

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：23903
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18H02481
研究課題名(和文) ショウジョウバエの睡眠覚醒制御機構の総合的研究

研究課題名(英文) Sleep-wake regulation mechanism in *Drosophila*

研究代表者

桑 和彦 (Kume, Kazuhiko)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授

研究者番号：30251218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ショウジョウバエを用いた睡眠研究を行い、その結果、睡眠覚醒を制御するT1ドーパミン神経が、脳の中の中心複合体の複数の部位を介して、睡眠中枢を制御する回路を完全に同定した。また、マウスで睡眠を制御するSIK3遺伝子が、ショウジョウバエでは概日周期を制御する時計神経で睡眠を制御することを発見した。この結果は、独立して制御されると考えられてきた概日周期と睡眠恒常性維持機構が、密接な相互関係をもつ可能性を示した。さらに、マウスでは睡眠要求性とリン酸化レベルが相関する遺伝子の一部が、ショウジョウバエでも睡眠制御に関与し、リン酸化レベルも変化することを発見し、種を超える共通点を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちは、その遺伝子の半数以上が人間と共通するショウジョウバエという昆虫をモデル動物とする睡眠の研究を長年続けてきました。今回の研究では、ハエの脳の中でドーパミンという物質が睡眠を制御する新しい回路の一つを完全に解明しました。また、ネズミで睡眠を制御する複数の遺伝子が、ハエでも睡眠を制御することを示し、さらにそれが体内時計とも密接な関係を持つことを発見しました。さらにネズミで眠気に関係する遺伝子が、ハエでも眠気に関係する可能性も示しました。これらの研究結果は、種を超えて睡眠という現象の全貌解明に寄与し、将来的には、睡眠の異常や病気の理解にも貢献する可能性があると考えられます。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted sleep studies in *Drosophila*. We identified the complete circuit of the T1 dopaminergic neuron, which controls sleep-wake, through multiple neurons of the central complex in the brain. We also found that the SIK3 gene, which regulates sleep in mice, regulates sleep in *Drosophila* functioning in a clock neurons that controls the circadian rhythm. These results indicate that the circadian rhythm and sleep homeostasis mechanisms, which have been thought to be independently regulated, may have a close mutual interrelationship. We found that some genes whose phosphorylation levels correlate with sleep demand in mice are also involved in sleep regulation in *Drosophila*, and that phosphorylation levels also change in *Drosophila*, indicating a similarity across species.

研究分野：睡眠医学、時間生物学

キーワード：睡眠 概日周期 ショウジョウバエ 遺伝子 ドーパミン 回路

1. 研究開始当初の背景

睡眠は誰でも毎日数時間を必要とする身近な生理現象であり、睡眠に対する欲求は食欲・性欲に加えて三大欲などとも呼ばれるが、食欲が活動のためのエネルギー摂取、性欲が種の保存に必要と考えられるのに対して、睡眠がなぜ必要かは直観的な解答がない。この「睡眠がなぜ必要か」という問いが睡眠科学の核心をなす。睡眠は一過性・可逆性の意識喪失状態で、覚醒状態の意識を保つためには、哺乳類では脳幹の覚醒中枢からの主にモノアミン性の覚醒シグナルが必要である。その発見から大脳皮質の睡眠覚醒状態を制御する機構の解明は進んだ。しかし、睡眠の必要量を脳のどの部分が決めているかは未解明である。睡眠不足の動物の脳脊髄液を他の動物に投与すると睡眠を誘発するという100年前の研究から、何らかの物質の貯留が睡眠要求(sleep needs)の本体と想定され、世界中で「睡眠物質」の研究が進められ数十種類の候補物質が同定された。しかし生理的な睡眠要求と比例するものは見つからなかったことから、生理的な睡眠と断眠時の変化は異なり、生理的な睡眠要求は単純な物質の蓄積で説明できるものではないと考えられている。睡眠の研究が最終的に目指すのは、この睡眠欲求の本質の解明であり、睡眠の必要性に直接的につながる課題である。睡眠欲求の生成機序の解明のため、遺伝学手法が強力に脳構造が単純なショウジョウバエを使い、睡眠を総合的に理解する研究が、世界的に進められている。特に、哺乳類と昆虫で共通する睡眠関連遺伝子が多数発見され、その機能の解明から得られる結果は、ショウジョウバエだけでなく哺乳類の睡眠にも応用が可能で、さらに単一の神経細胞レベルの遺伝子機能解析が、神経回路から個体の行動レベルに演繹できる個体レベルの系のシステム解析は、睡眠にとどまらず、神経科学全体の発展に寄与する創造性を持つ。

2. 研究の目的

ショウジョウバエをモデル生物とする睡眠研究は、2000年頃から始まり、私たちが世界をリードしてきたが、今では世界中の多くの研究室が対象とする。そこで、独創性が高い研究を続けるため、独自の情報や解析法を用いた研究を進めて、睡眠の総合的な理解を進めることを目的とする。

特に、ショウジョウバエでの睡眠制御機構の全貌の解明のために、睡眠制御回路を単一細胞レベルで解明すること、新規に発見された睡眠関連遺伝子の機能解析により、睡眠要求の分子基盤を理解すること、さらに、睡眠と概日周期制御の関係の解明を行うことを目的とする。

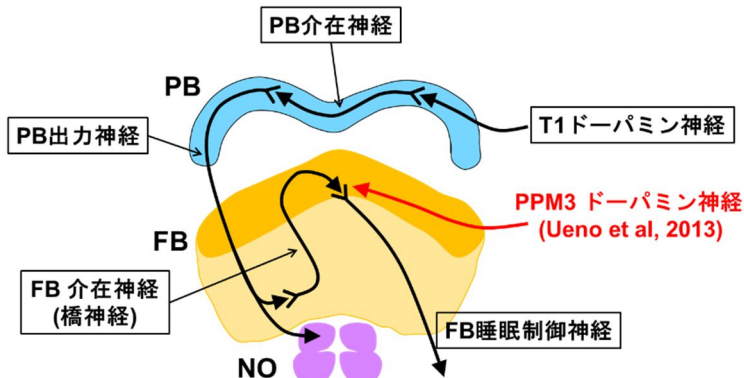
3. 研究の方法

・睡眠と覚醒閾値制御回路の解明：睡眠制御回路の解明のため、複数のモダリティの外部刺激が睡眠や覚醒を誘導する入力経路の詳細な解析と中心複合体の回路の解析を行い、睡眠覚醒の制御機構を分析する。睡眠量は、覚醒から睡眠と睡眠から覚醒への移行の遷移確率で調節され、それぞれ睡眠潜時(=眠気の強さ)と覚醒閾値(=睡眠の深さ)と相関する。私たちは、最近、ショウジョウバエは飢餓状態では睡眠が短縮するが、味覚刺激のみでも睡眠が誘導され、栄養状態は覚醒閾値を別の仕組みで制御することを発見した。さらに味覚(甘味感受性)の一次神経の活性化で睡眠の誘導にも成功した。この飢餓による覚醒閾値低下・甘味刺激による睡眠誘導現象を回路レベルで完全に記載できれば、味覚・栄養状態という因子が睡眠を制御する機構の理解につながる。そこで、分子遺伝学的手法と行動遺伝学的手法を用いて、睡眠制御回路と代謝と行動の関係を解析する。

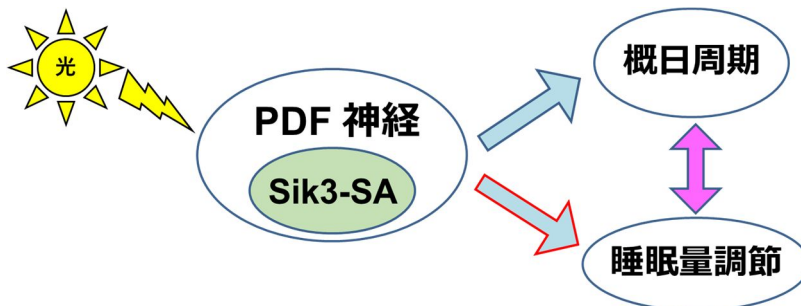
・概日周期と関係する睡眠欲求を生成する機構の解明：概日周期は睡眠の位相(タイミング)を決めるだけで、睡眠は概日周期と独立した機構で量的恒常性を維持すると考えられてきた。しかし、時計は一つではなく、朝と夜は別々の時計が制御し位相差が活動や睡眠量に影響する。このように両者に相互関係があることがわかってきたが、ノーベル賞を受賞したRosbashらは、概日周期中枢のPDF神経が睡眠のprofileも制御することを発表した(Fang et al. Nature 2016)。私たちは、昨年マウスでノンレム睡眠を増やすことが発見されたSik3遺伝子の変異がショウジョウバエでも睡眠を増やすことを報告したが(Funato et al., Nature 2016)、その後の解析でPDF神経だけのSik3遺伝子変異でも、全神経の変異に匹敵する効果が認められたことから、PDF神経が睡眠の恒常性にも関与することを発見した。この結果はRosbashらの報告とも整合性があり、単純な上下関係とされてきた概日周期と恒常性が、複数の態様で相互に影響する複雑な関係で睡眠量を制御することを示す。そこで、分子遺伝学的手法を用いて、概日周期制御系と睡眠制御系の関係を解析する。

4 . 研究成果

・中心複合体の睡眠制御回路の解析: ショウジョウバエの活動制御の中枢と考えられる中心複合体は、PB、EB、FB、NOの各部位に分類され、背側FB(dFB)に睡眠制御中枢があるとされる。私たちはPBが睡眠制御に関係することを発見し、その上流・下流の解析から、下図のような、一連の睡眠制御回路を完全に解明した。この経路では、覚醒を誘導するT1ドーパミン神経が、PB介在神経、PB出力神経、FB介在神経の3つの神経を順に介して、最終的にFBから出力するFB睡眠制御神経に投射することで、睡眠を制御する。神経回路が、詳細に解析できるショウジョウバエにおいても、5つの神経が順に結合して作り出す行動の回路が解明された例は少なく、生物学的な意義が高い。また、T1ドーパミン神経は、闘争や交尾など、睡眠覚醒と異なる行動の制御にも重要であり、それらの行動と睡眠覚醒の制御との相関についても、今後、種々の知見が得られることが期待される。また、以前、私たちが発見したPPM3ドーパミン神経は、直接、FB睡眠制御神経を制御するため、2種類のドーパミン神経系の機能的な分化についても、今後解明が期待される。



・新規睡眠制御遺伝子 SIK3 の機能解析: マウスの遺伝学研究から発見された SIK3 遺伝子は、変異型遺伝子の発現により睡眠が増加する。ショウジョウバエでは、概日周期制御の中心的役割を担う PDF 神経のみで、この変異型遺伝子を発現させても睡眠量が増加することを発見した。さらに、この作用が、明暗周期の存在下では弱く、恒常暗条件、つまり、概日周期の作用が顕在下する条件では、より強く認められること、さらに PDF 神経以外の時計細胞でも認められることを発見した。これらの結果は、右図に示すように、概日周期の中枢と考えられてきた時計細胞が、睡眠量の調節にも直接関与することを示す。これは、従来独立して機能すると考えられてきた概日周期と睡眠の恒常性維持機構が、相互に影響を及ぼしあうことを示し、新しい概念をもたらすと考えられる。



・新規睡眠制御遺伝子の探索と睡眠要求性とリン酸化の関係の解析: マウスの遺伝学・生化学解析から、睡眠の要求性に比例してリン酸化レベルが変化する遺伝子群が同定され、SNIPPs(Sleep Need Index Phosphoproteins, Wang et al Nature 2018) と命名された。これらの遺伝子の機能を調べるため、ショウジョウバエでこれらの遺伝子をノックダウンしてスクリーニングすることで、新規の睡眠関連遺伝子群を発見した。さらに、そのリン酸化レベルを調べたところ、日周期や睡眠状態による変化も認められた。これらは、ショウジョウバエでも、睡眠制御にタンパク質のリン酸化が関係する可能性を示した。今後、詳細に解析を続ける。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 小林里帆, 桑和彦	4. 巻 25
2. 論文標題 睡眠医学の原典：石森國臣論文現代語訳	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 時間生物学	6. 最初と最後の頁 36,40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Hirayama Jun, Alifu Yikelamu, Hamabe Rin, Yamaguchi Sho, Tomita Jun, Maruyama Yusuke, Asaoka Yoichi, Nakahama Ken-ichi, Tamaru Teruya, Takamatsu Ken, Takamatsu Nobuhiko, Hattori Atsuhiko, Nishina Sachiko, Azuma Noriyuki, Kawahara Atsuo, Kume Kazuhiko, Nishina Hiroshi	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 Scientific Reports	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 Hashizaki Masanori, Nakajima Hiroshi, Shiga Toshikazu, Tsutsumi Masakazu, Kume Kazuhiko	4. 巻 35
2. 論文標題 A longitudinal large-scale objective sleep data analysis revealed a seasonal sleep variation in the Japanese population	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chronobiology International	6. 最初と最後の頁 933 ~ 945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/07420528.2018.1443118	査読の有無 無
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 Miyamoto Keisuke, Ishikura Kei-ichiro, Kume Kazuhiko, Ohsawa Masahiro	4. 巻 67
2. 論文標題 Astrocyte-neuron lactate shuttle sensitizes nociceptive transmission in the spinal cord	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 27 ~ 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23474	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 条 和彦
2. 発表標題 睡眠と概日周期研究の最前線～二過程モデルの再考
3. 学会等名 日本麻酔科学会第65回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 条 和彦
2. 発表標題 概日周期と睡眠恒常性維持機構の関係再考～二過程モデルの限界
3. 学会等名 第60回 日本小児神経学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuhiko Kume
2. 発表標題 Circadian rhythm and sleep regulation in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 9th Asian Sleep Research Society Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masanori Hashizaki, Hiroshi Nakajima, Toshikazu Shiga, Masakazu Tsutsumi, Kazuhiko Kume
2. 発表標題 Seasonal changes in sleep revealed by a longitudinal large-scale objective data obtained by contactless sleep monitor.
3. 学会等名 9th Asian Sleep Research Society Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018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
研究 分担 者	富田 淳 (Tomita Jun) (40432231)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・講師 (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------