

Title	昆虫が触角を失ったときの視覚の感受性の変化
Author(s)	炭廣, 仁志
Citation	令和元(2019)年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書. 2020
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/75975
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

2019年度大阪大学未来基金【住野勇財団】学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな氏名	すみひろ ひとし 炭廣 仁志	学部 学科	理学部生物科学 科生物科学コース	学年	2年
ふりがな 共同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	長谷部政治先生	所属	大阪大学理学研究科		
研究課題名	昆虫が触角を失ったときの視覚の感受性の変化				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				
1. 動機・目的・実験の概要					
<p>目の不自由なヒトにおいて音の反響を利用して周りの様子を知ることができる、音程を聞き分ける能力が向上している、という話がある。実際にこのような例についていくつか研究報告があり、それらの研究では脳の情報の処理を行う領域を変化させることによって感覚を補償していると報告している。例えば、聴覚情報の入力が無くなったネコは聴覚野を視覚情報の処理に用いているとされている。しかし、感覚の補償について、ほ乳類以外での研究は行われておらず、また上記のような脳の処理の変化がどのようにして行われるのか詳しいメカニズムについては分かっていない。この研究では、昆虫は感覚を補償する能力を持っているかどうか、またそのメカニズムについて調査することを目的とした。</p> <p>ソヘリカメムシでは先行研究より数種類の光受容体が同定され、それが複眼で発現していることが判明している。また、触角は昆虫にとって重要な感覚受容器であるため、触角を失うとホソヘリカメムシは外部環境の情報を得る重要な手段を失うと考えられる。以上の理由から、この研究では触角を失ったときの光感受性の変化に着目して実験を行った。</p> <p>「行動」と「光受容体遺伝子の発現量の変化」の2つのアプローチで研究を行った。</p>					
2. 行動実験 1					
<p>カメムシは触角で嗅覚情報を、複眼で視覚情報を受容して餌を探索していると考えられる。触角の切除によって嗅覚情報を受容できなくなるあるいは感受性が低下すると、餌の探索が難しくなり、餌に辿り着くまでの時間が長くなると考えられる。嗅覚の欠損(減弱)を補償する能力があれば、餌に辿り着くまでの時間の増加が小さくなることが期待される。</p> <p>次に示す行動実験によって、触角を切除したホソヘリカメムシの行動を観察し、比較した。</p>					
2.1. 方法					
<p>触角を切除しなかった個体(WT)、羽化後に(成虫になってから)触角を切除した個体(OR)、羽化前に(成虫になる前、4~5 齢)触角を切除した個体(ORL)、の3群を用意した。OR は羽化後 13 日目に触角を切除した。採餌を行うモチベーションを生むために、実験の前はすべての群につ</p>					

いて7日間絶食した。実験は透明なプラスチックの円筒形のケース(普段飼育に使用しているケース,半径約 10cm,高さ 12cm)で行った(図 1)。ケースに餌場とホソヘリカメムシの個体 1 匹を入れ、餌場に到達して採餌を始めるまでの時間を計測した。餌には、大豆とレッドクローバーの種子(飼育に使用している餌と同じもの)を用いた。餌場とホソヘリカメムシは遠い位置に置くようにし、頭部を餌場と逆の方向に向けた状態で開始した。時間の計測は上限を 15 分とし、15 分以内に採餌を開始しなかった固体は「探索期間内に未到達」とした。実験は 10 時から 12 時の間に行った。

2.2. 結果

結果を積み上げ棒グラフで示す(図 2)。どの実験群もほとんどの個体が探索期間内に未到達となった。全ての群で、期間内に到達した個体の割合は 10%以下であった。

2.3. 考察

予備実験では 15 分以内の到達率が 85.7%であったため、探索期間の設定は適切であると考えている。

本実験で到達率が著しく低下したのは、予備実験は夕方、本実験は昼前に実験を行ったためであると考えられる。ホソヘリカメムシの 1 日の行動リズムの中で昼前と夕方では異なる行動パターンを示すと考えられる。

3. 行動実験 2

行動実験 1 とは異なる条件で実験を行った。行動実験 2 を行うにあたり、いくつかの予備実験を行い、行動実験 1 において予備実験と異なる結果になった原因として、実験を行う時間、実験を行うときの明るさについて検証した。予備実験において、強光ではない条件で、かつ実験に使用する飼育ポットに 1 日置いた個体で実験を行うと到達率 66% (n=3) であったため、行動実験 2 はこの条件で実施した。

3.1. 方法

実験群の設定、絶食の日数、計測時間と評価の方法は行動実験 1 と同じ設定で行った。行動実験 1 と異なる点は、OR 群の触角切除は羽化後日目に行った点、実験実施 1 日前からケースに入れておきそのケースで実験を行った点、16 時から 19 時の間に実験を行った点である。

3.2. 結果

結果を積み上げ棒グラフで示す(図 3)。WT、OR は到達率 0%、ORL は到達率 18%であった。

3.3. 考察

予備実験と条件が全く同じはずの WT 群の到達率が 0%であったことから、予備実験から条件が変わってしまった可能性、到達率の変化が偶然であった可能性が考えられる。

到達率の変化が偶然出会った可能性について検討してみる。様々に条件を変えながら行動の変化が検出できる実験系を検討したことは行動には特に影響がなく、試行回数を増やただけであったと仮定し、予備実験を含めた全ての行動実験の到達率を求めると 27.5%(n=51)となる。行動実験 2 の予備実験における到達率 66%(n=3)になる確率は 16.4%である。この確率はさほど低いものではなく、偶然に現れる到達率として十分考えられるものである。行動実験 1 の予備実験である 85.7%(n=7)が現れる確率は 0.22%であり、偶然ではないかもしれない確率である。行動実験 1 の予備実験のときには満たしていたが他の実験では満たせなかった条件が存在する可能性がある。行動実験 1 の予備実験のときの条件を完全に再現できれば、行動から感受性を検討できる実験系を確立できる可能性がある。



図 1 実験の様子

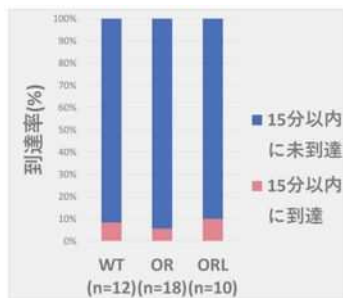


図 2 行動実験 1

15分以内到達率

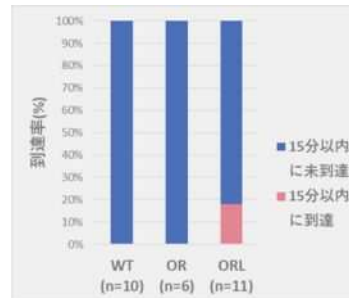


図 3 行動実験 2

15分以内到達率

4. 光受容体の発現量の変化

多くの動物で共通してみられる光受容体として、*Opsin* が知られている。ホソヘリカメムシの複眼では *Rp-LW opsin 1*, *Rp-LW opsin 2*, *Rp-LW opsin 3*, *Rp-SW opsin* の 4 つの *Opsin* が発現していることが分かっている。

ホソヘリカメムシが何らかの方法で光に対する感受性を上昇させて嗅覚の欠損(減弱)を補うとすれば、光受容体の発現量を変化させている可能性が考えられる。

qRT-PCR 法でホソヘリカメムシの複眼に発現する光受容体の発現量の変化を解析した。

4.1. 方法

触角を切除しなかった個体(WT)、羽化後に(成虫になってから)触角を切除した個体(OR)、羽化前に(成虫になる前に)触角を切除した個体(ORL)、の 3 群を用意した。OR は羽化後 13 日目に触角を切除した。また、RNA の抽出は羽化後 23 日目、行動実験の後、12 時から 13 時の間に行った。(各 n=6)

4.1.1. RNA の抽出と逆転写

Opsin の mRNA はホソヘリカメムシの頭部から抽出した。mRNA の抽出には FastGene RNA Basic Kit(50 回分) FG-80050 (Nippon Genetics Co.,Ltd , Tokyo , Japan)を使用し、抽出の手順はキットのスタンダードプロトコルに準拠した。ただし遠心の時間のみ、プロトコルには 30s とあるものを全て 60s に変更した。

逆転写には PrimeScript RNA PCR Kit 50 回 RR014A (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)を使用した。Primer には Oligo dT Primer を選択した。逆転写プログラム終了後、qRT-PCR の実験を行うまで cDNA 溶液は冷凍庫(-20°C)で数日保管した。

4.1.2. qRT-PCR

Standard として、cDNA 溶液を(1倍,)5倍,25倍,125倍,625倍,3125倍に希釈した。Reference 遺伝子には β -*tublin* を用いた。

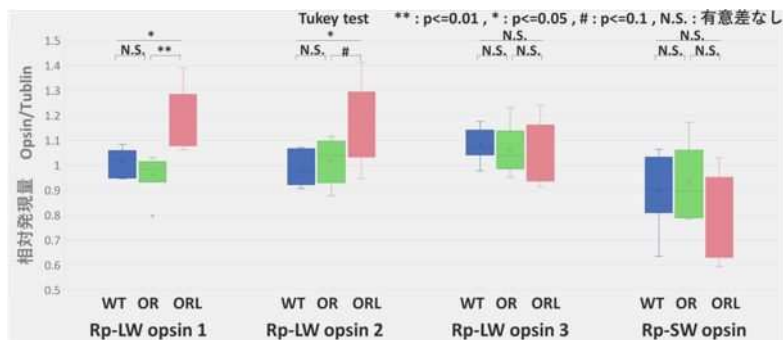
Opsin、 β -*tublin* それぞれについて、Roche FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) 500 μ l, Forward 6 μ M primer 50 μ l, Reverse 6 μ M primer 50 μ l, 滅菌 MilliQ 水 300 μ l を混合した Mixture を調製した。この Mixture を 18 μ l、Standard サンプル又はホソヘリカメムシの cDNA サンプル(10 倍希釈)を 2 μ l ずつ各ウェルに分注した。

PCR は 95°C 10min の後、95°C 15sec, 60°C 1min のサイクルを 40 サイクル繰り返した。その後、95°C 15sec, 60°C 30sec, 95°C 15sec で反応を行った。

Standard サンプルの Ct 値から検量線を描き、各遺伝子の相対発現量を求めた。*Opsin* の発現量を Reference 遺伝子の β -*tublin* の発現量に対して比較し、*Opsin* の発現量が増加したかどうかを調べた。

4.2. 結果

結果を箱ひげ図で示す。縦軸は *Opsin* の発現量(相対値)を β -*tublin* の発現量(相対値)で割った値である(図 3)。ORL 群の *Rp-LW Opsin 1* は、WT 群・OR 群よりも有意に高く発現していた(WT: $p<0.05$, OR: $p<0.01$)。ORL 群の *Rp-LW Opsin 2* は WT 群・OR 群よりも高く発現していた(WT: $p<0.05$, OR: $p<0.1$)。 *Rp-LW Opsin 3* と *Rp-SW Opsin* の発現量には有意な差がなかった。

図 3 各実験群の *Opsin* 発現量

4.3. 考察

ORL 群では WT 群と比較して、長波長の *Opsin* の発現量が増加していたことから、ホソヘリカメムシは触角を失ったときに光受容体の発現量を増加させることによって感覚受容を補償していると考えられる。また、ORL 群では OR 群と比較しても、長波長の *Rp-LW Opsin 1, 2* の発現量が増加していたことから、*Rp-LW Opsin 1, 2* の発現量の変化による感覚補償には長い期間を要する、または補償が行われるのは幼虫期に切除した場合のみであると考えられる。切除からの時間が必要なのか、切除の時期が重要なのかについては、さらなる実験と検討が必要である。

5. まとめ

光受容体の発現量を解析する実験で、ホソヘリカメムシは触角を失ったときに光受容体の発現量が増加した。このことから、昆虫も感覚の補償性を持っていることが示唆された。

今回の行動実験からは補償性の有無については確認できなかった。

6. 展望

光受容体の発現量が増加したことから、複眼における光に対する応答性が上昇していると考えられるため、電気生理学的なアプローチによる研究などが考えられる。

参考文献

- 1) Distribution of opsin-encoding mRNAs in the compound eyes and their knockdown effects on photoperiodism in the bean bug, *Riptortus pedestris*, Kensuke Suzuki (Laboratory of Comparative Neurobiology in Osaka University), 修士論文, 2018
- 2) Mouth-clicks used by blind expert human echolocators – signal description and model based signal synthesis, Liam J. Lore Thaler, Galen M. Reich, Xinyu Zhang, Dinghe Wang, Graeme E. Smith, Zeng Tao, Raja Syamsul Azmir Bin. Raja Abdullah, Mikhail Cherniakov, Christopher J. Baker, Daniel Kish, Michail Antoniou, PLOS Computational Biology, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005670>, Aug.31, 2017
- 3) Pitch discrimination in the early blind, Frédéric Gougoux, Franco Lepore, Maryse Lassonde, Patrice Voss, Robert J. Zatorre & Pascal Belin, Nature vol.430, 2004, pp309-310
- 4) Stephen G Lomber, M Alex Meredith & Andrej Kral, Cross-modal plasticity in specific auditory cortices underlies visual compensations in the deaf, Nature Neuroscience, vol.13 No.11, 2010, pp1421-1429