

2023 年度年次報告書
細胞の動的・高次構造体
2022 年度採択研究代表者

戸田 浩史

筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構
助教

生体防御と睡眠: 液-液相分離がつなぐ2つの高次機能

研究成果の概要

Nemuri の抗菌ペプチド作用機序の確認

まず *in vitro* 培養細胞系 (S2 細胞) を用いて、Nemur-ALFA を恒常的に発現させる細胞株を得るため、アクチンプロモーターの下流に Nemuri-ALFA をつないだプラスミドを作製し薬剤耐性をセレクションマーカーとして恒常的に Nemuri-ALFA を発現する S2 培養細胞株の取得に成功した。さらに、上清中に Nemuri-ALFA が分泌されていることを確認したところ、切断型の Nemuri ペプチドが存在することが判明した。このペプチドがどこで切断されているのかを確認するため、ALFA 抗体で精製後、プロテインシークエンサーを用いて切断箇所を同定することに成功した。その結果、Furin プロテアーゼ切断酵素サイトで切断されていることが判明した。さらにこの切断された Nemuri ペプチドの抗菌活性を測定するため、化学合成によって Nemuri ペプチドを合成した。その結果、Nemuri の全長では抗菌活性を示さないが切断型ペプチドでは抗菌活性を示すことを明らかにした。Nemuri ペプチドに蛍光色素を付加したペプチド合成もおこない、これを菌と混合したところ Nemuri ペプチドは菌の膜を破壊することなく菌の内部に局在する事が明らかになった。さらに、Nemuri ペプチドは菌内の特定の核酸と局在していることも明らかになった。

Nemuri とその相互作用因子が睡眠に与える影響の検証

昨年度までに同定した Nemuri 相互作用因子の 1 つであるタンパク質修飾因子に着目し、この因子の解析をおこなった。まず、この因子に対する抗体を作成し脳神経細胞に発現していることを確認した。さらに、細胞内で Nemuri と一部共局在することも確認した。このタンパク質修飾因子が睡眠に重要な役割を示す先行研究がこれまでになかったもので、ショウジョウバエの行動学を用いて検証した。具体的には、脳神経特異的に RNAi ノックダウンをおこない Nemuri と同様にストレス誘因性の睡眠に重要であるかを検証したところ、通常の睡眠には影響しないが熱ショックや細菌感染によって引き起こされる睡眠に重要な役割を果たすことが判明した。