

【特別推進研究】
生物系



研究課題名 フォワード・ジェネティクスによる睡眠覚醒制御機構の解明

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・機構長/教授 やなぎさわ まさし
柳沢 正史

研究課題番号：17H06095 研究者番号：20202369
研究分野：神経科学
キーワード：睡眠覚醒、マウス、フォワード・ジェネティクス

【研究の背景・目的】

睡眠は動物に普遍的に認められる行動であるが、睡眠覚醒行動を制御する神経科学的メカニズムは不明である。研究代表者らは睡眠制御機構の解明を目指し、世界で類を見ない、哺乳類を用いた睡眠のフォワード・ジェネティクス研究を推進した。その結果、睡眠増大をもたらす遺伝子変異をリン酸化酵素 SIK3(図1、2)に、レム睡眠の短縮をもたらす遺伝子変異を非選択的陽イオンチャネル NALCNに見出した(Funato, Yanagisawa et al., Nature 2016)。

本研究では、1)睡眠の大規模フォワード・ジェネティクス研究を推進し、睡眠覚醒を制御する新規遺伝子を同定するとともに、2)睡眠覚醒を制御する SIK3シグナルカスケードを解明し、3)レム睡眠を制御する細胞内シグナル伝達系を明らかにする。これらの研究により、睡眠覚醒研究におけるパラダイムシフトを起こす。

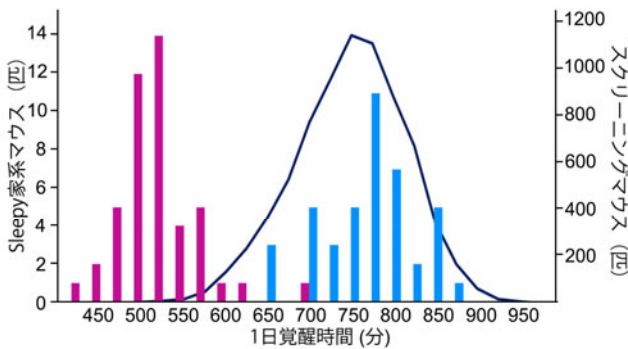


図1 SIK3遺伝子に変異を持つマウス(赤)と変異のないマウス(青)の覚醒時間。SIK3遺伝子変異による覚醒時間短縮が明らかである。黒線は検討した全突然変異マウスの覚醒時間を示した。

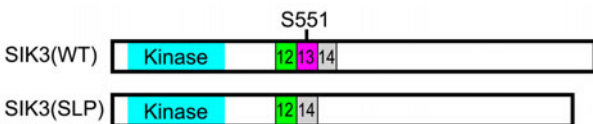


図2 SIK3はリン酸化酵素である。変異型SIK3蛋白質はエクソン13にコードされる領域を欠失している。欠失する領域に、PKAによるリン酸化を受けるセリン(S551)が存在する。

【研究の方法】

1) エチルニトロソウレアによりランダム点突然変異を導入したマウスの脳波筋電図を記録し、睡眠覚醒を評価する。睡眠異常を示す個体が得られれば、次世代マウスの検討により睡眠異常の遺伝性を評価する。睡眠異常家系の樹立後、全エクソームシーケンス・ゲノム編集により、原因遺伝子変異を同定・

導入する。

2) SIK3シグナルパスウェイによる睡眠量制御については、部位、時期、細胞種特異的に変異型 SIK3遺伝子発現を制御できる遺伝子改変マウスと、各種 Cre ドライバーマウスや Cre 発現ウイルスベクターを組み合わせることで、睡眠覚醒制御神経回路の同定を行う。FLAG-SIK3マウスおよび FLAG-SIK3(SLP)マウスの網羅的定量的リン酸化蛋白質解析を行い、睡眠覚醒を制御する細胞内シグナル伝達系の同定を行う。

3) NALCNによるレム睡眠制御については、部位、時期、細胞種特異的に変異型 NALCNを発現させる遺伝子改変マウスを用いて、レム睡眠制御神経回路の同定を行う。さらに、パッチクランプ法と分子生物学的手法を融合して NALCN を介したレム睡眠制御シグナルの同定を行う。

【期待される成果と意義】

睡眠のフォワード・ジェネティクス研究は始まったばかりであり、同じアプローチを継続することで睡眠覚醒を制御する新規遺伝子が今後も複数同定できると期待される。また、SIK3シグナルを構成する分子を同定することで、睡眠覚醒制御のシグナル伝達系を明らかにすることができる。NALCNの開閉を制御する分子機構を明らかにすることで、レム睡眠エピソードの維持・終止の細胞内シグナル伝達系を明らかにすることができる。

これらの点を明らかにすることができれば、睡眠科学領域における画期的成果として、新たな研究領域を創成することになる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Chemelli, Yanagisawa et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. Cell 98, 437-451, 1999.
- Funato, Yanagisawa et al. Forward-genetics analysis of sleep in randomly mutagenized mice. Nature 539, 378-383, 2016.

【研究期間と研究経費】

平成 29 年度-33 年度
423,000 千円

【ホームページ等】

<http://sleepymouse.tsukuba.ac.jp>



研究課題名 フレキシブルな概日ロバスト振動体の分子解剖と個体制御

東京大学・大学院理学系研究科・教授 ふかだ よしたか
 深田 吉孝

研究課題番号：17H06096 研究者番号：80165258

研究分野：生物学：基礎生物学、生物科学

キーワード：動物生理化学、転写調節、翻訳後修飾、サーカディアンリズム、概日振動機構

【研究の背景・目的】

約24時間周期の生物リズムを刻む概日時計は、自律振動して生理現象を安定に制御する頑強性と、環境変化にตอบสนองして位相制御する柔軟性を兼ね備えている。本研究では、頑強な振動体が時計遺伝子の転写リズムにより生み出されるとする従来の転写時計の概念から踏み出し、遺伝子の転写後制御や翻訳後制御、さらに根源的な振動子となり得る細胞内レドックス変動などの細胞機能に基づく新しい振動原理を追究する。一方、頑強な振動と対比される柔軟な位相制御に着目し、細胞外環境から多彩なシグナルを自動傍受する電波時計のような巧妙な位相制御の分子機構に迫る。

また本研究課題の前半で得られる知見をもとに、不可逆な時間軸に沿って進行する老化と概日時計の相互作用に挑戦する。24時間周期で繰り返す概日時計の振動が老化と共に減衰するという従来の考えに加え、不可逆に進行する老化も概日時計の出力の一つと捉え、概日時計と老化時計が双方向性に相互制御する分子機構を探る。

【研究の方法】

本研究課題では、体内時計の新しい振動原理を求め、特にタンパク質分子レベルとマウス個体レベルでの解析を統合的に推し進める。また、体内時計の基本的な3要素である入力系・発振系・出力系のそれぞれの観点から、時計システムがもつ頑強性（ロバストネス）と柔軟性（フレキシビリティ）という、見かけ上、対照的な特徴が両立する仕組みの理解を目指す。さらに、老化と共に変化する時計振動体において、時計タンパク質が時刻依存的に翻訳後修飾されるアミノ酸残基レベルの変化を明らかにし、その役割をマウス個体レベルで探る。

【期待される成果と意義】

多くの組織で発現RNAの約1割に量的な概日変動が見られるが、最近、米国の2グループが行ったnascent RNA-Seqの結果、このリズム的なRNAの約7割のde novo転写はほぼ一定であることが判明した(Koike *et al.*, 2012; Menet *et al.*, 2012)。つまり、転写活性化と抑制の日周リズムを基礎的な概念として発展してきた本研究分野は大きな転換期を迎えた。このような背景の中で応募者らは、RNAのA-to-I編集酵素ADAR2の活性リズムを見出し、

これが多数のRNAの日周変動を導くという、新しい転写後リズム生成機構を発見した(Terajima *et al.*, 2017)。本研究では、このようなパラダイムシフトの中で、哺乳類（マウス）の概日時計のフレキシブルな位相制御とロバストな振動機構が同時に可能となる新しい作動原理の解明を目指す。また応募者らが最近見出した、海馬に依存する長期記憶や扁桃体に依存する不安様行動の日周リズムを引き起こす分子機構(Shimizu *et al.*, 2016; Nakano *et al.*, 2016)を着想の起点として、生理機能が頑強な概日振動体により巧妙に制御される分子機構を解き明かす本研究課題を計画した。時間生物学は、時間の関数として変化する生物現象の中でも、特に一定の周期性で繰り返すリズム的な生命現象を扱う研究分野である。一方、睡眠をはじめ概日時計が制御する様々な生理的リズムが老化と共に変貌することは経験的に良く知られているが、「老化」と「時計」が相互制御する分子リンクは未だ謎に包まれている。本研究ではこのように24時間周期とは異なる時間軸に沿って変化する「概日振動体の老化」を立体的な時間生物学の新テーマと捉え、老化は頑強で柔軟な概日振動体のどの構成分子をいかに変化させるのか、その逆に、振動体の頑強性や柔軟性を操ることにより老化を操ることができるのか、という双方向性の制御の観点から未解明の研究課題に挑戦する。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Hirano *et al.* (2013) FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. *Cell*, 152, 1106-1118
- Terajima, Yoshitane *et al.* (2017) ADARB1 catalyzes circadian A-to-I editing and regulates RNA rhythm. *Nature Genet.* 49, 146-151

【研究期間と研究経費】

平成29年度－33年度
435,800千円

【ホームページ等】

<http://www.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/fukada-lab/index-j.html>
sfukada@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

【特別推進研究】
生物系

研究課題名 核磁気共鳴法による膜タンパク質の in situ 機能解明



東京大学・大学院薬学系研究科・教授 しまだ いちお
嶋田 一夫

研究課題番号：17H06097 研究者番号：70196476

研究分野：構造生物学

キーワード：核磁気共鳴法、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)、イオンチャネル、トランスポーター

【研究の背景・目的】

膜タンパク質は生体内において重要な役割を果たすとともに最大の創薬標的タンパク質である。X線結晶解析および電子顕微鏡法は、膜タンパク質の機能メカニズムの解明に大きく貢献してきたが、得られる立体構造は静的なスナップショットであり、膜タンパク質が機能している in situ 状態の動的な構造や分子間相互作用を必ずしも反映しない。本研究では、in situ 条件下でのタンパク質の動的構造情報を得ることが可能な核磁気共鳴法を用いて、生物学的に重要であり、かつ動的構造が機能発現の本質であることが想定される膜タンパク質の機能・構造解析を行う。これにより、1. Gタンパク質共役型受容体(GPCR)のシグナル選択機構、2. イオンチャネルの電流制御機構、3. 多剤耐性システムの機能メカニズムを解明することを研究目的とする。

【研究の方法】

本研究では、in situ 条件下における膜タンパク質の動的構造を解析するため、まず昆虫細胞発現系における洗練された安定同位体標識法の開拓、動的構造平衡の解析法の高度化、高分子量タンパク質の動的構造を解析するための新規 NMR 測定法の開発を行う。開発した手法を、GPCRによるGタンパク質とアレチン活性化のシグナル選択機構の解明、内向き整流性カリウムイオンチャネル GIRKのGタンパク質ファミリー選択的な活性化機構の解明、カリウムイオンチャネル KcsAの脂質二重膜依存的な電流変化機構の解明、多剤耐性システム(転写因子 LmrRとトランスポーターLmrCD)の機能メカニズムの解明に応用する。

【期待される成果と意義】

近年 GPCR とアレチンの複合体の結晶構造が解かれたが (Kang et al. Nature, 2015)、GPCR 部分の構造は、G タンパク質を模倣したペプチドとの複合体の結晶構造 (Scheerer et al. Nature, 2008) とほぼ同一であり、シグナル選択機構の解明は安定な状態に偏る結晶構造の情報では困難である。本研究では、NMR 法を用いて in situ における G タンパク質およびアレチンの活性化機構を動的構造の観点より解明する。これは生命科学の進展に大きく貢献するだけでなく、一方のシグナルを選択的に活性化し理想的な作用を持つ GPCR をはじめとする膜タンパク質を標的とした創薬開発にもつながる。

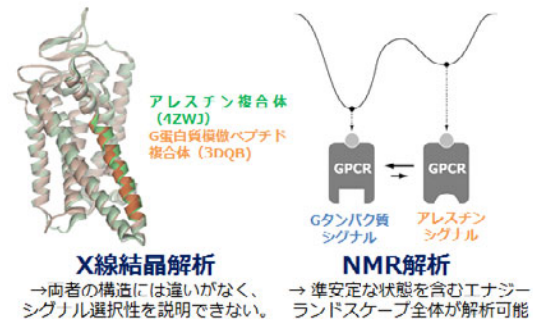


図2 本研究の意義

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Efficacy of the β 2-adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region, Kofuku Y, Ueda T, Okude J, Shiraishi Y, Kondo K, Maeda M, Tsujishita H, Shimada I, Nat Commun. (2012) 3, 1045
- Dynamic regulation of GDP binding to G proteins revealed by magnetic field-dependent NMR relaxation analyses. Toyama Y, Kano H, Mase Y, Yokogawa M, Osawa M, Shimada I., Nat Commun. (2017) 8, 14523

【研究期間と研究経費】

平成 29 年度 - 33 年度
354,100 千円

【ホームページ等】

http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public_html/index_j.html

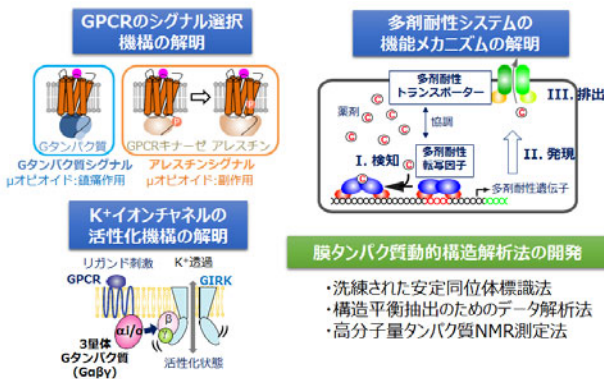
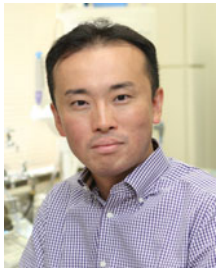


図1 本研究の計画

【特別推進研究】

生物系



研究課題名 ヒト生殖細胞発生機構の解明とその試験管内再構成

京都大学・大学院医学研究科・教授

さいとう みちのり
齋藤 通紀

研究課題番号：17H06098 研究者番号：80373306

研究分野：医歯薬学

キーワード：生殖細胞、発生医学、ゲノム、発現制御、進化

【研究の背景・目的】

精子・卵子・その前駆細胞を総称して生殖細胞と呼ぶ。生殖細胞の発生機構の解明は、遺伝情報継承機構・エピゲノム制御機構の解明や、その異常に起因する病態の発症機序解明につながる。

我々は、精子・卵子の起源となる始原生殖細胞 (primordial germ cells: PGCs) の形成機構を解明し、その知見に基づき、マウス胚性幹細胞 (embryonic stem cells: ESCs) や人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPSCs) から始原生殖細胞様細胞 (PGC-like cells: PGCLCs) を誘導し、それらから精子・卵子・健全な産仔を作成することに成功した。また、ヒト iPSCs からヒト PGCLCs を誘導し、それらが形成直後のヒト PGCs の特性を有することを示した。本研究では、マウス・カンクイザルをモデル生物とし、またヒト細胞を用いて、ヒト生殖細胞発生過程の試験管内再構成を進展させ、ヒト生殖細胞の発生機構とその異常に関する知見を得る基盤を形成する。

【研究の方法】

本研究では、1) 規定条件に基づくマウス PGCLCs の雌雄生殖細胞への分化制御法の開発、2) 1) の知見に基づき、カンクイザル PGCLCs のエピゲノムリプログラミング誘導法・雌雄生殖細胞への分化制御法の開発、3) 1), 2) の知見に基づき、ヒト PGCLCs のエピゲノムリプログラミング誘導法・雌雄生殖細胞への分化制御法の開発、4) マウスをモデルとした知見・また生殖巣と近縁でヒト iPSCs からの誘導方法が報告されている胎児腎臓細胞の誘導法等に基づき、ヒト iPSCs からのヒト生殖巣体細胞系譜の誘導法の開発、の4つの研究を統合的に推進する (図1)。



【期待される成果と意義】

本研究により、マウス・サル・ヒトにおいて、既定された条件のもと、生殖細胞の初期発生過程に伴う重要な現象 (エピゲノムリプログラミングと雌雄生殖細胞への分化開始) が試験管内で再現可能となると期待される。それら3種間における過程を詳細に比較解析することで、生殖細胞の発生機構に関する進化的に重要な知見が得られると期待される。また、ヒト・サルエピゲノムリプログラミング誘導機構、減数分裂誘導機構、前精原細胞誘導機構の詳細を解析する基盤が初めて形成されることが期待され、こうした研究は霊長類における新しいエピジェネティクス及び遺伝学を開拓する基盤となり、その関連分野への波及効果は大きいと期待される。さらに、本研究は、試験管内でヒト精原細胞・ヒト卵子を誘導する研究の基盤となり、不妊や遺伝病、エピゲノム異常に起因する疾患の原因究明につながることを期待される。即ち、本研究の成果は、生命科学・医学両分野にインパクトを及ぼすと期待される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Nakamura, T., Okamoto, I., Sasaki, K., Yabuta, Y., Iwatani, C., Tsuchiya, H., Seita, Y., Nakamura, S., Yamamoto, T., and Saitou, M. (2016). A developmental coordinate of pluripotency among mice, monkeys, and humans, *Nature*, **537**, 57-62.
- Sasaki, K., Yokobayashi, S., Nakamura, T., Okamoto, I., Yabuta, Y., Kurimoto, K., Ohta, H., Moritoki, Y., Iwatani, C., Tsuchiya, H., Nakamura, S., Sekiguchi, K., Sakuma, T., Yamamoto, T., Mori, T., Woltjen, K., Nakagawa, M., Yamamoto, T., Takahashi, K., Yamanaka, S., and Saitou, M. (2015). Robust In Vitro Induction of Human Germ Cell Fate from Pluripotent Stem Cells, *Cell Stem Cell*, **17**, 178-194.

【研究期間と研究経費】

平成 29 年度ー平成 33 年度
435,300 千円

【ホームページ等】

<http://anat.cell.med.kyoto-u.ac.jp/index.html>

