

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2009

課題番号：18380043

研究課題名（和文） 昆虫の光周性と概日振動の分子生物学

研究課題名（英文） Molecular mechanisms controlling circadian rhythms and photoperiodism in insects

研究代表者

竹田 真木生（TAKEDA MAKIO）

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：20171647

研究成果の概要（和文）：光周性は、生物が日長を測るシステムで、生物学的に、かつ農業上も重要であるが、物質的な制御機構は分っていない。本研究は、光受容、内分泌機構と、概日振動機構に関連する遺伝子と、その産物の動態と発現箇所の解析から、光周性の構造と調節機構を解明しようとした。概日振動の因子の脳内局在性は、種と、発育ステージで、また近縁の系統間でも大きく異なった。概日時計の下流にメラトニン合成酵素の一つ、N-アセチル転移酵素（NAT）遺伝子の転写制御があることが、この遺伝子の upstream 制御域の構造から示唆された。また、メラトニン受容体が出力系の前胸腺刺激ホルモン産生細胞に存在することから、環境情報がメラトニン系によって、時計の同調に使われている可能性を示唆した。メラトニン系が、光周情報の計数器なら、光情報と時計、出力系をつなぐ鍵的な因子となり、光周性の重要な機能中心を統合すると考えらる。Blue wave opsin と NAT 活性、メラトニンと P T T H の分泌機構の調節は連関し、N A T 細胞が P E R 細胞と完全に一致した局在性を示し、メラトニン合成系で光周システムが統合されている。

研究成果の概要（英文）：Photoperiodism is an important biological mechanism and involved in agriculture production but its molecular mechanism remains obscure.

This study analyzed the structures, localization and dynamics of the elements involved in photoreception, circadian oscillation and endocrine switch to reconstruct the photoperiodic system. Comparative studies using different insects revealed a considerable flexibility in the circadian pacemaker structure and photoreceptor regarding to ontogenetic stages and phylogenetic lines. The important factor mediating photoperiodic system seems to be the indolaminergic pathway, since the upstream regulatory region of N-acetyltransferase (NAT) that catalyze the production of melatonin has several E-boxes where transcription factors CLK/CYK binds, the cells secreting prothoracicotropic hormone (PTTH) express melatonin receptor and all PER containing cells have NAT, and melatonin content and NAT transcript level show a circadian oscillation. These cells have the extraretinal photoreception.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2007年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：光周性、概日振動、メラトニン合成系、光受容、変態、休眠、表現型多型

1. 研究開始当初の背景 光周性は日長を読み取る機構であるが、その構造は、複雑で、機能的には、最低次の4つのユニットからなっている；光受容器、光周時計、長日または短日の計数器、内分泌的スイッチ。これらが、どのような蛋白質又は遺伝子により調節されているかについては具体的なことは、わかっていなかった。

2. 研究の目的 以上のような複雑な装置を動かす機構について、それぞれの機能的ユニットに関連する遺伝子機構を明らかにする中で全体の機構を再構築するというアプローチを行うことが本研究の目的である。

3. 研究の方法 カイコ、サクサン、マダラスズ、カブラハバチをモデル昆虫とし、光受容、概日時計、インドールアミン代謝系、その受容体、Rab蛋白質、神経伝達物質、前胸腺刺激ホルモンなどを支配する遺伝子のクローニングと発現位置、動態を明らかにすることで、全体の系を再構成する。

4. 研究成果 概日時計とインドールアミン代謝系を中心に抗体を作り、時計にかかわる脳内の神経内分泌的な構造を明らかにした。カイコでは、背側部に時計に関連する高原が共存するが、食道下神経節にも比較的集中した時計要素が見られたが、コオロギでは、視葉と脳間部と食道下神経節に集中する2つのパターンが比較的近縁のコオロギに見られた。また、幼虫と成虫間にも時計の構造に大きな差が見られたことから、時計の神経の脳内における配置は系統によっても個体発生においてもかなり可塑的であることがわかった。マダラスズには、発現ステージの異なる光周性があるので、個体発生に特異的な時計の構造があるのかもしれない。出力系については、メラトニン合成酵素の一つカイコのN-アセチル転移酵素(NAT)の遺伝子の上流プロモーター領域にperiod遺伝子の転写制御をする転写制御因子Clock/Cycleの結合するエンハンサーE-boxが存在することが明らかになったから、NAT遺伝子は時計によって制御されているccg(clock-controlled gene)のひとつである可能性が出てきた。また、メラトニン受容体が、ワモンゴキブリや、サクサンのPTTH蛋白質の発現細胞に見られたことから、時計の制御下にあるメラトニン合成系が変態すなわち休眠の出力系を制御する可能性が示唆された。メラトニン受容体がワモンゴキブリでクローニングされたが、この受容体は7回膜貫通型のG蛋白質結合型の受容体であった。それで、PTTH細胞でカルシウム依存的に発現し、PTTHの神経分泌にかかわる可能性のある、CキナーゼとRab蛋白質

の共存を調べたが、PTTH細胞はこの装置を持っていることが明らかになった。また、メラトニン受容体、NAT抗体でゴキブリの脳を調べた結果、インドールアミン系は時計蛋白質及び出力系のPDF陽性細胞に極めて密接に接触しており、機能的な関連が示唆される。また、光の入力系も調査した。Cryや幾つかのタイプのオプシンやアレスチン遺伝子をクローニングした。幾つかは、時計蛋白質を発現する神経分泌細胞に発現するし、また、遺伝子の転写制御に時計がかかわっていることが、わかった。オプシンの一種は、上流の調節域に、E-boxを持っており、時計と光受容体のフィードバックは転写レベルでも起こっていることがわかった。出力系では、ワモンゴキブリの脳間部切除が、光依存的に摂食-消化活動の攪乱をひきおこし、肥満ゴキブリを作ることを明らかにした。摂食-消化活動は、中腸内で分泌される消化酵素によって制御されるが、この分泌の促進と抑制を制御する消化管ペプチドは、脳による支配があり、それは、光条件と時計によって制御を受けているので、非常に複雑なネットワークと情報の応答がなされていることがわかった。明確になったのは、昆虫の概日振動系はヒエラルキー的な集中型ではなく、分散的な構造をとっているのが一般的であるということだ。

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27件)

①Bembenek, J., Tsugehara, T., Ichihara, N., Takeda, M., (in press) Arylalkylamine *N*-acetyltransferase in insects and its regulatory role in circadian oscillation. Trends in Entomology, 4 [An Invited Review]

②Suzuki, T., N. Izawa, T. Takashima, M. Watanabe, M. Takeda 2009. Action spectrum for the suppression of arylalkylamine *N*-acetyltransferase activity in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Photochemistry and Photobiology(in press)

③Suzuki, T., Fukunaga, Y., Amano, H., Takeda, M., Goto, E. (in press) Effects of

light quality and intensity on diapause induction in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. Applied Entomology and Zoology

④ **Trang, L. T. D., Shao, Q.-M., Takeda, K.** (in press) Molecular Structure of Insect Circadian Clock. In: "Short Views on Insect Molecular Biology" (Editors, Chandrasekar R, Krishnan, M), Published by Insect Molecular Biology Unit, Bharathidasana Uni, India

⑤ **Shao Qi-Miao, Fauda Mohammad Ali, Makio Takeda** (2010) Serotonin- and Putative Serotonin Receptor-like Immunohistochemical Reactivities in the Ground Crickets *Dianemobius nigrofasciatus* and *Allonemobius allardi*. Accepted for publication; Journal of Insect Physiology

⑥ **Suzuki, T., Takeda, M.** 2009. Utilizing LED technology for arthropod pest control. In "Light-emitting Diodes: Research, Technology and Applications" Nova Science Publishers.

⑦ **Matsui, T., Matsumoto, Sakai T., Satake H., Takeda M.** (2009) Pars intercerebralis as a modulator of locomotor rhythms and feeding in the American cockroach, *Periplaneta americana*. Physiology & Behavior 96: 548-556.

⑧ **Izawa N, Suzuki T, Watanabe M, Takeda M.** (2009) Characterization of arylalkylamine *N*-acetyltransferase (NAT) activities and action spectrum for suppression in the band-legged cricket, *Dianemobius nigrofasciatus* (Orthoptera: Grillidae) Comparative Biochemistry and Physiology B 152, 346-351

⑨ **Hiragaki, S., Uno T., Takeda M.** (2009) Putative regulatory mechanism of

prothoracicotropic hormone (PTTH) secretion in the American cockroach, *Periplaneta americana* as inferred from co-localization of Rab8, PTTH and protein kinase C in neurosecretory cells. Cell and Tissue Research 335, 607-615

⑩ **Suzuki, T., Watanabe, M. and Takeda, M** (2009). UV tolerance in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (accepted for publication) Journal of Insect Physiology 55, 649-654.

⑪ **Suzuki T, Takeda M.** Diapause-inducing signals prolong nymphal development in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Physiological Entomology* 34, 278-283

⑫ **Uno, T, Hata, K., Trang, L. T. D., Hiragaki, S., Nakada, T., Nakamura, M., Uno, Y., Yamagata, H., Kanamaru, K., Takeda, M., Matsubara M.** (2009) Phosphorylation of small GTPase Rab proteins from *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) *Eur. J. Entomol.* 106, 499-506.

⑬ **Iwai S, Trang LTD, Takeda M.** (2008) Expression analyses of casein kinase 2alpha and casein kinase 2alphan the silkworm, *Bombyx mori*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 149; 38-46

⑭ **Shao, Q-M, Hiragaki, S, Takeda, M** (2008) Co-localization and unique distributions of two clock proteins CYCLE and CLOCK in the cephalic ganglia of the ground cricket, *Allonemobius allardi* Cell and Tissue Research 331, 435-446

⑮ **Shao, Q-M, Hiragaki, S, Takeda, M** (2008) Molecular structural, expression patterns and localization of the circadian

- transcription modulator CYCLE in the cricket, *Dianemobius nigrofasciatus* *Journal of Insect Physiology* 54, 403-413
- ⑩ **Suzuki T, Fukunaga Y, Amano H, Takeda M, Goto E** (2008) Effects of light quality and intensity on diapause induction in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (*Applied Entomology and Zoology*, 43, (2);213-218.
- ⑪ **Hiragaki, S., Kawabe Y., Takeda M.** Molecular cloning and expression analysis of two putative serotonin receptors in the brain of *Antheraea pernyi* pupa. *International Journal of Wild Silkmoths and Silk* (accepted for publication)
- ⑫ **Suzuki, T., Takashima, T., N. Izawa, M. Watanabe, M. Takeda** (2008) UV radiation elevates arylalkylamine *N*-acetyltransferase activity and melatonin content in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* *Journal of Insect Physiology* 54, 1168-1174.
- ⑬ **Shao, Q.-M., Hiragaki, S., Takeda, M.** (2008) Molecular structural, expression patterns and localization of the circadian transcription modulator CYCLE in the cricket, *Dianemobius nigrofasciatus*. *Journal of Insect Physiology*, 54, pp.403-413
- ⑭ **Bembenek, J, Itokawa, K, Hiragaki, S., Shao, Q.M, Tufail, M., Takeda, M.** (2007) 2 Molecular characterization and distribution of cycle protein from *Athalia rosae*. *J. Insect Physiol.*, 53, 418-427
21. **Suzuki, T., Amano A., Goto E., Takeda, M. Kozai, T.** (2007) Effects of extending the light phase on diapause induction in a Japanese population of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Experimental and Applied Acarology*, 42, pp.131-138
22. **Iwai, S. and Takeda, M.** (2007) Expression analysis of two types of transcripts from circadian output gene lark in *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 146, pp.470-476
23. **Tsugehara, T, Iwai, S, Fujiwara, Y, Mita, K., Takeda, M** (2007) Cloning and characterization of insect arylalkylamine *N*-acetyltransferase for *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 147, pp.358-36
24. **Sehadova, H., Shao, Q.-M., Sehnal, F. Takeda, M.** (2006) Neurohormones as putative circadian clock output signals in the central nervous system of two cricket species. *Cell Tiss. Res.*, Published online
25. **Trang, L. T. D., Sehadova, H., Ichihara, N., Iwai, S. Mita, K., Takeda, M.** (2006) Casein kinase I in the silkworm, *Bombyx mori*: Structure and possible roles in circadian timing and development. *J. Biol. Rhythms*, 21, pp. 335-349
26. **Iwai, S., Fukui, Y, Fujiwara, Y., Takeda, M.** (2006) Structure and expressions of two circadian clock genes, period and timeless in the commercial silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 52, pp. 625-637
27. **Tsugehara, T, Tsenkova, R., Takeda, M.** (2006) A non-invasive monitoring of developmental changes in pupal case of *Antheraea pernyi* by near infrared spectroscopy. *International Journal of Wild Silkmoths and Silk*, 11, pp.14-20

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計1件）

- ① 竹田真木生（2008）ナンダ・ハムナー・プロトコールなどー光周性研究のためのツール。108-111頁。時間生物学事典。石田直理雄・本間研一編 朝倉書店 340頁。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 真木生 (TAKEDA MAKIO)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：20171647