

令和 5 年 4 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21441

研究課題名（和文）行動スクリーニングから同定された新規睡眠調節遺伝子群の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of novel genes regulating sleep discovered through behavior screen

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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：睡眠は神経を有するすべての動物に保存されている生命現象であるが、その機能はもちろん、分子メカニズムに関してよく理解されていない。本研究では、申請者がショウジョウバエを用いて独自におこなった機能獲得型の大規模な行動スクリーニングから同定された遺伝子に着目し、睡眠の分子メカニズムに迫ることを目標とする。行動スクリーニングから同定されたいくつかの新規遺伝子に着目して研究を行った結果、RNAiを脳神経特異的にノックダウンすると睡眠が減少することが複数のRNAi系統を用いた実験から明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代の先進国の国民の多くが睡眠に悩んでいる実態があるが、その時代の要請に現代生物学は十分に答えているとは言えない。それは睡眠という高次現象がどのような神経・遺伝メカニズムで制御されているのか、という基本的な疑問にすら答えられていないということに端を発する。キイロショウジョウバエを用いた遺伝学的解析は基礎学問として重要な役割を果たすのみならず社旗にも大きなインパクトを与えるモデル生物である。本研究を通じて、睡眠の基本原則を解き明かす一助になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Sleep is a biological phenomenon that is conserved in all animals with nerves system, but its function as well as its molecular mechanisms are poorly understood. In this study, we will focus on the genes identified through my original large-scale gain-of-function behavioral screening using Drosophila. I aim to elucidate the molecular mechanisms of sleep using Drosophila especially focusing on novel genes identified from it, Multiple RNAi lines expressing pan-neuronally showed that such gens play an important roles in sleep.

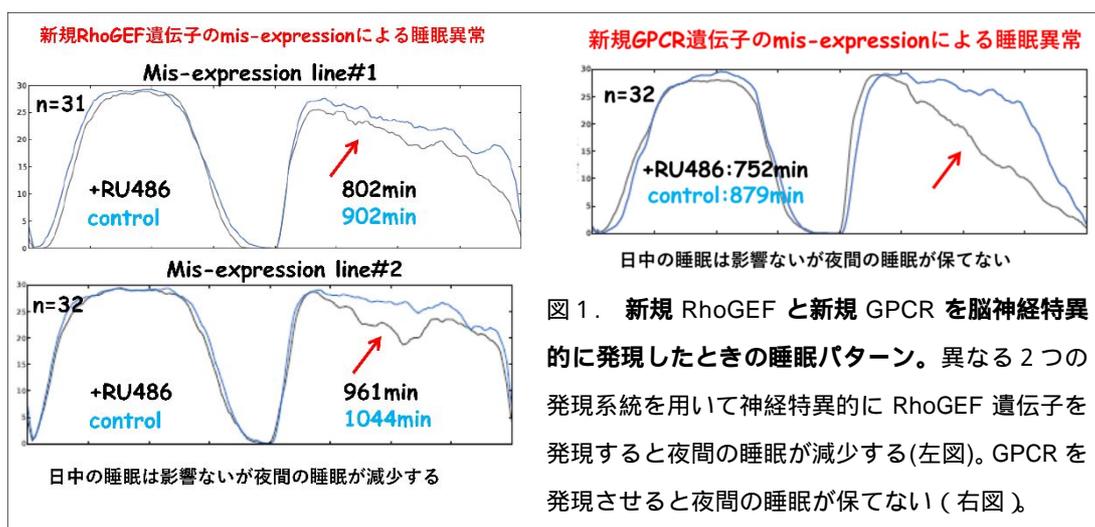
研究分野：睡眠

キーワード：睡眠 遺伝学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

睡眠は神経を有する生物に保存されている高次生理現象である。しかし、睡眠のもつ本質的な役割はもちろん、分子メカニズムに至るまで本質的な理解はなされていない。そこで申請者は、遺伝学的解析に優れているモデル生物であるショウジョウバエを用いて行動スクリーンをおこない、睡眠を制御する分子メカニズムの解明に取り組んだ。具体的には、機能獲得型のスクリーニングを通じて睡眠を誘発する遺伝子の探索を行った。その結果、睡眠を誘引する新規の因子を同定することができた。一方、このスクリーニングの副産物として、遺伝子を過剰発現させることで睡眠が短くなる遺伝子を複数系統発見するに至った(図1)。



興味深いことにどれも新規の遺伝子であり、今後これらの遺伝子を解析することで、今まで明らかにされていない睡眠の分子メカニズムに迫れることが期待される。現在までに、過剰発現をすることで睡眠が短くなるということが知られている遺伝子は殆ど知られていないため、睡眠に関する新たなメカニズムを解き明かすきっかけになる可能性がある。

2. 研究の目的

そこで、本研究はショウジョウバエのゲノム規模でおこなわれた遺伝的行動スクリーンから得られた、過剰発現をすると睡眠が減少する遺伝子に着目して研究を推進する。これらはどれも新規の遺伝子であり、一連の新規遺伝子の機能解析を行うことで、睡眠調節メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

まず、それぞれの遺伝子に対して RNAi 系統をショウジョウバエのストックセンターから取り寄せ、脳神経特異的に発現することで、特定の遺伝子だけをノックダウンする。これにより睡眠量に変化するかどうかを、ショウジョウバエの行動を指標に睡眠検定をおこない評価をする。更に、CRISPR/Cas9 の手法によって特定の遺伝子にのみ破壊をおこなうノックアウトをし、それぞれの遺伝子欠損系統を樹立する。そして、RNAi ノックダウンから観察されるのと同様の睡眠への変化が観察されるかどうかを確認する。

4. 研究成果

それぞれの RNAi 系統をストックセンターから取り寄せ、神経特異的な Gal4 系統と掛け合わせ

ことで、神経特異的に特定の遺伝子をノックダウンし、複数の系統において睡眠に異常が認められた。具体的には、それぞれの遺伝子に対して RNAi 系統を 2 系統ずつ用意して睡眠を計測したところどちらの遺伝子のノックダウンも睡眠が減少することが判明した（図 2）。このことから、行動スクリーニングで発見された新規の遺伝子は睡眠に重要な役割を果たして

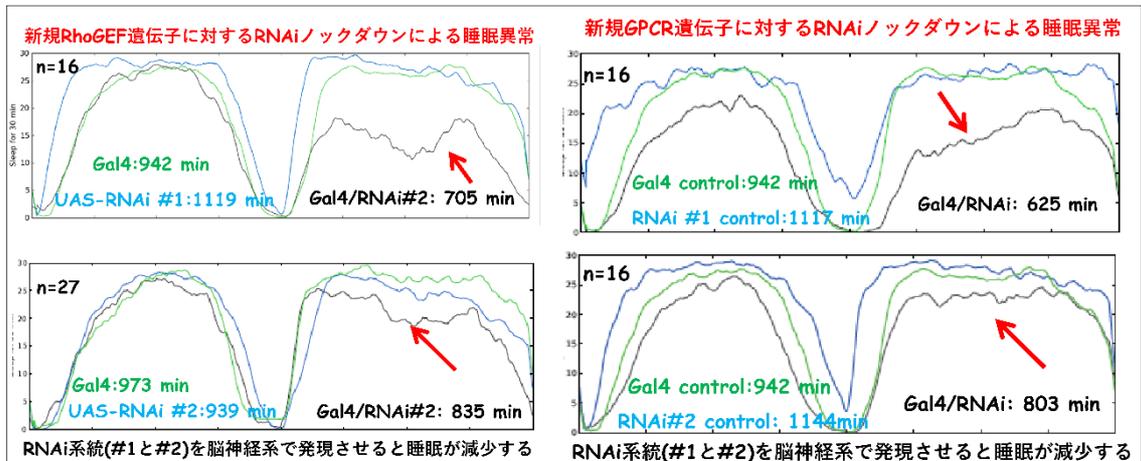


図 2. 新規 RhoGEF と新規 GPCR 遺伝子を RNAi ノックダウンしたときの睡眠パターン

新規 RhoGEF 遺伝子（左）もしくは新規 GPCR 遺伝子に対する RNAi を脳神経細胞特異的に発現させたときの睡眠パターン。それぞれの遺伝子に対して 2 系統の RNAi を試みた。（上下）どちらも睡眠が減少する

いることが判明した。そこで、次に CRISPR/Cas9 を用いてそれぞれの遺伝子に対するノックアウト系統を作出する試みをおこなった。その結果、複数の遺伝子に対してノックアウト系統を樹立することに成功した。（図 3）

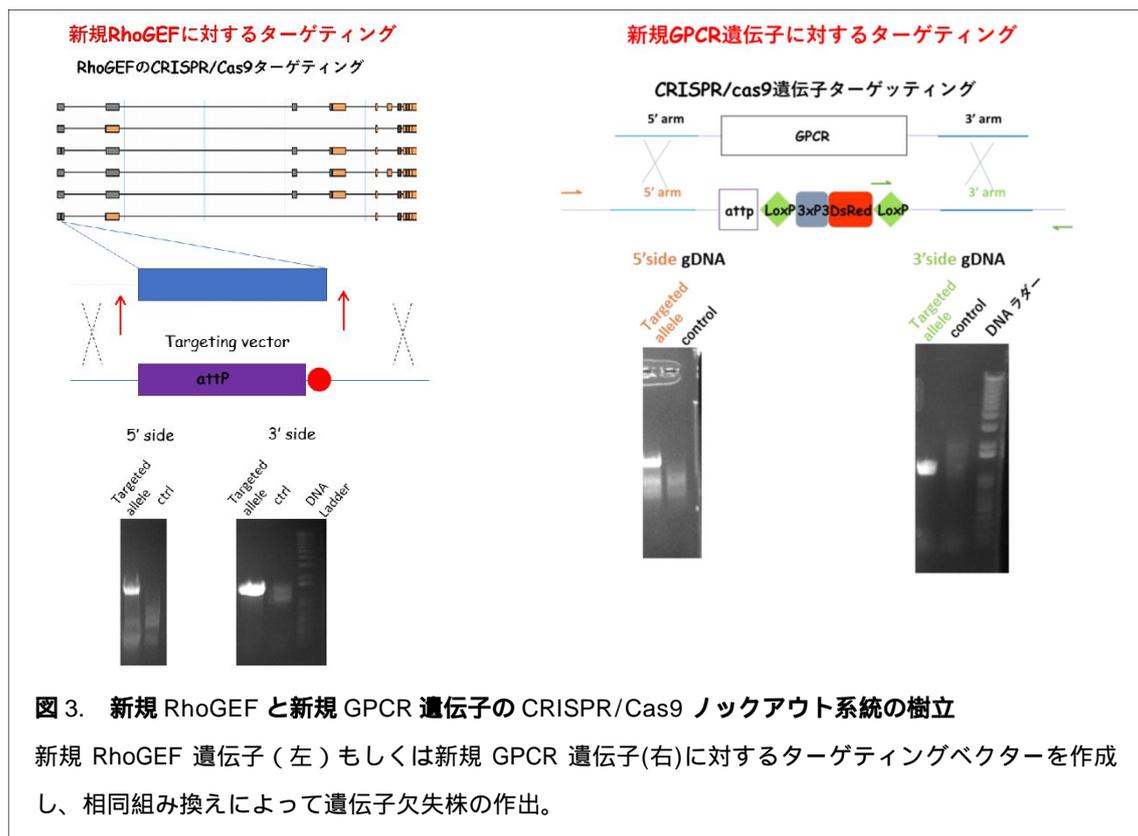


図 3. 新規 RhoGEF と新規 GPCR 遺伝子の CRISPR/Cas9 ノックアウト系統の樹立

新規 RhoGEF 遺伝子（左）もしくは新規 GPCR 遺伝子(右)に対するターゲティングベクターを作成し、相同組み換えによって遺伝子欠失株の作出。

今後はそれぞれの遺伝子が断眠後やストレスを加えた後に引き起こされる睡眠に重要な役割を果たすかどうかを検討する。

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|