

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657060

研究課題名(和文) オオクロコガネの二日周期の活動リズム形成機構

研究課題名(英文) Circadian rhythm in a large black chafer *Holotrichia parallela*

研究代表者

志賀 向子 (Shiga, Sakiko)

大阪市立大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90254383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：標識再補と活動記録によりオオクロコガネの概日リズムを調べた。成虫は野外の同じ樹に約2日の周期で繰り返し夜間に現れ摂食を行うこと、比較的狭い範囲に出現日をずらした2集団が同所的に存在することがわかった。また、本種は内因性の約二日周期のリズムを持ち、このリズムは24時間周期の明暗条件では2周期二一度時刻合わせをして同調すると考えられた。さらに、このリズムの形成には概日時計が関与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Many organisms synchronize their biological activity with environmental cycles on the earth. However, the large black chafer *Holotrichia parallela* have a unique 2-day rhythm. Adults remain under ground in the daytime and appear on the ground every other night. We have made an ecological and chronobiological study on this rhythm. Mark and recapture study suggested that beetles repeatedly appear on the same tree for feeding on alternate days from June to September. It is thought that 2 groups occurred sympatrically on different days. The captured beetles showed a clear endogenous activity rhythm with a period of about 48 h. Phase responses to light pulses suggested that this circadian rhythm is driven by a circadian clock.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：コウチュウ 概日リズム 標識再補法 生物時計

## 1. 研究開始当初の背景

多くの生物は、地球の自転周期に近いおよそ 24 時間周期の内因性のリズムを持つ。これは概日リズムと呼ばれ、恒常条件下で自由継続する。一方、オオクロコガネの成虫は丸 1 日間地中で過ごし、翌日の夜に地上で活動する 2 日周期の非常に珍しい活動リズムを持つ (吉岡、山崎 1983)。しかしながら、このリズムの時間生物学的な解析は一切行われておらず、究極要因、至近要因ともわかっていない。環境要因がもたらす 2 日の周期は地球物理学的には存在せず、このリズムが何のために存在するのか、また、どのようなメカニズムから生じるのか興味深い。

## 2. 研究の目的

本研究は、オオクロコガネ成虫の地上への出現行動を対象とし、2 日リズムの性質を生態学および、時間生物学的に明らかにすることを目的とした。また、概日時計の関与という観点からこのリズムの至近要因を探った。

## 3. 研究の方法

### (1) 昆虫

大阪府大和川河川敷 (34°35' N、135°30' E)、あるいは大阪府淀川河川敷 (34°43' N、135°31' E) で採集したコウチュウ目コガネムシ科に属するオオクロコガネ *Holotrichia parallela* を用いた。淀川河川敷で採集した個体は位相反応の実験と概日時計遺伝子のクローニングに、それ以外は全て大和川河川敷で採集した個体を用いた。

### (2) 野外発生消長と出現周期の調査

大和川河川敷に生息するアキニレ (*Ulmus parvifolia*) 樹上に集まる集団を対象に、標識再捕を行い、オオクロコガネ成虫の季節的発生消長と出現周期を調査した。2011 年は 1 本 (樹木 E)、2012 年は二本 (樹木 A、E) のアキニレ樹上に現れる個体を捕まえ、毎日、日の入り時刻に鞘翅に個体番号を刻印した。翌日以降、同じ樹木で採集される個体の番号を調べた。二年間、オオクロコガネの出現期間を通して標識再捕を行った。オオクロコガネの出現が開始した 6 月 3 日を基準の第 1 日とし、2011、2012 年ともにそれ以降を偶数日 (第 2・4・6 日など)、奇数日 (第 3・5・7 日など) と呼ぶこととした。

### (3) 野外活動範囲の調査

2011 年 7 月 28、29 日に、個体標識を行った樹木 E を含めた 10 本の樹木に出現する標識個体、非標識個体の数を記録した。

### (4) 野外出現時刻の調査

Leal ら (1992) によって同定されたフェロモン (L-isoleucine methyl ester: Linalool = 4:1) を準

備し、トラップを作製してアキニレの枝に設置した。午前 6 時から翌日午前 6 時まで 1 時間ごとにフェロモントラップ内の捕獲数 (オス) とフェロモントラップを仕掛けたアキニレの樹上にいる個体数をオス、メス区別せずに調べた。樹上の個体数調査は目視で行い、10 個体以上を ++、1~9 個体を +、0 個体を - で表記した。この 24 時間調査を 8 日毎に繰り返した。

### (5) 活動リズムの測定

野外からオス個体を採集し、25℃一定 12h 明期 12h 暗期の明暗条件 (12L12D)、恒暗条件 (DD) で地上への出現行動を記録した (図 1)。直径 7 cm、高さ 11 cm の円柱形のプラスチック容器に土を入れ、餌としてサクラの葉を入れた。地上の様子を 6 分間ごとにウェブカメラで撮影し、成虫が地上にいる時間帯を記録した。位相反応を調べる実験では、潜っている成虫に光が届くよう、土の代わりに細かく砕いた白いスポンジ片を用いた。

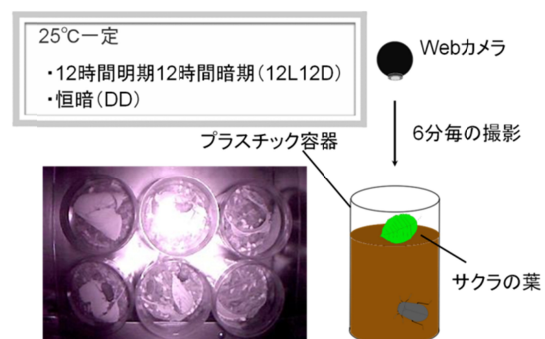


図 1 活動記録の様子

プラスチック容器内には土、あるいはスポンジ片を入れた。

### (6) 位相反応

採集した個体を 16L8D、25℃ に 1~10 日間おき、その後、DD で出現リズムを記録した。DD 条件において 11 日目から、概日時刻 (CT) 15、21、36、45 付近を中心に 3 時間の光パルスを与え、あるいは 2 回与えた。その後、9 日間再び DD で活動を記録した。なお、光パルスを与えた概日時刻は DD で観察した最初の 10 日間のリズムから決定した。前半の DD 条件 10 日間、光パルス照射後の DD 条件 8 日間それぞれの自由継続周期 ( $\tau$ ) を  $\chi^2$  乗ピリオドグラムにより算出し、その傾きを参考に光パルス前後の活動開始位相を決定した。そして、位相変位量を求め、光パルスを与えた時刻と位相変位の関係をグラフ化した。

## 3. 研究成果

(1) 野外発生消長と出現周期: 2 年間で 683 個体の標識を行った。採捕率は約 40%、また、3 回以上繰り返し採捕された割合は全体の約 20% だった (表 1)。図 2 に標識された日を奇数日と偶数日で分けた採捕数とそれら個

体群全体の野外発生活長を示す。オス、メスともに6月初旬から9月中旬まで出現し、6月下旬から7月にかけて個体数が増加した。オスとメスに出現傾向の違いはなかったため、図2では合計個体数を表している。2011年には、奇数日に標識された個体はほとんど奇数日に出現し、偶数日標識個体は偶数日に採捕された。このことから、出現日が異なる二つの集団が同所的に存在すると考えられた。しかしながら、それらの分離は完全ではなかった。2012年には、6月後半に大雨があり(図2赤点線枠内)、これにより偶数日集団の出現日がずれて、2集団ともに大雨の日以降、多くの個体が奇数日に出現した。このことから、出現日は必ずしも固定されているのではなく、環境要因によって変わりうることが分かった。

表1 標識調査の結果

標識調査の結果		
	2011	2012
標識個体数	224	459
再捕率(%)	40.6	44.4
3日以上出現した個体(%)	21.0	22.7

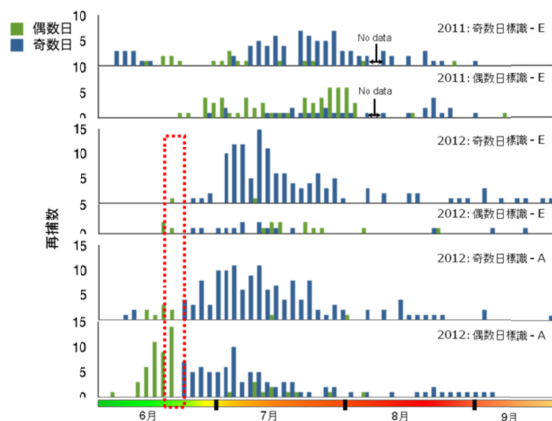


図2 大和川河川敷における出現個体数 2011、2012年の記録。6月3日を第1日(奇数日)とし、以後の日を偶数日(緑)と奇数日(青)を分けて示す。いずれのグラフも偶数日あるいは奇数日出現に偏っており、これらの集団は2日ごとに出現していることが分かる。赤の点線枠は大雨があった日を記す。A, Eはアキニレ樹木を指す(図4参照)

また、個体ごとの出現日を見ると、標識日から2日ごとに繰り返し捕獲される個体が観察された(図3)。このことから、野外では

オオクロコガネ成虫はオスメスともに48時間の周期で活動すると考えられた。

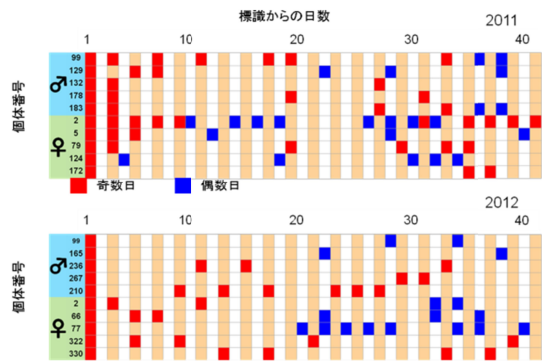


図3 大和川河川敷における個体の活動周期(2011、2012年のオス5個体、メス5個体の例) 個体の活動があった日を赤あるいは青のマスで示す。このプロットでは、個体が標識された日を1日とし、41日間の記録を示す。

(2) 野外における活動範囲: 標識を行った樹木Eを含む計10本の木を対象とし、成虫の行動範囲を連続2日間調査した。その結果、標識を行った樹木E以外で捕獲された個体は95頭あり、このうち標識された個体は2頭だけであった(図4)。

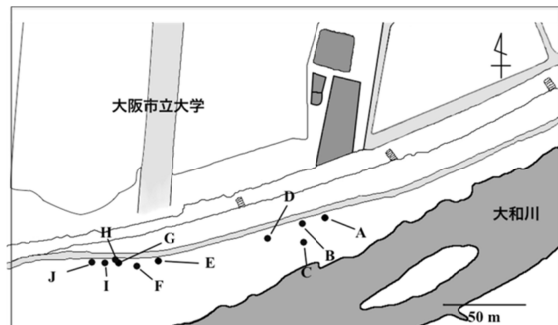
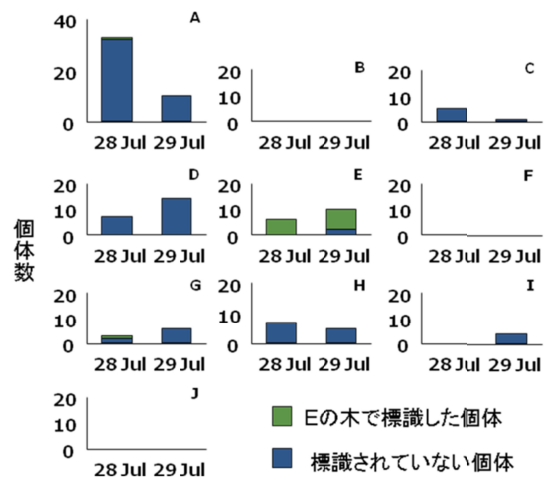


図4 大和川河川敷における標識個体の出現範囲 上のグラフは、7月28,29日に下の地図に示すA~Jの樹上に出現した個体数を表す。Eで標識された個体はほとんどがEの樹木に出現していることが分かる。

また、日の出時刻にアキニレの木から飛び去る成虫を7頭追跡し、土へ潜る場所を記録した。その結果、いずれの個体も摂食していた樹木から15 m以内にある土中に潜った。

以上より、オオクロコガネ成虫は比較的狭い範囲で、2日の周期性を持ってほぼ同じ木に繰り返し飛来すると考えられた。

(3) 野外出現時間帯：フェロモントラップ内のオス捕獲数は、日の入り時刻と同期して多く、その後新たに捕獲される個体はほとんど無かった。また、夜間を通して樹上で摂食する個体が観察された。そして、日の出時刻に樹上からいなくなった。樹上への出現時刻は日の入りと、樹上から飛び去る時刻は日の出と同期していた(図5)。また、日暮れ後間もない時間帯に交尾が観察された。これより、オス、メスともに日暮れに樹状へ飛来し、夜明けまで滞在して摂食することがわかった。

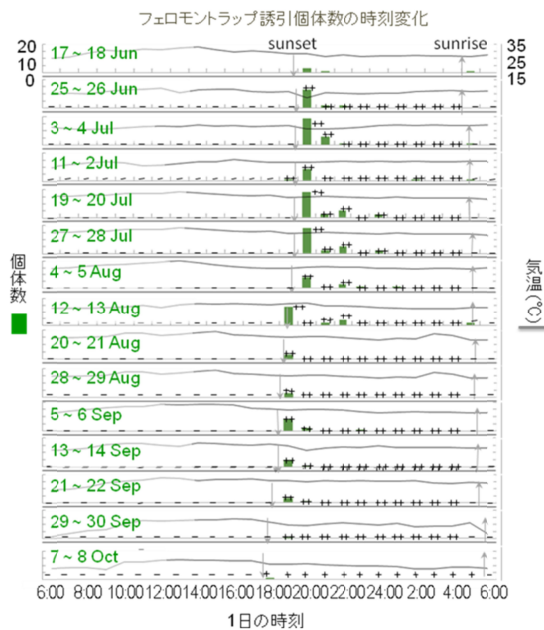


図5 フェロモントラップで誘引される個体数および樹上個体数の時刻変化

(4) 活動リズム：図6に実験室内での地上への出現を記録したアクトグラムを示す。明暗サイクルのもとでは2日に一度の暗期に地上へ出現するリズムが見られ、その周期は48時間であった。このリズムはDDでも自由継続し、その周期は平均  $47.6 \pm 0.3$  時間 ( $n=6$ ) であった。これより、オオクロコガネは内因性の48時間リズムをもつことが明らかになった。

(5) 位相反応：地中滞在時にも光が届くように、土の代わりに光を通すスポンジ片を用いて位相変位の有無を調べた。オオクロコガネが地下に滞在する日の夜に当たるCT15とCT21、地上に出てくる日の夜に相当するCT36とCT45に光パルスを与えた。

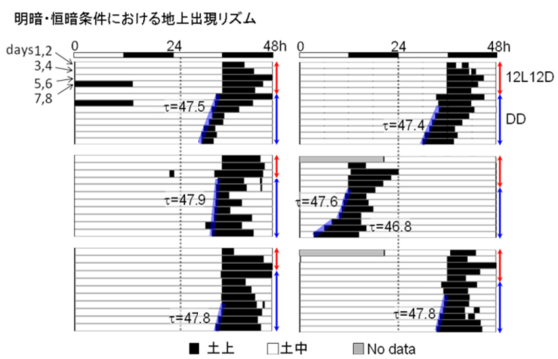


図6 明暗、恒暗条件における地上出現リズム 1行が48時間の活動を示し、これが日を追って縦に並んでいる。ダブルプロットでは無いことに注意。アクトグラム中の黒はオオクロコガネが地上に、白は地中に存在することを示す。一番上の白黒のバーは明暗条件(12L12D)における明期(白)と暗期(黒)を示す。

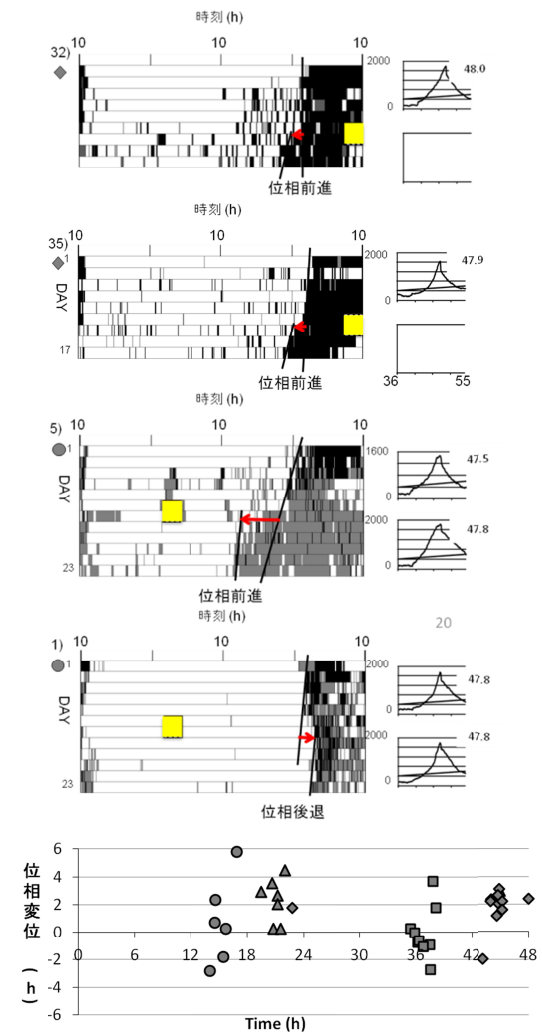


図7 光パルスによる位相反応 上：アクトグラムと二乗ピリオドグラムの結果。4例を示す。黄色は光パルスを与えた時間帯。下：位相変位を表すグラフ。



その結果、共通してCT21とCT45の近くで位相前進が見られ、CT15では位相前進と後退の両方が見られ、CT36ではわずかに位相後退が起こった(図7)。オオクロコガネが地中に滞在する日の夜に相当する時刻においても位相変位がみられたことから、この2日リズムの背後には概日時計のしくみが関わることが示唆された。今後、他の時刻への光パルス照射による位相反応を調べることにより、位相反応曲線を完成させ、この概倍日リズムと概日時計の関係を明らかにする必要がある。

(6) 概日時計遺伝子のクローニング: 概日時計遺伝子 *Clock* をクローニングし、部分配列514bpを得た。この配列は、コクヌストモドキ *Tribolium castaneum* の配列と69%一致した。今後、この配列を用いてRNAi法を用いた発現抑制を行い、概倍日リズムへの影響を調べ、概倍日リズムの形成に概日時計遺伝子が係るかどうか明らかにしたい。

以上より、オオクロコガネは野外では同じ樹におよそ2日の周期で繰り返し現れ、摂食、交尾を行うこと、奇数日出現集団と偶数日出現集団が同所的に存在することがわかった。また、オオクロコガネは明瞭なおよそ48時間周期の内因性リズムを持ち、24時間の明暗周期下では、環境周期に対して二回に一度時刻合わせをすることにより同調し、48時間周期となると考えられた。さらに、このリズムの形成には概日時計が関与する可能性が示された。

Leal, W.S., Sawada, M., Matsuyama, S., Kuwahara, Y., Hasegawa, M., 1993. Unusual periodicity of sex pheromone production in the large black chafer *Holotrichia parallela*. *Journal of Chemical Ecology* 19 No.7, 138-1391

吉岡幸治郎・山崎 康夫, 1983. オオクロコガネの発生生態, 日本応用動物昆虫学会誌 第27巻 第1号, 52-54.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 4件)

河崎裕太・志賀向子 概倍日リズムを持つオオクロコガネの野外における移動距離と出現周期 第20回日本時間生物学学会学術大会 2013年11月9日 近畿大学

河崎裕太・志賀向子 オオクロコガネの行動と48時間周期活動リズム (社)日本動物学会近畿支部研究発表会 2012年5月12日 奈良女子大学

河崎裕太・志賀向子 オオクロコガネの活動にみられる48時間リズム 第18回日本時間生物学学会学術大会 2011年11月24日 名古屋大学

河崎裕太・志賀向子 大和川河川敷に生息するオオクロコガネの二日リズム (社)異本動物学会第82回大会 2011年9月22日 旭川クリスタルホール

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

志賀 向子 (SHIGA, Sakiko)  
大阪市立大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号: 9024383

### (2) 研究分担者

後藤 慎介 (GOTO, Shinsuke)  
大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号: 70347483