

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07444

研究課題名(和文) 加齢に伴う睡眠相の断片化に関わる神経回路網と分子メカニズムの同定

研究課題名(英文) Analysis of neural and molecular mechanism of sleep fragmentation with aging in *Drosophila*

研究代表者

松本 顕 (Matsumoto, Akira)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：40229539

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)：雌では半数致死が12週の典型的なS字型生存曲線が得られ、最長寿命は17週であった。雄は加齢に伴い個体数が単調に減少し14週が最長寿命であった。そこで、1週齢と10週齢の雄60匹の歩行を1秒毎に個別計測した。老齢個体では約45分周期で睡眠相が断片化していた。

1週齢と10週齢の雄の脳を採取し、1日の時系列に沿ったRNAseqを行った。発現の周期性に着目したバイオインフォマティクス解析から8～10クラスタを検出した。各クラスタには特徴的な遺伝子機能、共通した転写因子の存在が示唆された。加齢が周期的遺伝子発現に影響する際の第一因となる候補遺伝子は同定できたが、神経回路網の同定には到らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴う睡眠相断片化による不眠、それに伴う不眠不安症に対する治療法の確立や創薬はQOLの観点からも重要である。本課題では、基礎科学の立場からその原因解明に取り組んだ。研究期間内には、タイトルに掲げた睡眠相断片化に関わる神経回路網の同定には到らなかったが、原因のひとつと思われる液性因子は同定できた。しかし、昆虫特異的なホルモン関連物質で、直ちに創薬などに繋げる事は出来なかった。一方、脳内の遺伝子発現を若齢と老齢で一日の時系列で網羅的に比較することで、周期的な遺伝子発現に加齢が影響を及ぼす際のターゲット遺伝子候補を複数同定できた。解析の進展によっては創薬への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We obtained a typical sigmoidal survival curve with half-lethal of 12 weeks and a maximum lifespan of 17 weeks in females while males are dead monotonically with aging up to 12 weeks. Then we compared 1-week and 10-week-old males focused on the locomotor activities recorded by 1 second bin. The sleep fragmentation was shown every 45 minutes in the old flies. We sampled 1 and 10-week-old male brains every 6 hours for 3 days, and performed RNAseq analyses. The bioinformatics analysis suggests that 8 to 10 clusters exist in cyclically expressing genes. Each cluster had a characteristic gene function and, in some cases, a common transcription factor. Based on these results, we identified candidate genes those likely to act as the primary cause of aging affecting cyclic gene expression, although a further analysis are necessary to identify how these genes functions in sleep fragmentation in *Drosophila* neural network.

研究分野：時間生物学

キーワード：ショウジョウバエ 概日リズム 老化 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えた日本では、加齢に伴う諸問題の解決が大きな課題となっている。老人に好発性の重篤な疾病に対する治療法の開発が急務であることは自明であるが、睡眠相の自然中断（夜中の目覚め）による不眠や寝不足、またそれに伴う不眠不安症は、健康で充実した生活を送るための QOL の向上という観点からも今後重要な解決課題となると予想される。これらに対する研究を加速的に進展させるにはモデル生物を用いることが不可欠である。

ショウジョウバエは老化や睡眠研究においても有力なモデル生物であり、概日時計の分子メカニズムの概要がほぼ解明されていることも大きな利点となっている。しかし、睡眠相の中断現象に関する行動レベルの詳細な観察は行われて来なかった。これまでの活動記録は、計測装置の 1 点に仕掛けられた赤外線ビームが歩行で遮断される頻度によって計測されており、それ以外の場所で、いつどのような行動が生じているのかの情報には乏しかった。睡眠相の中断現象の観察には新たな活動記録装置の開発が必須であった。そこで、本申請研究では、個別のハエの行動を 1 秒ごとに赤外線カメラで計測し、最大 10 日間座標追尾できる装置を開発し、行動観察から始めることとした。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、加齢に伴う睡眠相中断に関与する遺伝子、および、脳内の神経回路網の同定である。

加齢によって誘発される睡眠相の中断現象を対象とするため、まずは、ショウジョウバエの老化過程を明らかにして、観察および解析の対象として適した週齢や性別、さらには飼育条件を決定することが必要であった。このために、大規模な生存曲線の解析を複数の条件で行った。

続いて、上記の自作の新規活動記録装置を用いて、ショウジョウバエの睡眠相の中断がどのように生じているかを明らかにした。この過程では、複数の統計解析方法を適用して比較することで、加齢による睡眠相の中断を最も顕著に検出できる方法の確立を目指した。

これと並行して、若齢と老齢のショウジョウバエの脳内で発現する遺伝子群を次世代シーケンズによって網羅的に同定し、発現量に対して加齢による影響が明瞭に表れる遺伝子の同定を目指した。

同定された遺伝子群に関して組織特異的な RNAi による遺伝子ノックダウンを行い、若齢個体での行動解析を行うことで、実際に睡眠相中断が若齢個体でも誘発されるかを調べた。RNAi の組織特異性を変更することで、脳内の神経回路のどの領域で影響を及ぼすかの同定を試みた。

3. 研究の方法

【標準系統と飼育】 キイロショウジョウバエ white(BL#5905)を本実験に関する標準型として用いた。transgenic 系統の遺伝的バックグラウンドもこの標準型にそろえた。生存曲線に関する実験では、同一の飼育群から 3 日以内に羽化した交尾済み成虫を 1 つの集団として扱い、雌雄別に飼育ビンあたり 25 匹ずつに取り分けた。1 週間ごとに新しい飼育ビンに移し替えながら死亡数をカウントした。このような集団を同一の飼育条件で少なくとも 3 つ観察して再現性を確認した。

【行動解析】 睡眠相の断片化の観察は、自作の赤外線カメラシステムを用いて行った。グルコースを含む寒天を敷き詰めた 12 ウェルの培養プレート内にハエを個別に隔離し、個別の行動を 1 秒ごとに、明暗条件下で 3 日間以上連続して記録した。時系列データは R プログラムを用いて周波数分析した。本実験では全てオスを用いたが、予備実験段階では若齢メスの観察も行った。

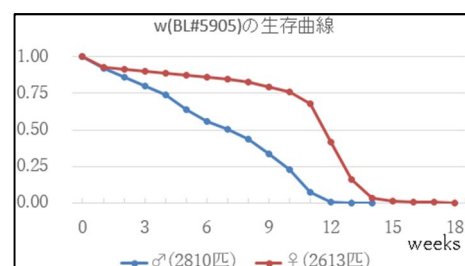
概日歩行リズムの測定は、TriKinetics 社の DAM2 システムを用い、6 分ごとの赤外線遮断数の記録によって行った。直径 1mm、長さ 7cm のガラス管に 3cm 程度にグルコースを含む寒天をエサとして詰め、オスを個別に隔離した。明暗サイクルに数日間同調させた後、恒暗条件下での歩行活動を個別にモニターし、概日周期を 2 ペリオドグラムによって統計計算した。

【遺伝子解析】 脳での遺伝子発現の次世代シーケンズによる同定は、標準型のオスを 4 時間ごとに 3 日間サンプリングし、まず頭部だけを集めた。1 サンプリングあたり 50~100 匹分の頭部を氷冷 PBS 中で解剖し、Total RNA を抽出後に次世代シーケンズを行った。シーケンズ作業およびバイオインフォ解析は業者委託した。

4. 研究成果

(1)【標準型系統の生存曲線】 25 での生存曲線を雌雄別に求めた。図は、独立した集団に関する複数の観察結果を合算したもので、スタート時点での合計個体数は、オス 2810 匹、メスは 2613 匹である。生存曲線は、個々の集団でもこれと非常に相似していた。

メスは 10 週齢から 14 週齢にかけて急激に死亡数が累積する典型的な S 字曲線を示し、半数致死は約 12 週、

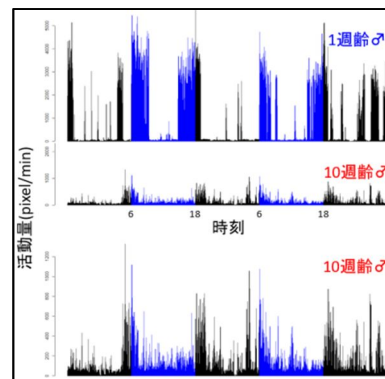


最長寿命は17週であった。オスは加齢に伴って単調に個体数が減少し12週でほぼ死に絶えた。半数致死は約7週、最長寿命は14週であった。

同様の実験を20の環境でも行ったところ、メスの半数致死は16週まで延長されたが、最長寿命は18週で、25とはさほど変化がなかった。オスでは25の場合と同様に、加齢に伴って単調に個体数が減少するが、半数致死は12週に、最長寿命は16週に延長された。つまり、オスでの加齢過程は温度とほぼ相関しており、他の条件の影響を受けにくいと思われた。

これらの結果から、以降は25で飼育した、1週齢および10週齢のオスを、若齢および老齢個体群として比較しながら研究を進めることに決定した。

(2)【加齢に伴う睡眠相の断片化】若齢の雌雄および老齢オス個体の歩行活動を明暗環境で1秒毎に観察することで、老齢個体における睡眠相の断片化について調べた。若齢オス60個体、老齢オス53個体(7個体は計測中に死亡)、若齢メス24個体の時系列データに対して様々な統計的手法による周波数分析を適用したところ、最大エントロピー法による分析が短周期成分の抽出に効果的であることがわかった。さらに、真昼の6時間と真夜中の6時間の時間帯を抽出して周波数分析すれば、睡眠相の断片化が明瞭に比較できることがわかった(図では明期を青、暗期を黒で表している)。



これらの時間帯では、週齢や性別に関係なく7、9、15分周期の短周期リズムが検出された。これらは、いったん歩行を開始してから立ち止まるまでの継続時間を示しているものと思われた。つまり、ハエの歩行活動の一区切りは7~15分程度であると推測された。一方、老齢オスでのみ別の短周期性成分が顕著であった。約45分の周期成分で、真夜中もしくは真昼の6時間の時間帯で特に顕著になる。よって、睡眠相の断片化が45分の周期性で生じていることが推測された。

(3)【脳内の遺伝子発現への加齢による影響】睡眠相の断片化に関わる遺伝子の同定を目指し、サンプルとして若齢および老齢個体を4時間ごとに3日間採取した。解剖により脳だけを取り出し、発現している遺伝子群を次世代シーケンサにより網羅的に同定した。発現量および発現周期に関するバイオインフォマティクス解析を行い、加齢に伴い発現量に差が生じる遺伝子群を網羅的に同定することで、睡眠相断片化に影響する候補遺伝子群とした。

同定されて来た候補遺伝子群を機能別に分類すると多様性に富んでいた。主だったものだけでも、脂質代謝、転写、クロマチン構造の維持、イオンチャネル、などの関連遺伝子が同定された。この中でも特に、昆虫ホルモン関連遺伝子群では加齢の影響を受けているものが複数あった。初期段階での解析では幼若ホルモン関連遺伝子が5個みつき、再解析では8遺伝子が見つかった。この中でもtakeoutは概日時計の出力に関与することがすでに報告されている遺伝子であった。これとは別に、脱皮ホルモン関連遺伝子では2つが見つかった。一方で、明瞭に神経系との関連を示唆される遺伝子はOpen rectifier K+ channelをコードするOrk1が見つかったのみであった。

(4)【組織特異的ノックダウンによる行動解析】上記の次世代シーケンサ解析で同定された遺伝子で発現変化の大きかった上位10遺伝子に関して、RNAiを用いた細胞特異的な遺伝子発現のノックダウンを行った。この中には、takeoutをはじめとして上記の5つの幼若ホルモン関連遺伝子が含まれていた。

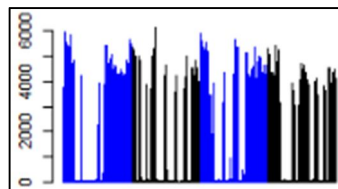
手始めとして、概日リズムへの影響を調べた。時計関連組織特異的なRNAiの誘発のためにtim-gal4をドライバーとし、リズム計測には若齢オスを用いた。takeoutでは計測した46個体中、17個体が無周期で、7個体では25時間を超える長周期であった。この結果は先行研究と一致していた。CG16820はtakeoutと同じく幼若ホルモン結合タンパク質をコードすると考えられているが、機能的な相違点は解明されていない。計測した32個体のノックダウン系統中2個体で1時間程度の周期延長がみられたものの、残りの個体は標準型の周期を示した。この他に3つの幼若ホルモン関連遺伝子と脱皮ホルモン関連遺伝子2つについても行動解析を行ったが、いずれも概日周期には影響がみられなかった。Fatty acyl-CoA reductaseをコードするCG17560のノックダウン系統は計測した32個体中27個体が 24.8 ± 0.38 hrの周期を示し、約1時間の周期延長を誘発した。5個体は無周期であった。CG17560の神経系での機能は未知である。神経系で発現しているOrk1のノックダウンは32個体中24個体の平均周期が 24.8 ± 0.38 hrで約1時間の周期延長を誘発した。残りの8個体は無周期になった。

続いて、これらの遺伝子が脳内のペースメーカー細胞で機能しているかを調べるために、pdf-Gal4系統をドライバーとする遺伝子発現ノックダウンを行った。しかし、どの系統でも明瞭な周期変化は生じていなかった。このことから、これらの遺伝子は、どれも概日時計の中核で機能するものではなく、出力系に関与していることが示唆された。

さらに、elav-gal4をドライバーとして神経系全般での遺伝子ノックダウンを行ったが、全て致死となってしまった。よって、これらの遺伝子は神経系で発現することが生存に必須であ

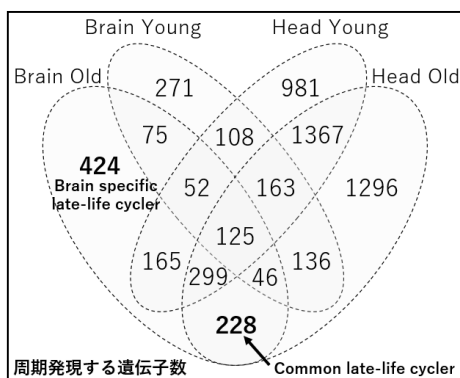
ると推測された。しかし、神経系でのこれらの遺伝子のノックダウンが睡眠相の断片化にどのような影響を及ぼすかを調べることは不可能だった。そこで、これらの遺伝子を過剰発現して概日リズムや睡眠相断片化への影響を調べることを企図したが、利用できる既存の系統を他の研究室から譲渡してもらうことは出来なかった。これらの事情のため、これらの遺伝子については、それ以上の解析は断念した。

時計関連組織特異的ノックダウンを行った若齢個体では、睡眠相の断片化の観察も行った。takeout では、計測した 15 個体中、12 個体の若齢個体で約 45 分の短周期成分が顕著に観察され、老齢個体に似た睡眠相断片化が生じることがわかった（右図）。断片化が生じる場合、睡眠中断相では、時間あたりの活動量が高く、朝夕のそれに匹敵していた。また、中断は比較的長く持続する傾向があった。よって、これらが要因になって、定点赤外線ビームで活動記録した場合に takeout ノックダウン系統の一部が統計的に無周期と判定されるのではないかと推測された。

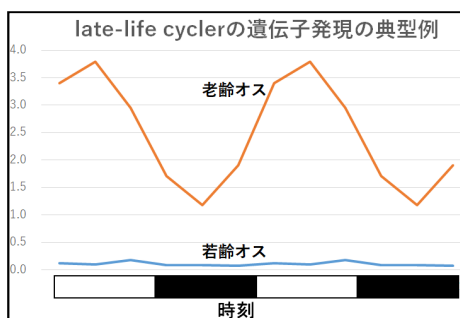


しかしながら、上記の通りペースメーカー特異的な takeout ノックダウンは概日リズムには全く影響しなかった。takeout がコードするのは幼若ホルモン結合タンパク質と予想されているが、その根拠となる生化学的な報告はない。また、TAKEOUT タンパク質は、ショウジョウバエ体液中に存在し、全身を循環すると考えられており、特定の神経組織での機能は明らかになっていない。さらに、ショウジョウバエ成虫での幼若ホルモンの機能、特に脳内での働きに関しては、いまだ明らかにされていない部分が大きかった。ノックダウンした全個体で表現型が出現するわけでもないため、本申請課題の残りの実施期間（1 年間）で睡眠相の断片化の神経機構との関連性を解明するのは非常に難しいと予想された。そこで、残りの申請期間および 1 年間の期間延長を使って、(3)の脳内で発現する遺伝子の網羅的比較を再検討することで、新たな候補遺伝子の同定を目指すことにした。

(4)【加齢による脳特異的遺伝子発現への影響】本申請課題の着手とほぼ同時期に、加齢が遺伝子発現に及ぼす影響を次世代シーケンスによって網羅的に同定した論文が Kuintzle らによって発表された（Nat commun, 2017）。本申請研究の狙いと非常に似た観点からの解析で、有り体に言えば先を越されてしまった。



ただし、サンプルとしてメスを用いている点と、脳ではなく頭部での遺伝子発現を解析している点が本申請研究とは大きく異なっていた。ショウジョウバエで頭部に占める複眼の体積は大きく、遺伝子発現量の比率では複眼でのそれは脳の 10 倍程度と見積られる。よって、Kuintzle らの解析は脳というよりも複眼/末梢組織への加齢の影響をメスで調べたものと解釈できた。つまり、本申請研究での次世代シーケンス結果を Kuintzle らの解析結果と比較することで、脳特異的に発現し、しかも加齢の影響が顕著な遺伝子群を同定可能と思われた。特に、加齢に従い発現量が増加し、概日振動を示すようになる late-life cycler と名付けられた遺伝子群は、睡眠相の断片化にも関与する可能性が高いと推測された。



Kuintzle らのバイオインフォ解析では、本申請研究で当初同定したよりもはるかに多くの遺伝子が同定されていた。そこで、Kuintzle らの生データを入力して 3 種類の異なるアルゴリズムによるバイオインフォ解析を独自に行って再解析することで、頭部と脳での発現を若齢群と老齢群で比較した。Kuintzle らの手法に基づく比較の概要を右上図に示す。統計法および有意水準のレベル設定次第で具体的な遺伝子数は大幅に変化するが、それぞれのグループに分類される遺伝子群の概略は一致している。現在、太字で示す領域に本申請研究で最終目的とする遺伝子が含まれていると推測している。この解析で新たに発見された遺伝子の発現プロファイルを下図に示した。本遺伝子は自然免疫への関与が報告されている遺伝子であるが、神経系での機能は未知である。

以上のように、研究期間内には本申請研究の最終目的である睡眠相の断片化に関わる神経回路網の同定には到らなかったが、幼若ホルモン関連遺伝子である takeout の関与を明らかにし、また、それ以外の候補遺伝子群の網羅的な同定と分類までは達成することが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本顕
2. 発表標題 Cleaning <i>Drosophila</i> 's clock: Unaddressed and unresolved questions about the fruit fly circadian timekeeper
3. 学会等名 第25回日本時間生物学会学術大会（長崎）シンポジウム「Epoch-making Discoveries in Chronobiology」（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本顕、伊藤太一
2. 発表標題 ショウジョウバエ歩行活動に対する加齢の影響
3. 学会等名 第24回(2017年度)日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松本顕	4. 発行年 2018年
2. 出版社 岩波書店	5. 総ページ数 131
3. 書名 時をあやつる遺伝子	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊藤 太一 (Itoh Taichi) (20769765)	九州大学・基幹教育院・助教 (17102)	