



睡眠に関わるたんぱく質リン酸化酵素の働きを解明 ～入眠の促進と目覚めの抑制を異なる状態で制御～

ポイント

- ▶ たんぱく質リン酸化酵素のCaMKIIβ^{注1)}には睡眠を促進する働きがあることを明らかにしてきましたが、その睡眠制御の詳しい機構は不明でした。
- ▶ CaMKIIβは、自身のリン酸化修飾^{注2)}の状態に応じて、入眠の促進と、目覚めの抑制という異なるステップにおいて睡眠を制御していることがマウスにおける研究で明らかとなりました。
- ▶ 睡眠の誘導（入眠の促進）と睡眠の維持（目覚めの抑制）という異なる制御可能点を明らかにしたことで、それぞれをターゲットとする新しい睡眠コントロール戦略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）、戸根 大輔 助教、大出 晃士 講師、張 千恵 氏（博士課程4年（研究当時））らは、神経細胞で働く主要なたんぱく質リン酸化酵素CaMKIIβが、睡眠時間を延長する仕組みとして、入眠の促進と目覚めの抑制という異なるステップの両方で作用することを明らかにしました。

研究グループは、CaMKIIβが睡眠時間の延長に働くことを発見していましたが、その詳しい仕組みは不明でした。CaMKIIβには複数のリン酸化部位があり、自身のリン酸化状態によって機能が変化することがよく知られています。そこで、本研究グループは、リン酸化され得る部位1カ所ずつに疑似的にリン酸化状態を模した変異を導入したCaMKIIβ変異体シリーズを作製し、マウスを用いて、CaMKIIβのリン酸化状態と睡眠制御の関係を網羅的に調べました。その結果、CaMKIIβが特定のリン酸化状態では、覚醒状態から睡眠状態への移行を促進する（睡眠を誘導する）ことが分かりました。さらに、このリン酸化状態にあるCaMKIIβに、追加で2カ所目あるいは3カ所目と、疑似リン酸化変異を導入したところ、睡眠状態から覚醒状態への移行を抑制する（睡眠を維持する）という働きを持つことが明らかになりました。

今回の研究で、CaMKIIβがリン酸化状態に応じて、睡眠時間を延長する複数のステップ（睡眠の誘導と維持）にそれぞれ働くことが分かりました。多くの既存の睡眠薬は基本的には睡眠の誘導のステップに作用するものです。今回、睡眠の誘導と維持を行う機構の一端を明らかにしたことで、これまで難しかった睡眠の維持のステップに作用する方法の開発の手掛かりとなるかもしれません。

本研究成果は、2022年10月4日（米国東部夏時間）にオンライン科学誌「*PLoS Biology*」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」

（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））

研究期間：2020年10月～2026年3月

JSTはこのプロジェクトで、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、ヒトの睡眠覚醒において分子から社会に生きるヒト个体までを通貫する「生体時間」情報の理解を目指します。

<研究の背景と経緯>

睡眠覚醒リズムは私たちの行動パターンを支配する重要な生理機能であり、その乱れは、脳機能はもとより代謝などの全身の機能に多くの問題を生じさせます。このため、動物には1日あたり一定量の睡眠を確保する、睡眠の恒常性を担う仕組みが備わっています。これはいわゆる「眠気」と呼ばれる仕組みで、例えば徹夜などで長く覚醒が続くとその直後は睡眠を多くとることは良く知られています。これは眠気が強い時には、眠りに落ちやすく（睡眠状態に誘導されやすく）、一旦眠ると起きにくく（睡眠が維持されやすく）なっていることが予想できます。よく知られた現象であるにも関わらず、眠気や睡眠の誘導・維持を担う分子的な仕組みは、ほとんど明らかになっていませんでした。

近年の複数の研究で、睡眠の制御には、たんぱく質のリン酸化修飾が重要であることが示されてきました。その中でも本研究グループは、CaMKII α とCaMKII β が睡眠を促進するたんぱく質リン酸化酵素であることを2016年に報告し、眠気の分子の実体がたんぱく質のリン酸化である可能性を「睡眠のたんぱく質リン酸化仮説」として指摘しています。CaMKII α やCaMKII β は、脳の神経細胞に多く存在しており、記憶などの機能に重要な働きをすることが古くから研究されてきたたんぱく質です。しかし、睡眠についてはCaMKII α やCaMKII β のこういった機能や状態が、睡眠を制御するために重要なのかは分かっていませんでした。

<研究の内容>

CaMKII α やCaMKII β は、自身のリン酸化状態によって、リン酸化酵素活性やたんぱく質構造が大きく変化することが知られています。このリン酸化状態制御の一部は、CaMKII α やCaMKII β が自分自身をリン酸化する^{注3)}ことで行われます。本研究グループは以前に、*Camk2a*と*Camk2b*それぞれの遺伝子を失わせた遺伝子ノックアウトマウスの睡眠状態を解析しており、*Camk2b*ノックアウトマウスは*Camk2a*ノックアウトマウスよりも、1日あたりにより大幅な睡眠時間の減少が見られました。そこで、今回の研究ではCaMKII β に着目し、CaMKII β のどのリン酸化箇所が睡眠制御に関わるのかを明らかにしました。CaMKII β には自己リン酸化が行われる可能性があるセリンとスレオニンが69カ所あります。そこで、まずこれらそれぞれに疑似リン酸化変異^{注4)}を導入した69種類の変異*Camk2b*遺伝子を作製し、ウイルスベクター^{注5)}を用いてマウスの全脳に変異CaMKII β を発現させ、マウスの睡眠状態を測定しました。その結果、特定の箇所（287番目のスレオニン；T287）に疑似リン酸化変異を導入したCaMKII β を発現させた場合、1日あたり100分以上、マウスの睡眠時間が長くなりました（図1）。この睡眠時間の延長は、睡眠の誘導が促進さ

れたことによるものでした。つまり、CaMKII β の287番目のスレオニンがリン酸化されると、睡眠の誘導が生じることが想定されます。さらに同様の手法でCaMKII阻害ペプチド^{注6)}を発現させてCaMKIIの機能を阻害すると、マウスの睡眠時間が短くなることも分かりました。ウイルスベクターを利用してCaMKII機能を変化させることで、それぞれ3時間程度の睡眠延長と短縮が観察されたことから、睡眠制御においてCaMKII機能が重要な役割を果たしていることが強く示唆されます(図2)。

CaMKII β の自己リン酸化は複数箇所が生じることが知られています。そこで、287番目のスレオニンに疑似リン酸化変異を導入したCaMKII β の残りの68カ所のアミノ酸位置に2カ所目の疑似リン酸化変異を導入した変異CaMKII β を作製し、同様にマウスの睡眠状態を調べました。その結果、287番目のスレオニンに加えて、306番目あるいは307番目のスレオニンに疑似リン酸化変異を導入した場合、287番目のスレオニンのみに疑似リン酸化変異を導入した場合と同様にマウスの睡眠時間が長くなりましたが、その原因は睡眠の誘導ではなく、睡眠の維持が促進されたことによるものでした(図3)。つまり、CaMKII β の306番目あるいは307番目へのリン酸化修飾は、287番目のスレオニンのリン酸化がもたらす睡眠の誘導活性を、睡眠の維持活性に変換すると考えられます。

287番目のスレオニンは、CaMKII β がCa²⁺/カルモジュリンによって活性化された後、自己リン酸化によってリン酸化修飾されることが良く知られています。さらに睡眠を阻害され眠気が蓄積されたマウスでは、そのリン酸化が高いレベルで生じていることも明らかになりました。287番目のスレオニンがリン酸化されたCaMKII β は、カルシウム/カルモジュリンがなくてもリン酸化酵素活性が保持されます。今回の研究でも、CaMKII β が睡眠の誘導や維持を行うためには、CaMKII β のリン酸化酵素活性が重要であることが確認されました。また、306番目と307番目のスレオニンは、287番目のスレオニンの自己リン酸化が生じた後に自己リン酸化修飾されることが良く知られています。これを合わせると、まず287番目のリン酸化によって睡眠の誘導活性が生じた後に、306番目と307番目のリン酸化によって睡眠の維持活性が発揮されると考えられ、CaMKII β が睡眠状態を効率的に促進するために都合がよい仕組みであることが示唆されました。

また、今回の研究では、CaMKII β が持つ睡眠の誘導や維持の活性を失わせる疑似リン酸化変異も発見されています。つまり、CaMKII β は、睡眠の誘導や維持に加えて、それらをキャンセルするという複数の睡眠制御を、自身のリン酸化状態に応じて切り替えている可能性があります(図4)。

<今後の展開>

今回の成果は、「睡眠のたんぱく質リン酸化仮説」で提唱した、眠気の実体がたんぱく質リン酸化であるという可能性に対して、CaMKII β のリン酸化がその候補であるということを提示しています。

また、睡眠の誘導と維持が、それぞれ異なるリン酸化状態のCaMKII β によってコントロールされるならば、睡眠の誘導と維持の制御には、異なる仕組みがあると予想されます。つまり、睡眠の誘導あるいは維持を、それぞれ狙って制御することが可能であるこ

とを意味しています。私たちが考える「質の良い睡眠」とは、夜にぐっすり眠り、朝まで目覚めないことを指し、睡眠の維持が促進された状態と言えるでしょう。今回の成果は、睡眠の維持をターゲットとした、より理想的な睡眠コントロールの方法を考える手がかりを与えるものになると期待されます。

<参考図>

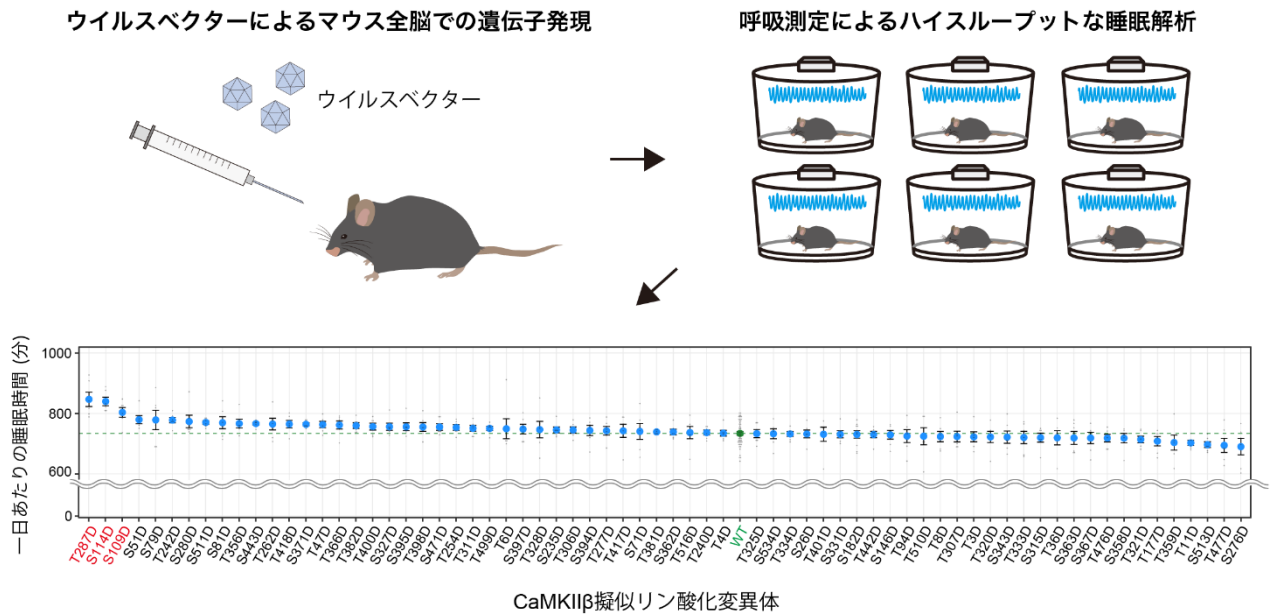
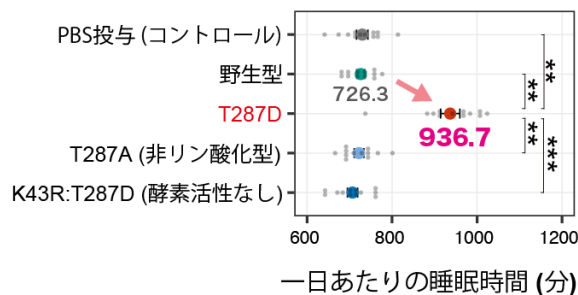


図1 ウイルスベクターを利用したCaMKIIβ 擬似リン酸化変異体スクリーニング
 ウイルスベクターをマウスに投与することで、全脳にCaMKIIβ 変異体を発現させる(左上図)。そのマウスに対し呼吸測定による睡眠解析を行うことで、マウスの睡眠時間をハイスループットに取得できる(右上図)。69種のCaMKIIβ 擬似リン酸化変異体に対応したウイルスベクターを構築し、それぞれの睡眠時間を解析した結果、マウスの睡眠時間を延長するCaMKIIβ 擬似リン酸化変異体が複数得られた(下図)。このうちT287に擬似リン酸化を導入した変異体(T287D)では最も安定に睡眠延長が観察されることが、さらなる解析で明らかになった。

CaMKIIβ変異体発現 (睡眠時間延長)



CaMKII 阻害ペプチド発現 (睡眠時間短縮)

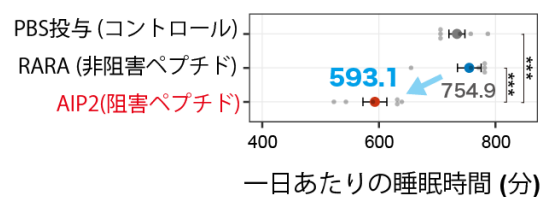


図2 CaMKIIβ 機能の睡眠制御への影響

T287に擬似リン酸化を導入した変異体(T287D)では、睡眠時間が延長するが、擬似リン酸化として働かない変異(T287A)、および酵素活性を失った変異(K43R)の存在下では睡眠延長は見られない(左図)。このことから、この287番目のスレオニンリン酸化並びにCaMKII酵素活性が睡眠制御に重要であることが分かる。CaMKIIの機能を阻害するペプチドを、ウイルスベクターを利用して発現させると、睡眠時間の短縮が観察された(右図)。

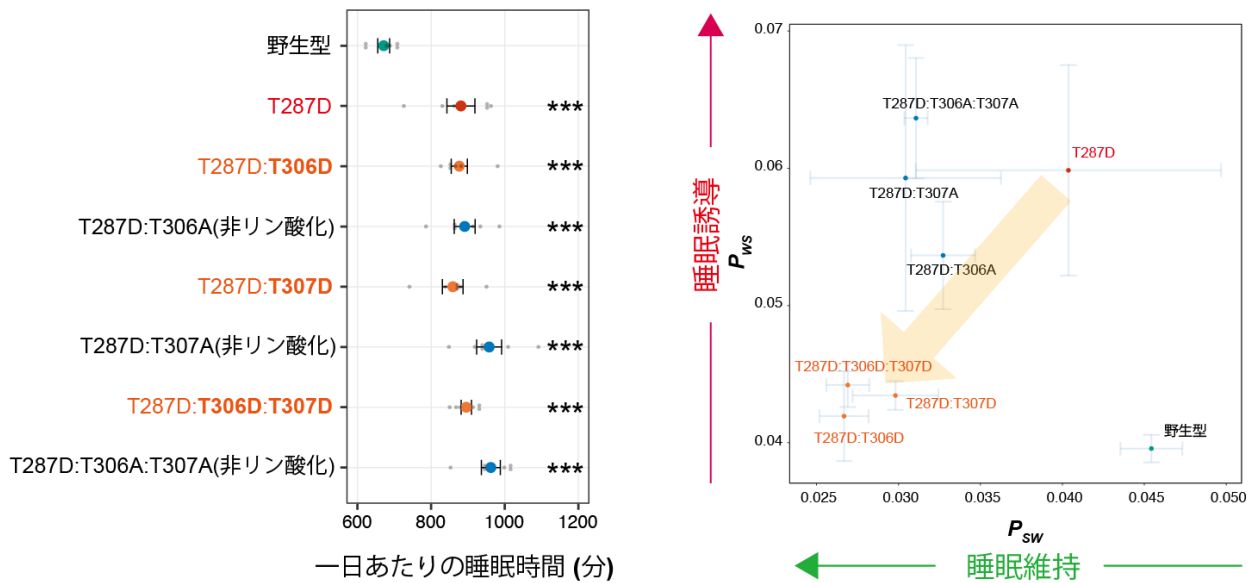


図3 CaMKIIによる睡眠誘導と睡眠維持

287番目のスレオニンに加えて、306番目あるいは307番目のスレオニンに疑似リン酸化変異(T287D:T306D、T287D:T307D、T287D:T306D:T307D)を導入すると、287番目単独の場合(T287D)と同程度の睡眠時間の延長が観察される(左図)。しかし、これらの疑似リン酸化が追加導入されることで、T287Dの睡眠誘導活性は低下し、睡眠維持活性に切り替わった(右図)。この睡眠維持活性への切り替わりは、306番目あるいは307番目のスレオニンに疑似非リン酸化変異(T287D:T306A、T287D:T307A、T287D:T306A:T307A)を導入しても生じないことから、306番目あるいは307番目のリン酸化が切り替わりに重要であることが示唆される。

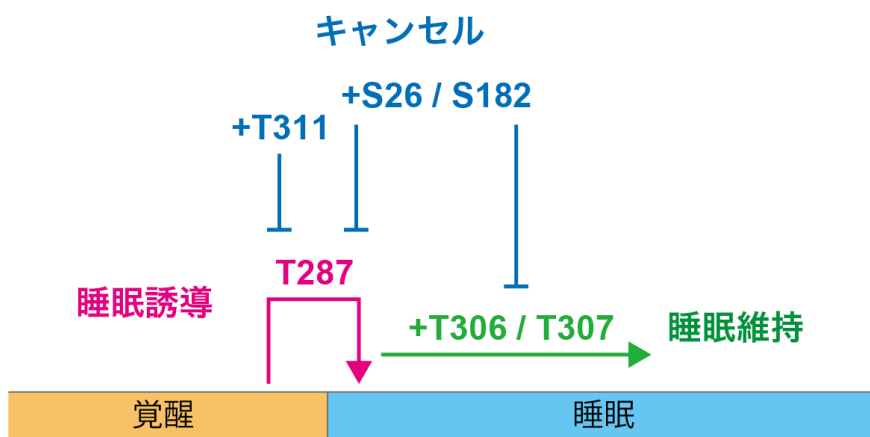


図4 CaMKIIβリン酸化状態による睡眠制御モデル

CaMKIIβは、自身のリン酸化状態に応じて、睡眠の誘導(T287)、維持(T306、T307)、それらのキャンセル(S26、S182、T311)という複数の制御を切り替えながら、睡眠覚醒状態を制御している。

<用語解説>

注1) CaMKII

Ca²⁺/カルモジュリン依存性キナーゼ II。神経細胞に多く存在し、Ca²⁺/カルモジュリンが結合することで活性化する。α、β、δ、γサブタイプが知られており、これらのサブユニットが12量体を形成する。キナーゼとして他のたんぱく質をリン酸化するほか、さまざまなたんぱく質と複合体を形成することで、神経細胞の働きを制御している。たんぱく質のリン酸化は、たんぱく質を構成する20種類のアミノ酸のうち、とくにセリン、スレオニン、チロシンに対して生じることが知られている。CaMKIIはこのうち、セリンとスレオニンに対してリン酸化修飾を行う。

注2) リン酸化修飾

生体内では、たんぱく質は遺伝子の転写・翻訳により作られ、その後、化学修飾を受けて機能が調節されることもある。中でもリン酸化は、最も多くのたんぱく質で行われる翻訳後修飾である。

注3) 自己リン酸化

キナーゼは他のたんぱく質をリン酸化するが、キナーゼ自体をリン酸化修飾することもある。これを「自己リン酸化」と呼ぶ。キナーゼの働きでキナーゼ自体の働きを調節することができるため、フィードバック制御を行うために都合のよい仕組みと考えられる。本プレスリリースでは、自己リン酸化を想定している場合は「自己リン酸化」と、CaMKIIβ以外のたんぱく質リン酸化酵素によるリン酸化も想定される場合は「リン酸化」と書き分けている。

注4) 疑似リン酸化変異

リン酸基は細胞内でマイナスに荷電しているため、リン酸化のターゲットとなるセリン(S)やスレオニン(T)を、マイナス電荷を持つアスパラギン酸(D)に変異させると、リン酸化された状態を疑似的に作ることができる。

注5) ウイルスベクター

遺伝子を細胞に送達するためのツール。本研究ではアデノ随伴ウイルス(AAV)を利用した。AAVには低い病原性で、神経細胞などにも効率的に遺伝子を導入でき、かつ遺伝子発現が長期に渡って持続するなどの利点があり、神経科学を中心に幅広く利用されている。近年、より効率的な遺伝子導入が可能なAAVの開発や臨床応用の取り組みも進んでいる。

注6) 阻害ペプチド

たんぱく質の働きを阻害するために用いられる十数個のアミノ酸が連なったもの。アミノ酸残基間の相互作用に基づいて緻密な設計が可能であるため、標的となるたんぱく質に特異性が高いものが得られやすい。今回使用したCaMKII阻害ペプチドは、基質たんぱく質のCaMKIIへの結合を阻害するもの。なお、この阻害ペプチドはCaMKIIの

4種類サブタイプ全てを抑制するため、CaMKII「β」の阻害と言い切ることはできない。そのため、サブタイプを記載せずCaMKII阻害ペプチドと記載している。

<論文タイトル>

“Distinct phosphorylation states of mammalian CaMKIIβ control the induction and maintenance of sleep.”

(哺乳類CaMKIIβの異なるリン酸化状態が睡眠の誘導と維持を制御する)

DOI : 10.1371/journal.pbio.3001813

<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 : 03-3512-3545 Fax : 03-3222-2068

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

東京大学医学部・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

Tel : 050-3495-0247

E-mail : ex-press@ml.riken.jp