

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：74415

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300133

研究課題名（和文） 睡眠時に活性化する神経細胞による睡眠制御の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of the sleep control by neurons activated during sleep

研究代表者

裏出 良博（URADE YOSHIHIRO）

公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生物学部門・研究部長

研究者番号：10201360

研究成果の概要（和文）：

成熟マウス大脳皮質では、転写因子 Sox5 のエクソン 2 の一部が欠損した新規スプライシングアイソフォーム（Sox5t2）が他のアイソフォームに比べ最も多く存在した。ゲルシフトアッセイ法により、Sox5t2 タンパク質がマウス Sox5 遺伝子のプロモーター領域に存在する Sox 配列に結合できることを確認した。CaMKII プロモーターの制御下に、成体期の前脳で Sox5 をノックダウンしたマウスでは、明期での有意な REM 睡眠の減少がみられた。このことは、マウス脳の神経細胞に発現する Sox5 が、Sox5 結合配列に結合・機能し、睡眠制御に関与することを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we identified a novel splicing isoform of Sox5 with truncation at exon 2, Sox5-t2. Q-PCR analysis revealed that Sox5-t2 was dominantly expressed in the adult mouse cortex. Electrophoretic mobility shift assay showed that Sox5-t2 binds to genes that are up-regulated during sleep and contain Sox5-binding elements. By conditional knockout of Sox5 in the forebrain, the amount of REM sleep decreased in the light phase. These results suggest that Sox5 is an important regulator of sleep-related functions of neurons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：睡眠、Sox5

1. 研究開始当初の背景

生理学や脳科学的な研究から、ノンレム睡眠時に脳の疲労回復が起きることや、記憶の定着はレム睡眠を挟むと上昇することが知られている。しかし、睡眠中に脳内で起きるこれらの生理機能を説明できる遺伝子発現や代謝系の変化についてはほとんどわかっていない。我々のグループは平成 18 年度から 3 年間、文部科学省のゲノムネットワークプロジェクトに参画し、「睡眠覚醒調節に関わる遺伝子発現ネットワークの解明」に取り組んだ。そして、自然な睡眠状態にある成熟マウスの脳内（大脳皮質）で、睡眠時間依存的に発現上昇する 38 個の遺伝子を同定し、転写因子である Sox5 がこれらの遺伝子発現を制御している可能性を見出した。さらに脳内に存在する Sox5 が軟骨組織などで同定された Sox5 とは異なる、第 2 エクソンの一部が欠損した新しいスプライシングアイソフォーム (Sox5t2) であり (図 1)、成熟マウス脳内では、このアイソフォームが特定の神経の細胞核に局在することを明らかにした。

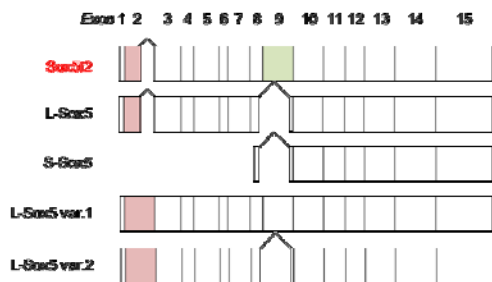


図 1. マウス Sox5 のスプライシングアイソフォームの構造

Sox5 の脳特異的なコンディショナルノックアウトマウスは大脳皮質の層構造の形成異常を起こすことから、Sox5 は神経細胞の分化制御に関与すると考えられた。また、Sox5 はそれ自体では転写活性を持たず、coiled-coil とよばれる二量体形成に必要なドメインをもち、パートナータンパク質とのヘテロ二量体を形成して転写調節を行うことが知られている。しかし、成熟マウス脳内での Sox5 のパートナータンパク質は不明であった。さらに、睡眠中の成熟マウス脳内において、神経細胞に発現する Sox5t2 が睡眠中の脳内でどのような働きをしているかも全く不明であった。

2. 研究の目的

睡眠時のマウス脳の神経細胞における Sox5t2 の機能解明と Sox5t2 を発現する神経細胞の睡眠制御における機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) マウス大脳皮質における Sox5t2 mRNA 発現レベルの定量

マウス大脳皮質から mRNA を抽出し、qPCR により Sox5 のアイソフォームの mRNA レベルを定量した。

(2) ゲルシフトアッセイ

組換え Sox5t2 タンパク質を調整し、マウス Sox5 遺伝子のプロモーター領域に存在する Sox5 結合配列と Sox5t2 タンパク質との結合をゲルシフトアッセイにより確認した。また、モルモットを用いてマウス Sox5 に対する特異的抗体を作製し、スーパーシフトアッセイによる結合の特異性の確認を行った。

(3) 神経細胞を用いた Sox5 の機能解析

リポフェクション法により、ヒト神経培養細胞株 SH-SY5Y に Sox5t2 を過剰発現させ、細胞の形態変化を調べ、神経細胞における Sox5t2 の機能を解析した。

(4) マウス個体を用いた Sox5 の機能解析

① Sox5 のコンディショナルノックアウトマウスの作製

Sox5 遺伝子は胎性致死であったため、tet-on/off システムを用いて、成熟マウスの神経細胞の Sox5 発現をノックダウンした。

まず、flox-Sox5/CamK II-tTA マウスおよび flox-Sox5/tet0-Cre マウスを作製した。次に、これらのマウスを交配し、flox-Sox5/CamK II-tTA/tet0-Cre トリプルトランスジェニックマウスを作製した。4 週齢からドキシサイクリン除去による Cre-lox システムの誘導を行い、時期特異的にマウス前脳に存在する神経細胞特異的 Sox5 遺伝子をノックダウンした (図 2)。

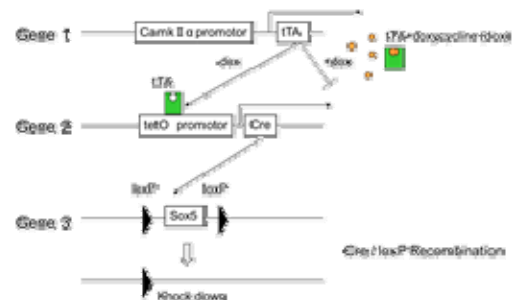


図 2. Sox5 のコンディショナルノックアウトマウスの作製

②脳波解析

小形動物用睡眠解析システム (図 3) を用いてマウスの脳波、睡眠量、行動量を測定し、Sox5 ノックダウンによる睡眠の質と量の変化を調べた。

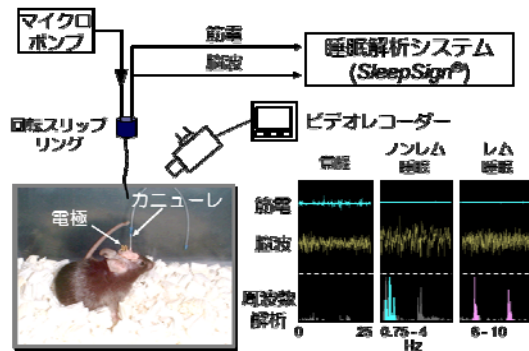


図 3. 小型動物用睡眠解析システム

4. 研究成果

(1) マウス大脳皮質における Sox5t2 mRNA 発現レベルの定量

成熟マウス大脳皮質から mRNA を抽出し、定量的 PCR を行い、各 Sox5 アイソフォーム (図 1) の発現レベルを調べた。

まず初めに、sSox5 とそれ以外の mRNA レベルを調べたところ、成熟マウス大脳皮質では sSox5 以外の発現レベルが 96% を占めた (not shown)。次に、Sox5t2、L-Sox5、Sox5 var. 1、Sox5 var. 2 の mRNA レベルを調べた結果、Sox5t2 の発現レベルが最も高かった (図 4)。

以上の結果から、成熟マウスの大脳皮質では Sox5t2 の発現が最も多いことが明らかとなった。

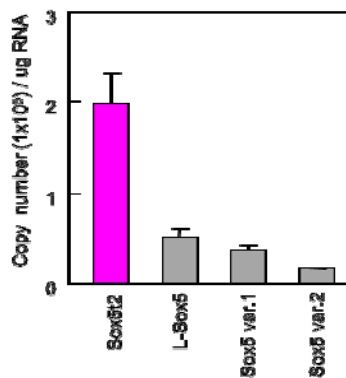


図 4. マウス大脳皮質における Sox5 アイソフォームの mRNA レベル

(2) Sox5t2 タンパク質とマウス Sox5 遺伝子のプロモーター領域に存在する Sox5 結合配列の結合の確認

マウス神経細胞株である Neuro-2a 細胞に Sox5t2 を導入・過剰発現させ、細胞抽出液を調製し、抗 Sox5 抗体を用いて免疫沈降後、LC/MS/MS 法により Sox5 の結合パートナーの同定を進めた。その結果、Sox ファミリーに属する転写因子で単離できたのは Sox5 のみであった。

そこで、Sox5t2 タンパク質がマウス Sox5 のプロモーター領域に存在する Sox5 結合配列に結合するかどうかを調べるため、組換え Sox5t2 タンパク質およびプローブとしてマウス Sox5 プロモーターに存在する Sox5 結合配列を用いてゲルシフトアッセイを行った。

その結果、組換え Sox5t2 タンパク質を加えた場合のみシフトバンドが検出され、マウス Sox5 結合配列に、Sox5t2 タンパク質が結合することを確認した (図 5、lane 2)。

更に、結合の特異性を調べるため、抗 Sox5 抗体を用いてスーパーシフトバンドの検出を行った。その結果、抗 Sox5 抗体により、スーパーシフトバンドが検出された (図 5、lane 4)。

これらの結果より、Sox5t2 タンパク質がマウス Sox5 遺伝子のプロモーター領域に存在する Sox5 結合配列に結合することが明らかになった。これは、Sox5t2 タンパク質が DNA 結合能を維持していることを示すと同時に、Sox5 遺伝子が Sox5 自身により発現制御されている可能性を示している。

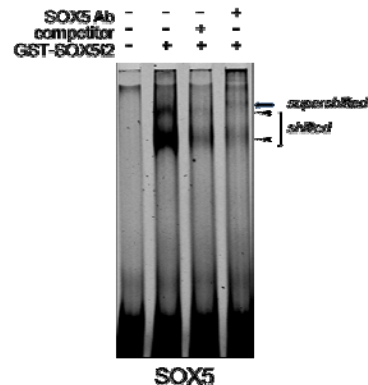


図 5. ゲルシフトアッセイ

(3) 神経細胞を用いた Sox5 の機能解析

リポフェクション法により、ヒト神経細胞株 SH-SY5Y 細胞に Sox5 var. 1 あるいは Sox5t2 を過剰発現させ、細胞の形態変化を調べた。

神経突起の長さや数の増大は、Sox5t2 だけでなく、Sox5 var. 1 を過剰発現させた場合にも観察された (図 6、Long および Multi)。一方、神経突起の分岐や spine 形成の誘導は、

Sox5t2 を過剰発現させた場合のみ観察された (図 6、Branch および Spine)。

これらの結果は、Sox5t2 がヒトの Sox5 結合配列に結合し、機能していることを示している。更に、脳内において、Sox5t2 が神経細胞のシナプス形成などの機能に参与する可能性を示している。

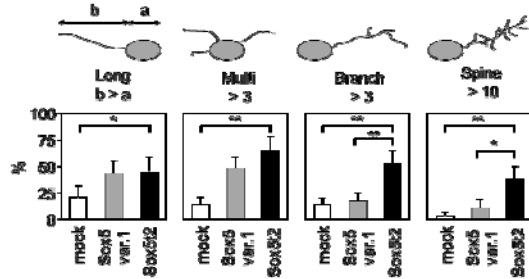


図 6. Sox5 t 2 は神経細胞の突起の分岐や spine 形成を誘導する

(4) マウス個体を用いた Sox5 の機能解析

大脳皮質の、より広範囲な部位での Sox5 遺伝子をノックダウンし、睡眠覚醒に与える影響を調べるため、トリプルトランスジェニックマウス (CamKII-tTA / tet0-Cre / flox-Sox5) を作製した。

Tet-on/off システムにより成熟マウスの前脳神経細胞の Sox5 発現をノックダウンした結果、コンディショナルノックアウトマウスでは、大脳皮質の Sox5t2 mRNA レベルがコントロール群の約 58% に低下した (not shown)。

睡眠解析の結果、明期での有意な REM 睡眠の減少がみられた (図 7)。また、周波数解析の結果、Sox5 のコンディショナルノックアウトマウスは NREM 睡眠時におけるデルタ波のパワー値の増加と、シータ波のパワー値の低下がみられた (図 8)。

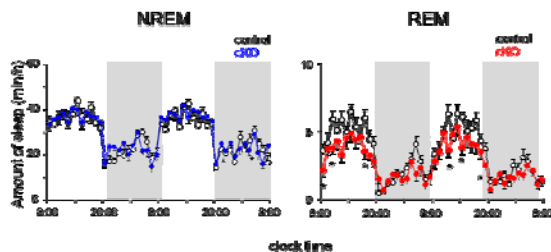


図 7. Sox5 コンディショナルノックアウトマウスの睡眠解析

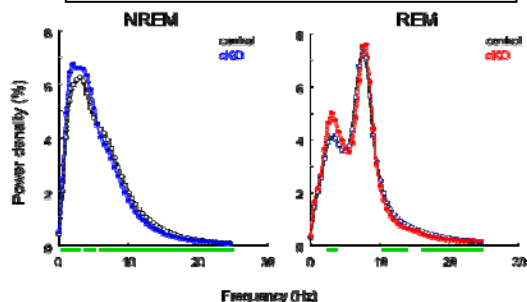


図 8. Sox5 コンディショナルノックアウトマウスの脳波の周波数解析

以上、成熟マウスの大脳皮質では、転写因子 Sox5 のエクソン 2 の 1 部が欠損した新規スプライシングアイソフォーム (Sox5t2) が他のアイソフォームに比べ最も多く存在することを示した。更に、ゲルシフトアッセイ法により、Sox5t2 タンパク質がマウス Sox5 遺伝子のプロモーター領域に存在する Sox5 結合配列に結合することを確認した。ヒト神経細胞株 SH-SY5Y 細胞に Sox5t2 を過剰発現させると、神経突起の分岐や spine 形成が有意に誘導された。また、CaMKII プロモーターの制御下に、成体期の前脳で Sox5 をノックダウンしたマウスでは、明期での有意な REM 睡眠の減少がみられた。これらの結果から、マウス脳の神経細胞に発現する Sox5t2 が、Sox5 結合配列に結合・機能し、睡眠制御に参与する可能性が高いと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Lazarus, M.; Chen, J. F.; Urade, Y.; Huang, Z. L., Role of the basal ganglia in the control of sleep and wakefulness. *Curr Opin Neurobiol* 2013, DOI: 10.1016/j.conb.2013.02.001.
2. Nagata, N.; Urade, Y., [Sleep-wake regulation by prostaglandin D2 and adenosine]. *Brain Nerve* 2012, 64 (6), 621-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22647469>.
3. Nagata, N.; Urade, Y., [Endogenous sleep-promoting substance]. *Nihon Rinsho* 2012, 70 (7), 1227-32. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22844810>.
4. Lazarus, M.; Huang, Z. L.; Lu, J.; Urade, Y.; Chen, J. F., How do the basal ganglia regulate sleep-wake behavior? *Trends Neurosci* 2012, 35 (12), 723-32. DOI: 10.1016/j.tins.2012.07.001.
5. Urade, Y.; Hayaishi, O., Prostaglandin D2 and sleep/wake regulation. *Sleep Med Rev* 2011, 15 (6), 411-8. DOI: 10.1016/j.smr.2011.08.003.
6. Moniot, B.; Farhat, A.; Aritake, K.; Declosmenil, F.; Nef, S.; Eguchi, N.; Urade, Y.; Poulat, F.; Boizet-Bonhoure, B., Hematopoietic prostaglandin D synthase (H-Pgds) is expressed in the early embryonic gonad and participates to the initial nuclear translocation of the SOX9 protein. *Dev Dyn* 2011, 240 (10),

- 2335-43. DOI: 10.1002/dvdy.22726.
- Huang, Z. L.; Urade, Y.; Hayaishi, O., The role of adenosine in the regulation of sleep. *Curr Top Med Chem* 2011, 11 (8), 1047-57. URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21401496>.

[学会発表] (計 19 件)

<国際学会>

- Zhi-Li Huang, Wei-Min Qu, Yoshihiro Urade (2012) Hypothalamic regulation of sleep-wake cycle, from basic research to drug discovery. The 2012 Beijing Sleep Medicine Forum, May 13, Beijing, China
- Yoan Cherasse, Yo Oishi, Michael Lazarus, Zhi-Li Huang, Osamu Hayaishi, Yoshihiro Urade (2012) Sleep is regulated by prostaglandin D2 selectively produced in the meninges by lipocalin-type prostaglandin D synthase. 22nd IUBMB, Sept 6, Sevilla, Spain
- Yoshihiro Urade (2012) Role of PGD₂ and adenosine in sleep regulation: from pharmacological approaches to gene-knockout mice. The 7th National Sleep Congress of Chinese Sleep Research Society, Oct 20, Nanjing, China
- Yoan Cherasse, Michael Lazarus, Yo Oishi, Mahesh Kaushik, Yoshihiro Urade, Osamu Hayaishi (2012) Prostaglandin D₂ involved in sleep regulation is produced in the leptomeninges of brain. The 7th Asian Sleep Research Society Congress, Nov 30, Taipei, 台湾
- Zhi-Li Huang, Wei-Min Qu. Yoshihiro Urade (2012) Key roles of dopamine D₂ receptor in the sleep-wake regulation. The 7th Asian Sleep Research Society Congress, Nov 30, Taipei, 台湾
- Z.-L. Huang, W.-M. Qu, Yoshihiro Urade (2011) Dopamine D2 receptors in the basal ganglia are essential in the maintenance of wakefulness. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, July 13-18 2011, Florence, Italy
- Michael Lazarus, Yoshihiro Urade (2011) The role of adenosine A2A receptors in the nucleus accumbens for sleep-wake regulation. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, July 13-18 2011, Florence, Italy
- Yoshihiro Urade (2011) Molecular mechanism of sleep-wake regulation: From basic research to translational research. 21st World Congress on Psychosomatic Medicine, Aug. 24-28 2011, Seoul, Korea
- Michael Lazarus, Yoshihiro Urade (2011) The role of the nucleus accumbens in the regulation of behavioral arousal. 21st World Congress on Psychosomatic Medicine, Aug. 24-28 2011, Seoul, Korea
- Yoshihiro Urade (2011) Humoral and neural regulation of sleep - Lesson from prostaglandin D₂-induced sleep. Worldsleap 2011, Oct. 16-20, Kyoto, Japan
- Zhi-Li Huang, Wei-Min Qu, Yoshihiro Urade, Osamu Hayaishi (2011) Key roles of the histaminergic system for the somnogenic effect of prostaglandin D2 and adenosine. Worldsleap 2011, Oct. 16-20, Kyoto, Japan
- Michael Lazarus, Yoshihiro Urade, Osamu Hayaishi (2011) The role of adenosine A2A receptors in the nucleus accumbens for sleep-wake regulation. Worldsleap 2011, Oct. 16-20, Kyoto, Japan
- Nanae Nagata, Kaori Kashiwagi, Toshiyoshi Yamamoto, Elizabeth P. Ko-Mitamura, Michael Lazarus, Zhi-Li Huang, Ko Fujmori, Yoshihiro Urade (2011) A novel SOX5 splicing isoform expressed in mouse brain during sleep. Worldsleap 2011, Oct. 16-20, Kyoto, Japan
- Zhi-Li Huang, Wei-Min Qu, Yoshihiro Urade, (2010) Roles of histaminergic systems in sleep-wake regulation, 2010 Beijing international sleep medicine forum, Apr.18, Beijing, China
- Yoshihiro Urade, Huang Zhi-Li, (2010) Recent progress on sleep-wake promoting substances: Prostaglandin D₂ and adenosine, Turkish-Japanese Sleep Forum, May 4, Izmir, Turkey

<国内学会>

- 裏出良博 (2012) 「睡眠基礎研究 - 動物から人へ -」 第 12 回日本抗加齢医学会総会、6 月 24 日、横浜
- 永田奈々恵、柏木香保里、山本利義、三田村エリザベス、ミハエル・ラザルス、黄 志力、藤森 功、宮本悦子、裏出良博 (2012) 「マウス脳における脂肪酸結合タンパク質 FABP7 の相互作用タンパ

- ク質の同定」第 85 回日本生化学大会、
12 月 15 日、福岡
3. 裏出良博 (2010) 睡眠覚醒調節の分子機
構、第 52 回日本小児神経学会総会、5
月 20 日、福岡
 4. 永田奈々恵、柏木香保里、山本利義、岡
崎一生、三田村エリザベス、Wei-Min Qu、
Michael Lazarus、Zhi-Li Huang、藤森
功、裏出良博 (2010) 睡眠時に脳内で発
現する新規 SOX5 スプライシングアイソ
フォームの機能解析、第 33 回日本神経
科学大会・第 53 回日本神経化学会大
会・第 20 回日本神経回路学会大会合同
大会、9 月 2 日-4 日、神戸

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ : <http://www.obi-dept2.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

裏出 良博 (URADE YOSHIHIRO)

(公財) 大阪バイオサイエンス研究所・分
子行動生物学部門・研究部長
研究者番号 : 10201360

(2) 研究分担者

藤森 功 (FUJIMORI KO)

大阪薬科大学・薬学部・講師
研究者番号 : 70425453

(3) 連携研究者

柏木 香保里 (KASHIWAGI KAORI)

(公財) 大阪バイオサイエンス研究所・分子
行動生物学部門・研究員
研究者番号 : 10372666

永田 奈々恵 (NAGATA NANAE)

(公財) 大阪バイオサイエンス研究所・分子
行動生物学部門・研究員
研究者番号 : 80390805

黄 志力 (Zhi-Li-Huang)

(公財) 大阪バイオサイエンス研究所・分子
行動生物学部門・研究副部長
研究者番号 : 10321704