

柳沢 正史

筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構  
機構長・教授

## 光を用いた睡眠の機能と制御機構の統合的解析

### § 1. 研究成果の概要

睡眠の理解と制御を目的とした複数の研究プロジェクトが進行している。

【柳沢 G】睡眠の自発性の根源である「眠気」は日常的に体感できるが、その生物学的実態は未知である。我々のグループが同定した新規睡眠因子である salt-inducible kinase 3 (SIK3)はその変異やリン酸化状態が「眠気」と相関することから、「眠気」の中核を担うと考えられる (Wang et al, Nature, 2018)。本研究の目的は SIK3 活性のイメージングによる「眠気」の可視化である。京都大学松田道行教授らと共同で SIK3 活性を検出する蛍光プローブ Eevee-SIK を開発した。この Eevee-SIK を脳に発現するマウスを作製し、in vivo イメージングを進める。

【櫻井 G】昨年度までに哺乳類のフォトプシンを使って Gi 共役のシステムを模倣したシステムを用いて、神経操作を行い、オレキシンニューロンの下流、ノルアドレナリンニューロンやセロトニンニューロンを抑制することによる効果を報告した (Hasegawa et al., PNAS 2017; Soya, et al., Nat. Commun. 2017)。しかし、興奮性のツールがさらに有用と考え、フォトプシンと各種 G タンパク質共役受容体キメラの作成により、Gs や Gq と共役するツールの開発もすすめているほか、メラノプシンと Cry 共発現を用いた操作も検討している。並行して解析するべきペプチドやモノアミン系が構成する睡眠覚醒回路のコネクトーム解析を行っている (Saito, et al. J. Neurosci., 2018)。また、Tet-off システムを改変した光駆動性の転写制御ツールの開発もすすめている。

【坂口 G】昨年度、脳局所の機能負荷と睡眠状態の変化に応じて変化する代謝分子を見出した。本年度はそのいくつかの候補分子に関する機能解析を in vivo で行った。また、自由行動条件下で自然な睡眠を行うマウスの脳局所において、各睡眠ステージにおいて活動を变化させるニューロンの長期に連続したカルシウムイメージングを行う技術を確立させた。

【ラザルス G】アデノシン A2A 受容体の正のアロステリック調節薬の同定に成功し、それによる A2A 受容体シグナルの増強が心血管系に影響することなく自然な睡眠を誘導することを証明した (Korkutata et al. Neuropharmacology, 2018)。また、in vivo 光薬理学手法の開発において、光照

射により化学構造が変化し、活性薬物が放出される新規化合物の合成に成功した。

【フォクト G】 オプトジェネティクスによる光刺激下での睡眠記録を行った。青斑核における AAV 注入での ChR2 の発現により、覚醒に関してこれまでの報告と異なる結果を得た。これまでに野生型、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)-Cre マウス、ノルアドレナリントランスポーター(NAT)-Cre マウスを用いて記録を行った。光刺激(1Hz, 5ms duration)を行ったところ、一部のマウスで明期での睡眠増加がみられた。現在、より正確な青斑核の光刺激のために NAT-Cre マウスのコロニーを再作製している。

【林 G】 線虫をモデル動物として睡眠の生理作用を明らかにすることにも取り組んでいる。線虫は、全身が透明なため、生きたまま体内の神経細胞まで容易に光を届けることができる。この利点を活用し、睡眠中の線虫を光刺激等により強制的に覚醒させる技術を開発して、睡眠阻害が特定の生理機能に影響を与える可能性を見出した。本年度は、線虫の睡眠の計測をハイスループットに行う実験系を利用して、睡眠に異常が起きる変異体の順遺伝学的スクリーニングを行った。その結果極端に睡眠量の多い変異体や少ない変異体の単離に成功した。原因遺伝子を同定することで、睡眠の生理的意義や分子機構の理解につながるものと期待される。

#### 【代表的な原著論文】

Wang Z, Ma J, Miyoshi C, Li Y, Sato M, Ogawa Y, Lou T, Ma C, Gao X, Lee C, Fujiyama T, Yang X, Zhou S, Hotta-Hirashima N, Klewe-Nebenius D, Ikkyu A, Kakizaki M, Kanno S, Cao L, Takahashi S, Peng J, Yu Y, Funato H, Yanagisawa M, Liu Q., Quantitative phosphoproteomic analysis of the molecular substrates of sleep need, *Nature*. 2018 Jun;558(7710):435-439. doi: 10.1038/s41586-018-0218-8.1.

## § 2. 研究実施体制

### (1)「柳沢」グループ

- ① 研究代表者:柳沢 正史 (筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構、機構長・教授)
- ② 研究項目
  - ・睡眠制御因子の可視化

### (2)「櫻井」グループ

- ① 主たる共同研究者:櫻井 武 (筑波大学医学医療系(国際統合睡眠医科学研究機構)、教授)
- ② 研究項目
  - ・代謝向性神経伝達を模倣する新規光遺伝学ツールおよび光で遺伝子発現を制御する新規技術の開発

### (3)「坂口」グループ

- ① 研究代表者:坂口 昌徳 (筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構、准教授)
- ② 研究項目
  - ・光遺伝学とメタボローム解析による眠気の化学的実態の同定

### (4)「ラザルス」グループ

- ① 主たる共同研究者:ラザルス ミハエル (国際統合睡眠医科学研究機構、准教授)
- ② 研究項目
  - ・アデノシン受容体を利用した in vivo 光薬理学手法の開発と展開

### (5)「フォクト」グループ

- ① 研究代表者:フォクト キャスパー (筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構、准教授)
- ② 研究項目
  - ・睡眠徐波の制御機構の解明

### (6)「林」グループ

- ① 主たる共同研究者:林 悠 (国際統合睡眠医科学研究機構、准教授)
- ② 研究項目
  - ・光遺伝学と線虫遺伝学を組み合わせた睡眠の生理的作用の解明