

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】

我々が日々体感する「眠気」の生物学的実態に迫るべく、新規睡眠因子 salt-inducible kinase 3 (SIK3)活性の視覚化に挑んでいる。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」の中核と考えられるが、生体内でのその活性の動態は不明なままである。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 と HyBRET-SIK を開発した。これらのプローブを神経系に発現する線虫及びマウスを作製し、in vivo イメージングを実施している。

【櫻井 G】

光で G タンパク質シグナリングを活性化させるオプトジェネティクスツールを開発している。本年度は特に、哺乳類 OPN4 を用いた Gq シグナリングの活性化が個体レベルで有用であることを示した。我々は最近、視床下部のある神経細胞を活性化することで、マウスが冬眠状態に移行することを発見したが、この冬眠現象を評価系として活用することでオプトジェネティクスツールの開発・改良を行なった。OPN4 をこの神経細胞に発現させて光照射すると、マウス体温の低下が観察された。重要なことに、一般的に使用されている光刺激の光強度の 1000 倍以上弱い光 (5-10 μ W) でも個体レベルで生理現象を引き起こすことが可能であった。また、6 時間という極めて長い時間、光刺激をマウスに与えても効果は持続していた。チャンネルロドプシンに比べて、OPN4 は刺激に使用するレーザー強度、細胞毒性、効果の持続時間の観点で極めて優れていると考えられる。

【坂口 G】

本年度は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に取り組んだ。質量分析計による高分解能・ハイスループットスクリーニングにより、脳局所の機能負荷と睡眠状態に応じて変

動する代謝分子を見出した。また、そのいくつかの候補分子に関する機能解析を行った。さらに、柳沢 G、櫻井 G との共同でレム睡眠時に記憶を固定化するのに必要な神経細胞集団を同定した。また、林 G の研究に貢献し、アルツハイマー病における睡眠と記憶の機能相関の解明に貢献した。さらに、任意の光でカルシウムイメージングと光操作を同時に可能とする小型脳内視鏡を完成させた(図 1)。そして、機械学習による実時間全自動睡眠判定装置

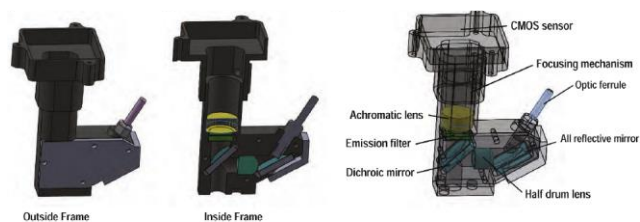


図 1. 自由行動下で任意の光で Ca イメージングと光遺伝学操作を可能にする顕微鏡。外観(左), 光路(中), 内部構造(右)を図示。オープンソースで自由に作成できる設計図を公開した。Srinivasan et al., BBRC, 2019 より抜粋

を開発した。これらを組み合わせることで睡眠中の脳内の神経活動を生きたまま観察し、操作することで睡眠時の特有な神経活動とその機能との因果関係を証明することが可能となった。

【ラザルス G】

我々はモチベーションや快楽に関与する脳部位、側坐核による睡眠誘発機能を見出した。側坐核はモチベーション刺激と睡眠制御をつなぐ役割を果たすため、例えば退屈な時の眠気などはこれにより説明されるかもしれないと考えられる。そこで本年度、我々は睡眠を誘発するアデノシン A2A 受容体の正のアロステリック調節薬を世界に先駆け同定し、またそれが心血管系作用を示さないことを発見し、報告した。

【フォクト G】

我々は本年度、光遺伝学的な刺激に対する大脳皮質の応答を睡眠状態と覚醒状態で比較した。驚くべきことに、ノンレム睡眠時における応答は覚醒時のものに比べて非常に大きいことが判明した。応答の速さから考えると、上の現象は睡眠と覚醒における神経修飾物質の差に依存していると推測された。この仮説を検証したところ、応答の変動はノンレム睡眠時のフィードフォワード障害の低下であることが明らかになった。我々の得た、覚醒時よりもノンレム睡眠時に大脳皮質の応答性が高まるという結論は、ノンレム睡眠の間に大脳皮質が回復機能のために活発に活動しているという最近の知見と一致している。

【林 G】

我々は睡眠の生理作用を明らかにするためにマウスとともに線虫もモデル生物として研究に取り組んでいる。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。この利点を生か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、睡眠障害が特定の生理機能に影響を与える可能性を見出した。さらに、線虫の睡眠計測をハイスループットに行う実験系を開発して、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。本年度は、上記の変異

体の内いくつかの原因遺伝子を同定することができた。今後、この遺伝子の詳細な解析により、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】

1. Mustafa Korkutata, Tsuyoshi Saitoh, Yoan Cherasse, Shuji Ioka, Feng Duo, Rujie Qin, Nobuyuki Murakoshi, Shinya Fujii, Xuzhao Zhou, Fumihiro Sugiyama, Jiang-Fan Chen, Hidetoshi Kumagai, Hiroshi Nagase and Michael Lazarus, “Enhancing endogenous adenosine A2A receptor signaling induces slow-wave sleep without affecting body temperature and cardiovascular function”, *Neuropharmacology*, vol. 144, pp. 122-132, 2019
2. Deependra Kumar, Iyo Koyanagi, Alvaro Carrier-Ruiz, Pablo Vergara, Sakthivel Srinivasan, Yuki Sugaya, Masatoshi Kasuya, Tzong-Shiue Yu, Kaspar E Vogt, Masafumi Muratani, Takaaki Ohnishi, Sima Singh, Catia M Teixeira, Yoan Cherasse, Toshie Naoi, Szu-Han Wang, Pimpimon Nondhalee, Boran A H Osman, Naoko Kaneko, Kazunobu Sawamoto, Steven G Kernie, Takeshi Sakurai, Thomas J McHugh, Masanobu Kano, Masashi Yanagisawa and Masanori Sakaguchi, “Sparse Activity of Hippocampal Adult-Born Neurons During REM Sleep Is Necessary for Memory Consolidation”, *Neuron*, in press (online ahead of print, May 20, 2020).
3. Tohru M. Takahashi, Genshiro A. Sunagawa, Shingo Soya, Manabu Abe, Katsuyasu Sakurai, Kiyomi Ishikawa, Masashi Yanagisawa, Hiroshi Hama, Emi Hasegawa, Atsushi Miyawaki, Kenji Sakimura, Masayo Takahashi and Takeshi Sakurai, “A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents”, *Nature*, in press (online ahead of print, Jun 11, 2020).

§ 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 (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
 - ・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 キヤスパー (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 (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
 - ・光遺伝学と線虫遺伝学を組み合わせた睡眠の生理的作用の解明