

ショウジョウバエ求愛行動リズムに影響を
及ぼすミオイノシトールと関連遺伝子の研究

2018年1月

坂田 一樹

ショウジョウバエ求愛行動リズムに影響を
及ぼすミオイノシトールと関連遺伝子の研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士（農学）学位論文

坂田 一樹

目次

第1章 序論

- 第1節 研究背景 1
- 第2節 本研究の目的 5

第2章 過剰量のみオイノシトールによる CP リズムの長周期化

- 第1節 緒言 6
- 第2節 実験方法
 - 2-1 使用したショウジョウバエの系統 8
 - 2-2 ショウジョウバエの飼育 8
 - 2-3 餌の条件 8
 - 2-4 CP リズムアッセイ 9
 - 2-5 統計解析 9
 - 2-6 歩行活動リズム測定 11
- 第3節 結果
 - 3-1 CP リズムと歩行活動リズム 13
- 第4節 考察 15

第3章 ミオイノシトール合成酵素 *Inos* ノックダウン系統の作成

- 第1節 緒言 17
- 第2節 実験方法
 - 2-1 ショウジョウバエ *Inos* 遺伝子ノックダウン系統の作成 20
 - 2-2 使用したショウジョウバエの系統 22
 - 2-3 餌の条件 23
 - 2-4 サンプルリングと RNA 抽出 23
 - 2-5 cDNA 合成 23
 - 2-6 Quantitative RT-PCR 24
 - 2-7 使用したプライマー 24
 - 2-8 統計解析 24
- 第3節 結果
 - 3-1 *Inos* 遺伝子ノックダウン系統の *Inos* mRNA 発現量 25
- 第4節 考察 28

第4章	<i>Inos</i> ノックダウン系統のCPリズム異常	
第1節	緒言	29
第2節	実験方法	
2-1	使用したショウジョウバエの系統	30
2-2	餌の条件	30
2-3	CPリズムアッセイ	30
2-4	歩行活動リズム測定	30
2-5	統計解析	30
2-6	自己相関係数のグラフ	30
第3節	結果	
3-1	CPリズムと歩行活動リズム	31
第4節	考察	38
第5章	総括	
第1節	結論	45
第2節	今後の展望と課題	47
	引用文献	48
	謝辞	53

第 1 章 序論

第1節 研究背景

地球上の多くの生物は、地球の自転周期に依存して様々な生理や行動を示す。その根拠として、生体内には約 24 時間周期で振動する「概日時計」の分子機構が存在する。これまで、概日時計の分子機構はショウジョウバエを用いて先駆的に研究されてきた。現在最も有名な分子機構は、特定のタンパク質の量が 1 日の周期で変動するというものである。ここで特定のタンパク質とは、4 種類の遺伝子 *dClock*、*cyc*、*period*、*timeless* から作られるそれぞれのタンパク質 dCLK、CYC、PER、TIM を指す。まず、dCLK と CYC が二量体を形成する。dCLK/CYC 二量体が *period* および *timeless* の転写調節領域に結合して転写を促進する。作られた PER と TIM タンパク質が二量体を形成する。PER/TIM 二量体が dCLK/CYC 二量体に直接結合して *period* および *timeless* 遺伝子の転写を抑制する(Glossop *et al.*, 2002)。概日時計の分子機構は、キイロショウジョウバエの歩行活動や羽化のリズムを調節する *period* を代表とする複数種類の時計遺伝子を介している(Dunlap., 1999)。また、脳内にリズムミクな行動を司る時計神経が存在すると考えられている。ショウジョウバエでは 5 つの時計神経群に分類されており、DN1、DN2、DN3、LNds、LNvs とそれぞれ名付けられている。これら時計神経とショウジョウバエ歩行活動リズムの関連性はよく調べられている。例えば、歩行活動リズムには DN1s、LNds、LNvs が非常に重要な役割を果たしている(Grima *et al.*, 2004., Stoleru *et al.*, 2004., Stoleru *et al.*, 2005., Picot *et al.*, 2007., Murad *et al.*, 2007.)。特に、LNvs は恒暗条件下で行動のリズム性を維持するために、また明暗条件下で朝方における行動の活性を維持するために重要だと考えられている。それ故に LNvs は Morning cells (M細胞)と名付けられた(Grima *et al.*, 2004., Stoleru *et al.*, 2004.)。一方、LNds といくつ

かの DNs は Evening cells (E 細胞)と名付けられた。これは、LNds が明暗条件下で夕方における行動の活性を維持するために必要であることに由来する(Grima *et al.*, 2004., Stoleru *et al.*, 2004., Stoleru *et al.*, 2005., Picot *et al.*, 2007., Murad *et al.*, 2007.)。ショウジョウバエの概日時計と繁殖行動の間には密接な関係がある(Beaver *et al.*, 2004., Kadener *et al.*, 2006.)。ショウジョウバエのメスがオスと交尾する確率は *period* と *timeless* によって制御されており、交尾行動には概日リズムが存在する(Sakai *et al.*, 2001.)。また、オスとメスを 1 匹ずつ小さな容器に入れて観察すると、お互い 1 匹でいた時とは異なった、しかし 1 日周期の行動を示す(Fujii *et al.*, 2007.)。これは、オスがメスに対して行う求愛行動と密接な関係にあり、1 日当たり雌雄が近接する頻度のリズムとして Close-Proximity (CP) リズムと名付けられた(Fujii *et al.*, 2007.)。

ショウジョウバエのオスは図 1 の B~E の求愛を経て F の交尾に至る(図 1)。先行研究より、オスがメスに近づく求愛行動を利用して、Close-Proximity (CP)リズムアッセイ法が開発された(Fujii *et al.*, 2007)。石田研究室では、CP リズムアッセイ法をもとに、1 ウェル毎に作成した食餌成分培地に、ショウジョウバエのオスとメスを 1 匹ずつ入れ、CP リズムの測定系が開発された(Hamasaka *et al.*, 2010)。ショウジョウバエ脳内における M 細胞を破壊した系統では CP リズムは振動を維持した。しかし、E 細胞を破壊した系統では CP リズムの振動が消失した。このことから、CP リズムの振動発現には、E 細胞中の DN1 神経および NPF ネガティブな LNds 神経が必要であると分かった(Hamasaka *et al.*, 2010)。その後、私の学部時代からの研究によって、CP リズムの振動発現には *period* が必要であり、通常栄養餌から低栄養餌に変えると CP リズムの振幅が減少した事や、低栄養餌に 0.5% アイスプラント粉末を加えた餌で CP リズムの活性が著しく上昇した事(図 2, Sakata *et al.*, 2015)、アイスプラント含有成分として知られるミオイノシトールを低栄養餌に 0.001%, 0.01%, 0.1% ずつ加えた場合、用量依存的な CP リズムの振幅上昇が見られた事などが明らかとなった(図 3, Sakata *et al.*, 2015)。

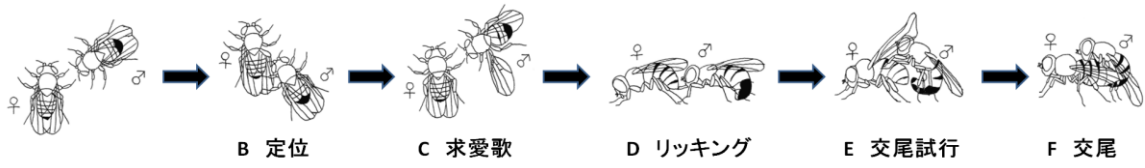


図1. 求愛行動のプロセス

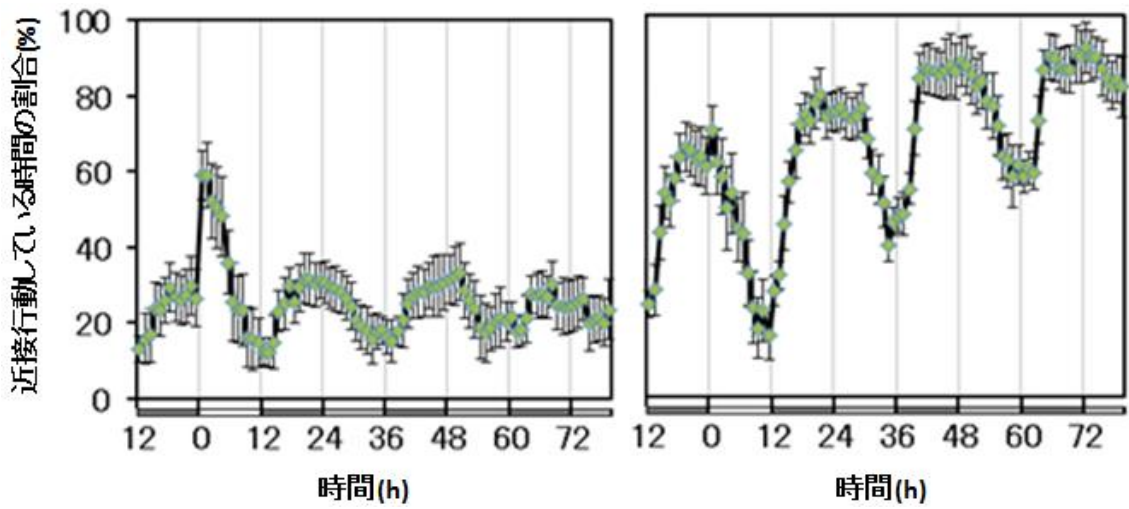


図2. 低栄養餌(左)と0.5%アイスパラント粉末混合餌(右)における野生型ショウジョウバエ Oregon R 系統の CP リズム(Sakata *et al.*, 2015 より引用)

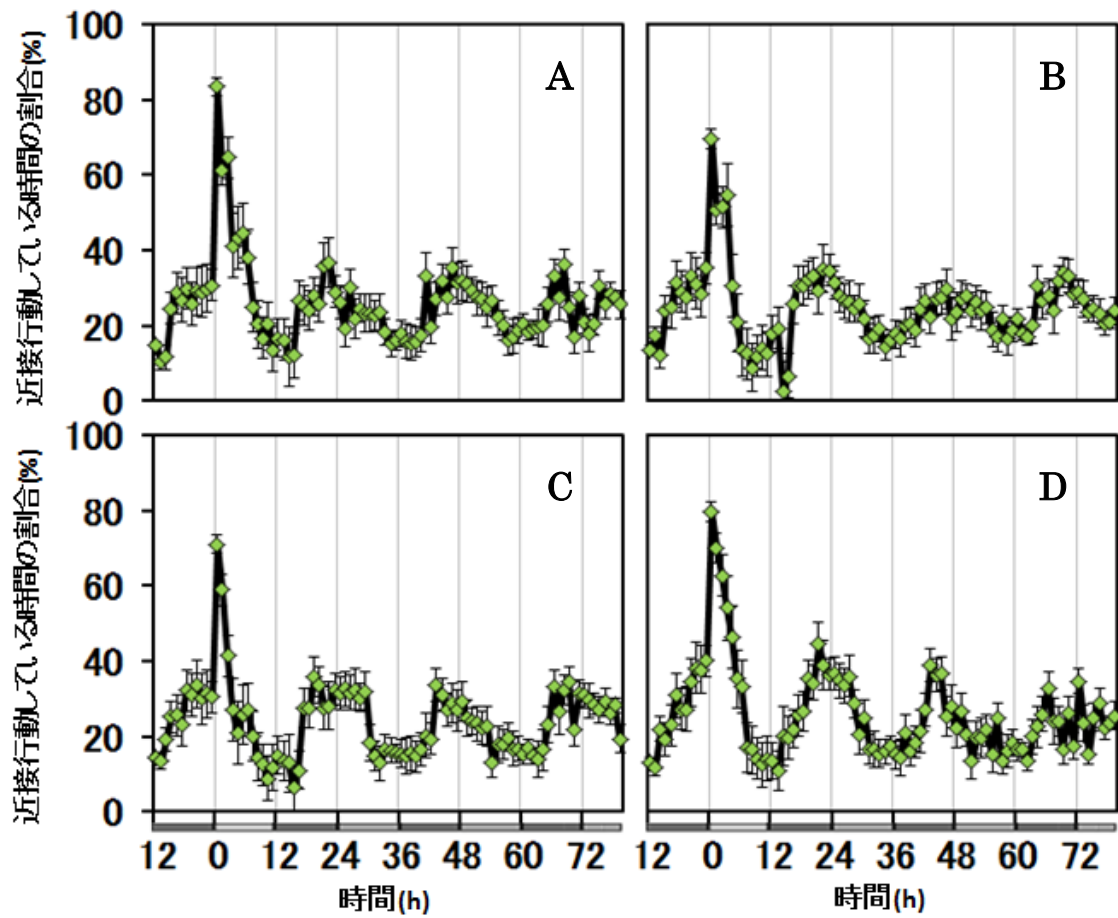


図3. 低栄養餌(A)と 0.001%、0.01%、0.1%ミオイノシトール混合低栄養餌における野生型ショウジョウバエ Oregon R 系統の CP リズム(順に B、C、D) (Sakata *et al.*, 2015 より引用)

第2節 本研究の目的

これまで、CP リズムの振動発現には *period* 遺伝子が必要であり、餌に混ぜた外来性のミオイノシトールが CP リズムの周期長を変動させる事が分かってきた。しかしながら、ミオイノシトールが CP リズムに作用する分子機構については不明のままである。そこで本研究は、内在性のミオイノシトールが作用する CP リズムの分子機構を解明する目的で、ミオイノシトール合成酵素をコードする *Inos* 遺伝子の変異系統を作成し、CP リズム行動の変化を比較した。

先行研究より、ミオイノシトールを 0.001%、0.01%、0.1% ずつ加えた低栄養餌条件下において、CP リズムを用量依存的に短周期化する傾向が見られた。しかし統計学的な有意差は認められず、外来性のミオイノシトールと周期長の変動効果については未知であった。そこで第 2 章では、さらに過剰量のミオイノシトールを用いて、CP リズムを有意に変動させるか否かについて実験を行った。

第 2 章では、外来性のミオイノシトールが CP リズムを有意に長周期化した。しかしながら、この現象は遺伝子レベルにおいて未知であった。内在性のミオイノシトールと概日時計に関連する変異系統を確立することを第 3 章の目的とした。

第 3 章では、*Inos* 遺伝子を RNAi 法で不活性化し、内在性のミオイノシトールと概日時計に関連する変異系統を確立した。しかし、この変異系統は CP リズムの行動レベルでの影響は不明であった。その為、第 4 章では、内在性のミオイノシトールが CP リズムの行動レベルで関与するか否かについて実験を行った。

第2章 過剰量のみオイノシトールによる CP リズムの長周期化

第1節 緒言

オスがメスに近づく求愛行動を利用して、Close-Proximity (CP)リズムアッセイ法が開発された(Fujii *et al.*, 2007)。石田研究室では、CP リズムアッセイ法をもとに、1 ウェル毎に作成した食餌成分培地に、ショウジョウバエのオスとメスを 1 匹ずつ入れ、CP リズムの測定系が開発された(図 4、Hamasaka *et al.*, 2010)。その後 CP リズムの測定系が改良され、石田研究室で小動物サーカディアンリズム自動計測システム(図 5、AutoCircaS)が確立された。先行研究より、通常栄養餌から低栄養餌に変えると CP リズムの振幅が減少した。また、低栄養餌に 0.5% アイスプラント粉末を加えた餌で CP リズムの活性が著しく上昇した(図 2、Sakata *et al.*, 2015)。アイスプラントとは、アフリカに自生する緑色の植物である。葉の表面が凍ったように見えることからアイスプラントと名付けられた。特徴として、アイスプラント中にはカロテンやビタミンなど他の野菜と比べ比較的多くの機能性成分が含まれる。これまでに、筑波大学の根岸らは、高速液体クロマトグラフィーを用いた成分分析により、アイスプラント粉末新鮮重 100g あたりみオイノシトール 3.4mg が含まれている事を明らかにしている(Negishi *et al.*, 2015)。すなわち、0.5%アイスプラント粉末混合低栄養餌には 0.017%のみオイノシトールが含まれている。みオイノシトールはビタミン B 群の 1 つでありうつ病改善のために用いられる(Levine, J., 1997)。みオイノシトールを低栄養餌に 0.001%, 0.01%, 0.1%ずつ加えた所、CP リズムの振幅は用量依存的に上昇した(図 3、Sakata *et al.*, 2015)。また、同様の餌条件下において、CP リズムを用量依存的に短周期化する傾向が見られた(Sakata *et al.*, 2015)。しかし、この結果について統計学的な有意差は認められず、外来性のみオイノシトールと周期長の変動効果については未知であった。そこ

で、さらに過剰量のミオイノシトールが CP リズムを有意に変動させるか否かについて実験を行った。CP リズムはオス 1 個体とメス 1 個体のペアによる 2 個体の概日リズムから成る。その為、1 個体の概日時計に与えるミオイノシトールの効果については不明のままである。そこで、ミオイノシトールが個体の概日時計に影響を及ぼすか否かについて試験する為、歩行活動リズムを測定した(図 6)。過剰量のミオイノシトール餌を入れた 1 本のガラス管にオスを 1 個体ずつ入れ、歩行活動リズムを測定した。

第2節 実験方法

2-1 使用したショウジョウバエの系統

- ・野生型 Oregon R 系統

2-2 ショウジョウバエの飼育

Oregon R 系統のオスとメスを 10 匹ずつ通常栄養餌の入ったバイアルに入れ、12L12D 条件下(12 時間の明条件と 12 時間の暗条件を繰り返すサイクル)で飼育、交配させた。交配開始から 7 日目に親バエをバイアルから取り除き、羽化後 3 日目にあたる子バエを CP リズムや歩行活動リズムの測定に用いた。羽化後 3 日目にあたる個体を CO₂ 麻酔下で回収した。CP リズムの実験では、実験餌の入った 35mm ディッシュ中にオスとメスを 1 個体ずつ入れ、防水スプレーを塗布したプラスチックで蓋をした。歩行活動リズムの実験では、餌を入れたガラス管にオスを 1 個体ずつ入れ、楕円形に丸めた脱脂綿で蓋をした。

2-3 餌の条件

<通常栄養餌>

8%[w/v]コーンミール、5%[w/v]グルコース、5%[w/v]ドライイースト、
0.64%[w/v]寒天、0.5%[v/v]パラオキシ安息香酸ブチル、0.5%[v/v]プロピオン酸

<低栄養餌>

5%[w/v]グルコース、1.5%[w/v]寒天、0.5%[v/v]パラオキシ安息香酸ブチル

<1%, 2%, 4%, 5%, 10%ミオイノシトール混合低栄養餌>

5%[w/v]グルコース、1.5%[w/v]寒天、0.5%[v/v]パラオキシ安息香酸ブチル、

1%(or 2%, 4%, 5%, 10%)[w/v]ミオイノシトール

2-4 CP リズムアッセイ

ショウジョウバエの求愛行動は、図 1 中 B~E のプロセスを経て F の交尾に至る。このプロセスにおいて、オスはメスの近くに位置する。オスがメスに近づく性質を利用して、オスおよびメスの間隔が 5mm 以内に近づいている時を求愛行動とし、5mm 以上の間隔があれば求愛行動していないと定義した。実験の流れを図 4 に示した。通常栄養餌で飼育した羽化後 3 日目のオスとメスを、実験用の餌を加えた 35mm ディッシュ上に 1 匹ずつつがい載せた。天井に CCD カメラを内設したインキュベーターに入れ、測定開始から 2 日間は 12L12D 条件下、3 日目以降は DD 条件下(24 時間の全暗条件)に置いた。CCD カメラを用いてハエの静止画を 10 秒間に 1 枚撮り続け、求愛行動をしていた時間の割合を 1 時間ごとに算出した(図 4)。この装置は後に本研究室と企業の共同研究により製品化に成功した(図 5)。黒のバーは 12D、白のバーは 12L の時間帯を表しており、初日は 12D12L 条件下そして 2 日目以降は DD 条件下で行った。

2-5 統計解析

統計学的な有意差の有無については t 検定を用いた。CP リズムの周期長、歩行活動リズムの周期長におけるそれぞれ生データの数値を t 検定に適用した。

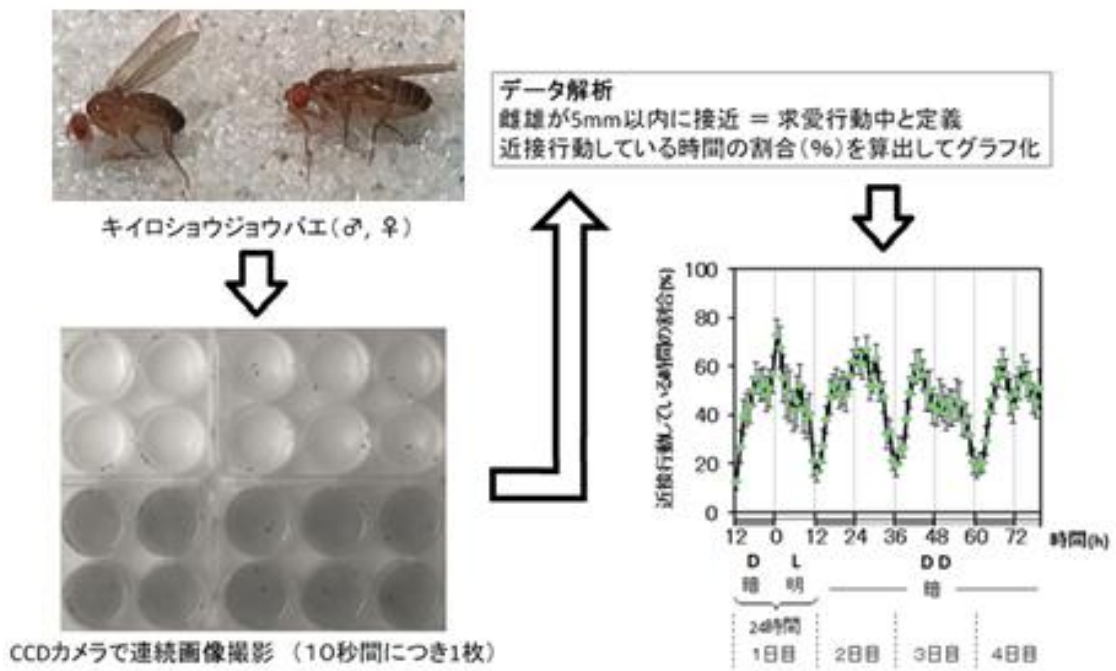


図 4. CP リズムアッセイ法



図 5. 小動物サーカディアンリズム自動計測システム(AutoCircaS)

2-6 歩行活動リズム測定

餌を詰めたガラス管に、羽化後3日目のショウジョウバエオス1匹と脱脂綿を詰めた。図6Aの様に、餌と脱脂綿の隔は2cmに統一した。このガラス管を図6Bの *Drosophila* Activity Monitoring(DAM)プレートに1本ずつセットした。1分間ごとに赤外線を交差した回数を計測した。計測開始から2日間は明暗(LD)条件、3日目以降は恒暗(DD)条件で歩行活動リズムを測定した。

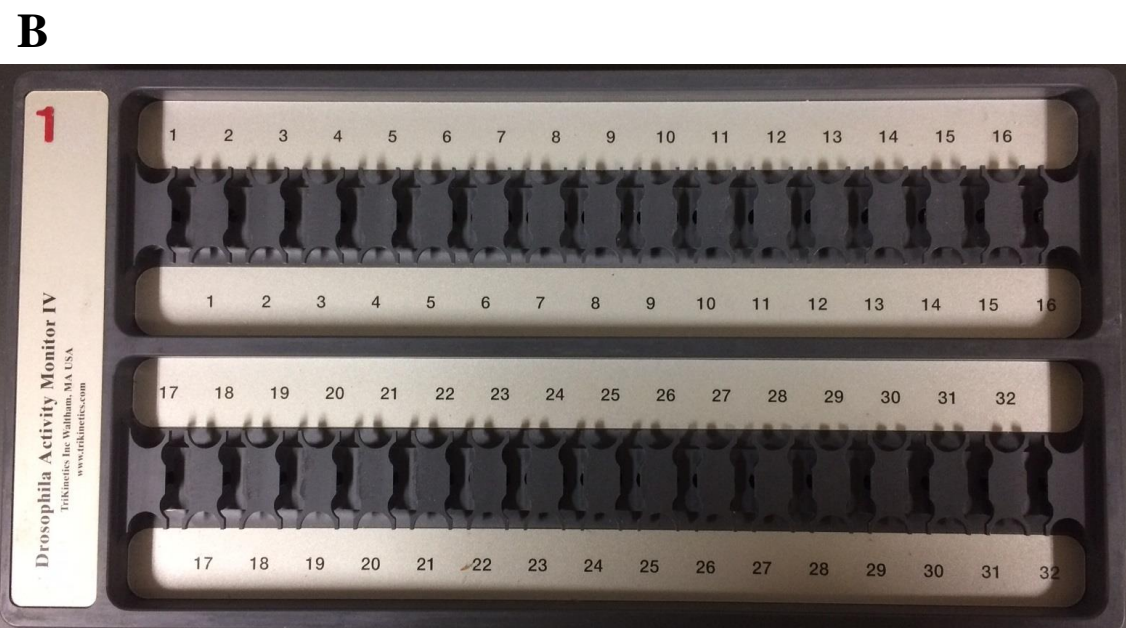
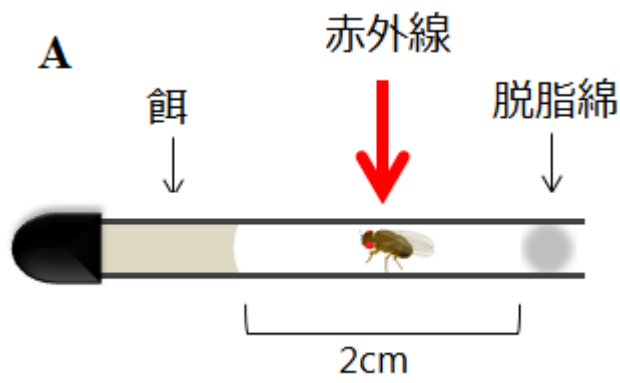


図 6. (A)餌とハエを詰めたガラス管 1 本の模式図 (B)ショウジョウバエ個体の歩行活動リズムを測定する Drosophila Activity Monitoring(DAM)プレート

第3節 結果

3-1 CPリズムと歩行活動リズム

先行研究より、ミオイノシトールを低栄養餌に 0.001%, 0.01%, 0.1% ずつ加えた所、CPリズムの振幅は用量依存的に上昇した(図 3、 Sakata *et al.*, 2015)。また、同様の餌条件下において、CPリズムを用量依存的に短周期化する傾向が見られた(Sakata *et al.*, 2015)。しかし、この結果について統計学的な有意差は認められず、外来性のミオイノシトールと周期長の変動効果については未知であった。そこで、さらに過剰量のミオイノシトールが CPリズムを有意に変動させるか否かについて実験を行った。低栄養餌に 1%、4%、10% ミオイノシトールを加えた結果、DD2 日目の位相が用量依存的に後退した(図 7A、7B、7C、7D における赤色の矢印)。CPリズムの周期長は、フリーソフト gnuplot (<http://www.gnuplot.info/>)を用いてコサイナー法により算出した。コサイナー法とは、時系列データにコサインカーブを最小二乗法でフィッティングさせる事によって周期長を求める方法である。その結果、CPリズムの周期長は低栄養餌で 22.06 時間、1% ミオイノシトール混合餌で 21.66 時間、4% ミオイノシトール混合餌で 24.44 時間、10% ミオイノシトール混合餌で 28.16 時間を示した。4% および 10% ミオイノシトール混合餌において周期長が有意に延長した(図 7E)。過剰量のミオイノシトール餌条件下におけるオスの行動リズムの周期長を測定する為、歩行活動リズムを測定した(図 8)。ポジティブコントロールとして通常栄養餌、ネガティブコントロールとして低栄養餌、2%、5%、10% ミオイノシトールを混合した低栄養餌を作成した。これらの餌を用いて歩行活動リズム測定を行った。その結果、通常栄養餌では 23.67 時間、低栄養餌で 24.80 時間、2% ミオイノシトール混合餌で 25.14 時間、5% ミオイノシトール混合餌で 25.96 時間、10% ミオイノシトール混合餌で 25.72 時間を示した。低栄養餌と比べ 2%、5%、10% ミオイノシトール混合餌で周期長が有意に延長した(図 8)。

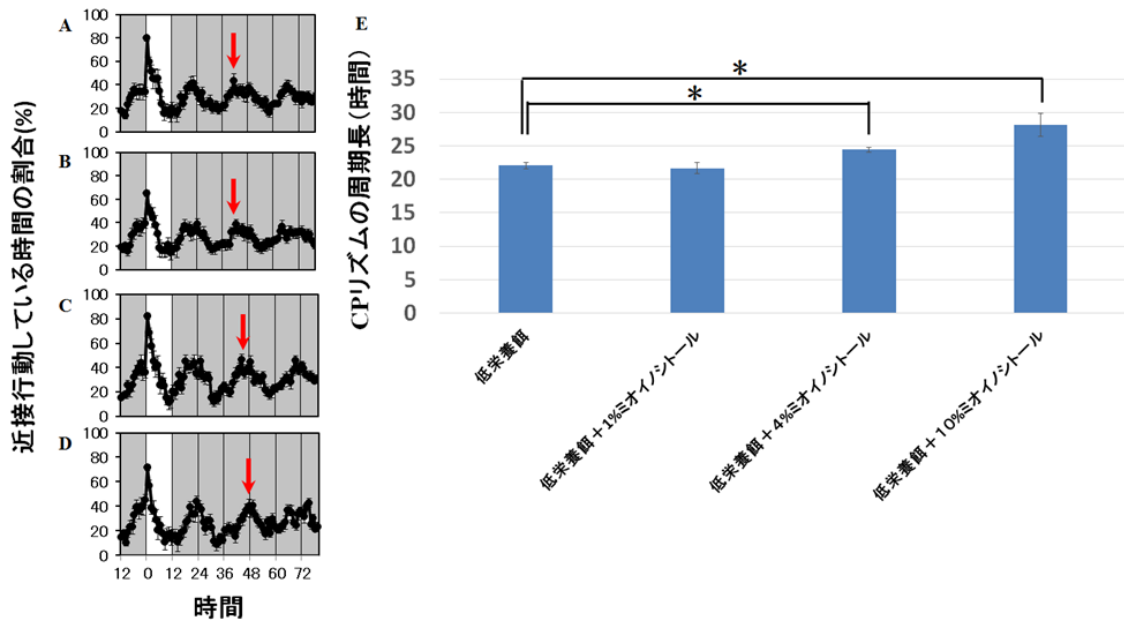


図 7. (A)低栄養餌および(B、C、D)1%、4%、10%ミオイノシトール混合低栄養餌における野生型 Oregon R 系統の CP リズムと周期長のグラフ
error bar は各系統 5 ペアの 1 時間あたりの平均活性値に対する標準偏差を表す。周期長のグラフにおける*は $P < 0.05$ を示し、error bar は標準偏差を表す。

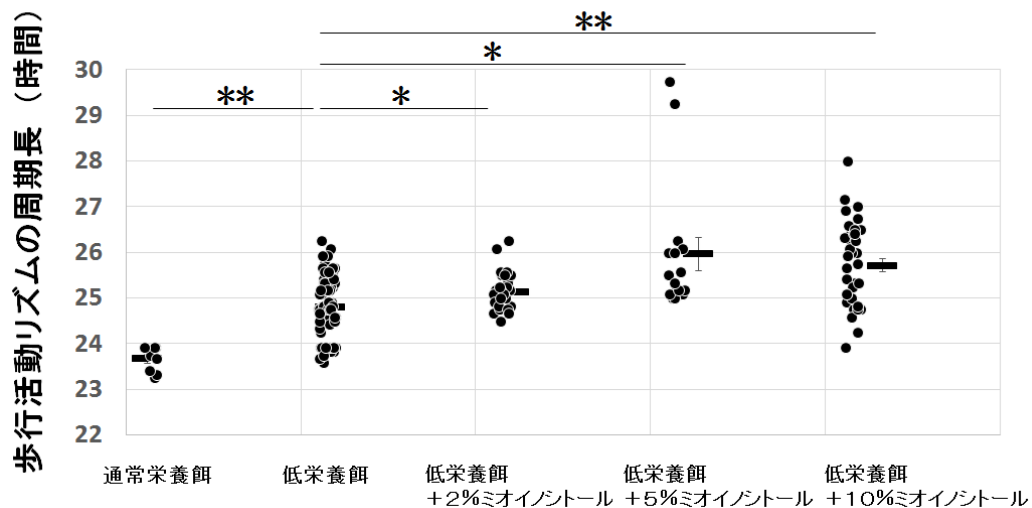


図 8. 通常栄養餌、低栄養餌、2%、5%、10%ミオイノシトール混合低栄養餌における野生型 Oregon R 系統の歩行活動リズム
(*は $P < 0.01$ 、**は $P < 0.001$ を示す。error bar は標準偏差を表す)。

第4節 考察

これまでの研究では、ミオイノシトールを低栄養餌に 0.001%, 0.01%, 0.1%ずつ加えた場合、CP リズムを用量依存的に短周期化する傾向が見られた(Sakata *et al.*, 2015)。しかしながら、外来性のミオイノシトールは周期長を有意に変動しなかった。そこで、さらに過剰量のミオイノシトール場合に、CP リズムが有意に変動するか否かについて実験を行った。その結果、4%および 10%ミオイノシトール混合餌における CP リズムの周期長は有意に延長した(図 7E)。先行研究より、ミオイノシトールは、多嚢胞性卵巣症候群(polycystic ovary syndrome: PCOS)という女性の排卵障害に効果を示す事が知られている。PCOS の特徴の 1 つに、卵胞の形成に伴う血液中の男性ホルモン(テストステロン)の上昇があり、多毛、にきび、低音声などの男性化の症状を引き起こす。PCOS の患者に対しミオイノシトールを服用した結果、PCOS 群のテストステロンが低下した(Unfer *et al.*, 2017)。仮に、ミオイノシトールがショウジョウバエのテストステロンを減少させるならば、過剰量のミオイノシトールを摂取する事によって、オスの体内でテストステロンが減少し、結果として CP リズムを延長した可能性が考えられた。

CP リズムはオス 1 個体とメス 1 個体のペアによる 2 個体の概日リズムから成る。その為、1 個体の概日時計に与えるミオイノシトールの効果については不明のままである。そこで、ミオイノシトールが個体の概日時計に影響を及ぼすか否かについて試験する為、歩行活動リズムを測定した。ポジティブコントロールとして通常栄養餌、ネガティブコントロールとして低栄養餌、2%、5%、10%ミオイノシトールを混合した低栄養餌を用いた。その結果、通常栄養餌と比べて低栄養餌で有意に周期長が延長した。この結果より、通常栄養餌から低栄養の低い餌に変えると、オスの歩行活動リズムの周期長が延長する可能性が考えられた。坂田らの研究により、野生型 Oregon R 系統ショウジョウバエの CP リズムは、通常栄養餌と低栄養餌の間で周期長の違いは見られなかった(Sakata *et al.*, 2015)。この事から、ショウジョウバエにおける歩行活動リズムの周期長は餌の栄養価に依存するが、CP リズムの周期長は餌の栄養価に依存しない事が示唆された。また、低栄養餌と比べて 2%および 5%、10%ミオイノシトール混合餌で周期

長が有意に延長した(図 8)。この結果より、外来性のミオイノシトールはオスショウジョウバエ 1 個体の概日時計に影響を及ぼす事が示唆された。本研究で用いた低栄養餌は 5%グルコースが主成分であった。先行研究より、ATP 依存的なイオンポンプの働きによって、遊離したイノシトールは能動的に腸壁を通過する。しかし、グルコースによってこの過程が抑制され得る。循環する遊離イノシトールは、膜結合性の塩濃度依存的なイノシトール共輸送体によって、多くの組織中に取り込まれる(Papaleo *et al.*, 2009)。よって、ショウジョウバエが体内で吸収したミオイノシトールの量は、低栄養餌中のグルコースによって抑制され得る可能性が考えられた。

第3章 ミオイノシトール合成酵素 *Inos* ノックダウン系統の作成

第1節 緒言

第2章では、外来性のミオイノシトールがCPリズムに影響を及ぼした。しかしながら、分子機構のレベルにおいて未知である。分子機構に関わる遺伝子を把握するため、まず、ショウジョウバエにおいて内在性のミオイノシトール合成に関わる遺伝子をピックアップした。これまでに、ミオイノシトール-1-リン酸合成酵素 *Inos* 遺伝子をノックダウンする事によって、ショウジョウバエオスの単体の歩行活動量が夕方頃に増加することが報告されている(Fu *et al.*, 2012)。第2章結果より、外来性のミオイノシトールは歩行活動およびCPリズムに影響を及ぼした。この事から、*Inos*がCPリズム分子機構に影響し得ると予想した。*Inos*はミオイノシトール-1-リン酸合成酵素をコードする遺伝子である。イノシトールリン酸代謝経路において、*Inos*が外来性のグルコース-6-リン酸をミオイノシトール-1-リン酸に変換する。その後、ミオイノシトールモノホスファターゼがミオイノシトール-1-リン酸をミオイノシトールに変換する(図9)。次に、ショウジョウバエのCPリズムと歩行活動リズムに関わりそうな遺伝子をピックアップした。先行研究より、*period*はCPリズムの振動発現に必要な遺伝子であり(Sakata *et al.*, 2015)、*neuropeptide F*はショウジョウバエオスの求愛行動率の制御に必要な遺伝子であることが知られている(Lee *et al.*, 2006)。この事から、*period*と*neuropeptide F*がCPリズム分子機構に影響すると予想した。また、*period*は交尾経験の長期記憶形成に必要であり(Sakai *et al.*, 2004)、*armadillo*遺伝子が嗅覚の長期記憶形成に必要である事が知られている(Tan *et al.*, 2013)。*period*についてはオスの求愛行動量を調節する(Sakai *et al.*, 2004)が、*armadillo*がオスの求愛行動量を調節する事は現在まだ報告されていない。しかし、嗅覚はオスの求愛行動の対象がメスである事を認識する際に必要

である(Tachibana *et al.*, 2015)。このことから、*armadillo*が CP リズム分子機構に影響すると予想した。そこで第3章では、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F*それぞれを発現する細胞中で *Inos* をノックダウンした系統を作成した。*Inos* ノックダウン系統確立の判定には、Quantitative RT-PCR 法を用いて、*Inos* mRNA 発現量をコントロール系統と比較した。

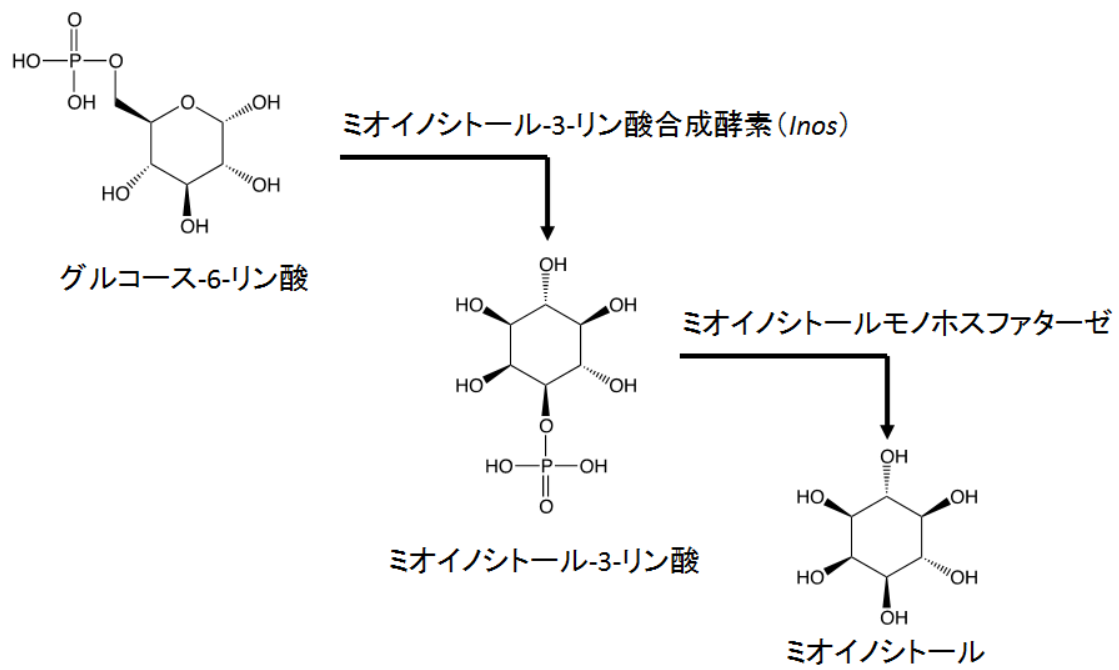


図 9. ミオイノシトール合成の代謝経路

第2節 実験方法

2-1 ショウジョウバエ *Inos* 遺伝子ノックダウン系統の作成

RNAi 法を用いて、*period*、*neuropeptide F* 特異的な *Inos* ノックダウン系統を作成した(図 11)。*Inos* ノックダウン系統の作成には GAL4/UAS システムを用いた。GAL4/UAS システムとは、転写因子 GAL4 がその認識配列 UAS に結合する事で、UAS 下流の構造遺伝子が発現される仕組みである。系統の作成には、任意の遺伝子プロモーターに GAL4 を配置した Gal4 ドライバー系統と、UAS 下流に任意の構造遺伝子を配置した UAS レスポンダー系統を掛け合わせる。例として、*armadillo*-Gal4 系統と UAS-RNAi *Inos* かつ UAS-RNAi *Inos* を両方もった系統を交配させる事によって、*armadillo*-Gal4 :UAS RNAi -*Inos* -*dicer2* 系統を作成した。*Inos* ノックダウン系統の作成にあたり、まず、汎用性のあるレスポンス系統 A を作成した。この系統 A と各種 Gal4 ドライバー系統 *armadillo*-Gal4、*period*-Gal4、*neuropeptide F*-Gal4 を掛け合わせる事によって、*armadillo*-Gal4 :UAS RNAi -*Inos* -*dicer2* 系統、*period*-Gal4 :UAS RNAi -*Inos* -*dicer2* 系統そして *neuropeptide F*-Gal4 :UAS RNAi -*Inos* -*dicer2* 系統を作成した(図 10)。

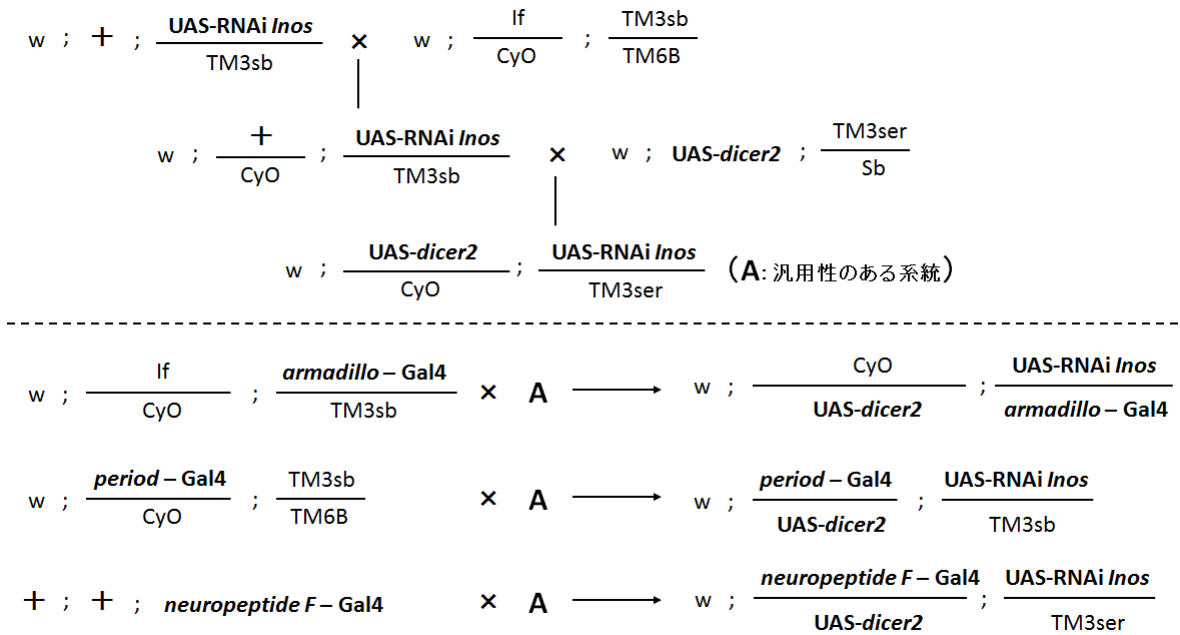


図 10. *Inos* 遺伝子ノックダウン系統の作成手順

＋は正常、TM3sb と TM6B はバランサー、If、CyO、Sb はマーカー、*dicer2* は RNA 切断酵素をそれぞれ表している。

2-2 使用したショウジョウバエの系統

< *armadillo*-Gal4 :UAS RNAi -*Inos* -*dicer2* 系統とコントロール系統 上段は遺伝型、
()内は略称 >

- w ; CyO / UAS-*dicer2* ; UAS-RNAi *Inos* / *armadillo*-Gal4
(*armadillo*-Gal4 : UAS -RNAi *Inos* -*dicer2* 系統)
- w ; If / CyO ; *armadillo*-Gal4 / TM3sb (*armadillo*-Gal4 系統)
- w ; UAS-*dicer2* / CyO ; UAS-RNAi *Inos* / TM3ser
(UAS -RNAi *Inos* -*dicer2* 系統)

< *period*-Gal4 :UAS RNAi -*Inos* -*dicer2* 系統とコントロール系統 上段は遺伝型、()内は略称 >

- w ; *period*-Gal4 / UAS-*dicer2* ; UAS-RNAi *Inos* / TM3sb
(*period*-Gal4 : UAS -RNAi *Inos* -*dicer2* 系統)
- w ; *period*-Gal4 / CyO ; TM3sb / TM6B (*period*-Gal4 系統)
- w ; UAS-*dicer2* / CyO ; UAS-RNAi *Inos* / TM3ser
(UAS -RNAi *Inos* -*dicer2*)

< *neuropeptide F*-Gal4 :UAS RNAi -*Inos* -*dicer2* 系統とコントロール系統 上段は遺
伝型、()内は略称 >

- w ; *neuropeptide F*-Gal4 / UAS-*dicer2* ; UAS-RNAi *Inos* / TM3ser
(*neuropeptide F*-Gal4 : UAS -RNAi *Inos* -*dicer2* 系統)
- + ; + ; *neuropeptide F*-Gal4 (*neuropeptide F*-Gal4 系統)
- w ; UAS-*dicer2* / CyO ; UAS-RNAi *Inos* / TM3ser
(UAS -RNAi *Inos* -*dicer2*)

2-3 餌の条件

<通常餌>

8%[w/v]コーンミール、5%[w/v]グルコース、5%[w/v]ドライイースト、
0.64%[w/v]寒天、0.5%[v/v]パラオキシ安息香酸ブチル、0.5%[v/v]プロピオン酸

2-4 サンプルングと RNA 抽出

通常栄養餌入りのバイアル上で飼育し、羽化後 5 日目の各 *Inos* ノックダウン系統とそのコントロール系統のオスを CO₂ 麻酔下で ZT2 に回収した。回収したオスを、速やかに 100μl TRIzol(Life Technologies, US)入り 1.5mm チューブに移した。その後ペッスルでよく粉砕し 4℃で保存した。サンプルに含まれる total RNA は、100μl TRIzol 試薬を用いて抽出した。常温で 5 分間置いてから、1 サンプルあたり 20μl クロロホルムを加え、15 秒間攪拌してから常温で 3 分間置いた。その後 4℃ 12,000g で 15 分間遠心分離した。分離した後の上清を別の新しいチューブに移し、50μl イソプロパノールを加えて攪拌した。常温で 10 分間置いてから再び 4℃ 12,000g で 15 分間遠心分離した。上清を捨て、70%エタノールを 500μl ずつ加えてリンスした後、4℃ 7,500g で 5 分間遠心分離した。エタノールを除去して、サンプルチューブの蓋を空け、沈殿物が白くなるまで乾燥させ、1 サンプルあたり 100μl RNase-free water を加えた。

2-5 cDNA 合成

分光光度計(NanoDrop ND-1000)を用いて total RNA の濃度を測定した。測定した RNA の濃度から必要な水の量を計算し、別の新しいチューブに、1 サンプルあたり RNA 水溶液 6.5μl と cDNA 合成試薬(PrimeScript RT Master Mix, TaKaRa)3.5μl を加えた。その後、PCR(37℃で 15 分間、85℃で 5 秒間、4℃で冷却)により、cDNA を合成した。

2-6 Quantitative RT-PCR

cDNA サンプルをチューブごとに 10 倍希釈した溶液 4.6 μ l に、5 μ l Master Mix (FastStrat Essential DNA Green Master, Roche) と、各プライマー(Forward および Reverse)を 0.2 μ l ずつ加え、総量が 10 μ l となるように調製した。攪拌してスピンドウンした後、Light Cycler Nano(Roche)を用いて cDNA を増幅させることにより各遺伝子の mRNA 量を定量した。

2-7 使用したプライマー

使用したプライマーの配列を次に示した。インターナルコントロールとして RpL32 を用いた。

遺伝子名		プライマー配列
RpL32	FW	AGATCGTGAAGAAGCGCACCAAG
	RW	CACCAGGAACTTCTTGAATCCGG
<i>Inos</i>	FW	TTTTCAATTGCCGGCGATG
	RW	TGTA ACTGGCAATGGACACCG

2-8 統計解析

統計学的な有意差の有無については *t* 検定を用いた。*Inos* mRNA 発現量の生データの数値を *t* 検定に適用した。

第3節 結果

3-1 *Inos* 遺伝子ノックダウン系統の *Inos* mRNA 発現量

第2章結果より、外来性のミオイノシトールが CP リズムに影響を及ぼした。しかしながら、分子機構のレベルにおいて未知である。そこで分子機構に関わる遺伝子をピックアップした。これまでに、ミオイノシトール-1-リン酸合成酵素 *Inos* 遺伝子をノックダウンする事によって、ショウジョウバエオス単体の歩行活動量が夕方頃に増加することが報告されている(Fu *et al.*, 2012)。第2章結果より、外来性のミオイノシトールは歩行活動および CP リズムに影響を及ぼした。この事から、*Inos* が CP リズム分子機構に影響し得ると予想した。先行研究より、*period* は CP リズムの振動発現に必要な遺伝子であり(Sakata *et al.*, 2015)、*neuropeptide F* はショウジョウバエオスの求愛行動率の制御に必要な遺伝子であることが知られている(Lee *et al.*, 2006)。この事から、*period* と *neuropeptide F* が CP リズム分子機構に影響すると予想した。また、*period* は交尾経験の長期記憶形成に必要であり(Sakai *et al.*, 2004)、*armadillo* 遺伝子が嗅覚の長期記憶形成に必要である事が知られている(Tan *et al.*, 2013)。*period* についてはオスの求愛行動量を調節する(Sakai *et al.*, 2004)が、*armadillo* がオスの求愛行動量を調節する事は現在まだ報告されていない。しかし、嗅覚はオスの求愛行動の対象がメスであることを認識する際に必要である(Tachibana *et al.*, 2015)。この事から、*armadillo* が CP リズム分子機構に影響すると予想した。以上の理由から、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F* それぞれを発現する細胞中で *Inos* をノックダウンした系統の作成を試みた。その結果、コントロール系統(UAS-RNAi *Inos* -*dicer2* および *armadillo*-Gal4)と比べて *armadillo*-Gal4 : UAS-RNAi *Inos* -*dicer2* 系統で *Inos* mRNA 発現量は有意に減少した(図 11)。また、コントロール系統(UAS-RNAi *Inos* -*dicer2* および *period*-Gal4)と比べて *period*-Gal4 : UAS-RNAi *Inos* -*dicer2* 系統で *Inos* mRNA 発現量は有意に減少した(図 12)。また、コントロール系統(UAS-RNAi *Inos* -*dicer2* および *neuropeptide F*-Gal4)と比べて *neuropeptide F*-Gal4 : UAS-RNAi *Inos* -*dicer2* 系統で *Inos* mRNA 発現量は有意に減少した(図 13)。

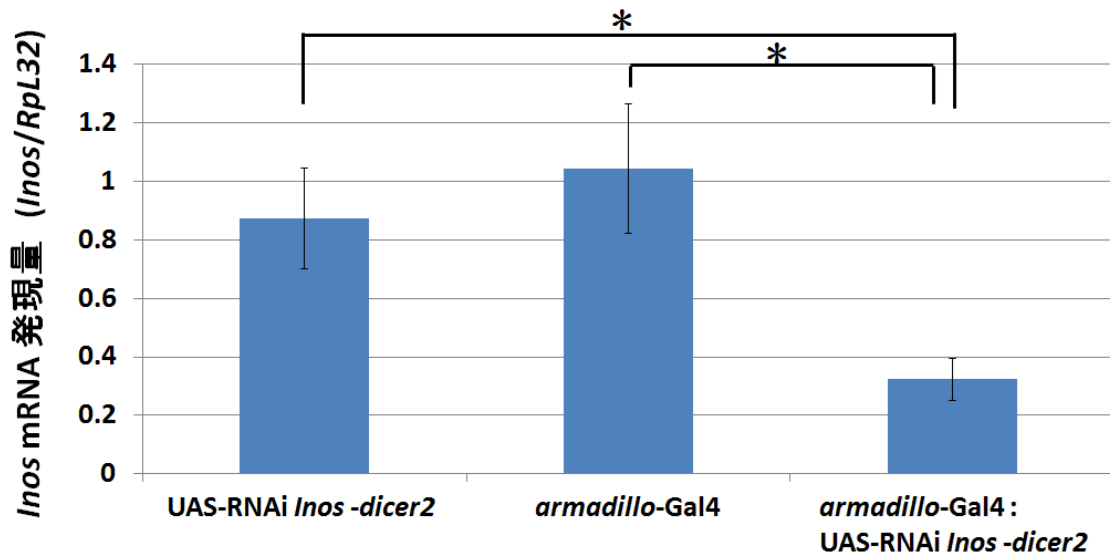


図 11. *armadillo-Gal4*:UAS RNAi-*Inos-dicer2* 系統の *Inos* mRNA 発現量
 (*は P<0.001 を示す。error bar は標準偏差を表す。)

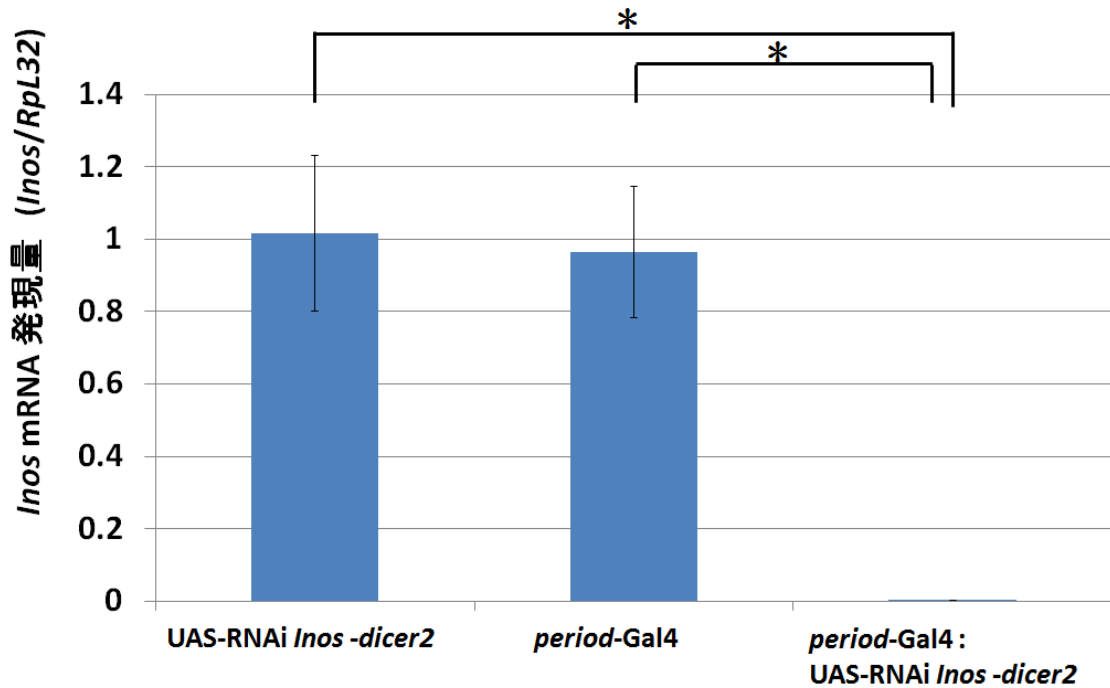


図 12. *period-Gal4*:UAS RNAi-*Inos-dicer2* 系統の *Inos* mRNA 発現量
 (*は P<0.001 を示す。error bar は標準偏差を表す。)

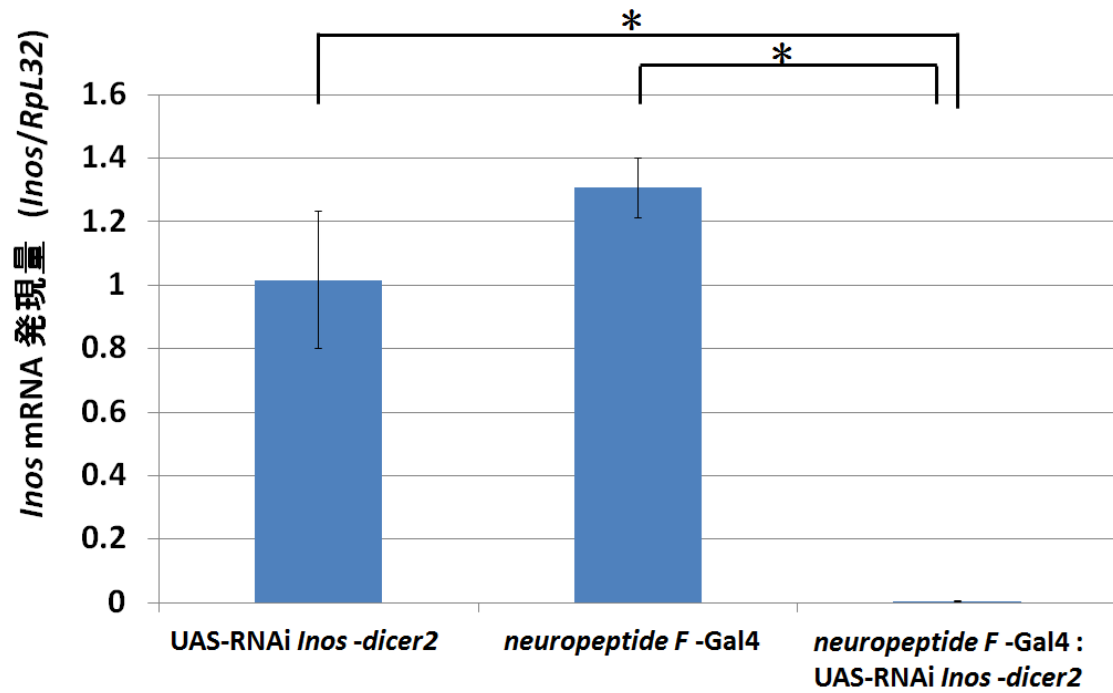


図 13. *neuropeptide F-Gal4 :UAS RNAi -Inos-dicer2* 系統の *Inos* mRNA 発現量 (*は $P < 0.001$ を示す。error bar は標準偏差を表す。)

第4節 考察

第2章結果より、外来性のミオイノシトールがCPリズムに影響を及ぼした。しかしながら、分子機構のレベルにおいて未知である。そこで分子機構に関わる遺伝子をピックアップし、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F*がCPリズム分子機構に影響すると予想した。次に、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F*それぞれを発現する細胞中で*Inos*をノックダウンした系統の作成を試みた。その結果、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F*特異的に*Inos* mRNAを抑制した系統では、それぞれのコントロールGal4ドライバー系統およびUASレスポンドナー系統に比べて、*Inos* mRNA発現量が有意に減少した(図11、12、13)。ショウジョウバエのデータベースFlyBaseを用いて、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F*の発現箇所を調べた。その結果、*armadillo*は頭部と脳内、心臓、脂肪体、精巣及び卵巣などで発現し、*period*は頭部や脳内、心臓、脂肪体で発現する。*neuropeptide F*は脳内においてのみ発現する事が分かった。よって、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F*の共通発現領域はショウジョウバエの脳内であると推測された。我々の研究より*period*はCPリズムの振動発現に必要な遺伝子であり(Sakata *et al.*, 2015)、先行研究により*neuropeptide F*はショウジョウバエオスの求愛行動率の制御に必要な遺伝子であることが知られている(Lee *et al.*, 2006)。また、*armadillo*は嗅覚の長期記憶形成に必要であり(Tan *et al.*, 2013)、嗅覚はオスがメスを認識して求愛行動を起こすのに必要である(Tachibana *et al.*, 2015)。今回作成した*Inos*ノックダウン系統における*Inos* mRNA発現量の有意な減少が、これらの機能やCPリズム分子機構に影響を及ぼす可能性が考えられた。

第4章 *Inos* ノックダウン系統の CP リズム異常

第1節 緒言

第2章結果より、外来性のミオイノシトールが CP リズムに影響を及ぼした。しかしながら、分子機構のレベルにおいて未知であった。そこで分子機構に関わる遺伝子をピックアップし、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F*が CP リズム分子機構に影響すると予想した。第3章では、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F*それぞれを発現する細胞中で *Inos* をノックダウンした系統の作成をした。その結果、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F*特異的に *Inos* mRNA を抑制した系統では、それぞれのコントロール Gal4 ドライバー系統および UAS レスポンダー系統に比べて、*Inos* mRNA 発現量が有意に減少した。先行研究より、*period* は CP リズムの振動発現に必要な遺伝子であり (Sakata *et al.*, 2015)、*neuropeptide F*はショウジョウバエオスの求愛行動率の制御に必要な遺伝子であることが知られている (Lee *et al.*, 2006)。また、*armadillo*は嗅覚の長期記憶形成に必要であり (Tan *et al.*, 2013)、嗅覚はオスがメスを認識して求愛行動を起こすのに必要である (Tachibana *et al.*, 2015)。今回作成した *Inos* ノックダウン系統における *Inos* mRNA 発現量の有意な減少が、これらの機能や CP リズム分子機構に影響を及ぼし得ると考えた。

第2節 実験方法

2-1 使用したショウジョウバエの系統

第3章第2節2-2と同様の系統を使用した。

2-2 餌の条件

第2章第2節2-3に記載の〈通常栄養餌〉と同様の餌を使用した。

2-3 CPリズムアッセイ

第2章第2節2-4と同様の方法で実験を行った。

2-4 歩行活動リズム測定

第2章第2節2-6と同様の方法で実験を行った。

2-5 統計解析

統計学的な有意差の有無については t 検定を用いた。歩行活動リズムの周期長における生データの数値を t 検定に適用した。

2-6 自己相関係数

CPリズムの概日ピークは、自己相関(CORREL関数)解析を用いて決定した(Levine *et al.*, 2002)。

第3節 結果

3-1 CPリズムと歩行活動リズム

第3章では、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F*特異的な *Inos* ノックダウンシステムを作成した。しかしながら、内在性のミオイノシトールが、CPリズムおよび概日時計の分子機構に与える影響については未知であった。そこで、*Inos* ノックダウンシステムがCPリズムの周期長を変動させるか否かについて実験を行った。コントロールシステム UAS-RNAi *Inos* -*dicer2* (A) および *armadillo*-Gal4(B) に比べて *armadillo*-Gal4 : UAS-RNAi *Inos* -*dicer2* (C) では CPリズムの概日ピークが消失した(図 14)。また、コントロールシステム UAS-RNAi *Inos* -*dicer2* (A) および *period*-Gal4 (B) に比べて *period*-Gal4 : UAS-RNAi *Inos* -*dicer2* (C) では CPリズムの概日ピークが消失した(図 15)。また、コントロールシステム UAS-RNAi *Inos* -*dicer2* (A) および *neuropeptide F*-Gal4 (B) に比べて *neuropeptide F*-Gal4 : UAS-RNAi *Inos* -*dicer2* (C) では CPリズムの概日ピークが消失した(図 16)。この結果より、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F* が発現する領域中の *Inos* が CPリズムの振動発現に必要である事が示唆された。CPリズムはオス 1 個体とメス 1 個体のペアによる 2 個体の概日リズムから成る。その為、1 個体の概日時計に与えるミオイノシトールの効果については不明のままである。そこで、*Inos* ノックダウンシステムが個体の概日時計に影響を及ぼすか否かについて試験する為、歩行活動リズムを測定した。コントロールシステム UAS-RNAi *Inos* -*dicer2* および *armadillo*-Gal4 の歩行活動リズムの周期長と、*armadillo*-Gal4 : UAS-RNAi *Inos* -*dicer2* システムの歩行活動リズムの周期長との間に有意差はなく、*armadillo*-Gal4 : UAS-RNAi *Inos* -*dicer2* システムは概日リズムを示した(図 17)。また、コントロールシステム UAS-RNAi *Inos* -*dicer2* および *period*-Gal4 の歩行活動リズムの周期長と、*period*-Gal4 : UAS-RNAi *Inos* -*dicer2* システムの歩行活動リズムの周期長との間に有意差はなく、*period*-Gal4 : UAS-RNAi *Inos* -*dicer2* システムも

概日リズムを示した(図 18)。さらに、コントロール系統 UAS -RNAi *Inos* -*dicer2* および *neuropeptide F*-Gal4 の歩行活動リズムの周期長と、*neuropeptide F*²-Gal4 : UAS -RNAi *Inos* -*dicer2* 系統の歩行活動リズムの周期長との間にも有意差はなく、*neuropeptide F*²-Gal4 : UAS -RNAi *Inos* -*dicer2* 系統も概日リズムを示した(図 19)。これらの結果より、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F* が発現する領域中の *Inos* は歩行活動リズムの振動発現に必須でない事が示唆された。よって、*Inos* は CP リズムの分子機構に影響を及ぼすが、オス個体の概日時計の分子機構には影響を及ぼさなかった。

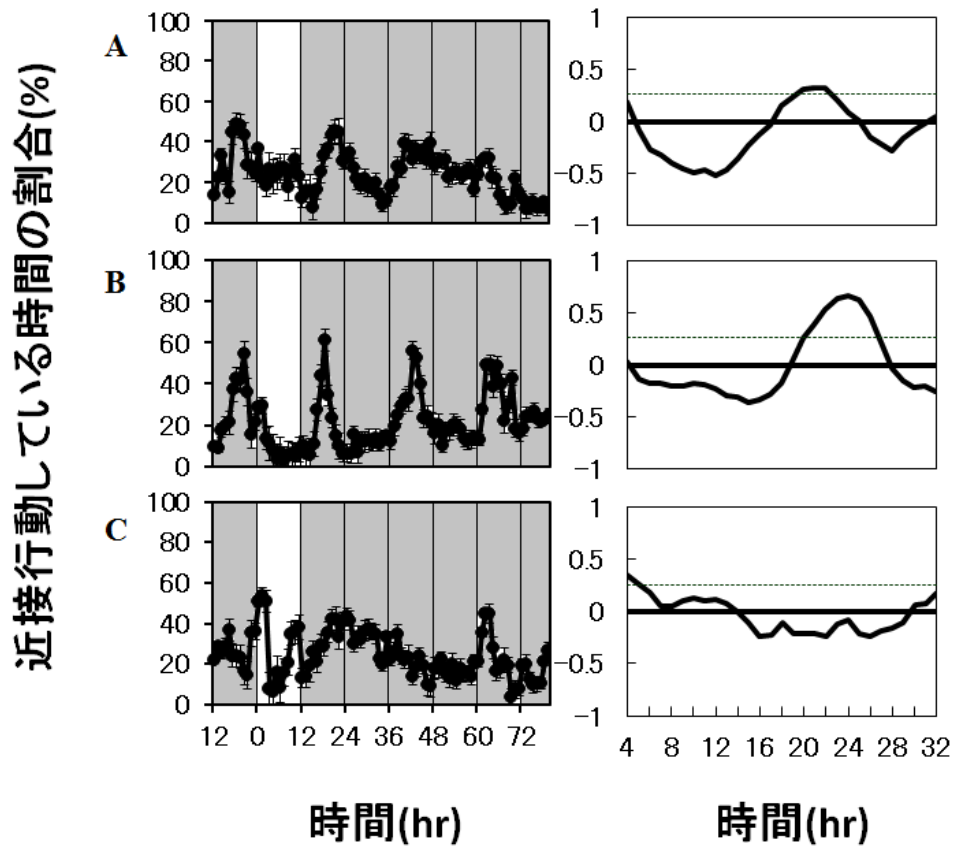


図 14. (A)UAS RNAi -*Inos* -*dicer2*, (B)*armadillo*-Gal4, (C)*armadillo*-Gal4 :UAS RNAi -*Inos* -*dicer2*系統の CP リズム

error bar は各系統 5 ペアの 1 時間あたりの平均活性値に対する標準偏差を表す。自己相関係数のグラフを CP リズムの右側に示している。CP リズムにおける DD1 の活性の積分値に対する DD2 の活性の積分値の相関度を表しており、相関係数が 1 に近い程正の相関を示している。仮に、DD1 の活性の積分値が、24 時間経過後の DD2 の活性の積分値に近いほど相関係数は 1 を示し、概日ピークが検出される。

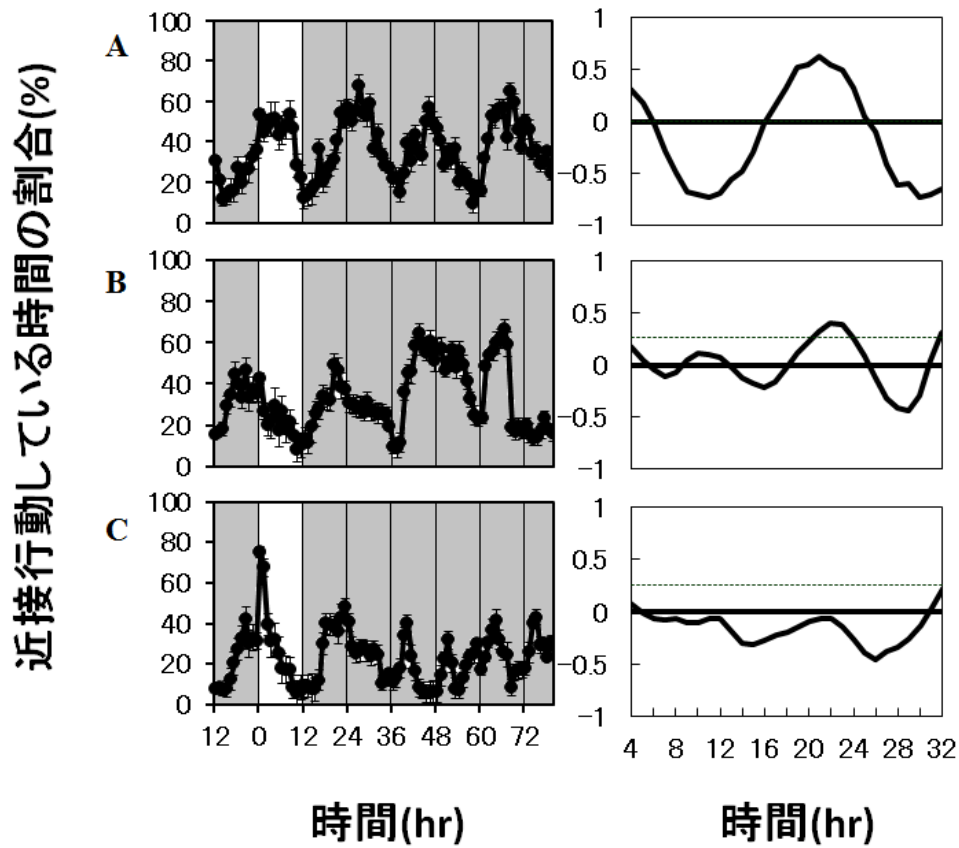


図 15. (A)UAS RNAi -*Inos-dicer2*, (B)*period-Gal4*, (C)*period-Gal4 :UAS RNAi -Inos-dicer2*系統の CP リズム

error bar は各系統 5 ペアの 1 時間あたりの平均活性値に対する標準偏差を表す。自己相関係数のグラフを CP リズムの右側に示している。

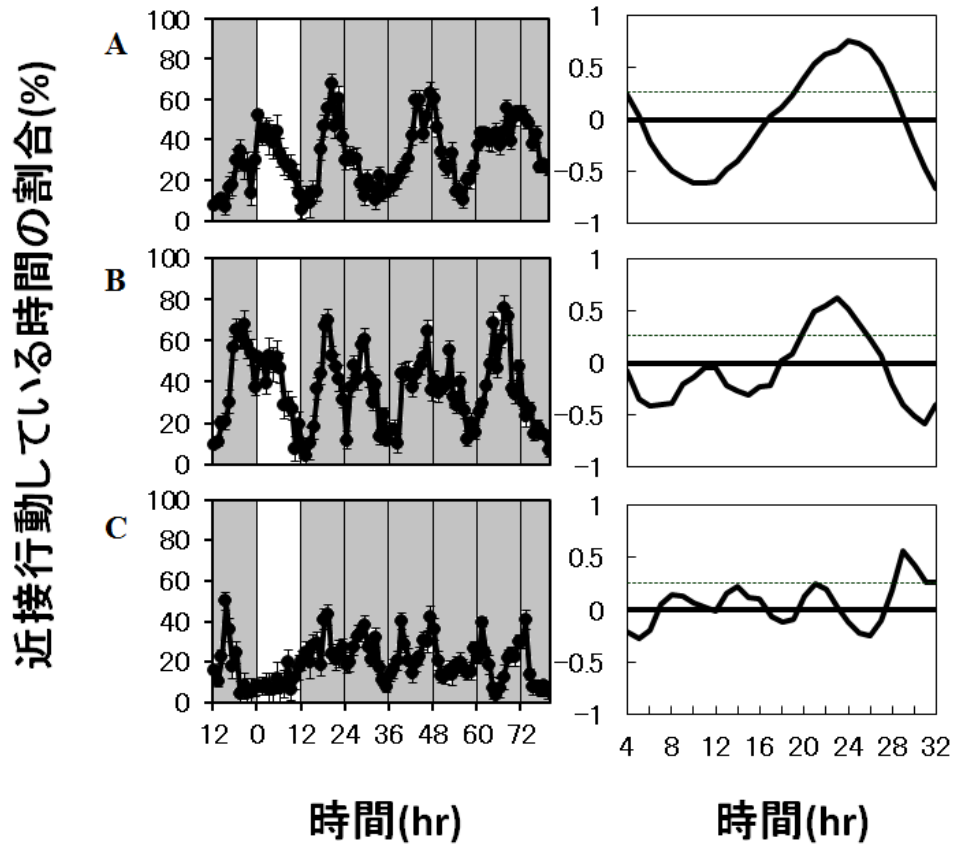


図 16. (A)UAS RNAi -*Inos-dicer2*、(B)*neuropeptide F*-Gal4、(C)*neuropeptide F*-Gal4 :UAS RNAi -*Inos-dicer2* 系統の CP リズム
 error bar は各系統 5 ペアの 1 時間あたりの平均活性値に対する標準偏差を表す。自己相関係数のグラフを CP リズムの右側に示している。

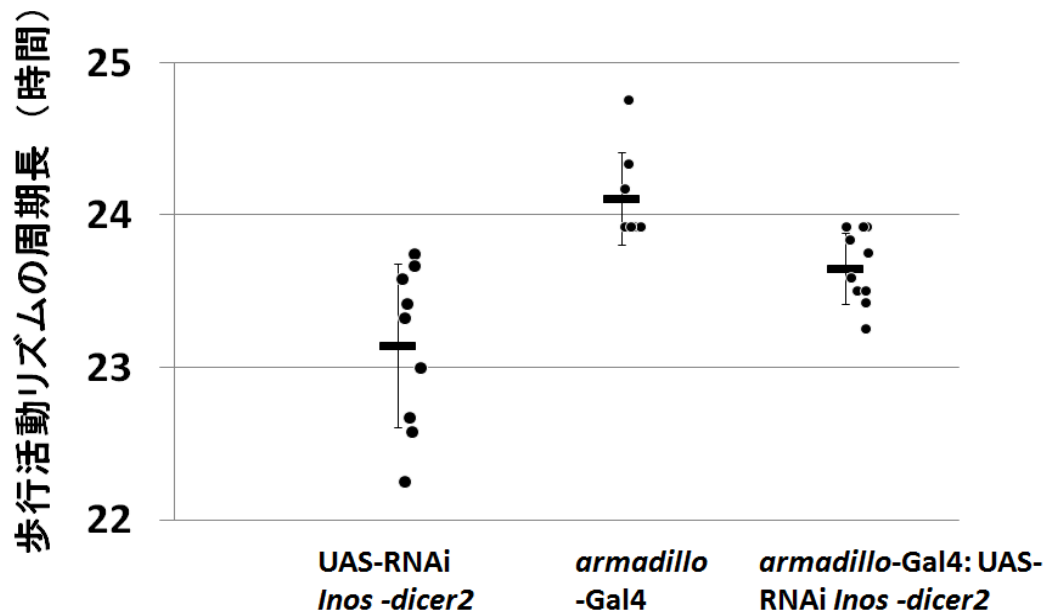


図 17. *armadillo-Gal4:UAS RNAi -Inos-dicer2* 系統の歩行活動リズム
error bar は標準偏差を表す。

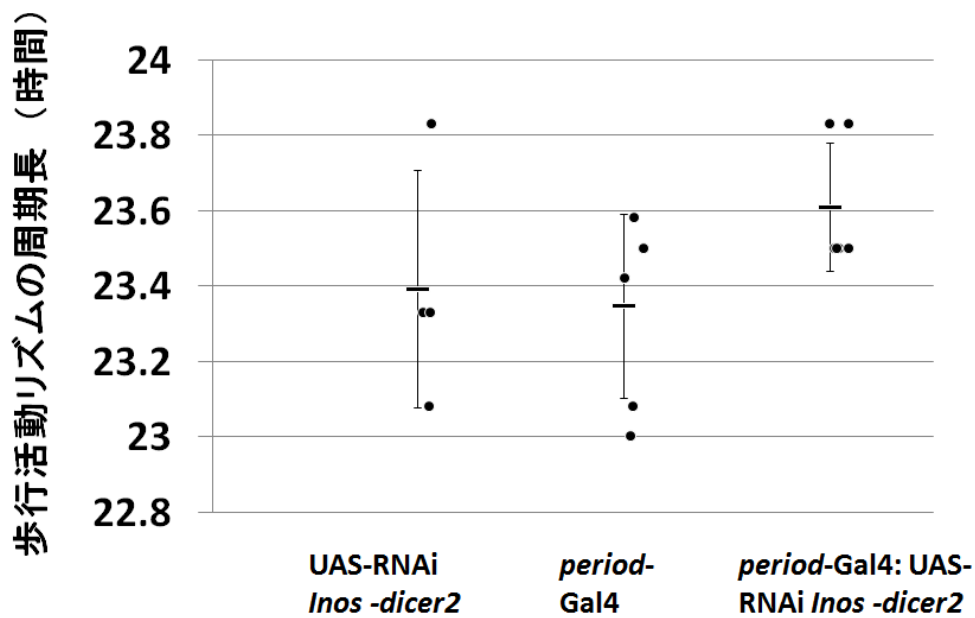


図 18. *period-Gal4:UAS RNAi -Inos-dicer2* 系統の歩行活動リズム
error bar は標準偏差を表す。

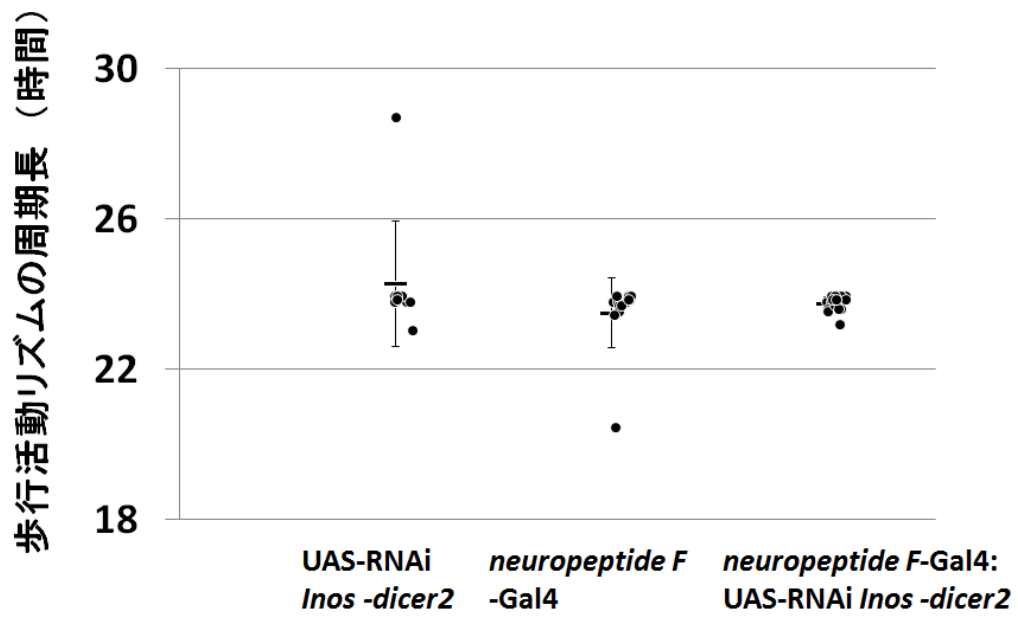


図 19. *neuropeptide F-Gal4:UAS RNAi -Inos-dicer2* 系統の歩行活動リズム
error bar は標準偏差を表す。

第4節 考察

コントロール系統 UAS -RNAi *Inos* -*dicer2* および *armadillo* -Gal4 に比べて *armadillo*-Gal4 : UAS -RNAi *Inos* -*dicer2*ではCPリズムの概日ピークが消失した(図 14)。また、時計遺伝子 *period*、*neuropeptide F*においても、同様にノックダウンした系統でCPリズムの概日ピークが消失した(図 15、16)。このことから、*armadillo* および *period*、*neuropeptide F*が発現する領域中の *Inos*がCPリズムの振動発現に必要である事が示唆された。コントロール系統 UAS -RNAi *Inos* -*dicer2* および *armadillo* -Gal4、そして *armadillo*-Gal4 : UAS -RNAi *Inos* -*dicer2*の歩行活動リズムは概日リズムを示した(図 17)。また、時計遺伝子 *period*、*neuropeptide F*においても、同様にノックダウンした系統で歩行活動リズムが確認された(図 18、19)。先行研究より、マウスのイノシトールモノホスファターゼは2種類存在し、そのうちの1つである *Impa1*を破壊したマウスにおいて、歩行活動リズムが確認された(Ohnishi *et al.*, 2014)。このことから、ミオイノシトール合成の代謝経路中、*Inos* 下流のミオイノシトールモノホスファターゼを破壊した系統では歩行活動リズムが存在する可能性が考えられる。また、*armadillo* および *period*、*neuropeptide F*が発現する領域中のミオイノシトールは歩行活動リズムの振動発現に必須でない事が示唆された。第4章では、内在性のミオイノシトール合成酵素 *Inos*のノックダウンによって、CPリズム異常を示した。また先行研究より、ショウジョウバエの脳内時計神経群において *period*の遺伝子産物 PER と神経ペプチド Fの遺伝子産物 NPFは5th s-LNv および L1-s、D1、D2領域中で発現する事が知られている(図 22)。その為、5th s-LNv および L1-s、D1、D2領域中の *Inos*がCPリズムの振動発現に必要である可能性が考えられた。*Inos* RNAi 系統の歩行活動リズムはリズムックを示した。その為、今回使用した *Inos* RNAi 系統オスの振動体は無傷であると考えられた(図 23)。第2章では、外来性のミオイノシトールを過剰量与える事によって、CPリズムがリズムックかつ延長し、歩行活動リズムもリズムックかつ延長した。これらの事から、外来性のミオイノシトールと内在性のミオイノシトールでは、CPリズムや歩行活動リズムの分子機構に与える作用機序が異なる可能性が示唆された。しかしながら、

第2章の実験では、コントロール餌として低栄養餌をベースに過剰量のみオキノシトールを混合した。よって、この条件下におけるショウジョウバエのオスとメスが飢餓の状態にある可能性を含んでいた。その為、外来性のみオキノシトールがCPリズムに及ぼす影響と、内在性のみオキノシトールがCPリズムに及ぼす影響については現在も不明である。

本研究において、オス1個体とメス1個体のペアによる2個体の概日時計から成るCPリズムの測定にCPリズムアッセイ法を用いたほか、1個体の概日時計に対する影響の試験には歩行活動リズム測定を用いた。第4章結果より、*Inos* RNAi 系統の歩行活動リズムは概日リズムを示したが、CPリズムは消失した。この事から、今回作成した *Inos* RNAi 系統の歩行活動リズムは正常であり、歩行活動リズム中枢は少なくとも無傷であった。一方、CPリズムは異常であり、CPリズム中枢が障害された事が明らかになった(図23)。この事から、*Inos* RNAi は中枢時計下流の *Inos* が介在する分子機構に影響し、結果としてCPリズムが消失した可能性が考えられた。また、CPリズムの先行研究より、12L12Dで同調したオスとメスのCPリズムは、11時間差で同調をずらしたオスの存在下で位相が変動した。しかし、11時間差で同調をずらしたメスの存在下では位相の変動を示さなかった。この事から、CPリズムはオスの概日時計に依存することが知られている(Fujii *et al.*, 2007.)。この実験に *Inos* RNAi 系統を応用すれば、*Inos* RNAi がオスまたはメスに依存するか否かを決定し得ると考えられた。また行動リズム研究の中には、CPリズムのほか交尾行動リズムの研究がある。交尾行動リズムでは、オスの集団およびメスの集団ごとにまとめたバイアルを用意し、特定の時間ごとにオスとメスを5匹ずつ取り出して1本のバイアルにまとめ、15分後に交尾したメスの数を測定する。交尾行動リズムの振動発現にはメスの時計遺伝子 *period* および *timeless* を必要とした。この事から、交尾行動リズムはメスの概日時計に依存した(Sakai *et al.*, 2001.)。この実験に *Inos* RNAi 系統を応用すれば、CPリズムだけでなく、*Inos* がオスの交尾行動リズムにおいても必要であるか否かの知見を得る事ができると考えられる。

最後に、ショウジョウバエの歩行活動リズムおよびCPリズムの振動発現を司る脳内神経群をまとめた。歩行活動リズム中枢について、これまで dorsal neuron 1(DN1s)、

dorsal lateral neurons(LNds)、LNvs(l-LNv and s-LNv)が歩行活動リズム振動発現に必要な事が知られている(図 20)。一方、CP リズム中枢について、先行研究結果(Hamasaka *et al.*, 2010)より、DN1s と dorsolateral 1-small neurons (L1-s)、dorsal 1 neurons (D1)、dorsal 2 neurons (D2)を除く LNds そして 5th s-LNv 領域中の細胞が CP リズム振動発現に必要な事が推定されていた(図 21)。本研究結果より、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F*の共通発現領域として LNds 中の L1-s、D1、D2 そして 5th s-LNv 領域中の *Inos* 発現が CP リズム振動発現に必要な事が示唆された(図 22)。この結果と先行研究結果(Hamasaka *et al.*, 2010)より、5th s-LNv 細胞が概日時計から CP リズム生成に関わる重要な中枢であることが推定された。*Inos* の上流に E-box 配列や D-box 配列の存在を確認する事により、5th s-LNv で *Inos* が時計遺伝子の制御下にあり調節される可能性を検証する事ができる。しかしながら、DN1s の *Inos* 発現が CP リズムに必要なかどうかについては不明のままである。今後、複数の Gal4 ドライバーを用いてこれら領域特異的な *Inos* 変異系統を作成し、DN1s の CP リズムとの関連性を明らかにする必要がある。今後、本論文において樹立した *Inos* 変異系統を用いた *Inos* 関連遺伝子を探索する事によって、生体内のミオイノシトールがどの様に代謝され、最終的に CP リズムを活性化するといった CP リズム分子機構の詳細な解明が望まれる。

これらの結果をまとめると図 23 のような概念図が提唱された。今回作成した *Inos* RNAi 系統は CP リズムを消失した。この結果から、*Inos* の発現がショウジョウバエ CP リズム生成に必要な分子の 1 つである事を明らかにした。しかしながら、興味深い事にこれら 3 種の *Inos* RNAi 系統の歩行活動リズムに著しい異常は見られなかった。この事から、*Inos* RNAi 系統は dCLK、CYC、PER、TIM から成る概日時計の分子機構は保たれていると考えられた。本研究では、これら概日時計の分子機構から CP リズム発現までの出力機構に *Inos* が関わる事を明らかにした(図 23)。

今後、*Inos* がどのような機構で CP リズムのような本能行動に関わるのか、更なる研究が期待される。

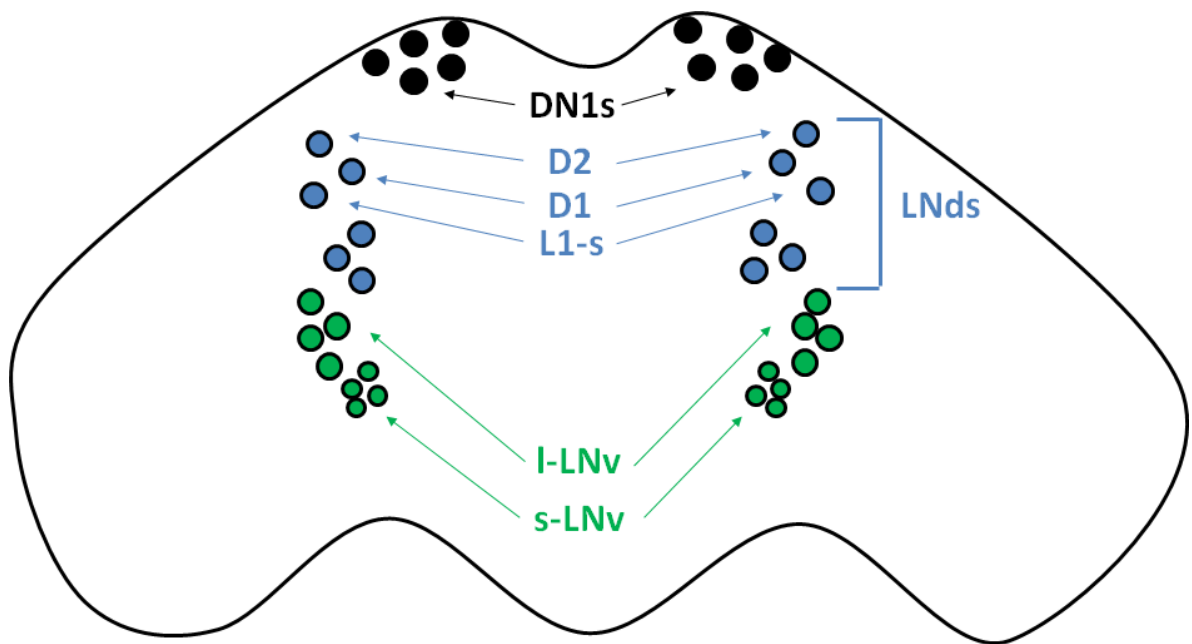


図 20. 現在考えられているショウジョウバエ脳内における歩行活動リズム中枢
 これまで、dorsal neuron 1(DN1s)、dorsal lateral neurons(LNds)、LNvs(I-LNv and s-LNv)の存在が歩行活動リズム振動発現に必要な事が知られている。

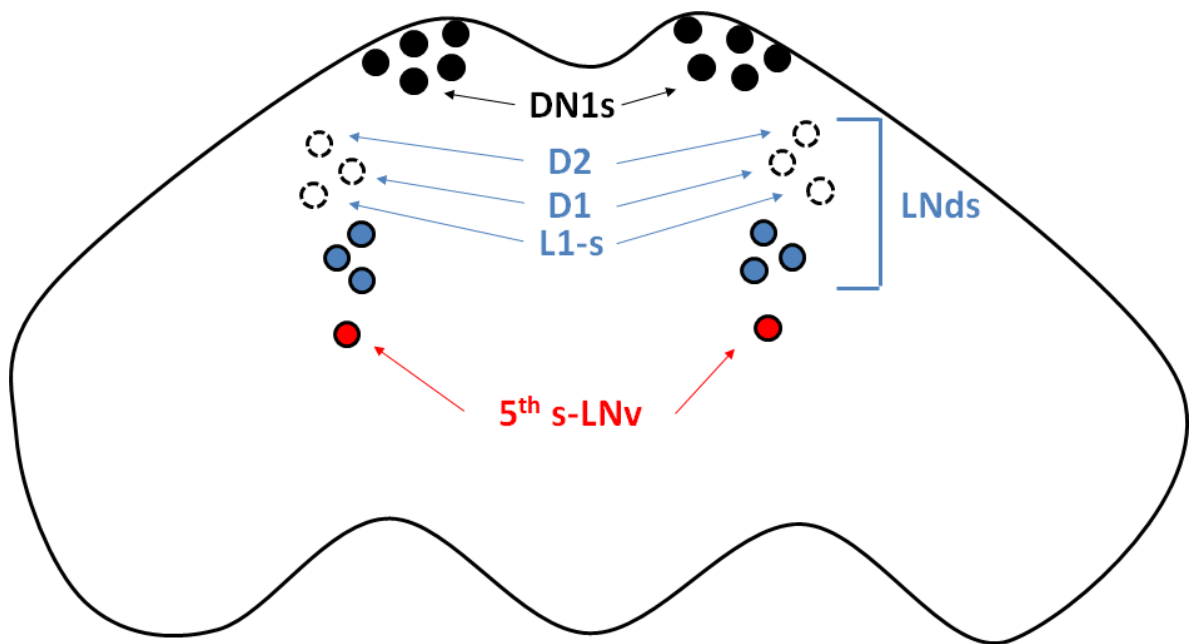


図 21. 先行研究結果(Hamasaka *et al.*, 2010)より推定されたショウジョウバエ脳内における CP リズム中枢

これまでに DN1s と L1-s、D1、D2 を除く LNds、5th s-LNv が CP リズム振動発現に必要な事が推定されていた。

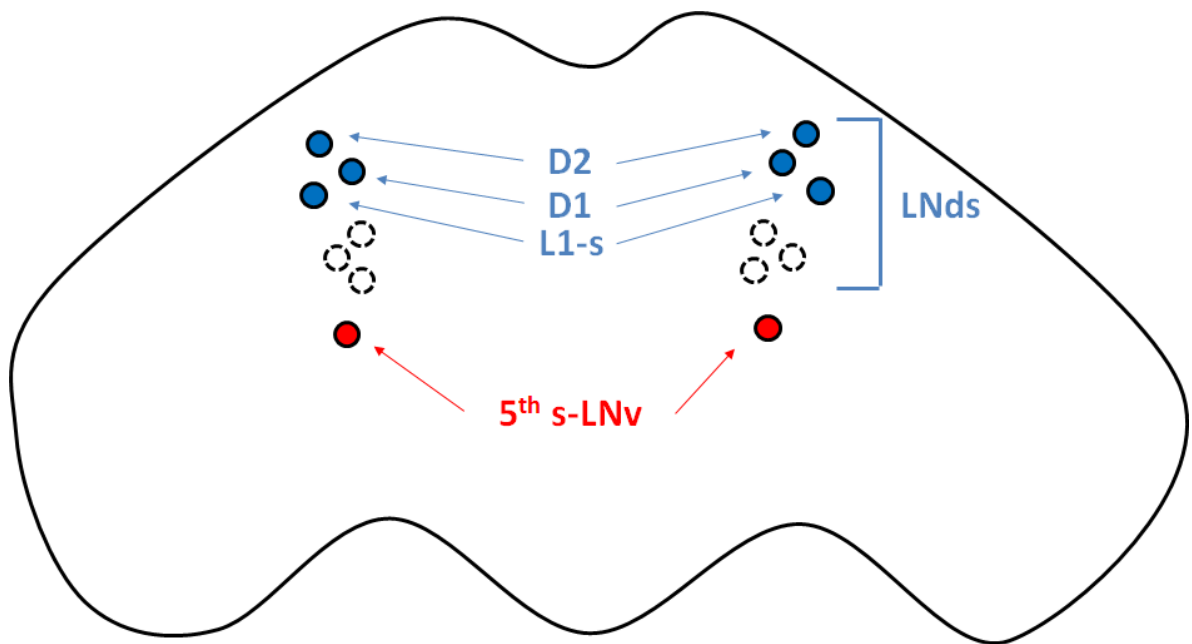


図 22. 本研究により明らかにされたショウジョウバエ成虫脳内における *Inos* RNAi 実験から推定した CP リズム発現神経群 *period* の遺伝子産物 PER と神経ペプチド F の遺伝子産物 NPF は **5th s-LNv** および **L1-s**、**D1**、**D2** 領域中で発現する。

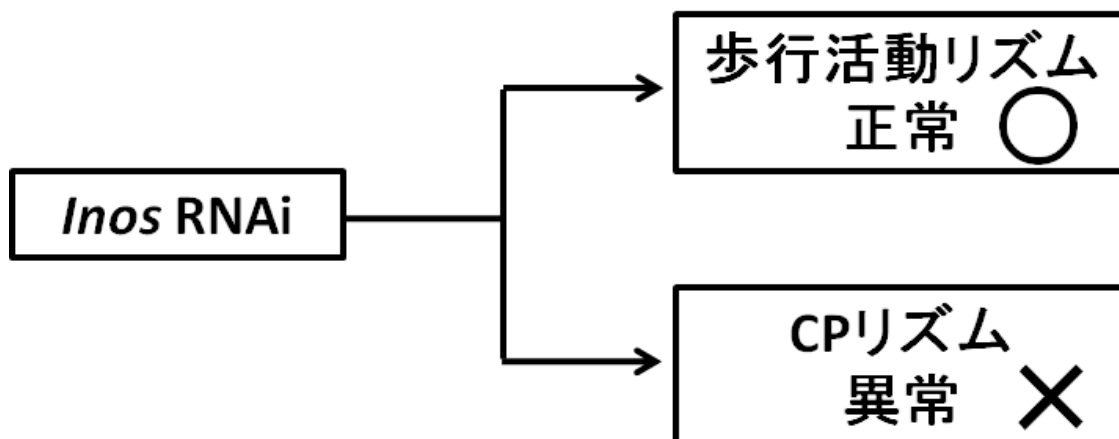


図 23. *Inos* RNAi 系統における行動リズムの関係図

Inos RNAi 系統の歩行活動リズムは概日リズムを示したが、CPリズムは消失した。このことから、今回作成した *Inos* RNAi 系統の歩行活動リズムは正常であり、歩行活動リズム中枢は少なくとも無傷であった。一方、CPリズムは異常であり、CPリズム中枢が障害された事が明らかになった。

第5章 総括

第1節 結論

先行研究より、ミオイノシトールを 0.001%、0.01%、0.1%ずつ加えた低栄養餌条件下において、CP リズムを用量依存的に短周期化する傾向が見られた。しかし統計学的な有意差は認められず、外来性のミオイノシトールと周期長の変動効果については未知であった。そこで第2章では、さらに過剰量のミオイノシトールを用いて、CP リズムを有意に変動させるか否かについて実験を行った。4%および 10%ミオイノシトール混合低栄養餌条件下において、野生型 Oregon R 系統の CP リズムが有意に延長した。この結果から、過剰量のミオイノシトールは CP リズムを長周期化する事が示唆された。第2章の実験により初めて、外来性のミオイノシトールが CP リズムを長周期化する事を明らかにした。

第2章結果より、外来性のミオイノシトールが CP リズムに影響を及ぼした。しかしながら、分子機構のレベルにおいて未知であった。そこで分子機構に関わる遺伝子をピックアップし、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F*が CP リズム分子機構に影響すると予想した。次に、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F*それぞれを発現する細胞中で *Inos* をノックダウンした系統の作成を試みた。その結果、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F*特異的に *Inos* mRNA を抑制した系統では、それぞれのコントロール Gal4 ドライバー系統および UAS レスポンダー系統に比べて、*Inos* mRNA 発現量が有意に減少した。

第3章では、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F*特異的な *Inos* ノックダウン系統を作成した。しかしながら、内在性のミオイノシトールが、CP リズムおよび概日時計の分子機構に与える影響については未知であった。そこで、*Inos* ノックダウン系統が

CP リズムと歩行活動リズムの周期長を変動させるか否かについて実験を行った。各 *Inos* ノックダウン系統は CP リズムがそれぞれ消失した。このことから、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F* が発現する領域中の *Inos* が CP リズムの振動発現に必要である事が示唆された。一方、歩行活動リズムについては概日リズムを示した。このことから、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F* が発現する領域中のミオイノシトールは歩行活動リズムの振動発現に必須でない事が示唆された。よって、内在性のミオイノシトールは CP リズムの分子機構に影響を及ぼすが、オスの概日時計の分子機構には影響を及ぼさなかった。また先行研究より、ショウジョウバエの脳内時計神経群において *period* の遺伝子産物 PER と神経ペプチド F の遺伝子産物 NPF は 5th s-LNv および LNds 領域中で発現する事が知られている。その為、5th s-LNv および LNds 領域内 NPF 発現細胞中の *Inos* が CP リズムの振動発現に必要である可能性が考えられた。*Inos* ノックダウン系統の歩行活動リズムはリズムックを示した。その為、今回使用した *Inos* ノックダウン系統オスの振動体は無傷であると考えられた。

第2節 今後の展望と課題

本研究では、外来性のミオイノシトールが CP リズムの周期長を延ばし、*armadillo*、*period*、*neuropeptide F*中に含まれる *Inos* が CP リズムの振動発現に必要である事を明らかにした。しかしながら、第 2 章の実験では、コントロール餌として低栄養餌をベースに過剰量のミオイノシトールを混合した餌を使用した。その為、この条件下でショウジョウバエのオスとメスが飢餓の状態にある可能性を含んでいた。よって、外来性のミオイノシトールが CP リズムに及ぼす影響と、内在性のミオイノシトールが CP リズムに及ぼす影響については、本研究の結果を用いて結論付ける事が出来なかった。外来性および内在性のミオイノシトールの関係について更なる追加実験が必要である。第 3 章で作成した *Inos* ノックダウンシステムを用いて、低栄養餌と 10%ミオイノシトール混合低栄養餌の条件下で CP リズム計測を行うことによって、ミオイノシトールの外来性と内在性における働きについて関係づけたい。また、今後 CP リズムの分子機構をさらに詳しく調べる為、*In situ hybridization* を用いた *Inos* mRNA 発現組織の特定や、免疫染色法を用いて *Inos* にコードされるタンパク質が発現する細胞の特定を行いたい。また *period* のほか、他の時計遺伝子に特異的なドライバーを用いた *Inos* 変異システムの作成と、歩行活動リズムおよび CP リズムの比較も検討し、脳内での出力系としての *Inos* の必要発現部位を特定したい。

引用文献

Beaver, L.M., Giebultowicz, J.M. (2004).

Regulation of copulation duration by period and timeless in *Drosophila melanogaster*.

Curr Biol, 14(16):1492-1497.

Dunlap, J.C. (1999).

Molecular bases for circadian clocks.

Cell, 96(2):271-290.

Fu, C., Whitfield, C.W. (2012).

Genes associated with honey bee behavioral maturation affect clock-dependent and -independent aspects of daily rhythmic activity in fruit flies.

PLoS One. 7(5):e29157.

Fujii, S., Krishnan, P., Hardin, P., Amrein, H. (2007).

Nocturnal Male Sex Drive in *Drosophila*.

Curr Biol, 17(3):244-251.

Glossop, N.R., Hardin, P.E. (2002).

Central and peripheral circadian oscillator mechanisms in flies and mammals.

J Cell Sci, 115(17):3369-3377.

Grima, B., Chélot, E., Xia, R., Rouyer, F. (2004).

Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain.

Nature, 431(7010):869-873.

Hamasaka, Y., Suzuki, T., Hanai, S., Ishida, N. (2010).

Evening circadian oscillator as the primary determinant of rhythmic motivation for *Drosophila* courtship behavior.

Genes Cells, 15(12):1240-1248.

Hermann, C., Yoshii, T., Dusik, V., Helfrich-Förster, C (2012).

Neuropeptide F immunoreactive clock neurons modify evening locomotor activity and free-running period in *Drosophila melanogaster*.

J Comp Neurol, 520(5):970-987.

Kadener, S., Vilella, A., Kula, E., Palm, K., Pyza, E., Botas, J., Hall, J.C., Rosbash, M. (2006).

Neurotoxic protein expression reveals connections between the circadian clock and mating behavior in *Drosophila*.

Proc Natl Acad Sci U S A, 103(36):13537-13542.

Kawasaki, H., Doi, R., Ito, K., Shimoda, M., Ishida, N. (2013).

The Circadian Binding of CLOCK Protein to the Promotor of *C/ebpalpha* Gene in mouse cells.

PLoS One, 8(3):e58221.

Lee, G., Bahn, JH., Park, JH.(2006).

Sex- and clock-controlled expression of the neuropeptide F gene in *Drosophila*.

Proc Natl Acad Sci U S A, 103(33):12580-12585.

Levine, J. (1997).

Controlled trials of inositol in psychiatry.

Eur Neuropsychopharmacol, 7(2):147-155.

Levine, J.D., Funes, P., Dowse, H.B., Hall, J.C. (2002).

Signal analysis of behavioral and molecular cycles.

BMC Neurosci, 3:1.

Murad, A., Emery-Le, M., Emery, P. (2007).

A subset of dorsal neurons modulates circadian behavior and light responses in

Drosophila.

Neuron, 53(5):689-701.

Negishi, O., Mun'im, A., Negishi, Y. (2015).

Content of methylated inositols in familiar edible plants.

J Agric Food Chem, 63(10):2683-2688.

Ohnishi, T., Murata, T., Watanabe, A., Hida, A., Ohba, H., Iwayama, Y., Mishima, K.,

Gondo, Y., Yoshikawa, T. (2014).

Defective craniofacial development and brain function in a mouse model for depletion of intracellular inositol synthesis.

J Biol Chem, 289(15):10785-10796.

Papaleo, E., Unfer, V., Baillargeon, J.P., Chiu, T.T. (2009).

Contribution of myo-inositol to reproduction.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 147(2):120-123.

Picot, M., Cusumano, P., Klarsfeld, A., Ueda, R., Rouyer, F. (2007).

Light activates output from evening neurons and inhibits output from morning neurons in the *Drosophila* circadian clock.

PLoS Biol, 5(11):e315.

Sakai, T., Tamura, T., Kitamoto, T., Kidokoro, Y. (2004).

A clock gene, *period*, plays a key role in long-term memory formation in *Drosophila*.

Proc Natl Acad Sci U S A, 101(45):16058-16063.

Sakai, T., Ishida, N. (2001).

Circadian rhythms of female activity governed by clock genes in *Drosophila*.

Proc Natl Acad Sci U S A, 98(16):9221-9225.

Sakata, K., Kawasaki, H., Suzuki, T., Ito, K., Negishi, O., Tsuno, T., Tsuno, H., Yamazaki, Y., Ishida, N. (2015).

Inositols affect the mating circadian rhythm of *Drosophila melanogaster*.

Front Pharmacol, 6:111.

Stoleru, D., Peng, Y., Agosto, J., Rosbash, M. (2004).

Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*.

Nature, 431(7010):862-868.

Stoleru, D., Peng, Y., Nawathean, P., Rosbash, M. (2005).

A resetting signal between *Drosophila* pacemakers synchronizes morning and evening activity.

Nature, 438(7065):238-242.

Tachibana, S., Touhara, K., Ejima, A. (2015).

Modification of male courtship motivation by olfactory habituation via the GABAA receptor in *Drosophila melanogaster*.

PLoS One, 10(8):e0135186.

Tan, Y., Yu, D., Busto, GU., Wilson, C., Davis, RL. (2013).

Wnt signaling is required for long-term memory formation.

Cell Rep, 4(6):1082-1089.

Unfer, V., Facchinetti, F., Orrù, B., Giordani, B., Nestler, J. (2017).

Myo-inositol effects in women with PCOS: a meta-analysis of randomized controlled trials.

Endocr Connect, 6(8):647-658.

遺伝子産物と代謝経路のデータベース KEGG PATH WAY

(<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)

謝辞

本研究を行うにあたりご指導頂いた（公）国際科学振興財団 時間生物学研究所 石田直理雄所長に心から感謝いたします。また、CP リズムアッセイ法をご指導頂いた（公）国際科学振興財団 時間生物学研究所 鈴木孝洋外来研究員に深く感謝致します。また、アイスプラント粉末中に含まれるミオイノシトール量の成分分析データを快くご提供頂いた筑波大学 生命環境系 根岸紀先生に深く感謝いたします。また、Quantitative RT-PCR をご指導頂いた（公）国際科学振興財団 時間生物学研究所 川崎陽久研究員に深く感謝致します。また、博士課程所属先の研究室として快く在籍を許可して頂きました筑波大学 生命領域学際研究センター 深水昭吉先生に深く感謝致します。最後に、本大学院で研究する機会を与えて頂き、経済的、精神的にも支え、励まして頂いた両親、家族に心から感謝致します。