

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03708

研究課題名(和文) 昆虫の概日時計 神経分泌細胞連関を中心とした光周性機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of photoperiodic mechanisms involving circadian clock and neurosecretory cells in insects

研究代表者

志賀 向子 (Shiga, Sakiko)

大阪大学・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) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：チャバネアオカメムシとルリキンバエを用いて脳内の概日時計と脳神経分泌細胞に注目し、これらの光周性における役割を調べた。チャバネアオカメムシでは、アラタ体のJH合成を抑制するPlast-MIPや時計タンパク質CYCLEの発現を抑制した結果、これらの遺伝子発現が生殖休眠を調節する光周性に関わることがわかった。また、Plast-MIP陽性細胞が存在する脳間部の大型細胞の自発発火活動が短日で高まることから、短日条件では脳間部の大型細胞がPlast-MIPの分泌を介して卵巣発達を抑制していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、昆虫の季節適応機構として重要な光周性の神経機構を探るものである。これまでに、農業害虫としても重要なチャバネアオカメムシの幼若ホルモン合成を抑制する神経ペプチドを同定した。今回、秋の短日情報を受けることによりそのペプチドを分泌する神経分泌細胞の候補を示すことができた。また、昆虫の行動リズムを制御する概日時計を構成する遺伝子が光周性にも関わることを示した。これらの成果は、昆虫光周性の神経機構の解明という基礎生物学的知見を深めるとともに、今後、農業害虫の管理方法といった側面にも貢献し得る。

研究成果の概要(英文)：In the brown-winged green bug *Plauti stali* and the blow fly *Protophormia terraenovae*, roles of circadian clock and neurosecretory cells in photoperiodism were examined. In *P. stali*, knockdown of *plast-mip* mRNA, which encodes peptide suppressing juvenile hormone biosynthesis, and of clock gene *cycle* mRNA showed involvement of these gene expression in photoperiodic control of reproductive diapause. Electrophysiological recording showed *pars intercerebralis* cells increase spontaneous activities under short days suggesting that *pars intercerebralis* cells release Plast-MIP to suppress ovarian development.

研究分野：神経生物学

キーワード：光周性 神経ペプチド myoinhibitory peptide チャバネアオカメムシ ルリキンバエ 脳間部 *cycle*

## 1. 研究開始当初の背景

多くの生物は光周期から季節を読み、生存に適さない時期には成長や生殖を一時的に停止した休眠に入る。このような性質を光周性と呼ぶ。光周性中枢となる脳内の光周時計では、一日の日の長さが測定され、内分泌系を介して、生殖腺の発達等が調節される。これまで日長測定機構を説明するモデルがいくつか提唱されており、国内外で概日時計遺伝子の光周性への関連が議論されてきた (Dolezel 2015)。しかし、光周時計を担う細胞や、そこで起こる分子メカニズムはほとんどわかっていない。

これまでに私たちは脳の微小破壊を行い、複数の昆虫種に共通して、概日時計細胞 (以下、時計細胞) を含む領域と、神経分泌細胞である脳側方部細胞が光周性に重要であることを示した。ルリキンバエでは、時計細胞が PERIOD タンパク質の核内移行タイミングを変えて光周期情報を符号化し (Muguruma et al. 2010)、脳側方部細胞は時計細胞からシナプス入力を受け、短日条件下でアラタ体を抑制して休眠を誘導する (Matsuo et al. 1997; Hamanaka et al. 2005)。これらより、脳側方部細胞は時計細胞から短日情報を受けると次第にアラタ体を抑制し、幼若ホルモン合成が低下し、休眠が誘導されると考えられる。

また、チャバネアオカメムシの脳から幼若ホルモン合成を抑制するペプチド (Plast-MIP, *Plautia stali*-myoinhibitory peptide) が同定され、ルリキンバエ脳のトランスクリプトーム解析と qPCR 解析により、短日情報を受けて数日以内に発現が上昇する遺伝子 (*ace*, *angiotensin converting enzyme*) が見つかった。これら二つの分子も光周性神経機構を探るための重要な因子となる。ゴキブリのアラトスタチンなどの知見から Plast-MIP が脳側方部細胞に存在し、短日条件下でアラタ体を抑制する分子ではないかと考え (Stay et al. 1992) 以下の実験を実施した。

## 2. 研究の目的

本研究は、成虫期に光周期感受性を持つチャバネアオカメムシとルリキンバエを用いて、脳内の概日時計細胞と脳側方部細胞について、細胞の位置と投射形態、細胞の電気的性質、細胞内で発現している遺伝子の光周性に対する影響を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 昆虫 実験室継代飼育系統であるチャバネアオカメムシ *Plautia stali* メス成虫と *Protophormia terraenovae* メス成虫を実験に用いた。チャバネアオカメムシは 25 長日 (LD 16h:8h) あるいは短日 (LD 12h:12h) で飼育し、ルリキンバエは長日条件として 25 -LD 18h:6h あるいは 20 -LD 18h:6h、短日条件として 20 -LD 12h:12h で飼育した。

(2) 電気生理学的解析 頭部から脳を生理塩溶液に取り出し、赤外微分干渉法を用いて顕微鏡下で脳間部、脳側方部の神経分泌細胞を観察し、ガラス微小電極 (電極抵抗 3-7  $\Omega$ ) を細胞へ当てパッチクランプ法により細胞から電位記録を行った。

(3) 免疫組織化学 脳を固定し免疫組織化学染色を行った。一次抗体として Plast-MIP、ルリキンバエ ACE、キロショウジョウバエ PERIOD、[Arg(7)]-コラゾニン、カイコ prothoracostatic peptide 1 (PTSP-1)、コオロギ pigment-dispersing factor (PDF) を用いた。

(4) RNA 干渉 チャバネアオカメムシを用い、*Plast-mip*, *pdf*, *pdfreceptor (pdfr)*, *short neuropeptide (snpf)*、コントロールとして蛍光蛋白質 *venus* の二本鎖 RNA を合成し、チャバネアオカメムシに羽化後 1、15 あるいは 20 日に注射し産卵あるいは卵巣発達を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) チャバネアオカメムシ

#### Plast-MIP 細胞の位置と投射形態

免疫組織化学染色を行った結果、Plast-MIP 陽性を示す細胞が脳間部 (PI) と脳側方部近くの dpCM を含む 7 つの脳領域に見つかり、免疫陽性ファイバーがアラタ体近くに見つかった (Fig. 1)。

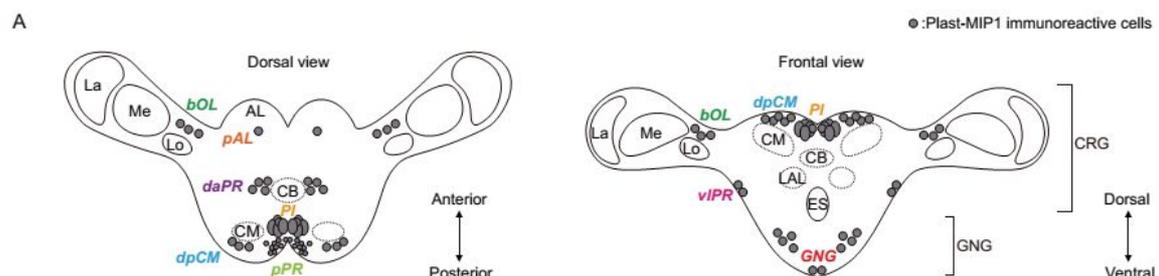


Fig. 1 Schematic illustration shows dorsal (left) and frontal (right) views of Plast-MIP immunoreactive cells in *Plautia stali*. (from Hasegawa et al. 2019).

Fourier transform mass spectrometry 解析によりこれらの領域から Plast-MIP と一致する質量ピークが検出された (Hasegawa et al. 2019)。Plast-MIP と似たアミノ酸配列を持つ PTSP-1 の抗体を用いた免疫組織化学染色により、Fig 1 の大部分の細胞が染色され、Plast-MIP 抗体より多くの神経線維が標識された。また、視葉内視髄近くに 7-12 個の PDF 免疫陽性細胞が見られ、dpCM 細胞 (Fig.1) の近くで PDF と PTSP1 の神経バリコシティが近接していることがわかった。概日時計との関連が示唆される視髄近くの PDF 細胞と dpCM 細胞が連絡している可能性が示された。

### 細胞の電気的性質

脳間部神経分泌細胞 (PI) の自発発火パターンは regular, irregular, silent の 3 つに分類され (Fig. 2)、それらの割合が長日と短日で有意に異なり、短日で regular が増え、静止膜電位も高くなっていた。染色を行ったところ、記録細胞はアラタ体へつながる神経経路 *Nervi corporis cardiaci* 1 内に神経繊維を持つことがわかった。

次に、dpCM 付近の脳側方部神経分泌細胞からの記録を試みた。しかし、細胞が脳間部細胞よりも小さく、形態学的に判別することができたのは 1 - 4 個程度であったこと、表面の神経鞘と一緒にはがれることが多かったことから、記録には至らなかった。

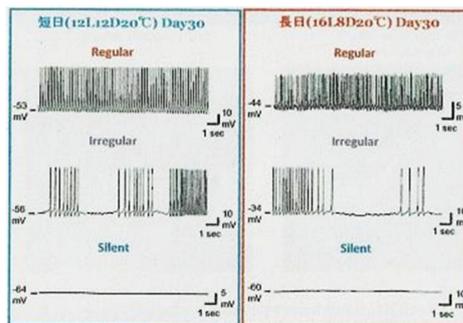


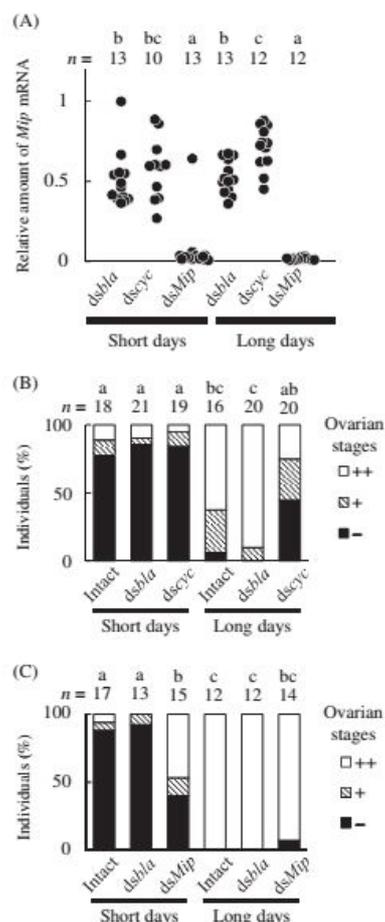
Fig. 2 Comparison of spontaneous firing patterns of PI neurons between long (right) and short days (left) in *Plautia stali*.

### 光周性に対する時計遺伝子 *cycle* と神経ペプチドノックダウンの影響

歩行活動リズムを制御する時計遺伝子 *cycle* のノックダウンにより、長日で休眠に入る個体が増加し (Fig. 3、Tamai et al. 2019)、幼若ホルモン合成活性が低下する傾向が見られた。これは、カメムシにおいて行動を制御する時計遺伝子が光周性に関わることを示す初めての報告となった。一方、Plast-MIP のノックダウンでは、短日で卵巣を発達させる個体の割合が対照群より有意に増えた (Fig. 3)。しかしながら、幼若ホルモンの合成活性には顕著な効果は見られなかった。

次にチャバネアオカメムシの日長変化に対する反応を利用し (小滝・八木 1987)、神経ペプチドおよび受容体ノックダウンの影響を調べた。短日で飼育した昆虫に羽化後 1 日に二本鎖 RNA を注射し、羽化後 20 日に長日へ移して日長移動後の産卵前期間を調べたところ、PDF 受容体のノックダウンにより、コントロール群よりも有意に産卵前期間が長くなった。一方、羽化後 20 日の二本鎖 RNA の注射は効果がなかった。PDF ペプチド、sNPf 受容体のノックダウンの効果は見られなかった。次に長日で飼育した昆虫を羽化後 1 日に二本鎖 RNA を注射し、短日に移したところ、産卵が停止するまでの日数には大きな影響は見られなかった。

Fig. 3 Effects of RNA interference (RNAi) directed against *cyc* and *Mip* on relative amounts of *Mip* mRNA (A) and effects of *cyc* RNAi (B) and *Mip* RNAi (C) on ovarian development in *Plautia stali*. (from Tamai et al. 2019).



## (2) ルリキンバエ

### ACE 細胞の位置

ルリキンバエ ACE の N 末端から 106-122 アミノ酸に対する抗体を作製し、免疫組織化学染色を行った。その結果、食道下神経領域背側側方領域に 1 対の大型の細胞が染色され、これまでに同定されている時計細胞、脳間部、脳側方部細胞とは異なっていた (Fig. 4、Hase et al. 2017)。この ACE 免疫陽性細胞を外科的に除去し卵巣発達を調節する光周性に対する影響を調べたが、有意な効果は見られなかった。ほかに *ace* を発現する細胞が無いか調べるため、in situ hybridization を行ったが、*ace* の発現量が少なく染色に至らなかった。アラタ体側心体からの

バックフィル(脳側方部細胞の染色)と免疫組織化学の二重染色により、脳側方部細胞と PERIOD 陽性細胞(DN)は異なる細胞で隣接して存在する様子が観察された。また、二重免疫組織化学染色により、脳側方部に両抗体で標識される細胞が3対見つかった。例数がまだ少なく、今後これらの結果を検証する必要がある。

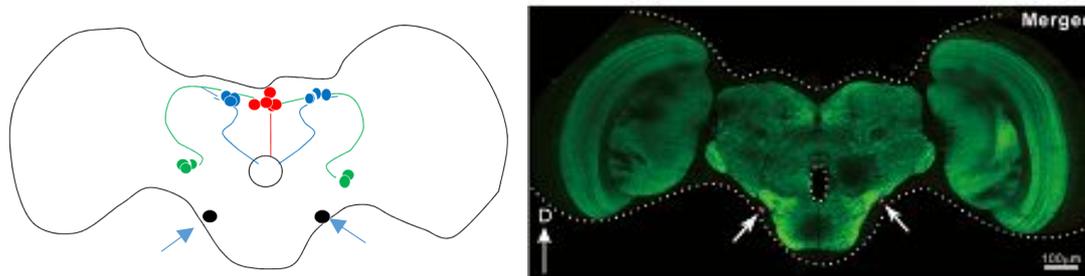


Fig. 4 ACE immunocytochemistry of *Protophormia terraenovae* brain. ACE immunolabelling cells (arrows). Synapsin immunolabelling (green region). PI (red), Pars lateralis (blue) and clock cells (green cells) are schematically shown in the above. (From Hase et al. 2017)

### 細胞の電気的性質

13 個体において脳側方部に細胞体を持つニューロンから電気記録に成功し、4 種類に分類された。2 例においてアラタ体・側心体へ投射する posterior lateral tract 内に神経線維が染色された。

以上より、チャバネアオカメムシではアラタ体の幼若ホルモン合成を抑制する Plast-MIP の発現を抑制すると短日で卵巣発達する個体が増加すること、Plast-MIP 陽性細胞が存在する脳間部の大型細胞の電気的活動が短日で高まることから、短日条件では脳間部の大型細胞が Plast-MIP の分泌を介して卵巣発達を抑制している可能性がある。ただし、Plast-MIP の発現が抑制されても短日条件で幼若ホルモン合成活性は低かったことから、Plast-MIP 以外にも幼若ホルモンを低下させる要因があると考えられる。また、RNA 干渉実験と免疫組織化学の結果から PDF を用いたシグナルカスケードが Plast-MIP の上流で光周性に関わることが示唆された。

ルリキンバエでは ACE に注目した解析は技術的な難しさから機能の考察には至らなかったが、脳側方部からのパッチクランプ法による電気生理学的解析のシステムを立ち上げることができた。これをもとに、今後、休眠誘導に関わる脳側方部細胞を同定し、その作用メカニズムを探ることができるだろう。

### < 引用文献 >

Dolezel D, Photoperiodic time measurement in insects. *Current Opinion in Insect Science*, 7:98-103, 2015

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*. *Journal of Comparative Neurology* 491:390-399, 2005

Hase H, Koukai M, Hamanaka Y, Goto SG, Tachibana S-I, Shiga S Transcriptome analysis of the brain under diapause and nondiapause conditions in the blowfly *Protophormia terraenovae*. *Physiological Entomology* 42:282-289, 2017

Hasegawa T, Hasebe M, Shiga S Immunohistochemical and direct mass spectral analyses of *Plautia stali* myoinhibitory peptides in the cephalic ganglia of the brown-winged green bug *Plautia stali*. *Zoological Science* 37:42-49, 2020

小滝 豊美、八木 繁実 チャバネアオカメムシの休眠発育と体色の変化 *日本応用動物昆虫学会誌* 31: 285-290, 1987

Muguruma F, Goto SG, Numata H, Shiga S. Effect of photoperiod on clock gene expression and subcellular distribution of PERIOD in the circadian clock neurons of the blow fly *Protophormia terraenovae*. *Cell and Tissue Research* 340:97-507, 2010

Matsuo J, Nakayama S, Numata H. Role of the corpus allatum in the control of adult diapause in the blow fly, *Protophormia terraenovae*. *Journal of Insect Physiology* 43:211-216, 1997

Stay B, Chan KK, Woodhead AP. Allatostatin-immunoreactive neurons projecting to the corpora allata of

adult *Diptera punctata* Cell and Tissue Research 270:15–23, 1992

Tamai T, Shiga S, Goto SG Roles of the circadian clock and endocrine regulator in the photoperiodic response of the brown-winged green bug *Plautia stali*. Physiological Entomology 44: 43-52, 2019

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 Tamai T, Shiga S, Goto SG	4. 巻 44
2. 論文標題 Roles of the circadian clock and endocrine regulator in the photoperiodic response of the brown-winged green bug <i>Plautia stali</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiological Entomology	6. 最初と最後の頁 43-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/phen.12274	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 Hase H, Koukai M, Hamanaka Y, Goto SG, Tachibana S, Shiga S	4. 巻 43
2. 論文標題 Transcriptome analysis of the brain under diapause and nondiapause conditions in the blowfly <i>Protophormia terraenovae</i> .	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Physiological Entomology	6. 最初と最後の頁 282-289
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/phen.12205	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 Hasegawa T, Hasebe M, Shiga S	4. 巻 37
2. 論文標題 Immunohistochemical and direct mass spectral analyses of <i>Plautia stali</i> myoinhibitory peptides in the cephalic ganglia of the brown-winged green bug <i>Plautia stali</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 42-49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/zs190092	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 長谷部政治、志賀向子	4. 巻 40
2. 論文標題 チャバネアオカメムシの脳 アラタ体における <i>Plautia stali</i> -Myoinhibitory Peptidesの局在解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 阪大化学熱学レポート	6. 最初と最後の頁 80-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 3件 / うち国際学会 1件）

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 日本生態学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷部 政治, 志賀 向子
2. 発表標題 Plast-MIP に着目したチャバネアオカメムシのメス成虫における絶食時の生殖抑制機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakiko Shiga
2. 発表標題 Ascending neuronal pathway to the photoperiodic clock in <i>Riptortus pedestris</i>
3. 学会等名 International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川智久・志賀向子
2. 発表標題 チャバネアオカメムシの頭部神経節におけるPlast-MIPの免疫組織化学およびFT-MS解析
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷部政治・志賀向子
2. 発表標題 チャバネアオカメムシの脳間部大型神経細胞における光周反応の電気生理学的解析
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 玉井貴章・志賀向子・後藤慎介
2. 発表標題 チャバネアオカメムシの光周性機構：概日時計遺伝子cycとアラタ体抑制遺伝子Mipの役割
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小滝豊美・志賀向子・後藤慎介
2. 発表標題 チャバネアオカメムシの産卵に対するPDF受容体RNAiの効果
3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志賀向子
2. 発表標題 概日時計を使った時間設定 光周性機構
3. 学会等名 日本動物学会第88回富山大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長谷川智久, 松本圭司, 志賀向子
2. 発表標題 チャバネアオカメムシにおけるアラタ体抑制因子Plast- Myoinhibitory peptideの機能と局在
3. 学会等名 第64回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 玉井貴章、後藤慎介
2. 発表標題 cycle RNAiがチャバネアオカメムシの概日歩行活動リズムと幼若ホルモン生合成および卵巣発達を制御する光周性に及ぼす影響
3. 学会等名 第24回(2017年度)日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2017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	小滝 豊美  (Kotaki Toyomi)  (20391550)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主席研究員   (82111)	
研究分担者	後藤 慎介  (Goto Shinsuke)  (70347483)	大阪市立大学・大学院理学研究科・教授   (24402)	
連携研究者	長谷部 政治  (Hasebe Masaharu)  (40802822)	大阪大学・大学院理学研究科・助教   (14401)	