

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26702037

研究課題名(和文)細胞機能制御による睡眠覚醒メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of sleep-wake mechanism by controlling cell function

研究代表者

上野 太郎 (UENO, Taro)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：30648267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：フルオレセインを修飾した化合物を作成し、トランスフェクションを行った細胞に添加したところ、PLEを発現する細胞においてフルオレセインの著明な蛍光増強が認められた。GAL4の発現依存的に特定の細胞のみでPLEを発現させたトランスジェニックハエを作成し、上記化合物を摘出脳に投与したところ、組織特異的な蛍光が見られた。個体レベルでの行動制御ができるかを検討するため、PLEをドーパミン細胞特異的にPLEを発現するショウジョウハエを作成した。経口投与によってドーパミン合成酵素阻害剤に修飾基を付加した化合物を投与したが、睡眠覚醒量に変化は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Fluorescein-modified compounds were prepared and added to the transfected cells, and a marked fluorescence enhancement of fluorescein was observed in cells expressing PLE. We generated a transgenic fly expressing PLE only in specific cells in the expression-dependent manner of GAL4, and when the above compound was administered to the isolated brain, tissue-specific fluorescence was observed. In order to examine whether behavior control at an individual level is possible, *Drosophila* expressing PLE specifically for dopamine cells was created. A compound to which a modifying group was added to a dopamine synthase inhibitor was administered by oral administration, but no change in sleep awakening amount was observed.

研究分野：睡眠科学

キーワード：睡眠 ケミカルジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

睡眠覚醒制御は概日周期生物時計の出力系として最重要なものの一つであり、ショウジョウバエにおいても睡眠類似行動があることが2000年に報告された (Shaw *et al. Science* 2000, Hendricks *et al. Neuron* 2000)。

生物時計をつかさどる遺伝子は、哺乳類とショウジョウバエの間でも保存されているが、睡眠覚醒制御においても遺伝子レベルの類似性が示され、哺乳類と同じモノアミン系の関与が示された (Cirelli *et al. Nature* 2005, Kume *et al. J.Neurosci.* 2005)。また睡眠を調節する脳内構造についても研究が進み、ショウジョウバエの睡眠中枢が、学習に関与する脳内のキノコ体という構造に存在するという特筆すべき発見も報告され、ますます注目されている (Joiner *et al. Nature* 2006, Pitman *et al. Nature* 2006)。

このように、ショウジョウバエにおける睡眠研究は、睡眠の分子生物学を大きく発展させてきた。その背景としては、GAL4-UASシステムによる遺伝子発現制御 (Brand & Perrimon, *Development*, 1993) や、ゲノムワイドな RNAi ライブラリーの存在 (Dietzl *et al. Nature*, 2007) といった、ショウジョウバエにおける遺伝学的ツールの充実が大きい。特に、近年 Channelrhodopsin-2 や TrpA1 channel などを用いた神経細胞の賦活化/活動抑制により、特定の神経ネットワークの活動と行動との因果関係が明らかになってきている。ショウジョウバエを用いた研究では、そのシンプルな中枢神経系と、ゲノムワイドに作成・公開されている発現ドライバーの活用により、行動を制御する神経細胞の活動が1細胞レベルで解明されてきている。

行動を制御する神経ネットワークが明らかになる一方で、行動の発現を担う神経活動に至るまでの分子メカニズムは依然としてブラックボックスの状態である。また、上記遺伝学的ツールは強制的な神経活動を誘導しているため、生理的な影響を観察しているとは言い難く、また分子基盤が不明なままでは薬理的介入による病態治療などにはつながりにくい。

近年、睡眠がシナプスレベルの制御を受け、細胞内分子動態によって制御が行われている可能性 (synaptic homeostasis 仮説) が示唆されており (Gillestro *et al. Science* 2009, Donlea *et al. Science* 2009)、注目を集めている。一方で、睡眠覚醒と分子シャペロンの発現変化が関係し、睡眠中のタンパク質合成が睡眠の機能を担っているという macromolecule 仮説も提唱されており (Mackiewicz *et al. Trends Mol Med* 2008)、睡眠の分子基盤を一元的に理解するには至っていない。このように睡眠の分子メカニズムについて不明な点が多い現時点においては、神経細胞やグリア細胞を含めた中枢神経系において、より広汎な細胞機能を制御する

ことで新たに得られる知見が大きいと考えた。

2. 研究の目的

本研究課題においては、遺伝学的に化合物の薬理活性を制御する新たなシステムを提唱する。本システムを用いて、時期・組織特異的な細胞機能制御をショウジョウバエをモデル動物として実装し、睡眠覚醒の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

本課題は遺伝学と化学・薬理学を融合させた独創的な研究課題であり、それぞれの研究領域における長所を兼ね備えたものとなる。さらに、各研究領域における限界点を克服することも期待される。例えば、従来の遺伝学的ツールではその空間分解能は細胞レベルであるが、化合物によるタンパク質結合誘導を用いることで細胞内分子動態へとその可能性を広げることができる。なお、薬理学と遺伝学の融合として、clozapine-N-oxide を用いた DREADDs: Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs が先行研究として挙げられるが、これらは細胞膜表面の受容体を介した細胞内シグナルの制御に留まり、本研究課題では細胞内での薬理作用により網羅的な細胞機能制御を実現する点で大きく異なる。

3. 研究の方法

化合物の細胞内への輸送には膜透過性が大きく関わり、水溶性化合物の細胞内輸送は困難である。細胞膜を透過できないような水溶性化合物においては、カルボン酸基をアセトキシメチルエステル化することで脂溶性とし、細胞膜の透過性を上げることができる。細胞内に入った化合物は、アセトキシメチルエステル基がエステラーゼによって切り出され、脂溶性の低下に伴い、細胞内に化合物を貯留させることができる。これまでも、細胞内 Ca 指示薬である Fura-2 の膜透過性の向上のために、アセトキシメチルエステル基修飾を加えた Fura-2 AM は広く使用され、細胞内のエステラーゼ活性によりその機能発現が誘導されてきた。しかし、本手法は膜透過性の問題を乗り越える一方で、内在のエステラーゼを用いるため、薬理作用の細胞特異性を担保することはできない。

細胞内のエステラーゼはエステル基の処理を行うが、エステル基のうちあるもの (メチルシクロプロパンカルボキシメチルエステル基) は、内在のエステラーゼによって処理されず、ブタ肝臓に発現するエステラーゼ (PLE: porcine liver enzyme) によってのみ代謝される (Tian *et al. PNAS* 2012)。PLE はブタ肝臓に特異的に発現しているエステラーゼであり、昆虫や哺乳類の細胞株、中枢神経などの組織を用いた解析で、上記エステル基の処理が行われないことが確認されている (図1)。また、メチルシクロプロパンカルボキシメチルエステル基は、ヒドロキシル

基を持つ化合物の修飾により得られ、多くの化合物をこのシステムに導入することが可能である。

本研究ではこのブタ肝臓に特異的に発現するエステラーゼである PLE を、ショウジョウバエ脳内で細胞特異的に発現させることで、化合物による細胞機能の制御を実現することを試みた。

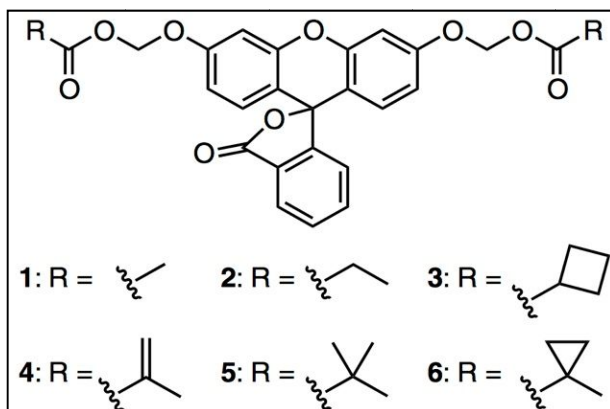


図 1. フルオレセインとエステル基

R 部分の修飾により、フルオレセインの蛍光を被覆する。

1 はアセトキシメチルエステル基

6 のメチルシクロプロパンカルボキシメチルエステル基は PLE によってのみ代謝される。

PLE による代謝によって、フルオレセインの蛍光が回復する。

4. 研究成果

逆転写により PLE 遺伝子のクローニングを行った。さらに、P2A ペプチドと蛍光タンパク質である mRFP を PLE につなぎ、発現ベクターを構築している。培養細胞を用いたトランスフェクションによる発現により、PLE の発現が細胞毒性を有さないことを確認した。また、研究協力者である化学者にフルオレセインをメチルシクロプロパンカルボキシメチルエステル基で修飾した化合物を作成してもらい、トランスフェクションを行った細胞に添加したところ、PLE を発現する細胞においてフルオレセインの著明な蛍光増強が認められた。以上の結果より、PLE を発現する任意の細胞において、化合物の代謝が行われ、薬理作用の発現を誘導することが細胞レベルで確認された (図 2)。

さらに、発現ベクターをショウジョウバエの個体レベルで発現させ、組織特異的な薬理作用を実現した。具体的には GAL4/UAS シス

テムを用いて、GAL4 の発現依存的に特定の細胞のみで PLE を発現させる。UAS の発現ベクターに上記プラスミドを移し、インジェクションによりトランスジェニックハエを作成した。

PLE を発現するショウジョウバエ摘出脳に、上記化合物を投与したところ、PLE 発現依存的に蛍光が認められ、組織特異的な作用が確認された (図 3)。

その後、個体レベルでの行動制御ができるかを検討するため、TH-GAL4 ドライバーを用いて PLE をドーパミン細胞特異的に PLE を発現するショウジョウバエを作成した。経口投与によってドーパミン合成酵素阻害剤に修飾基を付加した化合物を投与したが、睡眠覚醒量に変化は認められなかった。化学修飾をしたフルオレセインを経口投与したところ、ショウジョウバエの腸管内において蛍光シグナルが認められ、腸管内での化学修飾の処理が起きていることが推測された。

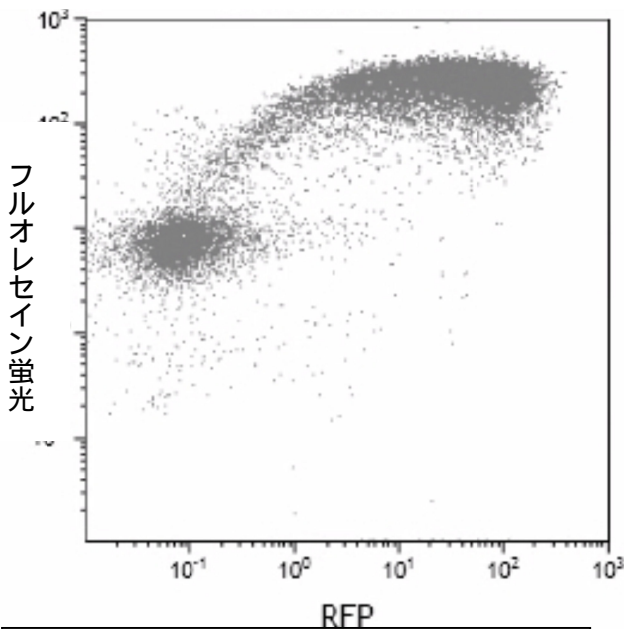


図 2. PLE 発現細胞における薬理活性の発現

HEK293T 細胞に PLE-P2A-mRFP のプラスミドをトランスフェクションし、化学修飾を加えたフルオレセインを投与した。

投与後、細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーにより定量した。

PLE を発現する RFP 陽性群で、フルオレセイン蛍光の増強を認める。

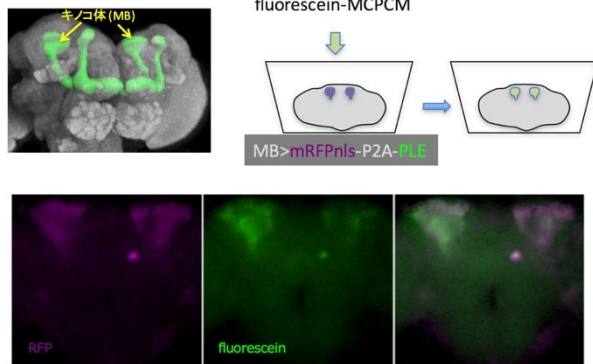


図 3. PLE 発現脳における薬理活性の発現

UAS-PLE-P2A-mRFP のトランスジェニックハエと MB-GAL4 のトランスジェニックハエを掛け合わせ、キノコ体特異的に PLE を発現するハエを作成した。脳を摘出し、化学修飾を加えたフルオレセインを投与した。

投与後、PLE を発現する RFP 陽性群で、フルオレセイン蛍光の増強を認める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Tomita J, Ueno T, Mitsuyoshi M, Kume S, Kume K

The NMDA Receptor Promotes Sleep in the Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*.

PLoS One 10(5) e0128101 2015

doi:10.1371/journal.pone.0128101.

(査読有り)

上野太郎, 桑和彦.

ショウジョウバエを用いた睡眠の基礎研究. 日薬理誌(*Folia Pharmacol. Jpn.*), 日本薬理学会, 2015

doi.org/10.1254/fpj.145.134

(査読無し)

Yamazaki D, Horiuchi J, Ueno K, Ueno T, Saeki S, Matsuno M, Naganos S, Miyashita T, Hirano Y, Nishikawa H, Taoka M, Yamauchi Y, Isobe T, Honda Y, Kodama T, Masuda T, Saitoe M

Glial dysfunction causes age-related memory impairment in *Drosophila*.

Neuron 84 753-763 2014

doi:10.1016/j.neuron.2014.09.039.

(査読有り)

Ueno T*, Kume K* (* correspondence)

Functional characterization of dopamine

transporter in vivo using *Drosophila melanogaster* behavioral analysis.

Frontiers in Behavioral Neuroscience, 2014, 8, 303

doi: 10.3389/fnbeh.2014.00303.

(査読有り)

〔学会発表〕(計 7 件)

上野太郎

ショウジョウバエを用いた精神疾患の基礎研究

第 38 回日本生物学的精神医学会

2016 年 9 月 10 日

福岡国際会議場 福岡県福岡市

(招待講演)

上野太郎

子どもの成長と睡眠 -学力向上への睡眠の重要性-

熊本県医師会主催 市民公開講座

2015 年 9 月 6 日

ホテル熊本テルサ 熊本県熊本市

(招待講演)

上野太郎

ぐっすり眠って元気な仙台っこ -よい睡眠習慣を取り戻そう

仙台市教育委員会主催 仙台っこ健康セミナー

2015 年 8 月 4 日

旭ヶ丘市民センター 宮城県仙台市

(招待講演)

上野太郎

児童生徒の睡眠障害について

北区教育委員会主催 学校保健会総会

2015 年 5 月 14 日

滝野川文化センター 東京都北区

(招待講演)

上野太郎

睡眠研究の最前線

都民講座

2015 年 4 月 24 日

公益財団法人東京都医学総合研究所 東京都世田谷区

(招待講演)

上野太郎, 桑和彦

Sleep study using *Drosophila*

第 21 回日本時間生物学会シンポジウム

2014 年 11 月 8 日

九州大学 福岡県福岡市

上野太郎, 桑和彦

睡眠と麻酔の類似性から探る新規睡眠関連遺伝子

第 39 回日本睡眠学会シンポジウム

2014 年 7 月 4 日

あわぎんホール 徳島県徳島市

〔図書〕(計0件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 太郎 (UENO, Taro)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：30648267

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

古田 寿昭 (FURUTA, Toshiaki)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：90231571