

RNA 干渉を用いた昆虫における行動制御機構の遺伝子機能解析

日大生産工(院) ○守矢 敬 (独)農業生物資源研 霜田 政美
日大生産工(日大院総科) 野呂 知加子

1. 諸言

地球上の生物は、さまざまな環境で生存・繁殖するために多種多様な適応能力を発達させてきた。そのなかで、多くの生物が共通する能力の一つに概日リズム(circadian rhythm)がある。概日リズムは、1日の環境変化に応じて生理状態や行動様式を変化させる現象であり、脳に存在する概日時計 (circadian clock) によって調節されている。

ショウジョウバエの概日時計は分子レベルで説明されている。その機構は時計遺伝子 *period* (*per*)を中心とした時計遺伝子の周期的発現からなる。昼の後半から夜の前半にかけて *per* および *timeless* (*tim*)が活発に転写され、それらの mRNA から翻訳された *PER*、*TIM*たんぱく質は夜の後半にヘテロ 2量体を形成して核へ移行する。核へ入った *PER-TIM* 2量体は、転写因子 *CLK-CYC* の活性を抑制し、*per*、*tim* の転写が抑制され、昼にはその結果 *PER*、*TIM*量が減少する。*PER-TIM*の減少により、昼の後半には *CLK-CYC*による *per*、*tim*の転写が再び活性化され、次のサイクルに入っていく。この系に、*CLK*を周期的に発現するもう一つの振動系が組み合わさり、約 24 時間の周期が作られると考えられている。

時計遺伝子は、主にモデル生物といわれる哺乳類やショウジョウバエで研究がおこなわれている。しかし非モデル生物では、ほとんど研究が行われておらず、分子機構が明らかになっていない。本研究では非モデル生物を利用し、

分子機構について明らかにしようとしている。

2. 使用生物及び実験方法

2.1 使用生物

本研究では、非モデル生物として、チャバネアオカメムシという昆虫を使用する。この昆虫は果樹などに被害をもたらす害虫として知られ、移動性が高く薬剤の散布による防除が困難であるとされている。また行動レベルで見たとときに行動が顕著に出やすいという利点がある。このカメムシを使用し、概日リズムを調べると共に将来的に防除法を考えることを目的とする。本来ならチャバネアオカメムシを使用して実験を行うが、手順や機器の使い方が不十分であるため、慣れるためにショウジョウバエで QRT-PCR 実験を行った。ショウジョウバエは、*hck1δ*(human casein kinase I δ)の F5,E25 と *dbl*(double time)の 201,704 の時計遺伝子を含む系統を使用した。

2.2 RNA 抽出、精製

はじめに資料となるショウジョウバエの頭 30 匹分をホモジェナイズし、TRIzol(100 μ l)・クロロホルム(25 μ l)を加えて遠心分離(12000 \times g 15min)をする。上清に RNA があるので、ほかを吸わないように別のチューブに移す。次にイソプロパノール(40 μ l)を加え、遠心分離(12000 \times g 10min)をする。RAN は沈殿として残るので、吸わないように気をつけ、液体だけを除去する。そこに 70%エタノール(100 μ l)を加えて、残った塩を遠心分離(7500 \times g 5min)で除去する。最後にミリ Q(30 μ l)を加え RNA を溶かす。

2.3 cDNA 合成

PrimeScript®RTreagentKit(Perfect Real Time)(RR037A)を用いて、PreMix を作製する。作製した PreMix を分注し、サンプルを加える。これを 37°C で 30min 加熱することで cDNA を合成する。反応を止める際は、85°C で 5sec 熱する。その後、4°C で 10min 以上冷やす。定量するときのサンプルとして、それぞれのサンプルから 3µl ずつ回収して新しいチューブに集める。サンプルをミリ Q で 10 倍希釈、検量線サンプルをミリ Q で 3 倍希釈する。

2.4 定量

SYBR®PremixExTaq™(Perfect Real Time)(RR041A)を用いて PreMix を作製する。Quantitative-RT-PCR 用のプレートに作製した PreMix(9µl)分注し、サンプル(1µl)を加える。その後、軽く蓋を貼り、遠心(1500×g 程度)をして、LightCycler にセットし定量をする。

3. 結果および考察

今回、ハエの頭から RNA を抽出して DNA に逆転写し、RT-PCR を行った。PCR の結果、*hcklδ* 遺伝子が発現していることが確認できた。Fig2,3 に青線の他に、赤線がある。この線は melting peak において 同じ場所で見られることから dbt であると推測出来る。しかし断定することは出来ず、他の遺伝子の可能性も考えられる。このような結果が出来てしまった理由として、プライマーの設計が悪かった点、検体として使用したハエに異常があった点、サンプルの作製段階でのコンタミなどが考えられた。今後は、以上の過程を含めた点において調査をしていくことが課題となると考えられる。

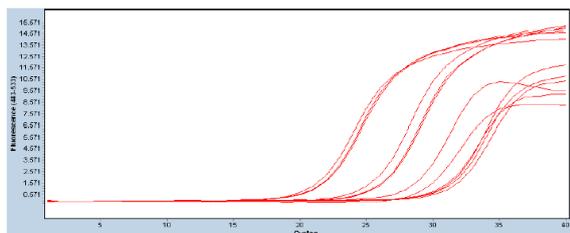


Fig.1 Q-RT-PCR *hcklδ* Amplification Curves

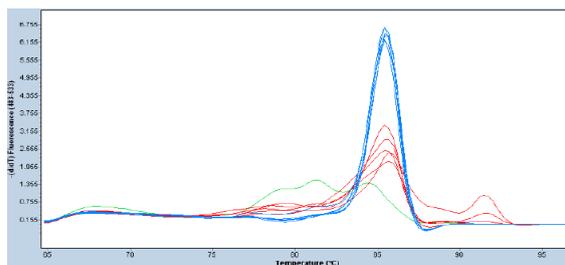


Fig.2 *hcklδ* Melting Peaks

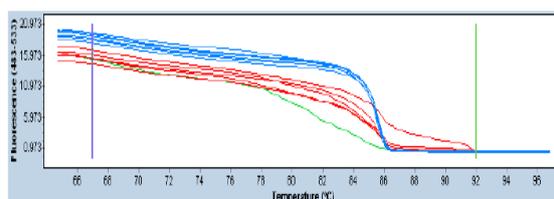


Fig.3 *hcklδ* Melting Curves

4. 研究計画

これからの研究計画として、チャバネアオカメムシの時計遺伝子はまだ同定されていないため、モデル生物の塩基配列と照らし合わせ、配列を見つける。その配列をクローニングして発現リズムを解析する。そして RNA 干渉法を利用し、遺伝子をノックダウンさせて昆虫の概日リズムにどう影響をもたらすのか検討する。

5. 参考資料

- 1) Ikeno T, Numata H, Goto SG. 2008 *Gene.* ;419:56-61.
- 2) Ikeno T, Tanaka SI, Numata H, Goto SG. 2010 *BMC Biol.* ;8:116.
- 3) Ikeno T, Numata H, Goto SG. 2011 *J Insect Physiol.* ;57:935-8.
- 4) Uehara T, Yamaguchi T, Arikawa K, Kotaki T, Shimoda M. Wave-length dependant phototactic behavior in the brown-winged green stink bug(*Plautia stali*)
- 5) Stefano V, Supriya B, Steano M, Pamela M, Edward G, Mirko P, Fwderica S, Rodolfo C, Charalambos K. 2012 *Nature.* ;484:371-375