

博士論文

鳥類のアロマターゼ遺伝子と  
転写調節因子SF-1/Ad4BPに関する研究

工藤 季之

平成 11 年

①

第1章	総論	1
1	遺伝子組換え技術	1
2	動物の性決定	1
3	性染色体と性決定	1
4	哺乳類の性決定機構	2
5	鳥類の性決定機構	3

## 博士論文

第2章	ニワトリおよびツズラ・アロマターゼ遺伝子5'上流域の クローニングと比較	6
-----	---	---

第1節	序論	6
1	鳥類のアロマターゼ遺伝子と	6
2	アロマトキシンの生合成	6

### 転写調節因子SF-1/A d 4 B Pに関する研究

1	アロマターゼ遺伝子の発現と生合成の分化	8
2	鳥類のアロマターゼ遺伝子の発現制御	9

第2節	材料と方法	10
1	ニワトリ・ゲノミックライブラリーの作製	10
2	アロマトキシンのアロマトキシナーゼ遺伝子のクローニング	10
3	ニワトリ・ゲノミックライブラリーのスクリーニング	11
4	ツズラ・ゲノミックライブラリーのスクリーニング	11
5	5' RACEとRT-PCR	12
6	塩基配列の決定	13

第3節	結果	15
1	ニワトリ・アロマターゼ遺伝子5'上流域のクローニング	15
2	ツズラ・アロマターゼ遺伝子5'上流域のクローニング	15
3	ニワトリおよびツズラ・アロマターゼ遺伝子の比較	16
4	ニワトリ・アロマターゼ遺伝子の転写開始部位	16

第4節	論議	17
1	ニワトリおよびツズラ・アロマターゼ遺伝子	17
2	ニワトリ・アロマターゼ遺伝子の転写開始部位	17
3	鳥類のアロマターゼ遺伝子の転写	18

第5節	要約	21
-----	----	----

第3章	ニワトリドナドド1関連cDNAのクローニングと発現	21
-----	---------------------------	----

第1節	序論	21
1	脂溶性リガンドと膜内レセプター	22

工藤 季之

平成11年

第1章	緒言 .....	1
1.	有性生殖と「性」 .....	1
2.	動物の性決定 .....	1
3.	性染色体と性決定 .....	1
4.	哺乳類の性決定機構 .....	2
5.	鳥類の性決定機構 .....	3
6.	性決定機構と進化 .....	4
第2章	ニワトリおよびウズラ・アロマターゼ遺伝子5'上流域の クローニングと比較 .....	6
第1節	序論 .....	6
1.	エストロゲンの作用 .....	6
2.	エストロゲンの生合成 .....	6
3.	アロマターゼ遺伝子 .....	7
4.	アロマターゼ遺伝子の発現と生殖巣の分化 .....	8
5.	鳥類のアロマターゼ遺伝子の発現制御 .....	9
第2節	材料と方法 .....	10
1.	ニワトリ・ゲノミックライブラリーの作製 .....	10
2.	PCRによるプローブDNAの調製 .....	10
3.	ニワトリ・ゲノミックライブラリーのスクリーニング .....	11
4.	ウズラ・ゲノミックライブラリーのスクリーニング .....	11
5.	5' RACEとRT-PCR .....	12
6.	塩基配列の決定 .....	13
第3節	結果 .....	15
1.	ニワトリ・アロマターゼ遺伝子5'上流域のクローニング .....	15
2.	ウズラ・アロマターゼ遺伝子5'上流域のクローニング .....	15
3.	ニワトリおよびウズラ・アロマターゼ遺伝子の比較 .....	16
4.	ニワトリ・アロマターゼ遺伝子の転写開始点の決定 .....	16
第4節	論議 .....	17
1.	ニワトリおよびウズラのアロマターゼ遺伝子 .....	17
2.	ニワトリ・アロマターゼ遺伝子の転写開始部位 .....	17
3.	鳥類のアロマターゼ遺伝子の転写調節領域 .....	18
第5節	要約 .....	21
第3章	ニワトリFTZ-F1関連cDNAのクローニングと発現 .....	22
第1節	序論 .....	22
1.	脂溶性リガンドと核内レセプター .....	22

2.	核内レセプターの構造と機能 .....	22
3.	オーファン核内レセプター .....	23
4.	FTZ-F1ファミリー .....	24
5.	SF-1/Ad4BPの機能 .....	25
6.	鳥類のFTZ-F1ホモログ .....	25
第2節	材料と方法 .....	27
1.	RT-PCR .....	27
2.	5' RACEと3' RACE .....	27
3.	塩基配列の決定 .....	29
4.	ノーザンハイブリダイゼーション .....	30
5.	<i>in situ</i> ハイブリダイゼーション .....	30
6.	PCRによる雌雄判別 .....	31
第3節	結果 .....	33
1.	オーファン核内レセプターの増幅 .....	33
2.	ニワトリFTZ-F1関連cDNAのクローニング .....	33
3.	ニワトリFTZ-F1関連遺伝子の発現 .....	34
第4節	論議 .....	36
1.	ニワトリ初期胚で発現するオーファン核内レセプター .....	36
2.	ニワトリFTF/LRH-1およびSF-1/Ad4BPの構造 .....	37
3.	ニワトリFTF/LRH-1および SF-1/Ad4BP遺伝子の発現 .....	39
第5節	要約 .....	43
第4章	ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子の構造解析 .....	44
第1節	序論 .....	44
1.	核内レセプターの発現と細胞分化 .....	44
2.	SF-1/Ad4BP遺伝子 .....	44
3.	SF-1/Ad4BP遺伝子の発現と生殖巣の分化 .....	45
4.	鳥類のSF-1/Ad4BP遺伝子の発現制御 .....	46
第2節	材料と方法 .....	47
1.	ニワトリ・ゲノミックライブラリーのスクリーニング .....	47
2.	5' RACEとRT-PCR .....	47
3.	塩基配列の決定 .....	49
4.	ニワトリ卵巢由来細胞の初代培養 .....	49
5.	プロモーター解析 .....	50

第3節	結果	52
1.	ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子のクローニング	52
2.	ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子の転写開始点の決定	52
3.	ニワトリ卵巣由来細胞の特性	53
4.	ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子のプロモーター解析	53
第4節	論議	55
1.	ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子	55
2.	ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子の転写開始部位	56
3.	ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子の転写調節領域	57
第5節	要約	60
第5章	結語	61
	謝辞	63
	引用文献	64
	表	
	図と図の説明	

DRE : DNA regulatory element  
 DREAM : DRE-associated modulator  
 ELP : embryonic long terminal repeat  
 MuLys protein  
 FBS : fetal bovine serum  
 FSH : follicle stimulating factor  
 FTF : transcription factor  
 FTF-1 : forkhead factor 1  
 LBD : ligand binding domain  
 LKH-1 : liver-specific homeobox-1  
 LTR : long terminal repeat  
 MIB : Myc-interacting factor  
 PDS : polyoma virus-derived signal  
 PCR : polymerase chain reaction  
 PFA : polyformaldehyde  
 RACE : rapid amplification of cDNA

略語リスト (アルファベット順)

- aa : amino acids  
A d 4 B P : Ad4 binding protein  
bp : base pairs  
C B F : CAAT-binding factor  
C O U P - T F : chicken ovalbumin  
upstream promoter-transcription factor  
C R E : cAMP responsible element  
C R E B : CRE binding protein  
D A X - 1 : DSS-AHC critical region on  
the X chromosome 1  
D B D : DNA binding domain  
D M E M : Dulbecco's Modified Eagle's  
Medium  
D R E : downstream regulatory element  
D R E A M : DRE-antagonist modulator  
E L P : embryonal long terminal repeat-  
binding protein  
F B S : fetal bovine serum  
F S H : follicle stimulating factor  
F T F : fetoprotein transcription factor  
F T Z - F 1 : *fushi tarazu*-factor 1  
L B D : ligand binding domain  
L R H - 1 : liver receptor homolog-1  
L T R : long terminal repeat  
M I S : Müllerian inhibiting substance  
P B S : phosphate-buffered saline  
P C R : polymerase chain reaction  
P K A : protein kinase A  
R A C E : rapid amplification of cDNA  
ends  
R T - P C R : reversetranscriptase  
polymerase chain reaction  
S F - 1 : Steroidogenic factor-1  
S O X : SRY-related HMG-box gene  
S p 1 : specificity protein 1  
S R Y : sex determining region Y  
T D F : testis-determining factor  
U S F : upstream stimulatory factor  
U T R : untranslated region  
W T 1 : Wilms' tumor suppressor gene 1

## 第1章 緒言

### 1. 有性生殖と「性」

生物は、「性」を進化させることにより、その遺伝的多様性を展開してきた。無性生殖が、限りなく完全な自己複製を行うことにより、自らの遺伝子を保存しそのまま次世代に伝えるのに対し、有性生殖は、積極的に他の遺伝子と共存させることにより、自らの遺伝子を次世代と受け継いでいく。この自らの遺伝子を他の遺伝子と共存させるための仕組みが「性」であり、「性」は原核生物から真核生物まで広く存在している。原核生物においては、遺伝子の共存が個体同士の直接的な遺伝子の交換を通して行われるのに対し、多くの真核生物では、減数分裂による配偶子の形成とそれらの合体を通して行われる。多くの場合、この配偶子には2つ以上の型が存在しており、その異なる型の配偶子を作り出す仕組みが狭い意味で「性」と呼ばれる。一般に、作り出される配偶子が2型で、一方が運動性に乏しく大型であり、他方が運動性が高く小型の場合、前者が雌性配偶子、後者が雄性配偶子とされ、それぞれを作り出す個体の「性」が雌および雄と呼ばれる。雌性配偶子と雄性配偶子は同じ個体内でつくられること、すなわち雌雄同体の場合もあれば、別の個体内でつくられること、すなわち雌雄異体の場合もある。この雌雄異体の出現にともない、その個体が雌になるのか雄になるのかを決めるための仕組み、すなわち性決定の機構が必要となったと考えられる。

### 2. 動物の性決定

現在認められる性決定の機構は極めて多様であり、雌雄同体から雌雄異体への変化、あるいは雌雄異体から雌雄同体への変化は、進化のいろいろな段階で独立に生じたものと考えられる。動物の性決定機構には、大きく分けて2つの様式、すなわち遺伝的要因によって決まるものと環境的要因によって決まるものが存在する。どちらの性決定様式をとるかは、分類学的に同じ綱 (class)、同じ目 (order)、同じ科 (family) に属していても必ずしも一致しない。脊椎動物門についてのみ考えてみても、その様式は多様である。硬骨魚類では、雌雄同体種も存在すれば、雌雄異体種もあり、雌雄異体に関しても遺伝的に決定されていると思われる種もあれば、環境要因によって決定されている種も存在する。これは、両生類においても同様である。爬虫類では、カメ類、ワニ類が環境要因 (温度) によって性が決定されているのに対して、ヘビ類では遺伝的に性が決定されていると考えられている。鳥類、哺乳類に至ってはじめて、完全に遺伝的に決定される性決定様式が認められる。

### 3. 性染色体と性決定

遺伝的な性決定様式のなかで、もっともよく知られているのが、形態的に異なっ

た性染色体が関与するものである。これには、雄が異形配偶子性である場合 ( $XX/X Y$ 型あるいは $XX/X O$ 型) と、雌が異形配偶子性である場合 ( $Z Z/Z W$ 型) がある。

性染色体と性決定機構の関係がもっともよく解析されているのが、哺乳類、ショウジョウバエ、線虫である。哺乳類とショウジョウバエはともに $XX/X Y$ 型の性染色体を有しているが、その性決定機構は全く異なっている。哺乳類においては、基本的には雌型への分化機構 ( $XX$ ) が、 $Y$ 染色体上に存在する精巣決定因子 (TDF, testis-determining factor) の存在により、雄型への分化機構 ( $X Y$ ) へと転換する。この際に、 $X$ 染色体の数は関係はなく、 $Y$ 染色体の存否によって性が決定されている。これに対し、ショウジョウバエでは、 $X$ 染色体の数が重要であり、 $X$ 染色体と常染色体の比により性が決定され、 $Y$ 染色体は雄の妊性にのみ関与している。一方、線虫の性染色体は $XX/X O$ 型であるが、 $XX/X Y$ 型であるショウジョウバエと同様に、 $X$ 染色体と常染色体の比により性が決定されている。

鳥類とヘビ類は $Z Z/Z W$ 型の性染色体を有しており、遺伝的な性決定様式をとっているが、その詳細な性決定機構はよくわかっていない。哺乳類の $Y$ 染色体のように、 $W$ 染色体上に卵巣決定因子 (ODF, ovary-determining factor) が存在するのか、あるいはショウジョウバエの $X$ 染色体のように、 $Z$ 染色体と常染色体の比が性を決定しているのか、いずれの説についてもそれを強く示唆する知見は得られていない。

#### 4. 哺乳類の性決定機構

哺乳類の性決定は、 $Y$ 染色体上に存在する性決定遺伝子 (ヒトではTDF、マウスではTdyと呼ばれる) によって制御されると仮定されていたが、1990年、その候補遺伝子としてSR Y (sex determining region Y) / S r yがクローニングされた (Sinclair *et al.*, 1990, Gubbay *et al.*, 1990)。このSR Y / S r yが同定される以前には、1975年のH-Y抗原 (histocompatibility antigen-Y) 説 (Wachtel *et al.*, 1975) や1987年のZFY (zinc finger Y gene) / Z f y説 (Page *et al.*, 1987) などが存在したが、いずれもその後の解析により否定された。SR Y / S r yは多くの哺乳類の $Y$ 染色体上に存在しており、精巣においてその特異的な発現が確認された。さらに、同遺伝子を導入することによって、遺伝的に雌の胚 ( $XX$ ) を雄に性転換することが可能なことが、トランスジェニックマウスの作製により示された (Koopman *et al.*, 1991)。SR Y / S r yは、HMG (high mobility group) 様のDNA結合ドメインを有していることから、転写調節因子として働くものと考えられている。その標的遺伝子としては、雄化遺伝子の一つであるMIS (Müllerian inhibiting substance) があげられる (Haqq *et al.*, 1993, 1994) が、それらの発現時期に



は明らかなタイムラグが認められており、直接転写制御を行っているかどうかは疑問視されている。SRY/Sryには多くのホモログの存在が知られており、SOX (SRY-related HMG-box gene) ファミリーを形成している。当初、SRY/Sryの標的遺伝子とされていたMISについても、最近では同ファミリーの一つであるSOX9が直接転写制御を行っている (de Santa Barbara *et al.*, 1998) とも言われ、SRY/Sryの生体内での働きと性決定機構はまだ十分には解明されていない。

また、SRY/Sry以外にも、哺乳類の生殖腺の分化に関わっている転写制御因子が3つ (WT1、SF-1、DAX-1) 知られている。WT1 (Wilms' tumor suppressor gene 1) は、ウィルムス腫瘍の原因となる癌抑制遺伝子としてクローニングされたが (Gessler *et al.*, 1990, Call *et al.*, 1990)、ノックアウトマウスの作製により、腎臓と生殖腺の分化に不可欠な遺伝子であることがわかった (Kreidberg *et al.*, 1993)。SF-1 (steroidogenic factor-1) は、ステロイドホルモン合成酵素の転写因子としてクローニングされたが (Honda *et al.*, 1993, Ikeda *et al.*, 1993)、ノックアウトマウスの解析から、副腎と生殖腺の分化に不可欠な遺伝子であることが判明した (Luo *et al.*, 1994)。DAX-1 (DSS-AHC critical region on the X chromosome 1) は、X染色体連鎖の先天性副腎形成不全の原因遺伝子としてクローニングされ (Zenaria *et al.*, 1994)、ノックアウトマウスの解析により、精子形成に重要な役割を果たしていることが確認された (Yu *et al.*, 1998)。これらについては、タンパク質同士の直接的な相互作用や、遺伝子の相互の転写調節といったさらに多くの知見が得られており、その関係は非常に複雑に絡み合っている (Fig. 1)。これらはともに、生殖腺の分化のみならず、その性分化においても極めて重要な役割を果たしているものと考えられている。

## 5. 鳥類の性決定機構

鳥類の性染色体は、雌ヘテロのZZ/ZW型であるが、性決定遺伝子がW染色体上に存在するのか、あるいはZ染色体上に存在するのか、未だに決定的な証拠は示されていない。これは、哺乳類 (ヒト、マウス) と異なって、鳥類においては、突然変異体などを用いた厳密な遺伝学的解析が行われていないためである。ニワトリにおいて偶発的に生じる三倍体では、ZZW個体は間性の表現型を示す (Bitgood and Shoffner, 1990)。W染色体上に性決定遺伝子 (雌化遺伝子) が存在すると仮定すると、ZZW個体は雌の表現型を示すことが期待される。また、Z染色体上に性決定遺伝子 (雄化遺伝子) が存在し常染色体との比によって性が決定されるとすると、ZZW個体は雄の表現型を示すことが期待される。実際には、そのどちらでもなく、どちらの仮説も積極的には支持されない。最近、この2つの仮説に対して、興味深

い示唆を与える知見が示された。ニワトリの胚盤葉細胞を性の異なった胚へ移植する実験である (Kagami *et al.*, 1995)。雌のドナー細胞 (ZW) を雄のレシピエント胚 (ZZ) に移植した場合には、発生した個体の性は雄のままであるのに対して、雄のドナー細胞 (ZZ) を雌のレシピエント胚 (ZW) に移植した場合には、発生した個体の性は約半数の割合で雌から雄へと性転換していたのである。鳥類では、哺乳類の X 染色体とは異なり、Z 染色体上の遺伝子量補正はないとされている (Baverstock *et al.*, 1982)。この現象は、Z 染色体上に存在する性決定遺伝子 (雄化遺伝子) がドナーの雄細胞で 2 倍量発現することにより、レシピエントの雌個体の雄化を誘導したものと解釈することができるかもしれない。

哺乳類の性決定遺伝子として SRY/Sry がクローニングされてから、鳥類の性決定遺伝子として同遺伝子のホモログを同定しようとするいくつかの試みがなされた (Griffith, 1991, Coriat *et al.*, 1993, McBride *et al.*, 1997)。しかしながら、SOX ファミリーに属する遺伝子はいくつかクローニングされたものの、哺乳類の SRY/Sry に相当する遺伝子は未だ同定されていない。哺乳類の性分化において重要な役割を果たしている SOX9 に関しては、鳥類においてもそのホモログがクローニングされており、性分化過程における役割も哺乳類と同様であることが示されている (Kent *et al.*, 1996, Molais da Silva *et al.*, 1996)。

哺乳類で同定され、クローニングされている性分化に関与するその他の遺伝子についても、いくつかは鳥類のホモログが既にクローニングされている (Fig. 2)。しかしながら、鳥類と哺乳類の性決定機構の相違を明確に解明できるような知見は未だ得られていない。

## 6. 性決定機構と進化

脊椎動物の生殖腺の分化と性分化に関与する因子は、ほとんどが共通であり、その機構も進化的にかなり保存されているようである。それにもかかわらず、その性決定様式が極めて多様であるのは、生物が進化の過程で、性分化に関与する因子の一つをそれぞれの都合に合わせて、性決定遺伝子として採用したためと思われる。ある個体が雄になるか雌になるかは、その個体の生死に直接関わる問題ではない。どちらであれ、完全な個体が出来さえすれば、その個体は生き残ることができ、異性を見つけだせれば、子孫を残すことも可能である。つまり、繁殖可能な個体になるために「性分化」は厳密に制御されなければならないが、性比が繁殖可能なところに落ち着けば「性決定」は比較的ルーズであっても支障がなかったものと思われる。

脊椎動物の性決定および性分化において、極めて重要な働きを持つ因子に性ステロイドホルモンがある。哺乳類を除く脊椎動物においては、雌性ホルモンであるエ

ストロゲンが、性決定において絶対的に重要な役割を果たしている。(哺乳類の性決定においては、例外的に、エストロゲンがほとんど重要な役割を担っていない。これは、哺乳類の個体発生が、エストロゲン過剰の雌の胎内で進行するという特殊性のために、二次的に別の性決定機構が発達したものと考えられる。) このことから、多くの脊椎動物の性決定は、エストロゲン合成機構の構築、すなわちその鍵酵素であるアロマターゼ遺伝子の発現制御を通して行われているものと考えられる。

本研究は、鳥類のアロマターゼ遺伝子の発現制御の解析を行うことにより、未だ十分な知見の得られていない鳥類の性決定機構の解明を試みるものである (Fig. 2)。さらに、既に多くの知見が得られている哺乳類の性決定機構と対比することにより、脊椎動物に共通する性分化の機構を明らかにするとともに、進化の過程で鳥類がその機構の何を性決定遺伝子としたのかを解明したいと思う。

### 3. エストロゲンの生合成

エストロゲンは、ステロイドホルモンは、コレステロールを原料として、ミトコンドリアおよび細胞体内にある特定の酵素により合成される。アロマターゼ (EC 1.1.1.61) は、雄生殖腺においてもアンドロステノジオンやテストステロンなどのアンドロゲンも基質として、 $\Delta^4$ -アンドロステノジオンやテストステロンから $\Delta^5$ -アンドロステノジオンやテストステロンなどのエストロゲン合成を促進する。雌生殖腺では、雄生殖腺とは異なり、 $\Delta^5$ -アンドロステノジオンやテストステロンは、 $\Delta^4$ -アンドロステノジオンやテストステロンから合成される。エストロゲンの生合成は、 $\Delta^5$ - $\Delta^4$ イソメラーゼ (aromatase) によって行われる。アロマターゼは、哺乳類の胎盤や胎児の生殖腺に発現する。鳥類の胎盤や胎児の生殖腺にも発現する。アロマターゼは、哺乳類の胎盤や胎児の生殖腺に発現する。鳥類の胎盤や胎児の生殖腺にも発現する。

アロマターゼは、哺乳類においては、胎盤や胎児の生殖腺に発現することが知られている。哺乳類 (ヒト、マウス) の胎盤では、アンドロステノジオンやテストステロンなどのアンドロゲンも基質として、 $\Delta^4$ -アンドロステノジオンやテストステロンから $\Delta^5$ -アンドロステノジオンやテストステロンなどのエストロゲン合成を促進する。雌生殖腺では、雄生殖腺とは異なり、 $\Delta^5$ -アンドロステノジオンやテストステロンは、 $\Delta^4$ -アンドロステノジオンやテストステロンから合成される。エストロゲンの生合成は、 $\Delta^5$ - $\Delta^4$ イソメラーゼ (aromatase) によって行われる。アロマターゼは、哺乳類の胎盤や胎児の生殖腺に発現する。鳥類の胎盤や胎児の生殖腺にも発現する。

## 第2章 ニワトリおよびウズラ・アロマターゼ遺伝子5'上流域のクローニングと 比較

### 第1節 序論

#### 1. エストロゲンの作用

エストロゲンは、哺乳類においては、雌の生殖腺（卵巣）や付属生殖器官（子宮など）の発育肥大と、二次性徴発現を促す、生殖に不可欠な雌性ホルモンである。卵巣内の濾胞（follicle）におけるエストロゲン合成は、脳下垂体の濾胞刺激ホルモン（FSH）により促進される。分泌されたエストロゲンは、FSHの分泌を抑制し、黄体形成ホルモン（LH）の分泌を促進する。このフィードバック作用により、哺乳類の雌の血中エストロゲン濃度は周期的に変化し、その結果として性周期が形成される。妊娠が成立すると性周期は止まり、黄体（corpus luteum）が退縮せずに発達して、妊娠維持に必要なエストロゲンを産生し続ける。一方、卵生脊椎動物（鳥類、爬虫類、両生類、魚類）では、エストロゲンは、肝臓に作用し、卵黄タンパク質前駆体ビテロゲニンの合成を促し、卵黄の蓄積に寄与するほか、鳥類では、輸卵管に作用して、卵白タンパク質（オボアルブミン、コンアルブミンなど）の合成、分泌を促進する。

#### 2. エストロゲンの生合成

エストロゲンをはじめとする性ステロイドホルモンは、コレステロールをもとにして、ミトコンドリアおよび小胞体内にある5種の酵素により生合成される。アロマターゼ（EC 1.14.14.1.）は、C19-ステロイドであるアンドロステンジオンやテストステロンなどのアンドロゲンを基質とし、C18-ステロイドであるエストロンやエストラジオールなどのエストロゲンの生成を触媒する、雌性ホルモン生合成の鍵酵素である。その芳香環化活性には分子状酸素およびNADPHを必要とし、細胞内の小胞体内に局在することから、アロマターゼはシトクロムP450の一種（P450<sub>aroma</sub>）とされている。

アロマターゼは、哺乳類においては、卵巣や胎盤などの雌性生殖器官に局在することが知られてる。哺乳類（ヒト、マウス）の卵巣濾胞では、アンドロステンジオンまでの変換は内莖膜（theca interna）で、これに続くテストステロン、エストラジオールへの変換は、顆粒膜細胞（granulosa cell）で行われ、アロマターゼは顆粒膜細胞に局在している（Ishimura *et al.*, 1989, Sasano *et al.*, 1989）。胎盤におけるアロマターゼの存在は、哺乳類・有胎盤類の中でも大型真獣類のみに限られている。通常、哺乳類の妊娠は、黄体が産生するエストロゲンによって維持されるが、大型真獣類では妊娠期間が長く、黄体の産生するプロゲステロンおよびエストロゲンでは妊娠を維持できなくなる。そのため、黄体の機能が低下した後に、胎盤が黄体に代わっ

てエストロゲンを産生するものと考えられている。近年、ヒトにおいては、雌性生殖器官以外のさまざまな器官（脳、肝臓、皮膚、脂肪、副腎、精巣など）にもアロマトラーゼが存在することが明らかになったが、これらの器官が産生するエストロゲンは、傍分泌（paracrine）あるいは自己分泌（autocrine）により種々の重要な生理機能に関与しているものと思われる。

一方、鳥類（ニワトリ）においても、哺乳類と同様に、雌性生殖器官である卵巣にアロマトラーゼが局在していることが知られている。しかしながら、鳥類（ニワトリ）の卵巣濾胞では、顆粒膜細胞でプロゲステロンが合成され、莢膜細胞（thecal cell）でテストステロン、エストラジオールへの変換が行われるため、アロマトラーゼは、外莢膜（theca externa）に点在するアロマトラーゼ細胞と呼ばれる細胞に局在している（Nitta *et al.*, 1991）。

### 3. アロマトラーゼ遺伝子

1988年、特異的抗体あるいは部分アミノ酸配列に基づくオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより、哺乳類（ヒト）の完全長のアロマトラーゼcDNAがはじめてクローニングされた（Harada, 1988, Corbin, *et al.*, 1988）。ヒト・アロマトラーゼcDNAは、1509 bp（503 aa）のアミノ酸コード領域を含んでおり、推定されるアミノ酸配列と他のシトクロムP450との比較から、シトクロムP450ファミリーの一員であることが判明した。ヒト・アロマトラーゼ遺伝子は、ヒト・アロマトラーゼcDNAをプローブとしてクローニングされた（Means *et al.*, 1989, Harada *et al.*, 1990, Toda *et al.*, 1990）。その遺伝子構造は10個のエクソンからなっており、アミノ酸コード領域は、約35 kb以内にある第2エクソンから第10エクソンに存在していた。第1エクソンは第2エクソンから35 kb以上離れて存在しており、5'非翻訳領域（5' UTR）のみを含んでいた。RT-PCRなどによる解析により、ヒトのさまざまな器官でアロマトラーゼ遺伝子が発現していることが確認されたが、こうした器官での特異的発現は、単一のアロマトラーゼ遺伝子に存在する複数のプロモーターおよび第1エクソンを使い分けることにより、調節されていることが判明した。最初にクローニングされたヒト・アロマトラーゼcDNAは、ヒトの胎盤由来であり、その第1エクソンは胎盤で発現するアロマトラーゼmRNA特有のものである。他種でこの第1エクソンが確認されているのは、大型真獣類（ウシ、ウマ、ブタ）のみであり（Hinshelwood *et al.*, 1995）、このエクソンは進化的にかなり後の段階で付加され、胎盤特異的な遺伝子発現を担ったものと考えられている。アロマトラーゼの主要な産生器官である卵巣では、第2エクソンのすぐ上流にあるプロモーターによりその発現が制御されている（Means *et al.*, 1991）。このエクソンおよびプロモーターは、大型真獣類を含む多くの脊椎動物（ラット、ニワトリ、マウス）で確認されており

(Hickey *et al.*, 1990, Matsumine *et al.*, 1991, Honda *et al.*, 1996)、進化的に原初のものであると考えられている。ヒトではさらに、胎児肝臓/皮膚繊維芽細胞転写型 (Harada, 1992)、前立腺転写型 (Harada *et al.*, 1993)、脳転写型 (Honda *et al.*, 1994) など6種類のエクソンが確認されている。

鳥類 (ニワトリ) のアロマターゼ cDNA は、1988年、ヒトのアロマターゼ cDNA をプローブとしてクローニングされた (McPhaul *et al.*, 1988)。ニワトリ・アロマターゼ cDNA は、1521 bp (507 aa) のアミノ酸コード領域を含んでおり、推定されるアミノ酸配列は、ヒトのアロマターゼと70%の同一性を示した。ニワトリ・アロマターゼ遺伝子は、ニワトリ・アロマターゼ cDNA をプローブとしてクローニングされた (Matsumine *et al.*, 1991)。その遺伝子構造は9個のエクソンからなっており、約15 kb 以内に存在していた。

#### 4. アロマターゼ遺伝子の発現と生殖巣の分化

哺乳類の雄の性的分化において、精巣で産生されるアンドロゲンは重要な役割を果たしている。ウォルフ管 (Wolffian duct) の分化、形成には、精巣のライデッヒ細胞 (Leydig cell) で合成されるテストステロンが不可欠である。マウスでは、未分化生殖腺が精巣に分化し始める時期に、4種のステロイドホルモン合成酵素 (P450<sub>scc</sub>、3 $\beta$ -HSD、P450<sub>c17</sub>、17 $\beta$ -HSD) の発現が認められ、出産直前にはアロマターゼの発現が認められる (Greco and Payne, 1994)。それに対し、卵巣の分化においては、1種のステロイドホルモン合成酵素の発現は認められるものの、他の酵素やアロマターゼの発現は認められなかった。哺乳類の胎生期の卵巣は、精巣とは異なり、ステロイド合成をほとんど行っていないと考えられている。また、アロマターゼ遺伝子のノックアウトマウスの解析からも、エストロゲンは卵巣の形成自体には不可欠ではないことが示唆された (Fisher *et al.*, 1998)。

一方、鳥類の雌の性的分化において、卵巣で産生されるエストロゲンは、非常に重要な役割を果たしている。ニワトリでは、精巣または卵巣に分化する前の未分化生殖腺で、3種のステロイドホルモン合成酵素 (P450<sub>scc</sub>、3 $\beta$ -HSD、P450<sub>c17</sub>) の発現が認められる (Nakabayashi *et al.*, 1998)。その後、未分化生殖腺が卵巣へ分化する直前から、雌でのみ17 $\beta$ -HSDおよびアロマターゼの発現が認められる (Andrews *et al.*, 1997, Smith *et al.*, 1997, Nakabayashi *et al.*, 1998)。また、雌の未分化生殖腺の分化時期に、アロマターゼの酵素活性を阻害すると、卵巣の形成が阻害され、精巣が形成されることから、エストロゲンは卵巣の形成に不可欠であることが示唆された (Elbrecht and Smith, 1992)。

## 5. 鳥類のアロマターゼ遺伝子の発現制御

アロマターゼは、鳥類の初期発生における発現様式などから、その性決定に極めて重要な役割を果たすと考えられる。また、アロマターゼ遺伝子の発現より前に、その発現が性的二型性を示す遺伝子は知られておらず、鳥類の性決定遺伝子が、アロマターゼ遺伝子を直接の標的遺伝子とし、その転写制御を行っている可能性が高い。しかしながら、鳥類のアロマターゼ遺伝子は、ニワトリの遺伝子がクローニングされてはいるものの、その発現制御に関する解析はほとんど行われていない。そこで、本研究ではニワトリのアロマターゼ遺伝子のクローニングを行うとともに、その初期発生における転写開始点の検討を行った。さらに、近縁種であるウズラのアロマターゼ遺伝子のクローニングを行い、ニワトリのアロマターゼ遺伝子と比較することにより、転写制御領域の進化的な保存性について検討した (Kudo *et al.*, 1996)。

## 第2節 材料と方法

### 1. ニワトリ・ゲノミックライブラリーの作製

#### 1. 1 ゲノミックDNAの調製

ニワトリのゲノミックDNAは、養鶏場より入手した雌の成鶏（白色レグホン種、White Leghorn）の肝臓から、フェノール抽出法により調製した（Sambrook *et al.*, 1989）。

#### 1. 2 ライブラリーの作製

ニワトリのゲノミックDNAは制限酵素 *Mbo* I による部分切断反応の後、ショ糖密度勾配遠心によりサイズ分画を行った。分子サイズが 15~20 kb の画分を集め、dGTP、dATP による部分修復反応を行った。ファージベクター Lambda FIX II (Stratagene) は制限酵素 *Xho* I による切断の後、dTTP、dCTP による部分修復を行った。得られたDNA断片（ゲノミックDNAとベクターDNA）は T4 DNA ligase (Takara) による結合反応の後、Gigapack Gold II (Stratagene) によりインビトロパッケージングを行った。

このライブラリーは、 $1.05 \times 10^6$  の独立したクローンを含んでいた。

### 2. PCRによるプローブDNAの調製

#### 2. 1 プライマーDNA

プライマーDNAは既知のニワトリ・アロマトラーゼの塩基配列（Matsumine *et al.*, 1991）をもとにして作製した。

センスプライマー

AROMA2: ATGCTGGAGATGAAGGTCTG

アンチセンスプライマー

AROMA1: CAAGTCTGGTACCAGGCTGG

#### 2. 2 PCR

ニワトリのゲノミックDNAを鋳型とし、1組のプライマー（AROMA1 およびAROMA2）を用いて、PCRを行った。反応液の組成は、template DNA 5 ng、 $1 \times$ Tth 緩衝液（10 mM Tris-HCl(pH8.9)/80 mM KCl/1.5 mM MgCl<sub>2</sub>/5 mg/ml BSA/0.1% sodium cholate/0.1% Triton X-100）、0.2 mM dNTPs、0.4  $\mu$ M primers、Tth polymerase (Toyobo) 2 units で、反応液量は 50  $\mu$ l とした。反応条件は、95℃ 3分間の熱変成の後、94℃ 1分間 50℃ 1分間 72℃ 1分間を 35 サイクルで行った。1次PCR産物（1次PCRの反応液 1  $\mu$ l）を鋳型とし、2次PCRを行った。反応液の組成および反応条件は、1次PCRと同様に行った。



## 2. 3 サブクローニング

2次PCR産物は3% Nusieve 3:1 agarose (FMC) 電気泳動によりサイズ分画し、予想されるサイズ(390 bp)のDNA断片を回収した。DNA断片はT4 DNA polymerase (Takara) による平滑末端化、T4 polynucleotide kinase (Takara) によるリン酸化を行った後、プラスミドベクター pGEM3Zf(+) (Promega) の *Sma* I 部位に導入し、塩基配列の確認を行った。

## 3. ニワトリ・ゲノミックライブラリーのスクリーニング

### 3. 1 プローブDNAの調製と標識

PCRにより得られたDNA断片(390 bp)は、Megaprime DNA labeling systems (Amersham) を用いて[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTPで標識した(random primer 法)。

### 3. 2 スクリーニング

標識したDNA断片をプローブとして、ニワトリ・ゲノミックライブラリー(6.0x10<sup>5</sup>)のスクリーニングを行った。ブランクはHybond N nylon membrane (Amersham) に転写し、ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション液(6x SSC/5x Denhardt's solution/0.5% SDS/100 $\mu$ g/ml salmon sperm DNA)で65℃3時間プレハイブリダイゼーションを行った後、同液に標識したDNA断片を加え、65℃で一晩(16時間)行った。メンブレンは、洗浄液(2x SSC/0.2% SDS)で65℃15分間、洗浄液(1x SSC/0.2% SDS)で65℃15分間洗浄した後、オートラジオグラフィーを行った。

シングルブランクを単離するために、同様の方法で2次、3次スクリーニングを行った。

### 3. 3 サブクローニング

陽性クローンからファージDNAを調製し(Sambrook *et al.*, 1989)、制限酵素 *Eco* RI で切断した後、プラスミドベクター pGEM3Zf(+) (Promega) の *Eco* RI 部位に導入し、塩基配列の確認を行った。

## 4. ウズラ・ゲノミックライブラリーのスクリーニング

### 4. 1 プローブDNAの調製と標識

ニワトリ・アロマターゼ遺伝子の一部を含むDNA断片(3.2 kb)は、Megaprime DNA labeling systems (Amersham) を用いて[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTPで標識した(random primer 法)。

#### 4. 2 スクリーニング

標識したDNA断片をプローブとして、ウズラ・ゲノミックライブラリー (9.6x10<sup>5</sup>) のスクリーニングを行った。ウズラ・ゲノミックライブラリーは、山本博章助教授 (東北大学) より分与された (Yamamoto *et al.*, 1992)。ハイブリダイゼーションおよび洗浄は、3. 2と同様に行った。ただし、温度は50℃で行い、最終洗浄は洗浄液 (0.1x SSC/0.2% SDS) で行った。

#### 4. 3 サブクローニング

陽性クローンからファージDNAを調製し (Sambrook *et al.*, 1989)、制限酵素 *Eco* RI で切断した後、プラスミドベクター pGEM3Zf(+) (Promega) の *Eco* RI 部位に導入し、塩基配列の確認を行った。

### 5. 5' RACEとRT-PCR

#### 5. 1 RNAの調製

全RNAは、孵卵後6日目のニワトリ全胚あるいは成鶏 (白色レグホン種) の種々の器官 (副腎、卵巣、精巣) から、ISOGEN (Nippongene) を用いて調製した (Acid phenol 法)。ポリ (A)<sup>+</sup>RNAは、全RNAから Oligotex-dT30 Super (Roche) を用いて調製した。

#### 5. 2 プライマーDNA

5' RACEには、以下の5つのプライマーを使用した。

特異的アンチセンスプライマー1

AROMA7: GAGAGGCCCAATTCATGCAGTATCC

特異的アンチセンスプライマー2

AROMA3: AATGATGATAGGCACTGTGGCAACTGG

特異的アンチセンスプライマー3

AROMA1 (2. 1のアンチセンスプライマーと同じ。)

d T 1 7アダプタープライマー

GAGTCGACTCGAGAATTCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

アダプタープライマー

GAGTCGACTCGAGAATTC

RT-PCRには、以下の3つのプライマーを使用した。

AROMA7 (上記の特異的アンチセンスプライマー1と同じ。)

AROMA13: TACAGGGCCTCCAGCAGGTT

AROMA14: AGCAGTCCAGGTCCTCA

### 5. 3 5' RACE

一本鎖cDNAは、全RNAもしくはポリ(A)<sup>+</sup>RNAをもとに、特異的アンチセンスプライマー1をプライマーとし、SUPERSCRIPT II reverse transcriptase (Gibco BRL) を用いて作製した。さらに、この一本鎖cDNAに、terminal deoxynucleotidyl transferase (Takara) を用いてポリ(A) テイルを付加した後、SUPREC-02 (Takara) で精製した。

このcDNAを鋳型とし、特異的アンチセンスプライマー2およびdT17アダプタープライマーを用いて1次PCRを行った。反応液の組成は、poly(A) tailed first strand cDNA 1  $\mu$ l、1  $\times$  ExTaq 緩衝液 (25 mM TAPS(pH9.3)/50 mM KCl/2 mM MgCl<sub>2</sub>/1 mM 2-mercaptoetanol)、0.2 mM dNTPs、0.2  $\mu$ M primers、ExTaq polymerase (Takara) 2.5 units で、反応液量は50  $\mu$ lとした。反応条件は、95 $^{\circ}$ C 3分間の熱変成の後、94 $^{\circ}$ C 1分間60 $^{\circ}$ C 1分間72 $^{\circ}$ C 1分間を35サイクル、72 $^{\circ}$ C 7分間の伸長で行った。さらに、この1次PCR産物(1次PCRの反応液0.1  $\mu$ l)を鋳型とし、特異的アンチセンスプライマー3およびアダプタープライマーを用いて2次PCRを行った。反応条件は、1次PCRと同様に行った。

2次PCR産物は、SUPREC-02(Takara)で精製した後、プラスミドベクター pGEM-T (Promega) に導入し、塩基配列の確認を行った。

### 5. 4 RT-PCR

全RNAは、ゲノミックDNAの混入を排除するため、DNAase (Pharmacia) による消化反応を行った。cDNAは、この全RNAをもとに、ランダムプライマーをプライマーとし、First Strand cDNA Synthesis kit (Pharmacia) を用いて作製した。

このcDNAを鋳型とし、2組のプライマー (AROMA7 および AROM13 または AROMA14) を用いてPCRを行った。反応液の組成は、first strand cDNA 1  $\mu$ l、1  $\times$  ExTaq 緩衝液 (25 mM TAPS(pH9.3)/50 mM KCl/2 mM MgCl<sub>2</sub>/1 mM 2-mercaptoetanol)、0.2 mM dNTPs、0.2  $\mu$ M primers、ExTaq polymerase (Takara) 2.5 units で、反応液量は50  $\mu$ lとした (cool start 法)。反応条件は、95 $^{\circ}$ C 3分間の熱変成の後、94 $^{\circ}$ C 1分間60 $^{\circ}$ C 1分間72 $^{\circ}$ C 1分間を35サイクル、72 $^{\circ}$ C 7分間の伸長で行った。PCR産物は、2% agarose X (Nippongene) 電気泳動により確認した。

## 6. 塩基配列の決定

DNA断片は、適宜、適当な制限酵素で切断してサブクローンを作製するか、もしくは、Exonuclease III (Takara) と Mung Bean nuclease (Takara) を使用して欠失クローンを作製した後、シーケンシング反応を行った。鋳型とするプラスミドDNAは、boiling 法もしくは alkaline lysis 法で調製した後、RNAase (Sigma) 処理し、

ポリエチレングリコール沈澱により精製した。

シーケンシング反応は、Dyeprimer (Perkin Elmer) あるいは Dyeterminater (Perkin Elmer) を用い、酵素は Taq polymerase (Gibco BRL) あるいは ThermoSequenase (Amersham) を使用して、dideoxyterminater 法で行った (cycle sequencing 法)。

塩基配列の決定は、373A DNA Sequencer (Perkin Elmer) を用いて行った。

ウズラ・アロマトラーゼ遺伝子の第1エクソンの塩基配列を決定したところ、2つのウズラ・アロマトラーゼ遺伝子の第1エクソンの塩基配列と5'末端塩基配列が一致した。

ウズラ・アロマトラーゼ遺伝子の第1エクソンをサブクローニングしたところ、約9.6 kbのクローンから4つの塩性クローンを得ることができた。インサートDNAを制限酵素 *Bam*I で切断し、サブクローニングを行ったところ、3つのクローンに共通して存在する 4.3 kb の断片にウズラ・アロマトラーゼ遺伝子の第1エクソンが含まれることがわかった。この断片をサブクローニングし塩基配列を決定したところ、既知の第1エクソンの配列を確認することができた (Fig. 3)。さらに、複製する 1.1 kb の断片には第2エクソンの配列を確認することができた (Fig. 3)。

これらの断片は、全長 3224 bp および 1340 bp で、第1エクソンのアミノ酸コード配列 (2613-2796) および第2エクソンのアミノ酸コード配列 (3908-4091) が存在した (Fig. 3) とサブライニング (GT, 3997-3798 と 4157-4090) およびアタセプター部位 (AG, 3997-3998) が保存されていた (Fig. 3)。

## 2. ウズラ・アロマトラーゼ遺伝子の 5' 末端塩基配列のサブクローニング

ウズラ・アロマトラーゼ遺伝子の第1エクソンを含む cDNA 断片 (3.2 kb) をサブクローニングに、ウズラ・アロマトラーゼ遺伝子の第1エクソンをサブクローニングしたところ、約9.6 kbのクローンから4つの塩性クローンを得ることができた。インサートDNAを制限酵素 *Bam*I で切断し、サブクローニングを行ったところ、3つのクローンに共通して存在する 4.3 kb の断片にウズラ・アロマトラーゼ遺伝子の第1エクソンが含まれることがわかった。この断片をサブクローニングし塩基配列を決定したところ、ウズラ・アロマトラーゼ遺伝子の第1エクソンおよび第2エクソンの塩基配列を確認することができた (Fig. 4)。

この断片は、全長 4051 bp で、第1エクソンのアミノ酸コード配列 (2443-2796) および第2エクソンのアミノ酸コード配列 (3029-3839) が存在した。サブライニング (GT, 2985-2986 と 2989-3840) およびアタセプター部位 (AG, 3987-3988) が保存されていた (Fig. 4)。

### 第3節 結果

#### 1. ニワトリ・アロマターゼ遺伝子5'上流域のクローニング

PCRによるゲノミックDNAからのニワトリ・アロマターゼ遺伝子の増幅は、反応条件をいくつか検討したが、電気泳動で十分に明瞭なバンドは確認することができなかった。わずかながら増幅されたDNA断片をサブクローニングし、塩基配列を確認したところ、ニワトリ・アロマターゼ遺伝子の第1エクソンの一部と5'上流領域の配列が認められた。

PCRにより増幅したDNA断片(390 bp)をプローブに、ニワトリ・ゲノミックライブラリーをスクリーニングしたところ、約60万のクローンから4つの陽性クローンを得ることができた。インサートDNAを制限酵素 *Eco* RI で切断し、サザンブロッティングを行ったところ、4つのクローンに共通して存在する3.2 kbの断片にニワトリ・アロマターゼ遺伝子の第1エクソンが含まれることがわかった。この断片をサブクローニングし塩基配列を決定したところ、既知の第1エクソンの配列を確認することができた (Fig. 3)。さらに、隣接する1.3 kbの断片には第2エクソンの配列を確認することができた (Fig. 3)。

これらの断片は、全長3229 bp および1340 bpで、第1エクソンのアミノ酸コード配列(2615-2756) および第2エクソンのアミノ酸コード配列(3906-4056)が存在した (Fig. 3)。スプライシングドナー部位 (GT、2757-2758 と 4057-4058) およびアクセプター部位 (AG、3687-3688) は保存されていた (Fig. 3)。

#### 2. ウズラ・アロマターゼ遺伝子5'上流域のクローニング

ニワトリ・アロマターゼ遺伝子の第1エクソンを含むDNA断片(3.2 kb)をプローブに、ウズラ・ゲノミックライブラリーをスクリーニングしたところ、約96万のクローンから12個の陽性クローンを得ることができた。インサートDNAを制限酵素 *Eco* RI で切断し、サザンブロッティングを行ったところ、3つのクローンに共通して存在する4.3 kbの断片にウズラ・アロマターゼ遺伝子の第1エクソンが含まれることがわかった。この断片をサブクローニングし塩基配列を決定したところ、ニワトリ・アロマターゼ遺伝子の第1エクソンおよび第2エクソンの相同配列を確認することができた (Fig. 4)。

この断片は、全長4351 bpで、第1エクソンのアミノ酸コード配列(2443-2584) および第2エクソンのアミノ酸コード配列(3689-3839)が存在した。スプライシングドナー部位 (GT、2585-2586 と 3839-3840) およびアクセプター部位 (AG、3687-3688) は保存されていた (Fig. 4)。

### 3. ニワトリおよびウズラ・アロマトラーゼ遺伝子の比較

クローニングしたニワトリおよびウズラ・アロマトラーゼ遺伝子の部分塩基配列をホモロジープロット解析により比較した (Fig. 5A)。両者は全配列にわたり高い相同性を示したが、5' 上流域に 200 bp 前後のギャップが存在した。相同性は、アミノ酸非コード領域でも 85% 前後、アミノ酸コード領域では 95% 以上であった (Fig. 5B)。塩基配列から推定される部分アミノ酸配列は、94% (94 aa 中 91 aa) 同一であった。

### 4. ニワトリ・アロマトラーゼ遺伝子の転写開始点の決定

ニワトリ 6 日胚のポリ (A)<sup>+</sup>RNA をもとに 5' RACE を行ったところ、約 250 bp の特異的な増幅産物が確認できた。この DNA 断片をサブクローニングし、24 個のクローンについて塩基配列を確認したところ、12 個のクローンにアロマトラーゼ遺伝子の塩基配列が含まれていた。それらは全て、翻訳開始コドンのメチオニンから 199 bp 上流の G (2416) までを含んでいた (Fig. 3)。

ニワトリの卵巣および精巣のポリ (A)<sup>+</sup>RNA をもとに 5' RACE を行ったところ、約 200 bp の特異的な増幅産物が確認できた。これらの DNA 断片をサブクローニングし、卵巣由来および精巣由来の各 24 クローンについて塩基配列を確認したところ、卵巣由来の 23 クローンおよび精巣由来の 7 クローンにアロマトラーゼ遺伝子の塩基配列が含まれていた。それらはほとんど (30 クローン中 22 クローン) が、翻訳開始コドンのメチオニンから 144 bp 上流の G (2471) までを含んでいた (Fig. 3)。

RT-PCR により、ニワトリ 6 日胚および各器官 (副腎、卵巣、精巣) で発現するアロマトラーゼ mRNA の 5' 非翻訳領域 (5' UTR) の増幅を行った (Fig. 6)。AROMA7 および AROMA13 を用いた増幅では、副腎および卵巣で特異的な増幅産物が確認できた。精巣では、痕跡量の増幅産物しか確認できず、6 日胚では、特異的な増幅産物は確認できなかった。AROMA7 および AROMA14 を用いた増幅では、6 日胚でも他の器官でも痕跡量の増幅産物しか確認できなかった。

## 第4節 論議

### 1. ニワトリおよびウズラのアロマターゼ遺伝子

今回クローニングしたニワトリ・アロマターゼ遺伝子と、すでに報告されている塩基配列 (Matsumine *et al.*, 1991) の間には、いくつかの塩基置換や欠失、挿入といった違いが認められる (Fig. 7)。彼らは、レグホン種のほかに、シーブライト種 (Sebright) およびカンピン種 (Campine) から同遺伝子をクローニングし、それらの配列間に相違が認められることを示した。今回クローニングしたアロマターゼ遺伝子は、白色レグホン種由来のものである。これと彼らが報告したレグホン種の塩基配列との間にはいくつかの相違が認められたが、その中のいくつかは、他品種の塩基配列と、また、いくつかはウズラ・アロマターゼ遺伝子の塩基配列と一致していた (Fig. 7)。このことから、これらの違いは、品種の違いによる相違と言うよりはむしろ、個体差 (多型) を反映しているものと思われる。PCRによりゲノミックDNAからニワトリ・アロマターゼ遺伝子を増幅した際に、期待したより増幅の効率が悪かったが、これは、使用したプライマーの塩基配列の中に、同様な塩基配列の相違が存在したためと判明した (Fig. 3)。(センスプライマー AROMA2: ATGCTGGAGATGAAGGTCTG→ゲノミック配列 ATGCTGGAGATGAAAGGTCTG)

ニワトリ・アロマターゼ遺伝子は、第1エクソンと第2エクソンの間に *Eco* RI 切断部位が1カ所が存在する (Fig. 3) が、ウズラの同遺伝子にもほぼ同様の位置 (3045-3050) に GGATTC という配列が存在した (Fig. 4)。これが種の違いを反映しているものか、単なる個体差 (多型) なのかは不明である。

ニワトリのアロマターゼ遺伝子の5'上流域には、ウズラの同遺伝子と比較すると、約200 bpの塩基配列の挿入が認められる (Fig. 5)。ニワトリには *henny-feathering* と呼ばれる表現型 (雄が雌型の羽を持つ) を示す品種 (シーブライト種、カンピン種) が存在する。シーブライト種では、皮膚でのアロマターゼ遺伝子の発現が誘導され、エストロゲンの亢進が起こっているが、これはアロマターゼ遺伝子の5'上流域に挿入された鳥類レトロウイルスのLTRの作用によると推定されている (Matsumine *et al.*, 1991)。そこで、この200 bpの挿入配列がなんらかの転移因子である可能性を調べるため、データベースにより相同配列の検索を行った。しかしながら、この挿入配列と有意な相同性を持つ配列は認められなかった。

### 2. ニワトリ・アロマターゼ遺伝子の転写開始部位

今回決定したニワトリ6日胚におけるアロマターゼ遺伝子の転写開始点 (翻訳開始コドンのメチオニンから199 bp上流のG) は、以前報告された (Matsumine *et al.*, 1991) 成体の卵巣における転写開始点 (翻訳開始コドンのメチオニンから147 bp上流のT) よりさらに52 bp上流であった (Fig. 7)。実際にここから転写が始まってい

るとすると、基本転写エレメントであるTATAボックスは、mRNAの5' UTRに含まれることになり、より上流には、TATAボックスに類似の配列は認められない。TATAボックスが存在しないプロモーターでは、GCボックスや、転写開始部位のイニシエーター配列(PyPyCAPyPyPyPyPy)が認められることがあるが、そのような配列は認められなかった。さらに、卵巣および精巣における転写開始点を調べたところ、既知の転写開始点(翻訳開始コドンのメチオニンから147 bp上流のT)より3 bp下流のGが主要な部位と推定された(Fig. 7)。

アロマターゼのmRNAの5' UTRをRT-PCRで確認したところ、卵巣や精巣で認められたTATAボックスより下流の転写開始点はよく機能しているものの、6日胚で認められたより上流の転写開始点は成体ではあまり機能していないことがわかった(Fig. 6)。ニワトリ6日胚ではアロマターゼ遺伝子の発現が認められるのは、雌の卵巣のみであり、副腎および雄の精巣での発現は認められていない(Andrews *et al.*, 1997, Smith *et al.*, 1997, Nakabayashi *et al.*, 1998)。このことから、より上流に認められた転写開始点は、生殖腺以外の器官での転写によるものと言うよりはむしろ、発生の一時期に卵巣で認められるマイナーな転写産物を反映したものと考えられる。

### 3. 鳥類のアロマターゼ遺伝子の転写調節領域

ニワトリ・アロマターゼ遺伝子の転写開始点から25 bp上流(-25)には、典型的なTATAボックスが認められる(Fig. 7)。この配列は、ウズラのアロマターゼ遺伝子でも完全に保存されており、基本転写エレメントとして機能していると考えられる(Fig. 7)。

さらに、転写開始点の127 bp上流(-127)には、ステロイドホルモン合成酵素遺伝子の転写調節領域に共通して認められるAd4配列(CAAGGTCA)が認められる(Fig. 7)。この配列は始め、哺乳類において、複数のステロイドホルモン合成酵素遺伝子の転写調節領域に共通して認められる配列として同定された(Rice *et al.*, 1991)。近年、この配列を認識して転写を制御する因子として、SF-1 (Steroidogenic factor-1) / Ad4BP (Ad4 binding protein) が同定され(Lala *et al.*, 1992, Morohashi *et al.*, 1992)、そのcDNAがクローニングされた(Honda *et al.*, 1993)。哺乳類(ラット、ヒト)のアロマターゼ遺伝子においては、卵巣型プロモーターの転写調節領域にこのAd4配列が保存されており、その発現に非常に重要な役割を果たしている(Lynch *et al.*, 1993, Michael *et al.*, 1995)。哺乳類の卵巣におけるアロマターゼ遺伝子の発現は、FSH刺激によって誘導されることが知られている(Hickey *et al.*, 1988, Fitzpatrick *et al.*, 1991)。このシグナルはcAMP-PKA系を介して細胞内に伝達されるが、Ad4配列はこの発現誘導にも関与していると考えられている(Michael *et al.*,



1995)。

cAMP-PKA系のシグナルをつたえる転写調節領域として、さまざまな配列が知られているが、CRE (cAMP responsible element) もその一つである。哺乳類 (ヒト、ラット、マウス) のアロマターゼ遺伝子の転写調節領域には、典型的なCRE配列 (TGACGTCA) は認められないが、いくつかの類似配列の存在が確認されている。Ad4配列のさらに上流には、CLS (CRE like sequence, TGCACGTCA) と呼ばれる配列が存在する。ラットとヒトにおいては、この配列に結合するCREB (CRE binding protein) が、Ad4配列に結合するSF-1/Ad4BPと相乗的に働いて、アロマターゼ遺伝子の転写を活性化することが示されている (Fitzpatrick and Richards, 1994, Carlone and Richards, 1997, Michael *et al.*, 1997)。しかしながら、この配列の転写誘導能は、特定のステロイド産生細胞でしか確認できないとも指摘されている (Young and McPhaul, 1998)。ニワトリおよびウズラのアロマターゼ遺伝子には、このCLS配列と高い類似性を示す配列は認められなかった。

また、哺乳類 (ヒト、ラット、マウス) においては、CLS配列の上流にもう一つのCRE類似配列 (TGAAATCA) が存在する。この配列はCLS配列とは異なり、多くのステロイド産生細胞において、アロマターゼ遺伝子の転写活性化に関与していることが示されている (Young and McPhaul, 1998)。ニワトリおよびウズラのアロマターゼ遺伝子には、転写開始点から 287 bp 上流 (-287) にこの配列と高い類似性を示す配列 (TGA~~A~~CTCA) が認められた (Fig. 7)。

FSH刺激によるエストロゲン合成の増加は、ニワトリの卵巣においても認められているが、この作用はカルシウム依存性であり、cAMP-PKA系のシグナルを介していないとも考えられている (Onagbesan and Peddie, 1989)。また、エストロゲン合成の誘導は、アロマターゼ活性の上昇よりはむしろ、他のステロイド合成酵素活性の上昇により、基質となるアンドロゲンが増加することによっておこるとする考えもある。さらに、FSHあるいはcAMP刺激により、ニワトリ・アロマターゼ遺伝子の発現が誘導されるという報告も現在のところない。したがって、鳥類のアロマターゼ遺伝子のプロモーター領域に存在するCRE類似配列とAd4配列が、哺乳類と同様に、FSH-cAMP-PKA系のシグナルのターゲットとなっているかどうかは疑問が残る。

ラットのアロマターゼ遺伝子の転写調節領域には、SRYe と呼ばれる配列がある。これは、哺乳類の性決定遺伝子であるSRY (sex determining region Y) のコードするタンパク質を組み換えタンパク質として調製し、その結合配列を検索することにより同定された配列である (Haqq *et al.*, 1993)。ラットのアロマターゼ遺伝子で同定されたSRYe配列に相当する領域は、ニワトリおよびウズラのアロマターゼ遺伝子にも認められ、転写開始点から 224 bp 上流 (-224) の約 20 bp の領域である

(Fig. 7)。しかしながら、SRYが結合するとされている配列は、一般的な転写因子などの認識配列と較べるとかなり特異性が低く、類似の配列はゲノム中に高い頻度で認められる。また、実際にSRYタンパク質が他の転写制御因子と同様に機能するかという点でも疑問が残されている。さらに、鳥類では哺乳類のSRYに相当するような遺伝子の存在は確認されていないことから、この配列が実際にニワトリのアロマターゼ遺伝子の転写において、何らかの役割を果たしているかは不明である。

鳥類（ニワトリ、ウズラ）のアロマターゼ遺伝子においても、哺乳類のアロマターゼ遺伝子で認められるいくつかの転写制御配列が認められた。しかしながら、それらに作用すると考えられる転写因子の存否については未同定であり、アロマターゼ遺伝子の転写制御を解析するには、それらの転写因子の同定が不可欠である。

## 第5節 要約

アロマターゼ (EC 1.14.14.1.) は、雌性ホルモンであるエストロゲン生合成の鍵酵素である。鳥類においては、エストロゲンは、肝臓に作用し、卵黄タンパク質前駆体ビテロゲニンの合成を促し、卵黄の蓄積に寄与するほか、輸卵管に作用して、卵白タンパク質 (オボアルブミン、コンアルブミンなど) の合成、分泌を促進する。また、鳥類の初期発生においては、エストロゲンは卵巣の分化・形成に不可欠であり、その生合成の鍵酵素であるアロマターゼ遺伝子の発現は、鳥類の性決定に極めて重要な役割を果たすと考えられる。そこで、本研究では鳥類のアロマターゼ遺伝子の発現制御に関する解析の端緒として、ニワトリおよびウズラのアロマターゼ遺伝子のクローニングを行い、その転写調節領域に関する構造的解析を行った。

ニワトリおよびウズラのアロマターゼ遺伝子の第1および第2エクソンを含む領域の塩基配列は、アミノ酸コード領域で高い相同性 (95%以上) を示したのみならず、アミノ酸非コード領域 (5' 上流域および第1イントロン) でも高い保存性を示した (85%前後)。

哺乳類においては、アロマターゼ遺伝子の組織特異的発現は、複数のプロモーターおよび第1エクソンを使い分けることにより調節されていることが知られているため、ニワトリの初期胚 (6日胚) および成体のステロイド産生器官 (副腎、卵巣、精巣) における転写開始点の決定を行った。

5' RACEによる解析では、成体のステロイド産生器官での転写開始点は、TATAボックスの25 bp下流に同定されたが、初期胚での転写開始点は、TATAボックスの25 bp上流に同定された。さらに、RT-PCRによる5' UTRの確認を行ったところ、TATAボックスの上流に同定された転写開始点は、あまり機能していないことが示唆された。

ニワトリおよびウズラのアロマターゼ遺伝子のプロモーター領域について、既知の哺乳類の塩基配列 (ヒト、ラット、マウス) と比較することにより、転写調節配列の検索を試みたところ、いくつかの配列を同定することができた。転写開始点の127 bp上流には、ステロイドホルモン合成酵素遺伝子の転写調節領域に共通して認められるAd4配列 (CAAGGTCA) が存在した。224 bp上流には、哺乳類の性決定遺伝子であるSR Yの認識配列とされるSR Yeが認められた。また、cAMP-PKA系のシグナルを伝えるCRE類似配列 (TGAAATCA) と高い相同性を持つ配列が、転写開始点から287 bp上流に認められた。これらの配列が、鳥類のアロマターゼ遺伝子の発現においても何らかの役割を果たすことは推測されるが、それが哺乳類における役割と同様のものであるかどうかはさらなる解析が必要である。

### 第3章 ニワトリFTZ-F1関連cDNAのクローニングと発現

#### 第1節 序論

##### 1. 脂溶性リガンドと核内レセプター

コレステロールから生合成されるステロイドホルモン、アミノ酸の1つであるチロシンから生合成される甲状腺ホルモン (thyroid hormone)、微量栄養素として同定された脂溶性ビタミン類などは、低分子の脂溶性リガンドとして知られ、生体内でさまざまな生理機能を有している。これらの脂溶性リガンドは、水溶性リガンド (ペプチドホルモン、サイトカイン、成長因子など) が、主として細胞膜上に存在する特異的なレセプターを介してそのシグナルを細胞内に伝えるのに対して、リガンド自体が細胞内に入り込み、核内レセプターと呼ばれる転写因子と直接結合することによりそのシグナルを伝達する。核内レセプターは早くからその存在が想定されていたが、1985年から1987年にかけて、グルココルチコイドレセプター (Hollenberg *et al.*, 1985)、エストロゲンレセプター (Green *et al.*, 1986)、甲状腺ホルモンレセプター (Sap *et al.*, 1986, Weinberger *et al.*, 1986)、レチノイン酸レセプター (Petkovich *et al.*, 1987, Giguère *et al.*, 1987) のcDNAが相次いでクローニングされ、これらが核内レセプタースーパーファミリーを形成していることが確認された。現在、核内レセプタースーパーファミリーは、脊椎動物でゲノムあたり約50種の遺伝子が同定されているが、それらはアミノ酸配列の相同性と対応するリガンドの分子種により、さらにいくつかのサブファミリーに分類されている (Mangelsdorf *et al.*, 1995)。

##### 2. 核内レセプターの構造と機能

核内レセプターは、その構造と機能的な側面から、いくつかの領域 (A~F) に分けられる (Fig. 8, Laudet *et al.*, 1992)。分子の中央部 (region C) には特異的な塩基配列を認識し結合するためのDNA結合ドメイン (DBD) があり、これは66アミノ酸のコア配列からなっている (Evans, 1988, Green and Chambon, 1988)。一般に、核内レセプターに対する応答配列は、6塩基対からなるハーフサイトが1~5塩基対のスペーサーをおいて逆方向または同方向に並んだ反復配列として認められる。DBDは、保存された2つのC4型Znフィンガー構造を有しているが、ハーフサイト塩基配列に対する特異性は、第1Znフィンガー後端の5アミノ酸 (Pボックス) により (Umezono and Evans, 1989)、スペーサーサイズは、第2Znフィンガー前端的5アミノ酸 (Dボックス) により (Glass, 1994) 制御されている。多くの核内レセプターは、ホモもしくはヘテロダイマーを形成して機能するが、このDボックスがタンパク質間の相互作用 (ダイマー形成) に重要な役割を果たしていることが立体構造の上からも証明されている (Freedman, 1992)。分子のカルボキシル側 (region

E)には特異的なリガンドと結合するためのリガンド結合ドメイン(LBD)があり、約250アミノ酸からなっている。LBDは、DBDで認められるほど際立った1次配列上の類似性を有していないが、これはむしろ、異なったりガンドを認識するために分子種ごとの多様性が増しているためと考えられる。しかしながら、2次構造上の類似性は高く、 $\alpha$ ヘリックス(H1~H12)に富んだ構造を有している(Wurtz *et al.*, 1996)。中でも、カルボキシル末端に存在するH12はAF2-ADとも呼ばれ、転写制御に不可欠な領域とされている。H12は他の共役因子と直接相互作用する領域で、リガンドの結合の有無によりその配向性が変わり、転写活性を制御していると考えられている。

### 3. オーフアン核内レセプター

核内レセプターファミリーの中には、特異的なリガンドが同定されていないものも多く存在するが、これらは総称してオーファンレセプターと呼ばれている。初期の核内レセプターが、特定のリガンドに対する結合性をもとにクローニングされてきたのに対して、多くのオーファンレセプターは、核内レセプターの構造上の類似性を利用してクローニングされたり、あるいは他の機能(特定の塩基配列に対する結合性や刺激応答性など)に基づいてクローニングされた後に、その構造上の類似性から核内レセプターに分類されたものである。RXRファミリー(Mangelsdorf *et al.*, 1990)、PPARファミリー(Issemann and Green, 1990)、LXR(Willy *et al.*, 1995)、FXR(Forman *et al.*, 1995)などはクローニングされた時点ではリガンド未同定であったが、その後の解析により、9-シスレチノイン酸、プロスタグランジン(アラキドン酸経路代謝産物)、オキシステロール(コレステロール代謝中間体)、胆汁酸(コレステロール代謝産物)などがリガンドとして同定された。COUPファミリー(Qiu *et al.*, 1996)、NURファミリー(Murayama *et al.*, 1998)はリガンドの存在なしに、構成的に転写を抑制したり、活性化したりするとされているが、特定のリガンドの存在も否定できない。オーファンレセプターのリガンドとされる物質は、概して細胞内での代謝産物や中間体であることが多く、その意味では細胞外からの特定のシグナルを伝えるためのリガンドというよりも、細胞内の状態を反映するコファクターと考えることもできる。

オーファンレセプターの中には、他の核内レセプターとは異なり、ダイマー形成を行わず、モノマーで機能していると考えられているものもある(Laudet and Adelmant, 1995)。これらモノマー型核内レセプターの応答配列は、6塩基対からなるハーフサイトとさらに5'側の2または3塩基対の認識配列からなっている。この付加された2または3塩基対の認識には、DBDの直後に存在する12アミノ酸のTボックスおよび7アミノ酸のAボックスが重要な役割を果たしていると考えられている

(Fig. 8, Wilson *et al.*, 1993)。

#### 4. FTZ-F1ファミリー

ショウジョウバエのFTZ-F1 (*fushi tarazu-factor 1*) は、体節形成遺伝子の一つである *fushi tarazu* 遺伝子の転写を活性化する転写制御因子として同定され (Ueda *et al.*, 1990)、そのcDNAがクローニングされた (Lavoragna *et al.*, 1991)。その構造上の類似性から、核内レセプタースーパーファミリーに属すとされ、リガンドが未同定のためオーファンレセプターに分類されている。認識配列は、CAAGGTCAの8塩基対のハーフサイトのみで、モノマー型核内レセプターである。ショウジョウバエのFTZ-F1には、early型とlate型の2つのアイソフォームが存在するが、前者は *fushi tarazu* 遺伝子が発現する胞胚期に極細胞を除く胚全体で発現し、後者は胚後期、幼虫期の脱皮直前、および前蛹期中期に発現が認められる。FTZ-F1のcDNAに類似したcDNAとして、FTZ-F1 $\beta$  (これに対し、先にクローニングされたものをFTZ-F1 $\alpha$ と呼ぶ) がクローニングされているが、これは胞胚期には胚全体で発現し、胚後期には中枢神経系と後腸で特異的に発現している (Ohno and Petkovich, 1992)。近年、FTZ-F1のホモログが哺乳類をはじめとする多くの種に存在することがわかり、FTZ-F1ファミリーを形成していることが判明した (Escriva *et al.*, 1997)。

ELP (embryonal long terminal repeat-binding protein) は初め、マウスの胚性カルシノーマ (EC) 細胞に存在する、モロニー白血病ウイルスの増殖を抑制する因子として同定され (Tsukiyama *et al.*, 1989)、そのcDNAがクローニングされた (Tsukiyama *et al.*, 1992)。このELPは、その構造上の類似性と応答配列の一致から、哺乳類のFTZ-F1ホモログであると考えられた。ほぼ同時期に、複数のステロイドホルモン合成酵素の転写を活性化する因子としてSF-1 (Steroidogenic factor-1) / Ad4BP (Ad4 binding protein) が同定され (Lala *et al.*, 1992, Morohashi *et al.*, 1992)、そのcDNAがクローニングされた (Honda *et al.*, 1993) が、マウスSF-1がELPと同一の遺伝子によってコードされるアイソフォームであることが判明した (Ikeda *et al.*, 1993)。さらに、マウスの肝臓で発現する新規の核内レセプターとしてクローニングされたLRH-1 (liver receptor homolog-1) およびそのラットのホモログであるFTF (fetoprotein transcription factor) もまた、ショウジョウバエのFTZ-F1と高い類似性を示しており (Galarneau *et al.*, 1996)、SF-1 / Ad4BPのパラログであると考えられる。哺乳類以外でも、両生類 (アフリカツメガエル) および魚類 (ゼブラフィッシュ) でFTZ-F1ホモログがクローニングされたが (Ellinger-Ziegelbauer *et al.*, 1994, Liu *et al.*, 1997)、そのアミノ酸配列からいずれもFTF / LRH-1のオルソログと考えられる。

## 5. SF-1/Ad4BPの機能

哺乳類のステロイドホルモンは、コレステロールをもとに複数のステロイドホルモン合成酵素により生合成されるが、それらの遺伝子の転写を制御する因子として同定されたのがSF-1/Ad4BPである。SF-1は、マウスの副腎で発現する3つの酵素(P450<sub>scc</sub>、P450<sub>c21</sub>、P450<sub>11β</sub>)の転写調節領域に存在する配列AGGTCA (Rice *et al.*, 1991)を認識して結合する蛋白として同定され、そのcDNAがクローニングされた(Lala *et al.*, 1992, Lynch *et al.*, 1993)。一方、Ad4BPは、ウシの副腎で発現する酵素(P450<sub>11β</sub>)の転写調節に不可欠な配列の一つAd4(YCAAGGY)に結合する蛋白として同定され(Morohashi *et al.*, 1992)、そのcDNAがクローニングされた(Honda *et al.*, 1993)。その後、SF-1/Ad4BPの標的遺伝子はステロイドホルモン合成酵素だけではなく、オキシトシン(Wehrenberg *et al.*, 1994)、MIS(Shen *et al.*, 1994)、性腺刺激ホルモン(Halvorson *et al.*, 1996)、ACTHレセプター(Cammas *et al.*, 1997)、プロラクチンレセプター(Hu *et al.*, 1997)、StAR(Sugawara *et al.*, 1996)など数多く存在することがわかった。

哺乳類におけるSF-1/Ad4BPの発現は、副腎皮質、精巣のセルトリ細胞とライディヒ細胞、卵巣の卵胞膜細胞、顆粒膜細胞、黄体細胞といったステロイド産生細胞に認められた(Ikeda *et al.*, 1993, Hatano *et al.*, 1994)。また、ステロイド産生細胞以外にも、脳下垂体の性腺刺激(ホルモン産生)細胞(gonadotroph)と視床下部腹内側核にもその発現が認められた(Ingraham *et al.*, 1994, Shinoda *et al.*, 1995, Ikeda *et al.*, 1995)。これらの発現部位は、標的遺伝子の発現分布ともよく一致しており、SF-1/Ad4BPが、視床下部-脳下垂体-性腺系および視床下部-脳下垂体-副腎系の正常な機能維持に極めて重要な役割を果たしていることが示唆される。

初期発生における生殖腺でのSF-1/Ad4BP遺伝子の発現には、性的二型性が認められている(Hatano *et al.*, 1994)。性分化が認められる前の未分化生殖腺では、SF-1/Ad4BPの発現に雌雄差は認められないが、性分化に伴い、雄で発現が高く雌で低いという差が表れ、これが出生後の卵胞形成開始期まで維持される。この二型性の顕現は、哺乳類の性決定遺伝子であるSRYの発現時期にほぼ一致しており、SF-1/Ad4BPは、哺乳類の性分化においても非常に重要な役割を果たしていると考えられる。

## 6. 鳥類のFTZ-F1ホモログ

鳥類のFTZ-F1ホモログ、特にSF-1/Ad4BPのオルソログは、鳥類の性分化にも重要な役割を果たしていることが予想される。しかしながら、FTZ-F1ホモログは、両生類および魚類でFTF/LRH-1のオルソログがクロー





## 第2節 材料と方法

### 1. RT-PCR

#### 1.1 RNAの調製

全RNAは、孵卵後6日目のニワトリ全胚から、ISOGEN (Nippongene) を用いて調製した (Acid phenol 法)。ポリ (A)<sup>+</sup>RNAは、全RNAから Oligotex-dT30 Super (Roche) を用いて調製した。

#### 1.2 プライマーDNA

縮退プライマーDNAは既知のウシAd4BP (Ad4 binding protein) の塩基配列 (Morohashi *et al.*, 1992) をもとにして作製した。

センスプライマー

SFFN-1: TGYCCNGTNTGYGGNGAYAA

アンチセンスプライマー

SFFN-2: CATNCCNACNGTSAGRCAYT

#### 1.3 RT-PCR

cDNAは、全RNAもしくはポリ (A)<sup>+</sup>RNAをもとに、ランダムプライマーをプライマーとし、First Strand cDNA Synthesis kit (Pharmacia) を用いて作製した。

このcDNAを鋳型とし、1組のプライマー (SFFN-1 および SFFN-2) を用いてPCRを行った。反応液の組成は、first strand cDNA 1  $\mu$ l、1  $\times$  Taq 緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH8.4)/50 mM KCl/1.5 mM MgCl<sub>2</sub>)、0.2 mM dNTPs、4  $\mu$ M primers、Taq polymerase (Gibco BRL) 2.5 units で、反応液量は 50  $\mu$ l とした。反応条件は、95  $^{\circ}$ C 3分間の熱変成の後、94  $^{\circ}$ C 1分間 60  $^{\circ}$ C 1分間 72  $^{\circ}$ C 1分間を 35 サイクル、72  $^{\circ}$ C 7分間の伸長で行った。

#### 1.4 サブクローニング

PCR産物は 3% Nusieve 3:1 agarose (FMC) 電気泳動によりサイズ分画し、予想されるサイズ (198 bp) のDNA断片を回収した。DNA断片はプラスミドベクター pGEM-T (Promega) に導入し、塩基配列の確認を行った。

## 2. 5' RACEと3' RACE

### 2.1 RNAの調製

全RNAおよびポリ (A)<sup>+</sup>RNAは、1.1と同様にして調製した。

## 2. 2 プライマーDNA

3' RACEには、以下の5つのプライマーを使用した。

特異的センスプライマー1

OR2-1: GACCGTCCAGAACAACAAGAGGTACAC

OR21-1: ACTAACCCCTGCACCGAGAGCCAGAACT

特異的センスプライマー2

OR2-2: GCCAGATTGACAAAACGCAGAGGAAGC

OR21-2: CAGAAGTCAAGATCGACAAGACCCAG

NN<sub>1</sub>-oligo(dT) CDS プライマー

CCTCTGAAGGTTCCAGAATCGATAGGAATTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN

アンカープライマー

CTGGTTCGGCCCACCTCTGAAGGTTCCAGAATCGATAG

5' RACEには、以下の8つのプライマーを使用した。

特異的アンチセンスプライマー1

OR2-3: CATTTCGGTCAGCTCGCACAGCTTCTAG

OR21-3: ACATGGGCCCAAACCTTATTCCTCCC

特異的アンチセンスプライマー2

OR2-4: CTGCGTTTTGTCAATCTGGCA

OR21-4: CTGGGTCTTGTCGATCTTGCA

特異的アンチセンスプライマー3

OR2-5: GGTTTTCTATACACGTGTACC

OR21-5: GTTCTGGCTCTCGGTGCAGGT

dT17アダプタープライマー

GAGTCGACTCGAGAATTCTTTTTTTTTTTTTTTTTT

アダプタープライマー

GAGTCGACTCGAGAATTC

## 2. 3 3' RACE

3' RACEは、3'-AmpliFINDER RACE KIT (Clontech) を用いて行った。一本鎖cDNAは、ポリ(A)<sup>+</sup>RNAをもとに、NN<sub>1</sub>-oligo(dT) CDS プライマーをプライマーとし作製した。

このcDNAを鋳型とし、特異的センスプライマー1およびアンカープライマーを用いて1次PCRを行った。反応液の組成は、first strand cDNA 1  $\mu$ l、1  $\times$  ExTaq 緩衝液 (25 mM TAPS(pH9.3)/50 mM KCl/2 mM MgCl<sub>2</sub>/1 mM 2-mercaptoetanol)、0.2 mM dNTPs、0.2  $\mu$ M primers、ExTaq polymerase (Takara) 2.5 units で、反応液量は 50  $\mu$ l と

した。反応条件は、95℃3分間の熱変成の後、94℃15秒間66℃4分間を30サイクル(OR2.0)もしくは94℃15秒間64℃6分間を30サイクル(OR2.1)、72℃7分間の伸長で行った。さらに、この1次PCR産物(1次PCRの反応液0.1 μl)を鋳型とし、特異的センスプライマー2およびアンカープライマーを用いて2次PCRを行った。反応条件は、1次PCRと同様に行った。

2次PCR産物は、SUPREC-02(Takara)で精製した後、プラスミドベクター pGEM-T (Promega) に導入し、塩基配列の確認を行った。

## 2. 4 5' RACE

一本鎖cDNAは、ポリ(A)<sup>+</sup>RNAをもとに、特異的アンチセンスプライマー1をプライマーとし、SUPERScript II reverse transcriptase (Gibco BRL) を用いて作製した。さらに、この一本鎖cDNAに、terminal deoxynucleotidyl transferase (Takara) を用いてポリ(A)テイルを付加した後、SUPREC-02 (Takara) で精製した。

このcDNAを鋳型とし、特異的アンチセンスプライマー2およびdT17アダプタープライマーを用いて1次PCRを行った。反応液の組成は、poly(A) tailed first strand cDNA 1 μl、1×ExTaq 緩衝液(25 mM TAPS(pH9.3)/50 mM KCl/2 mM MgCl<sub>2</sub>/1 mM 2-mercaptoethanol)、0.2 mM dNTPs、0.2 μM primers、ExTaq polymerase (Takara) 2.5 units で、反応液量は50 μlとした。反応条件は、95℃3分間の熱変成の後、94℃1分間60℃1分間72℃1分間を35サイクル、72℃7分間の伸長で行った。さらに、この1次PCR産物(1次PCRの反応液0.1 μl)を鋳型とし、特異的アンチセンスプライマー3およびアダプタープライマーを用いて2次PCRを行った。反応条件は、1次PCRと同様に行った。

2次PCR産物は、SUPREC-02(Takara)で精製した後、プラスミドベクター pGEM-T (Promega) に導入し、塩基配列の確認を行った。

## 3. 塩基配列の決定

DNA断片は、適宜、適当な制限酵素で切断してサブクローンを作製するか、もしくは、Exonuclease III (Takara) と Mung Bean nuclease (Takara) を使用して欠失クローンを作製した後、シーケンシング反応を行った。鋳型とするプラスミドDNAは、boiling 法もしくはalkaline lysis 法で調製した後、RNAase (Sigma) 処理し、ポリエチレングリコール沈澱により精製した。

シーケンシング反応は、Dyeprimer (Perkin Elmer) あるいはDyeterminater (Perkin Elmer) を用い、酵素はTaq polymerase (Gibco BRL) あるいはThermoSequenase (Amersham) を使用して、dideoxyterminater 法で行った(cycle sequencing 法)。

塩基配列の決定は、373A DNA Sequencer (Perkin Elmer) を用いて行った。

## 4. ノーザンハイブリダイゼーション

### 4. 1 RNAの調製

全RNAは、成鶏（白色レグホン種）の種々の器官（副腎、卵巣、精巣、肝臓、脾臓、心臓、腎臓）から、ISOGEN（Nippongene）を用いて調製した（Acid phenol法）。

### 4. 2 プローブDNAの調製と標識

OR2.0およびOR2.1については、3' RACEで増幅しpGEM-T（Promega）にクローニングした断片から、1.4 kbの *Pst* I断片（OR2.0）および1.6 kbの *Nco* I断片（OR2.1）を切り出し、プローブとして使用した。ニワトリのアロマターゼおよび $\beta$ アクチンのcDNAについては、既知の塩基配列（McPaul *et al.*, 1988, Kost *et al.*, 1983）をもとにRT-PCRにより増幅しp123T（MoBiTec）にクローニングしたのから、1.5 kb（アロマターゼ）および1.3 kb（ $\beta$ アクチン）の *Bam* HI/*Eco* RI断片を切り出し、プローブとして使用した。各DNA断片は、Megaprime DNA labeling systems（Amersham）を用いて $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ で標識した（random primer法）。

### 4. 3 ノーザンハイブリダイゼーション

全RNA（20  $\mu\text{g}$ ）は、2.2 M formaldehyde/1.2% agarose（Takara）電気泳動を行った後、Hybond N<sup>+</sup> nylon membrane（Amersham）に転写し（alkaline transfer法）、ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション液（50% formamide/5x SSPE/5x Denhardt's solution/0.5% SDS/20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  salmon sperm DNA）で45℃3時間プレハイブリダイゼーションを行った後、同液に標識したDNA断片を加え、45℃で一晩（16時間）行った。メンブレンは、洗浄液（2x SSPE/0.1% SDS）で室温10分間2回、洗浄液（1x SSPE/0.1% SDS）で60℃10分間洗浄した後、オートラジオグラフィーを行った。オートラジオグラフィーには、BioMax-MS film（Eastman Kodak）と増感スクリーンを使用した。

## 5. *in situ* ハイブリダイゼーション

### 5. 1 凍結切片の調製

ニワトリ胚は、37℃で6あるいは7日間孵卵した後、胚のみを取り出し、PBSで洗浄して、直ちに液体窒素で凍結した。凍結胚は、固定液（4% paraformaldehyde/PBS）中で融解し、そのまま4℃で一晩（16時間）固定した。さらに、30% sucrose/PBSに移し、4℃で一晩（16時間）置換を行った。置換した胚は、包埋材（O. C. T. compound）とともに、ドライアイスで凍結包埋した。クリオスタットを使用して、10  $\mu\text{m}$ の切片を作製し、ポリLリジンでコートしたスライドガラスに貼り付け、直ちに乾燥させた。

## 5. 2 プローブRNAの調製

OR2.0 については 1.4 kb の *Pst*I 断片を、OR2.1 については 1.6 kb の *Nco*I 断片を、pGEM3Zf(+) (Promega) あるいは pGEM5Zf(+) (Promega) にサブクローニングし、RNA プローブ作製用の鋳型とした。プローブの作製には DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Boehringer Mannheim) を使用した。RNA プローブは、アルカリ処理 (40 mM NaHCO<sub>3</sub>/60 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/10 mM EDTA) による断片化の後、ハイブリダイゼーションに用いた。

## 5. 3 ハイブリダイゼーションと抗体による検出

スライドガラスは、プロテアーゼ液 (10 µg/ml proteinase K/PBS/0.3 % Triton X-100) で、室温 5 分間処理した後、固定液 (4% paraformaldehyde/PBS/0.3 % Triton X-100) で、室温 15 分間再固定した。さらに、PBS で洗浄した後、アルコール系列で脱水乾燥させた。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション液 (50% formamide/20 mM Tris-HCl(pH8.0)/5 mM EDTA/1x Denhardt's solution/1x SSPE/0.2% Sarcocyl/200 µg/ml salmon sperm DNA/500 µg/ml tRNA/10% dextran sulfate) にプローブ RNA を加えて切片上にのせ、45 °C で一晩 (20 時間) 行った。スライドガラスは、洗浄液 (2x SSC/50% formamide) で 45 °C 1 時間洗浄した後、RNase 液 (1 µg/ml RNase A/0.5 M NaCl/10 mM Tris-HCl(pH8.0)) で、37 °C 30 分間消化した。さらに、洗浄液 (2x SSC/50% formamide) で 45 °C 1 時間 2 回、洗浄液 (1x SSC/50% formamide) で室温 1 時間洗浄した後、TBS で室温 15 分 3 回置換した。抗体反応は、ブロッキング液 (0.5% blocking reagent/TBS) で室温 30 分間ブロッキングした後、抗体液 (1.5 units/ml anti-DIG antibody/TBS) で室温一晩行った。TBS で室温 15 分 3 回洗浄した後、酵素基質液 (100 mM Tris-HCl(pH9.5)/100 mM NaCl/50 mM MgCl<sub>2</sub>/337.5 µg/ml NBT/175 µg/ml BCIP) で室温 3 日間発色させた。

## 6. PCRによる雌雄判別

### 6. 1 凍結切片からのDNAの調製

ゲノミックDNAは、スライドガラス上の切片から、DEXPAT (Takara) を用いて調製した。

### 6. 2 プローブDNA

プライマーDNAは既知のニワトリW染色体特異的塩基配列 (Kodama *et al.*, 1987) をもとにして作製した。

Xho-1: TTCTGCACTTCCTTCCCGAA

Xho-2: GGGTGAAATGGGGTTGTTTC

### 6.3 PCR

切片から調製したゲノミックDNAを鋳型とし、1組のプライマー (Xho-1 および Xho-2) を用いて、PCRを行った。反応液の組成は、template DNA 1  $\mu$ l、1  $\times$  Taq 緩衝液 (20 mM Tris-HCl(pH8.4)/50 mM KCl/1.5 mM MgCl<sub>2</sub>)、0.2 mM dNTPs、0.5  $\mu$ M primers、Taq polymerase (Gibco BRL) 1.0 units で、反応液量は 20  $\mu$ l とした。反応条件は、95  $^{\circ}$ C 3 分間の熱変成の後、94  $^{\circ}$ C 1 分間 60  $^{\circ}$ C 1 分間 72  $^{\circ}$ C 1 分間を 35 サイクルで行った。PCR産物は、2% agarose X (Nippongene) 電気泳動により確認した。

### 第3節 結果

#### 1. オーフアン核内レセプターの増幅

RT-PCRにより、ニワトリ6日胚のポリ(A)<sup>+</sup>RNAからZnフィンガーモチーフ領域の増幅を行った。増幅されたDNA断片(198 bp)をサブクローニングし、塩基配列を確認したところ、解析した119個の独立したクローンの中で、101個のクローンにZnフィンガーモチーフをコードする塩基配列が確認できた。101個のクローンは、5つの配列(OR1.0、OR1.1、OR2.0、OR2.1、OR3.0)に分類することができ、それぞれが既知の核内レセプターのZnフィンガーモチーフと高い類似性を示した(Fig. 9)。

最も多く認められた配列がOR1.0(50クローン)で、これはニワトリのCOUP-TFII(Lutz *et al.*, 1994)と完全に同一の塩基配列を含んでいた。OR1.1(10クローン)は、OR1.0と極めて類似性が高く(66 aa 中 65 aa)、哺乳類のCOUP-TFIと同一のアミノ酸配列を含んでおり、ニワトリのCOUP-TFIオルソログをコードしているものと思われる。

二番目に多く認められた配列は、OR2.0(25クローン)で、これは哺乳類のFTF/LRH-1と極めて高い類似性を示し、ニワトリのFTF/LRH-1オルソログをコードしていると思われる。OR2.1(2クローン)は、OR2.0と類似性が高く(66 aa 中 62 aa)、さらに哺乳類のSF-1/Ad4BPとも極めて高い類似性を示しており、ニワトリのSF-1/Ad4BPオルソログをコードしているものと思われる。すなわち、これらはともにニワトリのFTZ-F1ホモログのcDNAの一部をコードしていると考えられる。

OR3.0(14クローン)は、哺乳類のNurr1/RNR-1と同一のアミノ酸配列を含んでおり、ニワトリのNurr1/RNR-1オルソログをコードしているものと思われる。

#### 2. ニワトリFTZ-F1関連cDNAのクローニング

ニワトリのFTZ-F1ホモログ(OR2.0およびOR2.1)の完全長cDNAを得るため、ニワトリ6日胚のポリ(A)<sup>+</sup>RNAをもとに3'RACEおよび5'RACEを行った(Fig. 10)。3'RACEによって増幅されたOR2.0およびOR2.1の3'領域のcDNA断片は、それぞれ2.6 kbおよび2.8 kbであった。また、3'RACEによって増幅されたOR2.0およびOR2.1の5'領域のcDNA断片は、ともに350 bp前後であった。各DNA断片は、サブクローニングの後、塩基配列を解析し、Znフィンガーモチーフ領域の塩基配列を含めて、全領域の塩基配列を決定した(Fig. 11、12)。

OR2.0(FTF/LRH-1オルソログ)は、ポリ(A)テイルを除いて全長

2945 bp あり、121 bp の 5' 非翻訳領域、1505 bp (501 aa) のアミノ酸コード領域、および 1318 bp の 3' 非翻訳領域からなっていた。3' 非翻訳領域には、4つのポリアデニレーションシグナルが認められた (Fig. 11)。

OR2.1 (SF-1/Ad4BP オルソログ) は、ポリ (A) テイルを除いて全長 3255 bp あり、133 bp の 5' 非翻訳領域、1401 bp (466 aa) のアミノ酸コード領域、および 1721 bp の 3' 非翻訳領域からなっていた。3' 非翻訳領域には、1つのポリアデニレーションシグナルが認められた (Fig. 12)。

### 3. ニワトリ FTZ-F1 関連遺伝子の発現

ニワトリ成体での FTZ-F1 ホモログ (OR2.0 および OR2.1) の発現を調べるため、種々の器官 (副腎、卵巣、精巣、腎臓、肝臓、心臓、脾臓) から抽出した全 RNA に対するノーザンブロッティングを行った。RNA 量と分解の程度の確認は、エチジウムブロマイドによる染色と、 $\beta$  アクチン cDNA によるハイブリダイゼーションで行った (露光 3 時間)。OR2.0 および OR2.1 のハイブリダイゼーションには、相同性の高い Zn フィンガー以外の領域を使用した。OR2.0、OR2.1 ともに発現量は低く、3 日間の露光でわずかにバンドが確認できる程度であった (Fig. 13)。OR2.0 (FTF/LRH-1 オルソログ) は、副腎および肝臓で約 4.8 kb のバンドが確認できた。さらに、肝臓では約 3.4 kb のマイナーなバンドが観察された (Fig. 13)。OR2.1 (SF-1/Ad4BP オルソログ) は、副腎、卵巣、および精巣で約 3.6 kb のバンドが確認できた。発現量は副腎で最も高く、次に卵巣、精巣ではかろうじて発現が確認できる程度であった。それに対し、SF-1/Ad4BP の標的遺伝子の一つであるアロマターゼ遺伝子は、卵巣と副腎で強い発現が認められ (卵巣が最も発現量が高い)、精巣ではバンドを確認できなかった (露光 1 日)。

ニワトリのステロイド産生細胞 (副腎、卵巣、精巣) における FTZ-F1 ホモログ (OR2.0 および OR2.1) の発現頻度を調べるため、RT-PCR による Zn フィンガーモチーフ領域の増幅を行った。増幅した DNA 断片はサブクローニングし、独立した複数クローンの塩基配列を決定した (Table 1)。副腎では解析した 23 クローン中 11 クローンが OR2.0、9 クローンが OR2.1 で、ほぼ同頻度で確認された。卵巣では解析した 20 クローン中 11 クローンが OR2.1 で、OR2.0 は確認できなかった。精巣では解析した 21 クローン中 7 クローンが OR2.0、2 クローンが OR2.1 であった。また、精巣では OR3.0 が 21 クローン中 12 クローンと高い頻度で確認された。

ニワトリの初期発生における FTZ-F1 ホモログ (OR2.0 および OR2.1) の発現を調べるため、6 日および 7 日胚に対する *in situ* ハイブリダイゼーションを行った (Fig. 14, 15)。OR2.0 は、肝臓および膀胱で発現が認められ、特に膀胱で



強い発現が確認された。精巣での発現は、肝臓と同程度かやや低い程度で、卵巣での発現は、バックグランドよりやや高い程度であった。副腎での発現は確認できなかった。OR2.1 は、副腎、卵巣、および精巣で発現が認められ、特に副腎で強い発現が確認された。雌雄での発現の違いおよび6日、7日胚での発現の違いは確認できなかった。

ヒトのCOUP-TF Iは、ヒトのCOUP-TF Iに相同性の高い遺伝子として、H<sub>2</sub>L<sub>3</sub>細胞のcDNAライブラリーからクローニングされた (Wang et al., 1991)。それとは別に、アポリポプロテインA Iの転写調節因子として、C<sub>2</sub>H<sub>10</sub>細胞のcDNAライブラリーからクローニングされたのがA<sub>2</sub>A<sub>2</sub>-1で (Ladha and Krasinski, 1991)。これはCOUP-TF Iと同じものであった。ヒトのCOUP-TF Iは、そもそもニワトリのオルソログ遺伝子の転写調節因子 (control element upstream protein-acceptor factor) として、H<sub>2</sub>L<sub>3</sub>細胞のcDNAライブラリーからクローニングされたものである (Wang et al., 1991)。これはまた、ヒトのヒトに相同性の高い遺伝子としてクローニングされたBAR-3 (Miyajima et al., 1992) と同じものである。現在、これらのオルソログは、ショウジョウバエのgenome 完結物として種々の種からクローニングされており、COUP-TFファミリーを形成している (Gall et al., 1996)。マウスのCOUP-TFファミリーは、発生過程のさまざまな器官でその発現が認められる (Gall et al., 1994) が、発生その中脳神経系において特に強い発現が認められる (Gall et al., 1994)。ニワトリにおいても、COUP-TF Iは発生中の脊髄神経ニューロンで強い発現が認められる。さまざまな発生中の組織で発現が認められる (Liu et al., 1994)。COUP-TFファミリーの転写因子は、他の核内レセプターと結合することにより、転写調節因子として働くことが知られている。ニワトリ初脳胚における成細胞な器官でのCOUP-TF Iの発現は、種々の器官で発現する転写特異的な核内レセプターとの結合を阻害して、転写調節因子の調節転写調節に寄与しているためと考えられる。ニワトリも胚でCOUP-TF Iのオルソログ (ORI II) が最も強い発現で確認されたのは、この時期に新発な神経系および他の器官の発生を反映したものと推測される。これと比較すると、COUP-TF Iのオルソログ (ORI II) の発現はかなり低くなっているが、これはこの時期におけるCOUP-TF Iとの機能的な調節の阻害を反映しているのかもしれない。

二番目に多く確認されたのが、R<sub>2</sub>L<sub>3</sub>細胞RH-1のニワトリ・オルソログ (OR2) である。マウスのRH-1 (Givet receptor homolog II) は、肝臓で発現する転写特異的な核内レセプターとしてクローニングされ、データベースに登録された (Tagerud et al., 1991)。ラットのRTF (Retinoid receptor homolog) は、発生期の胎児、新生児の肝臓で特異的に発現されるとα<sub>2</sub>マクロプロテインの転写調節因子として決定された。その特異的な組織配列と肝臓での存在から、マウスのRH-1

## 第4節 論議

### 1. ニワトリ初期胚で発現するオーファン核内レセプター

ニワトリ6日胚から増幅されたオーファン核内レセプターの中で、最も多く確認されたのが、COUP-TFIIのニワトリ・オルソログ(OR1.0)である。ヒトのCOUP-TFIIは、ヒトのCOUP-TFIに相同性の高い遺伝子として、HeLa細胞のcDNAライブラリーからクローニングされた(Wang *et al.*, 1991)。それとは別に、アポリポプロテインAIの転写制御因子として、ヒト胎盤のcDNAライブラリーからクローニングされたのがARP-1で(Ladiaz and Karasanas, 1991)、これはCOUP-TFIIと同じものであった。ヒトのCOUP-TFIは、そもそもニワトリのオバルブミン遺伝子の転写制御因子(chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor)として、HeLa細胞のcDNAライブラリーからクローニングされたものである(Wang *et al.*, 1989)。これはまた、ヒトの*erbA*に相同性の高い遺伝子としてクローニングされたEAR-3(Miyajima *et al.*, 1988)と同じものであった。現在、これらのホモログは、ショウジョウバエの*seven-up*を始めとして他の多くの種からクローニングされており、COUP-TFファミリーを形成している(Qiu *et al.*, 1996)。マウスのCOUP-TFファミリーは、発生段階のさまざまな器官でその発現が認められる(Jonk *et al.*, 1994)が、発生中の中枢神経系において特に強い発現が認められる(Qui *et al.*, 1994)。ニワトリにおいても、COUP-TFIIは発生中の脊髄運動ニューロンで強い発現が認められる他、さまざまな発生中の器官で発現が認められる(Lutz *et al.*, 1994)。COUP-TFファミリーの転写因子は、他の核内レセプターと競合することにより、転写抑制因子として働くことが知られてる。ニワトリ初期胚における広範囲な器官でのCOUP-TFIIの発現は、種々の器官で発現する組織特異的な核内レセプターとの競合を通して、標的遺伝子の精妙な転写調節に寄与しているためと考えられる。ニワトリ6日胚でCOUP-TFIIのオルソログ(OR1.0)が最も高い頻度で確認されたのは、この時期に活発な神経系および他の器官の発生を反映したものである。これと比較すると、COUP-TFIのオルソログ(OR1.1)の頻度はかなり低くなっているが、これはこの時期におけるCOUP-TFIIとの機能的な役割の違いを反映しているのかも知れない。

二番目に多く確認されたのが、FTF/LRH-1のニワトリ・オルソログ(OR2.0)である。マウスのLRH-1(liver receptor homolog-1)は、肝臓で発現する新規の核内レセプターとしてクローニングされ、データベースに登録された(Tugwood *et al.*, 1991)。ラットのFTF(fetoprotein transcription factor)は、哺乳類の胎児、新生児の肝臓で特異的に産生される $\alpha$ フェトプロテインの転写調節因子として同定された。その特異的な認識配列と肝臓での局在から、マウスのLRH-1

のオルソログであることが推測され、マウスのLRH-1をプローブとしてそのcDNAがクローニングされた (Galarnau *et al.*, 1996)。ニワトリ6日胚の肝臓は胚全体に占める割合も高く、そこで特異的に発現していると思われるFTF/LRH-1のオルソログが、比較的高い頻度で確認されたのは合理的と思われる。これに対し、同じFTZ-F1ホモログの一つであるSF-1/Ad4BPのニワトリ・オルソログ (OR2.1) は、ごく低頻度でしか発現が確認できなかった。これは、SF-1/Ad4BPがごく限られたしかも比較的小さな器官 (視床下部腹内側核、脳下垂体性腺刺激細胞、副腎、生殖腺) でしか発現していないことを反映しているものと考えられる。

次に高頻度で確認されたのは、Nurr1/RNR-1のニワトリ・オルソログ (OR3.0) である。哺乳類のNurr1/RNR-1は、中枢神経系、特にドーパミン作動性ニューロンを含む大脳辺縁系および腹側中脳で特異的に発現している核内レセプターである (Law *et al.*, 1992)。マウスのNurr1は、脳で特異的に発現する核内レセプターとしてクローニングされた (Law *et al.*, 1992)。再生肝で特異的に発現が誘導される遺伝子として同定されたのがRNR-1 (regenerating liver nuclear receptor) で、これはNurr1のラット・ホモログであった (Scarce *et al.*, 1993)。これらは、NGFI-B/Nur77 (Hazel *et al.*, 1988, Milbrandt, 1988) 等とともに、NURファミリーを形成している (Murayama *et al.*, 1998)。ニワトリ6日胚でNurr1/RNR-1のオルソログ (OR3.0) が確認されたのは、COUP-TFIIと同様にこの時期に活発な中枢神経系の発生を反映したものと考えられる。

## 2. ニワトリFTF/LRH-1およびSF-1/Ad4BPの構造

哺乳類のFTZ-F1ホモログには、SF-1/Ad4BPとFTF/LRH-1の2つのパラログの存在が知られている。今回クローニングした2つのニワトリのFTZ-F1ホモログは、その推定されるアミノ酸配列から、それぞれニワトリのFTF/LRH-1 (OR2.0) とSF-1/Ad4BP (OR2.1) に相当すると考えられる。

OR2.0は、哺乳類 (マウス、ラット、ヒト) のFTF/LRH-1と極めて高い1次配列上の一致 (塩基配列で80%前後、アミノ酸配列で90%) を示している (Table 2)。FTF/LRH-1ホモログと考えられる両生類 (アフリカツメガエル) のx F F 1 r (Ellinger-Ziegelbauer *et al.*, 1994) や魚類 (セブラフィッシュ) のz F F 1 (Liu *et al.*, 1997) とともに、非常に高い相同性を有している (Table 2)。ラットのFTFには複数のアイソフォームが存在することが確認されているが、これは複数のイニシエーションコドンを使い分けることにより産生されることが示されている (Galarnau *et al.*, 1996)。マウスのLRH-1には、DBDよりN末端側に5

つのインフレームのメチオニンコドンが存在し、これはラットやヒトでも同様である。さらに、ラット (Yanase *et al.*, 1999) とヒト (Li *et al.*, 1998, Takayanagi, 1998) では、この領域でのオルタナティブスプライシングによると思われるバリエーションも確認されている。一方、OR2.0 には、4つのインフレームのメチオニンコドンが存在するが、マウスの第1メチオニンに相当するメチオニンは認められず、これは、x F F 1 r や z F F 1 でも同様である。また、マウスの第2メチオニンより5'側ではこれらの間の相同性が比較的低い。このことから、OR2.0 を含む哺乳類以外の F T F / L R H - 1 では、マウスの第2メチオニンに相当するメチオニン (OR2.0 では第1メチオニン) か、それより3'側のメチオニンのいずれかがイニシエーションコドンとして機能しているものと考えられる。x F F 1 r にはA、B2つのホモログが存在するが、それらは極めて類似性が高く (塩基配列で93%、アミノ酸配列で96%)、ゲノムの四倍体化によって比較的最近生じたパラログであると推測されている (Ellinger-Ziegelbauer *et al.*, 1994)。z F F 1 にもまた、A、B2つのバリエーションが存在するが、これらはオルタナティブスプライシングにより生じたものと考えられている (Liu *et al.*, 1997)。これらの事実から、OR2.0 にも何らかのバリエーションが存在する可能性は否定できない。

OR2.0 の Z n フィンガーモチーフ領域は高度に保存されており、66アミノ酸中4アミノ酸を除き、哺乳類の F T F / L R H - 1 と同一である。また、一致しない4アミノ酸については、x F F 1 r および z F F 1 で置換しているアミノ酸と一致しており、これらが同一遺伝子のオルソログであることを強く示唆している。Pボックスはこれらの中で完全に一致しており (E S C K G)、Dボックスも極めて高度に保存されている (I E N Q N / S)。さらに、DBDのC末端側に存在するTおよびAボックスも完全に保存されている。F T Z - F 1 ファミリーでは、TおよびAボックスを含むDBDのC末端側の約30アミノ酸が極めて高く保存されており、特にF T Z - F 1 ボックスと名付けられている。LBDでは、DBDと較べるとやや類似性が低下するが、C末端に存在するA F 2 配列 (L L I E M L) は完全に保存されていた。

OR2.0 と哺乳類の F T F / L R H - 1 との極めて高い相同性に対して、OR2.1 と哺乳類 (マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒト) の S F - 1 / A d 4 B P との1次配列上の一致率 (塩基配列で76~78%、アミノ酸配列で72~74%) はやや低く感じられる (Table 2)。最近、爬虫類 (アカミミヌマガメ、Cowan and Wibbels, 1999)、両生類 (ツチガエル、Kawano *et al.*, 1998) および魚類 (メダカ、Watanabe *et al.*, 1998) から S F - 1 / A d 4 B P のオルソログと考えられる cDNA がクローニングされたが、これらとの間の1次配列の保存性も、F T F / L R H - 1 のオルソログ間の保存性と較べるとやや低い (Table 2)。これは、F T F / L R H - 1 は進化的に非常に

厳密に保存されているのに対し、SF-1/Ad4BPはやや淘汰圧が低く、バリエーションが大きくなっているものと思われる (Fig. 16)。

OR2.1 のZnフィンガーモチーフ領域は高度に保存されており、66アミノ酸中2アミノ酸を除き、哺乳類のSF-1/Ad4BPと同一である。一致しない2アミノ酸については、哺乳類のFTF/LRH-1で置換しているアミノ酸と一致しており、OR2.1 が進化的にややFTF/LRH-1に寄っていることを示唆している。Pボックスはこれらの中で完全に一致しており (ESCKG)、Dボックスも極めて高度に保存されている (TESQS/N)。DBDのC末端側に存在するTおよびAボックス、さらにFTZ-F1ボックスも完全に保存されている。LBDでは、かなり類似性が低下するが、C末端に存在するAF2配列 (LLIEML) は完全に保存されていた。哺乳類のSF-1/Ad4BPでは、DBDとLBDの間 (region D) にあるヒンジ領域に、プロリンが複数個並んだプロリンストレッチと呼ばれる特徴的な配列が認められる。OR2.1 では同様な配列は認められないが、他の哺乳類以外のSF-1/Ad4BPでも認められず、これは哺乳類のみの特徴と考えられる。ヒンジ領域は分子全体の中でも最も相同性が低い領域である。これは、DBDやLBDとは異なり、ヒンジ領域は特定の決まった構造をとって他の分子 (DNAやリガンドあるいは共役因子) と相互作用をする必要がないために、変異が生じやすいためと考えられる。

### 3. ニワトリFTF/LRH-1およびSF-1/Ad4BP遺伝子の発現

両生類のFTF/LRH-1オルソログであるxFF1rは、成体においては卵細胞、肝臓、腎臓でその発現が確認されており (Ellinger-Ziegelbauer *et al.*, 1994)、魚類のFTF/LRH-1オルソログであるzFF1は、成体においては脳 (脳下垂体)、肝臓、生殖腺 (卵巣、精巣)、膵臓、腎臓でその発現が認められている (Liu *et al.*, 1997)。しかしながら、これらについては、詳細なデータが示されていなかったり、また、RT-PCRで発現を確認しただけであり、その発現量については不明である。ラットのFTFの成体における発現は、ノーザンプロットでは、肝臓でのみ認められており、腎臓、心臓、脂肪、胸腺、骨格筋、精巣では検出されていない (Galarneau *et al.*, 1996)。さらに、ターゲット配列をプローブとしたゲルシフトアッセイでは、肝臓と同様に膵臓にもFTFが存在することがわかった (Galarneau *et al.*, 1996)。これに対し、ニワトリのFTF/LRH-1 (OR2.0) の成体における発現は、肝臓と副腎で特に高く (Fig. 13)、精巣でも認められる (Table. 1)。肝臓での発現は他の種でも共通して確認されているが、副腎での発現は確認されていない。無羊膜類 (魚類、両生類) では中腎が成体の腎臓として機能するが、この際、副腎との明瞭な分化が確認できない。このため、魚類および両生類の腎臓で確認されたFTF/

LRH-1 オルソログの発現は、腎臓内に存在する副腎に相当する細胞での発現を反映しているものと考えられる。精巣における発現は、ニワトリにおいてもRT-PCRで確認できる程度のもので、発現量としては極めて低く、そのため、他の種においては検出できなかったものと思われる。ニワトリの初期胚においては、成体と同じく肝臓で強い発現が認められた (Fig. 14)。精巣においても同程度の発現が確認できたが、副腎での発現は確認できず、これらの器官におけるFTF/LRH-1 オルソログの発現は発生段階によって厳密に制御されている可能性を示唆している。さらに、膵臓の原基である膵管で最も強い発現が確認されたが、これは、他の種において膵臓でその発現が確認されている事実と一致している。

こうしたFTF/LRH-1 遺伝子の発現様式から、FTF/LRH-1 は発生段階において、腸管から肝臓および膵臓という器官が分化する際に極めて重要な役割を果たしているものと考えられる。また、副腎や生殖腺で認められる発現は、進化的に近縁なSF-1/Ad4BPと発生段階において何らかの相互作用を行っていることを示唆している。

哺乳類 (マウス、ラット) の成体におけるSF-1/Ad4BPの発現は、ステロイド産生細胞に特異的に認められる。マウスの成体においては、副腎皮質、精巣のライディヒ細胞、卵巣の莢膜細胞で強い発現が認められる (Ikeda *et al.*, 1993)。哺乳類 (マウス、ラット) の初期胚におけるSF-1/Ad4BP陽性細胞は、ラット胎齢11.0日前後に背側大動脈から腹腔上皮にかけて存在する一群の細胞として認められ (Ikeda *et al.*, 1994., Hatano *et al.*, 1996)、これらが、副腎皮質と生殖腺 (卵巣、精巣) の共通原基と考えられている。これらの細胞は、ラット胎齢12.0日には増殖しながらもまだ一塊りの細胞集団として存在するが、ラット胎齢12.5日に至ると2つの細胞集団に分離しはじめ、背側腹壁内に存在する細胞が副腎原基に、腸管膜の両側に中腎に沿って隆起した細胞集団 (生殖隆起) が生殖腺原基となる。副腎原基には、後根神経節から神経細胞が進入し、皮質と髄質の二層構造ができる。出生後さらに、副腎皮質が機能の異なる三層 (球状層、柵状層、網状層) に分化し、成熟した副腎が形成される。SF-1/Ad4BPの発現は、この間変わらずに副腎皮質細胞で高く維持される (Hatano *et al.*, 1994, Ikeda *et al.*, 1994)。一方、生殖腺でのSF-1/Ad4BPの発現は、卵巣に分化するか精巣に分化するかにより大きく異なる。未分化生殖腺は、ラット胎齢14.5日で雌雄の形態的な区別 (卵巣、精巣) が明瞭になる。精巣では精巣索が構築されるが、生殖細胞を取り巻く体細胞で、SF-1/Ad4BPの強い発現が認められる。その後発現量の異なる2つの細胞種に分かれ、強い発現を示す細胞が間質のライディッヒ細胞に、弱い発現を示す細胞がセルトリ細胞となる。この発現様式はラット生後1週齢くらいまで維持されるが、ラット生後3週齢以降で、セルトリ細胞でのSF-1/Ad4B

Pの発現が急激に低下し、ライディッヒ細胞でのみその発現が高く維持される (Hatano *et al.*, 1994)。これに対し、卵巣では、ラット胎齢14.5日からラット生後1週齢くらいまで、SF-1/Ad4BPの発現は極めて低く維持されている。その後、卵巣の形態的な分化(幼若な卵胞の出現)に伴い発現が上昇し、強い発現を示す莢膜細胞と、弱い発現を示す顆粒膜細胞へと分化していく (Hatano *et al.*, 1994)。こうしたSF-1/Ad4BPの発現様式は、それぞれの細胞の発生段階におけるステロイド産生能と非常によく相関している。ニワトリのSF-1/Ad4BP (OR2.1)の成体における発現は、副腎で特に高く、卵巣ではそれよりやや低く、精巣でわずかに認められる程度である (Fig. 13, Table. 1)。こうした発現様式は、哺乳類のSF-1/Ad4BPの発現様式とよく一致している。

ニワトリの初期胚における生殖腺の分化は、孵卵後5日目前後から副腎原基および生殖隆起の形成が始まり、孵卵後6日目までは形態的には雌雄の区別がつかない未分化生殖腺の状態である。形態的に雌雄の区別が可能な生殖腺の分化が始まるのは7日目以降であるが、雌特異的に発現が確認されるアロマターゼ遺伝子の発現は、孵卵後5日目前後から始まっているており、遺伝子発現のレベルでみると既に雌雄の分化が始まっていると言える。ニワトリの生殖腺が形態的に卵巣または精巣に分化し始める時期(孵卵後6日および7日)におけるSF-1/Ad4BPの発現を調べたところ、雌雄に関わりなく生殖隆起(未分化生殖腺)で発現が確認され、その発現量に関しても目立った雌雄差は確認されなかった (Fig. 15)。

哺乳類の初期胚ではステロイド合成が盛んな精巣でSF-1/Ad4BPの発現が高く維持されるということから類推すると、ニワトリの初期胚ではステロイド合成が盛んな卵巣でSF-1/Ad4BPの発現が高く維持されることが予想されるが、そうした知見は得られなかった。このことから、鳥類の初期胚におけるステロイド合成系の制御には、SF-1/Ad4BP以外の別の因子がより深く関与しており、結果的に生殖腺の雌雄への分化を調節しているものと考えられる。一つの可能性としては、この時期に精巣でより強く発現しているFTF/LRH-1 (OR2.0)が、SF-1/Ad4BP (OR2.1)に対してアンタゴニスティクに作用し、その結果として精巣におけるステロイド合成系の抑制が起こっているというメカニズムが考えられる (Table. 1)。また、ニワトリ成体の精巣で高頻度に発現が認められるOR3.0がアンタゴニストとして働いている可能性も考えられる。OR3.0は、Nurr1/RNR-1のニワトリ・オルソログと考えられるが、同じNURファミリーのTR3はNGFI-B/Nurr77のヒト・オルソログで、ヒトの精巣のcDNAライブラリーからクローニングされた (Chang *et al.*, 1989)。同ファミリーの遺伝子が、鳥類の精巣の分化において何らかの役割を果たしていることは十分に予想されることである。ニワトリの初期胚における副腎原基でのSF-1/Ad4

BPの発現は、雌雄の区別なく確認され、その発現強度は生殖腺よりもかなり強いものであった (Fig. 15)。この発現様式もまた、哺乳類で認められているものとよく一致していた。副腎の分化は、その遺伝的な性に関わらず同様に進行するため、鳥類におけるSF-1/A d 4 BPの発現と哺乳類におけるそれとの間に本質的な違いはないものと考えられる。

この結果は、SF-1が生殖腺の分化と正常な副腎の分化に不可欠な因子であり、また、哺乳類の性分化においても重要な役割を果たしており、鳥類の性決定においても重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、本研究ではニワトリのSF-1とSF-2の遺伝子発現の比較を行った。これらの遺伝子発現の比較は、SF-1とSF-2の遺伝子発現の比較を行った。

ニワトリのSF-1とSF-2の遺伝子発現の比較は、SF-1とSF-2の遺伝子発現の比較を行った。SF-1とSF-2の遺伝子発現の比較は、SF-1とSF-2の遺伝子発現の比較を行った。

ニワトリのSF-1とSF-2の遺伝子発現の比較は、SF-1とSF-2の遺伝子発現の比較を行った。SF-1とSF-2の遺伝子発現の比較は、SF-1とSF-2の遺伝子発現の比較を行った。

さらに、ニワトリのSF-1とSF-2の遺伝子発現の比較は、SF-1とSF-2の遺伝子発現の比較を行った。SF-1とSF-2の遺伝子発現の比較は、SF-1とSF-2の遺伝子発現の比較を行った。

この結果は、SF-1とSF-2の遺伝子発現の比較は、SF-1とSF-2の遺伝子発現の比較を行った。SF-1とSF-2の遺伝子発現の比較は、SF-1とSF-2の遺伝子発現の比較を行った。

哺乳類の初期発生におけるSF-1/A d 4 BPの発現には、生殖腺の分化に伴う性的二重性が認められるが、副腎のSF-1/A d 4 BPの発現には明らかな性的二重性は確認できなかった。しかしながら、哺乳類のSF-1/A d 4 BPの発現には明らかな性的二重性が確認され、一つの可能性として、これがSF-1/A d 4 BPと協同的に作用することにより、哺乳類と同様に性分化に関与する役割を果たしていることが考えられる。

鳥類の性決定に重要な役割を果たしているアロマターゼ遺伝子は、SF-1/A d 4 BPの発現の調節因子の一つと考えられるが、その発現の性的二重性にはSF-1/A d 4 BPがどのように関与しているかは重要な問題である。



## 第5節 要約

オーファン核内レセプターの一つであるFTZ-F1 (*fushi tarazu-factor 1*) は、ショウジョウバエの *fushi tarazu* 遺伝子の転写制御因子であるが、哺乳類をはじめ多くの種にそのホモログが存在し、FTZ-F1ファミリーを形成している。哺乳類のホモログの一つが、SF-1 (Steroidogenic factor-1) / Ad4BP (Ad4 binding protein) で、これはステロイド合成酵素をはじめ種々の遺伝子の転写制御に関与しており、視床下部-脳下垂体-副腎・性腺系の分化と正常な機能維持に不可欠な因子である。さらに、哺乳類の性分化においても重要な役割を果たしており、鳥類の性決定においても極めて重要な役割を果たすと考えられる。そこで、本研究ではニワトリFTZ-F1ホモログのクローニングを行うとともに、それらの成体および初期胚での発現についての解析を行った。

RT-PCRおよびRACEにより、ニワトリの6日胚から2つのFTZ-F1ホモログ (OR2.0 および OR2.1) がクローニングされたが、その配列からそれぞれ哺乳類のFTF/LRH-1 およびSF-1/Ad4BPのオルソログであると考えられた。

ニワトリFTZ-F1ホモログの成体における発現をノーザンブロットおよびRT-PCRにより確認したところ、OR2.0は肝臓および副腎で比較的強く、精巣で弱い発現が、OR2.1は副腎および卵巣で比較的強く、精巣で弱い発現が認められた。

さらに、ニワトリ初期胚における発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより確認したところ、OR2.0は肝臓および膵管で強く、精巣で弱い発現が、OR2.1は副腎、卵巣および精巣で比較的強い発現が認められた。

こうした発現部位は、哺乳類や他の脊椎動物のオルソログの発現部位とよく一致しており、これらが脊椎動物に共通する器官の分化・形成機構に関与しているものと考えられる。

哺乳類の初期発生における生殖腺でのSF-1/Ad4BPの発現には、未分化生殖腺の分化に伴う性的二型性が認められるが、鳥類のオルソログであるOR2.1の発現には明確な性的二型性は確認できなかった。しかしながら、哺乳類のFTF/LRH-1のオルソログであるOR2.0の発現に性的二型性が確認され、一つの可能性として、これがSF-1/Ad4BPと拮抗的に作用することにより、哺乳類と同様に性分化に何らかの役割を果たしていることが考えられる。

鳥類の性決定に重要な役割を果たしているアロマターゼ遺伝子は、SF-1/Ad4BPの標的遺伝子の一つと考えられるが、その発現の性的二型性にSF-1/Ad4BPがどのように関与しているかは重要な問題である。

## 第4章 ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子の構造解析

### 第1節 序論

#### 1. 核内レセプターの発現と細胞分化

核内レセプターは、レセプター型の転写因子として細胞外からのシグナルを捉え、特定の遺伝子（群）の転写制御を直接行うことにより、生体におけるホメオスタシスの維持を行っている。最近の知見では、特異的なリガンドが未同定でオーファンレセプターと呼ばれているもののシグナル分子は、細胞外（他の細胞）からもたらされるものばかりではなく、細胞内の代謝産物や生合成の中間体などが、直接リガンドとして作用することも知られている。また、核内レセプターは、発生段階においては、胚の区画化や領域化、組織や器官の形成においても、極めて重要な役割を果たしている。これらの核内レセプターの発生段階における役割は、主として、ノックアウトマウスの作製による遺伝子破壊実験によって解析されてきているが、核内レセプターに複数のパラログが存在する場合、その機能的な冗長性から明瞭な表現型として観察できない場合も多い。また、核内レセプターの中には、培養細胞系で強制発現させることにより、細胞の分化を誘導することが可能なものも存在するが、それらの核内レセプターは細胞分化の鍵因子と考えることができる。このことから、核内レセプターの発現制御を通して、発生段階での特定の細胞分化が制御されているとも言え、その発現制御機構を解析することは、細胞分化という観点からも興味深い。

#### 2. SF-1/Ad4BP遺伝子

哺乳類のSF-1 (Steroidogenic factor-1) / Ad4BP (Ad4 binding protein) は、はじめ、複数のステロイド合成酵素の転写を活性化する因子として同定された (Lala *et al.*, 1992, Morohashi *et al.*, 1992)。1992年、その特異的な認識配列が核内レセプターの認識配列と類似していたことから、他のオーファンレセプターのDNA結合ドメインをプローブとして、マウス副腎皮質由来Y1細胞のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、マウスSF-1のcDNAの一部がクローニングされた (Lala *et al.*, 1992)。翌年、それとは独立して、ウシの副腎から精製したAd4BPの部分アミノ酸配列を決定して得られた情報を元にして、ウシ副腎皮質のcDNAライブラリーから、完全長のウシAd4BPのcDNAがクローニングされた (Honda *et al.*, 1993)。ウシAd4BPのcDNAは、1383 bp (461 aa) のアミノ酸コード領域を含んでおり、推定されるアミノ酸配列と他の核内レセプターとの比較から、ショウジョウバエのFTZ-F1 (*fushi tarazu-factor 1*) のホモログであることが判明した。

マウスSF-1遺伝子は、マウスSF-1 cDNAをプローブとしてクローニン

グされた (Ikeda *et al.*, 1993)。その遺伝子構造は7個のエクソンからなっており、約15 kb に渡っていた。アミノ酸コード領域は、第2エクソンから第7エクソンに存在しており、第1エクソンは、5' 非翻訳領域 (5' UTR) のみを含んでいた。その後、1995年に、ラットSF-1遺伝子 (Nomura *et al.*, 1995) が、1996年に、ヒトSF-1遺伝子 (Oba *et al.*, 1996) がクローニングされたが、その基本構造はマウスと同様であった。

マウスにおいては、SF-1 cDNAのクローニングとほぼ同時期にELP (embryonal long terminal repeat-binding protein) と呼ばれる転写因子がクローニングされていた (Tsukiyama *et al.*, 1992) が、これは、マウスSF-1と同じ遺伝子によってコードされており、オルターナティブなスプライシングによって生じるアイソフォームであることが判明した (Ikeda *et al.*, 1993)。

SF-1/Ad4BP cDNAに関しては、その後さらに、哺乳類 (ブタ、Pilon *et al.*, 1998)、鳥類 (ニワトリ、Kudo and Sutou, 1997、本研究)、爬虫類 (アカミミヌマガメ、Cowan and Wibbels, 1999)、両生類 (ツチガエル、Kawano *et al.*, 1998) および魚類 (メダカ、Watanabe *et al.*, 1998) からクローニングされ、脊椎動物に広く保存されていることが確認されている。

### 3. SF-1/Ad4BP遺伝子の発現と生殖巣の分化

哺乳類 (マウス) におけるSF-1/Ad4BPの発現は、副腎皮質、精巣のセルトリ細胞とライディヒ細胞、卵巣の卵胞膜細胞、顆粒膜細胞、黄体細胞といったステロイド産生細胞 (Ikeda *et al.*, 1993, Hatano *et al.*, 1994) および、脳下垂体の性腺刺激ホルモン産生細胞 (gonadotroph) と視床下部腹内側核に認められる (Ingraham *et al.*, 1994, Shinoda *et al.*, 1995, Ikeda *et al.*, 1995)。また、鳥類 (ニワトリ) においても、副腎、卵巣、精巣といったステロイド産生細胞でその特異的発現が確認されている (Kudo and Sutou, 1997、本研究第3章)。これらの発現部位は、SF-1/Ad4BPの標的遺伝子の発現分布ともよく一致しており、SF-1/Ad4BPが、視床下部-脳下垂体-性腺系および視床下部-脳下垂体-副腎系の正常な機能維持に極めて重要な役割を果たしていることが示唆される。ノックアウトマウスによる解析では、副腎と生殖腺の形成が認められず (Luo *et al.*, 1994, Sadovsky *et al.*, 1995)、脳下垂体性腺刺激細胞の著しい減少と、視床下部腹側内核の形成不全が確認される (Shinoda *et al.*, 1995)、SF-1/Ad4BPが、これらの器官や組織の分化にも極めて重要な役割を果たしているものと推測される。また、SF-1/Ad4BP cDNAをES細胞で強制発現させることにより、ステロイド産生細胞への分化を誘導することが可能とされ (Crawford *et al.*, 1997)、この点からも、SF-1/Ad4BPはステロイド産生細胞分化の鍵因子と考えられる。

哺乳類（マウス）の初期発生における生殖腺でのSF-1/Ad4BP遺伝子の発現には、性的二型性が認められている（Hatano *et al.*, 1994）。未分化生殖腺においては、雌雄同様に認められるSF-1/Ad4BPの発現が、卵巣あるいは精巣への分化に伴い、雌では急激に低下し、雄では高く維持されるようになり、これが出生後まで継続する。この二型性の顕現は、哺乳類の性決定遺伝子であるSRYの発現時期にほぼ一致しており、この因子が哺乳類の性分化に重要な役割を果たしているものと考えられる。一方、鳥類（ニワトリ）においては、哺乳類と同様に未分化生殖腺の段階（孵卵後6日目）で、SF-1/Ad4BPの発現が認められるが、その後の卵巣あるいは精巣への分化（孵卵後7日目）に先立つ発現量の顕著な変化は認められなかった（本研究第3章）。この時期には既にアロマターゼ遺伝子の雌雄による顕著な発現の違いが認められているので（Andrews *et al.*, 1997, Smith *et al.*, 1997, Nakabayashi *et al.*, 1998）、SF-1/Ad4BPがそれを直接制御しているとは考えがたい。ごく最近、ニワトリにおいても生殖腺の分化に伴い（孵卵後7日目以降）、精巣でのSF-1/Ad4BP遺伝子の発現が低下することが報告されたが（Smith *et al.*, 1999）、鳥類におけるSF-1/Ad4BP遺伝子の発現と性分化の関係は未だ判然としない。

#### 4. 鳥類のSF-1/Ad4BP遺伝子の発現制御

鳥類のSF-1/Ad4BP遺伝子の発現制御は、鳥類の性分化においても重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、その初期発生における発現様式をみる限り、哺乳類と同様の明確な雌雄による発現制御の違いが存在するようには思われず、そこには哺乳類とは異なった発現制御機構の存在も示唆される。特に、哺乳類と鳥類の卵巣における発現様式の違いは顕著であり、SF-1/Ad4BP遺伝子の卵巣における発現制御機構を詳細に検討することは、性分化の観点からも重要と思われる。そこで本研究では、ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子のクローニングおよびその構造決定を行うとともに、卵巣におけるプロモーター機能の解析を行った（Kudo and Sutou, 1999）。

## 第2節 材料と方法

### 1. ニワトリ・ゲノミックライブラリーのスクリーニング

#### 1. 1 プローブDNAの調製と標識

ニワトリSF-1/Ad4BPcDNA (OR2.1) の1.6 kbのNco I断片を切り出し、プローブとして使用した。さらに5'上流域をクローニングするため、ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子の第2, 第3エクソンを含む3.0 kbのSal I/Bam HI断片を切り出し、プローブとして使用した。各DNA断片は、Megaprime DNA labeling systems (Amersham) を用いて[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTPで標識した(random primer法)。

#### 1. 2 スクリーニング

標識したDNA断片をプローブとして、ニワトリ・ゲノミックライブラリー(6.0x10<sup>5</sup>)のスクリーニングを行った。ブランクはHybond N nylon membrane (Amersham)に転写し、ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション液(6x SSC/5x Denhardt's solution/0.5% SDS/100 $\mu$ g/ml salmon sperm DNA)で65 $^{\circ}$ C 3時間プレハイブリダイゼーションを行った後、同液に標識したDNA断片を加え、65 $^{\circ}$ Cで一晩(16時間)行った。メンブレンは、洗浄液(2x SSC/0.2% SDS)で65 $^{\circ}$ C 15分間、洗浄液(1x SSC/0.2% SDS)で65 $^{\circ}$ C 15分間洗浄した後、オートラジオグラフィーを行った。

シングルブランクを単離するために、同様の方法で2次、3次スクリーニングを行った。

#### 1. 3 サブクローニング

陽性クローンからファージDNAを調製し(Sambrook *et al.*, 1989)、制限酵素Bam HIで切断した後、プラスミドベクターpGEM3Zf(+)(Promega)のBam HI部位に導入し、塩基配列の確認を行った。

## 2. 5' RACEとRT-PCR

### 2. 1 RNAの調製

全RNAは、孵卵後6日目のニワトリ全胚あるいは成鶏(白色レグホン種)の種々の器官(副腎、卵巣、精巣)から、ISOGEN (Nippongene)を用いて調製した(Acid phenol法)。

### 2. 2 プライマーDNA

5' RACEには、以下の5つのプライマーを使用した。

特異的アンチセンスプライマー 1

OR21-3: ACATGGGCCCAAACCTTATTCCTCCCGC

特異的アンチセンスプライマー 2

OR21-4: CTGGGTCTTGTCGATCTTGCA

特異的アンチセンスプライマー 3

OR21-5: GTTCTGGCTCTCGGTGCAGGT

d T 1 7 アダプタープライマー

GAGTCGACTCGAGAATTCTTTTTTTTTTTTTTTTTT

アダプタープライマー

GAGTCGACTCGAGAATTC

RT-PCRには、以下の3つのプライマーを使用した。

OR21-5 (上記の特異的アンチセンスプライマー 3 と同じ。)

OR21-10: ACTCTCGGAGTCTCCTCGAG

OR21-13: CAGCCGCGACCCTATAAATC

## 2. 3 5' RACE

一本鎖cDNAは、全RNAをもとに、特異的アンチセンスプライマー1をプライマーとし、SUPERScript II reverse transcriptase (Gibco BRL) を用いて作製した。さらに、この一本鎖cDNAに、terminal deoxynucleotidyl transferase (Takara) を用いてポリ(A)テイルを付加した後、SUPREC-02 (Takara) で精製した。

このcDNAを鋳型とし、特異的アンチセンスプライマー2およびdT17アダプタープライマーを用いて1次PCRを行った。反応液の組成は、poly(A) tailed first strand cDNA 1  $\mu$ l、1  $\times$  ExTaq 緩衝液 (25 mM TAPS(pH9.3)/50 mM KCl/2 mM MgCl<sub>2</sub>/1 mM 2-mercaptoethanol)、0.2 mM dNTPs、0.2  $\mu$ M primers、ExTaq polymerase (Takara) 2.5 units で、反応液量は50  $\mu$ lとした。反応条件は、95  $^{\circ}$ C 3分間の熱変成の後、94  $^{\circ}$ C 1分間60  $^{\circ}$ C 1分間72  $^{\circ}$ C 1分間を35サイクル、72  $^{\circ}$ C 7分間の伸長で行った。さらに、この1次PCR産物(1次PCRの反応液0.1  $\mu$ l)を鋳型とし、特異的アンチセンスプライマー3およびアダプタープライマーを用いて2次PCRを行った。反応条件は、1次PCRと同様に行った。

2次PCR産物は、SUPREC-02 (Takara) で精製した後、プラスミドベクター pGEM-T (Promega) に導入し、塩基配列の確認を行った。

## 2. 4 RT-PCR

全RNAは、ゲノミックDNAの混入を排除するため、DNAase (Pharmacia) による消化反応を行った。cDNAは、この全RNAをもとに、ランダムプライマーを

プライマーとし、First Strand cDNA Synthesis kit (Pharmacia) を用いて作製した。

このcDNAを鋳型とし、2組のプライマー (OR21-5 および OR21-10 または OR21-15) を用いてPCRを行った。反応液の組成は、first strand cDNA 1  $\mu$ l、1  $\times$  ExTaq 緩衝液 (25 mM TAPS(pH9.3)/50 mM KCl/2 mM MgCl<sub>2</sub>/1 mM 2-mercaptoethanol)、0.2 mM dNTPs、0.2  $\mu$ M primers、ExTaq polymerase (Takara) 2.5 units で、反応液量は50  $\mu$ l とした (cool start 法)。反応条件は、95  $^{\circ}$ C 3分間の熱変成の後、94  $^{\circ}$ C 1分間60  $^{\circ}$ C 1分間72  $^{\circ}$ C 1分間を35サイクル、72  $^{\circ}$ C 7分間の伸長で行った。PCR産物は、2% agarose X (Nippongene) 電気泳動により確認した。

### 3. 塩基配列の決定

DNA断片は、適宜、適当な制限酵素で切断してサブクローンを作製するか、もしくは、Exonuclease III (Takara) と Mung Bean nuclease (Takara) を使用して欠失クローンを作製した後、シークエンシング反応を行った。鋳型とするプラスミドDNAは、boiling 法もしくは alkaline lysis 法で調製した後、RNAase (Sigma) 処理し、ポリエチレングリコール沈澱により精製した。

シークエンシング反応は、Dyeprimer (Perkin Elmer) あるいは Dyeterminater (Perkin Elmer) を用い、酵素は Taq polymerase (Gibco BRL) あるいは ThermoSequenase (Amersham) を使用して、dideoxyterminater 法で行った (cycle sequencing 法)。

塩基配列の決定は、373A DNA Sequencer (Perkin Elmer) を用いて行った。

### 4. ニワトリ卵巢由来細胞の初代培養

#### 4. 1 ニワトリ卵巢細胞の調製

ニワトリ成体の卵巢から白色小卵胞 (small white follicles, SWF) および黄色小卵胞 (small yellow follicles, SYF) を切り出し、PBS (phosphate-buffered saline) 中でハサミにより細断して、卵黄を取り除いた。細断した組織は180IU/ml コラゲナーゼ (Sigma) を含むDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) で再懸濁し、37  $^{\circ}$ C 30分間もしくは4  $^{\circ}$ C一晩 (16時間) 消化した。細胞懸濁液は遠心した後、新しいDMEM/10% FBS (fetal bovine serum) /抗生物質 (50 units/ml penicillin G sodium/50  $\mu$ g/ml streptomycin sulfate) に再懸濁し、組織培養用ディッシュに移して一晩培養した。死んだ細胞およびディッシュ底面に接着しなかった細胞を取り除き、残った繊維芽細胞様細胞を継代培養した。

#### 4. 2 継代培養

ニワトリ卵巢由来の繊維芽細胞様細胞は3日毎に5  $\times$  10<sup>5</sup> cells/10 cm dish で植え継ぎ、約3週間継代した。NIH3T3細胞は3日毎に3  $\times$  10<sup>5</sup> cells/10 cm dish で植え

継ぎ、約3週間継代した。NIH3T3細胞は新井賢一教授（東京大学）より分与された。培養液は、DMEM/10%FBS (fetal bovine serum) /抗生物質 (50 units/ml penicillin G sodium/50µg/ml streptomycin sulfate) を使用し、培養条件は、37℃5%CO<sub>2</sub>95%空気で行った。

#### 4. 3 RNAの調製

全RNAは、1枚の10cmディッシュ中で培養した細胞 (1-4 x 10<sup>6</sup> cells) から、ISOGEN (Nippongene) を用いて調製した (Acid phenol 法)。

#### 4. 4 プライマーDNA

RT-PCRには、以下の4つのプライマーを使用した。

OR21-5: GTTCTGGCTCTCGGTGCAGGT

OR21-10: ACTCTCGGAGTCTCCTCGAG

AROMA7: GAGAGGCCCAATTCCCATGCAGTATCC

AROMA13: TACAGGGCCTCCAGCAGGTT

#### 4. 5 RT-PCR

cDNAは、全RNAをもとに、ランダムプライマーをプライマーとし、First Strand cDNA Synthesis kit (Pharmacia) を用いて作製した。このcDNAを鋳型とし、2組のプライマー (OR21-5 および OR21-10 または AROMA7 および AROMA13) を用いてPCRを行った。反応液の組成は、first strand cDNA 1µl、1×ExTaq 緩衝液 (25 mM TAPS(pH9.3)/50 mM KCl/2 mM MgCl<sub>2</sub>/1 mM 2-mercaptoetanol)、0.2 mM dNTPs、0.2 µM primers、ExTaq polymerase (Takara) 2.5 units で、反応液量は 50 µl とした (cool start 法)。反応条件は、95℃3分間の熱変成の後、94℃1分間60℃1分間72℃1分間を35サイクル、72℃7分間の伸長で行った。PCR産物は、2% agarose X (Nippongene) 電気泳動により確認した。

### 5. プロモーター解析

#### 5. 1 レポータープラスミドの構築

ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子の5'上流領域を含むレポータープラスミドPGV-B-SF1は、5'上流領域に存在するKpnI切断部位から転写開始点に新たに導入したXhoI切断部位までの約2.5 kbのDNA断片を、プラスミドベクターPGV-B (Nippongene) のルシフェラーゼ構造遺伝子上流に存在するマルチクローニング部位に導入して構築した。さらに、同プラスミド (PGV-B-SF1) を制限酵素KpnIおよびNotIで切断した後、Exonuclease III (Takara) とMung Bean nuclease (Takara)



を使用して8つの欠失クローン (PGV-B-SF1(-1122)、PGV-B-SF1(-996)、PGV-B-SF1(-750)、PGV-B-SF1(-572)、PGV-B-SF1(-394)、PGV-B-SF1(-198)、PGV-B-SF1(-152)、PGV-B-SF1(-138)) を作製した。3つの欠失クローン (PGV-B-SF1(-86)、PGV-B-SF1(-56)、PGV-B-SF1(-394Δ)) については、適当なプライマーを使用して必要なDNA断片をPCRにより増幅し、プラスミドベクター PGV-B (Nippongene) のマルチクロニング部位に導入することにより作製した。

遺伝子導入に使用したプラスミドDNAは、QIAGEN plasmid DNA midi kit (QIAGEN) を用いて抽出し、精製した。

## 5. 2 遺伝子導入

遺伝子の導入は、TransIT Polyamine Transfection Reagents (PanVera) を用いて行った。使用した細胞は、遺伝子導入時に培養ディッシュの底面を60%程度被うくらいの細胞数になるように、前日に植え継ぎを行った ( $2 \times 10^5$  cells/35-mm well)。レポータープラスミド (1  $\mu$ g) は内部対照用のプラスミドベクター pSV- $\beta$ GAL (1  $\mu$ g) とともに細胞に導入した。遺伝子導入した細胞は、48時間培養した後、細胞融解液 (Boehringer Mannheim) に懸濁して培養ディッシュから回収し、凍結-融解を一度行うことにより破壊して、生成されたタンパク質を酵素活性の測定に供した。遺伝子導入効率は、pSV- $\beta$ GAL 由来の $\beta$ ガラクトシダーゼの活性を測定することにより推定し、標準化した。遺伝子導入実験は最低3回繰り返して行った。

## 5. 3 ルシフェラーゼアッセイと $\beta$ GALアッセイ

ルシフェラーゼの酵素活性の測定には、Luciferase Reporter Gene Assay (Boehringer Mannheim) を使用した。 $\beta$ ガラクトシダーゼの酵素活性の測定には、 $\beta$ -Gal Reporter Gene Assay (Boehringer Mannheim) を使用した。各測定は、Lumat LB9501 (Berthord) を用い、最低3回繰り返して行った。

### 第3節 結果

#### 1. ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子のクローニング

ニワトリSF-1/Ad4BP cDNA (OR2.1) の1.6 kbの *Nco*I 断片をプローブとして、ニワトリ・ゲノミックライブラリーをスクリーニングしたところ、約60万のクローンから5つの陽性クローン (1-6-1、1-7-1、1-7-2、1-11-2、1-12-1) を得ることができた (Fig. 17)。インサートDNAを制限酵素 *Bam* HI および *Sal* I で切断した後、3つの *Bam* HI 断片と2つの *Bam* HI/*Sal* I 断片をサブクローニングし、その部分塩基配列を決定したところ、これらの断片には、ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子の第1エクソンを除く6つのエクソン (第2~第7エクソン) が含まれることがわかった (Fig. 17)。さらに、第1エクソンを含む5' 上流領域をクローニングするため、ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子の第2、第3エクソンを含む3.0 kbの *Sal* I/*Bam* HI 断片をプローブにして、ニワトリ・ゲノミックライブラリーをスクリーニングしたところ、約60万のクローンから4つの陽性クローン (2-1-1、2-6-1、2-11-1、2-11-2) を得ることができた (Fig. 17)。インサートDNAを制限酵素 *Bam* HI および *Sal* I で切断した後、サザンブロットィングを行ったところ、これらのうち2つのクローン (2-6-1、2-11-1) に第1エクソンを含む5' 上流領域が含まれることがわかった (Fig. 17)。

エクソンを含む全ての塩基配列を決定したところ、ニワトリのSF-1/Ad4BP遺伝子は、哺乳類のSF-1/Ad4BP遺伝子と同様に7つのエクソンからなっており、それらは約15 kbの領域に渡っていた (Fig. 17, 18)。エクソン-イントロン構造は、哺乳類のそれと一致しており、6カ所のスプライシングドナー部位およびアクセプター部位は、全て「GT-AGルール (Mount, 1982)」に従っていた (Fig. 18)。

#### 2. ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子の転写開始点の決定

ニワトリSF-1/Ad4BPのcDNA (OR2.1) は、ニワトリ6日胚のポリ(A)<sup>+</sup>RNAをもとにRT-PCRおよびRACEによりクローニングされたが (Kudo and Sutou, 1997、本研究第3章)、その正確な転写開始点を確定するため、主要な発現部位であるステロイド産生器官 (副腎、卵巣、および精巣) のポリ(A)<sup>+</sup>RNAをもとに5' RACEを行った。増幅された主要なPCR産物の大きさは、器官により異なった。副腎では、解析したほとんどのクローン (22クローン中17クローン) が、第1エクソンのスプライシングドナー部位から115 bp上流のAまでを含んでいた (Fig. 19)。これは、ニワトリ6日胚のポリ(A)<sup>+</sup>RNAをもとに行った5' RACEで認められた転写開始点(G)の4塩基下流であった。また、第1エクソンのスプライシングドナー部位から172 bp上流のCまでを含むクローン

が2クローン存在した。卵巣では、解析したほとんどのクローン(29クローン中28クローン)が、第1エクソンのスプライシングドナー部位から117 bp上流のGと109 bp上流のGとの間までを含んでいた(Fig. 19)。一方、精巣では、解析した全てのクローン(12クローン)が、第1エクソンのスプライシングドナー部位から4 bp上流のCまたは3 bp上流のGまでしか含んでいなかった(Fig. 19)。

RT-PCRにより、ニワトリ6日胚およびステロイド産生器官(副腎、卵巣、精巣)で発現するSF-1/Ad4BP mRNAの5'非翻訳領域(5'UTR)の増幅を行った(Fig. 20)。OR21-5およびOR21-10を用いた増幅(第3エクソンから第1エクソンのスプライシングドナー部位の102 bp上流のAまでを増幅)では、解析した全ての器官で特異的な増幅産物が確認できた(Fig. 20)。さらに、OR21-5およびOR21-13を用いた増幅(第3エクソンから第1エクソンのスプライシングドナー部位の157 bp上流のCまでを増幅)でも、解析した全ての器官で特異的な増幅産物を確認することができたが、6日胚での増幅産物は痕跡量程度であった(Fig. 20)。

### 3. ニワトリ卵巣由来細胞の特性

ニワトリ卵巣から初代培養した細胞の特性を調べるため、RT-PCRによりアロマターゼ遺伝子およびSF-1/Ad4BP遺伝子の発現を確認した。37℃で30分間のコラゲナーゼ処理により得られた細胞(chicken ovary-derived cell 1、以降COV1と略す)では、SF-1/Ad4BP遺伝子の発現は確認できたものの、アロマターゼ遺伝子の発現は確認できなかった(Fig. 21)。一方、4℃で一晩(16時間)のコラゲナーゼ処理により得られた細胞(chicken ovary-derived cell 2、以降COV2と略す)では、SF-1/Ad4BP遺伝子の発現はやや弱いものの、アロマターゼ遺伝子の発現が確認できた(Fig. 21)。

### 4. ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子のプロモーター解析

ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子のプロモーター領域の機能を解析するため、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして、ニワトリ卵巣由来細胞(COV1、COV2)およびNIH3T3細胞への一過的な遺伝子導入を行った。実験毎の遺伝子導入効率の補正は、内部対照として同時に導入したβガラクトシダーゼ遺伝子の発現をもとに行い、プロモーター活性は、陽性対照であるSV40プロモーターによるルシフェラーゼ遺伝子の発現に対する相対値として表した。

ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子のプロモーター領域は、副腎での主要な転写開始点と考えられる第1エクソンのスプライシングドナー部位より115 bp上流のA(以降これを+1とする)から約2.5 kb上流までを基本クローン(PGV-B-SF1)

とし、順次5'上流領域を欠失させたクローンについて検討を行った (Fig. 22)。ニワトリSF-1/A d 4 B P 遺伝子は約 2.5 kb の5'上流領域で、ニワトリ卵巣由来細胞においては十分なプロモーター活性を有していた。5'上流領域を-1122まで末端欠失させるとそのプロモーター活性は少し増加し、-966から-750までの末端欠失ではその活性は約半分まで減少した。-198から-153まで末端欠失させるとその活性はさらに約半分まで減少するものの、さらに-138まで末端欠失させるとプロモーター活性は-195で示した値まで増加し回復した。5'上流領域を-86まで末端欠失させると、そのプロモーター活性はほぼ完全に失われてしまった。ニワトリ卵巣で確認されたものより上流の転写開始点 (第1エクソンのスプライシングドナー部位から172 bp上流のC) についてその機能を確認するために、-56から-1までを介在欠失させると、そのプロモーター活性は著しく減少した。こうした傾向は、COV 1細胞でもCOV 2細胞でも同様に認められた。非ステロイド産生細胞であるNIH 3 T 3細胞では、-198から-153まで末端欠失させた場合に、プロモーター活性の著しい減少が認められた (Fig. 22)。しかしながら、NIH 3 T 3細胞で認められたニワトリSF-1/A d 4 B P 遺伝子のプロモーター活性は全体として、ニワトリ卵巣由来細胞 (COV 1細胞およびCOV 2細胞) で認められた活性の10分の1に過ぎなかった。

## 第4節 論議

### 1. ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子

SF-1/Ad4BP遺伝子は、哺乳類（マウス、ラット、ヒト）でのみその遺伝子構造が決定されているが、それらは全て6つのイントロンを含む7つのエクソンからなっており、全長は約15 kbに渡っている (Ikeda *et al.*, 1993, Nomura *et al.*, 1995, Oba *et al.*, 1996)。今回決定したニワトリのSF-1/Ad4BP遺伝子もそれらと同様に、6つのイントロンを含む7つのエクソンという遺伝子構造を有していた。第1エクソンは5' UTRのみからなり、アミノ酸コード領域は第2～第7エクソンに含まれていた (Fig. 17)。

齧歯類（マウス、ラット）のSF-1/Ad4BP遺伝子は、2つの異なった転写産物すなわち、SF-1/Ad4BPおよびELPをオルタナティブな転写開始点の使用とスプライシングにより産生することが知られている (Ikeda *et al.*, 1993, Nomura *et al.*, 1995)。ELPは、SF-1/Ad4BP遺伝子の第1イントロン中に存在する転写開始点から転写され、SF-1/Ad4BPの翻訳開始コドンより231 bp上流のメチオニンコドンから翻訳されることにより、SF-1/Ad4BPより77 aa長いアミノ末端を有している。さらに、第6エクソン以降の転写はされず、第5イントロン中に存在する翻訳停止コドンで翻訳が止まることにより、SF-1/Ad4BPより74 aa（マウス）もしくは107 aa（ラット）短いタンパク質が産生されるとされている。しかしながら、ELPはマウスのEC細胞においてはタンパク質の存在が確認されているものの、生体内においてはRT-PCRで特異的な転写産物の存在が示唆されている程度であり (Morohashi *et al.*, 1994)、現在のところ生理的な条件下での存在については否定的な見解が多い。一方、ヒトのSF-1/Ad4BP遺伝子では、齧歯類（マウス、ラット）のSF-1/Ad4BP遺伝子にみられたELPの翻訳開始コドンに相当するメチオニンコドンは確認されず、また、ELPのカルボキシ末端のアミノ酸配列についても類似性は認められなかった。これは、ニワトリのSF-1/Ad4BP遺伝子についても同様であり、ニワトリのELPをコードしていると推測できる塩基配列は確認できなかった (Fig. 18, 23)。こうした点から、ELPはマウスのEC細胞でのみ発現する、副次的なタンパク質である可能性が強く示唆される。

齧歯類（ラット、マウス）においては、SF-1/Ad4BP遺伝子の第1イントロン内、第1エクソンの直後にSF-1/Ad4BPの認識配列であるAd4配列 (CAAGGTCA) に類似の配列 **GAAGGCCG** が認められる (Ikeda *et al.*, 1993, Nomura *et al.*, 1995)。ラットにおいては、SF-1/Ad4BP自身がこの配列に作用することにより自らの転写を活性化させ、結果的にオートレギュラトリーループができることが示唆されている (Nomura *et al.*, 1996)。ところが、マウスにおいてはこ

の配列がSF-1/Ad4BP遺伝子の転写活性化には何ら寄与しないとされている (Woodson *et al.*, 1997)。ヒトのSF-1/Ad4BP遺伝子の相当する位置の塩基配列は、**GAGGGCCT**となっており、Ad4配列とはかなり異なっている。これは、ニワトリのSF-1/Ad4BP遺伝子についても同様であり、オートレギュラトリーループの存在を示唆するような配列は認められなかった (Fig. 18)。

## 2. ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子の転写開始部位

哺乳類 (マウス、ラット、ヒト) のSF-1/Ad4BP遺伝子のプロモーター領域には、基本転写エレメントであるTATAボックスが存在しないのが特徴の一つである (Woodson *et al.*, 1997, Nomura *et al.*, 1995, Oba *et al.*, 1996)。真核生物においては、タンパク質をコードする遺伝子はRNAポリメラーゼII (Pol II) によって転写されるが、TATAボックスはPol II系のプロモーターの多くで、-30付近に認められる配列 (TATAAA) である。ハウスキーピング遺伝子など、どこでも発現する遺伝子では、TATAボックスを持たないプロモーターも認められるが、この場合、-30から-50にかけてGCボックスが存在している。今回クローニングしたニワトリのSF-1/Ad4BP遺伝子の5'上流領域には典型的なTATAボックス配列が存在しており、その配列が実際に機能的なものであるかどうかを推測するためには、SF-1/Ad4BP遺伝子の転写開始点を確定することが不可欠である。SF-1/Ad4BP遺伝子の主要な発現部位である副腎、卵巣、精巣における転写開始点を、5' RACEにより確認したところ、各々の器官で異なる転写開始点を示唆する結果が得られた (Fig. 19)。副腎および卵巣では、以前にニワトリ6日胚で確認された転写開始点 (第1エクソンのスプライシングドナー部位から119 bp 上流のG) とほぼ同様の場所が主要な転写開始点として同定された。実際にここが主要な転写開始点であるとする、その約25 bp 上流に典型的なTATAボックスが存在することになり、鳥類においては哺乳類のSF-1/Ad4BP遺伝子とは異なる転写調節機構を有していることが示唆される。しかしながら、副腎ではこれよりさらに上流にマイナーな転写開始点が存在することが示唆されており、ここが主要な転写開始点であるとする、その上流には典型的なTATAボックスは存在せず (前出のTATAボックスは5' UTRに含まれる)、哺乳類と同様の転写調節機構が存在すると考えることができる。一方、精巣においてはそれらよりはるかに下流の場所から転写が起こっていることを示唆する結果が得られており、これもまた別の転写調節機構の可能性を示している。

SF-1/Ad4BPのmRNAの5' UTRをRT-PCRで確認したところ、TATAボックスの上流の転写開始点も下流の転写開始点も同様に機能していることが示唆された (Fig. 20)。これは、ニワトリ6日胚でも他の器官 (副腎、卵巣、精

巢)においても全て同様であり、TATAボックスが実際にSF-1/Ad4BP遺伝子の発現にどの程度寄与しているのかは判断することはできなかった。

### 3. ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子の転写調節領域

ニワトリのSF-1/Ad4BP遺伝子のプロモーター領域には、哺乳類(マウス、ラット、ヒト)の同遺伝子では認められない典型的なTATAボックスが存在するが、これは実際に機能しているのだろうか。今回行ったレポーター遺伝子を用いた解析では、少なくともニワトリの卵巣におけるSF-1/Ad4BP遺伝子の発現には、TATAボックスが極めて有効に機能していることが判明した(Fig. 22)。2つのレポータープラスミドPGV-B-SF1(-394)およびPGV-B-SF1(-394Δ)は、それぞれTATAボックスの下流の転写開始点(第1エクソンのスプライシングドナー部位より115 bp上流のA)および上流の転写開始点(第1エクソンのスプライシングドナー部位から172 bp上流のC)からの転写を模するように構築されている(Fig. 21)。前者が、ニワトリ卵巣由来の細胞(COV1およびCOV2)で有効に機能するのに対して、後者ではその活性が著しく低下していた。このことから、ニワトリのSF-1/Ad4BP遺伝子の主要な転写開始部位は、第1エクソンのスプライシングドナー部位より115 bp上流のA付近であり、TATAボックス(-25)が転写基本エレメントとして機能していることが強く示唆された。現在、まだ他の生物種でのSF-1/Ad4BP遺伝子のプロモーター領域の解析が十分に進んでいないため、これが、進化的にもともと存在していたTATAボックスが哺乳類の段階で欠落してしまったものなのか、あるいはもともと存在していなかったTATAボックスを鳥類が後から獲得したものであるかは推測できない。

ニワトリのSF-1/Ad4BP遺伝子の転写開始点(第1エクソンのスプライシングドナー部位より115 bp上流のA)から165 bp上流(-165)には、Eボックス(CACGTG)が存在し、その少し下流(-150)には、CCAATボックス(CCAAT)が存在するが(Fig. 18)、同様の配列は、哺乳類(マウス、ラット、ヒト)のSF-1/Ad4BP遺伝子でも確認されている(Woodson *et al.*, 1997, Nomura *et al.*, 1995, Oba *et al.*, 1996)。特にEボックスは、SF-1/Ad4BP遺伝子の組織特異的あるいは発生段階特異的な発現に重要な役割を果たしていると考えられている。マウスでは、未分化生殖線が卵巣もしくは精巣へと分化する際に、SF-1/Ad4BPが性的二型性を示す発現様式をとるが、SF-1/Ad4BP遺伝子のEボックスに特異的に結合するタンパク質もそれと同様の出現様式を示している(Nomura *et al.*, 1995)。このことから、このEボックス結合タンパク質が、哺乳類の性決定においても重要な役割を果たしているものと推測されている。また、哺乳類(マウス、ラット)においては、この配列を欠失させたり、突然変異を導入したり

すると、SF-1/Ad4BP遺伝子のプロモーター活性が著しく減少することが知られている。ニワトリのSF-1/Ad4BP遺伝子においても、この配列を欠失させることにより、そのプロモーター活性が約半分にまで減少することから、哺乳類と同様にこの配列が重要な役割を果たしていることが推測される (Fig. 19)。しかしながら、この現象は、卵巣由来の細胞 (COV1およびCOV2) のみならず、非ステロイド産生細胞であり、SF-1/Ad4BP遺伝子を発現していないNIH3T3細胞でも認められることから、このEボックスが必ずしも組織特異的な転写に寄与しているものとは考えがたい (Fig. 22)。最近、SF-1/Ad4BP遺伝子のEボックスに結合するタンパク質として、USF (upstream stimulatory factor) が同定されたが、これはユビキタスな転写因子として知られており、この配列が組織特異的な発現を制御する配列であるとする認識は必ずしも決定的でないことが判明した (Harris and Mellon, 1998)。CCAATボックスに関しては、マウスにおける解析から、CBF (CAAT-binding factor) が特異的に結合するタンパク質として同定された (Woodson *et al.*, 1997)。この配列に突然変異を導入すると、Eボックスに突然変異を導入したときと同程度のプロモーター活性の減少が認められたが、人為的にTATAボックスを導入したプロモーターでは、CCAATボックスを欠失させても、プロモーター活性の著しい減少は認められなくなった (Woodson *et al.*, 1997)。このことから推測すると、TATAボックスの存在するニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子の転写制御においては、CCAATボックスはあまり重要な役割を果たしていないとも考えられる。

さらに、ニワトリのSF-1/Ad4BP遺伝子の転写開始点から100 bp 上流 (-100) には、GAリッチ配列 (GGGAGG) が存在し、その下流 (-72) には、GCボックス (GGGCGG) が存在する (Fig. 18)。哺乳類 (マウス、ラット、ヒト) のSF-1/Ad4BP遺伝子では、ほぼ同様の位置にGAリッチ配列は存在するものの、その下流にGCボックスは認められない (Woodson *et al.*, 1997, Nomura *et al.*, 1995, Oba *et al.*, 1996)。(ヒトでは、GAリッチ配列と重なるようにしてGCボックスが存在する。) マウスにおける解析では、このGAリッチ配列に結合するタンパク質としてSp1が同定されているが、これはTATAボックスが存在しない哺乳類のSF-1/Ad4BP遺伝子においては、基本転写エレメントとして機能しているものと考えられてる (Woodson *et al.*, 1997)。ニワトリでは、このGAリッチ配列を欠失させると、SF-1/Ad4BP遺伝子のプロモーター活性がほとんど消失してしまうことから、その転写制御に極めて重要な働きを持っているものと考えられる (Fig. 22)。一方、その下流に存在するGCボックスは、Sp1の結合するコンセンサス配列として知られてるにもかかわらず、ニワトリのSF-1/Ad4BP遺伝子の転写には十分な機能を示さないことから、GAリッチ配列に作用する転写



因子がSp1以外に存在する可能性も否定できない。TATAボックスが存在するニワトリのSF-1/Ad4BP遺伝子のプロモーターでは、GAリッチ配列は哺乳類とは違った働きを担っているものと思われる。

ニワトリのSF-1/Ad4BP遺伝子のプロモーター領域でのみ、哺乳類では認められなかった特異的な転写抑制配列と思われるものが、転写開始点から140 bp上流付近に存在する。プロモーター活性の解析実験において、152 bp上流まで欠失させることにより(EおよびCCAATボックスを欠失)、約半分にまで減少した活性が、さらに138 bp上流まで欠失させることにより、再び元の活性まで回復するという現象が認められた(Fig. 22)。この領域には、何らかの転写抑制配列が存在すると推定されたが、当初この領域の配列には既知の転写抑制因子の結合配列は認められなかった。しかしながら、ごく最近、転写抑制因子DREAM (DRE-antagonist modulator)の特異的な認識配列(DRE, downstream regulatory element, GNARYYRAG)がまさにこの領域に存在することが判明した(Fig. 18)。DREAMは、ヒトのプロダイノルフィン遺伝子の転写制御に関わる位置依存性のサイレンサー配列DREに結合するタンパク質として同定され(Carrión *et al.*, 1998)、クローニングされた(Carrión *et al.*, 1999)。EFハンド型のカルシウム結合ドメインを4つ有しており、実際にカルシウム刺激により、DREAMのDNA結合能と転写抑制活性が阻害されることが示されている(Carrión *et al.*, 1999)。SF-1/Ad4BPのターゲット遺伝子の1つであるアロマターゼ遺伝子の発現は、FSHにより誘導されるが、ニワトリにおいてはこの発現誘導はカルシウム依存性であるとされている(Onagbesan and Peddie, 1989)。これらの事実から、このアロマターゼ遺伝子のカルシウムによる発現誘導は、DREAMを介したカルシウムによるSF-1/Ad4BP遺伝子の発現誘導に起因するとも考えられる。

## 第5節 要約

哺乳類のSF-1 (Steroidogenic factor-1) / Ad4BP (Ad4 binding protein) は、複数のステロイド合成酵素をはじめとして、ステロイド産生細胞の分化およびその機能維持に関わる遺伝子(群)の発現を制御する転写因子で、視床下部-脳下垂体-性腺・副腎系の分化と機能維持に不可欠な鍵因子である。さらに、生殖腺の分化に際して認められる遺伝子発現の性的二型性から、SF-1 / Ad4BPの発現制御が、哺乳類の性決定機構においても極めて重要な役割を果たしているものと考えられる。一方、鳥類のSF-1 / Ad4BPの発現においては、哺乳類で認められるのと同様の性的二型性は確認されておらず、哺乳類とは異なった転写制御機構が存在すると思われる。そこで本研究では、ニワトリSF-1 / Ad4BP遺伝子のクローニングおよびその構造決定を行うとともに、卵巣におけるプロモーター機能の解析を行った。

ニワトリのSF-1 / Ad4BP遺伝子は、哺乳類と同様に7つのエクソンからなっており、それらは約15 kbの領域に渡っていた。第1エクソンは5' UTRのみからなり、アミノ酸コード領域は第2~第7エクソンに含まれていた。齧歯類では、同遺伝子にELP (embryonal long terminal repeat-binding protein) と呼ばれるアイソフォームがコードされているが、ニワトリでは、ELPの存在を示唆するような配列は認められなかった。また、齧歯類では、Ad4配列が同遺伝子の第1イントロン内に存在し、自己発現制御を行うとされるが、ニワトリにおいては類似の配列は認められなかった。

ニワトリのSF-1 / Ad4BP遺伝子のプロモーター領域には、哺乳類の同遺伝子では存在しなかったTATAボックスが認められ、ニワトリ卵巣においては効果的に機能していることがわかった。その他には、哺乳類で認められた3つの転写制御配列(Eボックス、CCAATボックス、GARリッチ配列)が、ニワトリにおいても同様に認められた。EおよびCCAATボックスに関しては、哺乳類と同様に転写制御に重要な役割を果たしていたが、その依存度は哺乳類ほど高くはなかった。それに対して、GARリッチ配列の依存度は極めて高く、必要不可欠な配列と考えられる。また、同プロモーター領域には、GCボックスも認められるが、その機能については検証できていない。さらに、ニワトリのSF-1 / Ad4BP遺伝子のプロモーター領域にのみ認められた転写抑制配列が存在するが、これは最近発見されたCa依存性の転写抑制因子DREAM (DRE-antagonist modulator) の認識配列DRE (downstream regulatory element) と一致した。これらから、鳥類独自のSF-1 / Ad4BPの転写制御機構の存在が強く示唆された。

## 第5章 結語

鳥類の性分化において、エストロゲンは不可欠なキーファクターであり、その合成を行う酵素であるアロマターゼ遺伝子の発現は、性分化におけるキーイベントと言える。つまり、鳥類の性決定は、アロマターゼ遺伝子の発現制御により具現化されるとも考えられる。また、これは哺乳類を除く多くの脊椎動物においても同様であり、アロマターゼ遺伝子の発現制御機構には、脊椎動物の性決定機構の基本原則が存在すると考えられる。

本研究においては、鳥類のアロマターゼ遺伝子の転写調節領域の構造を解析することにより、その転写調節機構の可能性について、いくつかの知見を得た (Fig. 24)。鳥類の卵巣で機能すると考えられるプロモーターは、哺乳類の卵巣特異的プロモーターと類似しており、いくつかの転写制御配列が共通して認められた。しかしながら、初期発生におけるそれらの発現様式は全く異なっており、それを反映する何らかの未知の転写制御機構が、鳥類の転写調節領域には存在するものと考えられる。

また、アロマターゼ遺伝子の転写因子の一つである SF-1/Ad4BP に関して解析を行い、その初期胚および成体卵巣における機能について、いくつかの知見を得た。哺乳類の SF-1/Ad4BP は、性分化の際に雌でその発現が著しく低下することから、性決定に重要な役割を果たすとされている。しかしながら、鳥類の SF-1/Ad4BP は、未分化生殖腺から卵巣および精巣が分化し始める時期、すなわち、雌でのみアロマターゼ遺伝子の発現が認められる時期で、大きな発現の差は認められなかった。このことから、この時期のアロマターゼ遺伝子の雌特異的な発現には、SF-1/Ad4BP 以外の転写制御因子が重要な役割を果たしていることが示唆された。また、ニワトリ成体におけるアロマターゼ遺伝子の発現と SF-1/Ad4BP 遺伝子の発現には、その発現量に相関が認められなかった。さらに、予備的な実験として、アロマターゼ遺伝子の転写調節領域を、SF-1/Ad4BP で活性化させることを試みたが、SF-1/Ad4BP のみではアロマターゼ遺伝子を活性化することは出来なかった (データ示さず)。これらの事実は、鳥類のアロマターゼ遺伝子の発現には、SF-1/Ad4BP 以外の転写制御因子が必要であることを強く示唆している (Fig. 25)。

さらに、SF-1/Ad4BP 遺伝子に関して解析を試み、その発現調節について、いくつかの知見を得た (Fig. 26)。鳥類のプロモーターは、哺乳類のプロモーターと同様の転写制御配列を含んでいたが、さらにいくつかの特徴的な配列を含んでいた。哺乳類では認められなかった TATA ボックスの存在や、GA リッチ配列の重要性、転写抑制配列 DRE などは、鳥類の SF-1/Ad4BP 遺伝子が、哺乳類とは明らかに異なった転写制御を受けていることを示唆している。

本研究により、哺乳類および鳥類のアロマターゼ遺伝子の発現制御領域の構造的

な違いや、転写制御因子 SF-1 / Ad4BP の発現様式の違いに関する知見は得られたが、それらの違いと鳥類の性分化を促す機構との関係については、十分な知見を得ることが出来なかった。それこそが、まさに鳥類の性決定機構の本質となる部分であり、これを解明することにより、鳥類の性決定遺伝子を同定することが可能になるものと思われる。

この論文をまとめるにあたりましては、東北大学大学院理学研究科分子細胞発生生物学専攻の先生方、特に先生方のご指導を頂戴しました。伊藤ハム株式会社中央研究所長・研究主任佐藤博樹博士にも心より感謝いたします。お世話になりました。同研究室（旧第4研究室）の皆さんにも感謝いたします。

分子生物学の基本的な手法、手法は多く、先生方に関する知識は、東北大学および東北大学大学院在学中に得たものです。ご指導いただきまして、東北大学理学部生物学専攻動物発生生物学専攻の内村尚博博士および元同期生山本博樹博士（現東北大学大学院理学研究科分子細胞発生生物学専攻助教授）にも心より感謝いたします。また、山本博樹博士には、本論文のまとめるにあたり大変なご指導、ご指導を頂戴しました。相模原市実業大学にも感謝いたします。

細胞への遺伝子導入等の手法、手法は、東北大学理学部研究科在学中に習得したものです。お世話になりました。元東北大学理学部研究科分子生物学専攻助教新井新一郎博士（現同所長）および元同専攻助教野村正明博士（現株式会社ヘリックス研究所専任研究員）にも心より感謝いたします。分子生物学研究部（現分子細胞発生生物学専攻）の皆さんにも感謝いたします。

本研究分野の中心人物の一人である岡崎真司先生（現東北大学理学部研究科助教）先生には、大変なご指導と貴方、共同研究の機会を頂戴いただきました。佐藤博樹博士のご指導のおかげで、本論文の一区画は進行出来なかったものと思っております。心より感謝いたします。

本論文をまとめるにあたりましては、東北大学大学院理学研究科分子細胞発生生物学専攻専攻生物学専攻教授佐藤尚樹博士ならびに東北大学大学院理学研究科分子細胞発生生物学専攻動物発生生物学専攻専任助教授佐藤尚樹博士にも大変なご指導、ご指導を頂戴しました。心より感謝いたします。

最後に、本研究を行う機会を頂戴しました。伊藤ハム株式会社社長伊藤新一代取締役、ならびに同中央研究所長中村尚博教授にも心より感謝いたします。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導、ご助言、ご協力いただきました沢山の方々に、深く感謝いたします。

最初に、本研究を行うきっかけを与えていただきました、元伊藤ハム株式会社中央研究所第4研究室室長須藤鎮世博士に心より感謝いたします。須藤鎮世博士のご指導とご尽力がなければ、本研究を始めることもできなかったものと思っております。また、その後の本研究の継続をご支援いただきました、伊藤ハム株式会社中央研究所第3研究室室長佐藤静治博士にも心より感謝いたします。お世話になりました、同第3研究室（旧第4研究室）の皆様方にも感謝いたします。

分子生物学の基本的な手技、手法の多くと、発生遺伝学に関する知識は、東北大学および東北大学大学院在学中に習得したものです。ご指導いただきました、元東北大学理学部生物学教室動物発生学講座教授竹内拓司博士および元同助手山本博章博士（現東北大学大学院理学研究科分子細胞生物学講座発生生物学分野助教授）に心から感謝いたします。また、山本博章博士には、本論文をまとめるにあたり貴重なご助言、ご指導を頂きました。旧竹内研究室の皆様方にも感謝いたします。

細胞への遺伝子導入等の手技、手法は、東京大学医科学研究所在学中に習得したものです。お世話になりました、元東京大学医科学研究所分子生物学研究部教授新井賢一博士（現同所長）および元同教務技官村松正明博士（現株式会社ヘリックス研究所部長研究員）に心より感謝いたします。旧分子生物学研究部（現分子細胞制御部）の皆様方にも感謝いたします。

本研究分野の中心人物の一人である岡崎共同研究機構基礎生物学研究所教授諸橋憲一郎博士には、貴重なご助言を頂き、共同研究の機会を与えていただきました。諸橋憲一郎博士のご協力がなければ、本研究の一部は遂行出来なかったものと思っております。心より感謝いたします。

本論文をまとめるにあたりましては、東北大学大学院理学研究科分子細胞生物学講座発生生物学分野教授井出宏之博士ならびに東北大学大学院理学研究科分子細胞生物学講座細胞生物学分野教渡辺疆博士に貴重なご助言、ご指導を頂きました。深く感謝いたします。

最後に、本研究を行う機会を与えて頂きました、伊藤ハム株式会社社長伊藤研一代表取締役、ならびに同中央研究所所長中村豊郎取締役へ深く感謝いたします。

## 引用文献

- Andrews, J. E., Smith, C. A., Sinclair, A. H. (1997) Sites of estrogen receptor and aromatase expression in the chicken embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108, 182-190.
- Baverstock, P. R., Adams, M., Polkinghorne, R., W., Gelder, M. (1982) A sex-linked enzyme in birds: Z-chromosome conservation but no dosage compensation. *Nature* 296, 763-766.
- Bitgood, J. J., Shoffner, R. N. (1990) Cytology and cytogenetics, in Crawford, R. D. (ed): *Poultry Breeding and Genetics* (Elsevier Science, Amsterdam), 401-427.
- Call, K. M., Glaser, T., Ito, C. Y., Buckler, A. J., Pelletier, J., Haber, D. A., Rose, E. A., Kral, A., Yeager, H., Lewis, W. H. (1990) Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60, 509-520.
- Cammas, F. M., Pullinger, G. D., Barker, S., Clark, A. J. L. (1997) The mouse adenocorticotropin receptor gene: cloning and characterization of its promoter and evidence for a role for the orphan receptor steroidogenic factor 1. *Mol. Endocrinol.* 11, 867-876.
- Carlone, D. L., Richards, J. S. (1997) Functional interactions, phosphorylation, and levels of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-regulatory element binding protein and steroidogenic factor-1 mediate hormone-regulated and constitutive expression of aromatase in gonadal cells. *Mol. Endocrinol.* 11, 292-304.
- Carrión, A. M., Mellstöm, B., Naranjo, J. R. (1998) PKA-dependent depression of the human prodynorphin gene via differential binding to an intragenic silence element. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6921-6929.
- Carrión, A. M., Link, W. A., Ledo, F., Mellstöm, B., Naranjo, J. R. (1999) DREAM is Ca<sup>2+</sup>-regulated transcriptional repressor. *Nature* 398, 80-84.
- Chang, C., Kokontis, J., Liao, S., Chang, Y. (1989) Isolation and characterization of human TR3 receptor: a member of steroid receptor superfamily. *34*, 391-395.
- Corbin, C. J., Graham-Lorence, S., McPhaul, M. J., Mason, J. I., Mendelson, C. R., Simpson, E. R. (1988) Isolation of a full-length cDNA insert encoding human aromatase system cytochrome P-450 and its expression in nonsteroidogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8948-8952.
- Coriat, A. -M., Müller U., Harry, J. L., Uwanogho, D., Sharpe, P. T. (1993) PCR amplification of *SRY*-related gene sequences reveals evolutionary conservation of the *SRY*-box motif. *PCR Meth. Appl.* 2, 218-222.
- Cowan, J., Wibbels, T. (1999) Cloning and developmental expression of steroidogenic factor 1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. unpublished and submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank as accession number AF033833.

- Crawford, P. A., Sadovsky, Y., Milbrandt, J. (1997) Nuclear receptor steroidogenic factor 1 directs embryonic stem cells toward the steroidogenic lineage. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3997-4006.
- de Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., Scherer, G., Poulat, F., Berta, P. (1998) Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and Steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6653-6665.
- Elbrecht, A., Smith, R. G. (1992) Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* 255, 267-270.
- Ellinger-Ziegelbauer, H., Hihi, A. K., Laudet, V., Keller, H., Wahli, W. and Dreyer, C. (1994) FTZ-F1-related orphan receptors in *Xenopus laevis*: Transcriptional regulators differentially expressed during early embryogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2786-2797.
- Escriva, H., Safi, R., Hänni, C., Langlois, M. -C., Saumitou-Laprade, P., Stehelin, D., Capron, A., Pierce, R., Laudet, V. (1997) Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8603-6808.
- Evans, R. M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
- Fisher, C. R., Graves, K. H., Parlow, A. F., Simpson, E. R. (1998) Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6965-6970.
- Fitzpatrick, S. L., Richards, J. S. (1991) Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. *Endocrinology* 129, 1452-1462.
- Fitzpatrick, S. L., Richards, J. S. (1994) Identification of a cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-response element in the rat aromatase promoter that is required for transcriptional activation in rat granulosa cells and R2C Leydig cells. *Mol. Endocrinol.* 8, 1309-1319.
- Forman, B. M., Goode, E., Chen, J., Oro, A. E., Bradley, D. J., Perlmann, T., Noonan, D. J., Burka, L. T., McMorris, T., Lamph, W. W., Evans, R. M., Weinberger, C. (1995) Identification of a nuclear receptor that activated by farnesol metabolites. *Cell* 81, 687-693.
- Freedman, L. (1992) Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocrine Rev.* 13, 129-145.
- Galarneau, L., Pare, J. F., Allard, D., Hamel, D., Levesque, L., Tugwood, J.D., Green, S. and Belanger, L. (1996) The  $\alpha$ 1-fetoprotein locus is activated by a nuclear receptor of the *Drosophila* FTZ-F1 family. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3853-3865.

- Gessler, M., Pouska, A., Cavenee, W., Neve, R. L., Orkin, S. H., Bruns, G. A. (1990) Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343, 774-778.
- Giguère, V., Ong, E. S., Segui, P., Evans, R. M. (1987) Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330, 624-629.
- Glass, C. K. (1994) Differential recognition of target gene by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocrine Rev.* 15, 391-407.
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J. -M., Argos, P., Chambon, P. (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134-139.
- Green, S., Chambon, P. (1988) Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.* 4, 309-314.
- Greco, T. L., Payne, A. H. (1994) Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 side-chain cleavage, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/C<sub>17-20</sub>lyase, and P450 aromatase in fetal mouse gonads. *Endocrinology* 135, 262-268.
- Griffiths, R. (1991) The isolation of conserved DNA sequences related to the human sex-determining region Y gene from the lesser black-backed gull (*Larus fuscus*). *Proc. R. Soc. Lond. B* 244, 123-128.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Münsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R. (1990) A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346, 245-250.
- Halvorson, L. M., Kaiser, U. B., Chin, W. W. (1996) Stimulation of luteinizing hormone  $\beta$  gene promoter activity by the orphan receptor, steroidogenic factor-1. *J. Biol. Chem.* 271, 6645-6650.
- Haqq, C. M., King, C. -Y., Donahoe, P. K., Weiss, M. A. (1993) SRY recognizes conserved DNA sites in sex-specific promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1097-1101.
- Haqq, C. M., King, C. -Y., Ukiyama, E., Falsafi, S., Haqq, T. N., Donahoe, P. K., Weiss, M. A. (1994) Molecular basis of mammalian sexual determination: activation of Müllerian inhibiting substance gene expression by SRY. *Science* 266, 1494-1500.
- Harada, N. (1988) Cloning of a complete cDNA encoding human aromatase: immunochemical identification and sequence analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156, 725-732.



- Harada, N., Yamada, K., Saito, K., Kibe, N., Dohmae, S., Takagi, Y. (1990) Structural characterization of the human estrogen synthetase (aromatase) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166, 365-372.
- Harada, N. (1992) A unique aromatase (P-450<sub>AROM</sub>) mRNA formed by alternative use of tissue-specific exons 1 in human skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 1001-1007.
- Harada, N., Utsumi, T., Takagi, Y. (1993) Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11312-11316.
- Harris, A. N., Mellon, P. L. (1998) The basic helix-loop-helix, leucine zipper transcription factor, USF (upstream stimulatory factor), is a key regulator of SF-1 (steroidogenic factor-1) gene expression in pituitary gonadotrope and steroidogenic cells. *Mol. Endocrinol.* 12, 714-726.
- Hatano, O., Takayama, K., Imai, T., Waterman, M. R., Takakusu, A., Omura, T., Morohashi, K. (1994) Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development. *Development* 120, 2787-2797.
- Hatano, O., Takakusu, A., Nomura, M., Morohashi, K. (1996) Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. *Gene to Cells* 1, 663-671.
- Hazel, T. G., Nathan, D. and Lau, L. F. (1988) A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8444-8448.
- Hickey, G. J., Chen, S., Besman, M. J., Shively, J. E., Hall, P. F., Gaddy-Kurten, D., Rechard, J. S. (1988) Hormonal regulation, tissue distribution, content of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid, enzyme in rat ovarian follicles, corpora lutea: relationship to estradiol biosynthesis. *Endocrinology* 122, 1426-1436.
- Hickey, G. J., Krasnow, J. S., Beattie, W. G. Richards, J. S. (1990) Aromatase cytochrome P450 in rat ovarian granulosa cells before and after luteinization: Adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent and independent regulation. Cloning and sequencing of rat aromatase cDNA and 5' genomic DNA. *Mol. Endocrinol.* 4, 3-12.
- Hinshelwood, M. M., Liu, Z., Conley, A. J., Simpson, E. R. (1995) Demonstration of tissue-specific promoters in nonprimate species that express aromatase P450 in placentae. *Biol. Reprod.* 53, 1151-1159.

- Hollenberg, A. N., Weinberger, C., Ong, E. S., Cerelli, G., Ono, A., Lebo, R., Thompson, E. B., Rosenfeld, M. G., Evans, R. M. (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635-641.
- Honda, S., Morohashi, K., Nomura, M., Takeya, H., Kitajima, M., Omura, T. (1993) Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* 268, 7494-7502.
- Honda, S., Harada, N., Takagi, Y. (1994) Novel exon 1 of the aromatase gene specific for aromatase transcripts in human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 1153-1160.
- Honda, S., Harada, N., Takagi, Y. (1996) The alternative exons 1 of the mouse aromatase cytochrome P-450 gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1305, 145-150.
- Hu, Z., Zhuang, L., Guan, X., Meng, J., Dufau, M. L. (1997) Steroidogenic factor-1 is an essential transcriptional activator for gonad-specific expression of promoter 1 for the rat prolactin receptor gene. *J. Biol. Chem.* 272, 14263-14271.
- Ikeda, Y., Lala, D.S., Luo, X., Kim, E., Moisan, M. -P., Parker, K. L. (1993) Characterization of the mouse *FTZ-F1* gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol. Endocrinol.* 7, 852-860.
- Ikeda, Y., Shen, W. -H., Ingraham, H. A. and Parker, K. L. (1994) Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol. Endocrinol.* 8, 654-662.
- Ikeda, Y., Luo, X., Abbud, R., Nilson, J. H., Parker, K. L. (1995) The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol. Endocrinol.* 9, 478-486.
- Ingraham, H. A., Lala, D. S., Ikeda, Y., Luo, X., Shen, W. -H., Nachitingal, M. W., Abbud, R., Nilson, J. H., Parker, K. L. (1994) The nuclear receptor steroidogenic factor-1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev.* 8, 2302-2312.
- Ishimura, K., Yashinaga-Hirabayashi, T., Tsuru, H., Fujita, H., Osawa, Y. (1989) Further immunocytochemical study on the localization of aromatase in the ovary of rats and mice. *Histochemistry* 90, 413-416.
- Issemann, I., Green, S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347, 645-650.
- Jonk, L. K. C., de Jonge, M. E. J., Pals, C. E. G. M., Wissink, S., Vervaart, J. M. A., Schoorlemmer, J., Kruijer, W. (1994) Cloning and expression during development of three murine members of the COUP family of nuclear orphan receptors. *Mech. Dev.* 47, 81-97.

- Kagami, H., Clark, M. E., Verrinder Gibbins, A. M., Etches, R. J. (1995) Sexual differentiation of chimeric chickens containing ZZ and ZW cells in the germline. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 379-387.
- Kawano, K., Miura, I., Morohashi, K., Takase, M., Nakamura, M. (1998) Molecular cloning and expression of the SF-1/Ad4BP gene in the frog, *rana rugosa*. *Gene* 222, 169-176.
- Kent, J., Wheatley, S. C., Andrews, J. E., Sinclair, A. h., Koopman, P. (1996) A male-specific role for *SOX9* in the vertebrate sex determination. *Development* 122, 2813-2822.
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R. (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for *SRY*. *Nature* 351, 117-121.
- Kost, T. A., Theodorakis, N. and Huges, S. H. (1983) The nucleotide sequence of the chick cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acids Res.* 11, 8287-8301.
- Kreidberg, J. A., Sariola, H., Loring, J. M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., Jaenisch, R. (1993) WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74, 679-691.
- Kudo, T., Yamamoto, H., Sato, S., Sutou, S. (1996) Comparison of 5' upstream regions of chicken and quail aromatase gene. *J. Reprod. Dev.* 42, 101-107.
- Kudo, T., Sutou, S. (1997) Molecular cloning of chicken FTZ-F1-related orphan receptors. *Gene* 197, 261-268.
- Kudo, T., Sutou, S. (1999) Structural characterization of chicken SF-1/Ad4BP gene. *Gene* 231, 33-40.
- Ladias, J. A. A., Karathanasis, S. K. (1991) Regulation of the *apolipoprotein AI* gene by ARP-1, a novel member of the steroid receptor superfamily. *Science* 2151, 561-565.
- Lala, D. S., Rice, D. A., Parker, K. L. (1992) Steroidogenic factor 1, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor 1. *Mol. Endocrinol.* 6, 1249-1258.
- Laudet, V., Hanni, C., Coll, J., Catzeflis, F., Stehelin, D. (1992) Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J.* 11, 1003-1013.
- Laudet, V., Adelmant, G. (1995) Lonesome orphans. *Curr. Biol.* 5, 124-217.
- Lavorgna, G., Ueda, H., Clos, J., Wu, C. (1991) FTZ-F, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of *fushi tarazu*. *Science* 252, 848-851.
- Law, S. W., Conneely, O. M., DeMayo, F. J., O'Malley, S. W. (1992) identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol. Endocrinol.* 6, 2129-2135.
- Li, M., Xie, Y. H., Kong, Y. Y., Wu, X., Zhu, L., Wang, Y. (1998) Cloning and characterization of a novel human hepatocyte transcription factor, hB1F, which binds and activates enhancer II of hepatitis B virus. *J. Biol. Chem.* 273, 29022-29031.

- Liu, D., Le Drean, Y., Ekker, M., Xiong, F., Hew, C. L. (1997) Teleost FTZ-F1 homolog and its splicing variant determine the expression of the salmon gonadotropin II $\beta$  subunit gene. *Mol. Endocrinol.* 11, 877-890.
- Luo, X., Ikeda, Y., Parker, K. L. (1994) A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77, 481-490.
- Lutz, B., Kuratani, S., Cooney, A. J., Wawersik, S., Tsai, S. Y., Eichele, G. and Tsai, M.-J. (1994) Developmental regulation of the orphan receptor *COUP-TFII* gene in spinal motor neurons. *Development* 120, 25-36.
- Lynch, J. P., Lala, D. S., Peluso, J. J., Luo, W., Parker, K. L., White, B. A. (1993) Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. *Mol. Endocrinol.* 7, 776-786.
- Mangelsdorf, D. J., Ong, E. S., Dyck, J. A., Evans, R. M. (1990) Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345, 224-229.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umezono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. and Evans, R.M. (1995) The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 83, 835-839.
- Matsumine, H, Herbst, M. A., Ignatius Ou, S. -H., Wilson, J. D., McPhaul, M. J. (1991) Aromatase mRNA in the extragonadal tissues of chickens with the henny-feathering trait is derived from a distinctive promoter structure that contains a segment of a retroviral long terminal repeat. *J. Biol. Chem.* 266, 19900-19907.
- McBride, D., Sang, H., Clinton, M. (1997) Expression of *Sry*-related genes in the developing genital ridge/mesonephros of the chick embryos. *J. Reprod. Fert.* 109, 59-63.
- McPhaul, M. J., Noble, J. F., Simpson, E. R., Mendelson, C. R., Wilson, J. D. (1988) The expression of a functional cDNA encoding the chicken cytochrome P-450arom (aromatase) that catalyzes the formation of estrogen from androgen. *J. Biol. Chem.* 263, 16385-16363.
- Means, G. D., Mahendroo, M. S., Corbin, C. J., Mathis, J. M., Powell, F. E., Mendelson, C. R., Simpson, E. R. (1989) Structural analysis of the gene encoding human aromatase cytochrome P-450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 264, 19385-19391.
- Means, G. D., Kilgore, M. W., Mahendroo, M. S., Mendelson, C. R., Simpson, E. R. (1991) Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human ovary and fetal tissues. *Mol. Endocrinol.* 5, 2005-2013.
- Michael, M. D., Kilgore, M. W., Morohashi, K., Simpson, E. R. (1995) Ad4BP/SF-1 regulates cyclic AMP-induced transcription from the proximal promoter (PII) of the human aromatase P450 (*CYP19*) gene in the ovary. *J. Biol. Chem.* 270, 13561-13566.

- Michael, M. D., Michael, L. F., Simpson, E. R. (1997) A CRE-like sequence that binds CREB and contributes to cAMP-dependent regulation of the proximal promoter of the human aromatase P450 (*CYP19*) gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* 134, 147-156.
- Milbrandt, J. (1988) Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* 1, 183-188.
- Miyajima, N., Kadowaki, Y., Fukushige, S., Shimizu, S., Semba, K., Yamanashi, Y., Matsubara, K., Toyoshima, K., Yamamoto, T. (1988) Identification of two novel members of erbA superfamily by molecular cloning: the gene products of the two are highly related to each other. *Nucl. Acids Res.* 16, 11057-11074.
- Morais da Silva, S., Hacker, A., Harley, V., Goodfellow, P., Swain, A., Lovell-Badge, R. (1996) Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genet.* 14, 62-68.
- Morohashi, K., Honda, S., Inomata, Y., Handa, H., Omura, T. (1992) A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s. *J. Biol. Chem.* 267, 17913-17919.
- Morohashi, K., Iida, H., Nomura, M., Hatano, O., Honda, S., Tsukiyama, T., Niwa, O., Hara, T., Takakusu, T., Shibata, Y., Omura, T. (1994) Functional difference between Ad4BP and ELP, their distributions in steroidogenic tissues. *Mol. Endocrinol.* 8, 643-653.
- Mount, S. M. (1982) A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res.* 10, 459-472.
- Murayama, K., Tsukada, T., Ohkura, N., Bandoh, S., Hosono, T., Yamaguchi, K. (1998) The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily. *Int. J. Oncol.* 12, 1237-1243.
- Nakabayashi, O., Kikuchi, H., Kikuchi, T., Mizuno, S. (1998) Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos. *J. Mol. Endocrinol.* 20, 193-202.
- Nitta, H., Osawa, Y., Bahr, A. M. (1991) Multiple steroidogenic cell populations in the thecal layers of preovulatory follicles of the chicken ovary. (1991) *Endocrinology* 129, 2033-2040.
- Nomura, M., Bartsch, S., Nawata, H., Omura, T., Morohashi, K. (1995) An E box element is required for the expression of the ad4bp gene, a mammalian homologue of ftz-f1 gene, which is essential for adrenal and gonadal development. *J. Biol. Chem.* 270, 7453-7461.
- Nomura, M., Nawata, H., Morohashi, K. (1996) Autoregulatory loop in the regulation of the mammalian ftz-f1 gene. *J. Biol. Chem.* 271, 8243-8249.
- Oba, K., Yanase, T., Nomura, M., Morohashi, K., Takayanagi, R., Nawata, H. (1996) Structural characterization of human Ad4bp (SF-1) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226, 261-267.

- Ohno, C., Petkovich, M. (1992) *FTZ-F1 $\beta$* , a novel member of the *Drosophila* nuclear receptor family. *Mech. Dev.* 40, 13-24.
- Onagbesan, O. M., Peddie, M. J. (1989) Calcium-dependent stimulation of estrogen secretion by FSH from theca cells of the domestic hen (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 75, 177-186.
- Page, D. C., Mosher, R., Simpson, E. M., Fisher, E. M., Mardon, G., Pollack, J., McGillivray, B., de la Chapelle, A., Brown, L. G. (1987) The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51, 1091-1104.
- Petkovich, M., Brand, N. J., Krust, A., Chambon, P. (1987) A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330, 444-450.
- Pilon, N., Behdjani, R., Daneau, I., Lussier, J. G., Silversides, D. W. (1998) Porcine steroidogenic factor-1 (pSF-1) expression and analysis of embryonic pig gonads during sexual differentiation. *Endocrinol.* 139, 3803-3812.
- Qiu, Y., Cooney, A. J., Kuratani, S., DeMayo, F. J., Tsai, S. Y., Tsai, M. -J. (1994) Spatiotemporal expression patterns of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors in the developing mouse central nervous system: evidence for a role in segmental patterning of the diencephalon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4451-4455.
- Qiu, Y., Krishnan, V., Pereira, F. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. -J. (1996) Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors and their regulation. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 56, 81-85.
- Rice, D. A., Mouw, A. R., Bogerd, A. M., Parker, K. L. (1991) A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes. *Mol. Endocrinol.* 5, 1552-1561.
- Sadovsky, Y., Crawford, P. A., Woodson, K. G., Polish, J. A., Clements, M. A., Tourtellotte, L. M., Simburger, K., Milbrandt, J. (1995) Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10939-10943.
- Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mole. Biol. and Evolution* 4, 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sap, J., Muñoz, A., Damm, K., Goldberg, K., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H., Vennström, B. (1986) The c-erb-A protein is a high affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324, 635-640.

- Sasano, H., Okamoto, M., Mason, J. I., Simpson, E. R., Mendelson, C. R., Sasano, N., Silverberg, S. G. (1989) Immunolocalization of aromatase, 17 $\beta$ -hydroxylase and side-chain-cleavage cytochromes P-450 in the human ovary. *J. Reprod. Fert.* 85, 163-169
- Scarce, L. M., Laz, T. M., Hazel, T. G., Lau, L. F., Taub, R. (1993) RNR-1, a nuclear receptor on the NGFI-B/Nur77 family that is rapidly induced in regenerating liver. *J. Biol. Chem.* 268, 8855-8861.
- Shen, W. -H., Moore, C. C. D., Ikeda, Y., Parker, K. L., Ingraham, H. A. (1994) Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the Müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* 77, 651-661.
- Shinoda, K., Lei, H., Yoshii, H., Nomura, M., Nagano, M., Shiba, H., Sasaki, H., Osawa, Y., Ninomiya, Y., Niwa, O., Morohashi, K., Li, E. (1995) Development defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the *Ftz-F1* disrupted mice. *Dev. Dynam.* 204, 22-29.
- Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A. -M., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P. N. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346, 240-244.
- Smith, C. A., Andrews, J. E., Sinclair, A. H. (1997) Gonadal sex differentiation in chicken embryos: expression of estrogen receptor and aromatase genes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 60, 295-302.
- Smith, C. A., Smith, M. J., Sinclair, A. H. (1999) Expression of chicken steroidogenic factor-1 during gonadal sex differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 187-196.
- Sugawara, T., Holt, J. A., Kiriakidou, M., Strauss III, J. F. (1996) Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochemistry* 35, 9052-9059.
- Takayanagi, R. (1999) Human FTZ-F1beta (human homologue 1 of mLRH-1) mRNA, complete cds. unpublished and submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank as accession number AB019246.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882.
- Toda, K., Terashima, M., Kawamoto, T., Sumimoto, H., Yokoyama, H., Kuribayashi, H., Mitsuuchi, Y., Maeda, T., Yamamoto, Y., Sagara, Y., Ikeda, H., Shizuta, Y. (1990) Structural and functional characterization of human aromatase P-450 gene. *Eur. J. Biochem.* 193, 559-565.

- Tsukiyama, T., Niwa, O., Yokoro, K. (1989) Mechanism of suppression of the long terminal repeat of Moloney leukemia virus in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 9, 4670-4676.
- Tsukiyama, T., Ueda, H., Hirose, S., Niwa, O. (1992) Embryonal long terminal repeat-binding protein is a mouse homolog of FTZ-F1, a member of the steroid receptor superfamily. *Mol. Cell. Biol.* 12, 1286-1291.
- Tugwood, J. D., Issemann, I. and Green, S. (1991) LRH-1: A nuclear hormone receptor active in the absence of exogenous ligands. unpublished and submitted to the GenBank as accession number M81385.
- Ueda, H., Sonoda, S., Brown, J. L., Scott, M. P., Wu, C. (1990) A sequence-specific DNA-binding protein that activates fushi tarazu segmentation gene expression. *Genes Dev.* 4, 624-635.
- Umesono, K., Evans, R. M. (1989) Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57, 1139-1146.
- Wachtel, S. S., Ohno, S., Koo, G. C., Boyse, E. A. (1975) Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. *Nature* 257, 235-236.
- Wang, I. -H., Tsai, S. Y., Cook, R. G., Beattie, W. G., Tsai, M. -J. O'Malley, S. W. (1989) COUP transcription factor is a member of the steroid receptor superfamily. *Nature* 340, 163-166.
- Wang, I. -H., Ing, N. H., Tsai, S. Y., O'Malley, S. W., Tsai, M. -J. (1991) The COUP-TFs compose a family of functionally related transcription factors. *Gene Express.* 1, 207-216.
- Watanabe, M., Tanaka, M., Kobayashi, D., Yoshiura, Y., Oba, Y., Nagahama, Y. (1998) Medaka FTZ-F1 potentially binds to promoter regions of P-450 aromatase gene. unpublished and submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank as accession number AB016834.
- Wehrenberg, U., Ivell, R., Jansen, M., von Goedecke, S., Walther, N. (1994) Two orphan receptors binding to a common site are involved in the regulation of the oxytocin gene in the bovine ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1440-1444.
- Weinberger, C., Thompson, C. C., Ong, E. S., Lebo, R., Gruol, D. J., Evans, R. M. (1986) The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. 324, 641-646.
- Willy, P. J., Umesono, K., Ong, E. S., Evans, R.M., Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J. (1995) LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* 9, 1033-1045.
- Wilson, T. E., Fahrner, T. J., Milbrandt, J. (1993) The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol. Cell. Biol.* 13, 5794-5804.



- Woodson, K. G., Crawford, P. A., Sadovsky, Y., Milbrandt, J. (1997) Characterization of the promoter of SF-1, an orphan nuclear receptor required for adrenal and gonadal development. *Mol. Endocrinol.* 11, 117-126.
- Wutz, J. -M., Bourguet, W., Renaud, J. -P., Vivat, V., Chambon, P. Moras, D., Gronemeyer, H. (1996) A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature Structural Biol.* 3, 87-94.
- Yamamoto, H., Kudo, T., Masuko, N., Miura, H., Sato, S., Tanaka, M., Tanaka, S., Takeuchi, S., Shibahara, S., Takeuchi, T. (1992) Phylogeny of regulatory regions of vertebrate tyrosinase genes. *Pigment Cell Res.* 5, 284-294.
- Yanase, T., Ichino, I., Oba, K. (1999) Rat FTZ-F1beta1 (rat homologue 1 of mLRH-1) mRNA, complete cds. unpublished and submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank as accession number AB012960.
- Young, M., McPhaul, M. J. (1998) A steroidogenic factor-1-binding site and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-like elements are required for the activity of the rat aromatase promoter in rat Leydig tumor cell lines. *Endocrinology* 139, 5082-5093.
- Yu, R. N., Ito, M., Saunders T. L., Camper, S. A., Jameson, J. L. (1998) Role of Arch in gonadal development and gametogenesis. *Nature Genet.* 20, 353-357.
- Zenaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T. M., Guioli, S., Guo, W., Lalli, E., Moser, C., Walker, A. P., McCabe, E. R. B., Meitinger, T., Monaco, A. P., Sassone-Corsi, P., Camerio, G. (1994) An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 372, 635-641.

Table 1

Expression profile of chicken orphan receptors in several tissues

clones	Numbers of clones			
	Adrenal gland	Ovary	Testis	6-day-old embryo
OR1.0	1	3	0	50
OR1.1	1	4	0	10
OR2.0	11	0	7	25
OR2.1	9	11	2	7
OR3.0	1	2	12	14
Total	23	10	21	101

Table 1

## Expression profile of chicken orphan receptors in several tissues

clones	Numbers of clones			
	Adrenal grand	Ovary	Testis	6-day-old embryo
OR1.0	1	3	0	50
OR1.1	1	4	0	10
OR2.0	11	0	7	25
OR2.1	9	11	2	2
OR3.0	1	2	12	14
Total	23	20	21	101



## 図と図の説明

genetic

sex

XY

female

male



Fig. 1 哺乳類の性決定

哺乳類の性決定と生殖腺の分化を模式的に示した。

genetic sex

XY

XX

male

female

testis

ovary

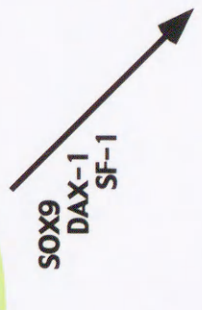
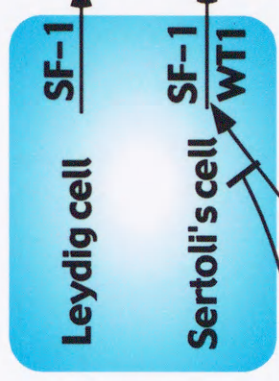




Fig. 2 鳥類の性決定

鳥類の性決定と生殖腺の分化を模式的に示した。

genetic sex

ZZ ?

genital ridge

indifferent gonad

ZW ?

male

testis



Wolffian duct

MIS

Müllerian duct

female

ovary



estrogen

MIS

Müllerian duct

SOX9

SOX9

WT1

Aromatase

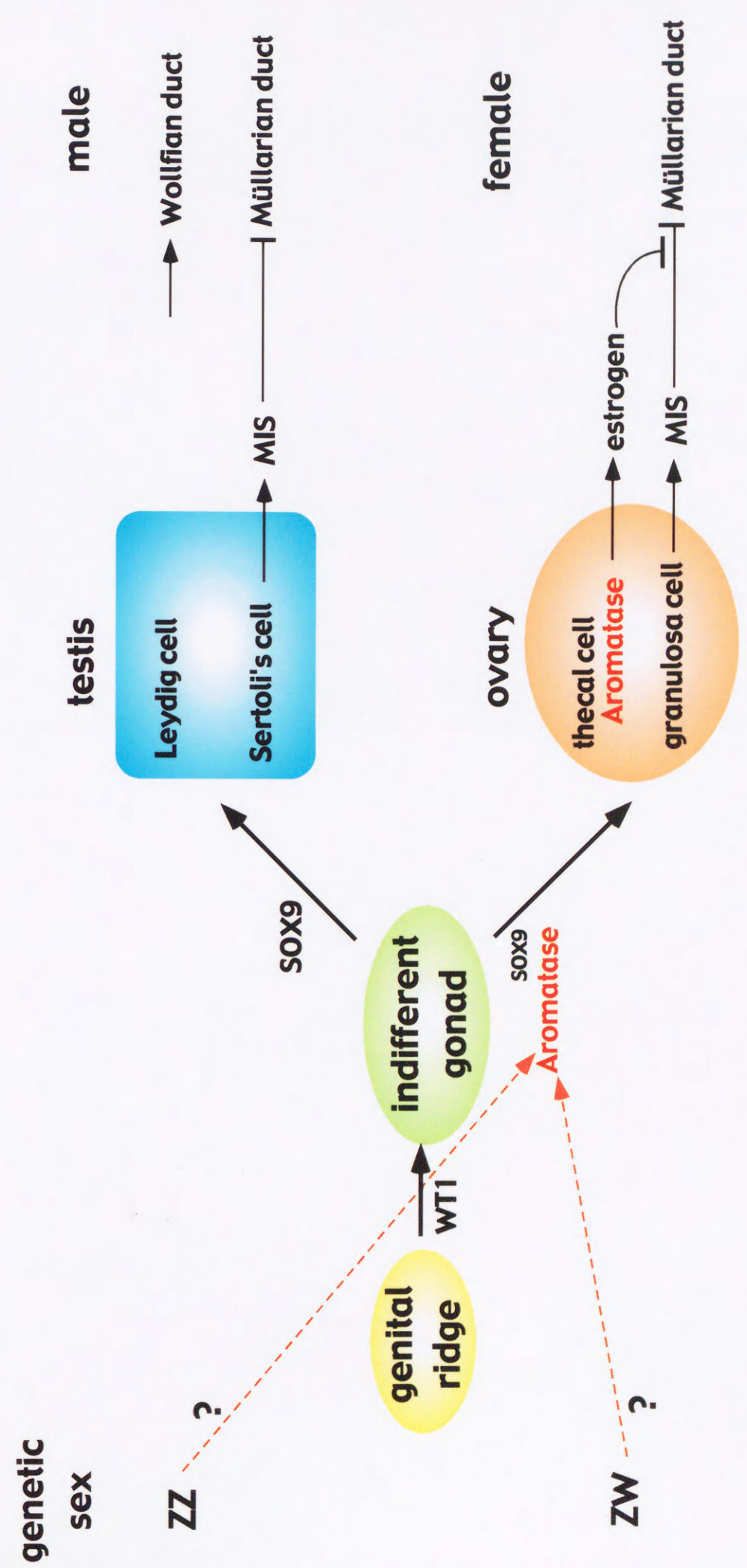


Fig. 3 ニワトリ・アロマターゼ遺伝子の塩基配列

アミノ酸コード配列は太字で示した。矢印はPCRに使用したプライマーを表す。*Eco* RI 切断部位は二重下線で示した。スプライシングドナー部位およびアクセプター部位はボックスで囲んだ。

GAATTCTTTACTGTGGAGCCCTGATCTCGTTCACTGAAACACCTTTTGCAGAGAAAAGTG 60  
 CTTAACAGGACCCAGAATTTTCTCACAGTATTTAGTCAAGTCTTAAAGAACCATGATCT 120  
 ATAGGTCCCTCTGCTGGCAGGTGCTTACAGCTGTTAAACTCTAAAATTACCTGTATGCG 180  
 TATCCAATTAATTTATGTCACAAAAGCATTTCCCTTGTAAGCTTCTTTCCCTCCACTCTCTG 240  
 ACTTTAAAAGCTTCCCTCCACCCCTTCTCCCATATAAGCAACAGTCAGAACCAACAAA 300  
 ACCTTCTTATCAGTCTTATACCTCATCCAGCTGCAAGGGAAAGAAAACCACCCACAGAAG 360  
 ATTTCAAGATCAAAGAGGCAAGAATAGTAAAAAGCTTCTTCCATGCACCTCAGCTGTGT 420  
 TCCATTTCTGCTTACTATCAAAGTTTACTTACTGAATTTTGTAGTTTTTCTTGAGTGATTT 480  
 TCTTCATAGGAAATGAGTATAAGCAGGACAAGTAGTTTCCAGCTGAAGTATTTGCAAGATGG 540  
 TTTTCCATCACCAAGCTGACTTTTCCAACAAAAAACATTTGGAAATTTCAAACCTGGA 600  
 AGTGTTCTTGGATCATGTTTATCAAATGGGGCAAAGAATTTCTCAGTACAAGTAGTGTC 660  
 AATCGCTTGTTTTAAATTCTAAGGGAGCCACATTTCTAATGCTTTGTGTGCTTCAGACA 720  
 GGTGCCAGAGTATAAAATGGATCCAAATAAAAGACAGTACCTTCACTACATTTCAATTTAC 780  
 ATGACAGTTAGGTGCAGGATATAAGAACAAGAAAGATCTAACAGTAAGGTGCACGCTGA 840  
 TGTAGCTGTCATATTATGGAGGGAAAAAATGATAAGACCATACTCTCACTAAGAAATTTGT 900  
 AAAATGAAGTCAGATCCAGAAAGAAAGTAATAAGGAAGTGAATTTATGTGCCTGAAGCAT 960  
 AGTCATTTCCATATGCTGTAAGCTCAGTGAACGGAAGTAAATAAGACCCTCTAT 1020  
 GATTCTGTCTACATATATACGTAAATAGTAACGAATAGTATTCGGTGCAATTTAAAGCTA 1080  
 GCATTTTCATTTGTATCATCATGGAAACATTACCATTAGTGTGTAGCAGTATTTATTAGT 1140  
 GGAAGTTACATACAGTTATGTGATTTTAAAGTGTCTGATTACAAGATCCTTCTTCAGG 1200  
 ACATGCATGACAGTACAACAGCTGGACACATACAGACTATGTACATATCATCACTAGAGG 1260  
 GATAGTGCTAGCTATTGGAATTGTGTGCACATTTCTGTACCTGGCATAACCATGTCTTGG 1320  
 TCAATGTGGGCCATAAAAATACACAGACTTTCATTACAATTATCCAGAATACAGGAACAT 1380  
 TACATACGCCTGCAAGGTTTTGAGCCACTGCTGCTCCTTTCAGCATGGTTTTGGTCTGTAC 1440  
 TGTAACATTTTTGCTTGAAAACACCAATTTCTCACTGTCTAGAAAGCACCTATCACATTC 1500  
 TTGGCATAGTTTAAATATGAAGATAGCACCCAGAGTTACTACAAAGTTAGCTGTTCTTTCA 1560  
 TCTGCGAGACCAAATCACAAGATAAAAGAGAGAACATTTGCTGAAAGTAAGCCCAACAAA 1620  
 AAACCTCCTATAAAGGAACTGCATCGCTGCCGGGAGGAACAAAGAAAACATTTTCCTTTT 1680  
 TCTTTGTTAGAGCAGAATTAAGAAAATGTTTTACCTTATTACAGAACAGACGAAAGCTGC 1740  
 ATCTTTCTGTGGTTATGCAAGATTTTCTCACTCACATCATCACATCCTCCTTCTTAGATG 1800  
 TTGTGATTTAAAATAAAAAAATTGGCAAAATATTTCAATGCAATCCTTCTGTGCCTGCCA 1860  
 TACATCCCAGAGCTGTCCACATGCTTCTGCTTGTCTTCCATGCTACTACCTGAAGGACC 1920  
 AGATAGTCCATGGTCACGTTTTGTTACAGTAGAAACTAATTTTCTCCAAGTATTCACCAAC 1980  
 AGAATCACCATAATTAATGCTATATATATATATATAAAAAATAATAGAATGAATATAT 2040  
 ATACATATGTTCCCTTCAAACAACTCCTGTATCTATAGCATGAAAACTAATGTAAGCTT 2100  
 TCTGGAAATTCAAGTACTAACACTAGAGGCATGCCGGACGGAAGGAGGCTAAGAAACAGA 2160  
 GATAAAAGCCCATGGGTGAACTCATTCAATGCTGCCATGTGTGGTGTGCTGAGAGTTTAA 2220  
 TTTCTTGTGTTTTGGTTAGCAATTTGCAAGGAGTAACCCTCAGTACTGGCCAGCCAAGCC 2280  
 AATGCTGGAGATGAAAGGTCTGACAGCCAAAGCATCCAAAAGCATGCTTCCATATCAAGG 2340

AROMA2

TCAGAGAAGCTTTGTTATTTCCAGCCAAAGAGTGTCTGCTGCACATCTCTTTCAACTTGT 2400  
 GATGTAACCTGTCCTGGCAAGCAGTCCAGGTCCTCATTATAAAACACAGCTACCTCA 2460

AROMA14

GAGGTAATTTGCTCATTTACAGGGCCTCCAGCAGGTTGAAAGGTACCAAGCAGATCTGAA 2520

AROMA13

CAGAACTTTGAGCTCTAAAAAACTCTGCCTCTTTTCCCCTTCTCTCTCTCCCTCTCTC 2580  
TCTCTCTAAAGCAAAGCAGAATCATTGGGAAAAGATGATACCAGAACTTTGAATCCACT 2640  
MetIleProGluThrLeuAsnProLe

AROMA1

←GGTCGGACCATGGTCTGAAC

GAACTACTTCACCAGCCTGGTACCAGACTTGATGCCAGTTGCCACAGTGCCTATCATCAT 2700  
uAsnTyrPheThrSerLeuValProAspLeuMetProValAlaThrValProIleIleIl

TCTCATCTGCTTTTCTGTTTCTAATATGGAATCATGAAGAAACATCATCAATACCAGGTAA 2760  
eLeuIleCysPheLeuPheLeuIleTrpAsnHisGluGluThrSerSerIleProG

GGTAACTCCACAGTATTGCCTAACAGCTGCCAAAGTACTTCTGTTGTTTTTCAAATTTAA 2820  
ATGAGGAGGGAATGCTGAATAATAACTGTACACAGCAAATTTTCTAATAATAATGTAGA 2880  
CATTAAAGTAATCAATGAAAGAAATCAGGCTCTATTTAGCCTTACCCACTTCCCTAACAA 2940  
ACCTGGTCTAACCATACAAATACATCATTTTGTGTTGCTTCTATTGTGTATATGCTAGAA 3000  
AGATAAAACATCATCTGACAAATTCTACACATTCATATTTTCATGTGCATTATAAATTC 3060  
TACTTTTTACGTGTTGCATGCTTAAAGCTCACTGAAGTATCTACACTGGAAACAAGCAGT 3120  
ACTATCAGGCAAATTACTTCAATTTTAGCAGATTTTGTCTTTTACAGACATTGTAGAGG 3180  
CAGGTTGAGGTTTTTCTTCTTACAGTATCCTTCTTTTAGAAA GAATTCAAAAGCCATGC 3240  
TAATTCTGTAATGTTCTCTCCACATTCTCCTTTTTGTTGTAAGGACATTTGGTGCTGTGT 3300  
TACTGTAGGTTCTAGCTGATAACTTTAAACGCTTATTAATCCTTTCTTAACTCCTATTTT 3360  
ACCATGTTGTTTTCATAAATTTACTGCCTAAAATACTCTTCCCCTAAATATCTATTTT 3420  
CTCACTCTAGTATTAATGACTAAGACAAATATAATTACATTAAGAGAGATTAAGTTAATT 3480  
ATATTTAATTATAACACAAGGATATTCAACTTTATAGGGCTATTGCCAAGATCACTCAA 3540  
TGATTCATTGAAATCACAAGTAAATCATATGCATTTGTTCCACACCACTTCTTTCCGTGT 3600  
CTAGCCATTCTTCATCCATTTGTAAGCAATCTCAAAGCAACATTTTGAAGTCGCATAAAG 3660  
AAATACTGAATTTTATTTGCAGTATTCACACTGAATGGCATGTAGGTTTTTCAGATAATA 3720  
ATGAGATTCCAGCAGTGCAGGTGCAAGTTTCTGTAAGACAAAACCTTCTGAACAGGATTTT 3780  
ATGTGGTGCCCAGTGCAAACCTTGGCCATAATGCAAAAAGGGCAATTTCCAAAGGGGTGA 3840  
TGTTTTGGTGACATATTCTTGCCTGCGAATGCTCACAAGAGAAAGCTTTTCTTATTTTTCC 3900

AROMA7

←CCTATGACGTACCCTTAACCCGGAGAG

CTCAGGGCCAGGATACTGCATGGGAATTGGGCCTCTCATTTCACATGGGAGATTTCTCTG 3960  
lyProGlyTyrCysMetGlyIleGlyProLeuIleSerHisGlyArgPheLeuTr

GATGGGAGTAGGTAATGCCTGCAACTACTACAACAAGACATATGGAGAATTTGTGAGAGT 4020  
pMetGlyValGlyAsnAlaCysAsnTyrTyrAsnLysThrTyrGlyGluPheValArgVa

TTGGATCAGCGGTGAAGAAACATTTATAATTAGCAAATAATCCTTATTTTCTATCTTCA 4080  
lTrpIleSerGlyGluGluThrPheIleIleSer

ATAATATAAAAAAGTTGTTTTTTAAACGTTGATTTAACGTTTTTGTCTGATGTAGAATTGA 4140  
AATAATTGCTTTACAAAATTATCATAACATAATCCTTTTATTCTCTGTTGTTTCACAGATC 4200  
TTTTTCTAATCTTTTGTCTTTAAAGACTCTGATATTGAGGTCTCTACTAAAGACTACC 4260  
ACTGGATGGAGTCTCTCATTTTCTAAGTGGAAAGGAACATAAAGAATTATGACCCAATCC 4320

TAAAAGATGCTTACAACCTACTATTCCATTTAGTATTAGGATGACACATTACACATGAAT 4380  
GATGATTGATTGACTTCCACGCAGCTTTAAGCCAAATTTTAGTTTCCCGTGTTAAGATTC 4440  
TCCTTCAAATGAGAGTAATGTTTGAAGATTATGGCTCCAGTTCAGAAAGGTAAATTAAGC 4500  
AAAAGCAGCATTATAGGATCATGAGTAATTCCACTGCAATTACTGAGATTACTCCTA GAA 4560  
TTC..... 4563

Fig. 4 ウズラ・アロマターゼ遺伝子の塩基配列

アミノ酸コード配列は太字で示した。*Eco* RI 切断部位は二重下線で、*Eco* RI 切断部位類似配列は破線で示した。スプライシングドナー部位およびアクセプター部位は、ボックスで囲んだ。

GAATTCTTTACTGTGAAATCCTGTTATCATTCACTAAAACACCTTTTGCAGAGAAAAGTG 60  
 CTTAACAGAATCCTGAACTTTCTCAGTGTTTCAGTCTCAAAGATCTGTGATCTATAGGTC 120  
 CCTCTGCTGGCGGGTGCTTACAGCCGTTAAGCTCTAAAATTACCTGTATGTGCTTCCAA 180  
 TTAATTTATGTCACAAAAGCATTTCCTTCTAAGCTTCTTTCCTCCCATTCTCTGGCTTTG 240  
 AAAGCTTCCTTCCATCCCCTGCTCCCGTATAAGCAACAAGCAGAACCAGCAAAAACCTCT 300  
 TATCAGACAAATACCTCATCCAGCTGCAAGGGGAAGAAAATGACCCAGAGAAGATTTCAA 360  
 GATTAAATAGGCAAGAATAGTGAAAGCTTCTTCCGTGCACCTCAGATGTGTTCCATTTCT 420  
 GCTTACTATCAAAGTTTACTTACTGAATTTTTAGTTTTTCTTGAGGGATTTTCTTCATAG 480  
 GAAATGAATATAGGCAGGACAAATAGTTCAGCTCAAGTATTTGCAAGATGATTTTCCCAT 540  
 TGCCAAGCTGACTTTCCCAACAAAAAATATTTGGAAATTCCAAACCTGGAAAGTGTTCT 600  
 TGGATTGTATTTATCAAACCGAGGCTAAGAATTTCTCAGTGCAAGTACTGTCAATTGCTT 660  
 GTTTTCAAACCTAATGGAGCCACATTTCTAATGCTTCATGTGCTTCAAATAGGTTCCAG 720  
 AGTATAAAATGGATTAAAAAAGAAAGTAGTAAGGAAAGTAGTAAGGAAGCAAACCTTATGT 780  
 GCCTTAAGCACAGCCATTTCTACAAAGCTCAGTAAAAGGAATTGGATTAGATAAGACCAC 840  
 CCTATGATTCTAGCTACATACGCACATAAGTGGTAACAAAAATAGTACTCCATACCATTT 900  
 AAAGCTAACATTTTCGCTTGTATTATTATGGAAACATTACCATTAGTGTGTAGCAGTATT 960  
 TATTGTTGAAAGTAGCACACAGTTACGTGATTTTAAAATCTTTCTGATGACAAAATTCTT 1020  
 TTTTCAGATCATGCATGACAGCACAAACAGCTGAACACATACAGAGTATGTACATATCACAA 1080  
 GAGGGATGCTGGTAGCTATTGGAACCTTTGTGCACACTTCTGTCACTTGGTACACCATGTC 1140  
 TTGGTTAACATGGACTATAAAAAATGGAAAGACTTTCATAGCAATTATCCAGAATACAGCA 1200  
 ATGTTACAAACACCTACAGGGTTTTGAGCCACTGCTGCTCCCTTCAGCATGGTTTGGTCT 1260  
 GTACTGCAAACATTTTGACTGAAAATACCAGTTTCTCTCTGTCTAGAAAGCACCTATCGC 1320  
 ATTCTTGGCATAGTTTAAATGTGATGATAGCACCCAGGGTTACTACAAAGTTAGCTGTTCT 1380  
 TTCATCTGTGAGACCAAATCACAAGATAAAAAGAGAACGCTTGCTGAAAGTAAGGCAACAG 1440  
 AAAGCTTCCTATTAAGGAACTACATTTCTCCTGGGAGGAACAAAGAAAACATTTTCTTT 1500  
 TTAGAGCAGAATTAAGAAAATGCTTTATTACCTCATTACAGAGCAGATGCAGGTAGCATC 1560  
 TTTCTCAAATCTTATGCAAAAATTTCTCACTTATATCATCACATCCTCCTTCTAATACGT 1620  
 TGTGATTTAAAATCAAAAACCTGGCAAAATATTTTCAAAGCAATCCTTCTGCTCCCCTGT 1680  
 ACATCCCAGTGCTGTCCACCTGATTACTTTCCATGCTGCTCAAAGTGCTGGCCACTACC 1740  
 TGTAGGACCAGATAATCCATAGTCGTGTTTGTATAGCAGAACTAATTTTCTCAAAGCA 1800  
 TTCACCAATAGAATCACCACAAAGAAATGCAATACTCTGTACTCCACTCAAAGGTTGACT 1860  
 ATAAAATTTATATATGTTACTTCAAACCTCTGGATCTACAACGTGAAAACTAATATAAG 1920  
 CTTTCTGGAAATTCAGTATTAATACAGGCATTATAGAGGCATTAGTAAGGCAGGAGGC 1980  
 TAAGAAACAGAGGTTAAAGCCCATGGATGAACTCATTCAATGCTTCCACGTGTGCTGAGA 2040  
 GTTTAATTTCTTGTGTTTTGGTTAGCAATTTGCAAGGGGTAACCCTCAGTACTGACCAGC 2100  
 CAAGCTAATGCTGGAGATGAAAGACCTGACAGCCAAAGCATCCAAAAGCAAGCTTCATA 2160  
 TCAAGGTCAGAGAAGTTTTGTTATTTCCAGCCAAAGAGAGTGTTTGCTGCATGTCTCTTT 2220  
 CAGCGTGTGATATAGCCTGACCTGGCAAGCAGTCCAAGTCAGTCTCGTTATAAAACACAG 2280  
 CTACCTCAGAGGTAATTTGCTCATTTACAGGGCCTCCAGCAGGTTGAAAGGTACCAAGCA 2340  
 GATCTGAATAGAGCTTTGAGCTTTTTAAAAAAAAAAAAACCTCTGCCTCTTTTCCATTCTC 2400  
 TCTCTCCCTCTGTCTAAAGCAAAGCAGAATCATTTGGAAAAG **ATGATACCAGAACTTTG** 2460

MetIleProGluThrLeu

**AATCCACTGAACTACTACACCAGCCTGGTACCAGACTTGATACCAGCTGCCACAGTGCCT** 2520  
 AsnProLeuAsnTyrTyrThrSerLeuValProAspLeuIleProAlaAlaThrValPro





Fig. 5 ニワトリおよびウズラ・アロマターゼ遺伝子の比較

(A) ニワトリおよびウズラ・アロマターゼ遺伝子の塩基配列のホモロジープロット

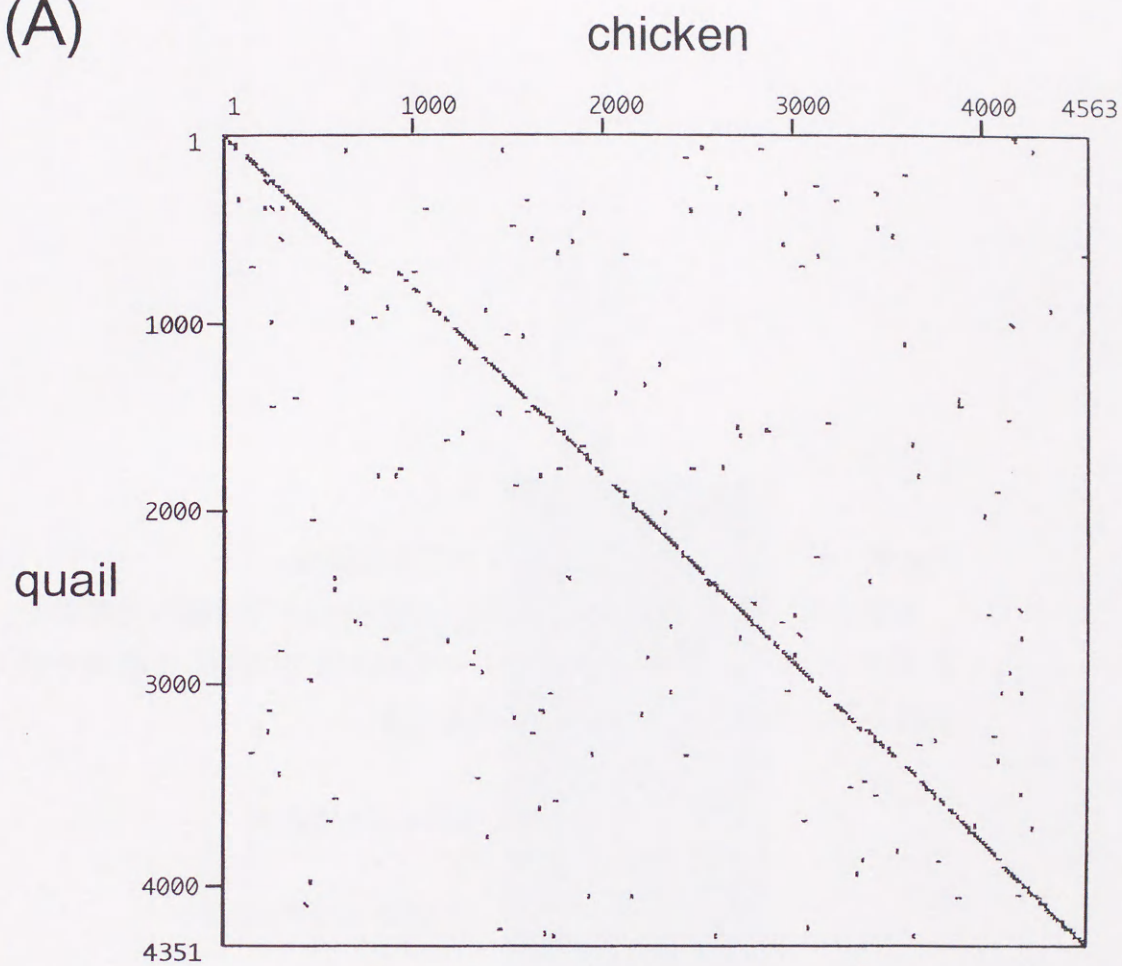
マッチングサイズは、10塩基中9塩基でプロットした。

(B) ニワトリおよびウズラ・アロマターゼ遺伝子の構造

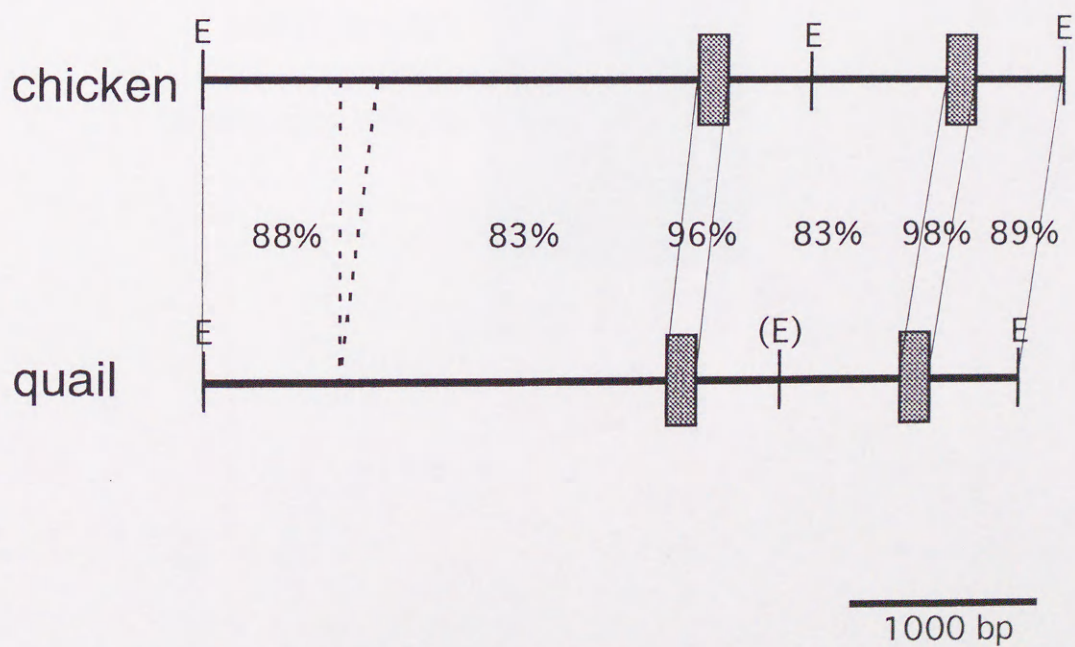
ボックスはアミノ酸コード領域を、Eは *Eco* RI 切断部位を表す。

200 bp のギャップ領域は破線で示した。パーセンテージは塩基配列の一致率を示す。

(A)



(B)



**Fig. 6 5' UTRのRT-PCRによる増幅**

左側4レーンは AROMA7 および AROMA13 で増幅した産物を、  
右側4レーンは AROMA7 および AROMA14 で増幅した産物を電気  
泳動した。矢印は増幅産物の位置を示す。

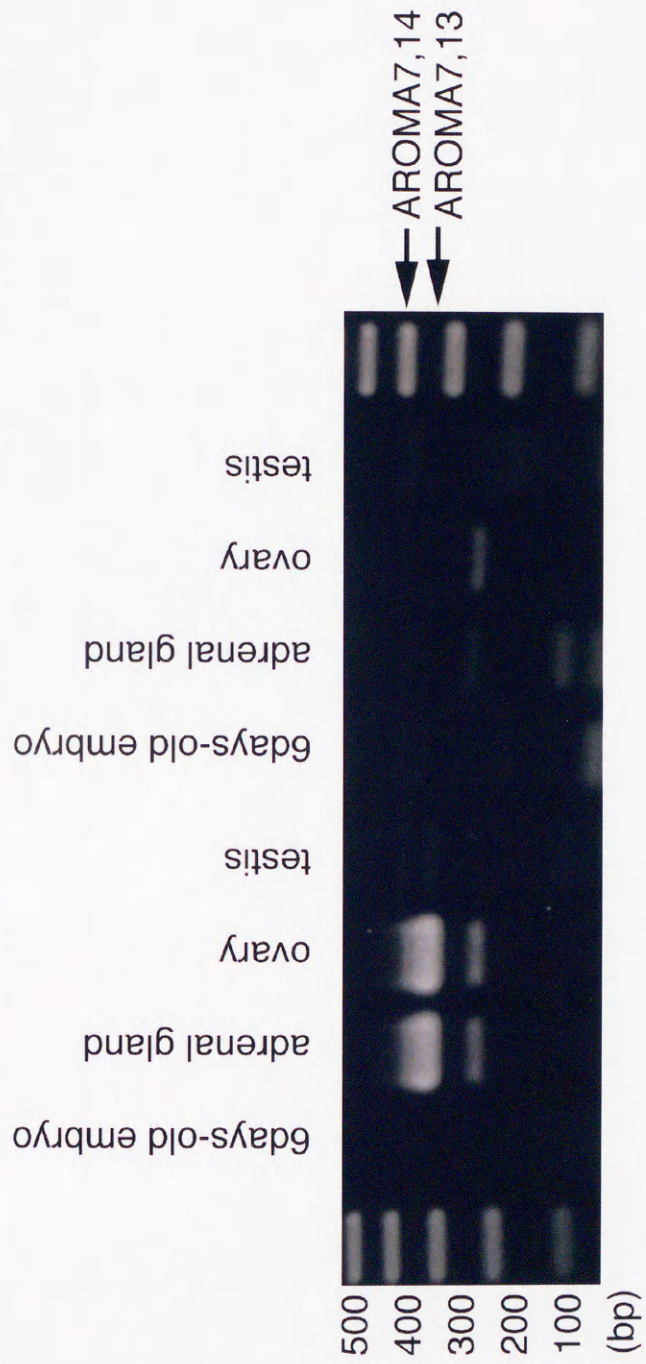


Fig. 7 鳥類アロマターゼ遺伝子のプロモーター領域

翻訳開始コドン ATG より 500 bp 上流を示した。相対的な位置は転写開始点の G を +1 として表した。( +1 ) はニワトリ 6 日胚で認められた転写開始点の G を示す。一致する塩基はドットで、欠失している塩基はダッシュで示した。ニワトリ・アロマターゼ遺伝子の上に太文字で示したのは、既知のニワトリ・アロマターゼ遺伝子の塩基配列 (Matsumine *et al.*, 1991)。主なシスエレメントはボックスで囲んだ。

**G**

chick TAA-CAC--TAGAGGCATGCCGGACGGAAGGAGGCTAAGAAACAGAGATA -311  
 quail C.GG..TTA.....T.A.T.A..C.....G.. -308

**CRE-like**                      **GT**                      **G A T**

chick AAAGCCCATGGG**TGA**ACTCATTCAATGCTGCCATGTGTGGTGTGCTGAGA -261  
 quail .....A.....T...C-----..... -263

**SRYe**

chick GTTTAATTTCT**TGTGTTTTGGTTAGCAATTGCA**AGGAGTAACCCTCAGT -211  
 quail .....G..... -213

-

chick ACTGGCCAGCCAAGCCAATGCTGGAGATGAAAGGTCTGACAGCCAAAGCA -161  
 quail ....A.....T.....AC..... -163

**Ad4**

chick TCCAAAAGCATGCTTCCATATCA**AGGTCAG**AGAAGCTTTGTTATTTCCAG -111  
 quail .....A.....T..... -113

chick CCAAAGAG--TGTCTGCTGCACATCTTTCAACTTGTGATGTAACCTGT -63  
 quail .....AG...T.....TG.....G.G.....A..G....A -63

(+1)                      **G G TATA-box**

chick CCTGGCAAGCAGTCCAGGTCACTCTCAT**TATAAAA**CACAGCTACCTCAGA -13  
 quail .....A....G....G..... -13

+1

chick GGTAATTTGCTCATTACAGGGCCTCCAGCAGGTTGAAAGGTACCAAGCA 41  
 quail ..... 41

**T G T**

chick GATCTGAACAGAACTTTGAGCTCT-AAAAA-----C-TCTGCCTCTTT 83  
 quail .....T...G.....T.T.....AAAAA.C..... 91

chick TCCCCTTCTCTCTCTCTCCCTCTCTCTCTCTCTAAAGCAAAGCAGAATCA 136  
 quail ....A.....--.....G...-----..... 132

chick TTTGGAAAAG**ATG** 149  
 quail ..... 145

**Fig. 8 核内レセプターの構造**

核内レセプターの構造を模式的に示した。A/B、C、D、E、Fは各領域を、DBDはDNA結合ドメイン、LBDはリガンド結合ドメインを示す。



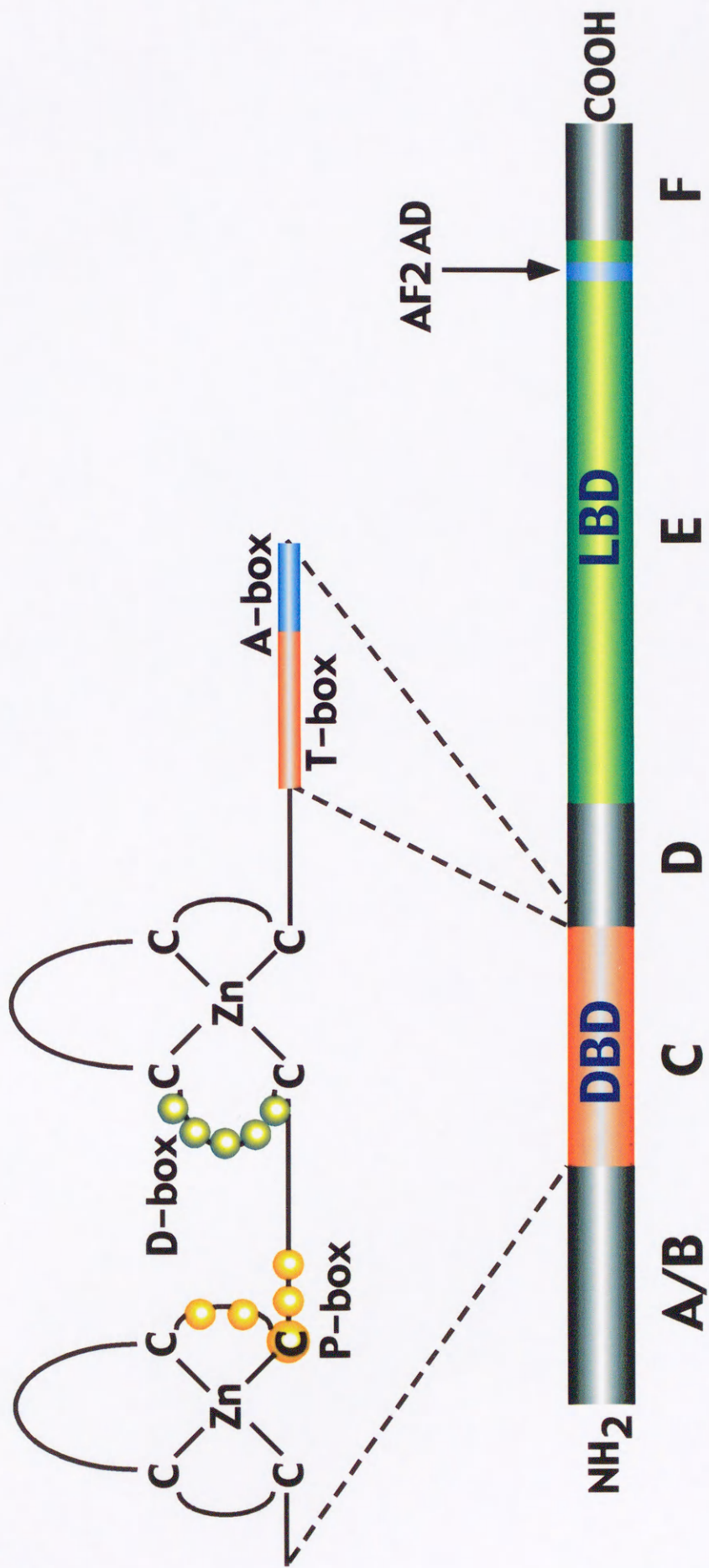


Fig. 9 各クローンの塩基配列から推定されるアミノ酸配列 (A) と既知の配列 (B) との比較

(A) では、ウシAd4BPと一致するアミノ酸残基を、(B) では、既知のオーファンレセプターと一致するアミノ酸残基をドットで示した。PおよびDボックスは、ボックスで囲んだ。保存されたシステインはアスタリスクで示した。プライマー部位は下線で示した。



Fig. 10 OR2.0 および OR2.1 の cDNA の構造

アミノ酸コード領域はボックスで示した。灰色のボックスはZnフィンガー領域を示す。RT-PCRおよびRACEに使用したプライマーは矢印で示した。ノーザンブロットィングおよび *in situ* ハイブリダイゼーションに使用したDNA断片は陰付きのボックスで示した。

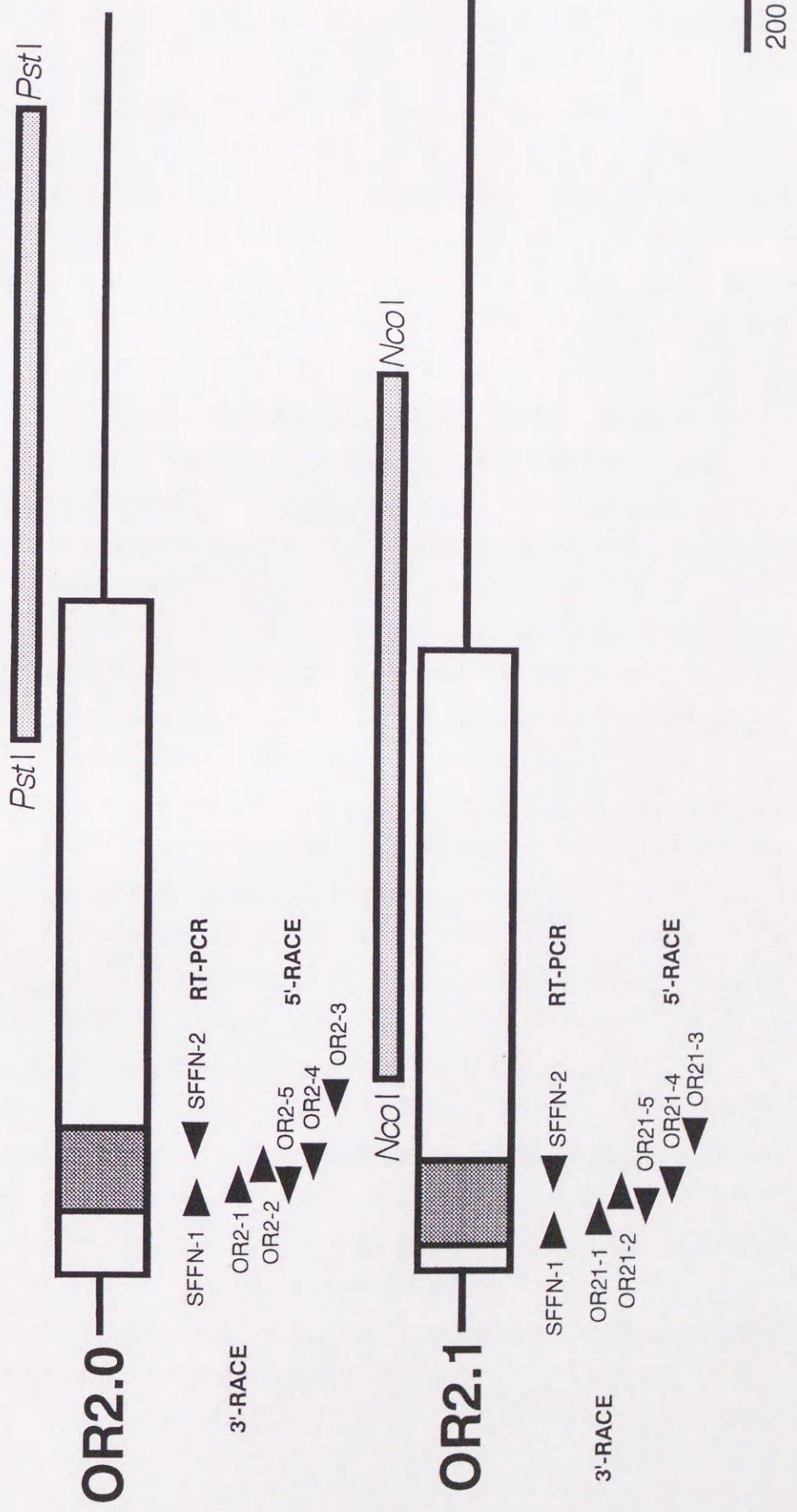


Fig. 11 OR2.0 の cDNA の塩基配列

アミノ酸コード領域は太字で、推定されるアミノ酸配列はその下に示した。Znフィンガー領域はボックスで囲み、保存されたシステインは太字で示した。ポリアデニレーションシグナルは下線で示した。

AGGAAGAAGAGGCATCGGCCGCCGAGCGCCCCACGGTCCCGCTAACCTGTGCTGCCGTG 60  
 TCCAGGTGCCGGTGCCGCGGACGGACACGGAGCCCCAGCCCGGCCCGCAGCCGCCTTGT 120  
 CATGCTGCCCAAAGTGGAGACGGAGGCCCTGGGACTCGCCCGGTCTGAATGGGGAACAGGG 180  
 MetLeuProLysValGluThrGluAlaLeuGlyLeuAlaArgSerAsnGlyGluGlnG1 (20)  
 GCAGATGCCAGAAAACATGCAAGTGTCTCAGTTTAAAATGGTGAATTACTCCTACGACGA 240  
 yGlnMetProGluAsnMetGlnValSerGlnPheLysMetValAsnTyrSerTyrAspGl (40)  
 AGACCTGGAGGAGCTGTGTCCGGTGTGCGGAGATAAGGTGTGGGGTACCACTACGGGCT 300  
 uAspLeuGluGluLeuCysProValCysGlyAspLysValSerGlyTyrHisTyrGlyLe (60)  
 GCTCACCTGCGAGAGCTGCAAGGGATTCTTTAAGCGGACCGTCCAGAACAACAAGAGGTA 360  
 uLeuThrCysGluSerCysLysGlyPhePheLysArgThrValGlnAsnAsnLysArgTy (80)  
 CACGTGTATAGAAAACCAGAACTGCCAGATTGACAAAACGCAGAGGAAGCGATGCCCTTA 420  
 rThrCysIleGluAsnGlnAsnCysGlnIleAspLysThrGlnArgLysArgCysProTy (100)  
 CTGCCGGTTCCAAAAATGCCTCAGCGTTGGAATGAAGCTAGAAGCTGTGCGAGCTGACCG 480  
 rCysArgPheGlnLysCysLeuSerValGlyMetLysLeuGluAlaValArgAlaAspAr (120)  
 AATGCGCGGCGGCAGAAACAAGTTTGGACCGATGTACAAGAGAGACAGGGCGCTGAAGCA 540  
 gMetArgGlyGlyArgAsnLysPheGlyProMetTyrLysArgAspArgAlaLeuLysGl (140)  
 GCAGAAGAAAGCTCTTATCCGAGCAAATGGACTTAACTGGAAGCCATGACTCAGGTGAT 600  
 nGlnLysLysAlaLeuIleArgAlaAsnGlyLeuLysLeuGluAlaMetThrGlnValIl (160)  
 CCAAGCTATGCCAACTGACCTGACAATATCCTCTGCGATCCAGAACATCCATTCTGCCTC 660  
 eGlnAlaMetProThrAspLeuThrIleSerSerAlaIleGlnAsnIleHisSerAlaSe (180)  
 CAAAGGCCTACCTCTGAACCATACTGCCTTGCTCCACAGACTATGACAGAAGCCCCTT 720  
 rGysGlyLeuProLeuAsnHisThrAlaLeuProProThrAspTyrAspArgSerProPh (200)  
 TGTAACCTCTCCAATTAGTATGACGATGCCACCCACGGCAGCTTGCAAGGTTACCAAAC 780  
 eValThrSerProIleSerMetThrMetProProHisGlySerLeuGlnGlyTyrGlnTh (220)  
 ATATGGCCACTTCCCAAGCCGTGCTATCAAGTCCGAGTACCCTGACCCTTACACTAGCTC 840  
 rTyrGlyHisPheProSerArgAlaIleLysSerGluTyrProAspProTyrThrSerSe (240)  
 ACCAGAGTCAATAATGGGCTACTCATACATGGATGGTTATCAAACAAGCTCACCGGCAAG 900  
 rProGluSerIleMetGlyTyrSerTyrMetAspGlyTyrGlnThrSerSerProAlaSe (260)  
 TATTCCACATCTGATATTGGAACTCCAGAAATGTGAGCCAGATGAACCACAAGTCCAAGC 960  
 rIleProHisLeuIleLeuGluLeuGlnLysCysGluProAspGluProGlnValGlnAl (280)  
 AAAGATCATGGCATACTGCAGCAAGAGCAAGCCAACAGAAGCAAGCACGAGAAGCTCAA 1020  
 aLysIleMetAlaTyrLeuGlnGlnGluGlnAlaAsnArgSerLysHisGluLysLeuAs (300)  
 CACATTTGGGCTTATGTGTAATAATGGCTGACCAAACCCTATTCTCCATCGTCGAGTGGGC 1080  
 nThrPheGlyLeuMetCysLysMetAlaAspGlnThrLeuPheSerIleValGluTrpAl (320)

TAGGAGTAGCATCTTTTTTAGAGAGCTTAAGGTTGATGACCAAATGAAGTTGCTTCAGAA 1140  
 aArgSerSerIlePhePheArgGluLeuLysValAspAspGlnMetLysLeuLeuGlnAs (340)  
 CTGCTGGAGCGAACTCTTAATTCTAGATCACATTTACCGGCAAGTGGTACACGTGAAAGA 1200  
 nCysTrpSerGluLeuLeuIleLeuAspHisIleTyrArgGlnValValHisValLysGl (360)  
 AGGCTCCATCCTTCTGGTTACCGGGCAACAAGTAGATTATTCGTAATAGCGTCACAAGC 1260  
 uGlySerIleLeuLeuValThrGlyGlnGlnValAspTyrSerValIleAlaSerGlnAl (380)  
 TGGAGCCACCCTCAACAACCTTATGAGCCATGCACAAGAACTGGTAGCAAAGCTTCGCTC 1320  
 aGlyAlaThrLeuAsnAsnLeuMetSerHisAlaGlnGluLeuValAlaLysLeuArgSe (400)  
 CCTGCAGTTTGATCTACGTGAATTTGTATGTCTCAAATTCCTGGTGCTGTTTAGTTTAGA 1380  
 rLeuGlnPheAspLeuArgGluPheValCysLeuLysPheLeuValLeuPheSerLeuAs (420)  
 TGTCAAAAACCTAGAGAACCTCCAGCTTGTGGAGGGTGTTCAGGAACAAGTGAATGCTGC 1440  
 pValLysAsnLeuGluAsnPheGlnLeuValGluGlyValGlnGluGlnValAsnAlaAl (440)  
 TCTGCTGGACTACACAATGTGTAATTACCCACAGCAAACAGACAAATTTGGGCAGCTTCT 1500  
 aLeuLeuAspTyrThrMetCysAsnTyrProGlnGlnThrAspLysPheGlyGlnLeuLe (460)  
 CCTGCGACTACCAGAAATCCGGGCCATCAGTATGCAGGCAGAAGAATACCTCTACTGCAA 1560  
 uLeuArgLeuProGluIleArgAlaIleSerMetGlnAlaGluGluTyrLeuTyrCysLy (480)  
 ACACCTGAACGGAGATGTTCCATGTAATAACCTTCTCATTGAGATGCTGCATGCAAAGAG 1620  
 sHisLeuAsnGlyAspValProCysAsnAsnLeuLeuIleGluMetLeuHisAlaLysAr (500)  
 AGCATAAATTATATCCATTAGAGCTTCTGCTTTCAAGGAAAAAATATATTCTGAACTGCT 1680  
 gAla\*\*\* (501)  
 CCAAGCAACACTAATTAAAAGGTGGTTTTAAGACTTTGCAAATGGTATAATAATCAAAT 1740  
 ACTAATAGTAAATAAGTGATGTATCAGGGTATTTGTATTGCAAACCTGTGAATCATATGCT 1800  
 ACACATCCCCAAAGGAATCTCTGTAGGACTTTATAAACTGGAGTGAAGTAAACTTAAAAA 1860  
 GTGGATACTATACCAATGCCAACATGAATAAGGACAGAATGATTCTTGTATATTTAACT 1920  
 TCTGATTGCCAATATGAAGAAATTTAGGGGAAAACCTGACCTGTATTGTTGAGCTAAGAGA 1980  
 GCGGGGAATTTGAGTGCCTAAATTCCTTCATTGTACAGCAGGACTTCTAGAACAGTTAT 2040  
 AATAGATGCAAAGCTGCATCTATAACCATCTTCTATCATTCTTCCAAGGTCCCAGCACTTC 2100  
 TGTGATAAACGATGTGGCATCCATTCAACAGTCTGTAAGAGAGAGTTGGCCTAGGCCACG 2160  
 TTCTAGGTAGTATGGCTACCACTTCCTCGAGGCTGGTTTTGACAGTCTCTCAGGCCTGC 2220  
 AAATAGCTAATGTGAAAAGTCTGTTTTCAAGTTAGCTTGACATTCTTACTATTTCTAAAG 2280  
 TTTGTTTCGCTACGTGTTTCATGTTGTTAAATCAGGCAGTATCCCTCTTCTACTACTGTCA 2340  
 CTGGCTGTCACTAAAAATCTAAGATAAATACACACAAAAAATATCAACTCAAATATAT 2400  
 ACTTCAGCAGTGGCTAAAAAATGGCCCCACTATGTACTCATGGCCTATTCCAGAAAAAGA 2460  
 AAATGAAGATACCTAAGCCACTAAAAGTGACAGCTTCTTTGACAAAAACCTTTTCTAGAA 2520  
 CACCAAATACTGTTGTAAACAACGGTAAATAAAATAAAATAAAATAAAAAAGAACAGA 2580  
 AATGCAGCATTAAAGCAATGCAAGAATAAGCAAGGAAATTGTATGAGATGATGTCCAGTAT 2640  
 CTAATCAAACCTTTTGTTTTTTAAAGTAATACACTTTTTTTTTTACGCAAAAAAGAAGAGTG 2700



ATACTGCTATGTCTATGTAGGCCAAAGTCTGCTGCAGAACAAATATTAGAGAAGAACAAA 2760  
CAATTCTCTCTCTGTCCAAATGAAGGTATCAGTATTAAAATGCAGTGCCACGGTTCTAAG 2820  
TCTTGCCTTATTTTATTATCCTTTAAAGGTAAGTGTGCAGATGTGGATCAACATATGTTT 2880  
AAAATAAAGTATTAGTCTCTACCATTAACAAAAACATTGTGTTTACATTCTTTAGGACCT 2940  
GTGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA..... 2963

Fig. 12 OR2.1 の c D N A の塩基配列

アミノ酸コード領域は太字で、推定されるアミノ酸配列はその下に示した。Znフィンガー領域はボックスで囲み、保存されたシステインは太字で示した。ポリアデニレーションシグナルは下線で示した。

GAGCAGCGCTGCCCGGCACTCACGGAGTCTCCTCGAGCTGGAGCTGCTCACCATCGACGC 60  
 AGAAGAAGCTCTCCTGTGACCTCGGCCCCGTGCACAGCACAGCGCTGAGCCGCATCGAGG 120  
 GCCGCCGGCGGGGATGGACTATTCGTATGATGAGGATCTGGACGAGCTGTGTCCGGTCTG 180  
 MetAspTyrSerTyrAspGluAspLeuAspGluLeuCysProValCy (16)  
 CGGGGACAAGGTCTCCGGGTACCACTACGGGCTGCTCACCTGCGAGAGCTGCAAGGGCTT 240  
 sGlyAspLysValSerGlyTyrHisTyrGlyLeuLeuThrCysGluSerCysLysGlyPh (36)  
 CTTCAAGAGGACCGTGCAGAACAACAAGCACTACACCTGCACCGAGAGCCAGAAGTCAA 300  
 ePheLysArgThrValGlnAsnAsnLysHisTyrThrCysThrGluSerGlnAsnCysLy (56)  
 GATCGACAAGACCCAGAGGAAGCGCTGCCCTACTGCCGCTTCCAGAAGTGCTGACCGT 360  
 sIleAspLysThrGlnArgLysArgCysProTyrCysArgPheGlnLysCysLeuThrVa (76)  
 GGGGATGCGCCTGGAAGCCGTGCGCGCGGATCGGATGCGCGGGAGGAATAAGTTTGG 420  
 lGlyMetArgLeuGluAlaValArgAlaAspArgMetArgGlyGlyArgAsnLysPheGl (96)  
 GCCCATGTACAAACGGGACCGTGCCTTAAAGCAGCAGAAGAAAGCGCTGATCCGTGCCAA 480  
 yProMetTyrLysArgAspArgAlaLeuLysGlnGlnLysLysAlaLeuIleArgAlaAs (116)  
 CGGCTTCAAGCTGGAGACGGTGCCACAGATCGTGTACCTGTGCAGAATGACTACGGGCT 540  
 nGlyPheLysLeuGluThrValProGlnIleValSerProValGlnAsnAspTyrGlyLe (136)  
 GTCTCCACCATCCACAGCATCCACGCCATGGCCAAGACGCTGCCGCCAACCCCGCCGC 600  
 uSerSerThrIleHisSerIleHisAlaMetAlaLysThrLeuProProAsnProAlaAl (156)  
 CCTGACACCTGCTGACTATGAACGCGGCCCTACGGGACCCCTCCCTGGCCATGACTGT 660  
 aLeuThrProAlaAspTyrGluArgGlyProTyrGlyThrProSerLeuAlaMetThrVa (176)  
 GCCCGGCCACACGCCGCTCGCCGGCTACCACTACCCCTCCTTCCCCAACCGCGCCATCAA 720  
 lProGlyHisThrProLeuAlaGlyTyrHisTyrProSerPheProAsnArgAlaIleLy (196)  
 GTCCGAGTACCCCGACCACTACAGTGCTGCACATGAGGCCGTGCCACCTATGCATACCC 780  
 sSerGluTyrProAspHisTyrSerAlaAlaHisGluAlaValProThrTyrAlaTyrPr (216)  
 AGAGACCTACCCAGCAGTTCCCCACCCGACATCCCCGAGGTCATCCTGAAGCTGCTGCA 840  
 oGluThrTyrProSerSerSerProProAspIleProGluValIleLeuLysLeuLeuGl (236)  
 GCTGGAGCCTGACGAGGCGCAGGTGAAGGCTCGCATCCTGGCCTGCCTGCAGCAGGAGCA 900  
 nLeuGluProAspGluAlaGlnValLysAlaArgIleLeuAlaCysLeuGlnGlnGluGl (256)  
 GGGCAAGGGCCGGCATGAGAAGCTCAGTACCTTTGGCCTCATGTGCAAGATGGCTGACCA 960  
 nGlyLysGlyArgHisGluLysLeuSerThrPheGlyLeuMetCysLysMetAlaAspGl (276)  
 GACGCTGTTCTCCATCGTGGAGTGGGCGCGGAGCTGCATCTTCTTCAAGGAGCTGGAGGT 1020  
 nThrLeuPheSerIleValGluTrpAlaArgSerCysIlePhePheLysGluLeuGluVa (296)  
 GGGAGACCAGATGAAGCTGCTGCAGAACTGCTGGAGCGAGCTGCTGGTGTTCGACCACGT 1080  
 lGlyAspGlnMetLysLeuLeuGlnAsnCysTrpSerGluLeuLeuValPheAspHisVa (316)

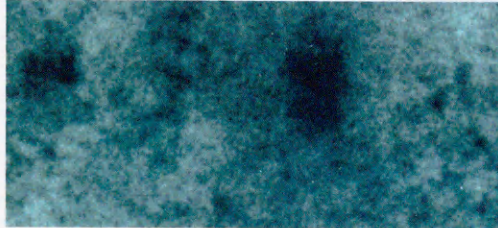
GTACCGGCAGCTGCAGCACGGCAAAGAGCACAGTGTGCTGCTGGTCACCGGGCAGGAGGT 1140  
 lTyrArgGlnLeuGlnHisGlyLysGluHisSerValLeuLeuValThrGlyGlnGluVa (336)  
 GGATCTGTCAGCAGTGGCGGCGCAGGCGGGCTCCATCCTGCACTCCCTGGTGTGCGGGC 1200  
 lAspLeuSerAlaValAlaAlaGlnAlaGlySerIleLeuHisSerLeuValLeuArgAl (356)  
 ACAGGAACTGGTCCTGCACCTGCACTCACCGCAGGTGGACCGGCAGGAGTTCGTCTGCCT 1260  
 aGlnGluLeuValLeuHisLeuHisSerProGlnValAspArgGlnGluPheValCysLe (376)  
 CAAATTCCTGATCCTCTTCAGCCTCGATGTGAAGTACCTGGAGAACCACGCGCTGGCTAA 1320  
 uLysPheLeuIleLeuPheSerLeuAspValLysTyrLeuGluAsnHisAlaLeuAlaLy (396)  
 GGACGCTCAGGAGAAGGCCAATGCAGCCCTGCTGGAGTACACGGTGTGCCACTACCCACA 1380  
 sAspAlaGlnGluLysAlaAsnAlaAlaLeuLeuGluTyrThrValCysHisTyrProHi (416)  
 CTGCACAGACAAGTTCCGGCAGCTGCTGCTGCGGCTGACTGAGGTCCGGGCGCTGAGCAT 1440  
 sCysThrAspLysPheArgGlnLeuLeuLeuArgLeuThrGluValArgAlaLeuSerMe (436)  
 GCAGGCAGAGGAGTACCTGTACCACAAGCACCTGAGCGGAGAGGTGCCCTGCAACAACCT 1500  
 tGlnAlaGluGluTyrLeuTyrHisLysHisLeuSerGlyGluValProCysAsnAsnLe (456)  
 CCTCATCGAGATGCTGCACGCCAAGCGGACTTGAGTGCAGTTCACACATGGACTCTGCAG 1560  
 uLeuIleGluMetLeuHisAlaLysArgThr\*\*\* (466)  
 GGCCCCGCGCAGAATGGGGCAGGACACGCACCTGGGACCACCTCTCCGCCCCATGCCTCT 1620  
 CAGTGATGCTATTTAACCTGTGCTAGTGGAAAGGTCCCAGGCGATTTATTTTAATACATGG 1680  
 TAAGGACGGTTAATGGTTCGCAGGGATGTGTGCTCGACAGCCGGACTGCCCTGCCAGCACT 1740  
 GCAGCCCTGCAGACCCTGCACAGTCAGTGCCCAACCTGCTGCCTGACCCGGCTCTGCGAC 1800  
 ATGAGCAGGGGGAAAGCCTGTCCTGGCTTAGCTCCCATTTCTGCTTCTCTCCTGTTCATCC 1860  
 CCGCACTCTGTCTCTCCACCTCTGCGCTCCCACTGCCAGTCTGCCCCCTCTGGGACCCC 1920  
 TGATGTACAGGGCATGGGAGGAAGTAAGCTTAAATCCCTCCAGGCTGTGGGGTTTCTCTT 1980  
 TGCTCTGGCACCCGCACAGTGGCAGGGGATTTCTGCAGCAGCAAAGCTGAGCCCTGGGGC 2040  
 TGAGATCTGCTCCTGTGTGCCTCAGAGTCACTGCCTGCCAGCACCAAGCAGGGCACTGC 2100  
 TGACCCTCAGCTGGCTCCACTTTCATAGCACTTGCCAATGCCATGGCAGGAGCTGGGATT 2160  
 TTACAGCCCCCTGGCAGCTGCAGTGCCCAAATCCCACCCATGTCTGGGCTCAGCTCACGTC 2220  
 CAGGATGGCAAGGCTTTGTGTAGAGGCTCCAAGAGTCAGTGCCGGGGACAGGGACTCATC 2280  
 CCTGGGACATTTAGTTCCCCTGCATCAGGGCAGGAGAGGGTGCAGGGGCAGCGGCACGG 2340  
 CCAGGCACCCACAGCCTGGGCAGATTCCTGGAGCTCACTCCAGCCACCAGCCGTACCTGC 2400  
 ATGCTGCTGGGGAGCAGCCAAAGGGCAGCCAAAGGGACAGAGATGGACACCATCCCCTCG 2460  
 CTGCCTGCAGGTGATGCTGGTAGAGGCGGCACTGCAGGCAGCAGGGCAGGAGGGACGCTC 2520  
 AGGGCCCAGCCTCATGCTGTGGGCACTGGGACAGTTGCAGCAGCACGTGCCAGCACGTGC 2580  
 CCAGGACTGCAGCTGGGGGCCCTGGCAGCACCCCTGACATTTGGGCAAGGAGGAAGCAGA 2640  
 AGGGCCAGCACTGCCTTGTCCCCACGTGACAGCAGAGCGCTGAAGACACAGAGATGCTGC 2700  
 CTCTCCTCCCAGCCTGGGCTGGGGCTTAGCAGGGCAGCACAGAGGCTCCATCACAGCCTC 2760  
 CTCCTGCCCCACGCTGTGTCTCACCGGTGCACAGCACATGGCCCTGCCAGCTCTGCCAA 2820  
 TGGGTTTGGTTCAGGTGTTTTCTCCGCTGTCCCACTTGAGGGGGACACTTCACACACCAC 2880

GGCTCCGCACAGCACTGGCGCTTGGGGAGCTCTCGTGCTGCCAACCTCCAACCCCAACTT 2940  
GTTAGATACAGAAGAGCATGTTTGTGTTTTGCTTTTCAACGTTTGTGCATTTTCCTCCTGA 3000  
AGTCTGTGGTTCAGTTTCACTTTCTTCTTTCTGTGAACTTAAAGAAGTGGAGAAAATGGT 3060  
TTGGGAGGTAAAAGATATTTTATTTTCAGAAAATGAAAAGTGTCTTAAGTGTCTCTCTC 3120  
TCTCTCTTTCTCTCACATCCTTTCTCTCTCCCATCCCTCTCCTCCTTTGCTCCCCACCC 3180  
TTCCTTCCCAGGCAGGAGGTTATTAAGTTCATGTCAGGAGTAAACCACTGTAATAAAAT 3240  
TTGCAGTTCATCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA..... 3273

Fig. 13 ニワトリ成体における OR2.0 および OR2.1 の発現  
分子量マーカーの位置は右側に示した。

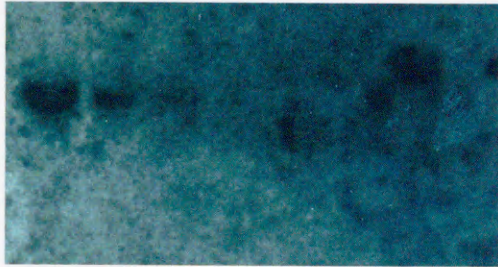
adrenal gland  
ovary  
testis  
kidney  
liver  
heart  
spleen

**OR2.0**



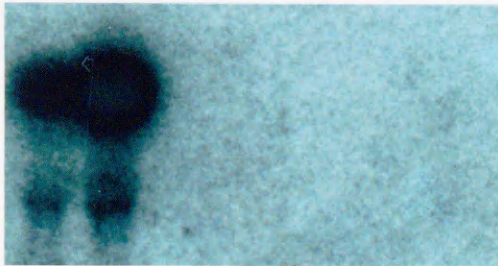
- 5.0 kb  
- 3.6 kb  
- 2.6 kb

**OR2.1**

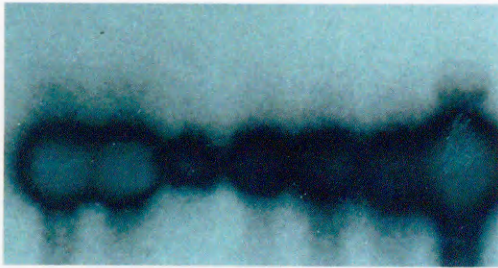


- 5.0 kb  
- 3.6 kb  
- 2.6 kb

**Aroma**



**$\beta$ -actin**



**EtBr**

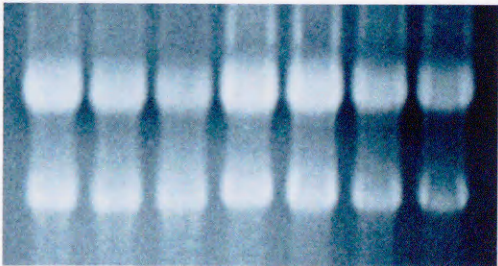


Fig. 14 ニワトリ初期胚における OR2.0 の発現

Aは6日胚 (♂)、Bは6日胚 (♀)、Cは7日胚 (♂)、Dは7日胚 (♀) の横断面を示す。tes は精巣、ov は卵巣、liv は肝臓、pan は膵管を示す。



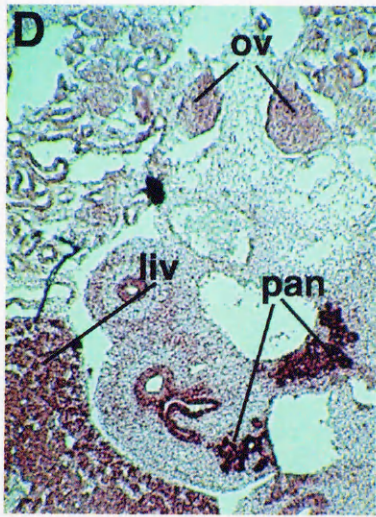
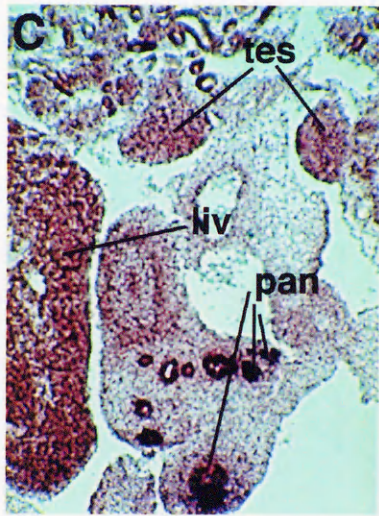
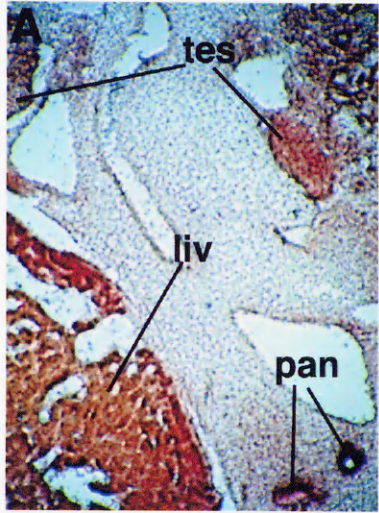


Fig. 15 ニワトリ初期胚における OR2.1 の発現

Aは6日胚（♂）、Bは6日胚（♀）、Cは7日胚（♂）、Dは7日胚（♀）の横断面を示す。ad は副腎、tes は精巣、ov は卵巣を示す。

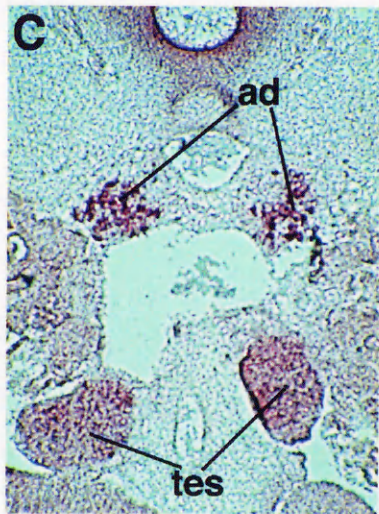
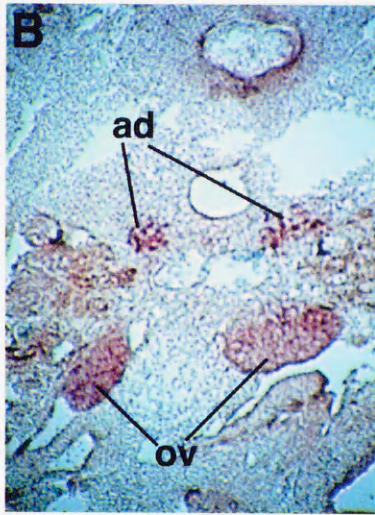
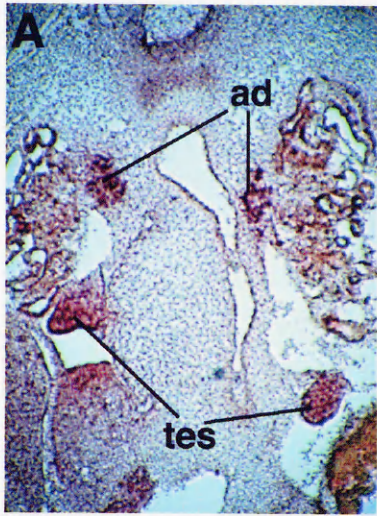


Fig. 16 脊椎動物FTZ-F1ファミリーの分子系統樹

アミノ酸配列は、CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) を使用してアラインメントし、N-J (neighbor-joining) 法 (Saitou and Nei, 1987) により作成した。

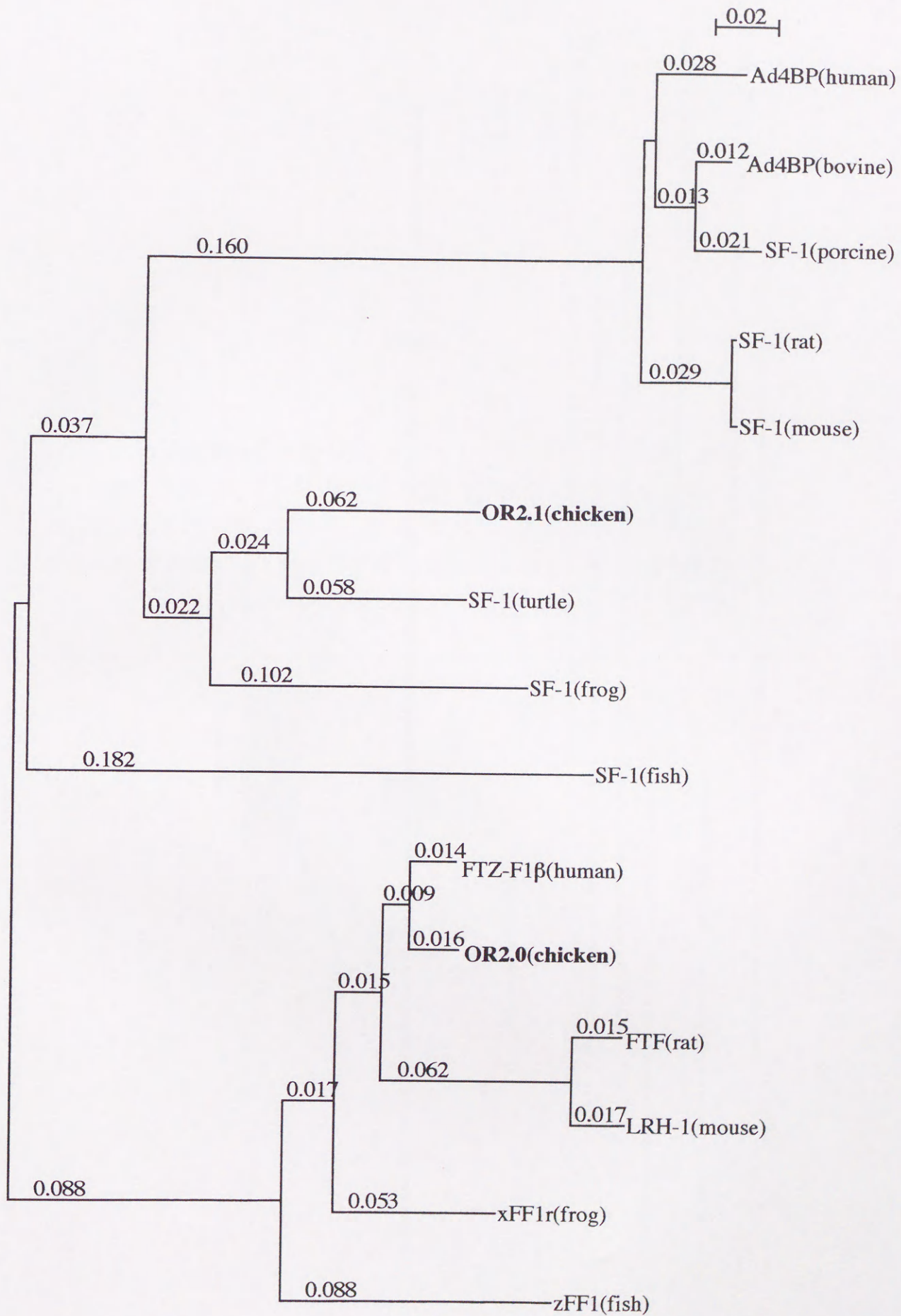


Fig. 17 ニワトリSF-1/Ad4BP遺伝子の構造

エクソンはボックスで示した。灰色のボックスはアミノ酸コード領域を示す。スクリーニングに使用したDNA断片は矢印の付いた実線で示した。Bは、*Bam*HI 切断部位を表す。下に実線で示したのは、スクリーニングにより得られたクローン。

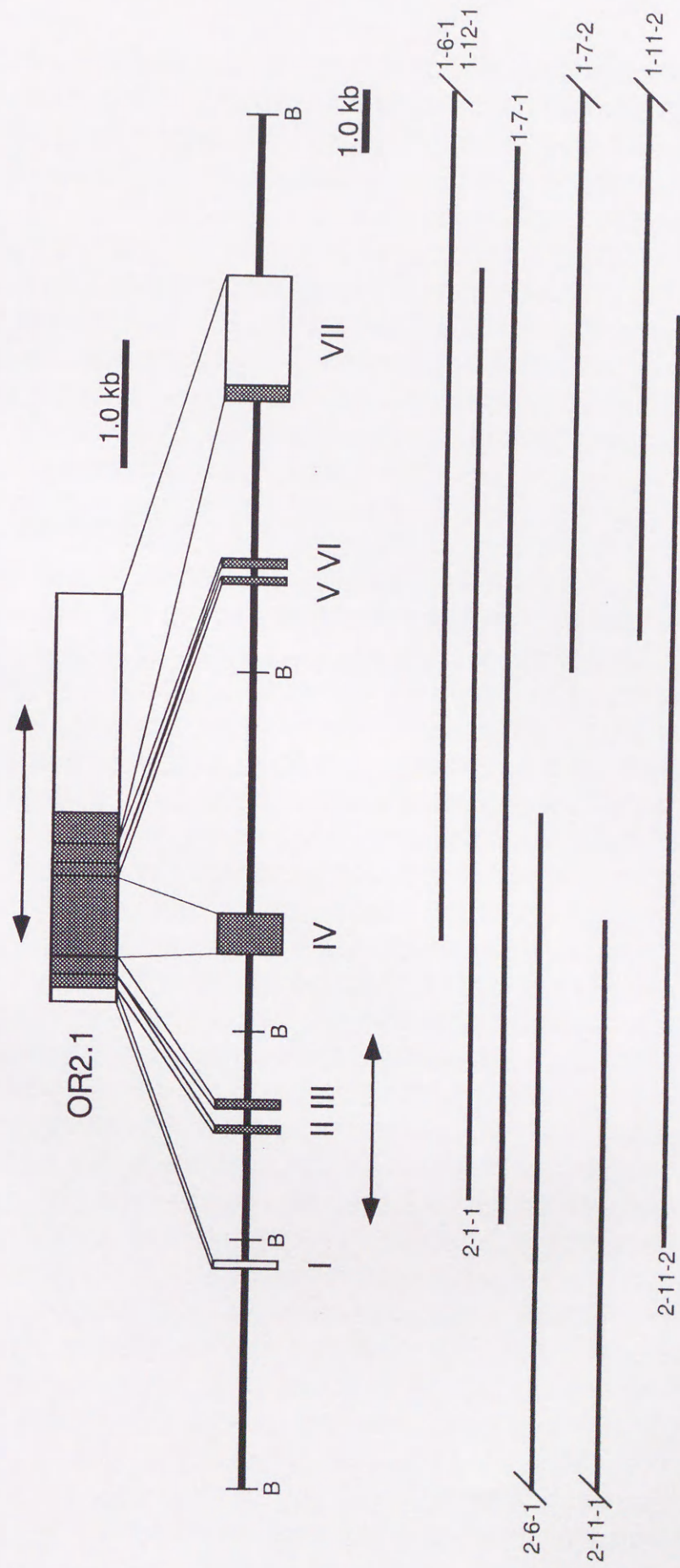


Fig. 18 ニワトリSF-1/A d 4 B P遺伝子の塩基配列

エクソンは太字で表した。DNAエレメントは下線付きの太字で表した。齧歯類のELPに相当する配列は、下線で示した。スプライシングドナー部位およびアクセプター部位はボックスで囲んだ。



GGATCCTGTGCAGCATTGCTCACGAGGGTAGTGATGTCCTCCTGCAGCAGACATTTTTAC	60
TTAGGAAAGTCTCCAACATCTCTTTCCACAACAGAAATGCTTTTGTTCAGACCCAAAAGG	120
GCTTTGCTCAGGGAGCAGGATGGAGGAGCTGCCGCGTGCTGGGCCAAGCCAAACAGCGCT	180
GGCTGCAGTATGGCTGCAGGTTGGTCTTGTCCCAGACCCAGCTTCTCTCTGCAGCATTGC	240
TCGCTCCTCCCTTGCTCCTTCTGGAGTTATGGAGTCCCAGTATGAGCCATGCTGCTCTG	300
CTCCTCCACCACATGCTCACCTTTTTCTGTCCCTCTGCACTGTGCTCATTTTGCTTATT	360
TACAGCACTTCTCCTCCCAGCGGAGCGGCTCCAATGTCTCTGCCCCAAACTGCCTGGATT	420
TATCCCCCGGAGGCTGGCGGTGCATGGGGTGGTGCAGAGGACGCTGTACTTGCAGGGCT	480
GGGTTTGCCAGCACCGAGGCAGAGCCTGGGGACGTGCGGGCAGACAGGGGCTGCTGTGG	540
TGGGAAAAGTACCGACACGTTTTAATTTCCAGCTGAACCTCTGCTGACCACTGTATTTG	600
ATTAGAGCTCTGCTTCCTTTTCATCTCCGAGCTCGGGCTGGTGACAACCTGCTGCAGCCTC	660
GTGCGCCGAGTGCCATAGTTTATCACCGAAGCCAACCTGCTCTATGAATCCAGAGCCAGCG	720
CTGAACAAATCACGCTGTCACCAACGTCAAACCTGTAACTGATCTTTGGTGGATCACC	780
AGTGTCAACATTGCACGGGACATACATTATCGGGCCCAAGGACTTTGGGAGATGCGTTTG	840
TCAGGCTGTTCTGTCACAGTCCCCTCTTGACCTTCGCAAAGTAACTTTCAAGGATAAGC	900
CGCCTTCCTCTTAAAGAGAGAAGCTGTCCCCCAGAGGGTCACCCACAGCCAGGGTGGGGT	960
GTGGGGTGAGGATGGGGCTCCCCGTGTGGTGGGTGAAGGTCTGGAGGCGTACTCTGAGCT	1020
GGGGGTACCCTCTGCTTCATTCCCCACCGCCCATCTCCTCTGGGCTCCCACCTTGCCACC	1080
AGCTGCTCCCACGTTGTGCAGGAGTCGGATGAAGGACAGCCACCGCTGCCAGGACAGTGG	1140
CAGTGTGTCCCAGCGGGCTCCTGCCTGCCGCTCCCCGCCGGTGCTTGGAGCTGGGATGG	1200
GGCTGCTCAGGGCAGGGAGCGGCTGTGCGCCCCCAGGCAGGCGCTGGGCTCCAGCCCCA	1260
CGCTGCTCTCCCCGCAGGGTGACCCCACTAATCAGCTGTGAAAGAGAAAGAAAGCCGAAG	1320
AGAAATCTTTCTCTCCGCTAACCTCATCACAATAAAGATTCTATAAAGAGCTCTTATCC	1380
TTGAAGAAAATGAGGCACATAAGCAAGAATAGTAAACAAAAGGCTGTCATTTTGACCCAG	1440
GAGTGCTTCATGTTGTTGGCAACTGCCAAGAGGAAACATAAAGAGAGGCTGCATCCAAGT	1500
CCCAATTATGCAGAACTATGTGACTGATATGTCAATGAGTCCCCCGGGAGGAGACCACC	1560
AGCGCTTCGCGGCACTGCCTGCGCACCATCTGCACACAGCGCCATGCGCCGGGCTGCC	1620
GCGCCCCCGAGCGCAGGCGTGCCTGGCATCGGAAGAATGCGGGGGGACAAGGTAATGTCA	1680
TCGGCAGCTCTATCGCCAAAGTCTCACCGCGCGCATTATCGGTGCGGGCCGCGGAGTCA	1740
GGGACTGCGGGCAGCCGGCGGTGCAGGCAGCCAGCAGCGGCAACAGTAGTGCTGACCACA	1800
CCTGCTGCAGGCACGCTCCGGGAACGTGGCGCAGGCAGGAGGGCTGCCCTGCCGCCGATA	1860
AGCCGCGTGGATGGAGATAACATCCCAGGAGGAGATATGCTTTGCTGAGCATCAAGGCTG	1920
CGCACCAGCGAGGAGCCAAAGCGCGGCTGCAGCCCGCGGCGGTGGTGCAGTGTGGTGGGC	1980
TCAGGCTGCGGCCGCGCGGCCCTTCGGTGCCCGTGACAGCAGCTGGGGCAGTGATGACAG	2040
CCGTGGTGGGGCTCCGGCCAGCAGAACGCAGAGCAGAGGCGGTGCCGTGCCACCCGC	2100
CACGACCCGGCTTCACGCGGGACCCCATGTGGCCGGGAACCACTGGAGCTGGGCCGCGGC	2160
CTTGGTGAGGGCCTGTGCAGAGGAAGGTGCCAAGGCCGCGGGGACGCATTTACCCCGC	2220
AAACACCTCTGCTTCCAAAATAGCAAGACAGGGCGGCAGTGAGGCCGGGCCTTCCCGGG	2280
GAACAATGCCCGGCGGGAAGCGGGAGGAAAGCGCTGCGGCCAGCCCCGCGCTGCTCCGTC	2340
CCCGCCTCACTCGGGGCTGAGCCGTGAGCCGCTGCGTGCCGGCCTGGCGGGACCTTGAAC	2400
CTGCTAGAGATTTATTTTCCCTGACATTGGCATTGCATCGGAACATCTGGCATTGGCTG	2460
ATAATTGCTGGGGATTGGGGCGGAAGCTGCCTCTCCAGGCCTGGCTCTTCTACAGAGCTG	2520

TGTTTTCACTTTCTCCTCTCTTTCAGCTGCAAAGCACGGAAAAACAACCTGGGCAG 2580  
 TGCAGATTGCGGCTCCCCTCCTCCTCAGGGCTTTGTGCTCCCTTCTGCCCATGAGGAC 2640  
 GCGCCCGGGCCCTGTCCCTGCCCTCCCCTGCTGCCAACCCGCTGGGCCAGGGGC 2700  
 TGCGGTTGGGTCTGGGCGTGAGCCACAGGGCAATGCTATGCTGAGCAATAGTGGAGCGT 2760  
 GGTGCTGCTGGGGGAGTAAATCTCCACTCCGGGAGGAGAGGTGTCAAAGTGGCCACACCC 2820  
 CAGGGCCGCACCTCGCTGCCCATGCAGGGGACGGAGCCCTCAGCCCCACGGTGCCTGCAG 2880  
 GCTGGGATGGCGCCAGGGCAGCGTGGGAGATGGGAAACCCATGGAGCAGCGGCTCTGCC 2940  
 CCACACCTCATCCCCAGTGCTTCCCCTGCAGCGCTTTGCAGCCCCAGTCCACAAGGGCT 3000  
 ATGTACCTCGGCTGCCCGCTGCTGGGCTCGCTGCCCATGGCCTACCCCGCCGTGTCCAT 3060  
 CTCACAACCCCTCCCTCGCACCGTAAATCAGCGCACTCCGACGTGGGCGCTGGTGCCT 3120  
 GCCCTGCCCGCCGTGCCCCACCTCCCCGCAGTTCTCTCCTGGCGCTTTATCTGCTG 3180  
 CAGAGGTCCTACTTATCTCCTCTGTCACCTTTCTAATGCTAGTTTATGAGCAGCATTG 3240  
 AGCTTAATTATGATGTTTTTTCAGCATGGTCACGTGGCCGCAGAAACCAATAAGGCAACTA 3300

E-box                      CCAAT-box      DRE

AGTTGGTCCACCTCGGCCGAGCCTGGCCCCATGGGGAGGAGATTGGCCGCTGTCTTGCA 3360

GA-rich

CCGGGCGGTGTGCGCACCGGGACCCGCACCTCCCCGGCAGCCGCAGCCCCTATAAATCCCC 3420

GC-box

TATA-box

CGGCCCTCCCGCAGCGGGCAGCGCTGCCCGGCACTCACGGAGTCTCCTCGAGCTGGAGCT 3480  
 GCTCACCATCGACGCAGAAGAAGCTCTCCTGTGACCTCGGCCCGTGACACAGCACAGCGC 3540  
 TGAGCCGCATCGAGGTGAGTACTTGCAGTGGGGACCCATGGCTGCCTGGGGGTGAGCTG 3600  
 GGTGCTGGGGGCCACGCTTCCCATGCTCTGTGGTTTGTGGGGTCTCAGTGACATGGCG 3660  
 GAGGGTGGGGACGCCCGCAAGGAAGTGGGAGCCATGCACGGGTCTCCGCTTCCCATCTC 3720  
 CGTGAGGAGGGATGGAGGCACCAGTGCTAGCTGTGCCTGGGGACATGCAGGGACATTCA 3780  
 GGGATGCCATGTGACACCTGGGGATGCCAGTGATGCCATCCCTTCTCCAGGCCCTGTG 3840  
 GCAGCAGCAAGAGGCCCTGCCATAATCTCGGCCGTGTGCGCAGAAGCGCCGGATCCAGCT 3900  
 GACGGGACGAGTGGGCGGTGAGCGGAGGCCTCCGAGGGCTTTGGGAGTGCAGGCGGTGCT 3960  
 GAGCTGTGTGCTGCTGGCCCCAGCTCTGGCACAGCCCCTGCACCTTGGAGCAAGCTTGGG 4020  
 GGTGGCCGGGACCCACACGAACCCCATGGCCCTTCTGGGCTCCTCTGTCAATGGCTCTG 4080  
 TAGCTCAGAGGCTCCCTGCGGTGTGGGGCTGCTGCTGAGAGGCACCACAGGCAGCAGGAG 4140  
 CGTCCCTTCCCGGCTCAACCACCCACACAGGGGCTGCTCTGCTGCTATTCTTAGTGTGG 4200  
 GCGCCACGCCGGGTGGCTCTGGAGTGATCCTCTGCTGAGCCCGCTTCTGTTTGCCGCAC 4260  
 ATCCCTGCCAACACCGCTTCTCCCCGGGGCACTGCGGGCCTCATTGGGTGTGCGGGATG 4320  
 AGCCATACGGGGTGAGAAGAGTGGGACAATCTGTGTGGGATGGGATGTGCAGGATGGGAT 4380  
 GTGCGGGATGAGATGTGTGGGATGAGCCAAGCCCTGCAGCCAGTGCCCTCCCTGCAGCTC 4440  
 CATCGGGCACCAAGCGCCTTGAATCGCAGTGATGTGCAGGGCAGCAGGGCAGAAGGCCGT 4500  
 CTCGAGCAGAACGGTTTGGCCCTGCAGGGCTCAGCAATGGACCCTTGTTCTCGTGGCCAA 4560  
 GCAGTCTCATGGCAGCCACAGCCATACAGCTTGGAGCGGGCAGCTCCTCCTGCCTGAGT 4620  
 GGTGCTGTGCCCTGGGCACATCCTGGAGAGAACACAGAGCTGGCACTGCCCTGCCTCA 4680  
 GTCCCGGCTGTATTGTGGGCTGGATTTGGCCCTGGCCATCGGCTGATAGGGCAGGGAGCG 4740  
 AGCTGGCTGTGTTACCTGTGAGCAGGAACTTCCATGCAGGACAAATGCAGATGATGAA 4800

TAGAATGTGCTTCTGCACTGATCTGCCAGGGAATGTTTCATTAAGAGTCCCTAAAAATGA 4860  
 AGCAATTAATTAACAGCGGCACTGAACATGCCACAGGGCAGCGCTGGCAGCATTGCCGT 4920  
 GTGTGCTGGCGGCCGGCCAACACCAAAGCCGGTGGCGTTCCCGACGGCCGCAGGGGAGGT 4980  
 GCAGAAGGCCGTGCACCCCCGCTCCTCACGCCGGGCTCTCAGCAGCTCCCCGCTATCGC 5040  
 TGGGTGGAGGCAAAGGGGTGGTCCGGCTGCGCTGGGGGTGGCGGGGCTCCGGTTAGGG 5100  
 CTGGGGTTAGAGTTGGGGTTAGGGTTAGAATTGGGGTAAAGGACGTGGTGGATGCTGCA 5160  
 GGCAGCGTGTGGCGTTGGGTGACACAGCAGCCTCCAGTCCCTTCTTCTGACGATTCCCTG 5220

\*\*\*

AGGAGGTACCCTCAGCCCGGGGCTCCCTCAGCCCACGACCGCCCCCGGCCGAGCCCCCG 5280  
GCGGCGTCCCGCTCCCTCCCGCCCTGCCCTCGGGGTGCCGGGTCCCTGCAGGTCCCTCC 5340  
TCCCCAGCCCGGCCCCAGCCGCCCGCGCCCGCTCTCCAGAGGAGGTTTCCCATCCCCCG 5400  
GGGGGCTGTCCGCCCGCCCGCACCCGCATGGAGATGCTCTTCCAGGCGCTATAAAGGGCT 5460  
CTGGCTCCGGCACCTGCGCTCGGGCTTCGCGCGCGCTCTCCCGCTCCGCACCCGGCGCAG 5520  
GGCTCGGGGCCCGGGTGGCGCCCGCTGACCCGCCGTCCCGAGCAGGGCCCGCGGGGA 5580

M ( 1 )

TGGACTATTCGTATGATGAGGATCTGGACGAGCTGTGTCCGGTCTGCGGGGACAAGGTCT 5640  
 etAspTyrSerTyrAspGluAspLeuAspGluLeuCysProValCysGlyAspLysValS ( 21 )

CCGGTACCCTACGGGCTGCTCACCTGCGAGAGCTGCAAGGTAGGAGCCCGCGGGCGGC 5700  
 erGlyTyrHisTyrGlyLeuLeuThrCysGluSerCysLys ( 34 )

GAGCAGCGGGGCCGGGCGGGGAGCGGGGTGGGCACGGCCGGGGCCGGGGCAGGAGAGCC 5760  
 TCCCGCGAGCCGCCCGCCCGCTTTCGTTGGCGTCGATTACCGCTCGGCGGCGGGAC 5820  
 GGGAGCGCGGAGGGAGCCGGGCGGGGGCGGCGGGGCGGGGCTGGGAGCGGGGACCGGG 5880  
 TGGGGCCGATGCGCGCTGATGCGGGGTGCCGGTGCCGACGCATCGTCGCCCTTTGGCCGC 5940  
 CGTAGGGCTTCTTCAAGAGGACCGTGCAGAACAACAAGCACTACACCTGCACCGAGAGCC 6000

GlyPhePheLysArgThrValGlnAsnAsnLysHisTysThrCysThrGluSerG ( 53 )

AGAAGTCAAGATCGACAAGACCCAGAGGAAGCGCTGCCCTACTGCCGCTTCCAGAAGT 6060  
 lnAsnCysLysIleAspLysThrGlnArgLysArgCysProTyrCysArgPheGlnLysC ( 73 )

GCCTGACCGTGGGGATGCGCCTGGAAGGTACCGCGGGGCGGCCCGGAGGGGGGGTGGGTG 6120  
 ysLeuThrValGlyMetArgLeuGluA ( 82 )

CCGTCCCCTCGCCGCGGTCGCTCCGTCCCCGGCGCCCCCGGGCCGGGAATTGCCACGGC 6180  
 GGCTCCGATTCCGTTTTTCTCCCAAGTCAACGAAAAATTCGTTTTGTGCGCCTGTATT 6240  
 CTGTTTTTCGTTTTCTTTGTTTTGTTTTGTTTTCTCCCGGGTTTTGGCTGCCGAGGTTTCA 6300  
 ACTTTCCGGGACTGTCTTTGCTTGGCAGAACGTTGGGAAATAGCTTAGAAATCATTGTTT 6360  
 TCCTTAATCGCACAAATCCAGAAGCCGAGACTTAAGGAAAACGTTAATATTGCGAGACT 6420  
 GACACGAAAACGCGGGAGATCCGCCGCAAATCAGTTTTTCTTTAGCGCGGCTCCGGGC 6480  
 AGCGCGGAAACACGCGGTAATCCGCCGAGAGCCGCGCATCGCAGCGCTCAGCCCCACCGC 6540  
 GACGTGACGGTCCGGCTGTGGTGTCCCCGAGCCCTACGCCGGGATTTCTGCCGCGCTCGG 6600  
 CACACGGAAGCGCGCTGAGGACCCTCCGCTGCAAACGTGGATAGGAAATCCCCAGCTG 6660  
 TGCTCGCGCCCCCTTCCCCGGCCGCGGTGGCAGCGGGCGCGTGGCGGGGCGGCACCGCTCC 6720

TCGTGCGCTCCGTGCAGTGCCCGACCCACAGCGGGGCTGCTCCGCGCTCTGCGGCAGCT 6780  
CTGGGCTCGGGACGGGCGCTGGGAGGGAGGGGAGGCAGCGGCGCGTTTTCGCTTCGGGGT 6840  
GGGGACGGGTTCAGCTCCGCTTTCCTATTTTGGGCGGTTTTTCGTGCGGCGGAGCCCGTTTCG 6900  
GCCCCGCGTTTTGCCCCGGGCTGCGGCAGCCCGCTCACCCCTTTTTGTTTTATCTCCTCGCT 6960  
GCTCGCCGCAGCAGCTACCAAGGAGGAGGCACCCGCAGGCGAACGGCGTTCCCGTGGGA 7020  
CTCTTTTGTGTTAAAAACACGAGCCCACCTTGCCTTTGTGAACGGTGTTTTTTCGGTTCAGG 7080  
GAGTCTGAGCTACACGGGGAATCCTCCAGCAAGACGGACAAAATCCAGCGGGATTTTCAGA 7140  
ACGGATCCGGTCTTGAATGGAAAAGTGGAGCGCGAGGGAACACGAGATCCCCTTCCCTC 7200  
TTTGTGCTCGCGCTTCGGGAGCAAATGGAGGGAAGCAGCGTTCGCCACGGGAGGGTTCTG 7260  
TGTGAGCACCTCCCGCACGTGCAGGGCCGGGCTCTGCTCCGTGGCCATCGCCCTGCCCGG 7320  
CCTCGGGCCGTGGGGGGAAAACCGTTCATTATTTGGAGGGCGGGGAGATTTGTGCTCTC 7380  
GGAGCACTGCAGTGCAGACGGGGCTGCAGGCTGGGACCCAGGGCTGCGGGTGGAGGCCTG 7440  
GCACAGCCGGCGCTCTCAGTGGTGCACCCCGAAAGCAGCGGGGCTCCCATAGCCCAAACG 7500  
GAGGCATCCCAGTATCCAGGCACCCAGTATCGAGGCATCCTTGCCTTGCAGGGCTGGAG 7560  
AAGCTGTTTCCACGAATAACGAACGAGGGGAGGAAGCGCAGAGCAGCTCCCCGGGGAGCAC 7620  
ATTCCTGCTTTCCTGCAAATGCTGCTCCCGGCCGTGCCGCCGCCCTCCAGTCTGCGTGG 7680  
AGAAAGTCTCGGGGCTTGCAGCACCCGCGGGGCACGCGGGCAAAGGGAGGCAGAGGAAGG 7740  
AGGGGGGCACAGAACAGAGCAGCCCGCTCTCGTGGGCTGCGAACCCGCCAGGGGCTGTT 7800  
CCCTTCCACGCGGGGGCCGCGCGGTGCTTGCTGGCTCGCTCCCTCTCCGCTGCCGGGGCT 7860  
GTGCGGGTGGGCCGGCGGCCCGCCATGCCGGGGCCAAGCTTGTGCTGCAGAGAAGCACCTG 7920  
CTCGGGTGACACATTCTTGGGTTTAACTCGAGGCTCAGAGCAGCCTCTGCTGCGCCGCAC 7980  
AGCAAGCAGGGCGATGGGGAGAGGGGCAGCGGGGAGAGTGTCTGGAAGATGGGAGAGGA 8040  
TTGCAAAGGCAGCACAGTCCGGAATGAAATCCCAGGGCTGGTCCAGGCCCGGGGGCTGT 8100  
GGAAATGAAAGCAGCGTTCAGGCACCCCTAATCTGCCCCGAGCCCCCGGGGCTCTGCTCTGTG 8160  
CGCTTTACTTCCGTGTGTTTCATACACCCGAGCATGTCTTCCCTCCCTCACCGTGCCTGGA 8220  
GCTGCTGCAGTGCAGCACACCCCGACCCACAGCACAGCTCTCTGGGAAGGGGGCCACCA 8280  
CCCCCAGCCCCATCAGTCCCCGTCCCCCCATGCCCGGTCTCTGCTCTGCTCACACAGC 8340  
TCTGCTCCTCTGCCACAGCCGCGCGGGATCGGATGCGCGGGGAGGAATAAGTTT 8400  
1aValArgAlaAspArgMetArgGlyGlyArgAsnLysPhe ( 95)  
GGGCCATGTACAAACGGGACCGTGCCTTAAAGCAGCAGAAGAAAGCGCTGATCCGTGCC 8460  
GlyProMetTyrLysArgAspArgAlaLeuLysGlnGlnLysLysAlaLeuIleArgAla (115)  
AACGGCTTCAAGCTGGAGACAGTGCCACAGATCGTGTACCTGTGCAGAATGACTACGGG 8520  
AsnGlyPheLysLeuGluThrValProGlnIleValSerProValGlnAsnAspTyrGly (135)  
CTGTCCTCCACCATCCACAGCATCCACGCCATGGCCAAGACGCTGCCGCCAACCCCGCC 8580  
LeuSerSerThrIleHisSerIleHisAlaMetAlaLysThrLeuProProAsnProAla (155)  
GCCCTGACGCTGCTGACTATGAACGCGGCCCTACGGGACCCCTCCCTGGCCATGACT 8640  
AlaLeuThrProAlaAspTyrGluArgGlyProTyrGlyThrProSerLeuAlaMetThr (175)  
GTGCCCGGCCACACGCCGCTCGCCGGCTACCACTACCCCTCCTTCCCCAACCGCGCCATC 8700  
ValProGlyHisThrProLeuAlaGlyTyrHisTyrProSerPheProAsnArgAlaIle (195)

AAGTCCGAGTACCCCGACCCTACAGTGCTGCACATGAGGCCGTGCCACCTATGCATAC 8760  
 LysSerGluTyrProAspHisTyrSerAlaAlaHisGluAlaValProThrTyrAlaTyr (215)  
 CCAGAGACCTACCCCGAGCAGTCCCCACCCGACATCCCCGAGGTCATCCTGAAGCTGCTG 8820  
 ProGluThrTyrProSerSerSerProProAspileProGluValIleLeuLysLeuLeu (235)  
 CAGCTGGAGCCTGACGAGGCGCAGGTGAAGGCTCGCATCCTGGCCTGCCTGCAGCAGGAG 8880  
 GlnLeuGluProAspGluAlaGlnValLysAlaArgIleLeuAlaCysLeuGlnGlnGlu (255)  
 CAGGGCAAGGGCCGGCATGAGAAGCTCAGTACCTTTGGCCTCATGTGCAAGATGGCTGAC 8940  
 GlnGlyLysGlyArgHisGleLysLeuSerThrPheGlyLeuMetCysLysMetAlaAsp (275)  
 CAGACGCTGTTCTCCATCGTGGAGTGGGCGGGAGCTGCATCTTCTTCAAGGAGCTGGAG 9000  
 GlnThrLeuPheSerIleValGluTrpAlaArgSerCysIlePhePheLysGluLeuGlu (295)  
 GTAGGGCTGGGCGGTGGGGGTGCGGGGCCAGCATGAGCCGGGTGGGGGCTGCAGTGTGCC 9060  
 AACGTGGGACGGGGTGGGGGAGGTCCCGGCTGAGCACCAGAACGGTCCCAGCAGGCAACA 9120  
 TGGGGCTCGTGTGTCTGATCCATCACGGCAGCGGGGGTGTGGAGGCAATCACAGGCAGA 9180  
 GTGAGCGCGGTGTCAAGCTGAAGATATAATTGAAAAATGTAACGTTGAGGAATTACGGTT 9240  
 GAAACAATTCACCTCCTTCGTCTTTGGGAGGAAAATCGATGCTGTCAGGCGGGTGCCCCGAC 9300  
 GGCAGCCAGCAGGAATGGGGTGGGGGCCCTTACACCTCCAGCCCCACAGAACTGGGGC 9360  
 CAGCAGTGGGGGGGAGCAGGGCTGGGGCAGCCAGCCAGCTCAGCCATTTCCATTTCGTA 9420  
 GCCCCAGATTGACCAAAGATCCCAAAGTGGGCAAAACCAGGAGATGCATTTTGTAAATGCA 9480  
 GCCAAAGAGAGCTGAACTGCAGGTGGGGAGATGTGGTGCCTCCCTGCACTGCCCCATAC 9540  
 AGACCCGTCCTGCTGCCGTGGGACCGGGCCCCATGCAGGGGCTGCAGGGCAGTCCTCATG 9600  
 CCCGAAATAGCCCCTGGCTGCGCAGAACAGTGTCCGGAAGGCACTCAGTGGGGCTGGGTC 9660  
 AGGCTCCTTTCAATAATATCAGTGTCCAGCCTGGATTTTGGGAACAGGGTGGCTGTTGTT 9720  
 TTGCAGGAGATATTATAAACAGTGTAAATGTGGATCTCAGCTGCATGGCAACATAGCCTT 9780  
 GTAATGCTATTGTCTTTCCAATCGCGTCAGGAGAGCGGGCTGTTTCTGTGTGAATCCACC 9840  
 TCTGAGGGCTCCAGGCAGGAGGGCCAGAGCTCTCACCTGGGCACAGGGCAGCTGCACAGC 9900  
 CCCACAGCTGCTCCCTCCTCTGCACAGCGCATCAGGGCACGGCAGGATGGAAAATGAACT 9960  
 CCTGCTAGTGCCGACTTCATGGCTTCGCCCTAAAGCCCGTGAGCACAGTGTAAAAGCGTG 10020  
 GCCTCAGGGATCGATGGCCGTAACACAGGCAGCCCCACTGCAAAGTCAGGGCTCCTCAG 10080  
 GGCAGGGACACCGTGAACCCCGCACCCCTGGAAATGTCCACGTGAAAGTGGCTGCTGCTG 10140  
 CACCAGCCAGGGAAGGGCAGCTGGAGGCTTTGAGGGGTGAGGCAAAGCATTGGCATTGCA 10200  
 CCAGACATCACGCTAAGCACTGCACCAGGCACTGCGCTGAGCATCACACTGGCTTCACAC 10260  
 CGGTATTGCGCCAGTTTTGCACCAGCCTGCTGTGGGTACCACCCAGCCAGAGGGTCCCG 10320  
 TTCCCATTTCCATTTCCGTTCCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCACCCCA 10380  
 GCCAGAGGGTCCCGTTCCCATTTCCATTTCCGTTCCCTGCAGACAAGTGTGCTGCTGCAGA 10440  
 GCGGACCCTTTGCCACCACCTCCAGGGGATGACCGCGGCTGGGGGCGTTGGGGAGACCCC 10500  
 CCCGCTGCGCCCTGGGAAGGACGCGGGGGGAGAGGGGCGAGCGGCCTCTTGACATCAGC 10560  
 TCGCGCGCCACGTCTGCCCGCCAGCGCGGGGCAGCCAGATTGAAAACAGATTTAACTTCC 10620  
 CAGATATATCGTTTCATTTAAGGGCCAGTAATTCTGTGCTGCTGCACTGACAAACGAGG 10680  
 GTCCCCATGCCAATCCGCCGCGAGACTGATGTCGCCGCTTCATCTTGTGTCACCAGGGC 10740  
 GAGAATTACGGACTGCGCTGGCCTTCGGAGGCAAGACTAATAATGCCGCGCGGCTGAGGG 10800

GGATTTGGGGGCCCTCTGTTTATCGAGGGCCGGCCACAGAGCCGCGGGCGCGAGGCCACGC 10860  
GGGCGGAGGTGGAAGAGGTCAGCGTGACGCCATAAATACGAACTTTAACTGAGTCTAGA 10920  
TGAGATGTGTCAGGGCTGAGGGAAGATTTGCAGCGGCTCTTCAGGAAGAAAAATATGGGC 10980  
CGGGGGTAAAATATATTTTCGTAGGGTTGTGAGTCTCAGGCAACTTTGTCCTTTCAGATGT 11040  
AATTTTTTTATATATATATGAGGAGGGAGAGATGTGCACGCGCACACTTGTACAAACACG 11100  
TTGTGTCTGCCTGAGGTTTCATTTTATATAACCAGTATTGGCGTGGTACTGTTTAGATAGGT 11160  
GATACTGCTCCGTGCACATATAAATGTCATGTACGCACCGTGCAATGACCCCTGGGTTGA 11220  
GACGAGCAGCCAGGAATGTGCAACAACTGCTGTGGCTCCAGCCTGAGGTCACCCAAAGC 11280  
CCAGAGCGTGGGCACGTGGGCTCATGGCAATGGGCGCGTGGTGTATGGGCATGTGGTGACG 11340  
GGGCACAGGGCTGGTCCCGGTCCCTGGGGCCAGTTTCCCTTGCTCCTTGGGAGTGATCTG 11400  
GGAGCTCCCGCTGGTCCCATATGCAGTCGGCTGCTCCTCTGCCTCTAGCACACACGGGTC 11460  
ATGCTGACCCCATCTCCTGGCCAACAGCCAGCGCGTTTTTTGGCAGATTTAACATCTCCTT 11520  
CTGGCGGTGGACGCAGCAGCGATGTTTACGATCCTCTGCACTGGGGTAAATGTGACCCGC 11580  
TTCCCGCGGCCGTGTGCTCCACAGTGACGCAGGGAAGGGGCAGCAGCCGGGGCTGAGC 11640  
ACAGCTCTGCCTGCAGGGAGCCGATCCTGCACTGTGCTCAGTGGTCTCTCTTTGTGCTGC 11700  
CCGTCGTGGTGGTGTGCGGGCTGGGGCAGTGATTCCCGCGTCTGGCCACTCACGCCTTGT 11760  
GTTTGTGTGGGGTTTTGACTGCCATGTTTGGTGGACGGTTAATCCACTTTCACACTCCCC 11820  
AGCAGCAATGCTGACAGCTCGTGCTCACACTCAGGAGCTGCCCCGCGCTGTGTGTTGGGGT 11880  
GCGCCTGCAGTGGCAGAGCTGTGTGAGCGCTCACCCCATGTGAGCAGCGCTTCACTGCCG 11940  
TGTTTTGTGCATGGGTTGAACACTTCTTCAAAAAATAAAGGTCACCTCTTAAAGGCAGC 12000  
TTGCATCAGGTCCTCCGTGCAGCGCTCTGCTGGAAGGCCTTGACATTAAGAGAGGAAGAT 12060  
CCCTTGCTTAACTTTGCAGGCAAGCAGGGTGTGTGCCTCCTCACCAGAGGACCGACCGCC 12120  
TCTGGATGGCCACACATTATGAGCCCCTCCTTGGCCACGGGTGCTGCAGGGTATGGGGCT 12180  
GTGGGGGGGAATGCCTCGGCTGCCCCAGTGTGGGTGTGGGGTTGGTTCAGGCTGGGCACG 12240  
TGAGGGGTGGAAGGGGAGGCTGGGGGTGTGATGGGGATGTGCTGGATCTGCCCGCAGAG 12300  
GTGGGGAGAAGGCAGTTAGCAATTGTTCAAGGAAAGAACGAAGATCTCGAGATTGTTTAA 12360  
ATGTTTCCTTTTGGAAAAGATTTTTTTTTTTAAGCCATTTTGTAGCACAAAACCCTCAGTC 12420  
TGTCCCTTCTGGAGCTCATCCCAACGAGGAATGAGGCACAGGAAGGAGGTTACAAAACAA 12480  
CGCTGTGAGACTGAGCGCGGGGCTCAGCGCGGCCGCATGCGGTGGGGTGGGAGCGGGGCT 12540  
GTGCCGGGAGCCCAGATCTCTGCACCGCTGCACCGCCTCAGCACAGGGGTACCCGGGAT 12600  
GCAGATCTCCTGTTTGTGTTGATGCAGGGTGTGAGCTTTTCCCAGTTCATTGTGCAGCAGC 12660  
TGGGCAGAACCCTCCGTCTGGCTGTGCTCTGTTTACGACTGCTTCCAGGCAGCCCCACTG 12720  
CCTCCTGCTGCACCTTGCTGCCATGTTTACCCCCCAAACCCCCAAAATACATCTCAAGTG 12780  
GCCCCTGGGGGTGCTGGCATGGGATCCATAAAGCTCTTCTCATCTCATTCTATTCCTT 12840  
TTGCAATCTCCCGTACTGGTTTATTGCAGCCTCTTCAGCCAAACGATGGCATTATCCAG 12900  
CTCTATGATACCACATCTGTCTTCCCTCCATCAACAGCAGAGAGCAAATGGCACTGCAGA 12960  
GCTCTCTGGGTGGTGTGCTGGGAGGAGGTGATTGCAGTCACCCCATCTTTGGATGTGGGAAC 13020  
GATGGCTTTGGCACTTCTTATGTCCCTCAGCACCACCAGGCTGGGTGGGCACAGCTCT 13080  
GTCTTGTGCCACATGCACCCATCCCTGCGGTTGGCTCACCCACCGTCCACCACGGGCGCT 13140  
GCCTCCAGCCCCTGCTCTCCAGAGAGGCTCTGGGAAATTCAGGCACTTTGCCTCCCTGAG 13200  
TTGACTGTCTTACATTTCTTTGCAAACCTGGTGTGCACACATAGCTGCACACACTTAGA 13260  
GCTGTGCACATTTCTTACAGTTGCATGCATGTACAGCTGTGCTCACGTACAGCTGTGCAC 13320

CTGTATAGCTGTGCATACCCAGCCAGCACATGGCTGTGTGTGTGGGTCTGTGTGAAGGTGC 13380  
AGGCAGCTTGGCATGCTGTGGGGGTGCTGGGGTTCGAGTGCTGCCACGCTCCCCAGAC 13440  
CTGCCCTGGGAGGACAGACGGTCTGTTCTGCAATCTGGAAGCAGCCAGAGCAGCCTGC 13500  
AGACACAGAGCCTTTGTGCAGCCCCGTGAGGCTGCAGGGACGCGGCCAATGACCGTTTTG 13560  
TTAAAGATGTGTGCGCGGCTCTGAGAGATTCTGCTGTGCGGAGGCAAAGCAGCACTGAT 13620  
AAGGGGCAGCCAGCATCAGTGGGACATGGACGTGTGTGGGTGAGGGATTGGGAAGTACTC 13680  
TGTGGGTGCGGTGCGTGCAGCGCTTCCATCGGTGGGGACAGATTAGTGAAAAGTGATTCT 13740  
TTAGCTGGCAGAGGAGGGAGGGGCTCCTGGGAAGGCGATGGTGCAGCGTGGGGTCTGCT 13800  
GTGAGCCCTCCCACCTGTGGCCCTGTGCTCAAAGCTGTGGTCTGTGGGAGGCAGCCCCA 13860  
TGGCTCTGTCCCACCTTGGGCAGAGGTCTGTTGGCCCTCAGGCACCCACGTGGCTGCGG 13920  
TACAGTGCCAATGCGCCGCTCTCCCTGCTGGCAGGCGGCCTCCTGCGGTGGCACCCATTG 13980  
GTGGCTGGACTCACTGCTGTGCTGGGCGGTGGACACATTTCTGACACTGCTGCCTCTCCG 14040  
GTACCTCTCACTGCACCCACACGGTGCCACACTGAGCACAGCACGCCCGGCCCTGTGGGA 14100  
TGGGTGCAGGCACTGGGATGCGCTGCCGTACAGCCGGGGCCAGCACCACGTCCGAGTGC 14160  
CGGTGCCAGCAGTGTGGCTCTGCTCTCTTGCAGGTGGGAGACCAGATGAAGCTGCTGCAG 14220

ValGlyAspGlnMetLysLeuLeuGln (304)

AACTGCTGGAGCGAGCTGCTGGTGTTCGACCACGTGTACCGGCAGCTGCAGCACGGCAA 14280  
AsnCysTrpSerGluLeuLeuValPheAspHisValtyrArgGlnLeuGlnHisGlyLys (324)

GAGCACAGTGTGCTGCTGGTCACCGGGCAGGAGGTGAGCGCAGGGCTGCACCACAGTGTG 14340  
GluHisSerValLeuLeuValThrGlyGlnGlu (335)

GAGCCGGGGACTGCTGTCTGCCTTCTGAGCTCGCTCCCCCTCCAGTATGTGGTGGGCAC 14400  
ATGGTGGGGTGGCCGTGGGGGCCCCGTGCTTGATGCTGTTCTCCCGCAGGTGGATCTGT 14460

\*\*\*

ValAspLeuS (339)

CAGCAGTGGCGGCGCAGGCGGGCTCCATCCTGCACTCCCTGGTGTGCGGGCACAGGAAC 14520  
erAlaValAlaAlaGlnAlaGlySerIleLeuHisSerLeuValLeuArgAlaGlnGluL (359)

TGGTCTGCACCTGCACTCACTGCAGGTGGACCGGCAGGAGTTCGTCTGCCTCAAATTCC 14580  
euValLeuHisLeuHisSerLeuGlnValAspArgGlnGluPheValCysLeuLysPheL (379)

TGATCCTCTTCAGCCTCGGTAAAGCGGGACCGTGGATGGGGCAATGGGCAGTGAGGGCA 14640  
EuIleLeuPheSerLeuA (385)

GTGGCTGTGCTCGCAGATGGGCAGAGGGGATAAAGAGGCTTTGGTGTGGCACTGGGAACA 14700  
AGGGCTGAGGCCTCACCGCTGCCCTGCCCTGTGCATCTGGAGCTTTGGGGGCTGTTCTTG 14760  
CTTCGCTGTGGCTGTGGAGGACACTGCATTCCTGTCCCACGAGCAGAGCCTTATTTTGA 14820  
TCACTCGCCTGCCGCAGGGCAAGCAGCAGCTGATAGTGCCCTGCAAACCGCCGTGTTGGC 14880  
AGAGACGGCCGCAGGGGACGGCCCTATCTCCCGGGATGTGCGTCAGCAGCACCCAGGCAG 14940  
CGCCGCACGCAGCTTCTGATTAGACCCTGCCCGGAGCCTGCGGTGAGCCGAGGCGGCGCA 15000  
TTCACACGGCCGCTCCTCACCCAGACAAAACATCGGAGCCGCAGCTGAGAGCTCTGATCT 15060  
CTGGGCACAGAGCTGCCAGGGGCTCAGCTGTGTGCCACACTGCCGCCTCGCACCTTGCC 15120  
GCCGCCCGGCTTCACATCGTGCCAGCTGCTGCTAATTGTGCCTAGAGAGAGTATGCGGGT 15180  
GGGTCCCTGCAGCACAGGGGTGCTGGGGAGAGATGGGTGTCTCTGTCCCGTCCCCATCCC 15240

AATCTCAGAGCGGGGTTTGCTGAGGACATCCCTGGCAGCAGCAGGTCCCTGGGAGCCTGG 15300  
AGCCACACAGCTGTCCCCCCTGCAGCTGCAGCATCTCCTCCTCCCGAGGGCGTTCTTTTT 15360  
TCTCTGGAGCTGTTTTGAAATCCACAGAAACCAGATATGGCGGCTCGCTATTTCAACAGT 15420  
GATAAGGGGTGACACAAACAGTGTGGGAAATGAGGGAGCTGGGGAAGGGGCCATGCCCC 15480  
ACTGCTGCCCCATGGGTTCTGCAGTAGCATAACCAGACAGTCCTCCAATGCTGCCCTGTC 15540  
CCCATTCCCACCTGCATTCCCATCCCTGAACCCATCCCTGTCCCCATCCCTTCTGCACAT 15600  
GGCAGCAAGCAGGGCACCATCCTCCCAGGCACTGGCGTCTGCAGCACCGTCTCAGCCTG 15660  
GGATTCTCATCCGCAGGGCAGCAGCTTTCAGGGAGGGCATGGAATAAAACAGCAGTGTT 15720  
TTCCCAGACGTTATTTTGCCCCAAATTCAACTTTTTCTCTCCATATTGCAGAGCTCACTT 15780  
GGAGTAATTTGCCCTTCTCAGGCTCAGCTGTAGAGGATGGGATTGTGTATTATGTTTCAGG 15840  
ATGTAATTGCCTTTAACAAGAGAATTTCCACATTTACCACTCTGCCACAGCACAAATCAA 15900  
GCCAAGCCCCACTCACAAGAGCTGCCATTTGAGTTCTAAATAGATTTCTCTCCTGAGCAG 15960  
GTAAAGAGATTTAATTAATAATAGGGCTTCTCAAATAGCAATATTTATGAGGACGGCAC 16020  
AGGTTAGCTTTGTTATACAGAAGGGCTTAATAGAGCCTTAATGGATTGACCTATCATTTCG 16080  
ATTTTCATGACTTACATTCATGAAGCAGCTACTCTTGGGGAGGGGAGGAAGAGAGGCTTTT 16140  
ATAGCCCACATTCCTTAAGCGTTTGCAATTTATCAGCAGCTTCTCCCAAACAAAAGGAG 16200  
CTGTGAATAGGAAGAACACTTGAGGGCATAGAAATAATCCCAGGCATATCTGTATGTGTG 16260  
ATGGGAGGCTTTGTACAGGACAGTCTTTGCAACTGCTGCAGTGTGCTAAATGAAGTGA 16320  
GTCAATGTTATTTGGACAACATTTCTGTATTCCTTGCAAGGATGAAAAGATTATTCAAATA 16380  
TTCAATTAAACAGTGAATAGGGTCTTTCAGAGAACCAGGTGAGTTCATCGAGTAGAACTA 16440  
GCTATTGTTGAGCCAACTCGGGATAGATTTGACATTTATCAATATAACTTCTTTTTTTTA 16500  
ATGACATGCACAATAACCTTATGCAGATAAAGAGATTTATAACAACAACCCCGGGTAGA 16560  
AGGGAGACGGCCACAATAGGAGCAAATGTGCCTCAGGAGTTAAAAGGGAAGGGTGATCTG 16620  
ATAAGTGCCAGGCACACCCCGCAGGGCTGCAGCCACACCGTGCAGTGCCCGGCCGGCCC 16680  
CGGCCATGGAGGCTGAGCCCCCGGGGCCCTCCACCACCAGCACTGCACATTGCCCTCT 16740  
GGAGAGCTGCTCGGCCCTTGGTGAGGCCGCGGCCTGTTGGGCTCAAAGCCCCAAATAAA 16800  
TTGCAGAACCCCATGCTTTGCTGCCCAGATCTGAGGGCTCCGCACAGCCAGGCAGTGTC 16860  
CAAGCTGCAAACCTCAGTCCCTAAGTGTGCGCACATGGGGAGCTGGCAGCACGGCGAGCAGC 16920  
AAACCGAGCATCCAAGCTGCGGCACCAGCACGGGCACTGCGGGCACTCAGGTCTCAGGGG 16980  
GAAGGACAGTGGGGACAGACCCTCCTGGTGCACCCAGCACAGTGCGGGCAGTGCCCTGTGC 17040  
CTGGCTCTGCTTCACTCCCCCATCTCGCTCTCTTGTAGATGTGAAGTACCTGGAGAACC 17100  
AGATGTGAAGTACCTGGAGAACC 17100  
spValLysTyrLeuGluAsnH (392)  
ACGCGCTGGCTAAGGACGCTCAGGAGAAGGCCAATGCAGCCCTGCTGGAGTACACGGTGT 17160  
isAlaLeuAlalysAspAlaGlnGluLysAlaAsnAlaAlaLeuLeuGluTyrThrValC (412)  
GCCACTACCCACACTGCACAGACAAGTTCCGGCAGCTGCTGCTGCGGCTGACTGAGGTCC 17220  
ysHisTyrProHisCysThrAspLysPheArgGrnLeuLeuLeuArgLeuThrGluValA (432)  
GGGCGCTGAGCATGCAGGCAGAGGAGTACCTGTACCACAAGCACCTGAGCGGAGAGGTGC 17280  
rgAlaLeuSerMetGlnAlaGluGluTyrLeuTysHisLysHisLeuSerGlyGluValP (452)  
CCTGCAACAACCTCCTCATCGAGATGCTGCACGCCAAGCGGACTTGAGTGCAGTTCCCAC 17340  
roCysAsnAsnLeuLeuIleGluMetLeuHisAlaLysArgThr\*\*\* (466)



ATGGACTCTGCAGGGCCCCGTGCAGCAATGGGGCAGGACACGCACCTGGGACCACCTCTC 17400  
CGCCCCATGCCTCTCAGTGATGCTATTTAACCTGTGCTAGTGGAAGGTCCCAGGCGATTT 17460  
ATTTTAATACATGGTAAGGACGGTTAATGGTCGCAGGGATGTGTGCTCGACAGCCGGACT 17520  
GCCCTGCCAGCACTGCAGCCCTGCAGACCCTGCACAGTCAGTGCCCAACCTGCTGCCTGA 17580  
CCCGGCTCTGCGACATGAGCAGGGGAAAGCCTGTCTGGCTTAGCTCCCATTTCTGCTT 17640  
CTCTCCTGTCATCCCCGCACTCTGTCTCTCCACCTCTGCGCTCCCAGTCCCAGTCTGCC 17700  
CCCTCTGGGACCCCTGATGTACAGGGCATGGGAGGAAGTAAGCTTAAATCCCTCCAGGCT 17760  
GTGGGGTTTCCCTTTGCTCTGGCACTCGCACAGTGGCAGGGGATTTCTGCAGCAGCAAAG 17820  
CTGAGCCCTGGGGCTGAGATCTGCTCCTGTCTGCCTCAGAGTCACTGCCCTGCCAGCACC 17880  
AAGCAGGGCACTGCTGACCCTCAGCTGGCTCCACTTTCATAGCACTTGCCAATGCCATGG 17940  
CAGGAACTGGGATTTTACAGCCCCTGGCAGCTGCAGTGCCCAAATCCCACCCATGTCTGG 18000  
GCTCAGCTCACGTCCAGGATGGCAAGGCTTTGTGTAGAGGCTCCAAGAGTCAGTGCCGGG 18060  
GACAGGGACTCATCCCTGGGACATTTTCACTTCCCCTGCATCAGGGCAGGAGAGGGTGCAG 18120  
GGGCAGCGGCACGGCCAGGCACCCACAGCCTGGGCAGATTCCTGGAGCTCACTCCAGCCA 18180  
CCAGCCGTACCTGCATGCTGCTGGGGAGCAGCCAAAGGGCAGCCAAAGGGACAGAGATGG 18240  
ACACCATCCCCTCGCTGCCTGCAGGTGATGCTGGTAGAGGCGGCACCTGCAGGCAGCAGGG 18300  
CAGGAGGGACGCTCAGGGCCCAGCCTCATGCTGTGGGCAGTGGGACAGTTGCAGCAGCAC 18360  
GTGCCAGCACGTGCCAGGACTGCAGCTGGGGGCCCTGGCAGCACCCCTGACATTTGGGGC 18420  
AAGGAGGAAGCAGAAGGGCCAGCACTGCCTTGTCCCCACGTGACAGCAGAGCGCTGAAGA 18480  
CACAGAGATGCTGCCCTCTCTCCCCGCGCTGGGGCTGGGGCTTAGCAGGGCAGCACAGAGGC 18540  
TCCATCACAGCCTCCTCCTGCCCCACGCTGTGTCTCACCGGTGCACAGCACATGGCCCT 18600  
GCCAGCTCTGCCAATGGGTTTGGTTCAGGTGTTTTCTCCGCTGTCCCACCTGGAGGGGAC 18660  
ACTTCACACACCACGGCTCCGCACAGCACTGGCGCTTGGGGAGCTCTCGTGCTGCCAACC 18720  
TCCAACCCCAACTTGTTAGATACAGAAGAGCATGTTTTGTTTTTCTTTTCAACGTTTTGTG 18780  
CATTTTCCCTCCTGAAGTCTGTGGTTCAGTTTCACTTTCTTCTTTCTGTGAACTTAAAGAA 18840  
CTGGAGAAAATGGTTTGGGAGGTAAGATAATTTTATTTTTCAGAAAATGAAAAGTGTCTT 18900  
TAAGTGTCTCTCTCTCTCTCTTTCTCTCACATCCTTTCTCTCTCCCATCCCTCTCCTCC 18960  
TTTGCTCCCCACCCTTCCCTTCCCAGGCAGGAGGTTATTAACCTCCATGTCAGGAGTAAAC 19020  
CACTGTAATAAAATTTTGCAGTTTCATTTAAGAAGGCCAAACGTTGGTTTTTTTTGATTGCATT 19080

poly (A) signal

TCTGACACTCCTTCCTGGTGCCACCCCTCCTCCCAGCCGCAGGGCACCACTCAGCCCCC 19140  
GGCCCCATCCCGTGGGACCCCCAGCAGGAGGGGACCGCTGTTGTGGCTCAATAGGAGGG 19200  
CATCAGTGA CT CAGGACCTGATTCCAAGTGCTGCTGTGAATTGCCATAGCGACTCTGAGT 19260  
GTGTTTTGCAAGTAAGCTTGAGAATTATAGCATTTAGGAGGCAATGGGCAATGCCATGTG 19320  
CTGAGGGAGGGAGCAAACCTCAGCAGGGCATCGAGCAACGGGTGTGAATGCAGTGCCGC 19380  
CTGGCAGTGCCCCAAGCATGGGCTCCCCAGCCCCCAACAGCTGGAGATGCTGACACCAGA 19440  
AGTGGTGTTCCTGCACCCAGATTGTGGTTCCTGGCCAGTACAGAGCTGTTTTGGGGGCTG 19500  
CGGTTTCCACCAGCAATTAAATGCCATCCGGCACAAGCTGTGCTGAGACCAAGGAACACA 19560  
GTGTGATGGGGCAGCCAGCCAGCGGATCACAGAGCCACGATCCCTCACATTGCAGCCCT 19620  
ACACCCTTCCAACCTGTGAAGCTATCACGTGTGGCTGTGGAACCGTTCCCAGGGACAAA 19680  
TTACAGGGAGAGAAGCTGCCTTTAAAAATCAGCATTTACTGTCATCGTAACCAGCAAAA 19740

AACAACACTTTTAAATGTGCTCTAAACACTATAAAGTAACAGGAGAAGCAGTCCAAGGCAC 19800  
AGAACAGAGGGGAGGGAGAACGTAACGCCAGCTGGAAGGGGAAGTAACCAGCCAGATGGGA 19860  
AACCAGGAGGAGAAAGGAGATTTTTTGTCCAAAACACAGCCAAAGAAGCTATTAAAGTCA 19920  
GCTGGTTTTAGAAAAGCACTGAAGCAAGACACTGTCTTCCCTCGTGCCTGTGCTTCCATGC 19980  
AGCCCAGCCCCAGTCTGCCCCTGCAGAGTGATGCCCTCCTCTGTGTGGGCACAGCCCTGG 20040  
GCACAGCGTGTCCCACACCACGTCTCCAAGTGAAACCAGCCCTGGTAGTGGCACAACCA 20100  
ACGCTGGCAGCGATGTGGAGCTGGGGATGCGTGGAGTGCCTTCAGCAGCGCACAGTGCCC 20160  
AGTGGCCCTGTGAGAACCCCTGCAGCCCCTGTCTGCCGTGGCTTTGTCTGCACATGAT 20220  
GCTGGGAAGAAGCACAGTTAGCCGTCTGTGGGAAGCAGCTCCTCTGCCACCATCCTCCT 20280  
GGCTGCTTGAAGAACCACCACAGTGTTCATGGCACCCAGAAACCTCCTCTCAGAAACCTGA 20340  
AGCAAAGAGAGATGGGCTGAGCCGCACCGGCTGGGAGAGGGGCCGGGGCGGCTCCCTGC 20400  
TGCCCTGCTGGGGTCTGGGGCACAGGCAGGGAGCAGGGAGACTGCTCCTACAGCTGCTC 20460  
AGCAATGAGCACACCATAACACTGCGCAGGGCACCATCAGCTCTGAATGCACTGAAGAA 20520  
AGTTTTAGCAAGATGAAATGAAAATACCACTGGTACCGTGGAAAGAGAGCACTGATTCTG 20580  
CATGGGTGCGCTTCCCCATTGAGGCACAGGGCCCCCCTACCCAGACAGTAGCACCCAG 20640  
GGCAGGGAGGGATGGGGCAGCTCGGTGGGTGCGCGTTTTCCCGGCACCCACAGCATGCC 20700  
AGTGCCCGGCTGGCTGCAGATCCCTGAGATCAACCATTTCCCGTTATTTTAAATGAAAT 20760  
CCTACTGAAGGCATTATTGCGGGAGTTGCAGAAATACTCAATATTGATCACAGAAAGGCT 20820  
GGCCCGTGGAGACAAGATCCATGTTGCTATGTGTGGCTTAGCAACATATAAATGTATTCA 20880  
AACCGAATAATGAAATTATCGTGGGGAAACAAAGAAGCCATCACTTGAAGAGATGGAGGA 20940  
TGTGGAGGCCTCTTGGAGCTCTTGTTACCAAGACAAGGAAGACGGCACTCATTGTTTGT 21000  
GCAAACATGTGAACCCCCCGGCCATCCCCTTCTTACATAATGGGTGTAATGAATCTGG 21060  
GCAGAGTGCTCCGTGCAACGCACATCTTTGTACAGCTGGGCTGGAGCTCATTACTGCGAA 21120  
AAGCACGCGGCCCTCTGAGTGAATTGAGTCCTTGGAGGGGGAGACCGAATATTGGGGGT 21180  
GGGAGAGGGGGAGGGCTGTGGGGGCAGCGCTCAGCCCCGCCTGCCTGTGCCTCAGCCAC 21240  
ACTGCTGAACCGCGTGCTGTGTGCTTCTGAACCTGGCCAGTCTTTACCTGGGCTCAATC 21300  
TGCTTACCCCTCACACACACACTGAAGTGTTGCTATGAGCCCGTCTGTCTGCACCATG 21360  
AACCCCACTGGTTCGCCTTGCATGGAGAGCAAGAGCATGGTTGCACTCAGTTACAGCCAT 21420  
AGGGTGAGGCAGATGGATTCCATCCCAGGCCCAGCACCCTTTGCTGGGCAGCTATGAGC 21480  
AGGTGCTGCCAGCCCCAGATTCCAACCTGCACTCCTGCCACGTGATCTCCTGGTTCGGG 21540  
CAGGGGCAGGCGGGATCC..... 21558

Fig. 19 ニワトリSF-1 / Ad4BP遺伝子の転写開始点の決定

ニワトリSF-1 / Ad4BP遺伝子のプロモーター領域と第1エクソンを模式的に示した。GCおよびTATAボックスはボックスで示した。GTは第1エクソンのスプライシングドナー部位をし、数字はそこからの相対的位置を表す。矢印は、RT-PCRに使用したプライマーを示す。上に黒いバーで示したのは、副腎、卵巢、精巣からの5' RACEクローンの数。

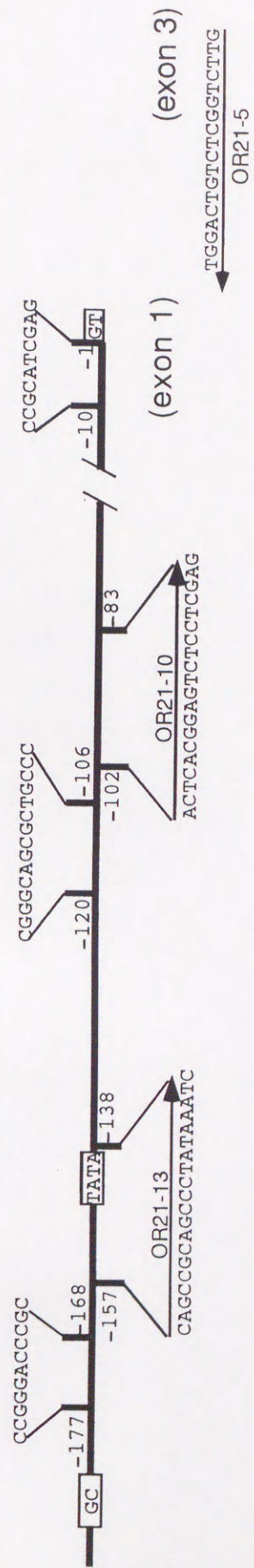
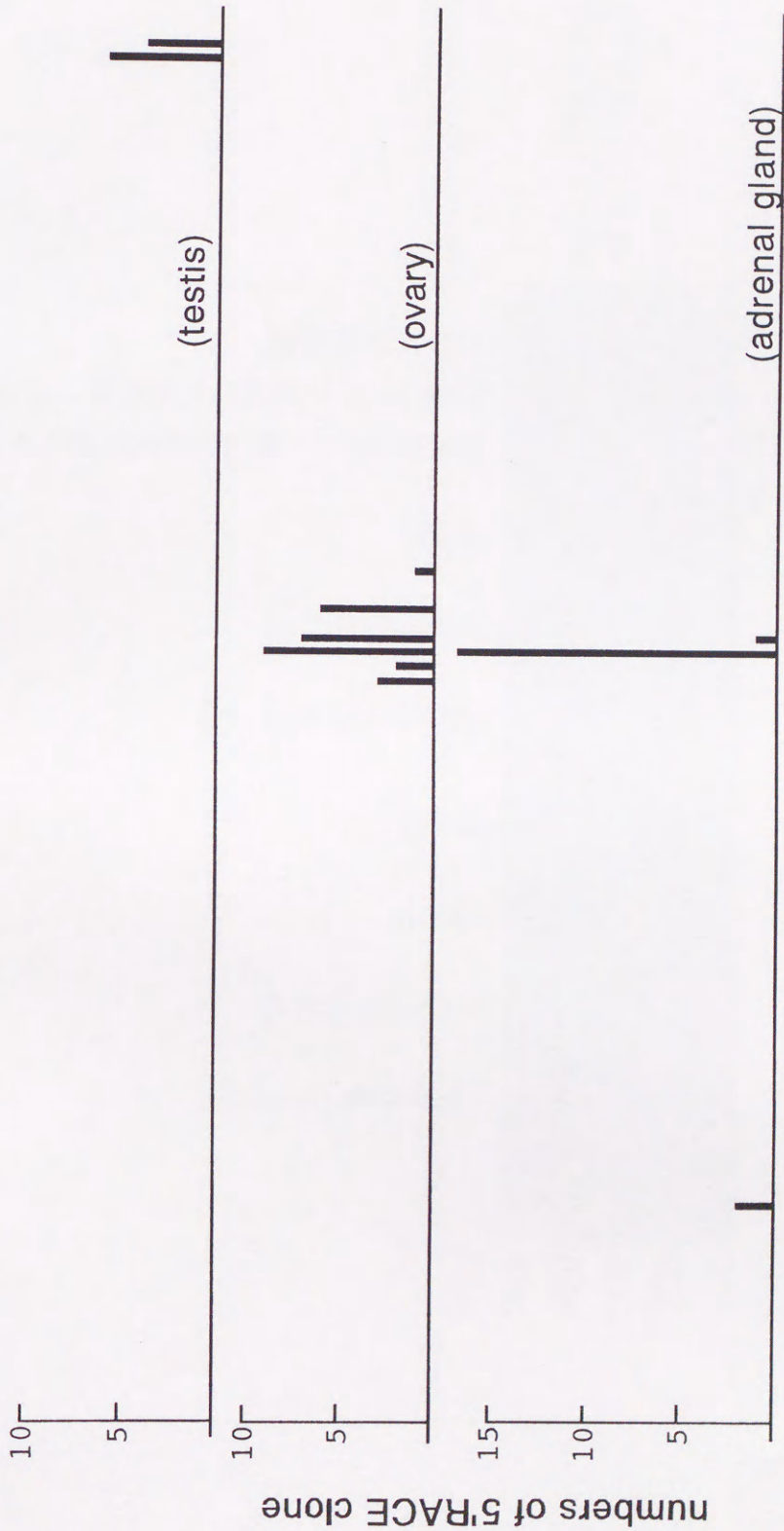


Fig. 20 5' UTRのRT-PCRによる増幅

左側4レーンはOR21-5およびOR21-13で増幅した産物を、右側4レーンはOR21-5およびOR21-10で増幅した産物を電気泳動した。矢印は増幅産物の位置を示す。

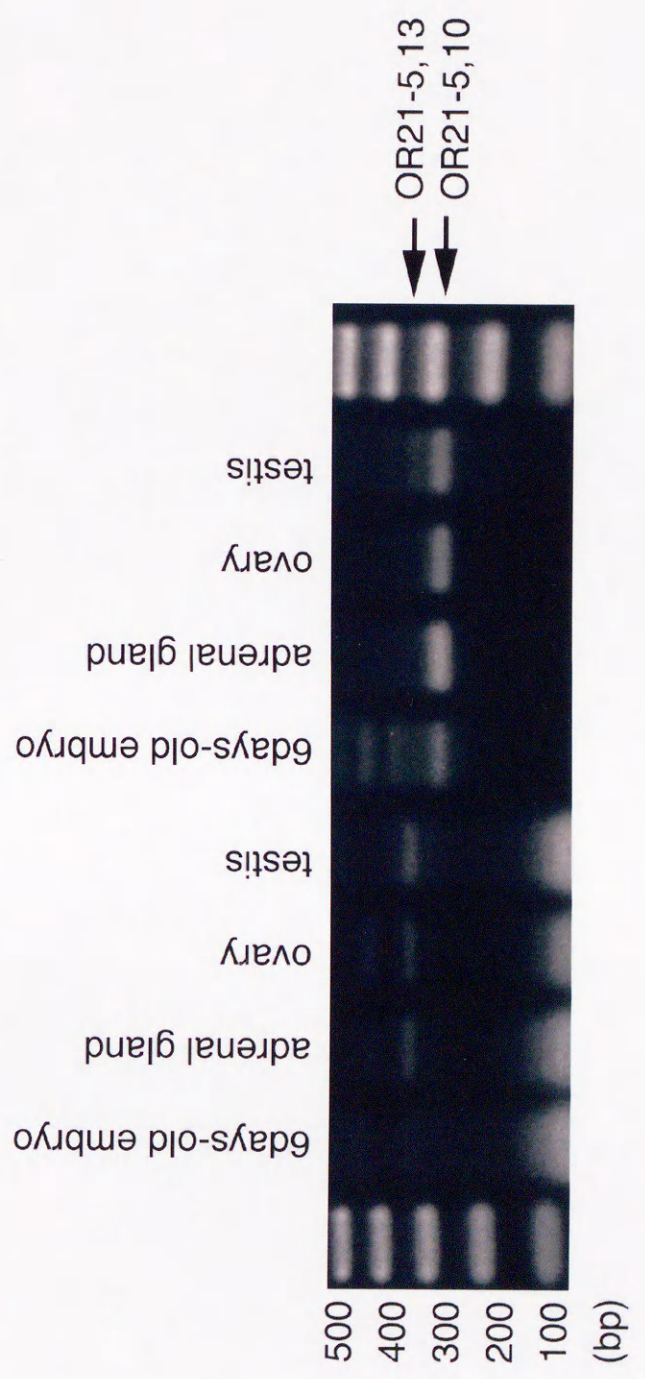


Fig. 21 ニワトリ卵巣由来細胞の特徴付け

上の写真は OR21-5 および OR21-10 で増幅した産物を、下の写真は AROMA7 および AROMA13 で増幅した産物を電気泳動した。矢印は増幅産物の位置を示す。

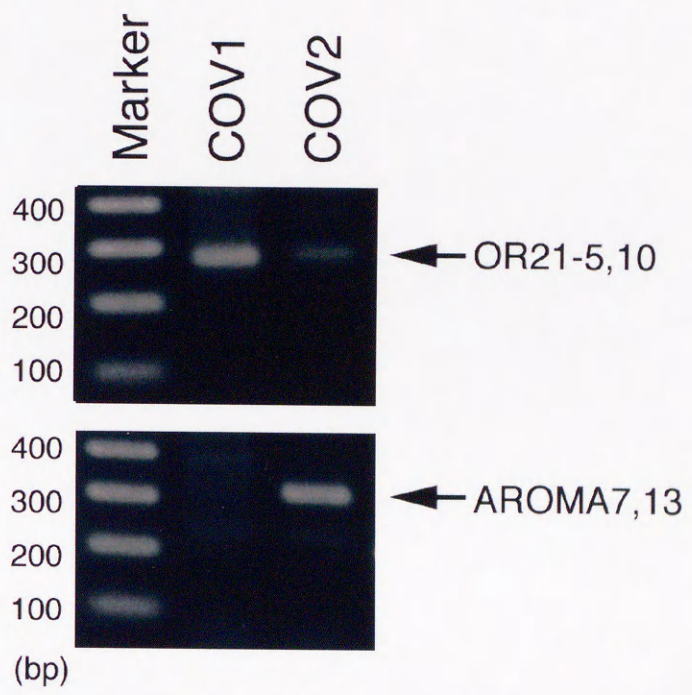




Fig. 22 ニワトリSF-1 / Ad4BP遺伝子のプロモーター解析

遺伝子導入実験に使用したレポータープラスミドのプロモーター領域を模式的に示した。かっこ内の数字は、転写開始点からの相対的位置を表す。遺伝子導入実験は、ニワトリ卵巣由来細胞 (COV1、COV2) およびマウスNIH3T3細胞で行った。ルシフェラーゼ活性は、SV40プロモーターの活性に対する相対値 (%) で表した。ルシフェラーゼアッセイは少なくとも3回行い、結果は3回の独立した実験の平均値で示した。

SF-1/Ad4BP promoter (2.5 kb)



Fold Activation (%)

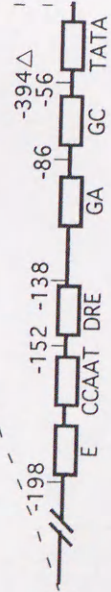
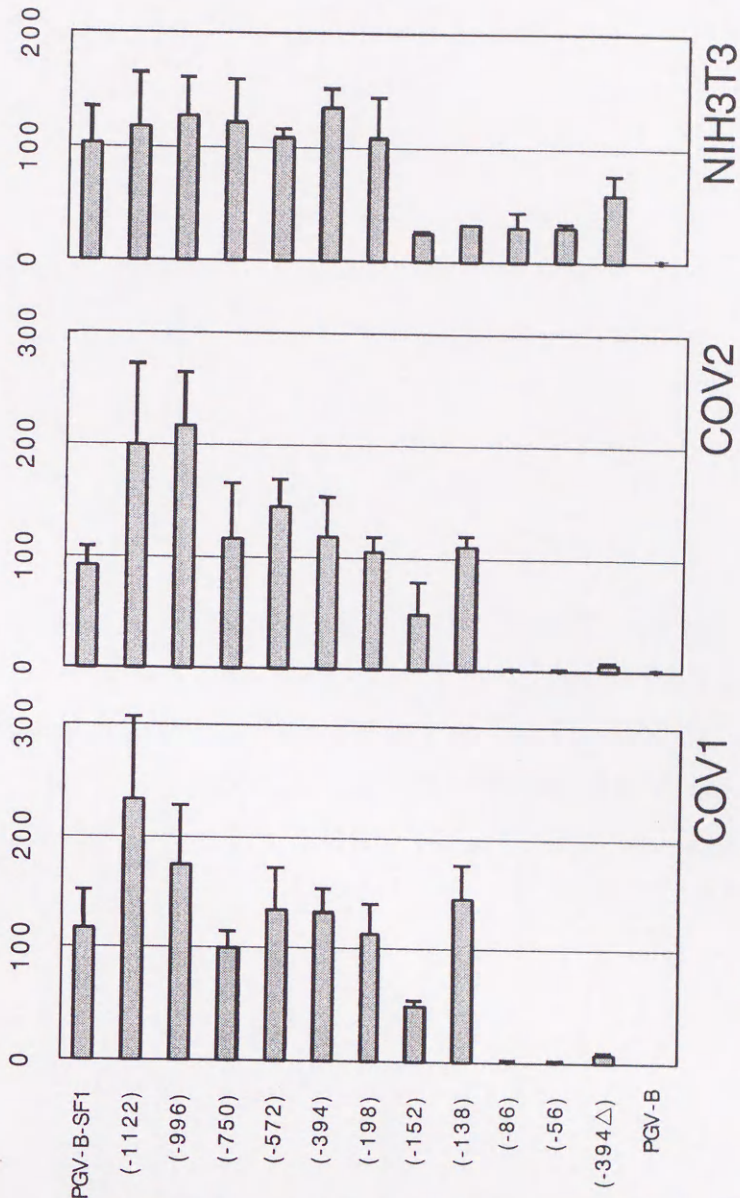


Fig. 23 齧歯類のELP遺伝子に相当する領域のアミノ酸配列の比較

齧歯類（ラット、マウス）のELPの第1および第4エクソンに相当する領域の推定されるアミノ酸配列を示した。アミノ酸の一致はコロンで表した。太字はSF-1/Ad4BPの配列を、アスタリスクは翻訳停止コドンを示す。



**Fig. 24 アロマターゼ遺伝子の転写制御**

哺乳類および鳥類のアロマターゼ遺伝子のプロモーター領域を模式的に示した。ボックスは転写制御配列を、丸はそれに作用する転写因子を表す。5 CREは本文中のCRE類似配列を示す。TBPはTATA-binding proteinのこと。



sex-determining factor ?



Fig. 25 鳥類SF-1/Ad4BPの性分化における役割

鳥類のSF-1/Ad4BP遺伝子の発現と生殖腺の性分化を模式的に示した。赤いクエスチョンマークは、未同定の転写制御因子を表す。

genetic sex

ZZ

?

genital ridge

SF-1

WT1

indifferent gonad

SOX9

SF-1

ovary

SF-1

Aromatase<sup>SOX9</sup>

?

Aromatase

ZW

?

testis

Leydig cell

Sertoli's cell

MIS

Wolffian duct

Müllerian duct

ovary

thecal cell

Aromatase

granulosa cell

estrogen

MIS

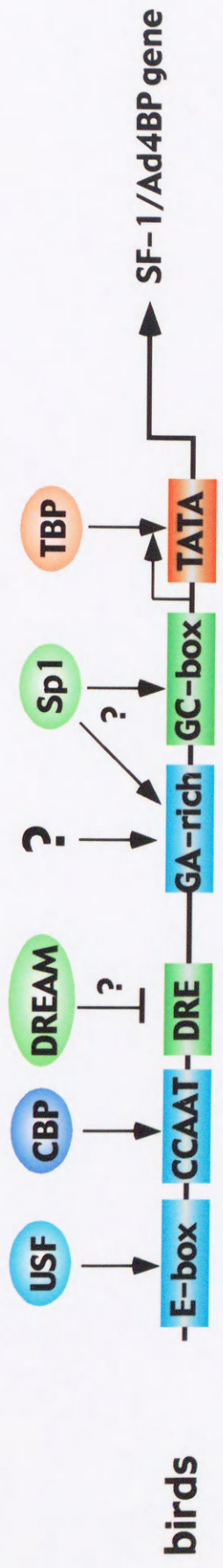
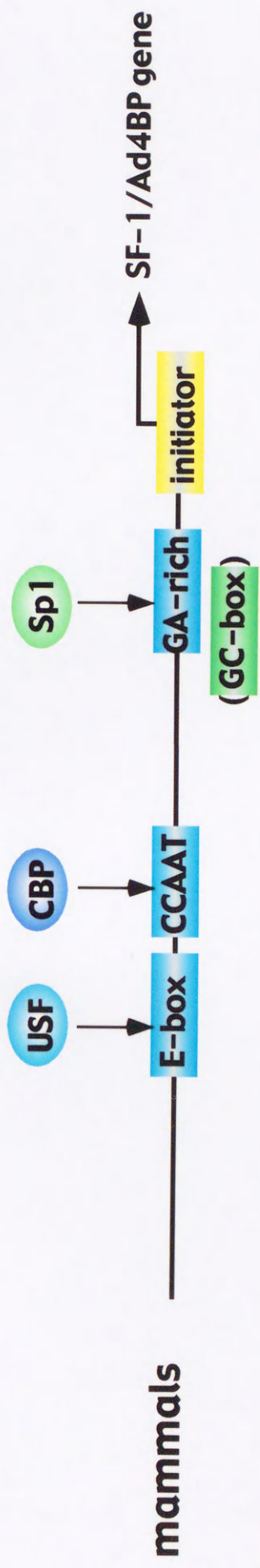
female

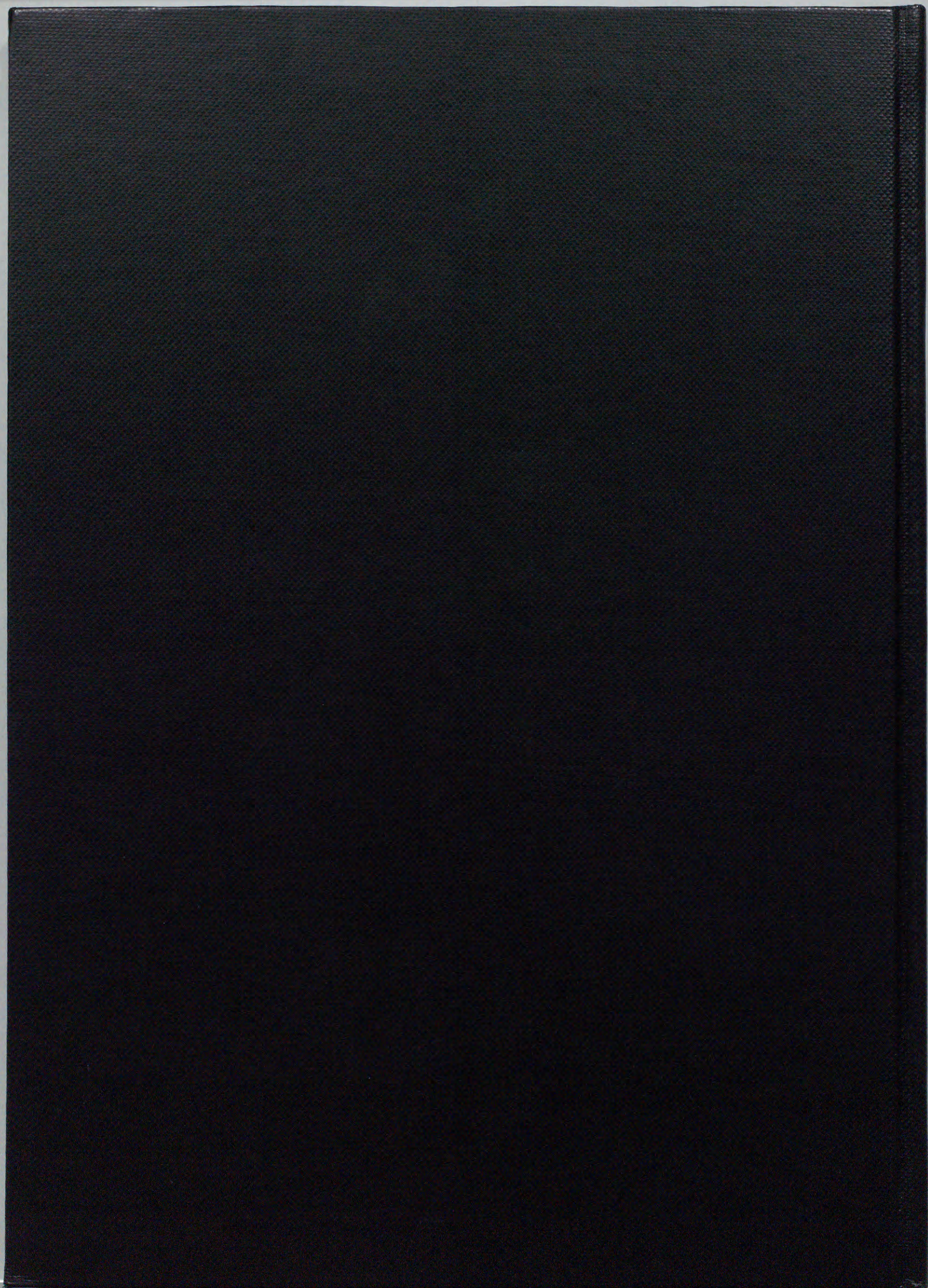
Müllerian duct



Fig. 26 SF-1/Ad4BP遺伝子の転写制御

哺乳類および鳥類のSF-1/Ad4BP遺伝子のプロモーター領域を模式的に示した。ボックスは転写制御配列を、丸はそれに作用する転写因子を表す。括弧はヒトでのみ認められる転写制御配列を示す。





inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

