

## リークカリウムチャネルの睡眠時間制御への関与を発見

### 1. 発表者：

上田 泰己（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  
／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、東京大学ニューロインテリジェンス国際研究機構主任研究者 兼任）

吉田 健祐（東京大学医学部 6年生：研究当時）

史 蕭逸（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 助教  
／理化学研究所 客員研究員 兼任）

### 2. 発表のポイント：

- ◆睡眠時に大脳皮質の神経細胞で観察される発火パターン（徐波発火パターン：注1）の新規の数理モデルに基づいてリークカリウムチャネルが睡眠制御に重要であることを予測し、本予測を遺伝子改変マウスの睡眠測定により世界で初めて実証した。
- ◆これまでより詳細な数学的解析が可能な徐波発火パターンの数理モデルを作成した。さらに数理モデルにより重要であると予測されたリークカリウムチャネルが睡眠時間制御に実際に関わっていることを動物実験で示し、睡眠時間を制御する遺伝子として **Kcnk9** を新たに発見した。
- ◆今回作成した数理モデルにより徐波発火パターン形成における他のチャネルの役割も予測できる可能性があり、睡眠時間制御の分子機構の解明につながることを期待される。

### 3. 発表概要：

東京大学大学院医学系研究科 機能生物学専攻薬理学専攻 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、東京大学ニューロインテリジェンス国際研究機構 主任研究者兼任）、吉田健祐学生（研究当時：医学部6年生）、史蕭逸助教（理化学研究所 客員研究員兼任）らの研究グループは、ホジキン・ハクスレーモデルをベースにした数理モデルと網羅的遺伝子ノックアウト技術（トリプル CRISPR 法：注2）・非侵襲で並列化可能な睡眠測定法（SSS法：注3）を用いて、リークカリウムチャネル（注4）が睡眠時間の制御において重要な役割を果たすことを示しました。

ヒトをはじめとする哺乳類で睡眠時間がどのように制御されているかはよくわかっていません。睡眠中、特に徐波睡眠中は特徴的な大脳皮質の神経細胞の発火パターン（徐波発火パターン）が観察されます。これまで本研究グループの研究によって、徐波発火パターン形成と睡眠時間の制御は一部の制御機構を共有している可能性が示唆されています。今回、本研究グループはまず、神経細胞の数理モデルを用いた徐波発火パターン形成機構の解析を行い、リークカリウムチャネルが徐波発火パターンの形成に重要な役割を果たしている可能性を明らかにしました。その後トリプル CRISPR 法と SSS 法を組み合わせることで、リークカリウムチャネルがカルシウム依存的な過分極（注5）と協調的に徐波発火パターン形成に寄与している可能性を明らかにし、リークカリウムチャネルファミリーに含まれる遺伝子の網羅的ノックアウト実験から、**Kcnk9** が睡眠時間制御に重要な役割を果たすことを明らかにしました。この結果は、徐波発火パターン形成・睡眠時間制御におけるリークカリウムチャネルの役割を示すと

もに、二つの現象の裏には共通する制御機構がある可能性を再度強調するものであり、睡眠時間の制御機構の解明に大きく貢献すると期待できます。

本研究は、米国の科学雑誌『*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*』（9月17日付け：日本時間9月18日）に掲載されました。

#### 4. 発表内容：

##### 【背景】

動物の状態は覚醒、レム睡眠、ノンレム睡眠の三つに分類され、それぞれの状態は脳波と筋電図で定義されます。脳波は脳の神経細胞の活動をマクロにとらえたものですが、一神経細胞レベルでもノンレム睡眠時と覚醒やレム睡眠時では活動が異なっています。ノンレム睡眠時に大脳皮質の神経細胞では、**Down state**, **Up state** の2つの状態が交互に行き来する徐波発火パターンと呼ばれる特徴的な波形が観察されます（図1左）。

近年、本研究グループは平均場近似を参考にした手法を用いることで、「平均化された一神経細胞」で徐波発火パターンを再現するような **Averaged-Neuron (AN)** モデルを作成しました。AN モデルにおいて特定のチャンネルの透過性を変化させたときの発火パターンの変化を調べることで、徐波発火パターン形成にはカルシウム依存的な過分極が本質的に働くという予測が得られました。実際にカルシウム依存的な過分極に関連するチャンネルのノックアウトマウスを作製したところ、そのうちのいくつかの遺伝子 (**Kcnn2**, **Kcnn3**, **Cacna1h**, **Cacna1g**, **Atp2b3**) について個体の睡眠時間が変化することを示しました。この結果は徐波発火パターンの形成と睡眠時間制御が共通の機構により制御される可能性を示唆しており、徐波発火パターン形成のメカニズムをさらに解明することが睡眠時間制御機構の解明にもつながることを示唆します。

AN モデルは徐波発火パターン形成を一細胞レベルで説明した有望なモデルであるため、さらに詳細な解析をおこなうことで徐波発火パターンの形成の詳しい数学的機構やカルシウム関連チャンネル以外のチャンネルを解析することが可能となります。そこで、本研究グループは、AN モデルのうち徐波発火パターン形成に本質的に働くチャンネルを抽出した **Simplified AN (SAN)** モデルを作成し、徐波発火パターン形成・睡眠時間制御機構に関与する新たなチャンネルの同定を試みました。

##### 【研究手法と成果】

本研究グループはまず徐波発火パターン形成のモデルである AN モデルの重要な要素を残しつつ単純化をおこないました。単純化の際には、AN モデルにおいて特定のチャンネルがある状態とない状態で、ランダムにパラメーターを設定したときに徐波発火パターンが出る確率の比較をおこない、徐波発火パターンが出る確率に大きな影響を与えるようなチャンネルを選択しモデルに残すことで、より単純なモデルである SAN モデルの作成に成功しました。具体的には AN モデルがチャンネル・ポンプ数 13 個、変数 10 個であったのに対して SAN モデルはチャンネル・ポンプ 6 個、変数 3 個にまで単純化されています（図2）。また、このような客観的指標を用いてモデルの作成をおこなったため、SAN モデルは AN モデルを自然に単純化したものであり徐波発火パターン形成の有用なモデルになると考えられました。

モデルが単純化されたことにより、SAN モデルを用いて新たにさまざまな解析が可能になりました。まず徐波発火パターンにおける電流の解析をおこなうと、徐波発火パターンに特徴的な **Down state** において、以前から睡眠への関与が知られていたカルシウム依存性カリウムチャンネルに加えてリークカリウムチャンネルが働いていることがわかりました。さらにカルシウ

ム依存的な過分極に関連したチャンネルの透過性を低下させた状態でリークカリウムチャンネルの透過性を低下させると、徐波発火パターンから覚醒時の発火パターン（図1右）に変化することがわかりました。そこでこれらのチャンネルと相平面上のヌルクライン（注6）との関係を調べることにより、リークカリウムチャンネルとカルシウム依存性カリウムチャンネルが共同して Up state から Down state への移行に関与していることが明らかになりました（図3）。これによりリークカリウムチャンネルの透過性を下げると徐波発火パターンが覚醒時の発火パターンに変化することがわかりました。

これらの結果のうち検証可能なものについては、AN モデルでも同様の結果が得られました。以上のことにより、リークカリウムチャンネルの透過性が低いと徐波発火パターンではなく覚醒時の発火パターンが出現することがわかりました。このことからリークカリウムチャンネルの発現が低下した状態では神経細胞では徐波発火パターンが出にくく、大脳皮質全体として徐波が出にくくなると考えられ、その結果睡眠時間が減少すると予測されました。

実際にこの予測をマウスの個体レベルで検証しました。まず、1次スクリーニングとしてトリプル CRISPR 法でリークカリウムチャンネル遺伝子の一つずつ欠失させたマウスを作製し、高速に睡眠表現型を解析することができる SSS 法により睡眠量を測定しました。その結果、二つのリークカリウムチャンネル（Kcnk9 または Kcnk16）を欠失したマウスにおいて睡眠時間の有意な減少が観察され、特に Kcnk9 を欠失したマウスについては睡眠時間が著しく減少していました（図4左）。そこで、Kcnk9 遺伝子欠失マウスの睡眠量を、脳波・筋電図測定を用いてより詳細に解析したところ、Kcnk9 遺伝子欠失マウスは睡眠時間のうちノンレム睡眠の時間が著しく減少していることがわかりました（図4右）。このように、徐波発火パターンの形成への関与が示唆されたリークカリウムチャンネルが、マウスの睡眠時間制御にも関与していることが動物実験で示されました。

#### 【今後の期待】

本研究では、徐波発火パターン形成に対する従来のモデルの単純化をおこなうことにより、徐波発火パターン形成の機構をより詳細に明らかにし、リークカリウムチャンネルの関与を予測しました。さらに、リークカリウムチャンネル遺伝子の欠失マウスを作製することで、リークカリウムチャンネルが睡眠時間制御に関与することを示しました。

本研究の SAN モデルは徐波発火パターン形成の数学的機構をこれまでより詳細に解明することに成功しており、その他のチャンネルが徐波形成にどのように働くかを予測しうるものとなっています。今後リークチャンネルを含め一つの神経細胞レベルの構成因子が、回路レベルの機構とどのように関与しているか解明されることが期待されます。

#### 5. 発表雑誌：

雑誌名：Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America  
オンライン版（日本時間：9月18日）

論文タイトル：Leak potassium channels regulate sleep duration

著者：Kensuke Yoshida\*, Shoi Shi\*, Maki Ukai-Tadenuma, Hiroshi Fujishima, Rei-ichiro Ohno, and Hiroki R. Ueda#

(\*Co-first, #Lead contact)

#### 6. 問い合わせ先：

【研究に関する問い合わせ】

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 上田 泰己 (うへだ ひろき)

TEL : 03-5841-3415

FAX : 03-5841-3418

E-mail : [uedah-tky@umin.ac.jp](mailto:uedah-tky@umin.ac.jp)

【報道に関する問い合わせ】

東京大学医学部総務係

TEL : 03-5841-3304

FAX : 03-5841-8585

E-mail : [ishomu@m.u-tokyo.ac.jp](mailto:ishomu@m.u-tokyo.ac.jp)

## 7. 用語解説 :

### (注1) 徐波発火パターン

徐波睡眠中に大脳皮質の神経細胞で観察される特徴的な神経発火パターン。発火を繰り返す Up state と過分極する Down state を繰り返すことが特徴である (添付資料図1を参照)。

### (注2) トリプル CRISPR 法

共同研究者らにより開発された手法で、CRISPR (CRISPR/Cas 系を用いたゲノム編集技術の一つ) を改良し、3種類のガイド RNA を用いて、一世代目で極めて高い確率 (ほぼ 100%) でノックアウトマウスを作製できる (2016年1月8日理化学研究所プレスリリース「次世代型逆遺伝学による睡眠遺伝子 Nr3a の発見」  
[http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160108\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160108_1/))。

### (注3) SSS 法

共同研究らにより開発された手法で、呼吸パターンを用いて、非侵襲的かつ高効率に睡眠表現型解析をおこなう。レム睡眠、ノンレム睡眠を区別することはできないが、外科的な手術を伴わないため、脳波に比べて多種類のマウスの睡眠を測定することが容易である。

### (注4) リークカリウムチャネル

カリウムチャネルの一種であり、静止膜電位に深く関与することが知られている。

### (注5) カルシウム依存的な過分極

細胞内カルシウムイオン濃度の上昇がカルシウム依存性カリウムチャネルを活性化し、外向きカリウム電流が増加することで過分極が引き起こされる。本研究グループが過去に睡眠への関与を報告している (2018年3月18日プレスリリース「なぜ私たちは眠るか〜眠りの素は細胞内カルシウム?〜」 <https://www.jst.go.jp/pr/announce/20160318/index.html>)。

### (注6) ヌルクライン

微分方程式の挙動を解析する際に用いられる手法である。特に2変数微分方程式において各変数を軸とした相平面を考え、各方向の微分が0となる曲線であるヌルクラインをプロットすることで微分方程式のおおよその挙動を予測することができる。

8. 添付資料 :

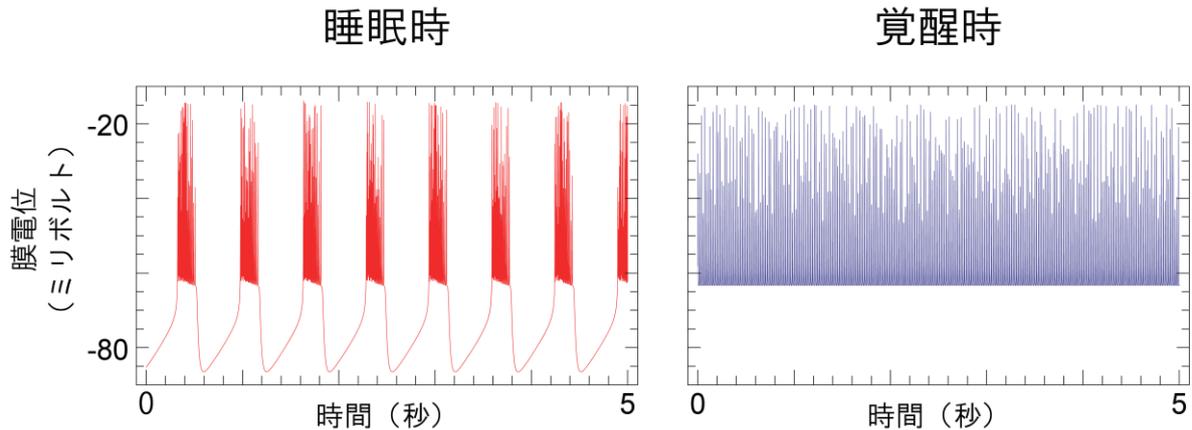


図1 覚醒、睡眠時の一神経細胞の波形例

睡眠時の大脳皮質神経細胞で観察される徐波発火パターン波形（赤）。発火を繰り返す Up state と過分極する Down state を繰り返すことが特徴である。一方、覚醒時などに観察されるバースト発火パターン（青）では Down state が観察されない。

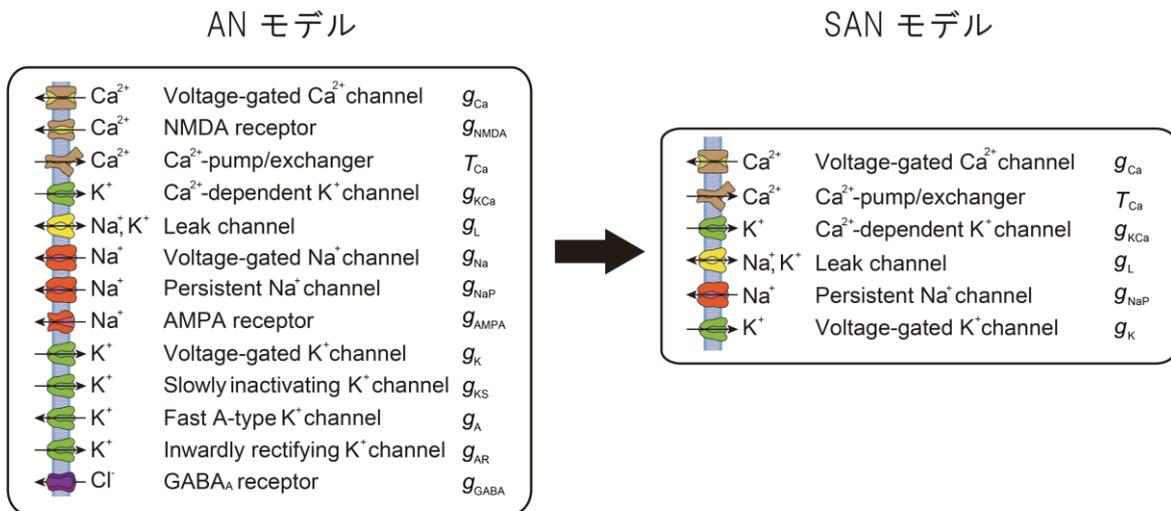
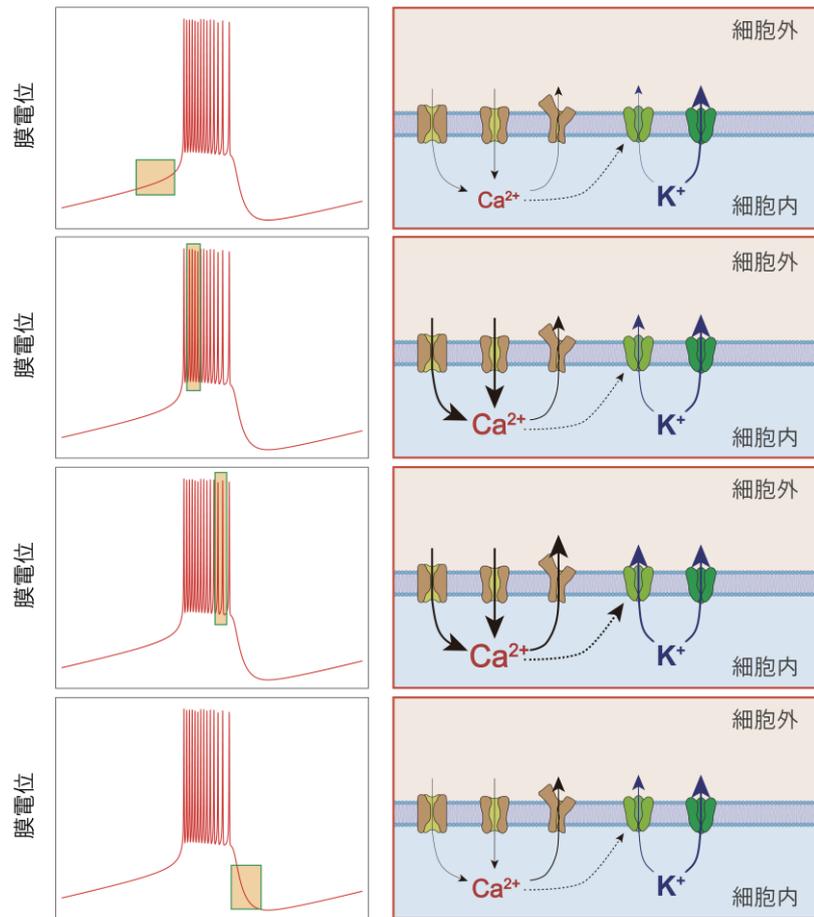


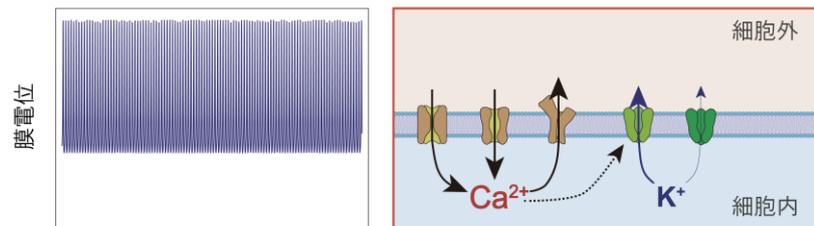
図2 ANモデル、SANモデルの構成要素

ANモデルにはチャネル・ポンプが13個あったのに対して、SANモデルでは6個まで減らすことに成功している。

リークカリウムチャンネル：正常



リークカリウムチャンネル：減少



時間

-  電位依存性カルシウムチャンネル
-  カルシウムポンプ/交換輸送体
-  カルシウム依存性カリウムチャンネル
-  NMDA受容体
-  リークカリウムチャンネル

図3 徐波発火パターン形成機構とリークカリウムチャンネルの関係

リークカリウムチャンネルが正常のときは細胞内カルシウム濃度上昇により活性化されたカルシウム依存性カリウムチャンネルとリークカリウムチャンネルの働きにより Up state から Down state に移行する。一方、リークカリウムチャンネルが減少している状態では、細胞内カルシウム濃度が上昇してもカルシウム依存性カリウムチャンネルとリークカリウムチャンネルを通る外向き電流が十分量に達しないため、Up state から Down state に移行しない。

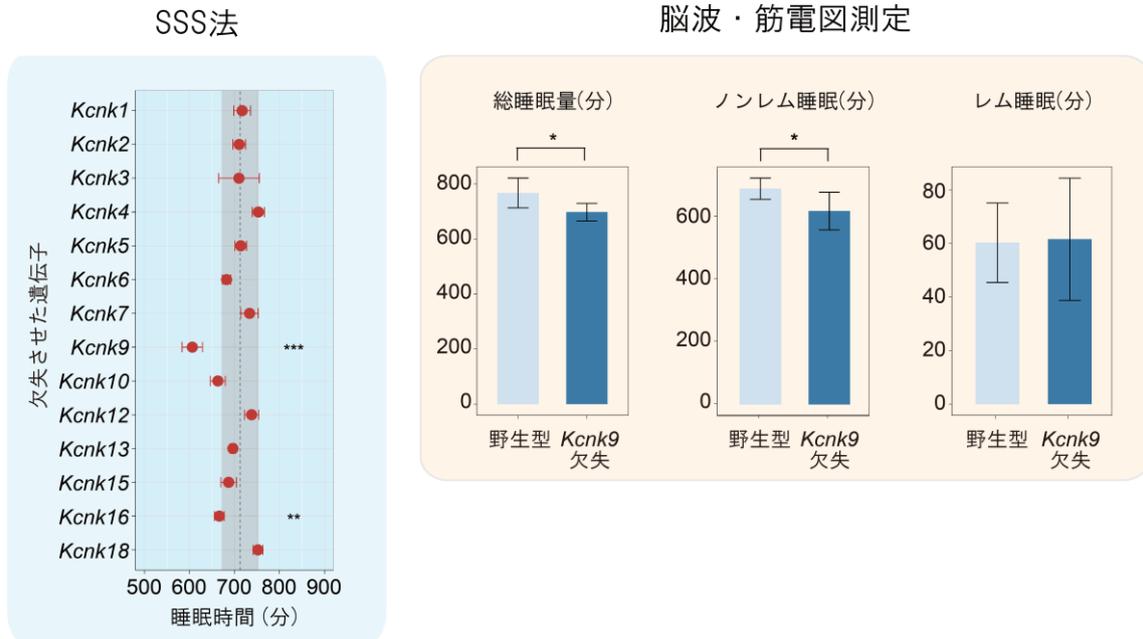


図4 リークカリウムチャンネル欠失マウスの睡眠時間

左図は SSS 法で測定したリークカリウムチャンネル欠失マウスの睡眠時間を示している。灰色部分が野生型の平均値±標準偏差を示しており、Kcnk9 欠失マウスでは睡眠時間が顕著に減少している。右図は脳波・筋電図で測定した Kcnk9 欠失マウスの総睡眠、ノンレム睡眠、レム睡眠の時間を示している。