

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：82112

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660268

研究課題名(和文) 暗闇で虫は何を見て眠り、目が覚めるのか？夜空の超微弱光が薄明薄暮性を支配する

研究課題名(英文) What controls the bimodal rhythm with peaks at dusk and dawn in the bugs?

研究代表者

霜田 政美 (Shimoda, Masami)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・昆虫相互作用研究ユニット・ユニット長

研究者番号：80344000

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)：果樹の重要害虫であるチャバネアオカメムシは「薄明薄暮性」の活動リズムパターンを示す。この薄明薄暮性が、日の出や日没時の超微弱光によってどのような支配を受けているのかを調査した。高感度アクトグラフを用いて直径4cmプラスチック容器内での微小動作を検出したところ、市民薄明よりも低照度の光で活動が励起され、特定の光受容体の吸収波長が強く支配していることが示された。

研究成果の概要(英文)：The stink bug, *Plautia stali*, is an important harmful insect of fruit garden including peach and plum in Japan. This bug exhibits a typical bimodal activity rhythm with peaks at dusk and dawn. We investigated what kind of light information controls this activity rhythm, especially the "twilight (super-dim light)" and "light wavelength". The bug's minute movement in a small plastic dish (4 cm -diameter) was monitored using an infrared actograph. As a result, the activity was excited by a low illumination than citizen twilight and it was indicated that the absorption wavelength of the specific light receptor stimulates the activity in this species.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：光受容 概日時計 チャバネアオカメムシ 走光性 活動リズム 薄明薄暮性 複眼

1. 研究開始当初の背景

昆虫の活動パターン(概日行動リズム)には、夜行性、昼行性のほか、朝と夕方に活動ピークをもつものがある。これは薄明薄暮性と呼ばれており、多くの種でこの行動パターンが報告されている。昆虫行動学・時間生物学において、この二峰性の概日行動リズムは脳の概日時計の支配を受けていると解釈されている。事実、我々がハエやカメムシを使って実験室内(蛍光灯を使った明暗サイクル)で活動計測を行うと朝夕の活動ピークが観察され、暗黒条件下では概日時計の周期による自由継続リズム(free-running rhythm)が確認できる。しかし、我々が新たに開発した高感度アクトグラフを野外に持ち出して、カメムシの生息環境下で活動解析を行ったところ、意外にも実験室内とは全く異なる挙動が見出された。朝の活動開始は、概日時計から予想される時刻よりも1時間以上早まり、薄明時の暗闇であった。同時に、夕方の活動も薄暮の時間帯に顕著な活動亢進が確認された。これらの結果から1つの疑問が湧いてくる。従来、薄明薄暮性は「概日時計による内的制御」と考えられてきたが、本当は、夜明け前や日没後の(人の目にはほとんど見えない)夜空からのごく弱い光「超微弱光」が重要なトリガーではないかという疑問である。すなわち、概日時計による支配に先行して「超微弱光」の情報をもとに活動のスイッチング(ON/OFF)が起こっているという仮説である。本当に月明かり(0.3ルクス)もない暗闇で夜空の「超微弱光」を感受して活動を開始しているのだろうか?我々がカメムシで得た実験データは明らかに光感受性の存在を示している。そんな中、最近、我々の観察結果と似た事象がVaninらによって報告された(Nature, 2012)。彼らは自然条件下でハエの歩行行動を精査し、市民薄明未満の光環境下で、概日時計では説明できない活動パターンが生じることを示した。しかしながら、超微弱光の光受容と行動制御については未知の部分が多く、その現象自体も報告例がほとんどない。

2. 研究の目的

多くの昆虫が示す活動パターン「薄明薄暮性」は、脳の概日時計の支配を受けていると考えられているが、私達は薄明薄暮性昆虫が自然条件下では実験室内とは大きく異なる挙動を示すことを発見した。そこから導かれるのは、昆虫は夜明け前の(人の目にはほとんど見えない)「超微弱光」を感受して活動を開始、または停止しているという仮説である。月明かりもない暗闇で昆虫は何を見て眠り、目が覚めるのか?これまで全く知られていない薄明薄暮性を支配する光受容機構の一端を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 光応答行動を誘起する閾値(検出感度)

の決定

電流値依存的に明るさを調整できるLEDを用いて0.0001~0.01ルクスの超微弱光をチャバネアオカメムシに照射し、走光性や活動リズムを誘起する閾値を探索する。走光性反応には、我々が開発した赤外線トラッキングシステムを用いて、二次元オープンフィールド上での歩行活動について、超微弱光照射に対する応答を検出する。また、活動リズムは、高感度アクトグラフを用いて、4cmプラスチック容器内での微小動作を検出する。以上の結果から、光応答行動を誘起する光強度の閾値を決定する。

(2) 「超微弱光」受容部位の決定

光受容部位としては複眼の可能性が高いが、薄明薄暮性を示すための活動開始のキュー(合図)を複眼が担っているとは限らない。複眼の他、単眼や脳による直接受容の可能性も含めて検討する。実験形態学的手法として、コーティング(特殊なマスカラ染料を使用)、微細メスによる切除などにより、複眼や単眼での光受容を遮断して、上記と同様の光応答行動の計測を行う。

(3) 光受容分子のcDNAクローニング

複眼における光受容体としてはロドプシン(オプシントタンパク質ファミリー)が最も可能性が高いと推定されるが、概日行動リズムの制御という点では概日時計のリセットに関わるクリプトクロムが関与している可能性もある。先入観を持たずにこれら候補遺伝子をすべてクローニングする。チャバネアオカメムシ頭部からRNAを抽出しcDNAを合成して、種間で高く保存されている領域を増幅する。候補遺伝子についてcDNAクローニング、発現部位の特定、定量PCR法により遺伝子発現の日内サイクルを調べる。

(4) RNA干渉による遺伝子発現ノックダウン

クローニングを完了した遺伝子から順にRNA干渉のためのdsRNAを合成し、カメムシ幼虫に注射して成虫まで育てる。複眼や単眼など器官ごとに光受容体遺伝子の発現量が低下していることを確認する。遺伝子発現をより強く抑制するための最適な注射条件(dsRNA濃度、注射量、タイミング、回数)を決定する。

(5) ノックダウン個体の光応答感受性低下の確認

遺伝子発現のノックダウンが確認された個体についてERG法により網膜の光感度低下を計測する(総合科学技術大学院大学の蟻川研究室に測定を依頼する。研究協力の了解済み)。つづいてLEDを用いて0.0001~0.01ルクスの超微弱光をチャバネアオカメムシに照射し、平成25年度の実験と同じ方法で、走光性反応および活動リズムを計測して、行動を誘起する光強度(光量子束密度)の閾値

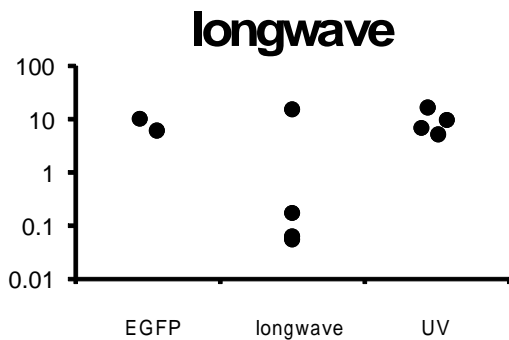


図4 dsRNAによるLW opsin ノックダウン (チャバネアオカメムシ複眼での遺伝子発言量の低下を相対値で示した)

(5) ノックダウン個体の光応答感受性低下の確認

遺伝子発現のノックダウンが確認された個体についてERG法により網膜の光感度低下を計測した(総合科学技術大学院大学の蟻川研究室の協力)。つづいてチャバネアオカメムシにLED光を照射し、走光性反応を解析した。その結果、UV オプシン、LW オプシンの各ノックダウン個体で、誘引される波長ピークが大きくシフトする、即ち波長選好性が変化することが確認された。

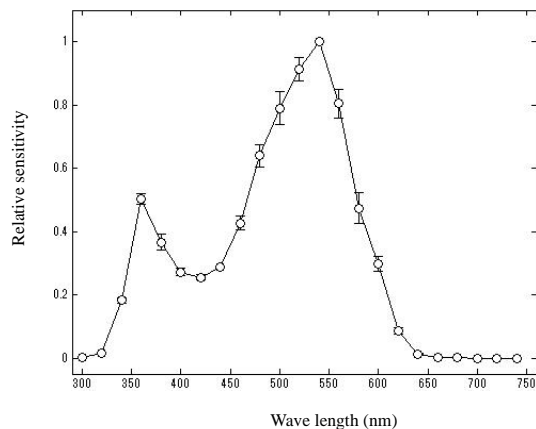


図5 UV opsin ノックダウン個体の複眼分光感度曲線(横軸は光波長、縦軸は感度相対値)

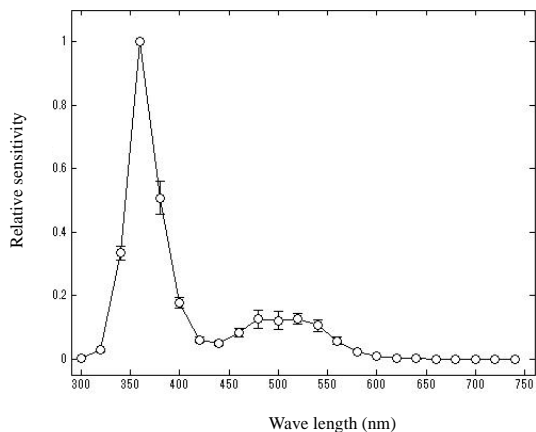


図6 LW opsin ノックダウン個体の複眼分光感度曲線(横軸は光波長、縦軸は感度相対値)

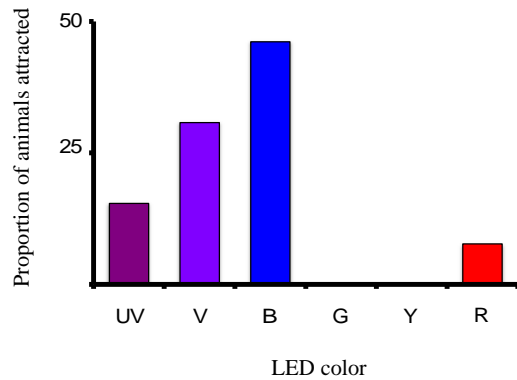


図7 UV opsin ノックダウン個体の波長選好性反応

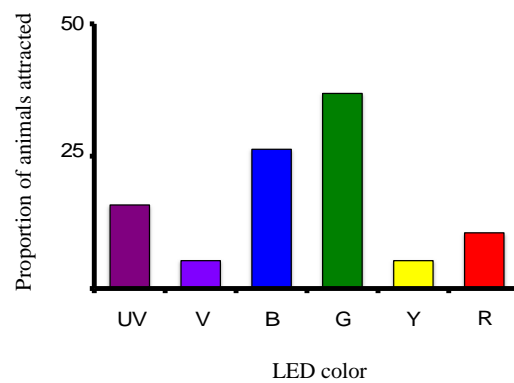


図8 LW opsin ノックダウン個体の波長選好性反応

(6) 自然環境下での概日行動リズムの測定

この実験項目に関しては、ノックダウン個体を多数得るのが難しかったため、十分なデータが得られなかった。そこで野生型の昆虫を用いて、野外の自然環境条件下で、薄明・薄暮前後の時間帯におけるチャバネアオカメムシの活動リズムを測定し、活動を励起する極微弱光の光度を詳細に調査した。その結果、市民薄明よりも低照度で活動が励起され、上記、活動リズムの周期性との相関関係から考えて、0.01Lx以下の極微弱光を受容して反応していることが強く示唆された。複眼の光受容体オプシン遺伝子のdsRNAノックダウン実験の行動解析結果からも、脳内の情報変換より以前に、抹消組織での特定波長の光受容シグナルが第一義的に支配していることが示唆された。

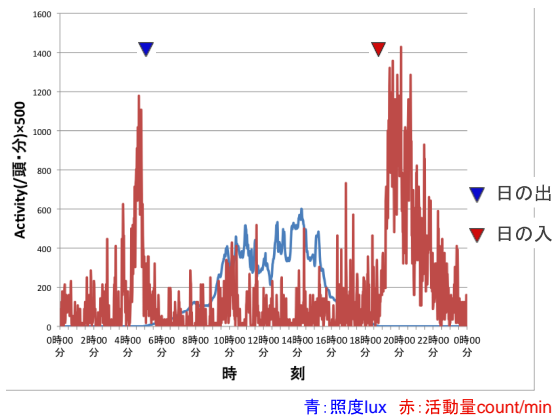


図9 野外自然光における活動量変化
(サワラ林内で計測、赤：未交尾雌 14 頭の活動量平均値；青：照度変化)

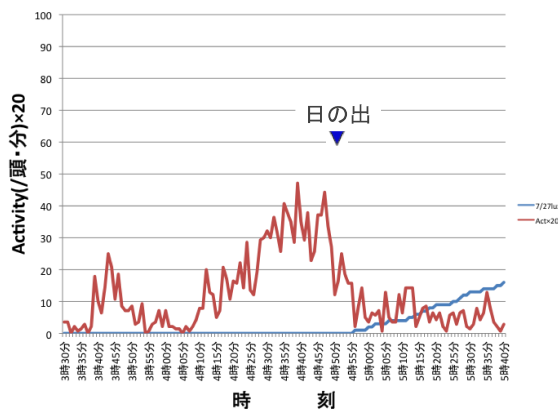


図10 薄明前後の活動量変化
(サワラ林内で計測、赤：未交尾雌 14 頭の活動量平均値；青：照度変化)

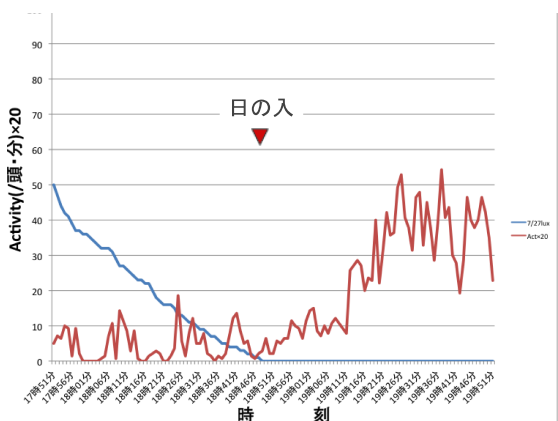


図11 薄暮前後の活動量変化
(サワラ林内で計測、赤：未交尾雌 14 頭の活動量平均値；青：照度変化)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

- 1) 荻野拓海・上原拓也・山口照美・戒能洋一・霜田政美 (2016) 捕食性カメムシの波長選好性：発光ダイオードを利用した減農薬

栽培技術の可能性について 農業電化 69: (印刷中)

- 2) 徳嶋賀彰, 上原拓也, 山口照美, 蟻川謙太郎, 戒能洋一, 霜田政美 (2016) 昆虫の光受容に基づく波長選好性のモデル化 JATAFF 研究ジャーナル 4: (印刷中)
- 3) 霜田政美 (2014) 昆虫の光に対する反応と害虫防除への利用. 植物防疫 68: 594 - 598.
- 4) 荻野拓海, 上原拓也, 山口照美, 野呂知加子, 前田太郎, 霜田政美 (2015) ナミヒメハナカメムシ *Orius sauteri* (Poppius) の波長選好性. 日本応用動物昆虫学会誌 59(1): 10-13.
- 5) 阿部成人・山口照美・中野昭雄・霜田政美 (2014) 赤外線アクトグラムで解析したギフアブラバチ *Aphidius gifuensis* Ashmead の活動時刻分布. 日本応用動物昆虫学会誌 58(4): 329-331.
- 6) 上原拓也, 山口照美, 小滝豊美, 霜田政美 (2014) オープンフィールド試験はチャバネアオカメムシ *Plautia stali* (Scott) の走光性評価に有効である 日本応用動物昆虫学会誌 58(1): 36-38
- 7) Shimoda M, Honda K (2013) Insect reactions to light and its applications to pest management. Applied Entomology and Zoology 48: 413-421

〔学会発表〕(計7件)

- 1) Takumi Ogino, Takuya Uehara, Terumi Yamaguchi, Takahisa Ichihashi, Takahiro Suzuki, Yooichi Kainoh, Masami Shimoda (2016) Attracting an indigenous natural enemy insect, *Orius sauteri*, with light. XXV International Congress of Entomology, Orlando, Florida, USA
- 2) Masami Shimoda, Takumi Ogino, Takuya Uehara, Terumi Yamaguchi, Takahisa Ichihashi, Takahiro Suzuki, Yooichi Kainoh (2016) Pest control using the predatory bug *Orius sauteri* with lighting devices. XXV International Congress of Entomology, Orlando, Florida, USA
- 3) Takuya Uehara, Terumi Yamaguchi, Kentaro Arikawa, Motohiro Wakakuwa, Toyomi Kotaki, Masami Shimoda (2016) Wavelength preference and orientation behavior to light source in the brown-winged green bug, *Plautia stali*. XXV International Congress of Entomology, Orlando, Florida, USA
- 4) Takumi Ogino・Takuya Uehara・Terumi Yamaguchi・Takahisa Ichihashi・Takahiro Suzuki・Yooichi Kainoh・Masami Shimoda (2016) Attracting the predatory bug, *Orius sauteri*, with light in eggplant field.
- 5) 荻野拓海, 上原拓也, 山口照美, 野呂知加子,

前田太郎, 霜田政美 (2015) ナミヒメハナカメムシの波長選好性 第 59 回日本応用動物昆虫学会, p.142, 2015.3.

- 6) Kubo-Irie M, Shimoda M, Sato A, Shida K, Mohri H, Takeda K, Irie M (2014) Effect of nanoparticles injected into larvae on spermatogenesis in the pupal testis of the sweet potato hornworm, *Agrius convolvuli* (L). The 12th International Symposium on Spermatology, 8th - 14th August 2014 Newcastle City Hall, Newcastle
- 7) 守矢敬・上原拓也・山口照美・松本由記子・蟻川謙太郎・小滝豊美・野呂知加子・霜田政美 (2013) RNA 干渉法を用いたチャバネアオカメムシの波長選好性の解析 第 36 回日本分子生物学会 1P

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

霜田 政美 (研究ユニット長) 人国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 昆虫制御研究領域

研究者番号：80344000

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：