

潜在的睡眠改善成分の新規イメージング技術による探索

筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構

上田 壮志

心身の健康を支えるのは睡眠である。その一方、現代社会は深夜まで煌々と明かりが灯る利便性と引き換えに睡眠リズムが乱れやすい環境となっている。日本では成人の20%が睡眠に問題を感じ、5%が睡眠薬を服用する。睡眠不足による経済的損失は日本だけでも年間15兆円とアメリカのRAND研究所は算出している (Hafner et al., 2016)。睡眠の不足は不注意や苛立ちを起こすだけでなく、代謝異常や精神疾患の原因でもある。睡眠を妨害されたラットが摂食量増加にもかかわらず数日で死に至る事実は、睡眠が脳や代謝だけでなく生命を支え、それが代替不可なことを示す (Rechtschaffen et al., 1983)。

現代社会においてこの生命に必須な睡眠は大きく不足している。しかし、睡眠不足は食事など別の方法では補えない。さらに睡眠時間を十分に確保することも社会環境として容易ではない。ならば、時間だけでなく質で補えばよい。睡眠の質はノンレム睡眠中の脳波の徐波(1~4 Hz)の大きさが反映する。この徐波誘導において、既存の睡眠導入薬や食品はあまり効果的ではない。現在主流のベンゾジアゼピン系睡眠導入剤による睡眠は徐波が小さく、メラトニンやセロトニンは体内時計や情動に作用した入眠で徐波には影響しない。本研究では、近年発見された徐波関連分子 salt-inducible kinase 3 (SIK3) に着目する (Funato et al., 2016)。SIK3 は脳にも発現するキナーゼで、SIK3 活性の変化が徐波を誘導することが示唆されている。つまり、SIK3 活性を操作できれば、徐波の大きな睡眠誘導の道標となる。

本研究では、この SIK3 活性を変調する因子をスクリーニングする。予防医学的観点から豆類・穀類成分が SIK3 を活性化するかを探索する。豆類・穀類は睡眠に良い影響をもたらすが、具体的なメカニズムや成分が未解明である。例えば、イソフラボンは睡眠に良いという報告があるが (Cui et al., 2015)、睡眠データが自己申告であるため、徐波への影響など詳細が不明である。スクリーニングの手法としてキナーゼ活性を蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) で検出するイメージング技術 the extension for enhanced visualization by evading extraFRET (Eevee)を用いる (Komatsu et al., 2011)。この技術で開発された SIK3 センサーを用いて (図1)、豆類・穀類に含まれる成分が SIK3 活性に影響するかを in vitro で探索する。

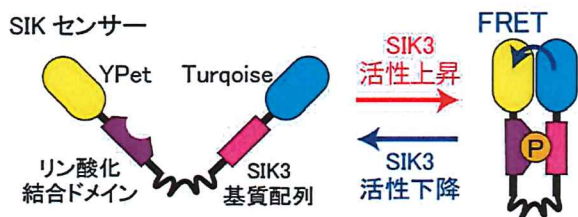


図1 SIK3 センサーの概略

センサーには SIK3 基質配列が組み込まれており、ここがリン酸化されると構造変化が起こり、ドナー (Turquoise) とアクセプター (YPet) の距離が接近し、FRET が生じつ。つまり、FRET 効率が SIK3 のキナーゼ活性と相関する仕組みである。

実験方法

1. 遺伝子導入

HEK293T 細胞 (理化学研究所バイオリソース研究センター由来) を4分面のガラスボトムシャーレ (CELLview, Greiner) に5~15%の割合でまず播種し培養した。播種の翌日に遺伝子導入試薬 (Lipofectamine LTX, ThermoFisher) を用いて 3x-FLAG-SIK3 と SIK3 センサーを HEK293T 細胞に導入した。

2. 試料

イソフラボン類の非配糖体であるダイゼイン、ゲニステイン及びグリシテイン、配糖体であるダイジン、さらにイソフラボン粗抽出物であるアグリコン型イソフラボンの5つのサンプルを実験に使用した。全て富士フィルムから購入した。ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン、ダイジンはDMSOを溶媒として溶液を作成した。アグリコン型イソフラボンはエタノールで溶解した。

3. イメージング

遺伝子導入から2日後、培養液をイメージング溶液（FluoroBrite DMEM, ThermoFisher）に交換して、培養チャンバー付きの共焦点レーザー倒立顕微鏡（Axio Observer, LSM700, Zeiss）に設置した（図2）。励起は445 nmレーザーを使用した。ドナー（Turquoise）の蛍光は490 nmのハイパスフィルターで、アクセプター（YPet）の蛍光は530-555 nmのバンドパスフィルターで取得し、細胞形態の観察のために微分干渉像も同時に取得した（図2）。イメージングは1分ごとに行い、各試薬はイメージング開始から10分後に加えた。

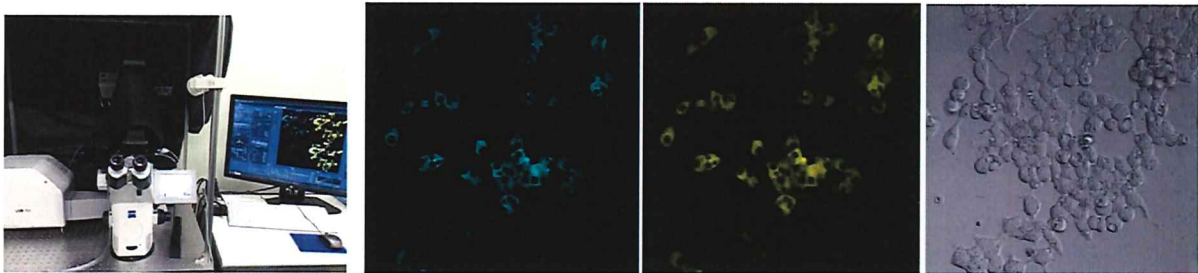


図2 蛍光顕微鏡と蛍光画像

蛍光観察は共焦点レーザー倒立顕微鏡（左端）を用いた。この顕微鏡には小型インキュベータが備わっているため、温度と湿度は一定を維持することができる。（左2番目から右端まで順に）ドナーである Turquoise 画像、アクセプターである Ypet 画像、微分干渉画像を取得した。

4. データ解析

得られた画像データは画像解析ソフトウェア Fiji/ImageJ と統計ソフトウェア R を用いて解析した。解析コードは自作した。まず背景信号（細胞の存在しない領域の蛍光強度）をフレームごとに差し引き、その後、画像内の SIK センサー発現細胞各々に region of interest (ROI)を設定し、ROI内の平均蛍光強度をチャンネルごと（ドナーとアクセプター）に算出した。さらに下記の通り R_t を計算した。

$$R_t = \frac{\text{Acceptor}_t}{\text{Donor}_t}$$

ここで Acceptor_t と Donor_t はある時間 t でのアクセプターとドナーの蛍光強度を表す。さらにベースライン（試薬添加前の R_t ）からの変化率で比較するために、下記の通り $\Delta R_t/R_0$ を計算した。

$$\Delta R_t/R_0 = \frac{R_t - R_0}{R_0} \times 100$$

ここで R_0 は試薬添加前の R_t の平均値を表す。 $\Delta R_t/R_0$ は以降 $\Delta R/R$ と表記する。

実験結果

各試料で4種の用量を添加した。各条件での解析細胞数は131~229個であった。図3に実験結果を表す。

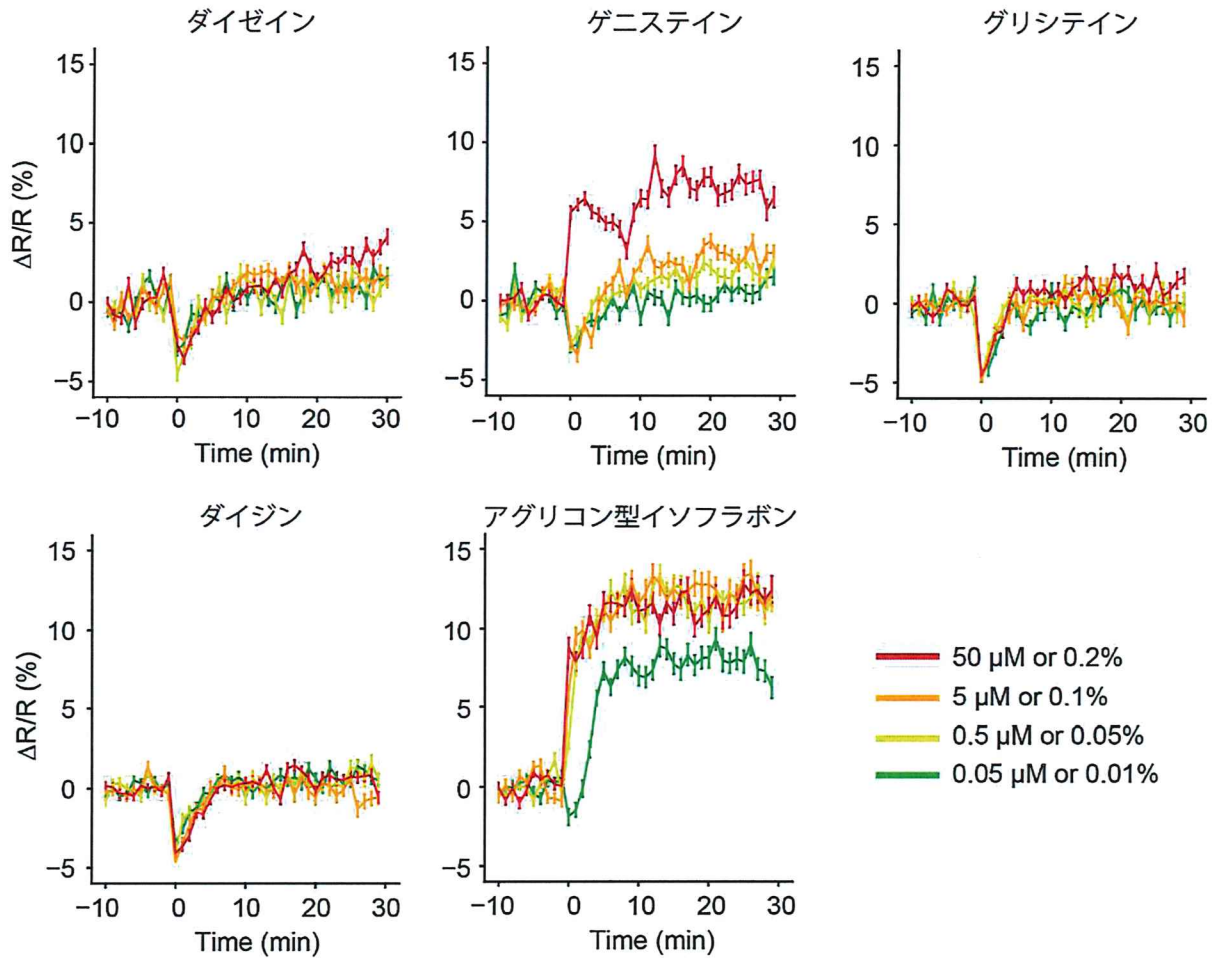


図3 解析結果

各条件、各時点の平均値をプロットした。エラーバーは標準偏差を示す。各試料は時間軸0の時点で加えた。アグリコン型イソフラボン以外の単位はモル濃度、アグリコン型イソフラボンのみ質量パーセント濃度を示した。試料添加後の一過性の $\Delta R/R$ 低下は細胞の揺れなどが起因のアーティファクトであるため、変化の議論には加えない。

ダイゼイン、グリシテイン、ダイジンの3つほどの濃度でも変化が見られなかった。これはこれら3つの試料はSIK3活性に変調を与えないことを示唆する。ゲニステインは50 μ Mのみで $\Delta R/R$ の上昇が見られ、それ未満の濃度では効果は無かった。これは高濃度ゲニステイン存在下でSIK3が活性することを示唆する。アグリコン型イソフラボンでは低用量から $\Delta R/R$ の上昇が観察された。この上昇の程度は0.01%と0.05%では差があったが、0.05%~0.2%の範囲では同じであった。これは少量のアグリコン型イソフラボンでSIK3は飽和近くまで活性化することを示唆する。

考察

SIK3活性に対して最も変化の大きかったものは粗抽出物であるアグリコン型イソフラボンであった。しかし、非配糖体であるダイゼイン、ゲニステイン、グリシテインに大きな効果が見られなかった。これは粗抽出物に含まれる未知の化合物、もしくは複数の化合物の協同作用が大きなSIK3活性能を持つことを示唆する。この未知の化合物に睡眠と徐波を促す機能があることが期待される。今後、この化合物の同定に努めたい。

要約

徐波睡眠と関連するキナーゼであるSIK3に着目して、睡眠の質を向上させる大豆成分のスクリーニングをSIK3活性イメージング技術で行った。イソフラボン類の非配糖体であるダイゼイン、ゲニステイン及びグリシテイン、配糖体であるダイジン、さらにイソフラボン粗抽出物であるアグリコン型イソフラボンの5つのサンプルを本実験では試し、粗抽出物であるアグリコン型イソフラボンで最も大きな活性化が見られた。この粗抽出物に含まれるであろう既知の化合物では同様の変化が見られなかったことから、未知の化合物によるSIK3の活性化と考えられる。今後、この化合物を同定し、SIK3活性化による徐波睡眠の誘導実現の道標としたい。

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご支援いただいた公益財団法人タカノ農芸化学研究財団に心から感謝申し上げます。また、実験と解析の多くを担っていただいた石川有紀子さん、本研究にご協力頂きました松田道行先生、柳沢正史先生、さらに筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構の皆様に深く感謝いたします。

文献

Cui, Y., Niu, K., Huang, C., Momma, H., Guan, L., Kobayashi, Y., Guo, H., Chujo, M., Otomo, A., and Nagatomi, R. (2015). Relationship between daily isoflavone intake and sleep in Japanese adults: a cross-sectional study. *Nutrition Journal* 14, 127.

Funato, H., Miyoshi, C., Fujiyama, T., Kanda, T., Sato, M., Wang, Z., Ma, J., Nakane, S.,

Tomita, J., Ikkyu, A., et al. (2016). Forward-genetics analysis of sleep in randomly mutagenized mice. *Nature* *539*, 378–383.

Hafner, M., Stepanek, M., Taylor, J., Troxel, W.M., and Stolk, C.V. (2016). Why sleep matters — the economic costs of insufficient sleep: A cross-country comparative analysis (Santa Monica, CA: RAND Corporation).

Komatsu, N., Aoki, K., Yamada, M., Yukinaga, H., Fujita, Y., Kamioka, Y., and Matsuda, M. (2011). Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *MBoC* *22*, 4647–4656.

Rechtschaffen, A., Gilliland, M., Bergmann, B., and Winter, J. (1983). Physiological correlates of prolonged sleep deprivation in rats. *Science* *221*, 182–184.