

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770069

研究課題名（和文） 光周反応における「外的符合モデル」の実体の解明

研究課題名（英文） Entity of the “external coincidence model” in photoperiodism

研究代表者

後藤 慎介（GOTO SHINSUKE）

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：70347483

研究成果の概要（和文）：光周性において重要な「外的符合モデル」では、概日時計が重要な役割を果たす。外的符合モデルを適用できるナミクバエ幼虫の脳には、2つの概日時計細胞群（DNs と LNs）が存在することがわかった。概日時計タンパク質 PERIOD の発現を調べたところ、これら細胞群は光周期によって特徴的な発現振動パターンを示すことがわかった。この光周期による振動パターンの違いが外的符合モデルの光周測時に重要な役割を果たしていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The external coincidence model sufficiently explain various photoperiodic responses. However, its entity is still largely unknown. In the present study, PERIOD-immunoreactive (PER-ir) cells were investigated in the brain of the flesh fly *Sarcophaga similis* larvae under different photoperiodic conditions every 2-4 hours. We detected 2 PER-ir clusters in the brain, and also found that photoperiods are encoded by these circadian clock neurons in different manners. These 2 PER-ir clusters would contribute to the photoperiodic time measurement in the external coincidence model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：光周性、昆虫、休眠、季節適応

1. 研究開始当初の背景

昆虫は日長（あるいは夜長）が長いか短いかを指標として季節を読み取り、休眠に入る。たとえばハエ目昆虫のナミクバエ

Sarcophaga similis は、日長が長い（長日）条件下ではすみやかに成長して成虫になるのに対し、日長が短い（短日）条件下では蛹で成長を停止し、休眠に入る。

光周性は、光受容器、測時機構、計数機構、

出力系といったいくつかの系が組み合わさって作り出されている。これまで、出力系やホルモンの標的器官に関しては数多くの研究がなされ、その物質的な基盤も明らかになってきたが、測時機構と計数機構からなる光周時計については理論的な研究（モデルの構築）が先行しており、その分子機構は明らかになっていない。また測時機構に概日時計が関与することは70年以上も前に指摘されているが、具体的にどこのどの時計がどのように関わるのかは明らかになっていない。

光周性のモデルはいくつか提唱されているが、そのうちでもっとも有力なものは「外的符合モデル」である。このモデルは、光周期に同調した概日振動体と、休眠か非休眠かを決定するのに重要な位相（光誘導相： ϕ_i ）を仮定している。 ϕ_i は暗期の後半に存在すると考えられ、 ϕ_i に光があたると非休眠、あたらないと休眠という決定がなされる。短日では暗期が長いため、 ϕ_i には光があたらずに休眠となる。一方、長日では明期の後半に位相後退が起こることで ϕ_i が明期に押し出されることで ϕ_i に光があたって非休眠となる。

以上のように、外的符合モデルでは光は2つの役割、すなわち概日振動体の位相変化と ϕ_i での短日・長日の見極め、を担っている。では光はどこで受容されるのだろうか。いくつかの昆虫において光周性のための光受容器が特定されているが、どの器官を光周性のための光受容器として用いるかは種によってさまざまで、単眼や複眼といった網膜光受容器を用いる昆虫や、脳のような網膜外光受容器を用いる昆虫が知られている。ハエ目昆虫の幼虫の光受容器としては口器の上に存在するBolwig's organ (BO)と脳とが考えられるが、どちらが光周性のための光受容器として役だっているのかは知られていない。

外的符合モデルは多くの昆虫に適用でき、また複雑な光周期に対する反応を説明できるにもかかわらず、いまだにその実体は明らかになっていない。

2. 研究の目的

外的符合モデルが適用できるナミクバエを用いて、外的符合モデルの実体を生理学的、分子生物学的に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 光受容器の解析

- ・ 脳の光受容能の解析のための脳移植。
- ・ Bolwig's organ (BO)の切除によるBO光受容能の解析。
- ・ オプシンのクローニングと発現解析。

(2) 概日時計の所在と概日時計遺伝子の発

現及びノックダウン

(3) ϕ_i において特異的に発現する遺伝子の探索

4. 研究成果

(1) 脳による光受容の可能性を検討するためには、脳だけを培養し異なる光周期を与えて、その脳を他個体に移植して光周性がどのように変化するかを調べる必要がある。そのため、まずは脳移植を試みた。長日条件を経験した個体（非休眠運命）から脳を取り出し、短日条件で発育した個体（休眠運命）に移植したところ、脳の移植にともなって非休眠運命も移植されることが明らかになった。ただ、死亡率が非常に高く、これにともなって移植の成功率は非常に低い。幼虫は皮膚の収縮性が高く内圧も高い。よって、移植のために皮膚を切開するだけで多くの体液が漏れだしてしまうために死亡率が高くなると考えられる。今後は、囲蛹（ハエ目昆虫に特徴的な現象で、蛹になる前に幼虫の皮膚が硬化する現象）を用いることで、上記のような幼虫のデメリットを克服できると考える。

ナミクバエは摂食を終了した幼虫も光周期への感受性を持つため、口器とともにBOを切除し、その幼虫に光周期を感受させて光周期に反応するかどうか（休眠するかどうか）を調べることが可能であると考えた。しかし、口器とともにBOを切除した個体は、休眠判定が可能となる発生ステージの直前ですべて死亡することがわかった。今後はBOを切除し光周期を感受させた幼虫の脳を他個体に移植することによって、BOが無くても光周期を感受できるのかどうかを検討する必要がある。

昆虫にはショウジョウバエ型クリプトクロムと哺乳類型クリプトクロムが存在するが、光受容能を持つのはショウジョウバエ型のクリプトクロムと考えられている。ナミクバエにおいて、ショウジョウバエ型クリプトクロムの遺伝子断片をクローニングすることができた。また、ナミクバエにおいて、2種類のオプシン(Rh1、2)のクローニングに成功した。これらオプシンはショウジョウバエのオプシンとも高い相同性を示した。脳とBOでクリプトクロム、Rh1の発現をリアルタイムPCR法により調べたところ、両遺伝子ともBOよりも脳で強い発現が見られた。これは脳が光受容器官として十分働いていることを示している。ショウジョウバエでは脳でのオプシンの発現は知られていない。これまでの研究により、ナミクバエでは、暗期の前半と後半で異なる光受容器が関与していると考えられている。暗期の前半は短波長の光を感受することからクリプトクロムが、暗期の後半は短波長から長波長までの幅広い光

を感受することから複数のオプシンが関与していると考えられる。ショウジョウバエでは脳でクリプトブロムが、BO ではオプシンが発現することが知られているので、ナミクバエではBO と脳を使い分けて光周性を生み出していると考えていたが、今回の結果より、脳だけで光周性の光受容から出力までを行なっている可能性が示された。今後は、脳のどこでRh1が発現しているのか、他のオプシンも同様に脳で発現しているのか、これらのオプシンが光周性の光受容に関与しているのかを検討していく必要がある。

(2) いくつかの昆虫において概日時計遺伝子 *period* (*per*) が光周性に関わることが指摘されている。そこでナミクバエから *per* 遺伝子のクローニングを行った。得られたDNA断片の塩基配列および予想されるアミノ酸配列は他の昆虫の *per* 遺伝子と高い相同性を示した。異なる光周期下での脳での発現を調べるため、2時間毎にサンプリングを行い、リアルタイムPCR法によって発現量の測定を行った。しかし、幼虫の脳での *per* 遺伝子の発現量は非常に少ないために、サンプル間で大きなばらつきが見られた。よって、脳内での振動パターンや異なる光周期下での発現の違いを議論することはできなかった。小さな脳を抽出するには時間がかかるため、各時間では少数の脳を扱い少ないRNA量で発現解析を行わざるを得なかったが、今後は脳だけの発現にとらわれず、全虫体での発現解析を進める必要がある。

per 遺伝子の役割を直接的に調べるためにRNA干渉法を試みた。二本鎖RNAを作製し幼虫への注射を時期を変え、濃度を変えて行ったが、光周性には影響が見られなかった。遺伝子発現を調べても干渉はほとんど見られなかった。リポフェクタミンを用いて効率よく二本鎖RNAを細胞内へ導入する方法も検討したが、効果は現れなかった。外部から二本鎖RNAを注射することで *per* 遺伝子を抑制することは困難であると考えた。

続いて、ショウジョウバエPERIOD (PER) に対する抗体を用いて、ナミクバエ脳を染

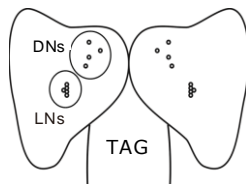


図1 ナミクバエ幼虫脳における概日時計細胞群DNsとLNs. TAG: 胸腹部神経節.

色することによって、概日時計細胞はどこに存在するのか、異なる光周期下において時計の振動パターンがどのように変化するかを検討した。ナミクバエ幼虫脳のPER免疫陽性細胞は、より背側に位置する背側ニューロン (DNs) とより側方に位置する側方ニューロン (LNs) の2グループに分類された。また、左右それぞれの脳半球には、最高で4個のDNsと5個のLNsが観察された(図1)。続いて、異なる光周期下でのPER免疫陽性細胞の数を調べた。細胞内のPERIOD量は染色される細胞の有無に反映され、その結果、PERIOD量に応じて染色される細胞の数が増減すると考えられる。

DNs, LNs どちらも明期の初めにはほとんどの細胞が染色され、暗期中に細胞数が最も減少するという時刻変化 (= 振動) が見られた。興味深いことに、同じ光周期条件下であってもDNsとLNsは異なる振動パターンを示した。より具体的には、同じ短日条件下でもDNsは振幅の谷が暗期に入ってから4時間ほど経過した後に見られるが、LNsでは暗期開始直後に見られる。このようにDNsとLNsは明暗周期に対して異なる位相関係を持つことが明らかになった。さらに、短日・長日条件下でのDNsとLNsの振動パターンを調べた。明期開始からの位相と比較すると、DNsとLNsは光周期にかかわらず同じ振動パターンを示した。その一方で、長日条件下のLNsは振幅の谷が短日条件下よりも幅広く、短い暗期のうちに急激に谷から山へと変化することがわかった(図2)。

このように、DNsとLNsは異なる光周期に対して特徴的な振動パターンを生み出すことが明らかになった。このような特徴的な振動パターンが光周測時に重要な役割を果たしていると考えられる。ナミクバエにおいては、暗期の前半は短い光パルス(15分)

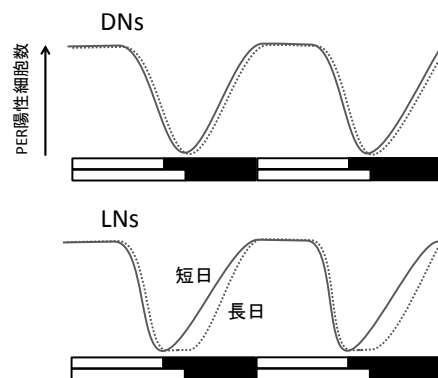


図2 異なる光周期下でのDNs, LNsにおけるPER陽性細胞数の時間的変動. 白塗りの枠は明期を、黒塗りの枠は暗期を示している.

にも反応して、休眠から非休眠へと発生運命を変更することができるが、暗期の後半は短い光パルスには反応しない。また、暗期の前半と後半では感受する光の波長特性も異なっている。このように長さの異なる光パルス、あるいは波長の異なる光パルスを暗期の前半あるいは後半に与えた場合に、DNs、LNsがどのように反応するかを調べることにより、これら細胞群で光周測時がどのように行われているのかをより詳細に知ることができる。異なる光周期下でのDNsとLNsの振動パターンの違いについては、学術論文として投稿すべく準備を進めている。

(3) サブトラクション法を用いることで、 ϕ_i において特異的に発現する遺伝子の探索を行った。数百のコロニーをスクリーニングしたが、現在のところ特異的な発現を示す遺伝子断片は得られていない。今後はRNAseqなど、より効率よく転写量の違いを明らかにできるシステムを用いることが肝要だと考えられる。

(4) 以上の成果を踏まえて、光周性における概日時計の役割について総説を執筆した(Goto 2013)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Goto, S.G. 2013. Roles of circadian clock genes in insect photoperiodism. *Entomological Science* 16, 1-16. 査読有り DOI: 10.1111/ens.12000
- ② Tagaya, J., Numata, H., Goto, S.G. 2010. Sexual difference in the photoperiodic induction of pupal diapause in the flesh fly *Sarcophaga similis*. *Entomological Science* 13, 311-319. 査読有り DOI: 10.1111/j.1479-8298.2010.00394.x

[学会発表] (計3件)

- ① 山本瑞・志賀向子・後藤慎介 ナミニクバエ幼虫脳の PERIOD 免疫陽性細胞に及ぼす光周期の影響 第57回日本応用動物昆虫学会大会、2013年3月28日、湘南(日本大学藤沢キャンパス)
- ② Goto, S.G. Photoreceptor and clock mechanisms for insect photoperiodism. 5th Asia and Oceania Conference for Photobiology, 2011年8月1日、奈良県新公会堂、招待講演
- ③ 沼田英治・池野知子・後藤慎介 昆虫の

光周性と概日リズムの振動・光同調機構
第16回日本光生物学協会年会、2010年
8月10日、吹田市(大阪大学大学院医学
系研究科)

[図書] (計1件)

- ① 後藤慎介 2010. 「ニクバエ」昆虫の低温耐性—その仕組みと調べ方— (積木久明・田中一裕・後藤三千代 編) 岡山大学出版会 pp. 272-273.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 慎介 (GOTO SHINSUKE)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号: 70347483