

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292175

研究課題名(和文)ホソヘリカメムシの光周性の分子・神経機構

研究課題名(英文)Molecular and neural mechanisms of photoperiodism in the bean bug, *Riptortus pedestris*

研究代表者

沼田 英治 (NUMATA, Hideharu)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：70172749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：光受容部である複眼中央部から脳への投射形態と時計タンパク質を発現している細胞が示され、光周性の入力部から中枢への神経連絡網が示された。光周性の指標となる血リンパ中の幼若ホルモン濃度の測定は成功しなかった。一方、幼若ホルモンとは無関係に示される脂肪蓄積の光周性にも時計遺伝子が関与したことから、内分泌出力系ではなく光周性中枢で時計遺伝子が発現していることが示唆された。また、光周期に応じて発現量の異なる遺伝子を見出した。頭部を培養する方法を開発し、培養条件でのRNAiも可能になったため、中枢神経系をからだの他の部分から切り離して分子レベルで光周性を解析する段階に至った。

研究成果の概要(英文)：We clarified projection pathways from the central ommatidia of the compound eye, which are the photoreceptor for photoperiodism, to the brain and the cells in the cephalic ganglia expressing a clock protein. It was unsuccessful to measure the juvenile hormone titer as an index of photoperiodism. Clock genes were involved in the photoperiodic response of lipid accumulation, which is independent of juvenile hormone. Therefore, these genes do not seem to play a role in the endocrine effector system but in the center of photoperiodism. Genes of which the expression levels are related to the photoperiod were identified. Because we succeeded in culture of the head and RNAi in vitro, now it is possible to examine the molecular basis of the photoperiodism in the central nervous system apart from the other parts of the body.

研究分野：動物生理学

キーワード：昆虫 生理学 時間生物学 光周性 時計遺伝子 中枢神経系 幼若ホルモン

1. 研究開始当初の背景

(1) 昆虫の季節適応において、光周性の重要性は広く認識されている。光周性に概日時計が関わることは指摘されており、発育に直接影響するホルモンの研究も古くから行われてきたものの、中枢神経系内部で起こっている現象を細胞レベル、分子レベルで明らかにする研究は未完成である。

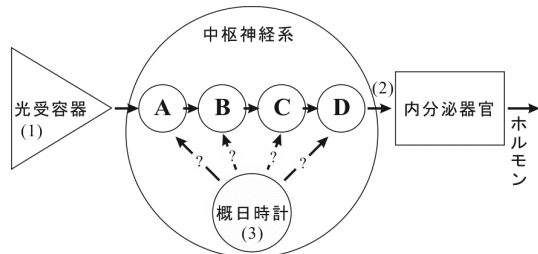


図1 昆虫の光周性機構の模式図

(2) ホソヘリカメムシの成虫休眠を制御する光周性機構については、研究代表者らによって、光受容器が複眼の中央部分の個眼であること(図1(1))、休眠時に脳がアラタ体からの幼若ホルモン(JH)分泌を神経経路で抑制していること(図1(2))が明らかになっていった。さらにアラタ体を支配し休眠を誘導・維持するために重要な脳側方部神経細胞、さらに複眼と脳側方部神経細胞の間に存在し光周性に必要と考えられる細胞を脳の微細な手術によって示し、光周性に関わる概日時計の実体として初めて *period(per)*、*cryptochrome*、*cycle*、*Clock(Clk)* という時計遺伝子が関係することを明らかにした(図1(3)、文献を参照)。

(3) しかし、中枢神経系内で起こっている日長測定から内分泌器官の制御に至る過程(図1A~D)の分子機構は明らかになっておらず、概日時計がそのうちのどれに関わるのかも不明である。さらに、時計遺伝子のもつ時計以外の機能でも説明できることが示唆され(文献)、別のカメムシでは消化管で発現する時計遺伝子が光周性に関係することが示されている(文献)。したがって、中枢神経系にある概日時計ではたらく時計遺伝子が光周性に関与すると完全には証明されていない。

(4) カメムシの幼若ホルモンの分子構造が明らかにされ(文献)、ホルモンを指標として光周性の研究が可能になった。

(5) こうして、ホソヘリカメムシの光周性において中枢神経系で起こるすべての過程を分子レベル、細胞レベルで明らかにする基盤が整った。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、ホソヘリカメムシの成

虫休眠を制御する光周性について、複眼における光情報の入力からアラタ体における内分泌系の駆動にいたるまで、中枢神経系内で起こる生理学的過程を細胞レベル、分子レベルで明らかにすることである。

(2) その研究成果は、1936年に提唱された「光周性機構に概日時計が関わる」というBünningの仮説を細胞・分子レベルで実証するだけでなく、昆虫の光周性を分子レベルで操作するための技術開発の基礎となり、昆虫の新規成長制御剤の開発、天敵昆虫の光周性の改変などにつながる事が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 光受容部からの神経経路および時計細胞の位置の特定

複眼中央部分からの色素注入により、光周性の光受容器が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。

色素拡散因子(Pigment-Dispersing Factor, PDF)あるいは時計タンパク質PERIOD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。

さらに、これらの脳領域の部分除去の光周性に対する影響を調べることによって光周性に関わる脳内の神経連絡を明確にする。

(2) JH濃度の測定

血リンパ中のJH濃度を測定する方法を確立する。その方法で、長日条件の非休眠成虫と短日条件の休眠成虫のJH濃度を、時間を追って比較し、さらに脳側方部ニューロンの除去がJH濃度に及ぼす影響を明らかにする。

(3) 脳培養系の確立とそこで示される光周性の解析

中枢における時計遺伝子の役割を調べるために、複眼とアラタ体が正常につながった状態からだから切り出した脳を短日および長日条件で培養し、培地に放出されるJH量あるいは発現の変化する遺伝子を明らかにすることによって、脳だけで示される光周性を見出す。

培養条件の脳だけで示される光周性に対して、時計遺伝子のRNAiを行い、それが有効であれば、脳内ではたらく時計遺伝子が光周性に関わることを証明できる。

(4) 脂肪蓄積の光周性の解析

これまでは、光周性の指標として卵巣発達に着目してきたが、概日時計遺伝子が光周性の中枢に関わることを示すために、JHの関与なしに示される脂肪量の光周性について、*per* 遺伝子および *Clk* 遺伝子のRNAiを行って、その効果を調べる。

(5) 時計遺伝子以外に光周性に関わる遺伝子の探索

短日に維持された成虫および短日から長日に移して成虫の脳（アラタ体、側心体を含む）から total RNA を抽出し、RNA シークエンスによるトランスクリプトーム解析を行う。これにより脳内で光周期によって発現が変動する遺伝子を突き止める。

それらの遺伝子の RNAi をからだ全体もしくはは頭部培養系において実施し、光周性における役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 光受容部からの神経経路および時計細胞の位置の特定

光周性の光受容部である複眼中央部から脳へ投射する神経経路を明らかにすることができた。複眼中央部から視髄中央部を經由して、2つの経路が脳の中央部へ、別の2つの経路が対側の視葉へと投射していた。さらに、視髄中央部を經由して脳へ至る神経経路のうち、posterior optic tract (POT 図2) の対側視葉への投射を詳細に調べたところ、これらの細胞体と細胞体周辺の神経繊維が PDF 免疫陽性ニューロンの細胞体と細胞体周辺の神経繊維と近い領域に分布していることがわかった。また、POT を切断すると、短日条件で卵巣を発達させる個体が増え、光周性が見られなくなった。

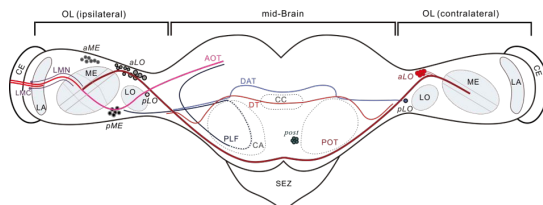


図2 左複眼 (CE) から脳、対側視葉への投射経路

時計タンパク質 PER の抗体に対する免疫染色を行った結果、脳の後方に強く染色される細胞と、視葉と食道下神経節に弱く染色される細胞が見つかった。ホソヘリカメムシの PER 免疫陽性細胞について抗体の特異性を検証した。一次抗体と抗原を吸着させた実験から、PER 免疫陽性細胞はホソヘリカメムシの PER タンパク質特異的に染色されていることが確認できた。

(2) JH 濃度の測定

チャバネアオカメムシとホソヘリカメムシにおいて血リンパ中の JH 濃度を液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) によって測定した。その結果、チャバネアオカメムシでは JH を検出することができたが、ホソヘリカメムシにおいては、100 μ L という大量の試料でのみ検出が可能で、実用的ではないため、血リンパ中の JH 濃度測定を光周性の研究に組み入れることを断念した。

(3) 脳培養系の確立とそこで示される光周性の解析

成虫の脳を複眼とアラタ体がつながった状態で切り出して培養することは困難であったため、頭部全体を培養する方法に切り替えた。頭部全体を培養する方法も当初はうまくいかなかったが、酸素供給が十分になるように気管を空気中に開口させるなど工夫した結果、10 日間培養後も、網膜電図 (ERG) によって複眼が正常に機能していることが明らかになった (図3)。しかし、培養時の条件によってカビが生えることが多かったため、培地の組成や抗生物質の添加量、消毒方法を工夫した結果、ようやく頭部の培養が軌道に乗った。

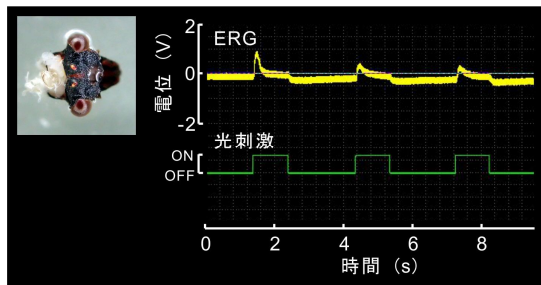


図3 培養中の頭部および10日後のERG

この頭部培養系において、短日および長日で7日間培養し JH のシグナル伝達系で重要なはたらきをする転写因子 *Krüppel-homolog 1* (*Kr-h1*) の mRNA 量を比較したが、両者の間に差はみられなかった。そして、JH 類縁物質である methoprene を培地に添加すると *Kr-h1* の mRNA 量が上昇したことから、および培養条件では幼若ホルモン合成酵素の遺伝子 *juvenile hormone acid methyltransferase* (*jhamt*) および *methyl farnesoate epoxidase* (*mfe*) の mRNA 量が非常に低かったことから、培養条件では JH が正常に合成されていない可能性が考えられる。

一方、培養条件で時計遺伝子 *Cik* の RNAi を行ったところ、*Cik* の発現が明瞭に抑制されたことから、培養条件で短日・長日間で差がみられるものを見つけさえすれば、光周性における時計遺伝子の役割を明らかにする実験は可能になった。

(4) 脂肪蓄積の光周性の解析

ホソヘリカメムシは短日では脂肪を蓄積するのに対し、長日では蓄積量が低いという光周性を幼若ホルモンの関与なしに示す。*per* 遺伝子の RNAi を行ったところ、短日条件でも脂肪の蓄積量は減少した。一方、*Cik* 遺伝子の RNAi を行ったところ、長日でも脂肪の蓄積量が増加した。このことはこれらの時計遺伝子からなる概日時計が、卵巣発達と脂肪量の両方を制御する光周性中枢に関わっていることを示す。幼若ホルモンの受容体の遺伝子 *Methoprene-tolerant* (*Met*) の RNAi を

行ったところ、長日でも短日のように卵巣発達が抑制されることがわかった。この結果は、長日での卵巣発達が JH シグナル伝達系を介していることを示している。一方、*Met* の RNAi を行っても脂肪蓄積の光周性には影響が見られなかった。短日で脂肪が蓄積する光周性は JH シグナル伝達系とは独立の経路で制御されていると考えられる (図 4)。

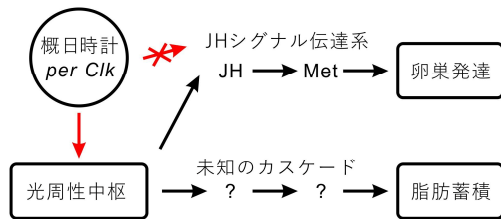


図 4 卵巣発達と脂肪蓄積の光周性の模式図

(5) 時計遺伝子以外に光周性に関わる遺伝子の探索

短日 1 日の試料を対照とし、各条件で発現が変動している遺伝子の同定を行った。その結果、対照に比べ有意に発現が増加または減少した 209 遺伝子が特定された。クラスター解析により特に長日に移した 5 日後の遺伝子発現は他の試料と大きく異なっていることが明らかになった (図 5)。光周期の変化に反応して発現が変わる遺伝子を同定するため、長日 5 日後にのみ発現が上昇していた 88 遺伝子についてさらに解析を行った。これらの遺伝子を blast 検索したところ、うち 66 遺伝子で機能が明らかになり、幼若ホルモンの合成や、それ以後に発現するシグナル遺伝子などが光周期に反応して発現が上昇する遺伝子として同定された。

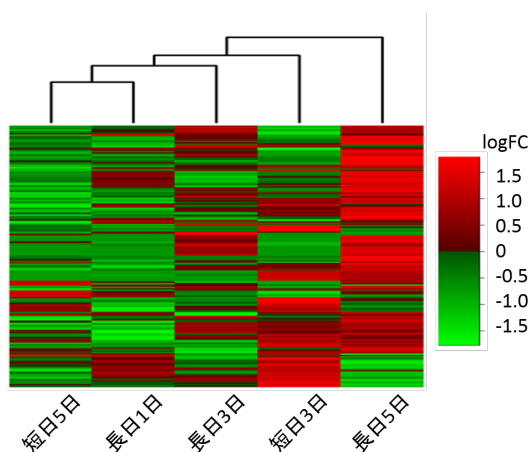


図 5 短日 1 日と比較し発現が変動していた 209 遺伝子の各条件における発現量の比較

これらの遺伝子の中から、*Kr-h1*、*Met*、*jhamt* について qPCR を用いてさらに解析を行った。その結果、*Kr-h1* の発現量が長日に移

してから 5 日後にすでに上昇しており、7 日後には差は著しくなっていることが明らかになった。

また、短日に維持されたものと長日に移したものの間で、*jhamt* の発現量に差はみられなかったが、*mfe* の発現量は後者において大きく上昇していた。したがって *mfe* が光周性の内分泌出力系の鍵となっている可能性が考えられる。また、JH 受容体の遺伝子 *met* および *Taiman(tai)* の発現量に関しては、上記の 2 条件間で差はみられなかった。

(6) 以上より、光周性における光受容部からの神経経路および時計細胞の位置が特定できた。しかし、血リンパ中の JH 濃度を測定することができなかったこと、頭部培養系において示される明瞭な光周性を見つけることができなかったために、中枢神経系ではたらく時計遺伝子が光周性に関わるという当初一番の目的にした結論が得られなかった。しかし、本研究において頭部培養系を確立したこと、培養系で RNAi が有効であることを考えると、近い将来証明できる可能性は高い。

< 引用文献 >

- Numata H *et al.* (2015) Common features in diverse insect clocks. *Zool Lett* **1**:10
 Bradshaw WE, Holzapfel CM (2010) Circadian clock genes, ovarian development and diapause. *BMC Biol* **8**:115
 Bajgar A *et al.* (2013) Autonomous regulation of the insect gut by circadian genes acting downstream of juvenile hormone signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**:4416-4421
 Kotaki T *et al.* (2009) Structure determination of a new juvenile hormone from a heteropteran insect. *Org Lett* **11**:5234-5237

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- Xi J, Toyoda I, Shiga S (2017) Afferent neural pathways from the photoperiodic receptor in the bean bug, *Riptortus pedestris*. *Cell Tissue Res* 査読有 **368**:469-485 DOI: 10.1007/s00441-016-2565-9
 Omura S, Numata H, Goto SG (2016) Circadian clock regulates photoperiodic responses governed by distinct output pathways in the bean bug, *Riptortus pedestris*. *Biol Rhythm Res* 査読有 **47**:937-945. DOI: 10.1080/09291016.2016.1212515
 Numata H, Miyazaki Y, Ikeno T (2015) Common features in diverse insect clocks. *Zool Lett* 査読有 **1**:10 DOI: 10.1186/s40851-014-0003-y
 Shimokawa K, Numata H, Shiga S (2014) Pars intercerebralis promotes oviposition in the bean bug *Riptortus pedestris* (Heteroptera:

Alydidae). *Appl Entomol Zool* 査読有
49:525-528 DOI: 10.1007/s13355-014-0281-z
Ikeno T, Numata H, Goto SG, Shiga S (2014)
Involvement of the brain region containing
pigment-dispersing factor-immunoreactive
neurons in the photoperiodic response of the
bean bug, *Riptortus pedestris*. *J Exp Biol* 査
読有 217:453-462 DOI: 10.1242/jeb.091801

[学会発表](計 16 件)

董笠・伊藤千紘・宇高寛子・沼田英治 ホソヘリカメムシにおける *Krüppel homolog 1* 遺伝子の発現と機能: 光周性に注目して 第 62 回日本応用動物昆虫学会大会 2018 年

宇高寛子・洲崎雄・沼田英治 ホソヘリカメムシにおける光周期の変化にตอบสนองする遺伝子の探索 第 61 回日本応用動物昆虫学会大会 2017

Goto SG, Numata H The role of the circadian clock in photoperiodism in the bean bug *Riptortus pedestris*. XXI International Congress of Entomology 2016

XiJili, Shiga S Input neuronal pathways for photoperiodism in the bean bug *Riptortus pedestris*. XXI International Congress of Entomology 2016

XiJili, Shiga S Effect of surgical severance of the posterior optic tract on photoperiodic response in the bean bug, *Riptortus pedestris*. 第 38 回日本比較生理生化学学会大会 2016

大村成樹・後藤慎介 ホソヘリカメムシの脂質量の光周性を制御する概日時計遺伝子 日本動物学会第 86 回大会 2015

Goto SG Molecular dissection of insect seasonality using RNAi: roles of the circadian clock genes. 9th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry 2015

XiJili・志賀向子 ホソヘリカメムシの光周性に関わる光受容器から脳への神経投射経路 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 2016

Goto SG, Shiga S, Numata H Roles of the circadian clock genes in photoperiodic regulation of diapause in the bean bug. 1st FAO/IAEA Research Coordination Meeting on Dormancy Management to Enable Mass-rearing and Increase Efficacy of Sterile Insects and Natural Enemies 2014

XiJili, Toyoda I, Numata H, Shiga S Neuronal pathways for photoperiodism in the bean bug *Riptortus pedestris*. Joint Meeting of the 11th International Congress of Neuroethology and the 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry 2014

Kotaki T, Shinada T, Numata H JHSB₃, the

juvenile hormone specific to stink bugs. 10th International Conference on Juvenile Hormones 2014

[図書](計 2 件)

Goto SG, Numata H (2014) Insect Photoperiodism. In: *Insect Molecular Biology and Ecology*. Hoffmann KH (ed) CRC Press, pp.211-238.

沼田英治(編) (2014) 昆虫の時計 分子から野外まで 北隆館 245pp

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)
大阪大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 90254383

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

(3) 連携研究者

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

小滝 豊美 (KOTAKI, Toyomi)
国立研究開発法人農業・食品産業記述総合
研究機構・主席研究員
研究者番号: 20391550

(4) 研究協力者

宇高 寛子 (UDAKA, Hiroko)
洲崎 雄 (SUZAKI, Yu)
伊藤 千紘 (ITO, Chihiro)
村松 伸樹 (MURAMATSU, Nobuki)
西吉利 (XiJili)
董 笠 (DONG, Li)
大村 成樹 (OMURA, Shigeki)