

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06083・19K21206

研究課題名（和文）睡眠の細胞内分子カスケードを担う新規制御分子の網羅的な探索と解析

研究課題名（英文）Exploration and analysis of novel components of intracellular molecular cascade for sleep

研究代表者

北園 智弘 (Kitazono, Tomohiro)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・研究員

研究者番号：40826517

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者の所属研究室の先行研究により、眠気を制御するセリンスレオニンキナーゼSIK3をキーとする細胞内シグナル伝達経路の存在が示唆された。このシグナル伝達経路の実体を明らかにするため、SIK3の基質を探索した。KIOSSと呼ばれる*in vitro*基質スクリーニングを行った結果、38のタンパク質の56か所のリン酸化部位がSIK3のリン酸化部位の候補として新規に同定された。さらに、今回のスクリーニングで同定された候補タンパク質について、パスウェイ解析を行い、SIK3の下流で機能している可能性が高いシグナル伝達経路を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

睡眠は、記憶形成、感情調節、代謝、発達、老化といった様々な生命機構と関連している。本研究で新規に同定した新規分子の知見をもとに、睡眠覚醒を制御する細胞内分子機構を明らかにすることで、生命科学における幅広い分野の研究の発展に寄与することが期待される。また、不眠は鬱病などの気分障害やメタボリック症候群などの様々な疾患のリスクを高めることも知られている。本研究で得られた知見をもとに、睡眠障害の治療薬開発の標的分子を明らかにすることは、睡眠障害と関連する疾患の治療の進歩におおいに貢献できる。

研究成果の概要（英文）：We recently reported that single nucleotide substitution (Sleepy mutation) in serine/threonine kinase SIK3 caused dramatically prolonged sleep time (Funato et al., 2016), and increase of sleep need broadly induced cumulative phosphorylation of the brain proteome (Wang et al., 2018). These results suggested that sleep need was regulated by unknown intracellular signaling pathways, in which serine/threonine kinase SIK3 functioned. To reveal these signaling pathways, we explored the novel substrate of SIK3. To identify the novel SIK3 substrate, we conducted *in vitro* substrate screening, KIOSS (Kinase-Oriented Substrate Screening) (Nishioka et al., 2015), and newly identified 56 phosphorylation sites in 38 proteins as the candidates of SIK3 phosphorylation sites. Furthermore, we performed pathway analysis with these candidate proteins, and found one signaling pathway, which possibly functioned downstream of SIK3.

研究分野：神経科学

キーワード：睡眠 覚醒 シグナル伝達経路 キナーゼ スクリーニング パスウェイ解析 リン酸化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

「睡眠」は広く動物に存在する普遍的な行動でありながら、その生理的な意義や制御機構の大部分は未解明である。睡眠は、起きている間に蓄積していく眠気の積算量を検知する「センサー」と、この量が閾値に達した際に睡眠・覚醒を切り替える「スイッチ」の2つの機構から成り立っていると考えられている。「スイッチ」の機構は、近年、明らかになりつつある一方で、「センサー」の機構の理解はほとんど進んでいない。

研究代表者が所属する研究室では、近年、AMPKファミリーに属するセリンスレオニンキナーゼ SIK3 の一塩基置換 (*Sleepy* 変異) が覚醒時間の大幅な減少とノンレム睡眠時間の増加を引き起こすことを見出した<sup>1</sup>。さらに、所属研究室では、睡眠要求の増減に比例して、脳内の膨大な数のタンパク質のリン酸化状態が劇的に変化することを見出した<sup>2</sup>。これらの発見から、我々は、SIK3 をキーとする神経細胞内の未知の細胞内シグナル伝達経路がこれを制御している、と仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究では、SIK3 をキーとする神経細胞内の未知の細胞内シグナル伝達経路を、質量分析を用いたプロテオーム解析を用いて網羅的に探索・解析し、睡眠制御の分子機構の全体像を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

所属研究室の先行研究により、*Sleepy* 変異によって約 4000 ものリン酸化部位のリン酸化状態を有意に変化させることが示されている<sup>2</sup>。このことは、単純に *Sleepy* 変異型脳においてリン酸化状態が変化しているタンパク質を探索するだけでは、その候補の数の膨大さゆえに、SIK3 に制御される分子の同定には至れないことを意味している。

#### (1) 細胞種特異的 *Sleepy* 変異型マウスや *Sik3* 欠損変異型マウスを用いたリン酸化プロテオーム解析

所属研究室では、*Sleepy* 変異型マウスは、睡眠異常以外にもいくつかの特異な表現型を示すことを未発表であるが確認している。このことから、先行研究によって見出された *Sleepy* 変異型脳におけるリン酸化状態が変化したタンパク質の多くは、睡眠覚醒制御とは無関係な機構に関与していると考えられる。ここで、所属研究室における、これまでの研究から SIK3 が機能する神経細胞集団が同定されている。そこで、本研究では、Cre/LoxP システムや CRISPR/Cas システムを用いて、この細胞種特異的に *Sleepy* 変異を導入した変異型マウスや、*Sik3* を欠損したマウスの脳について、タンデム質量タグ (TMT) と LC-MS3 を用いたリン酸化プロテオーム解析を行うことにより、これらの変異によってリン酸化状態が変化する脳内のタンパク質を探索する。これらの複数の解析の結果を比較し、組み合わせることで、SIK3 の下流分子カスケードの構成分子の候補を探索する。

#### (2) KIOSS による SIK3 の基質の探索

KIOSS (Kinase-Oriented Substrate Screening) と呼ばれるスクリーニング<sup>3</sup>を行うことで、SIK3 によってリン酸化される基質を探索する。このスクリーニングでは、あらかじめ、SIK の阻害剤を添加した培養細胞に、ホスファターゼ阻害剤を添加する。ホスファターゼ阻害剤が添加されると、細胞内のリン酸化が全般的に向上するが、SIK の阻害剤を事前に添加しておくことで、SIK の基質のリン酸化のみが抑制されるため、他のリン酸化基質とのリン酸化状態の差が増強され、SIK の基質のみを明瞭に分離することができる。さらに、リン酸化タンパク質結合タンパク質 14-3-3 を固相化したビーズでリン酸化タンパク質を濃縮することによって、分子カスケードで機能するリン酸化タンパク質を選択的に濃縮し、リン酸化されたハウスキープタンパク質や構造タンパク質を除去することができる。このように濃縮したリン酸化ペプチドについて、LC-MS/MS で検出を行い、SIK3 の基質候補を探索する。

### 4. 研究成果

#### (1) 主な研究成果

##### 細胞種特異的 *Sleepy* 変異型脳を用いた定量的リン酸化プロテオーム解析

所属研究室が見出した SIK3 が機能する神経細胞集団特異的に *Sleepy* 変異を導入した変異型マウス脳を用いて、野生型マウス脳との比較定量的リン酸化プロテオーム解析を行った。その結果、約 400 か所のリン酸化部位のリン酸化状態が上昇し、約 100 か所のリン酸化部位のリン酸化状態が低下していることが分かった。

##### *Sik3* 欠損マウス脳を用いた定量的リン酸化プロテオーム解析

既存の研究から、*Sleepy* 変異は機能獲得型変異であると推定できるため<sup>4</sup>、SIK3 に制御される分子カスケードは *Sik3* 欠損マウス脳では *Sleepy* 変異型脳とは逆のリン酸化状態の

変化を示すと推測される。そこで、まず、*Sik3* 欠損マウス脳と野生型脳とで定量的比較リン酸化プロテオーム解析を行い、リン酸化状態が変化するタンパク質を探索した。その結果、約 2000 か所のリン酸化部位のリン酸化状態が変化していた。このリン酸化部位と、前項の細胞種特異的 *Sleepy* 変異型脳と野生型脳との比較でリストアップされた約 500 か所のリン酸化部位とを比較した結果、*Sleepy* 変異型脳と *Sik3* 欠損マウス脳の両方で顕著なリン酸化状態の変化を示すタンパク質のリン酸化レベルは、非常に強い正の相関を示し、2 種の変異型マウス間で逆のリン酸化状態を示すタンパク質はほとんど見つからなかった。このことから、我々は、数秒から数分で完了するリン酸化という現象を、恒常的な変異導入という、大きくタイムスケールの異なる方法で追うことには限界があるのではないかと考えた。

#### KIOSS による SIK3 の基質の探索

、の結果を受けて、KIOSS を用いた *in vitro* 基質スクリーニングに方法を転換して研究を行うこととした。KIOSS の結果、38 のタンパク質の 56 か所のリン酸化部位が SIK3 のリン酸化部位の候補として同定された。これらの候補部位と所属研究室において行われたマウス脳のリン酸化プロテオーム解析<sup>2</sup>で同定されたリン酸化部位とを比較した結果、7 か所が重複していることが分かった。さらに、今回のスクリーニングで同定された候補タンパク質について、パスイ解析を行った結果、GTPase シグナル伝達経路の構成因子が有意に含まれていることが分かった。このことから、SIK3 の下流では、このシグナル伝達経路が機能している可能性がある。

#### (2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

分子レベルでの睡眠・覚醒制御に迫る研究は、ここ 20 年ほど、多くのトランスクリプトーム解析やプロテオーム解析、リン酸化プロテオーム解析がなされており、睡眠に関連する膨大な数のタンパク質が報告されている<sup>2, 5, 6, 7</sup>。しかし、これらの先行研究は因子の同定までにとどまっており、これらの因子の睡眠・覚醒制御における機能まで追求したものは、後述するごくわずかの例以外はない。ここで、所属研究室で発見された *Sleepy* 変異型マウスは顕著なノンレム睡眠時間の増加を示すことから、SIK3 は睡眠覚醒制御において重要な機能を有していると考えられる<sup>1</sup>。そのため、この SIK3 が機能する細胞内シグナル伝達経路の全容を明らかにすることで、長年明らかにされてこなかった「眠気」の実体を解明できる公算が高いと考えられる。本研究で特定された SIK3 の基質候補はいずれも SIK3 との関係も睡眠覚醒制御との関係もほとんど報告されていないタンパク質であり、現在ほとんど明らかにされていない睡眠覚醒制御の分子機構を明らかにする新たな手がかりとなる可能性が高い。

#### (3) 今後の展望

本研究で新規に特定された SIK3 の基質候補について、*in vitro* キナーゼアッセイや変異型マウスの作製・解析を通して、睡眠覚醒制御において SIK3 の基質として機能するタンパク質を特定する実験がすでに進行しており、この進行中の研究をもとに睡眠覚醒制御の分子機構を明らかにできる可能性は非常に高い。

睡眠は、記憶形成、感情調節、代謝、発達、老化といった様々な生命機構と関連することから、睡眠覚醒を制御する細胞内分子機構を明らかにすることで、生命科学における幅広い分野の研究の発展に寄与することが期待される。また、不眠は鬱病などの気分障害やメタボリック症候群などの様々な疾患のリスクを高めることが知られているため、本研究によって睡眠障害の治療薬開発の標的分子を明らかにすることは、睡眠障害と関連する疾患の治療の進歩におおいに貢献できる。

#### 引用文献

- (1) Funato, H. et al. Forward-genetics analysis of sleep in randomly mutagenized mice. *Nature* 539, 378-383 (2016)
- (2) Wang, Z. et al. Quantitative Phosphoproteomic Analysis of the Molecular Substrates of Sleep Need. *Nature* 558, 435-439 (2018)
- (3) Nishioka T. et al. Developing Novel Methods to Search for Substrates of Protein Kinases Such as Rho-kinase. *BBA* 1854, 1663-1666 (2015)
- (4) Sonntag T. et al. 14-3-3 Proteins Mediate Inhibitory Effects of cAMP on Salt-Inducible Kinases (SIKs) *FEBS* 285, 467-480 (2018)
- (5) Elliott A. S et al. A Review of Sleep Deprivation Studies Evaluating the Brain Transcriptome *Springerplus* (2014)
- (6) Diering G. H et al. Homer1a Drives Homeostatic Scaling-Down of Excitatory Synapses During Sleep *Science* 355, 511-515 (2017)
- (7) Brüning F. et al. Sleep-wake Cycles Drive Daily Dynamics of Synaptic Phosphorylation *Science* 366 (2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 北園 智弘、一久綾、松岡妙子、Wang Zhiqiang、船戸弘正、柳沢正史
2. 発表標題 恒常的睡眠・覚醒制御の細胞内分子メカニズムの解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kitazono T, Matsuoka T, Ikkyu A, Wang Z, Ma J, Funato H, Yanagisawa, M
2. 発表標題 Exploration of the intracellular molecular mechanisms for homeostatic sleep/wake regulation
3. 学会等名 The 7th Annual IIIS Symposium ~Solving the mystery of sleep~ (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----