

第 12 回 レム睡眠遺伝子②

(1) アセチルコリン受容体 その 1

睡眠に関係すると言われる脳部位に 2 つの遺伝子が特徴的に発現していたこと、2 つの遺伝子が発現している場所で破傷風毒素 (テタヌス毒素) を発現させて神経細胞の機能をおかしくしたマウス (TrkA-TeNT マウス、Ngfr-TeNT マウス) では睡眠時間が短くなったこと、この神経細胞の性質を調べたらアセチルコリンをつくるタイプの神経細胞だったこと、をお話しました (丹羽康貴さん)。このことからアセチルコリンが伝わって睡眠に関わる現象が起きていると考えられますので、アセチルコリンを受け取る分子を 1 つ 1 つ丹念に調べれば何か分かるだろう、ということになります。

アセチルコリンの受け取り手を受容体と言います。受容体はタンパク質で遺伝子にコードされています。アセチルコリン受容体をコードする遺伝子には多くの種類があり、マウスでは 21 種類 (ヒトでは 22 種類) あります。アセチルコリン受容体には大きく分けて 2 グループあり、タバコの成分であるニコチンを受け取る (結合する) ものが 1 番目のグループです。ニコチンに結合できるような受容体はヒトでは 17 種類、マウスでは 16 種類あります。ニコチン型のアセチルコリン受容体の中には筋肉に発現するものがマウスでは 6 種類 (ヒトでは 7 種類) あります。この 6 種類は遺伝子をノックアウトすると呼吸ができなくなってしまって動物が死んでしまうので睡眠の解析ができません。まずこれらを除いた 10 種類に狙いを定め、遺伝子を体からなくした (ノックアウトした) 時に睡眠がどうなるかを見ました。もしニコチン型受容体が TrkA-TeNT マウスで見られた 3 時間近く睡眠時間が短くなる現象に関わるならば、どれかの遺伝子をノックアウトすることでこの睡眠時間の減少が再現できるのではないかと考えました。そこで以前お話しした「次世代の遺伝学」(第 8 回参照) の技術を使い、この 10 種類を 1 つ 1 つノックアウトしていきました。

10+6※ ニコチン型受容体 Triple-CRISPR 標的配列

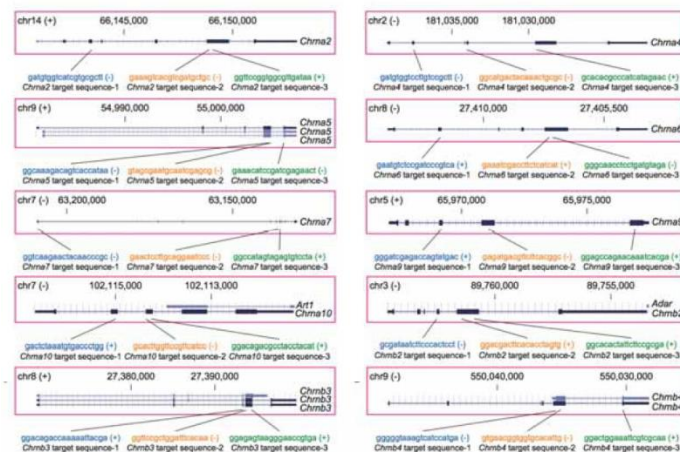


図1. ニコチン型アセチルコリン受容体。16ある遺伝子のうち10遺伝子を KO した。*Chrna1* は筋肉型のため除外し、*Chrna3*, *Chrb1*, *Chrnd*, *Chrne*, *Chrng* は致死性のため除外した。

10 種類の遺伝子のノックアウトマウスを全部作り、それをチャンバー（飼育用の空間）にセットして呼吸で睡眠を判定していったのですが、残念ながら全ての遺伝子で睡眠量は変わりませんでした。正確に言えばほんの少し睡眠量が減る遺伝子が2つ見つかったのですが、その差は3時間には及ばないわずかなものでした。神経細胞にあるニコチン型受容体はアセチルコリンが結合すると細胞の中にカルシウムを入れるため、私たちがそれまで明らかにしていたカルシウムと睡眠の関係と合致していたので、期待をしていました。しかし私たちの予想に反し、睡眠量は変わらない（ニコチン型アセチルコリン受容体は関係していなかった）という結論でした。従来の方法だと20年ぐらいかかるような大仕事を山田陸裕さん、神田元紀さんという研究者ががんばってやってきたわけですが、予期した結果が得られなかった。残念ですが当時私たちは、「ネガティブデータ（予想を否定するようなデータ）でも、十分に報告する価値があるので胸を張ろう」と自分たちを励ましていました。

（2）アセチルコリン受容体 その2

マウスの5種類の遺伝子は、アセチルコリン受容体のもう1つのグループ、ムスカリンという薬物に結合するムスカリン型アセチルコリン受容体をコードしています。私たちは今度はこの5種類（M1受容体、M2受容体、M3受容体、M4受容体、M5受容体）をTriple-CRISPR法で1つ1つノックアウトする実験をしました。そうしたところ面白いことに、5つのうち2つの遺伝子、*Chrm1*（M1受容体）と*Chrm3*（M3受容体）をノックアウトしたときに明らかな睡眠量の減少がみられました。ただ、それぞれのノックアウトマウスの睡眠量の減少は、*TrkA-TeNT* マウスでみられた減少量（約3時間）の半分ほどでした。

私たちははじめ睡眠時間を呼吸パターンで計測していたので、どんな睡眠が変わっているかまでは分かりませんでした。そこで脳波・筋電図で詳しい計測を試みたところ、面白いことが分かってきました。まず*Chrm3* 遺伝子を欠損した場合には総睡眠量の変化はノンレム睡眠と同じ程度で、つまり*Chrm3* 遺伝子はノンレム睡眠に重要だということを示唆していました。レム睡眠量はほとんど変わらなかったのですが、細かく見るとレム睡眠がバラバラになっていた（断片化していた）ことがわかり、レム睡眠にも若干の影響はありそうでした。驚いたのは*Chrm1* 遺伝子のノックアウトマウスの表現型で、ノンレム睡眠の現象は予想通りだったのですが、それだけでなくレム睡眠もほぼ半分に減っていました。どちらの遺伝子も片方だけ欠損した場合に、*TrkA-TeNT* マウスの3時間近い睡眠量の減少の半分ぐらいの表現型でした。そこで次に一度に両方の遺伝子を潰すことを試みたところ、*Chrm1/Chrm3* 欠損マウスでは睡眠量が劇的に変わり3時間近く減少することが分かりました。アセチルコリンが重要だと分かってその下流で働いているものを探す努力を続けてきましたが、ようやくその目標が達成できたわけです。

● 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	▲ 28 分

● 脳波・筋電図測定による詳細な睡眠解析

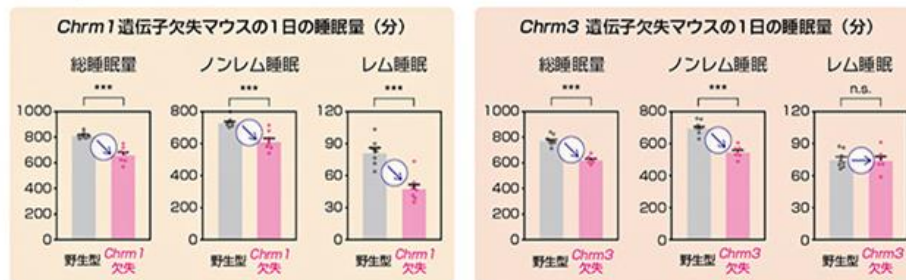


図2. アセチルコリン受容体 KO マウスの表現型。SSS 法(呼吸を用いた評価法)により、ムスカリン型受容体(*Chrm1*, *Chrm3*)では睡眠量が有意に減少した(上)。EEG/EMG 測定により *Chrm1* 遺伝子 KO マウスではレム睡眠とノンレム睡眠の両方が、*Chrm3* 遺伝子 KO ではノンレム睡眠のみが有意に減少した(下)。理研プレスリリースより一部改変の上、引用(*1)。

* 1 https://www.riken.jp/press/2018/20180829_1/

TrkA-TeNT マウスで劇的に変わっていたのはノンレム睡眠だったので、当然 *Chrm1/Chrm3* 欠損マウスでもノンレム睡眠が劇的に変わり、レム睡眠については若干の影響はあるかもしれない、程度の予想を立てて脳波・筋電図を測ることにしました。ところが大変驚いたことに *Chrm1/Chrm3* 欠損マウスではノンレム睡眠が減少してただけでなく、レム睡眠が全く無くなっていました。レム睡眠は発達過程で必須なはずだと言われていたので、正直に言えば何かの間違いじゃないかというのが最初の印象でした。そこで得られた結果を繰り返し確認し、また実験を繰り返して行いましたが、やはりレム睡眠が見えないという結果は変わらなかったことから、いよいよ特別に重要な発見をしたのではないか、という話になりました。*Chrm1* と *Chrm3* の両方が、レム睡眠に必須の遺伝子かもしれないということが見えてきたわけです。

Triple-CRISPR 法で作ったノックアウトマウスの場合、ほとんど全ての細胞で遺伝子がノックアウトされていることはいいのですが、細胞によって壊れ方が違うという問題があります。細胞によっては1番目のハサミで、別の細胞では2番目のハサミで、他にも3番目のハサミや2つのハサミで遺伝子が壊れているかもしれません。遺伝子を壊した影響を評価するという意味で、この点は少し気になります。今回の発見のようなどても重要なことを確かめるために、どの細胞も同じような壊れ方をしている動物で確かめようと考えて、別の技術を使って遺伝子が同じように壊れた動物を作ることにしました。

(3) ES マウス

私たちのところには、遺伝子を壊すだけではなく、遺伝子を入れ替えたり遺伝子に特別な細工をしたりするために作った技術があります。この ES マウス技術のことを少し詳しくお話しします。

ES 細胞（胚性幹細胞）は万能細胞と呼ばれ、様々な細胞に分化できる細胞です。まずこれまでの技術を紹介します。卵子は精子が受精すると 1 細胞から、分裂して 2 細胞、4 細胞、8 細胞、16 細胞、32 細胞、64 細胞と増えていきます。この 64 細胞以上になった受精卵に遺伝子改変した ES 細胞を入れます。受精卵が育った初期胚の内側が胎仔に、外側は胎盤になります。この内側の細胞に ES 細胞が混じって発生が進むと、生まれてくるのが ES 細胞由来細胞と初期胚由来細胞の混じったキメラ動物（1 つの個体の中に異なるゲノムを持った動物）です。例えば遺伝子変異によって白い毛になる ES 細胞を、黒い毛のマウスの受精卵に入れたとします。そうすると ES 細胞由来の白い細胞と元々の胚由来の黒い細胞が混じったキメラマウスが産まれます。もしも身体全身が白い動物（=すべて ES 細胞由来のマウス）が生まれたならばそのまま実験に使えますが、普通は胚由来の細胞が混じってしまいます。そこでキメラ動物と正常な動物（野生型といいます）を交配して、仔を準備する。たまたまキメラ動物の体内で、ES 細胞由来の精子（卵子）ができていた場合にはその精子（卵子）からできた仔は ES 細胞の染色体を全部引き継ぐので、改変した遺伝子を引き継ぐことになります。ただし交配する相手は正常な遺伝子を持っているので、キメラマウスと野生型マウスから生まれてきた動物は、2 つある遺伝子の片方だけに変異が入ることになります。両方の遺伝子に変異をもたせるために、さらに交配を進めていくのです。十分に実験を行うには個体数を増やす必要があり、結局交配を 5、6 回繰り返すので 2 年ぐらいかかってしまうのが実情でした。

1 世代で遺伝子改変動物を作るためには、初期胚に導入する ES 細胞から発生した細胞が身体全身を占めるマウスをつくれればよい、ということになります。実は 2010 年に画期的な進展があり、理化学研究所の清成寛先生がその萌芽となる技術を開発しました。清成先生の工夫は、まず使う初期胚を 8 細胞のときにいれるようにして、ES 細胞の貢献度（どれだけ ES 細胞由来の細胞からできるか）をあげるという工夫でした。またイギリスのグループが添加することで ES 細胞を培養すると（培養中に）ES 細胞が分化して万能性を失わないようにできる化合物をみつけていたのでこれを利用した (2i/3i テクノロジー)。そうしたところ、生まれてきた動物はなんとほぼ身体全身が ES 細胞由来でした。なぜほぼ全て ES 細胞由来の動物になるのか、その理由を色々調べていくと、ES 細胞由来の細胞が胎仔に、初期胚由来の細胞は胎盤になっていました (Kiyonari et al., *Genesis*, 2010)。私たちの研究室は清成先生達とタッグを組み、実際の ES 細胞の貢献度を調べてみたところ 99.999%にもなることを発見しました。さらに ES 細胞の培養法も簡便になるように工夫し、いわば職人技から汎用性のある技術に転換していくことができました。2017 年にこの技術に関する論文を二つの雑誌に発表しています (Ukai et al., *Nat Protocol*, 2017; Ode et al., *Mol Cell*, 2017)。

(4) レム睡眠遺伝子

私たちは、全身の細胞で同じように遺伝子が欠損したマウスをつくるため、ES マウスの技術を使い、*Chrm1/Chrm3* 遺伝子のダブルノックアウトマウス（2つの遺伝子を同時に欠損したマウス）を作り、睡眠を測ってみました。この結果、Triple CRISPR 法で作出したマウスと同じく、*Chrm1/Chrm3* 欠損マウスではレム睡眠は検出されませんでした。つまり、この二つの遺伝子がレム睡眠に必須の遺伝子だという結論が得られたことになりました。

レム睡眠がなくなる状態は他にも知られており、例えば冬眠の場合には脳波が減弱してレム睡眠も検出されなくなります。*Chrm1/Chrm3* 欠損マウスも冬眠のように極端に体温が低くなっているかもしれません。そこで体温を測ってみました。この他、マウスを断眠させた後にレム睡眠を測ると正常な動物では通常の倍ぐらいレム睡眠が起きやすくなり、レム睡眠量が増えます。このようにレム睡眠をより見やすくして *Chrm1/Chrm* 遺伝子欠損マウスでの睡眠を測っても、レム睡眠はほとんど検出不可能なレベルでした。いよいよ本当に、*Chrm1/Chrm3* 遺伝子欠損マウスは、レム睡眠を欠損した動物だと分かったのです。

私たちはレム睡眠は発達に必要不可欠だと思っていたので、まさかレム睡眠を欠損した動物ができるとは思っていませんでしたから、一連の研究結果には大変驚きました。今回の結果から、*Chrm1* と *Chrm3* 遺伝子の両方をなくしてレム睡眠が見えなくなったことは、アセチルコリンの M1 受容体と M3 受容体がレム睡眠に必須であることを示すと同時に、レム睡眠がなくてもマウスが生まれてくることも示していました。一方で *Chrm1/Chrm3* 欠損マウスでは学習障害が起きることが知られているので、そういう意味ではレム睡眠が必要なのかもしれません。また、M1 と M3 受容体はレム睡眠に必須ですが、全く同じ働きをしているのではなく、M1 はレム睡眠に、M3 はノンレム睡眠の制御により強く働いていました (Niwa et al., Cell Rep, 2018)。

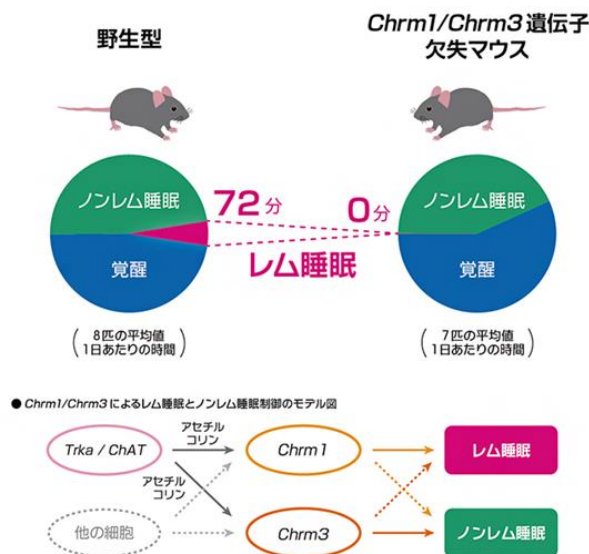


図3. *Chrm1/Chrm3*はレム睡眠に必須の遺伝子である。*Chrm1*と*Chrm3*の両遺伝子欠失マウスの睡眠量を評価したところ、レム睡眠がほとんど検出されなかった(上)。*Chrm1* 遺伝子と *Chrm3* 遺伝子の睡眠制御のモデル(下)。*Chrm1* 遺伝子は主にレム睡眠に、*Chrm3* 遺伝子は主にノンレム睡眠を制御する可能性がある。理研プレスリリースより一部改変の上、引用(*2)。

*2 https://www.riken.jp/press/2018/20180829_1/

(5) 余話

この研究結果を2018年に発表したところ、非常に大きな反響がありました。ある新聞は「ドリームジーン(夢の遺伝子)」が見つかったみたいな言い方をしてくれました。またあるイギリスの雑誌は、いかにもイギリス人のユーモアにあふれた言い回しで「日本の研究者が”夢”を壊した」というようなことを書きました。もっと良い言い方をしたい、と思ったものです。

これまでにノンレム睡眠にはカルシウムが重要な働きをし、カルシウムの下流の酵素が眠気を数えるタイマーのような役割をする、という仮説について実験結果とともにお話してきました。レム睡眠に関してはアセチルコリンをだす神経の下で2つの受容体が働いており、この受容体を作る2つの遺伝子をなくすとレム睡眠がなくなってしまうことを示しました。この2つの受容体の下流で何が起きているのかは謎のままなので、これから研究を深めていかなければなりません。脳の中で神経細胞は、覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠の3種類の状態をとるわけですが、実はこれらの実態は物質的にはまだ定義されていません。私たちの一連の研究で「分子のとっかかり」ができたので、こういう「とっかかり」から脳の3種類の基礎的な状態を定義できるようになっていくかもしれません。