

## 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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22300132  
 研究課題名（和文） ショウジョウバエの睡眠覚醒制御機構の解析  
 研究課題名（英文） Sleep and arousal regulation in *Drosophila melanogaster*  
 研究代表者  
 梶 和彦 (KUME KAZUHIKO)  
 熊本大学・発生医学研究所・准教授  
 研究者番号：30251218

研究成果の概要（和文）：睡眠覚醒制御機構の解明のため、モデル生物であるショウジョウバエを解析して、カルシニューリンなど数個の新規睡眠関連遺伝子を同定し、睡眠と記憶の関連、睡眠と加齢・寿命の関係を示した。また、覚醒制御物質であるドーパミンについて、活動の時系列解析から休息時間の制御への関与を、生理機能解析から代謝・温度嗜好性との関係を示し、さらに覚醒を制御する脳内のドーパミン神経回路を、単一神経細胞レベルで同定した。

研究成果の概要（英文）：Using *Drosophila melanogaster* as a model animal for sleep research, we identified calcineurin and others as novel sleep related genes and showed the relationship between sleep and memory retention. By the analysis of dopamine functions, which is an arousal regulator, we showed its role in rest length regulation, metabolism and temperature preference. We also identified arousal regulating dopamine circuit in fly brain at the single cell level.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2012 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：自然科学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：睡眠、覚醒、概日周期、ショウジョウバエ、ドーパミン、時系列解析、モザイク解析、代謝、加齢、寿命、温度嗜好性

## 1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエをモデル生物とする睡眠の研究は、2000年に最初の論文が発表された新しい分野である。研究代表者のグループ

は、当初から、この分野の研究を推進してきたが、ドーパミントランスポーターの機能欠失により睡眠時間が極端に短くなっている変異体 *fumin*（不眠）を発見し、ショウジ

ヨウバエでも哺乳類同様に、ドーパミンが睡眠覚醒を制御することを世界でも初めて示して注目された (Kume et al. *J. Neurosci*, 2005)。この結果、ショウジョウバエの睡眠が、行動レベルだけでなく、分子レベルでも、哺乳類と相似であることが示された。

そこで、睡眠研究のモデルとしてのショウジョウバエに、さらに興味が集まることになり、従来、哺乳類で知られていた知見を逆にショウジョウバエで試す研究も行われ、睡眠と代謝や加齢との関係、さらに睡眠と学習・記憶の関係などが調べられるようになった。

## 2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエのモデルが最適な分子遺伝学手法を用いた新規睡眠関連遺伝子の探索、及び、研究代表者グループが主要対象とするドーパミンの生理機能の解析を中心に、種々の手法を用いて、ショウジョウバエの睡眠覚醒制御機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規睡眠関連遺伝子の探索

ドーパミントランスポーターの欠失変異である *fumin* 変異体のハエと野生型のハエの頭部での遺伝子発現を、マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、発現差のある遺伝子群を候補として、新規睡眠関連遺伝子の探索を行った。

また、*fumin* 変異体に高カロリー栄養負荷を行うと睡眠量と寿命に影響を与えることがわかったので、*fumin* に高カロリー栄養を与えた場合に变化する遺伝子を候補とした睡眠関連遺伝子探索を行った。

### (2) ドーパミンの機能と回路の解析

*fumin* 変異株を用いて、活動の時系列解析、温度嗜好性と代謝量測定を行った。

また、ドーパミン受容体欠損株や、一部のドーパミン神経細胞を特異的に活性化可能なモザイク個体を作って解析することで、ドーパミンが覚醒を誘導する神経回路の同定を行った。

### (3) 共同研究

ドーパミン合成酵素 (Tyrosine Hydroxylase) が脳内でのみ欠損しているハエを作成したグループと共同研究で、脳内のドーパミンの生理機能を調べた。

オーファン受容体のリガンドペプチドを生化学的に精製するプロジェクトを共同研究で行い、得られたリガンドを過剰発現するハエの樹立などを行った。

## 4. 研究成果

### (1) カルシニューリン遺伝子機能の発見

*fumin* のマイクロアレイ解析から、約 30 個の候補遺伝子を抽出し、RNAi 法を用いて、全神経細胞でノックダウン (発現抑制) したハエを作り、その睡眠量を測定したところ、カルシニューリン A-14F をノックダウンしたハエで、極端に睡眠量が減少した (図 1)。

そこで、ハエの 5 種類のカルシニューリン遺伝子を全て調べたところ、カルシニューリン B をノックダウンしても、同様に睡眠が減少することが示された。また、発現を調べたところ、カルシニューリン A-14F 遺伝子は、脳内の多くの神経細胞に発現が認められた。

さらに、カルシニューリン A-14F をノックダウンしたハエでは、嗅覚と電気による嫌悪刺激による連合学習の記憶定着が障害されることも示された。この結果は、睡眠と記憶の関連を示唆する (Tomita et al. *J. Neurosci*, 2011)。

また、カルシニューリン遺伝子のノックアウトでも同様の現象が観察され、さらにカルシニューリンの制御因子である *sra/DSCR1* 遺伝子の変異体のハエでも、やはり同じ様に睡眠量の現象が観察された (Nakai et al. *J. Neurosci*, 2011)。

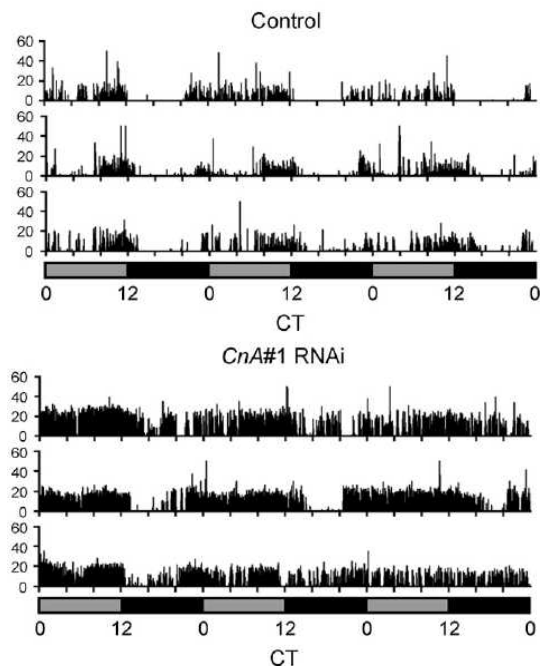


図 1: カルシニューリン抑制による睡眠減少  
上段が野生型のハエ 3 匹、下段がカルシニューリン A-14F 遺伝子を、全神経でノックダウンしたハエ 3 匹の、恒常暗条件下 3 日間の活動記録。下段の 3 匹のハエでは、活動量が増えて、睡眠量が減少している。

(Tomita et al. *J. Neurosci*, 2011 より)

## (2) 高カロリー負荷と睡眠量の関係と JNK

*fumin* 変異は睡眠量が野生型の 3 分の 1 程度まで減少するが、単独では寿命には影響がなかった。しかし、高カロリーのエサで飼育すると、さらに睡眠時間が短くなり、寿命も野生型よりも短縮することがわかった (Yamazaki et al. BBRC 2012)。

そこで、高カロリー条件下で発現が変化する遺伝子 20 個ほどを候補遺伝子として、全神経でノックダウンを行ったところ、c-jun terminal kinase (JNK) をノックダウンすると、睡眠時間が減少することが示された (Takahama et al. BBRC 2012)。

## (3) ドーパミンの生理機能解析

多数のハエの動きを同時ビデオ記録して、画像解析を行うことで、活動と休息を秒単位の時間分解能で分類・時系列解析し、それぞれの持続時間分布を調べた。その結果、哺乳類などで報告された結果と同様に、ショウジョウバエでも活動時間は指数分布を、休息時間はべき乗分布を示した。さらに、ドーパミンシグナルは、休息時間を短くすることで、活動量を増やすことが示された (Ueno et al. PLoS One 2012a)。

単独の個体を用いたスパイロメトリーを開発して、*fumin* 変異体の呼吸量を定量したところ、野生型よりも増加していた。活動を抑制した状態でも増加は観察されたため、活動が増えた結果ではなく、ドーパミンが基礎代謝を更新すると考えられた。また、安定した温度勾配を作り出す装置を開発して、温度嗜好性を調べたところ、*fumin* 変異体は野生型よりも低温を好んだ。このことから、ドーパミンシグナルの亢進により、代謝量が増加し、温度嗜好性が低温側にシフトすることが示された (Ueno et al. PLoS One 2012b)。

また、脳のドーパミン合成酵素が減少して、脳内のドーパミン量が減る変異体では、睡眠量が増加し、外部刺激による覚醒域値が上昇していることも示された (Riemensperger et al. PNAS 2011)。

## (4) ドーパミンの覚醒誘導回路の同定

D1 型ドーパミン受容体と、*fumin* の二重変異体を作成したところ、*fumin* の短眠の表現型が、野生型の通常の睡眠量に回復した。この二重変異体で、脳内の扇状体と呼ばれる部位で D1 受容体を再生したところ、短眠の表現形が、再び出現した。さらに、ハエから脳を取り出して培養し、そこにドーパミンを添加したところ、扇状体が直接ドーパミンに反応することが確認できた。これらの結果から、ドーパミンが覚醒制御に働く際の標的が、脳内の扇状体であることが示された。

次に、脳内に 200 個程度存在するドーパミン神経細胞の中の 1 個か 2 個だけを活性化す

ることができるモザイク個体を 400 匹以上、作出して、睡眠量を調べたところ、PPM3 と呼ばれる領域に存在する特定のドーパミン神経が活性化される個体のみで、睡眠が減少することがわかった。図 2 には、覚醒を促すことが示された単一のドーパミン神経細胞を示すが、この神経は扇状体に投射することから、受容体の結果と合わせて、PPM3 に存在するドーパミン神経が扇状体の D1 型ドーパミン神経に働くことで覚醒が誘導されることがわかった。

PPM3 以外の部位に存在して、脳のキノコ体という部位に投射するドーパミン神経が嫌悪刺激の連合学習を制御していることが、他のグループの結果でわかっているが、このドーパミン神経を活性化しても、覚醒が誘導されないことから、睡眠覚醒を制御するドーパミン神経と、学習記憶を制御するドーパミン神経は異なることが示された。この結果は、予想外で、睡眠中に学習を成立させる可能性や、逆に、記憶に残らない覚醒が存在する可能性を示した (Ueno et al. Nat Neurosci 2012)。

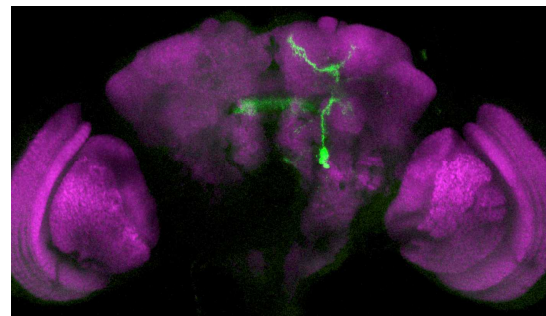


図 2 : 覚醒を誘導するドーパミン神経細胞  
紫色が脳を、緑色が単一のドーパミン細胞で、  
脳の中心部の横に長く見えるのが扇状体  
(Ueno et al. Nat Neurosci 2012 より)

## (5) 生理活性ペプチドの同定

ショウジョウバエのゲノム解析から、リガンドが不明で、7 回膜貫通型三量体 G 蛋白共役型のオーファン受容体を選び出した。これらの受容体遺伝子を、受容体活性化を検出可能な哺乳類細胞に発現して、その反応を指標に、ショウジョウバエの抽出物から、リガンドを精製した。その結果、4 つの新規ペプチドのリガンドをクローニングすることができた。現在、まだ、睡眠との関連は見い出されていないが、これらのリガンドは、腸に発現して、受容体が脳に発現することから、腸の情報を何らかの形で脳に伝えている可能性が示唆された (Ida et al. Front Endocrinol. 2012, Ida et al. BBRC 2011a, 2011b)。

5. 主な発表論文等 (研究代表者に下線)

[雑誌論文] (計 11 件 全て査読有)

- [1] T. Ueno, J. Tomita, H. Tanimoto, K. Endo, K. Ito, S. Kume, K. Kume. Identification of a dopamine pathway that regulates sleep and arousal in *Drosophila*. DOI: 10.1038/nn.3238 **Nat Neurosci.** **15** (2012) 1516-1523.
- [2] K. Takahama, J. Tomita, T. Ueno, M. Yamazaki, S. Kume, K. Kume. Pan-neuronal knockdown of the c-Jun N-terminal Kinase (JNK) results in a reduction in sleep and longevity in *Drosophila*. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.12.040 **Biochem Biophys Res Commun.** **417** (2012) 807-11.
- [3] M. Yamazaki, J. Tomita, K. Takahama, T. Ueno, M. Mitsuyoshi, E. Sakamoto, S. Kume, K. Kume. High calorie diet augments age-associated sleep impairment in *Drosophila*. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.12.041 **Biochem Biophys Res Commun.** **417** (2012) 812-6.
- [4] T. Ueno, N. Masuda, S. Kume, K. Kume. Dopamine modulates the rest period length without perturbation of its power law distribution in *Drosophila melanogaster*. DOI: 10.1371/journal.pone.0032007 **PLoS One.** **7** (2012a) e32007.
- [5] T. Ueno, J. Tomita, S. Kume, K. Kume. Dopamine modulates metabolic rate and temperature sensitivity in *Drosophila melanogaster*. DOI: 10.1371/journal.pone.0031513 **PLoS One.** **7** (2012b) e31513.
- [6] T. Ida, T. Takahashi, H. Tominaga, T. Sato, H. Sano, K. Kume, et al. Isolation of the bioactive peptides CCHamide-1 and CCHamide-2 from *Drosophila* and their putative role in appetite regulation as ligands for G protein-coupled receptors. DOI: 10.3389/fendo.2012.00177 **Front Endocrinol.** **3** (2012) 177.
- [7] J. Tomita, M. Mitsuyoshi, T. Ueno, Y. Aso, H. Tanimoto, Y. Nakai, T. Aigaki, S. Kume, K. Kume. Pan-Neuronal Knockdown of Calcineurin Reduces Sleep in the Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*. DOI:10.1523/JNEUROSCI.5860-10.2011

**J Neurosci.** **31** (2011) 13137-46.

- [8] Y. Nakai, J. Horiuchi, M. Tsuda, S. Takeo, S. Akahori, T. Matsuo, K. Kume, T. Aigaki. Calcineurin and Its Regulator Sra/DSCR1 Are Essential for Sleep in *Drosophila*. DOI:10.1523/JNEUROSCI.1337-11.2011 **J Neurosci.** **31** (2011) 12759-66.
- [9] T. Ida, T. Takahashi, H. Tominaga, T. Sato, K. Kume, M. Ozaki, et al. Identification of the novel bioactive peptides dRYamide-1 and dRYamide-2, ligands for a neuropeptide Y-like receptor in *Drosophila*. DOI:10.1016/j.bbrc.2011.06.081 **Biochem Biophys Res Commun.** **410** (2011a) 872-7.
- [10] T. Ida, T. Takahashi, H. Tominaga, T. Sato, K. Kume, K. Yoshizawa-Kumagaye, et al. Identification of the endogenous cysteine-rich peptide trissin, a ligand for an orphan G protein-coupled receptor in *Drosophila*. DOI:10.1016/j.bbrc.2011.09.018 **Biochem Biophys Res Commun.** **414** (2011b) 44-8.
- [11] T. Riemensperger, G. Isabel, H. Coulom, K. Neuser, L. Seugnet, K. Kume, et al. Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. DOI:10.1073/pnas.1010930108 **Proc Natl Acad Sci U S A.** **108** (2011) 834-9.

[図書] (計 1 件)

- [1] 条 和彦, 無脊椎動物の概日リズム 分子機構. 化学同人, 時間生物学 (海老原史樹文・吉村崇編) p.145-160 (2012)

[学会発表] (計 1 件)  
(海外招待講演のみ)

- [1] K. Kume Dopaminergic regulation of arousal in *Drosophila*. バイオジェニックアミン国際シンポジウム、ベルリン自由大学、ドイツ、Berlin (6-8, July 2012)

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：ショウジョウバエ新規生理活性ペプチドの発見とその作用

発明者：井田隆徳, 児島将康, 糸 和彦

権利者：同上、学校法人久留米大学、国立大学法人熊本大学

種類：特許

番号：特願 2010-045816

出願年月日：2010年3月2日

国内外の別：国内

〔その他〕

プレス発表

熊本大学発生医学研究所ホームページにて

<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/topics/ueno2012.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

糸 和彦 (KUME KAZUHIKO)

熊本大学・発生医学研究所・准教授

研究者番号：30251218