーゼアッセイは ADP-Glo Kinase Assay (プロメガ)を使用した。

4) SIK3 精製タンパクを用いたキナーゼ活性の解析

Flag タグ SIK3 発現ベクターを、HEK293T 細胞にトランスフェクションしてタンパク質を強制発現させ、Flag タグ抗体を用いた免疫沈降にて SIK3 タンパクを濃縮して回収し、キナーゼ活性を解析した。

4. 研究成果

1) リン酸化特異的抗体を用いた SIK3-Sleepy2 タンパクの相互作用解析

神経系株化細胞株である PC12 細胞から抽出したタンパクを用いて Sleepy2 の Western blot 解析を行った。PC12 細胞は内在性に SIK3 も Sleepy2 も発現している細胞である。リン酸化部位に対する特異的抗体 (anti Phospho Sleepy2) を用いて検討したが、Sleepy2 は恒常的にリン酸化状態であり、SIK3 を強制発現させても変化が見られなかった (図 1)。

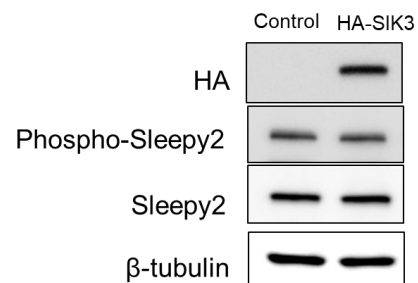


図 1 Sleepy2は培養細胞株PC12細胞で恒常的にリン酸化しておりSIK3による影響を受けない

一方で、SIK3 阻害剤である HG-9-91-01 を添加すると Sleepy2 は脱リン酸化した (図 2)。よって SIK3 は Sleepy2 のリン酸化を制御するキナーゼの一つであることが示唆された。

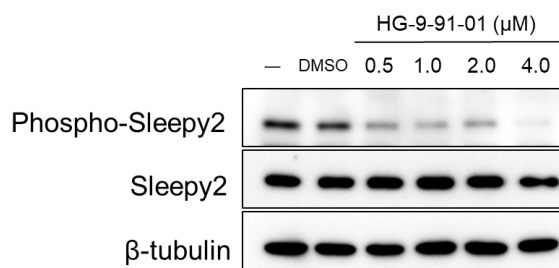


図 2 SIK3阻害剤HG-9-91-01により、Sleepy2 は脱リン酸化する

2) 免疫沈降法を用いた SIK3-Sleepy2 タンパクの相互作用解析

mycv5 タグ-Sleepy2 マウスの脳のライセートに対し、myc 抗体を用いて免疫沈降を行なった。免疫沈降物について、ウェスタンブロットにて SIK3 の発現の有無を確認しタンパク複合体を形成しているか検討したが、今回の実験では SIK3 は検出されなかった。酵素と基質の結合は一過性のものであることや SIK3 抗体の検出感度に起因すると考えられた。今後は免疫沈降物のプロテオミクス解析などにより、Sleepy2 と相互作用する分子の探索を行う予定である。

3) ペプチドを用いた Sleepy2 に対する SIK3 のキナーゼ活性の解析

Sleepy2 のリン酸化認識部位を含むペプチドを 2 つ作製した (Sleepy2 ペプチド、)。他に SIK3 の基質として知られているペプチド X とともに、活性化型 SIK3 を用いてキナーゼアッセイを行ったところ、SIK3 は Sleepy2 ペプチドのリン酸化を促進させることが示された (図 3)。

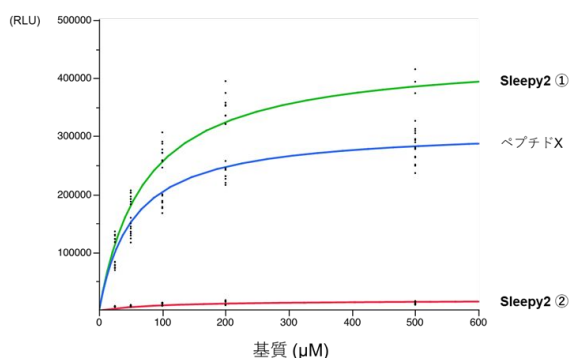


図 3 活性化型 SIK3 を用いたキナーゼアッセイ

4) SIK3 精製タンパクを用いたキナーゼ活性の解析

FLAG タグを付加した野生型 SIK3、exon13 欠損 SIK3 (Sleepy 変異)、T221A 変異 SIK3、S551A 変異 SIK3 発現用プラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、抽出したタンパクを免疫沈降法にて濃縮した。3) で用いた基質に対し、T221A 変異 SIK3 はキナーゼ活性を示さず、機能喪失型変異として予想していた結果となった。また、野生型、Sleepy 変異型、S551A 変異型タンパクはキナーゼ活性を示したが、その活性に明らかな違いは認めなかった。Sleepy 変異型、および S551A 変異型 SIK3 は機能獲得型変異であると考えていたが、キナーゼ活性では野生型と同等であった。これは細胞から抽出された野生型 SIK3 タンパクが、活性化状態であった可能性があり、今後さらに検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. 松岡 妙子, 柳沢 正史

睡眠と覚醒の科学 第 2 回 睡眠のフォワードジェネティクス解析

睡眠医療 第 12 巻第 2 号 233-237 頁 2018 年 06 月 30 日発行 株式会社ライフサイエンス (査読なし)

〔学会発表〕(計 2 件)

北園 智弘、一久 綾、松岡 妙子、Zhiqiang Wang、Jing Ma、船戸 弘正、柳沢 正史
恒常的睡眠・覚醒制御の細胞内分子メカニズムの解析
第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 パシフィコ横浜

Tomohiro Kitazono, Taeko Matsuoka, Aya Ikkyu, Zhiqiang Wang, Jing Ma, Hiromasa Funato, Masashi Yanagisawa

Exploration of the intracellular molecular mechanisms for homeostatic sleep/wake regulation

第 7 回 IIS シンポジウム ~ 睡眠の謎に挑む ~ 2018 年 12 月 東京コンファレンスセンター・品川

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

柳沢 正史 (YANAGISAWA, Masashi)

筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構(WPI-IIIS) 教授/機構長

研究者番号 : 20202369

船戸 弘正 (FUNATO, Hiromasa)

筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構(WPI-IIIS) 客員教授

研究者番号 : 90363118

北園 智弘 (KITAZONO, Tomohiro)

筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構(WPI-IIIS) 研究員

研究者番号 : 40826517

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。