

氏 名 松 浪 勝 義

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第279号

学位授与の日付 平成9年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究所 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 絹糸腺発生過程における*Bm trachealess* およびPOU-M1/SGF-3の解析

論文審査委員 主 査 教 授 長濱 嘉孝
教 授 鈴木 義昭
助 教 授 上野 孝治
助 教 授 兒玉 隆治

論文内容の要旨

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。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な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。

これまでに、中部絹糸腺特異的なsericin-1遺伝子の発現を制御する上流シス配列が解析され、転写活性化に重要なSCサイト結合因子としてPOU-M1/SGF-3が同定されてきた。しかし、実際に、絹糸腺内で、POU-M1/SGF-3とsericin-1遺伝子の発現との間に *in vivo* でのような相関が見られるのか、明らかでなかった。そこで、本研究では、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うことにした。まず、POU-M1/SGF-3については、モノクローナル抗体の調製を行った。ウェスタンブロット解析により特異性を確認したのち、immunohistochemistryにより絹糸腺での発現を解析した。その結果、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の低下していく様子が観察された。また、sericin-1遺伝子については、まず、転写が胚発生期のどの時期から始まるのかをノーザンブロット解析で確認した。その知見をもとに胚発生期の絹糸腺での発現を、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションで解析した結果、前部区画から後部区画にかけて漸次的に発現レベルが高まる様子が観察された。POU-M1/SGF-3の発現に対してsericin-1遺伝子の発現が相補的であったことから、前部区画から中部区画にかけてPOU-M1/SGF-3が転写を負に制御している可能性を示唆する結果を得た。この結果から、sericin-1の転写活性化には閾値が存在し、POU-M1/SGF-3が濃度勾配を形成することで、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いている可能性が考えられる。また、幼虫期の発現パターンについても解析を行い、sericin-1遺伝子が、令・眠期に応じて転写をON/OFFするのも関わらず、POU-M1/SGF-3の発現パターンは終始変わらないことが明らかになり、POU-M1/SGF-3が、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sericin-1転写を制御していることを示唆する結果を得た。

Bombyx 絹糸腺と *Drosophila* 唾腺は、相同器官であると考えられているが発生過程には明らかな差が見られる。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、唾腺原基細胞は陥入開始後は分裂せず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こるのに対し、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異なっている。POU-M1/SGF-3が、中部絹糸腺に多量に発現しているのに対して、その *Drosophila* ホモログであるCflaは、*Drosophila* 唾腺には発現の報告がないことから、両者の器官の間で大きな差となっており、発生過程の相違を引き起こす要因の1つではないかと考えられた。そこで、Hoechst染色により伸長過程を観察し、それに基づいてPOU-M

1/SGF-3に対するモノクローナル抗体を用いたimmunohistochemistryを行い、絹糸腺初期発生過程を解析した。その結果、POU-M1/SGF-3が、まさに陥入が始まろうとする時期から陥入部に発現し始めることが明らかになり、絹糸腺の発生過程に重要な機能をもつことが、示唆された。また、最近、*Drosophila*の気管系や、唾腺の形態形成に *tracheiless(trh)* が重要であることが報告され、絹糸腺でも重要な役割を果たすと推察され、*Drosophila*唾腺との発生の違いに関与している可能性から、*tracheiless*の *Bombyx*ホモログ (*Bm trh*) cDNAのクローニングを行い、発現を解析することにした。まず、*trh*と同じファミリーに属する遺伝子との間で良く保存された領域をプライマーとして増幅し、得られた断片の塩基配列を確認したところ、*Bm trh*の一部と見られる配列が確認できた。次にこのPCR断片をプローブに用いて、cDNAライブラリーをスクリーニングし、塩基配列を決定した。*Bm trh*は、bHLHやPASドメインといった機能ドメインに高いホモロジーが見られた。さらに、*in situ*ハイブリダイゼーションにより *Bm trh*転写物の発現パターンを解析したところ、気管系、絹糸腺、posterior spiraclesと相同の部位に発現が見られ、発現パターンも類似していたことから、*Drosophila trh*のホモログ遺伝子であると判断した。さらに、詳細に絹糸腺の発生過程での発現を解析すると、*Bm trh*は、絹糸腺の陥入期に下唇節の基部で発現を開始し、伸長が進むにつれて先端部分での発現が消失し、やがて、前部絹糸腺に限局する様子が観察された。*Bm Fkh*が中・後部絹糸腺では一様に発現することが知られており、中部と後部絹糸腺との間で発現に差が見られるPOU-M1/SGF-3が、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考えられる。

これらの結果は、*Bm trh*の発現している前部絹糸腺が、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を獲得し、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が、また、中部絹糸腺ではsericin-1が終末遺伝子として特異的に発現するようになる、というような絹糸腺形成から終末遺伝子の転写に至る制御カスケードが存在する可能性を示唆するものである。

審査結果の要旨

松浪君は、絹糸腺の発生過程におけるセリシン-1 遺伝子の発現状況を、ノーザン法ならびに *in situ*ハイブリダイゼーション法によって解析した後、この遺伝子の重要な転写制御因子であるSGF-3/POU-M1の発現をimmunohistochemistryで解析した。その結果、sericin-1 mRNAの発現強度とSGF-3/POU-M1の発現強度とは互いに相補的であることが明らかとなった。このことから、一つの可能性としてSGF-3/POU-M1が負の制御に関わっていることが示唆された。

次に、カイコ絹糸腺の発生とショウジョウバエ唾腺の発生のメカニズムの異同を追求する一環として、*trachealess*ホモログの役割に着目して、そのcDNAクローニングを行ない、全体構造を明らかにして、*trachealess*との配列比較から、これを*Bombyx*ホモログと同定した。*in situ*ハイブリダイゼーションにより*Bombyx trachealess*転写物の発現パターンを解析した。その結果、カイコ胚の気管系、絹糸腺、posterior spiraclesに発現が見られた。絹糸腺の発生過程にそっての詳細な観察から、絹糸腺陥入期にその原基で発現が開始され、絹糸腺の伸長が進むにつれてその先端部での発現が消失し、やがて前部絹糸腺に限局する様子が見られた。

これらの結果は、*Bombyx trachealess*の発現している前部絹糸腺が、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すこと、また、既に明らかにされていたように中部・後部絹糸腺はSGF-1/BmFkhにより分泌組織としてのidentityを確立すること、さらにSGF-3/POU-M1が前部・中部絹糸腺に発現することによって、中部・後部の区分が明確になるという様相についての仮説モデルを提唱するための基礎データとなると判断された。

また、学位論文として提出された研究結果について口頭発表させた後、審査委員が論文内容について諮問した。さらに、申請者の関連研究分野の一般知識およびその背景となる基礎的知識についても口頭諮問により審査した。これらの諮問に対する申請者の応答はいずれも適切であった。また、英語に関しては、論文作成および論文読解に関して十分な能力を有していると判定された。これらの結果をもとに、審査委員会は申請者の論文内容、学識、語学力とも学位取得に値するものと判断した。