

# 構造と模様との相関、ショウジョウバエを用いたアプローチ

## Correlation between structure and color pattern: a study using *Drosophila*

(日本動物学会推薦)

代表研究者 北海道大学 越川 滋行 Hokkaido University Shigeyuki KOSHIKAWA

A fruit fly species, *Drosophila guttifera*, which has polka-dotted pigmentation on its wings and abdomen and longitudinal pigmentation stripes on its thorax, has been used to study the mechanism of pigmentation pattern formation. In this study, we first focused on the striped pattern on the thorax. We aimed to clarify how the striped pattern is controlled in this species and how the pattern difference between closely related species is produced. The thoracic stripes appear to be related to areas of flight muscle attachment to the cuticle and may be controlled by the same pre-pattern. First, we examined the development of flight muscles and pigmentation in pupal stages of two species (*Drosophila guttifera* and *Drosophila annulipes*). The attachment site of the flight muscle and the areas of pigmentation matched depending on the stage of the pupa, and this suggested the importance of the developmental timing of the traits to understand the regulatory relationships among prepattern and traits. Next, we focused on the formation of wing pigmentation pattern in *Drosophila guttifera*. Genes highly expressed in the areas of pigmentation were obtained by transcriptome analysis. Knockout of a melanin-synthesizing gene with CRISPR/Cas9 genome editing resulted in insufficient pigmentation both in wings and the thorax. We have to clarify whether the regulatory genes expressed in wings are also involved in pattern formation of the thoracic stripes in a future study.

### 研究目的

ショウジョウバエ科 (ハエ目、昆虫綱) は 4000 種以上を含み、世界中に分布している。モデル実験生物としてよく利用されるキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) は、黄褐色の体色をベースに、腹部の一部に黒い着色を持っている。私はこれまで、翅や体に黒い水玉模様、胸部に黒い縦縞を持つミズタマショウジョウバエ (*Drosophila guttifera*) を主な材料に、キイロショウジョウバエとも比較しながら、模様の進化の仕組みを研究してきた (Koshikawa et al. 2017)。

翅においては、黒い水玉状の模様が一定の間隔で配置されているように見えるが、翅の構造に着目すると、縦脈が翅の縁に接する部分、横脈の両端、さらに翅の振動を感知するための機械受容器である鐘状感覚子の周辺など、ランドマークの周囲に着色が生じていることがわかる。ミズタマショウジョウバエにおいて、蛹期のこれらの場所に *wingless* (脊椎動

物の *Wnt-1* のホモログ) が発現し、着色を誘導していることがわかっている (Werner et al. 2010)。さらに、この *wingless* 周辺の *cis* 制御領域が変化し、キイロショウジョウバエでは発現していない場所で新たに発現するようになったことが模様の進化に一定の役割を果たしたことがわかっている (Koshikawa et al. 2015)。

今回の研究では、これまで注目していなかった胸部の縦縞に注目し、解剖学的な構造と、目に見えない下書きのような遺伝子の発現 (プレパターン) との関係性を明らかにすべく研究を行った。ミズタマショウジョウバエ (4 本の明瞭な縦縞) に加え、ダンダラショウジョウバエ (*Drosophila annulipes*, 3 本の明瞭な縦縞) を比較した。一見すると縦縞は胸部にある飛翔筋の外骨格への付着パターンとよく似ていて、何らかの関係があることを示唆している。飛翔筋の付着パターンのように機能的な制約がかかる形質は進化しにくいことが予想され、縦縞の本数が種

間で異なっていることとの整合性がどのように説明されるかに興味があった。共通のプレパターンが飛翔筋の付着と縦縞を両方とも制御しており、縦縞の制御のみが新しく進化したことが最も簡単な仮説である。

## 研究経過

まず胸部の飛翔筋の付着点の配置を成虫のパラフィン包埋切片で種間比較（ミズタマシヨウジョウバエとダンダラシヨウジョウバエ）したところ、予想どおりにほぼ同じ配置であった。成虫においては、ダンダラシヨウジョウバエでは飛翔筋の付着部を避けるように黒い着色があるのに対し、ミズタマシヨウジョウバエでは飛翔筋の付着部と黒い着色が重なる部分があった。つまり、飛翔筋の配置と胸部の縦縞のパターンが完全に一致して共進している、という可能性はこの時点で棄却された。成虫の構造の観察のみからは、飛翔筋のパターンは保存されていて、着色が進化しているように見えた。

蛹の様々な段階（ステージングは Fukutomi et al. 2017, 2018 に準拠）のパラフィン包埋切片を作成し調べたところ、いずれの種でも筋肉の付着点の範囲が発生が進むにつれて広がる傾向が認められた。次に、蛹期においても飛翔筋と縦縞模様が一致するかを調べた。その過程で、ダンダラシヨウジョウバエは蛹期に黒い縦縞が現れるのに対し、ミズタマシヨウジョウバエではずっと遅く、成虫への羽化が終わってからであることがわかった。飛翔筋と着色との関係を見ると、発生の時期によって両者の位置が一致する場合としない場合があることがわかり、これまでに考えていたよりもずっと複雑な現象である可能性が出てきた (Fig.1)。

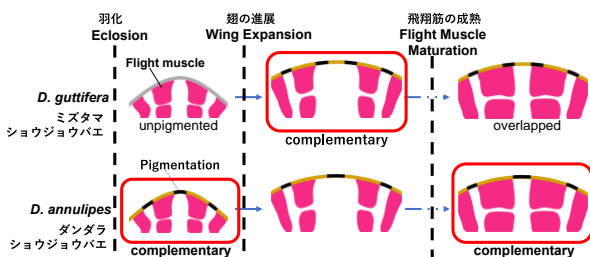


Fig.1 Schematic drawings of the relationship between flight muscle development and thoracic pigmentation in two *Drosophila* species. Original illustration by Tomohiro Yanone.

次に、パターン形成を司る遺伝子に着目することにした。ミズタマシヨウジョウバエにおいて、胸部の模様のプレパターン（下書きのような機能）に相当する遺伝子は、これまで翅での模様形成と同様に *wingless* ではないかと考えてきたが、胸部での機能に関する強い証拠はなかった。*wingless* 遺伝子の近傍にあるエンハンサーが胸部での縦縞状の発現を駆動することと、このエンハンサーの周辺にある4つの Wnt ファミリー遺伝子 (*DWnt4*, *wingless*, *Wnt6*, *Wnt10*) のうち胸部での逆転写 PCR では *wingless* が最も強く発現していることから、*wingless* が縦縞状に発現して模様の形成を誘導していると予想してきた。それを確かめるべく、抗体染色や *in situ* ハイブリダイゼーションによって縞状の発現を可視化しようと努力したが、明瞭なシグナルを得るには至らなかった。

ミズタマシヨウジョウバエの翅においては胸部のような内部の3D構造と模様との相関はないが、翅脈や鐘状感覚子などの翅の構造に関連した部位に着色が起るという点で、類似性がある。RNA-seqによって、蛹期の翅において、将来着色が起きる場所で高く発現し、かつ *wingless* の制御を受ける遺伝子を調べたところ、多くの遺伝子が見つかった。その中には、*Delta* や *Enhancer of split* 遺伝子群など、従来は神経系の発生に関与することが知られている遺伝子が含まれていた (Fukutomi et al. 2020)。これらの遺伝子は、ミズタマシヨウジョウバエにおいて、新たに模様形成に転用された可能性がある。

翅の模様の形成時に高発現することが明らかになった遺伝子は、胸部の縦縞模様の形成に関わる遺伝子の候補として有望である。縦縞模様の形成に必要な遺伝子の候補として、Fukutomi et al. (2020) で検出された *yellow* や *tan* などのメラニン合成系遺伝子が挙げられる。これらに関しては、CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集でコーディング領域にフレームシフト変異を導入し、機能喪失または低機能の遺伝子座を作ること成功した (松本ら、未発表)。そのうち、*tan* 変異体では胸部の縦縞模様に明瞭な違いが認められなかったが、*yellow* 変異体では明らかに縞模様が薄くなっていたため、胸部縦縞模様の着色に必要であることがわかった。それ以外にも、Fukutomi et al. (2020) で翅で高発現することがわかった遺伝子について、胸部における発現パターンの解析を進め

ている。

## 考察

当初の目的は、ショウジョウバエの胸部において、飛翔筋の配置と関連がありそうに見える縦縞模様が、飛翔筋との位置関係をどのように保って（あるいは保たないで）進化しているのかを明らかにすることであった。組織切片によって、飛翔筋の配置とその発生は比較的保守的であるのに対し、縞模様が位置関係にある程度保ちつつも進化しうることがわかったが、その仕組みを理解するためには、着色が起こる発生ステージの違いを考慮する必要があるかもしれない、ということが示された。着色と飛翔筋の付着部の両方を制御する仕組みがあり、その仕組みに関与する遺伝子の発現タイミングの違いや、関与する遺伝子群の一部が異なることなどによって、種間の模様の違いが説明できるかもしれない。そのためには模様形成に関わる遺伝子を同定する必要があるが、本研究ではメラニン合成に関与することが知られる *yellow* 遺伝子の機能を明らかにしたのみで、より上流のパターニングを司る遺伝子の同定には至らなかった。Fukutomi et al. (2020) 以外にも、別のショウジョウバエの種で模様のパターンに相関して発現する遺伝子が複数同定されている (Dufour et al. 2020, Koshikawa 2020)。また、キイロショウジョウバエにおいては、メラニン合成系の遺伝子 *ebony* の変異体では体色が全体に暗色になり、胸部に縦縞模様に似た模様が現れることが知られている。この模様ができる場所では *tan* 遺伝子のエンハンサーの活性が高く（つまり *tan* 遺伝子が発現していると考えられる）、飛翔筋の付着部の制御に関わる *stripe* という遺伝子の発現領域と相補的であることが知られている (Gibert et al. 2018)。今後、これらの遺伝子についても、胸部での発現と、縞模様の形成への関与を、CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集や、トランスポゾンを用いた遺伝子導入と遺伝子の強制発現/ノックダウンなどにより調べていく必要がある (Shittu et al. 2020)。

## 参考文献

1. Shigeyuki Koshikawa, Yuichi Fukutomi, Keiji Matsumoto. *Drosophila guttifera* as a model system for unraveling color pattern formation. In Diversity and Evolution of Butterfly Wing Patterns (pp. 287-
- 301). Springer, Singapore. 2017. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-4956-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4956-9_16)
2. Thomas Werner, Shigeyuki Koshikawa, Thomas M. Williams, Sean B. Carroll. Generation of a novel wing colour pattern by the Wingless morphogen. *Nature*, 2010;464(7292):1143–1148. <https://doi.org/10.1038/nature08896>
3. Shigeyuki Koshikawa, Matt W. Giorgianni, Kathy Vaccaro, Victoria A. Kassner, John H. Yoder, Thomas Werner, Sean B. Carroll. Gain of *cis*-regulatory activities underlies novel domains of wingless gene expression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015; 112(24), 7524–7529. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509022112>
4. Yuichi Fukutomi, Keiji Matsumoto, Kiyokazu Agata, Noriko Funayama, Shigeyuki Koshikawa. Pupal development and pigmentation process of a polka-dotted fruit fly, *Drosophila guttifera* (Insecta, Diptera). *Development Genes and Evolution*, 2017, 227(3), 171-180. <https://doi.org/10.1007/s00427-017-0578-3>
5. Yuichi Fukutomi, Keiji Matsumoto, Noriko Funayama, Shigeyuki Koshikawa. Methods for staging pupal periods and measurement of wing pigmentation of *Drosophila guttifera*. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2018, 131, e56935. <https://doi.org/10.3791/56935>
6. Héloïse D. Dufour, Shigeyuki Koshikawa, Cédric Finet. Temporal flexibility of gene regulatory network underlies a novel wing pattern in flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, in press. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002092117>
7. Jean-Michel Gibert, Emmanuèle Mouchel-Vielh, Frédérique Peronnet. Pigmentation pattern and developmental constraints: flight muscle attachment sites delimit the thoracic trident of *Drosophila melanogaster*. *Scientific Reports*, 2018, 8, 5328. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23741-4>
8. Mujeeb Shittu, Tessa Steenwinkel, Shigeyuki Koshikawa, Thomas Werner. The making of transgenic *Drosophila guttifera*. *Methods and Protocols*, 2020, 3(2), 31. <https://doi.org/10.3390/mps3020031>

## 研究の発表

### 口頭発表

1. Shigeyuki Koshikawa, Keiji Matsumoto, Yuichi Fukutomi : Generation mechanism of a polka-dot pattern in *Drosophila guttifer*. 第46回内藤コンファレンス、札幌、2018年10月.
2. Shigeyuki Koshikawa, Yuichi Fukutomi : Enhancer function and evolution of polka-dots in *Drosophila guttifer*. 日本発発生物学会第52回大会、大阪、2019年5月.
3. 福富雄一、重信秀治、越川滋行：模様形成遺伝子の探索 ～ミズタマシヨウジョウバエのトランスクリプトーム解析～. 日本進化学会 第21回北海道大会、札幌、2019年8月.
4. 越川滋行、福富雄一、松本圭司：ミズタマシヨウジョウバエの模様が作られる仕組み. 日本動物学会第90回大会、大阪、2019年9月.
5. 丹伊田拓磨、越川滋行：ミズタマシヨウジョウバエの水玉模様が配偶者選択により進化した可能性. 第64回日本応用動物昆虫学会大会、名古屋、2020年3月（みなし開催）.

### ポスター発表

1. 福富雄一、重信秀治、越川滋行：ミズタマシヨウジョウバエの模様が発現する遺伝子の解明のためのトランスクリプトーム解析. 日本発発生物学会第52回大会、大阪、2019年5月.
2. Shigeyuki Koshikawa, Keiji Matsumoto, Wataru

Yamamoto, Yuichi Fukutomi : Pigmentation pattern formation in *Drosophila guttifer*. 5th Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference、プネー、インド、2020年1月.

3. Takuma Niida, Shigeyuki Koshikawa : Thoughts on function of *Drosophila guttifer* wing color pattern. 5th Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference、プネー、インド、2020年1月.
4. Yuichi Fukutomi, Shuji Shigenobu, Shigeyuki Koshikawa : Transcriptome analysis of *Drosophila guttifer* to elucidate the gene network related to color pattern formation. 5th Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference、プネー、インド、2020年1月.

### 誌上発表

1. Yuichi Fukutomi, Shu Kondo, Atsushi Toyoda, Shuji Shigenobu, Shigeyuki Koshikawa: Transcriptome analysis reveals *wingless* regulates neural development and signaling genes in the region of wing pigmentation of a polka-dotted fruit fly. The FEBS Journal, 2020, in press. <https://doi.org/10.1111/febs.15338>
2. Shigeyuki Koshikawa: Evolution of wing pigmentation in *Drosophila*: Diversity, physiological regulation, and *cis*-regulatory evolution. Development Growth & Differentiation, 2020, in press. <https://doi.org/10.1111/dgd.12661>