

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06276

研究課題名(和文) 社会性昆虫における社会的同調に關与する時計遺伝子の探索

研究課題名(英文) Searching for clock genes involved in social synchrony in social insects

研究代表者

守山 禎之(Moriyama, Yoshiyuki)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：30707394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：社会性昆虫におけるコミュニケーションと生体リズムの同調に關与する時計遺伝子の探索を目指し研究を行った。得られたクロオオアリ時計遺伝子部分配列から、periodなどの時計遺伝子の1日の発現リズムを明らかにした。また、in situ ハイブリダイゼーションを用いて時計遺伝子を発現している細胞群を明らかにし、時計細胞の候補を示すことができた。二本鎖RNAを注射することで目的の遺伝子発現を抑えるRNAiを行い、時計遺伝子の機能解析を試みたが、効率良く導入することができず機能解析まで至ることは出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫概日時計の研究ではショウジョウバエにおいて最も研究が進んでいるが、近年昆虫種によって時計遺伝子をはじめとする分子基盤に差異があり、ショウジョウバエを用いた研究から得られた知見だけでは普遍的な昆虫概日時計を説明できず、様々な昆虫種において概日時計の分子メカニズムを明らかにし、比較する必要がある。アリ類の時計遺伝子とその発現リズムなど本研究で明らかにした成果は、昆虫における概日時計の普遍的メカニズムを明らかにする上での一端を担う意味では学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Research was conducted to search for clock genes involved in communication and biological rhythm synchronisation in social insects. From the obtained partial clock gene sequences of the *Camponotus japonicus*, the daily expression rhythms of clock genes, such as period, were clarified. In addition, in situ hybridisation was used to identify a group of cells expressing the period gene and to indicate the candidate of candidate clock cells. An attempt was made to perform RNAi to suppress the expression of the target gene by injecting double-stranded RNA(dsRNA) and to analyse the function of the clock gene, but it was not possible to efficiently introduce the dsRNA into the cells, so it was not possible to reach a functional analysis.

研究分野：体内時計

キーワード：時計遺伝子 社会性昆虫

1. 研究開始当初の背景

概日時計は動物の体内にある約 24 時間周期の自律振動体であり、睡眠・覚醒リズムなど様々な生理機能の日周リズムを制御している。約 24 時間周期の振動は時計遺伝子と呼ばれる一群の遺伝子の周期的発現と、その産物による自己フィードバックにより制御されている。社会性昆虫では個体間あるいは集団間の情報伝達により同調が起こることが報告されており、例えばミツバチでは、ある時刻に採餌するように訓練した個体を別の時刻に採餌する訓練を受けたコロニーに入れると、その両方の時刻に採餌するようになる。また、位相が異なる二つのコロニーを物理的に接触させると両者のリズムが同調するようになる [1][2]。しかし、このような社会性昆虫におけるコミュニケーションと生体リズムの同調すなわち社会的同調の詳細なメカニズムは未解明であり、個体に組み込まれた測時機構である概日時計に、「社会」などの集団生活における他個体との相互作用が、どのような影響をおよぼすのかは重要な「問い」として残されている。社会性昆虫における社会構造の維持と調節には、コロニー内での個体間コミュニケーションと、それぞれの生体リズムを司る概日時計が重要な役割を担うことは想像に難くない。本研究では、未だ明らかになっていない社会的同調と時計遺伝子の直接の関与を明らかにすることを旨とする。

2. 研究の目的

社会性昆虫を用いた概日時計と社会的同調の研究は、セイヨウミツバチやトゲオオハリアリなどで報告があるが、どちらも行動レベルでの研究であり、遺伝子レベルと行動レベル両方からのアプローチで行われている研究はまだない。そこで、本研究では両方向からのアプローチで概日時計と社会的同調機構の解明を目指す。考案した個体間のコミュニケーションが相互の活動リズムへ与える変化を計測できる記録装置を用いた行動レベルの解析と、RNA 干渉 (RNAi) を用いた遺伝子レベルの解析の両方向からのアプローチを行うことで、社会的同調に関与する時計遺伝子を明らかにしようと試みる。また、クロオオアリではケミカルコミュニケーションに関わる化学感覚子と化学物質がすでにいくつか同定されており、本研究で得られる結果は、さらに発展させ概日時計の社会的同調を担う化学物質を追究していく際の有用な情報基盤となりうる。

3. 研究の方法

(1) RNA シークエンシングによる時計遺伝子解析

RNA シークエンシングを行いクロオオアリ時計遺伝子および時計関連遺伝子の配列を決定する。得られたデータから *de novo* アセンブリー、アノテーションを行う。公開されているハチ目のゲノム情報や、他昆虫の時計遺伝子配列を用いて、クロオオアリの時計遺伝子配列を決定する。時計遺伝子その中でもリズム発振に特に重要と予想される時計遺伝子 *period*, *clock*, *cycle*, *cryptochrome* の解析をまずは行う。

(2) 時計遺伝子の発現解析

RNA シークエンシングにより得られた時計遺伝子の 1 日における発現変動を解析する。他の昆虫同様、クロオオアリの概日時計の中核は脳内にあることが予想されるので、頭部をサンプルとし、温度一定条件での明暗サイクル下および恒暗条件下で 4 時間おきにサンプリングを行う。遺伝子配列から最適なプライマーを設計し、定量的逆転写 PCR 法を用いて各遺伝子の発現解析を行い、時計遺伝子発現の周期性を解析する。

(3) RNA 干渉を用いた時計遺伝子機能解析

得られた時計遺伝子を用いた RNA 干渉 (RNAi) により時計遺伝子の機能を解析する。時計遺伝子の配列から作製した二本鎖 RNA をクロオオアリに投与し、その後の活動リズムを計測し、リズム発振における各時計遺伝子の機能を解析する。また、RNAi により特定の時計遺伝子をノックダウンさせた個体における、その他の時計遺伝子の発現レベルの変化を解析し、概日時計の自己フィードバックメカニズム上での各時計遺伝子の関係を推定する。さらに、RNAi を行った個体と無処理個体を用いて個体間でコミュニケーションできる状態で活動リズムを計測する。時計遺伝子をノックダウンさせた個体と無処理個体間でのコミュニケーションによる相互の活動リズムへの影響および活動リズムの変化を観察し、社会的同調に関与する時計遺伝子を明らかにする。

(4) 時計遺伝子発現細胞の解析

in situ ハイブリダイゼーション (ISH) を用いてクロオオアリにおける時計遺伝子発現細胞 (時計細胞) の所在を明らかにする。得られた時計遺伝子配列からプローブを作製し、ISH により脳内の時計細胞を検出する。

4. 研究成果

(1) RNA シークエンシングによる時計遺伝子解析

時計遺伝子 *period*, *cycle*, *clock*, *clockwork orange*, *cryptochrome* および時計関連遺伝子 *pidment-dispersing factor* と考えられる部分配列が得られた。他昆虫の既知の時計遺伝子配列からのアミノ酸配列と比較すると、bHLH や PAS などのドメインが保存されていることが明らか

となった。得られた配列は全長ではなく部分配列なので、末端部で保存されているドメインについては本解析では不明であった(図1)。時計遺伝子 *cryptochrome* と *timeless* にはそれぞれ2種類ずつある(*cryptochrome1,2* と *timeless1,2*) ことが知られており、昆虫においては、それぞれの遺伝子について、両方を保持している場合やどちらか一方を保持している場合があることが知られている[3]。セイヨウミツバチは、*cryptochrome* のうち *cryptochrome2* を *timeless* のうち *timeless2* を保持している。本解析ではクロオオアリは *cryptochrome2* を保持していることが明らかとなった。*timeless* については本解析では明らかにできなかったが、同じ八チ目であると考え、*timeless2* を保持していることが予想される。詳細はゲノム解析を行いさらなる検討を行う必要がある。

(2) 時計遺伝子の発現解析

部分配列が得られた時計遺伝子からプライマーを設計し、それぞれの遺伝子の1日における発現のパターンをリアルタイムPCRで解析した。その結果、明期12時間、暗期12時間のサイクル下において、*period*, *cryptochrome2* 遺伝子は暗期の中頃にピークを持つ発現リズムが見られた。*cycle*, *clockwork orange* 遺伝子は明期の中頃にピークを持つ発現リズムが見られた。ヒアリ(*Solenopsis invicta*)を用いた研究においても[4]、*period* と *cryptochrome2* は暗期にピークを持つ発現リズムがあり、*cycle* と *clockwork orange* は明期にピークを持つ発現リズムある。このことから、他の昆虫同様これらの遺伝子がリズム発振に重要な役割を担っていると示唆される。

(3) RNA 干渉を用いた時計遺伝子機能解析

二本鎖RNA投与によるRNAiの技術は昆虫を用いた研究でも広く利用されている[5]。二本鎖RNAの個体への導入方法として本研究ではまず、個体に負担の少ない経口投与で行った。投与後の個体の活動リズムを、TRIKINETICS社製の活動記録装置を用いて計測した。二本鎖RNAの経口投与による効果は線虫やプラナリアなどで報告されているが[6]、クロオオアリでは経口投与後の個体において活動リズムの周期の変化が観察されなかった。正しく二本鎖RNAが導入されていない可能性が考えられたので、次に二本鎖RNAの投与方法をインジェクターを用いた腹腔への直接投与に切り替えて進めた。まずは多くの昆虫で周期的に発現しておりリズム発振に重要であると考えられる *period* 遺伝子を用いてRNAiを行った。無処理のワーカーにおいては、恒暗条件下で約22.7時間の昼行性の自由継続リズムが計測された。オオアリ類の *Camponotus floridanus* を用いた研究では、昼行性と夜行性の個体両方が観察されていたが[7]、本研究では昼行性のみであった。コロニーが生息していた環境や飼育条件も影響している可能性があるが、非常に興味深い。*period* 二本鎖RNAを導入した個体では、予想された活動リズムの周期の変調や無周期化が観察されなかった。自由継続周期も、無処理個体と有意な差がなかった(図2)。導入する二本鎖RNAの長さ、および二本鎖とする配列を変更し、また導入する二本鎖RNAの濃度を変え試行したが、恒暗条件下における活動リズムに有意な変化が表れる結果を得られなかった。アリ類ではRNAi

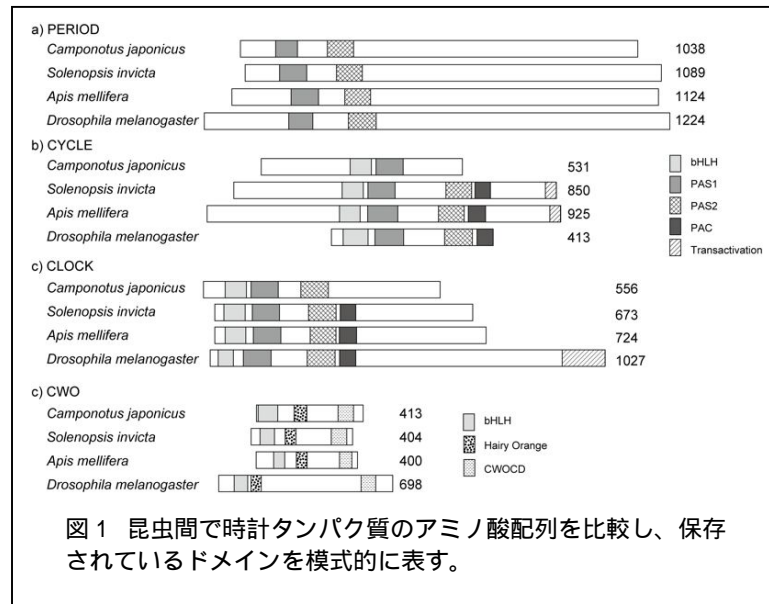


図1 昆虫間で時計タンパク質のアミノ酸配列を比較し、保存されているドメインを模式的に表す。

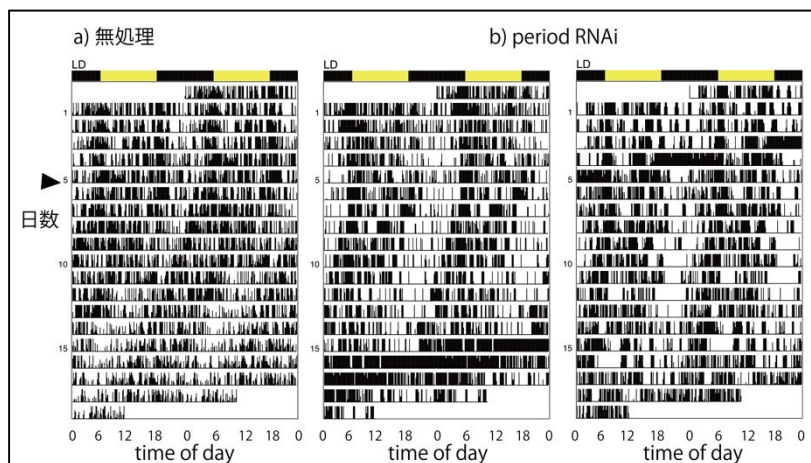


図2 a)無処理個体、b)period RNAi 個体の活動記録の典型例を示す。明期12時間、暗期12時間のサイクルを与えたのち、黒矢頭の日に恒暗条件下に移した。

を用いた研究自体が少なく、また RNAi は導入する遺伝子により効果に差がある場合があるので、クロオオアリでは本研究で用いた時計遺伝子による RNAi の効果が得られないか非常に弱い可能性が考えられる。近年、昆虫において CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集法において、メス成虫に注射することで子孫のゲノム編集を行う DIPA-CRISPR 法が開発されており [8] アリ類へ応用可能であれば、より効率のよい機能解析が行える可能性がある。

(4) 時計遺伝子発現細胞の解析

period 遺伝子配列から作製したプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。結果、脳内背側に *period* を発現している神経細胞群が観察された、また、視髄と視葉板の間の細胞群にシグナルが検出された。

Camponotus floridanus のセイヨウミツバチ PERIOD 抗体を用いた免疫組織染色においても脳内背側に PER 陽性細胞が観察されている [7] 他の時計遺伝子でも同様に ISH を行い確認する必要があるが、これらの細胞がクロオオアリにおける時計細胞の可能性が



図3 ISHによる *period* 発現細胞の検出。脳半球と片側視葉を含むパラフィン切片。B: 脳, M: 視髄, La: 視小葉

可能性がある。

< 引用文献 >

1. Moore D, Honey bee circadian clocks: behavioral control from individual workers to whole-colony rhythms, *J Insect Physiol*, 47(8), 2001, 843-857
2. Bloch G, The social clock of the honeybee, *J Biol Rhythms*, 25(5), 2010, 307-317
3. Beer K, Helfrich-Förster C, Model and Non-model Insects in Chronobiology, *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 14, 2020
4. Ingram KK, Kutowoi A, Wurm Y, Shoemaker D, Meier R, et al., The Molecular Clockwork of the Fire Ant *Solenopsis invicta*, *PLOS ONE*, 7(11), 2012, e45715
5. Uryu O, Kamae Y, Tomioka K, Yoshii T. Long-term effect of systemic RNA interference on circadian clock genes in hemimetabolous insects, *J Insect Physiol*, 59(4), 2013, 494-499
6. Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J, Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference, *Nature*, 408(6810), 2000, 325-330
7. Kay J, Menegazzi P, Mildner S, Roces F, Helfrich-Förster C, The Circadian Clock of the Ant *Camponotus floridanus* Is Localized in Dorsal and Lateral Neurons of the Brain, *J Biol Rhythms*, 33(3), 2018, 255-271
8. Shirai Y, Piulachs MD, Belles X, Daimon T, DIPA-CRISPR is a simple and accessible method for insect gene editing, *Cell Reports Methods*, 2(5), 2022, 100215

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 守山 禎之
2. 発表標題 Analysis of clock genes in the Ant <i>Camponotus japonicus</i>
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第44回高知大会
4. 発表年 2022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
---------	---------