

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02971

研究課題名(和文) 昆虫の光周性の変異を生み出す分子神経機構の解析

研究課題名(英文) Neuromolecular mechanisms underlying variations in insect 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・教授

研究者番号：70347483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：「昆虫の光周性における地理系統差や性差を生み出す生理機構」を明らかにすべく、ナミクバエを対象として、光周性を生み出す生理機構の解明、地理系統差・性差を生み出す生理機構の解明に取り組んだ。その結果、概日時計から前胸腺刺激ホルモン(PTTH)産生細胞、そして前胸腺にいたる分子神経機構の一端を明らかにすることができた。また光周性の地理的変異は概日時計によって規定される光誘導相の違いによるものであり、この違いによって神経ペプチドの分泌タイミングや量が変化し、その結果、内分泌系に変化が生じて休眠・非休眠の誘導が変化すると考えられた。一方、性差を生み出す機構についてはいまだに謎である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫は越冬のために休眠に入る(共通性)。一方、休眠を制御する光周性には種内でも違いがある(多様性)。この共通性と多様性はどのようなしくみで生み出されているのだろうか。本研究は、光周性の分子生理機構を解明するとともに、その機構のうちの何が変化することで種内変異が生み出されているかを検討したものである。光周性の違いを分子神経レベルで明らかにしようとする研究は非常に少なく、本申請課題は高い先駆性を有する。また、本研究は「光周性」をテーマとして生理学と生態学を結びつける新しい時代の「エコフィジオロジー(生態生理学)」の礎となるものである。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify "what physiological mechanisms produce geographic and sexual differences in photoperiodism in insects", we used a common flesh fly (*Sarcophaga similis*) to (i) elucidate the physiological mechanisms underlying insect photoperiodism and (ii) elucidate the physiological mechanisms that produce geographic and sexual differences. The results suggested that circadian clock, neuropeptides, neurotransmitters, prothoracicotropic hormone, prothoracic gland, ecdysteroid synthetic enzymes expressed in the prothoracic gland and ecdysteroids are involved in induction of pupal diapause. Geographical variation in photoperiodism was attributed to differences in the photoinducible phase defined by the circadian clock, which may regulate neuropeptides and the endocrine system. On the other hand, the mechanisms that generate sexual differences are still a big mystery.

研究分野：昆虫科学

キーワード：昆虫 光周性 休眠 変異

1. 研究開始当初の背景

多くの昆虫は光周性によって季節の到来を予測し、生存や繁殖に不適な季節に対応するための準備を行う。たとえば、本研究で対象とするナミクバエ(ハエ目ニクバエ科)も明瞭な光周性を示し、明るい時間が長い光周期(長日)を感受するとすみやかに成虫へと発育を進めるが、明るい時間が短い光周期(短日)を感受すると、蛹で発育を停止(蛹休眠)して休眠と呼ばれる生理状態となる。長日は春から夏、短日は秋に対応しており、日長を読み取ることによって生理状態を変化させて、季節に適応していることがわかる。

休眠誘導に関わる内分泌器官、ホルモン、休眠が起こる発育段階などは、種によって決まっている。しかし、この光周性には種内でも違いが見られる。光周性の種内変異で特に顕著なのは、地理系統差と性差である(図1)。昆虫を様々な日長で飼育した際の、強い長日反応と強い短日反応の中間の日長を「臨界日長」という。この臨界日長に地理系統差、性差が見られる。高緯度地域に生息する個体群の臨界日長は、低緯度個体群の臨界日長に比べて長い。このことは、高緯度個体群が低緯度個体群よりも早い季節に休眠に入ることを示している。これは、高緯度地域では晩夏に急激に寒くなるために早くに休眠に入る必要があること、低緯度地域では晩秋でも暖かく繁殖が可能であることが関連している。一方、オスの臨界日長はメスの臨界日長よりも長い。このことは、オスがメスよりも早い季節に休眠に入ることを示している。これは、遅くに羽化したオスは交尾の機会が得づらいこと、そしてメスは越冬のコストが高いためなるべく休眠せずに繁殖に賭けることに関連している。このように、光周性の種内変異は、生態学的に非常に重要である。しかし、この種内変異の背景にある生理学的なしくみについてはこれまで明らかになっていない(図1)。

蛹での休眠誘導には、日長測定に関わる概日時計、概日時計の出力因子としての神経ペプチド pigment-dispersing factor (PDF) や short neuropeptide F (sNPF)、神経伝達物質としてのグルタミン酸、前胸腺の活性を制御する前胸腺刺激ホルモン (PTTH) 産生細胞、そこから分泌される PTTH、前胸腺およびそこで合成されるエクジステロイドが関与すると考えられる。しかしこれらの因子がどのような挙動を示すことで休眠を誘導しているのかについては、不明な点が多い。

2. 研究の目的

「昆虫光周性の種内変異を生み出す生理機構の解明」を目的とする。そのためにまず、光周性にかかわる分子神経機構を概日時計から内分泌系に至る経路に注目して解明する(プロジェクト1)。続いて、得られた知見が地理系統差、性差にどのように寄与しているかを検討する(プロジェクト2)(図2)。知見が豊富なナミクバエを対象種とする。

3. 研究の方法

プロジェクト1

(1) 神経解剖学的解析

複数ある概日時計細胞の特性を明らかにするため、概日時計タンパク質 PERIOD (PER) と PDF の二重免疫組織化学染色を行う。また、PDF と sNPF の二重免疫組織化学染色を行う。前胸腺が

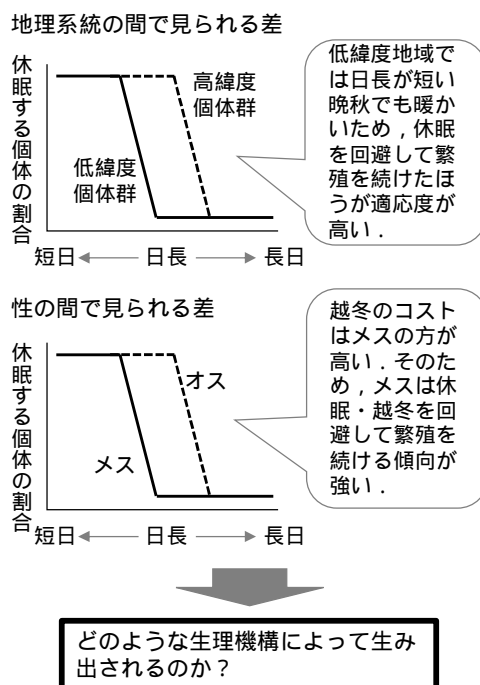
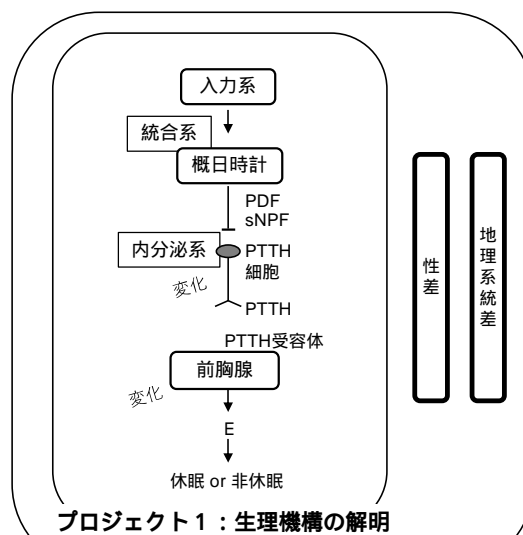


図1 光周性に見られる地理系統差と性差



プロジェクト2: 地理系統差・性差を生み出す機構の解析

図2 研究概要

らのバックフィルにより、PTTH 産生細胞を推定する。また PDF との二重標識を行い、概日時計細胞からの制御について検討する。Single Cell PCR により、PTTH 産生細胞で発現する受容体を推定する。ニクバエ PTTH 抗体を作成し、PTTH 産生細胞を同定するとともに sNPF 陽性細胞との関連を検討する。さらに、パッチクランプ法を用いて、PTTH 産生細胞の電気的活動に対する神経伝達物質および神経ペプチドの効果を調べる。

#### (2)生理生化学的解析

エクジステロイド合成分泌の時期を推定するために囲蛹殻形成時期（幼虫の皮膚が硬化して蛹を覆うようになる時期）を短日、長日条件下で調べる。また、酵素結合免疫吸着法（ELISA）によって体液エクジステロイドの濃度を測定する。

#### (3)分子生物学的解析

sNPF, PTTH の遺伝子クローニングを行い、発現解析の準備をする。また、得られた塩基配列からアミノ酸配列を推定し、抗体作成に役立てる。また、エクジステロイド合成関連遺伝子、その制御因子である *ptth* や *snpf* の発現を RT-qPCR 法によって調べる。

### プロジェクト 2

#### (4)性差を生み出す機構

実験を効率よく進めるためには、大きな性差を生み出す実験室条件を検討する必要がある。そこで、様々な光周期、温度を与えた条件の下で雌雄の休眠率を測定する。幼虫期には雌雄は区別できないため、分子生物学的に性を判定する方法を開発する。エクジステロイド分泌制御の性差を推定するために、囲蛹殻形成時期の性差を調べる。また、エクジステロイドへの感受性の性差を調べるために、休眠運命の蛹にエクジステロイドを注射し休眠回避の程度を観察する。

#### (5)地理系統差を生み出す機構

光周性の地理系統差は、日長測定に関わる概日時計の違いであると考えられる。系統間の概日時計の周期の差を調べるため、成虫の概日歩行活動リズムを調べる。また、一定の明期と長い暗記を組み合わせた Nanda-Hamner 実験により、日長測定に関与する概日時計の周期を検討する。

同じ日長であっても、高緯度地域個体群はその日長を短日と読み、低緯度地域個体群は長日と読む。この性質を利用し、13 時間明期 11 時間暗期を両系統に与え、囲蛹殻形成時期を調べる。また、エクジステロイド合成関連遺伝子、*ptth*, *snpf* の発現を RT-qPCR で調べる。

### 4. 研究成果

(1)二重免疫組織化学の結果、PDF と PERIOD 抗体の両方によって染色される細胞を明らかにした。また、環状腺へ注射し *ptth* の発現が認められた *pars lateralis* (PL) 細胞の近くに、PDF と PERIOD を共発現する細胞が注射していた。PL 細胞での受容体の発現を調べたところ、グルタミン酸閉鎖型塩化物イオンチャネル遺伝子の発現が最も顕著であった。さらに電気生理学的な解析の結果、PL 細胞の電気的活動はグルタミン酸によって抑制されることがわかった。一方で、PDF は PL 細胞の神経活動に顕著な影響を及ぼさないことがわかった。sNPF の影響については試行回数が少なく、はっきりした結果は得られていない。

sNPF と PDF を共発現する細胞は見られなかった。PTTH 産生細胞は脳中央部に神経線維を伸ばしていること、そしてその神経線維が sNPF 細胞の神経線維と絡み合うように位置していることがわかった。

(2)長日条件下では囲蛹化・蛹化は早くに起こることがわかった。また囲蛹化に先立って体液エクジステロイド量が上昇することがわかった。また、短日条件下では蛹期の途中からエクジステロイド量が低下することが分かった。

(3)短日条件下でのエクジステロイド量の低下に先立ち、エクジステロイド合成酵素 *Neverland* (*Nvd*), *ptth*, *snpf* の遺伝子発現が低下することがわかった。

(4)さまざまな光周期・温度条件下での雌雄の休眠率の差は大きくても 50% 程度であり、メスのみが非休眠・オスのみが休眠という条件は見つからなかった。この最も差が出る環境条件において、多くの個体を用いて実験を進める必要があることがわかった。*doublesex* (*dsx*) 遺伝子の性特異的転写産物により、幼虫、蛹での性判定が可能となった。雌雄間で囲蛹化のタイミングは同じであった。また、エクジステロイド注射による休眠回避率はオスのほうが高く、メスは注射にはあまり反応しないことがわかった。

(5)地理系統間で、成虫の概日歩行活動リズムの周期性と強度に違いは見られなかった。また、Nanda-Hamner 実験によっても各系統の概日時計の周期性にクラインは見られなかった。13 時間明 11 時間暗の条件下において、低緯度個体群では、*Nvd*, *ptth*, *snpf* の発現上昇がみられた。一方、高緯度個体群では、これらの遺伝子の発現上昇は見られなかった。

## 国内外での位置づけとインパクト

バックフィルと免疫組織化学, single Cell PCR により, PTH 産生細胞を特定することができた. またこの細胞は PDF, sNPF, あるいはグルタミン酸によって制御されていることが考えられた. 特にグルタミン酸はその有力な候補である. パッチクランプ法を用いた PTH 産生細胞の活性測定は, 当該研究分野において大きなインパクトを持って迎えられよう. PDF, sNPF, グルタミン酸は概日時計細胞に由来すると考えられるが, この点については更に解析する必要がある.

長日条件では, sNPF, ptth, Nvd の発現が次第に上昇し, それに遅れて体液エクジステロイド濃度が上昇し, 非休眠となることが示唆された. 一方, 短日条件では逆に, sNPF, ptth, Nvd の発現が次第に低下し, 体液エクジステロイド濃度が低下する. sNPF PTH Nvd といったカスケードでエクジステロイド合成が制御されていると考えられる.

地理系統の差は, 概日時計の挙動の違いではなく, 日長測定を直接司る光誘導相の違いによると考えられた. そしてその違いが, sNPF PTH エクジステロイドという経路を制御することによって地理系統差を生み出していることが考えられた. 一方, 性差を司る機構についてはいまだ謎が多く, 解明には至らなかった. 幼虫および初期蛹において, 分子生物学的な性判定を行うとともに, 体液エクジステロイド量の測定を行う必要がある.

得られた成果と追加実験の成果をとりまとめて, 複数の原著論文として発表する予定である. 昆虫生理学分野において重要な貢献であり, 当該分野において驚きとともに迎えられよう.

本成果により, 昆虫光周性の分子生理機構, そして光周性の種内変異を生み出す機構の一端を明らかにできた. また, 光周性の種内変異を分子神経レベルで明らかにしようとする研究は非常に少なく, 先駆性の高い研究となった. 本研究は「光周性」をテーマとして, 生理学と生態学を結びつける新しい時代の「エコフィジオロジー (生態生理学)」の礎となる.

## 今後の展望

追加実験を行い 概日時計細胞あるいはその下流のニューロンが, どのような因子を用いて PTH 産生細胞の活性を制御しているのかを明らかにする必要がある. また, 地理的変異の中枢を調べるには, 休眠・非休眠運命の決定を担う光誘導相の分子生理学的な解明が必須である. 光誘導相の存在は今から 50 年前に提唱されたものの, いまだにその実体は不明である. この点の解明を目的として次期の科研費に応募する. 光周性の雌雄差は, エクジステロイドレベルの違いによることが考えられたので, 今後はこの点に関して実験を重ねる.

上記の研究を通して, 光周性の種内変異を生み出す機構の全貌を明らかにする.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ichikawa Aoi, Ikeda Motohiro, Goto Shin G.	4. 巻 55
2. 論文標題 Cold storage of diapausing larvae and post-storage performance of adults in the blowfly <i>Lucilia sericata</i> (Diptera: Calliphoridae)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 321 ~ 327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13355-020-00685-8	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 Matsumoto Keiji, Yasuno Yoko, Yasuda Kohei, Hayashi Tsuyoshi, Goto Shin G., Shinada Tetsuro	4. 巻 49
2. 論文標題 Structure Determination of Juvenile Hormone from Chagas Disease Vectors, <i>Rhodnius prolixus</i> and <i>Triatoma infestans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 538-541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.200126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mukai Ayumu, Yamaguchi Koki, Goto Shin G.	4. 巻 8
2. 論文標題 Urban warming and artificial light alter dormancy in the flesh fly	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Royal Society Open Science	6. 最初と最後の頁 210866 ~ 210866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsos.210866	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Des Marteaux Lauren, Xi Jili, Mano Genyu, Goto Shin G.	4. 巻 589
2. 論文標題 Circadian clock outputs regulating insect photoperiodism: A potential role for glutamate transporter	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 100 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.014	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 該当する

1. 著者名 Mukai Ayumu, Mano Genyu, Des Marteaux Lauren, Shinada Tetsuro, Goto Shin G.	4. 巻 144
2. 論文標題 Juvenile hormone as a causal factor for maternal regulation of diapause in a wasp	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 103758 ~ 103758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibmb.2022.103758	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 該当する

1. 著者名 MUKAI Ayumu, TAGAYA Jun, GOTO Shin G, NUMATA Hideharu	4. 巻 39
2. 論文標題 Effect of light intensity in urban night on insect seasonality: A case study in a flesh fly	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hikaku seiri seikagaku(Comparative Physiology and Biochemistry)	6. 最初と最後の頁 53 ~ 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3330/hikakuseiriseika.39.53	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 後藤慎介
2. 発表標題 昆虫の季節適応機構に関する分子生理学的研究
3. 学会等名 第66回日本応用動物昆虫学会大会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 向井歩・山口幸紀・後藤慎介
2. 発表標題 都市温暖化と人工照明がナミクバエの休眠誘導に及ぼす影響
3. 学会等名 第81回日本昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 淵側太郎・後藤慎介
2. 発表標題 ナミニクバエ終齡幼虫の脳における神経ペプチドPDFおよびsNPFの分布
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉永奈央・後藤慎介
2. 発表標題 ナミニクバエ光周性の臨界日長の緯度クラインを生み出す生理機構：概日時計の違いに注目して
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Oh-e, Yutaro
2. 発表標題 Study of circadian clock and prothoracicotropic hormone neurons in the photoperiodic response of <i>Sarcophaga silmiliis</i> larvae
3. 学会等名 NTHU-OU Virtual Symposium on Biological and Medical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤慎介
2. 発表標題 昆虫の環境適応と時間設定機構
3. 学会等名 生物リズム2019若手研究者の集い(招待講演)
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
研究分担者	淵側 太郎  (Fuchikawa Taro)  (90802934)	大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授   (24402)	
研究分担者	志賀 向子  (Shiga Sakiko)  (90254383)	大阪大学・大学院理学研究科・教授   (14401)	
研究分担者	長谷部 政治  (Hasebe Masaharu)  (40802822)	大阪大学・大学院理学研究科・助教   (14401)	

	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
研究協力者	溝口 明  (Mizoguchi Akira)  (60183109)	愛知学院大学・教養部・客員教授   (33902)	
研究協力者	浜中 良隆  (Hamanaka Yoshitaka)  (10647572)	大阪大学・大学院理学研究科・助教   (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------



カナダ	Agriculture and Agri-Food Canada			
-----	-------------------------------------	--	--	--