

絹糸腺発生過程における *Bm trachealess* および *POU-M1 / SGF-3* の解析

松浪 勝義

総合研究大学院大学生命科学研究科分子生物機構論専攻

目次

| | |
|---|-------|
| 第 1 章. 序論 | - 3 |
| 第 2 章. 方法 | - 7 |
| 第 3 章. 結果 | - 1 1 |
| 3 - 1. sericin-1 遺伝子の転写物の発現解析 | - 1 1 |
| 3 - 2. 抗 POU-M1 / SGF-3 モノクローナル抗体の調製 | - 1 2 |
| 3 - 3. sericin-1 遺伝子の発現期における POU-M1 / SGF-3 の発現解析 | - 1 2 |
| 3 - 4. 抗 POU-M1 / SGF-3 抗体による immunohistochemistry と Hoechst 染色による絹糸腺の発生過程の解析 | - 1 3 |
| 3 - 5. <i>Bm trh</i> cDNA のクローニングと塩基配列決定 | - 1 4 |
| 3 - 5 - 1. <i>Bm trh</i> 断片の PCR クローニング | - 1 4 |
| 3 - 5 - 2. 全 ORF を含む cDNA の単離と構造解析 | - 1 5 |
| 3 - 6. <i>in situ</i> ハイブリダイゼーションによる <i>Bm trh</i> 遺伝子転写物の発現解析 | - 1 6 |
| 第 4 章. 考察 | - 1 7 |
| 4 - 1. POU-M1 / SGF-3 因子と sericin-1 遺伝子転写についての考察 | - 1 7 |
| 4 - 2. <i>Bm trh</i> は <i>trh</i> のホモログ遺伝子である | - 1 8 |
| 4 - 3. <i>Drosophila</i> 唾腺と <i>Bombyx</i> 絹糸腺の相違点についての考察 | - 1 9 |
| 謝辞 | - 2 2 |
| 参考文献 | - 2 3 |
| 図 | - 2 6 |

相互に関連して複雑なネットワークを構築し、時間的・空間的に重なり合いながら発現する発生制御遺伝子の働きは、器官の発生や細胞の表現型を決定する。これら制御遺伝子に由来する因子の多くは、配列特異的 DNA 結合蛋白であり、器官の特定の細胞の表現型を定義するための遺伝子プログラムを活性化し、最終的に組織特異的な終末遺伝子の発現を引き起こすことが示されてきている (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980; Sternberg and Horvitz, 1984; Akam, 1987; Gehring, 1987; Ingham, 1988; Scott et al., 1989; Olson, 1990)。器官の発生過程を理解するには、その器官に特徴的な上位の発生制御因子から、分化した組織を特徴づける組織特異的終末遺伝子の発現に至るまでのカスケードの全貌を明らかにすることが重要だと考えられる。

Bombyx mori 絹糸腺は、組織特異性の研究にとって良いモデル系と考えられる。絹糸を構成する fibroin 蛋白質をコードする mRNA や遺伝子が一早く単離され (Suzuki and Brown, 1972; Ohshima and Suzuki, 1977)、ついで組織特異的転写制御機構を解析しようとする多くの試みに先駆けて、組織を用いた無細胞転写系が確立され (Tsuda and Suzuki, 1981)、fibroin 遺伝子や sericin-1 遺伝子といった遺伝子が *in vitro* でも組織特異性を反映して転写されることが示されてきた (Suzuki et al., 1986, 1990)。さらに、中部絹糸腺特異的に発現する sericin-1 遺伝子の発現を制御する上流シス配列が解析され、Silk Gland Factor (SGF-1~4) が同定された。SGF-1 と SGF-3 はそれぞれ SA および SC サイトに結合する因子で、SA および SC を欠失させると *in vitro* 転写能が減少することから、これらの因子は sericin-1 遺伝子の転写制御に重要であることが示されてきた (Matsuno et al., 1989, 1990; Hui et al., 1990)。その後、SGF-1 は、Fork head (Fkh) の *Bombyx* ホモログとして同定され、*Bombyx* Fkh / SGF-1 と命名された (Mach et al., 1995)。また、SGF-3 は、POU ファミリー因子としてクローニングされ、POU-M1 / SGF-3 と命名された (Fukuta et al., 1993)。POU-M1 / SGF-3 は、POU ドメインの同一性から、*Drosophila* dopa decarboxylase 遺伝子の C エlement 結合因子である Cf1a (Johnson and Hirsh, 1990) のホモログと考えられている。

中部・後部絹糸腺から核抽出物を調製し、SA、SCサイトをプローブにしたゲルシフト解析による定量の結果、SAサイトに結合する Bm Fkh / SGF-1 は、中部・後部絹糸腺の抽出液中にはほぼ等量存在するのに対して、SCサイトに結合する POU-M1 / SGF-3 は、中部絹糸腺抽出液中に圧倒的高濃度に存在することがわかり、sericin-1 が中部絹糸腺特異的に転写される遺伝子であることに対応していることが示された (Matsuno et al., 1989, 1990; Hui et al., 1990)。また、sericin-1 プロモーターに SA または SC サイトを 5 個タンデムに連結した改変遺伝子プロモーターの、無細胞転写系での転写活性を調べたところ、SA を連結した場合、活性が 3 倍に上がったのに対し、SC を連結した場合、9.5 倍まで上がったことから、SC サイト結合因子である POU-M1 / SGF-3 は、sericin-1 の転写に関して鍵となる因子であることが示されている (Matsuno et al., 1989, 1990; Hui et al., 1990)。しかしながら、実際、POU-M1 / SGF-3 と sericin-1 の発現との間に *in vivo* でどのような相関が見られるのかは明らかでなかった。そこで本研究の一環として、sericin-1 mRNA に対する *in situ* ハイブリダイゼーションと、POU-M1 / SGF-3 に対する immunohistochemistry を行い、発現パターンの解析を行った。

Bombyx 絹糸腺は、*Drosophila* 唾腺と同じく、下唇体節の付属器官であることから (外山, 1909; 布目, 1936)、両者は相同器官であると考えられている。そのため、*Bombyx* 絹糸腺の発生を考慮する際、*Drosophila* 唾腺に関する知見から多くの情報が提供される。

Drosophila 唾腺は、*Sex combs reduced* (*Scr*) の発現する下唇節の表皮細胞から陥入して形成されるが、*Scr* を欠く突然変異体では唾腺が形成されず、*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* が唾腺形成に必要な遺伝子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ている (Panzer et al., 1992)。*Scr* により唾腺形成が誘導された後、唾腺原基はダクト組織と分泌組織とに分化し、陥入形態形成がおこる。分泌組織には、Fkh が特異的に発現し、*fkh⁻ / fkh⁻* の胚では、分泌細胞が陥入することができないまま表皮上にとどまり、やがて消失することから、分泌細胞の発生に重要であることが示されている (Jürgens and Weigel, 1989)。*Bombyx* 絹糸腺についても、*Scr* ホモログがクローニングされ、下唇節での Bm *Scr* の発現が観察されてい

る (H. Kokubo, submitted)。また、*Bombyx Antennapedia* の3' 領域欠失変異 (Nagata et al., 1996) の *Nc/Nc* 変異体 (Itikawa, 1944; 1952) では、*Scr* の発現領域が後方の体節にまで拡大し、その結果、付加的な絹糸腺の陥入が観察されたことから、*Bm Scr* が絹糸腺の形成を誘導していることが示された (H. Kokubo et al., submitted)。また、*Bm Fkh / SGF-1* の発現が解析され、*Fkh* と同様、胚発生の初期に胚帯の末端領域に発現し、前腸、後腸の器官形成中も発現が持続していたほか、絹糸腺については、陥入期から発現が見られ伸長の始めには一様に発現しているが、伸長が進むにつれて、中・後部絹糸腺へと限局する様子が観察された (Kokubo et al., 1996)。

このように、遺伝子レベルで両器官の相同性が理解されつつあるが、*Bombyx* 絹糸腺と *Drosophila* 唾腺の発生過程には明らかな違いが見られる。1つは、*Drosophila* の唾腺がダクト組織と分泌組織の2種の組織からなるのに対して、絹糸腺は、前・中・後部絹糸腺の3つの組織から成り立っていること。もう1つは、唾腺原基細胞は唾腺形成に必要な細胞群がそろった状態で一度に陥入形成がおり、陥入開始後は分裂しないのに対し、絹糸腺は陥入後、細胞分裂を続けながら伸長形成する点で異なっている。この違いを生じさせている理由を知ることは、腺組織の器官発生を考える上で唾腺の研究だけからでは得られない有用な知見を得ることにつながる。最近、*Drosophila* で、気管系、唾腺、posterior spiracles といった外胚葉上皮由来の管状組織の形態形成に重要な遺伝子として *tracheless* (*trh*) がクローニングされて解析された (Isaac and Andrew, 1996; Wilk et al., 1996)。Trh は、気管系での発現の後、唾腺原基全体に発現が開始され、その後、次第に分泌細胞での発現が弱くなり、最終的には、ダクト細胞のみでの限局した発現となる。*trh* 変異体では、ダクト組織が完全に失われるのに対して、分泌組織は正常であったことから、ダクト組織の発生に重要であると考えられている。絹糸腺でも *tracheless* の *Bombyx* ホモログが重要な役割を果たしていると予想され、ダクト組織が絹糸腺ではどの領域に対応するのか、また、絹糸腺が陥入伸長し、ダクト組織がどの時期に分化するのかといった点について、分子的な視点での考察が可能になると考え、本研究で *tracheless* の *Bombyx* ホモログをクローニングし、その発現解析を行った。また、*Cf1a* は、*drifter*、*ventral veinless* として、別々に解

析され、気管系、midline glia、wing veins の発生分化に重要であることが示されているが、*Drosophila* 唾腺には発現の報告がない (Anderson et al., 1995; Celis et al., 1995)。このことは、POU-M1 / SGF-3 が中部絹糸腺に多量に発現していることと大きな相違である。そこで、*Bm trh* に加えて、絹糸腺に特徴的に発現している POU-M1 / SGF-3 についても発現パターンを解析することで、両器官の相違点が分子的に明らかにできるのではないかと考え、本研究に着手した。ここで得られた解析結果と、既に得られている知見を加えて、絹糸腺の発生過程について考察を試みた。

第2章 方法

2-1 動物

Bombyx mori の卵については、商業種である錦秋×鐘和をカネボウシルクエレガンス株式会社（愛知県春日井市）より購入し、25℃で発生させた卵を使用した。

2-2 モノクローナル抗体の調製

POU-M1 / SGF-3 の N 末端領域（1～82 aa; Site A, 62～172 aa; Site B）をコードする DNA 断片を PCR 法で増幅し、pGEX-1 λ T (Pharmacia Biotech) ベクターに組み込み、インストラクションに従って GST-融合タンパク質を生産させ、Glutathion Sepharose 4 B カラム (Pharmacia Biotech) で精製した。精製した融合タンパク質をマウスに 25～50 μ g/each、2 週間インターバルで 4 回免疫した後に脾臓細胞を摘出し、myeloma 細胞 (P3U1) と融合させ、ELISA 法によってスクリーニングした (Harlow and Lane, 1988)。非常に強い titer を示した融合細胞をマウスの腹腔内で増殖させ、腹水を採取し、Poros protein G column (Millipore) でモノクローナル抗体 (mAbA1) を精製した。精製した mAbA1 を western blot 解析並びに immunohistochemistry に用いた。

2-3 poly (A)⁺RNA の調製及び cDNA library の構築

poly (A)⁺RNA の調製は、acid-guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction 法によった (Chomczynski and Sacchi, 1987)。まず卵を、液体窒素中で破碎し、solution D (4 M guanidium thiocyanate, 25 mM sodium citrate (pH 7.0), 0.5 % sarcosyl, 0.1M β -mercaptoethanol) で可溶化した後、1/10 vol. の 2 M sodium acetate (pH 4.1), equal vol. の water saturated phenol, 1/5 vol. の chloroform-isoamylalcohol (49:1) を加えて攪拌した後、氷上で 15 分間静置し、10,000 \times g で 20 分間遠心し、上清を isopropanol 及び、ethanol 沈殿として回収し、粗 RNA 画分とした。さらに 5.7 M CsCl step gradient で 120,000 \times g, 20℃, 20 時間遠心し、精製 RNA 画分とした。poly (A)⁺RNA は、oligo-dT cellulose カラム で精製した。

cDNA library は、cDNA synthesis kit (pharmacia Co.) を用いて作製した。合成した cDNA は、 λ Zap II vector に組み込み、Gigapack II Gold Packaging kit で packaging して cDNA library とした。

2-4 *Bm trh* の cDNA クローニング

trh の *Bombyx* ホモログについては、ステージ 23 の胚から調製した cDNA 50 ng をテンプレートとして、5' - KENYEFYE - 3' (sense) と 5' - CHAEDANR - 3' (anti-sense) のアミノ酸配列に対応する degenerated primers (320 pM / each) を用いて (Fig. 9)、200 μ M / each dNTPs, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 2.5 units Amplitaq DNA polymerase / 100 μ l の反応液中で、94 °C 1 min, 45 °C 1 min, 55 °C 3 min を 1 cycle として 40 cycle 反応させた。遺伝子増幅後、ベクター (pBluescript II KS (-)) にサブクローニングし、塩基配列を決定した。*Drosophila trh* と相同性を確認した後、この領域をプローブとして cDNA library をスクリーニングした。得られたクローンの塩基配列は、オートシーケンサー (ABI Co.) で決定した。

2-5. Northern blot 解析と Southern blot 解析

Northern blot 解析は、各ステージの卵より acid-guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction 法で粗 RNA 画分を得て、さらに 5.7 M CsCl step gradient で 120,000 \times g, 20 °C, 20 時間遠心し得られた精製 RNA 画分を、oligo-dT cellulose カラムにより調製した poly (A)⁺ RNA を 5 μ g / lane で 1 % agarose / 2.2 M formaldehyde ゲル電気泳動法によって分離し、20 \times SSC で nylon membrane へ転写した (Ausubel et al., 1998)。Hybridization は、rapid hybridization system (Amersham) を用いて行った。30 分 65 °C で prehybridization の後、1 \sim 5 \times 10⁶ cpm / ml のプローブを加えて、4 時間インキュベートした。2 \times SSC / 0.1 % SDS 室温で 5 分、0.5 \times SSC / 0.1 % SDS 65 °C で 30 分、さらに 0.1 \times SSC / 0.1 % SDS 65 °C で 30 分 \times 2 回 filter を洗浄し、Image Analyzer で解析した。*Bombyx* cytoplasmic actin のオリゴヌクレオチド 5' - TCCTGTGTACAATGGAGGACCAG - 3' をプローブとして検出されるシグ

ナルを positive control とした (Mounjer and Prudhomme, 1986)。50 °C 4 時間、hybridization buffer (6 × SSC, 5 × Denhardt' s solution, 0.1 % SDS, 250 μg/ml heat denatured salmon testes DNA) 中で prehybridization の後、1~5×10⁶ cpm/ml のプローブを加えて、12 時間インキュベートした。2 × SSC/0.1 % SDS 室温で 5 分、65 °C で 30 分×2 回 filter を洗浄し、Image Analyzer で解析した。

Southern blot 解析は、EcoRI および Hind III で消化した genomic DNA (鐘和) を 20 μg / lane で 0.7 % agarose ゲル電気泳動した後、0.2 N HCl で室温 20 分間インキュベートし、DNA を断片化した。Denaturing soln. (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) で、室温 30 分間変成させ、Neutralizing soln. (0.5 M Tris-HCl (pH7.4), 1.5 M NaCl) で、室温 30 分間平衡化し、20 × SSC で nylon membrane へ転写した。Hybridization は、rapid hybridization system (Amersham) を用いて行った。30 分 65 °C で prehybridization の後、1~5 × 10⁶ cpm/ml のプローブを加えて、4 時間インキュベートした。2 × SSC/0.1 % SDS 室温で 5 分、0.5 × SSC/0.1 % SDS 65 °C で 30 分、さらに 0.1 × SSC/0.1 % SDS 65 °C で 30 分×2 回 filter を洗浄し、Image Analyzer で解析した。

2-6 In situ hybridization

各ステージの卵を 10 % Antiformin で、室温 1 時間処理しコリオンを消化した後、蒸留水で 2 回洗浄し、4 % paraformaldehyde / PBS で固定した。ethanol シリーズで脱水した後、Palaplast 中に包埋し、9 μm section として poly - D - lysine でコートしたスライドガラスに固定した。リボプローブは、digoxigenin labeling kit (Boeringer Mannheim) で作製した。Xylen - ethanol シリーズで脱パラフィンし、0.5 N HCl 20 分間、2 × SSC 70 °C で 30 分間インキュベートした後、Protease (Sigma, 0.25 mg / ml in 5 mM Tris - HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA) で 15 分間処理した。4 % paraformaldehyde / PBS で再固定化した後、0.5 % acetic anhydride, 0.1 M triethanolamine (pH 8.0) でアセチル化した。ethanol シリーズで脱水し、風乾した。Hybridization は、Hybridization buffer (40 % formamide, 10 % dextran sulfate, 300 mM NaCl, 10 mM Tris - HCl (pH 7.5), 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8), 5 mM EDTA, 1 ×

Denhardt's sol., 10 mM DTT 中に digoxigenin - labeled antisense probe を加えて、45 °C で 12～16 時間インキュベートした。Hybridization の後、wash buffer (0.3 M NaCl, 8.89 mM Tris - HCl, 1.1 mM Tris-base, 5 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaH₂PO₄, 5 mM EDTA, 50 % formamide, 14 mM β -melcaptoethanol) で 50 °C 4 時間洗浄し、RNase A (20 μ g / ml, 0.5 M NaCl, 10 mM Tris - HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA) で 37 °C、30 分処理した後、digoxigenin-labeled detection kit (Boeringer Mannheim) で検出した。

2-7 immunohistochemistry

各ステージの *Bombyx* 胚および絹糸腺を PBS 中で解剖し、0.1 % Triton X - 100 / PBS / 3.7 % formaldehyde 中で室温で 60 分間固定した。0.1 % Triton X-100 / PBS (PBST) で 5 分間 \times 3 回および 0.1 % BSA / PBST (PBSTB) 5 分間 \times 3 回洗浄した後、0.2 % normal mouse serum / PBSTB 中で 30 分間インキュベートし、さらに 100～1000 倍に 0.2 % normal mouse serum / PBSTB で希釈した anti-POU-M1 / SGF-3 モノクローナル抗体で、4 °C で 12～16 時間インキュベートした。PBSTB で 20 分間 \times 3 回洗浄した後、100～500 倍に 0.2 % normal mouse serum / PBSTB で希釈した FITC conjugated anti-mouse IgG でインキュベートした。PBSTB で 20 分間 \times 3 回洗浄した後、直接蛍光顕微鏡下で観察した。

2-8 ウェスタンブロット解析

各ステージの *Bombyx* 胚および絹糸腺断片を 2 % SDS, 5 % 2 -メルカプトエタノール, 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8) 中、100 °C 2 分間熱処理し、可溶化蛋白 100 μ g / lane を 10 % SDS-PAGE で泳動し分離した。25 mM Tris-base, 192 mM glycine, 0.1 % SDS, 20 % methanol 中で electro blotting (100 mA const.) を行い、nitrocellulose filter にブロットした。5 % skim milk / PBST 室温 1 時間でブロッキングした後、15 分間 \times 2 回洗浄し、1 % BSA, 0.5 % skim milk / PBST で 1000 倍希釈した mAbA1 と 1 時間反応させた。15 分間 \times 3 回洗浄した後、1 % BSA-0.5 % skim milk / PBST で 1000 倍希釈した HRP - conjugated anti-mouse IgG と 1 時間反応させ、15 分間 \times 4 回洗浄した後、ECL western blotting detection reagents (Amersham) で検出した。

3-1 sericin-1 遺伝子の転写物の発現解析

これまで、後部絹糸腺特異的な fibroin 遺伝子については、胚発生期における発現が調べられていたが (Ohta et al., 1988)、sericin-1 遺伝子については、不明であった。そこで、胚発生過程における sericin-1 遺伝子発現の経時的变化および、発現パターンを明らかにするため、ノーザンブロット解析ならびに *in situ* ハイブリダイゼーションを行うことにした。

まず、胚発生期における sericin-1 遺伝子の発現の経時的变化を調べるため、ノーザンブロット解析を行った。最初に転写産物が確認できるのは、器官形成完了期の少し後 (stage 26) で、主に約 4.0 Kb の転写産物が認められた。孵化期が近づき mRNA の発現レベルが高くなるにつれて選択的スプライシングによる 10.5、9.0、2.8 Kb 等の生成物も認められるようになる (Fig. 1)。次に、絹糸腺内での発現パターンを明らかにするため、絹糸腺のホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、stage 25 ではシグナルは検出されず、stage 26 になってようやく転写物が中部絹糸腺に認められるようになった (Fig. 2-A)。sericin-1 遺伝子の転写物は発生が進むにつれて中部絹糸腺内での発現レベルは高まるが、前部絹糸腺、後部絹糸腺では、まったく発現が認められなかった (Fig. 2-B)。中部絹糸腺を、さらに2つの屈曲点を境にして、前・中・後部区画とに分けて観察してみると、前部区画には発現はなく、中部区画から後部区画にかけて漸次的に発現レベルが上昇していくという発現パターンが観察された (Fig. 2-B)。孵化後、1令幼虫になっても暫くはこの発現パターンが継続するが、次第に後部区画のみに限局される (Fig. 2-C)。その後は、この発現パターンを、令期の終わりまで継続し、眠期にはいると転写物は認められなくなる。この経時的な発現パターンの変化は、1令から4令にかけて繰り返され (Fig. 2-D,E)、4令までは、同じ制御様式により発現がコントロールされていると推察される。しかし、最終令である5令になると様相は変わり、sericin-1 遺伝子の発現は爆発的に増加し、後部区画だけでなく中部区画まで高いレベルの発現を示すようになった (Fig. 2-F)。

5 令期は、特に繭をつくるための大量の絹糸の生産が必要であるため、他の令期とは違う特別の制御メカニズムが存在するものと思われる。

3-2 POU - M1 / SGF - 3 モノクローナル抗体の調製

POU-M1 / SGF-3 の N 末端領域を発現ベクターに組み込み、GST - fusion - A (1 - 82 aa) と、GST - fusion - B (62 - 172) の 2 種類の GST 融合蛋白を調製し (Fig. 3)、マウスに免疫した。ハイブリドーマを作製し、sericin-1 遺伝子エンハンサーエレメントの SC 部位をプローブとしたゲルシフト - ハイパーシフト法により、特異的抗体を産するモノクローンを単一分離した。合計 6 個のモノクローンが得られ、ウェスタン解析により認識部位の検索を行ったところ、GST - fusion - A (1 - 82 aa) のみに結合するものが 4 種、GST - fusion - B のみに結合するものが 1 種、GST - Fusion - A, B の共通配列部分に結合するもの (mAbA1) が 1 種得られた (Fig. 4)。抗体力価および特異性の最も良い mAbA1 を以後の実験に使用した。胚発生期における胚全体での発現量の変化をウェスタンブロット解析で調べたところ、42 KDa に特異的な単一のバンドを与え、器官形成完了期 (stage 25) の少し前に発現の最大値に達した (Fig. 5)。各種の器官形成に重要な役割を果たしていることが推察された。

3-3 sericin-1 遺伝子の発現期における POU - M1 / SGF - 3 の発現解析

POU - M1 / SGF - 3 は、正のシスエレメント SC に結合する因子として、sericin-1 遺伝子の転写制御に重要であることが示唆されているが、実際に、*in vivo* で、どのような制御関係になっているかは不明であった。sericin-1 遺伝子が、絹糸腺内で特徴的な分布 (Fig. 2-A-E) を示すことから、POU - M1 / SGF - 3 の発現パターンの解析により、sericin-1 遺伝子の転写にどのような寄与をしているのか考察できると考えられたので、POU - M1 / SGF - 3 に特異的なモノクローナル抗体 (mAbA1) を用いて、immunohistochemistry により、特に前部区画から後部区画への漸次的な発現パターンを示す令期の初期、また、転写がなくなる眠期に注目して発現パターンを解析した。POU - M1 / SGF - 3 は、絹糸腺が形態的

に前・中・後部絹糸腺に区別できるようになる時期 (stage 23) から、5令に至るまで終始前部絹糸腺に一様に発現し、中部絹糸腺内で前部区画から後部区画へと漸次的に発現レベルが低下していき、後部絹糸腺に至ると検出限界以下になる (Fig. 6-A; Fig. 7)。sericin-1 遺伝子が、中部絹糸腺内で前部区画から後部区画にかけて発現量が増加するのと相補的に POU - M1 / SGF - 3 の発現量が減少することから、POU - M1 / SGF - 3 が sericin-1 遺伝子の転写を抑制している可能性が示唆される。このことは、POU - M1 / SGF - 3 が結合する SC サイトが、正の制御エレメントであることと矛盾しており、未知の制御機構が存在している可能性が考えられる。さらに、眠期においても POU - M1 / SGF - 3 は、同様のパターンを維持していたことから (Fig. 6-B)、眠期における sericin-1 遺伝子転写の抑制には、POU - M1 / SGF - 3 は、直接的には関与していないと思われる。このことは、幼若ホルモン、脱皮ホルモンによるホルモン制御経路とは、独立した経路で POU - M1 / SGF - 3 が sericin-1 遺伝子の転写を制御していることを示唆している。

3-4 抗 POU - M1 / SGF - 3 抗体による immunohistochemistry と Hoechst 染色による絹糸腺の発生過程の解析

絹糸腺や *Drosophila* 唾腺は、下唇節からの陥入伸長形成によって発生することから、以前から相同器官と考えられているが、2つの大きな相違点がある。1つは、*Drosophila* 唾腺の分泌組織が一種なのに対して、*Bombyx* 絹糸腺は、明らかに形態の異なる中部と後部絹糸腺の2つの分泌組織を持つ。もう一つは、*Drosophila* 唾腺は、陥入前に既に細胞分裂を終え、唾腺原基内にダクト部分と分泌細胞部分の細胞がそろった状態で陥入形成するのに対して、*Bombyx* 絹糸腺は、陥入後、細胞分裂を続けながら伸長形成される。この相違を理解することは、腺組織の器官形成といった問題に対して、*Drosophila* 唾腺からだけでは得られない知見をもたらしてくれると考えられる。Cf1a が *Drosophila* 唾腺では発現していないのに対して、POU - M1 / SGF - 3 が絹糸腺で発現していることから、両者の相違に関与している可能性が考えられ、抗 POU - M1 / SGF - 3 抗体を用いた immunohistochemistry と Hoechst 染色により、絹糸腺の初期発生過程を詳細に解析することにした。

POU - M1 / SGF - 3 は、stage 18 になると、絹糸腺での発現に先駆けて、気管系、前胸腺、アラタ体、エノサイトといった同じく外胚葉上皮の陥入によって形成される組織に発現が開始され、stage 19 になり胚帯短縮が始まる時期になってようやく絹糸腺陥入部に発現が見られるようになった (Fig. 8-A-D)。陥入伸長開始後しばらくは、絹糸腺細胞全体にほぼ一様に発現しているが、伸長先端部分が腹節に達する頃になると、先端部分から次第に発現が低下する (Fig. 8-E,F)。その後さらに第 3 腹節から第 6 腹節由来の内臓気管系に接触しながら伸長をつづけ (Fig. 8-G,H)、最終的に第 6 腹節由来の皮膚内臓筋と思われる部分に到達すると先端部分はその場に固定される (Fig. 8-I-M)。このころになるとそれまで一本の分枝であった内臓気管がそれぞれ数本に分枝するようになり (Fig. 8-K,L)、中部・後部絹糸腺上に分布するようになる。5 令絹糸腺は、特徴的に折れ曲がった構造を持つが (Fig. 2-F)、その原因として、継続して肥大成長し続ける絹糸腺に対して、先端及び途中の数カ所が皮膚内臓筋や内臓気管系に固定されることで、余分な部分が屈曲として生じるのではないかと考えられる。

3-5 *Bm tracheless* cDNA のクローニングと塩基配列決定

最近、気管形成のマスター制御因子として *tracheless* がクローニングされ、機能が解析された (Isaac and Andrew, 1996; Wilk et al., 1996)。*tracheless* は気管系、唾腺のダクト組織、posterior spiracles に発現し、突然変異体では、これらの器官が形成されないことから、器官形成に重要な役割を果たしていると考えられている。*Drosophila* 唾腺と *Bombyx* 絹糸腺は相同器官であると考えられていることから、*tracheless* の *Bombyx* ホモログが絹糸腺に発現し、絹糸腺発生に重要な役割をはたしていると考えられたので、cDNA のクローニングを行い発現パターンを解析することにした。

3-5-1 *Bm trh* 断片の PCR クローニング

Drosophila tracheless は、DNA 結合に重要な bHLH ドメインと、蛋白 - 蛋白相互作用に必要だと考えられている PAS ドメインとから成っている。ホモロジーの高いファミリー遺伝子間で保存されている領域をもとにして inosine を導入したプライマーを合成した

(Fig. 9)。 stage 23 の random primed cDNA をテンプレートにして PCR 反応をおこない、得られた PCR 産物 (ca. 1050 bp) を、 TA クローニング法にて pBluescript II KS (-) にサブクローニングし (Bm trh - PCR)、核酸配列を決定した。 BLAST 検索したところ、 *Drosophila trachealess* と高い相同性を示したことから、 *Bombyx trachealess* (*Bm trh*) の一部がクローニングできたと考え、この断片をプローブにして、 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。

3-5-2 全 ORF を含む cDNA の単離と構造解析

Bm trh - PCR を、プローブとし、ノーザンプロット解析をしたところ、約 5.4 Kb のサイズのバンドが検出され (Fig. 10)、 stage 23 の poly (A)⁺RNA から調製した oligo - dT primed cDNA ライブラリー (7.5×10^5 pfu) をスクリーニングした。その結果、ポジティブクローンが 3 クローン得られ、そのうち約 4.5 Kbp の最長のクローン (cTrh - dT1) の核酸配列を決定したところ、 *Drosophila trh* の ORF と比較して、 N 末側が不十分であることが明らかになった。さらに、 cTrh - dT1 の N 末側約 300 bp の断片をプローブとし、 random primed cDNA ライブラリー (3.6×10^5 pfu) をスクリーニングし、 3 つのポジティブクローンを得た。このうち、 N 末側の不足分をカバーしたクローン (cTrh - R1) の塩基配列を決定した。

Bm trh の cDNA 塩基配列は、 2547 bp の ORF を含む 4950 bp で、 849 アミノ酸をコードする。翻訳開始点については、 *Drosophila trachealess* とのホモロジーを考え合わせて決定した (Fig. 11)。 *Drosophila* のアミノ酸配列と比較すると、全体で 51.8 % の相同性を示し、各ドメインについても、 bHLH ドメインが 100 % (71 / 71)、 PAS - A ドメインが 97 % (57 / 59)、 PAS - B ドメインに関しては 66 % (35 / 53) で、さらに前後の領域を含めると 80 % (102 / 128) の相同性が見られた。また、 PAS - B ドメインよりもさらに C 末側の領域に関しても転写活性化に働く可能性のあるグルタミンに富んだ領域にホモロジーが確認された (Fig. 12)。また、 PAS - B ドメインの一部を含んだ 452 bp (1332 - 1784) の領域 (Trh-is-1) をプローブとして、サザンプロット解析をしたところ (Fig. 13)、 genome 上で、 1 コピー

存在することが分かった。以上の結果から、*Bm trh* は、*Drosophila tracheless* のホモログ遺伝子であると結論した。

3-6 *in situ* ハイブリダイゼーションによる *Bm trh* 遺伝子転写物の発現解析

Drosophila 唾腺との相同性から、*Bombyx* 絹糸腺での発現を期待し、クローニングした *Bm trh* が、実際に絹糸腺で発現しているのか、また、発現パターンはどのようなかを明らかにするために、切片に対する *in situ* ハイブリダイゼーションと孵化直前の絹糸腺を用いたホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより発現を解析した。その結果、気管陥入のまだ起こっていない stage 18 に、絹糸腺での発現に先行して、各擬体節の前側部分の気管原基と思われる部分に発現が開始された (Fig. 14 - A)。絹糸腺原基への発現が開始されるのは、それよりやや遅れて、stage 19 になってからで、下唇節の後側部分に発現が観察されるようになった (Fig. 14 - B)。この時期の気管陥入部への強い発現に比較して、絹糸腺での発現はかなり弱い強度で検出された。その後、胚帯短縮が進むと一定の長さをもった管状組織へと伸長するが、この段階では、絹糸腺全体に一様に発現していた (Fig. 14 - C)。また、気管系はこの時期には、primary tracheation とよばれる最初の分枝を行っている (Fig. 14 - D)。また、*Drosophila* の posterior spiracles に相同な器官にも発現が観察された (Fig. 14 - D)。その後 stage 21 の反転期の前期にさしかかり、絹糸腺が第一腹節を超えて、伸長しようとする時期になると、先端部分から発現が低下する様子が観察される (Fig. 15 - A)。形態的に前・中・後部絹糸腺の区別が明らかになる stage 23 では、前部絹糸腺で強い発現が、そして、中部絹糸腺では、急激に発現レベルが低下する様子が観察された (Fig. 15 - B,C)。この前部絹糸腺特異的な発現パターンは、その後 stage 30 の絹糸腺のホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーションに見られるように、胚発生期の間、維持されることがわかった (Fig. 15 - D)。この解析の結果から、*Drosophila trh* が気管系、唾腺、posterior spiracles の器官形成に重要であるのと同様に、*Bm trh* も気管系、絹糸腺、posterior spiracles の相同器官の発生に重要であることが推察される。

4-1 POU-M1 / SGF-3 因子と sericin-1 遺伝子転写についての考察

これまでに *in vitro* の無細胞転写系を用いた解析で、POU-M1 / SGF-3 因子が結合するエレメント SC は、欠失によって転写レベルが低下することから正の制御エレメントであり (Matsuno et al., 1989,1990; Hui et al., 1992)、POU-M1 / SGF-3 は、sericin-1 遺伝子転写の正の制御因子であると考えられてきた。しかし、*in vivo* で実際にどのような制御関係になっているかは不明であった。本研究において中部絹糸腺内で、POU-M1 / SGF-3 因子が前部区画から後部区画にかけて漸次的に発現レベルを低下させていくのに対して、相補的に sericin-1 遺伝子の転写レベルが増加していくような発現様式が観察された。このことは、POU-M1 / SGF-3 が sericin-1 遺伝子の転写を負に制御している可能性を推察させる。POU-M1 / SGF-3 が負の制御因子であると仮定すると、SC サイトを介して sericin-1 遺伝子の転写活性化に働く未知の因子が存在し、POU-M1 / SGF-3 が未知の因子に対して競合的に作用することで、負の制御をしている可能性が考えられる。しかし、sericin-1 遺伝子の転写レベルが最も高い中部絹糸腺後部区画には、低レベルながらも確かに POU-M1 / SGF-3 が存在し、これまで考えられてきた様に正の制御をしている可能性も残している。だとすると、POU-M1 / SGF-3 が高濃度で存在する前部区画・中部区画で sericin-1 遺伝子の転写を抑制し、低濃度で存在する後部区画で sericin-1 遺伝子の転写を活性化するメカニズムが必要である。sericin-1 遺伝子の上流エレメントには、SC サイト以外にまだ機能の同定されていない SB サイトがあり、SC サイトに比べて低アフィニティーで POU-M1 / SGF-3 が結合することがわかっている。この SB サイトが負のエレメントである場合、POU-M1 / SGF-3 が低濃度である後部区画では、高アフィニティーの SC サイトのみへの結合が起こり sericin-1 遺伝子の転写活性化が起こるが、POU-M1 / SGF-3 が高濃度に存在する前部区画になると、低アフィニティーの SB サイトへの結合も起こるようになり、転写を抑制するようになる。つまり sericin-1 遺伝子の転写活性化には POU-M1 / SGF-3 の存在量に対して閾値が存在し、中部絹糸腺内に見られる POU-M1 / SGF-3 の濃度勾配にもとづいて、

転写領域を中部区画から後部区画へと限定するように働くという機構が考えられる。

中部絹糸腺には、sericin-1 遺伝子以外に serisin-2 遺伝子が発現することが知られており、この sericin-2 遺伝子は、*in situ* ハイブリダイゼーションの結果、sericin-1 とは異なり、中部絹糸腺内で前・中部区画に発現していることが知られている。カイコ絹糸蛋白は、繊維としてのフィブロインが後部絹糸腺から中部絹糸腺へと輸送され、中部絹糸腺内で数種のセリシン蛋白によって順に数層にコーティングされた後、前部絹糸腺を経て吐糸される。sericin-1 遺伝子やsericin-2 遺伝子の発現領域が異なるのは、このコーティングの過程がスムーズに行くために必要であろう。現在までのところ、sericin-2 遺伝子の転写制御機構についてはほとんど解析がなされていないが、遺伝子産物の類似性から sericin-1 遺伝子とかなり似た制御を受けていることが予想される。しかしながらその発現領域が異なるのは、その発現制御に関わっている重要な因子が POU-M1 / SGF-3 で、sericin-2 遺伝子の転写に対する効果が sericin-1 遺伝子と異なっているために差が生じるのではないだろうか。

4-2 *Bm trh* は *trh* のホモログ遺伝子である。

Trh は、bHLH ドメインと PAS ドメインを持つ因子である。bHLH ドメインは、ダイマーの形成と DNA 結合とに重要で、このドメインをもつ bHLH ファミリー遺伝子群には、筋細胞の分化誘導に重要な *MyoD* (Lassar et al., 1986; Davis et al., 1987; Tapscott et al., 1988) や、neuroblast の分化決定に重要な *achaete - scute complex* (Skeath and Carroll, 1994) などが知られ、いずれも組織の identity の確立に重要な機能を持つ遺伝子として同定されている。また、PAS ドメインは、周期性の制御に関わる PERIOD (Konopka and Benzer, 1971; Jackson et al., 1991; Reddy et al., 1986; Bargiello et al., 1987)、aromatic hydrocarbon receptor complex の一員である ARNT (Hoffman et al., 1991)、中枢神経系の発生に重要な SIM (Nambu et al., 1991) に共通して見られるドメインで、蛋白-蛋白相互作用に関わっていることが示されている。*Bm trh* と *Drosophila trh* のアミノ酸配列を比較すると、bHLH 領域が相同で、PAS-A、PAS-B 領域にそれぞれ 97%、80% の高いホモロジーが見られた。また、転写活性化に働いている可能性のあるグルタミンに富んだ領域にもホモロジーが見られた。

よって、構造的に非常に良く似た蛋白であることが推察される。

また、発現パターンは、*Drosophila* で、気管系、唾腺、posterior spiracles に発現が見られるのと同様、*Bombyx* でも気管系、絹糸腺、および posterior spiracles に相当する部位に発現が見られ、発現領域も類似していた。*Drosophila* では機能解析が進んでおり、*trh* を欠く突然変異体では、気管系、唾腺のダクト部分や、posterior spiracles を形成する原基細胞の陥入がおこらず、器官形成が正常に行われなことが示されている。*Bombyx* でも構造の類似性や発現パターンの類似性から、機能的にも共通し、器官形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

4-3 *Drosophila* 唾腺と *Bombyx* 絹糸腺の相違点についての考察

絹糸腺と *Drosophila* 唾腺の発生過程には明らかな違いが見られる。第一点は、*Drosophila* の唾腺が形態的にダクト組織と分泌組織の2種の組織からなるのに対して、絹糸腺は、前・中・後部絹糸腺の3つの組織から成り立っていること。第二点は、唾腺原基細胞は陥入開始前に既に細胞分裂を終え、唾腺形成に必要な細胞群が下唇節の基部にそろった状態になってから陥入形成が始まるのに対し、絹糸腺は陥入後、細胞分裂を続けながら伸長形成する点である。

Drosophila では、*fkh* のゲノム上流領域に、分泌組織特異的な発現に関与するフラグメントと、ダクト・分泌組織の両方の発現に関与するフラグメントが存在し、これらのフラグメントを持ったレポーター遺伝子の発現を解析した結果、唾腺原基は、すでに陥入前に、将来ダクトになる領域と分泌組織になる領域とに分化していることが示されている (Kuo et al., 1996)。一方、*Bombyx* では、*Bm Fkh*、*Bm trh*、POU-M1 / SGF-3 をマーカーに絹糸腺基部の観察を行ったところ、絹糸腺原基は非常に小さな細胞集団で構成されることがわかった。しかし、発現領域が小さいことから、現時点では絹糸腺陥入部に、*Drosophila* で見られるようなダクトと分泌組織原基の明確な区別が存在するかどうか観察できていない。加えて、絹糸腺は、伸長中に盛んに細胞分裂を行いながら形成されていき、伸長の過程で徐々に前・中・後部絹糸腺への分化が進行していくように見えることから、絹糸腺では、

陥入期にはまだダクトと分泌組織の区別ができていない可能性が考えられる。*Drosophila* 唾腺と *Bombyx* 絹糸腺で陥入形成の様子が異なっている理由のひとつに、分化決定の時期にずれがあるのではないだろうか。この問題を明らかにするには、*Bm trh* や、*Bm Fkh* に加えて、*Drosophila* 唾腺のダクト原基に特異的に発現することが知られている *serrate* の *Bombyx* ホモログ遺伝子など、さらに別の遺伝子の解析も必要であると思われる。

さて、絹糸腺はどのような遺伝子の働きで3つの組織へと分化するに至るのだろうか。*Drosophila* 唾腺では *Fkh* が分泌細胞で、また、*Trh* がダクト細胞でそれぞれ限局して発現し、下位の分泌細胞特異的遺伝子群や、ダクト細胞特異的遺伝子群の発現を引き起こすことで、2つの分化した組織を形成するに至る (Isaac and Andrew, 1996; Wilk et al., 1996)。絹糸腺は、中・後部絹糸腺からセリシンやフィブロインといった絹糸蛋白を分泌し、また、前部絹糸腺では絹糸蛋白の分泌の報告がないことから、機能的に見て、ダクトとしての前部絹糸腺と分泌組織としての中・後部絹糸腺の2つに分けて考えることができる。今回の解析で *Bm trh* の転写物が前部絹糸腺で特異的に発現していることが分かり、既に *Bm Fkh* が中・後部絹糸腺で発現するという事実から、遺伝子レベルで、ダクト組織としての前部絹糸腺と、分泌組織としての中・後部絹糸腺という区分が可能になった。そして、*POU-M1 / SGF-3* が、後部絹糸腺では検出されず、前・中部絹糸腺に発現していることから、中部と後部絹糸腺との間に差違を生み出している要因となっている可能性がある。事実、*POU-M1 / SGF-3* は、中部絹糸腺特異的遺伝子の *sericin-1* の転写制御に関して鍵となる因子であると考えられており、中部絹糸腺での重要性は確かである。さらに、*Cfla* が唾腺では発現せず、*POU-M1 / SGF-3* が絹糸腺に発現することは、両者の器官の間で大きな差となっており、絹糸腺の分泌組織がさらに中・後部絹糸腺へと分化する要因となっているのではないかとと思われる。

最後に現在までに得られている知見をもとにして、絹糸腺の発分化についてモデルを考えてみた。まず、*Bm Scr* が絹糸腺の上位の遺伝子として下唇体節で発現する。次に *Bm Scr* の働きにより、*Bm fkh*、*Bm trh*、*POU-M1 / SGF-3* の発現が開始される。絹糸腺の陥入伸長がおこるにつれて徐々に発現領域に差が生じるようになり、最終的に前部絹糸腺に

Bm trh が、中・後部絹糸腺に *Bm Fkh* が、そして、前・中部絹糸腺に POU-M1 / SGF-3 が特異的に局在化して発現するようになる。その結果、*Bm trh* の発現している前部絹糸腺は、ダクトとしての identity を確立し、ダクト特異的な遺伝子発現を引き起こし、また、中・後部絹糸腺は、*Bm Fkh* により分泌組織としての identity を獲得する。さらに POU-M1 / SGF-3 が前・中部絹糸腺に発現することによって、中部と後部絹糸腺の区分が明確となり、後部絹糸腺では fibroin 遺伝子が、また、中部絹糸腺では sericin-1 遺伝子が終末遺伝子として特異的に発現するようになる。*Drosophila* 唾腺との相同性から、この様なカスケードになっていると推察しているが、未だ、直接的な証明に乏しいことや、さらに多くの遺伝子が関わっていると考えられ、今後さらに研究を展開させて行く必要があると思われる。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始懇篤な御指導を賜りました、基礎生物学研究所の鈴木義昭教授に心からお礼申し上げます。有益な御指導、御助言をして戴いた上野孝治助教授に心から感謝いたします。有益な御指導、御助言を数多くして戴いた大野薫助手、小久保博樹助手に心から感謝致します。また、技術的な援助を戴いた、鈴木悦子夫人、佐々木美智子さん、渡辺淳子さん、井上慎子技官の方々に深く感謝いたします。さらに、研究を行うにあたって多くの技術的な援助を戴いた、分析室、RIセンター、動物実験施設の方々に深く感謝いたします。

- Akam, M. (1987). The molecular basis for metameric patterns in the *Drosophila* embryo. *Dev.* 101, 1-22
- Anderson, M., G., Perkins, G., L., Chittick, P., Shrigly, R., J. and Johnson, W., A. (1995). *drifter*, a *Drosophila* POU-domain transcription factor, is required for corect differentiation and migration of tracheal cells and midline glia. *Genes & Dev.* 9, 123-137
- Ausubel, F. M., Brend, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology* (Miley, New York).
- Bargiello, T.A., Saez, L., Baylies, M.K., Gasic, G., Young, M.W. and Spray, D.C. (1987). The *Drosophila* clock gene *per* affects intercellular junctional communication. *Nature* 328, 686-691
- Celis, J., F., Llimargas, M. and Casanova., J. (1995). *ventral veinless*, the gene encoding the Cf1a transcription factor, links positional information and cell differentiation during embryonic and imaginal development in *Drosophila melanogaster*. *Dev.* 121, 3405-3416
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate- phenol-chliroform extraction. *Anal. Chem.* 162, 156-159
- Davis, R. L., Weintraub, H. and Lassar, A. B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* , 987-1000
- Fukuta, M., Matsuno, K., Hui, C.-c., Nagata, T., Takiya, S., Xu, P.-X., Ueno, K. and Suzuki, Y. (1993). Molecular cloning of POU domain-containing factor involved in the regulation of the *Bombyx* sericin-1 gene. *J. Biol. Chem.* 268, 19471-19475
- Gehring, W. J. (1987). Homeoboxes in the study of development. *Science* 236, 1245-1252
- Harlow and Lane (1988). *Antibodies: A laboratory manual.* (Cold Spring Harbor Laboratory)
- Hoffman, E.C., Reyes, H., Chu, F.-F., Sander, F., Conley, L.H., Brooks, B.A. and Hankinson, O. (1991). Cloning of a factor for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252, 54-958
- Hui, C. -c., K. Matsuno, and Y. Suzuki. (1990). Fibroin gene promoter contains a cluster of homeodomain binding sites that interact with three silk gland factors. *J. Mol. iol.* 213, 651-670
- Ingham, P. W. (1988). The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. *Nature* 335, 25-34
- Isaac, D.D. and Andrew, D.J. (1996). Tubulogenesis in *Drosophila*; arequirement for the *tracheiless* gene product. *Genes & Dev.* 10, 103-117
- Itikawa, N. (1944). *Nc* mutation locus mapped in the 8th chromosome linkage group of *Bombyx mori*. *Synopsis of Sericulture in Eastern Asia (toh-a Sen-i Soh-ran)* 15 (2), 1-6 (in japanese)

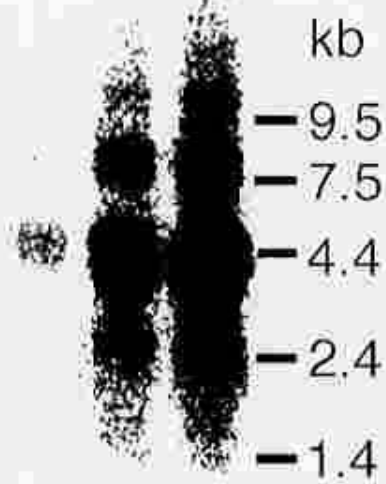
- Itikawa, N. (1952). Genetical and embryological studies on the *E-multiple* alleles in the silkworm, *Bombyx mori* L. Bull. Sericult. Exp. Sta. 14, 23-91 (in Japanese with English summary)
- Jackson, F.R., Bargiello, T.A., Yun, S.-H. and Young, M.W. (1986). Product of the *per* locus of *Drosophila* shares homology with proteoglycans. Nature 320, 185-188
- Johnson, W. A. & Hirsh, J. (1990). Binding of a *Drosophila* POU-domain proteins to a sequence element regulating gene expression in specific dopaminergic neurons. Nature 343, 467-470
- Jürgens, G. and Weigel, D. (1988). Terminal versus segmental development in the *Drosophila* embryo : the role of the homeotic gene fork head. Roux's Arch. Devl. Biol. 197, 345-354
- Kokubo, H., Takiya, S., Mach, V., and Suzuki, Y. (1996). Spatial and temporal expression pattern of *Bombyx fork head / SGF-1* gene in embryogenesis. Dev. Genes Evol. 206, 80-85
- Kokubo, H., Ueno, K., Amanai, K., Suzuki, Y. submitted
- Konopka, R.J. and Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. 68, 2112-2116
- Lassar, A., B., Peterson, B. and Weintraub, H. (1986). Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts. Cell 47, 649-656
- Mach, V., Takiya, S., Ohno, K., Handa, H., Imai, T. (1995). Silk gland factor-1 involved in the regulation of *Bombyx sericin-1* gene contains fork head motif. J. Biol. Chem. 270, 9340-9346
- Matsuno, K., C.-c. Hui, S. Takiya, T. Suzuki, K. Ueno and Y. Suzuki. (1989). Transcription signals and protein binding sites for sericin gene transcription *in vitro*. J. Biol. Chem. 264, 18707-18713
- Matsuno, K., S. Takiya, C.-c. Hui, T. Suzuki, M. Fukuta, K. Ueno and Y. Suzuki. (1990). Transcriptional stimulation via SC site of *Bombyx sericin-1* gene through an interaction with a DNA binding protein SGF-3. Nucl. Acids res. 18, 1853-1857
- Mounjer, N. and Prudhomme, J-C. (1986). Isolation of actin genes in *Bombyx mori*: the coding sequence of a cytoplasmic actin gene expressed in the silk gland is interrupted by a single intron in an unusual position. Biochimie. 68, 1053-1061
- Nagata, T., Suzuki, Y., Ueno, K., Kokubo, H., Xin, X., Hui, C.-c., Hara, W. and Fukuta, M. (1996). Developmental expression of the *Bombyx Antennapedia* homologue and homeotic changes in the Nc mutant. Genes to cell. 1, 555-568
- Nambu, J.R., Lewis, J.O., Wharton, K.A.J. and Crews, S.T. (1991). The *Drosophila single-minded* gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. Cell 67, 1157-1167
- 布目 順郎 (1936). 家蚕絹糸腺の発生. 応用動物学雑誌 9, 68-92
- Nüsslein-Volhard, C. and E. Wieschaus. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. Nature 287, 795-801

- Ohshima, Y. and Suzuki, Y. (1977). Cloning of silk fibroin gene and its flanking sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5363-5367
- Olson, E. N. (1990). MyoD family: A paradigm for development ? Genes & Dev. 4, 1454-1461
- Ohta, S., Suzuki, Y., Hara, W., Takiya, S. and Suzuki, T. (1988). Fibroin gene transcription in the embryonic stages of the silkworm, *Bombyx mori*. Develop. Growth & Differ., 30 , 293-299
- Panzer, S., Weigel, D. and Beckendorf, S. K. (1992). Organogenesis in *Drosophila melanogaster* : embryonic salivary gland determination is controlled by homeotic and dorsoventral patterning genes. Dev. 114, 49-57
- Reddy, P., Jacquier, A.C., Abovich, N., Peterson, G. and Rosbash, M. (1986). The *period* clock locus of *D. melanogaster* codes for a proteoglycan. Cell 46, 53-61
- Scott, M. P., J. W. Tamkun, and G.W.Hartzell. (1989). The structure and function of the homeodomain. Biochim. Biophys. Acta. 989, 25-48
- Skeath, J.B. and Carroll, S.B. (1994). The achaete-scute complex ; Generation of cellular pattern and fate within the *Drosophila* nervous system. FASEB J. 8, 714-721
- Sternberg, P. W. and H. P. Horvitz. (1984). The genetic control of cell lineage during neomatode development. Annu. Rev. Genet. 18, 489-524
- Suzuki, Y. and Brown, D. D. (1972). Isolation and Identification of the Messenger RNA for Silk Fibroin from *Bombyx mori*. J. Mol. Biol. 63, 409-429
- Suzuki, Y., Tsuda, M., Takiya, S., Hirose, S., Suzuki, E. and Ninaki, O. (1986). Tissue-specific transcription enhancement of the fibroin gene characterized by cell-free systems. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 9522-9526
- Suzuki, Y., Obara, T., Takiya, S., C.-c. Hui, Matsuno, K., Suzuki. T., Suzuki, E., Ohkubo, M., and Tamura, T. (1990). Differential transcription of the fibroin and sericin-1 genes in cell-free extracts. Develop. Growth & Differ. 32, 179-187
- Tapscott, S. J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Cheng, P. F., Weintraub, H. and Lassar, A. B. (1988). A nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. Science 242, 405-411
- 外山 亀太郎 (1909), 蚕種論 東京 丸山舎
- Tsuda, M. and Suzuki, Y. (1981). Faithful transcription initiation of fibroin gene in a homologous cell-free system reveals an enhancing effect of 5' flanking sequence far upstream. Cell 27, 175-182
- Wilk, R., Weizman, I. and Shilo, B. (1996). *trachealess* encodes a bHLH-PAS protein that is an inducer of tracheal cell fates in *Drosophila*. Genes & Dev.10, 93-102

Fig.1 ノーザンプロット解析による胚発生期の sericin-1 遺伝子の発現解析

各ステージ (stage 23 - 30) の卵から調製した Poly (A)⁺ RNA 5 μg/lane を電気泳動し、プロットして調製したナイロン膜を、sericin-1 遺伝子をプローブとして、ハイブリダイズした。positive control として cytoplasmic actin (C.A) を用いた。

stage 23
stage 24
stage 25
stage 26
stage 28
stage 30



C.A

Fig.2 胚発生期および幼虫期における sericin-1 遺伝子の発現解析

in situ ハイブリダイゼーションによって、胚発生期・幼虫期の絹糸腺について sericin-1 遺伝子の発現状態を観察した。全ての図は左が絹糸腺の吐糸管側で、右が終端側となっている。

(A) stage 26 の絹糸腺で、中部絹糸腺での発色が観察される。矢印は前部と中部および、中部と後部絹糸腺の境界を示す。

(B) stage 30 の絹糸腺で、前部・後部絹糸腺には発色が見られず、中部絹糸腺内で前側から後側へ漸次的に発現レベルが高くなる。矢印は前部と中部および、中部と後部絹糸腺の境界を示す。

(C) 1 令幼虫の絹糸腺で、中部絹糸腺の後部区画での限局した発現が観察される。核内に発色がなく、細胞質で発色が見られる。矢印は、中部と後部絹糸腺の境界を示す。

(D) 2 令 60 時間後の絹糸腺で、後部区画での限局した発現が見られる。1 令幼虫に比べて発現レベルは高い。

(E) 2 眠 幼虫の絹糸腺で、発現はほとんど検出できない。

(F) 5 令 2 日目の幼虫の絹糸腺で、後部区画だけでなく中部区画まで高いレベルの発現が見られる。

全てのスケールバーは、200 μm である。

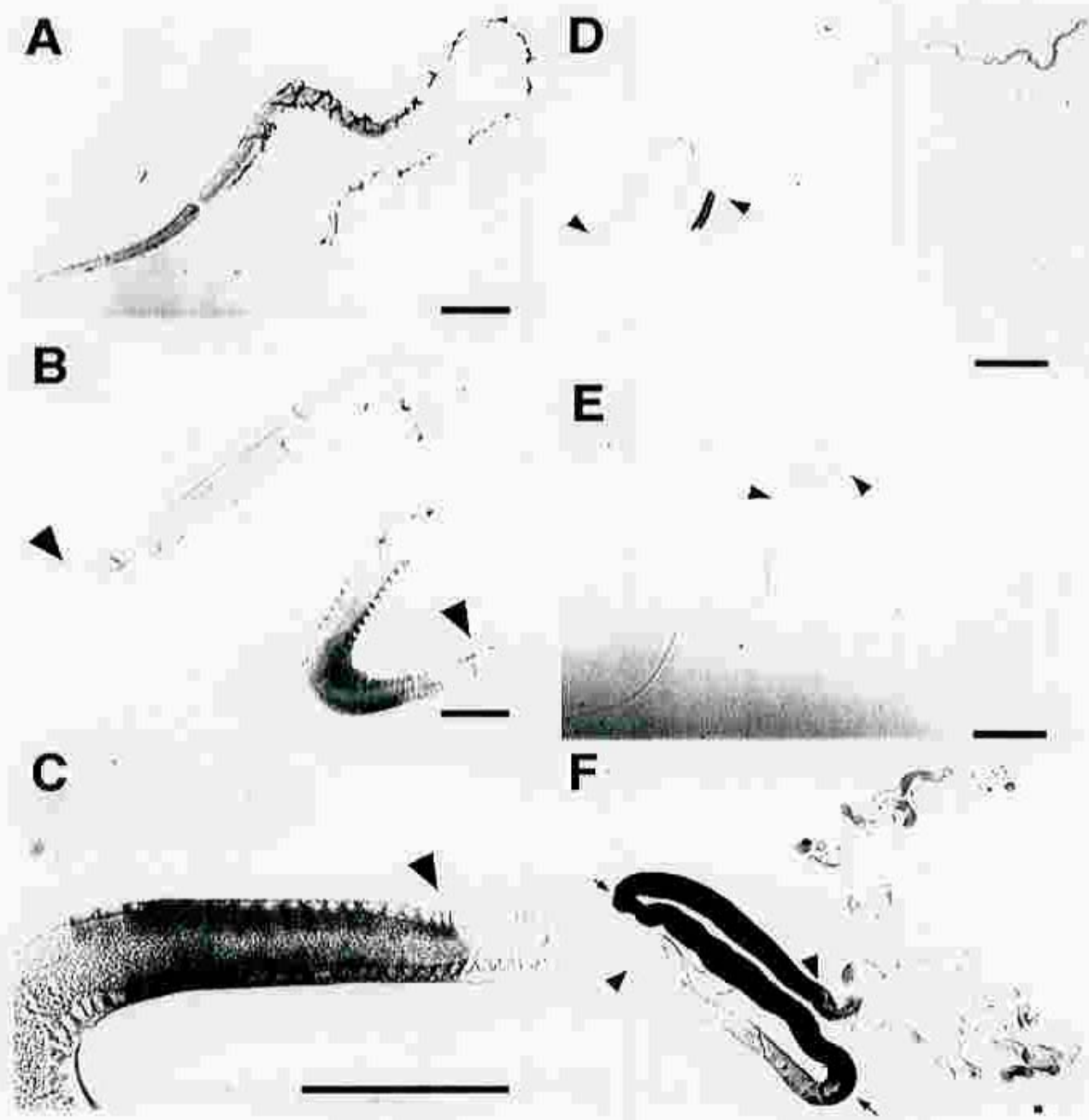


Fig.3 モノクローナル抗体作製のための GST 融合蛋白のデザイン

POU-M1 / SGF-3 cDNA の ORF 領域の構造を示す。数字はアミノ酸残基の位置。POU-S は、POU specific ドメインで、POU-H は、POU ホメオドメインを示す。1 - 82 aa を融合させた GST - fusion - A と、62 - 172 aa を融合させた GST - fusion - B でマウスを免疫した。網掛領域は、得られたモノクローナル抗体 mAbA1 の認識領域を示す。

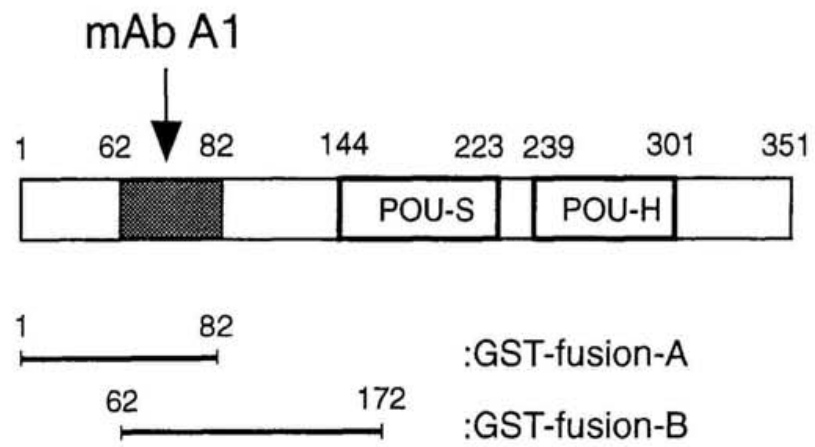


Fig.4 各モノクローナル抗体の認識領域の解析

GST - fusion - A を免疫したマウスから得た、mAbA1 から mAbA5 の 5 種と、GST - fusion - B を免疫したマウスから得た、mAbB1 の 1 種についてウェスタンブロット解析により、抗原認識部位の同定を行った。

上のパネルは、各融合蛋白を 1 μ g / lane で、10 % SDS - PAGE で泳動したゲルをニトロセルロース膜にブロットし、残ったゲルをクマシー染色したもの。M は、蛋白サイズマーカー。A は、GST - fusion - A で、B は、GST - fusion - B を示す。C は、POU-M1 / SGF-3 の C 末側の融合蛋白 (281 - 351 aa) で、ネガティブコントロールとして用いた。

下の図が、DAB による発色を見たもの。mAbA1 は、GST - fusion - A、GST - fusion - B ともに反応している。mAbA2、mAbA3、mAbA4、mAbA5 は、いずれも GST - fusion - A のみを認識している。mAbB1 は、GST - fusion - B のみを認識する。C1Ab は、POU-M1 / SGF-3 の C 末側に対応する合成ペプチドでウサギを免疫して得られた抗体 (Fukuta et al., 1993) で、C 末端側の融合蛋白のみを認識している。

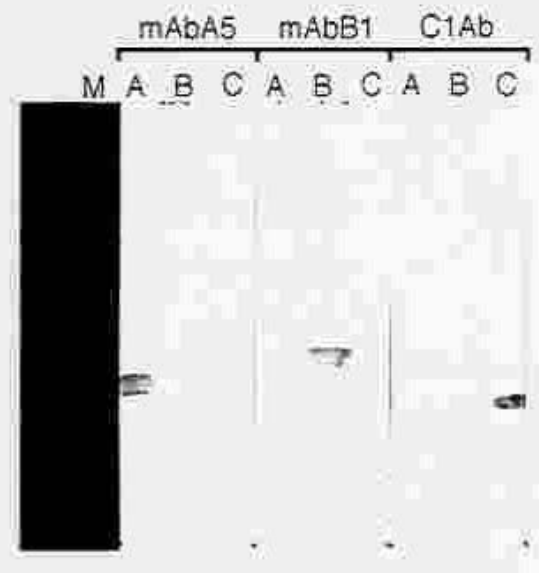
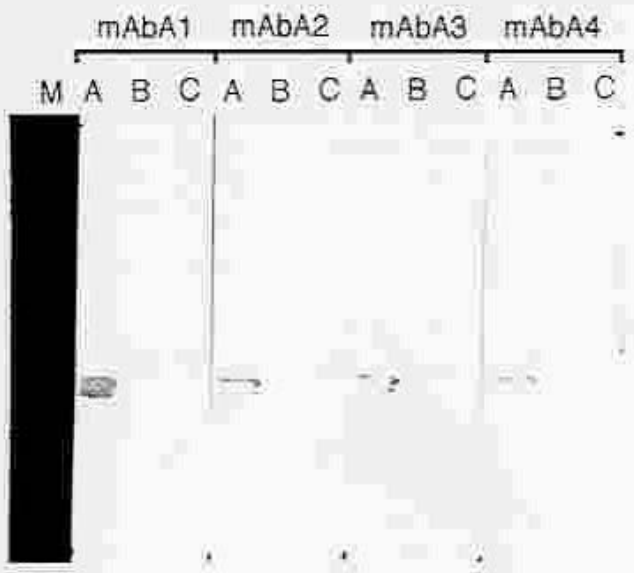
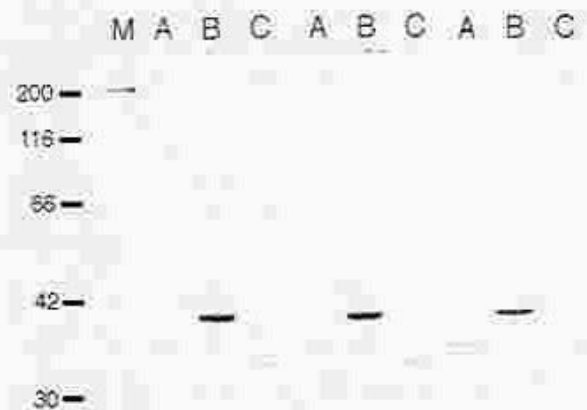
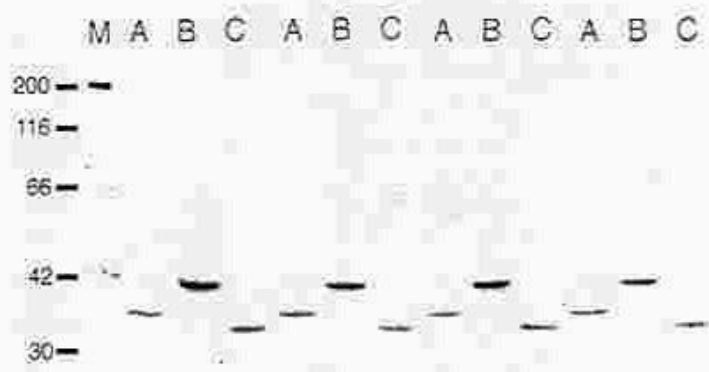


Fig.5 胚発生期における POU-M1 / SGF-3 のウェスタンブロット解析

各ステージ (stage 20 - 30) の卵から SDS 可溶化蛋白を抽出し、100 μ g / lane を SDS-PAGE で泳動し、ニトロセルロース膜にブロットした。抗 POU-M1 / SGF-3 モノクローナル抗体 mAbA1 を反応させた後、HRP 結合 2 次抗体をさらに反応させ DAB の発色で検出した。POU-M1 / SGF-3 は 42 K Da で、器官形成完了期 (stage 25) の前後で発現量が最大値に達した。

stage 20 early
stage 20 late
stage 21 early
stage 21 late
stage 22
stage 23
stage 24
stage 25
stage 26
stage 28
stage 30



Fig. 6 immunohistochemistry による POU-M / SGF-3 の発現パターンの解析

mAbA1 抗体を反応させた後、FITC 結合 2 次抗体を用いて蛍光顕微鏡下で観察した。矢印は、前部・中部絹糸腺と中部・後部絹糸腺の境界を示す。図は、全て、左が吐糸管側で、右が終端側になっている。

(A) 2 令 60 時間の幼虫絹糸腺で、中部絹糸腺内で前部区画から後部区画にかけて発現レベルが漸次的に低下している。前部絹糸腺では、一様に発現しているが、後部絹糸腺には発現は見られない。

(B) 2 眠幼虫絹糸腺で、2 令 60 時間の幼虫絹糸腺と同様の発現パターンを示す。気管系での発色も見られる。

全てのスケールバーは 200 μm である。

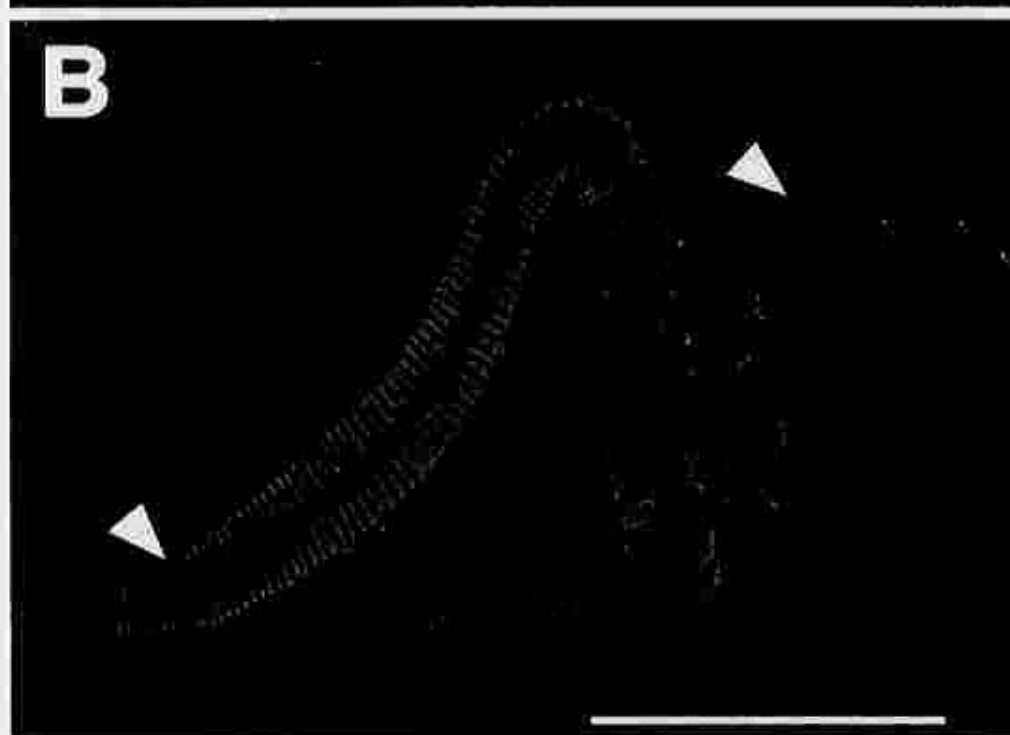
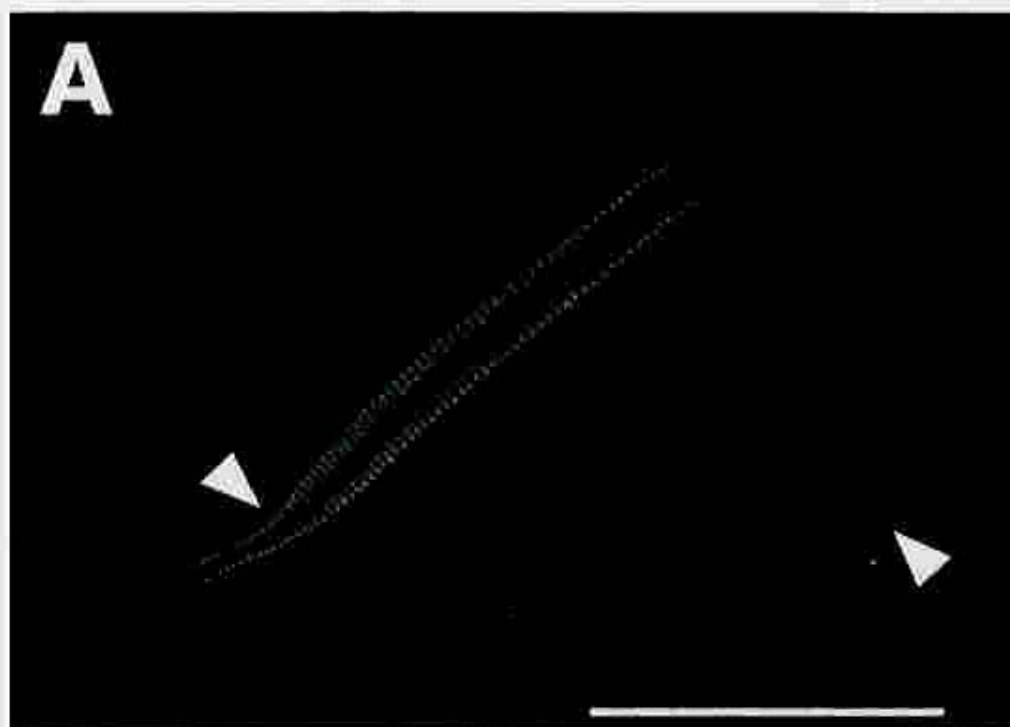


Fig.7 ウェスタンブロット解析による5令絹糸腺内のPOU-M1 / SGF-3の発現分布

5令2日幼虫絹糸腺を5つの領域に解剖して、SDSで可溶化蛋白を抽出し、100 µg/laneをSDS-PAGEで泳動し、ニトロセルロース膜にブロットして、抗POU-M1 / SGF-3モノクローナル抗体 mAbA1を反応させた後、HRP結合2次抗体をさらに反応させ化学発光法により検出した。中部絹糸腺内で、前部区画から後部区画にかけて順次発現レベルが低下している。前部絹糸腺では比較的多く発現しているが、後部絹糸腺では検出されない。ASGは前部絹糸腺。MSGは中部絹糸腺で、後に続くA、M、Pはそれぞれ前部区画、中部区画、後部区画を示す。PSGは後部絹糸腺で、後に続くA、Pは前側と後側を示す。42Kは、POU-M1 / SGF-3の位置を示す。

ASG
MSG - A
MSG - M
MSG - P
PSG - A
PSG - P



42K

Western blot analysis of the expression of ASG, MSG-A, MSG-M, MSG-P, PSG-A, and PSG-P in the brain tissue of mice.

Fig.8 抗 POU - M1 / SGF - 3 抗体による immunohistochemistry と Hoechst 染色による絹糸腺の発生過程の解析

mAbA1 抗体を反応させた後、FITC 結合 2 次抗体で検出した。図は、全て、左が胚の前側で、右が胚の終側になっている。(A,C,D,E,G,I,K,M) は、Hoechst での対比染色で、(B,F,H,J,L) は、抗 POU - M1 / SGF - 3 抗体による immunohistochemistry。(D) は、腹側からの観察で、他は全て背側からの観察。

(A,B,C,D) stage 19 の胚。絹糸腺陥入の初期。矢印は、絹糸腺陥入部を示す。

(E,F) stage 20 の胚。絹糸腺の先端は、腹部第 3 体節まで到達している。先端部での発現が消失している。矢印は腹部第 3 体節を示す。

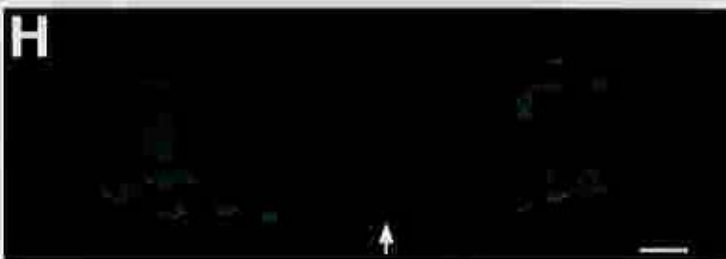
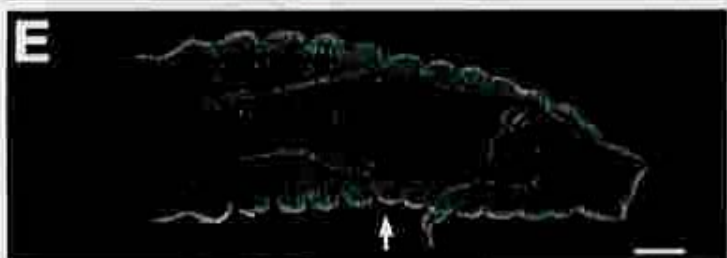
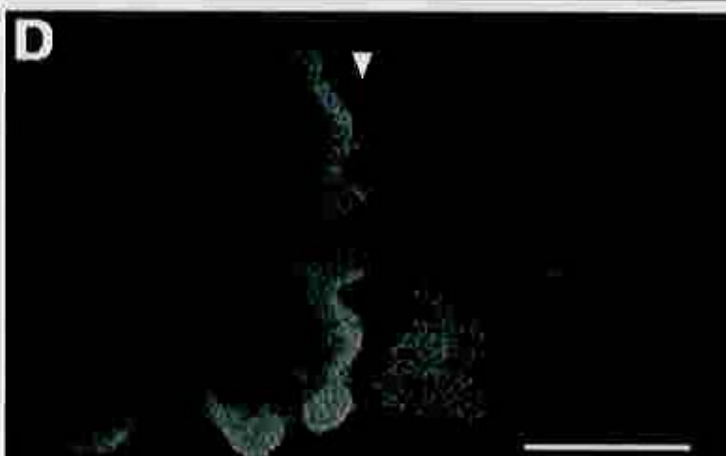
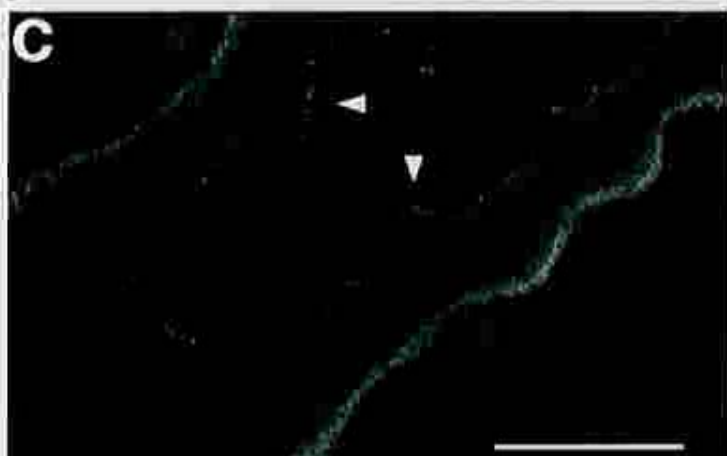
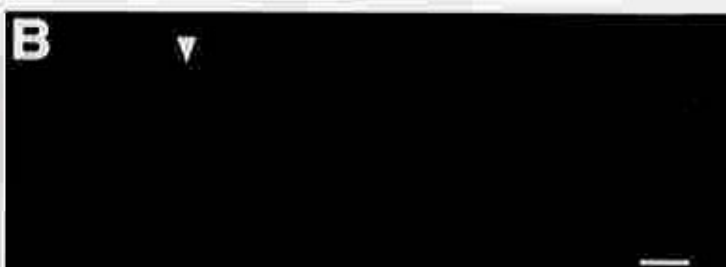
(G,H) stage 21 の胚。内臓気管系に接触しながら、伸長を続けている。

(I,J) stage 23 の胚。形態的に前・中・後部絹糸腺の区別がつくようになる。

(M) (I) の拡大図。絹糸腺の先端が、第 6 腹節由来の皮膚内臓筋と思われる部分に固定されている。矢印は、皮膚内臓筋を示す。小矢印は、内臓気管系を示す。

(K,L) stage 23 の胚。前・中部絹糸腺までは発現が観察される。気管系では発現が見られるのに対して、後部絹糸腺では、発現が見られない。矢印は内臓気管系を示す。

全てのスケールバーは 100 μm である。



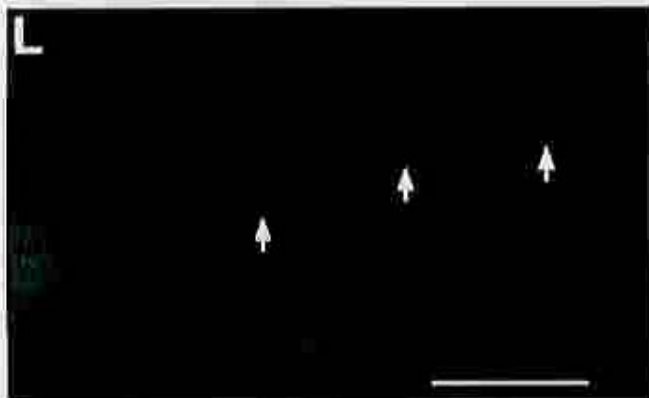
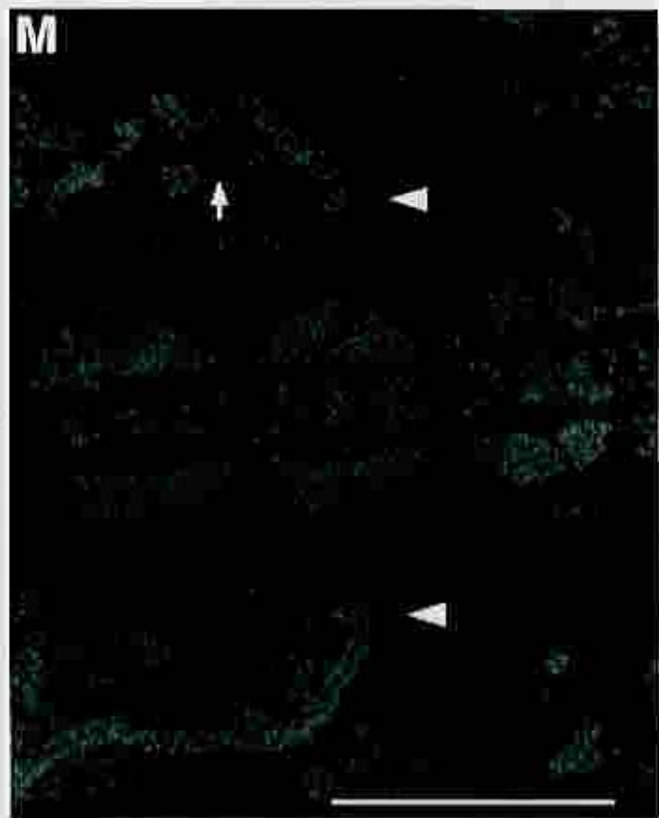
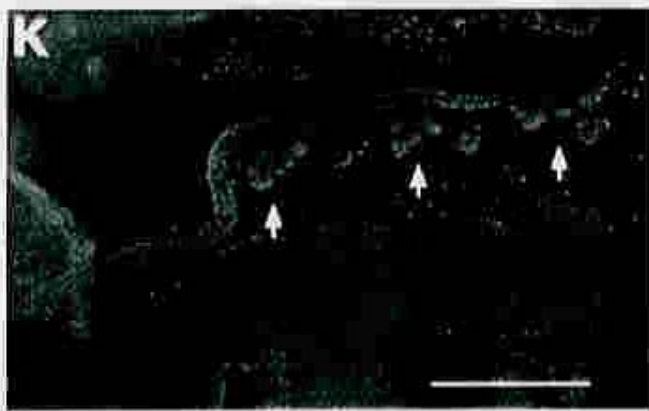


Fig.9 PCR プライマーのデザイン

bHLH とPAS - B ドメインで良く保存された領域を使ってプライマーをデザインした。イノシンを導入して、degeneration の度合いを低下させている。bHLH の領域を sense 方向に、PAS - B の領域を antisense 方向にとっている。

(sense primer)

| | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|------|
| | K | E | N | Y | E | F | Y | E | |
| 5' - | AAA | GAA | AAT | TAT | GAA | TTT | TAT | G | - 3' |
| | G | G | C | C | G | C | C | | |

(antisense primer)

| | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|------|
| | C | H | A | E | D | A | N | |
| 3' - | ACA | GTA | CGI | CTT | CTA | CGI | TT | - 5' |
| | G | G | | C | C | | | |

Fig.10 ノーザンプロット解析による *Bm trh* の発現解析

stage 22 の胚から調製した poly (A)⁺ RNA 5 μg / lane を泳動し、プロットして調製したナイロン膜を、*Bm trh* - PCR をプローブとして、ハイブリダイズした。5.4 Kb の位置に単一のバンドを示す。

(kb)

9.5 —

7.5 —

4.4 —



← 5.4

Fig.11 *Bm trh* の塩基配列およびアミノ酸配列

Bm trh の cDNA の全塩基配列および、コードされると考えられるアミノ酸配列を示した。赤色部分は bHLH、緑および青色部分がそれぞれ PAS-A、PAS-B 領域を示す。紫および黄色部分はそれぞれグルタミン、プロリンに富んだ領域を示す。

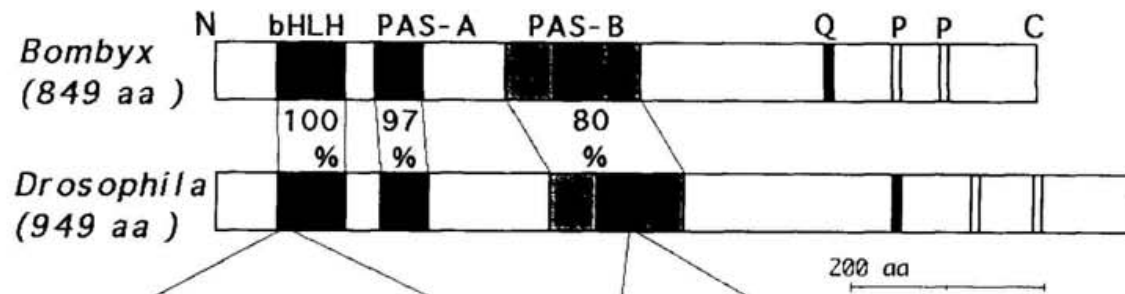
ATCGAAGATCAAAATCCAGAAATGTGTTATAAAATTTGAAATGGAACAGTTTTGAA 60
TTTATCCGCCGACCGACACATCTTGATCGTTTGGTGAAATTAATATGGGGTATGCGCG 120
GGAACTTTTGGAAACCCGAAACCCGGAAATGTTTGTACTGAGTGTGGACGATGT 180
TGCCGTATCAAGCGGTAGCGATGGCATCCGGTGGCATCCGCTGGTTTTCATCACACC 240
D Y A V A S A G F H H H Q
AGCGCCCCGGTGTGGCCGGAGTGATGGGGCTGCCCGGGCCAGGATCCGGTTTGAATC 300
R P G G L P G V M G L P G P G S G L N P
CAGGCTGAACCCGGCTCCACCCATCTCGTTCGTAACAGAACCCGGATATCTGTG 360
G L N P A F T H S W F V Q T S P D I C R
GGCAGCAACAGATCCAAACCAATCGCATCTCGAACTGGTATCTCGAGCTCCGAAAAG 420
Q Q Q A S N Q S H L E P G I L L R K E
AAGAGTCGTGACGAGCCGCTCGAGGAGGAAAGGAAACTACGAGTCTATGAGT 480
S R D A A R S R R G K E N Y E F Y E I
CAAGATGTTGCTTACCCGGCCATCACAGTCACTGGCAAGCGCTGATCA 540
K M L P L P A A I S Q L D K A S I I
CGCTGACATAAGCTACTCAAGTTAAGGACTTCTCCGGACACGGGACCCCGCT 600
E T E S Y L K L L D F S G H G D P P W
GGAGCCGGGATCCACCTCTCCAGTAAAGCTTTGAAAGGGCACAGAATCGTGAACAG 660
S R D P P P S S K A L K G A Q N R R T A
CGGCTGGTCTGGCGATGGATTTTCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG 720
A G L A M E
ACCAAGCAGATCATGCTGAGATTGCTGAGCAGTAGGGTATCATTTGCCGGGAGAT 900
Q A D H A E I A E Q L G L S L A G R S
CAGGAGTGGGACTGAACAGTCCCGCTCGGGGAGCAAGAGGAAGTCAACATGGCA 960
G G A G L N S P A S G S E E G S Q H G T
CAAAACCCCTGATGTGATCCGAAATGAGCCTCGCAAGTAGTGGCTCTATATCGGG 1020
N N P D V S S Q M S L A A S G S L Y R G
GAATGGATCGGGCTTCTGTGTCGGCATGAAGAGCACCTCCACAAAAGCGGATGCCATT 1080
M D R A F C V R M K S T L T R K R G C H F
TCAAATCATCAGGATACAGGGTGTCTCATGTTGTGTAGACTCGGCTCAGTACTCAT 1140
K S S G Y R V V L M L C R L R P Q Y S F
TCTCCACAGTGGAAATCAGCCAGCTACTCGGAATGGTGGCTCGCCATAGCAC 1200
S H S R K S P T V L L G N V A L A I A L
TCCACCCECCCTCCGTCACGAGATACGACTAGAAATCCGACATGTTTGTGACCAGAA 1260
P P P S V H E I R L E S D M F V T R I N
ACTTTGACTCCGAATAGCTCATTGCGAACCAAGTAGGGTATCCGAGCTGCTTGGTTACA 1320
F D F R I A H C E P S R V S E L L G Y T
CAGCAGGAGTGTGACCGAAAGAACCTTACAGCTATGTACGGAGAACGCCAACCA 1380
E E E U T G K N L Y T L C H G E D A N K
ACTTAGGAATGTCACTTAGATTTAATGAACAAAGGCCAAGTACTGACCCACTACTATA 1440
R K C H L D L M N K G Q V L T H Y Y R
GGATAATGAACAACTTGGCGGTACACCTGGATCGAGACTCGGCTACCGTTGTGTGT 1500
I M N K L G G Y T W M Q T C A T V V C S
CCTCTAAAAATGCTGAAGAACAAATAAATTTGGTCAACTGTTATGAGCGGACAG 1560
S K N A E E N I E C V N Y V I S G R E

AGTACCCCAACACAGTAATGGACTCTGCCAATCGGAAAGAGCGTCAAGGTGTGAAC 1620
Y P N T V M D C C Q L E E S V Q G V X R
GAGAGAAACACCGGGAGATCCCAGAAACGGACCCGACAGCCGACAAACACGGGCGTC 1680
E E T T G D P E N G P P D T D N T G G P
CCGCCCAACATCCAGCATCCGGCAGAAAGAACCGAACCTCAACGAAACAGCGAGACAG 1740
P P T S R H P A E R T E P P T N S E T A
CTTECTCTGCACGGTCAACGGCTCTGACGTAAACGACCTGACGGGCTAAACGACGCCC 1800
S S A P V N A S D V T H L T R L N D A Q
AGCCTCTACCGTTACACACGACCCCGGAGAGACTTCCCAATGCCCGCTAGAAGACTGA 1860
P L P L H T T P E R T S P M P A R R L K
AAAAACGAAACAAACCAACGACTCGGACGAGGACGAGGACGAGAGCGGAAATCCGCT 1920
K R K Q T T D C O E O E D E R R K S A S
CAAAACGACAGCTACAATTEACCCGGGACCGGACATGACCAAAACAGCCAACTTAA 1980
N P A A T I S P A D R D N T K T A N L T
CAATACCCGAAGCAGGAAACGATGCCACCTCGGTGAGGATCTAGAGAACCGGATGCGA 2040
I P E A G N D A T S V R D L E N A M S K
AGCATCTACCGGCTCTCGACGGCAAGAAATGCTCTGACCGACCGCTCTCTACGG 2100
H L P A L D G K E I A H R P T D F S T D
ATGCGTTACTGAAACAGCAGCAGAGAGTGCACATCAATGGATAGGGACCAAAACC 2160
A L L K Q Q Q Q K S T I Q W I G T Q N H
ATCATTTGATGAACCGTCAGATACCTACCAACATCCGCTTTCGACACAGCGTCCGGT 2220
H L M N R Q I P T N H P S S T P A S A L
TACTGAGACGCTTACGCAACAGAGAGCGTTATAAGAAAGCAATTTCTTGGTGAGC 2280
L R Q L Y A N R E S V I R S N S A Y S E A L R
GCAGAAGTGGGCTACTATTCGAAATGACGGTCACTGAGCAGCAGCTCGGACCGCCGAG 2340
R T G G Y Y S N D G Q S G P L P T P P G
GAAGCGAGGGATCCGGTATAGCGAAACAGTATAGGTACAAAGAAACGGATATAGTTCCG 2400
S E G S G Y S E Q L G H K G T D I G S L
TGCGTACGGAGGATAGCGGATACCAATTCAGCAATGACGCGCCCGGTTCAAGTTCCG 2460
A Y G G Y A E Y H S A M T P P G S V S P
CGAGAGCAAAACAAATACGCTTGTGTGACGCAATAGCGCTTATTCGGAAGCGTTAA 2520
R O K Q Q Y A L S Y D N S A Y S E A L R
GGCACTCGTATTTGGGGAAGCGCTCTACCGTTGAAGCTCAAGCGTATTCGGCGGTAC 2580
H S Y L G E A P L P L K P Q A Y S A V P
CGGGCGGTTAGATTACCGCTCTCAATGGACCAATCCAGTCTTCCATCCGCTTCTGT 2640
G A L D Y A S P L D Q S Q F F H P P S S
CGTCCATCTGACACATCCCGAGGCGACGGGCCCCAGCCAGCCATCCACCAGCCCG 2700
F H L Y H P Q A H A A H A P T H S H Q P V
TAGACAAGACAGCCCGCTTAAACAACTGGTACTGACGGGGTCAATGTATGCAAT 2760
D K T A P P N T N W Y S T G S *
AATCCGCTGCTGCAAAATCAAAGTATTTTGTATGTTTGTGTTTCAATGTTTCT 2820
GAGGATCGATTATTTAAGGCTACTTTAGAAACAGCTCAATTTAGGTTGTATATA 2880
TTGATATTTAAATCTAATATGGTATACGGCTAAAGACTCCAAACATTAAGTTGTT 2940
GGCCATCAAGTTCACCGTATGGCTTATTTGTAATCTCAACTCAGCGGAAATAGT 3000
ATCGAGAAATCCATAACCGGCTTCCAAATAGTAGAATCAATTTATAGATTG 3060
TCGTATAAATTTGGATTACATGCCAGTATTTCTTAAAGAAACATCGAACTTGAC 3120
ATCTTCAAAATTTCAAAACCCAGGCTAAACATTTACCGGTTGAAGTTTCAATGTC 3180
TCATCTGATCAGTTTAAATTTACTTCTTTGGCGACTGACTGGGTCTGAAGAGATT 3240
TACGATAATCTCTGAAACATTTCTGCTCTGCAATTAATCATATCGAAATAAAA 3300
TTAATCAACATAAACATACCGTTTCTCGCACTGCCCTAAATTAATGGAATCAATCT 3360

GCTTATAATGCTCACCCTTTAGATCTAAGCTCTTCGCAAGAACAAATGAACCTGCA 3420
AAGCTTAATTTACAAGTAAACCTCTTAAAGTACTTTTCGGGAAATTTTGTCCACT 3480
CCGGCATGATTTGGCTAGACATGAGTCAAGCTGAAATTAACCTCTTTGGAAAGTAGAT 3540
AAAAATCACCACTGACAGTCTTATCAATTTACTTCTTGAATGTATCCACAATAGA 3600
ATTACGGAAATTAACAAACGAATTAGATAATTTGAAACAACTACTGCTTTAGACAT 3660
ACCAACAATCCGTTGGCTGACCGGAGACTTTGAAACCTCATGACATGGCTGAACAA 3720
CACACAGTGTGGCTACTGGTAACTCTGCCAAGCTGCCAATATGGCTAGAGATGAAAA 3780
GATGATGAGTCCACTACAGCTGGGATTTCTGACTATCAAGACTTGGAACTACAGT 3840
ATTTCCCTCTGTTGAACTTATCGGCTGATCTGACGAAAGAAATTTGGAAAGAA 3900
GACAAAGACTGAGGTAATTTGATTTGAAAGAACCTTATGATGCGGTAAAATCTCT 3960
GATGATCAACCGCTCTGCTGACAGCAAAATAATGATAGCACTGATGAAGATCA 4020
GATGACTGTATCCCGATGATGATGAAGCAGGGCAGCATGATGACGACGAAGACGAC 4080
CTGGCGAAGATTACGAGAAATGATGACATAGATCTTAAATGATGACTCATCAACAA 4140
GACTCGAAATCTGAGAAATACAAAGAAATCTGAAACAAAGCCAGAGAAAGTTAAG 4200
GACATCAAGCTCTTACTTATACGAAATTTGAGCAGACGCTATGATGACGAACATCG 4260
ACCGAGGAAGAACCGGCTTACAGCTACTTGTGGCAATATCAATTGCCATCTCGGA 4320
CGCTTTTGTGCTATCGTTATCGCTAAGGCTGCTCATGATGACGTGTAATCAAGAAC 4380
AGGAGCTCAGATCAACAGTGCATTTATGACGATGATGATCAACCCGGCCGCAAAA 4440
AAGGACTGGGCTTGGTATCCAGCAGTGTGCGAAGACTCACAGGCTCCGGCACTCCA 4500
AACTAAGCCGATAGCTCACTTCAAGGCTCACTGCAATGATCCAACTATGCTCTAT 4560
GAGACAGTCCCTTCCACCAACAACTGTCGAGAAAGCAGTGTGAGCCACAGTATG 4620
TGTGAGCCACAGTACAAAATTAATTTTAAAGGTTATATCATGAACTAAACACTGAG 4680
CTAAGCTTTTTCAGCAACAACTGATAGATATACCGCTGATGACAAATTAATTTAT 4740
GACATTTTATATGCTCTTATGTGACTCTGATGAACTGACAAATTAATTTAT 4800
TAGCGCTTTTTCGAAATTAAGTAAACAACTGAACTCAAACTAATTAATTTAA 4860
GATTATACATATTAATATATAAAATGATGATGTTTATTTTATGACTTAA 4920
AAATATTAATAAATACTAAAAA

Fig.12 *Bm trh* と *Drosophila trh* のアミノ酸配列の比較

Bm trh にコードされると考えられるアミノ酸配列を *Drosophila* と比較した。赤色部分は bHLH、緑および青色部分がそれぞれ PAS-A、PAS-B 領域を示す。紫および黄色部分はそれぞれグルタミン、プロリンに富んだ領域を示す。また、PCR に用いたプライマーの位置を図中に示した。



(sense primer)

K E N Y E F Y E
 5'-AAA GAA AAT TAT GAA TTT TAT G-3'
 G G C C G C C

(anti-sense primer)

C H A E D A N
 3'-ACA GTA CGI CTT CTA CGI TT-5'
 G G C C

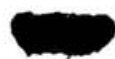
Fig.13 *Bm trh* による *Bombyx* genome DNA のサザンプロット解析

HindIII (lane 1)、およびEcoRI (lane 2) で消化した genome DNA を 20 μ g / lane で 0.7 % アガロースゲル電気泳動で分離後、ナイロン膜に転写して、*trh-is-1* をプローブとしてハイブリダイズした。HindIIIでは、約 10 Kb、EcoRI では、6.0 Kb のバンドが得られた。

H E

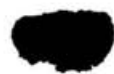
(kbp)

19.2-



7.7-

6.2-



4.3-

3.5-



2.7-

1.9-

1.5-

in situ ハイブリダイゼーションによって、各ステージの胚での *Bm trh* 遺伝子の発現状態を観察した。全ての図は左が胚の前側で、上が胚の背側となっている。

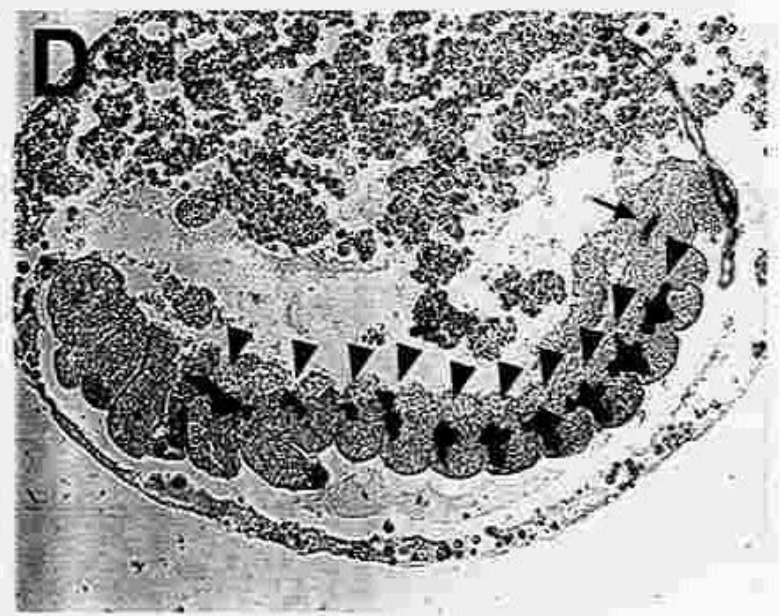
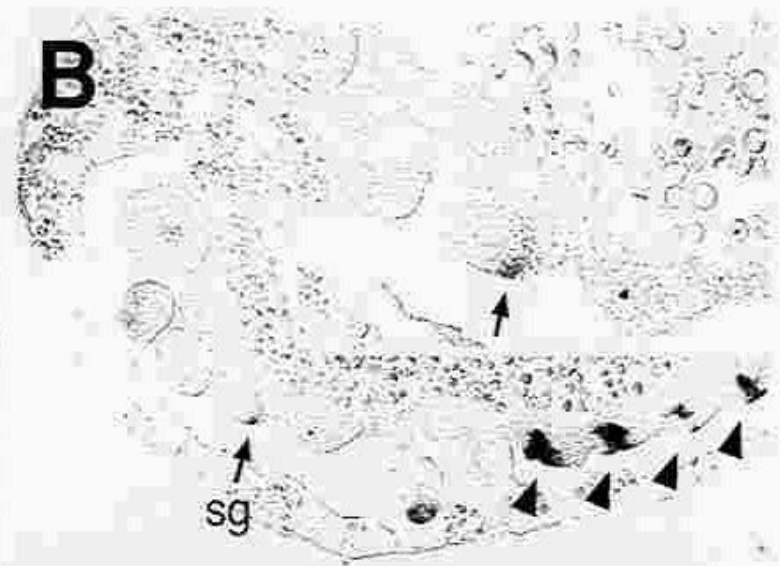
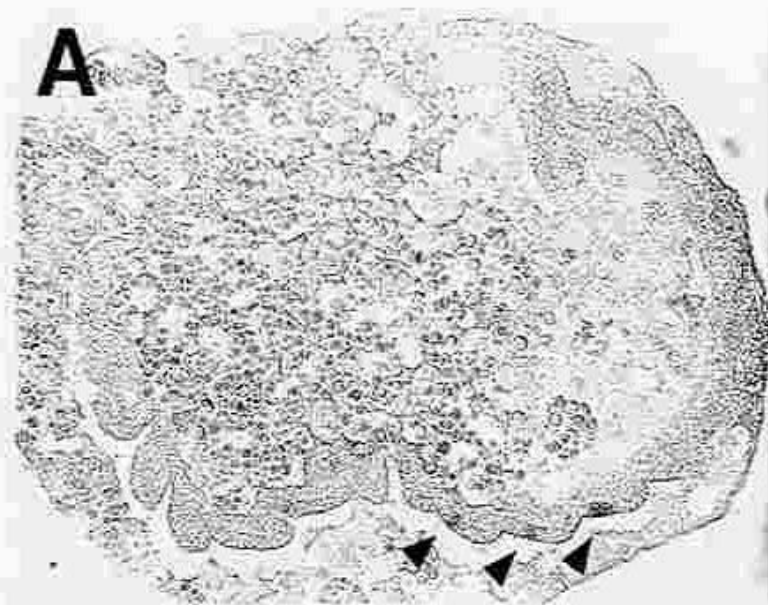
(A) stage 18 の胚で、気管原基に発現している。

(B) stage 19 の胚で、下唇節の基部に発現が認められる。気管系への強い発現と気管陥入が観察される。矢印は気管陥入部。小矢印は絹糸腺原基を示す。

(C) stage 20 の胚で、伸長した絹糸腺に一様に発現が認められる。

(D) stage 20 の胚で、気管系が最初の分枝を行い前後に連結しつつある (矢印)。

Drosophila posterior spiracles と相同と思われる器官にも発現が始まる (小矢印)。



in situ ハイブリダイゼーションによって、各ステージの胚での *Bm trh* 遺伝子の発現状態を観察した。全ての図は左が胚の前側で、上が胚の背側となっている。

(A) stage 21 の胚で、絹糸腺は、腹部第 1 体節まで伸長している。絹糸腺の先端部分で発現がなくなりつつある。

(B) stage 23 の胚で、前部絹糸腺に特異的に強い発現が見られる。矢印は前部と中部絹糸腺の境界を示す。

(C) (B) の拡大図。中部絹糸腺は、前部絹糸腺よりも肥厚し、形態的な差違が明らかになっている。

(D) stage 30 の絹糸腺で、前部絹糸腺に限局した発現が見られる。

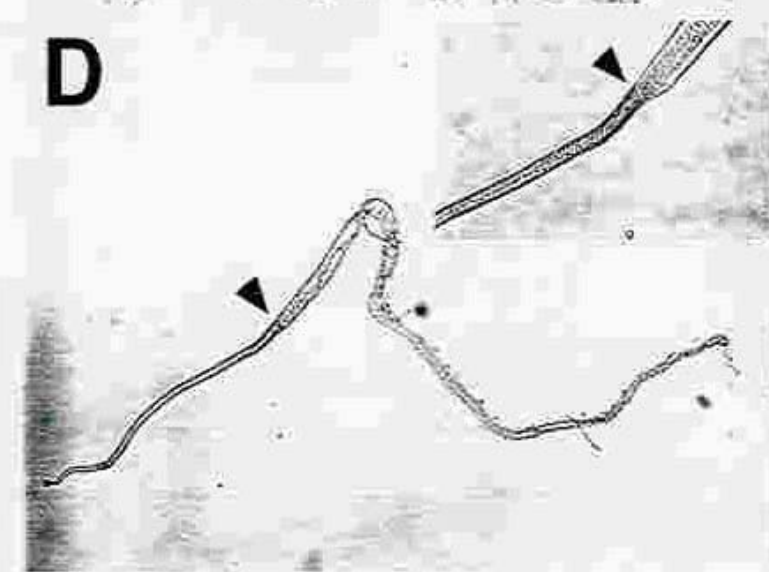
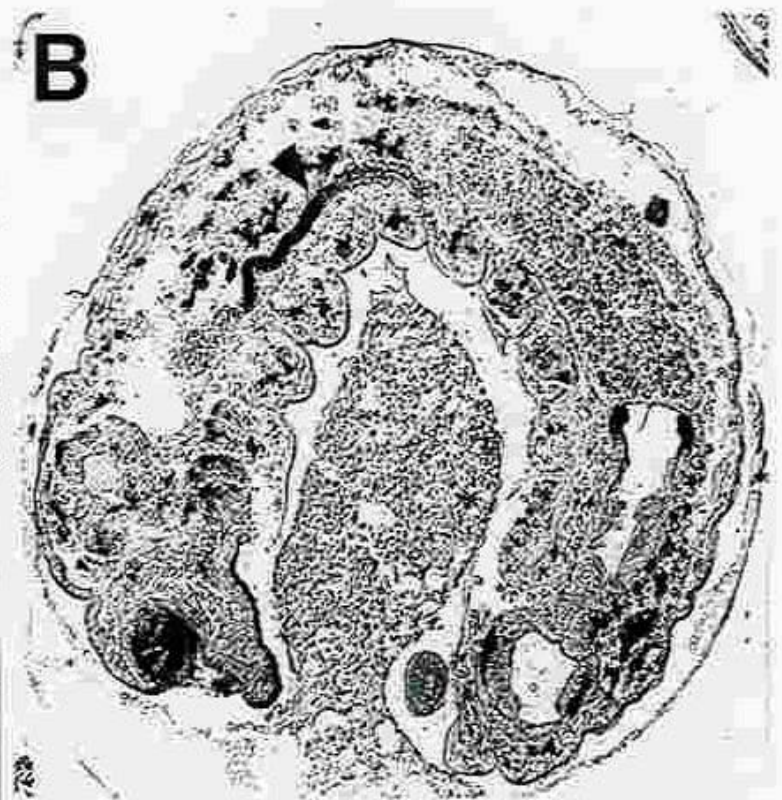
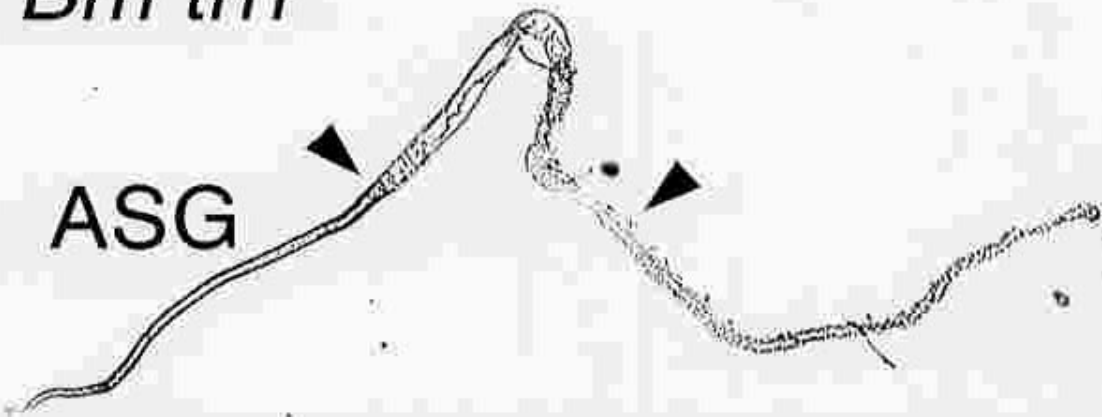


Fig.16 *Bm trh*、POU-M1/SGF-3、*Bm Fkh* の発現パターンの比較。

Bm trh は前部絹糸腺に、POU-M1/SGF-3 は前・中部絹糸腺に、*Bm Fkh* は中・後部絹糸腺（Kokubo et al.,1996）にそれぞれ領域特異的に発現する。

Bm trh



POU-M1 /
SGF-3

MSG

ASG



Bm Fkh /
SGF-1

MSG

PSG

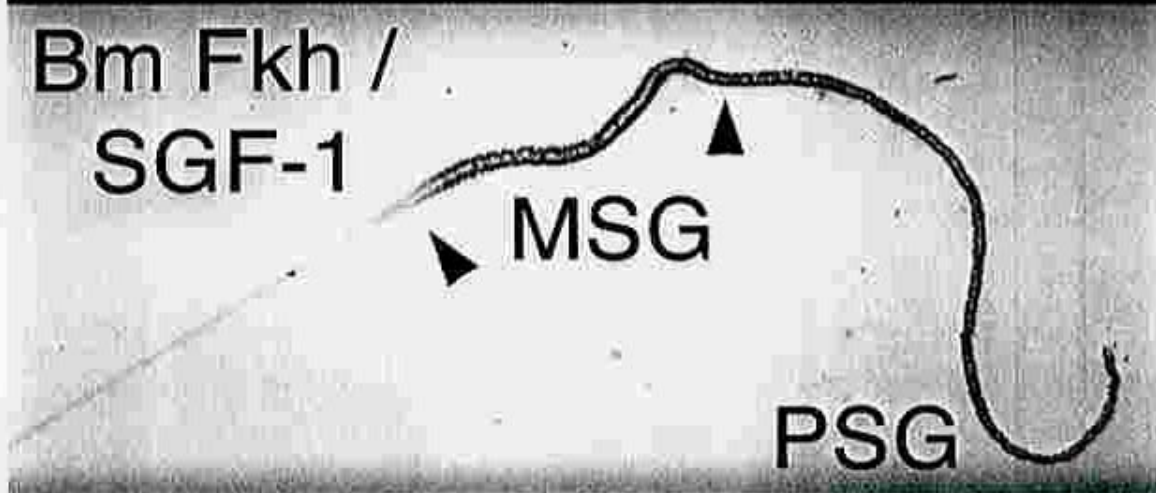


Fig.17 絹糸腺発生分化についてのモデル。

まず、Bm Scr の機能により下唇節の性格づけがなされ絹糸腺形成が誘導される。その結果、*Bm trh*、POU-M1/SGF-3、*Bm Fkh* の発現がおこり、絹糸腺伸長形成にともなって、それぞれが異なる領域に特異的に発現するようになり、最終的に前・中・後部絹糸腺の区分が明らかになる。そして、前部絹糸腺からはダクト特異的な遺伝子群の発現がおこり、中部絹糸腺からセリシン-1 遺伝子などが、また、後部絹糸腺からはフィブロイン遺伝子などが発現するようになる。

Bombyx mori silk gland

Bm Scr

Bm trh

POU-M1 / SGF-3

Bm fkh / SGF-1

ASG

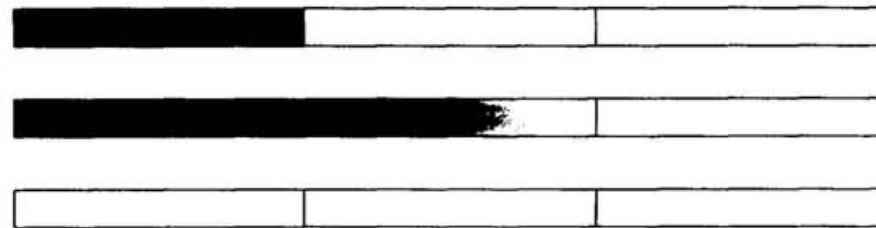
MSG

PSG

Bm trh

POU-M1 / SGF-3

Bm fkh / SGF-1



duct specific genes

sericin-1 gene

fibroin gene