

ヒストンメチル化を介した睡眠要求の分子メカニズムの解明

張 沁悦 (筑波大学 生物学類)

指導教員：柳沢 正史 (筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構)

【背景と目的】

哺乳類の睡眠は、脳波 (electroencephalogram: EEG) および筋電図 (electromyography: EMG) に基づき、ノンレム睡眠 (non-rapid eye movement sleep: NREMS) とレム睡眠 (rapid eye movement sleep: REMS) に分類される。それぞれの特徴として、ノンレム睡眠は 4Hz 未満のデルタ波優位な EEG を示し、レム睡眠は 6~9Hz のシータ波優位な EEG と筋緊張消失を示す。

睡眠量が、覚醒時に蓄積する睡眠要求 (眠気) に応答して一定に保たれている仕組みを睡眠恒常性と呼ぶ。睡眠要求は覚醒時に増加し睡眠により解消される。一方で断眠後には、その反動で睡眠時間が長くなることが知られている。ノンレム睡眠時のデルタ波成分は、睡眠要求を反映する指標として考えられている。

これまで我々の研究室では、一細胞 RNA シーケンスを用いて、断眠マウスの大脳皮質における遺伝子発現変化を網羅的に解析し、睡眠要求の蓄積に応答する遺伝子群を同定した。そのうち、発現量が著明に増加する遺伝子群の上流エンリッチメント解析により、ポリコム抑制複合体 2 (PRC2) の中核を担う構成分子である *Ezh2* 遺伝子をマスター制御候補因子として同定した。PRC2 はヒストンタンパクのトリメチル化 (H3K27me3) を介して、エピジェネティックな転写抑制を行うことが知られている。

予備検討では、高効率な全脳感染を可能とする AAV-B10 と複数の shRNA を組み合わせ、神経細胞特異的な *Ezh2* の遺伝子発現抑制により、総覚醒時間減少とノンレム睡眠時のデルタ波成分の増加が誘導された。これらの予備検討の結果は、*Ezh2* 遺伝子がヒストンタンパクのトリメチル化を介して、睡眠要求の蓄積に応答する遺伝子群を制御し、睡眠恒常性の中核を担う可能性を示唆する。

本研究では、ヒストンタンパクのトリメチル化を亢進する変異型 *Ezh2* 遺伝子を神経細胞特異的に発現させることで、ヒストンメチル化の亢進による睡眠恒常性への影響を検討することを目的とする。

【方法】

1) プラスミド・AAV 作成

神経細胞特異的なプロモーター (hSyn) 下流で、野生型 *Ezh2* 遺伝子と P2A リンカー配列後に mScarlet 赤色蛍光タンパクを発現するプラスミドを用いた。PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kit を用いて、トリメチル化を亢進する点突然変異である W113C 変異と Y641F 変異を *Ezh2* 遺伝子に導入した (pAAV-hSyn-3xflag-Ez (W113C/Y641F)-P2A-mScarlet3: Ez-DMT 群)。

対象群として、hSyn プロモーター下流で mScarlet のみを発現するプラスミドを作成した (pAAV-hSyn-3xflag-mScarlet3: mScarlet 群)。

作成した発現カセットを持つベクタープラスミドとカプシドプラスミド (pUC-mini-iCap-B10) とヘルパープラスミドの 3 種類のプラスミドを AAVpro 細胞にトランスフェクションを行った。AAV 粒子を産生する細胞を収穫後、超遠心機を用いた密度勾配遠心法により AAV を精製した。

2) 電極手術

野生型 C57BL/6N マウス (7 週齢) を用いて、睡眠測定用 EEG/EMG 電極埋め込み手術を行った。EEG 測定電極部を脳表面に留置し、EMG 測定電極を背側頸部の筋肉内に挿入した。
(mScarlet 群: n=5, DMT 群: n=6)

3) 眼窩下静脈注射

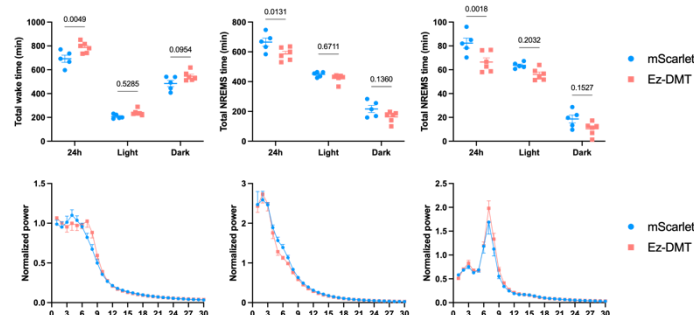
AAV-B10 カプシドの優れた特徴として、高効率に末梢静脈から血液脳関門を通過し、神経細胞への感染を可能とする。そのため、29 ゲージシリリングを用いて、眼窩下静脈叢から AAV 投与を行った。電極埋め込み手術からの回復期間として、1 週間後のマウスに対して、 5.0×10^{13} vg/ml に濃度を調節した AAV を一匹あたり $100 \mu\text{l}$ 投与した。

4) 睡眠計測・解析

AAV 眼窩下静脈叢投与から 2 週間後に、生理的条件下での睡眠・覚醒行動と、明期開始時から 6 時間の断眠後に、睡眠要求蓄積下での睡眠を測定した。20s エポックで睡眠判定を行い、解析した。

【結果】

図のように、mScarlet 群と比較して、Ez-DMT 群では総覚醒時間の増加を示し、総ノンレム睡眠時間と総レム睡眠時間の減少を示した。また、眠気の指標とされるノンレム睡眠時のデルタ波成分に著明な変化は見られなかった。



【考察・展望】

本実験では、*Ezh2* 遺伝子を介したヒストンメチル化の亢進により、総覚醒時間の増加が誘導されることが明らかになった。本結果は、予備検討での *Ezh2* の遺伝子発現抑制の結果と矛盾せず、*Ezh2* 遺伝子を介したヒストンメチルが睡眠制御に重要な役割を担う可能性が考えられる。

今後の展望として、免疫組織染色により AAV 由来の発現タンパクが広範な脳領域に発現が認められるか検証する必要がある。また、過去文献ではトリメチル化の亢進が報告されている W113C/Y641F 変異が、実際に神経細胞内 H3K27me3 を亢進しているかウェスタンブロッティング法により、検証を行う。