

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5月12日現在

機関番号：10101
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22500380
 研究課題名(和文) マウス亜種間コンソミック系統を用いた新規レム睡眠調節遺伝子の単離・同定
 研究課題名(英文) Exploring novel genetic factors involved in sleep/wake regulation using inter-subspecific consomic strains established from MSM/Ms and C57BL/6J mice
 研究代表者
 寺尾 晶 (TERAO AKIRA)
 北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
 研究者番号：10451402

研究成果の概要(和文)：実験用近交系マウス C57BL/6 (B6) を受容系統とし、5 番染色体の 41～86cM 領域を野生由来近交系マウス MSM 染色体と置換した B6-Chr5T^{MSM} は B6 と比較して、1) 最も長く覚醒していた時の持続時間、2) シータ波帯域ピーク周波数、3) 高振幅脳波の 3 表現型において特徴的な差異が認められた。そこで、これらの表現型に關与する遺伝子座の絞り込みを実施したところ、1) と 3) は D5Mit338 (59cM) 近傍、2) は D5Mit338 (59cM) と D5Mit141 (74cM) 近傍に原因遺伝子が存在すると推測された。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive phenotypic analysis was performed in B6-Chr5C^{MSM} (5C) and B6-Chr5T^{MSM} (5T), a consomic strain with 1-45cM and 41-86cM segments of chromosome 5 from MSM on a B6 background, respectively. Their parental strains, C57BL/6J (B6), a commonly used laboratory mouse strain, and MSM, a wild-derived inbred mouse strain whose genetic background is diverse from that of B6, were analyzed in parallel. MSM chromosome 5 in the context of a B6 genetic background conferred distinct differences in phenotypes from B6 controls. 5C had more consolidated sleep than B6. 5T had three distinct differences from B6 that can be summarized as follows: 1) The longest wake duration of 5T was 2.6 times longer than that of B6; 2) Theta peak frequency (TPF) during rapid eye movement sleep in 5T was significantly lower than that in B6; 3) 5T showed occasional (up to 19 events in 30 min) spontaneous electroencephalogram (EEG) discharges lasting around 1 second, which was not observed in B6. The amplitude of such EEG discharges was twice as high as that of the normal waking EEG level with a peak frequency of 6-8Hz. In order to examine the hereditary patterns of these three phenotypes identified between B6 and 5T, sleep/wake in (B6×5T)F₁ was analyzed and the results were compared with that of B6 and 5T. As a result, (B6×5T)F₁ had B6-like phenotypes in terms of TPF and EEG discharge frequency. Therefore, in the next step, linkage analysis was performed using {(B6×5T)F₁×5T}N₂. As a result, the genetic region associated with both the longest wake duration and EEG discharges was suggested to be located around *D5Mit338* (59cM), and that associated with TPF to be located around *D5Mit338* (59cM) and/or *D5Mit141* (74cM).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：睡眠、覚醒、脳波、実験用近交系マウス、野生由来近交系マウス、コンソミックマウス、マイクロサテライトマーカー、連鎖解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 睡眠・覚醒は脳全体の複雑な神経活動によって調節されており、そのタイミング、量、質に関わる因子は、モノアミン、時計遺伝子などを含め今までに数多く報告されている。しかしながら、現在知られている因子のみでは説明できないことも多く、未知の因子が想定されている。睡眠調節機構の分子基盤を明らかにするためにヒトを研究対象とするには自ずと限界があるため、近交系マウスを用いた睡眠研究が盛んに行われている。

(2) 我々は、遺伝的多様性が豊富な点で行動学研究上有利であり、世界でも類を見ないユニークなマウス遺伝子資源である野生由来近交系マウスに注目した。野生由来近交系マウス 5 系統および汎用実験用交系マウス C57BL/6J (B6) において各々 20 項目の睡眠解析を行い、睡眠形質の差違を網羅的に検索した結果、日本産亜種 (*Mus. mus. molossinus*) 由来である、野生由来近交系マウス MSM/Ms と B6 の間にレム睡眠に関連する 3 つの形質において大きな差違を見出した。

2. 研究の目的

B6 と MSM の間に認められる遺伝的多様性に注目し、順行性遺伝学的手法を用いることで睡眠・覚醒調節に関係する新規遺伝子の同定を目指した。5 番染色体上にレム睡眠に関わる遺伝子が存在する事を示唆した報告がいくつかあるため、B6 の全染色体のうち 5 番染色体のみを MSM に置換した 5 番コンソミックマウスに注目した。5 番染色体完全置換マウスは繁殖上の問題があるため、テロメア側およびセントロメア側の各々半分の領域が置換された系統 B6-Chr5C^{MSM} (5C) と B6-Chr5C^{MSM} (5T) で維持されている。このため、本研究ではまず、B6、5T、5C、MSM について睡眠表現型を網羅的に比較し、系統間相違を見出すことを第 1 の目的とした。さらに連鎖解析を用いて系統間差異を産み出す原因遺伝子座の絞り込みを実施することを第 2 の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験には、B6 (n=10)、B6-Chr5C^{MSM} (5T) (n=10)、B6-Chr5C^{MSM} (5C) (n=8)、MSM (n=10)、(B6×5T) F1 (n=10)、{(B6×5T) F1×5T} N2 (n=28) の雄マウスを用いた。B6 は、日本クレア (東京) より購入した。5T、5C、MSM は、城石俊彦博士 (国立遺伝学研究所、三島) より供与いただいた。また B6 と 5T を交配することで F1 を作出し、さらに F1 を 5T に戻し交配することで N2 を作出した。マウスは獣医学研究科動物実験施設 I に搬入後、23±3℃、昼夜 12 時間サイクル (明期: 08:00–20:00) 環境下で、市販固形飼料 (CE-2: 日本クレア) および蒸留水を自由に与えて個別飼育した。全てのマウスは 8–12 週齢の間に電極留置手術を行い、以降の睡眠測定を行った。なお、本研究に関わる動物実験は北海道大学動物実験委員会にその計画が承認 (実験番号 09-0065 及び 10-0107) され、北海道大学動物実験実施マニュアルならびに獣医学研究科動物施設運営標準操作手順書に従った。

(2) 脳波および筋電活動の測定

マウスをケタミン (75mg/kg) およびメドミジン (1mg/kg) 混合液の腹腔内投与にて麻酔し、脳波および筋電活動測定用の電極留置手術を行った。脳波測定用の 2 つのビス (直径 1mm) を、左大脳半球の頭蓋骨上に留置し、アース用のビスを右鼻骨上に留置した。筋電活動測定用の 2 本の絶縁ワイヤーは、左右の頸部僧帽筋上にそれぞれ留置した。手術後、マウスに鎮痛剤を腹腔内投与、抗生物質を筋肉内投与した後、メドミジン拮抗薬の皮下投与にて麻酔を解除した。10–15 日間の術後回復期間の後、マウスを脳波、筋電活動、および自発運動量測定用のケージに移し、マウス頭部の電極に脳波および筋電活動測定用のケーブルを接続した。4–5 日間の順化期間の後、脳波、筋電活動、および自発運動を VitalRecorder® (キッセイコムテック株式会社、松本) にて明期の始め (午前 8:00) から

24 時間連続的に記録した。

(3) N2 マウス遺伝子型判定

N2 マウスの尾端 0.5cm 部分から RED

Extract-N- Amp™ Tissue PCR Kit

(Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)

を用いてゲノム DNA を抽出した。N2 の遺伝子型判定には、simple sequence length

polymorphis を用いた。すなわち、DNA 抽出

液 1 μ l に PCR 溶液 [1 μ l の 10 \times Ammonium

buffer、0.8 μ l の 10mM dNTP Mix (各 2.5mM

dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、0.3 μ l の 3.3mM マ

イクロサテライトマーカープライマーミッ

クス、0.05 μ l の Taq DNA ポリメラーゼ

(Ampliqon, Herlev, Denmark) に蒸留水を

加え 9 μ l にメスアップ] を加え、総反応量

10 μ l とし PCR 反応を行った。反応条件は

95 $^{\circ}$ C で 5 分間、次いで 95 $^{\circ}$ C で 30 秒間 (熱変

性)、65 $^{\circ}$ C で 30 秒間 (アニーリング)、72 $^{\circ}$ C

で 30 秒間 (伸長反応) を 1 サイクル、アニ

ーリングの温度を 56 $^{\circ}$ C まで 1 $^{\circ}$ C ずつ下げなが

ら 9 サイクル、95 $^{\circ}$ C で 30 秒間、55 $^{\circ}$ C で 30 秒

間、72 $^{\circ}$ C で 30 秒間を 40 サイクル繰り返した

後、72 $^{\circ}$ C で 2 分間とした。マイクロサテライト

マーカースは、Mouse Microsatellite Data

Base of Japan

(<http://www.shigen.nig.ac.jp/mouse/mmdb>

[j/top.jsp](http://www.shigen.nig.ac.jp/mouse/mmdb/top.jsp)) を参考にして 3-14cM 間隔で配

置した。プライマー配列も同データベースの

ものを使用した。上記で得られた PCR 産物を

4%アガロースゲルにて電気泳動の後、紫外

線照射により遺伝子型を判定した。

4. 研究成果

(1) B6、MSM、5C、5T の 4 系統について睡眠解析を行い、B6 と MSM の間における睡眠表現型の差異と、5 番染色体遺伝子の寄与を調べた。その結果、B6 と MSM の間に大きな表現型の差異はみられなかった。5C は B6 に比べて睡眠の断片化の度合いが低かった。また、5T は B6 と比較して以下 3 つの大きく異なる表現型を示した。①睡眠記録を行った 24 時間中最も長く覚醒していた覚醒持続時間が、B6 に対して 5T では約 2.6 倍長かった。②レム睡眠時の脳波成分の指標となるシータ波帯

域ピーク周波数 (TPF) が、B6 では 7.34Hz であるのに対し、5T では 6.66Hz であった。③マウスの覚醒時の脳波は通常一定の振幅を保っているが、5T でのみ散発的に通常時の 2 倍以上の振幅を持つ脳波が現れた。この高振幅脳波の周波数強度のピークは概ね 6-8Hz、持続時間は 1 秒前後、発生回数は覚醒の累積 30 分あたり約 19 回であった。

(2) MSM においては、5T で認められた 3 つの特徴的表現型を確認できなかった。このことから、5T の特徴的表現型は、遺伝子間相互作用を排除した結果、表出したものと推測される。すなわち、MSM においては 5 番染色体の 41-86cM 領域に特徴的表現型を生み出す遺伝子が存在するが、それ以外の染色体領域に特徴的表現型を打ち消すなんらかの因子が存在するために、MSM では表現型として確認できない。しかし B6 には MSM の 5 番染色体の 41-86cM 領域に存在する、特徴的表現型を生み出す遺伝子を打ち消す因子が存在しないため、5T で特徴的表現型が確認できたと考えることができる。

(3) 5T で認められた 3 つの特徴的表現型の遺伝様式を調べるために、B6 と 5T を交配して得た F1 についてこれらの表現型を調べた結果、3 形質とも B6 と 5T の中間の形質となったが、そのうち TPF と高振幅脳波発生回数は B6 に近い形質であった。そこで F1 を 5T に戻し交配して得た N2 を用いて連鎖解析を行い、原因遺伝子座の絞り込みを試みた。解析の結果、①最長覚醒持続時間は D5Mit338 (59cM)、②TPF は D5Mit338 (59cM) と D5Mit141 (74cM)、③高振幅脳波発生回数は D5Mit338 (59cM) の近傍に原因遺伝子が存在することが推測された。

(4) 本研究では、5T で認められた高振幅脳波の性状解析を N2 を用いて実施した。高振幅脳波が欠神発作にみられる棘徐波と類似していること、高振幅脳波が欠神発作治療薬エトスクシミドによって抑制されること、高振幅脳波発生時にマウスの行動が消失することから、高振幅脳波は欠神発作と同様の性質であることが示唆された。

(5) B6 と 5T の間にみられる表現型の差異、及びその原因となっている遺伝子座のおおよその位置が明らかとなった。今後さらなる遺伝学的解析、及び高振幅脳波の性状解析を進めることによって、睡眠・覚醒、欠伸発作に関わる新規因子の発見が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- 1) Tanno, S., Terao, A., Okamatsu-Ogura, Y., and Kimura, K. Hypothalamic prepro-orexin mRNA level is inversely correlated to the non-rapid eye movement sleep level in high-fat diet-induced obese mice, *Obes. Res. Clin. Pract.*, in press. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.orcp.2013.01.005>, 査読有 *Corresponding author
- 2) Ishii, T., Fukano K., Shimada K., Kamikawa A., Okamatsu-Ogura Y., Terao, A., Yoshida T., Saito M., and Kimura K. Proinsulin C-peptide activates α -enolase: implications for C-peptide-Cell membrane interaction, *J. Biochem.* 152 (1): 53-62 (2012), 査読有
- 3) Shimada, K., Ohno, Y., Okamatsu-Ogura, Y., Suzuki, Y., Kamikawa, A., Terao, A., and Kimura, K. Neuropeptide Y activates phosphorylation of ERK and STAT3 in stromal vascular cells from brown adipose tissue, but fails to affect thermogenic function of brown adipocytes, *Peptides* 34 (2): 336-342 (2012), 査読有
- 4) Okamatsu-Ogura, Y., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Terao, A., Kimura, K., Saito, M. Possible involvement of uncoupling protein 1 in appetite control by leptin. *Exp. Biol. Med.* 236 (11): 1274-1281 (2011), 査読有

5) Abd Eldaim, M. A., Okamatsu-Ogura, Y., Terao, A., and Kimura, K. Effects of retinoic acid and hydrogen peroxide on sterol regulatory element-binding protein-1 α activation during adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *Jpn. J. Vet. Res.* 58: 149-154 (2010), 査読有

6) Abd Eldaim, M. A., Kamikawa, A., Soliman, M. M., Ahmed, M. M., Okamatsu-Ogura, Y., Terao, A., Miyamoto, T., and Kimura, K. Retinol binding protein 4 in dairy cows: its presence in colostrum and alteration in plasma during fasting, inflammation, and the peripartum period, *J. Dairy Res.* 77 (1): 27-32 (2010), 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- 1) 寺尾 晶、日吉秀行、岡松優子、木村和弘
野生由来近交系マウス系統の睡眠表現型解析 第 150 回日本獣医学会 平成 22 年 9 月帯広畜産大学(帯広)
- 2) 丹野翔伍、寺尾 晶、岡松優子、木村和弘 食餌性肥満が睡眠に及ぼす影響 第 31 回日本肥満学会 平成 22 年 10 月前橋テルサ(前橋)
- 3) 岡田ゆふ子、寺尾 晶、富田潤一、岡松優子、木村和弘 新規神経ペプチド QRFP の睡眠-覚醒調節系における役割 第 152 回日本獣医学会 平成 23 年 9 月大阪府立大学中百舌鳥キャンパス(大阪)
- 4) 富田潤一、寺尾 晶、岡田ゆふ子、岡松優子、木村和弘 亜種間コンソミックマウスを用いた睡眠-覚醒調節因子の分離 第 152 回日本獣医学会 平成 23 年 9 月大阪府立大学中百舌鳥キャンパス(大阪)
- 5) 寺尾 晶 亜種間コンソミックマウスを用いた睡眠-覚醒調節因子の探索 第 155 回日本獣医学会 平成 25 年 3 月東京大学駒場キャンパス(東京)

〔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〕

ホームページ等

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/biochemistry01.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺尾 晶 (TERAO AKIRA)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：10451402

(2) 研究分担者

佐々木 宣哉 (SASAKI NOBUYA)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：20302614

(3) 連携研究者

小出 剛 (KOIDE TSUYOSHI)

国立遺伝学研究所・マウス開発研究室・准教授

研究者番号：20221955