

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650121

研究課題名(和文) 温度補償性を持つ生物リズムの探索

研究課題名(英文) Exploration of biological rhythms for temperature compensation

研究代表者

伊藤 浩史 (Ito, Hiroshi)

九州大学・芸術工学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20512627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：24時間周期で繰り返される生命現象は概日リズムとよばれる。一般に生化学反応は温度に依存するが、生物種を問わず概日リズムの周期は温度に依存しないことが言われており、温度補償性とよばれている。本研究では概日リズム以外のリズムにおいて温度補償性が存在するのを探索を試みた。私たちのグループではケンサキイカ色素胞の拡張のリズムに着目し、様々な温度下における周期を調べた。この結果概日リズムほど強くはないが、弱い温度補償性が観察された。

研究成果の概要(英文)：Biological phenomena with a 24 hours period is called circadian rhythms. Although Biochemical reactions generally depend on temperature, the period of circadian rhythms do not depend on temperature. This property is called "temperature compensation" and it is shared among circadian rhythms of any organisms. In this research, I explored temperature compensation of biological rhythms except circadian rhythms. I focused contraction rhythms of squid and examined its period under various temperatures. The weaker temperature compensation compared with circadian rhythms was observed through this project.

研究分野：時間生物学

キーワード：生物リズム 温度補償性 イカ 色素胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 応募者は博士後期課程以来「概日リズム」に関する研究に従事してきた。全ての概日リズムが満たしている3要素として自律性(一定環境下でもリズムがあること)・同調性(周期的な光/温度刺激に対して周期をあわせること)・温度補償性(温度を変えても周期が変わらないこと)が知られている。このうち自律性・同調性に関しては、多数の時計遺伝子・タンパク質が同定されており、基本的な分子メカニズムは解決されていると言える。(Nakajima *et al. Science* 2005, Ito *et al. Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008)。

一方温度補償性を生み出すメカニズムに関しては研究が進んでいない。一般に生化学反応は温度が10度上がると反応速度が2倍になるという温度依存性がある。概日リズムは温度依存性のある生化学反応の組み合わせから構成されているにもかかわらず、周期は温度不依存である。この謎を解明するためには、温度補償性を有する別のリズム現象を発見し、概日リズムと比較検討することによって普遍的な温度補償性メカニズムがあぶりだされるだろう、というのが本研究の中心的なアイデアである

(2) 温度補償性を持つ可能性のあるリズムの有力な候補として本研究提案ではイカ色素胞の収縮リズムに着目する。ケンサキイカの表皮にはオモクロームを含む多数の色素胞が存在する。色素胞の大きさは一定ではなく筋繊維による収縮リズム呈することがあり、日本では古くからイカの提灯と呼ばれている。単離されたイカ表皮においてもこの収縮運動は観察されるため中枢神経の制御ではなく末梢神経による制御と考えられている。これまで色素胞の収縮運動を「リズム」とみなし解析を進め、温度補償性に関する予備的な結果を得ている。

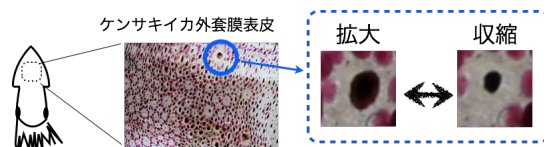
(3) 色素胞に関する研究は国内外で行わ

れ色素胞の形態、分化の過程に関しては詳細な報告がある。しかしリズムに着目した報告は極めて少ない。特に温度との関連は報告が未だなされていない。

## 2. 研究の目的

24時間周期で繰り返される生命現象である概日リズムは、環境の温度が変わっても周期があまり変わらないという性質を有しており、温度補償性と呼ばれている。リズムミクな生命現象のなかで温度補償性を有すると報告されているのは今のところ概日リズムだけである。

本研究計画では温度補償性が概日リズム以外のリズムも有していることを見いだす。現在までにケンサキイカの色素胞の収縮リズムが温度補償性を有している手がかりを得ている。より詳細な観察により、温度補償性の存在を明確に示す。本研究計画のゴールは既存の概日リズムとの対比から温度補償性を生み出す一般的なメカニズムを提



案することである。数理モデルを利用した解析により、温度補償性を生み出しうる普遍的な分子ネットワークの提案をめざす。

## 3. 研究の方法

### (1) イカの色素胞リズム観察系の構築

イカ色素胞のリズムは図4に示すような観察系を構築する。中枢神経系からの影響を排除するために表皮の部分だけを分離し海水中でリズム観察を行う。サーモスタットを用いて、温度コントロールが可能な観察系を構築する。またハロゲンスポットヒーターにより、局所的な温度コントロールを試みる。観察はビデオカメラによる撮影によって色素胞断面積の計測を行う。

### (2) 画像データからのリズム解析法の確立

画像データからのイカ色素胞リズムの周期の抽出を行う。1枚の画像には多数の色素胞が存在するため、画像データから自動的に色素胞を抽出するプログラムの作成が効率的な解析には不可欠である。画像解析ソフト ImageJ を利用し、色素胞解析のための Plugin を作成する。

また図2に示したように波形には長周期と短周期の二つの成分が存在することが予備実験で示唆されている。長周期と短周期に分けて解析を行う。特に短周期の波形に関しては1サイクルのなかで若干の変調が見られることがわかっている。周期が変化する波形同士を比較するための手法を開発する。

### (3) 温度に対するリズムの観察

環境温度を様々に変え、イカ色素胞の周期を観察する。一般に温度補償性は  $Q_{10}$  という指標で評価される。 $Q_{10}$  は温度が 10 上がるごとに反応速度が何倍になるかを表してしており、

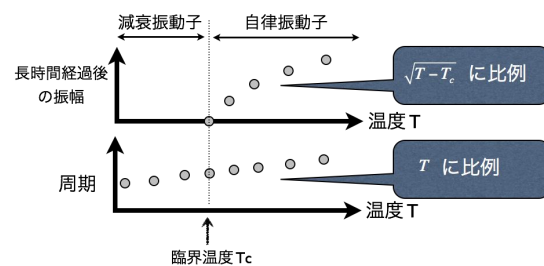
$$Q_{10} = \left( \frac{t_1}{t_2} \right)^{\left( \frac{10}{T_2 - T_1} \right)}$$

で与えられる(環境温度  $T_i$  [ ]の時の周期を  $t_i$  [h]する)。一般の生化学反応では  $Q_{10}$  はおよそ 2 から 3 であり、概日リズムの分野で温度補償性を有するとは  $Q_{10}$  が 0.9~1.3 程度であることをさす。色素胞リズムの  $Q_{10}$  を求め、温度補償性を有することを明らかにする。予備実験は、 $Q_{10}$  は 2 より小さいことを示唆している。

### (4) 分岐現象の観察

温度を極端に変化させた時にホップ分岐のメカニズムが現れるかどうかを確認する。「研究の新規性・チャレンジ性」で述べたようにホップ分岐の理論によれば、振幅は温度に対して 1/2 乗で減少し、周期は温度に比例することが知られている(Strogatz, *Nonlinear Dynamics and Chaos* 2001)。ま

た周期は変化しない。減少した結果振幅は最終的に 0 となり自律振動子でなくなり、減衰振動子へと変化する。シアノバクテリア、シロイヌナズナ、ショウジョウバエ、哺乳類繊維芽細胞ではこのような現象が起こることを応募者はすでに見いだしている(Ito *et al.* 論文準備中)。この現象と同じものがイカ色素胞に見られるのであれば、温度補償性とホップ分岐が関連している有力な証拠となる。



### (5) 電気生理実験：温度補償性に関わる神経回路の同定

電気生理学的手法によって色素胞のリズム生成に関わるニューロンを同定する。同じイカ科の *Doryteuthis pealeii* ではヒレ神経の電気刺激により色素胞の変化が起こることが報告されており、色素胞の神経制御が示唆される(T. J. Wardill *et al.* *Proc. R. Soc. B* 2012)。本研究ではケンサキイカ色素胞の拡散収縮を引き起こす神経系を同定し、同定されたニューロンの神経活動も色素胞リズムと同様に温度補償性を持つかどうかを確認する。温度補償性が単一のニューロンから生み出されるものか、神経回路のシステムとして生み出されるものかに関して検討する。

### (6) 数理モデルの作成

(v)までに得られた知見を利用して、温度補償性を有する振動子についてのシンプルな数理モデルを構築する。これまで個別の概日リズムの温度補償性を説明するモデルは提案されている(Hatakeyama & Kaneko, *PNAS* 2012 など)が一般的な枠組みに対して

はまだ回答が得られていない。本研究計画では(iv)で述べたホップ分岐現象と温度補償性が結びついているという作業仮説の元、数理モデルの構築を試みる。温度というパラメータ変化に対して周期の頑健性を持つ分子ネットワークに特徴的なネットワーク構造の探索を行う。

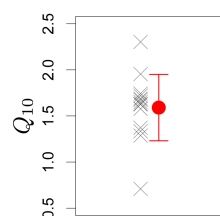
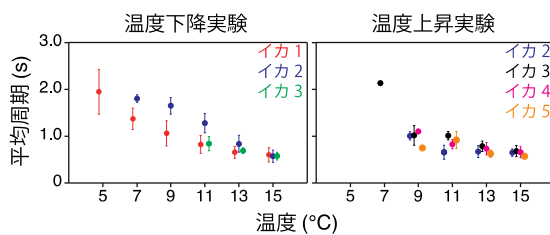
#### 4. 研究成果

##### (1) ケンサキイカ色素胞リズムの観察系の構築

ビデオカメラと冷却プレートを組み合わせてケンサキイカ色素胞のリズム観察系を構築した。ImageJを利用して色素胞の断面積の時系列変化を抽出した例を図に示す。

##### (2) ケンサキイカ色素胞リズムの温度補償性

ケンサキイカ色素胞収縮リズムの温度依存性を調べてみると、その  $Q_{10}$  は約 1.5 であった。この値は概日リズムの分野で知られる  $Q_{10}$  が 0.8~1.2 程度であるのと比較して高い値であり、概日リズムほどの温度補償性があるとは言いがたい。一方で一般的な生化学反応の  $Q_{10}$  が 2 であることと比較すると、低いといえ、弱い温度補償性が認められる。



(2) ケンサキイカ色素胞リズムの分岐構造  
5 程度の低温下での色素胞のリズム周期を調べてみると周期が大きく無限大に発散し、

最終的にリズムが観察されなくなった。これは非線形力学の分野におけるサドルノード分岐現象を示唆している。

温度補償性が概日リズムに比べて弱いこととサドルノード分岐現象は関係している可能性がある。

##### (3) 数理モデル化

サドルノード分岐を示す事を踏まえて、ケンサキイカ色素胞のリズムを生み出す数理モデルを作成した。

##### (4) 電気刺激による色素胞拡張リズムへの摂動

色素胞の拡張はそれを取り囲む筋繊維の収縮によっておこることが知られていた。そこで電極を刺し、電気刺激を与えたところリズムの振る舞いに影響を与えることに成功した。現在この研究を進展させ周期的な刺激を与え同期現象が起こることを目指している。

以上の結果は現在論文報告の準備中である。

#### 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2件)

Tsuchiya Y, Umemura Y, Minami Y, Koike N, Hosokawa T, Hara M, Ito H, Inokawa H, Yagita K

Effect of Multiple Clock Gene Ablations on the Circadian Period-Length and Temperature Compensation in Mammalian Cells

Journal of Biological Rhythms 31, 48-56 (2016)

Gibo S, Ito H

Discrete and ultradiscrete models for

biological rhythms comprising a simple negative feedback loop

Journal of Theoretical Biology 378, 89-95 (2015)

〔学会発表〕(計1件)

伊都浩史

ケンサキイカ色素胞収縮リズムの温度依存性

頭足類学を紡ぐ

2015年7月31日～8月2日 琉球大学

〔図書〕(計1件)

伊藤浩史

生物リズムを学び楽しむために

生物時計の生態学-リズムを刻む生物の世界 (種生物学研究シリーズ) 249-267 文一総合出版 (2015)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

研究代表者ホームページ

<http://www.design.kyushu-u.ac.jp/~hito/>

研究代表者研究グループホームページ

<http://clock.aid.design.kyushu-u.ac.jp/~hitolab/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 浩史(ITO, Hiroshi) 九州大学・芸術工学研究院・助教

研究者番号: 20512627

### (2) 研究分担者

上妻 多紀子 (KOUZUMA, Takiko) 九州

大学・芸術工学研究院・教務職員

研究者番号: 20512627

### (3) 連携研究者

該当無し