

令和 2 年 4 月 8 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07425

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

研究課題名（英文）Real-time imaging of butterfly wing tissues

研究代表者

大瀧 丈二 (Otaki, Joji)

琉球大学・理学部・准教授

研究者番号：70360211

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はチョウの翅が蛹の中で形成されていく過程を細胞レベルおよび細胞内小器官（オルガネラ）レベルでリアルタイムに観察することで、翅に表現される色模様の形成や翅の形状の形成のメカニズムを明らかにするものである。蛹の翅組織の細胞の核、ミトコンドリア、膜構造などを蛍光染色し、共焦点顕微鏡を用いてリアルタイムで変化を観察できる実験系を、小型のチョウであるヤマトシジミを対象として確立した。これによって、翅組織の動態の詳細が明らかとなった。さらに、チョウの翅の色模様形成は翅組織の物理的な損傷や歪みに依存するだけでなく、翅組織の接触表面（細胞外マトリクス）の物理化学的性質にも依存することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チョウの翅形成および色模様形成のメカニズムの解明に一石を投じることができた。そのメカニズムはチョウに限らず、生物の発生全般に適用されうるものであろう。チョウの場合、色模様形成のシグナルは、翅細胞の特定の位置に存在する形成体（オーガナイザー）と呼ばれる小さな特殊な細胞群から発せられると考えられている。形成体からシグナルが発せられるという考え方は100年ほど前に提案され、発生生物学の最も重要な概念の一つであり、現代生物学全体においても重要なパラダイムとなっているが、その実態は未解明のままである。本研究によってその一部が解明され、今後のさらなる発展のための基盤を形成することができた。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study is to clarify developmental mechanisms of color pattern formation and wing shape formation in butterfly wings through real-time observations of these developmental processes in pupae at the cellular and organelle levels. Focusing on a small butterfly, the pale grass blue butterfly, the experimental system for real-time observations of developmental changes was established using fluorescent dyes that stain nuclei, mitochondria, and membrane structures such as Golgi apparatus. With this system, dynamics of the pupal wing tissues was made clear in detail. Furthermore, it was discovered that color pattern formation in butterfly wings depends not only on physical damage and distortions of the tissue but also on physicochemical characters of contact surface (extracellular matrix) of the tissue.

研究分野：分子生理学

キーワード：チョウ 翅組織 色模様形成 リアルタイムイメージング 蛍光イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

チョウの翅は多様な色模様を持つため、多くの研究者がチョウを対象にした研究を行ってきた。その中でも、1994年のNijhout(アメリカ、デューク大学)の著作『*The Development and Evolution of Butterfly Wing Patterns*』はその後の研究動向に大きな影響を与えた。この本は、チョウの色模様形成過程を発生生物学および進化生物学の中で位置づけ、当時までに発表されているもののあまり知られていなかった研究結果を整理し、本分野全体を体系的に議論したものである。これに刺激され、EvoDevo(進化発生学)で有名なCarrollのグループ(アメリカ、ウィスコンシン大学マディソン校)は、チョウの翅で、ショウジョウバエで知られていた形態形成遺伝子が発現されていることを次々と発見した。しかしながら、ショウジョウバエの翅には色模様はないため、チョウの翅でこれらの遺伝子群がどのような機能をもっているのか、謎のままであった。さらに、遺伝子発現レベルでの研究は進んだものの、実際に蛹の翅組織にどのような変化が起こって色模様を含む成虫の翅が完成されるのかといった基本情報が欠如していた。翅組織を一つのシステムとして総合的にとらえようとする努力はまったくなされていなかったのである。

そのような状況下において、われわれはアオタテハモドキと呼ばれるチョウの生きた翅組織を対象として、発生生理学的な解析を進めてきた。本研究開始の前に、それまでの努力が実り、生きた翅組織の長期的リアルタイムイメージングに成功した[1,2]。さらに、カルシウム波が翅組織の表面を伝播していく様子を直接観察することに成功した[3]。ただし、アオタテハモドキを用いた実験系には、恒常的な採集があまり容易ではないこと、飼育が煩雑であること、翅が大きすぎて顕微鏡の視野に収まりきれないことなど、改善すべき点多々あった。

その一方で、われわれは進化生物学のモデルとしてヤマトシジミという小型のチョウを研究対象としてきた[4]。ヤマトシジミは小型であるために多くの個体を同時に飼育することが可能であり、野外でも個体数が多いため、恒常的な採集が可能である。また、翅が小さいため、翅全体を視野に入れて観察することが可能であるという利点も考えられた。

本研究では、これらの二つの流れを合体させ、チョウの翅の色模様形成過程の研究にヤマトシジミを導入した。ヤマトシジミを導入することで、翅全体の変化を一つの視野内で観察できる。一方、アオタテハモドキによる実験系にもヤマトシジミにはない利点がある。それは、翅が大きいため、局所的な観察には適していること、また、翅組織に対する手術が施しやすいことである。本研究は、それら両種の利点を生かして進められた。

2. 研究の目的

本研究は、ヤマトシジミに蛍光イメージング技術を適用することで、チョウの蛹での翅組織の動態を総合的に観察することが目的である。さらに、それによって、翅の色模様形成のメカニズムを推察することを目的としている。そのために、以下の点を明らかにすることを目的として掲げた。(1) ヤマトシジミの翅組織全体にカルシウム波が走っていること。翅全体を顕微鏡で捉えることができるため、カルシウムの発信源を捉えることが可能となる。(2) そのカルシウム波がその後形成される色模様と対応していること。これは、色模様形成シグナルの一部がカルシウム波であることを示唆するものである。(3) 翅組織の細胞構成(種類、形態、大きさ、密度、細胞内小器官など)とクチクラ構造との関係を明らかにすること。これは研究対象物の基本情報を詳細に得ることである。また、クチクラが鋳型あるいは力学的な基盤となって翅の形態や色模様を決めているという可能性を探ることもである。(4) 翅組織の発生初期(蛹化直後)において発見された組織全体の遅延型収縮のメカニズムを明らかにすること。細胞の動きを長時間イメージングすることで、収縮がどのようにして起こっているのかを明らかにする。(5) 蛍光抗体の翅への浸透方法を確立すること。これは、抗体による機能阻害実験系の確立をめざした、将来の研究のための方法論の開拓である。

3. 研究の方法

本研究では、共焦点蛍光顕微鏡を用いてヤマトシジミの蛹の翅組織の発生段階での変化を記録した。最初にヤマトシジミの翅組織に蛍光試薬を導入するための手術法の開発とマニュアル化を行った。その後、各蛍光試薬について、導入方法の最適化を行った。そのうえで、様々な蛍光試薬を用いて、核、ミトコンドリア、ゴルジ体を含む膜構造などを特異的に蛍光染色し、組織レベル、細胞レベル、細胞小器官レベルでの動態を記録した。同様に、カルシウムインディケーターを用いてカルシウムイメージングを行った。蛍光抗体の導入法の確立を目的とした試行も行った。さらに、アオタテハモドキの翅組織を対象として翅組織に損傷や歪みを導入する実験、および、細胞外マトリクスを人工材質で置き換える実験を行った。そのような実験操作によってどのように色模様が変化するのかを記録した。

4. 研究成果

本研究全般に必要な翅組織への試薬導入の方法を研究の第一段階として確立することができた。これは、蛹化直後に蛹の前翅を実体顕微鏡下でめくりあげ、その状態で翅に試薬を浸透させる方法である。この方法のヤマトシジミでの確立により、本研究は大きな一歩を踏み出すことができた。しかし、残念ながら、当初の目的に照らし合わせると、研究全体としては、目的の一部しか達成できなかったと言わねばならない。ただし、達成できた部分では、当初の予定よりも深

く広く研究を進めることができ、その意味では大きな成果があったと言ってよいだろう。

(1)および(2)の目的については、カルシウムシグナルは検出されたものの、シグナルが弱いためか、あるいはノイズが高いためか、あまり明確な画像を得るには至らなかった。実験結果の再現性についても問題があった。この原因は何なのか結論付けることはできなかったが、ヤマトシジミは小型であるため、シグナルそのものが弱いため、検出そのものが難しいという可能性もある。この点は今後の課題であるが、ヤマトシジミでのカルシウム波の検出にあまりにも労力が必要な場合は、アオタテハモドキからヤマトシジミに対象生物を変更した利点が得られない。そのため、今後は、アオタテハモドキとの併用を考えなければならなくなった。

(3)の目的については、ヤマトシジミおよびアオタテハモドキにおいて翅組織における詳細なデータを得ることができた[5,6]。蛹化直後には縦方向に長い生きた細胞が観察された。横方向には長い軸索のような突起を伸ばし、相互に連結している様子が観察された。さらに、いくつかの細胞が横方向に連結する単位(クラスター)があることが発見された。また、翅組織の細胞構成については、鱗粉レベルで詳細に検討することができた[7]。その結果、色模様要素の中心に大きな細胞が位置付けられるという過去の成果[8]に加え、色の強度変化に関する分析、色模様要素境界付近の鱗粉の形態や色に関する分析、発生途中で停止していると思われる眼状紋の形態分析から、眼状紋の内部の色が周辺部に比べて常に濃いこと(the inside-dark rule)を発見するなど、色模様形成メカニズムについて推察することができた[7]。クチクラ構造との関係を明らかにするため、翅組織の損傷実験やクチクラ(細胞外マトリクス)を別の物質に置き換える実験を行った[9-12]。その結果、色模様決定シグナルは損傷や組織の物理的歪みに影響を受けるばかりでなく、細胞外マトリクスの性質にも影響を受けることがわかった。特に、クチクラのように細胞が接着できる物理的基質となる構造物がなければ、色模様決定シグナルが伝播できないことがわかった。

(4)の目的については、翅の収縮過程を様々な種で捉えるとともに[13]、ヤマトシジミでその全貌を動画として捉えることに成功した[6]。蛹化から数日後の翅の細胞の動態を蛍光イメージング法によって記録する方法を確立したことで、発表した内容[6]よりもさらに詳細なデータを得ることに成功した。それらのデータは現段階では未発表であるが、近い将来、論文として発表する予定である。

(5)の目的については、残念ながら大きな発展はみられなかった。これは研究課題が当初の予想よりも難しく、多くの試行錯誤を要するものであるにもかかわらず、それに見合う十分な時間が確保できなかったことが主な原因である。今後の課題としたい。

最後に、一般雑誌である『昆虫と自然』に本研究の成果の一部について解説記事を掲載し、研究成果の公開に努めた[14,15]。

< 引用文献 >

[1] Ohno Y, Otaki JM (2015) Live cell imaging of butterfly pupal and larval wings *in vivo*. *PLoS One* **10**, e0128332. doi: 10.1371/journal.pone.0128332.

[2] Iwata M, Ohno Y, Otaki JM (2014) Real-time *in vivo* imaging of butterfly wing development: revealing the cellular dynamics of the pupal wing tissue. *PLoS One* **9**, e89500. doi: 10.1371/journal.pone.0089500.

[3] Ohno Y, Otaki JM (2015) Spontaneous long-range calcium waves in developing butterfly wings. *BMC Developmental Biology* **15**, 17. doi: 10.1186/s12861-015-0067-8.

[4] Otaki JM, Hiyama A, Iwata M, Kudo T (2010) Phenotypic plasticity in the range-margin population of the lycaenid butterfly *Zizeeria maha*. *BMC Evolutionary Biology* **10**, 252. doi: 10.1186/1471-2148-10-252.

[5] Iwasaki M, Otaki JM (2017) Butterfly eyespot organiser: *in vivo* imaging of the prospective focal cells in pupal wing tissues. *Scientific Reports* **7**, 40705. doi: 10.1038/srep40705.

[6] Hirata K, Otaki JM (2019) Real-time *in vivo* imaging of the developing pupal wing tissues in the pale grass blue butterfly *Zizeeria maha*: establishing the lycaenid system for multiscale bioimaging. *Journal of Imaging* **5**, 42. doi: 10.3390/jimaging5040042.

[7] Iwata M, Otaki JM (2019) Insights into eyespot color-pattern formation mechanisms from color gradients, boundary scales, and rudimentary eyespots in butterfly wings. *Journal of Insect Physiology* **114**, 68-82. doi: 10.1016/j.jinsphys.2019.02.009.

[8] Iwata M, Otaki JM (2016) Spatial patterns of correlated scale size and scale color in relation to color pattern elements in butterfly wings. *Journal of Insect Physiology* **85**, 32-45. doi: 10.1016/j.jinsphys.2015.11.013.

- [9] Iwasaki M, Otaki JM (2017) Synergistic damage response of the double-focus eyespot in the hindwing of the peacock pansy butterfly. In: Perveen FK (Ed) *Lepidoptera*. pp. 65-82. InTech, Croatia. doi: 10.5772/intechopen.70050.
- [10] Otaki JM (2017) Contact-mediated eyespot color-pattern changes in the peacock pansy butterfly: Contributions of mechanical force and extracellular matrix to morphogenic signal propagation. In: Perveen FK (Ed) *Lepidoptera*. pp. 83-102. InTech, Croatia. doi: 10.5772/intechopen.70098.
- [11] Otaki JM (2018) Long-range effects of wing physical damage and distortion on eyespot color patterns in the hindwing of the blue pansy butterfly *Junonia orithya*. *Insects* **9**, 195. doi: 10.3390/insects9040195.
- [12] Otaki JM (2020) Butterfly eyespot color pattern formation requires physical contact of the pupal wing epithelium with extracellular materials for morphogenic signal propagation. *BMC Developmental Biology* **20**, 6. doi: 10.1186/s12861-020-00211-7.
- [13] Iwata M, Tsutsumi M, Otaki JM (2018) Developmental dynamics of butterfly wings: real-time *in vivo* whole-wing imaging of twelve butterfly species. *Scientific Reports* **8**, 16848. doi: 10.1038/s41598-018-34990-8.
- [14] 大瀧丈二 (2017) チョウの翅のリアルタイムイメージング: 色模様形成の謎に迫る. *昆虫と自然* **52**(5), 39-40.
- [15] 大瀧丈二 (2017) チョウの翅の色模様を読み解く: 自己相似構造. *昆虫と自然* **52**(8), 41-42.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Iwata M, Tsutsumi M, Otaki JM	4. 巻 8
2. 論文標題 Developmental dynamics of butterfly wings: real-time in vivo whole-wing imaging of twelve butterfly species.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-34990-8	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 Otaki JM	4. 巻 9
2. 論文標題 Long-range effects of wing physical damage and distortion on eyespot color patterns in the hindwing of the blue pansy butterfly <i>Junonia orithya</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Insects	6. 最初と最後の頁 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/insects9040195	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 Hirata K, Otaki JM	4. 巻 5
2. 論文標題 Real-time in vivo imaging of the developing pupal wing tissues in the pale grass blue butterfly <i>Zizeeria maha</i> : establishing the lycaenid system for multiscale bioimaging.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Imaging	6. 最初と最後の頁 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jimaging5040042	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 Iwata M, Otaki JM	4. 巻 114
2. 論文標題 Insights into eyespot color-pattern formation mechanisms from color gradients, boundary scales, and rudimentary eyespots in butterfly wings.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Insect Physiology	6. 最初と最後の頁 68 - 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jinsphys.2019.02.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mayo Iwasaki, Joji M. Otaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Synergistic damage response of the double-focus eyespot in the hindwing of the peacock pansy butterfly	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Lepidoptera (InTech)	6. 最初と最後の頁 65-82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5772/intechopen.70050	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 -
2. 論文標題 Contact-mediated eyespot color-pattern changes in the peacock pansy butterfly: Contributions of mechanical force and extracellular matrix to morphogenic signal propagation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Lepidoptera (InTech)	6. 最初と最後の頁 83-102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5772/intechopen.70098	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 大瀧丈二	4. 巻 52(5)
2. 論文標題 チョウの翅のリアルタイムイメージング：色模様形成の謎に迫る	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 39-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大瀧丈二	4. 巻 52(8)
2. 論文標題 チョウの翅の色模様を読み解く：自己相似構造	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 41-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mayo Iwasaki, Joji M. Otaki	4. 巻 7
2. 論文標題 Butterfly eyespot organiser: in vivo imaging of the prospective focal cells in pupal wing tissues	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 40705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1038/srep40705	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 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) doi: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 -

[学会発表] 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岩崎茉世、大野良和、大瀧丈二
2. 発表標題 色模様決定に機能するチョウの眼状紋オーガナイザー細胞のライブイメージング
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平田香南子、大瀧丈二
2. 発表標題 チョウの翅発生過程のリアルタイムイメージングによる新知見
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

〔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
研究協力者	平田 香南子 (Hirata Kanako)		
研究協力者	岩崎 茉世 (Iwasaki Mayo)		
研究協力者	岩田 大生 (Iwata Masaki)		
研究協力者	大野 良和 (Ohno Yoshikazu)		
研究協力者	平良 渉 (Taira Wataru)		
研究協力者	グラング ラージ (Gurung Raj)		