

氏名	小久保 博 樹
学位（専攻分野）	博士（理学）
学位記番号	総研大甲第91号
学位授与の日付	平成6年3月24日
学位授与の要件	生命科学研究科 分子生物機構論専攻 学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	カイコ <i>Bombyx mori</i> 絹糸腺発生過程におけるホメオ ティック遺伝子発現パターンの解析
論文審査委員	主 査 教 授 鈴 木 義 昭 教 授 江 口 吾 朗 教 授 長 濱 嘉 孝

## 論文内容の要旨

昆虫の体は、基本的に体節の繰り返し構造より成り立っている。発生過程の初期には形態的によく似た体節構造が顕在化し、後の段階で各体節に固有の構造へと分化していく。これら形態形成の過程は、種々の遺伝子の時間的、空間的な発現のネットワークによって実現されると考えられる。まず、体節化の過程には、母性効果を示す遺伝子と分節化遺伝子の両方の機能が作用し、各体節の特異性は、ホメオティック遺伝子の選択的発現と体節形成に関わる遺伝子の相互作用に基づいて決定すると考えられる。今日までに、ホメオティック遺伝子は多数同定され、アンテナペディア遺伝子群及びバイソラックス遺伝子群とそれに関連する遺伝子についての研究が特に進んでいる。ホメオティック遺伝子産物には、そのアミノ酸配列中に60残基にわたって極めて相同性の高い領域が存在している。その領域は DNA結合活性を有しており、ホメオティック遺伝子が転写因子として機能していると考えられ、それを示す多くの知見が得られている。

最近、*Drosophila*を用いた研究で、ホメオティック遺伝子と器官形成との関連性が示されてきている。例えば、アンテナペディア遺伝子群の中の Sex combs reduced (Scr) が唾腺形成に影響することが報告されている。唾腺は、Scr の発現する下唇体節の表皮細胞より陥入して形成されるが、Scr を欠く突然変異株では唾腺が形成されないことや、Scr を任意の時期に一過的に発現させると付加的に唾腺が形成されることなどから、Scr は唾腺形成に必要な遺伝子発現カスケードの上位に位置し、唾腺形成を誘導すると考えられる。*Bombyx*の絹糸腺は、*Drosophila*の唾腺の形成される体節と同じ体節から陥入形成される。*Bombyx*の絹糸腺の形成や、フィブロインやセリシンといった終末遺伝子発現経路でもホメオティック遺伝子が重要な働きをしていると考えられるので、顎部で発現していると予想される Deformed (Dfd) および Scr のホモログ遺伝子（以下 Bm Dfd 及び Bm Scr と略する）に注目して研究を展開することにした。

まず、Bm Dfd 及び Bm Scr のゲノム断片をクローニングした。Bm Scr のホメオボックス領域付近のゲノム断片はすでに得られていたので (K. Ueno, 未発表)、それを出発材料として利用することにした。Bm Dfdについては、ホメオボックス内のよく保存された領域に対応する配列をプライマーとして PCR法で遺伝子を増幅し、塩基配列を確認した。これを基に、Bm Dfd配列のプライマー領域を含まない66bpのオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブとして*Bombyx*のゲノムライブラリーをスクリーニングし、Bm Dfdのゲノムクローンを得た。

Bm Dfd 及び Bm Scr のホメオボックス付近の塩基配列を決定した。ホメオボックスを *Drosophila*と比較すると、Bm Dfdは60残基中 1残基異なる98.3%の相同性を示し、Bm Scrは100%の相同性を示した。ホメオボックスの3'下流約300bpの領域をサブクローニングし、この領域をプローブとして、発生初期から孵化までのBm DfdとBm Scr転写産物の発現の経時的变化をノーザンハイブリダイゼーション法で調べた。Bm Dfd転写産物の大きさは約2.8kbで、産卵後24時間に発現が開始し、36時間で最高となり、その後減少していく。Bm Scr転写産物の大きさは約3.6kbで、産卵後36時間で発現し始めて4日目で最高となり、その発現は孵化する時期まで続いていた。

Bm DfdとBm Scr転写物がともに強く発現している4日目胚からcDNAライブラリーを作製

し、ノーザンブロット解析で用いたプローブでスクリーニングし、クローンを得て、塩基配列を決定した。Bm DfdのcDNAは、1200bpのオープンリーディングフレーム(ORF) 含み、400アミノ酸のタンパク質をコードする。Drosophilaと比較すると、98.3% 相同のホメオボックス領域以外にも、N 末端領域や、ホメオボックスをはさんでN 末端側 YPWM 配列を含む26残基で、またC 末端側12残基にわたって高いホモロジーがある。また、アミノ酸レベルでDrosophilaと異なっているものの、酸性領域が存在する。Bm ScrのcDNAは1071bpのORFを含み、357アミノ酸のタンパク質をコードする。Drosophilaと比較すると、100% 相同のホメオボックス以外にも、N末端領域で類似配列がみられ、ホメオボックスをはさんで N末端側はYPWM配列を含む24残基の領域で、また C末端側は全領域にわたってよく保存されていた。

Bm Dfd 及び Bm Scr の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法で観察すると、体節化が起こる時期にはBm Dfdは大顎及び小顎体節で、Bm Scrは下唇体節でパラセグメントな発現を示した。そして、絹糸腺が陥入形成される胚体短縮期にはBm Scrが下唇体節の表皮に発現しているが陥入部で発現が消失し、伸長形成される時期の絹糸腺でも発現されていなかった。

さらに、絹糸腺形成過程の遺伝子カスケードでBm Scrの下位に位置すると考えられ、セリン遺伝子の組織特異的転写因子と考えられているPOU-M1/SGF 3と、Drosophilaの唾腺で特異的に発現されているfork head 遺伝子ホモログ(Bm fkh)の発現を解析した。すると、POU-M1/SGF 3が、Bm Scrの発現の消失する絹糸腺陥入部分で発現することが認められ、伸長形成される時期の絹糸腺でも発現されていた。また、Bm fkhが、伸長形成している時期の絹糸腺で発現していることを確認した。これらの結果は、ホメオティック遺伝子であるBm Scr が組織特異的転写因子と考えられているPOU-M1/SGF 3と互いに制御し合いながら陥入位置や組織分化の方向を決定し、さらにBm fkhなどの下位の遺伝子群を活性化して腺形成を誘導するような、絹糸腺を形成する遺伝子カスケードが存在する可能性を示唆するものである。

## 論文の審査結果の要旨

小久保博樹君は、カイコ Bombyx mori 絹糸腺の発生・分化に関わる遺伝子群の発現パターンを解析した。

まず、Deformed の Bombyx ホモログおよび Sex combs reduced の Bombyx ホモログのゲノム DNA 断片を得、次いでフルサイズ cDNA をクローニングし、その構造決定を行って、ホモログとして同定した。次いでカイコ胚発生過程におけるこれらの遺伝子の発現状況を in situ hybridization の技法により解析した。その結果、Bombyx Sex combs reduced が、絹糸腺の陥入形成される下唇節に特異的に発現されること、やがてこの陥入形成部域からは発現が消失することを明らかにした。

さらに、研究部門のメンバーとの共同により、中部絹糸腺特異的なセリシン-1遺伝子の転写制御因子遺伝子 POU-M1 が、上記の消失を相補した形で陥入形成部域に特異的に発現されることを見いだした。また、他のメンバーとの共同により fork head の Bombyx ホモログが、絹糸腺の成長過程でその後部絹糸腺に対応すると思われる部分に発現されることを明らかにした。

最後に、これらを総括して、絹糸腺発生・分化に関与する遺伝子群の制御カスケードについてのモデルを提唱した。

解析は適正かつ厳密になされており、カスケードモデルの提唱は興味深いものであり、かつ関連諸領域の知識も十分である。

審査委員会では、研究結果についての口頭発表の後、内容についての試問を行い、良好であると判断した。次いで、胚発生過程における遺伝子発現制御ヒエラルキーおよび制御ヒエラルキーの進化的側面に関する基礎知識について試問を行い、適正な解答が得られた。

また、英語の学力については重要論文に関する読解力から十分であると判断した。

以上の結果を総合的に判断して、本論文は学位を授与するにふさわしいものであると審査委員会で判定した。