

修士論文

イカの視覚に関する基礎的研究

～沿岸性種および沖合性種の

網膜構造、視精度、視物質に関する検討～

三重大学大学院生物資源学研究科

博士前期課程 生物圏生命科学専攻

水圏生物生産学講座

水族生理学教育研究分野

牧野 朗彦

目次

緒言	・・・1
第 I 章 網膜構造および視精度と視軸	
1-1. 実験材料と方法	・・・9
1-1-1. 実験材料	
1-1-2. 視細胞外節層の観察	
1-1-3. 視細胞核の密度分布	
1-2. 結果	・・・14
1-2-1. 視細胞のモザイク配列と層状構造	
1-2-2. 視細胞核の密度分布および視軸	
1-2-3. 視精度	
1-3. 考察	・・・18
第 II 章 ロドプシンの最大吸収波長の推定	
2-1. 実験材料と方法	・・・24
2-1-1. 実験材料	
2-1-2. 網膜組織からの totalRNA の抽出	
2-1-3. 1 本鎖 cDNA の合成	
2-1-4. 特異的プライマーによるロドプシン遺伝子断片の増幅	
2-1-5. 電気泳動によるロドプシン遺伝子 cDNA のサイズ分画	
2-1-6. cDNA 断片のプラスミドベクターへのライゲゼーション	
2-1-7. コンピテント細胞へのトランスフォーメーション	
2-1-8. インサートチェック	
2-1-9. プラスミド濃度の測定	
2-1-10. シーケンス	
2-2. 結果	・・・33

2-3. 考察	・・・35
要約	・・・39
謝辞	・・・41
引用文献	・・・42

緒言

イカはコウイカ目 (Sepiida) と ツツイカ目 (Teuthida) の 2 目に大きく分類され、前者は 5 科、後者は 33 科に分けられる。世界には約 450 種のイカが生息すると言われており、その内、コウイカ目コウイカ科 (Sepiidae)、ツツイカ目ヤリイカ科 (Loliginidae)、ツツイカ目アカイカ科 (Ommastrephidae) に属する約 100 種が水産資源として各国で利用されている。日本ではこれらの他に、いずれもツツイカ目に属する、ソデイカ科 (Thysanoteuthidae) のソデイカ (*Thysanoteuthis rhombus*)、ホタルカモドキ科 (Enoploteuthidae) のホタルイカ (*Watasenia scintillans*)、テカギイカ科 (Gonatidae) のテカギイカ (*Gonatus onyx*) など食用として利用されている。このようにイカ類の水産資源としての重要性は高く、イカ類の繁殖生態や行動生態などの漁業生物学に関する研究が古くからなされてきた (添田, 1950; 清水, 1962; 浜部, 1962, 1963, 1966; 笠原, 1968)。

添田 (1950) は、日本近海におけるスルメイカ (*Todarodes pacificus*) の系群について調査を行い、本種は 3 つの季節群に分けられることを明らかにした。すなわち、スルメイカには、12 月～3 月頃に九州南西岸から東シナ海で生まれ、太平洋沿岸と日本海沿岸に別れて北海道まで北上回遊する「冬生まれ群」、9 月～11 月頃に九州西岸から日本海西部沿岸で生まれ、対馬海流にのって日本海を北上し、7 月頃に日本海全域に広がる「秋生まれ群」、および、

6 月頃に山陰から山形、駿河湾など各地域で生まれ、大きな回遊は行わない「夏生まれ型」がいる。一方、浜部(1962)は、スルメイカの繁殖行動や産卵行動を沖合の蓄養生簀で観察するとともに、その発生過程を飼育水槽内で調べた。その結果、スルメイカの交接は日出前後に海の表層で 3~10 秒程度の短い時間で行われ、その後メスが単独で卵嚢の中に卵を排出して卵塊を作ることが明らかにされた。また、ヤリイカ (*Loligo bleekeri*)については、北沢ら(1986)による日本海南西海域で行った成長と成熟に関する調査報告があり、本種の寿命はほぼ 1 年であること、早生まれ個体は成長がよく大型になるが、遅生まれ個体は成長が遅く、成熟により成長が抑制され大型に成長しないことが明らかにされた。さらに和田(2006)は、ヤリイカ科 3 種 [ヤリイカ、ケンサキイカ (*Loligo edulis*)、アオリイカ (*Sepiotuthis Lessoniana*)]とコウイカ科 3 種 [コウイカ (*Sepia esculenta*)、カミナリイカ (*Sepia lycidas*)、シリヤケイカ (*Sepiella japonica*)]の繁殖行動について調べ、いずれの種においても、メスとペアを組むオスの体の大きさが単独でいるオスに比べ大きいことから、これらの種では、体の大きい個体ほど交接において有利であると述べている。また一方で、これら 2 科では、異なった交接戦略をとっているとも述べている。すなわち、ヤリイカ科では小型のオスは交接せずにメスの口唇部に精包をつけるが、大型のオスは交接によりメスの輸卵管の輸卵管開口部に精包を取り付け、受精をほぼ確実にする。

これに対しコウイカ科では、オスは交接の際に、まずメスの口唇部に付着している古い精包を取り除いてから自分の精包をつけ、自分の子孫を残すという戦略をとる。以上のように、スルメイカ、ヤリイカ、およびコウイカは、とりわけ水産的利用価値が高いことから、回遊行動や生殖行動、また、資源量変遷に関する知見がこれまでに多く蓄積されている。また、これらの研究からは、イカ類は種や科によって、行動にさまざまな違いがあることもうかがい知れる。

一方、頭足類の神経系は無脊椎動物の中で最も発達していることから、脳や巨大神経、感覚器等に関する研究も古くから行われてきた。とくに、彼らの大部分は光に対して敏感であること、眼の構造が脊椎動物のそれに類似する「カメラ眼」であり、高度な視覚認識能力を持つ可能性があることなどから、網膜構造や視物質、視覚行動生理等に関する研究が古くからある。

イカの網膜構造についての最初の研究は Zonana (1961) によるもので、視細胞は微絨毛を持ち、4つの視細胞が四方型に並んで感桿を形成することが報告された。Hara and Hara (1965)はスルメイカの網膜構造を観察するとともに、視物質抽出法によるロドプシンの吸収波長を測定している。その結果、ロドプシンの主波長は 480 nm であること、またロドプシンとは異なる視物質(フィロドプシン)も存在し、その主波長は 490 nm であることを報告した。さらにその後、同視物質が微絨毛中に含まれて

いることが明らかにされた (Hara and Hara, 1980)。

頭足類に光や物体を認識する能力があることも古くから知られている。イカが偏光を識別する能力をもつことは Moody and Parriss (1960) の行動実験によって最初に報告された。前述の通り、頭足類の網膜においては、感桿が格子状に規則正しく並ぶことから、偏光の識別は、視細胞外節の微絨毛の構造、およびこれらの薄膜上にあるロドプシンの相互作用によるものであると推定されている (Saidel *et al.*, 1983; Shashar *et al.*, 1996, 2000; Mathger and Denton, 2001)。この偏光識別能力は、彼らの種間におけるコミュニケーションにも利用されている可能性があることが、最近のいくつかの行動実験によって示されている。例えば、Shashar *et al.* (1996) は、ヨーロッパコウイカ (*Sepia officinalis*) の鏡に映った自らの像に対する反応行動について、イカと鏡の間に偏光除去フィルターを置いた場合とニュートラルフィルターを置いた場合とで違いを観察している。その結果、後者の場合では、イカは鏡に映った自らの像に反応を示すのに、前者では反応がなかったことから、彼らは仲間の体表から反射する偏光を見分けることで種を認識している可能性があると推定している。さらに Shashar *et al.* (2000) は、ヨーロッパコウイカの餌生物に対する反応行動についても同様の実験を行い、ニュートラルフィルターを介して餌生物を示した場合は餌に対して高確率でアタックしたのに、偏光除去フィルターを介した場合はほとんどアタックしなかったことから、彼らは偏光を利用することで、逆光の中にいる餌生

物を見分けている可能性がある」と推定している。

また、Mathger and Denton(2001)はイカが仲間を識別する何らかのメカニズムが皮膚の色素胞にあると考え、ホソトガリイカ (*Alloteuthis subulata*)とヨーロッパヤリイカ (*Loligo vulgaris*)を用い、これらの皮膚に対して様々な角度から当てた光の反射光の波長を測定した。その結果、光の入射角度や体表面までの距離によって反射光の波長や強度が変化することを明らかにした。このことから、これら2種では、照射された光の偏光が体表面で反射され、その反射光を種内のコミュニケーションに使っていると推測している。

イカの視機能については、視精度と色覚について、それぞれ1つずつの研究がこれまでに報告されている。視精度に関してはコウイカについての研究がある。Watanuki *et al.*(2000)は、コウイカの餌に対する視認距離から視力を推定している。また、眼に対して様々な角度から光を当てた場合の、“W型”の形状をした瞳孔によって光が遮られる角度範囲から同種の視野を推定している。これらの実験の結果、コウイカの最大視力は0.36であり、水平面の単眼視野は253°、両眼視野は前方で86°、後方で60°であることが報告された。また同時に、組織学的手法による視力の推定も行い、網膜における視細胞核の最大密度と焦点距離から、視精度は0.89であるとの結果を得ている。

イカ類に色覚があることは、唯一、ホタルイカにおい

て示された (Michinomae *et al.*, 1994)。Michinomae *et al.* (1994) はホタルイカの視細胞外節層の数層におけるモザイク配列と視物質の最大吸収波長を調べ、同種の腹側網膜の一部には、長さや形が異なる4種類の視細胞があること、主波長が異なる3つの視物質を持ち、これらがそれぞれ異なる視細胞に含まれることを示した。また、感桿を作る視細胞は、網膜の深さで種類と数が異なり、この多重層構造の形成により、各層で異なる波長の光を感受できるのだと述べている。ホタルイカにおける色覚の役割について Michinomae *et al.* (1994) は、同種が自分たちの発光する光の波長と背景光の波長とを見分けている可能性があるかと述べている。

以上のように、イカ類の視覚に関する研究はいくつかあるものの、種が持つ特徴的網膜構造や機能、あるいは行動に限定した研究が多く、種間での比較や生息域の違いに着目したものはない。前述したように、イカ類は世界で約450種が知られており、生息域も様々である。例えば、コウイカ類やヤリイカ類は沿岸性で、アカイカ類は沖合に生息している。垂直分布も多様で、浅海に生息するアオリイカやコウイカ、深海に生息するツメイカ (*Onychoteuthis borealijaponica*) やテカギイカなど様々である。また、行動パターンも異なっており、一般にコウイカ類は海底付近に生息し、あまり大きな群れを作らないのに対し、スルメイカやアカイカは海底から中層付近に生息し、群れを作って外洋を回遊する。群れの大きさ

も、アオリイカでは数匹から数十匹程度の群れを作るのに対し、スルメイカでは何百匹もの大きな群れを作っている。これらの行動は、イカの視覚とも密接な関係があると考えられる。魚類では、生息する地形や水深、行動パターンは、種の網膜における視細胞モザイク配列や視細胞の密度分布、そこから推定される視軸や視野をよく反映しているという事例が数多く知られている (Collin and Pettigrew, 1988a, b; Williamson and Keast, 1988; Browman *et al.*, 1990; Beaudet *et al.*, 1997)。また、視物質の吸収波長も魚種で異なり、生息水深の波長によく一致することが報告されている (Kobayashi, 1962)。したがって、イカ類においても、魚類と同様に、種間、あるいは生息域の違いと、視細胞のモザイク配列、その密度分布や視精度、またロドプシンの吸収波長等との間には何らかの関連がある可能性があると考えられる。

そこで本研究では、沿岸性3種と沖合性3種のイカの視覚について比較生物学的検討を行うとともに、彼らの行動的特徴や生息域の光環境との関係を検討することを目的として、第一に、網膜における視細胞層のモザイク配列と視細胞核の密度分布を調べた。これにより、視軸と視精度を推定した。第二に、網膜の部位によって視細胞のモザイク配列に違いがあるか、またホタルイカのように視細胞の多重層構造があるかを調べた。そして第三に、網膜からロドプシン遺伝子を単離し、そのアミノ酸配列から最大吸収波長を推定することにより、生息域の

海水の光学的特性との関係を調べた。

第 I 章 網膜構造および視精度と視軸

1-1. 実験材料と方法

1-1-1. 実験材料

実験にはヤリイカ科のアオリイカ、同科のケンサキイカ、ダンゴイカ科 (Sepiolidae) のミミイカ (*Euprymna morsei*)、アカイカ科のスルメイカ、同科のスジイカ (*Eucleoteuthis luminosa*)、およびソデイカ科のソデイカの計 6 種を用いた (図 1)。アオリイカ、ケンサキイカおよびミミイカは沿岸性種であり、スルメイカ、スジイカおよびソデイカは沖合性種である (表 1)。

アオリイカは 2004 年 10 月、三重県紀北町島勝漁港付近沿岸にて昼間に、また、2005 年 11 月、三重県尾鷲市の尾鷲港岸壁にて昼間にそれぞれ釣りで採集した。ケンサキイカは 2006 年 7 月、三重県度会郡南伊勢町宿浦の堤防にて夜間に釣りで採集した。ミミイカは 2006 年 10 月、山口県下関市吉見沖の響灘にて夜間に底曳き網で採集した。スルメイカは 2004 年 10 月、三重県度会郡南伊勢町見江島沖の熊野灘にて勢水丸船上から夜間に釣りで採集した。スジイカとソデイカは 2005 年 11 月、五ヶ所湾沖の熊野灘にて勢水丸船上から夜間に釣りで採集した。いずれの個体も外套長を測定した後に頭部だけを切断し、ブアン液 (アオリイカ、ケンサキイカ、ミミイカ、スルメイカ)、またはデビットソン液 (スジイカ、ソデイカ) に入れて固定した。アオリイカの 1 個体については、採集して暗順応させた後外套長を測定し、網膜の一部をカルノ

フスキー固定液(パラホルムアルデヒド溶液、70%グルタルアルデヒド、0.2Mリン酸緩衝液の混合液)により0~4℃下で前固定した。

1-1-2. 視細胞外節層の観察

実験に用いた材料の外套長は、アオリイカは18.0 cm、ケンサキイカは19.0 cm、ミミイカは2.9 cm、スルメイカは23.5 cm、スジイカは15.4 cm、およびソデイカは33.0 cmのものをそれぞれ1個体ずつ使用した。

いずれの個体についても、眼球の方向が確認できるように虹彩の足側に切れ込みを入れた後に頭部から眼球を摘出した。摘出した眼球は、虹彩、水晶体、水晶体筋、強膜および視神経等を、実体顕微鏡下でピンセットや眼科バサミを使用して丁寧に除去した。次に、視神経乳頭を中心として網膜辺縁部に5~9箇所の切れ込みを入れて花びら様に平らに展開し、さらに部位が分かるように一辺が約3~4 mm四方の小片に分割した。分割した小辺数は各イカで異なり、アオリイカでは133枚、ケンサキイカでは94枚、ミミイカでは64枚、スルメイカでは81枚、スジイカでは77枚、ソデイカでは302枚、となった。分割した小片はエタノールシリーズで脱水後、パラフィンで包埋し、ミクロトームで厚さ5 μmの横断連続組織切片を作製した。キシレンで脱パラフィン後、ヘマトキシリンとエオシンで二重染色を施し、光学顕微鏡下で視細胞外節層の観察を行った。ホタルイカでは視細胞外

節層のモザイク配列は深さで異なることが知られていることから (Michinomae *et al.*, 1994)、本実験においても、網膜表面からの深さが異なる数層での観察を行った。

光学顕微鏡観察により他種とは明らかに異なるモザイク配列が見られたアオリイカについて、視細胞外節層のさらに詳細な構造を確認するために、電子顕微鏡による観察を行った。

観察には外套長 6.8 cm のアオリイカを用いた。前固定された網膜組織を 0.1M リン酸緩衝液で数回洗浄し、4% オスミウム酸で後固定を行った。エタノール上昇系列による脱水後、n-ブチルグリシジルエーテルで置換し、エポキシ樹脂で包埋し、36 時間 60°C で樹脂を重合した。その後、光学顕微鏡観察用のエポキシ切片を作製し、トルイジンブルー染色を施したものを参考に、ダイヤモンドナイフによる超薄切片を作製した。超薄切片は、コロジオン膜作製メッシュにのせた。メッシュは、酢酸ウラニル・クエン酸鉛で二重染色を施し、透過型電子顕微鏡を用いて加速電圧 75kV で検鏡した。

1-1-3. 視細胞核の密度分布

6 種の視軸と視精度を推定するために、網膜全体における視細胞核の密度分布を調べた。

イカの眼は魚類と同じ『カメラ眼』であるが、その構造は異なり、魚類では視細胞が光の入射方向と逆に向い

ているのに対し、イカでは視細胞が光の入射方向に向いている(図2)。また、視物質は、魚類では視細胞外節の中に含まれているのに対し、イカでは視細胞外節から外向きに一対伸びている微絨毛の中に含まれる(Hara and Hara, 1965)。魚類においては、視精度を求めるとき、古くは錐体細胞の最高密度とレンズの焦点距離より推定されてきた(Tamura, 1957)。錐体細胞は網膜の中で最初に光を受容する細胞であるが、この光情報は水平細胞、アマクリン細胞、双極細胞等の介在神経細胞で情報処理がなされた後、神経節細胞を最終として視神経に送られる。このことから近年では錐体細胞ではなく、神経節細胞の最高密度とレンズの焦点距離から視力が推定されている(Collin and Pettigrew, 1989; Shand *et al.*, 2000a, b)。イカでは網膜の最終が視細胞であることから、魚類の神経節細胞からの推定法にならい視精度を推定した。

まず、全ての横断組織標本について、0.025 mm²平方に存在する視細胞核数を計測した。これらの値を1 mm²当たりの数に換算し、各種の網膜における視細胞核の密度分布図を作製した。それぞれの分布図において、最も視細胞核の密度が高かった部位とレンズの中心を結ぶ方向から各種の視軸を推定した。また、同部位での視細胞核密度とレンズの焦点距離から、各種の網膜分解力(視精度)を推定した。推定には、海産哺乳動物や魚類の視精度推定において用いられている以下の方程式(Mass and Supin, 1986)を適用した。

レンズの中心から網膜中心までの距離 (posterior nodal distance, PND) は、レンズの半径 (r : mm) と Matthiessen's ratio (=2.55) により算出される。

$$PND = 2.55r$$

網膜上の 1 mm に内在する角度 (α) (radian) は、

$$\tan \alpha = 1/PND$$

$$\alpha = \arctan(1/PND) \text{ (radian)}$$

で与えられる。

神経節細胞の最大密度 D (cells/mm²) が 1 mm 平方中に規則正しく配列している場合、1 mm の直線には、

$$\sqrt{D} \text{ (cells/mm)}$$

の神経節細胞が存在することになる。

見込み角 (最小分離角) を分で表すと、

$$\text{min. of arc} = \frac{1}{\sqrt{D}} \times \alpha \div \frac{\pi}{180} \times 60$$

となる。これを視精度とした。

1-2. 結果

1-2-1. 視細胞のモザイク配列と層状構造

視細胞のモザイク配列は横断組織標本にて観察した。スルメイカ、スジイカおよびソデイカでは、両側に微絨毛を出した大きさがほぼ等しい視細胞が分布した(図 3-d、e、f)。視細胞は4つがほぼ直角に交差し、1つの四方形の感桿を形成していた。感桿は規則正しく並び、格子状のモザイク配列を形成していた。この3種では、モザイク配列に種間での大きな差異は認められなかった。ミミイカのモザイク配列は、上記の3種と同じく四方形で規則正しく並んでいたものの、格子の目が大きいのが特徴的であった(図 3-c)。一方、ともにヤリイカ科に属するアオリイカとケンサキイカでは、両種のモザイク配列は類似するものの、他の4種に比べるとより複雑なモザイク配列であった(図 3-a、b)。これらの配列における規則性の有無は光学顕微鏡レベルでは判断することが出来なかった。

この複雑なモザイク配列を、アオリイカについてのみであるが、電子顕微鏡により観察したところ、上記4種と同様に視細胞の両側からは微絨毛が伸びているものの、大きさの異なる2種類の視細胞が確認された(図 4)。また、1つの感桿は4つの視細胞で構成されているものの、他の4種のようにほぼ同じ大きさの視細胞が互いの両端で接するのではなく、大きい視細胞の中央付近、あるいは大きい視細胞をほぼ3等分した点で小さい視細胞が直

角に接するなどし、様々な四方型の格子を形成していた。なお、視細胞外節層において層別に観察したモザイク配列は、いずれの種においても、部位や深さによる大きな差異は認められなかった。

1-2-2. 視細胞核の密度分布および視軸

視細胞核の密度は、アオリイカ、ミミイカ、スルメイカ、ソデイカにおいては、4種とも網膜の中心部よりやや後方に最も高い部位があった(図5~9)。またその部位は、アオリイカとミミイカでは中心線よりやや背側に(図5、6)、スルメイカとソデイカでは網膜の中心線よりやや腹側であった(図7、9)。一方、最も密度の低い部位は、アオリイカとスルメイカでは腹側前方辺縁部にあったが、ミミイカとソデイカではほぼ中央線上の前方辺縁部にあった。スジイカは、これらの密度分布とは異なり、最も視細胞核密度の高い部位は腹側後方辺縁部にあり、最も低い部位は網膜の中央よりやや背側にあった(図8)。したがって、視軸は、アオリイカ、ミミイカ、スルメイカ、ソデイカにおいては4種とも前向きやや側方にあると考えられた。さらにこの方向において、アオリイカとミミイカではやや下方に向き、スルメイカとソデイカの視軸はやや上方に向いていると推測された(表2)。一方、スジイカでは体軸方向の前方上方を向いていると推定された。なお、ケンサキイカについては、視細胞核層が不明瞭な組織標本が多く、網膜の広範囲で視細胞核数の計

測が難しかったため、密度分布図を作製することができなかつた。

最も密度の高い部位における視細胞核密度は、アオリイカで 32080 cells/mm²、ミミイカで 28640 cells/mm²、スルメイカで 40840 cells/mm²、スジイカで 79600 cells/mm²、およびソデイカで 44800 cells/mm²であった。また、最も密度の低い部位は、それぞれ、11920 cells/mm²、17840 cells/mm²、18320 cells/mm²、42080 cells/mm²、23600 cells/mm²であった(表 3)。

1-2-3. 視精度

視細胞核の最高密度(D: cells/mm²)とレンズの直径(r:mm)から各種の視精度を求めた。例えばアオリイカでは、視細胞核の最高密度は 32080 cells/mm²であり、レンズの直径は 9.57 mm であるので、以下のような計算過程となる。

レンズの中心から網膜までの距離 PND は

$$PND = 2.55 \times 9.57 / 2 = 12.202$$

と計算され、

網膜上の 1 mm に内在する角度(α)(radian)は

$$\tan \alpha = 1 / 12.202$$

$$\alpha \doteq 0.082$$

と計算された。

1 mm の直線には $\sqrt{32080}$ (cells/mm) の視細胞核が存在しているので、最小分離角を分で表すと

$$\text{min. of arc} = \frac{1}{\sqrt{32080}} \times 0.082 \div \frac{\pi}{180} \times 60$$

$$\div 1.575$$

と表される。

したがって、視精度は

$$\frac{1}{1.575} = 0.63$$

と算出される。

同様にして、ミミイカ、スルメイカ、スジイカ、およびソデイカでの視精度は、それぞれ 0.32、0.64、0.90、および 1.37 と算出された(表 3)。

1-3. 考察

本研究では、科や生息域が異なる 6 種のイカについて、網膜構造、視軸、および視精度を比較した。その結果、これらには以下のような、科による差異、空間利用による差異、および生息域の海水の透明度による差異が認められた。

まず、網膜構造のうちの視細胞モザイク配列は科によって差異があると推察された。視細胞外節層の観察では、いずれの種でも、視細胞が両側に微絨毛を持つこと、4 つの視細胞が直角に交差して 1 つの感桿を形成していることが共通していた。しかし、感桿を構成する 4 つの視細胞の大きさ、および視細胞による感桿の構成の仕方がヤリイカ科に属するアオリイカとケンサキイカでは他の 4 種と明らかに違っていた。つまり、ミミイカ、スルメイカ、スジイカ、およびソデイカの 4 種では、大きさがほぼ等しい視細胞 4 つが互いの両端を接して正四方形を形成しているのに対し、ヤリイカ科に属するアオリイカとケンサキイカでは、細長い視細胞と太く短い視細胞が観察され、これらが変則的な四方形を形成していた。しかしながら、本研究で用いたヤリイカ科 2 種と同じく、沿岸域に棲むミミイカのモザイク配列は、むしろ沖合性のスルメイカ、スジイカ、ソデイカに酷似していた。

Saibil and Hewat(1987)は、ヨーロッパ沿岸に生息するヤリイカ科の一種であるホソトガリイカの視細胞外節層の構造、および視細胞微絨毛の構造を X 線と電子顕微鏡

によって解析している。その研究で示されたホソトガリイカの視細胞のモザイク配列は、本研究において電子顕微鏡で観察されたアオリイカのモザイク配列に非常に似ていた。すなわち、ホソトガリイカでも大きい視細胞にいくつかの小さい視細胞が直角に接する格子状の配列をしていた。イカの網膜における視細胞のモザイク配列の違いが彼らの視覚機能にどのように関与するのかは不明であるが、この2つの異なる大きさの視細胞により構成されるモザイク配列は、ヤリイカ科の特徴である可能性が考えられた。

また、本研究で調べた6種の視軸においては、種による空間利用との関連で差異があると考えられた。スジイカを除く4種では、いずれの種も網膜の中心部周辺に最高密度部位があり、彼らが体軸方向前方ではなく、前方のやや側方に視軸を持っていると推察された。この方向は、彼らの通常の遊泳行動時の進行方向とも一致せず、餌生物に対して正確に焦点を合わせているとも考えられない。また、その最高密度部位は、沿岸性で底層付近に生息するアオリイカとミミイカではやや背側にあり、沖合性で中層に生息するスルメイカとソデイカではやや腹側にあった。イカは普通で遊泳しているとき、またはホバリングしているときは、頭部をやや下げる姿勢をとる(表3)。この際、視軸は図5~9の各b図に示したよりもやや下方方向にずれると考えられる。この場合、アオリイカやミミイカの視軸は海底方

向に向くことになり、彼らが生息する沿岸では、岩礁等の障害物を避けたり、底生性の餌生物を探したりするのに有利である可能性が考えられた。これに対し、スルメイカやソデイカの視軸は前方を向くことになる。沖合の中層を回遊している彼らにとってこの視軸は、同じ遊泳層にいる餌生物や群れの中の仲間を認識するのに有利な方向なのかもしれない。

一方、スジイカにおいては、他の種と違って網膜の腹側辺縁部に視細胞核の最も高い密度部位があった(図8)。実験に用いた6種の中でのスジイカの特徴としては、彼らは外套膜腹側の両側、頭部の眼の前方、および第IV腕の付け根の表皮下に発光器を持っていることがあげられる。一般に、中深層に生息する発光器を持つ生物は界面から降下してくる光の強度に合わせて発光して自分の姿を隠す、いわゆるカウンターシェイディングを行うと言われている(Young and Roper, 1976)。しかし一方、ホタルイカのように、発光器を仲間とのコミュニケーション手段として使っている可能性もある(Michinomae *et al.*, 1994)。スジイカが自らの発光器をコミュニケーションの手段として使っていると考えると、得られた視細胞核の密度分布は彼らが群れで泳いでいる際に、仲間の腹側にある発光を下から見るのに役に立つのではないかと示唆された。

視精度の差異は、イカの生息域の海水の透明度の違いと関連があるのではないかと考えられた。本研究で求め

られた視力は、アオリイカで 0.63、ミミイカで 0.32、スルメイカで 0.64、スジイカで 0.90、ソデイカで 1.37 であった(表 3)。数値を比較すると、沖合性のスルメイカ、スジイカ、およびソデイカで比較的高く、逆に沿岸性のミミイカでは比較的低い値であった。海水の光学的特性に着目した場合、一般に沿岸域よりも沖合域の方が透明度は高い。つまり、海水中の懸濁物質に水中視程が影響されない沖合域での生活には、高い視精度を持つスルメイカ、スジイカ、およびソデイカは有利かも知れない。一方、視精度が低いミミイカは、沿岸に生息しており、回遊もほとんどしないとされている。沿岸域には、陸起源の懸濁物質が多く、水中視程が制限される環境に生息する彼らには、高い視精度はそれほど必要でないのかもしれない。したがって、高い視精度は沖合性種における特徴であり、低い視精度は沿岸性種における特徴なのかもしれない。しかしながら、沿岸性種のアオリイカと沖合性種のスルメイカの視精度を比較してみると、両者はほぼ同程度の値であった。視精度と生息域の海水の透明度との関係については、今後さらに検討していく必要がある。

視精度に関してはもう一点、種における視細胞核密度とレンズの大きさの違いに興味深いことが本研究の結果から見える。つまり、表 3 に示したレンズの径と算出された視精度を比較すると、スジイカでは視細胞核密度が他の 5 種よりも明らかに高く、そのことが高い視精度に反映している。一方、ソデイカではレンズの大きさが大きいことが

高い視精度に反映している。これは、ソデイカはスジイカよりも視精度は高いものの、網膜の解像度においてはスジイカの方が優れていることを意味している。スジイカの網膜の解像度が他の種に比べて高いのは、前述した仲間の2本の帯状の発光器を認識することと関係しているのかもしれない。

ここで、イカ類の視精度を同じ水圏に生息する魚類の視精度と比較してみる。今回得られたイカの視力は0.32~1.37の範囲であった。一方、沿岸に生息する魚類の視力はおよそ0.06~0.24であり(Tamura, 1957)、外洋を回遊するマグロ・カジキ類でも0.3~0.5である(Kawamura *et al.*, 1981)。両者を比較すると、イカ類の視力の方が魚類よりも5~6倍高いことがわかる。ただし、これらイカ類の視力は魚類を対象とした計算式を用いたものである。イカ類も魚類と同じ「カメラ眼」ではあるが、その発生過程は異なり、眼球の外側と内側で網膜層構造の順位は逆転している(Zonana, 1961)。また、レンズの形成過程やレンズの組成そのものも異なっていて(Sivak *et al.*, 1994; Tomarev and Piatigosky, 1996)、魚類のレンズが球形のまま発生していくのに対し、イカ類のレンズは虹彩前方と後方で別々に形成されていく(Sivak *et al.*, 1994)。

イカの視精度に関する報告は少ないが、Watanuki *et al.* (2000)は、コウイカの視精度を2つの推定方法で推定している。すなわち、餌に対する視認距離から視力を推定する方法と視細胞の最高密度とレンズの焦点距離から

視力の推定する方法である。視精度は前者では 0.36、後者では 0.89 であるとの結果を得ており、本研究の結果と魚類の視力をそのまま比較することは出来ないが、イカ類の視精度は魚類に比べ、比較的高いと思われる。

第 II 章 . ロドプシンの最大吸収波長の推定

2-1. 実験材料と方法

2-1-1. 実験材料

実験にはアオリイカ、ミミイカ、アカイカ (*Ommastrephes bartrami*)、トビイカ (*Sthenoteuthis oualaniensis*)、スジイカ、およびソデイカを用いた (図 1)。前 4 種は 2005 年 10 月に五ヶ所湾沖の熊野灘において勢水丸の船上から夜間の釣りにより採集した。アオリイカは同月に、三重県尾鷲市の尾鷲港岸壁において昼間に釣りで採集した。ミミイカは 2006 年 10 月、山口県下関市吉見沖響灘で昼間に底引き網で採集した (表 4)。

2-1-2. 網膜組織からの totalRNA の抽出

イカを採集後、眼球を摘出し、解剖して網膜を約 500 mg 採取した。これを 1.5ml エッペンチューブに入れ、TRIzol Reagent (Invitrogen) 0.2ml 中で十分にホモジナイズした。ホモジナイズ後 TRIzol Reagent をさらに 1ml 入れて転倒攪拌し、-20℃で冷凍保存した。研究室に持ち帰り、解凍後、室温で約 5 分間インキュベートした。4℃、12000rpm (冷却高速遠心分離器 MX-160, TOMY) で 10 分間遠心することにより組織を沈殿させ、上清を 1ml 分取し、新しいエッペンチューブに移した。クロロホルムを 0.2ml 加え、15 秒間転倒攪拌し、2~3 分間室温で静置した。その後、4℃、12000rpm で 15 分間遠心し、totalRNA が含まれる上清 0.6ml を分取して新しいエッペンチューブ

ブに移した。イソプロパノールを 0.5ml 加え、ボルテックスにて攪拌後、10 分間室温で静置した。4℃、15000rpm で 10 分間遠心し、totalRNA をペレットとして沈殿させた後、上清をアスピレーションで除去した。70%エタノールを 1ml 加え、ボルテックスで攪拌後、4℃、12000rpm で 5 分間遠心することにより totalRNA ペレットをリンスした。上清を除去して totalRNA を風乾した後、50 μ l の DEPC(Diethylpyrocarbonate)で処理した DNase/RNase-free の蒸留水に溶解した。

2-1-3. 1 本鎖 cDNA の合成

Oligo dT₁₈₋₃₀primer を用いて、totalRNA をテンプレートとした RT(Reverse Transcriptase)-PCR 法による逆転写反応を行い、1 本鎖 cDNA を合成した。

total RNA	1 μ l
oligo dT primer(0.5 μ g/ μ l)	1 μ l
10mM dNTP	1 μ l
DEPC-DW	5 μ l
<hr/>	
total	8 μ l

以上の試薬を用いて、65℃で 5 分間インキュベートし、速やかに 3 分間の氷冷を行った。

次に、以下の試薬を混和し、42℃で 2 分間インキュベートし、RNA の高次構造を変性させた。

5×RT Buffer	4 μl
25 mM MgCl ₂	4 μl
0.1 M DTT	2 μl
RNase inhibitor	1 μl
total RNA mixture	8 μl
<hr/>	
total	19 μl

その後、RT 酵素 (Super Script II, Invitrogen) を 1 μl 加えて静かに混和し、42℃ で 50 分間の逆転写反応を行った後、72℃ で 15 分間インキュベートして逆転写酵素を失活させた。さらに、これに RNaseH を 1 μl 加えて静かに混和し、37℃ で 20 分間インキュベートすることにより、cDNA-RNA ハイブリッド鎖の RNA を破壊し、1 本鎖 cDNA とした。

2-1-4. 特異的プライマーによるロドプシン遺伝子断片の増幅

スルメイカのロドプシン遺伝子配列に基づき著者らが設計したプライマーセット (Fw, 5'-CTCTTCACCAAGACGAAATC-3'; Rv, 5'-GCATAAGGTGTTACCCATTC-3') を用いて、試薬を以下のように調整し、PCR 法によるイカ類のロドプシン遺伝子断片の増幅を行った。

1st strand cDNA	1 μl
25 mM dNTP mix	4 μl

10×Buffer	5 μl
20 pmol Fw primer	1 μl
20 pmol Rv primer	1 μl
EX Taq(Takara)	0.4 μl
DW	37.6 μl
<hr/>	
total	50 μl

以上の試薬を用いて、94℃で5分間の十分な熱変性を行った後、30サイクルの熱変性(94℃、30秒間)、アニーリング(53℃、90秒間)、伸長(72℃、2分間)によるPCR反応を行った後、最終伸長を72℃で5分間行った。これによってイカ類のロドプシン遺伝子 cDNA 断片を増幅した。

2-1-5. 電気泳動によるロドプシン遺伝子 cDNA 断片のサイズ分画

増幅した cDNA に dye を 2 μl 加えて 0.8%アガロースゲル(0.5×TBE Buffer)上で、DNA マーカーとともに 100V で 20 分間電気泳動した。UV 下で cDNA を検出し、目的とする約 700bp の cDNA バンドを確認した。

UV 下で目的とするバンドを切り出し、Takara EASY Trap II (Takara)を用い、以下の手順で cDNA を精製、回収した。

まず、切り出したゲルを 1.5ml エッペンチューブに入れ、NaI 溶液 300 μl と Melting Buffer 35 μl を加え、50℃でインキュベートし、ゲルを完全に融解した。次に、Glass

milk を 5 μ l 加えて懸濁させ、5 分間静置することにより cDNA 断片を Glass milk に吸着させた。5000rpm で 10 秒間遠心して上清を除去し、Washing Buffer を 450 μ l 加えて Glass milk を十分に再懸濁させ、Glass milk をリンスした。リンスを 3 回繰り返した後、Glass milk を風乾させた。Glass milk に TE Buffer を 7 μ l 加え、50 $^{\circ}$ C で 3 分間インキュベートすることにより cDNA 断片を Glass milk から外し、5000rpm で 60 秒間遠心して上清とともに cDNA 断片を回収した。

2-1-6. cDNA 断片のプラスミドベクターへのライゲーション

回収した cDNA 断片は pGEM-T Easy Vector System I (Promega) を用いて T ベクターへライゲーションした。2-1-5 で得られた cDNA 断片 5 μ l に 2 \times Ligation Buffer を 5 μ l、T ベクターを 25ng、T4 リガーゼを 0.5 μ l 加え、やさしく混和した後、冷蔵庫 (4 $^{\circ}$ C) で一晩静置することによりライゲーション反応を行った。

2-1-7. コンピテント細胞へのトランスフォーメーション

以下の手順で cDNA 断片をライゲーションしたプラスミドのコンピテント細胞へのトランスフォーメーションを行った。

2-2-6 で cDNA 断片を挿入したベクター 5 μ l を 50 μ l のコンピテント細胞 (XL1-Blue) に静かに混和し、氷上で

20 分間インキュベートした。これに 42℃で 45 秒間のヒートショックをかけ、氷上で 2 分間の急冷を行った後、SOB 液体培地を 900 μ l、1M グルコースを 18 μ l、1M MgCl₂ を 4.5 μ l 加え、37℃で 1 時間振盪培養した。

次に、3000rpm で 4 分間遠心してコンピテント細胞を集め、上清約 150 μ l とともに、アンピシリン、IPTG、および X-Gal を含む LB 寒天平板培地上に植菌し、37℃で 14 時間培養した。このベクターはアンピシリン耐性部位を持つため、トランスフォーメーションに失敗した大腸菌はアンピシリン存在下では死滅する。さらに、cDNA 断片は β -ガラクトシダーゼをコードする領域内に取り込まれるため、セルフライゲーションしたベクターは IPTG と X-Gal を基質として青色に発色する (Blue/White Selection)。この原理を利用して、cDNA 断片が正しく取り込まれたことを示す白色コロニーを選別し、これを滅菌した爪楊枝でピックアップし、同上寒天平板培地に再植菌することにより、マスタープレートを作製した。

2-1-8. インサートチェック

EcoRI による制限酵素処理を行い、2-2-7 でピックアップしたコロニーのインサートチェックを行った。

LB 液体培地をエッペンチューブにそれぞれ 1 μ l 入れ、アンピシリン (50mg/ml) を 2 μ l 加えた中に、マスタープレートから滅菌爪楊枝を用いてプラスミドを植菌し、37℃で 14 時間振盪培養した。3000rpm で 4 分間遠心して大腸菌を集め、上清を除去した。

プラスミドの回収はミニプレップ法により行った。まず、沈殿した大腸菌に GTE Buffer (glucose 50 μ M、Tris-HCl pH8.0 25 μ M、EDTA pH8.0 10 μ M) を 100 μ l 加えてボルテックスし、大腸菌を十分に懸濁させた。次に、NaOH/SDS 溶液 (NaOH 0.2N、SDS 1%) を 100 μ l 加えて転倒攪拌し、透明になったのを確認後、5 分以内に 3M KOAc 溶液 (potassium 3M、acetate 5M) を 140 μ l 加え、転倒攪拌して十分に懸濁させた。4 $^{\circ}$ C、15000rpm で 10 分間遠心し、上清を別のエッペンチューブに移し、これにイソプロパノールを 180 μ l 加えてボルテックスした後、室温で 10 分間静置した。4 $^{\circ}$ C、15000rpm で 10 分間遠心してプラスミドを沈殿させ、上清をアスピレーションにより除去した。75%エタノールを 1ml 加えてタッピングした後、4 $^{\circ}$ C、15000rpm で 5 分間遠心しプラスミドをリンスした。上清をチップで除去し、室温に静置して風乾させた後、25 μ l の TE Buffer にプラスミドを溶解させた。

次に以下の試薬を用いて、37 $^{\circ}$ C で約 1 時間インキュベートし、プラスミド DNA を切断した。使用した T-ベクターはマルチクローニングサイトの上流と下流にそれぞれ 1ヶ所の EcoRI サイトを持っており、電気泳動を行った際、インサートが入っているプラスミドは 2 本以上のバンドが検出される。

10 \times EcoRI Buffer	0.7 μ l
EcoRI	0.3 μ l
DW	3 μ l

plasmid solution	3 μ l
<hr/>	
total	7 μ l

制限酵素処理の終わったプラスミド溶液をアガロースゲル上で電気泳動し、インサートの有無を確認した。

2-1-9. プラスミド濃度の測定

電気泳動でインサートが確認できたプラスミドを 50 倍希釈して、分光光度計にて 260nm と 280nm での吸光度を測定し、その比からプラスミド DNA の純度と濃度 (ng/ μ l) を求めた。

2-1-10. シーケンス

プラスミド濃度測定で得られた吸収率の比が 1.8 に近いものをシーケンスに用いた。シーケンス産物取得のための PCR は DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit(Amersham Biosciences)を用い、以下の手順で 1 サンプルにつき Fw と Rv の両方向から塩基配列を読んだ。

プラスミド (50 - 150 ng)	1 μ l
pre mix	2 μ l
Buffer	2 μ l
T7 または SP6 primer (5 pmol)	1 μ l
DW	4 μ l
<hr/>	
total	10 μ l

以上の試薬を PCR チューブに入れて混和し、95℃で 20 秒間の十分な熱変性後、30 サイクルの熱変性(95℃、20 秒)、アニーリング(50℃、15 秒)、伸長(60℃、1 分)を行い、最後に 4℃で伸長を維持した。PCR チューブの壁面に EDTA を 1μl 付着させ、95%エタノール 40μl を EDTA を落とすように加えて混和した。全液を 0.5ml チューブに移し、15 分間室温で静置した。15000rpm で 15 分間遠心した後、上清を除去した。300μl の 75%エタノールを加え、15000rpm で 5 分間遠心した後、上清を除去し風乾した。シーケンスは三重大学遺伝子実験施設において ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)により行った。

2-2. 結果

単離されたロドプシン遺伝子断片はいずれも 676 塩基で、これらは遺伝子解析ソフト (Genetyx ver8.0) によって 225 残基のアミノ酸に翻訳された。

図 10 はそれぞれのイカのアミノ酸配列を比較したものである。全種に共通するアミノ酸残基は黒塗りに白抜きの文字で示した。なお、ソデイカについては、今回用いたプライマーでは cDNA が増幅されなかった。

ロドプシンの最大吸収波長は Bellingham *et al.* (1998) によって示された 3 カ所のアミノ酸残基から推定した。Bellingham *et al.* (1998) はイカ類のロドプシンの最大吸収波長は 1 つのアミノ酸残基の置換によってシフトするとし、その決定部位は N 末端から数えて 127 番目、167 番目、および 270 番目であると報告している。127 番目はセリン (Ser, S) からアラニン (Ala, A) になると最大吸収波長が 12 nm 短波長側にシフトし、セリンがトレオニン (Thr, T) なる場合は最大吸収波長が変わらない。167 番目はアラニンがセリンになると 2 nm 短波長側にシフトし、270 番目のセリンがフェニルアラニン (Phe, F) になると 5 nm 短波長側にシフトすると述べている。

ミミイカ、アカイカ、トビイカ、スジイカについてはいずれも、最大吸収波長のシフトに関係する 127 番目の残基はアラニン (A)、167 番目はアラニン (A)、270 番目はフェニルアラニン (F) であった (Fig. 9)。一方、アオリイカの 127 番目はトレオニン (T) で、先の 4 種と異なってい

たが、167番目と270番目はそれぞれ、アラニン(A)、フェニルアラニン(A)で、先の4種と同様であった。

前述のアミノ酸配列からの最大吸収波長の推定方法により、これらのロドプシンの最大吸収波長を推定すると、ミミイカ、アカイカ、トビイカ、スジイカでは482 nmとなり、アオリイカは494 nmという結果になった。今回用いた Bellingham *et al.*(1998)に基づく推定方法では最大波長は499 nmで最小波長は480 nmであるので、前4種は吸収波長が比較的短波長のロドプシンを持ち、後1種は比較的長波長のロドプシンを持つと言える。

2-3. 考察

イカ類のロドプシンの最大吸収波長については、Hubbard and George(1958)がアメリカケンサキイカ (*Loligo Pealei*)について視物質抽出法により調べたのが最初の研究で、最大吸収波長は493 nmであると報告している。さらにBrown and Brown(1958)はヨーロッパコウイカについて同方法によって調べており、本種のロドプシンは492 nmに最大吸収波長があると述べている。Hara and Hara(1965)はスルメイカの網膜から視物質を抽出し、ロドプシンの主波長は480 nmであること、またロドプシンとは異なる視物質が存在し、その主波長は490 nmであることを報告した。また、Messenger(1981)は深海に生息する5種のイカでは、最大吸収波長が480 nmであるのに対し、表層に生息するアメリカケンサキイカの最大吸収波長は493 nmであり、このことから、イカ類の視物質最大吸収波長と生息する水深における海水の透過波長との間には相関があると指摘している。

一方、Morris *et al.*(1993)は、中深海性のホソトガリイカと深海性のヨーロッパオオヤリイカ (*Loligo forbesi*)のロドプシンについて、視物質抽出法により最大吸収波長を測定するとともに、遺伝子のアミノ酸配列を比較した。その結果、最大吸収波長は前者では499 nmであるのに対し後者は494 nmであること、また、両者のロドプシンのアミノ酸配列は、7つの膜貫通領域のうち、270番目のみが異なり、前者ではセリン(S)であるのが後者ではフ

ェニルアラニン (F) であることを明らかにした。このことから、この 270 番目の S/F のアミノ酸置換がロドプシン吸収波長を 5 nm 短波長側にシフトさせるのであろうと述べている。

本研究ではロドプシン遺伝子のアミノ酸配列から最大吸収波長を推定したところ、ミミイカ、アカイカ、トビイカ、スジイカで 482 nm、アオリイカで 494 nm であった。アカイカ、トビイカ、スジイカは沖合に生息する種であり、アオリイカは沿岸に生息する種である。そのため、推定された最大吸収波長は生息域の海水の光透過特性と相関があるようにうかがえる。しかし、ミミイカのロドプシンの吸収波長は沖合性種と同じ 482 nm と推定され、同じ沿岸性種であるアオリイカのロドプシン吸収波長 494 nm とは一致しなかった。視物質抽出法によりミミイカのロドプシンの最大吸収波長を測定した研究 (Hikari *et al.*, 1991) では本研究で沿岸性種について得られた値とほぼ同様な 492 nm の結果が得られており、本研究での推定値よりもミイカの生息域の光透過特性を反映したものとなっている。したがって、遺伝子のアミノ酸配列に基づくイカのロドプシン吸収波長の推定法にはまだ検討の余地があると思われる。

視物質遺伝子におけるアミノ酸置換と吸収波長との関係については、脊椎動物では数多く研究されており、波長のシフトに関与するアミノ酸部位は年々新たに発見され、生息域の光環境との関連が議論されている (Beaudet

et al., 1997; Yokoyama, 2000; Hunt *et al.*, 2001; Bowmaker and Hunt, 2006)。イカ類のロドプシンでは、本研究で用いた Bellingham *et al.* (1998) の推定方法があるのみで、この研究は、ヨーロッパコウイカ、ヨーロッパオオヤリイカ、ホソトガリイカ、スルメイカ、ミズダコ (*Paroctopus defleini*) の 5 種をモデルとして提示されたものである。したがって 127 番目、167 番目、270 番目の 3 つのアミノ酸以外でも最大吸収波長に影響を及ぼすアミノ酸があることが十分に考えられ、今回のミミイカの実験結果はそれを示唆するものである。魚類をはじめ、脊椎動物では視物質遺伝子の全長配列決定は数多くなされているのに対し、イカ類では全長配列が知られているのは 4 種に過ぎない。今後、イカ類の視物質遺伝子の研究が進むことによって、アミノ酸置換による吸収波長の推定方法をより正確なものに変えていくであろう。

一方、ソデイカのロドプシン遺伝子が増幅されなかったことについては、スルメイカのロドプシン配列から設計したプライマーがソデイカのロドプシン配列に適していなかったか、あるいは PCR 設定が適していなかった可能性が考えられる。Takumiya *et al.* (2005) はミトコンドリア DNA によりイカ類の系統樹を近接接合法、最尤法、および最節約法で作成している。これによると、ソデイカはドスイカ、ホタルイカと近い分類群であると示されている。これらの仲間のロドプシン遺伝子配列はいまだ DNA データベースには登録されていないが、ホタルイカ

の近縁種のヒギンスホタルイカモドキ (*Enoploteuthis higginsi*) のロドプシン遺伝子配列が Strugunell *et al.* (2004) によって登録されている。ヒギンスホタルイカモドキのロドプシン遺伝子配列をスルメイカのそれと比べてみると、両者に顕著な差異は認められなかった。ソデイカはホタルイカに近い分類群であることから、ヒギンスホタルイカモドキと同様にスルメイカとの差異もあまりないと考えられる。今後、ヒギンスホタルイカモドキのロドプシン遺伝子配列から新たにプライマーを設計したり、PCR 設定を検討するなどし、再度、ソデイカのロドプシン遺伝子の単離を試みる必要がある。

要約

1. アオリイカ、ケンサキイカ、ミミイカ、スルメイカ、スジイカ、およびソデイカの網膜について、視細胞モザイク配列と層状構造を観察した。その結果、ミミイカ、スルメイカ、スジイカ、およびソデイカでは、ほぼ同じ大きさの4つの視細胞により正四方型の感桿が規則正しく形成されているのに対し、アオリイカとケンサキイカでは2つの異なる大きさの視細胞が確認され、様々な四方型の感桿を形成していることがわかり、このモザイク配列はヤリイカ科の特徴である可能性が考えられた。
2. アオリイカ、ミミイカ、スルメイカ、スジイカ、およびソデイカにおいて視細胞核の密度分布図を作製し、各種の視軸を推定した。その結果、アオリイカとミミイカではやや側方の下方に、スルメイカとソデイカはやや側方の前方にそれぞれ向いていることがわかった。これらの視軸は種における空間利用と関係があると推察され、前者は障害物や底生性の餌生物を探すため、後者は餌生物や群れの中の仲間を見るためであると考えられた。一方、スジイカは視軸が体軸方向の上方に向いており、これは仲間の腹側にある発光を下から見るためではないかと推測された。
3. 視細胞核の最高密度とレンズの直径から視精度を算出した。その結果、アオリイカ、ミミイカ、スルメイカ、スジイカ、およびソデイカの視精度はそれぞれ

0.63、0.32、0.64、0.90、1.37と算出された。これら視力の違いは生息域の海水の透明度と関係があると考えられた。すなわち、高い視精度をもつスジイカとソデイカは、彼らが生息する透明度の高い沖合ではより遠くを見るのに有利であり、透明度の低い沿岸に生息するミミイカでは、あまり高い視精度を必要としないものと推察された。

4. アカイカ、トビイカ、スジイカ、ソデイカ、アオリイカ、およびミミイカの網膜からロドプシン遺伝子断片を単離し、これらのアミノ酸配列からロドプシンの最大吸収波長を推定した。その結果、アカイカ、トビイカ、スジイカ、およびミミイカでは482 nmであり、アオリイカでは494 nmであると推定され、沖合性種の方が最大吸収波長は短い傾向があった。

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始御指導を賜りました三重大学生物資源学部水族生理学研究室の神原淳教授、宮崎多恵子助教授に深く感謝の意を表します。また、電子顕微鏡解析の手法についてのご指導ならびに本修士論文を丁寧に査読していただいた浅海増殖学研究室の一色正助教授、電子顕微鏡解析の手法について協力をいただいた水族病理学研究室の葛谷佳孝氏に深く感謝の意を表します。

サンプリングを手伝っていただいた勢水丸の方々、実習に同行させていただいた海洋個体群動態学研究室の原田泰志教授、ならびに実習に参加してサンプリングを手伝ってくださった学生の皆様、サンプリングを手伝ってくださった水族生理学研究室の学生の皆様に心からお礼申し上げます。また、宿浦漁港のサンプリングに同行していただいた藻類学研究室の豊田智康氏、響灘でのイカの採集をしていただき、実験材料の写真を提供してくださった下関市立海響館の久志本鉄平氏に感謝いたします。実験材料の写真を提供してくださった岡田光男氏に心からお礼を申し上げます。

引用文献

Beaudet, L., Flamarique, F. I. and Hawryshyn, C. W. (1997). Cone photoreceptor topography in the retina of sexually mature pacific salmonid fishes. *J. Comp. Nearol.*, 383:49-59.

Bellingham, J., Morris, A. G. and Hunt, D. M. (1998). The rhodopsin gene of the cuttefish *Sepia officinalis*: sequence and spectral turning. *Exp. Bio.*, 201:2299-2306.

Bowmaker, J. K. and Hunt, D. M. (2006). Evolution of vertebrate visual pigments. *Curr. Biol.*, 16:484-489.

Browman, H. I., Goron, W. C., Evans, B. I. and O'Brien, W. J. (1990). Correlation between histological and behavioral measures of visual acuity in a zooplanktivorous fish, the white crappie(*Pomoxis annularis*). *Brain Behav. Evol.*, 31:269-282.

Brown, P. K. and Brown, P. S. (1958). Visual pigments of the octopus and cuttlefish. *Nature(Lond.)*, 182:1288-1290.

Collin, S. P. and Pettigrew, J. D. (1988a). Retinal Topography in reef teleosts I. Some species with well-developed areae but poorly- developed streaks. *Brain Behav. Evol.*,

31:269-282.

Collin, S. P. and Pettigrew, J. D. (1988b). Retinal Topography in reef teleosts II. Some species with prominent horizontal streaks and high-density areas. *Brain Behav. Evol.*, 31:283-295.

Collin, S. P. and Pettigrew, J. D. (1989). Quantitative comparison of the limits on visual spatial resolution set by the ganglion cell layer in twelve species of reef teleosts. *Brain Behav. Evol.*, 34(3):184-192.

浜部基次 (1962). 日本海西南海域におけるスルメイカの発生学的研究. *Bull. Jap. Sea Reg. Fish. Res. Lab.*, 10:1-45.

浜部基次 (1963). スルメイカの生殖腺衰弱から斃死にいたる経過. *Bull. Jap. Sea Reg. Fish. Lab.*, 11:53-63.

浜部基次, 清水虎雄 (1966). 日本海西南海域を主にしたスルメイカの生態学的研究. *Bull. Jap. Sea Reg. Fish. Res. Lab.*, 16:13-55.

Hara, T. and Hara, R. (1965). New photosensitive pigment found in the retina of the squid *Ommastrephes*. *Nature(Lond.)*, 206:1331-1334.

Hara, T. and Hara, R. (1980). Retinochrome and Rhodopsin in the Extraocular Photoreceptor of squid, *Todarodes*. J. Gen. Physiol., 75:1-19.

Hikari, K., Hamanaka, T., Seidou, M. and Kito, Y. (1991). Conformation changes of cuttlefish(*Euprymna morsei*) rhodopsin following photoconversion. Bioc. et Biop. Acta, 1077:355-361.

Hubbard, R. and St. George, R. C. (1958). The rhodopsin system of the squid. J. Gen. Physiol., 41:501-528.

Hunt, D. M., Dulai, K. S., Partridge, J. C., Cottrill, P. and Bowmaker, J. K. (2001). The molecular basis for spectral turning of rod visual pigment in deep-sea fish. J. Exp. Biol., 204:3333-3344.

笠原昭吾 (1968). 日本海沖合水域で観察されたスルメイカの交接行動. Bull. Jap. Sea Reg. Fish. Res. Lab., 19:65-67.

Kawamura, G., Nishimura, W., Ueda, S. and Nishi, T. (1981). Vision in Tunas and Marlins. Mem. Kagoshima Univ. Res. Center S. Pac., 1:3-47.

北沢博夫 (1986). 日本海南西海域におけるヤリイカの漁業

生物学的研究 1 . 島根水産技術センター研究報告 , 4:67-82.

Kobayashi, H. (1962). A comparative study on electroretinogram in fish, with special reference to ecological aspects. J. Shimonoseki Coll. Fish., 11:407-538.

Kroger, R. H. H. and Gislén, A. (2004). Compensation for longitudinal chromatic aberration in the eye of the firefly squid, *Watasenia scintillans*. Vision Res., 44:2129-2134.

Mass, A. M. and Supin, A. Y. (1986). Topographic distribution of sizes and density of ganglion cells in the retina of a porpoise, *Phocoena phocoena*. Aquatic Mammals, 12:95-102.

Mathger, L. M. and Denton, E. J. (2001). Reflective properties of iridophores and fluorescent 'Eyespots' in the loliginid squid *Alloteuthis subulata* and *Loligo vulgaris*. J. Exp. Biol., 204:2103-2118.

Messenger, J. B. (1981). Comparative physiology of vision in molluscs. Handbook of Sensory Physiology, 6:93-200.

Michinomae, M., Masuda, H., Seidou, M. and Kito, Y. (1994). Structural basis for wavelength discrimination in the banked retina of the firefly squid *Watasenia scintillans*. J. Exp. Biol.,

199:1-12.

Moody, M. F. and Parriss, J. R. (1960). The discrimination of polarized light by octopus. *Nature(Lond.)*, 186:839-840.

Morris, A., Browmaker, J. K. and Hunt, D. M. (1993). The molecular basis of a spectral shift in the rhodopsins of two species of squid from different photic environments. *Proc. R. Soc. Lond.*, 254:233-240.

Saibil, H. and Hewat, E. (1987). Ordered transmembrane and extracellular structure in squid photoreceptor microvilli. *J. Cell Biol.*, 105:19-28.

Saidel, W. M., Lettvin, J. Y. and Macnichol, E. F. (1983). Processing of polarized-light by squid photoreceptors. *Nature(Lond.)*, 304:534-536.

Shand, J., Chin, S. M., Harman, A. M., Moore, S. and Collin, S. P. (2000a). Variability in the location of the retinal ganglion cell area centralis is correlated with ontogenetic changes in feeding behavior in the black bream, *Acanthopagrus butcheri*(Sparidae, Teleostei). *Brain Behav. Evol.*, 55:176-190.

Shand, J., Chin, S. M., Harman, A. M. and Collin, S. P.

(2000b). Mechanisms for changing the position of the area centralis in a retina that undergoes continual growth. Proc. Aust. Neurosci. Soc., 11:100.

Shashar, N., Hagan, R., Boal, J. G. and Hanlon, R. (2000). Cuttlefish use polarization sensitivity in predation on silvery fish. Vision Res., 40:71-75.

Shashar, N., Rutledge, P. S. and Cronin, T. W. (1996). Polarization vision in cuttlefish - A concealed communication channel. J. Exp. Biol., 199:2077-2084.

清水虎雄 (1962). 隠岐島近海産スルメイカの胃内に摂取された交接痕跡の時間的变化. Bull. Jap. Sea Reg. Fish. Res. Lab., 10:47-49.

Sivak, J. G. (1982). Optical properties of a cephalopod eye (The short finned squid, *Illex illecebrosus*). J. Comp. Physiol., 147:323-327.

Sivak, J. G., West, J. A. and Campbell, M. C. (1994). Growth and optical development of the ocular lens of the squid (*Sepioteuthis lessoniana*). Vision Res., 34:2177-2187.

添田潤助 (1950). 日本海沿岸におけるスルメイカ

(*Ommastrephes sloani pacificus*)の回遊について. 北海道水産試験所報告書, 4:1-30.

Takumiya, M., Kobayashi, M., Tsuneki, K. and Furuta, H. (2005). Phylogenetic relationships among major species of Japanese coleoid cephalopods(mollusca:Cephalopoda)using three mitochondrial DNA sequences. Zoo. Sci., 22:147-155.

Tamura, T. (1957). A study of visual perception in fish, especially on resolving power and accommodation. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 22(9):536-557.

Tomarev, S. I. and Piatigorsky, J. (1996). Lens crystallins of invertebrates: diversity and recruitment from detoxification enzymes and novel proteins. Eur. J. Biochem., 235:449-465.

和田年史 (2006). ヤリイカ科およびコウイカ科各3種の繁殖行動生態. 長崎大学大学院博士論文.

Watanuki, N., Kawamura, G., Kaneuchi, S. and Iwashita, T. (2000). Role of vision in behavior, visual field, and visual acuity of cuttlefish *Sepia Esculenta*. Fish Sci., 66:417-423.

Williamson, M. and Keast, A. (1988). Retinal structure relative to feeding in the rock bass(*Ambloplites rupestris*) and

bluegill(*Lepomis macrochirus*). Can. J. Zool., 66:2840-2846.

Yokoyama, S. (2000). Molecular evolution of vertebrate visual pigments. Prog. Retin. Eye Res., 19:385-419.

Young, R. E. and Roper, C. F. (1976). Bioluminescent countershading in midwater animals: evidence from living squid. Science, 191:1046-1048.

Zonana, H. V. (1961). Fine structure of squid retina. bull. Johns hopk. Hosp., 109:85-205.

表 1. 6 種のイカの生息域、外套長、採集場所、採集時間帯、および群れ形成の有無。

	ツツイカ目					コウイカ目
	ヤリイカ科		アカイカ科		ソデイカ科	ダンゴイカ科
	アオリイカ	ケンサキイカ	スルメイカ	スジイカ	ソデイカ	ミミイカ
生息域	沿岸	沿岸	沖合	沖合	沖合	沿岸
外套長 (cm)	18.0	19.0	23.5	15.4	33.0	2.9
採集場所	島勝漁港	宿浦漁港	熊野灘沖	熊野灘沖	熊野灘沖	響灘
採集時間帯	昼	夜	夜	夜	夜	夜
群れ	s	S	S	S	S	—

S：群れを作る。

s：若齢期にだけ群れを作る。

—：群れはつukらない。

表 2. 6種のイカにおけるモザイク配列および視軸の比較。

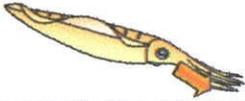
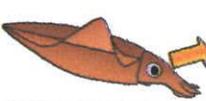
	ツツイカ目				コウイカ目	
	ヤリイカ科		アカイカ科		ソデイカ科	ダンゴイカ科
	アオリイカ	ケンサキイカ	スルメイカ	スジイカ	ソデイカ	ミミイカ
モザイク配列	B型	B型	A型	A型	A型	A型
視軸	側方 やや下方向	ND	側方 やや上方向	体軸方向 上方向	側方 やや上方向	側方 やや下方向

A型：規則正しい正四方形のモザイク配列。

B型：複雑なモザイク配列。

ND：No data。

表 3. 6種のイカの視細胞核数、視精度等の比較。

	ツツイカ目					コウイカ目
	ヤリイカ科		アカイカ科		ソデイカ科	ダンゴイカ科
	アオリイカ	ケンサキイカ	スルメイカ	スジイカ	ソデイカ	ミミイカ
						
最大視細胞核数(cells/mm ²)	32080	ND	40840	79600	44800	28640
最小視細胞核数(cells/mm ²)	11920	ND	18320	42080	23600	17840
レンズの直径(mm)	9.57	7.43	8.52	8.63	17.28	5.07
視精度 (焦点距離 2.55)	0.63	ND	0.64	0.90	1.37	0.32
視精度 (焦点距離 2.27)	0.57	ND	0.57	0.80	1.21	0.28

ND : No data.

表 4. イカ 7 種の外套長、採集場所、およびロドプシンの最大吸収波長の比較。

	ツツイカ目					コウイカ目	
	ヤリイカ科	アカイカ科			ソデイカ科	ダンゴイカ科	
	アオリイカ	アカイカ	トビイカ	スルメイカ	スジイカ	ソデイカ	ミミイカ
生息域	沖合	沖合	沖合	沖合	沖合	沿岸	沿岸
外套長 (cm)	6.0	21.5	20.0	—	15.4	33.0	2.4
採集場所	尾鷲港	熊野灘沖	熊野灘沖	—	熊野灘沖	熊野灘沖	響灘
採集時間帯	昼	夜	夜	—	夜	夜	夜
最大吸収波長 (nm)	494	482	482	480* ¹	482	ND	482* ²

*¹ : Hara and Hara(1965)参照。

*² : Hikari *et al.* (1991)の視物質抽出法では 492 nm。

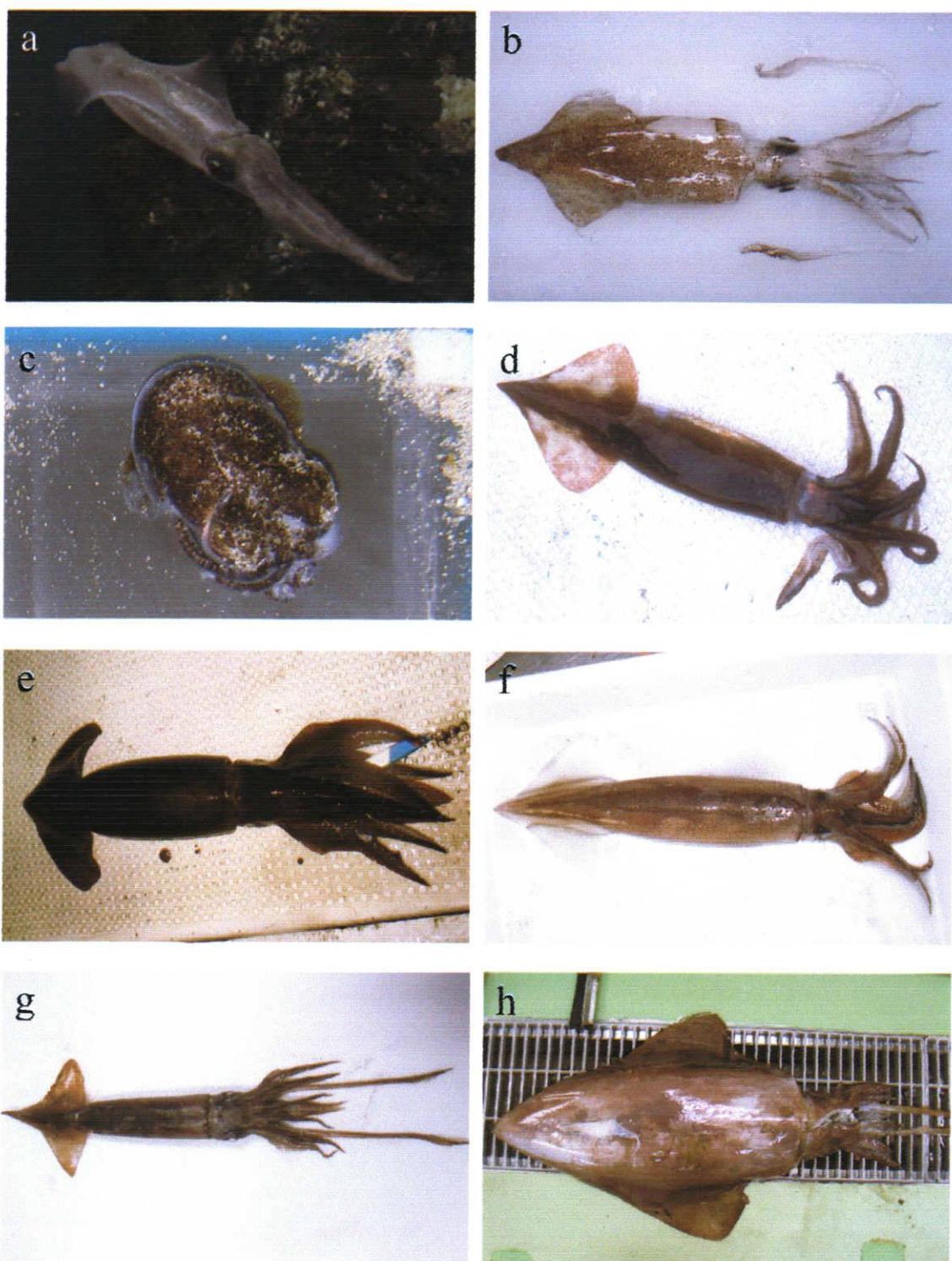


図 1. 実験に供したイカ

(a)アオリイカ、(b)ケンサキイカ、(c)ミミイカ、(d)アカイカ(写真提供：岡本光央氏)、(e)トビイカ、(f)スルメイカ、(g)スジイカ、(h)ソデイカ。

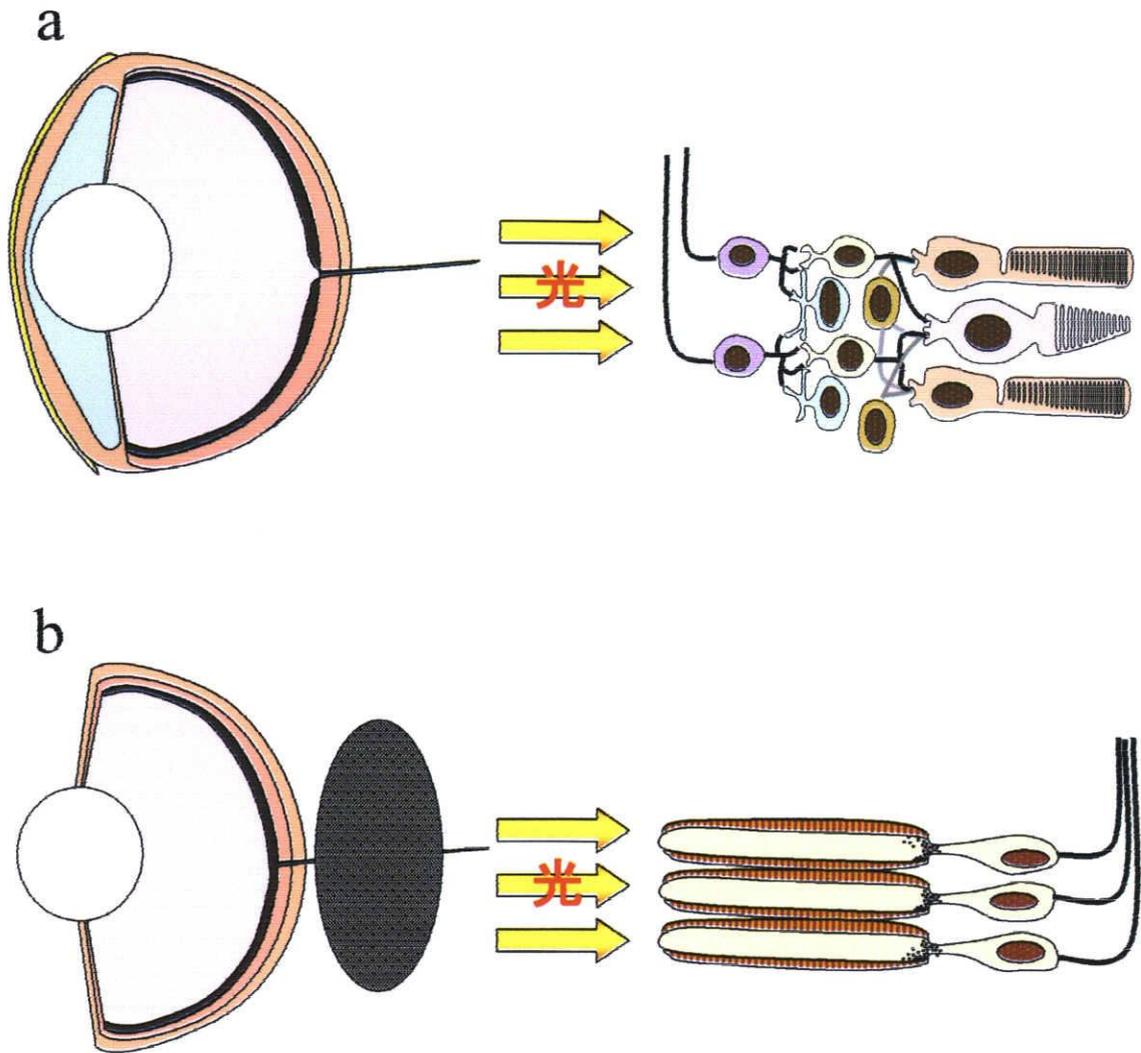


図 2. 魚類とイカの眼の模式図

a は魚類の眼の模式図で b はイカの眼の模式図。それぞれ、左図は眼球の断面図で、右図は網膜の断面図。光の入射方向は左側。

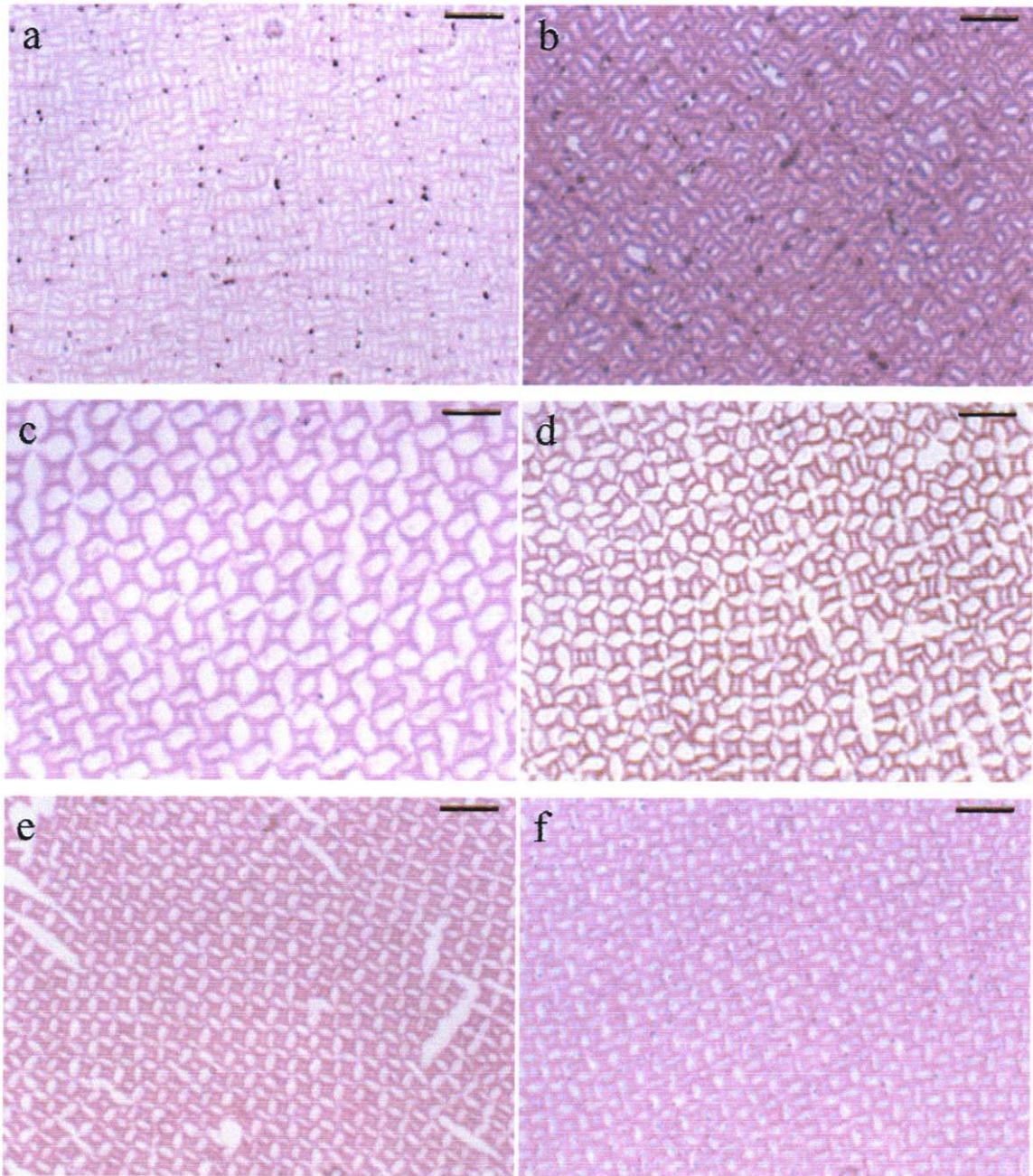


図 3. 視細胞外節層のモザイク配列の光学顕微鏡写真

(a)アオリイカ、(b)ケンサキイカ、(c)ミミイカ、(d)スルメイカ、(e)スジイカ、(f)ソデイカ

1000 倍率。スケールは 10 μm 。

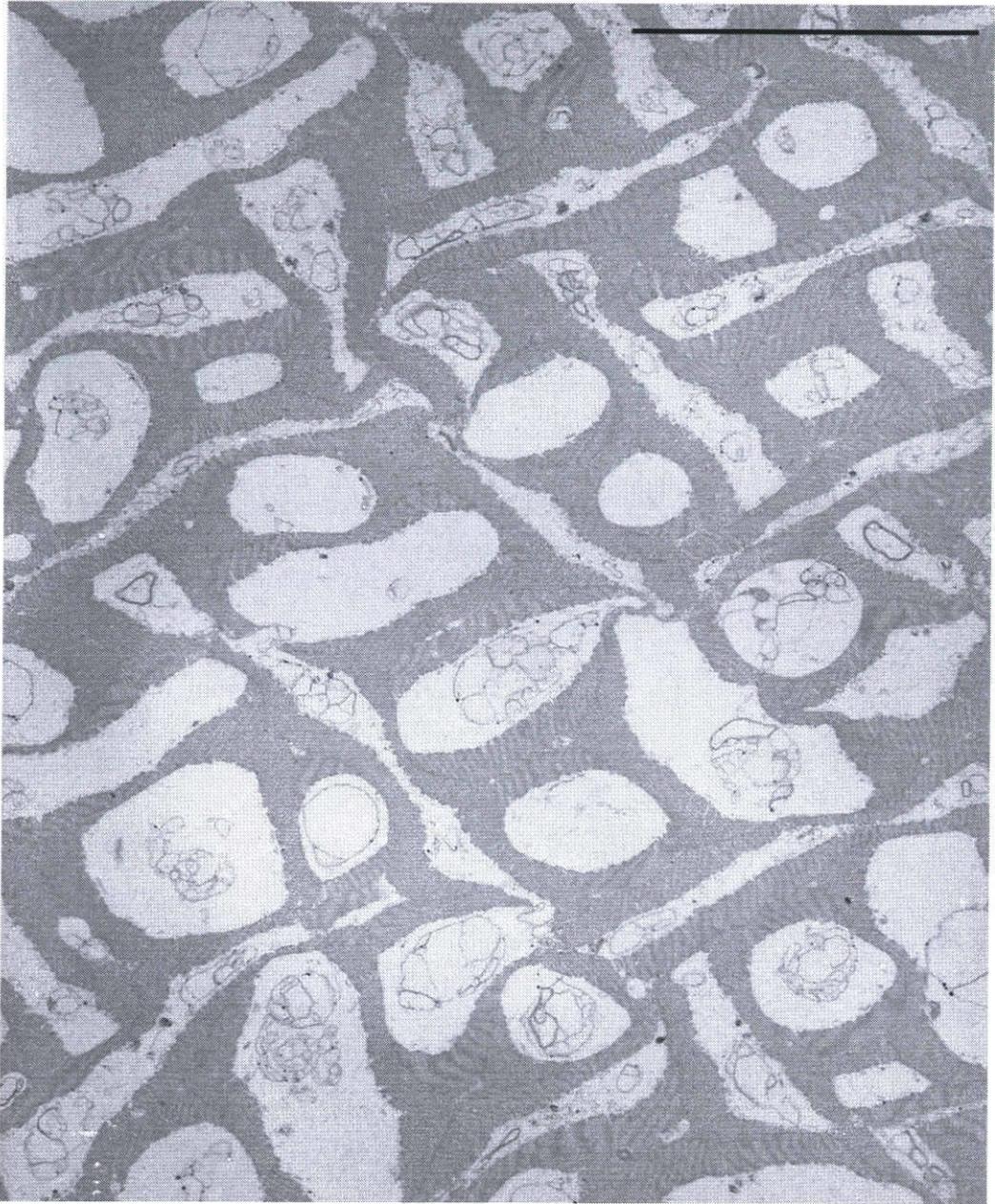


図 4. アオリイカ視細胞外節層の電子顕微鏡写真
5000 倍率。スケールは 10 μm 。

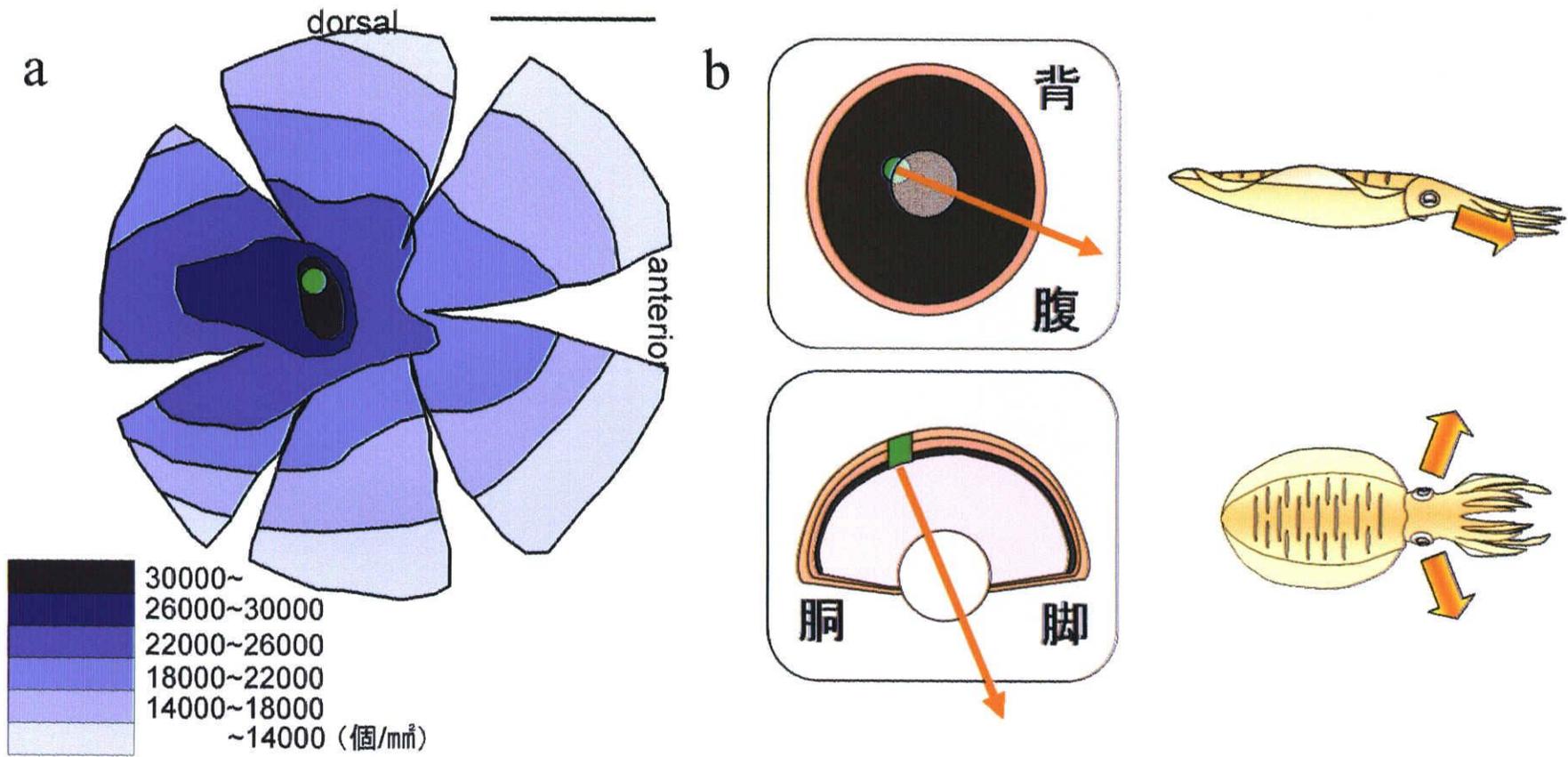


図 5. アオリイカの視細胞核の密度分布図 (右眼)

a は視細胞核の密度分布図。スケールは 10 mm。黄緑色の丸は視細胞核の最高密度部位を示す。b は密度分布図から推察される視軸方向。左は上下方向、右は左右方向の視軸を示す。

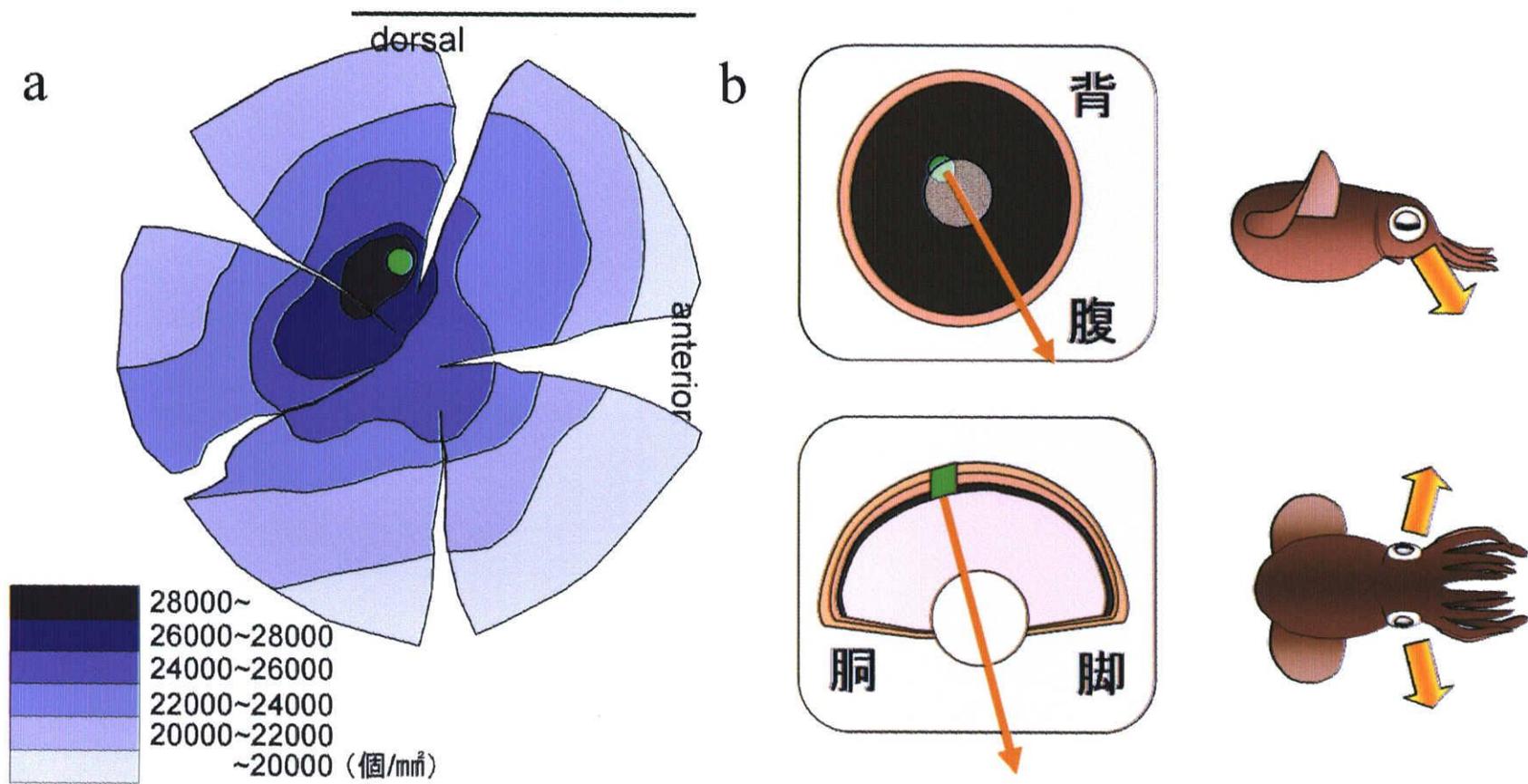


図 6. ミミイカの視細胞核の密度分布図 (右眼)

a は視細胞核の密度分布図。スケールは 10 mm。黄緑色の丸は視細胞核の最高密度部位を示す。b は密度分布図から推察される視軸方向。左は上下方向、右は左右方向の視軸を示す。

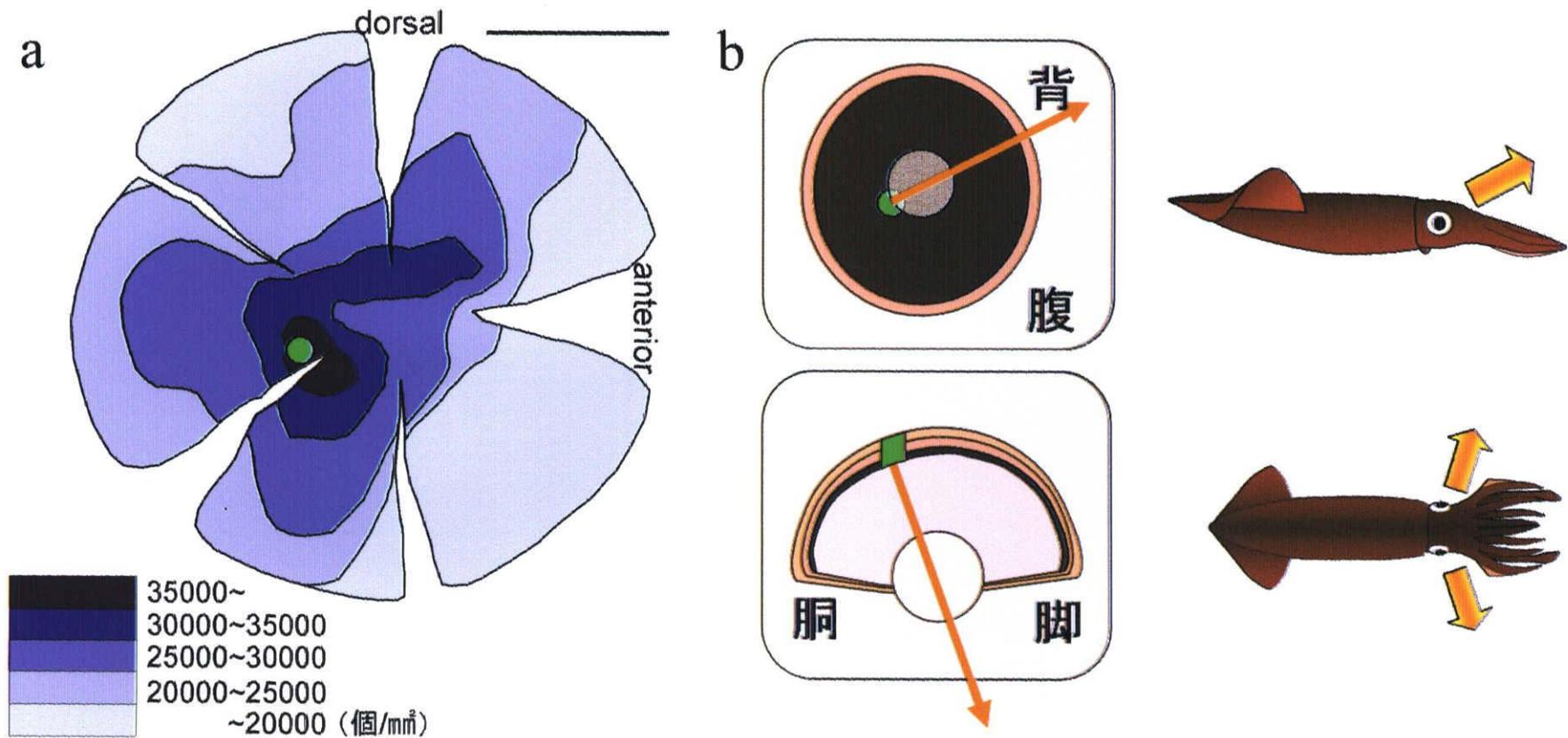


図 7. スルメイカの視細胞核数の密度分布図 (右眼)

a は視細胞核の密度分布図。スケールは 10 mm。黄緑色の丸は視細胞核の最高密度部位を示す。b は密度分布図から推察される視軸方向。左は上下方向、右は左右方向の視軸を示す。

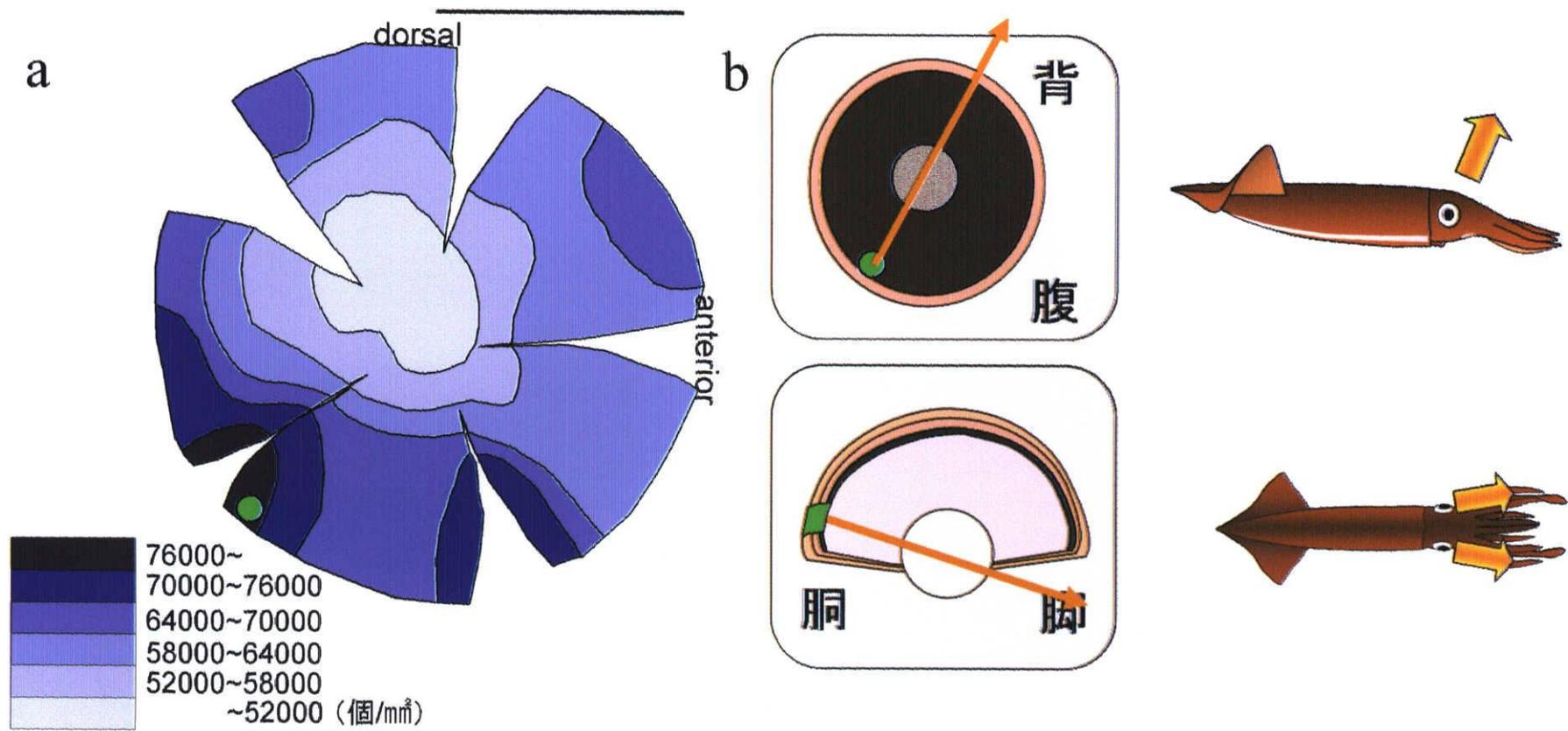


図 8. スジイカの視細胞核の密度分布図 (右眼)

a は視細胞核の密度分布図。スケールは 10 mm。黄緑色の丸は視細胞核の最高密度部位を示す。b は密度分布図から推察される視軸方向。左は上下方向、右は左右方向の視軸を示す。

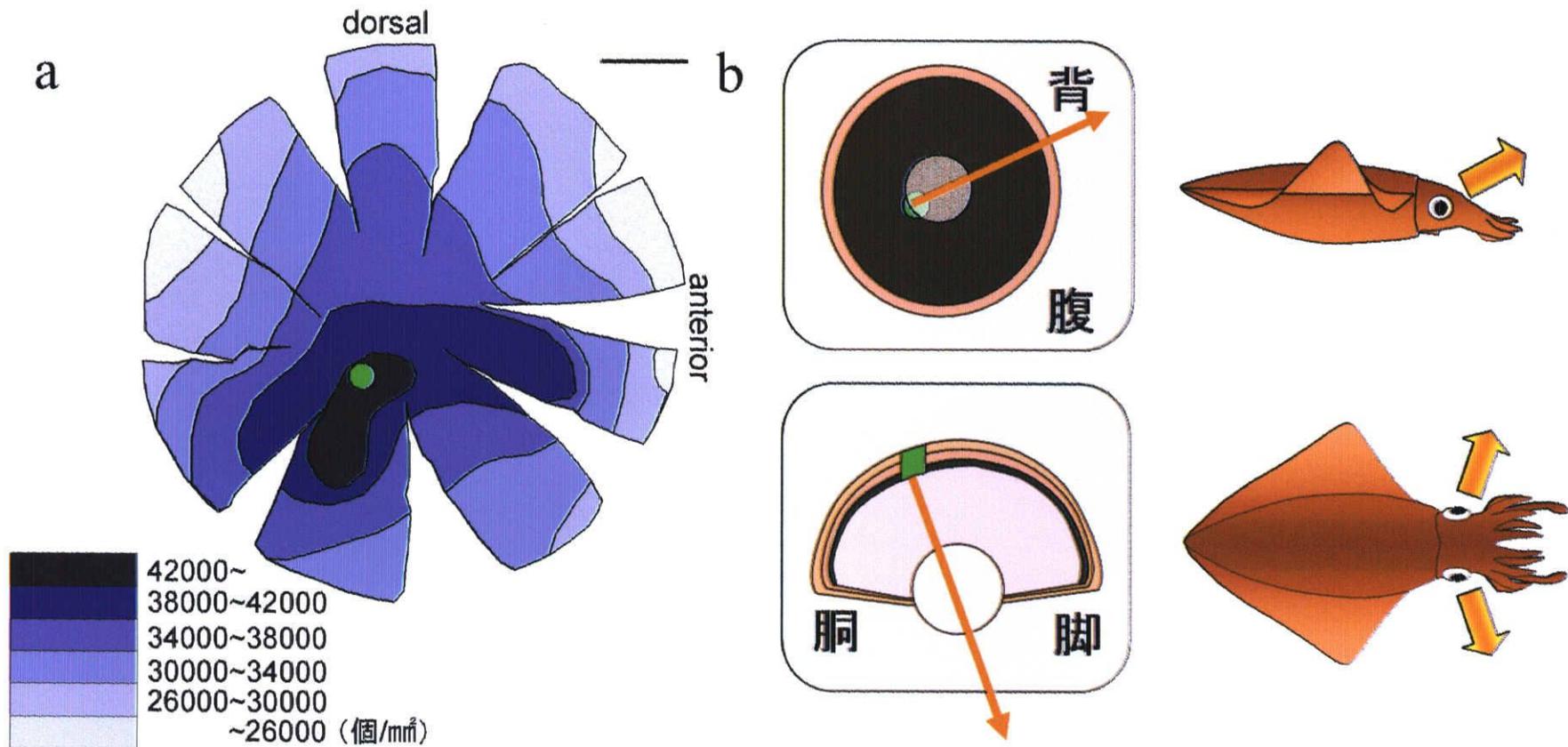


図 9. ソデイカの視細胞核の密度分布図(左眼)

左右反転して示す。aは視細胞核の密度分布図。スケールは10mm。黄緑色の丸は視細胞核の最高密度部位を示す。bは密度分布図から推察される視軸方向。左は上下方向、右は左右方向の視軸を示す。

```

スルメイカ 1: MGRDLRDNETWWYNPSI VVHPHWREFDQVPDAVYYSLGI F I G I CGI I GCGGNGI VI YLFT 60
アオリイカ 1: -----
ミミイカ 1: -----
アカイカ 1: -----
トビイカ 1: -----
スジイカ 1: -----

スルメイカ 61: KTKS LQTPANMFII NLAFSDFTFSLVNGFPLMTI SCFLKKWI FGF A ACKVYGF I GGI FGF 120
アオリイカ 1: ---- LQTPANMFII NLAFSDFTFSLVNGFPLMTI SCFLKKWV FGT A ACKVYGL I GGI FGL 56
ミミイカ 1: ---- LQTPANMFII NLAFSDFTFSLVNGFPLMTI SCFLKKWV FGH A ACKVYGF I GGI FGL 56
アカイカ 1: ---- LQTPANMFII NLAFSDFTFSLVNGFPLMTI SCFI KRWI FGY A ACKVYGF I GGI FGF 56
トビイカ 1: ---- LQTPANMFII NLAFSDFTFSLVNGFPLMTI SCFI KRWI FGY A ACKVYGF I GGI FGF 56
スジイカ 1: ---- LQTPANMFII NLAFSDFTFSLVNGFPLMTI SCFI KRWI FGY A ACKVYGF I GGI FGF 56

スルメイカ 121: MSI MTMAMI SI DRYNVI GRPMAASKKMSHRRAFI MI I FVWL WSVL WAI GPI FGWGAYTLE 180
アオリイカ 57: MSI MTMTMI SI DRYNVI GRPMSASKKMSHRKAFI MI I FVWI WSTI WAI GPI FGWGSY TLE 116
ミミイカ 57: MSI MTMAMI SI DRYNVI GRPMAASKHMSHRRAFI MI I FVWL WSVL WAI GPI FGWGAYTLE 116
アカイカ 57: MSI MTMAMI SI DRYNVI GRPMAASKKMSHRRAFI MI I FVWL WSVL WAI GPI FGWGAYTLE 116
トビイカ 57: MSI MTMAMI SI DRYNVI GRPMAASKKMSHRRAFI MI I FVWL WSVL WAI GPI FGWGAYTLE 116
スジイカ 57: MSI MTMAMI SI DRYNVI GRPMAASKKMSHRRAFI MI I FVWL WSVL WAI GPI FGWGAYTLE 116

スルメイカ 181: GVL CNCSFDYI SRDSTTRSNI LCMFI LGFFG-PILI IFFCYFNI VMSVSNHEKE MAATAK 239
アオリイカ 117: GVL CNCSFDYI TRDTATRSNI VCMYLFAMC-PII VI EFCYFNI VMSVSNHEKE MAATAK 175
ミミイカ 117: GVL CNCSFDYI TRDYATRSNI ICMYIFA-CP I I I LFCYFNI VMSVSNHEKE MAATAK 175
アカイカ 117: GVL CNCSFDYI SRDSTTRSNI V LCMFI LGFFG-PILI IFFCYFNI VMSVSNHEKE MAATAK 175
トビイカ 117: GVL CNCSFDYI SRDSTTRSNI V LCMFI LGFFG-PILI IFFCYFNI VMSVSNHEKE MAATAK 175
スジイカ 117: GVL CNCSFDYI SRDSTTRSNI LCMFI LGFFG-PILI IFFCYFNI VMSVSNHEKE MAATAK 175

スルメイカ 240: RLNAKELRKAQACANAEMRLAKI SI VI VSQFLLSWSFYAV VALLAQFGPL EWVTPYAAQL 299
アオリイカ 176: RLNAKELRKAQACANAEMKLAKE SI VI VTQFLLSWSFYAI VALLAQFGPI ----- 225
ミミイカ 176: RLNAKELRKAQACASAEMLAKI SI VI VTQFLLSWSFYAI VALLAQFGPL ----- 225
アカイカ 176: RLNAKELRKAQACANAEMRLAKI SI VI VSQFLLSWSFYAI VALLAQFGPL ----- 225
トビイカ 176: RLNAKELRKAQACANAEMRLAKI SI VI VSQFLLSWSFYAI VALLAQFGPL ----- 225
スジイカ 176: RLNAKELRKAQACANAEMRLAKI SI VI VSQFLLSWSFYAI VALLAQFGPL ----- 225

スルメイカ 300: PVMFAKASAI HNPMI YSVSHPKFREAI SQTFPWVLTCCQFDDKETE DDKDAETE I PAGES 359
アオリイカ -----
ミミイカ -----
アカイカ -----
トビイカ -----
スジイカ -----

スルメイカ 360: SGGETADAAQMKEMMAMMQMQAQQQQPAYPPGGYFPQGYPPPPPQGYPPQGYPPQGY 419
アオリイカ -----
ミミイカ -----
アカイカ -----
トビイカ -----
スジイカ -----

スルメイカ 420: PQQYPPPPQGGPPPPQGGPPQAAPPQGVNDQAYQA 452
アオリイカ -----
ミミイカ -----
アカイカ -----
トビイカ -----
スジイカ -----

```

図 10. 7種のイカのロドプシン遺伝子断片のアミノ酸配列比較