

氏名 孫 冠 誠

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第49号

学位授与の日付 平成5年3月23日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 BmFTZ-F1遺伝子のクローニングとその発現調節

論文審査委員 主査 教授 中 辻 憲 夫

教授 瀬 野 悍 二

教授 桂 勲

教授 小 原 雄 治

教授 石 崎 宏 矩（名古屋大学）

論文内容の要旨

カイコの転写因子BmFTZ-F1は、ショウジョウバエにおいてFushi tarazu (ftz) 遺伝子の発現調節に関与するFTZ-F1と同じ塩基配列を認識して特異的にDNAに結合し、さらにFTZ-F1と生化学的性質が類似しているカイコの因子である。BmFTZ-F1は、カイコ後部絹糸腺から精製されており、その分子量は73kdである。また、そのトリプシン分解物の解析によって4つの部分ペプチド配列が決定されている。一方、カイコ後部絹糸腺全細胞抽出液を用いたin vitro転写系による解析より、BmFTZ-F1は、ショウジョウバエのftz遺伝子の転写を活性化することが明らかとなっている。

この博士論文は、BmFTZ-F1遺伝子をクローニングし、その構造を解析し、また、その発現様式を解析することにより、その機能および発現調節機構を解明することを目的として行った研究結果をまとめたものである。

まず、カイコを後部絹糸腺ポリ(A)RNAより合成したcDNAを鋳型にして、BmFTZ-F1のトリプシン分解物のアミノ酸配列をもとに合成したDNAプライマー(Bm31U)及びFTZ-F1のZ_nフィンガー内部のアミノ酸をもとに合成したDNAプライマー(p5ZNF)を用いてPCRを行ったところ、0.42kbのフラグメントを得た。FTZ-F1のZ_nフィンガーの部分を探るにザンプロットハイブリダイゼーションを行ったところ、この0.42kbのフラグメントがハイブリダイズした。次に、この0.42kbのフラグメントの塩基配列を決定したところ、推定されるアミノ酸配列はFTZ-F1と高いホモロジーがあることが明らかとなり、得られた0.42kbのフラグメントはBmFTZ-F1遺伝子の一部であると推定された。

この0.42kbのフラグメントを探るに用いて、カイコの後部絹糸腺ポリ(A)RNAをもとに調製したλgt10cDNAライブラリーをスクリーニングし、その中から10個のハイブリダイズするクローンを得た。この中で、強くハイブリダイズする4個のクローンの制限酵素地図を作成したところ、これらのクローンはオーバーラップしていることが明らかとなった。

これらのクローンのほぼ全領域の塩基配列を決定したところ、BmFTZ-F1は555アミノ酸残基からなるタンパク質で、Cys₂-Cys₂タイプのZ_nフィンガーを2個持つステロイドホルモンレセプタースーパーファミリーの一員であることが判明した。さらに、BmFTZ-F1は、ショウジョウバエのFTZ-F1とマウスのELPおよびLRH-1と高いホモロジーを有することが明らかとなった。これら4つの因子は多くの特徴を共有し、それぞれの生物におけるカウンターパートであるだけでなく、ステロイドホルモンレセプタースーパーファミリーの中で、『FTZ-F1サブファミリー』を形成すると結論した。

BmFTZ-F1 cDNAを探るに用い、カイコのゲノムDNAへのザンプロットハイブリダイゼーションを行った結果、BmFTZ-F1はシングルコピー遺伝子であることが明らかとなった。また、カイコの幼虫期3齢2日から成虫の3日にかけて、後部、中部絹糸腺および脂肪体のRNAへのノーザンプロットハイブリダイゼーションを行った結果、BmFTZ-F1は、カイコ幼虫が脱皮する直前、蛹化する直前および羽化する直前に、時期特異的に発現することが明らかとなった。これらの結果により、BmFTZ-F1がカイコの脱皮と変態にかかわっていることが示唆された。

カイコの5齢3日の幼虫に、幼若ホルモンあるいはエクダイソンを注射し、BmFTZ-F1の発現量を調べた結果、BmFTZ-F1の発現がエクダイソンにも幼若ホルモンによっても誘導されることが明らかとなった。カイコの5齢3日幼虫の後部絹糸腺のin vitro培養系に幼若ホルモンあるいはエクダイソンを加え培養し、BmFTZ-F1の発現量を調べた。幼若ホルモン存在下で培養するとBmFTZ-F1の発現は3時間以内に誘導されることが明らかになった。一方、エクダイソン存在下で培養した場合はBmFTZ-F1の発現は誘導されてなかったが、エクダイソン存在下で6時間あるいは12時間培養し、その後エクダイソンを除いて6時間から12時間培養しつづけるとBmFTZ-F1の発現が誘導されることが明らかとなった。

以上のことから、BmFTZ-F1は幼若ホルモンあるいはエクダイソンにより誘導され、脱皮の直前に時期特異的に発現し、カイコの変態にかかわる遺伝子の発現調節に関与することにより、変態に重要な役割を果たすことが示唆された。

論文の審査結果の要旨

孫 冠誠君の博士論文は、キイロショウジョウバエの転写調節因子として知られている FTZ-F1 のカイコにおける相同な因子として発見された BmFTZ-F1 について次のような研究を行なった結果をまとめたものである。①当研究グループのこれまでの研究により知られている BmFTZ-F1 蛋白質のアミノ酸配列をもとにして、DNAプライマーを作成し、カイコ後部絹糸腺からのポリ(A)RNAから合成したcDNAを鋳型にしたPCR法により、BmFTZ-F1のcDNAのクローニングを行なった。②このcDNAの塩基配列を決定して既知遺伝子の塩基配列と比較したところ、BmFTZ-F1はショウジョウバエのFTZ-F1やマウスのELPおよびLRH-1と高い相同性を持つことなどから、これら4つの因子はステロイドホルモンレセプタースーパーファミリーのなかで、「FTZ-F1サブファミリー」を形成するとの結論を得た。③BmFTZ-F1cDNAをプローブに用いたサザンブロットハイブリダイゼーション及びノーザンブロットハイブリダイゼーション実験により、BmFTZ-F1はカイコにおいて単一コピー遺伝子であり、その発現パターンに関しては、カイコの幼虫脱皮、蛹化、羽化各々の直前に時期特異的に発現することが明らかとなった。④カイコ幼虫への幼若ホルモンやエクダイソンの注射、あるいは後部絹糸腺の器官培養系へのホルモン投与の実験によって、両ホルモンの影響によりBmFTZ-F1の発現が誘導されることが分かった。

以上の研究結果はカイコのBmFTZ-F1遺伝子について、cDNAの構造を明らかにしたのみでなく、その機能に関しても、昆虫の変態に密接に関連する発現様式と調節を示すことを明らかにしたことにより、今後この遺伝子の生体内での機能解析の重要性と研究方向を指し示すという意義を持つものであり、当専攻の博士論文として十分な資格を備えたものであると判断できた。特に、幼虫脱皮、蛹化、羽化各々の直前にこの遺伝子ほどきわめて時期特異的に発現する遺伝子はこれまで殆ど知られていないことから、昆虫変態の分子機構の研究にとって、今後大きく寄与する発展の可能性が期待できるとの評価が審査委員から述べられた。

孫君の博士論文はこれらの研究結果を適切に論旨も分かりやすく記述していた。また口演発表が日本語が母国語でないという不利な点を感じさせないほど明快に行なわれたことについても審査委員から高い評価を受けた。さらに、孫 冠誠君と審査委員とが、博士論文の内容や関連する問題についての質疑応答を行なった結果、孫君は博士論文に関わる研究分野及び関連する分野について十分な知識を有していること、またそれらの知識をもとにして今後の研究方向などについての考察を行なうことについても十分な能力を持っているとの結論を得た。一方、語学力については既に外国語である日本語についてきわめて十分な作文と会話の能力をもつことは明らかであるが、孫君が筆頭著者であり現在国際専門誌に投稿中である英文論文の原稿について検討した結果から、英語についても十分な語学力を持つと判断できた。