

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06232

研究課題名(和文)概日ペースメーカーニューロンにおける細胞内pHリズムと活動電位リズムの相関解析

研究課題名(英文) Relationships between intracellular pH rhythms and action potential rhythms in *Drosophila* pacemaker neurons

研究代表者

森岡 絵里 (Morioka, Eri)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・助教

研究者番号：80756122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、キイロショウジョウバエの体内時計を制御する中枢時計ニューロン(LNs)における蛍光イメージング実験や電気生理的解析を介して、ミトコンドリアのカリウム-プロトン交換輸送体であるLETM1のノックダウンにより、1) 恒暗条件下での歩行活動のフリーランリズムが長周期化すること、2) LNs特異的に見られる細胞内pHリズムが抑制されること、3) 細胞外pH依存的なLNsの活動電位発火頻度変化が抑制されることなどを明らかとした。本研究結果は、LNsの体内時計リズム形成機構に細胞内pHとミトコンドリアLETM1が関与する可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Drosophila circadian pacemaker neurons (LNs) exhibited unusual intracellular pH rhythms. To straightly address relationships between intracellular pH rhythm and action potential in LNs, I combined bio-imaging assays with an electrophysiological analysis. I found that circadian pH oscillations were specific for LNs. Using newly derived locomotor activity monitoring system, we observed significantly prolonged free-running periods in LNs-specific mitochondrial K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger LETM1 knockdown flies. In addition, LETM1 knockdown reduced intracellular pH oscillation and clock protein PERIOD and TIMELESS expression rhythms.

Using newly introduced electrophysiological rigs to monitor action potentials in LNs, I found spontaneous action potential firing frequency changed according to extracellular pH conditions in control flies but not in LETM1 knockdown flies. The present study suggest that intracellular pH and mitochondrial LETM1 may be involved in circadian clock mechanisms in LNs.

研究分野：時間生物学

キーワード：中枢時計ニューロン キイロショウジョウバエ 細胞内pH 活動電位

### 1. 研究開始当初の背景

(1) キイロショウジョウバエは、効率的に遺伝子 - 行動リズム間の相関解析を行うことが可能なモデル生物である。しかしながら、概日リズムを制御する時計遺伝子の分子振動が、どのようにして細胞の生理活動リズムを形成しているのかといった細胞レベルの解析は、実験手技の難しさから、あまり行われていない。

(2) 予備実験において、蛍光  $Ca^{2+}$ あるいは pH センサータンパク質を発現させたトランスジェニックバエを用いて、脳組織培養モデルにおける中枢時計ニューロン (LNs) のバイオイメージング解析を行い、LNs の細胞内 pH が概日振動することを観察した。しかし、この pH 振動が LNs の細胞生理活動リズムに果たす役割については不明であった。

### 2. 研究の目的

(1) これまで行ってきたバイオイメージング実験に、電気生理学的実験を組み合わせることにより、LNs の最終的な情報出力である活動電位形成に、概日細胞内 pH リズムがどのような影響を及ぼしているのかを明らかにする。

(2) 予備実験により、ミトコンドリア  $K^+/H^+$  交換輸送体 (LETM1) が概日リズム形成に関与する可能性が示されたことから、LNs 特異的に LETM1 に対する RNAi を発現させたノックダウンシステムを用いて、LNs 細胞内 pH リズムおよび活動電位リズム形成における LETM1 の役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) LNs における細胞内 pH リズムが、自発的神経発火リズムとどのような関係を持つのかを明らかにするために、留学先で習得した、成虫脳の LNs におけるパッチクランプ実験を行うための装置をセットアップする。さらに、この電気生理的手技を、脳組織培養用の蛍光イメージングと組み合わせ、細胞内 pH と自発発火頻度記録の同時モニターを試みる。

(2) LETM1 RNAi システムを用いて同様の解析を行うことにより、活動電位リズム形成における LETM1 の役割を明らかにする。また、近年、概日光受容分子クリプトクロムを介した直接的な LNs 神経発火頻度の制御機構が報告されていることから、細胞内 pH がクリプトクロムの概日性調節機能に及ぼす影響と、それに対する LETM1 の関与についても検討を行う。

### 4. 研究成果

(1) 予備実験において観察された細胞内 pH リズム特性を明らかにするため、中枢神経系組織培養を用いた細胞内 pH イメージング実験を実施した。まず、細胞内 pH リズムが LNs に特異的な現象であるかを検証するために、

非時計ニューロンであり、睡眠覚醒リズム制御に関与するドーパミンニューロンに特異的な発現ドライバー (TH-gal4) を用いて、蛍光 pH センサータンパク質 deGFP4 を発現させたショウジョウバエシステムを作出し、その中枢神経系組織培養を用いて pH イメージングを行った。その結果、ドーパミンニューロンにおいては明瞭な pH 振動は観察されず、ほぼ一定の細胞内 pH であった。また、電位依存性ナトリウムチャネルブロッカーであるテトロドトキシン (TTX, 300 nM) を用いて、他のニューロンからの神経入力を遮断した場合においても、自律的な細胞内 pH リズムが観察された (図 1)。よって、細胞内 pH リズムが中枢時計ニューロン特異的であることが明らかとなった。このようなダイナミックな細胞内 pH 振動の存在は、本研究により初めて明らかとなった新規な概日リズム現象である。

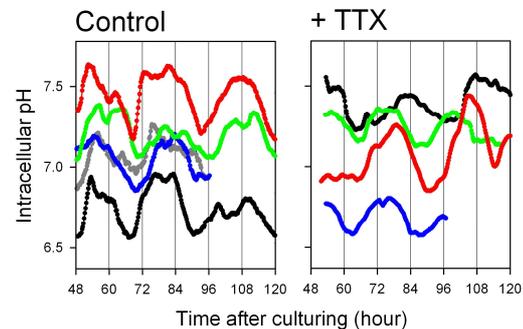


図 1 . LNs 細胞内 pH イメージング。中枢神経系組織培養 LNs における deGFP4 蛍光輝度変化の代表例を示した。励起光 (405 nm) は 15 分毎に照射し、510 nm および 465 nm 蛍光輝度を 72 時間にわたり測定した。左軸に示した pH 値は pH キャリブレーション結果から算出した。TTX の存在に関わらず、概日細胞内 pH 振動が観察された。

(2) 新たに商業的のショウジョウバエ自動歩行活動記録装置 (DAM2 システム) を導入し、複数の変異体システムの行動リズム変異の効率的な解析を可能とした。このシステムを用いて、細胞内 pH リズム形成に関与すると考えられる 4 候補遺伝子に対する RNAi を、Dicer2 と共に LNs 特異的に発現させたノックダウンシステムについて、恒暗条件下における歩行活動リズム解析を行った。その結果、ミトコンドリアのカリウムプロトン交換輸送体 LETM1 をノックダウンしたシステムにおいて、フリーランリズムが有意に長周期化 (コントロール =  $23.59 \pm 0.06$ 、LETM1 RNAi =  $25.65 \pm 0.07$  時間) することが明らかとなった。

(3) 歩行活動リズムに変異が見られた LETM1 RNAi システムの LNs において、細胞内 pH リズムにどのような影響が生じているかを、pH イメージングにより薬理的に検証した。

具体的には、LNs 特異的に RNAi および deGFP4 を発現する系統) を作出し、中枢神経系組織培養を用いて LNs における pH イメージングを行った。異なる時刻におけるプロトン特異的イオノフォア (カルボニルシアニド-m-クロロフェニルヒドラゾン; CCCP, 10  $\mu$ M) 刺激に対する応答を調べることで、定常状態の細胞内 pH に対する RNAi の影響を解析した。その結果、コントロールの LNs においては、CCCP 誘発性細胞内酸性化応答の振幅が昼間に大きく夜間に小さい、すなわち昼間にアルカリに、夜間に酸性に変化するという日周リズムが見られた (図 2)。これは、長期 pH イメージングにおいて観察された概日 pH リズムの存在を裏付ける結果である。これに対し、LNs 特異的 LETM1 ノックダウン系統においては、時刻依存的な変化は見られず、一日を通して中程度の振幅が観察され (図 2)、LETM1 ノックダウンにより LNs 細胞内 pH リズ

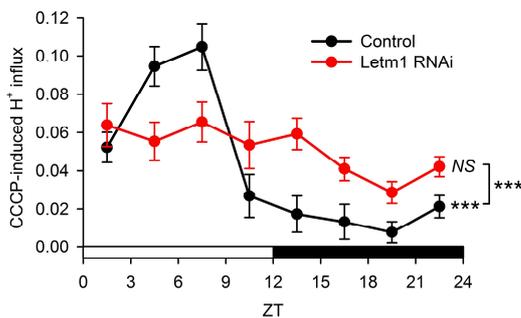


図 2. CCCP 誘発性細胞内 pH 酸性化の振幅の日周リズム。コントロール (黒) は明期に大きく、暗期に低いという明瞭なリズムが見られた ( $***P<0.001$ , one-way ANOVA)。対照的に、LETM1 ノックダウン系統においては、時刻依存的な変化は見られず (*N.S.* one-way ANOVA)、有意差が見られた ( $***P<0.001$ , two-way ANOVA)。

ムが抑制されることが明らかとなった。

また、LETM1 ノックダウンが LNs におけるコアの時計遺伝子振動にどのような影響を及ぼすのかを、免疫組織化学的に解析した。その結果、時計タンパク質 PERIOD および TIMELESS の発現リズムの振幅が減少し、位相後退する傾向が観察された。これは、LETM1 RNAi 系統で見られた行動リズム変異と概ね一致している。

(4) 次に、LNs の細胞内 pH リズムがニューロン活性とどのような相関を持つかを調べるため、LNs の電気生理的解析を行うための装置をセットアップし、whole-cell パッチクランプ法によりコントロールおよび LNs 特異的 LETM1 ノックダウン系統における LNs の活動電位発火記録を試みた。最も簡単に pH と神経活動性の関連性を検証する方法として、LNs に対するパッチクランプ記録を行いながら、pH 6.9 に調整した細胞外液を灌流させ、

異なる細胞外 pH 条件下における自発的神経発火頻度を解析した。その結果、コントロール系統では、細胞外 pH が酸性であるほど発火頻度が低く、アルカリ性であるほど発火頻度が高いという、典型的な S 字型曲線が得られた。とくに、pH 8.3 以上のアルカリ条件下では、バースト発火パターンの誘起あるいはバースト持続時間の長期化が観察された。これに対し、LETM1 ノックダウン系統の自発的神経発火頻度は、pH 6.25 以下の強い酸性条件下ではコントロール系統よりも大幅に減少したが、pH 6.25-9.1 条件下においては、細胞外 pH を変化させても発火頻度は一定であり、コントロール系統のような細胞外 pH 依存的な発火頻度変化は生じないことが明らかになった。

本実験において LNs の電気生理的解析が可能となったことから、今後は、pH イメージングとの同時測定を試み、細胞内 pH とニューロン活性の関連性をより明確にする。

(5) LNs は概日光受容体クリプトクロム (CRY) を発現しており、CRY はその自発的活動電位発火頻度を調節する青色光センサーとして機能することが知られている。そこで、異なる細胞外 pH 条件下において、LNs 神経発火頻度における CRY 依存的な光応答を調べた。その結果、標準的な細胞外 pH 条件下 (pH 7.5) では、CRY が受容しない波長である黄色光 (>550 nm) に対し、CRY 受容波長を含む白色光および青色光 (460-490 nm) 波長の光照射により有意に自発的発火頻度が増加した (図 3)。これに対し、酸性 (6.5) あるいはアルカリ性 (8.5) 条件下においては CRY 依存的な発火頻度増加応答は観察されなかった (図 3)。この結果は、概日リズム形成に関

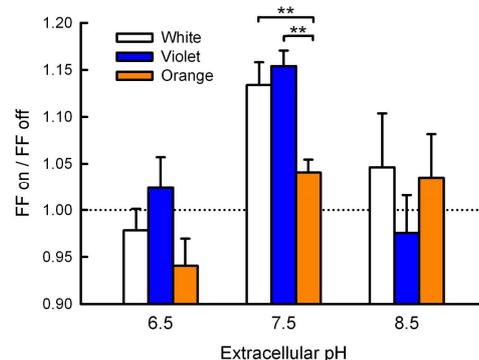


図 3 異なる細胞外 pH 条件下における CRY 依存的な LNs 神経発火頻度の光応答。バーの色は与えた光の色を、縦軸は光照射中の発火頻度を照射前後の発火頻度で割った値を示す。標準的な細胞外 pH 条件 (7.5) では、黄色光照射に比べ、白色光および青色光照射により発火頻度が有意に増加した ( $**P<0.01$ , one-way ANOVA) のに対し、酸性 (6.5) およびアルカリ性 (8.5) 条件下では光照射による発火頻度増加応答は見られなかった。

わるタンパクの機能が pH により抑制されることを示す結果である。今後、LETM1 ノックダウン系統においても同様の解析を行い、LETM1 が CRY 機能に及ぼす影響を調べる予定である。

以上の結果から、キイロショウジョウバエ LNs には、(i) 昼間にアルカリ化し夜間に酸性化すると推定される、振幅およそ 0.5 の概日性の細胞内 pH リズムが存在し、(ii) その神経発火頻度は細胞外酸性化により減少、アルカリ化により増加することが示された。これらの結果は、成虫の中枢時計ニューロンの自発的神経発火頻度は、朝方に最も高く徐々に低くなり夜間に再び上昇する、という概日制御された電気生理学的性質を持つことを示した先行研究結果 (Sheeba et al., 2008; Cao & Nitabach, 2008) と一致する。また、(iii) 光による神経発火頻度制御 (CRY 応答) が細胞外 pH 変化により抑制されたことから、細胞内 pH リズムが時計タンパク質機能に直接的に作用している可能性が示された。加えて、(iv) LETM1 ノックダウンにより細胞内 pH リズムおよび細胞外 pH 依存性な神経発火頻度変化の両方が抑制された。これは、LETM1 が細胞内 pH リズム形成および神経発火頻度調節機構に寄与していることを示している。近年、ミトコンドリアの酸化的代謝の概日制御が報告されており (Peek et al., 2013)、細胞内 pH リズムが代謝リズムと関連して概日時計機構に関与している可能性も考えられる。本研究結果は、時計遺伝子の分子振動と代謝振動、そして神経活動出力をリンクさせている新たな細胞内メカニズムが存在する可能性を示唆している。

今後は、時計遺伝子変異体を用いた解析により、分子振動と細胞生理活動リズムとの関係を明らかにする。また、ミトコンドリア機能や、K<sup>+</sup>チャネルなどの神経発火調節に関わる因子が、細胞内 pH の変化によりどのような機能変化を生じるか、そこに LETM1 がどのように関与しているかを検証することにより、LNs の概日 pH リズム形成過程および機能の全容解明を目指す。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

森岡絵里、キイロショウジョウバエ体内時計ニューロンにおける細胞内 pH リズムと活動電位リズムの相関解析、Toyama Science GALA 2016、2016年9月30日、富山大学総合教育研究棟(富山)

森岡絵里、老田皆実、土田努、池田真行、共生細菌が宿主の体内時計に及ぼす影響、第22回日本時間生物学会、2015年11月21-22日、東京大学伊藤国際学術研究センター、情報学環・福武ホール(東京)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森岡 絵里 (MORIOKA, Eri)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・

助教

研究者番号：80756122