

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14748

研究課題名(和文) 光周時計における日長・日数計測機構の神経生物学的解析

研究課題名(英文) Neurobiological analysis of mechanisms for measurement of day length and number of the days in photoperiodic clock

研究代表者

長谷部 政治 (HASEBE, Masaharu)

大阪大学・理学研究科・助教

研究者番号：40802822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：動物は日長・日数情報を正確に計測することで、季節変化に適応している。これまでに、脳内で約24時間リズムを刻む概日時計をもとに、この日長や日数情報を計測する光周時計の存在が示唆されてきたが、その実体は不明であった。本研究では、昆虫で光周性への関与が示唆される脳副視髄(AMe)に注目し、光周時計の神経機構をホソヘリカメムシにおいて解析した。解析の結果、AmEには複数種類の神経伝達物質産生ニューロンが局在し、光周性機構の出力系を担う脳間部(PI)細胞との神経連絡が示唆された。また、PI細胞は日長に応じてその神経活動を变化させ、その日長応答は概日時計遺伝子のノックダウンにより消失することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

概日時計をもとにした光周性制御メカニズムについては、Bunningが1936年にモデルを提唱してから、長年世界中で研究が進められてきた研究トピックである。しかし、概日時計に基づいて日長・日数情報をどのように処理しているかについて、未だその詳細なメカニズムは不明瞭である。本研究成果は、世界で初めて昆虫をモデルとして、概日時計の分子機構をもとに神経活動レベルで日長情報処理を行っていることを示唆したものである。そのため、本研究は概日時計をもとにした日長・日数情報処理の中核機構の理解に向けた先駆的な研究に位置づけられ、世界的に見ても大きな学術的インパクトを持つものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Animals accurately measure day length and number of the days to adapt seasonal changes. Previous studies suggested the existence of a photoperiodic clock system, which interprets the information of day length and number of days depending on a circadian clock. However, the detailed mechanisms for the photoperiodic clock have been elusive. In this study, I focused on the accessory medulla (AmE), which is a brain region involved in photoperiodism, and analyzed the neuronal mechanisms for the photoperiodic clock in the bean bug, *Riptortus pedestris*. Analyses suggested that multiple types of neurons exist in the AmE and interact with pars intercerebralis (PI) cells, which are suggested to take on a role of the output system of the photoperiodic mechanism. Additionally, PI cells changed their neuronal activity according to the day length, and the knockdown of a circadian clock gene abolished the photoperiodic response in the PI cells.

研究分野：神経科学

キーワード：光周性 概日時計 PDF 電気生理学 免疫組織化学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 日長情報を蓄積・処理する脳内の光周時計

生物は年による変動がない季節に応じた1日の日長の変化とその日数を正確に測定することで、季節を読み取っている。多くの自然界の動物は、この日長・日数情報に応じて生殖などの生理機能・行動を制御し、この日長応答は光周性と呼ばれる。

様々な動物種における先行研究より、この光周性制御には体内の約 24 時間周期のリズム形成を行う概日時計やその形成遺伝子(概日時計遺伝子)が重要な役割を果たしていることが報告されてきた。脳内において、概日時計をもとに日長や日数情報を処理する中枢時計:光周時計が存在することが長年示唆されてきた。しかし、どのような細胞が、どのようにして概日時計をもとに日長・日数情報の読み取りを行っているかについて、そのメカニズムは不明瞭であった。

(2) 光周性に関与する昆虫の脳内神経ネットワーク

幾つかの昆虫種において、脳の副視髄(Accessory medulla, AMe)が概日リズム形成の中枢制御領域であることが示唆されている。ショウジョウバエにおいて、概日時計遺伝子を共発現する pigment-dispersing factor (PDF)ニューロンが、AMeで神経連絡し、概日リズム形成に重要な役割を果たしていることが報告されている(Wülbeckら、2008)。ホソヘリカメムシにおいて、このPDFニューロンを含むAMe領域の除去により、生殖腺発達の光周性が消失することが報告された(Ikenoら、2014)。これらの先行研究より、PDFニューロンと中心としたAMe神経ネットワークが、日長・日数情報処理を行う光周時計の一端を担うと考えた。

PDFニューロンは、PDFペプチド分泌を介してAMeの神経活動を同期させ、リズム出力に寄与していることが報告されている(Schneiderら、2005)。PDFペプチドを含む神経伝達物質の分泌は、細胞の神経活動に応じて行われていると考えられている。そこで、PDFニューロンを含むAMe神経ネットワークは、概日時計をもとに日長・日数に応じて神経活動・出力分子の分泌を段階的に制御することで、日長・日数情報の計測を行っていると思定し、解析を行うことにした(図1)。

2. 研究の目的

本研究では、生殖腺発達に明瞭な光周性を示し、概日時計遺伝子に関する研究も進んでいたホソヘリカメムシを用いて解析を行った。まず、PDFニューロンを中心としたAMe神経ネットワークの形態学的な解析に取り組んだ。続いて、神経活動レベルでの日長応答と、その日長応答における概日時計遺伝子の関与について電気生理学・分子遺伝学的手法を応用し、解析を行った。これらの解析により、PDFニューロンを中心としたAMe神経ネットワークによる、概日時計に基づく神経活動レベルでの日長・日数情報処理機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) PDFニューロンを中心としたAMe神経ネットワークの形態学的解析

実験には、羽化成虫前は短日条件(12時間明期(L):12時間暗期(D)、25℃)、羽化後は長日条件(16L:8D、25℃)で飼育したホソヘリカメムシのメス成虫を用いた。メス成虫の全脳を固定後、PDFと他の種で概日リズム形成などへの関与が示唆されていた神経伝達物質:セロトニン、FMRFamide、Glutamate、 γ -アミノ酪酸(GABA)に対する抗体を用いて、免疫組織化学法による二重標識を行った。

(2) 全脳標本におけるPatch clamp法による神経活動記録

実験には、羽化成虫前は短日条件、羽化後は短日もしくは長日条件に振り分けて飼育したホソヘリカメムシのメス成虫を用いた。メス成虫の全脳を取り出し、人工細胞外液を満たした記録槽に移した後、各標的細胞に対して記録電極をアプローチし、Whole-cell patch clamp法によって神経活動記録を行った。

(3) 神経トレーサーと各種神経伝達物質の抗体を用いた多重標識

記録電極内に神経トレーサー:Neurobiotinを入れておき、(2)で神経活動記録を行った細胞の神経投射について、導入した神経トレーサーを標識することにより可視化した。同時に、各種神経伝達物質に対する抗体を用いた免疫組織化学法による標識を行った。

(4) RNA干渉法による遺伝子ノックダウン個体での神経活動記録

ホソヘリカメムシにおいて、概日時計遺伝子*period(per)*のRNA干渉法による遺伝子ノックダウンによって、生殖腺発達の光周性が消失することが報告されていた(Ikenoら、2010)。そこで、概日時計遺伝子の遺伝子ノックダウン個体において、細胞の神経活動の日長応答への影響を解

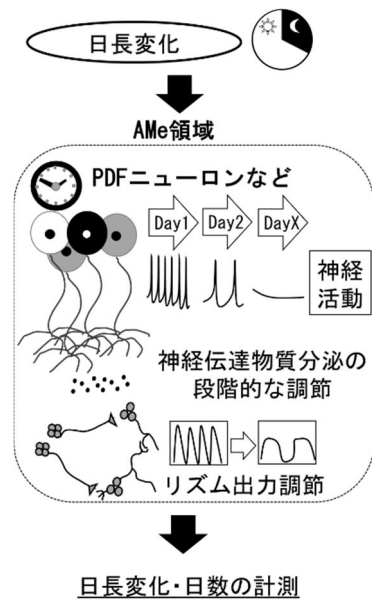


図1 AMe ネットワークによる日長・日数計測機構

析した。方法として、羽化直後のホソヘリカメムシの頭部に、*per* とコントロールとして非ホソヘリカメムシ遺伝子 *b-lactamase(bla)* の 2 本鎖 RNA を注入し、RNA 干渉法による遺伝子ノックダウンを行った。これらのノックダウン個体を短日と長日飼育群に分け、方法(2)と同様の手法を用いて、対象細胞の神経活動記録を行った。

4. 研究成果

(1) Ame 神経細胞群の免疫組織化学法による形態学的な解析

免疫組織化学法による形態学的な解析の結果、既に報告されていた PDF 免疫陽性細胞に加えて、視葉基部の Ame 近傍にはセロトニン・FMRFamide 免疫陽性細胞が局在することがわかった(図2)。また、一部の PDF 免疫陽性細胞において、セロトニン、FMRFamide が共発現していることがわかった(図2)。さらに、Ame の PDF 免疫陽性細胞は背側前大脳へと神経線維を伸ばし、背側前大脳の側方部で多くの免疫陽性バリコシティが見られるが、それらの PDF 免疫陽性線維・バリコシティの一部でセロトニン免疫陽性シグナルも共発現している様子が観察された。これらの結果より、Ame 領域において PDF、セロトニン、FMRFamide といった複数種類の神経伝達物質産生ニューロンが局在し、一部の細胞においてこれら複数の神経伝達物質が共発現していることが示唆された。

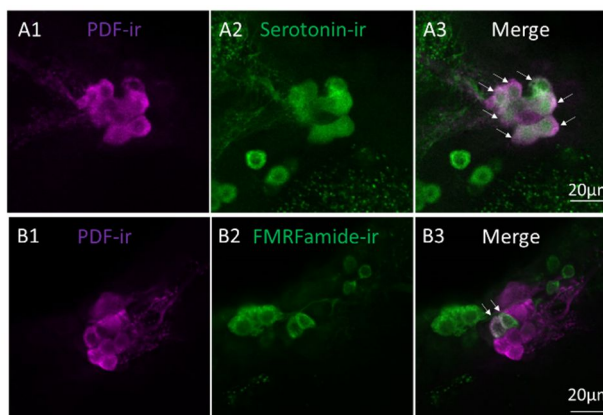


図2 視葉基部の PDF 免疫陽性細胞(紫, A, B)とセロトニン免疫陽性細胞(緑, A)、FMRFamide 免疫陽性細胞(緑, B)

これらの神経伝達物質に加えて、Glutamate や GABA といった神経伝達物質に対する抗体を用いた免疫組織化学法による標識も試みた。過去の別の昆虫種で報告されていた固定・標識方法を複数種類試行したが、安定した標識結果は得られなかった。

(2) Patch clamp 法による各日長条件下での神経活動記録

まず初めに、Ame 近傍領域の PDF ニューロンにおける神経活動記録を試みた。しかし、予想よりも Ame の PDF ニューロンの細胞体が小さく、脳膜を剥がす際に Ame の細胞体もダメージを受けやすく、安定した記録を取ることができなかった。

そこで、続いて Ame 神経ネットワークから日長情報を受け取り、光周性制御の出力系を担うと考えられる大型の神経分泌細胞群に注目した。今回、先行研究より長日条件下での産卵促進に寄与することが報告されていた脳間部(Pars intercerebralis, PI)の大型神経細胞を標的とした(Shimokawa ら、2014)。PI の大型神経細胞の細胞体は大きく、形態学的なアプローチも容易であったこともあり、安定した長期間の神経活動記録の実験系の確立に成功した。そこで、この PI ニューロンにおいて、日長条件による神経活動への影響を解析した。

解析の結果、PI ニューロンは高い発火頻度を示す Burst、高頻度発火を示さないが自発的な神経活動が見られる Non-burst、発火が見られない Silent といった多様な発火パターンを示した。各日長条件間で比較したところ、長日飼育個体の PI ニューロンは短日飼育群と比べて、発火活動が見られない Silent の割合が小さく、発火頻度が顕著に高いことがわかった。この結果は、PI ニューロンが日長条件に応じて、その自発神経活動を変化させることを示唆するものである。

(3) 記録 PI 細胞と PDF・セロトニン免疫陽性細胞間での神経接続

記録 PI 細胞に対して導入した神経トレーサーと PDF・セロトニンに対する抗体を用いて、多重標識を行った。その結果、記録 PI 細胞の神経線維と PDF・セロトニン免疫陽性線維が、背側前大脳領域において、近接している様子が観察された。この結果は、PDF・セロトニンニューロンが、PI ニューロンと神経連絡している可能性を示唆するものである。

(4) 概日時計遺伝子ノックダウン個体における PI ニューロンの神経活動記録

結果(2)で示唆された PI ニューロンの神経活動における日長応答と概日時計遺伝子との関係性を解析するために、RNA 干渉法による概日時計遺伝子 *per* の遺伝子ノックダウンを行った。*per* ノックダウン個体において、通常時では卵巣発達が見られない短日条件下でも卵巣発達が見られ、先行研究同様に卵巣発達の光周性が消失する様子が観察された。一方で、コントロール群の *bla* ノックダウン個体においては、卵巣発達に明瞭な光周性が見られた。

これらの個体を用いて、PI ニューロンの神経活動の日長応答を解析した。コントロール群の *bla* ノックダウン個体において、結果(2)と同様に、PI ニューロンの自発神経活動は短日条件と比べて長日条件で顕著に高く、明瞭な日長応答が見られた。一方、*per* ノックダウン個体において、短日・長日条件間で、PI ニューロンの神経活動に顕著な差は見られず、日長応答が消失することがわかった。これらの結果は、PI ニューロンの神経活動の日長応答には概日時計遺伝

子が寄与していることを示唆するものである。

(5) 研究成果のまとめ

本解析により、AMe には PDF に加えてセロトニン、FMRFamide 産生ニューロンが局在し、一部の AMe ニューロンにおいては、これら複数の神経伝達物質が共発現していることが示唆された。また、電気生理学・分子遺伝学的手法を組み合わせた解析により、出力系を担う PI ニューロンは日長条件に応じてその自発神経活動を変化させ、この PI ニューロンにおける日長応答は概日時計遺伝子ノックダウンにより消失することがわかった。更に、PDF・セロトニンニューロンは、背側前大脳において PI ニューロンと神経連絡している可能性が示唆された。

これらの解析結果より、AMe 神経細胞群は概日時計の分子機構をもとに測定した日長情報を、PI ニューロンへと PDF・セロトニン等の分泌を介して伝達し、PI ニューロンはその日長情報をもとに自発神経活動を調節している可能性が考えられる。

本解析結果は、不明瞭であった概日時計をもとにした日長・日数計測の光周時計機構の一端の解明に寄与するものであると考えられる。

<引用文献>

Wülbeck C, Grieshaber E, Helfrich-Förster C. Pigment-dispersing factor (PDF) has different effects on *Drosophila*'s circadian clocks in the accessory medulla and in the dorsal brain. *J Biol Rhythms*. 2008 Oct;23(5):409-24.

Ikeno T, Numata H, Goto SG, Shiga S. Involvement of the brain region containing pigment-dispersing factor-immunoreactive neurons in the photoperiodic response of the bean bug, *Riptortus pedestris*. *J Exp Biol*. 2014 Feb 1;217(Pt 3):453-62.

Schneider NL, Stengl M. Pigment-dispersing factor and GABA synchronize cells of the isolated circadian clock of the cockroach *Leucophaea maderae*. *J Neurosci*. 2005 May 25;25(21):5138-47.

Ikeno T, Tanaka SI, Numata H, Goto SG. Photoperiodic diapause under the control of circadian clock genes in an insect. *BMC Biol*. 2010 Sep 3;8:116.

Shimokawa K, Numata H, Shiga S. Pars intercerebralis promotes oviposition in the bean bug, *Riptortus pedestris* (Heteroptera: Alydidae). *Appl Entomol Zool*. 2014 Nov 49(4):525-528.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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 第89回大会 2018札幌
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hasebe M, Shiga S
2. 発表標題 Pars intercerebralis neurons show photoperiodic change in their spontaneous firing activity in the bean bug Riptortus pedestris
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry
4. 発表年 2019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 第90回 大阪大会
4. 発表年 2019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