

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658088

研究課題名（和文）ニワトリの性決定遺伝子の同定

研究課題名（英文）Identification of a sex-determining gene in chicken

研究代表者

黒岩 麻里（KUROIWA ASATO）

北海道大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：20372261

研究成果の概要（和文）：ニワトリの性別は産業的に大変重要であるが、性決定メカニズムは未だ明らかとなっていない。申請者はニワトリの性決定遺伝子を見つけるために、雌雄の生殖腺に発現している転写産物を、網羅的にスクリーニングした。その結果、生殖腺特異的な発現を示し、ZあるいはW上に存在する新規遺伝子配列を7種類同定した。申請者は研究期間内にこれら7種類の新規候補遺伝子の詳細なキャラクタライゼーションを行ない、性決定遺伝子であるかを検証した。候補遺伝子7種類のうち、Z染色体上の遺伝子2種類、W染色体上の遺伝子1種類の計3種類に、さらに解析対象をしぼった。これら3種類の遺伝子について詳細な解析を行い、Z染色体上の1種類の遺伝子は、哺乳類では造血系細胞の分化に働く転写因子として知られる遺伝子のホモログであり、鳥類では哺乳類と同様に造血系で機能するだけでなく、鳥類特異的に精巣分化に関わる新しい機能が確認された。Z染色体上のもう1種類の遺伝子は、性分化への関わりはないと判断された。また、W染色体上の1種類の遺伝子は、ユビキチン結合酵素の一種であることは明らかとなったが、卵巣分化にどのように関わるのかまでは確認できなかった。

研究成果の概要（英文）：A sex of chicken is significantly important for agricultural production. However, the molecular mechanism of sex determination of chicken has been unrevealed. We screened mRNA transcribed in early embryonic gonads, and identified seven genes which showed sex-specific expression in gonads and located on Z or W chromosome. To identify a candidate gene for sex-determining, we determined the sequences of complete ORF, exons and introns, and expression patterns in the seven genes. The three genes (two Z-linked and one W-linked) were remained as the last candidates. We made an anti-body for the one of Z-linked genes, and performed Western blotting and Immunostaining. As a result, this gene was a homologue of hematopoietic gene reported in mammals (human and mouse), and involved in early testis differentiation specifically in chicken. The other had no function in sex determination. And we revealed that the W-linked gene was a kind of ubiquitin-conjugating enzyme.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,100,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	330,000	3,330,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：ニワトリ、性決定、Z染色体、W染色体

1. 研究開始当初の背景

ニワトリは肉および卵を食用とし、世界中で広く有用されている家禽である。家禽産業では、様々な理由でニワトリの性を区別する。販売用の鶏卵を産むメスと、ほとんどが鶏肉として売るために肥育されるオスとで、早い時期からそれぞれの商業的役割に応じた異なる餌の与え方をするためである。また、鶏卵を生産するファクトリーファームでは、オスは不要である。このように、ニワトリの性別は産業的に大変重要であるが、ニワトリの雌雄がどのように決定されるのか、性決定メカニズムは未だ明らかとなっていない。

ニワトリはオスがZZ型、メスがZW型の性染色体構成をしており、遺伝的に性が決定されることは古くから知られている。しかし、W染色体上にメスを決定する遺伝子が存在するのか、あるいはZ染色体上に性決定遺伝子が存在し、Z染色体と常染色体の本数の比で性が決定される（遺伝子量で性が決定される）のか、そのメカニズムは謎のままである。2000年前半頃に、いくつかの遺伝子が候補として報告されており、候補遺伝子の一つに、Z染色体上に存在する *DMRT1* 遺伝子が知られている。2009年8月にSmithらがRNA干渉によりオスの生殖腺での *DMRT1* の発現を抑制すると、生殖腺がメス化すると報告した。*DMRT1* は脊椎、無脊椎動物を超えた幅広い分類群で精巣分化に必須な遺伝子であることが知られており、ニワトリにおいてもその重要性が確認されたわけであるが、Smithらの報告中には、*DMRT1* 以外の性決定遺伝子が存在する可能性が示唆されている。また、その他の候補遺伝子についても性決定遺伝子としてのネガティブデータが報告されており、性決定遺伝子は未だみつかっていない。

2. 研究の目的

申請者はニワトリの性決定遺伝子がみつからない要因として、鳥類特異的な遺伝子であること、性決定時期のごく限られた期間に

しか発現せず、かつその発現量が低いこと、を想定し、HiCEP (High-coverage expression profiling) 法を用いて、性決定時期である孵卵開始 5.5~6.5 日目の初期胚における雌雄の生殖腺に発現している転写産物を、網羅的にスクリーニングした。その結果、生殖腺特異的な発現を示し、ZあるいはW上に存在する新規遺伝子配列を7種類同定した。申請者は研究期間内にこれら7種類の新規候補遺伝子の詳細なキャラクタライゼーションを行ない、その機能を確認することで、性決定遺伝子であるかを検証する。候補遺伝子として同定された遺伝子は、全てが性特異的および生殖腺特異的な発現を示しているため、生殖腺の発生、分化に関与しており、この中にニワトリの性決定遺伝子が存在する可能性が極めて高い。ニワトリの性決定遺伝子が特定されれば、長年の謎であった鳥類での性決定メカニズムが明らかとなり、基礎生物学的な知見のみならず、家禽産業への応用が可能となる。

3. 研究の方法

候補遺伝子として絞り込まれた7種の新規遺伝子については、現段階では性決定時期（孵卵開始 5.5~6.5 日目）の生殖腺に強く発現していることが確認されている。よって、全長配列、ゲノム構造を決定し、より詳細な mRNA およびタンパク質の発現解析を行なった。

(1) ニワトリ初期胚（孵卵開始 5.5、6.5、7.5、8.5、10、15、20 日目）と孵化後4週目、8週目のニワトリの各組織（生殖腺、脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、筋肉、血液、初期胚の場合は前肢、後肢）から mRNA を抽出し、RT-PCR 法、ノーザンハイブリダイゼーション法を用いて各遺伝子の発現様式を雌雄間、組織間、発生段階間で比較した。

(2) ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、発現様式および生殖腺中の

発現部位を特定した。

(3) ニワトリ初期生殖腺の cDNA ライブラリーを雌雄別に作製し、候補遺伝子が含まれる cDNA クローンを単離し、全長配列を決定した。

(4) real-time PCR 法を用いて、生殖腺中の mRNA 発現量を定量した。

(5) ゲノムデータベースを用いて、エクソン、イントロンなどのゲノム構造を確認する。

(6) データベースにより ORF を予測し、特異的抗体を作製した。

(7) 作製した抗体を用いて、ノーザンハイブリダイゼーションを行なった発生段階の各組織についてウェスタンブロッティングを行ない、タンパク質のサイズ、発現様式を確認した。

(8) 生殖腺の切片を作製し免疫染色を行ない、発現部位を特定した。生殖腺中には主に、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞、始原生殖細胞が存在し、各細胞を判別するマーカーとしてそれぞれ SOX9、DMRT1、CVH タンパク質がある。よって、二色の蛍光色素抗体を用いて候補遺伝子抗体とマーカー抗体を同時にハイブリダイズすることにより、発現細胞の種類を特定する。

(9) データベースを用いて、候補遺伝子中にある機能モチーフ、ドメインなどを推定した。また、候補遺伝子の 5' 側および 3' 側ゲノム配列中に、何らかの転写因子結合ファクターがないかを確認した。

(10) 7つの候補遺伝子はゲノムデータベースの情報から Z、W 染色体のどちらか、あるいは Z、W 染色体の両方に存在することがわかっているが、FISH マッピングを行い、染色体の位置を実験的に確認した。

4. 研究成果

7 種類の新規候補遺伝子の詳細なキャラクタライゼーションを行ない、性決定遺伝子であるかを検証した結果、候補遺伝子 7 種類のうち、Z 染色体上の遺伝子 2 種類、W 染色体上の遺伝子 1 種類の計 3 種類に、さらに解析対象をしぼった。これら 3 種類の遺伝子について、qRT-PCR 法を用いて、生殖腺中の mRNA 発現量を定量した。ゲノムデータベースを用いて、エクソン、イントロンなどのゲノム構造を確認した。また、Z 染色体上に遺伝子 1

種類においてのみ、データベースにより ORF を予測し、特異的抗体を作製した。作製した抗体を用いて、各組織についてウェスタンブロッティングを行ない、タンパク質のサイズ、発現様式を確認した。生殖腺の切片を作製し免疫染色を行ない、発現部位を特定した。以上の実験により、Z 染色体上の 1 種類の遺伝子は、哺乳類では造血系細胞の分化に働く転写因子として知られる遺伝子のホモログであり、鳥類では哺乳類と同様に造血系で機能するだけでなく、鳥類特異的に精巢分化に関わる新しい機能が確認された。Z 染色体上のもう 1 種類の遺伝子は、性分化への関わりはないと判断された。また、W 染色体上の 1 種類の遺伝子は、ユビキチン結合酵素の一種であることは明らかとなったが、卵巣分化にどのように関わるのかまでは確認できなかった。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 中田智大、我妻奈菜、松田洋一、黒岩麻里「鳥類特異的に生殖腺分化に関与する機能を獲得した候補遺伝子の解析」日本畜産学会第 113 回大会, 2011 年 3 月, 東京農業大学 (厚木市)
- (2) 中田智大、三上陽司、湯野川春信、松田洋一、黒岩麻里「鳥類特異的に獲得された生殖腺分化に関与する候補遺伝子の解析」日本分子生物学会 2010 年度大会, 2010 年 12 月, 神戸国際会議場 (神戸市)
- (3) 中田智大、三上陽司、湯野川春信、松田洋一、黒岩麻里「ニワトリの生殖腺分化に関与する候補遺伝子の解析」日本遺伝学会第 82 回大会, 2010 年 9 月, 北海道大学 (札幌市)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

研究室 HP

<https://sites.google.com/site/kuroiwagroup/home>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒岩 麻里 (KUROIWA ASATO)

北海道大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：20372261