

令和 6 年 4 月 25 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03291

研究課題名(和文)新規睡眠誘引遺伝子nemuriの作用機序の解明

研究課題名(英文)Analysis of a novel sleep-inducing gene, nemuri

研究代表者

戸田 浩史(Toda, Hirofumi)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教

研究者番号：80862010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：「睡眠」は、ヒトを含むあらゆる動物に保存されている高次の生理現象である。しかし、その本質的な意義やどのようにして調節されているのか、といった問いに対して、いまだに明確な答えがない。本基盤研究では、モデル生物であるキョウジョウバエを用いることで、分子遺伝学的な解析のみならず、生化学、行動学などの幅広い技術分野を横断的に取り入れながら研究を進める。特に、申請者が発見した新規睡眠誘引遺伝子「nemuri」に焦点を当て、Nemuriの分子機能を包括的に理解する基盤を整えることを目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

睡眠はあらゆる動物に備わった重要な生理現象である。睡眠が充足されないと、精神面を含む体の多くに不具合が生じ、多くの疾患になるリスクが増える。これほど重要な生理現象であるにもかかわらず、睡眠の本質的な機能や制御メカニズムは謎が多い。特に熱ショックや細菌感染によって引き起こされるストレス誘因性の睡眠はとても重要である。新規睡眠誘引因子Nemuriはストレス誘因性睡眠に重要であることが示されているため、Nemuriの分子作用メカニズムを理解することは、睡眠を理解する上で重要な手掛かりを与えてくれると期待できる。本研究を通じてNemuriの分子挙動や相互作用因子を同定する基盤を整えることができた。

研究成果の概要(英文)：Sleep is a fundamental physiological phenomenon conserved across animals, including humans to insects. However, it remains mysteries on its fundamental roles and molecular/cellular/neuronal mechanisms. In this foundational research B program, we will utilize the model organism, *Drosophila melanogaster*, and conduct interdisciplinary research incorporating a wide range of techniques including molecular genetics, biochemistry, and behavioral studies. In particular, I will focus on the novel sleep-inducing gene, 'nemuri', identified by myself, and aim to establish a comprehensive understanding of the molecular function of Nemuri.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：睡眠 遺伝学 ショウジョウバエ 生化学

1. 研究開始当初の背景

「睡眠」という行動は、ヒトを含むあらゆる動物に保存されている高次の生理現象である。しかし、その本質的な意義やなぜ進化の過程で保たれてきたのか、といった問いにはまだ明確な答えがない。また、睡眠がどのようにして調節されているのか、その生理的な機能だけでなく、そのメカニズムも十分に理解されていない。

一般的に、睡眠は「体内時計」と「恒常性」という2つのメカニズムによって調節されていることが知られている。体内時計の分子メカニズムについてはかなり理解が進んでおり、その成果が2017年のノーベル医学・生理学賞にもつながった。一方、「恒常性」の分子・神経メカニズムに関して、ほとんど解明されていない。

ショウジョウバエは、分子遺伝学の研究において非常に有用なモデル生物で100年を超える遺伝学の蓄積がある。約20年前にショウジョウバエが睡眠に似た行動を示すことが報告されて以来、多くの研究グループが睡眠に関わる遺伝子を同定してきた。しかし、これらの遺伝子の変異体は、睡眠を試みるもののすぐに覚醒してしまい、睡眠を維持できないという特徴を持っている。このことから、これまで同定された遺伝子は本来、「覚醒系」を制御する役割を持ち、睡眠の「恒常性」そのものには直接関与していない可能性があると考えられる。

そこで、申請者は睡眠とよぶには、以下3つの基準をすくなくとも満たさないといけないと考えた。1) 遺伝子の機能が上がると、個体の睡眠が誘導される(誘導)、2) 遺伝子の機能が低下すると、睡眠の質や長さが低下する(必要性)、3) 個体の睡眠圧が高まると、その遺伝子の活性化または発現が増加する(相関)である。しかし、これまでの研究で同定された遺伝子の中で、この基準に当てはまるのは2)の睡眠の必要性だけであった。

そのため、申請者は真に睡眠に重要な役割を果たす遺伝子を特定するため、ショウジョウバエを用いて遺伝子一つ一つ神経系で発現させる「機能獲得型」のスクリーニングを無作為、及びゲノム規模でおこなった。このスクリーニングでは、12,000以上のショウジョウバエの系統を対象に睡眠行動検定法を用いて、スクリーニングを行った結果、睡眠を強く誘引する新規遺伝子である“*nemuri*”を同定することに成功した。

Nemuri は分泌型ペプチドであり、カルボキシ末端に特徴的なアルギニン(R)とグリシン(G)の反復配列があり、タラ由来の *Cathelicidin* と相関性があることが判明した。*Cathelicidin* は「抗菌ペプチド」であることから、*Nemuri* も抗菌活性を持つことが予想され、実際に抗菌活性があることを示した。さらに、*nemuri* 遺伝子を欠損させる個体を CRISPR/Cas9 技術によって作製し、睡眠を計測することとした。哺乳動物が細菌感染などによって病気になると睡眠が深く長くなることが知られているが、ショウジョウバエも同様で、細菌感染後に睡眠が誘導される。しかし、*nemuri* 変異体では細菌感染依存的な睡眠がほとんど見られないことを明らかにした。さらに、個体の睡眠圧を上昇させる操作、感染や断眠後に *nemuri* 遺伝子の発現が誘導されることを見出した。

以上の結果から、*nemuri* は睡眠の「誘導」、「必要性」、「相関」のすべてを満たす睡眠遺伝子であることが示されただけでなく、上記の研究結果から、*Nemuri* が睡眠と生体防御をつなぐ重要な分子基盤である可能性が高いことが示唆された。

しかしながら、*Nemuri* が1) 細胞内でどのように振る舞い、2) 他のどのような因子と相互作用し、3) 最終的に睡眠を誘導するのか、という分子メカニズムに関する重要な課題がまだ解明されていない。

2. 研究の目的

そこで、以上の課題に取り組むために、以下の3つのプロジェクトを本申請で実施した。

1. *Nemuri* の *in vitro* での分子挙動を解析するためタンパク質の精製および *in vitro* 物性検定系の確立をする
2. *Nemuri* と相互作用するタンパク質を同定するための遺伝学的ツールを確立する
3. *nemuri* の下流のシグナルカスケードを同定するための遺伝学的ツールを開発する

これらの課題に取り組むことで、*nemuri* が引き起す睡眠の分子メカニズムを解明するだけでなく、睡眠の生理学的意義にも迫ることができると考えられる。なぜなら、*Nemuri* のような抗菌ペプチドをコードする遺伝子は、自然免疫系の一部として脊椎動物にも保存されているからである。しかし、自然免疫系で機能する遺伝子と睡眠がどのように相互作用しているのかは、よく理解されていない。上記の *nemuri* の研究プロジェクトを推進することで、睡眠が果たす重要な役割を分子レベルで説明できることが期待される。

3. 研究の方法

上記の研究目的を達成するために、生化学、遺伝学、行動学など、異なる分野の学際的な手法を活用し、異分野の研究者との積極的な共同研究を推進しながら、様々な角度から研究をおこなう。

- (1) 生化学的手法： *Nemuri* タンパク質を精製し液-液相分離実験をおこなう。
- (2) 遺伝学的手法： 分子生物学的手法を用いて特定の遺伝子に改変を加えたプラスミドを作製し、キイロショウジョウバエの卵にインジェクションすることで、遺伝子組み換え体の作出をおこ

なう。必要に応じて、CRISPR/Cas9 技術を用い、特定の遺伝子に対してターゲティングをおこなう。

(3)行動学的手法：ショウジョウバエの睡眠を計測するため、市販されている DAM システム (Trikinetics 社)を用い、キイロショウジョウバエを一匹だけチューブにいれ、DAM システムに装着し、恒温槽にて明暗サイクル(12-12)下で温度(25 度)が制御された状態で活動を計測する。睡眠判定として、良く用いられている指標(活動がない状態が 5 分かそれ以上)を用いて、睡眠時間を計測する。

4. 研究成果

(1) *in vitro* で液-液相分離実験に用いるために必要な Nemuri タンパク質を、大腸菌を用いて大量かつ安定的に調製・精製する系の確立をおこなった。Nemuri は抗菌活性を持つため、大腸菌内で発現するのに非常に困難を極めたが、菌を殺さないように Nemuri を発現するため、Nemuri に大きいタグを付加し、低温、且つ低濃度の IPTG 誘導体を大腸菌に添加することで、大量に Nemuri を発現させる条件を見出すことに成功した。その後、タグを切断し、精製するためにイオン交換カラムを用いることで、非常に精製度が高い Nemuri タンパク質を大量に調製することに成功した。

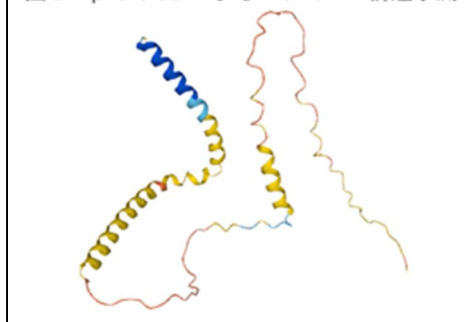
また、Nemuri 配列の特徴として、カルボキシ末端側に多くの R と G アミノ酸配列が存在する(図 1)。これらの RGG 繰り返し配列をもつタンパク質は、これらの特徴的なアミノ酸配列は Nemuri の機能に重要な役割を果たしている可能性があるため、Nemuri AGG 変異体に対してもタンパク質精製を試み成功した。

図1 Nemuriの全長のアミノ酸配列

```
MSAKYTLIFALAALCCLVLFSTEEAAQQRSLVLS  
SRRGSELVEKTSNDKEDSELAQEQDLERQ  
EQEEQNDRLEGRSDDVAEGSDNKEDKETAT  
NNKDTIVKPNKDDARARRIVRAGRRRGGRR  
GGRRGGRRSARKSVRRGGRRGGRRGGRR  
GRGGARRRTSVKRRSGKGNKA
```

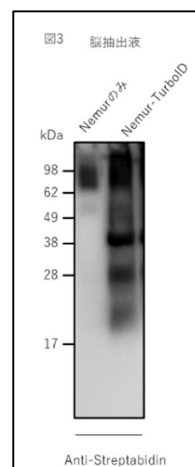
(2) Nemuri タンパク質は RGG 繰り返し配列を有するが、このようなタンパク質は天然変性タンパク質であることがわかっている。実際に構造予測をしたところ、確かに特定の形を取らない天然変性タンパク質であることが判明した(図 2)。天然変性タンパク質は液-液相分離をすることが知られているので、精製した Nemuri タンパク質を用いて液-液相分離実験をおこなった。上記の(1)で精製した Nemuri を用い、温度、塩濃度、pH、分子クラウダ PEG 濃度の様々なパラメーターを振って条件検討し、Nemuri が試験管内で液-液相分離する条件を見出すことができた。特に生理条件下の温度、pH、塩濃度において相分離することを見出すことができた。一方で、Nemuri AGG 変異体では、液-液相分離による液滴形成能力が野生型の Nemuri と比較して著しく減少していることを確認した。これはカルボキシ末端の RGG の繰り返しが液滴形成に重要であることを示している。

図2 AlphaFold2 による Nemuri の構造予測



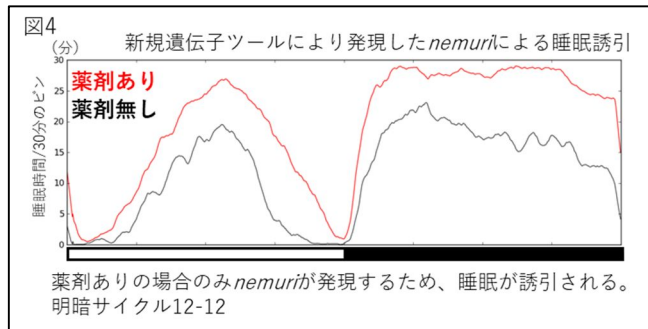
(3) Nemuri AGG 変異体を脳神経系で発現させるために、Nemuri AGG 変異体をクローニングし、遺伝子組み換えショウジョウバエの作出をおこなった。Nemuri AGG 変異体を脳神経系で成虫に特異的に発現したところ、Nemuri 野生型とは異なり、Nemuri AGG 変異体では睡眠を誘引する能力がほぼ消失していることを見出した。さらにすべてのカルボキシ末端の R を A に変異を入れた all A 変異体をクローニングし Nemuri all A 変異体を発現する遺伝子組み換え体も作出した。脳神経系で成虫特異的に発現したところ、予想通り、睡眠誘引能力は完全に消失することを確認した。

(4) 脳神経細胞において Nemuri と相互作用する因子の同定のため、キイロショウジョウバエの脳神経系特異的に Nemuri と TurboID(ビオチンリガーゼ)を付加した Nemuri-TurboID の遺伝子組み換えショウジョウバエを作出した。さらに、この Nemuri-TurboID が睡眠誘引能力を維持していることを確かめるため、Nemuri-TurboID を脳神経系・成虫特異的に発現したところ、睡眠を誘引することを確認した。このことから、Nemuri-TurboID は本来の Nemuri の睡眠誘引能力を維持していることが判明した。次に、Nemuri-TurboID がハエの脳神経系で発現させた際、ビオチンリガーゼとして機能をすることを確かめるため、ハエの頭から用意した抽出液をストレプトアビジン抗体で Western blotting した。その結果、ハエの細胞内に存在する内在性のタンパク質に対してビオチン化をしていることを生化学的に確認することに成功した(図 3)。このことから、Nemuri-TurboID はビオチン化酵素としてハエの脳内で確かに機能することを見出した。並行して、脳内で TurboID だけを発現するショウジョウバエの系統の作出、及び、Nemuri のカルボキシ末端の RGG 繰り返し配列に変異を入れた Nemuri AGG 変異体に TurboID を付加するショウジョウバエ



の遺伝子組み換え体も同時に作出した。これにより、睡眠誘引に重要な *Nemuri* 野生型に特異的に相互作用する因子を同定するための基礎的な実験基盤を打ち立てることに成功した。

(5) *Nemuri* が引き起す睡眠誘引の分子・神経カスケードを明らかにするため、新たな遺伝学ツールの開発をおこなった。まず、*Nemuri* を Q システムで発現させるため *QUAS-nemuri* のクローニングし、遺伝子組み換え体の作出をした。次に、脳神経系・成虫特異的に *nemuri* を発現するため、Q システムの転写因子である QF に改良を施し、餌に薬剤を含ませたときのみ QF が *QUAS-nemuri* の下流の *nemuri* を発現するよう分子設計をおこなった。そして、これをすべての脳神経系で発現するプロモーターの下流につないだ遺伝子組み換え体の作出をおこなった。さらに、この遺伝子組み換え体と *QUAS-nemuri* を掛け合わせたところ、薬剤の存在下でのみ、*nemuri* を発現させることに成功し、且つ、睡眠を誘引する系の開発に成功した(図4)。このツールを用いることで、*nemuri* の下流に重要な因子及び神経網を探索する基盤を整えることができた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 戸田 浩史
2. 発表標題 睡眠誘引因子「Nemuri」の物性の理解へ向けて
3. 学会等名 生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸田 浩史
2. 発表標題 ストレスによって誘因される睡眠の分子メカニズム ~新規睡眠誘引因子“Nemuri”の作用機序の解明~
3. 学会等名 蛋白質学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 戸田 浩史
2. 発表標題 細胞質ゾーニングが駆動する睡眠誘引メカニズム
3. 学会等名 生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 戸田 浩史
2. 発表標題 新規睡眠誘因遺伝子 “nemuri” の発見
3. 学会等名 日本疲労学会（招待講演）
4. 発表年 2020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
研究 分担 者	白木 賢太郎 (Shiraki Kentaro) (90334797)	筑波大学・数理物質系・教授 (12102)	2020年度及び2021年度のみ

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		
米国	University of Pennsylvania		