

# 研 究 報 告 書

## 「体温の概日リズムを制御する分子機構と神経回路ネットワークの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 10 月

研 究 者: 濱田 文香

### 1. 研究のねらい

本研究では、体温の概日リズム(体温リズム)を司る分子機構と神経回路の解明を目指している。ヒトの体温は、一日の周期で約1℃変動する。例えば、ヒトでは体温が上昇すると覚醒し、体温が下降すると眠くなる。また、病気の例として、睡眠障害である睡眠相前進症候群 (ASPS: Advanced sleep-phase syndrome)や睡眠相後退症候群 (DSPS: Delayed sleep-phase syndrome)は、不規則な体温変化をもたらす。したがって、この体温リズムは、睡眠や代謝に密接に関与し、恒常性の維持に重要な働きをもたらす。

体温リズムは視床下部(視交叉上核)にある概日時計によって制御されていることは周知である。しかし、体温リズムの研究は、これまで主にヒト、霊長類の生理現象が着目され、マウスなどの遺伝学を用いた研究は数少ない。そのため、体温リズムがどのように制御されているか、特にその分子機構と神経回路はほとんど未知である。これまでの研究において、概日リズムや睡眠などの哺乳類の概日リズムはショウジョウバエでも保存されており、その基本的な分子機構には共通性があることが見いだされてきた。また、ショウジョウバエは遺伝学を元に、行動を制御する神経回路を、体系的かつ迅速に調査可能な優れたモデル生物である。そこで本研究ではショウジョウバエをモデル生物として、体温リズムのメカニズムを、分子、細胞、神経回路レベルで探求することをねらいとしてきた。まず、私達はショウジョウバエの温度選択性行動に着目し、体温リズムを測定することに成功した。ショウジョウバエは概日時計依存的な体温リズムをもち、その周期性および分子機構はヒトの体温リズムの特徴と相似していた (Kaneko H, et al. *Current Bio* (2012))。この結果から、ショウジョウバエと哺乳類において、体温リズムを制御する基本的なメカニズムは、ハエと哺乳類で進化的に保存されていることが示唆された。本研究および、今後得られる知見はヒトまで進化的に保存している可能性が考えられる。

### 2. 研究成果

#### (1)概要

本研究は、体温リズムの分子メカニズムの解明を目指し、まず、ショウジョウバエの行動に着目した。哺乳類の体温は内在のエネルギーを使って調節されるが、変温動物であるショウジョウバエの体温は、外界の気温と限りなく近い。そのため、変温動物は自ら温度を選択することで体温調節を行っていると考えられている。そこで私達は、ショウジョウバエは温度選択行動を用いて、体温リズムを変動させているのではないかと考えた。その結果、ショウジョウバエは温度選択リズムを行い、リズムは哺乳類の体温リズムと3つの点で相似する事を明らかにした。1) 温度は昼間上昇し、夜間下降する。2) 概日時計による制御である。3) ハエの温度選択リズムは哺乳類の体温リズムと同様に、活動リズムとは異なった神経回路により制御される。哺乳類とショウジョウバエの体温調節機構は全く異なる。それにもかかわらず、体温リズム(温度選択

リズム)を制御する基本的なメカニズムは哺乳類とショウジョウバエにおいて相似している事が示唆された。このことから、体温リズムの分子メカニズムは進化的に保存されているのではないかと考えられる(Kaneko H, et al. *Current Bio* (2012))。さらに、本研究はこの行動の分子機構と神経回路のネットワークを明らかにする事を目的に実験を行い、これまでに次の3点を明らかにしてきた。1)温度選択リズムを制御する神経ペプチドの同定、2)光による温度選択行動への影響、3)温度感覚神経の温度選択リズムへの影響。今後これらの知見をもとに、概日時計と体温リズムをつなぐ分子制御機構および神経回路の解明だけでなく、睡眠障害の機構解明につながる事が期待される。

## (2)詳細

### 研究計画1) 温度選択リズムを制御する神経ペプチドの同定

ショウジョウバエ温度選択リズムは一日の周期で変動し、昼間に温度上昇、夜に温度下降が起こる。ではなぜこのような変化が起きるのか、分子レベルでの制御機構の違いを明らかにするため、私達は神経ペプチドに着目した。神経伝達物質である神経ペプチドは、神経間の情報伝達だけでなく、多くの行動を含む生理的な課程を制御する。温度選択行動を用いたスクリーニングの結果、G 蛋白質受容体である DH31 受容体(哺乳類の CGRP 受容体ホモログ)変異体は、昼間に常に一定の高い温度を選択した。DH31 受容体の発現部位を特定するため、DH31 受容体抗体を作製し、脳での抗体染色を行ったところ、DH31 受容体は脳の時計細胞に発現していた (Goda et al., *in preparation*)

一方、DH31 受容体のリガンドである DH31 ペプチドは PDF 受容体と *in vitro* で結合する。PDF 受容体は DH31 受容体のホモログであり、かつ活動リズムに重要な働きをする事が知られている。そこで、私達は DH31 ペプチドと PDF 受容体の温度選択リズムにおける役割を調査するため、DH31 ペプチドの変異体を作製し、DH31 ペプチドの変異体および PDF 受容体変異体の温度選択リズムの表現型を観察した。その結果、どちらの変異体も昼間の温度上昇は正常にも関わらず、夜の温度下降に異常が見られた。私達は以前、脳にある 150 個の時計細胞のうち、DN2 細胞と呼ばれる細胞が、温度選択リズムを特異的に制御する事を発見した。そこで DN2 細胞特異的に PDFR 受容体、もしくは DH31 ペプチドを発現させ、PDFR 受容体変異体および DH31 ペプチド変異体の表現型をそれぞれレスキューすることに成功した。したがって、DH31 は PDFR 受容体のリガンドとして夜のみに関与する事が示唆された。このことから、温度選択リズムは、ホモログである2つの G 蛋白質受容体により、昼間と夜それぞれ特異的に制御される事が明らかになった (Goda et al., *Current Biology in revision*)。本研究により、DH31 受容体の役割および、DH31-PDF 受容体の機能的な役割が初めて明らかになった。

### 研究計画2) 光による温度選択行動への影響

夜間、光にあたると私達の体温は上昇する。私達は、ショウジョウバエは光照射下では高い温度を、暗黒下では低い温度を選択する(light dependent temperature preference (LDTP))事を明らかにした(Head et al., *Current Biology* (2015))。このことから、ハエの体温は外界の温度に近い、ハエも人と同様に光照射により体温が上昇すると考えられる。

この LDTP の神経回路を明らかにするため、ハエの 7 つの眼に着目した。それぞれの眼が異常になる変異体を用いて、スクリーニングを行ったところ、7個の眼のうち全てに異常が見られ

る変異体を用いても、LDTP 表現型は正常であった。ところが、*glass* 変異体を用いたところ、LDTP 表現型に異常が見られた。*glass* は転写因子であり、*glass* 変異体は7つの眼の発生が異常になるだけでなく、脳にある概日時計である DN1 神経細胞(DN1s)の発生に異常が見られる。そこで、私達は DN1s が LDTP 行動に関与しているのではないかと考え、更なる解析を行った。まず、DN1s は概日時計細胞なので、概日時計に関与する分子の変異体を用いて、スクリーニングを行った。その結果、pigment dispersing factor receptor (PDFR) と呼ばれる GPCR の変異体のみが異常を示した。さらに、DN1s 特異的に PDFR-RNAi を発現させた PDFR のノックダウン、および、DN1s 特異的に PDFR-cDNA を発現させたレスキュー実験から、PDFR の DN1s での発現が必要十分である事を示した。温度選択リズムにおいても、LD にした場合と DD にした場合で選択する温度が同様に变化するため、昼間においては、温度選択リズムは外界の光刺激と体内時計の情報が統合する事によって、成り立つ事が考えられる。

### 研究計画3)温度感覚神経の温度選択リズムへの影響

外界からの温度刺激は、哺乳類の体温変化を促しその結果、概日時計にも影響を与える。そこで私達は、まず、ハエの外界からの温度刺激を感知する分子メカニズムを明らかにし、そのメカニズムが、温度選択リズムに影響を与えるか否かに着目した。TRP (Transient Receptor Potential) チャンネルは哺乳類からショウジョウバエなどで保存された温度感知センサーである。しかし、TRP チャンネルを使って感知された様々な温度情報が、どのように神経回路中で統合され伝達するのかほとんどわかっていない。ショウジョウバエ TRPA1 は 25°C>で活性化する暖センサーである。私達は以前、この TRPA1 の発現する AC 神経が直接暖かさを感知し、温度選択行動に重要な働きを示す事を明らかにした(Hamada FN, et al. *Nature* (2008))。この AC 神経は脳に存在するため、内在的な温度環境を感知している事が考えられる。ところが最近、昆虫の温度センサーは触覚や足などに多く存在する事がわかってきた。そこで AC 神経の存在する場所を詳しく調査したところ、AC 神経細胞は触覚からの神経群が脳に投射する軸索上に接して存在し、触覚からの温度感知情報を統合している事が明らかになった。さらに私達は、TRP チャンネルの1つである 38°C>で活性化する pyrexia (pyx) が触覚第二節に発現し、AC 神経はこの pyx 神経からの暖温度情報を統合している事を明らかにした。本研究は末梢から中枢への温度情報統合を初めて示し、この統合が動物の行動に重要な働きを示す可能性を示唆した(Tang X, et al. *J Neurosci* (2013))。

痛みの強さ(例えば偏頭痛や歯痛)は時間によって変化する事が知られている。この現象は概日リズムとの関連性は示唆されるが、そのメカニズムはあまり明らかでない。そこで本研究において、感覚神経と時計の神経回路がどのように関連し、生理に影響を与えているのか、ハエの温度選択行動をモデルに検証した。ショウジョウバエ温度選択リズムは一日の周期で変動し、昼間に温度上昇、夜に温度下降が起こる。TRP チャンネルの1つである TrpA1 の発現する anterior cells (AC) 神経は脳で外部の温度を感知する神経細胞であり、ハエ温度選択行動を制御する。私達は AC 神経と small lateral neurons (sLNv)時計細胞が末端で接触し、夜明け前の温度選択のみに重要な働きをしていることを明らかにした。また、セロトニンが温度伝達に使用されており、特にセロトニンは哺乳類においても体温制御に関与する事が示唆されている。さらに、私達は sLNv は、温度選択リズム全体を制御する master clock である dorsal neurons

(DN2)神経に接触する事を明らかにした。この接触した数は夜間、劇的に変化し、夜明け間にピークを示した。また sLNvs は DN2s を活性化し、DN2s の活性化を阻害したハエは低い温度を選択した (Tang et al., *Current Biology* in revision)。このことから、夜明け前に sLNvs と DN2s 神経はより結合し、DN2の活性化を制御する事で適切な温度選択リズムを制御しているという事が考えられる。したがって、本研究において、sLNvs は外界の温度の情報を時計の神経回路に統合するための gate として働いている事が示唆された。ハエの温度選択リズムは哺乳類の体温リズムと同様な働きをもつ。したがって、哺乳類の体温リズムにおいても外界の温度の情報は重要な働きをしているのかもしれない。特に、夜明け前は体温リズムだけでなく、私達の体内で多くの現象がおこる、例えば、心拍数の増加や目覚めなど、これらの現象も外界の温度の情報は重要な働きをしているのかもしれない。

### 3. 今後の展開

概日リズムの研究は、1972年にショウジョウバエを用いて *period*変異体が発見されて以来、大きく進展した。今もなお、概日リズムを制御する分子メカニズムを明らかにするために、ショウジョウバエの活動リズムは、世界中で頻繁に使用されている。このショウジョウバエの活動リズムを用いて、分子メカニズムが明らかにされ、その多くは哺乳類にまで保存していた。そのためショウジョウバエのモデル生物としての貢献はとても大きい。私達は 2012 年にショウジョウバエの温度選択リズムを発見した。重要なことは、この体温リズムのメカニズムは、これまで頻繁に使われている活動リズムとは異なるメカニズムによって制御されている点である(哺乳類の体温リズムも同様、活動リズムとは異なるメカニズムで制御されている)。このことから、温度選択リズムを用いることで、新しい概日リズムのメカニズムが明らかになるかもしれない。また、最近の結果から、温度選択リズムと代謝および睡眠の影響を示唆する結果がでてきた。このことを含めて、将来的にはさらなる温度選択リズムのメカニズムの解明をするとともに、代謝や睡眠にどういった影響を及ぼすのか、分子レベルで明らかにしていきたいと考えている。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

ショウジョウバエの温度選択リズムの分子機構とその神経回路ネットワークを明らかにするにあたり、これまでに6本の論文(うち2本は revision)を発表する事ができた。当初の予定であった、温度選択リズムの基本的なメカニズムを明らかにするだけでなく、新しい因子の特定、および、光に対する反応など、温度選択行動を中心として、研究が発展でき、将来の展望も明らかになってきた。妊娠中および産休中は領域会議にスカイプでしか参加できなかったため、他の領域の研究者の発表を聞くことができなかったのはとても残念に思う。しかし、さきがけを通じて、領域の先生方だけでなく、研究者の方達と知り合う事ができ、さきがけに採用されるというチャンスを頂けたという事を本当に感謝したいと思う。

#### (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)

行動遺伝学の研究材料として 40 年以上にわたり多様な分子遺伝学的研究が行われてきたショウジョウバエは変温動物とされ、その体温の研究はほとんど顧みられてこなかった。本研究はこのハエが環境温度選択行動を示しかつその行動に日周リズムがあることを発見し、これが概日時計による制御を受け、それは活動リズムとは別個の神経回路による制御であることを解明した。さらに、時計細胞 DN2 細胞に着目した遺伝変異体解析などにより、神経ペプチドの DH31 受容体と PDF 受容体の機能が昼の高温選択と夜の低温選択行動とを特異的に演出していることを解明し、また DN1 細胞における PDFR 受容体が昼の温度選択リズムに光刺激が介入することを可能にしていること、および外界温度の感知は AC 神経細胞の TrpA1 チャンネルにより、その情報が AC 神経から sNLv 時計細胞を介して DN2 細胞に統合されることを見いだした。これらは独創性の高い研究成果であり、適宜論文発表しあるいは投稿中となっている。これら一連の研究によっても哺乳類の体温リズムとショウジョウバエの温度選択リズムには関与分子を含めて共通点が複数見いだされており、今後ハエの概日リズム機構の全貌がより精緻に解明され、哺乳類の概日リズム神経機構の理解に役立ち、ひいては睡眠障害などの治療の手がかりも得られることが期待できる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Head, L.M., Tang, X., Hayley, S.E., Goda, T., Umezaki, Y., Chang, E.C., Leslie J.R., Fujiwara, M., Garrity, P.A. and **Hamada F.N.** The influence of light on temperature preference in *Drosophila*. **Current Biology**, 2015 Apr 20;25(8):1063–8.
2. Goda, T, Leslie J., and **Hamada F. N.** Design and analysis of temperature preference rhythm in *Drosophila*. **J. Vis. Exp**, 2014 Jan 13; (83)
3. Tang X., Platt M.D., Lagnese C.M., Leslie J.R., & **Hamada F.N.** Temperature integration at the AC thermosensory neurons in *Drosophila*. **The Journal of Neuroscience**, 2013 Jan 16;33(3):894–901.
4. Kaneko H., Head L.M., Ling J., Liu Y., Hardin. P.E., Emery.P., & **Hamada F.N.** Circadian rhythm of temperature preference and its neural control in *Drosophila*. **Current Biology**, 2012 Oct 9;22(19):1851–7

### (2) 特許出願

研究期間内累積件数: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)

#### 口頭発表

- “Integration of clock and temperature circuits drives pre-dawn temperature preference in *Drosophila*”

Gold spring harbor meeting, Neurobiology of *Drosophila* 2015 年 9 月

- “Circadian rhythm of temperature preference and its neural control in *Drosophila*”  
SRBR (The Society for Research on Biological Rhythms) 2014, Symposium, Big Sky,  
Montana 2014 年 6 月
- “Circadian rhythm of temperature preference and its neural control in *Drosophila*”  
日本神経科学大会 2012 年 9 月

#### 受賞

- Charlotte R. Schmidlapp Woman Scholars 2015 年
- Basil O’ Connor Starter Scholar Research Award, March of Dimes 2012 年