

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06342

研究課題名（和文）反対色細胞を基盤とする色覚生成機構の解明

研究課題名（英文）Color vision mechanisms based on color opponent cells

研究代表者

関 洋一（Seki, Yoichi）

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：30634472

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、脊椎動物とも多くの機能構造的共通性を持つショウジョウバエの視覚系を用い、色覚生成機構の神経基盤の解明を目指した。電気生理学的手法を用い、高次視覚ニューロンの波長応答特性に関する最初の報告を行った。多くのニューロンは広帯域の波長の光に興奮性の応答を示し、全体の応答パターンを解析すると紫外領域と中波長領域の波長の分離が確認された。また、色識別の行動実験系を確立し、光の波長および明るさの識別における各光受容体の寄与について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年モデル生物であるショウジョウバエを用いた神経科学的研究が急速に進展しており、様々な脳の機能が神経回路との対応で明らかになっている。これらの研究は、生物が持つ感覚のしくみの理解やヒトなどの哺乳類の複雑な脳の理解にも大きく貢献する。

多くの生物が色覚を持つが、脳内における光の波長や明るさの情報が処理されるしくみは未解明な部分が多い。本研究では、高次視覚神経の光応答の計測や色識別の行動解析により、ショウジョウバエをモデルに色覚のしくみを理解するための基盤となるいくつかの重要な情報を提供した。

研究成果の概要（英文）：This research aimed to reveal the neural basis of color vision using the *Drosophila* visual system, which has many functional and structural similarities with vertebrates. By using electrophysiological approaches, we reported the first detailed wavelength response properties of higher visual neurons in *D. melanogaster*. Many neurons showed excitatory responses to broadband wavelengths while UV and middle wavelength ranges were separated by the population level analysis. We established a visual learning behavioral experiment and examined how each photoreceptor contributed to the wavelength and intensity discrimination.

研究分野：神経行動学

キーワード：色覚 ショウジョウバエ パッチクランプ 電気生理 反対色性 色識別 光受容体

1. 研究開始当初の背景

動物は外界の光環境から、少数の異なる分光感度(波長特異性)を持つ光受容体を使って、色世界を見ることが出来る。色の見え方の違いは、異なる分光感度を持つ光受容細胞の活動の組み合わせにより決定される。色覚とは、光の強さによらず波長の違いを識別できる能力のことである。波長の違いを識別するためには、少なくとも2つ以上の分光感度の異なる光受容細胞からの入力と比較する機構、つまりあるタイプの光受容細胞からの入力には興奮性の、別のタイプの光受容細胞からの入力には抑制性の応答を示すような反対色細胞(color opponent cell)の存在が必要であると考えられている。色覚情報処理の本質を理解するためには、この反対色細胞の信号生成機構およびその後の情報統合機構を理解する必要がある。

脊椎動物と昆虫の間には、少数の異なる分光感度を持つ光受容体による色識別機構の存在や視覚情報処理経路の機能構造的共通性が明らかにされている(Sanes, Zipursky Neuron 2010)。サルやヒトなどでは、3つの異なる分光感度を持つ光受容体による色弁別(trichromacy)があり、それぞれ青、緑、赤の波長帯域に分光感度のピークを持つ光受容細胞の活動の組み合わせが、色覚の基盤をなしている。光受容細胞からの情報は、網膜の神経回路を経て修飾され、網膜からの出力である神経節細胞において、青-黄、または緑-赤の波長の光に対し、反対の極性の応答を示す2つのタイプの反対色細胞の存在が報告されている。さらに、網膜からの情報は外側膝状体の小細胞層や顆粒細胞層で中継され、一次視覚野であるV1野、さらにV2野、V4野から下側頭皮質(IT)で処理されていく。ところが、これらの領域で色覚が形成される神経基盤については未解明である。

昆虫の色覚に関する研究では、これまでハチ類、チョウ類、ハエ類などで光受容細胞の性質や色識別能についてよく調べられている。種によって可視波長範囲および光受容細胞の数は異なるが、3-6種類程度の分光感度の異なる光受容細胞を持ち、色覚を生成していると考えられている。昆虫の初期視覚中枢である視葉は、脊椎動物の網膜と類似の回路構成を持ち、視葉板(lamina)、視髄(medulla)、視小葉(lobula)、視小葉板(lobula plate)から構成される。ショウジョウバエには、分光感度の異なる5つのタイプの光受容細胞が存在し、広帯域の光波長に感受性のあるR1-R6という光受容細胞の軸索は視葉板に投射し、介在神経により視髄と接続する。一方、紫外、青、緑領域のより狭い波長に感受性をもつR7,R8の光受容細胞の軸索は直接視髄へと投射する。これらの情報は、視髄の介在神経(Tmニューロン)を介し、視小葉へと投射される。さらに、視小葉からの情報は、高次視覚中枢であるOptic glomeruliという特徴的形狀を持つモジュール構造へと投射する。ショウジョウバエの色覚情報処理に関しては、2次神経細胞以降の電気生理学的な解析がほとんどなされていない。

また、本研究の開始とほぼ同時期に Schnaitmann らによりショウジョウバエにおいて最初の反対色性の応答およびその生成機構が発表された(Schnaitmann et al. 2018 Cell)。光受容細胞の軸索末端において、同じ個眼に属するR7,R8の細胞がヒスタミン受容体のHisCl1を介して、相互に抑制する機構があることを示したものである。(関連する研究と本研究の成果との考察については、4.(5)を参照)。この視細胞の軸索末端における反対色応答が初期視覚中枢でどのように処理され、高次中枢へと投射されるのか、またその情報処理と色識別との関係を解明するのが次の課題である。

2. 研究の目的

本研究では、脊椎動物に比べ数的にシンプルな神経回路構造を持つショウジョウバエの視覚系をモデルに、色覚生成機構の神経基盤を解明することを目的とする。特に、反対色応答を示す神経細胞を回路の中で同定し、それらの細胞が反対色応答を生成する神経メカニズムと反対色細胞からの情報がその後どのように統合されていくかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) in vivo ホールセルパッチクランプ法

In vivo で微分干渉顕微鏡下に固定し、後頭部を切開した標本に対し、脳表面の細胞体をコラゲナーゼ酵素処理によって露出し、標的の細胞にホールセルパッチクランプを行った。標的細胞の膜電位を記録しながら、複眼にモノクロメーターとキセノン光源より構成される光刺激装置から1秒間の光刺激を行った。光刺激は300nm-650nmの範囲で25nmごとに波長間での光子数を揃えた15波長の刺激を15秒置きに照射し、300nmからの昇順と650nmからの降順を交互に繰り返した。初期の実験では、遺伝子組み換え系統を用いて蛍光標識された視髄の2次ニューロンや視小葉からの出力神経を標的に記録を試みたが、細胞体の小ささや標識神経の少なさから安定的な計測が確立できなかった。そこで、細胞体サイズのもう少し大きい初期視覚中枢から高次視覚領域のニューロンを対象に、ある程度ランダムに標的細胞を定め、波長応答特性

の計測を行った。その内のいくつかのニューロンに関しては、ガラス電極からピオサイチンを注入し、形態の染色を行った。記録後脳を解剖し、シナプス部に対する抗体を用いた脳全体の染色とともにニューロンの免疫染色を行い、共焦点顕微鏡によりニューロンと脳領域の形態画像を取得した。

(2)カルシウムイメージング

GAL4-UAS システムを用いて、標的細胞に GCamp6 または 7 を発現させた系統をかけ合わせにより作成し、標的細胞から光刺激に対する応答の記録を行った。後頭部を露出させた標本を顕微鏡下に固定し、複眼に光刺激を照射した時の蛍光強度変化を測定した。

(3)光の波長と明るさの識別に対する熱忌避学習実験

ショウジョウバエ約 50 匹をチャンバーに入れ、トレーニングでは、クールプレートの熱により下からチャンバー内の温度をコントロールし、上から単色の LED 光を照射した。2 つの異なる LED 光と忌避温度または正常温度の組み合わせで、1 分ごとに条件を入れ替え、これを 6 回繰り返した。テストでは、対角線上に交互に色を配置し、それぞれの領域にいるハエの数を数え、Preference Index を計算した。さらに光と温度のペアリングが異なる組み合わせの実験を行い、2 つの Preference Index から Learning Index を算出した。Learning Index では、もともとの光の選好性は相殺され、学習によって識別できた割合が算出される。

(4)識別モデルと行動実験の結果の比較

実験に用いた LED 光の波長と強度を計測し、ショウジョウバエの持つ光受容体の感度から各光受容体における光子補足量を計算した。行動実験の結果を参照しながら、光受容体の組み合わせによる反対色性や各光受容体の重みについて、最適なモデルの検討を行った。

4. 研究成果

(1)高次視覚ニューロンの波長応答特性

ホールセルパッチクランプ法を用いて光波長応答特性をショウジョウバエの *in vivo* で記録するための方法を確立し、高次視覚ニューロンから記録を行った。光刺激に対する発火パターンの違いから、興奮 ON-OFF、興奮 ON、抑制の 3 つの応答タイプに分類した。さらに、波長応答特性について解析した結果、特定の波長で興奮、別の波長で抑制されるような典型的な反対色応答はみられず、広帯域の波長の光に興奮性の応答を示すものが多かった (図 1)。主成分分析を用い、細胞集団全体で波長応答の違いを分析したところ、紫外領域 (300-375nm) と中波長領域 (425-575nm) の波長で分離がみられた。いくつかのニューロンは視小葉や視小葉板のニューロンであることが形態的に同定された。これらの結果をまとめ、ショウジョウバエにおける高次視覚ニューロンの波長応答特性として報告した (Yonekura et al. 2020 J Comp Physiol A)。

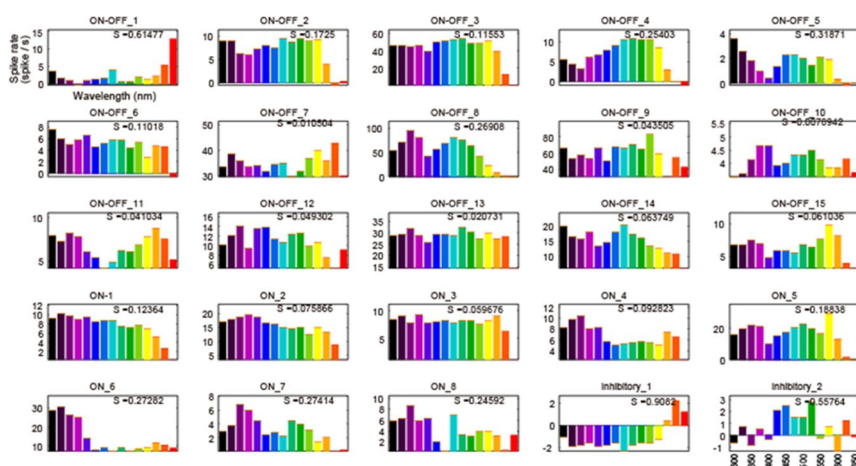


図 1. 記録したニューロンの波長応答特性の例。各光波長の刺激に対する刺激期間 1 秒間における発火数を応答強度として示している。

(2)ケニオン細胞の波長応答特性

ホールセルパッチクランプ法の適用が難しい細胞体が小さなニューロン群を対象に、カルシウムイメージング法による波長応答特性の計測を行った。視髄にある二次ニューロンからは、自発活動や光刺激に対する応答がみられたものの、波長応答特性が評価できるほどの明確で安定的な応答の計測ができなかった。また、先行研究において色識別に関与が報告されている γ d-ケニオン細胞の応答の計測に成功した。紫外から可視領域のいくつかの波長の光刺激に対する応答が得られ、特に紫外領域の光に強い応答がみられた。

(3)波長と明るさの識別能

菫、青、緑、黄、橙、赤の 6 種類の波長の LED を用い、すべての波長の組み合わせに対する

野生型のハエの識別能を調べた。堇、青、緑の短い波長から中間の波長の組み合わせは識別できたが、緑、黄、橙、赤の中間から長い波長の組み合わせは識別できなかった。次に各波長の光に対して、明るさの違い(100% vs 10%)に対する識別能を調べた。緑と橙の波長で識別がみられた。

(4)各光受容体の寄与の解明

行動実験の結果に基づき、光の波長と明るさの識別と光受容体との関係を調べるため、各光受容体の光子補足量に基づく識別モデルを作成した。さらに、光受容体変異体を用いた行動実験により、光受容体の寄与について検証した。これらの結果から、明るさの識別には R1-6 の関与が、波長の識別には R7, R8 の関与が強いことが示唆された。

(5)今後の展望

本研究では、電気生理学的アプローチとして、*in vivo* ホールセルパッチクランプ法を高次視覚ニューロンに適用し、300nm-650nm まで 25nm ほどの光刺激を用い、これまでにない精度でショウジョウバエの高次視覚ニューロンから光の波長応答特性を記録した。ミツバチを中心とした先行研究では、比較的少数の波長の光刺激を用いて、広帯域の波長に応答するタイプに加え、狭帯域の波長の光への応答するタイプや反対色応答を示すタイプのニューロンが多数報告されている (Hempel de Ibarra et al. 2014 J Comp Physiol A)。これらの違いについては、今回の研究では高次視覚ニューロンのうちの一部のサンプリングに留まっているため、他に特定の狭い波長に反応するニューロンや反対色反応をするニューロンが存在する可能性や、花の色を識別する高度な色覚を有するミツバチと色に関する具体的な行動が報告されていないショウジョウバエとでは、色覚情報処理の脳内における回路がかなり異なっている可能性なども考えられる。

それと関連して、本研究では行動学的アプローチとして、色識別の学習実験を行い、光の波長と強さの識別に関する光受容体の寄与について考察した。その結果では、ミツバチやアゲハなどに比べると、ショウジョウバエの色識別能はあまり高くない可能性が示唆された。また、明るさの識別と波長の識別に関与する光受容体の組み合わせにミツバチとの類似性もみとめられた。ミツバチでは、物体までの距離(視角の大きさ)により明るさの識別と波長の識別の優先度が切り替わる機構が示唆されている。ショウジョウバエにおいても、明るさと波長のコントラストをどのように利用しているのか、またその神経機構を明らかにするのが今後の課題である。

本研究期間と並行して、ショウジョウバエにおける反対色反応に関するいくつかの重要な報告があった。一つは、同じ個眼に属する R7, R8 の光受容細胞の軸索末端において相互に抑制する機構があること (Schneitmann et al. 2018 Cell)。次に、個眼内の相互抑制だけでなく、Dm9 という水平細胞に類似したニューロンを介した個眼間での反対色反応形成機構があること (Heath et al. 2020 Curr Biol)。さらに、Dm8 という視髄での介在神経が紫外線と可視光の光刺激に対し、反対色反応を示すこと (Pagni et al. 2021 Curr Biol)。そして、Dm8 の反対色反応は空間的な反対色性も持っており、R1-6 からの入力と R7, R8 からの入力が複雑に収束していることが示唆された (Li et al. 2021 Curr Biol)。本研究では、これらの視髄における介在神経や出力ニューロンの反応はとらえることができなかったが、さらに高次の視小葉や中央脳におけるニューロンの波長応答特性を報告した。今後は、視髄で形成される反対色生成機構の理解を踏まえ、これらの間をつなぐ神経回路およびより体系的なマッピングを行うことが、色覚をはじめとする波長情報の処理の理解に重要である。

また、これまでの昆虫の色覚に関する研究では、空間情報はほとんど考慮されていない。Liらの研究で空間情報と波長情報の double opponent cell のような性質のニューロンが見つかったことから (Li et al. 2021 Curr Biol)、色の空間コントラストを抽出する機構が存在する可能性が示唆される。そのような色コントラストの視覚刺激に対する明確な行動発現系を見出すこと、さらにそのような刺激に対応する神経反応機構を計測し、神経回路の情報処理機構を明らかにすることが今後の重要な課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yonekura T, Yamauchi J, Morimoto T, Seki Y	4. 巻 206
2. 論文標題 Spectral response properties of higher visual neurons in <i>Drosophila melanogaster</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Physiology A	6. 最初と最後の頁 217,232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00359-019-01391-9	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 三沢 智行、山内 淳司、森本 高子、関 洋一
2. 発表標題 ショウジョウバエの色覚に関する高次ニューロンの機能解析
3. 学会等名 NEURO2019（第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学会大会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三沢 智行、山内 淳司、森本 高子、関 洋一
2. 発表標題 Identification and functional analysis of higher order neurons underlying color vision in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第41回東京大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関洋一
2. 発表標題 ショウジョウバエをモデルとした嗅覚と色覚の神経情報処理機構の解明
3. 学会等名 第11回分子高次脳機能研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関洋一、米倉太郎、鳥居塚康広、三沢智行、善財綾香、山田瑞紀、佐伯梨々子、山内淳司、森本高子
2. 発表標題 Neural circuits underlying color vision examined by physiological and behavioral approaches in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第40回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関 洋一、米倉 太郎、森本 高子、山内 淳司
2. 発表標題 Spectral response properties of higher visual neurons and mechanisms of photoreceptor contributions to wavelength and luminance discrimination in <i>Drosophila melanogaster</i> .
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第42回山形大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関 洋一、米倉 太郎、森本 高子、山内 淳司
2. 発表標題 ショウジョウバエにおける高次視覚神経の波長応答特性と波長と輝度の識別に対する光受容体の寄与のしくみ
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020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

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
---------	---------