

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06744

研究課題名（和文）ショウジョウバエ神経細胞におけるNMDA受容体活性の測定に基づく睡眠要求の定量化

研究課題名（英文）Quantification of sleep needs using a luciferase reporter of intracellular Ca²⁺ in sleep-regulating neurons in *Drosophila*

研究代表者

富田 淳 (Tomita, Jun)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（薬学）・講師

研究者番号：40432231

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ショウジョウバエの睡眠を制御する2種類のニューロン群（PB介在ニューロン群とLNd）に着目した。これらのニューロン群の細胞内Ca²⁺濃度の変化を測定し、睡眠要求を定量的に評価するために、これらのニューロン群を特異的にラベルできるドライバー系統を見出した。睡眠制御に関わるニューロン群（Kunst et al., 2014）にCa²⁺依存性ルシフェラーゼレポーター（Gao et al., 2015）を発現させて、自由行動下で生物発光を測定したところ、発光強度には、活動量が多い主観的昼に上昇し、睡眠量が多い主観的夜に低下する傾向がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LNdや睡眠を促進するPB介在ニューロン群に着目し、さらに研究を進めることで、自由行動下の個体からNMDA受容体シグナルに基づいた睡眠要求を定量的に測定することが可能になると考えられる。また、この測定系を利用した睡眠要求に関わる遺伝子の探索によって、睡眠要求の分子機構の解明にもつながると期待される。

研究成果の概要（英文）：The idea of this study is to quantitatively assess sleep needs by measuring changes in intracellular Ca²⁺ concentration in sleep-regulating neurons in *Drosophila*. We focused on two groups of neurons: the sleep-promoting PB interneurons and circadian clock neurons LNd and found driver lines labeling these neurons specifically. We expressed a Ca²⁺-dependent luciferase reporter (Gao et al., 2015) in a group of neurons involved in sleep regulation (Kunst et al., 2014) and measured bioluminescence from free-moving individuals. Luminescence intensity tended to be increased during the subjective daytime when locomotor activity was increased and reduced during the subjective night when sleep was increased.

研究分野：神経科学

キーワード：睡眠 覚醒 ショウジョウバエ 中心複合体 ドーパミン NMDA受容体 睡眠要求 生物発光

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

睡眠は多くの動物種に認められる生理現象であり、種間で共通する睡眠制御機構が明らかになってきた。睡眠の制御機構や生理機能についてのこれまでの研究は、脳波によって睡眠を厳密に定義できる哺乳類を主な対象として行われてきた。一方、遺伝学的解析が容易な線虫、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュといった非哺乳類モデル生物においても、行動学的に睡眠と類似する休息状態(以下、睡眠)が認められ、分子レベルでの睡眠研究が進められている。ショウジョウバエ(以下、ハエ)では、これまでに多くの睡眠関連遺伝子が同定され(Tomita et al., *Neurosci. Res.*, 2017) K⁺チャネル、ドーパミントランスポーター、NMDA型グルタミン酸受容体(以下、NMDAR) Sik3などがハエと哺乳類で共通な睡眠制御分子として示されているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。ハエの睡眠を制御する神経回路についても解明が進み、キノコ体や中心複合体などの脳領域や、概日時計ニューロン群に複数の神経回路が同定されている。

我々は、NMDARがハエの睡眠を促進することを明らかにしたが(Tomita et al., *PLOS ONE*, 2015)、マウスでは、神経細胞のコンピューターモデルを用いた徐波睡眠時の神経活動のシミュレーションから、NMDARを介した細胞内[Ca²⁺]上昇による神経細胞の過分極が睡眠を誘導することが予測され(Tatsuki et al., 2016)、実際にNMDARサブユニットの一つNr3aのノックアウトマウスで睡眠量の減少が示された(Sunagawa et al., 2016)。このように、NMDARシグナルは、ハエとマウスで共通して睡眠状態を作り出す機構と考えられている。

1日あたりの睡眠量は、睡眠要求(恒常性)によって制御される。ハエの場合、睡眠剥奪(断眠)後の睡眠量の増加(リバウンド睡眠)を測定することで睡眠要求が評価されてきたが、生理的条件下では測定不能であること、定量性が乏しいこと(Geissmann et al., 2019)、どの細胞のどのような分子実体を反映したものが不明であることなどの課題がある。したがって、睡眠関連遺伝子の睡眠量制御における機能解析のためには、生理的条件下で測定可能、かつ定量性に優れ、分子実体に基づいた睡眠要求の評価系が求められている。

2. 研究の目的

我々のこれまでの研究によって、ハエの概日時計を構成するニューロン群の一つであり、脳内に12個しか存在しないLNd(dorsal lateral neurons)におけるNMDAR活性が、睡眠要求と関係することが示唆された。また、LNdにおけるSik3の機能が睡眠制御に重要であることも示した。これらの結果と、睡眠要求の実体がシナプスタパク質のリン酸化と神経細胞内[Ca²⁺]の上昇であるとするマウスの研究から提唱された2つの仮説に基づき、本研究では、LNdという少数の神経細胞のNMDAR活性を測定することで、哺乳類の脳波デルタパワーのように、睡眠要求を定量的に評価できる系をハエで確立することを目的とする。

3. 研究の方法

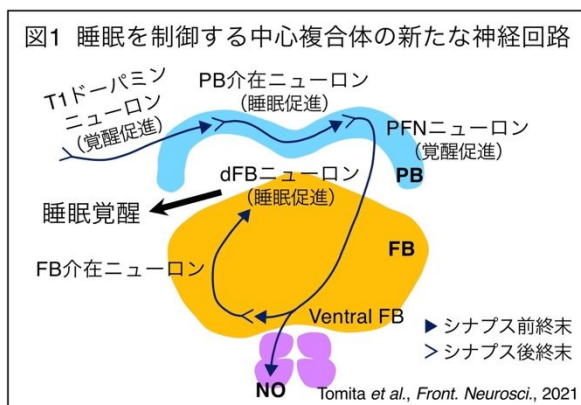
(1) LNdまたは睡眠を促進するPB介在ニューロン群を特異的にラベルするドライバー系統を、FlyLight画像データベース(<https://flweb.janelia.org/cgi-bin/flew.cgi>, Jenett et al., 2012)や論文に基づき探索した。候補ドライバー系統を用いてGFPを発現させて、脳を含む中枢神経系での発現パターンを調べた。

(2) 生物発光測定装置を準備した。睡眠-覚醒制御に関わるニューロン群にTRIC(Transcriptional reporter of intracellular Ca²⁺)(Gao et al., 2015)を発現させて、自由行動下で生物発光を測定した。

4. 研究成果

(1) 睡眠-覚醒を制御する中心複合体の新たな神経回路の解析

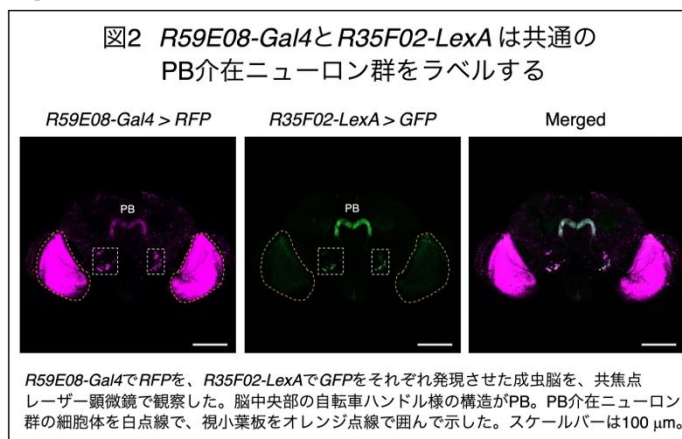
これまでの研究で発見した睡眠-覚醒を制御する中心複合体PB(protocolocerebral bridge)の神経回路の解析結果を論文発表した(Tomita et al., *Front. Neurosci.*, 2021)。中心複合体は脳の中央部分に存在する脳領域で、PB、FB(fan-shaped body)、EB(ellipsoid body)、NO(noduli)という4つの構造から成る。発見した神経回路は、PBに投射し覚醒を促進するT1ドーパミンニューロン群、睡眠を促進するPB介在ニューロン群、PBからFBとNOに投射し覚醒を促進するPB-FB-NOニューロン群から構成される。T1ニューロン群がD2受容体シグナルを介してPB介在ニューロン群を抑制することで覚醒を促進し、PB介在ニューロン群がPB-FB-NOニューロン群を抑制することで睡眠を促進することが示唆された(図1)。さらに、この神経回路が最終的にハエの睡眠



制御において中心的な役割を担う dFB (dorsal FB) ニューロンに接続することも示した (Kato et al., PLOS ONE, 2022)。睡眠を促進する PB 介在ニューロン群で、NMDA 受容体やカルシニューリン (Ca²⁺/カルモジュリン依存性タンパク質脱リン酸化酵素) をノックダウンしたところ、睡眠量は、カルシニューリンノックダウンでは有意に減少し、NMDA 受容体ノックダウンでは減少傾向がみられた。また、Mg²⁺ブロック変異型 NMDA 受容体を発現させると睡眠量が有意に増加した。これらの結果から、PB 介在ニューロン群における NMDA 受容体-カルシニューリンシグナルと睡眠要求が相関する可能性が示され、上述した LNd 神経細胞群に加えて、PB 介在ニューロン群も本研究の解析対象とした。

(2) 睡眠を促進する PB 介在ニューロン群をラベルするドライバー系統の探索

発表した論文で使用した PB 介在ニューロン群をラベルする Gal4 ドライバー系統 (R59E08-Gal4) は、視小葉板という脳領域にも強く発現するため、ルシフェラーゼレポーターシステムを用いた PB 介在ニューロン群のみの細胞内 [Ca²⁺] 変化の測定に使用できなかった。そこで、睡眠を促進する PB 介在ニューロン群をラベルする別のドライバー系統を探索した。R35F02-LexA は、R59E08-Gal4 と共通の PB 介在ニューロン群をラベルし (図 2)、この LexA ドライバー系統を用いたニューロン活性化でも睡眠量が顕著に増加した。R35F02-LexA は視小葉板での発現が低いため、R35F02-LexA と R59E08-Gal4 を利用して Split-Gal4 系統を作製することで、PB 介在ニューロンを特異的にラベルできると考えられる。今後、Split-Gal4 系統を作製し、研究を進める予定である。



(3) LNd をラベルするドライバー系統の探索

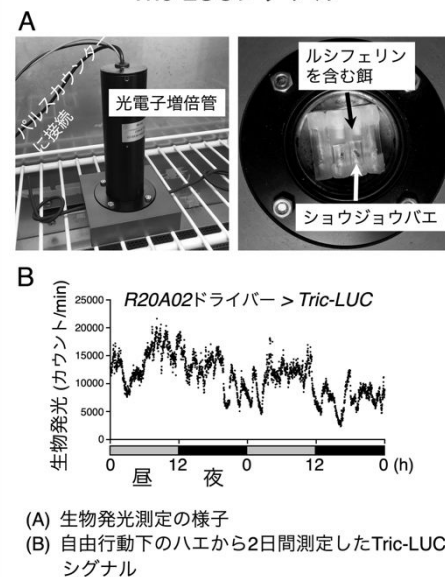
LNd を比較的特異的にラベルできる 2 つの系統を見出した。そのうちの 1 つの系統を用いてニューロンを活性化すると、主観的夜の睡眠量が有意に増加した。

4

(4) Ca²⁺依存性ルシフェラーゼレポーターを用いたニューロンの細胞内 [Ca²⁺] 変化の測定

Ca²⁺依存性ルシフェラーゼレポーターシステムを用いた測定が可能であるかを検討した。そのために生物発光測定装置を準備した (図 3A 左)。睡眠-覚醒制御に関わるニューロン群を含む複数のニューロン群をラベルするドライバー系統 (R20A02-QF2) (Kunst et al., 2014) を用いて、TRIC を発現させた。このショウジョウバエを 12 時間ずつの明暗サイクルに同調させた後、10 mM ルシフェリンを含む餌を入れた管に移し (図 3A 右)、1 分間あたりの生物発光を連続測定した。図 3B は、別々の管に入れた 2 匹のショウジョウバエから 2 日にわたり測定した生物発光パターンである。発光強度には、活動量が多い主観的昼に上昇し、睡眠量が多い主観的夜に低下する傾向がみられた。生物発光の測定中に機械刺激を与えて断眠するための装置の作製も行った。本研究で見出した PB 介在ニューロン群および LNd のドライバー系統を用いて、TRIC とは異なる Ca²⁺依存性ルシフェラーゼレポーターである CaLexA-LUC (Masuyama et al., 2012) を駆動するために必要な LexAop2-luciferase 系統を作製中である。

図3 睡眠制御ニューロンから測定した Tric-LUCシグナル



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kobayashi R, Yamashita Y, Suzuki H, Hatori S, Tomita J, Kume K.	4. 巻 643
2. 論文標題 rdgB knockdown in neurons reduced nocturnal sleep in <i>Drosophila melanogaster</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 24-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.12.043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kato YS, Tomita J, Kume K.	4. 巻 17
2. 論文標題 Interneurons of fan-shaped body promote arousal in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0277918
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0277918	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi ST, Kobayashi R, Tomita J, Kume K.	4. 巻 183
2. 論文標題 The regulation of circadian rhythm by insulin signaling in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurosci. Res.	6. 最初と最後の頁 76-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2022.07.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakagawa H, Maehara S, Kume K, Ohta H, Tomita J.	4. 巻 e12807
2. 論文標題 Biological functions of 2-adrenergic-like octopamine receptor in <i>Drosophila melanogaster</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes Brain Behav.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gbb.12807	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi ST, Tomita J, Kume K.	4. 巻 591
2. 論文標題 Insulin signaling in clock neurons regulates sleep in Drosophila	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 44-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa H, Nakane S, Ban G, Tomita J, Kume K.	4. 巻 589
2. 論文標題 Effects of D-amino acids on sleep in Drosophila	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 180-185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.11.107	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomita J, Ban G, Kato YS, Kume K.	4. 巻 15
2. 論文標題 Protocerebral Bridge Neurons That Regulate Sleep in Drosophila melanogaster	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front. Neurosci.	6. 最初と最後の頁 647117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2021.647117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima K, Gao T, Kume K, Iwata H, Hirai S, Omachi C, Tomita J, Ogino H, Naito M, Shibamoto Y.	4. 巻 194
2. 論文標題 Fruit Fly, Drosophila melanogaster, as an In Vivo Tool to Study the Biological Effects of Proton Irradiation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Radiat Res.	6. 最初と最後の頁 143-152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1667/RADE-20-00006	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 -

1. 著者名 Nomura N, Matsuno K, Muranaka T, Tomita J.	4. 巻 13
2. 論文標題 Toward a Practical Theory of Timing: Upbeat and E-Series Time for Organisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosemiotics	6. 最初と最後の頁 347-367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12304-020-09398-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計18件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Riho Kobayashi, Sena Hatori, Hiroko Suzuki, Shin Nakane, Sho Yamaguchi, Jun Tomita, Hiromasa Funato, Masashi Yanagisawa, Kazuhiko Kume.
2. 発表標題 Functional analysis of Drosophila Sik3, a homologue of mouse Sleepy1, in clock neurons
3. 学会等名 85th CSHL symposium: Biological Time Keeping, 2021, virtual (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sho Yamaguchi, Jun Tomita, Kazuhiko Kume.
2. 発表標題 Insulin signaling regulates circadian rhythm in Drosophila melanogaster
3. 学会等名 85th CSHL symposium: Biological Time Keeping, 2021, virtual (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 磯部 一郎、富田 淳、桑 和彦.
2. 発表標題 ショウジョウバエの闘争に関わるドパミン作動性神経による睡眠制御
3. 学会等名 第29回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 洵、小林 里帆、富田 淳、桑 和彦.
2. 発表標題 時計神経 dorsal lateral neuronsによる睡眠制御
3. 学会等名 第29回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jun Yamamoto, Riho Kobayashi, Jun Tomita, Kazuhiko Kume.
2. 発表標題 Functional analysis of dorsal lateral neuron on sleep regulation in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kosuke Sakai, Taro Ueno, Jun Tomita, Kazuhiko Kume.
2. 発表標題 Sleep regulation by a neutral amino acid transporter in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 翔、富田 淳、桑 和彦.
2. 発表標題 インスリンシグナルによる概日リズム制御
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 遥輝、中川 寛之、石崎 千晶、富田 淳、桑 和彦.
2. 発表標題 ショウジョウバエのソルピトールに対する行動の経時的変化
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下 裕子、小林 里帆、羽鳥 聖七、鈴木 博子、三宅 遼、富田 淳、桑 和彦.
2. 発表標題 ショウジョウバエSNIPPsのキノコ体での睡眠制御
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅 遼、小林 里帆、山下 裕子、羽鳥 聖七、鈴木 博子、山本 洵、富田 淳、桑 和彦.
2. 発表標題 SNIPPsの新規睡眠関連遺伝子のスクリーニング
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 里帆、羽鳥 聖七、鈴木 博子、山口 翔、富田 淳、船戸 弘正、柳沢 正史、桑 和彦.
2. 発表標題 時計神経でのショウジョウバエSik3の睡眠調節
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 里帆、羽鳥 聖七、鈴木 博子、中川 寛之、山口 翔、富田 淳、船戸 弘正、柳沢 正史、桑 和彦.
2. 発表標題 Sik3による睡眠量、概日リズムの調節
3. 学会等名 日本睡眠学会第46回定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中川 寛之、前原 志穂里、桑 和彦、太田 広人、富田 淳.
2. 発表標題 Functional analysis of 2-adrenergic-like octopamine receptor in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 善章、富田 淳、桑 和彦.
2. 発表標題 ショウジョウバエの中心複合体における新規睡眠経路
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中川 寛之、中根 伸、富田 淳、桑 和彦.
2. 発表標題 ショウジョウバエの睡眠に影響を与えるアミノ酸の同定
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 里帆、中川 寛之、羽鳥 聖七、鈴木 博子、山口 翔、中根 伸、富田 淳、船戸 弘正、柳沢 正史、桑 和彦.
2. 発表標題 ショウジョウバエSik3による睡眠量調節機構の解析
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 羽鳥 聖七、小林 里帆、中川 寛之、富田 淳、船戸 弘正、柳沢 正史、桑 和彦.
2. 発表標題 ショウジョウバエを用いた新規睡眠調節遺伝子HDAC4の機能解析
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiaki Kato, Jun Tomita, Kazuhiko Kume.
2. 発表標題 A novel sleep regulatory circuit in Drosophila central complex
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 富田 淳、桑 和彦	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 772
3. 書名 動物の事典(末光 隆志 総編集)第6章 動物の生理 動物の睡眠	

〔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
---------	---------