

氏名	鎌江 優一
授与した学位	博士
専攻分野の名称	理学
学位授与番号	博甲第4776号
学位授与の日付	平成25年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Molecular analysis of the circadian clock in the firebrat, <i>Thermobia domestica</i> (マダラシミ概日時計の分子振動機構の研究)
論文審査委員	教授 富岡 憲治 教授 上田 均 准教授 中越 英樹

学位論文内容の要旨

概日時計の分子機構に関する研究はモデル生物であるショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)で最も進んでおり、その約24時間の振動が時計遺伝子とその産物タンパク質による負のフィードバックにより駆動されることが示されている。しかし、ハエ以外の昆虫での解析結果の多くは、ショウジョウバエのモデルでは説明することができないことから、多くの分類群に多様化した昆虫では時計機構も多様化していると考えられる。昆虫全体に通じる時計機構のモデルを提唱するためには、系統進化的に原始的な分類群を用いる必要がある。そこで本研究では、マダラシミ(*Thermobia domestica*)を用いて概日時計の分子振動機構の解析を行った。マダラシミは、昆虫綱・総尾目・シミ科に属する無翅昆虫で、古生代に分岐した進化系統的に原始的な昆虫であり、その系統的な位置付けから昆虫の時計機構の原型を持つことが予想され、昆虫の多様な時計機構を理解するための好材料であると期待される。

まず、クローニングによりハエで転写活性化に働く時計遺伝子、*Clock* (*Td'Clk*)、及び *cycle* (*Td'cyc*)の全長 cDNA を得た。構造解析の結果、*Td'Clk* はハエの *Clk* (*Dm'Clk*) で転写活性化に必要と考えられている poly-glutamine region を欠いていた。一方、*Td'cyc* はハエの *cyc* (*Dm'cyc*) に比べ C 末端側が長く、その哺乳類オルソログ *Bmal1* で転写活性化領域である BMAL1 C-terminal region (BCTR) を含んでいた。また、定量的リアルタイム PCR (qPCR) により *Td'Clk* と *Td'cyc* の mRNA 発現量を検討したところ、*Td'Clk* は明瞭なリズムを示さず、*Td'cyc* は明期の終わりにピークとなるリズムを示すことが明らかとなった。さらに、*Td'Clk* および *Td'cyc* の 2 本鎖 RNA (dsRNA) を作成してシミに注射したところ、*Td'Clk* と *Td'cyc* mRNA がそれぞれ有意に減少し、30 日以上にわたり恒暗条件下での活動リズムが消失した。これらの結果から、*Td'Clk*、*Td'cyc* はいずれもシミ時計機構に不可欠な時計遺伝子であり、その構造的特徴や発現制御機構はハエよりも哺乳類のそれに類似していることが示唆された。

次に時計遺伝子 *timeless* (*Td'tim*) のクローニングを行い、その全長 cDNA を得た。構造およびその mRNA 発現解析の結果から、*Td'tim* は構造およびその発現パターンがハエと類似していることが明らかとなった。したがって、*Td'tim* の発現制御機構が、*Td'Clk* や *Td'cyc* とは異なりハエ型であることが示唆された。さらに、*Td'tim* の dsRNA をシミに注射したところ、その mRNA レベルが有意に減少するとともに、30 日以上にわたり恒暗条件下でのリズムが消失したことから、*Td'tim* がシミ概日リズムの発現に不可欠であることが示された。*Td'tim* の発現は、*Td'Clk* もしくは *Td'cyc* の dsRNA 処理により有意に低下するとともに、無周期となった。この事実は、*Td'tim* の発現を *Td'Clk* と *Td'cyc* が活性化することを示唆している。一方、*Td'tim* の dsRNA 処理は、*Td'Clk* mRNA 量には影響しないが、*Td'cyc* mRNA レベルを有意に低下させた。この事実は、*Td'cyc* の発現調節機構がショウジョウバエとは異なることを示唆している。

以上の結果から、マダラシミ概日時計分子振動機構は、ショウジョウバエに類似した要素と哺乳類に類似した要素を併せ持つことが示唆された。

論文審査結果の要旨

昆虫概日時計の振動はショウジョウバエでの研究から、時計遺伝子とその産物タンパク質による負のフィードバックにより駆動されると提唱されている。しかし、時計に関わる遺伝子やそれらの機能は種により異なる可能性が指摘されている。多くの分類群に多様化した昆虫では時計機構も多様化しており、昆虫時計機構を包括的に理解するには、その祖先型の解析がアプローチの一つとなる。本研究は、原始的昆虫の一種マダラシミ(*Thermobia domestica*)を用いて概日時計の分子振動機構を解析したものである。

まず、ハエで転写活性化に働く時計遺伝子、*Clock* (*Td'Clk*), 及び *cycle* (*Td'cyc*)の全長 cDNA を取得し、*Td'Clk* がハエの *Clk* で転写活性化に必要と考えられている poly-glutamine region を欠くこと、一方 *Td'cyc* はハエの *cyc* に比べ C 末端側が長く、その哺乳類オルソログ *Bmal1* で転写活性化領域である BMAL1 C-terminal region (BCTR) を含むことを明らかにした。次いで、*Td'Clk* mRNA は明瞭なリズムを示さないが *Td'cyc* mRNA は明期後半にピークとなるリズムを示すことを明らかにした。さらに、*Td'Clk* と *Td'cyc* の 2 本鎖 RNA (dsRNA) の投与により、それぞれの mRNA が有意に減少し、かつ長期にわたり恒暗下での活動リズムが消失することを示した。以上から、*Td'Clk*, *Td'cyc* はいずれもシミ時計機構に不可欠な時計遺伝子であり、その構造的特徴や発現制御機構はハエよりも哺乳類のそれに類似していることを示唆した。続いて、時計遺伝子 *timeless* (*Td'tim*) の全長 cDNA を取得し、*Td'tim* は構造およびその発現パターンがハエと類似していること、その発現が *Td'Clk* と *Td'cyc* により活性化されることを明らかにし、*Td'tim* の発現制御機構が *Td'Clk* や *Td'cyc* とは異なりハエ型であることを示唆した。さらに、*Td'tim* dsRNA をシミに注射することでその mRNA レベルが有意に減少し、かつ長期にわたり恒暗条件下での活動リズムが消失することを明らかにし、*Td'tim* がシミ概日リズムの発現に必須であることを示した。一方 *Td'tim* の dsRNA 処理により、*Td'Clk* mRNA 量は変化しないが、*Td'cyc* mRNA レベルが有意に低下することから、*Td'cyc* の発現調節機構がショウジョウバエとは異なることを示唆した。以上の結果に基づき、原始的昆虫マダラシミの概日時計分子振動機構は、ショウジョウバエに類似した要素と哺乳類に類似した要素を併せ持つことを示唆した。

本論文は昆虫概日時計振動機構およびその多様化の理解に大きく寄与するものであり、また、発表会での質疑に対する応答も充分であった。以上により、博士の学位に値すると判断された。