

平成 29 年 4 月 10 日現在

機関番号：12702

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650117

研究課題名(和文)複眼進化研究の新機軸：視細胞のdeep homology

研究課題名(英文)New direction of evolutionary study of compound eyes: deep homology of photoreceptors

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：多くの昆虫複眼は2タイプの個眼を含むが、チョウではこれが3タイプである。これは訪花性への適応なのか？この疑問に答えるため、複眼の形成過程をチョウとハエで比較した。ハエでは、全個眼で調節因子Prospero(Pros)がR7細胞に発現する。Prosはチョウでは個眼当り2細胞に発現していた。チョウではR7が重複したらしい。ハエの個眼多様性は、R7にSpineless(Ss)が発現するか否かで決まる。チョウ個眼ではSs陽性細胞数が2か1か0で、3タイプの個眼に対応すると考えられた。実際ssの機能を止めると、全個眼に紫外受容細胞が2個できた。複眼の分光学的多様性は視細胞数の増加と関係あるようだ。

研究成果の概要(英文)：Compound eyes of many insects consists of two spectrally-heterogeneous ommatidia. The number is three in butterflies and bees, making their eyes spectrally richer. Is this an adaptation for having better color vision in flower-visitors? We addressed this question by comparing the eye development in flies and butterflies. A transcription factor Prospero (Pros) is expressed in a short-wavelength receptor, R7, in all ommatidia in flies. We found Pros is expressed in two cells per an ommatidium in butterflies: R7 seems to be duplicated. Ommatidial heterogeneity is detected in flies by stochastic expression of Spineless (Ss) in R7. In butterflies, two R7-like cells express Ss in three patterns, on/off, on/on and off/off, as if they correspond to three ommatidial types. In fact, butterflies whose ss gene is knocked-out have only the UV-UV type ommatidia. It thus appears that the spectral richness of butterfly eyes is associated with duplication of R7-like cell in the process of adaptation.

研究分野：神経行動学、感覚生理学

キーワード：複眼 視細胞 進化 発生 ショウジョウバエ チョウ類 調節因子 国際研究者交流

## 1. 研究開始当初の背景

複眼を構成する個眼では、数個の視細胞が光受容部位としての「感桿」を形成している。視細胞の数は種を越えてほぼ安定しているが、感桿の構造には著しい多様性がある。感桿の構造は、視細胞の分光感度などにも強い影響を与える重要な形質である。本研究では、レンズ系と細胞内光情報伝達系に偏った複眼の進化研究に、視細胞の深部相同性 (deep homology、あるいは進化的相同性) を新機軸として加えて個眼構造の多様性を評価、複眼の進化に関する研究を一段と深めることを目指した。

地球上に生息する動物の約7割が昆虫と言われる。彼らの視覚器はどれも複眼である。つまり複眼は圧倒的多数派で、ゆえに多様性も著しい。個眼は、レンズ系と光受容系からできている。複眼はレンズ系の構造によって連立型 (昼行性型) と重複型 (夜行性型) に大別される。光学的には連立型が“進化的に古い”とされるが、昆虫の行動は夜行性が原型とも言われる。例えば連立型に、単純型・無限遠焦点型・神経重複型などがあるのは、祖先が昼と夜とを行き来したことと関係がある。一方、最近の研究で、光受容系にも様々な多様性が見つかっている。1つの個眼には8~9個の視細胞が作る感桿があって、この構造が種特異的であるのみならず、個体の中でも多様性があり、多様な個眼の配列パターンにも、規則的な種とそうでない種とがある。

以上のような背景の中で私は、個眼構造の多様性を生んだ進化的背景に分子レベルで切り込む本研究を行った。

## 2. 研究の目的

視細胞の deep homology は、視細胞の形成過程で発現する転写因子をたどることで調べられる。複眼の形成過程はショウジョウバエで詳細な研究があるため、私はショウジョウバエとチョウを比較することで、この問題に取り組んだ。

昆虫複眼には、分光学的な性質の異なる個眼がランダムに分布している。ショウジョウバエには2タイプの個眼が、チョウ類には3タイプが存在する。視細胞の分光感度という点から見ると、ショウジョウバエよりもチョウ類のほうがより複雑で、これは、訪花行動と色覚機構との間に深い関係があるためと考えられる。

さらに、ひとつの個眼に含まれる視細胞の数はショウジョウバエで8つ、チョウ類では9つである。チョウで一個眼あたりの視細胞数が多いことが、より複雑な色覚系の進化になにか決定的な役割を果たしている可能性がある。ショウジョウバエの8個の視細胞のうち、どれがチョウで重複しているのか、視細胞の重複と個眼タイプが2から3に増えたことにどのような関係があるのか、分子レベルで明らかにした。

## 3. 研究の方法

### (1) トランスクリプトーム解析

ショウジョウバエ個眼には6つの広帯域受容細胞 (R1-6) と、2つの色覚細胞 (R7,8) とが存在する。R7とR8は個眼によって分光感度に違いがあり、この性質が個眼タイプを決めている。個眼が形成されるとき、視細胞の前駆体細胞にはそれを特徴づける転写因子がいくつか発現する。そのひとつが Prospero で、すべての個眼の R7 に発現する。Spineless は約半数の個眼でのみ R7 に発現し、これが2タイプの個眼のランダムな配列に対応している。Senseless はすべての個眼の R8 で、Spalt はすべての個眼で R7 と R8 の両方に発現する。

アゲハとヒメアカタテハでこれらの転写因子に相同な遺伝子を、トランスクリプトーム解析で同定する。

### (2) 組織学的免疫組織化学

同定した遺伝子がコードするタンパク質に特異的な抗体を作成、抗体を用いて蛹期の複眼原基で免疫組織化学を行う。Prospero を発現する細胞はショウジョウバエの R7 に対応すると考えられる。また、Prospero 発現細胞に、Spineless を発現するものとしないうちがあると考えられ、それがチョウ類における個眼タイプと対応していると予測できる。

### (3) 遺伝子編集による遺伝子機能解析

Spineless の発現パターンが個眼タイプと対応していた場合、spineless 遺伝子をノックアウトすると個眼タイプに変化が見られると期待される。CRISPR-Cas9 法をアゲハに適用し、この点を確認する。

## 4. 研究成果

### (1) チョウでは色覚細胞が1つ増えている

アゲハの5日目蛹から複眼原基を取り出し、抗 Prospero 抗体で染色したところ、1個眼当たり2個の細胞が免疫陽性を示した (図1A)。抗 Senseless 抗体で染まる細胞は1個眼あたり1つだった。つまり、アゲハ個眼ではショウジョウバエの R7 に相当する細胞がひとつ重複していることが分かった。

抗 Spineless 抗体による染色からは、染まる細胞の数が個眼によって2個、1個、0個の3パターンが認められた。いずれも抗 Spalt 抗体で染まるものと同様だったため、これはアゲハで重複した R7 視細胞であることが分かった (図1B)。Spineless の発現パターンはおそらく3つの個眼タイプと関連していると思われた。

同様の結果は、タテハチョウ科に属するヒメアカタテハでも得られた。

## (2) Spineless が個眼タイプと対応している

生まれて3時間以内のアゲハ卵に、*spineless* 遺伝子をノックアウトするようにデザインしたコンストラクトを注射、孵化した幼虫に柑橘の生葉を与えて蛹まで育てた。

*spineless* 遺伝子がノックアウトされた個体では触角の形成に不全が見られるが、複眼は外見上は正常だった。複眼の内部構造を詳細に観察、野生型と比較した。CRISPR 処理したものの中には、複眼に野生型の領域とノックアウト領域とが混在するモザイク個体も見られた。野生型で発現する Spineless (図 1 B) は、ノックアウトではもちろん発現していない。

アゲハ複眼に発現する5種の視物質のうち、紫外 (UV)、青 (B)、緑 (G) 2型の3種の分子に対する抗体を用いて、免疫組織化学的に個眼タイプを同定した。野生型では1個眼に UV 細胞が2個あるもの、UV 細胞と B 細胞が1個ずつあるもの、B 細胞が2個あるものが認められる。また、UV 細胞が2個あるものには G 視物質を弱く発現する視細胞が4個含まれる一方、B 細胞が2個があるものにはこれら4個の視細胞での G 視物質の発現が強かった。これらの視物質発現パターンは、野生型アゲハ成虫の3つの個眼タイプとよく一致する。

ノックアウト個体では、全ての個眼に UV 視物質を発現する視細胞が2個ずつ含まれており、一方で B 視物質の発現は全く見られなかった。野生型では、このタイプの個眼は、感桿周囲の色素は赤く、UV 線射で励起される蛍光色素が含まれる。ノックアウト個体では、すべての個眼が赤い色素を持ち (図 1 C)、UV 照射で蛍光を発することも分かった (図 1 D)。

以上の結果から、チョウ類の分光学的に複雑な複眼は、その発生過程で色覚細胞が1つ重複することによって作られることが分かった。3タイプの個眼のランダム分布を作り出す分子メカニズムは、ショウジョウバエ複眼で2タイプの個眼をランダムに分布させているものと、基本的には共通である。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕 (計2件)

1. 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
2. Arikawa K (2017) The eyes and vision of butterflies. *Journal of Physiology*, in press

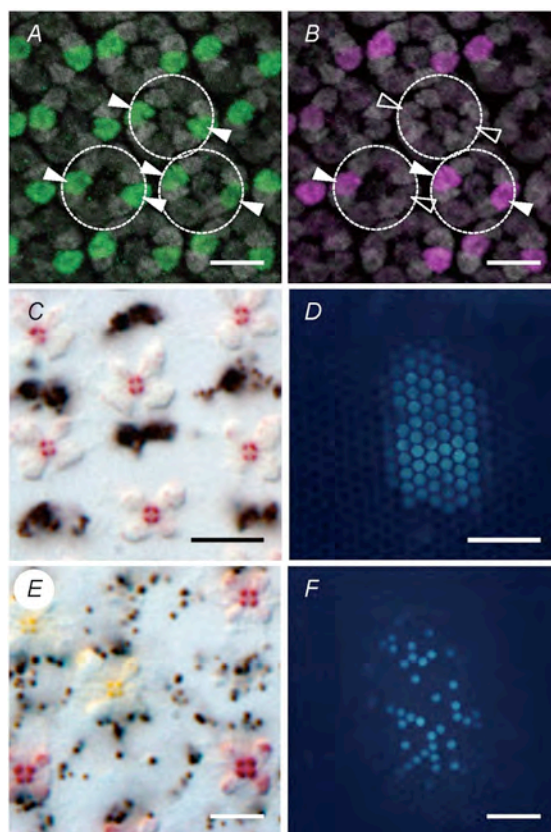


図 1 A) アゲハ蛹複眼原基の抗 Prospero 抗体による染色。一個眼あたり2個の細胞が染まっている。B) Aと同じ切片。抗 Spineless 抗体による染色。Prospero 陽性細胞が染まるが、染まる細胞の数は、2個、1個あるいは0個である。C) CRISPR-Cas9 による *spineless* 遺伝子ノックアウト個体の複眼切片。すべての個眼に赤い色素がある。D) Cと同じ個体の複眼を、UV 落射照射の蛍光顕微鏡で撮影したもの。すべての個眼が蛍光を発する。E) 野生型アゲハの複眼切片。個眼色素は赤または黄色。F) Eと同じ個体の蛍光写真。蛍光を出す個眼と出さない個眼がランダムに分布している。Arikawa 2017 より。

### 〔学会発表〕 (計5件)

1. 蟻川謙太郎: チョウ類視覚系とその性差. ワークショップ「昆虫学のこれから」, 第38回日本分子生物学会年会, 2015年12月、神戸 (招待講演)
2. 蟻川謙太郎: チョウ類複眼の細胞構成と色覚に関する研究. 日本比較生理生化学会第37回大会, 2015年12月、広島 (学会賞受賞講演)
3. 蟻川謙太郎、Michael Perry、Claude Desplan: アゲハ短波長視細胞とショウジョウバエ中心視細胞の deep homology. 日本動物学会第86回大会, 2015年9月、新潟 (一般口頭発表)
4. Arikawa K: Adaptive color vision in flower-visiting insects. Symposium “Insect Adaptations: Current Trends” 22nd International Congress of Zoology, November, 2016, Okinawa (招待講演)

5. Arikawa K: The eyes and vision of butterflies. 1<sup>st</sup> interdisciplinary UK phototransduction/synaptic transmission workshop, August 2016, Sheffield UK (招待講演)

〔図書〕 〔産業財産権〕 該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

蟻川謙太郎 (ARIKAWA, Kentaro)  
総合研究大学院大学先導科学研究科・教授  
研究者番号： 20167232

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 海外研究協力者

Michael Perry  
JSPS Post-doctoral fellow / New York University,  
Post-doctoral fellow