

視細胞間シナプスがつくる波長対比性の神経行動学的解析

Spectral opponency in photoreceptors :

neuroethological analysis

課題番号 : 18H05273

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



研究の概要

色覚に優れたアゲハを用い、色覚の神経機構とその進化を探る。カギになるのは、視覚一次中枢で見られる視細胞間シナプスである。これは色覚が貧弱なショウジョウバエには無い構造で、色覚初期の波長情報処理に重要な役割を担っている可能性がある。生理実験で機能を解明するとともに、数種の昆虫で視葉板の細胞構成を比較することで色覚の進化について考察する。

研究分野：動物生理学、感覚生理学、神経行動学

キーワード：昆虫、色覚、視細胞、視葉板、波長対比性

1. 研究開始当初の背景

アゲハは色覚能力に極めて優れている。ヒトのRGB3原色にUVを加えた4色性で、その感度はヒトよりも鋭い。複眼にある多様な色受容細胞で捉えられた光の波長情報が、視覚中枢で処理される機構を調べる過程で、第一次視覚中枢である視葉板で、分光感度の異なる視細胞が長い側枝を出し、互いにシナプスで繋がっていることが分かっていた。アゲハに見られる長い側枝や視細胞間シナプスは、ショウジョウバエには無い。また、ショウジョウバエの色覚は非常に貧弱である。

アゲハが鋭い色覚を持ち得るのは、視細胞の長い側枝とシナプス結合が、初期の波長情報処理で何か重要なはたらきを担っているのではないかと考え、この研究を始めた。視葉板神経回路の比較研究から、昆虫における色覚機構の進化についても検討する。

2. 研究の目的

昆虫視細胞の伝達物質として同定されているのはヒスタミンのみである。視細胞から出たヒスタミンは二次ニューロン LMC に発現するヒスタミン感受性 *Cl* チャンネルによって受容され、LMC を過分極させる。視細胞に類似のシナプスがあれば、分光感度の異なる視細胞の結合は、波長対比性を作ると期待される。実際、波長対比性はチョウ類複眼で記録されることがある。本研究ではここに着目し、主としてアゲハで、①視細胞間シナプスは波長対比性を作るか？②波長対比性は LMC にどう伝達されるか？の2点について、徹底した実験的研究を行う。また、色覚の進

化過程を解明する狙いで、色覚機能が全く異なるアゲハとショウジョウバエで視葉板神経回路が大きく違うことに着目、数種の昆虫で視葉板神経回路を詳細に調べる。

3. 研究の方法

神経回路の解明には、本研究で導入した高解像度連続ブロック表面走査型電子顕微鏡 (SBF-SEM) を使う。SBF-SEM で連続電顕像を取得、個々のニューロンを手動または自動でトレースして、神経連絡を詳細に調べる。

視細胞末端や LMC の反応は、ガラス微小電極を用いた細胞内記録法で調べる。反応を記録したあとで細胞内に色素を注入、神経細胞の形態も合わせて明らかにする。

視細胞や LMC のシナプス機能は、チャンネル分子の生理的解析と局在解析で調べる。チャンネル候補分子を発現させた培養細胞にパッチクランプ法を適用してチャンネルの性質を調べる一方、特異的抗体を使って組織内局在を調べる。さらに CRISPR-Cas9 法でチャンネルをノックアウトした個体を作り、神経回路、生理的反応、行動への影響を調べる。

4. これまでの成果

チャンネルの解析：アゲハ視覚中枢で発現するヒスタミン感受性 *Cl* チャンネルを 2 種類 PxHCLA と PxHCLB を同定した。生理学的測定の結果、いずれもヒスタミンと高濃度の GABA に反応すること、A よりも B の方が感度が高いことが分かった (論文 7)。さらに、免疫組織化学では A は視細胞と LMC のシナプスに、B は視細胞間シナプスに発現するこ

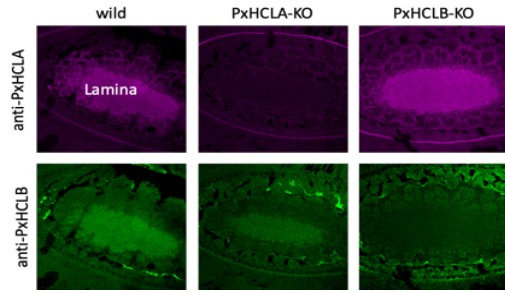


図 1) CRISPR-Cas9 によるチャンネルノックアウトの効果は、特異的抗体による視葉板 (Lamina) の染色で確認した。

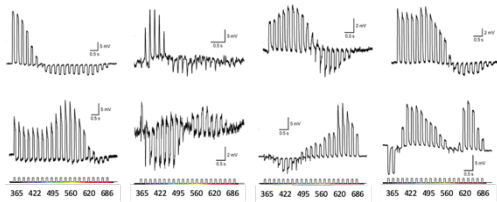


図 2) アゲハ視細胞終末で同定された 8 種の波長対比性反応。それぞれ、網膜における 8 種の色受容細胞に対応すると考えられる。

とを確認した (論文 6)。チャンネルをノックアウトしたアゲハについては、G0 世代で遺伝子編集の効果が確認できた (図 1)。

波長対比性：ガラス微小電極を用いた神経生理学の手法で、視細胞末端および LMC 軸索から分光感度を記録した。結果、視細胞からは少なくとも 8 種類の波長対比性反応が記録された (図 2、論文 2)。LMC の波長対比性反応は希だった。

視髄の動き知覚ニューロンの色感受性：予期していなかった成果として、視髄で記録される動き知覚ニューロンに色コントラストに反応するものがあることが分かった。昆虫の動き知覚は一般に単色とされてきたが、今回の結果はこれに一石を投じる結果で、今後の進展が期待される。

視葉板神経回路の比較解剖：これまでに 7 種の昆虫から視葉板の連続電顕画像を取得した。トレースの自動化を目指して、現在、深層学習を用いた手法を準備中である。

5. 今後の計画

アゲハ視葉板コネクトーム：アゲハ視葉板では個眼 8 個分のトレースがほぼ完成した。視細胞と LMC がつくる回路をまとめ、波長対比性反応の理解につなげる。

LMC の分光感度と形態の解析：コネクトーム解析で明らかになった LMC の形態と、細胞の分光感度の対応は未だ明らかではない。細胞内記録・色素注入法で解明する。

LMC 反応の空間特性の解析：高速光刺激提示装置を用いて、光刺激を空間上の様々な場所から与える生理実験を行う。ある個眼への、周辺個眼からの入力を解析する。

視髄ニューロンの生理と形態：昆虫の動き検知ニューロンでは初めての色感受性について、より詳細に解析・検討する。反応の発現機構を解明するため、視髄遠位層の神経回路を連続電顕画像で調べる。

チャンネル KO 個体の解析：G0 世代の成虫を用いて解剖学および生理学的解析を進める一方、行動実験を行うために、null 系統の確立を目指す。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Nagloo N, Kinoshita M, Arikawa K (2020) Spectral organization of the compound eye of a migrating nymphalid, the Chestnut tiger butterfly, *Parantica sita*. *J Exp Biol* 10.1242/jeb.217703
2. Chen P-J, Belušič G, Arikawa K (2019) Chromatic information processing in the first optic ganglion of the butterfly *Papilio xuthus*. *J Comp Physiol A* 10.1007/s00359-019-01390-w
3. Saito T, Koyanagi M, Sugihara T, Nagata T, Arikawa K, Terakita A (2019) Spectral tuning involving helix III in butterfly long wavelength-sensitive visual opsins revealed by heterologous action spectroscopy *Zool Lett* 10.1186/s40851-019-0150-2
4. Blake AJ, Pirih P, Qiu X, Arikawa K, Gries G (2019) Compound eyes of the small white butterfly *Pieris rapae*, have three distinct classes of red photoreceptors. *J Comp Physiol A* 10.1007/s00359-019-01330-8
5. Stewart F, Kinoshita M, Arikawa K (2019) Monopolar motion vision in the butterfly *Papilio xuthus*. *J Exp Biol*, 10.1242/jeb.191957
6. Chen P-J, Matsushita A, Wakakuwa M, Terai Y, Arikawa K (2019) Immunolocalization suggests a role of the histamine-gated chloride channel PxHCLB in spectral opponent processing in butterfly photoreceptors. *J Comp Neurol*, 10.1002/cne.24558
7. Akashi HD, Chen P-J, Akiyama T, Terai Y, Wakakuwa M, Takayama Y, Tominaga M, Arikawa K (2018) Physiological responses of ionotropic histamine receptors, PxHCLA and PxHCLB, to neurotransmitter candidates in a butterfly, *Papilio xuthus*. *J Exp Biol*, 10.1242/jeb.183129

7. ホームページ等

http://www.esb.soken.ac.jp/research/index.html#kentarou_ariakawa