

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450488

研究課題名(和文) 昆虫の光周性における母性効果の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying maternal regulation 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・准教授

研究者番号：70347483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：「母親が受けた光周期によって次世代の発生運命が変化する」という現象は多くの昆虫に見られるにもかかわらず、その分子基盤はいまだ不明である。本研究ではコオロギとハチを対象にその分子機構の解明に取り組んだ。その結果、*Clk*、*per*といった時計遺伝子が日長の判断に関わり、この判断が卵巣へと伝えられて特異な遺伝子発現を誘導し、これによって子世代の細胞分裂周期制御遺伝子や胚発生制御遺伝子の発現の変化が誘導されて、発生が停止することが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Many organisms including insects are well-known to respond to photoperiods to enter diapause; i.e., photoperiodism. In some cases, mother receives the photoperiod and induces diapause in offspring; i.e., maternal regulation in photoperiodism. Mechanisms underlying this event are still largely veiled. Here, I focus on the molecular mechanisms underlying this event in a cricket and a wasp and found involvement of circadian clock genes *period* and *Clock* in maternal photoperiodic discrimination, unique gene expression in the ovary of the mother, and also unique gene and protein expression in offspring. These molecular events would be causally involved in the maternal induction of photoperiodic diapause.

研究分野：動物生理学

キーワード：昆虫 休眠 光周性 母性効果 概日時計

1. 研究開始当初の背景

温帯の多くの昆虫は、明るい時間の長さ（日長）あるいは暗い時間の長さ（夜長）の周期（光周期）を読み取って季節の到来を予測し、「休眠」と呼ばれる特別な生理状態となって生存や繁殖に不適な季節をやり過ごす (Goto & Numata, 2014)。休眠とは、神経内分泌系を介した積極的な発生の停止を言い、不適な季節をやり過ごすのに適した生理状態となっている。たとえば、モンシロチョウ *Pieris rapae* (チョウ目, シロチョウ科) は幼虫で光周期を感受し、夏のように明るい時間が長い環境条件（長日条件）のもとではすみやかに発育するが（非休眠という）、秋のように明るい時間が短い環境条件（短日条件）のもとでは蛹で休眠に入り発生を停止する。休眠蛹はすぐには羽化せず、冬の寒さを経験したあとで翌年の春に成虫へと羽化する。

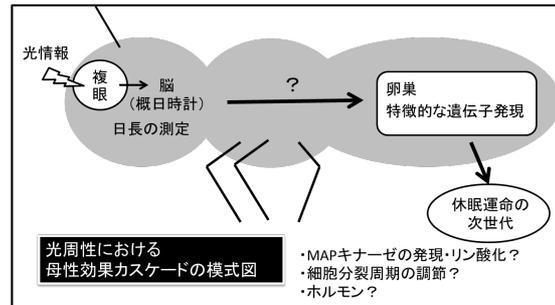
このように、多くの昆虫は自分自身が受けた光周期を元に自身が休眠に入るかどうかを決定している。一方、一部の昆虫では親世代が受けた光周期によって子世代の発生運命が変化することも知られている。たとえば、小さなコオロギであるマダラスズ *Dianem obius nigrofasciatus* (バッタ目, ヒバリモドキ科) のメス成虫は長日条件を感受するとすみやかに発生する卵を産むが、短日条件を感受すると胚発生の初期で発生を停止する休眠卵を産むようになる (Tanigawa et al., 2009)。また、ハエの蛹に寄生するキョウソヤドリコバチ *Nasonia vitripennis* (ハチ目, コガネコバチ科) のメス成虫は長日条件下ではすみやかに成長する卵を産むが、短日条件下では幼虫で発育を停止する卵を産む (Saunders, 1966)。このような現象は、母親が感受した光周期情報が脳に存在する何らかの機構で処理された後に、卵巣を通じて卵に伝えられ、産下された卵（子世代）は母親から伝えられた情報にしたがって休眠に入る、と考えられるが、その分子機構は未だ大きな謎に包まれている。カイコガ *Bombyx mori* (チョウ目カイコガ科) では、母親の食道下神経節で作られる「休眠ホルモン」が卵巣に働きかけて、休眠卵の産生を誘導する、ということが知られているが、これが昆虫における光周性の母性効果に関する唯一の知見である (Denlinger et al., 2012)。さらに、休眠を誘導する「休眠ホルモン」の存在は、カイコガ以外の他の昆虫では確認されていない。

2. 研究の目的

そこで、本研究は、明瞭な光周性を示し、長年の研究の知見があり、RNAi も有効なマダラスズとキョウソヤドリコバチを対象に「光周性における母性効果の分子基盤」を明らかにすることを目的とした。

光周性における母性効果を詳しく調べるため、母性効果のカスケードを3つの段階に分けてアプローチすることとした。

- (1) 母親の脳で何が起きているのか。
- (2) 母親の卵巣で何が起きているのか。
- (3) 子世代で何が起きているのか。



3. 研究の方法

当初の研究計画ではマダラスズのみを用いる予定であった。しかし、野外から採集した個体の実験室ではなかなか産卵しない、あるいは産卵しても卵の数が少ない、という現象が見られるようになった。餌、水、温度、湿度、人工気象器、部屋、建物といった条件を詳細に検討したが原因を特定できず、事態を打開することはできなかった。そこで、マダラスズでの研究と平行して、キョウソヤドリコバチも用いて実験を行うこととした。それぞれの種は休眠に入るステージは異なるものの、母親が感受した日長によって子世代の発生運命が変化するという明瞭な母性効果が見られる点では同じである。

(1) 母親の脳で何が起きているのか：日長測定には概日時計が関わることがいくつかの昆虫で知られている。遺伝子発現を抑制する RNAi 法で概日時計遺伝子の発現を抑制した際に光周性にどのような影響が出るのかを調べた。

(2) 母親の卵巣で何が起きているのか：母親の脳で処理された光周期情報は何らかの形で卵巣に伝えられ、それが卵に伝えられて次世代の発生運命が決まる。次世代の発生運命の変化のために卵巣内で特異な遺伝子発現が誘導されると考え、卵巣から RNA を抽出し、RNA seq 解析を行った。

(3) 子世代で何が起きているのか：子世代は母親の情報に基づいて休眠に入る。この休眠に入る直前直後に何が起きているのかを明らかにすることで、母親がどのような情報を送り込んでいるのかを探る。具体的には細胞分裂周期解析、MAP キナーゼの発現量とリン酸化、さらにこれらの現象に関与すると考えられる遺伝子の発現を調べた。

4. 研究成果

(1) 母親の脳で何が起きているのか。 マダラスズ

概日時計遺伝子 Clock (Cik) の RNAi を行った。Clock は概日時計機構において非常に重要な因子であり、キイロショウジョウの Cik 遺伝子機能喪失変異体ではすべての遺伝子の概日発現振動が失われることが知られている (McDonald & Rosbash, 2001)。まず、Cik RNAi によって概日歩行活動リズムに影響が出るかどうかを恒暗条件下で調べたところ、対照個体は明瞭な概日歩行活動リズムを示したものの、Cik RNAi 個体は活動リズムが不明瞭となることがわかった。このことは Cik RNAi によって概日時計に異常が生じることを示している。その一方で、明暗条件下ではコントロール個体も Cik RNAi 個体も明瞭な歩行活動リズムを示した。さらに、Cik RNAi 個体においても明瞭な「暗期の予期的活動」が見られた。このことは明暗条件下では Cik RNAi 個体の概日時計が機能していることを示している。しかし、暗期の予期的活動を指数化して比較したところ、Cik RNAi 個体はコントロール個体に比べて予期的活動が弱くなっていることが明らかとなった。よって、Cik RNAi 個体の異常な概日時計は、明暗条件下では明暗という外部環境のシグナルによって駆動されるものの、コントロール個体の概日時計とは異なる性質を持つ、ということがわかった。

続いて、Cik RNAi 個体の光周反応を調べた。コントロール個体は、長日条件下では非休眠卵を、短日条件下では休眠卵を産む。一方、Cik RNAi 個体の多くは長日条件下では非休眠卵を産むが、短日条件下では最初の数日非休眠卵を産み、その後休眠卵を産み、続いて非休眠卵を産むという傾向が見られた。2 度にわたって非休眠卵を産出するということは、Cik RNAi が異なる機構に働きかけたと考えられる。メス成虫が光周期を感受して次世代の発生運命を切り替えるのには 10 日以上かかる。このことを考えると、Cik の二本鎖 RNA 導入直後に見られる非休眠卵の産生は光周性機構を介さずに行われたと考えられる。Cik RNAi は非休眠卵の産生に直接関わっているのではないだろうか。これに続く、休眠卵の産生が何を意味しているのかは現在のところ不明である。おそらく「直接非休眠卵の産生に関わる Cik の RNAi の効果が切れたため」と考えられるものの、その詳細は不明である。一方、後半で再び見られる非休眠卵の産生は、Cik の二本鎖 RNA 導入から時間がたってから見られること、この非休眠卵産出の時期が光周性による非休眠卵産生の時期とほぼ同じであることから、Cik RNAi が日長測定に

関わる概日時計に影響した結果、光周性に異常が現れた、と考えられる。しかしながら、RNAi は全身的に効果をもたらすこともあり、具体的にどこの組織にどの程度影響を及ぼし、その効果がいつまで続いているのかについてはわからない。今後さらなる検証が必要であるものの、現在のところ、Cik 遺伝子は歩行活動リズムを司る概日時計、光周性の日長測定を司る概日時計、休眠誘導機構、に参与していると考えている。続いて period (per) の RNAi を行った。まず概日歩行活動リズムへの影響を調べたが、その効果は非常に弱いものであった。導入した二本鎖 RNA の質や量などの条件検討が必要であり、period 遺伝子が概日時計に及ぼす影響、さらには光周性に及ぼす影響は、現在のところ不明である。

キョウソヤドリコバチ

メス成虫が蛹の時期に per の二本鎖 RNA を導入し、光周性への影響を調べた。対照個体は長日条件下では非休眠運命の卵を、短日条件下では休眠運命の卵を産んだが、per RNAi 個体は短日条件下にもかかわらず非休眠運命卵を産んだ。キョウソヤドリコバチメス成虫は光周期にかかわらず低温を感受すると休眠運命卵を産出することが知られている。この低温処理は即座に休眠運命卵の産出を促すため、光周性機構を介さず低温が直接末梢器官に働きかけていると考えられている。per RNAi 個体を低温にさらすと、対照個体と同様に休眠運命卵を算出した。以上の結果をもとに、per RNAi は末梢器官における休眠運命卵産出の過程には影響せず、光周性機構の中枢に影響していると考えられた (原著論文として発表; Mukai and Goto, 2016)。

(2) 母親の卵巣で何が起きているのか。 マダラスズ

休眠運命卵を産生しているメス成虫、非休眠運命卵を産生しているメス成虫から卵巣を取り出し、RNA 抽出を行った後、RNA seq 解析を行った。466566600 リードから 235995 コンティグを作成することができた。Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments (FPKM 値) の比較により、休眠運命卵産生卵巣と非休眠運命卵産生卵巣の間で、さまざまな遺伝子の発現が異なることが明らかになった。特筆すべきは、piwi-like protein, aubergine, spindle-E, dicer-like といった遺伝子群の発現に違いが見られたことである。これらの遺伝子は、ニクバエの一種 *Sarcophaga bullata* の休眠に関わることが報告されており (Reynolds et al., 2013)、エピジェネティックにさまざまな遺伝子の発現を制御することが知られている。母性効果にはエピジェネティックな発現制御が関わっているのかもしれない。

(3) 子世代で何が起きているのか。

マダラスズ

母性効果による休眠誘導においては、メス成虫が卵に行った「細工」によって次世代の細胞分裂が停止する。この機構を明らかにするため、まず休眠卵・非休眠卵の細胞分裂周期を調べた。その結果、休眠卵はG0/G1期で細胞分裂を停止していることが明らかになった。ただし、細胞分裂の停止は胚発生の停止が起こるよりもあとで起こることが明らかになった。細胞分裂を制御する *pna*, *cyclin D*, *cyclin E* の遺伝子発現を休眠運命卵・非休眠運命卵で調べたところ、胚発生の停止が起こるよりも前に *pna* の発現が休眠運命卵で抑制されていることがわかった。一方、*cyclin D*, *E* は休眠卵で発生が停止した後で発現が低下する。また細胞分裂の誘導に関わるMAPキナーゼの発現量とリン酸化を調べたところ、*extracellular signal-related kinase* (ERK) の発現およびリン酸化が休眠卵で胚発生停止直後に強く抑制されていることが明らかになった。

マダラスズの休眠卵は、産下後 40 時間から 56 時間といった胚発生のかなり早い段階で胚発生を停止することから、初期発生に関わる遺伝子の発現が制御されているのではないかと考えた。そこで、母性効果遺伝子として知られる *caudal* と *pumilio*, *Gap* 遺伝子として知られる *hunchback* と *Krüppel*, *Pair-rule* 遺伝子として知られる *runt* の発現を比較した。その結果、胚発生の停止よりも前に休眠運命卵で *caudal*, *pumilio* の発現が低下していることが明らかになった。一方、胚発生停止よりも前には休眠運命卵・非休眠運命卵で *hunchback*, *Krüppel*, *runt* の発現は変わらず、胚発生停止後に休眠卵でこれらの遺伝子の発現が低下することがわかった。

以上の結果より、母親は卵に何らかの細工を行い、胚発生に関わる母性効果遺伝子、細胞分裂を制御する *pna* の発現とともに抑制するとともに、MAPキナーゼの発現とリン酸化を抑制することで胚発生を停止させることが考えられた。

キョウソヤドリコバチ

キョウソヤドリコバチにおいても細胞分裂周期を調べたところ、休眠幼虫はG0/G1期で細胞分裂を停止させることがわかった。ERK の発現量とリン酸化レベルは休眠・非休眠個体でほぼ変わらなかった。*pna*, *cyclin D*, *cyclin E* の発現は休眠個体で強く抑制されていた。いくつかの分子機構に着目したものの、その全てが発生停止後に起こっており、発生停止前から起こっている変化を見出すことはできなかった。母親が卵にどんな細工をすることで、子世代の発生を幼虫期で止めるのかはいまだに謎である。一般的に、昆虫の幼虫休眠はエクジステロイドの分泌停止で誘導されることが明らかになっている

(Denlinger et al., 2012)。母親はエクジステロイドの合成分泌を幼虫後期で抑制する細工を行っているのだろう。今年に入ってから、キョウソヤドリコバチの休眠誘導にはDNAのメチル化が関わっていることが示された (Pegoraro et al., 2016)。母親が卵のDNAのメチル化を行い、エクジステロイドの合成分泌を制御して、子世代の発生運命を変更しているのかもしれない。

以上の結果より、

マダラスズでは、母親が受けた光周期情報を概日時計遺伝子 *Clk* が関わる概日時計を用いて読み解くことで長日か短日かを判断し、卵巣へとその情報を送り、卵巣において特異な遺伝子発現が起こることで、卵に「細工」が行われ、その結果、母性効果遺伝子や細胞分裂制御遺伝子の発現が抑制されて胚発生の停止が起こることが考えられた。また、*Clk* は休眠運命卵の産生そのものにも関わることも示唆された。

キョウソヤドリコバチでは、母親が受けた光周期情報を概日時計遺伝子 *per* が関わる概日時計を用いて読み解くことで長日か短日かを判断し、その情報をもとに卵でDNAのメチル化が起こり、子世代の胚発生が停止するものと考えられた。

<引用文献>

- Denlinger, D.L., Yocum, G.D., Rinehart, J.P. (2012) Hormonal control of diapause. In Gilbert, L.I. (ed.). *Insect Endocrinology*. pp.430-463. Academic Press, London.
- Goto, S.G., Numata, H. (2014) Insect Photoperiodism. In Hoffmann, K.H. (ed.) *Insect Molecular Biology and Ecology*. pp. 217-244. CRC Press, Boca Raton.
- McDonald, M.J., Rosbash, M. (2001) Microarray analysis and organization of circadian gene expression in *Drosophila*. *Cell* 107, 567-578.
- Mukai, A., Goto, S.G. 2016. The clock gene period is essential for the photoperiodic response in the jewel wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Applied Entomology and Zoology* 51, 185-194.
- Pegoraro, M., Bafna, A., Davies, N.J., Shuker, D.M., Tauber, E. (2016) DNA methylation changes induced by long and short photoperiods in *Nasonia*. *Genome Research* 26, 203-210.
- Reynolds, J.A., Clark, J., Diakoff, S.J., Denlinger, D.L. (2013) Transcriptional evidence for small RNA regulation of pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43, 982-989.
- Saunders, D.S. (1966) Larval diapause of

maternal origin—II. The effect of photoperiod and temperature on *Nasonia vitripennis*. *Journal of Insect Physiology* 12, 569–581.

Tanigawa, N., Matsumoto, K., Yasuyama, K., Numata, H., Sakiko, S. (2009) Early embryonic development and diapause stage in the band-legged ground cricket *Dianemobius nigrofasciatus*. *Development, Genes and Evolution* 219, 589-596.

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 1 件)

査読あり

Mukai, A., Goto, S.G. 2016. The clock gene period is essential for the photoperiodic response in the jewel wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Applied Entomology and Zoology* 51, 185-194. DOI: 10.1007/s13355-015-0384-1

[学会発表](計 10 件)

後藤 慎介, マダラスズ休眠卵の細胞周期と発生の制御機構, 日本昆虫学会第 76 回大会・第 60 回日本応用動物昆虫学会大会合同大会, 平成 28 年 3 月 28 日, 大阪府立大学(大阪府, 堺市)

向井 歩, 概日時計遺伝子 period がキョウソヤドリコバチの光周性に関与する, 日本昆虫学会第 75 回大会, 平成 27 年 9 月 21 日, 九州大学(福岡県, 福岡市)

清水 悠太, キョウソヤドリコバチ休眠幼虫の脳の細胞周期解析, 第 86 回日本動物学会, 平成 27 年 9 月 19 日, 朱鷺メッセ(新潟県, 新潟市)

向井 歩, 時計遺伝子 period の RNAi がキョウソヤドリコバチの光周性に及ぼす影響, 第 59 回日本応用動物昆虫学会, 平成 27 年 3 月 27 日, 山形大学(山形県, 山形市)

清水 悠太, マダラスズ休眠卵の細胞周期の解析, 第 85 回日本動物学会大会, 平成 26 年 9 月 13 日, 東北大学(宮城県, 仙台市)

向井 歩, キョウソヤドリコバチの光周性を制御する概日時計遺伝子 period, 第 18 回日本光生物学協会年会, 平成 26 年 8 月 22 日, 大阪市立大学(大阪府, 大阪市)

Goto, S.G., Roles of the circadian clock genes in photoperiodic regulation of diapause in the bean bug. FIRST FAO/IAEA RESEARCH

COORDINATION MEETING ON Dormancy Management to Enable Mass-rearing and Increase Efficacy of Sterile Insects and Natural Enemies, 平成 26 年 7 月 22 日, Vienna (Austria) 向井 歩, キョウソヤドリコバチの光周性と概日時計, 第 58 回日本応用動物昆虫学会, 平成 26 年 3 月 28 日, 高知大学(高知県, 高知市)

後藤 慎介, マダラスズの光周性における概日時計遺伝子 Clock の役割, 第 58 回日本応用動物昆虫学会, 平成 26 年 3 月 27 日, 高知大学(高知県, 高知市)

永田 雅俊, 概日時計遺伝子 Clock の RNA 干渉がマダラスズの光周性に及ぼす影響, 第 84 回日本動物学会, 平成 25 年 9 月 28 日, 岡山大学(岡山県, 岡山市)

[図書](計 2 件)

後藤 慎介, 北隆館, 「光周性」昆虫の時計, 2014, pp.168-204.

Goto, S.G., Numata, H., CRC Press, 「Insect Photoperiodism」 *Insect Molecular Biology and Ecology*, 2014, pp. 217-244.

[その他]

一般向け解説書

後藤 慎介, ニューサイエンス社, 「昆虫の光周性に時計遺伝子は関わるか?」昆虫と自然 特集: 昆虫の時間生物学 最新の進歩, 2013, pp.9-12.

アウトリーチ活動

後藤 慎介, 西宮市生涯学習大学 宮水学園マスター講座, 2015.10.-2016.01. (全 5 回).

ホームページ等

<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/biol/aphys/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤 慎介 (GOTO, Shinsuke [GOTO, Shin G.])

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 70347483

(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)連携研究者

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：7 0 1 7 2 7 4 9

(4)研究協力者

向井 歩 (MUKAI, Ayumu)
大阪市立大学・大学院理学研究科・大学院
生

永田 雅俊 (NAGATA, Masatoshi)
大阪市立大学・大学院理学研究科・大学院
生

清水 悠太 (SHIMIZU, Yuta)
大阪市立大学・大学院理学研究科・大学院
生