

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19580330

研究課題名 (和文) 鳥類特異的下垂体転写因子の機能及び発現調節解析

研究課題名 (英文) Analysis of function and regulatory mechanism of mRNA expression of bird specific transcription factor in the anterior pituitary gland

研究代表者

神作 宜男 (KANSAKU NORIO)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：60333142

研究成果の概要 (和文)：早成性及び晩成性鳥類の Pit-1 遺伝子イントロン 1 のクローニングおよび構造類似性を検討し、発現制御領域の解析を行った。鳥類の Pit-1 遺伝子イントロン 1 領域は似ているものの、種によっては挿入や欠損が生じていることが示された。また、晩成性鳥類の多くはニワトリ翻訳開始点のコドンが異なることから、翻訳産物としては存在できないことが明らかになった。さらに、転写開始点は従来考えられていた部位より 1.5k ほど上流であり、発現を制御する領域が非常に小さいことが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：Intron 1 of the precocial and altricial bird of the Pit-1 gene were cloned and sequenced. Homologous position of putative translation starting site of Pit-1w/ γ in the altricial species was not ATG methionin codon. Thus, it is suggested that Pit-1w/ γ is not exist in the altricial species. Moreover, transcription starting region was cloned by RT-PCR. Results of this study showed that regulatory region of Pit-1w/ γ is smaller than previously expected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,570,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 応用動物科学

キーワード：生産機能制御、転写制御

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の下垂体において発現する下垂体特異的転写因子 (Pit-1) は成長ホルモン、プロラクチン、甲状腺刺激ホルモンの発現を調節する転写因子である。Pit-1cDNA のクローニングはほ乳類にお

いて最初に報告され、続いて魚類や鳥類において報告された。ほ乳類では通常型 Pit-1 の他にイントロン 1 の一部領域 (β 挿入) を含む Pit-1 β というアイソフォームが存在する。ほ乳類において β 挿入が生じると GH の発現に関しては通常型

Pit-1 と同様の効果を示すが、PRL 遺伝子への発現誘起効果は減少する。魚類の Pit-1 は、ほ乳類の β 挿入を基本的に含む以外にもほ乳類には存在しないエクソン (γ 挿入) を有している。 β 及び γ 挿入は魚類の PRL 遺伝子発現制御に必須である事が明らかにされており、ほ乳類において β 挿入が生じると PRL 遺伝子の発現誘起効果が減少する結果とは反対の結果になるという興味深い報告がなされている。鳥類においては、 β 挿入を有する mRNA が存在する、という報告と存在しない、という報告があり、詳細は明らかではない。一方、魚類及び鳥類における Pit-1 結合コンセンサス配列が提唱されており、シチメンチョウ PRL 遺伝子プロモーターの Pit-1 結合コンセンサス配列において存在する多型は血中 PRL 濃度と関連が認められる事を明らかにしている。これらの結果は鳥類においても Pit-1 は PRL 遺伝子の発現に関与し、形質発現に影響を与えている可能性が非常に高い事を示している。また、ほ乳類の通常型 Pit-1 に相当する Pit-1 α の他にイントロン 1 において転写が開始する Pit-1w/ γ というアイソフォームが発現する事が明らかにされている。しかしながら鳥類の Pit-1w/ γ はイントロン 1 内より転写が始まることから発現制御に重要と思われる N 末端領域のセリンリッチ領域を欠損している。現在まで Pit-1w/ γ の機能及び発現制御領域は不明である。

2. 研究の目的

Pit-1 の発現機構及び Pit-1 による PRL や GH 遺伝子の発現制御機構は主としてほ乳類及び魚類において行われて来た。従って、進化的に両類の間に含まれる両生類、は虫類、鳥類ではほとんど解明されていない。その結果、魚類において認められる β 挿入は PRL や GH 遺伝子の発現誘起には必須であるのに対し、ほ乳類では PRL 遺伝子の発現に対しては抑制的にはたらくという、相反する点に関しての明瞭な解答が得られていなかった。本研究においてはリコンビナント鳥類 Pit-1 を用いて結合領域やアイソフォーム間の競合について検討することにより新たな知見が得られると考えられる。従って、遺伝子工学的手法によるリコンビナント Pit-1w/ γ の産生とそれを利用したゲルシフトアッセイによる結合能検定、Pit-1w/ γ 発現ベクターと PRL や GH プロモーターの同時トランスフェクションによる発現制御機構の解明、様々な鳥類 Pit-1 イントロン 1 のクローニング、キジ科鳥類のプロモーター領域のクロー

ニングと保存性を含めた比較解析及び鳥類特異的 Pit-1w/ γ の発現制御領域の解析を目的とした。

3. 研究の方法

リコンビナント Pit-1w/ γ を大腸菌に発現・合成させ、アフィニティークロマトグラムを用いて精製し、ゲルシフトアッセイにより PRL 及び GH プロモーターに対する結合能を検討する。さらに PRL 及び GH プロモーターをレポーターベクターに組み込みこんだプラスミドを作成するとともに、ほ乳類細胞における発現ベクターに Pit-1 α 及び Pit-1w/ γ cDNA を組み込んだものも作成し、GH3 や COS7 細胞に同時に導入し、プロモーターへの結合と発現制御機構を明らかにした。

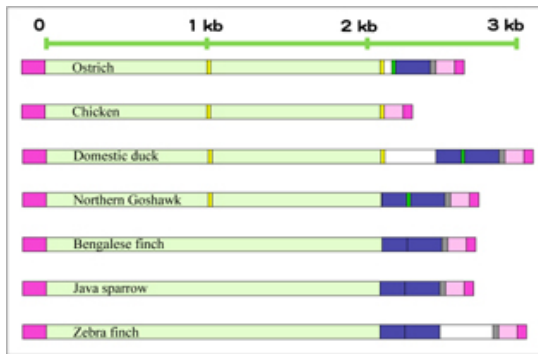
ダチョウ、ブンチョウ、ジュウシマツ、オオタカの血液よりゲノム DNA を抽出し、ニワトリ、シチメンチョウ及びアヒルのエクソン 1 及びエクソン 2 に保存された配列よりイントロン 1 を増幅するプライマーを設計し、イントロン 1 領域を増幅し、塩基配列を決定する。比較された塩基配列より保存領域を明らかにし、Pit-1 γ 発現制御領域の検討を行った。さらに、ニワトリ Pit-1 遺伝子のイントロン 1 領域とエクソン 2-a 及び 3' -UTR においてプライマーを設定し、mRNA より逆転写を行い、PCR による産物が得られるか否かによって Pit-1 γ の 5' UTR 領域の推定および発現に関与していると考えられる配列の推定を行った。

4. 研究成果

大腸菌に発現・合成させ、精製したリコンビナント Pit-1w/ γ をゲルシフトアッセイにより PRL プロモーターに対する結合能を検討したところ、結合能が認められた。さらに PRL 及び GH プロモーターをレポーターベクターに組み込みこんだプラスミドを用いた解析によりプロモーターへの結合と発現誘起効果を持つことが示された (結果は現在投稿中)。

さらに、様々な鳥類において Pit-1 γ が発現するか否かを明らかにするためにダチョウ、オオタカ、ブンチョウ、ジュウシマツにおける Pit-1 イントロン 1 の塩基配列を決定し、類似領域、種特異的配列を明らかにした。その結果、鳥類全体で共通している領域は 2k ほどであり、ニワトリのイントロン 1 は最小の構成単位から出来ている事が示された。さらに、PCR 増幅により、キジ科鳥類のほとんどはニワトリで同じ大きさのイントロンを持ち、鳥類の中では短いことが明らかになった。一方、アヒル特異的と思われていた領域は鳥類全体におい

て保存されていた事が新たに明らかになった(下図)。



さらに、イントロン1において鳥類共通の領域はほぼ中央で分ける事ができるが、それぞれの鳥類における類似性も明らかにされた(下表)。

Sequence similarity of common region

	Ostrich	Chicken	Duck	Goshawk	Bengalese	Sparrow	Zebra
Ostrich		67	67	71	65	65	65
Chicken	67		73	70	65	66	66
Duck	70	70		72	67	68	67
Goshawk	74	70	74		74	75	75
Bengalese	67	66	66	74		97	94
Sparrow	67	65	66	74	97		95
Zebra	67	65	65	73	95	94	

また、進化的に古いと考えられる早成性の鳥種では Pit-1 γ の翻訳に必要なメチオニンコドンが有するのに対し、晩成性鳥種ではメチオニンコドンが存在せず、また塩基の欠損も生じており、Pit-1 γ が存在する事が不可能な事が明らかにされた。従って、Pit-1 γ は早成性においてのみ存在する可能性が考えられたが、一方で発現しても翻訳されない mRNA として存在する可能性も考えられた(下図 ニワトリにおける Pit-1w/ γ 予想転写開始点近傍の比較図 Z, J, B, G, C, D, O はそれぞれキンカチョウ、ブンチョウ、ジュウシマツ、オオタカ、ニワトリ、アヒル、ダチョウを示す)。

```

Z AGCACAGAG GC-ATTGGCT GCCTCGAAGT TAAAGG-CTC TGCTTTGAAT CTTGA-----
J TGACACAGAG GC-ATTGGCT GCCTCGAAGT TCAAGG-CTC TGCTTTGAAT CTTGA-----
B TGACACAGAG GC-ATTGGCT GCCTCGAAGT TGAAGG-CTC TGCTTTGAAT CTTGA-----
G TACATACAAG GATACTGTCT GCTCTGAAAC TTACAGGCTG TGCTTTGAAT CCTCACAT
D AATATACAAG GACACCGCTT ACTTCTAAAC TGAAGGATG TATCTTGAAT CCTTATACAT
C GAGATACAAG GATATTGTCT ACCTCTGAAAC TGAAGGATG TATCTTGAAT CCTCACAGAT
O TAAATACAAG GATGTAGTCT ACCTTGAAT TGAAGGATG TATCTTGAAT CCTCACAT
Z GTTCTTAGA GTCTGTCTG TTTTCTCTT GCTCCCAAC CGTGGGTGT GGTGCATTGG
J GTTCTTAGA GTCTGTCTG TTTTCTCTT GCTCCCAAC CGTGGGTGT GGTGCATTGG
B GTTCTTAGA GTCTGTCTG TTTTCTCTT GCTCCCAAC CGTGGGTGT GGTGCATTGG
G TTTCTTACCA GTCCCATCG TTTTGTCTT GATCCAAACT CCTAAATGCT CCCATCTCCA
D TTTCTTACCA GTCCCATCG TTTTGTCTT GATCCAAACT CCTAAATGCT CCCATCTCCA
C TTTCTTACCA GTCCCATCG TTTTGTCTT GATCCAAACT CCTAAATGCT CCCATCTCCA
O TTTCTTACCA GTCCCATCG TTTTGTCTT GATCCAAACT CCTAAATGCT CCCATCTCCA
Z CCTGCGCGG ACAACGCCGC GA-ACCCTGG GCCAGGCGTG CACTACTCTG TGCC
J CCTGCGCGG ACAACGCCGC GAGGCCCTGG GCCAGGCGTG CACTACTCTG TGCC
B CCTGCGCGG ACAACGCCGC GAGGCCCTGG GCCAGGCGTG CACTACTCTG TGCC
C CCTGCGCATG ACAACTTGG GGAACGCTTC GGCAGGCGTT CACTACTCTG TGCC
D TTTTGCATG ATGACTTTGG GAAATACAT GG-CAGGACTT CACTACTCTG TGCC
C TTTTGCATG ATGACTTGG GAAACGCTTC AG-CAGGACTA CACTACTCTG TGCC
O CCTTGCATG ACGACTTTGG GAAACATC GGCAGGCGTT CATTATTCTG TGCC
  
```

Pit-1 α あるいは W/ γ の発現関与及びキジ科鳥類の発現共通性を検討するために、ニワトリにおける転写開始領域より約3800塩基上流までのプロモーターをクローニングした。この結果、キジ科鳥類では非常に

強く構造が保存されている事が明らかになった。このことから Pit-1 結合領域は強く保存されており、鳥類の PRL 遺伝子発現に関して、Pit-1 が関与している事が強く示された

Pit-1 α はほ乳類で報告されているものと同様に PRL プロモーター及び GH プロモーターへの結合能を示し、ルシフェラーゼアッセイにより転写を促進させる事が明らかになったが、既に記述したように、晩成性鳥類では Pit-1 γ は存在しないことが強く示された。従って、ニワトリ Pit-1 イントロン1内における Pit-1 γ の発現制御領域を明らかにすることに焦点を絞った。正確な転写開始点を明らかにし、5' UTR を決定する必要からニワトリ Pit-1 遺伝子のイントロン1領域とエクソン2-a及び3' -UTR においてプライマーを設定し、Pit-1 γ の5' UTR 領域の推定を行った。その結果、Pit-1 γ の5' UTR は予想されていたものより遥かに長く、当初 TATA ボックスと推定されていた領域は5' UTR であり、ATG 開始コドンより上流1400塩基までは UTR である事が確認された。従って、ATG 開始コドンより上流1450塩基付近に存在する TATAAATAA という配列が TATA ボックスとして機能している可能性が示唆された。この結果に基づきエクソン1の終わりより650塩基程が発現制御領域と思われる。この領域を鳥類で比較すると近縁種では95%の相同性を示すものの、鳥類全体では65%ほどの相同性であり、高い類似性を示す訳でもない事が確認された。従って、相同性の高い領域が発現に関与している事が示され、全く当初の予測とは異なる結果が示された。ルシフェラーゼアッセイを該当領域で行ったが、プロモーターを挿入したプラスミドとコントロールプラスミドとは大きな発現量の変化は認められず、Pit-1 γ の発現にはイントロン1の UTR 以外の領域が関与している可能性が強く示唆された。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

Hiyama, G., Kansaku, N., Sasanami, T., Nakamura, A., Noda, K., Tsukada, A., Shimada, K. and Zadworny, D. Changes in post-translational modifications of prolactin during development and reproductive cycles in the chicken. *General and Comparative Endocrinology*. 161: 238-245. 2009. (査読有)

Hiyama, G., Sato, T., Zadworny, D. and Kansaku, N. Cloning of PRL and VIP cDNAs

of the Java Sparrow (*Padda oryzivora*).
Animal Science Journal. 80:176-186. 2009.
(査読有)

Hiyama, G., Zadworny, D. and Kansaku, N.
Cloning and Comparison of Prolactin
Promoter in Galliformes. Journal of
Poultry Science. 46: 6-12. 2009. (査読
有)

Kansaku, N., Soma, A., Furukawa, S.,
Hiyama, G., Okabayashi, H., Guémené, D.,
Kühnlein, U. and Zadworny, D. Sequence of
the domestic duck (*Anas platyrhynchos*)
growth hormone-encoding gene and genetic
variation in the promoter region. Animal
Science Journal. 179:163-170. 2008. (査
読有)

Kansaku, N., Hiyama, G., Sasanami, T.,
Zadworny. Prolactin and growth hormone in
bird: protein structure, gene structure,
and genetic variation. Journal of Poultry
Science 45 : 1-6, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

Detection of alternative splicing form
of PRL mRNA in the chicken anterior
pituitary gland. N. Kansaku, T. Sasanami,
T. Ohkubo, G. Hiyama, and D. Zadworny. The
2009 Joint Annual Meeting of the American
Dairy Science Association, Canadian
Society of Animal Science and the
American Society of Animal Science,
Montreal, Canada, July 15, 2009

Sequence comparison of the prolactin
(PRL) promoter in BUT and Bettina turkeys
Hiyama, G., Kansaku, N., Reddy, I. J.,
Sotocinal, S., Guémené, D., Zadworny, D.
9th International Symposium on Avian
Endocrinology. Leuven Catholic
University, Leuven, Belgium, 2008 July,
13,

Comparison of Pit-1 intron-1 in birds.
Kansaku, N., Tanaka, I., Tsushima, K.,
Zadworny, D. 9th International
Symposium on Avian Endocrinology.
Leuven Catholic University, Leuven,
Belgium, 2008 July, 12,

Comparison of prolactin in galliforms
Hiyama G, Zadworny D, Ohtsuki M, Sasanami
T, Kansaku N 9th International
Symposium on Avian Endocrinology. Leuven
Catholic University, Leuven, Belgium,
2008 July, 11,

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計◇件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神作宜男 (KANSAKU NORIO)
麻布大学・獣医学部・教授
研究者番号 : 60333142

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :