

氏 名(本籍) さい 藤 ひさ と
齊 藤 寿 仁

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 博 第 4 0 3 号

学位授与年月日 平 成 2 年 3 月 28 日

学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当

研究科専攻 東北大学大学院農学研究科
(博士課程) 農芸化学専攻

学位論文題目 ニワトリ，シチメンチョウ，キジのW染色体
を構成する反復DNAの構造ならびにW-proteinとの相互作用の解析

論文審査委員 (主 査)

教授 水野 重樹

教授 藤尾 芳久

教授 一島 英治

論文内容要旨

第1章 序論

鳥類の性染色体構成は雌ヘテロ型であり、雄はZZ、雌はZWの各2本の性染色体を体細胞の核内に含んでいる。雌に特異的なW染色体は、一般に小型で、Cバンド法により全域が濃染されるため他の染色体と容易に区別される。Cバンド法による分染の現象は、in situ ハイブリダイゼーションの際に染色体DNAをアルカリ変性後、DNA 2本鎖の再形成反応を行なわせた結果見出されたもので、その後の研究からCバンド法で濃染される染色体領域と高度反復DNAが局在する部位とが一致する場合が多いことが知られている。このことから、以前からW染色体DNAはその大部分が反復DNAより構成されているのではないかと考えられていた。また、W染色体DNAは体細胞核内においてその全域が高度に凝縮したクロマチン(ヘテロクロマチン)構造を形成していることも知られており、こうしたヘテロクロマチン構造の形成と高度反復DNAとの因果関係も以前より興味を持たれていた問題である。

本研究は、間期の細胞核内におけるW-ヘテロクロマチンの分子構築の解明の一環として行なわれたものであり、その研究対象としてはキジ目に分類されるニワトリ、シチメンチョウ、キジのW染色体に着目した。ニワトリのW染色体DNAのヘテロクロマチン化については、この染色体の約60%を構成する反復DNA成分(XhoIファミリー反復配列)^{1,2,3)}とXhoIファミリー反復配列に高親和性結合するW-protein⁴⁾が関与している可能性がすでに報告されており、本研究ではこのような反復DNAとタンパク質との相互作用が他種のW染色体DNAについても認められるかどうかを検討した。

第2章 ニワトリ XhoIファミリー反復配列の量的および質的な変動

XhoIファミリー反復配列の代表的な反復単位として0.7kb反復単位(XhoI-0.7kb配列)が知られており¹⁾²⁾、ニワトリ品種の一つである白色レグホンのW染色体上で、この反復ファミリーは0.7kb単位に換算すると約3万回反復して存在すると考えられている。このことは白色レグホンのW染色体DNA(全長約 3.3×10^4 kb)のうち約 2.1×10^4 kbの領域は比較的均一な反復DNAで構成されていることを示している。

研究を始めるにあたり、このXhoIファミリー反復配列の特徴をさらに知ることが重要と考えられた。そこで初めに、この配列がニワトリ各品種のW染色体中でどのような量的変動を示すかという点に着目して解析を行なうことにした。Fig.1には³²P-XhoI-0.7kb配列をプローブとして、塩基不対合を約11%まで許容する条件下で19種のトリDNAに対しドットプロットハイブリダイゼーションを行なった結果が示されている。上段のタイワンジドリ(Taiwan Native Fowl)から15段目の赤色野鶏(Red jungle fowl)まではGallus属(ニワトリおよび野鶏)である。XhoI配列との顕著なハイブリット形成はこれらGallus属の種の雌においてのみ認められた。しかし、それぞれの反復回数には変動が認められ、最も多いタイワンジドリでは2倍体ゲノム当たり約4万回、最も少ないエジプト産ニワトリ品種ファヨウミでは2倍体ゲノム当たり約5千回反復していることが示された。これらの結果から、XhoIファミリー反復配列に極めて高い相同性を示すDNA成分はGallus属において広くW染色体上で反復して存在しているが、その存在量はW染色体当たり約5千回から約4万回まで変動が許容されていることが

明らかとなった。

さて、上述の実験結果を見るとファヨウミのW染色体においてはXhoIファミリー反復配列が著しく少ない分だけ、その他の反復DNA成分が増幅している可能性があった。しかし、極めて近縁である品種間において、全く異なった反復DNA成分が増幅しているとは考え難く、XhoIファミリー反復配列に関連または類縁のDNA成分が存在していると予想された(本論文では、“関連”配列とはXhoI-0.7kb配列と60%以上の相同性を持つ配列を、“類縁”配列とは60%未満の相同性を持つ配列を示す)。そこで、次にXhoI配列との相同性の許容度を変化させた条件下でハイブリット形成反応を行なうことで、XhoIファミリー関連または類縁配列の存在をファヨウミのゲノム中に検索してみた(Fig. 2)。実験には、白色レグホン(WL)およびファヨウミ(Fa)、またFig. 1の実験条件下ではXhoI配列が検出されなかったシチメンチョウ(T)、そして対照としてヒト(C)のDNAを用いた。プローブである³²P-XhoI-0.7 kb配列との塩基不対合を約32%まで許容すると(AおよびC)、雌ファヨウミDNAに対するハイブリット形成レベルが雌白色レグホンDNAとのハイブリット形成レベルの約70%まで上昇した。さらに塩基不対合を約40~60%まで許容すると(BおよびD)、ハイブリット形成レベルは2種のニワトリ品種間でほぼ同程度となった。これらの結果は、XhoIファミリー配列の関連または類縁配列がファヨウミのW染色体DNA中で高度に反復して存在することを示唆するものであった。

Fig. 2の実験から、ファヨウミについてばかりでなく、本研究を進める上でのいくつかの重要な知見が得られた。その一つは、塩基不対合を約60%まで許容した条件下で、雌シチメンチョウDNAに対するハイブリット形

成レベルが雄DNAに対するその約2倍であったことである。この結果は XhoIファミリー反復配列に類縁のDNA成分がシチメンチョウのW染色体にも存在することを示唆するものであり、XhoIファミリー反復配列の進化的起源を考える上で興味深く思われた。

第3章 シチメンチョウおよびキジのW染色体を構成する反復DNA

前章で述べた実験結果から、Meleagris属のシチメンチョウのW染色体中にもXhoIファミリー反復配列と類縁の反復配列が存在することが示唆され、Gallus属以外のW染色体中にもXhoIファミリー類縁配列が存在する可能性が示された。そこで、XhoI-0.7kb配列をプローブとし、高い塩基不対合を許容する条件下でハイブリット形成反応を行なうことで、Gallus属以外のキジ目のトリの雌ゲノム中にXhoIファミリー類縁配列を検索した。

Fig. 3-BにはシチメンチョウDNAをPstI分解した後、またDにはキジDNAをTaqI分解した後にアガロースゲル電気泳動を行ない、³²P-XhoI-0.7kb配列をプローブとして、約60%の塩基不対合を許容する条件下でサンブロットハイブリダイゼーションを行なった結果が示されている。シチメンチョウのPstI-0.4kbおよび-0.8kb配列等ならびにキジTaqI-0.5kbおよび-0.9kb配列等、雌特異性の高いハイブリット形成バンドがいくつか認められた。これらのDNA断片は、それぞれの種のW染色体を構成するXhoIファミリー類縁配列と考えられたので、シチメンチョウのPstI-0.4kb配列およびキジのTaqI-0.5kb配列をクローン化して塩基配列レベルの解析を行なうことにした。

PstI-0.4kbおよびTaqI-0.5kb配列を含むプラスミドクローンをそれぞれ pUMG0401およびpUPV0501と命名した。Fig. 4にはこれらのクローン化DNAをプローブとして、シチメンチョウおよびキジのゲノムDNAに対しサザンブロットハイブリダイゼーションを行なった結果が示されている。また Table 1には、これらのDNA配列のゲノム中での反復回数を定量的なサザンおよびスロットブロットハイブリダイゼーションによって調べた結果が示されている。これらの実験結果から、PstI-0.4kb関連配列はシチメンチョウのW染色体に特異性が高く、この染色体中で0.4kb単位に換算して約3万回も反復していると推定された。一方、TaqI-0.5kb配列は、関連配列がキジの雄ゲノム中にも認められたことから、キジのW染色体に特異的な反復単位ではあるがその関連配列は常染色体中にも存在することが示唆された。TaqI-0.5kb関連配列のキジW染色体中での反復回数は、Table 1の雌の値から雄の値を引くことで求めたところ、0.5kb単位に換算して約1万回であると推定された。

次に、これらの反復単位の塩基配列を決定した(Fig. 5)。PstI-0.4kb配列は全長393bp、TaqI-0.5kb配列は全長485bpであり、GC含量はそれぞれ36%および42%で、全体として見るといずれもAT含量が高いことが示された。これらの配列の最も興味深い特徴は、Fig. 5にも示したように、いずれの配列も(A)₃₋₅および(T)₃₋₅のクラスターを含む約21bpの繰り返し単位の縦列重複により構成されている点であった。また、21bpの基本単位中Tクラスターの後の5'-CTCCC-3'という配列も2種の配列で保存されていた。TaqI-0.5kb配列の構成上の規則性はPstI-0.4kb配列に比べ、より劣るものであるが、こうした特徴的な繰り返し単位、およびTクラスター後の

CTCCCという配列はXhoI-0.7kb配列中にも認められることから⁵⁾、ニワトリ、シチメンチョウ、キジの3種のW染色体を構成する反復DNA成分は構造的に非常に類似していることが明らかとなった。

第4章 XhoI-0.7kb、PstI-0.4kb、TaqI-0.5kb配列の湾曲構造

ニワトリXhoI-0.7kb、シチメンチョウPstI-0.4kb、キジTaqI-0.5kb配列の塩基配列の解析から、これら3種の配列に共通した特徴として、以下の2点が明らかとなった。1)基本繰り返し単位の長さがDNA 2重らせんの2ピッチ(21bp)に相当する。2)AおよびTクラスターがらせんのピッチと同調して現われる。ところで、こうした塩基配列の特徴は、これらの反復配列が湾曲DNA(curved DNAまたはbent DNA)である可能性を示すものであった。湾曲DNAは近年特に注目されてきたDNAの特殊構造の一つで、通常のB型DNAにおいては塩基対の形成する面がらせん軸に対してほぼ直交しているのに対し、塩基配列そのものに依存してらせん軸が折れ曲がるという特徴を持った構造のことを示すものである。

XhoI、PstIおよびTaqI配列が、湾曲構造を形成していることを電気泳動により実験的に検出したのがFig. 6である。AおよびBには4%ポリアクリルアミドゲルを支持体とした場合の、CおよびDには1.5%アガロースゲルを支持体とした場合の電気泳動の結果をそれぞれ示してある。また、AおよびCは16°Cで、BおよびDは55°Cで泳動を行なった結果である。マーカ-DNA(lane 1)との比較により、それぞれの配列の鎖長を推定し、この値をまとめたところTable 2に示す結果が得られた。16°Cにおけるポリア

クリルアミドゲル電気泳動の結果を見ると、XhoI、PstIおよびTagI配列はいずれもその推定鎖長が真の分子鎖長よりも大きく、それぞれ2.59倍以上、1.75倍および1.47倍になっているのが分かる。一方、こうした泳動の遅れは55°Cの泳動や、支持体をアガロースゲルにした際にはほとんど解消され、推定鎖長と真の鎖長との比が1.00に近づくことも示されている。このような電気泳動での異常な挙動は、現在までにいくつかの生物種から単離されている湾曲DNAの特徴と一致するもので、さらに塩基配列の特徴も湾曲DNAの塩基配列の規則を満たすものであることから、これら3種の反復DNAは水溶液中で湾曲構造を形成しているものと考えられた。

さて、Fig. 6の実験で用いられたのはすべてクローン化した反復DNA単位であったことから、ここで見られた湾曲性がゲノムDNA中の反復DNA成分全体についてもあてはまる性質かどうかという点に興味を持たれた。そこで、ゲノム中の反復DNA成分を直接分離して、電気泳動により湾曲構造の解析を行なうことにした。Fig. 7には雌ニワトリのゲノムDNAのXhoI分解により得られたXhoI-0.7kb成分を回収し、これをアガロースゲル(A)またはポリアクリルアミドゲル(B)電気泳動に供した結果が示されている。アガロースゲル電気泳動では、期待される分子鎖長である約0.7kbの位置にエチジウムブロマイド染色でほぼ単一のバンドとして泳動されたが、ポリアクリルアミドゲル電気泳動では1860bp以上の位置にほぼ単一のバンドとして検出された。これらの結果は、クローン化したDNA断片の挙動とほぼ一致するものであり、ゲノム中に約12,000回反復して存在するXhoI-0.7kb成分のほとんど全部が、クローン化したDNA断片と同様な湾曲構造を形成していることを示すものであった。

第5章 湾曲反復DNAとニワトリ

W-proteinとの相互作用

ニワトリ肝臓の単離核の0.35M NaCl抽出画分に、XhoIファミリー反復配列に高親和性結合するタンパク質がゲルリターデーション法により見出され、W-proteinと命名された⁴⁷⁾。W-proteinは数種のカラムクロマトグラフィを行なうことで精製され、分子量約72,000の非ヒストンタンパク質で、未変性条件下では約30分子から成る会合体を形成する興味深い性質を持つことが知られている。また、W-proteinはニワトリの細胞核に由来するにも関わらず、ヘテロな種間の組み合わせでもあるシチメンチヨウPstI-0.4kb配列やキジTaqI-0.5kb配列ともニワトリXhoI-0.7kb配列と同様に高親和性結合することがゲルリターデーション法により示された⁶²⁾。

さて近年、DNAと非ヒストンタンパク質との相互作用の解析は、遺伝子発現制御およびクロマチン超構造の形成を考える上で基本的に重要な研究として注目を集めている。XhoI-0.7kb配列については*in vitro*での結合様式がDNaseIフットプリント法により明らかにされており、このDNA配列のAおよびTクラスターが構成するマイナーグループがW-proteinの表面に接し、DNAがタンパク質の回りに巻き付くような相互作用をしていると推定されている。しかし、PstI-0.4kbおよびTaqI-0.5kb配列についてはDNaseIフットプリント法による結合様式の解析はなされておらず、これら2種のDNA配列とW-proteinとの相互作用がXhoI-0.7kb配列のそれと同じなのか、それとも様式の異なったものなのかという点に興味を持たれた。そこで、PstI-0.4kb配列およびAT断片(TaqI-0.5kb配列中の約370bpを含むサブクローン)をプローブとして、W-proteinとの結合様式をDNaseIフットプリント

法により解析した。Fig. 8には実際に観察されたDNaseI分解に対する保護部位を、Fig. 9にはFig. 8で得られた結果をそれぞれの基本繰り返し単位(21bp)に対応させてまとめたものを示した。これらの実験結果から、2種のDNA配列とW-proteinとの結合様式はXhoI-0.7kb配列のそれと極めて類似することが明らかとなった。すなわち、DNaseI分解に対する保護部位が約21bpの繰り返し単位の両鎖当たりそれぞれ2ヶ所存在し、これらの部位は約10bp隔たっており、そのような保護部位がそれぞれの配列全域にわたって認められた。

ところで、XhoI-0.7kb配列で観察された結合様式とは異なった特徴がTaqI配列との相互作用の分析結果に認められた。すなわち、Fig. 8-Bに示したように、TaqI配列内におけるDNaseI分解に対する保護部位の一部はAAまたはTTジヌクレオチド(図中の下線部I, IV, V, VII, IX)の部分にも、またAまたはTクラスターのない部位(II, III, VI, VIII)にも認められたことであった。この結果は、繰り返し出現する(A)₃₋₅または(T)₃₋₅のクラスターの間隔がDNA 2重らせんのピッチに同調していれば、その間の一部クラスターの欠けている部分でもW-proteinとの接触が可能であることを示すものと思われた。

さて、W-proteinと湾曲DNAとの相互作用をさらに理解するため、このタンパク質との結合に必須なDNA領域の解析をさらに進めた。Fig. 10には、こうした解析の一例を示してある。XhoI-0.7kb配列由来で、21bpの基本単位が約20回繰り返したDNA断片(a:420bp)をプローブとし、精製したW-proteinを用いゲルリターデーションを行なったところ、安定な複合体の形成が認められたが、約8回または約11回の繰り返しから成るDNA断片

(b:167bpおよびe:230bp)では、複合体がほとんど検出されなかった。しかし、bおよびeの片側または両側に200bpまたは114bpのpUC119由来の湾曲DNAを連結させたところ、W-proteinとの複合体形成が認められるようになった(c, d, f, g)。図には示していないが、同様の実験をシチメンチョウのPstI-0.4kb配列由来のDNA断片についても行なったところ、約230bpのDNA断片については非湾曲DNAを連結した効果が認められたが、約160bpのDNA断片では認められずXhoI配列とは若干異なった結果が得られた。これらの結果は、W-proteinとの相互作用において、DNAの湾曲構造への親和性およびDNA分子全体の鎖長が重要であることを示唆するものと考えられた。さらに、XhoI配列についていえば、少なくとも約160bpの湾曲DNAに約200bpの非湾曲DNAが連結したようなDNA領域であればW-proteinの結合が可能であることは、このタンパク質がW染色体の湾曲反復DNAドメインのみならず、他の比較的短い湾曲DNA配列をも認識して結合する可能性を示唆するものと思われた。

第6章 総合考察

第3, 4章で述べたように、ニワトリのほかに、シチメンチョウ、キジのW染色体を構成する反復DNAが本研究でクローニングされ、それらがいずれも湾曲DNAであることが示された。ニワトリXhoI-0.7kb配列およびシチメンチョウPstI-0.4kb配列はそれぞれ約3万回、キジTaqI-0.5kb配列は約1万回もそれぞれの種のW染色体上で反復して存在することを考えると、これらの種のW染色体の相当な部分が湾曲反復DNAで占められることになり、3種のW染色体は非常に特殊なDNAドメインを含む染色体であること

になる。ニワトリ、シチメンチョウ、キジの共通の祖先種は今から約800万年前にはすでに存在していたと言われている⁷⁾。よって、その様な祖先種のゲノム中に複数種の湾曲反復DNA(=21bpの繰り返し単位の中にAまたはTクラスターを持つ反復DNA)が存在しており、これらのうちの異なった成分を利用してそれぞれのW染色体上で独自に反復単位の増幅が生じ、その後、塩基置換や不等交叉などの変異を受けたことで現在のW染色体が形成されたという可能性が一つ考えられる。他の可能性は、祖先種中の1種類の湾曲反復DNAが種分化の過程で変異を蓄積し、それらの反復単位の異なったものが再度それぞれの種のW染色体上で増幅したというものである。

ところで、ニワトリ XhoI-0.7kb、シチメンチョウ PstI-0.4kb、キジ TaqI-0.5kb配列の存在は、それぞれの種のW染色体上で少なくとも0.7kb、0.4kb、0.5kbの単位で増幅が生じたことを示すものである。ここで不思議なのは、なぜ内部に21bp単位の反復が認められるにもかかわらず0.7kb、0.4kb、0.5kbという反復単位が存在するのかということである。不等交叉ではこうした結果は説明できないことから、おそらくW染色体上での反復単位の増幅の過程にその原因があると考えられる。すなわち、こうした結果は、反復DNAドメインの形成過程において、少なくとも2つのステップがあったことを示唆している。この2つのステップとは、1)21bp単位での増幅のステップ、および2)XhoI、PstI、TaqI切断部位の塩基配列を含む、より大きな単位での増幅のステップ、である。

それでは、こうしたDNAドメインが形成され、かつ現在なおゲノム中に保持されているのは、これら3種のトリに特異な例であろうか。甲殻類の

アルテミア⁹²のヘテロクロマチンや、哺乳類のマウスの染色体の動原体領域⁹³(この領域もW染色体と同様に細胞核内ではヘテロクロマチンを形成している)も湾曲反復DNAで占められていることを考えると、こうした湾曲反復DNAドメインの形成が反復DNAをヘテロクロマチンとして細胞核内に保持するために積極的に関与してきた可能性もある。湾曲DNAの発見が近年であることもあり、現在まで湾曲DNAという特徴に着目してゲノムDNA中の領域が詳細に解析された例は少ないが、今後ポリアクリルアミドゲル電気泳動における異常な挙動を指標に、こうしたDNAドメインを検索することも可能であろう。今後探せば多くの生物種から見つかる可能性はある。

それでは、湾曲反復DNAはヘテロクロマチンの構築にどのような役割をになっているのだろうか。この点については、現在のところ明確な解答を示すことはできない。しかし、本研究ではこうした問題を解明するための基礎的研究として、湾曲反復DNAのそれ自身の構造特性だけでなく、タンパク質との相互作用の面からもとらえることが重要であるという視点から解析を行なった。第5章で述べたW-proteinとの相互作用の研究がそれである。その結果、PstIおよびTagI配列とW-proteinの結合様式はXhoI配列のそれと極めて類似しており、W-proteinが湾曲DNAという共通の特徴を持つ分子種に種を越えて同様のメカニズムで相互作用を示し得ることが明らかになった。おそらく、W-proteinは適当な電荷の分布を持った表面として働くことで、湾曲DNAの湾曲面に周期的に現われるAおよびTクラスターから成るマイナーグループと相互作用を起こし、DNA鎖の湾曲面にはまりこむことで安定なDNA-タンパク質複合体を形成しているのであろう。

さて、このW-proteinのようにDNAの湾曲構造が相互作用に重要である

といわれているタンパク質の例が現在いくつか知られている。例えばヒストン8量体、DNAジャイレース、CAPタンパク質(catabolite activator protein)などがそれである¹⁰⁾。いずれの場合も、DNAがタンパク質の回りに巻き付くような相互作用を生じていると考えられている。こうした例を考慮するなら、本研究で行なった湾曲反復DNAとW-proteinの相互作用の解析は、タンパク質の表面に2本鎖DNAが巻き付くというタイプの相互作用のメカニズムを解明する上で、普遍的な意味を持ち得るものと考えられる。

参考文献

- 1) Tone, M., Nakano, N., Takao, E., Narisawa, S. and Mizuno, S. (1982) Demonstration of W chromosome-specific repetitive DNA sequences in the domestic fowl, Gallus g. domesticus., Chromosoma(Berl.), 86, 551-569
- 2) Tone, M., Sakaki, Y., Hashiguchi, T. and Mizuno, S. (1984) Genus specificity and extensive methylation of the W chromosome-specific repetitive DNA sequences from the domestic fowl, Gallus gallus domesticus., Chromosoma(Berl.), 89, 228-237
- 3) Uryu, N., Nagata, Y., Ito, K., Saitoh, H., and Mizuno, S. (1989) Determination of the sex of chickens by a biotin-labeled deoxyribonucleic acid probe., Poultry Science, 68, 850-853
- 4) Harata, M., Ouchi, K., Ohata, S., Kikuchi, A. and Mizuno, S. (1988) Purification and characterization of W-protein: A DNA-binding protein showing high affinity for the W chromosome-specific repetitive DNA sequences of chicken., J. Biol. Chem., 263, 13952-13961
- 5) Kodama, H., Saitoh, H., Tone, M., Kuhara, S., Sakaki, Y. and Mizuno, S (1987) Nucleotide sequences and unusual electrophoretic behavior of the W chromosome-specific repeating DNA units of the domestic fowl, Gallus gallus domesticus., Chromosoma(Berl.), 96, 18-25
- 6) Saitoh, H., Harata, M. and Mizuno, S. (1989) Presence of female-specific bent-repetitive DNA sequence in the genomes of turkey and pheasant and their interactions with W-protein of chicken., Chromosoma(Berl.), 98, 250-258
- 7) Helem-Bychowsky, K.M. and Wilson, A.C. (1986) Rates of nuclear DNA evolution in pheasant-like birds: Evidence from restriction maps., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83, 688-692
- 8) Benfante, R., Landsberger, N., Tubiello, G. and Badaracco, G. (1989) Sequence-directed curvature of repetitive Alu DNA in constitutive heterochromatin of Artemia franciscana., Nucleic Acids Res., 17, 8273-8282
- 9) Radic, M.Z., Lundgren, K and Hamkalo, B.A. (1987) Curvature of mouse satellite DNA and condensation of heterochromatin., Cell, 50, 1101-1108
- 10) Travers, A. and Klug, A. (1987) DNA wrapping and writhing., Nature, 327, 280-281

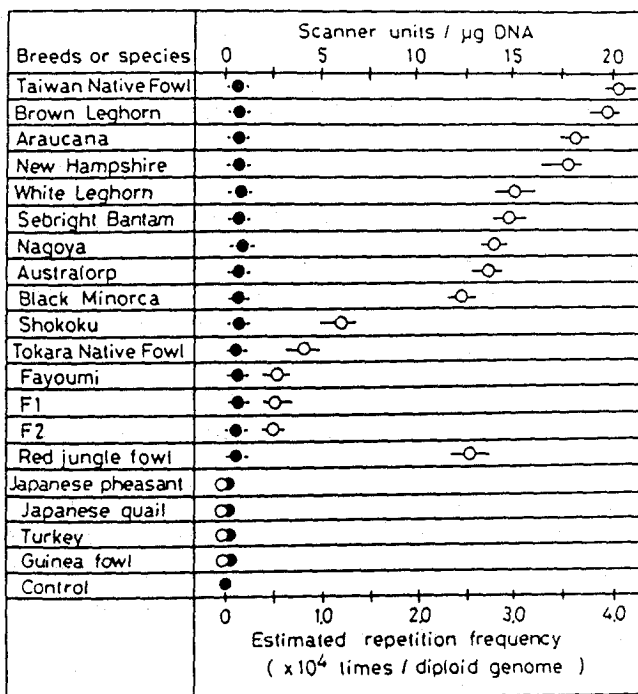


Fig.1 Estimation of repetition frequencies of the XhoI-0.7kb-related sequences in the diploid genomes of different breeds of Gallus g. domesticus and some species belonging to the order Galliformes. DNA from each breed or species (○ :female, ● :male) was subjected to quantitative dot blot hybridization with ^{32}P -XhoI-0.7kb fragment from pAGD0601 under the conditions allowing about 11% base-pair mismatches in the resulting hybrids. F1 individuals were derived from the cross of Black Minorca (male) x Fayoumi (female). F2 individuals were derived from the original cross of White Leghorn (male) x Fayoumi (female). DNA from human male was included as a control. Repetition frequencies are expressed as relative numbers to that of the female White Leghorn; i.e. 3×10^4 times per diploid genome.

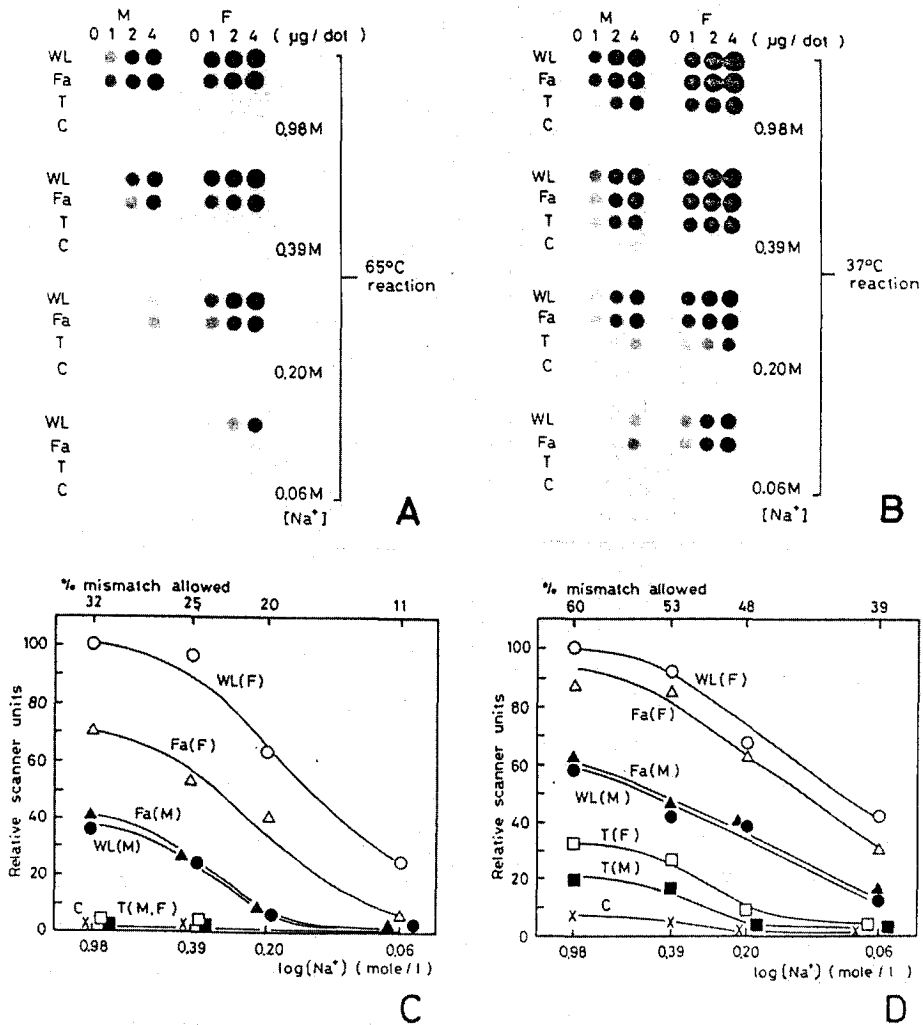


Fig.2A-D Quantitative dot blot hybridization of genomic DNAs from the male (M) and the female (F) individuals of White Leghorn (WL), Fayoumi (Fa), and turkey (T) with ^{32}P -XhoI-0.7kb fragment from pAGD0601 under different conditions of overall stringency. DNA from a human male was included as a control (C). Hybridization reactions were carried out in the hybridization buffer at 65°C (A and C) or at 37°C (B and D). After the reaction, each DNA-filter was washed in 6x, 2x, 1x or 0.3xSSC at the same temperature as for the reaction, and subjected to autoradiography (A and B) and densitometric scanning (C and D).

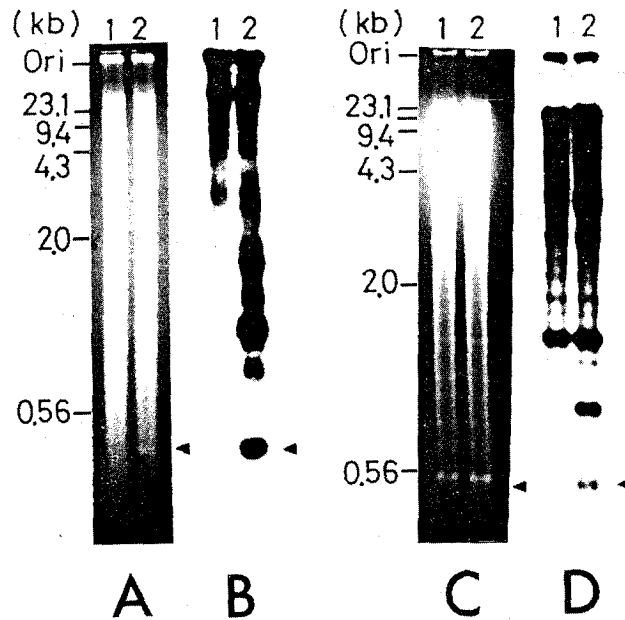


Fig.3A-D Detection of female-specific restriction fragments hybridizable with the XhoI-family sequence of the chicken in the genomic DNAs of the turkey (A and B) and the pheasant (C and D). PstI-digested DNAs from the male (lane 1) and the female (lane 2) turkey were electrophoresed (4 μ g/ lane) on a 1%-agarose gel, stained with ethidium bromide (A) and subjected to Southern blot hybridization with the 32 P-labeled XhoI-0.7kb fragment from pAGD0601 and autoradiography (B). TaqI-digested DNAs from the male (lane 1) and the female (lane 2) pheasant were subjected to electrophoresis (C) and blot hybridization (D) as for the turkey DNAs. DNA-filters were incubated with the 32 P-probe in the hybridization buffer at 37 $^{\circ}$ C and washed in 6xSSC at 37 $^{\circ}$ C. Arrowheads indicate fragments that were recovered from gels for molecular cloning.

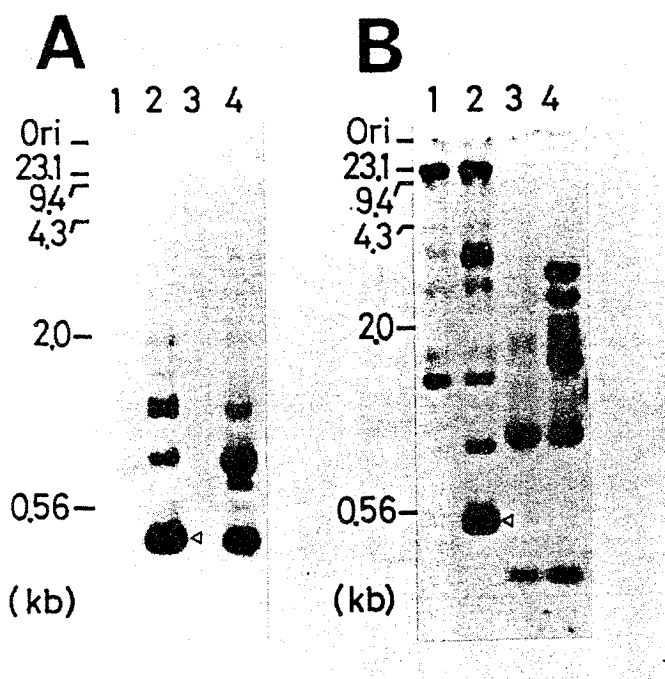


Fig.4A,B Female specificity of the cloned repetitive units. Genomic DNA ($4\mu\text{g}/\text{lane}$) from male (lanes 1 and 3) and female (lanes 2 and 4) turkey (A) and pheasant (B) were digested with PstI (lanes 1 and 2 in A), TaqI (lanes 1 and 2 in B) or HinfI (lanes 3 and 4 in A and B), electrophoresed, blotted and probed with the ^{32}P -labeled PstI-0.4kb fragment from pUGD0401 (A) or the ^{32}P -labeled TaqI-0.5kb fragment from pUPV0501 (B). Reactions were carried out in the hybridization buffer at 65°c and DNA-filters were finally washed in $0.3\times\text{SSC}$ at 65°c . Arrowheads indicate the fragments corresponding to those subjected to the cloning.

Table 1 Repetition frequencies of the PstI-0.4kb and the TaqI-0.5kb repeating units and their related sequences in the diploid genomes of turkey (A) and pheasant (B).

(A)

Genome	PstI-0.4kb unit ^a	PstI-0.4kb-related sequences ^b
Female turkey	9,300-11,000	30,000-33,000
Male turkey	UD ^c	< 600

(B)

Genome	TaqI-0.5kb unit ^a	TaqI-0.5kb-related sequences ^b
Female pheasant	3,700-4,500	18,000-21,000
Male pheasant	UD	7,500- 9,000

a; Determined by Southern blot hybridization

b; Determined by slot blot hybridization and expressed as multiples of the repetitive unit

c; Undetectable

A

Internal Repeat No.	Position	Sequence	Number of Nucleotides
	1	GTTCCTCCC	
1	11	ACAAATACCA <u>TTTTT</u> CAACC	21
2	32	AGAAATAGGACG <u>TTTTT</u> CTCCC	22
3	54	AGAAATACCGGAT <u>TTTTT</u> GCCCC	22
4	76	CAAAACATGACAT <u>TTTTT</u> CTCCC	21
5	97	AGAAATACGAG <u>TTTTT</u> CTCCC	20
6	117	AAAATATGATAT <u>TTTTT</u> GCACC	20
7	137	AGAAATCCAG <u>TTTTT</u> TATCACC	21
8	158	GAAGACTCTACG <u>TTTTT</u> CTACC	21
9	179	AGAAATACCAATTATCTCC	19
10	198	GCAAAAATTACAT <u>TTTTT</u> CTCC	20
11	218	AGAAATACAGAT <u>TTTTT</u> CTCCC	21
12	239	TTAAATATGACAC <u>TTTTT</u> TCC	20
13	259	AAGAAATAGTAGAT <u>TTTTT</u> CCCC	22
14	281	AAAAATATGACAT <u>TTTTT</u> CTCC	20
15	301	AGGAAATGCCAG <u>TTTTT</u> TATCGT	21
16	327	ATAAATATGACAT <u>TTTTT</u> TATACC	21
17	343	GCAAAATATCCG <u>TTTTT</u> CTCCC	20
18	363	AAAAATATGCCAT <u>TTTTT</u> CTGCC	21
	384	AGGAACTGCA	
Consensus		AGAAATA ^{TG} _{CC} NCAT <u>TTTTT</u> CTCCC	21

B

Internal Repeat No.	Position	Sequence	Number of Nucleotides
	1	C	
1	2	GACAAAATACCACCATTCTCCC	22
2	24	ACAGAGATGGCATTTCATCCC	21
3	45	ACAAGTACTACTTCACACTCC	21
4	66	ACACGATGATACT <u>TTTTT</u> CCATC	20
5	86	AAGAATAGGGCATTGGACCAC	21
6	107	AGAAATACCAGCT <u>TTTTT</u> CTGCCT	21
7	128	AAGAGATGACAT <u>TTTTT</u> CTCCC	20
8	148	AGAAATACCAC <u>TTTTT</u> CTCCC	20
9	168	AGAAATACAGGA <u>TTTTT</u> CTGC	22
10	190	CAGAAACACCATGCTCATCCTC	22
11	212	TCCAGATGTTG <u>TTTTT</u> CACCCC	21
12	233	AAACACTAGGAC <u>TTTTT</u> CTCC	20
13	253	TCACTACTCCCTG <u>TTTTT</u> CTCC	20
14	273	AAAACATAGATGGTCTCTCTCCC	23
15	296	AGAAATACTAGCATTCTCTGC	21
16	317	AAGATGGGAC <u>TTTTT</u> CCAA	19
17	336	CCAAAGATGGTAGAGTCTCCC	21
18	357	AGAAATAGCACT <u>TTTTT</u> CTTC	19
19	376	ATCAGAACTGTCA <u>TTTTT</u> CTCC	21
20	397	AAAAAATACTACT <u>TTTTT</u> CAACT	21
21	418	GTTCAGGTGACAT <u>TTTTT</u> GCAGCC	22
22	440	AAACATAGGAGAGATTCTCC	20
23	460	ACAAAGTAACCACT <u>TTTTT</u> CTCTC	22
	482	ACGT	
Consensus		AGAAATANNNA ^A _C <u>TTTTT</u> CTCCC	21

Fig. 5 A, B

Nucleotide sequences and internal repeats of the inserts in pUMG0401 (A) and pUPV0501 (B).

Underlines indicate A_n and T_n clusters ($n \geq 3$). Nucleotide position 1 in A is the G after the cleavage site in the PstI recognition sequence, and that in B is the C after the cleavage site in the TaqI recognition sequence. N in the consensus sequence means any of the four bases.

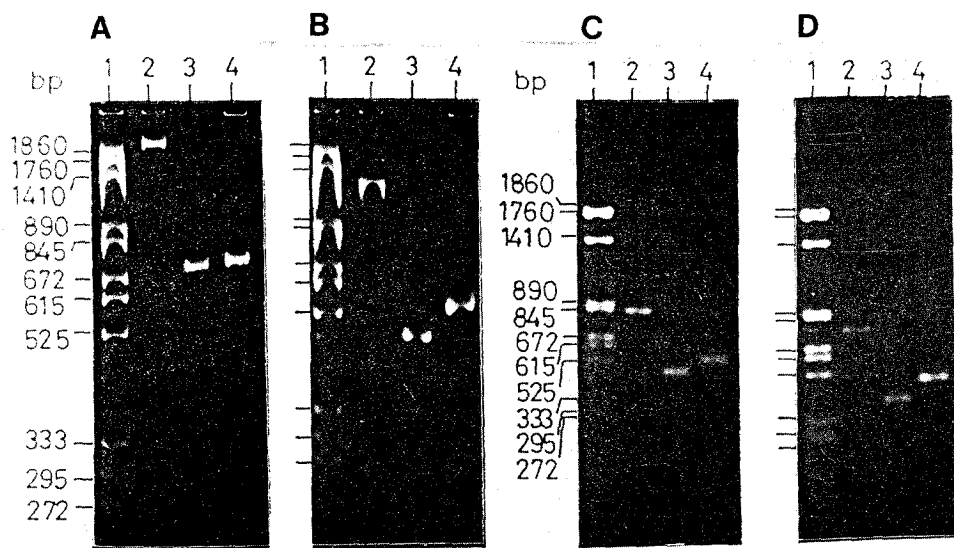


Fig.6A-D Electrophoretic behavior of the cloned repetitive units. 4% polyacrylamide gel electrophoresis (A and B) and 1.5% agarose gel electrophoresis (C and D) were carried out at 16 °c (A and C) or 55 °c (B and D). In A to D, DNA samples applied were as follows: HaeIII digest of PM2 DNA as size markers (lane 1), XhoI-0.7kb unit (chicken) from pAGD0601 (lane 2), PstI-0.4kb unit (turkey) from pUMG0401 (lane 3) and TaqI-0.5kb unit (pheasant) from pUPV0501 (lane 4).

Table 2. Fragment sizes of cloned repetitive units determined by nucleotide sequencing or deduced from electrophoretic mobility

Repetitive unit	Fragment size determined by nucleotide sequencing (bp)	Fragment size deduced from electrophoretic mobility (bp)			
		1.5% agarose gel		4% polyacrylamide gel	
		16° C	55° C	16° C	55° C
0.7 kb XhoI (chicken) ^a	717	800 (1.12) ^b	730 (1.02)	>1860 (>2.59)	1200 (1.16)
0.4 kb PstI (turkey)	399	490 (1.23)	400 (1.00)	700 (1.75)	450 (1.13)
0.5 kb TaqI (pheasant)	489	540 (1.10)	490 (1.00)	720 (1.47)	530 (1.08)
AT fragment (pheasant)	451 ^c	480 (1.06)	- ^d	650 (1.44)	-
0.4 kb BamHI (Bobwhite quail)	389	380 (0.98)	-	350 (0.90)	-

^a Origin of the repeating unit

^b Size relative to that determined by nucleotide sequencing

^c Including 83 bp of vector sequences

^d Not determined

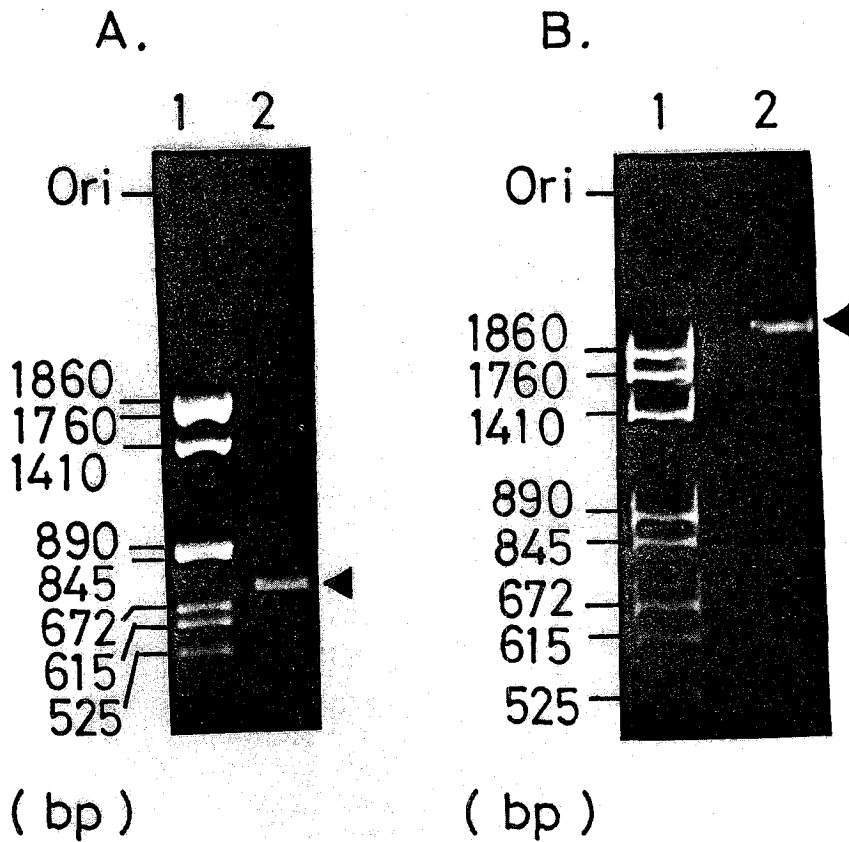


Fig.7A,B Electrophoretic behavior of a genomic population of the 0.7kb XhoI family repeating unit as revealed by ethidium bromide fluorescence. 1.2% agarose gel electrophoresis (A) and 4.0% polyacrylamide gel electrophoresis (B) in the presence of ethidium bromide. Lane 1; HaeIII digest of PM2 DNA, lane 2; 0.7kb repeating units recovered from the XhoI digest of genomic DNA of the female White Leghorn chicken (0.2 μ g/lane).

A

1 GCAGTTTCCTCCC ACAAATACCATTTTTTCAACC AGAAATAGGACGTTTTTCTCCC AGAAATACCGGATTTTTGCCCC 75
 CGTCAAAGGAGGG TGTTTATGGTAAAAAGTTGG TCTTTATCCTGCAAAAAGAGGG TCTTTATGGCCTAAAAACGGGG

76 CAAAACATGACATTTTCTCCC AGAAATACGAGTTTTTCTCCC AAAATATGATATTTTGCACC AGAAATCCAGTTTTATCACC 157
 GTTTTGTACTGTAAAAGAGGG TCTTTATGGTCAAAGAGGG TTTTATACTATAAAACGTGG TCTTTAAGGTCAAATAGTGG

158 GAAGACTCTACGTTTTCTACC AGAAATACCAATTATCTCC GCAAAAATTACATTTTCTCC AGAAATACCAGATTTTCTCCC 238
 CTCTGAGATGCAAAAAGATGG TCTTTATGGTTAATAGAGG CGTTTTAATGTAAAAGAGG TCTTTATGGTCTAAAAGAGGG

239 TTAAATATGACACCTTTTCC AAGAAATAGTAGATTTTCCCC AAAAATATGACATTTTCTCC AGGAAATGCCAGTTTTATCGT 321
 AATTTATACTGTGAAAAGG TCTTTATCATCTAAAAAGGG TTTTATACTGTAAAAGAGG TCCTTTACGGTCAAATAGCA

322 ATAAATATGACATTTTATACC GCAAATATCCGTTTTCTCCC AAAAATATGCCATTTTCTGCC AGGAACTGCA 399
 TATTTATACTGTAAAATATGG CGTTTATAGCCGAAAGAGGG TTTTATACGGTAAAAGACGG TCCTTGACGT

B

118 CTTTCTGCCT AAGAGATGACATTTTCTCCC AGAAATACCACTTTTCTCCC AGAAATACAGGAACTTTTCTCC 189
 GAAAGACGGA TTCTCTACTGTAAAAGAGGG TCTTTATGGTAAAAGAGGG TCTTTATGTCCTTGAAGAGCC

190 CAGAAACACCATGCTCATCCTC TCCAGATGTTGTTTCCACCC AACACTAGGACCTTTTCTCC TCACACTCCCTGCTTTTTTC 272
 GTCTTTGTGGTACGAGTAGGAG AGGTCTACAACAAAAGTGGGG TTTGTGATCCTGGAAGGAG AGTGATGAGGGACGAAAAAG

273 AAAACTAGATGGTCTTCTCTCCC AGAAATACTAGCATTCTCTGC AAGATGGACCTTTTCCAA CCAAGATGGTAGAGTCTCCC 356
 TTTTGATCTACCAGAAGAGAGGG TCTTTATGATCCTAAGAGAGG TTCTACCTGGAAAAGGTT GGTTCCTACCATCTCAGAGGG

357 AGAAATAGCACTTTTCTTC ATCAGAAGTGTCTTTTCTCC AAAAAATACTACTTTCAACT GTTCCAGGTGACATTTGCAACC 439
 TCTTTATCGTGAAAAGAG TAGTCTTGACAGTAAAAGAGG TTTTTTATGATGAAAAGTTGA CAAGGTCCACTGTAACCGTCCG

440 AAACATAGGAGAGATTCTCC ACAAAGTAACCACTTTTCTCTC ACGT 485
 TTTGATCCTCTTAAGAGG TGTTCATTGGTAAAAGAGAG TGCA

I II III IV V VI VII VIII IX

Fig.8A,B Periodic appearances of the protected site (▼) with W-protein against DNaseI cleavage in each strand of the PstI-0.4kb unit (A) and AT fragment from the TaqI-0.5kb unit (B). Sites of enhanced DNaseI cleavage (▽) are also marked. Boundaries of internal repeating units of about 21 bp are shown with spaces. Protected sites in underlined regions (I~IX) in B appear with periodicity but without association with A_n or T_n (n ≥ 3) clusters.

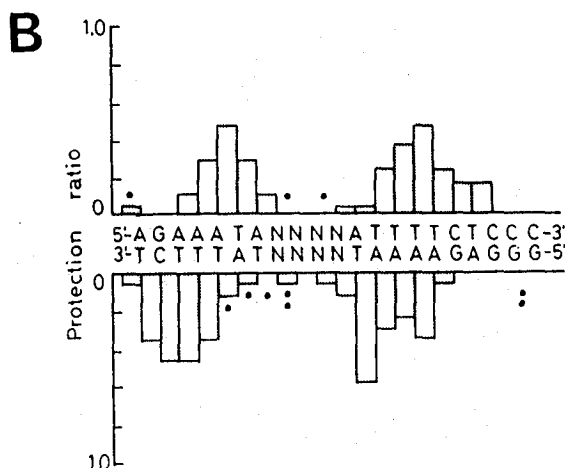
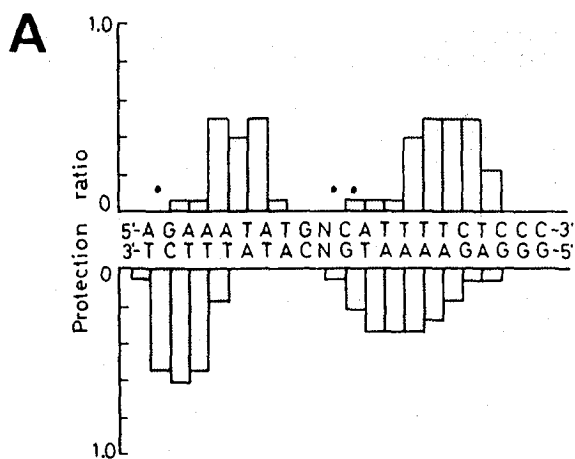
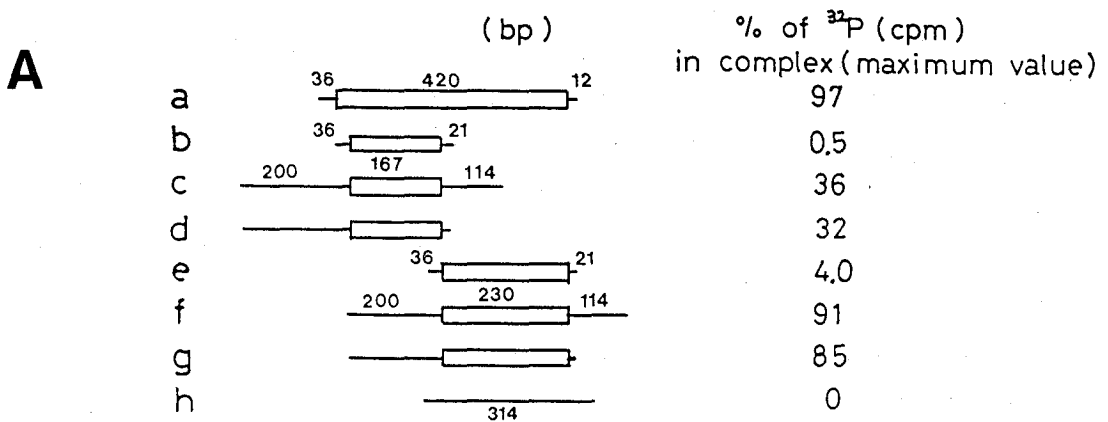


Fig.9A,B Summary of the DNaseI footprint analyses with respect to the 21 bp internal repeats in the PstI-0.4kb unit (A) and AT fragment from the TaqI-0.5kb units (B). The frequency of protection against the DNaseI cleavage calculated for the 18 (A) or 17 (B) internal repeats is indicated with vertical bars on each consensus sequence. When the fragment length of an internal repeat and that of the consensus sequence are different, the site was assigned according to the position from the first base pair of the internal repeat. Enhanced sites of DNaseI cleavage are indicated by dots.



B Gel retardation assays :

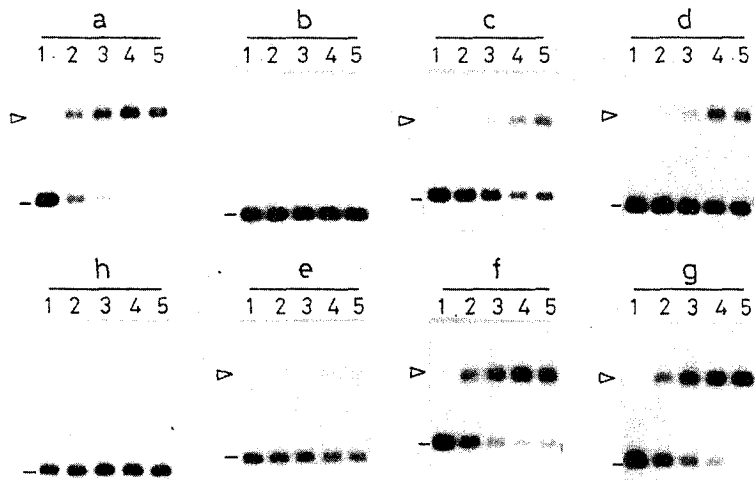


Fig.10A,B Interactions of W-protein with subfragments of the Xho-family repeating unit flanked with sequences from pUC119. In A, constructs of fragments used in this assay are shown. Boxed regions indicate subfragments derived from the XhoI-0.7kb repeating unit. Thin lines indicate fragments from pUC119. In B, each of the construct shown in A was 5'-end-labeled with ³²P and subjected to the gel retardation assay. Lane 1-5; 0, 4, 8, 16 and 20 μ l of the purified W-protein fraction was added, respectively, to the reaction mixture. Each reaction (25 μ l) contained 2.5ng of ³²P-labeled probe and 100ng of E. coli DNA. Arrowheads indicate positions of DNA-protein complexes. Relative levels of binding of W-protein to these fragments are listed on the right in A.

審査結果の要旨

雌ヘテロ型の性染色体構成をもつ鳥類のW染色体は雌の性決定に積極的役割を演じるが、体細胞核内ではほぼ全域が異常凝縮してヘテロクロマチンボディを形成している。従来からヘテロクロマチン領域に高度反復DNAが局在することが知られているが、反復DNAが染色体の異常凝縮にどのように関わっているのかは明らかにされていない。

本研究はニワトリのW染色体をモデルとするヘテロクロマチン形成機構解明の一環として行われたものである。

まず第一に白色レグホンのW染色体DNAの約60%を占めるXho Iファミリー反復配列のニワトリ品種間での量的変動を定量的なドットプロットハイブリダイゼーションによって調べ、品種間で反復回数が2倍体ゲノムあたり5,000~40,000回と大きく異なることを示した。そして反復回数が約5,000回と最も少ないエジプト産品種ファヨウミに着目して、Xho Iファミリー配列と約30%の塩基不対合を許容する条件下でDNA/DNAハイブリダイゼーションを行わせることにより、1.3kb EcoR I断片を反復単位とするXho Iファミリー関連の反復配列がW染色体中に多量に存在することを見出し、その反復単位のクローニングを行った。また、約60%の塩基不対合を許容する条件を適用して、シチメンチョウのW染色体中で約10,000回反復している0.4 kb Pst I断片、キジのW染色体中で約4,000回反復している0.5 kb Taq I断片を見出し、これらをクローニングして塩基配列を決定した。シチメンチョウ、キジのW染色体由来の配列は(A)_{3~5}, (T)_{3~5}クラスターを含む約21bpの基本単位が縦列重複した構造をもつこと、水溶液中で湾曲DNAとして挙動することの両面でニワトリのW染色体由来のXho I-0.7 kb反復単位と共通する特徴を持つことを明らかにした。さらに、ニワトリ肝臓の核内から分離、精製されたW-proteinがこれら3種類の配列に対して同様の機構で高親和性結合することを示した。また、W-proteinの安定な結合は約170 bpの湾曲DNAに約200 bpの非湾曲DNAが連結した配列の場合にも認められることを示した。

以上のように本研究は3種類のトリのW染色体DNA中に多量の湾曲反復DNAが存在すること、それらは配列構成上共通の特徴を有し、いずれも同様の機構でタンパク質と相互作用することを明らかにしたもので、ヘテロクロマチンの分子構築の理解に新しい視点を与えたものであることから審査員一同、著者は農学博士の学位を授与されるに十分な資格を有するものと判定した。