

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06771

研究課題名(和文)概日リズム可塑性を生み出す神経機構の解明

研究課題名(英文)Elucidating the physiological mechanisms that control the plasticity in circadian rhythms

研究代表者

淵側 太郎 (Fuchikawa, Taro)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：90802934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：社会性昆虫コロニー内の社会的環境に応じて概日リズムの有無がスイッチする現象である「概日リズムの可塑性」について、それを制御する生理機構の解明に取り組んだ。先行研究より、その制御機構は、概日時計から運動出力に至るまでの経路上に存在するとされている。本研究では、昆虫の脳において時刻情報を伝達すると考えられている神経ペプチドshort neuropeptide F(sNPF)に着目し、その動態と機能の解析を試みた。その結果、ミツバチ脳において時計遺伝子PERIODとsNPFが共発現する細胞が複数発見された。このことはミツバチ脳でもsNPFが時刻情報の伝達を担うという仮説を支持する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫における概日行動リズム出力機構は、中枢で時を刻む機構に比べ不明な点が多い。行動の制御は、活動電位といった電気的過程、神経ペプチドを含む神経伝達物質を介した化学的過程、さらに細胞内のシグナル伝達過程といった複数の要素に関わる。本研究は、上記の化学的過程の理解に焦点を当てている。昆虫脳におけるsNPFの神経解剖学的な分布はこれまでショウジョウバエ以外ではほとんど明らかになっておらず、今回、これにミツバチが加わった。ミツバチはショウジョウバエには見られない概日リズムが関与する行動を示す。本研究で見つかった時計細胞に発現する神経ペプチドは、こういった行動の制御機構に関与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed at elucidating the physiological mechanisms that control the plasticity in circadian rhythms, a phenomenon in which the presence or absence of circadian rhythms switches in response to the social environment within a social insect colony. Previous studies suggest that the control mechanism exists on the pathway from the circadian clock to motor output. In this study, we focused on short neuropeptide F (sNPF), which is thought to transmit time information in the insect brain, and attempted to analyze its dynamics and function. As a result, we found several cells in which the clock gene PERIOD and sNPF are co-expressed in the honeybee brain. This supports the hypothesis that sNPF is responsible for the transmission of time information in the honeybee brain. Further studies are needed to identify the role of sNPF in the regulation of the plasticity in circadian rhythms.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日リズム ミツバチ 神経ペプチド sNPF

1. 研究開始当初の背景

概日リズムは生命活動に見られる約一日周期で起こる変動現象であり、実験室などの一定の環境下では安定的な概日リズムが見られる。しかし、野外で見られる概日リズムは様々な特徴を示す。その一つに概日リズムの可塑性がある。渡り鳥では、渡りの季節に昼も夜も活動することで渡りを迅速に行い、それ以外の季節では昼に活動して夜は休む。社会性昆虫では、養育すべき子(卵、幼虫、蛹)が存在する場合には昼も夜も世話をするが、子がいない場合には、夜間は睡眠と似た休息をとる。このように概日リズムが環境によって起きたり起きなかったりする。

セイヨウミツバチはリズム可塑性を示す代表的な生物である。労働個体である働きバチのうち採餌に従事する個体(採餌バチ)は昼に活動して夜は休む明瞭な概日リズムを示す。一方、育児に従事する個体(育児バチ)は、昼夜ともに育児行動を行い、概日リズムが見られない。また、育児バチを巣から単離すると、半日から1日で概日リズムが見られるようになる。さらに、このリズム可塑性を生み出す環境要因が、幼虫が分泌するフェロモンであることが明らかになっている。

概日リズムの生成は、概日時計が自律的に時を刻み、生物体内の各部位に時刻情報を伝えることで起こる(図1)。概日時計を中心とした概日リズムを生み出す一連の生理機構を概日システムという。以降で単に“リズム”と述べる場合、すべて概日リズムを指す。ミツバチにおいて、概日時計としての機能を担う時計細胞がミツバチ脳内で同定されている。また、その細胞の時計遺伝子の一つ PERIOD のタンパク産物が、採餌バチでも育児バチでも同程度の振幅で日周変動していることも分かっている。つまり、概日時計は、行動リズムを示す個体でも示さない個体でも同様に時を刻んでいることになる。そこで本研究では、ミツバチにおけるリズムの可塑性は概日時計が時を刻む機構より下流のメカニズムによって制御されていると考えられている。

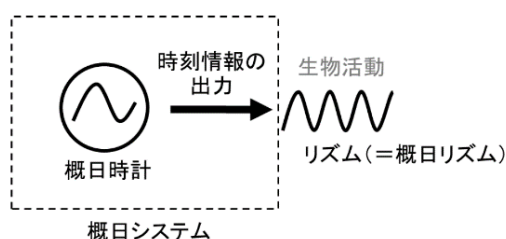


図1 概日時計がリズムを支配する過程の模式図

概日時計から行動リズムに至るまでの信号伝達経路についてはまだ解明されていないものの、概日時計から時刻情報を出力する神経ペプチドがショウジョウバエにおいて複数報告されている。なかでも pigment dispersing factor(PDF)と呼ばれるペプチドは、完全・不完全変態昆虫を問わず多くの昆虫で脳内での発現分布が報告されており、ショウジョウバエにおける機能阻害実験より、PDF が行動リズムの出力に重要な役割を果たすことが分かっている。しかしながら、ミツバチを用いた先行研究では、行動リズムを持つ採餌バチと、行動リズムが見られない育児バチの間で、そのペプチドの脳内の発現分布や経時的な変動パターンに違いが見られないとされている。したがって、これ以外の神経ペプチドによって時刻情報の制御が行われている可能性が考えられた。そこで、ショウジョウバエにおいて、時刻情報の伝達を担い、脳内の時計細胞の中

でもリズム形成に主要な役割を果たすと考えられている lateral neurons(LNs)に発現する short neuropeptide F(sNPF)に注目した。sNPF は摂食制御の背景で、その転写量や機能阻害による影響が調べられているが、ショウジョウバエ以外では脳内におけるその発現分布はほとんど調べられていない。そこで、ミツバチでもショウジョウバエと同様に sNPF が時計細胞で発現しているという仮説を立て、その検証を行った。sNPF が時計細胞で発現することは、このペプチドがリズムの可塑性を制御するという仮説(図2)を支持する。

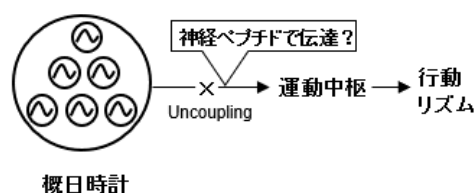


図2 概日リズム可塑性を実現する生理機構についての仮説
概日時計から運動中枢に至る経路の途中がUncoupleしている。概日時計は複数の時計細胞から構成される。大きな丸の中に見られる波線を持った小さな丸は、時計細胞一個に相当する。

2. 研究の目的

本研究は、セイヨウミツバチにおける概日リズムの可塑性を生み出す生理的機構の解明を目指す。その第一歩として、sNPF が時計細胞で発現しているかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) sNPF 抗体の新規作製

ミツバチ脳で発現しているペプチドの網羅的解析を行った先行研究により得られている、ミツバチ sNPF 成熟ペプチド配列の一部 LSKPMSAIPSYKFDDK に対して、業者委託によりマウスポリクローナル抗 sNPF 抗体を作成した。本抗体の特異性の確認は、抗原ペプチドをあらかじめ加えた抗体液を用いて免疫組織化学染色を行い、シグナルが消失することにより行った。

(2) ハエ sNPF 抗体での検証

ニクバエ sNPF を染色することが分かっているウサギポリクローナル抗ニクバエ sNPF 抗体(抗原配は AQRSPSLRL。このうちミツバチ sNPF と共通の配列は QRSPSLRL) を用いて、ミツバチ脳において免疫組織化学染色を行い、上記の新規抗ミツバチ sNPF 抗体に陽性シグナルパターンと比較することでミツバチ脳における sNPF の分布を確認した。本抗体の特異性の確認は上記と同様の方法で行った。

(3) sNPF と PER の二重染色

先行研究によりすでにミツバチ PERIOD を特異的に標識することが分かっているウサギポリクローナル抗ミツバチ PERIOD 抗体と、新規抗ミツバチ sNPF 抗体を用いて免疫組織化学二重染色法を行った。実験に用いたミツバチワーカーは後脚に花粉をつけていた採餌バチで、明け方(ZT22)頃にサンプリングしたものを用いた。

4. 研究成果

4. 1. 結果の概要

・セイヨウミツバチワーカー(採餌バチ)の脳内の sNPF の発現パターンがペプチドレベルで明らかになった。

背側ニューロン領域の前部(dorsal neuron anterior, DNa)に複数の細胞体、背側ニューロン領域の後部(dorsal neuron posterior, DNp)、および食道下神経領域(subesophageal zone, SEZ)にそれぞれ半球あたりに 1 個の sNPF 免疫陽性細胞が見られた。DNa の細胞数は 0-14 個と個体間で大きくばらついた。DNa, SEZ の細胞体から延びる sNPF 陽性の神経線維が観察された。ミツバチ脳における sNPF 免疫陽性細胞の数は、ショウジョウバエ成虫の脳(半球当たり少なくとも 140 個) と比べると少ない。

・時計遺伝子との免疫組織化学二重染色により、セイヨウミツバチワーカー(採餌バチ)の時計細胞の中の一部の細胞に sNPF が発現することが分かった。

DNa の領域に見られる時計遺伝子 PERIOD 免疫陽性細胞の一部に sNPF 免疫陽性細胞が見られた。この両方のシグナルが見られる細胞は片半球当たり 1-2 個だった。ショウジョウバエ以外で、脳内で神経ペプチド sNPF が時計細胞に発現することを示したのは本研究が初めてである。ショウジョウバエでは lateral neurons (LN)と呼ばれる前大脳側方領域に位置する時計細胞にて、sNPF が発現するが、ミツバチでは DN と呼ばれる前大脳背側領域において sNPF との発現が見られ、LN では sNPF の発現が見られなかった。この違いがどのような機能の違いを生み出すのかは不明である。

4. 2. 結果のまとめ

セイヨウミツバチワーカー(採餌バチ)の脳内において、前大脳背側領域(DNa)に位置する 1-2 個の時計細胞に sNPF が発現することが分かった。このことは、sNPF が概日時計からの時刻情報の出力を担う神経ペプチドであるという仮説を支持する。sNPF が概日リズムの可塑性を生み出す生理的機構に関与するかどうかの解明には、sNPF の機能阻害実験といったさらなる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 澗側 太郎	4. 巻 36
2. 論文標題 社会性昆虫のコロニー内における概日リズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 比較生理生化学	6. 最初と最後の頁 155-165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3330/hikakuseiriseika.36.155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 澗側 太郎
2. 発表標題 ミツバチ集団内にみられる概日リズム可塑性
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂口 史音, 澗側 太郎
2. 発表標題 時刻情報に関わる神経ペプチドsNPFのミツバチ脳における発現分布
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水谷龍佑, 澗側太郎
2. 発表標題 セイヨウミツバチの若齢ワーカーにおける概日リズム発生促進への温度の影響
3. 学会等名 第10回ミツバチシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 淵側 太郎
2. 発表標題 ミツバチにおける概日行動リズム可塑性と脳における時計遺伝子発現
3. 学会等名 第90回日本動物学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 淵側 太郎
2. 発表標題 ミツバチの寝起き～社会生活と体内時計～
3. 学会等名 第2回ミツバチサミット（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水谷龍佑、淵側太郎
2. 発表標題 セイヨウミツバチのコロニー内の温度は“若バチ”の概日歩行活動リズムの発生を促す
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会
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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------