

# 論文概要

論文題目：*Sik3*変異マウスにおける睡眠量の  
恒常性制御を担う組織・細胞集団の時空間的探索

指導教員：

人間総合科学研究科 生命システム医学専攻  
柳沢正史教授

所属：筑波大学大学院人間総合科学研究科  
生命システム医学専攻

氏名：岩崎加奈子

## 目的:

全身性に SIK3 の Exon13 を欠損する *Sik3<sup>Slp</sup>* マウスでは睡眠量と睡眠負債が顕著に増加するが、SIK3 は胎生期から脳と末梢組織で発現するため、(1) SIK3(SLP)が神経発生を変化させた結果として、または、(2) SIK3(SLP)が神経細胞以外の細胞機能に影響を与えた結果として、睡眠量が増加した可能性を否定できなかった。そこで、新規に時期特異的に *Sik3<sup>Slp</sup>* アリルを誘導するマウスを作成し、SIK3(SLP)が成熟した神経細胞で睡眠量を制御しうるかを明らかにすることを第一目的とした。

次に、SIK3(SLP)の責任脳領域を明らかにすることを第二の目的とした。所属研究室において、様々な脳領域特異的 Cre マウスと *Sik3<sup>flox</sup>* マウスの交配実験が行われ、視床下部における SIK3(SLP)の発現が睡眠増加に十分であることが示された。本研究では、AAV を用いた脳局所的な遺伝子改変により、視床下部において SIK3(SLP)が睡眠量を増加させる神経核の同定を目標とした。

## 対象と方法:

実験動物：時期特異的に神経細胞において *Sik3<sup>Slp</sup>* アリルを誘導するため、神経細胞特異的に CreERT2 を発現させる *Synapsin1<sup>CreERT2</sup>* マウスと、Cre 依存的に *Slp* アリルを発現する *Sik3<sup>ex13flox</sup>* マウスを作成した。また、組織学的検討のため *ROSA<sup>LacZ/+</sup>* マウスを使用し、グルタミン酸作動性神経細胞特異的に操作するために *Vglut2<sup>Cre</sup>* マウスを使用した。

脳波筋電図測定：睡眠覚醒行動を調べるため、脳波筋電図測定を行った。脳波筋電図データは 20 秒ごとに覚醒、NREM 睡眠、REM 睡眠に判別し、各ステージの合計時間を求めた。また、脳波データに対して高速フーリエ変換を行い、睡眠負債の指標であるノンレム睡眠時  $\delta$  パワーを算出した。

## 結果:

1. *Synapsin1<sup>CreERT2</sup>* マウスの組換え効率：*Synapsin1<sup>CreERT2</sup>; ROSA<sup>LacZ/+</sup>* マウス脳で X-gal 発色を行った。生後 28 日齢以降（青年期）のタモキシフェン投与と比べて、生後 14 日齢以降（後期乳児期）のタモキシフェン投与は、高効率で組換えを引き起こすがわかった。
2. タモキシフェンを後期乳児期に投与した *Synapsin1<sup>CreERT2</sup>; Sik3<sup>ex13flox/+</sup>* マウスの睡眠覚醒：*Synapsin1<sup>CreERT2</sup>; Sik3<sup>ex13flox/+</sup>* マウスに対して後期乳児期にタモキシフェンを投与し、SIK3(SLP)を神経細胞特異的に発現させると、ノンレム睡眠量と NREM 睡眠時  $\delta$  パワーの両方が増加した。
3. タモキシフェンを青年期に投与した *Synapsin1<sup>CreERT2</sup>; Sik3<sup>ex13flox/+</sup>* マウスの睡眠覚醒：*Synapsin1<sup>CreERT2</sup>; Sik3<sup>ex13flox/+</sup>* マウスに対して青年期にタモキシフェンを投与し、SIK3(SLP)を神経細胞特異的に発現させると、NREM 睡眠時  $\delta$  パワーは増加するが、NREM 睡眠量は変化しなかった。
4. SIK3(SLP)発現マウスの脳波データを用いた Process S の推定：睡眠の恒常性制御を担

う睡眠負債「Process S」を、睡眠覚醒ステージ情報と脳波  $\delta$  パワーをもとにシミュレーションした。SIK3(SLP)発現マウスでは、Process S が増加速度に対して減少が遅いことが明らかになった。

5. *Sik3<sup>ex13flox/flox</sup>* マウスにおいて Cre の発現により睡眠量が増加する脳領域：*Sik3<sup>ex13flox/flox</sup>* マウス脳に Cre 発現 AAV を局所投与することで、SIK3(SLP)が睡眠量を増加させる脳領域を探索した。視床下部腹内側核に Cre が発現した個体では、睡眠量が増加傾向にあった。
6. *Vglut2<sup>Cre/+</sup>* マウスを用いた SIK3(SLP)の神経核特異的な発現による睡眠変化：*Vglut2<sup>Cre/+</sup>* マウスに Cre 依存的に SIK3(SLP)を発現させる AAV を投与し睡眠覚醒行動を調べた。視床下部腹内側核に AAV を感染させると NREM 睡眠が増加するが、NREM 睡眠時  $\delta$  パワーは変化しなかった。

#### 考 察：

1. *Synapsin1<sup>CreERT2</sup>* マウスについて：*Synapsin1<sup>CreERT2</sup>* マウスで見られる脳領域間で見られる Cre の発現量の差は、*Synapsin1* の発現量の違いによるものと考えられる。一方で、組換え効率の脳領域間での差は、Cre の発現量とタモキシフェンのアクセスのしやすさの差の両方が寄与していると考えられる。
2. *Synapsin1<sup>CreERT2</sup>; Sik3<sup>ex13flox/+</sup>* マウスの睡眠覚醒行動：*Synapsin1<sup>CreERT2</sup>; Sik3<sup>ex13flox/+</sup>* マウスに対して、タモキシフェンを後期乳児期に投与した場合には NREM 睡眠が増加するのに対し、青年期に投与した場合には変化しなかった。2 つの投与条件間では、SIK3(SLP)が誘導される時期と、組換え効率が異なる。AAV を用いて成体で SIK3(SLP)を発現させた場合にも睡眠量が増加することから、これらの条件間の NREM 睡眠量の差が SIK3(SLP)の誘導時期によるものとは考えにくく、SIK3(SLP)が誘導される効率の違いによるものと考えられる。
3. SIK3(SLP)が睡眠量を増加させる脳領域：*Sik3<sup>ex13flox/flox</sup>* マウスで視床下部腹内側核に Cre が発現していると、他の視床下部の神経核と比べて覚醒時間の減少が強く見られた。さらに、視床下部腹内側核の *Vglut2* 陽性神経細胞特異的に SIK3(SLP)を発現させた場合にも、覚醒量の減少が見られたことから、視床下部腹内側核の *Vglut2* 陽性神経細胞に発現する SIK3 (SLP) は NREM 睡眠量の増加に十分であることが示された。
4. SIK3(SLP)が NREM 睡眠時のデルタパワーを増加させる脳領域：*Synapsin1<sup>CreERT2</sup>; Sik3<sup>ex13flox/+</sup>* マウスに対して、青年期にタモキシフェンを投与した場合、NREM 睡眠量は増加しないが、NREM 睡眠時  $\delta$  パワーは増加していた。一方で、視床下部腹内側核のグルタミン酸作動性神経細胞集団に SIK3(SLP)を発現させた場合には、NREM 睡眠量は増加したが、NREM 睡眠時  $\delta$  パワーは増加しなかった。以上の結果から、NREM 睡眠時  $\delta$  パワーの増加には視床下部腹内側核以外の領域に発現する SIK3(SLP)が関与していることが示唆された。

## 結 論:

*Synapsin1<sup>CreERT2</sup>; Sik3<sup>ex13flox/+</sup>*マウスにおいて、生後 14 日齢以降に SIK3(SLP)を誘導すると、NREM 睡眠の増加と NREM 睡眠時  $\delta$  パワーの増加が見られた。一方で生後 28 日齢以降に SIK3(SLP)を誘導させた場合には、NREM 睡眠時  $\delta$  パワーの増加のみが観察された。また、視床下部腹内側核に Cre を発現した *Sik3<sup>ex13flox/flox</sup>* マウスでは、視床下部の他の領域に Cre を発現した個体よりも覚醒量が大きく減少した。*Vglut2<sup>Cre/+</sup>*マウスを用いて VMH のグルタミン酸作動性神経細胞特異的に SIK3(SLP)を発現させた場合にも、同様に覚醒量の減少が見られたが、ノンレム睡眠時  $\delta$  パワーの増加は見られなかった。

以上の結果から、生後 14 日齢以降の成熟神経細胞に発現する SIK3(SLP)が NREM 睡眠の増加に十分であり、さらに、SIK3(SLP)が睡眠を増加しうる脳領域は、視床下部腹内側核グルタミン酸作動性神経細胞集団まで狭まることが明らかになった。