

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290007

研究課題名(和文) ショウジョウバエを用いた自発的覚醒・睡眠制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of sleep-arousal regulation in *Drosophila melanogaster*

## 研究代表者

条 和彦 (KUME, KAZUHIKO)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・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)：モデル生物として注目されているショウジョウバエの睡眠覚醒制御機構を解析した。まず、学習・記憶に重要なNMDA型グルタミン酸受容体が睡眠制御にも働くことを示し、睡眠と記憶の関連について新たな可能性を示した。また、空腹時には睡眠が減るが、ハエの場合、人工甘味料でも睡眠が誘導された。一方、甘味だけでは睡眠が深くならなかった。このことから、甘味だけで睡眠は誘導されるが、睡眠の安定には栄養成分が重要なことが示された。また、ヒトでも睡眠を深める作用が知られているグリシンが、ハエでも強く睡眠を誘導することがわかり、ハエは人間の睡眠の良いモデル動物になることが確認された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the sleep-arousal mechanism of a fruit fly, *Drosophila melanogaster*, which has been noted as a model for sleep study. First, we identified NMDA glutamate receptor as a novel sleep regulating gene. This provides a clue to the relationship between sleep and memory. Next we found that artificial sweeteners, but not non-sweet nutritive saccharides, induced sleep in fasting flies. Activation of sweet-receptor expressing neurons also induced sleep. Arousal threshold, however, was not reversed in artificial sweetener-fed flies. These results suggests that sweetness facilitates the transition from arousal to sleep, while the nutritional state, i.e. satiety inhibits that from sleep to arousal. In addition, we found glycine induces sleep in flies similarly in mammals, re-confirming that fruit fly can serve as a good model animal for sleep study.

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 ドーパミン グルタミン酸受容体 学習記憶 概日周期 生物時計

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類の睡眠制御の基礎科学研究は 100 年以上前の睡眠物質の発見に始まるが、睡眠の生理的意義や、なぜ一定量の睡眠が必要かについての明確な説明はまだされていない。近年、無脊椎動物で睡眠様行動が記載され、遺伝学的操作に優れたショウジョウバエが睡眠研究にも用いられるようになった。

(2) 私たちはショウジョウバエの睡眠研究が始まった 2000 年頃からパイオニアとして、この分野の研究を続けてきた。2005 年にはドーパミントランスポーター変異が睡眠時間の短縮を起こすことを報告し、哺乳類で覚醒制御に使われるモノアミン類が、ショウジョウバエでも覚醒制御に使われることを世界で初めて示した (Kume et al. J. Neurosci 2005)。この発見により、ショウジョウバエの睡眠は、単に行動学的に哺乳類の睡眠と似ているだけではなく、分子レベルでの制御機構にも相同性があることが証明された。

(3) その後、世界中のグループが参入して、睡眠研究が進んだ。私たちも、本研究課題の前の課題 (平成 22 ~ 24 年度・基盤 B) で、ドーパミントランスポーター以外の睡眠制御遺伝子として、カルシニューリン (Tomita et al. J. Neurosci 2010)、JNK (Takahama et al. BBRC, 2011) の関与を報告し、さらにドーパミン神経の覚醒回路も同定した (Ueno et al. Nat Neurosci 2012)。

2. 研究の目的

(1) 本研究課題では、ショウジョウバエの睡眠制御機構の解明を目的として、特に睡眠状態から覚醒状態への移行機構を解析する。

(2) その目的のため、遺伝学的手法として、新規の睡眠覚醒制御遺伝子の探索とその機能解析、神経学的手法として、睡眠覚醒制御回路の解析、さらに、行動生理学的手法として、種々の生理的条件下での睡眠覚醒状態の解析、および、覚醒閾値計測法の開発を、目的とする。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエの系統と飼育

野生型は、Canton-S 由来の w1118 系統 (2202u) を用いた。トランスジェニック個体はストックセンターなどから取得し、野生型系統に 5 代以上の戻し交配を行ったものを使用した。飼育は定法通り、コーンミール・酵母・小麦胚芽・ブドウ糖などを含む寒天培地で、明暗サイクル (12 時間:12 時間) 25 度で行った。

(2) 睡眠計測

歩行活動の記録は、Trikinetics 社製のショウジョウバエ活動モニター (DAM: Drosophila Activity Monitor) を用いて行

った。ハエを一匹ずつ、長さ 65mm、内径 3mm のガラスチューブに入れて、中心部の赤外線ビームを横切る回数を毎分取得し、5 分以上連続して静止状態が続く場合を睡眠と定義した。測定時のエサは、1%の寒天をベースとして、それぞれの糖類を加えた。アミノ酸の実験では、5%のショ糖に、それぞれのアミノ酸を添加した。

(3) 覚醒閾値計測

睡眠計測と同サイズで側面の一端から 5mm の部位に直径 0.5mm の穴を開けたプラスチックチューブを作成して使用した。穴から遠い端側を 32 本のチューブに同時にガスを送るガスケットにつなぎ、活動モニター (DAM2) にセットし、ハエを入れた後、側面の穴に近い端はキャップで覆い、歩行活動を記録しながらガスケット側から、空気、または、オクタノールの匂いを加えた空気を送り、覚醒閾値を調べた。覚醒閾値は、刺激前に睡眠中だったハエの中で、刺激に反応して活動を始めたハエの割合として計算した。

4. 研究成果

(1) 新規睡眠制御遺伝子としての NMDA 受容体遺伝子の機能解析

睡眠制御機能をもつ新規遺伝子の候補群のスクリーニングを行った結果、図 1 に示すように、RNA 干渉法を用いて全神経細胞で NMDA 受容体の発現抑制を行うと、睡眠量が減少することを発見し、NMDA 受容体遺伝子は、新たな睡眠制御遺伝子と考えられた。

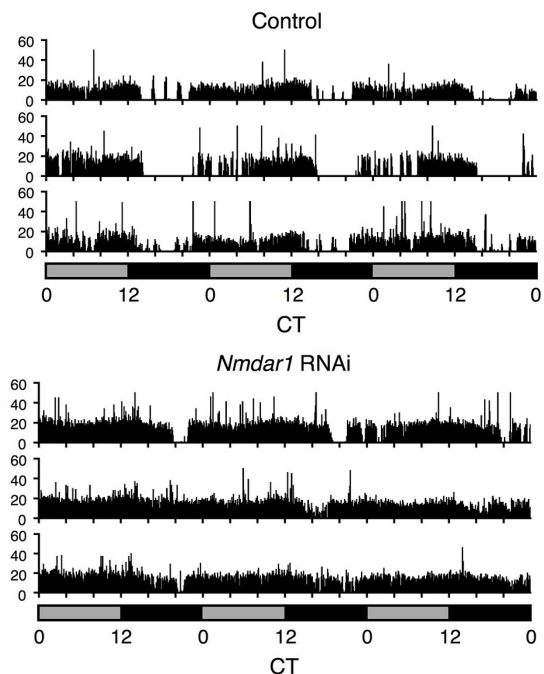


図 1. NMDA 受容体遺伝子の発現抑制による睡眠量の減少: 縦軸は 1 分間の活動量、横軸は時間 (恒常暗条件 3 日間) を示す。上段は、コントロール、下段は全神経で Nmdar1 遺伝子の発現を抑制した個体、それぞれ 3 匹ずつの活動記録を示す。

NMDA 受容体は哺乳類、ショウジョウバエの両者で学習・記憶に重要な役割を果たすことが示されていることから、睡眠と記憶という二つの生理機能を結びつける役割をもつ可能性が示された(Tomita et al. PLoS One, 2015)。

### (2) 糖類による睡眠制御

初日(Pre)に5%シヨ糖を与え、その後水分のみ、または各種の糖分を与えて飼育した時の2日間(Day1, Day2)の睡眠量の時間変化を図2 Aに示す。エサの交換後24時間以上経過すると睡眠量の変化が顕著になるため、24時間後から36時間後の総睡眠量(図2 B)を定量したところ、絶食群はシヨ糖を与えた群に比べて睡眠が減少し、エサを求めて動き回る状態になると考えられた。シヨ糖の代わりに甘味はあるが栄養とならない人工甘味料のスクラロースやアラビノースを与えた群でも、絶食による睡眠量減少が抑制された。一方、栄養はあるが甘味がないソルビトールでは、絶食群と同様に睡眠量が減少した。

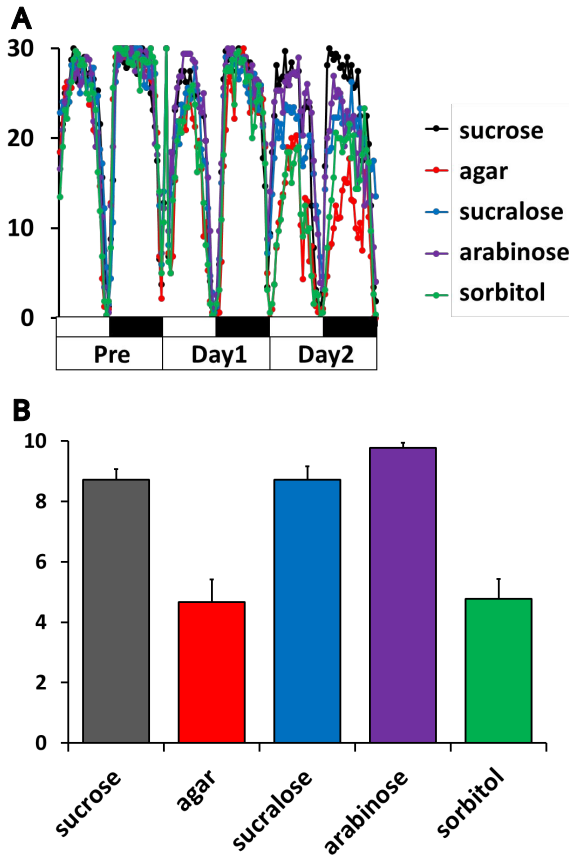


図2. 各種糖類投与時の睡眠量変化: シヨ糖群(sucrose)に比べ、絶食群(agar)では、Day2から睡眠量が減少するが、人工甘味料投与群(sucralose, arabinose)では減少しない。A: 時系列データ。縦軸は30分あたりの睡眠量を示す。B: 睡眠量の定量、縦軸はDay2前半12時間あたりの総睡眠量を示す。

### (3) 糖類による覚醒閾値制御

この実験では、弱い空気の流れや匂いによる刺激を与えて覚醒閾値を計測できる系を新たに樹立して、各種の糖類の影響を調べた。図3に示すように、通常のシヨ糖を投与された群では、ほとんど反応しない程度の弱い空気の刺激でも、飢餓状態では覚醒する個体が25%以上認められた。この覚醒閾値の低下(反応性の上昇)は、スクラロースなどの人工甘味料投与では抑制されず、栄養のあるソルビトールの投与では、やや抑制された。データには示さないが、強い匂い刺激を与えたところ、シヨ糖投与群と、飢餓状態群などでの差がなくなることから、強い刺激に対する覚醒反応には差がなかった(長谷川ら、Cold Spring Harbor Meetingにて発表、2015)。

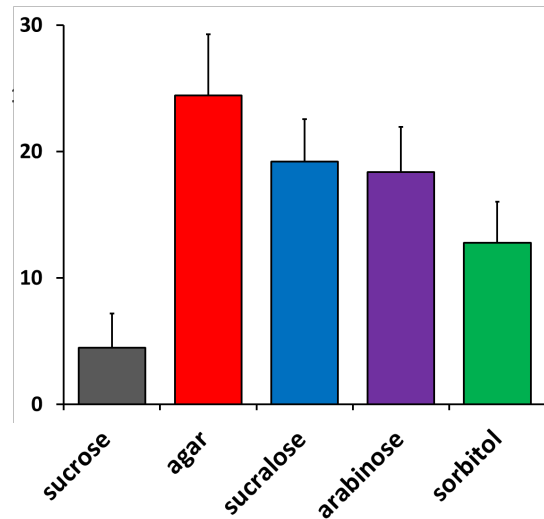


図3. 各種糖類投与時の覚醒閾値: 縦軸は、刺激に反応して覚醒した個体の割合(%)を示す。シヨ糖群に比べ、絶食群では顕著に反応性が高まる。人工甘味料投与群でも、反応性は高まったままで抑制されなかった。

### (4) 甘味受容体発現神経細胞の睡眠制御

ショウジョウバエの甘味受容体の一つでシヨ糖感受性の高いGr64a遺伝子を発現する神経細胞に、温度感受性のカチオンチャンネルであるdTrpA1を発現させ、高温(29度)で活性化した時の睡眠量の定量結果を図4に示す。Gr64a発現細胞の活性化で、絶食(agar)時の睡眠減少が抑制されることが示された。

また、結果は示さないが、別の甘味受容体であるGr5a発現細胞を活性化した場合も、Gr64aより弱い同様の傾向の効果が認められた。また、逆に、Gr64a発現細胞の機能を阻害しても、シヨ糖や人工甘味料の睡眠への効果はなくならなかったことから、複数の甘味受容体神経細胞が、並列に睡眠制御にかかわっていると考えられる。

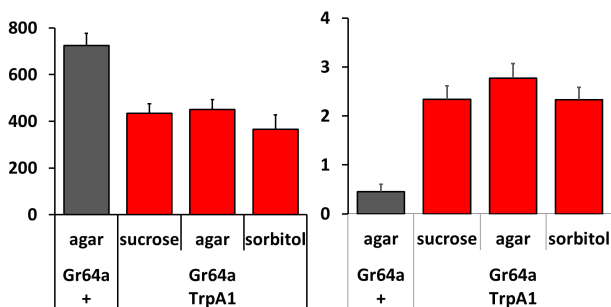


図4. 甘味受容体 Gr64a 発現神経細胞活性化の睡眠への影響：高温で TrpA1 を活性化した時間帯 6 時間あたりの総活動量（左）と睡眠量（右）を示す。TrpA1 を発現していないコントロールの絶食群に比べて、TrpA1 の活性化は、活動量を減少して睡眠量を増加した。この効果は、ショ糖投与に匹敵した。

#### (5) アミノ酸による睡眠制御

5% ショ糖に各種アミノ酸を添加したエサを与え、食事性アミノ酸の影響を調べた。アミノ酸投与後の活動量・睡眠量を計測した結果を図5に示す。タンパク質の材料となる20種類を調べたところ、グリシンが最も強く、活動を減少し、睡眠を増加する作用を持つことを見出した（中根ら、Cold Spring Harbor Meetingにて発表、2015）。

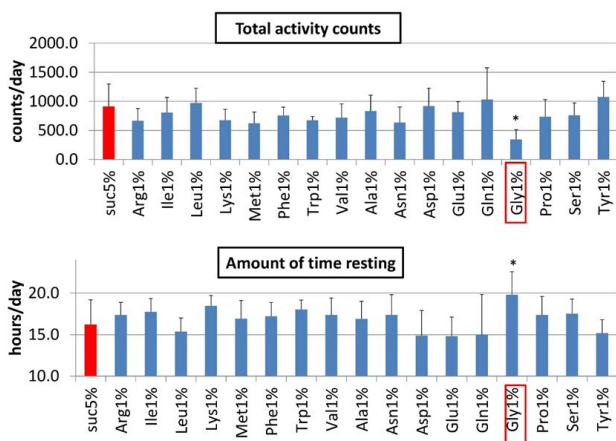


図5. 各種アミノ酸の睡眠に与える影響：5% ショ糖を含む培地に、それぞれのアミノ酸を1%添加して食べさせた後の3日間のデータを平均して定量解析したもの。

#### (6) 考察

今回の研究結果から、新規睡眠関連遺伝子として NMDA 受容体を同定し、さらに栄養状態と、糖類やアミノ酸という栄養素の摂取が睡眠量や覚醒閾値を制御することが示された。絶食状態では、活動量増加と睡眠量減少、および、覚醒閾値の低下が認められる。糖類と、Gr64a などの甘味受容体発現神経細胞の活性化の結果から、覚醒から睡眠への移行は甘味のみでも増えるが、睡眠から覚醒への移行は、栄養状態に依存すると考えられる。シ

ョウジョウバエでは、糖類に反応する甘味受容体が多種類存在するが、その中でもショ糖に対する反応性が高く、フルクトースに対する反応性は低い Gr64a を発現する細胞の活性化が強く睡眠を誘導したことが、甘味が重要な分子基盤と考えられる。最近、他のグループの研究から、栄養状態を反映するのはフルクトースであり、その検知には Gr43a が重要な役割を果たすという報告があることから、睡眠から覚醒への移行のしやすさである覚醒閾値に、Gr43a が関与する可能性があり、今後、検討していく予定である。

また、食事性アミノ酸投与のスクリーニングでは、グリシンの睡眠誘導効果を見出したが、これは、非常に興味深い発見である。グリシンは、哺乳類でも睡眠誘導効果が知られており、その作用が NMDA 受容体を介する可能性が最近、報告された。グリシンは NMDA 受容体に結合して活性を調節するが、同様の作用が D-セリンにもある。データは示していないが、私たちの検討では D-セリン投与でもショウジョウバエの睡眠が誘導された。上述したように、ショウジョウバエでも、NMDA 受容体の発現抑制が睡眠を減少させることから、NMDA 受容体は睡眠促進的に働いている可能性が高い。以上の結果から、グリシンの作用は、NMDA 受容体を介する可能性がある。

図6は、以上の私たちの結果と他グループの結果、さらに、現在の作業仮説をまとめた模式図である。今後、これらの神経回路の詳細を調べることで、今回見出した新規の睡眠制御機構の詳細を解明したい。

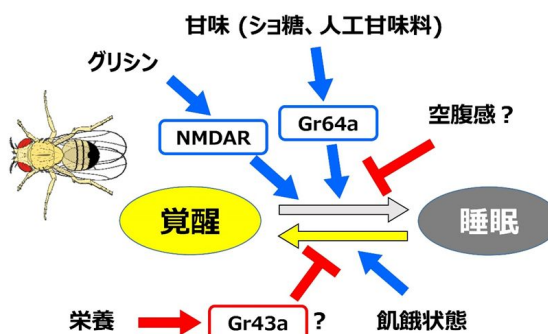


図6. 今回の研究結果と仮説に基づく、睡眠覚醒制御機構の模式図：甘味と栄養は睡眠を増加する。覚醒状態から睡眠への移行の促進には甘味が必要・十分であり、睡眠から覚醒への移行を阻害して睡眠を安定させるのは栄養状態と考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

(1) Ueno T and Kume K: Functional characterization of dopamine transporter in vivo using *Drosophila melanogaster* behavioral assays. *Front Behav Neurosci* 8: 303, 2014. doi:10.3389/fnbeh.2014.00303

(2) Sano H, Nakamura A, Texada MJ, Kume K, et al.: The Nutrient-Responsive Hormone CCHamide-2 Controls Growth by Regulating Insulin-like Peptides in the Brain of *Drosophila melanogaster*. PLoS Genet 11: e1005209, 2015. doi:10.1371/journal.pgen.1005209

(3) Tomita J, Ueno T, Mitsuyoshi M, Kume S and Kume K: The NMDA Receptor Promotes Sleep in the Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*. PLoS One 10: e0128101, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0128101

〔学会発表〕(計10件)

(1) 桑 和彦、(特別講演)ドーパミントランスポーターによるシナプス外情報伝達制御、第8回トランスポーター研究会、2013年6月16日、熊本

(2) 桑 和彦、(シンポジウム講演)睡眠と学習を制御するドーパミン回路の同定、日本睡眠学会第38回学術集会、2013年6月28日、秋田

(3) 桑 和彦、(シンポジウム講演) 桑 和彦 睡眠の生理機能モデルとしてのショウジョウバエ  
日本睡眠学会第38回学術集会  
2013年6月28日(秋田)

(4) 桑 和彦、(国際シンポジウム講演) Brain circuit for Sleep and Learning in a Fruit fly model. IEEE-EMBC2013、2013年7月7日

(5) 桑 和彦、(国際学会シンポジウム講演) Large-scale objective sleep-data analysis using a contactless sleep monitor. European Biological Rhythm Society, General Meeting、2013年8月19日、ミュンヘン、ドイツ

(6) 桑 和彦、(研究所招待講演) Sleep and arousal regulation by dopamine in fruit fly, *Drosophila melanogaster*. Max-Planck Institute of Psychiatry、2013年8月22日  
ミュンヘン、ドイツ

(7) 桑 和彦、(国際学会シンポジウム講演) Signaling molecules involved in sleep regulation in *Drosophila melanogaster*. Asian Forum on Chronobiology、2015年9月8日、札幌

(8) 富田淳、桑 和彦、(国際学会) Neuronal amino acid transporter regulates sleep in *Drosophila*. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting for Neurobiology of *Drosophila*、2015年10月2日、ニューヨーク、米国

(9) 長谷川達也、桑 和彦、(国際学会) Dietary control of sleep and arousal threshold in *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting for Neurobiology of *Drosophila*、2015年10月1日、ニューヨーク、米国

(10) 中根伸、桑 和彦、(国際学会) Regulation of sleep by dietary amino acids in *Drosophila*. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting for Neurobiology of *Drosophila*、2015年10月3日、ニューヨーク、米国

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

桑 和彦 (KUME, Kazuhiko)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：30251218