

ショウジョウバエ概日時計の遺伝学的研究

Genetic approaches to *Drosophila* circadian clock

- 代表研究者 山口大学理学部教授 千葉喜彦
Prof., Biological Inst., Fac. of Science, Yamaguchi Univ.
Yoshihiko CHIBA
- 協同研究者 九州大学教養部助教授 谷村禎一
Assoc. Prof., Biological Laboratory, Kyushu Univ., Ropponmatu
Teiichi TANIMURA
- 山口大学理学部助手 富岡憲治
Assist., Biological Inst., Fac. of Science, Yamaguchi Univ.
Kengi TOMIOKA
- 山口大学理学部教務員 松本 顕
Res., Biological Inst., Fac. of Science, Yamaguchi Univ.
Akira MASTUMOTO

The purpose of our study is to find out new genes which seem to be involved in the control of *Drosophila* circadian clock and to elucidate interactions between multiple genes including *per* gene most well-known as controlling the circadian locomotor rhythm largely.

Among 400 strains, which had the P-element inserted by a 'P[lacZ] enhancer-trap mutagenesis method, one abnormal strain (H22) was obtained that 84% of flies does not reveal significant circadian rhythm. This strain was found to have P[lacZ] inserted into the locus 86C on the third chromosome. However, a part of data suggested that the insertion may not be involved in the arrhythmicity. Studies are still going on to make these situations conclusive.

In addition to these studies, for which the research funds were provided originally, we have so far isolated two mutants related to the circadian rhythm in *D. melanogaster*. One is *Toki* which has an 'ethylmethane sulfonate'-induced mutation on the second chromosome and shows higher values in circadian period, ratio of activity time to rest time in one circadian cycle, and intensity of locomotor activity. The other mutant, *Ritsu*, found in an inbred line from the natural population in Yamaguchi, shows an abnormally long period (27.7 hr), which may be caused mainly by gene (s) on the second chromosome and partly by those in the third chromosome.

Interactions between mutations were also investigated, to find the multiplicative or additional effect.

研究目的

生物の体内には、約24時間周期で動作する概日時計機構が遺伝的に備っている。行動を含めたさまざまな生理機構が、概日時計が発信する時刻情報をもとに、互いに決まった時間関係を保ちながら一日周期で変動し、その結果、生物体は全体として時間的に統一のとれたシステムを成す。

概日時計の基本的な性質は真核生物において共

通であると考えられている。しかし、これまでの膨大な研究にもかかわらず、概日時計の分子レベルでのメカニズムは謎のままであるといつてよい。この謎を解くためには、概日時計機構に異常をもつ突然変異体を分離するという遺伝学的なアプローチが有効であり、そのために、これまでショウジョウバエ及びアカパンカビなどを用いた研究が行われてきた。

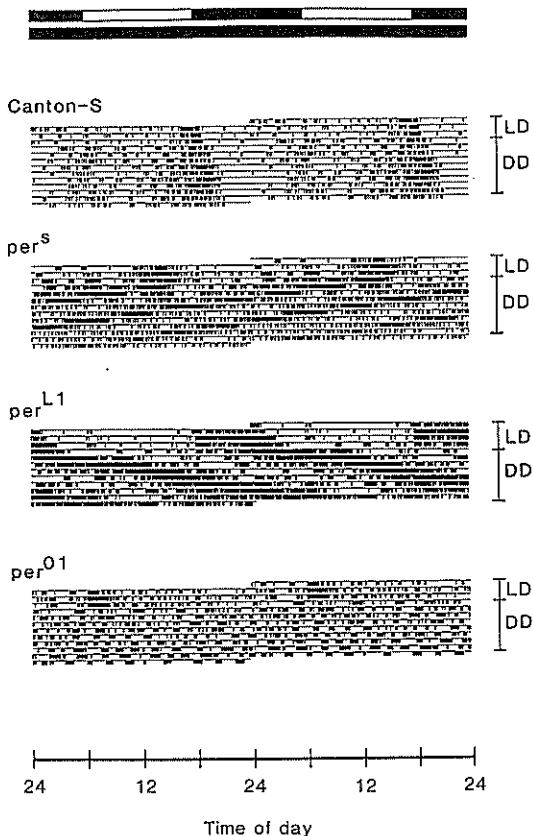


図1. キロショウジョウバエ野生型 Canton-S および per 遺伝子突然変異体の典型的個体における活動記録図。キロショウジョウバエは明暗サイクル下で、明期の開始時と終了時の2回活動ピークを示し、恒暗条件下では約24時間の概日リズムを示す(最上段)。per 遺伝子上の1塩基の置換によって生じた、短周期 per^s (2段目)、長周期 per^L (3段目)、無周期 per^0 (最下段) 突然変異体の活動。活動ピークの動きを見やすくするため、同じ記録図を2枚、1日分だけ上下にずらし左右に並べている。

ショウジョウバエでは、羽化及び活動リズムの周期性に関与する period 遺伝子の存在が、時計突然変異体の分離によって明らかになっている (Konopka & Benzer, 1971)。この遺伝子上の1塩基が突然変異することによって、周期が短くなる (19 hr) per^s 、長くなる (29 hr) per^L 、周期性を失う per^0 といった系統が生ずる (図1)。 per 遺伝子はすでにクローニングされ、多様の分子生物学的手法を用いた研究によりその機能が解明されつつ

ある (総説 Hall, 1990)。また、最近、 per 遺伝子産物に対する抗体が分離され (Swicki *et al.*, 1988)、それが、ショウジョウバエ以外の節足動物や軟体動物 (Siwicki *et al.*, 1989) あるいは哺乳類などで、概日時計の所在部位と思われる組織に結合することがわかるなど、その普遍性についても関心を集めている (総説 Hall, 1990)。しかし、一方において、この抗体は時計所在部位以外の組織にも結合するというむずかしい問題も含んでいる。

概日時計機構は極めて複雑で、複数の遺伝子の関与が考えられるが、 per 遺伝子以外については全く研究がないと言ってよい。本実験の目的は、新しい時計遺伝子を同定し、その機能を調べることによって時計機構の遺伝学的解明を行うことにある。

これまでに我々は、二つの時計突然変異を我が国で初めて分離することに成功した。現在三つ目について、それが新しい突然変異であるかどうかを検討しているところである。以下、その研究経過を述べる。

研究経過

1. 実験装置の作成

概日活動リズムの実験のためには、恒温、恒照明条件下で、長期間活動を記録することができる装置が不可欠である。我々は、これまでに蓄積していた技術を基に、128個体のショウジョウバエの活動を個別に記録計測し得る装置を作成した。この装置は、①動物の活動を電気的变化に変えるための変換ユニット (環境制御装置に収められている)、②変換ユニットから送られる電気信号を管理、蓄積するコンピュータ、③個々のショウジョウバエの活動記録を解析するためのコンピュータから成る。

活動の電気的変換には光電的原理を用いた。ショウジョウバエを1匹ずつ細長い透明アクリル製活動箱 (内法 $3 \times 3 \times 70$ mm) に入れ、それが赤外線を通する回数を6分間毎に記録し、この情報を基に、活動リズムの解析を行った。光源には赤外線発光ダイオード、光受容にはフォトトランジスタを用いた。活動箱の片側半分は、餌とし

て15% グルコースを含む寒天を詰め、パラフィンで封じた。もう片側は、ショウジョウバエを入れたあとで、綿と粘着テープで封をした。

ショウジョウバエは、12時間明・12時間暗(LD 12:12)の光サイクルの下で、コーンミール・小麦胚芽入りの標準飼料で飼育された、羽化後5日以内のオスである。活動リズムの計測は、主としてLD 12:12と恒暗条件(DD)および25°Cで行った。

2. 系統の作成

突然変異の誘発には次の三つの方法を用いた。

①突然変異誘発剤 EMS を用いる方法

我々は、本助成金を受ける以前より、第2染色体をエチルメタンスルホン酸(EMS: 塩基のアルキル化剤)で処理した約1000系統を確立し、活動リズムの異常をスクリーニングし、長周期型、短周期型、しだいに周期性が失われていくものなど多数の時計突然変異候補系統を見いだしていた。この中で、長周期型の突然変異 Toki と名付けた系統について解析を行った

②自然集団からの近交交配による分離法

野外集団には、さまざまな突然変異が保有されていると考えられる。これらの突然変異は、正常遺伝子とヘテロ接合した形で保有されていたり、あるいは、複数の遺伝子の作用によらなければ異常が現れない形質であったりするために、通常は発見されない。このような潜在的な突然変異を明らかにする方法として、1匹のメスから得た子孫を代々近親交配する単一雌系統作成法と、さらにそれを1対1交配で世代を継続する近交系系統作成法がある。これらを併用して、山口大学構内の野外集団から時計突然変異を分離するのに成功した。

③トランスポゾンによる挿入突然変異誘発法

最近、ショウジョウバエでは、トランスポゾン的一种であるP因子を利用した挿入突然変異誘発法が、簡便で有効な突然変異分離法となっている。今回我々が用いたのは、その中でもP-lacZエンハンサートラップ法(O'Kane & Gehring, 1987)と呼ばれるものである。この方法では、二つの形質転換系統P[lacZ]とP[Δ2-3]を用いる。

P[lacZ]は、P因子内に大腸菌のβ-ガラクトシダーゼ(lacZ)の構造遺伝子を組込んだ遺伝子(P[lacZ])を1個だけ持つ。P[lacZ]内にはこのほかに、選別マーカーとして眼色の正常遺伝子ry⁺が組込まれているので染色体への挿入を眼色という外部形態によって確認できる。さらに、大腸菌の複製開始点、薬剤耐性遺伝子も連結されているため、挿入部位近傍のDNAをプラスミドレスキュー法でクローニング出来るという利点もある。このP[lacZ]は、転移に必要な酵素トランスポゼースの構造遺伝子を欠いており、そのみでは自律的な染色体上の転移を起こさない。P[lacZ]系統とP[Δ2-3]系統(トランスポゼースのみ産出し、自身は転移を起こさないP因子を持つ。優性マーカーKiにより識別可能)を交配する。この交配による雑種第1代(F₁)の雄の精原細胞ではP[lacZ]のゲノムへのランダムな転移が誘発される。この雄をさらに交配し、F₂世代でP[Δ2-3]を持たない系統を選別すれば、次世代以降、P[lacZ]は転移不可能になる。この交配により約400系統の常染色体上へのP因子挿入系統を作成した。

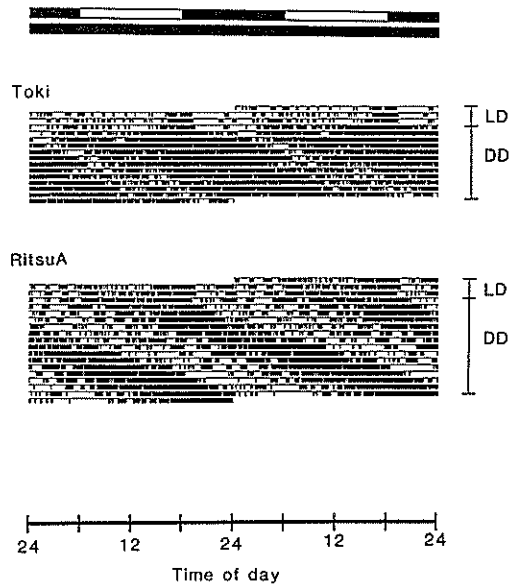


図2. 二つの長周期突然変異系統 Toki と Ritsu A の典型的個体における活動記録図。

確立した挿入系統の中に、概日活動周期に異常があると思われる1系統を得た。そこで、残りの系統に対するスクリーニングはひとまず打ち切り、この系統に関するさらに詳細な解析を行った。

研究成果

1. EMSによる概日リズム突然変異系統 Toki

(1) Tokiの概日パラメーター

Tokiは野生型 Canton-S の第2染色体を突然変異誘発剤 EMS で処理することによって作りだされた、概日リズム突然変異系統である(図2)。この系統は、概日活動リズムに関するさまざまなパラメーターに変調を起こしている(表1)。すなわち、①活動周期(τ)はCanton-Sより1時間長く、 25.3 ± 0.3 hrであった。②LDでのリズムの位相(ϕ_{LD} : 暗開始から1日の活動終了までの時間)はCanton-Sよりも後退していた。③概日リズムの1サイクルにおける活動期と休止期の比(α/ρ ratio)はCanton-Sの1.6に対して5.6であった。さらに、④DDでの活動量がCanton-Sの約2.3倍あった。

(2) 温度補償性

変温動物概日リズムの最も注目すべき性質の一つに温度補償性がある。これは、周期を温度に対して安定に保つ機構で、その存在は、温度が10°C変化した時の周波数の変化率(Q_{10})が1に近いこ

表1. 長周期2系統の概日パラメーター

Strain	N	τ (hr)	ϕ_{LD} (hr)	α/ρ Ratio
Canton-S (+/+)	31	24.2 ± 0.3	0.4 ± 0.2	1.7 ± 0.3
Toki/+	28	24.6 ± 0.2	0.4 ± 0.2	2.4 ± 0.9
Toki/Toki	25	25.3 ± 0.3	0.6 ± 0.3	4.2 ± 1.8
RitsuA	25	27.3 ± 0.8	1.5 ± 1.2	1.7 ± 1.2

N: 個体数

表2. 各種環境条件下における Toki 系統の周期

Strain	19°C		24°C			28°C
	DD	DD	0.1 lux LL	1 lux LL	50 lux LL	DD
Canton-S	24.2 ± 0.3 (11)	24.2 ± 0.3 (31)	26.6 ± 0.5 (20)	28.1 ± 1.8 (10)	ns (14)	24.1 ± 0.3 (14)
Toki	25.1 ± 0.3 (11)	25.3 ± 0.3 (25)	26.0 ± 0.4 (11)	ns (14)	ns (14)	25.2 ± 0.3 (14)

ns: 有意な周期なし

() 内は個体数

とで示される。

19°Cおよび28°Cで活動記録をもとに計算した結果、Canton-S, Tokiともに Q_{10} は、ほぼ1に近く、高い温度補償性を示した(表2)。このことは、Toki突然変異が、温度補償機構に対しては本質的な変化を与えていないことを示している。

(3) 照度依存性

概日パラメーターと照度との間には、一般に“概日則”と呼ばれる経験則が成り立つことが知られている。それは、三つのパラメーター① α/ρ ratio ②1周期における活動の総量③周期の逆数が、光量に比例して、昼行性動物では増加し、夜行性動物では減少するというものである。

この概日則の適用性を調べるため、3種類の照度(0.1, 1.0 lux, および50 lux以上の恒明条件(LL), およびDD)の下での活動をCanton-SとTokiの間で比較した(表2)。両者ともに、照度が高くなるにつれて周期が伸び(周波数が減少し)、概日則に反する性質を示した。また、周期伸張の度合いは、Canton-Sの方が大きく、その結果として、0.1 lux LLではToki(26.0 ± 0.4 hr)より長い(26.6 ± 0.5 hr)周期を示した。さらに、照度が高くなるにつれて周期性が無くなる傾向が認められたが、その傾向はTokiで比較的強く、1 luxですでにほとんどの個体が正常なリズムを示さず、LL第1日目に1回だけ概日ピークを示す傾向はあったものの、その後の活動からは概日周期が検出できなかった。

周期に関して概日則が成り立たないこと、2系統のあいだで照度依存性に差があることなどは、ショウジョウバエの概日機構を明らかにする上で重要な事実であると思われる。

(4) 遺伝学的研究

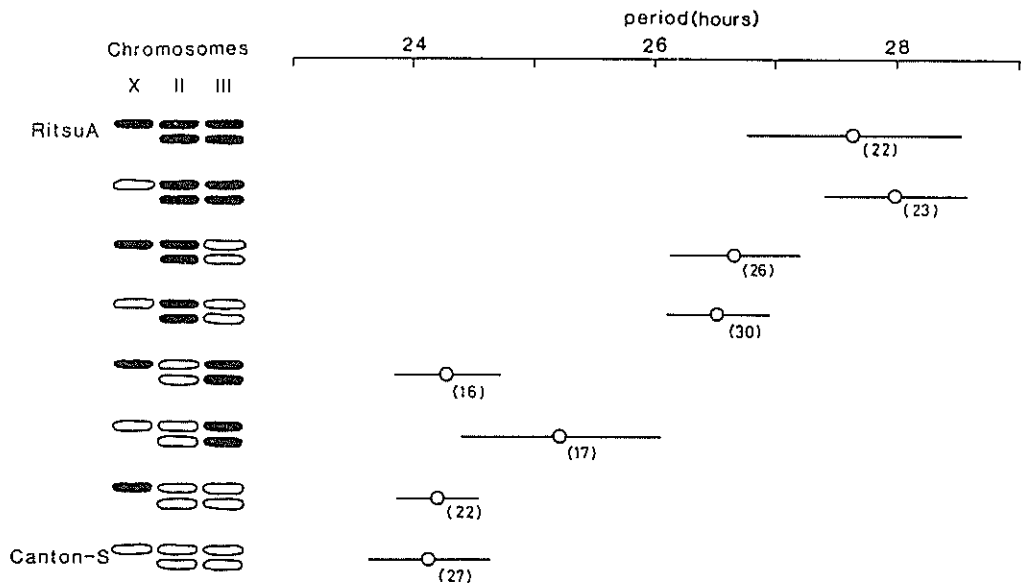


図3. Ritsu A (黒)とCanton-S (白抜き)の間での染色体入れ替え系統の周期. 第2染色体がRitsu由来(上から4段目まで)であれば周期は1時間以上長く, 第3染色体がRitsu由来(上から5,6段目)でも若干の延長が見られる.

Canton-SとTokiを交配して得た F_1 は, 両系統の中間の周期を示した(表1)。よって, この突然変異は周期についてみると, 野生型に対して不完全優性であると思われる。

形態マーカー遺伝子との交叉を利用してToki遺伝子の座位を推定した。優性マーカーを使用した実験と劣性マーカーを利用した実験の間で, 結果に多少のくいちがいはあったが, Toki遺伝子は, *black* (2-48.5)~*Bristle* (2-54.8)の間に位置する可能性が強い。これは, 第2染色体中央部左腕, 唾液腺染色体上の部位としては, 34D4-6~38E9に該当する。この部位にさまざまな形で染色体欠失を起こしている7系統と交配させ, 遺伝子量効果による細胞学的マッピングを試みたが, Toki遺伝子の正確な座位決定には至らなかった。

2. 自然個体群からの分離

(1) 単一雌系統

山口大学構内のキイロショウジョウバエ自然集団から分離した11の単一雌系統は, 23.8~24.9 hrの平均周期を示したが, それには有意差はなく, 全系統で用いた総数137匹の平均は24.4±

1.0 hrであった。この平均値は, 標準偏差が大きいことを除けば, Canton-Sとほとんど同じであった。

(2) 近交系系統

単一雌系統の一つを出発点として, 雌雄1対1交配を15代続けた近交系系統で, 異常に周期の長い(約27.5 hr), 二つの突然変異系統を得, それぞれRitsuAおよびRitsuBと名づけた(図2)。二つの系統の周期には有意差はなく, 両方の交配による F_1 でも周期は変らなかったで, これらは本質的には同一の突然変異であると思われる。

この周期は per^L (29 hr)に次ぐ長さで, Canton-Sより3 hrも長く, 概日周期のホメオスタシス限界に近いと思われる。

(3) RitsuAの概日パラメーター

周期については上に述べた通りであるが, LDサイクルに対する同調性にも変異が見られ, ϕ_{LD} はTokiよりもさらに後退していた。しかし, α/ρ ratioには変化が見られず, 突然変異がある特定位相を伸ばす(additive effect)のではなく, リズ

ム全体に対して延長効果 (multiplicative effect) をもつものである可能性を示唆する結果を得た (表 1)。

(4) RitsuA に関する遺学的研究

(4-1) 染色体置換

突然変換がどの染色体上にあるかを調べるために、RitsuA と Canton-S との間で染色体置換を行なった系統のリズムを計測した (図 3)。その結果、第 2 染色体上の突然変異遺伝子 (群) が周期を長くすることに対して最も大きな影響を持つことがわかった。また、第 3 染色体上にも、影響は比較的にかさいものの、周期を延長する効果のある突然変異 (群) が存在することがわかった。

(4-2) 遺伝子座の推定

第 2 染色体のみが Ritsu 由来になるような染色体置換系統をつくり、それを用いて、交叉を利用したマッピングを行った。その結果、第 2 染色体左腕, dumpy(2-16.5) と black(2-48.5) との間に突然変異を持つことがわかった。

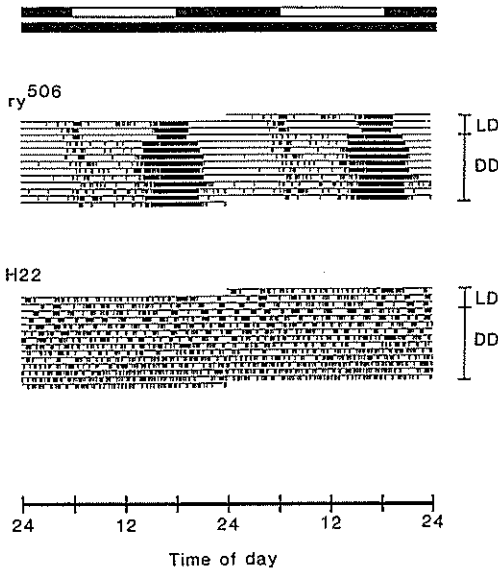


図 4. エンハンサートラップ法で生じたと思われる突然変異候補株からみつけた系統 H22 の、無周期個体の典型的活動記録図。基本系統 ry 506 (上段) の活動 (野生型 Canton-S とほぼ同じ) に比べ、明暗周期に対する同調性が弱く、恒暗条件下で、約 88% の個体が無周期であった。

3. エンハンサートラップ法による分離

(1) 時計突然変異体の分離

約 400 の P 因子挿入系統を確立し、187 系統 (のべ 529 個体) の活動リズムを計測した。ほぼすべての系統は、LD 12:12 および DD の両条件下で、標準系統 ry506 とほぼ同様の活動を示し、概日時計機構における突然変異は誘発されていないと思われた。ただ、186 番目にスクリーニングした系統 H22 は、明暗サイクルに対する同調性が弱く、また、恒暗条件下での概日周期性にも異常が認められたので、さらに詳しく時間生物学的検討を加えた。

(2) 時間生物学的研究

(2-1) H22 のほとんどの個体は、恒暗条件下で概日周期性を示さなかった (図 4)。しかし、一部に、統計的に有意な周期性を示すものもあった。これまでに調べられた生物の中で、無周期型の突然変異は、ショウジョウバエの per^0 系統のみである。H22 の無周期性が本当であれば、 per^0 について 2 番目ということになり、時計の遺伝学的研究をさらに発展させるものになる。そこで、H22 および per^0 両系統について周期性の有無を、主として χ^2 ピリオドグラムにより慎重に検討した。この方法のほかにも、最小自乗スペクトラム法、最大エントロピー法による解析も行い参考とした。

計測した全個体についての概日周期性の有無をまとめたものが表 3 である。 per^0 では全個体の 29.1% という高率で有意な概日周期が検出された。一方 H22 で周期があると判断されたものは 11.6% であった。この出現率は有意であった (χ^2 検定, $p < 0.001$)。

(2-2) 活動リズムの周期性が失われている場合、その原因として、①概日時計機構そのものの機能障害によるものと、②概日時計機構には異常はないが、活動リズム発現に至るまでの経路に異常がある場合の大きく二つが考えられる。どちらに原因があるかを推察する時間生物学的の方法の一つとして、phase shift 実験がある。これは、生物が同調している明暗サイクルの位相を前進あるいは後退させて、再同調までの過程すなわち移行期

の状態を調べる実験である。新しい明暗サイクルに同調するまである程度の日数が必要であれば(いわゆる“時差ぼけ”が存在すれば)、時計機構が働いていることが推察されるが、即座に同調する場合には(移行期が存在しない)、そのほかにいろいろな可能性が考えられて、理由は速断できない。

ry506, H22 両系統について、LD 12:12 を 6 時間の後退及び前進させることにより、移行期を比較した。後退の際には、両系統とも再同調が直ちに完了し、はっきりとした移行期は現れなかった。位相前進の場合には、ry506 では、少なくとも 1 日以上移行期が存在していたのに対し、H22 では、移行期が存在しないように思われるもの(14 個体)と存在するように思われるもの(7 個体)の 2 通りが現れた。

phase shift 実験は、LD サイクルの位相を変えるだけでなく、LD の相対的照度をさまざまに変えて行う必要がある。その意味で実験はまだ不完全であるが、上記の結果は、H22 で概日時計が作動している可能性を捨てきれないことを示している。

(3) 遺伝学的研究

(3-1) H22 系統の染色体のどの座位に P[lacZ] の挿入が起こっているかを調べるために digoxigenine ラベルした Carnegie-20 (P 因子の一部を含む cDNA) をプローブとした、唾液腺染色体上での *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、P[lacZ] は、ショウジョウバエの 4 対の染色体中、第 3 染色体右腕のほぼ中央部、86C の部位に挿入されていることがわかった。この座位近傍には、neu (neuralized), Su(var) 14 という二つの遺伝子があることがわかっているが、H22 がこれらの遺伝子の突然変異体かどうかは不明である。

(3-2) 第 3 染色体 86C の座位には、Df(3R) cu⁴⁰cu⁴⁰ という染色体欠失が見ついている。これと H22 の染色体がヘテロ接合した個体(遺伝子型 Df/H22)のリズムを計測することによって、この突然変異遺伝子における遺伝子量効果を知ることができる。

野生型と欠失染色体とのヘテロ接合個体(遺伝子型 Df/+) は、恒暗条件下で 23.35 ± 0.17 hr ($N=10$) の自由継続周期を示した。また、Df/H22 (後述のホモ個体と欠失系統を交配して得た) は 23.49 ± 0.16 hr ($N=7$) の自由継続周期を示した。これらの値の間には有意差は認められなかった (*t*-test, $p < 0.01$)。

(3-3) エンハンサートラップ法によって作成した系統は、通常飼育しているレベルでは、P[lacZ] 挿入染色体がホモ・ヘテロ混在系で維持されている。すなわち、H22/H22 (ホモ接合) と H22/ry (ヘテロ接合) である。この二つの遺伝子型は、外部形態からは区別できないため(どちらも正常型の眼色を示す)、これまでの計測では、これら混在系をそのまま用いてきた。ホモ接合のものと、ヘテロ接合のもので周期性の有無に差異があるかを調べるために、無周期性を示すことが実際の計測でわかっているオス個体 10 匹に関して、それぞれ個別に ry506 のメス 3 個体ずつと戻し交配した。無周期性を示したオス遺伝子型が H22/H22 ならば F_1 世代は全て H22/ry 型、すなわち外部形態は正常型になるはずである。無周期のオスが H22/ry であったならば F_1 世代は H22/ry 型と ry/ry (外部形態 ry506) 型が 1:1 の割合で出現するはずである。

結果は、10 交配のうちで子孫を得たものが 4、そのすべてにおいて F_1 世代は H22/ry 型と ry/

表 3. H22 系統の周期性の有無

Strain	N	Circadian rhythm	
		Yes	No
24°C			
ry506	69	92.9	7.1
per ^o	134	29.1	70.9
H22	95	11.6	88.4
+/Df	10	100	0
H22/Df	7	100	0
H22/H22	21	90.5	9.5
19°C			
ry506	14	100	0
H22*	15	100	0

*: ホモ, ヘテロ混在系
N: 個体数

ry 型に分離していた。このことから、少なくとも 4 匹のオスについてはその遺伝子型は H22/ry のヘテロ型であったことが示唆された。

(3-4) そこで次に、ホモ接合の個体の活動リズムを調べた。まずホモ個体のリズムを効率よく計測するために、ホモ個体のみで構成された系（第 3 染色体についての純系）を作成した。作成には、交叉を抑制する平衡致死染色体系統 TM3 ry^{rk} Sb e を用いた。4 回の交配の後、第 3 染色体についての純系を得た。ただし、この系統の第 2, 第 4 染色体はもとの H22 系統由来の染色体と TM3 系統由来のものとの混在系であり、性染色体は、TM3 系統由来のものに置換されている。得られたホモ系統のリズムを計測した結果は、表 3 のとおりであった。全体の 90.5% の個体で概日周期が認められた。しかし、周期性の見られないものも 9.5% 現れた。

P[lacZ] のみが突然変異原であると考え、(3-2)~(3-4) の結果には矛盾がある。すなわち、(3-3) で示されたように、この突然変異が優性であれば、(3-2) の H22/Df および (3-4) のホモ個体は無周期になるはずである。

これらの結果を矛盾なく説明するためには、次のような可能性を考える必要がある。①H22 は P[lacZ] によらない突然変異である。その場合、突然変異は第 3 染色体上にはない。なぜなら、第 3 染色体に関する純系の多くは周期性を示すから。②P[lacZ] による突然変異ではあるが、他の遺伝子との相互作用で無周期になっている。H22/Df やホモ個体のゲノムの半分以上は、他系統由来のものに置き換わっている。この置き換わった染色体上に、もう一つの突然変異が存在していた可能性がある。

いずれにせよ、先に RitsuA 系統の解析で示したような、染色体入れ替え系統を作成し、そのリズムを計測してみる必要があると思われる、現在、その作業中を行っている。

(4) 組織学的研究

今回用いたトランスポゾンベクター P[lacZ] には、挿入箇所近傍の遺伝子発現のレポータ遺伝子として、大腸菌の β -ガラクトシダーゼ遺伝子を組

み込んである。今回は基質である X-gal との酵素反応によって、H22 遺伝子が発現していると思われる組織の染色を行った。組織切片を作成しての染色部位の詳細な同定を行っていないので、whole mount 染色での簡単な記載にとどめる。

成虫の頭部では、視葉 (medula) の最外層よりもやや深い部分が層状に染色されていた。成虫の胸部では、神経節の一部に染色が見られた。

幼虫では、脳半球の両側に染色が見られた。ガングリオンでは点々とした染色が左右対象に列状に見られた。これらは、おそらく神経芽細胞ではないかと思われる。

(4-4) 今後の課題と発展

今回の研究によって、我々は、二つの概日リズム突然変異体 Toki, Ritsu を分離し、その遺伝学的、時間生物学的性質を解析した。また現在、もう一つの系統 H22 について新しい突然変異の可能性を検討中である。これらはいずれも、我が国で初めての試みである。

概日活動リズムのパラメーターに関係のある遺伝子をできるだけ多く検索し、それらの間の相互作用を調べることによって、時計の実体に近づくことが最終課題である。さしあたっての課題は、時間生物学的面と遺伝学的面にわけて述べれば、次のようなものであろう。

時間生物学では、概日リズムの性質に関して多くの経験則が知られている。これらの経験則には、さまざまな環境条件下での長期の活動記録に基づくものが少なくない。概日リズムの遺伝学的研究の第一段階は、無周期性も含めて、経験則から逸脱した変異を見つけることである。それを的確に判断するためには、周期性の有無、周期や位相の変化に止まらず、リズム全体の様相 (例えば、複数の概日時計が存在する可能性など) に関する細かな観察を、もっと多様な環境の下で、また長期記録 (30 日程度の) に基づいて行う必要がある。

遺伝学的な実験としては、まず、これまでに知られていた時計突然変異とわれわれが見つけた突然変異との二重突然変異の作成が必要である。遺伝子間の相互作用を調べることで、概日時計機構

の遺伝的な成立背景についての情報が得られると思われる。さらに、概日時計機構の分子レベルでの解明のためには、これらの遺伝子のクローニングが重要だが、そのためにはさらに詳しい遺伝子座の決定を行わねばならない。

研究成果については学会で口頭発表した。これを学術論文にまとめて世に問うこともまた重要な課題である。現在 1 篇を執筆中、1 篇を準備中である。

5. 発表論文

千葉喜彦, 村田武英, 新川泰弘, 松本 顕, 富岡憲治:
昆虫における時計遺伝子変異検索の試み, 日本生気象学会第 29 回総会 (長崎) 講演要旨集, *Jpn. J. Biometeorol.* (1990)

Y. Chiba, T. Murata, Y. Shinkawa, A. Matsumoto and

K. Tomioka: Search for biological clock mutant, *Int. J. Biometeorol.* (1990), in press

T. Murata, A. Matsumoto, K. Tomioka and Y. Chiba: Clock mutant form natural population of *Drosophila melanogaster*, 日本動物学会第 61 回大会 (新潟) 講演要旨集, *Zoological Sci.* (1990).

松本 顕, 谷村禎一, 富岡憲治, 千葉喜彦: キイロショウジョウバエにおける第 2 染色体性突然変異 M-780 の遺伝子座, 日本動物学会中国四国支部大会講演要旨集 (1990, 高知).

村田武英, 松本 顕, 富岡憲治, 千葉喜彦: 野外集団から分離したキイロショウジョウバエ時計突然変異体, 日本動物学会中国四国支部大会講演要旨集 (1990, 高知).

松本 顕, 村上柳太郎, 富岡憲治, 千葉喜彦, 谷村禎一: エンハンサートラップ法を用いたキイロショウジョウバエ時計突然変異体分離の試み, 日本動物学会中国四国支部大会 (1991, 島根).