

ショウジョウバエの睡眠覚醒研究

はじめに

睡眠の制御機構には今でも未解明の部分が多い。睡眠は高等脊椎動物の脳機能だが、昆虫などの無脊椎動物にも睡眠類似行動が認められることから、哺乳類以外の動物モデルを使った研究にも期待が集まっている。2006年6月にソルトレークシティで開かれた米国睡眠学会（APSS）でも、前年度の学会長のAllan Pack博士の基調講演は、哺乳類以外の動物の睡眠研究に関するものだった。その中で、様々なモデル動物の研究が近年の睡眠科学の最大の進歩として取り上げられ、ゼブラフィッシュ・ショウジョウバエ・線虫の研究が紹介された。筆者らは数年前に睡眠が減ったショウジョウバエの変異株を発見し不眠 (*fumin*) と命名し、その原因がドーパミントランスポーターの変異であることをつきとめた。この結果は、ショウジョウバエの睡眠覚醒制御が、行動レベルだけではなく、物質・遺伝子レベルでも高等動物と相似性を持つことを示した^{1,2)}。本稿では急速に進みつつあるショウジョウバエの睡眠研究を概観する。なお概日周期研究の基礎や睡眠の遺伝的研究については、筆者の他稿も参考にしてほしい³⁻⁵⁾。

1. 睡眠の行動観察による定義

ショウジョウバエは、生物時計研究の材料としての歴史は長い⁶⁾、睡眠という視点から調べた最初の論文の発表は2000年で^{7,8)}、その後、現在（2006年8月）までに原著

論文は20報以上、総説などを含めれば50報以上の論文が報告されている。その中から主要なものを時系列順に表1にまとめた。

ショウジョウバエの睡眠は、他の動物に習い、まず行動学的に規定された。哺乳類の場合、睡眠は電気生理学的に脳波で定義され、レム睡眠とノンレム睡眠という2種類の性質の異なる睡眠がある。ノンレム睡眠時は脳幹の睡眠中枢が働き大脳皮質の活動レベルは低下する。これに対してレム睡眠時には大脳皮質は覚醒時に近い活動レベルを保つ。このレム睡眠は哺乳類以外には恒温動物である鳥類にも認められるが、一部の爬虫類の報告を除き爬虫類・両生類・魚類などの変温動物には認められない⁹⁾。そこで脳波を計測することが難しい動物種においては睡眠類似行動が行動学的な特徴に基づいて記載される。

睡眠は積極的・意図的な活動を休止してマクロの個体レベルの動きがない状態である。動物には活動（運動）状態と非活動（不動）状態があり、活動をしていない状態の中に、眠っている状態と（単に活動を止めているだけで）眠っていない状態がある。

この眠っている状態（睡眠）と眠っていないが動いていない状態（休息）は、以下の3点で異なる。

1 番目は睡眠は概日周期の制御を受けるが、休息は一般的に昼夜を問わない。人間は昼行性だが昼でも運動をして疲れれば横になって休むが眠ることは少なく、たとえ昼寝をしたとしても睡眠は深まらず短時間で終わる。それに対して日中にほとんど運動をせず肉体的な疲労がなくても夜間には眠る。

2 番目に睡眠の量は身体的な活動量には直接は比例せず覚醒の量に比例する。つまり夜間眠気があるのに我慢して起きていた場合、たとえ横になって身体的な疲れがなくて

表1 これまでに発表されたショウジョウバエの睡眠に関する研究結果

1. ショウジョウバエの睡眠の行動学的な最初の記載 (Hendricks *et al.* *Neuron*, Shaw *et al.* *Science*, 2000)
2. cAMP-CREB の系が睡眠量の調節に重要 (Hendricks *et al.* *Nature Neurosci.*, 2001)
3. 睡眠は生存に必須である (Shaw *et al.* *Nature*, 2002)
4. 脆弱 X 症候群遺伝子の異常が、睡眠量を変化させる (Inoue *et al.* *Curr. Biol.*, Morales *et al.* *Neuron*, 2002)
5. 脳の電気生理学的な活動が、睡眠・覚醒状態と相関する (Nitz *et al.* *Curr. Biol.*, 2002)
6. 性差が睡眠の性状に影響を与える (Hendricks *et al.* *J. Biol. Rhythms*, 2003)
7. 覚醒物質であるモダフィニルが覚醒を増加する (Hendricks *et al.* *Sleep*, 2003)
8. 脳の電位変化が覚醒を規定する (van Swinderen *et al.* *Curr. Biol.*, 2004)
9. ドーパミンが睡眠覚醒調節に関与する (Andreic *et al.* *Curr. Biol.*, Kume *et al.* *J. Neurosci.*, 2005)
10. カリウムチャンネルの変異が短眠・短寿命を引き起こす (Cirelli *et al.* *Nature*, 2005)
11. 老化と睡眠量に相関がある (Koh *et al.* *PNAS USA*, 2006)
12. 脳のキノコ体が睡眠の調節を行う (Joiner *et al.* *Nature*, Pitman *et al.* *Nature*, 2006)
13. セロトニン受容体 1A 型が睡眠量の増加に関与する (Yuan *et al.* *Curr. Biol.*, 2006)
14. 飼育環境の差による覚醒状態が睡眠量を変化させる (Ganguly-Fitzgerald *et al.* *Science*, 2006)

も翌日の睡眠量は増える。一方運動後の休息は運動の量が多ければより長く必要となるので、休息の量は運動の量に比例関係がある。このように睡眠には睡眠の量そのものを一定にしようとする恒常性維持機構が働く。

3番目に睡眠中は外部からの刺激に対して反応性が低下する。深い睡眠時は外部からの情報入力が増減された状態で、軽く触れられた程度では目を覚まさない。ところが単に横になって身体を休めているだけの時には意識があり、刺激に対する反応性は活動時と同じレベルである。

1, 2番目の特徴はある時点でその個体が睡眠中か否かを判断するためには利用できず、3番目の特徴が重要となる。睡眠は可逆性も必須で強い刺激に対しては反応して覚醒状態に戻らなければならない。もし身体をゆすられても起きなければ、眠っているのではなく気を失っている状態である。

2. ショウジョウバエの睡眠

このような睡眠に類似する行動学的な特徴を持つ「不動状態」が1992年にゴキブリで示され¹⁰⁾、2000年にアメリカの二つのグループがショウジョウバエでも報告した^{7,8)}。Hendricksらは30分 Shawらは10分を基準とし、それより長い時間ショウジョウバエが動かない場合を睡眠とみな

した。するとその量の変化は概日周期の制御を受け、刺激を与えることで休ませないで睡眠を剥奪すると、反動でその後の睡眠量が増えた。さらに直前まで活動していた個体よりも一定時間じっと動かない状態にいた個体の方が外部の刺激に対する反応性が低下していた。これらは前項にあげた三つの行動学的な基準を満たしている。

さらに一定時間不動だったハエは直前まで動いていたハエに比べて姿勢を低くすること(姿勢の変化)、じっとしている時には餌の近くの一定の場所を好むこと(巣の存在)、睡眠の量がカフェインで減り抗ヒスタミン剤で増えること(薬理的な類似)、哺乳類で睡眠に関与するとされる遺伝子がハエでも睡眠時に変化していることなどもショウジョウバエに哺乳類に類似した睡眠がある傍証とされた。

われわれも睡眠と時計遺伝子との関連について解析を行った。ハエの活動を連続的に観察するために赤外線を使ったモニター装置を使う(図1)。ハエを細いガラス管の中に入れセットするとガラス管中央部に赤外線のビームが通り、ハエが歩いてこのビームを横切るとセンサーがその回数を計数する。コンピューターでこのデータを一定時間ごとに記録することでハエが動いているのか止まっているのかを判定する。この装置はもともと活動の概日周期を観察するために開発されたので、その目的では30分間隔でデータを記録していたが、睡眠を詳細に観察する目的で1分単位のデータを取り込み、自動的に解析するプログラムを開発した。これを使って、ショウジョウバエの概日周期変異株(*per*, *tim*, *clk*, *cyc*: いずれも無周期変異株)の活動・睡眠を詳細に解析したところ、*per*と*tim*では睡眠量の変化はなかったが*clk*と*cyc*では睡眠量が減少していることや、その差には性差があることも示された¹¹⁾。

3. *fumin* 変異株の発見

この研究の過程で、われわれは偶然睡眠の量が減っている変異株を発見し *fumin* (*fumin* = 不眠) と名付けた。*fumin* は野生型に比べて活動量が3~4倍増加し、睡眠量が3分の1から4分の1に減少していた。さらに睡眠中に刺激

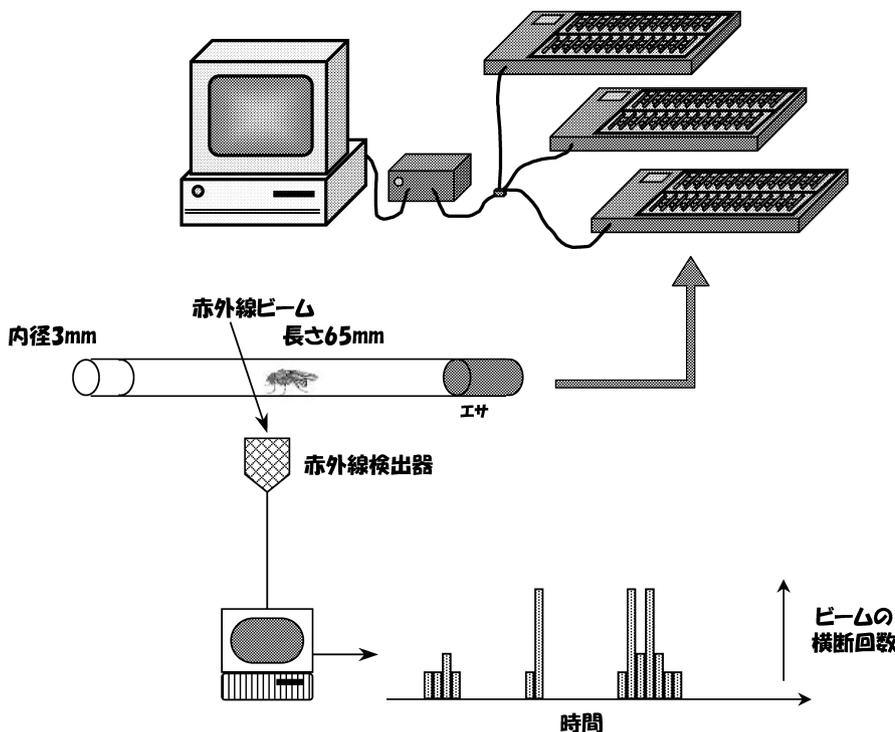


図1 ショウジョウバエの行動解析装置

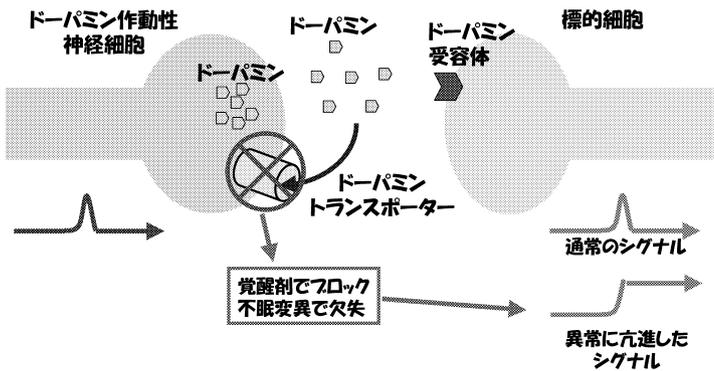


図2 ドーパミントランスポーターの機能

を加えてその反応性を観ることで覚醒域値を調べてみると、野生型では20%以下しか反応しない弱い刺激に対して *fumin* では半分程度が反応し、さらに野生型の半数程度が反応するやや強い刺激に対しては、*fumin* の大多数が反応した。このことは不眠変異株は睡眠時間が短くなっているだけではなく、睡眠の深さも浅くなっていることを示し、量だけではなく質的にも睡眠に変化があることを示す。

不眠変異株は研究室のストックの中に自然に発生したものであったため、定型的な forward genetics で変異遺伝子の同定を試み、最終的にドーパミントランスポーター (DAT) 遺伝子の挿入変異であることを解明した。*fumin* 変異株では DAT 遺伝子の6番目のイントロン部分にトランスポゾンの断片が挿入されたことによりスプライシングが阻害され、3' 側の欠失した短い cDNA が作られることにより DAT タンパク質機能が失われていると考えられる。

DAT は哺乳類ではドーパミン作動性神経細胞の軸索末端の前シナプス膜に発現して、放出されたドーパミンを再取り込みしてシナプス間隙の量を一定以下に調節する役割を持つ。覚醒物質のコカインやアンフェタミンは DAT に結合して働きを抑えてしまうことでドーパミンシグナルを強め覚醒を誘導することからわかるように、人間でも DAT は覚醒制御に重要な役割をしている。ショウジョウバエでも DAT はチロシン水酸化酵素を発現するドーパミン作動性神経細胞に発現していることが知られているため¹²⁾、同様の作用を持つと考えられる。このことから、*fumin* では、アンフェタミンなどを投与された時と同じく、ドーパミン作用が増強することによって、睡眠が阻害された状態になっていると考えられる (図2)。また薬理学的な実験からも、ショウジョウバエの睡眠覚醒制御にドーパミンが重要なことは示され、ショウジョウバエと人間という進化的に離れた動物の間で覚醒制御に同じ物質と

同じ遺伝子が使われていることが示された。

4. 睡眠と寿命の関係

野生型のショウジョウバエを24時間程度断眠しても致死的にはならないが、*cyc* 変異株では6時間から12時間という比較的短時間でも、休ませないように刺激を与え続け断眠をすると死んでしまう個体があることが報告された¹³⁾。またカリウムチャンネルの変異 (*Shaker*) を持つショウジョウバエは、睡眠が短くまた寿命の短縮も認められることが報告された¹⁴⁾。これらの報告からショウジョウバエでも哺乳類同様に睡眠が生存に必須である可能性が示唆された。しかし *fumin* 変異は寿命には全く影響がなかった。われわれは、遺伝背景、雌雄、飼育温度 (20, 25, 30 度) の異なる全ての条件下で *fumin* が野生型と同程度の寿命があることを確認している。そのためショウジョウバエで断眠による致死性や睡眠の量と寿命の関係の一般性には、今のところ疑問があり、さらに研究を進めている。

5. 睡眠と脳の機能の関係

哺乳類の睡眠の一義的な意義は、脳、特に大脳の休息のためと考えられており、脳に由来する脳波は睡眠特有のパターンを示す。ショウジョウバエの睡眠覚醒行動が、脳によって制御されているかどうかに関しては、脳の電気生理学的な活動パターンが、覚醒状態と相関するという報告がある。van Swinderen らによれば、ショウジョウバエの脳の電位変化の中で、20~30Hz の成分が重要であり、その成分の変化と睡眠覚醒状態には相関が認められるとされる。彼らは別の研究で、ショウジョウバエが特定のものに注意を払う状態があることを示しており、原初的な意識の研究という意味でも興味深い^{15,16)}。

また最近、ショウジョウバエの脳の中でも、記憶などに重要な役割を果たすとされるキノコ体と呼ばれる構造が、睡眠も制御しているという報告がなされた。これらの報告も、ショウジョウバエの睡眠には、単なる休息以上の意味がある可能性を示唆している^{17,18)}。

今後の展望

哺乳類では、睡眠に関与する脳内の回路も詳細に調べられており、またさまざまな睡眠物質も見つかっている。しかし、では眠くなっている時には何が起きているかと問われると明確には答えられない。その理由の一つは眠気は意識に影響を及ぼすが、意識がどのように作られているのか

がほとんどわかっていないからである。

脳の構造を見ても、ショウジョウバエとヒトは全く異なるが、ドーパミンという同じ物質を使い同じような行動を取ることから、睡眠行動の原型は哺乳類と同じと考えられる。つまりこの2種類の動物が進化的に分離した数億年前まで睡眠覚醒行動のルーツ、そしてその生物学的意義もさかのぼれる可能性がある。またさらに、睡眠の対称状態である覚醒、それを規定する意識の面でも、ショウジョウバエという遺伝学的ツールが用いやすいモデル動物を使うことでさらなる研究の進展が期待される。

- 1) Kume, K., Kume, S., Park, S.K., Hirsh, J., & Jackson, F.R. (2005) *J. Neurosci.*, 25, 7377-7384.
- 2) Kume, K. (2006) *Sleep Biol. Rhythm.*, 4, 263-273.
- 3) 糸 和彦 (2003) 時間の分子生物学, 講談社, 東京.
- 4) 糸 和彦 (2006) 蛋白質核酸酵素, 51, 853-862.
- 5) 糸 和彦 (2006) 医学のあゆみ, 217, 571-575.
- 6) Konopka, R.J. & Benzer, S. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68, 2112-2116.
- 7) Hendricks, J.C., Finn, S.M., Panckeri, K.A., Chavkin, J., Williams, J.A., Sehgal, A., & Pack, A.I. (2000) *Neuron*, 25, 129-138.
- 8) Shaw, P.J., Cirelli, C., Greenspan, R.J., & Tononi, G. (2000) *Science*, 287, 1834-1837.
- 9) Campbell, S.S. & Tobler, I. (1984) *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 8, 269-300.
- 10) Tobler, I.I. & Neuner-Jehle, M. (1992) *J. Sleep. Res.*, 1, 231-239.
- 11) Hendricks, J.C., Lu, S., Kume, K., Yin, J.C., Yang, Z., & Sehgal, A. (2003) *J. Biol. Rhythms*, 18, 12-25.
- 12) Porzgen, P., Park, S.K., Hirsh, J., Sonders, M.S., & Amara, S. G. (2001) *Mol. Pharmacol.*, 59, 83-95.
- 13) Shaw, P.J., Tononi, G., Greenspan, R.J., & Robinson, D.F. (2002) *Nature*, 417, 287-291.
- 14) Cirelli, C., Bushey, D., Hill, S., Huber, R., Kreber, R., Ganetzky, B., & Tononi, G. (2005) *Nature*, 434, 1087-1092.
- 15) van Swinderen, B., & Greenspan, R.J. (2003) *Nat. Neurosci.*, 6, 579-586.
- 16) van Swinderen, B., Nitz, D.A., & Greenspan, R.J. (2004) *Curr. Biol.*, 14, 81-87.
- 17) Pitman, J.L., McGill, J.J., Keegan, K.P., & Allada, R. (2006) *Nature*, 441, 753-756.
- 18) Joiner, W.J., Crocker, A., White, B.H., & Sehgal, A. (2006) *Nature*, 441, 757-760.

糸 和彦

(熊本大学発生医学研究センター)

Regulation of sleep and arousal in *Drosophila*
Kazuhiko Kume (Kumamoto University, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Honjo, Kumamoto, Kumamoto 860-0811, Japan)

ゴルジ体ユニットによる糖鎖多様性の制御

はじめに

細胞外に分泌または細胞膜上に提示されるタンパク質の多くは、糖鎖による翻訳後修飾を受ける。そのような糖鎖の構造は非常に多岐にわたっており、糖鎖付加されるタンパク質内の配列、タンパク質の種類、細胞や組織の種類、個体、生物種によって大きく異なる。そのように多様な糖鎖だが、特定のタンパク質の特定の位置には、ほぼ同じ種類の糖鎖が特異性をもって付加される。このような糖鎖付加の多様性と特異性がどのように制御されているかについては、現在のところ、多くの部分がかかっていない。我々はショウジョウバエを用いた解析より、糖鎖付加の現場であるゴルジ体には異なる糖鎖付加を行う複数の種類があることを見出し、このような機能的に異なるゴルジ体のことを「ゴルジ体ユニット」と名付けた。

1. 生体内での糖鎖付加反応：糖転移酵素、糖ヌクレオチド輸送体

糖鎖とは、単糖がグリコシド結合を介して鎖状につながったものである。単糖間のグリコシド結合は、糖転移酵素によって生成される。糖転移酵素の数は多く、ヒトでは300以上、ショウジョウバエでも100ほどあるといわれている。糖転移酵素は、タンパク質や脂質、またはタンパク質や脂質に結合した糖鎖に対して、さらに単糖を結合させ、糖鎖を伸長させる活性をもつ。糖鎖に利用される単糖にはいくつもの種類があり、さらに単糖間のグリコシド結合にも多様な種類があるため、糖転移酵素には基質および反応特異性がある。糖転移反応には、糖にヌクレオチドが結合した「糖-ヌクレオチド」が利用される。糖-ヌクレオチドは主として細胞質で生成されるが、その生成過程というのは、いくつもの反応から構成される複雑な代謝回路からなる。

ところで、N-結合型糖鎖のコア部分を別として、多くの糖鎖は小胞体やゴルジ体内腔で生成される。したがって、糖-ヌクレオチドは小胞体やゴルジ体の膜を通過する必要がある。その輸送を行っているのが、小胞体やゴルジ体の膜上にある「糖-ヌクレオチド輸送体」である¹⁾。「糖-ヌクレオチド輸送体」はアンチトランスポーターであり、