

令和元年5月23日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05600

研究課題名(和文) 時計細胞間コミュニケーションの役割

研究課題名(英文) Neuronal communications between circadian clock neurons

研究代表者

吉井 大志 (Yoshii, Taishi)

岡山大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：50611357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,000,000円

研究成果の概要(和文)：多くの動物で、活動や睡眠・覚醒などの概日行動リズムを制御する中枢機構は、脳に存在することが知られている。しかし、概日時計の研究が最も進んでいる動物キイロショウジョウバエにおいても、脳内時計細胞の神経ネットワークの全容は明らかになっていない。本研究では、環境の変化によって概日時計を構成する神経細胞群の役割を明らかにすることができ、さらに新規の概日時計出力因子CCHamide1神経ペプチドを同定することができた。また、時計細胞群の神経突起の同定とその機能的な接続においても成果を挙げることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

概日時計はヒトを含む多くの動物が持つ生物時計機構である。哺乳類などの非常に高度な脳を持つ動物では、概日時計の神経回路の全容を明らかにすることは非常に困難であるが、細胞数が比較的少ないキイロショウジョウバエを用いることで、概日時計を構成する神経回路の形態と機能的役割の一端を明らかにすることができた。哺乳類で報告されている概日時計の神経回路との相似性も見出すことができ、昆虫と哺乳類という進化的に離れている種においても、保存されている神経機構があることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Many animals possess the central circadian clock system in brain, which controls activity rhythms. However, their detailed neuronal circuits are still not well understood even in the most advanced model animal, fruit fly, *Drosophila melanogaster*. In this study, we identified circadian clock neurons that are responsive to environmental changes and a new neurotransmitter CCHamide1 involved in the circadian network. Furthermore, we could contribute to understand the morphological and physiological connections among circadian clock neurons.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日時計 体内時計 時間生物学 キイロショウジョウバエ 神経回路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 動物では行動リズムを制御する概日中枢時計は、脳内(もしくは眼)に存在することが明らかになっている。モデル生物であるマウスやラット、キイロショウジョウバエでは脳内概日時計の中核細胞(時計細胞)がすでに同定されている。しかし、これらモデル生物においても、時計細胞からの出力系や時計細胞同士の相互作用は不明な点が多い。

(2) キイロショウジョウバエは約 150 個の脳内神経細胞が時計遺伝子を発現し、分子レベルの概日リズム(遺伝子発現やタンパク質量の振動)をつくっている。この 150 個のすべてが行動リズムに重要な働きを担っているのかは不明な点もあるが、それぞれの時計細胞は役割が異なることが我々の過去の研究を含む先行研究より示唆されている。

2. 研究の目的

キイロショウジョウバエの概日時計を構成する神経細胞は約 150 個と少数である。マウスの中枢概日時計である視交叉上核では約 1 万個以上の神経細胞があることから、ショウジョウバエの時計細胞の数が非常に少ないことが分かる。しかし、そのショウジョウバエの時計細胞群でさえ、非常に複雑な回路を形成しており、その神経回路の総理解にはまだ時間が掛かることが予想される。本研究では、キイロショウジョウバエの遺伝学を駆使し、すでに同定されている概日時計に関わる神経ペプチドを遺伝子発現抑制、過剰発現、異所発現により修飾し、そのショウジョウバエの概日リズム(脳内の分子リズムと行動のリズム)を解析する。これにより、それぞれの神経ペプチドの機能解析、または複数のペプチドの相互作用の解明を足掛かりに、概日時計の神経ネットワークがどのように形成されているのか、また時計細胞ネットワークの役割を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエ系統

キイロショウジョウバエでは、RNAi 系統、突然変異体などがストックセンターより供給されている。本研究で使用した系統の多くは、アメリカ・インディアナ大学 Bloomington Drosophila stock center、オーストリア Vienna Drosophila Resource Center、京都ショウジョウバエストックセンターからのショウジョウバエ系統を利用した。これらのショウジョウバエ系統は、必須栄養素を含む寒天培地を入れた密封したプラスチックビンの中で飼育した。さらにショウジョウバエ系統の飼育条件の管理と逃亡を防ぐために、それらの飼育プラスチックビンは、インキュベータ内に設置している。

(2) 過剰発現系統の作製

本研究で同定した新規の概日時計出力因子 CCHamide1 の過剰発現系統は、CCHamide1 の cDNA を PCR 法によってクローニングし、過剰発現用のベクターに挿入し、Drosophila DNA injection service を利用して、形質転換体を作成した。

(3) 概日歩行活動リズム計測

Trikinetics 社の Drosophila activity monitor を使用して、歩行活動リズムの計測を行った。データ解析には当研究グループが開発したソフトウェアで行った。雄のショウジョウバエが入った活動記録モニターはインキュベータ内に設置し、温度条件と光条件を制御できるようにした。突然変異系統や RNAi 系統などを約 1 カ月、明暗サイクル下や恒暗条件下などにおいて、活動リズムを計測した。

(4) 生物発光を用いた時計細胞リズムの可視化

オリンパス社 LV200 を用いて、ルシフェラーゼ発光の可視化を行った。ルシフェラーゼ遺伝子の上位に時計遺伝子 period の上位配列や別の時計遺伝子 timeless の上位配列を結合させた系統を用いて、時計遺伝子発現リズムの計測を行った。また、細胞情報伝達を可視化するための新規の系統の作製を行い、それらについても時計細胞からの生物発光の可視化を行った。これらの実験は、ショウジョウバエ脳をガラスボトムシャーレ上で培養しながら行った。培養液には複数の抗生物質を含むシュナイダー培養液を使用した。

4. 研究成果

(1) 光条件で変化する時計ネットワーク

ショウジョウバエの脳内に存在する約 150 個の時計細胞は、ネットワークを形成していると考えられているが、そのネットワークの意義には不明な点が多い。時計細胞群の約半数では、Cryptochrome (CRY) と呼ばれる青色光受容タンパク質が発現しており、複眼などの外部光受容器を介さない光同調系に関与している。そこで、GAL4-UAS システムによる遺伝子発現制御法を用いて、CRY 発現を特定の時計細胞群だけに限定した場合に、概日リズムの光同調にどのような影響が現れるかを検討した。その結果、CRY を LNd 時計細胞群と 5th s-LNv 時計細胞群に発現した場合には、野生型と非常に近い光同調能を示すことが分かった。つまり、他の時計細胞群と比較して、LNd と 5th s-LNv 時計細胞群は、CRY を介した光同調に強く関与していることが

明らかになった。この研究成果は発表論文 で報告している。過去の研究と合わせて、150 個の時計細胞は、光同調に強く関わる時計細胞とそうではない時計細胞に分けることができると考えることができる。

ショウジョウバエの概日時計は、単に明暗の光サイクルに同調してリズムを生み出すだけでなく、季節に合わせて変化する日の長さにも対応することができる。夏季を模倣した長日条件では、野生型のハエは昼間の活動を抑えて、より夕方に活動を示すようになる。これは、夏の暑い日中に活動を高めることを避けていると説明することができる。本研究において、Cry の突然変異体は、野生型と比較して長日条件においてより夕方側に活動ピークをシフトすること、また複眼などを欠く変異体では、より日中側に活動ピークがシフトすることが明らかになった。従って、Cry 光受容経路と複眼など外部光受容経路は、活動リズムの長日適応において拮抗的に働くことが考えられる。その時に重要な時計細胞も LNd と 5th s-LNv 時計細胞群であった。この研究成果は、発表論文 で報告している。以上の結果より、ショウジョウバエ概日時計の長日適応の光受容機構が明らかになり、またそのための時計細胞群の機能分化について新たな知見を得ることができた。

(2) 新規の概日時計出力因子

時計ネットワークの理解において重要な要素である概日出力因子の研究は、本研究課題の主要な部分を占める。まず本研究において、他大学との共同研究を進めながら新規の概日出力因子を同定するに至った。CCHamide1 は、機能未知の神経ペプチドとして同定されており、CCHamide1 に対する抗体を使った免疫染色により脳内の DN1a とよばれる時計細胞で発現していることを発見した。RNAi や突然変異系統、過剰発現系統を用いた行動解析より、朝と夕方の活動量が低下し、日中に見られる昼寝が増加することが明らかになった。ショウジョウバエの概日時計において中心的な役割を担っているとされる s-LNv 時計細胞について、DN1a 時計細胞は神経突起を s-LNv に伸ばし、その神経突起と沿うように s-LNv も DN1a 側に神経突起を伸ばしていた。さらに、合成した CCHamide1 を培養中の脳に投与すると、s-LNv 時計細胞内の cyclic AMP の濃度が上昇し、s-LNv は CCHamide1 を受容することが示唆された。その後、CCHamide1 受容体の発現細胞を可視化することで、その受容体が s-LNv でも発現していることを突き止めた。

これらの研究結果から、DN1a が CCHamide1 を使って s-LNv 時計細胞に時間情報を伝達していることが明らかになった。s-LNv 時計細胞は PDF 神経ペプチドを使って時間情報の出力を行っているが、CCHamide1 はこの PDF の発現量に影響を与える。以上の研究結果は、発表論文 で報告している。一方で、PDF は CCHamide1 の発現量には影響を与えないという結果を得ている。従って、DN1a と s-LNv には相互作用があるが、その作用様式については今後も検討していく必要がある。この CCHamide1 と他の概日時計に関与する神経伝達物質の多重変異体の研究も進めており、未発表ではあるが重要な知見が得られている。以上の研究より、概日時計神経ネットワークの解明に貢献することができた。

(3) 時計細胞群の神経回路

約 150 個ある時計細胞の神経突起をそれぞれ正確に同定することは非常に難しいが、Flybow システムを利用することで、一細胞ごとに蛍光タンパク質の色を変えて、その突起の位置を同定する方法を確立した。最終的に先行研究より注目されてきた時計細胞群を中心に形態的な回路の同定が終了した。我々の研究グループは、Flybow を特定の時計細胞で発現させるための GAL4 系統の探索で貢献した。この研究成果は、発表論文 で報告した。

時計細胞間の光情報伝達においても、共同研究を行い、複眼などから入力される光情報は、特定の時計細胞に集められるのではなく、数多くの時計細胞が独立して光情報を入力していることを明らかにした。この研究においても、我々のグループは主に特定の時計細胞をラベルする GAL4 系統の探索で貢献した。さらに、複眼からの光受容がどの介在神経を介しているのかを明らかにするための実験も行ったが、期待していたような結果を得ることは出来なかった。発表論文 。以上の研究より、時計細胞の形態学的な接続様式、また光入力経路を軸にした機能的な接続様式の解明に貢献することができた。

(4) 生物発光を用いた時計細胞リズムの可視化

単一時計細胞の分子レベルの概日リズムを長期的に計測することができれば、この研究分野で非常に大きなブレークスルーを起こすことができると期待される。マウスではある程度手法が確立しているが、哺乳類の概日時計を構成する神経細胞の数は非常に多いので、細胞間の相互作用を研究することは困難である。本研究においては、生物発光ルシフェラーゼを用いて、時計遺伝子 period と timeless のプロモーター配列を利用した、時計遺伝子発現リズムの長期レコーディングに取り組んだ。まず長期的なショウジョウバエの脳の培養が第一ハードルであったが、培養液の工夫や解剖時の工夫などによってほぼ克服することができた。時計遺伝子の発現モルシフェラーゼによる生物発光を介して可視化することに成功した。しかし、少数の時計細胞群における発現リズムの安定的なレコーディングは困難であり、残念ながら本研究期間内には成功の目途を立てることはできなかった。もう一工夫必要であることは明白であるので、今後も長期的に研究を継続していき、本研究成果を発展させる予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Li MT, Cao LH, Xiao N, Tang M, Deng B, Yang T, Yoshii T, Luo DG (2018) Hub-organized parallel circuits of central circadian pacemaker neurons for visual photoentrainment in *Drosophila*. *Nature Communications* 9: 4247 査読有
doi: 10.1038/s41467-018-06506-5.

Fujiwara Y, Hermann-Luibl C, Katsura M, Sekiguchi M, Ida T, Helfrich-Förster C, Yoshii T (2018) The CCHamide1 neuropeptide expressed in the anterior dorsal neuron 1 conveys a circadian signal to the ventral lateral neurons in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Physiology* 9: 1276 査読有
doi: 10.3389/fphys.2018.01276.

Schubert FK, Hagedorn N, Yoshii T, Helfrich-Förster C, Rieger D (2018) Neuroanatomical details of the lateral neurons of *Drosophila melanogaster* support their functional role in the circadian system. *The Journal of Comparative Neurology* 526: 1209-1231 査読有
doi: 10.1002/cne.24406.

Kistenpfennig C, Nakayama M, Nihara R, Tomioka K, Helfrich-Förster C, Yoshii T (2018) A tug-of-war between Cryptochrome and the visual system allows the adaptation of evening activity to long photoperiods in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Rhythms* 33: 24-34 査読有
doi: 10.1177/0748730417738612.

Maeda T, Nakamura Y, Shiotani H, Hojo KM, Yoshii T, Ida T, Sato T, Yoshida M, Miyazato M, Kojima M, Ozaki M (2015) Suppressive effects of dRYamides on feeding behavior of the blowfly, *Phormia regina*. *Zoological Letters* 1: 35 査読有
<https://doi.org/10.1186/s40851-015-0034-z>

Yoshii T, Hermann-Luibl C, Kistenpfennig C, Schmid B, Tomioka K, Helfrich-Förster C (2015) Cryptochrome-dependent and -independent circadian entrainment circuits in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* 35: 6131-6141 査読有
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0070-15.2015>

[学会発表](計15件)

吉井大志 「キイロショウジョウバエ概日行動リズムを制御する神経回路」第63回日本応用動物昆虫学会大会, 2019年3月27日 シンポジウム

吉井大志 「キイロショウジョウバエにおけるペプチド作動性時計細胞ネットワーク」Symposium on insect chronobiology, 2019年2月21日 シンポジウム

桂万喜, 藤原有里, 吉井大志 「キイロショウジョウバエの新規概日出力因子 CCHamide1はs-LNv 時計細胞からの出力に影響を与える」第25回日本時間生物学会学術大会, 2018年10月20-21日

関口学, 井上浩太郎, 吉井大志 「キイロショウジョウバエ時計細胞における GAL4 発現システムの網羅的探索」第25回日本時間生物学会学術大会, 2018年10月20-21日

中山達宏, 吉井大志 「キイロショウジョウバエ概日時計の光同調に介入する視覚に介在ニューロン」第89回日本動物学会, 2018年9月13-15日

桂万喜, 藤原有里, 吉井大志 「キイロショウジョウバエにおける新規概日出力因子 CCHamide1 の概日発現リズム」第89回日本動物学会, 2018年9月13-15日

中山達宏, 吉井大志 「キイロショウジョウバエの複眼光受容体と時計細胞を繋ぐ神経回路の探索」第70回日本動物学会中国四国支部大会, 2018年5月12-13日

T. Yoshii Intercellular coupling between pacemaker clock neurons in *Drosophila melanogaster* 第95回日本生理学会大会, 2018年3月28日-30日 シンポジウム

吉井大志 「キイロショウジョウバエ概日時計の温度同調性」第24回日本時間生物学会学術大会, 2017年10月28-29日

丹原瑠璃, 中山真由美, Christa Kistenpfennig, 吉井大志 「キイロショウジョウバエ概日時計における長日適応機構への光受容系の関与」第24回日本時間生物学会学術大会, 2017年10月28-29日

T. Yoshii (2016) "Light and temperature entrainment of circadian clock in fruit flies." The 22nd International Congress of Zoology, The 87th meeting of Zoological Society of Japan, September 14-19, 2016, Symposium

T. Yoshii, Yuri Fujiwara, Christiane Hermann-Luibl, Takanori Ida, Charlotte Helfrich-Förster "Reciprocal communications of clock neurons via PDF and CCHa1 neuropeptides in *Drosophila*" SRBR2016, May 21-25, 2016

藤原有里, 井田隆徳, 吉井大志 「The CCHa1 neuropeptide as a new candidate for an output factor of the *Drosophila* circadian clock」第22回日本時間生物学会学術大会, 2015年11月21-22日

吉井大志 「ハエの脳の時計」茨城県つくば市筑波大学「生命の樹セミナー」2015年11

月 20 日

藤原有里, 井田隆徳, 吉井大志「キイロショウジョウバエにおける概日時計の新規出力因子 CCha1 神経ペプチドの機能解析」 第 86 回日本動物学会, 2015 年 9 月 17-19 日

〔図書〕(計 4 件)

Tomioka K, Uryu O, Kamae Y, Moriyama Y, ASM Saifullah, Yoshii T (2017) Chapter 6. Molecular approach to the circadian clock mechanism in the cricket. In H. Ohuchi, S. Noji, H. W. Horch, T. Mito and A. Popadic eds. The Cricket as a Model Organism: Development, Regeneration and Behavior, Springer, pp.77-89. 査読有

DOI: 10.1007/978-4-431-56478-2_6

梅崎勇次郎, 吉井大志 (2017) キイロショウジョウバエの概日温度適応, 比較生理生化学, 34: 80-91 査読有

<https://doi.org/10.3330/hikakuseiriseika.34.80>

吉井大志, 富岡憲治 (2016) ショウジョウバエ中枢概日時計の神経機構, 生体の科学, 67: 532-5 査読有

<https://doi.org/10.11477/mf.2425200546>

Yoshii T, Hermann-Luibl C, Helfrich-Förster C (2016) Circadian light-input pathways in Drosophila. Communicative & Integrative Biology 9: 1-8 査読有

<https://doi.org/10.1080/19420889.2015.1102805>

〔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

<https://sites.google.com/site/chronobiologyokayamauni/home>

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: Helfrich-Förster, Charlotte

ローマ字氏名: Helfrich-Förster, Charlotte

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。