

論文審査の結果の要旨

氏名 白井 博之

本論文は2章からなり、第1章は複数のカイコ組織由来の培養細胞のエクジソン応答性とエクジソン誘導性核内受容体遺伝子の発現パターンの変化について、第2章はエクジソン誘導性核内受容体遺伝子の promoter 領域の解析について述べられている。

第1章では、まず本論文で用いた3種類のカイコ組織由来培養細胞のエクジソンに対する特性について解析されている。この3種類の培養細胞は、カイコの卵巣もしくは脂肪体を由来とする。まずそれぞれの細胞にエクジソンを添加して培養することで起こる変化を顕微鏡で観察し、それぞれの培養細胞でエクジソンに対する応答性が異なることが示された。実験としては単調であるが、添加するエクジソン濃度を変化させるなど、複数の検証がなされていることは評価できる。次に、各培養細胞において3種類の核内受容体遺伝子がエクジソンによって発現パターンがどのように変化するのかを Northern Hybridization によって解析している。それぞれの核内受容体の発現パターンはエクジソンによって様々に変化することが多角的な視点による解析から示された。中でも3種類の核内受容体遺伝子について、それぞれの発現が活性化するのに最低限必要なエクジソン濃度の決定を試みた点は評価できる。第1章は、それぞれの核内受容体遺伝子の promoter 領域を解析する第2章 第2部の基盤として位置付けられており、その役割は十分に果たしていると思われる。

第2章は2部に分けられて構成されている。第2章 第1部はエクジソンの直接の受容体であるエクジソン受容体(ecdysone receptor, 以下 EcR)の、isoform 毎の promoter 領域について解析されている。これまでの解析から、EcR isoform には複数の isoform が存在すること、また変態期に昆虫の組織における細胞死・細胞増殖といった、細胞運命の決定にそれぞれの isoform が深く関与していることが示唆されていた。しかし、それぞれの isoform の発現を制御するメカニズムはおろか、promoter 領域の解析すら行われていなかった。本論文ではカイコの EcR-A, EcR-B1 という2種類の isoform に対し、それぞれの転写開始点を共同研究により決定した。この情報を基に、それぞれの isoform の promoter 領域を更に詳細に解析した。まず転写開始点より上流側を様々な形で欠失させたコンストラクトを作成し、Dual-Luciferase Assay により解析、それぞれの isoform の転写に必要な領域を絞り込んだ。加えてそれぞれの promoter 領域全体を cis-element 予測ソフトで解析し、絞り込まれた領域との関連性を調べた。また、どちらの isoform も転写開始点の上流側に TATA box を持たない TATA-less 遺伝子であることが明らかとなった。このような遺伝子は転写開始点の下流側から制御を受けていることが考えられ、この領域を Dual-Luciferase Assay で詳細に解析した。その結果、EcR-A と EcR-B1 では転写開始点周辺で機能する cis-element の種類が異なることが示された。このような EcR isoform のそれぞれの promoter 領域を詳細に解析した点、及びこれら EcR isoform の転写開始点周辺の違

いと領域特異的な発現との関係を結びつけて考察した点は評価できる。

第2章 第2部はカイコにおける EcR-A, EcR-B1, E75-A, HR3-B といった4種類のエクジソン誘導性核内受容体遺伝子の promoter 領域に対して、エクジソン応答配列(ecdysone response element, EcRE)の探索・解析が行われている。着目した各遺伝子のエクジソンによる誘導パターンがそれぞれ異なることは第1章で示されており、その関係性を含めて考察がなされている。それぞれの promoter 領域の転写開始点上流側を Dual-Luciferase Assay で解析していったところ、最終的に EcR-A を除く3種類の promoter 領域から EcRE を同定することに成功した。この解析では単純に転写開始点上流側を欠失させただけでなく、部分欠損や複数の変異を用いて、緻密に行われた点は評価できる。また同定した3種類の EcRE を EMSA (electrophoretic mobility shift assay) で結合する因子で調べたところ、E75-A, HR3-B の EcRE には EcR が結合することが示された。興味深いことに、EcR-B1 の EcRE は「EcR の結合配列」と「別の因子が結合する領域」という2つの領域がどちらも必要である、つまり2つの *cis-element* が共役する形で構成されていることが明らかとなった。このような EcRE はこれまでに報告が無く、本研究で明らかとなった新規の知見となる。またこの「別の因子が結合する領域」に対しては更に解析が行われており、bHLH (basic helix - loop - helix) ドメインを持つ転写因子が結合する可能性が示唆された。つまり昆虫の脱皮・変態で中心的に機能する EcR のエクジソン応答性が、EcR と別の転写因子によって制御されているということである。これは脱皮・変態の分子メカニズム全体を制御に関わる未知の因子を加えることができる、極めて重要な知見であり、本論文中で最も評価できる点である。

なお、第2章 第1部は、農業生物資源研究所の神村学博士との共同研究である。しかし、BmEcR isoform の promoter 領域を含む多数のコンストラクトの作成・解析、それぞれの promoter 領域で予測される既知の転写因子認識配列のとりまとめなどは、論文提出者が主体となって行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。