

第10回 ノンレム睡眠とリン酸化仮説

(1) CaMK2

「眠りの状態・覚醒の状態」を表現するのに、カルシウムの振る舞いは非常に適しているようです。それでは「眠気」はどうかと言うと、これは全く分かっていなかった。眠っている状態は何かで記述できそうだが、覚醒の時に眠気として何を数えているのかは、何も答えられていなかったのです。しかしながら、覚醒と睡眠でカルシウムの振る舞いが大きく変わることが分かり、覚醒は「カルシウムブレーキ」が働いていない状況、睡眠は「カルシウムブレーキ」が強く働いてる状況だと想定されました。しかも覚醒中には細胞内に流入したカルシウムは睡眠を起こすように作用しない、と予測されます。そうだとすれば、カルシウムを測って覚えるようなやり方で、眠気が表せるんじゃないか、というアイデアが生まれてきました。

実は脳の「学習」や「記憶」の文脈で、ある分子（タンパク質）がカルシウムを感じてその情報を自分自身に書き込むというような仕組みについて、長い間研究がなされてきました。私たちはカルシウムによって自分自身に印をつけていくようなタンパク質（リン酸化という印をつける酵素）に着目すればいいのではないかと考え、その（睡眠覚醒に関する）役割を調べようと考えました。脳の中に有名な酵素 CaM キナーゼ (CaMK) 2 というのがあります。この酵素はカルシウムが入ってくると自分自身のスイッチが入ってもっと活性化する酵素です。なかなか研究が難しい酵素で、この遺伝子を壊したハエは死んでしまうことが知られています。哺乳類には4つの CaMK2 があり、それぞれ CaMK2 α 、CaMK2 β 、CaMK2 γ 、CaMK2 δ という名前がついています。私たちは父親からきた染色体と母親からきた染色体をもち、同じ遺伝子を1対もつのですが、脳の中に多く発現する Camk2a 遺伝子も Camk2b 遺伝子も1つ壊したマウスはつくれても次の世代は作れなくなってしまう（交配できなくなる）という問題がでます。このため従来の遺伝学的手法を使ってこの遺伝子の研究をすることは極端に難しかったのです。しかし私たちの方法だと、いきなりノックアウトマウスが作れますから、これらの難点を克服することができるのではないかと試してみたところ、遺伝子をなくしたノックアウトマウスを作ることができました。このマウスを使った研究から分かってきたことは、Camk2a 遺伝子の場合も、Camk2b 遺伝子の場合も、遺伝子を欠損すると睡眠が減る、逆に言えばこれらの酵素が正常に働くと睡眠は誘導されることが分かってきました。前回お話しした通り違う「ハサミ」の組み合わせを使った実験でも同じ結果が得られましたし、脳波を測った場合にも呼吸を測ったときと同様の結果を得られることを証明しました。これらの結果は、カルシウムの出入りを担う遺伝子と睡眠の関係とともに、カルシウムの下流でおそらくその履歴を覚えている（メモリーになっている）酵素の候補が CaMK2 であるのではないかという論文として、2016年に報告しました (Tatsuki et al. Neuron, 2016)。

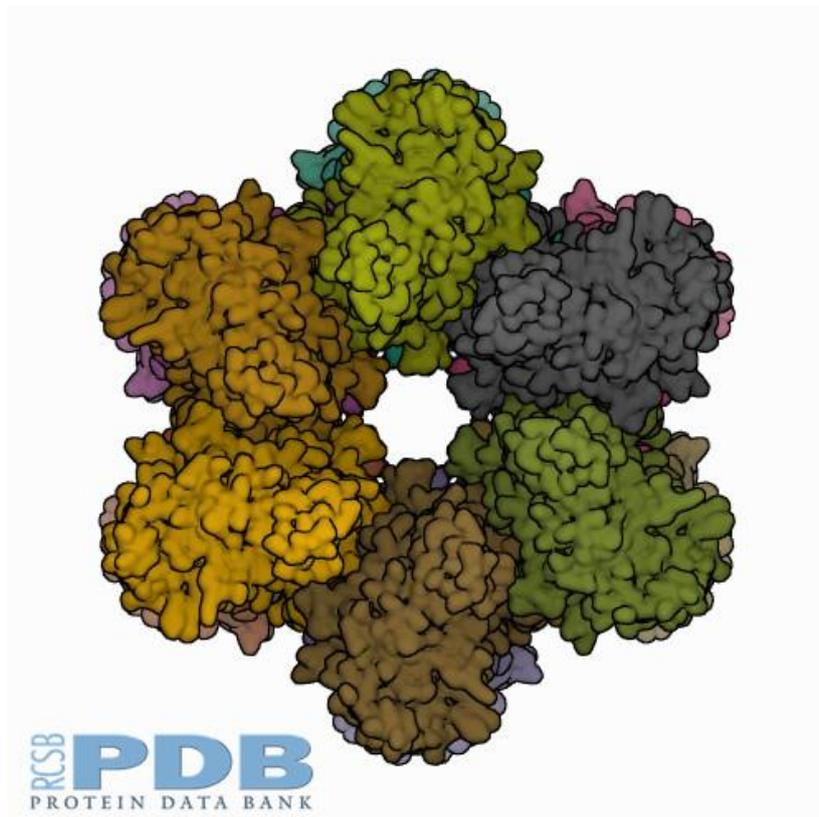


図1. ヒト CaMK2 (<https://www.rcsb.org/structure/3SOA> より引用)。CaMK2 は細胞内 Ca 濃度上昇に伴い Ca-カルモジュリンが結合して活性化されるセリン-スレオニンキナーゼであり、12量体を形成する。CaMK2 アイソフォーム間ではキナーゼ部とハブをつなぐリンカーの長さが異なっている。

(2) 睡眠のリン酸化仮説と CaMK2

カルシウムによって神経細胞の状態が色々変わり、カルシウムの下流にはその履歴が刻まれるリン酸化酵素があることになります。カルシウムの下流のタンパク質の状態に眠気が書き込まれるという考え方が正しいことを証明するために、いくつか示さないといけないことがあります。まず私たちの仮説は、分子の状態に「眠気」という情報がかけられているということなので、この情報を人の手で書き換えた時に眠りの状態は急激的に変わるはずですが、また、眠気情報はカルシウムもしくはカルシウムが結合するタンパク質（カルモジュリン）が書き込んでいる（エンコード）と考えられます。現実世界で使われる形が変わるためには情報が解読される（デコード）必要がありますので、解読装置があると考えられます。

2016 年以後私たちは解読装置に当たるのは酵素活性ではないかと考え、CaMK2 の出力を変えたとき、「眠り」が本当に変えられるのか試していきました。CaMK2 のリン酸化状態を色々変えた時に、本当に「眠り」が変わるか実験することにしたのです。実際に私たちが試みたことは、分子（ここでは CaMK2）の印がつくだろう場所の部品を入れ替えて「印

がついたまま」、もしくは「印が外れたまま」の状態にして、その影響を1つ1つテストするということでした。もう少し詳しく言うと、リン酸化（印をつけること）はセリンやトレオニンと呼ばれるアミノ酸に起きることが知られています。「リン酸」は酸なのでリン酸化されると負の電荷（マイナス）をもちます。タンパク質はアミノ酸でできていますが、アミノ酸のうち負の電荷を持つものはグルタミン酸とアスパラギン酸の2種類なので、セリンやトレオニンをどちらかに交換することで、リン酸化状態を「真似る」ことができます。逆に、セリンやトレオニンからリン酸化されないアラニンというアミノ酸に変えてやると、リン酸化されない状態を「真似る」ことができます（Chen and Cole, *Curr Opin Chemic Biol*, 2015）。

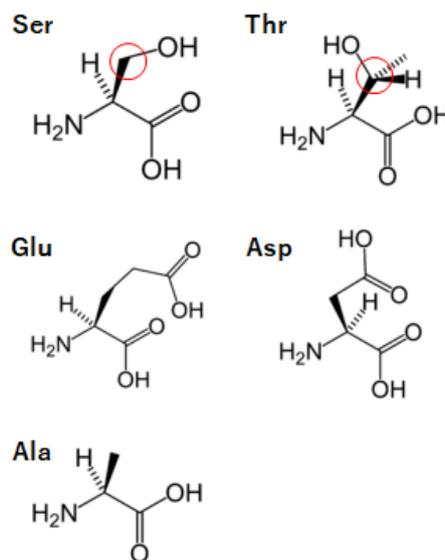


図2. リン酸化ミミックに関連するアミノ酸の例。CaMK2 はセリン(Ser)、トレオニン(Thr)残基をリン酸化する(赤丸部分がリン酸化される)。グルタミン酸(Glu)およびアスパラギン酸(Asp)は負の電荷をもち、リン酸化のオンの状態をミミック(模倣)することができる。アラニン(Ala)はリン酸基の外れた状態(オフ)をミミックするのにつかわれる。Wikipedia(“タンパク質を構成するアミノ酸”)より引用の上、作図。

CaMK2 のリン酸化される候補部位は非常に多くて、CaMK2 α には 54 個、CaMK2 β には 69 個もあり、大変でした。まず CaMK2 β に着目して 69 個のリン酸化候補部位のアミノ酸について、3 番目のトレオニンを アスパラギン酸に、次は 4 番目のものを変える、次は 6 番目を、8 番目を、11 番目を…、という具合に 1 つずつ入れ変えていき、正常なマウスに変異タンパク質を発現させてその影響を評価していきました。世界でも例のないような実験ですが、つい最近第 1 回目の実験が終わりました。マウスは夜行性で正常なマウスは主に昼に寝ます。しかし、それでも昼だけでなく夜も寝たり起きたりしています。正常なマウスの脳に全く変異のない CaMK2 β を発現させた場合、睡眠は変化しませんでした。しかし CaMK2 β の 1 つのアミノ酸をリン酸化を真似たアミノ酸に置換したタンパク質を発

現させた場合には、昼夜を問わずマウスの睡眠時間が伸びることが分かりました。1日の総睡眠時間を見ると、普通のマウスは800分（13.3時間）近く寝ていました。しかしリン酸化を真似たタンパク質を入れた場合には1000分（16.7時間）近く、つまり3時間以上よく寝ることが分かりました。たった1箇所分子に「印」をつけただけで睡眠時間が増えたのです。本当にこの「印」が睡眠時間の延長に重要ならば、「印」が入らなくなれば睡眠時間は延長しないはずです。そこでこのアミノ酸を印の入らないアラニンに変えてみたところ、見事に睡眠時間は元に戻りました。つまり、リン酸化すると眠る時間が延び、リン酸化されなくなるとその効果がキャンセルされる、というわけです。さらにCaMK2 β の酵素活性を人為的に失わせてみると、睡眠時間延長の効果はやはりキャンセルされました。このことは、CaMK2 β の酵素活性が酵素の状態を「眠り」に伝えるための情報の解読に重要だ、という仮説を支持しました。私たちは同じような実験をCaMK2 α でも試み、同様の結果を得ました。ここまでの実験では、睡眠の量を「呼吸」で計測していました。しかし「眠気」と言うからには睡眠の質、すなわちデルタ波（0.5-4Hzの波）の強さを見る必要があると考えました。そこで、Camk2b遺伝子を失くしたマウス（Camk2bノックアウトマウス）の脳波・筋電図を測り、睡眠時間だけでなく睡眠の質も計測してみました。その結果、睡眠時間は呼吸で測った結果と同様に減少し、デルタ波も減弱することが観察されました。すなわち、CaMK2 β は睡眠の質の制御にも関わっていることが分かってきたのです。

さらに眠気が溜まっている時に本当に印がつく（リン酸化されている）のか、調べてみました。リン酸化されると必ず重さ（質量）が変わります。質量分析機を使えばタンパク質がリン酸化の有無を定量的に測ることができるようになってきました。そこで、CaMK2 α 、CaMK2bのリン酸化状態を調べてみたところ、普通のマウスよりも眠りを奪って（断眠させて）眠気が非常に多く溜まっているマウスでは、どちらのタンパク質もより多くリン酸化されているという結果が得られました。このことは、実際にリン酸化状態と眠気とが相関していることを示唆している、つまり、まるで眠気を数えているように「印」がついていくことが分かったわけです。

最後に、このタンパク質が脳のどの場所で働いているのか調べました。現在様々な技術を使えば、（外来性の）たんぱく質を発現させる場所を変えることができます。頭の中には他の神経細胞を活性化する神経細胞（興奮性の神経細胞）もあれば不活性化させる神経細胞（抑制性の神経細胞）もあります。私たちが最初にコンピューター上で睡眠・覚醒モデルとして使ったのは興奮性神経細胞でした。そこでまず、変異させたCaMK2 β を興奮性の神経細胞に発現させてみると、睡眠時間の延長が確認できました。次に抑制性の神経細胞に発現させてみると、今度は睡眠時間延長作用は全く見られませんでした。このことから、CaMK2 β は予想通り興奮性の神経細胞で働くということが分かりました。

（3）「SOS」スイッチ

睡眠には3つの制御、すなわち活動に応じて眠気が溜まるという制御、概日性、時間に応

じて眠気の強さが変わるという制御、緊急の場合に眠気が飛ぶ（キャンセルされる）という制御がありました。私たちは、CaMK2 β のリン酸化状態が、真に眠気を反映しているならば、緊急時にその効果をキャンセルするシグナルがあるのではないかと考えました。つまり、CaMK2 β タンパク質に、電車の緊急停止スイッチ（SOS スイッチ）のように、緊急に睡眠を止めるスイッチが内在しているのではないかと考えたのです。

そこで、まず先ほど見つけた眠気を誘導するスイッチに「印」をつけたタンパク質（リン酸化をまねた変異を入れた CaMK2 β ）を準備しました。その変異タンパク質に、また1つずつ「印を」つけていって、変異タンパク質の影響がキャンセルされる場所を探していきました。つまり1つのスイッチを ON にしたままにして、2番目の OFF にできるスイッチを68個の中から探していったのです。そうしたところ、本当に睡眠を OFF にするようなスイッチがありそうだ、ということが分かってきました。実は候補部位はいくつか見つかってきていて、このうちのいくつかは「印」が入らない（リン酸化できない）ようにすると、また元の変異タンパク質の効果が戻る（睡眠の増大がおきる）ことが分かっており、本当にスイッチのように働くことが証明できそうです。

この他、私たちは人為的に CaMK2 β の酵素活性を上げた時に、眠気が引き起こされるかというような実験もしています。CaMK2 β のリン酸化状態は、酵素活性の強さとして読みだされているという仮説を紹介しました。CaMK2 β は自分自身に対するブレーキを備えていて、これを取り除いた短い酵素を発現させると酵素活性が上がるということが知られています。そこでこのブレーキを壊した CaMK2 β を発現させたところ、睡眠はやはり顕著に伸びることが分かりました。このブレーキを壊した酵素の活性の肝となる部位を壊した（酵素活性を失った）タンパク質を発現させると、睡眠時間の延長効果は見えなくなりました。このことから、やはり酵素活性が情報の「読み出し」に必要なということが見えてきたのです。

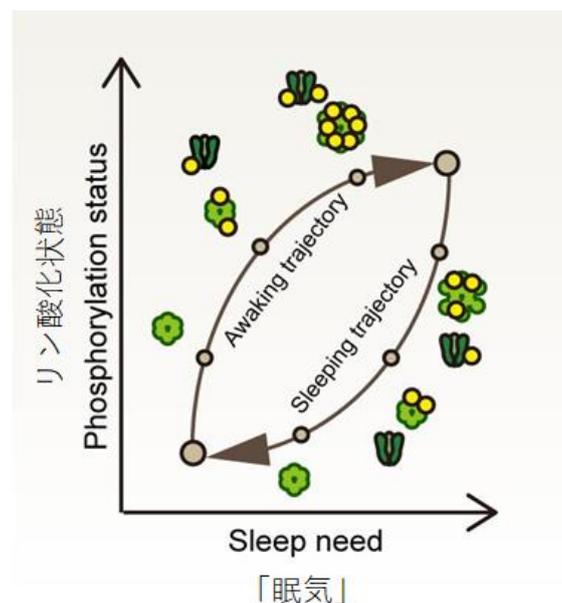


図3. 睡眠のリン酸化仮説。リン酸化状態の変化によって、眠気が増大し(Awaking trajectory 覚醒経路)、眠気が減少する(Sleeping trajectory 睡眠経路)。(Ode and Ueda. Front Psychol. 2020, Fig.4 を改変の上、引用)

(4) 残された謎

まだ解けていない問題として、概日時計の制御がどこに入るかについては良く分かっていません。また、睡眠制御の場合レム睡眠、ノンレム睡眠の移行が約 90 分周期でおきる、つまり体内時計と同じように状態が回転すると思われるのですが、本当にサイクルする機構があるかどうかを含め、その仕組みは良くわかっていません。今見えてきた現象(眠気が CaMK2 のリン酸化で表現される)が本当に睡眠の本質に迫っているならば、CaMK2 のリン酸化状態の変化にサイクルに関する情報が書き込まれていておかしくないかもしれません。そうだとすれば、ここで分かってきた 1 番目のスイッチとそれを元に戻すスイッチの他に、睡眠がより深くなるスイッチや深い睡眠からまた元に戻ったりするスイッチがあるのかもしれない。以前、睡眠にはいろいろな状態があるというお話をしましたが、1 番目の「眠気」のスイッチの他に、2 番目のさらに睡眠のステージを進むスイッチや 3 番目の最初に戻る(覚醒状態に戻る)スイッチ、そういったものが隠れている可能性もありそうです。今後、そういう研究もやっていきたいと思っています。

最後に、睡眠の中心となるメカニズムの何がまだ分かっていないのかについて、触れたいと思います。一連の研究から、CaMK2 をいろいろ書き換えることで眠りがだいぶコントロールできそうだということが分かってきました。また CaMK2 のリン酸化状態が「眠気」に変換されるためには、酵素活性の強さに変換されることが重要そうだということが分かってきました。しかし CaMK2 が「眠り」に関わる神経の活動に具体的にどのように関わっているのか、ここはよく分からない。また睡眠は代謝の変化や、遺伝子発現の変化、神経の学習の素過程との関わりの変化といった出力がバラエティに富みますが、どのようにつながっているか、その仕組みは分かっていません。

今回はカルシウムという非常に古くから知られた入力を中心に CaMK2 についてお話ししました。しかし、実は眠気を誘導するものが神経活動だけかはよく分かっていません。例えば私たちが活動する際に、ミトコンドリアが作る ATP が使われますが、カルシウムの変化だけでなく ATP を数えて「眠気」を表現しているのかもしれない。あるいは、私たちが活動するときには不可欠な酸素濃度の変化や活性酸素のようなストレスの蓄積を数えて「眠気」を表現するのかもかもしれません。実際のところ、どんなものを数えて「眠気」に変換しているのか、これはまだ明確ではないのです。もしも疲れや眠気の正体が分かれば、なぜかわからないけれども非常に疲れる、1 日中ひどく眠気が続くような疾患、そういった症状の謎が解け、治療法も分かってくると期待できます。あるいは、眠気の情報や「書き込んでいる仕組み」や「書き出している仕組み」を深く知ることによって、私たちの脳の中の状態の制御について深く理解出来るのではないかと考えています。