

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19387

研究課題名（和文）光導波路が曲がった動物は何を見ているのか 光軸から外れた視細胞の機能と個体の行動

研究課題名（英文）The hook-shaped ommatidia of the compound eye of *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipod); how does it prevent the light leakage from the bent shaped light waveguide in the eye.

研究代表者

山濱 由美 (Yamahama, Yumi)

浜松医科大学・医学部・教務員

研究者番号：90242784

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：視覚定位行動を行う甲殻類端脚目トビムシの *Talitrus saltator* の複眼は、光軸に対し個眼軸が大きく曲がっており、不完全な導波路としての光情報の損失が危惧される。本研究では、個眼レンズの3Dモデルを形態学的解析により構築し、レンズ基部から入射した光のレンズ表面での拡散角度（理論値）の物理光学的シミュレーションを実施し、電気生理学的に個眼の受光角（実測値）を測定した。視細胞を取り囲む反射色素細胞の高い光反射性により、光情報の損失を生じず、これまでの報告にない広い受光角をもつことを明らかにした。また偽瞳孔の角度変化を利用して非侵襲的に個眼の受光角を推定できることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本種の複眼では、反射色素細胞の高い光反射性により、個眼の光軸が曲がっていても光情報の損失は起こらないことが示された。また、偽瞳孔の角度変化を指標とした各個眼の受光角の推定方法を確立した。本種の複眼構造は連立像眼型に分類されるが、隣接する複数の個眼での視野が大きく重複する。ガ類やハエ類などの複眼も視野が重複するが、各個眼情報は光学的に重複している。しかし、本種の個眼情報は独立しており、機能的に全く異なる新しい結像系を発見したことになり、空間弁別資材として利用できる可能性が高い。また、主成分が生元素の反射色素細胞は生分解性が予想され、エコフレンドリーな新しい反射素材としての応用展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）： It is believed that the axes of both of lens and retina in animal eyes are arranged straight toward the optical axis in order to keep their light waveguide efficiency. We found the hook-shaped ommatidia in the compound eye of the sand-hopper, *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipod). In this study, we compared the deviation of actual values of the acceptance angle electrophysiologically measured from the theoretical values of acceptance angles which calculated from the optical path analyses in the reconstructed 3D-image of crystalline cone. We revealed it possesses the wide acceptance angle without any light loss because of the substance surrounding the retinular cells which shows the high reflective index. The pseudo-pupil measurements also support this wide acceptance angle in each retinular cell. This is the new discovery that the hook-shaped ommatidia keep the optical waveguide efficiency by the highly reflective effects of the inter-ommatidial cells.

研究分野：視覚生理学、バイオメテックス

キーワード：複眼 レンズ 視細胞 視覚定位行動 光導波路 光軸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外部環境からの光情報を効率よく受容することは、生物が生存していく上で不可欠であり、動物の視覚器である眼は、長い進化の中で最適化されてきた。研究代表者の所属研究室では、視覚器の環境適応と適応進化についての研究を推進しており、超深海海底から陸上の高山帯まで、地球上のあらゆる環境に広く生息する甲殻類端脚目に注目し、その視覚機能について多角的な解析を行ってきた。ヨーロッパの砂浜の潮間帯上部に生息する甲殻類端脚目の *Talitrus saltator* は、太陽や月、天空のグラデーション、風景など、視覚情報を使って陸と海の間(汀線に対して垂直に)で定位行動を行うことが70年にも及ぶ研究で明確に示されている(Pardi and Papi, 1952; Ugolini *et al.*, 2006, 2010など)。私達はフィレンツェ大学の研究チームとの国際共同研究で、紫外光と緑色光に応答する視細胞が存在していることを電気生理学的に明らかにし(Ugolini *et al.*, 2010)、引き続き *T. saltator* の複眼と視覚定位行動についての検討を行ってきた。これまでの一連の研究から、*T. saltator* の複眼を構成する個眼は、その光学レンズである円錐晶体(端脚目の角膜は本種も含めて平らでレンズとしての曲率をもたない)とそれに続く光受容部のラブドームが大きく曲がりくねっていることを発見した(図2)。このような曲がった個眼構造をもつ動物はこれまでに全く報告がない。*T. saltator* の複眼は連立像眼型(apposition eye)の個眼構造であり、個眼の光学系構造である角膜レンズや円錐晶体と受光部であるラブドームは直線的な配置であると報告されている(Ercolini, 1965)。しかし、*T. saltator* の複眼構造を連続切片による立体構築や μ CT法などを用いて詳細に再検証したところ、個眼の円錐晶体とラブドーム構造が大きく曲がっていることを発見し、Ercoliniの報告は観察不足であることが分かった。この *T. saltator* の複眼で発見された曲がった光学系とラブドーム構造は、光受容部位をコンパクトに折りたたんでいるようにも観察される構造で、これまでの連立像眼型の個眼構造での光受容の概念を覆すものである。70年にわたるイタリアでの行動学的研究によって、*T. saltator* が多様な cue を視覚情報処理で弁別し定位行動に用いていることが明瞭に示されていることは、*T. saltator* の複眼中の曲がった光学系のデメリットを補償するあるいは積極的に利用する何らかの仕組みが隠されていることを強く示唆しており、本研究の構想に至った。

2. 研究の目的

脊椎動物のカメラ眼や節足動物の複眼など、レンズ構造をもつ眼では、網膜での光受容効率を上げ、入射角などの空間情報を損失しないように、レンズと受光部である網膜が入射光の光軸に沿って直線的に配置する事が必須なものと捉えられている(図1)。通常、複眼においてラブドームは光受容部位であると同時に光導波路(optical waveguide)であり、レンズから個眼に入射した光はラブドーム上部に集光され、ラブドーム内を全反射しながら後方へと導波する。視細胞の細胞体とラブドームの屈折率の差は、光導波路が直線の場合のみ高効率とされ、その間に視物質による光吸収を受ける。もしこれが曲がった光学系である場合、視細胞の細胞体とラブドームの屈折率の差が少ないため、曲がった部分からの光の漏出による入射光量に対する受容光量の極端な低下、他の視細胞へ光が抜けることによる入射角度情報の損失、波長情報の混合、偏光情報の消失、などの大きな情報損失が起こることが予想される。しかし、*T. saltator* は、天空の波長のグラデーションや、地上の目標物などを視覚で弁別し、巧みな定位行動を行うことが明確に示されている。レンズとラブドームが曲がっていても問題なく定位の為の cue を弁別できているということは、世界の視覚研究者に新たな難問を投げつけているといっても過言ではない。本研究課題では、*T. saltator* 複眼の視覚機能についての生物学的な解析を行うとともに、その結果に基づきレンズとラブドームについての物理光学的シミュレーション解析を行い、生物学的に調べられた実際の結果と理論的に導き出された結果を総合的に解析し、*T. saltator* の曲がった視細胞の光学結像系での光情報処理機構の利得と行動との関連を解明する。

3. 研究の方法

T. saltator の曲がった個眼構造の光学結像系での光情報損失の可能性を検証するため、光学レンズ表面の受光角(acceptance angle)について、形態学的三次元データに基づいた物理光学的シミュレーション解析(理論値)および電気生理学的解析による受光角の測定(実測値)を行い、理論値と実測値との差を検証する。また、理論値と実測値との差がみられた場合、周辺色素細胞の光学的性質等を加味した解析を行う。さらに、複眼内での受光角の部域差について検討すると共に、*T. saltator* の視覚定位行動において行動の Cue を受け取る複眼の部域の役割についての解析を行う。

本研究には、研究協力者として浜松医科大学の針山孝彦教授、海外の研究協力者としてフィレ

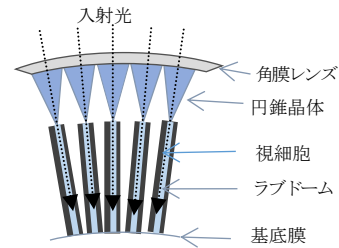


図1 甲殻類連立像眼の個眼構造

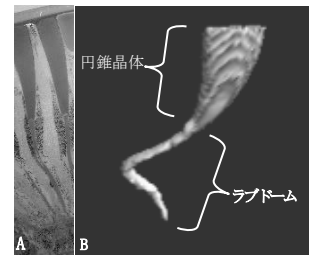


図2 *T. saltator* 複眼の個眼構造
A: TEM 画像(縦断面)
B: 個眼の三次元立体再構築像

ンツェ大学の Alberto Ugolini 教授と Luca Mercatelli 教授が参画した。研究材料の *T. saltator* は、ヨーロッパの砂浜の潮間帯上部に生息する種で日本国内では入手困難であるため、Ugolini よりイタリア国内で許可を得て野外採集された個体の提供を受けた。野外での行動観察実験は Ugolini が担当し、物理光学的シミュレーション解析は Mercatelli が担当し、それ以外の形態学的、電気生理学的解析は山濱と針山が担当した。浜松医大とフィレンツェ大学との研究連携は大学間国際研究協力提携を締結し行われた。

(1) 複眼の形態学的データの数值化と三次元立体構築モデルの作成

T. saltator の頭部を通常の電顕試料作製法により樹脂包埋し、複眼全体の連続準超薄切片を作製した。トルイジンブルー染色したすべての連続切片の光学顕微鏡画像を PC に取り込み、コンピュータ解析ソフト (Amira) を用いて、複眼全体の三次元立体構築像の作成を行った。この三次元再構築像を基に、複眼の背側、腹側、および赤道面前方、赤道面中央、赤道面後方の 5 か所について個眼構造を比較した。

(2) 個眼構造の光学的性能の測定

複眼を外科的に解剖し、角膜 (cornea)、円錐晶体 (crystalline cone)、視細胞 (retinula cell)、視細胞のラブドーム (rhabdom)、反射色素細胞 (reflecting pigment cell)、それぞれの屈折率および反射率を顕微分光装置 (CRAIC) により測定した。

(3) 3D モデルからの物理光学的シミュレーション解析

上記 (1) の 3D モデルおよび (2) の光学的性能データに基づいて、円錐晶体の形状の三次元計測を行い、曲がった円錐晶体およびラブドームにおいて光がどのように集光されるのか物理光学的なシミュレーション解析を行った。ラブドームの基部側からレンズ系に向けて (実際の光の進行と逆の方向) 光が進行すると仮定したシミュレーションを行うことにより、レンズ表面からの光の拡がりやを推定した。このレンズからの光の拡がりや、つまり個眼の理論的な受光角 (理論値) となる。

(4) 複眼の電気生理学的解析による受光角の測定

複眼の各部位において、視細胞の細胞内記録により、単一視細胞を水平断面あるいは垂直断面から刺激し、複眼の各部位における個眼の受光角 (実測値) を求めた。この生理学的実測値と前出のシミュレーションにより導き出された受光角 (理論値) を比較し、個眼の光導波路機能の評価した。

(5) 偽瞳孔を利用した複眼の受光角の部域差の比較

T. saltator の複眼にみられる偽瞳孔を指標として、複眼の各部域における個眼の受光角度の部域差について検討を行った。同軸落射照明を装着した実体顕微鏡下でゴニオメーターにより個体の体の角度を変化させたときの偽瞳孔を撮影し、角度変化で偽瞳孔の重なる個眼を調べることにより、複眼における個眼の受光角の部域差を検討した。

(6) 反射色素細胞を構成する成分の元素分析

液体窒素中で急速凍結させた *T. saltator* を液体窒素中で複眼部分を凍結切断し、凍結乾燥を行ったのち、SEM-EDS (JCM-6000, JEOL) により反射色素細胞の元素分析を行った。

(7) 視覚定位行動解析による複眼の機能評価

T. saltator の複眼の背側または腹側をペンキ (電顕用銀ペースト) などで塗りつぶしたときの視覚定位行動への影響を検討した。これまでに、*T. saltator* の定位行動に、天空のグラデーション、太陽あるいは月の位置、陸にある構造物などが cue として使われていることが分かっている。複眼のどの部位から得られた情報が、どの Cue が視覚定位に用いられているかについて行動学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 曲がった個眼における受光角度について

複眼の連続切片画像を基に再構築された個眼の円錐晶体の 3D モデル (図 2b) を用い、物理光学的シミュレーション解析によりレンズの近位側から入射させた光の遠位側への広がりについての数値解析を行ったところ、複眼の中央部付近の個眼モデルでの理論値は 10° であった。一方、電気生理学的解析により測定された複眼の中央部付近の個眼の受光角は水平方向および垂直方向共に 38° (実測値) であり、実測値と理論値には大きな差がみられた。一方、顕微分光装置による複眼の各部位の光学的測定の結果、個眼の周辺色素細胞である反射色素細胞には高い光反射性があることが分かり (図 3)、個眼の周囲からの反射が起こる条件を加味して再度シミュレーション解析を行った結果、背側付近の個眼で水平方向が 31° 垂直方向が 29° 、複眼中央部の個眼で水平方向が 24° 垂直方向が 43° の広い受光角をもつことが分かった。したがって、個眼構造が大きく曲がっていても個眼の周囲を取り囲む反射色素細胞の高い光反射性によって広角の光を受光することができ、なおかつ個眼の曲がりの部分からの光情報漏出の可能性も低いことが示唆された。

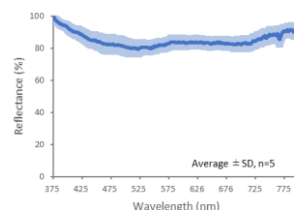


図 3 *T. saltator* の反射色素細胞の光反射率 (%)

研究開始当初は、数個体の複眼の各部位の個眼について 3D モデルを作成し物理光学的シミュレーション解析により比較する計画であったが、シミュレーション解析に用いる 3D モデルの作製に莫大なコスト（労力、資金、時間）がかかり、量的な解析には向かないことが分かった。そこで我々は偽瞳孔(pseudo-pupil)に着目し、偽瞳孔から個眼の受光角を推定する方法を検討した。*T. saltator*の複眼は、視細胞や周辺色素細胞に黒色素顆粒が少ないため、偽瞳孔を容易に観察することができる(図4)。偽瞳孔は、観察方向からの入射光が網膜に達した部分であり、その部分の個眼は網膜からの反射により黒く観察される。同軸落射照明を装着した実体顕微鏡下で、ゴニオメーターにより個体の体の角度を 5° ずつ変えていくと、複眼内の偽瞳孔の位置も少しずつ移動するが、偽瞳孔内の任意の個眼がどのぐらい角度変化させたら偽瞳孔として認識できなくなるかを調べた。その結果、複眼の中央付近の個眼でその角度はおよそ 30° であり、電気生理学および物理光学的シミュレーション解析で求められた受光角と近似することから、偽瞳孔の角度変化を利用して個眼の受光角を非侵襲的に簡便に推定できることが分かった。

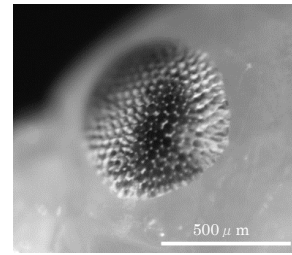


図4 *T. saltator*の偽瞳孔
(黒くみえる部分)

さらに、ゴニオメーターで個体の前後軸方向（水平方向）および背腹軸方向（垂直方向）に角度変化させたときの偽瞳孔の大きさの変化を測定したところ、前後軸方向では偽瞳孔の大きさに差は見られないが、背腹軸方向に移動させたとき、偽瞳孔は背側では小さく、腹側で大きくなる傾向が見られた。

(2) 高光反射性を示す反射色素細胞について

高光反射性を示す反射色素細胞について、その内部構造を電子顕微鏡で観察したところ、細胞質に $\phi 200\text{nm}$ ほどの微細顆粒が高密度に含まれていた(図5)。反射色素細胞での高光反射性は、これらの微細顆粒上での拡散反射（ランバート反射）の可能性が強く示唆される。また、この反射色素細胞の構成元素について電子顕微鏡によるEDS解析を行ったところ、主な構成成分が生元素(C, N, O)であることが分かった(図6)。

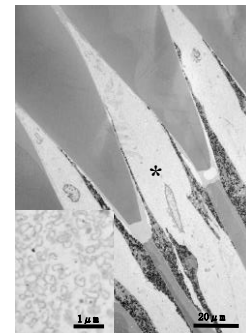


図5 *T. saltator*複眼の反射色素細胞のTEM像(挿入図は*の拡大)

(3) 複眼の部域による行動の Cue について

複眼の背側および腹側部分を銀ペーストで覆った時の視覚定位行動への影響を検討した。その結果、背側部分を覆った時に定位精度が低くなることが明らかとなった(本研究内容については、現在国際誌に投稿中であり、詳細は省略する)。

(4) まとめと今後の展望

本研究により、*T. saltator*で発見された曲がった個眼構造において、周辺色素細胞である反射色素細胞の高い光反射性により、個眼構造が光軸から外れて曲がっていても光情報の損失は起こらないことが示された。さらに、本種の個眼は受光角が非常に広く、隣接する複数の個眼間で視野が大きく重複することが明らかになった。*T. saltator*を含む端脚目の複眼の個眼構造は、集合型感桿(fused rhabdom)の連立像眼である。一般的に、連立像眼では光学系が個眼ごとに独立し、一個眼ごとに結像する。一方、ガ類の重複像眼(superposition eye)の個眼においても視野が重複するが、複数の個眼レンズに入射した光を集光するため、光学的には重複している。ハエの神経重複眼(neural superposition eye)でも個眼の視野が重複するが、分散感桿型(open rhabdom)であり、集合型感桿で広い受光角で集光する本種の結像系とは異なる。本種の個眼は一個眼ずつ光学的に完全に独立していることから、機能的にも全く異なる新しいタイプの結像系であるといえる。この隣接する複数の個眼からの重複した光情報処理がどのように行われているのか、視神経終末の視葉への投射部位や神経カートリッジのまとまりなど、視葉や脳での高次情報処理についてのさらなる解析が必要である。また、野外行動実験により複眼の背側部域から得られた視覚情報が行動の Cue として重要であることが示されたことから、特に複眼の背側部域からの視神経終末および脳神経ネットワークを詳細に調べることにより、動物の視覚定位行動の制御に関わる脳神経系部位の機能解明が期待される。

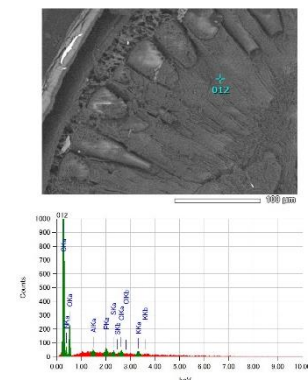


図6 *T. saltator*複眼の反射色素細胞のSEM-EDS解析

また、反射色素細胞は生元素が主成分であることから生分解性が期待され、環境にやさしい高反射基材としての今後の応用展開が期待される。

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 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Victor Benno Meyer-Rochow & Yumi Yamahama	4. 巻 31
2. 論文標題 Consequences of extreme miniaturization: The ultrastructure of the compound eyes of a 0.65 mm long "three-eyed" gall midge (Diptera; Cecidomyiidae).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Entomologie heute	6. 最初と最後の頁 57-72
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Futahashi Ryo, Yamahama Yumi, Kawaguchi Migaku, Mori Naoki, Ishii Daisuke, Okude Genta, Hirai Yuji, Kawahara-Miki Ryouka, Yoshitake Kazutoshi, Yajima Shunsuke, Hariyama Takahiko, Fukatsu Takema	4. 巻 8
2. 論文標題 Molecular basis of wax-based color change and UV reflection in dragonflies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.43045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kitta Ryo, Yamahama Yumi, Yamamoto Takayuki, Mase Keisuke, Sawada Hiroshi	4. 巻 35
2. 論文標題 Molecular Characterization and Tissue Distribution of Mitochondrial Ca ²⁺ -Dependent Solute Carrier Protein during Prevention of Diapause by HCl Treatment in the Silkworm, <i>Bombyx mori</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 487 ~ 493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs180041	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 Murata Mika, Hariyama Takahiko, Yamahama Yumi, Toyama Mina, Ohta Izumi	4. 巻 53
2. 論文標題 In the presence of red light, cucumber and possibly other host plants lose their attractability to the melon thrips <i>Thrips palmi</i> (Thysanoptera: Thripidae)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 117 ~ 128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.1007/s13355-017-0537-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murata Mika, Hariyama Takahiko, Yamahama Yumi, Toyama Mina, Ohta Izumi	4. 巻 30
2. 論文標題 Effects of the range of light wavelengths on the phototactic behaviour and biological traits in the melon thrips, <i>Thrips palmi</i> Karny (Thysanoptera Thripidae)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Ethology Ecology & Evolution	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.1080/03949370.2017.1320688	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Meyer-Rochow V. Benno, Yamahama Yumi	4. 巻 32
2. 論文標題 A comparison between the larval eyes of the dimly luminescent <i>Keroplatus nipponicus</i> and the brightly luminescent <i>Arachnocampa luminosa</i> (Diptera; Keroplatidae)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Luminescence	6. 最初と最後の頁 1072~1076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bio.3293	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 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山濱由美、外山美奈、Luca Mercatelli、Alice Ciofini、Alberto Ugolini、針山孝彦
2. 発表標題 曲がった個眼で光をどう受ける? ~ハマトビムシ複眼における光受容
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会(大阪市立大学)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山濱由美、外山美奈、Alice Ciofini、Alberto Ugolini、針山孝彦
2. 発表標題 曲がった個眼はどのようにできるのか~ハマトビムシ <i>Talitrus saltator</i> の個眼の成長過程における個眼構造の変化
3. 学会等名 日本動物学会第89回札幌大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村田未果、針山孝彦、山濱由美、外山美奈、太田泉
2. 発表標題 ミナミキイロアザミウマ防除のための赤色光利用の気温条件
3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会第63回つくば大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山濱由美、外山美奈、Luca Mercatelli、Alice Ciofini、Alberto Ugolini、針山孝彦
2. 発表標題 曲がった個眼で光をどう受ける？～ハマトビムシ複眼における光受容
3. 学会等名 日本動物学会第88回富山大会、2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 外山美奈、山濱由美、Luca Mercatelli、Alice Ciofini、Alberto Ugolini、針山孝彦
2. 発表標題 ハマトビムシ <i>Talitrus saltator</i> の複眼の明暗順応
3. 学会等名 日本動物学会第88回富山大会、2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 針山孝彦、高久康春、河崎秀陽、太田勲、鈴木浩司、山濱由美、外山美奈、David Wilcockson、Alice Ciofini、Alberto Ugolini
2. 発表標題 濡れたまま・生きたまま電子顕微鏡観察するNanoSuit法 ハマトビムシなどを例にして
3. 学会等名 日本動物学会第88回富山大会、2017
4. 発表年 2017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
研究協力者	針山 孝彦 (Hariyama Takahiko) (30165039)	浜松医科大学 (13802)	
研究協力者	ウゴリーニ アルベルト (Ugolini Alberto)	フィレンツェ大学	
研究協力者	メルカテーリ ルカ (Mercatelli Luca)	フィレンツェ大学	