

SIK3-シャペロン結合の睡眠覚醒制御における役割の解明

小嶺 大樹 (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】

睡眠は無脊椎動物から脊椎動物まで、広範な動物群に共通する生理現象であり、脳と身体を健康に維持するために不可欠な役割を果たしている。しかしながら、睡眠覚醒制御の分子メカニズムの多くが未解明である。

これまでに我々の研究室では、ランダム変異導入マウスを用いて脳波および筋電図に基づく大規模なフォワードジェネティクススクリーニングを実施しており、睡眠と覚醒に関与する新たな遺伝子として Salt-inducible kinase 3 (*Sik3*) を同定した。*Sik3* 遺伝子の機能獲得型 *Sleepy* (*Slp*) 変異は、SIK3 タンパク質のエキソン 13 の欠失を引き起こし、ノンレム (non-REM) 睡眠時間の増加、睡眠要求の指標であるノンレム睡眠時の脳波デルタ波成分の増加といった特徴的な表現型を呈する。

また先行研究において、熱ショックで誘導されるシャペロン分子として有名な HSP70s が、睡眠覚醒制御に関与する可能性が示唆されている。覚醒時の神経活動は ROS (活性酸素) の蓄積や小胞体への変性タンパク質の蓄積を引き起こすとされ[1]、シャペロン分子は変性タンパク質の正しいフォールディングを誘導する。実際、覚醒時間が延長される (断眠) につれて *Hsp70s* 発現量が増加し、これらは睡眠時間とともに減少するとされており[2]、シャペロンが睡眠中にタンパク質修復を行っていると考えられている。

所属研究室における予備実験によって、これら SIK3 と HSP70s が結合することが示された。しかしながら、HSP70s 自身や、SIK3 と HSP70s の相互作用の睡眠覚醒制御における役割は解明されていない。そこで本研究では、睡眠覚醒制御における SIK3-HSP70s 相互作用の役割を明らかにすることを目的とし、HSP70s のノックダウンが睡眠に与える影響を調べ、SIK3-HSP70s の結合部位の同定を行った。

【方法】

(1) 断眠による HSP70s の発現量の変化

マウス (C57BL/6N, 雄) は自由飲水・採餌下で 12 時間ごとの明暗サイクルで飼育された。マウスが頭を下げ始めたら、背中を筆で撫でて起こす断眠を、明期開始 (ZT0) から 6 時間にわたって行った。断眠実験終了後、自由睡眠個体と断眠個体の両方で頸椎脱臼、断頭し、大脳皮質を採取した (ZT6)。採取した大脳皮質から RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した。合成した cDNA を用いて RT-qPCR を行い、断眠による HSP70s (*Hspa1a1b*, *Hspa5*, *Hspa8*) と *Sik3* の発現量の変化を調べた。

(2) HSP70s ノックダウンと睡眠測定

HSP70s (*Hspa1a1b*, 5, 8) を shRNA による RNA 干渉法によりノックダウンした。配列は Vector builder 社のツールを用いて設計し、In-Fusion クローニングによりプラスミドを得た。プラスミド DNA を AAV pro 細胞にトランスフェクションすることで AAV を得た。マウスに注射する濃度に希釈した (5.0×10^{12} vg/mouse)。

8-9 週齢のマウスの頭部に脳波測定及び筋電測定用の電極を外科手術により取り付け、1 週間後に 5.0×10^{13} vg/ μ L の濃度の AAV を

100 μ L 眼窩静脈叢注射した。注射後 2 週目から 5 週目まで睡眠測定を行った。睡眠測定は 24 時間実施し、記録された脳波と筋電は 20 秒ごとのエポックで区切り、脳波成分と筋電位の情報から覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠の判定を行った。

(3) HSP70s と *Sik3* の結合箇所の同定

様々な SIK3 欠失変異体を作製し、HSP70s との結合箇所の同定を目指した。それぞれの変異体に対応するプライマーを作製し PCR を行うことで、目的のプラスミドを得た。HEK293T 細胞に得られたプラスミド (3xFLAG-SIK3 変異体) をトランスフェクションし、免疫沈降した後、抗 HSPA1A1B, HSPA5, HSPA8 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

【結果】

(1) 断眠による *Hsp70s* の発現量の変化 (図 1)

検討したシャペロン分子のうち、断眠により *Hspa1b* の発現量が統計学的に有意に増加した。これは先行研究における結果と一致した。一方、*Sik3* の発現量は short isoform で統計学的に有意に減少した。

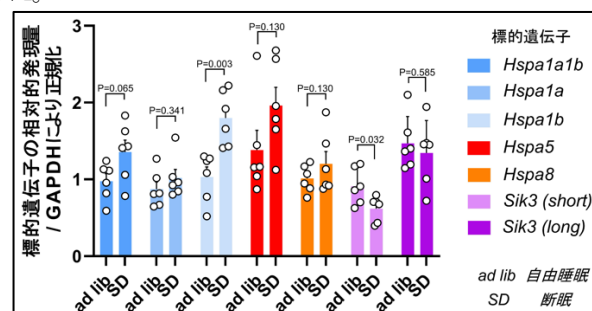


図 1：断眠による大脳皮質 *Hsp70s* と *Sik3* の発現量の変化

(2) HSP70s ノックダウンと睡眠測定

Hspa8 ノックダウン個体は注射後 2 週間経たずに死んでしまった。これは HSPA8 がハウスキーピング遺伝子であるからだと考えられる。また 2 週目・4 週目における HSPA1A1B, HSPA5 ノックダウン個体はコントロール個体に比べ、ノンレム睡眠時間・脳波デルタ成分ともに増加傾向だった。

(3) HSP70s と SIK3 の結合箇所の同定

現在解析中で、詳細は発表会にて報告する予定である。

【展望】

現在 (3) の実験を継続的に行っており、HSP70s と *Sik3* の結合箇所を数アミノ酸まで絞りたいと考えている。その後、ルシフェラーゼアッセイを用いて HSP70s が結合しない SIK3 変異体の機能特性 (機能獲得型変異か機能喪失型変異か) を判断し、最終的にこの変異が睡眠覚醒制御に与える影響を評価したい。

【参考文献】

- [1] Vyazovskiy et al. (2014) doi:10.1016/s0306-4522(02)00695-4
- [2] Terao et al. (2003) doi:10.1038/nm3494