

研究題目 睡眠覚醒変化に伴うリン酸化プロテオミクス変動解析

研究組織

研究代表者：上田 泰己（東京大学大学院医学系研究科）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：大出 晃士（東京大学大学院医学系研究科）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

どのような分子実態が、「眠気/睡眠圧」と表現される覚醒時間の蓄積に伴って睡眠を誘導する機能の担うのかについては、全く明らかでない。

一方、近年の研究からは、タンパク質リン酸化が睡眠圧と深く関係することが示唆されている。遺伝学的には *Camk2a/b* が睡眠誘導性のリン酸化酵素であることが示され (Tatsuki et al., *Neuron* 2016)、またリン酸化プロテオミクス解析から、断眠などの睡眠圧が高い状態では、シナプスタンパク質のリン酸化状態が変化することが示された (Diering et al., *Science* 2017, Wang et al., *Nature* 2018, Bruning et al., *Science* 2019)。

しかし、睡眠誘導に寄与する具体的なリン酸化基質タンパク質、さらには特定のリン酸化サイトについては、なお明らかでない。そこで、断眠状態に加えて、睡眠覚醒状態が変化する遺伝学的・薬理的摂動を与えた条件でリン酸化プロテオミクス解析を行うことにより、睡眠圧変動と相関して変動するリン酸化基質を網羅的に明らかにする。

[1-2]研究の方法・経過

初年度において、明暗環境で飼育したマウスを用い、次の4つの睡眠摂動を与えた条件で、リン酸化プロテオミクス解析を行った。

- 1) 自由睡眠 (Ad lib sleep)
- 2) 睡眠はく奪条件 (Sleep deprived)
- 3) 遺伝学的あるいは薬理的摂動による睡眠減少条件
- 4) 遺伝学的あるいは薬理的摂動による睡眠誘導条件

その結果、過去の文献で報告されている、睡眠状態に応じてリン酸化レベルが変動すると報告されているリン酸化タンパク質の同定・定量にも成功した。

ここで得られたリン酸化レベルが変動したタンパク質の中から、睡眠表現型の変化との対応付けをより精緻に行うため、異なる遺伝学的摂動によって睡眠摂動を与えたサンプル、3') 遺伝学的摂動による睡眠減少条件、4') 遺伝学的摂動による睡眠誘導条件の解析を行った。

これらのマウス脳は、初年度同様に、同一の時刻 (Zeitgeber time) でサンプリングしたのち、メタノール/クロロホルム沈殿によってタンパク質を回収した後、トリプシンなどのプロテアーゼ処理によってペプチドを調製した。そして、immobilized metal affinity chromatography (IMAC) 法を用いてリン酸化ペプチドを濃縮した。得られたペプチドおよびリン酸化ペプチドは tandem mass tag (TMT) 標識を行ってから混合し、質量分析計を用いた網羅的なペプチドおよびリン酸化ペプチドの同定および定量を行った。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

質量分析計を用いた測定から、概ね 30,000 種類のリン酸化ペプチドを同定・定量することに成功した。これは、測定に用いたサンプル量や質量分析計の測定性能から考えて十分高い値であり、網羅的な同定・定量に成功したと考えられる。また、遺伝学的な摂動を行ったターゲットである遺伝子産物の明確な変動を確認したことから、摂動方法が機能していることが支持された。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

初年度と本年度の研究成果を合わせて、異なるターゲット遺伝子に対して、睡眠量を増加・現象の双方向に変動させた際の、リン酸化プロテオミクスデータを得ることができた。これらのデータを総合的に評価することで、睡眠圧が変化したときに共通して変動するリン酸化サイトや、各摂動ターゲット遺伝子産物の下流で変動するリン酸化タンパク質を絞り込むことができると期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

なし

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

得られたリン酸化プロテオミクスデータから、どのリン酸化タンパク質および、どのサイトのリン酸化修飾状態が、睡眠表現型の変化と因果関係を持つのかを、遺伝学的な摂動実験から検討する。

リン酸化プロテオミクス解析と、そこから見いだされた因子に対する遺伝学的摂動のサイクルを繰り返すことで、タンパク質リン酸化状態変化と睡眠表現型変化の因果関係を検証することができるだろう。