

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20380038

研究課題名（和文） カメムシの光周性と休眠を支配する中枢機構

研究課題名（英文） Central mechanism controlling photoperiodism and diapause in stink bugs.

研究代表者

沼田 英治（NUMATA HIDEHARU）

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：70172749

研究成果の概要（和文）：ホソヘリカメムシでは、概日時計遺伝子 *period*、*cycle*、哺乳類型 *cryptochrome*、*Clock* から構成される概日時計が光周性に必須であることが明らかになった。また、視葉の色素拡散因子免疫陽性ニューロンが光周性に関与することも示唆された。チャバネアカカメムシでは、脳間部、脳側方部を含む脳領域が幼若ホルモン合成を抑制することで休眠の制御にかかわることが証明され、血リンパ中から幼若ホルモン分子を検出する方法として、高速液体クロマトグラフィーとマスマスペクトルの組み合わせによる分析法を確立した。

研究成果の概要（英文）：In *Riptortus pedestris*, a circadian clock consisting of *period*, *cycle*, *mammalian-type cryptochrome*, and *Clock* is indispensable for photoperiodism. Moreover, the pigment-dispersing factor immunoreactive neurons in the optic lobe were suggested to be involved in photoperiodism. In *Plautia stali*, a brain region including the pars intercerebralis and pars lateralis regulates diapause by inhibiting juvenile hormone biosynthesis, and the method for detecting the juvenile hormone molecule was established.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫、生理学、生体分子、脳・神経、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 昆虫の生活史適応において、光周性によって制御される休眠はきわめて重要な意味をもっている。

(2) 光周性によって制御される休眠の中枢機構は、光受容器（入力系）、光周時計、内分泌効果器（出力系）からなる（図1）。光周時計は1日のうちの明るい（暗い）時間の長

さを測定して短日や長日という情報を蓄積するが、これには概日時計が関与する。光周時計は内分泌系に指令を出し、ここから分泌されるホルモンによって休眠が誘導または回避される。

(3) これまでに、さまざまな昆虫で光受容器や、内分泌効果器についての研究がなされてきたが、光周時計を含む中枢機構全体で一連

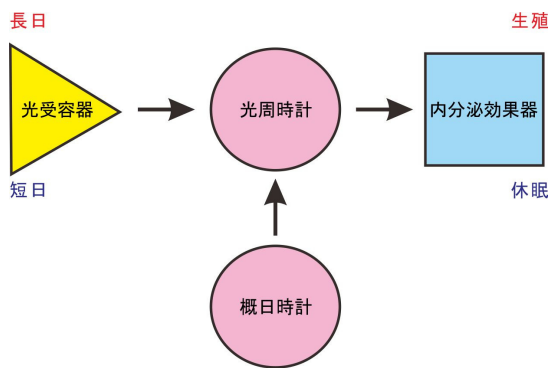


図1 光周性・休眠機構の模式図

の流れが解剖学的にどの部分で、またどのような分子機構でおこなわれているのかを示した研究はない。

(4) 研究代表者は、ホソヘリカメムシにおいて、入力系は複眼の中央部分の個眼であること、出力系はアラタ体の幼若ホルモン (JH) 分泌の脳による抑制であることを明らかにしていた。近年になって、休眠の誘導に脳側方部ニューロンが重要であることを示し、いくつかの概日時計遺伝子の構造を決定した。さらにはチャバネアオカメムシで幼若ホルモンの化学構造を決定したことで、本研究を開始する基盤が整った。

2. 研究の目的

- (1) カメムシの成虫休眠とそれをもたらす光周性について、光入力から卵巣発達の抑制にいたる、中枢神経系および内分泌系による制御機構を細胞、分子のレベルで明らかにする。
- (2) 入力系である複眼の中央部分から連絡している脳内の部位および概日時計の位置をつきとめ、これらの光周性における役割を明らかにする。
- (3) 概日時計遺伝子の発現抑制が光周性・休眠に及ぼす影響を調べ、これらの遺伝子の光周性・休眠における役割を明らかにする。
- (4) 休眠の誘導、維持において重要な脳内ニューロンによるアラタ体の幼若ホルモン (JH) 合成活性の調節機構を明らかにする。
- (5) 血リンパ中の JH 濃度と休眠の関係を明らかにし、JH による標的遺伝子の発現を調べる。
- (6) これらの結果として、光周性・休眠のしくみにおける入力から出力までを、中枢神経系のどこで、どんな分子がどのようなしくみでおこなっているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 複眼中央部分からの色素注入により脳内のどこに連絡しているのかを調べ、休眠調節に重要な脳側方部ニューロンへの連絡経路を同定する。また、他の昆虫では概日時計細胞で発現している神経ペプチド、色素拡散因

子 (PDF) に対する抗体を用いた免疫組織化学によって概日時計の所在を推定する。次に、これらの脳領域の部分除去の光周性・休眠に対する影響を調べる。

(2) RNA 干渉法 (RNAi) による特定の遺伝子発現の抑制方法を確立し、これによって、いくつかの概日時計遺伝子の発現抑制を行い、光周性・休眠に対する影響を調べる。さらに、概日時計遺伝子の RNAi をおこなった個体の遺伝子発現を調べることで、概日時計遺伝子が光周性・休眠機構のどこにかかわっているのかを検討する。

(3) 休眠中の脳によるアラタ体の JH 合成の抑制機構を明らかにするために、アラタ体を脳と共に培養し JH 合成活性を放射化学アッセイで調べる。さらに、脳側方部のニューロンに含まれると考えられるアラタ体抑制分子をマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI) と免疫組織化学によって同定する。

(4) JH の血リンパ中の濃度を測定する方法を確立する。これによって、長日条件の非休眠成虫と短日条件の休眠成虫の血リンパ中の JH 濃度を、時間を追って比較する。

4. 研究成果

(1) ホソヘリカメムシの複眼中央部から中枢への神経連絡は、明らかにならなかった。一方、PDF に対する抗体を用いた免疫組織化学によって視葉の視髄にある複数の細胞が PDF を含んでいることが明らかになった。そこで、タングステン針を用いてその領域を除去したところ、光周性に明らかな影響がみられたので、この領域が光周性において重要であることが判明した。しかし RNAi によって PDF の発現を抑制しても光周性に影響しなかったため、PDF 自身は光周性にかかわっていないと考えられる。

(2) ホソヘリカメムシにおいて、RNAi による特定の遺伝子発現の抑制方法を確立した。この方法を用いて、概日時計遺伝子である *period* (*per*)、*cycle* (*cyc*)、哺乳類型 *cryptochrome* (*cry-m*)、*Clock* (*Clk*) の発現抑制を行い、概日リズムと光周性に及ぼす効果を調べた。ホソヘリカメムシの成虫は実験室で明瞭な概日活動リズムを示さないため、クチクラ形成の概日リズムを観察した。クチクラ形成のリズムとは、キチンの配向の異なる 2 種類の層を交互に形成するリズムで、交叉させた偏光板のもとでは明るい層と暗い層の繰り返しとして認識できる。ホソヘリカメムシではこのクチクラ形成が概日リズムの支配下にある。4 種類の概日時計遺伝子の RNAi をおこなったところ、いずれもクチクラ形成リズムがなくなり、同じ層を連続的に形成した (図 2)。さらに、これらの概日時計遺伝子の RNAi によって、光周性も失われた

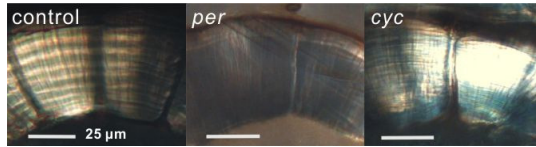


図2 概日時計遺伝子のRNAiをおこなったホソヘリカメムシ成虫のクチクラ層

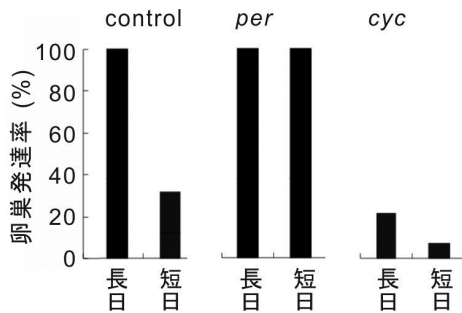


図3 ホソヘリカメムシにおける概日時計遺伝子RNAiの光周性に対する効果

(図3)。しかも、昆虫の概日時計分子機構のフィードバックループにおいて negative element とされている *per* と *cry-m* の RNAi ではいずれもクチクラには暗い層のみが形成され、長日でも短日でも休眠に入らなかった (卵巣を発達させた)。一方 positive element とされている *cyc* と *Clk* の RNAi では明るい層のみが形成され、長日でも短日でも休眠に入った (卵巣を発達させなかった)。以上より、これらの概日時計遺伝子はクチクラ形成の概日リズムにおいて重要な役割を果たしているばかりではなく、光周性において長日と短日を読み取っている際にも重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、オス成虫においても同様の結果が得られたことから、これらの遺伝子は卵巣の発達に直接関係しているものではないと結論した。negative element と positive element は異なる位相で概日時計を停止させるため、光周性においても反対の結果をもたらすと推定される。光周性に概日時計が関与していることは古くから知られてきたが、本研究は遺伝子レベルでその概日時計の実体を明らかにした初めての例である。

続いて、概日時計が光周性・休眠機構のどこに関わっているのかを検討した。ホソヘリカメムシにおいては長日では血リンパ中の JH 濃度が高くなって生殖が誘導され (非休眠)、短日では JH 濃度が低くなって休眠が誘導されると考えられる。血リンパ中の JH 濃度の測定および JH 合成活性の測定が困難であったため、JH 応答性遺伝子の発現を調べることによって JH 濃度を推定した。その結果、

per RNAi 個体では体液中の血リンパ中が高く、*cyc* RNAi 個体では JH 濃度が低いと推定された。したがって、*per*、*cyc* からなる概日時計は内分泌効果器を調節する機構、すなわち光周時計もしくは光受容器にかかわっていると考えられた。

次に、いくつかの概日時計遺伝子の RNAi が他の概日時計遺伝子の発現に及ぼす影響を調べた結果、PER と CRV-m タンパク質が CYCLE タンパク質のはたらきを抑制すること、*cyc* の転写調節は *per*、*cry-m* 遺伝子によっては制御されていないことが明らかになった。(3) ホソヘリカメムシのアラタ体を培養して、放射化学アッセイ法により JH 合成活性を調べたが、JH 合成量が低くこの方法で測定することは困難であると結論した。そこで JH の化学構造が明らかになっているチャバネアオカメムシにおいて、放射化学アッセイ法によりアラタ体の幼若ホルモン合成活性を測定し、それらの個体の卵巣発達を調べた。その結果、短日では幼若ホルモン合成活性は低く休眠に入り、長日では幼若ホルモン合成活性は上昇し生殖が誘導された。さらに、脳間部と脳側方部のニューロンがアラタ体-側心体複合体へ軸索を送っていることが示されたため、アラタ体の幼若ホルモン合成は光周期によって脳間部か脳側方部のニューロンを介して調節されていると考えられる。次に、長日条件のアラタ体を短日条件の脳の脳間部、脳側方部ニューロンの細胞体を含む部分 (脳中央部) とともに培養すると、JH 合成活性は低下した (図4)。これにより、短日では脳がアラタ体の JH 合成をこの神経経路を経てさらには液性経路を介して抑制していることが明らかになった。

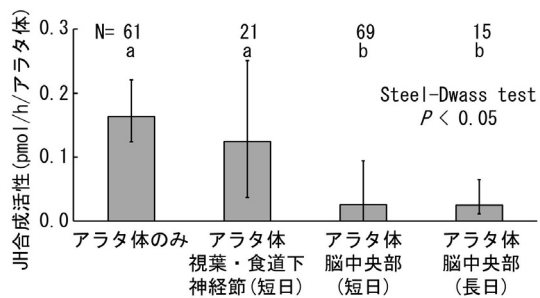


図4 チャバネアオカメムシのアラタ体における JH 合成活性に対する脳の影響

また、これまでにゴキブリのアラタ体抑制物質として知られているアラトスタチン B2 の JH 合成に対する影響を調べたが、抑制、促進いずれの効果もみられなかった。

MALDI によるアラタ体抑制分子の解析には至らなかったが、免疫組織化学により、脳側方部の細胞体にコラゾニン免疫陽性がみられ、その神経繊維は側心体、アラタ体へはほ

とんど分枝せず大動脈に終末することが明らかになった。脳側方部ニューロンからのコラズニンが液性因子としてアラタ体を抑制する可能性が考えられる。

(4) チャバネアオカメムシの新規幼若ホルモン JHSB₃ は、ホソヘリカメムシにおいても主要な JH と考えられた。そこで、この分子およびその光学異性体を合成し (図 5)、ホソヘリカメムシの血リンパ、さらにはアラタ体を培養した培地をガスクロマトグラフィーとマススペクトルとの組み合わせによって解析した。しかしこの方法では JHSB₃ は検出できなかった。さらに感度の高い方法として、逆相液体クロマトグラフィーとマススペクトルとの組み合わせにより JHSB₃ とその立体異性体、JHB₃、JH III の光学活性体をそれぞれ分離・解析可能な条件を確立した。この方法によってチャバネアオカメムシの血リンパから JHSB₃ を検出したが、血リンパ抽出物には JH 以外の多数の生体分子が含まれているため、この方法で血リンパ中の JH 濃度を測定することは困難であった。したがって、このホルモンによる標的遺伝子の発現を調べる段階には進めなかった。

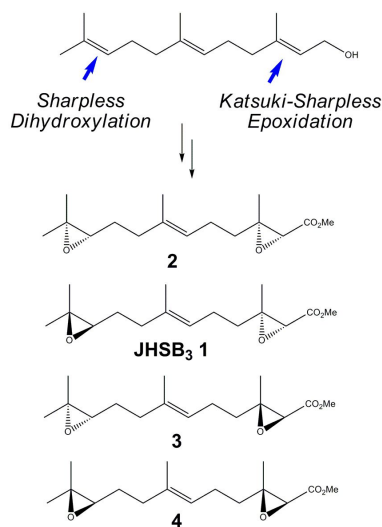


図 5 JHSB₃ 合成スキーム

(5) 以上のように、カメムシの光周性と休眠を支配する中枢機構について、とりわけ光周性にかかわる概日時計の実体に関して、これまでになく知見が得られた。さらに、JH 分子の検出方法にも進展がみられたため、今後、入力系から出力系につながる情報の流れを細胞レベル、遺伝子レベルで明らかにする糸口が見えた。

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 8 件)

- ① Kotaki, T., Shinada, T., Numata, H. (2012) Structure determination of a natural juvenile hormone isolated from a heteropteran insect. *Psyche* **2012**, Article ID 924256, 7 pages. 査読有 doi:10.1155/2012/924256
- ② Kaihara, K., Shinada, T., Ohfuné, Y., Numata, H., Kotaki, T. (2012) Structure-activity relationship of novel juvenile hormone, JHSB₃, isolated from a stink bug, *Plautia stali*. *Tetrahedron* **68**: 106-113 査読有 doi:10.1016/j.tet.2011.10.080
- ③ Ikeno, T., Numata, H., Goto, S.G. (2011) Photoperiodic response requires mammalian-type cryptochrome in the bean bug *Riptortus pedestris*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **410**: 394-397 査読有 doi:10.1016/j.bbrc.2011.05.142
- ④ Ikeno, T., Numata, H., Goto, S.G. (2011) Circadian clock genes *period* and *cycle* are indispensable for the photoperiodic regulation of male reproduction in the bean bug *Riptortus pedestris*. *J. Insect Physiol.* **57**: 935-938 査読有 doi:10.1016/j.jinsphys.2011.04.006
- ⑤ Ikeno, T., Numata, H., Katagiri, C., Goto, S.G. (2011) Causal involvement of mammalian-type cryptochrome in the circadian cuticle deposition rhythm in the bean bug *Riptortus pedestris*. *Insect Molec. Biol.* **20**: 409-415 査読有 doi:10.1111/j.1365-2583.2011.01075.x
- ⑥ Kotaki, T., Shinada, T., Kaihara, K., Ohfuné, Y., Numata, H. (2011) Biological activities of juvenile hormone III skipped bisepoxide in last instar nymphs and adults of a stink bug, *Plautia stali*. *J. Insect Physiol.* **57**: 147-152 査読有 doi:10.1016/j.jinsphys.2010.10.003
- ⑦ Ikeno, T., Tanaka, S. I., Numata, H., Goto, S.G. (2010) Photoperiodic diapause under control of circadian clock genes in an insect. *BMC Biol.* **8**: 116 査読有 <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/8/116>
- ⑧ Kotaki, T., Shinada, T., Kaihara, K., Ohfuné, Y., Numata, H. (2009) Structure determination of a new juvenile hormone from a heteropteran insect. *Org. Lett.* **11**: 5234-5237 査読有 doi:10.1021/ol902161x

〔学会発表〕 (計 3 7 件)

- ① 品田哲郎 チャバネアオカメムシ由来の幼若ホルモン JHSB₃ の構造活性相関 第 56 回日本応用動物昆虫学会大会 2012 年 3 月 29 日 近畿大学農学部
- ② Numata, H. Photoperiodism in the bean bug *Riptortus pedestris* is under control of circadian clock genes. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 16 日 パシフィコ横浜
- ③ Goto, S.G. Photoreceptor and clock mechanism for insect photoperiodism. 5th Asia and Oceania

Conference for Photobiology 2011年8月1日
奈良県新公会堂

④松本圭司 チャバネアオカメムシにおける幼若ホルモン合成の光周期による調節
社団法人日本動物学会第81回大会 2010年9月23日 東京大学教養学部

⑤後藤慎介 概日時計遺伝子によって制御されるホソヘリカメムシの光周性 日本昆虫学会第70回大会 2010年9月19日 山形大学農学部

⑥沼田英治 昆虫の光周性と概日リズムの振動・光同調機構 第16回日本光生物学協会年会 2010年8月10日 大阪大学医学系研究科

⑦沼田英治 概日時計遺伝子はホソヘリカメムシの光周性において決定的な役割を果たす 第54回日本応用動物昆虫学会大会 2010年3月28日 千葉大学西千葉キャンパス

⑧品田哲郎 カメムシ由来の新規幼若ホルモンの構造決定 第50回天然有機化合物討論会 2008年9月30日 福岡国際会議場

〔図書〕(計1件)

①Goto, S.G., Shiga, S., Numata, H. (2010) Photoperiodism in insects: perception of light and the role of clock genes. In: *Photoperiodism: The Biological Calendar*. Oxford University Press, pp.258-286.

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：光学活性化合物およびその製造方法、ならびに昆虫制御剤

発明者：小滝豊美、品田哲郎、沼田英治、大船泰史

権利者：独立行政法人農業生物資源研究所、公立大学法人大阪市立大学

種類：特許

出願番号：特願 2008-176363

公開番号：特開 2010-013410

出願年月日：2008年07月04日

公開年月日：2010年01月21日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沼田 英治 (NUMATA HIDEHARU)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：70172749

(2) 研究分担者

志賀 向子 (SHIGA SAKIKO)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：90254383

(3) 研究分担者

後藤 慎介 (GOTO SHINSUKE)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：70347483

(4) 研究分担者

品田 哲郎 (SHINADA TETSURO)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：30271513