

# 目錄

目錄	1
圖表目錄	3
中文摘要	5
英文摘要	7
前言	9
一、 果蠅眼睛	9
二、 果蠅色素細胞的發育	10
三、 Mob2 蛋白的研究	12
研究目的	15
材料與方法	16
一、 果蠅品系	16
二、 UAS- Gal4 系統	16
三、 果蠅眼睛發育時期的挑選	17
四、 組織免疫染色	17
五、 共軛焦顯微鏡觀察	18
六、 小眼內細胞計算方法	19
七、 果蠅成蟲外觀的觀察	19

結果.....	20
一、 Dmob2 蛋白參與在果蠅色素細胞.....	20
二、 Dmob2 蛋白會隨著果蠅色素細胞發育而改變表現位置.....	20
三、 在色素細胞發育中調控 Dmob2 蛋白的表達會造成小眼間細胞數目的異常.....	23
四、 在色素細胞發育中降低 Dmob2 蛋白的表現會照成粗糙眼.....	26
討論.....	29
一、 Dmob2 蛋白在果蠅色素細胞發育中的角色.....	29
二、 Dmob2 蛋白在色素細胞的分子機制.....	30
參考文獻.....	32



## 圖表目錄

圖一、Dmob2 蛋白在色素細胞有表現.....	36
圖二、Dmob2 蛋白在色素細胞發育早期表達的位置.....	37
圖三、Dmob2 蛋白在色素細胞發育中期表達的位置.....	39
圖四、Dmob2 蛋白在色素細胞發育晚期表達的位置.....	41
圖五、大量 Dmob2 蛋白觀察果蠅色素細胞發育中期以及發育完全後的排列.....	43
圖六、降低 Dmob2 蛋白的表現觀察果蠅色素細胞發育中期以及發育完全後的排列.....	45
圖七、調控 Dmob2 蛋白的表現會導致小眼間細胞數目異常.....	47
圖八、在果蠅色素細胞發育後調控 Dmob2 蛋白的表現並不會影響小眼間細胞的排列.....	48
圖九、利用 <i>GMR-Gal4</i> 調控 Dmob2 蛋白的表現會影響果蠅成蟲眼睛的型態.....	49
圖十、利用 <i>ey-Gal4</i> 調控 Dmob2 蛋白的表現會影響果蠅成蟲眼睛的型態.....	50
圖十一、利用 <i>sev-Gal4</i> 調控 Dmob2 蛋白的表現會影響果蠅成蟲眼睛的型態.....	51

圖十二、利用 *elav-Gal4* 調控 Dmob2 蛋白的表現會影響果蠅成蟲眼睛的型態.....52

圖十三、利用 *Rh1-Gal4* 調控 Dmob2 蛋白的表現會影響果蠅成蟲眼睛的型態.....53

圖十四、推測 Dmob2 蛋白對色素細胞影響的模式圖。.....54



## 中文摘要

果蠅的小眼包含了感光細胞、錐狀細胞和色素細胞。感光細胞是由三齡幼蟲開始進行分化，而色素細胞的發育是從化蛹後 19 小時開始進行。先前我們實驗室研究顯示調控 *Dmob2* (*Drosophila* *mps1-one-binder 2*) 的表現，會使發育中的色素細胞構型改變，但詳細的參與狀況目前還不清楚。*Dmob2* 是從酵母菌、果蠅和脊椎動物高度保留的蛋白。我的研究主要是希望了解 *Dmob2* 蛋白是如何調控果蠅色素細胞的發育，利用免疫染色法我分析 *Dmob2* 蛋白在色素細胞表現的位置。結果發現 *Dmob2* 蛋白的表現會隨著色素細胞重新排列組合的時間而有所改變。我進一步探討 *Dmob2* 蛋白是如何參與在果蠅色素細胞的發育，藉由改變 *Dmob2* gene 的表現來研究 *Dmob2* 蛋白是如何影響色素細胞的發育。結果顯示大量表現 *Dmob2* 蛋白和降低 *Dmob2* 蛋白會改變小眼間細胞的數目；此結果顯示 *Dmob2* 蛋白可能參與色素細胞的排列。接著探討色素細胞形成後，調控 *Dmob2* 蛋白表現是否還會影響色素細胞的排列。我利用了不同的啟動子調控 *Dmob2* 蛋白的表現，結果顯示不論是大量表現 *Dmob2* 蛋白或降低 *Dmob2* 蛋白，都會影響色素細胞的排列，說明了 *Dmob2* 蛋白參與色

素細胞的發育。總結，利用免疫染色及 Dmob2 基因之改變，我們發現 Dmob2 基因參與了色素細胞的發育。



## Abstract

*Drosophila* eye contains photoreceptor cell, cone cell and pigment cell. Differentiation of photoreceptor cells begins at the third instar larvae, whereas the development of pigment cells is initiated at 19 hours after puparium formation (APF). Previous studies showed that manipulated Dmob2 (*Drosophila* mps1-one-binder 2) expression disrupts the formation of the pigment cells. However, the role of Dmob2 in pigment cells development remains unclear. Dmob2 protein belongs to a small protein family, which their sequences are highly conserved from yeast to mammals. To study the function of Dmob2 in pigment cell development, we used immunohistochemistry to study the localization of Dmob2 in developing pigment cells. Results show that Dmob2 expresses in pigment cells and accumulates in different pigment cells in different developmental stages. To further study the role of Dmob2 in pigment cell development, we use genetic manipulation to alter the Dmob2 expression and examine its effect in pigment cell development. The results show the number and array of pigment cells are affected in overexpression and

downregulation of *dmob2*. Together, these results suggest that Dmob2 plays an important role in development of pigment cells in *Drosophila*.





## 前言

果蠅的色素細胞被認為，與支持複眼的排列以及做為光線進入眼睛屏障相關，但確切的功能目前還不清楚。為了要更進一步了解色素細胞的功能，必須先了解色素細胞的發育。我的研究主要是探討 Dmob2 對果蠅眼睛色素細胞的型態發育的影響。

### 一、 果蠅眼睛

果蠅的複眼 (compound eyes) 是由胚胎時期先驅細胞約一群 20 個上皮細胞一連串的增生 (cell proliferation) 及分化而形成 (cell differentiation)。成蟲後果蠅眼睛的外觀包含約 750-800 個小眼 (ommatidia)，每個小眼 (ommatidium) 結構上具有八個感光細胞 (photoreceptor cells/R cells)，四個錐體細胞 (cone cells)，兩個初級色素細胞 (primary pigment cells)，六個二級色素細胞 (secondary pigment cells)，三個三級色素細胞 (tertiary pigment cells)，以及三個與感覺機械性震動相關的剛毛細胞 (bristle cells) 所形成的剛毛複合體共同組成。小眼與小眼間由二級色素細胞以及三級色素細胞所分開，呈規則的六邊形蜂巢狀緊密連結，剛毛則在六邊型的三個頂點 (Wolff and Ready, 1991a)。

## 二、 果蠅色素細胞的發育

在果蠅幼蟲時期，八個感光細胞以及四個錐體細胞則已經透過交互作用而決定細胞型態，到了成蛹後成蛹後 19 小時兩個一級色素細胞會增長包覆住椎狀細胞，阻斷其它細胞與椎狀細胞接觸，明顯別於其它小眼間細胞 (interommatidial cells)。接著成蛹後 24 小時後，三個剛毛細胞會在六邊形蜂巢狀的三個頂點，而會有三個與兩個一級色素細胞有接觸小眼間細胞會成為三級的色素細胞。到了成蛹後 28 小時後，沒有與一級細胞接觸的小眼間細胞，就會進行計劃性細胞死亡 (programmed cell death)，到了成蛹後 42 小時會變成單層的色素細胞，並且排列整齊呈六邊形蜂巢狀緊密連結 (Johnson and Cagan, 2009; Wolff and Ready, 1991b)。

色素細胞發育時，有許多分子參與在其中，未分化之相鄰細胞 (neighbouring cells) 決定色素細胞的型態並與色素細胞的存活與死亡有關係，且細胞間的正確的附著 (adhesive) 與色素細胞的生成有密切的關係。在過去的實驗發現兩個主要的訊息傳導鏈分別是 EGF (Epidermal Growth Factor) 與 Notch 的個別的受體 (receptor) 在果蠅成蛹時期調控眼睛細胞的型態 (cell fate) 與凋亡 (apoptosis)(Freeman, 1996; Miller and Cagan, 1998)。其 EGF 訊息傳遞鏈的受體 Ras 會調控整個眼睛的發育，防止細胞進行劇烈的凋亡，當大量的表現 EGF 訊

息傳遞鏈的受體 Ras 則會造成發育中的細胞全部存活 (Miller and Cagan, 1998)。分析 EGF 訊息傳遞鏈的其中的配體 (ligand) Spitz，發現 Spitz 蛋白表現於錐狀細胞與一級的色素細胞，當將 Spitz 去除時，則會使細胞凋亡增加 (Miller and Cagan, 1998)。而另一個訊息傳遞鏈 Notch 與 EGF 為拮抗作用，當活化 Notch 訊息傳遞鏈時，會移除過多的小眼間前驅細胞 (interommatidial precursor cells)。當小眼間細胞少了 *Notch* 的功能，則會有過多的細胞存活 (Miller and Cagan, 1998)。

果蠅眼睛細胞的構成，第二重要的是與鄰近細胞的接觸附著，在組織裡給與細胞選擇性附著可以進行篩選，這種選擇性附著的接觸會決定哪個細胞接收到訊息傳遞，因而決定哪些細胞會進行分化，哪些細胞會進行細胞凋亡。在 *irregular chiasm C-roughest (irreC-rst)* 的突變種中，篩選的機制沒有發生，造成小眼細胞間細胞變成兩到三排，以此了解正確的細胞篩選在細胞的發育中，顯示會於果蠅眼睛的型態 (Reiter et al., 1996)。在野生型 (wild-type) 的果蠅中 IrreC-rst 蛋白會積聚於一級色素細胞與小眼間細胞連接的位置，當喪失或大量表現 IrreC-rst 會妨礙準確的頭尾相接 (end-to-end) 及除去多餘的細胞 (Reiter et al., 1996)。細胞的附著與細胞的底部-頂部極性 (apicobasal polarity) 對於維持眼睛的構型也很重要，在前面有指出，果蠅眼睛細胞進行篩選的細胞附著對於細胞構型的重要性，在其中的附著蛋白包

括轉譯出 DE-cadherin 同種細胞 (hemophilic cell) 的 *shotgun* 與轉譯出果蠅  $\beta$ -catenin 同源 (homologue) 的 *armadillo* (Peifer and Wieschaus, 1990; Tepass et al., 1996)。而 *crumbs* (*crb*) 是其中一種底部-頂部極性蛋白，在過去的研究中大量表現 Crb 蛋白會阻止果蠅小眼間細胞進行篩選，這種現象是因為 Crb 影響 IrreC-rst 與 DE-cadherin 表現分佈，並使得計劃性細胞死亡減少 (Grzeschik and Knust, 2005)。

### 三、 Mob2 蛋白的研究

從酵母菌、果蠅與脊椎動物 Mps1-one binder (Mob) 蛋白家族高度保留的蛋白家族，在脊椎動物包含有六個 Mob 蛋白，分別是 hMOB1A、hMOB1B、hMOB2、hMOB3A、hMOB3B 與 hMOB3C，而在果蠅包含有四個 Mob 蛋白，分別是 Dmob1 (*mats*)、Dmob2、Dmob3 與 Dmob4，在酵母菌裡則包含兩種 Mob，分別是 scMob1p 與 scMob2p (Hergovich, 2011)。

在果蠅和脊椎動物裡都發現 Mob1 蛋白是 Salvador/Warts/Hippo (SWH) 訊息傳遞鏈中的重要蛋白，SWH 訊息傳遞鏈會抑制下游的 Yorkie (Yki) 蛋白進細胞核核，當 Yki 蛋白進到細胞核中時，會造成細胞的增生與減少細胞的凋亡。而 Mob1 是 SWH 訊息傳遞鏈上游中的重要蛋白，當 Mob1 失去功能後，則會因為 Yki 蛋白進到細胞核中，

導致細胞過度的增生 (Badouel et al., 2009; Zhang et al., 2009)。

過去在實驗室前人的研究，在果蠅眼睛發育的早期，當降低 Dmob2 蛋白的表現，會擾亂 IrreC-rst 蛋白在色素細胞的積聚，並影響 DE-cadherin 的附著，而防止小眼間細胞的篩選 (劉，2009)。在果蠅眼睛發育的晚期，發現 Dmob2 蛋白會表現於發育中的感光細胞。而一個成熟的感光細胞，位於頂端的細胞膜會分化成兩個區域：分別是具有感光功能的桿小體 (rhabdomere) 區域以及具有支持功能的頸部區域 (stalk domains)。當調控 Dmob2 蛋白的表現，發現 Dmob2 蛋白會參與在桿小體的型態中。而 Dmob2 蛋白與 Crb 為拮抗作用，當大量表現 Dmob2 蛋白可以減少大量表現 Crb 所造成的粗超眼 (Liu et al., 2009)。

因此，本研究的結果發現 Dmob2 蛋白會表現於色素細胞上，更進一步將果蠅發育時分成早期、中期與晚期進行分析，發現在色素細胞發育的早期，Dmob2 蛋白會先表現於錐狀細胞以及色素細胞，而到了色素細胞發育的中期主要表現於剛毛細胞的外圍，到了色素細胞發育的晚期則主要表現於二級色素細胞與三級色素細胞。顯示出 Dmob2 蛋白會隨著色素細胞的發育表現的位置會有所改變。接著以調控 Dmob2 蛋白表現的方式，發現當調控 Dmob2 蛋白的表現會導致小眼間細胞數目的異常，而統計發現不論大量表現 Dmob2 蛋白或降

低 Dmob2 蛋白，都會造成小眼間細胞數目增多，進一步利用在色素細胞表現的啟動子調控 Dmo2 蛋白的表現，則在小眼間細胞的構型並沒有改變。而利用不同的啟動子調控 Dmob2 蛋白，發現當降低 Dmob2 蛋白，可能會在色素細胞發育的時候影響果蠅成蟲的外觀，造成粗糙眼。因此，本研究提供 Dmob2 蛋白與果蠅色素細胞型態發生的相關性。



## 研究目的

過去在我們實驗室的研究指出，調控 Dmob2 蛋白的表現會影響色素細胞的排列，想要了解 Dmob2 與色素細胞排列的關係，我想要解決以下的問題。

### 一、 Dmob2 蛋白是否有在色素細胞表達？

在實驗中利用了 phalloidin 染細胞骨架及 Dmob2 蛋白的抗體染 Dmob2 蛋白所表現的位置，來探討 Dmob2 是否會表達於色素細胞，而如果在色素細胞有表達，則進一步研究是否會隨著色素細胞發育兒表線位置有所改變。

### 二、 Dmob2 蛋白是如何參與在色素細胞的排列？

利用 *GMR-Gal4* 調控 Dmob2 蛋白的表達，並且以 phalloidin 染細胞骨架，觀察 Dmob2 蛋白是如何參與在色素細胞的排列。並進一步以 *7077-Gal4* 探討 Dmob2 蛋白是否參與在色素細胞發育中。

### 三、 Dmob2 蛋白果蠅成蟲的粗糙眼是否是經由色素細胞影響？

利用不同 Gal4 在不同細胞調控 Dmob2 蛋白的表現，藉此了解 Dmob2 是藉由眼睛的哪種細胞造成粗糙眼。

# 材料與方法

## 一、果蠅品系

本實驗以黑腹果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 為模式動物，並以 UAS- Gal4 系統進行實驗。W1118 及 Oregon R 為野生種果蠅；而使用的 UAS 轉殖基因果蠅分別為，*UAS-GFP* 帶有 GFP 的基因轉殖果蠅；*UAS-Flag - Dmob2* 是 *Dmob2* 全長並在前面有 Flag tag 的序列的基因轉殖果蠅；而 *UAS-Dmob2-IR1*、*UAS- Dmob2-IR2* 是帶有 *Dmob2* dsRNA 的基因轉殖果蠅。而 Gal4 轉殖基因果蠅分別是 *GMR- Gal4* (Freeman, 1996)、*7077- Gal4* (Wang et al., 2010)、*Rh1-Gal4* (Kumar and Ready, 1995)、*elav-Gal4* (Tomlinson et al., 1987)、*sev-Gal4* (Luo et al., 1994)、以及 *ey-Gal4* (Quiring et al., 1994)。所有果蠅均以標準培養基飼養，並飼養於室溫或 25°C 培養箱中。

## 二、UAS- Gal4 系統

UAS- Gal4 系統在自然界的果蠅中並不存在，而是由酵母菌所發展出來的系統。在酵母菌中，*UAS* (Upstream Activating Sequence) 為一段會與 Gal4 蛋白節和的序列，Gal4 蛋白會藉由與 *UAS* 序列結合，而表現 *UAS* 下游的一段目標基因的序列。Gal4 蛋白是分離出來的轉



錄因子，上游據有一段在組織或細胞中具有專一性的增強子 (enhancer)。當在果蠅體內同時具有 *Gal4* 與 *UAS* 這兩段基因的時後，就可以利用 *Gal4* 上游的增強子，控制在特定的時間、特定的組織或細胞，大量表現 *Gal4*，並與 *UAS* 結合後促進 *UAS* 下游的目標基因的轉錄，進而在特定的時間、組織或細胞大量表達 (Brand and Perrimon, 1993)。實驗方法是先將帶有 *Gal4* 和帶有 *UAS* 的果蠅品系養在同一個飼養管中，其中雌果蠅必須為處女蠅，雄雌比例為 1:2，並將有果蠅的飼養管置於 25°C 的恆溫培養箱中。

### 三、果蠅眼睛發育時期的挑選

本實驗觀察蛹期，是將剛從三齡幼蟲成蛹的白色蛹 (white prepupa) 放置於收集盒中，並在周圍加入二次水，以維持盒中的濕度。並將收集盒放置 25°C 的恆溫培養箱中。並在色素細胞發育中的時期，即成蛹後 19 小時到 42 小時間進行解剖染色分析。

### 四、組織免疫染色

在林格氏液 (Ringer's solution: 55mM NaCl, 15mM KCl, 40mM MgSO<sub>4</sub>, 4.5mM anhydride CaCl<sub>2</sub>, 20mM Glucose, 50mM Sucrose, and 10mM Pipes, pH=6.95) 中解剖取出果蠅的眼睛樣本，接著將其轉置到含有 4% paraformaldehyde 的 PBS 溶液 (10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 137mM NaCl)溶液中，靜置固定 20 分鐘。固定後將眼睛樣本以 PBST 溶液 (PBS : 0.2% Triton X-100) 清洗三次每次 10 分鐘。接著將眼睛樣本取出，置於染色盤中，進行一級抗體作用，靜置於 4°C 冰箱，染色盤的每個樣品分別以 10ul 稀釋過的一級抗體進行反應。本實驗用到的一級抗體包括 phalloidin (1:100, Sigma-Aldrich), rabbit anti-Dmob2 (1:200, Lin et al.,2011)，以含 5% 馬血清的 PBST 溶液中稀釋。隔天在將眼睛樣本從染色盤取出，置於 PBST 溶液中進行清洗三次，每次 10 分鐘。接著將眼睛置於染色盤中，進行二及抗體作用，本實驗用到的二及抗體包括 Chicken anti-rabbit 488 (1:200, Molecular Probes-Invitrogen) 與 Donkey anti-rabbit (1:200, Molecular Probes-Invitrogen)，室溫下作用 1 小時 30 分鐘，以 PBST 溶液進行稀釋，染色盤的每個樣品分別以 10ul 稀釋過的二級抗體進行反應。作用完畢後將眼睛樣本從染色盤取出，以 PBST 溶液清洗三次，每次 10 分鐘，接著以 mounting medium (20ml 10X PBS, 100ml glycerol, 4g N-propyl gallate and 80ml D.D. water, pH8.5) 進行封片。封片後以共軛焦顯微鏡進行觀察。

## 五、 共軛焦顯微鏡觀察

本實驗使用 LSM510 軟體及 Zeiss Axiovert 100 的顯微鏡，以不

同波長 488nm、543nm 或 647nm 的雷射光下，擷取眼睛樣本所帶的螢光訊息，進行掃描拍攝不同發育階段的構造圖。

## 六、小眼內細胞計算方法

將使果蠅眼睛解剖並利用 phalloidin 進行組織免疫染色，利用共軛焦顯微鏡觀察後的結果進行分析，先定一個小眼為主，將圍繞在小眼及小眼間的細胞，以剛毛細胞與三及色素細胞為底進行數量上的計算，計算後的結果以 One-way ANOVA 進行分析。

## 七、果蠅成蟲外觀的觀察

將成蟲後的公果蠅放置於滴有乙醚的 50ml 的尖體離心管中，因要在避免果蠅碰到乙醚的情況下進行迷昏，所以將果蠅至於尖體離心管的蓋子上，將離心管倒置，靜置約 15 至 20 分鐘，接著將果蠅排列於玻片黏性不強的雙面膠上，利用 Carl Zeiss SV II 的光學解剖顯微鏡固定放大 66 倍率拍攝果蠅成蟲的眼睛。

# 結果

## 一、 Dmob2 蛋白參與在果蠅色素細胞

為了要了解 Dmob2 蛋白在色素細胞是否有表達，本實驗使用野生型的果蠅進行解剖，並進行 phalloidin 及 Dmob2 蛋白的抗體染色，藉由染出細胞骨架的主要成分之一，F-actin 的分布位置，去分別出色素細胞的位置，以及利用 Dmob2 蛋白的抗體染出 Dmob2 蛋白表現的位置，並利用共軛焦螢光顯微鏡進行拍攝，所拍攝的圖在利用軟體進行轉色，使用色彩對比較為強烈的紅色以及綠色分別表示，紅色表示 phalloidin 的染色，而綠色表示 Dmob2 蛋白的抗體染色。果蠅色素細胞發育的時間是成蛹後 19 小時至成蛹後 42 小時，所以實驗的進行是在果蠅成蛹後 28 小時以及 48 小時，目的是探討色素細胞發育中以及色素細胞發育完全後 Dmob2 蛋白是否都會有參與。實驗的結果指出不論是在果蠅色素細胞發育中 (圖一，A、B 與 C) 或是果蠅色素細胞發育完成後 (圖一，D、E 與 F) 都有 Dmob2 蛋白的表達。

## 二、 Dmob2 蛋白會隨著果蠅色素細胞發育而改變表現位置

了解 Dmob2 蛋白在果蠅色素細胞發育中有表達，進一步的想探討 Dmob2 蛋白是否會隨著色素細胞發育而表現位置有所改變。在本實驗中利用野生型的果蠅進行解剖，並以 phalloidin 及 Dmob2 蛋白的

抗體進行染色，利用共軛焦螢光顯微鏡進行拍攝，所拍攝的圖在使用軟體進行轉色，使用色彩對比較為強烈的紅色以及綠色分別表示，紅色表示 phalloidin 的染色，而綠色表示 Dmob2 蛋白的抗體染色。本實驗於果蠅色素細胞發育後每兩個小時解剖果蠅，並以果蠅成蛹後 26 小時及 34 小時將果蠅色素細胞的發育分成早期（成蛹後 20 小時至 26 小時）、中期（成蛹後 28 小時至 34 小時）與晚期（成蛹後 36 小時至 42 小時）進行分析。

結果顯示在果蠅色素細胞發育的早期，在成蛹後 20 小時，Dmob2 蛋白會集中表現在錐狀細胞以及所有色素細胞（圖二，A、B 與 C）；當成蛹後 22 小時，Dmob2 蛋白的表現位置與 20 小時相同（圖二，D、E 與 F）；而成蛹後 24 小時，Dmob2 蛋白的表現位置一樣不變（圖二，G、H 與 I）；於成蛹後 26 小時，Dmob2 蛋白表現只有在色素細胞有表現（圖二，J、K 與 L）；顯示出 Dmob2 在色素細胞發育的早期會先表現於錐狀細胞以及色素細胞，到了成蛹後 26 小時，主要表現於色素細胞。

而在果蠅色素細胞發育的中期，在成蛹後 28 小時，Dmob2 蛋白會在錐狀細胞以及所有色素細胞（圖三，A、B 與 C）；當成蛹後 30 小時，Dmob2 蛋白的表現位置主要在剛毛細胞的外圍（圖三，D、E 與 F）；而成蛹後 32 小時，Dmob2 蛋白的表現位置與 30 小時相同，

位於剛毛細胞的外圍 (圖三, G、H 與 I); 於成蛹後 34 小時, Dmob2 蛋白表現一樣不變 (圖三, J、K 與 L); 顯示出 Dmob2 在色素細胞發育的中期會先表現於錐狀細胞以及色素細胞, 到了成蛹後 30 小時, 主要表現於剛毛細胞的外圍。

於果蠅色素細胞發育的晚期, 在成蛹後 36 小時, Dmob2 蛋白會集中表現在一級色素細胞以及少量在二級與三級色素細胞 (圖四, A、B 與 C); 當成蛹後 38 小時, Dmob2 蛋白的表現位置主要在二級色素細胞與三級色素細胞 (圖四, D、E 與 F); 而成蛹後 40 小時, Dmob2 蛋白的表現位置與 38 小時相同, 在二級色素細胞與三級色素細胞 (圖四, G、H 與 I); 於成蛹後 42 小時, Dmob2 蛋白表現與前面相同, 在二級與三級色素細胞 (圖四, J、K 與 L); 顯示出 Dmob2 在色素細胞發育的晚期會集中表現在一級色素細胞以及少量在二級與三級色素細胞, 到了成蛹後 38 小時後, 則主要表現於二級色素細胞與三級色素細胞。

在色素細胞發育的早期, Dmob2 蛋白在色素細胞發育會先表現於錐狀細胞以及色素細胞, 而到了中期主要表現於剛毛細胞的外圍, 而晚期則主要表現於二級色素細胞與三級色素細胞。顯示出 Dmob2 蛋白會隨著色素細胞的發育表現的位置會有所改變。

### 三、在色素細胞發育中調控 Dmob2 蛋白的表達會造成小眼間細胞數目的異常

而以 Dmob2 蛋白是否會在色素表達並會隨著色素細胞發育而改變表現位置，接著想要了解 Dmob2 蛋白是如何參與在色素細胞，利用在眼睛調控 *Dmob2* 的表現，去研究 Dmob2 蛋白與色素細胞的關係。本研究是使用過去我們實驗室所製作出來的轉殖基因果蠅 *UAS-Dmob2-Flag*、*UAS-Dmob2-IR1* 與 *UAS-Dmob2-IR2*，以 *GMR-Gal4* 調控 *Dmob2* 的表現。將 *GMR-Gal4* 與 *UAS-Dmob2-Flag* 交配後產生的子代，會大量表現 Dmob2 蛋白，以 *GMR>Dmob2-Flag* 表示；而 *GMR-Gal4* 與 *UAS-Dmob2-IR1* 和 *UAS-Dmob2-IR2* 交配後產生的子代，會分別表現不同的 Dmob2 RNAi 進而減少 Dmob2 蛋白的表現，以 *GMR> UAS-Dmob2-IR* 表示。以 phalloidin 進行染色，利用共軛焦螢光顯微鏡進行拍攝，所拍攝的圖在使用軟體進行轉色，將其轉為黑白顯示，實驗的進行是在果蠅成蛹後 30 小時以及 48 小時，目的是探討色素細胞發育中以及色素細胞發育完全後 Dmob2 蛋白參與的狀況。

利用 *GMR-Gal4* 與 *UAS-Dmob2-Flag* 大量表現 Dmob2 蛋白，在成蛹後 30 小時 (圖五, C) 與對照組相比 (圖五, A) 顯示出小眼間數目異常，呈現多排的現象，並在成蛹後 48 小時 (圖五, D) 與對照組 (圖五, B) 相比，排列變的不整齊，已經非規則的六邊形蜂巢狀。

而利用 *GMR-Gal4* 與 *UAS-Dmob2-IR1* 降低 Dmob2 蛋白的表現，在成蛹後 30 小時 (圖六, E) 與對照組相比 (圖六, A) 顯示出小眼間數目異常，在成蛹後 48 小時 (圖六, F) 與對照組 (圖六, B) 相比，排列變的不整齊；而 *GMR-Gal4* 與 *UAS-Dmob2-IR2* 降低 Dmob2 蛋白的表現，在成蛹後 30 小時 (圖六, G) 與對照組相比 (圖六, A) 與 *UAS-Dmob2-IR1* 相同，顯示出小眼間數目異常，在成蛹後 48 小時 (圖六, H) 與對照組 (圖六, B) 相比，排列也變的不整齊。結果顯示出，調控 Dmob2 蛋白的表現，會使小眼間細胞的數目異常，於小眼間某些部份的細胞數會變多，某部分細胞數目缺失，並使得眼睛的排列不整齊，於小眼間某些部分多於一排，某些部分小眼間小於一排。

接著想探討調控 Dmob2 蛋白的表現，使得小眼間的數目異常，是增加還是減少，則先將 *GMR>GFP* 與 *GMR>Dmob2-Flag*、*GMR>Dmob2-IR1* 及 *GMR>Dmob2-IR2* 的小眼間細胞數目量化，並將 *GMR>Dmob2-Flag*、*GMR>Dmob2-IR1* 及 *GMR>Dmob2-IR2* 量化的結果分別與 *GMR>GFP* 量化的結果，利用 One-way ANOVA 進行分析。結果顯示 (圖七) 出調控 Dmob2 蛋白的表現，小眼間細胞數目增加。

過去知道 *7077-Gal4* 可以與 UAS 果蠅品系的果蠅可以在色素細胞進行調控，而我利用 *7077-Gal4* 與 *UAS-GFP* 在色素細胞大量表現 GFP，並在色素細胞發育的早期、中期與晚期進行觀察，發現在色素



細胞發育的時期，都沒有偵測到 GFP，顯示出 *7077-Gal4* 與 UAS 果蠅品系只有在色素細胞發育後才會進行表現。而在我過去之前的實驗中 *GMR-Gal4* 會持續表現在色素細胞，所以接著想探討，是否 Dmob2 蛋白是因為表現於色素細胞影響是在色素細胞發育前還是發育後，就利用只在色素細胞發育完才會開始表達的 *7077-Gal4*，來分別 Dmob2 對色素細胞的影響是在色素細胞發育前還是發育後。而利用 *7077-Gal4* 與 *UAS-Dmob2-Flag* 大量表現 Dmob2 蛋白 (圖八, B)，在成蛹後 48 小時進行觀察，結果與對照組 (圖八, A) 相同，並無 *GMR>Dmob2-Flag* (圖五, D) 的排列不整齊與小眼間細胞數目異常。而利用 *7077-Gal4* 與 *UAS-Dmob2-IR1* 降低 Dmob2 蛋白的表現 (圖八, C)，在成蛹後 48 小時進行觀察，與對照組 (圖八, A) 相同，並無 *GMR>Dmob2-IR1* (圖六, F) 的排列不整齊與小眼間細胞數目異常。最後 *7077-Gal4* 與 *UAS-Dmob2-IR2* 降低 Dmob2 蛋白的表現 (圖八, D)，在成蛹後 48 小時進行觀察，與對照組 (圖八, A) 結果相同，也並無 *GMR>Dmob2-IR2* (圖六, H) 的排列不整齊與小眼間細胞數目異常。利用 *7077-Gal4* 調控 Dmob2 蛋白的表現，並沒有類似以 *GMR-Gal4* 調控的排列不整齊與小眼間細胞數目異常，說明了 Dmob2 蛋白是參與在色素細胞發育的期間。

#### 四、在色素細胞發育中降低 Dmob2 蛋白的表現會照成粗糙眼

在利用 *GMR-Gal4* 降低 Dmob2 蛋白表現時，發現果蠅的成蟲會有粗糙眼，所以想探討 Dmob2 蛋白是否是因為參與在色素細胞發育中而造成粗糙眼，所以我使用了刪去法來分析 Dmob2 蛋白對果蠅成蟲造成的粗糙眼是經由椎狀細胞、色素細胞或感光細胞哪一部分，實驗上利用了五種 *Gal4* 調控 Dmob2 蛋白來探討此問題，五種 *Gal4* 分別是在果蠅三齡幼蟲眼睛發育早期的 *ey-Gal4*，以及表現在椎狀細胞、色素細胞與感光細胞的 *GMR-Gal4*，而 *sev-Gal4* 表現於椎狀細胞與少數的感光細胞，以及從果蠅幼蟲時期表現到蛹期都持續表現於感光細胞的 *elav-Gal4*，和表現在感光細胞發育後期的 *Rh1-Gal4*，以區分 *GMR-Gal4* 所造成的粗糙眼，是因為 Dmob2 蛋白參與在那種細胞。利用 *GMR-Gal4* 與 *UAS-Dmob2-Flag* 大量表現 Dmob2 蛋白在果蠅成蟲的眼睛，*GMR>Dmob2-Flag* (圖九，B) 與 *GMR>GFP* (圖九，A) 比較顯示出有些微的不平整，而以 *ey-Gal4*、*sev-Gal4*、*elav-Gal4*、*Rh1-Gal4* 與 *UAS-Dmob2-Flag* 大量表現 Dmob2 蛋白，顯示出 *ey>Dmob2-Flag* (圖十，B)、*sev>Dmob2-Flag* (圖十一，B)、*elav>Dmob2-Flag* (圖十二，B) 及 *Rh1>Dmob2-Flag* (圖十三，B) 與對照組 *ey>GFP* (圖十，A)、*sev>>GFP* (圖十一，A)、*elav>GFP* (圖十二，A) 及 *Rh1>GFP* (圖十三，A) 相同。而利用 *GMR-Gal4* 與

*UAS-Dmob2-IR1* 降低 *Dmob2* 蛋白的表現，*GMR> Dmob2-IR1* (圖九，C) 在果蠅成蟲的眼睛，與 *GMR>GFP* (圖九，A) 相比顯示出有粗糙眼，而 *ey-Gal4*、*sev-Gal4*、*elav-Gal4* 與 *Rh1-Gal4* 與 *UAS-Dmob2-IR1* 降低 *Dmob2* 蛋白的表現，顯示出 *ey>Dmob2-IR1* (圖十，C)、*sev>Dmob2-IR1* (圖十一，C)、*elav>Dmob2-IR1* (圖十二，C) 及 *Rh1>Dmob2-IR1* (圖十一，C) 與對照組 *ey>GFP* (圖十，A)、*sev>GFP* (圖十一，A)、*elav>GFP* (圖十二，A) 及 *Rh1>GFP* (圖十三，A) 相同。接著 *GMR-Gal4* 與 *UAS-Dmob2-IR2* 以 RNAi 降低 *Dmob2* 蛋白的表現，在果蠅成蟲的眼睛 (圖九，D) 與 *UAS-Dmob2-IR1* (圖九，C) 相同顯示出有粗糙眼，而以 *ey-Gal4*、*sev-Gal4*、*elav-Gal4* 與 *Rh1-Gal4* 與 *UAS-Dmob2-IR2* 降低 *Dmob2* 蛋白的表現，顯示出 *ey>Dmob2-IR2* (圖十，D)、*sev>Dmob2-IR2* (圖十一，D)、*elav>Dmob2-IR2* (圖十二，D) 及 *Rh1> Dmob2-IR2* (圖十三，D) 與對照組對照組 *ey>GFP* (圖十，A)、*sev>GFP* (圖十一，A)、*elav>GFP* (圖十二，A) 及 *Rh1>GFP* (圖十三，A) 相同。

實驗的結果以刪去法來看，利用表現在椎狀細胞、色素細胞與感光細胞的 *GMR-Gal4* 大量表現 *Dmob2* 蛋白，會使得果蠅成蟲眼睛有些微的不平整，而用 *GMR-Gal4* 兩種不同的 RNAi 降低 *Dmob2* 蛋白的表現，會使果蠅成蟲的眼睛變成粗糙眼，但是在利用 *ey-Gal4*、

*sev-Gal4*、*elav-Gal4* 與 *Rh1-Gal4* 調控 *Dmob2* 表現並不會改變果蠅成蟲眼睛外觀，此結果去除了 *Dmob2* 對感光細胞與椎狀細胞可能對果蠅粗糙眼的影響。結論顯示 *Dmob2* 蛋白透過參與在色素細胞而影響果蠅眼睛的外觀。



## 討論

### 一、 Dmob2 蛋白在果蠅色素細胞發育中的角色

本實驗使用野生型的果蠅進行解剖，利用 phalloidin 及 Dmob2 蛋白的抗體染色，探討色素細胞發育中以及色素細胞發育完全後 Dmob2 蛋白是否都會有參與。實驗指出不論是在果蠅色素細胞發育中或是果蠅色素細胞發育完成後都有 Dmob2 蛋白的表達。並進一步的以色素細胞發育的時間解剖果蠅的眼睛，觀察 Dmob2 的表現位置，了解 Dmob2 蛋白會隨著色素細胞的發育表現的位置會有所改變。這個結果顯示了 Dmob2 蛋白會參與在色素細胞的發育中，而在過去的研究中顯示，有兩個主要的訊息傳遞鏈參與在色素細胞的發育，分別是 EGF 與 Notch 的個別的受體在果蠅成蛹時期調控眼睛細胞的型態與凋亡 (Freeman, 1996; Miller and Cagan, 1998)。所以接著可以進一步的探討，在眼睛上 Dmob2 蛋白是否參與在 EGF 訊息傳遞鏈或 Notch 訊息傳遞鏈。

在前面有提到 EGF 訊息傳遞鏈的受體 Ras 會調控整個眼睛的發育，防止細胞進行劇烈的凋亡。而 EGF 訊息傳遞鏈的配體 Spitz 蛋白會使色素細胞進行計劃性細胞死亡增加 (Miller and Cagan, 1998)。另外當活化 Notch 訊息傳遞鏈時，會移除過多的小眼間前驅細胞

(interommatidial precursor cells) (Miller and Cagan, 1998)。則可先藉由 Ras、Spitz 或 EGF、Notch 訊息傳遞鏈的下游，利用組織染色分析是否與 Dmob2 蛋白表現在相同的位置進行初步的分析。

## 二、 Dmob2 蛋白在色素細胞的分子機制

使用過去我們實驗室所製作出來的轉殖基因果蠅 *UAS-Dmob2-Flag*、*UAS-Dmob2-IR1* 與 *UAS-Dmob2-IR2*，以 *GMR-Gal4* 以及 *7077-Gal4* 調控 *Dmob2* 的表現。結果顯示，在色素細胞發育時調控 *Dmob2* 蛋白的表現，會使小眼間細胞的數目異常，於小眼間某些部份的細胞數異常。而將 *GMR>Dmob2-Flag*、*GMR>Dmob2-IR1* 及 *GMR>Dmob2-IR2* 量化的結果分別與 *GMR>GFP* 量化分析。量化結果顯示出調控 *Dmob2* 蛋白的表現，小眼間細胞數目增加並達到顯著的差異，雖然量化圖的誤差值很大，平均值也與對照組看起來差不多，這是因為 *Dmob2* 主要是影響小眼間排列所造成的結果。而小眼間細胞排列異常，以及小眼間細胞數目增加，與鄰近細胞的接觸附著有關，因而決定哪些細胞會進行分化，哪些細胞會進行計劃性細胞死亡。過去實驗室前人的研究，降低 *Dmob2* 蛋白會影響 *IrreC-rst* 蛋白與 *DE-cadherin* 蛋白的表現 (劉，2009)。在先前的研究指出與 *Dmob2* 蛋白在果蠅眼睛會有拮抗作用的 *Crb* 蛋白，也會影響 *IrreC-rst* 蛋白與 *DE-cadherin* 蛋白表現分佈，顯示出 *Crb* 蛋白與 *Dmob2* 蛋白在果蠅的

色素細胞可能也有交互作用 (Liu et al., 2009)。另外在實驗的統計發現調控 Dmob2 蛋白所產生小眼間的細胞數目增加並使排列不不正常，可能是因為調控了 IrreC-rst 蛋白與 DE-cadherin 蛋白的分佈，而影響小眼間細胞與鄰近細胞的接觸附著出現問題，沒辦法進行正確篩選，而減少計劃性細胞死亡。但是詳細的機制需要更嚴謹的實驗來回答。

而結合實驗室前人的研究，我推測 Dmob2 蛋白與 Crb 蛋白可能在色素細胞發育時可能有相互作用，進而影響 IrreC-rst 蛋白與 DE-cadherin 蛋白的表現位置，接著抑制色素細胞的凋亡，造成小眼間細胞數目增加，最後使果蠅成蟲的眼睛變成不規則之外型 (圖十四)。

## 參考文獻

劉玲妤。2009。果蠅 *mob2* 參與感光細胞型態發生的功能。東海大學生命科學系，博士論文。

Badouel, C., Gardano, L., Amin, N., Garg, A., Rosenfeld, R., Le Bihan, T., and McNeill, H. (2009). The FERM-domain protein Expanded regulates Hippo pathway activity via direct interactions with the transcriptional activator Yorkie. *Dev Cell* 16, 411-420.

Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.

Freeman, M. (1996). Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell* 87, 651-660.

Grzeschik, N.A., and Knust, E. (2005). IrreC/rst-mediated cell sorting during *Drosophila* pupal eye development depends on proper localisation of DE-cadherin. *Development* 132, 2035-2045.

Hergovich, A. (2011). MOB control: reviewing a conserved family of kinase regulators. *Cell Signal* 23, 1433-1440.



Johnson, R.I., and Cagan, R.L. (2009). A quantitative method to analyze *Drosophila* pupal eye patterning. *PLoS One* 4, e7008.

Kumar, J.P., and Ready, D.F. (1995). Rhodopsin plays an essential structural role in *Drosophila* photoreceptor development. *Development* 121, 4359-4370.

Liu, L.Y., Lin, C.H., and Fan, S.S. (2009). Function of *Drosophila* *mob2* in photoreceptor morphogenesis. *Cell Tissue Res* 338, 377-389.

Luo, L., Liao, Y.J., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1994). Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* *Drac1* is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev* 8, 1787-1802.

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.

Peifer, M., and Wieschaus, E. (1990). The segment polarity gene *armadillo* encodes a functionally modular protein that is the *Drosophila* homolog of human plakoglobin. *Cell* 63, 1167-1176.

Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U., and Gehring, W.J. (1994). Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the *Small eye* gene in

mice and Aniridia in humans. *Science* 265, 785-789.

Reiter, C., Schimansky, T., Nie, Z., and Fischbach, K.F. (1996). Reorganization of membrane contacts prior to apoptosis in the *Drosophila* retina: the role of the IrreC-rst protein. *Development* 122, 1931-1940.

Tepass, U., Gruszynski-DeFeo, E., Haag, T.A., Omatyar, L., Torok, T., and Hartenstein, V. (1996). *shotgun* encodes *Drosophila* E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neurectoderm and other morphogenetically active epithelia. *Genes Dev* 10, 672-685.

Tomlinson, A., Bowtell, D.D., Hafen, E., and Rubin, G.M. (1987). Localization of the *sevenless* protein, a putative receptor for positional information, in the eye imaginal disc of *Drosophila*. *Cell* 51, 143-150.

Wang, X., Wang, T., Jiao, Y., von Lintig, J., and Montell, C. (2010). Requirement for an enzymatic visual cycle in *Drosophila*. *Curr Biol* 20, 93-102.

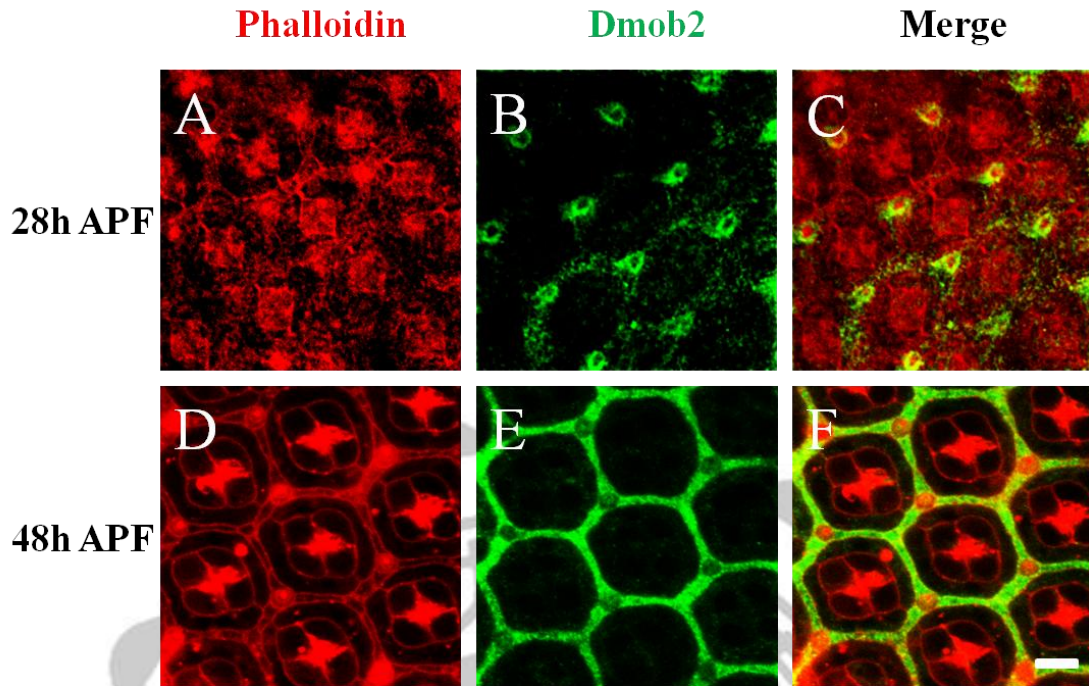
Wolff, T., and Ready, D.F. (1991a). The beginning of pattern formation in the *Drosophila* compound eye: the morphogenetic furrow and the second mitotic wave. *Development* 113, 841-850.

Wolff, T., and Ready, D.F. (1991b). Cell death in normal and rough

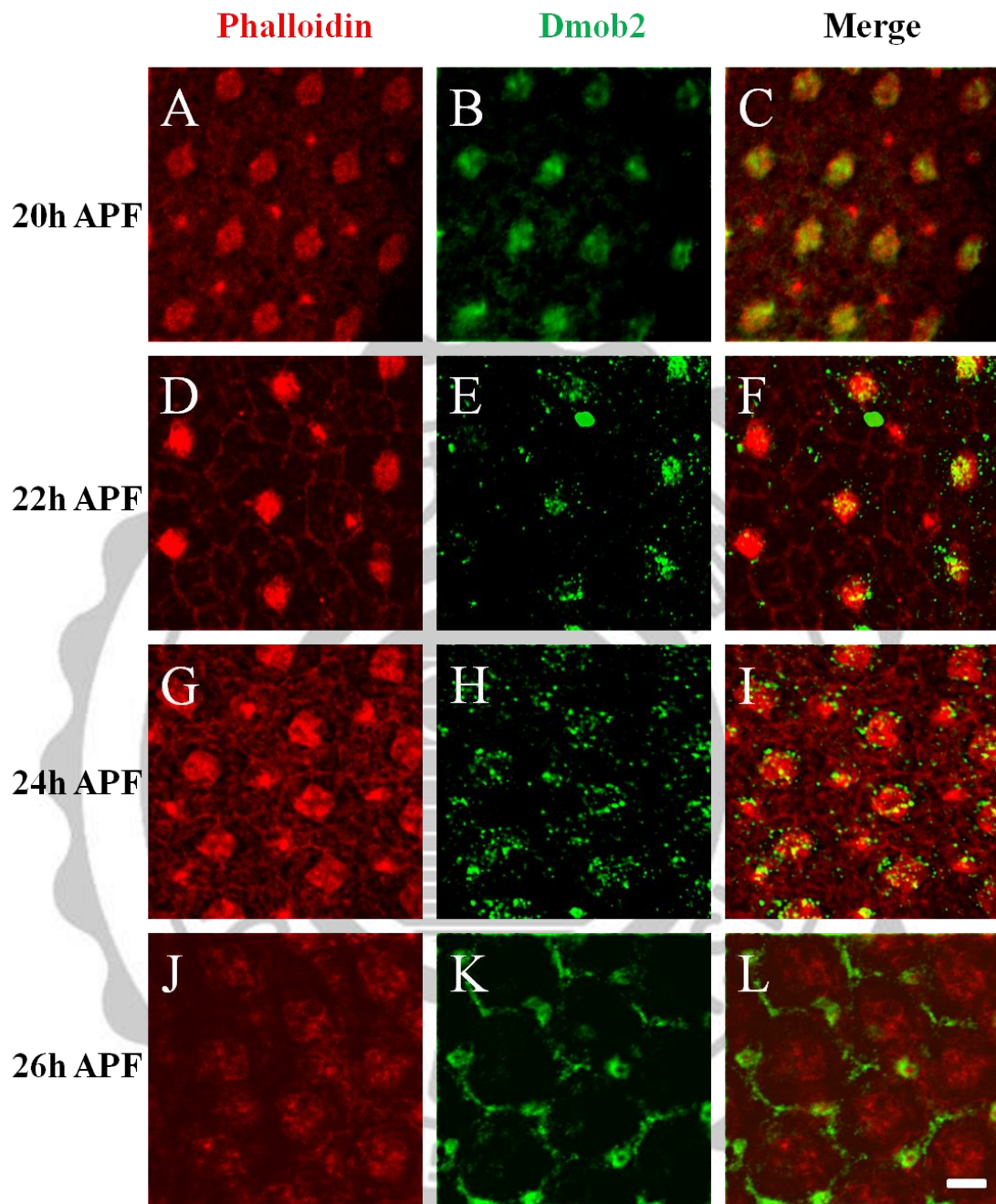
eye mutants of *Drosophila*. *Development* 113, 825-839.

Zhang, X., Milton, C.C., Humbert, P.O., and Harvey, K.F. (2009).  
Transcriptional output of the Salvador/warts/hippo pathway is controlled  
in distinct fashions in *Drosophila melanogaster* and mammalian cell lines.  
*Cancer Res* 69, 6033-6041.





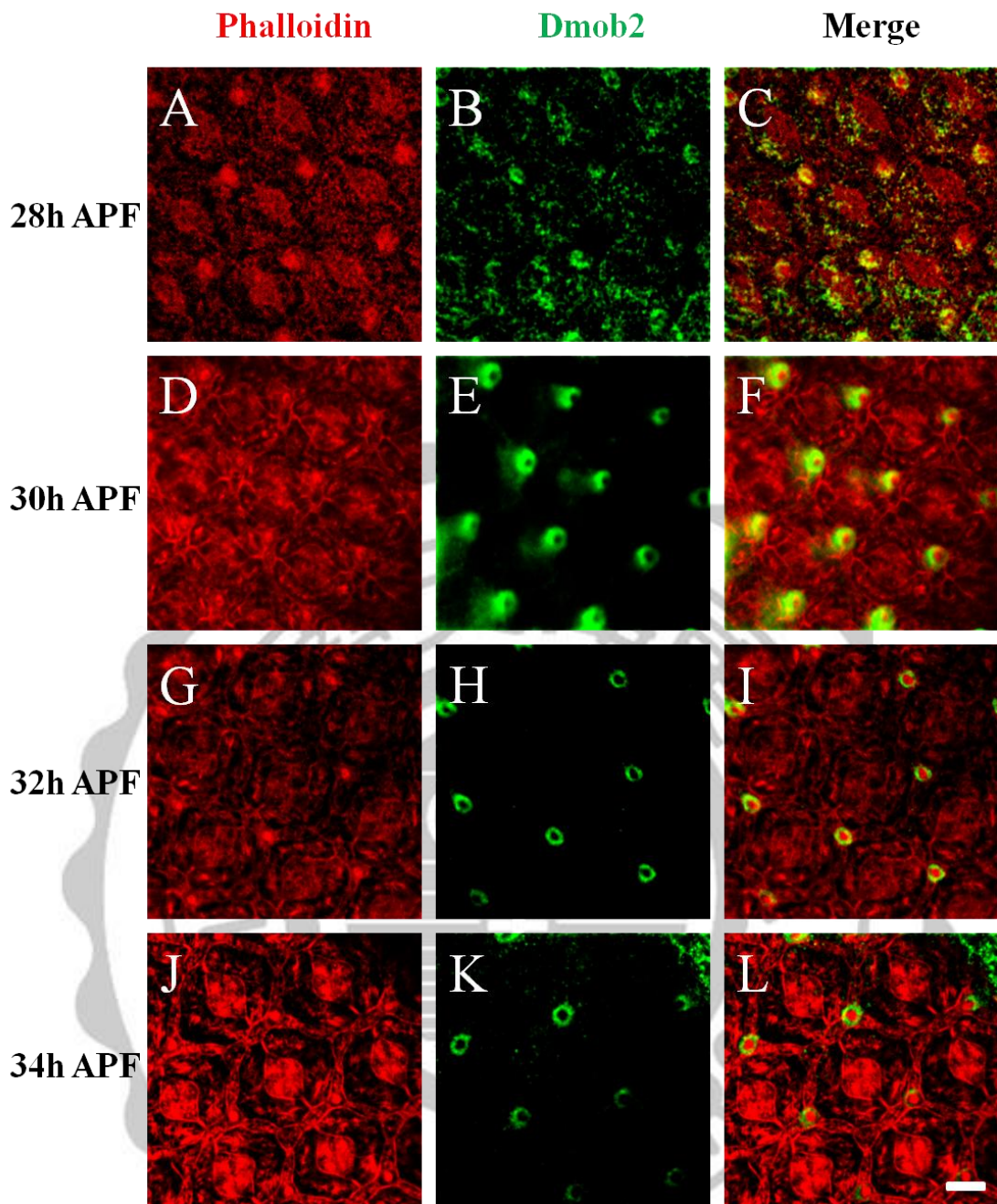
圖一、Dmob2 蛋白在色素細胞有表現。將 Wild type 的果蠅於 28h APF (圖 A、B 與 C) 及 48h APF (圖 D、E 與 F) 解剖果蠅眼睛，目的是為了瞭解 Dmob2 蛋白在色素細胞發育中以及發育後是否都有表達，並將 28h APF 及 48h APF 解剖的果蠅眼睛進行組織免疫染色。Phalloidin 抗體染色表示紅色(圖 A 與 D)，Dmob2 抗體染色表示綠色 (圖 B 與 E)，Merge 表示 Phalloidin 與 Dmob2 合圖 (圖 C 和 F)，顯示出 Dmob2 蛋白在色素細胞發育中以及發育後都有表達。游標尺為 5 $\mu$ m。



圖二、Dmob2 蛋白在色素細胞發育早期表達的位置。於 20 APF (圖 A、B 與 C)、22h APF (圖 D、E 與 F)、24 APF (圖 G、H 與 I) 及 26 APF (圖 J、K 與 L) 解剖果蠅眼睛，並進行組織免疫染色。Phalloidin 抗體染

色表示紅色(圖 A、D、G 與 J)，Dmob2 抗體染色表是綠色 (圖 B、E、H 與 J)，Merge 表示 Phalloidain 與 Dmob2 合圖 (圖 C、F、I 與 L)。

染色結果表示在果蠅成蛹後 20 小時，Dmob2 蛋白會集中表現在錐狀細胞以及所有色素細胞 (圖 A、B 與 C)；當成蛹後 22 小時，Dmob2 蛋白的表現位置與 20 小時相同 (圖 D、E 與 F)；而成蛹後 24 小時，Dmob2 蛋白的表現位置一樣不變 (圖 G、H 與 I)；於成蛹後 26 小時，Dmob2 蛋白表現只有在色素細胞有表現 (圖 J、K 與 L)；顯示出 Dmob2 在色素細胞發育的早期會先表現於錐狀細胞以及色素細胞，到了成蛹後 26 小時，主要表現於色素細胞。游標尺為 5 $\mu$ m。

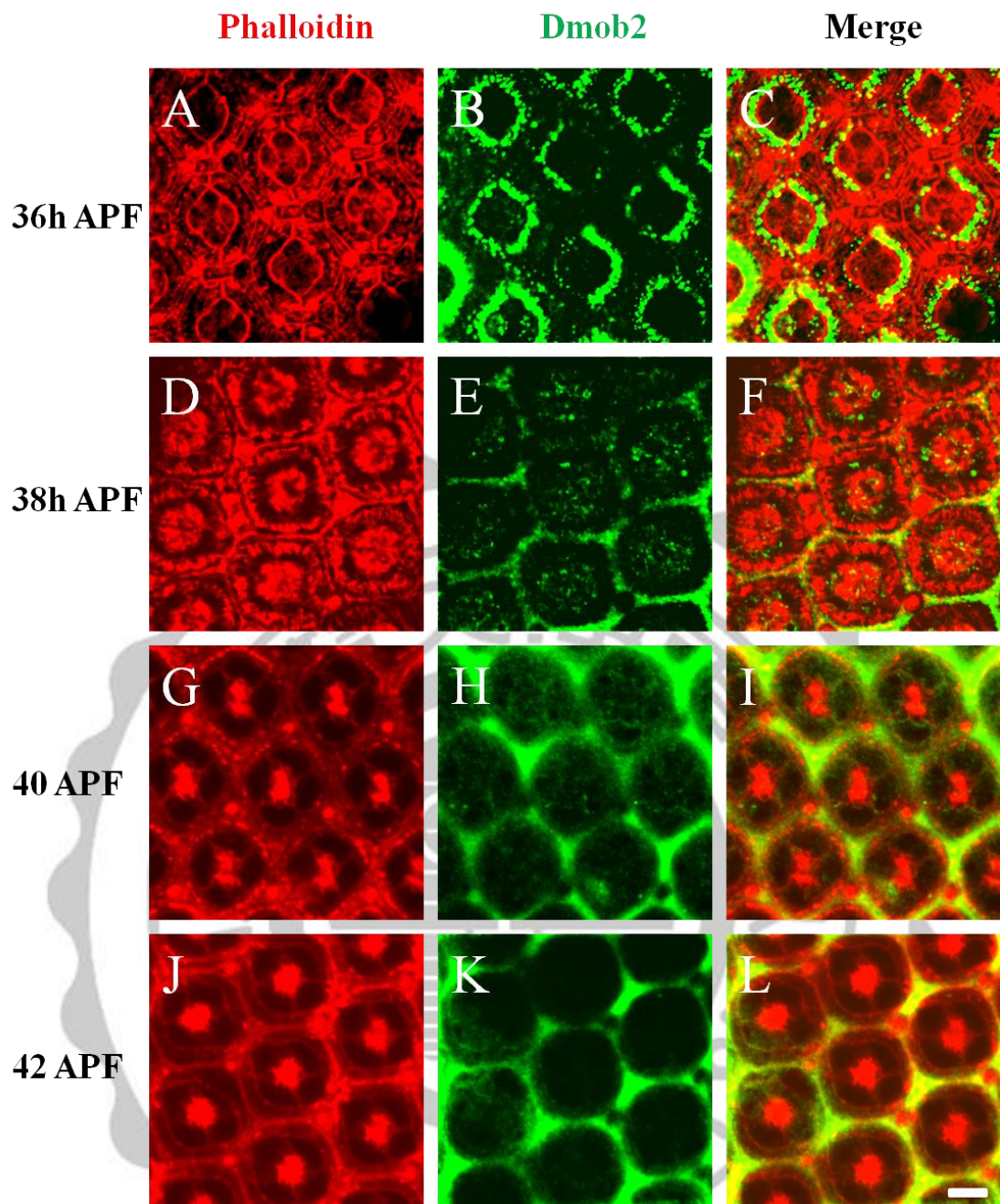


圖三、Dmob2 蛋白在色素細胞發育中期表達的位置。於 28 APF (圖 A、B 與 C)、30h APF (圖 D、E 與 F)、32 APF (圖 G、H 與 I) 及 34 APF (圖 J、K 與 L) 解剖果蠅眼睛，並進行組織免疫染色。Phalloidin 抗體染色表示紅色(圖 A、D、G 與 J)，Dmob2 抗體染色表示綠色 (圖 B、E、H 與 J)，Merge 表示 Phalloidin 與 Dmob2 合圖 (圖 C、F、I 與

L)。染色結果表示在成蛹後 28 小時，Dmob2 蛋白會在錐狀細胞以及所有色素細胞 (圖 A、B 與 C)；當成蛹後 30 小時，Dmob2 蛋白的表現位置主要在剛毛細胞的外圍 (圖 D、E 與 F)；而成蛹後 32 小時，Dmob2 蛋白的表現位置與 30 小時相同，位於剛毛細胞的外圍 (圖 G、H 與 I)；於成蛹後 34 小時，Dmob2 蛋白表現一樣不變 (圖 J、K 與 L)；顯示出 Dmob2 在色素細胞發育的中期會先表現於錐狀細胞以及色素細胞，到了成蛹後 30 小時，主要表現於剛毛細胞的外圍。游標尺為 5 $\mu$ m。

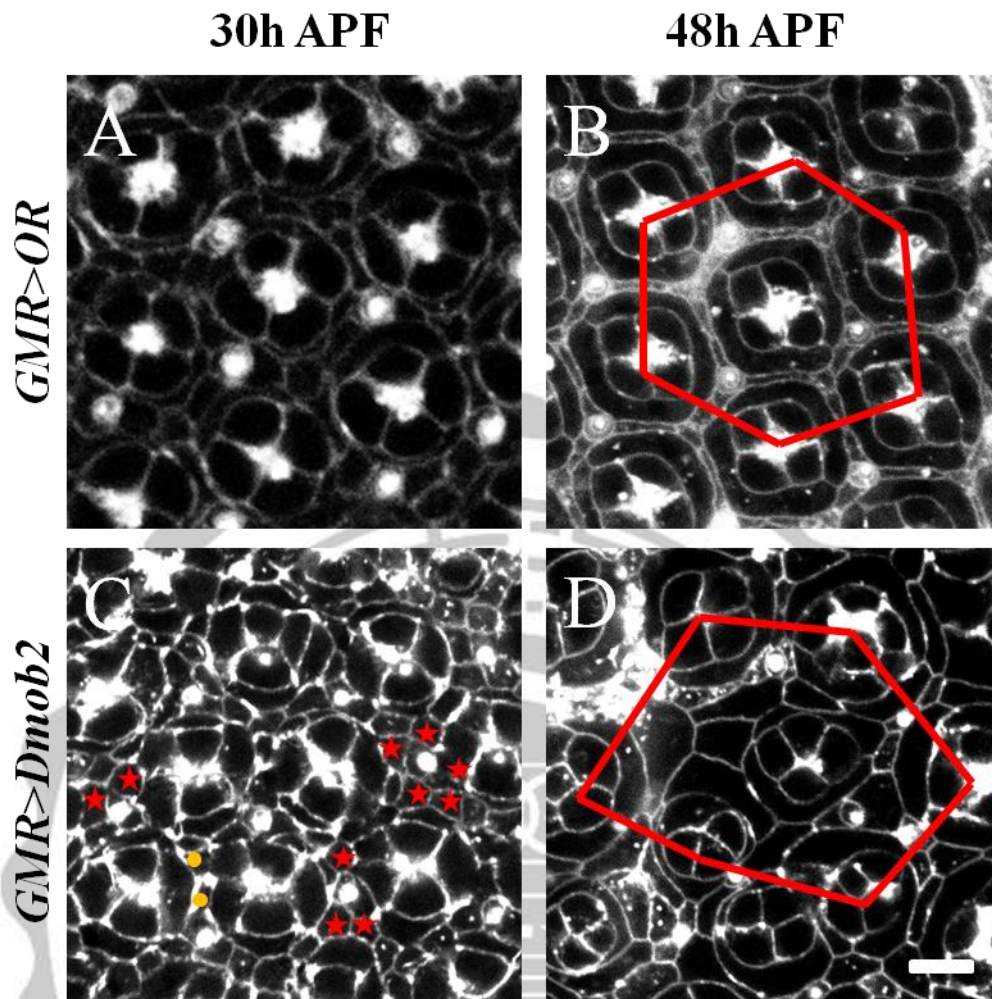






圖四、Dmob2蛋白在色素細胞發育晚期表達的位置。於36 APF (圖 A、B 與 C)、38h APF (圖 D、E 與 F)、40APF (圖 G、H 與 I) 及 42 APF (圖 J、K 與 L) 解剖果蠅眼睛，並進行組織免疫染色。Phalloidin 抗體染色表示紅色(圖 A、D、G 與 J)，Dmob2 抗體染色表示綠色 (圖 B、E、H 與 J)，Merge 表示 Phalloidin 與 Dmob2 合圖 (圖 C、F、I 與 L)。

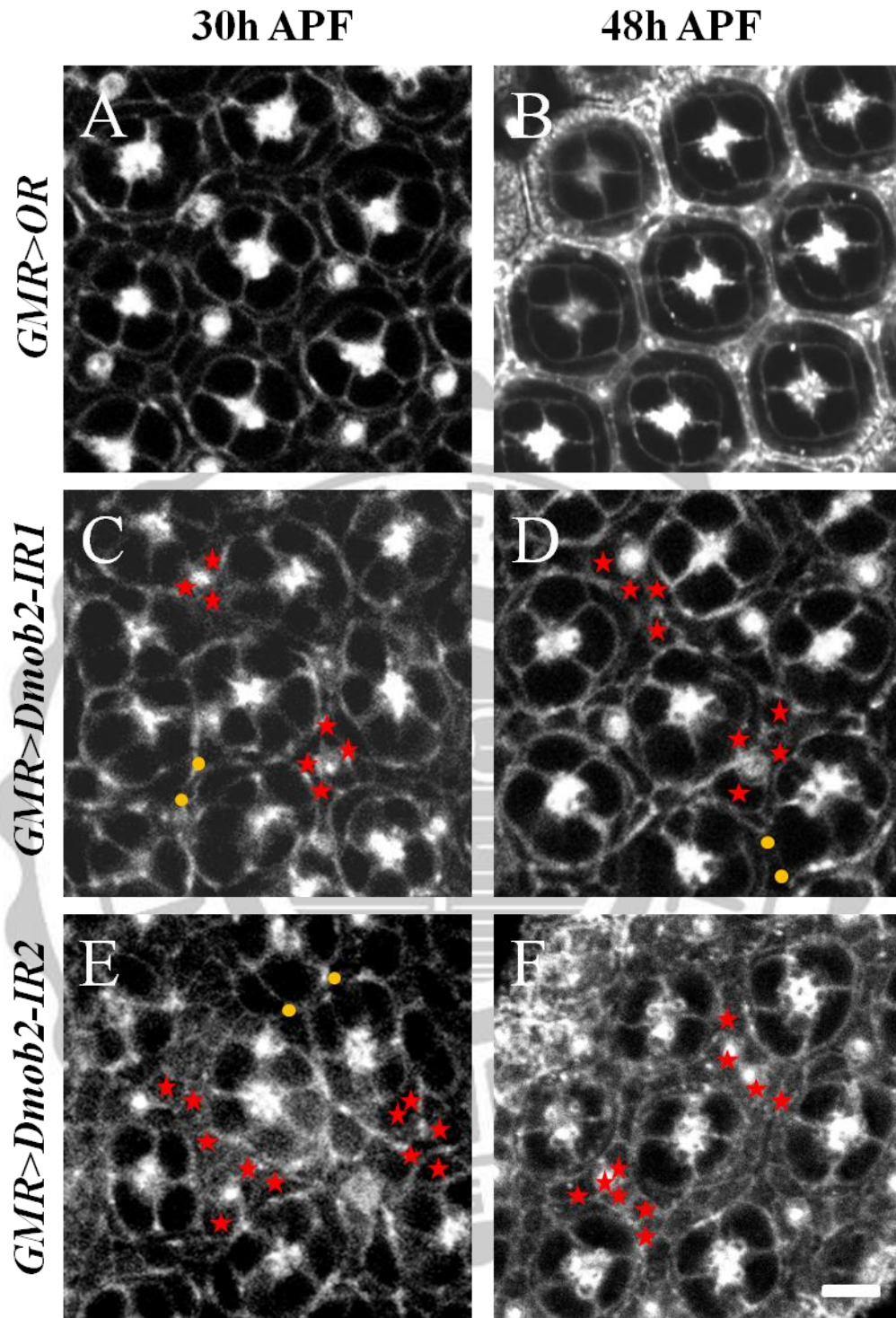
染色結果表示在成蛹後 36 小時，Dmob2 蛋白會集中表現在一級色素細胞以及少量在二級與三級色素細胞 (圖 A、B 與 C)；當成蛹後 38 小時，Dmob2 蛋白的表現位置主要在二級色素細胞與三級色素細胞 (圖 D、E 與 F)；而成蛹後 40 小時，Dmob2 蛋白的表現位置與 38 小時相同，在二級色素細胞與三級色素細胞 (圖 G、H 與 I)；於成蛹後 42 小時，Dmob2 蛋白表現與前面相同，在二級與三級色素細胞 (圖 J、K 與 L)；顯示出 Dmob2 在色素細胞發育的晚期會集中表現在一級色素細胞以及少量在二級與三級色素細胞，到了成蛹後 38 小時後，則主要表現於二級色素細胞與三級色素細胞。游標尺為 5 $\mu$ m。



圖五、大量 Dmob2 蛋白觀察果蠅色素細胞發育中期以及發育完全後的排列。在發育的中期成蛹後 30 小時與發育後成蛹後 48 小時，利用 *GMR-Gal4* 大量表現 Dmob2 蛋白並以 Phalloidin 抗體染色觀察，大量表現 Dmob2 蛋白表現 (圖 C 與 D) 與對照組 (圖 A 與 B) 觀察，以紅色星星代表果蠅眼睛色素細胞數目增加，黃色圓圈代表細胞數目減少。在成蛹後 30 小時進行觀察，發現大量表現 Dmob2 會使色素細胞增加以及減少 (圖 C)，而在成蛹後 48 小時進行觀察，發現色素細胞的排

列變成多邊形 (圖 D)，而非六邊形 (圖 B)。結果顯示在 Dmob2 蛋白大量表現後眼睛的排列與對照組相比，眼睛的排列變的不整齊，小眼間細胞數目有異常的現象。游標尺為  $5\mu\text{m}$ 。

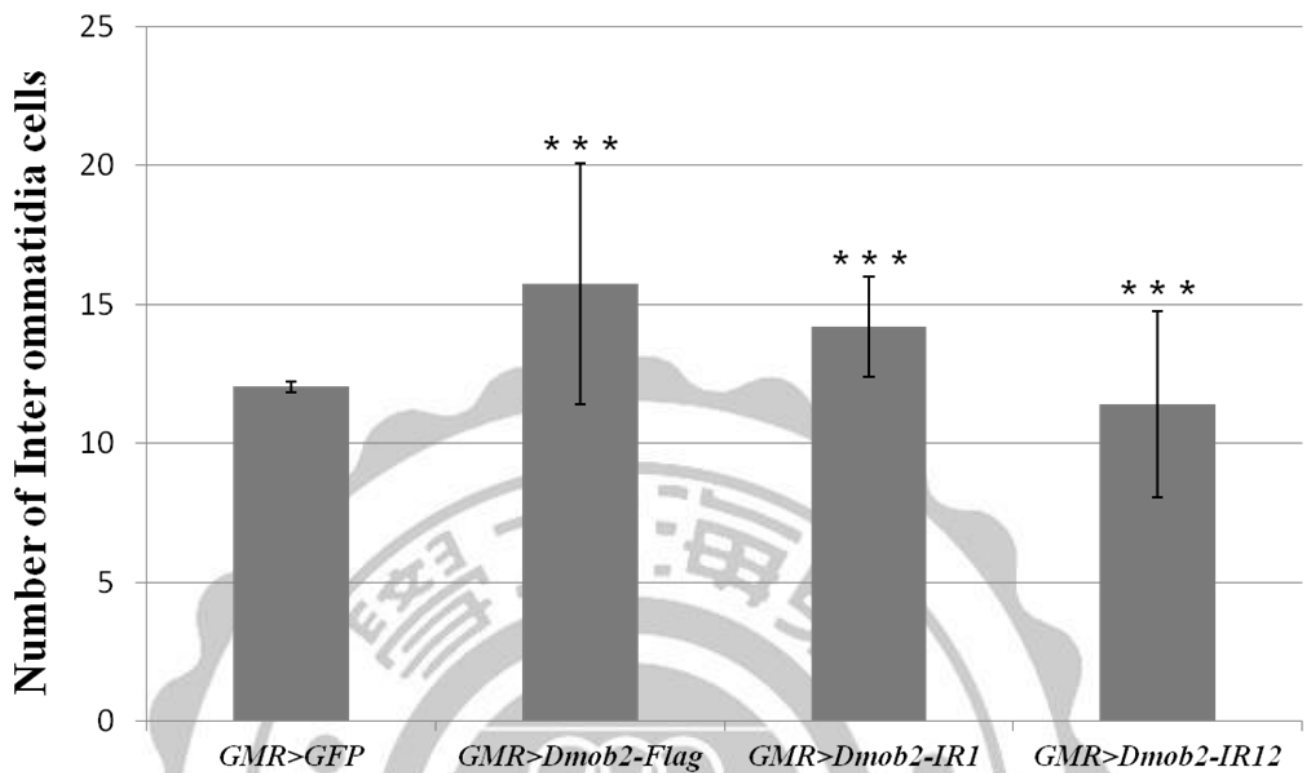




圖六、降低 Dmob2 蛋白的表現觀察果蠅色素細胞發育中期以及發育完全後的排列。在發育的中期成蛹後 30 小時與發育後成蛹後 48 小時，以 *GMR-Gal4* 利用 RNAi 降低 Dmob2 蛋白表現並以 Phalloidain 抗體

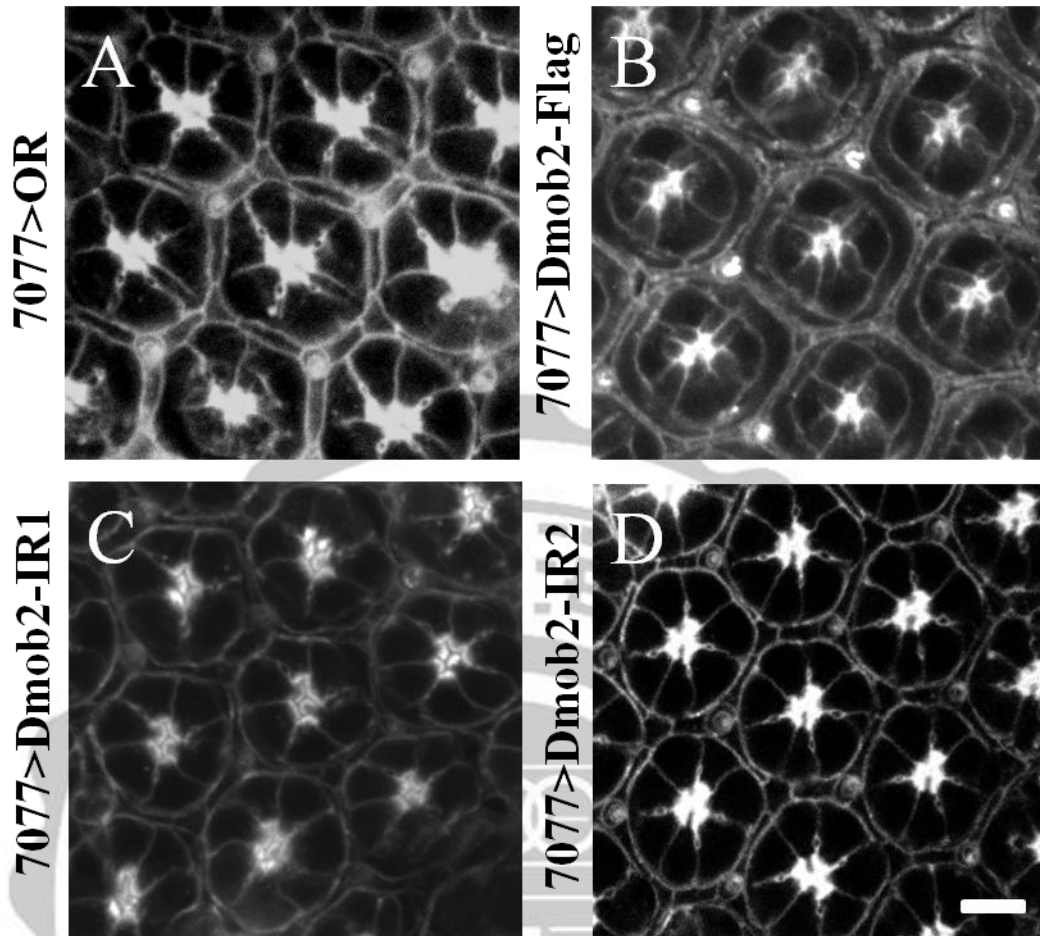
染色觀察，降低 Dmob2 蛋白表現 (圖 E、F、G 與 H) 與對照組 (圖 A 與 B) 觀察，以紅色星星代表果蠅眼睛的色素細胞數目增加，黃色圓圈代表細胞數目減少，當減少 Dmob2 的表現後不論是成蛹後 30 小時或是呈用後 48 小時，都可以觀察到色素細胞有增多及減少的趨勢。而結果顯示在調控 Dmob2 蛋白表現後眼睛的排列與對照組相比，眼睛的排列變的不整齊，小眼間細胞數目有異常的現象。游標尺為 5 $\mu$ m。





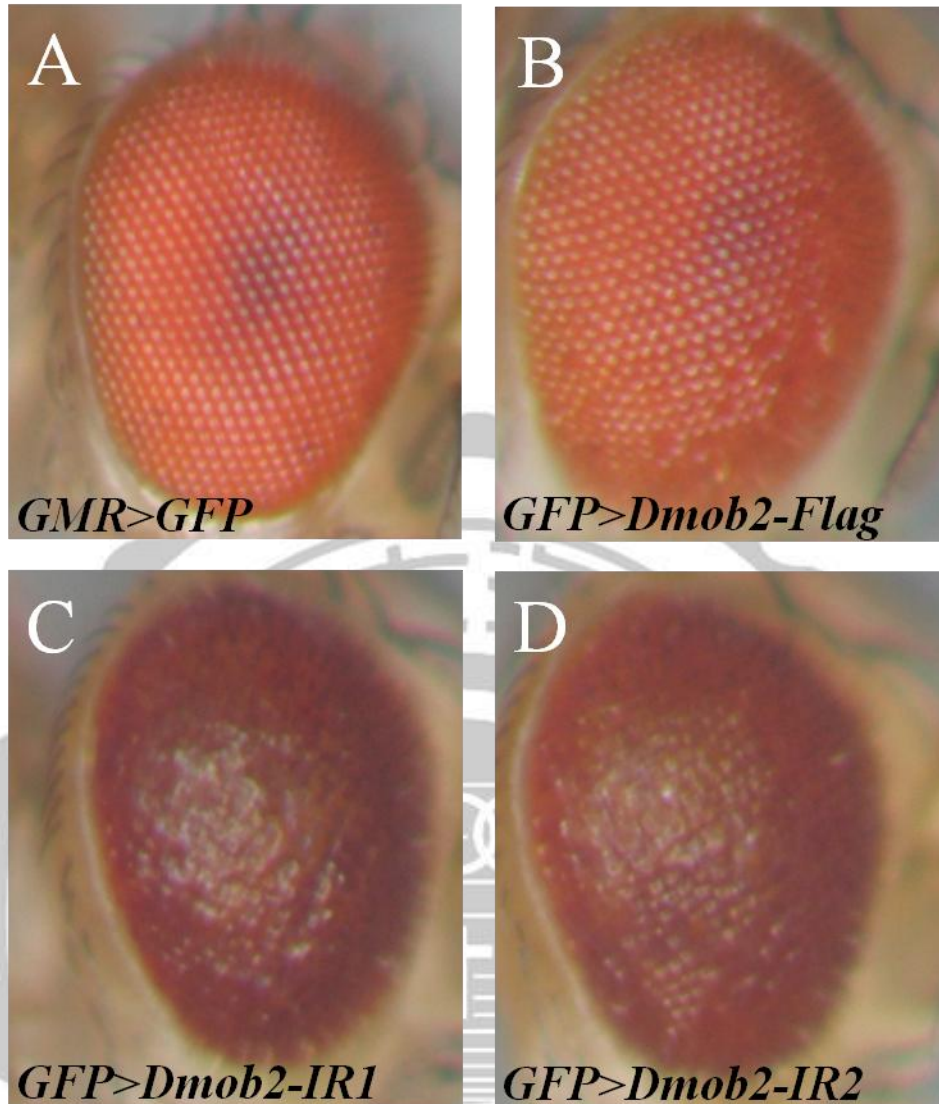
圖七、調控 Dmob2 蛋白的表現會導致小眼間細胞數目異常。X 軸顯示三種果蠅，Y 軸為小眼間細胞數目。將 *GMR>GFP* 分別與 *GMR>Dmob2-Flag*、*GMR>Dmob2-IR1* 及 *GMR>Dmob2-IR2* 的小眼間細胞數目量化的結果，利用 One-way ANOVA 進行分析，顯示出三種果蠅的小眼間細胞數目都有明顯增加。

\* : P-value<0.05 。\*\* : P-value<0.01 。\*\*\* : P-value<0.001

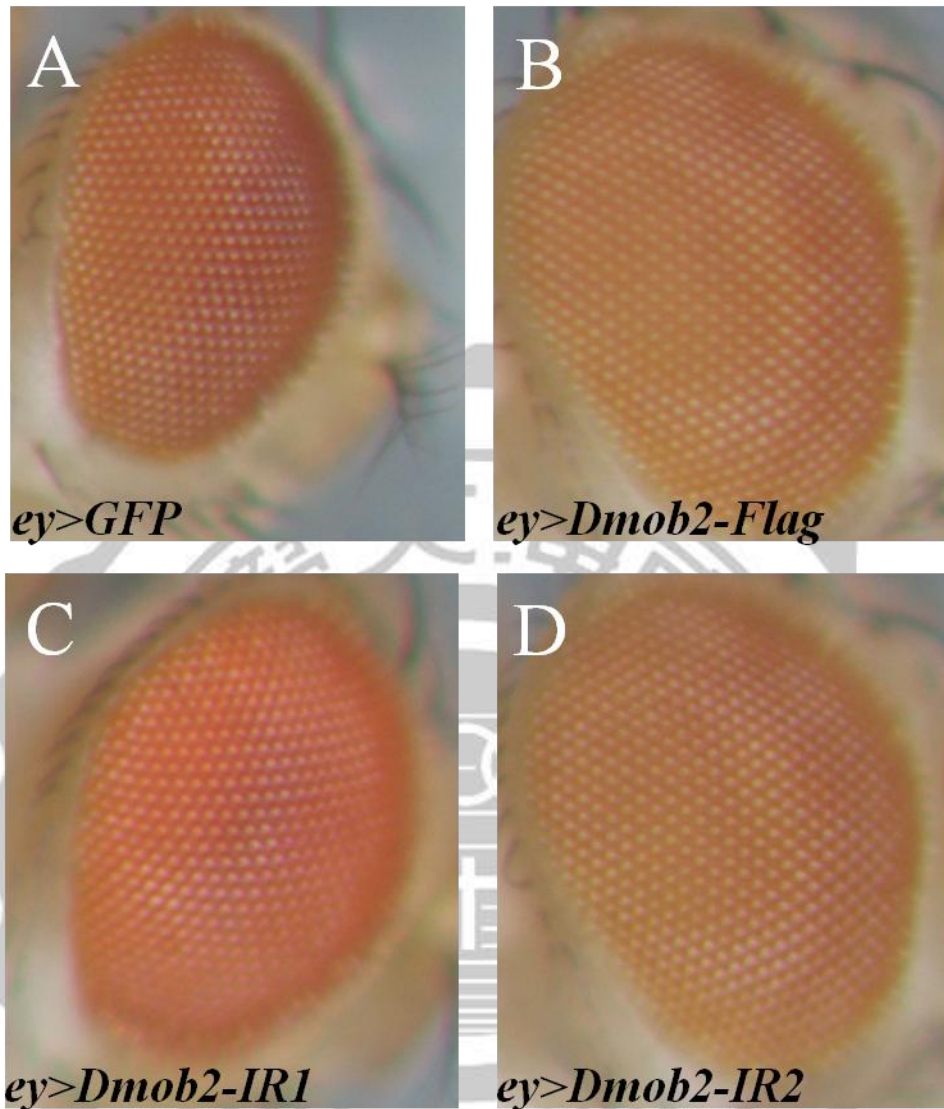


圖八、在果蠅色素細胞發育後調控 Dmob2 蛋白的表現並不會影響小眼間細胞的排列。利用 7077-Gal4 調控 Dmob2 蛋白表現，在色素細胞發育完後大量表現 Dmob2 蛋白 (圖 B) 或降低 Dmob2 蛋白的表現 (圖 C 與 D)，與對照組相比 (圖 A) 並無差異，在眼睛的排列上是成六邊形並切為單排。游標尺為 5 $\mu$ m。

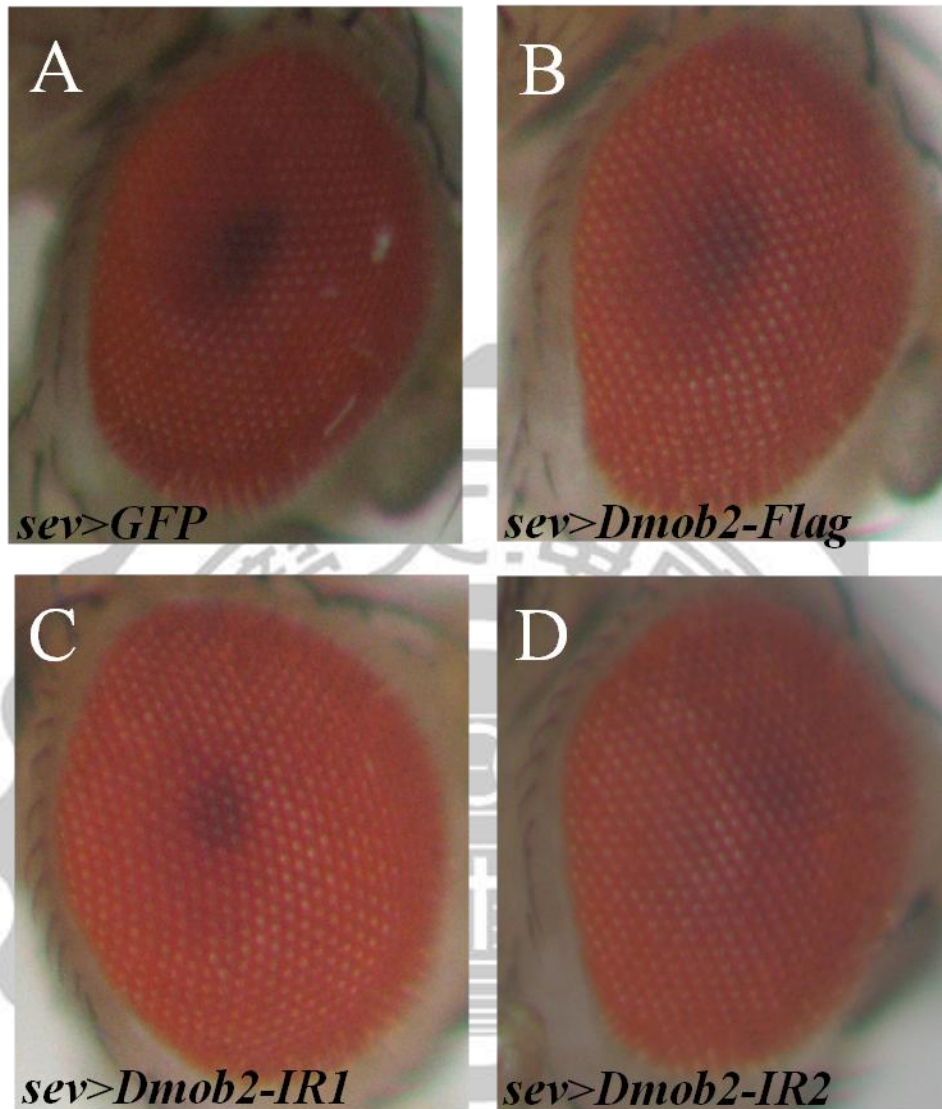




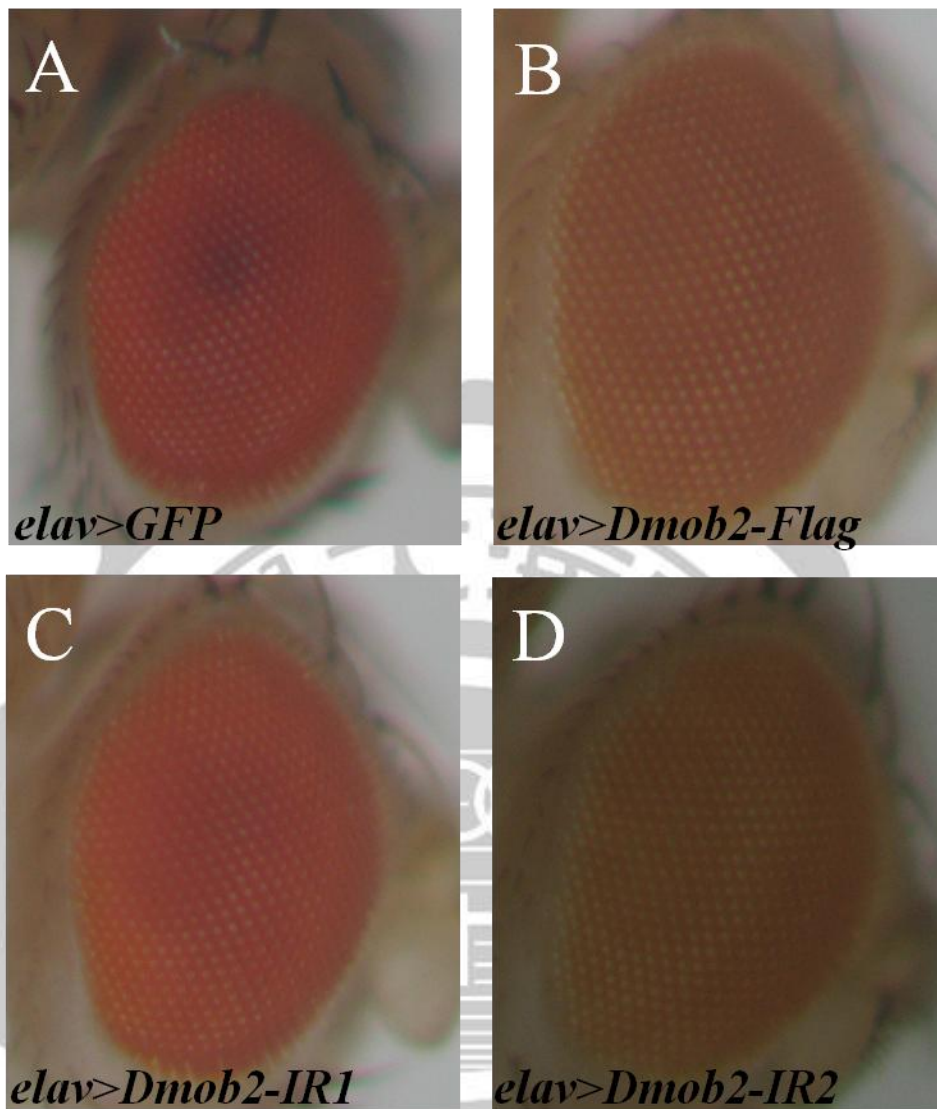
圖九、利用 *GMR-Gal4* 調控 *Dmob2* 蛋白的表現會影響果蠅成蟲眼睛的型態。*GMR>Dmob2-Flag* 為大量表現 *Dmob2* 蛋白 (B)，當 *GMR-Gal4* 大量表現 *Dmob2* 蛋白後，比起對照組 *GMR>GFP* (A)，眼睛外觀較為不平整。以 *GMR>Dmob2-IR1* 與 *GMR>Dmob2-IR2* 降低 *Dmob2* 蛋白表現後，會造成粗糙眼 (C 與 D)。



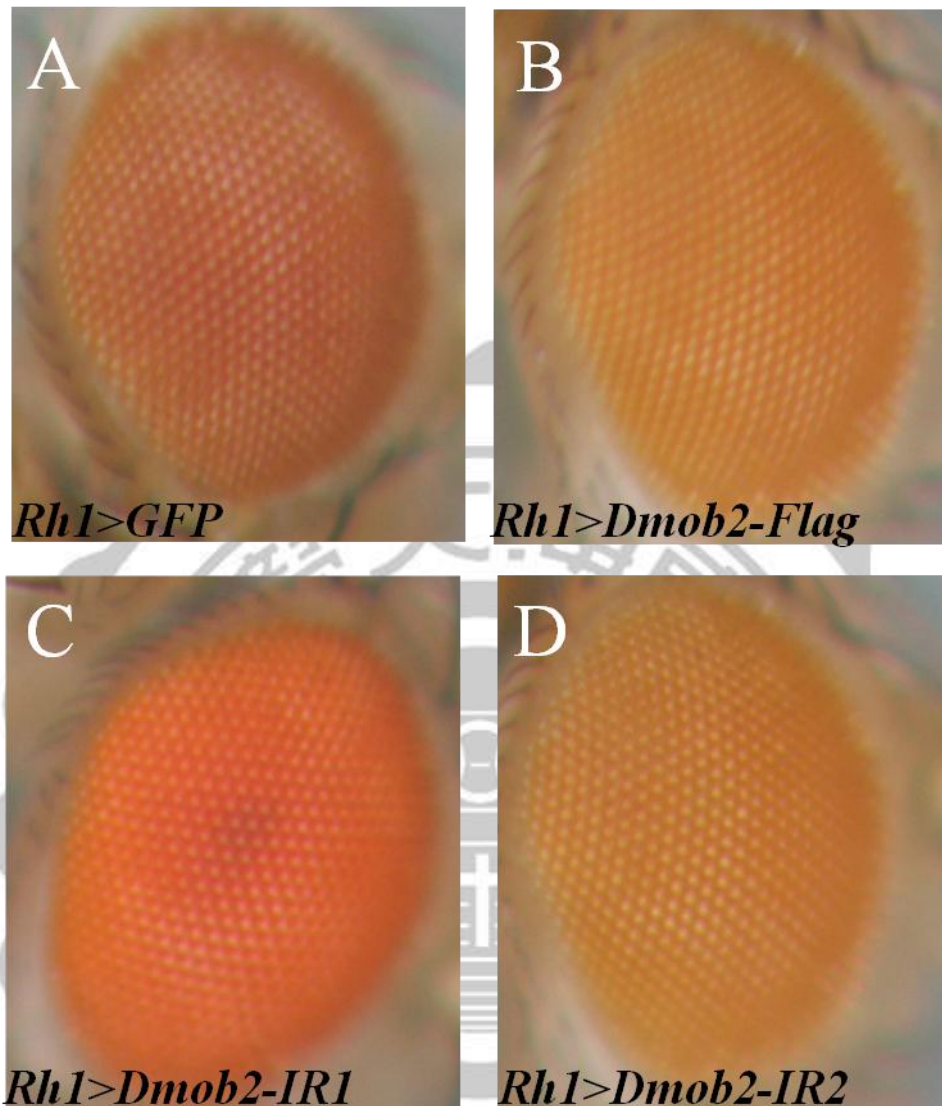
圖十、利用 *ey-Gal4* 調控 *Dmob2* 蛋白的表現會影響果蠅成蟲眼睛的型態。以 *ey>Dmob2-Flag* 大量表現 *Dmob2* 蛋白 (圖 B)，當 *ey-Gal4* 大量表現 *Dmob2* 蛋白後，眼睛外觀相似於對照組 *ey>GFP* (圖 A)。而以 *ey>Dmob2-IR1* 與 *ey>Dmob2-IR2* 降低 *Dmob2* 蛋白表現後 (圖 C 與 D)，果蠅眼睛的外觀與對照組相同。



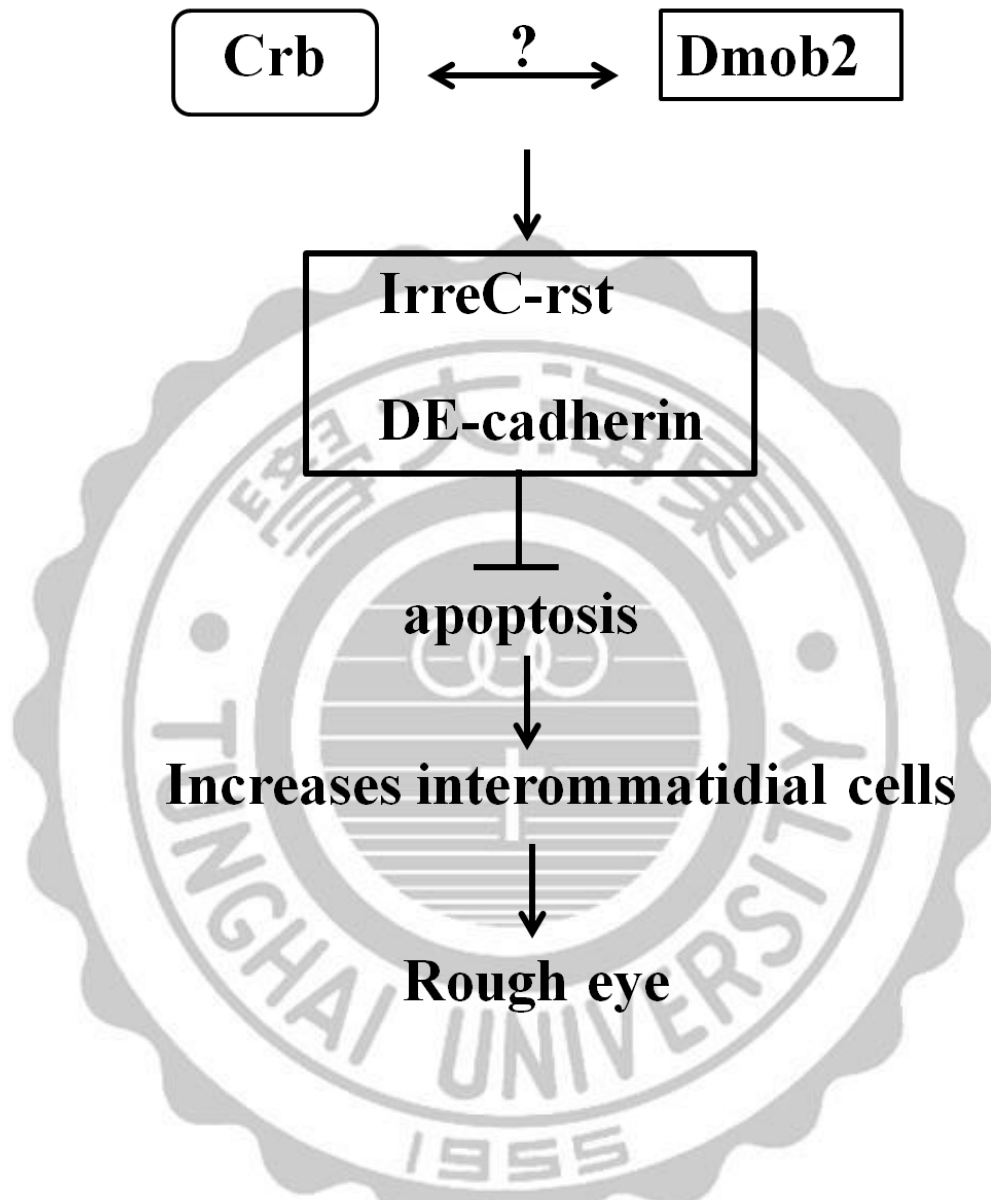
圖十一、利用 *sev-Gal4* 調控 *Dmob2* 蛋白的表現會影響果蠅成蟲眼睛的型態。以 *sev>Dmob2-Flag* 大量表現 *Dmob2* 蛋白 (圖 B)，當 *sev-Gal4* 大量表現 *Dmob2* 蛋白後，眼睛外觀相似於對照組 *sev>GFP* (圖 A)。而以 *sev>Dmob2-IR1* 與 *sev>Dmob2-IR2* 降低 *Dmob2* 蛋白表現後 (圖 C 與 D)，果蠅眼睛的外觀與對照組相同。



圖十二、利用 *elav-Gal4* 調控 *Dmob2* 蛋白的表現會影響果蠅成蟲眼睛的型態。以 *elav>Dmob2-Flag* 大量表現 *Dmob2* 蛋白 (圖 B)，當 *elav-Gal4* 大量表現 *Dmob2* 蛋白後，眼睛外觀相似於對照組 *elav>GFP* (圖 A)。而以 *elav>Dmob2-IR1* 與 *elav>Dmob2-IR2* 降低 *Dmob2* 蛋白表現後 (圖 C 與 D)，果蠅眼睛的外觀與對照組相同。



圖十三、利用 *Rh1-Gal4* 調控 *Dmob2* 蛋白的表現會影響果蠅成蟲眼睛的型態。以 *Rh1>Dmob2-Flag* 大量表現 *Dmob2* 蛋白 (圖 B)，當 *Rh1-Gal4* 大量表現 *Dmob2* 蛋白後，眼睛外觀相似於對照組 *Rh1>GFP* (圖 A)。而以 *Rh1>Dmob2-IR1* 與 *Rh1>Dmob2-IR2* 降低 *Dmob2* 蛋白表現後 (圖 C 與 D)，果蠅眼睛的外觀與對照組相同。



圖十四、推測 Dmob2 蛋白對色素細胞影響的模式圖。推測 Dmob2 蛋白與 Crb 蛋白在色素細胞發育時相互作用，進而影響 IrreC-rst 蛋白與 DE-cadherin 蛋白的表現位置，接著抑制色素細胞的凋亡，造成小眼間細胞數目增加，最後使果蠅成蟲的眼睛變成不規則的外型。

## 個人資料

中文姓名：萬雅玄

英文姓名：Ya-Hsuan Wan

出生日期：1988 年 7 月 15 日

戶籍地址：台中市北屯區松安里松和街 56 號 6 樓

聯絡電話：(家) (04)22462476

(手機) 0931554328

電子信箱：ccc7152000@hotmail.com

學歷：

亞洲大學生物資訊系 (2006-2010)

東海大學生命科學系生物醫學組碩士班 (2010-2012)

經歷：

東海大學生命科學系普通生物學實驗兼任助教 (2010)

東海大學生命科學系微生物實驗兼任助教 (2010)

東海大學生命科學系普通生物學教學助理 (2011)

東海大學生命科學系普通生物學實驗兼任助教 (2011)