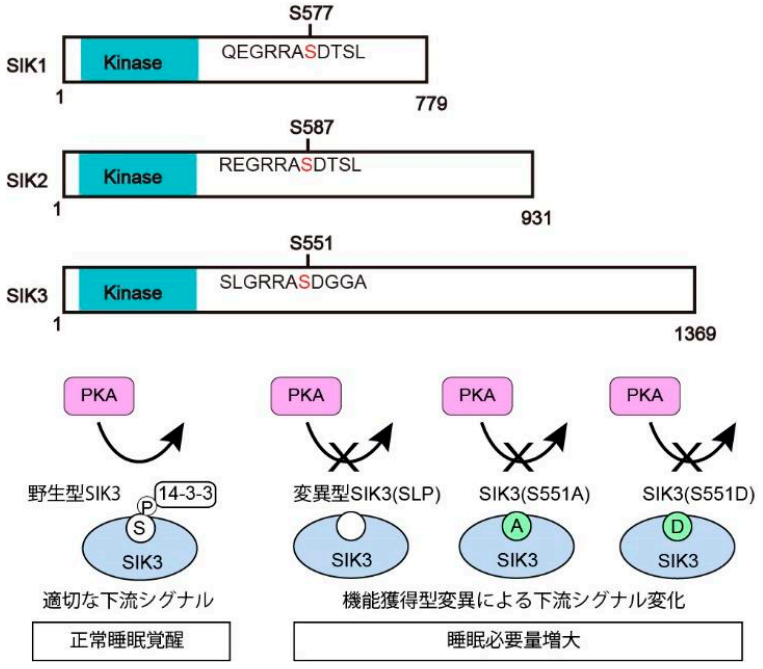
51　睡眠覚醒制御の細胞内シグナル伝達系の解明	船戸　弘正

【目的】睡眠の恒常性維持や睡眠覚醒状態を切り替える分子機構は明らかではない。研究代表者らはマウスを用いた睡眠のフォワードジェネティクス研究によって、睡眠の恒常性維持や睡眠量を決定に深く関与する分子としてリン酸化酵素 SIK3 を同定した。SIK3 は SIK（salt-inducible kinase）ファミリーを構成する。しかし、SIK3 に代表される SIK ファミリーがどのような機構によって個体の睡眠量を増加させているのかは不明である。インフレームの点突然変異によってスプライス異常が生じ、途中を欠失した変異型 SIK3 蛋白が産生される。SIK ファミリーは C 末側の構造には多様性があるものの、N 末にあるキナーゼドメインと、中間部にあるプロテインキナーゼ A（PKA）リン酸化部位はよく保存されている。変異型 SIK3 蛋白は PKA リン酸化部位を欠失することから、PKA-SIK が睡眠覚醒制御の細胞内シグナルを構成していることが推測される。本研究では、マウス個体および細胞を用いて SIK ファミリー蛋白質が睡眠覚醒を制御する分子機構の理解を深めることを目的とした。

【方法】Cre を発現するアデノ随伴ウイルスを作製し、脳定位固定装置およびキャピラリーを用いて脳内局所にウイルスを投与した。FLAG タグを付加した SIK を発現するアデノ随伴ウイルスベクターも調整した。睡眠覚醒は脳波筋電図に基づいて検討した。HEK293 細胞を用いて Cre を発現するアデノ随伴ウイルスを作製した。FLAG タグを付加した SIK1、SIK2、SIK3 および SIK1（S577A）、SIK2（S587A）、SIK3（S551A）を pcDNA3 に組み込んだ発現ベクターを、FuGENE を用いて HEK293 にトランスフェクトした。ホモジネートから FLAG 抗体を結合させたビーズを用いて免疫沈降を行った。

【結果】SIK3 S551 に相当するアミノ酸は、SIK1 S577 および SIK2 S587 である。このセリン残基をアラニン置換した SIK1（S577A）、SIK2（S587A）、SIK3（S551A）蛋白はいずれも PKA リン酸化認識抗体の反応性が大きく低下し共沈する 14-3-3 の量が大きく減少した。AAV ベクターを視床下部に局所投与することにより部位特異的に変異型 SIK3 を発現させ、脳波筋電図に基づき睡眠覚醒行動を検討した。コントロールベクターを投与したマウスも未処理のマウスに比べるとわずかにノンレム睡眠量が増加する傾向が見られた。AAV ベクターは視床下部の各部位に局所投与した。ノンレム睡眠量が増加する部位を見出し詳細な検討を進めている。

SIK ファミリーによる睡眠制御シグナル



51. 睡眠覚醒制御の細胞内シグナル伝達系の解明

船戸　弘正

東邦大学 医学部 解剖学講座

Key words：睡眠，SIK ファミリー，視床下部，14-3-3，リン酸化酵素

緒　言

ヒトは人生の 3 分の 1 を睡眠に費やす。睡眠はヒトの身体的、精神的な健康に不可欠な要素であり、慢性的な睡眠負債が様々な疾患のリスクを高める。睡眠はどの哺乳動物も示す行動であるが、睡眠に類似した行動は、哺乳類だけではなくショウジョウバエや線虫を含めた幅広い動物種に認められる。このような睡眠の重要性および普遍性にも関わらず、睡眠の恒常性維持や睡眠覚醒状態を切り替える分子機構は明らかではない。研究代表者らはマウスを用いた睡眠のフォワードジェネティクス研究によって、睡眠の恒常性維持や睡眠量を決定に深く関与する分子としてリン酸化酵素 SIK3 を同定した［1，2］。SIK3 は SIK（salt-inducible kinase）ファミリーを構成する［3］。しかし、SIK3 に代表される SIK ファミリーがどのような機構によって個体の睡眠量を増加させているのかは不明である。インフレームの点突然変異によってスプライス異常が生じ、途中を欠失した変異型 SIK3 蛋白が産生される。SIK ファミリーは C 末側の構造には多様性があるものの、N 末にあるキナーゼドメインと、中間部にあるプロテインキナーゼ A（PKA）リン酸化部位はよく保存されている。変異型 SIK3 蛋白は PKA リン酸化部位を欠失することから、PKA-SIK が睡眠覚醒制御の細胞内シグナルを構成していることが推測される。実際に SIK3 の PKA リン酸化セリン（S551）をアラニンに置換すると、ノンレム睡眠量が増加した［4］。このシグナルの明らかにすることができれば、睡眠の量と質を規定する分子機構の解明や新しい創薬ターゲットによる新規睡眠薬の開発につながると期待される。本研究では、マウス個体および細胞を用いて SIK ファミリー蛋白質が睡眠覚醒を制御する分子機構の理解を深めることを目的とした。

方　法

1. 動物実験

マウスを用いた動物実験は、東邦大学動物実験規定および筑波大学動物実験規程に従い実施した。10 週齢以上の雄マウス（遺伝的背景は C57BL/6J）を実験に使用した。

2. 睡眠解析

イソフルラン麻酔下でマウス頭蓋に 4 箇所穴を空け、脳波筋電図測定用の微小電極を頭蓋内及び頚筋に埋め込んだ。1 週間以上回復期間をおいた後、電極をテザーケーブルにつないだ。テザーケーブルはレバーアームに接続し、マウスはケージ内を自由に行動できる。脳波・筋電図の記録・解析は SleepSign（キッセイコムテック）および MatLab を用いた。

3. ウイルスベクター

Cre を発現するアデノ随伴ウイルスを作製した。脳定位固定装置およびキャピラリーを用いて脳内局所にウイルスを投与した。FLAG タグを付加した SIK を発現するアデノ随伴ウイルスベクターも調整した。

4. 細胞培養

HEK293 細胞を用いて Cre を発現するアデノ随伴ウイルスを作製した。FLAG タグを付加した SIK1、SIK2、SIK3 および SIK1（S577A）、SIK2（S587A）、SIK3（S551A）を pcDNA3 に組み込んだ発現ベクターを、FuGENE を用いて HEK293 にトランスフェクトした。ホモジネートから、FLAG 抗体を結合させたビーズを用いて免疫沈降を

行った。ウェスタンブロットの一次抗体には、各種の SIK 抗体、FLAG 抗体、14-3-3 抗体、PKA リン酸化モチーフ抗体、GAPDH 抗体を用いた。

結　果

1. SIK ファミリー蛋白質とその PKA 部位変異型蛋白質

Sleepy 変異型 SIK3 はエクソン 13 にコードされる 52 アミノ酸が欠失している。この 52 アミノ酸の中にプロテインキナーゼ A（PKA）リン酸化セリン残基である S551 がある。この SIK3 S551 に相当するアミノ酸は、SIK1 S577 および SIK2 S587 である。図 1 に示すように、このセリン残基をアラニン置換した SIK1 S577A、SIK2 S587A、SIK3 S551A 蛋白は、いずれも PKA リン酸化認識抗体の反応性が大きく低下し、共沈する 14-3-3 の量が大きく減少した。これは HEK293 での結果であるが、アデノ随伴ウイルスを用いてマウス脳に発現させた SIK 蛋白質についても同様の結果が得られた（未発表）。

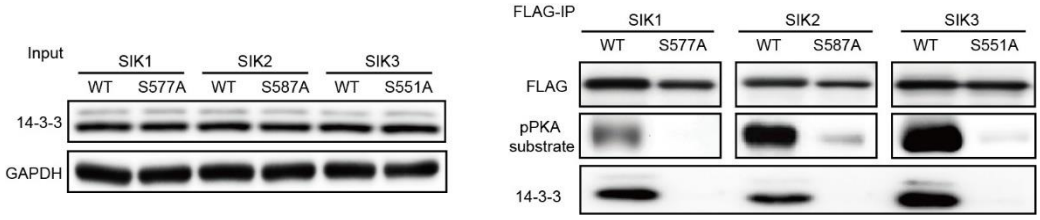


図 1. SIK ファミリー蛋白質とその PKA 部位変異型蛋白質

FLAG タグを挿入した野生型 SIK1、SIK2 および SIK3 と、PKA リン酸化部位をアラニン置換した SIK1（S577A）、SIK2（S587A）、SIK3（S551A）を HEK293 に発現させ、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った。左は免疫沈降のインプットであり、14-3-3 が同レベルに発現している。GAPDH はローディングコントロールである。右は免疫沈降後に行った western blot である。FLAG 抗体で検出される。PKA リン酸化認識抗体では、野生型 SIK1 は認識されるが SIK1（S577A）は検出されない。同様に、野生型 SIK2 および SIK3 は検出されるが、SIK2（S587A）および SIK3（S551A）は検出されない。野生型 SIK1、SIK2 および SIK3 は 14-3-3 と共沈するが、SIK1（S577A）、SIK2（S587A）および SIK3（S551A）は 14-3-3 と共沈しない。

2. 脳部位特異的変異型 SIK3 発現による睡眠覚醒変化

AAV ベクターを視床下部に局所投与することにより、部位特異的に変異型 SIK3 を発現させ、脳波筋電図に基づき睡眠覚醒行動を検討した。コントロールベクターを投与したマウスも未処理のマウスに比べるとわずかにノンレム睡眠量が増加する傾向が見られた。AAV ベクターは視床下部の各部位に局所投与した。再現性良くノンレム睡眠量が増加する部位を見出した。現在さらに詳細な検討を進めている。SIK3 発現ニューロンの同定には形態学的検討が必要であるが組織学的検討に適した抗体が無いため、*in situ* hybridization（ISH）による RNA 検出が必要であるがニューロン種の同定に必要な多重 ISH は技術的難易度が高く、最近開発された RNA scope は高価で使いにくい。この点を解決するため核酸を用いた新しいシグナル増強手法である HCR（hybridization chain reaction）を組織学的検討に応用した *in situ* HCR をさらに改良したシステムを開発した（図 2）。視床下部の多様なニューロン群のマーカーとして Penk などの検出や、短時間での多重 *in situ* HCR に成功した［5］。現在、この手法を用いて SIK3 の睡眠覚醒誘導ニューロンの詳細な解析を進めている。

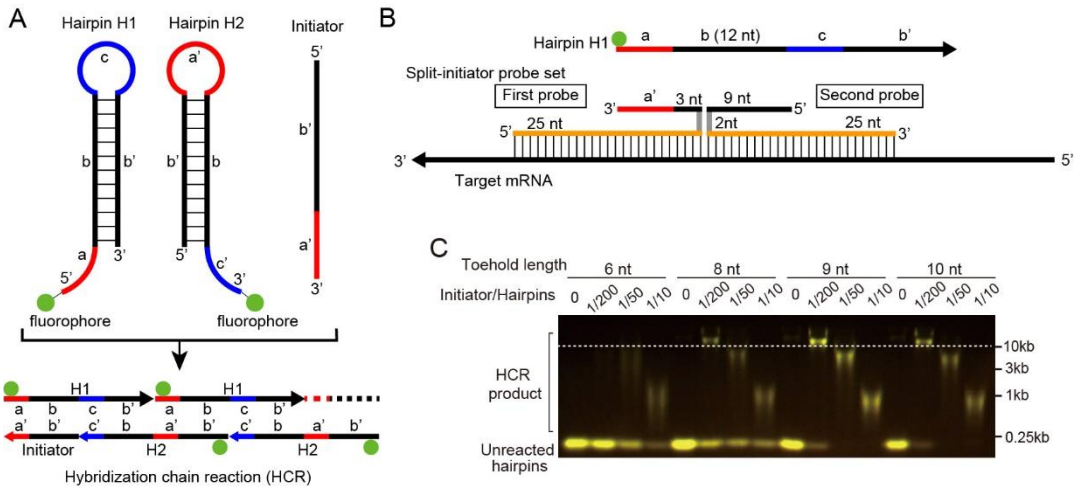


図 2. HCR（hybridization chain reaction）の条件検討

A） HCR のための 2 つの hairpin DNA である H1 と H2 および HCR をトリガーするイニシエーターのスキーム。プライムによって相補性を示した。つまり a と a'は相補的な塩基配列である。

B） A のイニシエーター配列を 2 つに分け、標的 RNA 認識配列を半分に分けたものと組み合わせた 1 対のスプリットイニシエータープローブによって、標的 RNA を可視化する。

C） より短い hairpin DNA 開発のため、異なるトウホールド長の hairpin DNA を用いた HCR の結果。10 kD 以上のバンドが良好な HCR を示す。

考　察

SIK3 に代表される SIK ファミリーは、高塩飲食によって副腎に誘導される分子として同定された。我々の検討では SIK1 や SIK3 は高塩食によって発現量は変化せず、SIK2 は副腎と肝臓で増加した。SIK3 ファミリーのなかで SIK3 は脳に豊富に発現しているのに対して、SIK1 および SIK2 の発現は少ない。今回示したように、SIK ファミリーに保存された PKA リン酸化部位をアラニン置換すると、その PKA リン酸化部位が SIK 蛋白の唯一の PKA リン酸化部位ではないにもかかわらず、PKA リン酸化部位認識抗体の反応性が激減した。また、14-3-3 との結合も大幅に減少する。これは培養細胞だけではなく、SIK3 については脳でも確認した結果である。実際に、未発表であるが SIK ファミリーの PKA リン酸化部位をアラニン置換したマウスの睡眠時間もしくは睡眠要求の指標とされるノンレム睡眠中デルタ波成分は増加した。このことからよく保存された PKA-SIK シグナル系が睡眠覚醒制御に重要な役割を果たしていることが示された。このシグナルの下流に眠気の物質的基盤となるリン酸化タンパク質群 SNIPPs が位置する[6]。このシグナル系は過眠以外の表現型にも関わっており、おそらく責任ニューロン集団が異なるのであろう。その表現型ごとの SIK シグナルの役割を明らかにするためにも、本研究で行ったような脳部位特異的な操作による検討が不可欠である。また SIK3 は脳内に広範囲に発現しているが、特定ニューロンでの役割を明らかにするためには、組織学的検討が必要になるが、今回開発した新しい手法によって SIK3 シグナルが睡眠量を変化させる場を同定することが今後の課題となる。

共同研究者・謝辞

本研究の主な共同研究者は東邦大学医学部解剖学講座微細形態学分野古部瑛莉子助教、恒岡洋右講師および筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構柳沢正史教授、三好千香助教、藤山知之助教である。東邦大学医学部解剖学講座微細形態学分野および筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構柳沢船戸研究室のメンバーに深謝いたします。

文 献

1) Funato H, Miyoshi C, Fujiyama T, Kanda T, Sato M, Wang Z, Ma J, Nakane S, Tomita J, Ikkyu A, Kakizaki M, Hotta-Hirashima N, Kanno S, Komiya H, Asano F, Honda T, Kim SJ, Harano K, Muramoto H, Yonezawa T, Mizuno S, Miyazaki S, Connor L, Kumar V, Miura I, Suzuki T, Watanabe A, Abe M, Sugiyama F, Takahashi S, Sakimura K, Hayashi Y, Liu Q, Kume K, Wakana S, Takahashi JS, Yanagisawa M. Forward-genetics analysis of sleep in randomly mutagenized mice. Nature. 2016 Nov 17;539(7629):378-383. Epub 2016 Nov 2. PMID: 27806374 DOI: 10.1038/nature20142

2) Funato H. Forward genetic approach for behavioral neuroscience using animal models. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2020;96(1):10-31. PMID: 31932526 DOI: 10.2183/pjab.96.002.

3) Sakamoto K, Bultot L, Göransson O. The Salt-Inducible Kinases: Emerging Metabolic Regulators. Trends Endocrinol Metab. 2018 Dec;29(12):827-840. Epub 2018 Oct 29. PMID: 30385008 DOI: 10.1016/j.tem.2018.09.007.

4) Honda T, Fujiyama T, Miyoshi C, Ikkyu A, Hotta-Hirashima N, Kanno S, Mizuno S, Sugiyama F, Takahashi S, Funato H, Yanagisawa M. A single phosphorylation site of SIK3 regulates daily sleep amounts and sleep need in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Oct 9;115(41):10458-10463. Epub 2018 Sep 25. PMID: 30254177 DOI: 10.1073/pnas.1810823115

5) Tsuneoka Y, Funato H. Modified in situ hybridization chain reaction using short hairpin DNAs. Frontiers in Molecular Neuroscience, in press, 2020. DOI: 10.3389/fnmol.2020.00075

6) Wang Z, Ma J, Miyoshi C, Li Y, Sato M, Ogawa Y, Lou T, Ma C, Gao X, Lee C, Fujiyama T, Yang X, Zhou S, Hotta-Hirashima N, Klewe-Nebenius D, Ikkyu A, Kakizaki M, Kanno S, Cao L, Takahashi S, Peng J, Yu Y, Funato H, Yanagisawa M, Liu Q. Quantitative phosphoproteomic analysis of the molecular substrates of sleep need. Nature. 2018 Jun;558(7710):435-439. Epub 2018 Jun 13. PMID: 29899451 DOI: 10.1038/s41586-018-0218-8