

氏 名 秋山 辰穂

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2435 号

学位授与の日付 2023 年 3 月 24 日

学位授与の要件 先導科学研究科 生命共生体進化学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Parallel evolution of vision among hawkmoth species  
through the diurnal-nocturnal transition

論文審査委員 主 査 木下 充代  
生命共生体進化学専攻 准教授  
寺井 洋平  
生命共生体進化学専攻 助教  
大田 竜也  
生命共生体進化学専攻 准教授  
蟻川 謙太郎  
総合研究大学院大学  
統合進化科学研究センター 教授  
今井 啓雄  
京都大学 ヒト行動進化研究センター 教授

## 博士論文の要旨

氏 名 秋山 辰穂

論文題目 Parallel evolution of vision among hawkmoth species through the diurnal–nocturnal transition

Light environments differ dramatically between day and night. The transition between diurnal and nocturnal visual ecology has happened repeatedly throughout evolution in many species, e.g., primates and butterflies. Since between day and night both the intensity and wavelength composition of sky light vary in terrestrial habitats, vision is considered to have adapted to ambient light. The light reception begins when light is absorbed by the visual pigment molecules, which consist of an opsin protein and an 11-*cis* retinal attached to it as the chromophore. Evolution of the amino acid sequence of opsin therefore tunes the visual pigment's absorption spectrum. However, because diurnal–nocturnal transition occurred long time ago and/or the diurnal and nocturnal species are distantly related, the molecular and physiological mechanisms underlying the evolution of visual pigments in a set of closely related species through recent diurnal–nocturnal transition have remained a question.

In this thesis, I focus on hawkmoth family (Lepidoptera: Sphingidae), which appeared around 42.8 million years ago containing both nocturnal and diurnal species, to address the question. The enigmatic phenomena have been reported in hawkmoth vision, i.e., color vision in the nocturnal species and scotopic vision type compound eyes in the diurnal species, suggesting that they have experienced multiple relatively recent diurnal–nocturnal transitions. Thus, I investigated the visual pigments of five nocturnal and five diurnal hawkmoth species.

First, I performed RNA sequencing (RNA-seq) from the eyes and brain. I reconstructed a phylogenetic tree of hawkmoth species base on the RNA-seq reads, and showed that the diurnal lineages had independently emerged at least three times from the nocturnal ancestors. I then identified the three visual opsin genes corresponding to the ultraviolet (UV), short-wavelength (SW), and long-wavelength (LW)-absorbing visual pigments in the transcriptomes of each of all the ten species verified by polymerase chain reaction (PCR) method. Opsin gene duplications and losses have occurred frequently in animals during diurnal–nocturnal transition, but hawkmoths kept their opsin gene repertoire. In addition to the opsin gene repertoire, I found no significant differences in the expression patterns of opsin genes between the nocturnal and diurnal species by RNA-seq analysis: the *LW* gene is predominantly expressed, while the *UV* and *SW* genes are expressed almost equally in hawkmoth eyes.

I constructed the gene trees of opsins, and found that the topology of the UV opsin

tree reflects the species' phylogenetic relationships, but in contrast, the SW and LW opsin trees exhibit distinct branching patterns from that of the species tree: SW and LW opsins in diurnal species form monophyletic groups in both trees. The evolutionary rates of amino acid substitutions were significantly higher on the diurnal branches than on the nocturnal branches in all the three opsins. I found an excess number of parallel amino acid substitutions in the opsins in the three independent diurnal lineages, which included the common substitutions on the three diurnal branches. The numbers were significantly more than those inferred from neutral evolution, suggesting that positive selection acted on these parallel substitutions during the transitions.

Second, I measured the spectral sensitivity of the compound eyes by recording the electroretinograms (ERG), and observed the histological localization of the screening pigments in the eyes in two nocturnal and two diurnal species belonging to different clades. I then predicted the visual pigments' absorption spectra. In the diurnal species, the peak absorption wavelength ( $\lambda_{\max}$ ) values of SW pigments shifted about 10 nm on average to the long-wavelength direction: 16.0 nm shift for diurnal *C. hylas* and 5.0 nm shift for diurnal *M. pyrrhosticta* from the average value of nocturnal species, respectively. On the other hand, the shift direction was opposite in LW pigments, i.e., the  $\lambda_{\max}$  values were about 10 nm shorter in diurnal species: 14.7 nm shift for *C. hylas* and 5.8 nm shift for *M. pyrrhosticta* from the average value of nocturnal species, respectively. Meanwhile, the  $\lambda_{\max}$  values of UV pigments were conservative. The reduced  $\lambda_{\max}$  separation increases the overlap of the spectral sensitivities of LW and SW pigments, which potentially enhances the color discrimination in the diurnal species.

In conclusion, the transitions from nocturnal to diurnal ecologies in hawkmoths were accompanied by parallel evolution of amino acid sequences of the visual opsins, which presumably brought spectral sensitivities of LW and SW pigments closer and enhanced the color discrimination properties of diurnal hawkmoths in ambient light. The findings in this thesis of rapid parallel evolution of opsin visual pigments shed new light on adaptive evolution of vision through diurnal–nocturnal transition.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏名 秋山 辰穂

論文題目 Parallel evolution of vision among hawkmoth species through the diurnal-nocturnal transition

秋山辰穂（出願者）は、博士研究として、スズメガの複眼で起こった昼と夜の光環境適応と進化をテーマとして取り上げ、視物質のタンパク質成分(オプシン)の分子進化・視物質の性質を、分子生物学・神経生理学・組織学など複数の手法を用いて明らかにした。スズメガで見出した新しい知見に対して、スズメガ・複眼構造・光受容物質とその進化についての一般的な序論と、光環境適応をより広く捉えた議論を展開することにより博士論文をまとめている。研究の中心となる内容は、国際誌に掲載され、雑誌から重要知見としても取り上げられており、昆虫視覚系の光環境適応・進化のより深い理解に寄与するものである。以上のことから審査委員会は、本博士論文が博士（理学）授与に値すると判断した。

昼と夜の光環境は、光強度・波長分布特性ともに大きく異なる。進化の過程で多くの動物門で昼行性と夜行性の生物が何度も出現し、それぞれの光環境に適応した視覚系を持つことが知られている。昼行性から夜行性への進化は非常に古くに起こり、それぞれの種は系統的に遠いことが多い。ところが、鱗翅目昆虫の多くが夜行性であるのに対し、スズメガの仲間には昼行性と夜行性の種が含まれている。そのため、このグループでは、昼行性の種が比較的最近夜行性から進化したと考えられている。

眼に含まれる視物質とそのタンパク質成分(オプシン)遺伝子の発現量は、生息する光環境に適した性質を持つ。そこで、夜行性と昼行性それぞれ5種類のスズメガの脳と眼を対象に RNA-seq を行い、種の系統関係を明らかにした上で、複眼に含まれる視物質のアミノ酸配列とその発現量を明らかにした。その結果、スズメガでは夜行性から昼行性の種が独立に3回出現していること、いずれの種も紫外(UV)・青(SW)・緑(LW)を持ちその発現パターンに種差は見られなかった。また、オプシンのアミノ酸配列の解析から、紫外オプシンの系統樹は種の系統を反映する一方、青と緑オプシンの系統は昼行性と夜行性種で分かれた。昼行性の種でより多くのアミノ酸置換が起こっていることから、これらの種では正の選択による並列進化が起こった可能性が高いことがわかった。

視物質のアミノ酸配列からその生理特性を同定することは難しい。そこで、昼行性と夜行性それぞれ2種から測定した分光感度を使って、同定した視物質の分光吸収特性と発現量を推定した。すると、夜行性種に比べ昼行性の種では青オプシンの最大吸収波長が10nm長波長側に、緑オプシンの最大吸収波長は10nm短波長側にシフトしていると推定できた。これにより、青と緑受容細胞の分光感度が大きく重なるため、色の弁別が良くなると考えられる。さらに、複眼内にある遮蔽色素の関与もモデル解析により推定した。以上は、夜行性の種では可視光の波長域を広げ、昼行性では色覚が鋭くなるよう進化が進んできたことを示している。