

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22425

研究課題名(和文)脳による時間符号化研究の新機軸

研究課題名(英文)New approach for time encoding mechanisms by the brain

研究代表者

志賀 向子(Shiga, Sakiko)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：90254383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の光周性と概倍日リズムには概日時計を用いた日数計数機構が関与すると考え、光周性を持つナミクバエと概倍日リズムを持つオオクロコガネの時計細胞および細胞ネットワークの一端を明らかにした。また、キイロショウジョウバエにおける短期間の日長情報の符号化とオオクロコガネの概倍日リズムには共通して脳の側方に位置する時計細胞が関わることを示唆された。さらに、オオクロコガネの脳における時計遺伝子の発現振動から、概倍日の計数に時計遺伝子が関わる可能性が示された。今後、これらの知見をもとに、日数計数に関わる時間符号化の分子・細胞機構を探ることができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物は、細胞、組織、個体、社会いずれの階層においても「時間」と言う尺度を用い、総体として活動の調和を取っている。しかし、数日やそれ以上の長い時間を脳で符号化する具体的なメカニズムはわかっていない。本研究では、数日間の日長情報や二日リズムの形成に時計細胞が関わる可能性を示した。これは、今後、数日という時間が脳で符号化され、時間を認知するメカニズムの解明につながり得る。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that a circadian clock mechanism is involved in the day counting shared by photoperiodism and circa 'bi' dian rhythm in insects. We anatomically identified clock cells and their network in the brain of *Sarcophaga similis* (photoperiodism) and *Holotrichia parallela* (circadian rhythm). The encoding of day-length information for 3 days in *Drosophila melanogaster* and the circadian rhythm in *H. parallela* are suggested commonly to involve clock cells located in the lateral part of the brain. Oscillations of clock gene expression in the brain showed a possibility that mechanisms of the two-day counting may involve certain types of clock genes in *H. parallela*. Based on these, we will be able to explore the molecular and cellular mechanisms of time encoding involved in day counting in the future.

研究分野：神経生物学、時間生物学

キーワード：二日リズム 光周性 *Holotrichia parallela* *Sarcophaga similis* *Drosophila melanogaster*

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 地球上に生息するほとんどの生物は、概日時計により駆動される約 24 時間周期の概日リズムを持つ。生命現象には概日時計が回るサイクル数に依存した反応も知られている。例えば、昆虫では日長とその日数により季節が判断され、成長のタイミングが決まる (光周性: Gibbs 1975)。また、2 日周期の行動リズムを持つ昆虫がいる (概「倍」日リズム: Kawasaki et al. 2017)。これらには概日時計のサイクル数を検出するしくみが関与すると考えられる。

(2) 概日時計機構として、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の成虫の脳では約 150 個、幼虫の脳では約 20 個の時計細胞がネットワークを作り機能することが知られている (Helfrich-Förster 2003)。

### 2. 研究の目的

進化の過程で脳の時計細胞ネットワークに計数回路が組み込まれ、概日時計という「ものさし」を用いて日数を測る脳のメカニズムがあると考えられる。本研究では、キイロショウジョウバエの時計細胞ネットワークを参照し、昆虫の「光周性」と「概倍日リズム」に関与しうる時計細胞とそのネットワークを探る。そして、脳による日数という時間の符号化機構の探索に挑戦する。

### 3. 研究の方法

(0) 材料として、時計細胞ネットワークの詳細がわかっているキイロショウジョウバエ、5 日間の光周期に反応し蛹休眠を調節するナミクバエ *Sarcophaga similis*、地上への出現行動に概倍日リズムを持つオオクロコガネ *Holotrichia parallela* を用いた。

(1) 時計細胞ネットワークの標識と発現遺伝子の解析: キイロショウジョウバエの時計細胞に発現することが知られている時計タンパク質や神経ペプチドのアミノ酸配列、遺伝子配列を参照し、免疫組織化学、in situ hybridization (ISH)、あるいはシングルセル nested PCR を行い、ナミクバエ幼虫とオオクロコガネ成虫の脳の時計細胞やそれらの神経ネットワークを調べた。また、オオクロコガネの脳手術を行い、概倍日リズムに必要な脳領域を調べた。

(2) 異なる日長での時計細胞の形態変化の観察: キイロショウジョウバエ成虫脳とナミクバエ幼虫脳を用い、時計細胞の 1 つである small lateral neuron ventral (sLNv) の前大脳背側領域の投射形態の複雑さを一定日数の短日と長日を与えた後、比較した。キイロショウジョウバエ成虫の観察には、pdf>MCD8::gfp 系統と GFP 抗体を用いて sLNv を標識し、神経繊維の分枝の複雑さを Sholl analysis (Sholl, 1953) を用いて定量した。ナミクバエでは PDF 免疫陽性 sLNv を観察し、神経繊維上のバリコシティの数を数えた。

(3) シナプス構造阻害剤あるいは RNA 干渉法による光周性、概倍日リズムに対する影響、および脳内遺伝子発現の解析: 神経細胞の形態学的可塑性が光周性に関わるかについて探るため、シナプス前部のシナプス活性領域の拡大とシナプス小胞の放出を抑制することが知られているスペルミジンを投与し (Gupta et al. 2016)、ナミクバエ光周性に対する影響を調べた。スペルミジンを人工飼料に混ぜて、20°C の長日と短日でハエを飼育した。また、オオクロコガネでは、25°C 一定の明暗条件、恒暗条件それぞれで、6 時間ごとに脳から total RNA を抽出し、RNA-sequencing を行った。アセンブルした全コンティグについて Transcripts per million (TPM) 値を取得し、時系列データの周期性を解析した。そして、概日周期、概倍日周期を持つ遺伝子の数を調べた。また、時計遺伝子の RNA 干渉を行い、概倍日活動リズムに対する影響を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) 時計細胞ネットワーク

(1-1) ナミクバエ幼虫脳 時計タンパク質 PERIOD と神経ペプチド pigment-dispersing factor (PDF) の抗体を用いて二重標識を行った結果、片側に 5 つある sLNv のうち、4 つが PDF 陽性を示し、PDF 陽性繊維は前大脳背側領域へ投射していた (図 1 A)。環状腺の先端と基部を除く領域にヘマトキシリンで強染される細胞集団があり、これらが前胸腺細胞と考えられた。そこで、環状腺先端の片側を切断し、脳側へ染色液を流し込むことにより (バックフィル)、切断面よりも環状腺先端部 (前胸腺を含む) に終末している神経細胞を染色した。その結果、染色液を流した側と同側に 6 つの細胞体 (PL-i)、反対側

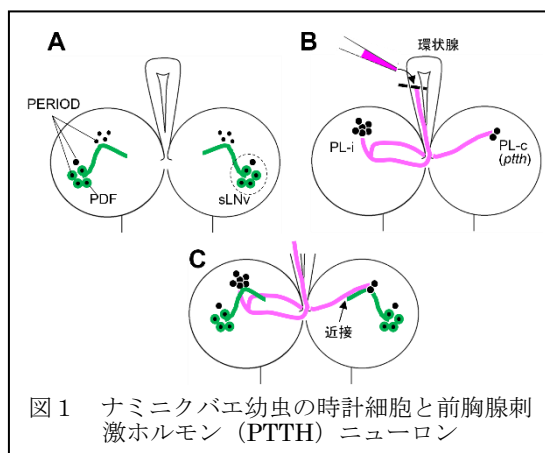


図 1 ナミクバエ幼虫の時計細胞と前胸腺刺激ホルモン (PTTH) ニューロン

に2つの細胞体 (PL-c) が染色された (図 1 B)。また、バックフィルで染色した PL-c を微小ピペットで個々に採取し、シングルセル nested-PCR を実施した結果、前胸腺刺激ホルモン (*ptth*) が発現していた (図 1 B)。これより、PL-c が PTH ニューロンであることがわかった。また、PDF の免疫組織化学とバックフィルで二重染色したところ、PL-c の神経繊維と PDF 免疫陽性の神経繊維が近接していた (図 1 C)。

(1-2) オオクロコガネ成虫脳 視葉除去により概日リズムが見られなくなった (図 2 Watanabe and Shiga 2020)。ISH により *period* のアンチセンス鎖で標識される細胞群が視葉内視髄基部に観察された。また、副視髄近くに多数の PDF 免疫陽性細胞が観察された。これらの神経繊維は前大脳背側領域を経て、反対側の PDF 細胞の神経繊維と合流していた。

### (2) 日数経過に伴う時計細胞の形態変化の探索

(2-1) キイロショウジョウバエ成虫脳 25°C で短日または、長日を3日間経験させ、sLNv の軸索終末部の形態を4時間毎に比較した。その結果、一つの時間帯で分枝の複雑さが日長により有意に異なることがわかった。これより、3日間という短期間で時計細胞 sLNv において、短日と長日情報の符号化が行われる可能性がある。

(2-2) ナミニクバエ幼虫脳 20°C で短日または長日を5日間経験させ、明期開始後1-2時間で PDF 免疫組織化学を行った。その結果、前大脳背側領域にある sLNv 神経繊維上のバリコシティの数に有意な差はなかった。次に、sLNv 形態の日周変化を考慮し、キイロショウジョウバエと同様に4時間ごとにサンプリングを行い、免疫組織化学を行った。現在、短日と長日条件のバリコシティ数を解析している。

### (3) シナプス構造阻害剤による光周性、あるいは RNA 干渉法による概日リズムに対する影響

(3-1) ナミニクバエ幼虫 人工飼料を用い、スペルミジン投与群 (5mM) と未投与群で比較したところ、光周性には影響は見られず、対照群と同様に休眠率は短日条件で長日より有意に高かった。

(3-2) オオクロコガネ成虫 脳の RNA-sequencing により約 56 万個のコンティグが得られた。このうち、明暗・恒暗両条件でその TPM 値に 48 時間の周期性を示すコンティグは、24 時間の周期性を示すものに比べて約 6 倍多かった。また、*period*, *timeless*, *clock*, *cycle*, *double time*, *cryptochrome2*, *vriille*, *shaggy*, *crock work orange* の9つの時計遺伝子の配列が得られ、TPM 値が明暗・恒暗条件ともに 24 時間の周期性を示す時計遺伝子と、48 時間の周期性を示す別の時計遺伝子があった。これらの結果から、概日リズムを示すオオクロコガネの脳に概日時計が存在すること、また、時計遺伝子を用いて二日という時間を作る仕組みが存在する可能性が考えられた (図 3)。

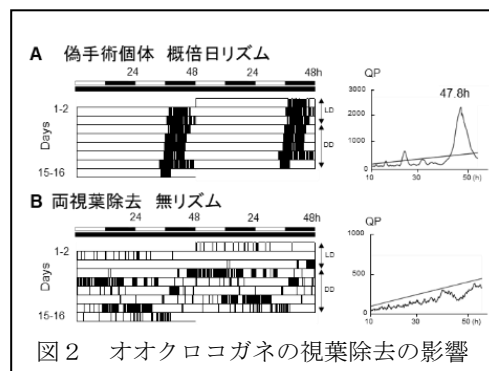


図 2 オオクロコガネの視葉除去の影響

時計遺伝子二種類の RNA 干渉を行った結果、まだ例数は少ないが、いずれの遺伝子においても、地上への出現行動に見られる概日リズムの自由継続周期が対照実験群に比べ短くなる傾向があった。

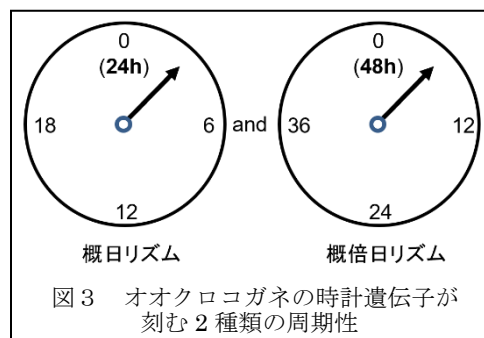


図 3 オオクロコガネの時計遺伝子が刻む2種類の周期性

(4) 以上より、ナミニクバエとオオクロコガネの時計細胞ネットワークの一端が明らかになり、短期間の日長の符号化と概日リズムの形成に共通して時計細胞が関わりと示唆された。また、時計遺伝子を用いて二日という時間を作るあるいは計る仕組みが脳に存在する可能性がある。

### <引用文献>

Gibbs D (1975) Reversal of pupal diapause in *Sarcophaga argyrostoma* by temperature shifts after puparium formation. *J Insect Physiol* 21:1179-1186.  
 Gupta VK et al. (2016) Spermidine suppresses age-associated memory impairment by preventing adverse increase of presynaptic active zone size and release. *PLOS Biology* | DOI:10.1371/journal.pbio.1002563  
 Helfrich-Förster C (2003) The neuroarchitecture of the circadian clock in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Microsc Prs Tech* 62:94-102.  
 Kawasaki Y et al. (2017) Plausible link between circa'bi'dian activity rhythms and circadian clock systems in the large black chafer *Holotrichia parallela*. *J Exp Biol* 220:4024-4034.  
 Sholl DA (1953) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87:387-406.  
 Watanabe K, Shiga S (2020) The optic lobe-pars intercerebralis axis is involved in circa'bi'dian rhythm of the large black chafer *Holotrichia parallela*. *J Comp Physiol A* 206:819-829.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Watanabe Kohei, Shiga Sakiko	4. 巻 206
2. 論文標題 The optic lobe-pars intercerebralis axis is involved in circa 'bi' dian rhythm of the large black chafer <i>Holotrichia parallela</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Physiology A	6. 最初と最後の頁 819 ~ 829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00359-020-01440-8	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 SHIGA Sakiko	4. 巻 37
2. 論文標題 Circadian rhythm and its mechanism in <i>Holotrichia parallela</i> ;	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hikaku seiri seikagaku(Comparative Physiology and Biochemistry)	6. 最初と最後の頁 180 ~ 188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3330/hikakuseiriseika.37.180	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 -
1. 著者名 志賀向子、渡邊耕平	4. 巻 57
2. 論文標題 クロコガネ属の活動に見られる二日リズム	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本の科学者	6. 最初と最後の頁 144 ~ 149
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 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 Shiga Sakiko, Omura Yuzuru, Kawasaki Yuta, Watanabe Kohei	4. 巻 39
2. 論文標題 Phylogenetic Separation of <i>Holotrichia</i> Species (Insecta, Coleoptera, Scarabaeidae) Exhibiting Circadian Rhythm and Circa 'bi' dian Rhythm	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs210091	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水谷 瑞穂, 渡邊 耕平, 志賀 向子
2. 発表標題 RNA-sequencing によるオオクロコガネの脳における概日リズム および概倍日リズムの解析
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazune Hirata, Sakiko Shiga
2. 発表標題 The Bolwig organ and its role in the photoperiodic response of the flesh fly <i>Sarcophaga similis</i> larvae
3. 学会等名 第 66 回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水谷 瑞穂, 渡邊 耕平, 志賀 向子
2. 発表標題 オオクロコガネにおける時計遺伝子の発現リズム
3. 学会等名 日本動物学会 第92回 オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大野響, 志賀向子, 濱中良隆
2. 発表標題 キイロショウジョウバエ概日時計ニューロンsLN <sub>v</sub> の軸索終末部 における光周期依存的な構造変化
3. 学会等名 2021年 日本動物学会近畿支部春季研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田暉也, 志賀向子
2. 発表標題 概倍日リズムを持つオオクロコガネが示す概日リズム
3. 学会等名 2021年 日本動物学会近畿支部春季研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊耕平、志賀向子
2. 発表標題 オオクロコガネの概倍日リズムに関わる脳領域の解析
3. 学会等名 第 27 回 日本時間生物学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊耕平、志賀向子
2. 発表標題 Analysis of brain regions involved in circa'bi'dian rhythm in the large black chafer <i>Holotrichia parallela</i>
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第42回山形大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志賀向子
2. 発表標題 昆虫の季節性休眠を調節する光周性分子神経機構の解析
3. 学会等名 第68回日本生態学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊耕平、志賀向子
2. 発表標題 オオクロコガネ <i>Holotrichia parallela</i> の概倍日リズムにおける視葉の役割
3. 学会等名 日本動物学会近畿支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大江 勇太郎, 志賀 向子
2. 発表標題 ナミニクハエ <i>Sarcophaga similis</i> 幼虫の脳におけるPigment-dispersing factor免疫陽性ニューロンとPars lateralisニューロンの形態学的解析
3. 学会等名 日本動物学会大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川 一生, 志賀 向子
2. 発表標題 オオクロコガネ ( <i>Holotrichia parallela</i> ) の概倍日リズムにおける温度補償性
3. 学会等名 日本動物学会大阪大会
4. 発表年 2019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	濱中 良隆  (Hamanaka Yoshitaka)  (10647572)	大阪大学・理学研究科・助教       (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	長谷部 政治  (Hasebe Masaharu)  (40802822)	大阪大学・理学研究科・助教    (14401)	

	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 協力者	後藤 慎介  (Goto Shinsuke)  (70347483)	大阪公立大学・大学院理学研究科・教授    (24402)	

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