

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18966

研究課題名(和文)新規睡眠関連遺伝子に基づくレム睡眠制御機構の解明

研究課題名(英文)A genetic analysis of REM sleep based on a novel sleep related gene Nalcn

研究代表者

藤山 知之(FUJIYAMA, Tomoyuki)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・特別研究員(PD)

研究者番号：00635089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：フォワードジェネティクスにより樹立されたDreamless変異マウスは、レム睡眠の総時間および一回あたりの平均時間に顕著な短縮を呈する。次世代シーケンスおよび遺伝子連鎖解析により、原因遺伝子として電位非依存性イオンチャネルをコードするNalcnを見出し、遺伝子変異部位も同定した。さらに、最新のゲノム編集技術CRISPR/Cas9システムを用いてNalcn遺伝子特異的に同様の変異を導入し、Dreamlessマウス表現型の再現に成功することでNalcn遺伝子と表現型の因果関係を明らかにした。これらの結果により、Nalcn遺伝子がレム睡眠の制御に関わるということが世界で初めて明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Dreamless mice, which was established from an ENU mutagenized mouse, showed a decreased rapid-eye-movement (REM) sleep. Subsequent genome sequencing including whole exome sequencing and genetic linkage analysis revealed that the mutation in Dreamless mice affects a gene Nalcn, which codes for an ion-channel protein and has previously been implicated in the circadian control of the neuronal excitability. In addition, Funato and Fujiyama et al. demonstrated that the reproduction of the same mutation in Dreamless mice via CRISPR/Cas9 system could recapitulate thier phenotypes, which defined the causality of Dreamless mice. Electrophysiologically assessed brain waves were altered in Dreamless mutant mice compared with controls, during REM and NREM sleep, and during wakefulness. These findings implied that a novel sleep related gene Nalcn is involved in the regulation of all vigilance states, but especially in REM sleep.

研究分野：睡眠医科学

キーワード：レム睡眠 Forward genetics CRISPR ENU mutagenesis Dreamless Nalcn REM sleep

1. 研究開始当初の背景

睡眠障害と様々な中枢神経系疾患との双方向のリスク関係が注目されている。睡眠覚醒行動は恒常性および概日リズムによる制御を受けるとされており、クロック遺伝子群や神経細胞の活動性を制御するチャネル群、それらを介在する細胞内シグナル分子群などが重要な役割を果たしていると考えられているものの、睡眠を制御する遺伝子・分子・神経基盤にはいまだ不明な点が多い。また、レム睡眠は全ての哺乳類および鳥類に認められるが、レム睡眠そのものの役割は未だよくわかっていない。本研究開始にあたり、藤山を含む研究グループは、化学変異原 ENU を用いたランダム点突然変異を導入したマウスの大規模スクリーニングにより、遺伝的にレム睡眠異常を呈する新規マウス家系 *Dreamless* を樹立することに成功した。さらに、エクソームシーケンスや遺伝子連鎖解析により、*Dreamless* 変異マウスにおける原因遺伝子がイオンチャネルをコードする *Nalcn* 遺伝子であることを同定した。

2. 研究の目的

本研究では *Dreamless* 変異マウスの発見に基づき、脳部位特異的 *Nalcn* 遺伝子改変マウスなどを用いて、レム睡眠を制御する分子・神経回路メカニズムを明らかにするとともに、不安・うつ・記憶障害などの側面から解析することで特定の睡眠障害と精神・神経疾患発症との関連性について調べ、レム睡眠の生体における意義・役割を明らかにする。すなわち、新たに単離された *Dreamless* 家系およびその原因遺伝子 *Nalcn* を対象とし、(A)「レム睡眠を制御する分子・神経回路メカニズム」を明らかにし、(B)「レム睡眠の生体における意義・役割」を明らかにすることが目的である。

(A)については、*Nalcn* 遺伝子産物に対し、*in vitro* および *ex vivo* での生化学的・電気生理学的実験により、*Dreamless* 変異が与える分子特性・機能への影響を解析する。また、中枢神経系において *Nalcn* 遺伝子を発現する細胞について、免疫染色や *in situ* ハイブリダイゼーション法などの分子生物学的手法を組み合わせて組織学的に解析する。さらに、*Dreamless* ヘテロおよびホモ変異マウスや、*Nalcn* 遺伝子に対し脳部位特異的に変異を誘導した遺伝子改変マウスなどを用いて、EEG/EMG 記録により睡眠覚醒様式を *in vivo* で調べることで、レム睡眠制御に関わる神経ネットワーク基盤を明らかにする。

(B)については、*Dreamless* 変異マウスがレム睡眠障害のモデルとなることから、記憶・学習、うつ・不安様行動を含む各種行動学的検討を行い、レム睡眠不全がもたら

す認知機能・精神活動や概日リズム形成への影響、ひいては精神・神経疾患との関連性についても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 野生型および変異型 *Dreamless* 遺伝子産物の機能解析

Nalcn 遺伝子産物はイオンチャネル型構造を持つ細胞膜蛋白質である。変異型遺伝子の産物について、HEK293 細胞などの培養細胞への強制発現系を用い、パッチクランプ法による電気生理実験を通して野生型蛋白質の機能との比較検討を行う。そして、*Nalcn-Dreamless* 遺伝子産物の機能の変化・破綻が、発現細胞の電気生理学的性質に対してどのような影響を与えるかを調べ、*Dreamless* 変異型 *NALCN* 分子の機能を解析する。

(2) 野生型およびヘテロ変異マウスを用いた *NALCN* 発現細胞の性質の解析

野生型および変異型の成獣マウス脳スライスを用いて、*Nalcn* 遺伝子を発現する神経細胞について、興奮性や発火頻度などについて電気生理学的な解析をおこない、*Dreamless* 変異が細胞の電気生理学的性質に与える影響を明らかにする。

また、野生型および変異型の成獣マウス脳サンプルを用いて、*Nalcn* 遺伝子発現細胞について、中枢神経系における分布、分子マーカーを用いた神経伝達物質サブタイプなどについて組織学的に解析する。すなわち、*Nalcn* 発現細胞について、1)レム睡眠に関わるとされる神経領域に局在があるか、2)どのような性質を持つ(抑制性・興奮性など)のかを調べる。具体的には、発現細胞の性質について *in situ* ハイブリダイゼーションや免疫組織化学染色、神経細胞種マーカー等との二重標識により、*Nalcn* 遺伝子を発現する細胞種および性質を同定する。特に、レム睡眠の制御に関連があるとされる橋、脳幹において実験を行う。また、*Dreamless* ヘテロマウスの成獣脳において、解剖学的な表現型があるかについても組織化学的手法などを用いて調べる。

(3) 脳部位特異的遺伝子改変マウスを用いたレム睡眠を制御する神経領域の探索

Dreamless 家系においてレム睡眠の短縮が認められたので、変異型 *Nalcn* 遺伝子がどの脳領域で作用しているかを、遺伝子改変マウスを用いてさらに解析する。申請者らは、特定のプロモーター制御下で Cre 組換え酵素を発現する遺伝子改変マウスや AAV ベクターを組み合わせることで、Cre/loxP システムにより任意の細胞種・神経核特異的に *Dreamless* 変異型 *Nalcn* 遺伝子を発現させる遺伝子変異マウスを新潟大学崎村研究室と共同作製した。このマウス

を用いて、*in vivo* の動物実験を行い、レム睡眠異常の表現型が最も強くみられる細胞種・神経核部位を探索する。

(4) レム睡眠異常モデルマウス家系 *Dreamless* を用いた概日リズム解析

レム睡眠時間はうつ病において減少するが、その病態生理学的意義やメカニズムはよくわかっていない。*Dreamless* 変異マウスにおいては、レム睡眠の減少のみならず、入眠後より短時間でレム睡眠が出現する(レム潜時の短縮)という、典型的なうつ病症状と同じ状態が観察された。よって、*Dreamless* 変異マウスを用いて、レム睡眠不全により引き起こされる影響について各種行動様式を調べることで、正常なレム睡眠の高次精神活動における生理学的な機能・意義について明らかにする。特に、睡眠に関わるとされる認知、情動、記憶・学習などに着目し、各種行動解析(オープンフィールド、高架式十字迷路、スリーチャンバー式社会性試験、尾懸垂、モリス水迷路、恐怖条件づけテストなど)を行い、レム睡眠の異常とうつ・不安様行動などの精神・神経疾患との関連性について調べる。さらには、睡眠と深い関連がある概日リズムに着目し、概日リズムへの影響を回転輪テストにより解析する。

4. 研究成果

(1) 野生型および変異型 *Dreamless* 遺伝子産物の機能解析

野生型 *Nalcn* 遺伝子および *Dreamless* 変異型 *Nalcn* 遺伝子をコードするベクターを HEK293 培養細胞へトランスフェクションすることにより強制発現させ、パッチクランプ法により細胞膜の電気生理学的性質へ与える影響について調べた。その結果、野生型 NALCN と比較して変異型 NALCN を発現する細胞においては、細胞膜のイオン透過性や電流密度が顕著に増加していることが明らかになった(図1)。

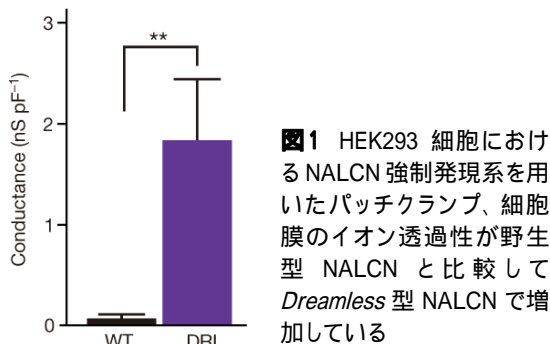


図1 HEK293 細胞における NALCN 強制発現系を用いたパッチクランプ、細胞膜のイオン透過性が野生型 NALCN と比較して *Dreamless* 型 NALCN で増加している

(2) 野生型およびヘテロ変異マウスを用いた *Dreamless* 発現細胞の性質の解析

Nalcn 遺伝子について、野生型成獣マウス脳における発現分布を *in situ* ハイブリ

ダイゼーション法により調べたところ、大脳皮質および海馬、視床下部の視交叉上核、脊髄などの脳ほとんどすべての領域で、その強弱はあるものの発現がみられた。特にレム睡眠制御に関わる神経領域である橋、延髄領域において広く発現がみられた(図2)。さらに発現細胞の性質について、抑制性ニューロンマーカー *Vgat* および興奮性ニューロンマーカー *Vglut2* を用いて、蛍光二重 *in situ* ハイブリダイゼーション法により調べたところ、*Nalcn* 発現神経細胞には興奮性のものや抑制性のものが含まれることがわかった。加えて、*Dreamless* 変異マウス脳における解剖学的所見を検討したが、皮質や海馬の構造変化や脳重の顕著な変化は確認されなかった。

また、野生型マウスおよび *Dreamless* マウスの脳スライスを用いて、レム睡眠の終止に関与する神経細胞を含む深部中脳核領域(DpMe)における神経細胞について、パッチクランプによる *ex vivo* 電気生理学的解析を行った結果、非常に興味深いことに、*Dreamless* 変異型 NALCN を発現する神経細胞において、発火頻度の増加や静止膜電位が脱分極していることが判明した(図3)。これらの結果は、*Dreamless* 変異がレム睡眠の制御に関与する神経細胞の興奮性に影響を及ぼし、レム睡眠の様式に変化を与えている可能性を強く示唆していた。

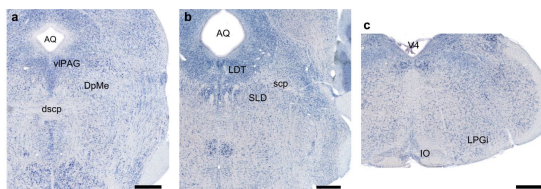


図2 野生型マウス脳における *Nalcn* 遺伝子の *in situ* hybridization、橋・延髄領域において広範囲に発現していることが確認された

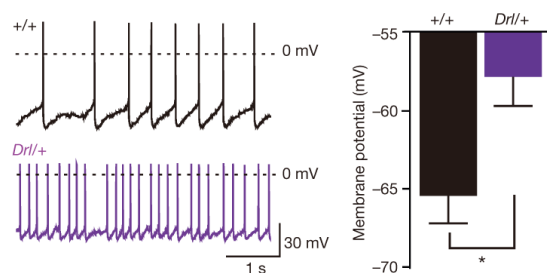


図3 野生型および *Dreamless* 変異マウスにおける DpMe 領域の神経細胞での *in vivo* パッチクランプ、野生型と比較して、*Dreamless* マウスにおいて神経細胞の興奮性が増加し、膜電位が脱分極している

(3) 脳部位特異的遺伝子改変マウスを用いたレム睡眠を制御する神経領域の探索

Cre 酵素依存的に *Dreamless* 型 NALCN の発現が期待されるマウス系統(*Nalcn-FLEX* KI)を作製したが、ゲノム構造が複雑な

めか、Cre を効かせる以前のアルルで問題が確認された(ホモで致死)。また、Cre を効かせた後のアルルにおいても、mRNA のスプライシングに異常がみられた。よって再度、新潟大学崎村研究室と共同で改良型の *Nalcn-FLEX* アルルの作製に取り組み、最近、*Nalcn* mRNA 発現が Cre を効かせる以前のアルルからみられること、Cre 組換え酵素の導入により変異型 *Dreamless* 遺伝子が誘導されることを確認した。

また、*Nalcn* 遺伝子について脳部位特異的遺伝子欠損をおこなうため、コンディショナルノックアウトアルル (*Nalcn-flox* KI) の作製を試みた。方法として CRISPR/Cas9 を用い、loxP site の二ヶ所挿入を、それぞれに分けて行った。その結果、当初の予想より期間が掛かったものの、約 2 年の歳月を経て *Nalcn-flox* allele を持つマウス系統を樹立することができた。

今後はこれらの *Nalcn-FLEX* マウスおよび *Nalcn-flox* マウスを用いて、各種 Cre 発現マウス系統との掛け合わせや AAV ベクターの注入実験を進め、レム睡眠に関わる神経領域の神経細胞における NALCN の機能に迫ることができることを期待している。

(4) レム睡眠異常モデルマウス家系 *Dreamless* を用いた行動解析

前述の *Nalcn* 発現細胞の分布の解析結果より、概日リズム形成に関連が深いことが知られている視交叉上核 (SCN) において *Nalcn* 遺伝子が強く発現していることが判った。そこで、*Dreamless* 変異マウスを用いて概日リズムのパターンに変化がみられるかについて回転輪テストにより検討したところ、暗期飼育環境下において、で表される 1 サイクルあたりの時間は野生型のそれと比較して変化はみられなかった。しかしながら、概日リズムの指標となる活動期の行動量について検討したところ、*Dreamless* マウスにおいて活動強度 (amplitude) が顕著に減少していることが明らかになった。このことから、NALCN が概日リズムの形成において機能し、*Dreamless* 変異により影響を受けることが示された。

また、モリス水迷路実験や恐怖条件付けテストにおいて、現時点ではまだ試行回数は十分でないものの、*Dreamless* 変異マウスにおける成績の低下が示されたことから、*Nalcn* 遺伝子の記憶能力への影響も示唆された。今後は試行回数を増やすとともに、海馬や扁桃体などの記憶形成に関わる脳領域のどこで NALCN が機能しているかを、*Dreamless* 変異マウスや前述の *Nalcn* 遺伝子改変マウスなどを用いた行動解析から明らかにしていきたい。

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 3 件)

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. doi: 10.1038/nature20142. Epub 2016 Nov 2. 査読有

Hossain MS, Asano F, **Fujiyama T**, Miyoshi C, Sato M, Ikkyu A, Kanno S, Hotta N, Kakizaki M, Honda T, Kim SJ, Komiya H, Miura I, Suzuki T, Kobayashi K, Kaneda H, Kumar V, Takahashi JS, Wakana S, Funato H, Yanagisawa M;; Identification of mutations through dominant screening for obesity using C57BL/6 substrains. *Scientific Reports*. 2016 Sep 2;6:32453. doi: 10.1038/srep32453. 査読有

Ruffault PL, D'Autréaux F, Hayes JA, Nomaksteinsky M, Autran S, **Fujiyama T**, Hoshino M, Hägglund M, Kiehn O, Brunet JF, Fortin G, Goridis C.; The retrotrapezoid nucleus neurons expressing *Atoh1* and *Phox2b* are essential for the respiratory response to CO₂. *Elife*. 2015 Apr 13;4. doi: 10.7554/eLife.07051. 査読有

[学会発表](計 4 件)

藤山知之、船戸弘正、三好千香、佐藤牧人、水野聖哉、上田壮志、高橋智、村本玄紀、Liu Qinghua、一久綾、堀田範子、柿崎美代、管野里美、石川有紀子、浅野冬樹、本多隆利、三浦郁生、鈴木智広、若菜茂晴、柳沢正史 「連鎖解析と全エクソームシーケンスによる *Dreamless* 変異家系特異的な塩基置換の同定と CRISPR 法による再現」 第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月、神戸国際会議場(兵庫県神戸市) **ポスター発表**
藤山知之、三好千香、佐藤牧人、上田壮志、水野聖哉、高橋智、村本玄紀、浅野冬樹、本多隆利、岩崎加奈子、一久綾、堀田範子、柿崎美代、管野里美、石川有紀子、三浦郁生、鈴木智広、若菜茂晴、Vivek Kumar、Joseph Takahashi、船戸弘正、柳沢正史 「Identification of a single nucleotide substitution specific to

the *Dreamless* mutant mouse pedigree by linkage analysis and whole exome sequencing, and its genetic verification by CRISPR」 Neuroscience 2015, SfN's 45th Annual Meeting、2015年10月、シカゴ(米国) **ポスター&口頭発表**
藤山知之、三好千香、佐藤牧人、上田 壮志、水野聖哉、高橋智、村本玄紀、浅野冬樹、本多隆利、岩崎加奈子、一久綾、堀田範子、柿崎美代、菅野里美、石川有紀子、三浦郁生、鈴木智広、若菜茂晴、Vivek Kumar、Joseph Takahashi、船戸弘正、柳沢正史 「Identification of a single nucleotide substitution specific to the *Dreamless* mutant mouse pedigree by linkage analysis and whole exome sequencing, and its genetic verification by CRISPR」 The 4th Annual IIS Symposium、2016年2月、筑波大学(茨城県つくば市) **ポスター発表**
藤山知之、三好千香、佐藤牧人、水野聖哉、柳沢正史、船戸弘正 「連鎖解析と全エクソームシーケンスによる *Dreamless* 変異家系特異的な一塩基置換の同定と CRISPR 法による再現」第121回日本解剖学会、2016年3月、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市) **招待講演**

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

プレスリリース(日本語)
http://wpi-iiis.tsukuba.ac.jp/japanese/wp-content/uploads/sites/2/2016/11/1103_FG_PR.pdf

Press Release(英語)
http://wpi-iiis.tsukuba.ac.jp/wp-content/uploads/2016/11/1103_FG_PR_EN.pdf

6. 研究組織

(1)研究代表者
藤山 知之(FUJIYAMA, Tomoyuki)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構(WPI-IIS)・特別研究員(PD)
研究者番号: 00635089

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
上田 壮志(KANDA, Takeshi)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構(WPI-IIS)・助教
研究者番号: 00599821

三好 千香(MIYOSHI, Chika)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構(WPI-IIS)・助教
研究者番号: 60613437

船戸 弘正(FUNATO, Hiromasa)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構(WPI-IIS)・客員教授
研究者番号: 90363118

柳沢 正史(YANAGISAWA, Masashi)
筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構(WPI-IIS)・教授/機構長
研究者番号: 20202369

(4)研究協力者
水野 聖哉(MIZUNO, Seiya)
筑波大学・生命科学動物資源センター(LARC)・助教
研究者番号: 10633141

高橋 智(TAKAHASHI, Satoru)
筑波大学・生命科学動物資源センター(LARC)・教授
研究者番号: 50271896