

学位論文題名

Cloning and expression analysis of the *Broad-Complex* gene in the silkworm, *Bombyx mori*

(カイコ *Broad-Complex* 遺伝子のクローニングと転写調節機構の解析)

学位論文内容の要旨

昆虫の発生は、繰り返し分泌されるエクジステロイド (主に ecdysone や 20-hydroxyecdysone、以下 ecdysone と略) が、ecdysone receptor (EcR/Usp heterodimer、以下 EcR と略) と結合し、少数の初期遺伝子 (転写調節因子をコード遺伝子を含む) の発現を活性化し、次にこれらの遺伝子産物が後期遺伝子 (構造遺伝子のみ) の活性化を行う Ashburner model と呼ばれる段階的な遺伝子発現誘導により進行する。

初期遺伝子に属する遺伝子の一つである *Broad-Complex* (BR-C) は、*Drosophila* をはじめ多くの昆虫でその存在が報告されている。*Drosophila* における遺伝学的な解析によると、この遺伝子の変異体では、主に変態に関する様々な異常がみられる。BR-C mRNA にはスプライシングの違いにより複数のアイソフォームが存在し、これらより翻訳される BR-C タンパク質の構造は、GAGA factor 等 chromatin-altering factor に多く存在する BTB/POZ ドメインを含むコア領域 (共通領域) が N 末端側に存在し、これに異なる C₂H₂ 型 zinc finger を含む Z1 から Z4 までの 4 種類のアイソフォーム特異的な領域のいずれかがつづく。この構造的な特徴から、BR-C タンパク質も転写調節因子として作用することが予想される。

本研究は、特定の組織や器官を比較的得やすく、生化学的解析に向けた大型昆虫である *Bombyx* を材料とし、(i) BR-C 遺伝子ホモログ (*BmBR-C*) をクローニングし、その構造を明らかにする、(ii) 変態の過程で異なった発生運命をたどる組織 (表皮・絹糸腺 (変態後消失)、脂肪体 (変態後も残存) 等) での *BmBR-C* mRNA の時期・組織特異的な発現パターンを明らかにする、(iii) *BmBR-C* の転写制御機構を解析することによって、ecdysone による階層的な遺伝子発現制御機構の全体像を理解する上で必要となる基礎的な知識を得ることを目的としている。幼虫期に焦点を当てた解析は、幼虫脱皮と変態との比較においても重要であると考えている。

はじめに Z3 を除く *BmBR-C* Z1、Z2、Z4 アイソフォームをコードする cDNA の他、これらのアイソフォーム特異的な領域をコードするゲノム部分長 (約 9 kbp) をクローニングし、これらの塩基配列を明らかにした (GenBank/EMBL/DDBJ AB113084-113089)。これらより予想されるアミノ酸配列を *Drosophila* や *Manduca* の BR-C タンパク質と比較すると、コア領域中の BTB ドメインでそれぞれ 90.3%、98.2%、また zinc finger ドメインにおいて、*Drosophila* Z1、2、4 タイプのそれぞれと 96.0%、90.7%、85.2%、*Manduca* Z2、4 タイプのそれぞれと 96.3%、98.1% と高い相同性がみられた。*Bombyx* では Z3 アイソフォームをコードする cDNA は得られていないが、上述のゲノム部分長配列中に Z3 タ

イブの zinc finger ドメインをコードすると考えられる塩基配列が存在しており、そこから予想されるアミノ酸配列は、*Drosophila* や *Manduca* の BR-C タンパク質の対応する配列と 100%の相同性がみられたことから、*Bombyx Z3* アイソフォームもいずれかの時期・組織において発現しているものと推定された。さらに、得られた *BmBR-C* の cDNA やゲノム部分長の塩基配列をプローブとし、独立行政法人農業生物資源研究所が公開する KAIKOBLAST を用いて *in silico* で *BmBR-C Locus* のゲノム塩基配列決定を試みたところ、8 kbp 程の 5'末端側上流域を含む約 166 kbp の塩基配列が得られた (GenBank/EMBL/DDBJ AB219449)。*BmBR-C* はこの塩基配列中に 13 のエクソンに分割されてコードされており、また前述の cDNA 塩基配列と比較した結果、alternative splicing を受ける領域が 3'末端側のアイソフォーム特異的な領域ばかりではなく、5'末端側の非翻訳領域 (untranslated region, UTR) にも存在することが明らかとなった。さらに、cDNA の 5'末端配列は大別して 2 種類得られており、これらがゲノム塩基配列中の異なる場所と相同性を有することから、*BmBR-C* には最低でも 2 つのプロモーター (P_{dist}, P_{prox}) が約 101 kbp 離れて存在することが示された。

次に、カイコの 4 齢初期から蛹化開始直前 (5 齢 9 日目) までの表皮、脂肪体、絹糸腺 (前部、中部、後部糸腺) での *BmBR-C* の発現パターンを Northern 法により解析したところ、各組織での *BmBR-C* の発現パターンは概して体液中のエクダイソン濃度の変化と平行してみられるが、脂肪体では逆位相の変化が示された。このような差異へのプロモーター選択性の関与を調べるため、各時期・組織において P_{dist}, P_{prox} のどちらが優位に使用されるかを semi-quantitative RT-PCR により解析した。表皮と前部糸腺では 4 齢初期から 5 齢期前半にかけてどちらのプロモーターもほぼ同様に使用されているが、5 齢期後半には P_{dist} が活性化する一方で P_{prox} の抑制がみられた。中部・後部糸腺および脂肪体では、4 齢初期から 5 齢期前半にかけて P_{prox} が優位に用いられており、5 齢期後半には両プロモーターの抑制が見られた。しかし脂肪体ではこの後、両プロモーターの急激な活性化がみられ、結果として P_{dist} がやや優位に用いられるような変化が観察された。体液中のエクダイソン濃度の変化と *BmBR-C* の転写量変化および優位に使用されるプロモーターの関係を総合的に判断すると、P_{dist} は ecdysone に対して正の、一方 P_{prox} は負の制御を受けると考えられた。従って、ecdysone に対する応答性の異なる P_{dist}, P_{prox} のどちらが優位に用いられるかは組織や発生時期により異なり、プロモーター選択性が ecdysone による時期・組織特異的な *BmBR-C* 発現制御の一端を担うことが示された。

最後に、*BmBR-C* の転写調節機構を解析するため、約 5 kbp の各プロモーター領域を含むレポータープラスミドを構築し、培養細胞への遺伝子導入実験を行った。この結果、P_{dist}, P_{prox} がプロモーター活性を持つことが確認された。また、P_{prox} の転写活性は培地への 20-hydroxyecdysone (20E) 添加により抑制され、この反応には近位転写開始点より -5,012~-3,027 bp の領域が重要であることが示された。さらに、P_{dist} の転写活性は 20E 添加により促進され、この反応には遠位転写開始点より -3,106~-2,081 bp の領域が重要であることが示された。この領域の中には、EcR が結合すると考えられるエレメント (ecdysone responsive element; EcRE) とホモロジーの高い塩基配列 (EcRE 様配列) が存在しており、実際にその部位に EcR が結合するか否かをバンドシフト法 (EMSA) により解析した。この結果、EcRE 様配列には 20E 処理した培養細胞の核抽出物特異的に存在するタンパク質が結合することが見いだされたが、この結合は *Drosophila* の *hsp27* や *fbpl* 遺伝子上の典型的な EcRE とは競合せず、ここで見いだされたタンパク質は EcR ではない可能性が高い。従って、ecdysone による P_{dist} の転写活性化には、新たなタイプの EcR や EcRE の関与、ecdysone-EcR による直接的な作用ではな

く、間接的な機構を介している可能性等が示唆された。

今後、EcRE 様エレメント以外の領域に関する解析や、20E 処理特異的な EcRE 様エレメント結合タンパク質の機能解析、さらに *ecdysone* による *Pprox* 抑制機構の解析等により、より詳細な *BmBR-C* の転写調節機構を明らかにしていきたいと考えている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 伴 戸 久 徳

副 査 教 授 増 田 税

副 査 准教授 滝 谷 重 治 (大学院生命科学院)

学 位 論 文 題 名

Cloning and expression analysis of the *Broad-Complex* gene in the silkworm, *Bombyx mori*

(カイコ *Broad-Complex* 遺伝子のクローニングと転写調節機構の解析)

昆虫の発生に重要な役割を果たす末梢ホルモンの一つ *ecdysone* は、はじめに少数の初期遺伝子の発現を活性化し、次にこの初期遺伝子産物が後期遺伝子の活性化を行う *Ashburner model* で示される段階的な遺伝子発現誘導を行う。この初期遺伝子の一つである *Broad-Complex (BR-C)* 遺伝子は、*Drosophila* では mRNA スプライシングの違いにより複数のタンパク質アイソフォームをコードし、遺伝学的な解析により変態に関して重要な役割を担っていることが報告されている。そこで本研究は、大型昆虫であるため特定の組織や器官を比較的得やすい *Bombyx* を材料とし、(i)*BR-C* 遺伝子ホモログ(*BmBR-C*)を単離し、その構造を明らかにする、(ii)変態の過程で異なった発生運命をたどる組織での *BmBR-C* mRNA の時期・組織特異的発現パターンを明らかにする、(iii)*BmBR-C* の転写制御機構を解析する、ことにより、*ecdysone* による階層的な遺伝子発現制御機構に関する理解を深めることを目的に行ったものである。

はじめに Z1、Z2、Z4 タイプの *BmBR-C* タンパク質アイソフォームをコードする cDNA が単離され、これらより予想されるアミノ酸配列を *Drosophila* や *Manduca* の *BR-C* タンパク質と比較すると、N 末端側に存在する BTB ドメインでそれぞれ 90.3%、98.2%、また C 末端側に存在する zinc finger ドメインにおいて、*Drosophila* Z1, 2, 4 タイプのそれぞれと 96.0%、90.7%、85.2%、*Manduca* Z2, 4 タイプのそれぞれと 96.3%、98.1%と高い相関性が示された。さらに *in silico* で *BmBR-C* Locus の塩基配列決定を行い、この遺伝子が約 158 kbp の塩基配列中に 13 の exon に分割された形でコードされていること、また *Bombyx* では Z3 タイプの cDNA は得られていないが、このゲノム塩基配列中に Z3 タイプに特異的な塩基配列の存在が確認され、そこにコードされる zinc finger ドメインのアミノ酸配列は、*Drosophila* や *Manduca* *BR-C* の対応する配列と 100%の相関性が示された。さらに cDNA とゲノムとの塩基配列比較によ

り、alternative splicing を受ける領域が、3'側アイソフォーム特異的な領域ばかりではなく、5'側の非翻訳領域にも存在することを明らかにした他、約 101 kbp 離れた exon 1 と exon 3 のそれぞれに転写開始点が存在することから、*BmBR-C* は少なくとも 2 つのプロモーター (Pdist、Pprox) から転写されることが示された。

Bombyx の 4 齢初期から蛹化開始直前 (5 齢 10 日目) までの表皮、脂肪体、絹糸腺 (前部、中部、後部糸腺) での *BmBR-C* の発現パターンは概して体液中の ecdysone 濃度の変化と平行してみられたが、脂肪体では逆位相の変化がみられた。そこでこのような差異へのプロモーター選択性の解析を行い、各時期・組織において Pdist、Pprox のどちらがどの程度優位に使用されるかは、組織により異なるとの結果を得た。また培養細胞への遺伝子導入実験により Pdist や Pprox の ecdysone に対する応答性を解析し、Pprox の転写活性は 20-hydroxyecdysone (20E) により抑制されるが、逆に Pdist の転写活性は 20E により促進されることを明らかにした。また Pdist の 20E による転写促進は、転写調節領域内に存在する ecdysone receptor (EcR) が結合すると考えられる塩基配列 (EcRE 様配列) の機能によるものと予想し、タンパク質結合実験を行った結果、この配列近傍に 20E 処理特異的に結合するタンパク質が存在したものの、そのタンパク質は EcR ではないことを強く示唆する結果を得た。

以上の結果より、ecdysone に対する応答性の異なる Pdist、Pprox のどちらが優位に使用されるかは時期や組織により異なり、これが複雑で時期・組織特異的な発現パターンを示す *BmBR-C* 遺伝子転写制御の一端を担うことが示された。さらに ecdysone receptor 以外の因子を介した Pdist の転写活性化機構の存在が示唆され、これらの結果は、ecdysone による階層的な遺伝子発現制御機構を理解する上で重要な知見を与えるものである。よって審査員一同は、西田義憲が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。