

氏名	坂本 智昭
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3910号
学位授与の日付	平成21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	Physiological and molecular analysis of the photoperiodic time-measurement mechanism in the cricket, <i>Modicogryllus siamensis</i> (タンボコオロギにおける光周測時機構の生理学的・分子生物学的解析)
論文審査委員	教授 富岡 憲治 教授 酒井 正樹 教授 高橋 純夫

学位論文内容の要旨

概日時計が昆虫の光周測時機構に関与することがこれまでの研究から示唆されてきた。しかし、それを実証した例は無く、概日時計がどのように光周測時機構に関与するかは未解明である。本研究では、タンボコオロギ (*Modicogryllus siamensis*) を用いて、光周測時機構と概日時計との関連を生理学的手法と分子生物学的手法により検討した。

タンボコオロギはその幼虫発育に顕著な光周反応を示し、この光周反応は1、2齢期に受容する光周期で決定されることが示されている。そこでまず、長日、短日、および恒暗条件下での幼虫発育を検討した。その結果、長日では孵化後7回の脱皮を経て約50日ですべての個体が成虫となるが、短日では脱皮回数が増加し、幼虫期間も130日以上に延長することがわかった。一方、恒暗条件下では、長日よりやや遅く羽化する群(恒暗早期型)と短日型の2群が生ずることが明らかとなった。

次に、この光周反応に概日時計が関与する可能性を生理学的に検討した。フタホシコオロギでは概日リズムの波形が左右一対の視葉時計間の相互作用で決定されることから、1齢初期に片側の複眼を除去して長日または短日に置き、その場合の光周反応を解析した。複眼除去は恒暗条件に置くことと同等と考えられる。まず、長日条件では、多くの個体で無処理の個体群より脱皮回数が1~2回増加し、幼虫期間も延長した。一方、短日条件下では恒暗早期型と短日型との中間付近で羽化する個体と、短日型よりも羽化が遅延する個体が観察された。これらの結果から、タンボコオロギの幼虫発育の光周反応に、概日時計間の相互作用が関わるということが強く示唆された。また、光周期が複眼を通して受容されること、完全な光周反応には左右の複眼からの光周情報が必要であることも示唆された。

続いて、タンボコオロギ光周測時機構への概日時計の関与を分子レベルで検討した。概日時計が光周測時機構に直接関与しているならば、概日時計機構が光周期に応じて変化する可能性が考えられる。タンボコオロギにおいて時計遺伝子 *period* をクローニングし、*period* の発現リズムが光周期に依存するかどうかを、長日、短日の各光周条件下のタンボコオロギ幼虫を用いて検討した。発現量の谷は長日と短日で異なっており、発現ピークの mRNA 量は長日に比べて短日のほうが有意に高かった。さらに *period* の光周測時機構への関与を検討するため、*period* 2本鎖 RNA(dsRNA)を雌成虫に投与し、その個体が産下した卵から孵化した幼虫の光周反応を解析した。*period* dsRNA 処理された幼虫は、*period* mRNA レベルが正常幼虫に比べ有意に低下しており、長日、短日のいずれの場合でも恒暗条件下に置かれたものと類似した幼虫発育パターンを示した。*period* dsRNA 処理個体の羽化後の活動リズムを計測したところ、大部分の個体で無周期性や活動リズムの波形が異常となることが観察された。

これらの結果から、タンボコオロギでは複眼が光周受容器であり、光周測時機構には概日時計が不可欠であること、時計遺伝子 *period* が光周測時機構において重要な役割を担うことが明らかになった。また、*period* mRNA の発現パターンが光周期に応じて変調することが判明したが、この光周期依存的な概日時計の変調が光周測時機構の重要な構成要素である可能性がある。

論文審査結果の要旨

本論文は、タンボコオロギ (*Modicogryllus siamensis*) を用いて、昆虫の光周測時機構と概日時計との関連を生理学的手法と分子生物学的手法により検討したものである。タンボコオロギはその幼虫発育に顕著な光周反応を示し、この光周反応は 1、2 齢期に受容する光周期で決定されることが示されている。

第 1 章では、光周感受期に片側の複眼を除去して長日または短日に置き光周反応を解析した。処理個体群の幼虫発育は、長日・短日の両方で正常個体群とは異なることから、幼虫発育の光周反応に、概日時計間の相互作用が関わること、光周期が複眼を通して受容されること、完全な光周反応には左右の複眼からの光周情報が必要であることが示唆された。

第 2 章では、タンボコオロギ光周測時機構への概日時計の関与を分子レベルで検討した。まず、時計遺伝子 *period* をクローニングし、その発現リズムが光周期に依存するかどうかを、長日、短日の各光周条件下で検討し、発現量の谷は長日と短日で異なり、発現ピークの mRNA 量は長日に比べて短日のほうが有意に高いことを明らかにした。さらに *period* 2 本鎖 RNA(dsRNA) を雌成虫に投与し、その個体が産下した卵から孵化した幼虫の光周反応を解析した。*period* dsRNA 処理された幼虫は、*period* mRNA レベルが正常幼虫に比べ有意に低下し、長日、短日のいずれの場合でも恒暗条件下に置かれたものと類似した幼虫発育パターンを示すこと、また大部分の処理個体は羽化後、無周期性や異常な活動リズムを示すことが明らかとなった。これらの結果から、タンボコオロギでは光周測時機構に概日時計が不可欠であること、時計遺伝子 *period* が光周測時機構に重要な役割を担うことを示唆した。

本論文は、タンボコオロギの光周受容器が複眼であること、昆虫の光周測時機構に概日時計遺伝子 *period* が関与することをはじめ明らかにしたものであり、論文の内容は質量ともに博士論文として十分に値するものと認定された。以上