

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06267

研究課題名（和文）昆虫概日リズムを制御する複数振動体系：複眼時計と視葉時計の相互作用機構

研究課題名（英文）The multiple oscillatory system that drives insect circadian rhythms:
Interaction between the compound eye clock and the optic lobe clock

研究代表者

富岡 憲治 (Tomioka, Kenji)

岡山大学・環境生命自然科学研究科・特命教授

研究者番号：30136163

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：コオロギの複眼時計-視葉時計系を対象として、中枢時計と抹消時計の相互作用を検討した。視神経の切断により、30℃、恒暗下で視葉時計が駆動する歩行活動リズムの周期（ P ）が有意に延長すること、日毎の周期の標準偏差（SD）とその変動係数（CV）が有意に増大することが判明した。同様の効果が複眼時計のみを選択的に停止させた場合にも得られた。従って、複眼時計は、視葉時計へ神経路を介して温度依存的に視葉時計の P とその安定性を制御することが示唆された。一方、視葉時計は神経路介して複眼の感度リズムを制御していることから、複眼時計-視葉時計系は、相互作用を介して、相互に安定な振動系をなすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに昆虫の中枢時計と末梢時計との関係については、八工で複眼、脚等にある末梢時計が中枢時計とは独立して振動していること、またゴキブリでは触角の化学感覚受容リズムが視葉時計に強く依存しており、視葉切除後は無周期となることなどが示されている。しかし、末梢時計から中枢時計への制御や末梢時計と中枢時計との相互作用については、未解明である。本研究は、コオロギ複眼時計-視葉時計系を対象として、抹消時計から中枢時計への制御があることを初めて示すとともに、中枢時計と末梢時計が相互作用を介して、安定な振動系を構築することを初めて明らかにした。この成果は、他の動物での複数振動体系研究の指針となるものである。

研究成果の概要（英文）：The interaction between central and peripheral clocks was investigated using the compound eye (CE) clock and optic lobe (OL) clock system in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. Under DD at 30°C, the optic nerve severance resulted in longer free-running periods (P) of the locomotor rhythm driven by the OL clock and a significantly greater daily fluctuation of P , expressed as SD or CV. A similar result was obtained when the CE clock was stopped by local RNAi treatment of the period gene. These results suggest that the CE clock controls P and its stability of the OL clock via neural pathway. Since the OL clock is known to control the CE clock via a neural pathway, the two clocks are reciprocally coupled to form a stable oscillatory system.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日時計 視葉 複眼 時計間相互作用 自由継続周期 周期の安定性 コオロギ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ほとんどの動物は、外界の一日の変化に適応した生活リズムを営んでいる。このリズムは動物自身の体内に在って、約 24 時間の周期で自律振動する概日時計によって制御されている。概日時計は、時計遺伝子とその産物タンパク質によって構成される分子振動機構によって駆動されている。行動を制御する概日時計、すなわち中枢時計は、神経系の特定の場所に局在することが古くから知られている。コオロギやゴキブリなどの不完全変態昆虫では、中枢時計は視葉にある[1]。しかし、概日リズムは、マルピーギ管、前胸腺、精巣、複眼、触角など、体内の様々な組織で観察されている[2]。これらの末梢組織の時計は中枢時計に制御されるとの見方があるが、この中枢時計と末梢時計との関係はほとんど未解明である。

複眼がその感度に概日リズムを示すことは古くから知られており、申請者もフタホシコオロギの複眼が恒暗条件下で短い光パルスによって誘発される網膜電図 (ERG) の振幅に概日リズムを示すことを報告している[3]。このリズムは複眼—視葉複合体を脳から切り離れた状態でも継続することから、視葉時計によって制御されると考えられてきた[4]。しかし、申請者は最近、視神経の切断によって視葉から神経的に隔離された複眼でも、半数以上が ERG の振幅に概日リズムを示すこと、複眼内の時計遺伝子が周期的に発現することなどを示し、複眼内に概日時計が内在することを明確にした[5]。

この複眼内振動体と中枢時計との関係については、これまでに視葉時計が複眼時計の振動を強化することが分かっている[5]が、その機構は未解明である。さらに、複眼内時計が視葉時計へ与える影響についても未解明である。複眼は視葉時計が明暗周期に同調するための光受容器の役割を担っており[6, 7]、複眼時計がこの光同調系を介して視葉時計を制御する可能性が高い。

2. 研究の目的

上記の背景のもとに、本研究では、フタホシコオロギを用いて、複眼時計と視葉時計との相互作用を解明することを目的とする。特に、複眼は視葉時計が明暗周期に同調するための光受容器であり、この同調系を介して複眼時計が視葉時計を制御する可能性が高い。これまでに昆虫の中枢時計と末梢時計との関係については、ハエで複眼、触角、脚等にある末梢時計が中枢時計とは独立して振動していること[8]、またゴキブリでは触角の化学感覚受容リズムが視葉時計に強く依存しており、視葉切除後は無周期となること[9]などが示されている。しかし、末梢時計から中枢時計への制御や末梢時計と中枢時計との相互作用については、まったく未解明である。本研究により、この複眼時計—視葉時計系の解析を進めることにより、中枢時計と末梢時計との関係を分子レベルおよび組織レベルで明らかにし、昆虫の時計機構に新たな視点を拓きたい。

3. 研究の方法

本研究では以下の項目について解析を進め、複眼時計と視葉時計との相互作用を解明することとした。

(1) 複眼時計から視葉時計への制御を検討する。作業仮説：光同調経路を介して、複眼時計から視葉時計へ、周期信号が伝達され、視葉時計の振動が制御される。視神経の切断によりこの神経路を遮断することにより、視葉時計の振動が変化する。

方法：

複眼時計が視葉時計へ及ぼす影響の解析：視神経を切断した個体の活動リズムを計測し、恒暗条件下での自由継続周期、周期の安定性、並びにリズムの振幅を解析する。これらを、疑似手術個体と比較し、複眼時計から視葉時計への制御を検討する。

複眼時計が視葉時計の分子振動機構へ及ぼす影響の解析：視神経を切断後、1 日を経過した個体から、4 時間間隔で視葉を採取し、定量的 PCR により、時計遺伝子 *per*, *tim*, *cry2* および *cyc* の mRNA 発現リズムを解析する。対象として、疑似手術を施した個体から採取した視葉を用いる。視神経切断個体の時計遺伝子発現リズムの振幅、ピーク位相、mRNA の発現レベルを対照群と比較し、複眼時計から視葉時計への制御を分子レベルで明らかにする。

複眼時計の選択的停止の影響の解析：時計遺伝子 2 本鎖 RNA を複眼内に微量注入し、複眼時計のみを停止させ、上記と同様の手法で活動リズムへの影響を解析する。

神経路の探索：複眼の部分切除から複眼の光情報は加算的に視葉時計に入力されることが分かっている[7]。そこで、複眼時計から視葉時計に至る神経路が視神経全体に分散するのか、あるいは特定の神経路があるのかを検討する。具体的には、視神経の前方部、後方をそれぞれ部分的に切断し、その後の恒暗条件下での活動リズムへの影響を検討する。

(2) 視葉時計から複眼時計への制御の解析：視葉時計から複眼時計への制御は既に一部明らかにしている[5]が、その詳細はまだ未解明である。そこで、以下の手順で、その詳細を検討する。

視神経を切断の複眼 ERG リズムへの影響の解析：恒暗条件下で ERG を長時間記録し、その概日リズムの周期、振幅を偽手術を施した複眼のものと比較し、視葉概日時計からの制御を明らかにする。

複眼時計の光同調機構：複眼時計のみで光同調可能か、あるいは視葉時計からの制御が必要か。視神経を切断後、明暗周期を 8 時間前進または後退させ、7 日後に ERG 概日リズムを計測する。通常、正常な場合には明暗周期への同調は 5 日程度で完了する。もし、同調が完了して

いれば、複眼のみで光同調が可能といえるが、同調できていなければ視葉時計からの制御が必要と考えられる。

4. 研究成果

(1) 複眼時計から視葉時計への制御

活動リズムを指標として、複眼時計が視葉時計に及ぼす影響を検討した。片側の視葉を切除し、さらに反対側の視神経を切断あるいは偽手術を行った個体を用いて歩行活動リズムを計測し、複眼時計からの入力の有無に依存した視葉時計の自由継続リズムの変化を検討した。得られた結果について、自由継続周期、日毎の周期の標準偏差 (SD)、その変動係数 (CV) を解析した。まず片側視葉を切除後、単一視葉に駆動される活動リズムを解析したところ、自由継続周期 (τ) とその変動係数 (τ_{CV}) はともに温度に依存して変化し、温度が高いほど周期が延長し、 τ_{CV} が低下することが分かった (図 1)。単一視葉に視神経切断の偽手術を施した場合もほぼ同様の結果が得られた。一方、単一視葉に視神経切断手術を施した場合の恒暗条件下での歩行活動リズムは、飼育下での標準である 25°C の下では、偽手術を施した対照群との間に、自由継続周期、SD、CV のいずれも有意差は見られなかったが、リズムの振幅は視神経切断個体群で有意に低下することが分かった。しかし、温度を 20°C および 30°C に設定し、同様の実験を行ったところ、リズムのパラメーターに偽手術群と比較して有意差がみられた。20°C では、自由継続周期が有意に長くなることが分かった。さらに 30°C では、周期の有意な延長に加えて、 τ_{CV} が有意に増大することが分かった (図 2)。これらの結果から、複眼時計の視葉時計に及ぼす影響が温度に依存すること、その影響には自由継続周期の短縮効果とその安定化の 2 つがあることが示唆された。さらに詳細な解析から、正常個体では周期が長いほど周期が安定化するが、視神経を切断するとこの関係が消失することが明らかとなった。

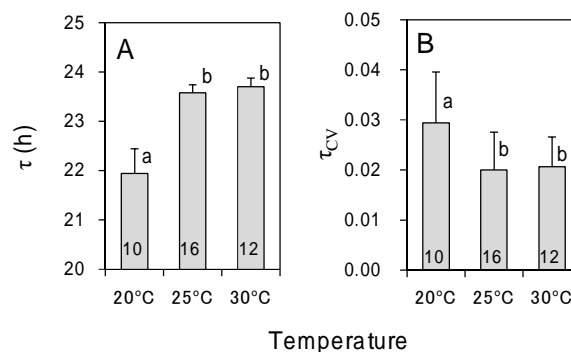


図 1. 単一視葉時計に駆動される活動リズムの 20、25、30 に於ける周期 (A) と周期の変動係数 (B)。エラーバーは標準偏差、各カラムの数字は個体数、カラム右上の小文字は異なる小文字間で有意差があることを示す。

複眼の前半分あるいは後半分の部分の切除を行い、恒暗 30°C 下で活動リズムを計測し、周期制御に関わる複眼領域を検討した。その結果、いずれの領域を切除しても周期の延長は視神経切断とほぼ同様であり、周期の制御には複眼全域が関与することが明らかとなった。一方、周期の CV は複眼後方を切除しても正常個体

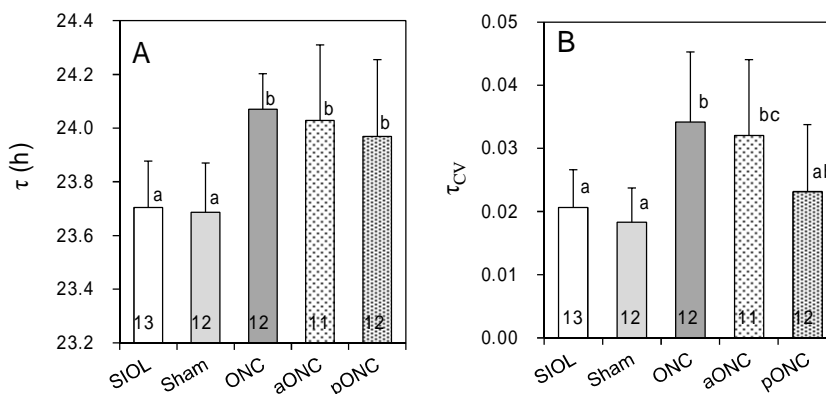


図 2. 30、恒暗条件下で単一視葉により駆動される活動リズムの自由継続周期 (A) とその変動係数 (B)。SIOL、単一正常視葉；Sham、単一視葉視神経切断偽手術；ONC、単一視葉視神経切断；aONC、単一視葉複眼前方半分切除；pONC、単一視葉複眼後方半分切除。エラーバーは標準偏差、各カラムの数字は個体数、カラム右上の小文字は異なる小文字間で有意差があることを示す。

とほぼ同様であったが、複眼前方を切除すると有意に増大することが明らかとなった (図 2)。この結果から、周期の安定化に係る情報は複眼前方から入力されることが判明した。

複眼時計が視葉時計の振動機構に与える影響を検討するため、視神経切断後の視葉内での時計遺伝子、*per*、*tim*、*cry2*、*cyc* の恒暗条件下での発現リズムを検討した。4 時間間隔でサンプルした視葉内時計遺伝子発現を qPCR により検討したところ、いずれの遺伝子も正常個体とほぼ同位相で振動を維持するが、その振幅が有意に低下することを見出し、複眼が視葉時計の振動に影響することを明らかにした。

period 遺伝子 RNAi により視神経を切断せず複眼時計を停止させた場合の視葉時計への影響

を検討した。恒暗条件、30°C下で活動リズムを解析したところ、この処理により周期の延長、周期 CV の増加が生ずることが明らかとなった。この結果は、視葉時計の周期と安定性の制御は、視神経を介する時計以外からの制御によるものではなく、複眼時計によるものであることが強く示唆された。

(2) 視葉時計から複眼時計への制御

視神経を切断し、視葉時計からの神経性制御を遮断した場合の複眼時計の動きを解析した。複眼内に刺入した電極により、暗黒下で緑色 LED により惹起される ERG を長時間記録したところ、振幅はかなり低下するが ERG リズムは多くの個体で継続することが明らかとなった(図3A)。

視葉からの神経性制御を遮断した場合の複眼時計の光リセットを解析した。視神経切断後 ERG を計測する前に、6 時間位相を後退させた明暗周期下に 4 日、7 日間置いた後恒暗条件に移行して、ERG リズムを恒暗条件下で記録し、リズムの主観的夜開始の位相を求めた。主観的夜開始の位相は、ERG の振幅が谷からピークの 50% に達する時刻とした。視神経を切断しない正常複眼を対照とした。対照複眼では、明暗周期後退群は暗期移行直後の位相が後退 1 日目では 19.7 時であったが、4 日間、7 日間の位相後退を経験したものはそれぞれ 22.4 時、24.8 時で有意に後退していた。視神経切断個体でもほぼ同様に位相後退が観察され、位相後退の大きさに有意差はなかった(図3)。これらの結果は、複眼時計の光同調系は複眼内にあり、複眼時計の光リセットには視葉時計を必要としないことが示唆された。視葉時計は複眼から神経路を介して、神経伝達物質により視葉時計内での *c-fos* 経路および *Pdpl* 経路が活性化されることによってリセットされる[10, 11]。本研究成果は、複眼時計の光リセットがこの視葉時計のリセットとは別の仕組みで制御されることを示唆している。

複眼内に微量に *period* 遺伝子 2 本鎖 RNA を投与し、複眼時計のみを停止させることを試みた。恒暗条件下で ERG を長期記録したところ、ERG に概日リズムは観察されなかった。さらに、複眼内の時計遺伝子発現を解析したところ、*per*, *tim*, *cry2*, *cyc* の各時計遺伝子は完全に周期性を失うことが判明した。これらの結果から、視葉時計からの遠心性制御は複眼内の時計遺伝子の周期的発現を介することが示唆された。

(3) 複眼時計と視葉時計の相互作用(図4)

これまでに視葉時計と複眼時計の間には、視葉から複眼への制御があることがわかってきた。複眼の ERG リズムは複眼内の時計により駆動されるが、この振幅は視葉からの制御により強化されている[5]。今回、複眼内への *per* 二本鎖 RNA の微量投与により、ERG リズムが消失することが示された。この結果は、複眼から視葉時計への制御は複眼時計の分子振動を介していることを示唆している。一方、複眼時計は視葉時計の制御を受けることにより、特に日暮れの感度が強化されると推定される。複眼時計はこの強化された光情報を視葉時計に供給することで、視葉時計の同調位相を安定化させると推定される。また、恒暗条件下での複眼から視葉への制御に関しては、複眼時計が視葉時計の周期および周期の安定化を制御することが明らかになった。30°C下では、視神経の切断により自由継続周期の延長とともに、自由継続周期の変動が増大する。これらの効果は、視神経を切断しない場合でも、*per* 二本鎖 RNA 処理により複眼時計を停止させることにより観察される。従って、複眼時計は視神経を経由して視葉時計の周期と安定性を制御することが強く示唆された。この制御系はおそらく光同調経路を介しているものと推定される。

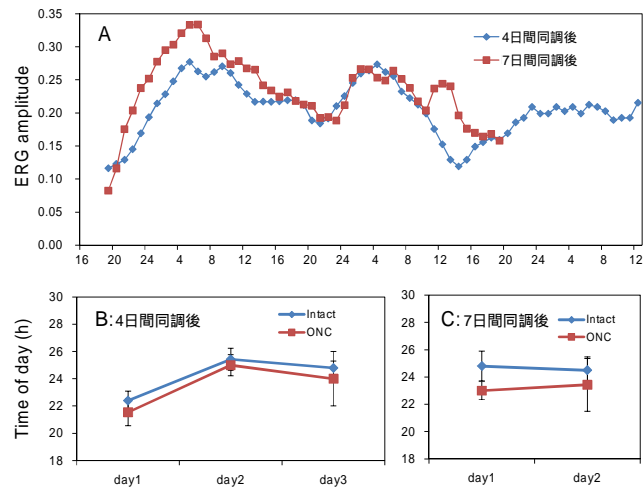


図3. 視神経切断後の複眼の ERG リズムの明暗周期への同調。A: 6 時間後退させた明暗周期下に 4 日あるいは 7 日置かれた複眼の ERG リズム。B, C: 4 日間 (B) あるいは 7 日間 (C) 6 時間後退させた明暗下におかれた複眼の恒暗移行 1, 2, 3、日目のピークの 50% に達する時刻。青は正常複眼、赤は視神経切断複眼。いずれの場合も正常複眼と視神経切断複眼との間に有意差は検出されなかった。

一方、複眼時計は視神経切断後も明暗周期への同調能を有しており、このリセットは視神経により視葉時計と接続している場合とほぼ同等であった。この同調機構はおそらく、複眼から神経路によりシナプスを経て光同調シグナルが入力される視葉時計とは異なるものと推定される。

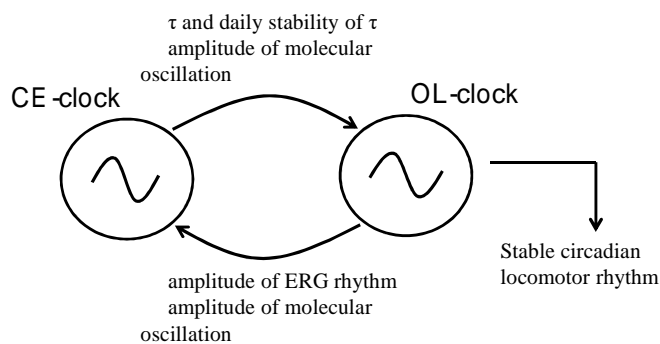


図4 . 複眼時計 (CE-clock) と視葉時計 (OL-clock) の相互作用。

引用文献

1. Tomioka, K. and A. Matsumoto, *Chapter Three - The circadian system in insects: Cellular, molecular, and functional organization*. *Advances in Insect Physiology*, 2019. **56**: p. 73-115.
2. Tomioka, K., et al., *Peripheral circadian rhythms and their regulatory mechanism in insects and some other arthropods: a review*. *Journal of Comparative Physiology B*, 2012. **182**: p. 729-740.
3. Tomioka, K. and Y. Chiba, *Persistence of circadian ERG rhythms in the cricket with optic tract severed*. *Naturwissenschaften*, 1982. **69**(8): p. 355-356.
4. Tomioka, K., *Optic lobe-compound eye system in cricket: a complete circadian system*. *Journal of Interdisciplinary Cycle Research*, 1985. **16**: p. 73-76.
5. Ohguro, C., Y. Moriyama, and K. Tomioka, *The compound eye possesses a self-sustaining circadian oscillator in the cricket *Gryllus bimaculatus**. *Zoological Science*, 2020. **38**(1): p. 82-89.
6. Tomioka, K. and Y. Chiba, *Effects of nymphal stage optic nerve severance or optic lobe removal on the circadian locomotor rhythm of the cricket, *Gryllus bimaculatus**. *Zoological Science*, 1984. **1**(3): p. 375-382.
7. Tomioka, K., Y. Okada, and Y. Chiba, *Distribution of circadian photoreceptors in the compound eye of the cricket *Gryllus bimaculatus**. *Journal of Biological Rhythms*, 1990. **5**: p. 131-139.
8. Plautz, J.D., et al., *Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila**. *Science*, 1997. **278**(5343): p. 1632-1635.
9. Saifullah, A.S.M. and T.L. Page, *Circadian regulation of olfactory receptor neurons in the cockroach antenna*. *Journal of Biological Rhythms*, 2009. **24**(2): p. 144-152.
10. Kutaragi, Y., et al., *Transcriptional and non-transcriptional events are involved in photic entrainment of the circadian clock in the cricket *Gryllus bimaculatus**. *Physiological Entomology*, 2016. **41**(4): p. 358-368.
11. Kutaragi, Y., et al., *A novel photic entrainment mechanism for the circadian clock in an insect: involvement of *c-fos* and cryptochromes*. *Zool. Lett.*, 2018. **4**(September 18): p. 26.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tomioka Kenji, Takeuchi Kazuki, Matsuka Mirai, Moriyama Yoshiyuki	4. 巻 41
2. 論文標題 Reciprocal coupling of circadian clocks in the compound eye and optic lobe in the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/zs230113	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 Moriyama Yoshiyuki, Takeuchi Kazuki, Tomioka Kenji	4. 巻 39
2. 論文標題 Constant Light, Pdp1, and Tim Exert Influence on Free-Running Period of Locomotor Rhythms in the Cricket <i>Gryllus bimaculatus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 459-467
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/zs220014	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 Takeuchi Kazuki, Matsuka Mirai, Shinohara Tsugumichi, Hamada Mayuko, Tomiyama Yasuaki, Tomioka Kenji	4. 巻 40
2. 論文標題 Fbx14 Regulates the Photic Entrainment of Circadian Locomotor Rhythms in the Cricket <i>Gryllus bimaculatus</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 53-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/zs220047	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 Tomioka Kenji	4. 巻 40
2. 論文標題 The Compound Eye Regulates Free-Running Period and Stability of the Circadian Locomotor Rhythm in the Cricket <i>Gryllus bimaculatus</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 300-307
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/ZS230005	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 富岡憲治	4. 巻 27
2. 論文標題 コオロギの概日時計機構の研究を振り返る	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 時間生物学	6. 最初と最後の頁 83 - 92
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 Moriyama Yoshiyuki, Takeuchi Kazuki, Shinohara Tsugumichi, Miyagawa Koichi, Matsuka Mirai, Yoshii Taishi, Tomioka Kenji	4. 巻 39
2. 論文標題 timeless plays an important role in compound eye-dependent photic entrainment of the circadian rhythm in the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 397-405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs220011	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6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Tomioka, Kenji
2. 発表標題 Photic entrainment mechanism of the circadian clock in the cricket, <i>Gryllus bimaculatus</i>
3. 学会等名 Non-Traditional Arthropod Model Systems (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 富岡憲治
2. 発表標題 コオロギ複眼概日時計による視葉概日時計の制御
3. 学会等名 日本動物学会第94回山形大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 守山禎之、竹内一輝、篠原従道、宮川航一、松家未来、吉井大志、富岡憲治
2. 発表標題 フタホシココロギ概日時計の光同調機構におけるtimelessの役割
3. 学会等名 日本動物学会中国四国支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内一輝、篠原従道、濱田麻友子、松家未来、富山泰旭、富岡憲治
2. 発表標題 ココロギ概日時計の光同調機構：Fbx1の関与
3. 学会等名 日本動物学会第93回早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenji Tomioka
2. 発表標題 Photic entrainment of the circadian clock includes two pathways in the cricket, <i>Gryllus bimaculatus</i>
3. 学会等名 The 5th Asian Forum on Chronobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富岡憲治
2. 発表標題 ココロギ視葉概日時計の光同調機構
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hideharu Numata and Kenji Tomioka (eds)	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer Verlag	5. 総ページ数 357
3. 書名 Insect Chronobiology	

〔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
---------	---------