

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26507003

研究課題名(和文)新規過眠・肥満マウスの解析による睡眠覚醒と摂食代謝制御の統合分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of integrated molecular mechanisms of sleep/wakefulness and metabolic control in newly established Sleepy mouse

研究代表者

三好 千香 (MIYOSHI, Chika)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教

研究者番号：60613437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、フォワード・ジェネティクスの手法を用いて覚醒時間の短縮を示すSleepy家系を樹立した。本年、Sleepy変異Sik3遺伝子(sleepy)の睡眠覚醒の制御という新たな機能について報告したが、本マウスは過眠とともに肥満の表現型を示す。QTL解析の結果、体重の表現型も睡眠と同じ染色体に責任領域があることが明らかになったことから、Sleepyが摂食行動や代謝制御においても重要な機能を担っていることが示唆された。一方で、表現型の出現時期が異なることから、今後、Sleepyの脳内での発現部位や時期、発現の量的変化など、時空間的解析を進めることにより、睡眠と代謝を制御する分子機序を明らかにする。

研究成果の概要(英文)：We established Sleepy mutant pedigree showing shorter wake time compared to the mean of all mice screened through the large-scale forward-genetic screening. Sleepy mice have a mutation in the AMP-activated kinase-related kinase Sik3 gene. This year, we reported a new function of Sleepy mutant Sik3 gene in sleep behavior. This pedigree of mouse shows obesity as well as shorter wake time. The QTL analysis identified a mutation related to the abnormal sleep phenotype in the same chromosome region responsible for body weight phenotype. Sleepy mutant mice showed a significant decrease in energy consumption, though no difference was found in food intake. There are various reports on the relationship between sleep and obesity. Since the onset age of the phenotype is different, it may be essential to examine spatiotemporal changes comparing various experimental conditions, such as the site of expression of Sleepy-mutant SIK3 in the brain, timing of sampling, quantitative change of expression.

研究分野：実験動物学

キーワード：睡眠 フォワード・ジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

睡眠は哺乳類から節足動物までほとんどの動物に認められる普遍的な行動である。よい睡眠は心身の健康を保ち、質の高い社会生活を送ることに不可欠であるが、我が国では国民の約2割、高齢者では3割以上に不眠等の睡眠障害が認められている。睡眠障害は、うつ病などの気分障害、メタボリック症候群との関連も深い。特にうつ病は不眠や食欲減退を伴うことが多い。しかし、近年増加している非定型うつ病では、逆に過眠や食欲増加を伴うことが特徴である。気分の障害と睡眠覚醒行動や摂食行動の障害とは密接に関係するものの、その分子機構は不明である。よいモデル動物が得られれば、睡眠覚醒行動、摂食行動、および不安・うつ行動を制御する統合的な研究が可能になると期待される。

2. 研究の目的

過眠や過食・肥満は非定型うつ病の症状として知られているが、その機序は不明である。これまで過眠、過食を示す動物モデルは存在しなかったが、われわれがフォワード・ジェネティックスの手法によって新たに同定した *Sik3* 遺伝子 *Sleepy* 変異マウスは過眠と肥満を示すことから、睡眠覚醒と体重制御の脳内制御機構の解明に重要であるだけでなく、非定型うつ病のモデルマウスとしての可能性を秘めている。

本研究では、*Sik3* 遺伝子 *Sleepy* 変異マウスの睡眠覚醒行動および摂食・エネルギー代謝機構、さらには情動行動を検討することで、異なる行動モダリティを統一的に制御する分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

我々は、ランダム突然変異マウスを用いた睡眠覚醒の制御機構を解明するフォワード・ジェネティックス研究に参画してきた。このプロジェクトでは、化学変異原エチルニトロソウレア (ENU) によって、マウスの生殖細胞にランダムな遺伝子変異を生じさせたマウスを用い、大規模なスクリーニングを行う。睡眠覚醒異常を示すマウスが認められれば、第二世代でその遺伝性を評価する。このような方法で、約8000匹の突然変異マウスの睡眠覚醒をスクリーニングし、30家系以上について遺伝性確認を行った。遺伝性が確認された家系のうち、有意な睡眠時間の延長(覚醒時間の短縮)を示す *Sleepy* 家系を樹立した (Funato et al., 2017)。

本マウスを用いて、睡眠と肥満(代謝異常)の表現型を解析するため、*Sleepy* 変異マウスのヘテロ変異とホモ変異、各群10-15匹のマウスを自然交配もしくは胚操作によってマウスを生産した。

睡眠覚醒は、*Sleepy* 変異マウスの雄に自作の脳波筋電図電極を装着し、脳波および筋電図を測定して、覚醒時間、ノンレム睡眠時間、レム睡眠時間を検討した。脳波の増幅には高感度増幅器システム (#AB-611J, JB-621J; 日本光電社) 脳波筋電図は LabView (National Instruments 社) で記録した。解析には、Matlab (Math Works 社) をベースとした自作プログラム SleepyScore を使用して半自動的に解析した。

代謝の表現型の解析には、各遺伝子群のマウスについて、離乳後毎週体重測定を行うとともに体脂肪を CT (R-mCT2, リガク社) による非侵襲的な方法で経時的に測定した。また、カロリメトリー ARCO2000 (アルコ社) を用いて酸素消費量、呼吸商、エネルギー産生量を測定した。

4. 研究成果

Sleepy 家系マウスは、図1に示すように、覚醒時間の短いマウスと野生型マウスの交配で得られる個体の約半数が覚醒時間の短縮を示す優性遺伝の家系である。

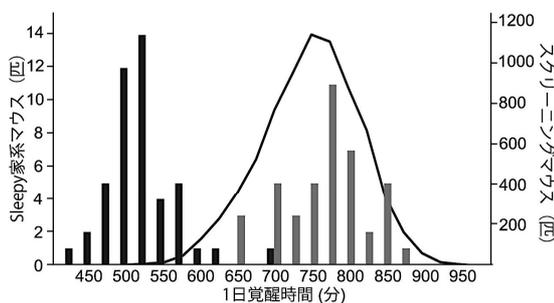


図1 *Sik3* 遺伝子に変異を持つマウス (黒) と変異のないマウス (灰) の覚醒時間。 *Sik3* 遺伝子変異による覚醒時間短縮が明らかである。黒線は検討した全突然変異マウスの覚醒時間を示した。

Sleepy 家系マウスは、AMP-activated kinase-related kinase (AMPK-RK) に属するセリンスレオニンキナーゼである *Sik3* 遺伝子に変異をもつ。本年、*Sleepy* 変異 *Sik3* 遺伝子の睡眠覚醒の制御という新たな機能について Nature 誌に報告したが、睡眠の表現型の他に、加齢に伴う肥満がみられた (図2)。

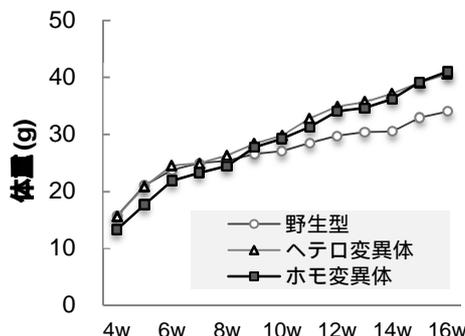


図2 *Sik3* 遺伝子に変異を持つマウスの体重変化

過眠及び肥満とリンクする染色体部位について連鎖解析を行ったところ、同一染色体の同部位に強い単一のピークを得ることができた。さらに全エクソン領域を網羅的にシーケンスしたところ、連鎖解析でピークが認められた範囲に点突然変異が同定され、*Sleepy* 変異を持つ *Sik3* が肥満においても原因遺伝子であることが明らかになった。

Sik3 ノックアウトマウスを用いた先行研究において、エネルギー負荷によって肥満が引き起こされることが報告されているが、*Sleepy* マウスにおいても *Sleepy* 変異 *Sik3* が睡眠覚醒のみならず、摂食行動や代謝制御において重要な機能を担っていることが示唆された。

摂餌量において *Sleepy* マウスは、同腹の野生型マウスと差が見られなかったが、*Sleepy* ホモ変異およびヘテロ変異とも、エネルギー消費に有意な低下が観察された。また、体重の増加に伴って血糖値の顕著な上昇がみられたが、その程度は、ホモ変異体においてより顕著であった。

一方、本家系マウスは、体重の増加が見られ始める時期から、繁殖行動が見られなくなった。体外受精の効率は正常であることから、生殖細胞には異常がないものの、社会的行動になんらかの表現型があることが示唆された。

睡眠異常と体重の関わりについては、様々な報告があるが、*Sleepy* マウスにおける睡眠時間の延長は、体重に差が出る前の10週齢前後の若齢期で既に顕著であり、体重の増加(加齢)による差は遺伝子型による差に比べて無視できる程度であった。覚醒時間の短縮と肥満の表現型の出現時期が異なることから、今後、*Sleepy* 変異 *SIK3* の脳内での発現部位や時期、発現の量的変化など、時空間的解析を進めることにより、睡眠と代謝を制御する分子機序やそのネットワーク機構を詳細に明らかにしていくことで、モデル動物としての可能性について検討を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Funato H, Miyoshi C, Fujiyama T, Kanda T, Sato M, Wang Z, Ma J, Nakane S, Tomita J, Ikkyu A, Kakizaki M, Hotta-Hirashima N, Kanno S, Komiya H, Asano F, Honda T, Kim SJ, Harano K, Muramoto H, Yonezawa T, Mizuno S, Miyazaki S, et al.
Forward-genetics analysis of sleep in randomly mutagenized mice.
Nature. 2016 Nov 17; 539(7629):378-383.
doi: 10.1038/nature20142. (査読あり)

Ikeda M, Sato A, Mochizuki N, Toyosaki

K, Miyoshi C, Fujioka R, Mitsunaga S, Ohno I, Hashimoto Y, Takahashi H, Hasegawa H, Nomura S, Takahashi R, Yomoda S, Tsuchihara K, Kishino S, Esumi H.
Phase I trial of GBS-01 for advanced pancreatic cancer refractory to gemcitabine.
Cancer Sci. 2016 Dec;107(12):1818-1824.
doi: 10.1111/cas.13086. (査読あり)

③ Hossain MS, Asano F, Fujiyama T, Miyoshi C, Sato M, Ikkyu A, Kanno S, Hotta N, Kakizaki M, Honda T, Kim SJ, Komiya H, Miura I, Suzuki T, Kobayashi K, Kaneda H, Kumar V, Takahashi JS, Wakana S, Funato H, Yanagisawa M.
Identification of mutations through dominant screening for obesity using C57BL/6 substrains.
Scientific Report. 2016 Sep 2;6:32453.
doi: 10.1038/srep32453. (査読あり)

Takase K, Tsuneoka Y, Oda S, Kuroda M, Funato H.
High-fat diet feeding alters olfactory-, social- and reward-related behaviors of mice independent of obesity.
Obesity (Silver Spring). 2016 Apr;24(4):886-94.
doi: 10.1002/oby.21441. (査読あり)

⑤ Kanda T, Tsujino N, Kuramoto E, Koyama Y, Susaki EA, Chikahisa S, Funato H.
Sleep as a biological problem: an overview of frontiers in sleep research.
Physiol Sci. 2016 Jan;66(1):1-13.
doi: 10.1007/s12576-015-0414-3. (査読あり)

〔学会発表〕(計14件)

船戸弘正

フォワード・ジェネティクスによる過眠と肥満をもたらす遺伝子変異の同定
第23回日本行動医学会学術総会・シンポジウム「健康に及ぼす睡眠と食との相互作用」(招待講演) 2017年03月17日沖縄科学技術大学院大学(沖縄県・恩納村)

菅野里美、三好千香、佐藤牧人、原野加奈子、一久綾、堀田範子、柿崎美代、高橋智、若菜茂晴、船戸弘正、柳沢正史
睡眠異常を示す新規2型糖尿病モデルマウスの解析と予防的介入法の検討
第39回日本分子生物学会年会 第39回日本分子生物学会年会 2016.12.02 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

堀田範子、三好千香、佐藤牧人、一久綾、菅野里美、船戸弘正、柳沢正史

離乳前若年齢マウスの脳波・筋電測定法の開発

第 39 回日本分子生物学会年会 第 39 回日本分子生物学会年会 2016.11.30 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

一久綾、堀田範子、佐藤牧人、三好千香、管野里美、柿崎美代、船戸弘正、柳沢正史
新規睡眠制御分子 Sleepy のリン酸化状態の解析

第 39 回日本分子生物学会年会 第 39 回日本分子生物学会年会 2016.12.02 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Funato H, Miyoshi C, Sato M, Hotta N, Kanno S, Ikkyu A, Kakizaki M, Komiya H, Wakana S, Yanagisawa M.

Forward genetic analysis of sleep in randomly mutagenized mice

Neuroscience 2016, Convention center, San Diego, USA 2016.11.16

Kim SJ, Fujiyama T, Miyoshi C, Hotta N, Kanno S, Ikkyu A, Kakizaki M, Matsuoka T, Mizuno S, Miura I, Suzuki T, Kumar V, Takahashi JS, Takahashi S, Wakana S, Funato H, Yanagisawa M.

Forward genetics approach in identification of novel sleep/wakefulness related gene(s)

Neuroscience 2016, Convention center, San Diego, USA 2016.11.16

Hossain MS, Asano F, Fujiyama T, Miyoshi C, Sato M, Ikkyu A, Kanno S, Hotta N, Kakizaki M, Miura I, Kaneda H, Suzuki T, Wakana S, Funato H, Yanagisawa M.

Identification of Mc4r mutation through obesity screening of ENU-mutagenized mice
第 121 回日本解剖学会 ビッグパレットふくしま(福島県・郡山市) 2016.3.29

浅野冬樹, Hossain MS, 藤山知之, 三好千香, 佐藤牧人, 一久綾, 管野里美, 堀田範子, 柿崎美代, 三浦郁生, 金田秀貴, 鈴木智広, 若菜茂晴, 船戸弘正, 柳沢正史
ランダム点突然変異マウスの肥満スクリーニングによる Sim1 遺伝子変異の同定
第 121 回日本解剖学会 ビッグパレットふくしま(福島県・郡山市) 2016.3.29

Miyoshi C, Fujiyama T, Sato M, Ikkyu A, Kanno S, Hotta N, Kakizaki M, Honda T, Kim SJ, Komiya H, Asano F, Suzuki T, Vivek K, Takahashi JS, Wakana S, Funato H, Yanagisawa M.

Sleep screening of randomly mutagenized mice established a long sleep pedigree. The 4th Annual IIIS International Symposium. 筑波大学(茨城県・つくば市)

2016.2.26

Hossain MS, Asano F, Fujiyama T, Miyoshi C, Sato M, Ikkyu A, Kanno S, Hotta N, Kakizaki M, Honda T, Kim SJ, Komiya H, Miura I, Suzuki T, Vivek K, Takahashi JS, Wakana S, Funato H, Masashi Yanagisawa.

Identification of Sim1 and Mc4r mutations through obesity screening of randomly mutagenized mice

The 4th Annual IIIS International Symposium. 筑波大学(茨城県・つくば市) 2016.2.26

Honda T, Fujiyama T, Miyoshi C, Sato M, Funato H, Yanagisawa M.

Systematic behavioral screening of Sleepy and Dreamless, newly identified mouse pedigrees with sleep abnormalities

The 4th Annual IIIS International Symposium. 筑波大学(茨城県・つくば市) 2016.2.26

Fujiyama T, Miyoshi C, Sato M, Kanda T, Mizuno S, Takahashi S, Muramoto H, Asano F, Honda T, Iwasaki K, Ikkyu A, Kakizaki M, Hotta N, Kanno S, Ishikawa Y, Miura I, Suzuki T, Wakana S, Kumar V, Takahashi JS, Funato H, Yanagisawa M.

Identification of a single nucleotide substitution specific to the Dreamless mutant mouse by linkage analysis and whole exome sequencing and its genetic verification by CRISPR

The 4th Annual IIIS International Symposium. 筑波大学(茨城県・つくば市) 2016.2.26

Cao L, Klewe-Nebenius D, Tang A, Miyoshi C, Funato H, Yanagisawa M, Liu Q.

Understanding the molecular basis of fear and the role of emotion in sleep regulation

The 4th Annual IIIS International Symposium. 筑波大学(茨城県・つくば市) 2016.2.26

藤山知之 船戸弘正 三好千香 佐藤牧人 水野聖哉 上田壮志 高橋智 村本玄紀 Qinghua Liu 一久綾 堀田範子 柿崎美代 管野里美 石川有紀子 浅野冬樹 本多隆利 鈴木智広 若菜茂晴 柳沢正史

Identification and recapitulation of a single nucleotide substitution specific to the Dreamless mutant mouse pedigree by linkage analysis, whole exome sequencing and CRISPR.

第 38 回日本神経科学学会学術総会 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市) 2015.7.28

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 千香 (MIYOSHI, Chika)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構
・助教
研究者番号：60613437

(2) 研究分担者

船戸 弘正 (FUNATO, Hiromasa)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構
・教授
研究者番号：90363118