

寝ても寝ても眠いマウスの脳内メカニズム
～単一遺伝子の単一アミノ酸が、1日の睡眠時間と睡眠要求量・眠気を制御する～

研究成果のポイント

1. ゲノム編集技術により、リン酸化^{注1}の修飾を受ける *Sik3* 遺伝子の 551 番目のアミノ酸を置換したところ、ノンレム睡眠時間が延長、睡眠要求量が増加する過眠症マウスが作製されました。
2. リン酸化修飾を受けるたった1つのアミノ酸が、日々の正常な睡眠時間や睡眠要求量（眠気）を恒常的に保つ上で不可欠な役割を担っていることが明らかになりました。
3. 睡眠・覚醒制御の分子ネットワーク解明への糸口となる情報が得られました。未だ原因不明の睡眠障害「特発性過眠症^{注2}」などの分子メカニズム解明が進むことが期待されます。

筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構（WPI-IIIS）の本多隆利（研究当時、大学院生/日本学術振興会特別研究員DC1）、船戸弘正客員教授、柳沢正史機構長/教授らの研究グループは、遺伝子組換えマウスを用いた睡眠解析により、1日の睡眠時間と睡眠要求量（眠気）をコントロールする上で欠かせない単一遺伝子の単一アミノ酸を同定しました。

ヒトが一生涯の1/3を費やす「睡眠」は、誰もが日々行なう行動でありながら、未だにその役割や制御メカニズムは謎に包まれています。とりわけ「眠気」の脳内での物理的実体や、日々の睡眠量を一定に保つ根本原理は未解明です。本研究では、ゲノム編集技術 CRISPR/Casシステム^{注3}を用いて、リン酸化修飾を受ける *Sik3* 遺伝子の551番目のアミノ酸セリン（S551）を別のアミノ酸に置換したところ、マウス個体においてノンレム睡眠時間が大幅に延長し、さらに睡眠要求量（眠気）の指標であるノンレム睡眠時の徐波（デルタ波）量^{注4}が顕著に増加しました。本成果は、リン酸化酵素SIK3タンパク質の単一アミノ酸S551が、1日の睡眠時間と眠気を決定づける上で不可欠な構成要素であることを示しています。分子レベルでは、他のタンパク質からリン酸化修飾を受けるS551の置換や欠損により、SIK3と他のタンパク質との相互作用や結合が変化することが明らかになりました。このアミノ酸は線虫、ショウジョウバエ、マウス、ヒトまで進化的に広く保存されており、生物種を超えて睡眠・覚醒制御の中核を担うことが示唆されます。

本研究で樹立された過眠症モデルマウスが示す睡眠様態は、長時間の睡眠時間を確保しているにも関わらず、日中の眠気が軽減されない「特発性過眠症」の病態に共通しており、これら未だ原因不明の睡眠障害の分子メカニズムの理解に貢献できると期待されます。

本研究は、筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構（WPI-IIIS）、東邦大学、米国・テキサス大学サウスウェスタン医学センター、筑波大学生命科学動物資源センターによる共同研究として行なわれました。

本成果は、「米国科学アカデミー紀要（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)）」オンライン版にて、9月24日米国時間午後3時（日本時間9月25日午前4時）に先行公開されます。

本研究は、文部科学省/日本学術振興会 世界トップレベル研究拠点プログラム (WPI)、博士課程教育リーディングプログラム、日本学術振興会 科研費 (#15J06369, #26220207, #17H06095, #17H04023, #16K15187, #15H05942)、FIRST、科学技術振興機構 CREST (#JPMJCR1655)、上原財団、武田財団の支援により行われました。

研究の背景

ヒトが一生の1/3を睡眠に費やしています。誰もが日々行なう行動でありながら、睡眠の役割や制御メカニズムは未だに謎に包まれています。とりわけ「眠気」の脳内での物理的実体や、日々の睡眠量を一定に保つ根本原理は未知のままです。

著者らの研究グループは最近、ランダムな突然変異を導入した多数のマウスをスクリーニングする「フォワード・ジェネティクス」の手法を採用し、覚醒時間が大幅に減少する *Sleepy* 変異家系を見出し、責任遺伝子である *Sik3* 遺伝子を同定しました。*Sik3* 遺伝子が翻訳されて作られる SIK3 タンパク質はリン酸化酵素として働き、リン酸化修飾をリレーのバトンのようにして、他の分子からバトンを受け取り、次の分子にシグナルを伝えます。*Sleepy* 変異家系では、*Sik3* 遺伝子の13番目のエクソン(翻訳配列)が欠損していました。そこで、この欠損されたエクソンの内部に睡眠・覚醒の制御に関わる因子があるという仮説を立てました。*Sik3* 遺伝子の13番目のエクソンは52個のアミノ酸から構成されていますが、これら52個のアミノ酸のうち、マウス個体においてどのアミノ酸が直接的に睡眠・覚醒制御に関わるのか、どのようなシグナル伝達系が正常な睡眠・覚醒制御に重要なのかは不明でした。

そこで本研究では、PKA(プロテインキナーゼA)という別のリン酸化酵素からリン酸化修飾を受ける SIK3 の551番目のセリン(S551)に注目しました。S551は *Sleepy* 変異家系で欠損していたエクソン13内に位置すること、また、線虫やショウジョウバエなどの無脊椎動物から、マウスやヒトなど脊椎動物まで広く生物種に共通して保存されているアミノ酸であることから、進化的に重要な役割を担っていると考えられます。

研究内容と成果

本研究では、ゲノム編集技術CRISPR/Casシステムを用いて、*Sik3* 遺伝子S551を別のアミノ酸に置換する変異をマウス個体に導入することで、リン酸化のターゲット部位であるS551と睡眠・覚醒行動との関連性を検証しました。PKAはセリンやスレオニンを認識してリン酸化修飾を行うことから、SIK3のPKA認識部位S551のセリン(S)をアラニン(A)に置換した *S551A* 変異マウス家系、セリン(S)をアスパラギン酸(D)に置換した *S551D* 変異マウス家系を作製しました。これらマウス各個体について、脳波・筋電図(EEG・EMG)測定をすることで睡眠・覚醒行動を評価しました。

その結果、*S551A*・*S551D*家系ともに同腹の野生型マウスに比べ、24時間を通じて顕著な覚醒時間の減少、ノンレム睡眠時間の延長がみられました(図1A・B)。マウスは夜行性であることから、同腹の野生型マウスでは暗期での覚醒時間が長いのにに対し、*S551A*・*S551D*家系では特に暗期において、覚醒時間の減少、ノンレム睡眠時間の延長が著しいことが明らかとなりました(図1A・B・C)。マウスの脳波は覚醒からノンレム睡眠に移行すると0.5~4Hz周波数帯の徐波(デルタ波)が大部分を占めるようになります。徐波(デルタ波)量は睡眠遮断をすることで顕著に高まることから、睡眠要求量(眠気)を反映し、睡眠負債に深く関わっているとされています。脳波スペクトル解析^{注4}の結果、*S551A*・*S551D*家系において、24時間を通じて顕著なノンレム睡眠時の徐波(デルタ波)量の増大が見られました(図1D)。これらの結果は、*S551A*・*S551D*マウス家系では睡眠時間が延長しているだけでなく、常に睡眠要求量

(眠気)が高く、日中をかけて眠気に晒されていることを示します。本研究により、SIK3 の S551 が 1 日の睡眠量・睡眠要求量を決定する上で不可欠な役割を担っていることが明らかになりました。

S551A・*S551D*・*Sleepy* 変異家系の 3 系統における一貫した覚醒時間減少・睡眠時間延長の表現型について、細胞レベルでの分子機序を明らかにするために、*S551A*・*S551D*・*Sleepy* (S551 を含むエクソン 13 欠損型)・野生型 *Sik3* の全 4 種類に HA タグを付けた遺伝子発現プラスミドベクターを作製しました。それらを発現させた培養細胞サンプルを用いて HA 抗体での免疫沈降法、多種の抗体を用いたウェスタンブロッティング法により、S551 部位の置換・欠損に伴い、結合パターンの異なる分子の同定を進めました。その結果、PKA のリン酸化基質に結合する抗体を用いると、野生型 SIK3 でのみ結合が確認され、変異型の 3 系統では共通して PKA からの認識が減弱していました。さらに、蛋白質のリン酸化/脱リン酸化や標的タンパク質の細胞内局在に関わる 14-3-3 タンパク質においても、3 系統の変異型 SIK3 においては、共通して結合が失われていました。3 系統で共通した結合パターンは過眠の表現型と一貫しています (図 2)。これらの結果は、S551 の置換・欠損により SIK3 の基質特異性や細胞内局在に異常が生じている可能性を示唆します。合わせて、正常な睡眠・覚醒制御には、PKA/SIK3/14-3-3 を介したシグナル伝達が重要な役割を担うことを示唆しています (図 2)。

今後の展開

本成果は、細胞内のシグナル伝達系と個体レベルの睡眠・覚醒行動を繋ぐ発見です。その中核として SIK3 タンパク質のリン酸化部位 S551 アミノ酸を介したリン酸化カスケードが重要であることを示しました。今回の研究成果を糸口に、SIK3 と PKA や 14-3-3 との相互作用に加えて、SIK3 の上流や下流で機能する分子の同定、より詳細な睡眠・覚醒制御の分子ネットワークの解明が進むことが期待されます。

さらに、本研究で新たに樹立された過眠症モデルマウスが示す睡眠様態は、長時間の睡眠時間を確保しているにも関わらず、日中の眠気が軽減されない「特発性過眠症」の病態に共通しており、これら原因不明の睡眠障害の分子メカニズムの理解に貢献できると期待されます。

用語解説

注 1) リン酸化

高エネルギーリン酸結合をもつアデノシン三リン酸 (ATP) などの分子から、ターゲットとなる分子にリン酸基を転移する化学反応。生体内にある蛋白質はリン酸化されることによって、構造の変化が起こり、その機能のオン・オフあるいは強・弱が切り替わる。細胞周期、増殖、アポトーシス、シグナル伝達経路など細胞の多くの機能を調整する上で重要な役割を果たす。

注 2) 特発性過眠症 (とくはつせい かみんしょう)

日中の耐えがたい眠気を来す疾患で、長時間の睡眠や仮眠では解消されない過度の眠気を伴う。睡眠時間の延長 (10 時間以上) などが症状として挙げられる。情動脱力発作 (カタプレキシー) を伴わないなど、ナルコレプシーの診断基準には当てはまらず、原因不明の睡眠障害とされている。治療法も確立されていないため、病理の解明が求められている。

注 3) CRISPR/Cas システム

細菌や古細菌においてウイルスなどの侵入物を排除するための適応免疫システム。これを遺伝子工学分野に応用し、DNA 二本鎖を切断することでゲノム上の任意の配列を欠失、置換、挿入など施すことができる最新のゲノム編集技術。

注4) 徐波（デルタ波）量

脳波はフーリエ変換によって周波数成分に分解することができる。周波数ごとの強さを定量的に求める処理をスペクトル解析という。このうち、デルタ波（0.5~4 Hz）帯域成分の量は徐波量（デルタパワー）と呼ばれる。徐波量はノンレム睡眠中に優位になり、入眠前の覚醒時間が長いと入眠後に増大し、睡眠遮断によっても高まることから、睡眠負債との関係性を示唆されている。

参考図

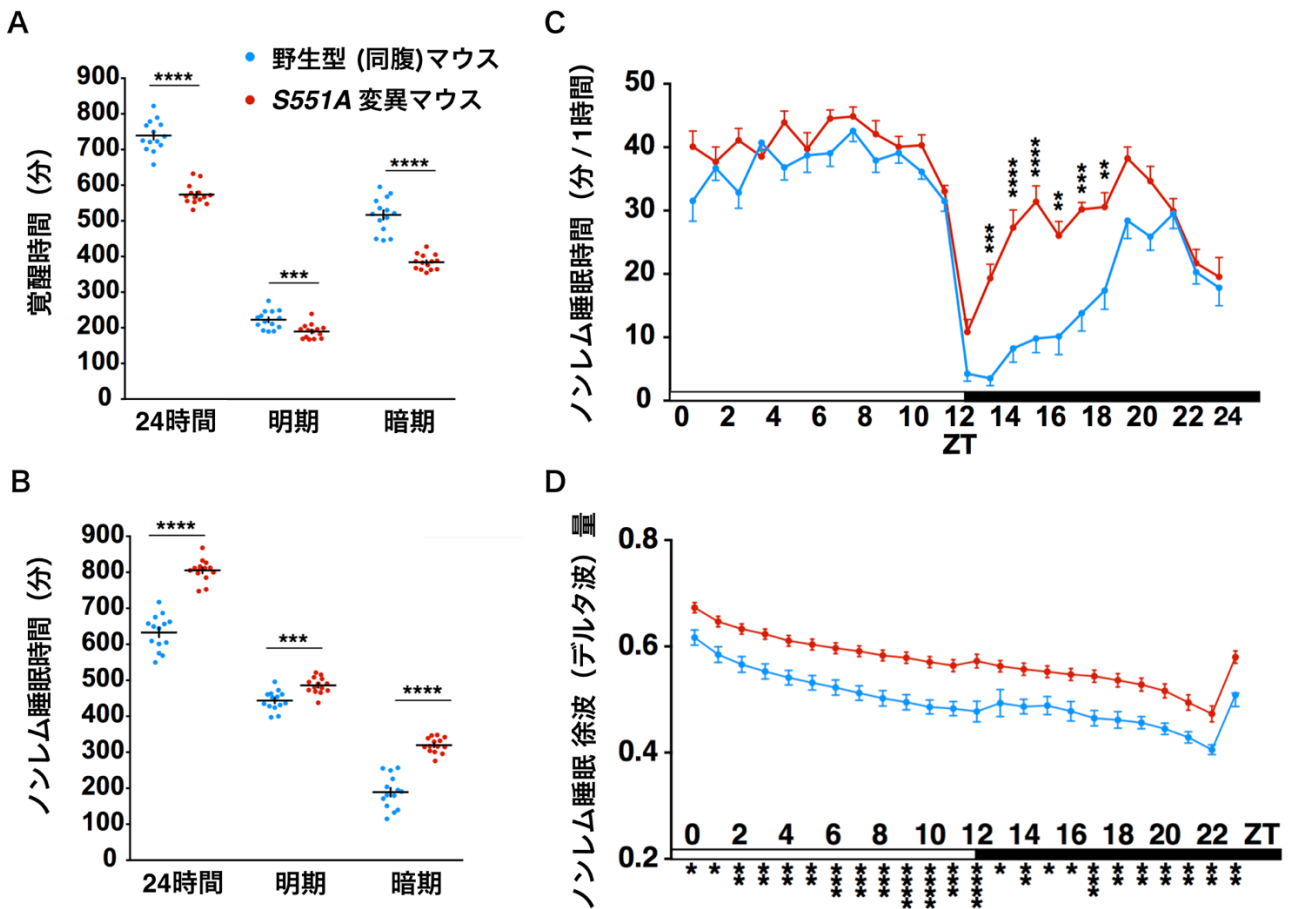


図 1. *S551A* 変異マウスは野生型マウスに比べて顕著に (A) 覚醒時間が減少し、(B) ノンレム睡眠時間が増加していた。(C) 1時間ごとのノンレム睡眠時間を示した。野生型に比べて、*S551A* 変異マウスは暗期のノンレム睡眠時間が増加している。(D) *S551A* 変異マウスでは、睡眠要求量（眠気）の指標であるノンレム睡眠時の徐波量が 24 時間を通じて増大していた。*S551D* 変異マウスの睡眠表現型も *S551A* 変異マウスと同様の傾向にある。

$n = 14$ for each genotype. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, Two-tailed unpaired t-test / two-way repeated measure ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. Data are mean \pm s.e.m.

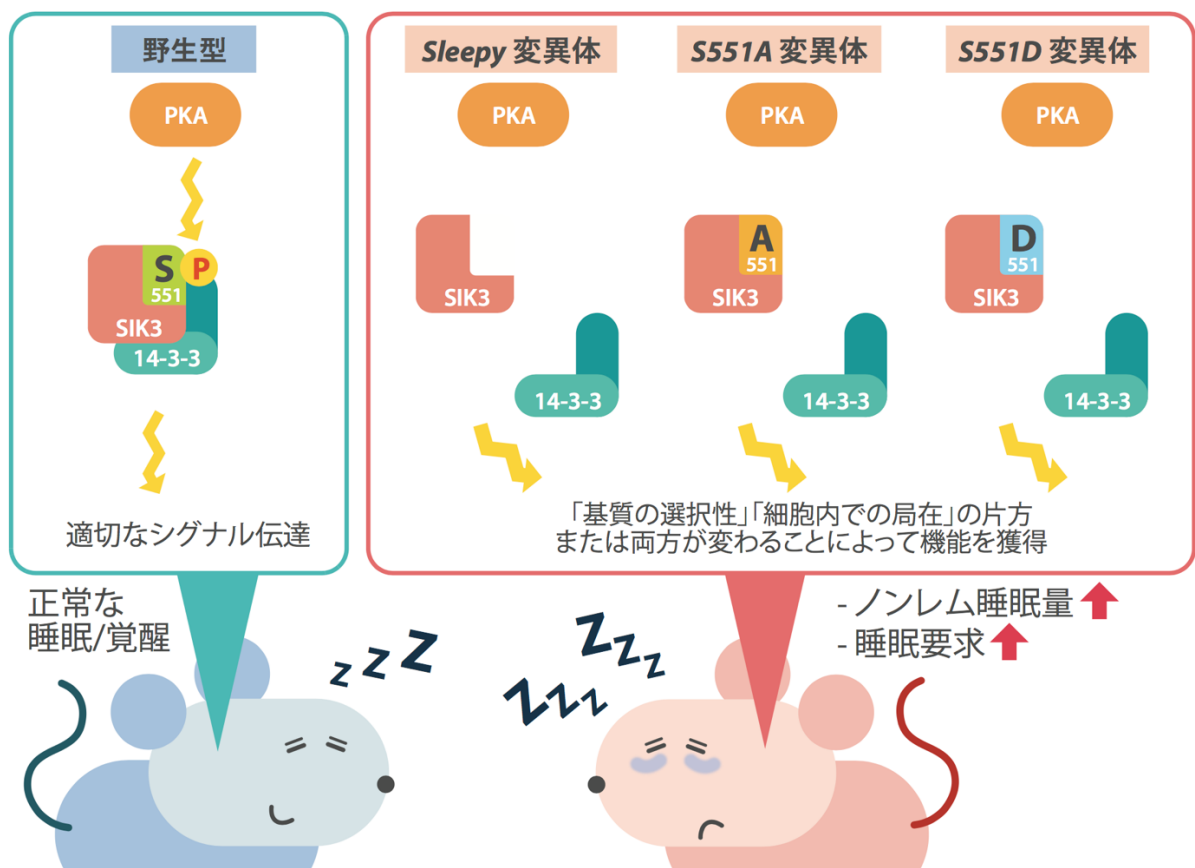


図2. 正常な睡眠/覚醒の制御には SIK3 のアミノ酸 S551 を介したリン酸化シグナル伝達が不可欠。*S551A*・*S551D*・*Sleepy* (S551 を含むエクソン 13 欠損型) の 3 系統の変異型 SIK3 タンパク質では、リン酸化酵素 PKA からの認識が減弱し、標的タンパク質の細胞内局在を司る 14-3-3 タンパク質との結合が失われる。その結果、SIK3 の基質特異性や細胞内局在が変化し、過眠の表現型に至ると示唆される。SIK3 の S551 が 1 日の睡眠量や睡眠要求量 (眠気) を規定する上で重要な役割を担っている。

掲載論文

- 【題名】 A single phosphorylation site of SIK3 regulates daily sleep amounts and sleep need in mice (SIK3 の単一リン酸化部位が 1 日の睡眠時間と睡眠要求量を制御する)
- 【著者名】 Takato Honda, Tomoyuki Fujiyama, Chika Miyoshi, Aya Ikkyu, Noriko Hotta-Hirashima, Satomi Kanno, Seiya Mizuno, Fumihiko Sugiyama, Satoru Takahashi, Hiromasa Funato and Masashi Yanagisawa
- 【掲載誌】 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* (米国科学アカデミー紀要)
DOI: 10.1073/pnas.1810823115

問い合わせ先

筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構 (WPI-IIIS) 広報連携チーム
住所 〒305-8575 茨城県つくば市天王台1-1-1 睡眠医科学研究棟
E-mail wpi-iiis-alliance@ml.cc.tsukuba.ac.jp
電話 029-853-5857