

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月11日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370003

研究課題名（和文） ショウジョウバエの睡眠行動の分子遺伝学的研究

研究課題名（英文） Molecular Genetics of Sleep in *Drosophila*.

研究代表者

谷村 禎一（TANIMURA TEIICHI）

九州大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：20142010

研究成果の概要（和文）：現代人にとって、睡眠障害、快適な眠りの確保が切実な社会的問題ともなっており、睡眠の研究が注目されている。生物はなぜ睡眠を必要とするのかに対する最終的な解答は得られておらず、睡眠の分子機構の全容も明らかではない。ショウジョウバエにも哺乳動物の睡眠と共通点を持った現象があることが近年報告されており、遺伝的なアプローチから睡眠を研究するためのモデル生物となりうる。本研究では、昼夜間の1匹のショウジョウバエの行動を詳細に解析するために暗視野 CCD カメラを用い解析装置をハード、ソフトの両面で開発した。この装置を用いて時計突然変異体の睡眠行動を解析し、*pdf* 時計突然変異体系統のバエの歩行活動リズムが非常に顕著なウルトラディアンリズムを示すことを見つけた。さらに、カフェインの覚醒作用に関わる神経機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Sleep research is important for people in modern world as we are faced with many problems associated with good sleep and sleep disorders. Recent studies indicate that *Drosophila* can be used as an excellent model organism to study on sleep. We have developed a CCD camera-PC system to track movement of a single fly. We found that *Drosophila* have an endogenous ultradian oscillator, which is masked by circadian rhythmic behaviors. The *pdf* clock mutant shows robust and precise ultradian rhythm with period length about 55 minutes. The ultradian rhythm of *pdf* mutant flies was not temperature compensated. We also studied the neural mechanism of sleep regulation by caffeine to reveal the possible role of the adenosine receptor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝、ゲノム動態

キーワード：ショウジョウバエ 睡眠 アデノシン受容体 行動解析 サーカディアンリズム
ウルトラディアンリズム

1. 研究開始当初の背景

現代人にとって、睡眠障害、快適な眠りの

確保が切実な問題となっており、睡眠の研究が注目されている。睡眠の生理学的な研究は、脳波、筋電図の記録とその解析に依ってきた。また、多くの睡眠修飾物質がこれまで報告されている。しかし、生物はなぜ睡眠を必要とするのかに対する最終的な解答は得られておらず、睡眠の分子機構の全容も明らかでない。教科書的な定義によると、睡眠が認められるのは哺乳類から鳥類までであり、両生類、爬虫類、特に無脊椎動物には休息状態はあっても、高等動物にみられる睡眠はないと考えられてきた。しかし、2000年に発表された論文によってショウジョウバエにおいて見られる夜間の活動度の低下が、ホ乳類などで見られる睡眠と共通項を有する行動であることが行動解析と薬理学的実験から提唱された。この発表が契機となって米国を中心とした複数の研究室がショウジョウバエの睡眠の研究を開始した。睡眠時では刺激に対する反応性の低下が認められること、さらに神経活動が低下しているという報告もある。また、生体のホメオスタシス維持のために恒常性として必要であることは、断眠後にリバウンドがあることから支持される。ごく最近では、ショウジョウバエにおいても睡眠が学習に必要であるという報告もある。さらに睡眠が異常となる突然変異体の研究も行われ、ドパミン作動性ニューロンの重要性が明らかになっている。したがって、ショウジョウバエは睡眠を研究するためのモデル生物となると考えられる。

2. 研究の目的

①これまでの睡眠の研究では、チャンバー内の1点でハエの動きをモニターしていた。ハエの動きの定量的な解析を行うためのシステムを構築する。

②その装置を用いて得られて時系列データの解析を行う。ヒトなどでは、サーカディアンリズムに加えて、約90分周期のウルトラディアンリズムが脳の神経活動に認められる。睡眠時は、REM、non-REMの出現にウルトラディアンリズムが認められる。ショウジョウバエにおいてもウルトラディアンリズムがあるかを研究し、サーカディアンリズムがウルトラディアンリズムとどのような関係にあるかを究明し、睡眠においてもあるのかを解明する。

③マウスにおける研究により、アデノシンが睡眠物質であり、カフェインはアデノシン受容体にアデノシンが結合するのを阻害すると考えられている。そこで、ショウジョウバエにおいてカフェインの睡眠への影響を調べる。

④覚醒と睡眠がどのような神経回路に働きによって調節されているのかを解明する。カフェインがアデノシン受容体に作用するかを分子遺伝学的な手法を用いて研究する。

3. 研究の方法

① 遠赤外線感受性 CCD ビデオカメラを用いて、20匹のハエの行動軌跡を画像データとしてPCに取り込むシステムを完成させた。画像データを処理して、各ハエのXY座標の時系列データを得た。

② 時系列データを最大エントロピー法と連続ウェーブレット解析を用いて解析した

③カフェインの睡眠、活動度への影響を評価する。

④ショウジョウバエのアデノシン受容体遺伝子を同定し、睡眠への関与を調べる。

4. 研究成果

① 1匹のショウジョウバエの行動軌跡を明暗下で追跡し、同時の多個体の動きを定量的に解析することが可能になった。これまでのサーカディアンリズムの測定装置ではハエは狭い空間を2次元的に動くだけだったが、今回、時計皿を用いることでハエの動きがより自由になった。赤外線暗視 CCD ビデオカメラと赤外線 LED 照明を用いて、明暗あるいは全暗下での20匹のショウジョウバエの2次元面での1秒ごとの画像を撮影記録した。得られたビデオ画像は、ImageJのプラグインソフトウェアを用いることでハエの重心座標の経時変化データを得ることができた。そのデータを当ラボで作製したソフトを用いて、ハエの移動速度、移動距離、移動スピードなどのデータを得ることができた。それによって、より正確にハエの休止状態を定義することができた。

②種々のサーカディアンリズムの突然変異

体の行動を解析したところ、サーカディアンリズムの振動が停止していると考えられる状態において、短い周期の活動リズムを検出できることが今回わかった。野生型のハエにおいても、全明の条件下で、同様なリズムが観察された。そこで、このウルトラディアンリズムの解析を行い睡眠との関連を研究することとした。ショウジョウバエの活動の時系列データを最大エントロピー法と連続ウェーブレット解析を用いて解析したところ、pdf 時計突然変異体において明瞭なウルトラディアンリズムを検出した。さらに諸条件下での解析を行ったところ、野生型のハエでも全明条件に数日置くことによりウルトラディアンリズムが検出された。周期の長さが異なる per 遺伝子の突然変異系統の長周期、短周期、無周期の突然変異体のウルトラディアンリズムの周期を調べたが、サーカディアンリズムの周期との相関関係はなかった。さらに、温度を変化させてウルトラディアンリズムの周期を調べたところ、温度補償されていないことがわかった。これらの結果は、ウルトラディアンリズムとサーカディアンリズムの振動体が別のものであることを示唆している。

③ カフェインはショウジョウバエにおいても覚醒効果を示すことを明らかにした。カフェインはハエの活動度には影響しなく、長時間の静止状態を減少させることがわかった。

④ ホ乳類ではカフェインの作用はアデノシン受容体を介して行われると考えられている。ショウジョウバエのゲノムにもアデノシン受容体の候補遺伝子が存在することを見だし、その遺伝子産物の機能を培養細胞発現系で確認した。アデノシン受容体遺伝子にトランスポゾンが挿入された系統を用いて遺伝子欠損突然変異体を分離することができた。アデノシン受容体が発現しているニューロンが睡眠に関わっていることがわかったが、アデノシン受容体が睡眠の制御をしているかについてはまだ結論は出ていない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

① Toshima, N. and Tanimura, T. (2012) Taste preference for amino acids is dependent on internal nutritional state in *Drosophila*. J. Exp. Biol. in press 査読有

② Fujita, M. and Tanimura, T. *Drosophila* evaluates and learns the nutritional value of sugars. Curr. Biol. 21, 751-755 (2011) 査読有

③ Itoh, T.Q., Tanimura, T. and Matsumoto, A. bHLH-ORANGE family genes regulate the expression of E-box clock genes in *Drosophila*. Appl. Entomol. Zool. 46, 391-397 (2011) 査読有

④ Itoh, T.Q., Tanimura, T. and Matsumoto, A. A membrane-bound transporter controls the circadian transcription of clock genes in *Drosophila*. Genes to Cells 16, 1159-1167 (2011) 査読有

⑤ Ryuda, M. Tsuzuki, S., Matsumoto, H., Oda, O., Tanimura T. and Hayakawa Y. Identification of a novel gene, *Anorexia*, regulating feeding activity via insulin signaling in *Drosophila melanogaster*. J. Biol. Chem. 286, 38417-38426 (2011) 査読有

⑥ Ozaki K, Ryuda M, Yamada A, Utoguchi A, Ishimoto H, Calas D, Marion-Poll F, Tanimura T. Yoshikawa H. A gustatory receptor involved in host-plant recognition for oviposition of the butterfly, *Papilio xuthus*. Nat. commun. 2:542. (2011) 査読有

⑦ 関 裕一: "ハエは夢をみるのか?" 昆虫と自然 45, 4-7 (2010) 査読有

⑧ Fuchikawa, T., Sanada, S., Nishio, R., Matsumoto, A., Matsuyama, T., Yamagishi, M., Tomioka, K., Tanimura, T. and Miyatake T. The clock gene cryptochrome of *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) in strains with different mating times. Heredity 104, 387-392 (2009) 査読有

〔学会発表〕（計2件）

① Yuuichi Seki and Teiichi Tanimura,
Ultradian rhythm is revealed by disruption
of circadian clock in *Drosophila*
melanogaster. ESF-EMBO Conference on
Functional Neurobiology in Minibrains From
Flies to Robots and Back Again. 2010年10月
17-22日、Sant Feliu de Guixols, Spain

② 関裕一、谷村禎一「キイロショウジョウ
バエ pdf[01]突然変異体におけるウルトラデ
ィアンリズム」2009年12月14日、第30回
に日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷村 禎一 (TANIMURA TEIICHI)

九州大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：20142010