

# 情文カフェ(2011年7月27日)

- 植物の生物リズムの研究
- 頭足類の学習の実験系

# 生物リズムとは？



- 生物はいろいろな周期のリズム現象を示す
- 1日周期のものを生物リズムということが多い
- 睡眠・覚醒を始め、多くの生理過程が生物リズムを示す

# 植物の生物リズム

開花のピーク

8:33

9:21

10:01

13:56

16:21



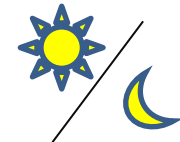
葉が閉じる

- 植物も(ゆっくりで気づきにくいが)生物リズムを示す
- 上: 中庭のマメ科植物の運動リズム
  - 花は午後に咲く; 夜は?
  - 葉は、基本開いているが、午後早くに閉じる
- 多くの生理現象がさまざまなタイミングでピークをむかえる

# 植物のリズム研究の歴史は長い



オジギソウの就眠リズム



環境サイクル



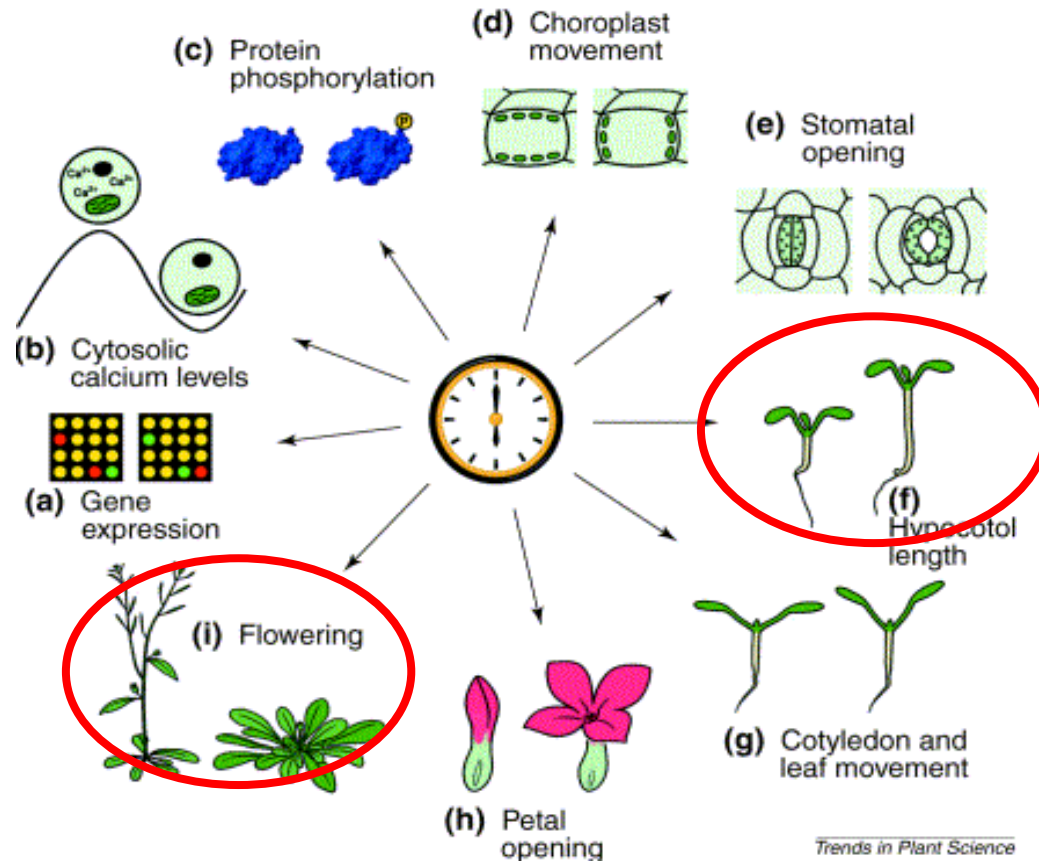
生物時計



生物リズム

- アンドロステネスによる *Tamarindus indicus* の就眠リズムの観察 (紀元前)
- de Mairan による恒常環境でのオジギソウの就眠リズムの観察 (1729年)
- → 生物リズムは自律振動 (生物時計) が生み出す

# 植物の様々な生物リズム



Trends in Plant Science

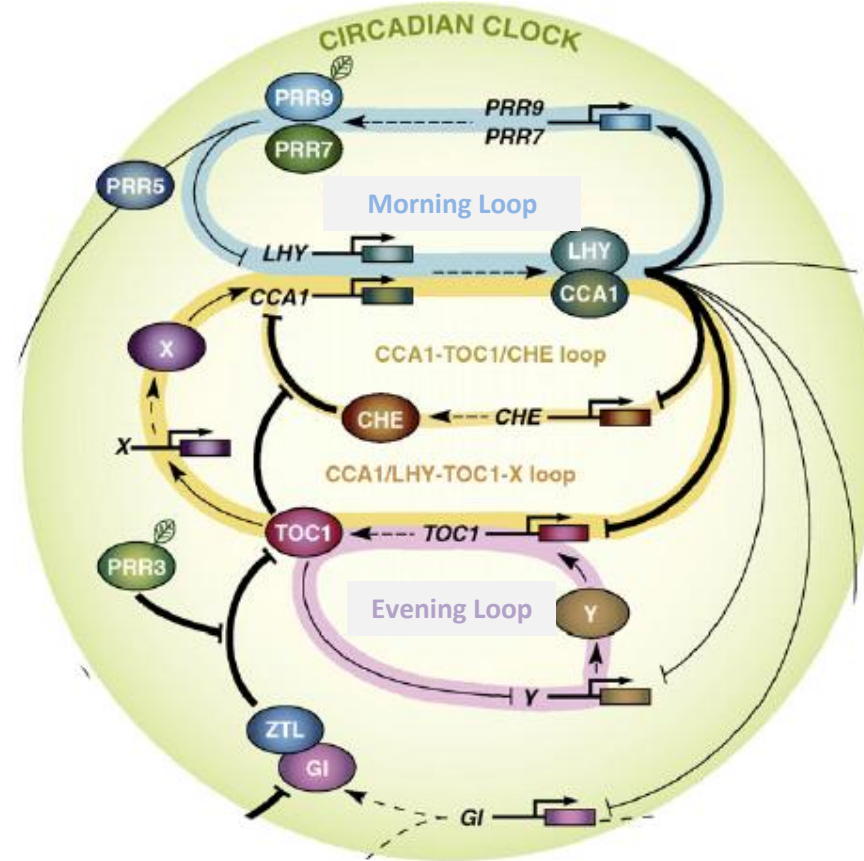
(Barak et al., TIPS, 2000)

- 植物はいろいろな生物リズムを示す（就眠運動、花卉の開閉、気孔の開閉、成長、代謝、光合成活性、様々な遺伝子発現、*e.t.c...*）
- 農業、園芸などに応用できる可能性があり、興味深い

# 植物の生物時計の分子機構



シロイヌナズナ  
(ナズナ)



- 植物では、モデル種のシロイヌナズナで遺伝子レベルの研究が進んだ
- 生物時計の部品「時計遺伝子」がいくつかみつかった
- 時計の仕組み：時計遺伝子の発現制御のネットワークではないか？
  - Morningループ：朝方に強く発現する遺伝子からなる
  - Eveningループ：夕方に強く発現する遺伝子からなる

# 時計の分子的仕組みの研究が進む「モデル生物」



シロイヌナズナ  
(ナズナ)



マウス



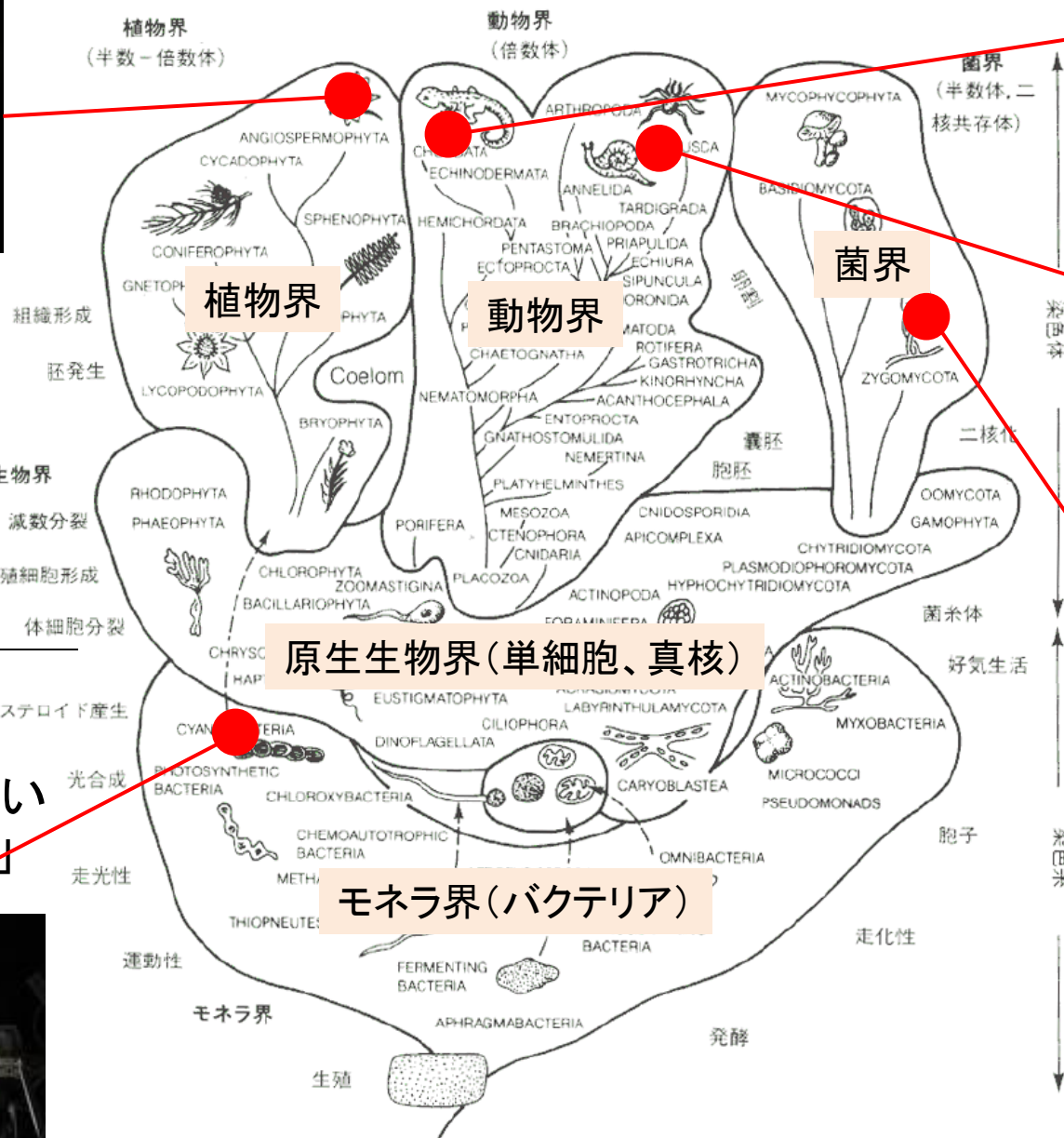
ショウジョウバエ



アカパンカビ

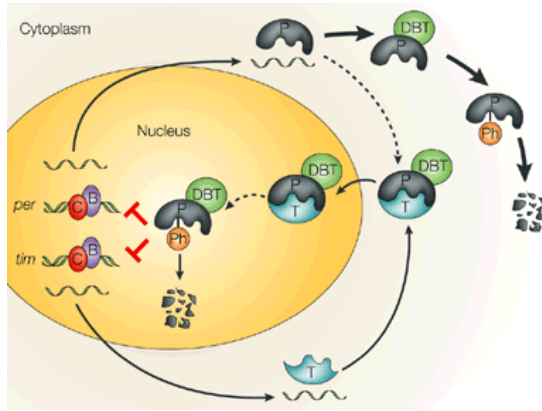
核を持つ  
「真核生物」

核を持たない  
「原核生物」

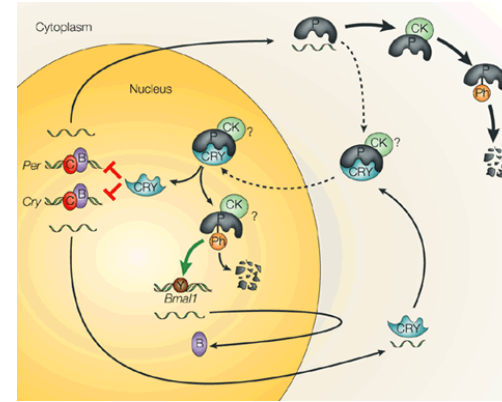


シアノバクテリア 五界説:リン・マルグリリスとカーリーン・V・シュヴァルツ(1982) より

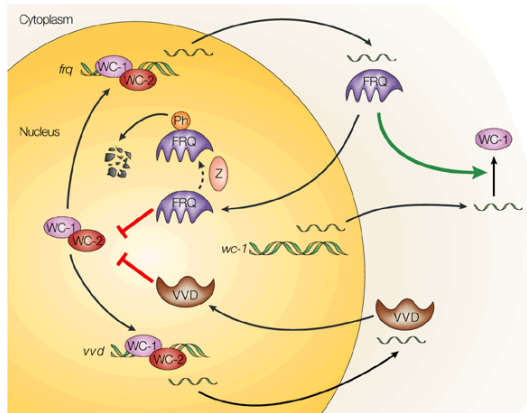
# 時計の仕組み：プロセスは似ているが部品は異なる



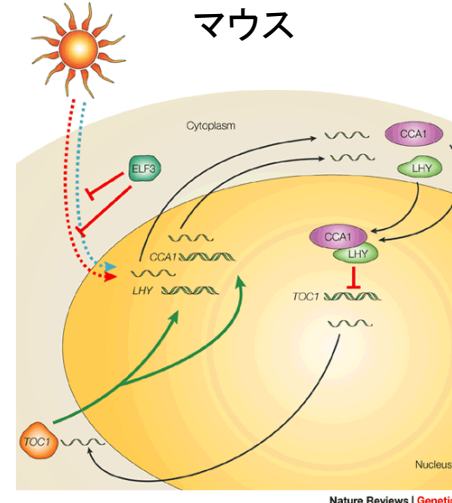
ショウジョウバエ



マウス



アカパンカビ



(シロイヌ)ナズナ



Young and Kay, 2001, Nat. Rev. Genet.

Nature Reviews | Genetics

- 時計の部品遺伝子「時計遺伝子」がみつけれられている
- プロセスの共通性：時計遺伝子の発現制御ネットワークが時計の仕組みであろう
- 動物、菌類、植物は互いに違う「時計遺伝子」セットを持つ→界の間のつながりがよくわからなかった



# 時計の分子的仕組みの研究が進む「モデル生物」



シロイヌナズナ  
(ナズナ)



マウス



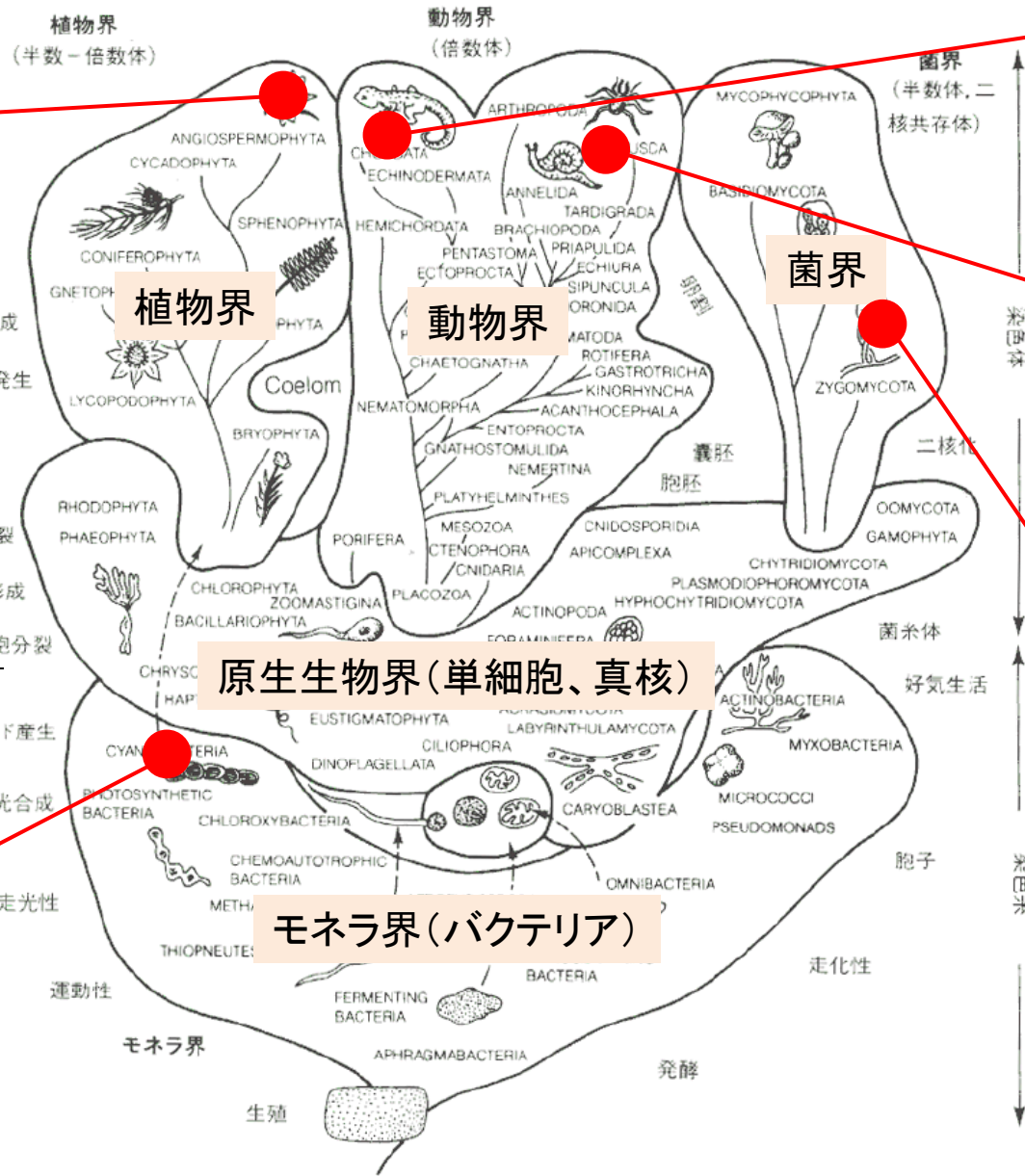
ショウジョウバエ



アカパンカビ

核を持つ  
「真核生物」

核を持たない  
「原核生物」



シアノバクテリア 五界説: リン・マルグリットとカーリーン・V・シュヴァルツ(1982) より

# 時計の分子的仕組みの研究が進む「モデル生物」



シロイヌナズナ  
(ナズナ)

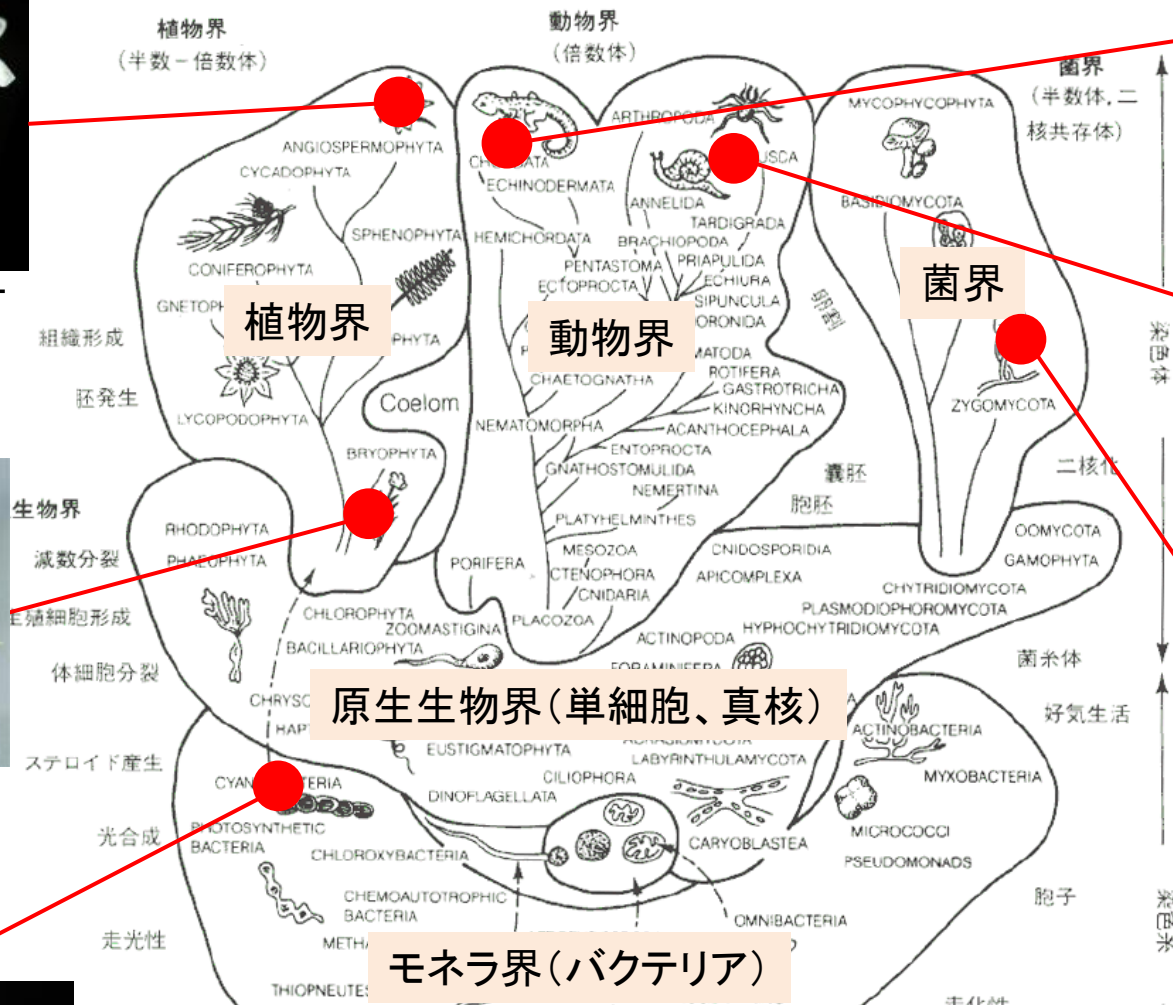


コケ

ゼニゴケ



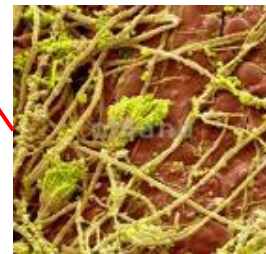
シアノバクテリア 五界説



マウス



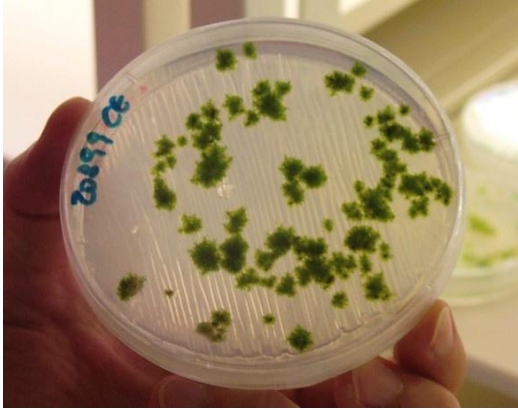
ショウジョウバエ



アカパンカビ

- ~5億年前に「高等」植物と別れた原始的なコケの時計の研究をすることにした
  - 植物の時計の進化・多様性を探る
  - ほかの界の時計とのつながりを探る

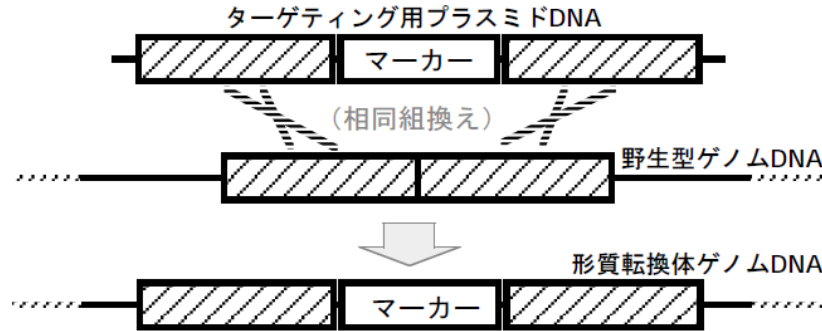
# コケの実験上の利点



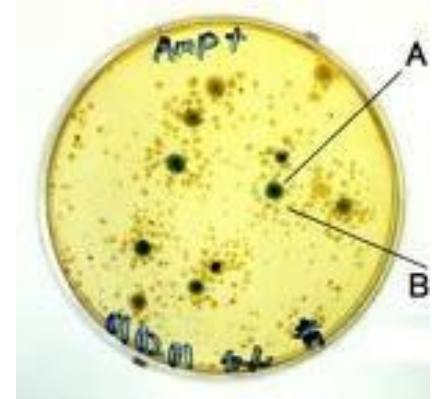
コケは原糸体コロニーを作る



原糸体の液体培養  
(Reutter and Reski 1996)



組み換えによる  
標的遺伝子のノックアウト



大腸菌のコロニー



大腸菌の液体培養

- 小さい、培養・取り扱いが大腸菌のように容易、半数体の期間が長く遺伝学向き
- 組換えにより、高い効率で、遺伝子を破壊（ノックアウト；KO）できる
- ゲノムプロジェクトが進んでいた（Rensing et al., 2008）

# ルシフェラーゼ：遺伝子発現をかんたんに観る道具

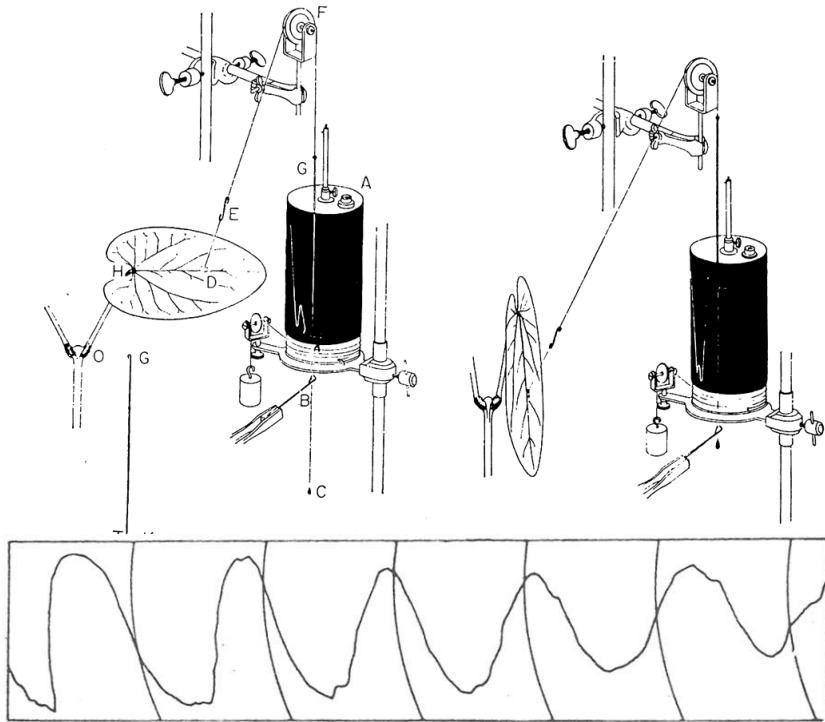
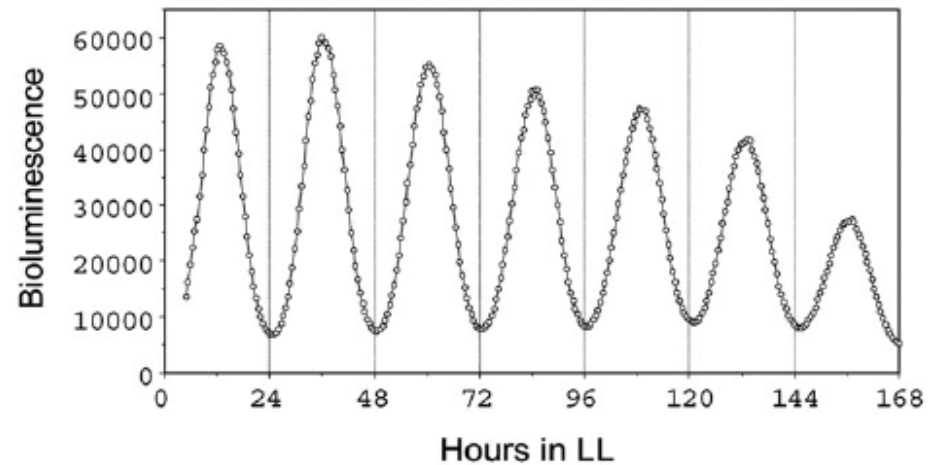
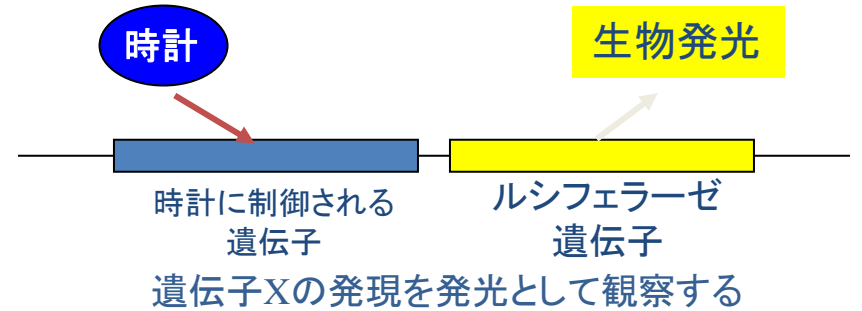


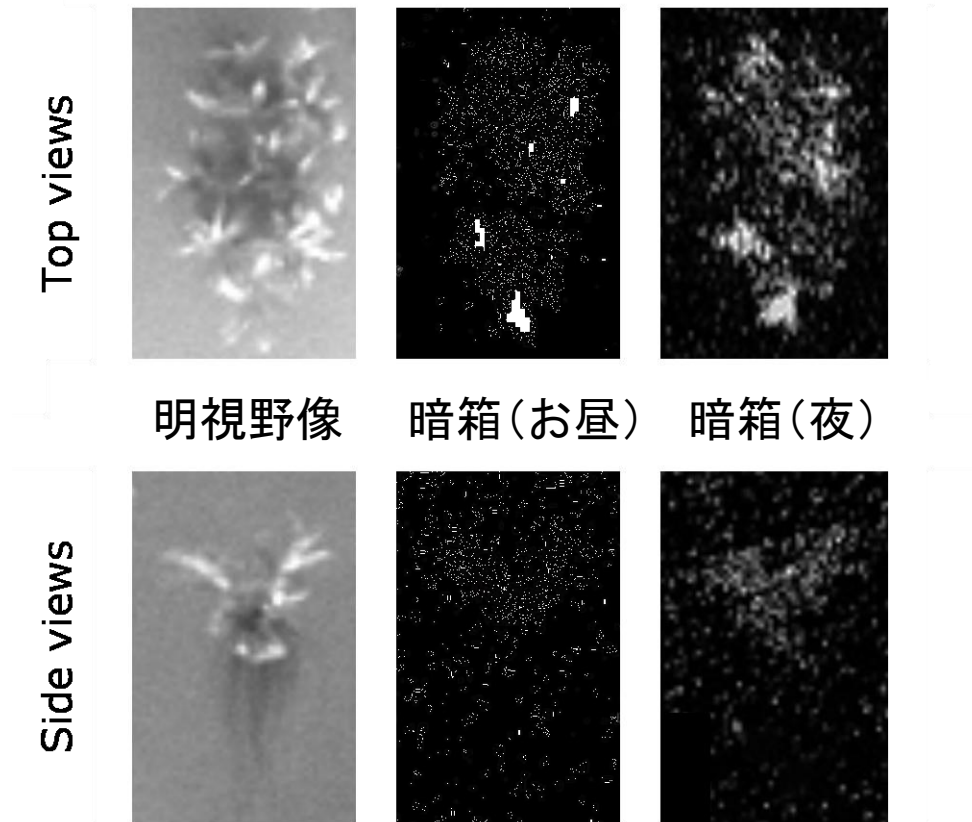
Fig. 13, The Physiological Clock, 2nd edition.  
Erwin Bünning, 1967, Springer-Verlag  
New York.



シアノバクテリアの遺伝子リズムの測定例

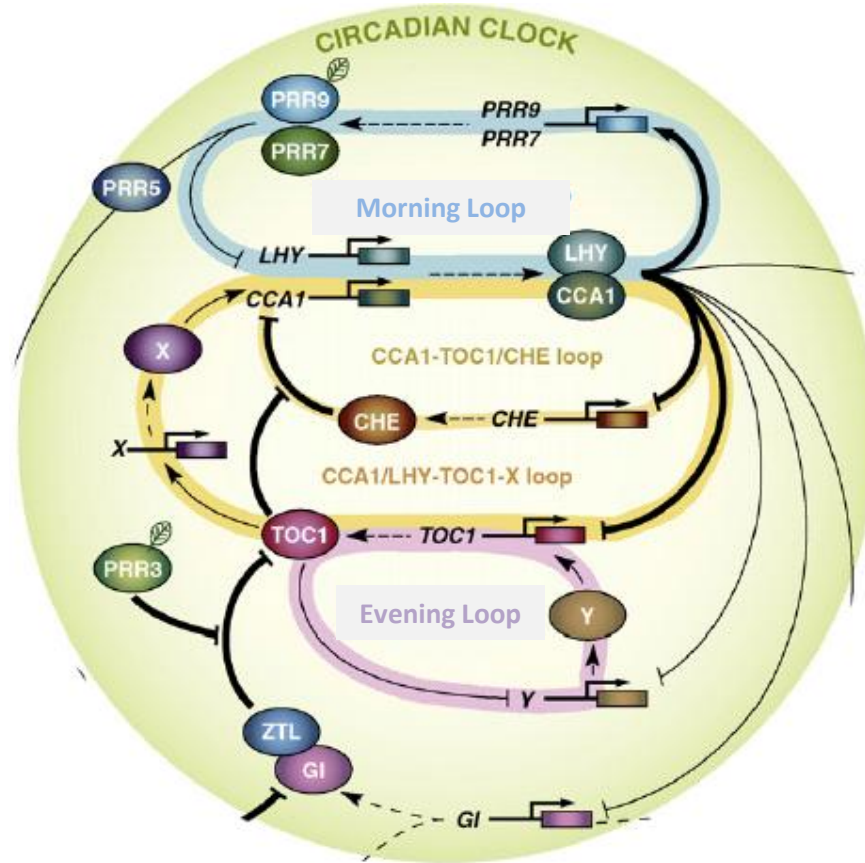
- コケでは生物リズムは一切観察されていなかった
- 左：葉の就眠リズムを自動的に観察する装置
- 右：ルシフェラーゼを用いた遺伝子リズム観察法

# ルシフェラーゼを光合成遺伝子に組み込み、その発現を観察した



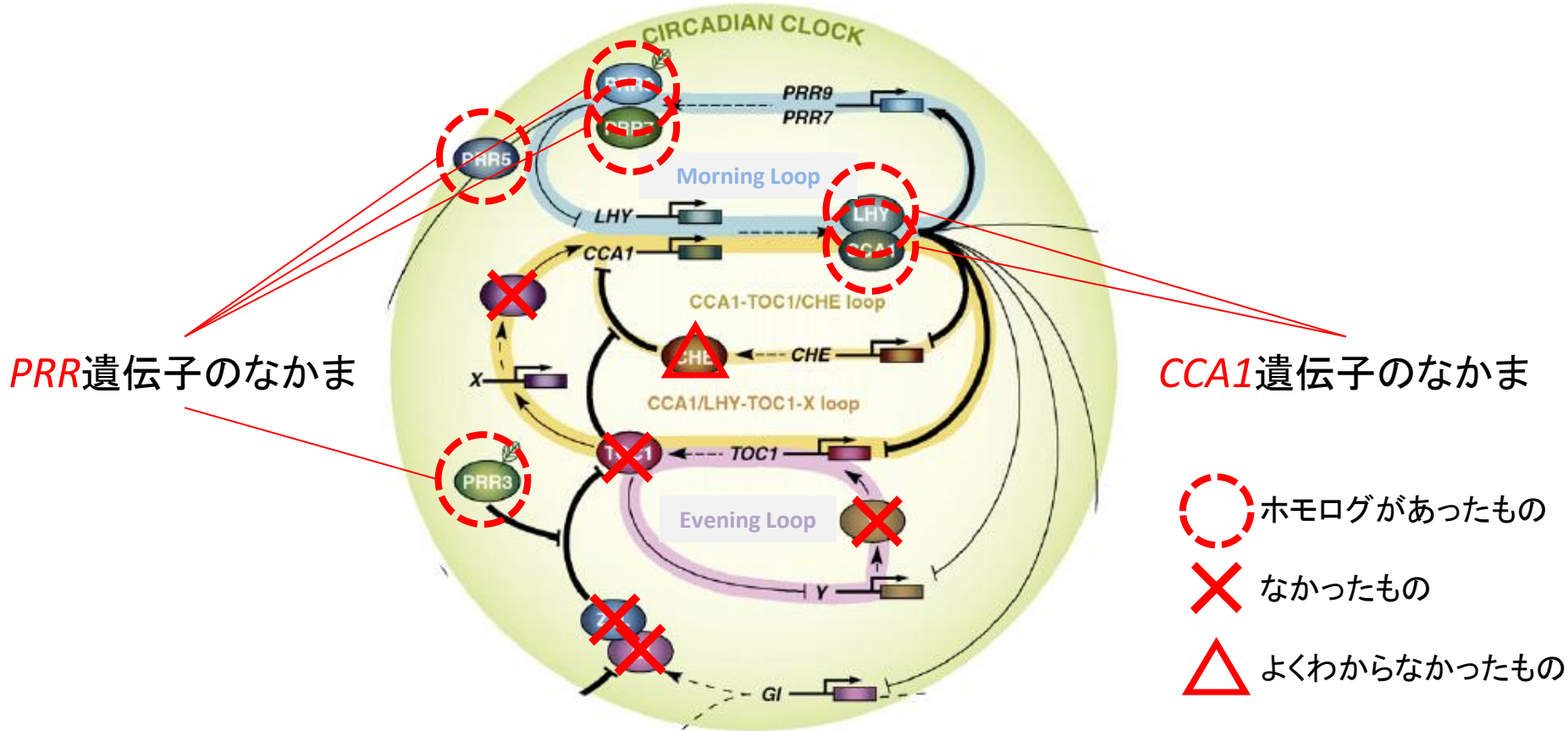
- ・ 光合成遺伝子のプロモーターにルシフェラーゼをつなげ、ゲノムに組込んだ
- ・ コケの葉から、お昼の時間帯に、より強い発光がみられる
- ・ →光合成遺伝子はお昼に強く発現するよう、時計に制御される

# コケにおける時計遺伝子ホモログの探索



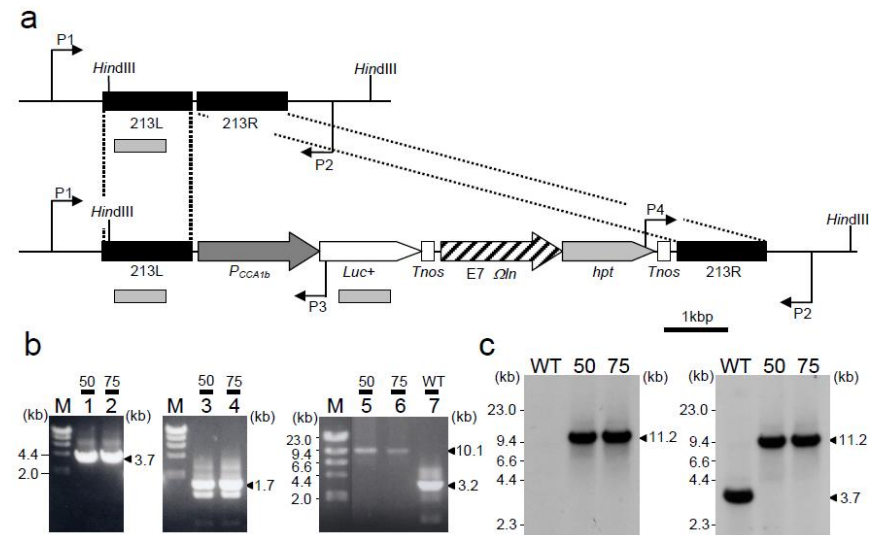
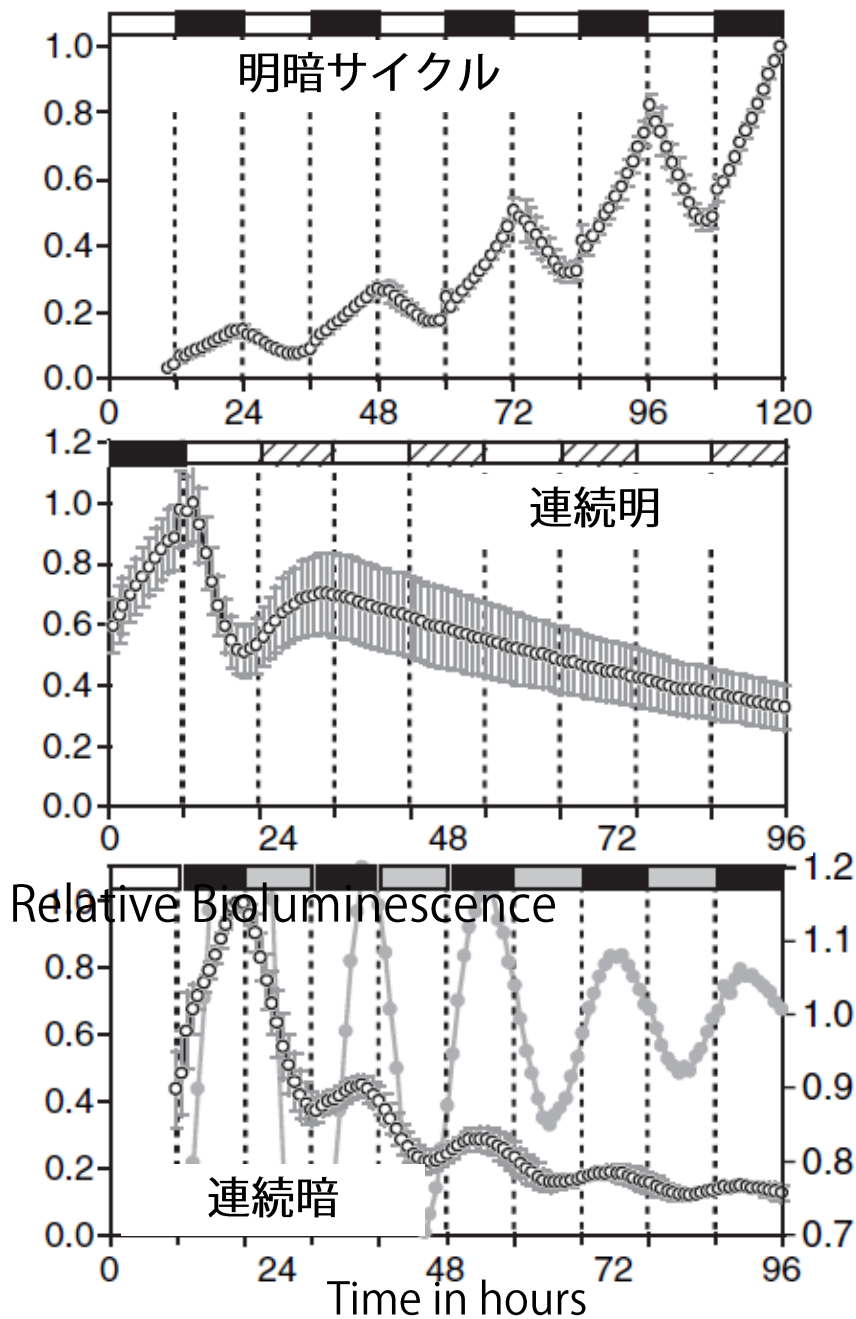
- 植物以外の時計遺伝子のホモログ (=配列の似た遺伝子) はみつからなかった
- ナズナの時計遺伝子のうち...
  - Morningループ周辺の **PRR**と**CCA1** のホモログはあった
  - Eveningループ周辺の **TOC1**、**GI**、**ZTL** のホモログはない
- →**PRR**/**CCA1**ホモログの動き (発現) と働き (時計の部品か?) を調べる

# コケにおける時計遺伝子ホモログの探索



- 植物以外の時計遺伝子のホモログ (=配列の似た遺伝子) はみつからなかった
- ナズナの時計遺伝子のうち...
  - Morningループ周辺の *PRR*と*CCA1* のホモログはあった
  - Eveningループ周辺の *TOC1*、*GI*、*ZTL* のホモログはない
- →*PRR*/*CCA1*ホモログの動き (発現) と働き (時計の部品か?) を調べる

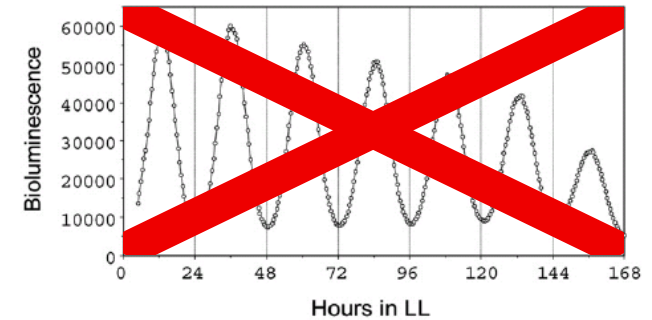
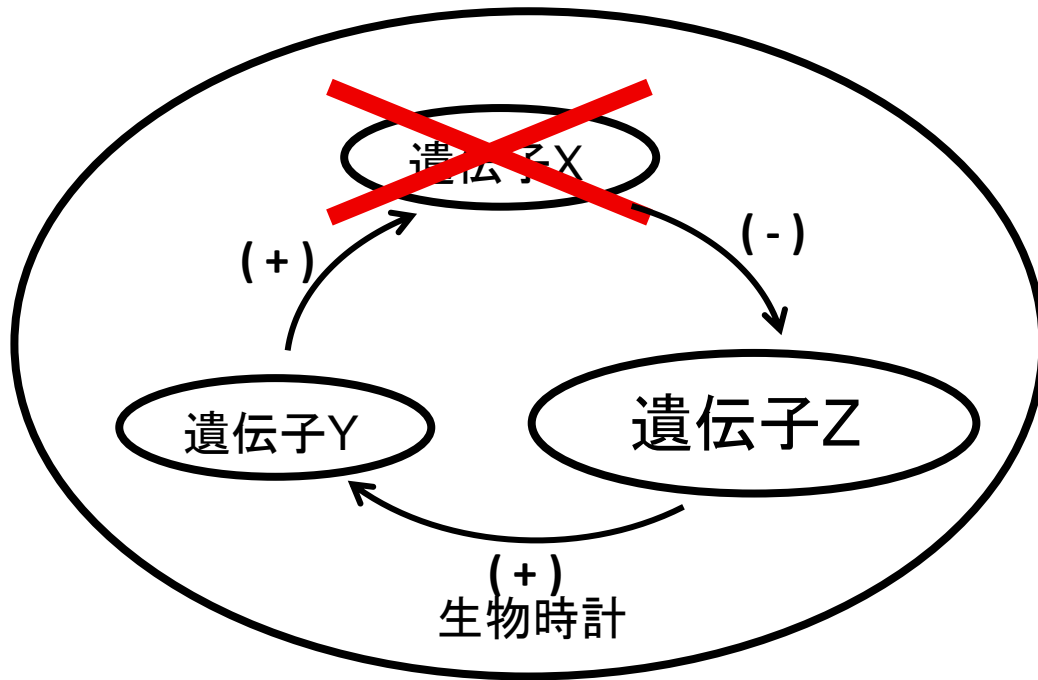
# コケ・CCA1bレポーター株の作出



- 右上：CCA1ホモログの1つCCA1bのプロモーターにルシフェラーゼを組み込んだ
- 左：レポーター株の発光パターン
- 左下：連続暗で発光リズムをはっきり観察できた
- 周期と振幅の正確な定量が可能に  
 → 遺伝子破壊で機能を調べる

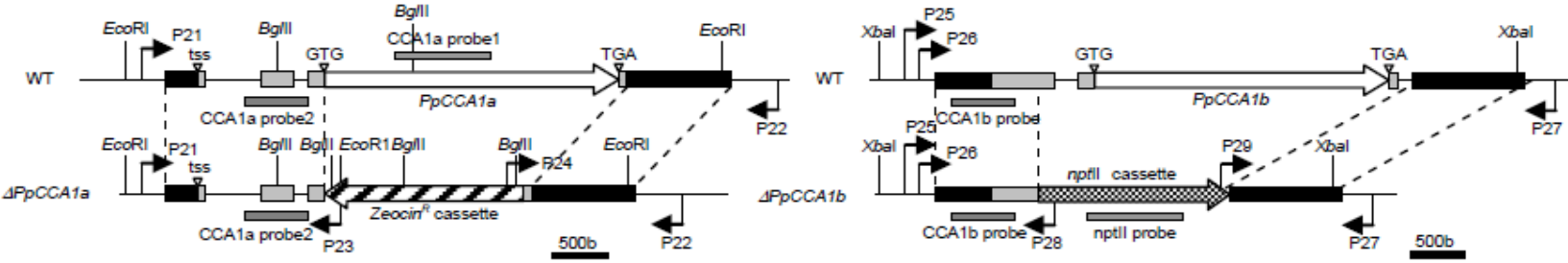


# 候補遺伝子の機能解析と、制御関係の特定

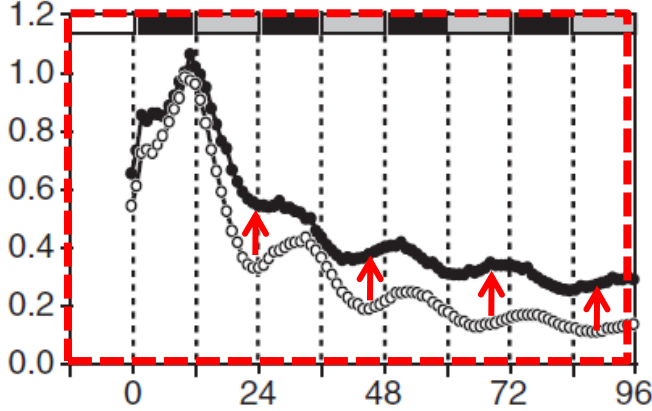


- 遺伝子Xを壊してリズムがおかしくなれば、時計の部品
- Xを壊してZの発現が上がれば、普段はXはZを抑制している

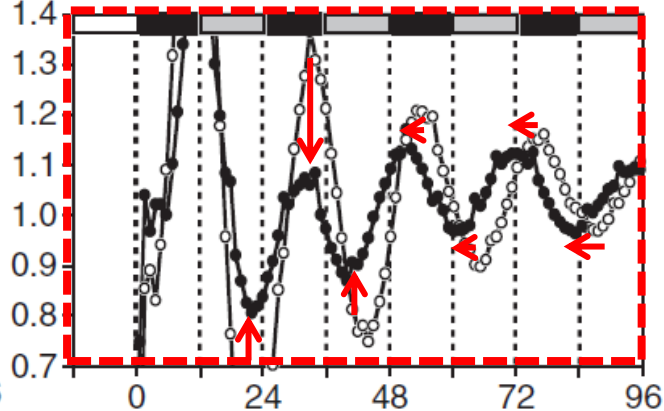
CCA1aとCCA1bは、自己抑制（ネガティブフィードバック）する時計遺伝子である



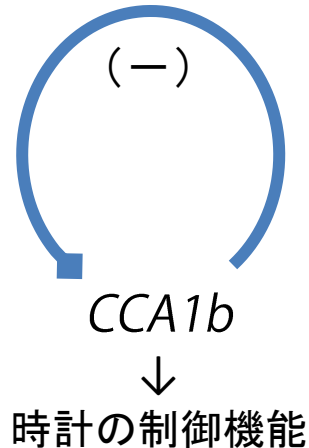
発光レベルの比較のグラフ



デトレンドし標準化したグラフ

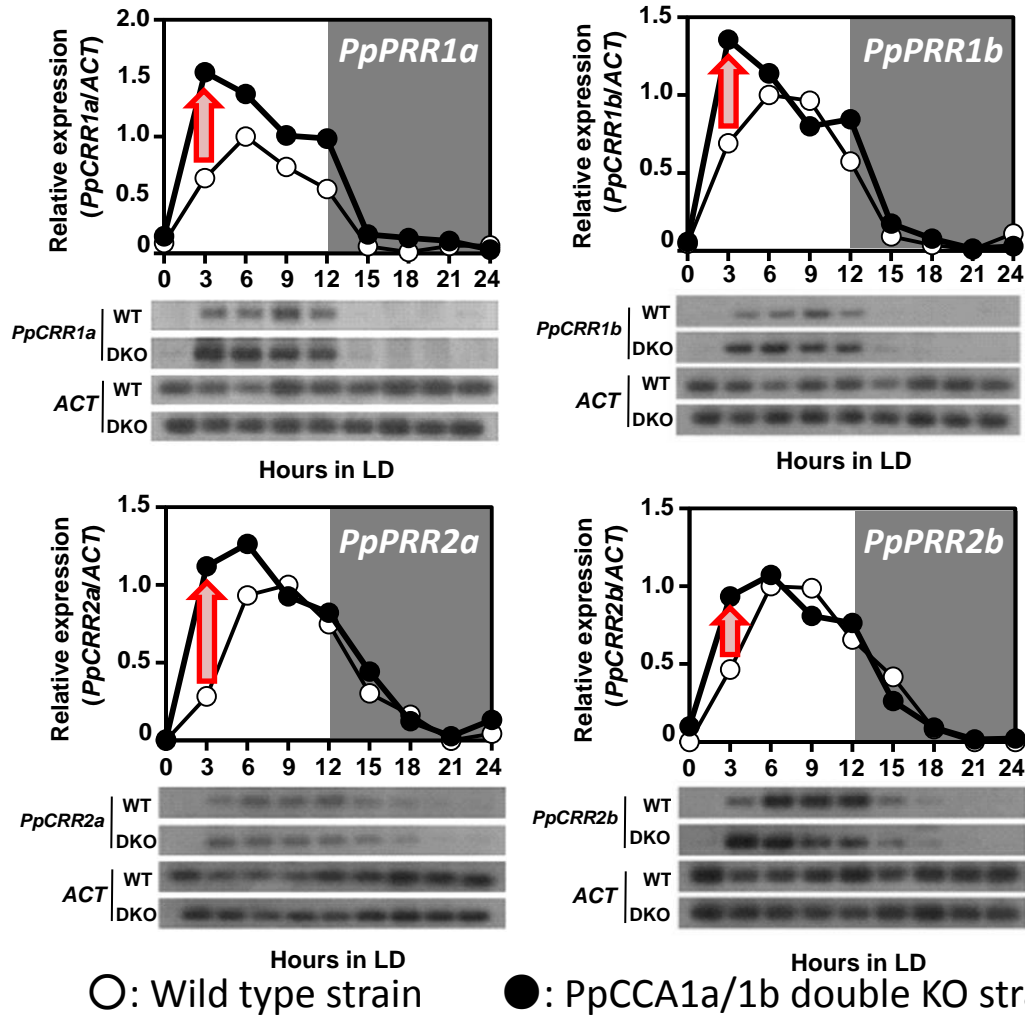


○：野生型      ●：1bのKO



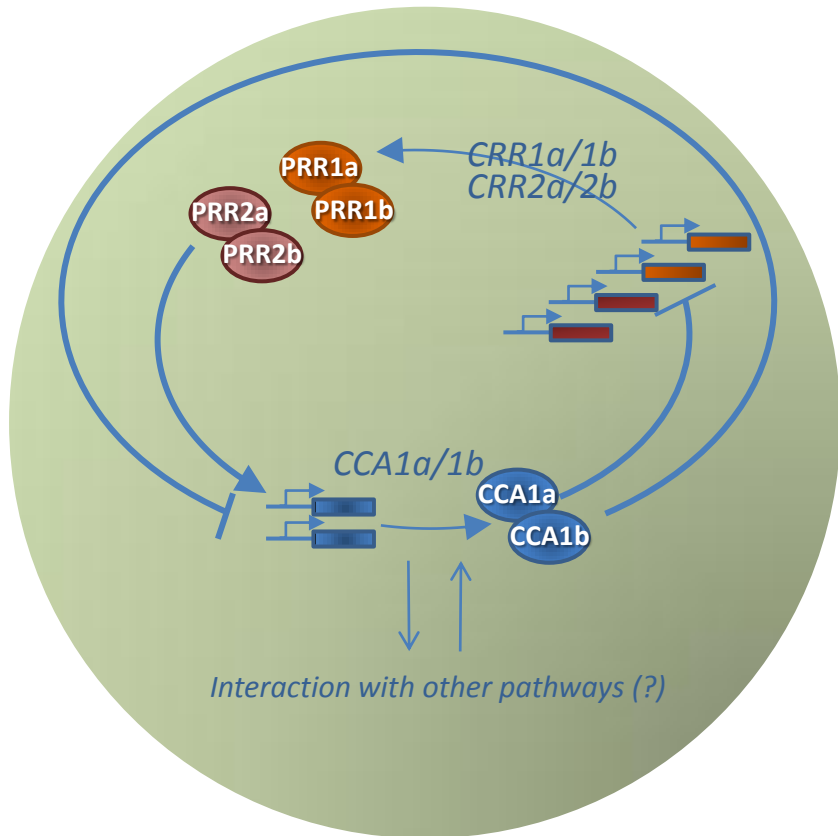
- 左：CCA1aとCCA1bの破壊により、CCA1aとCCA1bの発現が増加した
- 中央：CCA1aとCCA1bの破壊により、短周期化と低振幅化がみられた  
→ CCA1aとCCA1bは自己抑制する時計遺伝子である

# コケPRRはCCA1a/CCA1bに抑制される

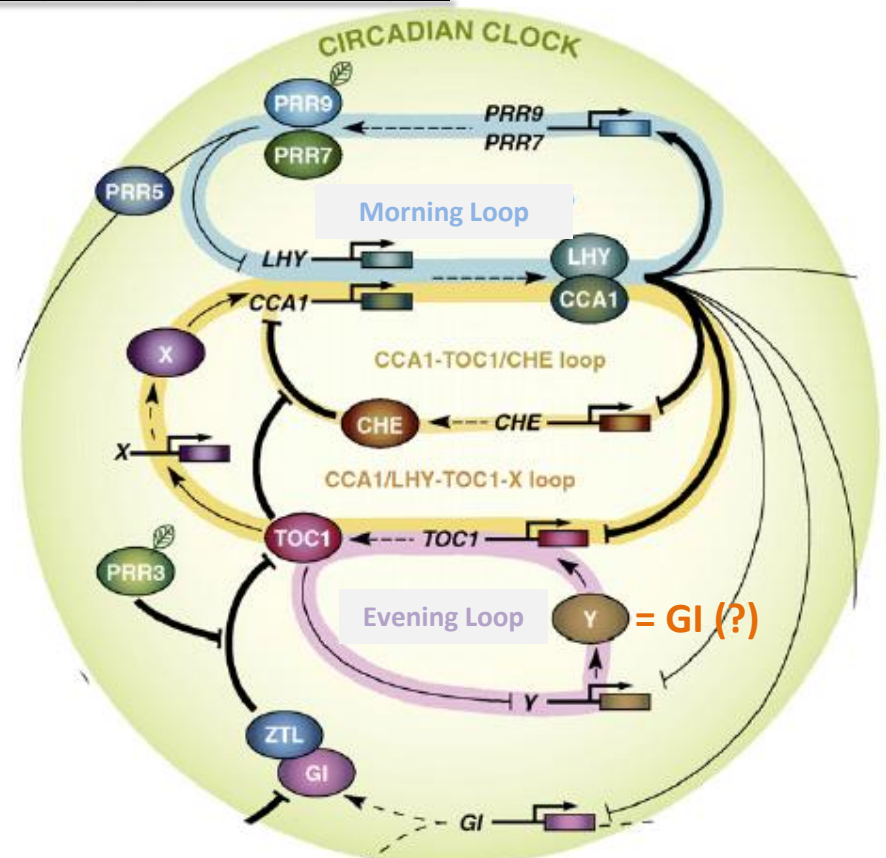


- CCA1a/CCA1bノックアウトコケでは、明期の序盤にすべてのPRR遺伝子の発現が高くなる
- →PRRは光依存的にCCA1a/CCA1bによって抑制される
- (PRR1a過剰発現株ではCCA1a/CCA1bの発現は抑制される)

# 既知の時計遺伝子の比較



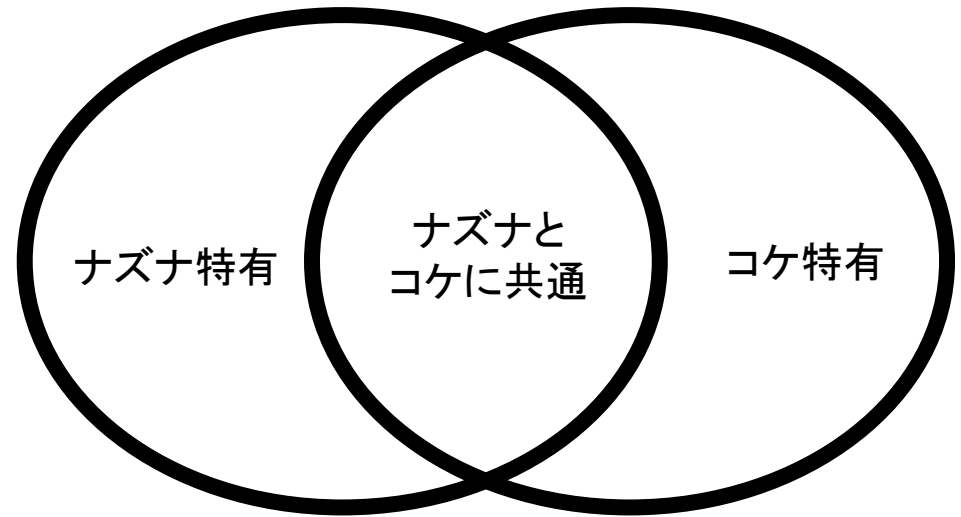
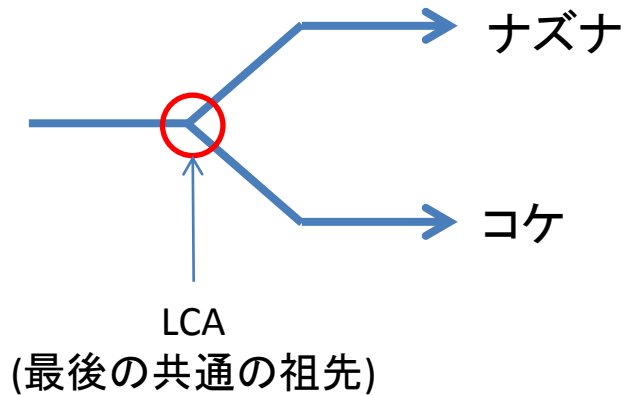
コケ



ナズナ

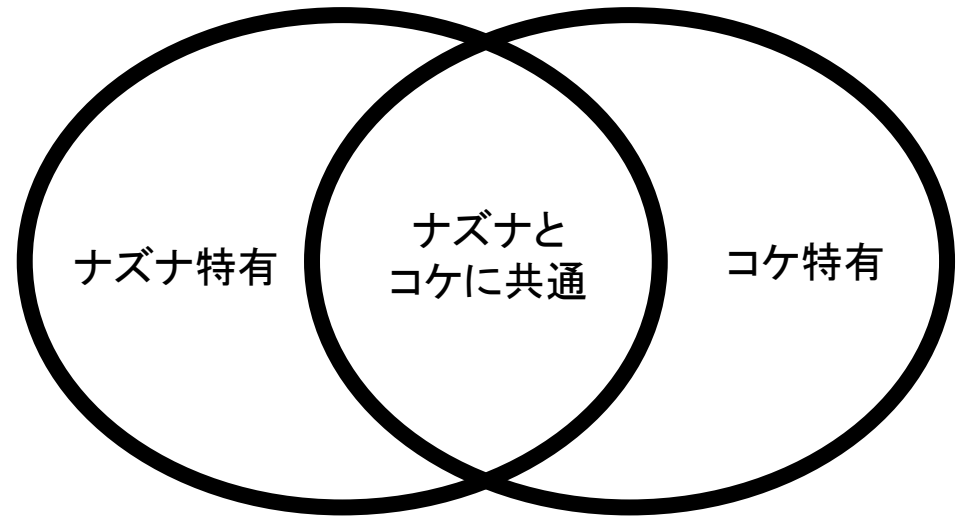
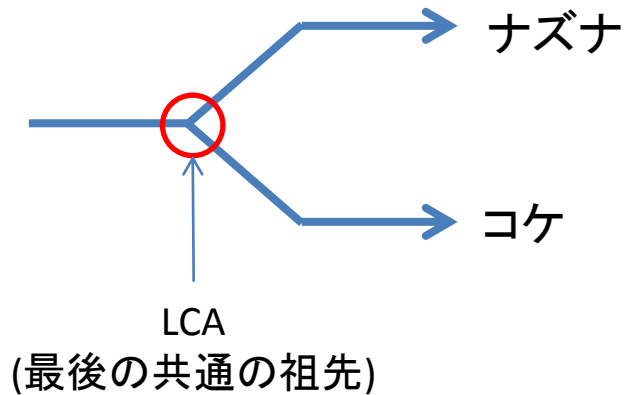
- CCA1とPRRはコケでも時計遺伝子として働く
- CCA1とPRRのネガティブフィードバックループはどちらの植物にもみられる
- コケゲノムはZTL、GIなどのMorning Loop以外の重要因子を欠く
- →植物の時計は、Morning Loopが核になって進化した？

# コケ特有の時計遺伝子の探索



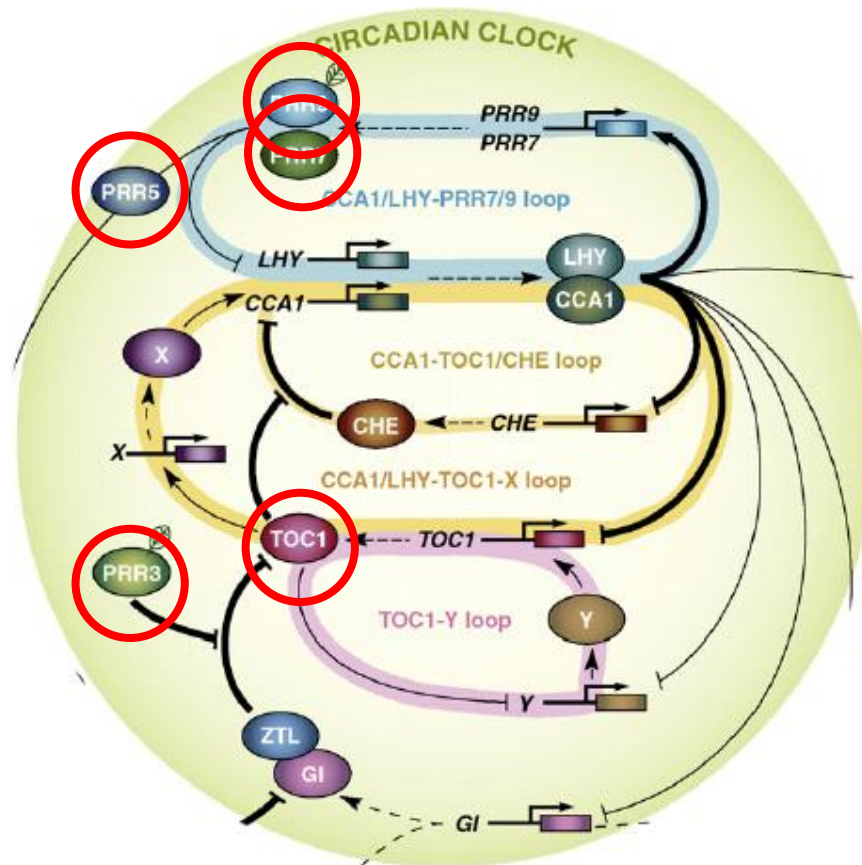
- ナズナ、コケ両方にあるMorning Loopは、共通祖先にもあったはず
  - コケの時計はMorning Loopのみからなる単純な祖先型？
  - →コケに特有な部品もあるかもしれない
    - 枝分かれ後にコケが新たに獲得した
    - 枝分かれ後にナズナが失った
  - コケに特有な部品を見つける方法：
    - 時計に異常のみられるミュータントを見つける→変異の原因遺伝子を見つける
    - すでにわかっている時計遺伝子と相互作用する新しい遺伝子を見つける
- PRRホモログと関係する因子を解析中

# コケ特有の時計遺伝子の探索



- ナズナ、コケ両方にあるMorning Loopは、共通祖先にもあったはず
  - コケの時計はMorning Loopのみからなる単純な祖先型？
  - →コケに特有な部品もあるかもしれない
    - 枝分かれ後にコケが新たに獲得した
    - 枝分かれ後にナズナが失った
  - コケに特有な部品を見つける方法：
    - 時計に異常のみられるミュータントを見つける→変異の原因遺伝子を見つける
    - **すでにわかっている時計遺伝子と相互作用する新しい遺伝子を見つける**
- PRRホモログと関係する因子を解析中

# ナズナのモデルにおけるPRR遺伝子群



- PRR : *Pseudo* (偽) Response Regulator
- PRR遺伝子ファミリー : TOC1/PRR1, PRR3, PRR5, PRR7, PRR9
- PRR遺伝子群はナズナの時計機構の重要な部品セットである

# PRR (偽レスポンスレギュレーター)とは?

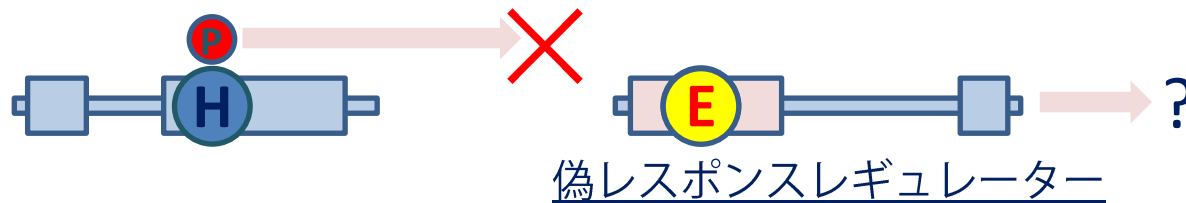
ⓓ: リン酸を受け取るアスパラギン酸

ⓔ: 受け取れないグルタミン酸

## A. 細菌のレスポンスレギュレーター



## B. ナズナの時計の偽レスポンスレギュレーター



- レスポンスレギュレーター (RR) : 細菌などにおいて、センサーキナーゼからリン酸を受け取り、転写を制御する (リン酸リレー)
- Pseudo (偽) レスポンスレギュレーター (PRR) : リン酸を受け取るアスパラギン酸 (D) がグルタミン酸 (E) に変化している
- PRRの、生化学的機能やRRとの系統的關係はよくわかっていなかった

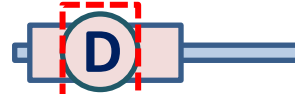


# コケPRRは典型的RRと同じくリン酸リレーを行うう？

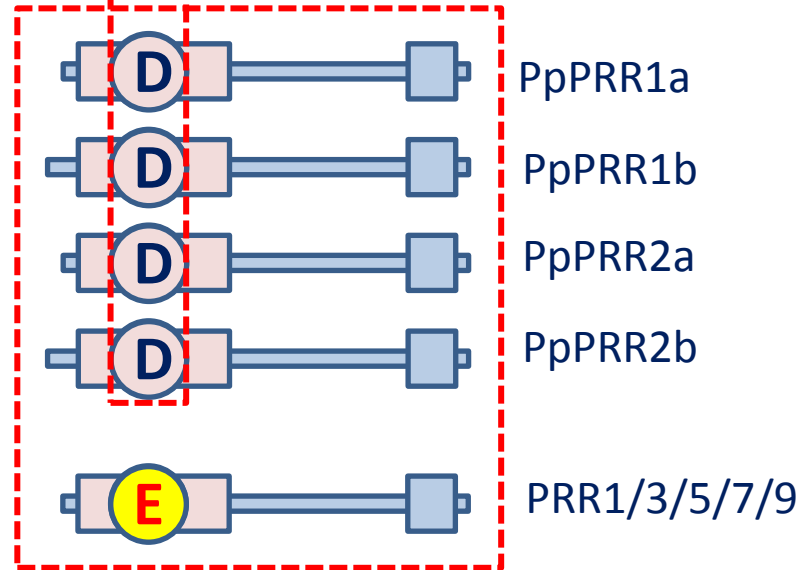
ⓓ: リン酸を受け取れるアスパラギン酸

ⓔ: 受け取れないグルタミン酸

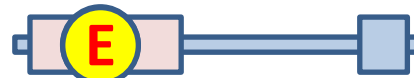
バクテリア等のレスポンスレギュレーター



コケのPRRホモログ



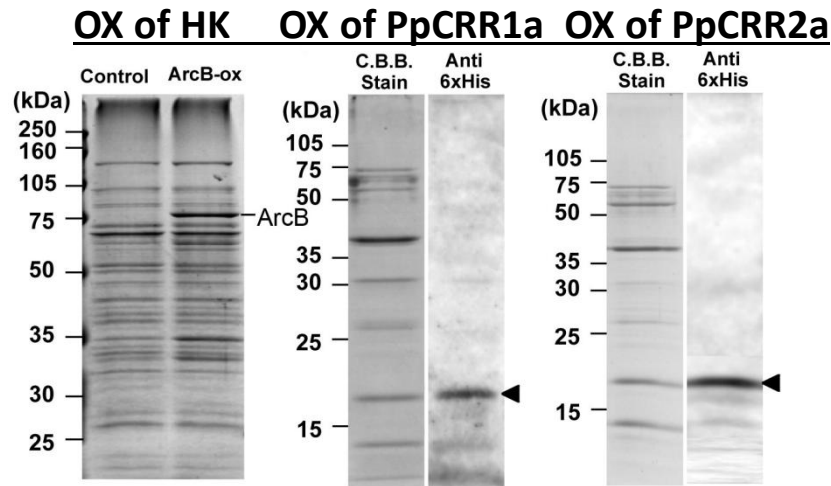
ナズナのPRR (偽レスポンスレギュレーター)



PRR1/3/5/7/9

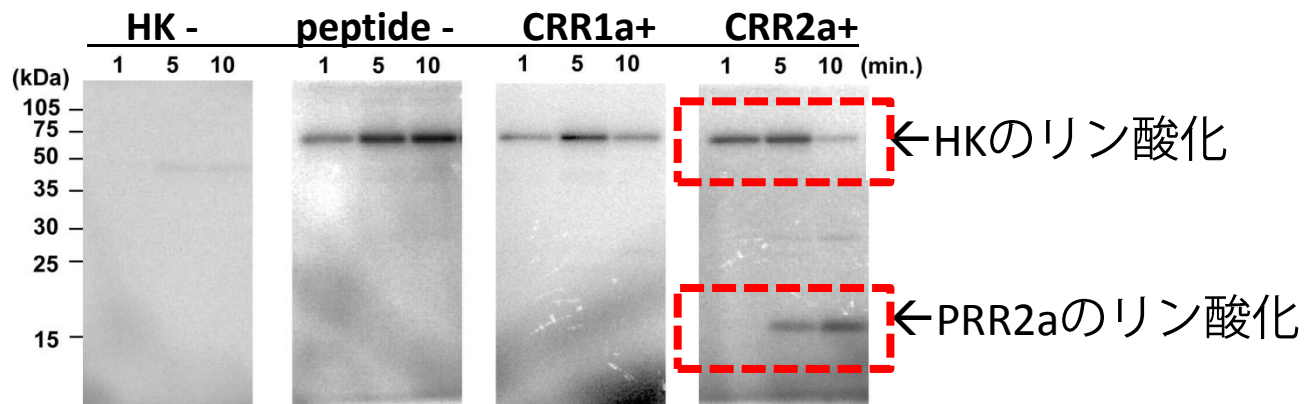
- レスポンスレギュレーターはアスパラギン酸がリン酸化され、信号伝達する
- 偽レスポンスレギュレーターはグルタミン酸に換わっていて、信号伝達しない
- コケPRRホモログは中間的な構造をしている
- ➔コケPRRホモログはリン酸を受け取る祖先的な特徴を持つのかもしれない？

# PRR2aはリン酸転移活性を持つ



上： *E. coli*におけるHK、  
PpCRR1a、PpCRR2aの発現

下： PpCRR2a/PpCRR1a ペプ  
チドの *In vitro* リン酸転移アッ  
セイの結果



- PRR1a/PRR2aのレシーバー様ドメインは *In-vitro* でリン酸転移活性を示すか？
- PRR2aペプチドのみリン酸転移活性を持つ
- →少なくともPRR2aはRRとして働くようだ
- → 1a/1b-2a/2bは機能分化している？

# 緑藻、コケ、シダはRRタイプの配列を持つ



緑藻



コケ



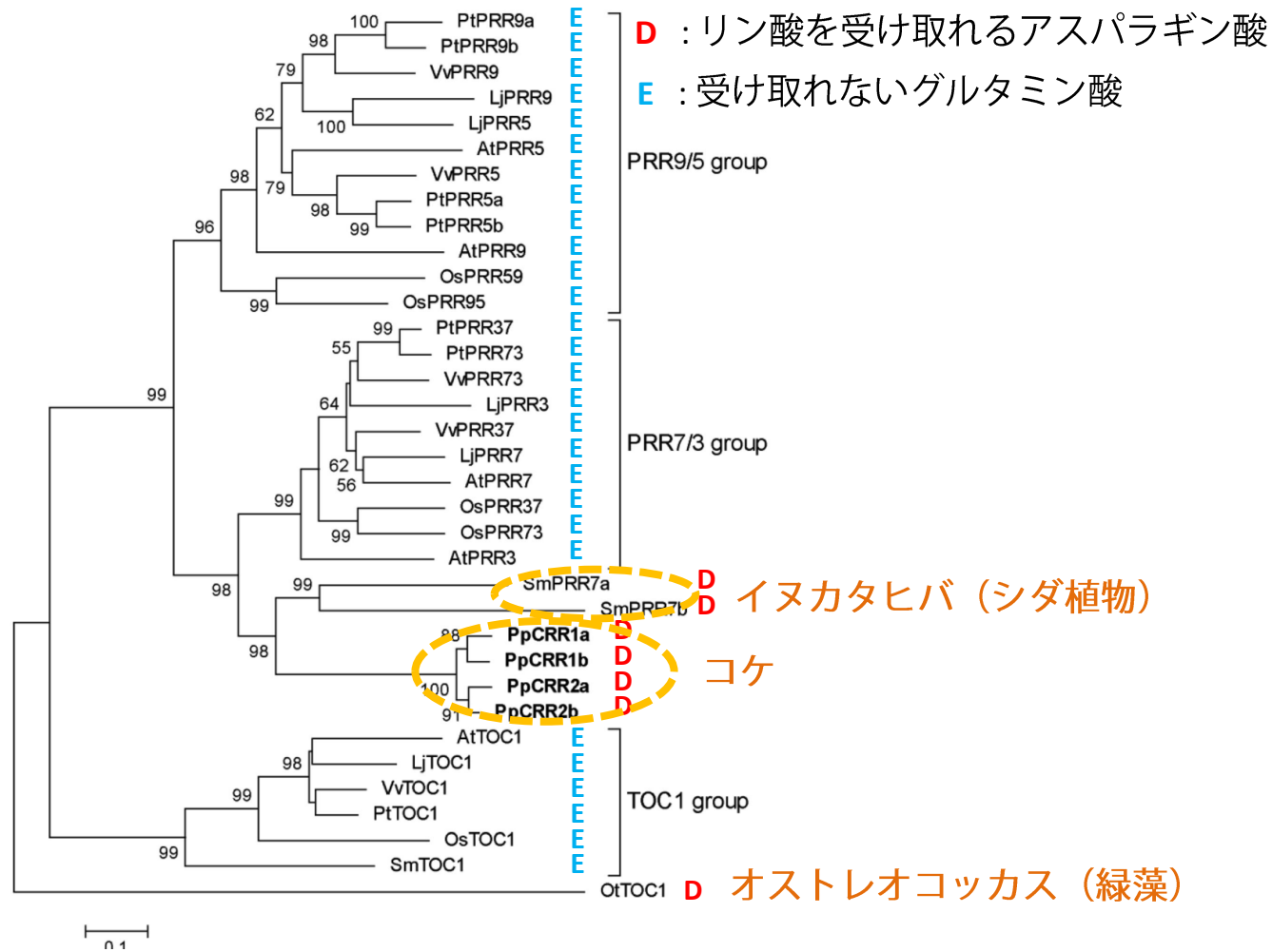
シダ



裸子植物

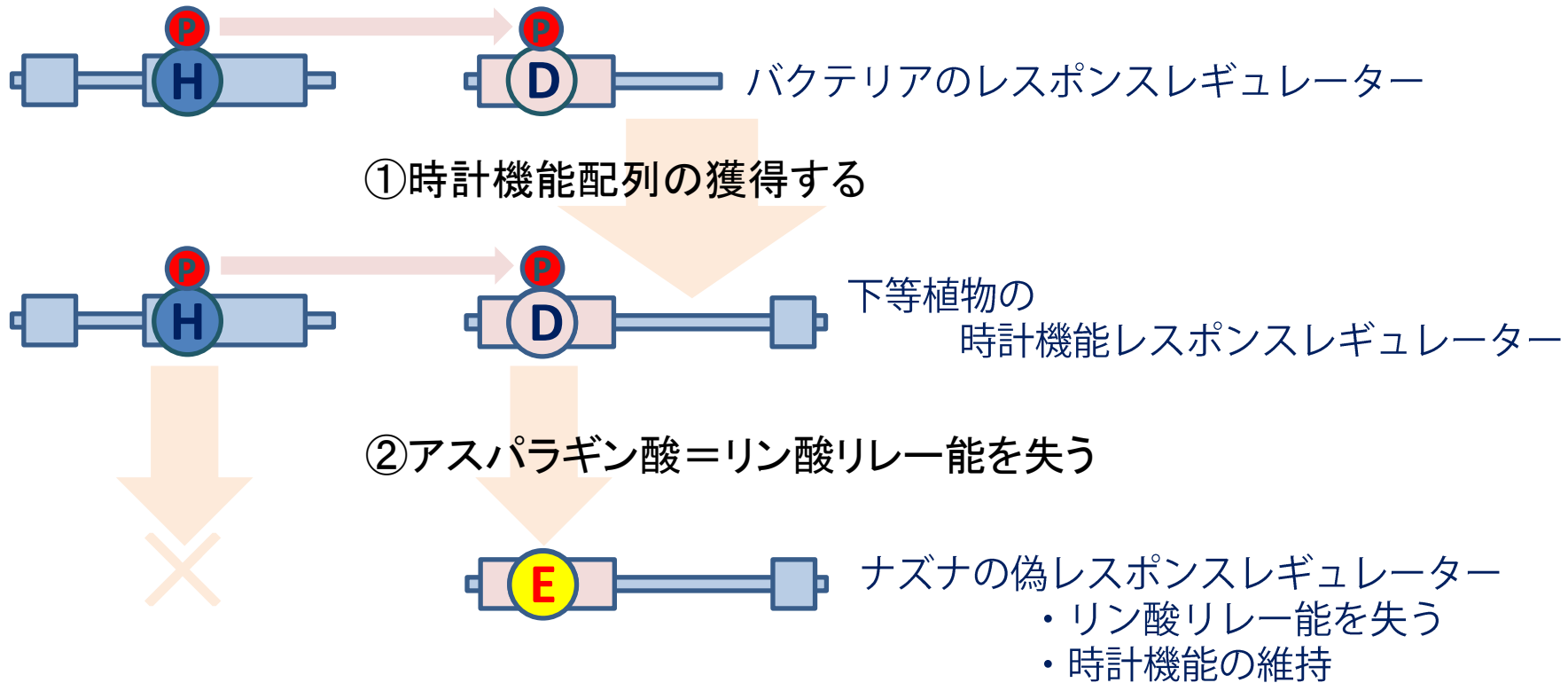


被子植物



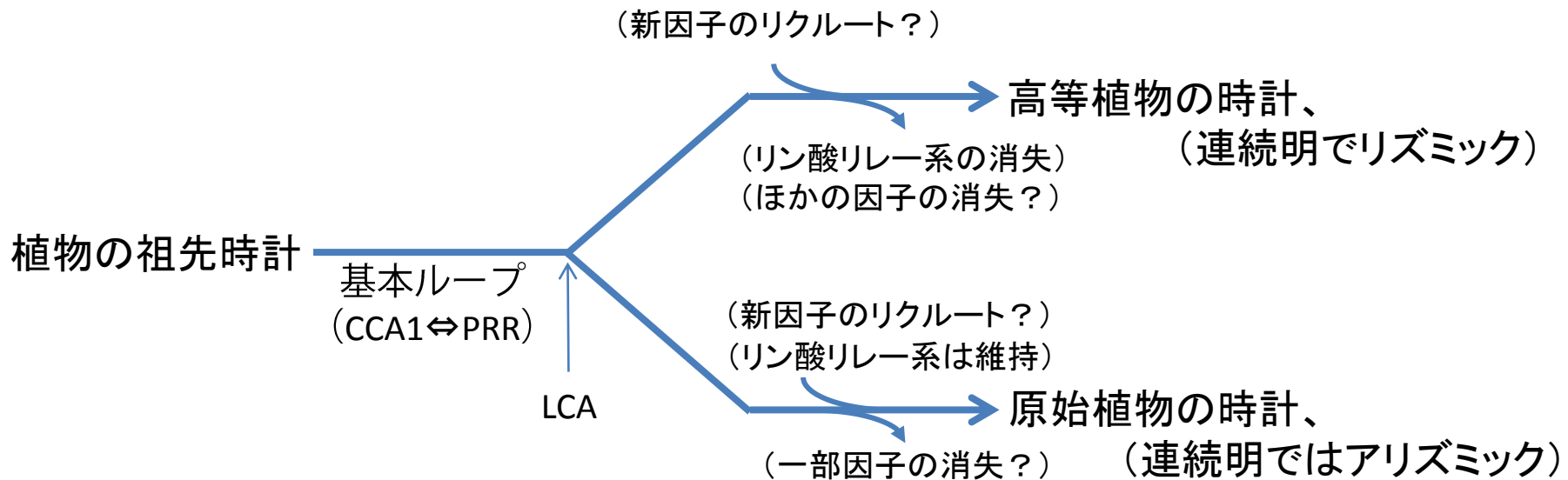
- 上：さまざまな植物のPRR類似配列の系統樹
- コケのPRR (とシダの配列) は高等植物のPRR7/3とクラスターする
- 緑藻、コケ、シダはリン酸受容残基であるアスパラギン酸 (D) を持つ
- シダ→被子植物の進化のどこかでリン酸リレーの働きを失った？

# コケのPRRのはなしの整理



- ・ レスポンスレギュレーターは、①→②を経て、偽レスポンスレギュレーターに変化した
- ・ コケのPRRにリン酸を伝えるセンサーキナーゼがあるはず

# コケの研究のまとめ



- 植物の時計は、CCA1⇔PRRのループが基本骨格となり進化した
- 高等植物の時計はリン酸リレー能を失い、一部の新規部品を獲得した?
- 原始植物の時計はリン酸リレー能を維持し、一部の部品を消失した?
- 生理的には、コケの時計は連続明でリズムが止まってしまう特徴がある

# コケの研究をしていくうちに...

- 個体レベルの行動を観たい
- より複雑なふるまいを観たい

+

- (進化を探りたい)
- (競争のない仕事をしたい)

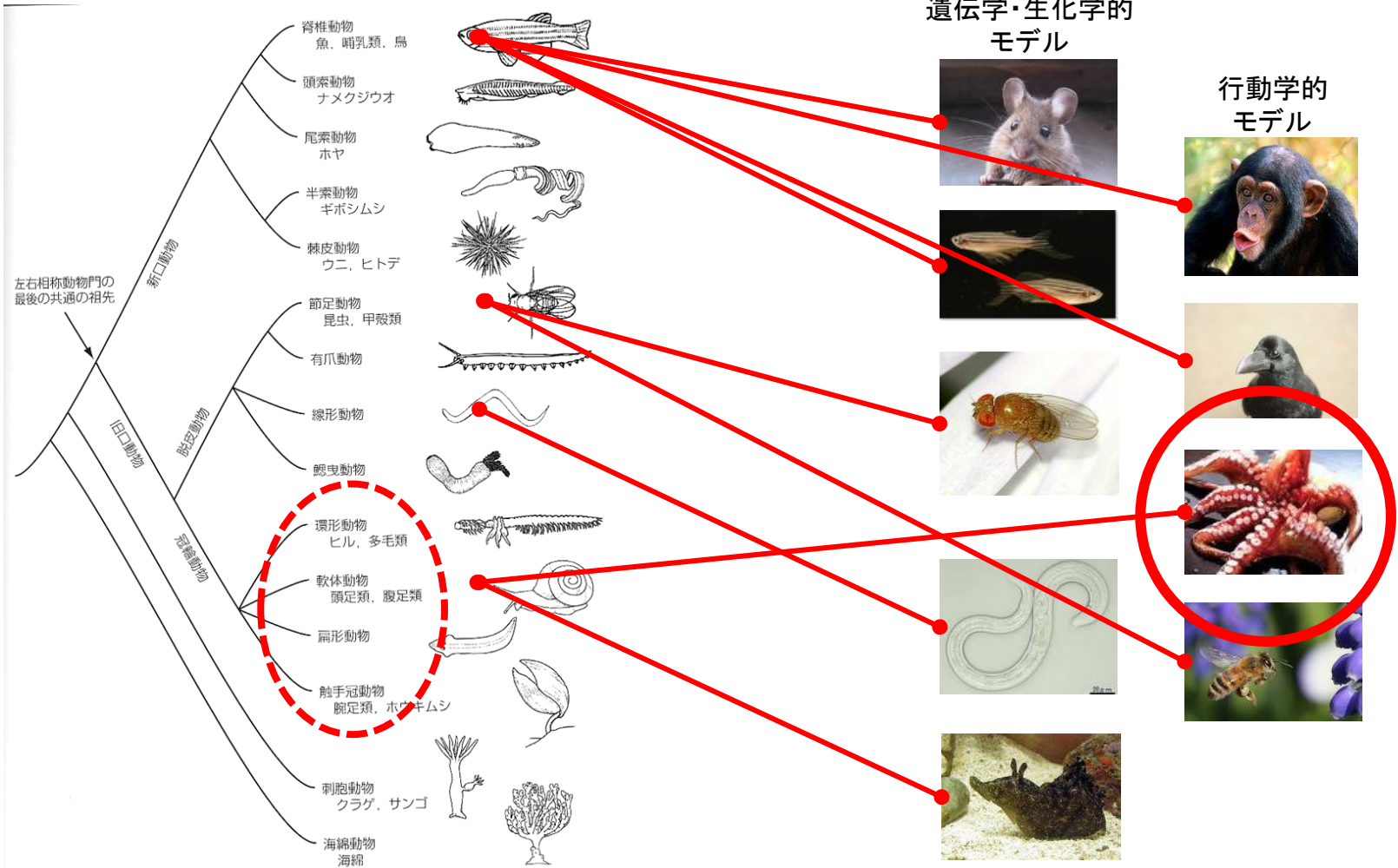
↓

- 頭がよく、小さくて扱いやすく、進化上興味深く、遺伝子をいじれる可能性のある、従来モデルではない動物を使った、行動実験

# 実験動物としての可能性を検討

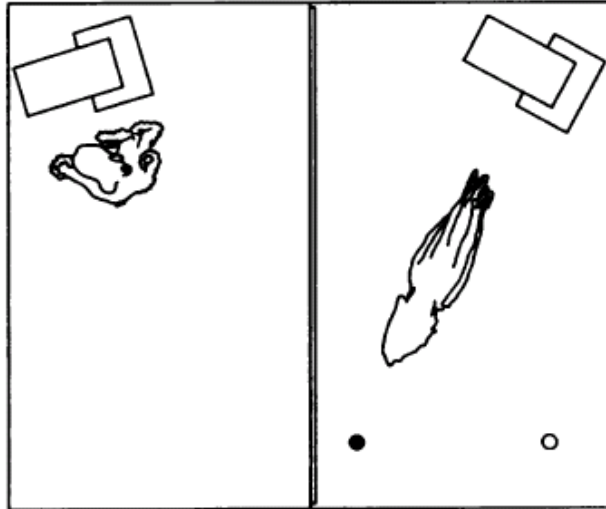
遺伝学・生化学的  
モデル

行動学的  
モデル

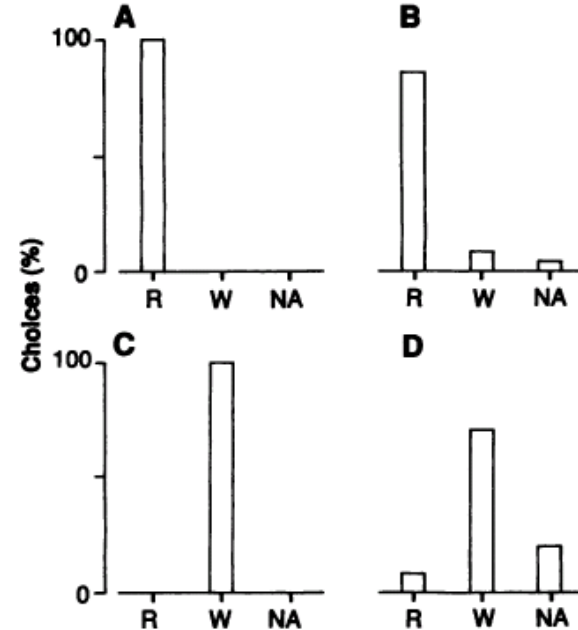


- 脊椎動物と出来るだけ系統的に離れていて、遺伝学が適用されて来なくて、複雑な行動を示すものは？ → 冠輪動物の頭足類
- マダコは海の霊長類と呼ばれるほど複雑な行動を示す

# マダコの「観察学習 (Observational learning)」



**Fig. 1.** Schematic of the experimental apparatus and protocol. An *Octopus vulgaris* is shown (right side of the figure) attacking a ball (the red one) and acting as a demonstrator for the other animal (observer, left side) that is standing outside of its home and watching its conspecific during the whole session through a transparent wall. Each tank had an independent supply of running water. Octopuses were allowed to visually interact for 2 hours before the start of the observational phase. Mean duration of the trials, which depended on the demonstrator's performances, was 40 s, and intertrial intervals were fixed at 5 min.



**Fig. 2.** Choices expressed as percent of the total choices made by demonstrators during the observational phase of the experiment and those of observers during the testing phase. (A) Red group demonstrators ( $n = 30$ ); (B) red group observers ( $n = 30$ ); (C) white group demonstrators ( $n = 14$ ); and (D) white group observers ( $n = 14$ ). R, red; W, white; NA, no attack.

Observation learning in *Octopus vulgaris*, Fiorito and Scotto, 1992, Science

- 赤いボールをアタックするタコを観察したタコは、赤いボールをアタックようになる



# マダコとイイダコの比較



マダコ



イイダコ

	サイズ (成体)	重さ (成体)	サイズ (卵)	ライフサイ クル	値段	知能
マダコ	~60 cm	~500 g	2-3 mm	2 - 3 年	2 - 3 千円	多く報告あり、観察学習など
イイダコ	~10 cm	~35 g	6-7 mm	1年 (数か月という報告あり)	~30円	報告ほぼゼロ

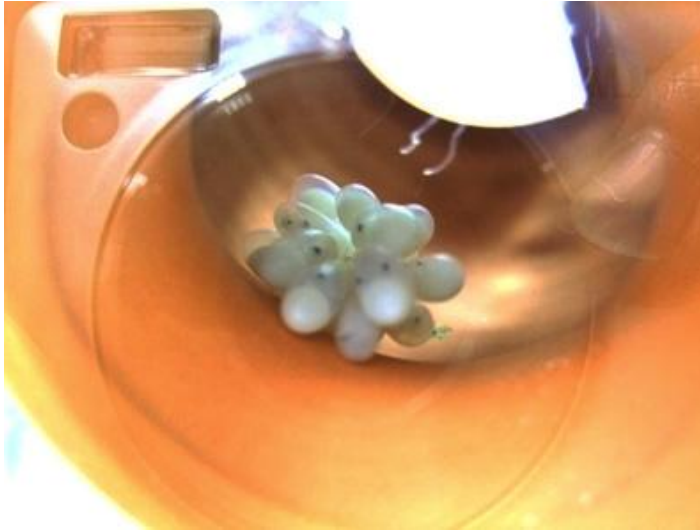
- マダコは大きく、高く、時間がかかる + 卵が小さく胚操作は難しい？
  - イイダコは、より多く、より安く、より速く飼えるかも
  - 卵が比較的大きく、胚を使った実験ができるかも
- 分子遺伝学的解析ができるのでは。。。
- 不明な点：
    - 内陸のラボで飼えるか？
    - 賢く、複雑な行動を示すか？

# イダコを飼ってみた



- 漁協に魚屋を紹介してもらって、三河湾でとれたイダコを生きのまま仕入れてもらう
- 1年のうち、8月、1月、2月以外はだいたい入手可能
- 人工海水・冷凍餌で数カ月は元気に生きる
- 数日で飼育環境に慣れ、探索を始め、大胆になる



# イイダコを飼ってみた



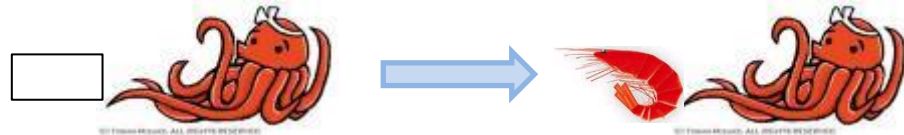
- かなりの頻度で卵をうみ、孵化する
  - 交尾がしばしばみられ、10匹程度飼うと、そのうちの1–2匹は数10個の卵を産む
  - 卵はbubblingしておけば親のケアなしに孵化した
- 飼育者を憶え、なつく(?)

# イダコの視覚弁別学習：定量的な実験が可能か？

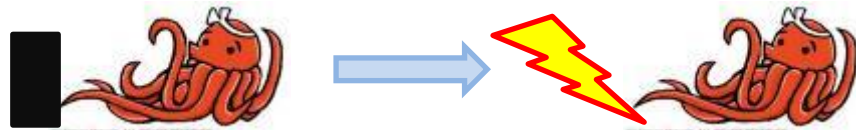
## 1. 視覚刺激：

ポジティブ図形：、ネガティブ図形： を用いる  
(両者を入れ替えた実験も行う)

## 2. 刺激に対する応答、応答に対する報酬／罰：







[ポジ図形をアタック、ネガ図形を無視 → 正答：報酬のエビを与える]

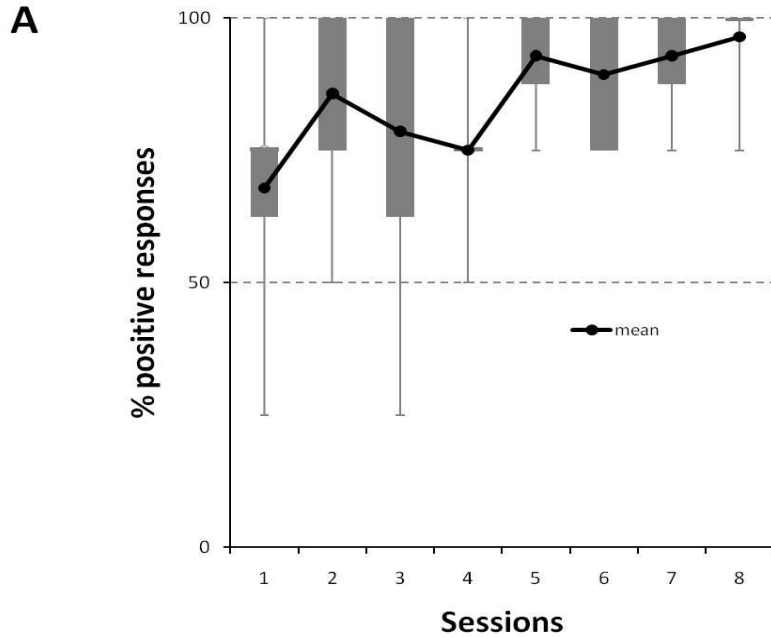


[ポジ図形を無視、ネガ図形をアタック → 誤答：罰の電気ショックを与える]

## 3. 実験スキーム：

- ・1セッション： →  →  →  のようにランダムに刺激を順々に4回提示し、正答率を得る
- ・1日に2セッション行い、3連続セッションで90%以上の正答率になったら実験終わり

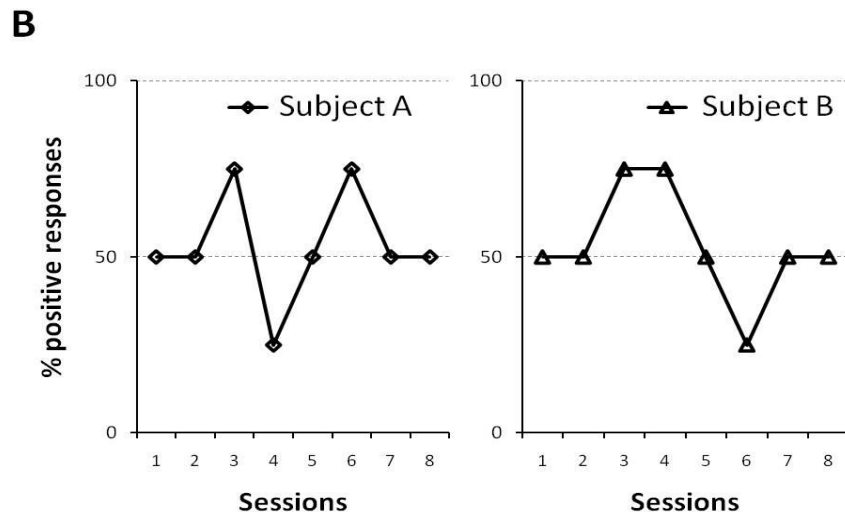
# イダコの視覚弁別学習：定量的な実験が可能か？



- (上)セッションごとに正答率は上昇する

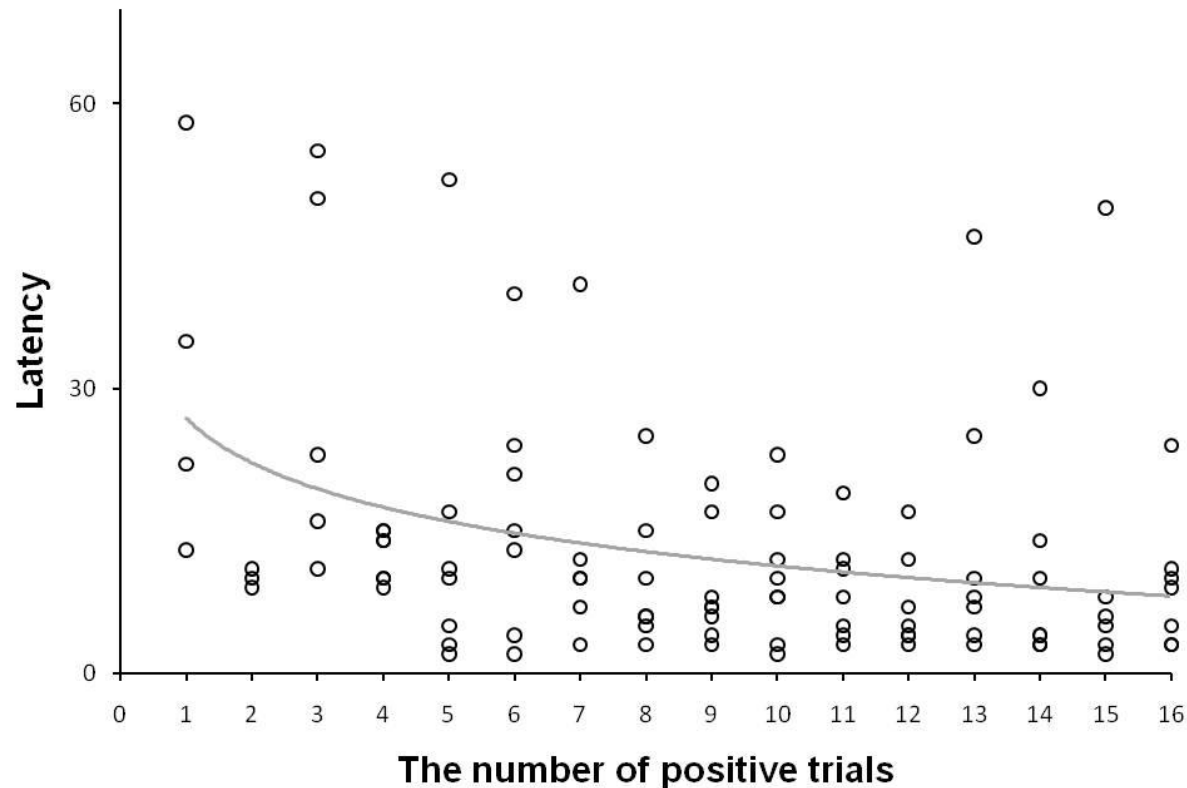
- 前訓練で罰なしのセッションを二日間行う

- (下)前訓練でアタック頻度が一定程度以下の2個体で調べてみると、正答率の上昇はみられない←どちらも直後に産卵した



- 産卵前は餌を食べなくなる→報酬に対するモチベーションが低くなり、学習しなくなる？

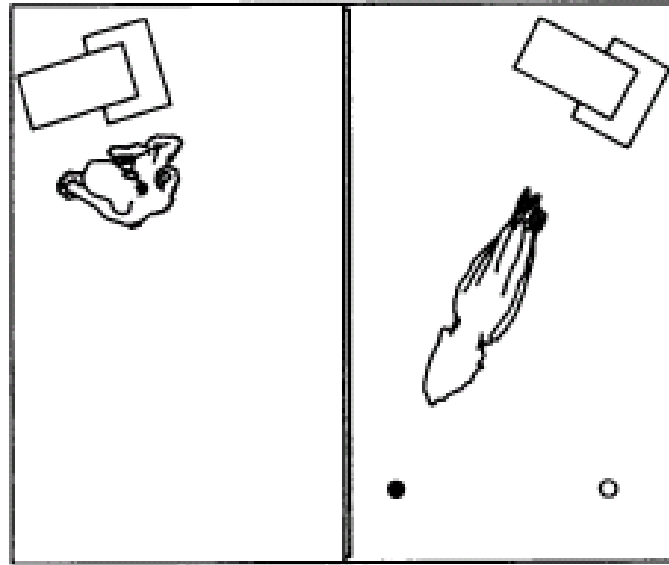
# トライアルごとに学習の効果が出てくる



- 刺激提示からアタックまでの時間 (latency) は、トライアルごとに短くなる
- → 学習が進んだ効果と思われる

→ イイダコで視覚弁別学習を定量的に示せる

# マダコの「観察学習」はSocial learningか？ それともStimulus enhancementか？



- タコは、デモンストレーターと同じボールをアタックするようになる
- 観察学習により、他個体の行動を真似た; かなりレベルの高いsocial learningである (Fiorito and Scott)
- → 反論:
  - アタックそのものは新しい行動パターンではない
  - 単に注意が片方のボールに偏った結果 (Stimulus enhancement) の可能性あり; 知覚レベルの影響



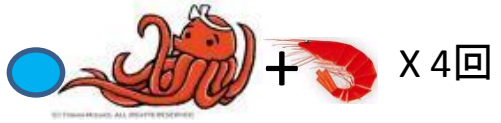
# イダコは、他個体の行動にどんなレベルで影響されるか？

NO(観察なし)

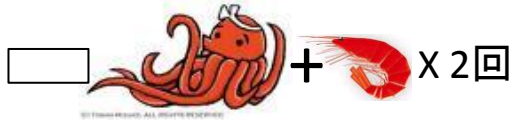
ND(デモンストレーターなし)



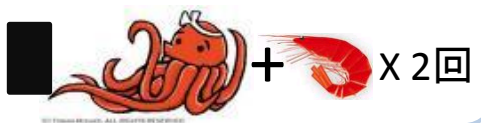
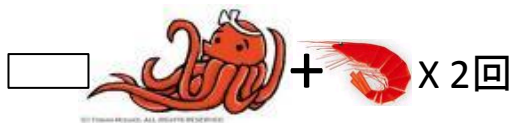
UR(無関係な刺激図形)



R-(報酬マイナス)

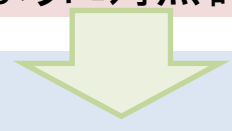


R+(報酬プラス)



## 観察期間

- (デモンストレーターを両方の図形にアタックするように条件づけておく)
- デモンストレーターがネガ図形にアタックするのを見せる(左のように対照群を設定)



## セッション

- オブザーバーに視覚弁別実験を行い、誤答率を調べる

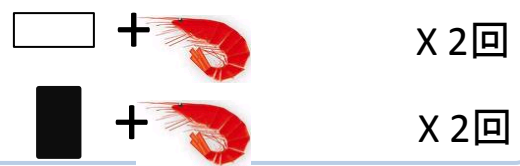
- ポジ図形 、ネガ図形 の視覚弁別
- ネガ図形にアタックするタコを観察させ、観察者の誤答を誘い、その率を比べる
- 低次の行動を区別するための対照群を設定(左)
- R+で優位に高い誤答率→ネガ図形に報酬を期待する、ある程度レベルの高い学習が関係するのでは？

観察あり

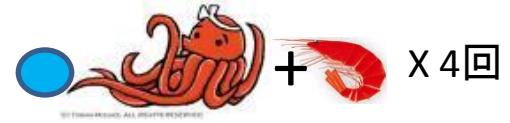
# イダコは、他個体の行動にどんなレベルで影響されるか？

NO (観察なし)

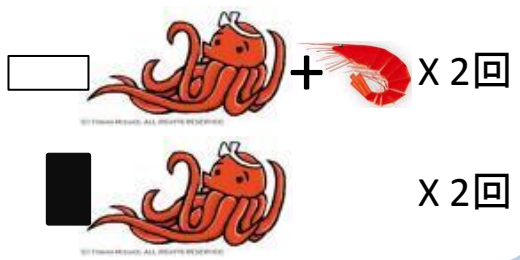
ND (デモンストレーターなし)



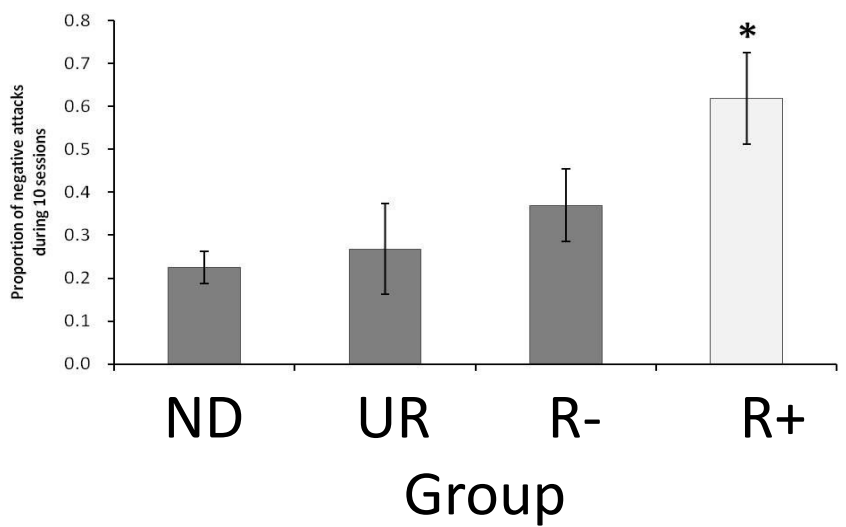
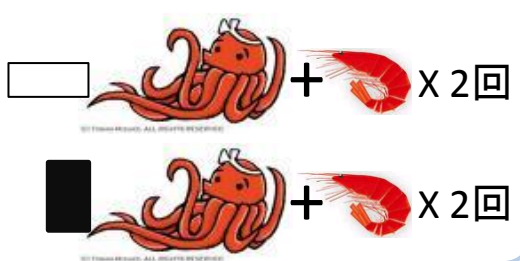
UR (無関係な刺激図形)



R- (報酬マイナス)



R+ (報酬プラス)



観察あり

- ポジ図形 □、ネガ図形 ■ の視覚弁別
- ネガ図形にアタックするタコを観察させ、観察者の誤答を誘い、その率を比べる
- 低次の行動を区別するための対照群を設定(左)
- R+で優位に高い誤答率→ネガ図形に報酬を期待する、ある程度レベルの高い学習が関係するのでは？

→無脊椎動物ではめずらしい  
Social learning/influenceの例？

# 神経系特異的に発現する遺伝子の同定

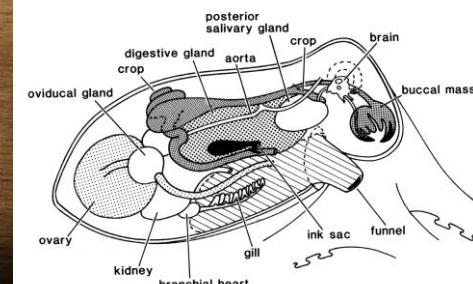
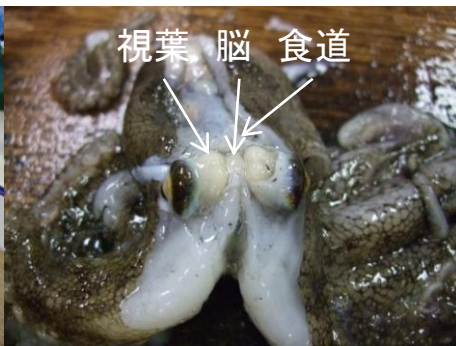
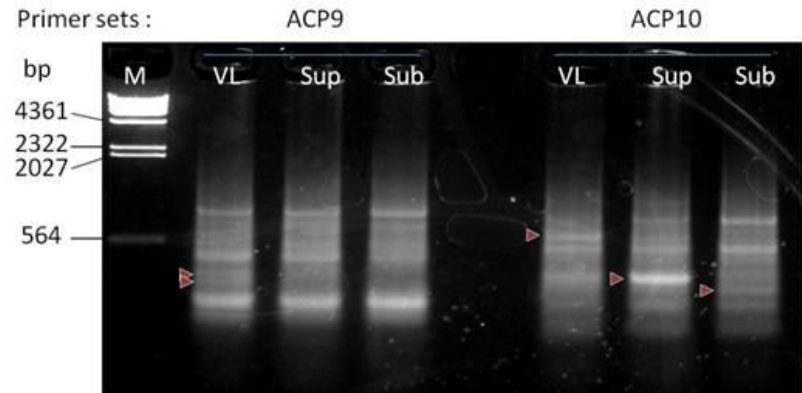
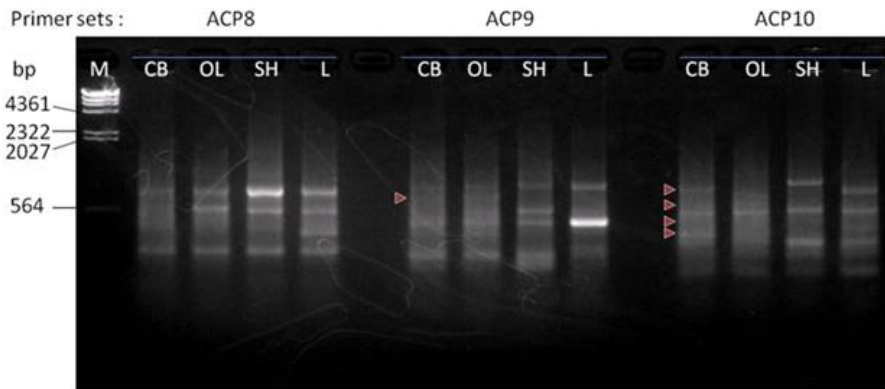


Fig. 3 Generalized anatomy of a female octopus.

- 脳特異的に発現する遺伝子をいくつか特定：
  - Ras-like GTP-binding protein Rho1
  - Neuropeptide Y precursor
  - RUN domain protein
- 垂直葉(海馬に相当)に発現するバンドをいくつか確認
- →機能解析の材料に？

# まとめ

- 植物の時計研究
  - 植物の時計の進化におけるコア機構が同定できた
  - コケ特異的な時計のシグナル伝達を同定しつつある
  - 新規因子をみつける実験系の確立が必要
  - 環境、生存戦略の違いとの対応付けが重要
- イイダコの研究
  - かなり有望な実験系と考えられる
  - 今後の研究のためには、ラボでの世代交代、生殖管理が重要