

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657007

研究課題名(和文)ハシリシヨウジョウバエを用いた光周性の新規な順遺伝学モデルの構築

研究課題名(英文)Establishing *Chymomyza costata* as a new genetic model system to study photoperiodism

研究代表者

近藤 周 (Kondo, Shu)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

研究者番号：90408401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：光周性とは、生物が一日あたりの日照時間を測定し、その長さに応じて生理的な反応を引き起こすメカニズムである。動物の光周性は、遺伝子操作が可能なモデル動物が存在しないため、分子レベルでの理解が進んでいない。本研究ではまず、ハシリシヨウジョウバエ(*Chymomyza costata*)をモデル動物として確立することを試みた。しかしながら同種は大量飼育と採卵が困難であったため、他のシヨウジョウバエ種も検討した。その中で、*D. putrida*の季節性体色変化が光周性を示すことを発見した。また、飼育の容易さでは*D. bifasciata*がもっとも優れており、同種が遺伝学モデルとして最適であると結論された。

研究成果の概要(英文)：Photoperiodism is a mechanism by which living organisms perceive long or short day lengths and differentially respond to each condition. Although photoperiodism is common in species living in areas where there are four seasons, little has been studied on its molecular mechanisms. Here we tried to establish *Chymomyza costata* as a new genetically tractable model system to study photoperiodisms. Although I could successfully culture *C. costata* in the laboratory, pair-mating and mass egg collection were found to be difficult, making *C. costata* an unideal species for genetic manipulation. Therefore, I turned to other *Drosophila* species. After comparing several different species, I found that reproductive diapause of *D. bifasciata* is the most ideal system to study photoperiodism. In addition, I found that seasonal color variation in *D. putrida* is under the photoperiodic control.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 遺伝・ゲノム胴体

キーワード：モデル生物

1. 研究開始当初の背景

光周性とは、生物が一日あたりの日照時間を測定し、その長さに応じて生理的な反応を引き起こすメカニズムである。光周性を利用した季節性行動には、繁殖時期の制御や冬眠などがあり、高緯度地域に生息する生物には普遍的に観察される。人類においても、冬季に抑うつ状態になる「季節性情動障害」は光周性により引き起こされると考えている。このように、光周性は極めて重要な生命現象であるにもかかわらず、動物においてはその分子メカニズムが全く解明されていない。その原因の一つは、これまで光周性の分子レベルでの解析に適したモデル生物が存在しなかったことにある。例えば、マウス、線虫、キイロショウジョウバエは、明確な光周性を示さない。従って、分子遺伝学実験が可能なモデル生物を新たに立ち上げることで、光周性研究は大きな飛躍を遂げることが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝学実験が可能な光周性のモデル生物を確立し、順遺伝学的スクリーンにより日長測定に関わる遺伝子を網羅的に同定することで、光周性システムの全貌を一挙に解明することである。

研究計画では、光周性の順遺伝学的解析に最適と考えられる「ハシリショウジョウバエ」を新規遺伝学モデル生物として確立し、突然変異体のスクリーニングを行うことを提案する。

3. 研究の方法

Chymomyza costata は北海道大学の島田公夫博士より入手した。*Drosophila putrida* はUCSD Stock Center より入手した。*D. triauraria* は京都工芸繊維大学の山田博万博士より入手した。*Drosophila bifasciata* は2012年夏にフィンランドにて採集した。

光周性実験には、紙製のフタ付き小型ボックス内にLEDテープを配置し、LEDのオン・オフはタイマーで制御した。

ENUを用いた変異原処理は、三齢幼虫の時に、餌の中にENU溶液(3mM)500ulを滴下し、幼虫にENUを食べさせる方法で行った。

4. 研究成果

Chymomyza costata (マエグロハシリショウジョウバエ)は、冬季は幼虫の状態越冬する。秋に生まれた個体は幼虫の段階で発生が停止し、これを幼虫休眠と呼ぶ。まず、*C. costata*の飼育条件を検討した。通常のショウジョウバエ培地での飼育は困難であったが、麦芽を培地に添加することにより、比較的容易に飼育できることがわかった。世代時間は25°Cにおいて25日程度であった。18°Cでの飼育条件においては明確な光周性を示し、明期が14時間以下の条件で幼虫が休眠した。

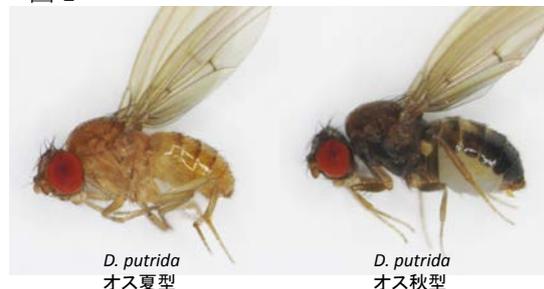
光周性の制御には概日時計の関与が示唆されている。*C. costata*の概日時計に関わる神経回路を明らかにするため、幼虫脳をキイロショウジョウバエの概日時計タンパクに対する抗体で染色した。Timeless, Clock, Period及び神経ペプチドPdfに対する抗体染色を行ったところ、Pdfに関して良好な染色結果が得られた。Pdf抗体の*Chymomyza*幼虫脳における染色は、キイロショウジョウバエと見分けがつかないほど似ており、幼虫脳において概日時計を制御する神経回路はキイロショウジョウバエと*C. costata*の間で同種性が高い可能性が示唆された。

突然変異体スクリーニングを行うためには、オス1匹×メス1匹のペアメイティングが必要である。しかしながら、我々の飼育条件では、効率よくペアメイティングを成功させることが困難であった。

また、トランスジェニック動物作成には、産卵直後の受精卵が必要になるが、同種は産卵数が少なく、大量に採卵するための方法を確立することができなかった。

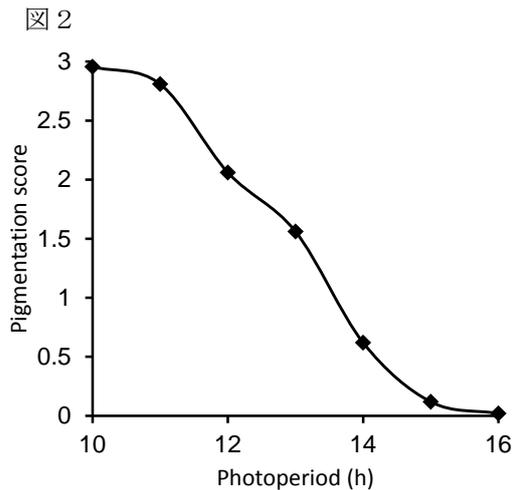
これらのことから、*C. costata*は極めて明確な光周性を示すものの、「遺伝学モデル」としては最適な種とは言えない結論に至った。そこで、明確な光周性を示すと同時により飼育が容易な他のショウジョウバエ種を探索することにした。

図1



Drosophila putrida (クモマショウジョウバエの一種)は候補の一つである。*D. putrida*は日の長い初夏に生まれた個体と、日の短い秋に生まれた個体で体色が異なる(図1)。体色の变化は肉眼で容易に識別できる表現型であることから、もしもこの現象が光周性を示せば、非常に有用なモデルになると考えた。

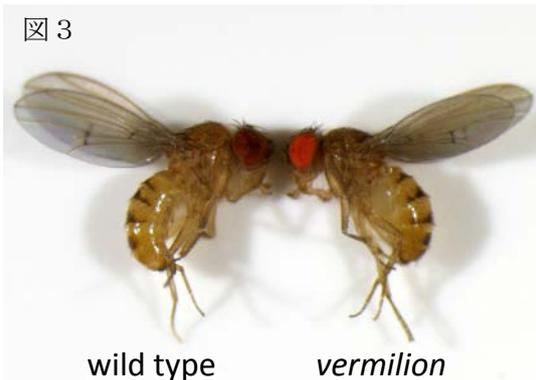
*D. putrida*の体色変化が光周性によって制御されているかを調べるため、温度条件は18°Cに固定し、明期を変化させることで、日照時間の体色への影響を観察した。その結果、長日条件で体色が黄色く、短日条件では体色が黒色になる事がわかり、体色変化が光周性制御を受ける可能性が強く示唆された(図2)。また、短日条件の個体では体内に顕著な脂肪の蓄積が蓄積された。*D. putrida*は冬季は成虫で越冬する。脂肪の蓄積は越冬に備えてエネルギーを蓄えるためだと考えられる。



光周性の関与についてさらなる証拠を得るため、光中断実験、Nanda-Hammer 実験を行ったところ、両方の実験において、光周性の関与を支持する結果が得られた。

D. putrida はペアメイティングが可能であることから、突然変異誘導を試みた。まずは、キイロショウジョウバエの突然変異誘導で一般的に使われるメタンスルホン酸エチル (EMS) を親バエに食べさせる方法を試みた。しかしながら、*D. putrida* は EMS の味に拒否反応を示すらしく、効率よく EMS を体内に導入することができなかった。そこで、餌に変異原を混ぜ込み、幼虫に食べさせる方法を試した。EMS は精細胞を標的とするので幼虫給餌法には適さない。本研究の幼虫給餌法では、変異原としてエチルニトロソウレア (ENU) を試した。

パイロット実験として、性染色体に連鎖した形質のスクリーニングを行った。ENU 処理した幼虫を成虫まで育て、その内のメス個体を野生型オス個体に交配し、次世代で可視表現型を示す変異体をスクリーニングした。約 2000 の F1 個体をスクリーニングした結果、white (白眼)、yellow (黄体色)、vermilion (朱眼) などの変異体が得られた (図 3)。ENU は、これまでショウジョウバエの突然変異誘導において一般的に用いられることはなかったが、本研究によって、非常に簡便で効率が良いことが示された。この手法は、EMS の給餌が困難なショウジョウバエ種での突然変異誘導に有用な方法であろう。



パイロット・スクリーンは短日条件下で行ったが、光周性に異常を示す変異体 (体色が黒くならない変異体) は得られなかった。

D. putrida の光周性は明確で、突然変異誘導も簡便にできることから、光周性の遺伝学モデルとして適していると考えられた。しかしながら、*D. putrida* の遺伝子配列を調べているうちに、一つの問題が明らかになった。それは、染色体逆位の存在である。哺乳類と異なり、ショウジョウバエ種では、ヘテロ染色体逆位が頻繁に存在することが知られている。*D. putrida* の遺伝子をクローニングすると、3 割程度の遺伝子について、非常に多型に富んだ (1/100bp 以上の SNP 頻度) 2つのアレルが得られた。そして、それらはヘテロの状態ですべて完全に固定されていた。このことは、*D. putrida* ゲノムに劣勢致死変異を内部に持つ染色体逆位が複数存在し、逆位がヘテロの状態ですべて安定的に保持されていることを示唆していた。固定された逆位の存在は、遺伝学解析を極めて困難とするため、少なくとも本研究で使用した *D. putrida* 系統は遺伝学モデルとしては使えないと結論せざるを得ない。従って、*D. putrida* をモデル生物として立ち上げるには、新たに野外から採集し、ヘテロ逆位のない系統を樹立する必要がある。

次に、*Drosophila bifasciata* (フタスジショウジョウバエ) 及び *Drosophila triauraria* (ノハラカオジロショウジョウバエ) の 2 種のショウジョウバエのモデル生物としての適性を調べた。両種とも成虫で越冬し、冬季は卵巣の発達が停止する「卵巣休眠」が起こる。この卵巣休眠は光周性を示すことが過去の文献で示されている。

D. triauraria は光周性休眠に関する先行研究が豊富であるが、飼育がやや困難であった。これに対し、*D. bifasciata* は、キイロショウジョウバエ並に容易に飼育できることがわかった。過去の研究では、北海道産の *D. bifasciata* の光周性が調べられていたが、その表現型 (短日条件下での休眠率) はやや弱かった。本研究では、より寒冷地のフィンランドで採集した *D. bifasciata* 系統を用いた。この系統は、極めて明確な光周性休眠を示した。

D. bifasciata は染色体逆位が多く、フィンランドで採集した個体群も逆位多型に富んでいた。幸いなことに、逆位領域内に劣勢致死遺伝子を持たないものが存在することが確かめられた。現在、ヘテロ逆位を持たない近交系を樹立しているところである。

D. bifasciata の近交系が樹立されれば、それが光周性の遺伝学モデルとして最適な実験材料になるであろう。近交系が樹立され次第、トランスジェニックの作成や突然変異体スクリーニングなどの遺伝学実験を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

(1) Kondo S, Ueda R. Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics*. 2013 Nov;195(3):715-21. (査読あり)

〔学会発表〕(計2件)

(1) Shu Kondo, Ryu Ueda, Expanding applications of CRISPR/Cas9 technology. 55th Annual *Drosophila* Research Conference.

2014年3月26日～2014年3月30日

サンディエゴ(米国)

(2) Shu Kondo, Ryu Ueda

Seasonal body color polyphenisms in *Drosophila putrida* is under photoperiodic control.

23rd European *Drosophila* Research Conference.

2013年10月16日～2013年10月19日

バルセロナ(スペイン)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 周 (Kondo, Shu)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

研究者番号: 90408401

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし