

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15339

研究課題名（和文）睡眠・覚醒を制御する新規細胞内シグナル伝達経路の解明

研究課題名（英文）Analysis of the novel intracellular signaling pathways for sleep/wake regulation

研究代表者

北園 智弘（Kitazono, Tomohiro）

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・特別研究員（PD）

研究者番号：40826517

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者は所属する研究室において近年発見された新規睡眠制御分子SIK3が、どのような細胞内シグナル伝達経路を構成しているかを探索した。まず、SIK3の上流経路については、ノックアウトマウスを用いた睡眠測定の結果、セリンスレオニンキナーゼLKB1がSIK3の直上の上流制御因子として機能していることを明らかにした。また、SIK3の下流経路については、基質スクリーニングと生化学的実験によって、SIK3の下流で低分子量Gタンパク質RhoAが睡眠覚醒制御に関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

睡眠は私たちの健康の基盤である。しかし、睡眠の制御機構については、「なぜ、私たちは眠らなければならないのか？」といった基本的なことすら分かっていない。睡眠は脳によって制御されており、これに関与する神経回路については近年明らかになってきている。しかし、その神経回路を構成する神経細胞の、さらにその内部で神経細胞の活動を制御する分子機構については今に至るまでほとんど全く分かっていない。本研究はその分子機構の一端を明らかにしたものである。特に本研究の成果は、シナプス可塑性という睡眠の制御において重要と考えられている機構が、実際に睡眠と分子的にどのように関連しているかの手がかりを示したものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, I explored what intracellular signaling pathways are constituted by SIK3, a novel sleep regulatory molecule recently discovered in our laboratory. First, as for the upstream pathway of SIK3, the results of sleep recording using knockout mice revealed that serine threonine kinase LKB1 functions as an upstream regulator directly above SIK3. As for the downstream pathway of SIK3, substrate screening and biochemical experiments revealed that the small G protein RhoA is involved in sleep-wake regulation downstream of SIK3.

研究分野：神経科学

キーワード：睡眠 キナーゼ シグナル伝達 GTPase シナプス可塑性

1. 研究開始当初の背景

「睡眠」は広く動物に存在する普遍的な行動でありながら、その生理的な意義や制御機構の大部分は未解明である。睡眠・覚醒の切替えを実行する機構は、近年、神経回路レベルで明らかになりつつある一方で、その切替えをドライブする機構の細胞レベル・分子レベルでの理解はほとんど進んでいない。実際に、これまでに明らかになっている睡眠制御分子は、いずれも細胞外で作用する分子であり、細胞内で睡眠を制御する分子群や分子機構は全く明らかになっていない。

その中で、研究代表者が所属する研究室では、近年、順遺伝学的スクリーニングにより、セリンスレオニンキナーゼ SIK3 の機能獲得型変異がノンレム睡眠時間の大幅な増加と顕著な睡眠要求（眠気）の増大を引き起こすことを明らかにした（Funato et al., *Nature*, 2016, Honda et al., *PNAS*, 2018, Miyoshi et al., *PNAS*, 2019）。この研究は、脳内に SIK3 をキーとする睡眠・覚醒を制御する細胞内シグナル伝達経路が存在していることを示唆するものであった。つまり、このシグナル伝達経路の全容を明らかにすることができれば、睡眠・覚醒を制御する細胞内分子機構の実体に迫ることができると考えられる。

2. 研究の目的

睡眠・覚醒の制御機構における SIK3 を上流および下流のシグナル伝達経路を明らかにすることで、睡眠・覚醒がいかなる細胞内分子機構によって制御されているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

1) SIK3 の上流因子の探索

SIK3 は AMPK ファミリーに所属しているが、この AMPK のキナーゼ活性は、LKB1、CaMKK β 、TAK1 の 3 種類のキナーゼによって活性化される（Jacquel et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 2018）。そこで、これらのキナーゼが睡眠覚醒制御機構において、SIK3 の上流で機能しているかを検証するため、各々のノックアウトマウスについて脳波・筋電図測定を行い、睡眠異常の表現型が生じるかを調べる。

2) SIK3 の下流因子の探索

A) SIK3 の新規基質の探索

SIK3 の基質として知られているタンパク質は非常に限られていることから、KIOSS (Kinase-Oriented Substrate Screening) と呼ばれる *in vitro* 基質スクリーニング（Nishioka et al., *BBA*, 2015）を行うことで探索する。このスクリーニングでは、培養細胞に SIK 阻害剤とホスファターゼ阻害剤を組み合わせることでタンパク質のリン酸化を誘導した後に、リン酸化タンパク質結合タンパク質で、分子カスケードで機能するリン酸化タンパク質を選択的に濃縮し、SIK のキナーゼ活性に関係するリン酸化基質とそのリン酸化部位を決定する。KIOSS を用いることで、SIK3 の基質、および、リン酸化部位の候補リストが得られる。

B) SIK3 の新規基質が SIK3 によってリン酸化されているかの確認

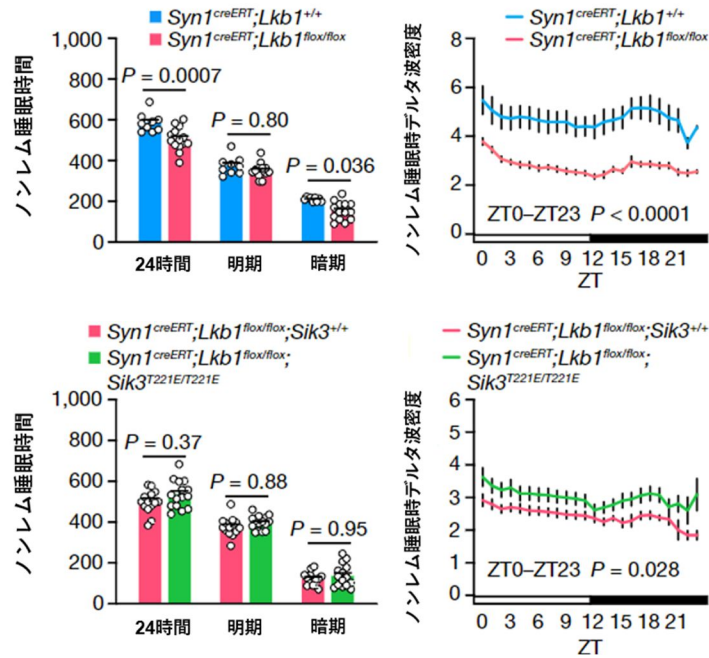
A)で同定した SIK3 の新規基質候補について、実際に SIK3 にリン酸化されているかを検証する。検証方法はそれぞれの分子の特性に基づいて決定する。

C) 同定した SIK3 の下流因子が睡眠・覚醒制御に関与しているかの検証

同定した新規基質やさらに下流の分子について、マウス脳でのノックダウンなどを行うことで、これらの分子が睡眠・覚醒制御に関与しているかを検証する。

4. 研究成果

(1) SIK3 の上流因子の探索



Lkb1 ノックアウトマウスを作製するために、*Lkb1*-flox (Nakada et al, *Nature*, 2010) と各種 Cre ドライバーを掛け合わせ、二重変異型マウスの作製を試みた。しかし、LKB1 は個体発生において重要な分子であることから (Ylikorkala et al., *Science*, 2001)、掛け合わせた二重変異型マウスはいずれも胚性致死になった。そこで、胚性致死を回避するために、所属研究室で開発した *Synapsin1*-CreERT2 ドライバーマウスと *Lkb1*-flox マウスとを掛け合わせることにした。*Synapsin1*-CreERT2 ドライバーマウスは、*Synapsin1a* アリルに *IRES-iCreERT2* 配列が挿入されており、神経系特異的かつタモキシフェン依存的に Cre を機能させることができる (Iwasaki et al, *J Neurosci*, 2021)。作製した *Synapsin1^{CreERT2};Lkb1^{flox}* 二重変異型マウスについて、生後 2 週から 3 週の期間にタモキシフェンを投与したところ、胚性致死を回避することができた。しかし、このマウスは生後 6-7 週で突然死することが分かったことから、睡眠測定は突然死の直前の生後 5-6 週で行った。その結果、*Lkb1* ノックアウトマウスは、ノンレム睡眠時間が減少し、睡眠の質の指標であるノンレム睡眠時デルタ波密度も減衰することが分かった。この表現型は *Sik3* ノックアウトマウスの表現型と一致している。さらに、*Synapsin1^{CreERT2};Lkb1^{flox}* 二重変異型マウスにおいて、SIK3 上の LKB1 リン酸化部位に疑似リン酸化変異 (グルタミン酸置換、T221E) を導入した *Synapsin1^{CreERT2};Lkb1^{flox};Sik3^{T221E}* 三重変異型マウスを作製したところ、ノンレム睡眠時間の減衰の表現型が部分的に回復した。この結果は、睡眠・覚醒制御機構において、LKB1 がこのリン酸化部位のリン酸化を介して、SIK3 の活性を制御していることを示している。この結果は、2022 年に *Nature* に

て報告した (Kim, Kitazono et al, *Nature*, 2022)。

CaMKK β ノックアウトマウスと *Tak1* ノックアウトマウスについても睡眠測定を行った (未発表)。

(2) SIK3 の下流因子の探索

A) SIK3 の新規基質の探索

KIOSS の結果、SIK3 の新規リン酸化部位の候補を 56 か所発見した。さらに、このスクリーニングで同定したリン酸化タンパク質について、パスウェイ解析を行った結果、Rho GTPase シグナル伝達経路に関連する因子が基質候補に有意に多く含まれていることが分かった (未発表)。

B) SIK3 の新規基質が SIK3 によってリン酸化されているかの確認

A) で同定した SIK3 の基質候補のうち、グアニンヌクレオチド交換因子 X が SIK3 の基質である可能性が最も高いことが分かった。そこで、リコンビナント SIK3 タンパク質と X のリン酸化部位周辺配列の合成ペプチドを用い、ADP-Glo キナーゼアッセイを行ったところ、リコンビナント SIK3 タンパク質によるリン酸化が認められた (未発表)。さらに、HEK293T 細胞に X タンパク質と SIK3 タンパク質を共発現させ、抗リン酸化 X 抗体を用いたウエスタンブロットングを行ったところ、こちらでも X のリン酸化が認められ、このリン酸化は X のリン酸化部位をアラニンに置換したタンパク質を発現させた際には見られなくなった。さらに、HEK293T 細胞に X と SIK3 を共発現させた後に、SIK 阻害剤 HG-9-91-01 を添加したところ、X のリン酸化部位のリン酸化が阻害された。以上の結果は、X が SIK3 の基質であることを示している (未発表)。

C) 同定した SIK3 の下流因子が睡眠・覚醒制御に関与しているかの検証

X は低分子量 G タンパク質 RhoA を標的としている。そのため、この RhoA が X のさらに下流で睡眠・覚醒を制御しているのではないかと推測された。これを検証するため、恒常的活性型 RhoA を AAV.B10 ベクターを用いて、マウス全脳に眼窩静脈叢注射によって導入し、このマウスの睡眠測定を行った。その結果、このマウスではノンレム睡眠時間が減少し、ノンレム睡眠時デルタ波密度も減衰した (未発表)。この結果は、RhoA が睡眠・覚醒制御には関与していることを示唆している。

以上の結果から、研究代表者は SIK3-X-RhoA 経路が睡眠・覚醒を制御していると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kim SJ, Hotta-Hirashima N, Asano F, Kitazono T, Iwasaki K, Nakata S, Komiya H, Asama N, Matsuoka T, Fujiyama T, Ikkyu A, Kakizaki Mi, Kanno S, Choi J, Kumar D, Tsukamoto T, Elhosainy A, Mizuno S, Miyazaki S, Tsuneoka Y, Sugiyama F, Takahashi S, Hayashi Y, Muratani M, Liu Q, Miyoshi C, Yanagisawa M, Funato H	4. 巻 612
2. 論文標題 Kinase signalling in excitatory neurons regulates sleep quantity and depth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 512 ~ 518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-05450-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arai Mary, Kurokawa Itsuki, Arakane Hoshinosuke, Kitazono Tomohiro, Ishihara Takeshi	4. 巻 42
2. 論文標題 Regulation of Diacylglycerol Content in Olfactory Neurons Determines Forgetting or Retrieval of Olfactory Memory in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8039 ~ 8053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0090-22.2022	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Teo Jamine Hooi-Min, Kurokawa Itsuki, Onishi Yuuki, Sato Noriko, Kitazono Tomohiro, Tokunaga Terumasa, Fujiwara Manabi, Ishihara Takeshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Behavioral Forgetting of Olfactory Learning Is Mediated by Interneuron-Regulated Network Plasticity in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0084-22.2022	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 北園智弘、堀田（平島）範子、岩崎加奈子、藤山知之、船戸弘正、柳沢正史
2. 発表標題 恒常的睡眠要求を制御する神経細胞内新規シグナル伝達経路
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会（NEURO2022）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北園智弘、堀田(平島)範子、岩崎加奈子、藤山知之、船戸弘正、柳沢正史
2. 発表標題 恒常的睡眠要求を制御する新規シグナル伝達経路の探索
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北園智弘、堀田(平島)範子、岩崎加奈子、藤山知之、船戸弘正、柳沢正史
2. 発表標題 「眠気」を制御する新規シグナル伝達経路の探索と解析
3. 学会等名 第94回日本生化学大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北園智弘、堀田(平島)範子、中田慎也、宮西和也、岩崎加奈子、藤山知之、船戸弘正、柳沢正史
2. 発表標題 Upstream and downstream pathways of SIK3 in the regulation of sleep and wakefulness
3. 学会等名 The 11th Annual WPI-IIIIS Symposium ~Deciphering the Mysteries of Instinctive Behaviors~ (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北園智弘、堀田(平島)範子、中田慎也、宮西和也、岩崎加奈子、藤山知之、船戸弘正、柳沢正史
2. 発表標題 睡眠覚醒を制御するLKB1-SIK3-RhoAシグナル伝達経路
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------