

令和 2 年 4 月 16 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21619

研究課題名(和文)神経性ペプチドから探る睡眠時間分布の設計原理

研究課題名(英文)Understanding of sleep/wake time distributions in mammals

研究代表者

神田 元紀(Kanda, Genki)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：70755115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：睡眠覚醒は概日リズムによって制御される代表的な個体行動であるものの、その機構は不明な点が多い。本研究では、これまでの研究の知見から睡眠ホメオスタシスの制御にアセチルコリンの関与が強く疑われていたため、アセチルコリン受容体ファミリーの遺伝子欠失マウスを作製し、睡眠状態の解析を行ったところ、ムスカリン型受容体Chrm1およびChrm3遺伝子欠失マウスにおいて睡眠量の顕著な減少が観察された。また、Chrm1/Chrm3遺伝子の両欠失マウスではより大きな総睡眠量の減少が観察されたことに加えて、レム睡眠がほぼなくなっていることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、レム睡眠の有無を決定する遺伝子を初めて同定しました。レム睡眠の誘導や睡眠覚醒における神経伝達物質アセチルコリンの役割の理解に貢献すると期待できます。また、本成果を利用して、レム睡眠を特異的に操作する技術や薬剤が開発され、さらなる睡眠研究ならびに睡眠障害に対する効果的な治療薬の開発が進展することが期待されます。

研究成果の概要(英文)：Sleep-wake is a typical individual behavior regulated by circadian rhythms, but its mechanism remains unclear. Because the involvement of acetylcholine in the regulation of sleep homeostasis was strongly suspected based on the findings of previous studies, we generated knockout mice of the acetylcholine receptor family and analyzed their sleep status. A marked decrease in sleep volume was observed in mice lacking the muscarinic type receptor Chrm1 or Chrm3 genes. In addition, the double knockout mice of the Chrm1/Chrm3 gene were found to have almost no REM sleep.

研究分野：分子生物学

キーワード：睡眠 CRISPR/Cas レム睡眠

1. 研究開始当初の背景

動物の状態は覚醒、レム睡眠、ノンレム睡眠の三つに分類される。この三つの状態は、脳波と筋電図で定義される。その中でもレム睡眠は、筋電図上では寝ている（ノンレム睡眠時と似ている）のに脳波は起きている（覚醒時と似ている）という中間の状態である。記憶の固定などは、レム睡眠時に多く起こるイベントとして知られており、レム睡眠は動物にとって重要な状態だと言われている。一方で、レム睡眠がどのように作られるのかについては、神経回路レベルでは少しずつ詳細が明らかになってきてはいるものの、分子・遺伝子レベルではほとんど分かっておらず、レム睡眠のない個体やレム睡眠がなくなっても生きられる個体の存在は、これまで全く知られていなかった。特に遺伝子の同定に関しては、1日の総睡眠量の制御（ホメオスタシス）を制御する遺伝子は近年いくつか発見されつつあるものの（Sunagawa et al, 2016, *Cell Reports*; Tatsuki et al, 2016, *Neuron*; Funato et al, 2016, *Nature*）、レム・ノンレム睡眠を司る遺伝子の同定はあまり進んでいなかった。その原因としては遺伝子改変マウスの作製および表現型解析に時間がかかることが挙げられる。

レム睡眠を制御する分子の候補としては、神経伝達物質のアセチルコリンがよく研究されており、いくつかの薬理的な証拠が得られている。例えば、脳幹にアセチルコリン受容体作動薬を投与すると、レム睡眠様の状態が誘導される。また、レム睡眠中の脳幹や、レム睡眠および覚醒時の大脳皮質において、アセチルコリンが豊富に放出されていることが報告されている（Kodama et al., 1990, *Neuroscience Letters*; Ruivo et al., 2017, *Cell Reports*）。しかし、アセチルコリンを放出するコリン作動性神経は脳内に広く投射しており、他の多くの神経に対してもさまざまな影響を与えると予想されている。さらに、脳内のアセチルコリン受容体には 11 種類のニコチン型受容体と 5 種類のムスカリン型受容体が存在し、一つ一つ調べるためには膨大な時間と労力がかかるため、アセチルコリンがレム睡眠に本当に不可欠であるかどうかはこれまで不明であった。

2. 研究の目的

研究開始時点において1日の総睡眠量に顕著な差が検出された遺伝子改変マウス（以下 TrkA-TeNT マウス）が得られていた。TrkA-TeNT マウスは *TrkA* 遺伝子発現神経細胞を特異的に不活化するマウスであったが、そのメカニズムや下流因子は未知であった。下流の候補遺伝子は数多く存在するため、そのノックアウトマウスの作製と睡眠解析は古典的な方法では時間の制約上実施が難しいものであった。本研究では、次項に示すトリプル CRISPR 法と SSS 法を駆使するこ

とにより、TrkA-TeNT マウスにおける *TrkA* 遺伝子発現細胞が睡眠覚醒にどのように寄与しているのかの解明を試みた。

3. 研究の方法

TrkA-TeNT マウスにおける *TrkA* 遺伝子発現神経細胞を透明脳解析（CUBIC 法、Susaki et al., 2014, *Cell*）ならびに蛍光 in situ hybridization によって評価した。

睡眠解析は以下の 2 段階に分けて行った。まず、1 次スクリーニングとして、マウスの呼吸をモニタリングすることで睡眠覚醒状態を非侵襲に自動で解析する測定系（Sunagawa et al., 2016, *Cell Reports*）を利用した。この方法は、外科的手術を伴わないため多数の遺伝子改変マウスの睡眠状態を高速に測定することが可能である。一方で、SSS は高い正確性をもつものの 100% ではないことに加えて、REM と NREM の区別が現時点では不可能なため、2 次スクリーニングとして脳波筋電図（EEG/EMG）による解析も行った。本方法は外科的手術を伴うためスループット低いものの、定義通りの Wake / REM / NREM の状態を観察可能である。

ノックアウトマウスの作製は Triple-CRISPR 法を用いた。従来の CRISPR/Cas 法では 1 つの遺伝子（対象遺伝子）に対して 1 ヶ所を guide RNA で切断していたが、3 ヶ所分の guide RNA を同時にインジェクションすることで、1 世代目で極めて高い確率（ほぼ 100%）で大量の遺伝子ノックアウトマウスが作製できる方法である（Sunagawa et al., 2016, *Cell Reports*）。F0 世代での表現型解析が可能となるため、実験の高速化が期待できた。

4. 研究成果

まず、TrkA-TeNT マウスにおける *TrkA* 遺伝子発現神経細胞を透明脳解析ならびに蛍光 in situ hybridization によって評価したところ、ターゲットとした preoptic area / basal forebrain (POA/BF) 領域特異的に発現していたことを確認した。

これまでの TrkA-TeNT マウスに関する研究の知見から睡眠ホメオスタシスの制御にアセチルコリンの関与が強く疑われていたため、アセチルコリン受容体の遺伝子を欠失させたマウスの睡眠状態を評価することで、どの受容体が睡眠量の制御に重要なかを調べた。まず、1 次スクリーニングとして、トリプル CRISPR 法でアセチルコリン受容体遺伝子を一つずつ欠失させたマウスを作製し、高速に睡眠表現型を解析することができる SSS 法により睡眠量を測定した。ニコチン型アセチルコリン受容体のノックアウトマウ

スは顕著な睡眠量の変化を見出さなかった。一方で、ムスカリン型アセチルコリン受容体 *Chrm1* および *Chrm3* 遺伝子ノックアウトマウスにおいては睡眠量の顕著な減少が観察された (図 1)。

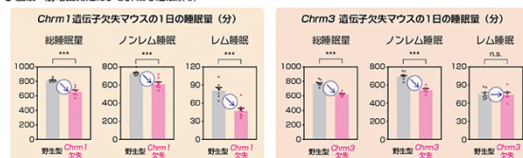
● SSS 法による1次スクリーニング

欠失させた遺伝子	ニコチン型アセチルコリン受容体		ムスカリン型アセチルコリン受容体				
	<i>Chrna2, a4, a5, a6, a7, a9, a10, b2, b3, b4</i> のそれぞれ		<i>Chrm1</i>	<i>Chrm2</i>	<i>Chrm3</i>	<i>Chrm4</i>	<i>Chrm5</i>
睡眠量 (野生型との差)	基準に達する差なし		▲ 82分	▲ 40分	▲ 118分	▲ 42分	▲ 29分

図 1 アセチルコリン受容体の網羅的に欠失させたマウスを用いた睡眠量の評価

次に、*Chrm1* または *Chrm3* 遺伝子の欠失マウスの睡眠量を、脳波・筋電図測定を用いてより詳しく解析したところ、*Chrm1* 遺伝子欠失マウスはレム睡眠とノンレム睡眠の時間が共に減少 (それぞれ約 34 分と 117 分短縮) した。一方、*Chrm3* 遺伝子欠失マウスではノンレム睡眠量のみが著しく減少 (約 153 分短縮) し、レム睡眠は 1 回の持続時間が短くなり頻度が増える影響が見られたものの、総量に変化は観察されなかった。これらの違いからレム睡眠、ノンレム睡眠の制御に *Chrm1*、*Chrm3* がそれぞれ違った役割を持つことが示唆され、すなわち、*Chrm1* 遺伝子はレム睡眠、*Chrm3* 遺伝子はノンレム睡眠を主に制御していると考えられる (図 2)。

● 脳波・筋電図測定による詳細な睡眠解析



● *Chrm1/Chrm3* によるレム睡眠とノンレム睡眠制御のモデル図



図 2 アセチルコリン受容体の *Chrm1*・*Chrm3* 遺伝子の欠失と睡眠量の関係

Chrm1 と *Chrm3* の相乗的な機能を探るために、両方の遺伝子を同時に欠失させたマウスを作製し、睡眠量を解析したところ、この両遺伝子欠失マウスは、レム睡眠量がほとんど検出不可能なレベルにまで減少するという、単独の遺伝子欠失マウスにはない表現型が現れた。この結果により、ムスカリン性アセチルコリン受容体遺伝子 *Chrm1* と *Chrm3* の両方が、睡眠量調節、特にレム睡眠を引き起こすために不可欠であることがわかった。

加えて、レム睡眠を誘導できる状況のひとつとして、マウスを断眠させ、その後の睡眠状態を解析したところ、このような状況にお

いても *Chrm1/Chrm3* ダブルノックアウトマウスではレム睡眠が観察されなかった。

これらの結果により、本成果は睡眠ホメオスタシスに寄与する遺伝子を同定するだけにとどまらず、レム睡眠を遺伝学的に定義付けする遺伝子を初めて発見した。レム睡眠において *Chrm1* および *Chrm3* 遺伝子が必須であるというこの知見は、レム睡眠の将来の研究において有用なツールとなると考えている。特に、レム睡眠をほぼ完全に欠失したマウスが生存するという事実は、レム睡眠が学習や記憶などの生物の基本的機能に重要な役割にどのような役割を果たすかどうかなどの点を解明するきっかけになると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Yasutaka Niwa*, Genki N. Kanda*, Rikuhiko G. Yamada*, Shoi Shi, Genshiro A. Sunagawa, Maki Ukai-Tadenuma, Hiroshi Fujishima, Naomi Matsumoto, Koh-hei Masumoto, Mamoru Nagano, Takeya Kasukawa, James Galloway, Dimitri Perrin, Yasufumi Shigeyoshi, Hideki Ukai, Hiroshi Kiyonari, Kenta Sumiyama, Hiroki R. Ueda (*Co-first) : Muscarinic Acetylcholine Receptors *Chrm1* and *Chrm3* Are Essential for REM Sleep. *Cell Reports*. **24**, P2231-2247 (2018)
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.082>

[学会発表] (計 1 件)

- ① Genki N. Kanda, Kenta Sumiyama, Rikuhiko G. Yamada, Hiroki R. Ueda. Involvement of interneuronal peptides in sleep duration in mammals. *Neuroscience* 2016. San diego, CA, USA (2016)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神田 元紀 (KANDA, Genki)
理化学研究所・生命システム研究センター・基礎科学特別研究員
研究者番号：70755115

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者
なし