

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06343

研究課題名(和文) グリア細胞による睡眠覚醒制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of sleep-wake regulation by glial cells

研究代表者

上野 太郎 (Taro, Ueno)

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：グリア細胞のクラスターによる睡眠覚醒制御への影響を調べるために、温度依存性チャネルであるdTrpA1をGAL4/UASシステムを用いて様々なGAL4ドライバーで発現させ、温度変化による睡眠量の変化を解析した。一部のGAL4ドライバーでdTrpA1を発現させた個体では、温度上昇とともに睡眠時間の減少が見られ、覚醒の誘導に働いていることが観察された。一方で温度上昇とともに睡眠時間の増加を示す個体も一部のGAL4ドライバーでは認められ、睡眠誘導もしくは歩行への影響があるものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRISPR/Cas9を用いてドーパミン受容体変異体(D1R1受容体変異体ならびにD1R2受容体変異体)を作成し、得られたそれぞれの個体において睡眠解析を実施した。本研究成果は共同研究結果として論文発表を行った(Akibaetal.,2020,EJN)。末梢神経損傷に伴う軸索クリアランスにはグリア細胞が関与していることが知られており、睡眠覚醒がこれら現象にどのように関与しているかについても検討した。GAL4/UASシステムを用いて羽や触角の神経細胞にGFPを発現させた個体を用いて、これらの組織を切除した後の軸索クリアランスを検討した。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effect of glial cell clusters on sleep-wake regulation, we expressed dTrpA1, a temperature-dependent channel, in various GAL4 drivers using the GAL4/UAS system and analyzed the change in sleep volume with temperature change. In individuals expressing dTrpA1 in some of the GAL4 drivers, a decrease in sleep duration was observed with increasing temperature, indicating that dTrpA1 works to induce wakefulness. On the other hand, some of the GAL4 drivers showed an increase in sleep time with increasing temperature, suggesting that they have an effect on sleep induction or walking.

研究分野：神経科学

キーワード：睡眠

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

睡眠は進化的に保存された行動にも関わらず、その機能やメカニズムは完全には明らかになっていない。近年、睡眠覚醒に関わる神経ネットワークの同定が光遺伝学などの技術によりなされているが、これら神経回路による睡眠覚醒の制御機構は不明である。一方、グリア細胞の活性によっても睡眠覚醒や体内時計が制御されていることが指摘されている。

申請者はこれまで、ショウジョウバエを用いた睡眠研究を行うことで、睡眠制御に関わる遺伝子や神経回路を同定してきた(Ueno et al. Nature Neuroscience 2012 など)。さらに、グリア細胞のサブクラスターを時期特異的に活性化させることにより、睡眠時間の増加・減少が見られることや、加齢性の睡眠障害に関わるグリア関連の遺伝子を同定している。

本研究課題では、グリア細胞による睡眠覚醒ならびに体内時計の制御メカニズムを明らかにすることを目的とする。本研究課題の遂行により、グリア細胞による制御メカニズムが明らかになることで、睡眠の機能やメカニズムに迫ることが可能と考える。

2. 研究の目的

本研究課題においては、グリア細胞による睡眠覚醒ならびに体内時計の制御メカニズムを明らかにすることを目的とする。

具体的には、睡眠覚醒制御に関わるグリア細胞のクラスターを同定するとともに、グリア細胞内における睡眠覚醒制御の分子メカニズムを同定する。

3. 研究の方法

本研究課題の遂行のために、下記研究方法を用いる。

温度依存性チャンネルを用いた睡眠覚醒制御を行うグリア細胞クラスターの同定

申請者はこれまで、温度依存性チャンネルを用いた時期特異的な神経細胞の活性化により、睡眠覚醒を制御する神経回路を同定してきた。本研究課題ではこの技術を用いて、睡眠覚醒制御に関わるグリア細胞のクラスターを同定する。

ショウジョウバエにおけるグリア細胞は、その解剖学的位置付けから複数のクラスターに分類される。それぞれのクラスターに特異的に GAL4 を発現するトランスジェニックラインを用いて、温度依存性チャンネルを用いたグリア細胞の刺激を行なったところ、一部の GAL4 ラインにおいて睡眠の減少もしくは増加が見られることを見出している。このことは、グリア細胞がクラスター特異的に睡眠覚醒を制御していることを示唆しており、グリア細胞による睡眠覚醒制御のメカニズム解明に有用なツールとなると考える。

本研究課題では、これまでに同定したグリア細胞クラスターのより詳細な細胞同定を試みるとともに、これらクラスターを刺激した際のグリア細胞・神経細胞に引き起こされる遺伝子発現の変化を探索することにより、下記の分子メカニズムの同定へと繋げることを試みる。

組織特異的 CRISPR/Cas9 によるグリア細胞での睡眠制御分子メカニズムの同定

申請者はこれまで、CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子改変を行うことで、ショウジョウバエの加齢性記憶障害に脳内の D-セリンの低下が関わっていることを明らかにし、報告してきた(Yamazaki et al. Neuron 2014)。D-セリンは L-セリンをセリンラセマーゼにより変換することで合成され、セリンラセマーゼの発現は哺乳類においても加齢とともに減少することが知られている。また、セリンラセマーゼは中枢神経系において、グリア細胞において強く発現することが知られている。ショウジョウバエは哺乳類と同様に加齢性に記憶障害を示すのに加えて、加齢とともに睡眠の断片化とリズムの減弱を示すことが知られている。

睡眠と記憶の関係性は近年明らかになってきており、申請者は、加齢性の記憶障害の背景に睡眠障害が存在し、その分子基盤を D-セリンが担っているのではないかと仮説を立て、検証を行った。まず、哺乳類のセリンラセマーゼのアミノ酸配列を元に、ショウジョウバエのホモログを探索し、相同遺伝子として CG8129 を見つけた。次に、CRISPR/Cas9 を用いて CG8129 の deletion mutant を作出した。deletion mutant の作出にあたっては、gRNA を 2 種類発現するプラスミドを用いて CG8129 の CDS を挟む形で gRNA 発現させ、予定領域の deletion mutant を得た。作出した変異体をバッククロスし、遺伝的背景を均一にした上で DAM(Drosophila Activity Monitor) を用いて経時的な睡眠時間の変化を解析した。その結果、加齢とともに CG8129 の変異体において著しい睡眠時間の減少を認めている。

哺乳類のデータを元に考えると、CG8129 はグリア細胞に発現することが予想される。そこで、グリア細胞で特異的に CG8129 を欠損させるためのシステムとして、独自に構築した組織特異的 CRISPR/Cas9 システムを用いた。この目的のために、全身の細胞で CG8129 の CDS を挟む形で 2 種類の gRNA を発現し、さらに GAL4 ドライバーの存在化で Cas9 を発現させる UAS-Cas9 を保有するラインを作成した。このラインに様々な GAL4 ドライバーラインをかけることにより、組織特異的に CG8129 を deletion させ、RNAi のノックダウン効率に依存することなく遺伝子機能を

調べることが可能となっている。

今後、前述の睡眠覚醒を制御するグリア細胞クラスターにおいて、CG8129 の遺伝子発現を制御することにより、温度依存性チャンネルにより活性を制御した時と同様の睡眠覚醒の変化が認められるかを調べる。

4 . 研究成果

グリア細胞のクラスターによる睡眠覚醒制御への影響を調べるために、温度依存性チャンネルである dTrpA1 を GAL4/UAS システムを用いて様々な GAL4 ドライバーで発現させ、温度変化による睡眠量の変化を解析した。一部の GAL4 ドライバーで dTrpA1 を発現させた個体では、温度上昇とともに睡眠時間の減少が見られ、覚醒の誘導に働いていることが観察された。一方で温度上昇とともに睡眠時間の増加を示す個体も一部の GAL4 ドライバーでは認められ、睡眠誘導もしくは歩行への影響があるものと考えられた。CRISPR/Cas9 を用いてドーパミン受容体変異体(D1R1 受容体変異体ならびに D1R2 受容体変異体)を作成し、得られたそれぞれの個体において睡眠解析を実施した。本研究成果は共同研究結果として論文発表を行った(Akibaetal.,2020,EJN)。末梢神経損傷に伴う軸索クリアランスにはグリア細胞が関与していることが知られており、睡眠覚醒がこれら現象にどのように関与しているかについても検討した。GAL4/UAS システムを用いて羽や触角の神経細胞に GFP を発現させた個体を用いて、これらの組織を切除した後の軸索クリアランスを検討した。睡眠制御の方法としては、カフェインや機会的振動による睡眠時間の減少、3-IY やガボキサドールによる睡眠時間の増加を介入として用いた。睡眠時間を減少させた個体では末梢神経損傷後の軸索クリアランスの遅延が認められた。コロナ感染症の拡大により、研究遂行が大幅に遅延した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akiba Masumi, Sugimoto Kentaro, Aoki Risa, Murakami Ryo, Miyashita Tomoyuki, Hashimoto Riho, Hiranuma Anna, Yamauchi Junji, Ueno Taro, Morimoto Takako	4. 巻 51
2. 論文標題 Dopamine modulates the optomotor response to unreliable visual stimuli in <i>Drosophila melanogaster</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 822 ~ 839
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ejn.14648	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------