

令和元年5月24日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14810

研究課題名(和文)野外で生物リズムを持たない個体は、どのように環境に適応して生存しているのか？

研究課題名(英文)How are individuals who do not have biological rhythms in the field adapt to their living environment?

研究代表者

宮竹 貴久 (Miyatake, Takahisa)

岡山大学・環境生命科学研究所・教授

研究者番号：80332790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：野外より採集してきたコクヌストモドキ類の生物リズムをアクトグラフ装置で測定したところ、リズムが無いと判断できる個体が多くいた。研究初年度は測定した個体の歩行活動データを、カイニ乗ピリオドグラム(Periodogram)の測定結果に基づき、リズムの有る個体とリズムの無い個体に分別した。ところが研究2年目になって統計手法に詳しい研究者に相談したところ、この手法でリズムの有無を判断する場合には、統計的な問題点が見つかった。そこで研究3年目に、これらの研究者を研究分担者に加えて、リズムの有無ではなく、リズムの強さをパラメータとして研究課題の問いに答えることを試みた。その結果、リズムの強さには遺伝変異が存在することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物個体のリズムの有無を判別するには統計学的な問題のあることがわかった。それはリズムは連続的な形質であり、1/0で分類できないためと考えられた。そこで、リズムの有無ではなく、リズムの強さを指標として行動生態学の解析を行った。コクヌストモドキでは行動形質を育種した系統間ではリズムの強さに一貫した差は見られず、オオツノコクヌストモドキではリズムの強さに遺伝変異があり、それはメスに比べてオスでより強かった。これはオス同士闘争が必要な昆虫では、リズムに関連した形質にも性差が見られることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Locomotor activities and circadian rhythms of long-reared (more than 35 years) and wild populations of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Insect) were compared. We found significantly higher percentages of arrhythmic individuals in the long-reared population compared to the population caught in the wild. Only males were compared because no difference between the sexes was found in the percentage of arrhythmic beetles. Next, comparison of the circadian rhythms of wild and long-reared beetle populations showed no significant difference between the populations. The result suggests that the circadian rhythm in *T. castaneum* has been lost during long-rearing under an artificial condition. We will discuss arrhythmicity in organisms.

研究分野：進化生態学

キーワード：リズム シガメ 体内時計 アリズムック 適応 コクヌストモドキ オオツノコクヌストモドキ コメグラサ
アマガエル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

時間に関するミクロ生物学は日本が中心拠点のひとつであり、もっとも分子メカニズムの理解が進んだ実験系の一つとしてモデル生物も多く存在する。マウスで時計遺伝子が発見されて以来、生理学および分子生物学的な研究は飛躍的に進んだ。それに大きな役割を果たした多くは日本人の研究者である(宮竹 2015 生命の不思議に挑んだ科学者たち, 山川出版社)。一方で、リズム研究者はリズムのある生物にしか興味を持たない。ところが野外には一定の割合で、少なからずリズムを持たない個体が存在することが知られていた。例えばショウジョウバエでは約 5%、ミバエでは約 15%、オサムシでは 30%、あるヤスデでは 37%もの個体がリズムを持っていない(清水・大石 2008 リズム生態学, 東海大学出版会; Miyatake et al. 2002 Proc R Soc B)。リズムを持たない生物の野外集団における適応の研究は世界のどこにおいても行われていない。申請者は、野外より採集した貯穀害虫の甲虫類のうち、コクヌストモドキで 60%、ヒラタコクヌストモドキで 80%以上の個体がリズムを持っていないことを発見してきた(Miyatake et al. in prep)。これに対して、同様の生息場所に生息する貯穀害虫のシバンムシ類は 80%以上の個体がリズムを持つ。コクヌストモドキは、時計を制御する時計タンパク質であるクリプトクローム(CRY2)の光受容機能(Fuchikawa et al. 2010 Heredity)が欠落している(Yuan et al, 2008; Crane and Young 2014)。申請者は野外に生息するリズムを持たない個体の生存戦略(生態適応研究)の謎解きに挑戦する。

2. 研究の目的

菌類、植物、動物まで地球上に生存するあらゆる生物は体内時計を持ち、測時機構により環境変化への適応を制御している。申請者は最近コクヌストモドキ類という普通種の甲虫を「野外の複数個所より採集して体内時計を計測したところ、8割以上の個体が明瞭なリズムを持たない」という事実を発見した。彼らは野外でどのように生存しているのだろうか? またリズムを持たないメスとオスの繁殖戦略はリズムを持つ個体と比べてどうなのか? メスの造卵周期は? リズムを持たないオスはいつでも交尾できる? 精子移送はどのようなタイミングで生じる? 数多の疑問に答えるため、本研究ではリズムを持たない甲虫類が野外で生活する上での適応度を計測し、生物リズムの適応性を行動戦略から分子レベルまで調べ、新しい研究分野を開拓する。

3. 研究の方法

申請者は、すでに中国地域の 5 か所のコクヌストモドキの野生集団を採集している。驚くべきことにこれらの甲虫においては、野外で生息しているにも関わらず、8割以上の個体が、アリズム(=体内時計を持っていない)である。フィールドにおいて、アリズムの個体は、どのように生存しているのか? まず、地域集団においてどれほどの個体が正確にアリズムであるのか、そのパーセントを調べる。次に、野生変異に基づいてリズムを持つ集団と持たない集団を確立し、リズムを持たない個体は繁殖成功でどのような交尾行動や交尾システムを示すのかを調べ、生存のための究極要因を調べる。最後にアリズムとリズム個体の次世代シークセンスによる RNA Seq.法を行い、その差をもたらししている時計遺伝子(群)の分子遺伝学的基盤についても調べる。

4. 研究成果

(1) 2016年の研究では、次の成果を得た。野外(岡山県)より採集したコクヌストモドキの集団、及び実験室内において35年以上も室内で累代飼育されたコクヌストモドキの集団から任意に個体を抽出して赤外線ビームによるアクトグラム装置によって概日リズムの測定を行った。その結果、累代飼育されたコクヌストモドキでは野外集団に比べてリズムのない個体の割合が高かった。これは時間生態学の研究分野では新しい発見である。また岡山県内の6か所のコイン精米機からコクヌストモドキの成虫を採集して概日リズムを測定した結果、どの野外集団においても概日リズムの見られる個体と概日リズムのない個体が混在していることが明らかとなった。コクヌストモドキの野外集団において明瞭なリズムの見られない個体が集団中に占める割合は明らかに五割を超えており、そのうち多くの個体では24時間中動き続ける around the clock 様式の活動性を持った個体であることが明らかとなった。極地方や洞窟以外の場所に生息している生物でこのような活動リズムを持つ生物は珍しく、時間生態学の研究分野においては新しい発見につながる可能性が高い。さらに室内で概日リズムのない個体どうし、あるいは概日リズムの明瞭な個体どうしを選んで交配させた。得られたF1個体の概日リズムを測定したところ、概日リズムの明瞭な両親から生まれた子であっても概日リズムのない子と概日リズムのある子が確認されたことから、概日リズムの有無に関する遺伝様式は単純ではない可能性が示唆された。

(2) 2017年の研究では、次の研究を行った。すなわち野外(岡山県)より採集したコクヌストモドキの集団、及び35年以上も室内で累代飼育されたコクヌストモドキの集団から任意に個体を抽出して赤外線ビームによるアクトグラム装置によって概日リズムの測定を行った。また本種における概日リズムの有無の遺伝性を調べるためにリズムの有る個体と無い個体の交配実

験を行い、F1 および F2 個体を得て概日リズムを解析したところ、本種の概日リズムの有無の遺伝様式は単純なメンデル遺伝ではなく、F1 世代の独立や F2 世代の分離が明瞭には見られなかった。これら測定できたデータについて概日リズムの有無の解析手法を精査したところ、概日リズムの有無を解析する場合には、従来の統計学的手法での比較には問題があることが判明したため、時系列解析法および画像解析手法の導入について検討した。またコクヌストモドキのリズムの有る個体とリズムの無い個体をアクトグラフの解析結果より識別を行ったうえで、両者の交尾行動について観察した。測定した形質は、交尾スピード、交尾持続時間、求愛行動（ラビング行動）およびマウント行動である。その結果、リズムの有無と交尾行動の間には、調べた範囲では有意な関係性が見られなかった。コクヌストモドキの野外集団として、全国から 20 か所以上のコイン精米機よりコクヌストモドキの成虫をサンプリングし、概日リズムの解析を行っている。さらにコクヌストモドキの近縁種であるオオツノコクヌストモドキ（属は異なる）の近交系統について、異なる温度環境下での概日リズムの解析を行っている。その結果は、アリズム個体とリズム個体の表現型可塑性の遺伝として、現在データを取りまとめているところである。さらにフィールドのモデルとして、モンカゲロウのリズムと交尾の関係についても研究を行った。

（3）ところが次の問題点が生じた。つまりアクトグラフによって得られた活動性の記録からリズムの有無を識別する際に、新たな数学的解析手法および統計的解析手法が必要であることが判明したため、共同研究者を 2 名追加し、問題点の検討および解決をすすめて研究を推進することとした。一名は時系列解析の専門家であり、コクヌストモドキの地域集団や累代飼育集団、およびオオツノコクヌストモドキの近交系統について、アクトグラフで取得したデータを動く・動かないという二形質値を時系列として解析を進める。も 1 人は画像解析の専門家であり、アクトグラフ解析の結果の画像としてとらえて解析する。またリズムと交尾の関係を研究対象とするフィールドモデルとして、モンカゲロウの群飛が生じるタイミングとリズム、および交尾行動の関係についても新たに研究課題として追加し、リズムとアリズミックの関係が配偶システムに及ぼす影響についても解析する。その際に群飛のダイナミックな動きを記録するために専門の昆虫写真家の協力も仰いで、包括的にリズム・アリズムと適応の研究を開拓する推進方策を決定した。

（4）最終年度の 2018 年には、データの再解析を行った。つまり、昨年度までの研究において、共同研究者と検討した結果、昆虫のロコモーター活動より計算する既存の概日時計の求め方（概日周期をサインカーブに順次ずらして当てはめて、概日周期長のタウを計算する手法）によって、リズムの有無を判定する手法には問題点のあることが判明した。そのため、最終年度である今年度は、解析の方針を一変し、一定時間間隔(6 分)ごとに抽出した昆虫の歩行活動記録データより、リズムの有無ではなく、「活動リズムの強さ」、「概日リズムの周期長」、「総歩行活動量」の 3 つのパラメーターを計算し、活動リズムの強さにおいて、2 数の甲虫種（コクヌストモドキ *Tribolium castaneum*、オオツノコクヌストモドキ *Gnatocherus cornutus*）において集団間に変異が見られるのかについて再解析を行った。その結果、コクヌストモドキについては、野外から採集した地域集団間において、3 つのパラメーターに違いが見られた。また対捕食者戦略と歩行移動能力に対して人為選抜をかけた集団間においても 3 つのパラメーターを算出したところ、選抜系統間よりもむしろ、系統の繰り返しライン間で差が観察されたことから、これらの行動形質に対する選択に対する相関反応としてのリズム関連形質には有意な違いが見られないことが明らかとなった。オオツノコクヌストモドキでは、これまでに 18 個のアイソライン（1 姉妹の繁殖を繰り返した遺伝的に均一に近いシブ系統：以下、アイソラインと呼ぶ）が作成されていることから、3 つのパラメーターにアイソライン間で差があるかを解析したところ、3 つのパラメーターともにアイソライン間で有意な差が観察されたことから、リズム関連形質には遺伝変異が見られることが確認された。また雌雄でもリズム形質を比較したところ、オスにおいてメスよりも、温度依存的に（つまりオスにおいて好適な温度条件下で）活動リズムが有意に強いことが明らかとなった。武器を持つ本種でのリズムの強さに性差が見られたことは新しい発見である。

（5）リズムに関連した形質について、甲虫以外の生物を用いた実験も行った。コメグラサシガメ *Amphibolus venator* においては、リズム形質と生活史形質との相関について解析した結果、両者の間には有意な関係がないことが明らかとなった。さらにアマガエルの生活パターンとエサへの慣れ方に対する周期関連形質について、および河畔で日内周期を持って群飛活動を行うモンカゲロウの成虫群飛についても、交尾の日内リズムという観点から研究を行った。具体的には岡山市内の旭川河畔に夕刻にスワームを形成するトウヨウモンカゲロウについても、スワームの生じる年内の周期、および日内周期の解析も行った。その結果、このスワームは一年のうち、特定の日と時間にオスがメスとの交尾を求めて集団で飛翔する性質によって形成されることがわかった。しかし、なぜ特定の日に集団が強く形成されるのか、そのメカニズムについては解明できなかった。交尾のための群飛を行うリズムに周期性がある日とない日が生じることも世界で初めて明らかにした。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

Matsumura Kentarou, Ito Rhohei, Miyatake Takahisa, Pace of life: Relationships among locomotor activity, life history, and circadian rhythm in the assassin bug, *Amphibolus venator*. *Ethology* 査読有り、2019、125, 127-132.

Matsumura K, Miyatake T, Influence of artificial selection of death-feigning behavior duration on pre- and post-copulatory traits in male *Tribolium castaneum*. *Journal of Ethology* 査読有り、2019、37, in press.

Tanabe S, Kasuya E, Miyatake T, Individual and sexual differences in time to habituate to food-stimuli presentation to potential prey in *Hyla japonica*. *Current Herpetology* 査読有り、2019、38, 14-22.

Matsumura K, Miyatake T, Effects of artificial selection for walking movement on reproductive traits in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *BiRD*, 査読有り、2019 in press.

Matsumura K, Miyatake T, Costs of walking: differences in egg size and starvation resistance of females between strains of the red flour beetle (*Tribolium castaneum*) artificially selected for walking ability. *Journal of Evolutionary Biology* 査読有り、2018、31, 1632-1637.

Minekawa K, Miyatake T, Ishikawa Y, Matsuo T, The adaptive role of a species-specific courtship behaviour in coping with remating suppression of mated females. *Animal Behaviour* 査読有り、2018、140, 29-37.

Matsumura K, Miyatake T, Responses to relaxed and reverse selection in strains artificially selected for duration of death-feigning behavior in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Journal of Ethology* 査読有り、2018、36, 161-168.

Koshiyama Y, Osajima G, Miyatake T, *Nyctalus aviator* and *Pipistrellus abramus* in the high raised railway of Ihara railway in Kurashiki City. *Bat Study and Conservation Report* 査読有り、2018、23, 18-23 (in Japanese).

Sumi T, Takahashi Y, Sawatani H, Karasawa S, Miura K, Miyatake T, Seasonality of *Wolbachia* infection rate in two closely related sympatric species of terrestrial isopods (Isopoda: Armadillidae) in Okayama, Japan, with effects on sex ratio. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 査読有り、2017、20, 1096-1103.

Hironaka M, Kamura T, Osada M, Sasaki R, Shinoda K, Hariyama T, Miyatake T, Adults of *Lasioderma sericorne* and *Stegobium paniceum* (Anobiidae: Coleoptera) are attracted ultraviolet (UV) over blue light LEDs. *Journal of Economic Entomology* 査読有り、2017、110, 1911-1915.

Matsumura K, Fuchikawa T, Miyatake T, Decoupling of behavioral trait correlation across life stages in two holometabolous insects. *Behavior Genetics* 査読有り、2017、47, 459-467.

Sumi T, Miura K, Miyatake T, *Wolbachia* density changes seasonally amongst populations of the pale grass butterfly, *Zieeria maha* (Lepidoptera: Lycaenidae). *PLoS ONE* 査読有り、2017、12, e0175373

Miyatake T, Faster (or slower) developers have a shorter (or longer) circadian period in *Bactrocera cucurbitae*. *Physiological Entomology* 査読有り 2017、42, 98-102.

Miyatake T, Yokoi T, Fuchikawa T, Korehisa N, Kamura T, Nanba K, Ryouji S, Kamioka N, Hironaka K, Osada M, Hariyama T, Sasaki R, Shinoda K, Monitoring and

detecting the cigarette beetle (Coleoptera: Anobiidae) using ultraviolet (LED) direct and reflected lights and/or pheromone traps in a laboratory and a storehouse. Journal of Economic Entomology 査読有り、2016、109、2551-2560.

Aizawa M, Watanabe T, Kumano A, Miyatake T, Sonoda S、Cypermethrin resistance and reproductive types in onion thrips, *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae). Journals of Pesticide Science 査読有り、2016、41、167-170.

Matsumura K, Sasaki K, Miyatake T、Correlated responses in death-feigning behavior, activity, and brain dopamine expression in red flour beetle *Tribolium castaneum* strains selected for walking distance. Journal of Ethology 査読有り、2016、34、97-105.

Gotoh H, Ishiguro M, Nishikawa H, Morita S, Okada K, Miyatake T, Yaginuma T, Niimi T、Molecular cloning and functional characterization of the sex-determination gene doublesex in the sexually broad-horned beetle *Gnatocerus cornutus* (Coleoptera: Tenebrionidae). Scientific Reports 査読有り、2016、6、29337. DOI: 10.1038/srep29337.

Koshiyama Y, Osajima G, Sonoda S, Miyatake T、New record of *Nyctalus aviator* from Kurashiki City, Okayama identified by fecal DNA analysis. Bat Study and Conservation Report 査読有り、2016、22、18-21 (in Japanese).

〔学会発表〕(計 4件)

宮竹貴久、群飛して交尾するトウヨウモンカゲロウ、日本生態学会第66回全国大会 2019年3月16日

松村健太郎・伊藤遼平・宮竹 貴久、コメグラサシガメにおける個性と生活史そして概日リズムの関係、平成29年度西日本応用動物昆虫研究会・日本昆虫学会中国支部会合同例会 2017年10月13日

宮竹貴久、Loss of circadian rhythm in a beetle population reared long-term、第33回個体群生態学会 2017年10月13日

宮竹貴久 アリズムについて考えてみました、自由集会「新しい時間生態学の展開： 企画者： 大原隆之・宮竹貴久」日本生態学会第64回全国大会 2017年3月18日

〔図書〕(計 1件)

宮竹貴久、したがるオスと嫌がるメスの生物学：昆虫学者が明かす「愛」の限界、集英社新書

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
教員：宮竹貴久のページ <http://www.agr.okayama-u.ac.jp/LAPE/miyatake.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：粕谷 英一
ローマ字氏名：Kasuya Eiiti
所属研究機関名：九州大学
部局名：理学研究院
職名：准教授
研究者番号（8桁）：00161050

(2) 研究分担者

氏名：阿部 真人
ローマ字氏名：Abe Masato
所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所
部局名：革新知能統合研究センター
職名：特別研究員
研究者番号（8桁）：60758027

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。