

氏名(本籍) 小^お野^の裕^{ひろ}之^{ゆき}

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 博 第 3 9 0 号

学位授与年月日 平 成 元 年 3 月 2 4 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 ニワトリ初期卵巣における組織分化の
マーカー遺伝子の検索とその遺伝情報に
関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 水野 重樹

教授 伊崎 和夫

助教授 山本 徳男

論文内容要旨

第1章 序論

近年、遺伝子操作技術の進歩により、高等動物の初期発生や組織分化といった生物学的に重要な問題に対して、時期特異的、組織特異的な遺伝子発現に着目してアプローチすることが可能となってきた。本研究は、ニワトリ初期卵巢の分化をテーマとしていくつかの生物学的現象を遺伝子レベルで研究することを試みたものである。ニワトリ初期卵巢は、組織として以下のような興味深い特徴を持つ。

◇卵巢は、精巣と共に生殖細胞系列を含む組織である。即ち始原生殖細胞から卵母細胞を発達させ、減数分裂を経て卵細胞として次の世代に遺伝情報を伝える役目を持っている。卵細胞が精細胞と大きく異なる点は、精細胞がほとんど核しか持たない細胞であるのに対し、巨大な細胞質を持つ点である。この巨大な細胞質には、多量のrRNAのほかに母性RNA (maternal RNA) と呼ばれるRNAが存在し、この中には初期発生時の非常に早期の細胞分裂や、体軸の決定に必要な遺伝情報を持つ母性mRNAが含まれているものと考えられている。

◇卵巢、精巣は、個体レベルの性分化に影響を及ぼす重要な内分泌器官である。したがって、卵巢では、性分化に影響をもたらす種々のステロイドホルモンのほか、インヒビンやミュラー管退化因子など、他の組織の機能を調節する種々の生理活性物質を生産する。

◇更に興味深いことに、鳥類では一般に右側の卵巢が発生のごく初期に退化し、左側の卵巢のみが発達、分化することが知られている。発達する左卵巢と、退化する右卵巢において発現している遺伝子が、質的に如何に異なるかは知られていない。

以上のような多くの興味深い特徴を持つニワトリの卵巢を研究材料として選び、この組織分化を遺伝子レベルで研究するための分子マーカーを検索し、分化に伴うその遺伝子発現を解析することが本研究の主要な目的である。

第2章 初期卵巢cDNAライブラリーの作製と卵巢特異的cDNAクローンの単離

まずふ化後1日から3日のヒヨコの左右卵巢のcDNAライブラリーの作製を行

った。左右各卵巣より調製した mRNA 約 3 μ g を用いて Okayama-Berg 法によりクローニングしたところ、左右各々約 3×10^5 クローンよりなる cDNA ライブラリーが得られた。次にこのライブラリーから卵巣特異性の高い mRNA に対応した cDNA クローンのスクリーニングを行った。任意に選んだ 8000 の cDNA クローンに対して、1 日ビナの左卵巣、肝臓、6 日目の embryo の mRNA から合成した ^{32}P -cDNA プロブでコロニーハイブリダイゼーション (differential colony hybridization) を行ったところ、左卵巣のプロブでのみシグナルの得られるクローンを 54 個得た。更にこれらのクローンのプラスミド DNA をドットプロットハイブリダイゼーションに供し、上記と同様の異なった ^{32}P -cDNA プロブとハイブリッド形成させてこれらのクローンの卵巣特異性を確認した (Fig. 1)。

第 3 章 卵巣特異的 cDNA クローンの解析

先に単離した卵巣特異的クローン 54 個のうち 200 bp 以上の cDNA 挿入配列を持つ 49 個を個々に解析した。先ずこれらのクローンの中には同じ mRNA に由来するクローンが含まれていると考えられたので、各クローンを相互にハイブリッド形成させてこれを調べた。その結果 49 のクローンは 17 のグループに分けられた。更に精巣における発現を ^{32}P -cDNA プロブを用いたコロニーハイブリダイゼーション法で、また、種々の組織における発現量を各クローンをプロブとした RNA ドットプロットハイブリダイゼーション法で調べた。以上の結果を Table 1 にまとめた。大部分のクローンは卵巣に高い特異性を示し、かつ精巣でも発現していることが示された。卵巣で強い発現がみられ、精巣を含めた他の組織で発現がみられないクローンのグループはグループ 1 とグループ 9 の 2 つであった。また全てのクローンについて雌雄ニワトリゲノム DNA に対して DNA ドットプロットハイブリダイゼーション法を用いて遺伝子のコピー数、性染色体への連関を調べた。その結果大部分のクローンはハプロイドゲノム当り数コピー程度の遺伝子数と思われる結果を得たが、グループ 3、4 はコピー数が非常に多く反復配列を含む転写産物に由来するクローンであることが示された。またグループ 9 はニワトリの性染色体である Z 染色体に由来するクローンで

あった。即ち雄 (ZZ) のゲノムDNAでは雌 (ZW) のゲノムDNAの2倍の強さのハイブリッドシグナルを示した (Fig. 2)。グループ9の転写産物は卵巣以外の組織ではみられず、mRNAは約1 kbから約6 kbまで連続的な大ききで存在した。cDNAの塩基配列を部分的に決定したところopen reading frameは存在せず後述するグループ1と同様、卵母細胞に蓄えられる母性RNAの一種である可能性が考えられる。

第4章 卵巣に極めて特異的なクローンpLOA0411の解析

精巣を含めた他の組織で全く発現がみられず、厳密な組織特異性を有するグループ1 (Table 1) についてグループ中で最も長鎖のpLOA0411を用いて解析した。転写産物はFig. 3に示すように約1 kbから約10 kbまで連続的な大きき分布を示した。そこで先ずこの現象の原因を解析した。まず遺伝子が多数存在することによってこの現象が起きているという可能性を検討した。定量的なゲノムサザンプロット法により遺伝子のコピー数を求めたところ、この遺伝子はハプロイド当りシングルコピーの遺伝子であることが示された。したがって連続的な大ききを示す転写産物は、シングルコピー遺伝子からの転写産物であることがわかった。次にこのcDNAに対応した遺伝子のクローニングを行った。コスミドベクターpKY2662を用いて遺伝子ライブラリーを作製しcDNAクローンpLOA0411をプローブとしてスクリーニングしたところ2クローンが単離された。cDNAと遺伝子の対応づけをしたところ2 kbのcDNAとそれに対応した遺伝子領域は制限酵素マップレベルで完全に一致した。またcDNAの3'末端の塩基配列500 bpと遺伝子の対応部分の塩基配列も完全に一致した。このことからこの転写産物はスプライシングは受けていないものと考えられる。さらにmRNAのpolyA付加部位の5'側にはAATAAAのpolyA付加シグナルが、3'側の下流域には転写終結シグナルと考えられているGTクラスターが存在し、遺伝子のpolyA付加部位/転写終結部位近傍は通常の遺伝子構造を持つことが確認された。このことから種々の長さの転写産物が生じる原因は不完全な転写終結 (read through) や不完全なスプライシングではないことが推定された。そこでこの転写産物は種々の異なった転写開始点から転写さ

れたものであるという仮説をたて Fig. 4 に示すノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。転写領域のうち3'末端近傍をプローブとした場合(プローブC)には1 kb から10 kb まで連続的に転写産物が認められたが、順次上流をプローブとすると、より大きな転写産物しかハイブリッド形成しなかった(プローブA, B)。即ち大きな転写産物はプローブA, B, Cの領域全てを含むのに対し小さな転写産物はプローブCの領域しか含まない。これは種々の大きさの転写産物が異なった転写開始点から転写されて生成したことを示す。一方3'末端より更に下流のプローブDでは全くハイブリッド形成が認められないことより転写終結は厳密に一定であると考えられる。このような特殊な転写様式を示すことやcDNAの塩基配列にopen reading frameが存在しないことなどから考えて、この転写産物はタンパク質に翻訳される機能的なものとは考えがたく、おそらく卵母細胞中に蓄えられる母性RNAの一種であると思われる。卵母細胞の成熟は卵巣分化の重要な指標であり、本クローンは卵巣分化の分子マーカーとなりうるとと思われる。本クローンの発現が精巣でみられず卵巣に限られていることから、ふ化直後のヒナの発達を停止した右卵巣における発現に興味を持たれる。そこで左右卵巣のcDNAライブラリーのうち一部を増幅し、これらのライブラリー中における目的クローンの存在量を比較した。その結果、本クローンは左卵巣に極めて特異的で右卵巣では検出されなかった。このことはふ化直後のヒナの右卵巣は、大きさや形態のみならず遺伝子発現レベルでも発達する左卵巣と異なることを示している。

第5章 ステロイドホルモン合成に関与するmRNAに対応するcDNAクローン(チトクロームP450のcDNAクローン)の解析

精巣では卵巣と同等の発現がみられるが、生殖腺以外の組織では発現がみられないグループ2 (Table 1) についてグループ中で最も長鎖のpLOA-0511を用いて解析した。cDNAの全塩基配列を決定したところアミノ酸残基数508、分子量56,910のタンパク質をコードするものであった。これをNBRF (National Biomedical Research Foundation) タンパク質データベースで検索したところチトクロームP450の遺伝子族に高いホモロジーがみられ

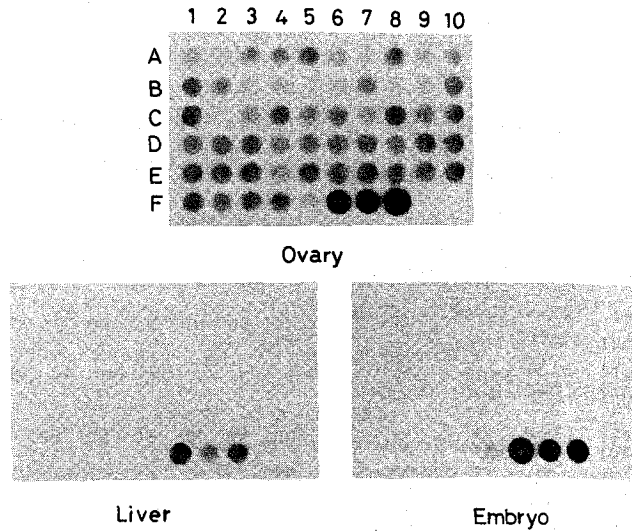
た。特にステロイドホルモン合成に関与するチトクロームP450にホモロジーが高く、中でもP450c17（ステロイド17 α ヒドロキシラーゼ/17、20リアーゼ）に顕著なホモロジーがみられた。既に報告されているウシとヒトのP450c17と各々244残基（48.0%）、243残基（47.8%）が一致した。Fig. 5にはほ乳類の種々のステロイドホルモン合成P450とのホモロジーを示した。ニワトリのP450c17と種々のP450との間で保存性の高いドメイン3カ所をボックスで囲い示した。F（438）からF（458）は、ヘム結合システイン（445）を含むヘム結合ドメインと考えられている領域、S（348）からH（376）はステロイド結合ドメインと考えられている領域である。この2つの領域はニワトリ、ウシ、ヒトのP-450c17の間（67-72%）のみならず、他のステロイド合成P-450との間でも高い保存性（34-62%）を示した。しかしG（300）からH（323）の領域は、P450c17の間では高い保存性（75-83%）を示したが他のステロイド合成P450との間ではあまり保存されていなかった（17-50%）。特にこの領域のG（300）からT（311）の12残基は3種の間で完全に一致している。P450c17に特異的に非常によく保存されているこの領域は、c17ヒドロキシラーゼ（あるいは17、20リアーゼ）の機能に重要であることが推定される。グループ2のクローンがチトクロームP450のcDNAであることが明らかとなったので次にこれを分子マーカーとして組織分化の過程での発現様式を調べた。転写産物はFig. 6に示すように約1.9kbで卵巣、精巣以外のいくつかの組織では検出されなかった。発生のステージでみると卵巣ではふ卵12日目のembryoから60日ビナまでほぼ一定（一定量の組織RNAあたりのハイブリッド形成量として）であった。一方、精巣ではふ卵12日目のembryoではごくわずかのmRNAしか検出されなかったが1日ビナでは卵巣よりも多量のmRNAが存在した。また第4章で述べた方法を用いてふ化直後のヒナの左右卵巣での発現を比較したところ左右でほぼ同等の発現が認められた。ところでステロイドホルモンの生産組織としては卵巣、精巣以外に副腎がある。そこで副腎における発現を次に調べた。ノーザンブロットハイブリダイゼーションでは卵巣、精巣に比べてごく僅かだが1.9kbのmRNAが検出された。副腎にP450c17のmRNAがわずかしかな存在しない点はほ乳類とは異なっている。しかし

鳥類の副腎皮質ホルモンは17位が-OH化されていないもの（コルチコステロン）が主体であり、この点を分子レベルでも支持する結果である。更に卵巢、精巢、副腎の各組織において17日目embryo、1日ピナ、30日ピナ、90日ピナの各ステージにおける発現をRNAスロットプロットハイブリダイゼーション法で調べた。その結果とFig. 6の12日目embryoの精巢、卵巢の結果を含めてFig. 7にグラフで示した。卵巢では12日目embryoから90日ピナまでほとんど発現量に変化がみられなかった（相対量5.6-7.4）が、精巢では12日目embryo（相対量6.0）、17日目embryo（相対量4.0）、1日ピナ（相対量1.2）と急激に発現量の増加が認められた。一方副腎では、全体的に発現量がごく僅か（相対量2.6-8.1）であったが、雌雄共に17日目embryoでの発現量（相対量6.8-8.1）は1日ピナ以降の発現量（相対量2.6-4.3）の2倍以上であった。即ち卵巢、精巢、副腎の3組織における発現量は、組織特異的に調節されているが、1日ピナ以降あまり変化がない。しかし卵巢では12日目embryoですでに一定レベルの発現に達しているが、精巢と副腎においてはembryoから1日ピナにかけてかなり発現量が増加する。このことはP450c17を分子マーカーとして組織分化を見た場合精巢、副腎ではふ化直前にヒナと同じ分化レベルになるのに対し、卵巢ではふ卵12日目embryoですでにヒナと同じ分化レベルになっていることを示している。また発達を停止した右卵巢でもP450c17が発現していることから、右卵巢もある程度までステロイドホルモン生産組織としての分化が行われていることが示唆される。

第6章 総合考察

卵母細胞に蓄えられる母性RNAの一種に対応したcDNAクローンと考えられるpLOA0411、およびステロイドホルモン合成に関与したチトクロームP450c17のcDNAであるpLOA0511を分子マーカーとして組織分化の解析を進めた。発達を停止したふ化直後の右卵巢は左卵巢と共通の遺伝情報も発現しているが、pLOA0411に対応するmRNAのようにすでに左卵巢とは異なっている面もある。この2つのグループ以外にも組織特異性があまり強くないグループ5、6について調べた結果いずれも右卵巢で左卵巢同様の発現が

みられた。精巣でも卵巣同様の発現がみられるグループ 2、5、6 のいずれもが右卵巣でも同様の発現を示し、精巣で発現のみられないグループ 1 は右卵巣でも発現がみられない。この点は発達を停止した右卵巣が、精巣類似の分化は起こるが卵巣への分化は起こらないことを示唆しており興味深い。一方ステロイドホルモン合成に関与する遺伝子に着目した場合、左卵巣はembryoの段階ですでに分化直後のヒナと同様の分化段階に到達しているが、精巣、副腎は分化直前にヒナと同じ分化レベルになるという違いがみられた。ステロイドホルモン合成の遺伝子に関しては、ステロイドホルモン合成に関与する他のチトクローム P 4 5 0 に着目して更に解析することも可能であると思われたので、他の P 4 5 0 のクローニングを試みた。P 4 5 0 c 1 7 のヘム結合部位の塩基配列を合成し、これをプローブとして類似塩基配列にもハイブリッド形成する条件で卵巣のライブラリーをスクリーニングした。その結果 P 4 5 0 c 1 7 とは異なったチトクローム P 4 5 0 が 1 クローン得られた。このチトクローム P 4 5 0 は副腎と精巣で強く発現し、卵巣ではごくわずかししか発現していなかった。今後この様な方法でステロイド合成に関与するチトクローム P 4 5 0 を単離し、それらを分子マーカーとして組織分化を解析して行くことも可能であると思われる。



cDNA probes

Left ovary: 1 day-old female chicken

Liver: 1 day-old female chicken

Embryo: 6 day whole embryo

Fig. 1 Dot blot hybridization of the cDNA clones from the left ovary with ³²P-cDNA probes prepared from different tissues.

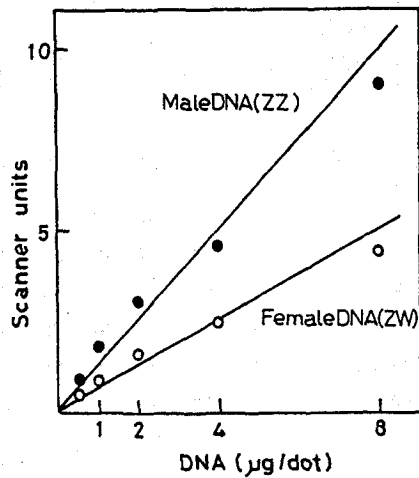
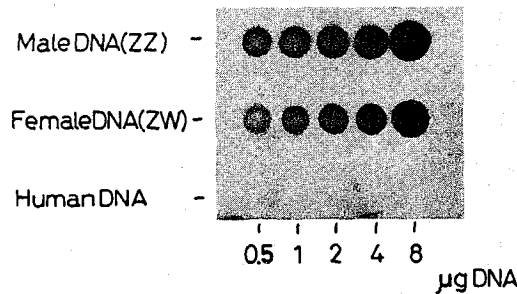
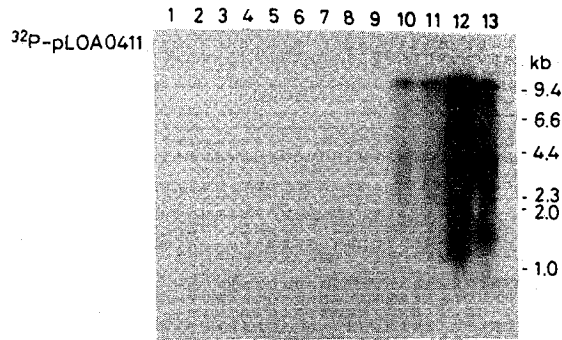


Fig. 2 Analysis of genomic sequences related to pLON3901 by dot blot hybridization.

Table 1 Summary of the properties of 49 cDNA clones selected by the differential screening.

	Clone	Size (b. p.)	OVARY	TESTIS	Ov	Li	Ki	Br	Mu	Bl	Em
1	pLOA0411	2150	++	-	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	pLON2301	240	+	-							
	pLON2901	500	++	-							
	pLON3801	470	++	-							
	pLON4301	630	++	-							
2	pLOA0511	1850	++	++	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	pLON0101	320	++	++							
	pLON0701	320	++	++							
	pLON3301	1100	++	++							
	pLON3701	760	++	++							
	pLON4001	300	++	++							
3	pLON0301	1450	++	+	100	<1	<1	ND	ND	ND	2
	pLON3101	700	++	+							
	pLON3601	1450	++	+							
	pLON4701	850	++	+							
4	pLON0601	320	++	+	100	<1	<1	ND	ND	ND	5
	pLON1601	250	++	+							
	pLON2501	470	++	+							
	pLON4101	800	++	+							
5	pLON0501	1050	++	++	100	5	18	<1	24	ND	7
	pLOB0902	750	++	++							
	pLON0801	1250	++	++							
	pLON1101	1450	++	++							
	pLON1201	800	++	++							
	pLON1401	470	++	+							
	pLON1701	380	++	++							
	pLON1801	460	++	++							
	pLON2101	1350	++	++							
	pLON2401	1350	++	++							
	pLON2801	1450	++	++							
	pLON4201	650	++	++							
	pLON4401	350	+	+							
6	pLOA0802	450	++	++	100	ND	12	3	9	ND	3
	pLON2001	670	++	++							
7	pLON0901	350	+	+	100	<1	<1	<1	<1	25	30
8	pLON2601	830	++	++	100	ND	34	<1	ND	ND	<1
9	pLON3901	2150	++	-	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	pLON3001	1210	++	++	100	ND	4	ND	<1	ND	<1
	pLON3201	1700	++	++							
	pLON4501	270	+	+							
	pLON4801	370	++	+							
11	pLON1001	1050	++	+	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	pLON3401	450	+	-							
12	pLON1301	390	+	-	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	pLON2701	750	+	+	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	pLON0401	530	++	+	100	3	22	4	37	ND	20
15	pLON1901	550	+	+	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	pLON3501	630	++	+	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	pLON4601	850	+	+	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Ov; Ovary Li; Liver Ki; Kidney
 Br; Brain Mu; Muscle Bl; Blood
 Em; 6-day whole embryo



Sources of poly(A)⁺RNA

- | | |
|---------------|-------------------------|
| 1. 1d.liver | 8. 12d.embryonic testis |
| 2. 1d.spleen | 9. 1d.testis |
| 3. 1d.muscle | 10. 12d.embryonic ovary |
| 4. 1d. blood | 11. 1d.ovary |
| 5. 1d. brain | 12. 20d.ovary |
| 6. 1d. kidney | 13. 60d.ovary |
| 7. 6d.embryo | |

Fig. 3 Analysis of poly(A)⁺RNAs related to pLOA0411 by Northern blot hybridization.

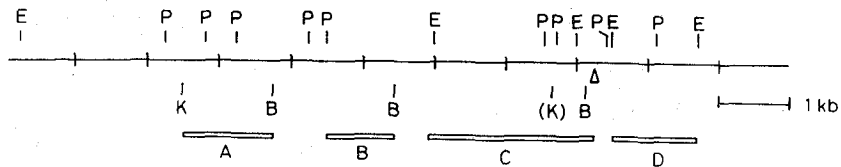
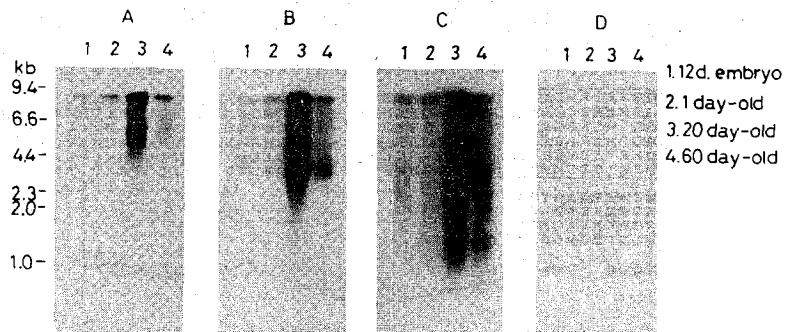


Fig. 4 Northern blot hybridization of pLOA0411-related poly(A)⁺RNAs with ³²P-probes from different regions of the gene

CP450 -----
Bcl17 -----
Hc21 -----
Bcl1 -----
Hscc MLAKGLPPRSVLVKQYQTFSLAPREGQLRVRVPTGEGAGISTRSFPFNEIPSPG
CP450 -----MPP-LAVELLEAEKLGCAWRL 19
Bcl17 -----MWLLEAVFLEETLAVLFWPK
Hc17 -----MWELVALLLETEAVLFWPK
Hc21 -----M-LLEGLLELPLLAGA-RLL
Bcl1 ONKWMRMLQIWKEQQSENHMLDMHQTFQELGPIFRYDVGRRHMVFMPLPED-VER
Hscc DNGWLNLVHFWRRETQTHKVLHVVQNFQKYGPIYREKLGNVESVYVIDPED-VAL
CP450 STSQPFTOTGTRPFRSWEAPENKAGETGQHACRETHL-RFWRVQRGEEKSLYQWWM 79
Bcl17 TKSHAKY-----EFSDHRSSEENVCHEPFFRPRGQGHK-NFFKKGKKGPIYSFRL
Hc17 RRCPEAKY-----FKEHLSTEALVGRHPFPRRGMHMH-NFFKKGKKGPIYSVRM
Hc21 WNWVK-----LREHHLPEEAPGFHHL-QRDNFPI-YELQITQKQWGFPIYREHL
Bcl1 LQQADSHH-----RQRMILERWLAYRQA---ROHKKGVFLNLNPGW-----
Hscc LFKSEGN-----ERFLIPRWVWVAYHQY---YQRPIOVMLKKSAAW-----
CP450 GSHYVYVWVWVYVHHTREKHLLEKKAATKGRRTVE---TDLEFRGQKQZAFASYOPL 125
Bcl1 GKTTFEMIGHHQLAEKDKGNLKSEKLNQEAANNVCGDFEATQHGEMIDLESFPLSLAV
Hc17 STKTTSEIGHHQLAKREYKKEGERSGRQMAT---DIAANNKGGKEDSQA
Hc21 ELQDDMMLKPKRTIEAMVETKWDKEDKEREPLT---YKVEVKNYPDLSEGDYSLL
Bcl1 RLDRRLRLLFPDVLSPANQKTYTFLVDAVQDFSOQLTKARVLQNRGSLTLDIAR
Hscc -KKDRMALKQEVMRPEATKNFLLDVAVSDFVSVLHRRIKKAGSGNYSGDISDD
CP450 WAFQREKVVHVAHVSMEGEEHVAEENKGRKASASCEKTHGAAQGMKDLMAPELTRAY 180
Bcl1 WQLHKKEBALNHPALEKDKGNLKSEKLNQEAANNVCGDFEATQHGEMIDLESFPLSLAV
Hc17 WQHERHMETFALKEDSDCKEKEKLEKQKISTHGDMETHNGQSIDISFPVFLAV
Hc21 WBAHKHMTRESHLQIRDSE-EPVV-EQLTQEFCEMRRAQPGTVPFAIEEFLSLT
Bcl1 LQYDIETGDKIKDDNLMPAYKCIQEVLTWVSHWSIQIYVDVIFHFRRFREPNGLE
Hscc ---IHAEAMLKSTVQLMFPFRRSRWMSTNMWREHFEAWD-----
---IDAIYQMFVTPMLNLPDMPFLFRTKTKWQKDVAAWD-----
CP450 ALFKRRELEVRQKHQQKFTENKSEAECCGTVREDDMALLEVRLNENNSLEPG-- 287
Bcl1 EKMGEVQVTNENENIELEKCGENESSDITNHLHBIQAKVNDNNAGPQQDS
Hc17 EKLEKSHVKIENDLKNILENYEKKRSDSITNMLDTEMQAKMNSDNGDAGPQQDS
Hc21 RRTFKAIKRDHLLVEMQLRQHKEKSLVAGQWRDMDYMLQ---GVAQRESMEEGS
Bcl1 RRTFKAIKRDHLLVEMQLRQHKEKSLVAGQWRDMDYMLQ---GVAQRESMEEGS
Hscc ---YIFQVANRAIQRIYQELAL---GHPWHYSGIVA
---VIFSKADITYQNPVYELKQ---KOSVHIIYRGMVY
CP450 LENDDHLNMTVGDHRCAGVETETTLVKKWAVLLELHYPE--VQKKIGREMDQKI 339
Bcl1 KLSNRHMDATIGDEGAGVETETTSVIKWIYKAZLHRS--LKKRHKDDIDQII
Hc17 ELSDNHIIHTIIGDEGAGVETETTSVVKWTLAFLEHNHQ--VKKKLYHEIDQNV
Hc21 QQLEOHVHMAAVDILLIGTETETANTISSWAYVFLRHPE---IQORLQEBLDHEL
Bcl1 ELMRAD---MFLDTEKANTIDLTAGVDTTAFPEEMTLFELARNPEVQDQAVRQES
Hscc RLQMSK---MSFDTEKANTIDLTAGVDTTSMTHQVHLYEMARNLKVQDMLRAVE
CP450 G---LAKHHLSDFPPEVYBEATISEGRERIRYSPLFEPHVSADTSEYSEYSI 390
Bcl1 G---FNRRTISDNREVLLEATLREVERLREVAARTEPHKAVIDSSIGDLTID
Hc17 PGASSSVR-YLEARKELNKEWHQDEDEMEERELNPAQTQLISRSVLEPEGAGPRSC
Hc21 LVAARISENQRATITHEBLBRKALKETERLVEKGITEREVSSDLVQNYHIP
Bcl1 LAARHISGQDQMATMLQHEVLEHKKSKKKTRELHRIEVTIQRYLVNDLVLRD-IMER
Hscc
CP450 KQARMMFNLSVHRHEKEWQKEEENPGRFLEDEGQGHISESPXLEPEGAGIRVQ 445
Bcl1 EQTDVWVNEVALHHSSEKWEHQEDLQMEERKADPTTQQLISRSVLEPEAGAPRSC
Hc17 EQTEVINNEVALHHSSEKWEHQEDLQMEERKADPTTQQLISRSVLEPEAGAPRSC
Hc21 EQTVIIPNLQGAHLDDETVVERBHERWEDEPPEPKN-----SALAEQCCAPVQ
Bcl1 AGTLVKVLYSLGRNPAPVAREESYHEQRWLDROGS---GSRFPHLAGQGVVQVRCQ
Hscc AKTLKQVAIYALGREPTFFPDEENDETRWLSKDKN---ITYFRNLGQGVVQVRCQ
CP450 EYEVVAKMENEERDANALQRRETRC---BQDQPEPRLTQKFGVYLHQVQKERMAR 497
Bcl1 VDEMIRARQELREDFMRLLEQRNRIE---RDDGKIBSREQHASLYEQKPEKXKIE
Hc17 IREIKARQELREDFMRLLEQRNRIE---RDDGQHEPRLTQKFGVYLHQVQKERMAR
Hc21 IREIPIARLEDEEVVTRLEQARTELP---SGDA-LREBNGLPPECVSVLKMGQFQ--
Bcl1 HERRVAEVMLLELHHHEKKNLVEVTELEQEDIKMYRFRILMPSLPLFRAIQ--
Hscc IRRRIEELRMTIEHINMEENERVVICHLSDVGTTFNMIIMPKEPISFTFWPFNQ
CP450 LREKRESEMYR# 508
Bcl1 VQCKREKAEAGSTP#
Hc17 VQCKREKAEAGSTP#
Hc21 VMLQPEGMGANSPPGQNQ#
Bcl1
Hscc ATQQ#

CP450: sequence for pLOA0511

Bcl17: bovine P-450c17

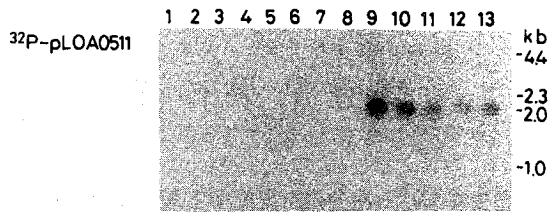
Hc17: human P-450c17

Hc21: human P-450c21

Bcl1: bovine P-450c11

Hscc: human P-450scc

Fig. 5 Comparison of the amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence of pLOA0511 with some mammalian steroidogenic P-450 sequences.



Sources of poly(A)⁺RNA

- | | |
|--------------|-------------------------|
| 1. 1d.liver | 8. 12d.embryonic testis |
| 2. 1d.spleen | 9. 1d.testis |
| 3. 1d.muscle | 10.12d.embryonic ovary |
| 4. 1d.blood | 11. 1d.ovary |
| 5. 1d.brain | 12. 20d.ovary |
| 6. 1d.kidney | 13.60d.ovary |
| 7. 6d.embryo | |

Fig. 6 Analysis of poly(A)⁺RNAs related to pLOA0511 by Northern blot hybridization.

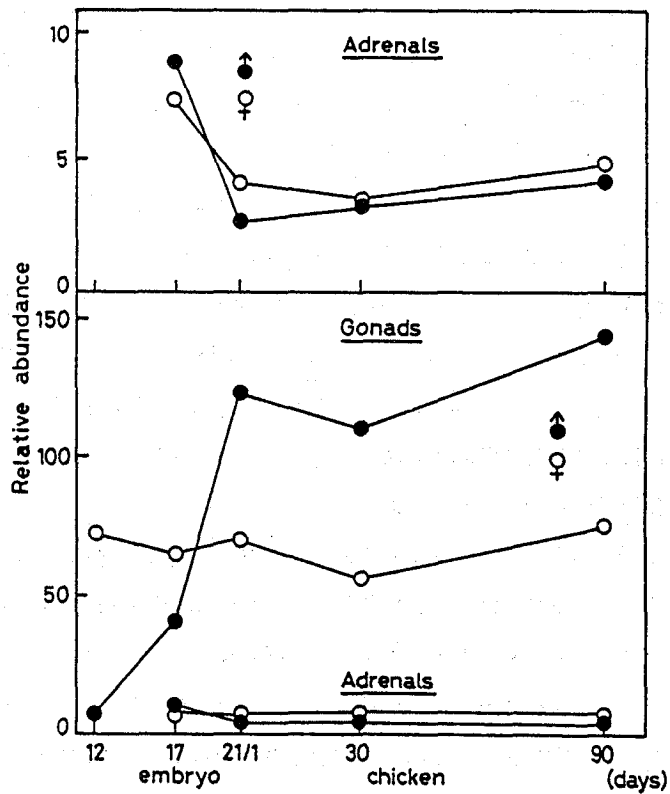


Fig. 7 Relative abundance of the transcript for P-450c17 in ovary, testis and adrenals at different developmental stages.

審査結果の要旨

本研究は脊椎動物の発生における性分化を研究する最もよい材料の一つであるニワトリを用いて、卵巣分化の分子レベルの研究に利用できるマーカー遺伝子を検索しその遺伝情報を明らかにすることを目的としたものである。また、鳥類では一般に左の卵巣のみが分化し、右側の卵巣は初期に発達を停止するという興味深い現象が知られているので、本研究では形成過程における左右卵巣の遺伝子発現の比較という点にも注目した。

まず、ふ化後1～3日のヒヨコ約200羽から実体顕微鏡下で左、右卵巣をそれぞれ摘出し、poly(A)⁺RNAを調製し、Okayama-Berg法によりcDNAライブラリーを作製した。次に1日ピナの左卵巣、肝臓、6日目胚の全poly(A)⁺RNAから作製したcDNAを³²P標識プローブとして左卵巣のcDNAライブラリーを検索し、17グループ49個の卵巣特異性の高いcDNAクローンを得た。このうち、14グループは初期精巣でも発現していることから、初期卵巣、精巣で共通に発現している遺伝子が多いことが示された。さらに、卵巣でのみ発現している2クローン (pLOAO411, pLON3901)、卵巣と精巣で発現の見られる1クローン (pLOAO511) の塩基配列決定を行って遺伝情報解析を試みた。左右卵巣のcDNAライブラリーへのハイブリット形成実験からpLOAO411は左卵巣でのみ発現しているが、その塩基配列中には翻訳可能な情報がなく、転写終結点は一定しているが開始点が複数存在するなど異常な転写調節を受けていることが分かり、卵母細胞中に蓄積される母性RNAの一つであると考えられた。pLON3901は、Z染色体由来の配列であることが分かり、Z染色体のDNAウォーキングがこの配列を出発点として可能になった。pLOAO511は鳥類で初めて見出されたチトクロムP-450 c 17のcDNA配列であることが判明し、左右両卵巣ではほぼ同程度の発現が認められた。このクローンをを用いてふ化前後の卵巣、精巣、副腎における同遺伝子の発現の解析を行った。

以上のように本研究によってニワトリの初期卵巣における遺伝子発現がcDNAクローンをを用いて解析可能であることが示された上、Z染色体由来のDNA配列が初めてクローン化されたこと、発達を停止する右卵巣もステロイドホルモン合成に関与するP-450 c 17の遺伝子の発現に関しては左卵巣と同程度の分化状態にあることが示されたことなど新発見も得られたことから、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と判定した。