

論文要旨

Abstract

Title: Molecular physiological studies on butterfly wing color pattern formation.

(チョウの色模様形成に関する分子生理学的研究)

Immunohistochemistry and *in situ* hybridization studies of widely studied elements in butterfly wings, eyespots, showed a number of genes expressed in and around the presumptive focus during eyespot development. I here developed a functional assay system using the blue pansy butterfly *Junonia orithya* with baculovirus injection followed by anti-gp64 antibody injection. One of the candidate genes, *Distal-less (Dll)* has been implicated in eyespot formation. However, *Dll* expression is not sufficient for eyespot formation. Nevertheless, the baculovirus tool can be an invaluable tool to transfer, express, and functionally examine foreign genes in butterfly wings.

DNA polymorphism in *Dll* is linked with eyespot size variation in *Bicyclus anynana*. Using *J. orithya*, I compared *Dll* cDNA sequence variations on one side of the wing with color pattern on the other side from the identical individual. I found three different types of *Dll* variants in *J. orithya* wing however no clear relationship between *Dll* sequence and eyespot size variation was observed.

To establish a standard rearing method, we reported various artificial diets for *J. orithya* modified Insecta F-II, AD-FZMUV, AD-FZM, and AD-FBY, AD-FBY diets. The modified artificial diet Insecta F-II was used to feed pharmacological agent sodium tungstate to larvae of *J. orithya*. Low temperature treatment at larval stage provided immunity against cold shock or tungstate treatment. Therefore, we speculate that the cold-shock or tungstate induced color pattern pathway has a physiological relationship with the fall-morph-inducing pathway.

In addition, using three nymphalid butterflies, *J. orithya*, *Vanessa cardui*, and *Danaus chrysippus*, the mechanism of tissue size determination during morphogenesis was studied by counting and measuring all the scales on one of the compartments of the wing. I found that, the butterfly wing tissue size is determined primarily by the number of scale cells and then by the size change of scale cells before or during the period of row arrangement. The putative morphogen signal is likely a ploidy signal that determined cell size and scale size. It also likely determines scale coloration and shape.

In summary, based on the current knowledge, I proposed an integrated model for the wing color pattern formation and modification

Name Bidur Dhungel

琉球大学大学院
理工学研究科長 殿

論文審査委員

主査 氏 名 大瀧 丈二
副査 氏 名 中村 宗一
副査 氏 名 竹村 明洋



学位 (博士) 論文審査及び最終試験の終了報告書

学位 (博士) の申請に対し、学位論文の審査及び最終試験を終了したので、下記のとおり報告します。

記

申請者	専攻名 海洋環境学 氏名 Dhungel, Bidur 学籍番号 108610D	
指導教員名	大瀧 丈二	
成績評価	学位論文 <input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格	最終試験 <input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格
論文題目	Molecular physiological studies on butterfly wing color pattern formation (チョウの色模様形成に関する分子生理学的研究)	
審査要旨 (2000字以内) 本研究は、チョウの翅という実験系を用いて、分子生理学的視点から色模様形成過程に研究したものである。チョウの色模様形成過程のメカニズムはこれまで多くの謎に包まれていたが、それらのいくつかの点を明らかにした最新の優れた研究である。 申請者は、この目的に向けて、チョウの幼虫・蛹をさまざまな条件のもとで飼育し、チョウで世界初となる、効率の高い翅組織への遺伝子導入法の開発に成功した。この論文は著名な英国のジャーナル <i>BMC Biotechnology</i> に発表されたばかりでなく、Editor's Choice に選ばれ、現在でもアクセス数ランキングで高い順位となっている。本研究の高		

(次頁へ続く)

い学術水準と、本研究に対する他の研究者の高い関心が伺える。

遺伝子導入法の確立に続き、眼状紋形成に関わると想定されてきた*Distal-less*および*Invected*と呼ばれる遺伝子の翅組織への導入に成功し、それらの遺伝子の色模様形成における機能を明らかにした。これまでに想定された広範囲にわたる眼上紋形成の機能はこれらの遺伝子は持ち合わせていないことが示唆された。さらに、これらの遺伝子が鱗粉の黒化を誘導する機能を持つことが示唆された。この研究で、チョウの色模様形成に関するメカニズムの一つが遺伝子レベルで明らかにされたことになる。これは20年近く前からのチョウの生物学での大きな謎のひとつであったため、この成果は大きい。

そのほかにも、鱗粉の数、大きさ、配列から形成メカニズムを推測する研究が日本昆虫学会誌である*Entomological Science*に発表された。また、*Journal of Thermal Biology*に掲載された論文では、温度ショック応答における色模様変化に対する耐性が幼虫時期に獲得されることが初めて示された。そればかりでなく、本研究で使用してきたアオタテハモドキと呼ばれるチョウの人工飼料の開発、および、cDNA配列と翅の表現型を対応させるための片翅手術法の開発に成功し、チョウの生物学の基盤形成に大きく貢献した。

最終的には4本の英文原著論文が国際学術誌に掲載されるにいたった。すべて筆頭著者である。このような一連の独創的な研究により、チョウの翅の色模様形成のメカニズムの重要ないくつかの点を解明したことは、分子生理学・発生生物学において大きな意義がある。

論文発表は、2013年8月9日理系複合棟102室において、9:00から1時間にわたり行われた（口頭発表40分、質疑応答20分）。論文発表会においては適切な発表が行われ、また、質問に適切に対応していた。その後、審査会が、2013年8月9日理学部棟530室において、主査および副査2名の出席で10:20から行われた。内容および質疑応答について議論した結果、適切であるという意見の一致に至った。

したがって、本研究成果は生物学的に重要な貢献をしていると判断するとともに、提出された学位論文は、博士の学位論文に相当するものと判断し、学位論文の審査を合格とする。また、論文発表会における発表ならびに質疑応答において、申請者は専門分野および関連分野の十分な知識ならびに琉球大学大学院理工学研究科博士課程修了者として十分な研究能力を有していることが確認できたため、最終試験を合格とする。