

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：34501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07489

研究課題名(和文) 土中温度環境への昆虫概日時計の適応機構を探る

研究課題名(英文) The study of adaptation mechanisms of insect circadian clocks to the soil temperature environment

研究代表者

宮崎 洋祐 (Miyazaki, Yosuke)

芦屋大学・経営教育学部・非常勤講師

研究者番号：40576039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：光の届かない土の中で蛹になるタマネギバエは、正確に早朝に羽化して地中から出てくる。このバエは蛹のときに概日時計と地温の変化で1日の時刻を知るが、土の中は深さによって温度環境が異なるという問題がある。さらに、土中の温度環境は天候からも影響を受ける。タマネギバエはこれらの問題をどのように解決しているのか。本研究はタマネギバエがもつ概日時計の土中温度環境への適応のしくみを明らかにした。彼らは、土の中の1日の最高温度と最低温度の差を利用して概日時計が指し示す時刻を巧みに補正していたのである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

概日時計を対象とした研究は多いが、そのほとんどが駆動のしくみを対象としてきたものである。しかし、多様な生物が、その独自の生活様式や生存・繁殖戦略に応じて概日時計をいかに活用しているのか注目した研究は少ない。本研究は、光の届かない土の中という制限された環境の中、動けない昆虫の蛹が1日の最高温度と最低温度の差をもとに、概日時計の時刻を補正して1日の時刻を知るしくみを示したもので、生息環境への概日時計の適応様式の理解を進める上で重要な意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The onion fly pupates in the soil where no light penetrates. This fly exactly ecloses as an adult and emerges from underground in the early morning. The underground pupae use a circadian clock and the change of temperature to know the time of day. However, the soil temperature environment is different according to the depth. In addition, the weather also affects the soil temperature environment. The onion fly must solve these problems to eclose in the early morning. The present study shows how the circadian clock of the onion fly adapts to the soil temperature environment. This fly can successfully correct the time on the circadian clock in response to the amplitude of the daily temperature cycle in the soil.

研究分野：時間生物学

キーワード：昆虫 タマネギバエ 概日時計 温度サイクル 温度較差 土中 羽化 湿度

1. 研究開始当初の背景

生物が持つ概日時計は、24 時間周期の環境サイクルへ同調しつつ、多くの生理・行動を制御する。その周期は 24 ± 4 時間の範囲にあり、光や温度の変化といった外界からの時刻信号(同調因子)が、時計を正確な 24 時間周期に同調させる。概日時計の周期や同調因子に対する応答性などは、種や系統に依存する。このことから生物は、生活環境や生存・繁殖戦略に応じて概日時計の性質を変えていると考えられる。しかし、その意義を見すえた研究は少ない¹⁾。

我々はタマネギバエの羽化を支配する概日時計の研究を進めてきた。このハエは約 22 時間周期の概日時計をもち²⁾、昼間の地表面の高温を避けるために早朝に羽化する³⁾。タマネギバエは深さ 2~20 cm の土中で蛹になり羽化するので、光は同調因子として利用できない。そこで温度の日周変動を利用していると考えられる。しかし、土の熱伝導率が低いいため、土中では深くなるほど地温の上昇・下降開始時刻が遅れてしまう。例えば、深さ 5cm で午前 8 時に地温が上がり始めるとき、深さ 20cm では 4 時間遅れて午後 0 時に地温が上がり始める。それにもかかわらず、どちらの深さでも午前 5 時ごろに多くのハエが羽化する。タマネギバエの羽化にみられる深さに伴う温度変化時刻の遅れの補正は、地温の日較差(1 日の最高温度と最低温度の差)が、深くなればなるほど小さくなることを利用して行われる。つまり、温度の較差が小さいほど羽化のタイミングを温度変化時刻に対して早めることで、深さに伴う温度変化の遅れを補正している。この反応は 1 日に 1°C 以下のわずかな温度差すら区別して、羽化のタイミングを変えている⁴⁾。

羽化のタイミングが温度の較差によって変わるしくみは、どのようなものだろうか。タマネギバエの概日時計遺伝子 *period* の発現に見られる日周変動が温度較差に影響されたことから、較差は羽化そのものというよりも、概日時計の時刻設定に影響していることが示唆された⁵⁾。また、この概日時計には、1 周期の間に高温に対して時計を後退させる位相と低温に対して時計を後退させる位相があり、そのどちらでも温度の変化量が大きくなるほど時計の後退反応はより顕著になる(宮崎ら、未発表)。24 時間より短い周期の概日時計は 1 日への同調の際、時計を遅らせていると考えられることを踏まえると、「深いところでは小さな較差のために小さな後退が、浅いところでは大きな較差のために大きな後退が起こり、結果として較差が小さいほど温度変化時刻に対して羽化のタイミングが早くなる」という仮説が考えられた。

温度較差をもとにした時刻設定には別の問題もある。曇りや雨の日に温度較差が小さくなってしまふことである。これは土中でも起こり、そのため浅いところでの較差が、深いところと同じ程度まで小さくなる。もしも、温度較差のみをもとにして羽化時刻の設定をしている場合、曇りの日に浅いところにいる蛹は、晴れの日の深いところと誤って羽化してしまうことになる。しかし、実験室での記録によると、大きい較差の温度サイクルにさらされている蛹は、2、3 日の間、小さい較差の温度サイクルにさらされても羽化時刻を大きく変えない⁶⁾。このことから、「大きい較差の温度サイクルは、その後には与えた同調因子の影響を小さくする」可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的はこれらの仮説を検証し、土中への概日時計の適応機構を明らかにすることである。タマネギバエは土中への適応のために、温度変化への高い感受性、温度較差に対する量的な反応、確実性の高い温度情報への準拠などを獲得した可能性がある。得られた結果をもとにして生理機構の解明へとつなげれば、概日時計研究のさらなる発展をもたらすことが期待される。

3. 研究の方法

羽化時刻の記録は全暗の下で赤外線センサーを取り付けた光電型アクトグラフを用いて行った。このシステムは、タマネギバエの蛹の前にステンレス球をセットし、羽化直後のハエがこれを押し出すと、押し出された球が取り付けられた滑り台を転がってセンサーの前を通過し、その信号がコンピューターに伝わることで羽化時刻が記録されるというものである²⁾。

(1) 従来、概日時計の温度変化に対する反応は、高温条件(例えば 12 時間 25°C)と低温条件(例えば 12 時間 15°C)を組み合わせた矩形波状 24 時間温度サイクルの下で調べられる。しかし、このような自然界ではありえない条件で得られた結果がどこまで概日時計の生態的意義を反映しているか、詳細な検討はなされていない。そこで、恒温器の温度設定を 1 時間ごとに変化するようプログラムして温度を正弦波状に変化させる環境を作り、タマネギバエの羽化時刻を記録し、矩形波状温度サイクルで得られる結果と比較した。例えば 8°C の温度較差の場合、1 時間に 0.8°C 、最高温度と最低温度付近で 0.4°C 変化するようにプログラムすると、正弦波に近似した温度条件になる。平均温度を 20°C または 25°C とし、温度較差を $1\sim 20^{\circ}\text{C}$ とさまざまに変えて、矩形波状に与えた条件と比較しつつ、温度サイクルの概日時計への影響を調べた。

(2) 「温度の日較差に対する反応の本質は、土中の温度変化に適応した概日時計が、24 時間より短い周期を持ち、温度較差の大きさに依存した後退反応を発達させたから」という仮説を検証するため、概日時計の後退反応が起こらないと予想できる 24 時間より短い温度サイクルを設定し、羽化時刻を記録した。温度サイクルは矩形波および正弦波条件を用い、温度較差は $1\sim 8^{\circ}\text{C}$ の範囲を用いた。矩形波条件では、温度サイクルを与えた後、 25°C 一定に移すことも行った。

(3) 「大きい較差の温度サイクルは、その後に与えた同調因子の影響を小さくする」かどうか調べるため、2、4、8、12、20℃のさまざまな温度較差の正弦波状温度サイクルを与えた後 25℃一定にし、12 時間の光刺激 (680lx) または高温刺激 (29℃) を与え、その後の羽化時刻を記録した。刺激は 25℃一定後 24 時間以内のさまざまな時期に与えたが、4、8、12℃の較差のサイクルの後では、特に羽化のタイミングを変化させるのに有効な時期に与えた。

(4) 本研究を進めてゆく中で、タマネギバエの羽化を支配する概日時計が、照度や温度の変化だけでなく相対湿度の変化にも応答している可能性が出てきた。本研究開始前に購入した旧式の低温恒温器で全暗 25℃一定にしてタマネギバエの羽化を記録すると、羽化はそろわずに数日にわたりばらつくのに対し、新しく購入した温度変化のぶれが少ない新型の低温恒温器では、同じ条件で羽化が約 1 日周期で見られた。この原因を調査してゆくと、新型の恒温器は湿度一定機能が削減されており、羽化の記録中に相対湿度が変化していることがわかった。そこで、羽化リズムに対する湿度変化の影響を検討した。タマネギバエの概日時計は、照度や温度のわずかな変化にも反応するので、湿度変化のみを発生させる条件を作らなければならない。そこで、芦屋市の相対湿度が高くなる夏季に、湿度制御機能のない新型の低温恒温器を 2 つの恒温室にそれぞれ置き、どちらの恒温器も全暗 25℃一定に設定した。一方の恒温室では、冷暖房で恒温器の周囲の温度を変動させ、恒温器内の湿度のみ変動させて羽化を記録した。もう一方の恒温室では、常に冷房をつけ恒温器の周囲の温度を一定にし、恒温器内の湿度をほぼ一定に維持して羽化を記録した。

4. 研究成果

(1) さまざまな温度較差の正弦波状の温度サイクルと、さまざまな温度較差の矩形波状温度サイクルの下でのタマネギバエの羽化時刻を比較した。どちらの温度サイクルでも、羽化は主に温度が低くなる時間帯に起こったが、温度較差が小さくなるほど温度変化に対する羽化時刻は早くなった。羽化時刻の変化は、較差が 1~8℃の範囲で顕著であり、12℃以上でゆるやかになった。これは、1 日に 12℃以上変化することがほとんどない土中環境に対する適応を反映しているのかもしれない。最低温度期の中点を基準とすると、羽化時刻は正弦波状サイクルよりも矩形波状サイクルで遅れた。それゆえ、緩やかな変化を受け取るよりも急激な変化を受けるほうが、概日時計の後退反応に大きな影響を与える可能性がある。矩形波状の温度変化と正弦波状の温度変化での結果の比較は国内外のほかの研究でもほとんど行われておらず、加えて温度較差の影響も考慮した研究はほかに例がない唯一のものである。この成果は国際学術雑誌にて発表された⁷⁾。

(2) さまざまな長さ (T 時間) の周期の温度サイクルを与える実験を行った。T=21、22、24 の矩形波状温度サイクル (1 または 8℃較差、平均 25℃、全暗) の下で羽化時刻を記録したところ、温度較差に依存した反応は T=22 で弱くなり、T=21 で消失した。同様の傾向は、矩形波状温度サイクルから 25℃一定に移した場合や、正弦波状温度サイクルを用いた場合にも見られた。これらの結果は、温度較差に依存した羽化時刻設定が、概日時計の位相の量的な後退反応によるという仮説を強く支持している。本研究は、環境サイクルへの概日時計の同調において、1 日の同調因子の変化量が重要な生態的意義をもつことを示しただけでなく、そのしくみを明らかにした点で時間生物学の発展に著しく寄与するものと思われる。

(3) さまざまな温度較差の正弦波状温度サイクルを与えた後 25℃一定にし、同調因子の刺激を与える実験を行った。その結果、前もって与えた温度サイクルの較差が大きくなればなるほど、高温刺激と光刺激のどちらにおいても、羽化リズムに対する影響が弱まる傾向があった。このことから、大きい較差の温度サイクルは、その後に与える同調因子の影響を小さくすると考えられた。高温刺激だけでなく光刺激の影響も小さくすることから、概日時計の挙動が、前もって与えた温度サイクルの較差によって影響されている可能性がある。これは、概日時計の環境への適応機構の一つの側面を表しているのかもしれない。概日時計の研究において、前もって与えた環境サイクルの変化量に注目した研究はほかになく、これまで知られていなかった概日時計の新たな性質が本研究によって明らかになった。環境サイクルの変化量が概日時計の挙動にどのような影響を与えているのか、さらに解析を進める必要がある。

(4) タマネギバエの羽化リズムに対する湿度変化の影響を調べた。恒温室の冷房をつけたまま、恒温器内の湿度を変化させない対照実験では、相対湿度はおおよそ 40%のままで羽化がばらついたが、恒温室の冷暖房を切り替えた場合、恒温器内の温度を 25℃に保ったまま相対湿度をおおよそ 40%から 90%まで毎日変動させることができ、羽化も周期的に起こった。また、恒温室の冷暖房の切り替えを途中でやめ、湿度変化をなくした場合もその後の羽化が周期的に起こった。このことから、相対湿度の変化は羽化そのものよりも羽化を支配する概日時計を動かし、相対湿度を一定にした後も概日時計がそのまま動き続け、羽化が周期的に起こったと考えられる。動物の概日リズムの研究で湿度の変動に対する反応を記述した文献や論文はなく、植物のシロイヌナズナで概日時計遺伝子の発現振動パターンが、湿度の変化によって影響される報告があったのみである⁸⁾。この研究では、相対湿度が 90%のときと 50%のときの間におおよそ 1℃の温度差が

発生するが、1℃の温度差ではシロイヌナズナの概日時計は影響を受けないので問題はないとされている。タマネギバエの羽化の概日時計は 1℃の温度差にも反応するが、上記の実験手法は、相対湿度 90%のときと 40%のときの間で温度差を 0.1℃未満まで抑えることができ、周期的な羽化が起こらなかった点でも興味深い。土中で羽化するタマネギバエの概日時計がなぜ湿度の変化に応答してしまうのか、温度同調と共通の何らかのしくみが反応してしまうのか、さらなる研究を積み重ねてゆかなければならない。

<引用文献>

- 1) Saunders D.S., Elsevier, *Insect Clocks*, 3rd edn., 2002, 560 pp.
- 2) Watari Y., Comparison of the circadian eclosion rhythm between nondiapause and diapause pupae in the onion fly, *Delia antiqua*, *J. Insect Physiol.*, 48, 2002, 83-89
- 3) Tanaka K., Watari Y., Is early morning adult eclosion in insects an adaptation to the increased moisture at dawn?, *Biol. Rhythm Res.*, 40, 2009, 293-298
- 4) Tanaka K., Watari Y., Adult eclosion timing of the onion fly, *Delia antiqua*, in response to daily cycles of temperature at different soil depths, *Naturwissenschaften*, 90, 2003, 76-79
- 5) Miyazaki Y., Watari Y., Tanaka K., Goto S.G., Temperature cycle amplitude alters the adult eclosion time and expression pattern of the circadian clock gene *period* in the onion fly, *J. Insect Physiol.*, 86, 2016, 54-59
- 6) Tanaka K., Watari Y., Day-to-day variations in the amplitude of the soil temperature cycle and impact on adult eclosion timing of the onion fly, *Int. J. Biometeorol.*, 61, 2017, 1011-1016
- 7) Miyazaki Y., Tanaka K., Watari Y., Dependence of phase setting on the amplitude of square-wave and pseudo-sinusoidal temperature cycles in the circadian eclosion rhythm of the onion fly *Delia antiqua*, *Physiol. Entomol.*, 43, 2018, 346-354
- 8) Mwimba M., Karapetyan S., Liu L., Marqués J., McGinnis E.M., Buchler N.E., Dong X., Daily humidity oscillation regulates the circadian clock to influence plant physiology, *Nat. Commun.*, 9, 2018, 4290

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyazaki Yosuke, Tanaka Kazuhiro, Watari Yasuhiko	4. 巻 43
2. 論文標題 Dependence of phase setting on the amplitude of square-wave and pseudo-sinusoidal temperature cycles in the circadian eclosion rhythm of the onion fly <i>Delia antiqua</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physiological Entomology	6. 最初と最後の頁 346 ~ 354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/phen.12264	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 宮崎洋祐	4. 巻 54
2. 論文標題 土中温度環境への昆虫概日時計の適応機構を探る	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 34 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮崎洋祐・田中一裕・渡康彦
2. 発表標題 矩形波状および正弦波状温度サイクルの較差とタマネギバエ羽化時刻の関係
3. 学会等名 第25回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎洋祐・田中一裕・渡康彦
2. 発表標題 タマネギバエの羽化リズムを発現させる温度変化の大きさ
3. 学会等名 第63回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎洋祐・田中一裕・渡康彦
2. 発表標題 タマネギバエにおけるフリーラン前に与えた温度振幅と1型・0型位相反応の関係
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎洋祐・黒木出・田中一裕・渡康彦
2. 発表標題 「湿度(しつど)」の変化がタマネギバエの概日羽化リズムに与える影響
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	後藤 慎介 (Goto Shinsuke) (70347483)	大阪市立大学・大学院理学研究科・教授 (24402)	
研究分担者	渡 康彦 (Watari Yasuhiko) (80240539)	芦屋大学・臨床教育学部・教授 (34501)	
研究分担者	田中 一裕 (Tanaka Kazuhiro) (00316415)	宮城学院女子大学・一般教育部・教授 (31307)	