

氏 名 守山 禎之

授与した学位 博士

専攻分野の名称 理学

学位授与番号 博甲第4151号

学位授与の日付 平成22年 3月25日

学位授与の要件 自然科学研究科 バイオサイエンス専攻

(学位規則第5条第1項該当)

学位論文の題目 Molecular characterization and functional analysis of the clock genes *period* and *Clock* in the cricket *Gryllus bimaculatus*

(フタホシコオロギにおける時計遺伝子 *period*, *Clock* の分子構造と機能の解析)

論文審査委員 教授 富岡 憲治 教授 高橋 純夫 教授 上田 均

学位論文内容の要旨

概日時計の分子機構は昆虫ではキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) で最も解析が進んでおり、時計遺伝子と呼ばれる複数の遺伝子とその産物タンパク質により構成されるフィードバックがリズム発振の中心にあると考えられている。しかし他の多くの昆虫でショウジョウバエとは異なる結果が得られており、昆虫概日時計分子機構の全容解明には至っていない。本研究では、フタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*) 時計遺伝子 *period* および *Clock* のリズム発振における機能を、行動リズムを指標として、分子生物学的手法により解析した。

まずフタホシコオロギ時計遺伝子 *period* cDNA をクローニングし、時計の所在である視葉内でのその発現リズムを検討した。成虫の視葉では *period* mRNA は明暗サイクル下で夜の初めにピークをもつ周期的発現を示した。この周期的発現は恒暗条件下でも継続したことから、*period* は内因的に周期的発現をしていることが示唆された。*period* のリズム発振における機能を解析するために *period* 2 本鎖 RNA (dsRNA) を雄終齢幼虫の腹部に注射し、羽化後の成虫の活動リズムを計測したところ、*period* dsRNA 処理された個体では恒暗条件下で活動リズムが消失し無周期となった。また、*period* dsRNA 処理された個体の視葉内 *period* mRNA 発現量は有意に低下し、発現リズムも消失していた。これらの結果から、dsRNA による RNA 干渉により *period* 発現リズムが消失し、その結果活動リズムが無周期になったと考えられる。フタホシコオロギでは幼虫期には昼行性、成虫期には夜行性となる行動リズムの位相逆転現象を示す。幼虫での解析の結果、頭部の *period* 発現が成虫同様に夜間にピークを持つリズムを示すこと、*period* dsRNA 処理したほとんどの個体で活動リズムが消失したことから、分子レベルでの時計の振動機構は幼虫も成虫と同様であることが示唆された。

続いて時計遺伝子 *Clock* cDNA をクローニングし、視葉内における発現リズムを検討した。成虫視葉内 *Clock* mRNA は、明暗サイクル下でもそれに続く恒暗条件下でも有意な周期的発現を示さなかった。この発現パターンは、キイロショウジョウバエ *dClock* の明け方にピークをもつ周期的発現とは大きく異なる。*Clock* のリズム発振における機能を解析するために *Clock* dsRNA を雄終齢幼虫の腹部に注射し、羽化後の成虫の活動リズムを計測したところ、恒暗条件下で活動リズムが消失し無周期となった。また、*Clock* dsRNA 処理個体の視葉内 mRNA 量を測定したところ、*Clock* のみならず *period*, *timeless* の mRNA 発現量も低下しかつそれらの発現リズムも消失していることがわかった。これらの事実から、*Clock* がリズム発振に重要な役割を果たすこと、また *period*, *timeless* の転写活性にも関わっていることが示唆された。

以上の結果から、フタホシコオロギでも *period*, *Clock* 両時計遺伝子がリズム発振機構において必須の役割を担うことが明らかになった。また *Clock* が *period*, *timeless* の転写活性に関わっていることも示唆されたが、視葉内での *Clock* mRNA の周期的発現がみられないことから、コオロギの概日時計分子メカニズムはショウジョウバエよりも哺乳類に近い可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

本論文は、フタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*) 時計遺伝子 *period* および *Clock* のリズム発振における機能を、行動リズムを指標として、分子生物学的手法により解析したものである。

まずフタホシコオロギ時計遺伝子 *period* cDNA をクローニングし、時計の所在である視葉内でのその発現リズムを検討した。成虫の視葉では *period* mRNA は明暗サイクル下で夜の初めにピークをもつ周期的発現を示し、この周期的発現は恒暗条件下でも継続したことから、*period* は内因的に周期的発現をしていることを示唆した。次いで、*period* のリズム発振における機能を解析するために *period* 2本鎖 RNA (dsRNA) を投与後の活動リズムを計測し、*period* dsRNA 処理により恒暗条件下での活動リズムが消失することを示した。また、*period* dsRNA 処理個体の視葉内 *period* mRNA 発現量が有意に低下し、発現リズムも消失することを明らかにした。これらの結果から、dsRNA による RNA 干渉により *period* 発現リズムが消失し、その結果活動リズムが無周期になることを示唆した。フタホシコオロギ成虫は夜行性であるが、幼虫期には昼行性を示す。幼虫での解析の結果、頭部の *period* 発現が成虫同様に夜間にピークを持つリズムを示すこと、また幼虫の活動リズムも *period* dsRNA 処理で消失することから、分子レベルでの時計の振動機構は幼虫も成虫と同様であることを示唆した。

続いて時計遺伝子 *Clock* cDNA をクローニングし、視葉内における発現リズムを検討した。その結果、成虫視葉内 *Clock* mRNA は、明暗下でもそれに続く恒暗下でも有意な周期性を示さないことを明らかにした。*Clock* のリズム発振における機能を解析するために *Clock* dsRNA を雄終齢成虫の腹部に注射し、羽化後の成虫の活動リズムを計測し、恒暗条件下で活動リズムが消失し無周期となることを示した。また、*Clock* dsRNA 処理個体の視葉内 mRNA 量を測定し、*Clock* のみならず *period*, *timeless* の mRNA 発現量も低下し、かつそれらの発現リズムも消失することを示した。これらの事実から、*Clock* がリズム発振に重要な役割を果たすこと、また *period*, *timeless* の転写活性にも関わっていることを示唆した。

以上の結果から、フタホシコオロギでも *period*, *Clock* 両時計遺伝子がリズム発振機構において必須の役割を担うことを明らかにした。また *Clock* が *period*, *timeless* の転写活性に関わることを示すとともに、視葉内での *Clock* mRNA の周期的発現がみられないことから、コオロギの概日時計分子メカニズムはショウジョウバエよりも哺乳類に近い可能性を示唆した。

本論文は昆虫概日時計の振動機構の理解に大きく寄与するものであり、また、発表会での質疑に対する応答も充分であった。以上により、博士の学位に値すると判断された。