

コオロギを実験動物とした生物時計の解析： 時計遺伝子 *period* のリズム発現機構における機能解析

坂本 智昭・守山 禎之・富岡 憲治

岡山大学大学院自然科学研究科バイオサイエンス専攻高次生物科学講座

はじめに

コオロギは直翅目に属する不完全変態昆虫であり、一般に比較的大型でしかも累代飼育が容易であり、歩行や虫鳴活動に明瞭な概日リズムを示すことや、温帯性のコオロギ類では光周性を示すことから、頻繁に神経行動学や時間生物学の実験動物とされている(富岡, 2008)。行動リズムの研究では、中枢神経系の構造が比較的単純であり、個々のニューロンがその形態により同定可能であること、外科手術等が容易に行えることなどの利点を生かして、特に時計の神経機構の解析が行われてきた。われわれは、以前からフタホシコオロギを用いて生物時計の研究を神経行動学的な視点から行ってきたが、最近、時計遺伝子の発現阻害を用いた分子機構の解析に取り組んでいる。本稿では、これまでのコオロギ時計機構についての知見を紹介し、続いて時計遺伝子 *period* を指標とした時計機構の解析について紹介する。

コオロギの概日リズム

実験動物として用いているフタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*) は、幼虫では昼行性の活動リズムを示すが、成虫になると夜行性に变化する(Tomioka and Chiba, 1982)。このリズム逆転は性成熟と軌を一にしており、雄では発音行動の発現や精包の形成とともに、羽化後約 1 週間程度で生ずる。幼虫でも成虫でも、活動リズムは体内時計に支配される内因性のものであり、恒常条件下でも長期にわたり継続する。

このリズムを駆動する自律振動体(概日時計)は視葉にある。このことは、行動学的実験と電気生理学的実験によって確かめられている。視葉は、複眼と脳茎との間に位置する神経組織であり、視覚情報処理の場でもある。この組織を左右で切除すると活動リズムが完全に消失し、活動は明暗周期の下でも一日中に分散してしまう(Tomioka and Chiba, 1984)。視葉がリズムを作り出すことはいくつかの実験で確かめられている。視葉の切除により無周期となったコオロギに、別の個体から視葉を移植すると、移植数週間後に視葉と脳との神経連絡の再生とともに再び活動リズムが回復する。さらに、視葉を脳に連結する神経を切断し、視葉側の神経断端から電気活動を記録すると、夜高く昼低いリズムが観察される(Tomioka and Chiba, 1986)。さらに、このリズムは視葉を体外に切り出し、培養しても継続する(Tomioka and Chiba, 1992)。

これらの事実は、視葉内に概日時計があることを示唆している。

概日リズムの分子機構

概日時計が 24 時間のリズムを作り出す機構については、キイロショウジョウバエを中心に解析が進められてきた。これまでに、概日リズムの発振が時計遺伝子とその産物タンパク質の自己フィードバックによって生ずるという仮説がほぼ確立している(Hardin, 2006)。その概略は以下のようである(図 1)。すなわち、時計遺伝子 *period(per)* とそのパートナーである *timeless (tim)* が、転写因子 CLOCK (CLK) と CYCLE (CYC) のヘテロ 2 量体 CLK-CYC により、昼の後半から夜のはじめにかけて活発に転写される。*Per*, *tim* の mRNA は夜間に活発に翻訳され、産物タンパク質 PERIOD (PER) と TIMELESS (TIM) は夜間に増加する。増加したタンパク質は夜の後半には PER-TIM ヘテロ 2 量体を形成して核に入り、転写因子 CLK-CYC を不活性化し、*per*, *tim* の転写を停止させる。これによって夜の後半から昼にかけてこれらの mRNA が減少することになり、PER, TIM も分解が進み減少する。この減少により CLK-CYC への抑制が解け、再び *per*, *tim* の転写が活発になり次のサイクルへと進行することになる。

ところが、この仮説は他の昆虫では十分には支持されていない。例えば、ガの一種では時計細胞の中で PER タンパク質が核に入らないことが報告されている(Sauman and Reppert, 1996)し、ゴキブリでは、PER が日周リズムを示さない(Takeda et al., 2000)。また、蝶の一種オオカバマダラでは、PER とヘテロ 2 量体を形成し核への移行を導くのは TIM ではなく CRY2 であるといわれている(Zhu et al., 2008)。従って、昆虫の時計機構を分子レベルで包括的に理解するためには、異なる目に属する昆虫の時計機構を分子レベルで明らかにする必要がある。われわれは、現在、直翅目昆虫であるコオロギの外に、無翅目のシミ、鞘翅目のシバンムシを用いて解析を行っている。われわれの戦略は、それぞれの昆虫から時計遺伝子をクローニングし、その機能を探るというものである。時計遺伝子の機能を解析するには、一般にその遺伝子を働かなくさせる方法と、遺伝子機能を失ったものに新たに遺伝子を導入して働かせるという方法などがとられる。ハエ以外の昆虫では突然変異を得て、そこからその機能を探るいわゆる順遺伝学は困難で

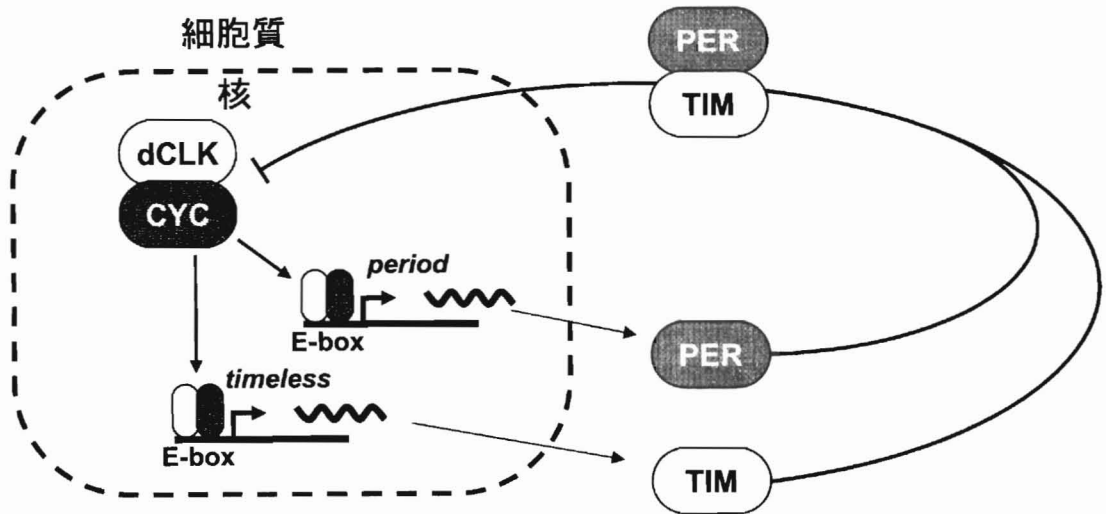


図1 概日時計の分子機構

ショウジョウバエでの仮説を模式的に表した。リズムの基本は、*per*、*tim* 遺伝子の産物タンパク質の自己フィードバックによる振動の発現と考えられている。詳細は本文を参照のこと。

ある。そこで、われわれは既知の遺伝子をクローニングにより得て、その機能を探る戦略すなわち逆遺伝学的アプローチを目指しており、遺伝子機能阻害のためには、2本鎖RNA(dsRNA)による遺伝子発現の抑制を採用している。

時計遺伝子の RNA 干渉による時計の分子機構の解析

RNA 干渉は dsRNA が細胞内に導入されるとそれと相補的な配列を持つ遺伝子の mRNA が分解され、その遺伝子の発現が抑制される機構であり、RNA ウィルスに対する防御機構などとして獲得されたものと考えられている(Ahlquist, 2002)。細胞内で dsRNA が検出されると、Dicer という酵素の働きで siRNA という短い dsRNA に分解され、それが RISC という蛋白質複合体と結合し、その RNA と相補的な RNA を分解する。従って、mRNA が低下し、遺伝子の働きが阻害されることになる。

われわれはまず、*per* の cDNA をクローニングした(Moriyama et al., 2008)。塩基配列から産物タンパク質 PER は 1065 アミノ酸からなると予想され、タンパク質間の相互作用にかかわる PAS-A、PAS-B、核移行のタイミングに関わる CLD、NLS など、他の昆虫で報告されている PER と同様の機能ドメインを含んでいる(図2)。これらから、コオロギ *per* はショウジョウバエ *per* と同様の機能を持つ可能性が示唆された。そこで、まずコオロギ視葉内での *per* mRNA の発現を検討した。その結果、*per* は明暗周期下で昼の後半から夜の前半にかけてピークを持つ発現の日周リズムを示し、そのリズムは恒暗条件下でも継続することから(図3)、*per* はハエと同様に概日時計にかかわる可能性が示唆

された(Moriyama et al., 2008)。そこで、*per* の dsRNA を作成し、遺伝子発現を抑制することを試みた。*per* dsRNA は PAS 領域を含む約 900bp で、最終濃度 20 μ M に調整した。これを、ナノリッシャーインジェクター(WPI 社製)を用いて、コオロギ腹部に投与した。実験に用いたコオロギは3齢幼虫と終齢幼虫である。投与量は、幼虫 207nl、終齢幼虫 760nl であった。終齢幼虫は1週間ほどで羽化して成虫になり、活動リズムへの影響の評価は成虫で行った。

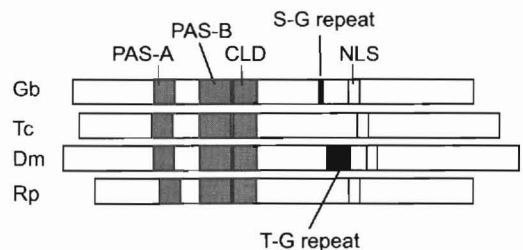


図2 コオロギ *per* 遺伝子の構造と他の昆虫との比較

推定されたコオロギ PER アミノ酸配列 (Gb) の他の昆虫の PER との比較。キロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*, Dm)、コクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*, Tc)、カメムシ (*Riptortus pedestris*, Rp)。PAS-A、PAS-B はタンパク質間の相互作用に関与し、ダイマー形成に関与する。CLD は細胞質局在ドメインを、NLS は核移行シグナルを示す。ショウジョウバエで知られる Thr-Gly の繰り返し配列 (T-G repeat) は Ser-Gly (S-G repeat) に置換されている。

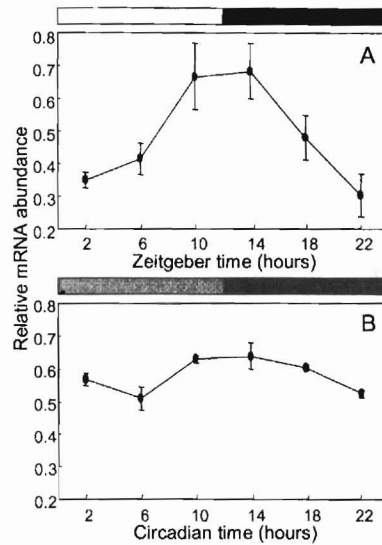


図3 コオロギ体内時計組織、視葉での *per* mRNA の周期的発現

成虫の視葉から total RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により *per* mRNA を測定した。測定値はハウスキーピング遺伝子 *rpl18a* mRNA の発現量を内部標準として、相対値で表し、縦のバーは標準誤差を示す。Zeitgeber time (ZT) は同調因子時刻を示し、ZT0 が明期開始、ZT12 が暗期開始を示す。Circadian time (CT) は概日時刻を示し、恒常条件下で CT0 は主観的昼の開始、CT12 は主観的夜の開始を示す。明暗、恒暗の両方で、*per* mRNA は昼の終わりから夜の初めにかけてピークをもつリズムを示す。図中の白黒のバーは明(白)暗(黒)周期を、灰黒のバーは主観的昼(灰)と主観的夜(黒)を示す。

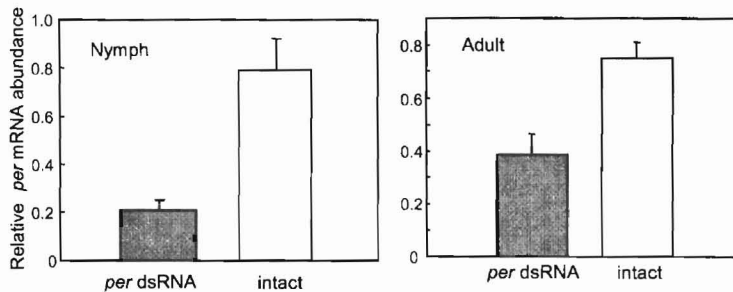


図4 *per* dsRNA による mRNA 発現の抑制

per dsRNA を投与後幼虫では1週間以上経過後頭部から、成虫では羽化後1週間以上経過後に視葉から、それぞれ total RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により *per* mRNA レベルを測定した。サンプルは正常個体群のピークの時刻(幼虫では ZT18、成虫では ZT14)で採取した。測定値はハウスキーピング遺伝子 *rpl18a* mRNA の発現量を内部標準として、相対値で表している。幼虫では正常個体の 25% に、成虫では約 50% にまで低下していた。(Moriyama et al., 2008, 2009 より改変)

まず、投与後約1週間後の *per* mRNA レベルを測定したところ、幼虫では正常コオロギの 25%、成虫でも 50% のレベルにまで低下していることがわかった(図4、Moriyama et al., 2008, 2009)。そこで、dsRNA を投与した個体の活動リズムを計測したところ、幼虫、成虫ともに大多数の個体で活動リズムが消失することがわかった(Moriyama et al., 2008, 2009)。幼虫では、恒暗条件下で 39 個体中 34 個体で活動リズムが消失し、残りの 5 個体は 24.9 ± 0.3 (平均 \pm SEM) 時間の周期をもつ自由継続リズムを示した。この周期は正常個体群(24.2 ± 0.08 時間、 $n=16$) に比較し、有意に長かった。一方、成

虫でも 21 個体中 19 個体でリズムが消失し、この無周期は恒暗条件下で 40 日以上にわたり継続した(図5A)。残りの 2 個体では非常に長周期(33.0 ± 0.5 時間)のリズムが自由継続した。ネガティブコントロールとしてサンゴ由来の遺伝子 *DsRed2* の 2 本鎖 RNA を投与した個体では、正常なリズムが継続することがわかった(図5B)。これらの結果は、RNA 干渉により *per* mRNA の発現量が低下することにより、概日時計が停止したことを示唆している。*per* mRNA の発現量に概日リズムがあることを考慮すれば、おそらくショウジョウバエと同様に、*per* 遺伝子の発現が自己フィードバック

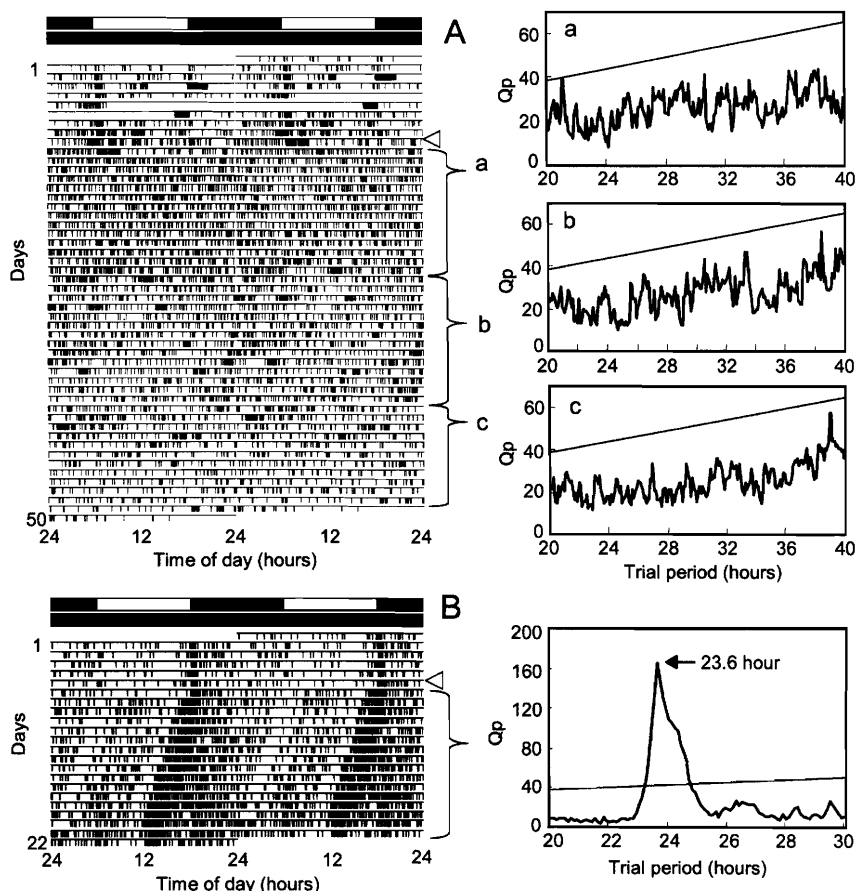


図5 *per* dsRNA と *DsRed2* dsRNA の成虫コオロギの活動リズムへの影響

A: *per* dsRNA 投与後のコオロギは、明暗周期下では明暗の切り替わり後にピークをもつリズムを示したが、恒暗条件下では無周期となり、ピリオドグラム(右)でも有意な周期性は検出されなかった。B: *DsRed2* dsRNA 投与後のコオロギは明暗周期下で、暗期の初めにピークを持つリズムを示し、そのリズムが恒暗条件下でも自由続した。三角は恒暗へ移行した日を示す。図中の白黒のバーは、明(白)暗(黒)サイクルを示す。(Moriyama et al., 2008 より改変)

クされ、発現量の周期を制御することが、概日時計発振のメカニズムであろうと考えられる。リズムの周期が延長するが無周期にはならなかった個体では、おそらく mRNA のレベルは低下しているがなお発振は維持されていると考えられる。ショウジョウバエでも *per*⁺ と *per*⁰ の組み合わせにより遺伝子量を低下させた場合には周期が長くなることが示されている(Smith and Konopka, 1982)。

われわれの実験結果は RNA 干渉が例外的に数十日にも渡って継続することを示している。これまでの報告では、RNA 干渉の効果は短期間しか継続しない場合が多い。コオロギは、RNA 干渉を利用することで、行動をはじめとする生理学での遺伝子機能の解析に有用な実験動物となると期待される。この長期にわたる dsRNA の効果の説明としては、投与した dsRNA が長期にわたって作用し続ける可能性と、細胞内で dsRNA が RNA 依存的

RNA ポリメラーゼにより増幅される可能性とがある。後者はシロイヌナズナや線虫で知られている(Voinnet et al., 1998; Tijsterman et al., 2002)が、昆虫では例が無く今後検討する必要がある。

今後の課題

ここでは、コオロギでの RNA 干渉を利用した概日時計の分子機構の解析について紹介した。得られた結果からのわれわれの一応の結論は、*per* 遺伝子が自己フィードバックにより 24 時間の発現リズムを表すというものである。今後、*tim*、*clock*、*cycle* など他の遺伝子の機能を解析することによりコオロギ時計機構の全貌に迫りたい。しかし、時計機構の解明には転写レベルだけでなく、タンパク質レベルの解析が必須であり、今後は抗体を使った時計タンパク発現の時間経過や細胞内局在の解析を進める予定である。

要約

フタホシコオロギでは、分子生物学的手法が開発されつつある。ここでは、最近われわれが試みているRNA干渉による、フタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)の時計遺伝子 *per* の機能解析を紹介した。幼虫頭部での解析により、*per* mRNA の発現量は、夜の始めにピークをもつリズムを示し、このリズムは恒暗・恒温条件下でも継続することが明らかとなり、*per* の時計機構への関与が示唆された。そこで、*per* dsRNA を用いたRNA干渉により、*per* 遺伝子の役割を検討した。幼虫への *per* dsRNA の投与により、*per* mRNA レベルは対照群の25%にまで減少し、かつほとんどの個体で活動リズムが消失することがわかった。これらの結果はコオロギでも *per* がリズムの発現に重要な役割を担うことを示唆している。さらに、終齢幼虫に *per* dsRNA を投与した場合も、羽化後の活動が恒暗条件下で無周期となることがわかった。これらの結果から、コオロギでは *per* が時計機構に必須であることが示唆された。また同時に、RNA干渉が時計遺伝子の機能解析に極めて有効な手段であることが確認された。

謝辞

本研究を進めるにあたり、時計遺伝子のクローニングでは九州大学松本顕博士に、RNA干渉の導入にあたっては徳島大学工学部の野地澄晴教授に御世話になった。記してお礼を申し上げる。この研究は日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究(B)、萌芽研究、および岡山大学重点研究の支援を受けて行われた。

参考文献

- Ahlquist, P., 2002. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* 296, 1270-1273.
- Hardin, P. E., 2006. Essential and expendable features of the circadian timekeeping mechanism. *Current Opinion in Neurobiology* 16, 686-692.
- Moriyama, Y., Sakamoto, T., Matsumoto, A., Noji, S., Tomioka, K., 2009. Functional analysis of the circadian clock gene *period* by RNA interference in nymphal crickets *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Insect Physiology* in press.
- Moriyama, Y., Sakamoto, T., Karpova, S. G., 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.

Sauman, I., Reppert, S. M., 1996. Circadian clock neurons in the silkworm *Antheraea pernyi*: Novel mechanisms of *period* protein regulation. *Neuron* 17, 889-900.

Smith, R. F., Konopka, R. J., 1982. Effects of dosage alterations at the *per* locus on the period of the circadian clock of *Drosophila*. *Molecular and General Genetics* 185, 30-36.

Takeda, M., Okada, M., Ichihara, N., 2000. Diversities in circadian/photoperiodic clocks in insects. In: *Complex Clocks* (Cosens, D., Kippert, F., eds), p 68. Edinburgh: University of Edinburgh.

Tijsterman, M., Ketting, R. F., Okihara, K. L., Sijen, T., Plasterk, R. H., 2002. RNA helicase MUT-14-dependent gene silencing triggered in *C. elegans* by short antisense RNAs. *Science* 295, 694-697.

富岡憲治, 2008. コオロギ. In: *時間生物学事典* 石田直理雄, 本間研一 (eds), pp 130-131: 朝倉書店.

Tomioka, K., Chiba, Y., 1982. Post-embryonic development of circadian rhythm in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Comparative Physiology A* 147, 299-304.

Tomioka, K., Chiba, Y., 1984. Effects of nymphal stage optic nerve severance or optic lobe removal on the circadian locomotor rhythm of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Zoological Science* 1, 385-394.

Tomioka, K., Chiba, Y., 1986. Circadian rhythms in the neurally isolated lamina-medulla complex of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Insect Physiology* 32, 747-755.

Tomioka, K., Chiba, Y., 1992. Characterization of optic lobe circadian pacemaker by in situ and in vitro recording of neuronal activity in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Comparative Physiology A* 171, 1-7.

Voinnet, O., Vain, P., Angell, S., Baulcombe, D. C., 1998. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 95, 177-187.

Zhu, H., Sauman, I., Yuan, Q., Casselman, A., Emery-Le, M., Emery, P., Reppert, S. M., 2008. Cryptochromes define a novel circadian clock mechanism in monarch butterflies that may underlie sun compass navigation. *PLoS Biology* 6, 138-155.