

鳥類のZW型性決定機構のゲノム生物学的アプローチによる解析

●水野重樹 ◆加藤 順 ◆荻原 淳

日本大学生物資源科学部

＜研究の目的と進め方＞

雌ヘテロの性染色体構成をもつ鳥類には雄ヘテロの性染色体をもつ哺乳類のY染色体上の精巣決定遺伝子SRYに相当する遺伝子は存在せず、W染色体上に存在の予想される卵巣決定遺伝子の実体は不明である。水野らはニワトリW染色体上の活性遺伝子数を最低約20個と推定した（成果公表リストNo.1）が、現在まで6個の遺伝子が報告されているのみである。本研究は生殖腺分化前のニワトリ2～5日胚（stage 12～27）の各ステージから雌マイナス雄サブトラクションcDNAライブラリーを作製、マクロアレイ化して、雌特異的発現の著しいクローンを網羅的に検索、それらの中からW染色体由来のクローンを特定し、遺伝子機能と発現時期、発現部位等を解析することにより、性決定あるいは性分化初期過程への関与の予想される遺伝子を絞り込むことを目的とするものである。

＜2003年度の研究の当初計画＞

- 1) 2002年度末までにニワトリ2～5日胚の雌マイナス雄サブトラクションcDNAライブラリーから合計21,888クローンをマクロアレイ化し、これに対して対応するステージの雌マイナス雄あるいは雄マイナス雌サブトラクションcDNAプローブ、雌total cDNA、雄total cDNA プローブ、W染色体上の既知のPKCI-W 遺伝子のcDNA プローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、雌特異的発現の著しい、PKCI-W 以外の1314クローンを選別した。2003年度は、これらのクローンのうち2～4日胚由来のクローンをそれぞれアルカリホスファターゼ標識して、いくつかの制限酵素で消化した雌雄ニワトリのゲノムDNAに対するサザンブロットハイブリダイゼーションを行ってW染色体由来と考えられるクローンを選別する。
- 2) 得られたクローンの部分的cDNA 配列を決定し、W染色体上の未知の遺伝子由来と考えられるクローンを特定する。これらの配列をプローブとしてゲノミックBAC クローンを取得し、蛍光in situ ハイブリダイゼーション（FISH）によりW染色体への局在を確認する。
- 3) W染色体上の局在が確認されたBACクローン中のcDNA に対応する塩基配列を決定してデータベース検索を行う。さらに、完全長cDNAライブラリーを作製して、完全長cDNAクローンを取得、全塩基配列を決定し、遺伝情報解析を行う。

＜2003年度の成果＞

- 1) 上記1) のサザンブロット解析を 508クローンをプローブとして行った結果W染色体由来と推定される67クローンが特定されたが、これらはいずれも2日胚cDNAライブラリー由来のクローンであった。そこで3日胚の雌マイナス雄サブトラクションcDNA ライブラリーを再調製し、21,120クローンからなるマクロアレイを作り直して実験を繰り返した。その結果、雌特異的発現の著しい1222クローンが選別された。このうち1127

クローンがサブトラクションcDNA プローブにより選別されたもので、コピー数の少ないmRNA に由来するものと考えられた。これらの中2～4日胚から得られた532クローンをプローブとしてサザンブロット解析を行い、W染色体上の遺伝子由来と考えられる65クローンを特定した。このうち61クローンが2日胚、4クローンが3日胚のマクロアレイから得られたものである。これらのクローンはサザンブロットのパターンから13タイプに分けられた。

- 2) 上記13タイプのクローンの部分的なcDNA 塩基配列を決定した結果、6種類の遺伝子に由来することが分かった。このうち2種類はW染色体上の既知の遺伝子SPIN-W、ATP5A1W であり、残りの4種類は機能未知のESTクローンとの相同性を有するが、W染色体上の遺伝子としては知られていないものである。このうちの2種類はBACクローンをプローブとするFISHによりW染色体上の局在が確認され、残りの2クローンについても実験を進めている。

＜国内外の成果の位置づけ＞

2004年にニワトリのドラフトゲノム配列が発表された。W染色体は反復配列が大部分を占めるため、決定された非反復配列はまだ50%程度で、数個の遺伝子の存在が推定されているに過ぎない。初期胚で雌特異的に発現するcDNAの網羅的検索と機能解析の例は他にない。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

当初計画3)の完全長cDNAクローンの取得と塩基配列解析が、よいライブラリーが作製できず遅れている。次年度の重要課題である。

＜今後の課題＞

本研究で得られたW染色体上の新規遺伝子クローンの発現解析から性決定、性分化初期過程への関与の可能性を探ることが主要な課題である。

＜成果公表リスト＞

1. 0308261802
Mizuno, S., Kunita, R., Nakabayashi, O., Kuroda, Y., Arai, N., Harata, M., Ogawa, A., Itoh, Y., Teranishi, M., and Hori, T., Z and W chromosomes of chickens: studies on their gene functions in sex determination and sex differentiation, *Cytogenetics and Genome Research*, 99 (1-4), 236-244 (2002).
2. 0403291535
Teranishi, M., and Mizuno, S., The male hypermethylation (MHM) region on the chicken Z chromosome: female-specific transcription and its biological implication, *Chromosomes Today*, Vol.14 (Schmid, M., and Nanda, I., eds.), pp. 45-53, Kluwer Academic Press (2004).