

昆虫の概「倍」日リズムの形成要因：概日時計の観点から

Roles of the circadian clock in driving circa'bi'dian rhythm in an insect

((公社) 日本動物学会推薦)

代表研究者 大阪大学 志賀向子 Osaka University Sakiko SHIGA

The large black chafer *Holotrichia parallela* exhibits ~48-h circa'bi'dian rhythm. Although circadian rhythm is thought to involve the circadian clock, there is no molecular evidence. Because there are no two-day cycles in geophysical environments, nothing is known about ultimate factors for the circadian rhythm. To discuss the proximate and ultimate factors of the circadian rhythm we first examined circadian clock genes expressed in the head or brain with its oscillation period, then compared life history traits, especially on feeding and reproduction between species exhibiting the circadian rhythm including *H. parallela* and *Holotrichia* species exhibiting the circadian rhythm. We found mRNA abundance of circadian clock genes shows daily rhythm in the head and brain. When feeding with certain plant leaves, *H. parallela* ate and laid eggs more than one *Holotrichia* species with the circadian rhythm. Species exhibiting the circadian rhythm have a distinct external form of a female reproductive organ compared with those exhibiting circadian rhythm. These results suggest *H. parallela* have the circadian clock in the brain, supporting an idea that circadian clock is involved in the circadian rhythm. *H. parallela* may have efficient digestive system to eat a large amount of food at one time to compromise less eating chance.

研究目的

概日時計により駆動される概日リズム(約 24 時間周期の内因性リズム)は、生物の環境周期との調和や、社会的同調に重要な性質であり、生物に普遍的に存在すると言われている。一方、概日リズムの二倍の周期で活動する動物もいる。私たちはこれまでに、潜土性のオオクロコガネ(昆虫綱コウチュウ目コガネムシ科クロコガネ属)が野外でほぼ二日に一度夜に活動し、実験室の恒暗条件においても約 48 時間の周期で地上に出現する概「倍」日リズムを持つことを報告した(Kawasaki et al., 2017)。二日と言う地球物理学的な環境周期は見当たらず、このリズムの究極要因は謎である。また、光パルスに対する行動リズムの位相反応から、概倍日リズムは概日時計により構成されると考えられたが(Kawasaki et al., 2017)、直接の証拠はなく至近要因も不明である。

そこで本研究は、概倍日リズムの至近要因と究極要因を探るため、以下の 2 点を目的とする。1) オ

オクロコガネの概日時計遺伝子の発現周期を明らかにし、オオクロコガネに 24 時間周期の概日時計が存在するか、そして、概日時計遺伝子の二サイクルで概倍日リズムが形成されるという仮説について考察する。さらに、2) 概倍日リズムを持つ種と概日リズムを持つ種の間で繁殖に関わる形質を比較し、概倍日リズムの究極要因を探るヒントを得る。

研究経過

1) オオクロコガネの頭部および脳における概日時計遺伝子発現リズムの解析

野外から採集したオオクロコガネオス成虫を実験室の 25°C 明暗周期(12 時間明期: 12 時間暗期 × 2 サイクル)で飼育し、明暗周期(2 サイクル: 出現日 1 サイクル + 非出現日 1 サイクル)および恒暗条件(48 時間暗期: 出現日 1 サイクル + 非出現日 1 サイクル)で 4 時間毎に頭部全体の時計遺伝子(*period*, *clock*,

cryptochrome2) の相対発現量を Quantitative real-time reverse transcriptase-PCR (q-rtPCR) により調べた。その結果、これら 3 つの遺伝子の相対発現量は、オオクロコガネが出現する日(出現日)、出現しない日(非出現日)に関わらず明暗周期で弱い日周性がみられた。一方、恒暗条件ではリズムは見られなかった。これらのサンプルでは、相対発現量を求めるために用いたコントロール遺伝子の mRNA 量に測定時間によるばらつきが見られたので、次に RNA-sequencing を用いて脳内の時計遺伝子 mRNA 量を調べることにした。

オオクロコガネオス成虫の野外採集個体を 25°C 明暗周期で飼育し、6 時間毎に脳の RNA 抽出を行い、96 時間分 16 サンプルについて RNA-sequencing を行った。その結果、93 億リード配列をアセンブルし約 54 万のコンティグ配列を得た。その中から、9 種類の時計遺伝子の候補配列を得た。各時計遺伝子の TPM (transcripts per million) 値を調べた結果、TPM 値に 24 時間あるいは 48 時間の周期性がみられるもの、周期性が見られないものに分類された。今後、q-rtPCR を用いて明暗周期、恒暗条件での脳における時計遺伝子の相対発現量を調べるとともに、これら時計遺伝子の RNA 干渉を実施し、概倍日リズムに対する影響を調べる予定である。

2) 概倍日リズムを持つ種と概日リズムを持つ種における摂食量、産卵数、メス生殖器形態の比較

概倍日リズムを持つ種は、概日リズムを持つ種に比べ二日あたりの活動時間が短くなる分、効率的な摂食・繁殖方法を持つという仮説を立て、これらの形質を比較した。準自然条件(自然日長・室温)で、野外から採集した概倍日リズムを持つオオクロコガネとクロコガネ、概日リズムを持つマルオクロコガネとクロコガネ 4 種を個別飼育し、餌としてサクラ *Cerasus yedoensis* あるいはクローバー *Trifolium repens* の葉を二日ごと与えた。摂食前と摂食後の葉をスキャンして面積差分を求め (Figure 1)、これを体長 x 前胸背板の幅で補正したものを food intake index (FII) として計算し、摂食量とした。

摂食量 (FII) について種 (オオクロコガネ、クロコガネ、マルオクロコガネ、クロコガネ)、性 (オス、メス)、餌 (サクラ、クローバー) の 3 要因で分散分析を行った結果、これら 3 要因はすべて摂食量に影響を与え、種と餌、餌と性で交互作用がみられた (Three way ANOVA, $P < 0.05$)。サクラを与えたと



Figure 1. Images of a cherry leaf before (upper) and after (lower) eaten. Images were scanned to measure the area.

きに、オオクロコガネはマルオクロコガネより有意に摂食量が多かったが (Tukey-Kramer test, $P < 0.05$)、他の種間比較では有意な差は見られなかった (Tukey-Kramer test, $P > 0.05$)。また、クローバーを与えたときは種の間で摂食量に有意な差は見られなかった。餌を限定すると、概倍日リズムを持つオオクロコガネは、1 回の摂食で概日リズムを持つマルオクロコガネの 2 日以上食べていることがわかった。また、サクラ、クローバーいずれを与えた場合でもメスの摂食量がオスよりも多かった。

次に産卵数を比較した。種 (4 種) と餌 (サクラ、クローバー) の二要因で分散分析を行った結果、種と餌の間に交互効果が見られた (Two way ANOVA, $P < 0.05$)。そこで餌ごとに産卵数を比較したところ、クローバーを与えた際は産卵数の種による違いは見られなかったが、サクラではオオクロコガネの産卵数は他種より有意に大きかった (Tukey-Kramer test, $P < 0.05$)。

さらに、メスの内部生殖器官の形態を 4 種で比較した。これまでに *Holotrichia* 属と同じコガネ科のケブカアカチャコガネ *Dasylepida ishigakiensis* において交尾囊 (bursa copulatrix)、受精囊 (spermatheca)、受精囊腺 (spermathecal gland) の形態が調べられている (Harano et al. 2012)。交尾囊は交尾時に雄から受け取る精子以外のオス由来物質を貯蔵、分解、吸収する器官、受精囊は精子の貯蔵、受精囊腺はオス由来物質を分解する酵素を分泌する器官として知られている。オオクロコガネ、クロコガネ、マルオクロコガネ、クロコガネにおいても、形態学的特徴からこれら 3 つの器官を分類し (Figure 2)、外部形態とパラフィン切片を作製し内部構造を調べた。

野外採集個体の受精嚢内部には細い繊維状のものが存在していたが、未交尾のオオクロコガネではこれは観察されなかったことから、受精嚢は *Holotrichia* 属においても精子の貯蔵器官であると考えられる。受精嚢腺の管はヘマトキシリンで強染される細胞からなり、内部にはエオシンで染まる物質で満たされていた。

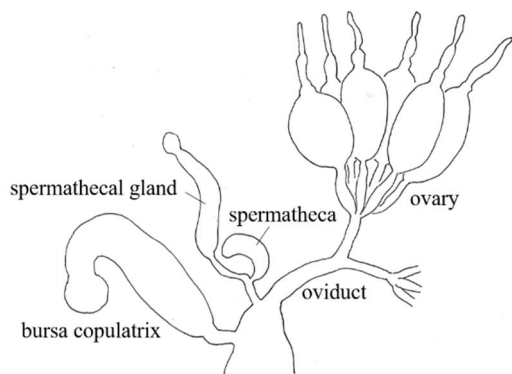


Figure 2 Schematic illustration of adult female reproductive tracts of *Holotrichia* species.

交尾嚢は先端と基部で外部形態、内部構造ともに違いが見られ、先端部で嚢胞を作っており、中央部から基部にかけて内部にはひだ構造が観察された。これら3つの器官を4種で比較したところ、受精嚢と受精嚢腺には種による違いは見られなかった。一方、交尾嚢の外部形態に違いが見られ、概日リズムを持つマルオクロコガネとクロコガネでは交尾嚢の管部分の中央部と基部の太さに差がないのに対し、概日リズムを示すオオクロコガネとコクロコガネでは交尾嚢の基部が中央部よりも細くなっていた。

交尾嚢基部の太さは何を意味しているのだろうか？松本 (2010) はクロコガネ属の交尾行動と交尾器形態の観察から、交尾時にメス交尾嚢の基部にオスの外部生殖器が位置すると記述している。そこで、オオクロコガネ交尾時のオスの外部生殖器のメス体内の位置を調べた。交尾時にメスとオスの腹部末端が接続している状態でオスの腹部末端をハサミで切り取り、メスを酢酸エチルで殺し、メスの腹部を丁寧に解剖した。3ペアの観察を行った結果、オスの生殖器 (temones) は、2個体では交尾嚢と輸卵管が開口している広い領域にあったが、1個体では交尾嚢の基部に位置していた。このことから、オオクロコガネでは交尾嚢基部の細い管に temones がうまくはまり込み効率的な交尾が可能となっているのかもし

れない。

考察

概倍日リズムの存在は古くから知られており、ヒトが環境からの時間信号のない部屋で長期間隔離されると、その睡眠周期が二日になる (Aschoff et al. 1967; Homma and Homma 1988)、蚊においても、長期間の恒常条件で概日リズムが概倍日リズムに変わると報告されている (Clopton 1984)。これらのリズムはいずれも通常の 24 時間周期の明暗条件では起こらず、恒常条件下で体内の複数の概日時計が互いに同調しない「内的脱同調」を起こすことが原因だと考えられている。

オオクロコガネの概倍日リズムは、野外を含めた 24 時間の明暗周期 2 サイクルごとに同調して観察されること (Kawasaki et al. 2017)、メスのフェロモン腺も二日周期で発達を繰り返すことから (Leal et al. 1993)、この概倍日リズムは野外で機能する周期現象であり、そのしくみや生態学的意義は興味深い。本研究により、オオクロコガネの脳にも 24 時間周期で発現量の増減が見られる概日時計遺伝子が存在することがわかった。これより、概倍日リズムを示すオオクロコガネにも概日時計が存在すると考えられる。そして、オオクロコガネの概倍日リズムは、概日時計と二日を数えるカウンター機構により成立するのではないか。このようなリズムの形成機構は、概日リズム、概潮汐リズム、概年リズムといった時計の周期と行動や生理現象のリズムの周期が一致するメカニズムとは大きく異なる。今後、概日時計遺伝子を用いてどのように二日リズムを形成するか探りたい。

概倍日リズムの究極要因を探るヒントを得るため、繁殖に関わる形質として摂食量、産卵数、メス内部生殖器を、概倍日リズム、概日リズムを示す種と比較した。その結果、概倍日リズムをもつオオクロコガネとコクロコガネに共通してメスの交尾嚢の基部が細くなっており、交尾時ここに雄の棒状骨片が位置する 1 例が観察された。松本 (2010) によると、オオクロコガネメスの交尾嚢の入り口付近で棒状骨片の先端が届き、骨片内の内囊が反転し交尾嚢の導管に達すること、そして、この構造は交尾時に雄が雌と生殖器のみで結合し反り返るような姿勢を取ることから、ぶら下がったままメスの交尾器から抜け落ちにくくする構造を作り上げている可能性がある

(松本, 2010)。このような構造が概倍日リズムを持つ種に共通して観察された。この形質は単に系統学的な制約である可能性もあるが、何らかの形で交尾効率と関連しているのかもしれない。

本研究により、サクラを餌とした場合、オオクロコガネの摂食量がマルオクロコガネよりも大きく、また産卵数も大きいことがわかった。一般には、出現日が減ると摂食や交尾の機会が減り不利であると考えられる。しかし、オオクロコガネに限って考えれば、2日に一度の出現で十分量を摂食し、産卵することがわかった。これらより、オオクロコガネは摂食機会の低減をカバーするだけの摂食量と繁殖方法を獲得することにより二日リズムでも問題なくやっていけるのではないか。

参考文献

1. Kawasaki Y, Nishimura H, Shiga S (2017) Plausible link between circa'bi'dian activity rhythms and circadian clock systems in the large black chafer *Holotrichia parallela*. *Journal of Experimental Biology*, 220(21): 4024 – 4034.
2. Harano K, Tokuda M, Kotaki T, Yukuhiro F, Tanaka S, Fujiwara-Tsujii N, Yasui H, Wakamura S, Nagayama A, Hokama Y, Arakaki N. (2012) The significance of multiple mating and male substance transferred to females at mating in the white grub beetle, *Dasylepida ishigakiensis* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Applied Entomology and Zoology*, 47:245–254.
3. 松本武 (2010) 日本産クロコガネ亜族 3 種の交尾行動と交尾器の観察. *Kogane*, 11:1-8.
4. Aschoff et al. 1967; Aschoff, J., Gerechtke, U. and Wever, R. (1967). Desynchronization of human circadian rhythms. *Japanese Journal of Physiology* 17:450-457.
5. Homma K, Homma S (1988) Circadian rhythm: its appearance and disappearance in association with a bright light pulse. *Experientia* 44:981-983.
6. Clopton JR (1984) Mosquito circadian and circa-bi-dian flight rhythms: a twooscillator model. *Journal of Comparative Physiology A* 155:1-12.
7. Leal WS, Sawada M, Matsuyama S, Kuwahara Y, Hasegawa M (1993) Unusual periodicity of sex pheromone production in the large black chafer *Holotrichia parallela*. *Journal of Chemical Ecology* 19: 1381-1391.

研究の発表

口頭発表

8. 澤田功司, 志賀向子「オオクロコガネとマルオクロコガネにおける摂食と生殖の比較」第 64 回日本応用動物昆虫学会 (2019 年 3 月)
9. 渡邊耕平, 志賀向子「オオクロコガネの概倍日リズムに関わる脳領域の解析」第 27 回日本時間生物学会学術大会 (2020 年 9 月)
10. Kohei Watanabe, Sakiko Shiga 「Analysis of brain regions involved in circa'bi'dian rhythm in the large black chafer *Holotrichia parallela*」日本比較生理生化学会 第 42 回山形大会 (2020 年 11 月)

誌上発表

1. Kohei Watanabe, Sakiko Shiga (2020) The optic lobe–pars intercerebralis axis is involved in circa'bi'dian rhythm of the large black chafer *Holotrichia parallela*. *Journal of Comparative Physiology A* 206(6) 819 – 829. doi: 10.1007/s00359-020-01440-8.
2. 志賀向子 (2020) オオクロコガネの概「倍」日リズムとその形成機構 日本比較生理生化学会 37(3): 180-188.