

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870858

研究課題名(和文)睡眠覚醒ダイナミクスの設計原理の解明

研究課題名(英文)Understanding the design principles of of sleep/wake dynamics in mammals

研究代表者

砂川 玄志郎 (Sunagawa, Genshiro)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・研究員

研究者番号：70710250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は睡眠覚醒ダイナミクスの設計原理を明らかにするために有用な2つの発見を行った。ひとつはNMDA受容体ファミリーの1つであるNr3a遺伝子をノックアウトすることでマウスの覚醒時間が増えることを示した。この研究は呼吸波形を用いた非侵襲睡眠覚醒表現型解析システム(SSS; Snappy Sleep Stager)の大規模化によって実現した。さらに、包括的に睡眠恒常性を理解するために、コンピューターで睡眠モデルを作成し、睡眠恒常性に関連する構成要素を予測する手法をとった。これが2つめの発見であるカルシウムイオンの動態を制御している経路が睡眠時間に影響を与えていることの発見につながった。

研究成果の概要(英文)：Two major findings were achieved in this study: (1) Nr3a-KO is a short sleeper, and (2) calcium hyperpolarization pathway is involved in sleep duration regulation in mammals. (1) was achieved by knocking out all members of the NMDA receptor and testing the sleep phenotype in SSS, the snappy sleep stgger, which was developed in this research. (2) was discovered in two steps. In the first step, we created a computational neural model to predict which currents within a neuron are critical for maintaining the type of neural activity associated with slow-wave sleep and the calcium related components became candidates. In the second step, we created twenty-one knockout mice using the developed CRISPR technology, and confirmed that seven genes which was related to calcium dynamics indeed affected sleep duration.

研究分野：神経生理学

キーワード：睡眠時間 NMDA CRISPR Nr3a カルシウム

1. 研究開始当初の背景

哺乳類はたくさん起きればたくさん眠るように、睡眠時間と覚醒時間が一定の比率に保たれており、睡眠恒常性として知られているが、そのメカニズムは全くわかっていない。遺伝学に進展によって特定の遺伝子を変異させることで睡眠時間が著しく変化するハエやゼブラフィッシュは見つかっているが、研究開始時点では、哺乳類においてそのような例はみつかなかった。概日時計分野では哺乳類におけるフォワードジェネティクスがメカニズム解明に大きく貢献したように、睡眠研究においても同様のアプローチが取れると、睡眠覚醒制御のメカニズム解明に有益であることは想像に難くない。しかし、現実的に睡眠研究でフォワードジェネティクスが難しい原因として睡眠覚醒システムを微細に制御し、微細に定量する手法が欠落していたことが大きい。そこで、本研究課題では哺乳類の睡眠覚醒システムを精緻に摂動することで任意の睡眠・覚醒状態を作り出し、そのダイナミクスを記述することで睡眠恒常性のメカニズムを明らかにしようとした。つまり、個体レベルのフォワードジェネティクスを実現し、睡眠覚醒メカニズムの解明を試みた。

2. 研究の目的

哺乳類の睡眠覚醒メカニズムを理解するための実験、特に個体レベルのフォワードジェネティクスを行うためには、効率よく表現型を解析し、効率よく個体を作成する必要がある。具体的には、睡眠覚醒を非侵襲かつ簡便に定量できる系の確立、および、遺伝子改変マウスを高速に作成する手法の開発が必須であった。このため、本研究課題では、上記のような簡便な睡眠表現型解析系の確立、および、簡便なノックアウトマウス作成法の確立を目的 A および目的 B とした。また、上記のような系を樹立しても、限られたリソースで研究をすすめるためには睡眠覚醒の制御に関与している遺伝子を限定する必要があった。そこで、候補となる遺伝子を絞り込むために、コンピューター上で *in vivo* で試行できるコンポーネントを含む睡眠覚醒モデルを作成し、*in silico* でシミュレーションを行うことで、その遺伝子あるいは遺伝子ファミリーを限定する手法をとった。上記のモデルを作成することを目的 C とし、睡眠覚醒のダイナミクスを制御する経路をシミュレーションで突き止めることを目的 D とした。最後に、目的 A と B で確立した系を用いて、目的 C と D で候補となった遺伝子をノックアウトし、睡眠表現型を確認することを目的 E とした。

3. 研究の方法

目的 A: 古典的な睡眠覚醒表現型解析である脳波法は侵襲的で高度な技術を有しさらにコストも高い。そこで非侵襲にマウスの呼吸波形を取得し自動的に睡眠覚醒表現型解析を行う SSS (Snappy Sleep Stager) を開発した。これまでに、呼吸波形の非侵襲測定に特化した小型の装置は存在したが、睡眠研究では数日間にわたってマウスが快適に過ごせるだけの飼育容積が必要であり、そのために装置の構造を工夫することで、1週間以上動物に触ることなく、連続的に呼吸波形を取得することに成功した。呼吸波形から睡眠表現型を判定できることを、野生型マウスのみならず、遺伝子改変動物および薬剤による睡眠覚醒

目的 B: CRISPR/Cas9 を直接受精卵に打ち込むことで1世代でノックアウトを作成する技術は従来より存在したが、標的アレルへ対して3種類のガイド RNA を打ち込むことで飛躍的にノックアウト効率が上がることを示し、1世代で表現型解析を行うことのできるノックアウトマウスを作成できるプラットフォームを整備した。

目的 C: 脳波上で睡眠徐波が出現している際の大脳皮質ニューロンの up-state および down-state の変動に注目し、1ニューロンで同様の变化を再現できるモデルを *in silico* で作成した。

目的 D: 目的 C で開発したモデルのパラメータをランダムに変化させることで、どのような遺伝子ファミリーをノックアウトすると睡眠表現型が覚醒へ変化するかシミュレーションを用いて検索した。

4. 研究成果

本研究の最終目標である睡眠覚醒ダイナミクスの設計原理を明らかにするために有用な2つの大きな発見に至った。

まず、目的 A および B を用いることで、NMDA 受容体ファミリーに属する全ての遺伝子のノックアウトをそれぞれ作成し、*Nr3a* 遺伝子をノックアウトすることでマウスの覚醒時間が増えることを示した。この研究は呼吸波形を用いた非侵襲睡眠覚醒表現型解析システム (SSS; Snappy Sleep Stager) の大規模化によって実現した。NMDA 受容体は精神疾患との関連がわかっているが、睡眠との関連は明らかになっていなかった。そこで、7つの NMDA 受容体遺伝子をそれぞれノックアウトした動物をトリプル CRISPR 法を用いて作製し、SSS で睡眠表現型を評価したところ *Nr3a* 遺伝子をノックアウトすると睡眠時間が減ることを突き止めた (Sunagawa et al., 2016, *Cell Reports*.)

本研究は睡眠恒常性への理解を深めたの

にとどまらず、個体レベルでシステムバイオロジーの手法、具体的には個体レベルでフォワードジェネティクスが可能であることを示した初めての論文でもあり、手法としても大きな価値のある論文である。さらに、包括的に睡眠恒常性を理解するために、コンピュータで睡眠モデルを作成し(目的C)、睡眠恒常性に関連する構成要素を予測する手法をとった(目的D)。これが2つ目の発見であるカルシウムイオンの動態を制御している経路が睡眠時間に影響を与えていることの発見につながった。シミュレーションによりカルシウムイオン関連経路が睡眠恒常性に重要であることが予測されたため、関連する21個の遺伝子を、それぞれノックアウトしたマウスを作製し、SSSで睡眠表現型を解析したところ(目的E)、*Cacna1g*, *Cacna1h*(電位依存性カルシウムチャネル)、*Kcnn2*, *Kcnn3*(カルシウム依存性カリウムチャネル)、*Camk2a*, *Camk2b*(カルシウムイオン・カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII)をノックアウトしたマウスの睡眠時間が、野生型のマウスと比べて顕著に短いことが、*Atp2b3*(カルシウムポンプ)をノックアウトしたマウスの睡眠時間が、野生型のマウスと比べて顕著に長いことがわかった(Tatsuki et al., 2016, *Neuron*)

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2件)

1. Tatsuki, F., Sunagawa, G.A., Shi, S., Susaki, E.A., Yukinaga, H., Perrin, D., Sumiyama, K., Ukai-Tadenuma, M., Fujishima, H., Ohno, R., Tone, D., Ode, K.L., Matsumoto, K., Ueda, H.R., 2016.

Involvement of Ca^{2+} -Dependent Hyperpolarization in Sleep Duration in Mammals.

Neuron 1-16. (査読あり)

doi:10.1016/j.neuron.2016.02.032

2. Sunagawa, G.A., Sumiyama, K., Ukai-Tadenuma, M., Perrin, D., Fujishima, H., Ukai, H., Nishimura, O., Shi, S., Ohno, R., Narumi, R., Shimizu, Y., Tone, D., Ode, K.L., Kuraku, S., Ueda, H.R., 2016.

Mammalian Reverse Genetics without Crossing Reveals *Nr3a* as a Short-Sleeper Gene.

Cell Rep. 14, 662-677. (査読あり)

doi:10.1016/j.celrep.2015.12.052

[学会発表](計4件)

1. Genshiro A. Sunagawa, Masayo Takahashi.

Development of stable induction method of torpor in mice.

March 24, 2016, poster presented at The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 札幌コンベンションセンター, Sapporo, Japan.

2. Genshiro A. Sunagawa, Masayo Takahashi.

Toward hypometabolic organ preservation: the development of stable induction method for mouse torpor.

March 19, 2016, oral presentation given at The 15th Congress of the Japanese Society for Regenerative Medicine, 大阪国際会議場, Osaka, Japan.

3. Genshiro A. Sunagawa.

Screening complex biological systems at organismal level: sleep and hibernation.

March 7, 2016, oral presentation given at Kanazawa University Brain/Liver Interface Medicine Research Center Symposium, ANA クラウンプラザホテル金沢, Kanazawa, Japan.

4. Genshiro A. Sunagawa, Hiroki R. Ueda.

Next-generation Sleep Phenotyping System for Mice.

July 30, 2015, poster presented at The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 神戸国際会議場, Kobe, Japan.

[その他]

ホームページ等

2016年1月8日 理化学研究所

次世代型逆遺伝学による睡眠遺伝子 *Nr3a* の発見 - 交配不要で解析も簡便かつ低コストな新しい逆遺伝学を確立 -

http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160108_1/

March 18, 2016

Brain calcium controls how long we sleep
http://www.riken.jp/en/pr/press/2016/20160318_2/

6. 研究組織

(1)研究代表者

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・研究員
砂川 玄志郎 (Genshiro A Sunagawa)

研究者番号：70710250

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし