

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657056

研究課題名(和文)概日リズムを指標とした脳神経回路の老化評価システムの構築

研究課題名(英文)Development of a method for evaluation of ageing in cerebral neuronal circuit using circadian rhythm as a gauge

研究代表者

富岡 憲治 (TOMIOKA, Kenji)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：30136163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ショウジョウバエ概日時計の加齢変化を指標として、脳機能の加齢変化をニューロン・分子レベルで解析する方法を確立することを目的とした。野生型および老化関連遺伝子変異体等を使った解析により、神経ペプチドPDFを発現する脳内時計ニューロンの出力部位でのPDF量の加齢による減少が、分子振動および行動リズムの加齢現象と密接に関係することを明らかにし、行動の加齢の解析により脳内ニューロンおよびネットワークの加齢変化を評価できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study was to establish a method to evaluate ageing of cerebral neuronal circuits using overt circadian rhythms as a gauge in *Drosophila*. Behavioral and molecular analyses revealed that age dependent retardation of a neuropeptide, pigment-dispersing factor (PDF), expression in the dorsal terminal of PDF immunoreactive cerebral clock neurons correlated with the ageing of behavioral rhythms. Overexpression of the peptide strengthened not only the activity rhythm but also molecular oscillation of clock genes even in old flies. Thus measuring the behavioral rhythms may be sufficient to evaluate ageing of the underlying neuronal circuit.

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：動物生理・行動

キーワード：概日リズム 概日時計 時計ニューロン 加齢 脳

## 1. 研究開始当初の背景

動物の脳機能は次第に老化する。老化のメカニズムは線虫、ハエ、哺乳類など一部の動物で研究が進められている。しかし、高等動物の脳機能の老化については、ニューロンレベルあるいは分子レベルでは十分な解析は行われていない。概日時計は極めて規則正しい行動リズムを規定する自律振動体であり、脳機能を評価するために適している。キショウジョウバエでは概日時計の振動機構が分子レベルで明らかにされており、それは基本的には、時計遺伝子 *period(per)*、*timeless(tim)* の周期的発現が根幹を成す [1]。これらは、転写因子 CLOCK (CLK) と CYCLE (CYC) のヘテロ二量体により、昼の終わりから夜の始めにかけて活発に転写される。その産物タンパク質は夜間に増加し、複合体を形成して核に入り、CLK-CYC に抑制をかけることで約 24 時間の振動を生ずると考えられている。ハエでは時計ニューロンの同定が進み、そのネットワーク構成も明らかにされつつある。ハエ脳内には、約 150 個の時計ニューロンが左右の脳半球にそれぞれ 7 群に分かれて存在している。これらのうち最も重要な役割を演ずるのは、色素拡散ホルモン様ペプチド (PDF) を発現する脳側方部にあるニューロンであり [2]、それらは PDF を神経伝達物質として、他のニューロンの位相を制御し、行動リズムを駆動している [3]。以上の背景を元に、概日時計の神経・分子機構の知見を利用して、時計機構の加齢変化を解析することで脳機能の老化を分子およびニューロンネットワークのレベルで探ることを着想した。

時計機構の老化は哺乳類では、主として行動レベルおよび遺伝子の発現を指標として研究されている (cf. [4]) が、神経回路レベルでの研究はほとんどない。一方、昆虫ではショウジョウバエで、分子レベルでの研究が少数ある [5,6] が、行動や神経回路レベルでの研究は行われていない。本研究は、光・温度同調性を指標とした行動レベル、分子・ニューロンネットワークレベルで加齢変化を明らかにしようとするもので、加齢・老化を分子およびニューロンネットワークレベルで解析・評価する道を拓くと期待される。

## 2. 研究の目的

以上の背景を元に、本研究では研究期間内に、概日時計の加齢による変化を、行動リズムの光・温度同調性、時計遺伝子発現レベル、

時計ニューロンネットワークの形態変化を指標にして、行動・ニューロン・分子のレベルで解析し、脳機能の加齢変化をニューロン・分子レベルで解析する方法を確立する。

## 3. 研究の方法

野生型 (Canton-S)、概日時計関連遺伝子突然変異系統のうち、クリプトクロム機能欠損 *cry<sup>b</sup>* 系統、PDF を欠く *pdf<sup>01</sup>* 系統、および *pdf* 過剰発現系統を用いて以下の項目について研究を進める。各系統について、明暗下でのリズム、明暗への同調性、恒暗条件下での自由継続リズム、PDF 免疫組織化学によるネットワークの解析を行った。野生型の平均寿命は 60 日程度であるので、加齢変化を解析するために用いるハエの日齢は、羽化直後、羽化後 30 日、50 日とした。

(1) 光・温度周期への同調性について、明暗 12:12 の光周期または恒暗温度周期 (25 12 時間 : 30 12 時間) 下での活動リズムを、上記各日齢のハエを用いて解析し、リズムの強度、同調位相を検討した。また、光周期または温度周期の 6 時間位相変位 (前進または後退) に対する再同調過程を、上記各日齢のハエを用いて解析し、時計機構の同調性の加齢による変化を検討した。

(2) 上記各日齢のハエを用いて、恒暗条件下で自由継続させ、そのリズムの強度、周期を比較し、自律振動性の加齢による変化を明らかにする。

(3) 時計遺伝子の発現リズムについては、上記各日齢のハエを用いて、頭部を 4 時間間隔で採取し、抽出した RNA を用いて、real-time RT-PCR を行い、時計関連遺伝子 *per*, *tim*, *cyc*, *Clock*, *cry*, *pdf* の発現リズム、発現量、発現位相を比較解析する。これによって各時計遺伝子発現リズム・発現レベルの加齢変化を Yoshii et al. [7] に準ずる手法で解析した。

(4) 時計タンパク質の発現リズムについては、上記各日齢のハエを用いて、頭部を 4 時間間隔で採取し、抽出したタンパク質を用いて、抗 PER, 抗 TIM 抗体を用いたウエスタンブロット [7] を行い、時計関連タンパク質 PER, TIM の発現リズム、発現量、発現位相を比較解析した。上記 (3) と合わせて各時計遺伝子発現リズム・発現レベルの加齢変化を検討した。

(5)時計ニューロンネットワークの中で、PDF 発現細胞は、他の時計ニューロン群の位相を制御し、行動リズムを駆動する重要な要素である。そこで、抗 PDF 抗体を用いた免疫組織化学により、PDF 発現ニューロンの形態変化を指標にし、時計ニューロンネットワークの加齢変化を解析した。各日齢の野生型を用いるとともに、時計遺伝子関連突然変異系統を用いて、加齢変化を、特に染色性、樹状突起と軸索終末部位の形態に着目して解析した。

(6) 加齢に関わる突然変異系統 *chico<sup>1</sup>*, *fmr1<sup>Δ50M</sup>* を用いて、行動リズムの加齢、PDF 発現量の加齢変化に関する解析を行った。*chico<sup>1</sup>* は寿命が約 60%延長し[8]、逆に *fmr1<sup>Δ50M</sup>* は約 40%短縮する[9]。これらの寿命の変化が時計機構の老化に反映されるかどうかを解析することで、時計機構の加齢が老化の指標となりうるかどうかを検討した。

(7)加齢によるネットワーク変化はニューロンに帰結できるかを検討するために、*pdf-gal4* と *UAS-cyc1R*, *UAS-chico1R*, *UAS-fmr11R* を組み合わせ、PDF を発現する時計ニューロンでのみ、*cyc*, *chico*, *fmr1* の 2 本鎖 RNA を発現させ RNAi による発現低下を誘導した。この場合の行動リズムの加齢変化を解析した。結果をそれらの突然変異と比較することにより、加齢変化が特定のニューロンでの遺伝子発現に帰結できるかどうかを検討した。

#### 4. 研究成果

(1)加齢による行動リズム変化：野生型の平均寿命は 60 日程度であるので、加齢変化を解析するために用いるハエの日齢は、羽化直後、羽化後 40 日、50 日とした。まず、明暗 12:12 下での活動リズムを、上記各日齢のハエを用いて解析し、リズムの強度、同調位相を検討した。その結果、明暗下で若齢ハエは夜明けと日暮れのピークを明瞭に示すが、加齢ハエでは両ピークの活動量が減衰し日暮れのピークが不明瞭となること、さらに日暮れのピークが約 2 時間前進することが分かった。恒暗条件では、若齢のハエは 24 時間よりもわずかに長い周期で自由継続リズムを示したのに対し、加齢とともに周期が有意に延長するとともに、リズムの強度も有意に低下し、無周期を示す個体数が増加した。

(2)時計遺伝子の発現リズムに関しては、時計振動機構の時計遺伝子 mRNA 発現リズムを羽化後 10 日と 30 日で比較したところ、加齢に伴い時計遺伝子発現リズムの振幅が低下することが明らかになった。さらに抗 PER, 抗 TIM 抗体を用いた免疫組織化学を行い、タンパクレベルでの解析を進めた。その結果、脳内のいずれの時計細胞においても、加齢に

伴い夜間の PER, TIM 発現量が有意に減少し、発現リズムの振幅が減弱することが明らかとなった。

(3)PDF 発現ニューロンに着目し、抗 PDF 抗体を用いた免疫組織化学により、PDF 発現ニューロンの形態変化を指標にし、時計ニューロンネットワークの加齢変化を解析した。その結果、PDF 発現量が加齢とともに減少し、特に軸索、軸索終末部の発現量が加齢ハエでは著しく減少することが分かった。

(4)PDF 発現ニューロンで PDF を強制発現させたところ、(1) に述べた活動リズムの加齢による変調が部分的に阻害されることが分かった。このことから、PDF の減少が加齢による行動リズムの変調の一因であることが示唆された。

(5)明暗への同調性を羽化直後、羽化後 30 日、40 日の個体で、明暗周期を 6 時間前進、後退後に再同調に要する日数を調べることにより検討した。前進、後退ともに加齢により移行期が有意に延長したことから、光同調性が加齢により低下することが示唆された。

(6)加齢による行動リズムの温度周期への同調性を羽化直後、羽化後 30 日、40 日の個体で、温度周期を 6 時間前進、後退後に再同調に要する日数を調べることにより検討した。前進、後退ともに加齢ハエでの移行期が有意に短縮したことから、光同調性とは異なり、温度への応答は加齢により増強されることが示唆された

(7) 加齢に関わる突然変異系統 *chico<sup>1</sup>*, *fmr1<sup>Δ50M</sup>* を用いて、明暗条件下および恒暗条件下でのリズムを解析した。寿命が延長する *chico<sup>1</sup>* では、明暗周期下での活動リズムが羽化後 40 日の加齢ハエでも若齢ハエに典型的な明瞭な双峰性リズムを示した。逆に 寿命が短縮する *fmr1<sup>Δ50M</sup>* では、活動リズムが不明瞭となった。これらの結果から、寿命と時計機構の老化とが密接に関係し、時計機構の加齢変化が老化の指標となりうることを示唆された。

(8)PDF 発現量を *chico<sup>1</sup>* *fmr1* で調べ、時計ニューロンの形態変化、PDF 発現量と老化との関係を検討した。個体レベルの解析には *w<sup>118</sup>* をコントロールとして、*chico<sup>1</sup>*, *Fmr<sup>1</sup>* 変異をそれぞれヘテロで持つ系統を使用した。*chico<sup>1</sup>*, *Fmr<sup>1</sup>* 変異を持つ系統では *w<sup>118</sup>* よりも 2 週間以上生存期間が長くなった。*chico<sup>1</sup>*, *Fmr<sup>1</sup>* 変異系統および *w<sup>118</sup>* 系統のいずれも、明暗周期下での活動量は加齢に伴い低下した。しかし、活動量の低下が始まる時期が、系統により異なっていた。全暗での自由継続周期は、いずれの系統でも加齢に伴って延長し、リズム強度が減少する傾向がみられたが、これらが生ずるまでの日数は *chico<sup>1</sup>* で最も長かった。*chico<sup>1</sup>* では PDF ニューロンの脳背側部へ投射での PDF 発現量が他の系統と比較し

て強いことが分かった。

(10)加齢によるネットワーク変化が特定のニューロンの加齢変化に帰結できるかを確認するため、*pdf-gal4* と *UAS-cyc1eR*, *UAS-chico1R*, *UAS-fmr11R*を組み合わせ、PDFを発現する時計ニューロンでのみ、*cyc*, *chico*, *fmr1*の2本鎖RNAを発現させRNAiによる発現低下を誘導した。これらの多くの系統で概日リズムの加齢変化が確認されたが、*cyc*を発現抑制した雄では加齢変化が抑制された。各遺伝子のPDF細胞特異的発現抑制の寿命への影響は、雌雄で異なっていた。*chico*の発現抑制では、第1染色体が異なる雄間で寿命の長さやリズム強度に有意差が見られた。従って、各遺伝子の発現抑制の影響に性差が存在すること、予想に反して*chico*や*Fmr1*のPDF細胞特異的な発現抑制は概日リズムの加齢や寿命へ殆ど影響しないこと、また寿命やリズム強度に関連する因子が第1染色体に存在する可能性等が示唆された。

#### 纏めと今後の展望

本研究では、いくつかの老化に関わる突然変異系統、遺伝子改変系統を用いて、加齢が脳内神経ネットワークレベルに帰結できるかを検討することになった。これまでに、加齢に伴い行動リズムの周期が遅延し、活動量が減少することを明らかにし、この加齢とPDF細胞でのニューロペプチドPDFの発現量が平衡関係にあることを示した。さらにPDFの過剰発現により、加齢バエでも行動リズムおよび分子レベルの振動が強化されることを明らかにした。老化に関わる*chico*, *Fmr1*変異系統を用いた個体レベルでのこれらの遺伝子の発現抑制が、行動リズムおよびPDF細胞の加齢変化に影響し、特に*chico*突然変異では老化が遅延し、PDF発現量が脳背側部の投射部位で加齢後も強いことが示された。これらの結果は、行動レベルの加齢と脳内ネットワークの加齢が密接に関係しており、行動リズムの測定により脳内ネットワークの加齢を評価できることを示唆している。

一方、Gal4/UAS系による*chico*, *fmr1*のPDF細胞特異的発現抑制は、行動リズムの加齢変化に大きな影響を与えないことが明らかとなった。この事実は、PDF陽性時計細胞のPDF発現量が加齢により変化し、行動リズムの加齢を引き起こすが、PDF陽性時計細胞の加齢はそれらが作るネットワークに依存することを示唆している。

本研究により、PDF陽性時計細胞の加齢はそれらが他のニューロンと作るネットワークに依存することが示唆された。PDF陽性時計細胞にはPDFをはじめとして、いくつかの神経伝達物質による入力系が知られている。今後は、これらの入力系がどのように加齢に関与するのかを、突然変異系統を利用して解

析を進めること、また、加齢への関与が指摘されているNAD/sirtuin系の関与についても解析を進めることが今後の課題である。

#### 引用文献

1. Tomioka K, Matsumoto A. Cell. Mol. Life Sci. 2010; 67:1397-1406.
2. Helfrich-Foerster C. Sleep Biol. Rhythms 2006; 4:224-234.
3. Yoshii T, Wullbeck C, Sehadova H, et al. J. Neurosci. 2009; 29:2579-2610.
4. Kondratov RV. Ageing Res. Rev. 2007; 6:12-27.
5. Hendricks JC, Lu S, Kume K, et al. J. Biol. Rhythms 2003; 18:12-25.
6. Krishnan H, Kretzschmar D, Rakshit K, et al. Ageing 2009; 1:937-948.
7. Yoshii T, Fujii K, Tomioka K. J. Biol. Rhythms 2007; 22:103-114.
8. Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, et al. Science 2001; 292:104-106.
9. Martinez V, Javadi C, Ngo E, Ngo L, Lagow R, Zhang B. Dev. Neurobiol. 2007; 67:778-791

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4件)

Hanafusa S., Kawaguchi T., Umezaki Y., Tomioka K., Yoshii T. (2013) Sexual interactions influence the molecular oscillations in DN1 pacemaker neurons in *Drosophila melanogaster*, PLoS ONE 8(12): e84495. doi:10.1371/journal.pone.0084495

Umezaki Y., Yoshii T., Kawaguchi T., Helfrich-Förster C., Tomioka K. (2012) Pigment-dispersing factor is involved in age-dependent rhythm changes in *Drosophila melanogaster*. Journal of Biological Rhythms, 27:423 - 432

Umezaki Y., Yasuyama K., Nakagoshi H., Tomioka K. (2011) Blocking synaptic transmission with tetanus toxin light chain reveals modes of neurotransmission in the PDF-positive circadian clock neurons of *Drosophila melanogaster*. Journal of Insect Physiology, 57(9):1290-1299

Ito C., Goto S.G., Tomioka K., Numata H. (2011) Temperature entrainment of the circadian cuticle deposition rhythm in *Drosophila melanogaster*. Journal of Biological Rhythms 26:14-23

〔学会発表〕(計 8件)

富岡憲治(2014)ショウジョウバエ概日リズムを制御する時計ニューロンネットワー

ク、第 2 回視交叉上核アリーナ、札幌市、1 月 23 日

富岡憲治(2013)昆虫の概日時計機構に関する神経生物学的研究。平成 25 年度日本動物学会賞受賞者講演, 日本動物学会第 84 回大会, 岡山市, 9 月 27 日

吉井大志、Christa Kistenpfennig、富岡憲治(2013)キイロショウジョウバエ概日時計の CRY 依存的な光同調神経機構、日本動物学会第 84 回大会、9 月 28 日

Yoshii T., Hanafusa S., Umezaki Y., Tomioka K. (2012) Sexual interaction influences circadian activity pattern in *Drosophila melanogaster*. SRBR 2012, Sandestin Golf and Beach Resort, Destin, Florida, May 19-23.

梅崎勇次郎、川口知晃、吉井大志、Helfrich-Foerster Charlotte, 富岡憲治(2012)キイロショウジョウバエ活動リズムの加齢変化への PDF の関与、日本動物学会中国四国支部大会、島根大学、松江市、5 月 13 日

花房志帆、吉井大志、富岡憲治(2012)キイロショウジョウバエ雌雄ペア時の活動リズム変調機構、日本動物学会第 83 回大会、大阪大学、大阪市、9 月 13 日

花房志帆、富岡憲治(2011)キイロショウジョウバエ雌雄個体間相互作用による概日リズムの変調機構、日本動物学会中国四国支部大会、香川大学、高松市、5 月 14 日~15 日

梅崎勇次郎、吉井大志、Helfrich-Foerster C, 富岡憲治(2011)加齢による色素拡散因子(PDF)の発現レベル低下が概日リズムの加齢変調を引き起こす、第 18 回日本時間生物学会学術大会、名古屋市、11 月 24~25 日

〔図書〕(計 1 件)

富岡憲治、松本顕(2012)Part III 無脊椎動物の概日リズム 10章 生理機構、時間生物学、海老原史樹史、吉村崇編、化学同人、pp. 133-144

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biol.okayama-u.ac.jp/tomioka1/top.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

富岡 憲治(TOMIOKA, Kenji)

岡山大学大学院自然科学研究科・教授  
研究者番号: 30136163

(2)研究分担者

吉井 大志(YOSHII, Taishi)

岡山大学大学院自然科学研究科・准教授  
研究者番号: 50611357