



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Elucidation of the mechanism of the wing color pattern formation in <i>Drosophila guttifer</i> from the perspective of tissue formation programs and gene network reorganization [an abstract of entire text]
Author(s)	古関, 将斗
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第16220号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95320
Type	doctoral thesis
File Information	KOSEKI_Masato_summary.pdf



学位論文の要約

博士（環境科学） 氏名 古関 将斗

学位論文題名

Elucidation of the mechanism of the wing color pattern formation
in *Drosophila guttifera* from the perspective of tissue formation programs
and gene network reorganization
(組織形成プログラムと遺伝子ネットワーク再編の視点で明らかにする
ミズタマショウジョウバエの翅模様形成メカニズム)

序論

地球上に生命が誕生した後、進化の過程を経て生物は多様な形態を獲得してきた。莫大な種数を誇る昆虫綱は数多くのユニークな形態をもつため、形態進化の分子基盤を模索する進化発生生物学の研究対象として用いられてきた。その中で特に着目されてきた形態は体表に描かれる「模様」である。

昆虫の模様が進化した背景にある分子基盤を探るために、先行研究ではまず、模様形成を制御する遺伝子発現が調べられてきた。その結果、祖先で獲得されていた発生制御遺伝子が新たに模様のパターンニング機能を獲得する「転用」が生じたことで、昆虫の模様が多様化した証拠が得られてきた。しかし、多くの研究では遺伝子の転用が生じたと記述することにとどまっている。特に、体の局所的な領域で転用が生じた発生的な背景と、転用された遺伝子間で形成される発現制御のネットワーク（遺伝子ネットワーク）について体系的に追究した例はない。そのため、転用がどのようにして成立し模様の獲得に貢献できたのか、そのメカニズムを考察するための実証研究が不足している。

ショウジョウバエ科に属する昆虫の翅には、黒メラニンで描かれる特徴的な着色パターンが数多く見られる。翅に模様を持たない祖先状態から多様な模様をもつ種が誕生してきたと考えられている。また、ショウジョウバエ科にはモデル生物のキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) が含まれており、この種の翅には模様がみられない。キイロショウジョウバエと模様を持つ種の遺伝子発現パターンやエンハンサー配列の駆動パターンを比較することで、翅の模様形成を制御する遺伝子について研究が行われてきた。

ミズタマショウジョウバエ (*Drosophila guttifera*) は翅に新奇な模様を獲得した。鐘状感覚子と呼ばれる神経組織の周囲に斑紋が形成される点や、横脈と縦脈末端の周囲に大きな斑紋が形成される点が他種には見られない。先行研究では、これらの斑紋のパターンニングが蛹中期に開始する発生制御遺伝子 *wingless* の発現によって行われることが判明した。*wingless* は Wnt シグナル伝達経路の分泌性リガンドをコードする。*wingless* の転用が模様の獲得に重要だったことが示唆されるものの、翅の局所的な位置で *wingless* の発現を活性化させるメカニズムや、Wingless タンパク質が着色形成を誘導するメカニズムについては実証研究を基にした理解が進んでいなかった。本博士論文では、組織染色実験と遺伝子操作実験を駆使

することによって、ミズタマシヨウジョウバエの翅の模様形成メカニズムを遺伝子ネットワークの構造に基づいて明らかにした。その結果から、模様形態が獲得された根底にある遺伝基盤がどのようにして構築されたのか新たに言及した。

第1章

ミズタマシヨウジョウバエでは、翅脈上に位置する鐘状感覚子と呼ばれる神経組織の付近で、模様のパターンニングに関わる種特異的な *wingless* の発現が観察されていた。鐘状感覚子は4タイプの構成細胞 (neuron、sheath 細胞、socket 細胞、dome 細胞) で構成されることが他の昆虫を利用した研究から知られていた。この位置において *wingless* の発現が生じるようになったメカニズムを理解するために、まず、鐘状感覚子で *wingless* の発現が生じるのかと、生じるのであればどの構成細胞が発現するのか明らかにすることを試みた。

方法としては、*wingless* mRNA の局在を *in situ* hybridization で、鐘状感覚子の構成細胞を免疫染色で同時に標識し、それぞれのシグナルを画像解析ソフトウェア Fiji で重ね合わせることで *wingless* の発現位置を確認した。元々は neuron が *wingless* を発現するのではないかと予想していたものの、同時染色の結果から neuron (とおそらく sheath 細胞) では発現しないことが判明した。そして、細胞膜に局在するタンパク質を構成細胞のマーカーとして利用し、共焦点顕微鏡を用いて観察した結果から、socket 細胞と dome 細胞の両方において *wingless* が発現すると判断した。

ミズタマシヨウジョウバエにおいて模様のパターンニングに関わる *wingless* の発現について、その一部は socket 細胞と dome 細胞という神経組織の構成細胞で獲得されたことが新たに明らかになった。*wingless* の発現が開始する蛹中期が構成細胞の分化段階に当たることを考慮すると、これら 2 細胞の分化に共通して働く遺伝子ネットワークが鐘状感覚子における *wingless* の発現を誘導することが示唆される。キイロシヨウジョウバエの研究では EGFR シグナルのような発現調節経路がこの分化に関与することから、今後はこのシグナルと *wingless* の関係性について調べる必要がある。

第2章

模様を含めた新奇形態を作り出すための遺伝基盤として転用の存在が明らかになってきたものの、その形成を制御する遺伝子ネットワークがどのようにして構築されたのかは依然として不明な点が多い。ミズタマシヨウジョウバエの翅において模様形成を制御する遺伝子ネットワークについては、複数の先行研究に基づいて予想することができた。この仮説では、翅脈形成や細胞分化に関わる遺伝子発現がそれぞれ別の位置で *wingless* の発現を活性化する。続いて、産生された Wingless タンパク質がその周囲で特定のシグナル伝達経路を活性化させる。経路の下流では、着色形成を実行するタンパク質がコードされた遺伝子群 (着色実行遺伝子) が発現する。このように仮説を立てることができたものの、ミズタマシヨウジョウバエでは遺伝子機能解析を行うための実験系が確立されていなかった。そこで、ミズタマシヨウジョウバエにおいて遺伝子発現を操作するためのシステムを新たに開発し、ネットワークに含まれると予想した遺伝子の機能解析を行って模様形成への機能を明らかにしようと考えた。その結果を基にして、模様形成を制御する遺伝子ネットワークを構築する要素について理解を深めることにした。

開発する遺伝子操作系として、キイロシヨウジョウバエにおいて頻繁に利用される、

Gal4/UAS システムを選択した。このシステムでは、エンハンサー配列の効果によって組織特異的に転写を活性化するタンパク質 Gal4 を発現する Enhancer-Gal4 系統と、Gal4 が結合する UAS (Upstream Activation Sequence) をゲノム中にもつ UAS 系統という 2 種類の遺伝子組換え系統を作出して交配する。交配で生まれた F₁ 世代では、UAS の後ろにつないだ特定の配列 (遺伝子) が高発現するため遺伝子機能解析が可能となる。今回は UAS に RNA 干渉 (RNAi) 誘導配列をつなぎ、F₁ において特定の遺伝子発現を抑制させることで機能解析を行った。ミズタマシヨウジョウバエの Gal4 系統と UAS 系統の作出は、*piggyBac* トランスポゾンプラスミドベクターをインジェクションし生殖細胞で形質転換を起こす手法 (germline transformation) によって行った。RNAi 誘導配列としてクローニング実験の容易さから、内在性 microRNA を模倣した short hairpin RNA (shRNA) の配列を使用した。また、Enhancer-レポーターを利用したエンハンサー機能の解析、UAS-レポーターを利用した Gal4 系統の性能の解析、遺伝子発現パターンの変化を見るために *in situ* hybridization や免疫組織染色の実験を行った。

結果として、まず、ミズタマシヨウジョウバエ蛹中期の翅脈予定細胞と蛹後期の着色予定位置のそれぞれで機能する、2 タイプの Enhancer-Gal4 系統を作出することに成功した。次に、蛹中期で機能する Gal4 系統を利用して *wingless*、蛹後期で機能する Gal4 系統を利用して着色実行遺伝子の機能解析を行い、各遺伝子の模様形成への必要性を確認した。続いて、蛹中期で機能する Gal4 系統を利用して翅脈形成遺伝子の機能解析を行ったところ、翅脈形成、模様形成、*wingless* 発現の活性化にこの遺伝子の発現が必要なことが判明した。RNAi 個体において転写因子の局在やエンハンサーの出力を観察することで、*wingless* の発現を活性化させるメカニズムについても言及した。さらに、蛹後期で機能する Gal4 系統を利用して Notch シグナル伝達経路の機能解析を行ったところ、このシグナルの活性化が着色範囲の拡大に必要なことが判明した。Notch シグナルが抑制された RNAi 個体では着色実行遺伝子の発現範囲が実際に狭くなっていたことから、遺伝子ネットワークの中に Notch シグナルの活性化が組み込まれていることが示唆された。

機能解析の結果に基づくと、はじめに予想した模様形成を制御する遺伝子ネットワークの構造はおおむね正しいと考えられる。そして、遺伝子ネットワークの構築において大きく 2 つの要素が関わっていることが実証された。1 つ目は、模様が形成される組織の発生プログラムが模様パターンニング遺伝子の獲得に貢献することである。キイロシヨウジョウバエにおける翅脈形成プログラムがミズタマシヨウジョウバエでも保存されており、模様のパターンニングに重要な *wingless* の発現を活性化することから示される。2 つ目は、発生制御遺伝子間におけるネットワークの再編とシグナル伝達経路の作用方法の改変である。ミズタマシヨウジョウバエの模様形成を制御する遺伝子ネットワークでは、キイロシヨウジョウバエの発生では報告されていない遺伝子間の制御関係がみられたり、Notch シグナル伝達経路の作用の仕方に新奇性がみられたりした。

総合考察

本研究によって、ミズタマシヨウジョウバエの新奇な翅模様の形成を制御する遺伝子ネットワークについて理解を深めることができた。模様のパターンニングに重要な *wingless* の発現が神経組織と翅脈の形成プログラムによって活性化することが示唆されるとともに、*wingless* の発現と特定のシグナル伝達経路の相互作用によってパターンニングが遂行されて

いくことが判明した。チョウ目の昆虫を対象とした研究では *wingless* やそのパラログの *Wnt* 遺伝子が模様形成に関与することが判明してきたものの、*Wnt* が他の発生制御遺伝子と柔軟に制御関係を構築して模様形成を遂行する点は本研究において初めて示されたと考えられる。また、形態進化の根底にある遺伝子ネットワークが構築される過程において、新奇性が生み出される組織の形成プログラムの転用と、発生制御遺伝子間のネットワーク再編が重要な役割を果たすことを提示した。今後の展望として、横脈や縦脈末端周囲に着色をもつミズタマシヨウジョウバエの近縁種を対象に着色形成メカニズムを明らかにすることで、系統進化と遺伝子ネットワーク構築のプロセスに言及できることが期待される。