

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840121

研究課題名(和文) 昆虫概日時計の出力系に関わる候補因子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of putative output factors of the insect circadian clock.

研究代表者

吉井 大志 (Yoshii, Taishi)

岡山大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：50611357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：モデル生物キイロシヨウジョウバエでは、概日時計の分子メカニズムが良く研究されているが、神経機構の研究ではまだ分からないことが多い。すでに脳内の150個の神経細胞が概日リズムをうみだす“時計細胞”であることが同定されているが、それらの細胞がどのようにして時間情報を出力していくかは不明である。本研究では、神経ペプチドであるITP (ion transport peptide) とCCHA1が概日時計の出力因子であることを新たに同定した。

研究成果の概要(英文)：In *Drosophila melanogaster*, the molecular mechanism of circadian clock has been well investigated. However, its neuronal mechanism still remains elusive. The *Drosophila* brain contains about 150 neurons that are responsible for circadian rhythms in behavior. The motivation of this study is to understand how the circadian clock neurons read out time information, which they generate, to downstream neurons. Here, we found that ITP and CCHA1 are new candidate peptides that function as output factors of the clock neurons.

研究分野：生物学

キーワード：概日時計 体内時計 キイロシヨウジョウバエ 時間生物学

1. 研究開始当初の背景

概日時計は、24 時間周期で変化する地球環境に適応するために、進化の過程で生物が獲得した生物時計機構である。概日時計は、約 24 時間のリズムを生みだし、生物の生存が有利になるように様々な生物活動に周期性を持たせる。概日時計はその約 24 時間周期を自律的に生み出すが、環境サイクルに同調することもできる。それにより様々な環境下で柔軟に生物の適応性を高める。これを概日時計の環境同調性とよぶ。

動物の概日行動リズムは、脳(いくつかの種では眼)にある中時計細胞によって制御されている。キロショウジョウバエは、全生物種で初めて、概日時計に関わる遺伝子が発見されたモデル生物である。その後 20 年以上の研究の積み重ねを経て、時計遺伝子を発現している約 150 個の脳神経細胞が中枢時計を担う、“時計細胞”であることが明らかにされた(図 1; Peschel & Helfrich-Förster, 2011)。脊椎動物でも、脳内の時計細胞は同定されているが、その数は数千個である。このことから、ショウジョウバエは概日時計の神経メカニズムの研究においても、非常に有用なモデル生物として扱われている。

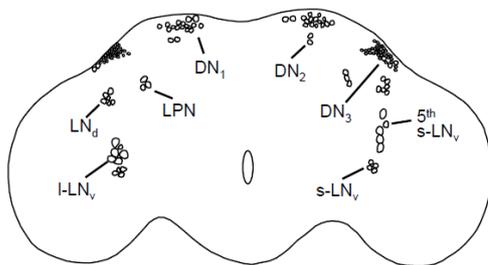


図 1. ショウジョウバエ脳内時計細胞群

これまでの研究で、恐らくショウジョウバエの 150 個の時計細胞は、細胞間のコミュニケーションによって、時間情報をやり取りし、互いに同調していることが明らかになっている(Yoshii et al., 2012)。神経ペプチド PDF(Pigment dispersing factor)は、I-LNv と s-LNv とよばれる一群の時計細胞の出力因子である。PDF の役割は、PDF 陽性時計細胞の情報を他の時計細胞へ伝達することである。それにより、時計細胞間の同調や、リズムの周期の調節、また光情報の共有などを行っていると考えられている。しかし、I-LNv と s-LNv 細胞群は、150 個の時計細胞の中の約 16 個であることから、他の時計細胞は別の因子によって、情報伝達を行っているはずであるが、未解明であった。我々のこれまでの研究により、ITP (ion transport peptide) と CCHamide1 (CCHa1) とよばれる神経ペプチドが、時計細胞の一部で発現していることが明らかになった。しかし、これらの神経ペプチドの時計細胞ネットワークにおける役割は研究されていなかった。

2. 研究の目的

キロショウジョウバエでは、概日行動リズムを生み出す脳時計細胞が正確に同定されているが、それらの神経群がどのようにして協調して、時間情報を下流細胞に伝えているのかは、ほとんど明らかになっていない。PDF 神経ペプチドは、一部の時計細胞群の出力因子であることが分かっているが、その他の時計細胞も出力因子を持っているはずである。そこで、本研究では、研究代表者らが新たに同定した候補因子である ITP と CCHa1 神経ペプチドの機能解析を行い、概日時計の神経ネットワーク機構の理解を深めることを目指した。

3. 研究の方法

(1) RNA 干渉法

当該神経ペプチドの機能解析のために、GAL4/UAS システムを用いて、時計細胞特異的に、それぞれの遺伝子に特異的な二本鎖 RNA の発現を行った。時計細胞特異的 GAL4 システムには *tim-GAL4* システムを用いた。また PDF、ITP、CCHa1 のそれぞれの UAS-RNAi システムは、ブルームントンストックセンター(アメリカ合衆国)と VDRC スtockセンター(オーストリア)からそれぞれ購入した。ショウジョウバエでは、RNA 干渉の過程で働く *dicer2* 遺伝子を二本鎖 RNA と同時に発現させると、より効果的に遺伝子ノックダウンを引き起こすことができることから、まず *UAS-dicer2; tim-GAL4* システムを一般的なショウジョウバエの交配実験によって作成した。この *UAS-dicer2; tim-GAL4* システムのメスを各 UAS-RNAi システムのオスに掛け合わせることで、時計細胞特異的に遺伝子ノックダウンを行った。

(2) 歩行活動リズムの計測

赤外線センサーを利用した一般的なショウジョウバエ用活動リズム計測装置 DAM2(Trikinetics Inc.)を用いて歩行活動の計測を行った。計測装置はインキュベーター内に設置し、温度は 20 一定で維持した。白色 LED によって明暗サイクルの制御を行った。まず明暗サイクル(明期 12 時間: 暗期 12 時間)の条件で 7 日間活動リズムを計測し、その後恒暗条件に移行した。成虫のショウジョウバエで羽化後 5 日以上経ったオスを使用した。活動リズムの解析には ActogramJ を使用した(Schmid et al., 2011)。

(3) 免疫組織化学

キロショウジョウバエ成虫の脳を解剖し、4%パラフォルムアルデヒドで固定した後、免疫蛍光染色を行った。一次抗体として、抗 ITP 抗体、抗 CCHa1 抗体、抗 TIM 抗体、抗 PDF 抗体を用いた。また二次抗体にはライフテクノロジー社の Alexa シリーズを使用した。

染色された脳はスライドグラス上に封入し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) ITP と CCha1 の時計細胞での発現

ショウジョウバエ成虫の脳を ITP と CCha1 にそれぞれ特異的な抗体を用いて、免疫染色した。時計細胞を同時に染めるために、時計タンパク質 TIM に特異的な抗体を用いた。ITP は 5th s-LNv と LNd とよばれる時計細胞で免疫陽性を確認できた。これは以前の我々の結果と同じである (Johard et al., 2009)。一方、CCha1 は DN1a とよばれる時計細胞群で発現していることが確認でき、ITP と CCha1 は別々の時計細胞群で働く神経ペプチドであると予想される。また PDF は l-LNv と s-LNv 細胞で発現していることから、これら二つの神経ペプチドとは別の時計細胞群で働いていることが分かった。

(2) ITP の機能解析

共同研究者により、*itp* 遺伝子のノックアウト系統は致死であることが知られていた。ITP はショウジョウバエの生存に重要な働きを持つと考えられる。ITP は時計細胞以外にも発現していること、また他の昆虫では体内の水分再吸収に関与していることから、時計細胞外の ITP は生存に直接関係すると考えた。そこで、時計細胞でのみ *itp* 遺伝子発現をノックダウンさせることを試みた。*UAS-dicer2; tim-GAL4/UAS-itp^{RNAi}* 系統は、問題なく生育し、コントロール系統と比べて死亡率が高くはなかった。

免疫組織化学により、*itp* 遺伝子 RNAi 系統の時計細胞内の ITP がどれくらい減少しているかを確認したところ、ほとんど検出できないレベルまで低下していた。一方で、時計細胞外の ITP の発現レベルには変化がなかった。

次に、*itp* 遺伝子 RNAi 系統の歩行活動リズムを計測し、時計細胞における ITP の機能を解析した。コントロール系統と比べて、*itp* 遺伝子 RNAi 系統では明期終わり頃の活動がやや上昇し、恒暗条件下では自由継続周期が約 30 分程度延長した。従って、時計細胞における ITP が概日行動リズムに関与していることが明らかになった。

(3) PDF と ITP の二重ノックダウン

PDF と ITP が相互作用して働く可能性を検証するために、*UAS-Pdf^{RNAi}* 系統を使って、*Pdf* 遺伝子と *itp* 遺伝子の二重遺伝子ノックダウンを試みた。免疫組織化学の結果では、ITP と PDF とともに検出できないレベルまで低下していることが確認できた。この二重ノックダウン系統では、それぞれのシングルノックダウン系統と比べて、昼間、夜間ともに活動量が大幅に上昇しており、睡眠量は大きく減少していた。つまり、PDF と ITP の二つの時計出力因子を欠くと、睡眠・覚醒に影響が出る

ものと考えられる。

(4) ITP の量的概日リズム

s-LNv 細胞群の軸索末端において PDF は量的な概日リズムを示す。本研究では ITP においても同様のことを免疫組織化学によって検討した。その結果、ITP も ITP 陽性時計細胞の軸索末端部分で、量的な変化が見られることが明らかになった。面白いことに、それぞれの軸索末端で、PDF 発現量が高まる時間帯では、ITP の量は減少し、逆に PDF が少ない時は、ITP が多くなる傾向が見られた。従って、PDF 陽性時計細胞と ITP 陽性時計細胞は相互補完的な役割があるのではないかと考えられる。このことは、PDF と ITP の二重遺伝子ノックダウンでは睡眠量が著しく低下したが、それぞれの遺伝子のシングルノックダウンではあまり影響がなかったことと関係しているのかもしれない。

(5) ITP の過剰発現

ITP が時計細胞の出力因子であるならば、脳内に ITP を過剰に発現した場合には、なんらかの影響が見られるのかもしれない。そこで、共同研究者らと共に *UAS-ITP* 系統を作製し、各種 GAL4 系統を用いて、脳内の ITP 量を増加させた。特に、*tim-GAL4* を用いて、すべての時計細胞に ITP を過剰発現した場合には、歩行活動リズムが消失した。しかし、他の多くの GAL4 系統ではあまり影響が見られなかったことから、単純な ITP の増加が活動リズムに影響したわけではなく、*tim-GAL4* 特異的な何かがあったと推察される。

(6) CCha1 の機能解析

ITP の研究と同様に、*CCha1* 遺伝子を RNA 干渉法によりノックダウンし、機能解析を行った。まず全身で *CCha1* をノックダウンした場合にはほぼすべての個体で致死となった。従って、ITP の場合と同様に、*CCha1* はハエの生存に関与している重要な遺伝子であることが分かった。そこで、また *tim-GAL4* を用いて、時計細胞特異的に *CCha1* をノックダウンした。免疫組織化学の結果では、ほぼ検出できないレベルまで *CCha1* ペプチドが減少していることが確認された。

CCha1 ノックダウン系統の歩行活動リズムは、明暗サイクル下では特に目立った影響は見られなかったが、恒暗条件下では多くの個体でリズムの減衰が見られた。従って、*CCha1* もまた概日行動リズムに関与する時計細胞の出力因子であることが明らかになった。

(7) CCha1-R の機能解析

CCha1 はすでに受容体 (*CCha1-R*) が特定されている。そこで、*CCha1-R* の遺伝子ノックダウンを行い、歩行活動リズムへ影響を検討した。その結果、全身でノックダウンを行うと致死になり、*tim-GAL4* でノックダウンを行うと、恒暗条件下で多くの個体の歩行活動リズム

ムが減衰した。従って、*CCha1-R* のノックダウンの結果は、*CCha1* をノックダウンした場合とほぼ同じであることが分かった。受容体の抗体は存在しないため、本研究で何度か抗体作製に取り組んだが、特異的な抗体を得ることはできなかった。

(8) *CCha1-R* の発現場所の同定

CCha1-R は抗体が存在しないため、脳内のどの場所で発現しているのかが特定されていない。そこで、*CCha1-R* の 5' 非翻訳領域に *GAL4* を挿入した系統を作製した。*UAS-GFP* 系統と掛け合わせることで、*CCha1-R* の発現場所を、GFP を用いて可視化することに成功した。*CCha1-R* は脳内の多くの場所で発現しており、この中のいずれかが時計細胞から時間情報を受け取っていると想定される。

今後の展開

CCha1 の機能解析により非常に重要な発見ができていますが、まだいくつかの点で確認しなければならない。まず、*CCha1* が時計細胞の出力因子であることは間違いないが、どこに出力しているかは不明である。*CCha1-R-GAL4* 系統はこれを明らかにする上で、非常に重要である。また、ITP や PDF と同様に、*CCha1* には量的な概日リズムが存在するかどうかとも検討しなければならない。さらに、これら 3 つの出力因子の相互作用は分かっていない。以上の問題を明らかにすることで、概日時計の神経ネットワークをさらに紐解くことができるであろう。

引用文献

Peschel N, Helfrich-Förster C. Setting the clock--by nature: circadian rhythm in the fruitfly *Drosophila melanogaster*. FEBS Lett. 2011; 585:1435-42

Yoshii T, Rieger D, Helfrich-Förster C. Two clocks in the brain: an update of the morning and evening oscillator model in *Drosophila*. Prog Brain Res. 2012; 199:59-82

Schmid B, Helfrich-Förster C, Yoshii T. A new ImageJ plug-in "ActogramJ" for chronobiological analyses. J Biol Rhythms. 2011; 26:464-7

Johard HA, Yoishii T, Dircksen H, Cusumano P, Rouyer F, Helfrich-Förster C, Nässel DR. Peptidergic clock neurons in *Drosophila*: ion transport peptide and short neuropeptide F in subsets of dorsal and ventral lateral neurons. J Comp Neurol. 2009; 516:59-73

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 10 件)

(1) Yoshii T, Hermann-Luibl C, Kistenpennig C, Schmid B, Tomioka K, Helfrich-Förster C (2015) Cryptochrome-dependent and -independent circadian entrainment circuits in *Drosophila*. The Journal of Neuroscience 35: 6131-6141 査読有

(2) Dusik V, Senthilan PR, Menzel B, Hartlieb H, Wülbeck C, Yoshii T, Raabe T, Helfrich-Förster C (2014) The MAP Kinase p38 is part of *Drosophila*'s circadian clock. PLOS Genetics 10: e1004565 査読有

(3) Hermann-Luibl C, Yoshii T, Senthilan PR, Dircksen H, Helfrich-Förster C (2014) The Ion Transport Peptide is a new functional clock neuropeptide in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. The Journal of Neuroscience 34: 9522-9536 査読有

(4) Schlichting M, Grebler R, Peschel N, Yoshii T, Helfrich-Förster C (2014) Moonlight detection by *Drosophila*'s endogenous clock depends on multiple photopigments in the compound eyes. Journal of Biological Rhythms 29: 75-86 査読有

(5) 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: e84495 10.1371/journal.pone.0084495 査読有

(6) Gmeiner F, Kołodziejczyk A, Yoshii T, Rieger D, Nässel DR, Helfrich-Förster C (2013) GABAB receptors play an essential role in maintaining sleep during the second half of the night in *Drosophila melanogaster*. The Journal of Experimental Biology 216: 3827-3843 査読有

(7) Vinayak P, Coupar J, Hughes SE, Fozdar P, Kilby J, Garren E, Yoshii T, Hirsh J (2013) Exquisite Light Sensitivity of *Drosophila* Cryptochrome. PLOS Genetics 9: e1003615 10.1371/journal.pgen.1003615. 査読有

(8) Tomina Y, Kibayashi A, Yoshii T, Takahata M (2013) Chronic electromyographic analysis of circadian locomotor activity in crayfish. Behavioural Brain Research 249: 90-103 査読有

(9) Uryu O, Kamae Y, Tomioka K, Yoshii T (2013) Long-term effect of systemic RNA interference on circadian clock genes in hemimetabolous insects. Journal of Insect Physiology 59: 494-499 査読有

(10) Hermann C, Saccon R, Senthilan PR, Domnik L, Dirksen H, Yoshii T, Helfrich-Förster C (2013) The circadian clock network in the brain of different *Drosophila* species. The Journal of Comparative Neurology 521: 367-388 査読有

〔学会発表〕(計 5件)

(1) 吉井大志, Hermann-Luibl C, Helfrich-Förster C 「ITP 神経ペプチドはキイロショウジョウバエ概日時計の新規出力因子」第 85 回日本動物学会, 2014 年 9 月 11-13 日, 宮城県仙台市東北大学川内北キャンパス

(2) Yoshii T “CRY expression in a subset of *Drosophila* clock neurons” SRBR 2014 Society for Research on Biological rhythms, June 14-28, 2014, Big Sky, Montana, USA

(3) 吉井大志, Kistenpfennig C, 富岡憲治 「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」第 84 回日本動物学会, 2013 年 9 月 26-28 日, 岡山県岡山市岡山大学津島キャンパス

(4) Hermann C, Yoshii T, Senthilan PR, Dirksen H, Helfrich-Förster C “The role of the Ion Transport Peptide in the circadian clock of *Drosophila melanogaster*” XIII Congress EBRs, August 18-22, 2013, Munich, Germany

(5) Yoshii T, Kistenpfennig C, Helfrich-Förster C, Tomioka K “Circadian neural networks for Cryptochrome dependent light-entrainment in *Drosophila melanogaster*” XIII Congress EBRs, August 18-22, 2013, Munich, Germany

〔図書〕(計 2件)

(1) 吉井大志, 北隆館, 天体航法, 環境 Eco 選書 昆虫の時計 分子から野外まで, 沼田英治編, 2014, pp. 205-237

(2) 吉井大志 ニューサイエンス社, 昆虫と自然, オオカバマダラの“渡り” 太陽コンパスナビゲーションと体内時計, 48 (11): 13-16

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

http://www.biol.okayama-u.ac.jp/news/news_id3841.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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