

## ショウジョウバエの睡眠覚醒制御機構

糸 和彦\*

熊本大学発生医学研究センター

睡眠覚醒制御は概日時計の出力系として最も重要なものの一つである。近年の研究の進展に伴い両者の関係も注目され、時間生物学と睡眠科学は急速に接近している。睡眠は基本的に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あることが示されている。また脊椎動物と昆虫の間で核酸レベルで保存された時計遺伝子が概日周期を制御する。私たちは遺伝学手法に優れるショウジョウバエの睡眠の研究中に、睡眠が量的にも質的にも減少したショウジョウバエの*fmn* 変異株を発見し、その原因がドパミントランスポーターの欠失であることを突き止めた。哺乳類においてもコカインやアンフェタミンなどの覚醒物質がこの遺伝子産物を標的にすることから、行動レベルだけでなく遺伝子・物質レベルでも睡眠覚醒制御機構に類似性があることが示され、今後の研究の発展が期待される。

## 1. はじめに

1 日約24時間のリズムを刻む概日周期は植物・動物・原核生物にまで広く存在し、様々な生物を用いて研究が進められてきた。概日周期の発振機構は遺伝学手法に優れるショウジョウバエでの研究が先行し、哺乳類の時計遺伝子機能の解明にも結びついた<sup>1)</sup>。哺乳類の*Per* 遺伝子群はショウジョウバエのものと相同であることが示され、その他にも多くの時計遺伝子の機能が類似している<sup>2-3)</sup>。系統発生的に遠く隔たる昆虫と哺乳類が核酸レベルで相同性を持つピリオドなどの時計遺伝子を使って生物時計を構成することは、本能行動の起源を考える上で興味深い。

時計発振機構の分子生物学的解明が進んだ現在では、生物時計を外部環境へ同調させる入力系や時計の情報を生理現象に反映させる出力系にも研究の興味注がれている。概日周期の出力系として最も身近で重要なものは睡眠覚醒サイクルの制御である。まだ未解明の部分が多い睡眠覚醒制御機構は高等脊椎動物の脳機能として研究されてきたが、近年昆虫などの無脊椎動物にも睡眠類似行動（以後単に睡眠と呼ぶ）が認められることが報告された<sup>4)</sup>。

筆者のグループはショウジョウバエの睡眠の性状を解析する研究中に睡眠が減ったショウジョウバエの変異株を見つけた<sup>7-9)</sup>。その遺伝子を同定した結果、昆虫の睡眠覚醒制御が分子生物学的にも哺乳類との類似点があることを発見した<sup>10)</sup>。本稿ではその研究経験を含めて概日周期制御と睡眠覚醒制御を概観する。

## 2. 概日周期と睡眠の関係

まず概日周期と睡眠の関係を簡単にまとめる。人間は眠気を我慢して睡眠を意識的に自己調節しうるのが一般的に睡眠の量は眠気の強さに比例する。この眠気の強さを決める主要要素は睡眠の量そのもののホメオスターシス（恒常性維持）機構と概日周期の二つである。前者はそれまでの覚醒時間（つまり睡眠の不足、睡眠負債と呼ぶ）に比例して眠気が増え一定量の睡眠を確保する。後者は1日の活動時間帯（人間では昼、夜行性動物では夜）に眠気を覚ます覚醒信号を作るとされ、睡眠負債の量にかかわらず時刻に応じて変化する成分である。

Borbelyのtwo process model<sup>11)</sup>では睡眠負債による眠気をS（process S）概日周期からの覚醒シグナ

\*kkume@medic.kumamoto-u.ac.jp (〒860-0811 熊本市本荘2-2-1)

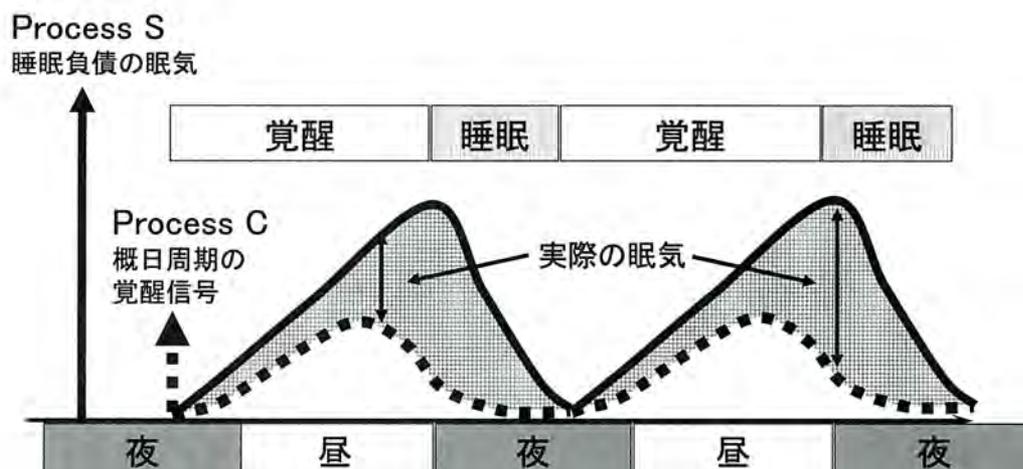


図1. 二過程モデルTwo Process Model

実線が睡眠負債による眠気 (process S) を点線が概日周期からの覚醒信号 (process C) を示す。この差 (灰色に塗りつぶした部分) がその時点での実際の眠気の強さを表す。

ルをC (process C) と呼び、この両者の差がその時点での実際の眠気であるとする (図1)。日中覚醒状態が続くと睡眠負債が貯まりSによる眠気が強まる。夜間に睡眠を取るとこの眠気は急速に減弱する。一方前日の睡眠量に関わらず日中には眠気を弱めるCが強まる。その結果ある時点における眠気の強さはSからCを差し引いたもので表され、日中は緩やかに増加し夜が近づくと急速に増加する。このモデルは時差ボケや徹夜明けに睡眠不足でも目が覚めてくる現象をうまく説明できるが、眠気には24時間だけではなく12時間やさらに短い周期の変動もあり限界もある。

### 3. 行動学的な睡眠の定義

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<sup>12)</sup>。しかし脳波を計測することが難しい動物種においても睡眠類似行動が認められるために行動学的な睡眠の特徴も記載されている。

睡眠は不動つまり積極的・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。ほぼ全ての動物には活動 (運動) 状態と非活動 (不動) 状態がある。また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) 眠ってはいない状態がある。ただし泳ぐことにより呼吸をするためずっと動きを続けるマグロなどの回遊性の魚類のような例外もある。また逆に睡眠中と考えられるのに身体の動きが止まらないこともあり、人間の場合は睡眠時遊行症 (いわゆる夢遊病) やレム睡眠行動障害などの寝ぼけ症状がある。さらにイルカでは脳の片側だけが睡眠状態になり対側の活動により泳ぎ続けられるという。

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

1 番目は睡眠は昼夜の区別つまり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の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ある程度の比例関係がある。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 番目に睡眠中は意識が失われ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

情報入力遮断された状態で軽く触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、外部の刺激に対する反応性は活動時と同じレベルである。

1, 2番目に述べた睡眠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非常に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。

#### 4. ショウジョウバエの睡眠

このような行動学的な特徴を持ち睡眠に類似する「不動状態」が1992年にゴキブリで示され<sup>13)</sup>、2000年にはアメリカの二つのグループからショウジョウバエでも報告された<sup>14,15)</sup>。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3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。

#### 5. 不眠変異株の性質

われわれもショウジョウバエの睡眠に興味を持ち、特に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図2に示すように一匹のハエを細いガラス管の中に入れ活動度モニター装置にセットする。この装置ではガラス管中央部に赤外線レーザー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。コンピュータでこのデータを一定時間毎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観察する目的で1分単位のデータを取り込みそれを自動的に解析するプログラムを開発した。これを使って概日周期変異株(*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

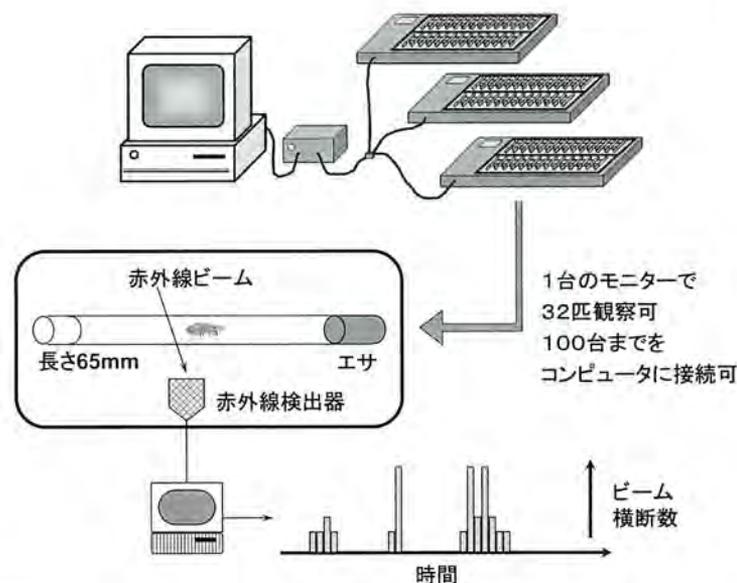


図2. ショウジョウバエの活動記録装置

細いガラスチューブの中に1匹のショウジョウバエを入れ赤外線レーザーのビームで動きを計測する。1台のモニターが32匹用で複数台のモニターを使うことで多数のハエ(当研究室では40台で1280匹)の観察を同時に行うことができる。

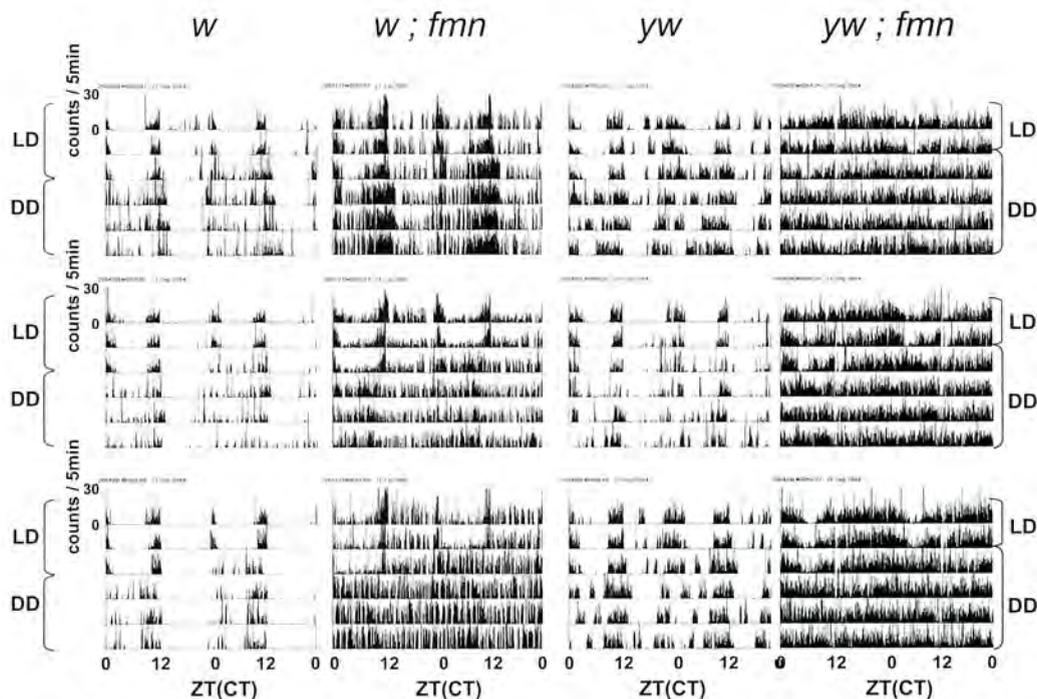


図3. 活動記録

野生型 (*w*, *yw*) *fmn* 変異株それぞれ3匹ずつの記録を示す。各段は2日間分の記録を並べたダブルプロット法で3日間が明暗条件(明期・暗期12時間ずつ)でその後4日間が恒常暗条件である。横軸が時刻、縦軸が5分間あたりの赤外線ビーム横断数を示す。

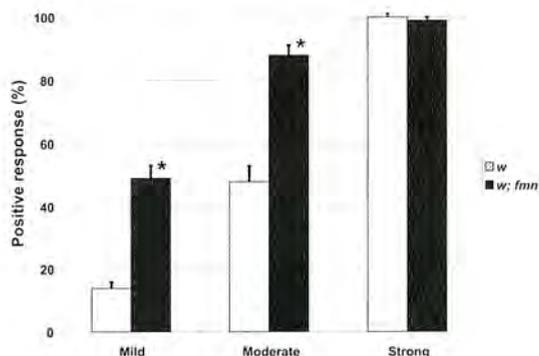


図4. 物理的刺激に対する反応性の変化

野生型(白)と *fmn* 変異株(黒)が5分間以上活動を停めている時に、強度の異なる3種類の刺激を与えた場合、反応して動き始めた個体の割合を示す。それぞれ16匹ずつ、5回の試行の平均とその偏差を示す。野生型がほとんど反応しない弱い刺激でも *fmn* 変異株が反応していることがわかる。

量の変化はなかったが *clk* と *cyc* では睡眠量が減少していた<sup>7)</sup>。

この研究の過程で偶然睡眠の量が減っている変異株を発見し *fmn* (*fumin* = 不眠) と名付けた。 *fmn* は研究室のストックの中に偶然発生した変異だったため2種類の異なる遺伝的背景を持つ系統 (*w* と *yw*) に戻し交配したところ、どちらの系統でも睡眠

量が減る同じ表現型を示した。図3にこの2種類の系統で、 *fmn* の野生型と変異型の個体の活動記録を示すが *fmn* はそれぞれのコントロールに比べて活動量が3~4倍睡眠量が3分の1から4分の1に減少していた。さらに図4に示すように睡眠中の覚醒閾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半分程度が反応し、野生型の半数程度が反応するやや強い刺激に対して大多数が反応した。このことは *fmn* 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。

## 6. 睡眠と寿命の関係

*cyc* 変異株では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<sup>16)</sup> ショウジョウバエでも哺乳類同様に断眠が致死的可能性が示唆された。また *fmn* 変異の発表と同年に他のグループからカリウムチャンネルの変異 (*Shaker*) をもつショウジョウバエも睡眠が短くなりまた寿命の短縮も認められることが報告された<sup>17)</sup>。しかし *fmn* 変異株は寿命には全く影響がなかった。図5には *yw* の例を示すが、他の遺伝背

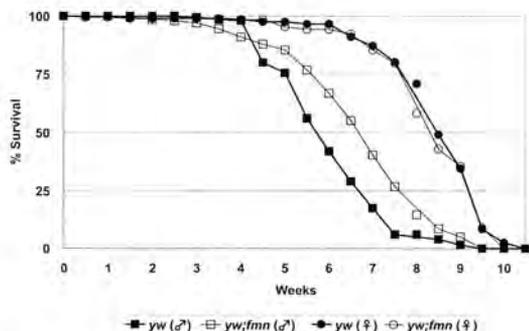


図5. 寿命  
野生型（黒）と *fnn* 変異株（白）のオス（四角）、メス（丸）の寿命曲線。X軸が羽化後の週齢をY軸が生存率を示す。*fnn* 変異株はオスもメスも野生型と同じかそれ以上の寿命を持つ。

景・雌雄・飼育温度（20, 25, 30℃）の全ての異なる条件下で *fnn* はコントロールと同程度の寿命をしめた。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疑問がある。

### 7. *fnn* の原因遺伝子

*fnn* 変異株は研究室のストックの中に自然に発生したものだったため、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。図6に示すように *fnn* 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タンパク質が失われていると考えられる。

DATは哺乳類ではド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<sup>18)</sup> 同様の作用を持つと考えられる。このことからショウジョウバエと人間という種としてかなり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。

### 8. 今後の展望

睡眠にはまだわからないことが多い。特に人間のレベルではさまざまな睡眠物質が知られており、睡眠に関与する脳内の回路も詳細に調べられている。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

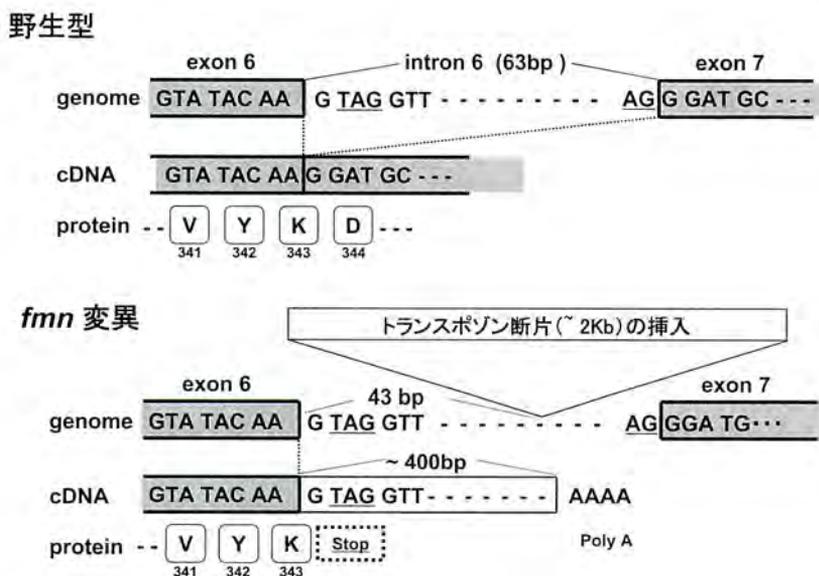


図6. *fnn* のドパミントランスポーター（DAT）遺伝子の変異  
野生型と *fnn* 変異のDAT遺伝子のゲノムとcDNAの配列。*fnn* では6番目のイントロンに長いDNA断片が挿入されたためスプライシングが阻害されストップコドンが生成することで翻訳が中断してしまう。

ているのがほとんどわかっていないからである。種々の遺伝子も関与が示されているだけのものも多い。

ショウジョウバエの睡眠は機能的にはヒトの睡眠とは全く異なると推察されるがド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睡眠覚醒制御の分子機構のさらなる解明も期待される。

#### 終わりに

私が最初に時間生物学会に参加したのは1998年のことです。その後留学先のMGHで行った哺乳類のクリプトクロームの機能解析について書かせて頂いて以来、今回が2回目です。執筆の機会を与えて下さった富岡憲治先生に感謝いたします。

#### [文献]

- 1) 糸和彦: 講談社現代新書(2003)
- 2) King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, Turek FW, Takahashi JS: *Cell* 89:641-53(1997)
- 3) Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M, Sakaki Y: *Nature* 389:512-6(1997)
- 4) Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert, SM: *Cell* 98:193-205(1999)
- 5) Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, Kume K, Lee CC, van der Horst, GT, Hastings MH, Reppert SM: *Science* 288:1013-9(2000)
- 6) Tobler I: *Behav Brain Res* 8:351-60(1983)
- 7) Hendricks JC, Lu S, Kume K, Yin JC, Yang Z, Sehgal A: *J Biol Rhythms* 18:12-25(2003)
- 8) Morales J, Hiesinger PR, Schroeder AJ, Kume K, Verstreken P, Jackson FR, Nelson DL, Hassan BA: *Neuron* 34:961-72(2002)
- 9) Jackson FR, Schroeder AJ, Roberts MA, McNeil GP, Kume K, Akten B: *J Insect Phys* 87:833-42(2001)
- 10) Kume K, Kume S, Park SK, Hirsh J, Jackson FR: *J Neurosci* 25:7377-7384(2005)
- 11) Borbely AA: *Hum Neurobiol* 1:195-204(1982)
- 12) Campbell SS, Tobler I: *Neurosci Biobehav Rev* 8: 269-300(1984)
- 13) Tobler I, Neuner-Jehle M: *J Sleep Res* 1:231-239(1992)
- 14) Shaw PJ, Cirelli C, Greenspan RJ, Tononi G: *Science* 287:1834-7(2000)
- 15) Hendricks JC, Finn SM, Panckeri KA, Chavkin J, Williams JA, Sehgal A, Pack AI: *Neuron* 25:129-38(2000)
- 16) Shaw PJ, Tononi G, Greenspan RJ, Robinson DF: *Nature* 417:287-91(2002)
- 17) Cirelli C, Bushey D, Hill S, Huber R, Kreber R, Ganetzky B, Tononi G: *Nature* 434:1087-92(2005)
- 18) Porzgen P, Park SK, Hirsh J, Sonders MS, Amara SG: *Mol Pharmacol* 59:83-95(2001)