

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03294

研究課題名(和文) 昆虫の概日時計細胞による光周性日長測定機構の解析

研究課題名(英文) Study of photoperiodic time-measurement mechanisms by circadian clock cells in an insect

研究代表者

志賀 向子 (Shiga, Sakiko)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：90254383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：多くの昆虫は光周性を用いて季節に適応しているが、概日時計細胞がどうやって日長を測り休眠を調節するかについてはわかっていない。本研究では、分子生物学、神経解剖学、生化学的方法によりルリキンバエの脳側方部ニューロンの一部が概日時計と神経分泌の二つの機能を持つことが示唆された。また、そのニューロンが分泌する神経ペプチドDh31が、アラタ体の幼若ホルモン合成および分泌を抑制することが明らかになった。この時計/神経分泌ニューロンが短日条件下でアラタ体のJH合成を抑制し、休眠を誘導あるいは維持する機能を持つかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物や植物は光周性を用いて季節に対応している。多くの昆虫は過酷な季節の到来を日長から予測し、あらかじめ生殖や成長を抑制した休眠に入る。日長の判断には24時間を計る体内時計が用いられると考えられている。本研究では、昆虫の脳に時計と神経ホルモン分泌という二つの機能を持つ神経細胞が存在することが示唆された。これは、今後、動物が季節を予測し過酷な環境に備えるためのメカニズムの解明につながるという学術的意義を有する。また、本研究は昆虫の休眠調節にも関連し、様々な環境問題に直面する中、ヒトと昆虫がうまく共存する手掛かりを与える広い意味での社会的意義を有している。

研究成果の概要(英文)：Many insects use photoperiodism for seasonal adaptation, but it is not known how circadian clock cells measure day length and regulate diapause. This study suggests that some neurons in the pars lateralis of the brain in the blowfly *Protophormia terraenovae* have dual functions: circadian clock and neurosecretion. The neuropeptide Dh31 secreted by these neurons inhibits the synthesis and secretion of juvenile hormone by the corpus allatum. This clock/neurosecretory neuron may play a role in induction or maintaining diapause by suppressing JH synthesis in the corpus allatum under short-day conditions.

研究分野：神経生物学、時間生物学

キーワード：光周性 幼若ホルモン 神経ペプチド ルリキンバエ 概日時計 時計遺伝子

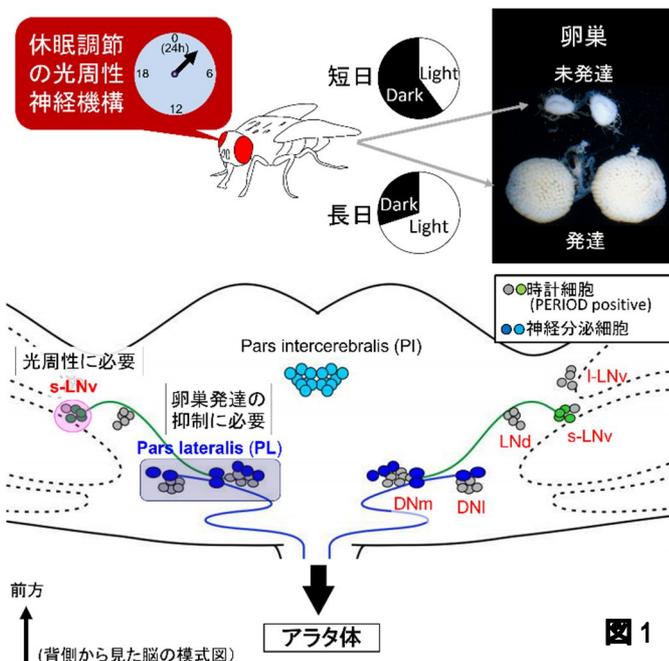
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 中～高緯度に生息する生物は、生存に適した季節に成長し生殖するが、不適な季節にはそれらを一時停止した休眠に入る。多くの昆虫は、一日の明るい時間の長さ「日長」あるいは「夜長」に反応する光周性を用いて季節に適応している。これまでに、日長を測定し、長日と短日を区別する機構には、概日時計(以下「時計」)遺伝子や時計細胞が関わることが示されてきた。しかし、「24時間を刻む時計遺伝子や時計細胞がどうやって日長を測るのか?」という問いに対する答えはまだない。

(2) 時計の分子機構がよく理解されているアフリカ原産のキロショウジョウバエや年中繁殖可能なマウスには、光周性はほとんど見られない。そのため、中緯度から高緯度に生息し明瞭な光周性を示す種を用いた分子生理学的な研究が必要となっている。

(3) そのような中、亜寒帯地方に生息するルリキンバエ (*Protophormia terraenovae*) の成虫は、短日を受容するとアラタ体で合成される幼若ホルモン (JH) の分泌が低下することにより、卵巣が発達せず生殖休眠に入ること(図1上)、休眠には脳の脳側方部 (PL) ニューロンが重要であることがわかっている(図1下)。しかし、PLニューロンと時計細胞の関りは不明である。



### 2. 研究の目的

(1) 「二種類の時計細胞 s-LNv と DN が時刻情報を処理し日長が判断され、短日では時計機能と神経分泌機能を併せ持つ DN が、卵巣発達に必要な幼若ホルモン (JH) 合成を抑制することにより休眠を誘導する」という作業仮説をたて、これを神経解剖学、分子生物学、電気生理学、生化学的に検証した。

### 3. 研究の方法

(1) 神経解剖学および分子生物学 神経ペプチドの抗体を用いた免疫組織化学と単一細胞の nested-PCR により、脳側方部に存在する時計細胞 (DN) とアラタ体側心体へ投射する PL ニューロンを分類した。そして、PL ニューロンと DN が同一であるかを調べた。また、アラタ体の免疫組織化学を行い、神経ペプチドを持つ神経線維の染色強度を調べた。定量性 rt-PCR により、脳、アラタ体における遺伝子発現量を日長により比較した。in situ hybridization (ISH) により遺伝子の発現細胞を調べた。

(2) トランスクリプトーム ルリキンバエ長日脳および短日脳の RNA-Seq データを取得し、日長により発現が変わる遺伝子を探索した。

(3) 電気生理学 パッチクランプ法により、PL ニューロンから静止膜電位と自発発火頻度を調べ、短日と長日条件で比較した。

(4) ゲノム編集 CRISPR/CAS9 法の確立のため、時計遺伝子 *period* の配列を読み、卵へのインジェクション法を検討した。

(5) JH の測定 重水素で標識した JH3 bisepoxide (JHB3、八エの JH) 同位体を内部標準とした UPLC/MSMS 解析により、アラタ体が単位時間あたりに分泌する JHB3 量を測定した。また、JH 分泌量に対する神経ペプチドの効果を調べた。

### 4. 研究成果

(1) PL/DN ニューロンの分子・形態学的解析 キロショウジョウバエの DN 細胞に発現する Diuretic hormone 31 (Dh31) について in situ hybridization と免疫組織化学を行った結果、ルリキンバエの 12 箇所脳領域に Dh31 が発現し、そのうちの 1 か所が PL であった。そして、4 つの PL ニューロンが Dh31 を発現することが分かった。アラタ体・側心体からのバックフィル染色により PL ニューロンの細胞体を標識した後、細胞体を個別採取して PCR を行った結果、採取された細胞の約 80% に、*period*、*timeless*、*clock*、*cycle* の時計遺伝子の発現が確認された。また、神経ペプチド *dh31*、*short neuropeptide f (snpf)* を含めた神経ペプチドの発現が約 70% の細胞に見られた。このことから、PL ニューロンの一部は時計遺伝子を発現する DN であると考えられた。

(2) 脳における日長応答遺伝子と発現細胞の解析 ルリキンバエの羽化後3,7日の全脳RNA-Seqで得られたコンティグを223,145個のクラスターに分類し、一日の4つの時刻(Zeitgeber time: ZT 0, 6, 12, 18; 明期開始ZT0)でTPM値を短日、長日条件間で比較した。その結果、合計153個のDEGが検出された。また、アミノ酸代謝経路、ビタミンと補因子の代謝経路、脂質代謝に関連する遺伝子に発現変動があることが示唆された。qPCRにより脳内発現量が3日間の短日条件で有意に上昇する遺伝子を1つ見つけた。一方、全脳の*dh31*の発現量には、日長による有意な差は認められなかった。

(3) PLニューロンの電気生理学的解析 単一PLニューロンへの色素注入により、形態学的に2タイプが区別された。PLaタイプのニューロンには、活動電位の自発発火が認められなかった。一方、PLbタイプの約20%に自発発火が認められた。これらニューロンの細胞膜電位や発火パターンに、日長による有意な差は認められなかった。また、PLaニューロンのみがDh31に対し免疫陽性を示した。そして、この細胞は背側前大脳に両側性に神経線維を伸ばし、アラタ体内部に細かく分枝していた。

(4) KO 個体作出の検討 ノックアウト個体の作製に向け、*period*遺伝子のシーケンスを行った結果、7つのexonとそれを挟むイントロン領域の配列を得た。また、PASドメイン内の領域をターゲットとする3種類のgRNAを設計した。

(5) JH合成抑制分子の探索 JH合成酵素である*juvenile hormone acid O-methyltransferase (jhamt)*, *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (hmgcr)* 遺伝子のアラタ体での発現量を調べた結果、羽化後7日には両遺伝子の発現量は短日より長日で有意に高かった。また、アラタ体が分泌するJHB3を定量した結果、羽化後7日のJHB3分泌量は短日より長日条件で有意に高かった。

羽化後7日のアラタ体において24種類の神経ペプチドの受容体遺伝子の発現を調べたところ、Dh31, sNPFの受容体である*dh31r*と*snpfr*の2つのみ発現していることが分かった。これより、アラタ体はPLニューロンが分泌するDh31とsNPFを受容すると考えられた。そこで、長日のアラタ体をDh31あるいはsNPFと一緒に培養した結果、*jhamt*発現量はDH31により減少したが、sNPFではコントロールと変わらなかった。また、JHB3分泌量はDH31とsNPFの両方により有意に抑制され、その効果はDH31において著しかった。

次に、長日と短日条件の間でアラタ体に投射する神経線維内のDH31とsNPFの量を免疫組織化学的に比較した。その結果、差は見られなかった。

以上のように、アラタ体・側心体へ投射するPLニューロンの一部に時計遺伝子が複数発現していることから、PLニューロンの一部が時計細胞として機能することが示唆された。また、アラタ体内へ投射するDH31ニューロンにも時計遺伝子の発現が示唆され、JHB3の分泌を強く抑制することから、

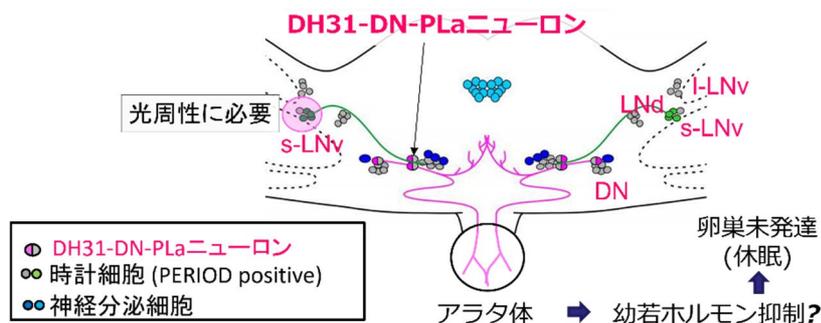


図2

このニューロン(図2 DH31-DN-PLaニューロン)が短日条件でアラタ体のJH合成を抑制し、休眠を誘導あるいは維持する機能を持つのかもしれない。これまでに光周性に必要なsLNvがPLニューロンへシナプス入力することがわかっている。これより、s-LNvとDH31-DN-PLaニューロンのネットワークが光周性における日長測定に関与するのかもしれない。しかしながら、DH31-DN-PLaニューロンに日長による違いは検出できなかった。今後、異なる時間帯、日齢においてこのニューロンの活動を調べる必要がある。

<引用文献>

Shiga S, Neural Mechanism of Photoperiodism. Entomolgy Monographs: Insect Chronobiology, 2023, 293-320.  
 Hirata K, Shiga S Bolwig Organ and Its Role in the Photoperiodic Response of *Sarcophaga similis* Larvae. Insects, 14, 2023, 115.  
 Koide R, Xi J, Hamanaka Y, Shiga S Mapping PERIOD-immunoreactive cells with neurons relevant to photoperiodic response in the bean bug *Riptortus pedestris*. Cell and Tissue Research 385, 2021,571-583.  
 Hamanaka Y, Yasuyama K, Numata H, Shiga S, Synaptic connections between pigment-dispersing factor-immunoreactive neurons and neurons in the pars lateralis of the blow fly *Protophormia terraenovae*. J Comp Neurol 49, 2005, 390-399.

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 1件）

1. 著者名 Koide Ryohei, Xi Jili, Hamanaka Yoshitaka, Shiga Sakiko	4. 巻 385
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 571-583
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 -

1. 著者名 Hirata Kazune, Shiga Sakiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Bolwig Organ and Its Role in the Photoperiodic Response of <i>Sarcophaga similis</i> Larvae	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Insects	6. 最初と最後の頁 115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/insects14020115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shiga Sakiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Neural Mechanism of Photoperiodism	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Entomolgy Monographs: Insect Chronobiology	6. 最初と最後の頁 293-320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-99-0726-7_14	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6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤原 一平, 舩形 のぞみ, 長谷部 政治, 志賀 向子
2. 発表標題 ルリキンバエの休眠に必要な脳側方部ニューロンの発現遺伝子による特徴づけ
3. 学会等名 (公社) 日本動物学会第93回早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本 陵央, 志賀 向子
2. 発表標題 ルリキンバエのアラタ体に受容体を発現する神経ペプチドがjhamt 発現に与える影響の解析
3. 学会等名 ( 公社 ) 日本動物学会第93回早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shiga Sakiko
2. 発表標題 Molecular characterization of pars lateralis neurons relevant to diapause control in the blow fly, <i>Protophormia terraenovae</i>
3. 学会等名 第26回 国際昆虫学会議 ( 招待講演 )
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 舩形のぞみ、長谷部政治、志賀向子
2. 発表標題 ルリキンバエ脳側方部ニューロンの異なる光周期下での電気生理学的解析および免疫組織学
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第43回札幌大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本廣千佳、藤原一平、志賀向子
2. 発表標題 ルリキンバエの脳における光周性機構に関する遺伝子の探索
3. 学会等名 第 6 5 回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志賀向子
2. 発表標題 昆虫の季節性に関わる概日時計ネットワーク
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会（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	品田 哲郎  (Shinada Tetsuro)  (30271513)	大阪公立大学・大学院理学研究科・教授   (24405)	

	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	橋本 陵  (Hashimoto Ryo)		
研究 協力者	舛形 のぞみ  (Masugata Nozomi)		
研究 協力者	本廣 千佳  (Motohiro Chika)		

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	藤原 一平  (Fujiwara Ippei)		
研究協力者	長谷部 政治  (Hasebe Masaharu)  (40802822)	大阪大学・大学院理学研究科・助教   (14401)	
研究協力者	西 吉利  (Xi Jili)		
研究協力者	井関 凜乃  (Iseki Rino)		

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