

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

蛻皮激素對德國蜚蠊與雙紋姬蠊之活動行為日週律動的影
響(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-359-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學昆蟲學系暨研究所

計畫主持人：李後晶

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 6 月 2 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫進度報告

蛻皮激素對德國蜚蠊與雙紋姬蠊之活動行為日週律動的影

響

主持人：李後晶 國立臺灣大學昆蟲學系

背景及目的

日週律動意指生物週期接近 24 小時週期性的生理或行為表現 (Brady, 1982)。為了適應 24 小時日夜變化的地球環境，從細菌到哺乳動物，幾乎所有的生物都演化出日週律動的生物時鐘 (circadian clock)，並且具有相同的基礎性質 (Moore-Ede *et al.*, 1982; Gekakis *et al.*, 1995; Giebultowicz, 2000)。首先，生物個體內的日週律動時鐘無須依靠外界訊息，本身即可規律地振動 (oscillation)，因此在全暗或者全亮、並且定溫的恆定環境之下，仍可保持週期接近 24 小時的律動；這種「節律器依照自身週期所表現出的規律現象」，被稱為「自由律動 (free-running)」 (Saunders, 1976; Brady, 1982)。第二，在環境具有週期性變化 (例如明暗週期、溫度週期、餵食週期等) 的情況下，日週律動時鐘可受到環境週期的導引 (entrainment)，而與外界訊息同步 (synchronization) (Sommer, 1975; Saunders, 1976; Aschoff *et al.*, 1982; Brady, 1982)；具有導引效果的週期性訊息，則稱為「時間指標 (zeitgeber, time-giver)」 (Brady, 1969, 1982; Colwell and Page, 1990)。第三，日週律動時鐘必須能在不同的溫度下以幾乎相同的速率運轉，這個性質稱為「溫度補償 (temperature compensation)」。所有的生物反應都是化學反應，而一般化學反應的 Q_{10} 值

大約為 2——亦即當溫度上升 10 °C，反應速率約為原來的 2 倍；然而，生物時鐘的 Q_{10} 值則接近於 1 (Brady, 1982; Takahashi, 1995; Hardin, 2000).

日週律動的調控系統包含了 3 個組成：(1) 環境訊息輸入路徑 (input pathway): 將外界的環境訊息傳遞至節律器中樞；(2) 節律器 (pacemaker): 即產生震盪週期 (oscillation) 的部位，因為屬於細胞層次，所以也被稱為時鐘細胞 (clock cells)；(3) 時間訊息輸出路徑 (output pathway): 將節律器產生之時間訊息傳遞至下游，表現出各類生化、生理、行為的日週律動現象 (Hardin, 2000)。

(1) 節律器／時鐘細胞 (pacemaker/clock cells)：

相對而言，節律器的分子機制是較為清楚的。日週律動時鐘的分子機制包含數個轉錄與轉譯的負回饋機制 (transcriptional and translational feedback loops)，但是抑制性的負因子 (negative elements) 與提高性的正因子 (positive elements) 都包含在這些自我調節的副回饋機制中。週期基因 (*period*, *per*) 是核心負回饋機制的主要負因子，轉譯出的蛋白質 Per 含有一個 PAS 區 (PAS domain) (Dunlap, 1999; Hardin, 2000)。轉譯發生在細胞質內而蛋白質 Per 不能通過核膜，便會在細胞質內逐漸分解殆盡。在果蠅中，蛋白質 Per 若與蛋白質 Tim 結合成為異質二元體 (Per/Tim heterodimer) 便可進入細胞核中，並且反過來抑制 *per* 和 *tim* 的轉錄。這樣的自我回饋調節便造成了週期 (Edery, 1999; Scully and Kay, 2000)。

(2) 環境訊息輸入路徑 (input pathway)：

環境訊息輸入路徑是將時間訊息傳至節律器以和環境同步的路徑。一般來說，光的明暗週期是最強的時間訊息；此外，溫度、聲音、進食週期，以及社會訊息 (social cues) 都能夠使節律器與之同步，但效果相對弱了許多 (Stokkan *et al.*, 2001)。目前對於環境訊息輸入路徑機制的了解仍然相當有限。

(3) 時間訊息輸出路徑 (output pathway) :

時間訊息輸出路徑是在日週律動循環中的特定時間被節律器活化而表達出生理或行為日週律動的路徑。因為這個路徑所經的距離較其他兩個組成長，而且為了配合多樣的環境和目的，而使得多樣性較大，所以對於這個路徑的機制所知甚少。

德國蜚蠊與雙紋姬蠊的日週律動

活動行為 (locomotion) :

德國蜚蠊 [*Blattella germanica* (L.)] 的活動行為依照各個齡期、性別和生殖狀況而不同 (Lin and Lee, 1996)。在固定溫度並固定光週期的環境下，雄性的成蟲會表現出日週律動的活動行為 (Sommer, 1975)，但雌性成蟲則不然。在 28 °C，光週期 (LD cycles) 24 小時 (16 小時亮 8 小時暗，16L:8D) 的情況下，雄性德國蜚蠊成蟲表達週期為 24 小時的週期性活動行為；然後將這些雄性成蟲移至缺乏環境時間訊息的全暗環境下 [28 °C, DD (constant darkness)]，這些雄性成蟲會表現出週期略短於 24 小時的自由律動 (約為 23.6 小時) (Lin and Lee, 1996)。相對地，在同樣的環境下，德國蜚蠊雌性成蟲的活動行為和雄性成蟲完全不同：處女成蟲不表現日週律動的活動行為，日活動量呈現與生殖週期相配合的週期性 (Lin and Lee, 1996)。然而，經過切除卵巢手術之後，雌蟲便可表現出與雄蟲完全相同的活動模式：在亮暗週期 (LD) 下表現出 24 小時週期的日週律動，在全暗 (DD) 環境下表現出自由律動，日週期長度與雄蟲的沒有顯著差異，活動高峰也與雄蟲相同。由此可知，雌蟲的活動行為仍然受到節律器的控制，但卵巢會對日週律動活動行為產生掩蓋效應 (masking effect) (Lin and Lee, 1996)。

雙紋姬蠊 [*B. germanica* (Brunner)] 與德國蜚蠊不但同屬，而且都是 *germanica* species group 的一員，在外觀、生活史、生殖週期、求偶行為

等各方面都非常近似。兩者最明顯的不同在於居地：德國蜚蠊生活於人類家屋之中，並且性習群聚，會產生聚集費洛蒙；雙紋姬蠊生活於野外，並且習於個體行動，因而並不製造聚集費洛蒙。德國蜚蠊之雌蟲僅與同種雄蟲交尾，而雙紋姬蠊的雌蟲會接受同種與德國蜚蠊的雄蟲。值得注意的是，兩者雖然如此接近，在活動行為上，雙紋姬蠊卻沒有上述德國蜚蠊所表現的「卵巢對活動行為的掩蓋效應」，因而可在掩蓋效應的研究上做為良好的對照。雙紋姬蠊與德國蜚蠊一樣，雌蟲懷孕期會攜帶卵鞘，且不管交尾與否皆會週期性地形成卵鞘，因此皆具有週期性的生殖現象。由於雌蟲於懷孕期間不需覓食及尋找配偶，活動量非常低，因此無法表現活動行為的日週律動，所以雙紋姬蠊與德國蜚蠊懷孕雌蟲皆受到懷孕的負向掩蓋作用 (negative masking effect)。兩物種不同的是雙紋姬蠊處女雌蟲可以表現行為日週律動，而且活動都侷限於相對夜晚 (subjective night)；但是在同一條件下，德國蜚蠊的處女雌蟲在性接受期間不論相對夜晚或白天，活動量都很高，也導致活動行為的日週律動無法表現。因此雙紋姬蠊雌蟲只具有懷孕的負向掩蓋因子，而德國蜚蠊雌蟲則具有懷孕和性接受期的雙重負向掩蓋因子。但是雙紋姬蠊不管交尾與否皆有週期性的生殖現象，也就是卵巢都會發育並且形成卵鞘，若是如此，理論上掩蓋因子應該會掩蓋行為日週律動的表現，然而雙紋姬蠊處女雌蟲仍可以表現行為日週律動，是否有其它因子影響仍屬未知 (Tsai and Lee, 2001)。

德國蜚蠊之視網膜電位圖譜 (electroretinogram)：

在日週律動調控的 3 個組成中，掩蓋效應究竟是作用在哪一個上呢？視網膜電位圖譜 (ERG) 是德國蜚蠊的另外一個週期性生理反應，雄性德國蜚蠊的 ERG 結果和活動行為一樣呈現日週律動；但是相對地，處女成蟲的 ERG 結果卻和活動行為不同，沒有掩蓋效應，而顯現出日週律動。因此可知，掩蓋作用的掩蓋因子 [masking factor(s)] 並非作用在節律器上，而是作用在訊息輸出路徑上 (Chang, 2000)。

神經系統或內分泌系統？

訊息輸出路徑相當地長：使用切除法已知德國蜚蠊活動行為的節律點位在大腦視葉的 lobula 和 medulla 之間 (Wen and Lee, 2000)，而活動行為的表現顯然需要腳部的配合。掩蓋效應必然是會作用在腦部到腳部之間。那麼掩蓋因子是經由什麼管道由卵巢傳達到訊息輸出路徑而阻斷它呢？生物體內傳遞訊息有兩大系統：神經系統和內分泌系統。已知在德國蜚蠊雌性成蟲中，切斷腹神經索對活動行為並無顯著影響。切斷腹神經索後，卵巢的訊息便無法經過神經網路傳遞，但是此項掩蓋作用仍然不會消失，可見卵巢對於雌蟲日週律動的掩蓋因子並非經過神經網路，而可能是經由內分泌路徑調控的 (Lin and Lee, 1998)。

掩蓋因子是什麼物質？

由以上推論，掩蓋因子應該是由卵巢發出的荷爾蒙。到目前為止，尚未有任何文獻提出掩蓋作用的確實機制。我們懷疑造成掩蓋作用的調控荷爾蒙，乃是德國蜚蠊卵巢主要分泌的荷爾蒙——蛻皮激素 (ecdysone)。

蛻皮激素 (ecdysone)：

由 1917 年 Kopec 提出首篇報告以降，傳統上對蛻皮激素的認知，正如它的名字，就是一種控制蛻皮（包括變態）的荷爾蒙 (a molting hormone)，和青春激素 (juvenile hormone, JH) 配合，共同控制蛻皮與變態：當兩者在昆蟲體內的濃度都高時，昆蟲蛻皮成為下一齡的幼蟲或若蟲；當青春激素的濃度低而蛻皮激素的濃度高時，昆蟲蛻皮成為蛹或成蟲 (Hoffmann and Hetru, 1983; Nijhout, 1994) ——也就是說，傳統的觀念認為蛻皮激素作用在幼蟲或若蟲時期 (Kozlova and Thummel, 2000)。而在這個時期，蛻皮激素是由前胸腺 (prothoracic gland) 或其同源組織 [例如環狀體 (ring gland) 或腹側體 (ventral gland)] 所分泌的 (Hoffmann and Hetru,

1983; Nijhout, 1994)；也有少數昆蟲，比如說甲蟲 *Tenebrio molitor*，沒有特化的器官或組織來分泌蛻皮激素 (Delbecque and Slama, 1980)，雖有一些報導認為包圍脂肪體周圍的絳色細胞 (oenocyte) 是蛻皮激素的來源 (Romer *et al.*, 1974)，但並未獲得公認 (Hoffmann and Hetru, 1983; Nijhout, 1994)。

因為大多數昆蟲的成蟲已經不需要蛻皮，而且前胸腺退化不再有作用，所以傳統的觀念並不認為成蟲具有蛻皮激素。然而邇來對成蟲蛻皮激素的研究顯示，蛻皮激素在成蟲期具有和在幼期完全不同的功用。在目前所知的所有雌性成蟲，卵巢中的濾泡細胞 (ovarian follicles) 都會分泌高濃度的蛻皮激素，在卵巢的成熟、卵黃蛋白 (yolk protein) 的合成和卵的發育中扮演了重要的角色。但其作用的細節，則因昆蟲生殖行為上高度演化輻射造成的多樣性，而隨昆蟲的種類而異 (Hoffmann and Hetru, 1983; Nijhout, 1994)：在蜚蠊目中，胎生性的蜚蠊 *Diploptera punctata* 中，卵巢分泌蛻皮激素來刺激腦分泌 allatohibins，從而抑制咽喉側腺 (corpora allata, CA) 對青春激素的分泌；在雙翅目的埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 中，卵巢分泌蛻皮激素刺激脂肪體產生卵黃素 (vitellogenin)；而蛻皮激素在半翅目的吸血椿象 *Rhodnius prolixus* 中的角色，則與 *Diploptera punctata* 類似。在雄性成蟲上，蛻皮激素在精巢的成熟和精子的產生也有作用，但詳情並不清楚；而蛻皮激素的分泌來源亦不確定，僅有菸芽夜蛾 (另譯「菸草青蟲」) *Heliothis virescens* 確知是在精巢本身 (Hagedorn, 1985; Nijhout, 1994)。除了與生殖相關的功能之外，蛻皮激素在 *Diploptera punctata* 中，可以促使大腦蕈狀體 (mushroom body) 的細胞在成蟲之後仍然再度增生，打破了傳統「成蟲之後大腦細胞便不再增生」的觀念，具有重要的意義 (Tsia *et al.*, 1999)。

蛻皮激素之受器 (ecdysteroid receptor)：

在果蠅幼蟲的研究中，已知蛻皮激素之受器 (ecdysteroid receptor) 由兩種蛋白質組成：其一是同名的蛋白 EcR (ecdysteroid receptor)，另一者是 Usp (ultraspiracle) (<http://sdb.bio.purdue.edu/fly/newgene/ecdysotr.htm>)。兩者組成異質二元體後，在蛻皮激素促使變態的發動 (on set) 上，證實有 *in vivo* 的活化以及抑制轉錄的作用；並且，這種異質二元體可被蛻皮激素誘導產生。該結構與其脊索動物中的同源物類維生素 X 的受器 (retinoid X receptor) 有很高的相似度 (Kozlova and Thummel, 2000)。然而，昆蟲成體所使用的蛻皮激素受器是否和幼期相同，則沒有文獻提出。

蛻皮激素 (ecdysone) 相關之基因：

在黃果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 的遺傳研究中發現許多與蛻皮類固醇生合成 (ecdysteroid biothesis) 有關的基因很多，包括參與蛻皮激素之生成、代謝以及與蛻皮激素反應之受器 (ecdysteroid receptor) 蛋白質產生有關的基因。舉例來說，P450 基因群在蛻皮類固醇生合成複雜的途徑中佔有相當比例的重要性，包括將膽固醇 (cholesterol) 轉換成 7-dehydrocholesterol (是蛻皮類固醇生合成的第一步)，而在將蛻皮激素 (ecdysone) 轉換成 20-hydroxyecdysone 的過程中所需的 ecdysone 20-monoxygenase 也是由一種 P450 基因產生 (Feyereisen, 1999)。除了 P450 之外，還有許多基因也與蛻皮激素的合成與代謝有關，但是到目前為止絕大多數被發現的都是影響幼蟲或若蟲蛻皮與變態 (metamorphosis) 的基因，與成蟲蛻皮激素有關的基因很少，*ecdysoneless (ecd)* 基因是少數被證實與成蟲卵巢蛻皮激素生合成有關的基因 (Warren *et al.*, 1996)。研究顯示 *ecd¹* 突變會使膽固醇或膽固醇的衍生物 (derivatives, 25-hydroxycholesterol) 最後轉換成蛻皮類固醇的量少很多，而這種現象在果蠅幼蟲的環狀體 (ring glands) 或是成蟲的卵巢都有發現。因此該基因在探討德國蜚蠊成蟲蛻皮激素與日週律動掩蓋效應的關係上應該是一個理想的標的基因。另外前面曾提到的有一種 P450 基因可

以產生 ecdysone 20-monoxygenase，將蛻皮激素 (ecdysone) 轉換成 20-hydroxyecdysone，由於後者才是真正與蛻皮激素受器作用的活化態，是蛻皮類固醇可以真正作用的關鍵化合物，目前在德國蜚蠊已經選殖出兩個 P450 基因的 cDNA (*CYP6K1* 與 *CYP6J1*) (Wen and Scott, 2001)，比較德國蜚蠊 P450 的 *CYP6K1* 與 *CYP6J1* 跟 *Locusta migratoria* 的 P450 *CYP6H1* 在胺基酸序列上的差異，發現有高的相似性。由於 *Locusta migratoria* 的 P450 *CYP6H1* 已證實與 ecdysone 20-hydroxylase 的產生有關，而這個酵素可以影響蛻皮激素 (ecdysone) 轉換成 20-hydroxyecdysone 的過程，因此推測這些 P450 基因也是研究德國蜚蠊成蟲蛻皮激素與日週律動掩蓋效應的重要因子。所以本研究打算以 *ecdysoneless* 與 *P450-CYP6K1* 這兩個與蛻皮激素合成相關的基因為對象進行分析，進而確認蛻皮激素與雌蟲日週律動掩蓋效應的關係。

在選定了標的基因後，我們計畫以 RNA interference (RNAi) 的技術讓 *ecdysoneless* 與 *P450-CYP6K1* 兩基因轉錄 (transcription) 產生的 mRNA 分解 (degradation)，使轉譯 (translation) 無法順利完成，這種情況就好像 DNA 發生了失去功能(loss-of function) 的突變 (即 DNA 序列的變化讓該基因原有的產物功能消失)；這個方法的好處是，雖然德國蜚蠊不像黃果蠅這種模式生物一樣有很多基因失去功能的突變品系，但利用這種方法可以快速產生類似基因失去功能的效果，就好像把基因關掉一樣 (silencing)。Fire *et al.* (1998) 首次嘗試將雙股 RNA (double stranded DNA) 注射入線蟲 (*Caenorhabditis elegans*) 中，產生基因關閉 (knocked out) 的效果。Bosher and Labouesse (2000) 推測 RNAi 可能是一種細胞防禦機制 (cellular defense mechanism)，用來讓自私基因 (selfish DNA) 無法侵入。利用這種技術我們可以讓 *ecdysoneless* 與 *P450-CYP6K1* 兩基因的產物無法表現，進而產生不能合成蛻皮激素的昆蟲，以這些雌蟲進行日週律動分析，如果其表現出與雄蟲完全相同的活動模式：在全暗環境下表現出自由律動；在亮暗週期下表現出日週律動，日週期長度與雄蟲的沒有顯著差異，活動高峰也與雄蟲相同，這代表蛻皮激素的確可能是卵巢掩蓋日週律動的決定因子。

由於雙紋姬蠖與德國蜚蠊在生活環境以及生殖策略有顯著差異，而這樣的差異是否會反應在蛻皮激素與日週律動表現關係上，是一個非常值得探討的問題。我們計畫也以 RNAi 的方法在雙紋姬蠖中產生 *ecdysoneless* 與 *P450-CYP6K1* 兩基因失去功能的個體，並進行行為活動的日週律動表現分析。

材料和方法

供試蟲源及飼養方法

自台北市區及近郊採得德國蜚蠊 (*Blattella germanica*) 及雙紋姬蠖 (*B. bisignata*)，置於 28°C、光週期為 16 小時光照、8 小時黑暗 (16L:8D) 的恆溫生長箱中，以統一寶多福特幼犬飼料及水，累代飼養數十代之後，始為試驗之用。若蟲以群聚的方式飼養於 2 公升的透明塑膠桶中，桶蓋上挖出一個直徑 6 公分的洞，以不銹鋼網覆蓋以為透氣之用；桶壁上塗上 FLUON (Northern Product, Inc.)，避免昆蟲逃逸；桶中放置數塊保麗龍，增加蜚蠊攀爬躲藏的空間。俟發育至末齡若蟲，再移到 250 ml 的透明塑膠杯 (直徑 9.5 公分，高 5.5 公分，盒蓋有 3 x 3 平方公分之紗網) 中飼育。每日將羽化的成蟲挑出，雌、雄蟲分開飼養，以備試驗之用。成蟲日齡計算的方式，以羽化 24 小時以內者為 0 日齡，24 小時至 48 小時者為 1 日齡，餘者類推。

活動行為的偵測

所有試驗昆蟲的活動情況，均以紅外線活動偵測系統偵測，如無特別敘述，試驗的環境均在 28°C 的條件下，先使試驗昆蟲的活動與 16L:8D 的光週期同步，5 天後再改為全暗 (DD)，使其表現自由律動。紅外線活動偵測系統包含 3

個主要的部分：(1)紅外線活動偵測盒 (motion detector box)－此偵測盒以 0.5 公分厚的透明壓克力製成，內徑長 27 公分、寬 2 公分、高 3 公分，中央部分格出長 3 公分、寬 2 公分、高 2.5 公分的空間，四壁及正上方貼上黑紙，佈置成一個黑暗的區域，作為蜚蠊棲息的場所，並在此空間內提供足夠的食物及水。活動偵測盒週圍放置 6 對紅外線感應器 (Infrared sensor) (包含發射器及接收器各一個)；(2)資料截收卡 [data acquisition card (AMUX-64T, National Instruments[®])]－此卡接收來自紅外線接收器傳來的訊息；(3)個人電腦－IBM 相容電腦，內含一張介面卡 (AT-MIO-16, National Instruments[®])，可蒐集來自資料截收卡的訊號。活動時間蒐集及記錄的原理是：當試驗昆蟲通過紅外線感應器時，紅外線發射器所發射的紅外線無法由接收器接收，造成紅外線接收器正負二極間之電位差改變，此種改變會透過資料截收卡傳至電腦內的介面卡，再以程式軟體加以區辨，並記錄電位差發生變化的時刻以及發生電位差改變的紅外線感應器號碼，由此獲得試驗昆蟲活動的時刻及所在的位置。我們將以紅外線感應器被遮斷的次數來作為活動量的指標。本系統將電腦的掃描頻率設定為 300 次／10 秒。

得到初步的資料後，經由試算表繪出每一試驗昆蟲的活動模式圖，並且計算每單一小時的活動量，以全暗環境下所蒐集到的連續 10 天的資料，利用 Sokolove and Bushell (1978)所提出的 chi-square periodogram 分析是否具有自由律動的現象，並且計算日週期長度(circadian period)，及其活動高峰之相位(phase)。

蛻皮激素對雄性德國蜚蠊活動行為之影響 (functional test)：

以紅外線連續偵測活動的方式，記錄 20 隻第 0 日齡雄性德國蜚蠊成蟲的活動行為。先在 16 L:8 D 下 5 天，接著在 DD 狀態下 10 天。然後將投影片裁成 20 條長 27 公分、寬 2 公分、高 3 公分 (和紅外線活動偵測盒底部的形狀、面積相同) 的長條，其中 10 條塗布蛻皮激素類似物之酒精溶液，另外 10 條僅塗布酒精，風乾後各自置入紅外線活動偵測盒，平整鋪在底

部，讓德國蜚蠊在實驗中步行其上，由接觸而吸收蛻皮激素類似物，在 16 L:8 D 下 5 天，接著在 DD 狀態下 10 天。然後除去投影片，在 16 L:8 D 下 5 天，接著在 DD 狀態下 10 天。

本實驗之目的在於觀察蛻皮激素是否能夠讓原本沒有掩蓋效應的雄性成蟲產生掩蓋效應。如果蛻皮激素可以對雄性成蟲造成類似於雌性成蟲卵巢的掩蓋作用，則假說「蛻皮激素是掩蓋作用的掩蓋因子」便可得到有力的佐證。

蛻皮激素對以綁縛法斷絕荷爾蒙流通之雌性德國蜚蠊活動行為之影響 (functional test) :

取第 0 日齡雌性德國蜚蠊處女成蟲 20 隻，在腹節卵巢上端處以棉線緊縛，使「卵巢後血體腔」與「卵巢前血體腔」隔開，血淋巴無法在兩者之間流通。以紅外線連續偵測活動的方式，記錄其活動行為。其中 10 隻的紅外線偵測盒中放入塗布蛻皮激素類似物之投影片（方法如前所述），另 10 隻的紅外線偵測盒中則放入僅塗布溶劑之投影片（如前述），在 16 L:8 D 下 4 天，接著在 DD 狀態下 9 天。

本實驗之目的在於觀察（一）斷絕卵巢後身體與卵巢前身體的血淋巴流通後，由卵巢分泌的蛻皮激素無法隨著血淋巴運送往身體前方，是否會因而阻斷雌性德國蜚蠊成蟲的掩蓋效應？（二）若會，此時投以蛻皮激素類似物，是否能「救回 (rescue)」其掩蓋效應？

蛻皮激素對帶卵鞘期之雌性德國蜚蠊活動行為之影響 (functional test) :

以紅外線連續偵測活動的方式，在 16 L:8 D 下記錄 20 隻第 0 日齡雌性德國蜚蠊處女成蟲的活動行為。在第 6 天給予未交尾過的第 10 日齡雄性成蟲，交尾後繼續紀錄紅外線連續偵測活動。觀察產出卵鞘的時

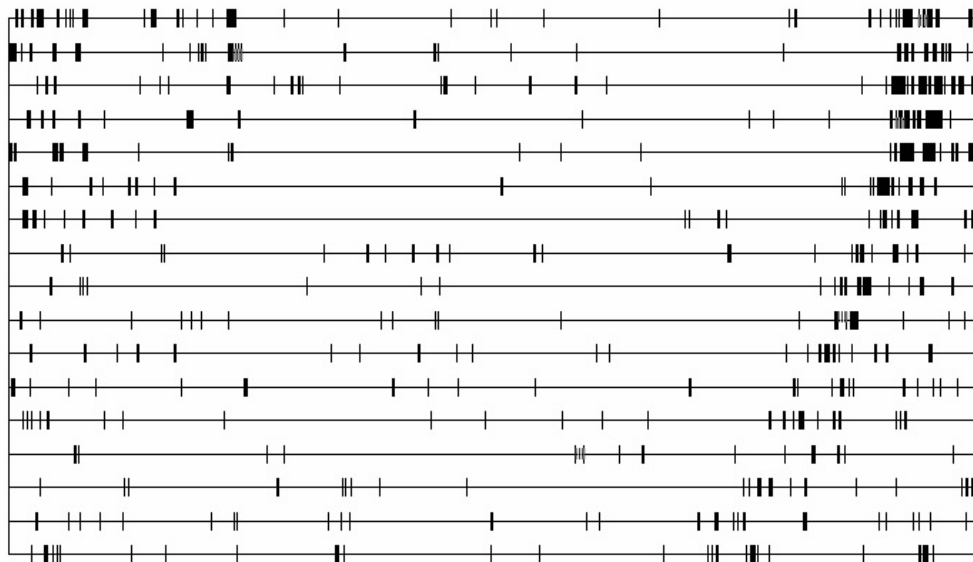
間，在產出卵鞘後 4 天，實驗組 10 隻在紅外線偵測盒中加入塗布蛻皮激素類似物之投影片（方法如上述），對照組 10 隻的紅外線偵測盒中加入僅塗布酒精風乾的投影片（如上述），繼續紀錄其活動行為。7 天後取出投影片，繼續紀錄其活動行為。

目的：帶卵鞘期的德國蜚蠊 mated female 活動行為少。若吸收蛻皮激素類似物後活動行為立刻增加、並且不受光暗影響（處女雌蟲第 5~7 日齡掩蓋效應之特色），即可為蛻皮激素是掩蓋因子提供有力的佐證。

結果：

蛻皮激素對雄性德國蜚蠊活動行為之影響

投予蛻皮激素的德國蜚蠊雄性成蟲仍然呈現明顯的日週律動活動行為。（圖 1.）






圖 1. 28 °C，前 5 天光週期 (LD cycles) 為 16 小時亮 8 小時暗 (16L:8D)，然後移至全暗環境 (DD) 下，投予蛻皮激素類似物的雄性德國蜚蠊 [*Blattella germanica* (L.)] 成蟲的活動行為圖譜。圖譜上方的黑白橫槓 (前 5 天) 以及全黑橫槓 (第 6 到第 18 天) 表示光週期，黑和白分別指亮與暗的狀態。每條橫線表示 24 小時，依照天數排在前一天的下方。垂直短線表示活動行為。

蛻皮激素對以綁縛法斷絕荷爾蒙流通之雌性德國蜚蠊活動行為之影響 (functional test) :

被綁縛的德國蜚蠊雌性成蟲的活動行為很少 (圖 2.)，無法判斷是否具有日週律動。

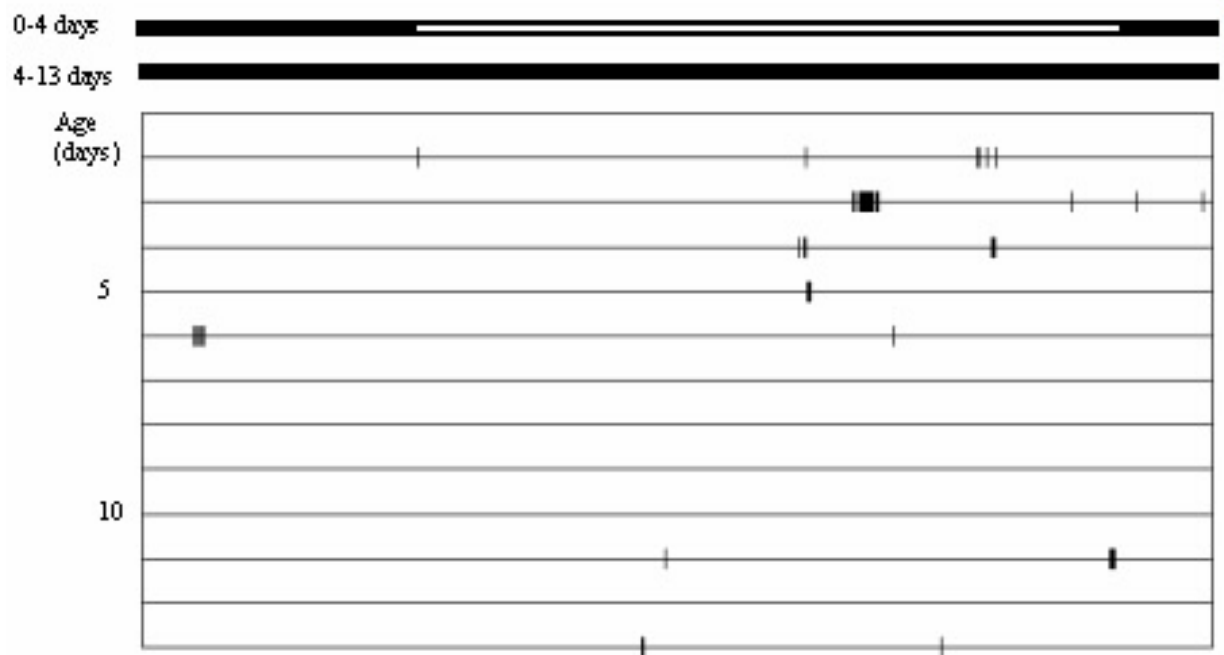


圖 2. 28 °C，前 4 天光週期 (LD cycles) 為 16 小時亮 8 小時暗 (16L:8D)，然後移至全暗環境 (DD) 下，投予蛻皮激素類似物的以綁縛法斷絕荷爾蒙流通之雌性德國蜚蠊 [*Blattella germanica* (L.)] 成蟲的活動行為圖譜。圖譜上方的黑白橫槓 (前 4 天) 以及全黑橫槓 (第 5 到第 13 天) 表示光週期，黑和白分別指亮與暗的狀態。每條橫線表示 24 小時，依照天數排在前一天的下方。垂直短線表示活動行為。

蛻皮激素對帶卵鞘期之雌性德國蜚蠊活動行為之影響

(functional test) :

與預期不同，投予蛻皮激素的帶卵鞘德國蜚蠊 mated female 並未有大量活動行為。並且具有明顯的光暗活動差異。(圖 3.)

討論：

蛻皮激素對雄性德國蜚蠊活動行為之影響

投予蛻皮激素類似物之德國蜚蠊雄性成蟲活動行為仍然表現明顯的日週律動，可能有以下三種原因：

- (1) 本投予方法不足以讓受試昆蟲體內蛻皮激素濃度提高至產生掩蓋作用之閾值。
- (2) 雄性成蟲蛻皮激素受器的位置、出現時機或者接受蛻皮激素之後的反應與雌蟲不同，無法產生掩蓋作用。

(3) 蛻皮激素的確不是掩蓋因子。

因此，針對以上各種可能，分別設計下一步的實驗，用以判斷：

(1) 偵測德國蜚蠊成蟲體內蛻皮激素濃度之變化。

(2) 蛻皮激素對去除卵巢之雌性德國蜚蠊活動行為之影響；

利用免疫染色法去偵測德國蜚蠊成蟲蛻皮激素受器。

(3) 德國蜚蠊與雙紋姬蠊卵巢移植之功能試驗。

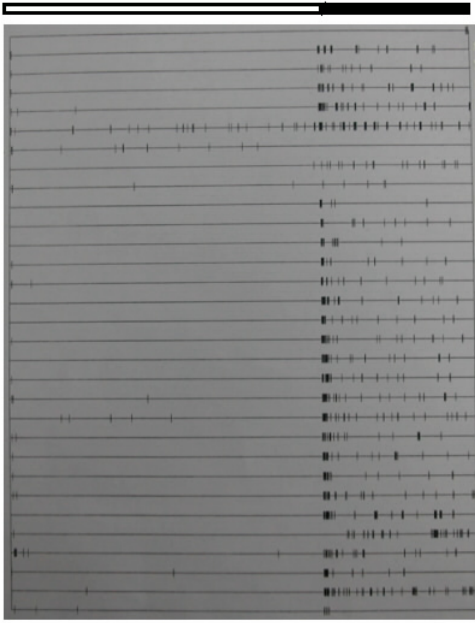


圖 3. 28 °C，前 4 天光週期 (LD cycles) 為 16 小時亮 8 小時暗 (16L:8D)，然後移至全暗環境 (DD) 下，投予蛻皮激素類似物的帶卵鞘期雌性德國蜚蠊 [*Blattella germanica* (L.)] 成蟲的活動行為圖譜。圖譜上方的黑白橫槓 (前 4 天) 以及全黑橫槓 (第 5 到第 13 天) 表示光週期，黑和白分別指亮與暗的狀態。每條橫線表示 24 小時，依照天數在前一天的下方。垂直短線表示活動行為。

蛻皮激素對以綁縛法斷絕荷爾蒙流通之雌性德國蜚蠊活動行為之影響 (functional test)：

被綁縛的德國蜚蠊雌性成蟲的活動行為很少，無法判斷是否具有日週律動。原因可能是綁縛對其傷害過大，嚴重影響活動行為。因此，後續實驗無法再使用綁縛法。

蛻皮激素對孕期之雌性德國蜚蠊活動行為之影響 (functional test) :

與預期不同，投予蛻皮激素的帶卵鞘德國蜚蠊 mated female 並未有大量活動行為；尤其是具有明顯的光暗活動差異的「同步」現象，和過去所得結果不同。其原因還需進一步的實驗，方能釐清。

結語

我們期待能夠得到以下結果：了解蛻皮激素是否為德國蜚蠊雌性成蟲卵巢掩蓋日週律動的掩蓋因子。若是，並了解其作用濃度暨位置。

生物時鐘廣泛存在於各種生物中，是生物適應環境的重要機制。但一般常見的模式動物（如果蠅及老鼠）大多只能進行分子或者單一細胞層次的研究，很難分析整體的聯繫網絡。而德國蜚蠊擁有「卵巢對雌性成蟲日週律動的掩蓋作用」特性，對於生物時鐘整體調控機制的研究具有其他實驗動物難及的優勢。本計畫如果順利完成，可以提供掩蓋作用的調控機制，對生物時鐘的調控機制的了解將可以擴大到訊息輸出路徑方面。

參考文獻

Aschoff, J. , S. Daan, and K. I. Honma. 1982. Zeitgebers, entrainment, and masking: some unsettled questions. In: J. Aschoff, S. Daan, and G. Groos (eds.). Vertebrate Circadian Systems: Structure and Physiology. Springer-Verlag, Berlin. pp. 13-24.

Bosher, J. M., M. Labouesse. 2000. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. Nat. Cell. Biol. 2:E31-E36.

Brady, J. 1969. How are insect circadian rhythms controlled.

Nature 223: 781-784.

Brady, J. 1982. Circadian rhythms in animals physiology. pp. 121-140. In: J. Brady (eds.) Biological Timekeeping. Cambridge Univ. Press, London.

Chang, H. W. 2000. The relationship between locomotion pacemaker and circadian rhythm of ERG in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). Master' thesis. National Taiwan Univ. Press, Taipei. 49pp.

Colwell, C. S., and T. L. Page. 1990. A circadian rhythm in neural activity can be recorded from the central nervous system of the cockroach. J. Comp. Physiol. A 166: 643-649.

Delbecq, J. and K. Slama. 1980. Ecdysteroid titers during autonomous metamorphosis in a dermestid beetle. Z. Naturforsch. 35c: 1066-1080.

Dunlap, J. C. 1999. Molecular bases for circadian clocks. Cell 96: 271-290.

Edey, I. 1999. Role of posttranscriptional regulation in circadian clocks: lessons from *Drosophila*. Chronobiol. Int. 16: 377-414.

Feyereisen, R. 1999. Insect P450 enzymes. Annu. Rev. Entomol. 44:507-533.

Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391:806-811.

Gekakis, N., L. Saez, A. M. Delahaye-Brown, M. P. Myers, A. Sehgal, M. W. Young and C. J. Weitz. 1995. Isolation of *timeless* by PER protein interaction: defective interaction between *timeless* protein and long-period mutant PER^L. Science 270: 811-815.

Giebultowicz, J. M. 2000. Molecular mechanism and cellular distribution

- of insect circadian clocks. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 769-793.
- Hagedorn, H. H. 1985. The role of ecdysteroids in reproduction. pp. 205-262 in G. A. Kerkut and L. I. Gilbert eds. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Pergamon, New York.
- Hardin, P. E. 2000. From biological clock to biological rhythms. *Genome Biol.* 1(4): 1023.1-1023.5.
- Hoffmann, J. A. and C. Hetru. 1983. Ecdysone. pp. 65-88 in R. G. H. Downer and H. Laufer, 2nded. *Endocrinology of insects*. ARL., New York.
- Kozlova, T. and C. S. Thummel. 2000. Steroid Regulation of Postembryonic Development and Reproduction in *Drosophila*. *TEM Vik.* 11 7: 276-280.
- Lin, T. M. and H. J. Lee. 1996. The expression of locomotion circadian rhythm in female German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Chronobiol. Int.* 13:81-91.
- Lin, T. M. and H. J. Lee. 1998. The parallel control mechanisms underlying locomotor activity and sexual receptivity of female German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *J. Insect Physiol.* 44: 1039-1051.
- Moore-Ede, M. C., F. M. Sulzman and C. A. Fuller. 1982. *The clocks that time us*. Harvard Univ. Press, Cambridge. 448pp.
- Nijhout, H. F. 1994. *Insect hormone*. Princeton Univ. Press, New Jersey. 267pp.
- Romer, F., H. Emmerich, and J. Nowock. 1974. Biosynthesis of ecdysones in isolated prothoracic glands and oenocytes of *Tenebrio molitor in vitro*. *J. Insect Physiol.* 20: 1975-1987.

- Saunders, D. S. 1976. Insect Clocks. Pergamon Press, Oxford. 279 pp.
- Scully, A. L., and S. A. Kay. 2000. Time files for *Drosophila*. Cell 100: 297-300.
- Sommer, S. H. 1975. Experimental investigation of the circadian locomotor activity of *Blattella germanica* L. (Dictyoptera: Blattellidae). Biol. Zentralbl. 94: 455-467.
- Stokkan, K. A., S. Yamazaki, H. Tei, Y. Sakaki and M. Menaker. 2001. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. Science 291: 490-493.
- Takahashi, J. S. 1995. Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. Annu. Rev. Neurosci. 18: 531-553.
- Tsia, C. W. and H. J. Lee. 2001. Analysis of specific adaptation to a domicile habitat: a comparative study of two closely related cockroach species. J. Med. Entomo. 38: 245-252.
- Tsia, W. H., A. S. Chang, and Y. S. Chow. 1999. Mitogenic effects of 20-hydroxyecdysone on neurogenesis in adult mushroom bodies of the cockroach, *Diploptera punctata*. J. Neurobiol. 39: 264-274.
- Warren, J. T., J. S. Bachmann, J.-D. Dai, L. I. Gilbert. 1996. Differential incorporation of cholesterol and cholesterol derivatives into ecdysteroids by the larval ring glands and adult ovaries of *Drosophila melanogaster*: a putative explanation for the *l(3)ecd^l* mutation. Insect. Biochem. Molec. Biol. 26:931-943.
- Wen, H. W. and H. J. Lee. 2000. Unequal coupling between locomotor pacemakers of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). J. Insect

Physiol. 46: 89-97.

Wen, Z., and J. G. Scott. 2001. Cloning of two novel P450 cDNAs from German cockroaches, *Blattella germanica* (L.). *CYP6K1* and *CYP6J1*. *Insect Molecular Biology* 10:131-137.