



理化学研究所



久留米大学
KURUME UNIVERSITY

科学技術振興機構（JST）
Tel：03-5214-8404（広報課）

東 京 大 学
Tel：03-5841-3304
（医学部総務チーム）

理 化 学 研 究 所
Tel：050-3495-0247
（広報室報道担当）

久 留 米 大 学
Tel：0942-31-7510
（総合企画部広報室）

哺乳類の睡眠・覚醒をリン酸化・脱リン酸化酵素群が制御 ～分子メカニズム解明で「眠気」などの理解深める～

ポイント

- 睡眠と覚醒の制御において、神経で働くたんぱく質に生じるリン酸化という化学修飾が重要な役割を持つことが明らかになってきましたが、その制御の全体像や分子メカニズムは未解明のままでした。
- 本研究により、哺乳類では、たんぱく質リン酸化酵素PKAが覚醒を、脱リン酸化酵素PP1とカルシニューリンが睡眠を促進することが、マウスを用いた研究で分かりました。
- これらの酵素がシナプスで競合的に働くことにより睡眠と覚醒のバランスが調整されている可能性が示されたことで、今後、睡眠の機能や意義のより深い理解につながることを期待されます。

JST 戦略的創造研究推進事業 ERATOにおいて、東京大学 大学院医学系研究科 機能生物学専攻 システムズ薬理学分野の上田 泰己 教授（理化学研究所 生命機能科学研究センター 合成生物学研究チーム チームリーダー兼任、久留米大学 特別招聘教授兼任）、王 乙萌 博士課程大学院生と曹 思鈺 博士課程大学院生、大出 晃士 講師らは、哺乳類において、プロテインキナーゼA（PKA）^{注1）}と呼ばれるたんぱく質リン酸化酵素が覚醒の促進を、脱リン酸化酵素であるプロテインホスファターゼ1（PP1）とカルシニューリン^{注2）}が睡眠を促進することを発見しました。

近年、脳の神経細胞に存在するさまざまなたんぱく質のリン酸化^{注3）}と呼ばれる化学修飾の状態が、睡眠と覚醒に応じて動的に変動することが観察されてきました。一方で、睡眠と覚醒の制御に関わるリン酸化を促進するたんぱく質リン酸化酵素と、リン酸化修

飾を外すたんぱく質脱リン酸化酵素がどのような酵素群なのかは、十分に解明されていませんでした。

本研究グループは、PKAとたんぱく質脱リン酸化酵素に着目し、網羅的な遺伝子ノックアウトマウスの作製や、ウイルスベクター^{注4)}を用いた機能改変型の酵素の発現誘導実験から、PKAの活性化によって睡眠時間と睡眠圧（眠気）の指標が低下すること、PP1およびカルシニューリンの活性化によって逆に睡眠時間と眠気の指標が増加することを発見しました。これらの覚醒および睡眠の促進活性は、PKA、PP1とカルシニューリンが神経細胞間の情報伝達を担うシナプスで働くことが重要であり、さらに睡眠と覚醒の促進が互いに競合的に働くことで、1日の睡眠時間が調節されている可能性が示されました。

本研究により、複数の酵素の働きで睡眠と覚醒のバランスが調整されていることが明らかになり、睡眠時間や眠気をコントロールする方法を分子レベルで考える上で重要な知見となります。

本研究成果は、2024年11月6日（現地時間）発行の英国科学誌「Nature」に掲載されました。

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

戦略的創造研究推進事業 総括実施型研究（ERATO）

研究領域：「上田生体時間プロジェクト」（JPMJER2001）

（研究総括：上田 泰己（東京大学 大学院医学系研究科 教授／理化学研究所 生命機能科学研究センター チームリーダー兼任／久留米大学 特別招聘教授兼任）

研究期間：令和2年10月～令和8年3月

JSTは本プロジェクトで、睡眠・覚醒リズムをモデル系として「ヒトの理解に資するシステム生物学」を展開し、分子から社会に生きるヒト個体までを通貫する「生体時間」情報の理解を目指します。

<研究の背景と経緯>

私たちは日々、睡眠と覚醒を繰り返して生活しています。睡眠は神経系を持つ動物に保存された、生命にとって必須の生理現象です。特に現代の24時間型社会において、いかに健康な睡眠習慣を確保するかという課題が広く認識され始めています。ヒトを含む動物は、1日に一定量の睡眠を確保する必要があり、これが達成されない状態を私たちは「寝不足」として感じます。しかし、1日の睡眠量がどのような分子機構で制御されているのかについては、まだ不明な点が多く残されています。

近年、複数の研究結果から、睡眠と覚醒の制御において、神経で働くたんぱく質に生じるリン酸化という化学修飾が重要な役割を持つことが明らかになってきています。細胞内では、リン酸化を促進するたんぱく質リン酸化酵素と、リン酸化修飾を除去する脱リン酸化酵素によって双方向に制御されています。例えば、本研究グループは以前、CaMKII（Ca²⁺／カルモジュリン依存性キナーゼII）と呼ばれるたんぱく質リン酸化酵素がマウスの睡眠を促進する活性を持つことを発見しました（JSTプレスリリース「睡眠に関わるたんぱく質リン酸化酵素の働きを解明」※関連情報参照）。しかし、睡眠を抑制する（覚醒を促進する）たんぱく質リン酸化酵素や、睡眠・覚醒を制御する脱リン酸化酵素については、哺乳類では十分に明らかにされておらず、睡眠・覚醒サイクルをつかさどるたんぱ

く質のリン酸化修飾制御の全体像は未解明のままです。

そこで、本研究グループは、哺乳類で覚醒を促進する可能性があるたんぱく質リン酸化酵素として、PKAに着目しました。PKAはショウジョウバエにおいて覚醒を促進することが知られており、また哺乳類においては、ノンレム（NREM）睡眠が断片化し、睡眠圧（眠気）の指標であるNREM睡眠時の脳波デルタパワー^{注5)}の増加が生じることが知られています。一方で、PKAが1日の睡眠時間にどのような影響を与えるかは不明確でした。また、脱リン酸化酵素に関しては、ショウジョウバエの遺伝学的研究において、カルシニューリンが睡眠促進効果を持つことが示唆されていますが、哺乳類における脱リン酸化酵素の役割はまだ十分に理解されていません。

<研究の内容>

本研究グループは、PKAが哺乳類の睡眠制御にどのように関与しているかを調べるため、PKAを構成する各サブユニット遺伝子をノックアウトしたマウスを作製し、その睡眠表現型を解析しました。その結果、PKAのリン酸化酵素活性を抑制する調節サブユニットである*Prkar2b*遺伝子をノックアウトすると、NREM睡眠時間の減少とデルタパワーの減少が見られました。*Prkar2b*遺伝子はPKAのリン酸化活性を抑制するため、この遺伝子のノックアウトによってPKA活性が促進されると予測されます。そのため、PKAの活性化は睡眠圧を減少させ、覚醒を促進することが示唆されます。

これを確かめるために、研究グループはPKAの酵素活性を阻害するペプチドや、PKAの酵素活性が常時活性化する変異型PKAサブユニットを、ウイルスベクターを用いてマウスの脳全体に発現させました。その結果、PKA阻害ペプチドを発現させたマウスではNREM睡眠時間の増加とデルタパワーの増加が見られました。一方、恒常活性化型PKAサブユニットを発現させた場合は、NREM睡眠時間の減少とデルタパワーの減少が観察されました。これにより、PKAの活性化が睡眠時間と睡眠圧の減少をもたらすことが確認されました（図1）。

PKAは、興奮性シナプス後部^{注6)}で働き、シナプス可塑性^{注7)}の制御に関与していることが広く研究されています。そこで研究グループは、恒常活性化型PKAサブユニットに興奮性シナプス後部局在シグナルを付加してマウスに発現させたところ、やはり睡眠時間と睡眠圧の減少が生じました。このことから、PKAは興奮性シナプス後部で覚醒を促進していると考えられます。

次に、本研究グループは睡眠・覚醒制御に関与する脱リン酸化酵素の探索を行いました。哺乳類の脳では、PP1、PP2A（プロテインホスファターゼ2A）、カルシニューリンの3種類の脱リン酸化酵素が主に働いています。そこで、これらの脱リン酸化酵素を構成する遺伝子群をノックアウトしたマウスを作製し、PKAと同様に解析を行いました。その結果、PP1の興奮性シナプス後部への局在をつかさどる調節サブユニットである*Ppp1r9b*遺伝子をノックアウトしたマウスでは、NREM睡眠時間の減少とデルタパワーの減少が観察されました。これは、PP1が興奮性シナプス後部に局在できなくなったために引き起こされた現象であると考えられます。

この現象を検証するため、研究グループはウイルスベクターを用いて、PP1の脱リン酸化活性が恒常的に活性化する変異体をマウスに発現させました。その結果、恒常活性化

型PP1変異体は、興奮性シナプス後部に局在するたんぱく質との融合たんぱく質として発現させた場合にのみ、NREM睡眠時間の延長をもたらしました。融合たんぱく質とすることで、通常のPP1よりも興奮性シナプス後部に局在するようになっていると期待できます。したがって、この結果は、PP1が睡眠を促進するためには、興奮性シナプス後部への局在が重要であることを示唆しています。

カルシニューリンに関しては、ショウジョウバエで睡眠制御に関与することが示唆されていましたが、哺乳類では遺伝子ノックアウトが胚性致死^{注8)}となるため、睡眠表現型の解析が困難でした。そこで、研究グループはウイルスベクターを用いて成長後に遺伝子ノックアウトを誘導する手法により、後天的にカルシニューリンのノックアウトを行いました。その結果、後天的なカルシニューリンノックアウトマウスでは、NREM睡眠の減少とデルタパワーの減少が観察され、さらに、断眠によって覚醒状態が長く続いた後のNREM睡眠時に通常よりも高いデルタパワーの増加が見られないことが分かりました。このことから、カルシニューリンがNREM睡眠の促進と睡眠圧の増加に重要な役割を果たしていることが確認されました。さらに、PP1と同様にカルシニューリンについても、恒常活性化型のカルシニューリンをウイルスベクターで発現させた際に、興奮性シナプス後部への局在シグナルが付加された場合のみ、NREM睡眠とデルタパワーの増加が見られました(図2)。

これらの結果から、PKAは覚醒を促進するたんぱく質リン酸化酵素であり、PP1とカルシニューリンは睡眠を促進する脱リン酸化酵素であること、また、これらの酵素はいずれも興奮性シナプス後部で睡眠・覚醒を制御していることが示唆されました。さらに、PKAとPP1あるいはカルシニューリンが競合的に睡眠時間を調節することを検証するため、恒常活性化型PKA変異体とPP1あるいはカルシニューリンの変異体を共発現させたところ、PKAによる覚醒促進効果がPP1あるいはカルシニューリンによる睡眠促進効果によって打ち消されることを確認しました。この結果は、PP1とカルシニューリンが興奮性シナプス後部でPKAと競合しながら睡眠時間を調節していることを示しています(図3)。

<今後の展開>

本研究では、ショウジョウバエにおいて確認されていたPKAの覚醒促進作用やカルシニューリンの睡眠促進作用が、哺乳類でも保存されていることが確認されました。また、PP1が、カルシニューリンと同様に睡眠促進活性を持つことも示されました。特に哺乳類を用いた今回の研究では、これらの酵素がいずれも睡眠圧制御に関与しており、興奮性シナプス後部においてリン酸化酵素と脱リン酸化酵素が機能的に競合していることが示唆されました。こうした制御様式は、哺乳類の睡眠時間や睡眠圧がダイナミックに調整されるために重要である可能性があります。

また、興奮性シナプス後部におけるPKAやカルシニューリンは、記憶に関連するシナプス可塑性の制御に重要な役割を果たしていることが知られています。今後、睡眠・覚醒の調節におけるPKA、PP1とカルシニューリンのリン酸化や脱リン酸化のターゲットとなるたんぱく質の同定が進むことで、睡眠・覚醒とシナプス可塑性制御との関連性、そして睡眠の機能や意義に関するより深い理解が得られると期待されます。

<関連情報>

2022年10月5日 JSTプレスリリース

「睡眠に関わるたんぱく質リン酸化酵素の働きを解明」

<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20221005-2/index.html>

<参考図>

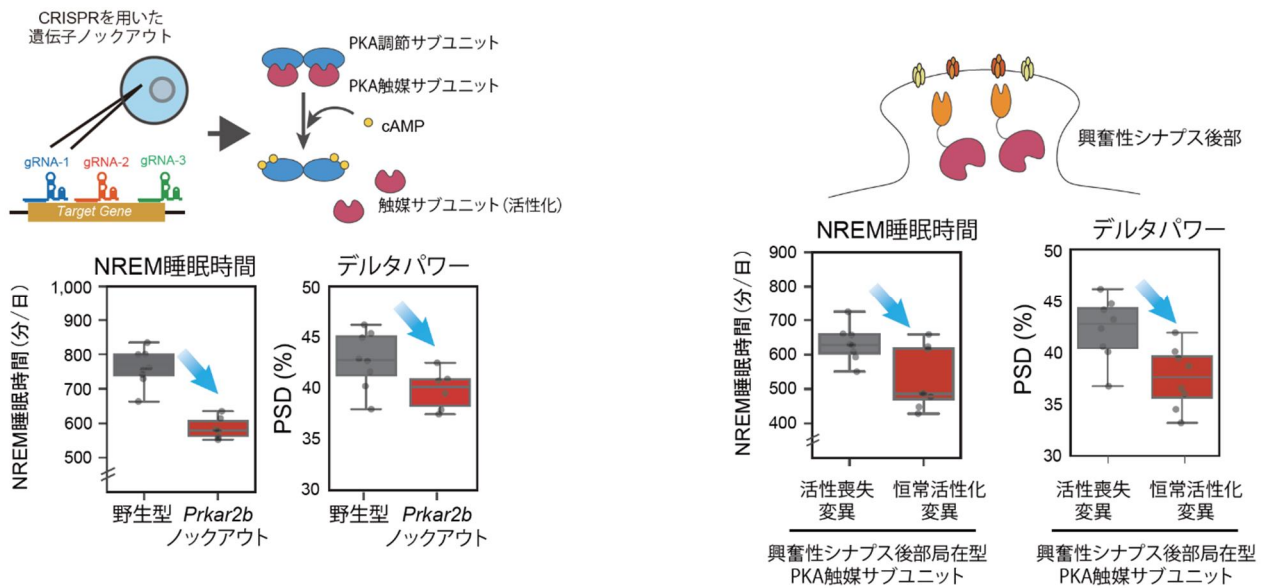


図1 PKA活性化により覚醒の促進と睡眠圧（眠気）の減少が生じる

マウスの受精卵に対してCRISPRを用い、PKAのリン酸化酵素活性を抑制する調節サブユニットである*Prkar2a*遺伝子のノックアウトマウスを作成した。このノックアウトマウスではNREM睡眠量の減少とデルタパワーの減少が見られた（左図）。また、PKAのリン酸化酵素活性が恒常的に活性化するPKAの酵素活性サブユニットの変異体を、興奮性シナプス後部への局在化シグナルを付加して発現することで、NREM睡眠量の減少と、デルタパワーの減少が見られた（右図）。

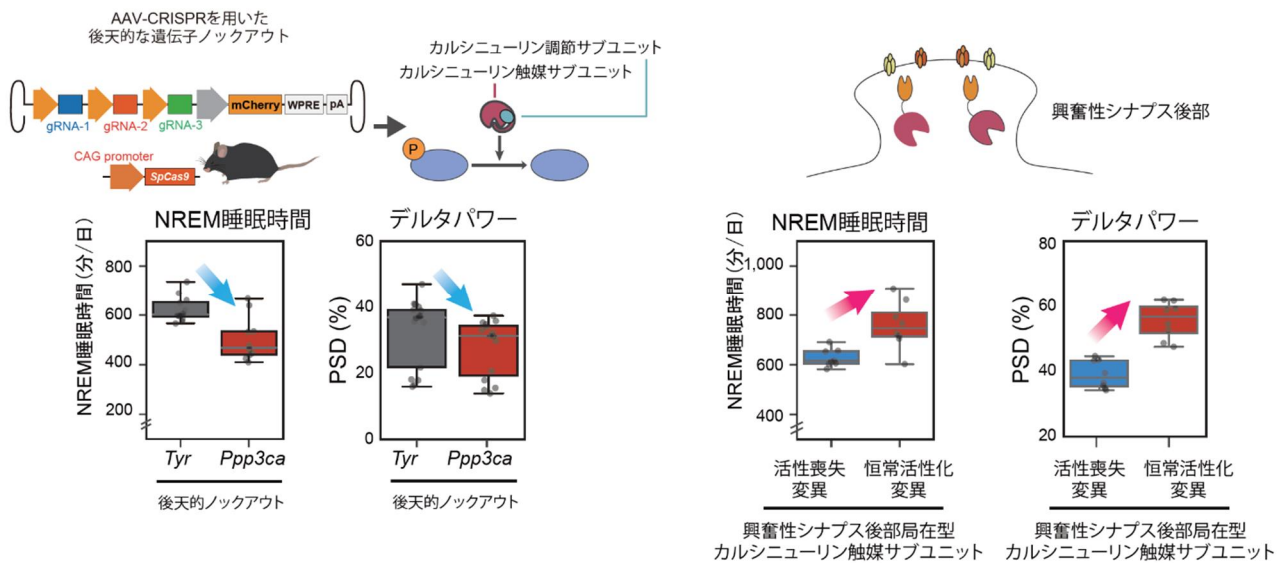


図2 カルシニューリンの活性化により睡眠の促進と睡眠圧（眠気）の増加が生じる
 カルシニューリンの脱リン酸化酵素活性サブユニット *Ppp3ca* 遺伝子に対して、アデノ随伴ウイルス（AAV）を用いたCRISPRによる後天的ノックアウトを行うと、NREM睡眠時間の減少とデルタパワーの減少が見られた。なお、対照実験としては睡眠制御には関係がないと想定されるチロシナーゼ（*Tyr*）遺伝子のノックアウトを行っている（左図）。一方、カルシニューリンの脱リン酸化酵素活性が恒常的に活性化するようにカルシニューリンの酵素活性サブユニット変異体を興奮性シナプス後部に発現することで、NREM睡眠時間の増加とデルタパワーの増加が見られた（右図）。

興奮性シナプス後部位におけるPKAとPP1やカルシニューリンの共発現

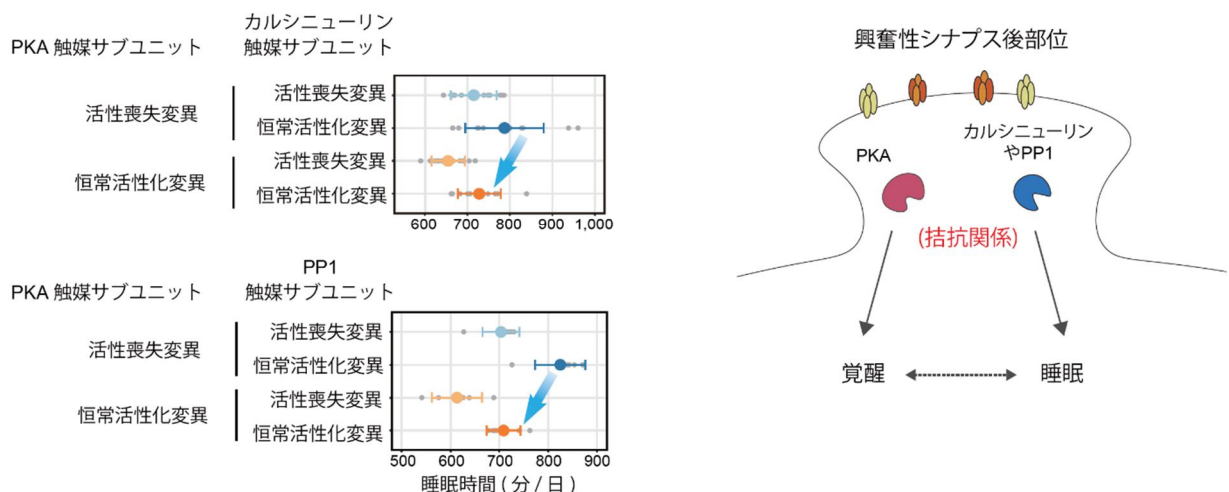


図3 興奮性シナプス後部におけるPKAとPP1、カルシニューリンの拮抗関係
 興奮性シナプス後部で、リン酸化酵素活性が恒常的に活性化するPKAの酵素活性サブユニット変異体と、脱リン酸化酵素活性が恒常的に活性化するPP1あるいはカルシニューリンの酵素活性サブユニット変異体を同時に発現させた。同時発現によって、PKAが引き起こす覚醒促進効果と、PP1あるいはカルシニューリンが引き起こす睡眠促進効果が互いに打ち消し合うことが示された。

<用語解説>

(注1) プロテインキナーゼA (PKA)

細胞内のシグナル伝達分子である環状アデノシンリン酸 (cAMP) によって活性化されるたんぱく質リン酸化酵素。PKAはリン酸化酵素活性を担う触媒サブユニットと、酵素活性を抑制する調節サブユニットから構成される。

(注2) プロテインホスファターゼ1 (PP1) とカルシニューリン

たんぱく質脱リン酸化酵素の中でも、PP1、PP2A、およびカルシニューリンの3グループが脳に高レベルで発現していることが知られている。今回の研究では、このうちPP1とカルシニューリンについて、睡眠制御の働きがあることが明らかとなった。これらの脱リン酸化酵素は、脱リン酸化酵素活性を担う触媒サブユニットと、酵素の細胞内局在や酵素活性を制御する調節サブユニットからなる。カルシニューリンは、そのほかの脱リン酸化酵素と異なり、カルシウムによって活性化される特徴を持つ。

(注3) たんぱく質のリン酸化

たんぱく質は転写・翻訳によって産生された後、さまざまな化学修飾によって活性調整を受けることがある。リン酸化はその中でも最も頻繁に生じる修飾であり、アデノシン三リン酸 (ATP) を基質としてリン酸基をたんぱく質に転移する反応を触媒する酵素をリン酸化酵素と呼び、リン酸化たんぱく質からリン酸化修飾を取り除く反応を触媒する酵素を脱リン酸化酵素と呼ぶ。

(注4) ウイルスベクター

ウイルスが細胞に感染する能力を持つことを利用した、遺伝子を細胞内に導入するためのツール。本研究では、AAVを改変したウイルスベクターの一種であるAAV-PHP.eBを用いた。このウイルスベクターは、特に中枢神経系に高い効率で遺伝子導入を行うことができる。

(注5) NREM睡眠時の脳波デルタパワー

哺乳類の睡眠は、睡眠時間の大部分を占めるノンレム (NREM) 睡眠と、レム (REM) 睡眠に大別される。NREM睡眠時には、脳波は特徴的な低周波数・高振幅のパターンをとる。特にデルタ波帯域 (0.5~4ヘルツ (Hz)) のパワー (デルタパワー) は、覚醒状態が長く続いた後のNREM睡眠時に高値となり、NREM睡眠が続くと低下していくことが知られており、予想される睡眠圧 (眠気) の良い指標となることが知られている。

(注6) 興奮性シナプス後部

神経と神経が接続し、情報伝達が生じる部位をシナプスと呼ぶ。多くの場合、シナプス前終末から放出されたシナプス伝達物質が、シナプス後部に発現している神経伝達物質の受容体で受け取られることで、シナプスにおける情報伝達が生じる。シナプスのうち、情報伝達によって神経伝達物質を受け取った側の神経発火が促進されるものを、興奮性シナプスと呼ぶ。

（注7）シナプス可塑性

神経細胞間の情報伝達はシナプスを介して行われる。各シナプスの情報伝達効率は、神経発火の頻度やパターンに応じて、シナプスの構造や性質が変化することで調節される。これをシナプス可塑性とよび、記憶や学習と密接な関係があることが知られている。

（注8）胚性致死

遺伝子のうち、個体の発生に必須の遺伝子は、遺伝子ロックアウトを行うと個体として出生することができない。これを胚性致死と呼ぶ。遺伝子ロックアウトが胚性致死となる遺伝子についても、発生後の生存に必須でないものなどは出生後に（一部の細胞などで）遺伝子をロックアウトすることで、個体を死に至らしめることなくその機能の解析ができる可能性がある。

<論文タイトル>

“Postsynaptic competition between calcineurin and PKA regulates mammalian sleep-wake cycles”

（シナプス後部位におけるカルシニューリンとPKAの拮抗的關係が哺乳類の睡眠を制御する）

DOI : 10.1038/s41586-024-08132-2

<お問い合わせ先>

<研究に関すること>

上田 泰己（ウエダ ヒロキ）

東京大学 大学院医学系研究科 機能生物学専攻 システムズ薬理学分野 教授

〒113-0033 東京都文京区7-3-1 東京大学 医学部 教育研究棟 8階南

Tel : 03-5841-3415

E-mail : uedah-tky@umin.ac.jp

<JST事業に関すること>

今林 文枝（イマバヤシ フミエ）

科学技術振興機構 研究プロジェクト推進部 ICT/ライフイノベーショングループ

〒102-0076 東京都千代田区五番町7 K's 五番町

Tel : 03-3512-3528

E-mail : eratowww@jst.go.jp

<報道担当>

科学技術振興機構 広報課

〒102-8666 東京都千代田区四番町5番地3

Tel : 03-5214-8404 Fax : 03-5214-8432

E-mail : jstkoho@jst.go.jp

東京大学 大学院医学系研究科 総務チーム
〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1
Tel : 03-5841-3304 Fax : 03-5841-8585
E-mail : ishomu@m.u-tokyo.ac.jp

理化学研究所 広報室 報道担当
〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1
Tel : 050-3495-0247
E-mail : ex-press@ml.riken.jp

久留米大学 総合企画部 広報室
〒830-0011 福岡県久留米市旭町6-7
Tel : 0942-31-7510 Fax : 0942-31-7718
E-mail : kikakukouhou@kurume-u.ac.jp