蚕糸・昆虫バイオテック 84（2）、119－126（2015）
SANSHI-KONCHU BIOTEC

特集「昆虫の休眠―再び―」

カイコの休眠誘導と環境応答

塩見 邦博*
信州大学　学術研究院　繊維学系

1. 昆虫の休眠と環境情報

あらゆる生物は環境からのさまざまな情報を受容し，地球の長い歴史とともにさまざまな生存環境に適応する能力を進化させてきた。その一つが季節適応である。生物は季節の移り変わりを敏感に察知し，冬のような生存に厳しい季節や，春や夏のように成長，繁殖に都合の良い季節の到来を予知し，自らだけでなく次世代個体の適応度を上げる生活史戦略をもつ。その一つが季節の変化に伴い，形態や生理状態，行動様式などの表現型を変化させる季節的多型（seasonal polyphenism）の誘導である。すなわち，日長は，夏には長く，冬には短くなる。動物たちは，この光周期や，これに伴って変動する温度や湿度，食物の量や質などの環境情報を感受し，発生プログラムをリプログラミングする（図 1A）（Nijhout, 2003; Tauber *et al.*, 1986）。このような現象は，「predictive adaptive response」（予知的適応応答）と言われ，環境刺激に対して即時に反応するのではなく，環境情報の受容から現象の発現までに比較的長い期間を有する環境応答反応であり，生物学的に非常に興味深い現象である（Gluckman *et al.*, 2005）。しかし，その詳細な分子機構についてはまだ不明である。そして，この現象の極端な例が「休眠（diapause）」である。

休眠する昆虫は，通常の発生を停止し，休眠間発育と呼ばれる独自の代謝系を発動させることにより，厳寒や酷暑などの不良環境を生き残ることが可能になる（Hahn and Denlinger, 2011）。また，昆虫種により休眠する発育ステージと覚醒する条件が決まっており，種によって特定の発育ステージに卵（胚）休眠，幼虫休眠，蛹休眠，成虫休眠を行ない，たとえ集団レベルで発育ステージにズレが生じても，休眠覚醒により一斉に通常の発生を再開し，生殖機会を増加させることができる（Kostal, 2006; 正木，1974）。

さらに，種や種内の系統によって，年に何回休眠するかは決まっており，これは化性（voltinism）という言葉で表される。年に一世代のライフサイクルを繰り返すものを一化性と呼び，年 2 回のものを二化性，まったく休眠しないで世代を繰り返す系統を多化性と呼ぶ。さらに，休眠するか否かが，遺伝的に決定するものと，随意休眠とよばれ，環境条件によって決定するものがある（Denlinger *et al.*, 2012）。

随意休眠において，休眠性を決定する環境条件として代表的なものは，日長（光周期），温度，湿度や栄養条件などであり，これらの変化により，その個体のそれ以降の発育ステージや次世代以降での休眠性が決定する。また，そのほかにも，植物由来の揮発性物質，フェロモン，個体群密度などによっても休眠が誘導されることが知られている（Denlinger *et al.*, 2012）。さらに，休眠をはじめとして，季節的多型の多くは，単一の環境条件により決定されるのではなく，日長・温度・栄養条件などの複合的な環境情報により修飾（上書き）され引き起こされる（Denlinger *et al.*, 2012; Tauber *et al.*, 1986）。自然界では，季節的な環境の変化は複数の環境要因の変動を意味し，ある単一の環境要因により前決定された季節的多型も，その後の日々刻々と変化する複数の環境要因に

*〒386-8567　上田市常田 3-15-1
信州大学学術研究院繊維学系
E-mail: shiomi@shinshu-u.ac.jp
Tel: 0268-21-5338　Fax: 0268-21-5331

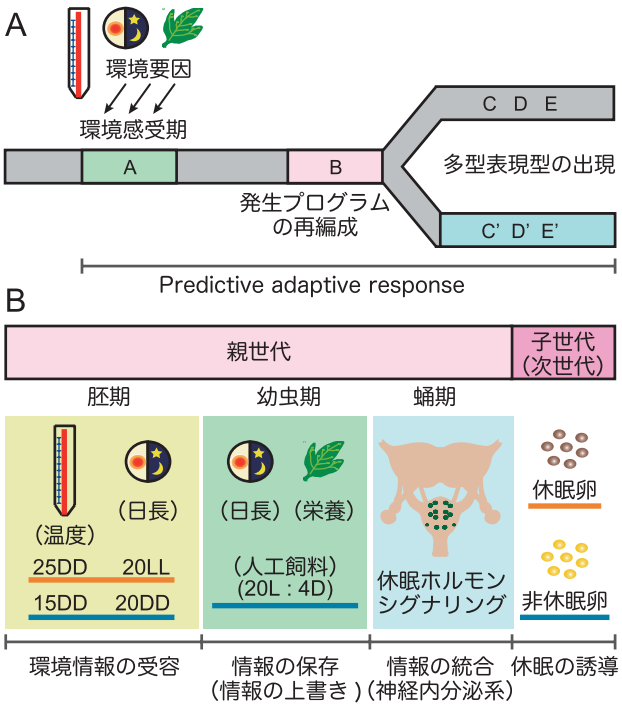


図 1. 季節的多型の発現とカイコの胚休眠誘導
(A) 動物は，季節の変動により日長，温度，食物の量や質などの環境要因の情報を環境感受期［A］に受け取り，やがて到来する季節を予知し，発生プログラムの再編成を行なう［B］。その結果，［C・D・E］もしくは［C'・D'・E'］のどちらかの表現型を出現させ，季節適応を行なう。これらの季節適応は predictive adaptive response の一つと考えられる。Nijhourt (2003) の図を改変した。(B) 休眠をはじめ季節的多型の誘導には概念的なモデルが提唱されており，その過程は，環境情報の受容・保存（上書き）・統合と神経内分泌系への翻訳からなる。カイコの次世代卵の休眠誘導の過程の分子機構はこのモデルによく符合する。

より上書きされ誘導される。そして，これが生物の巧妙で頑健な生活史戦略となり進化してきたと考えられる。

このような昆虫の季節的多型の誘導には，概念的なモデルが提唱されている（Tauber *et al.*, 1986）。それは，まず，環境情報をセンサー分子が受容し，受容された情報は比較的長期間に渡って記憶・保存（storage）され，その後，統合（integrate）され，神経内分泌機構へ翻訳（translate）されたのち，ホルモンの分泌調節などを介して，表現型の可塑的変化の発現に至ると考えられている（図 1B）。つまり，休眠誘導に見られる環境応答とは，季節的な外的環境要因の変化に対応した遺伝子発現，神経ネットワーク，ホルモン分泌などを可塑的に変化させ，発生プログラムの再編成を行ない，適応的な表現型が出現する一連のプロセスを指す。しかし，この現象の分子機構はまだほとんどわかっておらず，生物学の重要な課題の一つである。カイコ（*Bombyx mori*）の休眠誘導は，永きに渡る偉大な先人たちの研究の歴史を持ち，これらの課題に対する格好のモデルとなりうる。これまでの研究成果から，カイコの胚休眠誘導のプロセスが分子レベルで明らかになりつつあり，先に挙げたモデルに符合することが明らかになってきた。そこで，本総説ではこれらの取り組みを紹介するとともに，今後の展望を考察したい。

2. カイコの胚休眠誘導と休眠ホルモン物語

カイコは，産下 2 ～ 3 日の胚発生の初期に細胞分裂を停止し，卵（胚）のステージで休眠する代表的な昆虫である。休眠を開始した卵は，酸素消費量が極端に低下し，休眠間発育と呼ばれる独自の糖代謝系を作動させる。これらの休眠卵は，一定期間の 5°C などの低温に保護することにより休眠が覚醒し，胚発生が再開される（これらのことは本特集の柳沼先生の解説に詳しく記載されている）（Yamashita and Yaginuma, 1991）。二化性のカイコでは，母蛾の胚期の温度や光（日長），幼虫期の栄養条件により母性効果として次世代卵の休眠性が決定する（図 1B）（Yamashita and Hasegawa, 1985）。例えば，卵を 25°C・全暗（25DD）に保護すれば次世代卵は休眠する。15°C・全暗（15DD）では次世代は非休眠卵となり，約 1 週間で卵が孵化する。このように，親が受けた温度情報が記憶・保存され，子供（胚）の運命（表現型）がプログラミングされる。すなわち，カイコの胚休眠誘導にみられる季節適応は親子 2 世代にわたった独自の環境応答機構であり，次世代卵の産下時期を自然界に照らし合わせ，25DD を初秋，15DD を初夏と考えればその適応的意義が見てとれる。また，25DD と 15DD では休眠性の決定には温度条件が優先的に作用し，光（日長）条件は関係ないが，卵を 20°C に保護すると，全明（20LL）もしくは長日条件では次世代は休眠卵となり，全暗（20DD）もしくは短日条件では非休眠卵となる。さらに，幼虫期の人工飼料の違いによって，休眠性の決定条件は上書きされる。胚期を 25DD や 20LL に保護しても，幼虫期を全明や 20 時間・明，4 時間・暗（20L：4D）などの長日条件で保護し，特定の人工飼料を与えると次世代卵は非休眠卵になる（Tsuchida and Yoshitake, 1979）。

すでに 1924 年には渡邊勘次が，1933 年には小暮楨太がそれぞれ，母蛾の温度と日長条件により次世代卵の休眠性が決定されることを明らかにしていた（Kogure, 1933; Watanabe, 1924）。小暮のこの研究は，昆虫の休眠が光周性により支配されていることを初めて明らかにしたものとして光周性研究者の間でも有名である。そして，1950 年代には，長谷川金作や福田宗一によって，蛹期の食道下神経節（subesophageal ganglion; SG）中に休眠卵を誘導する物質（休眠ホルモン; diapause hormone: DH）

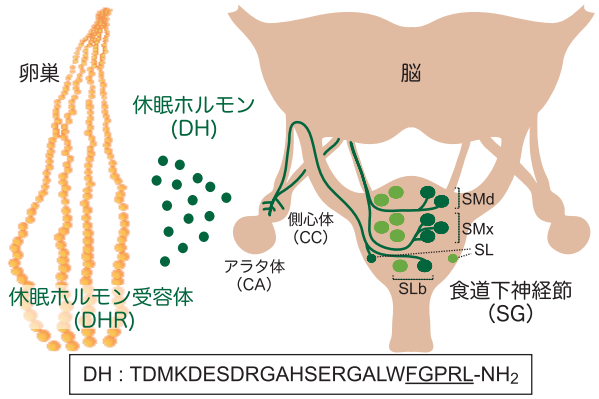


図 2．カイコの胚休眠誘導と「休眠ホルモン物語」
カイコの休眠卵は母蛾の蛹期に分泌される休眠ホルモン（DH）によって誘導される。DH は 24 残基のアミノ酸で構成される神経ペプチドホルモンであり，食道下神経節（SG）の産生細胞で合成され，側心体から血液中に放出される。卵巣には，DH 受容体（DHR）が存在し，DH が作用する。これらの過程は「休眠ホルモン物語」として知られている。

が存在することが明らかにされ（Fukuda, 1951, 1952; Hasegawa, 1952），1991 年にはその物質が 24 残基のアミノ酸からなる神経ペプチドホルモンであることが明らかになった（Imai *et al.*, 1991）（図 2）。DH は C 末端配列が Phe-Gly-Pro-Arg-Leu-NH_2 であり，さまざまな昆虫種でさまざまな生理機能を持つ神経ペプチドとして知られている FXPRLa ペプチドファミリーに属している（Jurenka and Nusawardani, 2011）。DH はホルモン前駆体遺伝子である *DH-PBAN*（pheromone biosyntehsis activating neuropeptide; フェロモン生合成活性化神経ペプチド）遺伝子にコードされており，この遺伝子には DH 以外に PBAN や α-SGNP，β-SGNP，γ-SGNP の 4 種類の FXPRLa がコードされている（Sato *et al.*, 1993）。また，DH は SG 中の 7 対 14 個から構成される DH-PBAN 産生神経分泌細胞群を構成する SMd，SMx，SLb および SL 細胞で産生され，側心体を経由して血液中に放出される（Sato *et al.*, 1998）。さらに卵巣には DH に対して選択的に親和性の高い G タンパク質共役型受容体（G-protein coupled receptor; GPCR）の一種である DH 受容体（DHR）が存在し，DH が DHR に作用することによって休眠卵が誘導されることが示唆されていた（Homma *et al.*, 2006）。2000 年に山下興亜らは，これまでのカイコの休眠研究を「休眠（ホルモン）物語」としてまとめ，カイコのユニークな生活史とその分子基盤を俯瞰した（山下・新美, 2000）。以上が，休眠ホルモン物語の中心となる研究の歴史である。

最近になって我々はゲノム編集技術の一つである TALEN（transcription activator-like effector nuclease）（Daimon *et al.*, 2014; Takasu *et al.*, 2014）を利用して二化性系統において *DH-PBAN* および *DHR* 遺伝子に突然変異を誘発させ，それぞれのタンパク質の生産が全く起こらない，ノックアウト変異体を作出した（図 3）。これらの変異体では，25DD や 20LL にも関わらず，非休眠卵が産出された。また，幼虫期を 20L：4D で飼育し，いかなる人工飼料を与えても，非休眠卵しか産出されなかった（投稿準備中）。これらに加えて，我々は，DH の N 末端と C 末端のそれぞれを特異的に認識する 2 種類の抗体を利用し，血液中の DH を特異的に検出し，蛹血液 150 µl 当たり，85.8 amol（0.57 pM）の検出限界を持つ測定系を開発した。この測定系を利用し，野生型の 25DD と 15DD の血液中の DH 濃度を測定したところ，両者とも数 pM オーダーの DH が存在し，25DD が 15DD の約 2 倍の血中濃度であることが判明した（投稿準備中）。また，*DH-PBAN* のノックアウト系統では血液中に DH は全く検出されなかった。これらの結果から，胚期および幼虫期に受けたさまざまな環境情報は DH と DHR から構成される DH シグナル経路に統合され，これが唯一の経路として休眠性の決定がなされると結論づけられた。また，二化性系統では胚期の温度条件の違いは蛹期の血液中の DH 濃度の違いに翻訳され，卵巣での DH 受容とシグナル伝達系に差異を生じ，休眠性の決定に繋がるのではないかと推測された。

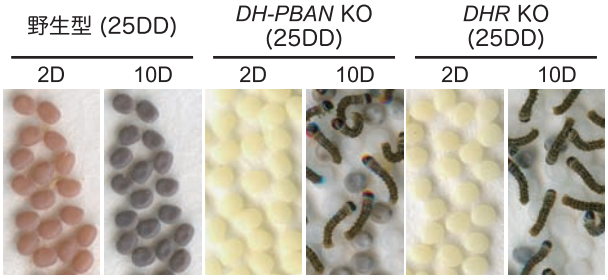


図 3．DH と DHR のノックアウトカイコによる休眠誘導の阻止
ゲノム編集技術の TALEN を用いて，二化性系統のコウセツにおいて，*DH-PBAN* および *DHR* のノックアウトカイコ（KO）を作出した。野生型の卵は母蛾の胚期を 25DD に保護した場合には着色し，休眠卵になるが，KO カイコでは産下 2 日において卵の着色は観察されず，10 日には幼虫が孵化した。

さらに，カイコのゲノム中には，*capa* と呼ばれる遺伝子が存在し，この遺伝子には CAPA-PK と呼ばれる FXPRLa がコードされている（Roller *et al.*, 2008）。つまり，カイコゲノム中には 6 種類の FXPRLa が存在し，さらに CAPA-PK の C 末端は Trp-Phe-Gly-Pro-Arg-Leu-NH_2 で DH と同一である。また，DHR は，ほ乳類のニューロメジン U（NMU）受容体と類縁関係があると考えられているが，カイコのゲノム中には NMU 受容体相同体が複数存在している（Yamanaka *et al.*, 2008）。我々の結果は，

カイコにおいて，DH と DHR より構成される DH シグナリング経路は，多種存在する FXPRLa と NMU 受容体相同体の中で，選択的に共進化を起こし，休眠誘導に関わっていることを示している。

3．環境情報の受容の分子解析

外温性で体サイズの小さい昆虫は，生息環境に大きな温度差が生じた場合，温度走性や回避などの行動を取ったり，休眠など生理状態の変化によって的確に体温を調節したり，耐性を発揮したりする能力を進化させている。そして，昆虫の環境温度のセンサー分子としては，transient receptor potential（TRP）イオンチャネルや，ある種の GPCR が機能していることが知られている（Barbagallo and Garrity, 2015）。それぞれのセンサー分子は固有の活性化温度閾値をもち，ある温度以上またはある温度以下になると，チャネルが開口し，細胞興奮が誘起される。TRP チャネルは，1997 年にそのサブファミリーの一つである TRPV1 が 42°C 以上の温度を感知する温度センサーであることが発見され（Caterina *et al.*, 1997），それ以降，昆虫を含めたさまざまな生物で環境温度の受容体として機能する温度感受性 TRP チャネルが同定されている。さらに，2013 年には TRPV1 の立体構造が解かれ，構造−機能相関の全貌も明らかにされつつある（Cao *et al.*, 2013; Liao *et al.*, 2013）。

昆虫の温度感受性 TRP チャネルの研究では，キイロショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）において，TRPA サブファミリーに属する TRPA1，Painless および Pyrexia が常温や高温域での温度センサーとして機能していることが知られている。TRPA1 は 27°C 以上で活性化され，温度走性や侵害刺激受容体として機能している（Rosenzweig *et al.*, 2005）。また，Painless は 38°C 以上で（Sokabe *et al.*, 2008），Pyrexia は 40°C 以上で活性化し（Lee *et al.*, 2005），それぞれが高温に対する侵害刺激受容体として機能していることが知られている。さらに，ハマダラカ（*Anopheles gambiae*）やセイヨウミツバチ（*Apis mellifera*）でも TRPA ファミリーが高温のセンサーとして機能していることが知られている（Kohno *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009）。このように，昆虫の常温あるいは高温における温度センシングには TRPA サブファミリーのメンバーが携わっていることが明らかになっている（Barbagallo and Garrity, 2015）。

そこで，我々は休眠性の決定に関わる母蛾の胚期の温度センサーを同定する目的で，カイコゲノムにコードされている 13 種類すべての *TRP* チャネル遺伝子をクローニングし，網羅的な RNA 干渉（RNAi）実験を行なった。つまり，二化性系統の産下直後の卵に二本鎖 RNA（dsRNA）を注射することにより RNAi 誘導し，それぞれの遺伝子をノックダウンし，その後，25DD に保護した後，次世代卵の休眠性を観察した。無処理の卵は，25DD のため休眠卵となるが，TRPA1 のオーソログである BmTRPA1 の dsRNA 注射では，10% 程度の非休眠卵が観察された。さらに，細胞生理学的解析により BmTRPA1 は，22°C 以上の温度で活性化する温度センサーであることを突き止めた（Sato *et al.*, 2014）。つまり，このチャネルは母蛾の胚期において 25°C の温度を受容し，次世代での休眠誘導を誘起するセンサー分子である可能性が示唆された。また，BmTRPA1 の活性化に伴い，蛹の SG においては DH の血液中への積極的な放出が促進される可能性が示された。以上の結果から，カイコの休眠誘導には母蛾の胚発育期の中盤にあたる温度感受性期に BmTRPA1 が 25°C と 15°C の温度に違いを感知し，25°C の場合，このセンサー分子の活性化が誘起され，やがて蛹期に DH シグナルの活性化が起こり，休眠が誘導されると考えられた。

これまでに知られている温度感受性 TRP チャネルの機能は，すべて即時的な温度応答反応である。例えば，キイロショウジョウバエの TRPA1 は温度走性に関わり，約 27°C 以上の温度で活性化し，これらの温度から忌避行動をとるために機能している（Rosenzweig *et al.*, 2005）。カイコにおいても胚期以外にも幼虫期や成虫期の脳−中枢神経系を含むさまざまな組織で発現が観察されており，休眠誘導以外にも侵害刺激受容や温度走性などへの関与が推測される。一方，カイコの休眠誘導に見られる predictive adaptive response のような比較的長期間にわたる温度応答反応への関与は我々の報告が初めてであり，おそらくカイコの BmTRPA1 は，昆虫に一般的に機能している即時的な機能と，カイコにおいて新規に獲得した機能の両方を持つようになったと考えられる（図 4）。

一方，光受容に関しては，胚期の青色や緑色波長の光が次世代の休眠誘導に必要であることが知られている（中島，1981）。しかし，どのような光（日長）センサー分子が胚期に働き，休眠性の決定に関わっているかは全く不明である。現在，我々はゲノムデータとゲノム編集技術をフルに活用し，光センサータンパク質の同定を試みている。さらに，図 1B で説明した幼虫期の人工飼料による影響については，我々はこれまでに，胚期を 25DD に保護して，幼虫期を 20L：4D で飼育し，独自に配合した複数の人工飼料を与えて，次世代の休眠性に与える影響を調査した。その結果，ほとんどすべての蛾区

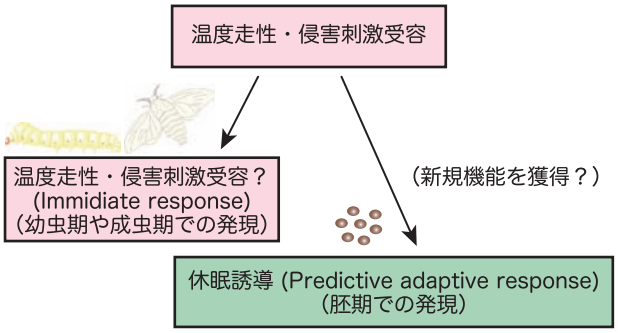


図 4．カイコにおける温度センサー BmTRPA1 の進化
温度感受性 TRPA チャネルは，昆虫において温度走性や侵害刺激受容などの immediate response に関わることが知られているが，カイコにおいては，休眠の誘導にみられる predictive adaptive response に関わる機能を新規に獲得したと考えられる。また，カイコの *BmTrpA1* は幼虫期や成虫期にも発現が認められることから温度走性や侵害刺激受容などにも関わっている可能性がある。

で休眠卵および非休眠卵がそれぞれ出現する 2 種の人工飼料を発見した（投稿準備中）。現在，休眠性に影響を与える人工飼料成分の同定を進めている。

4．環境情報の保存と統合の分子解析

これまで示したように，カイコにおける胚休眠誘導の分子機構は冒頭で紹介した概念的なモデルによく符合することが分かる（図 1B）。つまり，BmTRPA1 によって受容された温度情報と光（日長）センサーによって受容された光情報は，蛹期の中期まで保存され，DH シグナル経路に統合される。しかし，環境情報の受容から DH シグナル経路に至るまでの分子機構は不明のままであった。

そこで我々はまず，胚期から蛹中期に至る約一ヶ月間にいたる環境情報の保存と統合に関わる遺伝子の同定を目指して，種々の環境条件に曝した胚子と蛹の脳–SG 複合体において RNA-seq. 解析を行なった。その一例を図 5 に示すが，興味深い挙動を示す遺伝子が多数見つかった。胚期においては，25DD，15DD および BmTRPA1 のノックダウン個体の間で比較したところ，25DD に比べて 15DD および BmTRPA1 ノックダウン個体で発現量が有意に高いか，もしくは低い遺伝子をピックアップした（図 5A）。このような遺伝子が合計 56 個見つかり，これらの中には，成長因子，ペプチドホルモン受容体，核内レセプターや多数の機能未知遺伝子が含まれていた。もしかすると，これらの遺伝子の中には BmTRPA1 の活性化シグナルの下流で働き，休眠誘導に関わっている遺伝子が含まれているかもしれない。また，25DD と 15DD で胚期と蛹期の脳–SG で発現量に有意な差のある遺伝子を調査したところ，蛹期の脳–SG で発現量に差のあった

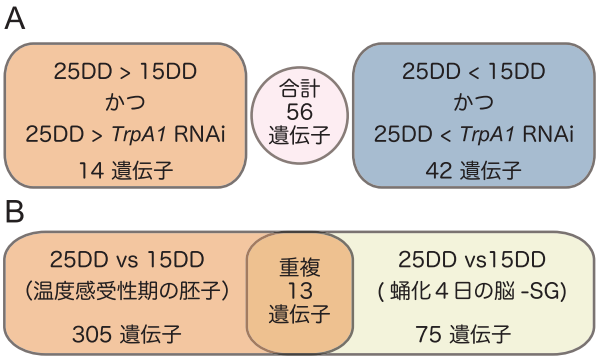


図 5．RNA-seq. 解析の一例
（A）胚期の温度感受性期の胚子を用い，発現量に有意差のある遺伝子を探索した。25DD に比べて 15DD および *TrpA1* のノックダウン胚子で発現量の低いものが 14 遺伝子，25DD に比べて高いものが 42 遺伝子得られた。（B）温度感受性期の胚子と蛹化 4 日の脳–SG 複合体において 25DD および 15DD のサンプルで RNA-seq. 解析を行なった。両ステージで 25DD で発現が高い，もしくは低いといったように共通の挙動を示す遺伝子は 13 遺伝子あり，蛹期に有意差のみられた遺伝子の約 20% にのぼった。

遺伝子の約 20% が，胚子でも差のある遺伝子であった（図 5B）。このことは，特定の遺伝子群のライフステージをまたいだ発現量の違いが休眠性の決定に重要である可能性を示している。さらに，蛹の脳–SG 複合体においても 25DD に比べて 15DD および BmTRPA1 ノックダウン個体で発現量が有意に高いか，もしくは低い遺伝子を多数ピックアップした。これらの遺伝子群の機能解析を現在進めている。

また，これまでの研究により，脳の特定の領域からの神経支配により DH 放出の促進と抑制が制御されていると考えられている（Fukuda, 1952; Matsutani and Sonobe, 1987; Shimizu *et al.*, 1997）。さらに，GABA 性の神経伝達が DH の放出抑制に関わっていることが推測されている（Shimizu *et al.*, 1997）。そこで我々は *piggyBAC* を用いた形質転換カイコによる GAL4-UAS システムを利用し，脳内の特定の細胞の細胞死や神経伝達阻害が休眠性に与える影響を調査しており，DH の放出制御に関わる遺伝子と細胞の同定を試みている。

5．in hand なカイコの環境応答システム

昆虫種によって休眠性を決定する環境条件が異なるのは何故だろうか？　カイコにおいては，温度条件が優先されるのは何故だろうか？　ここまで，カイコの休眠誘導を季節的多型誘導の一つと位置づけて説明し，時として，25DD と 15DD の温度の違いを自然界の季節変化になぞらえて解説してきた。こうした方法は説明しやすく，私の講義や講演での常套手段ではあるが，実のところ，この説明には決定的な間違いがある。それは，周知の通

り，カイコは人類の絹糸生産の歴史とともに継代され，飼育と絹糸生産に都合の良い形質を保つように選抜育種され家畜化（産業化）された昆虫種であり，決して自然下の野外では生存できないからである。当然，カイコの飼育に季節変化は関係なく，重要なのは人の手による蚕室の環境管理である。いわば，カイコが受容する最大の環境要因は人為管理・選抜と解釈でき，これによりカイコは独自の発展（進化）を遂げたと考えられる。休眠に関しても野外の昆虫とは異なる意義をもつ。野外（温帯域）の昆虫の休眠の意義の一つは越冬により，生存に不適な環境へ適応することであるが，カイコにおいては，越冬というよりもむしろ，産業活動における蚕種（カイコ卵）の効率的・計画的な保存のためであると考えられる。言い換えれば，カイコは卵で休眠するが，卵の時期が人類にとって最も管理しやすく，蚕種として売買の対象となりうることから，胚休眠の形質が選抜・保存され，人類が光周期よりも温度管理を行なうことが容易だったため，日長をコントロールするインキュベーターが存在しない古代から，温度条件で優先的に休眠が誘導される形質が選抜・保存されるようになったのではないかと推測している。この仮説を裏付けるデータは私の知るところまだ何もないが，カイコはクワコ（*Bombyx mandarina*）から家畜化された亜種だと考えられており，クワコも卵休眠を行ない，三化性を基本とし，二化，時には一化であるという記載がある。また，蛹期間が長い個体が存在することも報告されている（伴野，2010）。クワコとカイコの休眠誘導機構の関連性は不明であるが，昆虫を産業化する際，カイコは独自の環境応答機構を獲得したのではないかと推測している。我々はこのような環境応答機構を「孫悟空が觔斗雲に乗ってどこまで飛んでもお釈迦様の掌の中だった」という中国の古典文学「西遊記」になぞらえて,「in hand な環境応答システム」（図 6）と名付け，その進化機構の研究を始めている。また，温度管理という観点で考えると，カイコは休眠誘導のほかにも成長制御や休眠覚醒，人工孵化などに多くの温度管理の技術を利用する。例えば，「総合蚕糸学（日本蚕糸学会 編）」に記載されている「温度」というキーワードを探してみると驚くほど多くの記載があり，人類は産業化の過程で温度制御によってカイコを管理してきたと考えられる。これは，温度生物学の観点からも特異的で興味深いモデルであるといえる。

これらに加えて，今回紹介してきた研究結果は，二化性の「コウセツ」という品種を利用しており，この品種では 25DD および 15DD で次世代がそれぞれ 100% 休眠卵と非休眠卵になる。しかし，他の二化性の品種では，



図 6．in hand なカイコの環境応答システム
カイコは産業化された昆虫であり，胚休眠は環境の温度・光（日長）・栄養条件によって決定されるが，一番重要な環境要因は人為管理・選抜である。「孫悟空が觔斗雲に乗ってどこまで飛んでもお釈迦様の掌の中だった」ことになぞらえて in hand な環境応答システムと表現してみた。（イラスト：オオヤブカオル）

100% 休眠もしくは非休眠卵にならないものも珍しくない（小瀬川ら，2000）。これらの品種間での環境応答のバリエーションがどのようなゲノム基盤から生じ，分子ネットワークにどのようなバリエーションが存在するのか興味が持たれる。

6．カイコの休眠誘導と昆虫バイオテック

昆虫の休眠研究は世界中で精力的に行なわれており，その研究の展望も D.L. Denlinger による “Why study diapause?” というタイトルの優れた総説があり，多面的な展望が述べられている（Denlinger, 2008）。ここでは，カイコの休眠誘導と DH の私の研究に限って，その展望と産業利用を紹介したい。図 1B に示したように，二化性のカイコの休眠性は幼虫期の栄養条件によって上書きされ，決定される。このことから，人工飼料に含まれる何らかの成分（もしくは何らかの成分の欠如）が休眠性に影響を与えていると考えられているが，その詳細は明らかになっていない。そして，前述したように，我々は，次世代が休眠卵と非休眠卵になる 2 種の人工飼料を発見している。この結果をふまえて，人工飼料の成分を変えることによって，次世代卵の休眠性を自在にコントロールする技術が開発できるであろうという着想に至った。つまり，図 7 に示すように，母蛾の胚期をいかなる環境条件に設定しても，人工飼料に休眠誘導剤もしくは非休眠卵誘導剤を添加することにより，次世代卵の休眠性を自在にコントロールすることが可能になると考えられ

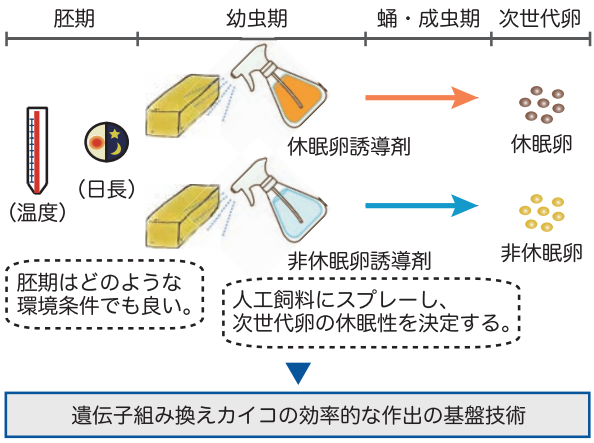


図 7．休眠性をスプレーで決定する！
人工飼料にスプレーし，休眠性を決定する飼育システムの構築を目指している。この技術は，二化性系統を用いた遺伝子組み換えカイコの効率的な作出に貢献できると考えられる。

る。この飼育システムの構築のため，現在，休眠性に影響を与える成分の同定や新しい人工飼料の開発と効率的・簡便な飼育条件の確立を行なっている。これらの研究を実施し，開発した技術を利用することにより，二化性系統の飼育を高効率に行なうことが可能となる。特に，近年利用が進んでいる遺伝子組み換えカイコの作出には，多化性または二化性の非休眠卵を注射およびスクリーニングに調達することが望ましい。しかし，二化性系統において非休眠卵を胚期の低温催青（15DD）により得ることは，卵の孵化率の低下や組み換え体選抜に膨大な時間を費やすことにより，効率的な組み換えカイコの作出の障害となる。図 7 に示したスプレー剤により，一年中いつでも容易に非休眠卵が調達でき，効率的に遺伝子組み換えカイコの作出が可能になると考えられる。このことは，豊富な二化性のバイオリソースを活かした特徴ある遺伝子組み換えカイコ作出のための基盤技術になると期待される。

さらに，リンゴの樹の害虫として知られるヒメシロモンドクガ（*Orgyia thyellina*）は，カイコと同様に胚発生の初期に休眠を開始する昆虫であり，DH オーソログによって胚休眠が誘導されることを明らかにしている（Uehara *et al.*, 2011; 塩見，2010）。カイコの胚休眠誘導と類似した分子ネットワークにより休眠が誘導されると推測されるため，カイコで明らかになった知見を応用し，害虫防除に役立てられないか実験圃場のリンゴ園で検討している。

7．おわりに

本特集が「昆虫の休眠～再び～」ということで，休眠（ホルモン）物語の続編をイメージして研究を紹介させていただきました。まだまだ分からないことが山盛りで道半ばですが，少しでもカイコの休眠研究の面白さが伝われば幸いです。本研究は多くの共同研究者のおかげで成り立っています。この場を借りて御礼申し上げます。

引 用 文 献

Barbagallo, B., and Garrity, P.A. (2015) Temperature sensation in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol*, **34C**, 8-13.

Cao, E., Liao, M., Cheng, Y., and Julius, D. (2013) TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature*, **504**, 113-118.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**, 816-824.

Daimon, T., Kiuchi, T., and Takasu, Y. (2014) Recent progress in genome engineering techniques in the silkworm, *Bombyx mori*. *Develop Growth Differ*, **56**, 14-25.

Denlinger, D.L. (2008) Why study diapause? *Entomol Res*, **38**, 1-9.

Denlinger, D.L., Yocum, G.D., and Rinehart, J.P. (2012) Hormonal control of diapause. In Insect Endocrinology, L.I. Gilbert, ed. (San Diego: Academic Press).

Fukuda, S. (1951) Factors determining the production of non-diapause eggs in the silkworm. *Proc Jap Acad*, **27**, 582-586.

Fukuda, S. (1952) Function of the pupal brain and suboesophageal ganglion in the production of non-diapause and diapause eggs in the silkworm. *Ann Zool Japon*, **25**, 149-155.

Gluckman, P.D., Hanson, M.A., and Spencer, H.G. (2005) Predictive adaptive responses and human evolution. *Trends Ecol Evol*, **20**, 527-533.

Hahn, D.A., and Denlinger, D.L. (2011) Energetics of insect diapause. *Annu Rev Entomol*, **56**, 103-121.

Hasegawa, K. (1952) Studies on the voltinism of the silkworm, *Bombyx mori* L., with special reference to the organs concerning determination of voltinism. *J Fac Agric Tottori Univ*, **1**, 83-124.

Homma, T., Watanabe, K., Tsurumaru, S., Kataoka, H., Imai, K., Kamba, M., Niimi, T., Yamashita, O., and Yaginuma, T. (2006) G protein-coupled receptor for diapause hormone, an inducer of *Bombyx* embryonic diapause. *Biochem Biophys Res Commun*, **344**, 386-393.

Imai, K., Konno, T., Nakazawa, Y., Komiya, T., Isobe, M., Koga, K., Goto, T., Yaginuma, T., Sakakibara, K., Hasegawa, K., *et al.* (1991) Isolation and structure of diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc Jpn Acad*, **Ser B67**, 98-101.

Jurenka, R., and Nusawardani, T. (2011) The pyrokinin/ pheromone biosynthesis-activating neuropeptide (PBAN) family of peptides and their receptors in Insecta: evolutionary trace indicates potential receptor ligand-binding domains. *Insect Molec Biol*, **20**, 323-334.

Kogure, M. (1933) The influence of light and temperature on certain characters of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Agric Kyushu Imp Univ*, **4**, 1-93.

Kohno, K., Sokabe, T., Tominaga, M., and Kadowaki, T. (2010) Honey bee thermal/chemical sensor, AmHsTRPA, reveals neofunctionalization and loss of transient receptor potential channel genes. *J Neurosci*, **30**, 12219-12229.

Kostal, V. (2006) Eco-physiological phases of insect diapause. *J Insect Physiol*, **52**, 113-127.

Lee, Y., Lee, Y., Lee, J., Bang, S., Hyun, S., Kang, J., Hong, S.T., Bae, E., Kang, B.K., and Kim, J. (2005) Pyrexia is a new thermal transient receptor potential channel endowing tolerance to high temperatures in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet*, **37**, 305-310.

Liao, M., Cao, E., Julius, D., and Cheng, Y. (2013) Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, **504**, 107-112.

Matsutani, K., and Sonobe, H. (1987) Control of diapause-factor secretion from the suboesophageal ganglion in the silkworm, *Bombyx mori*: The roles of the protocerebrum and tritocerebrum. *J Insect Physiol*, **33**, 279-285.

Nijhout, H.F. (2003) Development and evolution of adaptive polyphenisms. *Evol Develop*, **5**, 9-18.

Roller, L., Yamanaka, N., Watanabe, K., Daubnerova, I., Zitnan, D., Kataoka, H., and Tanaka, Y. (2008) The unique evolution of neuropeptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, **38**, 1147-1157.

Rosenzweig, M., Brennan, K.M., Tayler, T.D., Phelps, P.O., Patapoutian, A., and Garrity, P.A. (2005) The *Drosophila* ortholog of vertebrate TRPA1 regulates thermotaxis. *Genes Dev*, **19**, 419-424.

Sato, A., Sokabe, T., Kashio, M., Yasukochi, Y., Tominaga, M., and Shiomi, K. (2014) Embryonic thermosensitive TRPA1 determines transgenerational diapause phenotype of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **111**, E1249-1255.

Sato, Y., Oguchi, M., Menjo, N., Imai, K., Saito, H., Ikeda, M., Isobe, M., and Yamashita, O. (1993) Precursor polyprotein for multiple neuropeptides secreted from the suboesophageal ganglion of the silkworm *Bombyx mori*: characterization of the cDNA encoding the diapause hormone precursor and identification of additional peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 3251-3255.

Sato, Y., Shiomi, K., Saito, H., Imai, K., and Yamashita, O. (1998) Phe-X-Pro-Arg-Leu-NH_2 peptide producing cells in the central nervous system of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Physiol*, **44**, 333-342.

Shimizu, I., Aoki, S., and Ichikawa, T. (1997) Neuroendocrine control of diapause hormone secretion in the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Physiol*, **43**, 1101-1109.

Sokabe, T., Tsujiuchi, S., Kadowaki, T., and Tominaga, M. (2008) Drosophila painless is a Ca2+-requiring channel activated by noxious heat. *J Neurosci*, **28**, 9929-9938.

Takasu, Y., Tamura, T., Sajwan, S., Kobayashi, I., and Zurovec, M. (2014) The use of TALENs for nonhomologous end joining mutagenesis in silkworm and fruitfly. *Methods*, **69**, 46-57.

Tauber, M.J., Tauber, C.A., and Masaki, S. (1986) Seasonal Adaptations of Insects (Oxford University press).

Tsuchida, K., and Yoshitake, N. (1979) Effect of environmental condition on the voltinism of the silkworm, *Bombyx mori* reared on artificial diets. *J Seric Sci Jpn*, **48**, 469-472.

Uehara, H., Senoh, Y., Yoneda, K., Kato, Y., and Shiomi, K. (2011) An FXPRLamide neuropeptide induces seasonal reproductive polyphenism underlying a life-history tradeoff in the tussock moth. *PLoS ONE*, **6**, e24213.

Wang, G., Qiu, Y.T., Lu, T., Kwon, H.W., Pitts, R.J., Van Loon, J.J., Takken, W., and Zwiebel, L.J. (2009) Anopheles gambiae TRPA1 is a heat-activated channel expressed in thermosensitive sensilla of female antennae. *Eur J Neurosci*, **30**, 967-974.

Watanabe, K. (1924). Studies on the voltinism of the silkworm, *Bombyx mori*. *Bull Sericult Exp Sta (Tokyo)*, **6**, 411-455.

Yamanaka, N., Yamamoto, S., Zitnan, D., Watanabe, K., Kawada, T., Satake, H., Kaneko, Y., Hiruma, K., Tanaka, Y., Shinoda, T., *et al.* (2008) Neuropeptide receptor transcriptome reveals unidentified neuroendocrine pathways. *PLoS ONE*, **3**, e3048.

Yamashita, O., and Hasegawa, K. (1985) Embryonic diapause. In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, G.A. Kerkut, and L.I. Gilbert, eds. (Oxford: Pergamon Press), pp. 407-434.

Yamashita, O., and Yaginuma, T. (1991) Silkworm eggs at low temperatures: Implication for sericulture. In Insects at Low Temperature, J.R.E. Lee, and D.L. Denlinger, eds. (New York: Chapman and Hall), pp. 424-445.

山下興亜・新美輝幸（2000）カイコから学ぶ休眠物語．*遺伝* **54**，65-69．

小瀬川英一・G. Vemananda Reddy・清水久仁光・岡島輝雄（2000）家蚕地理的品種における低温暗催青による非休眠卵の出現．*日蚕雑* **69**，369-375．

正木進三（1974）昆虫の生活史と進化（中央公論社）．

中島誠（1981）．生物生産と環境調節― 23 ―環境とカイコの化性・眠性（農学講座）．*農業および園芸* **56**，1549-1553．

伴野豊（2010）．クワコの形質特性：カイコとの比較研究を中心に．*蚕糸・昆虫バイオテック* **79**，87-95．

日本蚕糸学会（編）（1979）．「総合蚕糸学」日本蚕糸新聞社．

塩見邦博（2010）．昆虫の季節戦略と私の研究展望．*蚕糸・昆虫バイオテック* **79**，25-28．