

色受容ユニットの配列パターンと視覚機能

「形とはたらき」領域 蟻川 謙太郎

1. 研究のねらい

昆虫は世界をどのように見ているか？この質問にさまざまな角度から取組みながら、視覚メカニズムに関する理解を深めることを目指しました。とくに複眼の構造と視覚機能の関連を考えながら研究を進めました。研究のポイントは色覚におき、研究対象にはチョウ類を選びました。

チョウ類はさまざまな花を訪れて蜜を吸います。チョウの求蜜行動を観察していると、チョウは花の色をあきらかに識別しているように見えますが、これを証明した研究はありませんでした。そこで私はチョウは本当に色を見ているのかどうかをまず調べ、そこから複眼の構造・機能の解明へと研究を発展させました。一連の研究の過程で、たとえばひとつの視細胞に2つ以上の視物質が発現していること、個眼は内部に含まれる色受容細胞の組合わせに多様性があることなど、これまで視覚生理学の分野で定説とされていたことが覆るような結果も得られました。

2. 研究方法と結果

昆虫の見る世界を探るために、行動学、神経生理学、組織学、生理光学、分子生物学、コンピュータシミュレーションなど、さまざまな方法を応用して研究を進めました。

2-1 求蜜行動中のアゲハの色覚と色恒常性

アゲハが色を見ているのかどうかを知るには、アゲハの行動を直接調べる必要があります。そこでアゲハの求蜜行動を指標に、色覚の有無を確かめました。

サナギから羽化してまだ一度も蜜を吸った経験のない個体に、ある色の色紙で作った円板の上で1日1回蜜を与えます。アゲハはほどなく円板を学習し、空腹になると自分が吸蜜した経験のある色の円板を、自発的に訪れるようになります。

ここでたとえば青、緑、黄、赤の色紙で作った円板をそれぞれ一枚ずつならべ、空腹のアゲハに提示すると、黄色の紙で蜜を吸っていた（＝訓練された）アゲハはほとんど間違いなく黄色の色紙に飛んで行き、口吻を伸ばします。訓練を他の色紙でやっても結果は同様に、

きちんと訓練された色紙を訪れるので、アゲハは蜜源として色紙を学習したということがわかります。さらに、学習した色紙をさまざまな明るさの灰色の中に置いてみると、アゲハは必ず色紙を選択します。この実験で、アゲハは色紙の色相、明度、彩度のうち、色相を弁別したということが証明できました。

視覚には不思議な現象が多くあります。色の恒常性と呼ばれる現象はそのひとつです。赤いりんごは、太陽光の下でも蛍光灯の下でも、赤く見えます。太陽光と蛍光灯から出る光の波長分布は大きく違い、そのためにりんごから反射される光も全く違います。にもかかわらず認識される色は赤、これが色の恒常性です。アゲハは晴天でも曇天でも花蜜を吸います。それを思えばアゲハにも色の恒常性があるべきです。

そこで、実験室の照明にさまざまな色のフィルターをかけ、色の選択性がどのように変わるかを調べました。結果は明瞭で、どのような色のフィルターの下でも、アゲハは訓練された色の色紙を正確に選ぶことがわかりました。橙と赤のような微妙な色のペア（赤いフィルターをかけた橙は、白色光下での赤と同じ反射スペクトルになる）を使った実験でも、赤で訓練されたアゲハはきちんと赤を選びました。もしアゲハに恒常性がなければ、赤で訓練されたアゲハは赤フィルターの下では橙を選ぶはずで、むしろあまり濃いフィルターをかけ

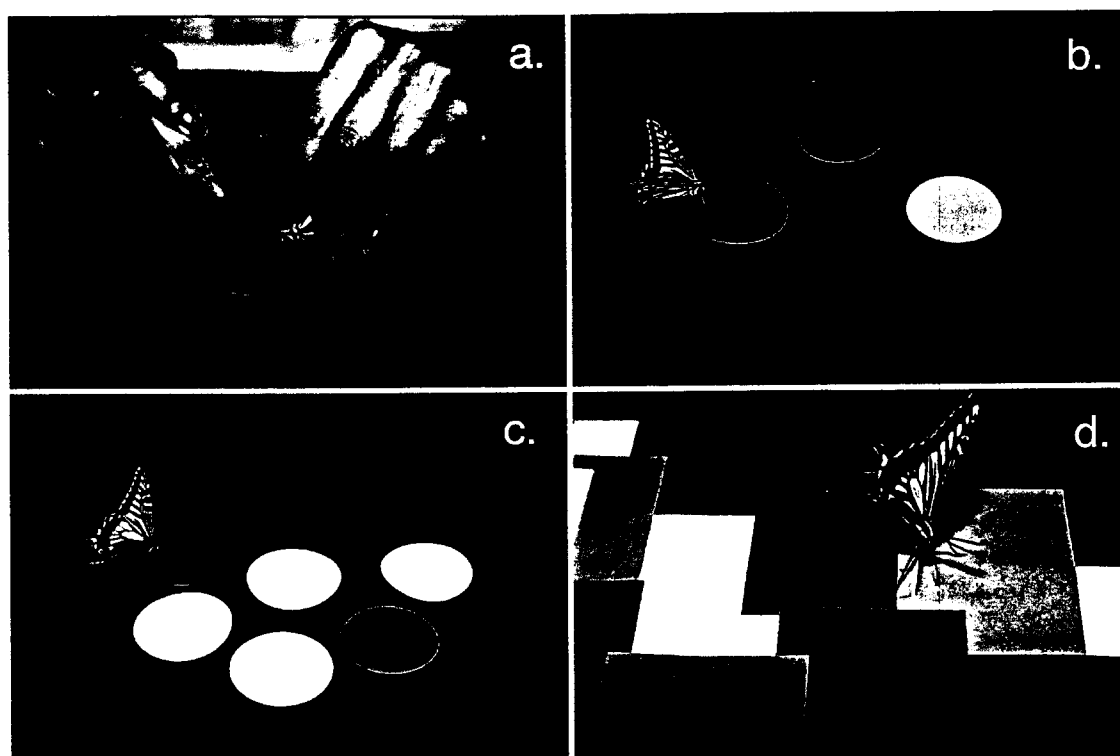


図1 アゲハ色覚の行動実験。a. 色紙の上で青を学習させる。b. 4色パターンの上で選択実験。c. 学習色をさまざまな明るさの灰色の中に置き、選択実験。d. カラーモンドリアン上で選択実験。色の恒常性のテストに使う。写真の個体は黄色を学習したもの。

ると色の選択はできなくなりますが、これは我々も日常的に経験することです。従って、アゲハにもかなりきちんとした色の恒常性があると結論されました。

2-2 網膜の細胞構成

動物が色覚をもつためには目に少なくとも2種の色受容細胞が存在する必要があります。ヒトの場合、網膜に3種類の細胞があって、それぞれ青、緑、赤に感度が高くなっています。これがヒトの3原色の基礎になります。アゲハの複眼には、紫外線、紫、青、緑、赤の5種類の細胞があることは、以前から明らかになっていました。

アゲハ複眼には約12,000個の個眼があります。ひとつの個眼には9個の光受容細胞が含まれ、9個の光受容細胞はそれぞれが上の5種類の細胞のどれかに相当します。電気生理実験でこの対応を調べた結果が図2です。この結果は、実は意外なものでした。例えば、視細胞1番と2番には、紫外線、紫、青の3種が対応しています。これは個眼によって含まれる色受容細胞が異なるということの意味しています。個眼というものはどれも同じというこれまでの考え方には合わないのです。

個眼に種類があるのなら、どのような種類がどう分布しているかが当然の疑問として出てきます。複眼の構造を丹念に調べると、個眼には色フィルターがかかっており、その色が赤

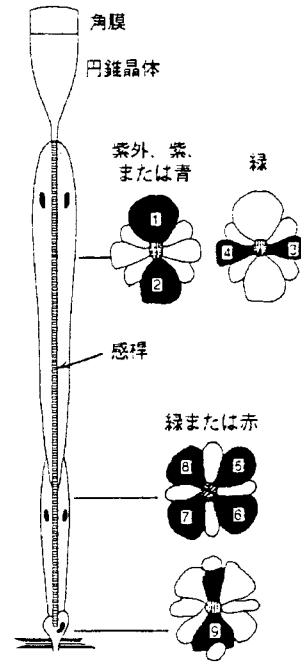


図2 アゲハ個眼の模式図。ひとつの個眼には9個の光受容細胞がある(1~9)。それぞれの色受容タイプは電気生理学的に決められた。

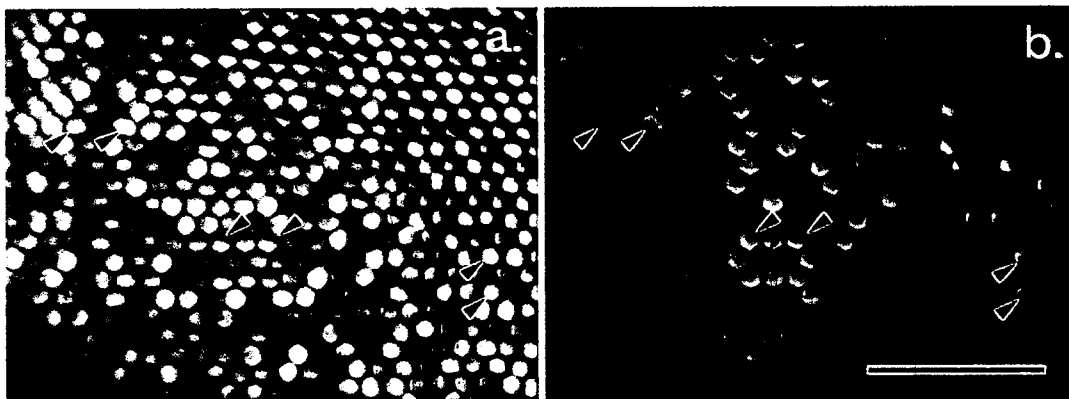


図3 アゲハ複眼における色フィルター。複眼を角膜から約200ミクロンの深さで切り取った標本。a. 切り口側から白色光で照明したところ。b. 同じ標本をUV落射照明で蛍光を見たところ。蛍光を発する個眼はaの写真で白っぽく見える個眼に対応する(矢頭)。スケール=200ミクロン。

いものと黄色いものとが混在していることがわかりました (図3 a)。赤い個眼の中には、UVの下で蛍光を発するものがあることもわかりました (図3 b)。本研究の中で、複眼構造に関する部分はこのあたりがスタートとなりました。

2-3 個眼における蛍光の起源

ここではアゲハ複眼の構造に関する研究を蛍光を発する個眼に絞って説明します。まず個眼蛍光の起源について考えます。

目の中には、蛍光の起源となり得る物質がいろいろあります。当初は視物質類がその起源と考えて実験しましたが、すっきりした結果は得られませんでした。次に考えた可能性はレチノール (ビタミンA) 類でした。ある論文の“アゲハ複眼には多量の3-OHレチノールが含まれている”という記述を思い出したので、アゲハ複眼から改めて3-OHレチノールを抽出、UV下で蛍光スペクトルを測定しました。そのスペクトルは個眼の蛍光スペクトルとほぼ重なりました。

3-OHレチノールはアゲハ複眼にどのような状態で存在するのでしょうか。これを明らかにするために、アゲハ網膜に含まれる3-OHレチノール結合タンパク質について調べました。阪大の尾崎浩一助教授との共同研究です。

非変性条件下でアゲハ網膜粗抽出物を電気泳動したところ、水溶性分画にUVで蛍光を発するバンドが現れました (図4)。このバンドを切り出してビタミンA類を抽出、高速液体クロマトグラフィーで分析すると3-OHレチノールが大量に検出され、これがいわゆるレチノール結合タンパク質であることがわかりました。さらに、ゲルから抽出されたタンパク質のアミノ酸部分配列を調べ、それをもとにRT-PCRを行なって全長の塩基配列を決定しました。塩基配列から予測されたアミノ酸配列は、既知のレチノイド結合タンパク質のどれとも相同性が低く、新規のタンパク質であることがわかりました。

しかしまだ、このタンパク質が3-OHレチノールを伴って蛍光個眼に局在するという証拠はなく、従って個眼蛍光との直接の関係は明らかではありません。いま更に研究を進めているところです。



図4 アゲハ網膜粗抽出物の水溶性分画を、非変性条件下で電気泳動したもの。UV照射によって強い蛍光を発するバンドが1本観察される。

2-4 蛍光個眼と紫受容細胞

ここでは仮に、蛍光の起源が3-OH レチノールであると仮定します。この3-OH レチノールという分子は、ハエの複眼では増感色素として知られているものです。ハエ類の青感受性視物質には本来の発色団（3-OH レチナール）の他に3-OH レチノールが1分子結合していて、これがUVのエネルギーを吸収して発色団に転移するため、この視物質を含む視細胞は青のみならずUVに対しても高い感度を示すようになるのです。ところが増感色素はハエ以外には全く見つかりません。従って、アゲハ複眼の3-OH レチノールは何か別の機能を持っていると考えるべきです。

そこで増感作用とは全く逆に、アゲハ複眼では3-OH レチノールがUV遮蔽フィルターとして機能していると考えてみました。この仮定に基づいて蛍光個眼の中で起こる光学的な現象のシミュレーションをしてみると、面白いことがわかりました。

紫受容細胞の分光感度は他の細胞のものに比べて極端に幅が狭く、分光感度の極大である400nmに最大吸収をもつ視物質の吸収スペクトルとは全く重なりません。一般に、光受容細胞の感度スペクトルをきめる主要因は視物質の吸収スペクトルなので、多くの場合、両者はおおむね一致します。一致しない場合、何かそこに別の要因があることになります。

シミュレーションモデルに、蛍光個眼の視細胞1、2番にUV吸収型視物質を入れ、さらに3-OH レチノールにUV吸収フィルターとしての機能を持たせてみたところ、面白いことに紫受容細胞の細い分光感度が予測されたのです。これは、紫受容細胞はUV受容細胞にUV吸収フィルターがかかった結果として生じたものである、ということの意味しています。もしもこの仮定が正しければ、紫受容細胞はかならず蛍光個眼に存在するはずですが、逆に、UV受容細胞は蛍光のない個眼になくはないことになります。

これを確かめるには、ガラス電極にルシファーイエローという蛍光色素を詰め、紫受容細胞に刺して分光感度を記録します。記録後、細胞にルシファーイエローを注入します。色素を注入した複眼をそのまま蛍光顕微鏡にセットし430nmの励起光で観察すると、色素が注入された細胞を含む個眼は黄色く光ります。この写真を撮ったあとで励起光をUVに切り替え、個眼蛍光を撮ります。2枚の写真を比べれば、紫受容細胞を含む個眼が蛍光個眼であるかどうか確かめられるわけです。

そのような実験の結果の一例が、図5です。図5

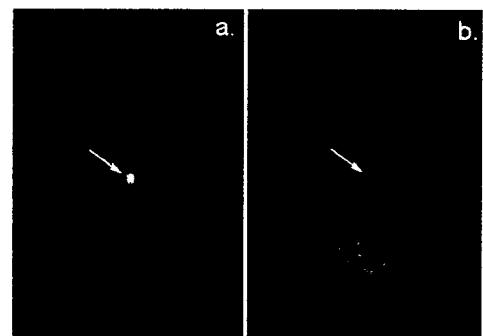


図5 紫受容細胞を含む個眼は、UVの下で蛍光を発する蛍光個眼である(矢印)。

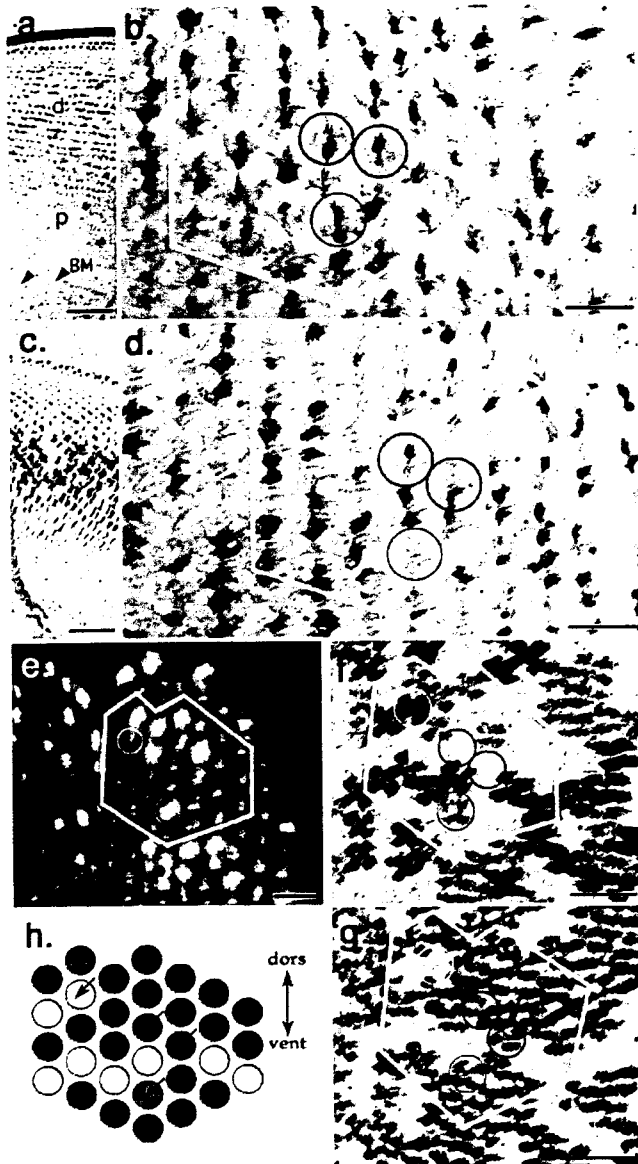


図6 視物質 mRNA の in situ ハイブリダイゼーション。a と c 以外は、ひとつの複眼の同じ部位から得られた切片。白い多角形は同じ個眼を示す。a と b. UV 受容型視物質 mRNA の分布。複眼網膜の遠位部 (d) のみに発現し、近位部 (p) には発現していない。遠位部では、1、2 番視細胞両方に出る個眼 (ピンク)、どちらか片方に出る個眼 (赤) どちらにも出ない個眼 (黄) の 3 タイプが認められる。c と d. 青受容型視物質 mRNA の分布。遠位部のみに発現。発現パターンは、UV 型と完全に相補的。e. in situ ハイブリダイゼーション前の切片を UV 落射照明で撮影したところ。個眼蛍光が見える。ピンクの個眼が蛍光個眼である。f. 緑受容型視物質 mRNA の分布。個眼近位部。5 ~ 8 番の細胞が濃く染まる個眼 (黄)、薄く染まる個眼 (ピンク)、染まらない個眼 (赤) がある。g. 赤受容型視物質 mRNA の分布。個眼近位部。緑受容型が発現していない個眼 (赤) はすべて染まる。加えて、ピンクの個眼 (= 蛍光個眼) の 5 ~ 8 番も染まっている。h. 3 つの個眼タイプ (赤、黄、ピンク) は図 2 a に見える色と対応している。ピンクは、白く見える個眼に対応する。

a がルシファーイエロー、5 b が UV での蛍光です。紫受容細胞は必ず蛍光個眼に発見されました。同じ実験を UV 受容細胞でも行ない、UV 受容細胞は蛍光を出さない個眼に存在することも確かめることができました。

ところで、ここにはもう一つ重要な仮定があります。UV 受容細胞と紫受容細胞が、UV 受容型の視物質を共有しているとしたことです。これを証明するために、分子生物学の手法でアゲハ網膜から UV 受容型と紫受容型の視物質 cDNA をクローニングしました。これらの mRNA を含む視細胞を in situ ハイブリダイゼーションで調べた結果、UV 受容細胞と紫受容細胞に UV 受容型視物質の mRNA が発現していることがわかり、物質レベルでもこの仮定が確かめられたこととなります (図 6)。

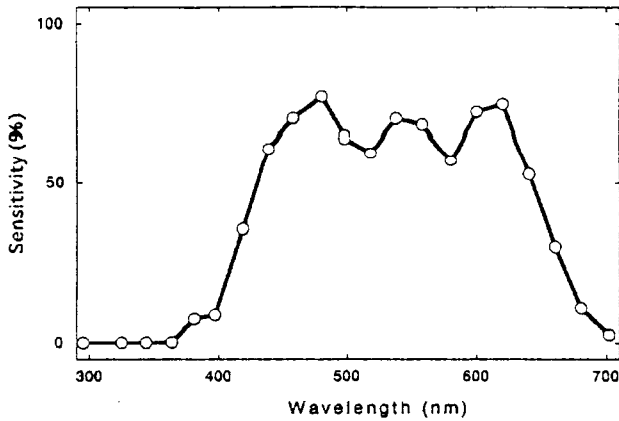


図7 A細胞の分光感度曲線。感度の半値幅が異常に広い。当初はアーチファクトと考えていたが、これは単一細胞の反応に由来するものであることがわかった。

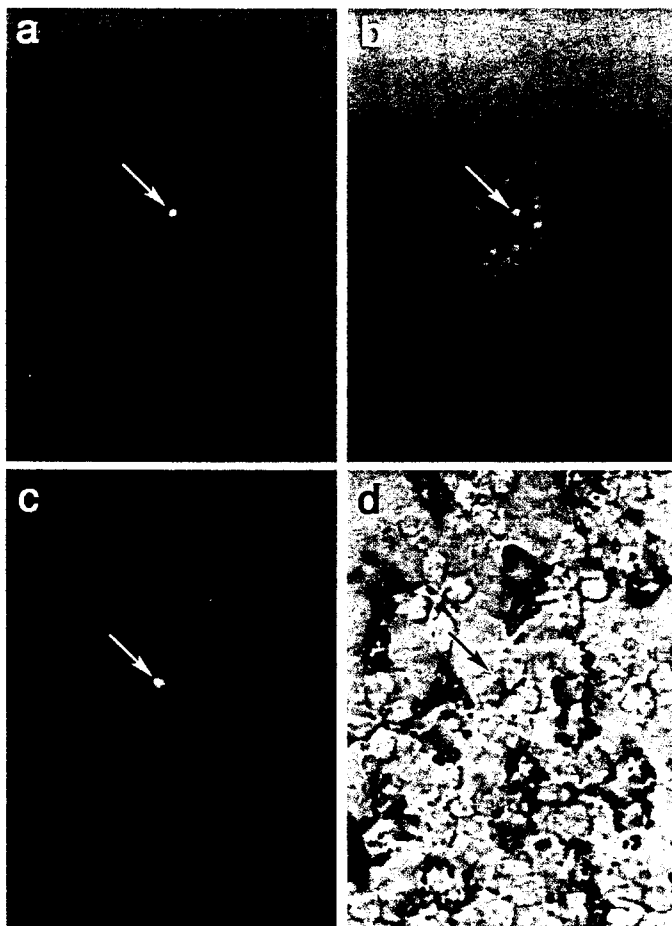


図8 A細胞の組織学。a. A細胞に蛍光色素ルシファーイエローを注入し、複眼を紫の励起光で見たところ。ひとつの個眼が光っている。b. 同じ標本のUV落射照明写真。個眼蛍光が見える。aで染色されていた個眼は蛍光を出す個眼である。c. 同じ複眼の切片の紫励起蛍光写真。d. 同じ切片の微分干渉顕微鏡像。A細胞を含む個眼には、赤い色素がある。

2-5 視物質重複発現とA細胞と蛍光個眼

視覚生理学では、ひとつの視細胞には1種類の視物質のみが発現しているとするのが一般的です。しかし本研究ではこの定説に合わない結果が得られました。

図6 fとgに見られるように、ある個眼の5～8番視細胞には緑受容型と赤受容型の2種類の視物質mRNAが同時に発現しています。

2つの視物質を重複発現していることの、機能的意義は何でしょうか？

実は以前から、視細胞分光感度の電気生理記録に、可視光の非常に広い範囲に高い感度をもつものが混ざっていることに気づいていました(図7)。当初は、これは2つ以上の視細胞の反応が同時に記録されたものと考えていましたが、今回の研究ではこれを視物質重複発現と関連づけて調べ直しました。その結果、この分光感度は、蛍光を発する個眼の5～8番の視細胞

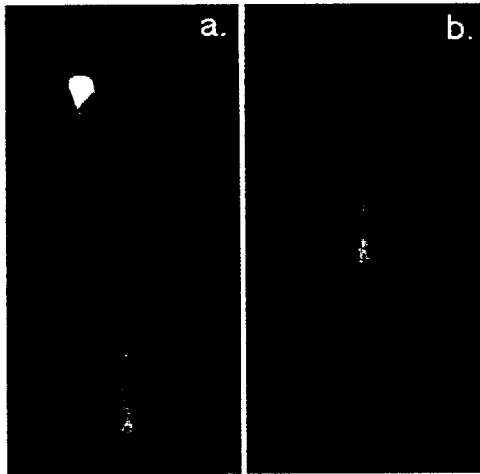


図9 アゲハ視葉板単極細胞 (LMC)。電気生理学の記録をとった後、色素注入で染色したもの。a. 視葉板での形態。b. 視髄での軸索末端の形態を示している。

から記録されることがわかりました (図8)。図6に示すとおり、蛍光個眼の視細胞5~8番には2種類の視物質が重複発現しています。図7の分光感度には可視光領域での感度の幅広さがあります。これはまさに3-OH レチノールのUV遮蔽効果によるものです。このような実験事実に基づき、私たちはこの細胞をA細胞 (異常に広い分光感度を持つ視細胞 / Photoreceptor cell with abnormally broad spectral sensitivity) と名付けました。

3. 今後の展望と展開

今後の展開でもっとも重要な方向のひとつが、視覚中枢における情報処理機構の解明です。ヒトを含む動物がいかにして色を感じるのかという問題は、研究の歴史が古いわりには重要な、特に神経生理学的な知見が欠落しています。その理由のひとつに、脊椎動物脳の複雑さが研究の進展を阻んでいるという実情があります。もしもヒトと同じような色覚機能がもっと“小さな”脳をもつ動物で研究できれば、色覚の一般的機能の研究がニューロンレベルで大きく進展することが期待できます。本研究では、アゲハには色の恒常性があることが示され、更に複眼網膜の細胞構成について非常に詳細な知見が蓄積されました。ここまで詳しく複眼の構造がわかった昆虫はアゲハだけです。色覚の神経機構の研究に、アゲハのこのようなメリットを最大限に生かしたいと考えています。

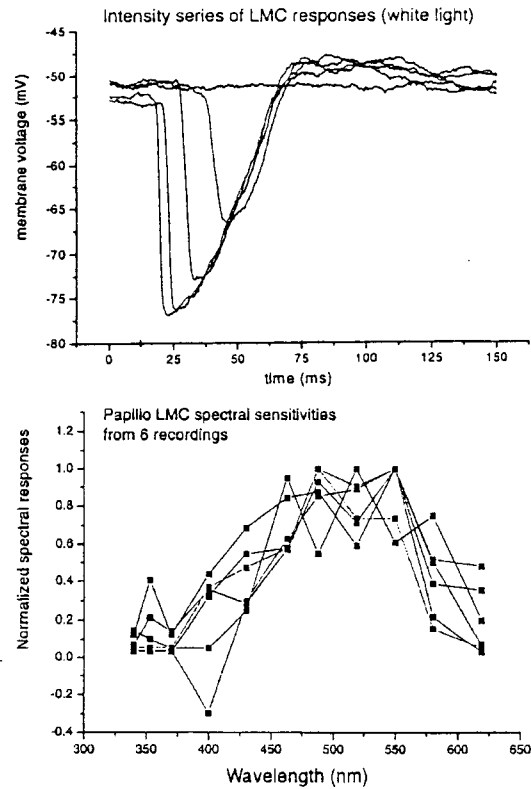


図10 アゲハ LMC の反応。左は、白色光の強度を変化させて記録した実際の反応の一例。右は、6個の細胞からそれぞれ記録した分光感度。

そのような視点に立って、本研究で私は視葉板（第一次視覚中枢）の細胞構成とそこに存在する視覚2次ニューロンの分光感度特性を調べる実験を始めました。

この実験はまさに手探り状態でのスタートでしたが、最近になってようやく、視葉板の単極細胞（Large Monopolar Cell, LMC）の反応が細胞内誘導できるようになりました。反応を調べたのちにルシファーイエローを注入した LMC の一例が図9です。視葉板と網膜基底部の間に細胞体を持ち、視葉板内で受容突起を伸ばしています。軸索は第二次視覚中枢である視髄まで到達し、その遠位層で終末しています。

図10は、実際に記録された LMC 反応の例です。ハエなどで知られているように、光照射に対して過分極性の応答をします。反応の振幅を指標として細胞の分光感度を測定したところ、どの細胞もかなり広い波長範囲で感度がありました。一方で、紫外線領域における反応の有無など、分光感度の細胞ごとの違いも明らかです。今後、網膜で見つかった3種の個眼と視葉板細胞構成との対応がついてくると、LMCの分光感度にきちんとした生理学的な説明を与えることができるようになります。

その他、生得的な色好みに性差があること、偏光振動面の違いを色として識別しているらしいこと、紫外線も求蜜行動となんらかの関係があることなど、面白い現象が次々に発見されました。まだひとつひとつは小さな発見ですが、これを大切に、注意深く検討しながら、重要な現象を解明する足掛かりとしたいと考えています。

4. 外部発表リスト

4-1 論文

- 1) Kinoshita M, Arikawa K (2000) Colour constancy of the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. J Exp Biol, in press.
- 2) Kitamoto J, Ozaki K, Arikawa K (2000) UV receptors and violet receptors express identical mRNA encoding an UV-absorbing opsin: Identification and histological localization of two mRNAs encoding short wavelength-absorbing opsins in the retina of the butterfly, *Papilio xuthus*. J Exp Biol, in press.
- 3) Arikawa K (2000) Hindsight of butterflies. Bioscience, in press
- 4) Matsushita A, Arikawa K, Eguchi E (1999) Appearance of opsin-containing vesicles as rhabdomeral precursors and their incorporation into the rhabdom around dusk in the compound eye of the crab, *Hemigrapsus sanguineus*. Zool Sci, 16: 25-34

- 5) Arikawa K, Scholten DGS, Kinoshita M, Stavenga DG (1999) Tuning of photoreceptor spectral sensitivities by red and yellow pigments in the butterfly *Papilio xuthus*. Zool Sci, 16 : 17-24
- 6) Kinoshita M, Shimada N, Arikawa K (1999) Colour vision of the foraging swallowtail butterfly *Papilio xuthus*. J Exp Biol, 202 : 95-102
- 7) Arikawa K, Mizuno S, Scholten DGW, Kinoshita M, Seki T, Kitamoto J, Stavenga DG (1999) An ultraviolet absorbing pigment causes a narrow-band violet receptor and a single-peaked green receptor in the eye of the butterfly *Papilio*. Vision Res, 39 : 1-8
- 8) Kitamoto J, Sakamoto K, Ozaki K, Mishina Y, Arikawa K (1998) Two visual pigments in a single photoreceptor cell: Identification and histological localization of three mRNAs encoding visual pigment opsins in the retina of the butterfly *Papilio xuthus*. J Exp Biol, 201 : 1255-1261
- 9) Arikawa K, Stavenga DG (1997) Random array of colour filters in the eyes of butterflies. J Exp Biol, 200 : 2501-2506
- 10) Arikawa K, Suyama D, Fujii T (1997) Hindsight by genitalia: Photo-guided copulation in butterflies. J Comp Physiol A, 180 : 295-299
- 11) Kinoshita M, Sato M, Arikawa K (1997) Spectral receptors of nymphalid butterflies. Naturwiss, 84 : 199-201
- 12) Liu X, Wu T, Stowe S, Matsushita A, Arikawa K, Naash MI, Williams DS (1997) Defective phototransductive disk membrane morphogenesis in transgenic mice expressing opsin with a mutated N-terminal domain. J Cell Sci, 110 : 2589-2597
- 13) Matsushita A, Arikawa K (1997) Actin-based vesicular transport in the first 20 min after dusk is crucial for daily rhabdom synthesis in the compound eye of the grasshopper crab *Hemigrapsus sanguineus*. J Exp Biol, 200 : 2387-2392

4 — 2 国際学会等招待講演

- 1) Hindsight of swallowtail butterfly: structure and function of photoreceptors on the butterfly genitalia. Symposium "Animal Senses-the leading edge" 24th Annual meeting of Japan Neuroscience Society, Sept 2000, Yokohama, Japan.

- 2) Random retina and color vision in butterflies. Official Seminar of the University of Lund, June 2000, Lund, Sweden.
- 3) The molecular basis of butterfly pentachromatic colour vision. In Symposium "How do flies see the world with their compound eyes?" 4th Dutch Endo-Neuro Meeting, June 2000, Park Hotel De Branding, Doorwerth, the Netherlands.
- 4) A detective story in the butterfly eye. ロレアル賞受賞者講演 第3回ロレアル賞授賞式 2000年1月 マイヨール美術館, パリ.
- 5) Ommatidial heterogeneity in butterflies. Official Seminar of the Free University of Berlin, October 1999, Berlin, Germany.
- 6) Color vision and retinal randomness of the Japanese yellow swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. International School of Biophysics on "Vision : The Approach of Biophysics and Neurosciences", October 1999, Naples, Italy.
- 7) Random array of color receptor units in the compound eye of the butterfly *Papilio* International Workshop on-the "Interface between systems brain science and neuroethology" September 1999, 仙台市福祉プラザ, 仙台.
- 8) What do butterflies "see" with their genitalia? International School of Biophysics on "Vision : The Approach of Biophysics and Neurosciences", October 1999, Naples, Italy.
- 9) Biological function of the genital photoreceptors of the butterfly *Papilio xuthus* August 1999, National Taiwan University, Taipei, Taiwan.
- 10) Color vision and compound eyes of butterflies August 1999, Academia Sinica, Taipei, Taiwan.
- 11) Color vision and compound eye structure of the butterfly, *Papilio xuthus* 第1回国際社会性昆虫学会日本支部会シンポジウム "昆虫のコミュニケーションと社会行動" 1998年10月, 滋賀県立大学, 彦根.
- 12) Randomness of the retina of the butterfly, *Papilio xuthus* : Basis for color vision? In Symposium "Color vision of Invertebrates" 26th Goettingen Neurobiology Conference, March 1998, Goettingen Germany.

外部発表83件 (論文13件, 総説・解説23件, 国際学会等招待講演12件, 国内学会等招待講演13件, 国内外口頭発表 : 22件)