

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700403

研究課題名(和文)レム睡眠を生じる分子基盤の解析

研究課題名(英文)Analyses of the molecular basis of REM sleep

研究代表者

林 悠(Hayashi, Yu)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教

研究者番号：40525812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：夢を生じるレム睡眠は、一部の脊椎動物に固有の生理状態であり、脳の高次機能に関わると期待される。本研究において我々は、レム睡眠とノンレム睡眠の切り替えに関わるニューロン群を脳幹において同定し、さらに、これらのニューロンのサブタイプ選択的に発現する遺伝子を同定することに成功した。こうした遺伝子のプロモーターを利用することで、レム睡眠を効率よく操作することにも成功した。また、脊椎動物固有シナプスタンパク質netrin-G1がレム睡眠の制御に関わることも明らかにした。本成果は、レム睡眠の制御機構の理解に大きく貢献できると同時に、今後、レム睡眠の役割を解明する上でも有用なツールを与えるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：REM (rapid eye movement) sleep is a phenomenon unique to certain vertebrate animal species and is thus expected to be involved in higher-order brain functions. We identified neurons in the brainstem that regulate transitions between REM and non-REM sleep. Furthermore, we identified genes that are expressed in a neuron-subtype selective manner in these neurons. Furthermore, using promoters of these genes, we could efficiently manipulate REM sleep. In addition, we showed that the vertebrate-specific synaptic protein netrin-G1 is involved in regulation of REM sleep. These results are expected to contribute to understanding the mechanism of REM sleep regulation, and may also provide a powerful tool for addressing the function of REM sleep.

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：睡眠 神経科学 遺伝学 マウス

1. 研究開始当初の背景

夢を生じるレム(急速眼球運動)睡眠は、一部の脊椎動物に固有の生理状態であり、脳の高次機能に関わると期待される。我々はこれまでに、脳幹においてレム睡眠とノンレム睡眠の切り替えに関わるニューロン群の同定に成功した。脳幹には、睡眠のみならず、呼吸・食事・排泄など、生命維持に必須な機能を担うニューロン群が存在する。ところが、これら多種多様なニューロンは明確な神経核構造を形成することなく混在するため、古典的な破壊実験などから特定のニューロンのサブタイプの機能を決定することは困難であった。そこで本研究では、脳幹のニューロンを機能ごとに分類する試みとして、特定のニューロンのサブタイプに選択的に発現する遺伝子を網羅的に探索した。得られた候補遺伝子は、そのプロモーターを利用することでニューロンのサブタイプ特異的な機能解析が可能となり、また、その候補遺伝子自身の機能を解析することで、レム睡眠制御などの脳幹機能を支える分子基盤の一端が明らかとなると期待される。

また本研究では、新規な候補遺伝子の検索と並行して、脊椎動物固有シナプスタンパク質である netrin-G1 にも注目した。netrin-G1 は、よく知られる軸索誘導因子 netrin とは異なり、分泌されずに細胞膜に固定される (Nakashiba ら, *J Neurosci*, 2000)。その遺伝子 *Ntng1* はヒトにおいて自閉症や統合失調症との関連が指摘されている (Sanders ら, *Nature*, 2012; Aoki-Suzuki ら, *Biol Psychiatry*, 2005)。これらの発達障害や精神疾患の患者では、しばしばレム睡眠の異常が見られ、これが他の症状の発症または重症化にも寄与している可能性がある。そこで本研究において、netrin-G1 のレム睡眠制御への関与も検討した。

2. 研究の目的

(1) レム睡眠制御に関わる脳幹の橋背側領域において特定のニューロンのサブタイプに発現する遺伝子の同定。

(2) 上記遺伝子のプロモーターを利用した特定ニューロンサブタイプ特異的な遺伝子操作による、同ニューロンサブタイプの機能解明。また、上記遺伝子のノックアウトによる同遺伝子の機能解明。

(3) *Ntng1* ノックアウトマウスにおけるレム睡眠の異常の有無の検討。

3. 研究の方法

(1) 脳幹の橋の背側部分には、レム睡眠とノンレム睡眠の切り替えを担うニューロン群が存在する。この部位において、特定のニューロンのサブタイプに選択的に発現する遺伝子を探索するため、次の二つの方法を用いた。

脳幹橋を大まかに背側部分、腹側部分、網様体部分に分け、それぞれから total RNA を抽出し cDNA マイクロアレイ法でいずれかの部位に選択的な発現を示す遺伝子を検索した。さらに、*in situ* hybridization (ISH) 法により、背側部分の中でも少数のニューロンに発現するものを候補遺伝子とした。

Allen Brain Atlas の Mouse Brain ISH データベースにおいて、数百に及ぶ遺伝子の脳幹での発現パターンを解析し、脳幹橋背側部分に選択的に発現する遺伝子を候補遺伝子とした。

(2) 上記で得られた候補遺伝子の上位のもの内、Cre ノックインマウスが既に存在するものについては入手し、存在しないものについては作製を開始した。これらの Cre ノックインマウスに、Cre 依存的に神経活動操作遺伝子を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを局所注入し、Cre 発現ニューロンを興奮または抑制し、睡眠への影響を脳波筋電図の測定により検討した。

また、ノックアウトマウスの存在するものについては、変異型対立遺伝子をホモで有する個体の作製を開始した。

(3) Ntng1 ノックアウトマウスの脳波筋電図測定によりレム睡眠異常の有無を検討した。

4. 研究成果

(1) レム睡眠とノンレム睡眠の切り替えを担う中枢部位を有する脳幹橋背側領域において、特定のニューロンのサブタイプに選択的に発現する遺伝子を多く同定することに成功した。遺伝子ごとに、その分布は多種多様であり、脳幹橋がヘテロな細胞集団から成る複雑な脳領域であることが改めて確認された。候補遺伝子の中には、これまでの AAV ベクター局所感染の実験から明らかとなったレム睡眠促進ニューロン・抑制ニューロンの分布と酷似するものもそれぞれ3遺伝子ずつ得られた。

(2) 上記の候補遺伝子のうち、発現パターンがレム睡眠促進ニューロンおよび抑制ニューロンの分布とよく似たもの1遺伝子ずつについて、Cre ノックインマウスを得ることに成功した。この内、一系統の Cre ノックインマウスに Cre 依存的に神経興奮誘導遺伝子を発現する AAV ベクターを局所感染させたところ、レム睡眠の強い抑制効果が確認された。従って、この候補遺伝子がレム睡眠抑制ニューロンの有用な遺伝子マーカーであることが確認された。本成果は、レム睡眠の制御機構の理解に大きく貢献できると同時に、今後、レム睡眠の生理的意義を解明する上でも非常に有用なツールを与えるものであると期待される。

(3) Ntng1 ノックアウトマウスにおいてレム睡眠の低下が見られた。Ntng1 KO マウスは様々な行動異常も示すが、レム睡眠の異常がこうした表現型の少なくとも一部に寄与している可能性がある。脳幹において Ntng1 は、

レム/ノンレム睡眠の制御に重要な部位に発現していた。脊椎動物固有因子である netrin-G1 がレム/ノンレム睡眠などの脊椎動物固有脳機能の獲得・回路形成に貢献したと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 5件)

1. Yu Hayashi, Genetic dissection of REM sleep circuitry and function, The 2nd Annual IIS Symposium ~Solving the mystery of sleep~, 2014年1月20日、つくば

2. Kosuke Yasuda, Yu Hayashi, Mika Tanaka, Shigeyoshi Itoharu, Genetic analysis of the roles of NMDA receptors in the parafascicular nucleus in sensory processing, Neuroscience 2013, 2013年11月9日、San Diego, California, USA

3. Yu Hayashi, Kazuya Sakai, Kosuke Yasuda, Reiko Ando, Shigeyoshi Itoharu, Genetic analysis of the REM sleep center and its developmental origin, Neurogenesis 2013, 2013年10月17日、松島

4. Yu Hayashi, Kazuya Sakai, Kosuke Yasuda, Julia Nguyen, Reiko Ando, Shigeyoshi Itoharu, Genetic analysis of the REM sleep center and its developmental origin, 日本睡眠学会第38回定期学術集会, 2013年6月28日、秋田

5. Yu Hayashi, Kazuya Sakai, Kosuke Yasuda, Julia Nguyen, Reiko Ando, Shigeyoshi Itoharu, Genetic analysis of the REM sleep center and its developmental origin, Neuro2013, 2013年6月22日、京都

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等

<http://wpi-iiis.tsukuba.ac.jp/japanese/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 悠 (HAYASHI, Yu)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・
助教

研究者番号：40525812

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし