

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08151

研究課題名(和文) チョウ目昆虫を用いた光周性制御遺伝子の網羅的検索

研究課題名(英文) Comprehensive screening for genes involved in photoperiodic diapause regulation of lepidopteran insects

研究代表者

坂本 克彦 (Sakamoto, Katsuhiko)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・教授

研究者番号：40416673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、昆虫の光周性(日長応答性)研究のモデルである、チョウ目のサクサンとカイコを実験対象とし、光周性に関与する遺伝子のスクリーニングを試みた。具体的には、短日刺激群と長日刺激群の間で脳内遺伝子発現プロファイルを、次世代シーケンサを用いて網羅的に比較し、日長変化に応答して発現変動を示す遺伝子を探索した。そして、得られた候補遺伝子に対して、RNAi法による機能抑制実験を行い、目的遺伝子の絞り込み/同定を行った。その結果、光周性に関与する可能性がある遺伝子を、サクサンで2つ、カイコで2つ、得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では、昆虫の光周性に関与することがこれまでに知られていなかった新規遺伝子が複数得られた。光周性を制御する分子メカニズムの解明に一步近づいたと言える。昆虫光周性の解明が進めば、光周性制御機構を作用点とした農薬の開発が期待できる。こうした農薬は、光周性をもたないヒトにとっては、比較的安全である可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to screen for genes involved in photoperiodism (photoperiodic responses) of the Chinese oak silkmoth *Antheraea pernyi* and the silkworm *Bombyx mori*, which are models for the study of insect photoperiodism. We comprehensively compared the gene expression profiles in the brain between the short-day stimulation group and the long-day stimulation group by next-generation sequencing, and searched for genes that show expression fluctuations in response to changes in day length. Then, to narrow down and identify the target genes, we performed RNAi-mediated gene knockdown experiments on the candidate genes obtained in the first screening. As a result, we obtained genes that might be involved in photoperiodism: two genes in *Antheraea pernyi* and two in *Bombyx mori*.

研究分野：感覚生理学

キーワード：光周性 遺伝子 昆虫 休眠

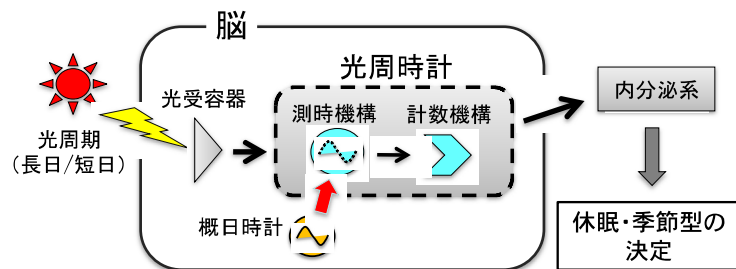
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 昆虫は、「昼または夜の長さ」をカレンダーとして用いる：体の小さい変温動物の昆虫にとって、冬や夏の成長に不敵な過酷な環境を乗り切れることは、進化の過程において不可欠の性質であったと考えられる。季節を知る手がかりとして、気温や食物成分の変化を使う昆虫もいるが、多くの場合、最も安定して環境情報である日の長さをカレンダーとして利用している。日長情報にもとづき、事前に生理状態を切り替えることで、生存に必須な季節適応を予測的に行う。このように、昆虫の様々な発育ステージで観察される休眠や季節型などの季節適応現象は、光周性（日長応答性）による制御を受ける。

(2) 光周性システムは4つの要素から構成される：光周性システムは、昼夜の明暗を検出するための光受容器、日長測定を行う測時機構、経験した光周期の日数を数える計数機構、および、ホルモン分泌を調整する内分泌系からなる。測時機構と計数機構は、合わせて「光周時計」と呼ばれる。蓄積した光周（日長）情報をもとに光周時計が指令を出し、それを受けて、生理状態を切り替えるためのホルモン分泌を内分泌効果が調節し、一連の反応が起こると考えられている。光周情報の統合部である光周時計に関しては、古典的な実験手法である、様々な周期の明暗サイクルに対する光周反応を観察する共鳴実験（Nanda-Hamner protocol）と、近年開発されたRNAi法を用いた時計遺伝子の機能抑制実験から、概日時計が関与していると考えられている。

チョウ目昆虫の光周性システム



(3) 昆虫の光周時計の実体解明は、分子レベルではほとんど進んでいない：昆虫では一般に、種による違いはあるが、光周反応の光受容器としては、脳または複眼、側単眼が働いていることが明らかになっている。また、出力（内分泌）系に関わる休眠ホルモンや前胸腺刺激ホルモン（PTTH）、幼若ホルモン（JH）などについては、すでに詳細な研究が行われている。そして、組織移植・組織破壊実験から、脳に存在する光周時計細胞の絞り込みが行われている。しかし、日の長さを測り光周期の日数を数える光周時計の分子メカニズムに関しては、概日システムが関与するという以外、まだほとんど解明されていない。そして、概日時計を構成する時計遺伝子のクローニングが進み、時計遺伝子の発現制御を含むネガティブフィードバックが時計の振動子を構成することが明らかにされたが、光周性制御における個々の時計遺伝子の具体的な役割については、不明のままである。

(4) カイコとサクサンは、昆虫の光周性研究において優れたモデル動物として、これまで利用されてきた。2化性系統のカイコの中には、幼虫期の光周期を調節するだけで、次世代卵の休眠モード（休眠または非休眠）を正確に誘導できるものがある。短日下で幼虫を飼育すると休眠卵を産み、長日下では日休眠卵を産む。一方、サクサン（ヤママユガ科）では、蛹休眠の覚醒に明瞭な光周性があり、短日下では休眠を維持するが、長日に数日間晒すと休眠が覚醒する。いずれの種においても、脳に光受容系から光周時計までが存在することがわかっている。また、光周性の出口である内分泌系についても解明が非常に進んでいる。特に、サクサンの休眠蛹では、ドーパミンやセロトニン、メラトニンなどの生体アミンが光周性の制御に関わることが、近年報告されている。しかし、光周時計における生体アミンの具体的な役割については、分子レベルではまだ不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

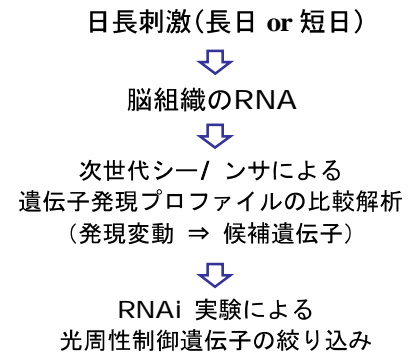
(1) 光周性研究の優れたモデル昆虫であるチョウ目のカイコとサクサンを研究対象とし、次世代シーケンス技術を用いて、日長刺激に特異的に応答する遺伝子群を包括的に解析し、光周性の制御に関わる遺伝子を探索する。光周性は、いまだに解明されていない、昆虫の持つ本質的に重要な性質のひとつである。カイコとサクサンの光周性制御遺伝子の発見を緒として、昆虫の光周時計の実体解明が進むことが期待される。

(2) カイコとサクサンは、有用な昆虫資源としての絹糸昆虫であると同時に、チョウ目害虫のモデル昆虫でもある。光周性の制御が可能になれば、チョウ目絹糸昆虫の飼育や品種維持・管理が容易になる。例えば、飼育環境の日長条件に関わらず、2化性系統カイコに保存用の休眠卵を確実に産ませることができる。そして、光周性の分子メカニズムが解明されれば、そこを作用点とする農薬や防除方法の開発が可能になる。チョウ目昆虫の幼虫は、農作物の主要な害虫であるため、その防除は特に重要である。こうした農薬は、光周性を持たないヒトにとっては、比較的安全である可能性が高いと考えられる。

### 3. 研究の方法

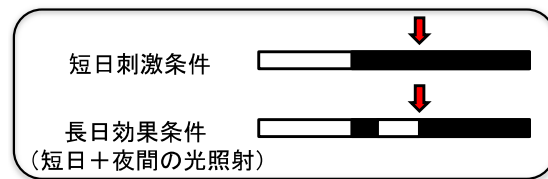
(1) 本研究では、幼虫期の光周期によって次世代卵の休眠・非休眠が決定される2化性系統カイコと、蛹休眠の終結が光周期で誘導されるサクサンを研究対象とする。光周性感受期の個体を用意し、短日刺激群と長日刺激群の間で、次世代シーケンサ(RNA-seqまたはCAGE-seq)を用いて、脳内の遺伝子発現プロファイルを網羅的に比較する。

特に、サクサンを用いた実験では、長日効果刺激として、短日下での暗期光中断処理を行った。対照群に与える短日刺激との違いは、夜間に照射する光パルスの有無だけである。そのため、通常の短日条件と長日条件の比較よりも、概日発現する遺伝子群のリズム位相のズレを抑制することができ、よりノイズの少ないスクリーニングが可能になる。



(2)(1)のスクリーニングで得られた光周性制御遺伝子候補に対して、RNAi法による機能抑制実験を行い、目的遺伝子の絞り込み/同定を進める。ポジティブな結果が得られた遺伝子(光周性制御遺伝子)については、光周性システムの既知のパーツとの関連性に留意しながら、さらに機能解析を進める。

#### 暗期光中断処理



### 4. 研究成果

(1) 短日下で休眠を維持し長日下では休眠を解除するサクサンの休眠蛹を用いたスクリーニングでは、長日効果刺激として短日下での暗期光中断処理を行い、短日刺激群との間に発現差異のある(有意に増加または減少する)遺伝子を約150個、得ることができた。そこで、その機能から関連性が高いと推測される候補遺伝子20個について、RNAi実験を行なった。具体的には、候補遺伝子に対するdsRNAをサクサン蛹に投与し、長日条件下での羽化パターンを観察した。その結果、2つの遺伝子について、光周反応に有意な影響を及ぼすことが判明した。1つはこれまでも他の昆虫で光周性に関与すると考えられてきたForkhead遺伝子で、もう1つは時計遺伝子としても働くGSK3bであった。Forkheadはインスリンシグナル系の下流に位置する遺伝子なので、サクサンにおいても、この情報伝達系が光周性に関与する可能性が示唆された。またこれまで、RNAi法を用いた時計遺伝子の機能抑制実験から、概日時計が光周性に関与することが示されてきたが、その際に研究対象となった時計遺伝子は研究者が任意に選んだものである。昆虫の光周性制御遺伝子のスクリーニングにおいて、時計遺伝子が取れてきたのは、我々の知る限り初めてのことである。光周性におけるGSK3bの役割を解析することにより、概日システムと光周時計との関係性が明らかになると考えられる。

(2) 一方、親世代の幼虫期の日長によって次世代卵の休眠状態を決定するカイコを用いた研究では、短日刺激群(休眠卵産下群)と長日刺激群(非休眠卵産下群)の幼虫脳で発現量に違いのある(有意に増加または減少する)遺伝子が約350個見つかった。さらにこれらの遺伝子から、休眠制御に本質的に関与するものを絞り込むために、追加のスクリーニング実験を行った。つまり、胚期(卵期)の温度だけ、または照度だけを調節することによって休眠卵産下群と非休眠卵産下群を作成し、脳内の遺伝子発現プロファイルを比較した。幼虫期の日長実験も含め、合計3つの条件でスクリーニングをかけた結果、いずれの実験条件においても休眠卵産下群で増加する遺伝子が9個、非休眠卵産下群で増加する遺伝子が20個得られた。次に、リアルタイム定量PCRで次世代シーケンサの結果を補完したところ、休眠卵産下群で増加する4つの遺伝子についてのみ再現性が取れた。そこで、これらの遺伝子に対してdsRNAを合成し、幼虫に投与してRNAiによる遺伝子機能抑制実験を行い、最終的に2つの遺伝子が短日刺激による休眠誘導効果を阻害した。1つは幼若ホルモン合成に関わる遺伝子で、これまでも他の昆虫で幼若ホルモンシグナル系が光周性に関与することが示唆されてきたので、カイコでもこの情報伝達系が光周性に関与する可能性があると考えられる。もう1つは、ビタミンの代謝に関わる遺伝子で、これが昆虫の光周性に関与する報告はこれまでないので、新規の光周性制御遺伝子である可能性がある。今後、この遺伝子の解析を行い、光周性システムの実体解明を推し進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----