

平成30年 5月18日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04400

研究課題名(和文) 不完全変態昆虫概日時計の分子振動機構

研究課題名(英文) Molecular oscillatory mechanism of the circadian clock in a hemimetabolous insect

研究代表者

富岡 憲治 (TOMIOKA, Kenji)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：30136163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：概日時計は、行動をはじめとする動物の各種生理機能に昼夜に調和した時間的秩序を作り出す内生的な自律振動機構である。本研究では、不完全変態昆虫の一種であるコオロギを用いて、時計の発振機構を分子レベルで解析した。その結果、不完全変態昆虫の概日時計が従来知られていた時計遺伝子 *period/timeless* 振動系と *cycle* 振動系に加えて、*cry1/cry2* 振動系を含む複合振動体系を構成すること、またこれらの振動系は2つの調整因子、*clockwork orange* と *timeless2* により微調整されており、ハエに代表される完全変態昆虫の時計機構に比べ、より複雑であることなどが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The circadian clock is an endogenous oscillatory mechanism with a period of approximately 24 hours and temporally regulates various physiological functions in animals. In the present study, the molecular oscillatory mechanism of the clock was investigated in a hemimetabolous insect, the cricket, *Gryllus bimaculatus*. Results showed that the clock consists of multiple oscillatory loops regulating rhythmic expression of so-called clock genes with key transcriptional factors, *Clock* and *cycle*. The first loop regulates rhythmic expression of *period* and *timeless*. In addition, *cycle* seemed to be regulated by *HR3* and *E75*, and *cry2* forms a loop with various combination of its transcriptional variants and *cry1*. These oscillatory loops are modulated by two factors, *clockwork orange* and *timeless2*. Thus, the circadian clock of hemimetabolous insects seems more complex than that of holometabolous insects such as fruit flies.

研究分野：時間生物学

キーワード：昆虫 概日時計 時計遺伝子 分子振動機構 フィードバックループ 概日リズム

1. 研究開始当初の背景

概日時計は動物の生理機能を昼夜のサイクルに調和させ、動物体内の時間的秩序の構築に必須の役割を担う。概日時計は、環境サイクルに同調して行動や視覚感度をはじめとする各種生理機能に 24 時間のリズムを作るのみならず、日長に適応した活動時間帯の伸縮、光周反応を制御する日長の読み取り、時刻記憶・学習など、様々な生理機能に深く関与している(海老原他、2012)。しかし、これらの生理機能を分子レベルで理解するためには、背後にある概日時計機構の分子レベルでの解明が必須条件である。コオロギは、これらの諸現象を明瞭に示すこと、最近の分子生物学的解析手法が適用できることから、概日時計機構の解明とその生理機能の解析に最も適した昆虫の一つである。

昆虫の概日時計の分子振動機構は世界的に見て、キイロショウジョウバエで最も詳細に解明が進んでいる。ハエの概日時計の振動機構は基本的には、*period(per)*、*timeless(tim)*の周期的発現が根幹を成す(Tomioka and Matsumoto, 2010)。これらの遺伝子は、転写因子 CLOCK(CLK)と CYCLE(CYC)のヘテロ二量体によりその転写が明期の終わりから夜の始めにかけて活性化される。産物タンパク質は夜間に増加し、複合体を形成して核に入り、CLK-CYC に抑制をかけることで約 24 時間の振動が生ずると考えられている。また、転写因子 CYC は定常的に発現しているが CLK が明期に増加する。これには CLK/CYC により転写が活性化する *vriille* と *Pdp1* が関与している。これに加えて、*clockwork orange(cwo)*が日周期的に発現し、*per*、*tim*の振幅を制御する系がある。ハエではこれら 3 つのループが結合し、安定な 24 時間の振動を作り出すと考えられている。このハエの時計仮説は、あたかも昆虫の時計を代表するかのよう信じているが、実際には多くのそれとは異なる事実が報告され

ている。

申請者はコオロギを用いて時計分子機構の解明を進め、その時計機構がハエ型の *per/tim* の振動系に加えて、*m-cryptochrome(cry2)* がリズム形成に関与すること、ハエと異なり *cycle(cyc)*が周期発現することなどを明らかにしており、全容の解明まであと一歩に迫っている。

2. 研究の目的

本研究ではコオロギを用いて、*cry2*の周期発現機構とその機能の解明、*Clock(Clk)*及び *cyc* の周期発現機構の解明、*cwo* の機能の解明により、世界に先駆けて不完全変態昆虫概日時計の分子振動機構の全容を解明し、光・温度周期への同調や光周測時機構など、概日時計が関与する諸機能の分子レベルでの研究のための礎を築くことを目的とする。

3. 研究の方法

フタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*) を用いて、*cry2*、*cyc*、*Clk*の周期的発現機構とその時計機構における機能及び *cwo*の時計機構における機能を以下の手順で解析する。

*cry2*と *cwo*については RNAi による発現抑制の影響を、行動レベルおよび分子レベルで解析し、その時計機構における機能を明らかにする。*cyc*および *Clk*の発現制御機構については、関与が想定されるそれぞれ *E75* と *HR3*、及び *vriille*と *Pdp1*の機能を RNAi により解析する。一方、*cry2*の周期発現に関与する因子と、*cyc*RNAi により誘導される *Clk*の周期発現に関与する因子については未同定であり、候補遺伝子の RNAi 等により、それらの同定と機能を解析する。

4. 研究成果

(1) *cry2*の機能と周期発現制御系:

まずクローニングにより *cry2* 遺伝子の全長 cDNA を取得した。発現解析の結果、少な

くとも6種のスプライシングバリエーションがあること、最も長いものの構造は八エと類似していること、いずれも夜間にピークとなる mRNA の周期的発現を示すことが明かとなった。2本鎖 RNA を用いた RNA 干渉を行った個体では、活動リズムは継続するが、周期がやや長くなる傾向を示した。これらのスプライシングバリエーションと *cry1* を様々な組み合わせで八エ培養細胞に導入し、E-box を介する遺伝子発現への影響を検討した。その結果、*cry2* は *cry1* あるいはバリエーションと複合体を形成し、E-box を経由して遺伝子発現を抑制することが明かとなった。実際に、*cry1*、*cry2* の RNAi による発現抑制を行うと、E-box 制御下にある *period* (*per*) の発現リズムが消失することが明かとなった。一方、同じ E-box 制御下にある *timeless* (*tim*) の発現リズムはほとんど影響されないことから、*tim* は *per* とは異なる制御を受ける可能性が示唆された。一方、*cry2* mRNA レベルは *per* RNAi で増加し、*Clk* RNAi で減少することから、その転写調節に CLK/CYC が関ることが示唆された。

cry2 と *cry1* との2重 RNAi により光同調が阻害されることから、これらが光依存性位相制御に重要な役割を担うことが明かとなった。この上流に位置する因子として、*c-fos* が判明した。*c-fos* RNAi で光による位相変位が阻害されるが *cry1*、*cry2* の mRNA レベルは変化しなかったため、*cry1*、*cry2* の翻訳後制御が位相制御に関与する可能性が示唆された。

(2) *cyc* の周期発現機構：

cyc の発現制御に関わる可能性のある遺伝子 *HR3* と *E75* の cDNA のクローニングを行い、*HR3* についてはほぼ全長 cDNA を、*E75* については部分配列を取得した。*HR3* と *E75* の RNAi 処理個体は、いずれも無処理個体と同様に夜行性リズムを示したが、*E75* RNAi ではやや周期が短縮する傾向があった。*HR3* RNAi では、*cyc* 発現量が夜間にやや増加し、*tim* の発現

ピークがやや後退すること、また、*E75* RNAi では、*cyc* に加えて *Clk* の発現にリズムが生ずることを明かにした。

(3) *Clk* の発現制御系

Clk の発現制御系に関する *vri* と *Pdp1* の cDNA を取得してその構造解析を行い、いずれも bZIP 領域を持つ転写制御因子であること、また mRNA がそれぞれ ZT10、ZT18 にピークを持つ日周発現パターンを示すことを明らかにした。*vri* と *Pdp1* の RNAi による解析を進め、*vri* RNAi では、活動リズムの周期が短縮すること、*Clk* や *cyc* の mRNA 発現リズムに変化が生じ、*tim* の発現ピークが前進することを明らかにした。*Pdp1* RNAi では、歩行活動リズムに目立った変化は観察されなかったが、*per*、*tim* の発現リズムの位相が前進することを明らかにした。

(4) *cwo* の機能解析

まず RNA-seq の配列情報から *cwo* の部分配列を取得した。構造解析から *cwo* は bHLH ドメインと Orange Hairly ドメインを持つ転写因子をコードすることが推定された。*cwo* mRNA の発現は暗期前半ピークを持つ日周リズムを示すことが明かとなった。RNAi により発現を抑制した場合、歩行活動リズムが約30%の個体で無周期となり、残りの個体も長周期を示すことが明かとなった。また、*cwo* RNAi により *tim* の発現レベルはほとんど影響を受けないが位相がやや後退すること、*per*、*Clk*、*cyc* は発現レベルが低下し、その発現も無周期となることが明かとなった。これらの結果から、*cwo* が *per*、*Clk*、*cyc* の発現制御を介して、概日リズムを制御することが示唆された。

(5) *tim2* の機能解析

tim2 は哺乳類 *Timeless* のオースログである。クローニングにより cDNA を取得し、その構造を解析したところ、TIMELESS、TIMELESSC ドメインと3つの核移行シグナル (NLS) を持つ1432アミノ酸からなることが

分かった。mRNA は、時計組織視葉内でほぼ定常的に発現していた。RNAi による発現抑制で、明暗下で明期開始時の活動が有意に低下すること、恒暗条件下では高頻度でリズム分割が生じ、自由継続周期が有意に短縮することなどが明らかになった。分子レベルでは *tim2* RNAi により、*per* と *Clk* は mRNA レベルが低下し無周期となること、逆に *cyc* は発現レベルが亢進し、リズムがより明瞭となること、*tim* はほとんど影響を受けないことなどが明らかとなった。

一方、*tim2* mRNA は卵に多量に含まれている。雌成虫への *tim2* 2 本鎖 RNA の投与により、成熟卵の形成数が減少し、産下された卵の胚発生が進まないことが明らかとなった。従って、*tim2* は雌の生殖能力や胚の初期発生にも重要な役割を担うことが明らかとなった。

(6) コオロギ概日時計の分子振動機構

本研究で得られた結果とこれまでの結果を総合すれば、時計の分子振動機構は以下のように説明できる。コオロギ時計は、*per*, *tim*, *tim2*, *Clk*, *cyc*, *cry1*, *cry2*, *vri*, *Pdp1*, *E75*, *HR3*, *cwo* により構成されている。*Clk*, *cyc* の産物タンパク質 CLK, CYC は *per*, *tim*, *cry2* の転写を活性化し、夜間に PER, TIM, CRY2 を増加させる。PER, TIM は協働して CLK/CYC の転写活性を抑制し、24 時間の発振を導いている。CRY2 はこれとは別に、CRY1 あるいは CRY2 バリエーションで複合体を形成し、CLK/CYC へ抑制的に作用し、24 時間の発振を導く。一方、*Clk* と *cyc* はそれぞれ *vri* と *Pdp1*, *E75* と *HR3* がハエと同様に発現制御に関わっている。また、*cwo* は *vri*, *E75* に抑制的に作用することで *Clk*, *cyc* の発現レベルを制御し、間接的に *per*, *tim* の発現を制御することが示唆された。*tim2* は *per* と *cyc* のレベルに影響することで、時計振動の調整に関与すると考えられる。

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 14 件)

1. Nose M., Tokuoka A., Bando T., Tomioka K (2018) *timeless2* plays an important role in reproduction and circadian rhythms in the cricket *Gryllus bimaculatus*. Journal of Insect Physiology, 査読有, 105:9-17. DOI:10.1016/j.jinsphys.2017.12.007
2. Tokuoka, A., Itoh, T. Q., Hori, S., Uryu, O., Danbara, Y., Nose, M., Bando, T., Tanimura, T., Tomioka, K. (2017) *cryptochromes* form an oscillatory loop independent of the *per/tim* loop in the circadian clockwork of the cricket *Gryllus bimaculatus*. Zoological Letters, 査読有, 3: 5, DOI: 10.1186/s40851-017-0066-7
3. Hamada, Y., Tokuoka, A., Bando, T., Ohuchi, H. and Tomioka, K. (2016) *Enhancer of zeste* plays an important role in photoperiodic modulation of locomotor rhythm in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. Zoological Letters, 査読有, 2:5, DOI: 10.1186/s40851-016-0042-7
4. Kutaragi, Y., Miki, T., Bando, T., and Tomioka, K. (2016) Transcriptional and non-transcriptional events are involved in photic entrainment of the circadian clock in the cricket *Gryllus bimaculatus*. Physiological Entomology, 査読有, 41: 358-368, DOI:10.1111/phen.12162
5. Ito C, Tomioka K (2016) Heterogeneity of the peripheral circadian systems in *Drosophila melanogaster*: A Review. Frontiers in Physiology, 査読有, 7:8. DOI: 10.3389/fphys.2016.00008.

6. Tomioka K, Matsumoto A (2015) Circadian molecular clockworks in non-model insects. *Current Opinion in Insect Science*, 査読有, 7:58-64. DOI: 10.1016/j.cois.2014.12.006.

[学会発表](計 32 件)

1. Nose, M. and Tomioka, K. (2017) *Timeless2* plays an important role in the circadian clock of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. 第 39 回日本比較生理生化学会大会、(福岡) 11 月 25 日.
2. 久多良木祐輝, 徳岡篤, 能勢基希, 渡辺崇之, 富岡憲治(2017)フタホシコオロギ概日時計における光リセットの分子機構の解析. 日本動物学会第 88 回大会、富山市、9 月 23 日.
3. Tokuoka, A., Itoh, T. Q., Hori, S., Uryu, Ou., Danbara, Y., Nose, M., Bando, T., Tanimura, T., Tomioka, K. (2017) Cryptochrome genes form and oscillatory loop that can operate independent of the *per/tim* loop in the cricket *Gryllus bimaculatus*. 15th Congress of European Biological Rhythms Society, Amsterdam, July 30-August 3.
4. Nose, M. and Tomioka, K. (2017) Timeout is involved in the circadian rhythm and reproduction in the cricket *Gryllus bimaculatus*. 15th Congress of European Biological Rhythms Society, Amsterdam, July 30-August 3.
5. Tokuoka, A. and Tomioka, K. (2016) A chronobiological analysis of the clock genes *cry1* and *cry2* in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. The 22nd International Congress of Zoology, The 87th meeting of Zoological Society of Japan, Okinawa, September 14-19.
6. Kutaragi, Y. and Tomioka, K. (2016)

Analysis of molecular events that are involved in photic entrainment of the circadian clock in the cricket *Gryllus bimaculatus*. The 22nd International Congress of Zoology, The 87th meeting of Zoological Society of Japan, Okinawa, September 14-19.

7. Kannan, N. N. and Tomioka, K. (2016) Molecular mechanism of temperature entrainment of the circadian clock in cricket, *Gryllus bimaculatus*. The 22nd International Congress of Zoology, The 87th meeting of Zoological Society of Japan, Okinawa, September 14-19.
8. Nose, M., Tomioka, K. (2016) Functional analysis of the clock gene *tim2*. in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. 第 38 回日本比較生理生化学会大会、(東京) 9 月 2 日 ~ 4 日.
9. Kutaragi, Y., Tomioka, K. (2015) Analysis of light resetting mechanism of the circadian clock in the cricket *Gryllus bimaculatus*. 第 40 回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第 37 回大会 合同大会、広島市、12 月 11 ~ 13 日.
10. 富岡憲治 (2015) 比較で見える昆虫概日時計機構の多様性、日本動物学会第 86 回大会、シンポジウム「ショウジョウバエと非モデル昆虫との相違点 - 化学受容、概日時計、記憶学習をテーマとして -」、新潟市、9 月 17 日 ~ 19 日.
11. 濱田 良真, 富岡 憲治 (2015) エピジェネティック因子 $E(z)$ はフタホシコオロギ概日リズムの光周期応答を制御する、日本動物学会第 86 回大会、新潟市、9 月 19 日.
12. 檜崎 弓奈, 富岡 憲治 (2015) フタホシコオロギ時計関連遺伝子 *vrrille* と *Pdp1* の時間生物学的解析、日本動物学会第 86

回大会、新潟市、9月17日。

13. Tomioka, K., Tokuoka, A., Kutaragi, Y. (2015) Neurobiological and molecular dissection of the cricket circadian system. Asian Forum on Chronobiology in 2015, Sapporo, September 7-9.
14. 徳岡篤、富岡憲治 (2015) フタホシコオロギ時計遺伝子 *cry1* および *cry2* の時間生物的解析、日本動物学会中国四国支部第67回大会、松山市、5月16-17日。

〔図書〕(計 4件)

1. Tomioka K., Uryu O., Kamae Y., Moriyama Y., Saifullah ASM and Yoshii T. (2017) Chapter 6. Molecular approach to the circadian clock mechanism in the cricket. In H. Ohuchi, S. Noji, H. W. Horch, T. Mito and A. Popadic eds. The Cricket as a Model Organism: Development, Regeneration and Behavior, Springer, pp.77-89.
2. 伊藤千紘、富岡憲治 (2015) いつ動く、動物の動きを見てみよう - コオロギの活動リズム測定: 連続写真撮影によるリズムの観察、尾崎まみこ他編、研究者が教える動物実験 第3巻行動, 共立出版, pp110-113.
3. 富岡憲治 (2015) 生物時計、未光隆志他編、動物の事典、朝倉書店、印刷中
4. Tomioka, K., Komada, S., Yoshiga, W., Ueda, H., Miki, T. (2015) The photoperiodic time-measurement system in the cricket, *Modicogryllus siamensis.*, In K. Honma and S. Honma eds.: "Circadian Clocks", Hokkaido University Press, 75-84

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:

権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<https://sites.google.com/site/chronobiologyokayamauni/>

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

松本 顕 (MATSUMOTO, Akira)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 40229539

(4) 研究協力者

()