

氏 名(本籍)	ほり 堀	てつ 哲	や 也
学位の種類	博	士	(農 学)
学位記番号	農	博	第 6 2 1 号
学位授与年月日	平	成	12 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科農芸化学専攻 (博士課程)		
学位論文題目	ニワトリW染色体上の新規遺伝子 Wpkci の構造，初期胚 における発現，ならびに深胸類鳥類種における保存性の解析		
論文審査委員	(主 査)	教 授	水 野 重 樹
		教 授	神 尾 好 是
		教 授	中 島 佑

論文内容要旨

第1章 序論

脊椎動物の性決定に関与する性染色体上の遺伝子の機能についてはまだ一部の知見がえられているに過ぎない。性染色体の構成と性決定の対応関係の明確な哺乳類、鳥類における性決定には大きく分けて3つの段階がある。すなわち、受精時に決まる性染色体構成の段階、初期発生時に働くと考えられる性決定遺伝子によるその後の性分化の方向決定の段階、性ステロイドホルモン合成と生殖腺分化の性分化過程を経て個体レベルで性が確定する段階である。雄XY、雌XXの性染色体構成を持つヒト、マウスにおいては雄特異的なY染色体上の遺伝子*SRY/Sry*[Sinclair et al. (1990) *Nature*, 346, 240-244, Gubbay et al. (1990) *Nature*, 346, 245-250]が現在、雄性分化への方向決定に働く遺伝子の一つとして注目されているが、その後の性分化へ至る過程の詳細は不明である。哺乳類とは違い鳥類は雄ZZ、雌ZWの雌ヘテロ型性染色体構成をとる。異なる性染色体構成をもつことから哺乳類とは異なる性決定段階を経ることが考えられるが、事実ニワトリには*SRY*遺伝子は存在しないと考えられている。しかし、ニワトリの性ステロイドホルモン合成と生殖腺分化、またその段階で働く遺伝子群は哺乳類とよく似ていることが分かっている。

ニワトリにおいて雌性決定遺伝子の存在が予想される雌特異的なW染色体上の遺伝子として、現在chromo-helicase-DNA-binding protein (*CHD1-W*) とATP synthase α -subunit (*ATP5A1W*)の遺伝子が知られている。これらの遺伝子はいずれもZ染色体上に相同遺伝子が存在し、性決定における特異的機能はないと考えられている。最近、ヒト9p23.3-p24.1に存在する*DMT1(DMRT1)*遺伝子がニワトリZ染色体上に存在することが分かった[Nanda et al. (1999) *Nat. Genet.* 21, 258-259]。興味深いことにヒトにおいて9p23.3-p24.1の欠失によりXY性逆転(男性から女性)が高頻度に生じることが知られ、これが*DMT1*遺伝子の遺伝子量の減少により生じるという考えがある。ニワトリZ染色体上の*DMRT1*遺伝子において遺伝子量補償作用が起こらないと仮定すれば、雄において雌の2倍量存在することになる*DMRT1*遺伝子が雄性決定を行っているという説もある。いずれにしても現在まで鳥類の初期発生における性決定、性分化の遺伝子機能に関する確定的な見解は得られていない。

本研究ではニワトリの初期発生における性決定から性分化に至る分子レベルの解析を目指し、性分化開始前の未分化生殖腺を含む組織由来のcDNAを用いて、雌cDNAから雄cDNAを差し引くサブトラクションを行い、雌特異的に発現する遺伝子のcDNAクローンの取得と、遺伝子機能の

解析を行うことを目的とした。

第2章 ニワトリ雌5日胚の未分化生殖腺を含む組織に特異的なcDNA配列の濃縮と検索

ニワトリ生殖腺における性分化が観察され始める孵卵6日から7日に先だって性特異的に発現する遺伝子の取得を目指した。

ニワトリ5日胚をW染色体特異的DNAプローブ(EE0.6)により性判別後、雄、雌それぞれ37個体から未分化生殖腺及び中腎を含む組織を取得し、poly(A)+RNAを抽出、精製後、cDNAを合成した。これらのcDNAを用い雌から雄cDNAを差し引くサブトラクションをPCR-Select cDNA subtraction法(CLONTECH)を利用して行い、5日胚における雌特異的なcDNA配列の濃縮を試みた(Fig. 1)。このとき雌由来のcDNAはTesterとして2種のadaptor配列(1、2R)を別々に付加し、雄由来のcDNAはDriverとしてadaptor配列は付加せずに用いた。2種のadaptor配列を持つTesterはそれぞれ別々にDriverと混合し、1回目のハイブリダイゼーションを行った。これら2つのハイブリダイゼーション反応液を混合し2回目のハイブリダイゼーションを行った。このときDriver cDNAとのハイブリッド形成を逃れた、異なったadaptor配列を持った雌特異的なTester cDNA配列間でのハイブリッドが形成され、引き続いて行ったこれら2種のadaptor配列に対するプライマーを用いたPCR(polymerase chain reaction)により優先的に増幅されると考えられた。このように濃縮されたcDNA配列をpBluescript KSベクターにサブクローニングしたのち、リバースノーザンブロット及びノーザンブロット解析によりクローンの雌特異的な発現の確認を行った。

約200クローンのインサート配列をベクター由来の配列をもとにPCRを用いて増幅後、2枚のゲルを用いて同条件下で電気泳動を行った。これらを用いサブトラクションに使用した雄、雌のcDNAをそれぞれプローブとしてサザンブロット解析を行った(リバースノーザンブロットハイブリダイゼーション)。この結果29クローンが雌cDNAプローブによってのみ、または、雄cDNAプローブと比べ強いシグナルを与えた。さらに雌雄5日胚poly(A)+RNAに対するノーザンブロット解析を行ったところ2クローン(5fm2,5fm3)において雌特異的な発現を確認した。

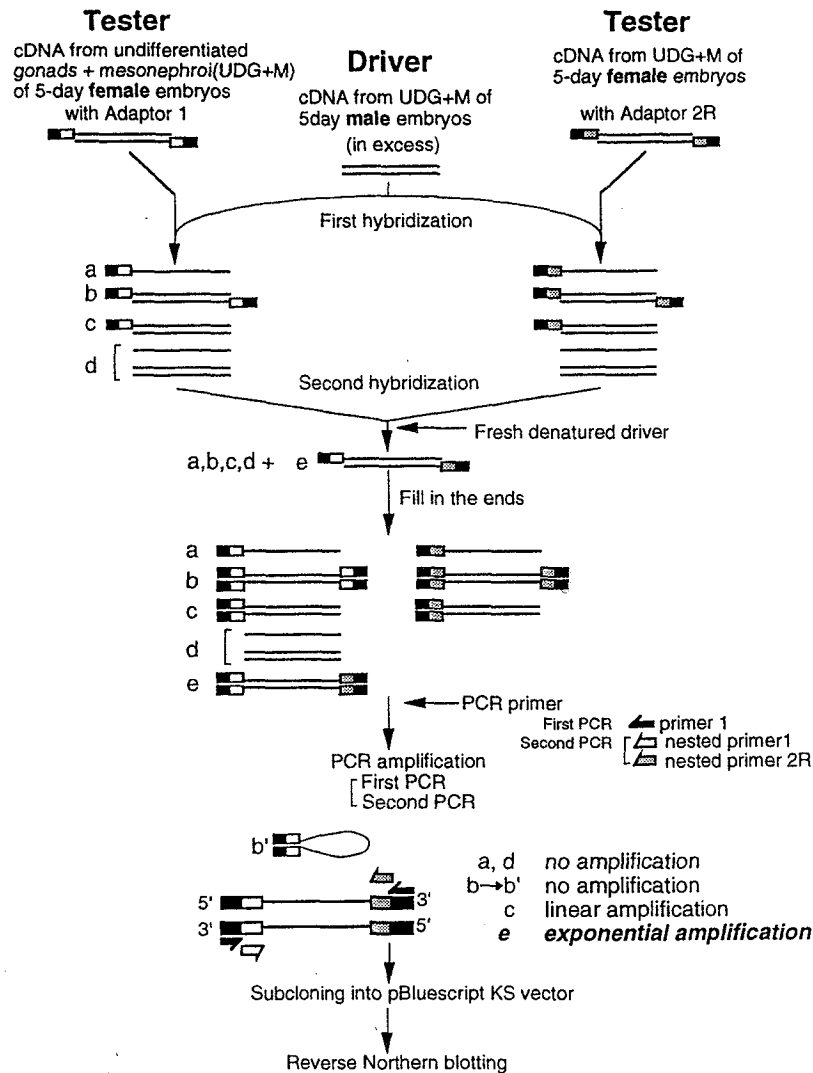


Fig. 1 Schematic diagram of PCR-Select cDNA subtraction

第3章 ニワトリ *Wpkci*、*PKCI* 遺伝子の cDNA クローニング

雌特異的発現を示した2つのcDNAクローン(5fm2, 5fm3)はニワトリ雌雄ゲノムDNAに対するサザンブロット解析で雌特異的なシグナルを与えたことから、雌特異的なW性染色体上の遺伝子由来であると考えられた。

この2クローンをプローブとして雌ニワトリ5日胚未分化生殖腺+中腎のcDNAライブラリー(インサートサイズ0.3-2kb)をスクリーニングした。5fm2プローブにより取得したインサートサイズ約660-bのクローンは130アミノ酸残基をコードするORF(open reading frame)を持ち(Fig. 2A)、そのアミノ酸配列はヒトPKCI-1 (protein kinase C inhibitor/ interacting protein-1)と61%の相同性を有することから *Wpkci* 遺伝子と命名した。さらに5fm3クローンも同一遺伝子由来であ

ることが分かった(Fig. 3A)。

ニワトリの*PKCI*遺伝子はまだクローン化されていなかった為、ヒト、マウスで報告されていた*PKCI*のcDNA配列をもとにRT-PCRを行い、それぞれからcoding領域214-bの配列を増幅後、混合プローブとして上記cDNAライブラリーのスクリーニングを同様に行った。その結果インサートサイズ約630-bで、ヒト及びマウス*PKCI*と約87%の相同性を有する126アミノ酸残基をコードするORFを持つクローンp*chPKCI-3*を取得した(Fig. 2B)。このcDNAクローンは*PKCI*において保存性の高いHIT(histidine triad)motifを持ち、ヒト*PKCI*のX線結晶構造解析により明らかとなったZn結合に関わる3個のヒスチジン残基も存在する(Fig. 2B○)ことから、ニワトリ*PKCI*遺伝子(*chPKCI*)由来であると考えられた(Fig. 2B, 2C)。

*Wpkci*遺伝子と*chPKCI*遺伝子はDNA塩基配列、推定アミノ酸配列でそれぞれ71%、65%の相同性があった。また*Wpkci*, *chPKCI*タンパク質の推定分子質量はそれぞれ13.9, 13.8kDaとほぼ同じであったが、推定等電点(pI; isoelectric point)はそれぞれ10.93, 6.33とかなり異なっていた。両タンパク質の推定配列をそれぞれアミノ酸の相同性の高さをもとに便宜的に6つの領域に分割した(Fig. 2C)。 *chPKCI*のHIT motifに相当する*Wpkci*の領域5にはHIT motifは存在しなかった。また*Wpkci*の領域2はロイシン、アルギニンに富んだmotif[Leu(4/20), Arg(4/20)]であったが *chPKCI*には存在せず、この2つのタンパク質は異なった機能を持つことが予想された。

第4章 ニワトリ*Wpkci*、*PKCI*遺伝子の遺伝子構造の解析と染色体上の局在部位

雌ニワトリ繊維芽細胞由来ゲノムDNAを*HindIII*で部分消化し、同様に*HindIII*で消化したpBAC-Lacベクターに組み込み、*E. coli* DH10B株に形質転換を行った。このようにして平均インサートサイズ約150-kb、約5万クローンからなるニワトリ雌BAC(bacterial artificial chromosome)ライブラリーを構築した(慶応大、清水信義先生との共同研究)。このライブラリーはニワトリ2倍体ゲノムサイズを2300-Mbとすると約3.2倍のゲノムサイズをカバーするものである。

このBACライブラリーを5fm2, 5fm3 cDNAクローンを混合プローブとしてスクリーニングを行い10個のBACクローンを取得した。いずれのクローン中にも5fm2, 5fm3プローブ配列を含む5-kbの*Bam*HI断片、5.6-kbの*Pst*I断片が存在した。この各断片をpBluescript KSベクターにサブク

A

```

GCCGCGCTGAGCCGTGCTGGGGAGGTTTGGGGCTGAGGGAGTGTGTAGCGAGCGGGCGC 60
                                     *
CGTCATGGCCGGCGGGATCGTTAGGTCGCCGGCCGCTGGCGCGGTGGCCCGCTCTCTTT 120
      M A G G I V R S P A A W R G G A A L L 19
GGGAAAAGTCGCCCCCAGGAGTTCTCCGCCAACGTTATCCCGAGGAGGAGCGTTGTG 180
      G K V A R Q E F S A N V I R E E E P L W 39
GACGAGGAGTGCCTTGCCTTCCATGATATTCACCGCAAGCTCCTACGCTTTTTCCTAGC 240
      T R S A L R S M I F H R K L L R F F L A 59
CGCTCCCCAGAAGGCCGTTGTTCGGGTTATCCGGAGCAGAAGATTGTGGCGCACCTCTTCT 300
      A P Q K A V V G L S G A E D C G A P L L 79
TGGGCGTTTGTATGATTGTTGGCGGAGAAGTGTGCTGCTAGCCTGGGCTTGACCGATGGATT 360
      G R L M I V G E K C A A S L G L T D G F 99
CCGGATGGCTGTGAGATACCCACCTCAGTCCCTCAGACTACCGCGCGGGCTCTGTAT 420
      R M A V R Y P P S V P S D Y R A R L C I 119
TCTGGGTGGCCGTCAGTTGGGCCAGCCTCCTGGCTAAGATGTTGCACCGCCGGTGTTCG 480
      L G G R Q L G Q P P G * 130

AGCACCGCTACGGATCGCCACCGAATGGGTTTACCGTGTGCCCCGTAGCCTAGCCACCG 540
GTGACATGTAATGTTTGGTGGGTGCCATGGAGGTAATGAAAAGCTTTGAGCAGCA 600
TTTGCAGATAAAGATGGAGCATGGGGATATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 657

```

B

```

CGTCTGCGGGTGCCTTTCGATACGTCGGCATGGCTGACGAGATCCGCAAGGCGCAGGCCG 60
                                     M A D E I R K A Q A 10
CGCGCCCTGGTGGGACACCATCTTCGGGAAGATTATCCGCAAGGAGATCCCGCCAACA 120
      A R P G G D T I F G K I I R K E I P A N 30
TAATCTACGAGGACGAGCACTGCCTTGCCTTCCATGATATCTCACCCCAAGCTCCAACGC 180
      I I Y E D E Q C L A F H D I S P Q A P T 50
ATTTTCTAGTATCTCCTAAGAAGCCAATTGTCAGGTTATCTGAAGCAGAAGATTCTGATG 240
      (H) F L V I P K K P I V R L S E A E D S D 70
AATCTCTTCTGGGCATTTAATGATTGTTGGCAAGAAGTGTGCTGCTAACCTGGGCCTGA 300
      E S L L G H L M I V G K K C A A N L G L 90
CCAATGGATTCCGGATGGTTTTGAATGAAGGGCTGAGGGTGGGCAGTCTGTCTATCATG 360
      T N G F R M V L N E G P E G G Q S V Y H 110
TACATCTCCATATTCTGGGAGGTCGTCAGTTGGGCTGGCCTCCTGGCTAAGATTTTTCGA 420
      V (H) L (H) I L G G R Q L G W P P G * 126

CCACAAGAGATGCTGCATGTGTACAAATCACTAGCAAATAGATTGTTTCCCATCAACTT 480
AGCCACTGTTAATGTAAATTGTTCTTGGATATGTGCTTTGGAGGGCAATAAATGCTCTG 540
AACAGCACTTGCACAATAAAGATACAGCATGTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 600
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 629

```

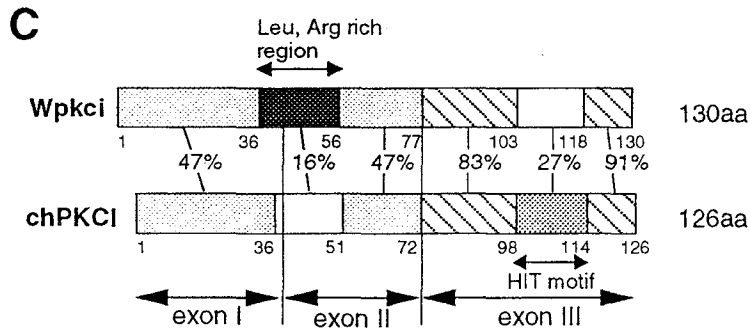


Figure 2. The cDNA and deduced amino acid sequences of Wpkci (A), chPKCI (B), and their protein domains and identity levels of their sequences (C).

The cDNA sequences of pWpkci-8 (A) and pchPKCI-3 (B) were determined. The N-terminal Met residue in (A) was assigned because of its location nearest to the termination codon in the 5'-UTR, and that in (B) was assigned by comparison with mammalian PKCI sequences. In (A) and (B), termination codon (asterisk), polyadenylation signal (underline) and the boundary of exons (vertical line) are indicated. The Leu, Arg-rich region of Wpkci is boxed in (A). The HIT motif containing the conserved His-triad motif (HVHLH) is double-underlined, and the three His residues involved in the binding of zinc are circled in (B). In (C), amino acid residue numbers for N-terminus, C-terminus, and the last residue of each domain, correspondence to exons I to III, and identity levels of the amino acid sequences of corresponding domains between Wpkci and chPKCI are indicated.

ローニング(pGB-1; *Bam*HI 5-kb断片を含む, pGP-3; *Pst*I 5.6-kb断片を含む)した後、両ゲノムクローンの塩基配列決定を行った。その結果*Wpkci*遺伝子は3個のエクソンからなる遺伝子であることが明らかとなった(Fig. 3A)。またこの遺伝子はタンデムに反復していると推定された。

同様にニワトリBACライブラリーを*chPKCI*cDNAクローン(*chPKCI*-3)をプローブとしてスクリーニングを行い3個のBACクローンを取得した。その内の224D8クローンの*Hind*III消化による1.3-kb(pGH1.3-1)及び3.3-kb(pGH3.3-3)断片、及びこれらサブクローンの隣接配列については224D8クローンを用いて塩基配列決定を行った。その結果*chPKCI*遺伝子も同様に3個のエクソンからなる遺伝子であることが明らかとなった(Fig. 3C)。

chPKCI、*Wpkci*遺伝子のイントロンIIはそれぞれ2,682-bp、985-bpで両配列間での有為な相同性は見い出せなかった。一方、*chPKCI*、*Wpkci*遺伝子のイントロンIIIはそれぞれ762-bp、831-

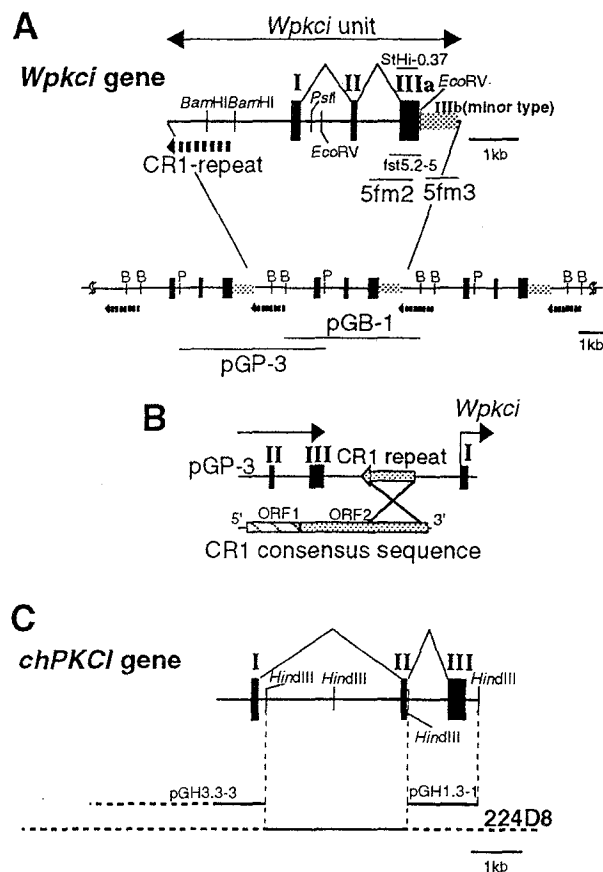


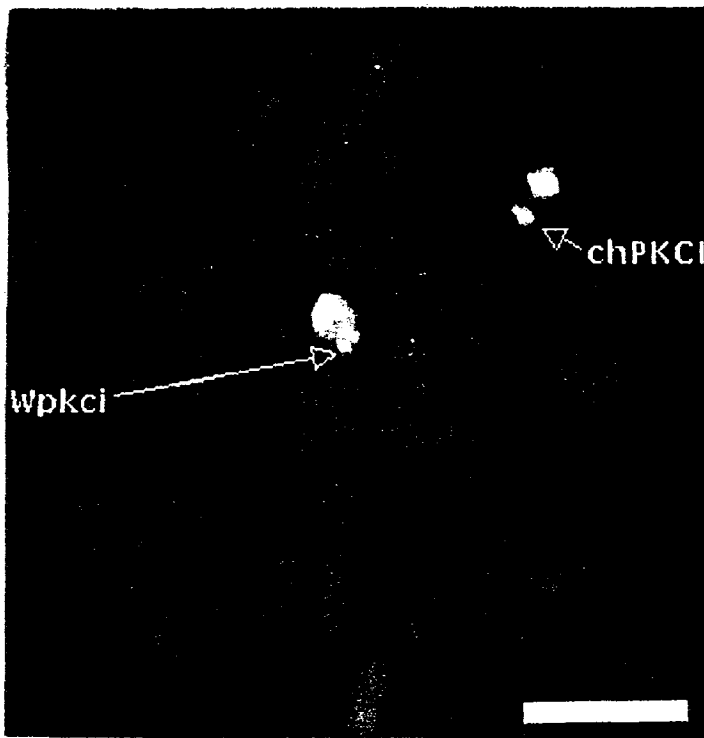
Figure 3. Gene structures of the tandemly reiterated *Wpkci* (A, B) and non-reiterated *chPKCI* (C). These structures were determined by restriction mapping and sequencing of BAC clones, 216G1 for *Wpkci* and 224D8 for *chPKCI*, and their subclones. Exons are indicated with filled rectangular boxes. Locations of the partial sequence of CR1 between *Wpkci* genes are indicated in (A) and (B). A minor 1.4-kb transcript of *Wpkci* gene was shown to contain an additional region of exon III as indicated IIIb in (A). Positions of cDNA clones; 5fm2, 5fm3, fst5.2-5, and genomic subclones; StHi 0.37, pGP-3, pGB-1, pGH3.3-3, pGH1.3-1, are indicated.

bpで57%の相同性があった。このようなエクソン間(第3章)、及びイントロンIIでの相同性から両遺伝子が同一の遺伝子を起源としていると考えられた。

ニワトリ雌繊維芽細胞由来の中期染色体標本に対して*chPKCI*(224D8 BACクローン)、*Wpkci*遺伝子(pGP-3ゲノムクローン)をプローブとしてFISH(fluorescence *in situ* hybridization)を行い染色体上の局在部位を決定した。このとき同時にW染色体長腕部反復配列である*EcoRI*-family配列(pUGD1201)、及びZ染色体長腕端部反復配列であるpFN-1マクロサテライト配列を染色体マーカープローブとして使用した。その結果*Wpkci*遺伝子はW染色体短腕の非ヘテロクロマチン領域端部に、*chPKCI*遺伝子はZ染色体長腕セントロメア近傍(短腕末端からZ染色体全体に対し53.4%の位置)に局在していることが明らかとなった(Fig. 4)。

*Wpkci*遺伝子がタンデムに反復していることがゲノム構造解析により予想された(Fig. 3A)。そ

A



B

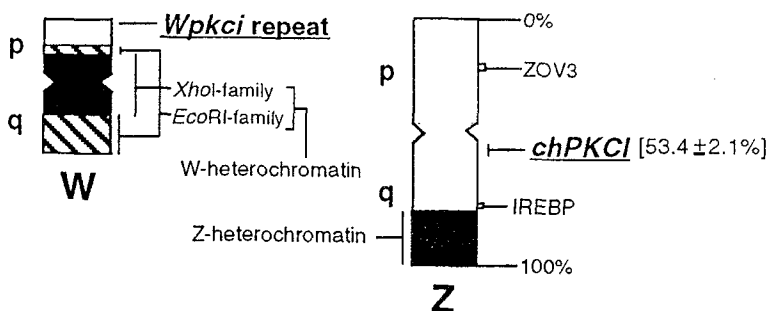


Figure 4. Chromosomal locations of *Wpkci* and *chPKCI* genes demonstrated by FISH with mixed probes. (A) A metaphase set from the female chicken embryonic fibroblast was hybridized with biotinylated pGP-3 (for *Wpkci*), DIG-labeled BAC clone 224D8 (for *chPKCI*), 1 : 1 mixture of biotinylated and DIG-labeled pUGD1201 (for *EcoRI*-family on the W chromosome) and 1 : 1 mixture of biotinylated and DIG-labeled pCZTH5-8 (for pFN-1 macrosatellite on the Z chromosome). The biotinylated probes were detected with FITC-avidin, and the DIG-labeled probes were detected with sheep anti-DIG Fab fragment followed with rhodamine-labeled anti-sheep Fab. Scale bar indicates 10 μ m. (B) Locations of *Wpkci* and *chPKCI* on W and Z chromosomes, respectively, are illustrated. The *chPKCI* locus on the Z chromosome was assigned by measuring 122 FISH figures as in (A).

ここで *Wpkci* 遺伝子を含む BAC クローンの一つ 216G1 のインサート配列 (約 140-kb) を *NotI* で切り出し、さらに *PstI* で部分消化後、電気泳動を行い、*pfst5.2-5* cDNA クローン (*Wpkci* 遺伝子イントロン II + エキソン III、pre-mRNA 由来; Fig. 3A) のインサート配列 (0.58-kb) をプローブとしてサザンブロット解析を行った。エチジウムブロマイド染色、サザンブロットハイブリダイゼーション、双方で 5.6-kb の整数倍の大きさの断片を検出した (Fig. 5A)。同様に *chPKCI* 遺伝子を含む BAC クローン 224D8 (インサート約 150-kb) を *NotI* 消化後、*BamHI* で部分消化し、電気泳動を行い、*chPKCI* の部分断片 (塩基配列 30-410; Fig. 2B) をプローブとしてサザンブロット解析を行った。その結果 9.4-kb とさらに高分子側に 3 つのバンドを検出したが *Wpkci* 遺伝子のような整数倍断片ではなかった (Fig. 5B)。

Wpkci 遺伝子の反復回数を測定するため *EcoRV* 消化したニワトリ雌ゲノム DNA (0.25-3 μ g)、及び *EcoRV* 消化したニワトリ雄ゲノム DNA 3 μ g と 5fm2 cDNA 断片 (10-90 pg) (*Wpkci* 遺伝子 pre-mRNA 由来; Fig. 3A) の混合物に対して、5fm2 cDNA 断片をプローブとしてサザンブロット解析を行った (Fig. 5C)。シグナル強度は Fuji FLA-2000 イメージアナライザーにより数値化した後、以下の計算式により反復回数を算出した。ニワトリ 2 倍体のゲノムサイズを 2.54pg、一塩基対の平均分子量を 650 とし、フィルターにブロットした DNA 量と放射活性の数値が直線関係にある領域の数値を用いて計算した。フィルター上のゲノムの重さ (pg) / 2.54 = Ng (2 倍体ゲノム数)、フィルター上のクローンの分子数 = Nc、ゲノムとクローンで得られた放射活性の数値をそれぞれ Sg, Sc とし、反復回数を X とすると、 $Ng \times X : Nc = Sg : Sc$ となり、 $X = Nc \cdot Sg / Ng \cdot Sc$ で反復回数を算出した。その結果雌 2 倍体ゲノム (W 染色体) 中に約 44 コピー存在していることが分かった。このように *Wpkci* 遺伝子は W 染色体上でタンデムに 44 回反復していることが分かったが、その形成過程は不明である。*Wpkci* 遺伝子のゲノム配列から各遺伝子間にはニワトリゲノムに存在する散在型である CR 1 反復配列の一部 (ORF2 の 3' 側約半分) が存在していた (Fig. 3B)。この反復配列は非 LTR (long terminal repeat) 型レトロトランスポゾン的一种であり、この配列を介して減数分裂時の不等交鎖等が生じ、タンデムリピートが形成された可能性も考えられる。

同様に *chPKCI* 遺伝子についてもコピー数の測定を行った。*BamHI* 消化した雄ニワトリゲノム DNA 3 μ g と *HindIII* 消化により直鎖状にした *pchPKCI-3* (*chPKCI* cDNA クローン) DNA (5-100 pg) を混合したものに対して、*chPKCI* の部分断片 (塩基配列 30-410; Fig. 2B) をプローブとしてサザンブロット解析を行った (Fig. 5D)。その結果、雄ニワトリ 1 倍体ゲノム当たり 1.3 コピー存在

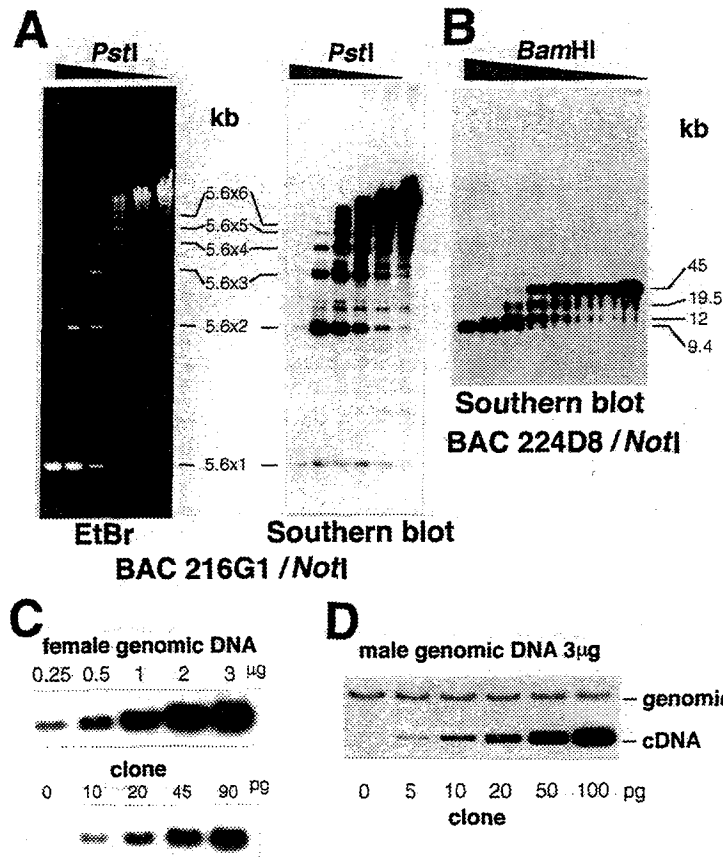


Figure 5. Determination of reiteration frequencies of *Wpkci* and *chPKCI* in the chicken genome. (A) The 140-kb insert containing *Wpkci* genes was recovered from the BAC clone, 216G1, by digestion with *NotI*, and further digested with *PstI* at six different concentrations. The digests were separated by agarose-gel electrophoresis, stained with ethidium bromide (left panel) and subjected to Southern blot hybridization with ^{32}P -labeled insert of the *Wpkci* cDNA clone, fst5.2-5 (right panel). (B) The insert of BAC clone, 224D8 containing *chPKCI* gene sequence, was recovered by *NotI* digestion, further digested with *BamHI* at eight different concentrations, and subjected to Southern blot hybridization with ^{32}P labeled cDNA fragment (nucleotide positions 30 to 410) of *chPKCI*. (C) Different amounts of *EcoRV*-digested genomic DNA of the female chicken (upper panel), and *EcoRV*-digested genomic DNA of the male chicken (3 μg each) mixed with different amounts of the linearized cDNA clone, p5fm2 (3.83 kb) (lower panel) were subjected to agarose-gel electrophoresis and Southern blot hybridization with the ^{32}P -labeled insert of p5fm2. (D) *BamHI*-digested genomic DNA of the male chicken (3 μg each) and different amounts of the *HindIII*-digested linearized cDNA clone, pchPKCI-3, were subjected to electrophoresis and Southern blot hybridization with ^{32}P -labeled subfragment (nucleotide positions 30 to 410) of pchPKCI-3 as a probe.

していることが分かった。よって*chPKCI*遺伝子はZ染色体上に存在するシングルコピー遺伝子であると考えられた。

第5章 ニワトリ *Wpkci* 遺伝子の他鳥類における保存性の解析

鳥類は竜骨の有無により深胸類(Carinatae species)、平胸類(Ratitae species)に分類される。またZ,W性染色体が形態的に容易に判別がつく深胸類と違い平胸類はほぼ同形で、区別するのが困難であることが知られている。*Wpkci* 遺伝子の鳥類における保存性を調べるため、平胸類1目2種、深胸類12目24種の雌雄ゲノムDNAを *EcoRI* で消化した後、*Wpkci* 遺伝子エクソンIII (StHi0.37, Fig. 3A) をプローブとしたサザンブロットハイブリダイゼーションを行った。Fig. 6で示した全ての深胸類の雌において *Wpkci* 遺伝子がニワトリと同様に反復して存在していることが示された。プローブに用いたエクソンIII配列は *chPKCI* と約73%の相同性を持つため、雄において検出されたバンドは *PKCI* 遺伝子由来であると考えた。しかし、平胸類に属するダチョウ、エミューでは *Wpkci* 遺伝子関連配列の雌特異的な反復性は見られず、*Wpkci* 配列の存在はゲノミッ

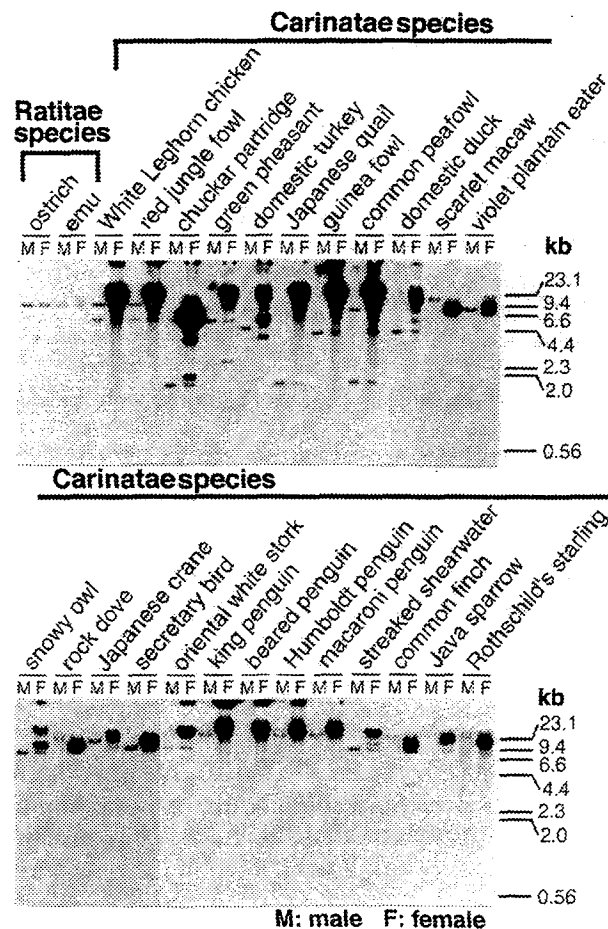


Figure 6. Conservation of the reiterated *Wpkci* gene in female genomes of Carinatae birds. *EcoRI* digested genomic DNAs from male (M) and female (F) species of birds as indicated were subjected to agarose-gel electrophoresis and Southern blot hybridization with ^{32}P -labeled genomic fragment StHi-0.37.

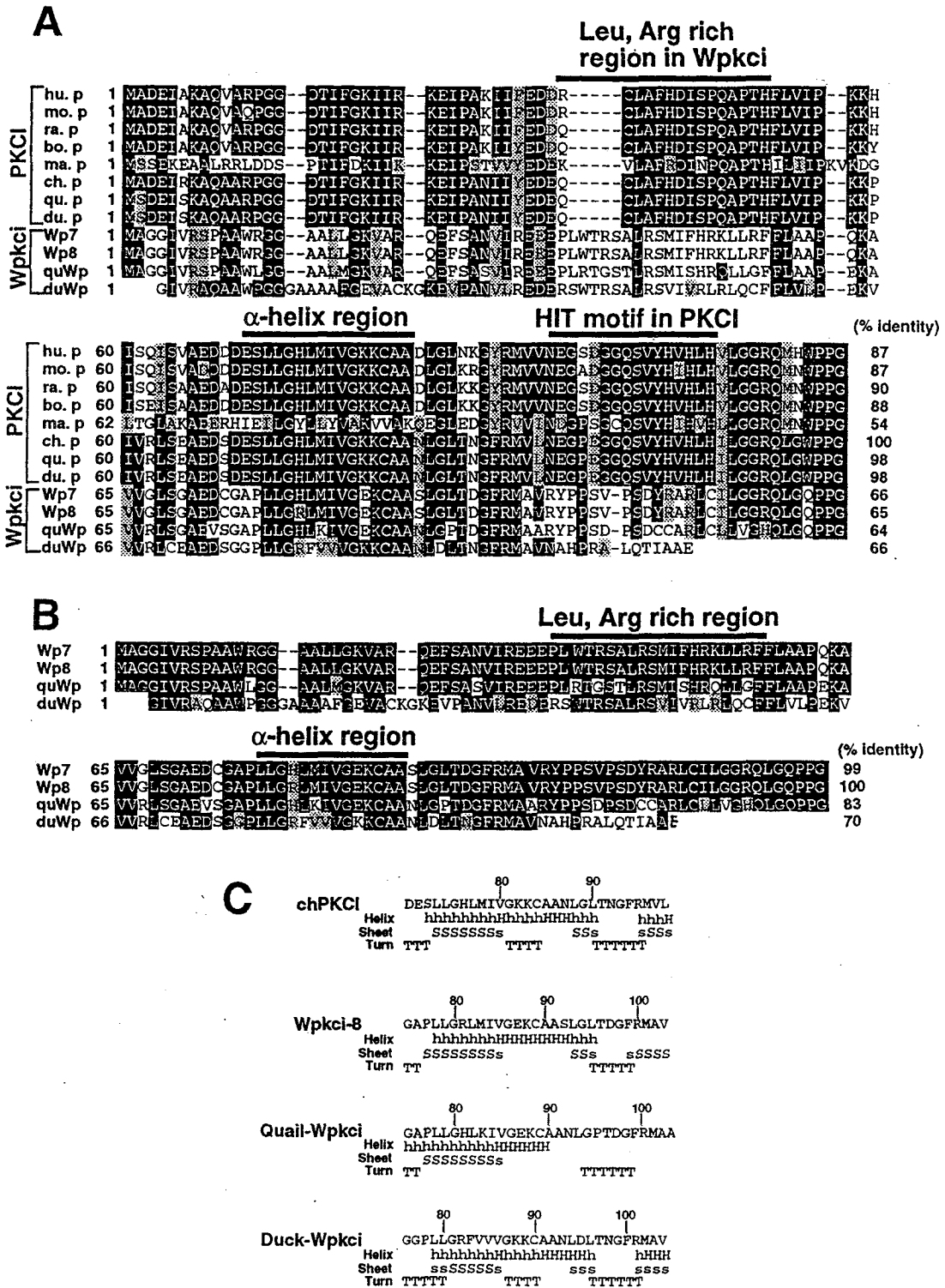


Figure 7. Comparison of deduced amino acid sequences of mammalian, plant and avian PKCI and avian Wpkci, and prediction of an α -helix forming domain of avian PKCI and Wpkci. (A) Deduced sequences of PKCI (p) from human (hu.), mouse (mo.), rabbit (ra.), bovine (bo.), maize (ma.), chicken (ch.), Japanese quail (qu.), domestic duck (du.), and Wpkci (Wp) from chicken (Wp7 and Wp8), Japanese quail and domestic duck, abbreviated as above, were aligned. Overall identity values (%) of sequences relative to the sequence of chicken PKCI are indicated at the end. Only a single residue is different between Wpkci-7 (Wp7) (H-81, minor type) and Wpkci-8 (Wp8) (R-81, major type) of chickens. (B) Alignment and comparison of sequences as in (A) for deduced sequences of Wpkci from chicken, Japanese quail and domestic duck. Wpkci of domestic duck lacks the last 14 residues. (C) Prediction of the formation of α -helix (H or h) for the indicated regions (α -helix regions in A, B) of Wpkci and PKCI of chicken, Japanese quail and domestic duck.

ククローンを得て塩基配列レベルの解析をするまでは結論出来ない。

ニワトリと同じキジ目(Galliforms)に属するニホンウズラ、カモ目(Anseriforms)に属するアヒルの3日胚からそれぞれcDNAライブラリーを作製し、pWpkci-8のインサート配列、chPKCIの部分断片(塩基配列30-410;Fig.2B)をプローブとしてスクリーニングを行った。その結果ニホンウズラ、アヒルのWpkci遺伝子ホモログ(pquWpkci-16, pduWpkci-20)、PKCI遺伝子ホモログ(pquPKCI-2, pduPKCI-8)をそれぞれ取得した(Fig.7A, B)。これまで報告のある哺乳類、植物のPKCI遺伝子

とニワトリ、ニホンウズラ、アヒルのWpkci, PKCI遺伝子の推定アミノ酸配列の比較を行った(Fig.7)。ニワトリPKCIは鳥類間で98%、哺乳類との間でも87から90%の高い相同性を示した。一方、いずれの鳥類WpkciもニワトリWpkci同様PKCIにはない特有のロイシン、アルギニンに富んだ配列を持ち、HIT motifは存在しないことが明らかとなった。またヒトPKCIのHIT motifのN末側は α -helix構造をとり、プロトマー間で互いに交差接触してホモダイマーを形成するために重要なドメインであることが分かっている。Chou and Fasman法によるタンパク質の2次構造予測により、鳥類PKCI, Wpkciいずれも α -helix構造をとることが予想された(Fig.7C)。

第6章 ニワトリWpkci, PKCI遺伝子の発現の時期特異性及び発現量の比較

Wpkci, chPKCI遺伝子の胚発生段階における発現量(胚全体)、及び80日ニワトリ組織における発現パターンをpoly(A)+RNAに対するノーザンプロットハイブリダイゼーションにより解析した。プローブにはWpkci, chPKCI遺伝子の特異的に認識するHITmotif(chPKCI)、104-118残基(Wpkci, Fig.2C)に相当する塩基配列をそれぞれPCRにより合成し使用した。また初期胚における発現量比(Fig.8D)はFujiFLA-2000イメージアナライザーにより数値化した後、ニワトリGAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) cDNAプローブによるシグナル強度で補正を行い示した。その結果これら遺伝子は双方共3日から6日胚までの発現が高く、それ以降のステージ、及び80日ニワトリ各組織では発現が低くなることが分かった(Fig.8A, B, D上部)。また両遺伝子の高発現状態は5、6日胚未分化生殖腺+中腎由来poly(A)+RNAに対するノーザンプロット解析においても同様に観察された(Fig.8C, D下部)。また両遺伝子とも80日ニワトリでの目立った組織特異性は見られなかった。2つの遺伝子間ではこのように発現パターンの一致が認めら

れたが、両遺伝子の5'プロモーター領域はTATA-boxが無く、CAAT-box, GC-boxが存在するという共通の特徴を示した(Fig. 8E)。両遺伝子が高発現状態を示した胚発生時期は生殖腺分化開始時期の直前であり興味深い。また*Wpkci*遺伝子(W染色体上)は雌のみで発現し、*chPKCI*遺伝子(Z染色体上)は遺伝子量補償(dosage compensation)を逃れ、雄(ZZ)において雌(ZW)の約2倍の発現量を示した(Fig. 8)。

*Wpkci*遺伝子からは0.65-kbのmajorな転写産物の他に、1.4-kb, 2.4-kb, 及びより高分子領域にminorな転写産物が認められた(Fig. 8A, C)。cDNAクローン5fm3(Fig. 3A)をプローブとして行ったノーザンブロット解析と、5fm3の塩基配列と*Wpkci*ゲノム配列との比較から、1.4-kb転写産物はさらに下流に存在するpoly(A)付加シグナルを利用したもの(Fig. 3A IIIb)で、5fm3配列はそのとき新たに付加した3'非翻訳領域由来であると考えられた。しかし、その他の転写産物の生成機構については不明である。

Fig.8に示したノーザンブロットハイブリダイゼーションの検出において、*chPKCI*遺伝子転写物が*Wpkci*遺伝子転写物のおよそ10倍の感光時間を要したことから、*Wpkci* mRNAは*chPKCI*と比べてより多量に存在することが予想された。そこでFig. 8で使用した*Wpkci*, *chPKCI*プローブを用いてそれぞれ6日胚全体、及び未分化生殖腺+中腎由来poly(A)+RNA(0.25-2 μ g)に対してノーザンブロット解析を行った(Fig. 9)。RNAのプロット量の補正にはFig. 8と同様GAPDH遺伝子プローブを用いた。またこのとき直鎖状にしたp*Wpkci*-8, p*chPKCI*-3 cDNAクローンをそれぞれプロット(10-100pg)したフィルターに対して、各々の遺伝子プローブと同時にハイブリダイズさせ、各プローブ間の比活性レベルの補正を行った(Fig. 9A, B)。その結果*Wpkci*遺伝子の転写物は*chPKCI*遺伝子の転写物に比べ、胚全体において10.2倍、未分化生殖腺+中腎において4.9倍の量で存在することが分かった。

第7章 ニワトリ *Wpkci*, *chPKCI* 遺伝子の初期胚における発現部位及びGFP融合タンパク質の細胞内局在部位の解析

*Wpkci*遺伝子の発現解析を*Wpkci*cDNA(63-534b, Fig2A)より合成したリボプローブを用いて、2から6日胚に対するwhole mount *in situ* hybridizationにより行ったところ、雌においてのみほぼ胚全域で発現が見られた。そこで6日胚未分化生殖腺を含む組織片に対して同様にwhole

mount *in situ* hybridizationを行った。その結果雌胚の左右未分化生殖腺、及び周辺組織で発現が見られた(Fig. 10A-female, antisense)。さらに未分化生殖腺を含む5日胚の凍結切片に対する *in situ* hybridizationにおいても同様に雌胚の左右未分化生殖腺切断面全体、及び周辺組織で発現が見られた(Fig. 10B-female antisense)。 *chPKCI* cDNA(30-410b, Fig2B)より合成したリボ

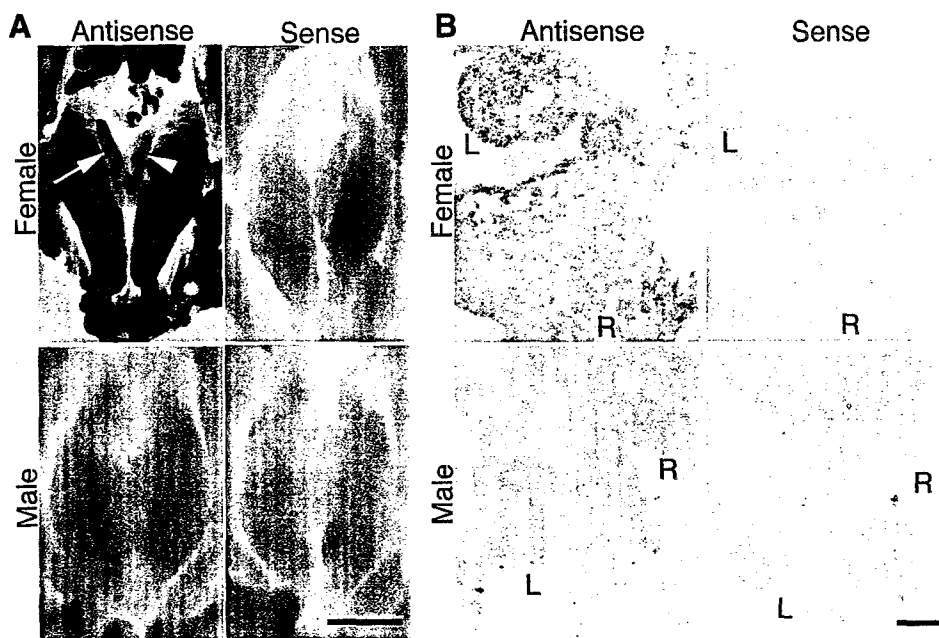


Figure 10. *In situ* hybridization indicating rather ubiquitous presence of *Wpkci* transcripts including undifferentiated gonads in female chicken embryos. (A) Whole mount *in situ* hybridization to the part of a 6-day female or male embryo containing mesonephroi and undifferentiated left (arrowhead) and right (arrow) gonads, with DIG-labeled antisense or sense riboprobe for *Wpkci*. *Wpkci* transcripts were detected only in the female embryo with the antisense probe. Scale bar indicates 1 mm. (B) *In situ* hybridization as above but to the cryostat sections of a part of the 5-day female or male embryo containing left (L) and right (R) undifferentiated gonads. Significant signals of hybridization were detected only in the section of the female embryo, including both sides of gonads, with the antisense probe. Scale bar indicates 50 μ m.

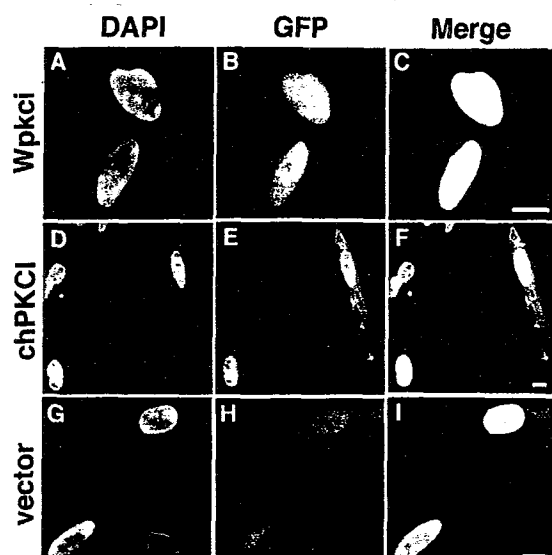


Figure 11. Intracellular distributions of GFP-fusion forms of *Wpkci* and *chPKCI* in embryonic fibroblasts from the male chicken. DAPI-stained nuclei (left panels), GFP-fluorescence of the protein expressed (middle panels) and merged images of DAPI-staining and GFP-fluorescence (right panels) are shown for cells transfected with the expression vector for GFP-*Wpkci* (A to C), GFP-*chPKCI* (D to F) or GFP alone (G to I). Each scale bar indicates 10 μ m.

プローブを用いて*chPKCI*遺伝子の発現についても同様の解析を行った結果、雄胚でも発現が検出されたことを除いて同様の発現パターンが見られた(data not shown)。

Wpkci, *chPKCI* cDNAの翻訳領域全長をそれぞれGFP(green fluorescent protein)の3'末にin frameで結合させた融合タンパク質発現コンストラクトを、雄ニワトリ繊維芽細胞に導入して発現させ、細胞内局在部位の解析を行った。その結果GFP-*Wpkci*融合タンパク質は核局在性を示した(Fig.11A-C)。またGFP-*chPKCI*融合タンパク質は核、及び細胞質両方に存在したが(Fig.11D-F)、GFPのみの場合(Fig.11G-I)と比べると核への局在性が強かった。

第8章 総合考察

本研究はニワトリの性決定及び初期胚での性分化の解析を目指し、ニワトリの生殖腺分化開始以前における性特異的なcDNAクローンの取得を行い、その遺伝子機能を解析することを目的としたものである。

ニワトリ5日胚で雌にのみ発現するcDNA断片をサブトラクション(雌-雄)法により取得し、このcDNA断片をプローブとしてニワトリ5日胚雌cDNAライブラリー(未分化生殖腺+中腎から調製)をスクリーニングしてW染色体上に存在する新規遺伝子*Wpkci*のcDNAクローンを取得した。*Wpkci*はヒトを初めとする各種生物のPKCIと相同性を有していた。ニワトリPKCI(*chPKCI*) cDNAを取得して推定アミノ酸配列を比べると*Wpkci*はPKCIに特有のHIT motif(HxHxH)を持たず、N末側に特有のロイシン、アルギニンに富んだ配列が存在することから、PKCIとは異なった機能を有しているものと考えられる。その一方で*Wpkci*, *chPKCI*のHIT motif N末側26残基は相同性が高く、共に α -helix構造をとることが予想された。ヒトPKCIのX線結晶構造解析によりこの領域は α -helix構造をとり、交差接触することでホモダイマーを形成することが知られている。さらに*Wpkci*, *chPKCI*遺伝子の初期胚での高発現、組織、細胞内での発現パターンの類似からも両遺伝子産物の相互作用、ヘテロダイマー形成の可能性が示唆される。

ニワトリの性決定は、W性染色体上の雌特異的遺伝子による説とZ性染色体上の遺伝子による説がある。Z遺伝子説は雄(ZZ)の遺伝子量(dosage)が雌(ZW)の2倍あることで性差が生じ、性が決まるというものである。しかし、分子レベルの研究は既に述べた*DMRT1*遺伝子に関するもの以外は見あたらない。

*Wpkci*遺伝子は本研究で明らかとなった以下の事実から、深胸類鳥類における性決定過程において機能する遺伝子の一つであると予想される。*Wpkci*遺伝子は雌に特異的なW染色体上の非ヘテロクロマチン領域に存在する遺伝子で、雌特異的に発現している。*Wpkci*遺伝子はZ染色体上にシングルコピー遺伝子として存在する関連遺伝子*chPKCI*とは違い、タンデムに反復した多コピー遺伝子であり、雌初期胚におけるmRNA量は*chPKCI* mRNA量を大きく上回っている。*Wpkci*遺伝子は深胸類鳥類(12目24種)の雌においてよく保存されており、いずれも多コピーで存在する。

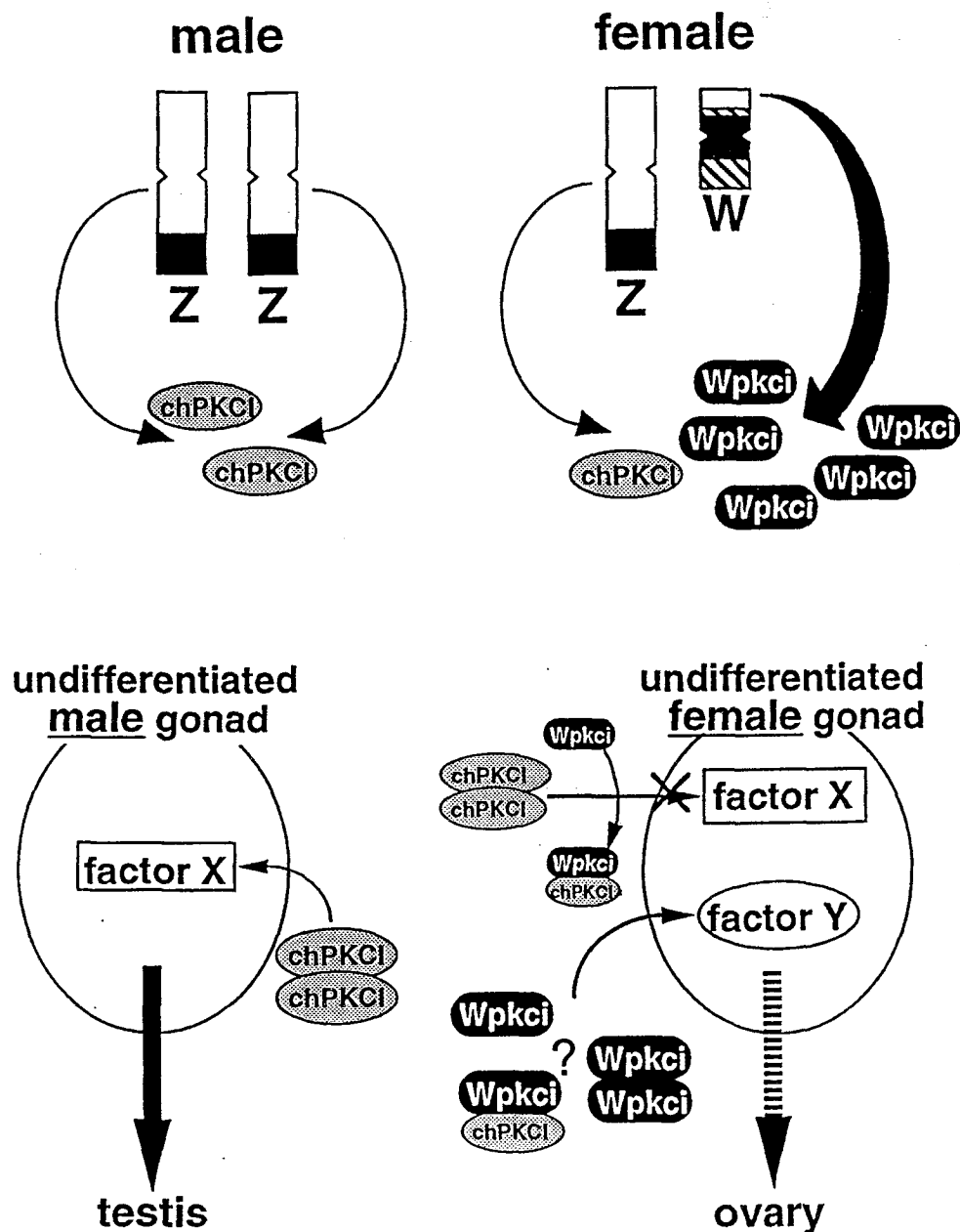


Figure 12. A model showing involvement of *chPKCI* in the determination of testis and *Wpkci* in the determination of ovary.

*Wpkci*遺伝子は生殖腺分化開始以前の雌初期胚での発現が高く、それ以降は急激に発現が低下する。また雄胚で雌の約2倍の発現量があるZ染色体上の*chPKCI*遺伝子も同様の発現量の変化を示す。推定アミノ酸配列から*Wpkci*はホモダイマー及び*chPKCI*とのヘテロダイマーを形成する可能性が考えられる。

しかし、これら遺伝子産物の性決定、性分化における機能は不明である。そこで生殖腺分化の開始において機能する以下のモデルを示した(Fig.12)。すなわち、雄において*chPKCI*ホモダイマーは因子Xへ作用して未分化生殖腺の精巣への分化に関与する。しかし、雌において多量に存在する*Wpkci*は*chPKCI*と効率的に結合し、*chPKCI*ホモダイマー形成を阻害する。その結果因子Xへの*chPKCI*ホモダイマーによる作用が遮断され、未分化生殖腺は卵巣への分化を開始する。

あるいは*Wpkci*モノマー、ホモダイマーあるいは*chPKCI*とのヘテロダイマーのいずれかが新たな因子Yに作用して未分化生殖腺の卵巣への分化に関与する。

上記モデルを検証する意味からも、*Wpkci*,*chPKCI*タンパク質の初期胚における検出、*Wpkci*のホモダイマー、*chPKCI*とのヘテロダイマー形成の有無、及びそれらと相互作用する因子の探索は今後の重要な研究課題である。さらに*Wpkci*遺伝子を未分化雄ニワトリ胚へ導入することによる生殖腺分化への影響を観察することは、最も積極的な遺伝子機能の解析手段であると思われる。

要約

1) ニワトリ5日胚雄、雌未分化生殖腺+中腎由来cDNAを用いてサブトラクション、cDNAクローニングを行い、雌特異的に発現する新規遺伝子 *Wpkci*のcDNAクローンを取得した。さらに *Wpkci*関連遺伝子であるニワトリ*PKCI*(*chPKCI*) 遺伝子のcDNAクローンを取得した。

2) 平均インサートサイズ150-kb、約5万クローンからなり、約3.2倍のゲノムサイズ(2倍体)をカバーする雌ニワトリ繊維芽細胞由来BACライブラリーを構築した。

3) *Wpkci*,*chPKCI*遺伝子を含むBACクローンを取得し、遺伝子構造解析を行い、いずれも3個のエキソンから構成され、*Wpkci*遺伝子はタンデムに約44コピー反復した構造をとり、*chPKCI*遺伝子はシングルコピー遺伝子であることを明らかにした。

4) FISH解析により *Wpkci* 遺伝子はW染色体短腕の非ヘテロクロマチン領域端部に、*chPKCI* 遺伝子はZ染色体長腕セントロメア近傍に局在していることを明らかにした。

5) *Wpkci* 遺伝子は12目24種の深胸類鳥類種の雌においてニワトリ同様反復して存在していることが示された。その中のニホンウズラとアヒルについて *Wpkci*, *PKCI* 遺伝子ホモログを取得した。鳥類 *PKCI* はいずれも機能的に必須であることの知られているHIT motifを有するが、ニワトリ、ニホンウズラ、アヒルの *Wpkci* はいずれもHIT motif を欠き、N末側にロイシン、アルギニンに富んだ *PKCI* には無い特有の配列を持つことを示した。

6) *Wpkci*, *chPKCI* 遺伝子はいずれも生殖腺分化前において高発現であり、左右未分化生殖腺においても発現が認められたが、*Wpkci* 遺伝子は雌に特異的で、*chPKCI* 遺伝子は雄において雌の約2倍の発現量を示す性差が見られた。また *Wpkci* 遺伝子の転写物は *chPKCI* 遺伝子の転写物に比べ多量に存在することが分かった。

7) *Wpkci*, *chPKCI* のGFP融合タンパク質の細胞内局在性の解析から、*Wpkci* は著しく核局在性であり、*chPKCI* は細胞質にも存在するが多少核局在性が強いことが示された。

8) *Wpkci* は雌ニワトリ未分化生殖腺において *chPKCI* ホモダイマー形成を阻害し、*chPKCI* の機能の阻害を行うか、*Wpkci* モノマー、ホモダイマーまたは *chPKCI* とのヘテロダイマーを形成し、これらのいずれかが未分化生殖腺から卵巣への分化を開始させるきっかけを担っているというモデルを提出した。

原著論文

Hori, T., Asakawa, S., Itoh, Y., Shimizu, N., and Mizuno, S. *Wpkci*, Encoding an Altered Form of *PKCI*, is Conserved Widely on the Avian W Chromosome and Expressed in Early Female Embryos: Implication of Its Role in the Female Sex Determination.
(submitted to Mol. Biol. Cell.)

参考論文

Saitoh, Y., Ogawa, A., Hori, T., Kunita, R., and Mizuno, S. Identification and localization of two genes on the chicken Z chromosome: implication of evolutionary conservation of the Z chromosome among avian species. *Chromosome Res.* (1993) **1**, 239-251.

Hori, T., Suzuki, Y., Solovei, I., Saitoh, Y., Hutchison, N., Ikeda, J., Macgregor, H., and Mizuno, S. Characterization of DNA sequences constituting the terminal heterochromatin of the chicken Z chromosome. *Chromosome Res.* (1996) **4**, 411-426.

Solovei, I. V., Joffe, B. I., Hori, T., Thomson, P., Mizuno, S., Macgregor, H. C.

Unordered arrangement of chromosomes in the nuclei of chicken spermatozoa. *Chromosoma*, (1998) **107**, 184-188

論文審査結果要旨

脊椎動物の性染色体構成は哺乳類に代表される雄ヘテロ型 [雄(XY), 雌(XX)] と鳥類に代表される雌ヘテロ型 [雄(ZZ), 雌(ZW)] に大別される。哺乳類ではY染色体上のSR_Y/Sry遺伝子が雄の性分化の引き金遺伝子として知られているが、W染色体上の雌の性分化の引き金遺伝子は発見されていない。Z染色体上の遺伝子(DMRT1など)が雄2:雌1の存在比を示すことが性分化の原因となるという説もある。本研究は、ニワトリのW染色体上に存在が予想される雌の性分化の引き金遺伝子の探索を目的として、生殖腺分化前のニワトリ雌雄の5日胚からcDNAライブラリーを調製、さらに雌胚由来のライブラリーから雄胚由来のライブラリーを差し引く方法を適用し、雌胚特異的に発現するmRNA由来のクローンが濃縮されたライブラリーを得て、クローンの探索を行った。

約200クローンについて、その配列をPCR増幅して調べた結果、2クローン(5fm2, 5fm3)が雌ゲノム特有であることが分かった。これらのクローンをプローブとして雌ニワトリ5日胚の未分化生殖腺と中腎の混合組織から作製したcDNAライブラリーをスクリーニングして、1クローンを得た。このクローンの塩基配列から哺乳類のPKCI(protein kinase C interacting protein)と約60%の相同性をもつタンパク質をコードするものであることが分かりWpkciと命名した。また、同じcDNAライブラリーから哺乳類のPKCIと約87%の相同性を有し、ニワトリのホモログと考えられるchPKCIクローンも取得した。これらのクローンをプローブとして、雌ニワトリゲノムのBACライブラリーをスクリーニングして、Wpkci, chPKCIのゲノムクローンをそれぞれ取得した。これらの塩基配列から先に取得した5fm2, 5fm3は共にWpkci遺伝子由来の配列を含むクローンであることが分かった。また、Wpkci遺伝子はW染色体の非ヘテロクロマチン末端部位に位置し、約44回縦列重複した構造をとるが、chPKCI遺伝子はZ染色体長腕のセントロメア近傍に位置する非反復遺伝子であることが分かった。Wpkciの推定アミノ酸配列中にはPKCI機能に必須のHITモチーフは存在しないが、PKCIのホモダイマー形成に関する α ヘリックス形成部位は保存されていた。また、Wpkci特有のロイシン、アルギニンに富むドメインが存在した。Wpkci遺伝子は12目24種の深胸類鳥類種のW染色体上に、いずれも反復した構造で存在した。Wpkci, chPKCI遺伝子とも生殖腺分化前の3-6日胚で高発現で、左右の未分化生殖腺を含めて広く発現が認められたが、mRNAの発現量はWpkciの方が数倍多かった。GFP-融合タンパク質として雄ニワトリ胚由来の繊維芽細胞で発現させると、Wpkciは著しい核局在性を示したがPKCIは細胞質と核の両方に存在した。これらの結果から、雌の初期歴ではWpkciがchPKCIと相互作用してchPKCIのホモダイマー形成を妨げることによりPKCI機能を妨げ、さらにWpkci自身核内で特異的な機能を発揮することにより雌の性分化の引き金を引くというモデルを提出した。

以上のように、本研究により、鳥類のW染色体上のWpkci遺伝子が見いだされ、その発現解析から雌の性分化への関わりが示唆されたことは、雌ヘテロの性決定機構解明への糸口を与えるものとして評価されることから、審査員一同、著者は博士(農学)の学位を授与されるに充分の資格を有すると判定した。