

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02478

研究課題名(和文) 昆虫の光周性の分子・神経機構：概日時計と日長測定

研究課題名(英文) Molecular and neural mechanisms of insect photoperiodism: Circadian clock and photoperiodic time measurement

研究代表者

沼田 英治 (Numata, Hideharu)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：70172749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：成虫休眠を制御する光周性をもつホソヘリカメムシでは、頭部の培養条件下で示される遺伝子レベルの光周性が、時計遺伝子ClockのRNAiによって打ち消されたことにより、Clock遺伝子が頭部内で光周性に関与することが示された。そして、Clock遺伝子による光周性の制御は幼若ホルモン合成以前の段階で起こることが明らかになった。さらに、PERIODを発現する時計細胞からの光周期情報は、副視髄を経て脳中央部へ伝えられている可能性が示された。カイコガにおいて、時計遺伝子periodのノックアウトシステムを作成することにより、period遺伝子が光周性に関与していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホソヘリカメムシとカイコガは、いずれも明瞭な光周性を示すが、入力系である光受容器も出力系である内分泌器官もまったく異なるものである。これら2種において、時計遺伝子が光周性において決定的な役割を果たしていることが明らかになり、前者では時計遺伝子は頭部で、休眠を決定するホルモン合成以前の段階で関与することがわかった。この結果は昆虫の光周性における中枢機構(光周時計)が共通であることを示しており、長年続いてきた光周性と概日時計の関係についての論争に大きな前進をもたらした。

研究成果の概要(英文)：In the bean bug, *Riptortus pedestris*, which shows photoperiodism for the control of adult diapause, RNAi of the gene Clock suppressed the photoperiodic effect on expression of another gene in the cultured head, and therefore Clock is involved in photoperiodism within the head. The involvement of Clock in photoperiodic control of diapause was shown to be at the synthesis of juvenile hormone or earlier. It is, moreover, suggested that the photoperiodic information is transmitted from clock cells with expression of PERIOD to the mid-brain via the accessory medulla. In the silkworm *Bombyx mori*, we established a knockout strain of a clock gene, period, and demonstrated that period is involved in the photoperiodism for the induction of embryonic diapause.

研究分野：動物生理学

キーワード：光周性 昆虫 概日時計 中枢神経系 休眠

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 生きものが日長に反応する性質(光周性)は、昆虫を含む多くの生物の季節適応において重要な役割を果たしている。「光周性における日長測定に概日時計が関わる」という Bünning (1936) の仮説は、現在では広く受け入れられている。しかし、日長測定に関わる概日時計の実体はいまだに明らかになっていない。昆虫の日周活動を支配する概日時計の細胞が、時計遺伝子のフィードバックループを使って日長測定に関与しているのかについても最終的な結論は出していない。

(2) 研究代表者らは、成虫が光周期を受容して成虫休眠を誘導しているホソヘリカメムシにおいて、RNA 干渉 (RNAi) による遺伝子発現の抑制により、概日時計のフィードバックループを形成する時計遺伝子が光周性において重要な役割を果たすことを報告した (文献①)。しかし、時計遺伝子が日長測定に直接関係しているのかは明らかではなく、時計遺伝子が示す多面発現効果による可能性を指摘する批判もある (文献②)。さらに研究代表者らは、光周性に関係する細胞が、概日時計と同様に視葉にあることも示したが (文献③)、この視葉にある細胞が概日時計細胞と同じものかどうかは明らかではない。

(3) 古くから光周性が研究されてきており、親世代が受容した光周期が子世代の胚休眠を誘導しているカイコガでは、光周性における時計遺伝子の役割はまったく不明である。本種では RNAi による遺伝子発現の抑制が困難であるが、TALEN による遺伝子ノックアウトが実用化されている (文献④)。研究代表者らは、すでに光周性を示さない *pnd-w1* 系統において、時計遺伝子 *period* (*per*) のノックアウト系統をすでに作成しており、羽化と孵化に関する概日リズムが失われているという予備的な結果を得ている。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、昆虫の光周性の分子・神経機構を、概日時計に注目して解明することである。ホソヘリカメムシの光周性においては成虫が複眼で光受容を行い、幼若ホルモン (JH) の分泌抑制により成虫休眠を誘導している。カイコガでは親世代の幼虫が脳によって光受容を行い、休眠ホルモンを分泌して子世代の胚休眠を誘導している。本研究では光周性において異なる入力系(光受容器)と異なる出力系(内分泌系)をもつ2種を対象とする。

(2) 時計遺伝子の役割が明らかになっているホソヘリカメムシでは、頭部の培養により頭部で時計遺伝子が光周性に関与していることを示すとともに、時計遺伝子が光受容から内分泌系のどの部分に影響するのかを決定する。カイコガでは、時計遺伝子のノックアウト系統を作成し、時計遺伝子が光周性に関与しているかどうかを明らかにする。それに加えて、2種において時計遺伝子が発現する細胞の局在を比較検討する。さらに、光周性に関わる時計遺伝子以外の遺伝子を探索し、どの細胞でどの分子がどのようにして日長を測定しているのかを解明する。これらの2種における結果を比較し共通点を見出すことによって、昆虫の光周性の分子・神経機構を包括的に理解する。

3. 研究の方法

【ホソヘリカメムシ】

(1) まず成虫の頭部培養系を確立し、短日および長日下での遺伝子発現を比較することにより、頭部のみで完結する光周性を見出す。次に、からだ全体に対する RNAi によって光周性に関わることが示されている時計遺伝子について、頭部培養系において RNAi を実施し、頭部のみで完結する光周性が失われるかどうかを調べる。

(2) 時計遺伝子が光受容から内分泌系のどの部分に影響するのかを調べるため、他の昆虫において JH によって誘導され、その作用を仲介することが知られている *Krüppel homolog 1* (*Kr-h1*) 遺伝子に注目した。*Kr-h1* の発現を短日と長日で比較し、時計遺伝子の RNAi が *Kr-h1* の発現に対する影響を調べる。これと並行してホソヘリカメムシの *Kr-h1* の機能解析も行う。

(3) 時計タンパク質の抗体を用いた免疫組織化学によって時計細胞の位置を特定する。そして、複眼からの光入力の経路としての後方視索や、光周性の出力系として機能する脳側方部ニューロンや概日時計細胞の接続を調べ、光周性の情報伝達経路を推定する。

【カイコガ】

(4) *pnd-w1* 系統をもとにした *per* ノックアウト系統が概日リズムを失っていることを確認し、続いて母親が経験した光周期によって子世代が休眠に入るかどうかが決まる江浙系統において (文献⑤)、TALEN により *per* のノックアウトを行い、その系統で概日リズムが失われているかどうかを調べる。

(5) 江漸をもとにした *per* ノックアウト系統を長日および短日で飼育して、ノックアウトにより光周性が失われたかどうかを検討する。

(6) カイコガ PER タンパク質の抗体を作成して PER 発現細胞を同定し、その投射形態を確認する。それによって得られた情報をもとに、光周性に関する概日時計細胞と光周性中枢の脳内部位を推定する。

4. 研究成果

【ホソヘリカメムシ】

(1) 成虫の頭部を一週間以上培養できる条件が得られた。25°C短日 (LD 12:12) で飼育した虫の頭部を短日または長日 (LD 16:8) で培養し、両者の遺伝子発現を比較した結果、遺伝子 *X* の発現が短日より長日で高くなることを見出した。これはからだの他の部分から切り離された頭部のみで、光受容から遺伝子発現の違いに至るまでが完結する光周性である。一方、頭部の培養系で時計遺伝子 *Clock* (*Clk*) の二本鎖 RNA (dsRNA) を培地に添加することによって、同遺伝子の発現量を十分の一に抑制することができた。すなわち、頭部の培養系において時計遺伝子 *Clk* のノックダウンが可能なが確かめられた。そこで、培養条件下で *Clk* の RNAi を行って遺伝子 *X* の発現量に対する効果を調べたところ、対照に比べて長日での発現量が低くなり、短日との発現量の差が小さくなったことから、培養条件下でみられる光周性に *Clk* 遺伝子が関与する可能性が示された (図1)。

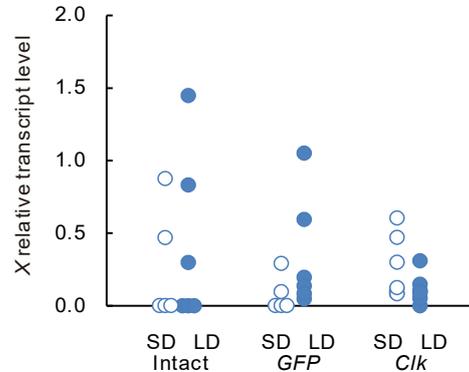


図1 ホソヘリカメムシの頭部培養系における遺伝子 *X* の発現量。無処理 (Intact)、*GFP* または *Clk* の dsRNA を培地に添加し、短日 (SD、○) または長日 (LD、●) で3日間培養した。

(2) 成虫の個体レベルで、*Kr-h1* 遺伝子の発現量は短日より長日でも有意に高く、この違いは *Clk* の RNAi によって消去された。すなわち概日時計遺伝子は、JH および *Kr-h1* のはたらきの上流に位置することが明らかになった。しかし、*Kr-h1* の個体レベルの RNAi によって、長日における成虫の卵巣発達は完全には抑制されず、JH に誘導される卵黄タンパク質遺伝子の発現も低下しなかった。したがって、*Kr-h1* は JH 下流の卵巣発達までの経路には関与していないと考えられた。そこで本来の研究課題からは離れるが、幼虫期における *Kr-h1* の機能解析を RNAi によって試みた。幼虫期における *Kr-h1* の RNAi は、幼虫に成虫の形態的特徴を誘導したため、*Kr-h1* は幼虫形質の維持にはたらいていることが明らかになった。

(3) 短日で維持した成虫と長日に移したものの間で、脳における発現遺伝子についてトランスクリプトーム解析を行った結果から、JH 合成酵素の一つである Methyl Farnesoate Epoxidase (MFE) の遺伝子 *mfe* の発現量が長日で短日より有意に高いことが明らかになっていた。そこで、*mfe* に加え、もう一つの JH 合成酵素 JH acid methyl transferase (JHAMT)、JH 受容体 Met、Met と受容体複合体を形成する Taiman の遺伝子 (*jhamt*, *met*, *taiman*) 発現を、短日で維持した成虫と長日に移したものの頭部 (アラタ体含む) の間で RT-qPCR により比較した。その結果、*mfe* の発現は長日でも有意に高かった (図2)。遺伝子 *X* と *mfe* の発現量の変化は、この虫の光周

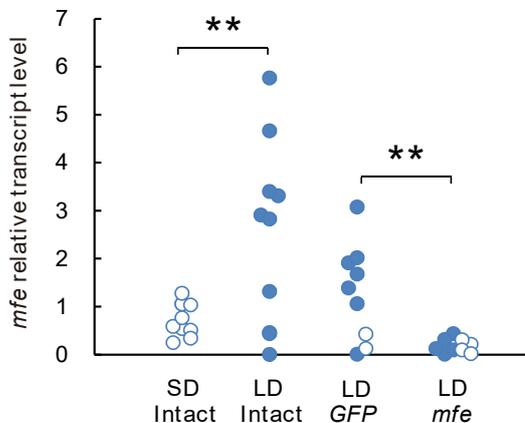


図2 ホソヘリカメムシの *mfe* 発現量。無処理 (Intact)、*GFP* または *mfe* の dsRNA を注射し、短日 (SD) または長日 (LD) で 21 日間飼育した。○は卵巣未発達、●は卵巣発達を示す。** P<0.01。

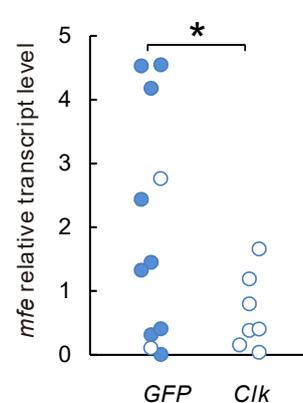


図3 ホソヘリカメムシに *GFP* または *Clk* の dsRNA を注射した時の *mfe* 発現量 (長日)。○は卵巣未発達、●は卵巣発達を示す。* P<0.05。

性における非常に早い段階でみられるものである。そして、*mfe* の発現を RNAi によって抑制すると、長日で卵巣の発達が抑制された。また、*Clk* の発現抑制によって、長日における卵巣発達が阻害されるとともに、*mfe* の発現が抑制された (図3)。これらの結果は、ホソヘリカメムシの JH 合成に *mfe* が関与し、概日時計による光周性の制御は JH 合成以前の段階で起こることを示唆している。

(4) 時計タンパク質PERIOD (PER) の抗体を用いて脳の免疫組織化学を行った結果、LN1、LNm、Prd、Prp、pAL、ALInの6種類のPER陽性細胞群が見つかった (図4)。次にこれまでに除去実験により光周性との関連が示唆されているPDFニューロン、後方視索の切断により光周性光入力経路として考えられるaLOニューロンとの三重染色を行った。その結果、PER陽性LN1とPDF陽性細胞、PER陽性LNmとaLO細胞は互いに近くに位置するが、別細胞であることがわかった (図5)。視髄前方中央側へは光周性光入力経路と時計からの情報が入力することから、視髄前方中央側領域は光周時計の場として機能している可能性がある。また、ハエやハチ、アリではPERとPDFが視葉内視髄前方中央側に位置する細胞に共局在することが知られているが、ホソヘリカメムシではPERとPDFは別細胞に存在し、PER陽性細胞からPDFニューロンへ副視髄で連絡し、光周期情報を脳中央部へ伝えている可能性がある。

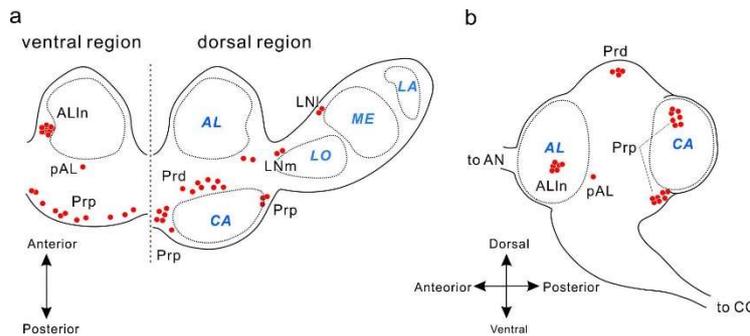


図4 ホソヘリカメムシ成虫の脳内 PER 陽性細胞の模式図。a 背側から、b 側方から見た図。

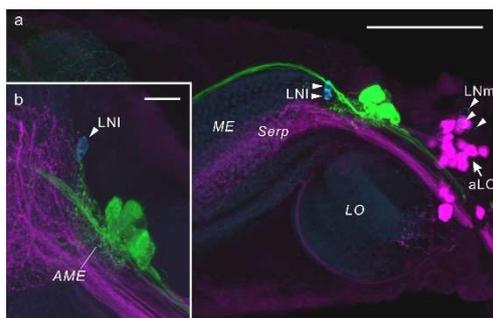


図5 ホソヘリカメムシ PER 陽性細胞 (青)、PDF 陽性ニューロン (緑)、aLO ニューロン (マゼンタ) の三重染色。視髄 (ME) 中央側前方の副視髄 (AME) で PDF と aLO ニューロンのファイバーが近接し、その近くに PERIOD 細胞が位置する。スケール a=100 μ m、b=20 μ m

【カイコガ】

(5) 江浙において、TALEN により *per* をノックアウトしたものを2系統作成したが、そのうちエクソン7において13塩基が挿入されていたものでは挿入された部分に終止コドンが含まれていたため、PERタンパク質が極端に短くなっていると推定された。以後の実験にはこの系統を使用した。*pnd-w1* 系統をもとにした *per* ノックアウト系統と同様、この系統でも、孵化、羽化の概日リズムが失われており (図6)、時計遺伝子 *per* と *timeless* の発現の日周変動も失われていた。

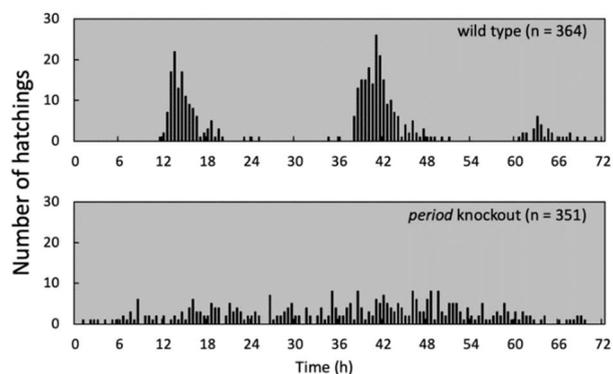


図6 カイコガの江浙 (wild type) および *per* ノックアウト系統の 25°C全暗条件における孵化リズム。全暗に移す前の条件は LD 12:12。

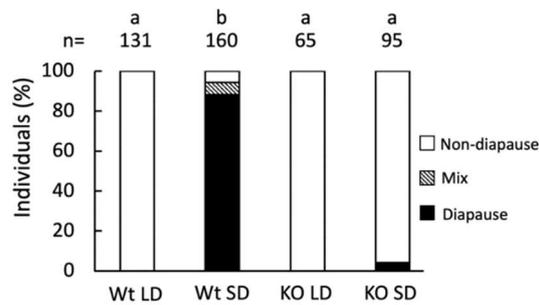


図7 カイコガの江漸(Wt)および *per* ノックアウト系統(KO)を25°C長日(LD)、または短日(SD)で飼育した母親が産んだ卵の休眠性。同じアルファベット間では有意差なし ($P > 0.05$)。

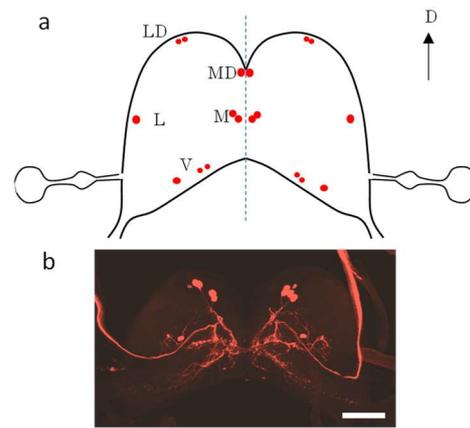


図8 カイコガ5齢幼虫の脳内PER陽性細胞(a)とコラゾニン陽性細胞(b)の模式図 前方から見た図。スケール=100 μm

(6) 江漸とそれをもとにした *per* ノックアウト系統を25°Cの短日(LD 12:12)または長日(LD 16:8)で飼育し、羽化した成虫が休眠卵を産むかどうかを調べた。その結果、江漸は長日で非休眠卵、短日で休眠卵を産んだのに対し、*per* ノックアウト系統はいずれの条件でも非休眠卵のみを産んだ(図4)。しかし、*per* ノックアウト系統を20°Cの短日(LD 6:18)で飼育したところ、36%の成虫がすべて休眠卵を、43%が一部休眠卵を産んだ。したがって、*per* 遺伝子の関与する概日時計が光周性には必須であるが、休眠卵を産み出すことには必要ないことが示された。すなわち、カイコガにおいても時計遺伝子 *per* は、ホソヘリカメムシと同様休眠誘導の光周性に必須であるが、休眠卵を産むための生理機構ではなく、光周性自体に関わることが示された。

(7) カイコガPERタンパク質のN末のペプチドを認識する抗体を用いて染色した結果、脳内にLD, MD, L, M, Vという5種類のPER陽性細胞が見つかり、そのうち中央のいくつかの細胞はコラゾニン陽性繊維の近くに位置していた(図8)。最近カイコガで温度により調節される休眠ホルモン分泌にコラゾニンが関わるということが報告された(文献⑥)。光周性による休眠調節では、PER陽性細胞を含む光周時計からの光周期情報がコラゾニン細胞へ入力し、休眠調節につながるのかもしれない。

<引用文献>

- ① Ikeno T, Tanaka SI, Numata H, Goto SG (2010) Photoperiodic diapause under control of circadian clock genes in an insect. *BMC Biology* **8**:116
- ② Emerson KJ, Bradshaw WE, Holzapfel CM (2009) Complications of complexity: integrating environmental, genetic and hormonal control of insect diapause. *Trends in Genetics* **25**:217-225.
- ③ Ikeno T, Numata H, Goto SG, Shiga S (2014) Involvement of the brain region containing pigment-dispersing factor-immunoreactive neurons in the photoperiodic response of the bean bug, *Riptortus pedestris*. *Journal of Experimental Biology* **217**:453-462.
- ④ Daimon T, Kiuchi T, Takasu Y (2014) Recent progress in genome engineering techniques in the silkworm, *Bombyx mori*. *Development Growth and Differentiation* **56**:14-25.
- ⑤ Shiomi K, Takasu Y, Kunii M, Tsuchiya R, Mukaida M, Kobayashi M, Sezutsu H, Ichida (Takahama) M, Mizoguchi A (2015) Disruption of diapause induction by TALEN-based gene mutagenesis in relation to a unique neuropeptide signaling pathway in *Bombyx*. *Scientific Reports* **5**:15566.
- ⑥ Tsuchiya R, Kaneshima A, Kobayashi M, Yamazaki M, Takasu Y, Sezutsu H, Tanaka Y, Mizoguchi A, Shiomi K (2020) Maternal GABAergic and GnRH/corazonin pathway modulates egg diapause phenotype of the silkworm *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **118**:e2020028118

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ikeda Kento, Daimon Takaaki, Sezutsu Hideki, Udaka Hiroko, Numata Hideharu	4. 巻 34
2. 論文標題 Involvement of the clock gene period in the circadian rhythm of the silkworm <i>Bombyx mori</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Rhythms	6. 最初と最後の頁 283 ~ 292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0748730419841185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dong Li, Udaka Hiroko, Numata Hideharu, Ito Chihiro	4. 巻 46
2. 論文標題 Regulation of Kruppel homolog 1 expression by photoperiod in the bean bug, <i>Riptortus pedestris</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physiological Entomology	6. 最初と最後の頁 82 ~ 93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/phen.12347	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koide Ryohei, Xi Jili, Hamanaka Yoshitaka, Shiga Sakiko	4. 巻 384
2. 論文標題 Mapping PERIOD-immunoreactive cells with neurons relevant to photoperiodic response in the bean bug <i>Riptortus pedestris</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-021-03451-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Numata, H.
2. 発表標題 Adaptation to seasonal changes in insects.
3. 学会等名 Sapporo Symposium on Biological Rhythm in 2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田健人・大門高明・瀬筒秀樹・沼田英治
2. 発表標題 カイコガの概日リズムに対するperiod遺伝子ノックアウトの効果
3. 学会等名 日本昆虫学会第78回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沼田英治
2. 発表標題 昆虫時計の多様性と普遍性
3. 学会等名 第25回日本時間生物学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沼田英治
2. 発表標題 動物の多様な環境適応機構の比較生物学的研究
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第40回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村田彰久・村上実・小林正和・横山岳・池田健人・大門高明・沼田英治・塩見邦博
2. 発表標題 カイコの休眠誘導における温度情報と時計遺伝子群の関係について
3. 学会等名 令和2年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第90回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 董笠・村松伸樹・沼田英治・伊藤千紘
2. 発表標題 ホソヘリカメムシ変態時のKruppel homolog 1遺伝子の役割
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 董笠・沼田英治・伊藤千紘・村松伸樹
2. 発表標題 ホソヘリカメムシのKruppel homolog 1遺伝子は幼虫形質を維持するはたらきをもつ
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田健人・大門高明・塩見邦博・宇高寛子・沼田英治
2. 発表標題 カイコガの光周性に対するperiod遺伝子ノックアウトの効果
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤瑞華・池田健人・大門高明・塩見邦博・沼田英治・志賀向子
2. 発表標題 カイコガ幼虫期における光周性とperiod発現細胞
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 沼田英治
2. 発表標題 なぜカメムシを研究してきたのか
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔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
研究分担者	大門 高明 (Daimon Takaaki) (70451846)	京都大学・農学研究科・教授 (14301)	
研究分担者	志賀 向子 (Shiga Sakiko) (90254383)	大阪大学・理学研究科・教授 (14401)	

	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
研究協力者	塩見 邦博 (Shiomi Kunihiro)	信州大学・繊維学部・教授 (13601)	
研究協力者	宇高 寛子 (UDAKA Hiroko)	京都大学・理学研究科・助教 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	伊藤 千紘 (Ito Chihiro)	京都大学・理学研究科・研究員 (14301)	
研究協力者	村松 伸樹 (Muramatsu Nobuki)	京都大学・理学研究科・教務補佐員 (14301)	
研究協力者	董 笠 (Dong Li)	京都大学・理学研究科・大学院生 (14301)	
研究協力者	池田 健人 (Ikeda Kento)	京都大学・理学研究科・大学院生 (14301)	
研究協力者	佐藤 瑞華 (Sato Mizuka)	大阪大学・理学研究科・大学院生 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関