

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：34501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570090

研究課題名(和文) 昆虫の概日羽化リズムにおける温度較差反応を探る

研究課題名(英文) Research on the response to amplitude of temperature cycle in circadian adult eclosion rhythm in insect.

研究代表者

渡 康彦 (WATARI, Yasuhiko)

芦屋大学・教育学部・教授

研究者番号：80240539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：タマネギバエは地下20cmぐらいまでさまざまな深さで蛹化し、温度周期が重要な羽化の同調因子となる。最高温度と最低温度の較差は土中の深さとともに小さくなり最低温度の時間は遅れていくが、どの深さの蛹も早朝に羽化する。すなわち温度較差が小さくなるほど、羽化時刻を前進させている。本研究は以下のことを明らかにした。(1)全暗と比較して全明は時計と温度周期のカプリングを弱くする。(2)概日時計には、高温あるいは低温に反応して羽化時刻を遅らせる位相と早める位相がある。(3)8℃較差と1℃較差でのperiodの発現量は振動しており、羽化と同様に8℃較差よりも1℃較差でより早くピークに達する。

研究成果の概要(英文)：Under natural conditions, thermoperiod rather than photoperiod would entrain the eclosion rhythm, because *Delia antiqua* pupates until 20 cm deep in the soil where no light penetrates. Since the amplitude of daily change in temperature decreases with depth in the soil, pupae lying deeper in the soil would eclose as adults at the optimal time period of early morning despite of the depth-dependent phase delay of the Zeitgeber (morning signal). In this study it is implied (1) that continuous light weaken the coupling strength between eclosion rhythm and thermoperiod compared with the continuous darkness, (2) that high or low temperature stimulus exhibited phase-shifting effects in the circadian clock, (3) that the phase of oscillation in the expression pattern of per was earlier at 1 °C temperature step than at 8 °C temperature step.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日時計 羽化リズム 温度較差反応 タマネギバエ 温度周期

## 1. 研究開始当初の背景

昆虫の羽化を支配しているのは概日時計である (Saunders, 2002)。これまでの研究から、概日リズムの同調因子としてもっとも強いものは光であるが、温度も重要な因子であることがわかっている。特に土中のような光の届かない環境で生活する昆虫にとっては、地温の日周期変動がもっとも信頼できる時刻シグナルになる。しかし、これまでの昆虫の概日リズム研究は同調因子としての光の働きに注目しすぎたきらいがある。同調因子としての温度変化に注目した研究は少なく、温度変化が概日時計の位相にどのように影響するのかは、まだよくわかっていない (Saunders, 2002)。

タマネギバエの羽化は明暗サイクル、温度サイクルの両方に同調する (Watari, 2002a, b)。しかし、タマネギバエは土の中で蛹化するので、自然条件下では温度変化のみを時刻シグナルとして利用していると考えられる。本種は地表下から地下 20cm ぐらいまで、さまざまな深さで蛹化する。土の熱伝導率があまり高くないために、蛹がさらされる温度環境は蛹化深度によって異なる。特に、地温の上昇・下降開始時刻は、土中深くなるほど遅くなる。それにもかかわらず、野外条件下では本種はほぼ同じ時刻 (早朝) に羽化する。彼らはこの土深に伴う夜明け時刻の遅れを何らかの形で補正しているに違いない。最近の研究から、蛹化深度に応じた羽化時刻の補正は、深くなるほど小さくなる地温の日較差を利用して行われていることがあきらかになった (Tanaka & Watari, 2003)。温度較差が小さくなるほど羽化時刻が前進するのである。この性質が土深にともなう温度変化の時間的なずれを補正し、さまざまな深さで蛹化した個体が自然条件下で早朝に一斉に羽化することを補償していると考えられるが、その生理機構は明らかではない。また、このような「温度較差反応」が土中で蛹化する他の昆虫にも存在するのかどうかは今後解明しなければならない問題である。

## 2. 研究の目的

昆虫がその羽化時刻の決定において、温度上昇や温度下降を時刻シグナルとして利用していることはこれまでも知られていたが、1 日の温度較差をもとにその位相の補正を行っているとは考えられてこなかった。温度較差による羽化時刻の補正は、2003 年にタマネギバエで発見されたばかりであり、その機構の実体は不明である。また、同様の機構が他の昆虫に存在するかどうか不明である。このような温度較差反応と概日時計との関係を調べることは、温度同調機構だけでなく、概日リズムの環境への適応能の解明にもつ

ながる。

本研究では、概日リズムの光による同調機構の研究においてこれまで用いられてきた解析法を応用して、タマネギバエの概日時計の性質、とくに温度較差反応の解析と根底にある時計のしくみについて明らかにしていきたい。

## 3. 研究の方法

1981 年に北海道中央農業試験場で採集され、現在まで累代飼育されたタマネギバエを研究に用いる。羽化時刻の記録は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う。羽化時刻は、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記録される (Watari 2002a)。

(1) タマネギバエの羽化リズムの位相決定における温度レベルと温度較差の相対的重要性を解明。

羽化リズムの温度サイクルへの同調を調べた研究で用いられてきた温度範囲は 15 ~ 25 °C の範囲内であるが (Watari 2002b, 2005, Tanaka & Watari 2003)、この範囲を含めた 8 ~ 30 の温度レベルで 1 ~ 10 °C のさまざまな温度較差のサイクル 12 時間高温 12 時間低温 (TC12:12) (たとえば温度レベル 20 で 8 較差なら 12 時間 24 : 12 時間 16、1 較差なら 12 時間 20.5 : 12 時間 19.5) をタマネギバエ蛹に与える。得られた羽化時刻から温度レベルと温度較差の相対的重要性を明らかにするとともに、野外実験の結果とあわせて季節による羽化時刻の変化への温度較差反応のかかわりを考察する。同時に以前得られた結果を補完するための野外実験も行う。

(2) タマネギバエの羽化リズムの温度較差による遺伝子変動の解析。

タマネギバエから概日時計遺伝子のクローニングを行い、温度較差の異なる条件間での概日時計遺伝子の発現パターンを比較する。手順として、他のハエ類でわかっているアミノ酸配列から degenerate プライマーを設計する。degenerate PCR で断片を得て、その塩基配列を決定する。これをもとに real-time PCR のプライマーを設計する。さまざまな温度較差をハエのさなぎに与えて 2 時間ごとにサンプリングを行い、real-time PCR により時計遺伝子の発現パターンを調べる。

(3) タマネギバエの羽化時計における 2 振動体モデルの検証のための選択実験。

12L:12D の光周期と 4 の温度較差の温度周期 (12h27 : 12h23 ) の組み合わせのうち、羽化の位相ジャンプが生じる位相角 (点灯時刻と最低温度時刻の差が 15h 付近) で蛹を選択する。選択の方法は位相ジャンプする直前と直後の条件で、それぞれ点灯時刻に近い集団と遠い集団を選択する。それぞれの集団をいろいろな温度較差において羽化を調べる。羽化の振幅が最も大きい全暗 1 較差の温度周期 (12h 25.5 : 12h 24.5 ) において、羽化位相の早い集団と遅い集団を選択する。それぞれの集団をいろいろな温度較差において羽化を調べる。とにより、羽化のタイミングの違う系統が得られたら、さらに実験方法を検討する。温度周期では B 振動体の選択のみをしている可能性が高いので、光周期にコントロールされている A 振動体の選択のために明期中の照度を変えた実験も行う。その結果によって、どのような選択実験が有効であるかを検討する。

#### 引用文献

Saunders, D. S. *Insect Clocks*, third ed, Elsevier, 2002

Watari, Y. Comparison of the circadian eclosion rhythm between non-diapause and diapause pupae in the onion fly, *Delia antiqua*. *Journal of Insect Physiology* Vol. 48, 2002a, pp. 83-89

Watari, Y. Comparison of the circadian eclosion rhythm between non-diapause and diapause pupae in the onion fly, *Delia antiqua*: the effect of thermoperiod. *Journal of Insect Physiology* Vol. 48, 2002b, pp. 881-886

Tanaka, K. & Watari, Y. *Naturwissenschaften* Vol. 98, 2011, pp. 711-715

Watari, Y. Comparison of the circadian eclosion rhythm between non-diapause and diapause pupae in the onion fly, *Delia antiqua*: the change of rhythmicity. *Journal of Insect Physiology* Vol. 51, 2005, pp. 11-16

#### 4. 研究成果

(1) タマネギバエの羽化リズムの位相決定における温度レベルと温度較差の相対的重要性を解明。

タマネギバエの羽化時刻に対する温度較差の影響

1~20 の較差を持つ矩形波および正弦波状の温度サイクル (平均 25 ) の下でタマネギバエの羽化時刻を記録した。矩形波状サイクルでは、較差を 1 から 12 まで変えるとそれに伴って羽化時刻は遅れた。12 較差と

16 較差では差はほとんどなく、20 較差では羽化は起こらなかった。1 較差と 12 較差の羽化時刻の差は 5.9 時間だった。正弦波状サイクルでは、較差を 1 から 20 まで変えるとそれに伴って羽化時刻は遅れた。羽化時刻の変化は較差が 2 から 6 の範囲で顕著であり、8 以上でゆるやかであった。1 較差と 20 較差の羽化時刻の差は 6.6 時間だった。このように、温度較差に対する羽化時刻設定は量的な反応を示した。

タマネギバエの羽化時刻に対する光の有無と温度周期の影響

蛹を異なる光条件 (全暗あるいは全明) および温度周期 (平均 25、8 あるいは 1 較差) の組み合わせのもとに置いたとき、温度周期は全暗でも全明でも明瞭な羽化リズムを誘導した。しかし、羽化時刻は全明よりも全暗で、大きな温度較差よりも小さな較差で早くなった。また、羽化のばらつきは、全暗よりも全明で、大きな較差よりも小さな較差で大きくなった。後者については、光条件や温度較差が羽化時計と温度周期のカップリングの強さに影響する可能性が示唆された。蛹の一部を一定温度条件に移して羽化の様子をみたところ、リズムの減衰は小さな温度較差よりも全明において顕著であった。背景の光条件が時計と温度周期のカップリングに及ぼす影響は温度較差よりも有意に大きいことが示唆された。

タマネギバエの概日時計に対する温度変化の影響の解析：温度位相反応曲線

温度変化のサイクルから 25 一定に移した蛹を、さまざまな時刻で 12 時間だけ 26 または 29 の高温、24 または 21 の低温へさらし、羽化時刻がどのように変わるかを調べた。結果をもとに位相反応曲線を描いたところ、概日時計には、高温に反応して羽化時刻を遅らせる位相と早める位相があり、それらはそれぞれ低温に反応して羽化時刻を早める位相と遅らせる位相でもあることがわかった。

(2) タマネギバエの羽化リズムの温度較差による遺伝子変動の解析。

タマネギバエ蛹における温度周期下での概日時計遺伝子 *period* の発現

タマネギバエから概日時計遺伝子 *period* をクローニングし、その発現を調べた。12 時間 29 12 時間 21 (8 較差) または 12 時間 25.5 12 時間 24.5 (1 較差) のサイクルを蛹に与えて 2 時間ごとにサンプリングを行い、real-time PCR により *period* の発現パターンを調べたところ、どちらの条件でも発現量は振動しており、8 較差よりも 1 較差でより早くピークに達した。これは、温度較差が概日時計の位相設定に影響することを

示唆している。

(3) タマネギバエの羽化時計における 2 振動体モデルの検証のための選択実験。

現在実験を進行中である。

#### 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)

[雑誌論文](計 4 件)

Watari, Y. & Tanaka K.: Effects of background light conditions on thermoperiodic eclosion rhythm of the onion fly, *Delia antiqua*, Entomological Science, 査読有、Vol. 17, 2014, pp. 191-197

DOI:10.1111/ens.12034

Suematsu, S., Harano, K., Tanaka, S., Kawaura, K., Ogiwara, Y., Watari, Y., Saito, O., & Tokuda, M.: Effects of barley chromosome addition to wheat on behavior and development of *Locusta migratoria* nymphs, Science report, 査読有、Vol. 3, 2013,

(<http://www.nature.com/srep/2013/130903/srep02577/full/srep02577.html>)

DOI:10.1038/srep02577

Tanaka K., Kimura Y. & Watari, Y.: The cabbage moth modulates the adult eclosion time in response to the amplitude of temperature cycle, Biological Rhythm Research, 査読有、Vol. 44, 2013, pp. 163-167

DOI:10.1080/09291016.2012.656249

Harano, K., Tanaka, S., Watari, Y. & Saito, O.: Phase-dependent locomotor activity in first-stadium nymphs of the desert locust, *Schistocerca gregaria*: Effects of parental and progeny rearing density, Journal of Insect Physiology, 査読有、Vol. 58, 2012, pp. 718-725

DOI:10.1016/j.jinsphys.2012.02.007.

[学会発表](計 12 件)

渡康彦、宮崎洋祐、後藤慎介、田中一裕、自然条件下でのキイロショウジョウバエの羽化時刻 温度周期の重要性、第 59 回日本応用動物昆虫学会大会、2015.3、山形大学

宮崎洋祐、渡康彦、沼田英治、Effects of low-temperature pulses in the circannual pupation rhythm of the varied carpet beetle *Anthrenus verbasci*, 第 21 回日本時間生物学会学術大会、2014.11、九州大学

田中一裕、渡康彦、地上で蛹化するキイロショウジョウバエも温度較差をもちいて羽化時刻を派生するのか? 日本昆虫

学会第 74 回大会、2014.9、広島大学  
田中一裕、渡康彦、伊藤清光、ウヅキコモリグモの日周活動、第 58 回日本応用動物昆虫学会大会、2014.3、高知大学  
宮崎洋祐、渡康彦、沼田英治、秋に蛹化するシロオビマルカツオブシムシは概年リズムを持っているか? 第 58 回日本応用動物昆虫学会大会、2014.3、高知大学  
宮崎洋祐、田中一裕、渡康彦、フリーラン前に与えた温度振幅は位相反応曲線のタイプを変える、第 20 回日本時間生物学会学術大会、2013.11、近畿大学

田中一裕、渡康彦、日中の高い砂温はタマネギバエ新成虫の地上脱出を妨げる、日本昆虫学会第 73 回大会、2013.9、北海道大学

田中一裕、渡康彦、昼行性ウヅキコモリグモは昼も夜も捕食する、日本蜘蛛学会第 45 回大会、2013.8、高知大学

宮崎洋祐、田中一裕、渡康彦、タマネギバエの概日時計に対する温度変化の影響の解析: 温度位相反応曲線、第 57 回日本応用動物昆虫学会、2013.3、日本大学

田中一裕、渡康彦、光条件(全暗・全明)が温度周期下でのタマネギバエの羽化リズムに及ぼす影響、第 57 回日本応用動物昆虫学会、2013.3、日本大学

渡康彦、田中一裕、タマネギバエの歩行活動 自然条件下での低温の効果、日本昆虫学会第 72 回大会、2012.9、玉川大学

田中一裕、渡康彦、温度較差がカイコの羽化リズムに及ぼす影響、日本昆虫学会第 72 回大会、2012.9、玉川大学

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡康彦 (WATARI, Yasuhiko)

芦屋大学・臨床教育学部・教授

研究者番号: 80240539

(2) 研究分担者

田中一裕 (TANAKA, Kazuhiro)

宮城学院女子大学・学芸学部・教授

研究者番号: 00316415

(3) 連携研究者

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