

令和元年5月29日現在

機関番号：12702

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26251036

研究課題名(和文) 昆虫視葉板における色覚初期過程の解剖学的・生理学的解析

研究課題名(英文) Anatomical and physiological analysis of early color processing in the insect lamina

研究代表者

蟻川 謙太郎 (Arikawa, Kentaro)

総合研究大学院大学・先端科学研究科・教授

研究者番号：20167232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,150,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫における色覚情報処理の初期過程とその進化を解明するため、すぐれた色覚をもつアゲハを対象に、視覚第一次中枢(視葉板)に的を絞り、1)視葉板カートリッジのコネクトーム解析、2)視細胞と視覚二次ニューロン(LMC)の波長対比性反応の解析を行った。

第一点については、6個の視葉板カートリッジで、視細胞とLMCのシナプス結合を、そのカートリッジ間結合も含めて解明した。ショウジョウバエにつづき、2種目のコネクトーム情報として、今後さまざまな研究に活用され得るデータを得た。第二点については、視葉板におけるヒスタミン感受性Cl⁻チャンネルが視細胞における波長対比性反応に関与していることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物が世界をどう見るか。これは古くから多くの人々をとらえ続けている興味深い疑問であると同時に、生態の深い理解や保護施策の正しい策定に不可欠な情報を提供する。これが感覚生態学と呼ぶ。この研究は色覚の多様性に着目したものである。現代生物学では、遺伝学的手法と画像処理技術の進展の後押しがあって、視覚メカニズムの研究分野ではキロショウジョウバエに関する理解が大きく進んだ。とくに脳の配線を完全に記載しようとするコネクトーム解析は威力を発揮した。しかし、ショウジョウバエの色覚は概して悪く、色覚能力の高い別の種との比較が不可欠である。私は、ヒトに匹敵する色覚をもつアゲハで、この問題に取り組んだ。

研究成果の概要(英文)：For understanding the neuronal mechanism underlying color vision in insects, we focused on the first optic ganglion, the lamina, of a butterfly *Papilio* that has sophisticated color vision. We studied (1) the neuronal connections in the lamina and (2) the possible spectral opponency in the photoreceptors and lamina monopolar cells (LMCs).

We analyzed serial EM pictures of the lamina and revealed all synaptic connections in six lamina cartridges including both intra- and inter-cartridge connections. This provides the second data set of such following the one in *Drosophila melanogaster*. We also analyzed the possible spectral opponencies in the lamina, and found two histamine-gated chloride channels appeared to be involved in the photoreceptor spectral opponency.

研究分野：神経行動学

キーワード：昆虫 色覚 視葉板 波長対比性 コネクトーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

昆虫色覚の研究にはいくつかのブレークスルーがあった。パイオニア的研究は言うまでもなく、1914年にFrischがミツバチに色覚を証明したことである。以来、昆虫色覚研究の対象は長くミツバチが中心だった。第一の転換点は、1987年に私がアゲハ複眼に5種の色受容細胞を報告したことである。ミツバチからの類推で“昆虫色覚は3種の色受容細胞による3原色”が定説だった状況に、これは昆虫をはじめとする無脊椎動物の色覚研究の大きなブレークスルーとなった。それから数年の間に多くの種で視細胞の同定が進み、モンシロチョウで5種、甲殻類のシャコでは10種以上の視細胞が報告された。次のブレークスルーは分子生物学の普及である。脊椎動物で視物質オプシンがクローニングされたことでその波は無脊椎動物にも広がり、昆虫色覚の分子生物学研究は一気に進展した。

一方、色覚の神経メカニズムの研究は遅々として進まなかった。神経生理実験が困難であること、神経細胞のつくる回路が複雑すぎるからである。そこに訪れた第3のブレークスルーは、脳の全神経回路を解明するコネクトーム解析である。米HHMIで始まったショウジョウバエ全脳のコネクトーム解析は、回路実体の正確な把握につながり、行動に直結する神経回路機能の理解を格段に進めた。HHMIから最初の論文が出たのは2008年だった。

実は私は、ショウジョウバエでコネクトーム解析が始まる前から、低解像度ながら同様の研究をアゲハで始め、最初の“コネクトーム”論文を2006年に発表した。その後、本格的なコネクトーム解析がショウジョウバエ研究を加速するさまを目の当たりにし、私はアゲハを含む他種でも詳細なコネクトーム解析を行うことが必須と考え、2013年から生理学研究所の共同利用を活用してこの課題に取り組み、2014年度に本研究を申請・開始した。

本研究を始めた当初、昆虫の色覚研究はまだショウジョウバエよりもアゲハで進んでいた。しかし今は、視覚行動の神経メカニズムに関する研究はショウジョウバエの後を追う形になっている。ただ幸いなことに、ショウジョウバエで“色覚”研究が進めば進むほど、アゲハとの違いが明らかになっている。何事であれ、生物の共通原理を知ろうとすれば、比較は不可欠である。小さな研究グループでアゲハ脳の完全なコネクトーム解析を進めるのは非現実的である(今では全ゲノム解析が日常的に行われるようになったように、画像解析の速度と精度が上がれば、一気に可能性は広がるだろう)。そこで私は対象を視覚一次中枢である視葉板に絞り、色覚初期過程における波長情報処理のメカニズム解明を目指した。その結果、アゲハとショウジョウバエには視葉板のレベルで様々な興味深い違いが見つかり、アゲハのもつ鋭い色覚のメカニズムについて、理解を一歩大きく進めることができた。

2. 研究の目的

昆虫における色覚情報処理の初期過程の解明を目指した。対象としては色覚にすぐれたアゲハ(*Papilio xuthus*)を用いた。

3. 研究の方法

視葉板は、複眼を構成するひとつひとつの個眼に由来する視葉板カートリッジでできている。連続表面ブロック走査型電子顕微鏡(SBF-SEM)を用い、アゲハ視葉板を、カートリッジの上端から下端までを完全に含む連続電子顕微鏡切片画像を取得する。電子顕微鏡画像で視細胞と視覚二次ニューロン(LMC)断面をていねいにトレースすることで、視葉板に含まれる視細胞とLMCの位置関係とシナプス様構造分布を3次元再構築する。構築したデータを用い、カートリッジ内のシナプス結合マトリクスを作成する。

視葉板における視細胞終末部とLMCの波長対比性は、ガラス微小電極を視葉板に刺入することで詳細に解析する。同時に、視葉板におけるシナプス伝達に関わっているヒスタミン駆動性Cl⁻チャネルの同定、生理学的性質と解剖学的分布の解明を進める。

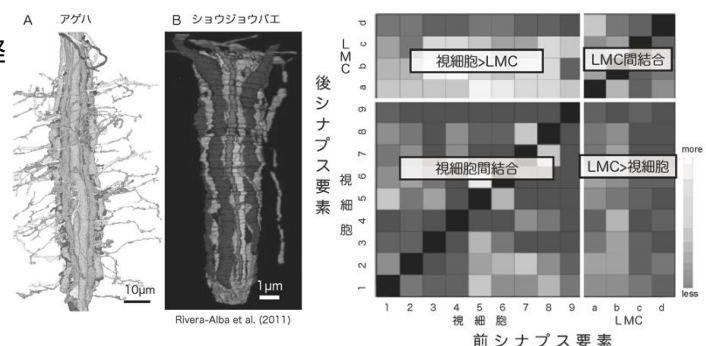
4. 研究成果

アゲハ視葉板のコネクトーム解析

アゲハ視葉板のSBF-SEM連続画像中、隣り合う6個の視葉板カートリッジに含まれる視細胞とLMCをトレース、シナプス構造の局在を調べた。その結果、ひとつのカートリッジにはひとつの個眼に由来する視細胞9個(R1-9)と、4つの形態の異なるLMCが含まれることが分かった。従来、R1, 2, 9は軸索を視髄まで伸ばす長視細胞、R3-8は軸索を視葉板で終末させる短視細胞と言われていた。しかし解析した範囲内では、R9はすべて視葉板で終末する短視細胞だった。

視細胞とLMCには、隣接するカートリッジへ伸びる側枝を持ったものが多く見つかった。これはショウジョウバエには存在しない。ハチ類やガ類ではゴルジ染色による神経解剖の研究で長い側枝を持つ視細胞やLMCが見つかり、これが存在しないのはショウジョウバエの特徴かもしれない。

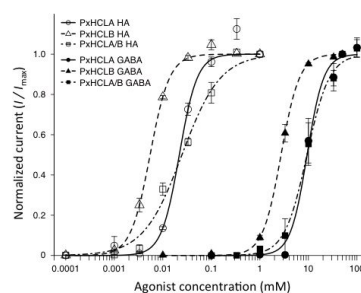
シナプス様構造をその前要素と後要素とともに同定し、シナプス結合マトリクスを作った。その結果、視細胞からLMC



への出力シナプスばかりでなく、視細胞同士、LMC 同士のシナプスも多く見つかった。また LMC から視細胞へのフィードバックシナプスの存在も明らかになった。視細胞同士のシナプスは、ショウジョウバエ視葉板では見つかっていない。

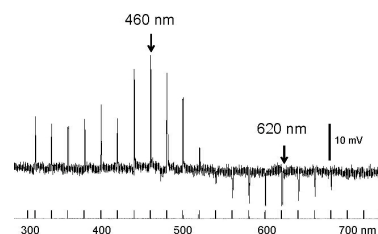
ヒスタミン駆動性 Cl⁻-チャンネルの解析

ショウジョウバエのヒスタミン駆動性 Cl⁻-チャンネル A と B (HCLA, HCLB) のホモログをアゲハで同定し、PxHCLA, PxHCLB と命名した。分子を HEK293T に発現させてパッチクランプ法で解析したところ、PxHCLA と B 共にヒスタミンと GABA によく応答した。いずれの分子に対しても PxHCLA の感度は PxHCLB よりも数倍高く、また、ヒスタミンに対する感度は GABA に比べて約 1000 倍高かった (右図)。PxHCLA と B に対する特異的抗体を作成し、光顕および電顕レベルでの免疫組織化学を行った。結果、PxHCLA は視細胞と二次ニューロン間のシナプスに、PxHCLB は視細胞同士のシナプスに発現していることが示唆された。



視細胞および LMC の波長対比性の解析

視葉板に微小電極を刺入し、視細胞および LMC の分光感度を詳しく解析した。結果、少なくとも 3 種類の波長対比性 (UV+G⁻, V+G⁻, B+G⁻) が視細胞末端から記録された (右図は B+G⁻)。LMC の分光感度はいずれも広帯域で、紫外と赤領域での反応性から 3 タイプ (UV+R⁺, UV-R⁺, UV+R⁻) に分かれた。それぞれ含まれる視細胞分光感度の異なる 3 タイプの個眼に対応していることが示唆された。少数ながら LMC の中でも波長対比性が認められた。



結論:アゲハ視葉板に見られる視細胞間結合は PxHCLB によって作られる符号反転性のシナプスで、視細胞末端部における波長対比性を作っている。多くの場合 LMC には波長対比性が見られず、これは LMC が achromatic な情報処理によって動き知覚などに参与しているという従来の考え方に一致する。一方 LMC にも波長対比性を示すものが見つかっており、視細胞の波長対比性と合わせて、視葉板における波長情報処理に強く関わっているものと考えられる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 35 件)

1. Rusanen J, Frolov R, Weckström M, Kinoshita M, Arikawa K (2018) Non-linear amplification of graded voltage signals in the first-order visual interneurons of the butterfly *Papilio xuthus*. *Journal of Experimental Biology*, jeb.179085 doi: 10.1242/jeb.179085
2. Chen P-J, Stewart FJ, Arikawa K (2018) The more, the better? A butterfly with 15 kinds of light sensors in its eye. *Frontiers for Young Minds*, 5: article 70
3. Arikawa K, Iwanaga T, Wakakuwa M, Kinoshita M (2017) Unique temporal expression of triplicated long wavelength opsins in developing butterfly eyes. *Frontiers in Neural Circuits*, 11:article 96
4. Rusanen J, Vähäkainu A, Weckström M, Arikawa K (2017) Characterization of first order visual interneurons in the visual system of the bumblebee (*Bombus terrestris*). *Journal of Comparative Physiology A*, 203:903-913
5. Stewart F, Kinoshita M, Arikawa K (2017) A novel display system reveals anisotropic polarisation perception in the motion vision of the butterfly *Papilio xuthus*. *Integrative and Comparative Biology*, icx070: 1-9
6. Arikawa K (2017) The eyes and vision of butterflies. *Journal of Physiology*, DOI: 10.1113/JP273917
7. Stavenga DG, A. Meglič A, Pirih P, Arikawa K, Wehling MF, Belušič G (2016) Photoreceptor spectral tuning by colorful, multilayered facet lenses in long-legged fly eyes (Dolichopodidae). *Journal of Comparative Physiology A*, 203: 23-33
8. Perry M, Kinoshita M, Saldi G, Huo L, Arikawa K, Desplan C (2016) Molecular logic behind the three-way stochastic choices that expand butterfly colour vision. *Nature*, 535:280-284
9. Chen P-J, Awata H, Matsushita A, Yang E-C, Arikawa K (2016) Extreme spectral richness in the eye of the Common Bluebottle butterfly, *Graphium sarpedon*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 4: 1-12
10. Stewart FJ, Kinoshita M, Arikawa K (2015) The butterfly *Papilio xuthus* detects visual motion using chromatic contrast. *Biology Letters*, 11: 20150687
11. Kawasaki M, Kinoshita M, Weckström M, Arikawa K (2015) Difference in dynamic properties of photoreceptors in a butterfly, *Papilio xuthus*: possible segregation of motion and color processing. *Journal of Comparative Physiology A*, 201:1115-1123

12. Yoshida M, Itoh Y, Ômura H, Arikawa K, Kinoshita M (2015) Plant scents modify innate color preference in foraging swallowtail butterflies, *Papilio xuthus*. **Biology Letters**, 11: 20150390
13. Stewart FJ, Kinoshita M, Arikawa K (2015) The roles of visual parallax and edge attraction in the foraging behaviour of the butterfly *Papilio xuthus*. **Journal of Experimental Biology** 218, 1725-1732
14. Futahashi R, Kawahara-Miki R, Kinoshita M, Yoshitake K, Yajima S, Arikawa K, Fukatsu T (2015) Extraordinary diversity of visual opsin genes in dragonflies. **Proceedings of National Academy of Science USA**, doi/10.1073/pnas.1424670112
15. Ohashi K, Makino T, Arikawa K (2015) Floral color change in the eyes of pollinators: testing possible constraints and correlated evolution. **Functional Ecology**, DOI: 10.1111/1365-2435.12420
16. Marshall J, Arikawa K (2014) Unconventional colour vision. **Current Biology**, 24: pR1150–R1154, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.025>
17. Kinoshita M, Arikawa K (2014) Color and polarization vision in *Papilio*. **Journal of Comparative Physiology A**, 200: 513-526

〔学会発表〕(計 65 件)

省略

〔図書〕(計 11 件)

1. 蟻川謙太郎 (2016) 複眼と単眼．光と生命の事典．朝倉書店、58-59
2. 蟻川謙太郎 (2015) 光刺激装置の構成と光の測定．研究者が教える動物実験、日本比較生理生化学会編、共立出版、134-137
3. 蟻川謙太郎 (2014) 生物の眼～複眼の構造と機能について～．光学技術の事典(黒田ほか編)朝倉書店、272-275
4. 牧野崇司、蟻川謙太郎 (2014) 視覚の基礎知識：ヒトの眼を例として．種生物学研究第 36 号：生き物の眼をとおして覗く世界(牧野、安元編)文一総合出版、11-28
5. Arikawa K, Stavenga DG (2014) Insect photopigments – photoreceptor spectral sensitivities and visual adaptations. In Hunt D, Marshall J (eds) *The evolution of visual and non-visual pigments* Springer, 137-162

〔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

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：木下充代

ローマ字氏名：Michiyo Kinoshita

研究協力者氏名：松下敦子

ローマ字氏名：Atsuko Matsushita

研究協力者氏名：Finlay Stewart

研究協力者氏名：Matti Weckstroem

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。