

研究報告書

「行動の概日リズムを制御する神経回路構築の分子基盤」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 名越 絵美

1. 研究のねらい

動物の行動は特異的な神経回路によって生み出され、外界からの感覚情報、体内の生理環境や経験によって調節を受ける。行動の異常は様々な精神・神経疾患において顕著にみられ、近年その理解と改善に対する期待が高まっているにも関わらず、行動を司る神経回路の構築と動作原理の殆どは謎に包まれている。本研究では、行動を司る神経回路の動作機構のロジックを解明することを長期的目標とする。地球上のほとんどすべての動物は、地球の自転と公転によって生み出される周期的な外界の環境変化に対応するために、約24時間周期にリズムに変動する活動のパターンを示す。このような行動の概日リズム(サーカディアンリズム)は人では睡眠-覚醒のリズムを司っており、そのリズム障害は不眠症、睡眠覚醒リズム障害として現れるだけでなく、肥満や高血圧、脂質異常症などの生活習慣病のリスクを増大し、うつ病や双極性障害などの精神疾患に伴って現れることが知られている。従って、概日リズム発現と調節のメカニズムの理解はリズム障害と様々な疾患との関係の理解にも貢献すると期待される。

ショウジョウバエは比較的簡単な神経系を持ちながら、脊椎動物にも共通する多様な行動を示す上に、分子遺伝学的手法によって特異的な細胞種や遺伝子の機能を *in vivo* で解析することが比較的容易に行える系である。本研究では、ショウジョウバエをモデルとして行動の概日リズムを生み出す神経回路の構築と動作原理を分子レベルで解明することを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究は、行動の概日リズムを司る脳内のサーカディアン回路の構築のロジックを総合的に理解することを目標としている。ショウジョウバエの行動のサーカディアンリズムは分子時計機構を有する約150の時計ニューロンからなる神経回路(サーカディアン回路)によって生み出される。時計ニューロンには少なくとも7種類のサブタイプが存在し、その中でも、ventral lateral neurons (LNvs, M-cells)が回路全体のリズムを同調させ、行動のリズムの位相と速度をコントロールするマスターペースメーカーであると考えられてきた。しかしながら、LNvs がどのような機構でマスターペースメーカーとしての機能を発揮するかの詳細は明らかにされていない。細胞内の分子時計は細胞内の大部分の生理機能をリズムに調節することが知られているので、時計ニューロンでは分子時計が神経間の情報伝達機構に関わる様々な過程をコントロールすることによって時計ニューロン間の同調を促していると考えられてきている

が、その仮説を裏付ける分子機構は未知である。我々は、サーカディアン回路が同調したリズムを刻み行動発現を調節する機構を多角的に理解するために、(A) LNvs がマスターペースメーカーとしての機能発揮するために必要な分子機構と、(B) 時計ニューロンの神経間コミュニケーションと細胞内時計の相互関係を解析してきた。研究テーマ(A)においては、LNvs に特異的に発現する遺伝子の中から、その機能に不可欠な遺伝子 *unfulfilled (unf)* を同定し(論文1)、*unf* が LNvs の分子時計機構と時計のアウトプット経路に直接関わっていることを分子的に明らかにした。さらに、UNF が第2の核レセプターE75 と協働的に、分子時計に不可欠な *period* 遺伝子の転写を更新することを明らかにした(論文3)。E75 は哺乳類の分子時計の構築因子の一つである Rev-erb alpha のホモログであるので、これらの結果から、核内レセプターを介した転写調節が時計機構に 有益であるため進化的に保存されてきたことが示唆された。研究テーマ(B)においては、時計ニューロンのリズムの発生をリアルタイムで観察する系の立ち上げに成功し、時計ニューロン間のコミュニケーションがリズム発生に不可欠であることを明らかにしてきた。

(2) 詳細

研究テーマ(A) LNvs の機能の分子解析

LNvs が 時計ニューロンのヒエラルキー内で上位の機能を担うのはなぜか。この問いに答えるため、ハエの脳内の特定の細胞を単離し、その細胞内の RNA 発現ゲノムワイドにマイクロアレイで検出するという独自の手法を用いて、我々はこれまでに LNvs に発現する全遺伝子のリスト、時計ニューロン内で LNvs にのみ特異的に発現する遺伝子を同定してきた(Nagoshi et al. Nature Neuroscience 2010. 13(1) 60-68)。LNvs に特異的に発現する遺伝子のなかでも特に高い特異的発現を示す遺伝子について、行動のリズム制御に関与するかどうかを変異体や RNAi などを利用して用いてスクリーニングをしたところ、核レセプター *unfulfilled (unf; DHR51)* 遺伝子をノックダウンするとハエのリズムは完全に消失することが明らかになった。UNF がどのように行動のリズムに関与するかを明らかにするため、時期特異的にコンディショナルな遺伝子ノックダウンを行なったところ、UNF は LNv の発生過程および、発生後の成虫のニューロンの両者が必要であることがわかった。*unf* コンディショナルノックダウンのよって LNvs の分子時計にどのような変化が起きたのかを、免疫染色によって調べたところ、発生中の *unf* ノックダウンも、成虫でのノックダウンでも、LNvs の分子時計は恒暗条件下のみで停止することが明らかになった。加えて、サーカディアン回路の他の時計ニューロンの分子時計のリズムにも変化が起きており、発生中の *unf* ノックダウンによっては他の全ての時計ニューロンの時計のリズムが消失し、成虫での *unf* ノックダウンによっては dorsal lateral neurons (LNds) の時計の周期が約2時間遅くなることが明らかになった。これらの結果から、UNF は、マスターペースメーカーである LNvs の時計機構に直接関わるだけでなく、他の時計ニューロンのリズムを同調させ、回路全体として統一されたリズムを生み出すことに必要であるという結論が導かれ、論文に発表した(論文1)。

UNF はリガンド依存的に遺伝子の転写を調節する核内レセプターである。核内レセプターはホモダイマーまたはヘテロダイマーを形成して遺伝子の転写を調節することが知られているので、UNF の機能を裏付ける分子メカニズムを明らかにするため、ハエに存在する18種類

の核内レセプターを個々に M-cell 内でノックダウンし行動実験をすることによって、UNF と類似の機能をもつ核内レセプターをスクリーニングした。その結果、ほ乳類の Rev-Erb alpha のホモログである E75 が UNF とほぼ同じ機能をもつことが明らかになった。さらに、UNF または E75 をノックダウンすると M-cell 内の分子時計のリズムが消失し、UNF と E75 をダブルノックダウンすると行動のリズムも完全に消失することから、UNF と E75 は時計の構築因子の転写を直接制御する可能性が高いことが示された。E75 は Rev-Erb alpha/beta と同様に、ROR element (RORE) に結合することが予想されるので、ハエの時計遺伝子座の近傍に RORE 配列が存在するかどうか調べたところ、*period* 遺伝子の exon1 に RORE が存在することが分かった。さらに、S2 細胞を用いて *period* 遺伝子に E75 と UNF が結合するか、また E75 と UNF の結合が *period* 遺伝子の発現レベルを制御するか、その制御機構に RORE が関与するかどうかを Chromatin IP 及びルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。その結果、E75 と UNF は *period* の proximal promoter と、RORE を含む intronic promoter の両者に結合し、結合パターンは CLK の結合ピークと類似していることが明らかになった。さらに興味深いことに、E75 と UNF はそれぞれ単独でも *period* 遺伝子に結合するが、両者が同時に存在すると、UNF の結合のターンオーバーが亢進し、それと同時に *period* 遺伝子の転写を活性化させることが明らかになった。転写活性の高いプロモーター上では、核内レセプターの結合のターンオーバーが速いことが知られているので、以上の結果から、E75 が UNF の転写活性機能をより亢進させることによって *period* 遺伝子のリズム的な発現を調節しているという新たな分子機構が明らかになった(論文 3)。加えて、我々の新しい知見は核内レセプター Rev-erb α のホモログの分子時計での役割が進化的に保存されていることを裏付けるものである(図1)。

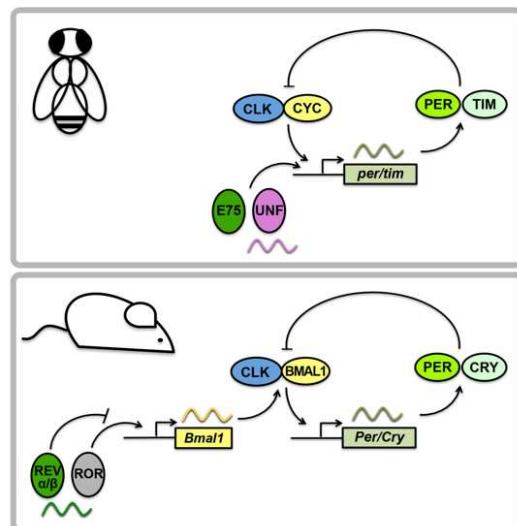


図1

研究テーマ(B)時計ニューロンの神経間コミュニケーションと細胞内時計の相互関係

時計ニューロンの分子時計のリズムの同調には、細胞間コミュニケーションが大きな役割を果たすと考えられてきたが、その機構はこれまで明らかにされていない。我々は、リアルタイムで時計ニューロン内の分子時計のリズムを観察する系を立ち上げることによって、神経間コミュニケーションとリズムの関係を明らかにすることを目指している。これまでに、*period* 遺伝子の転写リズムを VENUS 発現によって模倣するレポーターと、PER タンパクの C 末に赤色蛍光タンパクの TdTOMATO を融合し、PER タンパク質の発現と細胞内局在を模倣するレポーターの2種を構築し、それぞれを発現するハエの系統を作成した。さらに、ハエの脳と、分散培養ニューロンをリゾナンスキャナーコンフォーカル顕微鏡で長期間蛍光観察する系を立ち上げた。

両者のレポーターの挙動をライブイメージングで調べたところ、両者とも、培養脳内ではいくつかの時計細胞では概日振動に近いリズムを刻むが、分散培養系では振動は観察されない

ことがわかった。これらの結果は、ハエの時計ニューロンがリズムを発振するためには、インタクトな神経間ネットワークが必要であることを示唆している。

TdTOMATO レポーターは period タンパクと同様に、in vivo では時計ニューロン内で細胞質と核の間を行き来し、夜の後半には核内に局在する。しかし、分散培養ニューロンでは常に細胞質に存在することが明らかになった。分子時計は転写翻訳のネガティブフィードバックから構築されており、分子時計機構の中心的なリプレッサーである PER タンパクの核輸送は分子振動の鍵となるステップである。われわれのライブイメージングの結果は、分散培養ニューロンでは PER タンパクの核への輸送を調節する過程が阻害されているために、リズムが発振されないという可能性を示唆している。この可能性を検証し、時計ニューロン間のシグナル伝達がどのように PER タンパクの核輸送を調節するのかを明らかにするために、分散培養系を用いた薬理学的手法によってこの過程に関与する神経伝達物質を同定する実験を行った。その結果、VENUS 発現のベースラインは TTX または GABA の添加後に変化しないことから、period の基本的な転写には神経活動は必要ないことが分かった。しかし 興奮性伝達物質と考えられる PDF、5-HT、ACh の添加後には蛍光強度が増加した。PDF または 5-HT と同時に TTX を添加するとその変化が抑制された。これらの結果は、少なくとも period 遺伝子の転写レベルを増大させる過程には、PDF や 5-HT の入力と神経の発火活動が必要であることを示唆している(図2)。PDF は行動のサーカディアンリズムを公暗条件下で持続させるために不可欠なニューロペプチドであることが知られているが、PDF がどのように分子時計を調節するかは未知であった。これらの結果は、PDF の入力が Na チャネル依存的に period 遺伝子の転写レベルを増大させる役割があることをはじめて示したものであり、サーカディアン回路の動作機構を理解する上で極めて重要な知見である。

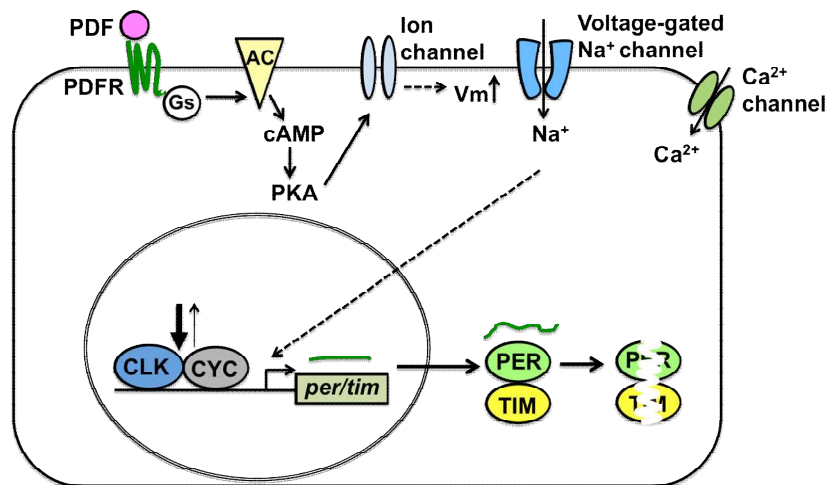


図2

3. 今後の展開

これまで、研究テーマ(A)においては、分子遺伝学の手法を駆使し、サーカディアン回路のメインペースメーカーである M-cell の機能に重要な分子 UNF、E75 を同定し、分子機構を追求してきた。研究テーマ(B)においてはライブイメージングを駆使して、個々の時計ニューロンの分子時計が、細胞間相互作用に非常に依存した特質を持つことを明らかにしてきた。今後は、分子遺伝学とイメージングの技術を組み合わせて、時計ニューロン間の相互作用が細胞内の時計機構を直接制御する機構を明らかにしていく。具体的には UNF によって転写調節を受けている幾つかの分子の機能解析をまず足がかりとする。一方、本研究で明らかにされた、細

胞間の相互作用に依存した時計機構を総合的に理解するための数理モデルの構築を目指す。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究は行動のサーカディアンリズムを司る神経回路の動作機構を解明することを目標にし、分子時計のリズム発生機構を分子レベルで追求するというミクロの視点と、神経回路の活動が個々の神経細胞のリズム発生機構にどう関与するかというマクロの視点から研究を進めてきた。研究開始当初は Nocturnin という分子に着目して細胞内時計が光入力に同調されるための分子機構の解析を行っていたが、様々な技術的困難のために停止をやむなくされた。しかしながら、同時に行っていたスクリーニングから UNF が細胞内時計に重要な役割を果たす事が明らかになり、論文発表につながる結果を得た。さらに UNF の機能を分子レベルで追求することによって、哺乳類の時計遺伝子のホモログである E75 がハエのメインペースメーカー細胞の時計の構築因子であることを明らかにした。この結果はサーカディアンリズムの分子機構が、これまで予想されていた以上に進化的に保存されていることを示したものであり、ジュネーブ大学からプレスリリースとして発表され、フランスの雑誌(Biofutur)にも掲載された。このように、具体的な研究内容は計画時とは異なるものの、サーカディアンリズムを司る神経回路の動作とその分子機構を明らかにするという研究目標に沿った結果が得られてきたと考えている。予想外の結果を得たときにあきらめず、また小さな結果でもおろそかにせずに追求することが必要であることを深く実感してきた。

蛍光レポーターを用いたライブイメージング系は、さきがけ研究よりの開始より数年前に構想し、パイロット実験行っていたが、いくつかの技術的困難によって完成されていなかった。しかし、さきがけ研究によってハエの系統を新たに作り直し、パイロット実験時には未だ開発されていなかった顕微鏡システムを用いることによって、技術的困難を克服し、信頼性のあるデータがとれるようになった。新たに確立したこの実験系を用いることによって、脳内の時計ニューロンの分子時計は細胞間のネットワークインタラクションに依存して機能するという新規の知見が見いだされた。この知見は、最近の哺乳類の研究結果と一部共通しており、ハエを用いた我々の研究が哺乳類にも共通するサーカディアン行動のペースメーカー回路の動作機構を理解するために非常に有益であることを示唆するものである。本研究で構築した蛍光のサーカディアンレポーターは、2光子顕微鏡を用いて生きたハエの脳内のサーカディアン振動を記録することに応用可能であり、オプトジェネティクスを組み合わせると、神経活動の操作とリズムの記録を生きたハエの脳内で同時に行うことも可能である。このような実験系は、例えば、ペースメーカー回路の光に対する応答を記録するためにも利用できる。外界の光情報は、ペースメーカー回路を介して行動の位相を左右させる最も重要な因子であり、光入力のタイミングが突然数時間もずれることが時差ぼけの原因であるが、その神経機構、分子機構は未解明である。新たに構築した蛍光のサーカディアンレポーターを用いて、光入力によって起こる個々のペースメーカー細胞のリズムの動的な変化を調べることによって、時差ぼけを起こす仕組みの神経基盤にも迫ることが可能である。このように、本研究で今後の研究にも役立つ技術を立ち上げることができ、研究領域の目標の一つを達成できたと言える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

動物は一般に周期的な外界の環境変化に対応して活動の周期的変動を示し、特にヒトにおいては脳による概日リズム制御の不調は不眠症等各種の疾患に深く関わっている。本研究は、比較的単純な構造の脳を持ちながらも行動に明確な概日リズムを呈し、かつ各種の遺伝学的手法を適用して行動を司る個々の遺伝子の機能を容易かつ迅速に解析できるショウジョウバエをもちいて、概日リズムの神経回路基盤を解明しようとするものである。脳内に数ある“時計ニューロン”の中でも LN_vs 細胞がマスターペースメーカーと目されつつもその分子機構が不明であった。本研究は *unf* 遺伝子がそこで経時機構と他の時計ニューロンを同調させる要となっていることを明らかにし、さらにその遺伝子産物 UNF が、ホモログが哺乳類において分子時計の一部とされている E75 と協働することにより、最も良く知られた時計遺伝子 *per* の読み出しに関わることを見だし、かつその周辺の分子現象を解明した。また薬理学的手法も援用してニューロペプチド PDF の PER 発現における役割も明らかにした。これらの成果は、分散神経培養系に加えてハエ脳を器官培養下にコンフォーカル顕微鏡にて長期間ライブイメージングできる実験観察系を立ち上げた得たことによるものであり、高く評価できる。これらの成果は適宜論文で発表している。今後は細胞内機構に加えて時計ニューロン間の相互作用の分子機構が明らかになるとともに、哺乳類脳の概日リズム神経機構とその障害の理解が加速されると期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Beuchle, D., Jaumouillé E., and Nagoshi, E. The nuclear receptor *unfulfilled* is required for free-running clocks in *Drosophila* pacemaker neurons. *Curr. Biol.* 2012. 22(13):1221–1227.
2. Bou Dib P, Gnägi B, Daly F, Sabado V, Tas D, Glauser DA, Meister P, and Nagoshi E. A conserved role for p48 homologs in protecting dopaminergic neurons from oxidative stress. *PLoS Genet.* 2014. 10(10):e1004718.
3. Jaumouillé E, Machado Almeida P, Stähli P, Koch R, and Nagoshi E. Transcriptional regulation via nuclear receptor crosstalk required for the *Drosophila* circadian clock. *Curr Biol.* 2015. 25(11):1502–8.
4. Abruzzi K, Chen X, Nagoshi E, Zadina A, Rosbash M. RNA-seq profiling of small numbers of *Drosophila* neurons. *Methods Enzymol.* 2015;551:369–86.
5. Daniel Pouly, Sébastien Chenaux, Virginie Martin, Maja Babis, Rafael Koch, Emi Nagoshi, Vladimir L. Katanaev, Frédéric Gachon and Olivier Staub. USP2–45 is a circadian clock output effector regulating calcium absorption at the posttranslational level. *PLoS One.* *in press.*

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. プレスリリース (フランス)。 BIOFUTUR 367 Juillet/Août 2015, Biotech News (Medtech).
《 Chronobiologie : L'homme et de la mouche, une horloge biologique analogue 》
2. ジュネーブ大学プレスリリース。 Geneva | Tuesday 19 May 2015. Embargo: May 21, 2015, 12:00 noon US Eastern Time. “The fly's time”
3. September 5, 2013. Swiss Chronobiology meeting, University of Fribourg, Switzerland. Oral presentaion. “Molecular mechanisms underlying the role of unfulfilled in Drosophila circadian rhythms“
4. September 4, 2013. SKMB Gene regulation workshop. University of Lausanne, Switzerland. Invited talk. “Circadian rhythms: from genes to networks“
5. September 2, 2013. Invited seminar at the Experimental Neurology Meeting, Host: Department of Clinical Research Neurology group, University of Bern. “Circadian rhythms from cells to networks“