

臺灣二〇〇四年國際科學展覽會

科 別：動物學科

作品名稱：Eye gone V.S. eyeless 決定果蠅複眼發育基因之
協同作用與未知調控基因之尋覓

得獎獎項：動物學科佳作

學 校：臺北市立第一女子高級中學

作 者：劉奎蘭、曾瑋婷

作者簡介



作者：劉奎蘭

1986 年哈雷彗星造訪地球，我從醫院成功登陸了地球。國中就讀美術資優班，除了美術，更鍾情於數理及自然科學，做過散熱及金屬的吸熱科展，入選台北市科展物理組佳作，另曾獲台北市國中盃數學競賽入選及台北市作文比賽第一名。著有童心與真情（奎蘭作文選，允晨文化出版）。

目前就讀北一女中數理資優班。高一錄取清華大學化學及中央研究院生命科學資優生培育計畫，復又錄取教育部高級中學基礎科學人才培育計畫(生命科學)。在中研分生所孫以瀚教授的指導下，從事二年的果蠅基因專題研究。



作者：曾瑋婷

自幼對生命科學有濃厚的興趣，國小起對各式生物及生命現象做過專題研究，國中時曾以「研究 NO_2 、 SO_2 、 CO_2 對植物生長的影響」代表參加北市科展，高一時以「植物是否會被麻醉？」參加校內科展獲研究精神獎。

目前就讀於北一女中數理實驗班。高一錄取基礎科學人才培育計畫(生科領域)，在中研院分生所孫以瀚教授的指導下，從事兩年的果蠅基因專題研究。高三代表學校參加台北市高級中學科學實驗能力競賽，獲生物科三等獎。

零、摘要(Abstract)

一、英文摘要

In this study, we try to know how ectopic eye genes: *eyeless(ey)*, *eye gone(eyg)*, *twin of eyeless(toy)*, *twin of eye gone(toe)* act cooperatively, and look for some unknown genes which affect the function of *eyg*. First, through human trans gene screening, we find two human genes change the phenotype of *ey>eyg* into dorsal out-growth when they co-express with *eyg* (*ey>eyg+X*). It means the two genes may relate to cell proliferation. Second, by sequencing the insert genes of mutant fly which was found by EP screening, the result shows the site of the insertion is the same as *effete (eff)* gene. *eff* translated wrong proteins which differ from functional ubiquitin-conjugating enzyme may be the major cause of the mutant eye.

二、中文摘要

本研究係探討果蠅複眼異位基因 *eyeless(ey)*、*eye gone(eyg)*、*twin of eyeless(toy)*、*twin of eye gone(toe)* 間的協同作用，並尋找與 *eyg* 有交互作用的基因、突變株。藉由人類基因轉殖篩選，找到兩株人類基因轉殖株，當其與 *eyg* 共同表現時(*ey>eyg+X*)，會改變 *ey>eyg* 的複眼性狀，造成 dorsal out-growth，顯示這兩個基因可能與細胞增生有關，此外，藉由 EP screening 複眼發生突變的果蠅之 UAS 下游基因經比對後，位置與 *effete (eff)* 部分契合，推測複眼發生突變的原因是 *eff* 的功能發生異常，致使細胞內蛋白質代謝失常所致。

壹、緒論

一、研究動機

eye gone(eyg) 與 *eyeless(ey)* 基因是果蠅複眼發育的必要基因，兩者的異位性表達皆會造成額外的眼睛形成，但是兩者的不同點在於可誘導形成複眼的位置不同。已發現部分決定果蠅複眼發育基因在果蠅複眼發育早期即產生作用，且這些基因可能合組一個交互作用網。

因此，不禁懷疑這些決定果蠅複眼發育之基因，在果蠅複眼發育的過程中，是否相互影響，產生協同作用？在果蠅異位複眼形成過程中，到底是何基因在何時產生變化，造成了什麼樣的反應亦或牽動了其他基因變化，致使果蠅產生額外的複眼？而決定果蠅複眼發育的基因產生異位性表達的部位也不盡相同，卻有可能互相影響，到底其中機制為何，讓人十分好奇。

二、研究目的

- (一) 探討果蠅複眼異位基因 *eyeless(ey)*、*eye gone(eyg)*、*twin of eyeless(toy)*、*twin of eye gone(toe)* 間的協同作用。
- (二) 尋找與 *eyg* 有交互作用的基因與突變株。
- (三) 尋找控制果蠅複眼發育的新基因。

在複眼發育中，誘發某些基因（來自人類的轉殖基因，或果蠅本身的基因）與 *eyg* 共同表現，篩選出與 *eyg* 之間有交互作用，相互影響的其他基因。

貳、文獻探討

果蠅因生活史短、繁殖力強、容易飼養及具有許多遺傳標記因子等條件，自二十世紀以來在遺傳學上扮演了重要的角色，以果蠅作為遺傳研究的材料最早可追溯至 1909 年 Morgan 的研究，以果蠅作為遺傳學研究的材料，利用突變株研究基因和性狀之間的關係已近一百年。基因的功能在演化上，有相當程度的保留，如在果蠅體內所有的同位基因皆含有一段相似的 DNA 序列，命名為同位序列 (homeobox) (McGinnis et al. 1992)；從酵母菌到人類，皆含有一高度保留性的同位序列，此顯示這些生物物種中所含之同位序列基因皆是從同一原始基因演化而來。不同種生物內相對應的基因，亦扮演著相同的角色，透過相同的途徑參與細胞的分化發育。

果蠅複眼為一精密而複雜的構造，果蠅的複眼發育始於胚胎形成之時，其細胞不經功能分化而形成幼蟲的 eye-antennal disc；直到三齡幼蟲的時期才開始從 eye disc 的後部向前作前後軸走向的細胞分化，其發育受為數眾多的基因所調控 (Wolff and Ready, 1993)。

目前，已有許多影響果蠅複眼發育的基因，在高等生物（包括人類）中有許多同源基因的發現，因此，研究果蠅複眼發育可為生物眼睛發育提供一相通的基因調控模式。

一、複眼發育的主控基因 *eyg* 與 *ey*

(一) *eyg*

eyg gone (eyg) 基因為複眼發育所必須，其突變造成複眼變小或完全不見 (Lindsley and Zimm, 1992)。在 *eyg*¹ 發生突變的三齡幼蟲晚期階段，eye disc 嚴重地縮小，但 antennal disc 大小仍然維持不變；在成蟲階段，功能嚴重缺失的突變株的頭部嚴重縮小，但其觸角外觀依舊正常，而功能完全喪失的突變株之頭部完全不發育，且所有由 eye-antennal disc 調控的結構皆無法形成，此頭部消失的性狀與 *ey* 和 *toy* 發生突變而導致其無作用時所表現出的情形類似 (Kronhamn et al., 2002)。*eyg* 與 *ey* 相互影響造成加倍的同基因合子之突變株，使果蠅成蟲死於蛹中，其頭部嚴重縮小且複眼完全消失，研究結果顯示可能在複眼形成初期即對其發育產生影響，並與 *ey* 有交互作用。*eyg* 與 *ey* 同屬於 Pax 基因族，且皆有調控複眼形成。*eyg* 可轉譯出一 Paired box containing protein (PAX 蛋白)，此類蛋白為轉錄因子 (transcription factor)，可以控制下游基因的轉錄，並經由抑制 *wg* 表現之作用影響複眼發育，與發育調控密切相關 (Jang et al., 2003)。

(二) *ey*

果蠅的 *eyeless (ey)* 亦為一複眼發育所必須之 Pax 基因，與老鼠的 Pax 6 (*Small eye*) 及人類的 PAX 6 (*Anindia*) 是同源基因，DNA 序列有 90% 以上的相同性，在神經系統的發育及眼睛的形態發生 (morphogenesis) 過程中都扮演類似角色，老鼠和果蠅的此基因突變皆會導致眼睛結構上的缺陷或複眼完全消失。*ey* 最早表現於胚胎時期的神經系統，在幼蟲階段持續地影響複眼發育，且於第三齡期間對 eye disc 前半部有重大的影響。若將 *ey* 基因表現在複眼以外的部位，可在翅、腿及觸角上長出額外的小型複眼，因此 *ey* 基因被稱為複眼發育的主控基因 (Halder et al., 1995)。*eyg* 亦有類似功能，*eyg* 與 *ey* 雖不互相調控表現，但可以合作決定複眼的發育 (Jang et al., 2003)。

二、*ey* 與其他果蠅複眼發育的調控基因之間的協調作用與回饋機制

(一) 各基因之間的協調作用之運作並不單純。

在功能缺失的突變株與錯誤表現的情形中，顯示 *ey*、*sine oculis (so)*、*eye absent (eya)*、*dachshund (dac)* 和 *teashirt (tsh)* 以網狀的協調作用互相調控而運作。這些基因中存在一正向的回饋機制，此機制對於基因協調作用之運作十分重要，因為 *eya*、*so/eya* 和 *dac/eya* 也對複眼發育的主控基因 *ey* 有調控作用 (Desplan, 1997; Shen and Mardon, 1997; Bonini et al., 1997; Chen et al., 1997; Pignoni et al., 1997; Halder et al., 1998; Pan and Rubin, 1998)。

(二) *twin of ey (toy)* 不受 *ey* 所調控

twin of ey (toy) 和 *ey*、*eyg* 的一些片段具有相似的 DNA 序列，且其與 *ey* 之間有交互作用，*toy* 可調控 *ey* 的表現但不受 *ey* 的調控，因此 *toy* 不包含於上述基因的回饋機制之中 (Czerny et al., 1999)。

(三) *toe*

twin of eyg (toe) 已被定序，相似的 DNA 序列已於人類中發現，且其胺基酸序列中包含 homeobox domain。

上述基因被認為與果蠅複眼早期的發育有密切關係，本研究希望能藉異位表現的方式，探討各基因之間的協調作用，並進一步發現控制果蠅複眼發育的未知基因。

三、*Effete* Gene 與 ubiquitin 的作用機制

effete (eff) 可轉譯一種參與 ubiquitin cycle 的“ubiquitin”結合酵素。*eff* 已完成定序，類似的序列在線蟲、小鼠及人類中皆有發現。從遺傳學的角度來看，*eff* 與許多基因皆有交互作用。Ubiquitin-conjugating 的酵素在生物體內的蛋白質管理系統扮演舉足輕重的角色 (Maniatis, 1999; Koepp et al, 1999)，可將細胞所產生不需要的蛋白質加以分解，以免堆積在細胞內，並維持細胞的正常運作。其作用機制是細胞將不需要的蛋白質與 ubiquitin 結合 (Hershko, 1998)，而蛋白質分解酵素會以 ubiquitin 作為辨識媒介，將不需要的蛋白質加以分解。(Scheffner et al., 1998)

參、研究方法

一、果蠅轉殖基因建構(將不同的轉殖基因或突變經過幾代的遺傳雜交的過程，形成實驗所需的組合。)

(一) 探討 *eyg* 與 *toe* 間協同作用：

1. G0 : ♂ *PUAS-toe22(II)* × ♀ *Sp/cyo* ; *Dr/TM6B*
F1 : ♂ *PUAS-toe22/cyo* ; *Dr/+* × ♀ *PUAS-toe22/cyo* ; *+/TM6B*
F2 : *PUAS-toe22/cyo* ; *Dr/TM6B*
2. G0 : ♂ *UAS-eyg4(III)* × ♀ *Sp/cyo* ; *Dr/TM6B*
F1 : *Sp/cyo* ; *PUAS-eyg4/TM6B*
3. G0 : ♂ *PUAS-toe22/cyo* ; *Dr/TM6B* × ♀ *Sp/cyo* ; *PUAS-eyg4/TM6B*
F1 : *PUAS-toe22/cyo* ; *PUAS-eyg4/TM6B*
4. G0 : ♂ *PUAS-toe22/cyo* ; *PUAS-eyg4/TM6B* × ♀ *dpp-lacZ* ; *dpp-GAL4/SM6-TM6B*

(二) 分別探討 *eyg*、*ey* 與 *ey*、*toe*、*toy* 間協同作用
(由於做法相似，此不再多加詳述，以此類推)

(三) 尋找與 *eyg* 有交互作用的基因與突變株：

1. ♀^rHuman Trans Gene × ♂ *UAS-eyg-2* > *eyGAL4*
2. ♀^r EP × ♂ *UAS-eyg-2* > *eyGAL4*

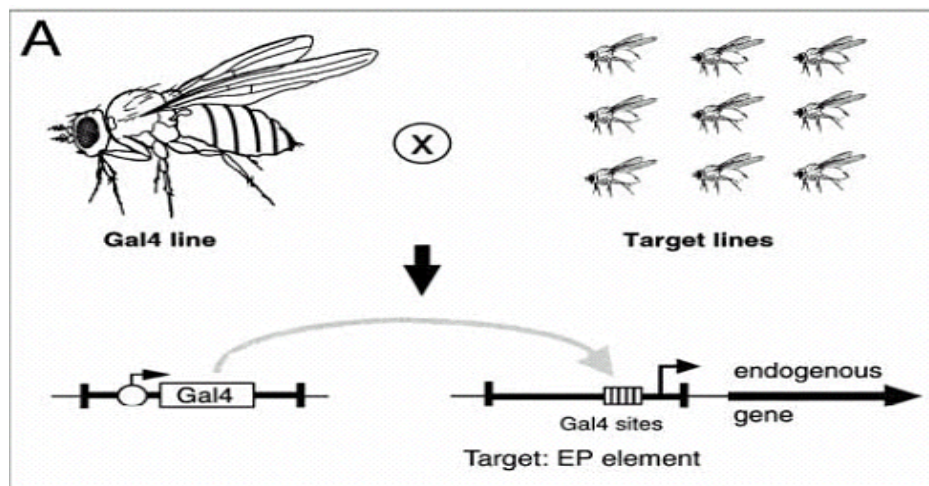
二、EP screening and Human trans gene screening 的實驗原理與設計 (圖 A)

多種遺傳學方法可辨識基因並了解其功能，在果蠅的遺傳研究模式中常透過大規模的突變性狀篩選。果蠅功能缺失表現的系統性篩選，結合了 EP element 的插入與 GAL4 的基因表現調節。經由一個 EP element 的插入，隨機地標示基因表現，此一 EP element 攜帶著 GAL4 結合位置 (UAS) 和一個 promoter，可調控鄰近 P element 的序列表現，當 EP element 與 GAL4 蛋白質結合後，將可調控任何在其插入點旁的基因之表現。中研院分生所簡正鼎實驗室已建立了約九百株 EP 插入的果蠅品系。利用不同表現的 GAL4 果蠅株，與這些 EP 株交配，在子代中就誘發 EP 插入點旁邊的基因在特定的組織中表現，然後篩選會造成某些性狀的基因。

在我的實驗中，我使用 *ey-GAL4*，將 *eyg* 與 EP 做共同表現。*ey-GAL4* 可誘發基因在複眼發育早期表現。*ey-GAL4* 誘使 *eyg* 表現時 (表示為 *ey>eyg*)，複眼形狀變為菱形。我希望能找到某些基因，當其與 *eyg* 共同表現時 (*ey>eyg+X*)，可以改變 *ey>eyg* 的複眼性狀，也許增強，也許減弱。這種方法可能可以找到在正常複眼發育中與 *eyg* 相互作用的一些基因。

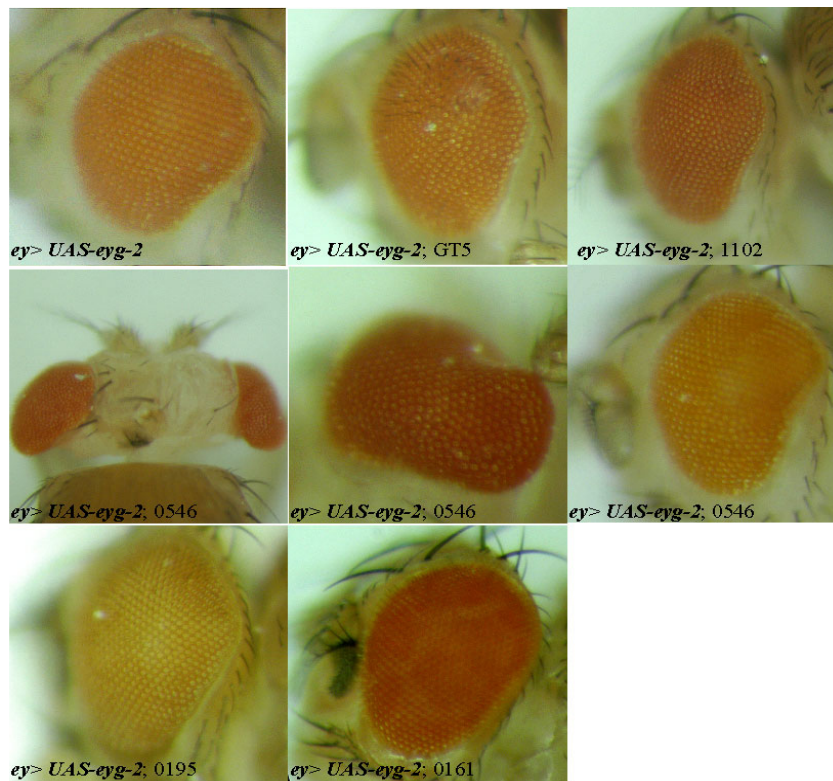
實驗室也建立了許多人類基因在果蠅的轉殖株，誘發這些基因在果蠅複眼發育中表現，許多會造成複眼發育的問題，顯示這些人類基因在果蠅中仍能發揮功能。我將這些人類基因與 *eyg* 共同表現 (*ey>eyg+X*)，以尋找可以影響 *ey>eyg* 的性狀的基因。若能找到，可以提供線索以研究這個人類基因在人類是否有類似的功能。

在進行 EP screening 與 Human trans gene screening 時，由於 *ey>eyg* 較 EP 與 Human trans gene 不易存活，因此以 *ey>eyg* 的 (菱形眼) 公果蠅分別與 EP、Human trans gene 的 virgin 交配，再篩選其子代之複眼是否有非菱形眼的突變，如：ectopic eye、rough eye、smooth eye、out-growth 等。



肆、研究結果

一、Human trans gene screening(見圖 B 與表格)

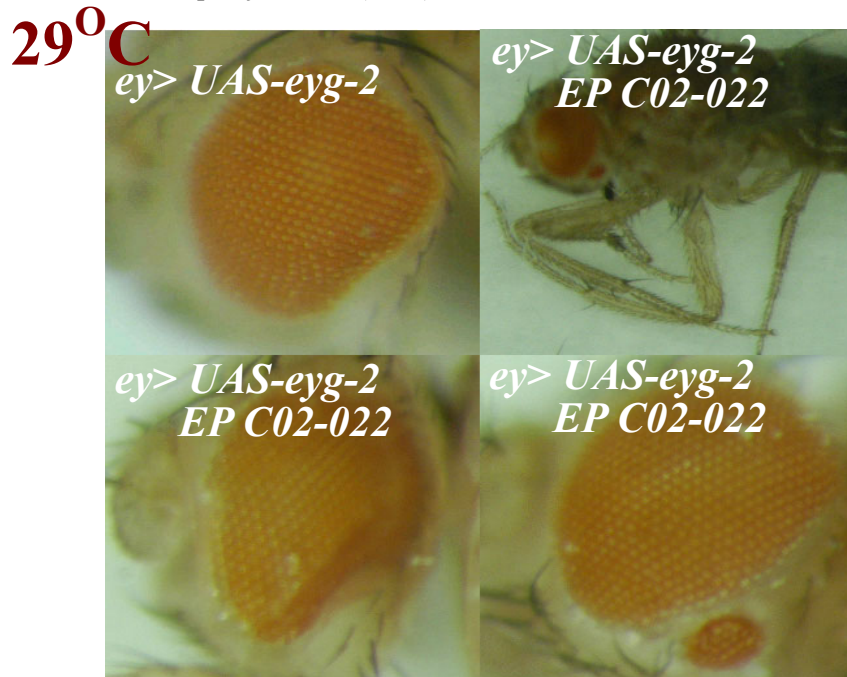


♀ virgin	25°C	29°C	Result
161 0-15-a	45		like <i>ey>eyg</i> only
161 1-23-a	83		like <i>ey>eyg</i> only
161 1-61-c1	69		like <i>ey>eyg</i> only
195 0-6-a	352		like <i>ey>eyg</i> only
195 1-28-b	124		like <i>ey>eyg</i> only
195 0-6-b	137		like <i>ey>eyg</i> only
546 0-8-D	57 (11)		<i>Dorsal out-growth</i>
546 1-22-a	356		like <i>ey>eyg</i> only
546 1-18-a	168		like <i>ey>eyg</i> only
GT3	74	94	like <i>ey>eyg</i> only
GT4	99		like <i>ey>eyg</i> only
GT5	247 (23)		<i>Dorsal out-growth</i>
1102 1-21-a	145		like <i>ey>eyg</i> only
1102 0-17-a	96		like <i>ey>eyg</i> only
1102 1-4-a	582	227	like <i>ey>eyg</i> only

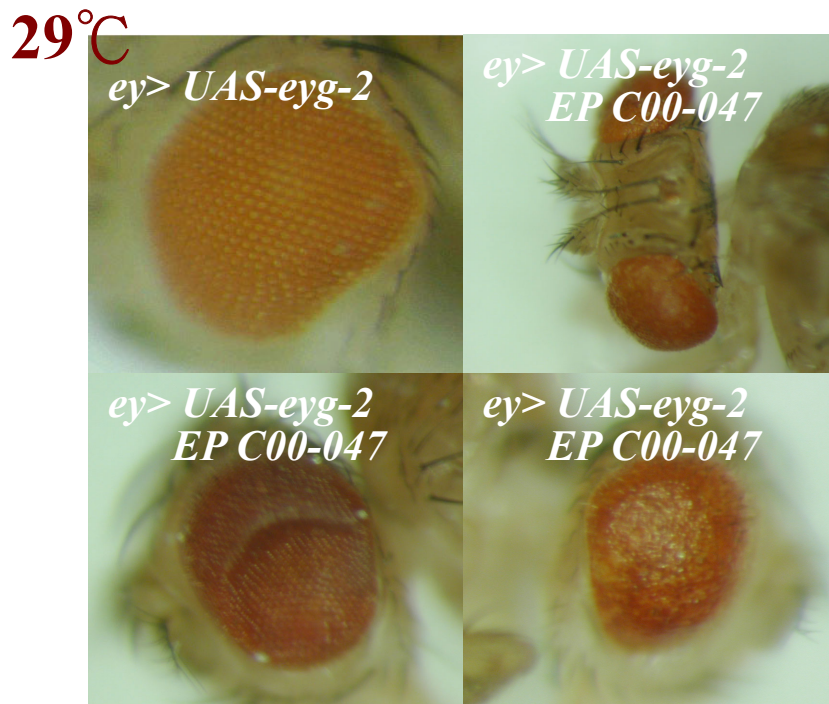
結論：找到兩株人類基因轉殖株，當其與 *eyg* 共同表現時(*ey>eyg*+X)，會改變 *ey>eyg* 的複眼性狀，造成 dorsal out-growth，顯示這兩個基因可能與細胞增生有關。

二、EP screening：

(一) C02-022—ectopic eye，live (圖C)



(二) C00-047—out-growth (圖D)



複眼發生突變的果蠅之UAS 下游基因經比對後，位置與 *effete* (*eff*) 部分契合，而 *eff* 可轉譯一種會參與 ubiquitin cycle 的“ubiquitin”結合酵素，而此種酵素在生物體內的蛋白質管理系統扮演著舉足輕重的角色，可標誌細胞不需要的蛋白質，蛋白質分解酵素會以 ubiquitin 作為辨識媒介，將多餘的蛋白質加以分解，以免堆積於細胞內，並維持細胞的正常運作。因此，推測複眼發生突變的原因是 *eff* 的功能發生異常，致使細胞內蛋白質代謝失常所致。

伍、結論

- 一、藉由 Human trans gene screening 找到兩株人類基因轉殖株，當其與 *eyg* 共同表現時(*ey>eyg+X*)，會改變 *ey>eyg* 的複眼性狀，造成 dorsal out-growth，顯示這兩個基因可能與細胞增生有關
- 二、藉由 EP screening 複眼發生突變的果蠅之 UAS 下游基因經比對後，位置與 *effete (eff)* 部分契合，推測複眼發生突變的原因是 *eff* 的功能發生異常，致使細胞內蛋白質代謝失常所致。

陸、參考文獻

- Bonini, N. M., Bui, Q. T., Gray-Board, G. L. and Warrick, J. M. (1997). The *Drosophila eyes absent* gene directs ectopic eye formation in a pathway conserved between flies and vertebrates. *Development* **124**, 4819-4826.
- Chen, R., Amoui, M., Zhang, Z. and Mardon, G. (1997). Dachshund and Eyes Absent proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in *Drosophila*. *Cell* **91**, 893-903.
- Czerny, T., Halder, G., Kloter, U., Souabni, A., Gehring, W. J. and Busslinger, M. (1999). *twin of eyeless*, a second *Pax-6* gene of *Drosophila*, acts upstream of *eyeless* in the control of eye development. *Mol. Cell* **3**, 297-307.
- Desplan, C. (1997). Eye development: Governed by a dictator or a junta? *Cell* **91**, 861-864.
- Halder, G., Callaerts, P. and Gehring, W. J. (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science* **267**, 1788-1792.
- Halder, G., Callaerts, P., Flister, S., Walldorf, U., Kloter, U. and Gehring, W. J. (1998). Eyeless initiates the expression of both *sine oculis* and *eyes absent* during *Drosophila* compound eye development. *Development* **125**, 2181-2191.
- Hershko A. (1998) The ubiquitin system. In: Peters J-M, Harris JR, Finley D, editors. Ubiquitin and the biology of the cell. New York: Plenum Press, p1-13
- Jang, C. C. (2003). Two Pax genes, eye gone and *eyeless*, act cooperatively in determining *Drosophila* eye development. (Manuscript submitted)
- Koepp, D. M., Harper, J. W. and Elledge, S. J. (1999). How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* **97**, 431-434.
- Kronhamn, J., Frei, E., Daube, M., Jiao, R., Shi, Y. and Noll, M. (2002). Headless flies produced by mutations in the paralogous *Pax6* genes *eyeless* and *twin of eyeless*. *Development* **129**, 1015-1026.
- Lindsley, D. L. and Zimm, G. G. (1992). *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego, CA.
- Maniatis, T. (1999). A ubiquitin ligase complex essential for the NF-kappaB, Wnt/Wingless, and Hedgehog signaling pathways. *Genes Dev.* **13**, 505-510.
- McGinnis, W., and Krumlauf, R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* **68** (24 January 1992), 283-302.
- Pan, D. and Rubin, G. (1998). Targeted expression of *teashirt* induces ectopic eyes in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15508-15512.
- Pignoni, F., Hu, B., Zavitz, K. H., Xiao, J., Garity, P. A. and Zipursky, S. L. (1997). The eye-specification proteins *so* and *eya* form a complex and regulate multiple steps in *Drosophila* eye development. *Cell* **91**, 881-891.
- Scheffner M, Smith S, Hentsch S. (1998) The ubiquitin conjugating system. In: Peters J-M, Harris JR, Finkly D, editors. Ubiquitin and the biology of the cell. New York: Plenum Press. p65-91
- Shen, W. and Mardon, G. (1997). Ectopic eye development in *Drosophila* induced by directed *dachshund* expression. *Development* **124**, 45-52.

Wolff, T. and Ready, D. F. (1993). Pattern formation in the *Drosophila* retina. In *The Development of Drosophila melanogaster* (ed. M. Bate and A. Martinez Arias), pp. 1277-1325. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

柒、謝誌

- 一、爲了我們小小的實驗，慷慨赴義壯烈犧牲的果蠅們
- 二、提供取之不盡用之不竭美味食物及實驗器材的實驗室
- 三、每星期在生專教室很認真且很有耐心聽我們不太像是進度的進度報告的潘彥宏老師
- 四、The most important……費盡千辛萬苦，終於教會兩個笨小孩一點點 fly work 和相關知識的孫以瀚教授&張純純學姊

評語及建議事項

本作品是針對果蠅基因之協同及交互作用進行研究探討。雖有顯著的成果呈現，但本作品之標題並未切中研究的內容使研讀者不易了解，若能再加考慮重定會有更完整的表現，同時本研究之內容範圍太廣泛，所應用之技術太多，我們肯定作者的努力，但若能更專注於特定方向的研究則會有更良好的表現。