



Title	ナミニクバエ幼虫における光周期情報伝達に関わる神経細胞の形態学的可塑性の研究
Author(s)	大江, 勇太郎
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105655
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

ナミクバエ幼虫における光周期情報伝達に関わる神経細胞の形態学
的可塑性の研究

**Study of morphological neural plasticity for photoperiodic signaling in
the flesh fly *Sarcophaga similis* larvae**

理学研究科

生物科学専攻

令和 7 年度

大江勇太郎

要旨

多くの生物は、日長（光周期）の変化を読み取って季節の到来を予測し、生理状態を切り替える光周性を有している（Saunders, 2020）。光周期は、温度や降水量と異なり、地球の軌道運動に由来するため年ごとの変動が少なく、特に温帯域に生息する動物にとって最も安定した季節指標である（Ikegami and Yoshimura, 2012）。光周性のメカニズムは「入力系（光受容機構）」「統合系（日長測定・日数計測機構）」「出力系（内分泌機構）」の三要素に分類される（Saunders, 2002）。脳内の概日時計は単なる概日リズムの駆動にとどまらず、光周性の統合系にも関わっており、日長の長短を識別していると考えられている（Saunders, 2020）。さらに、光周反応の出力機構に関する研究が進展し、脊椎動物から昆虫に至るまで、光周期という外部情報を概日時計を介してホルモンという内部信号へと変換する基本原理は、共通することが示されてきた（Ikegami & Yoshimura, 2012; Saunders, 2020）。これまで、遺伝子や分子レベルでの光周性メカニズムは研究されているが、脳の時計細胞を含む神経回路がどのようにして光周期情報を符号化しているかという点については分かっていない。それに挑むためには、脳の構造が単純な昆虫、中でも特に明瞭な光周性を示す種が適している。

ハエ目ニクバエ科のナミニクバエ *Sarcophaga similis* は、幼虫期に長日条件下で生育すると成虫へ発育するが、短日条件下で生育すると蛹休眠に入る。その光周反応の感受期はわずか5日間であり、本種の光周反応は光周性メカニズムを探る上で極めて敏感な系である（Denlinger, 1971; Tanaka et al., 2008）。本種では概日時計を基盤とした「外的符合モデル」が測時機構として適用可能であることが示唆されているが、その具体的な神経基盤や、光周期情報がどのように積算・統合されるのかについては分かっていない（Goto & Numata, 2009; Yamamoto et al., 2017）。本研究では、数日間の日長情報により光周性に関わりうる脳ニューロンがどのように変化するかを明らかにすることを目的とし、概日時計ニューロンと蛹休眠を制御する神経分泌細胞の形態学的接続に着目し、その接続を担う伝達物質の候補や、時計ニューロン神経末端形態に対する光周期の影響を解析した。

まず最初に、脳内の概日時計細胞と前胸腺（成虫発育のための脱皮ホルモンであるエクジステロイドを合成する内分泌器官）までの神経経路の特定を行った。概日時計細胞とその神経投射を調べるため、免疫組織化学染色により時計タン

パク質 PERIOD と概日時計細胞の伝達物質として知られる神経ペプチド色素拡散因子 (Pigment-Dispersing Factor; PDF) の局在を解析した結果、脳の各半球に 4 個の細胞で両者が共局在することを突き止めた (PDF lateral neurons; PDF-LN)。前胸腺を含む内分泌器官環状腺からの逆行性色素注入とシングルセル PCR 解析の結果、脳側方部 (pars lateralis; PL) から反対側の環状腺へ軸索を伸ばす 2 対の contralateral PL (PL-c) ニューロンが、前胸腺刺激ホルモン (*prothoracicotropic hormone; ptth*) 遺伝子を発現していることわかり、この PL-c が PTTH ニューロンであることが明らかとなった。

次にこれら PDF-LN と PTTH ニューロンの形態学的な連結を解析した。二重染色および三次元再構築の結果、PDF-LN 由来のバリコシティ (神経伝達物質の放出部位) を伴う神経線維が、前大脳背側において PTTH ニューロンの神経線維と接触していることが判明した。さらに、シングルセル PCR を用い、キイロショウジョウバエの概日時計細胞が分泌する神経伝達物質の受容体が PTTH ニューロンに発現するか調べた。その結果、PDF 受容体、グリシン受容体は発現せず、short neuropeptideF (sNPF) 受容体および抑制性グルタミン酸作動性塩化物イオンチャネルの遺伝子が発現していることがわかった。これより、ナミクバエにおいて PDF-LN あるいは別の時計細胞がこれらを介して PTTH ニューロンを制御している可能性が考えられる。

最後に、特定した神経経路が光周期の違いにより何を変化させているかを知るために、PDF-LN と PTTH ニューロンとの接続が見られた部位の形態を調べた。前大脳背側における PDF-LN 末端のバリコシティ数を、長日および短日条件下で 4 時間ごとに比較した結果、短日条件で飼育された幼虫は長日条件の個体よりも有意に多くのバリコシティを有していた。PDF-LN のバリコシティ数の違いは、PDF-LN とそれが連絡するニューロンとの間の接続強度の変化を示す可能性がある。

これらの結果から、光周期情報の違いおよび蓄積が、神経接続様式の変化という形で脳内で符号化されることが示唆された。

目録

1.総合序論	4
2.序論.....	8
3.材料および方法.....	12
3.1.昆虫.....	12
3.2.ヘマトキシリン・エオシン(H-E)染色	12
3.3.免疫組織化学.....	12
3.4.PDF に対する免疫組織化学と環状腺への逆行性色素注入の重染色	14
3.5.単一細胞逆転写ネステッド PCR.....	14
3.6.顕微鏡観察	15
3.7.PDF 免疫陽性バリコシティの計測	16
3.8.統計解析.....	16
4.結果.....	17
4.1.ナミクバエ幼虫の光周性応答.....	17
4.2.環状腺の内部構造.....	17
4.3.PDF 免疫陽性ニューロンと PL-c ニューロンの形態学的接続	17
4.4.PL-c ニューロンにおける遺伝子発現解析.....	18
4.5.長日および短日条件における PDF 免疫陽性バリコシティ数の比較.....	19
5.考察.....	20
5.1.ナミクバエ幼虫脳における PTTH および PDF-LN ニューロンの形態学的同定	20
5.2.PDF-LN および PTTH ニューロンを含む神経回路	21
5.3.PDF-LN における光周期依存の神経可塑性	23
6.結論、展望	26
7.引用文献	28
8.図表.....	37

1.総合序論

地球上の生命は、その誕生以来、太陽を中心とした周期的な地球の公転、自転の影響下で進化してきた。地球の自転は約 24 時間周期の昼夜の交替を生じさせ、これにより日内の光環境が周期的に変動する。一方で、地球の自転軸が傾き(約 23.4 度)をもって公転するため、太陽高度の季節的变化を引き起こし、年間を通じた昼夜の長さ、すなわち「光周期」を変化させる原因となっている。温度や降水量などの環境要因は年ごとに変動しやすいが、日長は地球の軌道力学に由来し、赤道付近を除くほとんどの地域において季節ごとに再現性高く変化するため、光周期は季節の最も信頼できる指標として機能する。そのため、多くの生物は光周期を季節の到来を予測するための外部からの時間情報として利用している(Rowan 1925; Dunlap et al. 2004)。このように、光周期の変化に応じて生物が形態・行動・生理状態を周期的に変化させる現象は「光周性」と呼ばれる。

光周性は「生物が昼夜の長さの変化を感知し、それに応じて季節的な生理的变化を現す性質」と定義される。植物においては開花、動物においては繁殖、渡り、冬眠、休眠など、さまざまな形でこの現象が観察されている(Garner & Allard, 1920; Baker & Ranson, 1932; Rowan, 1926)。これらの反応は単なる光刺激への応答ではなく、昼夜の相対的な長さを計測し、動物の場合これを「時間情報」として内部的に処理する高度な神経内分泌システムによって制御されていると考えられる。そして、光周性のメカニズムは「入力系(光受容機構)」「統合系(日長測定・日数計測機構)」「出力系(内分泌機構)」の三要素に分類され得る(Saunders, 2002)。光周性の生物学的意義は、季節変化に先立って生理状態や行動を季節に合わせた形に調節できる点であり、このような予測的な季節適応は、環境変化に対する受動的反応ではなく、時間情報に基づいた能動的制御機構である(Tauber et al., 1986; Saunders, 2013)。

光周性研究の始まりは、20 世紀初頭の植物生理学にさかのぼる。Garner と Allard (1920) は、タバコやダイズなどの植物が特定の昼夜条件下でのみ花芽を形成することを発見し、植物が「日長」を感知して開花時期を決定することを明らかにした。この研究は、光周性が生物の季節的適応機構として働くことを示す最初の証拠であり、「short-day plants(短日植物)」および「long-day plants(長日植物)」という概念を生み出した。その後、光周期が生物現象を制御するという概念は、次第に動物にも拡張された。イチゴネアブラムシ *Aphis forbesi* における生殖行動(Marcovitch, 1923, 1924) やユ

キヒメドリ *Junco hyemalis* における渡りと繁殖行動 (Rowan, 1926)、ハタネズミ *Microtus agrestis* における繁殖行動 (Baker & Ranson, 1932) などの光周期による季節的反応が確認され、光周性が植物のみならず動物にも広く存在する基本的な生理現象であることが明確になった。特に Rowan (1926) の研究は、人工的な光照射によって鳥の繁殖期を操作できることを示し、「光周期が生理的時計として機能する」という考えを広める契機となった。その後、Bünning (1936) は植物の光周反応において、概日時計が日長測定に関与しているという画期的な仮説を提唱した。彼は、光周反応が約 24 時間周期の内的リズムに依存することを示し、これが後に「Bünning 仮説」として知られるようになった。この仮説は、内的リズムを駆動する機構が昼夜の切り替わりに同調したうえで、生物が「どの時間帯に光刺激を受けたか」を認識し、そのタイミングに応じて生理的スイッチを切り替えるという考え方である。Bünning (1936) が提唱した仮説以来、光周性が日長を測定する際に内部の 24 時間周期リズムを利用するという考え方は、多数の実験的証拠によって支持され、光周反応の核心には、「概日時計」の存在があると考えられてきた。

概日時計は、生物が地球の自転周期に同調して活動・代謝・行動を調節するための基本的な時間計測システムであり、生物に広く保存されている。昆虫における概日時計の分子基盤は、*period* や *timeless* などの時計遺伝子群による転写・翻訳の負のフィードバックループによって構成されている (図 1; Saunders & Bertossa, 2011; Goto, 2013)。この時計システムは、単なる概日リズムの駆動にとどまらず、季節の変化を読み取る光周性の内部振動子として機能しており、昼夜サイクルに応じた概日時計の位相変化を通じて、日長の長短を識別している (Saunders, 2020)。光周的な時間計測において、概日時計がどのように日長を識別するかについては、主に 2 つの理論モデルが提唱されてきた。一つ目は、概日時計によって制御される特定の光感受期が、環境の明期と時間的に一致した際に長日反応が誘導され、暗期に留まった際に短日反応が誘導されるとする外的符号モデル (図 2; Pittendrigh & Minis, 1964; Saunders, 2020)。二つ目は、環境の「夜明け」と「日暮れ」にそれぞれ同調する複数の内部振動子の位相関係が、日長の変化に応じて変化し、その相互作用によって季節反応が決定されるとする内的符号モデルである (図 2; Tyshchenko, 1966; Goto, 2013) これらのモデルを裏付ける知見として、ホソヘリカメムシ *Riptortus pedestris* やキュウソヤドリコバチ *Nasonia vitripennis* において概日時計遺伝子が光周性に関与することが、RNA 干渉を用いた研究により報告されている (Ikeno et al., 2010; Mukai & Goto 2016)。

1970年代以降、神経内分泌学の進展により、光周反応の出力機構に関する研究が進展した。哺乳類においては、網膜で受容された光情報が中枢時計である視交叉上核を経て松果体に伝達されメラトニン分泌を制御している(Reiter, 1980; Ralph et al., 1990; Ikegami & Yoshimura, 2012)。メラトニンは夜間にのみ分泌されるため、その分泌持続時間が「夜の長さ」という時間情報を体内に伝達する直接的な内分泌信号として機能している(Ikegami & Yoshimura, 2012)。この時間情報は下垂体隆起部において甲状腺刺激ホルモンの変動へと変換され、脳内の甲状腺ホルモン活性を切り替えることで季節繁殖を制御する(Ikegami & Yoshimura, 2012)。一方、鳥類では、眼・松果体・視床下部のいずれにも光受容器と概日時計が存在し、複数の光受容・リズム発振系が連携して日長情報を処理する(Ikegami & Yoshimura, 2012)。昆虫における光周性研究は、20世紀後半に急速に発展した。昆虫の光受容系は極めて多様であり、種によって異なる戦略をとる。多くの種では複眼や幼虫の視覚器官である Bolwig 器官が光周期を受容するが、視覚器官を外科的に除去しても光周性を維持する種が存在する。例えば、ルリキンバエ *Protophormia terraenovae* や *A. forbesi*、アカイエカ *Culex pipiens* 等の多くの種において、脳内の細胞が直接光を受容する網膜外光受容器の関与が証明されている(Shiga, 2003; Saunders, 2020; Ikegami & Yoshimura, 2012)。さらに、カイコ *Bombyx mori* では脳内の神経分泌細胞において新規のオプシン(*boceropsin*)が同定されるなど、神経分泌細胞自体も光受容能力を備えていることが明らかになりつつある(Shiga & Numata, 2007)。このように、脊椎動物から昆虫に至るまで、光周期という外部情報を概日時計を介してホルモンという内部信号へと変換する基本原理は、多様な受容系や出力系を持ちながらも、高度に保存された戦略であると言える(Ikegami & Yoshimura, 2012; Saunders, 2020)。

近年、気候変動に伴う季節環境の変化は、光周性を基盤とした生物の季節適応戦略に新たな選択圧を与えている。地球温暖化の進行により、平均気温の上昇や季節の移行時期の変化が各地で観測されており(Parmesan, 2006)、これに応じて多くの動植物で発育、繁殖、渡り、休眠のタイミングが変化している(Bradshaw & Holzapfel, 2007)。しかし、光周期は地球の軌道力学に基づくため、温度や降水量と異なり気候変動によって変化しない。このため、季節適応機構を光周性に依存する生物では、温度や餌資源など他の季節信号との間に時間的不整合が生じる危険性が指摘されている(Parmesan, 2006)。こうした状況下で、光周性応答の進化的可塑性を理解すること

は、生物の適応的季節戦略の将来を予測する上で極めて重要である。特に昆虫は、短い世代周期を有するため、光周性の変化が比較的短期間で観察されやすいと予想される。しかし、光周期という時間情報が、どのようにして生理学的出力へと変換されるのか、その詳細な神経基盤は依然として不明な点が多い。生物が季節環境に適応する際、自然選択の標的となるのは、環境信号を読み取る「測時機構」と、それをホルモン分泌へと繋ぐ「出力回路」の接点であると考えられる。したがって、本研究では昆虫の光周性制御の中核をなす「概日時計ニューロンと神経分泌細胞の連結」に着目し、その連結強度の動的な変容が季節情報の符号化に果たす役割を解明することを目指した。

2.序論

環境シグナルがこの連結部を通じて生理学的な出力へと変換されるプロセスを、細胞レベルの解像度で詳細に追跡するためには、光周期に対して極めて敏感であり、かつ短期間で運命決定がなされるモデル系の選定が不可欠である。ハエ目ニクバエ科のナミニクバエ (*Sarcophaga similis*) は卵胎生であり、肉食動物の糞や動物死骸を発育・繁殖資源として利用する (Kurahashi, 1979)。ナミニクバエを含め、ニクバエ科は胚期および幼虫期にの短日条件で蛹休眠に入り、蛹期で発育を停止する (Denlinger, 1971; Tanaka et al., 2008)。しかし、ナミニクバエの場合、幼虫期にわずか 4~5 日間だけ長日条件に曝露すると、休眠運命は非休眠に転換される (Goto and Numata, 2009)。このように短期間の日長感受期で光周反応が成立する点で、ナミニクバエは光周性機構の研究に非常に有用なモデル生物である。例えば、光周性の分子神経機構の研究がおこなわれているホソヘリカメムシ (*R. pedestris*) では応答に 14 日を要することが知られており、ナミニクバエの光感受期はこれよりも 10 日ほど短い (Numata and Hidaka, 1982)。この感受期に、短日あるいは長日情報の積算に伴って、光周時計機構に参与する神経系に何らかの変化が生じていると考えられる。

また、ナミニクバエでは休眠決定の感受期が幼虫期に存在するため、成虫よりも構造の単純な幼虫脳を用いて神経機構を解析できる利点もある。例えば、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) では、幼虫脳に存在する時計細胞は 18 個であるのに対し、成虫では約 240 個に増加する (Kaneko et al., 1997; Helfrich-Förster, 2003; Reinhard et al., 2024)。シリアカニクバエ (*S. crassipalpis*) 及びナミニクバエの幼虫脳においても、キイロショウジョウバエ同様、少数の概日時計 PERIOD 免疫陽性細胞が報告されている (Kostál et al., 2009; Yamamoto et al., 2017)。さらに、ナミニクバエ幼虫をモデルとする利点として、蛹休眠の制御など光周性応答が外部符号モデルによって説明できることが挙げられる。これはセンチクバエ (*S. argyrostoma*) およびナミニクバエにおいて実証されている (Saunders, 1979; Goto and Numata, 2009)。ここでは、日長および夜長の識別は、概日時計の特定の位相 (光誘導相; photoinducible phase, ϕ_i) に光が存在するか否かに基づいて行われると考えられる。この位相は、光周期に同調した概日時計の主観的暗相後半に位置する (Pittendrigh and Minis, 1964)。センチクバエおよびナミニクバエの両種において、この光誘導相は暗期終盤の約 2 時間に生じることが報告されている (Saunders, 1979; Goto and Numata, 2009)。これらの知見は、両種の蛹休眠誘導における日長測定に概日時計が関与していることを強く支持して

いる。

昆虫の概日時計は、視葉および中枢脳に局在する一群のニューロンによって構成され、*period*、*timeless*、*clock*、*cycle* などの概日時計遺伝子を発現し、それらの転写・翻訳フィードバックループによって約 24 時間周期の内在リズムを生み出している(図 1; Saunders & Bertossa, 2011; Goto, 2013)。キイロショウジョウバエの成虫脳において Pigment Dispersing Factor(PDF)を発現する s-LNvs (small ventral lateral neurons) および l-LNvs (large ventral lateral neurons) と呼ばれる細胞群は、概日時計ネットワーク全体の位相を同期化し、行動リズムを制御する主要なペースメーカーとして機能している (Helfrich-Förster, 1997; Renn et al., 1999)。PDF は概日時計の主要な出力因子でもあり、時計情報を外部の神経・内分泌系へ中継する信号としても機能し、光周性の出力経路の一部を形成している(Shafer and Yao, 2014)。さらに、近年の研究により、PDF ニューロンが光周性反応にも直接関与することが示唆されている。例えば、ルリキンバエ *Protophormia terraenovae* では、s-LNv を含む領域の外科的除去が概日リズムとともに休眠誘導を阻害することが示されており(Shiga and Numata, 2009)、さらに PDF ニューロンが休眠誘導に不可欠な脳側方部 (pars lateralis; PL) ニューロンへ直接的な出力性化学シナプスを送っていることが免疫電子顕微鏡観察により明らかにされている (Hamanaka et al., 2005)。一方、ホソヘリカメムシ *Riptortus pedestris* においては、PDF ニューロンが存在する脳領域(副視髄周辺)が光周性反応に必要であることは示されているものの (Ikeno et al., 2014)、伝達物質としての PDF そのものの関与については否定的な結果が得られており、種によって出力シグナルの実体は異なる可能性がある (Hasebe et al., 2022)。実際に、*pdf* 遺伝子のノックダウンやノックアウトによる光周性応答の変化は、複数の昆虫種で報告されている。キイロショウジョウバエにおける生殖休眠の調節 (Nagy et al., 2019)、チャバネアオカメムシ *Plautia stali* における生殖の季節制御(Hasebe et al., 2022)、およびホシカメムシの一種 *Pyrrhocoris apterus* における臨界日長の短縮(Kotwica-Rolinska et al., 2022)など、PDF が光周期情報の統合や伝達において核心的な役割を担っていることが確認されている。つまり、PDF ニューロンは概日時計ネットワークの一部でありながら、光周性における統合系としての機能が考えられる。

昆虫の光周反応は、受容した光周期情報を光周時計で測時し、内分泌系の切り替えを行う一連のプロセスで構成されるが、蛹休眠はこの出力系において発育プログラムを一時的に停止させる適応戦略として位置づけられる (Denlinger, 2022)。この情報の統合から生理学的応答への変換において、内分泌系の主要な因子である PTTH が決定的な役割を担う。PTTH は脳の神経分泌細胞から放出され、前胸腺を刺激してエクジステロイドの合成と分泌を促進する作用を持つ (Mizoguchi et al., 1990; Smith and Rybczynski, 2012)。前胸腺におけるエクジステロイド合成は、PTTH 受容体である Torso を介して MAPK 経路を活性化することにより制御されている (Rewitz et al., 2009)。短日条件下では、脳からの PTTH 分泌が減少または停止し、その結果として前胸腺におけるエクジステロイド合成が抑制される。これにより血中エクジステロイド濃度が低下し、発育が停止して蛹休眠へと導入される (Denlinger, 2002)。一方、長日条件下では PTTH 分泌が維持され、エクジステロイド合成が継続することで正常な発育・羽化が促進される。多くのチョウ目昆虫において、休眠蛹の血リンパ中のエクジステロイド濃度は非休眠蛹に比べて著しく低いことが知られている (Bowen et al., 1984; Denlinger et al., 1997; Mizoguchi et al., 2013)。また、センチクバエにおいても、非休眠蛹では成虫発育に伴ってエクジステロイド濃度が上昇するのに対し、休眠蛹では低いレベルに維持される (Richard et al., 1987)。興味深いことに、休眠運命の個体では、蛹化前の幼虫期においてすでにエクジステロイド濃度の軽微な減少が観察されており、休眠プログラムが終齢幼虫期から開始されていることが示唆されている (Richard et al., 1987; Mizoguchi et al., 2013)。さらに、多くの種において PTTH 力価の上昇はエクジステロイドの上昇に先行して起こる (O'Brien et al., 1988; Kawakami et al., 1990)。たとえばヨトウガ *Mamestra brassicae* では、休眠蛹で PTTH が検出限界以下に減少するが、蛹化直後に PTTH を注入することで成虫発生が誘導される。このことは、PTTH の欠如が蛹休眠誘導にとって必要かつ十分な条件であることを示している (Mizoguchi et al., 2013)。

概日時計を担う PDF ニューロンと内分泌細胞 PTTH ニューロンの間に機能的関係が存在することが解剖学的・分子的に支持されつつある。キイロショウジョウバエでは、PDF ニューロンが PTTH ニューロンの樹状突起近傍まで神経線維を伸ばしている (McBrayer et al., 2007)。ナミクバエ幼虫において、PERIOD 免疫陽性を示す側方神経細胞群 (lateral neurons: LNs) および背側神経細胞群 (dorsal neurons: DN) が同

定されている(Yamamoto et al., 2017)。PER 免疫反応性は概日リズムに従って変化するが、長日条件および短日条件下では LNs においてのみ観察され、PERIOD 免疫陽性 LNs が時間測定に関与する時計細胞として機能していることが示唆される(Yamamoto et al., 2017)。さらに、ナミクバエ幼虫では、4 対の PDF 免疫陽性ニューロンも同定されている(Hirata & Shiga, 2023)。しかし、PERIOD と PDF が同じニューロンで共発現しているかどうかは不明である。加えて、PTTH ニューロンはこの種ではまだ同定されておらず、LNs との解剖学的関係も明らかになっていない。また、キイロショウジョウバエでは、PDF ニューロンの末端線維は概日リズムに応じた形態可塑性を示す(Fernández et al., 2008, 2020)。ナミクバエの LNs においても、光周期が形態変化を誘導する可能性がある。短日条件や長日条件下での日長情報の蓄積は、線維の複雑性や量の差として反映される可能性がある。光周性応答の弱いキイロショウジョウバエでは、光周期や温度などの季節的手がかりが s-LN_v 背側終末部における PDF 免疫活性の強度変化として評価されている。冬期様の低温条件下では、PDF 免疫活性が低下する(Hidalgo et al., 2023)。これに対し、光周性応答を示すクバエ類では、LNs が季節変化に応じた光周的可塑性を示す可能性がある。

本研究では、ナミクバエ幼虫を用いて免疫組織化学、逆行性色素注入、および単一細胞 PCR を用いて、PDF および PERIOD 免疫陽性の概日時計ニューロン、ならびに PTTH ニューロンを同定した。さらに、二重免疫染色および逆行性色素注入を組み合わせ、PDF/PERIOD 陽性ニューロン(PDF-LNs)と PTTH 発現ニューロンとの形態学的関係を解析した。加えて、電気生理学的手法を用いて PTTH ニューロンが受け取る神経伝達物質を探索した。最後に、短日および長日条件下における PDF-LNs 終末線維の形態可塑性を比較し、概日時計ニューロン—PTTH ニューロン軸が日長情報をどのように統合して光周反応を形成するかを明らかにすることを目的とした。

3.材料および方法

3.1.昆虫

本研究には、2018 年から 2021 年にかけて大阪大学豊中キャンパス(北緯 34.80°, 東経 135.45°)において採集した成虫由来のナミ尼克バエの累代飼育系統を使用した。すべての飼育および実験は、 $20 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ の恒温条件下で行った。長日条件(16 時間明期/8 時間暗期)下で羽化した雄および雌成虫を、羽化当日に短日条件(12 時間明期/12 時間暗期)へ移し、水、砂糖、および鶏肝片を与えた。照明には白色蛍光灯($4.4\text{--}7.7\text{ W m}^{-2}$, FL15W, NEC ライティング株式会社、東京)あるいは白色 LED ランプ($5.3\text{--}7.5\text{ W m}^{-2}$, LT-N300N-YS, 株式会社オーム電機、東京)のいずれかの光源を使用した羽化後 14 日目に幼虫を産仔させるために雌成虫に鶏肝片を再度供与した。産下された幼虫は、産仔翌日(Day 1)に新たな鶏肝片上に移し、長日または短日条件下で飼育した。幼虫は産仔後 5 日目(Day 5)に摂食を停止し、三齢期(終齢)でワンダリングに入り餌から離れた。蛹化後 10 日目に休眠か日休眠状態かを判定した。頭部の蛹殻を除去し、複眼の着色に基づいて休眠・非休眠蛹を識別した。複眼部に赤色が観察された蛹を非休眠蛹、赤色が認められない蛹を休眠蛹とした(Fraenkel and Hsiao, 1968)。なお、ヘマトキシリン・エオシン染色、PDF および PER の二重免疫組織化学、PDF 免疫組織化学とバックフィルの二重標識には、 20°C の長日条件下で飼育した雌成虫が産出した Day 5 幼虫を用いた。

3.2.ヘマトキシリン・エオシン(H-E)染色

幼虫の中枢神経系(脳および胸腹部神経節を含む)を採取し、ブアン固定液で室温($23\text{--}28^{\circ}\text{C}$)にて 24 時間固定した。固定後、70 %エタノールで 3 回(各 10 分)洗浄し、エタノール系列で脱水を行った後、パラフィン包埋した。包埋ブロックは厚さ $8\text{ }\mu\text{m}$ に薄切し、脱パラフィン処理後、Mayer ヘマトキシリン溶液(サクラファインテックジャパン株式会社、東京)に 5 分間(室温)浸漬した。その後、水道水および蒸留水で洗浄し、エオシン溶液(サクラファインテックジャパン株式会社)に 3 分間(室温)浸漬した。蒸留水で再洗浄後、エタノール系列で脱水し、キシレンで封入した。

3.3.免疫組織化学

中枢神経系は、Zeitgeber Time (ZT) 0–2 (ZT0 = 明期開始時)に摘出した。摘出した中枢神経系は、4%パラホルムアルデヒド溶液で 4°C にて約 10 時間固定した。固定後、

0.5%の Triton X-100 を加えた 0.1 M リン酸緩衝生理塩溶液(phosphate-buffered saline containing 0.5% Triton X-100; PBST, pH 7.4)で洗浄した。次に、非特異的抗体結合を防ぐため、5% 正常ロバ血清 (normal donkey serum; NDS, IHR-8135, ImmunoBioScience, USA)を含む PBST 中で室温 3 時間インキュベートしブロッキング操作を行った。一次抗体反応として、ヤギ抗 PERIOD 抗体 (1:100, sc-398462, Santa Cruz Biotechnology, USA) およびウサギ抗 PDF 抗体 (1:5000, RRID:AB_2916037, Dr. Tomioka より供与)を 5% NDS 含有 PBST 中に希釈し、4℃にて 8 日間反応させた。一次抗体反応後、PBST で 3 日間洗浄した。続いて、5% NDS 中で 1 時間 (RT) 処理後、ビオチン化ロバ抗ヤギ IgG 抗体 (1:200, 705-067-003, Jackson ImmunoResearch, USA)を 4℃で 4 日間反応させた。洗浄後、アビジン-ビオチン複合体法により PER シグナルを増強した (PK-4000, Vector Laboratories, USA; 4℃・3 日間)。その後、ストレプトアビジン結合 Alexa Fluor 647 (1:200, S21374, Thermo Fisher Scientific, USA) および TRITC 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (1:200, A-16028, Invitrogen, USA)を 4℃で一晩反応させた。反応後、組織を PBST で 3 回洗浄し、エタノール系列で脱水した後、サリチル酸メチルで透化处理した。PDF 免疫陽性神経終末の数を測定するため、Day 5 ZT12 から Day 6 ZT8 まで、4 時間間隔で中枢神経系を採取した (長日および短日条件下)。暗期の解剖は赤色 LED 光源 (M-BL-E26-7W-660 nm, MS-system, 宇都宮; 約 390 lx) 下で行った。各時点で、長日および短日条件下から各幼虫 5 例から中枢神経系を同時に摘出した (ZT12, ZT16, ZT20, ZT24 [Day 5], ZT4, ZT8 [Day 6])。摘出した CNS は 4% パラホルムアルデヒドで室温 4 時間固定した。暗期中の操作および固定はいずれも暗黒下で行った。固定後、組織を 0.1 M PBST で洗浄し、使用まで 4℃で保存した。Day 5 ZT12 から Day 6 ZT8 までに採取した全試料 (N = 60) は、ブロッキングから最終染色工程まで同一条件で同時処理した。まず 5% NDS で 1 時間ブロックし、次にマウス抗 PDF 抗体 (1:100, RRID:AB_760350, PDF C7, DSHB, USA) とともに 4℃で 3 日間インキュベートした。一次抗体反応後、PBST で洗浄し、最終洗浄液中で 4℃にて一晩保存した。次に、室温で 1 時間洗浄後、5% NDS で再ブロック (室温・1 時間) し、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1:200, A11001, Thermo Fisher Scientific)を 5% NDS 含有 PBST 中で 4℃にて 2 日間反応させた。反応後、PBST で 3 回洗浄し、エタノール系列で脱水後、サリチル酸メチルで透化处理した。

3.4.PDF に対する免疫組織化学と環状腺への逆行性色素注入の重染色

ハエ幼虫の内分泌器官として知られている環状腺を遠位端から約 1/3 の位置で眼科用ハサミにより切断し、切断端から 20 mM Neurobiotin 溶液 (SP-1120, Vector Laboratories) をガラスピペットにより片側のみに注入した。この標識により、反対側の contralateral pars lateralis (PL-c) ニューロンおよび同側の ipsilateral pars lateralis (PL-i) ニューロンが標識された。ガラスピペットはハウケイ酸ガラス管 (GD-1.5; 株式会社ナリシゲ, 東京) を用い、マイクロピペットプラー (P-97; Sutter Instruments, USA) で作製した。逆行性色素注入は室温で 2~3 時間実施した。逆行性色素注入後、中枢神経系を幼虫から取り出し、4% PFA で一晩固定し、0.1 M PBST で 3 回洗浄した。その後、マウス抗 PDF 抗体 (1:100, RRID:AB_760350, PDF C7, DSHB) で 4 °C・3 日間反応させた。次に、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1:200, A11001, Thermo Fisher Scientific) およびアビジン-ビオチン複合体 (PK-4000, Vector Laboratories) で 4 °C・1 日間反応し、続いてストレプトアビジン結合 Alexa Fluor 647 (1:200, S21374, Thermo Fisher Scientific) で 4 °C・一晩反応させた。反応後、エタノール系列で脱水し、サリチル酸メチルで透化処理した。

3.5.単一細胞逆転写ネステッド PCR

単一細胞逆転写ネステッド PCR は、Hasebe and Shiga (2021a) に記載された手法に基づいて実施した。まず、Alexa Fluor 488 標識デキストラン (D34682, Thermo Fisher Scientific) を用いて、PL-c ニューロンを室温で 2~3 時間、逆行性色素注入により標識した。細胞採取用ピペットは、ハウケイ酸ガラス管 (GD-1.5, 株式会社ナリシゲ) を用い、Flaming/Brown 型マイクロピペットプラー (P-97, Sutter Instruments, USA) で作製した。標識された Alexa Fluor 488 陽性細胞は、ZT6~ZT8 の時間帯に正立顕微鏡 (ECLIPSE FN1, Nikon, 東京) およびデジタル CMOS カメラ (ORCA-spark C11440-36U, 浜松ホトニクス株式会社, 静岡) を用いて観察・単離した (東京大学, 長谷部政治講師による)。単離した単一細胞は、FastGene™ Scriptase II cDNA Synthesis 5x ReadyMix (NIPPON Genetics, 東京) 4 µL と滅菌純水 16 µL を混合した反応液中に入れ、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を用いて逆転写 PCR を行い、cDNA を合成した。PCR 反応液は、鋳型 cDNA 1 µL, KAPATaq Extra Hot Start ReadyMix with dye (12.5 µL, Kapa Biosystems-Roche, スイス), 20 µM プライマー各 0.25 µL, 純水 11 µL で調製した。一次および二次 PCR のサイクル条件は、

95°Cで3分間の初期変性の後、変性(95°C・30秒)、アニーリング(48°C・30秒)、伸長(72°C・40秒)からなる工程を35サイクル繰り返すものとした一次PCRでは逆転写反応液1 µLを鋳型cDNAとして使用し、二次PCRでは一次PCR産物1 µLを鋳型DNAとして用いた。ネステッドPCR後、1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。電気泳動は、MARINE23ST(富士フイルム和光純薬株式会社、大阪)を用いて実施し、50 bp DNA Ladder(NE-MWD50, Nippon Genetics)によりPCR産物の長さを推定した。ゲルはMidori Green Advance 溶液(NE-MG04, Nippon Genetics)で60分以上染色した。PCR産物のバンド像は、ゲル撮影装置 AE-6932GXCF および CCD カメラコントローラ AE-6905CF(ATTO, 東京)を用いて撮影し、ビデオグラフィックプリンタ UP-897MD(SONY, 東京)で印刷した。標的遺伝子配列の同定は、tBLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=tblastn>) および ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)を用いて行った。検索には、ショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)のアミノ酸配列をクエリとし、ナミニクバエのコンティグリストを対象とした(表2)。また、Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>)を使用して、一次および二次逆転写ネステッドPCR用プライマーセットを作成した(表3)。

3.6.顕微鏡観察

蛍光画像の取得は、共焦点レーザー走査型顕微鏡 LSM 710 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)を使用して行った。対物レンズは、EC Plan-Neofluar 20×/0.50 M27 および Plan-Apochromat 63×/1.4 oil DIC M27 (Carl Zeiss)を使用した。蛍光物質の励起にあたっては、Alexa Fluor 488 および TRITC に対してはアルゴンレーザー(488 nm)を、Alexa Fluor 647 に対しては赤色 HeNe レーザー(633 nm)をそれぞれ使用した。蛍光検出波長は、Alexa Fluor 488:523 nm, TRITC:562 nm, Alexa Fluor 647:697 nm に設定した。得られた光学断層像は、画像解析ソフトウェア Zen 3.5 (Carl Zeiss)を用いて再構築した。また、三次元再構築は、Amira 2019(Thermo Fisher Scientific)を用いて行い、2種類の神経細胞の二重標識線維を手動でセグメンテーションした。生成された表面モデルおよびその投影図を用いて、3D 構造の可視化・解析を行った。

3.7.PDF 免疫陽性バリコシティの計測

PDF 免疫反応性バリコシティの数は、ImageJ ソフトウェア (Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) のマルチポイントツールを用いて解析した。まず、観察者が各標本の ZT および光周期条件を認識しないように、顕微鏡画像にランダムな識別名を付与した。観察者は各標本スライスにおいてバリコシティを数えた。同一のバリコシティを重複して数えることを防ぐため、カウント済みのバリコシティには番号付きドットで印を付した。各標本について 2 回の計測を行い、1 回目と 2 回目の結果の差が 1 回目の数の 10% 以上であった場合には、3 回目の計測を実施した。3 回目の結果が 1 回目との差が 10% 未満、または 2 回目との差が 10% 未満のいずれかを満たした場合、その時点で計測を終了した。最終的に、差が 10% 以内の 2 回の計測値の平均値をその標本の採用値とした。この手法により、4 回目のカウントは必要としなかった。

3.8.統計解析

休眠率の比較には、Excel 統計 ver.7 (エスミ株式会社, 東京) を使い、Tukey の多重比較検定 (比率の比較) を実施した。バリコシティ数の比較には、Excel 統計 ver.7 を用いて二元配置分散分析 (two-way ANOVA) および Holm 補正を伴う Student の t 検定を実施した。有意水準は $P = 0.05$ とした。

4.結果

4.1.ナミクバエ幼虫の光周性応答

本ハエ系統が示す光周性感受性を検証するため、SD 条件で飼育した幼虫を六つのグループに分け、産仔後 0～5 日の間に限ってそれぞれを LD 条件に曝露した(図 3)。幼虫を全期間にわたり SD 条件下で飼育した場合、209 個体中 92.8%が蛹休眠に入った。一方で、産仔後 2 日以上 LD 条件に曝露した群では休眠率が有意に低下した。特に、産仔後 4 日間 LD 条件に移した群では、休眠率は 35.6%(N=135)にまで減少した。また、産仔後 5 日間 LD 条件に曝露した幼虫では、休眠は完全に回避された。これらの結果から、ナミクバエ幼虫は産仔後の初期数日間に光周性情報を取り込み、その後の休眠決定に反映させていることが示唆された。

4.2.環状腺の内部構造

前胸腺領域を支配する神経細胞の特徴を明らかにするため、前胸腺を含むと考えられる環状腺のパラフィン切片を用いて組織学的観察を行った。環状腺の中央部から末端部にかけては 2 種類の細胞が確認された。環状腺の末端に近い領域は淡いマゼンタ色に染色され(図 4a)、この領域に含まれる細胞の大きさは約 15 μm であった。一方、これらの細胞の外側に位置する細胞はより大きく、濃い青色に染色され、その直径は約 25 μm であった(図 4b)。Enya ら(2014)の報告に従い、淡いマゼンタ色を呈する細胞群をアラタ体細胞、それらの外側に位置する領域の細胞を前胸腺細胞として同定した(図 4c)。

4.3.PDF 免疫陽性ニューロンと PL-c ニューロンの形態学的接続

前胸腺に投射する神経細胞と PDF 免疫陽性ニューロンとの解剖学的関係を明らかにするため、環状腺遠位端の約 1/3 の位置から脳へ向けてニューロビオチンを流入させ、前胸腺およびアラタ体領域へ投射する神経細胞を標識したのちに、PDF に対する免疫組織化学を行った(図 5c)。環状腺からの片側の逆行性注入により、脳の側方領域(pars lateralis: PL)には 2 つの細胞群が存在することが明らかとなった(図 5a)。前胸腺と同側の PL に 6 個の細胞(ipsilateral PL: PL-i, 図 5a1)、反対側の PL に 2 個の細胞(contralateral PL: PL-c, 図 5a2)が観察された。PL-c ニューロンは、細胞体から伸びる軸索に沿って微細な側枝を持っていた(図 5a2)。

一方、脳の側方領域 LNs における PDF 免疫陽性ニューロン(PDF-LN ニューロン)は、先行研究の報告どおり(Hirata and Shiga, 2023)、各脳半球に 4 個存在し、背側かつ脳の中央方向へ線維を伸ばして前大脳領域へ投射していた(図 5a)。PDF 免疫陽性のバリコシティは、PL-i および PL-c ニューロンの微細な神経突起分布域に近接して観察された(図 5a1, a2)。

さらに、PDF 陽性ニューロンの神経線維と PL-c ニューロンの神経線維を三次元的に再構築した結果(図 5b1, b2)、複数の PDF 免疫陽性のバリコシティが PL-c ニューロンの線維と重なって存在することが確認された(図 5b2 の青色点)。これらの結果は、PDF-LN ニューロンが PL-c ニューロンと形態学的に密接な関係を有することを示唆している。

PERIOD および PDF に対する抗体を用いた二重免疫組織化学の結果、4 個の PDF 免疫陽性細胞(PDF-LN)のすべてが PERIOD 抗体によっても標識された。一方で、1 個の細胞は PERIOD のみ免疫陽性であった(図 5c)。この共局在は 3 個の脳サンプルで確認された。これらの結果から、PDF 免疫陽性ニューロンはすべて PERIOD を含み、前胸腺領域へ投射する PL-c ニューロンの神経突起のごく近傍に線維を伸ばしていることが示された。

4.4.PL-c ニューロンにおける遺伝子発現解析

キイロショウジョウバエ幼虫脳では、脳から反対側の前胸腺に交差的に投射する 2 組の神経細胞群が *ptth* を発現することが知られている(McBrayer et al., 2007)。そこで、本研究ではナミクバエ幼虫脳における 2 組の PL-c ニューロンで *ptth* を含む遺伝子の発現を調べた。13 個体の幼虫から各脳あたり 1~2 個の PL-c 細胞を採取し(合計 20 細胞、長日飼育幼虫から 8 細胞、短日飼育幼虫から 12 細胞)、単一細胞逆転写 PCR を行った。20 細胞のうち 19 細胞(95%)は陽性対照として用いたリボソームタンパク質 L32(*rpl32*)を明確に発現していた。*ptth* は長日飼育幼虫の 8 細胞すべて、短日飼育幼虫の 12 細胞中 10 細胞で発現していた(図 6、全体の 90%)。これらの結果から、2 つの PL-c ニューロンはいずれも *ptth* 発現ニューロンであることが示唆された。

PDF、short-neuropeptide F (sNPF)、グリシンはキイロショウジョウバエの PDF-LN から放出される神経伝達物質であり、グルタミン酸は DN1 の一部である DN1 から放出される (King and Sehgal, 2020)。次に、これらの神経伝達物質が PL-c ニューロンにシグナル伝達できるかを調べるため、それらの受容体遺伝子の発現を調べた。ネステッド PCR では、目的とする第 2 PCR 産物サイズ (437 bp) をもつ PDF 受容体の転写産物が短日飼育幼虫の PL-c 細胞 2 個で検出され、長日飼育幼虫からは検出されなかった (全体の 10%)。第 2 バンドを伴わない第 1 PCR 産物 (521 bp) がいくつかの細胞で見られたが、これは予期しないプライマー結合部位による非特異的な増幅と考え、陰性と判断した。

sNPF 受容体の転写産物は 長日飼育幼虫の PL-c 細胞 8 個中 5 個、短日飼育幼虫の 12 個中 4 個で検出された (全体の 45%)。一方、グリシン受容体を発現する細胞はなかった。抑制性グルタミン酸受容体であるグルタミン酸作動性塩化物イオンチャネル (*gluCl*) は長日飼育幼虫の PL-c 細胞 8 個中 7 個、短日飼育幼虫の 12 個中 8 個で発現していた (図 6、全体の 75%)。以上の結果から、*ptth* を発現する PL-c ニューロンは主に *gluCl* を発現し、一部の細胞は sNPF 受容体を発現する可能性が示唆された。受容体発現には長日飼育と短日飼育の幼虫間で差は見られなかった。

4.5. 長日および短日条件における PDF 免疫陽性バリコシティ数の比較

PDF 免疫陽性ニューロンに光周期による違いが存在するかどうかを明らかにするため、Day5~6 の 6 つの時点 (ZT=12, 16, 20, 0, 4, 8) において、長日飼育幼虫と 短日飼育幼虫の各脳半球あたりの前大脳領域に存在する PDF 免疫陽性バリコシティ数を比較した (図 7)。二元配置分散分析の結果、時間経過がバリコシティ数に与える有意な影響は認められなかった (表 4, 二元配置分散分析, $P = 0.12$)。しかし、光周期の違いにより有意な差が認められた (表 4, 二元配置分散分析, $P = 2.79 \times 10^{-15}$)。さらに、光周期と ZT の間に交互作用が検出されたため (二元配置分散分析, $P = 1.69 \times 10^{-3}$)、各時間帯において光周期条件間でバリコシティ数を比較した。その結果、ZT0 を除くすべての時点で、短日飼育幼虫のバリコシティ数は 長日飼育幼虫よりも有意に高かった (Student の *t* 検定、Holm 補正, $P < 0.05$)。

5. 考察

5.1. ナミニクバエ幼虫脳における PTTH および PDF-LN ニューロンの形態学的同定

キイロショウジョウバエおよびルリキンバエの幼虫の環状腺では、アラタ体は遠位端に位置し、その周囲を前胸腺細胞が取り囲んでいることが知られている (Meurant and Sernia 1993; Siegmund and Korge 2001; Hamanaka et al. 2009; Enya et al. 2014)。ナミニクバエにおいても、アラタ体とその周囲の細胞との間に同様の組織学的特徴が観察され、この周囲の細胞は前胸腺細胞であると考えられる。本研究で前胸腺領域から片側からの逆行性標識を行ったところ、2 個の PL-c ニューロンと 6 個の PL-i ニューロンが標識された。これらの投射パターンはシリアカニクバエで報告されているものと一致する (Giebultowicz and Denlinger 1985)。さらに、ナミニクバエの PL-c 細胞において *ptth* の発現が確認された。

キイロショウジョウバエの幼虫では、LP-PGs と呼ばれる 2 個の PTTH ニューロンが脳の各半球に存在し、対側性に前胸腺を支配している (Siegmund and Korge 2001; McBrayer et al. 2007)。これらのことから、ナミニクバエの PL-c ニューロン 2 対が対側性に前胸腺へ投射していることは、これらが PTTH ニューロンであることを示唆する。タバコスズメガにおいても、各半球に 2 個の PTTH ニューロンが存在し、対側性投射を行うことが知られている (Agui et al. 1980; O'Brien et al. 1988)。したがって、このニューロン数および投射パターンは、ガおよびハエ類で共通しているようである。

免疫組織化学の結果、PERIOD 陽性 LN が 5 個確認され、これは先行研究 (Yamamoto et al. 2017) と一致していた。本研究では、これらのうち 4 個が PDF 免疫陽性であることが示された。キイロショウジョウバエでは、幼虫期の 4 対の PDF ニューロンが成虫脳の *period* 発現 s-LNv へと発生分化する (Helfrich-Förster 1995, 1997)。一方、PDF 陰性の第 5 LN は成虫の第 5 LN に発達し、その神経線維の分布は s-LNv よりも背側の LN に類似する (Helfrich-Förster et al. 2007; Schubert et al. 2018)。本研究では、PDF および PERIOD 陽性の 4 個の LN を PDF-LN と同定し、PDF 陰性 PERIOD7 陽性の 1 個の細胞をナミニクバエ幼虫脳における第 5 LN とした。

さらに本研究では、ナミニクバエにおいて PDF-LN 由来のバリコシティを持つ神経線維が、PL-c ニューロン (PTTH ニューロン) の樹状突起の近傍に投射することを明ら

かにした。共焦点画像の 3 次元再構築により、PDF 免疫陽性のバリコシティを含む神経線維と PL-c ニューロン (PTTH ニューロン) の神経線維が前大脳領域内で形態学的接触を持つことが示された (図 5b)。

キイロショウジョウバエ幼虫では、PDF ニューロンから背側へ投射する神経線維が長くわずかに湾曲した領域を形成し、これは PTTH ニューロンの軸索の走行に沿っている (Siegmund and Korge 2001; McBrayer et al. 2007)。さらに、シナプスパートナー間で緑色蛍光タンパク質を再構成する GRASP 法により、キイロショウジョウバエ幼虫の PDF ニューロンと PTTH ニューロンがシナプス結合を形成することが示されているが、幼虫期における伝達物質はまだ特定されていない (Gong et al. 2010; Yamanaka et al. 2013)。これらの知見は、ナミクバエにおいても PDF-LN から PTTH ニューロンへの直接的なシグナル伝達が起こる可能性を示唆している。

5.2. PDF-LN および PTTH ニューロンを含む神経回路

次に、PDF-LN から PTTH ニューロンへの伝達物質候補を探索した。キイロショウジョウバエの幼虫では、4 つの LN が PDF を含み (Kaneko et al. 1997)、そのうち 2 つの LN が sNPF を共発現する (Johard et al. 2009)。成虫の s-LN_v ではグリシンが分泌されることが知られているが (Frenkel et al. 2017)、幼虫の時計細胞ではまだ詳細に調べられていない。そこでまず、PDF、sNPF、グリシンをナミクバエにおいて PDF-LN から PTTH ニューロンへの候補伝達物質とし、PTTH 細胞におけるそれらの受容体発現を調べた。PL-c (PTTH) 細胞ではグリシン受容体遺伝子の発現は見られなかった。しかし、sNPF 受容体と PDF 受容体遺伝子の発現がそれぞれ 45%、10% の PL-c 細胞で観察された。これには 2 つの可能性がある。1 つ目は、細胞採取時に PL-c 細胞と一緒に隣接細胞が回収され、そこで発現が検出された可能性。2 つ目は、PL-c 細胞内で実際に発現しているが、発現量が低いため一部の細胞で検出されなかった可能性がある。ナミクバエ幼虫の PTTH ニューロンにおける電気生理学的解析から、PDF ペプチドによる自発活動の瞬間周波数にも発火数にも有意な影響は認められなかった一方で、sNPF は自発発火活動を有意かつ急速に抑制した (Ohe et al., 2025)。これらより PDF 受容体に関しては隣接細胞と一緒に回収した可能性、sNPF 受容体に関しては発現量が低く検出限界を下回る細胞があった可能性が高いと考えられる。キイロショウジョウバエのファレート成虫では、PTTH ニューロンは sNPF に応答するが PDF に

は応答しない(Selcho et al. 2017)。最近では、キイロショウジョウバエの PTTH ニューロンは sNPF 受容体を発現するが、PDF 受容体は発現しないことも示された(Cavieres-Lepe et al. 2024)。本研究にの結果もこれを支持しているが、ナミクバエの蛹化後における内分泌調節の解析によれば、長日個体では *sNPF* と *Ptth* が同期して発現上昇することが明らかとなっている (Yoshinaga and Goto, 2025)。この知見に基づけば、sNPF の役割は単なる抑制シグナルだけではない可能性が高いため、sNPF 産生細胞の同定を起点とした、多角的かつ統合的な回路解析が不可欠である。

また、PTTH ニューロンに影響を与える可能性のある伝達物質としてグルタミン酸についても調べた。キイロショウジョウバエ幼虫では、グルタミン酸は LN ではなく DN1 に存在するが(Hamasaka et al. 2007; Daniels et al. 2008)、ナミクバエ幼虫では PTTH 細胞の大部分がグルタミン酸作動性塩化物イオンチャネルを発現していた。さらに、PTTH ニューロンの自発活動がグルタミン酸によって急性的に抑制された(Ohe et al., 2025)。これらの結果は、グルタミン酸がナミクバエ幼虫の PTTH ニューロンを直接抑制することを示す。一部の PTTH ニューロンではグルタミン酸作動性塩化物イオンチャネルの発現が見られず、発現が一定でない可能性がある。キイロショウジョウバエと同様に、DNs がグルタミン酸を産生する場合、DNs が PTTH ニューロンを直接抑制している可能性がある。また、ナミクバエにおいては PDF-LN がグルタミン酸を産生している可能性も残されている。

キイロショウジョウバエ幼虫では、PTTH ニューロンは PDF を発現する LN とシナプス結合し、脱皮時刻の調節に加えて光回避行動の調節にも関わっている(Gong et al. 2010; Yamanaka et al. 2013)。光回避行動は1齢から3齢中期幼虫で見られ、その後、徘徊幼虫が蛹化のために餌から離れるタイミングで消失する(Sawin-McCormack et al. 1995)。PTTH は光回避行動において、Bolwig 器官のような受容体下流のシグナル伝達成分に影響を与えられている(Yamanaka et al. 2013)。光回避行動の神経回路では LN や DN の関与も示されているが、LN は必須ではない(Mazzoni et al. 2005; Keene et al. 2011; Collin et al. 2012)。幼虫の DN1 はグルタミン酸を含み、グルタミン酸作動性塩化物イオンチャネルを介して LN を抑制し、このグルタミン酸シグナルは光回避行動を抑制することが示唆されている(Hamasaka et al. 2007; Collin et al. 2012)。

キイロショウジョウバエ幼虫での解剖学的・機能的解析から、DN、LN、PTTH ニューロンが神経回路を形成し、脱皮を行うための「時間(発育制御)」および「場所(光回避)」を決定していると考えられている(Yamanaka et al. 2013)。本研究では、グルタミン酸作動性塩化物イオンチャネルを介したグルタミン酸による PTTH ニューロンの抑制および sNPF による抑制、さらに PDF-LN と PTTH ニューロンの形態学的接触を確認した。ナミクバエ幼虫におけるグルタミン酸産生ニューロンの正体は不明であるが、グルタミン酸および sNPF が LN または DN から放出され、光回避を制御するために PTTH ニューロンを抑制している可能性がある。同時に、PDF-LN、DN、PTTH ニューロンを含む回路が、光周期に応じて休眠・非休眠蛹の発育時期を制御している可能性がある。今後、ナミクバエ幼虫で PTTH ニューロンと接続するグルタミン酸作動性細胞および sNPF 細胞の同定が必要である。

5.3.PDF-LN における光周期依存の神経可塑性

キイロショウジョウバエ成虫の s-LNv は構造的可塑性を示し、2 つの異なる方法により、軸索樹状構造の複雑性が夜間よりも朝に高くなることが示されている(Fernández et al. 2008; Petsakou et al. 2015)。s-LNv の神経終末の日内の構造的可塑性は概日時計の維持には必須ではないが、温度変動への同調には必要であり、s-LNv 終末の日内変化は時計ネットワークの感覚信号に対する感受性を変化させる可能性がある(Fernández et al. 2020)。

キイロショウジョウバエ幼虫では PDF ニューロンの形態学的可塑性も報告されている。PDF ニューロンの樹状突起の総延長は日内変動を示さないが、光周期による違いを示し(Yuan et al. 2011)、恒暗および短日条件下では、恒明および長日条件下よりも長くなり、Bolwig 器官を介した光に対する PDF ニューロンの応答が強くなる(Yuan et al. 2011)。Yuan ら(2011)は、光曝露が樹状突起部位を変化させ、Bolwig 器官を介した PDF ニューロンの光感受性を調節し、これが季節変化への適応を促進する可能性を示唆した。

本研究でも、季節的な蛹休眠制御反応が明瞭なナミクバエにおいて、PDF 免疫陽性バリコシティ数の光周期差という形で PDF-LN の光周期依存的变化を観察した。

キイロショウジョウバエの PDF-LN の樹状突起 (Yuan et al. 2011) とナミクバエの PDF 免疫陽性バリコシティは、いずれも短日条件下で形態的增加を示した。ナミクバエ幼虫では、Bolwig 器官からの神経終末が PDF-LN の樹状突起領域の近くに位置する (Hirata and Shiga, 2023)。Bolwig 器官は光周期情報を伝え、PDF-LN の神経終末の PDF 含量を変化させ、それを介して PTTH—内分泌経路に間接的に影響し、蛹休眠の光周期的制御に寄与する可能性がある。Yamamoto ら (2017) はナミクバエの LN における PERIOD 免疫陽性細胞の光周期差を示しており、これは PDF-LN のバリコシティの変化と関連する可能性がある。

PDF 免疫陽性ニューロンの光周期的可塑性はマデイラゴキブリ *Leucophaea maderae* でも報告され、長日条件で視葉の PDF 免疫陽性細胞の数が増加し、その神経繊維が伸長することが示された (Wei and Stengl 2011)。これは、概日時計系の回路安定性を維持しつつ、時計ニューロンが光周期的修飾能力を持つ必要性を示している。

神経終末におけるバリコシティは、シナプス伝達における伝達物質放出部位であると同時に、非シナプス性のペプチド放出 (ボリューム伝達) の部位でもある (Agnati et al. 1995)。キイロショウジョウバエでは、電子顕微鏡および膨張顕微鏡により、背側前大脳の s-LNv 終末のバリコシティには、ボリューム伝達のための大きな高電子密度小胞、シナプス伝達のための多数の小型小胞、さらに後シナプス構造が含まれることが示され、s-LNv の背側終末が入力および出力部位として機能することが明らかになった (Yasuyama and Meinertzhagen 2010; Shafer et al. 2022)。また、sLNv からの PDF 放出はシナプス前アクティブゾーンに依存せず、PDF がボリューム伝達で放出される可能性が強く示唆されている (Hofbauer et al. 2024)。

ナミクバエにおける PDF 免疫陽性バリコシティ数の違いは、PDF-LN の構造変化を伴わない PDF 含量の違い、あるいは PDF-LN 繊維の構造的違いのいずれかを示唆する。これらを区別することはできないが、PDF 免疫陽性バリコシティ数の違いは、PDF-LN とそのシナプス前細胞またはシナプス後細胞間の接続強度の変化を示す可能性がある。また、PDF 免疫陽性バリコシティには、sNPF やグルタミン酸などの PTTH ニューロンへ直接シグナルを送る他の伝達物質が含まれ、短日と長日条件の間で異

なる伝達を行っている可能性がある。時計ニューロンとPTTHニューロンが蛹休眠を制御する光周反応において重要であることを考えると、PTTHニューロンの神経繊維の近くに位置するPDF免疫陽性バリオシティの光周期依存の可塑性は、ナミクバエ幼虫における光周性機構に関与する可能性がある。今後、時計ニューロン—PTTHニューロン回路が蛹休眠の光周期制御で果たす機能的意義を明らかにする必要がある。

6. 結論、展望

本研究では、ナミクバエ幼虫をモデルとして、季節適応を司る光周性メカニズムの神経基盤を、解剖学的、分子生物学的な観点から多角的に検討した。その結果、概日時計細胞から発育制御の中枢である内分泌系への具体的な神経経路を特定するとともに、光周期情報が神経細胞の形態的な変化として脳内に記録される可能性を示した。

本研究により、幼虫の脳内において、免疫組織化学により概日時計タンパク質 PERIOD と神経ペプチド PDF が共局在する 4 対の PDF-LN を特定した。さらに、逆行性色素注入とシングルセル PCR の結果から前胸腺を制御し発育を決定する PTTH を産生する 2 対の PL-c ニューロンを同定した。三次元再構築を用いた解析により、PDF-LN の軸索末端が PTTH ニューロンの樹状突起近傍に投射し、物理的な接触を形成していることを証明した。そして、PTTH ニューロンは概日時計細胞が持つとされる神経伝達物質の受容体、sNPF 受容体および抑制性グルタミン酸作動性イオンチャネル (GluCl) を発現していることが判明し、sNPF およびグルタミン酸が PTTH ニューロンの自発的な発火活動を抑制することを示唆した。

本研究の最も重要な発見は、光周期に応じた神経細胞の形態変化である。休眠を誘導する短日条件下の幼虫では、長日条件下と比較して、PDF 免疫陽性のバリコシティの数が増加することを見出した。このバリコシティの増加は、光周期という外部環境情報の蓄積が、脳内で神経接続の様式の変化という物理的な形に変換されている、すなわち「季節情報の符号化」を反映していると考えられる。

本研究は、ニクバエの光周性を説明する理論的枠組みである「外的符号モデル」に対し、概日時計細胞と内分泌系における神経細胞の形態学的可塑性という物理的な裏付けを示した。また、この「時計細胞による内分泌系の抑制」という方法は、ショウジョウバエや哺乳類とも共通する時間情報伝達の普遍的な基盤であることが示唆された (Ikegami & Yoshimura, 2012; Selcho et al. 2017)。今後は、PDF ニューロンのバリコシティの増減がいかなる分子メカニズムによって制御され、また日数を数える過程でどのように累積していくのかを解明することが次の重要な課題となる。本研究で得られた知見により、今後生物がいかにして光周期から季節を読み取るのかという問題に迫ることが期待される。

7.謝辞

本研究の遂行にあたり、終始温かいご指導と有益なご助言を賜りました大阪大学の志賀向子教授、濱中良隆講師、東京大学の長谷部政治講師、ならびに大阪公立大学の後藤慎介教授に、心より深く感謝申し上げます。また、本論文の審査にあたり、精読していただいた上で貴重なご助言を賜りました大阪大学の古屋秀隆教授ならびに進藤麻子教授に、厚く御礼申し上げます。最後に、日々の研究活動を通じて有意義な議論と多大なるサポートをいただきました大阪大学比較神経生物学研究室の皆様、に、深く感謝の意を表します。

7.引用文献

- Agnati LF, Zoli M, Strömberg I, Fuxe K (1995) Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. *Neuroscience* 69:711–726.
- Agui N, Bollenbacher WE, Granger NA, Gilbert LI (1980) Corpus allatum is release site for insect prothoracicotropic hormone. *Nature* 285:669–670.
- Baker JR, Ranson RM (1932) Factors affecting the Breeding of the Field Mouse (*Microtus agrestis*). Part II.—Temperature and Food. *Proc. R. Soc. Lond. B* 112:39-46.
- Bowen MF, Bollenbacher WE, Gilbert LI (1984) In vitro studies on the role of the brain and prothoracic glands in the pupal diapause of *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 108:9–24.
- Bradshaw WE, Holzapfel CM (2007) Evolution of animal photoperiodism. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38:1–25.
- Bünning E (1936) Die endogene Tagesrhythmik als Grundlage der Photoperiodischen Reaktion. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 54:590–607.
- Cavieres-Lepe J, Amini E, Zabel M, Nässel DR, Stanewsky R, Wegener C, Ewer J (2024) Timed receptor tyrosine kinase signaling couples the central and a peripheral circadian clock in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 121:e2308067121.
- Collins B, Kane EA, Reeves DC, Akabas MH, Blau J (2012) Balance of activity between LN(v)s and glutamatergic dorsal clock neurons promotes robust circadian rhythms in *Drosophila*. *Neuron* 74:706–718.
- Daniels RW, Gelfand MV, Collins CA, DiAntonio A (2008) Visualizing glutamatergic cell bodies and synapses in *Drosophila* larval and adult CNS. *J. Comp. Neurol.* 508:131–152.
- Denlinger DL (1971) Embryonic determination of pupal diapause induction in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *J. Insect Physiol.* 17:1815–1822.
- Denlinger DL, Valaitis AP, Lee K (1997) Further evidence that diapause in the gypsy moth, *Lymantria dispar*, is regulated by ecdysteroids: a comparison of diapause and nondiapause strains. *J. Insect Physiol.* 43:897–903.
- Denlinger DL (2002) Regulation of diapause. *Annu. Rev. Entomol.* 47:93–122.
- Denlinger DL (2022) *Insect diapause*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ (2004) *Chronobiology—Biological timekeeping*. Sinauer, Massachusetts.
- Enya S, Ameku T, Igarashi F, Iga M, Kataoka H, Shinoda T, Niwa R (2014) A Halloween gene *noppera-bo* encodes a glutathione S-transferase essential for ecdysteroid biosynthesis via regulating the behaviour of cholesterol in *Drosophila*. *Sci. Rep.* 4:6586.
- Fernández MP, Berni J, Ceriani MF (2008) Circadian remodeling of neuronal circuits involved in rhythmic behavior. *PLoS Biol.* 6:e69.
- Fernández MP, Pettibone HL, Bogart JT, Roell CJ, Davey CE, Pranevicius A, Huynh KV, Lennox SM, Kostadinov BS, Shafer OT (2020) Sites of circadian clock neuron plasticity mediate sensory integration and entrainment. *Curr. Biol.* 30:2225–2237.e5.
- Fraenkel G, Hsiao C (1968) Morphological and endocrinological aspects of pupal diapause in a flesh fly, *Sarcophaga argyrostoma* and *S. bullata*. *J. Insect Physiol.* 14:689–705.
- Frenkel L, Muraro NI, González ANB, Marcora MS, Bernabó G, Hermann-Luibl C, Romero JJ, Helfrich-Förster C, Castaño EM, Marino-Busjle C, Calvo DJ, Ceriani MF (2017) Organization of circadian behavior relies on glycinergic transmission. *Cell Rep.* 19:72–85.
- Garner WW, Allard HA (1920) Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *J. Agric. Res.* 18:553–606.
- Giebultowicz JM, Denlinger DL (1985) Identification of neurons innervating the ring gland of the flesh fly larva, *Sarcophaga crassipalis* Macquart (Diptera: Sarcophagidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 14:155–161.
- Gong Z, Liu J, Guo C, Zhou Y, Teng Y, Liu L (2010) Two pairs of neurons in the central brain control *Drosophila* innate light preference. *Science* 330:499–502.
- Goto SG, Numata H (2009) Possible involvement of distinct photoreceptors in the photoperiodic induction of diapause in the flesh fly *Sarcophaga similis*. *J. Insect Physiol.* 55:401–407.
- Goto SG (2013) Roles of circadian clock genes in insect photoperiodism. *Entomol. Sci.* 16:1–16.

- Hamanaka Y, Yasuyama K, Numata H, Shiga S (2005) Synaptic connections between pigment-dispersing factor-immunoreactive neurons and neurons in the pars lateralis of the blow fly *Protophormia terraenovae*. *J. Comp. Neurol.* 491:390–399.
- Hamanaka Y, Tanaka S, Numata H, Shiga S (2009) Morphological characterization of neurons projecting to the ring gland in the larval blow fly, *Protophormia terraenovae*. *Zool. Sci.* 26:227–237.
- Hamasaka Y, Rieger D, Parmentier M-L, Grau Y, Helfrich-Förster C, Nässel DR (2007) Glutamate and its metabotropic receptor in *Drosophila* clock neuron circuits. *J. Comp. Neurol.* 505:32–45.
- Hasebe M, Shiga S (2021) Oviposition-promoting pars intercerebralis neurons show period-dependent photoperiodic changes in their firing activity in the bean bug. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 118:e2018823118.
- Hasebe M, Kotaki T, Shiga S (2022) Pigment-dispersing factor is involved in photoperiodic control of reproduction in the brown-winged green bug, *Plautia stali*. *J. Insect Physiol.* 137:104359.
- Helfrich-Förster C (1995) The period clock gene is expressed in central nervous system neurons which also produce a neuropeptide that reveals the projections of circadian pacemaker cells within the brain of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:612–616.
- Helfrich-Förster C (1997) Development of pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* 380:335–354.
- Helfrich-Förster C (2003) The neuroarchitecture of the circadian clock in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Microsc. Res. Tech.* 62:94–102.
- Helfrich-Förster C, Yoshii T, Wülbeck C, Grieshaber E, Rieger D, Bachleitner W, Cusumano P, Rouyer F (2007) The lateral and dorsal neurons of *Drosophila melanogaster*: new insights about their morphology and function. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 72:517–525.
- Hidalgo S, Anguiano M, Tabuloc CA, Chiu JC (2023) Seasonal cues act through the circadian clock and pigment-dispersing factor to control EYES ABSENT and downstream physiological changes. *Curr. Biol.* 33:675–687.e5.

- Hirata K, Shiga S (2023) Bolwig organ and its role in the photoperiodic response of *Sarcophaga similis* larvae. *Insects* 14:115.
- Hofbauer B, Zandawala M, Reinhard N, Rieger D, Werner C, Evers JF, Wegener C (2024) The neuropeptide pigment-dispersing factor signals independently of Bruchpilot-labelled active zones in daily remodelled terminals of *Drosophila* clock neurons. *Eur. J. Neurosci.* 59:2665–2685.
- Ikegami K, Yoshimura T (2012) Circadian clocks and the measurement of daylength in seasonal reproduction. *Mol. Cell. Endocrinol.* 349:76–81.
- Ikeno T, Tanaka SI, Numata H, Goto SG (2010) Photoperiodic diapause under the control of circadian clock genes in an insect. *BMC Biol.* 8:116.
- Ikeno T, Numata H, Goto S, 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.* 217:453–462.
- Johard HA, Yoshii T, Dircksen H, Cusumano P, Rouyer F, Helfrich-Förster C, Nässel DR (2009) Peptidergic clock neurons in *Drosophila*: ion transport peptide and short neuropeptide F in subsets of dorsal and ventral lateral neurons. *J. Comp. Neurol.* 516:59–73.
- Kaneko M, Helfrich-Förster C, Hall JC (1997) Spatial and temporal expression of the *period* and *timeless* genes in the developing nervous system of *Drosophila*: Newly identified pacemaker candidates and novel features of clock gene product cycling. *J. Neurosci.* 17:6745–6760.
- Kawakami A, Kataoka H, Oka T, Mizoguchi A, Kimura-Kawakami M, Adachi T, Iwami M, Nagasawa H, Suzuki A, Ishizaki H (1990) Molecular cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone. *Science* 247:1333–1335.
- Keene AC, Mazzoni EO, Zhen J, Younger MA, Yamaguchi S, Blau J, Desplan C, Sprecher SG (2011) Distinct visual pathways mediate *Drosophila* larval light avoidance and circadian clock entrainment. *J. Neurosci.* 31:6527–6534.
- King AN, Sehgal A (2020) Molecular and circuit mechanisms mediating circadian clock output in the *Drosophila* brain. *Eur. J. Neurosci.* 51:268–281.

- Košťál V, Závodská R, Denlinger D (2009) Clock genes *period* and *timeless* are rhythmically expressed in brains of newly hatched, photosensitive larvae of the fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *J. Insect Physiol.* 55:408–414.
- Kotwica-Rolinska J, Damulewicz M, Chodakova L, Kristofova L, Dolezel D (2022) Pigment dispersing factor is a circadian clock output and regulates photoperiodic response in the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*. *Front. Physiol.* 13:884–909.
- Kurahashi H, Ohtaki T (1979) Induction of pupal diapause and photoperiodic sensitivity during early development of *Sarcophaga peregrina* larvae. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 32:77–82.
- Marcovitch S (1923) Plant lice and light exposure. *Science* 58:537–538.
- Marcovitch S (1924) The migration of the Aphididae and the appearance of sexual forms as affected by the relative length of daily light exposure. *J. Agric. Res.* 27:513–522.
- Mazzoni EO, Desplan C, Blau J (2005) Circadian pacemaker neurons transmit and modulate visual information to control a rapid behavioral response. *Neuron* 45:293–300.
- McBrayer Z, Ono H, Shimell M, Parvy JP, Beckstead RB, Warren JT, Thummel CS, Dauphin-Villemant C, Gilbert LI, O'Connor MB (2007) Prothoracicotrophic hormone regulates developmental timing and body size in *Drosophila*. *Dev. Cell* 13:857–871.
- Meurant K, Sernia C (1993) The ultrastructure of the prothoracic gland/corpus allatum/corpus cardiacum ring complex of the Australian sheep blowfly larva *Lucilia cuprina* (Wied.) (Insecta: Diptera). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23:47–55.
- Mizoguchi A, Oka T, Kataoka H, Nagasawa H, Suzuki A, Ishizaki H (1990) Immunohistochemical localization of prothoracicotrophic hormone-producing neurosecretory cells in the brain of *Bombyx mori*. *Dev. Growth Differ.* 32:591–598.
- Mizoguchi A, Ohsumi S, Kobayashi K, Okamoto N, Yamada N, Tateishi K, Fujimoto Y, Kataoka H (2013) Prothoracicotrophic hormone acts as a neuroendocrine switch between pupal diapause and adult development. *PLoS ONE* 8:e60824.
- Mukai A, Goto SG (2016) The clock gene *period* is essential for the photoperiodic response in the jewel wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Appl. Entomol. Zool.* 51:185–194.

- Nagy D, Cusumano P, Andreatta G, Anduaga AM, Hermann-Luibl C, Reinhard N, Gesto J, Wegener C, Mazzotta G, Rosato E, Kyriacou C, Helfrich-Förster C, Costa R (2019) Peptidergic signaling from clock neurons regulates reproductive dormancy in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 15:e1008158.
- Numata H, Hidaka T (1982) Photoperiodic control of adult diapause in the bean bug, *Riptortus clavatus* Thunberg (Heteroptera: Coreidae). I. Reversible induction and termination of diapause. *Appl. Entomol. Zool.* 17:530–538.
- O’Brien MA, Katahira EJ, Flanagan TR, Arnold LW, Haughton G, Bollenbacher WE (1988) A monoclonal antibody to the insect prothoracicotropic hormone. *J. Neurosci.* 8:3247–3257.
- Ohe Y, Hasebe M, Hamanaka Y, Goto SG, Shiga S (2025) Photoperiodic plasticity of pigment-dispersing factor immunoreactive fibers projecting toward prothoracicotropic hormone neurons in flesh fly *Sarcophaga similis* larvae. *J. Comp. Physiol. A* 211, 261–276.
- Petsakou A, Sapsis TP, Blau J (2015) Circadian rhythms in Rho1 activity regulate neuronal plasticity and network hierarchy. *Cell* 162:823–835.
- Pittendrigh CS, Minis DH (1964) The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. *Am. Nat.* 98:261–294.
- Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247:975–978.
- Reinhard N, Fukuda A, Manoli G, Derksen E, Saito A, Möller G, Sekiguchi M, Rieger D, Helfrich-Förster C, Yoshii T, Zandawala M (2024) Synaptic connectome of the *Drosophila* circadian clock. *Nat. Commun.* 15:10392.
- Reiter RJ (1980) The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr. Rev.* 1:109–131.
- Rewitz KF, Yamanaka N, Gilbert LI, O’Connor MB (2009) The insect neuropeptide PTTH activates receptor tyrosine kinase torso to initiate metamorphosis. *Science* 326:1403–1405.
- Richard DS, Warren JT, Saunders DS, Gilbert LI (1987) Haemolymph ecdysteroid titres in diapause- and non-diapause-destined larvae and pupae of *Sarcophaga argyrostoma*. *J. Insect Physiol.* 33:115–122.

- Rowan W (1925) Relation of light to bird migration and developmental changes. *Nature* 115:494–495.
- Rowan W (1926) On photoperiodism, reproductive periodicity, and the annual migration of birds and certain fishes. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.* 38:147–189.
- Saunders DS (1979) External coincidence and the photoinducible phase in the *Sarcophaga* photoperiodic clock. *J. Comp. Physiol. A* 132:179–189.
- Saunders DS (2002) *Insect Clocks*. 3rd ed. Elsevier, Amsterdam.
- Saunders DS (2013) Insect photoperiodism: measuring the night. *J. Insect Physiol.* 59:1–10.
- Saunders DS (2020) Dormancy, diapause, and the role of the circadian system in insect photoperiodism. *Annu. Rev. Entomol.* 65:373–389.
- Saunders DS, Bertossa RC (2011) Deciphering time measurement: the role of circadian ‘clock’ genes and formal experimentation in insect photoperiodism. *J. Insect Physiol.* 57:557–566.
- Sawin-McCormack EP, Sokolowski MB, Campos AR (1995) Characterization and genetic analysis of *Drosophila melanogaster* photobehavior during larval development. *J. Neurogenet.* 10:119–135.
- Schubert FK, Hagedorn N, Yoshii T, Helfrich-Förster C, Rieger D (2018) Neuroanatomical details of the lateral neurons of *Drosophila melanogaster* support their functional role in the circadian system. *J. Comp. Neurol.* 526:1209–1231.
- Selcho M, Millán C, Palacios-Muñoz A, Ruf F, Ubillo L, Chen J, Bergmann G, Ito C, Silva V, Wegener C, Ewer J (2017) Central and peripheral clocks are coupled by a neuropeptide pathway in *Drosophila*. *Nat. Commun.* 8:15563.
- Shafer OT, Yao Z (2014) Pigment-dispersing factor signaling and circadian rhythms in insect locomotor activity. *Curr. Opin. Insect Sci.* 1:73–80.
- Shafer OT, Gutierrez GJ, Li K, Mildenhall A, Spira D, Marty J, Lazar AA, Fernandez MP (2022) Connectomic analysis of the *Drosophila* lateral neuron clock cells reveals the synaptic basis of functional pacemaker classes. *eLife* 11:e79139.
- Shiga S (2003) Anatomy and functions of brain neurosecretory cells in Diptera. *Microsc. Res. Tech.* 62:114–131.

- Shiga S, Numata H (2007) Neuroanatomical approaches to the study of insect photoperiodism. *Photochem. Photobiol.* 83:76–86.
- Shiga S, Numata H (2009) Roles of PERIOD-immunoreactive neurons in circadian rhythms and photoperiodism in the blow fly, *Protophormia terraenovae*. *J. Exp. Biol.* 212:867–877.
- Siegmund T, Korge G (2001) Innervation of the ring gland of *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* 431:481–491.
- Smith W, Rybczynski R (2012) Prothoracicotropic hormone. In: Gilbert LI (ed) *Insect Endocrinology*. Academic Press, San Diego, pp 1–62.
- Tanaka M, Tachibana SI, Numata H (2008) Sensitive stages for photoperiodic induction of pupal diapause in the flesh fly *Sarcophaga similis* (Meade) (Diptera: Sarcophagidae). *Appl. Entomol. Zool.* 43:403–407.
- Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S (1986) *Seasonal Adaptations of Insects*. Oxford University Press, New York.
- Tyshchenko VP (1966) Two-oscillatory model of the physiological mechanism of insect photoperiodic reaction. *Zh. Obshch. Biol.* 27:209–222.
- Wei H, Stengl M (2011) Light affects the branching pattern of peptidergic circadian pacemaker neurons in the brain of the cockroach *Leucophaea maderae*. *J. Biol. Rhythms* 26:507–517.
- Yamamoto M, Shiga S, Goto SG (2017) Distribution of PERIOD-immunoreactive neurons and temporal change of the immunoreactivity under long-day and short-day conditions in the larval brain of the flesh fly *Sarcophaga similis*. *Chronobiol. Int.* 34:819–825.
- Yamanaka N, Romero NM, Martin FA, Rewitz KF, Sun M, O'Connor MB, Léopold P (2013) Neuroendocrine control of *Drosophila* larval light preference. *Science* 341:1113–1116.
- Yasuyama K, Meinertzhagen IA (2010) Synaptic connections of PDF-immunoreactive lateral neurons projecting to the dorsal protocerebrum of *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* 518:292–304.
- Yoshinaga N, Goto SG (2025) Expression of short neuropeptide F and prothoracicotropic hormone in relation to photoperiodic regulation of pupariation and

pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga similis* (Diptera: Sarcophagidae). *Appl. Entomol. Zool.* (published online 22 Feb 2025).

- Yuan Q, Xiang Y, Yan Z, Han C, Jan LY, Jan YN (2011) Light-induced structural and functional plasticity in *Drosophila* larval visual system. *Science* 333:1458–1462.

8.図表

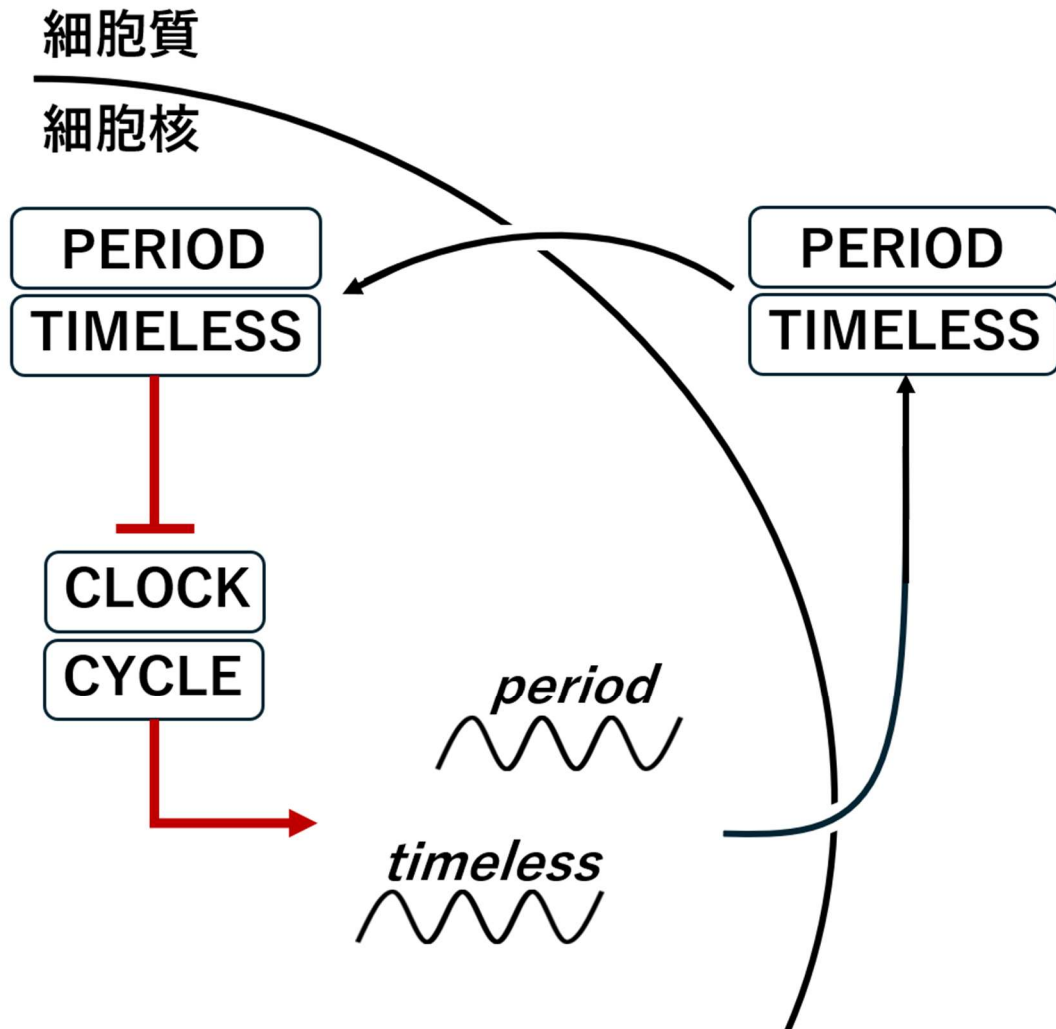


図 1. 概日時計による転写・翻訳フィードバックループ

CLOCK と CYCLE はヘテロダイマーを形成し、DNA 上のエンハンサー要素である E-box に結合し、*period* や *timeless* の転写を活性化する。転写された *period* と *timeless* の mRNA から PERIOD と TIMELESS タンパク質が合成され、細胞質に蓄積する。これらのタンパク質がヘテロダイマーを形成して核内へ移行し、CLOCK/CYCLE の転写活性を抑制することで、自分自身の遺伝子の転写を停止させる。このサイクルにより、各遺伝子の産物は約 24 時間周期で振動を行う。

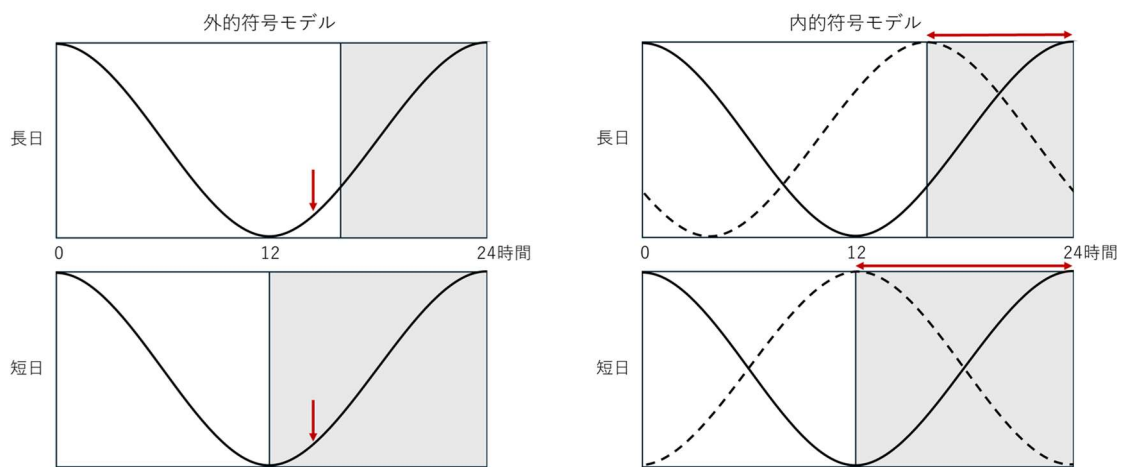


図 2. 外的符号モデルと内的符号モデル

外的符号モデルは、矢印で示した光誘導相と呼ばれる特定の時間帯に光を受けると長日と認識されとするモデル。内的符号モデルは、明期でピークを示す振動体と暗期にピークを示す振動体の二つの位相のずれの違いにより日長を測定するとするモデル。それぞれの白は明期、グレーは暗期を表す。

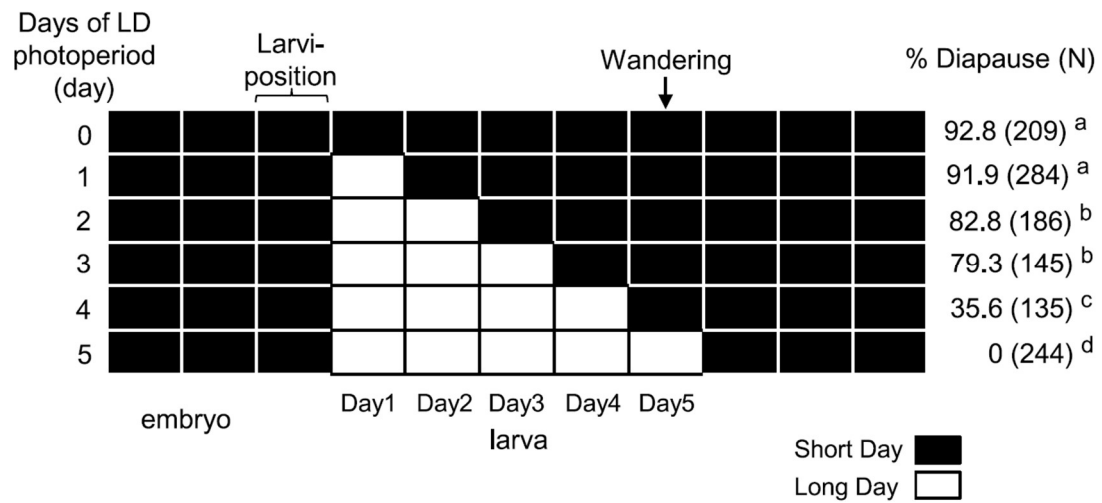


図 3. ナミクバエ (*Sarcophaga similis*) 幼虫における光周反応

長方形の配列は、各光周期スケジュールを模式的に示している。幼虫は、短日条件を基準として、0～5 日間の長日 (long day; LD) を付加した計 6 種類の光周期スケジュールのいずれかに曝露された。図の右端には、それぞれの条件における休眠率および解析に用いた個体数を示す。異なるアルファベットは、休眠率に有意な差が存在することを示す ($P < 0.01$ 、母比率テューキー多重比較検定)。

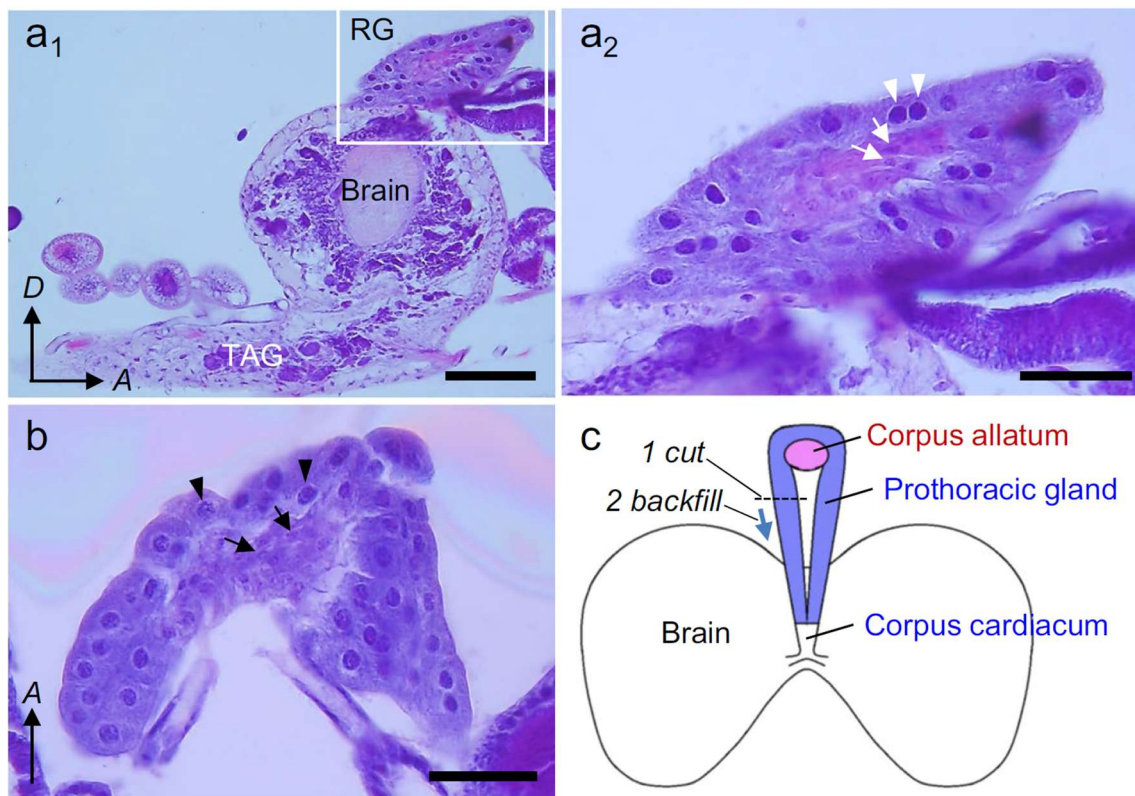


図 4. ナミクバエ (*Sarcophaga similis*) 幼虫における脳および環状腺のヘマトキシリン・エオシン染色像(長日条件下 5 日目)

a: 矢状断切片。a1 に示した長方形で囲んだ領域を a2 に拡大して示す。胸腹部神経節 (thoracicoabdominal ganglia: TAG) の一部も観察される。

a2, b: 環状腺 (ring gland: RG) の遠位部。エオシンに強く染色された細胞 (矢印) は、複数のヘマトキシリン染色細胞 (矢じり) に取り囲まれている。

c: 環状腺および脳の模式図。アラタ体 (corpus allatum) および前胸腺 (prothoracic gland) は異なる色で示している。環状腺を切断し、色素を脳内に充填することで、前胸腺およびアラタ体を支配するニューロンを標識した。

A: 前方、D: 背側

スケールバー: 100 μm (a1)、50 μm (a2、b)

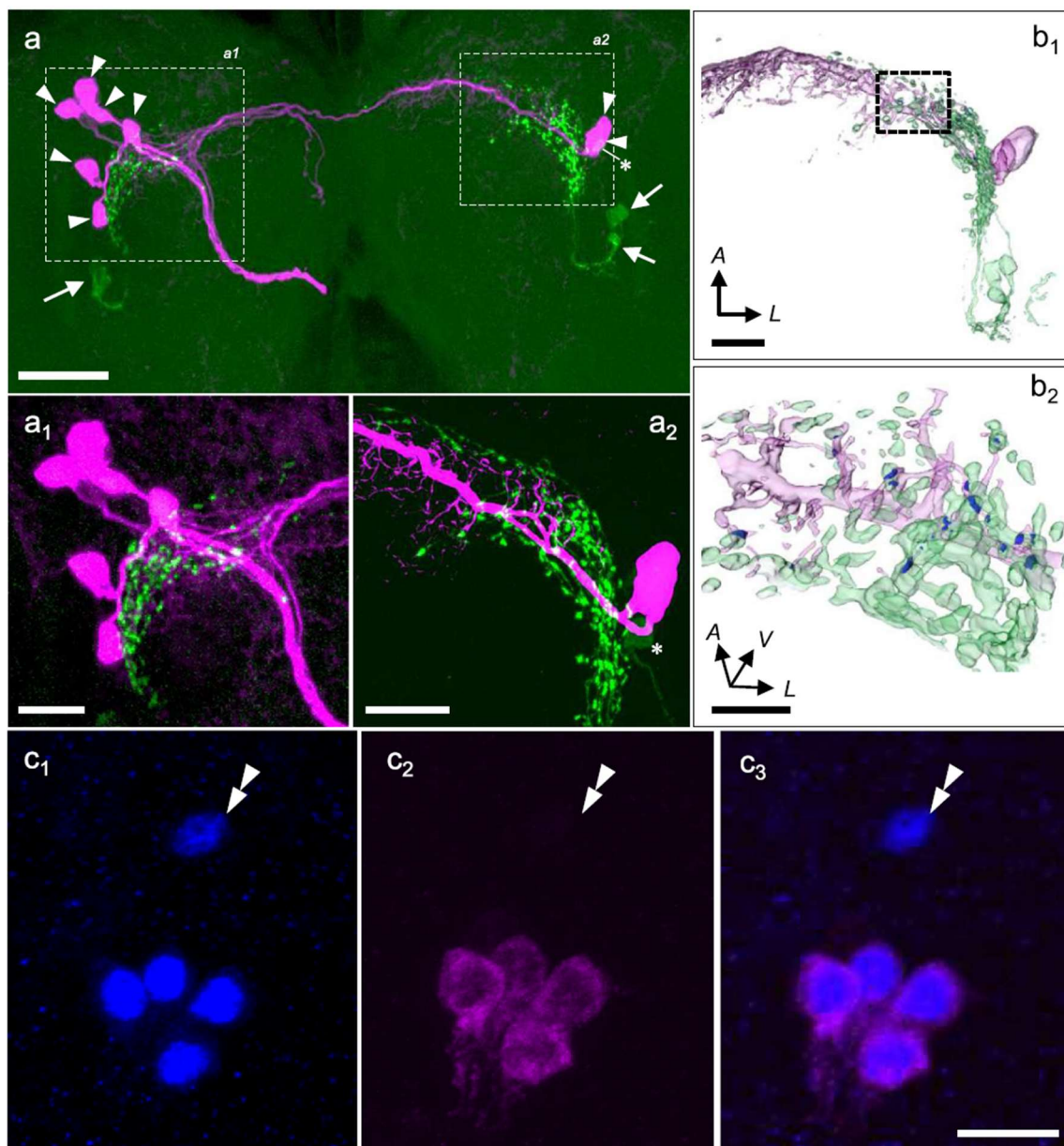


図5. ナミクバエ (*Sarcophaga similis*) 幼虫 (長日条件下5日目) における、Pigment-dispersing factor (PDF)、PERIOD 免疫陽性ニューロンおよび前胸腺領域へ投射するニューロンの神経解剖学的解析

背側から観察した像であり、上方が前方を示す。

a: 前胸腺領域からの逆行性色素注入 (マゼンタ) と、PDF 免疫組織化学染色 (緑) との二重標識像。片側性の逆行性色素注入により、同側の pars lateralis (PL-i) ニューロン6個および対側の pars lateralis (PL-c) ニューロン2個が標識された (マゼンタ、矢じり)。PL-i ニューロン (a1) および PL-c ニューロン (a2) の拡大像を示す。PDF 免疫陽性の神

経線維は背側前大脳において細胞体から突出して認められ(矢印)、また PL ニューロン近傍の終末樹状分岐に沿って複数の免疫陽性バリコシティが観察された。

b:PDF 免疫陽性線維(緑)および PL-c 線維(マゼンタ)について、共焦点画像から三次元再構築した像。**b2** は **b1** 中の点線枠で示した領域の拡大像である。PDF 免疫陽性線維と PL-c 線維の重なりは青色で示している。

c:脳外側領域において、PERIOD 抗体(青、**c1**)および PDF 抗体(マゼンタ、**c2**)を用いた二重免疫組織化学染色像。PERIOD 免疫陽性細胞 5 個のうち 4 個は PDF とも共標識されていた(**c3**)。残りの 1 細胞(両矢頭)は PERIOD のみ免疫陽性であった。

a、a1:ピクセルサイズ 0.52 μm 、ボクセル深度 1.0 μm の共焦点画像 97 枚のスタック

a2:ピクセルサイズ 0.13 μm 、ボクセル深度 0.3 μm の共焦点画像 81 枚のスタック

c:ピクセルサイズ 0.11 μm 、ボクセル深度 0.4 μm の共焦点画像 69 枚のスタック

アスタリスクは PL-c 近傍に存在する PDF 免疫陽性細胞を示す。

A: 前方、L: 側方、V: 腹側

スケールバー: 50 μm (**a**)、20 μm (**a1**、**a2**、**b1**)、10 μm (**b2**、**c3**)

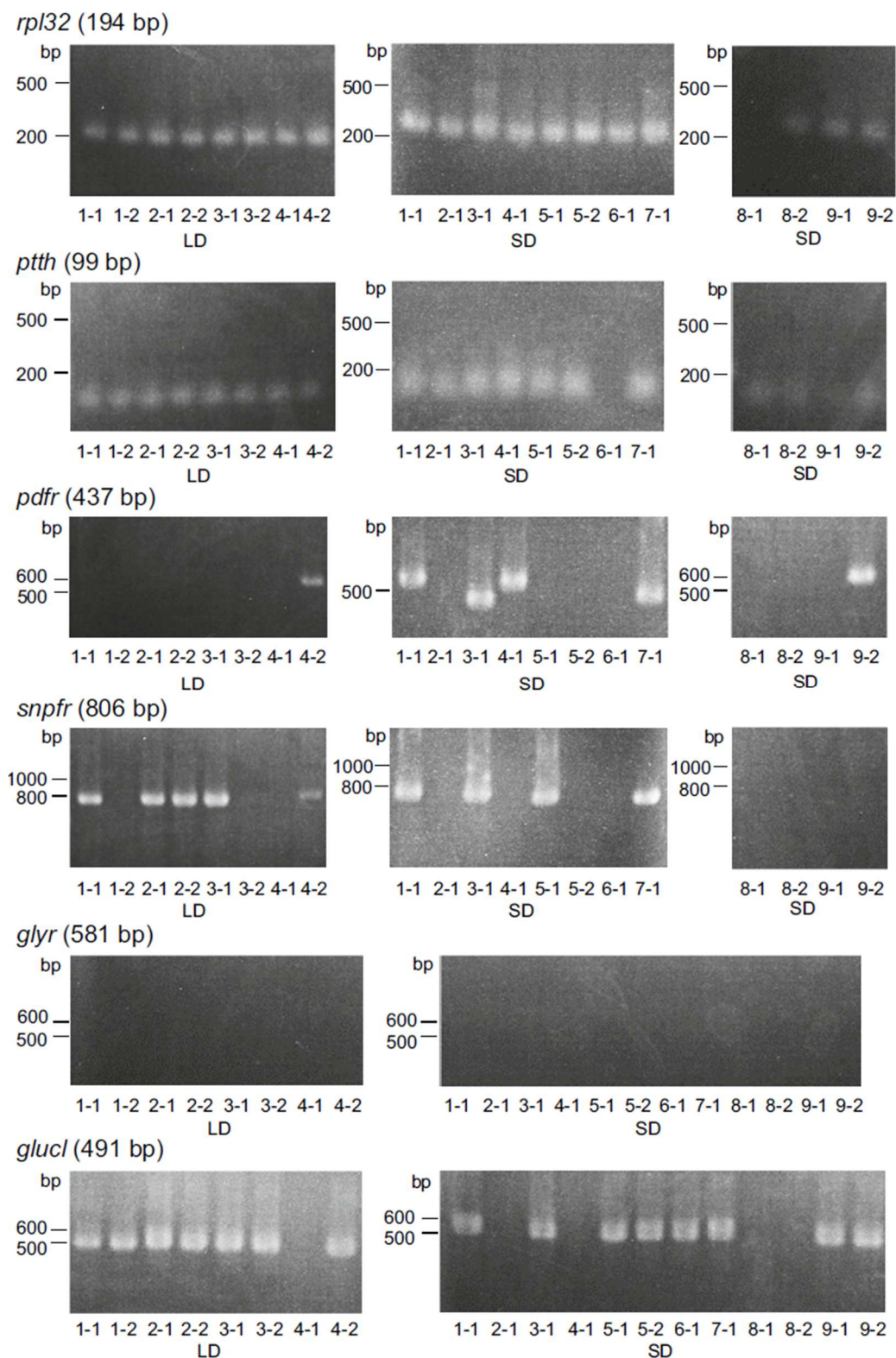


図 6. ナミニクバエ (*Sarcophaga similis*) 幼虫における PL-c ニューロンの単一細胞逆転写ネステッド PCR 解析

長日条件 (LD) および短日条件 (SD) 下で飼育した 5 日齢幼虫 13 個体から取得した

PL-c ニューロン 20 細胞について、リボソームタンパク質 L32 (*rpl32*; 対照遺伝子)、前胸腺刺激ホルモン (*prothoracicotropic hormone: ptth*)、pigment-dispersing factor 受容体 (*pdfr*)、short neuropeptide F 受容体 (*snpfr*)、グリシン受容体 (*glyr*)、グルタミン酸作動性塩化物チャネル (*glutamate-gated chloride channel: gluc1*) の発現を示す画像を示した。

各遺伝子名の後に、逆転写ネステッド PCR における第 2 産物の長さ(bp)を示している。写真下部の番号は、解析した各単一細胞の個体識別コードを表す。

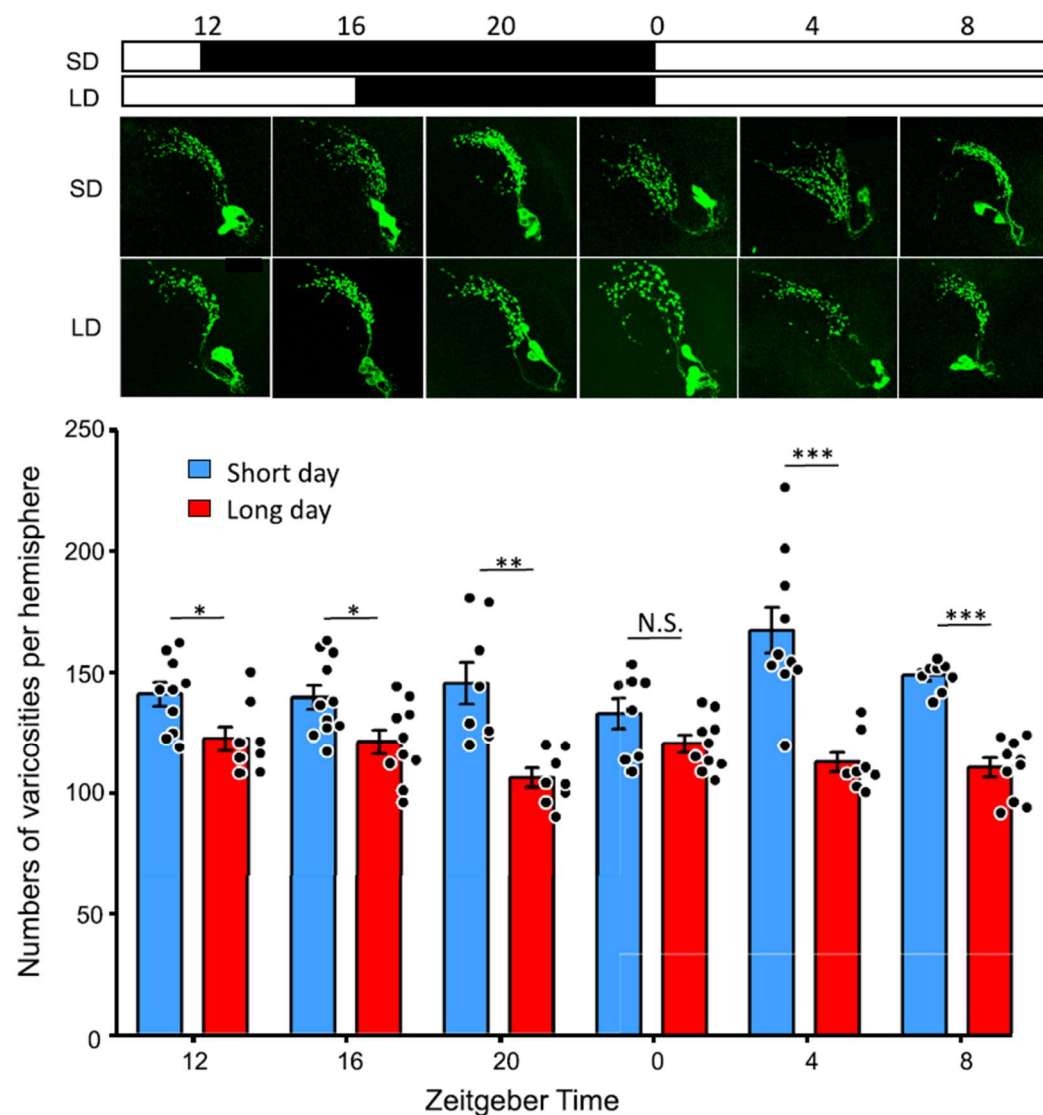


図 7. ナミクバエ (*Sarcophaga similis*) 幼虫における、長日条件および短日条件間での Pigment-dispersing factor (PDF) 免疫陽性線維のバリコシティ数の比較

4 つのツァイトゲバー時刻 (Zeitgeber time) ごとに観察した PDF 免疫陽性ニューロンの代表的画像を示す。上部の白および黒のバーは、それぞれ明期および暗期を示す。グラフ中の黒点は各半球における個々の測定値を示し、棒グラフおよびエラーバーは平均値 $\pm$ 標準誤差を表す。

解析に用いた個体数は幼虫 5 個体、脳半球は 8~11 個である。

二元配置分散分析 (two-way ANOVA; 表 4 参照) を行った後、Holm 補正を適用した Student の t 検定を実施した (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, N.S.: 有意差なし)。

表 1. ナミクバエにおける光周性に関わる組織

入力系 (光受容機構)	
Bolwig器官	PDFニューロンの樹状突起領域近傍への神経投射
統合系 (日長測定・日数計測機構)	
PERIOD	概日時計タンパク質
Pigment Dispersing Factor (PDF)	概日時計細胞がもつ神経ペプチド
出力系 (内分泌機構)	
前胸腺刺激ホルモン (PTTH) ニューロン	前胸腺におけるエクジステロイド合成を促進
前胸腺	エクジステロイドを合成することにより成虫発育を誘導

表 2. ナミニクバエのコンティグリスト

Putative gene	Accession No	Length (bp)	ORF (aa)*	Identity to <i>D. melanogaster</i>	
				%	Acc. Number
<i>Ss_rpl32</i>	LC782570	1014	133	95.52	NP_733339.1
<i>Ss_ptth</i>	LC782571	395	34	58.06	NP_001303304.1
<i>Ss_pdf receptor</i>	LC782572	1395	376	59.48	NP_570007.2
<i>Ss_snpf receptor</i>	LC782573	2571	488	63.17	NP_001262086.1
<i>Ss_glycine receptor</i>	LC782574	1543	421	59.33	NP_524131.1
<i>Ss_gluc1</i>	LC782575	1065	277	100	NP_001287409.1
<i>Ss_pdf</i>	LC815001	276	91	47.92	NP_524517.1
<i>Ss_snpf</i>	LC832170	556	148	48.93	NP_724239.1

表 3. 逆転写ネスト PCR のプライマーリスト

gene	Usage	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	Product size (bp)
<i>rpl32</i>	1st	ATGACCATTCTGCCAGCATATAGG	TGTGAACGAACACGACCATTG	392
	2nd	TGTTAAGAAGCGCACCAAGC	ACTTCTTGAAGCCAGTTGGGAG	194
<i>ptth</i>	1st	TGATTTGGTGGATTGGGGTCAGC	TCTTAAATCATCCGGTAGCCATGC	214
	2nd	TTCCACGGTACTTGCTTAATGC	ATTCCAATGGACGGCATACC	99
<i>pdf receptor</i>	1st	TGCAGGTGGTGATACGTTTAAG	CAATGGCAACAGAACGATGG	521
	2nd	GTGACAATCACGACCCTACC	GCGTGTCTGTTCAATATCACTGG	437
<i>snpf receptor</i>	1st	ATGTATTTCTCCACCACAGCAC	GAGTGAGCCACAAAGAAGAGTAAC	1004
	2nd	GGGTGTCTTTGGCAATGTATTGG	GCAGCCAAGACAGACCAAAC	806
<i>glycine receptor</i>	1st	AAACGCACAACAACAGCAAC	CAGTGCTGGTGGCAAATTC	665
	2nd	CAGCAATCACCACGCCATC	CTACGATTACCACCCGCCTG	581
<i>gluc1</i>	1st	AGGAGGGCCATTTCATAACATC	TCGAGCAGGGCACCGAATAC	586
	2nd	TGGTTCCGTGCTATACAGTATTCG	CGGTCCAGACATCAATAGCCTTC	491

表 4. ナミニクバエの PDF 免疫陽性のバリコシティ数における光周期と時間変化の影響の二元配置分散分析による評価

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F	P
Photoperiod	1	24,836	24,836	88.16	2.79E-15 ***
Zeitgeber	5	2549	510	1.81	0.11803
Photoperiod: Zeitgeber	5	5916	1183	4.2	0.00169 **
Residuals	97	27,327	282		

** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$