

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700413

研究課題名(和文)カルシニューリンとドーパミンのクロストークによるショウジョウバエの睡眠制御の解析

研究課題名(英文) Crosstalk between calcineurin and dopaminergic signaling in Drosophila sleep regulation

研究代表者

富田 淳(Tomita, Jun)

熊本大学・生命科学研究部・研究員

研究者番号：40432231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：脳の広範な領域でのカルシニューリン(Ca²⁺/カルモジュリン依存性タンパク質脱リン酸化酵素)活性がショウジョウバエの睡眠制御に関与することが示唆された。また、睡眠の恒常性維持へのカルシニューリンの関与も示唆された。そこで、睡眠のシナプス恒常性仮説におけるカルシニューリンの機能解析をミトコンドリアに着目して行った。成虫の全神経でミトコンドリア輸送を阻害したところ、睡眠量が増加した。カルシニューリンノックアウトハエにおいて、覚醒を司る概日時計ニューロンのミトコンドリア分布を調べたが、影響はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that calcineurin (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase) regulates sleep in Drosophila. Pan-neuronal calcineurin knockdown significantly decreases sleep. However, we could not identify a specific brain region important for reducing sleep by calcineurin knockdown, suggesting that ubiquitous calcineurin activity in the brain is involved in sleep regulation. We found that the amount of rebound sleep was significantly increased in calcineurin RNAi flies compared to control flies. Thus, we hypothesize that calcineurin plays a role in the synaptic homeostasis hypothesis of sleep regulation. To understand calcineurin function in the synaptic homeostasis hypothesis, we examined the relationship between mitochondrial dynamics in neurons and sleep. Although pan-neuronal impairment of mitochondrial transport significantly increased sleep, mitochondrial distribution in circadian clock neurons was not affected by calcineurin knockout.

研究分野：総合領域

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 覚醒 カルシニューリン NMDA型グルタミン酸受容体 シナプス恒常性仮説
断眠 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

睡眠は脳波で定義されるため、主に哺乳類で研究されてきたが、その分子機構や生理的意義については、未解明な点が多い。一方、遺伝学の優れたショウジョウバエ(以下、単にハエ)で、行動学的に睡眠と類似する休息行動(以下、単に睡眠)が報告され注目された(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、cAMP-CREB 経路などの哺乳類と共通な睡眠の分子機構が明らかにされた。また、シナプス可塑性維持や学習記憶における睡眠の生理機能についても、哺乳類との共通性が示されつつある。

我々は、これまでにショウジョウバエの睡眠が Ca^{2+} /カルモジュリン依存性タンパク質脱リン酸化酵素カルシニューリン(以下、Cn)によって制御されることを発見し、哺乳類と同様に記憶形成に必須であることを示した(Tomita, J. *et al.*, *J. Neurosci.*, 2011)。また、NMDA 型グルタミン酸受容体(以下 NMDAR)は、記憶形成に必須であることが示されていたが、Cn と同様に睡眠に重要であることを示した。ハエの睡眠が、ドーパミンシグナルなど複数のシグナル伝達経路によって制御されることは示されていたが、Cn シグナルの関与も明らかになり、シグナル経路間のクロストークが重要と考えられるが、その詳細は不明である。Cn と NMDAR 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, K. *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、ドーパミンと Cn の関係が示唆された。

全神経細胞で Cn をノックダウンすると、睡眠量が顕著に減少する。Cn の発現を、*in situ* ハイブリダイゼーション法により調べたところ、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 を発現する系統を用いて Cn を局所的にノックダウンし、機能部位を調べた。その結果、ハエの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 ドライバー系統のみで睡眠量が減少した。その効果は全神経でのノックダウンに匹敵し、記憶異常も認められた。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。さらに、ドーパミンとの関係を調べる目的で、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、Cn ノックダウンとは逆に睡眠量が増加した。この結果から、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が示された。また、抗 DopR 抗体による免疫染色を行い、OK307 ドライバーで GAL4 を発現する細胞の中で複数の DopR

陽性細胞が確認され、これらの細胞が睡眠制御に関与すると考えられた。

2. 研究の目的

これまでの結果から、OK307 ドライバーで GAL4 を発現する脳内の細胞において、図 1 に示した睡眠メカニズムのモデルを想定できる。本研究では、OK307 ドライバーを用いて、睡眠制御において Cn シグナルとドーパミンシグナルがクロストークする脳内の分子・細胞・回路を同定し、全く新しい睡眠制御機構の解明を目的とする。また、Cn による記憶制御についても、OK307 ドライバーを用いて、睡眠制御との生理的・分子的な関連を明らかにする。

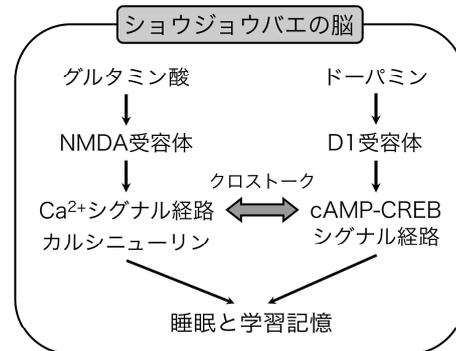


図1 睡眠メカニズムのモデル

3. 研究の方法

本研究では、OK307 ドライバーで GAL4 が発現する細胞群に注目し、以下の3つの研究項目を計画していた。

- (1) Cn シグナルとドーパミンシグナルの下流分子の遺伝学的スクリーニング
- (2) Cn とドーパミン D1 受容体が共発現する細胞の機能解析
- (3) Cn による睡眠と記憶制御機構の関連の解析

しかしながら、初年度に行った研究から、OK307 ドライバーの脳において GAL4 は、giant fiber のみならず非常に多くの細胞で発現しており、そのパターンは全神経細胞で GAL4 を発現する *elav-GAL4* ドライバーに近いことが示され、脳の広範な領域での Cn 活性が睡眠制御に関与することが示唆された。

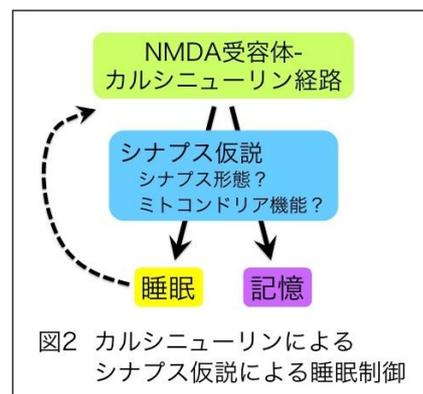


図2 カルシニューリンによるシナプス仮説による睡眠制御

また、Cn を全神経でノックダウンしたハエでは、睡眠量の顕著な減少に加えて、強制的な睡眠除去（断眠）後のリバウンド睡眠量が増加しており、Cn が睡眠の恒常性維持機構に関与することが示唆された。Cn はシナプス可塑性に重要な分子であることから、睡眠量の恒常性維持機構として近年提唱されたシナプス恒常性仮説（以下、単にシナプス仮説）に基づく Cn による睡眠制御モデルを想定し（図 2） 以下のような研究を行った。

4. 研究成果

(1) シナプス仮説を支持するデータのの一つとして、ハエでは睡眠-覚醒状態によりシナプス形態が変化することが報告されている（Bushey *et al.*, *Science* 2011）。そこで、ハエ脳に少数存在し、覚醒を司る概日時計ニューロンにシナプス前膜マーカー neuronal synaptobrevin と GFP の融合タンパク質（n-syb-GFP）を GAL4-UAS 系により発現させた。このハエを 12 時間断眠し、n-syb-GFP シグナルを観察し、シナプス仮説の検証を行った。Bushey らの報告と同様に、断眠するとコントロール（断眠なし）に比べて、軸索末端での n-syb-GFP シグナルの増強がみられた（図 3、白矢印）。今後は、このハエを用いて睡眠-覚醒に伴うシナプス形態の変化（体積やスパイン数など）を定量化する系を確立し、Cn 機能阻害の影響を調べる予定である。

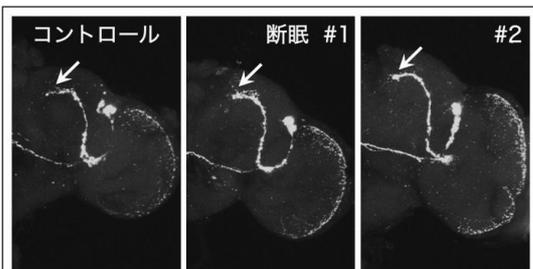


図3 断眠による概日時計ニューロンのシナプス前膜の変化

(2) ニューロンのミトコンドリア動態と睡眠との関係について解析した。ミトコンドリアは増強しているシナプスに集積し、シナプス可塑性に働く（Sheng & Cai, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2012）。また、Cn はニューロンのミトコンドリアの移動や形態の制御に関与する（Han, *et al.*, *Neurosci. Res.*, 2008）。ニューロンでのミトコンドリア輸送に必要な dMiro (*Drosophila* mitochondrial rho) を成虫の全神経で過剰発現したところ、睡眠量の有意な増加がみられた（図 4）。UAS-dMiro トランスジェニックハエは、Konrad E. Zinsmaier 博士（アリゾナ大学）より分与していただいた。観察が容易な概日時計ニューロンに、ミトコンドリア局在型 GFP (mito-GFP) を発現させてミトコンドリアを可視化し、ミトコンドリア動態（数や局在など）への Cn ノックアウトの影響を調べたが、影響はみられなかった。現在、他の二

ューロンでも解析中である。

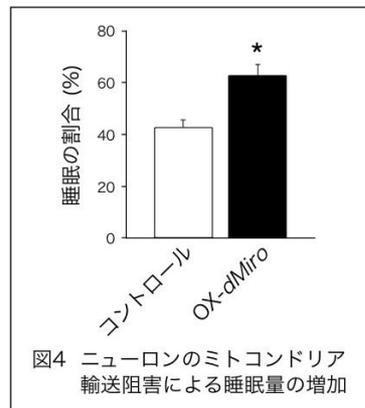


図4 ニューロンのミトコンドリア輸送阻害による睡眠量の増加

(3) シナプス仮説における Cn の機能を調べるためには、成虫ニューロンで時期特異的に Cn の機能を阻害できる実験系が必要だが、成虫ニューロンでのコンディショナル RNAi は効果がみられなかった。そこで、内在の Cn を GFP 標識し、抗 GFP ナノボディを用いたタンパク質ノックアウト法（Caussin *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012）と、ハエのコンディショナル遺伝子発現制御系（TARGET システム）を組み合わせ、Cn のコンディショナル機能阻害系を計画した。P[acman]BAC システムと BAC recombineering により N 末端を GFP 標識した Cn をもつトランスジェニックハエの作製を試みたが、形質転換体は得られなかった。

(4) 既知の睡眠関連遺伝子と Cn の関係について解析した。ハエの睡眠関連遺伝子の中で、*sleepless* と *homer* はどちらもシナプス部位で働き、睡眠に関して Cn と似た表現型を示す。*sleepless* については、脳の広範な領域での発現が睡眠制御に重要であるとされている（Wu, *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 2010）。*homer* については、最近、睡眠の恒常性維持機構への関与が報告された（Naidoo, *et al.*, *PLoS ONE*, 2012）。我々は、Cn ノックダウンハエの頭部において、*homer* mRNA レベルが有意に減少していることを見いだした（図 5）。そこで、エピトープタグを付加した Cn、Homer、SLEEPLESS の発現ベクターを作製した。現在、培養細胞系

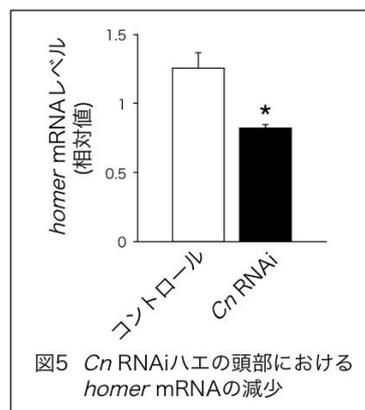


図5 Cn RNAiハエの頭部における homer mRNAの減少

で免疫沈降法により Cn との相互作用について検討中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

1. Kawabata, M., Ueno, T., Tomita, J., Kawatani, J., Tomoda, A., Kume, S. and Kume, K. "Temporal organization of rest defined by actigraphy data in healthy and childhood chronic fatigue syndrome children." *BMC Psychiatry* 13: 281 (2013)
査読有
2. Ueno, T., Tomita, J., Tanimoto, H., Endo, K., Ito, K., Kume, S. and Kume, K. "Identification of a dopamine pathway that regulates sleep and arousal in *Drosophila*." *Nat. Neurosci.* 15: 1516-1523 (2012)
査読有

[学会発表](計5件)

1. Tomita, J. *et al.* "Male-male interaction-induced sleep in a fruit fly, *Drosophila melanogaster*", Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Neurobiology of *Drosophila*, 2013年10月1日～5日, New York, United States
2. 富田 淳, 他, "Male-male interaction-induced sleep in a fruit fly, *Drosophila melanogaster*", Neuro2013, 2013年6月20日～23日, 国立京都国際会館
3. 富田 淳, 他, 「個体間相互作用によるショウジョウバエの睡眠制御」, 日本時間生物学会学術大会, 2012年9月15日～16日, 北海道大学学術交流会館
4. Tomita, J. *et al.* "NMDA receptor-calcineurin signaling function in promoting sleep in *Drosophila*", Neurofly, 2013年9月3日～7日, Padua, Italy
5. 富田 淳, 他, 「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」, 日本睡眠学会定期学術集会, 2012年6月28日～30日, パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

富田 淳 (TOMITA JUN)

熊本大学・生命科学研究部・研究員

研究者番号: 40432231