

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16185

研究課題名(和文) ショウジョウバエ体内時計ニューロンの電気生理・Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>イメージング複合解析研究課題名(英文) Combining Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> imaging and electrophysiology in *Drosophila* circadian pacemaker neurons

研究代表者

森岡 絵里 (MORIOKA, Eri)

富山大学・学術研究部理学系・助教

研究者番号：80756122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：複数のCa<sup>2+</sup>/pH感受性蛍光タンパク質を用いたイメージングおよび電気生理学的解析により、ショウジョウバエの中枢時計ニューロン(LNs)には、細胞内pH濃度リズムが存在し、この振動がGFPベースのセンサータンパク質の蛍光輝度に影響し得ること、細胞内pHと成虫の中枢時計ニューロン(large-LNvs)の神経発火頻度に相関があり、細胞内pH振動が神経活動を駆動していると考えられることを明らかにした。ミトコンドリアイオン輸送体LETM1ノックダウンシステムを用いたこれまでの研究結果と合わせ、ミトコンドリアが細胞内pHリズムと時計遺伝子振動に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ショウジョウバエ体内時計ニューロンにおいて、ミトコンドリア内膜のイオン輸送体LETM1が、約24時間周期の細胞内イオン濃度リズムや時計遺伝子振動に不可欠であることを明らかにした。この成果は、これまで細胞核(時計遺伝子)を主に説明されてきた体内時計の分子振動メカニズムが、ミトコンドリアの強い関与を必要とすることを示すものである。哺乳類の時計中枢ニューロンにおいてもLETM1が同様の機能を果たすことから、本研究は、種を超えた時計中枢ニューロンに固有な細胞メカニズムを明らかにした重要な知見といえる。

研究成果の概要(英文)：Fluorescent imaging analyses using multiple GFP-based fluorescent proteins, including ratiometric Ca<sup>2+</sup>/pH-sensitive fluorescent sensors (Yellow cameleon2.1, deGFP4, GCaMP6s and EYFP), revealed that there is an intracellular pH concentration rhythm in *Drosophila* pupal pacemaker neurons (LNs). We should note the technical difficulties in sensing Ca<sup>2+</sup> with GFP-based Ca<sup>2+</sup> sensors in LNs because most are acid sensitive. Electrophysiological analysis showed that action potential firing of adult pacemaker neurons (large-LNvs) is sensitive to pH perturbations, so circadian pH rhythms in LNs can theoretically influence circadian behavioural rhythms. Together with our previous results using mitochondrial cation antiporter (LETM1) knockdown flies, our findings indicate that mitochondrial LETM1 play an important role in intracellular pH rhythms and clock gene oscillations 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 キロショウジョウバエ イメージング 細胞内イオン濃度 発火頻度 ミトコンドリア

### 1. 研究開始当初の背景

キイロショウジョウバエは、体内時計を支配する時計遺伝子の発見や遺伝子機能解析の分野において、先導的な研究成果を挙げてきたが、時計遺伝子の分子振動がどのようにして細胞内イオン濃度リズムや神経興奮性を制御し、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については、哺乳動物モデルのような実験系は確立しておらず、動物の体内時計機構の総合的理解の障壁となっている。植物細胞 (Johnson et al., 1995) や、哺乳動物の体内時計中枢である視交叉上核 (SCN) ニューロン (Ikeda et al., 2003) には、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に内在性の概日リズムが存在し、これが時計遺伝子の分子振動や代謝リズムと組み合わせることにより、複合的にリズム出力を構築していると考えられているが、ショウジョウバエにおいても、このような普遍的な仕組みにより、体内時計中枢が動いているのだろうか。

### 2. 研究の目的

汎用の 1 波長  $Ca^{2+}$  センサー GCaMP を用いた先行研究から、*in vivo* のショウジョウバエ中枢時計ニューロン (LNs) では、概日細胞内  $Ca^{2+}$  振動が示唆されている (Liang et al, 2016)。一方で自身のこれまでの研究では、より定量性をもつ 2 波長蛍光センサー Yellow Cameleon2.1 を用いて、数日間にわたる連続的イメージングを行い、LNs 内に同様の  $Ca^{2+}$  濃度リズムは検出されず、むしろ細胞内  $H^+$  (pH) が大きく概日振動することを観察した。そこで、本研究では、より選択性の高い蛍光センサーを用いて、LNs の細胞内  $Ca^{2+}/H^+$  濃度リズムを解析すること、電気生理学的手法を組み合わせ、pH 変動が LNs の活動電位発火に及ぼす影響を解析することを目的とし、以下の実験を行った。

### 3. 研究の方法

(1) LNs における細胞内  $Ca^{2+}$  振動の実体を明らかにするために、先行研究で用いられている GCaMP6s を LNs 特異的に発現させたショウジョウバエの脳組織培養を作成し、LNs におけるイメージング実験を行い、先行研究のような蛍光輝度の振動が見られるか、細胞外 pH シフトにより GCaMP6s 蛍光輝度がどのように変化するかを解析した。また、EYFP を発現するショウジョウバエ用いて同様にイメージング実験を行い、見かけ上の蛍光輝度変化が見られる可能性を検討し、GFP 変異体を用いた 1 波長励起 1 波長蛍光型センサーの問題点を明白にした。

(2) LNs における細胞内 pH 振動と神経活動の関係性を明らかにするため、人為的に細胞外 pH を変化させながらパッチクランプ法による電気生理学的解析を行った。さらに、細胞外 pH 変化に伴う、LNs 特異的に発現させたレシオメトリック pH センサータンパク質 (deGFP4) の蛍光輝度変化を指標として、細胞内-外 pH のキャリブレーションを行い、細胞内 pH と神経活動の相関を明らかにした。ミトコンドリア  $K^+/H^+$  交換輸送体 (LETM1) の RNAi ノックダウン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 の役割についても検討した。

(3) RNAi を用いた LNs 特異的な *Letm1* のノックダウンが、細胞内 pH リズムや時計遺伝子振動を変調させることなどが示されていたが、RNAi 効率の評価は行っていなかった。そこで、リアルタイム RT-PCR 法を用いて、*Letm1* に対する RNAi により、*Letm1* mRNA レベルが抑制されるかどうかの評価も実施した。

### 4. 研究成果

(1) 近年広く用いられている 1 波長励起 1 波長蛍光  $Ca^{2+}$  センサーである GCaMP6s を LNs 特異的に発現させたショウジョウバエ系統 (*Pdf-Gal4; UAS-GCaMP6s; cry<sup>b</sup>*) 前蛹の中樞神経系の組織培養を用いて、長期的イメージングを行ったところ、概日性の蛍光輝度変化が観察された (図 1 左)。この結果は、一見、先行研究 (Liang et al, 2016) で報告された *in vivo* のショウジョウバエ中枢時計ニューロンにおける概日細胞内  $Ca^{2+}$  振動の存在を支持する結果のように見える。しかしながら、黄色蛍光タンパク質 EYFP を発現させたショウジョウバエ (*Pdf-Gal4; UAS-EYFP; cry<sup>b</sup>*) を用いて同様のイメージング実験を行った結果、GCaMP6s と類似した輝度変化が観察された (図 1 右)。EYFP の

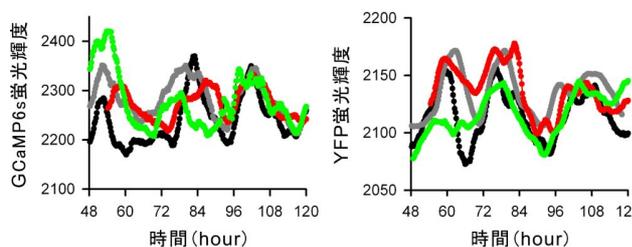


図 1. GCaMP6s(左)および YFP(右)を用いた LNs イメージングで得られた、4 つの異なる LNs における蛍光輝度変化。

励起光は 15 分毎に照射し、*Pdf*-driven GCaMP6s および YFP 蛍光輝度を 72 時間にわたり測定した。励起光による概日時計の攪乱を防ぐため、実験には *cry<sup>b</sup>* バックグラウンドシステムを用いた。GCaMP の蛍光輝度変化は、一見、細胞内  $Ca^{2+}$  の振動を示しているように見えるが、 $Ca^{2+}$  感受性を持たない YFP においても類似した輝度変化が見られたことから、細胞内 pH の変化を検出しているものと考えられる。

蛍光輝度変化は、自身のこれまでの研究で観察した 1 波長励起 2 波長蛍光のレシオメトリック  $\text{Ca}^{2+}$  センサー Yellow cameleon2.1 の平行な蛍光輝度変化と一致するものであり、GCaMP6s の蛍光輝度振動は、 $\text{Ca}^{2+}$  よりもむしろ pH 変化に起因するものであると考えられる。実際に、レシオメトリック pH センサーである deGFP4 を発現させたトランスジェニックバエを用いた実験により、LNs には、pH6.8 から 7.1 付近で振動する概日 pH リズムが存在することを観察している。GCaMP ファミリーを含む GFP ベースのセンサータンパク質は、ほとんどが pH (酸) 感受性であることから、中性からやや酸性の pH 振動を有する LNs において、GFP ベースの  $\text{Ca}^{2+}$  センサーで  $\text{Ca}^{2+}$  測定をするには、技術的な難しさがあることが示された。とくに、GCaMP のような 1 波長励起 1 波長蛍光型センサーでは、観察された輝度変化が pH の影響を受けていないかどうかを、慎重に判断する必要がある。ショウジョウバエ LNs における細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  の概日リズム解析には、酸耐性の蛍光タンパク質ベースの新規センサーを用いた解析が推奨される。

(2) 自身のこれまでの研究により、ミトコンドリア  $\text{K}^+/\text{H}^+$  交換輸送体 (Leucine zipper EF-hand containing transmembrane protein 1; LETM1) に対する RNAi を用いて、LNs 特異的に *Letm1* をノックダウンすると、(i) LNs の細胞内 pH リズムが失われること、(ii)  $\text{LN}_{\text{vs}}$  の時計タンパク質 PER および TIM 発現リズムが変調すること、(iii) 歩行活動リズムのフリーラン周期が長周期化することなどを明らかにしてきた。しかしながら、これまでの実験では、これらの *Letm1* ノックダウンによる影響が、RNAi により当該遺伝子が抑制されたことによるものであるかどうかを確認する実験を欠いていた。そこで、*Letm1* ノックダウンにより *Letm1* mRNA 発現レベルが抑えられているかどうかを検証した。上記の実験では、中枢時計ニューロン特異的な発現を誘導する異所性発現ドライバーとして、*Pdf-Gal4* ドライバーを使用しているが、中枢時計ニューロンのみを回収して RNA を抽出することは技術的に困難である。そこで代替として、広く使用される全神経発現ドライバーである *Elav-Gal4* を用いて *Letm1* RNAi を発現させた系統 (*Elav-Gal4/CyO; UAS-Letm1<sup>RNAi</sup>*) の脳から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 解析を行った。その結果、有意な *Letm1* mRNA 発現量低下がみられ (図 2)、上述した細胞内イオン濃度リズム、分子時計リズム、行動リズムにおける異常が、RNAi による *Letm1* ノックダウン効果によるものであることが確認された。

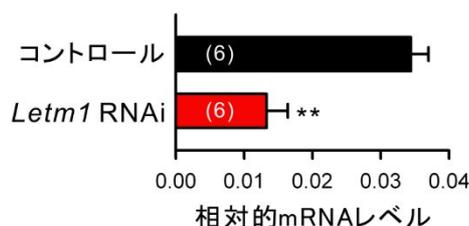


図 2. *Letm1* RNAi によるノックダウンの評価。リアルタイム RT-PCR 法を用いた、コントロールおよび *Elav*-driven *Letm1* ノックダウン系統の脳における *Letm1* mRNA 発現量。内部標準 *rp49* に対する相対的レベルを評価した。ノックダウンにより有意に *Letm1* mRNA 発現量が抑制されていることが示された。\*\* $P < 0.01$  by the Mann-Whitney U-test.

(3) ホールセルパッチクランプ法を用いた自身のこれまでの研究において、成虫ペースメーカーニューロン large- $\text{LN}_{\text{vs}}$  の自発的発火頻度が、細胞外 pH 依存的に変化することが示されていた。しかしながら、細胞外 pH を変化させたときに、緩衝作用を持つ細胞内 pH がどのように変化しているかどうかについては、未検証のままであった。ホールセルモードで直接的に細胞内 pH を変化させることはできないため、 $\text{LN}_{\text{vs}}$  特異的に発現させたレシオメトリック pH センサー deGFP4 の蛍光輝度を指標として、細胞内-外 pH の相関関係をキャリブレーションし、細胞内 pH 推定を試みた。その結果、コントロール系統 (*pdfGal4-p12c*) では細胞内 pH と発火頻度に正の相関が示されたのに対し (図 3)、*Letm1* ノックダウン系統 (*pdfGal4-p12c; UAS-Letm1<sup>RNAi</sup>*) ではその相関が失われることが示された。pH7.3 (スタンダードな細胞外 pH 条件) における large- $\text{LN}_{\text{vs}}$  の平均発火頻度は、コントロール ( $5.67 \pm 0.60$  Hz) に比べ、*Letm1* ノックダウン ( $4.32 \pm 0.45$  Hz) のほうが有意に低い結果となった。上述したように、pH センサー deGFP4 を用いたイメージングにより観察された

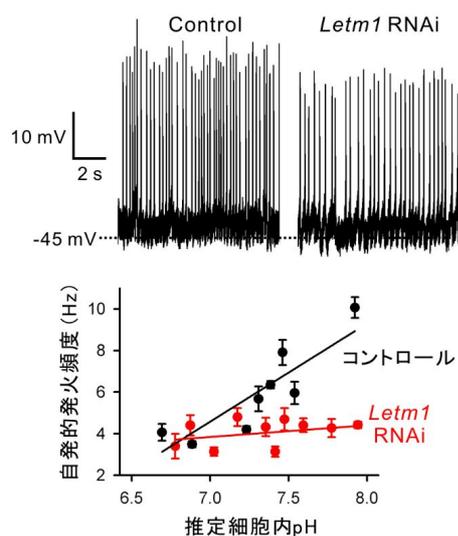


図 3. LNs の自発発火頻度の pH 依存性。(上) 細胞外 pH7.3 条件下におけるコントロールおよび *Letm1* ノックダウン LNs の代表的な 10 秒間の神経発火。(下) 推定細胞内 pH 変化に対する LN 自発的発火頻度。蛍光 pH センサーである deGFP4 の蛍光輝度を指標として細胞内 pH を推定した。コントロール:  $N = 9-39$ , ノックダウン:  $18-54$ .

LNsの概日pHリズムは、昼間に中性(pH7.1-7.2)を示し夜間に弱酸性化(pH6.8付近)する。このリズムは*Letm1*ノックダウンにより抑制され、時刻にかかわらずpH6.9-7.0で推移し、昼間の*Letm1*ノックダウンLNsの細胞内pHはコントロールに比べ酸性化していることが示されている。電気生理学的実験はすべて昼間に実施しており、pH7.3条件下での自発的発火頻度が*Letm1*ノックダウンで低いという結果は、概日pHリズムの結果と矛盾しない。これらの結果より、細胞内pH変動がLNsの活動電位リズムを駆動するものと考えられる。

電気生理・Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>イメージングを用いた本研究および自身のこれまでの研究により、ショウジョウバエの中枢時計ニューロンには、夜間に弱酸性化する細胞内pHリズムが存在することを突き止めた。また、RNAiノックダウンシステムの解析を通じて、この細胞内イオン濃度リズムの震源を解析し、ミトコンドリア内膜に発現するK<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体LETM1が決定的な役割を果たしていることを明らかとした。さらに、電気生理学的実験から、細胞内pHリズムが中枢時計ニューロンの自発的発火頻度リズムを制御していることを示した。また、免疫組織学的解析により、*Letm1*をノックダウンした中枢時計ニューロンでは、時計遺伝子発現リズムが変調することを観察している。加えて、これらのキイロショウジョウバエ時計中枢ニューロンで得られた知見が、哺乳類の時計中枢(視交叉上核)ニューロンにおいても当てはまるかどうかについては、分担研究者として参画した研究にて実験が終了しており、*Letm1*をノックダウンしたラットの視交叉上核ニューロンにおいても、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度リズムや時計遺伝子リズムが大きく減衰することが明らかとなった。ミトコンドリアは、エネルギー産生を行うオルガネラであり、これらの研究成果は、時計遺伝子の振動、細胞内イオン濃度リズム、代謝リズムがミトコンドリアLETM1により三つ巴の関係で連動して動いていることを示唆している(図4)。

本研究期間において、以上のショウジョウバエと哺乳類を用いた研究成果を合わせて学術論文を執筆、投稿した。本研究期間内には間に合わなかったが、中枢時計ニューロンにおける細胞内イオン濃度および時計遺伝子振動がミトコンドリアLETM1により制御されることを明らかとした研究成果は、2022年5月に原著論文として掲載された(Morioka et al., 2022 *Cell Reports*)。

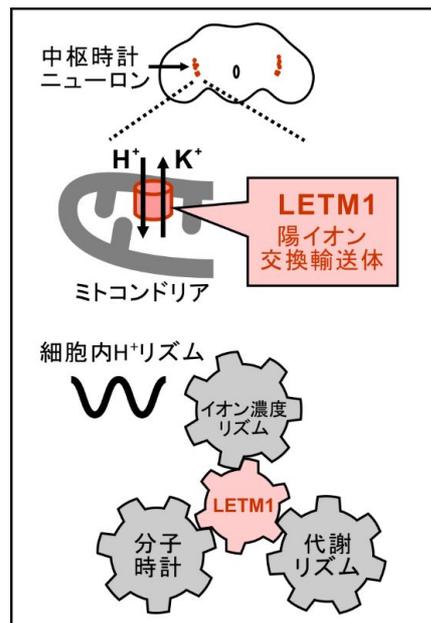


図4. 中枢時計ニューロンの体内時計機構におけるLETM1の役割。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Morioka Eri, Kasuga Yusuke, Kanda Yuzuki, Moritama Saki, Koizumi Hayato, Yoshikawa Tomoko, Miura Nobuhiko, Ikeda Masaaki, Higashida Haruhiro, Todd C. Holmes, Ikeda Masayuki | 4. 巻<br>39           |
| 2. 論文標題<br>Mitochondrial LETM1 drives ionic and molecular clock rhythms in circadian pacemaker neurons   | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>Cell Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>110787 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.celrep.2022.110787  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する         |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Koizumi Hayato, Mohammad Shahid, Ozaki Tomoya, Muto Kiyokazu, Matsuba Nanami, Kim Juhyon, Pan Weihong, Morioka Eri, Mochizuki Takatoshi, Ikeda Masayuki | 4. 巻<br>10          |
| 2. 論文標題<br>Intracellular interplay between cholecystokinin and leptin signalling for satiety control in rats  | 5. 発行年<br>2020年     |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>12000 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41598-020-69035-6   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>池田真行, 森岡絵里                                   |
| 2. 発表標題<br>ミトコンドリア・カチオンアンチポーターLetm1を介した体内時計ペースメーカーの振動制御 |
| 3. 学会等名<br>第99回日本生理学会大会                                 |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>森岡絵里, 池田真行  |
| 2. 発表標題<br>Disrupted temperature compensation by mitochondrial LETM1 knockdown in Drosophila pacemaker neurons |
| 3. 学会等名<br>第28回日本時間生物学会学術大会  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Morioka E, Moritama S, Miyajima R, Murayama N, Todd C. Holmes and Ikeda M.   |
| 2. 発表標題<br>Mitochondrial LETM1 drives core ionic rhythms in circadian pacemaker neurons |
| 3. 学会等名<br>Toyama Forum for Academic Summit on “Dynamic Brain” (国際学会)                   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>森岡絵里, Todd C. Holmes, 池田真行   |
| 2. 発表標題<br>Mitochondrial LETM1 drives intracellular proton rhythm in Drosophila pacemaker neurons |
| 3. 学会等名<br>第26回日本時間生物学会学術大会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>小泉隼人, 森玉早貴, 宮嶋梨沙, 村山望, 森岡絵里, 池田真行                                      |
| 2. 発表標題<br>Effects of mitochondrial LETM1 knockdown on cytosolic calcium dynamics |
| 3. 学会等名<br>第26回日本時間生物学会学術大会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

〔図書〕 計1件

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>森岡 絵里、池田 真行 (編集: 梶村 真吾、小川 佳宏、矢作 直也)  | 4. 発行年<br>2021年 |
| 2. 出版社<br>羊土社  | 5. 総ページ数<br>230 |
| 3. 書名<br>個人差の理解へ向かう肥満症研究 ~ GWAS、エピゲノム、腸内細菌、栄養学的知見から多様な病態を解明し Precision Medicineをめざす 第2章2. 摂食抑制ペプチドとしてのコレシストキニンとレプチンの相互作用 |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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

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 |
|---------|---------|