

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18770053

研究課題名 (和文)

ハエ目昆虫の光周性に関与する分子の特定と単離

研究課題名 (英文)

Characterization of molecules involved in the fly 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・講師

研究者番号：70347483

研究成果の概要：

多くの昆虫は、光周期を季節を示す情報として用いている。では光周期はどのように読み取られているのだろうか。本研究により、ナミニクバエでは、暗期の前半と後半に光を感受する時刻が存在し、その時刻に光が当たるかどうかによって長日と短日を判定していることがわかった。さらに、これら2つの時刻での光受容には、異なる光受容分子がかかわっていることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,000,000	0	2,000,000
2007年度	800,000	0	800,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	240,000	3,840,000

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：生理学、光周性、休眠、光受容、昆虫、ナミニクバエ

1. 研究開始当初の背景

多くの昆虫は光周期を季節情報として用い、長日ではすみやかに成長・生殖を行い、短日では休眠に入ることによって不適な季節を乗り切る。このように光周期に反応する性質を光周性という。

これまでの研究から、光周性は、光入力(光受容)、光周時計、出力系といった機構によって構成され、光周時計には概日振動体が関

与する、と考えられている。

しかし具体的に、光周期をどのように感受し、どのようにして光周期を読み取っているか、特にその分子メカニズムについてはいまだに不明である。

このメカニズムにアプローチする実験として暗期の光中断が挙げられる。これは光周期の読み取りに重要な暗期の位相に光パルスを与え、その結果として暗期のある特定の位相(光感受相)に光が当たることで長日と

同じ効果が得られるというものである。これは光受容器から入った光情報が光周時計で処理されることにより、仮想的な「休眠誘導物質」の合成・分解が促進される、と説明されるが、この機構の実体についてはいまだに不明である。

2. 研究の目的

光周性機構において重要な「光がどのような分子に受容されているのか、光が照射されることによって脳内でどのような変化が起こり、休眠・非休眠を決定しているのか」を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ハエ目昆虫のナミクバエ *Sarcophaga similis* を研究対象として用いた。本種の大坂個体群では明瞭な光周性が見られ、長日条件下ではすみやかに成虫になるが、短日条件下で飼育された場合、蛹で発育を停止し、休眠に入る。光周期を感受する時期は胚期と幼虫期である [1]。

ナミクバエの成熟幼虫を水に濡れた条件（水処理）に保持すると幼虫期間が延長され、この間の光周期感受性は鋭敏になる。本研究ではこの水処理条件を用い、以下の実験を行った。

暗期の光中断実験

暗期の光中断実験を行い、光感受相を特定する。

光受容にかかわる分子

光感受相にさまざまな波長の光パルスを与え、どの波長の光が有効かを検討する。またその波長からどのような光受容分子が関与しているかを推定する。

光周時計にかかわる分子

暗期の光中断実験と Nanda-Hammer 実験を行い、本種の光周性に概日振動体が関与しているかどうかを検討する。概日時計遺伝子 *period*, *timeless* 遺伝子の発現を RNA 干渉法 (RNAi) によって抑制し、光周性への影響を検討する。光誘導相 (ϕ_i : 後述) で発現する遺伝子をクローニングする。

4. 研究成果

暗期の光中断

水処理の間に暗期の光中断実験を行ったところ、暗期の前半と後半の2つの位相で長

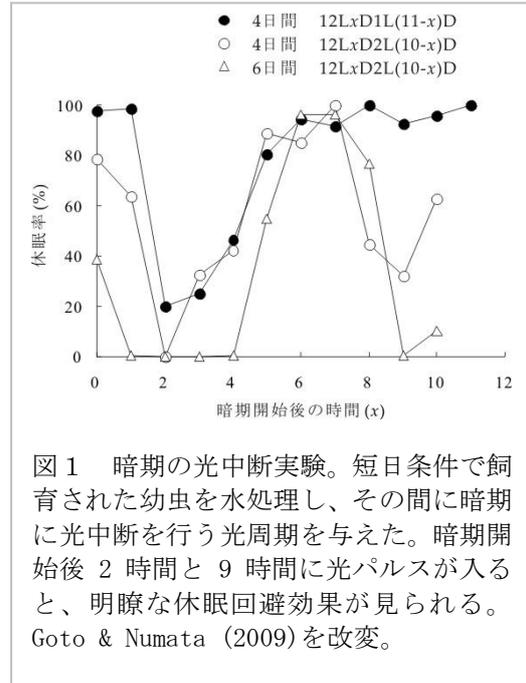


図1 暗期の光中断実験。短日条件下で飼育された幼虫を水処理し、その間に暗期に光中断を行う光周期を与えた。暗期開始後2時間と9時間に光パルスが入ると、明瞭な休眠回避効果が見られる。Goto & Numata (2009)を改変。

日の効果（休眠回避）が得られることが明らかになった（図1）。

光受容にかかわる分子

暗期の光中断実験で長日の効果が得られる2つの位相（暗期の前半と後半）に、さまざまな波長の光を与えたところ、暗期の前半では紫外や青といった短波長に対して感受性が高いこと、暗期の後半ではより広範囲の波長（紫外から赤）にも反応することが明らかになった（図2）。

さらに、その感受性を詳細に検討するため、光量子束密度を段階的に低くして与えたところ、暗期の前半は特に青に感受性が高いこと、暗期の後半も低光量子束密度のもとでは短波長の光に感受性が高いことが示された。ただし、それぞれの位相で反応の鋭敏さは異なり、暗期の前半はより低い光量子束密度でも反応する（図3）。

以上の結果から、ナミクバエは、暗期の前半と後半で異なる光受容分子を用いて光周期を読み取っていると考えられる。これまでの他のニクバエ *Sarcophaga argyrostoma* での研究から、暗期の前半の光パルスは概日時計の位相を前進させる働きによって休眠を回避させること、暗期の後半では「光照射によって直接、休眠を回避させる位相（光誘導相： ϕ_i ）」に光があたったために休眠が回避される、と考えられている [2]。

(1) 後述のように、光周性には概日時計遺伝子によって構成される概日振動体が関与すると考えられる。概日振動体の位相変化には青色光受容分子クリプトクロムがかかわっている [3]。(2) ナミクバエの暗期の前半は紫外光、青色光によって休眠が回避される（図2）。(3) 上述のように暗期の前半での光

パルスによる休眠回避効果は概日振動体の位相前進が重要である。以上の(1)~(3)の知見をもとに、暗期の前半での光受容にはクリプトクロムが重要であると考えた。

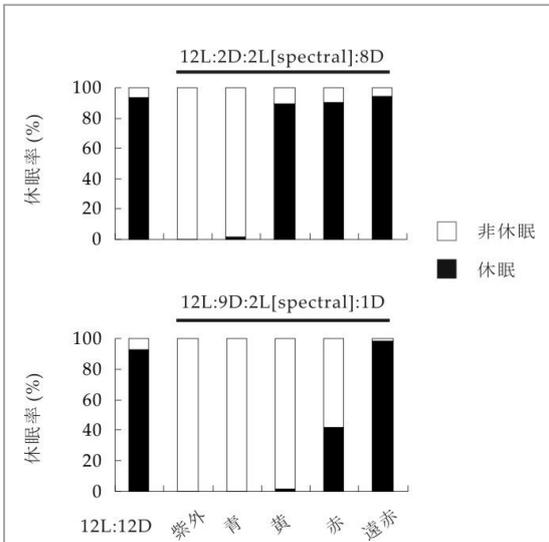


図2 さまざまな波長の2時間の光パルス、暗期の前半(上段)あるいは暗期の後半(下段)に与えた際の休眠率。光量子束密度は5.7-8.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ に設定した。Goto & Numata (2009)を改変。

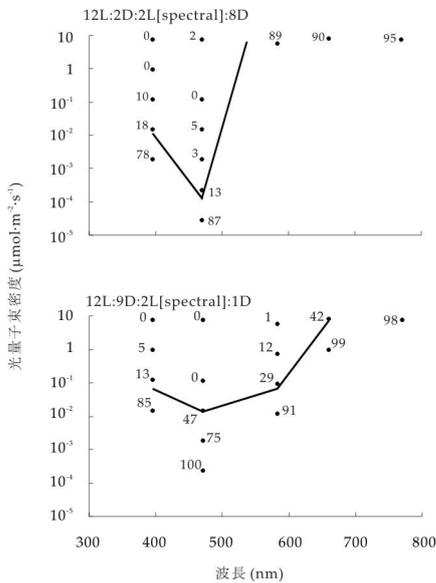


図3 さまざまな光量子束密度のさまざまな波長の光パルスを暗期の前半(上段)、後半(下段)に与えた際の休眠率。各●は実験を行った光量子束密度を表す。●横の数字は休眠率。休眠率が50%になると推定される光量子束密度を直線で結んだ。Goto & Numata (2009)を改変。

一方、暗期の後半はさまざまな波長の光を感受し、休眠を回避する。広範な波長の光を受容する分子としては光受容分子オプシンが挙げられる(クリプトクロムは紫外、青といった短波長の光しか感受できない)。よって、暗期の後半での光受容には、(1)さまざまな波長を受容するさまざまなタイプのオプシン、あるいは(2)さまざまなタイプのオプシンに加えてクリプトクロム、が関与すると考えられる。

ナミクバエからクリプトクロムと数種類のオプシン遺伝子のクローニングに成功した。しかしすべてのタイプのオプシン遺伝子のクローニングには至っていない。近年、ナミクバエと近縁なシリアクバエ *Sarcophaga crassipalpis* の EST データベースが報告された[4]。今後はこのデータベースを活用し、目的の遺伝子をクローニングする必要がある。

ハエ目昆虫の幼虫の光受容器官としては Bolwig's organ (B0) と脳が挙げられる。キイロショウジョウバエでは B0 にオプシンの発現が見られ、脳ではクリプトクロムが発現する[5, 6]。まず B0 に着目し、B0 を切除した幼虫が光周期に反応するかどうかを検討した。しかしながら、B0 を切除された幼虫は蛹へと変態するものの、休眠か否かを判定できるステージにまで至らず、すべて死亡することがわかった。よって、現在のところ光受容器の推定にまでは至っていない。B0 を切除せずに、脳だけあるいは B0 だけに光周期を与える実験を計画する必要がある。

光周時計にかかわる分子

Nanda-Hammer 実験(明期の長さを一定にし、暗期の長さをさまざまに変えた非24時間光周期を与える実験)を行ったところ、弱いながらも明瞭な休眠率の振動が見られた。この結果および暗期の光中断実験の結果から、本種の光周性には概日振動体が関与していると考えられる。

キイロショウジョウバエでは羽化リズムや歩行活動リズムを制御する概日時計機構が分子レベルで明らかになっており、*period* や *timeless* といった概日時計遺伝子が重要な役割を担うことが知られている[7]。また、ニクバエを含むいくつかの昆虫で概日時計遺伝子が光周性に関与する概日振動体を構成していることが示唆されている[8]。

そこで、本種の光周性に関与する概日振動体は概日時計遺伝子によって構成されると考え、RNA干渉法(RNAi)による *period*, *timeless* の発現抑制を試みた。

幼虫のさまざまな時期に、*in vitro* で合成した概日時計遺伝子 *period*, *timeless* の2本鎖RNAをさまざまな濃度で注射した。その後、幼虫をさまざまな光周期条件下で飼育し、

光周反応への影響を調べた。「2本鎖 RNA の注射 (RNA 干渉法) により概日時計が停止し、光周期を読み取ることができなくなる。そのため、長日条件下であっても休眠、あるいは短日条件下であっても非休眠になる」と予想したが、そのような個体はわずかであった。遺伝子発現が実際に抑制されているかどうかについてはさらなる検討が必要であるが、本種では RNA 干渉法による遺伝子発現の抑制が困難であり、遺伝子導入による発現抑制など、他のアプローチが必要であると判断した。

光誘導相 (ϕ_i) に光が照射された場合とされない場合で脳内でどのような遺伝子発現の変化が起こるかを明らかにするため、subtractive hybridization を行った。数百の遺伝子断片を対象として、さらに differential display 法を行った。その結果、光が当たらない場合に発現量が増大している遺伝子断片が 9 ヶ、逆に発現量が減少している遺伝子が 3 ヶ得られた。ただ、これらの遺伝子の発現には個体によるばらつきも見られ、今後さらにこれらの特異性について検討する必要がある。

成果の位置づけ、インパクト、展望

以上の結果の一部は以下の「主な発表論文等」に挙げた原著論文、総説で発表するとともに、国内外の学会で発表した。国際会議 (XXIII International Congress of Entomology と International Congress of Insect Biotechnology and Industry 2007) では、invited speaker として本研究成果を発表した。

昆虫の光周性機構において、暗期の前半と後半で異なる光受容分子がかかわること、また具体的な分子としてクリプトクロムとオプシンの両方を候補として挙げ、これまでの理論的な研究と組み合わせで議論した研究はこれまでなかった。本研究は昆虫光周性機構の新たな切り口を見出したものとして評価されるであろう。

さらなる検討が必要ではあるものの、光誘導相 (ϕ_i) で特異的に発現する遺伝子をクローニングできたことは、今後の光周時計の分子遺伝学的解析に大いに役立つものと考えられる。

ナミニクバエでは RNA 干渉法による遺伝子発現の抑制は困難であることがわかった。よって、今後ナミニクバエを用いて研究を進める際には transgenic 系統の作製によって光周性にかかわる分子を直接的に調べることが重要と考えられる。また、光周性に異常の見られる系統を用いた量的遺伝学的解析によって、光周性にかかわる遺伝子を明らかにすることができるであろう。

文献

- [1] Tanaka, M, Tachibana, S.-I., Numata, H. 2008. Sensitive stages for photoperiodic induction of pupal diapause in the flesh fly *Sarcophaga similis* (Meade) (Diptera: Sarcophagidae). *Applied Entomology and Zoology* 43, 403-407.
- [2] Saunders, D.S. 2002. *Insect Clocks*, third ed. Elsevier, Amsterdam.
- [3] Emery, P., So, W.V., Kaneko, M., Hall, J.C., Rosbash, M. 1998. CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95, 669-679.
- [4] Hahn, D.A., Ragland, G.J., Shoemaker, D.D., Denlinger, D.L. 2009. Gene discovery using massively parallel pyrosequencing to develop ESTs for the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *BMC Genomics* 10, 234.
- [5] Pollock, J.A., Benzer, S. 1988. Transcript localization of four opsin genes in the three visual organs of *Drosophila*: RH2 is ocellus specific. *Nature* 333, 779-782.
- [6] Malpel, S., Klarsfeld, A., Rouyer, F., 2002. Larval optic nerve and adult extra-retinal photoreceptors sequentially associate with clock neurons during *Drosophila* brain development. *Development* 129, 1443-1453.
- [7] Price, J.L. 2004. *Drosophila melanogaster*: A model system for molecular chronobiology. In *Molecular Biology of Circadian Rhythms* (Sehgal, A. ed). Wiley-Liss, Hoboken, NJ: pp. 33-74.
- [8] Pavelka, J., Shimada, K., Košťál, V. 2003. TIMELESS: a link between fly's circadian and photoperiodic clocks? *European Journal of Entomology* 100, 255-265.

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 6 件)

- ① Goto, S.G., Numata, H. Possible involvement of distinct

photoreceptors in the photoperiodic induction of diapause in the flesh fly *Sarcophaga similis*. *Journal of Insect Physiology*, 55, 401-407. (2009)、査読あり

- ② Goto, S.G. Genetic analysis of diapause capability and association between larval and pupal photoperiodic responses in the flesh fly *Sarcophaga similis*. *Physiological Entomology*, 34, 46-51. (2009)、査読あり
- ③ Goto, S.G. Photoreceptor and clock in the photoperiodic regulation of flesh fly diapause. *Entomological Research*, 37, A16-17. (2007)、査読なし
- ④ Goto, S.G., Han, B., Denlinger, D.L. A nondiapausing variant of the flesh fly, *Sarcophaga bullata*, that shows arrhythmic adult eclosion and elevated expression of *period* and *timeless*. *Journal of Insect Physiology*, 52, 1213-1218. (2006)、査読あり
- ⑤ Goto, S.G., Numata, H. Photoperiodic sensitivity and action spectra in post-feeding larvae of the flesh fly *Sarcophaga similis*. *Zoological Science*, 23, 1194 (2006)、査読なし
- ⑥ 渡康彦、松井崇明、齋藤治、後藤慎介、田中一裕、昆虫の羽化リズムにおける温度周期の重要性-土中で蛹化するハエ類を例に- 芦屋大学論叢、43、119-130. (2006)、査読なし

[学会発表] (計6件)

- ① 後藤慎介、ニクバエの光周性機構、日本昆虫学会第68回大会(第10回昆虫の季節適応談話会)、2008年9月15日、高松
- ② 後藤慎介、ナミニクバエの幼虫期と蛹期に見られる光周性、日本動物学会第79回大会、2008年9月6日、福岡
- ③ Goto, S.G. Clock and photoreceptor in the photoperiodic regulation of diapause in the flesh fly *Sarcophaga similis*. XXIII International Congress of Entomology, 2008年7月9日、Durban, Republic of South Africa.
- ④ 多賀谷純、後藤慎介、沼田英治 ナミニクバエの休眠誘導にみられる性差 日本昆虫学会第67回大会、2007年9月16日、神戸
- ⑤ Goto, S.G. Photoreceptor and clock in the photoperiodic regulation of flesh fly diapause. International Congress of Insect Biotechnology and Industry 2007, 2007年8月20日、Daegu, Republic of Korea.

- ⑥ 後藤慎介、沼田英治 ナミニクバエの水処理によって延長した幼虫期の光周期感受性と遺伝子発現 日本動物学会第77回大会、2006年9月22日、松江

[図書] (計1件)

- ① Goto, S.G., Shiga, S., Numata, H. Oxford University Press, Insect photoperiodism: photoreception and clock genes. In *Photoperiodism: The Biological Calendar*. (Nelson, R.J., Denlinger, D.L., Somers, D.E., eds.). (2009)、印刷中(査読なし)

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・講師
研究者番号：70347483

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし