

令和元年6月16日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06623

研究課題名（和文）カルシウム依存的な過分極経路の睡眠恒常性制御における役割の理解

研究課題名（英文）Understanding the role of Ca²⁺-dependent hyperpolarization pathway in the regulation of sleep homeostasis

研究代表者

史 蕭逸（Shi, Shoi）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

研究者番号：40803656

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は睡眠恒常性とカルシウム依存的な過分極経路の関係性を問うものである。本研究ではカルシウム依存的な過分極経路と睡眠恒常性制御の関係を明らかにし、新規睡眠時間制御遺伝子としてKcnk9を同定することに成功した。同結果をPNAS誌に報告し、同結果に関してEuropean Sleep Research Society 24thのシンポジウムで招待講演を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

睡眠時間を決める遺伝子を明らかにすることで、その遺伝子もしくは関連遺伝子をターゲットとした安全な睡眠薬の開発が可能です。また睡眠は多くの精神疾患と密接に関わっており、睡眠を制御するメカニズムを解明することは精神疾患に対する新規治療法の開発に繋がる可能性があります。

研究成果の概要（英文）：This study questions the relationship between sleep homeostasis and the calcium-dependent hyperpolarization pathway. In this study, we clarified the relationship between calcium-dependent hyperpolarization pathway and sleep homeostasis control, and succeeded in identifying Kcnk9 as a novel sleep gene. The results were reported to PNAS, and the invited talk was given at the symposium of the European Sleep Research Society 24th.

研究分野：睡眠

キーワード：睡眠恒常性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

睡眠はショウジョウバエからヒトまで保存されており、一日の睡眠時間や入眠のタイミングは動物種間では異なるものの、動物種内では一定に保たれている。これらの睡眠の重要な性質を端的に表現したモデルとして2プロセスモデルが知られる (Berbely et al., 1982)。つまり、“一日の中でいつ寝るか”という入眠のタイミングを決めるプロセスCと、“一日にどのくらい寝るか”という睡眠の量を決めるプロセスSによって睡眠は制御されているというモデルである。このプロセスSの構成因子を同定することが、睡眠研究の大きな主眼の一つであるが、未だに達成されていない。これまで申請者の所属する研究グループは、睡眠時の大脳皮質の神経細胞が示す神経発火パターンに着目し、その構成要素が睡眠時間の制御にも重要な役割を果たすという仮説を立て、それを検証しました。その結果、数理モデルを用いた睡眠時間制御遺伝子の予測とKOマウスの作製および睡眠表現型解析を組み合わせることで、カルシウム依存的な過分極経路に含まれる遺伝子群が睡眠時間制御に重要な役割を果たすことを明らかにしました (Tatsuki et al., 2016)。しかし、睡眠時間を制御する遺伝子 (睡眠時間制御遺伝子) と睡眠恒常性との関係性は未だに明らかではありません。

2. 研究の目的

本研究では、睡眠時間制御遺伝子の探索及び、同定した睡眠時間制御遺伝子と睡眠恒常性の関係性を明らかにするものである。

3. 研究の方法

数理モデル：

Tatsuki et al 2016 で用いた数理モデルを改変し、よりシンプルなモデルを作成し、新たな睡眠時間制御遺伝子の予測を行った。

実験：

Triple-CRISPR 法と SSS 法を組み合わせることで、(Sunagawa et al., 2016)、遺伝子改変マウスを作製した。作製した遺伝子改変マウスに対して EEGEMG 測定を行った。

解析：

非線形時系列解析とデルタ波の解析アルゴリズムを実装し、睡眠時間制御遺伝子の KO マウスにおける睡眠恒常性の異常の有無について調べた。

4. 研究成果

カルシウム依存的な過分極経路に属する遺伝子群のノックアウト (KO) マウスを作製し、脳波・筋電図を用いてその測定を行った。その結果、カルシウム依存的な過分極経路に属する遺伝子と、ノンレム睡眠およびレム睡眠制御との関係が明らかになった。更に、非線形時系列解析アルゴリズムとデルタ波の解析アルゴリズムを開発・実装し、これらのマウスの脳波データに適用したところ、複数の変異体マウスで睡眠恒常性の変化が示唆された。

新規の睡眠時間制御遺伝子を同定するために、まず徐波発火パターン形成のモデルである AN モデルの重要な要素を残しつつ単純化をおこなった。単純化の際には、Tatsuki et al 2016 で報告された AN モデルにおいて特定のチャンネルが“ある”状態と“ない”状態で、ランダムにパラメーターを設定したときに徐波発火パターンが出る確率の比較をおこないました。徐波発火パターンが出る確率に大きな影響を与えるようなチャンネルを選択しモデルに残すことで、より単純なモデルである新しいモデル (SAN モデル) の作成に成功しました。具体的には AN モデルがチャンネル・ポンプ数 13 個、変数 10 個であったのに対して SAN モデルはチャンネル・ポンプ 6 個、変数 3 個にまで単純化されました。

モデルが単純化されたことにより、SAN モデルを用いて新たにさまざまな解析が可能になりました。まず徐波発火パターンにおける電流の解析をおこなうと、徐波発火パターンに特徴的な Down state において、以前から睡眠への関与が知られていたカルシウム依存性カリウムチャンネルに加えてリークカリウムチャンネルが働いていることがわかりました。さらにカルシウム依存的な過分極に関連したチャンネルの透過性を低下させた状態でリークカリウムチャンネルの透過性を低下させると、徐波発火パターンから覚醒時の発火パターンに変化することがわかりました。そこでこれらのチャンネルと相平面上のヌルクラインとの関係を調べることで、リークカリウムチャンネルとカルシウム依存性カリウムチャンネルが共同して Up state から Down state への移行に関与していることが明らかになりました。これによりリークカリウムチャンネルの透過性を下げると徐波発火パターンが覚醒時の発火パターンに変化することがわかりました。

これらの結果のうち検証可能なものについては、AN モデルでも同様の結果が得られました。以上のことにより、リークカリウムチャンネルの透過性が低いと徐波発火パターンではなく覚醒時の発火パターンが出現することがわかりました。このことからリークカリウムチャンネルの発現が低下した状態では神経細胞では徐波発火パターンが出にくく、大脳皮質全体として徐波が出にくくなると考えられ、その結果睡眠時間が減少すると予測されました。

実際にこの予測をマウスの個体レベルで検証しました。まず、1 次スクリーニングとしてトリプル CRISPR 法でリークカリウムチャンネル遺伝子を一ずつ欠失させたマウスを作製し、高速に睡眠表現型を解析することができる SSS 法により睡眠量を測定しました。その結果、二つのリークカリウムチャンネル (*Kcnk9* または *Kcnk16*) を欠失したマウスにおいて睡眠時間の有意な

減少が観察され、特に *Kcnk9* を欠失したマウスについては睡眠時間が著しく減少していました (図1)。そこで、*Kcnk9* 遺伝子欠失マウスの睡眠量を、脳波・筋電図測定を用いてより詳細に解析したところ、*Kcnk9* 遺伝子欠失マウスは睡眠時間のうちノンレム睡眠の時間が著しく減少していることがわかりました (図2)。このように、徐波発火パターンの形成への関与が示唆されたリークカリウムチャンネルが、マウスの睡眠時間制御にも関与していることが動物実験で示されました。AN モデルで得られた結果と照らし合わせると、カルシウム依存的・非依存的なカリウムチャンネルの働きが睡眠時に見られる徐波発火パターンに重要な役割を果たすと考えられます (図3)。

これらの結果に関しては、睡眠の国際的な学術大会である "World Sleep 2017" で口頭発表およびポスター発表を行い、Young Investigator Outstanding Poster Award を受賞した。また "ESRS 2018" のシンポジウムで口頭発表 (招待) を行った。更に、これらの結果をまとめ筆頭著者の一人として、PNAS 誌に報告した (Yoshida, Shi, et al., 2018)。

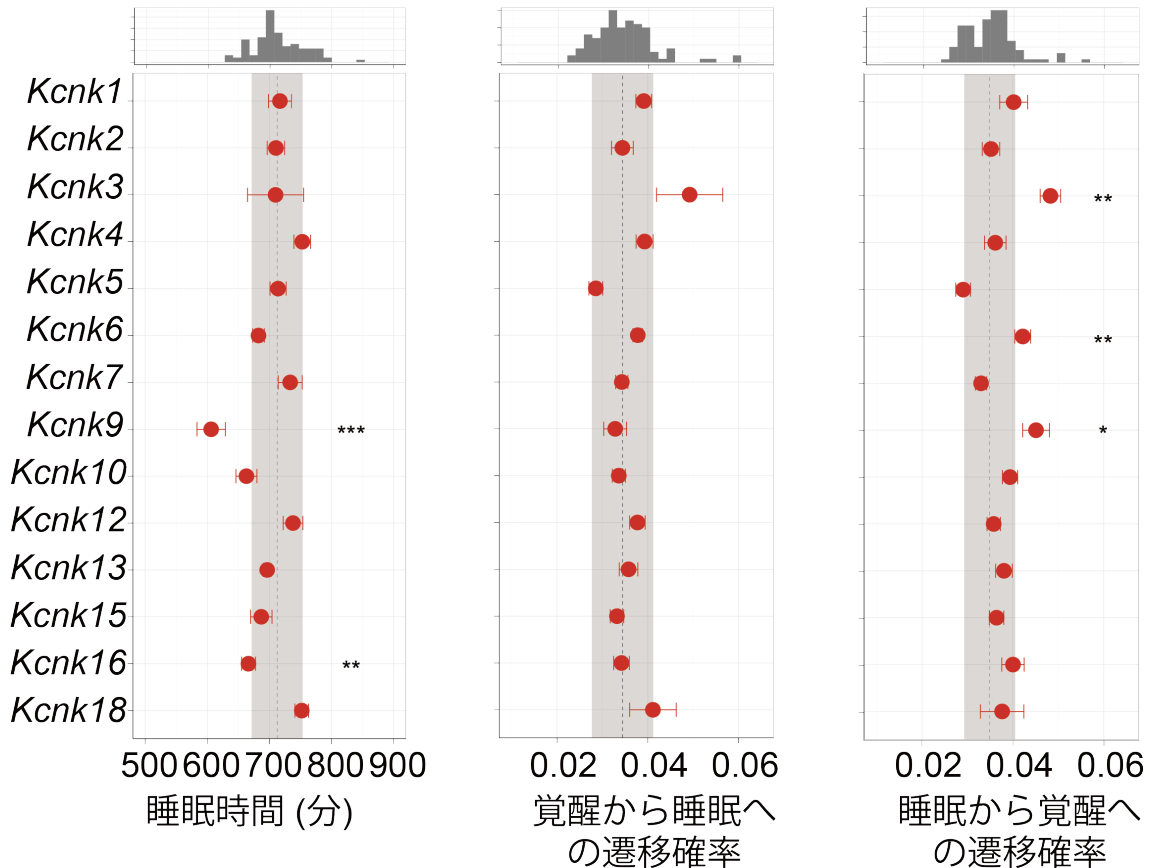


図1. リークカリウムファミリー遺伝子群のKOマウスの睡眠表現型

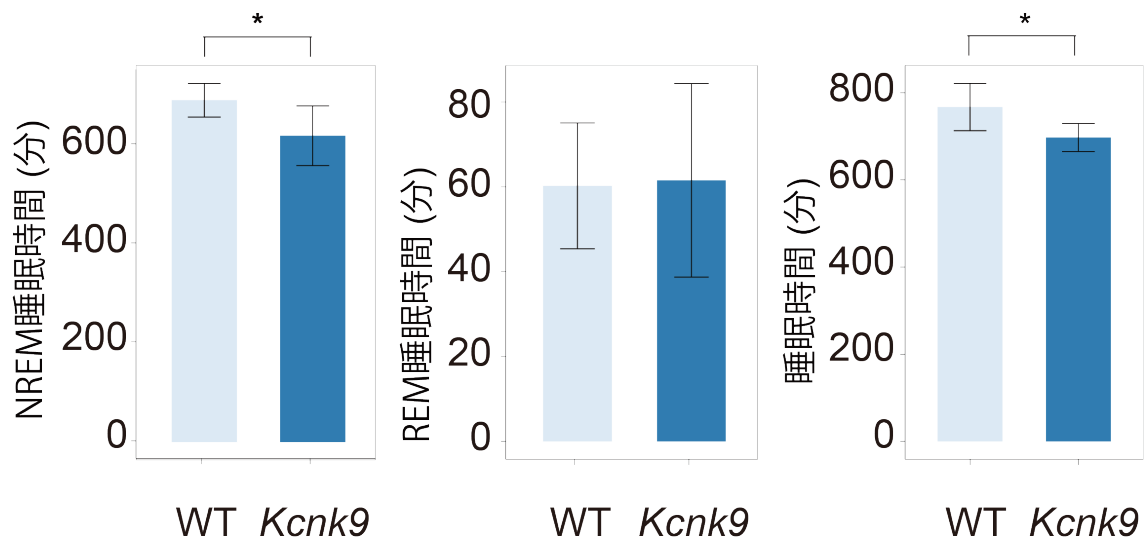
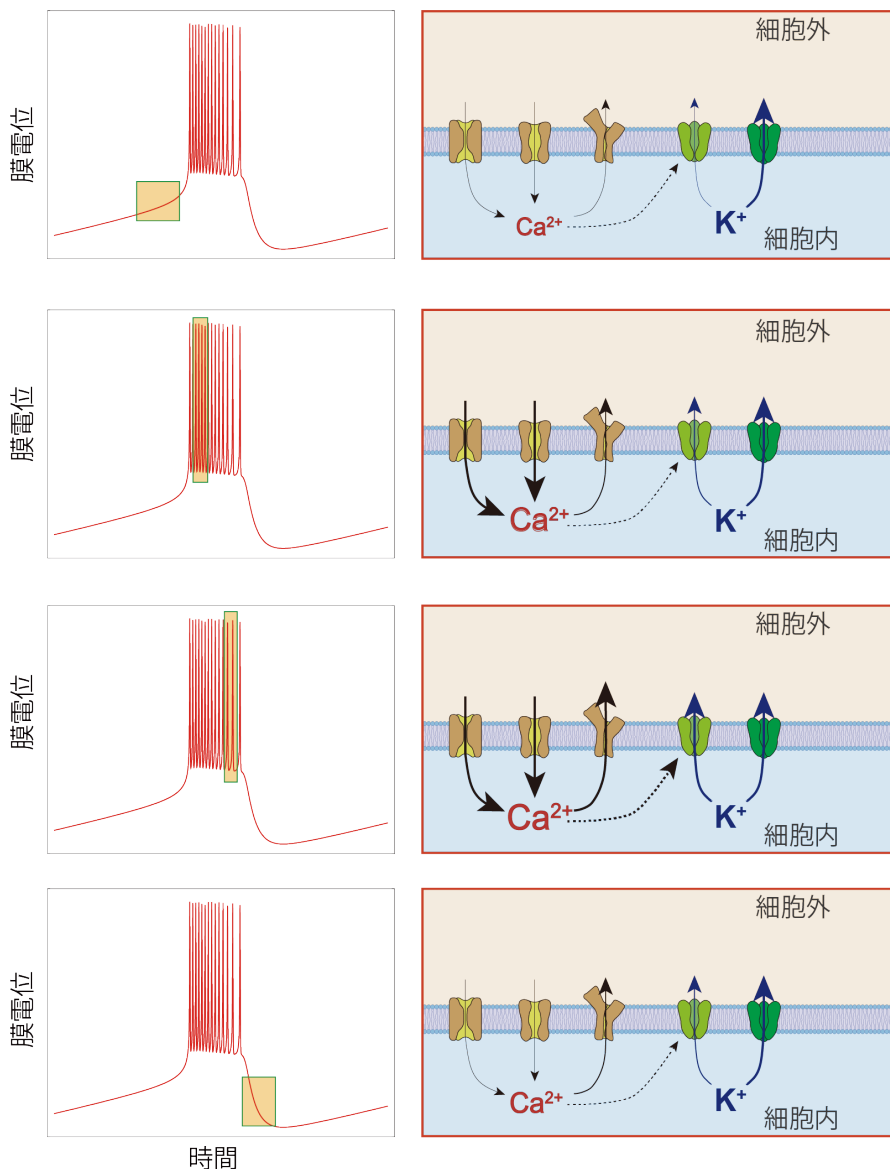
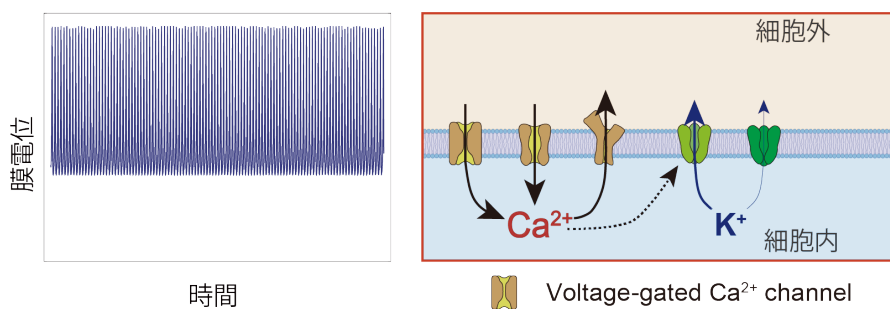


図2. 脳波筋電図測定による**Kcnk9 KO**マウスの睡眠時間測定結果

リークカリウムチャネルの活性が正常



リークカリウムチャネルの活性が低い








-  Voltage-gated Ca²⁺ channel
-  NMDA receptor
-  Ca²⁺-pump/exchanger
-  Ca²⁺-dependent K⁺ channel
-  Leak K⁺ channel

図3. リークカリウムチャネルによる神経発火パターンの制御機構

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)(すべて査読あり)

1. Genes and ion channels in the circadian and homeostatic regulation of sleep
Shi S, Millius A, Ueda HR
Handbook of Sleep Research in press 2018年
2. Leak potassium channels regulate sleep duration.
Yoshida K*, **Shi S***, Ukai-Tadenuma M, Fujishima H, Ohno RI, Ueda HR
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
115(40) E9459-E9468 2018年10月
3. Muscarinic Acetylcholine Receptors Chrm1 and Chrm3 Are Essential for REM Sleep.
Niwa Y*, Kanda GN*, Yamada RG*, **Shi S**, Sunagawa GA, Ukai-Tadenuma M, Fujishima H,
Matsumoto N, Masumoto KH, Nagano M, Kasukawa T, Galloway J, Perrin D, Shigeyoshi Y,
Ukai H, Kiyonari H, Sumiyama K, Ueda HR
Cell reports 24(9) 2231-2247.e7 2018年8月
4. Ca²⁺-Dependent Hyperpolarization Pathways in Sleep Homeostasis and Mental Disorders.
Shi S, Ueda HR
BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology 40(1)
2018年1月

[学会発表](計11件)

1. Ono H, **Shi S**, Ueda HR: The discovery of novel gene for stabilizing wakefulness., The
92nd Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society, 3-P-035, 14-16 Mar 2019
2. Honda S, **Shi S**, Ueda HR: SMILES Transformer for Drug Discovery Using Masked Language
Model., International Research Center for Neurointelligence. 17 Dec 2018.
3. Kon K, **Shi S**, Ueda HR: The Role of Ca²⁺-dependent Hyperpolarization Pathway in Sleep
Duration., The 5th Annual IIIS Symposium, P15, 13 Dec 2018
4. **Shi S**, Ueda HR: Ca²⁺-dependent hyperpolarization pathway in sleep homeostasis, 24th
Congress of the European Sleep Research Society, 25-28 Sep 2018
5. Yoshida K, **Shi S**, Ueda HR: Leak potassium channels regulate sleep duration, Gordon
Research Conference on Sleep Regulation and Function, 18-23 Mar 2018
6. Yoshida K, **Shi S**, Ueda HR: Leak potassium channels regulate sleep duration, Gordon
Research Seminar on Sleep Regulation and Function, 17-18 Mar 2018
7. Kon K, **Shi S**, Ueda HR: The Role of Ca²⁺-dependent Hyperpolarization Pathway in Sleep
Duration., World Sleep 2017, P34, 7-11 Oct 2017
8. **Shi S**, Ueda HR: A potential pharmacological target of insomnia: the molecules involved
in the Ca²⁺-dependent hyperpolarization pathways play a pivotal role in the
regulation of sleep homeostasis., World Sleep 2017, P58, 7-11 Oct 2017
9. **Shi S**, Ueda HR: A potential pharmacological target of insomnia: the molecules involved
in the Ca²⁺-dependent hyperpolarization pathways play a pivotal role in the
regulation of sleep homeostasis., World Sleep 2017, 021, 7-11 Oct 2017
10. **Shi S**, Yoshida K, Ueda HR: Newly-identified sleep-related genes: fast and slow
Ca²⁺-dependent hyperpolarization pathway, 11th Forum of Neuroscience, E009, 7-11
July 2017
11. Kon K, **Shi S**, Ueda HR: The impairments of Ca²⁺-dependent hyperpolarization pathway
altered NREM sleep duration in mice, 18th WORLD CONGRESS OF BASIC AND CLINICAL
PHARMACOLOGY, P01-6-3, 1-6 July 2017

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。