

博士論文

キイロショウジョウバエの色覚に関わる
ロドプシン発現の制御機構

The regulatory mechanisms of rhodopsin expression
involved in color vision of *Drosophila melanogaster*

令和8年 3月

張 軒碩 (Zhang Xuanshuo)

岡山大学
大学院自然科学研究科

目次

1. 要旨	1
2. 序論	3
3. 材料と実験方法	6
3-1. ショウジョウバエの系統および飼育条件	
3-2. ステージングおよび温度シフト条件	
3-3. 成虫レチナの解剖および免疫染色	
3-4. 蛹期レチナの解剖および免疫染色	
3-5. 画像取得条件	
3-6. ロドプシンカップリング(個眼サブタイプ)の定量	
3-7. 統計解析	
4. 結果と考察	9

第 1 章 Rh5誘導シグナル成立に必要なInnexin(ギャップ結合)因子の同定と作用部位

I-1. 序論	9
I-2. 結果	9
I-2-1. 接着結合・隔壁結合の阻害では顕著な mis-coupling は得られにくいですが, Innexin 阻害は再現性高く mis-coupling を誘導する	
I-2-2. <i>inx2/ inx7</i> は付属細胞で必要である	
I-2-3. <i>Inx2/Inx7</i> は蛹期初期に時期特異的に要求される	
I-3. 考察	10
I-3-1. Innexin因子が必要であることは, Rh5誘導シグナルに“細胞間チャネル依存性”があることを示す(I-2-1)	
I-3-2. 付属細胞での必須性は「非神経細胞が神経細胞の機能分化を成立させる」ことを示す(I-2-2)	
I-3-3. 第1章の結論: Rh5 誘導シグナル成立は「PR 細胞同士」ではなく「付属細胞を含む個眼ネットワーク」で決まる	

第 2 章 Notch依存的付属細胞分化がロドプシンカップリング成立に与える影響

II-1. 序論	12
II-2. 結果	12
II-2-1. Notch 阻害による付属細胞異常は mis-coupling と強く関連する	

II-2-2. Notch 機能が必要な時間窓は PPC 誘導期に一致し, 16–24h APF 阻害で mis-coupling が誘導される	
II-3. 考察	13
II-3-1. Notch は Rh5 誘導シグナルの“上流で場を作る因子”である(II-2-1)	
II-3-2. PPC 誘導期が臨界期であることは, 第1章の“付属細胞で Innexin が必須”と整合する(II-2-2)	
II-3-3. 第2章の結論: Notch 依存的付属細胞分化は Rh5 誘導シグナル成立の前提条件である	

第3章 IP3R–Ca²⁺シグナルが Rh5 誘導シグナル成立に果たす役割

III-1. 序論	15
III-2. 結果	15
III-2-1. PKA 阻害では mis-coupling の有意な増加は見られない	
III-2-2. IP3R 機能阻害により mis-coupling が有意に増加する	
III-3. 考察	16
III-3-1. IP3R–Ca ²⁺ 経路は Innexin 依存的成立機構の中核候補である (III-2-2)	
III-3-2. PKA が主要因でないことは, 候補分子輸送の仮説を絞り込む (III-2-1)	
III-3-3. 第3章の結論: Rh5 誘導シグナル成立は「Notchで整えられた付属細胞環境」上で「Innexin–IP3R–Ca ²⁺ 」が作動する	

5. 総合考察	18
---------	----

6. 謝辞	19
-------	----

7. 参考文献	20
---------	----

8. 図表	24
-------	----

1. 要旨

ショウジョウバエの複眼は約 800 個の個眼 (ommatidium) から構成され、各個眼には 8 個の光受容細胞 (photoreceptor cell; PR) と複数の付属細胞 (accessory cells) が存在する。PR 細胞は外側 PR (R1–R6) と内側 PR (R7, R8) に分類され、外側 PR は視物質 Rh1 を発現して運動視に関与し、内側 PR は Rh3–Rh6 のいずれかを発現して色覚に関与する。R7 および R8 におけるロドプシン発現パターンにより、個眼は pale 型 (R7: Rh3/R8: Rh5) および yellow 型 (R7: Rh4/R8: Rh6) に分類され、両者は一定比率でランダムに分布する。これらの発現パターンは極めて厳密に制御されており、R7 から同一個眼内の R8 へと伝達される「Rh5 誘導シグナル (instructive signal)」によって規定される。しかし、発生後期には R7 と R8 の間に R1 の細胞体が介在するため両細胞間の直接接触は存在せず、Rh5 誘導シグナルの細胞間伝達機構は長らく未解明であった。先行研究により、転写制御因子 Defective proventriculus (Dve) の R1 における活性がシグナル伝達に必須であることが示され、R7→R1→R8 という経路で情報が伝達される可能性が示唆されてきた。一方、細胞間結合は組織の構造維持だけでなく、発生期のシグナル伝達や機能分化にも関与する。とくにギャップ結合は、隣接細胞間でイオンや小分子を直接移動させる細胞間チャネルであり、昆虫では Innexin がその主要構成因子として機能する。複眼において *innexin2* (*inx2*) の機能低下がロドプシンカップリング異常を引き起こす報告があるが、*inx2* は主として付属細胞で発現することから、PR 細胞自身ではなく周囲の付属細胞を介した間接的な情報伝達機構の存在が強く示唆される。そこで本研究では、付属細胞におけるギャップ結合依存的シグナル伝達が、R7–R8 間のロドプシンカップリング制御に果たす役割を明らかにすることを目的として解析を行った。

1. ギャップ結合因子の同定と付属細胞における必須性

まず、R7–R8 間の情報伝達に細胞間結合が関与する可能性を検証するため、眼全体において細胞間結合関連因子を RNA 干渉 (RNAi) により機能低下させ、ロドプシン発現のカップリング異常 (mis-coupling) を指標としたスクリーニングを行った。その結果、接着結合 (adherens junction) や隔壁結合 (septate junction) 関連因子の抑制では顕著なカップリング異常はほとんど認められなかったのに対し、複数のギャップ結合関連遺伝子の抑制により、Rh3/Rh6 ミスカップリングが有意に増加することを見出した。とくに、*innexin2* (*inx2*) および *innexin7* (*inx7*) の機能低下は高い再現性でミスカップリングを誘導し、これらが Rh5 誘導シグナルの成立に関与する可能性が示された。

次に、*inx2/inx7* がどの細胞種で要求されるかを明確にするため、付属細胞 (円錐細胞および一次色素細胞) で発現する *spa-GAL4* を用いて、付属細胞特異的に *inx2* または *inx7* を RNAi により抑制した。その結果、眼全体での抑制と同様に Rh3/Rh6 ミスカップリングが有意に増加し、Inx2 および Inx7 が付属細胞において必須であることが示された。付属細胞は PR 細胞の細胞体を取り囲み、光学的遮蔽や組織の形態形成に寄与するのみならず、発生期には PR 細胞と接触しうる構造 (例：円錐細胞の突起) を持つことから、付属細胞-PR 細胞間のギャップ結合を介した情報伝達が、R7→R8 の機能的連結を成立させる可能性が浮上した。

2. 付属細胞分化(Notch依存)とギャップ結合の時期特異的要求性

ギャップ結合が「分化した細胞間の継続的な物質移動」に必要なのか、あるいは「発生期の特定時間窓における組織成熟」に必要なのかを区別するため、温度感受性 GAL80 (GAL80^{ts}) を用いた時期特異的抑制実験を行った。全眼で *inx2* または *inx7* の RNAi 誘導を時間窓ごとに開始したところ、囲蛹殻形成時 (0h APF [After puparium formation] 付近) あるいは蛹期初期 (12h APF 付近) から抑制を開始した条件でミスカップリングが顕著に増加した一方、24h APF 以降に抑制を開始した条件ではミスカップリングの増加が見られなかった。RNAi 誘導の立ち上がりや GAL80^{ts} の解除に要する時間遅れを考慮すると、*Inx2/Inx7* が要求される臨界期は蛹期初期に位置し、付属細胞分化が進行し完了へ向かう時期と重なることが示唆された。したがって、*Inx2/Inx7* は成熟後の PR 細胞間で常に開口するチャンネルとして働くというよりも、付属細胞の発生・成熟過程、あるいはその完了に伴う PR 細胞成熟開始 (ラプオドメア形成開始やロドプシン発現プログラムの確立) を適切なタイミングで誘導する過程に関与する可能性が高い。

さらに、付属細胞分化の主要制御系である Notch シグナルとの関連を検証した。Notch の機能を時期特異的に阻害すると、付属細胞配置の乱れ (一次色素細胞の異常誘導、二次・三次色素細胞配列の破綻、剛毛の重複など) とロドプシンミスカップリングが強く相関し、とくに一次色素細胞誘導が進行する時間窓に Notch 活性が阻害された条件でミスカップリングが増加した。これらの結果は、Notch 依存的な付属細胞発生プログラムの成立が、R7-R8 間の Rh5 誘導シグナル伝達に必要な「場」を形成し、その過程で *Inx2/Inx7* を介したギャップ結合依存シグナルが機能することを支持する。

3. IP3R-Ca²⁺シグナル経路の関与とモデル

ギャップ結合を介して移動しうる候補分子としては、イオン (特に Ca²⁺) や IP3 などの小分子が知られ、発生過程では Ca²⁺ 波が細胞集団の協調的成熟を制御する例が報告されている。そこで本研究では、候補経路として cAMP-PKA 経路および IP3 受容体 (IP3R) を介した Ca²⁺ シグナル経路に着目し、それぞれ阻害条件下でロドプシンカップリングへの影響を評価した。その結果、PKA 阻害条件下ではミスカップリングの有意な増加は認められなかった一方、IP3R 機能阻害によりミスカップリングが有意に増加した。以上より、付属細胞における *Inx2/Inx7* 依存的なギャップ結合は、IP3R-Ca²⁺ シグナルと連動することで付属細胞の成熟、あるいは PR 細胞の成熟開始に必要な状態変化を誘導し、結果として R7-R8 間のロドプシンカップリングを確立することが示唆された。

本研究の成果は、感覚神経細胞 (R7/R8) の機能分化が神経細胞自身の自律的機構のみで完結するのではなく、周囲の非神経細胞 (付属細胞) によるギャップ結合依存的シグナル伝達を介して制御されることを示すものである。すなわち、付属細胞の Notch 依存的分化と *Inx2/Inx7* を介した細胞間コミュニケーションが協調して、Rh5 誘導シグナルが成立する発生学的時間窓を規定し、R7-R8 の機能的カップリングを成立させるという新たな概念を提示する。これらの知見は、神経発生・感覚器形成における「非神経細胞による分化タイミング制御」という一般原理の理解を深化させるとともに、ギャップ結合が組織レベルで神経機能の精密化に関与する仕組みの解明に寄与すると期待される。

2. 序論

細胞-細胞接着および細胞間結合は、多細胞生物における組織恒常性の維持に必須であり、バリア形成、細胞増殖、細胞移動、組織形態形成など多岐にわたる生命現象を統合的に制御する(Guillot and Lecuit, 2013 ; Garcia et al., 2018). 上皮組織では、頂端側に接着結合 (adherens junction; AJ), 側方領域に中隔結合 (septate junction; SJ) が配置され, SJは脊椎動物におけるタイトジャンクションに相当する閉鎖結合として機能する (Rice et al., 2021). さらに, これらの結合構造は単なる細胞間接着装置にとどまらず, 創傷治癒や平面内極性 (planar cell polarity), apical-basal polarity の形成など「非閉鎖的」な多様な機能を担うことが示されている (Rice et al., 2021). ショウジョウバエにおいて Crumbs は上皮の apical-basal polarity を規定する中心因子であり, AJ の局在制御を通じて, 光受容細胞 (photoreceptor cell; PR) における集光器官ラブドメア (rhabdomere) の形態形成に重要である (Izaddoost et al., 2002 ; Pellikka et al., 2002 ; Pichaud, 2014). したがって, 細胞接着因子は細胞間接着だけでなく, 発生過程のさまざまな局面で細胞内シグナルを生成し, 組織形成と機能成熟の時間的・空間的制御に寄与する重要な分子基盤である.

このような細胞間結合のなかでも, ギャップ結合 (gap junction) は隣接細胞間にチャネルを形成し, イオンや小分子を直接交換することで細胞集団の協調を可能にする代表的な細胞間コミュニケーション機構である (Bauer et al., 2005 ; Herve and Derangeon, 2013 ; Guiza et al., 2018). ギャップ結合チャネルは, 六量体のヘミチャネル (半チャネル) が向かい合ってドッキングすることにより形成される. 脊椎動物では Connexin が, 無脊椎動物では Innexin が主要な構成因子であり, 両者の配列相同性は低いものの, 同様の膜貫通構造と細胞間チャネル形成能を持つ (Bauer et al., 2005 ; Guiza et al., 2018). Connexin 変異が遺伝性難聴や皮膚疾患 (Cx26, Cx30), 遺伝性白内障 (Cx46, Cx50) など多様な疾患を引き起こすことは, ギャップ結合が組織機能に不可欠であることを強く支持する (Srinivas et al., 2018). 一方, 無脊椎動物における Innexin ファミリーも多様であり, ショウジョウバエでは innexin2~innexin7, さらに Shaking-B (Inx8) など複数の因子が組織特異的に機能することが報告されている (Stebbins et al., 2002). これらの知見は, ギャップ結合が発生・分化・組織成熟において重要な役割を担い, 細胞種や発生段階に応じて異なる分子組成が利用される可能性を示唆する.

ショウジョウバエ複眼は, 細胞間コミュニケーションが神経細胞の機能分化をどのように制御するかを解析する上で優れたモデル系である. 複眼は約 800 個の個眼 (ommatidium) から構成され, 各個眼には 8 個の PR 細胞 (外側 PR : R1-R6, 内側 PR : R7, R8) に加え, 円錐細胞 (cone cell) および色素細胞 (pigment cell) からなる付属細胞群が規則正しく配置される (Cook and Desplan, 2001). PR 細胞の頂端側には多層膜が折り畳まれたラブレット (rhabdolet) を含むラブドメアが形成され, ここに視物質ロドプシン (Rhodopsin; Rh) が局在して光受容が実行される. 外側 PR (R1-R6) は広域波長に応答する Rh1 を発現し, 運動視・形態視に関与して軸索をラミナへ投射する. 一方, 内側 PR (R7, R8) は Rh3~Rh6 を発現し, 色覚や偏光認識を担って軸索をメダラへ投射する (Cook and Desplan, 2001 ; Wernet and Desplan, 2004). 背側偏縁部 (dorsal rim area; DRA) では偏光認識に特化した個眼が配列し, R7 と R8 がともに Rh3 を発現する特殊なサブタイプが形成される. 中心部の多くの個眼では, R7 と R8 のロドプシン組合せにより pale 型

(R7: Rh3/R8: Rh5) と yellow 型 (R7: Rh4/R8: Rh6) が決定され、両者はおおよそ 3:7 の比でランダムに分布する (図.1) (Wernet and Desplan, 2004 ; Mollereau and Domingos, 2005). R7 と R8 は同一光軸上に上下に並んで配置されるため、異なる波長感受性をもつロドプシンが同一個眼内で厳密にペアリングすることが、色の識別における基本構造となる。

この極めて厳密なロドプシンペアリングは、pale 型 R7 (pR7) から同一個眼内の R8 へ伝達される “Rh5 誘導シグナル (instructive signal)” によって成立する (Chou et al., 1999). R7 側では、蛹中期に Spineless (ss) が約 70% の R7 でランダムに発現し、yellow 型 R7 (yR7) 運命と Rh4 発現を誘導する (Wernet et al., 2006). 残りの R7 は pR7 となり、Orthodenticle (Otd) などを介して Rh3 の発現が確立する (Tahayato et al., 2003). R8 側の運命は Warts (Wts) と Melted (Melt) による相互抑制フィードバックによって制御され、yellow 型では Wts 優位により Rh5 が抑制され Rh6 が発現し、pale 型では Rh5 誘導シグナルに応答して Melt が誘導され Rh5 が発現する (Mikeladze-Dvali et al., 2005 ; Chou et al., 1999). このように、R7 の確率的運命決定と R8 の状態安定化回路が統合されることで、個眼レベルのサブタイプが厳密に成立する。

しかし、Rh5 誘導シグナルの「細胞間伝達経路」は長年未解明の重要課題である。発生後期には R7 と R8 の間に R1 の細胞体が介在し、R7 と R8 が直接接触しない構造が生じるため、R7 由来情報がどのように R8 へ伝わるのかは自明ではない。先行研究により、ホメオドメイン型転写制御因子 Defective proventriculus (Dve) は yellow 型 R7 で rh3 を抑制する役割を担い、さらに R1 における Dve 活性が R7→R8 へのシグナル伝達に必要であることが示され、R7→R1→R8 という細胞間コミュニケーション経路の存在が示唆されている (Johnston et al., 2011 ; Kitamata et al., 2024). この事実は、Rh5 誘導シグナルが単純な R7-R8 間の局所接触によって完結するのではなく、個眼内の細胞配置変化を踏まえた多段階の情報伝達機構によって支えられている可能性を示す。

個眼内の PR 細胞は周囲の付属細胞に取り囲まれており、付属細胞は形態・光学機能のみならず PR 細胞成熟にも関与する。円錐細胞は角膜レンズ形成に関与し、ラブドメア遠位部をキャップするとともに、interretinular fiber を伸長して PR 細胞体に接触しうる。円錐細胞は *prospero* や *dPax2* などグリア関連遺伝子の発現を示し、ラブドメア形成や PR 細胞の生理機能制御に関与する “グリア様機能” が提唱されている (Charlton-Perkins et al., 2017). 色素細胞は PR 細胞体を包み込み、個眼間の光散乱を防ぐとともに視覚応答に必要である (Wang and Montell, 2005). 付属細胞分化は Notch (N) シグナルに強く依存し、円錐細胞運命は PR 由来の EGFR と Notch の組合せで誘導される (Nagaraj and Banerjee, 2007). 囲蛹殻形成後 18 時間 (18h APF) 頃には、円錐細胞に隣接する細胞が高い Notch 入力を受け、Hibris (Hbs) や Sticks-and-Stones (Sns) などの接着分子発現を介して一次色素細胞 (primary pigment cell; PPC) が形成される (Bao, 2014). さらに二次・三次色素細胞の格子状配列は Notch 依存的な細胞選別 (不要細胞の除去) によって整えられ、最終的に約 40h APF までに付属細胞分化が完了し、その後ロドプシン発現が誘導される (図.1 ; Miller and Cagan, 1998 ; Bao, 2014). この時間軸は、付属細胞が PR 細胞の機能成熟 (ラブドメア形成、ロドプシン発現、サブタイプ確立) に先行して “環境” を整えることを示唆する。

細胞-細胞間の直接的情報交換という観点から、ギャップ結合はこの問題に対する有力な候補機構である。ショウジョウバエではギャップ結合構成因子 Innexin が複数存在し、

発生段階・細胞種ごとに異なる発現様式を示す (Stebbing et al., 2002). とくに *innexin2* (*inx2*) は幼虫期には眼原基全体で発現するが、蛹期には主として色素細胞での発現が顕著になることが報告されている (Richard and Hoch, 2015). また *inx7* も PPC で発現することが示されている (Stebbing et al., 2002). 一方で *Shaking-B* (*ShakB*; *Inx8*) は複数アイソフォームを持ち、*ShakB* (*neural*) が外側 PR (R1–R6) で発現する (Stebbing et al., 2002). これらの発現特性は、PR 細胞のみならず付属細胞を含む個眼内ネットワークとしてギャップ結合が組み込まれ得ることを示す.

さらに、ギャップ結合は単に細胞間の電氣的・代謝的結合を提供するだけでなく、発生における細胞運命決定や組織成熟のタイミング制御にも関与しうる. ギャップ結合を介した Ca^{2+} シグナルは、複数の組織で分化制御に関与することが報告されており (Dupont et al., 2007), ショウジョウバエでも *Inx2* 依存の Ca フラックスが卵形成過程の *border cell* 運命決定に必要である (Sahu et al., 2017) など、*Innexin* が Ca^{2+} ダイナミクスの組織内伝播に寄与する例が示されている. また *Inx2–Inx7* を介した高 Ca^{2+} の広がり腸上皮の損傷治癒に関与することも報告されている (Petsakou et al., 2023). 眼発生においても、色素細胞を介した Ca 波が観察され、細胞骨格収縮と関連することが示唆されている (Ready and Chang, 2021). これらの知見は、付属細胞におけるギャップ結合が、単なる構造維持ではなく、PR 細胞成熟や機能分化に必要な“時期特異的シグナル”を整える役割を担う可能性を支持する.

以上の背景を踏まえ、本研究では、R7–R8 間の *Rh5* 誘導シグナル伝達機構に細胞結合分子が関与するかを検証し、とくにギャップ結合因子に着目して解析を行った. 眼全体での RNAi スクリーニングにより、複数のギャップ結合遺伝子 (*ShakB*, *inx2*, *inx7*) の機能低下で *Rh3/Rh6* ミスカップリング (ロドプシンのデフォルト状態と考えられる異常ペアリング) が増加することを見出し、さらに付属細胞特異的抑制により *Inx2* および *Inx7* が付属細胞において *Rh5* 誘導シグナル成立に必要なことを明らかにした. 加えて、付属細胞分化の中核である Notch 依存的発生過程とロドプシンカップリングの関係、およびギャップ結合を介して伝播しうる候補分子として IP3R–Ca^{2+} シグナルの関与についても解析し、R7–R8 という異なる神経細胞間の機能的カップリングが、隣接する非神経細胞 (付属細胞) によるギャップ結合依存的シグナル伝達によって確立されるという作業仮説を提示する.

3. 材料と実験方法

3-1. ショウジョウバエの系統および飼育条件

本研究ではキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用いた。特に断りのない限り、すべての系統は標準培地 (酵母・コーンミール培地) で飼育し、25°C恒温条件下で維持した。GAL80^{ts} を用いた時期制御実験および温度感受性 *Notch* 変異体 (*N^{ts}*) を用いた実験では、GAL4 活性の抑制および温度依存表現型の安定化のため、親世代および交配後の飼育は18°Cで行った。所定の時点で30°Cに温度シフトし (各実験の条件は結果に記載)、温度シフト後は成虫羽化まで18°Cに戻して飼育した。

本研究で用いた主な系統を以下に示す。

細胞接着構造関連因子の機能阻害には主にRNAi 系統を用い、Vienna *Drosophila* Resource Center (VDRC), Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC), 国立遺伝学研究所 (NIG) 由来の系統を使用した。

VDRC : *inx3 v39094*, *inx3 v44767*, *inx7 22949*, *Dlg CG1725 41134*, *coracle-IR v9788*

BDSC : *ogre-IR JF02595* (#27283), *Pka-R1-IR* (#35550), *Itpr[DN]* (#602868), *GAL80^{ts}* (#7016)

NIG : *inx2 4590R-2*, *inx4 10125R-1*, *inx5 7537R-1*, *inx6 17063R-1*, *inx6 17063R-3*, *shaking-B 12678R-3*, *DE-cad 3722R-1*, *UAS-IP3R-IR 1063R-1*, *UAS-IP3R-IR 1063R-2*, *UAS-IP3R-IR HMC03351*, *UAS-Adcy1(rutabaga)-IR 9533R-1*, *UAS-Adcy1(rutabaga)-IR 9533R-2*

野生型コントロールとして Oregon-R (OR) 系統を用いた。成虫複眼で *white* RNAi を誘導するために *GMR-wIR* (Lee and Carthew, 2003) を用いた。眼特異的発現ドライバーとして *GMR-GAL4* (Li et al., 2012; BDSC#1104), 付属細胞領域 (円錐細胞および一次色素細胞) での発現ドライバーとして *spa-GAL4* (Jiao et al., 2001; BDSC#26656) を用いた。温度感受性 GAL80 として *GAL80^{ts}* (BDSC #7017) を用いた。

R7/R8 ロドプシン型判定のため、*Rh4-EGFP* (BDSC#7456) を用いた。また、*Notch* 活性を阻害するため、*UAS-d.n.N (N^{DN})* (Go et al., 1998; Tanaka et al., 2007), *N^{ts}* (BDSC#2533) を用いた。

本研究で用いた代表的な遺伝子型 (genotype) は以下の通りである (表記は原則として「染色・解析に用いた成虫個体」)。

- (1) 全眼での RNAi 阻害: *w; GMR-GAL4/(+)(UAS-**); wIR Rh4EGFP#2/(+)(UAS-**)* (各 RNAi)
 - (2) 付属細胞での RNAi 阻害: *spa-GAL4/Y; (+)(UAS-**)/CyO; wIR Rh4EGFP#2/(+)(UAS-**)* (各 RNAi)
 - (3) 時期制御: *w; GMR-GAL4/UAS-**; wIR Rh4EGFP#2/GAL80^{ts}*, または *spa-GAL4/Y; UAS-**/CyO; wIR Rh4EGFP#2/GAL80^{ts}*
 - (4) *Notch* 温度感受性: *UAS-d.n.N (N^{DN})*; *N^{ts}* (各温度シフト条件)
- (注) 遺伝子型の詳細は、実験ごとの図・結果の記載に併記した。

3-2. ステージングおよび温度シフト条件

①卵および蛹期ステージング

卵の回収は、酵母を塗布したブドウジュース寒天プレートに成虫を4時間産卵させ、回収した卵を after egg laying (AEL) 0時間と定義した。白色前蛹 (white prepupa) は after puparium formation (APF) 0時間と定義し、白色前蛹化した個体を回収して解析に用いた。

②温度シフト

GAL80^{ts} を用いた実験では、18°Cで飼育して GAL4 活性を抑制したのち、所定の時点(例: 0h APF, 12h APF, 24h APF 等)で 30°Cへ移し、GAL80^{ts} による抑制解除により RNAi または阻害因子を誘導した。温度シフト後は成虫羽化まで 18°Cに戻して飼育した。N^{ts} を用いた実験では、指定の時間窓(例: 0–8h, 10–16h, 16–24h, 24–32h APF)において 30°Cに移し、Notch 機能を一過的に阻害した。

3-3. 成虫レチナの解剖および免疫染色

成虫レチナの免疫染色は既報 (Hsiao et al., 2012) を参考に行った。成虫頭部を PBS (phosphate-buffered saline) 中で解剖し、口吻を除去したのち、触角・クチクラ・脂肪組織を可能な限り除去してレチナを回収した。固定は 3.7% formaldehyde を含む PBS (PBS-0.3%) 中で室温 15 分間振盪した。PBS で一度洗浄後、lamina を除去し、PBS-0.3% Triton X-100 を含む固定液 (3.7% formaldehyde/PBS-0.3% Triton X-100) に置換して室温 15 分間振盪した。続いて PBS 洗浄後、PBST (PBS + 0.3% Triton X-100) で洗浄し、ブロッキング液 (3% BSA/PBS-0.3% Triton X-100) で室温 30 分間ブロックした。

一次抗体は mouse anti-Rh3 (2B1, S. Britt 博士より供与, 1:50) および mouse anti-Rh5 (7F1, S. Britt 博士より供与, 1:100) を用い、室温 40 分間振盪後、4°Cで一晩反応させた。翌日、室温 30 分振盪後、PBS-0.1% Tween-20 で3回洗浄した。ブロッキング液 (5% skim milk/PBS-0.2% Tween-20) に置換し室温 40 分振盪後、二次抗体として Cy5-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, 1:200) および Phalloidin-TRITC (SIGMA; 20μM, 1/200) を用い、室温 30 分振盪後、4°Cで一晩反応させた。翌日、PBS-0.1% Tween-20 で3回洗浄し、Vectashield (Vector Laboratories) で封入した。観察および共焦点画像取得は Olympus Fluoview1200 を用いて行った。

3-4. 蛹期レチナの解剖および免疫染色

蛹期レチナの免疫染色は既報 (Hsiao et al., 2012 ; Wang et al., 2022) を参考に行った。氷上に置いた PBS 中で蛹殻を開き、レチナ-脳複合体を摘出した。固定は 3.7% formaldehyde/PBS-0.3% Triton X-100 中で室温 15 分間振盪した。PBS 洗浄後、PBST (PBS-0.3% Triton X-100) で洗浄し、ブロッキング液 (3% BSA/PBS-0.3% Triton X-100) で室温 30 分間ブロックした。

一次抗体として、mouse anti-Arm N27A1 (1:200, DSHB) および DN-Ex (DSHB DN-Ex #8, 1:200) を用い、室温 40 分振盪後 4°Cで一晩反応させた。翌日、PBS および PBST で洗浄し、ブロッキング液 (5% skim milk/PBS-0.2% Tween-20) で室温 40 分振盪した後、二次抗体として anti-mouse-IgG-Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratory #115-175-146; 1/200) を用い、室温 30 分振盪後 4°Cで一晩反応させた。翌日、PBS および PBST で洗浄し、脳を除去してレチナのみを分離し、Vectashield で封入した。観察は Olympus

Fluoview1200 を用いて行った。

(注)蛹期サンプルは形態が脆弱であるため、解剖・固定操作は可能な限り低温下で迅速に行った。

3-5. 画像取得条件

共焦点顕微鏡(Olympus Fluoview1200)を用いて画像取得を行った。撮影条件は原則として全サンプルで統一し、代表条件として以下を用いた。Scan speed : 40.0 μ s/pixel, 画像サイズ : 640 \times 640, Z step : 0.49 μ m, 対物レンズ : 40 \times . レーザーおよび検出条件の例として, FITC (Rh4-EGFP/Phalloidin 等) は Laser 5.0%, HV 550, Gain 1, Offset 0, Cy5 (Rh3/Rh5/接着構造等) は Laser 5.0%, HV 650, Gain 1, Offset 0, TRITC (Phalloidin-TRITC) は HV 380–550 (サンプルに応じ微調整) を用いた。

3-6. ロドプシンカップリング(個眼サブタイプ)の定量

成虫複眼の免疫染色像から, Rh3/Rh5 (pale type), Rh4/Rh6 (yellow type), およびミスカップリング (例 : Rh3/Rh6) を判定した。個眼数のカウントは Adobe Photoshop 2025 の Count Tool を用いて手動で行った。解析では, 全 pale type 個眼 (Rh3 陽性 R7 を含む個眼) に対するミスカップリング個眼の割合(%) を算出し, 各遺伝子型・条件間で比較した。

3-7. 統計解析

統計解析には Prism6 (GraphPad Software) を用いた。ロドプシンカップリング (個眼サブタイプ) の頻度分布の比較にはカイ二乗検定 (chi-square test) を適用した。また, Rh3 を発現する個眼群における Rh5 発現と Rh6 発現の頻度分布の比較には Fisher の正確確率検定 (Fisher's exact test) を適用した。有意水準はアスタリスクで示し, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ とした。

4. 結果と考察

第1章

Rh5 誘導シグナル成立に必要な *Innexin*(ギャップ結合)因子の同定と作用部位

I-1. 序論

pale型個眼における R7 (Rh3 発現) から R8 (Rh5 発現) へのロドプシンカップリングは、R7 由来の Rh5 誘導指示シグナル (instructive signal) によって厳密に制御される (図.1). しかし蛹期発達後期になると、R1 細胞体が R7 と R8 の間に位置するようになり、R7-R8 間の直接接触は極めて限定的となる. さらに先行研究により、R1 における Dve 活性がこのシグナル伝達に必須であることが示されており、R7→R1→R8 という多段階経路の存在が示唆されてきた. 一方、個眼内の光感受器 (PR) 細胞はすべて付属細胞 (cone cells および pigment cells) に囲まれており、これらの付属細胞は蛹期に PR 細胞体と密接な接触構造を形成する. したがって、付属細胞が PR 細胞間のシグナル伝達の「場」あるいは「中継」として機能する可能性が考えられる.

ギャップ結合 (gap junction) は、隣接細胞間でイオンや低分子量物質を直接交換する細胞間チャネルであり、昆虫では *Innexin* ファミリーがその主要構成因子である. 先行研究で、*inx2* が幼虫期には眼盤全体で発現するものの、蛹期には色素細胞 (特に primary pigment cells: PPC) に強く制限されること、また *inx2* 機能低下がロドプシンカップリング異常を引き起こすことが報告されている (Richard and Hoch, 2015). これらの知見から、Rh5 誘導シグナルの成立には *Innexin* 依存的な細胞間コミュニケーションが関与する可能性が高いと考えられた.

本章では、以下の3点を目的とした: (1) Rh5 誘導シグナル成立に必須の *Innexin* 因子の同定とスクリーニング, (2) それらの機能的必須性が付属細胞 (cone cells および PPC) に存在するかの検証, (3) *mis-coupling* 表現型 (Rh3/Rh6) の生物学的意味 (デフォルト状態への遷移) の整理, および Notch・IP3R-Ca²⁺経路との接続点の明確化.

I-2. 結果

I-2-1. 接着結合・隔壁結合の阻害では顕著な *mis-coupling* は得られにくい、*Innexin* 阻害は再現性高く *mis-coupling* を誘導する

R7→R8 間の指示シグナル伝達に細胞間接合分子が関与するかを検証するため、複眼全体 (*GMR-GAL4* 駆動) で接着結合 (adherence junction: AJ, DE-cadherin), 中隔結合 (septate junction: SJ, Discs large/Dlg, Coracle), およびギャップ結合関連因子の RNAi スクリーニングを行った.

その結果、AJ および SJ 関連因子のノックダウンでは、Rh3/Rh6 *mis-coupling* が一貫して強く誘導される条件は少なく、表現型が不安定または弱いものが多かった. これに対し、ギャップ結合関連因子では顕著な結果が得られた. *Shaking-B* (*ShakB*, 別名 *Inx8*), *innexin2* (*inx2*), *innexin7* (*inx7*) のいずれかを阻害した場合、Rh3/Rh6 *mis-coupling* (デフォルト状態とされる Rh3 発現への回帰) が有意に増加した. 特に *inx2* および *inx7*

の阻害は再現性が高く、強い mis-coupling を誘導した (図.2). これらの結果から、Rh5 誘導シグナルの成立には AJ/SJ よりも Innexin 依存的なギャップ結合が重要である可能性が強く示唆された。

ShakB (Inx8) は複数のアイソフォームを持ち、神経型 ShakB は外側 PR 細胞 (R1–R6) に強く発現する (Stebbing et al., 2002). 一方、Inx2 は幼虫期には眼盤全細胞に発現するが、蛹期には色素細胞に制限され、Inx7 も primary pigment cells (PPCs) に発現する (Richard and Hoch, 2015; Stebbings et al., 2002). これらの発現パターンは、付属細胞におけるギャップ結合が Rh5 誘導に中心的な役割を果たす可能性を示唆する。

I-2-2. inx2/ inx7 は付属細胞で必要である

次に、inx2/inx7 の機能的必須性がどの細胞種にあるかを検証するため、cone cells および PPCs に特異的に発現する *spa-GAL4* ドライバーを用いて付属細胞特異的なノックダウンを行った (図.3). 結果、*spa-GAL4* 駆動による inx2 または inx7 の KD は、全眼 KD と同程度に Rh3/Rh6 mis-coupling を有意に誘導した (図.4A). この結果は、inx2/inx7 の主要な作用部位が付属細胞 (cone cells および/または PPCs) にあることを示す。

付属細胞は角膜レンズ形成 (cone cells) や光散乱防止・視覚応答維持 (pigment cells) の役割を担うだけでなく、蛹期に PR 細胞体と直接接触する構造 (interretinular fibers など) を持ち、glia 様機能で rhabdomere morphogenesis や PR 細胞生理を制御することも知られている (Charlton-Perkins et al., 2017; Wang and Montell, 2005). しかし *spa-GAL4* は cone cells と PPCs の両方に作用するため、どちらが本質的かは本章の範囲では未確定である。

I-2-3. Inx2/Inx7 は蛹期初期に時期特異的に要求される

Inx2/Inx7 がロドプシンカップリング成立のどの発生段階で必要であるかを検証するため、温度感受性 *GAL80* (*GAL80^{ts}*) を用いて inx2 または inx7 の一過的ノックダウンを全眼で誘導した (図.5A). 18°C で飼育した後、示した時点 (0 h, 12 h, 24 h APF) から 30°C へ温度シフトし、成虫羽化まで RNAi 発現を誘導した。その結果、0 h APF および 12 h APF からの温度シフトでは Rh3/Rh6 mis-coupling が有意に増加したのに対し、24 h APF 以降のシフトでは mis-coupling の増加は認められなかった (図.5B, C). *GAL80^{ts}* の解除および RNAi 誘導に要する時間遅延を考慮すると、Inx2/Inx7 の要求性は蛹期初期に限定されると考えられる。

I-3. 考察

I-3-1. Innexin 因子が必要であることは、Rh5 誘導シグナルに“細胞間チャネル依存性”があることを示す (I-2-1)

AJ/SJ は上皮構造維持に必須であるが、Rh5 誘導シグナル成立には「構造保持」よりも「情報の直接交換」が重要である可能性が高い。ギャップ結合はイオン・小分子を迅速に共有し、発生過程での細胞集団の協調・同期化に頻繁に関与する。本研究で inx2/inx7 阻害により Rh3/Rh6 mis-coupling (デフォルト状態への回帰) が再現性高く誘導された事実は、Rh5 誘導シグナルが「何らかの小分子・イオン動態」に依存していることを強く示唆する。注目すべきは、mis-coupling が Rh3 側 (R7) ではなく Rh6 側 (R8) の固定

化失敗として現れる点であり，**Innexin** 阻害は R7 の確率的運命決定を破壊するのではなく，R8 における **Melt** 優位化などの誘導過程を阻害する状況を作り出していると考えられる。

I-3-2. 付属細胞での必須性は「非神経細胞が神経細胞の機能分化を成立させる」ことを示す(I-2-2)

spa-GAL4による付属細胞特異的KDで表現型が再現されたことから，**Inx2/Inx7**の主要作用部位は付属細胞にある。付属細胞はPR細胞体を包囲し，蛹期に密接接触構造を形成するため，付属細胞—PR細胞間のギャップ結合チャンネルが成立し得る。一方，**spa-GAL4**はcone cellsとPPCsの両方に作用するため，どちらが本質的かは未確定である。しかし**Inx2/Inx7**の蛹期発現が色素細胞（特にPPC）で強いこと（Richard and Hoch, 2015），および第2章で示すNotch依存的PPC誘導とmis-couplingの強い連動を考慮すると，PPCが主要な場である可能性が高い。

I-3-3. 第1章の結論：Rh5誘導シグナル成立は「PR細胞同士」ではなく「付属細胞を含む個眼ネットワーク」で決まる

本章の結果は，Rh5誘導シグナルがR7–R8間の直接伝達として単純化できないことを示した。R1介在による構造的制約下で，付属細胞における**Innexin**依存的ギャップ結合が必須であり，個眼全体の細胞ネットワークがシグナル成立を担保している可能性が高い。この機構は，付属細胞の機能的成熟（特に蛹期初期）がPR細胞の成熟（rhabdomere morphogenesis および Rhodopsin coupling）を同期させる「ゲート」として機能することを示唆する。

次章では，この付属細胞側の機構がNotch依存的発生プログラムとどのように結びつき，IP3R–Ca²⁺シグナルを介してPR細胞の機能的特異化を制御するかを詳細に検証する。

第2章

Notch 依存的付属細胞分化がロドプシンカップリング成立に与える影響

II-1. 序論

付属細胞 (cone cells および pigment cells) の分化は Notch シグナルに強く依存しており, primary pigment cell (PPC) の誘導, secondary/tertiary pigment cells (2°/3°色素細胞) の配列整列, 剛毛 (bristle) の配置など, 個眼の最終構造を規定する重要な役割を果たす. 付属細胞の分化は約 40 h APF までにほぼ完了し (図.7A), その後に光感受器 (PR) 細胞の機能的成熟 (rhabdomere morphogenesis およびロドプシンカップリング) が進行する.

第1章で示されたように, *inx2/inx7* は付属細胞 (特に色素細胞) で必須であり, 蛹期初期に時期特異的に要求される. これらの知見から, Rh5 誘導指示シグナルの成立には「付属細胞が正しく分化・配置され, 機能的成熟を達成すること」が前提条件である可能性が強く考えられた. 付属細胞分化異常が PR 細胞の成熟タイミングや細胞間コミュニケーション環境を乱すことで, R8 における Rh5 固定化が失敗し, *mis-coupling* (Rh3/Rh6) が誘導されるというモデルである.

そこで本章では, Notch 機能を時期特異的に阻害する実験系 (*GMR> N^[DN] GAL80^{ts}, spa> N^[DN] GAL80^{ts}, N^{ts} 温度感受性アレル) を用いて, (1) 付属細胞形態異常と *mis-coupling* の相関関係, (2) Notch 阻害の臨界時間窓が PPC 誘導期と対応するかを解析し, 付属細胞分化とロドプシンカップリング成立の因果関係を明確にすることを目的とした.*

II-2. 結果

II-2-1. Notch 阻害による付属細胞異常は *mis-coupling* と強く相関する

全眼 (*GMR-GAL4*) または付属細胞特異的 (*spa-GAL4*) で Notch ドミナントネガティブ型 (*N^[DN]*) を *GAL80^{ts}* システムにより時間制御発現させたところ, 特定の温度シフト条件で顕著な付属細胞形態異常が観察された (図.6A). 具体的には, PPC の過剰誘導, 2°/3°色素細胞の配列破綻, 剛毛の重複・異常配置などが生じ, これらの形態異常を示す個眼では Rh3/Rh6 *mis-coupling* が有意に増加した. 一方, 温度シフト開始が遅い条件 (0 h APF 以降) では形態異常が軽微または認められず, *mis-coupling* もほとんど誘導されなかった (図.6B).

これらの結果は, Notch 阻害による付属細胞分化異常がロドプシンカップリング異常と密接に連動することを示す. また, *spa-GAL4* 駆動で付属細胞特異的に *N^[DN]* を発現させた場合も同様の傾向が得られたことから, Notch の作用は主に付属細胞側に帰属すると考えられる (図.6C).

II-2-2. Notch 機能が必要な時間窓は PPC 誘導期に一致し、16–24h APF 阻害で mis-coupling が誘導される

Notch の臨界時期をより精密に解析するため、温度感受性アリル N^{ts} を用いて全眼で一過的阻害を行った。付属細胞分化が 40 h APF までに完了することを考慮し、以下の 4 つの時間窓で 30°C 温度シフトを実施した：0–8 h, 10–16 h, 16–24 h, 24–32 h APF。

結果、10–16 h および 16–24 h APF のシフト条件で付属細胞形態異常が顕著に観察された。具体的には、PPC 過剰誘導、2°/3°色素細胞の配列乱れ、剛毛重複が頻発し、特に 16–24 h APF シフトでは R8 の rhabdomere 発達不全も一部で認められた。一方、0–8 h APF または 24–32 h APF シフトでは付属細胞形態およびロドプシンカップリングがほぼ正常であった (図.7B-E)。

16–24 h APF シフト条件では、形態異常を伴って Rh3/Rh6 mis-coupling が有意に増加した (図.7F-G)。この時間窓は PPC 誘導期にほぼ対応し、Notch 依存的 PPC 分化・成熟が Rh5 誘導シグナル成立の臨界期であることを強く示唆する。なお、10–16 h APF シフトでは R8 rhabdomere の不完全発達が著しく、mis-coupling 評価が困難であったため、PPC 誘導期以降の阻害がカップリングに特異的に影響を与えることが確認された。

II-3. 考察

II-3-1. Notch は Rh5 誘導シグナルの“上流で場を作る因子”である(II-2-1)

Notch 阻害による付属細胞形態異常と mis-coupling の強い連動は、Rh5 誘導シグナルが PR 細胞内の転写回路だけで完結するのではなく、周囲付属細胞の分化状態・配置・成熟に強く依存することを示す。Notch は付属細胞の運命決定そのものを制御するため、阻害が mis-coupling を誘導するのは以下のいずれか (または複合) によるものと考えられる：(a) 付属細胞—PR 細胞間の物理的接触関係の破綻、(b) 付属細胞における Innexin (Inx2/Inx7) の局在・機能的チャネル形成の不成立、(c) PR 細胞成熟 (rhabdomere morphogenesis など) の開始タイミング異常。これにより、R8 における pale 側固定化 (Melt 優位化など) の誘導過程が成立しなくなる。

II-3-2. PPC 誘導期が臨界期であることは、第 1 章の“付属細胞で Innexin が必須”と整合する(II-2-2)

PPC は PR 細胞体を直接包囲する位置にあり、ギャップ結合チャネルの物理的接点として最適である。Notch 阻害の臨界時間窓が PPC 誘導期 (16–24 h APF) に一致することは、第 1 章で示された Inx2/Inx7 の蛹期初期要求性と完全に整合する。つまり、PPC 成熟が終盤に差し掛かる段階で付属細胞側の結合環境 (Inx2/Inx7 を含む) が整い、R8 の成熟・Rh5 カップリング固定化に必要なシグナル伝達が可能になる、というモデルを支持する。

一方、Notch 阻害は形態異常を広範に引き起こすため、mis-coupling が「純粋なシグナル伝達不全」なのか「成熟不全の二次効果」なのかの切り分けが必要である。今後、形態異常が軽微な条件での mis-coupling 再現性、R8 rhabdomere 成熟指標 (例：PtdIns(3,4,5)P3 蓄積など) との相関解析、または PPC 特異的 Notch 阻害系の構築が重要となる。

II-3-3. 第 2 章の結論 : Notch 依存的付属細胞分化は Rh5 誘導シグナル成立の前提条件である

本章の結果は, Notch 依存的な付属細胞分化 (特に PPC 誘導・成熟の時間窓) がロドプシンカップリング成立と密接に結びつくことを示した. 第 1 章の Innexin 必須性と合わせると, Notch は付属細胞側の結合・シグナル環境を整える上流因子として位置づけられる. この環境整備が完了した段階で IP3R-Ca²⁺ 経路が作動可能となり, R8 への Rh5 誘導シグナルが成立するという一連の流れが明らかになった. 次章では, この Notch 下流の IP3R-Ca²⁺ シグナルがどのように gap junction を介して PR 細胞成熟を指令するかを詳細に解析する.

第3章

IP3R-Ca²⁺シグナルが Rh5 誘導シグナル成立に果たす役割

III-1. 序論

ギャップ結合 (gap junction) は、隣接細胞間でイオンや小分子を直接交換する重要な構造であり、発生過程における細胞間コミュニケーションの基盤として広く機能している。ギャップ結合を介して移動可能な候補分子としては、Ca²⁺、IP3、cAMP、cGMP、ATP など多様な第二メッセンジャーが挙げられるが、中でも Ca²⁺ 波 (calcium wave) は、細胞集団の同期化、運命決定、組織修復、形態形成のタイミング制御など、さまざまな生物学的現象に深く関与することが知られている (Dupont et al., 2007; Berridge et al., 2003)。キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) では特に、Inx2 依存的な Ca²⁺ 動態が血球前駆細胞の運命決定 (Ho et al., 2021)、卵巣濾胞細胞における border cell の運命指定 (Sahu et al., 2017)、損傷後の腸上皮修復における Ca²⁺ 拡散と再生応答 (Petsakou et al., 2023)、眼発達における色素細胞を介した Ca²⁺ 波の伝播および endfeet stress fiber の収縮制御 (Ready and Chang, 2021) など、多様な文脈で報告されており、これらの例は Innexin 依存的ギャップ結合が Ca²⁺ 波の成立と細胞間シグナルの同期化に中心的な役割を果たすことを強く示唆している。

これまでの本研究では、第1章において inx2/inx7 が眼の付属細胞 (特に色素細胞) において必須であり、蛹期初期に時期特異的に要求されることが明らかになった。また、第2章では Notch シグナル依存的な付属細胞分化 (特に primary pigment cell : PPC の誘導と成熟) が Rh5 誘導シグナルの成立に不可欠な前提条件であることが示された。これらの知見を統合すると、Rh5 誘導シグナル成立の機構は「付属細胞の分化・成熟 → Innexin (Inx2/Inx7) 依存的な機能的 gap junction チャンネルの形成 → Ca²⁺ 動態 (または他の第二メッセンジャー) の活性化」という段階的連鎖によって担保されている可能性が強く考えられた。

一方で、ギャップ結合下流の第二メッセンジャーとして最も有力な候補は Ca²⁺/IP3 経路と cAMP-PKA 経路である。前者は IP3 受容体 (IP3R) を介した細胞内 Ca²⁺ 貯蔵庫からの Ca²⁺ 放出を起点とし、波状の伝播を可能にする。一方、後者は cAMP 依存性プロテインキナーゼ A (PKA) の活性化を介して転写制御や細胞骨格再編成に寄与する可能性があるが、眼発達における直接的な役割は未解明である。そこで本章では、ギャップ結合依存的な下流経路として (1) cAMP-PKA 経路、(2) IP3R-Ca²⁺ 経路の両方を比較検証し、Rh5 誘導シグナル成立および R8 における Rh5 固定化 (mis-coupling 抑制) にどちらが主要に関与するかを明らかにすることを目的とした。本解析を通じて、Notch-Innexin-Ca²⁺ の連鎖が Rh5 誘導の核心をなすのか、それとも他の経路が並行的に機能するのかを分子レベルで絞り込む。

III-2. 結果

III-2-1. PKA 阻害では mis-coupling の有意な増加は見られない

cAMP-PKA 経路が Rh5 誘導シグナル成立に関与する可能性を検証するため、dominant-negative 型 PKA (PKA-DN) を用いた機能阻害実験を行った。具体的には、GAL4/UAS

システムにより全眼特異的ドライバー (*GMR-GAL4*) を用いて PKA-DN を発現させ、成虫網膜における rhodopsin 免疫染色 (Rh3, Rh5, Rh6) および転遺伝子報告株を用いて R7/R8 のロドプシン発現パターンとカップリング状態を評価した (図.8A).

結果, PKA-DN 発現条件下では Rh3/Rh6 mis-coupling の割合に統計学的に有意な増加は認められなかった. この結果は, Notch 機能阻害や *Inx2/Inx7 RNAi* で観察される顕著な mis-coupling 増加 (第 1-2 章参照) と明確に異なり, R8 における Rh5 の正常発現率, rhabdomere の形態, および個眼全体の構造もほとんど影響を受けなかった. したがって, 少なくとも本実験条件下では cAMP-PKA 経路が Rh5 誘導シグナルの主要な下流経路ではないことが強く示唆された.

III-2-2. IP3R 機能阻害により mis-coupling が有意に増加する

次に, IP3 受容体 (IP3R) の dominant-negative 型 (IP3R-DN) を同様の GAL4/UAS システムで誘導し, Ca^{2+} シグナル経路を阻害したところ, Rh3/Rh6 mis-coupling が有意に増加した (図.8A). この増加は Notch 阻害や *Inx2/Inx7 RNAi* と同程度の強度であり, R8 における Rh5 の発現固定化失敗が顕著に観察された. この結果は, IP3R- Ca^{2+} 経路が Rh5 誘導シグナル成立に必須である可能性を強く示すものである.

III-3. 考察

III-3-1. IP3R- Ca^{2+} 経路は Innexin 依存的成立機構の中核候補である(III-2-2)

IP3R 阻害で mis-coupling が増加した事実は, Rh5 誘導シグナル成立に Ca^{2+} 動態が直接関与することを強く示唆する. IP3 は細胞質 Ca^{2+} 放出を引き起こし, Ca^{2+} 波を発生させる (Dupont et al., 2007). ギャップ結合は Ca^{2+} そのもの, あるいは IP3 などの小分子を拡散可能にするため, *Inx2/Inx7* 依存的な結合環境が整うことで, 付属細胞群 (または付属細胞-PR 細胞間) で IP3R 依存的 Ca^{2+} 波が同期・伝播し, R8 における成熟およびロドプシンカップリング固定化が誘導されるモデルが考えられる.

一方で, IP3R 阻害が必要な作用部位が「付属細胞側」か「PR 側」かは現時点で未確定である. 可能性として, (a) 付属細胞側の Ca^{2+} 波が PR 細胞成熟を指令する (例: rhabdomere morphogenesis のタイミング制御), (b) PR 細胞側での Ca^{2+} 応答がロドプシン選択回路の固定化に直接必要, という両方が挙げられる. 今後, 細胞種特異的 IP3R 阻害 (例: *spa-GAL4* 駆動または PR 特異的ドライバー) を行い, 表現型の帰属を明確にする必要がある.

III-3-2. PKA が主要因でないことは, 候補分子輸送の仮説を絞り込む(III-2-1)

PKA 阻害で明確な mis-coupling 増加が見られなかったことから, 本系における主要下流経路は cAMP-PKA ではなく IP3R- Ca^{2+} である可能性が高い. これにより, 第 1 章で示された「ギャップ結合依存性」は, $Ca^{2+}/IP3$ 動態を中心とするモデルで整合的に説明可能となる. cAMP-PKA 経路が関与する例 (例: placenta trophoblast fusion での Cx43 リン酸化, Pidoux et al., 2014) とは異なり, 眼発達では Ca^{2+} 波の同期化が中心的な役割を果たしていると考えられる.

III-3-3. 第3章の結論：Rh5 誘導シグナル成立は「Notch で整えられた付属細胞環境」上で「Innexin-IP3R-Ca²⁺」が作動する

本章の結果は、IP3R-Ca²⁺経路がRh5 誘導シグナル成立に必須であることを示した。第1章のInnexin 必須性、第2章のNotch 依存的付属細胞分化の必要性和合わせると、Rh5 誘導シグナル成立は以下の段階的連鎖によって担保される可能性が高い：(1) Notch による付属細胞分化・配置の完了（特にPPC 成熟）、(2) Inx2/Inx7 を基盤とした機能的gap junction チャンネルの形成、(3) IP3R 依存的Ca²⁺動態の作動（Ca²⁺波の伝播）。

この連鎖は、付属細胞成熟の完了を「ゲート」としてPR 細胞の機能的成熟（rhabdomere morphogenesis および Rhodopsin coupling）を同期させる機構として機能すると考えられる。gap junction チャンネル関連分子がchannel opening の精密なタイミングを制御する「gatekeeper」として働く可能性も示唆される。次章では、これらの結果を統合し、Rh5 誘導シグナルの全体像を模式モデルとして提示する。

5. 総合考察

本研究の結果は、Rh5 誘導指示シグナルの成立が R7-R8 間の単純な直接的細胞間伝達ではなく、付属細胞 (accessory cells) の成熟状態に強く依存した段階的過程であることを強く示唆している。すなわち、(1) Notch 依存的な付属細胞分化 (特に primary pigment cell: PPC の誘導) が進行・完了することにより、個眼内に光感受器 (PR) 細胞の機能的成熟 (rhabdomere morphogenesis および Rhodopsin coupling) を可能にする微小環境が整う。(2) 次いで、付属細胞側で高い要求性を示す *Inx2/Inx7* および PR 側で必須の *ShakB* (*Inx8*) を含む *Innexin* 群が協働し、付属細胞-PR 細胞間に機能的な gap junction チャンネルを形成する。(3) この gap junction を介して IP3R 依存的な Ca^{2+} シグナル (Ca^{2+} 波) が伝達され、R8 におけるロドプシン選択 (Rh5 カップリングの固定化) を誘導する。

本モデルは、以下の複数の独立した実験結果を一貫して説明可能である。0-12 h APF 期における *inx2/inx7* 阻害により Rh5 mis-coupling 表現型が顕著に増強される一方で 24 h APF 以降では影響が著しく減弱するという時間的特異性、Notch シグナル阻害による付属細胞分化異常と Rh5/Rh6 mis-coupling の密接な連動、ならびに IP3R 阻害が mis-coupling を誘導するのに対し PKA 阻害ではほとんど影響が見られないこと。これらの結果は、gap junction 介導シグナルが付属細胞の機能的成熟を介して PR 細胞に指示シグナルを伝達することを支持する。

一方で、本モデルは同時にいくつかの重要な未解決課題を浮き彫りにしている。第一に、*Inx2/Inx7* の機能的必須性が cone cell と PPC のどちら (あるいは両方) に主に帰属するのかは、*spa-GAL4* の駆動領域だけでは決定できない。第二に、これらの *Innexin* が形成するチャンネルが完全な gap junction (両方向性) として機能しているのか、あるいは hemichannel (片側開放型) として機能しているのかは未解明である。第三に、 Ca^{2+} ダイナミクスが主に付属細胞側で発生し PR 細胞の成熟を指令するのか、それとも PR 細胞側での Ca^{2+} 応答が直接的に Rh5 選択に必要なのかも不明である。

これらの疑問を今後解明していくことで、R7 から R8 への instructive signal は、従来考えられてきたような「特定シグナル分子の直接輸送」ではなく、付属細胞の成熟完了を「ゲート」として PR 細胞の機能的成熟 (rhabdomere morphogenesis および Rhodopsin coupling) を同期させる機構 (図 8B) として再定義される可能性が高いと考えられる。本研究の知見は、gap junction 介導の細胞間コミュニケーションが網膜発達における PR 細胞の機能的特異化をどのように制御するかを理解する上で重要な示唆を与える。

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始温かく，かつ的確なご指導を賜りました中越 英樹 教授に，心より深く感謝申し上げます．研究の立ち上げから実験計画の構築，結果の解釈，ならびに本論文の完成に至るまで，多方面にわたり懇切丁寧なご指導を賜りましたことに，深く御礼申し上げます．

また，本研究および論文作成に際し，多大なるご助言とご指導を賜りました北又 学 博士，大常 真一 氏，ならびに新城 綾樹 氏に，厚く御礼申し上げます．日々の議論を通じて，多くの示唆と学びを得ることができました．

ショウジョウバエ研究に関して多くの知見と刺激を与えていただきました上田 均 教授，吉井 大志 教授にも，心より感謝申し上げます．

本研究において使用したショウジョウバエ系統および抗体をご分与いただきました Steven Britt 博士（コロラド大学），に，深く感謝申し上げます．また，進学に関する面接の機会を通じて，Claude Desplan 博士（ニューヨーク大学），ならびに金沢大学の佐藤 純 教授 と直接お話しする機会をいただきました．結果としてご縁には至りませんでした，が，面接の際にいただいたご意見や励ましは，研究者としての姿勢や将来について考える上で大きな示唆となり，精神的にも大きな支えとなりました．ここに深く感謝申し上げます．

広州医科大学 霍夫曼研究所の楊 博 教授には，貴重な実習の機会をお与えいただき，研究の視野を広げる経験をさせていただきました．また，王 一鳴 先輩には，卒業前に進路について悩んでいた際，多くの助言と励ましをいただき，心より感謝しております．

日々の研究生活においては，松家 未来 先輩，荻野 裕人 先輩には，実験の基礎から丁寧にご指導いただきましたことに深く感謝いたします．また，鈴江 陽一郎 氏，山田 芳氏をはじめ，多くの研究室の皆様，研究室での生活や実験環境に慣れるまで多大なご支援をいただきました．中越研究室の諸先輩ならびに研究室の皆様，心より御礼申し上げます．

加えて，岡山大学において，留学生である私に対し，書類手続きや各種申請等において親身にご対応いただきました行政担当の先生方・職員の皆様にも，この場を借りて深く感謝申し上げます．

最後に，本研学生生活を支え，常に励まし続けてくれた家族，友人に心より感謝するとともに，多くのショウジョウバエにも感謝の意を表し，本謝辞といたします．

7. 参考文献

- Bao, S.** (2014). Notch controls cell adhesion in the *Drosophila* eye. *PLoS Genet.* **10**, e1004087.
- Bauer, R., Loer, B., Ostrowski, K., Martini, J., Weimbs, A., Lechner, H. and Hoch, M.** (2005). Intercellular communication: the *Drosophila* innexin multiprotein family of gap junction proteins. *Chem. Biol.* **12**, 515-526.
- Blackie, L., Tozluoglu, M., Trylinski, M., Walther, R. F., Schweisguth, F., Mao, Y. and Pichaud, F.** (2021). A combination of Notch signaling, preferential adhesion and endocytosis induces a slow mode of cell intercalation in the *Drosophila* retina. *Development* **148**, dev197301.
- Cook, T., Desplan, C.** (2001). **Photoreceptor subtype specification: from flies to humans.** *Semin Cell Dev. Biol.* **12**, 509-518.
- Charlton-Perkins, M. A., Sandler, E. D., Buschbeck, E. K. and Cook, T. A.** (2017). Multifunctional glial support by Semper cells in the *Drosophila* retina. *PLoS Genet.* **13**, e1006782.
- Choi, B. J., Chen, Y. C. and Desplan, C.** (2025). Retinal calcium waves coordinate uniform tissue patterning of the *Drosophila* eye. *Science* **390**, eady5541.
- Chou, W.-H., Huber, A., Bentrop, J., Schulz, S., Schwab, K., Chadwell, L. V., Paulsen, R. and Britt, S. G.** (1999). Patterning of the R7 and R8 photoreceptor cells of *Drosophila*: evidence for induced and default cell-fate specification. *Development* **126**, 607-616.
- Dossi, E., Zonca, L., Pivonkova, H., Milior, G., Moulard, J., Vargova, L., Chever, O., Holcman, D. and Rouach, N.** (2024). Astroglial gap junctions strengthen hippocampal network activity by sustaining afterhyperpolarization via KCNQ channels. *Cell Rep.* **43**, 114158.
- Dupont, G., Combettes, L. and Leybaert, L.** (2007). Calcium dynamics: spatio-temporal organization from the subcellular to the organ level. *Int. Rev. Cytol.* **261**, 193-245.
- Garcia, M. A., Nelson, W. J. and Chavez, N.** (2018). Cell-cell junctions organize structural and signaling networks. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, a029181.
- Go, M. J., Eastman, D. S. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1998). Cell proliferation control by Notch signaling in *Drosophila* development. *Development* **125**, 2031-2040.
- Guillot, C. and Lecuit, T.** (2013). Mechanics of epithelial tissue homeostasis and morphogenesis. *Science* **340**, 1185-1189.
- Guiza, J., Barria, I., Saez, J. C. and Vega, J. L.** (2018). Innexins: expression, regulation, and functions. *Front. Physiol.* **9**, 1414.
- Hsiao, H.Y., Johnston, R.J., Jukam, D., Vasiliauskas, D., Desplan, C., and Rister,**

- J. (2012). Dissection and immunohistochemistry of larval, pupal and adult *Drosophila* retinas. *J Vis Exp*, 4347. 10.3791/4347.**
- Herve, J. C. and Derangeon, M. (2013). Gap-junction-mediated cell-to-cell communication. *Cell Tissue Res.* 352, 21-31.**
- Ho, K. Y. L., Khadilkar, R. J., Carr, R. L. and Tanentzapf, G. (2021). A gap-junction-mediated, calcium-signaling network controls blood progenitor fate decisions in hematopoiesis. *Curr. Biol.* 31, 4697-4712.**
- Izaddoost, S., Nam, S. C., Bhat, M. A., Bellen, H. J. and Choi, K. W. (2002). *Drosophila* Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres. *Nature* 416, 178-183.**
- Johnston, R. J., Jr., Otake, Y., Sood, P., Vogt, N., Behnia, R., Vasiliauskas, D., McDonald, E., Xie, B., Koenig, S., Wolf, R., et al. (2011). Interlocked feedforward loops control cell-type-specific Rhodopsin expression in the *Drosophila* eye. *Cell* 145, 956-968.**
- Jiao, R., Daube, M., Duan, H., Zou, Y., Frei, E., Noll, M. (2001). Headless flies generated by developmental pathway interference. *Dev.* 128, 3307-3319.**
- Kitamata, M., Otake, Y., Kitagori, H., Zhang, X., Maki, Y., Boku, R., Takeuchi, M. and Nakagoshi, H. (2024). Functional opsin patterning for *Drosophila* color vision is established through signaling pathways in adjacent object-detection neurons. *Development* 151, dev202388.**
- Lee, Y. S. and Carthew, R. W. (2003). Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use of intron spacers. *Methods* 30, 322-329.**
- Li WZ, Li SL, Zheng HY, Zhang SP, Xue L. A broad expression profile of the GMR-GAL4 driver in *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Res.* 2012 Aug 6;11(3):1997-2002. doi: 10.4238/2012.August.6.4. PMID: 22911584.**
- Miller, D. T. and Cagan, R. L. (1998). Local induction of patterning and programmed cell death in the developing *Drosophila* retina. *Development* 125, 2327-2335.**
- Mollereau, B. and Domingos, P. M. (2005). Photoreceptor differentiation in *Drosophila*: from immature neurons to functional photoreceptors. *Dev. Dyn.* 232, 585-592.**
- Nagaraj, R. and Banerjee, U. (2007). Combinatorial signaling in the specification of primary pigment cells in the *Drosophila* eye. *Development* 134, 825-831.**
- Pelikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlade, C. J., Ready, D. F. and Tepass, U. (2002). Crumbs, the *Drosophila* homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature* 416, 143-149.**
- Petsakou, A., Liu, Y., Liu, Y., Comjean, A., Hu, Y. and Perrimon, N. (2023). Cholinergic neurons trigger epithelial Ca(2+) currents to heal the gut. *Nature* 623, 122-131.**
- Pichaud, F. (2014). Transcriptional regulation of tissue organization and cell morphogenesis: the fly retina as a case study. *Dev. Biol.* 385, 168-178.**
- Pidoux, G., Gerbaud, P., Dompierre, J., Lygren, B., Solstad, T., Evain-Brion, D.**

- and Tasken, K.** (2014). A PKA-ezrin-Cx43 signaling complex controls gap junction communication and thereby trophoblast cell fusion. *J. Cell Sci.* **127**, 4172-4185.
- Pinal, N., Goberdhan, D. C., Collinson, L., Fujita, Y., Cox, I. M., Wilson, C. and Pichaud, F.** (2006). Regulated and polarized PtdIns(3,4,5)P₃ accumulation is essential for apical membrane morphogenesis in photoreceptor epithelial cells. *Curr. Biol.* **16**, 140-149.
- Ready, D. F. and Chang, H. C.** (2021). Calcium waves facilitate and coordinate the contraction of endfeet actin stress fibers in *Drosophila* interommatidial cells. *Development* **148**, dev199700.
- Rice, C., De, O., Alhadyian, H., Hall, S. and Ward, R. E.** (2021). Expanding the junction: New insights into non-occluding roles for septate junction proteins during development. *J. Dev. Biol.* **9**, 11.
- Richard, M. and Hoch, M.** (2015). *Drosophila* eye size is determined by Innexin 2-dependent Decapentaplegic signalling. *Dev. Biol.* **408**, 26-40.
- Sahu, A., Ghosh, R., Deshpande, G. and Prasad, M.** (2017). A gap junction protein, Inx2, modulates calcium flux to specify border cell fate during *Drosophila* oogenesis. *PLoS Genet.* **13**, e1006542.
- Srinivas, M., Verselis, V. K. and White, T. W.** (2018). Human diseases associated with connexin mutations. *Biochim. Biophys. Acta* **1860**, 192-201.
- Stebbing, L. A., Todman, M. G., Phillips, R., Greer, C. E., Tam, J., Phelan, P., Jacobs, K., Bacon, J. P. and Davies, J. A.** (2002). Gap junctions in *Drosophila*: developmental expression of the entire innexin gene family. *Mech. Dev.* **113**, 197-205.
- Tan, H., Fulton, R. E., Chou, W. H., Birkholz, D. A., Mannino, M. P., Yamaguchi, D. M., Aldrich, J. C., Jacobsen, T. L. and Britt, S. G.** (2020). *Drosophila* R8 photoreceptor cell subtype specification requires *hibris*. *PLoS One* **15**, e0240451.
- Tanaka, R., Takase, Y., Kanachi, M., Enomoto-Katayama, R., Shirai, T. and Nakagoshi, H.** (2007). Notch-, Wingless-, and Dpp-mediated signaling pathways are required for functional specification of *Drosophila* midgut cells. *Dev. Biol.* **304**, 53-61.
- Tu, R., Tang, X. A., Xu, R., Ping, Z., Yu, Z. and Xie, T.** (2023). Gap junction-transported cAMP from the niche controls stem cell progeny differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **120**, e2304168120.
- Visser, J., Milior, G., Breton, R., Moulard, J., Garnero, M., Ezan, P., Ribot, J. and Rouach, N.** (2024). Astroglial networks control visual responses of superior collicular neurons and sensory-motor behavior. *Cell Rep.* **43**, 114504.
- Wang, T. and Montell, C.** (2005). Rhodopsin formation in *Drosophila* is dependent on the PINTA retinoid-binding protein. *J. Neurosci.* **25**, 5187-5194.
- Wernet, M. F. and Desplan, C.** (2004). Building a retinal mosaic: cell-fate decision in the fly eye. *Trends Cell Biol.* **14**, 576-584.

Yasarbas, S. S., Inal, E., Yildirim, M. A., Dubrac, S., Lamartine, J. and Mese, G. (2024). Connexins in epidermal health and diseases: insights into their mutations, implications, and therapeutic solutions. *Front. Physiol.* **15**, 1346971.

8. 図表

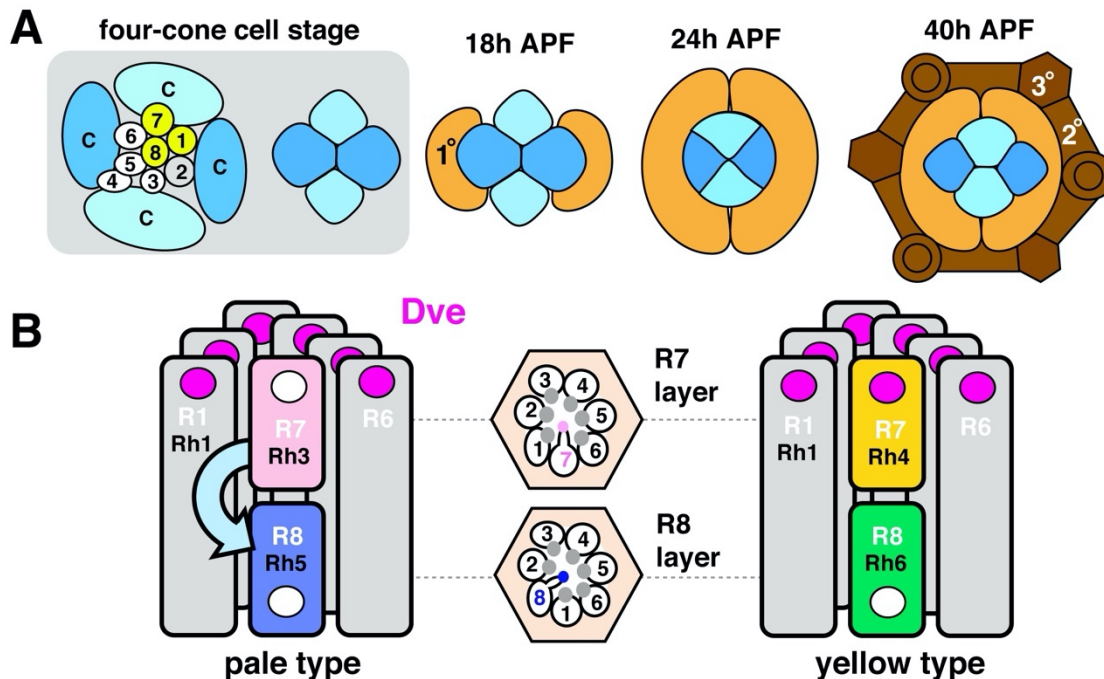


図. 1 付属細胞の分化過程と個眼のサブタイプ

(A) アクセサリー細胞の発生の模式図. 光受容細胞 R7, R8, R1 (黄色の円) は, four cone cell stage で直接接触している. 前後 (AP) および背腹 (DV) 円錐細胞は, それぞれ青色と水色で示されている. 一次色素細胞 (PPC: ライトブラウン, 1°) は AP 円錐細胞によって誘導され, 二次 (2°) および三次 (3°) 色素細胞 (ダークブラウン) が個眼の格子構造を形成する. APF: 囲蛹殻形成後.

(B) 個眼の二つの主要なサブタイプ. 長方形と円は, それぞれ光受容細胞のラブドメアと核を表している. ラブドメア内のロドプシン発現 (Rh1, Rh3-Rh6) は, 異なる色の長方形で示されている. 光受容細胞 R1-R8 は白い文字で示されている. Dve の核内での発現は, マゼンタ色の円で示されている. R7 から R8 への指示的 Rh5 誘導信号は, 曲線矢印で示されている. R7 および R8 層の横断面は, ラブドメアと細胞体の位置を示している.

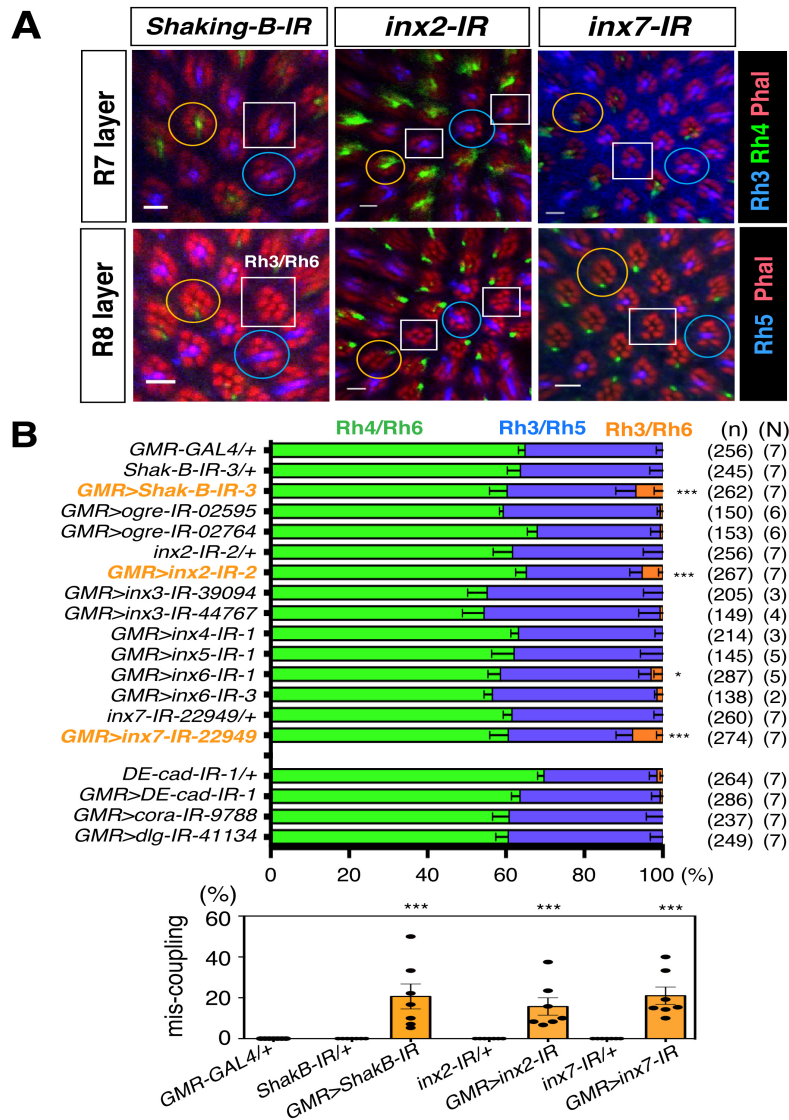


図. 2 細胞接着因子のノックダウンによる個眼でのロドプシン発現

(A) *GMR-GAL4* ドライバーを使用して, *Shaking-B*, *inx2* または *inx7* を全眼でノックダウンした個眼におけるロドプシン発現. 黄色型 (Rh4/Rh6) および pale 型 (Rh3/Rh5) の個眼は, それぞれ黄色と青色の円で示されている. ミスカップリング (Rh3/Rh6) の個眼は白い四角で示されている. Rh3/Rh5 (青) および Rh4-EGFP (緑) の発現が示されている. ラブドメアは Phalloidin (赤) で標識されている. スケールバー: 5 μ m.

(B) 示された遺伝子型で細胞接着因子をノックダウンした個眼におけるロドプシンカップリング. 黄色型 (Rh4/Rh6), pale 型 (Rh3/Rh5), およびミスカップリング個眼 (Rh3/Rh6) の比率が, それぞれ緑, 青, およびオレンジで示されている. 集計した個眼の数 (n) および複眼 (N) の数が示されている. 複眼内でのミスカップリングの比率が下にプロットされている. 誤差棒は平均標準誤差 (SEM) を示す.

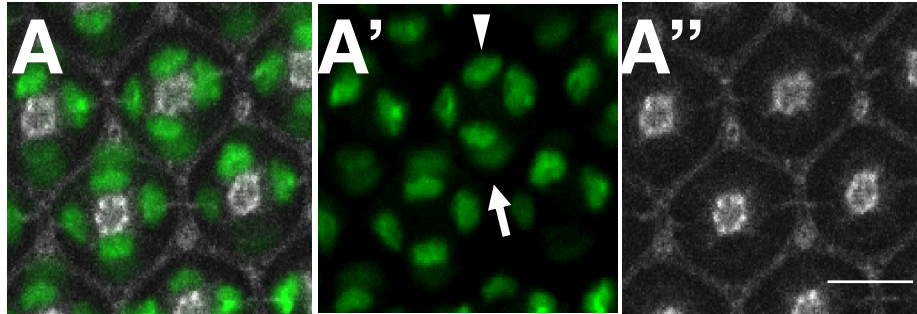


図.3 円錐細胞および一次色素細胞における *spa-GAL4* の発現パターン

40 h APF における *spa-GAL4>UAS-Stinger* の個眼像. *spa* 発現細胞は, 円錐細胞 (A'の矢頭) および一次色素細胞 (A'の矢印) において GFP 発現(緑) として標識されている. 細胞膜は anti-Arm 抗体 (白) で標識した. GFP (A') および Arm (A'') の単一チャンネル像を示す. スケールバー : 10 μ m.

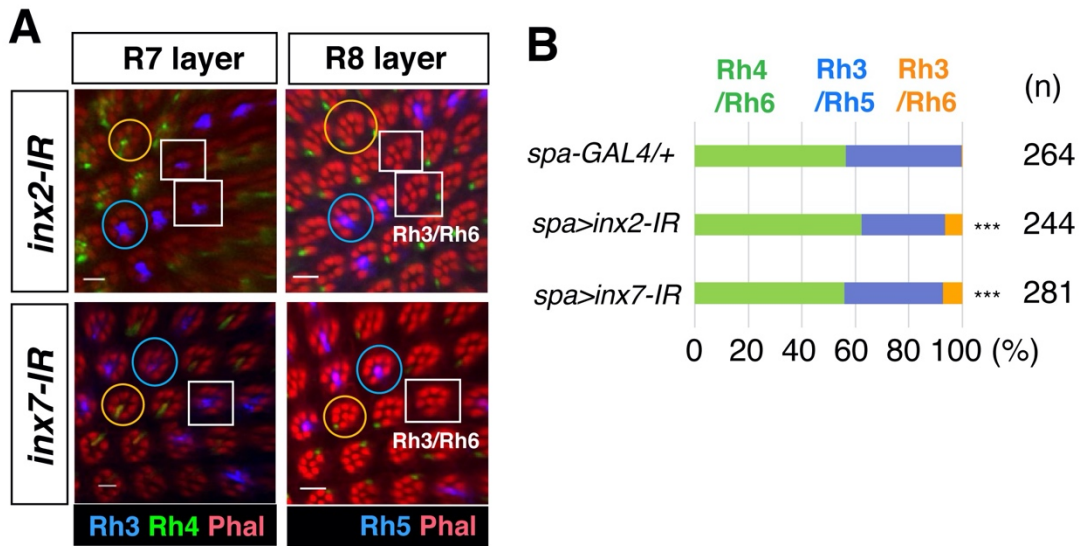


図.4 ギャップ結合因子は付属細胞で必要である

(A) *spa-GAL4* ドライバーを用いてアクセサリ細胞で *inx2* または *inx7* がノックダウンされた個眼におけるロドプシン発現. 黄色型 (Rh4/Rh6) および pale 型 (Rh3/Rh5) の個眼は, それぞれ黄色と青色の円で示されている. ミスカップリング (Rh3/Rh6) の個眼は, 白い四角で示されている. Rh3/Rh5 (青) および Rh4-EGFP (緑) の発現が示されている. R8 層では, Rh4 を発現する R7 (緑) が周辺部に可視化される. ラブドメアは Phalloidin (赤) で標識されている. スケールバー: 5 μ m.

(B) 示された遺伝子型での *inx* KD 個眼におけるロドプシンカップリング. 黄色型 (Rh4/Rh6), pale 型 (Rh3/Rh5), およびミスカップリング個眼 (Rh3/Rh6) の比率が, それぞれ緑, 青, およびオレンジで示されている. 集計した個眼の数 (n) および複眼 (N) の数が示されている. 複眼内でのミスカップリングの比率が下にプロットされている. 誤差棒は平均標準誤差 (SEM) を示す.

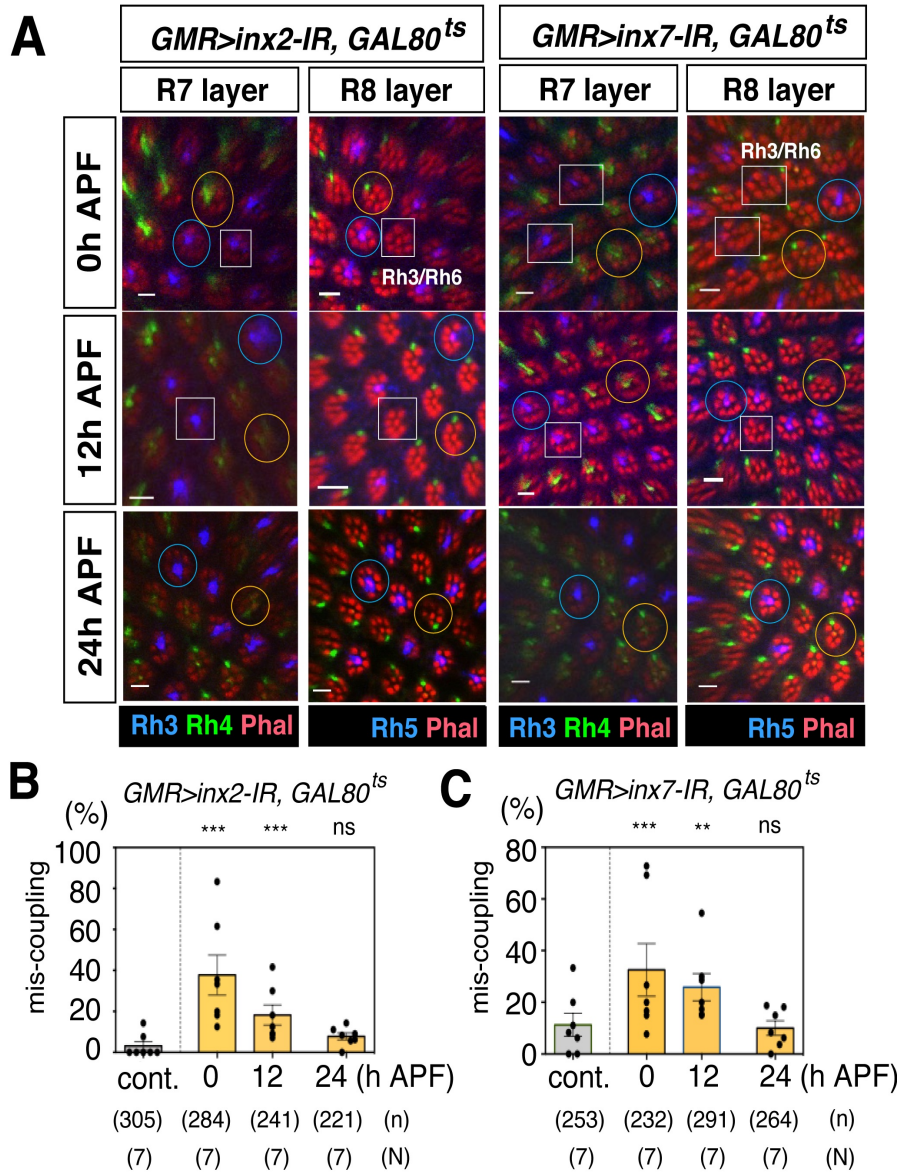


図.5 蛹期初期においてギャップ結合依存的シグナルが必要である

(A) *tub-GAL80^{ts}* を併用した *GMR-GAL4* ドライバーにより、全眼で *inx2* または *inx7* を一過的にノックダウンした個眼におけるロドプシン発現. 試験個体は、示した時点 (0 h, 12 h, 24 h APF) から羽化まで制限温度 (30°C) へシフトした. 対照群 (cont.) は許容温度 (18°C) で飼育した. 黄色型 (Rh4/Rh6) および pale 型 (Rh3/Rh5) の個眼はそれぞれ黄色および青色の円で示している. ミスカップリング (Rh3/Rh6) の個眼は白色の四角で示している. Rh3/Rh5 (青) および Rh4-EGFP(緑) の発現を示す. ラブドメアは Phalloidin (赤) で標識した. スケールバー: 5 μ m.

(B, C) 示した遺伝子型における複眼あたりのミスカップリング割合を示す. エラーバーは平均標準誤差 (SEM) を示す. 集計した個眼数 (n) および複眼数 (N) を併記した.

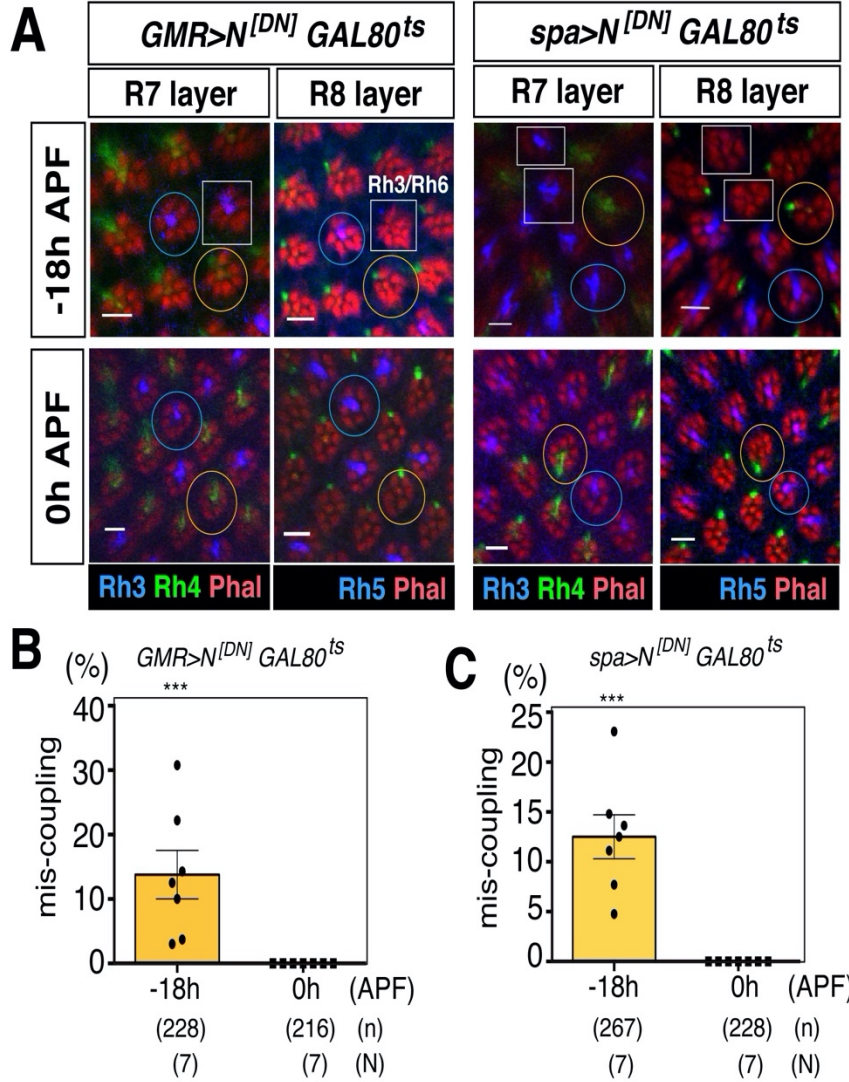


図. 6 蛹期初期における Notch 阻害はミスカップリング個眼を誘導する

(A) Notch (N) 阻害条件における個眼のロドプシン発現. ドミナントネガティブ型 Notch ($N^{[DN]}$) を *tub-GAL80^{ts}* を用いて, 示した時点 (-18 h APF, 0 h APF) から成虫羽化まで一過的に誘導した. *GMR-GAL4* により全眼で, あるいは *spa-GAL4* により付属細胞で Notch を阻害した. yellow 型 (Rh4/Rh6) および pale 型 (Rh3/Rh5) の個眼はそれぞれ黄色および青色の円で示し, mis-coupling (Rh3/Rh6) を示す個眼は白色の四角で示す. Rh3/Rh5 (青) および Rh4-EGFP (緑) の発現を示す. ラブドメアは Phalloidin (赤) で標識した. スケールバー: 5 μ m.

(B, C) 示した遺伝子型における複眼あたりの mis-coupling 個眼 (Rh3/Rh6) の割合を示す. エラーバーは標準誤差 (SEM) を示す. 集計した個眼数 (n) および複眼数 (N) を併記した.

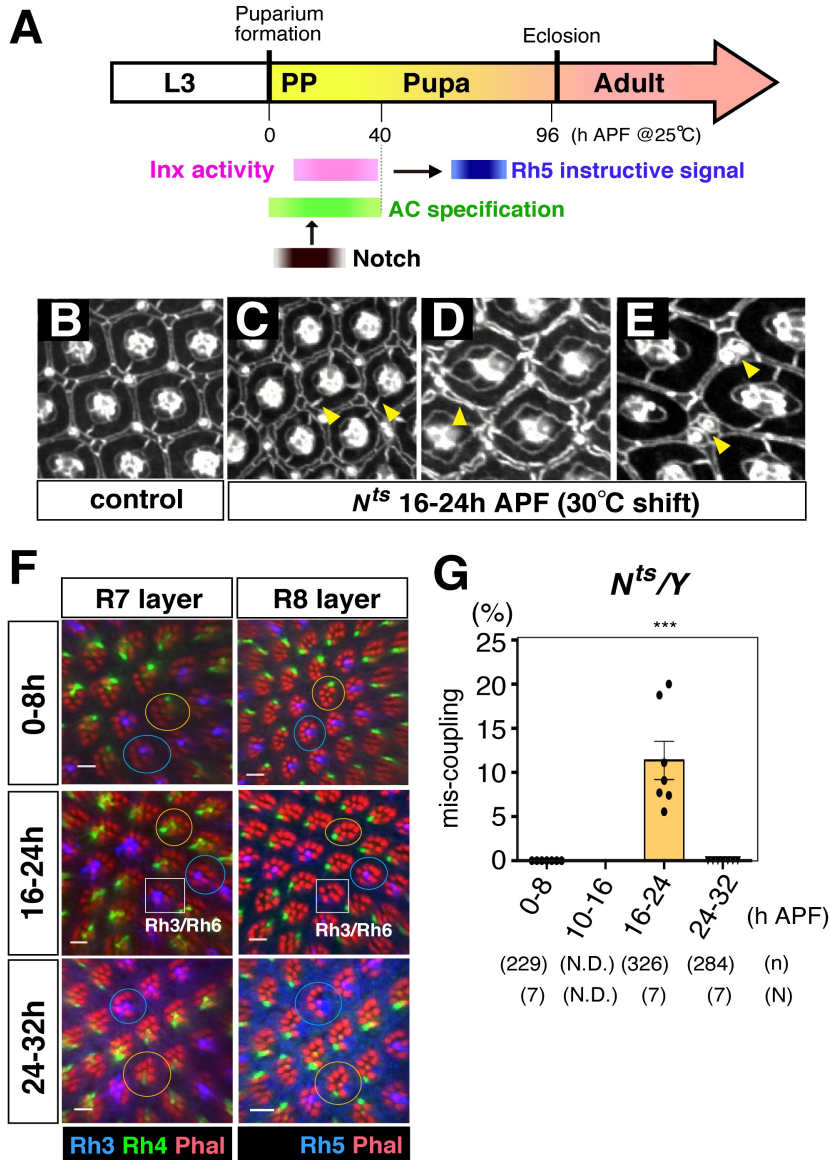


図. 7 Notch 依存的付属細胞分化が指示シグナルを成立させる

(A) 眼発生の模式図. 蛹期初期における *Inx* 活性(マゼンタ) は, *Rh5* 指示シグナル(青) の成立に必要である. 付属細胞 (AC) の規定 (緑) は 40 h APF までに完了し, この過程には Notch (N) の活性 (黒) が必要である. L3 : 三齢幼虫, PP : 前蛹.

(B-E) 40 h APF における *N^{ts}* オスの眼形態. 対照群 (B) は許容温度 (18°C) で飼育した. (C-E) 16-24 h APF の間に制限温度 (30°C) ヘシフトした試験群では, 過剰な PPC (C) , 二次および三次色素細胞の配列異常 (D) , 剛毛の重複 (E) などの付属細胞異常 (矢頭) が観察された. 細胞膜は anti-Arm 抗体で標識した.

(F) *N^{ts}* オス個眼におけるロドプシン発現. 示した期間 (0-8 h, 16-24 h, 24-32 h APF) に制限温度 (30°C) ヘシフトし, 羽化まで飼育した. 黄色型 (*Rh4/Rh6*) および pale 型 (*Rh3/Rh5*) の個眼はそれぞれ黄色および青色の円で示している. ミスカップリング

(Rh3/Rh6) の個眼は白色の四角で示している. Rh3/Rh5(青) および Rh4-EGFP(緑) の発現を示す. ラブドメアは Phalloidin(赤) で標識した. スケールバー : 5 μm .

(G) N^{ts} オスにおけるミスカップリング割合. 10–16 h APF に温度シフトした条件では R8 ラブドメアの形態異常が認められ, ロドプシンカップリングは決定不能 (N.D.) であった. 示した温度シフト条件ごとの複眼あたりのミスカップリング割合をプロットした. エラーバーは平均標準誤差(SEM) を示す. 集計した個眼数(n) および複眼数(N) を併記した.

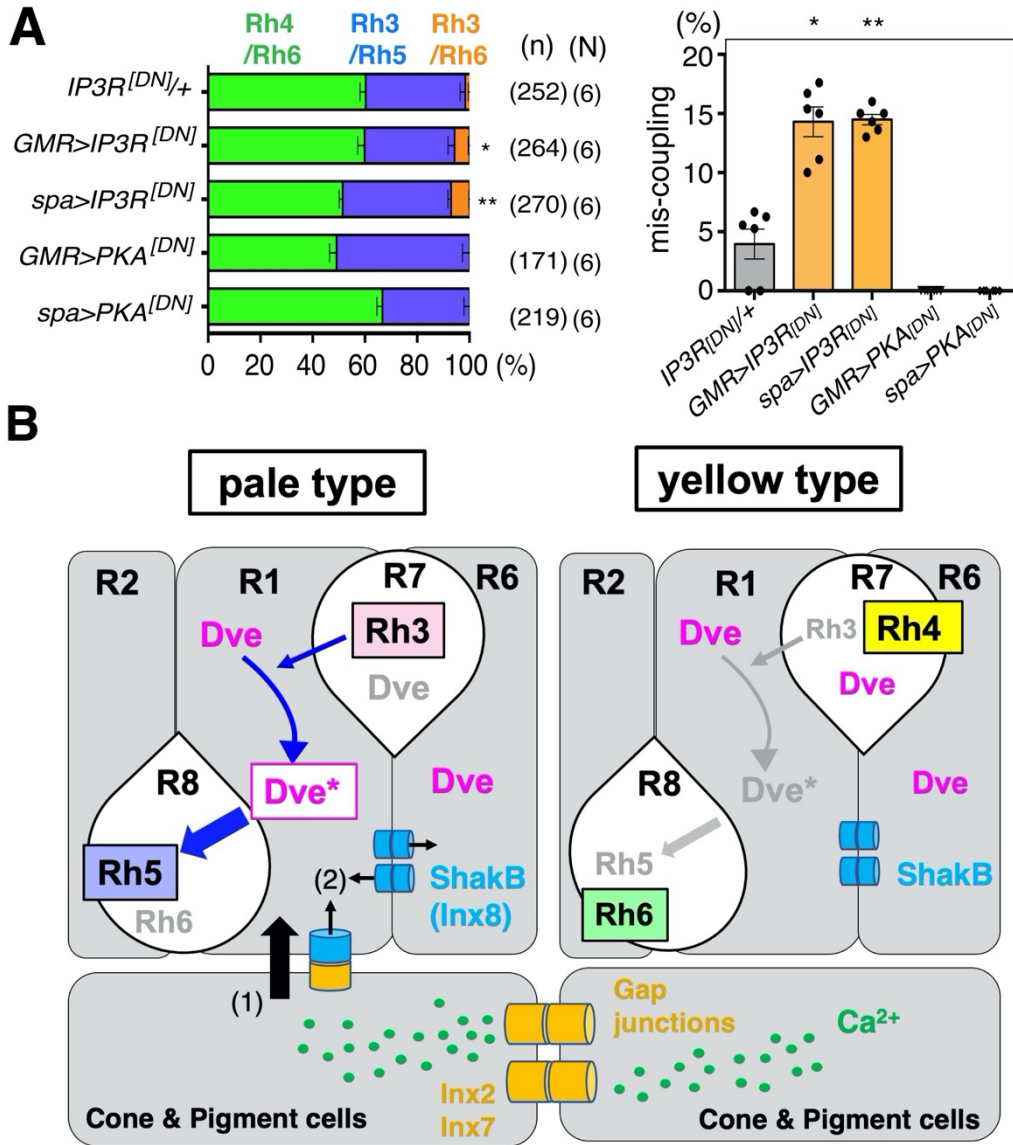


図. 8 Ca^{2+} シグナルが指示シグナルに必要である

(A) 全眼または付属細胞で $IP3$ 受容体のドミナントネガティブ型 ($IP3R^{[DN]}$) あるいは PKA のドミナントネガティブ型 ($PKA^{[DN]}$) を発現させた個眼におけるロドプシンカップリング. 黄色型 ($Rh4/Rh6$), pale 型 ($Rh3/Rh5$), およびミスカップリング個眼 ($Rh3/Rh6$) の比率を, それぞれ緑, 青, オレンジで示す. 示した遺伝子型における複眼あたりのミスカップリング割合をプロットした. エラーバーは平均標準誤差 (SEM) を示す. 集計した個眼数 (n) および複眼数 (N) を併記した.

(B) ギャップ結合依存的指示シグナルの模式モデル. 黄色型個眼では, *Spineless* (*Ss*) が R7 における $Rh4$ および *Dve* の発現を誘導し, *Dve* は $Rh3$ の発現を抑制する (Johnston et al., 2011). pale 型個眼では, $Rh3$ を発現する R7 が隣接する R1 にシグナルを送る. R1 における活性型 *Dve* (*Dve**) は, 抑制解除機構を介して R8 における $Rh5$ 発現を誘導す

る (Kitamata et al., 2024). 付属細胞においてはギャップ結合を介した Ca^{2+} 波が誘導される (Choi et al., 2025). **Inx2/Inx7** (黄) を含むギャップ結合を介したこの細胞間連絡は付属細胞の分化に必要であり, 間接的に **Rh5** 誘導シグナルに影響している可能性がある [(1) 黒矢印]. 別の可能性としては, PR 細胞間の **ShkB** (青) ホモ結合ジャンクションや **ShkB** と **Inx2/Inx7** のヘテロ結合ジャンクションが何らかの透過分子を移動させることによって **Rh5** 誘導シグナルを制御している可能性もある (2).