

平成23年 5月 31日現在

機関番号： 82401
研究種目： 研究活動スタート支援
研究期間： 2009～2010
課題番号： 21800090
研究課題名（和文）
レム睡眠の生理的意義の遺伝学的手法による解析
研究課題名（英文）
Genetic analyses of the function of REM sleep
研究代表者
林 悠 (HAYASHI YU)
独立行政法人理化学研究所・行動遺伝学技術開発チーム・基礎科学特別研究員
研究者番号： 40525812

研究成果の概要（和文）：夢を生じることで知られるREM睡眠は、一部の脊椎動物に固有の生理状態であり、脳の高次機能に関わることが期待される。しかしながら、その生理的な役割は今なお不明である。本研究では、従来のREM睡眠阻害方法（強制覚醒や薬剤投与）が抱える問題点（ストレスなどの副作用やリバウンドの影響）を克服するために、遺伝学的手法を用いた独自のアプローチを取った。具体的には、REM睡眠の中枢部位で特異的に神経発火抑制遺伝子を誘導できるトランスジェニックマウスを作製した。

研究成果の概要（英文）：REM sleep, a physiologic state responsible for dreaming, is unique to certain vertebrate species and thus might be involved in higher-order brain functions. Yet the roles of REM sleep remain elusive. Here, to overcome the problems of conventional methods to inhibit REM sleep (side-effects such as stress and rebound), I adopted a genetic approach. I established transgenic mice in which a neural-activity inhibiting gene can be induced specifically in the REM sleep center.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：REM睡眠、マウス、遺伝学

1. 研究開始当初の背景

脳波の測定技術の発展により、哺乳類の

睡眠は脳の活動様式から複数の段階に分けられる複雑な生理状態であることが明らかとなった。中でもREM睡眠は、他の睡眠段階よりむしろ覚醒時

に近い脳の活動様式や、夢がREM睡眠時に起こることなどから広く注目されてきた。しかしながら、REM睡眠の生理的意義に関してはまだ統一的な見解はない。これまでに、徐波睡眠（いわゆる深い睡眠）に関しては、脳の機能維持や記憶の固定化などの作用を持つことを支持する多くの報告がなされてきた。一方REM睡眠も、徐波睡眠と同様に記憶学習との関連に注目が集まってきたが、研究者間で実験結果やその解釈に隔たりがある。例えば、手続記憶の形成をREM睡眠が促進するという報告と阻害するという報告の両方がある。同一誌内にREM睡眠の記憶学習説の‘支持派’と‘反対派’双方の見解が掲載されることも珍しくない。

REM睡眠の生理的意義を検討する上では、従来のREM睡眠の阻害方法が抱える問題点を克服することが重要である。代表的な方法である覚醒強制は、覚醒のための刺激そのものが大きなストレスとなると同時に、REM睡眠のリバウンドの性質により、長期間の阻害が不可能であるという問題点がある。セロトニンやノルアドレナリンなどのモノアミンの取り込み阻害剤はREM睡眠を有効に阻害するが、これらの神経修飾因子は非常に広範な作用を持つので、他の脳機能への影響が無視できない。

私は従来のREM睡眠阻害方法の問題点を克服するには、遺伝学的手法を用いたアプローチが非常に有効であると考えた。以前に私は神経発火を人為的に抑制する手法として、膜電位を低下させるイオンチャンネルKir2.1の発現をtTA制御下で誘導できるトランスジェニックマウスの系を確立した。この系と、脳の特定部位でtTAを発現するトランスジェニックマウスを組み合わせることで、あらゆる脳部位の活動を高い細胞種・時期特異性をもって阻害できるものと期待された。REM睡眠の研究にもこの技術を適用することで、遺伝学的手法の特長である非侵襲性や高再現性などの利点を活用できることが期待された。

2. 研究の目的

本研究では、従来のREM睡眠の阻害方法の問題点を克服し、REM睡眠の生理的意義を

明らかにするための端緒として、遺伝学的手法によるREM睡眠の阻害方法の確立を目指した。具体的には、マウスにおいてREM睡眠の中枢を担う脳部位に、神経発火抑制遺伝子*Kir2.1*を特異的に誘導できるトランスジェニックマウスの作製を行った。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、まず、マウスのREM睡眠中枢の同定を行った。ネコでは、脳幹橋の青斑下核α部位と呼ばれる部位がREM睡眠において中枢的な役割を担うことが示唆されている。この部位にはREM睡眠時に選択的に発火するニューロンが存在し、また、薬剤の局所注入によりREM睡眠を誘導できるからである。マウスでこの部位に相当する部分をアセチルコリン作動性ニューロンおよびモノアミン作動性ニューロンの分布を手掛かりに探索した。次いで、この部分に選択的に発現する遺伝子を、この部位のmRNAの解析により同定した。こうした遺伝子のプロモーターを用いることで、REM睡眠中枢に特異的な遺伝子操作が可能となることが期待された。

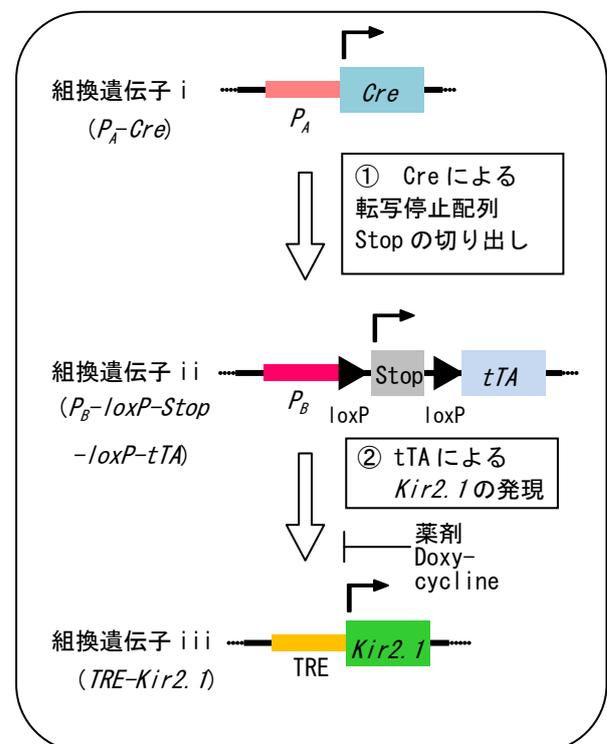


図1. 特定の脳部位の神経活動を抑制するためのトランスジェニックマウスの概要

そこで、上記の遺伝子のプロモーターを用いて、図1に示すように、次の3種類のトランスジ

ェニックマウスの作製を行った。

- i) REM 睡眠中枢神経核に選択的に DNA 組み換え酵素 Cre を発現するもの
- ii) DNA 組み換え酵素 Cre の存在下で REM 睡眠中枢神経核に選択的に薬剤感受性転写因子 tTA を発現するもの
- iii) tTA 存在下で神経活動抑制遺伝子 *Kir2.1* と *GFP* の融合遺伝子を発現するもの。

最終的には3種類すべての組み換え遺伝子を有する三重トランスジェニックマウスを作製することにより、図1のように薬剤制御下でREM睡眠中枢の神経活動を調節できると期待された。

4. 研究成果

マウスのREM睡眠中枢に選択的に発現する遺伝子の小規模のスクリーニングを行った結果、複数の候補遺伝子の同定に成功した。これらの遺伝子には、サイトカイン受容体や細胞外マトリクス、細胞間接着因子などをコードするものが含まれた。こうした遺伝子のプロモーターを利用することで、これらのニューロンの人為的な遺伝子操作が可能になると期待される。さらには、これらの遺伝子そのものの機能の解析により、これらのニューロンの分子レベルでの特性や、これらのニューロンが形成される発生および進化的な基盤に関する知見も得られることが期待される。

本研究で目的とするREM睡眠中枢での神経発火抑制遺伝子 *Kir2.1* の人為的発現には、候補遺伝子のうち、特に選択性の高かった2つの遺伝子のプロモーターを用いた。各プロモーターの下流に Cre または loxP-Stop-loxP-tTA をつないだBACコンストラクトをマウス受精卵に導入し、トランスジェニックマウスを構築した。こうして得た2種類のトランスジェニックマウスと、以前に構築した TRE-*Kir2.1* マウスを交配し、三重トランスジェニックマウスを作製した。このマウスの脳内における外来の *Kir2.1* の発現を調べたところ、脳幹のREM睡眠中枢に特異的に図2に示すような強いシグナルが検出された。今後、脳スライスを用いた *in vitro* での電気生理学的な解析と *in vivo* での c-Fos の発現解析により、これらのニューロンで実際に神経興奮が抑制されているかを検証する。さらには、REM睡眠が低下してい

るかを脳波・筋電図の解析により検証する。このマウスにおいて、期待通りREM睡眠が可逆的に阻害できれば、REM睡眠の生理的意義を調べる非常に有用なツールとなり得る。

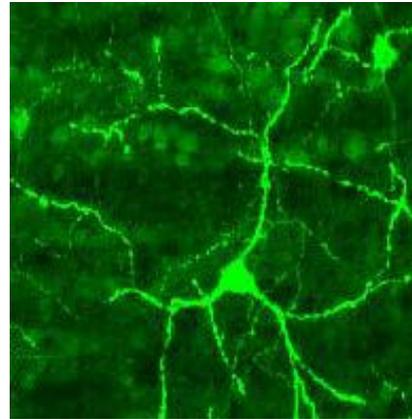


図2. 三重トランスジェニックマウスのREM睡眠中枢における *Kir2.1* の発現

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2件)

① 林 悠、
ニューロン同士をつなぐ神経突起の除去か維持かの決定における Wnt-Ror 経路の役割、
実験医学 28(1) : 78-81 (2010) 査読無し

② Hayashi, Yu, Hirotsu, Takaaki, Iwata, Ryo, Kage-Nakadai, Eriko, Kunitomo, Hirofumi, Ishihara, Takeshi, Iino, Yuichi, and Kubo, Takeo:

A trophic role for Wnt-Ror kinase signaling during developmental pruning in *Caenorhabditis elegans*.

Nature Neuroscience 12(8):981-7 (2009) 査読有り

[学会発表] (計1件)

① 林 悠、
マウス遺伝学的手法によるREM睡眠中枢ニューロンの解析、
日本睡眠学会第36回定期学術集会・シンポジウム「睡眠・覚醒の神経機構を探る戦略」、2010年7月1日、名古屋

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況（計0件）

〔その他〕

研究室ホームページ：

<http://bgshige.brain.riken.jp/indexj.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 悠 (HAYASHI YU)

独立行政法人理化学研究所・行動遺伝学技術
開発チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：40525812

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし