

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06724

研究課題名(和文) チョウの翅組織のリアルタイムイメージング：システム構成的アプローチ

研究課題名(英文) Real-time imaging of butterfly wing tissues: a system constitutive approach

研究代表者

大瀧 丈二 (Otaki, Joji)

琉球大学・理学部・教授

研究者番号：70360211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：チョウの翅の色模様形成過程が正常に進行するためには、蛹の翅組織はクチクラに接触していなければならないことがわかった。形成体からのモルフォゲン分子が周辺の細胞に作用するにはクチクラとの接触が必要なのである。クチクラの主成分であるキチンの細胞内動態を観察したところ、最初にキチン構造体が核付近に形成され、そこから上皮表層および深層へと延長されていくと思われる。表層へと伸びた構造体は鱗粉の前駆体であると推測される。一方、抗体等の蛋白質を直接翅組織の細胞へと導入する方法を開発した。この方法により、ゲノム編集等に頼ることなく、色模様形成に寄与する蛋白質の機能を生体内かつリアルタイムで阻害することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物の発生を考えるうえで、形成体とモルフォゲンの機能は最重要であるが、まだ解明されていない部分が多く残されている。本研究は、チョウの翅の色模様形成過程を対象にして、形成体とモルフォゲンの機能をリアルタイムイメージングを駆使して捉えようとする研究である。チョウの翅という実験系の利点を活かすことで得られた形成体とモルフォゲンに関する知見は、チョウに留まることなく、動物全体に一般化できると思われるため、本研究の学術的な意義は大きい。また、蛋白質導入方法も、さまざまな実験系に適用することができると思われ、汎用性が高い技術である。蛋白質導入法は投薬技術と直結しているため、今後さらに注目されると思われる。

研究成果の概要(英文)：This study discovered that the pupal wing tissue must have a physical contact with cuticle for normal color pattern development in butterflies. Such a contact is required for morphogenic molecules from organizers to act on surrounding cells. Because chitin is the major component of cuticle, its dynamics in cells were observed. chitin objects were produced near nuclei, from which the chitin objects appear to be extended to the surface and depth of the epithelial sheet. The objects extending to the surface may be scale precursors. On the other hand, this study established a method for directly delivering proteins such as antibodies to cells of the epithelial sheet. This method enabled researchers to inhibit protein functions for color pattern formation in vivo in real-time without using a genome editing method.

研究分野：分子生理学

キーワード：色模様形成 翅形成 チョウ リアルタイムイメージング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

チョウの翅の色模様は蛹化直後の蛹の翅組織で決定される。チョウの翅の色模様形成についての研究は、蛹の翅組織における形態形成遺伝子の発現パターン解析が長らく主流であったが、近年はゲノム解析および CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子編集による機能解析が主流となってきた。遺伝子編集されたチョウの個体では翅がモザイク状になるが、特定の色模様要素が消失するなどの変化が見られ、*Wnt* や *Distal-less* といった遺伝子の関与は確実なものとなった。しかしながら、実際に翅組織がどのように変化して最終的に色模様が決定されるのか、実際の翅の発生過程をリアルタイムで観察する研究はほとんどなされてこなかった。つまり、遺伝子という出発点と成虫の翅の色模様という最終点のみを対応させ、その間はブラックボックスとして扱われてきたのである。

確かに、翅組織は蛹の殻の中に閉じ込められているため、詳細に観察することは難しいと思われてきた。本研究室では独自に「めくりあげ手術」を発明した。蛹の翅組織を蛹化直後にめくりあげることによって、内部の様子を観察することができるようになった。この方法と共焦点顕微鏡を用いることで、インピボでのリアルタイムイメージングが可能となったのである。その結果、形成体(オーガナイザー)細胞の直接観察、上皮シートにおけるサイトニーム様構造の発見、色模様の上書き現象の発見などが相次いだ。しかしながら、これらの結果は必ずしも満足できるものではない。形成体細胞は周囲よりも厚いクチクラに覆われているため、全貌を捉えることが難しい。上記研究ではタテハチョウ科のチョウ(アオタテハモドキ)を主に用いていたため、顕微鏡の視野に翅全体が入らないため、全体像を把握しにくいという欠点もあった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、翅組織の組織・細胞・オルガネラ・分子レベルの動態を記述し、翅形成・色模様形成過程の全貌を知ることである。本研究では、小型のシジミチョウ科のチョウであるヤマトシジミを用いた。これは、小型であるために翅全体を顕微鏡の視野に収めることができることや飼育が容易であることなどの利点があるためである。ただし、タテハチョウ科のチョウについても、色模様の多様性の高さや大型の眼状紋の存在など、別の利点も多いため、両者を併用することで翅形成・色模様形成のシステム構成的な理解を目指した。

### 3. 研究の方法

チョウの幼虫を飼育し、蛹化直後の個体に、めくりあげ手術を行った。翅組織の細胞に直接蛍光試薬を透過させて染色した。蛋白質導入についても基本的に同様の手術を行い、抗体と導入試薬との混合物を翅組織に透過させた。その後、翅組織は薄いガラス板の表面に生きたまま固定し、共焦点顕微鏡を使用してインピボでのリアルタイム観察を行った。また、翅全体での色模様形成メカニズムを探るため、多様な種について翅の色模様の比較分析を行った。

### 4. 研究成果

ヤマトシジミの翅の辺縁部の発生過程について、長時間(100時間程度)のタイムラプス撮影を行い、その全体像を記録することに成功した。これは蛹化直後から、鱗粉が形成される時期までに相当する。鱗粉が形成されたあとは色素合成に時間がかかるが、長くても蛹化後1日程度で細胞分化の位置情報はすでに獲得されているものと考えられているため、本質的な細胞動態はすべて記録できたことになる。その結果、蛹の翅組織の一部が陥入することで成虫の翅の境界線が形成されることが明確に記録された。蛹の翅組織の辺縁部で成虫の翅の外側に位置する部分はアポトーシスで除去されると考えられており、これはしばしば「クッキーカッター・メカニズム」と呼ばれている。本研究の結果では、確かに陥入によって蛹の翅組織が切り取られると解釈できる結果が得られたが、切り取られた翅組織が引き続き陥入部位に移動していく様子が観察されたため、クッキーカッターのようなシンプルな比喩はあまり適切ではないと考えている。また、蛹の翅の最辺縁部位には、これまで記載されたことがない特殊な細胞が発見されたため、これらの細胞が蛹の翅組織の維持に何らかの役割を果たしていると考えられる。残念ながら、本結果には膨大な画像データが伴うため、未だにデータ整理に時間を要しており、未発表のままである。

翅細胞の形態変化と物理的な歪みおよび張力との関係については、当初の予想とは裏腹に初期の翅組織においては、細胞形態に方向性がないことがわかり、研究計画の一部変更を迫られた。一方、翅組織の眼状紋の焦点細胞(形成体)から発せられるモルフォゲンの性質を理解するために、翅組織に接触させる材質を変える実験を行った。これは、クチクラのどのような性質にモルフォゲンを伝達させる要因があるのかを調べるための実験である。その実験はかなりの成功を収め、クチクラでなくても疎水性が高くない材質であれば問題なくモルフォゲンを伝達させら

れることがわかった。いずれにしても、蛹の翅組織は何か接触到していなければモルフォゲンを伝達させることができないのである。これは当初の予想通り、モルフォゲンの伝達に力学的な要因が働いていることを示唆すると考えてもよいであろう。この研究は速やかに公開することができた（引用文献）。さらに、色模様修飾を誘導する薬剤はクチクラの主成分であるキチンに作用していることを突き止めた。これは1998年にタングステン酸が色模様修飾を誘導することが知られてから20年以上も謎となっていたが、今回、そのメカニズムの概要が解き明かされたことになる。本件についてもすでに論文として公開している（引用文献）。

クチクラの重要性が浮き彫りになってきたため、クチクラの主成分であるキチンをFB28と呼ばれる蛍光色素で染色し、蛹の翅組織を詳細に観察した。すると、初期には核付近にオタマジャクシ様の構造体が発見された。その後、おそらくこの構造体から表層部に向かってキチン構造体が延長されるようであった。おそらくこれが鱗粉前駆体であると思われる。他方、深層部に向かってかなり細長いキチン構造体が伸びていることがわかった。この機能については不明であるが、鱗粉前駆体を物理的に支えるものである可能性もある。この研究はすでに発表済である（引用文献）。

当初予定していたサイトニーム関連の解析についても、他の解析に時間を取られたため十分に解析できなかったが、関連して、カルシウムイメージングについては詳細な解析を行うことができた。特に本研究では翅組織の物理的損傷に対する細胞の挙動とカルシウムの反応を詳細に記録した。損傷部位には大きなカルシウムシグナルが発せられ、ヘモリンフの細胞が最初に移動してくる様子を動画で捉えることができた。その後、上皮細胞自体も損傷部位を覆うようになり、最終的には損傷部位が修復される。カルシウムシグナルを阻害剤で一時的に阻害しても修復過程は影響を受けないようであるが、おそらく、阻害剤の効果が一時的であるため、カルシウム阻害による修復への影響はわかりにくいだけなのだろうと考えている。残念ながら、カルシウムイメージングについても、現時点では未発表であるが、これから論文化していく予定である。

抗体導入実験については当初の予定していたL17Eと呼ばれる試薬では抗体はほとんど導入できないことがわかったが、続けて使用したProteoCarryと呼ばれる試薬では問題なく抗体が上皮細胞に導入されることがわかった。そこで、チョウの翅の色模様形成において重要な役割を果たしていると言われているDistal-lessおよびwinglessに対する抗体を作成し、翅組織への導入を試みた。どちらも有意に眼状紋が縮小することがわかったが、winglessについては正常な色模様と大きく変わるところがなかったため、この結果はさらなる検討を要する。一方、Distal-lessについては独特の色模様変化が見られたため、抗体による機能阻害が成功しているものと考えられる。この研究について前半はすでに公開済である（引用文献）。後半については、さらなる検討が必要である。

そのほか、あくまで付随的な研究ではあるが、多様な種の翅の色模様について、タテハチョウ基本プランや色模様ルールに照らし合わせながら比較分析を行った。タテハチョウ基本プランは対称システムの集合体として成り立っているが、これまでに見落とされていたディスカル・スポットを詳細に検討し、ディスカル対称システムとすることで、タテハチョウ基本プランを改訂することができた。色模様の形成過程の詳細はわからないものの、色模様要素の配置は自己相似あるいはフラクタル構造になっていることを示した。これらの成果はすでに公表済である（引用文献）。

#### <引用文献>

- Otaki JM. Butterfly eyespot color pattern formation requires physical contact of the pupal wing epithelium with extracellular materials for morphogenic signal propagation. *BMC Dev. Biol.* 2020, 20(1): 6. doi: 10.1186/s12861-020-00211-7.
- Otaki JM, Nakazato Y. Butterfly wing color pattern modification inducers may act on chitin in the apical extracellular site: Implications in morphogenic signals for color pattern determination. *Biology* 2022, 11(11): 1620. doi: 10.3390/biology11111620.
- Nakazato Y, Otaki JM. Live detection of intracellular chitin in butterfly wing epithelial cells in vivo using fluorescent brightener 28: Implications for the development of scales and color patterns. *Insects* 2023, 14(9): 753. doi: 10.3390/insects14090753.
- Nakazato Y, Otaki JM. Protein delivery to insect epithelial cells In vivo: Potential application to functional molecular analysis of proteins in butterfly wing development. *BioTech* 2023, 12(2): 28. doi: 10.3390/biotech12020028.
- Otaki JM. Morphological and spatial diversity of the discal spot on the hindwings of nymphalid butterflies: Revision of the nymphalid groundplan. *Insects* 2020, 11(10): 654. doi: 10.3390/insects11100654.
- Otaki JM. The fractal geometry of the nymphalid groundplan: Self-similar configuration of color pattern symmetry systems in butterfly wings. *Insects* 2021, 12(1): 39. doi: 10.3390/insects12010039.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Joji M. Otaki	4. 巻 20
2. 論文標題 Butterfly eyespot color pattern formation requires physical contact of the pupal wing epithelium with extracellular materials for morphogenic signal propagation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12861-020-00211-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Joji M. Otaki, Yugo Nakazato	4. 巻 11
2. 論文標題 Butterfly Wing Color Pattern Modification Inducers May Act on Chitin in the Apical Extracellular Site: Implications in Morphogenic Signals for Color Pattern Determination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 1620
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biology11111620	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yugo Nakazato, Joji M. Otaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Live detection of intracellular chitin in butterfly wing epithelial cells in vivo using fluorescent brightener 28: Implications for the development of scales and color patterns.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Insects	6. 最初と最後の頁 753
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/insects14090753	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yugo Nakazato, Joji M. Otaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Protein Delivery to Insect Epithelial Cells In Vivo: Potential Application to Functional Molecular Analysis of Proteins in Butterfly Wing Development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BioTech	6. 最初と最後の頁 28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biotech12020028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Joji M. Otaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Morphological and spatial diversity of the discal spot on the hindwings of nymphalid butterflies: Revision of the Nymphalid Groundplan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Insects	6. 最初と最後の頁 654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/insects11100654	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Joji M. Otaki	4. 巻 12
2. 論文標題 The fractal geometry of the Nymphalid Groundplan: Self-similar configuration of color pattern symmetry systems in butterfly wings	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Insects	6. 最初と最後の頁 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/insects12010039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

#### 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------