

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26507008

研究課題名(和文) 睡眠量の恒常性維持機構におけるカルシニューリンの機能解析

研究課題名(英文) Analysis of the function of calcineurin in Drosophila sleep homeostasis

研究代表者

富田 淳 (Tomita, Jun)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：40432231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの睡眠制御に関わる新たな遺伝子として、中枢神経系に広範に発現する中性アミノ酸トランスポーターを同定し、その解析から、プロリンが睡眠促進的に働く可能性が示された。さらに、プロリンの標的分子としてNMDA受容体が考えられた。

睡眠制御に関与する新たなニューロン群の同定も試みた。脳の中心複合体とよばれる構造に着目して研究を進め、中心複合体のPB (protocerebral bridge)、FB (fan-shaped body)、NO (noduli) にそれぞれ投射するニューロン群によって睡眠が制御されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We found pan-neuronal knockdown of one of putative transporter family genes in Drosophila, whose mammalian homolog is a transporter for neutral amino acids such as proline and leucine, significantly decreased sleep. Interestingly, mutant flies with elevated levels of free proline in neurons significantly increased sleep. Our present working hypothesis is that proline activates NMDA receptor signaling and promotes sleep.

In order to identify a novel neural circuit that control Drosophila sleep, we focused on central complex neurons. We found that activation of neurons labeled by a Gal4 driver that expresses in the protocerebral bridge (PB) neurons, significantly decreased sleep. Using mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM), we found that activation of neurons projecting from the PB to the fan-shaped body (FB) and the noduli (NO) in the driver reduced sleep. These results suggest that specific small group of PB neurons are implicated in sleep regulation.

研究分野：神経科学

キーワード：ショウジョウバエ 睡眠 カルシニューリン NMDA受容体 アミノ酸トランスポーター プロリン 中心複合体 モザイク解析法

## 1. 研究開始当初の背景

「個体にとって必要な睡眠量はどのように決まるのか？」すなわち、睡眠の恒常性維持機構の解明は、睡眠科学における大きな課題である。睡眠は脳波で定義されるため、主に哺乳類で研究されてきた。一方、遺伝学的手法が強力なショウジョウバエ(以下、単にハエ)で、行動学的に睡眠と類似する休息状態(以下、単に睡眠)が報告され、睡眠研究のモデル生物として注目された(Hendricks *et al.*, *Neuron*, 2000, Shaw *et al.*, *Science*, 2000)。これまでに多くの睡眠関連遺伝子が同定され、哺乳類と共通な睡眠の分子機構が明らかにされた。また、シナプス可塑性維持や学習記憶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つつある。

現在、哺乳類の睡眠制御には2つの階層があると考えられている。一つは、睡眠-覚醒中枢(脳幹部)による制御で、古くから研究され、関与する睡眠物質や神経回路が明らかにされている中枢性制御である。ハエの場合、後述するドーパミンニューロンによる制御に相当する。もう一つは、大脳皮質の部位ごとの局所的な睡眠制御である。局所性睡眠制御は、覚醒中に強く活性化された大脳皮質領域で深睡眠が多く観察される結果から提唱された概念で(Huber *et al.*, *Nature*, 2004)、そのメカニズムとしてシナプス恒常性仮説(以下、単にシナプス仮説)が提唱されている。この仮説では、覚醒中のシナプス増強が、睡眠中に全体的に減弱することでシナプス可塑性が維持されるとする。実際に、睡眠-覚醒状態によりシナプスタンパク質の発現が増減し、シナプス形態が変化する。興味深いことに、ハエでも同様の現象が観察されており(Gilestro *et al.*, *Science*, 2009, Bushey *et al.*, *Science*, 2011)、シナプス仮説は進化的に保存された睡眠の恒常性維持機構と考えられる。

我々は、これまでにショウジョウバエを用いて、新規睡眠関連遺伝子を同定してきた。中でもカルシニューリン(以下、Cn)は、哺乳類と同様に記憶形成に必須であることも示し、注目されている(Tomita *et al.*, *J. Neurosci.*, 2011)。他にも、JNK(*c-Jun N-terminal Kinase*)とNMDA型グルタミン酸受容体を同定した(Takahama, Tomita *et al.*, *BBRC*, 2012および投稿準備中)。また睡眠制御回路の解析も行い、脳に約200個存在するドーパミンニューロンのうち、fan-shaped body (FB)とよばれる部位に投射するニューロンによって特異的に睡眠-覚醒が制御されることも示した(Ueno, Tomita *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 2012)。

Cnを全神経でノックダウンしたハエでは、睡眠量の顕著な減少に加えて、強制的な睡眠除去(断眠)後のリバウンド睡眠量が増加しており、Cnが睡眠の恒常性維持機構に関与することが示唆された。また、その後の解析で、脳の様々なニューロンで部分的にCnをノックダウンしても、睡眠量の減少は認められず、脳の広範な領域でのCn活性が睡眠制御に関

与することが示唆された。Cnはシナプス可塑性に重要な分子であることから、上述したシナプス仮説に基づくCnによる睡眠制御モデルが想定できる(図1)。

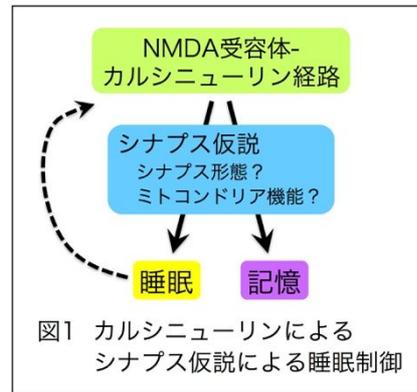


図1 カルシニューリンによるシナプス仮説による睡眠制御

## 2. 研究の目的

シナプス仮説は睡眠の恒常性維持機構を説明するが、その分子機構は全く未知である。本研究ではCnに着目し、相互作用する遺伝子やミトコンドリア動態との関係を解析することで、シナプス仮説の分子機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では当初、睡眠の恒常性維持機構におけるCnの機能を解明するために、以下の3つの研究項目を計画していた。

- (1) 睡眠のシナプス恒常性仮説の検証
- (2) ニューロンのミトコンドリア動態と睡眠との関係の解析
- (3) Cnと相互作用するタンパク質の同定と睡眠制御における機能解析

しかしながら、本科研費に応募後に、機械的刺激やドーパミンニューロンの人為的な活性化により12時間断眠したハエを用いて、頭部におけるシナプス前膜タンパク質(Bruchpilot)とシナプス後膜タンパク質(Discs large)の蓄積量をウェスタンブロットイングにより調べたが、我々の実験条件では、断眠によるシナプスタンパク質の発現増加はみられなかった。また、Cnノックアウトハエにおいて、覚醒を司る概日時計ニューロンのミトコンドリア動態(数と局在)を調べたが、影響はみられなかった。

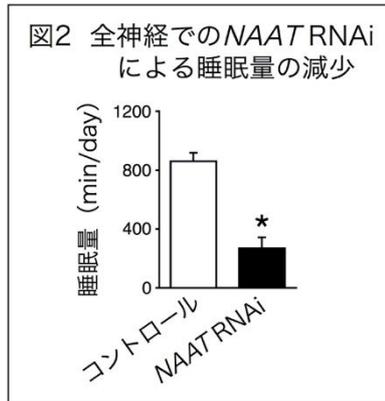
そこで、研究計画を変更し、睡眠を制御する新たな遺伝子およびニューロン群の同定を行なった。

## 4. 研究成果

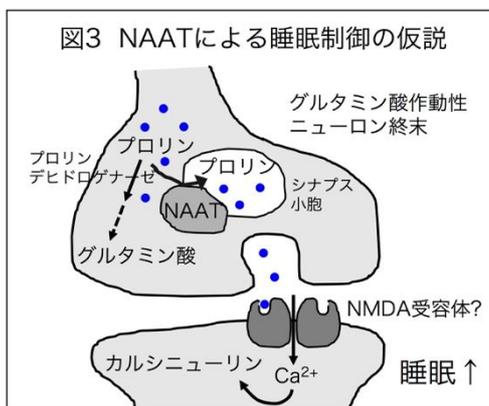
- (1) 新規睡眠関連遺伝子の同定

我々はこれまでに、短時間睡眠の変異体を単離し、その原因遺伝子としてドーパミントランスポーターを同定した(Kume *et al.*, *J. Neurosci.* 2005)。ドーパミントランスポーターが属するNa<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>依存性トランスポーターファミリーには、セロトニンやGABAのトランスポーターが含まれ、それらの神経伝達物

質も八エの睡眠制御への関与が報告されている。そこで、睡眠制御に関わる新たな遺伝子の同定を目的とし、このトランスポーターファミリーのメンバーで、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（以下、NAAT: neuronal amino acid transporter）に着目し、睡眠制御への関与を調べた。NAAT をコードする遺伝子の一つを RNAi 法により全神経でノックダウンしたところ、睡眠量が著しく減少した（図2）。さらに、特定のニューロ



ン群でノックダウンした結果、グルタミン酸作動性ニューロンでのノックダウンで睡眠量が有意に減少した。NAAT の哺乳類ホモログはシナプス小胞に局在し、中性アミノ酸（プロリン、グリシン、ロイシン、アラニン）を輸送することが報告されている。（Parra, *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 2008）。そこで、プロリン代謝酵素の一つであるプロリンデヒドロゲナーゼの機能欠損により、細胞内の遊離プロリン量が増加する突然変異体八エの睡眠量を調べたところ、顕著に増加していた。以上の結果から、図3に示すようなNAATによる睡眠制御の仮説を想定した。NAATはグルタミン酸作動性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睡眠を促進すると考えられる。プロリンは NMDA 受容体を活性化させることから（Henzi, *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 1992）睡眠制御におけるプロリンの標的分子として NMDA 受容体が考えられる。



(2) 睡眠を制御する中心複合体ニューロンの同定

睡眠制御の分子機構を解明するためには、睡眠を司る神経回路の解明が重要である。我々はこれまでに、脳の中心複合体のFBに投射するドーパミンニューロンによる特異的な睡眠制御を明らかにしている。中心複合体は、protocerebral bridge (PB)、FB、ellipsoid body (EB)、noduli (NO) という4つの構造から構成されるが、最近、EBの一部のニューロンが睡眠の恒常性を調節することも報告されている（Liu, *et al.*, *Cell* 2016）。

本研究では中心複合体に着目し、睡眠制御に関与する新たなニューロン群の同定を試みた。中心複合体が様々なパターンで欠損する突然変異体（Strauss & Heisenberg, *J. Neurosci.*, 1993）の睡眠を調べたところ、PBの一部が欠損する突然変異体において睡眠量の有意な減少がみられた。そこで、PBでGAL4が発現する13種類のGAL4ドライバーシステムを用いて、高温で開口するdTrpA1チャネルを発現させて、GAL4発現ニューロンを活性化させたところ、1種類のGAL4系統（以下、PB-GAL4）で睡眠量の顕著な減少がみられた。PB-GAL4において温度感受性ダイナミン（shibire<sup>ts1</sup>）を発現させて、30°Cでシナプス伝達を抑制したところ、睡眠量が有意に増加した。PB-GAL4では脳以外に、胸部神経節でもGAL4が発現が見られたことから、胸部神経節のみでGAL80（GAL4の阻害因子）を発現するトランスジェニック系統と組み合わせ、脳だけでdTrpA1を発現させて活性化しても、睡眠量の顕著な減少が見られた。また、GAL80を利用して、GAL4発現ニューロンのうちコリン作動性ニューロン以外で、dTrpA1を発現させて活性化すると、睡眠量の減少がみられなくなった。これらの結果からPB-GAL4において脳のコリン作動性のGAL4発現ニューロンの活性化が睡眠量を減少させることが示唆された。

次に、GAL4発現ニューロンのうち、どのニューロンが睡眠量の減少に寄与するのかを明らかにするために、MARCM（mosaic analysis with a repressible cell marker）法により、少数のニューロンにdTrpA1を発現させて活性化させたところ、睡眠量の有意な減少を示すモザイク個体が複数得られた。各個体から脳を摘出し、dTrpA1と共発現させたGFPの蛍光を観察したところ、多くの個体で投射パターンが類似したニューロンがラベルされており、PB、FB、NOにそれぞれ投射していた。そこで、同様の投射パターンを示すニューロン（PB-FB-NOニューロン）をラベルすることが報告されているGAL4系統（c465）を用いて、PB-FB-NOニューロンを活性化させたところ、PB-GAL4と同様に睡眠量が著しく減少した。以上の結果から、睡眠制御に関わる新たなニューロンとしてPB-FB-NOニューロンが同定された。PB-FB-NOニューロンに、後シナプスまたは前シナプスにそれぞれ局在するGFPを発現させることで、入出力シナプス部位を明らかにした。我々がこれまで

に同定した睡眠制御に関わる PPM3 クラスターのドーパミンニューロンは、FB と NO に投射する。そこで、このドーパミンニューロンと PB-FB-NO ニューロンの機能的関係を現在解析中である。

## 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4件)

1. Tomita, J., et al.: Genes and neural circuits for sleep of the fruit fly.  
*Neurosci. Res.* (2017) *in press*  
Review article、査読有
2. Funato, H.,..., Tomita, J., et al. (著者37名の9番目): Forward-genetics analysis of sleep in randomly mutagenized mice.  
*Nature* 539: 378-383 (2016)  
査読有
3. Takano, S., Tomita, J., Sonoike, K., Iwasaki, H.: The initiation of nocturnal dormancy in *Synechococcus* as an active process.  
*BMC Biol.* 13: 36 (2015)  
査読有
4. Tomita, J., Ueno, T., Mitsuyoshi, M., Kume, S., Kume, K.: The NMDA receptor promotes sleep in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*.  
*PLOS ONE* 10: e0128101 (2015)  
査読有

[学会発表](計6件)

1. 富田 淳, 他、「ショウジョウバエの睡眠-覚醒を制御する中心複合体ニューロンの同定」、第23回日本時間生物学会学術大会、2016年11月12日、名古屋大学豊田講堂
2. Tomita, J. et al. "Neuronal amino acid transporter regulates sleep in *Drosophila*", CSHL Meeting Neurobiology of *Drosophila*, 2015年10月2日, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, The U.S.A.
3. Tomita, J. et al. "Neuronal amino acid transporter regulates sleep in *Drosophila*", 第38回日本神経科学大会、2015年7月30日、神戸コンベンションセンター
4. 富田 淳, 桑 和彦「ショウジョウバエを用いた睡眠研究」、日本睡眠学会第40回定期学術集会、2015年7月3日、栃木県総合文化センター
5. 富田 淳, 他、「神経系アミノ酸トランスポーターによるショウジョウバエの睡眠

-覚醒を制御」、日本睡眠学会第40回定期学術集会、2015年7月2日、栃木県総合文化センター

6. 富田 淳, 他、「アミノ酸トランスポーターによるショウジョウバエの睡眠制御」、第21回日本時間生物学会学術大会、2014年11月8日、九州大学医学部百年講堂

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

富田 淳 (TOMITA JUN)

名古屋市立大学大学院・薬学研究科・講師

研究者番号：40432231