

## Regional specificities of the eye disc in *Drosophila melanogaster*.

YOSHIKO USHIODA

In this paper, will be confirmed that the regional specificities of the adult structures in the eye discs during the larval development has been described using  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation and transplantation techniques.

In the 70 hours disc which removed the optic stalk, autoradiographs showed that behind the furrow, only a tight band, paralalled to the furrow, was labeled. However, in the case of deeply and widely removed the part of optic stalk region, incorporation showed label distributed broadly over area anterior part of the disc.

The transplantation experiments, the fragments of 60 and 75 hours disc were *in vivo* cultured in adult abdomen for 3 days and transplanted back into full-grown larvae. Metamorphosed implant was removed from the differentiated host, and analysed of its imaginal structures.

Tabel 1 shows, the implanted fragments of A and A+B from 60 hours disc, ommatidial formation are negative, while from the B+C and C fragments could be observed the well-developed ommatidia. On the other hand, from 75 hours fragments (all of A, B+C, A+B and C) were formed ommatidial structure.

It is concluded, that the regional specificities of the adult epidermal structure are determined around 70 hours eye disc.

On the basis of result with fragmented discs the presumptive eye area to be located in the flat part of the disc, surrounded by the primodia of the hypodarmal head structures in the peripheral folds of the disc. Localization of the regional specificities in the eye discs showed a marked difference according to the developmental stages.

# ショウジョウバエの複眼原基の部域特異性

潮 田 嘉 子

ショウジョウバエの複眼原基内には、成虫構造形成のための特異的な位置が決まっている。成虫構造のうち最も重要な複眼のパターン形成の位置については、Campos-Ortega ら (1976, 1977)、Ready ら (1976)、Lebovitz ら (1986) は野生型について、Ushioda (1976 a)、潮田 (1993) は放射性同位元素を用いて突然変異種の *Bar* について、さらに Venkatesh ら (1985) はモノクローナル抗体を用いて分子レベルで、何れも原基後半部に位置することがみとめられている。

一方、成虫構造全般については、Ouweneel (1969, 1970) が、Homoeotic mutant の *loboid-ophthalmoptera* (*ld-opht*) および野生型の成熟幼虫 (孵化後95,6時間幼虫) の眼原基を切断し、成虫体内に移植して移植片の分化の様式から部域特異性の存在を確かめ、これに基づいて原基の器官形成地図を作成している。

以上のように、これまで多くの研究者によって、原基の部域特異性の存在がみとめられているが、本実験では原基の発生に伴って、成虫構造形成の位置変化が見られることに注目し、所謂発生分化が未決定の原基と、決定された後の原基についての部域特異性の変化をしらべた。また、原基内で複眼形成のパターン形成がおきるが、その最初の情報はどこから伝達されるか。これについては分化中心の存在が確かめられている (Kaji and Ushioda, 1984) が、この問題についても論及する。

## 材料および方法

実験には野生型 *Oregon-R* を用いた。複眼原基はあらかじめ成虫の腹腔内で培養し、トレーサーでラベルするか、あるいは成熟幼虫に再移植し、宿主が羽化後とり出しその成虫構造を調べるという2つの方法をとった。

### 1. $^3\text{H}$ -thymidine のとりこみによる方法

孵化後70時間の触角複眼原基をとり出し、複眼原基の一部を切りとる (PL I-2, 3の斜線部)。部分的に除去された原基を羽化後24時間以内の雌の腹腔に移植し、3日間培養

後これを取り出し、すでに行なった方法 (Ushioda 1976a) で  $^3\text{H}$ -thymidine ( $10\mu\text{Ci/ml}$ ) を40分とりこませた後、Squashed 法 (潮田, 1993) で固定した。固定標本はオートラジオグラフィー法 (Ushioda, 1976a, b) により  $^3\text{H}$ -thymidine のとりこみをしらべた。

## 2. 原基の組織片を成虫分化させる方法

原基の特定部域のみを切除する方法は、微細手術を必要とするのでタングステン線から作成したメス。あるいは微細ピンセットを用いた。

孵化後60および75時間の触角複眼原基を取り出し、これらをそれぞれ種々の断片 (PL II-A, B+C, A+B, C) に切断し、組織片を雌の腹腔内に移植し3日間培養する。次にこれらの原基の組織片を成虫の腹腔から取り出し、再び孵化後96時間の成熟幼虫の腹腔に移植し、宿主が羽化した後、移植片を取り出しその成虫構造をしらべた。成熟幼虫に再移植した理由は、この時期の幼虫は成虫分化のためのホルモン (ecdysterone) の濃度が最高であるためである。

## 実験結果

### 1. 後端部を除去した70時間複眼原基への $^3\text{H}$ -thymidine のとりこみ

すでに発表した実験結果 (潮田, 1993) と同様、野生型の複眼原基に  $^3\text{H}$ -thymidine をとりこませると、形態形成溝に沿って著しいバンド状のとりこみが見られる (PL I-4, 7)。これを本実験の control として、以下、原基の一部を除去してからとりこませたものと比較した。

Optic stalk (複眼原基の末端部を脳神経球を連絡させる神経束) の部分を切りとった原基での  $^3\text{H}$ -thymidine のとりこみはバンド状に集中して見られ、control と同じ傾向が見られた (PL I-5, 8)。これに反して、optic stalk を含めさらに深く末端部を切りとった原基では、 $^3\text{H}$ -thymidine のとりこみは原基内に広く分散するのが見られ、control および optic stalk の部分のみを切除した原基とは明らかに異なることが見出された。 (PL I-6, 9)。

### 2. 移植された複眼原基組織片の成虫分化

孵化後60時間と75時間原基を種々の部域に切断し、これらの組織片をそれぞれ成虫および成熟幼虫の体腔内で *in vivo* 培養し成虫構造への分化の状態をしらべた。

触角、複眼原基の複眼原基の部分 (control)、つまり A+B+C (PL II) からは、cuticle (表皮) 構造、メラニン形成、bristle および hair 形成、さらに facet および drosopterine (複眼に形成される赤色素) 形成もみとめられた。 (PL III-1)。

60時間原基の A (PL II) からは、cuticle 構造がつくられ、同時にメラニン形成がお

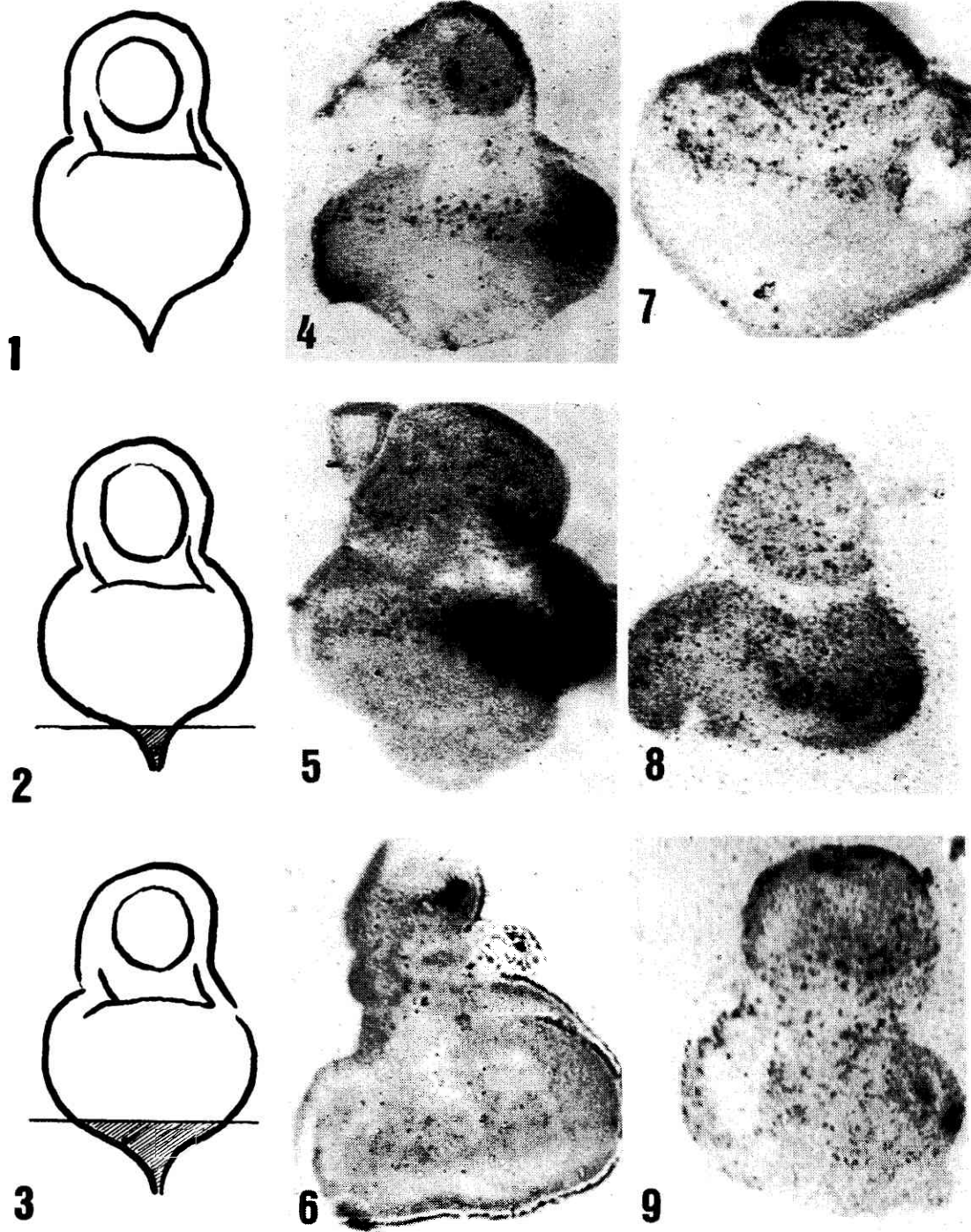


Plate I.

Incorporation of H-thymidine into 70 hours eye disc of *Or-R* after removed the optic stalk.

1(control)-3: Schema of 70th eye disc. An oblique line indicates removed optic stalk part.

4 and 7: Control incorporation is marked at the morphogenetic furrow.

5 and 6: Incorporation is almost same as control.

7 and 8: Eye disc of deeply removed the optic stalk. Incorporation is more diffuse labelling of all part of the disc.

きている。また、正常な成虫に見られる bristle (剛毛) の形成もみとめられたが、facet (小眼) および drosopterin の形成はみとめられなかった (PL III-2)。

60時間原基の B + C (PL II) からも cuticle 構造が形成され、さらに bristle, facet および drosopterin の形成がみとめられた。(PL III-3)。

60時間原基の A + B (PL II) からは、cuticle 構造が形成され、部分的にメラニン形成がおきているのがみとめられた。この組織片ではさらに bristle および hair が形成されていたが、facet および drosopterin 形成はみとめられなかった (PL III-4)。

60時間原基の C (PL II) からは cuticle 形成とメラニン化がおきている。また、drosopterin, facet および bristle の形成がみとめられた (PL III-5)。

75時間原基の A (PL II) では、cuticle 形成およびメラニン形成がみとめられ、さらに、facet および drosopterin 形成も見られた (PL IV-1)。

75時間原基の A + B (PL II) からは cuticle 構造ができメラニン形成もおき、さらに、bristle, face および drosopterin 形成もみとめられた (PL IV-3)。

75時間原基の C (PL II) からは facet および drosopterin は形成されたが、bristle および hair は、みとめられなかった。(PL IV-4)。

以上の実験の結果は Table 1 にまとめた。

Table 1. Imaginal differentiation of the eye disc fragments after implanted into mature larvae.

imaginal differentiation	A + B + C	60hrs. fragments				75hrs. fragments			
		A	B + C	A + B	C	A	B + C	A + B	C
cuticle	+	+	+	+	+	+	+	+	+
bristles, hairs	+	+	+	+	+	+	-	+	-
drosopterin	+	-	+	-	+	+	+	+	+
facets	+	-	+	-	+	+	+	+	+

Several region of the eye disc fragments are shown in Plate II.

+ present; - absent

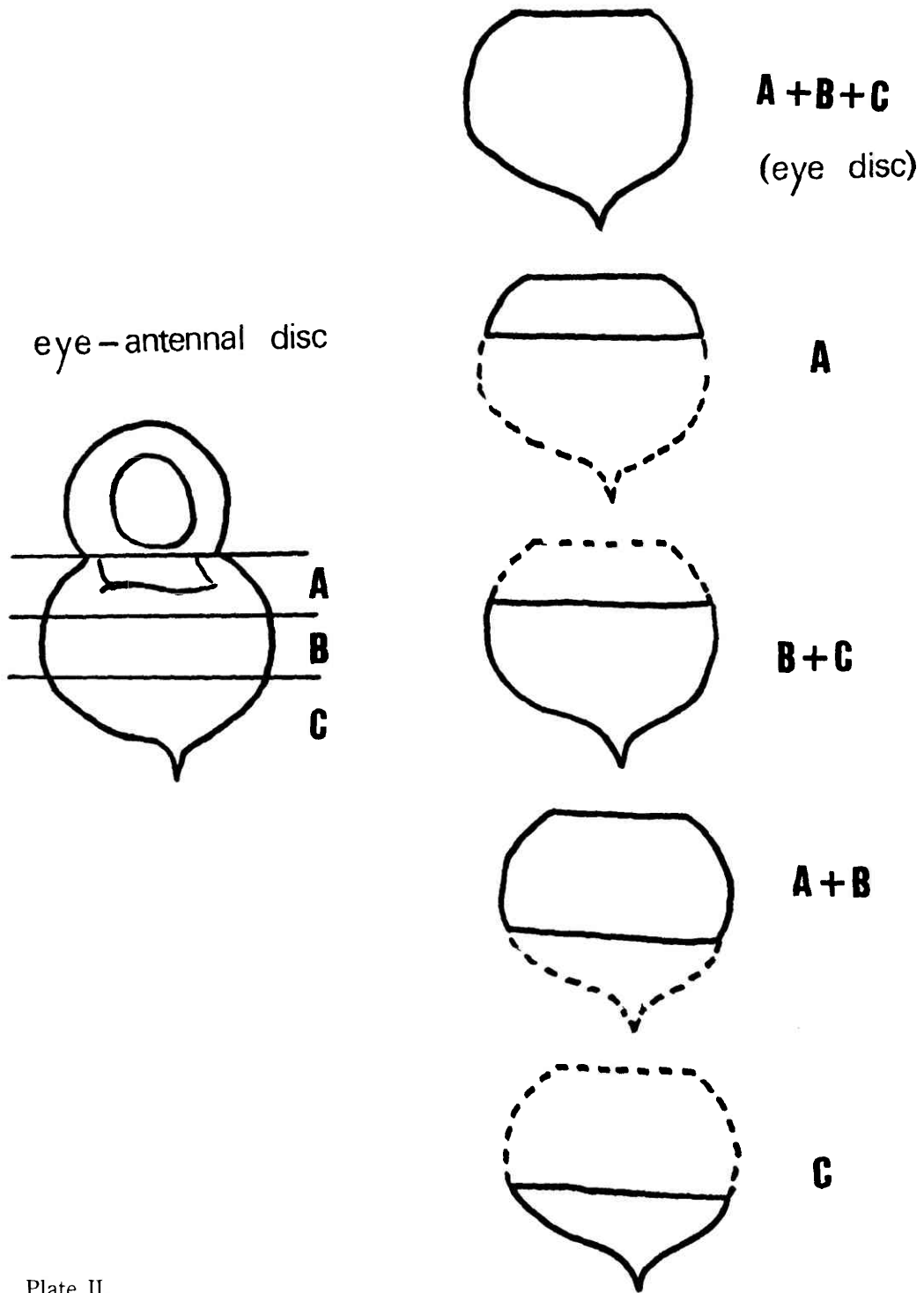


Plate II.

Schematic representation of the eye-antennal disc. The eye disc (A+B+C) is separated the several fragments.

A is anterior part of the disc fragment.

B+C is middle and posterior part of the disc fragment.

A+B is anterior and middle part of the disc fragment.

C is posterior part of the disc fragment.

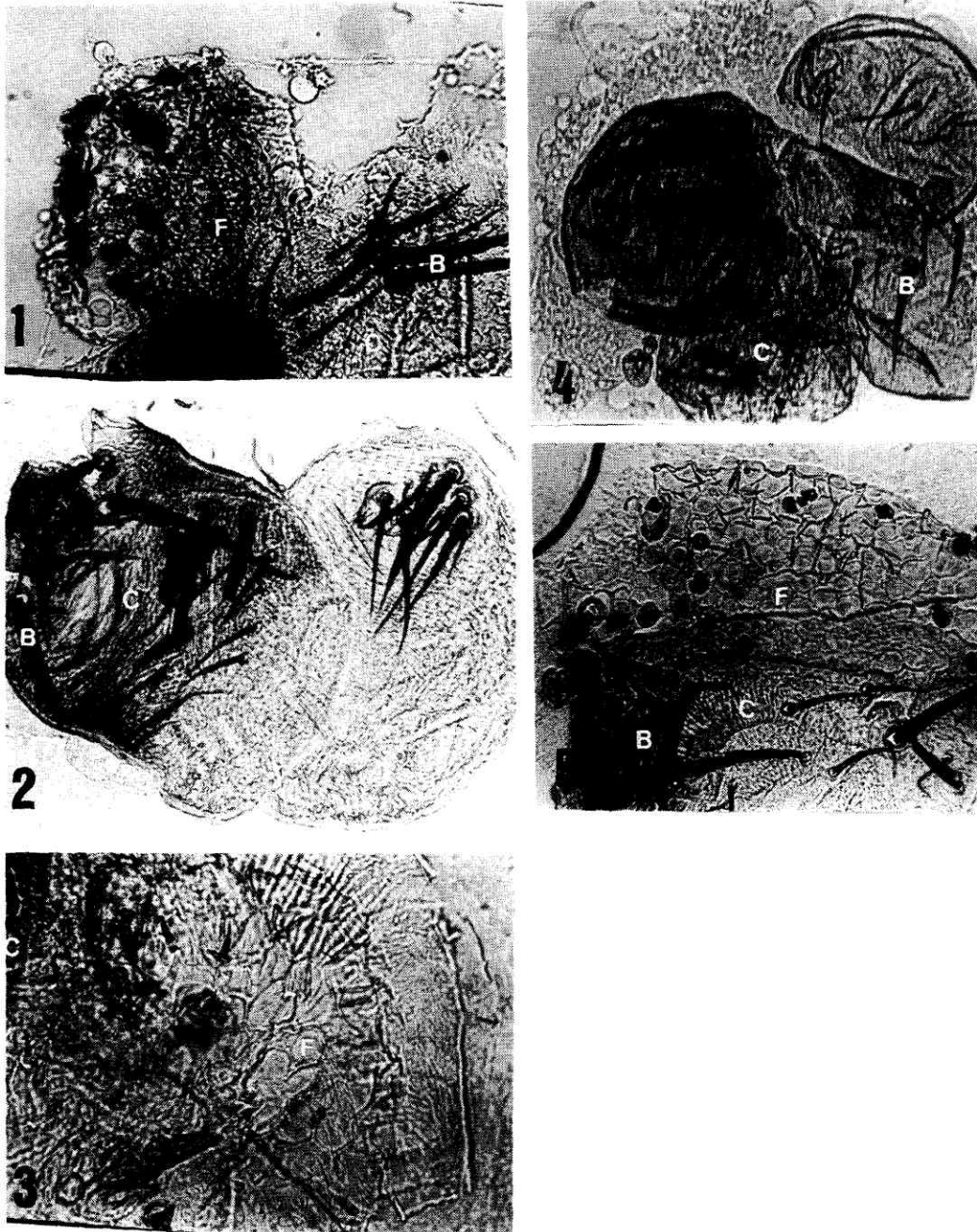


Plate III.

Cuticle structures produced from cultured 60h eye disc fragments.

1. A+B+C (control) fragment, showing well-formed head structures.
  2. A fragment, showing bristle and cuticle patterns, but cannot detected ommatidial formation.
  3. B+C fragment, showing well-formed head structures.
  4. A+B fragment, showing bristle and cuticle patterns, but cannot detected ommatidial regions.
  5. C fragment, showing well-formed head structures.
- F, facets; B, bristle; C, cuticle

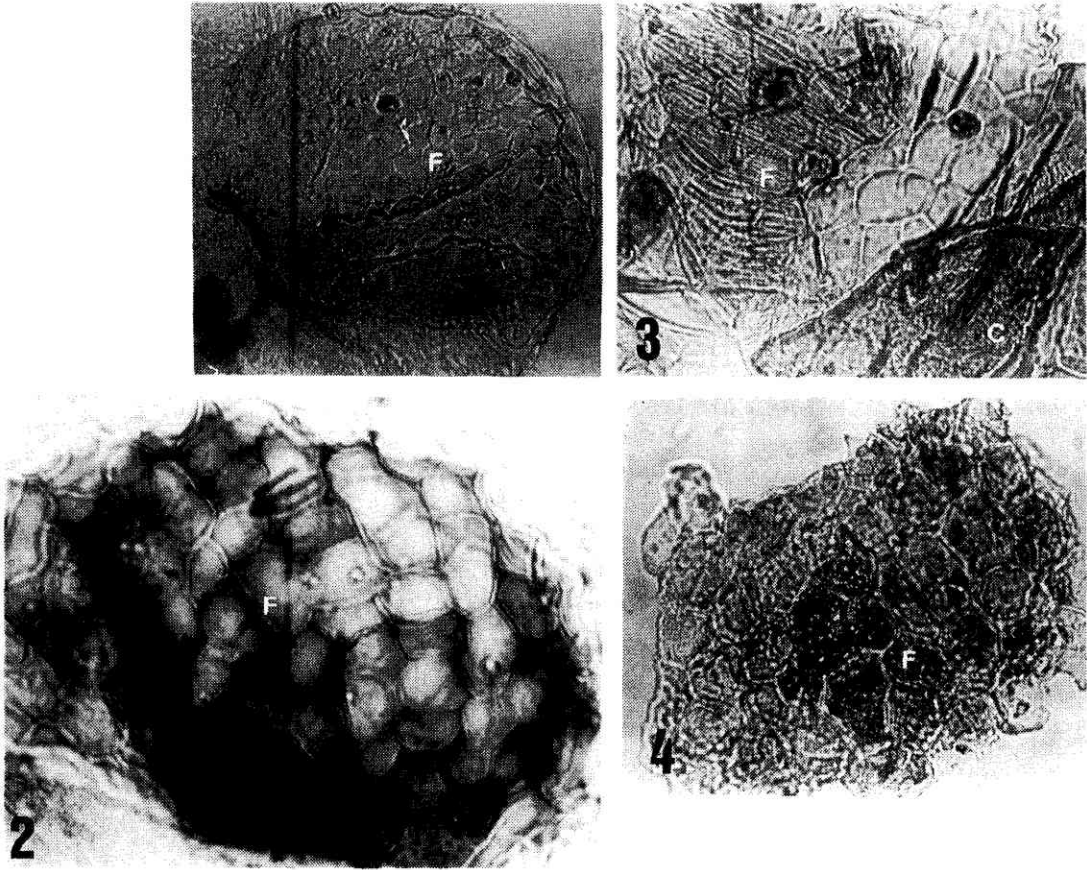


Plate IV.

Cuticle structures produced from cultures 75h eye disc fragments.

1. A fragment, showing cuticle patterns and ommatidial structures.
2. B+C fragment, showing well-developed ommatidial structures.
3. A+B fragment, showing cuticle patterns and ommatidial structures.
4. C fragment, showing ommatidial formation.

F, facets; B, bristle; C, cuticle

## 考 察

すでに、Ouweneel (1969, 1970) の研究によって、ショウジョウバエの *ld-opht* の複眼原基を移植する方法により、小眼形成域は原基の後半部に存在すると報告されている。

一方、野生型の *Oregon-R*、突然変異種の *Bar* で、 $^3\text{H}$ -acetamide、 $^3\text{H}$ -thymidine などの放射性同位元素を用いた研究から、これらは複眼原基の基底部に集中してとりこまれることから、小眼形成域が基底部に存在することが明らかにされている (Ushioda, 1976 a, b)。しかも、この小眼形成域は発生の進行に伴って、原基の基底部から前方部へと移行し、逐次光受容細胞が形成されることが詳しくしらべられている (潮田, 1993)。しかしながら、小眼形成が原基のどの位置から開始されるのか、さらにその分化中心 (differ-



entiation center) は原基のどこに存在するのか。また成虫構造に分化するための特異的部域で存在するとしたら、複眼構造を含め表皮構造などは原基のどの部分から形成されるのか、未だ不明の点が多い。

分化中心については古い研究であるが、Kim (1959) が *Pieris brassicae* (オオモンシロチョウ) の肢の原基で、White (1961, 1963) が *Aedes aegypti* (シマカ的一种) の複眼原基でその存在を確かめている。White は 1 令の時点で予定小眼部形成域の後縁部に存在するという。さらに、ショウジョウバエでは筆者ら (Kaji and Ushioda, 1984) はすでにその存在を確かめ研究の概要はすでに報告している。

本実験では放射性同位元素のとりこみと、眼原基を種々の部域に切断し、それぞれの組織片からどのような成虫構造が分化するかを、原基の未決定の状態の時期 (60時間) のものと、分化が決定されたと見做される時期 (75時間) の両者について比較した。さらにこれらの実験を通じて、分化中心の位置および部域特異性について考察した。

実験 1 で示されるように、孵化後 70 時間の原基で optic stalk の部分を切りとった原基 (PL I-5, 8) に  $^3\text{H}$ -thymidine をとりこませたところ、control と変わらずバンド状のとりこみが見られた。これは小眼形成のための遺伝情報が複眼原基以外のところ、つまり脳神経球などから伝達されるのではなく、原基内に存在する分化中心からの情報によるものであることが示唆されるものである。これに反して、原基の基底部を含めて除去した原基 (PL I-6, 9) への  $^3\text{H}$ -thymidine のとりこみは、原基内に広く分散し、バンド状のとりこみは見られなかった。これらの結果から、小眼を形成するための分化中心は原基の後半部に存在するが、optic stalk の部分ではなくそれより少し前方域に存在すると考えられる。

実験 2 で示されたように、切断された原基の組織片からどのような成虫構造が分化するかをしらべたところ、75 時間の A、B+C、A+B、C の何れの組織片からも drosophterine, facet の形成が見られた (Table I)。したがって、75 時間原基ではすでに facet を形成する情報が分化中心から広く原基全域に伝達されているものと考えられる。また、それぞれの組織片から生じた成虫構造から原基内での組織片の位置から予定形成域を推定することができた。この結果は、Ouweneel の用いた *ld-opht* の 3 令末期の成熟幼虫の複眼原基の予定器官形成地図とほぼ一致する。しかしながら、60 時間の原基の組織片では、A および A+B からは facet の形成でみとめられなかったが、B+C および C からは facet が形成された。したがって小眼形成の分化中心は 60 時間原基では optic stalk より前方にあって、原基の後半部  $\frac{1}{2}$  程度の位置に存在すると推定され、実験 1 の tracer による実験結果と一致する。しかし、60 時間の原基では未だ分化中心から小眼形成のための情報が前方域には伝達されていないと考えられる。これら分化中心からの遺伝情報の伝達については、さらに検討の上発表する予定である。組織片を移植して原基内の発生予

定域をしらべた研究に Lebovitz ら (1986) の報告がある。これによると、野生型の 3 令中期の原基を前後に切断し、羽化後、複眼のパターン形成の有無をしらべている。その結果、後方域の組織片からはパターン形成でおきるが、前方域からはおきなかったという従来からの知見と同じ結果を得ているがこの論文では分化中心にはふれていない。

### 参 考 文 献

- Campos-Ortega, J. A., and Gateff, E. A. (1976). The development of ommatidial patterning in metamorphosed eye imaginal disc implants of *Drosophila melanogaster*, Wilhelm Roux's Arch. 179, 373-392.
- Campos-Ortega, J. A., and Hofbauer, A. (1977). Cell clones and pattern formation: On the lineage of photoreceptor cells in the compound eye of *Drosophila*. Wilhelm Roux's Arch. 181, 227-245.
- Kaji, S and Ushioda, Y. (1984). Pattern formation and differentiation center during development in the eye disc of *Drosophila*. Proc. XV Internatl. Congr. Genetics, Part 1.
- Kin, C. (1959). The differentiation center inducing the development from larvae to adult leg in *Pieris brassicae* (Lepidoptera). J. Emb. Exp. Morph. 7, 572-582.
- Lebovitz, R. M., and Ready, D. F. (1986). Ommatidial development in *Drosophila* eye disc fragments. Develop. Biol. 117, 663-671.
- Ouweneel, W. J. (1969). Morphology and development of *loboid-ophthmloptera*, a homoeotic strain in *Drosophila melanogaster*. Wilhelm Roux's Arch. 164, 1-14.
- Ouweneel, W. J. (1970). Developmental capacities of young and mature, wild-type and *oph* eye imaginal discs in *Drosophila melanogaster*. Wilhelm Roux's Arch. 166, 76-88.
- Ready, D. F., Hanson, T. A., and Benzer, S. (1976). Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. Develop. Biol. 53, 217-240.
- Ushioda, Y. (1976a). Acetamide incorporation into the developing imaginal *Bar* eye discs in *Drosophila melanogaster*. Annot. Zool. Japon 49, 15-27.
- Ushioda, Y. (1976b). Tritiated acetamide incorporation into DNA of the mutant *Bar* larvae in *Drosophila melanogaster*. Annot. Zool. Japon 49, 90-95.
- 潮田嘉子(1993). ショウジョウバエ *Bar* の複眼のパターン形成 大手前女子大学論集27, 147-157.
- Venkatesh, T. R., Zipursky, S. L. and Benzer, S. (1985). Molecular analysis of the development of the compound eye in *Drosophyla*. Neuro sciences 8, 251-257.
- White, R. H. (1961). Analysis of the development of the compound eye in the mosquito, *Aedes aegypti*. J. Exp. Zool. 148, 223-237.
- White, R. H. (1963). Evidence of existence of a differentiation center in the developing eye of the mosquito. J. Exp. Zool. 152, 139-147.