

キイロショウジョウバエ *per⁰¹* 系統における 概日歩行リズムの温度依存的発現

松本 顕

九州大学大学教育研究センター

*per⁰¹*の恒暗条件 (DD) での歩行活動をさまざまな温度条件下で計測し、19℃の比較的低温の条件下では3割近い個体は何らかの概日周期性を示すことを見出した。続いて、周期性を示した個体同士の交配実験を行い、この表現型には複数の遺伝的要因が影響を与えること、およびキイロショウジョウバエには複数の *per*非依存的な概日振動体 (*perless oscillator*: 以下PLOと略) が存在している可能性を見出した。これらの結果とともにGeneChipを用いた周期的な遺伝子発現の網羅的同定に関する実験結果を簡単に概略し、最近提唱されている、いわゆるZeitnehmer説がショウジョウバエでも成り立ちうるかどうか考察した。

1. はじめに

概日時計機構の分子メカニズムの研究は、キイロショウジョウバエの突然変異体を用いた実験で進展してきた。現在、*period*遺伝子 (*per*) の転写に関する負の自己フィードバックループを中心とした概日時計の分子メカニズムのモデルが提唱されている³⁾。このループにかかわる分子としてPERタンパクの安定化や核輸送を行う *timeless* (*tim*)、PERの早期崩壊に関与するキナーゼ *double-time* (*dbt*)、*per* や *tim* の正の転写因子である *dClock* (*dClk*) と *cycle* (*cyc*) が同定されており、これらの分子の哺乳類でのホモログも見つかっている³⁾。時計遺伝子の負の自己フィードバックループは、シアノバクテリアやアカパンカビでも見つかっており、種を超えた概日振動の発振メカニズムではないかと考えられるに到っている³⁾。

ところが、最近アカパンカビでは、こ

のフィードバックループが機能しないはずの *frq null* 突然変異株でも概日リズムが存在している可能性が指摘されている^{7, 8)}。これらのデータをもとに、これまで時計遺伝子と考えられて来た一連の遺伝子を、概日振動を生み出す中枢で機能しているのではなく、概日時計からの影響を受けて振動しつつ、概日時計への入力系の役割も果たしているZeitnehmerとしてとらえ直そうとする考えも提唱され始めている^{6, 9)}。

一方、キイロショウジョウバエにおいても分子レベルでの解析が急進展する以前から、いわゆる無周期系統の *per⁰* で、本当に概日時計機構が全く機能しないのか? という疑問がもたれて来た。たとえば、HelfrichとEngelmann⁴⁾ は *per⁰* であっても同調可能な光サイクルの周期には限界があるというデータから、概日時計機構は潜在的には *per⁰* にも存在している可能性を示唆している。また、Dowseと

Ringo²⁾は、最大エントロピー法を用いて、DDでの per^0 の歩行活動にある種の概日周期を検出している。

ところで、 per 遺伝子の別の突然変異体で、周期の長さに影響する per^s と per^l は温度が高くなるほど、それぞれ、より短い、あるいはより長い周期を示すことが報告されていた⁵⁾。これは、温度が高いほど、その表現型が著しくなるとも解釈可能である。そこでわれわれは、 per^{0l} のDDでの歩行活動のさまざまな温度条件下での計測を行った。

2. 低温条件における per^{0l} 系統の活動

ショウジョウバエのDDにおける歩行活動を赤外線ビームの遮断回数によって計測した。得られたデータの周期性は χ^2 ピリオドグラム法によって分析した。仮周期は16-32時間の間に設定した。28℃の高温条件では、野生型のCanton-Sは明瞭な概日リズムを示すのに対して、 per^{0l} 系統は完全に無周期であった。続いて、通常の飼育温度である24℃での計測を行った。64個体中7個体が16-32時間の範囲で、なんらかの周期性を示した。19℃の低温条件下では、81個体中21個体が周期性を示すことが分かった(図1)。これらの結果を表1に示す。19℃では、20~28時間の周期性を示す個体が多かった。ピリオドグラム解析で2つの周期成分を示した個体もあった。サブピークを20-28時間の範囲に持つ個体数を表1の括弧の中に示した。これらの個体では複数の周期成分が1個体に認められたことになる。

3. 無周期突然変異体における低温条件下での周期出現

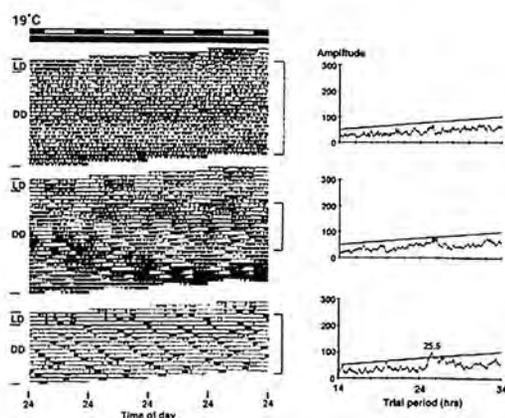


図1 19℃での per^{0l} の歩行活動リズム。LD12:12に数日間置いたのち、DDに移した。各個体のアクトグラムは、4日分を1段に並べて表示している。周期分析は χ^2 ピリオドグラム法を用いて行った。上から、無周期の個体、視察法では周期性が認められるがピリオドグラムでは有意な周期成分が検出されなかった個体、ピリオドグラムで周期が検出された個体を例示した。今回は、最下段のようにピリオドグラムで有意な周期性を示した個体だけを τ 周期を示した個体 τ として扱っている。

表1 Temperature dependency of rhythm expression in per^{0l} .

Temperature (°C)	N	N _r	The range of period (hr)		
			16-20	20-28	28-32
28	50	0	0	0	0
24	64	7	1	2	4
19	81	21	8(4)	14(1)	5(1)

N: Number of flies tested.

N_r: Number of rhythmic flies.

(): Number of flies which showed another period in the range from 20 to 28 hr.

per^{0l} 系統において高頻度で周期が観察されたことに関して、低温環境下では per^{0l} 突然変異で生じているストップコドン¹⁾が機能せず、翻訳時にread throughされた結果、ほぼ完全に近い形のPERタンパク質が発現している可能性がある。そこで、 per 遺伝子の欠失系統(per^- 系統)を用いて、19℃での周期出現率を調

表2 Number(%) of flies showing circadian rhythm in various clock mutants at 19°C.

Strains	N	rhythmic flies (%)
<i>per⁻</i>	24	29.2
<i>tim⁰¹</i>	15	26.7
<i>dClk^{dk}</i>	15	13.0
<i>cyc⁰¹</i>	16	18.8

N: Number of flies tested.

べた。同時に、これまでショウジョウバエで見つかった無周期突然変異体に関しても調べた。*per*-系統では、*per*遺伝子のプロモーター領域やcoding領域を含む比較的広い範囲で染色体欠失が生じており、PERタンパク質はもとより、*per* mRNAの転写も生じていない。

結果を表2に示す。*per*-や*tim⁰¹*では、全体の1/4をこえる個体で、概日周期を示すものが見つかった。*per*遺伝子や*tim*遺伝子の転写活性化因子である*dClk*や*cyc*遺伝子の無周期突然変異体でも、*per*-や*tim⁰¹*と比較すれば割合は低いものの周期性を示す個体が見つかった。これらの結果は、低温下における概日周期の出現は、*per⁰¹*突然変異によるストップコドンがread throughされてPERタンパク質が発現することによるものではないことを示唆している。さらに、*per⁰¹*系統に限らず、既知の無周期突然変異体では頻度の差はあるものの、いずれも低温条件下で周期性を示す個体が出現することが示された。

4. 遺伝的要因の影響

*per⁰¹*系統で低温条件下において周期性が回復する個体の割合は、複数の実験を通して、常に約3割程度であった。そこで、この現象が何らかの遺伝的要因の影

表3 Number (%) of *per⁰¹* flies with or without circadian rhythm in various genetic backgrounds at 19°C.

strain	N	Circadian rhythm	
		Yes	No
<i>per⁰¹</i> (original)	134	29.1	70.9
<i>per⁰¹</i> (out crossed)	43	9.3	90.7
<i>per⁰¹</i> (Hall's lab.)*	177	4.5	95.5

N: Number of flies tested.

* Hamblen et al. (1986) J. Neurogenet. 3: 249-291.

表4 Number (%) of rhythmic flies at different temperatures.

Strains	Temperature (°C)		
	19	24	29
<i>per⁰¹</i> (Generation-2)	25.3 (91)	19.4(154)	17.1 (35)
<i>per⁰¹</i> (Generation-7)	52.6 (19)	22.0 (59)	19.6 (51)

(): Number of flies tested.

響を受けるのかどうかに関して実験を行った。まず、*per⁰¹*系統と野生型Canton-Sとの交配を繰り返すことで、遺伝的なバックグラウンドを元の*per⁰¹*系統から野生型に置換した系統(out cross系統)を確立した。ただし、実験の都合上、*per*遺伝子が存在する性染色体はもとの系統からそのまま引き継がれている。out cross系統に関して19°Cでその周期性を調べた(表3)。元の*per⁰¹*系統は計測個体の約3割のものが概日周期を示していたが、野生型とのout crossを行うことによって、その頻度が1割ほどに低下したことが分かる。

続いて、上記の実験とは逆に、毎代明瞭な周期性を示した個体同士を選別して交配する実験を行った。結果を表4に示す。24°Cや29°Cでの周期性の出現率は、選別交配を2回繰り返しただけの比較的早期から若干の上昇を示したが、以降は交配を繰り返しても、ほとんど影響を受

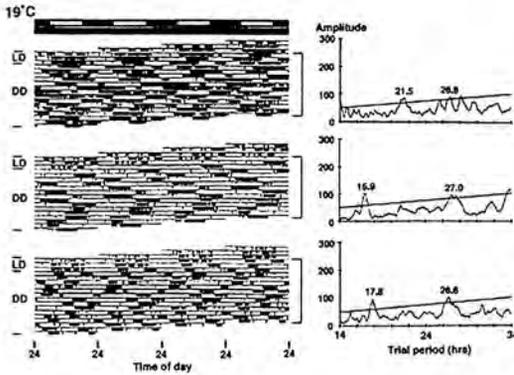


図2 選抜による近交系の歩行活動リズム。実験条件は図1に準ずる。周期性を示した個体同士の選抜交配を繰り返すことで、19°Cでの周期出現率を約50%まで高めることができた(表4)。幾つかの近交系では、周期性を示した個体のほぼ全てで、長短2つの周期成分が観察された。

けなかった。19°Cでの周期の出現率は、選別交配を7回繰り返した時点で50%を超えたが、以降は、選別を繰り返しても、周期性出現頻度の上昇は見られなかった。すなわち、選別交配は低温下での周期性発現に影響を及ぼすこと、しかし一方で、全ての個体が周期性を示すようになる訳ではないことが示された。これらの近交系の中のある系統では、周期性を示した個体のほとんどで長短2つの周期成分が観察された(図2)。これは、周期の異なる複数のPLOが、ショウジョウバエ1個体中に存在する可能性を示唆している。

5. GeneChipによる周期的遺伝子発現の網羅的な同定

ショウジョウバエのオリゴヌクレオチドマイクロアレイ(GeneChip)を用いて、明暗サイクル下で周期的に発現している遺伝子の網羅的な同定を試みた¹⁰⁾。野生型では約700個の遺伝子がショウジ

ョウバエ頭部で周期的に発現していた¹⁰⁾。その中には、これまで視覚系への関与が示唆されていた遺伝子が約20個含まれていた。

続いて、*per* feedback loopが機能していないと考えられる*dClk^{IRK}*突然変異体を用いて同様の実験を行ったところ、上記の視覚系遺伝子を含む、ほぼ全ての遺伝子の周期的な発現が停止していることがわかった¹⁰⁾。このことから、ショウジョウバエでは、少なくとも遺伝子発現の周期性に関しては、*per* feedback loopがほぼ唯一の発振源となっていることが推測された。

6. おわりに

以上のように、これまで無周期であると考えられて来た*per^m*系統でも低温条件下では概日周期性を示す個体が存在すること、この表現型が複数の遺伝的な因子の影響を受けていることがわかった。さらに、*per^m*だけでなく既存の無周期突然変異体のどれもが、低温条件下では、ある程度の割合で概日周期性を示すこともわかった。GeneChipを用いた実験からは、これまで視覚系で働いていることが分かっていた約20個の遺伝子を含む多数の遺伝子が周期的に発現していること、*per* feedback loopが機能しない突然変異体では、ほぼ全ての遺伝子の周期的発現は起こらないことが明らかになった。

これらのことを総合すると、ショウジョウバエの脳内には何らかのPLOが複数存在しており、それらは周期的な遺伝子発現を伴わずに概日振動を生み出す機構である可能性が推測される。RoennebergとMorrow⁹⁾は、光合成系の代謝のリズムが時計遺伝子のfeedback loopとは別

に概日振動の発振源として働いている可能性を考慮したモデルを提起している。今回見いだされた *per⁰¹* の周期性が生理的な代謝機構を背景にしているのかどうか、どのくらいの数の遺伝的要因がそれに関わっているのかなどの詳細な解析は今後の課題である。また、低温条件で特に周期性の回復が顕著な理由の解明も重要な課題と考えられる。

今回得られた結果をアカバシカビで提唱されている Zeitnehmer 説^{6,9)} に当てはめてみると、少なくとも GeneChip を用いた実験から同定された約20個の視覚系遺伝子群は Zeitnehmer と呼んでも差し支えがないように思われる。しかしながら、ショウジョウバエにおいて *per* 遺伝子を含む既存の時計遺伝子を Zeitnehmer として捉えなおすことが可能かどうかについては、今後も慎重な検討が必要とされるであろう。既存の時計遺伝子が Zeitnehmer であるならば、それら以外に概日リズムの発振機構が存在するはずである。この立場から、*per⁰¹* が低温条件下で示すリズムが本当に概日リズムと呼べるものかどうかを、環境リズムに対する同調性や外的な擾乱に対する位相反応性といった側面から詳細に検討することが必要と思われる。また、*per⁰¹* での周期性の出現率に影響を与える遺伝子群の同定も必須であろう。さらに、PLO がショウジョウバエのどの組織、器官に備わっているのかも明らかにすべき問題の1つである。

謝辞

有意義な御助言を頂いた名古屋大学大学院理学研究科の岩崎秀雄先生にお礼申し上げます。

本研究は、以下の先生方との共同研究として行ったものです。共同研究者の方々にお礼申し上げます。以下に敬称を略して列記させていただきます。

九州大学大学院理学研究院 谷村禎一。
山口大学理学部 千葉喜彦、富岡憲治、
治井由佳。
山之内製薬株式会社ゲノム創薬研究室
橋本誠一、上田泰己、河村美穂。

参考文献

- 1) Baylies et al.: Nature 326: 390-392. (1987)
- 2) Dowse, Ringo: J. Biol. Rhythms 2: 65-76. (1987)
- 3) Dunlap: Cell 96:271-290. (1999)
- 4) Helfrich, Engelmann: Z. Naturforsch. 42:1335-1338. (1987)
- 5) Konopka et al.: J. Neurogenet. 6:1-10. (1989)
- 6) Lakin-Thomas: Trends Genet. 16:135-142. (2000)
- 7) Lakin-Thomas, Brody: Proc. Nat. Acad. Sci. UAS 97: 256-261. (2000)
- 8) Mellow et al.: Nature 399: 584-586. (1999)
- 9) Roenneberg, Mellow: J. Biol. Rhythms 14: 449-459. (1999)
- 10) Ueda et al.: J. Biol. Chem. in press. (2002)

追補

脱稿後、*per⁰¹* の示す周期性を記述した論文を目にしたので紹介する。

- 11) Helfrich-Förster: J. Insect Physiol. 47: 877-887. (2001)