

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23870021

研究課題名（和文）

キイロショウジョウバエの光同調に関する脳時計神経ネットワークの解明

研究課題名（英文）

Analysis of the circadian brain network responsible for light entrainment in *Drosophila melanogaster*

研究代表者

吉井 大志 (YOSHII TAISHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：50611357

研究成果の概要（和文）：

キイロショウジョウバエの概日時計機構は複数の光入力系を持ち、その中でも CRY タンパク質を介する光入力是最も重要な光同調経路である。本研究ではハエが時差ボケから回復するまでの日数を解析し、CRY タンパク質がどの神経細胞で働いているのかを調べた。我々は脳内の時計細胞の一群である背側に位置する LN 細胞で CRY が発現することで、時差ボケの回復が早まることを見出した。このことより、ショウジョウバエには時差ボケから早く回復するための神経機構があることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The fruit fly *Drosophila melanogaster* has multiple light-input pathways for light entrainment for the circadian clock. Especially, a blue light photo-pigment Cryptochrome (CRY) plays an important role in the pathway. Here, we investigated the brain neural network responsible for the CRY-dependent light entrainment. We found that a subset of pacemaker neurons promotes recovery from 8 h Jetlag in *Drosophila*, suggesting that there is a neural mechanism involved in the speed of light-entrainment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：動物生理・行動

キーワード：概日時計・体内時計・キイロショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

動物の概日時計の中核は脳に存在する。ヒトの中核時計、視交叉上核 (SCN) は約60,000個の神経細胞から成り、それらが協調して働くことで、位相のそろったリズムを作り出す

と考えられている。一方で、キイロショウジョウバエの中核時計は約150個の神経細胞から成り、他のモデル脊椎動物と比較してもかなり少数の神経細胞群によって構成されている。したがって、時計細胞間コミュニケーション

オンを研究する上でショウジョウバエは大変有用なモデル生物である。

ショウジョウバエの時計細胞は大きく分けて、8つの細胞群に分類されている(図1)。それらは細胞の場所やサイズによって分類

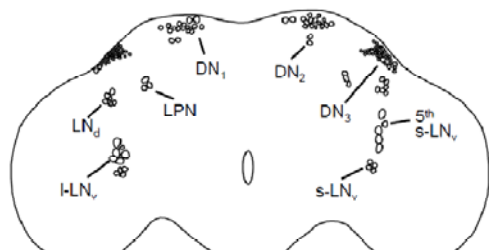


図1. ショウジョウバエ脳内時計細胞群

されているだけであり、機能によって区別されているものではない。現在、それぞれの細胞群の機能について分かっていることは

(1) s-LNv

- ①最も重要な時計細胞群
- ②朝方の活動リズムに重要な役割
- ③神経ペプチド PDF を発現する

(2) l-LNv

- ①睡眠覚醒
- ②光同調
- ③PDF の発現

(3) LN_d & 5th s-LNv

- ①夕方方の活動リズムに重要な役割

(4) 一部の DN & LPN

- ①温度サイクルへの同調に重要

である。

これらのことから 150 個の時計細胞は機能分化しており、協調して働くことで、正常な概日リズムを生み出すことができると考えられている。

我々は自身の研究を下に、時計神経細胞ネットワークは様々に変化する環境変化に対応するために重要であるという説を発表した (Yoshii et al., 2009; 2010, J Biol Rhythms)。概日時計は日周変化する環境に

対して同調することができる。特に光と温度への日周変化に対する同調性が高く、これにより外部環境に適応したリズムを生み出すことができる。しかし野外では光、温度ともに変化は一定ではなく、天候や季節に大きく依存する。従って、概日時計の光や温度に対する応答性にはある程度の柔軟性が存在するはずである。しかし、概日時計細胞群がどうネットワークを形成し光同調、温度同調を行うのかは全く明らかになっていなかった。

ショウジョウバエ概日時計の光同調経路は青色光受容タンパク質 **Cryptochrome (CRY)** によるものが主要な役割を担っている。CRY は脳内時計細胞で発現し、脳内で直接光を受容する。光を受けた CRY は時計タンパク質の一つである **TIMELESS (TIM)** と結合し、TIM を崩壊へと導く。我々は最近の研究で、時計細胞群の中には CRY を発現しないものがあることを明らかにしている (Yoshii et al., 2008, J Comp Neurol)。

そこで、CRY 依存的に光入力をした時計細胞群がどのような経路によって光情報を時計ネットワーク全体に伝達していくのが大きな疑問となった。

2. 研究の目的

キイロショウジョウバエ概日時計の神経ネットワークは徐々に解明されつつあるが、依然として総合的な理解がされるまでには至っていない。本研究では、キイロショウジョウバエ概日時計を構成する神経ネットワークの機能解析を行うために、概日行動リズムの光同調性と CRY 陽性時計細胞群に着目した。

CRY は 150 個ある脳内時計細胞の約半数で発現しているが、行動リズムへの重要性が明らかになっている s-LNv や LN_d 細胞群で特に発現している。従って、他の CRY を発現しない時計細胞群の光同調は CRY 陽性時計細胞群の

一部によって制御されている可能性が考えられる。そこで、キイロショウジョウバエ特有の遺伝学研究ツールGAL4-UASシステムを用いて、時計細胞群の一部でのみCRYを強制発現させ、行動リズムの光同調性を評価し、CRY依存型の光同調機構に最も重要な時計細胞群を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1)CRYを特定の時計細胞だけで発現するトランスジェニック系統の作製

GAL4-UASシステムを用いて(Duffy, 2002)、*cry*遺伝子を*cry*突然変異体(*cry⁰¹*)下で発現させる。その際に使用するGAL4系統は時計細胞の様々な場所で発現する系統を選抜した。

- ① *tim-GAL4*: すべての時計細胞
- ② *cry-GAL4*: CRY陽性細胞
- ③ *Mai179-GAL4*: s-LNv, 5th LNv, LNd, l-LNv
- ④ *Pdf-GAL4*: s-LNv, l-LNv
- ⑤ *r6-GAL4*: s-LNv
- ⑥ *npf-GAL4*: 5th s-LNv, LNd, l-LNv
- ⑦ *trpA1-GAL4*: LNd
- ⑧ *Clk4.1M-GAL4*: DN1p
- ⑨ *Mai179-GAL4, Pdf-GAL80*: 5th s-LNv, LNd

これらすべての系統に*cry⁰¹*遺伝子背景を持たせ、*uas-cry;cry⁰¹*と交配することにより、特定の時計細胞群で*cry*遺伝子をレスキューした。

(2)歩行活動リズムの測定

市販されているショウジョウバエ用の歩行活動リズム計測装置DAM2(Trikinetics社)を用いて計測を行った。まず、それぞれの系統を明期16時間：暗期8時間(LD 16:8)、温度一定の環境下で7日間同調させる。その後、明暗

サイクルを8時間後退させることによりハエに時差ボケを与える。

(3)免疫染色によるTIMタンパク質の時計細胞群依存的な光による分解

様々な長さの光パルスを与え(図2)、抗TIM抗体を用いて免疫染色を行い、脳内の時計細胞群におけるTIMの分解の速度を計測した。蛍光抗体法によりTIMは標識され、サンプルは共焦点レーザー顕微鏡によってスキャンした。その後、画像解析ソフトImageJを用いて、染色画像のシグナルの輝度をそれぞれの時計細胞群から測定した。



図2. TIM分解と光パルスの長さの関係
白い部分を明期、黒い部分を暗期として、暗期の後半(ZT19~ZT21:光がオンになってから19~21時間後)に光パルスを与えた。

4. 研究成果

(1)LNdと5th s-LNv時計細胞は時差ボケからの回復を促進する。

コントロール系統として使用した*w*変異体は光サイクルの8時間の位相後退に対して、約1~2日で再同調する。

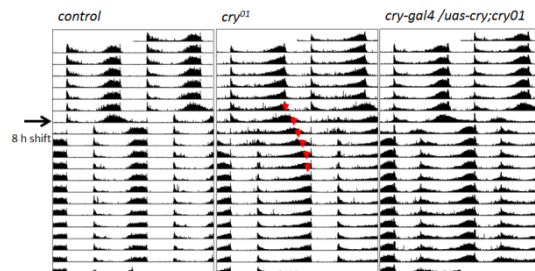


図3. 8時間の時差ボケによる行動リズムへの影響
コントロール個体(左)は時差ボケからすぐに回復するが、*cry⁰¹*変異体(中)は数日間必要となる(赤の矢印)。*cry*をレスキューした個体では時差ボケの回復速度がコントロールと同様になっている。

一方、*cry⁰¹*変異系統は再同調に約7日間必要とする。*cry⁰¹*変異系統に*cry-GAL4/UAS-cry*を用いてCRY発現細胞に*cry*遺伝子を発現させると、コントロール系統同様に、約1日で新

しい位相の光サイクルに同調することが可能となった(図3)。従って、GAL4-UASシステムによるcry遺伝子発現のレスキューは有効であることが認められる。

そこで、上記のGAL4システムを用いて特定の時計細胞群にのみcry遺伝子を回復させ、光サイクルへの再同調性を計測した。再同調の速度を評価するために、夕方に起こる活動ピークが光サイクルの位相後退後一日目に、どの程度位相後退するかをそれぞれの系統から測定した(図4)。

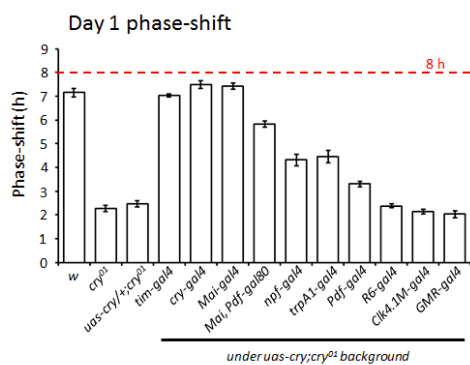


図4. 時差ボケ実験一日目における夕方の活動ピークの位相後退w変異体はコントロールとして用いた。

その結果、cry遺伝子をLN細胞群にのみ発現させた場合においては、再同調の速度が促進された。その中でも特にLNdと5th s-LNV細胞群におけるcry発現が再同調に掛かる時間を短縮することが分かった。このことから、ショウジョウバエの脳内にはCRY依存的に光への同調を促進するための時計細胞群があることが示唆される。

(2)各時計細胞群におけるTIMの光パルスによる分解。

cry遺伝子発現を特定の時計細胞に限定して行った上記の行動実験では、LNdや5th s-LNVがショウジョウバエ概日リズムの光同調に重要な役割をすることが分かった。CRYは光依存的にTIMタンパク質に結合し、TIMを分解に導くとされている(Peschel and

Helfrich-Förster, 2011)。そこで、光によるTIMの分解速度には時計細胞群依存性がある可能性を考え、光パルスによるTIMの分解速度をそれぞれの時計細胞群で、免疫染色法を用いて解析した(図5)。図5ではs-LNV細胞群におけるTIMの分解を示している。

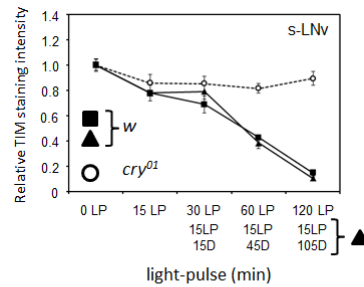


図5. 光パルス後のTIMの分解速度
どの条件の光パルスにおいてもTIMの分解は約2時間必要であった。

光パルスによるTIMの分解はCRYに依存しており、cry⁰¹系統においては光パルス後もTIMの分解は見られなかった。コントロール系統においては光パルス後から直線的にTIMが分解していき、その分解には約2時間必要であることが分かった。様々な長さの光パルスを与えてもこの2時間の分解時間は変わらなかった。このTIMの分解速度はどの時計細胞群においても同様であり、細胞群間では違いは見られなかった。従って、LNdと5th s-LNVにおけるCRY依存的な光同調の促進は、単にTIMの分解速度によるものではないことが明らかとなった。

(3)研究成果の位置づけ・インパクトと今後の展望

比較的単純な脳の構造を持つキイロショウジョウバエにおいても、概日時計を構成する神経ネットワークの解明はまだ入口に差し掛かったところと言っても良い。本研究の成果は、ショウジョウバエ概日時計神経ネットワークの光同調機構の理解において重要な意味を持つ。これまで、ショウジョウバエ概

日時計は遺伝学・分子生物学的な研究を中心に行なわれており、光同調のメカニズムもCRY-TIMのタンパク質レベルで説明されてきた。しかしながら、本研究の成果によって、CRY-TIMの光同調経路には細胞依存性があることが分かった。今後は、一部の時計細胞群で得られた光情報がどのようにして、150個ある時計細胞全体に拡散していくのかという問いが重要となってくる。時計細胞間ネットワークを構成する神経伝達物質の同定などによって、時計細胞間のコミュニケーションを理解することで、ショウジョウバエをモデルとした概日時計神経ネットワークの総合理解が進むと考えられる。

参考文献

Duffy (2002) *Genetics*, 34: 1-15
Peschel, Helfrich-Förster (2011) *FEBS letters*, 585: 1435-1442
Yoshii et al., (2008) *J Comp Neurol*, 508: 952-966
Yoshii et al., (2009) *J Biol Rhythms*, 24: 452-464
Yoshii et al., (2010) *J Biol Rhythms*, 25: 387-398

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

① Kistenpennig C, Hirsh J, Yoshii T, Helfrich-Förster C (2012) Phase-shifting the fruit fly clock without Cryptochrome. *Journal of Biological Rhythms* 27: 117-125 査読有
② Bywalez W, Menegazzi P, Rieger D, Schmid B, Helfrich-Förster C, Yoshii T (2012) The dual oscillator system of

Drosophila melanogaster under natural-like temperature cycles. *Chronobiology International* 29: 395-407 査読有

③ Menegazzi P, Yoshii T, Helfrich-Förster C (2012) Laboratory vs Nature: The Two Sides of the *Drosophila* Circadian Clock. *Journal of Biological Rhythms* 27: 433-42 査読有

④ Tomioka K, Uryu O, Kamae Y, Umezaki Y, Yoshii T (2012) Peripheral circadian rhythms and their regulation mechanism in insects and some other arthropods: a review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, systemic, and environmental physiology* 182 (6): 729-740 査読有

⑤ Uryu O, Kamae Y, Tomioka K, Yoshii T (2013) Long-term effect of systemic RNA interference on circadian clock genes in hemimetabolous insects. *Journal of Insect Physiology* 59: 494-499 査読有

[学会発表] (計5件)

① 吉井大志, Schmid B, Helfrich-Förster C, 新規の概日リズム解析プログラム ActogramJ、第82回日本動物学会 北海道旭川市大雪クリスタルホール 2011年9月21日~23日

② 吉井大志, Hermann C, Dircksen H, Helfrich-Förster C、ショウジョウバエNPF陽性時計細胞は夕方の活動と自由継続周期に関与する。、第18回 日本時間生物学会学術大会 愛知県名古屋市名古屋大学 2011年11月24日・25日

③ Yoshii T, Hanafusa S, Umezaki Y, Tomioka K. Sexual interaction influences circadian activity pattern in *Drosophila*

melanogaster. SRBR 2012 Society for Research on Biological rhythms, Destin, Florida, U.S.A, May 19-23, 2012

④ Yoshii T. The neuronal network of the circadian clock and its synchronization to environmental cycles in *Drosophila melanogaster*. 第 83 回日本動物学会 大阪府豊中市大阪大学豊中キャンパス 2012 年 9 月 13 日～15 日

⑤ 吉井大志、CRYが関与するキイロショウジョウバエ概日時計の磁気受容、第 19 回日本時間生物学会学術大会 北海道札幌市北海道大学 2012 年 9 月 15 日・16 日

〔図書〕(計 1 件)

Yoshii T, Rieger D, Helfrich-Förster C. Elsevier, Neurobiology of Circadian Timing. (2012) Two clocks in the brain –an update of the Morning and Evening oscillator model in *Drosophila*. In: Andries Kalsbeek, Martha Merrow, Till Roenneberg and Russell G. Foster, editors: Progress in Brain Research, Vol. 199, pp. 59-82

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biol.okayama-u.ac.jp/tomioka1/top.html>

<http://actogramj.neurofly.de/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉井 大志 (YOSHII TAISHI)
岡山大学・大学院自然科学研究科・助教
研究者番号：50611357

(2) 研究協力者

富岡 憲治 (TOMIOKA KENJI)
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号：30136163