

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	池田 健人
論文題目	Role of the clock gene <i>period</i> in the circadian rhythm and photoperiodism of the silkworm <i>Bombyx mori</i> (カイコガの概日リズムと光周性における時計遺伝子 <i>period</i> の役割)		
(論文内容の要旨)			
<p>生物は一日および一年周期の環境変化に適応する能力を持っており、多くの場合、一日のものに対しては概日時計、一年のものに対しては光周性により時間を予測し対応している。概日時計を作り出す遺伝子としていくつかの時計遺伝子が明らかになっており、キイロショウジョウバエにおいて提唱されたモデルでは、これらの時計遺伝子が負のフィードバックループを形成し約24時間の周期を形成する。光周性において日長を計測するのに概日時計が関与していることは広く認められている。</p> <p><i>period</i> (<i>per</i>) は代表的な時計遺伝子であり、フィードバックループにおける負の転写因子として知られる。しかし、チョウ目昆虫では、<i>per</i>の存在は確認されているが、発現場所や核内移行、周期性などの特徴がキイロショウジョウバエとは異なる。したがってチョウ目昆虫において<i>per</i>が他の昆虫と同様に概日時計の形成に関与しているかどうかは分かっていない。また、これまでいくつかの昆虫において、RNA干渉による時計遺伝子の発現抑制により光周性が失われることが報告されている。これらの昆虫の光周性は、幼虫もしくは成虫休眠に関係するもので、いずれも幼若ホルモンにより制御されている。したがって、時計遺伝子の多面発現として幼若ホルモンの系に作用し、休眠に影響した可能性を完全に排除することはできない。</p> <p>本研究では、カイコガ<i>Bombyx mori</i>に着目した。カイコガは遺伝子編集技術を用いた解析技術が確立されているため、遺伝子レベルの解析が可能であり、羽化と孵化を概日リズムが支配している。また、幼若ホルモンとは異なる休眠ホルモンによって調節される休眠の誘導に光周性が関わることも報告されている。そこで本研究では、カイコガにおいて遺伝子編集技術によって<i>per</i>のノックアウトシステムを作成することにより、これらの問題の解決を試みた。第1章では<i>per</i>が概日時計の形成に関与しているかどうか、第2章では光周性に関与しているかどうかを検証した。</p> <p>第1章においては、休眠をもたないシステムである<i>pnd w-1</i>を用いてTALENにより、<i>per</i>ノックアウトシステムを作成した。元となった<i>pnd w-1</i>において、恒常条件で明瞭な自由継続リズムが羽化と孵化ともに検出された。しかし、<i>per</i>ノックアウトシステムにおいてはこの概日リズムが消失していた。また時計遺伝子の時間的な発現の変化を調べると、ノックアウトシステムでは、<i>pnd w-1</i>で見られていた時間的な変動が失われていることが分かった。</p>			

第2章においては、光周性によって調節された休眠をもつ系統である江浙を用いてTALENにより、*per*ノックアウト系統を作成した。この系統においても行動と遺伝子レベルで概日リズムが消失していることが確かめられた。元となった江浙と*period*ノックアウト系統を卵期20°C恒明におき、幼虫期を25°Cの長日と短日で飼育したところ、江浙は長日では非休眠卵、短日では休眠卵を産下したが、*per*ノックアウト系統は、どちらの光周期でも非休眠卵を産下した。さらに、*per*ノックアウト系統を20°Cの短日で飼育したところ、半数以上の個体が休眠卵を産下した。すなわち、*per*ノックアウト系統は光周性を失っていたが、休眠卵を産むしくみは保持していた。

これらの結果から、カイコガにおいても *per* は概日時計形成に重要な分子であると結論した。また、光周性においても *per* の関わる概日時計が重要な役割を果たすことが明らかになった。

(論文審査の結果の要旨)

季節変化に対応するために、多くの生物が光周性を示す。光周性に概日時計が関与することは古くから指摘されており、現在では広く受け入れられている。しかし、この光周性に関与する概日時計が、行動の概日リズムを調節する時計と同じであるかどうかは明らかではなかった。近年になって、いくつかの昆虫で、時計遺伝子の発現をRNA干渉により抑制すると光周性が失われたことから、「既知の時計遺伝子から構成される概日時計が光周性に関わる」という考えが支持されるようになってきた。しかし、これらの昆虫の光周性が制御する休眠には、いずれも幼若ホルモンが関係していると考えられるため、時計遺伝子のもつ「時計以外の機能」が幼若ホルモンの系に関与していても、同様の結果が得られるという批判があった。カイコガの卵休眠は、幼若ホルモンとは分子も分泌器官もまったく異なる休眠ホルモンによって調節され、母親世代の経験した光周期によって誘導が決定される。本研究は、カイコガにおいて、代表的な時計遺伝子*period* (*per*) を遺伝子編集技術によってノックアウトした系統を作成し、行動の概日リズムおよび卵休眠誘導の光周性を調べたものである。

第1章で申請者は、休眠をもたない*pnd w-1*系統をもとに*per*ノックアウト系統を作成した。この*per*ノックアウト系統においては羽化と孵化に関する概日リズムも、*per*と*timeless* (*tim*) という時計遺伝子発現の日周変動も失われていた。これまでカイコガの属するチョウ目昆虫では、概日時計における*per*の機能が明らかになっていなかったが、カイコガにおいても*per*は行動リズムを支配する概日時計に関与していることが証明された。

第2章で申請者は、幼虫期に長日で飼育されると成虫は非休眠卵を産み、短日で飼育されると休眠卵を産むという光周性を示す江浙系統をもとに*per*ノックアウト系統を作成した。まず、この系統においても羽化と孵化の概日リズムおよび*per*と*tim*の発現の日周変動が消失していることが確かめられた。そして、この系統は短日と長日のいずれで飼育されても非休眠卵のみを産んだ。しかし、より低い温度の短日で飼育されると、半数以上の個体が休眠卵を産んだ。したがって、*per*ノックアウト系統は光周性を失っていたが、休眠卵を生産するしくみを保持していた。これにより、カイコガの光周性において*per*を構成要素としてもつ概日時計が重要な役割を果たすことが明らかになった。以上の結果から申請者は、昆虫全般において、*per*の「時計以外の機能」ではなく、それを構成要素としてもつ概日時計が光周性において重要な役割を果たす可能性が高いと考察している。

さらに、*per*ノックアウト系統においても幼虫の発育期間に短日と長日で差があることから、*per*なしでも見られる光周性の存在が示唆された。また、*tim*の発現は*pnd*

*w-1*をもとにした*per*ノックアウト系統では1日中高いまま、江浙系統をもとにしたものでは低いままという違いが見られた。これらは、これまでの光周性や概日時計の理解だけでは説明がつかない新しい知見である。

本研究によって、昆虫の光周性における、*per*を構成要素としてもつ概日時計の重要な役割が示された結果、昆虫の光周性の分子機構の理解が大きく前進した。この成果は時間生物学分野の今後の発展に大きく寄与すると考えられる。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和3年3月8日に論文内容とそれに関連した口頭試問をおこなった結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降