HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on the regulatory mechanisms of territory-specific expression of the silk genes in the silkworm, Bombyx mori [an abstract of entire text]
Author(s)	木本, 舞
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。【担当：理学・生命科学事務部図書担当】 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11404号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56332
Type	doctoral thesis
File Information	Mai_Kimoto_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　氏 名　　木 本　　舞

学 位 論 文 題 名

Study on the regulatory mechanisms of territory-specific expression of the silk genes in the silkworm, *Bombyx mori*

（カイコ絹糸腺における絹糸遺伝子の領域特異的発現制御機構の解析）

カイコ（*Bombyx mori*）絹糸腺では、一群の絹糸タンパク質が前後軸に沿って異なる領域で合成される。繊維タンパク質fibroinは後部絹糸腺特異的に、接着性タンパク質sericinは中部絹糸腺特異的に合成され、その特異性は転写レベルで制御されていることが知られている（Suzuki *et al.,* 1990）。組織抽出液を用いた*in vitro*転写系や組織への遺伝子導入系によるプロモーター解析と、DNA結合実験による結合因子の解析の結果、絹糸遺伝子の発現制御にはhomeobox因子が関与していることが示唆されてきた（Hui *et al.* 1993; Takiya *et al.,* 2011）。一方、Hox遺伝子を含むいくつかのhomeobox遺伝子が絹糸腺において領域特異的に発現することが報告されている（Hui *et al.,* 1992; Nagata *et al.,* 1996; Dhawan and Gopinathan *et al.,* 2003）。しかし、絹糸腺の分化や絹糸遺伝子の領域特異的発現制御機構に、homeobox因子がどのように関わっているかは明らかでなかった。

Hox因子は動物の形態形成を制御するマスター因子として知られているが、直接の標的として同定された下流遺伝子は限られており、各Hox因子が特異的な標的遺伝子を認識するメカニズムは十分に理解されていない（Hueber and Lohmann, 2008; Mann *et al.,* 2009; Uhl *et al.,* 2010）。本研究では、Hox因子を含むhomeobox因子が絹糸遺伝子の領域特異的発現制御に関与しているか*in vivo*で検証し、Hox因子の機能解析系としてのカイコ絹糸腺の有用性を検討することを目的とした。

先行研究において、*sericin-1*遺伝子の中部絹糸腺特異的発現には転写開始点上流-70bp付近配列（-70エレメント）が必須であることが明らかになるとともに、-70エレメントに結合する因子MICが検出されていた（Takiya *et al.,* 2011）。MICは中部絹糸腺（middle silk gland）抽出液中に脱皮間期（intermolt）特異的に検出されるcomplexで、*sericin-1*の発現領域及び時期と一致して検出される事から活性化因子として推定されたものの、MICを構成する因子は不明であった。

-70エレメントを含むMIC結合サイトにはATTAをコアとするhomeobox因子認識配列が存在し、MICにはhomeobox因子が含まれる可能性が考えられた。MICの構成因子の候補を探索するため、終齢幼虫絹糸腺の各領域においてHox遺伝子を含むhomeobox遺伝子の発現

解析を行い、これらの遺伝子の発現が絹糸腺組織の前後軸に沿って領域特異的パターンを示すことを明らかにした。例えば、前方Hox遺伝子*lab*や*Scr*は前部絹糸腺に、中央部Hox遺伝子*Antp*は中部絹糸腺に、*abd-A*は中部及び後部絹糸腺に、後方Hox遺伝子*Abd-B*は後部絹糸腺の後方及び前部絹糸腺に発現していた。また、セグメントポラリティグループに分類されるhomeobox遺伝子*en*は前部絹糸腺及び中部絹糸腺の後区で強い発現を示した。

*sericin-1*遺伝子と同じ領域で特異的に発現するenとAntpタンパク質を用いてDNA結合実験を行ったところ、AntpはMIC類似の結合特異性を示すのに対し、enは異なる特異性を示した。さらに、Antp抗体とMICが特異的に反応することから、MICはAntpを含むと結論した。*Drosophila*ではExdとHthがHox因子のcofactorとして作用していることが知られている（Mann *et al.,* 2009）。カイコExd及びHthに対する抗体をDNA結合実験系に加えたところMICと特異的に反応した。従って、MICはAntpとともに、Antpのcofactorとして知られるExdとHthを含むことが明らかになった。

ウェスタンブロット解析によって、後部絹糸腺ではAntpタンパク質は検出されないのに対し、ExdとHthは存在することが確認された。ヒートショックプロモーターを介して*Antp*が発現されるトランスジェニックカイコを用い、終齢幼虫期の個体で*Antp*を強制発現したところ、後部絹糸腺において*sericin-1*の異所的発現を確認した。従って、Antpが*sericin-1*の活性化因子であることが明らかになった。一方、前部絹糸腺では*Exd*と*Hth*が発現しているにも関わらず、*Antp*強制発現による*sericin-1*の異所発現は認められなかった。前部絹糸腺では*sericin-1*の抑制因子と推定されるPOU-homeodomain因子POU-M1が高レベルに発現しており、MICとDNA結合サイトを競合して*sericin-1*プロモーター活性を抑制する機構が考えられる。

一方、後部絹糸腺特異的に発現する*fibroin-H*遺伝子のプロモーターエレメント及び遠方エンハンサーには、SGF-2（silk gland factor-2）複合体が特異的に結合すること、SGF-2には後部絹糸腺特異的に発現するLIM-homeobox転写因子Awhが含まれることが報告されている（Ohno *et al.,* 2013）。トランスジェニックカイコを用い終齢幼虫期の個体で*Awh*を強制発現したところ、中部絹糸腺において*fibroin-H*の異所的発現を確認した。さらに、他の後部絹糸腺特異的遺伝子*fibroin-L*及び*fibrohexamerin*も、*Awh*強制発現に伴い中部絹糸腺において発現が誘導されることから、Awhが後部絹糸腺特異的な絹糸遺伝子の発現を統括的に制御することを明らかにした。

以上の結果から、中部絹糸腺において Hox 因子 Antp が *sericin-1* 遺伝子の発現を制御すること、後部絹糸腺では LIM-homeobox 因子 Awh が *fibroin-H* 遺伝子の発現を制御することを明らかにした。全ての Hox 因子は DNA 結合ドメインとして高度に保存されたホメオドメインを有し、*in vitro* では類似の DNA 配列に結合する。しかし、*in vivo* では各 Hox 因子は特異的な下流遺伝子を選択的に制御すると考えられが、特異性を発揮するための分子機構については十分に理解されていない。絹糸腺では Hox 因子や homeobox 因子がそれ

ぞれ領域特異的に、互いに一部重複した領域で発現する。また、*fibroin-H* と *sericin-1* の上流は共に AT-rich で、類似した homeobox 認識配列が存在する。絹糸遺伝子が Hox 因子の標的遺伝子の一つであることを明らかにした本研究の結果は、絹糸遺伝子の発現制御機構が homeobox 因子の特異性発揮メカニズムを解析するモデル系となり得ることを示している。更に、トランスジェニックカイコを用いた一過性強制発現系を適用することにより、カイコ絹糸腺が Hox 因子の機能解析に有用であることを示した。