

論文審査の結果の要旨

氏名 作道 隆

本論文は 3 章からなり、まず序論として、研究対象にしたカロテノイド結合タンパク質 (CBP)、黄血遺伝子 Y ならびに CBP の哺乳類相同遺伝子がステロイド合成に関わることなど本研究の背景を概説するとともに、研究の目的が述べられている。

第 1 章では、まず、CBP のエクジステロイド合成機構への関与を検証するため、エクジステロイド合成器官である前胸腺における CBP の発現を RT-PCR を用いて解析した。その結果、白繭品種 (錦秋×鐘和) では CBP の ORF 中央部と ORF3'末端のプライマーの組み合わせでは予想される長さの DNA の増幅が見られたが、ORF5'末端と ORF3'末端のプライマーの組み合わせでは増幅は見られなかった。そこで、増幅された CBP 部分配列をもとに 5' および 3'RACE を行ったところ、3'末端側は CBP と一致するが、5'末端側は CBP と異なり、膜貫通部位と思われる疎水性アミノ酸領域を 4 ヶ所コードする cDNA 全長が得られた。4 ヶ所の予想膜貫通部位の存在は、哺乳類の StAR と最も相同性の高いパラログであり、StAR と同様のコレステロール輸送能を有することが示唆されている MLN64 と同様の特徴であった。この新しく得た CBP のアイソフォームを BmStart1 と呼ぶことにした。次に、綿秋×鐘和と黄繭品種の N4 を用いて、BmStart1 と CBP の組織発現分布を調べた。BmStart1 は綿秋×鐘和と N4 の両方の品種で発現しており、エクジステロイド産生器官である前胸腺、卵巣、精巣のいずれの組織においても発現が見られた。一方、CBP の発現は、綿秋×鐘和ではいずれの組織でも見られなかった。発現が黄繭品種に限定される CBP ではなく、白繭品種にも発現している BmStart1 が、StAR と同様のコレステロール輸送能を有し、ステロイドホルモン合成の律速段階をカイコにおいて担う候補遺伝子であると考えた。

第 2 章では、綿秋×鐘和において、BmStart1 が発現し、CBP が発現しない原因を探るため、BmStart1 と CBP のゲノム配列を綿秋×鐘和で決定した。BmStart1 と CBP は 35 kbp に及ぶ同一の遺伝子上に存在し、alternative splicing によって 1 つの遺伝子から 2 つのアイソフォームとして作られていることが分かった。CBP 特異的なエクソンの exon B2 は、CBP の ORF を含む 3'側の配列が一部欠失しており、その欠失した部分には non-LTR タイプのレトロトランスポゾンの部分配列が存在した。綿秋×鐘和において CBP が発現しない原因は、CBP 特異的なゲノム領域の欠失と考えた。

第 3 章では、第 2 章で見いだした白繭品種における CBP ゲノム配列の欠失は、CBP が繭色決定因子である黄血遺伝子そのものであることを示唆していたため、CBP が黄血遺伝子の実体であるかどうかを検証した。CBP のゲノム構造を、複数の黄血遺伝子の有性 (Y) および劣性 (+) の系統で決定した。Y では、CBP はゲノム中に少なくとも 2 コピー以上存在し、それらはレトロトランスポゾンが挿入されていない配列 (Y-a) と、レトロトランスポゾンの全長が挿入されているがエクソンの欠失は起こっていない配列 (Y-b) の 2 つに分類されることが分かった。一方、+^r では、綿秋×鐘和と同様に、exon B2 の 3'側が欠失し、レトロトランスポゾンの部分配列を含む配列が 1 コピー存在した。+^r の配列は、

Y-b の配列から、exon B2 の 3'側配列とレトロトランスポゾンの 5'側配列を含む約 4.5 kb の領域が欠失したものと考えられた。このゲノム構造解析の結果から、黄血遺伝子の実体が CBP であり、*+^Y* の白繭ではなく *Y* の黄繭がカイコの祖先型であることが強く示唆された。

さらに、*Y* と *+^Y* のゲノム構造の変化が、どのように CBP タンパク質の発現の違いを生み出したのか明らかにするため、*Y* と *+^Y* で、*CBP* mRNA の発現とその構造をノーザンブロットティングと RT-PCR で調べた。その結果、*+^Y* では、CBP をコードするエクソンの一つ exon B2 が抜け落ちた mRNA が作られていることが分かった。すなわち、*+^Y* では、ゲノム構造の変化によって CBP の正常なスプライシングが出来なくなり、翻訳開始メチオニンを含む exon B2 がスプライスアウトされることで mRNA が機能を果たさなくなり、CBP のタンパク発現が失われたと考えられた。

一方、CBP が黄血遺伝子の実体であることを機能的に証明するため、CBP をトランスジェニックの手法で強制発現させることで *+^Y* の表現形が黄血・黄繭へと復帰するかどうかを調べた。強制発現には酵母の UAS/GAL4 系を利用した。UAS 配列の下に *CBP* を組み込んだベクターを作成し、そのベクターの配列を *+^Y* 品種のゲノムに導入した。作出した UAS-CBP 系統を GAL4 系統と掛けあわせ、CBP を中腸と絹糸腺に発現させることができた。その結果、体液と繭の黄血・黄繭への復帰が観察された。体液のカロテノイド成分を分析したところ、主にルテインが含まれていた。これは *Y* 品種で得られていた結果と一致した。

得られた結果をもとに総合考察と展望を述べたのち、結語、材料と方法、参考文献、謝辞が書かれている。

以上、本論文は CBP のアイソフォームである BmStart1 を見だし、BmStart1 と CBP は同一の遺伝子上に存在し、alternative splicing によって 2 つのアイソフォームとして作られていることを明らかにするとともに、CBP が黄血遺伝子の実体であることを機能的に明らかにしたものがある。なお、第 3 章は土田耕三、田村俊樹、瀬筒秀樹、小林功、内野恵郎、中島健陽、藤本浩文との共同研究であるが、いずれも論文提出者が主体となって研究を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。したがってで、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。