

令和元年5月30日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08101

研究課題名(和文)ハチとハエの光周性に関わる概日時計と日長測定機構の分子・神経生物学的解析

研究課題名(英文) Molecular and neurobiological dissection of the circadian clock and the photoperiodic time measurement system involved in photoperiodic responses of wasps and flies.

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・教授

研究者番号：70347483

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)：昆虫は日長を読み取ることで季節の到来を予測する。日長読み取り機構が異なると考えられるキョウソヤドリコバチとナミクバエを対象として、光周性に関わる分子神経機構の解析を行った。キョウソヤドリコバチの脳内に存在すると考えられる2つの概日時計の所在は明らかにならなかったが、本種は日長読み取りの結果を昆虫ホルモンの1つ幼若ホルモンの合成量に変換していることが明らかになった。ナミクバエにおいては、概日時計と考えられる細胞の脳内での所在を明らかにした。また、地理系統間での日長読み取りの違いが概日時計に起因することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物が日長に反応する性質である光周性は温帯の多くの生物に見られ、これらの生物が季節に適応するために必須の機構である。本研究は、日長読み取り機構が異なると考えられる2種の昆虫を用いて、光周性に関わる分子神経機構を解明することを目的とした。その結果、上述の成果をあげることができた。これらの成果は、昆虫の光周性機構の解明において重要な知見をもたらすものである。その成果の一部はすでに原著論文、総説、解説文として公開されており、本分野に携わる世界中の多くの研究者に大きな影響を与えている。また、国民的的好奇心を刺激すべく、得られた成果の内容を市民講座などを通して社会に還元している。

研究成果の概要(英文)：Insects anticipate upcoming seasons by measuring day length (or night length) of a day. In the present study, we focused on two insect species, of which photoperiodic time measurement systems differ, to clarify the molecular and neurobiological mechanisms involved in photoperiodic responses. Although we were unable to clarify the location of the brain clock cells putatively involved in photoperiodic time measurement, we verified that biosynthesis of the juvenile hormone, that is synthesized in and secreted at the corpora allata, is under control of the photoperiodic time measurement system. In a fly, we clarified the exact location of clock cells in the brain and their oscillation patterns under distinct photoperiods. In addition, we clarified that distinct geographic variations in photoperiodic responses are based on the differences in the circadian clock systems governing photoperiodic time measurement.

研究分野：昆虫生理学

キーワード：昆虫 休眠 概日時計 母性効果 日長測定

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 多くの昆虫は明暗の周期(光周期)を読み取ることで季節変化を予測し、発生運命を調節して不適な環境を乗り越える。このような性質を「光周性」という。例えば、キョウソヤドリコバチ *Nasonia vitripennis* (ハチ目コガネコバチ科) のメス成虫は、明るい時間(明期)が長い夏の間(長日)はすみやかに成虫へと発生する次世代を産むが、明るい時間が短くなる秋(短日)には幼虫で休眠する次世代を産む。「休眠」とは一時的な発生の停止のことで、キョウソヤドリコバチは幼虫で休眠に入り越冬する。母親が次世代の休眠を制御することから、この休眠制御は「母性休眠誘導」と呼ばれる。また、ナミニクバエ *Sarocophaga similis* (ハエ目ニクバエ科) は、長日条件下では成虫へと発育するが、短日条件下では蛹で休眠に入るという明瞭な光周性を示す。本種は、短日を感じた個体自身が休眠に入る。

(2) 今から約 80 年前、生理学者 Bünning は光周性の日長測定に「概日時計」(約 24 時間の周期を持つ生物時計)が関わるというモデルを提唱した。その後、複雑な光周期を与える実験から「外的符合モデル」と「内的符合モデル」が提唱され、現在、広く受け入れられている。外的符合モデルは、明暗に同調する概日時計のある特定の位相に「光誘導相」という特別な位相が存在し、この光誘導相に光が当たるか当たらないかで日長が測定されるというものである(図1)。ナミニクバエの光周反応はこの外的符合モデルによく当てはまる。一方、内的符合モデルは、夜明けに同調する概日時計(夜明け時計)と日暮れに同調する概日時計(日暮れ時計)が生み出す特別な位相「活性相」の重なりによって日長が測定されるというものである(図2)。キョウソヤドリコバチの光周反応はこの内的符合モデルによく当てはまる。

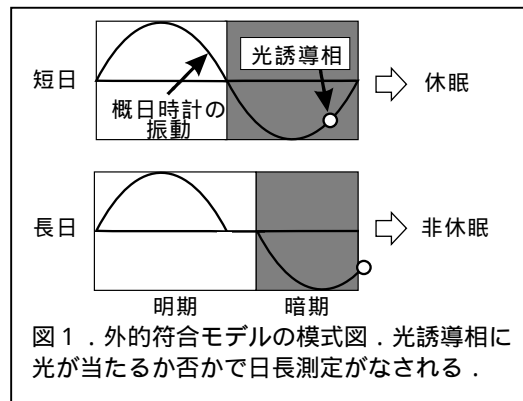


図1. 外的符合モデルの模式図。光誘導相に光が当たるか否かで日長測定がなされる。

(3) このようにモデル自体は古くから提唱されているものの、具体的にどのような分子や神経細胞が日長測定を担っているのかについては不明な点が多い。また、これらの日長測定の結果、どのような下流のプロセスが制御されているのかについても明らかになっていない。特に母性休眠誘導においては、メス成虫における内分泌系が関わりと考えられているもののその詳細は明らかになっていない。

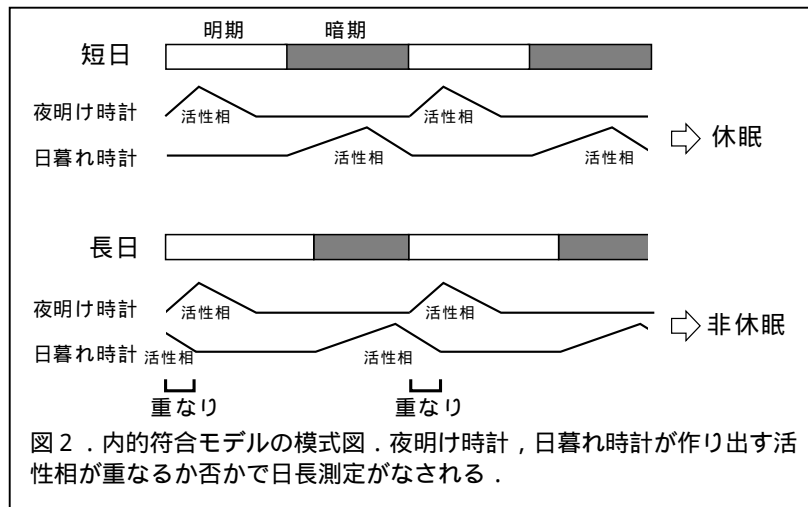


図2. 内的符合モデルの模式図。夜明け時計、日暮れ時計が作り出す活性相が重なるか否かで日長測定がなされる。

### 2. 研究の目的

本研究では、内的符合モデルがよく適合し母性休眠誘導を示すキョウソヤドリコバチと、外的符合モデルがよく適合するナミニクバエを用い、

光周性に関与すると考えられる概日時計の位置

時計の出力因子

日長測定に関わる分子機構

を明らかにすることを目的とした。

また、キョウソヤドリコバチの日長測定機構の下流の機構を明らかにすべく、母性休眠誘導機構に関わるホルモンを探索するため、幼若ホルモン(JH)の合成遺伝子 JHAMT (Juvenile hormone acid O-methyltransferase) の発現に注目した。さらに、ナミニクバエにおいては、地理系統の間で見られる光周反応の違い、性の間で見られる光周反応の違いが日長測定機構の違いによるものかを検討した。

### 3. 研究の方法

キョウソヤドリコバチ

(1) 光周性に関わると考えられる脳内の概日時計を明らかにすべく、本種の概日時計タンパク質 PERIOD (PER) の部分配列を用いた抗体を作成し、脳の免疫染色を行った。また、Fuchikawa et al. (doi: 10.1098/rsob.170047) でセイヨウミツバチの PER の染色に用いられた抗体、さらには市販のキイロショウジョウバエの PER 抗体 (st-15720, Santa Cruz Biotechnology) を用いて、免疫染色を行った。さらに、PER 以外の概日時計タンパク質にも着目し、Shao et al. (doi: 10.1016/j.jinsphys.2007.10.013) でマダラズズの CYCLE (CYC) の染色に用いられた抗体と、Hermann et al. (doi: 10.1002/cne.23178) でいくつかの *Drosophila* 属の PAR Domain Protein 1 (PDP1) 染色に用いられた抗体を使って、免疫染色を行った。

(2) 歩行活動を制御する概日時計が光周性をも制御するかを明らかにすべく、麻酔薬イソフルランを用いた実験を行った。セイヨウミツバチにおいて、この試薬は歩行活動を制御する概日時計の位相を変化させることが知られている。

(3) 概日時計の出力因子の候補として考えられる PDF (Pigment-Dispersing Factor), NAT (N-Acetyl transferase) の遺伝子発現抑制を行い、概日歩行活動リズムに対する影響、光周性に対する影響を調べた。

(4) 母性休眠誘導を制御するホルモンは JH であるという仮説の下、まず JH の塗布が休眠運命を変更するかを調べた。続いて、JHAMT の遺伝子発現を短日・長日で比較した。また JHAMT の RNAi によって光周性に影響がみられるかについて検討した。さらに、この JHAMT の発現制御が日長測定機構の下流にあるのかを調べるため、PER RNAi 個体での JHAMT の発現を調べた。

(5) 活性相の重なりが起こると考えられる長日、短日の明期直後に成虫の頭部をサンプリングし、次世代シーケンサーを用いて全 RNA を解読する RNAseq を行った。

#### ナミニクバエ

(1) キイロショウジョウバエの PER 抗体を用いて免疫染色を行うことで、ナミニクバエ脳内の概日時計細胞の所在を明らかにした。また、長日条件下、短日条件下での PER 陽性細胞の数の変動を調べた。

(2) 光誘導相で起こる反応を明らかにすべく、光誘導相で光が当たった条件、当たらない条件で幼虫の脳を取り出し、RNAseq を行った。得られたコンティグをもとに、それぞれの条件下で発現量が増大する遺伝子を探索した。また、同条件で新たな脳サンプルを準備し、定量的 RT-PCR 法により目的の遺伝子の RNA 量を調べた。

(3) 光周反応には地理系統の間での差、性の間での差がみられる。この差が日長測定機構によって生み出されているかを明らかにすべく、日本の 4 か所でナミニクバエの採集を行い、その光周反応を調べた。また、暗期に光パルスを与えることにより光誘導相の位置を推定した。

### 4. 研究成果

#### キョウソヤドリコバチ

(1) 様々な抗体、様々な手法、様々な条件で実験を繰り返したものの、概日時計細胞を明らかにすることはできなかった。一方、PDF の免疫染色は可能であり、図 3 に示すように、大きな細胞体の群と小さな細胞体の群が見られた。多くの昆虫において、視葉に存在する概日時計細胞 (PER 陽性細胞) は PDF も発現する。このことから、本種で染色された PDF 細胞は概日時計細胞であることが推察される。今後、より適切な概日時計タンパク質の抗体との二重染色を行うことにより、この点を確かめる必要がある。

(2) 本種においても、イソフルランは歩行活動リズムの位相を変化させることが明らかになった。イソフルランによる位相の変化量は、処理時刻に依存して異なった。長日条件においてもっとも位相反応量の大きかった時刻にイソフルラン処理を行ったところ、本来ならば長日では抑制される休眠産出メスの誘導がみられた。さらなる検証が必要であるものの、イソフルラン処理は本種の光周性に影響したと考えられる。

(3) PDF の RNAi は概日歩行活動リズムには影響しなかった。また、光周性にも影響は見られなかった。NAT の RNAi においても概日歩行活動リズムへの影響は見られなかった。NAT RNAi 個体は、短日条件下で休眠運命の次世代を産むのが遅れることがわかった。しかし、その影響は小さく、NAT が実際に光周性に関わっているかの検証は困難であると考えられた。

(4) 短日で育ち休眠運命個体を産むことが予想されるメス成虫に JH を塗布したところ、母性休眠誘導が抑制された。これは

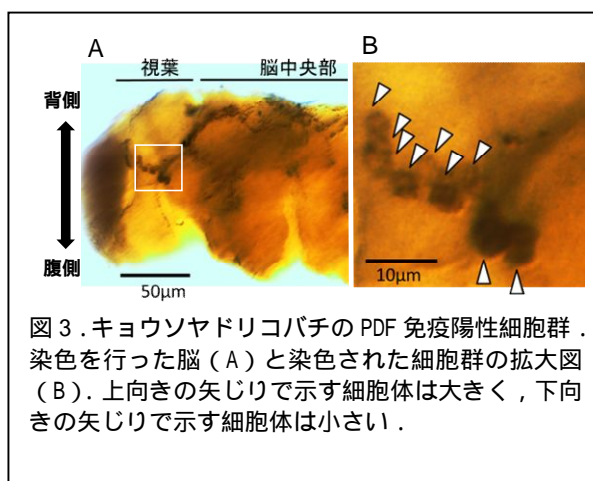


図 3. キョウソヤドリコバチの PDF 免疫陽性細胞群。染色を行った脳 (A) と染色された細胞群の拡大図 (B)。上向き矢じりで示す細胞体は大きく、下向き矢じりで示す細胞体は小さい。

JHが母性休眠誘導の鍵であることを示している。JH合成の律速遺伝子と考えられているJHAMTの発現を調べたところ、母性休眠誘導が起こる短日条件下のメス成虫でJHAMT遺伝子の発現が抑制されることが明らかになった。また、PER RNAiを行うと、長日と短日でのJHAMT発現量の違いが小さくなった。このことは、PERを構成因子とする概日時計が日長測定を行い、その結果をJHAMTの発現に反映させて母性休眠誘導を制御していることを示している。

(5) 約4億リードを得た。現在コンティグの解析を行っている。

#### ナミニクバエ

(1) 本種の幼虫の脳内には、2つのクラスターからなる概日時計細胞群があることがわかった。一つは脳背側に、もう一つは脳側方に位置していた。発現するPERタンパク質の量の指標として考えられる「それぞれの細胞群での時間ごとの免疫陽性細胞の数」を調べたところ、脳側方の細胞群の染まり方が短日と長日で異なることが明らかになった。一方、脳背側の細胞群では異なる光周期下でも違いはほとんど見られなかった。これは、異なる光周期下では時計の振動の仕方が細胞群によって異なることを示している。この時計の振動の仕方が日長測定に参与しているのかもしれない。

(2) 6サンプルから約4億リードを得、これをもとに7万コンティグを得た。このうち、光パルスの有無で発現量が増大すると考えられるコンティグを約150得た。定量的PCRによる検証を行ったものの、そのいずれもが、RNAseqで推定された発現量の変化を示さなかった。日長測定時に起こる遺伝子発現の変化はわずかであり、サンプリングの仕方によってその小さな差はマスクされてしまうことが考えられた。

(3) 4地点から採集した個体群の光周反応は異なり、高緯度地域個体群はより長い日長で休眠に入ることがわかった。このような地理的クラインは他の昆虫でも示されている。また、中緯度地域個体群と低緯度地域個体群では、同一光周期下においてもメスはオスに比べて休眠に入りづらいことがわかった。そこでこれらの系統、そして性の光誘導相の位置を調べたところ、地理系統間では光誘導相の位置が異なり、その位置に明瞭な緯度クラインが見られることがわかった。一方、性の間では光誘導相の位置には違いはなく、光周反応の違いは光パルスへの応答性の違い(同じ光周期を受けたとしても休眠回避反応をどれだけ強く引き起こすかという反応性の違い)であることが明らかになった。このように地理系統、性の光周反応の違いは、異なる生理機構によって生み出されていることが明らかになった。

#### まとめ

「光周性に参与すると考えられる概日時計の位置」

光周性を制御すると考えられる概日時計細胞を、ナミニクバエで明らかにすることができ原著論文として発表することができた。キョウソヤドリコバチではPDFの免疫組織化学により、2つの細胞群が候補として挙げられた。今後、in situ hybridizationやより適切な抗体を用いた免疫組織化学を精力的に進めることによって、キョウソヤドリコバチの概日時計細胞を明らかにできるだろう。またイソフルランの結果より、歩行活動リズムを制御する時計と光周性を制御する時計は類似した性質を持つことが考えられた。

「時計の出力因子」

NATがその候補として考えられたが、影響は小さく、さらなる検討が必要であることがわかった。

「日長測定に関わる分子機構」

キョウソヤドリコバチに関しては現在解析中である。一方、ナミニクバエで精力的な解析を行ったものの、その分子はいまだ不明である。今後は遺伝子発現にとらわれずに、概日時計細胞の反応性や本種の光周性において重要な内分泌器官である前胸腺の生理状態などを明らかにすることにより、光誘導相での反応がどのようにして内分泌系に指令を送るのかを明らかにしていく必要があることが考えられた。

上記の成果に加え、本研究はこれまで大きな謎であった母性休眠誘導機構の一端を明らかにすることができた。今後、JHAMTがどのように制御されているかを明らかにすることで、日長測定機構を明らかにすることができるだろう。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4件)

Yamaguchi, K., Goto, S.G. 2019. Distinct physiological mechanisms induce latitudinal and sexual differences in the photoperiodic induction of diapause in a fly. *Journal of Biological Rhythms*, in press. doi: 10.1177/0748730419841931 査読あり

Shimizu, Y., Mukai, A., Goto, S.G. 2018. Cell cycle arrest in the jewel wasp *Nasonia vitripennis* in larval diapause. *Journal of Insect Physiology* 106, 147-152. doi:

10.1016/j.jinsphys.2016.11.011 査読あり

Yamamoto, M., Shiga, S., Goto, S.G. 2017. Distribution of PERIOD-immunoreactive neurons and temporal change of the immunoreactivity under long-day and short-day conditions in the larval brain of the flesh fly *Sarcophaga similis*. *Chronobiology International* 34, 819-825. doi: 10.1080/07420528.2017.1310736 査読あり

後藤慎介 2017. 昆虫の季節適応研究の現状と今後の展開 昆虫と自然 700号 pp. 20-23. 査読なし

〔学会発表〕(計 8件)

2018.03. 向井歩, 山口幸紀, 北村文, 後藤慎介 都市環境におけるニクバエの光周性. 第62回日本応用動物昆虫学会大会

2017.10. 向井歩, 後藤慎介 麻酔薬イソフルランがキョウソヤドリコバチの光周性に及ぼす影響. 第24回(2017年度)日本時間生物学会学術大会

2017.09 向井歩, 後藤慎介 キョウソヤドリコバチ幼虫休眠時の発育停止と細胞分裂停止. 日本昆虫学会第77回大会

2017.03. 向井歩, 後藤慎介 イソフルランがキョウソヤドリコバチの概日時計に及ぼす影響. 第61回日本応用動物昆虫学会大会

2017.03. 山口幸紀, 後藤慎介 ナミクバエの光周性における臨界日長の地理系統差と光周測時機構. 第61回日本応用動物昆虫学会大会.

2016.11. 山口幸紀, 後藤慎介 ナミクバエの光周性の雌雄差と地理系統差を生み出す生理機構 第23回日本時間生物学会学術大会

2016.11. 後藤慎介 昆虫の環境適応における概日時計の役割. シンポジウム4「昆虫の時間生物学:可能性と課題」 第23回日本時間生物学会学術大会, 名古屋 招待講演

2016.9. Mukai, A., Goto, S.G. RNAi targeted to the circadian clock gene *period* disrupts photoperiodism of the jewel wasp, *Nasonia vitripennis*. International Congress of Entomology 2016, USA.

〔図書〕(計 1件)

Goto, S.G., Matsumoto, K. 2018. Photoperiodism, Insects. The Encyclopedia of Reproduction 2nd Edition, Volume VI: Comparative Reproduction, Elsevier. Pp.420-425. Doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20587-6 査読あり 分担執筆

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ <http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/biol/aphys/index.html>

アウトリーチ活動

- 西宮市生涯学習大学宮水学園において, 2018年に2回, 2017年に2回講師を務め, 昆虫の不思議さ, 面白さ, そして光周性のしくみについて講義を行った.
- 四天王寺学園(2019年3月), 大阪市立高校(2017年6月)の学生を研究室に受け入れ, 昆虫の生活史戦略について説明した.
- 2016年, 大学コンソーシアム大阪の授業を担当するとともに, 大阪府立泉北高等学校 SSH「高大連携講座」を担当し, 昆虫の生活史戦略について説明した.

6. 研究組織

(1) 研究協力者

連携研究者氏名: 志賀 向子

ローマ字氏名: SHIGA, Sakiko

連携研究者氏名: 橋 真一郎

ローマ字氏名: TACHIBANA, Shin-Ichiro

科研費による研究は, 研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため, 研究の実施や研究成果の公表等については, 国の要請等に基づくものではなく, その研究成果に関する見解や責任は, 研究者個人に帰属されます。