

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 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700433

研究課題名（和文）ショウジョウバエの新規睡眠関連遺伝子カルシニューリンの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of calcineurin, a sleep-related gene in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*

研究代表者

富田 淳 (TOMITA JUN)

熊本大学・発生医学研究所・特定事業研究員

研究者番号：40432231

研究成果の概要（和文）：ショウジョウバエの睡眠が、Ca²⁺-カルシニューリン（Ca²⁺/カルモジュリン依存性のタンパク質脱リン酸化酵素）シグナル経路によって制御されることを明らかにした (Tomita *et al.*, 2011)。さらに解析を進め、睡眠制御においてカルシニューリンが機能する脳の神経細胞群の同定に成功した。それらの細胞群で、ドーパミン D1 受容体をノックダウンすることで睡眠量が増加することを発見し、カルシニューリンシグナルとドーパミンシグナルのクロストークによる新たな睡眠制御機構が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We recently reported that calcineurin (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase) is an important regulator of sleep in *Drosophila* (Tomita *et al.*, 2011). The pan-neuronal knockdown of *Calcineurin A at 14F* (*CanA-14F*), which is one of the three calcineurin catalytic A subunit genes in *Drosophila*, resulted in sleep loss, while an adult-specific misexpression of a constitutively active form of CanA-14F in all neurons increased sleep. We identified brain neurons important for the function of CanA-14F in sleep regulation by targeted *CanA-14F* knockdown using the GAL4-UAS system. Moreover, we found that knockdown of D1 dopamine receptor in these neurons significantly increased sleep. These results suggest a cross-talk between Ca²⁺- calcineurin and dopaminergic signaling pathways in *Drosophila* sleep regulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：ショウジョウバエ、睡眠、カルシニューリン、ドーパミン、学習記憶

1. 研究開始当初の背景

睡眠は脳の高次機能であり、脳波で定義されるため、従来、哺乳類で主に研究されてきたが、そのメカニズムや機能の分子的基盤につ

いては未解明な点が多い。一方、昆虫などの下等動物にも、行動学的に哺乳類の睡眠と同様の特徴をもつ睡眠類似行動（以後、単に睡眠）が認められる。特に、遺伝学の優れたモ

デル生物であるショウジョウバエの睡眠が報告され注目を浴びた (Hendricks *et al.*, *Neuron* 2000, Shaw *et al.*, *Science* 2000)。これまでに多くの睡眠関連遺伝子が同定され、その中で cAMP-CREB (cAMP 応答性転写因子) シグナル経路が、ショウジョウバエと哺乳類で共通な睡眠の分子メカニズムとして明らかにされている。他にも、ドーパミン、セロトニン、GABA といった神経伝達物質のレベルでも共通性が認められた。さらに睡眠の機能についても共通性が示された。哺乳類では、睡眠は覚醒時に得た情報を再構築し、記憶する機能をもつことが示唆されている。強制的に睡眠を奪う断眠実験により、睡眠は生存に必須と考えられている。ショウジョウバエでも、断眠によって学習や記憶が障害され、寿命については、睡眠量が極端に減少する変異体のほとんどが短命化することが示されている。以上のように、ショウジョウバエの睡眠は、哺乳類の睡眠と単に行動学的に類似するだけでなく、そのメカニズムや機能についても哺乳類と共通性が高い。したがって、ショウジョウバエで明らかになる睡眠のメカニズムや機能の分子的基盤から、種を超えた睡眠の共通原理に迫ることが期待できる。我々は、カルシニューリン (Ca^{2+} /カルモジュリン依存性のタンパク質脱リン酸化酵素) 遺伝子を発現抑制したショウジョウバエでは睡眠量が著しく減少することを初めて示し、新たな睡眠のメカニズムとして Ca^{2+} -カルシニューリンシグナルをみいだした。また、このハエは記憶にも異常を示し、睡眠と学習記憶との関連の分子メカニズムを解明できると考えられる。またカルシニューリンは、ドーパミンシグナルが増強され、睡眠量が著しく減少する *fumin* 変異体 (Kume *et al.*, *J. Neurosci.* 2005) のマイクロアレイ解析により発見された遺伝子であり、カルシニューリンとドーパミンの関係が浮かび上がってきた。

2. 研究の目的

ショウジョウバエでは睡眠制御に関わる多くの遺伝子や神経系が同定されている。睡眠は、脳のローカルな現象であると同時にグローバルな現象でもあり、睡眠制御機構の解明には遺伝子や神経系のネットワークレベルの解析が不可欠だが、まだ、ほとんど行われていない。本研究では、まず、 Ca^{2+} -カルシニューリンシグナル経路に着目して、そのシグナルが脳のどこで (どのような細胞群) で機能し、また、どのようなタンパク質を標的とするのかを解明する。さらに、ドーパミンシグナル伝達と Ca^{2+} -カルシニューリンシグナル伝達の睡眠制御の遺伝子・神経ネットワークを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 睡眠制御において、カルシニューリンが機能する脳内の領域や細胞群の同定：特定の細胞群で、任意の遺伝子を発現することができる GAL4-UAS システムを用いて、成虫脳の様々な細胞群でカルシニューリン *CanA-14F* 遺伝子をノックダウンし、睡眠への影響を調べた。

(2) 睡眠制御におけるカルシニューリンシグナルの下流分子の遺伝学的スクリーニング：(1)で同定した細胞群で、カルシニューリンシグナルの下流の候補分子をノックダウンし、睡眠への影響を調べた。

(3) 睡眠制御におけるドーパミンとカルシニューリンシグナル伝達のクロストークの解析：(1)で同定した細胞群でドーパミン受容体をノックダウンし、睡眠への影響を調べた。また、ドーパミン受容体の発現を、免疫染色により調べた。

4. 研究成果

(1) 図 1 は、全神経細胞で GAL4 を発現する *elav-GAL4* と *CanA-14F* 遺伝子の UAS-RNAi を掛け合わせ、全神経細胞でノックダウンした結果で、睡眠量が著しく減少する。*CanA-14F* の発現を調べたところ、神経細胞・グリアを含む、脳のほぼ全ての細胞で発現していることがわかった。そこで、脳の様々な部位で GAL4 を発現するシステムを用いて *CanA-14F* を局所的にノックダウンし、機能部位を調べた。その結果、予想に反して、睡眠中枢とされるキノコ体では効果がなく、30 系統以上を調べた中で、唯一 OK307 という GAL4 ドライバーのみで、睡眠量が減少した (図 2)。その効果は全神経のノックダウンに匹敵し、記憶異常も認めた。OK307 ドライバーは、*giant fiber* という中枢から末梢への運動出力を担う神経系に GAL4 を発現するが、この神経系の睡眠や学習・記憶における役割は、これまで、全く知られていない。

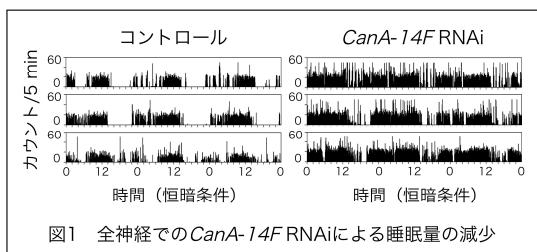


図1 全神経での *CanA-14F* RNAi による睡眠量の減少

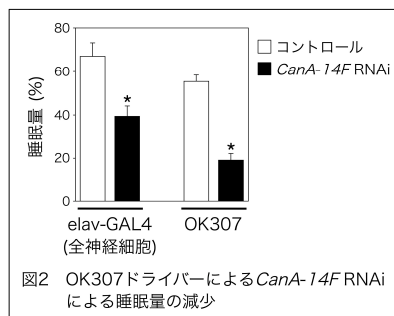


図2 OK307ドライバーによるCanA-14F RNAiによる睡眠量の減少

(2) ショウジョウバエの脳における、カルシニューリンシグナルの下流分子については、従来全く知見がない。一方、哺乳類では下流分子が多数知られており、中でもプロテインホスファターゼ 1 (PP1) の活性調節因子がよく研究されている。PP1 は、NMDA 受容体や転写因子 CREB や NFAT などの機能を調節する。そこで、これらの分子のノックダウンを、OK307 ドライバーを用いて行い、睡眠への影響を調べた。その結果、PP1 活性調節因子の一つである *I-2* のノックダウンにより、睡眠量が増加することを見出した (図3)。哺乳類の脳では、ドーパミンシグナルは、cAMP-PKA 経路による PP1 活性調節因子の制御を介して、カルシニューリンシグナルとクロストークすることから、興味深い結果である。

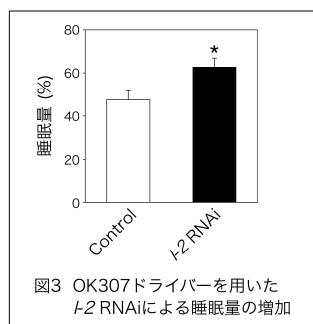


図3 OK307ドライバーを用いた I-2 RNAiによる睡眠量の増加

(3) OK307 ドライバーとドーパミンとの関係を調べるために、OK307 ドライバーを用いてドーパミン D1 受容体 (*DopR* と *DopR2*) をノックダウンしたところ、*CanA-14F* ノックダウンとは逆に、睡眠量が増加した (図4)。この結果は、OK307 ドライバーで GAL4 を発現する細胞が、ドーパミンシグナルの標的となっている可能性を示す。抗 *DopR* 抗体 (Fred W. Wolf 博士, Ernest Gallo Clinic and Research Center, USA より供与を受けた) による免疫染色を行い、OK307 ドライバーにおいて、カルシニューリンとドーパミン受容体を共発現する複数の細胞を確認した。これらの細胞が睡眠制御に関与すると考えられる。

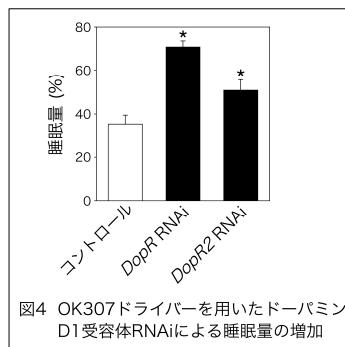


図4 OK307ドライバーを用いたドーパミン D1 受容体 RNAiによる睡眠量の増加

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① T. Ueno, J. Tomita, S. Kume, K. Kume (2012) "Dopamine modulates metabolic rate and temperature sensitivity in *Drosophila melanogaster*" *PLoS ONE*, 7(2): e31513 査読有
- ② M. Yamazaki, J. Tomita, K. Takahama, T. Ueno, M. Mitsuyoshi, E. Sakamoto, S. Kume, K. Kume (2012) "High calorie diet augments age-associated sleep impairment in *Drosophila*" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 417: 812-816 査読有
- ③ K. Takahama, J. Tomita, T. Ueno, M. Yamazaki, S. Kume, K. Kume (2012) "Pan-neuronal knockdown of the *c-Jun N-terminal Kinase (JNK)* results in a reduction in sleep and longevity in *Drosophila*" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 417: 807-811 (2012) 査読有
- ④ *J. Tomita, *M. Mitsuyoshi, T. Ueno, Y. Aso, H. Tanimoto, Y. Nakai, T. Aigaki, S. Kume, K. Kume (*equally contributed) (2011) "Pan-neuronal knockdown of calcineurin reduces sleep in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*" *J. Neurosci.*, 31: 13137-13146 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① J. Tomita (2012) "Calcineurin regulates sleep and memory in *Drosophila*" 2012 年 3月20日 International Symposium

Frontiers in Behavioral Brain Science,
東京国際フォーラム

② J. Tomita (2011) “Calcineurin regulates sleep and memory in *Drosophila*” 2011年
11月25日 GCOE International Symposium “Designing the Circadian Clock”, 名古屋大学

③ 富田 淳 (2011) 「カルシニューリンによるショウジョウバエの睡眠-覚醒制御」2011年
11月24日 第18回日本時間生物学会学術大会、名古屋大学

④ J. Tomita (2011) “Calcineurin regulates sleep and memory in *Drosophila*” 2011年
9月8-9日 KEY Forum in Developmental Biology and Regenerative Medicine, 熊本大学

⑤ J. Tomita (2010) “Calcineurin Regulates Sleep and Memory in *Drosophila*”
2010年9月2日 Neuro 2010, 神戸コンベンションセンター

[その他]

ホームページ等

<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np50.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 淳 (TOMITA JUN)

熊本大学・発生医学研究所・特定事業研究員

研究者番号：40432231