

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：12702

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570084

研究課題名(和文) 匂いによる色嗜好性の変化とその性差の神経行動学的研究

研究課題名(英文) Neuroethological study of innate color preference modified plant scent

研究代表者

木下 充代 (Kinoshita, Michiyo)

総合研究大学院大学・先端科学研究科・講師

研究者番号：80381664

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)：羽化後、求蜜未経験のナミアゲハに青・緑・黄・赤の色円板を見せると多くの個体が青に降りて蜜を探す。この生得的な色の好みに、植物の匂いがどのように影響するかを調べた。メスは食草があると緑、特定の花の匂いがあると赤を好む個体が増えた。ところが、匂いを嗅げなくしたメスは青を好んだ。一方、オスはいずれの匂いがあっても青を好む個体が多かった。以上は、脳で嗅覚と視覚情報が統合されること、嗅覚系を含む神経系に雌雄差があることを示している。情報の統合には視覚と嗅覚が入力するキノコ体と呼ばれる領域が、色嗜好性の雌雄差にはメスの第一次嗅覚中枢をつくる60の系球体のうち大きく発達した3個が関係すると考えている。

研究成果の概要(英文)：As most flower visitors, Japanese yellow swallowtail butterfly shows innate color preference of blue in its naive foraging. In behavioral experiments for testing effect of plant scents in innate color preference, odorant of larval host plant increased preference of green and a particular flower scents increased the preference of red in females. Female butterflies, whose olfaction was retarded by painting mascara on their antennae, preferred blue under condition with plant scents. Contrary to females, male butterflies prefer blue in any odorant conditions. These results suggest that a brain area integrates visual and olfactory information and the nervous system containing olfactory processing involves sexual dimorphism. In fact, the mushroom body receives visual and olfactory inputs. In addition, the first olfactory ganglion, antennal lobes, contains three enlarged glomeruli out of about 60 glomeruli in female, which might contribute to induce sexual dimorphism of the color preference.

研究分野：神経行動学

キーワード：感覚情報処理 視覚 嗅覚 感覚統合 昆虫 性差 行動

1. 研究開始当初の背景

(1) 多くの訪花性昆虫は、生得的に好む色を持つ。私は、自身の博士研究中に、ナミアゲハ（以後アゲハ）の色覚を明らかにする研究の過程で、夏型のアゲハでは、メスが赤や黄色を、一方オスは青を生得的に好むことを発見していた。

(2) 色嗜好性の性差を解明する実験を換気システムのある実験室で行ったところ、夏のアゲハが生得的に好む色は雌雄ともに青であった。そこで、予備実験と先行研究の実験条件を比べ、実験室内においた植物の匂いが生得的色嗜好性に影響するという仮説を立てた。そこで、幼虫の食草であるミカンの木を室内において生得的に好む色を調べたところ、メスでは緑を好む個体が優位に増え、一方オスでは青を好むものが多かった。この結果から、植物の匂いが生得的色嗜好性になんらかの影響を与えていると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、脳における異種感覚情報の統合のしくみを神経行動学的に明らかにする研究の一環として位置づけられる。具体的には、アゲハチョウの求蜜行動とその神経機構を対象として実験的研究を行った。

羽化したばかりのアゲハが最初に訪れて蜜を探す色を青・緑・黄・赤の中から選ばせると、多くの個体が青を選ぶ。ところが、アゲハの食草である柑橘の木が室内にあると、緑を訪れるメスが有意に増えることを発見した。そこでまず、どのような植物由来の匂いが生得的色嗜好性に影響するのかを行動学的に詳細に調べることにした。また、行動実験の予備的結果は、異種感覚の統合によって、色による選択に雌雄差が生まれることを示しているため、この現象を異種感覚の統合機構と、その情報処理系の性差を研究するためのモデル実験系の確立を3年間の目標とした。

3. 研究の方法

(1) 匂いによる色嗜好性の変化に関する行動学的検証：室内においた小さなカゴに、羽化後一度も求蜜経験のないアゲハを放ち、青・緑・黄・赤の色円板から最初に降り、吻を伸ばして蜜を探した色を生得的に好む色として記録する。

植物の匂いの影響は、アゲハから見えないところに、花の精油または植物を置き、生得的色嗜好性を記録した。匂いは触角で受容されるので、マスカラを触角に塗布してアゲハが匂いを嗅げないようにして、生得的色嗜好性を調べた。植物や精油に含まれるどの匂い成分が色嗜好性に影響するのかを明らかにするため、匂いの分析結果をもとに人工香を作製して、色嗜好性をみる実験も行った。

(2) 視覚と嗅覚系の統合領域の探索：行動実験の結果は、嗅覚と視覚の情報処理とその統合系が関わっていることを示している。そこで複眼、触角、第一次嗅覚中枢の性差に加え、異種感覚統合の場の探索を行った。

嗅覚系の雌雄差をみるため、触角上の感受子を走査電子顕微鏡で観察した。第一次嗅覚中枢の構成は、シナプシン抗体による免疫組織実験によって糸球体構造を可視化し3次元立体構築して解析した。

視覚と嗅覚情報の統合領域を明らかにするため、視覚中枢の出力領域と第一次嗅覚中枢に、デキストラン色素を注入し、それぞれの領域からの投射先を詳細に観察した。

(3) 視覚中枢出力の光応答記録：視覚中枢からキノコ体に伸びる3つの神経束を対象に、細胞内記録法の確立を試みた。アゲハの頭部を開き、脳の対象領域を露出し、ビオチンを充填した電極を差し入れて、細胞に入ったら光応答を記録する。記録後、ビオチンを電気泳動的に注入する。後で、脳は解剖・固定し、記録をえた細胞を組織化学的に可視化した。

4. 研究成果

(1) 匂いによる色嗜好性変容の行動学的検証：特定の植物の匂いがない部屋に置いたかごの中に吸蜜経験のないアゲハを放ち、青・緑・黄・赤の4色の円板のどれに降りて蜜を探すのかを記録すると、多くの個体は青を選ぶ（図1 Control）。ところが、ミカン（Neroli）・ユリ（Lirio）・ラベンター・ハイビスカスの精油もしくは花が咲いた鉢植えを室内に置いて同様の実験をすると、ミカンとユリの匂いがあるときメスでは赤を選ぶ個体数が優位に増えた（図1 Floral scent）。一方、ラベンターとハイビスカスでは、匂いがないときと同様青を選ぶ個体が多かった。さらに、花の匂いと植物の緑葉臭の関係を見るために、ミカンの木とミカンの花の精油を同時に室内に置くとメスでは、ミカンの木のみを置いたときと同様、緑に降りる個体が優位に増えた（図1 Host plant）。

色嗜好性において顕著な影響が見られた、ミカン花の匂いと緑葉臭の人工香を、主要10成分を混ぜ合わせて作成し、色嗜好性を観察した。ところが、いずれの場合も多くの個体が青を好み、自然香の影響を再現することはできなかった。このことは、花や緑葉臭に含まれる微量な成分が、色嗜好性に影響する可能性を示唆している。

触角にマスカラを塗布して、嗅覚を遮断したメスは青を好んだ（図1 Mascara）。また、オスでは、いずれの植物の匂いが部屋にあっても、青を訪問する個体が多かった。以上の結果から、生得的に好きな色は青であること、匂いが好きな色に影響を与えていたこと、嗅覚系もしくは嗅覚と視覚の統合系に雌雄差があると考えた。

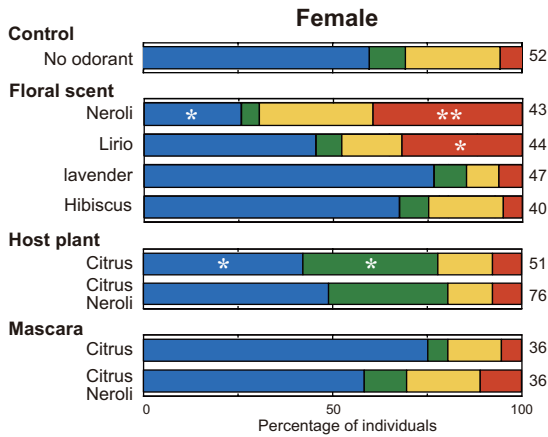


図1 ナミアゲハの生得的色嗜好性と匂いの影響。

(2) 視覚と嗅覚系の統合領域の探索：第一次嗅覚中枢（触角葉）と視覚中枢（視葉）にビオチンを入れて、双方の感覚情報処理に関わる神経の投射先を観察した。その結果、アゲハのキノコ体は、ハチやアリと同様キノコ体に嗅覚入力に加え、視覚入力が入っていることがわかった。感覚入力部位にあたるキノコ体の傘部では、嗅覚と視覚の入力はそれぞれ異なる場所に投射していた（図2）。キノコ体に入力する視覚中枢の神経をキノコ体傘部への色素注入によって調べたところ、少なくともひとつ神経束が第二次視覚中枢（ME; Medulla）から第三次視覚中枢（Lo; Lobula）を経由して投射すること、二本の神経束が第三次視覚中枢から直接入力していることがわかった（図2）。第三次視覚中枢からキノコ体に伸びる神経の細胞体は、キノコ体傘部の腹側部分に分布していた。

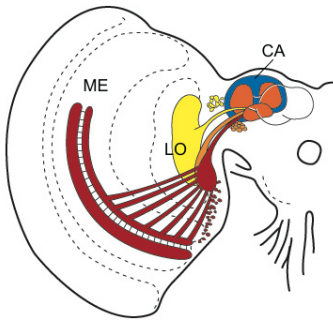


図2 キノコ体傘部（CA: Calyx）に入力する視葉からの3本出力神経束（赤・オレンジ・黄色）と嗅覚神経束。傘部（CA）では、視覚情報の入力部位（オレンジ）と嗅覚情報（青）がわかれて入力していた。

第一次嗅覚中枢に明確な雌雄差があることを、糸球体構造の3次元解析で発見した。60個前後ある糸球体のうち、側面腹側に位置する3個の糸球体がメスで大きく発達していた。また、雄には、背側に少なくともひとつ大きな糸球体があるが、メスでは相同糸球体が見つけられなかった。

(3) 視覚中枢出力の光応答記録：

視覚中枢からキノコ体に伸びる神経束に含まれる神経からの細胞内記録を試みた。白色光に反応は記録可能だが、適切な時間細胞内記録を持続することが難しく、まだ分光反応や偏光反応を記録するには至っていない。

限られた細胞内染色像から、第三次視覚中枢から入力する2種類の細胞形態を同定した。ともに、キノコ体傘部に大きく広がり、途中に多くのブロップ構造があった。

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13件）

1. Schmelting F, Tegtmeier J, Kinoshita M, Homberg U (2015) Photoreceptor projections and receptive field in the dorsal rim area and main retina of the locust eye. *Journal of Comparative Physiology A*. (in press) doi: 10.1007/s00359-015-0990-y
2. Futahashi R, Kawahara-Miki R, Kinoshita M, Yoshitaka K, Yajima S, Arikawa K, Fukatsu T. (2015) Extraordinary diversity of visual opsin genes in dragonflies. *Proceedings of the National Academy of Science* (in press) doi:10.1073/pnas.1424670112
3. Kinoshita M, Shimohigasi M, Tominaga Y, Arikawa K, Homberg U (2015) Topographically distinct visual and olfactory inputs to the mushroom body in the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. *Journal of Comparative Neurology*. 523(1):162-82. doi: 10.1002/cne.23674.
4. Schmelting F, Wakakuwa M, Tegtmeier J, Kinoshita M, Bockhorst T, Arikawa K, Homberg U (2014) Opsin expression, physiological characterization and identification of photoreceptor cells in the dorsal rim area and main retina of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Experimental Biology*. 217:3557-68. doi: 10.1242/jeb.108514
5. Kinoshita M, Arikawa K (2014) Color and polarization vision in foraging *Papilio*. *Journal of Comparative Physiology A*. 200: 513-26. doi:10.1007/s00359-014-0903-5.
6. Uchiyama H, Awata H, Kinoshita M, Arikawa K (2013) Rough eyes of the northeast-Asia wood white, *Leptidea amurensis*. *Journal of Experimental Biology*. 216: 3413-21. doi:10.1242/jeb.089169

7. Hamanaka Y, Shibasaki H, Kinoshita M, Arikawa K. (2013) Neurons innervating the lamina in the butterfly, *Papilio xuthus*. ***Journal of Comparative Physiology A***. 199(5): 341-51.
doi:10.1007/s00359-013-0798-6
 8. Ogawa Y, Kinoshita M, Stavenga DG, Arikawa K. (2013) Sex-specific retinal pigmentation results in sexually dimorphic long-wavelength-sensitive photoreceptors in the Eastern Pale Clouded Yellow butterfly, *Colias erate*. ***Journal of Experimental Biology***. 216: 1916-23.
doi:10.1242/jeb.083485
dio: 10.1242/jeb.083485
 9. Ogawa Y, Awata H, Wakakuwa M, Stavenga D, Kinoshita M, Arikawa K. (2012) Coexpression of the three middle wavelength-absorbing visual pigments in sexually dimorphic photoreceptors of the butterfly *Colias erate*. ***Journal of Comparative Physiology A***. 198(12):857-67.
dio:10.1007/s00359-012-0756-8
 10. Hamanaka Y, Kinoshita M, Homberg U, Arikawa K. (2012) Immunocytochemical localization of amines and GABA in the optic lobe of the butterfly, *Papilio xuthus*. ***PLoS One***. 7(7):e411109. PMID: 22844431
 11. Nagata T, Koyanagi M, Tsukamoto H, Saeki S, Isono K, Shichida Y, Tokunaga F, Kinoshita M, Arikawa K, Terakita A (2012) Depth perception from image defocus in a jumping spider. ***Science***. 335:469-71.
dio:10.1126/science.1211667
 12. Kinoshita M, Takahashi Y, Arikawa K (2012) Simultaneous brightness contrast of foraging Papilio butterflies. ***Proceeding of Royal Society of London Biological Science***. 279:19911-8
dio:10.1098/rspb.2011.2396
 13. Pfeiffer K, Kinoshita M (2012) Segregation of visual inputs from different regions of the compound eye in two parallel pathways through the anterior optic tubercle on the bumblebee (*Bombus ignites*). ***Journal of Comparative Neurology***, 520(2): 212-229
dio:10.1002/cne.22776
- [学会発表] (計 24 件)
1. 長屋ひろみ、Finlay Stewart、蟻川謙太郎、木下充代：産卵行動中のナミアゲハによる葉の選択. 日本動物学会関東支部大会、2015年3月、中央大学、東京
 2. 永田崇、木下充代、蟻川謙太郎、小柳光正、寺北明久：ハエトリグモの第一次視覚中枢における主眼視細胞の投射様式. 日本動物学会第85回大会、2014年9月、仙台
 3. Stewart F, Kinoshita M, Arikawa K: Visual course control of flower visiting behavior in *Papilio*: Kotos in behavioral biology. 日本動物学会第85回大会、2014年9月、仙台
 4. 吉田后那、蟻川謙太郎、木下充代：鱗翅目昆虫ナミアゲハの生得的な色嗜好性における匂いの影響. 日本動物学会第85回大会、2014年9月、仙台
 5. 木下充代：ナミアゲハの視覚能力と視覚神経系 in 行動を制御する脳神経機構 企画；山方恒宏，日本動物学会第85回大会，東北大学，2014年9月11日-13日 仙台市
 6. 二橋亮，川原玲香，木下充代，吉武和敏，矢嶋俊介，蟻川謙太郎，深津武馬：トンボの色覚に関わるオプシン遺伝子の極端な多様性，日本進化学会 第16回大阪大会 2014年8月21日-24日，高槻現代劇場，高槻市
 7. Kinoshita M. Brain structure and visual abilities for foraging in the Japanese yellow swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* in a invited symposium “In the footsteps Karl von Frisch: 100 years of investigation into insect color and polarization vision” 11th International Congress of Neuroethology. 2014年7月28日-8月1日 Sapporo, Japan
 8. Weckstroem M, Hamanaka Y, Kinoshita M, Arikawa K: How is wavelength information coded in photoreceptor axons and second order neurons in the lamina of the Japanese yellow swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. 11th International Congress of Neuroethology 2014年7月 Sapporo, Japan
 9. Stewart F, Kinoshita M, Arikawa K. Opposing effects of expansion and parallax cues in foraging butterflies. 11th International Congress of Neuroethology 2014年7月 Sapporo, Japan
 10. Yoshida M, Ito Y, Omura H, Arikawa K, Kinoshita M. Innate color preference is affected by plant odor in Japanese yellow swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. 11th International Congress of Neuroethology 2014年7月 Sapporo, Japan
 11. Uchiyama , Kinoshita M, Arikawa K: Sexual dimorphism and its function in the “rough” eye of the Northeast Asian Wood White, *Leptidea amurensis*. 11th International Congress of Neuroethology 2014年7月 Sapporo, Japan

12. 吉田后那, 伊藤優希, 大村尚, 蟻川謙太郎, 木下充代: ナミアゲハの生得的色嗜好性は匂いによって変化する, 第58回日本応用動物昆虫学会大会 2014年3月26-28日, 高知大学朝倉キャンパス, 高知市
13. 永田崇, 木下充代, 蟻川謙太郎, 小柳光正, 寺北明久: ハエトリグモの4層構造網膜に存在する視細胞の投射パターンの解析, 日本動物学会第84回大会 2013年9月26-28日, 岡山大学, 岡山
14. Kinoshita M: Odor effects on innate color preference in foraging behavior of the Japanese swallowtail, *Papilio xuthus*: International Conference on Invertebrate Vision, August 2013, Baeckaskog Castle, Sweden.
15. Stewart F, Kinoshita M, Arikawa K. Chromatic effects and regional specialization of looming detection in the swallowtail butterfly *s*: International Conference on Invertebrate Vision, August 2013, Baeckaskog Castle, Sweden.
16. Kinoshita M, Yoshida M, el Jundi B, Homberg U, Arikawa K: Is sexual dimorphism in *Papilio* antennal lobes linked to sexual dimorphism in odor effects on innate color preference? : 35th annual meeting of the Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry, 2013年7月イーグレひめじ・姫路
17. 吉田后那, 伊藤優希, 大村尚, 蟻川謙太郎, 木下充代: ナミアゲハの生得的色嗜好性は匂いによって変化する, 2013年3月27-29日, 日本大学生物資源学部湘南キャンパス, 藤沢
18. Yoshida M, Arikawa K, Kinoshita M: Order of *Citrus* trees changes innate color preference in female *Papilio* butterfly: 14th International Behavioral Ecology Meeting 2012年8月12-18日 Lund Sweden
19. Kinoshita M, Yoshida M, Arikawa K: Odor of *Citrus* trees causes sexual dimorphism in innate color preference of swallowtail butterflies: 10th international Congress of Neuroethology 2012年8月 Maryland America
20. Ogawa Y, Awata H, Kinoshita M, Arikawa K: Sexual dimorphic photoreceptor organization of the retina of eastern clouded yellow butterfly, *Colias erate*: 10th international Neuroethology Congress 2012年8月 Maryland America
21. Uchiyama H, Awata H, Kinoshita M, kentaro Arikawa: Ommatidial heterogeneity in the “rough” eye of the male northeast Asian wood white, *Leptidea amurensis*: 10th international Neuroethology Congress 2012年8月 Maryland America
22. 吉田后那, 蟻川謙太郎, 木下充代: 34th annual meeting of the Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry, 2012年7月13-15日 Hayama Kanagawa
23. Uchiyama H, Kinoshita M, Arikawa K: Ultrastructure of the rhabdom of the “rough” eye of the male Northeast Asian Wood White, *Leptidea amurensis*. 34th annual meeting of the Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry, 2012年7月 Hayama Kanagawa
24. Ogawa Y, Awata H, Kinoshita M, Arikawa K: Photoreceptors coexpressing three visual pigments in the *Colias* retina 34th annual meeting of the Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry, 2012年7月 Hayama Kanagawa

〔図書〕 (計 4件)

1. 蟻川謙太郎, 若桑基博, 木下充代 (2014) 昆虫視細胞の分光感度. 日本応用動物学会会誌 58:5-11
2. 木下充代 (2014) チョウ類視細胞の光応答-細胞内記録法による光強度と分光反応の測定, 研究者が教える動物実験 日本比較生理性化学会編. 共立出版社 (in press)
3. 木下充代 (2014) 行動から探るチョウの色覚, 視覚の認知生態学 生物たちが見る世界 (種生物学会 牧野・安元編) 文一総合出版: 51-61
4. 木下充代 (2014) 生物の偏光利用, 光と生命の辞典, 朝倉書店 (in press)

〔産業財産権〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 充代 (KINOSHITA, Michiyo)
総合研究大学院大学・先導科学研究科・講師
研究者番号: 80381664

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし