

遺伝子発現からみた高等動物の性分化と性染色体の機能制御

Gene expression during sex differentiation and regulation of sex chromosome function in higher animals

代表研究者	東北大学農学部教授 Prof., Faculty of Agriculture, Tohoku Univ. Shigeki MIZUNO	水野重樹
協同研究者	東北大学農学部助教授 Assoc. Prof., Faculty of Agriculture, Tohoku Univ. Katsuhiko NISHIMORI	西森克彦
	東北大学農学部助手 Res. Assoc., Faculty of Agriculture, Tohoku Univ. Masahiko HARATA	原田昌彦
	東北大学農学部大学院研究生 Grad. Res., Faculty of Agriculture Tohoku Univ. Yasushi SAITOH	斎藤靖史
	東北大学農学部大学院生 Grad. Student, Faculty of Agriculture Tohoku Univ. Osamu NOMURA	野村修

DNA sequences of sex chromosomes, gene expression during the development of ovary, and expression of genes involved in the sex steroid hormone biosynthesis during the sex differentiation were studied using chicken.

About 65% of the DNA in the W chromosome consists of strongly bent, repetitive sequences of XhoI and EcoRI families. These sequences are major constituents of the W heterochromatic body in the interphase nucleus and replicate very late during the S phase. The W heterochromatin from the nuclei of chicken MSB-1 cells was partially purified. This fraction contained several protein components that bound to the XhoI family sequences with high affinity. One of those proteins, p120, was purified from the MSB-1 nuclei. Fluorescence in situ hybridization (FISH) revealed that the majority of EcoRI family sequences occupy one arm and a minor fraction of the same family is present in the middle region of the other arm and that XhoI family sequences are present widely in pericentric regions of the W chromosome. These studies also revealed that a terminal area of the arm containing the minor fraction of EcoRI family contained neither repetitive families, implying that this terminal area might contain a pseudoautosomal region, genes, and sequences involved in meiotic pairing with the Z chromosome. To search for DNA clones from this unknown area, several W chromosome-specific DNA libraries were constructed, each from a single W chromosome, by adopting the method of S. Hadano *et al.* [*Genomics* 11: 364-373 (1991)].

Two genes on the chicken Z chromosome were cloned. One gene encoded for an immunoglobulin superfamily protein, ZOV3, and was expressed in an ovary. This gene was located by FISH to the middle region of the arm that did not contain a block of terminal heterochromatin. The other was a gene for iron responsive element binding protein (IREBP) that had been cloned utilizing its close similarity to the human IREBP gene. This gene was located to a region very close to the terminal heterochromatin.

Three cDNA clones isolated from an early left ovary cDNA library were characterized. Those

clones were for the above mentioned ZOV3, cytochrome P-450c17, and TGF- β binding protein.

Out of five genes involved in the biosynthesis of estrogen from cholesterol, above P-450c17 and aromatase [M. J. McPhaul *et al.*, J. Biol. Chem., 263: 16358-16363 (1988)] were cloned from chicken. In this study, we also obtained a cDNA clone for the chicken 3- β -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ isomerase and confirmed its function by expressing it in COS cells.

Sex of an early chicken embryo could be determined by hybridizing the W chromosome-specific XhoI family probe to the DNA isolated from the extraembryonic membrane. We examined transcription of P-450c17 and aromatase genes in male and female embryos by the qualitative PCR procedure. The results suggested that the P-450c17 gene was expressed both in male and female embryos after as early as 2 days-incubation, on the other hand, the aromatase gene expression was detected only in female embryos after 5 days-incubation.

研究目的

脊椎動物の発生過程における性分化の機構を解明するためには、性染色体の遺伝子機能、生殖腺分化の機構、発生初期の性ホルモンの生産と作用機構に関する理解を深めることが重要であると思われる。本研究は、脊椎動物の発生過程の実験系として適したニワトリを用いて、a) 性染色体の構築と遺伝子機能の解析、b) 卵巣分化の過程で発現する遺伝子群の解析、c) 性ステロイドホルモンの生産に関わる遺伝子群のクローニングと発生過程における発現プログラムの解析を進めることを目的としたものである。

研究経過

上記の a)~c) の研究を並行して進めた。a) では、W 染色体 DNA の約 65% を占める反復配列の塩基配列、配列構成、湾曲性、染色体中の局在部位の解析、W 染色体 DNA の複製時期の解析、W 染色体のヘテロクロマチン形成機構の研究を主に進めた。また、これらの研究の過程で W 染色体の一端に既知の反復配列を含まない領域が存在することが見いだされたので、池田稷衛教授(新技術事業団池田ゲノム動態プロジェクト総括責任者、東海大医学部)の協力を得て、レーザーマイクロダイセクション法による W 染色体特異的 DNA ライブラリーの作成とクローンの解析を開始した。Z 染色体については、この染色体上の 2 種の遺伝子(一つは卵巣で特異的に発現する遺伝子)のクローニングと遺伝情報の解析、染色体上の局在部位の解析を行った。また、W 染色体と同様にレーザーマイクロダイセクション法を適用

して、Z 染色体端部由来の DNA ライブラリーの作成とクローンの解析を始めた。

b) では、孵化後 1-3 日目のヒヨコの左卵巣から作成した cDNA ライブラリーから卵巣における発現特異性の高い 17 クローンを選んで、それらの性質を探り、卵巣分化という観点から興味深く思われた 3 クローンについて塩基配列ならびに発現特異性に関する研究を進めた。これらの遺伝子の卵巣中での発現部位を調べるために、組織切片中の mRNA に対する *in situ* ハイブリダイゼーションを大阪大学医学部病理学講座北村幸彦教授、同野村慎太郎助教授の指導を受けて行った。

c) では、コレステロールからテストステロンおよびエストロゲンの生成に関与する 5 種類の酵素の cDNA クローニングと性分化過程における遺伝子発現の解析をめざし、このうち P-450c17, 3 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ/ $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ イソメラーゼ(3 β -HSD), アロマトラーゼについて研究を進めることが出来た。

研究成果

a) 性染色体の構築と遺伝子機能の解析

本研究を開始する時点において既に代表研究者らはニワトリの W 染色体に局在する XhoI ファミリー反復配列をクローニングしてその塩基配列の決定と高度湾曲性などの特徴を明らかにしていた [Kodama H. *et al.*, *Chromosoma*, 96: 18-25 (1987)]。しかし、この反復配列の全量は核内で染色体のほぼ全域が顕著な性ヘテロクロマチンボディを形成する W 染色体 DNA の 50% 程度

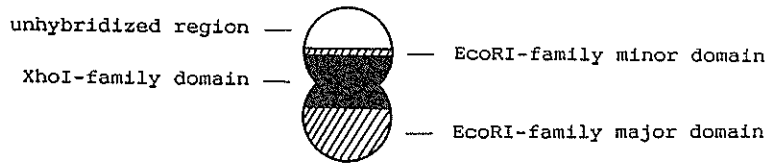


図1. ニワトリ W 染色体における XhoI, EcoRI ファミリー反復配列の局在ドメインと両反復配列を含まない端部領域。

であったことから、他の高度反復配列の存在が予想された。そこで、XhoI ファミリーの 0.7 kb 反復単位 (XhoI 断片) をプローブとして、計算上 32% の塩基不対合を許容する条件下でサザンハイブリダイゼーションを行い、雌由来の DNA に特異的な 1.2 kb の EcoRI 断片を検出して、これをクローニングした。このクローンをプローブとして調べた結果、1.2 kb 単位は W 染色体中で最高約 9000 回反復していることが分かり、この反復配列を EcoRI ファミリーと名付けた。1.2 kb 単位の塩基配列は XhoI ファミリーの 0.7 kb 反復単位の塩基配列と約 68% の相同性を示したが、両者の配列構成は極めて類似していた。すなわち、平均 21 bp の基本単位が縦列反復しており、ほとんどの基本単位中にはそれぞれ 3-5 ヌクレオチドの A クラスターと T クラスターが 6-7 ヌクレオチドの比較的 G, C に富んだ配列をはさんで存在していた。このような配列構成の結果、DNA らせんの 1 ピッチごとに A, T クラスターが交互に出現することになり、配列全体として高度に湾曲した構造となることが分かった。ただ、EcoRI ファミリー配列では A, T クラスターの分布が部分的に不規則となっているため、湾曲性は XhoI ファミリーよりやや劣るものであった。XhoI, EcoRI 両ファミリー配列は W 染色体 DNA の約 65% を占めるものと推定された。

超高分子の DNA を雌ニワトリ由来の繊維芽細胞から調製して、いくつかの制限酵素での切断後、パルスフィールドゲル電気泳動で分離し、両反復ファミリーの反復単位をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った結果、XhoI ファミリーは最低 1.4 Mb (1 Mb=10⁶ bp)、EcoRI ファミリーは最低 2.0 Mb にわたってそれぞれ独立に存在することが推定された。この点をさらに明らかにするため、両ファミリーの反復単

位をプローブとして、分裂中期の染色体および間期の核に対して蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) を行った。その結果、EcoRI ファミリー配列の大部分は W 染色体の一方の腕の大半を占め、一部分は他方の腕の中央部付近に存在すること、XhoI ファミリー配列は動原体をはさんで広く分布することが明らかになった。また、この分析結果から、W 染色体の一方の腕の端部にいずれの反復ファミリー配列をも含まない領域が存在することが示された (図 1)。この領域には、性分化に重要な遺伝子や減数分裂前期に Z 染色体と対合する配列部分などが含まれる可能性があり、この領域を構成する DNA 配列のクローニングの必要性が痛感された。

そこで、池田穰衛教授の開発した染色体のレーザーマイクロダイセクションと 1 本の染色体またはその 1 部分から DNA を抽出し、PCR 法で増幅したのちクローニングする方法 [S. Hadano *et al.*, *Genomics* 11: 364-373 (1991)] を適用して 1 本の W 染色体由来の DNA ライブラリーを多数作成した。この中の一つのライブラリーから XhoI, EcoRI ファミリー配列を含まないクローンを約 100 個選び出し、混合したのち、それらが W 染色体由来であることを FISH 法により確認した。現在、個々のクローンの性質を明らかにすべく実験を進めている。

W 染色体 DNA の著しい特徴の一つとして、その複製時期の遅れが観察された。雌ニワトリ由来の培養細胞である MSB-1 の細胞周期を過剰チミジン処理とアフディコリン処理を併用して G1/S 期に止めたのち、同調培養を開始する系を確立した。培養開始後、異なった時間でプロモデオキシウリジン (BrdU) を与え、最初の M 期で染色体標本を作成して、抗 BrdU 抗体との反応により DNA 複製部位を、XhoI ファミリー配列をプロ

ブとした FISH 法により W 染色体を同定した。その結果、W 染色体 DNA の複製は S 期のピークより約 1 時間遅れることが明らかになった。

W 染色体のヘテロクロマチン形成機構に関しては、W ヘテロクロマチンの分離法の検討と W 染色体に特異的な高度湾曲 DNA 配列に高親和結合する核内のタンパク質の精製と諸性質の解析の 2 面から研究を進めた。前者では、XhoI ファミリー配列が HaeIII 切断部位を含まないことを利用して、MSB-1 細胞の核を HaeIII 消化後、低塩濃度バッファーでクロマチン断片を抽出し、その後、塩化ナトリウム濃度を 50 mM に上げることにより、沈殿する画分と可溶性画分に分別した。XhoI 配列は沈殿画分に、 β -アクチンの遺伝子配列は可溶性画分に濃縮されることが示された。しかし、この方法では、W ヘテロクロマチンの濃縮度は 5-6 倍であるので、さらに有効な分画法を確立することが必要である。

ここで得られた W クロマチンを含む画分のタンパク質に対して、 32 P-標識した XhoI ファミリー 0.7 kb 反復単位をプローブとしてサウスウエスタンブロットを行って、湾曲 DNA 結合タンパク質を検索したところ、数種類のタンパク成分が検出された。興味深いことは、同調培養した MSB-1 細胞の G1/S 期と S 期後期からこの W クロマチンを含む画分を得て、XhoI ファミリー配列結合タンパク質を検索したところ、G1/S 期では数種類のタンパク成分が認められたのに対し、S 期後期では、1-2 種類の限られた成分しか認められなかったことで、W ヘテロクロマチンの細胞周期における構造変化を示唆している可能性があり、今後、より詳細に検討したいと考えている。

数種類の XhoI ファミリー配列結合タンパク質のうち、分子量約 120,000 の成分 (p120) を MSB-1 細胞の核から 6 M 尿素存在下に 3 段階のイオン交換カラムクロマトグラフィーによって精製し、モノクロナール抗体を作成した。この抗体を用いてウエスタンブロット法で調べたところ、p120 は核マトリックスに存在するタンパク質で W ヘテロクロマチンの核マトリックスへの結合

に参与する可能性が考えられた。現在、p120 のアミノ酸配列を cDNA クローニングにより決定する実験を進めている。

もう一方の性染色体である Z 染色体は比較的大型の染色体で、既に 20 種類近くの形質がマップされているが、分子レベルで解析された遺伝子はまだないのが現状である。本研究では Z 染色体上の二つの遺伝子について解析することが出来た。一つは、孵化直後のヒヨコの左卵巣から作成した cDNA ライブラリーの中から、初期卵巣での発現特異性の高いクローンとして得られたもので、FISH 法により、その遺伝子は Z 染色体の端部ヘテロクロマチンを含まない腕の中央部付近に存在することが示された。cDNA クローンの塩基配列決定の結果、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するタンパク質 (ZOV3) をコードする遺伝子であることが分かり、発現が卵巣特異的であることから、その機能にたいへん興味もたれ、現在、卵巣内での発現部位の解析やタンパク質としての諸性質の研究を続けている。もう一つは、約 10 年前にアイソザイムの解析からニワトリの細胞質アコニターゼが Z 染色体上の遺伝子であるという論文が Nature に発表されたことに関連するもので、最近、ヒトと酵母で細胞質アコニターゼは IREBP (iron responsive element binding protein) であるという論文が出された。我々はヒトの IREBP と 80% 以上の相同性を示すニワトリの cDNA ならびに遺伝子クローンを得て、FISH 法でこの遺伝子が Z 染色体の端部ヘテロクロマチンに極く近接した部位に存在することを示した。ZOV3 と IREBP の遺伝子はこのように Z 染色体の異なった腕に存在することから、今後、Z 染色体遺伝子のマッピングを進める上でよいランドマークとなるものと思われる。

ニワトリの Z 染色体の一端は顕著なヘテロクロマチンを形成している。この領域の DNA およびタンパク質レベルの解析は、W ヘテロクロマチンの構築機構との共通性を探る意味から興味深く思われる。また、Z 染色体のヘテロクロマチンを形成しない方の端部領域は、減数分裂前期に W 染色体と対合する部位や、X、Y 染色体におけ

る偽常染色体域に相当する部位を含むことも推定される。そこで、先に述べたレーザーマイクロダイセクション法をZ染色体の端部にも適用して、いくつかの染色体部位特異的 DNA ライブラリーを作成した。現在、これらのライブラリーの性質を調べているが、既にヘテロクロマチン領域由来のライブラリーが一つ確認されている。以上の性染色体 DNA の研究結果を 1992 年 8 月 2 日にスイスのインターラーケンで開かれた国際家禽ゲノムマッピングワークショップで発表した。

b) 卵巣分化の過程で発現する遺伝子群の解析
脊椎動物の性分化においては性染色体上の性決定に関わる遺伝子の発現が引金となって、その後カスケード的な遺伝子発現が続いて、生殖腺の分化が完成するものと一般に考えられている。雌ヘテロな性染色体構成をもつ鳥類では精巣より卵巣分化が先行することが知られている。そこで卵巣分化過程での遺伝子発現を解析する目的で、孵化後 1-3 日目の初期卵巣由来の cDNA ライブラリーを作成し、ディファレンシャルハイブリダイゼーション法により卵巣での発現特異性の高い 17 クローンを選んでそれらの性質を調べた。その結果、これらの中、3 クローンを卵巣分化の面から興味深いものとして取り上げて、さらに研究を進めることとした。

一つは、上述の免疫グロブリンスーパーファミリーに属する Z 染色体上の遺伝子 ZOV3 で、卵巣切片に対する RNA/RNA ハイブリダイゼーションの結果、主に顆粒膜細胞と夾膜細胞で発現していることが示された。このタンパク質は膜貫通ドメインと考えられる疎水域を C 末側にもち、糖鎖結合部位と予想されるアスパラギン残基を数ヶ所含むことから、これらの細胞の細胞膜に存在して細胞間接着に関与して濾胞の形成に関わる可能性が考えられる。現在、cDNA を大腸菌で発現させて、抗体を作成し、タンパク質としての局在部位や糖鎖結合の様子などを調べている。卵巣分化の過程での発現開始時期を PCR 法で調べることも計画している。2 番目は、性ステロイドホルモン合成に関わるシトクロム P-450c17 の cDNA クローンで、次項で述べるように当研究室の一つ

の大きなプロジェクトとして発展させている。3 番目は TGF- β 結合タンパク質の cDNA クローンで、このタンパク質は哺乳類では TGF- β に結合して分泌され、TGF- β の活性をマスクすることが知られている。鳥類での機能は明らかではないが、我々は鳥類における左卵巣の分化と右卵巣の退化という現象に何さらかの関与をしているのではないかと予想して、発生過程における左右卵巣での発現の様子を *in situ* ハイブリダイゼーション法で調べることを計画している。

c) 性ステロイドホルモンの生産に関わる遺伝子群のクローニングと発生過程における発現プログラムの解析

上述の初期卵巣 cDNA ライブラリーからの P-450c17cDNA クローンの取得は生殖腺分化過程における性ステロイドホルモン合成の重要性に我々の目を向けさせた。最近のアメリカのグループの研究結果でも孵化後 7 日目までの雌のニワトリ胚にアロマトーゼ阻害剤を投与すると雄への性転換が起こり、精巣が分化することが示され、性分化の初期過程におけるエストロゲンの生産が卵巣分化を決定づけるものと考えられる。コレステロールからエストロゲンに至る生合成過程に関与する 5 種類の酵素の遺伝子のうち、鳥類では我々のクローニングした P-450c17 とアメリカのグループがクローニングしたアロマトーゼがプローブとして利用出来るが、他の 3 種の遺伝子はまだクローニングされてない。哺乳類の遺伝子配列は鳥類の配列とかなり異なっていて、プローブとして利用できないため、我々は本研究でニワトリからこれらの cDNA ならびに遺伝子クローンを取得することを試みた。これまでに、3 β -HSD の cDNA クローンが得られ、COS 細胞で発現させて酵素活性レベルでもこれを確認している。現在 P-450scs と 17 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼの cDNA クローニングに向けて鋭意努力中である。これらのクローンが全て得られてプローブとして利用出来るようになれば、発生過程におけるこれらの遺伝子の発現開始時期とその発現量の性差を定量的な PCR 法で調べたいと考えている。

これまでに、XhoIファミリー配列をプローブとして、胚体外域から調製したDNAに対するDNA/DNAハイブリダイゼーションにより性別をすることに成功しており、これらの胚由来のcDNAに対してP-450c17とアロマターゼcDNA配列由来のプライマーを用いて定性的なPCR分析を行った。その結果、P-450c17遺伝子は雌雄を問わず孵卵2日目からそのmRNAが検出されたが、アロマターゼ遺伝子では、孵卵5日目から雌の胚でのみmRNAが検出され、性ステロイドホルモン合成に関わる遺伝子群の性分化過程における発現プログラムは同調していないことが示唆された。

今後の課題と発展

脊椎動物における性分化の機構はX, Y性染色体をもつ哺乳類について多くの研究者が研究を進めているが、Z, W性染色体をもつ鳥類などについての研究は非常に遅れている。両システムの研究が、両者の成果を比較しつつ、並行して進められることが、高等動物における性分化機構の全体像を明らかにするために必須である。本研究では、ニワトリを用いて、Z, W性染色体のDNA配列と遺伝子機能の一端を明らかにすることが出来た。Z, W性染色体の研究は非常に基礎的な研究と見なされるためか、研究費のサポートがなかなか得られないのが現状である。そのような中で、日産科学振興財団から3年間の研究助成を受け

られたことは誠にありがたく、これなしでは研究が進められなかったことと深く感謝している。

我々のグループでは、現在、上述の各研究項目(a~c)をそれぞれ進展させているが、新たな展開という意味では、W染色体のDNAライブラリーの中から非反復配列、特に遺伝情報を持つと考えられるクローンを得ること、同様にZ染色体の端部のDNAライブラリーからW染色体と偽常染色体的関係を示す、両染色体間で類似した配列を得ることがブレークスルーになると考えられ、今後、特にこのような性質を示すクローンの取得に全力をあげたいと考えている。

発表論文リスト

- 1) Y. Saitoh, H. Saitoh, K. Ohtomo, and S. Mizuno: Occupancy of the majority of DNA in the chicken W chromosome by bent, repetitive sequences. *Chromosoma*, **101**: 32-40 (1991).
- 2) Y. Saitoh and S. Mizuno: Distribution of XhoI and EcoRI family repetitive DNA sequences into separate domains in the chicken W chromosome. *Chromosoma*, **101**: 474-477 (1992).
- 3) S. Mizuno, Y. Saitoh, O. Nomura, R. Kunita, K. Ohtomo, K. Nishimori, H. Ono and H. Saitoh: Sex-specific DNA sequences in Galliforms and their application to the study of sex differentiation. In: Manipulation of the avian genome (eds. R.J. Etches and A.M. Gibbins), CRC Press, Inc., pp. 257-274 (1992).