

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

|   |           |  |        |         |               |
|---|-----------|--|--------|---------|---------------|
| 研究テーマ<br>(和文) AB  |           | キイロショウジョウバエ体内時計機構におけるミトコンドリア LETM1 の機能解析   |        |         |               |
| 研究テーマ<br>(欧文) AZ  |           | Functional analysis of mitochondrial LETM1 in <i>Drosophila</i> circadian clock system |        |         |               |
| 研究氏<br>代表<br>者  | カナ CC     | 姓)モリオカ   | 名)エリ   | 研究期間 B  | 2015 ~ 2016 年 |
|   | 漢字 CB     | 森岡   | 絵里     | 報告年度 YR | 2016 年        |
|   | ローマ字 CZ   | Morioka  | Eri    | 研究機関名   | 富山大学          |
| 研究代表者 CD<br>所属機関・職名   |           | 富山大学大学院 理工学研究部 (理学) ・助教  |        |         |               |
| <p>概要 EA (600 字~800 字程度にまとめてください。)</p> <p>本研究では、バイオイメージング技術、電気生理学的手法を用いて、ショウジョウバエの中枢時計ニューロン(LNs)の細胞生理的解析を行い、ショウジョウバエ体内時計機構におけるミトコンドリア LETM1 の機能を解明することを目的として以下の実験を行った。</p> <p>まず、蛍光 pH センサータンパク質を発現するショウジョウバエ系統を用いたイメージング実験の結果、LNs においては細胞内 pH リズムが観察されるのに対し、時計細胞ではないドーパミンニューロンでは pH リズムは観察されなかったことから、細胞内 pH 振動は LNs 特異的であることが示された。これまでに、ミトコンドリアのカリウム - プロトン交換輸送体 LETM1 をノックダウンした系統において、恒暗条件下におけるフリーラン行動リズムが有意に長周期化し、細胞内 pH 振動が減少することが明らかとなっている。そこで、LETM1 ノックダウンが LNs におけるコアの時計遺伝子振動にどのような影響を及ぼすのかを、免疫組織化学的に解析した。その結果、時計タンパク質 PERIOD および TIMELESS の発現リズムの振幅が減少し、位相後退する傾向が観察された。また、電気生理実験装置のセットアップを実施し、異なる細胞外 pH 条件下において、whole-cell パッチクランプによる LNs の活動電位の記録を試みた。その結果、LETM1 ノックダウンにより細胞外 pH 依存的な活動電位発火頻度変化が消失することが明らかとなった。また、クリプトクロムを介した青色光による直接的な発火頻度増加応答を解析した結果、細胞外 pH が酸あるいはアルカリに傾いた条件下において、発火頻度増加応答が有意に減少することが示された。</p> <p>これらの結果から、時計遺伝子の分子振動と神経活動出力をリンクさせる細胞内メカニズムとして、細胞内 pH とミトコンドリア LETM1 が関与している可能性が強く示唆された。</p> |           |  |        |         |               |
| キーワード FA  | 時計中枢ニューロン | ショウジョウバエ   | イメージング | 活動電位    |               |

(以下は記入しないでください。)

|            |  |  |  |  |           |  |  |  |  |  |  |  |  |
|------------|--|--|--|--|-----------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 助成財団コード TA |  |  |  |  | 研究課題番号 AA |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 研究機関番号 AC  |  |  |  |  | シート番号     |  |  |  |  |  |  |  |  |

| 発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。） |                    |   |                   |  |  |  |  |                    |  |
|-----------------------------------|--------------------|---|-------------------|--|--|--|--|--------------------|--|
| 雑誌                                | 論文標題 <sup>GB</sup> |   |                   |  |  |  |  |                    |  |
|                                   | 著者名 <sup>GA</sup>  |   | 雑誌名 <sup>GC</sup> |  |  |  |  |                    |  |
|                                   | ページ <sup>GF</sup>  | ～ | 発行年 <sup>GE</sup> |  |  |  |  | 巻号 <sup>GD</sup>   |  |
| 雑誌                                | 論文標題 <sup>GB</sup> |   |                   |  |  |  |  |                    |  |
|                                   | 著者名 <sup>GA</sup>  |   | 雑誌名 <sup>GC</sup> |  |  |  |  |                    |  |
|                                   | ページ <sup>GF</sup>  | ～ | 発行年 <sup>GE</sup> |  |  |  |  | 巻号 <sup>GD</sup>   |  |
| 雑誌                                | 論文標題 <sup>GB</sup> |   |                   |  |  |  |  |                    |  |
|                                   | 著者名 <sup>GA</sup>  |   | 雑誌名 <sup>GC</sup> |  |  |  |  |                    |  |
|                                   | ページ <sup>GF</sup>  | ～ | 発行年 <sup>GE</sup> |  |  |  |  | 巻号 <sup>GD</sup>   |  |
| 図書                                | 著者名 <sup>HA</sup>  |   |                   |  |  |  |  |                    |  |
|                                   | 書名 <sup>HC</sup>   |   |                   |  |  |  |  |                    |  |
|                                   | 出版者 <sup>HB</sup>  |   | 発行年 <sup>HD</sup> |  |  |  |  | 総ページ <sup>HE</sup> |  |
| 図書                                | 著者名 <sup>HA</sup>  |   |                   |  |  |  |  |                    |  |
|                                   | 書名 <sup>HC</sup>   |   |                   |  |  |  |  |                    |  |
|                                   | 出版者 <sup>HB</sup>  |   | 発行年 <sup>HD</sup> |  |  |  |  | 総ページ <sup>HE</sup> |  |

欧文概要 EZ

To examine relationships between intracellular pH rhythm and spontaneous action potential in *Drosophila* circadian pacemaker neurons (LNs), I applied bio-imaging assays and electrophysiological analysis on LNs. I found that LNs exhibited intracellular pH oscillations in a circadian manner. I screened LNs-specific RNAi for candidate genes that may regulate intracellular pH using newly derived commercial locomotor activity monitoring system. As a results, LNs-specific mitochondrial ion-transporter LETM1 knockdown significantly prolonged free-running periods. In addition, LETM1 knockdown reduced intracellular pH oscillation and core clock protein PERIOD and TIMELESS immunoreactivity rhythms.

Using newly introduced electrophysiological techniques to monitor action potentials in LNs, I found that spontaneous action potential firing frequency changed according to extracellular pH conditions in control flies but not in LETM1 knockdown flies. The present study suggest that intracellular pH and mitochondrial LETM1 may be involved in circadian clock mechanisms in LNs.