

40. ショウジョウバエを用いた新規の睡眠制御機構の探索

桑 和彦

名古屋市立大学 大学院薬学研究科 神経薬理学分野

Key words : 睡眠, 覚醒閾値, ショウジョウバエ, 甘味受容体, グリシン

緒言

睡眠は、私たちが毎日数時間を費やすとても身近な現象で、医療の中でも睡眠障害の重要性が増しているが、睡眠の生理的意義や制御機構には、今でも未知の部分が多い。私たちの存在の根源である意識を毎日一定時間失うことは適応的とは考えにくいですが、そもそも、その意識が生み出される機序も、科学的理解の途上である。そのような基礎科学的興味からも、近年、睡眠は盛んに研究されている。ヒトの場合、睡眠は一過性・可逆的に意識が失われる状態で、眠っているかどうか（意識の有無）は主観的判定しかなかった。しかし、脳波計測が開発され、その特徴から、ほぼ確実な睡眠覚醒判定が可能となり、睡眠の客観的研究が可能になった。その結果、哺乳類・鳥類などでは、脳波を用いて睡眠が定義され研究が進んだ。一方、分子生物学の進歩により、系統的に離れている生物の間でも遺伝子が保存され、同じ機能を持つ例が知られるようになり、生命現象の分子レベルの解明も進んだ。昆虫の睡眠は、最初は哺乳類の睡眠に似た特徴を持つ行動として定義されたが、変異体を用いた研究から関連遺伝子が発見されると、その多くが哺乳類と共通することから、進化的にも類似する行動であると考えられるようになった。

私たちは、ショウジョウバエを用いた睡眠の研究に初期から着手し^{1,2)}、ドーパミンが覚醒制御を行うこと³⁾、その神経回路の解明などを行ってきた⁴⁾。本研究では、睡眠の生理的意義の解明を目的として、新規の睡眠制御機構の探索を行った。探索手段の一つとして、個体を用いた行動レベルで睡眠に影響を与える物質（栄養素・薬剤・生薬など）の探索を行った結果、食事に含まれる栄養素と睡眠・覚醒制御の関係について、興味深い新規の知見をいくつか見出した。

方法

1. 実験動物の準備

野生型のキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster* 以下、単にハエ) は、多くの研究室で使われている Canton-S 由来の *w¹¹¹⁸* 系統を用いた。トランスジェニック個体は、ストックセンターなどから取得し、当研究室の野生型系統に 5 代以上の戻し交配を行ったものを使用した。飼育は定法に従い、コーンミール・酵母・小麦胚芽・ブドウ糖などを含む寒天培地で、明暗サイクル (12 時間 : 12 時間)、25 °C で行った。

2. 睡眠計測

ハエを一匹ずつ、長さ 65 mm、内径 3 mm のガラスチューブに入れて、ショウジョウバエ活動モニター (Trikinetics 社 DAM: *Drosophila* Activity Monitor) を用いて、中心部の赤外線ビームを横切る回数を計測することで、歩行活動を記録した。データは毎分取得して、5 分以上連続して静止状態が続く場合を睡眠と定義した。測定時のエサは、1 % の寒天をベースとして、それぞれの糖類、または、5 % のショ糖に加えて、それぞれのアミノ酸を添加した。

3. 覚醒閾値計測

睡眠計測と同サイズで側面の一端から 5 mm の部位に穴 (直径 0.5 mm) を空けたプラスチックチューブにハエを入れ、穴に近い端はキャップで覆い、反対側は 32 本のチューブに同時にガスを送るガasket につないで、DAM にセットした。活動計測をしながら、ガasket 側から、空気、または、オクタノールの匂いを加えた空気を送り、覚醒閾値を調べた。

4. 統計処理

定量データは平均値 ± 標準誤差で示し、Bonferoni 補正をした Student's t-test による有意差検定を行った。

結果

1. 糖類による睡眠制御

図 1a には、ハエを初日 (Pre) は 5% ショ糖を含む培地で飼育し、その後 1% 寒天 (水分のみの絶食)、または各種の糖分を含む培地に移し替えた後の 2 日間 (Day1、Day2) の睡眠量の変化を示す。24 時間以上経つと、エサによる睡眠量の変化が顕著になるため、24 時間後から 36 時間後の総活動量 (図 1b) と総睡眠量 (図 1c) を定量したところ、絶食群はショ糖を与えた群に比べて活動量が増加して睡眠が減少し、エサを求めて動き回る状態になると考えられた。ショ糖の代わりに甘味はあるが栄養とならない人工甘味料のスクラロースやアラビノースを与えた群でも、絶食による睡眠量減少が抑制された。一方、栄養はあるが甘味がないソルビトールでは、絶食群と同様に睡眠量が減少した。

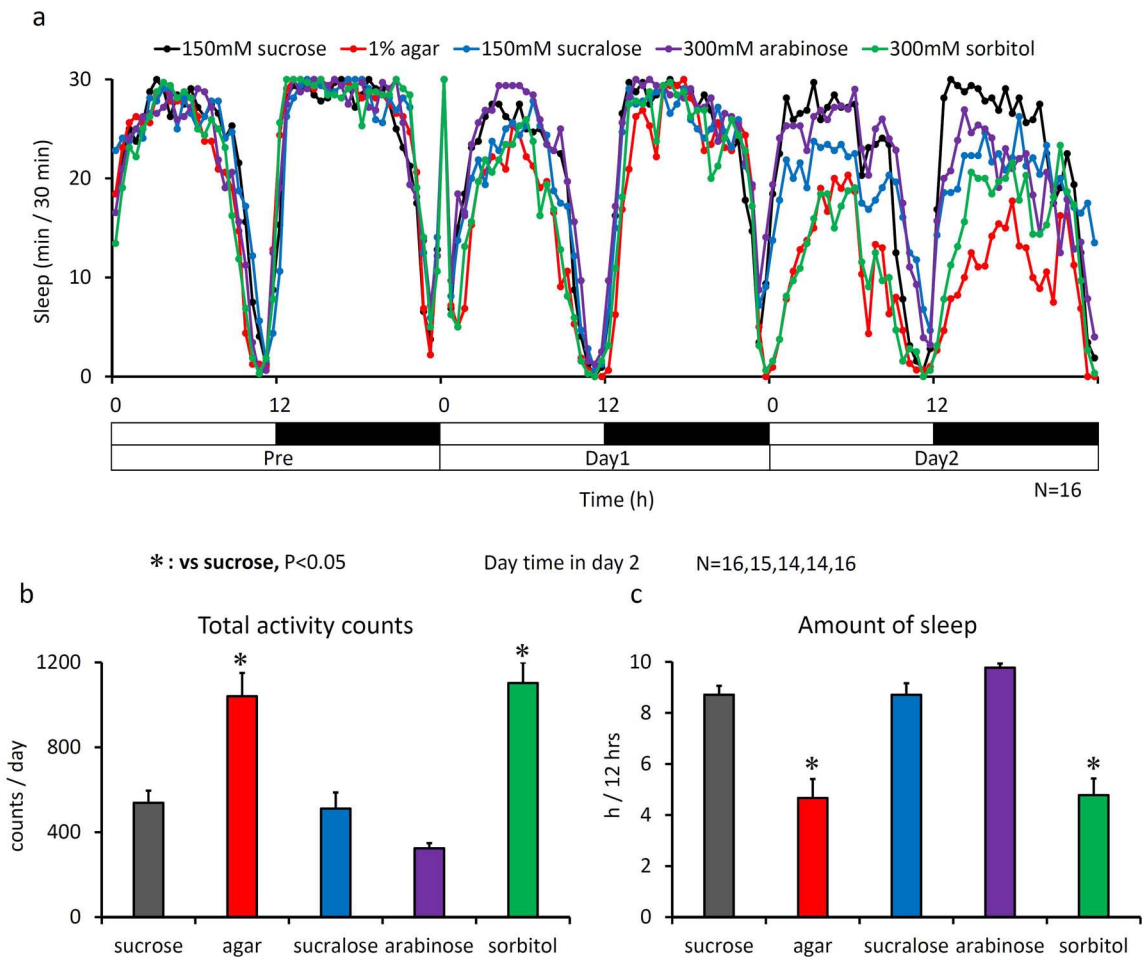


図 1. 各種糖類投与時の睡眠量変化

野生型ハエに各種の糖類を投与した時の睡眠量の変化。 a) 時系列変化、b) 総活動量、c) 総睡眠量。

図 2 には、甘味受容体の一つでショ糖に対する感受性の高い Gr64a を発現する神経細胞に、Gr64a-GAL4 ドライバーと、UAS-dTrpA1 を用いて、温度感受性のカチオンチャンネルである dTrpA1 を発現させ、高温 (29 °C) で活性化した時の活動と睡眠量の定量結果を示す。Gr64a 発現細胞の活性化で、絶食 (agar) 時の睡眠減少が抑制されることが示された。

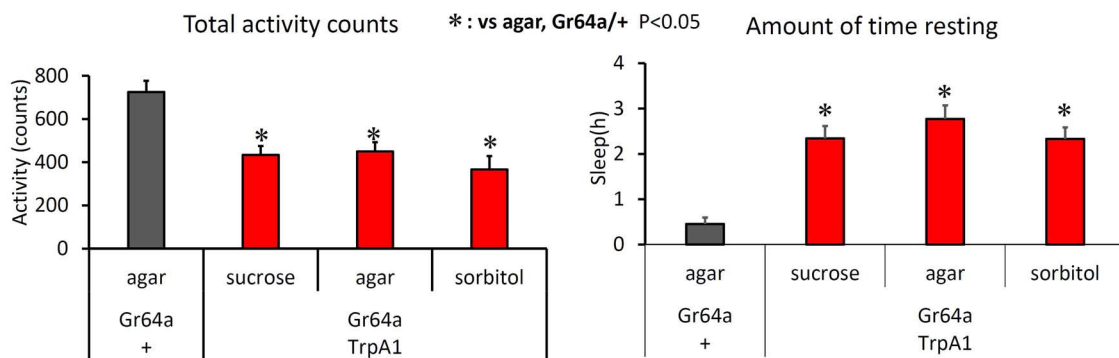


図2. Gr64a 発現細胞活性化の効果

Gr64a-GAL4 により TrpA1 を発現させ、高温で TrpA1 を活性化した時の活動量（左）と睡眠量を示す（右）。

図3には、各種糖類を与えた時の覚醒閾値の結果を示す。この実験では絶食の代わりにごく低濃度のシヨ糖を与えて飢餓状態を作っているが、この状態では、通常のシヨ糖を投与された群では、ほとんど反応しない、ごく弱い空気流の刺激でも覚醒する個体が25%以上認められ、これはスクラロースなどの投与では抑制されず、ソルビトールの投与では、やや抑制される（図3a）。一方、匂い刺激を与えたところ、シヨ糖投与群と、飢餓状態群などでの差がなくなることから、強い刺激に対する覚醒反応には差がないことがわかる。

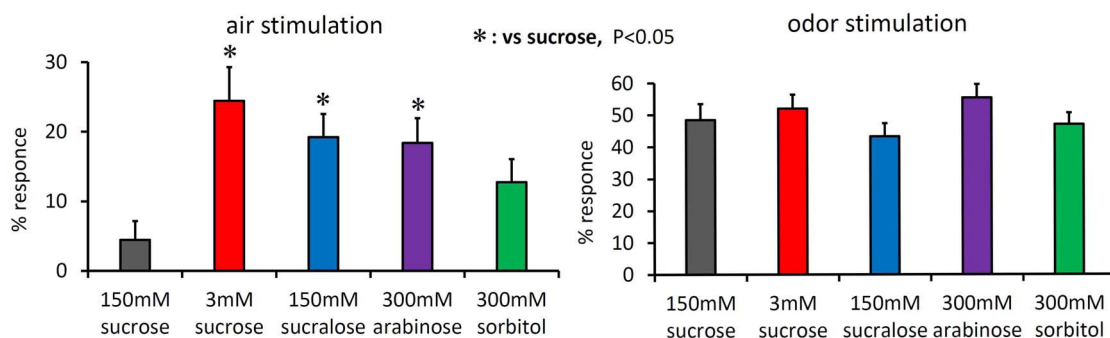


図3. 各種糖類投与時の覚醒閾値

左は弱い空気流による刺激で覚醒した割合を、右は強い匂い刺激で覚醒した割合を示す。

2. アミノ酸による睡眠制御

食事性のアミノ酸の影響を調べるため、5%シヨ糖に各種のアミノ酸を添加して、活動量・睡眠量を計測した結果を図4に示す。タンパク質の材料となる20種類を調べたところ、グリシンが活動を減少し、睡眠を増加することを見出した。

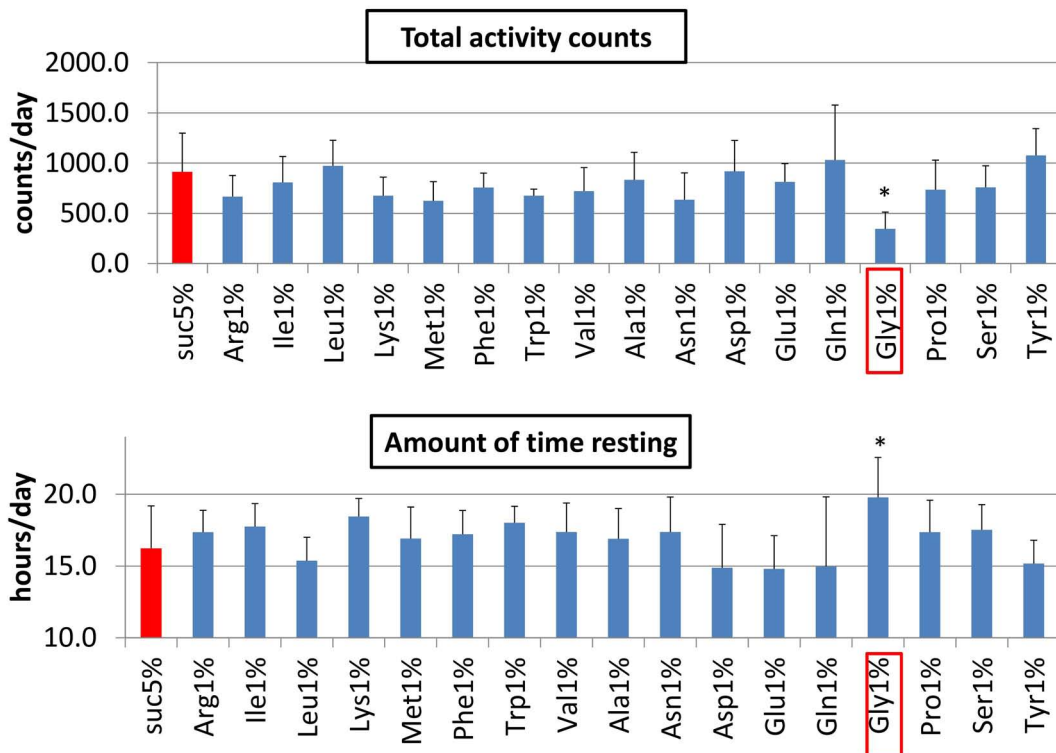


図4. 各種アミノ酸の睡眠に与える影響

5% ショ糖を含む培地に、それぞれのアミノ酸を1%添加して食べさせた後の3日間のデータを平均して定量解析した。(*P < 0.05)

データは示していないが、グリシンは濃度依存性に睡眠を増加させた。グリシン受容体を RNAi を用いてノックダウンさせたハエでも、グリシンの効果が認められた。さらに、グリシンに加えて、D-セリンも、同様の作用を持つことがわかった。

考 察

今回の研究結果から、ハエの栄養状態、および、糖類、アミノ酸という栄養素がハエの睡眠量を制御することが示された。絶食状態では、活動量増加と睡眠量減少、および、覚醒閾値の低下が認められる。糖類と、甘味受容体発現細胞の結果から、覚醒から睡眠への移行と、睡眠から覚醒への移行を考えたときに、前者は甘味のみでも増えるが、後者は、栄養状態が関係すると考えられた。ハエには、糖類に反応する甘味受容体が多種類存在するが、その中でもショ糖に対する反応性が高い Gr64a を発現する細胞の活性化が強く睡眠を誘導し、ショ糖に対する反応性が低い Gr5a 発現細胞の活性化では、この作用が弱かったこと (data not shown) から、甘味の性質にも違いがあることが示唆された。また、最近、他のグループの研究で、栄養状態の検知には、Gr43a が重要という報告があることから、睡眠から覚醒への移行のしやすさである覚醒閾値には、Gr43a が関与する可能性がある。

一方、アミノ酸のスクリーニングでは、グリシンの睡眠誘導効果を見出した。グリシンは、哺乳類でも睡眠誘導効果が知られており、非常に興味深い発見である。グリシンは NMDA 受容体に結合して活性を調節するが、同様の作用が D-セリンにもあり、D-セリン投与でも、睡眠が誘導された。さらに、私たちは、最近、NMDA 受容体に睡眠促進作用があることを報告しており⁵⁾、グリシンの作用は、NMDA 受容体を介する可能性がある。

図5は、以上の結果と現在の作業仮説をまとめた模式図で、今後、これらの神経回路の詳細を調べることで、今回見出した新規の睡眠制御機構の詳細を解明したい。

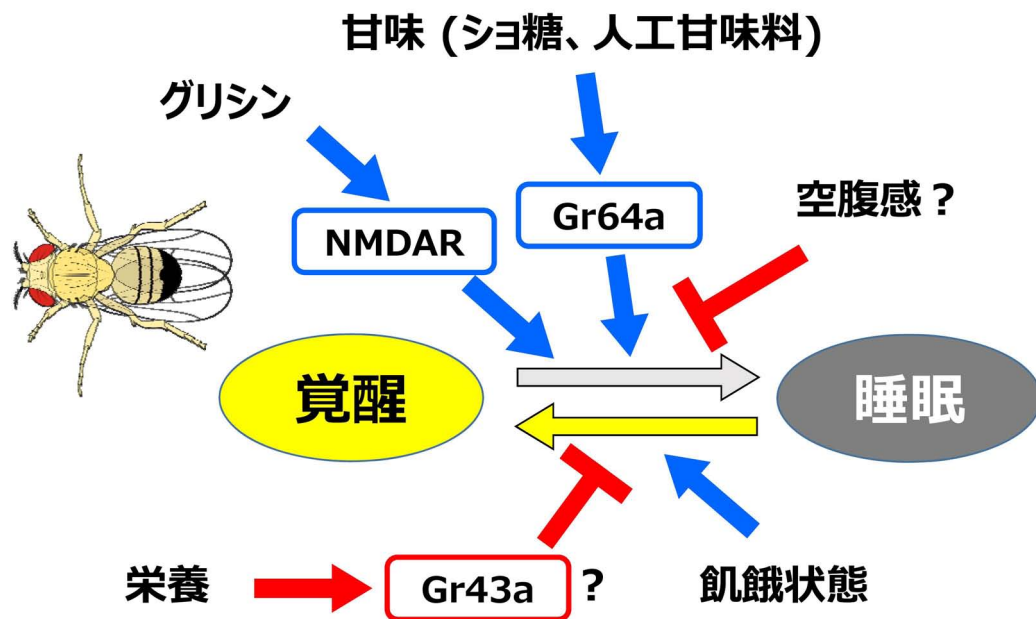


図5. 栄養素による睡眠制御機構
今回の結果と作業仮説に基づく模式図。

共同研究者

本研究の共同研究者は、富田淳、上野太郎、橋本梨菜、長谷川達也、中根伸である。

文献

- 1) Morales J, Hiesinger PR, Schroeder AJ, Kume K, Verstreken P, Jackson FR, et al. Drosophila Fragile X Protein, DFXR, Regulates Neuronal Morphology and Function in the Brain. *Neuron* 2002;34(6):961-72. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00731-6.
- 2) Hendricks JC, Lu S, Kume K, Yin JCP, Yang Z, Sehgal A. Gender dimorphism in the role of cycle (BMAL1) in rest, rest regulation, and longevity in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Rhythms* 2003;18(1):12-25. doi: 10.1177/0748730402239673.
- 3) Kume K, Kume S, Park SK, Hirsh J, Jackson FR. Dopamine is a regulator of arousal in the fruit fly. *J Neurosci* 2005;25(32):7377-84. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2048-05.2005.
- 4) Ueno T, Tomita J, Tanimoto H, Endo K, Ito K, Kume S, et al. Identification of a dopamine pathway that regulates sleep and arousal in *Drosophila*. *Nat Neurosci* 2012;15(11):1516-23. doi: 10.1038/nn.3238.
- 5) Tomita J, Ueno T, Mitsuyoshi M, Kume S, Kume K. The NMDA Receptor Promotes Sleep in the Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 2015;10(5):e0128101. doi: 10.1371/journal.pone.0128101.