

第9回 ノンレム睡眠とカルシウム

(1) 眠気とは何か

分子の量で眠気を表すやり方、脳あるいは神経細胞の中に「睡眠物質」が溜まっていくことが眠気の原因ではないかという研究は、非常に古い歴史をもっています。1909年、愛知医学校（現・名古屋大学）の石森國臣博士は、全く寝かさないでおいた（断眠した）犬の脳の中に睡眠誘発作用をもつ物質を探すという研究を報告しました。同じころフランスのピエロン博士らも同様の研究を行っています。近年に至るまで様々な「睡眠物質」の候補が報告されていき、候補物質の遺伝子や候補物質の受け取り手（受容体）、また候補物質をつくる経路に関わる合成酵素の遺伝子を壊した動物が作られていきましたが、自然な睡眠はほとんど変わりませんでした。期待された睡眠物質は、（少なくともこれまで見つかったものは）私たちの自然な睡眠にはあまり関わっていないようでした。実は、見つかった睡眠物質の多くは炎症性の物質が多かったのです。病気の状態では体を休ませる必要があるわけで、見つかった睡眠物質はこういう緊急の時に出てくる物質だったのではないかと解釈されています。もちろん、本当に自然な睡眠に関わる「睡眠物質」がある可能性もありますが、今のところ決定的な物質は見つかっていないと言っていいでしょう。もう1つの考え方、なにか分子の「質」的な違いで数えるというやり方について考えてみます。こういう物質があったとしても「量」が変わらないので見つけにくいのですが、進化的に探索することもでき、変異によって書かれている情報を変えられるかもしれないということで魅力的な仮説です。こういった考え方があり得るかについてお話ししていきます。

(2) 神経活動と脳波をつなぐ

1929年に始まった睡眠の定量は1980年代に大きな進展を見せました。1937年にデルタ波というゆっくりとした脳波が見つかったのですが、1980年代になってスイスのアレキサンダー・ボルベリ博士らが、このデルタ波の強さと「眠気」が非常によい相関を示すことが分かってきました。デルタ波の強さが眠気をうまく表現するということを意味し、覚醒が続くとデルタ波が上がり、徹夜をするとさらに上がるが、寝ると元のレベルに戻る、というわけです。一方でミルシア・ステリアデ博士は、電気生理学という手法で、起きているネコや寝ているネコの神経の電氣的な活動を詳細に調べました。その結果、起きているネコは神経が常に興奮を続けて（発火して）いましたが、寝ている時は、ある程度神経が活動しては一休みするというように、間歇的な発火をしていることが分かってきました。しかもこの間歇的な発火の間隔は0.5hz から4ヘルツ（1ヘルツは1秒に1回）であって、デルタ波の周波数でまとまった発火がおきていることを発見しました。デルタ波が眠気と相関することから、こういった神経の電氣的な活動に着目すれば、眠気というゆっくりした変化と神経活動という速い変化とをつなげられるかもしれない、と言うわけです。

2000年代に入って、1つの神経で起こるマイクロ（微小）で速い現象と、脳全体で起きるようなマクロでゆっくりした現象をつなぐ試みが多くなされ、この複雑な神経の活動パタ

ーンをコンピューターの中で「再現」しようと試みられてきました。例えば 28880 個の神経をコンピューターの中に仮定して、その繋がりを色々工夫して複雑なパターン (slow wave oscillation) を再現することに成功した研究があります (Compte et al., J Neurophysiol, 2003)。また 2005 年には 1280 個の神経細胞を仮定して再現する研究もありました (Hill and Tononi, J Neurophysiol, 2005)。ここで問題は、非常に精緻なモデルである分大規模計算が必要になるということです。モデルを使って「予測」をしようとする、いくつもの違った条件で確かめる必要がありますが、これがなかなか難しい。シミュレーション結果をもとにして「遺伝子を探そう」とはならなかったのです。

(3) アベレージニューロン (AN) モデル

こうした状況の中、私たちはもう一度、本当に睡眠をシミュレーションするのに 1000 個や 10,000 個の神経細胞が必要か考えてみました。脳の一部分が睡眠状態になるローカルスリープみたいな現象が知られていることを考えれば、たった 1 個の神経細胞でも「眠る」のではないかと考えたのです。もちろん神経は互いに繋がっていますから、これを成り立たせるためには工夫が必要でした。そこで「平均的な神経細胞」を仮定してみました。つまり平均的な神経細胞が平均的な神経細胞と繋がっているという過程をする。これまでは 1 万個の神経細胞の中に様々な遺伝子を仮定していたので、「神経の数 \times 遺伝子の数」という膨大な「複雑さ」を相手にしなければならなかった。それが今度は、仮定する神経細胞が実質一個に減りましたから、実質遺伝子の数だけで勝負できる、というわけです。

この仮想神経細胞の中に、既知の様々なタイプのイオンチャネルを想定し、神経細胞によってイオンチャネルが強く発現したり弱く発現したりするというセッティングで、2000 万個ぐらゐの様々な神経細胞の「どれが眠るか」を色々調べてみました。そうしたところ「眠る」神経細胞モデルを 1000 個以上も見つけることができました。そこでその 1 個 1 個を見ていって、どんな遺伝子が「眠り」に大事なのかを丹念に調べていきました。この結果、4 つの遺伝子群が重要だということが分かってきたのです。驚くべきことに 4 つともカルシウムの出入りに関わるようなものでした。カルシウムは神経が興奮すると細胞内に入ってくるので、間欠的な活動している神経では、2 つの遺伝子群が作り出すタンパク質からできるカルシウムチャネル (穴) を通じて間欠的にカルシウムが入ってくるというわけです。普通カルシウムは神経を興奮させるのでこの結果「起きている」と考えそうなものですが、私たちの結果が示唆するのは全く逆で、「眠らせる」というものでした。どうしてそうなるかというと、流入したカルシウムが今度は神経を「なだめる」ように働く、つまり別のタイプのチャネルを活性化して細胞の中にある陽イオンを外に出してしまうわけなのです。陽イオンが細胞内に入ると神経が興奮し、陽イオンが細胞外に出て行くと神経は休息します。ですから、カルシウムは細胞の中に入って神経を興奮させますが、同時に別のタイプのチャネルを活性化して眠りのパターンそのものを作り出している、こういうことが分かってきたわけです。ではその後なぜ再活性化するかということですが、神経発火が行われなくなると

カルシウムが入ってこなくなります。細胞内カルシウムの濃度は普段低く抑えられていますから、今度は細胞内のカルシウムを排出するポンプを通じて細胞外に出ていきます。そうすると今度は神経を休めている機構が止まり、また神経が活動を再開します。神経は発火してカルシウムが入って一休みしてまたカルシウムが抜けてまた再開するという形で、一定期間毎に活動するという特徴的な眠りのパターンを作り出せることが分かってきました。

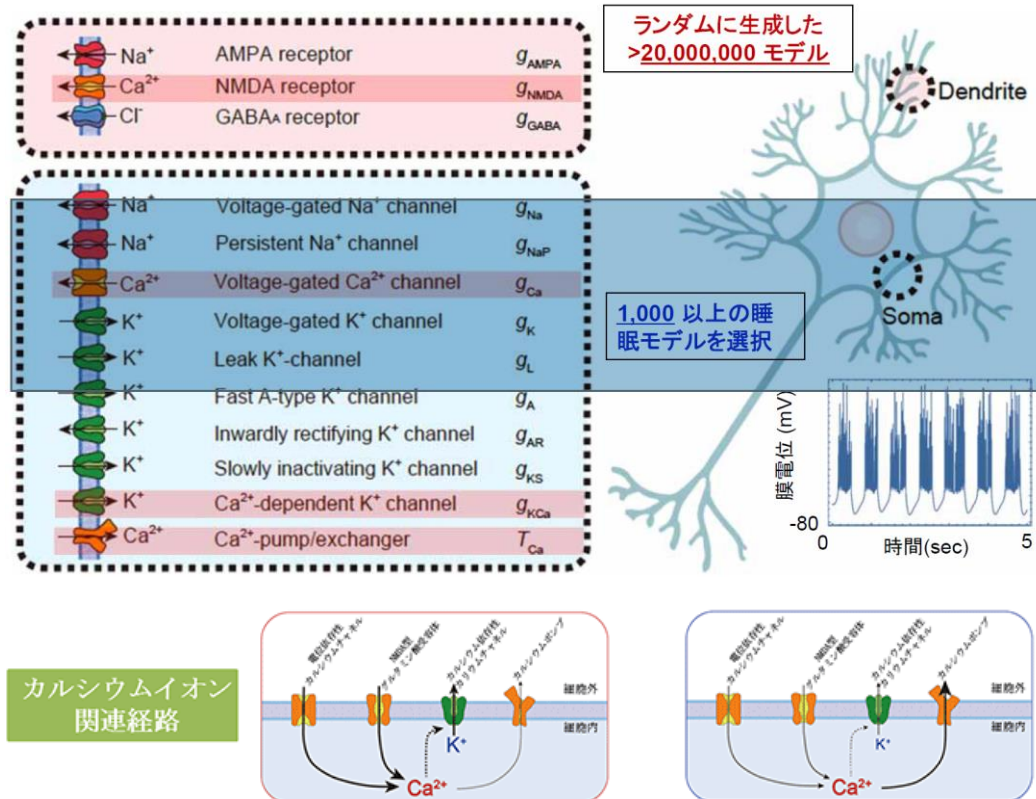


図1. AN モデルとカルシウムイオン関連経路。AN モデルに様々な組み合わせでイオンチャネルの発現を仮定して、睡眠制御に関連する可能性のあるイオンチャネルを探索する(上)。仮定されるカルシウムイオンの働き(下)。カルシウムイオンは睡眠時には細胞内に流入してカリウムチャネルを開きカリウムを細胞外に流出させる(下左)。覚醒時にはカルシウムイオンは細胞外へ流出する。一部 JST プレスリリースより改変の上転載(*1)。

*1 <https://www.jst.go.jp/pr/announce/20160318/index.html>

(4) 遺伝子改変動物による検証

シミュレーション結果からいくつかのことが予想されます。まずカルシウムチャネルを障害するとカルシウムが細胞内に流入しづらくなり、寝にくくなると考えられます。カルシウム流入の後に細胞を「なだめる」チャンネル(カリウムを外に出すチャンネル)を障害しても同様に寝にくくなるでしょう。逆に、カルシウムを外に排出するポンプを傷害した場合に

は、今度は起きにくくなると考えられました。私たちが見出した4群の遺伝子を1つ1つ壊したマウスの睡眠を調べれば、予想通りの現象が起きるか、仮説を検証できるはずです。

実はこの4群には全部で29もの遺伝子がありました。もし旧来の方法に従って2年に1個ずつ遺伝子を調べるとなると60年以上もかかってしまいます。それを前回お話したTriple CRISPR法を使うことで効率的に29遺伝子のノックアウトマウスを作ることができました。また、睡眠測定も手術をしていては時間がかかりますから、非侵襲の寝息で測る方法を使いました。毎週のように「遺伝子を改変したマウスを作って測って」を続けていったところ、予想通りの結果を得ることができました。つまりカルシウムによって開くカリウムの出口にあたる遺伝子やカルシウムの入り口を壊した時には睡眠が減少する一方、カルシウムの出口をノックアウトした時には睡眠が増加するということが分かってきて予想通りだったというわけです。

具体的にお話しします。2つのカルシウムに依存してカリウムを外に排出する遺伝子群をなくすとマウスは眠らなくなることが分かりました。逆に言えば、正常状態でこれらの遺伝子は眠るのに重要だ、ということです。またカルシウムの入り口にあたる2つのタイプの遺伝子をノックアウトしても眠らなくなることが分かりました。一部の遺伝子はノックアウトすると動物が死んでしまうので、そういった遺伝子は薬剤で機能を阻害して確認しました。逆にカルシウムを汲み出すポンプをなくすと、今度は眠りが多くなりました。このように29個の遺伝子を1つ1つつぶして睡眠計測をしたところ、コンピューターで予測した通りの睡眠と覚醒の変化が起きることが分かりました。

Triple CRISPR法についてお話した際、「ハサミ」を使って狙った遺伝子を切ったら予想通りのことが起きたと言いました。しかし、「狙ったところ（遺伝子）を切ったつもりだが、他の遺伝子も切れてはいないか？その結果睡眠が変わったのではないか？」（オフターゲット効果）というクレーム（疑義）が想定されます。これに対して私たちは、違う「ハサミ」の組み合わせを使ったマウスを用意してもう一度測ることをしました。遺伝子は（ハサミに比べ）非常に大きな構造物なので、いくつかの場所で「ハサミ」で切って遺伝子を壊すことができます。いま、遺伝子がある「ハサミ」で壊して睡眠が短くなったとして、別の「ハサミ」を使っても同じ結果が得られるか試してみた、ということです。重要なことは、オフターゲット効果というのは「ハサミ」に依存するので、別のハサミを使ったときに狙った場所以外に前のハサミと同じ場所が切れることはほぼない、ということです。ですから、同じ遺伝子を狙って作るハサミで、独立に同じ結果が得られたならば、高い確率で狙った遺伝子の障害によって起きた現象だということになります。実際、別のハサミで試したときにも、見事に睡眠・覚醒量も含めて同じ結果が得られたということで、問題ないだろうという結論になりました。もう一点、一連の実験では呼吸を測って睡眠を測定しました。しかしこれが本当に脳波で測った結果と同じかどうか分からない、という指摘も考えられます。そこで、狙った遺伝子を壊した動物で、旧来の方法である侵襲的で時間はかかるけれども確実な方法で、脳波を測定してみて、本当に睡眠に変化がおきていることを確かめました。そして実

際に息で測った方法と脳波で測った方法とで同じような結果が出ることを証明できたので、二番目の疑義にも答えたということになります。

Triple CRISPR法によるKOマウス

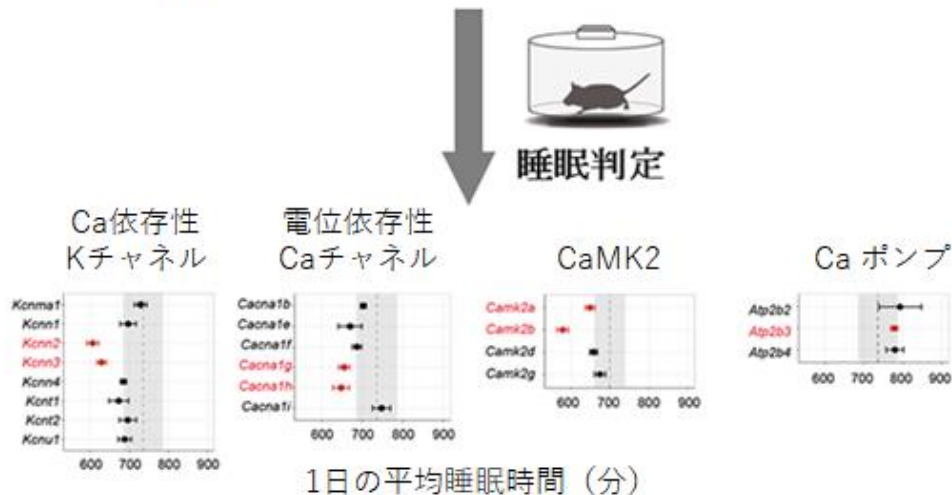


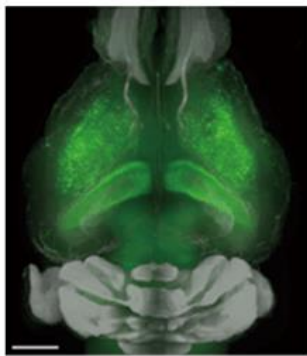
図2. Triple CRISPR 法による遺伝子欠損マウスを用いた検証。候補遺伝子を1つ1つ欠損して検証したところ、赤字で示すような遺伝子欠損マウスで、1日の平均睡眠時間が有意に短くなることがわかった。JST プレスリリースより改変の上転載(*2)。

* 2 <https://www.jst.go.jp/pr/announce/20160318/index.html>

ここまでの話から、カルシウムが細胞の中に入ってきて神経は「寝る」と言えます。この考え方は、実は今までの主流となっている考え方に挑戦しているようにもみえます。カルシウムは神経が興奮すると細胞内に流入し、カルシウムが神経細胞の中に入ると神経は興奮しますから、これまでカルシウムと神経興奮はセットで考えられてきました。これに対して今回の結果は、カルシウムが神経を眠らせるために重要である、と真逆にもみえることを言っています。本当にカルシウムによって「寝る」のならカルシウムの入り口を止めた時には神経細胞はブレーキが効かなくて興奮性があがり、逆に古くから信じられてきた通りであれば、カルシウムの入り口を切った時に神経は休息するのではないか。全脳レベルでこれを試してみれば、本当に私たちの仮説が正しいか分かるだろうと考えました。このために使ったのが、脳を透明にして全細胞を観察する技術です。神経が興奮すると発現するようなタンパク質に蛍光タンパク質をつけることで透明化技術で細胞個々の神経の興奮が見えるような工夫をしました。そのうえで薬剤でカルシウムが入らないような工夫をしたマウスと薬剤処理をしていないマウスの脳を比べてみたところ、薬剤を投与したマウスの脳の全体で過興奮（非常に活性化した状態）になっていました。薬剤処理によって興奮が上がった細胞がカルシウムの入り口（チャンネル）をもっているか（発現しているか）を確かめたところ、

それらの細胞はほぼすべてカルシウムの入り口（チャンネル）を持っていて、薬剤処理で興奮性があがった細胞は、薬剤が作用するカルシウムの入り口を持っていました。つまり、薬剤処理と神経の興奮に関係がありそうだ、ということです。さらに脳の外側の一番進化的に新しい領域に注目して場所ごとの解析をしたところ、神経の興奮が上がっていることが確かめられました。この大脳皮質の IV 層から VI 層という脳の表面から少し潜ったところにある領域は、先ほどお話した数理モデルでコンピューターの中に再現した領域だったので、その領域で本当に神経活動が変化したかどうかは、重要なことでした（Tatsuki et al., Neuron, 2016）。

NMDA型グルタミン酸
受容体阻害あり



NMDA型グルタミン酸
受容体阻害なし

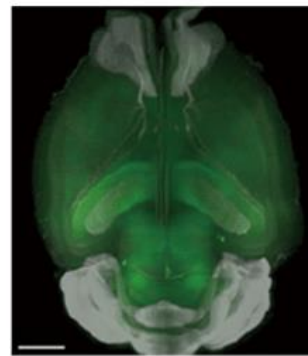


図3. カルシウムイオンの入り口の1つ(NMDA型グルタミン酸受容体)の阻害剤を神経細胞の活性化を蛍光の変化で見られるマウスに投与して、透明化の手法で観察したところ、阻害薬により神経の活性化がおきたことが観察された(右 緑色が強い)。JST プレスリリースより改変の上転載(*3)。

* 2 <https://www.jst.go.jp/pr/announce/20160318/index.html>

(5) カルシウム余話

カルシウムには2つの顔があり、1つは陽イオンとして細胞の中に入ってくると神経細胞を興奮させるというもの、もう1つはシグナル分子としての役割です。細胞の中でカルシウム濃度は非常に低く保たれていますが、細胞内に入ってくると他の分子に結合し、情報分子として次のイベントを引き起こしていきます。先駆的な研究をされたのが東京大学の江橋節郎名誉教授で、薬理学教室でカルシウム研究を開始され、カルシウムが情報分子であるということを世界で初めて示唆した高名な先生です。私は東京大学大学院に在籍中、薬理学教室に所属し、概日時計研究をずっとやっていました。恩師の飯野正光先生には「カルシウム研究なんてやらない」と宣言して、飯野先生は「ああ、そうですか」と笑っていらっしやったのを覚えています。その後、体内時計の研究から睡眠の研究に進んでその仕組みを紐解

いていくとカルシウムが非常に重要な分子として分かってきた。大学院に入ったのは 2000 年なので、ある意味で 16 年かけてカルシウム研究に戻ってきたと言えるかもしれません。