

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16115

研究課題名（和文）In vitro睡眠解析系を利用した睡眠制御分子ネットワークの一斉同定

研究課題名（英文）Identification of molecular networks regulating sleep by in vitro sleep analysis system

研究代表者

戸根 大輔 (Tone, Daisuke)

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

研究者番号：60806610

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、睡眠覚醒を制御する分子群を同定するために、ハイスループットな睡眠評価系の構築および、分子摂動系の構築を目指した。その結果、カルシウムシグナルのモニターにより、培養神経細胞での安定な神経活動の検出に成功し、睡眠評価系構築の下地が整備できた。さらに、分子摂動系では、リン酸化酵素の一つカルシウムカルモジュリン依存性プロテインキナーゼ(CaMKII)に注目し、この分子活性への摂動を通じ、睡眠制御システムの一部を明らかにすることができた (Tone et al, PLOS Biology, 2022)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究で明らかとなったCaMKIIによる睡眠制御について、CaMKIIは睡眠の導入に働くのみでなく、睡眠の維持にも重要な役割を果たすことが示唆された。現代では、多くの人々が睡眠に問題を抱え、社会問題の一つとなっている。今回の成果がより安定な眠りを実現する新たな睡眠薬の開発や、疾患や老化に伴う睡眠の不安定化を改善する方法につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to construct a high-throughput sleep evaluation system and molecular perturbation systems to identify the molecular mechanisms that control sleep/wake cycle. We succeeded in detecting stable neuronal activity in cultured neurons by monitoring calcium signals, providing the basis for the construction of the high-throughput system. As for the molecular perturbation system, we focused on calcium calmodulin-dependent protein kinase (CaMKII), one of the kinases, and revealed a part of the sleep regulation system by perturbing the activity of this molecule.

研究分野：分子神経科学

キーワード：睡眠 リン酸化 CaMKII

1. 研究開始当初の背景

現代社会において睡眠に問題を抱える人は多く、社会全体における慢性的な睡眠不足によるパフォーマンスの低下は莫大な経済損失につながっていることが知られている。適切な睡眠は記憶や学習に重要であるだけでなく、その破綻が疾患発症との関連も報告されていることから、生物にとって欠くことのできない基本的な生理機能であると考えられる。

睡眠覚醒サイクルは我々に身近な現象であるが、その制御に関わる分子機構はほとんど明らかになっていない。これまでにショウジョウバエやマウスを対象とした遺伝学的なアプローチを中心として、いくつかの睡眠関連遺伝子群が同定されてきた。これらの睡眠関連遺伝子は睡眠覚醒サイクルの制御に何らかの関与があると考えられるが、これらの手がかりから睡眠の制御機構の全体像を理解するには至っていない。睡眠制御の分子システムを理解するためには、睡眠に関わる因子の同定を効率的に進めつつ、それらの因子同士の関わりを評価することが重要である。

2. 研究の目的

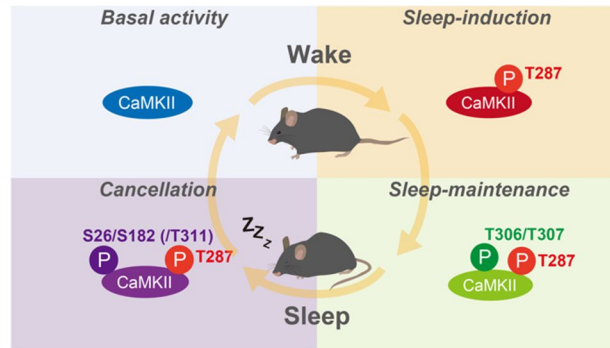
本研究では、睡眠制御因子を一斉に同定し、それらの関係性を詳細に解析することで、睡眠覚醒制御を担う分子ネットワークの解明を目指す。これまでの遺伝学的手法では動物個体の世代時間や、睡眠解析に要する高度な手技が律速となり、遺伝子の大規模な評価を行うためのスループットを確保することが困難であった。また、遺伝子の中にはノックアウトにより致死となるものも多く、これらの遺伝子の役割を検討することは困難であった。そこで、これらの制約を乗り越えるため、ハイスループットかつ網羅的に遺伝子を評価し、睡眠関連遺伝子を同定する実験系を構築する。

3. 研究の方法

本研究では、2つの計画を軸に研究を実施した。計画 1 ではハイスループットな睡眠評価系の構築、計画 2 ではターゲット分子の摂動方法の確立を目指した。計画 1 で確立した分子摂動法は計画 2 で構築した睡眠評価系に適用可能である。具体的には、まず計画 1 において、マウス胎児から採取した初代神経細胞を培養し、この神経活動をハイスループットに測定することで、睡眠脳波を反映した同期活動の評価を試みた。計画 2 においては、アデノ随伴ウイルス(AAV)を利用することで、ターゲット分子の変異体や阻害剤を神経細胞に導入することで分子活性を制御することを試みた。

4. 研究成果

計画 1 に基づき、ハイスループットな睡眠評価系の構築を目指し検討を進めた結果、カルシウム指示薬およびカルシウムインジケータ(GEC1)を利用して、神経細胞の活動をモニターすることで、神経の同期活動が安定に測定可能な系の構築に成功した。構築した系では、384 ウェルプレートでの同時測定が可能であり、スクリーニングに十分なスループットが得られた。また、計画 2 に基づいた、ターゲット分子摂動系の構築では、リン酸化酵素の一つカルシウムカルモジュリン依存性プロテインキナーゼ(CaMKII)に注目し、この分子を摂動する系の確立を目指した。CaMKII 変異体や CaMKII インヒビターを AAV に搭載することで、AAV の感染した神経細胞内での CaMKII 活性をコントロールすることが可能となった。この摂動系は計画 1 で確立した評価系に利用するのみでなく、マウスへの静脈投与により個体での睡眠表現型評価が可能である。実際に、マウス個体において AAV による CaMKII 分子活性制御を行うと、CaMKII 活性化時と抑制時で、マウス個体の睡眠時間が2倍弱の幅で変化することが明らかになった。同様のスキームを利用して、CaMKII 分子のリン酸化状態が個体の睡眠表現型にどのような影響を与えるのかを検討した。その結果 CaMKII がそのリン酸化状態に応じて睡眠の導入または睡眠の維持に重要な働きを持つことが示唆された(Tone *et al*, PLOS Biology, 2022)。これらの発見は哺乳類における睡眠制御システムを理解・制御にする上で重要な知見となる。特に、睡眠の安定化と入眠を独立にコントロールする方法が開発できれば、疾患や老化に伴う睡眠の断片化に対しても、最適な治療を確立できることが期待される。



本研究で示唆された CaMKII リン酸化に基づいた睡眠覚醒サイクル駆動モデル

神経活動に応じて細胞内のカルシウムイオン濃度が変化すると、CaMKII の活性化が起こる。活性化した CaMKII は自身をリン酸化することで、その機能を緻密に調整する。このリン酸化状態の遷移が睡眠覚醒サイクルで重要な働きを担う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shun-Ichi Funano, Daisuke Tone, Hideki Ukai, Hiroki R Ueda, Yo Tanaka	4. 巻 13
2. 論文標題 Rapid and easy-to-use ES cell manipulation device with a small groove near culturing wells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 453
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-020-05294-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tone D, Ode KL, Zhang Q, Fujishima H, Yamada RG, Nagashima Y, Matsumoto K, Wen Z, Yoshida SY, Mitani TT, Arisato Y, Ohno RI, Ukai-Tadenuma M, Yoshida Garcon J, Kaneko M, Shi S, Ukai H, Miyamichi K, Okada T, Sumiyama K, Kiyonari H, Ueda HR	4. 巻 20 (10)
2. 論文標題 Distinct phosphorylation states of mammalian CaMKII control the induction and maintenance of sleep	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS biology	6. 最初と最後の頁 e3001813
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pbio.3001813	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 戸根大輔、大出晃士、張千恵、上田泰己
2. 発表標題 CaMKIIにおける多段階リン酸化による睡眠覚醒サイクル制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daisuke Tone, Koji L. Ode, Qianhui Zhang, Hiroki R. Ueda
2. 発表標題 Multistep regulation of mammalian sleep by phosphorylation states of CaMKII
3. 学会等名 JPW2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Daisuke Tone, Koji L. Ode, Qianhui Zhang, Hiroki R. Ueda
2. 発表標題 Mammalian sleep regulation by phosphorylation states of CaMKII
3. 学会等名 日本薬理学会 関東部会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------