

機関番号：15301
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

研究成果の概要（和文）：

不完全変態昆虫であるコロオギおよびシミの概日時計発振の仕組みを分子レベルで解析し、ハエなど完全変態昆虫と同様に遺伝子の周期的発現がリズムの発振にかかわるが、時計遺伝子 *cycle*、*timeless* などの役割の解析から、その振動機構は完全変態昆虫よりも脊椎動物に類似することが示唆された。一方、概日時計が光周測時機構に不可欠であること、また、光周受容にはオプシン系が関わることも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Oscillatory mechanisms of circadian clocks in hemimetabolous insects are studied at a molecular level. The results show that the oscillatory mechanism is based on cyclic expression of so-called clock genes but resembles those of vertebrates rather than those of holometabolous insects in terms of the role of *cycle* and *timeless* genes. For the photoperiodic time-measurement, it is revealed that the circadian clock is indispensable and the opsins are the most likely photoperiodic receptors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
総計	10,300,000	3,090,000	13,390,000

研究分野：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. 研究開始当初の背景

概日リズムは動物の行動をはじめとする各種生理機能を制御する基本的な生理機構である。このリズムは動物自身もつ体内時計によって制御されている。体内時計の振動機構はキイロショウジョウバエをモデルとして分子レベルで研究が展開され、その基本は *period (per)*, *timeless (tim)*, *Clock (Clk)*, *cycle* などのいわゆる時計遺伝子のフィードバック制御による周期的な発現にあると考えられている (Stanewsky, 2002; Hardin, 2004; Tomioka and Yoshii, 2006)。すなわち、転写因子 CLOCK(CLK)と CYCLE(CYC)のヘテロダイマーにより、昼の後半から夜の前半にかけて時計遺伝子 *per* と *tim* の転写が活発に行われ、その翻訳産物 PER と TIM は夜間に細胞質に蓄積する。PER と TIM はヘテロダイマーを作り、夜の後半には核に入り、CLK/CYC に抑制的に作用し、自身の転写を抑制する。これにより *per*; *tim* の mRNA が減少により PER, TIM 蛋白質も減少すると、CLK/CYC への抑制が解け、再び *per*; *tim* の転写が活性化することで次のサイクルへ入ることになる。

この時計発振機構の仮説は、現在では脊椎動物でも広く受け入れられている (Stanewsky, 2003)。ところが、意外なことにキイロショウジョウバエ以外の昆虫では、この仮説を支持する結果がほとんど得られていない (Zavodska et al., 2005)。例えば、ヤママユガの脳の時計ニューロンでは PER は日周変動するが、核へは移行しない (Sauman and Reppert, 1996)。従って、PER が核へ入って転写を抑制するという仮説は成り立たない。その代わりに、*per* の antisense が mRNA と同時に発現し、これがリズム発振に関わると説明されている。同様にイエバエでも PER の核移行は確認されていない。甲虫やタバコスズメガ、ゴキブリでは、PER 量が日周変動すらしめない (Frisch et al., 1996; Takeda et al., 2000; Wise et al., 2002)。このように、脊椎動物でも受け入れられているショウジョウバエの時計振動の分子機構の仮説が、他の昆虫では必ずしも支持されていない。

申請者らはこれまでに、キイロショウジョウバエ時計機構の分子生物学的研究を進めるとともに、フタホシコオロギの時計の神経・分子生理学的な研究を展開してきた。コオロギでは、時計の所在を視葉内の外キアズマの細胞に絞り込むとともに (Tomioka and Abdelsalam, 2004)、コオロギ時計遺伝子、*per*; *tim*, *doubletime* などのクローニングに成功し (Sakamoto et al., 2005)、さらに、*per* の dsRNA を用いた RNA 干渉法により時計を停止させる手法を開発した (Moriyama et al., 2006)。また、Real-time PCR による

mRNA の定量法も確立し、幼虫頭部で *per* が周期的に発現すること (Moriyama et al., 2006)、コオロギの体内の多くの組織で *per* が発現するが、その日周リズムは視葉時計に依存するらしいことも明らかにした。このような状況の下で、ともに不完全変態で直翅目昆虫のコオロギと、最も原始的とされる無翅目昆虫シミの時計の分子機構を解明することにより、昆虫の時計振動機構の一般性と多様性を明らかにすることを立案した。一方、時計の機能として、行動のリズムを制御する以外に、日長の測時に関与する可能性が指摘されている。申請者は幼虫発育に明瞭な光周性を示すタンボコオロギを用いて時計遺伝子をクローニングし、RNA 干渉法により時計を停止させることに成功しており、この手法により光周測時機構へ概日時計がどのように関与するのかをも合わせて検討する研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

このような背景の下に、本研究では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、②RNA 干渉を利用した振動機構、および③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した。

3. 研究の方法

(1)実験動物

概日時計機構の解析には、フタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*) とマダラシミ (*Thermobia domestica*) を、光周側時計機構の解析にはタンボコオロギ (*Modicogryllus siamensis*) を用いた。

(2)時計遺伝子 cDNA のクローニング

時計遺伝子 cDNA のクローニングには、既知の遺伝子情報に基づき設計した縮重プライマーを用いた PCR 法を採用した。得られた断片から、さらに 3'RACE、5'RACE 法により全長 cDNA を得た。得られた cDNA を用いて Blast 検索を行い、既知の遺伝子とのホモロジー検索を行い、遺伝子の分子構造や分子系統関係を解析した。

(3)mRNA の定量

組織から抽出した RNA から逆転写して得られた DNA をテンプレートとして、目的遺

伝子のプライマーを用いた定量的リアルタイム PCR (qPCR) を行い、mRNA の定量を行った。

(4)RNA 干渉による遺伝子のノックダウン

目的遺伝子の cDNA の 600~800bp 程度の適当な領域を選んで 2 本鎖 RNA を *in vitro* で合成した。合成した 2 本鎖 RNA は 10 μ M の濃度に調整し、微量インジェクターでコオロギあるいはシミの腹部に必要量 (70~750nl) 投与した。その後、数日間を経た個体から組織を取り出し、そこから抽出した RNA を用いて qPCR で目的遺伝子を定量し、ノックダウンを確認した。

(5)行動リズムの解析

コオロギの場合にはシーソー型のアクトグラフを、シミの場合には光電式のアクトグラフを用いて、活動を検出した。検出された活動は、電気シグナルとしてコンピューターに 6 分間隔で積算値が記録された。記録データは通常のダブルプロットアクトグラムとして視覚化するとともに、ピリオドグラムによる周期性の検定を行い、リズムの有無を統計的に解析した。

(6)タンボコオロギ幼虫発育の解析

タンボコオロギ幼虫発育の過程は、孵化後の各幼虫脱皮日、および成虫脱皮日を確認することで解析した。

4. 研究成果

(1)コオロギの概日時計振動機構

①時計遺伝子 cDNA 取得と構造解析

フタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*) を用いて時計遺伝子 *period* (*per*), *timeless* (*tim*), *Clock* (*Clk*), *cycle* (*cyc*), *cryptochrome 2* (*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た。クローニングには縮重プライマーを用いた nested PCR を採用した。取得した cDNA については Blast 検索により既知の昆虫との相同性を検討したが、いずれの遺伝子もゴキブリとの相同性が高いことがわかった。

②時計遺伝子 mRNA の発現解析

qPCR により各時計遺伝子 mRNA の日周発現量を調べた。その結果、*per*, *tim*, *cyc*, *cry2* の mRNA 量が日周期的に発現することが明らかになった。ピークの位相は、*per*, *tim*, および *cry2* が夜の前半にあるのに対して、*cyc* は昼の後半にピークを示した。一方、シヨウジョウバエでリズムを示す *Clk* には明瞭な発現リズムは見られなかった。

③RNA 干渉の行動リズムへの影響

per, *Clk* の RNAi では mRNA の発現抑制が投与後長期にわたり活動リズムが消失することが明らかとなった。一方、*tim* RNAi ではリズムの自由継続周期がやや短縮したが、リズムは継続した。*cyc*, *cry2* の RNAi でも活動リズムはやや不明瞭になるものの、リズムが依然として弱いながら継続する個体が多かった。

④RNA 干渉の遺伝子発現への影響

per, *tim*, *Clk*, *cyc*, *cry2* いずれの RNAi でもそれらの mRNA は有意に減少し、その発現リズムも消失した。他の遺伝子発現への影響を検討したところ、*per* RNAi では *cry2* が増加したが、*Clk*, *tim* は低下した。*Clk* RNAi ではいずれの遺伝子も発現が低下した。*cyc* でも同様の結果が得られた。*tim* RNAi では、*per*, *Clk* は無周期となったが、*cry2* は正常個体とほぼ同様にリズムを維持することが分かった。

⑤pdf 遺伝子の時計機構への関与

PDF は時計機構の出力分子と考えられている。*pdf* 遺伝子の RNAi では、夜行性の成分が低下し、リズムが不明瞭となること、恒暗下での周期が短縮すること、明暗への同調が速やかになることなどが明らかになった。さらに、*pdf* RNAi 個体で時計遺伝子 *per*, *tim* の発現リズムを解析したところ、振幅が低下し、位相がやや前進することがわかった。これらの結果から、PDF は時計の発振機構にも影響することが示唆された。

⑥末梢時計の振動機構

時計遺伝子の発現リズムを指標として、前胃、中腸、マルピーギ管、精巣、脳などの視葉外組織での時計機構を解析した。精巣とマルピーギ管を除き、前胃、中腸、脳、腹部最終神経節で *per*, *tim*, *cry2* 発現にリズムがあることがわかった。視葉時計を切除した場合にも、脳はこれらの遺伝子発現リズムを維持したが、正常個体に比べ 4 時間位相が前進した。一方、中腸では *per*, *cry2* のリズムは維持したが、*tim* のリズムは消失した。これらの結果から、末梢時計の視葉時計への依存度が組織により異なること、発振の分子機構も末梢と中枢とで異なることなどが示唆された。

(2)シミの時計機構

①時計遺伝子 cDNA 取得と構造解析

コオロギと同様に縮重プライマーを用いた PCR により、マダラシミ (*Thermobia domestica*) *tim*, *Clk* および *cycle* (*cyc*) の cDNA を取得した。*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。

② mRNA の発現解析

tim, *Clk*, *cyc* の発現を qPCR により解析した。*tim*, *cyc* には明瞭なリズムが見られ、それぞれ主観的夜の前半および主観的昼の後半にピークを示すことが分かった。一方、*Clk* の発現は一日を通してほぼ一定で明瞭な発現リズムは見られなかった。

③ 時計遺伝子 RNAi の行動リズムへの影響

tim, *Clk*, *cyc* の 2 本鎖 RNA を投与し、その効果を検討した。いずれの場合にも、恒暗条件下で活動リズムは無周期となった。この効果は、コオロギと同様に長期にわたり継続した。一方、*per* RNAi ではリズムは恒暗移行後しばらく維持され、徐々に無周期になることがわかった。

④ 時計遺伝子 RNAi の遺伝子発現への影響

tim, *Clk*, *cyc* RNAi 個体で各遺伝子の mRNA を定量したところ、いずれも有意に低下し、発現リズムも消失していることがわかった。これらの RNAi の他の時計遺伝子への影響を検討したところ、*Clk* RNAi では *cyc* mRNA が増加し、*tim* mRNA が減少すること、*cyc* RNAi では *tim* は減少するが *Clk* mRNA にはほとんど影響しないこと、*tim* RNAi では *cyc* mRNA が減少するが *Clk* 発現レベルは変わらないことなどがわかった。

(3) 不完全変態昆虫時計機構

シミとコオロギでの本研究で得られて結果を総合すると、不完全変態昆虫の時計機構はショウジョウバエとは大きく異なることが示唆される。第 1 に、ハエでは *Clk* が振動し *cyc* が一定レベル発現するが、シミやコオロギでは逆に *cyc* が振動し *Clk* が一定の発現を示す。さらに、*tim* または *per* が必ずしも必須ではなく、哺乳衣類型のクリプトクロム *cry2* が重要な役割を担うことが推測された。これらの点で、不完全変態昆虫の時計機構は、完全変態昆虫よりもむしろ脊椎動物に類似していると考えられる。

(4) タンボコオロギ光周時計機構

① 時計機構の関与

タンボコオロギ (*Modicogryllus siamensis*) を用いて *per*, *tim* 遺伝子の cDNA をクローニングにより取得した。これらの遺伝子の発現リズムは光周期に依存しており、発現量と発現ピークが日長により異なっていた。続いて RNAi により、時計機構の光周期性における役割を検討した。*per* の RNAi では parental RNAi でも時計が停止することが示された。さらに、幼虫発育の光周反応も

完全に阻害され、日長に関わらず恒暗条件下での発育と類似した結果が得られた。サンゴ由来の遺伝子 *DsRed2* の 2 本鎖 RNA を投与した対照群では、正常個体と同様の発育パターンを示した。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。

② 光受容分子の探索

縮重プライマーを用いた nested PCR により *Opsin-UV (op-UV)*, *opsin-Blue (op-B)*, *opsin-Longwave (op-LW)* の cDNA を取得した。これらのオプシン遺伝子 RNAi の光周反応への影響を解析した。この場合も、雌成虫へオプシン 2 本鎖 RNA を投与し、処理雌が産下した卵から孵化した幼虫を実験に用いた。長日および短日の各条件下で幼虫発育を観察した。長日では 20~30% の個体で、脱皮回数の増加と発育の遅延が見られ、光周反応が部分的ではあるが阻害された。短日でもやや成長が促進される個体が現れた。これらの結果は、光周受容系には複眼オプシンが関係することが示唆された。

一方、ショウジョウバエで時計の同調に関わることが知られているクリプトクロム (*cry1*) 遺伝子の RNAi では、光周反応の阻害効果は現れなかった。

これらの結果から、コオロギ光周反応には複眼による光受容機構が関係し、クリプトクロムは関与しないことを示唆された。

5. 主な発表論文等

(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 22 件)

① Hassaneen E., Sallam A. E.-D., Abo-Ghalia A., Moriyama Y., Tomioka K. (2011) Pigment-dispersing factor affects circadian molecular oscillations in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Entomological Science* (in press)

② Hassaneen E., Sallam AE, Abo-Ghalia A, Moriyama Y, Karpova SG, Abdelsalam S, Matsushima A, Shimohigashi Y, Tomioka K (2011) Pigment-dispersing factor affects nocturnal activity rhythms, photic entrainment and the free-running period of the circadian clock in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Biological Rhythms* 26:3–13.

③ Ito C, Goto SG, Tomioka K, Numata H (2011) Temperature entrainment of the circadian cuticle deposition rhythm in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Rhythms* 26:3-13.

④ Tomioka K, Matsumoto A (2010) A comparative view of insect circadian clock systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67: 1397-1406

- ⑤ Uryu O, Tomioka K (2010) Circadian oscillations outside the optic lobe in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Insect Physiology* 56:1284-1290.
- ⑥ Kamae Y, Tanaka F, Tomioka K (2010) Molecular cloning and functional analysis of the clock genes, *Clock* and *cycle*, in the firebrat *Thermobia domestica*. *Journal of Insect Physiology* 56: 1291-1299.
- ⑦ Danbara Y, Sakamoto T, Uryu O, Tomioka K (2010) RNA interference of *timeless* gene does not disrupt circadian locomotor rhythms in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Insect Physiology* 56: 1738-1745.
- ⑧ 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.
- ⑨ 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.
- ⑩ 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.

〔学会発表〕 (計 44 件)

- ① 藪内まゆ子、高尾 智、富岡憲治 (2010) フタホシコオロギ雌活動リズムの交尾による変調機構、第 17 回日本時間生物学会学術大会、東京都、2010 年 11 月 21 日
- ② 鎌江優一、富岡憲治 (2010) マダラシミ時計遺伝子の cDNA クローニングと RNA 干渉による機能解析、第 17 回日本時間生物学会学術大会、東京都、2010 年 11 月 21 日
- ③ ハサニーン・イーハブ、守山禎之、富岡憲治 (2010) フタホシコオロギ活動リズム制御における PDF の役割、日本動物学会第 81 回大会、東京都、2010 年 9 月 23 日
- ④ 瓜生央大、富岡憲治 (2010) フタホシコオロギ視葉外組織における時計遺伝子発現リズムの後胚発生、日本動物学会第 81 回大会、東京都、2010 年 9 月 23 日
- ⑤ Tomioka K. (2010) How does the morning oscillator track dawn and the evening oscillator dusk? Lorentz Center Workshop, Leiden, Netherland, August 16-20.
- ⑥ Tomioka K. (2010) Is the *Drosophila*'s clock a general model for insects? Lorentz Center Workshop, Leiden, Netherland, August 16-20.
- ⑦ 守山禎之・富岡憲治(2010)コオロギ概日時計の光リセット機構の解析、日本比較生理生化学会第 32 回大会、福岡市、平成 22 年 7 月

17 日

- ⑧ 竹本早希・瓜生央大・富岡憲治(2010)タンポコオロギ幼虫発育の光周反応における光周受容系の解析、日本比較生理生化学会第 32 回大会、福岡市、平成 22 年 7 月 19 日
- ⑨ 高尾智・富岡憲治(2010) 交尾に伴う雌コオロギ活動リズムの変調機構、日本動物学会中
- ⑩ 鎌江優一・富岡憲治(2010)マダラシミ時計遺伝子 *cycle* の cDNA クローニングと機能解析、日本動物学会中国四国支部大会、山口市、平成 22 年 5 月 16 日
- 国四国支部大会、山口市、平成 22 年 5 月 16 日
- ⑪ 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.
- ⑫ 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.
- ⑬ 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
- ⑭ 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.
- ⑮ 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

〔図書〕 (計 8 件)

- ① 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.
- ② 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
- ③ 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.
- ④ 富岡憲治(2008) 概日時計の神経機構、昆虫ミメティクス エヌ・ティー・エス pp. 438-444.
- ⑤ 富岡憲治 (2007) 概日リズムの生理 七田芳則、深田吉孝編、21 世紀の動物科学第 9 巻 動物の感覚とリズム、pp. 102-125

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biol.okayama-u.ac.jp/tomioka1/top.html>

6. 研究組織

(1) 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