

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19370029

研究課題名（和文）不完全変態昆虫の概日時計振動機構とその機能の解析

研究課題名（英文）Analysis of oscillatory mechanism of the circadian clock and its function in hemimetabolous insects

研究代表者 富岡 憲治 (TOMIOKA KENJI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：30136163

研究代表者の専門分野：時間生物学

科研費の分科・細目：5705

キーワード：概日リズム、光周性、体内時計、時計遺伝子、RNAi

1. 研究計画の概要

不完全変態の直翅目昆虫コオロギと無翅目昆虫シミの概日時計の分子機構を明らかにすることにより、昆虫時計発振の分子機構の一般性と多様性を検討するとともに、その行動リズムおよび光周性への関与を明らかにすることを目的とする。具体的には、①各種光条件下での時計遺伝子 mRNA の発現リズムの解析、②時計蛋白質の発現リズムと細胞内挙動の解析、③RNA 干渉を利用した振動機構および光周測時機構における時計遺伝子機能の解析の3点に絞って解析を進め、直翅目および無翅目昆虫での概日時計発振の分子機構の解明とその行動および光周測時機構における役割の解明を目指す。

2. 研究の進捗状況

(1) フタホシコオロギの概日時計振動機構に関しては、時計遺伝子 *period* (*per*), *timeless* (*tim*), *Clock* (*Clk*), *cryptochrome2* (*cry2*) の cDNA の取得に成功し、それらの構造と機能の解析を進めている。これまでに、*per*, *tim* が周期的に発現すること、*per*, *Clk* の RNAi では mRNA の発現抑制と伴に、行動リズムも mRNA 発現リズムも完全に停止することを明らかにした。しかし、*tim* の RNAi では、mRNA の発現は抑制されるが活動リズムは継続すること、*Clk* mRNA 発現には日周期性が無いこと、また、*CLK* には転写活性化領域を欠くことなどから、コオロギ時計機構はショウジョウバエ型の振動機構とは異なることが明らかとなった。

(2) シミの時計機構に関しては、*tim*, *Clk* お

よび *cycle* (*cyc*) の cDNA を取得した。*tim*, *Clk* では RNAi により mRNA の発現抑制と行動リズムの消失が起こることを明らかにした。*tim*, *Clk* の発現には周期性は無く、*Clk* に転写活性化領域が無く、*cyc* に転写活性化領域があることを明らかにした。これらの結果から、シミ時計機構はハエ型ではなく、むしろ哺乳類に類似していることが示唆された。

(3) 光周性に関してはタンボコオロギを用いて *per*, *tim* 遺伝子の cDNA をクローニングにより取得し、それらの RNAi により、時計機構の光周性における役割を検討した。その結果、*per* の RNAi では時計が停止し、かつ光周反応も完全に阻害されることが明らかとなった。これらの結果から、概日時計の振動が光周測時機構に必須であることが示唆された。さらに、*opsin* の cDNA を取得し、RNAi による解析を行った結果、光周反応が部分的ではあるが阻害されることから、光周受容系には複眼オプシンが関係することを明らかにした。

3. 現在までの達成度

②概ね順調に進展している

当初取得を予定していた時計遺伝子の cDNA を大部分既に取得し、それらの明暗周期下および恒暗条件下での発現リズムの解析を終え、また RNA 干渉による発現抑制を用いた機能解析を進めている。RNA 干渉による時計遺伝子機能の解析はハエを除いて昆虫では初めての個体レベルでの成功例である。これらの解析の結果、概日時計機構に関しては直翅目および無翅目昆虫の時計機構が、ショ

ウジョウバエとは大きく異なることを明らかにしつつある。無翅目は最も原始的な昆虫の一つに位置づけられ、本研究の成果は昆虫時計機構の一般性と多様性の理解に大きく貢献するものと考えている。一方、光周測時機構に関しても、時計遺伝子 RNAi による概日時計の停止が光周反応を完全に阻害することを明らかにした。この発見は、光周測時機構を概日時計の光周期への反応として捉えることができることを示しており、今後の光周測時機構の分子メカニズムの解明に大きく近づいたと考えている。一方、従来から光周測時機構には複眼が関与することが示唆されてきたが、本研究によりオプシンの関与を始めて明らかにした。この成果は、概日時計の光周反応のメカニズムを明らかにする布石となる。

4. 今後の研究の推進方策

時計の分子振動系は、時計遺伝子とその産物タンパク質のネットワークにより成り立っている。今後は、このネットワークの解明を目指して、各遺伝子の RNAi によるノックダウンが他の時計遺伝子の発現リズムにどのような影響を及ぼすかを検討する予定である。また、既に作成した抗体を用いて Western blot 解析を行い、時計遺伝子産物タンパク質の時間的発現パターンの解析を行う計画である。これら遺伝子、タンパク質等に関する結果をハエ等の既知の例と比較検討し、昆虫の概日時計の振動機構の多様性の理解を目指す。技術面では、*per* のプロモーター領域を取得し、GFP や Luciferase 遺伝子と連結したコンストラクトを作成することにより、*in vitro* アッセイ系やトランスジェニック系を用いた、より簡便な遺伝子発現アッセイ系を確立し、より効率的な研究展開に資することも考えている。

5. 代表的な研究成果

(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 16 件)

- ① Moriyama Y, Sakamoto T, Karpova SG, Matsumoto A, Noji S, Tomioka K (2008) RNA interference of the clock gene *period* disrupts circadian rhythms in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Biological Rhythms*, 23: 308-318.
- ② Sakamoto T, Uryu O, Tomioka K (2009) The clock gene *period* plays an essential role in photoperiodic control of nymphal development in the cricket *Modicogryllus siamensis*. *Journal of Biological Rhythms*, 24:379-390.
- ③ Tomioka K, Matsumoto A (2009) A

comparative view of insect circadian clock systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67: 1397-1406

- ④ Tomioka K, Sakamoto T, Moriyama Y (2009) RNA interference is a powerful tool for chronobiological study in the cricket. *Sleep and Biological Rhythms*, 7:144-151.
- ⑤ Uryu O, Tomioka K (2010) Circadian oscillations outside the optic lobe in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Insect Physiology* (in press)

[学会発表] (計 27 件)

- ① 守山禎之・富岡憲治 (2007) 時計遺伝子 RNA 干渉によるフタホシコオロギ成虫の概日時計の停止、第 78 回日本動物学会大会、弘前市、9 月 23 日
- ② Tomioka K, Moriyama Y, Sakamoto T (2008) *period* gene plays a role in circadian rhythm and photoperiodism in crickets. XXIII International Congress of Entomology. Durban, South Africa, July 6-12, 2008.
- ③ 守山禎之・富岡憲治 (2008) 時計遺伝子 RNA 干渉によるフタホシコオロギ *period* 遺伝子の機能解析、第 79 回日本動物学会大会、福岡市、9 月 6 日
- ④ Tomioka K (2009) Dissection of the cricket circadian system with molecular tools. International Symposium on Biological Rhythm, Joint Symposium on Photonic Bioimaging. Sapporo, Japan, August, 1-4.
- ⑤ Moriyama Y, Sakamoto T, Tomioka K (2009) Functional analysis of the clock gene *period* and *Clock* with RNA interference in the cricket *Gryllus bimaculatus*. International Symposium on Biological Rhythm, Joint Symposium on Photonic Bioimaging. Sapporo, Japan, August, 1-4.

[図書] (計 8 件)

- ① 富岡憲治 (2008) 虫の脳に組み込まれた時計の謎、山口恒夫監修、昆虫はスーパー脳、技術評論社、pp. 159-184.
- ② 富岡憲治 (2009) 昆虫の体内時計、動物の多様な生き方 1 見える光、見えない光、動物と光のかかわり、寺北明久、蟻川謙太郎編、共立出版、pp. 174-192.
- ③ 富岡憲治 (2009) 昆虫の時計遺伝子と光周性、光周性の分子生物学、海老原史樹文、井澤毅編、シュプリンガー・ジャパン、pp. 112-119

[その他]