

**京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書**

平成30年4月9日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団
会 長 辻 井 昭 雄 様

所属部局 理学研究科

職 名 教授

氏 名 沼 田 英 治

助成の種類	平成29年度 ・ 研究活動推進助成			
研究課題名	昆虫光周性の分子機構の研究:概日時計遺伝子に注目して			
共同研究者	農学研究科・教授・大門高明 理学研究科・助教・宇高寛子			
発表学会文献等	池田健人・大門高明・沼田英治「 <i>period</i> 遺伝子をノックアウトしたカイコガの孵化リズムと羽化リズム」第23回日本時間生物学会学術大会(京都)2016年10月 董笠・宇高寛子・伊藤千紘・沼田英治「ホソヘリカメムシにおける <i>Krüppel homolog 1</i> 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(鹿児島)2018年3月			
成果の概要	「成果の概要／沼田英治」を添付いたします。			
会計報告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円		
	使用した助成金額	1,000,000 円		
	返納すべき助成金額	0 円		
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		消耗品費	155,131	
		旅 費	74,520	
		人件費・謝金	770,349	
当財団の助成について	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。)			

成果の概要／沼田英治

本研究は、複眼を光周性の光受容器とするホソヘリカメムシと、脳を光受容器とするカイコガを対象として、昆虫の光周性の分子機構を概日時計遺伝子に注目して解明することを目的とする。平成29年度には以下の研究を行った。

1. ホソヘリカメムシ

光周性の出力系においてはたらく幼若ホルモン (JH) に注目し、ホソヘリカメムシの JH 合成とシグナル伝達系に関わる5つの遺伝子の mRNA 発現量を、リアルタイム PCR を用いて長日と短日の間で比較した。JH 合成酵素 Juvenile hormone acid methyltransferase の遺伝子 *jhamt*、受容体 Methoprene-tolerant の遺伝子 *Met*、およびそれとヘテロ2量体を形成するタンパク質 Taiman の遺伝子 *tai* の発現量には条件間で差がみられなかったが、別の JH 合成酵素 Methyl farnesoate epoxidase の遺伝子 *mfe* と、シグナル伝達のより下流ではたらく転写因子 *Krüppel homolog 1 (Kr-h1)* は長日で発現量が有意に高くなった。そして、JH 類縁物質を塗布すると、短日でも卵巣発達と *Kr-h1* の発現が誘導された。しかし、*Kr-h1* の発現を RNA 干渉によって抑制しても、卵巣発達率は有意に低下しなかった。一方、概日時計遺伝子 *Clock (Clk)* を RNA 干渉によって抑制すると長日で卵巣発達が阻害されるとともに、*Kr-h1* の発現が短日と同程度に抑制された。

以上の結果から、他の数種の昆虫で報告されているように、ホソヘリカメムシにおいても *Kr-h1* は JH によって調節されているが、*Kr-h1* は卵巣発達にかかわらない可能性が考えられる。そして、*Clk* が光周性に関わっているのは *Kr-h1* の発現調節よりも上流であり、日長測定機構に関与する可能性が高いと考えられる。

また、体全体に対する RNA 干渉によって時計遺伝子の光周性への関与が示されてきたが、その結果が時計遺伝子の中枢神経系における機能にもとづくかどうかは明らかになっていなかった。そこで、成虫の頭部のみを切り出して培養し、培養条件が短日か長日かによって発現量の異なる遺伝子を見出し、頭部のみで完結する光周性を見出すことを目指した。各種条件を工夫して培養された頭部は7日以上生存した。しかし、非培養条件で短日と長日で発現量に明瞭な差がみられる遺伝子 *mfe* と *Kr-h1* において、いずれも発現量に有意な差はみられなかった。また、培養条件では長日でも *jhamt*、*mfe*、*Kr-h1* の発現量が非培養条件に比べてきわめて低かったことから、JH が正常に合成、分泌されていないと考えられる。一方、培養条件でも *Clk* を RNA 干渉によって発現抑制することができた。

2. カイコガ

光周性を示さない *pnd w-1* 系統において、TALEN を使って、概日時計遺伝子 *period (per)* のノックアウト系統を作製した。樹立したノックアウト系統では 64 bp の塩基欠失が起きていた。この欠失によって+2 のフレームシフトが起こったために途中に終始コドンが入り、翻訳された

タンパク質の長さは *pnd w-1* 系統では 1113 残基であるのに対し、ノックアウト系統では 198 残基であると推定された。これにより *per* の機能が失われたと見なし、その後の実験に用いた (*per* Δ 64 系統)。

羽化と孵化の概日リズムを、*pnd w-1* と *per* Δ 64 において調べた。その結果、*pnd w-1* では、明暗条件下で羽化は暗期中頃、孵化は点灯時刻付近でみられ、恒暗条件下では約 24 時間周期の自由継続リズムを示した。一方、*per* Δ 64 では、明暗条件下で羽化・孵化ともに点灯直後にみられたが、恒暗および恒明条件下では無周期になった。この結果から、カイコガにおいても他の昆虫と同様に *per* 遺伝子は行動の概日リズム形成に必須であることがわかった

3. 今後の見通し

ホソヘリカメムシにおいて、培養条件でこれまでに調べた以外の遺伝子の発現を調べて、培養条件の頭部のみで完結する光周性を見出す。そして、培養条件の頭部に対して RNA 干渉によって概日時計遺伝子の発現抑制を行い、頭部で概日時計遺伝子が光周性に参与していることを明らかにする。

カイコガでは、光周性をもつ系統で改めて *per* のノックアウト系統を作製し、この遺伝子の光周性に対する影響を調べる。

これらの結果から、ホソヘリカメムシとカイコガの光周性における概日時計遺伝子の役割を明らかにし、昆虫の光周性機構を包括的に理解したい。