

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 睡眠・覚醒リズムをモデルとした生体の一日の動的恒常性の解明
(英語) A Challenge to Reveal Dynamic Properties in Circadian Sleep-Wake Homeostasis

研究開発担当者 (日本語) 大学院医学系研究科システムズ薬理学教室 教授 上田泰己
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Medicine, Department of Systems Pharmacology,
Professor Hiroki R. Ueda

実施期間： 平成 28年 4月 1日 ~ 平成 29年 3月 31日

分担研究 (日本語) 睡眠・覚醒リズムをモデルとした生体の一日の動的恒常性の解明
開発課題名： (英語) A Challenge to Reveal Dynamic Properties in Circadian Sleep-Wake Homeostasis

II. 成果の概要 (総括研究報告)

上田泰己教授(東京大学 大学院医学系研究科)のグループは、哺乳類における睡眠覚醒の恒常性制御に関わる分子機構として、これまでに皮質神経膜電位制御の数理モデルからカルシウム依存的な膜電位過分極経路が重要な役割を果たすことを予測し、遺伝学的・薬理的な摂動によって実際にこの経路に関与するイオンチャネルやポンプがマウスの一日の睡眠時間を変化させることをげっ歯類の呼吸パターンを利用した睡眠表現型スクリーニングシステムを用いて確認してきた。本年度はこれを踏まえ、これまでに得られている睡眠表現型を多角的に解析するとともに、睡眠覚醒の移り変わりに応じてこれらのイオンチャネルやポンプがどのような活性制御をうけているのか調べるための測定法の開発に着手した。

研究グループはまず、睡眠表現型スクリーニングで見出された各種遺伝子変異マウスについて、睡眠表現型のコンベンショナルな方法である脳波筋電図測定を行った。その結果、スクリーニングで見出さ

れた遺伝子変異マウスは呼吸パターンによる測定結果と一致して、一日の総睡眠時間の増加もしくは減少が生じることが確認された。従って、研究グループが開発した呼吸パターンによるスクリーニングシステムは、多くの遺伝子変異マウスについても脳波筋電図測定と対応する睡眠表現型を得られることが確認された。

次に研究グループは、カルシウム依存的な膜電位過分極経路に関わり、睡眠時間制御に関わることが示唆されたイオンチャネル・ポンプについて、その機能を評価することに着手した。研究グループは特に睡眠時間を制御するリン酸化酵素と、これらのイオンチャネル・ポンプの関連に着目し、イオンチャネル・ポンプの多種類のリン酸化サイト変異体を評価できる機能スクリーニングを行うために、マルチウェルプレートを用いた各種蛍光プローブの測定から、特定のイオンチャネルの活性をハイスループットに測定する系を構築した。これを用いて、種々のリン酸化サイト変異体の機能スクリーニングを行う。

これらの実験系は、主にタンパク質制御の観点から睡眠表現型制御の実体を探索するものである。一方で、睡眠制御には脳内の神経細胞のネットワークが重要な役割を果たす側面がある。研究グループは、これまでに透明化組織観察手法 CUBIC を開発してきた。この手法は、マウス脳に限らず、より大きな組織や脳以外の組織にも適用することができ、全身の臓器が関わる恒常性制御を調べるうえで重要なツールになると期待される。研究グループは、CUBIC 法の更なる性能向上を行った。その結果、マウス組織よりも大型であり、かつ脂質含量などの問題から透明化が困難であった組織にも適用できる改良型 CUBIC 法を実現する試薬組成を見出した。またこれと並行して、研究グループは大型の透明化サンプルの撮像に適した長い焦点深度と高い開口率(NA)を特徴とする対物レンズを備えたシートレーザー型顕微鏡の開発を行い、その組み上げをほぼ完了した。

睡眠恒常性の制御機構を調べるには、睡眠ダイナミクスに効果的に摂動を加えることが重要である。研究グループは、一日の総睡眠時間に加えて、睡眠と覚醒の間の遷移確率を指標とした睡眠表現型の評価を行っている。本年度は、中枢神経系の疾患治療薬および薬物依存的な精神疾患様症状を惹起する薬物投与下での睡眠表現型解析を行い、この睡眠と覚醒の遷移率に影響を与える薬物とその投与条件を複数見出した。

以上、研究グループは、昨年までに見出した睡眠制御遺伝子について、その表現型のさらなる解析を進めるとともに、タンパク質あるいは神経細胞レベルでの詳細な解析へと重点を移し、詳細な睡眠恒常性制御の分子機構の解析を進めている。

A research group led by Professor Hiroki R. Ueda (Graduate School of Medicine, the University of Tokyo) has discovered the involvement of Ca^{2+} -dependent hyperpolarization of cortical neuron in the regulation of sleep duration in rodents. This finding is based on the mathematical modeling of cortical neuronal membrane potential and genetic/pharmacological inhibition of ion-channels/pumps and protein kinases (i.e. NMDA receptors, voltage-dependent calcium channels, calcium-dependent potassium channels, ATP-dependent calcium pumps and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II) anticipated to be involved in the hyperpolarization pathway. Notably, the screening of mice phenotypes has been carried out by a newly-developed system for the non-invasive sleep measuring based on the pattern of rodents' respiration. In this fiscal year, this research group conducted a series of experiments to explore how such ion-channels/pumps are regulated (e.g. through the post-translational modification) during the sleep-wake cycle and to obtain an in-depth information about the sleep phenotype of genetically modified mice.

The research group monitored the sleep phenotypes of genetically modified mice related to the hyperpolarization pathway by using the EEG/EMG (electroencephalogram/electromyogram) recording, a conventional method for sleep phenotyping. The results indicated that phenotypes obtained through the respiration-based method and the EEG/EMG recording are consistent each other, indicating that the non-invasive respiration-based screening system can be applicable to several types of mutant mice.

This confirmation led the group to investigate the in-depth regulation of each ion-channel/pump during the sleep-wake cycle. The group focuses on the phosphorylation dependent control of ion-channels/pumps partly because the group found that calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to the induction of sleep. To investigate a large number of phosphorylation-sites mutants, a high-throughput assay for ion-channels/pumps' function was developed. The new assay system uses fluorescent probes working in the cultured cell on multi-well plates, thus it is possible to compare the activity of hundreds of mutant ion-channels/pumps in a single assay.

The research group is also developing a method to analyze cell function through the fluorescent imaging of transparent organs called CUBIC. The CUBIC has been shown to be applicable to not only the brain but also other organs, contributing to the understanding of homeostatic system among different organs. In this fiscal year, the group achieved the development of new chemical combination enabling an efficient tissue clearing against human organs that generally contain a higher amount of lipid than mice brain, otherwise making it difficult to obtain highly-transparent samples within a reasonable time. The group also set up a new light-sheet fluorescent microscope featuring an objective lens with increased depth of field and higher numerical aperture.

Not only observe the phenotype but also applying perturbations on sleep-wake dynamics is important to understand the homeostatic property of sleep control. In this fiscal year, the research group investigated the effect of several chemicals that are used for the treatment of neuropsychiatric disorders or the induction of substance-induced psychotic disorders. As a result, several substances were found to affect the sleep dynamics especially for the probability of sleep-to-wake and/or wake-to-sleep state.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 7 件、国際誌 4 件）

1. Tatsuki F., Sunagawa G.A., Shi S., Susaki E.A., Yukinaga H., Perrin D., Sumiyama K., Ukai-Tadenuma M., Fujishima H., Ohno R., Tone D., Ode K.L., Matsumoto K., Ueda H.R. Involvement of Ca(2+)-dependent hyperpolarization in sleep duration in mammals. *Neuron*. 2016, 90, 70-85. (* Accepted は昨年度、publication は本年度である)。
2. Narumi R., Shimizu Y., Ukai-Tadenuma M., Ode K.L., Kanda G.N., Shinohara Y., Sato A., Matsumoto K., Ueda H.R. Mass spectrometry-based absolute quantification reveals rhythmic variation of mouse circadian clock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016, 133, E3461-E3467.
3. Tainaka K., Kuno A., Kubota S.I., Murakami T., Ueda H.R. Chemical principles in tissue clearing and staining protocols for whole-body cell profiling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2016, 32, 713-741.
4. Ode K.L., Ukai H., Susaki E.A., Narumi R., Matsumoto K., Hara J., Koide N., Abe T., Kanemaki M.T., Kiyonari H., Ueda H.R. Knockout-rescue embryonic stem cell-derived mouse reveals circadian-period control by quality and quantity of CRY1. *Mol. Cell*. 2017, 65, 176-190.
5. 小野 宏晃, 洲崎 悦生, 上田 泰己. 新しい医療技術 組織透明化による 1 細胞レベルの三次元イメージング. *整形・災害外科*. 2016, 59, 1235-1240.
6. 茂田 大地, 金子 みずほ, 洲崎 悦生, 上田 泰己. 三次元組織における網羅的な一細胞解析のためのオミクス的アプローチ. *医学のあゆみ*. 2016, 258, 311-316.
7. 勝俣 敬寛, 洲崎 悦生, 上田 泰己. 生体透明化イメージングの現状と展望. *内分泌・糖尿病・代謝内科*. 2016, 42, 362-368.
8. Kuwajima K., Ode K.L., Ueda H.R. Regulatory mechanism of sleep duration by membrane potential of neurons in mammals. *生体の科学*. 2016, 67, 541-545.
9. 史籥逸, 大出晃士, 上田泰己. 概日時計と睡眠をコントロールする遺伝子ネットワーク. *Animus*. 2016, 88, 11-17.
10. Kon K., Ode K.L., Ueda H.R. Molecular Mechanisms of Circadian Rhythm and Sleep Homeostasis. *Brain Nerve*. 2017, 69, 257-264.
11. Yoshida K., Ode K.L., Ueda H.R. Mathematical Modeling of neuronal membrane potential in sleep. *実験医学*. 2017, 35, 879-882.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 個体の透明化による細胞可視化技術, 口頭, 上田泰己, 第 56 回日本呼吸器学会, 2016/4/8, 国内
2. 全身・全脳透明化の先に見えるもの～体内の「時間」の謎の解明に向けて～, 口頭, 上田泰己, 遺伝子デリバリー研究会, 2016/5/16, 国内

3. 全身・全脳透明化の先に見えるもの～体内の「時間」の理解に向けて～, 口頭, 上田泰己, 第 117 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会, 2016/5/19, 国内
4. 全身・全脳透明化の先に見えるもの～個体レベルのシステムバイオロジーの実現に向けて～, 口頭, 上田泰己, 第 43 回日本毒性学会 2016, 2016/7/1, 国内
5. 睡眠・覚醒システムの解明に向けて～哺乳類睡眠におけるカルシウム依存的な過分極機構の役割～, 口頭, 上田泰己, 第 41 回日本睡眠学会, 2016/7/8, 国内
6. Whole-body and Whole-organ Clearing and Imaging with Single-cell Resolution toward Organism-level Systems Biology in Mammals, 口頭, 上田泰己, 第 39 回日本神経科学大会, 2016/7/21, 国内
7. 全身・全脳透明化の先に見えるもの, 口頭, 上田泰己, 若手研究者フォーラム 2016, 2016/7/16, 国内
8. Whole-body/organ clearing and imaging with single-cell resolution: Toward organism-level systems biology in mammals, 口頭, 上田泰己, the NetSci Satellite Symposium, 2016/5/30, 国外
9. Towards system-level understanding of mammalian sleep, 口頭, 上田泰己, 2nd WQBP Symposium | 5 July 2016, 2016/7/05, 国外
10. Toward Organism-level Systems Biology in Mammals~Whole-body and whole-organ clearing and imaging with single-cell resolution, 口頭, Hiroki R. Ueda, LSFM2016, 2016/9/02, 国外
11. Toward Organism-level Systems Biology in Mammals~Whole-body and whole-organ clearing and imaging with single-cell resolution~, 口頭, 上田泰己, 第 13 回自治医科大学国際シンポジウム, 2016/10/28, 国内
12. Systems Biology of Mammalian Sleep/wake Cycles~Involvement of Ca²⁺-Dependent Hyperpolarization in Sleep Duration in Mammals.~, 口頭, 上田泰己, Towards understanding the molecular clockwork, 2016/11/11, 国内
13. Toward Organism-level Systems Biology in Mammals~Whole-body and whole-organ clearing and imaging with single-cell resolution~, 口頭, 上田泰己, 第 54 回日本生物物理シンポジウム, 2016/11/25, 国内
14. 個体レベルのシステム生物学に向けて～全脳・全身透明化による全細胞解析の実現～, 口頭, 上田泰己, 第 39 回日本分子生物学会, 2016/12/1, 国内
15. 全身・全脳透明化の先に見えるもの, 口頭, 上田泰己, nano tech 2017, 2017/2/24, 国内
16. Whole-body and whole-organ clearing and imaging with single-cell resolution, 口頭, Hiroki R. Ueda, The Bio Systems Design 3.0 Symposium, 2017/2/16, 国外
17. 全身・全脳透明化の先に見えるもの, 口頭, 上田泰己, 第 6 回 超異分野学会, 2017/3/2, 国内
18. Technologies toward organism-level systems biology: CUBIC-based cell-omics analysis and next-generation mouse genetics. 口頭, 洲崎悦生, Max Planck Florida Institute Seminar, 2017/2/15, 国外
19. Comprehensive cell and cell circuit analysis of whole organ/body toward the organism-level systems biology, ポスター, 洲崎悦生, SUNPOSIUM, Max Planck Florida Institute, 2017/2/13, 国外

20. 全身全細胞解析技術による個体レベルのシステム生物学の進展, 口頭, 洲崎悦生, 名古屋大学グリーン自然科学国際教育研究プログラム IGER セミナー・名古屋大学先端ナノバイオデバイス研究センター 特別セミナー, 2016/12/16, 国内
21. CUBIC: A Platform for Cell-Omics Analysis Toward the Organism-Level Systems Biology, 口頭, 洲崎悦生, Seminars@Bioinformatics institute (A-star), 2016/12/12, 国外
22. CUBIC: A Platform for Cell-Omics Analysis Toward the Organism-Level Systems Biology, 口頭, 洲崎悦生, NUS-JST(PRESTO) joint workshop, 2016/12/9, 国外
23. CUBIC: A Platform for Cell-Omics Analysis Toward the Organism-Level Systems Biology, 口頭, 洲崎悦生, EPD Lecture Series: Innovative technology platforms for integrated single cell analysis, 2016/12/8, 国外
24. CUBIC: cell-omics analysis of whole organ/body toward the organism-level systems biology, 口頭, 洲崎悦生, 国立台湾大学-東京大学ジョイントワークショップ, 2016/12/1, 国外
25. CUBIC: cell-omics analysis of whole organ/body toward the organism-level systems biology, 口頭, 洲崎悦生, International Conference on Single Cell Research 2016, 2016/11/17, 国内
26. 全身全細胞解析技術による個体レベルのシステム生物学の進展, 口頭, 洲崎悦生, 第4回細胞凝集研究会 2016, 2016/9/9, 国内
27. 全身全細胞解析技術による個体レベルのシステム生物学の進展, 口頭, 洲崎悦生, 京都バイオ計測センターシンポジウム: 「食・ヘルスケアから未病診断への新しいバイオ計測—デーブラーニングをめざして」, 2016/8/2, 国内
28. 個体システム生物学実現に向けた全身全細胞解析技術, 口頭, 洲崎悦生, 第37回日本炎症・再生医学会, 2016/6/16, 国内
29. Using MS at the bench: the post-translational landscape of circadian clock proteins, 口頭, 大出晃士, 第64回質量分析総合討論会, 2016/5/18, 国内
30. 哺乳類概日時計周期長を制御する生化学的基盤, 口頭, 大出晃士, 第16回日本抗加齢医学会総会, 2016/6/10, 国内
31. 非専門家のためのプロテオミクス活用作戦, 口頭, 大出晃士, 第89回日本生化学会大会, 2016/9/25, 国内
32. Multiple phosphorylation at flexible loops of cryptochrome additively modulates the period of mammalian circadian clock, 口頭, 大出晃士, 第54回日本生物物理学会年会, 2016/11/26, 国内
33. トリプル CRISPR 法を用いた高効率な遺伝子ノックアウトマウス作出体制の実現, ポスター, 大野怜一朗, 第50回 実験動物技術者協会総会, 2016/9/29, 国内
34. The role of Ca²⁺-dependent hyperpolarization pathway underlying sleep homeostasis, ポスター, 史蕭逸, 30th The International College of Neuropsychopharmacology World Congress of Neuropsychopharmacology, 2016/7/3, 国外
35. Involvement of Ca²⁺-dependent hyperpolarization in sleep duration in mammals, ポスター, 史蕭逸, 23th Congress of the European Sleep Research Society, 2016/9/13, 国外
36. The role of Ca²⁺-dependent hyperpolarization pathway underlying sleep-duration regulation, ポスター, 史蕭逸, The 5th Annual IIS Symposium, 2016/12/12, 国内

37. Novel post-translational regulations of SK channel revealed by high-throughput and high-resolution ion channel profiling, ポスター, 戸根大輔, The International College of Neuropsychopharmacology, 2016/7/3, 国外
38. Whole-Body Imaging with Single Cell Resolution for Unbiased Analysis of Cell Status, ポスター, 久保田晋平, The 5th JCA-AACR Special Joint Conference, 2016/7/13, 国内
39. Quantitative cell profiling with whole-organ imaging, ポスター, 久保田晋平, QBiC symposium 2016, 2016/9/7, 国内
40. Whole-organ quantitative analysis of cancer metastasis, ポスター, 久保田晋平, 第75回日本癌学会学術総会, 2016/10/6, 口頭
41. Whole-organ pathology of cancer metastasis with single cell resolution, ポスター, 久保田晋平, KEYSTONE SYMPOSIA Inflammation-Driven Cancer: Mechanisms to Therapy, 2017/27, 国外
42. Whole-body quantitative analysis of cancer metastasis, 口頭, 久保田晋平, 第90回日本薬理学会年会, 2017/3/15, 国内
43. CUBIC-X: Whole-organ cell analysis of mammalian brain with expansion chemical cocktails, ポスター, 村上達哉, Society for Neuroscience, 2016/11/13, 国外
44. CUBIC-Atlas: Scalable Single-cell-resolution Mouse Brain Atlas by Whole-brain Cell Profiling, 口頭, 村上達哉, 日本薬理学会, 2017/3/15, 国内
45. マウス皮質スライスを用いたCa²⁺依存性過分極経路の検証, 口頭, 勝俣敬寛, 第90回日本薬理学会年会, 2017/3/15, 国内
46. 哺乳類における睡眠覚醒のコンソリデーション制御機構へのカルシウム依存神経過分極経路の関与, 口頭, 張千恵, 第90回日本薬理学会年会, 2017/3/16

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 全身透明化技術による1細胞解像度での全身解析の実現, 口頭, 上田泰己, 千里ライフサイエンスセミナー(神経と免疫・炎症のクロストーク), 2016/5/31, 国内
2. 交配を必要としない哺乳類遺伝学の確立～個体レベルのシステム生物学の実現に向けて～, 口頭, 上田泰己, BioJapan2016, 2016/10/12, 国内
3. 全身全細胞解析技術による個体レベルのシステム生物学の進展, 口頭, 洲崎悦生, JASIS2016, 2016/9/8, 国内

(4) 特許出願

当該年度に出願した特許は無い。