

氏 名 (本籍)	うえ 上	だ 田	ひとし 均
学位の種類	農	学	博 士
学位記番号	農 博 第	332	号
学位授与年月日	昭和 60 年 3 月 26 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当		
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農芸化学専攻		
学位論文題目	フィブロイン生産に欠陥を有する Nd(2) 変異蚕のフィブロイン H 鎖遺伝子の解析		

論文審査委員 (主 査)

教授 水 野 重 樹	教授 高 橋 甫
	教授 大 平 幸 次

# 論文内容要旨

## 第 I 章 序 論

フィブロインH鎖遺伝子はカイコの5令期に後部絹糸腺で特異的に且つ活発に発現されていることから遺伝子発現機構の解析に極めて有用な対象であると考えられる。Nd(2)変異蚕(Nd(2)系統)は、後部絹糸腺が発達せず、フィブロインを殆ど合成しないため、はだか蛹、(naked pupa)となる優性の変異を有する自然発生的突然変異種として1933年に中野により見い出された。兵頭らは、フィブロインH鎖の分子量の多形性(polymorphism)を利用した古典的交配実験によりNd(2)変異とH鎖遺伝子(Fib H)は共に第25番染色体上に位置していることを明らかにした。彼らはさらにNd(2)変異とFib-Hの交叉価を求めたが、H鎖タンパク質で分析すると0.1%以下、H鎖遺伝子で分析すると5%と異なる値を得た。また、兵頭らは、フィブロインを正常に生産するカイコの系統(正常蚕)であるJ-131とNd(2)系統を交配して得られたF1においては、Nd(2)変異がJ-131由来のH鎖遺伝子の発現を抑制するトランス(trans)効果と、Nd(2)由来のH鎖遺伝子の発現をJ-131由来の対立遺伝子の場合の約 $\frac{1}{4}$ に抑えるシス(cis)効果の両効果を示すことを明らかにした。これらの知見からNd(2)系統はH鎖遺伝子の内部または極く近傍に以上の諸現象の原因となるDNA塩基配列上の変異を有するものと考えられた。本研究は、Nd(2)系統のH鎖遺伝子内部および近傍の塩基配列を正常蚕と詳細に比較して、Nd(2)変異部位を探ること、さらにNd(2)変異とH鎖遺伝子発現の抑制との関係を理解することを目指したものである。

## 第 II 章 戻し交雑〔J-131 × (J-131 × Nd(2))〕で得られた「交叉型、カイコのH鎖遺伝子の解析

兵頭らは遺伝子レベルの多形性を利用してNd(2)変異とH鎖遺伝子(Fib H)の交叉価は5%と結論したが、この値はタンパク質レベルの多形性を利用して得られた0.1%以下という値と一致していないので、この点についてさらに検討を加えた。兵頭らが「交叉型」とした4検体は、J-131(+)型の後部絹糸腺とNd(2)型のH鎖遺伝子サイズ(J-131のH鎖遺伝子サイズより大きい)を有するものであった。これら4検体の後部絹糸腺からDNAを抽出し、それらに含まれるH鎖遺伝子とその近傍のHin f I分解パターンを $^{32}\text{P}$ でラベルしたH鎖mRNAをプローブとしてサーザンブロット法で解析した(Fig.1参照)。その結果、「交叉型」と考えられていたカイコ(Fig.1のNo.1~No.4)では、J-131とNd(2)系統の混合型の分解パターンを示すと予想されたが、実際は、Nd(2)系統(lane 11)と共通のバンドは存在せず、J-131型の分解パターンを基本として、これに矢印で示した新たなるバンドが、加わった型が得られた。この結果より、Nd(2)型の遺伝子サイズはJ-131系統由来のH鎖遺伝子の一方が変化したために生じたもので、交叉によるものではないことが明らかとなった。なお、No.1~No.4で新たに生じたバンドは、Nd(2)型の後部絹糸腺

を有する4個体 (Fig. 1, No 5~No 8) の全てにおいても共通に認められ、戻し交雑に用いたJ-131個体(♀)中のH鎖遺伝子の変化に基づくものと考えた。さらに検討を加えた結果、この変化はH鎖遺伝子内部のアミノ酸反復領域の5'末端近くが約2 kb 伸長した (J-131 E 遺伝子と命名) 結果であることが判明した。以上の結果から、染色体上のNd(2)変異と、FibHの距離は、交叉が検出されない程近いものであることが再確認された。

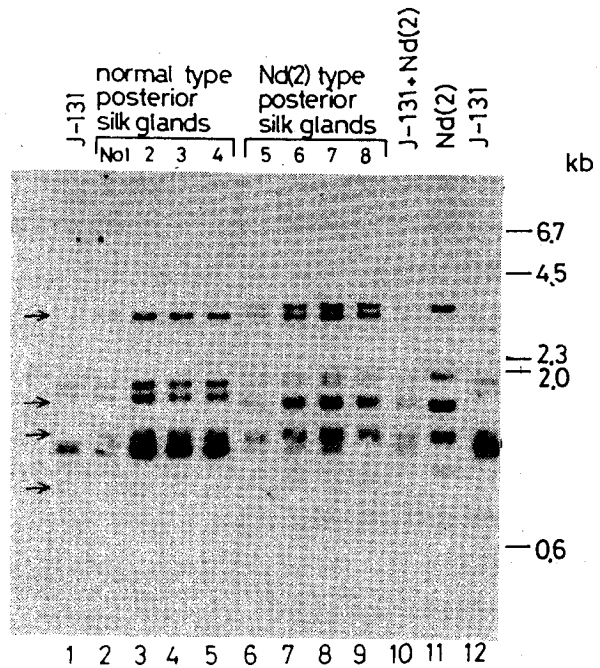


Fig. 1. Southern-blot hybridization of  $^{32}\text{P}$ -labeled fibroin H-chain mRNA of the *Hinf* I-digested DNAs from the F2 individuals (No 1-No 8) obtained after the back cross: J-131 x (J-131 x Nd(2)). Arrows indicate new fragments derived from J-131E alleles. Lanes 1 and 12; J-131; lane 2: No 1; lane 3: No 2; lane 4: No 3; lane 5: No 4; lane 6: No 5; lane 7: No 6; lane 8: No 7; lane 9: No 8; lane 10: J-131 + Nd(2); lane 11: Nd(2)

### 第三章 雑種第一代 [F1 (+/Nd(2))] におけるフィブロインH鎖の対立遺伝子間の不等発現のmRNAレベルでの解析

正常蚕 (J-131) と Nd(2) 系統との交雑種 (F1) におけるH鎖遺伝子の対立遺伝子間の不等発現が、H鎖遺伝子発現のどの段階で生じているかを明らかにするために、mRNAレベルでの解析を行なった。F1 (J-131/Nd(2)) の5令5日目の後部絹糸腺から分離した全RNAを電気泳動し、両対立遺伝子由来のH鎖mRNAを分子量の差に基づいて分画定量した。その結果、Nd(2)系統由来のH鎖遺伝子から転写されたH鎖mRNAの細胞内濃度は、J-131系統由来のもの約25%であった (Fig.2参照)。兵頭らは、F1において両対立遺伝子は等量存在することを示しており、この不等発現は、転写およびmRNAの安定性を含む転写後の段階で生ずるものと考えられた。また交配する正常蚕をJ-139系統とした場合にも同様の結果が得られ、不等発現の原因がNd(2)

側の遺伝子に存在するものと推定された。次に  $^{32}\text{P}$ -正リン酸を5令4日目のF1 (J-131 / Nd(2)) に注射し6~48時間後に後部絹糸腺全RNAを分離し、両対立遺伝子由来のH鎖mRNAの量比を求めたところ、メチレンブルー染色によって得られた値およびオートラジオグラフィによって得られた値は標識後の各時間で、J-131系統由来のものが約2.5倍とほとんど変化せずmRNAの安定性にはそれほど差がないことが予想された。

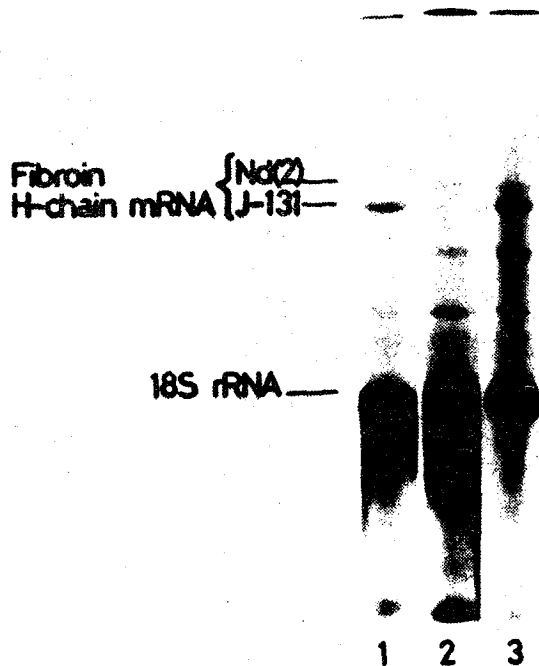


Fig. 2. Gel electrophoretic profiles of fibroin H-chain mRNA. Lane 1: J-131 strain; lane 2: Nd(2) strain; lane 3: F1 (J-131 / Nd(2)).

#### 第IV章 Nd(2)変異蚕ならびに正常蚕 (J-139) からのフィブロインH鎖遺伝子のクローニング

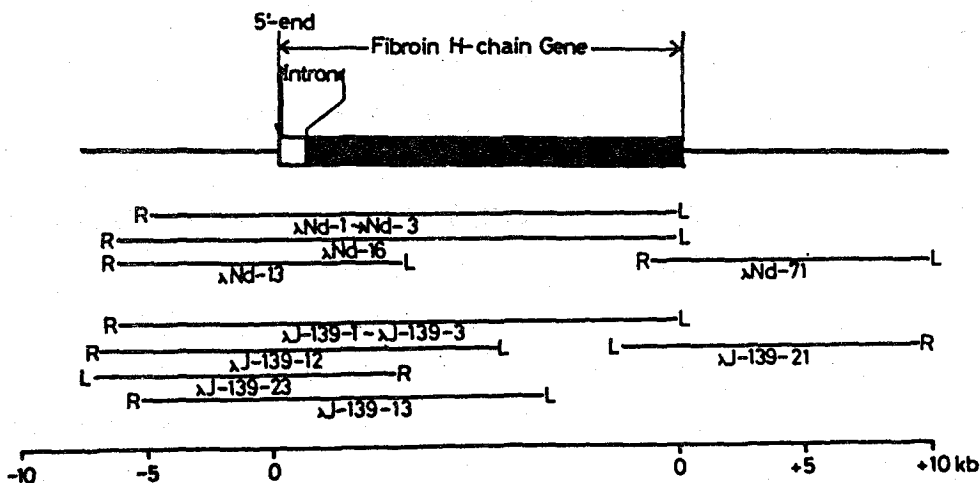


Fig. 3. Genomic position of the cloned region in each recombinant phage. Each line under the map represents the position of the cloned region. Each clone was named as indicated under each line. L: junction with the left arm, R: junction with the right arm.

両種の後部絹糸腺から抽出したDNAをHae III + Alu I で部分分解後、λ Charon 4 Aベクターに組み込む方法とEcoRI断片を部分精製後同じベクターに組み込む方法を併用し、λ DNAライブラリーを作成し、これから、<sup>32</sup>P 標識したH鎖mRNAをプローブとして、H鎖遺伝子を含むフェージクローンをスクリーニングした。その結果、Nd(2)系統由来のH鎖遺伝子を含む24クローン、J-139系統由来のH鎖遺伝子を含む10クローンが得られ、そのうち、それぞれ6クローンと7クローンについてH鎖遺伝子中に占める位置を簡単な制限酵素地図を作成することにより決定した (Fig.3参照)。これらのクローンの一部は、以後の解析を行いやすくするため、プラスミドベクターpBR 322中に組み込んでクローニングし直した (Fig.4)。なおその他の正常蚕由来のクローンpFb 29, pFb 19, pBF41は、基礎生物学研究所鈴木博士より供与を受けたもので、同時に解析した。また、すべてのクローンはクローニングの過程でアミノ酸反復配列をコードする領域でdeletionをおこしており、これらのクローンを用いたこの領域の比較は意味がないと考えられた。

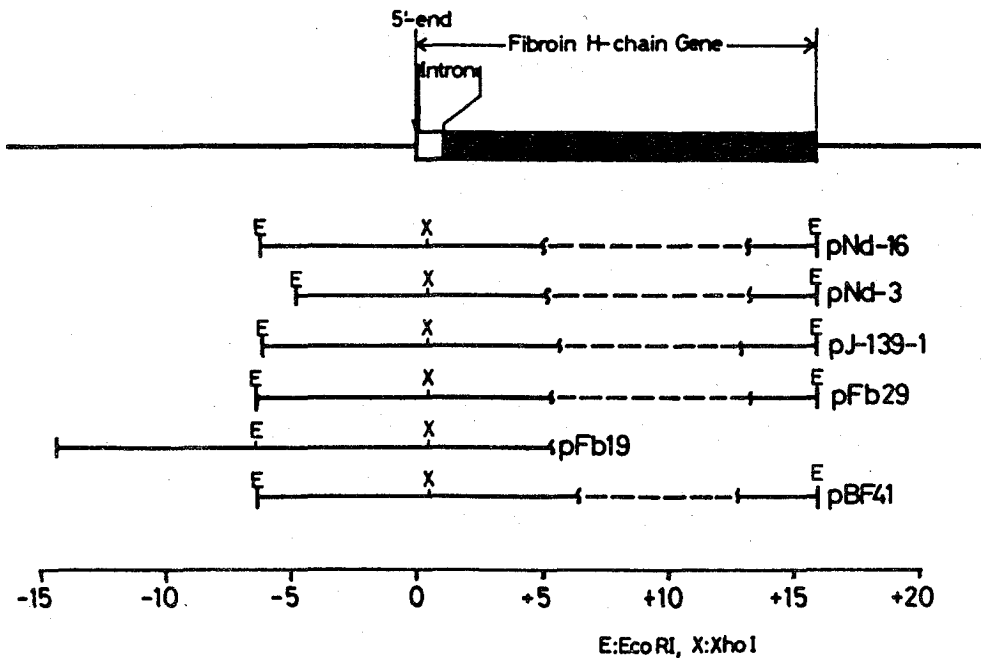


Fig. 4. Genomic position of the cloned region in each recombinant plasmid. Solid lines indicate cloned regions and broken lines indicate deletions.

## 第V章 Nd(2)変異蚕ならびに正常蚕のH鎖遺伝子の5'末端近傍の塩基配列の比較

Nd(2)系統由来のpNd-3, pNd-16, J-139系統由来のpJ-139-1, F1 (Gunpo × Shugyoku) 由来のpFb29, Daizoの由来のpBF41, そしてF1 (Gunka × Hoshun) 由来のpFb19を用いH鎖遺伝子5'末端近傍の制限酵素地図を作成し比較を行なった(Fig.5)。その結果, 約-2kb (5'末端を+1とし上流をマイナス, 下流をプラスとする) より約+1.5kbまでの間は系統間でよく一致していたが, 約-2kbより上流は, pFb29, pBF41, pFb19は一致しているものの, pNd-3とpJ-139-1は, それぞれ大きく異なっていた。なおpNd-16は, 約-0.2kbの所に約1.4kbの別の配列を有する特別なクローンと考えられ本章の最後に, 別にその解析結果を述べることにする。pJ-139-1の-2kbより上流約2.6kb (1.3kbが2断片) あるいは, pFb29の-3.3kb

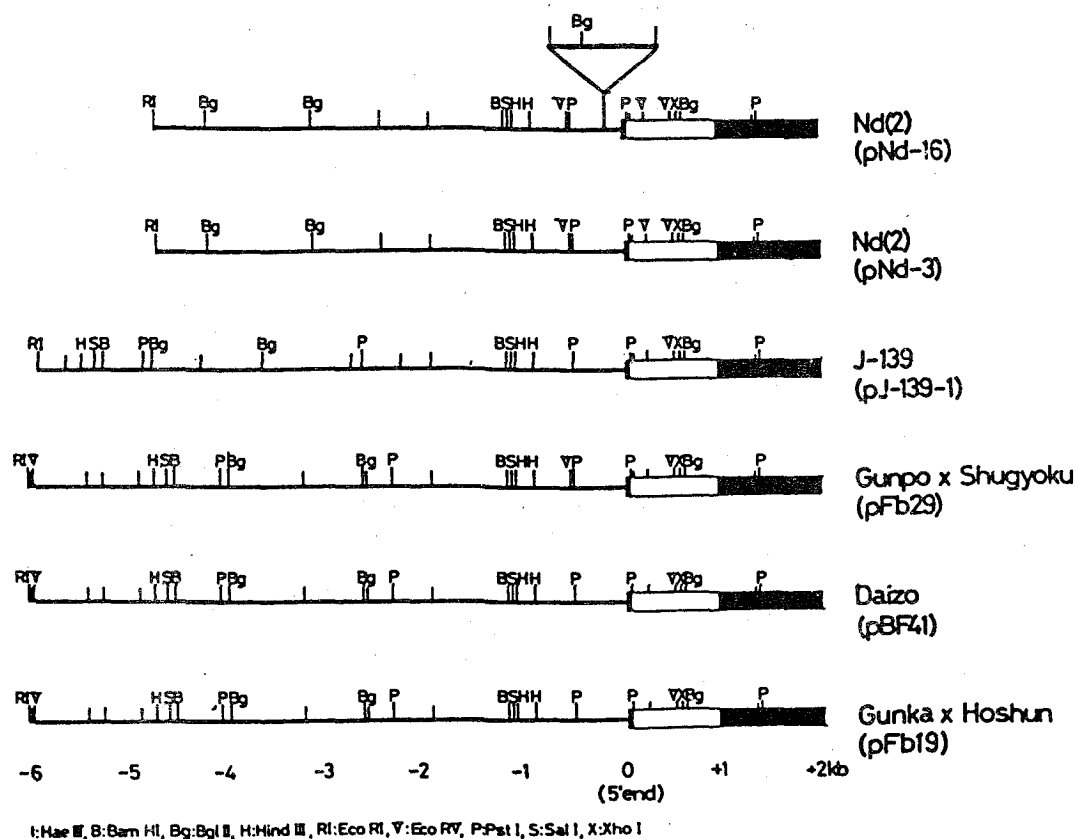


Fig. 5. Comparison of the restriction maps of 5'-flanking and a part of the fibroin H-chain gene. Black boxes indicate exons and a white boxes indicates an intron of the fibroin H-chain gene.

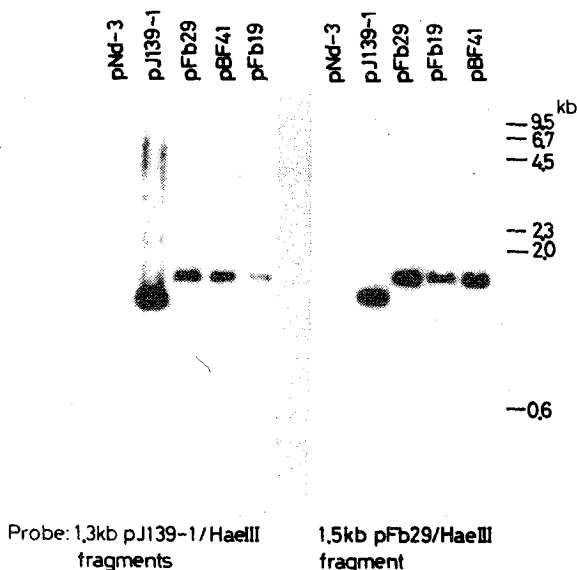


Fig. 6. Cross-hybridization analysis of the far upstream region of each clone.

より上流約1.5kbを含むHae III断片をそれぞれプローブとしてクロスハイブリダイゼーションをおこなった結果 (Fig.6), pJ-139-1の-4.5~-5.5kbおよびpFb29, pBF41, pFb19の-4~-5kbの領域に相同性の高い配列が存在することが明らかになった。しかし, pNd-3とは全くハイブリッド形成せず, Nd(2)系統は, この領域に異なる配列を有することが明らかになり, これがNd(2)変異の何らかの原因となる可能性を考えた。

次に, 約-2kbから+1.5kbまでの, 系統間でよく保存されている領域

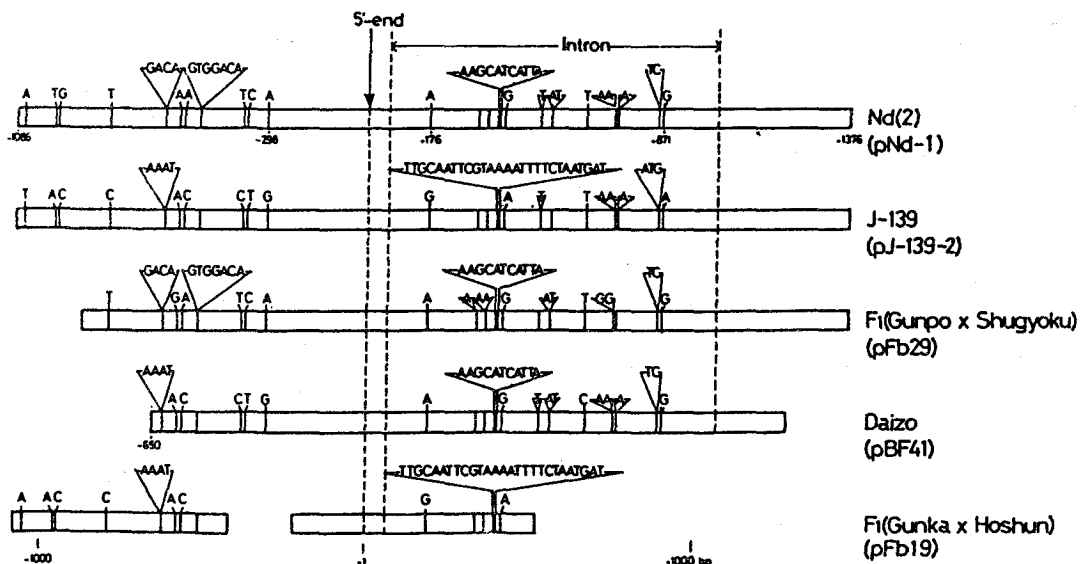


Fig. 7. Comparison of nucleotide sequences around the 5'-end of the H-chain gene. Boxes indicate the regions whose sequences were determined. Each vertical bar in the box indicates a position where any one of the strains showed a different sequence from others. Sequences of such loci are indicated. The vertical bar on which no sequence is given represents the position where a corresponding sequence was absent.

の全部または一部の塩基配列を pNd-3, pJ-139-1, pFb19 について Maxam-Gilbert 法および M13 法を用いて決定し, Suzuki らの決定した結果と比較した。その結果, いくつかの塩基配列多形 (polymorphism) が存在すること (Fig.7) を明らかにできたが, Nd(2) 系統の有する変異を説明できる違いは, 見出されなかった。5' 末端上流と intron 内部の polymorphism の形式を比較することにより, 調べたいずれかの系統で 5' 末端の極く近傍で交叉 (crossing-over) が生じたことを示唆する結果を得た。

pNd-16 (Fig.5) について 5' 末端を中心約 2.5 kb の塩基配列を決定したところ, このクローンには, 約 190 bp のところに両末端に 12 bp の逆位反復配列 (inverted repeat) を有する 1352 bp の転移要素 (transposable element) (Fig.8) が, さらに両末端に 3 bp の同方向反復配列 (direct repeat) を形成することにより挿入されていることが明らかになった。なおこれはカイコで初めて見出された transposable element である。

```

CACCGCCGACATCATTTTCCTTGTTCAGTTCGTATTACTTTTTTCCACTAATTGGTAGTGTGATCAGCAAATATACCTCATTTTTATCGTATCA
GTGCCCGCGCTAGTAAAAGGAACAAGTTCAGACTAATGAAAAAGGTGATTAACCATCAGCACTAGTGCCTTAATA TGCAGTAAAAATAGCATAGT
CATCAGGTTTTAAAAAAATTAACACATTCGGCTATTTTAAATTTTTGATTAATAATAAATTAATTTTAGATTTTGGCGCTCTTTCGCAATCGTGCCA
GTAGTCCAAAATTTTTTAAATTCGTCAACCGATAAAATTTAAAAAACTAATTTTATTTAAATTTAAATCTAAAACCCGGAGAAAAGAGCTTAGCACCGT
CCTCTCGTGAGAAATATATAGTTGCAACAACGACACACCCATTCGAAACAGGTTACATGCAATAAACCTCTACAGTTACTTTTGTTCATAAACTTTT
GGAGAGCACTCCTTTATATAAATCAACGTTGTGTGCTGTGGGTAAGCTTTGTCCAATGTACGTTTATTTGGAGATGTCAATGAAAACAAGTATTGAAAA
TACTGAAATTAGTGTGTTTTATTTAAAAAAAATCTTACGTTACGTAATATATATATATTTTTTATTTTACTTATATACAAAATTTCCAATGCTTC
ATGACTTTAATCACACAATAAATTTTTTTTTAGAAATGCAATGCAATGAAATATATATAAAAAATAAAAAAATGAATATATGTTTTAAAGGTACGAAAG
TTGTCGGAGTGGACAGTATAGCAGGAGACAAGCACTACGTTCAAAAATAATGGAATCCTCGTAAAAATCTCAAAGTAGAAAACAAAAACGTTAAACAAAA
AACACGCTCACCTGTCATATCGTCTGTGCTGTGATGCAAGTTTTTATTACCTTAGGAGCATTTTTAGTGTTCATCTTTGTTTTGCAATTTGTTTT
AAAAATAATAGTCCTGAAAAATTTTTACTACCTCCGCTTATATCAAACTCGGTGATGCAAAACAGTTTGTAAAGCATGGGATAAAAAACAATGCTAGT
TTTTTATTAATCAGCACTTTTTAAAAATGATGGAGCCGAAGTATAGTTTGAGCCATACTACTTTGTCAAAACAATTTGTAACCTATTTTTGTTACGATCA
TTTGAATACCTGCTGTAAAAAAATTCGAAGTATCTGTAGCAAAAAATTAACGGAGTGTTCGATGCCCGCAATCAGATCTTTGGTGGCTGACGAAAAC
AACTATAGGACACATTTTTTAAAGTTCTAATAGACTACGTTTTTAAATGTCCTCACAAAGCTACCTGGCGTTTAGTCTAGAAAACCCAGCTGCTTTTGA
TTGATGCCACAATGAATAACACTGAATCTAGATGCTTGGCTGGCGTTACAGATGTTGTCACAACATTTCTAGGAAATATAAACAATCCCGACTATAAAA
AACTACGGTGTACTTATTGTGACTTAGATCTACGAACCGACCGCAAGTCTCTACAACAGTTGTTAAAAGATCCTTTATTTTGTAGGGCTGATATTTT
ATAAGTTGCAAACCTTATTGGATAAGTATCAAAAAATGGGGTGTAATGAGCATAAAACCCACTTCTGATTCACATGTGGACTTTTTTCTGGTAAAT
TATTCACAGCTTTGAATAACCTATTCAATAGTTTTTAAACCCACATTACTCCTATTTTGAGGTGAAAGACTAAGTGTACACCTGAAAAAGGACCATTA
CTTGGTATTACAGTAAAGAGCAGGAAGAAAGGTTTTATCAGGACATAAAAACCATGGAGACAAGGTACCAATGTCGATGGAATGTGAATATGATGGCTG
GAACCACTAATGTCATTTCTCGTCCAACCTTTCCAAAATAGTCCGTATTTTTGTTACCTCTGAACCATGGTTACAGCTACCTTACACTTATACTACCGAC
ATTACTGCTGCTCACTCACAATGATATTACTGAAGTACTCACAAAAAACTCACAAAAAACTACACCCAGACGTAATTTGTCACGAAAACGTAAGAG
TAATGACCCAGTACTGTTACTATAATGACTTCTATGAGTCTTTTTTTGAGTGTTTTTTTGATGTGGGTCTGATTAACAACAGTGTCTTGCATTTTTC
ATGCTACTCTAAATAGTCTTGCAGCATTCTTTAGACTCAACGTTTTCTTTGTAATGTTCAAAATATATGCTTTTGTAAATATGATTTGATTTTTTCGTT
TACAGTGAGATTTATCAGAACGTCGTAACAAATCTGAGTTGCAAAAAGAAACATTTACAAGTTTATATACGAAAACATTATCTAATAACTAAAAAGCAA
AAATTTGAAAAAAATGCAATTCCTTCTTATAAAAAAATCTGATGTATAGGGCAAAATATGATGCTGTTTTGCTTTAAAAATAGTATAAAATGCGTGATA
TTTTAAACTTTTTTACGTAAGGAAGAATATTTTTTACACTACACTACCCGTTTATACATGCCAGAAAACACAAAATTTATGCATATTTAACCCACTAT
TTTTGCTGCTCAAAATACAAACAACCTTTCAAAAAATTTTTTCAATTTGTCGCCCGCTG
AAACACCGAGTTTATGTTTGTGAAAGTTTTTTAAAGTAAACAGCCCGCCAC

```

Fig. 8. Nucleotide sequence of the transposable element found in pNd-16. Arrows indicate inverted repeats.



## 第VI章 Nd(2)変異蚕ならびに正常蚕のH鎖遺伝子3'末端近傍の塩基配列の比較

Nd(2)系統由来の $\lambda$ Nd-71  
 およびJ-139系統由来の $\lambda$ J-139-21を用いてH鎖遺伝子3'末端近傍の制限酵素地図を作成し、OhshimaらおよびMukaiにより得られている結果と比較した(Fig.9)。その結果この領域では制限酵素地図はよく一致していたが、+3~+7 kb(3'末端を-1とし下流をプラスとする)の領域内とプラス数百ベースのところに、多少のpolymorphismが見出された。  
 $\lambda$ Nd-71と $\lambda$ J-139-21

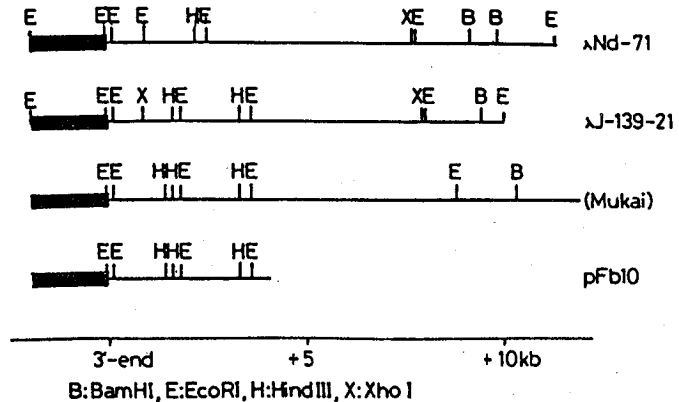


Fig. 9. Comparison of the restriction maps of the 3'-flanking and a part of the fibroin H-chain gene. Black boxes indicates fibroin H-chain gene.

について約-0.3 kbから約+0.9 kbまでの塩基配列を決定したところ、-338から+170 bpまで両クローン間で塩基配列が全く一致しているが、 $\lambda$ J-139-21では+171 bpから両末端に18 bpの逆位反復配列を有する約0.7 kbのtransposable element様断片が、その両末端に5 bpの同方向反復配列を形成することにより、挿入されており、+171 bp(Nd(2)系統の配列で)より再び約0.7 kbの間、両クローンは同じ配列を有することが明らかとなった。ゲノムDNAに対するサザンブロット法による解析により、正常蚕の一系統Daizoでも同様に、この領域の配列が存在しないことを示唆する結果を得ており、また現在理解されているかぎりにおいてpoly A付加部位の下流であるこの部位の塩基配列の重要性は低いと考えられ、Nd(2)系統の有する変異に寄与する可能性は小さいものと思われる。

## 第VII章 塩基配列多形性を利用したS1ヌクレアーゼマッピングによるmRNA前駆体の定量

第V章でフィブリンH鎖遺伝子の5'末端近傍の塩基配列を決定したことにより、Nd(2)とJ-139系統はイントロン内部の5'末端より約20 bpの異なる配列を有することが明らかとなった。そこでイントロン中央に存在するXho I切断部位から5'末端上流-43 bpのTag I部位までの断片

をpJ-139-1およびpNd-3から分離し、それぞれのXhoI部位の5'-末端を $^{32}\text{P}$ 標識した。これらの $^{32}\text{P}$ -断片をプローブとして、交雑種 [F1 (J-139/Nd(2))] の後部絹糸腺全RNAとのS1スクリーナーゼマッピングを行なった (Fig.10(A))。この結果、このF1においては、Nd(2)系統由来のH鎖遺伝子から転写されたmRNA前駆体とJ-139由来のものが、ほぼ等量存在することが明らかとなった (Fig.10(B) lanes 7~9)。この結果は、第V章の塩基配列レベルでの解析でNd(2)系統がスプライシングに影響を及ぼす変異を有していないと推定されたことを考えあわせると、転写の初期の段階およびスプライシングの段階では不等発現が生じていないことを示唆するものであり、転写時のRNA鎖の伸長過程あるいはmRNAの核から細胞質への移行などの段階で、シスに働く変異が影響を与えるものと推定された。

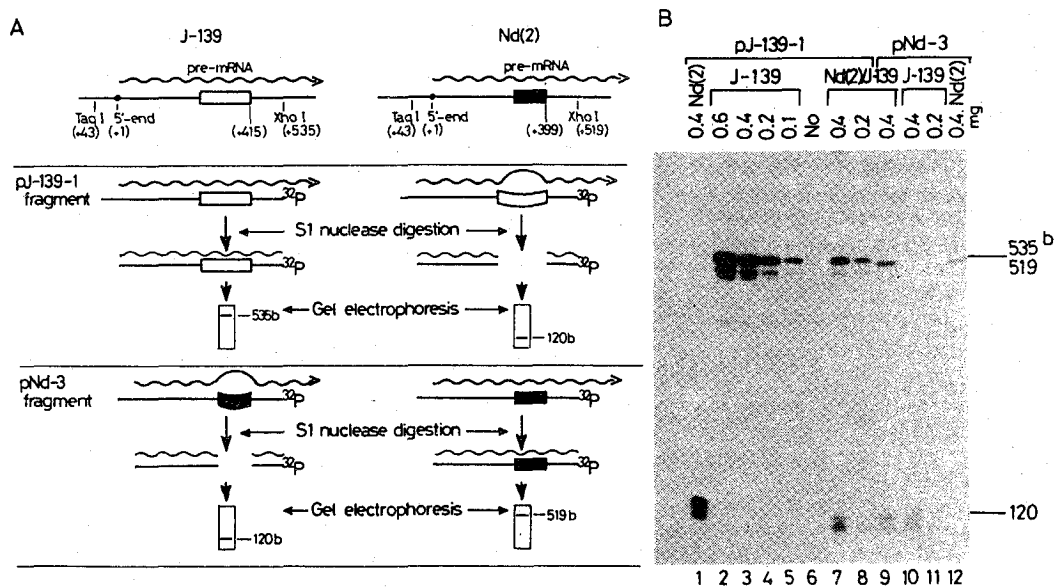


Fig. 10. Comparison of the amount of fibroin H-chain precursor mRNA using the S1 nuclease mapping.

(A) Strategy of S1 nuclease mapping.

(B)  $^{32}\text{P}$ -labeled Xho I-Taq I fragment of pJ-139-1 (lanes 1-8) or pNd-3 (lanes 9-12) was hybridized with total RNA of J-139 (lanes 2-5, 10 and 11), Nd(2) (lanes 1 and 12) and F1 (J-139/Nd(2)) (lanes 7-9), digested with S1 nuclease and electrophoresed on 6% polyacrylamide gel containing 8.3 M urea. Amount of RNA used was 0.6 mg (lane 2), 0.4 mg (lanes 1, 3, 7, 9, 10 and 12), 0.2 mg (lanes 4, 8 and 11), 0.1 mg (lane 5) and 0 mg (lane 6).

## 第VIII章 総合考察

第II章で述べた実験結果からNd(2)変異とH鎖遺伝子間の交叉価は0.1%以下であることが示された。この値をショウジョウバエで得られている値で換算すると、H鎖遺伝子の2kb以内の範囲にNd(2)変異が存在することを示唆するものであった。

第II章で述べた解析により、交雑種F1(+/Nd(2))におけるH鎖遺伝子の不等発現は転写、RNAのプロセシングの段階で生ずることが推定された。しかし、第VII章で述べた解析によりF1(+/Nd(2))における両対立遺伝子由来のH鎖プレカーサーmRNAの存在量がほぼ等しいことが示された。この結果は、スプライシングの段階にcisに働く変異が作用していないと仮定すると、転写の初期段階では不等発現が生じておらず、不等発現の原因は、それ以降の段階にあることを示すものと考えられる。いずれにせよ、これらの結果は、Nd(2)系統のcisに作用する変異が、H鎖遺伝子の内部あるいはごく近傍の遺伝子発現に重要な部位に存在することを示すものと考えられる。

制限酵素地図および塩基配列レベルの比較により、5'末端上流、3'末端下流、イントロン内部にいくつかの塩基配列多形が存在することを見出したが、Nd(2)系統の有する変異と結びつく明らかな違いは存在しなかった。Nd(2)ならびにJ-139系統から得られたクローンについてH鎖遺伝子内部の5'末端側と3'末端側に存在するアミノ酸非反復領域の遺伝子部分の全ての塩基配列を決定して比較したが、両者に全く違いは見出されなかった。またイントロン内部について多数の系統間で比較したがNd(2)系統特有の塩基配列の違いは見出されなかった。すなわち、F1(+/Nd(2))でNd(2)系統由来のH鎖のプレカーサーmRNAのスプライシングの段階に、cisに影響を及ぼす理由は見当たらないことになる。これらの結果は、不等発現の原因が転写初期およびスプライシング以降の段階に存在することを強く示唆しており、H鎖遺伝子内部のアミノ酸反復領域に対する遺伝子部分の比較解析が重要であると考えられる。従来、この領域の組換えDNA実験手法による解析は、クローニング過程で生じるdeletionのため進んでいない。今後は、ゲノムDNAを用いて直接塩基配列を決定するなど、deletionの心配のない方法によってこの領域の塩基配列を決定して比較することが必要である。

塩基配列の解析から、イントロン内部ならびに5'末端のかなり上流域が塩基配列多形に富むのに対し、5'末端に近接した上流域および3'末端に近接した下流域、またエキソンとイントロン境界部位近傍およびアミノ酸非反復領域の塩基配列が、いくつかのカイコの系統間で全く同一であったことは、これらの領域の配列の遺伝子発現ならびにH鎖の機能面での重要性を示唆するものと考えられる。

本研究では、また、塩基配列多形性の解析から調べたいずれかの系統のH鎖5'末端近傍で対立遺伝子間の交叉(crossing-over)が生じたことを示唆する結果を得た。

さらに、カイコのゲノム中に存在する **transposable element** を初めて見出した。このような **transposable element** は今後、カイコの受精卵に対する遺伝子の導入実験などの際のベクターとして利用できる可能性があるだろう。

## 審 査 結 果 の 要 旨

Nd(2) 変異は後部絹糸腺が発達せず、フィブロインを殆ど合成しないため裸蛹 (naked pupa) となる優性突然変異であり、交雑実験からNd(2) 変異部位とフィブロインH鎖遺伝子(以下H鎖遺伝子と略)とが第25番染色体上で近接して存在することが示されている。

著者はフィブロイン生産の正常なJ-131系統とNd(2)変異蚕の交雑種(雄)とJ-131(雌)の戻し交雑で得られた各個体のH鎖遺伝子について、J-131, Nd(2)両系統のH鎖遺伝子の制限酵素分解部位の多形性を利用して分析し、Nd(2)変異部位とH鎖遺伝子間の距離が交叉が検出されない程近いことを示した。次に、組換えDNA実験手法によりJ-131, Nd(2)両系統の遺伝子ライブラリーを作成し、これからH鎖遺伝子部分を含む数個のDNAクローンを分離し、H鎖遺伝子発現の解析のプロープとすると共に、これらの詳細な制限酵素地図の作成と塩基配列の決定を行った。その結果、交雑種J-131/Nd(2)においてNd(2)由来のH鎖遺伝子の発現がmRNA前駆体レベルではほぼ正常であるがmRNAレベルでは顕著に抑制されていることを認めた。両系統のH鎖遺伝子の5'-末端近傍、イントロン、3'-末端近傍の塩基配列を比較したところ、いくつかの興味ある塩基配列多形の存在を認めたが、mRNA発現の抑制に直接係わると考えられる塩基配列上の差異は存在せず、遺伝子内部のアミノ酸反復配列に対応する領域に転写の抑制を結果する異常が含まれるものと推論した。これらの研究の過程でNd(2)系統由来の1クローンのH鎖遺伝子上流域に1352塩基対からなる転移要素をカイコで初めて発見し、その塩基配列を決定した。

以上、本論文はフィブロイン遺伝子発現抑制を示す突然変異の分子機構をDNA塩基配列レベルで詳細に研究した上、将来の分子育種上有用なベクターとなると考えられる転移要素を発見し、その性質を明らかにしたものであり、審査員一同、著者は農学博士の学位を授与されるに十分な資格を有すると判定した。