

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08571

研究課題名(和文) ショウジョウバエとマウスで共通するNMDA受容体による睡眠制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of sleep-regulating NMDA receptor signaling conserved in Drosophila and mammals

研究代表者

富田 淳 (Tomita, Jun)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・講師

研究者番号：40432231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの睡眠-覚醒を制御する中心複合体の新たな神経回路の同定を試み、睡眠を促進するPB (protocerebral bridge) 介在ニューロン群を見いだした。PB介在ニューロン群は、すでに同定していた覚醒を促進するPB-FB-NOニューロン群を抑制することで、睡眠を促進することが示唆された。また、PBに投射するT1ドーパミンニューロンはD2受容体シグナルを介して、睡眠を促進するPB介在ニューロンを抑制することで覚醒促進的に働くことが示唆された。さらに、PB介在ニューロンは睡眠制御において、NMDA受容体-カルシニューリンシグナルによっても調節されることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同定した睡眠-覚醒を制御する中心複合体PBの神経回路に着目することで、これまで未解明であったNMDA受容体-カルシニューリンシグナルによる睡眠制御の分子機構の解明が可能になる。また、覚醒を促進するT1ドーパミンニューロンは闘争行動の制御に関わることが報告されており、睡眠-覚醒と闘争行動に共通する神経基盤の理解にもつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：We attempted to identify a novel neural circuit in the central complex regulating sleep-wake in *Drosophila melanogaster* and found a group of protocerebral bridge (PB) interneurons that promote sleep. Because the sleep-promoting PB interneurons had a physical connection with the already identified wake-promoting PB-FB-NO, the PB interneurons should inhibit the PB-FB-NO neurons.

We found that activation of T1 dopaminergic neurons projecting to PB using the temperature-sensitive dTrpA1 channel resulted in a significant reduction in sleep. Dopamine 2-like receptors (Dop2R) knockdown in the sleep-promoting PB interneurons significantly increased sleep, suggesting that T1 dopaminergic neurons promote wakefulness by inhibiting the sleep-promoting PB interneurons through D2 receptor signaling. In addition, we found that NMDA receptor-calcineurin signaling in the sleep-promoting PB interneurons is also involved in sleep regulation.

研究分野：神経科学

キーワード：睡眠 覚醒 ショウジョウバエ 中心複合体 ドーパミン NMDA受容体 カルシニューリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

睡眠は多くの動物種に認められる生理現象であり、動物種間で共通する睡眠-覚醒制御機構の存在が明らかになってきた。その分子的基盤を解明することで、「睡眠とは何か?」という睡眠科学における最も大きな謎に迫れると考える。睡眠の制御機構や生理機能についてのこれまでの研究は、脳波によって睡眠を厳密に定義できる哺乳類を主な対象として行われてきた。一方、近年、遺伝学的解析が容易な線虫、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュといった非哺乳類モデル生物においても、行動学的に睡眠と類似する休息状態(以下、睡眠)が認められ、分子レベルでの睡眠研究が進められている。ショウジョウバエでは、これまでに多くの睡眠関連遺伝子が同定され、ドーパミン、セロトニン、GABAなどの神経伝達物質や、K⁺チャネルやドーパミントランスポーターなどの分子が哺乳類と共通する睡眠制御メカニズムとして明らかにされている。さらに、マウスの順遺伝学的スクリーニングによって発見された新規睡眠制御遺伝子 *Sik3* の八エホモログも、八エの睡眠制御に関与することが示された (Funato *et al.*, *Nature*, 2016)。また、学習記憶やシナプス可塑性維持における睡眠の生理機能についても哺乳類との共通性が示され、ショウジョウバエは睡眠の分子機構解明の優れたモデル系である。

我々は、NMDA型グルタミン酸受容体(以下、NMDA受容体)が八エの睡眠を促進することを明らかにしたが (Tomita *et al.*, *PLOS ONE*, 2015)、NMDA受容体サブユニットの一つ Nr3a のノックアウトマウスでも睡眠量が減少することが報告され (Sunagawa *et al.*, *Cell Reports*, 2016)、八エとマウスで共通する睡眠制御機構として注目されている。また我々は、NMDA受容体の下流に位置する Ca²⁺/カルモジュリン依存性タンパク質脱リン酸化酵素カルシニューリンも睡眠促進的に働くことを明らかにした (Tomita *et al.*, *J. Neurosci.*, 2011)。さらに、中枢神経系に広範に発現するアミノ酸トランスポーター (NAAT) の全神経ノックダウンで、睡眠量が顕著に減少することを見だし、グルタミン酸作動性 (Glu) ニューロンでのノックダウンでも同様の結果を得た。NAATの哺乳類ホモログは、プロリンやロイシンなどの中性アミノ酸をシナプス小胞内に輸送し (Parra, *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 2008)、プロリンはNMDA受容体アゴニスト活性をもつ (Henzi, *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 1992)。そこで、細胞内の遊離プロリン量が増加する突然変異体の睡眠量を調べたところ、著しく増加した。

以上の結果から、NMDA受容体シグナルによる睡眠制御の仮説を想定した。NAATはGluニューロンにおいて、プロリンをシナプス小胞内に輸送し、放出されたプロリンはNMDA受容体-カルシニューリンシグナル経路を活性化することで、睡眠を促進すると考えられる。さらに睡眠制御回路についての解析から、脳の中心複合体の protocerebral bridge (PB) という部位におけるNMDA受容体シグナルが睡眠を制御する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

これまでに同定された睡眠制御遺伝子の多くが、昆虫と哺乳類で共通である。しかしながら、いずれの遺伝子についても、睡眠制御メカニズムにおける機能は未解明なものが多い。我々は、NMDA受容体がショウジョウバエの睡眠を制御することを発見したが、マウスでも示され注目されている。本研究では、これまでの研究成果から想定したNMDA受容体シグナルによる睡眠制御の仮説に基づき、その全容を分子・細胞レベルで解明することを目的とする。

3. 研究の方法

NMDA受容体による睡眠制御機構の全容を解明するために、本研究では以下の3つの研究項目を計画した。

(1)睡眠制御においてNMDA受容体が機能する神経回路の同定
中心複合体のPBに注目して解析する。睡眠制御に関与するPBニューロン群でNMDA受容体をノックダウンし、睡眠量が変化することを示す。またPBに投射するGluニューロンの中で、睡眠制御に関与するニューロンを同定し、神経回路を解明する。

(2)プロリンによる睡眠制御機構の解明
八エ摘出脳を用いて、睡眠制御においてNMDA受容体が機能するニューロン群のCa²⁺イメージングを行い、プロリンによる睡眠制御機構を明らかにする。

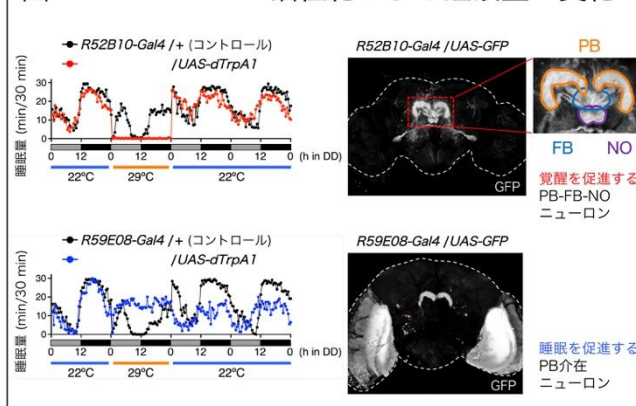
(3)NMDA受容体-カルシニューリンシグナルの下流分子の同定と睡眠制御における機能解析
カルシニューリンと既知の睡眠関連遺伝子との相互作用やリン酸化制御などについて調べる。また、生化学的手法で相互作用タンパク質の探索も行う。同定した分子の睡眠制御における機能を解析する。

4. 研究成果

(1)睡眠を促進するPB介在ニューロン群の発見
中心複合体は、PB、fan-shaped body (FB)、ellipsoid body (EB)、noduli (NO) という4つの構造から構成される。睡眠-覚醒制御に関わる新たなニューロン群を同定するために、PBに着目した。PBにGAL4が発現する14種類のGAL4ドライバーシステムを用いて、GAL4発現ニューロンに温度依存性イオンチャネルdTrpA1を発現させて人為的に活性化し、睡眠量の変化を調べた。その結果、R52B10-GAL4を用いた活性化では睡眠量が顕著に減少し、一方、R59E08-GAL4を用いた活性化では睡眠量が顕著に増加することを見出した(図1)。R52B10-GAL4に関しては、本科研費への応募までに解析を行い、R52B10-GAL4がラベルするPBからFBとNOに投射するニューロン

群(PB-FB-NOニューロン群)が覚醒促進的に働くことを示した。そこで本研究ではまず、R59E08-GAL4 について解析した。R59E08-GAL4 がラベルする PB ニューロン群は、それらの形態と報告されている論文 (Lin *et al.*, *Cell Reports*, 2013) に基づき PB 介在ニューロンであることが明らかとなった。また PB 介在ニューロンの他に視髄全体にも強い発現がみられたが、視髄で同様の発現パターンを示す複数の GAL4 系統を用いて、視髄ニューロンを活性化しても睡眠量の増加はみられなかった。R59E08-GAL4 は脳以外に、胸部神経節でも GAL4 発現がみられた。そこで、R59E08-GAL4 と tsh-GAL80 系統 (胸部神経節のみで GAL4 阻害因子である GAL80 を発現する) を組み合わせて、脳だけで dTrpA1 を発現させてニューロンを活性化しても、睡眠量の顕著な増加が見られた。以上の結果から、R59E08-GAL4 がラベルする PB 介在ニューロン群が睡眠促進的に働くことが示された。さらに、コリン作動性ニューロンのみで GAL80 を発現する Cha-GAL80 系統を利用して、R59E08-GAL4 発現ニューロンのうちコリン作動性ニューロン以外に dTrpA1 を発現させてニューロンを活性化すると睡眠量の増加がみられず、コリン作動性の PB 介在ニューロン群の活性化が睡眠量を増加させることが示唆された。

図1 PBニューロン活性化による睡眠量の変化

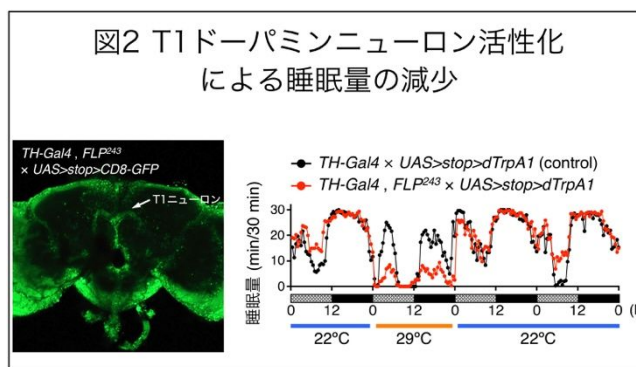


後シナプスと前シナプスに mCherry と GFP をそれぞれ発現させることで、覚醒を促進する PB-FB-NO ニューロン群は、PB に樹状突起を FB と NO にシナプス前終末をもつことが示唆された。そこで、シナプス前膜と後膜にそれぞれ分割 GFP を発現させてシナプス結合を特異的に調べることができる t-GRASP (targeted GFP reconstitution across synaptic partners) 法を用いて、覚醒を促進する PB-FB-NO ニューロン群と睡眠を促進する PB 介在ニューロン群とのシナプス結合を調べた。その結果、再構成された GFP シグナルが PB に観察され、2つのニューロン群の間のシナプス結合が示された。この結果とそれぞれのニューロン群を活性化したときの睡眠の表現型から、睡眠を促進する PB 介在ニューロン群は、覚醒を促進する PB-FB-NO ニューロン群を抑制することで睡眠を促進することが示唆された。

(2)睡眠を促進する PB 介在ニューロン群のドーパミンシグナルによる制御

PB には T1 とよばれるドーパミン (DA) ニューロンが投射することが知られている (Alekseyenko *et al.*, *PNAS*, 2013)。T1 DA ニューロン特異的に dTrpA1 チャネルを発現させて活性化したところ、睡眠量が有意に減少した (図 2)。また、GRASP 法により睡眠を促進する PB 介在ニューロンと T1 DA ニューロンとの間のシナプス結合が示唆された。PB にはドーパミン D2 受容体 Dop2R が発現することが報告されており、PB 介在ニューロンで Dop2R をノックダウンすると睡眠量が有意に増加した。

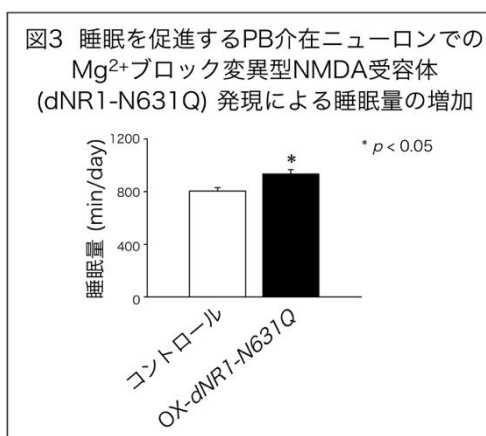
図2 T1ドーパミンニューロン活性化による睡眠量の減少



(3)睡眠を促進する PB 介在ニューロン群の NMDA 受容体シグナルによる制御

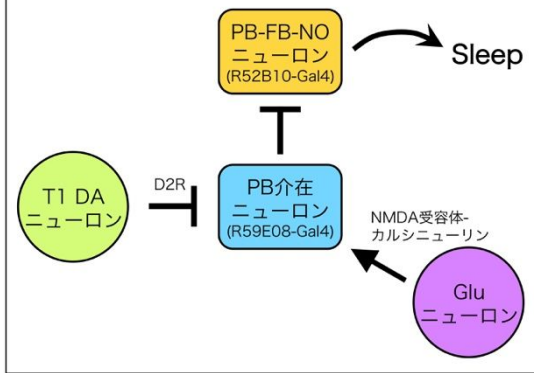
PB には Glu ニューロンも存在する。睡眠を促進する PB 介在ニューロンで、八エの睡眠制御に関わる NMDA 受容体やカルシニューリンをノックダウンしたところ、睡眠量は、カルシニューリンノックダウンでは有意に減少し、NMDA 受容体ノックダウンでは減少傾向がみられた。また、Mg²⁺ブロック変異型 NMDA 受容体を発現させると睡眠量が有意に増加した。(図 3)

図3 睡眠を促進するPB介在ニューロンでの Mg²⁺ブロック変異型NMDA受容体 (dNR1-N631Q) 発現による睡眠量の増加



以上の結果から、睡眠を促進する PB 介在ニューロン群は、D2 受容体シグナルと NMDA 受容体シグナルによって制御され、覚醒を促進する PB-FB-NO ニューロン群を抑制することで睡眠を促進するというショウジョウバエの睡眠-覚醒を制御する新たな神経回路が示された (図 4)。

図4 睡眠-覚醒を制御するPB神経回路



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nomura N, Matsuno K, Muranaka T, Tomita J.	4. 巻 12
2. 論文標題 How Does Time Flow in Living Systems? Retrocausal Scaffolding and E-series Time	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biosemiotics	6. 最初と最後の頁 267-287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12304-019-09363-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hirayama J, Alifu Y, Hamabe R, Yamaguchi S, Tomita J, Maruyama Y, Asaoka Y, Nakahama KI, Tamaru T, Takamatsu K, Takamatsu N, Hattori A, Nishina S, Azuma N, Kawahara A, Kume K, Nishina H.	4. 巻 9
2. 論文標題 The clock components Period2, Cryptochrome1a, and Cryptochrome2a function in establishing light-dependent behavioral rhythms and/or total activity levels in zebrafish.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-37879-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nomura N, Muranaka T, Tomita J, Matsuno K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Time from Semiosis: E-series Time for Living Systems.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biosemiotics	6. 最初と最後の頁 65-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12304-018-9316-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tomita, J., Ban, G., Kume, K.	4. 巻 118
2. 論文標題 Genes and neural circuits for sleep of the fruit fly.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurosci. Res.	6. 最初と最後の頁 82-91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2017.04.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa, T., Tomita, J., Hashimoto, R., Ueno, T., Kume, S., Kume, K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Sweetness induces sleep through gustatory signalling independent of nutritional value in a starved fruit fly.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 14355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-14608-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 富田 淳、坂 豪祐、加藤 善章、糸 和彦
2. 発表標題 ショウジョウバエの睡眠を促進する中心複合体ニューロンの調節機構
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富田 淳、坂 豪祐、加藤 善章、糸 和彦
2. 発表標題 ショウジョウバエの睡眠覚醒を制御する中心複合体の神経回路
3. 学会等名 第63回日本応用動物昆虫学会大会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Tomita, Gosuke Ban, Kazuhiko Kume
2. 発表標題 Identification of sleep-regulating central complex neurons in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun Tomita, Gosuke Ban, Yoshiaki Kato, Kazuhiko Kume
2. 発表標題 Identification of sleep-regulating central complex neurons in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 The 17th European <i>Drosophila</i> Neurobiology Conference - Neurofly 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 富田 淳、坂 豪祐、加藤 善章、桑 和彦
2. 発表標題 ショウジョウバエの睡眠-覚醒を制御する中心複合体の神経回路
3. 学会等名 第25回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomita, J., Ban, G., Kume, K.
2. 発表標題 Identification of sleep-regulating central complex neurons in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 CSHL Meeting Neurobiology of <i>Drosophila</i> (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----