

日本産ギンブナ *Carassius auratus langsdorfi* における  
雌性生殖に関与する遺伝子の探索

2002

麻布大学大学院獣医学研究科  
分子生物学研究室

松葉 周子

日本産ギンブナ *Carassius auratus langsdorfi* における  
雌性生殖に関与する遺伝子の探索

2002

麻布大学大学院獣医学研究科  
分子生物学研究室

松葉 周子

# 目 次

はじめに .....	1
第 1 章 日本産ギンブナの卵巣からの <i>wee1</i> 遺伝子ホモローグの単離 .....	3
概要 .....	3
1. 序論 .....	5
2 材料と方法 .....	7
2.1. 供試魚および RNA の精製 .....	7
2.2. 逆転写および PCR .....	7
2.3. 3'-rapid amplification of cDNA ends (3'-RACE) .....	8
2.4. 5'-rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) .....	8
2.5. <i>wee1</i> 遺伝子の全長の増幅 .....	9
2.6. PCR 産物のクローニング .....	10
2.7. 塩基配列の決定 .....	10
2.8. 塩基配列の解析 .....	11
2.9. RT-PCR による卵巣以外の組織における <i>wee1</i> の発現の確認 .....	11
2.10. RT-PCR による卵巣における <i>wee1</i> の発現量の比較 .....	12
2.11. ノーザンプロットハイブリダイゼーションによる発現量の比較 .....	12
3. 結果 .....	14
3.1. <i>wee1</i> ホモローグの cDNA 塩基配列 .....	14
3.2. <i>wee1</i> 遺伝子の構造 .....	14
3.3. さまざまな種の Wee1 とのアミノ酸配列の比較 .....	15
3.4. 組織別の発現解析 .....	16
3.5. RT-PCR およびノーザンプロットハイブリダイゼーションによる 卵巣における発現量の確認 .....	17
4. 考察 .....	18

5. 参考文献 .....	22
6. 図表 .....	
第2章 cDNA サブトラクション法による日本産ギンブナ卵巢における 雌性生殖特異的発現遺伝子の探索 .....	26
概要 .....	26
1. 序論 .....	28
2. 材料と方法 .....	31
2.1. 供試魚および RNA の精製 .....	31
2.2. 二本鎖 cDNA 合成 .....	31
2.3. cDNA サブトラクション .....	32
2.4. サブトラクション産物の PCR 増幅および産物のクローニング .....	32
2.5. 塩基配列決定および塩基配列の解析 .....	33
2.6. RT-PCR .....	34
2.7. ノーザンプロットハイブリダイゼーションによる発現解析 .....	34
3. 結果 .....	37
3.1. サブトラクション産物クローン (ST クローンと SD クローン) の分類 .....	37
3.2. RT-PCR .....	38
3.3. ノーザンプロットハイブリダイゼーション .....	40
4. 考察 .....	42
4.1. 候補遺伝子 D12 .....	42
4.2. 候補遺伝子 T12 .....	43
4.3. 候補遺伝子 D78 .....	44
4.4. 候補遺伝子 T1314 .....	44

5. 参考文献 .....47

6. 図表

謝辞.....49

# 日本産ギンブナ *Carassius auratus langsdorfi* における雌性生殖に関する遺伝子の探索

はじめに

雌性生殖 (gynogenesis) は単為生殖のひとつで、雄性配偶子の遺伝的寄与がなく雌性配偶子から胚が発生して次世代を残す生殖である。魚類では、カダヤシ科やコイ科など、今までに 5 科 8 属で雌性生殖を行う種が知られている (Vrijenhoek et al, 1989)。日本国内に生存する脊椎動物では、コイ科魚類であるギンブナと呼ばれるフナ (以下 “ギンブナ”) (*Carassius auratus langsdorfi*) の多くとドジョウ科魚類であるドジョウの一部のみが、自然雌性生殖を行う種として知られている。

日本産ギンブナは、日本国内の淡水域に広く分布し、自然界で有性生殖を行う 2 倍体の雌雄の集団と雌性生殖を行う 3 倍体 (稀に 4 倍体) の雌のみで構成される集団の二つの集団が同所的に存在する (Kobayasi, 1982; Onozato, et al., 1983)。有性生殖を行う雌ギンブナと雌性生殖を行う雌ギンブナの形態は区別することは困難で、両者が同所的に存在する場合、ギンブナ集団は全体として雌に性比が傾いた集団となる。雌性生殖を行う個体では、近縁種からの精子は卵発生の開始に必要であるが遺伝的寄与がなく、この為母個体に遺伝的に同一な娘個体を産出する。このような次世代を産出する為には、卵成熟過程における第一成熟分裂時に、3 極の紡錘体を形成して分裂しないまま第二成熟分裂に移行し、結果として 3 倍体卵子を形成する、受精に際し、精子の貫入刺激により発生は開始されるが、貫入した精子の核膜は崩壊することなく雌性前核と融合しない、という 2 点が、成立していることが大陸産のギンブナ (ギベリオブナ) を用いた細胞生物学的研究からまず明らかになり (Cherfas, 1979)、その後、日本産 3 倍体ギンブナでも

同様の現象が観察された (Kobayasi, 1976; Yamashita et al., 1990; Yamashita & Nagahama, 1992)。雌性生殖 3 倍体ギンブナのゲノムの由来をゲノム構成について、フナ属各 (亜) 種魚類を用いて DNA マーカーやミトコンドリアゲノムの塩基配列を比較することにより解析されている (Murakami and Fujitani, 1997, 1998; Ohara et al. 2000)。しかし、雌性生殖という特徴的な生殖機構そのものに関する分子の特徴や遺伝子レベルの解析はほとんど行われていない。

今回、ギンブナでの雌性生殖システムを遺伝子レベルで解明するために、雌性生殖における卵成熟過程および特徴的な受精後の現象を引き起す因子を探る方法として、2 つのアプローチを用いた。ひとつは、細胞分裂および減数分裂を制御する *wee1* 遺伝子に注目したもので、ギンブナ卵巣より *wee1* cDNA を単離して全長の塩基配列を解析し、雌性生殖ギンブナおよび有性生殖ギンブナそれぞれの卵巣における *wee1* 遺伝子の発現を調べるものである。また、他種の *Wee1* のアミノ酸配列と比較し、さらに、ゲノム領域での配列を決定し、遺伝子構造についても明らかにした (第 1 章)。もうひとつは、雌性生殖ギンブナあるいは有性生殖ギンブナの卵巣において発現の異なる遺伝子を網羅的に検索を行うというもので、cDNA サブトラクション法によって雌性生殖ギンブナと有性生殖ギンブナの成熟した卵巣内で異なる発現を示す遺伝子を検索し、得られた特異的発現が見られる候補遺伝子について、雌性生殖ギンブナおよび有性生殖ギンブナそれぞれの卵巣での発現量を比較した (第 2 章)。

## 第1章

### 日本産ギンブナ (*C. a. langsdorfi*) の卵巣からの *wee1* 遺伝子ホモログの単離

#### 概 要

雌性生殖ギンブナ卵における減数分裂時の異常、つまり、卵成熟の第一減数分裂時に分裂せずに極体を放出しないまま第二減数分裂に進行する現象を分子レベルで解明するために、細胞周期を制御する遺伝子のひとつである *wee1* 遺伝子に注目し、雌性生殖を行う3倍体ギンブナおよび有性生殖を行う2倍体ギンブナの卵巣からそれぞれ *wee1* 遺伝子ホモログを同定した。

RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 法および 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends)法、5'-RACE 法によって3倍体個体から得られた *wee1* の cDNA は、全長 1,934bp で 526 アミノ酸残基をコードしており、そのキナーゼドメインのアミノ酸配列は、アフリカツメガエル Wee1 と 69.9%という高い相同性を示した。3倍体個体から得られた *wee1* cDNA の塩基配列を基に設定したプライマーを用いた PCR によって、2倍体個体からも *wee1* cDNA の配列を得た。3倍体と2倍体の *wee1* の塩基配列の違いは、非転写領域に4箇所見られたが、タンパク質のアミノ酸配列を変えるような変異はなかった。また、さまざまな生物種の Wee1 タンパク質のアミノ酸配列を用いた系統樹解析により、脊椎動物における Wee1 は、生殖細胞由来の減数分裂型 Wee1 と、培養細胞由来の体細胞分裂型 Wee1 という二つのグループに分かれることが示唆された。この二つのグループは、キナーゼドメインの配列はよく保存されているが、アミノ末端の配列においてそれぞれのグループは大きく異なっている。今回得られたギンブナ Wee1 は、アフリカツメガエルの卵巣と卵由来の Wee1、および精巣に特異的発現の見られるヒト Wee1B に近縁であり、減数分裂型 Wee1 であることが示された。また、卵巣以外の組織を用いた RT-



PCR の結果から、ギンブナにおいても体細胞型 *wee1* の存在が示唆された。ノーザンハイブリダイゼーションの結果からは、今回得られた減数分裂型 *wee1* の卵巣での発現量は、有性生殖ギンブナと雌性生殖ギンブナの間で差は見られなかったため、*wee1* 遺伝子が雌性生殖ギンブナの特別な卵形成に関わっていないことが示唆された。さらに、long-PCR 法により、ギンブナゲノム DNA より、ほぼ全長を含んだ約 6kbp の大きさの *wee1* 遺伝子領域の塩基配列を決定した。ギンブナ *wee1* 遺伝子は、12 個のエクソンから構成されており、開始コドンは第二エクソンに存在することが明かとなった。

キーワード ; 雌性生殖、ギンブナ、*wee1* 遺伝子

## 1. 序 論

Wee1 は、真核生物において広く保存された体細胞分裂阻害因子として知られている (Russell and Nurse, 1987; Nurse, 1990)。真核細胞の細胞周期の分裂期 (M 期) では、MPF (maturation promoting factor あるいは mitosis-promoting factor) により染色体凝縮、紡錘体形成、核膜の崩壊などの有糸分裂初期の事象が引き起される (Masui and Markert 1971; Nurse 1990)。この MPF は、基質特異性を決定する調節サブユニットであるサイクリン B と、サイクリン依存性プロテインキナーゼ (Cdk) のひとつで触媒サブユニットの Cdc2 とからなる、ヘテロ二量体のプロテインキナーゼである (Dunphy et al., 1988; Draetta et al., 1989)。サイクリン B と Cdc2 が会合しただけでは MPF のプロテインキナーゼ活性は得られず、その制御には Cdc2 活性化プロテインキナーゼ (CAK)、Wee1、Cdc25 (など) が必要である。体細胞分裂過程では、Wee1 はチロシンキナーゼで、MPF の触媒サブユニット Cdc2 の 15 番目のアミノ酸残基チロシンをリン酸化して MPF を不活性化することによって、体細胞分裂の開始を制御する (Millar and Russell, 1992)。一方卵成熟過程においては、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞では、Wee1 タンパク質は、第一減数分裂の間は発現されておらず、第二減数分裂期から囊胚形成期にかけて発現が見られることが報告されており (Murakami and Woude, 1998)、また、このアフリカツメガエルの第一減数分裂期における Wee1 の欠乏は、第一減数分裂後の DNA 複製の抑制に必須であることが示されている (Nakajo et al., 2000)。

*wee1* 遺伝子は分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) の突然変異株から 1987 年に初めて単離された (Russell and Nurse, 1987)。現在までに Wee1 cDNA は、出芽酵母、真菌の仲間、トウモロコシ、ムラサキウニ、ショウジョウバエ、アフリカツメガエル、マウス、ヒト等のさまざまな生物から単離されている。ヒトでは、*wee1A* と *wee1B* の二つのタイプの *wee1* 遺伝子が見つかり、そのうち的一方である *wee1B* は特に、精巣における

顕著な発現が報告されている (Nakanishi et al., 2000)。Wee1 タンパク質のプロテインキナーゼドメインのアミノ酸配列は種間でも良く保存されており、トウモロコシやヒトの Wee1 タンパク質が分裂酵母の細胞内で機能的に働くことも示されている (Sun et al., 1999; Nakanishi et al., 2000)。しかしながら、現在までに *wee1* 遺伝子のゲノム領域での遺伝子構造はほとんどの種で明らかにされておらず、わずかに真菌の仲間とヒトにおいて解析されているのみである。魚類においては遺伝子の単離や遺伝子構造の解析などは行われていない。

最近、日本産ギンブナの近縁種で、雌性生殖を行う大陸産ギベリオブナ (*C. a. gibelio*) を用いた研究から、ギベリオブナの卵成熟過程での MPF のキナーゼ活性は、有性生殖フナに比べ、わずかに長い期間継続していることが報告され (An et al., 1999)、雌性生殖フナと有性生殖フナの卵形成過程の違いに MPF が関与していることが示唆された。そこで、MPF のキナーゼ活性を制御する遺伝子のひとつである *wee1* に注目し、雌性生殖の分子レベルでの解明の一歩として、日本産ギンブナの卵巢から *wee1* 遺伝子の単離を試み、その発現量を雌性生殖ギンブナと有性生殖ギンブナの卵巢で比較した。さらに、雌性生殖ギンブナの *wee1* 遺伝子の構造を明らかにした。

## 2. 材料および方法

**2.1. 供試魚と RNA の精製** 1999 年 4 月 17 日、神奈川県平塚市渋田川上流部（笠張川）でギンブナを捕獲し、DAPI 染色法（Hamada and Fujita, 1983; 高山, 1989）にて倍数性の判定を行った。約 1 ヶ月半ほど 13°C の水温にて飼育されたギンブナから卵巣を摘出し、-80°C にて保存した。1cm 角程度の卵巣を切り出し、RNA 溶出液（製品名 Isogen; ニッポンジーン）1ml を加え氷上でホモジェナイズした。室温で 5 分間放置後、クロロホルム 0.2ml を加えて激しく転倒混和しさらに室温にて 3 分間放置した。このホモジェネートを 4°C、12,000×g にて 5 分間遠心した。得られた上清にイソプロパノール 0.5ml を加え、混ぜ合わせた後、室温にて 10 分間放置し、4°C、12,000×g にて 10 分間遠心し、RNA の沈澱を得た。75%エタノールで洗浄後、二炭酸ジエチル（diethylpyrocarbonate; DEPC）を 0.1% 含んだ蒸留水を 37°C で数時間処理し 121°C で 20 分間オートクレーブにかけた DEPC 処理水 400μl に溶解し、分光光度計により濃度を計測した。得られた全 RNA 約 250μg から Oligotex-dT30 mRNA Purification Kit（TaKaRa）により mRNA（ポリ A-RNA）約 7μg を精製した。

**2.2. 逆転写および PCR** 上記により得られた mRNA 2μg に、2.5mM MgCl<sub>2</sub> と RNase-free DNase 2.5unit（TaKaRa）を加えて 37°C で 30 分間反応後 85°C 15 分間で DNase の失活処理をした。第一鎖 cDNA を合成するために、oligo dT<sub>15</sub> プライマー（ニッポンジーン）840ng とランダムヘキサマー（GIBCO BRL, USA）100ng を加えて 70°C で 10 分間変性した後、反応液 156μl（最終濃度；1mM dNTP、0.01M ジチオトレイトール（DDT）、1×1st strand bufer）中に逆転写酵素の superscript II RNase H reverse transcriptase（GIBCO BRL, USA）を 200 units 加えた。30°C で 33 分間、42°C で 30 分間で逆転写反応を行った。逆転写酵素の失活のために 80°C で 15 分間処理した。合成した cDNA は、続いて、PCR の鋳型として用いた。既知のアフリカツメガエルとラットの *wee1* 塩基配列とゼブラフィ

ッシュの発現配列タグ (expressed sequence tag; EST) の *wee1* ホモローグの塩基配列をもとに degenerate プライマーである *wee1-5'* と *wee1-3'* を設計し (表 1、図 1)、PCR を行った。鋳型 cDNA 1  $\mu$ l を加えた反応液 25  $\mu$ l (最終濃度 ; 1.2  $\mu$ M *wee1-5'* プライマー、 1.2  $\mu$ M *wee1-3'* プライマー、 1  $\times$  PCR バッファー、 0.2mM dNTP、 2.5 units *Taq* DNA ポリメラーゼ) を、94°C 3 分間で初期変性を行い、94°C 30 秒、48°C 30 秒、72°C 1 分の条件で 40 サイクルの反応を行った後、72°C 10 分間の伸長反応を行った。得られた約 770bp の産物をクローニングし、塩基配列を決定した。

**2.3. 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法** 得られた部分的 *wee1* ホモローグの 3' 下流領域の塩基配列を得るために、3'-RACE 法を行った。*Not*I サイトを持った oligo dT<sub>18</sub>-*Not*I プライマー (表 1) を用いて、上記と同様に第一鎖 cDNA を合成した。RT-PCR 産物から決定された塩基配列をもとにプライマー *wee1-5'* の下流に設計したプライマー WEU-5 (表 1、図 2) と *Not*I アダプタープライマー; Adaptor 1 (表 1) を用いて、合成した cDNA を鋳型にして、PCR を行った。PCR 反応は、cDNA 溶液 1  $\mu$ l を含んだ反応液 50  $\mu$ l (最終濃度 ; 0.4  $\mu$ M WEU-5 プライマー、 0.4  $\mu$ M *Not* I アダプタープライマー、 1  $\times$  PCR バッファー、 0.2mM dNTP、 2.5units *Taq* DNA ポリメラーゼ) を、95°C 3 分間の初期変性を行い、95°C 30 秒間、55°C 30 秒間、72°C 2 分 30 秒間を 35 サイクル繰り返した後、72°C 10 分間の伸長反応を行った。得られた約 850bp の PCR 産物を T ベクターを用いてクローニングし、塩基配列を決定した。

**2.4. 5'-RACE (5'-rapid amplification of cDNA ends) 法** GIBCO BRL 社 (現インビトロジェン社) の 5' RACE system ver. 2 を用いて、RT-PCR で得られた部分的 *wee1* ホモローグの 5' 上流領域の解析を行った。RT-PCR (2.2.) で得られた *wee1* ホモローグの部分的な塩基配列をもとに WEL-2 (表 1、図 3) プライマーを準備した。GIBCO BRL 社の方法に従い、全 RNA 0.88  $\mu$ g と 2.5pmol WEL-2 の混合液 15.5  $\mu$ l を 70°C 10 分間で熱変性した

後氷冷し、プレミックス液 8.5 $\mu$ l (全量 25 $\mu$ l 中の最終濃度 ; 2.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.4mM dNTP、10mM DTT、1 $\times$ PCR バッファー) を加えた。42°C で 1 分間保温した後、superscript II reverse transcriptase 1 $\mu$ l を加えてさらに、42°C 50 分間、51°C 30 分間逆転写反応を行った。70°C で 15 分間で逆転写酵素の失活を行い、第一鎖を合成した。合成された cDNA を添付の RNasemix (RNase H と RNase T1) で 37°C 30 分間で処理した後、5' RACE system に添付の DNA Purification System により、スピンカラムに cDNA を結合させて 70%エタノールで洗浄後、65°C の滅菌蒸留水 50 $\mu$ l に溶出した。精製された cDNA 溶液 10 $\mu$ l を含んだ反応液 24 $\mu$ l (全量 25 $\mu$ l 中の最終濃度 ; 0.2mM dCTP、1 $\times$  tailing buffer) を 94°C で 2 分間熱変性し、氷冷した後、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ 1 $\mu$ l を加え 37°C で 10 分間で反応し、cDNA の 5'-末端へ dCTP を付加した。65°C で 10 分間のトランスフェラーゼの失活処理を行った。続いて、第一鎖合成時に使用した WEL-2 プライマーより下流に WEL-4 (表 1、図 3) プライマーを設定し、この内部プライマーと 5' RACE system に添付されているポリ G サイトを持つ Abridged Anchor Primer を用いて、上記の dCTP 付加 cDNA を鋳型に PCR を行った。合成された dCTP 付加 cDNA 5 $\mu$ l を含む反応液 50 $\mu$ l (最終濃度 ; 0.4 $\mu$ M WEL-4 プライマー、0.4 $\mu$ M Abridged Anchor Primer、0.2mM dNTP、1 $\times$ PCR バッファー、Taq DNA ポリメラーゼ 2.5 units) を、94°C 3 分間の初期変性の後、94°C 1 分間、55°C 30 秒間、72°C 2 分間で 30 サイクルの反応を行い、72 10 分間の伸長反応を行った。これにより得られた、約 500bp の PCR 産物をクローニングした。

**2.5. *wee1* 遺伝子の全長の増幅** 3'-、5'-RACE 法により得られたギンブナ *wee1* ホモローグの 3'-末端と 5'-末端にプライマー WEU-7 (表 1) と WEL-8 (表 1、図 4) を設定し、2 倍体ギンブナと 3 倍体ギンブナの卵巣 cDNA を鋳型に、コード領域を含むほぼ全長 (約 1,800bp) を増幅した。また、このプライマーと long-PCR 用の LA Taq DNA ポリメラーゼ (TaKaRa) を用いて、ゲノム領域での *wee1* 遺伝子の増幅 (約 6kbp) も行った。long-PCR

に用いた鋳型となるゲノム DNA は、TNES-尿素緩衝液 (6M 尿素、10mM Tris-HCl (pH7.5)、125mM NaCl、10mM EDTA、1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)) 中に保存された 3 倍体雌性生殖ギンブナの肝臓から抽出した (Asahida et al.,1996)。long-PCR は、鋳型となるゲノム DNA 数  $\mu\text{g}$  を含んだ 50  $\mu\text{l}$  反応液 (最終濃度 ; 0.4  $\mu\text{M}$  WEU-7 プライマー、0.4  $\mu\text{M}$  WEL-8 プライマー、0.4mM dNTP、2.5mM  $\text{MgCl}_2$ 、1 $\times$ PCR バッファー、LA Taq DNA ポリメラーゼ 2.5 units) で、初期変性を 94°C 3 分間で行った後、94°C 1 分間、55°C 30 秒間、72°C 2 分 30 秒間を 30 サイクル繰返し、72°C 10 分間の伸長反応を行った。cDNA の増幅より得られた約 1,800bp の *wee1* ホモログと、ゲノム DNA から増幅された約 6kbp の遺伝子領域の PCR 産物を、塩基配列を決定するためにクローニングした。

**2.6. PCR 産物のクローニング** PCR 産物のクローニングには、Promega 社(USA)のプラスミドベクター pGEM-T Easy vector を用いた。pGEM-T Easy vector 50ng に対し数 10~100ng の PCR 産物と T4 DNA リガーゼ 3 units、最終濃度が 1 $\times$ になるように Rapid Ligation buffer を加えて、16°C で 4 時間以上ライゲーション反応を行った。組換えプラスミドとコンピテントセル JM109 大腸菌を混ぜ、氷上に 30 分間放置後、42°C 1 分間の熱ショックを加えて大腸菌を形質転換し、LB (Luria-Bertani 培地 ; bacto-tryptone 10g、bacto-yeast extract 5g、NaCl 10g / 11 蒸留水) 寒天培地で 37°C で 15 時間培養した。

**2.7. 塩基配列の決定** 上述のように形質転換した大腸菌を、LB 液体培地 3ml で一晩 37°C で培養し、Promega 社の DNA Purification System (製品名 Wizard Minipreps) を用いて PCR 断片を含んだプラスミドを回収した。回収したプラスミド 3  $\mu\text{g}$  に 1  $\mu\text{M}$  FITC 付きのプライマー (表 2) 加えた溶液 14  $\mu\text{l}$  を準備し、その混合液を 3  $\mu\text{l}$  ずつ、fluorescent labelled primer cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA) のジデオキシヌクレオチド (ddATP、ddGTP、ddCTP、ddTTP) を各々含んだ 4 種の A、G、C、T reagent 1  $\mu\text{l}$  に加えた。初期変性を 98°C で 10 分間行い、98°C 30 秒間、50°C 30 秒間、72°C 1 分

間を 20 サイクル、続いて 98°C で 30 秒間、72°C で 1 分間を 20 サイクル行った。自動塩基配列決定装置 DSQ-2000 DNA シークエンサー（島津製作所）を用いて、DNA 配列を解析した。PCR を行った時に生じる塩基の取込みエラーを考慮して、複数のクローンから塩基配列を得た。また、PCR 産物をクローニングせずに直接塩基配列決定をする場合は、増幅産物数百 ng にエキソヌクレアーゼ I（Amersham Pharmacia Biotech, USA）5 unit とエビ由来アルカリフォスファターゼ（Amersham Pharmacia Biotech, USA）0.5 unit を加え、37°C で 30 分間保温した後、85°C で 15 分間酵素を失活させた。続いて、シークエンス用プライマー 0.8pmol（表 1、図 5）と ABI Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit（Perkin-Elmer Applied Biosystems, USA）の ready reaction mix 2μl を加え、96°C にて 3 分間の初期変性を行い、96°C 30 秒間、50°C 25 秒間、60°C 4 分間を 31 サイクル反応させた。エタノール沈澱後 70%エタノールにて洗浄し、ホルムアミドに溶解した。ABI DNA シークエンサー model 373A（ABI、USA）を用いて塩基配列を解析した。

**2.8. 塩基配列の解析** 決定された塩基配列は、GENETYX-MAC version 8.0（Development, USA）Software を用いて解析した。DNA データベースに登録されているさまざまな生物における *Wee1* タンパク質アミノ酸配列を ClustalW（Thompson et al., 1994）を用いて解析し、近隣結合法（Saitou & Nei, 1987）により系統樹を作成した。また、1000 回繰返した場合のブートストラップ確率を求めた。系統樹の作図には、Program TREEVIEW（Page, 1998）を用いた。

**2.9. RT-PCR による卵巣以外の組織における *wee1* の発現の確認** 今回得られたギンブナの *wee1* 遺伝子が他の体細胞組織において発現しているかどうか調べるために、2 倍体ギンブナの脳、肝臓、腎臓、および卵巣、さらに 3 倍体ギンブナの卵巣とフナ属に属する金魚の卵巣より上述の **2.1.**および **2.2.**のように cDNA を逆転写し、上記 **2.9.**と同様の条件で PCR を行った。プライマーの組み合わせは、キナーゼドメイン内に設定された



プライマー WEU-3 (表 1) と WEL-11 (表 1)、およびアミノ末端側の減数分裂型特異的領域に設定されたプライマー WEU-7 と WEL-4 を用いた (図 6)。

**2.10. RT-PCR による卵巣における *wee1* の発現量の比較** 卵巣での *wee1* 遺伝子の発現を複数個体で確認した。2 倍体有性生殖ギンブナ 3 尾、3 倍体雌性生殖ギンブナ 3 尾の卵巣から上述の **2.1.** および **2.2.** のように mRNA を抽出して cDNA を合成した。これらの cDNA を鋳型にプライマー WEU-7 と WEL-4 を用いて PCR を行った。cDNA を含んだ反応液 50 $\mu$ l (最終濃度 ; 1 $\mu$ M WEL-7 プライマー、1 $\mu$ M WEL-4 プライマー、0.2mM dNTP、1 $\times$ PCR バッファー、*Taq* DNA ポリメラーゼ 2.5 units) を、94 $^{\circ}$ C 3 分間の初期変性の後、94 $^{\circ}$ C 1 分間、55 $^{\circ}$ C 30 秒間、72 $^{\circ}$ C 1 分間で 30 サイクルの反応を行い、72 $^{\circ}$ C 10 分間の伸長反応を行った。

**2.11. ノーザンハイブリダイゼーションによる mRNA 発現量の比較** ジゴキシゲニン (DIG) 標識プローブの合成は、PCR DIG プローブ合成キット (Roche, USA) を用いて行った。希釈した cDNA を鋳型にプライマー WEU-7 とプライマー WEL-4 を用い、反応液 50 $\mu$ l (最終濃度 ; 0.2 $\mu$ M 各プライマー、0.4mM dNTP、0.4mM PCR DIG 合成ミックス、1 $\times$ PCR バッファー、Expand High Fidelity DNA ポリメラーゼ 2.6 units) を、94 $^{\circ}$ C 3 分間で初期変性した後、94 $^{\circ}$ C 1 分間、55 $^{\circ}$ C 30 秒間、72 $^{\circ}$ C 1 分間を 30 から 35 サイクルの反応を行い、72 $^{\circ}$ C 10 分間の伸長反応を行った。

雌性生殖個体 3 尾、有性生殖個体 3 尾の卵巣から、上述の **2.1.**と同様に全 RNA を抽出した。全 RNA 5 $\mu$ g をホルムアルデヒド変性アガロースゲルで 1 $\times$ 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) 泳動バッファー (20mM MOPS、2mM 酢酸ナトリウム、1mM EDTA) 中で泳動した。泳動終了後、ゲルを 20 $\times$ SSC (3M NaCl、300mM クエン酸ナトリウム; pH7.0) 中に浸して、1 回につき 15 分間の平衡化を 2 回行った。20 $\times$ SSC を用い、ナイロンメンブレン (商品名 BIODYNE PLUS ; Pall BioSupport Division, USA) に一晩キャ

ピラリートランスファーした。終了後、UV クロスリンカーにて紫外線を  $120\text{mJ}/\text{cm}^2$  照射し RNA をメンブレンに固定した。

シグナルの検出には、Roche 社の DIG 発光検出キットを用いた。RNA 固定したメンブレンをハイブリダイゼーションバッグにいれ、1 枚につき 10ml のハイブリダイゼーション・バッファー (50% ホルムアミド、 $5\times\text{SSC}$ 、0.1% N-ラウロイルサルコシン、0.02% SDS、2% Roche ブロッキング試薬) を加えて、 $50^\circ\text{C}$  で 1.5 から 2 時間のプレハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション・バッファーを除き、 $95^\circ\text{C}$  で 5 分間熱変性した前述の DIG 標識プローブ (最終濃度 ;  $10\sim 20\text{ng}/\text{ml}$ ) を含んだハイブリダイゼーションバッファーをメンブレン 1 枚につき、10ml 加えて、 $50^\circ\text{C}$  で一晩のハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、メンブレンを洗浄液 1 ( $2\times\text{SSC}$ 、0.1% SDS) を用いて室温で 5 分間ずつ 2 回、洗浄液 2 ( $0.5\times\text{SSC}$ 、0.1% SDS) を用いて室温で 15 分間ずつ 2 回洗った。シグナルの検出には、DIG 標識核酸検出キット (Roche, USA) を用いた。メンブレンを、0.3% Tween 20 入りマレイン酸バッファー (100mM マレイン酸、150mM NaCl; pH7.5、0.3% Tween 20) で 1 分間平衡化した。続いて、ブロッキング溶液 (1% Roche ブロッキング試薬、100mM マレイン酸、150mM NaCl; pH7.5) 中に 1 時間浸した後、ブロッキング溶液で 10,000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (キットに添付) 液中で 30 分間インキュベートした。抗体溶液を捨て、0.3% Tween 20 入りマレイン酸バッファーで 2 回、1 回あたり 15 分間、メンブレンを洗浄した。洗浄液を捨てた後、検出バッファー (100mM Tris-HCl、100mM NaCl; pH 9.5) に 2 分間平衡化した。DIG 標識プローブに結合したアルカリフォスファターゼの基質である disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-yl)phenylphosphate (CSPD) を検出バッファーで 100 倍に希釈した溶液 (0.25mM CSPD) にメンブレンを浸し、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分間インキュベートした後、X 線フィルムに 3 時間感光させた。

### 3. 結果

**3.1. *wee1* ホモロークの cDNA 塩基配列** 3'-、5'-RACE および、*wee1* のほぼ全長を含むプライマー WEU-7 と WEL-8 (図 6) を用いた PCR 産物の塩基配列の解析から、3 倍体雌性生殖ギンブナの卵巣由来の *wee1* ホモロークの cDNA 塩基配列の全長を決定した (図 6; DDBJ Accession No. AB051198)。3 倍体雌性生殖ギンブナの卵巣由来の *wee1* ホモロークは、全長 1,934bp で 526 個のアミノ酸残基をコードしており、3'-非転写領域に cytoplasmic polyadenylation element site (CPE 部位; TTTTAAAT) とポリ A シグナル (AATAAA) を含んでいた (図 6)。一方、2 倍体有性生殖ギンブナの卵巣からもほぼ全長の 2 つの *wee1* ホモロークの cDNA が単離できた。これらは、プライマー WEU-7 と WEL-8 を用いて増幅することにより得られた。この大きさが 1,799b と 1,796bp の 2 つのホモロークの違いは、アスパラギン酸をコードする GAU (486-488bp) の 3 つの塩基の欠失があるかどうかのみであった。2 倍体個体から得られた 1,799bp の *wee1* ホモロークの塩基配列 (2n(gat+)) と、3 倍体個体から得られた *wee1* ホモロークの同じ範囲での比較では、塩基配列の違いは 4 箇所で見られたが、いずれも非転写領域にあり、タンパク質のアミノ酸配列を変化するものではなかった (図 7)。ギンブナ卵巣由来の *wee1* ホモロークがコードするタンパク質は、8 個の Ser-Pro/Thr-Pro モチーフ (図 6) 含んでいた。8 個の Ser-Pro/Thr-Pro モチーフのうち、7 個がアミノ末端に存在した。

**3.2. *wee1* 遺伝子の構造** 上記で *wee1* の cDNA 配列が決定された 3 倍体雌性生殖ギンブナと同一個体のゲノム DNA を用い、ゲノム領域の *wee1* 遺伝子の塩基配列を決定した。*wee1* cDNA のほぼ全長を含んで設定したプライマー WEU-7 と WEL-8 を用いて行った long-PCR により、約 6.3kb (type I) (図 8、9; DDBJ Accession No. ) と 6.1kbp (type II) (DDBJ Accession No. ) の PCR 産物が得られた。ゲノム領域の塩基配列と先に決定した cDNA の塩基配列とを比較した結果、type I、type II 共に、12 個のエクソンを含んでい

ること、開始コドン Met が第2エクソンに存在すること、イントロンとエクソンの各境を特徴づける GT/AG ルールに忠実であることがわかった (図8)。wee1 遺伝子のゲノム領域配列からスプライスされると予測されるイントロン配列を除いたエクソンのみからなる配列を、上述の3倍体の wee1 cDNA の配列と比較すると、type I と cDNA では非転写領域に1箇所、type II と cDNA では非転写領域に5箇所とオープンリーディングフレーム (ORF) 領域に4箇所の塩基置換が見られた。しかし、いずれの塩基置換も同義置換であって、type I と type II がコードすると予測されるアミノ酸配列は同じであった。また、type I と type II の塩基配列を較べると、エクソン領域の非転写領域に4箇所と ORF 領域に4箇所の変異が見られた。同様に、イントロン領域にも平均して70bpに1回塩基置換が見られ、挿入/欠失もイントロン全体では約30箇所で見られた。それらの大半は1-13bpのものであったが、特に第8イントロンに約200bpの挿入がtype Iにあるために、type I と type II の全長が大きく異なる原因となっていた。また、ゲノム領域中のイントロンの挿入がある場所を、ヒト wee1B 遺伝子との場合と比較すると、アミノ酸コード領域に含まれる3倍体雌性生殖ギンブナ wee1 における10個のイントロンのうち、8個のイントロンがヒト wee1 におけるイントロンの挿入部位に一致した (図10)。

**3.3. さまざまな種の Wee1 とのアミノ酸配列の比較** 一般的に、Wee1 のプロテインキナーゼドメインはさまざまな種で良く保存されていて、逆にアミノ末端はそれぞれの種で特異的な配列を有する (Sun et al., 1999)。他種のアミノ酸配列と比較した結果、今回得られたギンブナ卵巣からの Wee1 ホモログのアミノ酸配列も、プロテインキナーゼドメインはよく保存されていることが明らかになった (図11A の□内)。プロテインキナーゼドメインのアミノ酸配列を比較した結果、アフリカツメガエル Wee1 とは69.9%という高い相同性を示した。ギンブナ Wee1 と出芽酵母、真菌の仲間、ムラサキウニ、ショウジョウバエ、ゴカイの仲間、アフリカツメガエル、マウス、ヒト等のさまざま

まな生物の Wee1 アミノ酸配列との比較により得られた系統樹 (図 1 1 B) から、脊椎動物の Wee1 は2つのグループに別れることが示唆された。一方は、HeLa 細胞由来のヒト Wee1A、骨芽細胞由来マウス Wee1、腎臓培養細胞由来ラット Wee1 を含むグループ (体細胞分裂型 ; mitotic type) であった。他方は、精巣において特異的発現を示すヒト Wee1B、卵巣あるいは成熟卵由来のアフリカツメガエル Wee1 を含むグループ (減数分裂型 ; meiotic type) であった。今回得られたギンブナ卵巣由来の Wee1 は、ブートストラップ確率は低いが (58.1%)、後者のグループ、アフリカツメガエル Wee1 とヒト Wee1B の減数分裂型に含まれた (図 1 1 B)。また、2つの Wee1 グループに特徴的であると思われるアミノ末端側の配列を今回得られたギンブナ卵巣由来 Wee1 と2つのヒト Wee1 とそれぞれ比較すると、体細胞分裂型のヒト Wee1A とは 31.9%、減数分裂型のヒト Wee1B とは 35.1%の相同性を示し、ギンブナ卵巣由来 Wee1 は減数分裂型であると考えられた。

**3.4. 組織別の発現解析** 2 倍体有性生殖ギンブナの脳、肝臓、腎臓、卵巣、および 3 倍体雌性生殖ギンブナの卵巣、金魚の卵巣由来の cDNA を用いた PCR を行った結果、*wee1* 遺伝子の組織特異的発現が見られた (図 1 2)。上記のアミノ酸配列全長を用いた系統樹解析で、2つのタイプの *wee1* 遺伝子が存在することが示唆されたため、2つのタイプに保存性が高いと思われる Wee1 のキナーゼドメイン領域と、2つのタイプでそれぞれに特異的であると思われるアミノ末端側、の2つの領域について RT-PCR を行った。Wee1 のキナーゼドメインに設定したプライマー WEU-3 と WEL-11 (図 1 3) を用いた PCR の結果、すべての組織から PCR 産物が検出された。しかしながら、5'-側の非転写領域に設定した WEU-7 とアミノ末端側に設定したプライマー WEL-4 (図 1 3) を用いた PCR では、2 倍体ギンブナおよび 3 倍体ギンブナと金魚の卵巣由来 cDNA を用いた場合でのみ PCR 産物が検出され、他の組織からは検出されなかった。また、5'-側の非転写領域に設定した WEU-7 とキナーゼドメインに設定した WEL-11 とのプライマーの組み合わせでは、2

倍体ギンブナおよび3倍体ギンブナと金魚の卵巣由来cDNAに明瞭なバンドが検出され、また肝臓においても微かな増幅産物が見られた。

**3.5. RT-PCR およびノーザンハイブリダイゼーションによる卵巣における発現量の確認** 2倍体有性生殖ギンブナ3尾、3倍体雌性生殖ギンブナ3尾の卵巣由来 cDNA を鋳型にプライマー WEU-7 (図13) と WEL-4 (図13) を用いた RT-PCR の結果、2倍体ギンブナと3倍体ギンブナで PCR 産物の増幅量に差は見られなかった (図14)。また、プライマー WEU-7 と WEL-4 を用いた PCR 産物をプローブにしたノーザンハイブリダイゼーションにおいても2倍体有性生殖ギンブナ3尾、3倍体雌性生殖ギンブナ3尾の卵巣いずれにもシグナルが得られ、2倍体ギンブナと3倍体ギンブナでシグナルに強さに差は見られなかった (図15)。RNA サイズマーカー (0.28~5.58kb, Promega, USA) から求められたバンドの大きさは、約 1,800b で、前述の cDNA の全長とほぼ一致していた。

#### 4. 考 察

本研究では、細胞周期に関与する遺伝子 *wee1* に注目し、有性生殖ギンブナと雌性生殖ギンブナにおける、その遺伝子構造の解析と発現についての比較を行った。また、同時に魚類では初めてゲノム DNA 領域における *wee1* 遺伝子の単離をおこなって塩基配列を解析した。

本研究で単離された雌性生殖ギンブナ卵巣と有性生殖ギンブナ卵巣由来 *wee1* cDNA は、塩基配列上は 4 箇所の塩基置換が見られたがいずれも非翻訳領域にあり、アミノ酸配列上に差はなかった。定量的に mRNA 量をそろえて合成した cDNA を鋳型として用いた RT-PCR の結果からも、それぞれの卵巣においてバンドの濃さは同じで、その増幅量に差は認められなかった。またノーザンブロットハイブリダイゼーションのシグナルの強度にも差は認められなかった。これらの結果から、雌性生殖ギンブナの卵巣においても有性生殖ギンブナの卵巣においても、機能的にも同じ *wee1* 遺伝子が発現していることがわかり、Wee1 が雌性生殖卵が形成される上で直接に関わる因子ではないことが示唆された。

しかしながら、2 倍体ギンブナから得られた *wee1* cDNA 配列は、3 倍体の *wee1* cDNA 配列を元に、その内部に設定したプライマーを用いた RT-PCR によって得られており、この為、2 倍体ギンブナの cDNA 配列では、3'-UTR に設定したプライマー WEL-8 より下流側 70bp は欠ける。3 倍体ギンブナの *wee1* cDNA 配列では、この領域には cytoplasmic polyadenylation element site (CPE 部位、5'-TTTTTAAT-3') とポリ A シグナルが含まれていた。CPE 部位は、その下流にあるポリ A シグナルとの距離によって polyA 伸長を制御することが知られており、両配列間の距離を実験的に短縮すると、本来の転写時期よりも早まって、かつその鎖長が伸びる (Simon et al., 1992)。さらに、多くの母性 mRNA において、その翻訳が、ポリ A の長さによって調節されていることが知られていて、ポリ A 鎖が 30 bp 以下の時は翻訳が抑制された状態にあるが、その長さが 100 bp 以上に伸長

すると翻訳が活性化される (Sheets et al., 1994, 1995)。つまり、CPE 部位とポリ A シグナルの領域は、その mRNA について、いつ頃その翻訳が活性化されるのか、という情報を持っている。例えば、ギンブナに近縁種のキンギョの MPF のサブユニットである *cdc2* とサイクリン B では、3'-のこれらの翻訳制御領域は異なっており、CPE 部位は *cdc2* にはないが (Hirai et al., 1993)、サイクリン B には存在し (Hirai et al., 1992)、CPE 部位とポリ A シグナル間は約 100 bp である。今回得た有性生殖 (2 倍体) ギンブナ *wee1* ではこの情報を持った領域が明らかではない為、有性生殖ギンブナの翻訳制御が雌性生殖ギンブナと同じであるのか、塩基配列上は今のところ明らかではない。

いままでにも、酵母、キイロショウジョウバエ、マウス、アフリカツメガエルの Wee1、およびヒト Wee1A、Wee1B のアミノ酸配列を用いた系統樹は Nakanishi ら (2000) によって報告されているが、Nakanishi らはそれぞれの Wee1 の由来組織には注目しておらず、今回得られた Wee1 系統樹では、それぞれの Wee1 の由来組織に注目した結果、特に脊椎動物には 2 つの *wee1* グループがあることが明かとなった。体細胞組織由来の Wee1 からなるグループである体細胞分裂型と、生殖組織において顕著な発現を見せるヒト Wee1B や生殖組織由来の Wee1 からなるグループである減数分裂型である。今回得られたギンブナ卵巣由来 *wee1* cDNA は、系統樹解析において、ブートストラップ確率は低かったが減数分裂型に含まれ、また、2 つの *wee1* グループに特徴的であると思われるアミノ末端側の配列を 2 つのヒト Wee1、それぞれと比較すると、ヒト Wee1B に高い相同性を示したことから、減数分裂型であると考えられた。また、ヒト以外では、2 つのグループの *wee1* 遺伝子が両方とも単離されている種は未だないが、今回ギンブナのさまざまな組織で行った RT-PCR の結果から、魚類のギンブナにも、体細胞分裂型 *wee1* の存在が示唆された。体細胞組織由来の cDNA を鋳型に行った RT-PCR では、キナーゼドメイン領域に設定したプライマーを用いた場合は増幅産物のバンドが得られるが、アミノ末端側に設定した



プライマーを用いた場合には増幅産物が得られなかった。卵巣由来の cDNA の鋳型と同じプライマーを用いて RT-PCR を行うと、どちらのプライマーの組み合わせでも、増幅産物は得られた。これらの結果より、ギンブナにも、今回卵巣より得られた減数分裂型と考えられる *wee1* のほかに、減数分裂型とはアミノ末端側の配列は異なるが、Wee1 キナーゼドメインの配列を有する体細胞分裂型 *wee1* が、体細胞組織で発現していると考えられる。ヒトでは今までに2つのタイプの *wee1* が単離されていたが、ギンブナでも2つのタイプの *wee1* が存在していることが示唆され、また同時に、Wee1 の系統樹においては、バフンウニの Wee1 がアウトグループとなり、魚類であるギンブナの卵巣由来 Wee1 が一方のグループの根元から分岐している。これらの結果からは、この2つの遺伝子グループの関係については、ヒト、および、ギンブナでそれぞれの種内で重複した遺伝子とは考えられず、*wee1* 遺伝子における2つのグループは、無脊椎動物にはひとつしかない *wee1* 遺伝子が、脊椎動物の共通の祖先において重複したことが示唆された。

ゲノム領域より今回得られた2つのギンブナ *wee1* 遺伝子を比較すると、コードしているアミノ酸配列には差はなかったが、イントロン領域には多くの塩基置換、欠失/挿入が見られた。この2つのギンブナ *wee1* 遺伝子、type I と type II はどちらも、今回得られた減数分裂型 *wee1* cDNA のアミノ酸配列と同じ配列をコードしていた。今回ギンブナの肝臓や脳、腎臓で存在が示唆された体細胞分裂型 *wee1* はアミノ末端側のアミノ酸配列が減数分裂型 *wee1* とは異なると考えられるので、type I と type II は減数分裂型 *wee1* 遺伝子の2つの対立遺伝子(あるいは、コイ科魚類で起ったゲノム倍化によって重複した遺伝子)であろうと考えられる。type I と type II では、第8イントロンに 200bp の大きな欠失 (type II) /挿入 (type I) が見られる。この領域を指標に type I と type II のどちらを持っているかを見分ける為に、その領域を含むプライマーを用いた PCR を行った結果、2倍体にも type I、type II は含まれていた (データは示していない)。また、2倍体では type I

あるいは type II しかない個体も type I と type II 両方ある個体も見られたが、3 倍体では type II は全ての個体に見られ、type I と type II 両方ある個体か、type II のみの個体しか見られなかった。これらのことが何を意味するのか、今のところ不明であるが、2 つの *wee1* 遺伝子はイントロン領域が大きく異なっていることから、これらの遺伝子上流に存在すると考えられる発現調節領域に違いがないか興味深い。ギンブナの雌性生殖機構に関しては、今回得られた卵巣由来の *wee1* 遺伝子の直接の関与については可能性は少ない。しかし、今のところ、魚類卵巣における Wee1 タンパク質の機能やその発現調節は明らかになっておらず、雌性生殖機構におけるなんらかの働きは否定できない。また、本研究において、卵巣における *wee1* 発現量は、雌性生殖ギンブナと有性生殖ギンブナの間に差は見られなかったが、翻訳制御については明らかになっておらず、今後、翻訳についても解析が必要である。また、今回は放卵直前の成熟卵を持った卵巣を使用しているため、減数分裂時の各ステージでの *wee1* の発現量の変化などは反映されていない。雌性生殖ギンブナと有性生殖ギンブナの各ステージの卵細胞を用いて、*wee1* の発現量の変化を比較する必要もあると考えられる。今後、Wee1 タンパク質の機能解析を通して、減数分裂に関与するかなどの卵巣での働きの解析が必要である。

## 5. 参 考 文 献

- An, Y. Z., Li, Q. H., Wang, Y. F., and Gui, J. F. (1999)  
Comparative investigation on spindle behavior and MPF activity changes during oocyte maturation between gynogenetic and amphimictic crucian carp  
*Cell Res.*, 9, 145-154
- Asahida, T., Kobayashi, T., Saitoh, K., and Nakayama, I. (1996)  
Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffer containing high concentration of urea  
*Fisheries Sci.*, 62, 727-730
- Draetta, G., Luca, F., Westendorf, J., Brizuela, L., Ruderman, J., and Beach, D. (1989)  
Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF  
*Cell*, 56, 829-838
- Dunphy, W. G., Brizuela, L., Beach, D., and Newport, J. (1988)  
The *Xenopus cdc2* protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis  
*Cell*, 54, 423-431
- Frohman, M. A., Dush, M. K. and Martin, G. R. (1988)  
Rapid production of full length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single genespecific oligonucleotide primer  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8998-9002
- Hamada, S., and Fujita, S. (1983)  
DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry  
*Histochemistry*, 79, 219-226
- Hirai, T., Yamashita, M., Yoshikuni, M., Tokumoto, T., Kajiura, H., Sakai, N. and Nagahama Y. (1992)  
Isolation and characterization of goldfish cdk2, a cognate variant of the cell cycle regulator cdc2  
*Dev. Biol.*, 152, 113-120
- Hirai, T., Yamashita, M., Yoshikuni, M., Lou, Y.-H. and Nagahama Y. (1992)  
Cyclin B in fish oocytes: Its cDNA and amino acid sequences, appearance during maturation, and induction of p34<sup>cdc2</sup> activation  
*Mol. Rep. Dev.*, 33, 131-140
- Kirpichnikov, W. S. (1979)  
Geneticheskie Osnov Selektzii Rib (魚類育種遺伝学)  
翻訳版発行：恒星社厚生閣、269-288 (魚類の雌性発生、Cherfas, N. B.)

小林 弘 (1976)

3倍体ギンブナの卵形成における成熟分裂の細胞学的観察  
魚類学雑誌, 22, 234-240

小林 弘 (1982)

日本および日本周辺地域の倍数性ブナの分布  
日本女子大学紀要 家政学部 第29号 145-161

Masui, Y., and Markert, C. L. (1971)

Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes  
J. Exp. Zool., 177, 129-146

Millar, J. B. A., and Russell, P. (1992)

The *cdc25* M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase  
Cell, 68, 407-410

Mueller, P. R., Coleman, T. R., and Dunphy, W. G. (1995)

Cell cycle regulation of a *Xenopus* Wee1-like kinase  
Mol. Biol. Cell, 6, 119-134

Murakami, M. and Fujitani, H. (1997)

Polyploidy-specific repetitive DNA sequences from triploid ginbuna (Japanese silver crucian carp, *Carassius auratus langsdorfi*)  
Genes Genet. Syst., 72, 107-113

Murakami, M. and Fujitani, H. (1998)

Characterization of repetitive DNA sequences carrying 5S rDNA of the triploid ginbuna (Japanese silver crucian carp, *Carassius auratus langsdorfi*)  
Genes Genet. Syst.,

Murakami, M. S., and Vande Woude, G. F. (1998)

Analysis of the early embryonic cell cycles of *Xenopus*; regulation of cell cycle length by *Xe-wee1* and *Mos*  
Development, 125, 237-248

Nakajo, N., Yoshitome, S., Iwashita, J., Iida, M., Uto, K., Ueno, S., Okamoto, K., and N. Sagata (2000)

Absence of *wee1* ensures the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes  
Genes Develop., 14, 328-338

Nakanishi, M., Ando, H., Watanabe, N., Kitamura, K., Ito, K., Okayama, H., Miyamoto, T., Agui, T., and Sasaki, M. (2000)

Identification and characterization of human Wee1B, a new member of the Wee1 family of Cdk-inhibitory kinases  
Genes Cells, 5, 839-847

Nurse, P. (1990)

Universal control mechanism regulating onset of M-phase  
Nature, 344, 503-508

Ohara, K., Ariyoshi, T., Sumida, E., Sitizyo, K. and Taniguchi, N. (2000)

Natural hybridization between diploid crucian carp species and genetic independence of triploid crucian carp elucidated by DNA markers  
Zool. Sci., 17, 357-364

小野里 坦、鳥澤 雅、草間 政幸 (1983)

北海道に於ける倍数体フナの分布  
魚類学雑誌, 30, 184-190

Page, R. D. M. (1996)

TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers  
Comput. Applic. Biosci., 12, 357-358

Russell, P., and Nurse, P. (1987)

Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog  
Cell, 49, 559-567

Saitou, N., and Nei, M. (1987)

The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree  
Mol. Biol. Evol., 4, 406-425

Sheets, M. D., Fox, C. A., Hunt, T., Vande Woude, G. and Wickens, M. (1994)

The 3'-untranslated regions of *c-mos* and cyclin mRNAs stimulate translation by regulating cytoplasmic polyadenylation  
Genes Dev., 8, 926-938

Sheets, M. D., Wu, M. and Wickens, M. (1995)

Polyadenylation of *c-mos* mRNA as a control point in *Xenopus* meiotic maturation  
Nature, 374, 511-516

Simon, T., Tassan, J. P., and Richter J. D. (1992)

Translational control by poly(A) elongation during *Xenopus* development: repression and enhancement by a novel cytoplasmic polyadenylation element  
Genes Dev., 6, 2580-2591

Sun, Y., Dilkes, B. P., Zhang, C., Dante, R. A., Carneiro, N. P., Lowe, K. S., Jung, R., Gordon-Kamm, W. J., and Larkins, B. A. (1999)

Characterization of maize (*Zea mays* L.) *Wee1* and its activity in developing endosperm  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 4180-4185

高山 清次 (1989)  
雌性生殖系フナの実験動物化  
博士論文 (麻布大学大学院)

Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994)  
CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through  
sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice  
Nucl. Acids Res., 22, 4673-4680

Vrijenhoek, R. C., Dawley, R. M., Cole, C. J., and Bogart, J. P. (1989)  
A list of the known unisexual vertebrates  
New York State Museum, Bulletin 466, 19-23

Yamashita, M., Onozato, H., Nakanishi, T., and Nagahama, Y. (1990)  
Breakdown of the sperm nuclear envelope is a prerequisite for male pronucleus formation: direct  
evidence from the gynogenetic crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*  
Develop. Biol., 137, 155-160

山下 正兼 & 長濱 嘉孝 (1992)  
魚類卵成熟および受精の分子機構  
細胞工学, 11, 583-592

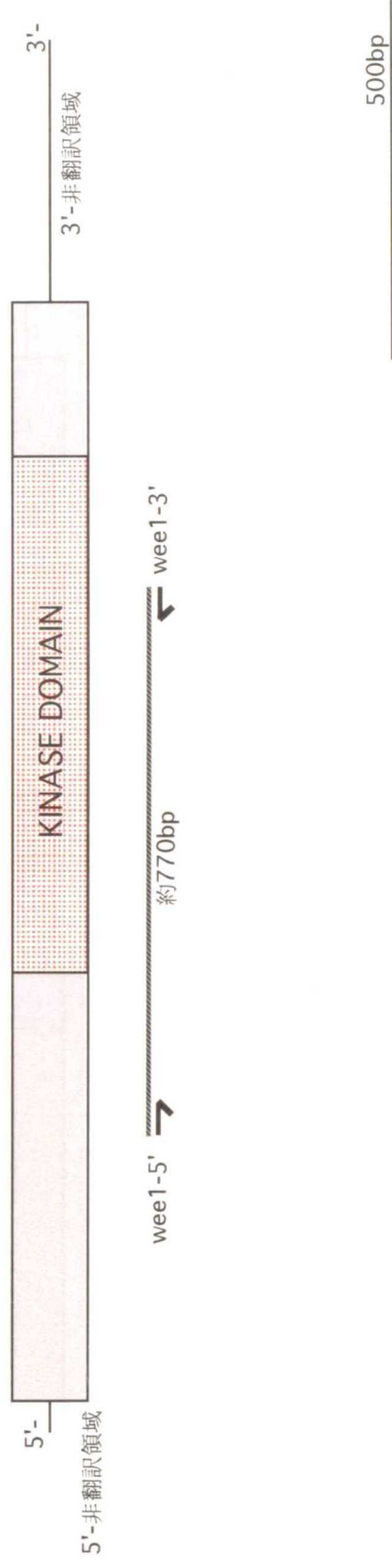


図1 3倍体ギンブナの卵巣由来wee1 cDNAとdegenerateプライマーの位置の模式図；実線は非翻訳領域を、ボックスはORFを示す。ボックス内がの領域は、キナーゼドメインを表している。矢印は、各プライマーの位置を示す。

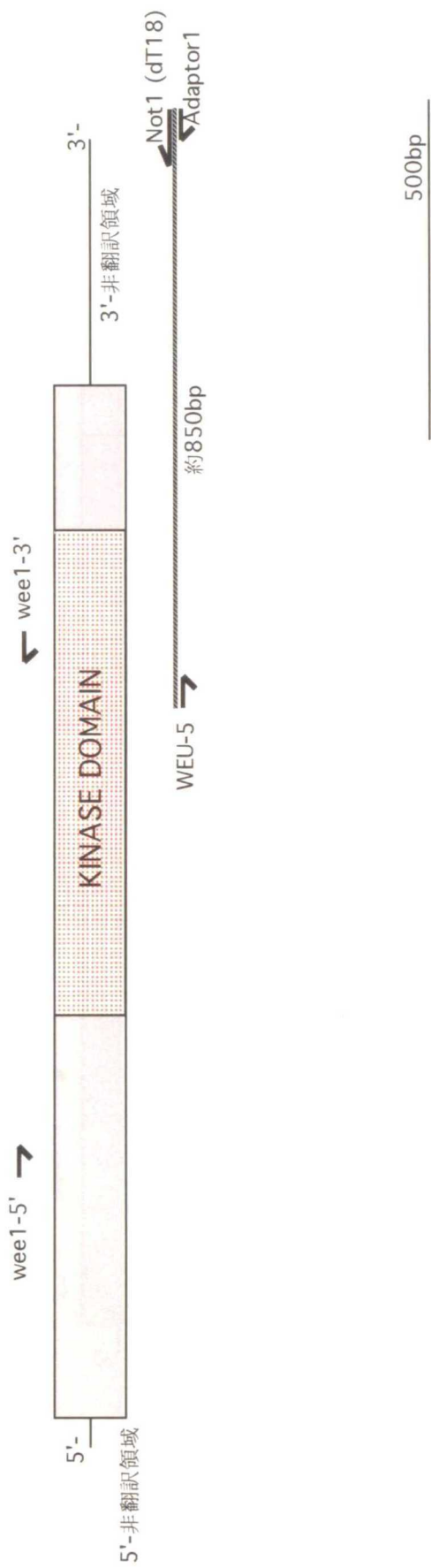


図2 3倍体ギンブナの卵巣由来wee1 cDNAと3'-RACEに用いたプライマーの位置の模式図：実線は非翻訳領域を、ボックスはORFを示す。ボックス内がの領域は、キナーゼドメインを表している。矢印は、各プライマーの位置を示す。



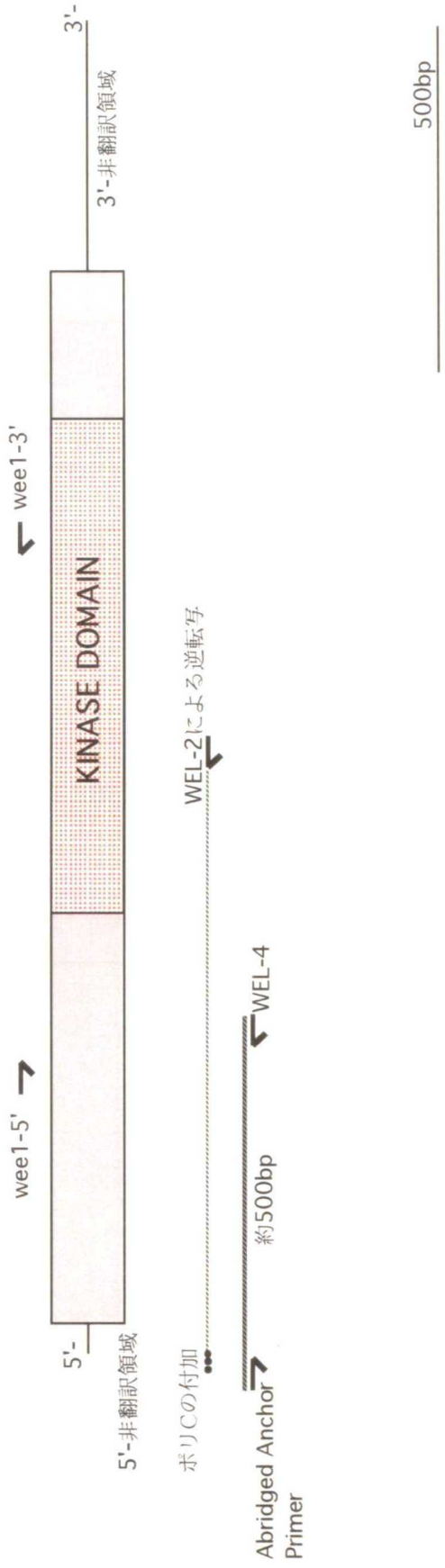


図3 3倍体ギンブナの卵巣由来wee1 cDNAと5'-RACEに用いたプライマーの位置の模式図：実線は非翻訳領域を、ボックスはORFを示す。ボックス内がの領域は、キナーゼドメインを表している。矢印は、各プライマーの位置を示す。

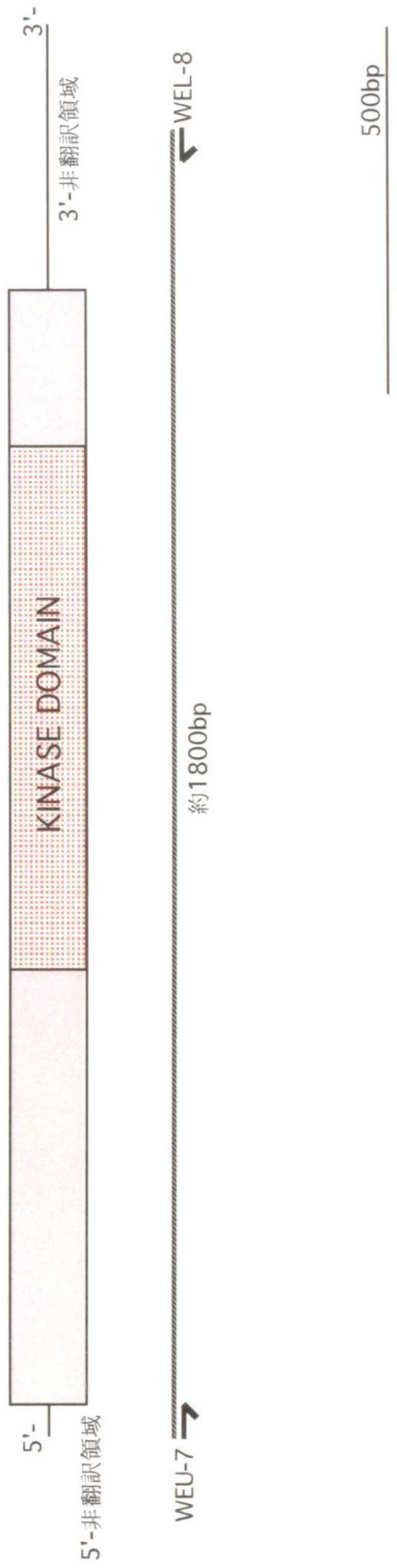


図4 3倍体ギンブナの卵巣由来wee1 cDNAと全長を含む領域の増幅に用いたプライマーの位置の模式図：実線は非翻訳領域を、ボックスはORFを示す。ボックス内がの領域は、キナーゼドメインを表している。矢印は、各プライマーの位置を示す。

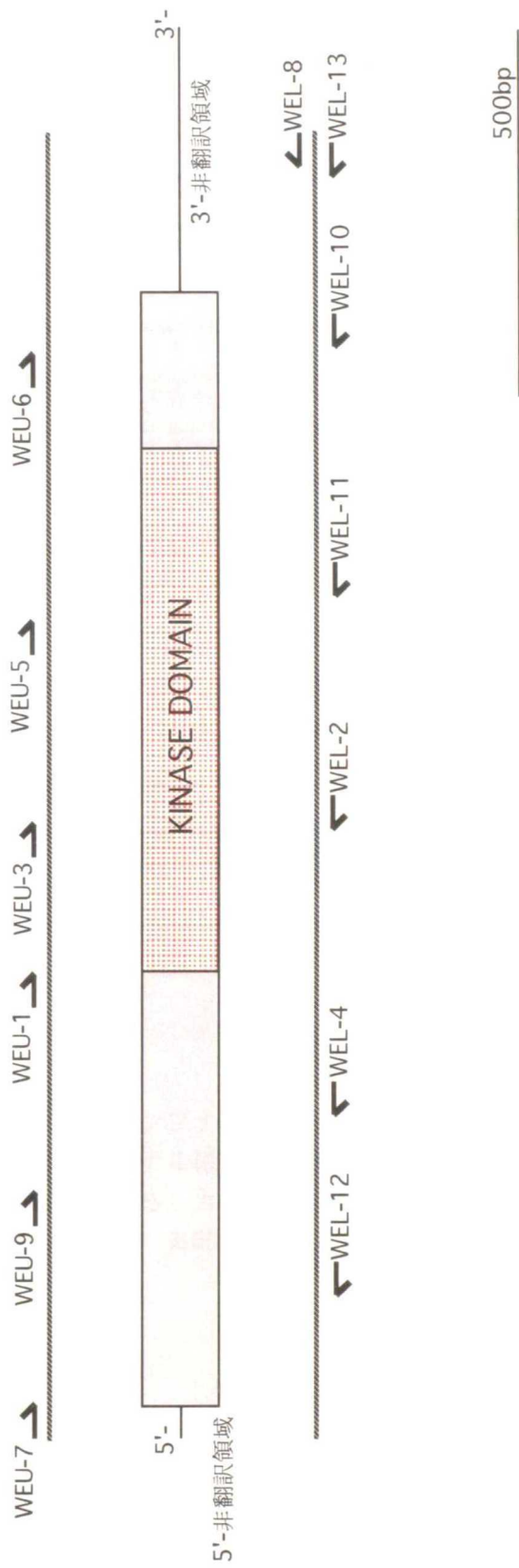


図5 3倍体ギンブナの卵巣由来wee1 cDNAと塩基配列の決定用いたプライマーの位置の模式図：実線は非翻訳領域を、ボックスはORFを示す。ボックス内が の領域は、キナーゼドメインを表している。矢印は、各プライマーの位置を示す。

WEU-7  
AAGGACCTCATTAAAGTTTCGCCCAAGTTCAAACGGTGGACCATGCGTTCTCATCGTGGTCTGAAATGGCCTCTGTGAATGCAGCACAGCAGCATCTAAACTTCTCCAGCAGTG 120  
M A S V N A A Q Q H L N F S S S G

GGGAGGAGGACAGCAGTGCACAATAGCTTTGAATGGGCGCACAGGAGTGTCCAGT CAGAAGCCCTGTCCGACACCCCGGTACAGCGCCACCAGGAGTATCACCGTTTCCCCCT 240  
E E D S S D N S F E W A H R S V P V R S P C R T P R V Q R H R T R S I T V S P S

CCAACCTACGCTCCCATCCGTATGCTGCTTGGAAAACTCCGGCTTTGTGACTCTCCAGTACACCAAGAGTTTGTGTCTAAAGCGACTCTACCTTGTCTAGCAGCAAGCCAC 360  
N P T S P I P Y A A W K K L R L C D S P S T P K S L L S K A T L P C S S S K P R

GTCGCAGTCAAAGATTCTTCGTTTGTCTACTGCTTTGATCGTATGCCCTCTGTAACATTAACCTTTCACACCAGAGCCGTGCGCAGGAACAGTGAACACCACAAGAGGAGAGCC 480  
R S Q R F L R L S T A F D R M P S V N I N P F T P E T V R R R N S E H H K R K S Q

WEU-4  
AAAGGAGTGTATGATGATGATGACGATGCACAAAGATCTAAGGAACTCAGAACTCTCAGAGGATGAAAATTTCTTCTCCCTCAAAGAGGCCAGCAGTGTGAGCCGCATGCTGTCCG 600  
R S D D D D D A Q R S K E T Q N S S E D E N F F L P S K R P A V S A R M L S R

GTTATGAGAGTGAAGTTCTAGAGCTGAGCTGCATCGGTGGGGCAGTTTGGTACTGTGTATCGCTGTGTGAAGAGTTGGATGGTTGCATGTACGCCATCAAGCGCTCCGGCAGGCCATA 720  
Y E S E F L E L S C I G V G E F G T V Y R C V K R L D G C M Y A I K R S R R P I

WEU-3  
TTG CAGGCTCAGCCAACGAGCAGCTGGCTTGAAGGAAGTGTACGCCCATGCAAGTGTGGCCATCACCTCATGTTGTGGTTACTACTCCGCATGGGCTGAGGATGACCATATGATTA 840  
A G S A N E Q L A L K E V Y A H A V L G H H P H V V R Y Y S A W A E D D H M I I

TACAAAATGAGTACTGTGATGGTGGTAGCCTCCATGATGCTATAACTGAAAAAGGAGAGCAAGGAGATTTCTTCTGTTCCTGAGATGAGTGTCTGCTCCTCAGGTCTCCATGGGGC 960  
Q N E Y C D G G S L H D A I T E K G E Q G E F F C V P E M S D L L L Q V S M G L

WEU-5  
TCAAAATACATCCACAGCCTAGGCCATGTCATCTCGACATTAACCCAGTAATATTTTTATCCGCCGTAGACCAAGCTCTAGTGCAGGTGGAGAGGGAGATAGTGAAGAAGAGGATGAAA 1080  
K Y I H S L G L V H L D I K P S N I F I R R R P S S S A G G E G D S E E E D E S

GCCCTCTATGGGTTGTATATAAAATTTGGTGAATGCTGGTGTGATGTAACATCCATCTCAAATCTCGGGTAGAGGAAGGGATAGCCGCTTCTTGGCCTTTGAGTCTCTGCAGAGGACT 1200  
P S Y G V V Y K I G D L G H V T S I S N P R V E E G D S R F L A F E V L R E D Y

WEU-11  
ATACACATCTTCTAAAGCAGATATTTTTGCAC TGGGCTGACTGTGTTATTAGCTCCGGAGCTCCACCACTTCTCAGAATGGAGATGACTGGCACAGCTCAGGCAAGGTTGCGTAC 1320  
T H L P K A D I F A L G L T V L L A A G A P P L P Q N G D D W H S L R Q G A L P

CCAGCCTGCCCAAGGATTACCAGCACCTTTAAAGACCTTCTAAAGACCTGTTGGATCCTGATCCTACAACATAGGCCATCGCATCTGCATTGTGTCGTATGATGACTGCGCAAGG 1440  
S L P Q E L P A P F K D L L K T L L D P D P T T R P S A S A L C R H D V L R K E

AGAGGATAGGCAAACTGGTGCACAACCTCGTAAGGAATTAATGTGAAAAGTT CAGAACTGTATGCTGAAAAGAGAATCAAGGAGGCCGACTGGCTGCTACCTCACCCAGCAGT 1560  
R I G K L A A A Q L R K E L N V E K F R T A M L E R E L K E A R L A A T S P Q Q S

CATCACACTAGGTTCTTTCAAAGCTGGGAGGAAGCTTGTGGCAGAAGTGTGCCGTTCCATGAGCTTTGGTTTCCCTGGATCTAGCACTGAAATTGTCATGACTGCATGTGCG 1680  
S Q L G S L P K A G R K L V G R S A A R S M S F G F P G Y \*

TCAGACCTACATACTGTATTTCTGGAATGCAATAGTCAGATGTTTTGACATTAATCAGCATTTGTCACTCGTGAACCTCAGATCCTCTTTTGTGTTAACCTTAAATCACCATTAT 1800  
TCATAGTTTTTTTGTGGCATGAATCAGTGCATATTTATAGTTTGTGTTGAATGGTACATTTATCTTTCAATTAAGTGGTCTTTTAAATGTAATAAAGTTTTAAATGTTAAAAA 1920  
AAAAAAAAAAAAA

WEU-B

図6 3倍体ギンブナ卵巢から単離されたwee1 cDNAの全長：CPE部位は□、ポリAシグナルは下線によって示してある。矢印は各々のプライマー位置を示している。カイネースドメインは、SP/TPモチーフにはの模様を付けた。矢印は各々プライマーを示す。

		WEU-7 →			
3n	1	AAGGACCTCATTAAAGTTTT	CGCGCC	AAGTTCAAACGTTGGACCATGCGTTCATCTCA	60
2n(gat+)	1		G	.....	35
			Met		
3n	61	GGTGGTCTGAAATGGCCTCTGTGAATGCAGCACAGCAGCATCTAAACTTCTCCAGCAGTG			120
2n(gat+)	36	.....			95
3n	121	GGGAGGAGGACAGCAGTGACAATAGCTTTGAATGGGCGCACAGGAGTGTTCAGTCAGAA			180
2n(gat+)	96	.....			155
3n	181	GCCCCTGTCGGACACCCCGGGTACAGCGCCACCGCACCCAGGAGTATCACCGTTTCCCCCT			240
2n(gat+)	156	.....			215
3n	241	CCAACCTACGTCCTCCATTCCGTATGCTGCTTGGAAAAAACTCCGGCTTTGTGACTCTC			300
2n(gat+)	216	.....			275
3n	301	CCAGTACACCAAAGAGTTTGCTGTCTAAAGCGACTCTACCTTGCTCTAGCAGCAAGCCAC			360
2n(gat+)	276	.....			335
3n	361	GTCGCAGTCAAAGATTCCTTCGTTTGTCTACTGCTTTTGATCGTATGCCCTCTGTAAACA			420
2n(gat+)	336	.....			395
3n	421	TTAACCTTTTACACCAGAGACCGTGCAGGAACAGTGAACACCACAAGAGGAAGAGCC			480
2n(gat+)	396	.....			455
3n	481	AAAGGAGT	GAT	GATGATGATGACGATGCACAAAGATCTAAGGAAACTCAGAACTCGTCAG	540
2n(gat+)	456	.....			515
3n	541	AGGATGAAAATTTCTTCTCCCTCAAAGAGGCCAGCAGTGTCAGCCCCGCATGCTGTCGC			600
2n(gat+)	516	.....			575
3n	601	GTTATGAGAGTGAGTTTCTAGAGCTGAGCTGCATCGGTGTGGCGAGTTTGGTACTGTGT			660
2n(gat+)	576	.....			635
3n	661	ATCGCTGTGTGAAGAGGTTGGATGGTTGCATGTACGCCATCAAGCGCTCGCGCAGGCCTA			720
2n(gat+)	636	.....			695
3n	721	TTGCAGGCTCAGCCAACGAGCAGCTGGCCTTGAAGGAAGTGACGCCCATGCAGTGTGG			780
2n(gat+)	696	.....			755
3n	781	GCCATCACCTCATGTTGTGCGTACTACTCCGCATGGGCTGAGGATGACCATATGATTA			840
2n(gat+)	756	.....			815
3n	841	TACAAAATGAGTACTGTGATGGTGGTAGCCTCCATGATGCTATAACTGAAAAAGGAGAGC			900
2n(gat+)	816	.....			875
3n	901	AAGGAGAGTTCTTCTGTGTTCTGAGATGAGTGATCTGCTCCTTCAGGTCTCCATGGGGC			960
2n(gat+)	876	.....			935

図7 2倍体ギンブナの卵巢由来wee1cDNA (2n(gat+)) と3倍体ギンブナの卵巢由来wee1cDNA (3n) の塩基配列の比較：・は同じ配列を、□は塩基置換の起こっていた箇所を示す。■は、2倍体のもう一方の配列においてGATが欠ける場所を示している。MetとStopはそれぞれ開始コドンと終止コドンを示す。矢印は増幅に用いたプライマーを示す。

3n	961	TCAAATACATCCACAGCCTAGGCCTAGTGCATCTCGACATTAACCCAGTAATATTTT	1020
2n(gat+)	936	.....	995
3n	1021	TCCGCCGTAGACCAAGCTCTAGTGCAGGTGGAGAGGGAGATAGTGAAGAAAGGATGAAA	1080
2n(gat+)	996	.....	1055
3n	1081	GCCCCCTCCTATGGGGTTGTATATAAAATTGGTGACTTGGGTCATGTAACATCCATCTCAA	1140
2n(gat+)	1056	.....	1115
3n	1141	ATCCTCGGGTAGAGGAAGGGGATAGCCGCTTCTTGGCCTTTGAGGTCCTGCGAGAGGACT	1200
2n(gat+)	1116	.....	1175
3n	1201	ATACACATCTTCCTAAAGCAGATATTTTTGCACTGGGCCTGACTGTGTTATTAGCTGCCG	1260
2n(gat+)	1176	.....	1235
3n	1261	GAGCTCCACCACTTCCTCAGAATGGAGATGACTGGCACAGCCTCAGGCAGGGTGCCTAC	1320
2n(gat+)	1236	.....	1295
3n	1321	CCAGCCTGCCCCAGGAGTTACCAAGCACCCCTTTAAAGACCTTCTAAAGACCCTGTTGGATC	1380
2n(gat+)	1296	.....	1355
3n	1381	CTGATCCTACAACCTAGGCCATCTGCATCTGCATTGTGTCGTCATGATGTAAGCAAGG	1440
2n(gat+)	1356	.....	1415
3n	1441	AGAGGATAGGCCAACTGGCTGCACAACCTCGTAAAGGAATTAATGTGGAAAAGTTAGAA	1500
2n(gat+)	1416	.....	1475
3n	1501	CTGCTATGCTGGAAAAGAACTCAAGGAGGCCGACTGGCTGCTACCTCACCGCAGCAGT	1560
2n(gat+)	1476	.....	1535
3n	1561	CATCACAACCTAGGGTCTCTTCCAAAAGCTGGGAGGAAGCTTGTGGGCAGAAGTGCTGCC	1620
2n(gat+)	1536	.....	1595
3n	1621	GTTCCATGAGCTTTGGTTTCCCTGGATACTAGCACTGAAATTGTGCATGTAAGTGCATGTCG	1680
2n(gat+)	1596	.....	1655
3n	1681	TCAGACCTACATACTGTATTTCTGGAAATGCAATAGTCAGATGTTTTAGCATTAAATCAGCA	1740
2n(gat+)	1656	.....	1715
3n	1741	TTTGTCACTCGTGAAACTTCAGATCCTCTTTTTGTCGTTAACCTTAAATCACCATTAT	1800
2n(gat+)	1716	.....	1775
3n	1801	TCATAGTTTTTTTGTGGCATGAATCAGTGCATATTTATAGTTTGCTGTTGAATGGTACA	1860
2n(gat+)	1776	.....	1799
3n	1861	TTTATCTTTTCAATTAAGTGGTCTTTTTAATTGTAATAAAGTTTTTAAATGTTAAAAA	1920
3n	1921	AAAAAAAAA	1930

Stop

WEL-8

図7 2倍体ギンブナの卵巢由来weel cDNA (2n(gat+)) と3倍体ギンブナの卵巢由来weel cDNA (3n) の塩基配列の比較 (続き)

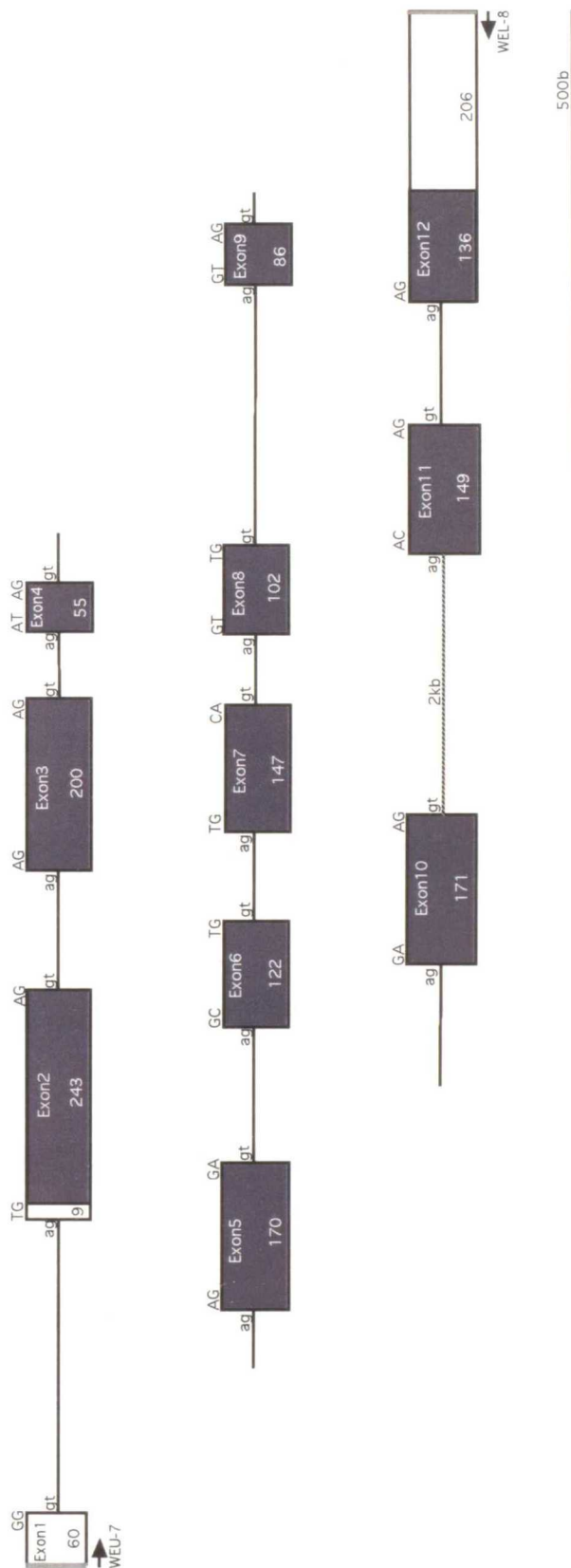


図8 3倍体ギンブナのwee1遺伝子のゲノム領域(type I)の模式図：白いボックスは非転写領域を、黒いボックスは転写領域を、実線はイントロン領域を示す。ボックスと実線の両端のアルファベットは、エクソンとイントロンの末端の塩基配列を表している。矢印は増幅に用いたプライマーを示す。

10 20 30 40 50 60  
GGACCTCATTAAAGTTTTTCGCGCCGAGTTCAAACGTGGTGGACCATGCGTTCATCTCAGG Exon 1

70 80 90 100 110 120  
GTAAGTTGAAATTGCATGTATGTGGTTCAAAGCAGCATAATAAGACCATGTGAGTGACCT

130 140 150 160 170 180  
AAGATATATTTTGAGAGAATCTGTAATGTGTTTATCTTTTCACAACAAATTTATGAGAT

190 200 210 220 230 240  
CCTTGAGATAATGAGGCCTAAGTTACCCAAGGAGACTAATCTCTTAACCTTGATTGTTT Intron 1

250 260 270 280 290 300  
ACCTTACATTTTGTGTTTGTGGTACATTTTAATTACATATAATGTAAAATAAATAAAAT

310 320 330 340 350 360  
GAAACAACACCTCACAAATTGCTAAGATCAAATTTATTGAACACCATAAATAATTGTATAG

370 380 390 400 410 420  
GCCATCTATAGTCCACTCTAGTTATCCACATTGATTAACCATTAATTTACACATTAGTT

430 440 450 460 470 480  
GCCATACTAACCCCTTTTTTCTCCTTAAATCTGTAACATTTTTCTGACTGCAGTGGT

490 500 510 520 530 540  
CTGAAATGGCCTCTGTGAATGCAGCACAGCAGCATCTAAACTTCTCCAGCAGTGGGGAGG  
M A S V N A A Q Q H L N F S S S G E E

550 560 570 580 590 600  
AGGACAGCAGTGACAATAGCTTTGAATGGGCGCACAGGAGTGTCCAGTCAGAAGCCCT Exon 2  
D S S D N S F E W A H R S V P V R S P C

610 620 630 640 650 660  
GTCGGACACCCCGGGTACAGCGCCACCGCACCAGGAGTATCACCGTTTCCCCCTCCAACC  
R T P R V Q R H R T R S I T V S P S N P

670 680 690 700 710 720  
CTACGTCTCCATTCCGTATGCTGCTTGGAAAAAATCCTGGCTTTGTGACTCTCCAGTA  
T S P I P Y A A W K K L R L C D S P S T

730 740 750 760 770 780  
CACCAAGGTGACCTTGACCTGCCTCAGATTCATGTAACCTTTGATGTGGTGACCATCTG Intron 2  
P K

図9 3倍体ギンブナの *wee1* 遺伝子のゲノム領域の塩基配列 (type I)

は非転写領域を、は ORF 領域を示す。塩基配列の下にアミノ酸配列が示されている。



790 800 810 820 830 840  
 CTGTATGCTTTTGCAGTAGCAATACATTTGGCCCTGTAAAGAATTGCTTGATGTTTATAT Intron 2

850 860 870 880 890 900  
 AATCGAATTTCTCTTCCCACAGAGTTTGCTGTCTAAAGCGACTCTACCTTGCTCTAGCA  
 S L L S K A T L P C S S S

910 920 930 940 950 960  
 GCAAGCCACGTGCGCAGTCAAAGATTCCTTCGTTTGTCTACTGCTTTTGATCGTATGCCCT Exon 3  
 K P R R S Q R F L R L S T A F D R M P S

970 980 990 1000 1010 1020  
 CTGTAAACATTAACCCCTTTCACACCAGAGACCGTGCGCAGGAACAGTGAACACCACAAGA  
 V N I N P F T P E T V R R N S E H H K R

1030 1040 1050 1060 1070 1080  
 GGAAGAGCCAAAGGAGTGATGATGATGATGACGATGCACAAAGGTAACCGCTCTTTCCTT Intron 3  
 K S Q R S D D D D D D A Q R

1090 1100 1110 1120 1130 1140  
 CAAGCAACGACATTTTAGGAACTAGATTTTACACTGAAGTACCATTACCTTACAGATCTA Exon 4  
 S K

1150 1160 1170 1180 1190 1200  
 AGGAAACTCAGAACTCGTCAGAGGATGAAAATTTCTTCTCCCCTCAAAGGTATGGTTTC  
 E T Q N S S E D E N F F L P S K

1210 1220 1230 1240 1250 1260  
 AAAGACCATTGCTTATCCTTGTTTTATATGTAGTAGGTTTGTCTTAATCCCACCAAAG Intron 4

1270 1280 1290 1300 1310 1320  
 CTTTGGCAAATCTATTTTGTCTCTCATACGGTCTCCCATCTGTTGCCCTTTAGAGGCCA  
 R P

1330 1340 1350 1360 1370 1380  
 GCAGTGTGAGCCCGCATGCTGTCGCGTTATGAGAGTGAGTTTCTAGAGCTGAGCTGCATC Exon 5  
 A V S A R M L S R Y E S E F L E L S C I

1390 1400 1410 1420 1430 1440  
 GGTGTGGGCGAGTTTGGTACTGTGTATCGCTGTGTGAAGAGGTTGGATGGTTGCATGTAC  
 G V G E F G T V Y R C V K R L D G C M Y

図9 3倍体ギンブナの *wee1* 遺伝子のゲノム領域の塩基配列 (type I) (続き)

1450	1460	1470	1480	1490	1500	
GCCATCAAGCGCTCGCGCAGGCCTATTGCAGGCTCAGCCAACGAGTGAGTCAGCACTGCC						Exon 5
A I K R S R R P I A G S A N E						
1510	1520	1530	1540	1550	1560	
AGCCACATTGGGCTTCATGTTCTCAGTTTTCCAAATTTAAAACCCCTAAGGACTATTCTA						Intron 5
1570	1580	1590	1600	1610	1620	
AATCTGGTTAGATTCTGTATATGGTTTTTGTGCTTCAATGAATCCTAAACCATTAGAGTT						
1630	1640	1650	1660	1670	1680	
CTTTATTTGTCTCTTCAGGCAGCTGGCCTTGAAGGAAGTGTACGCCCATGCAGTGTGG						
Q L A L K E V Y A H A V L G						
1690	1700	1710	1720	1730	1740	
GCCATCACCCCTCATGTTGTGCGTTACTACTCCGCATGGGCTGAGGATGACCATATGATTA						Exon 6
H H P H V V R Y Y S A W A E D D H M I I						
1750	1760	1770	1780	1790	1800	
TACAAAATGAGTACTGTGATGGTAGGACAGAAGCTCACAAAACACTACATTGACGGTCATGT						Intron 6
Q N E Y C D G						
1810	1820	1830	1840	1850	1860	
GTTTGGTGTGAGATTTTTCTTTCCTCTTTAACAAGGCTAACTCTTTGGTTTATTACACT						
1870	1880	1890	1900	1910	1920	
TATAGTGGTAGCCTCCATGATGCTATAACTGAAAAAGGAGAGCAAGGAGAGTTCTTCTG						
G S L H D A I T E K G E Q G E F F C						
1930	1940	1950	1960	1970	1980	
TGTTCTGAGATGAGTGTCTGCTCCTTCAGGTCTCCATGGGGCTCAAATACATCCACAG						Exon 7
V P E M S D L L L Q V S M G L K Y I H S						
1990	2000	2010	2020	2030	2040	
CCTAGGCCTAGTGCATCTCGACATTAACCCAAGTGAGCTTTGTTTCTCGCATGCCTATAA						Intron 7
L G L V H L D I K P S						
2050	2060	2070	2080	2090	2100	
CACTTGATGATGAACTGGATTTGCATGTTTAATTTCCATTCTTTTTAGGTAATATTTT						Exon 8
N I F						

図9 3倍体ギンブナの *wee1* 遺伝子のゲノム領域の塩基配列 (type I) (続き)

2110	2120	2130	2140	2150	2160	
ATCCGCCGTAGACCAAGCTCTAGTGCAGGTGGAGAGGGAGATAGTGAAGAAGAGGATGAA						Exon 8
I	R	R	R	P	S	S
S	S	A	G	G	E	G
D	S	E	E	E	D	E
2170	2180	2190	2200	2210	2220	
AGCCCCTCCTATGGGGTTGTATATAAAATTGGTATCTACCCATTTTTACAGATGTTTAAAC						
S	P	S	Y	G	V	V
Y	K	I	G			
2230	2240	2250	2260	2270	2280	
TGTTAAATGCATAAATGAATTGCCAGTTTTGATTACAGTACATATTTGGGTCTTTAGTGA						
2290	2300	2310	2320	2330	2340	
CCTGAAACAACACATTTCTAACATTGATCTTAACTGCCCCAAAAGTAACTCTCTTGGA						
2350	2360	2370	2380	2390	2400	
TTATTGGAGGGGCAACAAAAGGACTTTTAATCTAAAGCAAATTAAGTTTTTCATCTAGC						
2410	2420	2430	2440	2450	2460	
TTAAACTAATTTGGTAACAATTCCATATGCTGTTCCAGGGTGTGTTTGACCCAGGTAAAAG						
2470	2480	2490	2500	2510	2520	
ACATTAGTATAGTAAAGTTGTTTGGCAATGAGCAACCTCGTCATATTTTCAGACTAAATGT						Intron 8
2530	2540	2550	2560	2570	2580	
CACCATTTCCGGTCCAATTATTTTCAGCCCTCCAAAATAATTTTGCCTAAATTTAAAAAT						
2590	2600	2610	2620	2630	2640	
GTGGGGTGTTTATTTTCAACCACATTTTCAGATGCCAATCTAATAATGACAATTACCAA						
2650	2660	2670	2680	2690	2700	
AAAAATGTATTGACATTTCAATTTGTAATAGGCTTTGATGTGCATTGCTAAATTAATGCAA						
2710	2720	2730	2740	2750	2760	
TATACATTAGCGTATGTTAATTTTATATAGTGCCTTTCCAGGCTCAAGGACACTTTAC						
2770	2780	2790	2800	2810	2820	
AAGGTACAAATAATCATCACAAAGAAACAATTTAAGTGGACATTGGACATTTGCCAATT						
2830	2840	2850	2860	2870	2880	
CAGGAAAAAATGTATATATGTGATGTGACATGAATATCTTGTTCTTAAGGTGACTTGGG						Exon 9
						D L G

図9 3倍体ギンブナの *wee1* 遺伝子のゲノム領域の塩基配列 (type I)

2890	2900	2910	2920	2930	2940	
TCATGTAACATCCATCTCAAATCCTCGGGTAGAGGAAGGGGATAGCCGCTTCTTGGCCTT						Exon 9
H V T S I S N P R V E E G D S R F L A F						
2950	2960	2970	2980	2990	3000	
TGAGGTCCTGCGAGAGGTATGGTATCTGTTTGAACCTTATCAGAATGTTCTGTATGTTGC						
E V L R E						
3010	3020	3030	3040	3050	3060	
AGAGTTTAAACCATAGCGATCTTATCCAGAGAACTGCACTGATCTTATATACAGTGGGTA						Intron 9
3070	3080	3090	3100	3110	3120	
TGAATTTAAAAACAAGCTTGCTGGATTTAATCAGTTGTTGTCTTTTTTTTTTTTTTTTT						
3130	3140	3150	3160	3170	3180	
TTTTTTTTTTTTTTCAGGACTATACACATCTTCCTAAAGCAGATATTTTTGCACTGGGCCT						
D Y T H L P K A D I F A L G L						
3190	3200	3210	3220	3230	3240	
GACTGTGTTATTAGCTGCCGGAGCTCCACCACTTCCTCAGAATGGAGATGACTGGCACAG						Exon 10
T V L L A A G A P P L P Q N G D D W H S						
3250	3260	3270	3280	3290	3300	
CCTCAGGCAGGGTGCGCTACCCAGCCTGCCCCAGGAGTTACCAGCACCCTTTAAAGACCT						
L R Q G A L P S L P Q E L P A P F K D L						
3310	3320	3330	3340	3350	3360	
TCTAAAGGTGCATTTTAAAAGCCGTACATGTGTGTGGTTTATTGAACGCTCTAATTTTCT						
L K						
3370	3380	3390	3400	3410	3420	
CTCTCTCTGATGTTCTTAACTCAGAGTTTACACTTTCCGAAAACATTCACTGGAGCA						
3430	3440	3450	3460	3470	3480	
GTGCCTTTCAAAGGTGCAGCTTTGTACCTTATTTGTCCTAAATCAGGGGTGCAAACA						Intron 10
3490	3500	3510	3520	3530	3540	
CACGGCCCGCAGAGGTGTCCAATCCGCCCGCAGCAGGATTTAACAACAATATAAAAAT						
3550	3560	3570	3580	3590	3600	
AAATTAACATCACTTTGAAAATTAATAAAGGGTGTTCGCTAAAATGTTTGATTTTGAA						

図9 3倍体ギンブナの *wee1* 遺伝子のゲノム領域の塩基配列 (type I) (続き)

3610 3620 3630 3640 3650 3660  
 TTTAAAGAGGAACAAATTAATTTACGTTATATTACGCCTCGGGAGTCTGGACACTTAACA  
 3670 3680 3690 3700 3710 3720  
 TGCGCCTTTTAAAGCGGCGCCAGAATCTCAAGCAGCATGAGGATATGATGATTGCTTGTG  
 3730 3740 3750 3760 3770 3780  
 TGACAATTTTCTTGTGATTTTAAACATGTCGAAAAGAAGACAGTTTGGCCTGGAACGATG  
 3790 3800 3810 3820 3830 3840  
 GACAGGCTATTTAAGGAGAAACGCCAATGTGTACGTTTAAATCACAATTCGTGGCTAATAT  
 3850 3860 3870 3880 3890 3900  
 TAAATTACACTGATGCACTGGACAGCTTCGTATAGAGAAAGGATATGAGCAAGGAGTGTG  
 3910 3920 3930 3940 3950 3960  
 CAATATTTATCGTGTACTAATATCCTAACGGGTTGTTTTAATGATGTGCGAACTGACATT  
 3970 3980 3990 4000 4010 4020  
 TTTTACTTTGAAAACTCAATGTGTGTTTTTTTTTTGTTGGCAGTGCAGATGTAGGCT  
 4030 4040 4050 4060 4070 4080  
 ATCAGGTTACAATAGAATTCAAATATGAGGCAAAAGTGCCTGTATTTTAAATATTTAT  
 4090 4100 4110 4120 4130 4140  
 ATCATGATCGTTAAGAAATGTCTAACTATAACAAGCGTGTGCTTTCCCGAATGTCAGTG Intron 10  
 4150 4160 4170 4180 4190 4200  
 CGATTGCTTTTATACAATAGCTCAACTAAAAAGATGCTAGTATTAAGTGTGTTATATCAG  
 4210 4220 4230 4240 4250 4260  
 TCACAATGCTGTCTATCTCTGTTTCGCCAAGGAAAAGTTTTTAAACAAGGCCAGAGAAAG  
 4270 4280 4290 4300 4310 4320  
 ACCAATTGTGTGCTCCGTGCAGCACTGAGTATTTTGTACGGAATGGATCTCTGTTTTT  
 4330 4340 4350 4360 4370 4380  
 GATCAAAGCATTTCATCTATGATTCCTGGCCTATTCATAGACAATCTCTAACTTCATT  
 4390 4400 4410 4420 4430 4440  
 TCTAAATGAATCGGCCGTTTTGAATGAGTCAGTTGATCACTCAAAGACCGAGATTTGCTG  
 4450 4460 4470 4480 4490 4500  
 CCACCTACTGATAGCTTTAGTGTCAATTTATTTATCCATGTCAGGCTTAAACCATCTCAA

図9 3倍体ギンブナの *wee1* 遺伝子のゲノム領域の塩基配列 (type I) (続き)

4510      4520      4530      4540      4550      4560  
 AACTCTCTGCAAAATATGGTTATGTCATTTTTGTGCAATATTGAACACCCCTAAAATAAC  
  
 4570      4580      4590      4600      4610      4620  
 CTAGCATCATCTTCAAAAAAAGTTTTCTATATGTGTATACACACACACACACACACA  
  
 4630      4640      4650      4660      4670      4680  
 CACACTTTTTTTGTAAATTATATTGTAGTTTGTATGGTTAATATTAATGAATTGTAAGC  
  
 4690      4700      4710      4720      4730      4740  
 AAAGTAGAGTTTAAACAAAAGGTAATTTGGCCCGCACAAAGGGGACATTTTCTGCAATCTG  
  
 4750      4760      4770      4780      4790      4800  
 GCCCTCAACCTTAAATGAGTTTGAGACCCCTGCCCTAAATGATACATATTAGTACATTCT  
  
 4810      4820      4830      4840      4850      4860  
 GAATGGGTACCACAGCTTTATAGAGAGCTCTTCAAAATAGTTGTGCCACTAACATTAAG Intron 10  
  
 4870      4880      4890      4900      4910      4920  
 TCCAAAACAAGAATGACATATAAAAAGTACAGGGTGTAAATGCACATTTTCTGCAATTCAT  
  
 4930      4940      4950      4960      4970      4980  
 ATTTACCCTATAATTTTTATTAGTGTTCCTAAATAAACACATTTGTGGAATTGTGACCC  
  
 4990      5000      5010      5020      5030      5040  
 TGGACCACAAAACAGTCATAAGGGTCAATTTTTGGAGTTTATTATTATTTTTTTTATAT  
  
 5050      5060      5070      5080      5090      5100  
 ACTATATCATCTGAAAGCTGAATAAATAAGCTTTTCACTGACGTGTGGTTTGTAGGATA  
  
 5110      5120      5130      5140      5150      5160  
 GGACAATATTTGGTTGAGATAATACTATTTGAAAATCTTGAATCTGAGGGTGCAAAAAA  
  
 5170      5180      5190      5200      5210      5220  
 AAATCTGAATATTGTAAAAAAGAAAATCGCCTTTTTTTTTTTTTTTTATGTTGT  
  
 5230      5240      5250      5260      5270      5280  
 CCAAATTAAGTTCTTAATCAAATTACTATCTTAATGATTTTTTTTTTTTTTTTTCAGAA  
  
 5290      5300      5310      5320      5330      5340  
 AAGAAAAATGTATAGTCTTGATCAATACAATGTGTTGTTGACTATTGCTACAAATATACC  
  
 5350      5360      5370      5380      5390      5400  
 TATGCAGCTTAAAGTCAGCATGAAGTCAAACTGACTTTGTTAGCCTGCATTGCTAGTCT

図9 3倍体ギンブナの *wee 1* 遺伝子のゲノム領域の塩基配列 (type I) (続き)

5410	5420	5430	5440	5450	5460	
TGATGTGAACAAGTAATCCAACCTGTTAGGTTTCTATGAGTGAGAGACAGAGCGGAGGAGC						Intron 10
5470	5480	5490	5500	5510	5520	
GCAAAACATAAAACCAATGGTCTATTCAATATTCAATTTTCAGCTGGAATTACGTCACCTGCT						
5530	5540	5550	5560	5570	5580	
CAACTTTTGGTTCATGCAGACTTTTAAGACTGGTTTTGTGGTTCAAAACCTGTTAGAACT						
5590	5600	5610	5620	5630	5640	
GGTACTTCTGGTTTTAAAGTTGATTACATTTTATATCAGTCTCTAATATGTACAATACAT						
5650	5660	5670	5680	5690	5700	
TTGTATATGATAGACCCTGTTGGATCCTGATCCTACAACCTAGGCCATCTGCATCTGCATT						
						T L L D P D P T T R P S A S A L
5710	5720	5730	5740	5750	5760	
GTGTCGTCATGATGTAAGTGCAGCAAGGAGAGGATAGGCCAACTGGCTGCACAACCTCGTAA						Exon 11
						C R H D V L R K E R I G K L A A Q L R K
5770	5780	5790	5800	5810	5820	
GGAATTAATGTGGAAAAGTTCAGAAGTCTGCTGGAAGGTGAGATGAGTTATCTTG						
						E L N V E K F R T A M L E R
5830	5840	5850	5860	5870	5880	
TGTTGGACTATTCTGTAGTACTCTATTTTCATGAGGTAGCATTATTTACTTTTTTGGACT						Intron 11
5890	5900	5910	5920	5930	5940	
AATCACTTCTGCTTATAGAGGTCTTAATGCCATGCCTTTTTACTTCTATTTAGAGAAC						
						E L
5950	5960	5970	5980	5990	6000	
TCAAGGAGGCCCGACTGGCTGCTACCTCACCGCAGCAGTCATCACAACCTAGGGTCTCTTC						Exon 12
						K E A R L A A T S P Q Q S S Q L G S L P
6010	6020	6030	6040	6050	6060	
CAAAAGCTGGGAGGAAGCTTGTGGGCAGAAGTGCTGCCCGTTCCATGAGCTTTGGTTTCC						
						K A G R K L V G R S A A R S M S F G F P
6070	6080	6090	6100	6110	6120	
CTGGATACTAGCACTGAAATTGTCATGTAAGTGCATGTCGTCAGACCTACATACTGTATTT						
						G Y *

図9 3倍体ギンブナの *wee 1* 遺伝子のゲノム領域の塩基配列 (type I) (続き)

6130 6140 6150 6160 6170 6180  
CTGGAATGCAATAGTCAGATGTTTTAGCATTAAATCAGCATTTGTCACCTCGTGAAACTTCA Exon 12

6190 6200 6210 6220 6230 6240  
GATCCTCTTTTTGTCGTTAACCCCTAACATCACCATTATTCATAGTTTTTTTTGTGGCA

6250 6260 6270 6280  
TGAATCAGTGCATATTTATAGTTTGCTGTTG

図9 3倍体ギンブナの *wee1* 遺伝子のゲノム領域の塩基配列 (type I) (続き)



```

CC -----MASVNAQQHLNFSSGEEEDSSDNSEFW-----AHRVVPVRSPCRTP-----RVQR---H 47
HsB -----MDDKDIDKELRQKLNFSYCEETEIEGQKVE-----ESREASSQTPKEKGEVQDSEAKGT-----PPWTPLSNVHE 65

CC RTRSTVSPS-----NPTSPIPYAAWKKLRLCDSPTPKLLSKATLPCSSSKPRRSQRFLRLST-----AFDRMPSVNIINPFT 121
HsB LDTSSEKDKESPQQILRLTPVSH-----PLKCPETPAQPDSSRSKLLPSDPSPTPKITMLSRVLSPTGKLP SRGPKHLKLTAP---LKDEMTSLALVNIINPFT 159

CC PETVRRNSEHHRKRSQRSDDDDDDAQSKETQNSSEDENFFLPSRPAVSARMLSRYESEFELELSCIGVGEFTVYRCVKRLDGCMYAIKRSSRRRIAGSANEQLALKEVYAHAVLGHHPH 241
HsB PESYKKLFLQSGGK-----RKIRRCVLRETNMASTRYEKEFEVEKIGVGEFTVYKIKRLDGCVYAIKRSMKFTTELSNENSALHEVYAHAVLGHHPH 253

CC VVRYYSAWAEDDHMIQNEYCDGGSLHDAITTEKGEQGEFFCVPEMSDLLLQVSMGLKYIHSLGLVHLDIKPSNIFIRRRP---SSSAGGEDSEEEDESPSYGVVYKIGDLGHVTSISNPR 359
HsB VVRYYSWAEDDHMIQNEYCNGGSLQAATSENTKSGNHFEFPKLDIILLQISLGLNYIHNSSWVHLDIKPSNIFICHKMQSESSGVIEEVENEADWFLSANVMYKIGDLGHATSINKPK 373

CC VEEGDSRFLAFEVLRBDYTHL PKADIFALGLTVLLAA GAPPLPQNGDDWHS LRQGALPSLPQELPAPFKDLIKTLLDPDPTRPSASALCRHDVLRKERIGKLAQAQLRKELNVEKFR TAM 479
HsB VEEGDSRFLANEILQBDYRHL PKADIFALGLTI AVAA GAESLPTNGAAWHHIRKGNFPDVPQELSEFSLLKKNMIQDAEQRPSAAA LARNTVLRPSLG---KTEELQQQLNLEKFKTAT 491

CC LRELKEARLAATS-----PQQSSQLGSLPKAGR---HHGDTGVSGTHTGSRSTKRLVGGKSARSSFT---- 527
HsB LRELREAAQAQSPQGYT---HHGDTGVSGTHTGSRSTKRLVGGKSARSSFT---- 541

```

図10 ギンブナWee1とヒトWee1Bのアミノ酸配列上でのイントロン挿入位置の比較：CCはギンブナWee1アミノ酸配列、HsBはヒトWee1Bのアミノ酸配列を示す。↑はコドンとコドンの間にイントロンが挿入されている事を示す。■はコドンの第1塩基と第2塩基の間にイントロンが挿入されているアミノ酸を示す。□はコドンの第2塩基と第3塩基の間にイントロンが挿入されているアミノ酸を示す。

(A)

```

Ca -----MASVNAAQQLNFSSSEEDSNDSEFEW-----AHRSPVPS-CRTI-----RVQR--H 47
Xen -----MRTAMSCGGGLVQRLDFSSSEEDGLSNGINE-----GPOKGSVPSVSR TNNPCF-----PI TPQRNERE 60
Xl -----MRMAMSCGGRLVQRLDFSSSEEDGLSNRINE-----APQKGSVPSVSR TNNPCF-----PI TPQRNERG 60
HsB -----MDDKIDKELRQKLNFSYCEETEIEGQKVE-----ESREASSQTEKGEVQDSEAKGT-----PWTL SNVHE 65
HsA MSFLSRQQPPPPRRRAGAACTLRQKLFSPGSCDCEEEEEEEEEEE-GSGHSTGEDSAFQEPDPLPARSPTEPGPERRR-SFGPAPGSPGELEEDLLLPQCPGADEAGGGAE GDSWEEEGF 119
Rn MSFLSRQQPPPTRRRAAAACSLRQKLFSPGSDCEEEEEEEEEEE-GSGHSTGEDSAFQEPDPLPARSPAEAEARRRRSPGAEPSSPGELEEDLLRGGGGGAQAAGGGAE GDSWEEEGF 119
Mm MSFLSRQQPPPTRRVGAAYSLRQKLFSPGSDCEEEEEEEEEEE-GSGHSTGEDSAFQEPDPLPARSPAEAEARRRRSPGAEPSSPGELEEDLLRGGGGGAQAAGGGAE GDSWEEEGF 119
wee1-5
Ca RTRSRITVSPS-----NPTFTTPYAAMWKLRLCDSPSPKSLLSKATLPCSSSKPRRSQRFLRLST-----AFDRMPSVNI NPF 121
Xen LSP TQELSPSSDYS PDPS--V-----GAECPGTPHYSTWKKLKLCDTPYTPKSLLYKTLPSGSRVHCRGQRLRFVAG-----TGAELDDPSLVNI NPF 150
Xl LSP TQELSPSSDYS PDPSDKGV-----GGCPCGTPHYSTWKKLKLCDTPYTPKSLLYKTLPSGSRVHCRGQRLRFVAG-----TGAETDPTLVNI NPF 153
HsB LDTSSSEKDESDQILRTPVSH-----PLKCPETPAQPSRSKLLPSDPSPTKML SRLVITHTGKLP SRGPKHLKTPAP---LKDEMTSLALVNI NPF 159
HsA GSSSPVKSPAAPYFLGSSFPVRCGGPGDASPRGCGARRAGEGRSPRPDPHGTTPHKTRFKRLRFLDTPHTPKSLLSKARVIDSSSVKLRGSSLFMDTEKSGKRFEDTROTPQVNI NPF 239
Rn GSSSPVKSPPTAYFLGSSFPVRCGGPGDASPRGCGVPRAMDDPCSPQDPYPTTPHKTRFKRLRFLDTPHTPKSLLSKARVIDSSSVKLRGSSLFMDTEKSGKRFEDTROTPQVNI NPF 239
Mm GSSSPVKSPSTAYFLSSPFPVRCGGPGDASPRGCGAPRAMDDPCSPQDPYPTTPHKTRFKRLRFLDTPHTPKSLLSKARVIDSSSVKLRGSSLFMDTEKSGKRFEDTROTPQVNI NPF 239

Ca IETVRRNS EHKRKSQRSDDDDDDAQRSKETQNSS EDENF LPSKRPAVSARMLGRYSEFLELSCIGVGEFGTVYRCVKRLDGCYAIKRKRRIAGSANEQALKEVYAHAVLGHHPH 241
Xen IESYRQTHFQPNGK-RKERPEDDCRTRDQMKYAEKEHPAVFQSKRFVLRETNMGRYKTEFLEIEKIGAGEFGSVFKCVKRLDGCYAIKRKRKPLAGSTDEQLALREVYAHAVLGHHPH 269
Xl IQSYRQTHFQPNGK-RKERPEDDCSDSQMFKTDKEHPAVFQSKRFVLRETNMGRYKTEFLEIEKIGAGEFGSVFKCVKRLDGCYAIKRKRKPLAGSTDEQLALREVYAHAVLGHHPH 272
HsB IESYKFLQSGGK-----RKIRR CVLRETNMGRYKTEFLEIEKIGAGEFGTVYKIKRDLGVCYAIKRSMKFTTEL SNENSALHEVYAHAVLGHHPH 253
HsA IDSLLLHS GGQRRRKR TYWDDSCG-EDMEASDYELEDETRPAKRITITESNMKSRYYTFEHELEKIGSGEFGSVFKCVKRLDGCYAIKRKRKPLAGSVDEQNALREVYAHAVLGHHPH 358
Rn IDPVMLLHS GGQCRGRKRAYFNDS--EDMEASDYEFEDTRPAKRITITESNMKSRYYTFEHELEKIGSGEFGSVFKCVKRLDGCYAIKRKRKPLAGSVDEQNALREVYAHAVLGHHPH 357
Mm IDPVMLLHS GRCRGRKRAYFNDS--EDMEASDYEFEDTRPAKRITITESNMKSRYYTFEHELEKIGSGEFGSVFKCVKRLDGCYAIKRKRKPLAGSVDEQNALREVYAHAVLGHHPH 357

Ca VVRYYSAWAEDDHMIQNEYCDGGSLHDAITEKGEQGEFFCVPEMSDLLQVSMGLKYIHSGLVHLDIKPSNIFIRRRP---SSSAGGEDSEEEDESPSYGVVYKIGDLGHVTSINPR 359
Xen VVRYYSAWAEDDHMIQNEYCNGGSLQDLIVDNNKEQGVLEQELKEILLQVSMGLKYIHSGLVHMDIKPSNIFICR---KQTELGQEE SDGDDLSGSLVYKIGDLGHVTSILNPO 385
Xl VVRYYSAWAEDDHMIQNEYCNGGSLQDLIMENKKGQVPEQELKEILLQVSMGLKYIHSGLVHMDIKPSNIFICR---KQTEVGEDESDGDDVAVASLVYKIGDLGHVTSILNPO 388
HsB VVRYYSAWAEDDHMIQNEYCNGGSLQAIAISENTRSGNHFEPEKLDKILLQISLGLNYIHSMSWMLDIKPSNIFICHMKQSESSGVIEEVENEADWFLSANVMYKIGDLGHVTSINPK 373
HsA VVRYYSAWAEDDHMIQNEYCNGGSLADAISENYRIMSIFYKEAELKDLLLQVGRGLRYIHSMSLVHMDIKPSNIFISR---TSIPNAASEEGDEDDWASNKVMFKIGDLGHVTRISSPQ 474
Rn VVRYYSAWAEDDHMIQNEYCNGGSLADAVISENYRVMYSYFTEAELKDLLLQVGRGLRYIHSMSLVHMDIKPSNIFISR---TSIPNAASEEGDEDDWASNKVMFKIGDLGHVTRISSPQ 473
Mm VVRYYSAWAEDDHMIQNEYCNGGSLADAISENYRVMYSYFTEAELKDLLLQVGRGLRYIHSMSLVHMDIKPSNIFISR---TSIPNAASEEGDEDDWASNKVMFKIGDLGHVTRISSPQ 473
wee1-3
Ca VEEGDSRFLAFEVLRDYTHLPKADIFALGLTVLLAAGAPPLPQNDDWHS LRQALPSLPQELPAPFKDLLKTLDPDPTTRPSASALCRHDVLRKERIGKLAQQLRKL NVEKFR TAM 479
Xen VEEGDSRFLANEILQEDYSQPKADIFALGLTIALAAGAAPLPCNEDSWHHIRKGNLPHVQLLAFVFLALLKLVHPDPVMPRPPAASLAKNSVLRRCV G--KAAELQKQLNVEKFK TAM 503
Xl VEEGDSRFLANEILQEDYRQLPKADIFALGLTIALAAGAAPLPCNEDGWHHIRKGNLPHVQLLAFVFLALLKLVHPDPATRPPATSLAKNSVLRRCV G--KAAELQKQLNVEKFK TAM 506
HsB VEEGDSRFLANEILQEDYRHLPKADIFALGLTAVAAAGESLPTNGAAMHWHIRKGNFPDVPQELSEFS SLLKNMIQPDAEQRPSAAALARNTRVLRPSL G--KTEELQQQLNLEKFKTAT 491
HsA VEEGDSRFLANEVLQENYTHLPKADIFALALTVVCAAGAEPLPRNGDWHHEIRQGRLPRIQVLSQEQTELLKVMIHDPDPERRPSAMLVKHSVLLSASR-KSAEQLRIELNAEKFNKSL 593
Rn VEEGDSRFLANEVLQENYSHLPKADIFALALTVVCAAGAEPLPRNGDWHHEIRQGRLPRIQVLSQEQTELLKVMIHDPDPERRPSAMLVKHSVLLSASR-KSAEQLRIELNAEKFNKSL 592
Mm VEEGDSRFLANEVLQENYSHLPKADIFALALTVVCAAGAEPLPRNGDWHHEIRQGRLPRIQVLSQEQTELLKVMIHDPDPERRPSAMLVKHSVLLSASR-KSAEQLRIELNAEKFNKSL 592

Ca LERELKEARLAAATSS---SQSSQLSGLSPKAGR--KLVGRSAARSMSFGPPGY 527
Xen LERELKAAKLAQTS GKDE--CSDLPPMSGFS CRGRK--RLVGAKNTRSLSFTCGGY 555
Xl LERELQAAKLAQD--E--CLDLPPVSGFS CRGRK--RLVGAKNARLSFTCGGY 554
HsB LERELREAQAQAGQGYT--HHGDTGVS GTHTGSRSTKRLVGGKSARS SFT--- 541
HsA LQKELKKAQAQA AAEER-ALFTDRMATRSTTQSNRTSRLIGKKMNRSVSLTIY-- 646
Rn LQKELKKAQAQA AAEERALLTDRMATRSTTQSNRTSRLIGKKMNRSVSLTIY-- 646
Mm LQKELKKAQAQA AAEERALLTDRMATRSTTQSNRTSRLIGKKMNRSVSLTIY-- 646

```

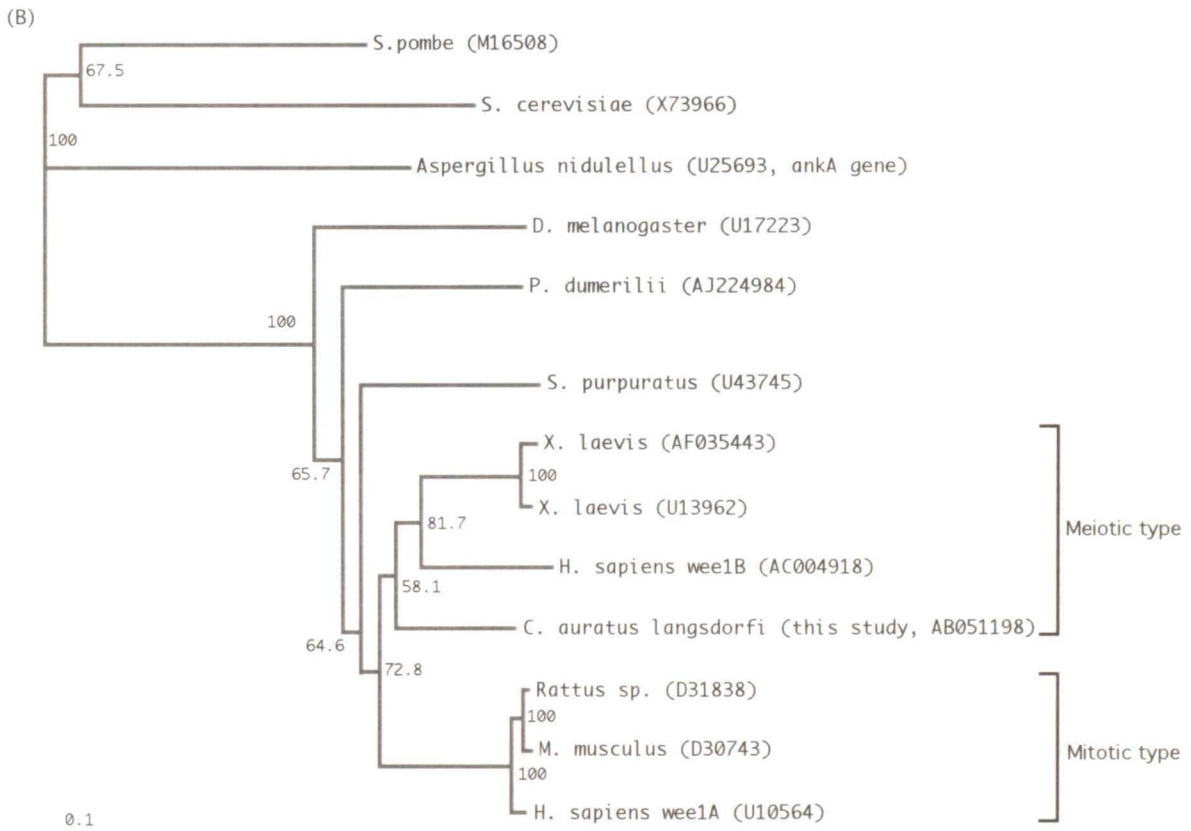


図1 様々な種のWee1アミノ酸配列の多重解析と系統樹：(A)多重解析結果Ca; C. a. langsdorfi, Xen; X. laevis (U13962), Xl; X. laevis (AF035443), HsB; Homo sapiens Wee1B HsA; Homo sapiens Wee1A, Rn; Ruttus sp., Mm; Mus musculusと (B)Wee1アミノ酸配列全長を用いたNJ法による系統樹

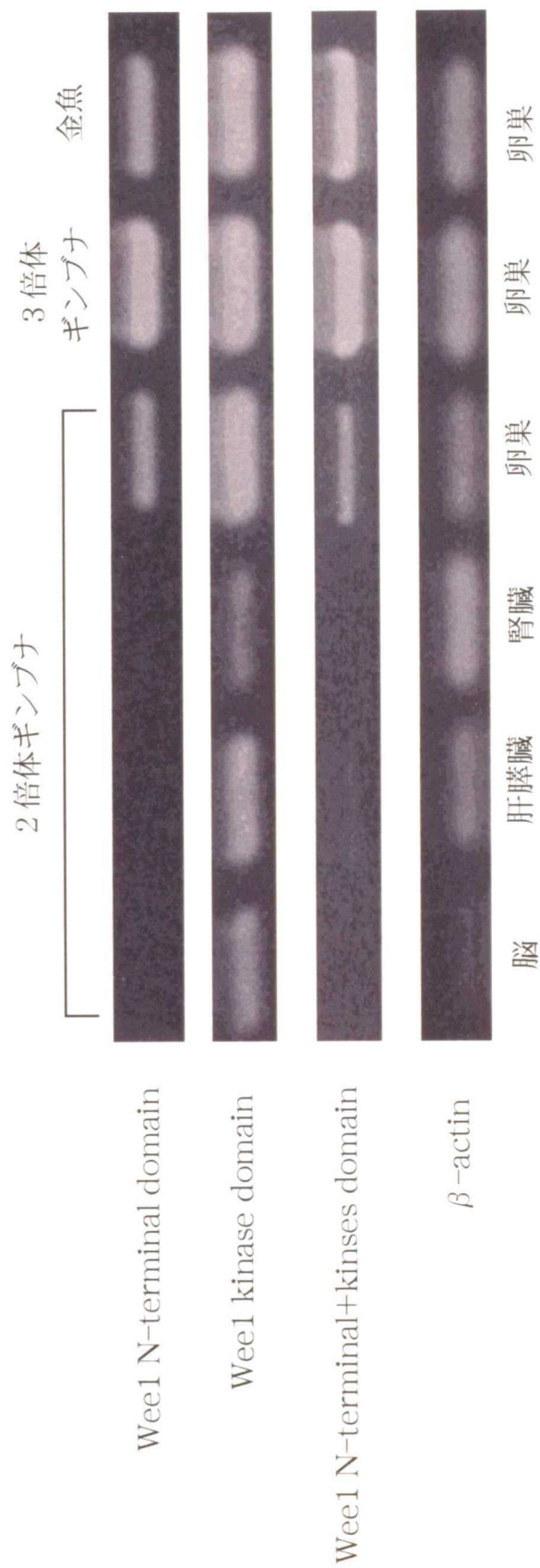


図 1 2 各組織におけるRT-PCRの結果：各組織のcDNAを鋳型に、Wee1 N-terminal domainはプライマーWEU-7とWEL-4を、Wee1 kinase domainはプライマーWEU-3とWEL-11を、Wee1 N-terminal+kinases domainはWEU-7とWEL-11を用いて増幅した。β-アクチンの増幅には、プライマーAUとAL690を用いた。

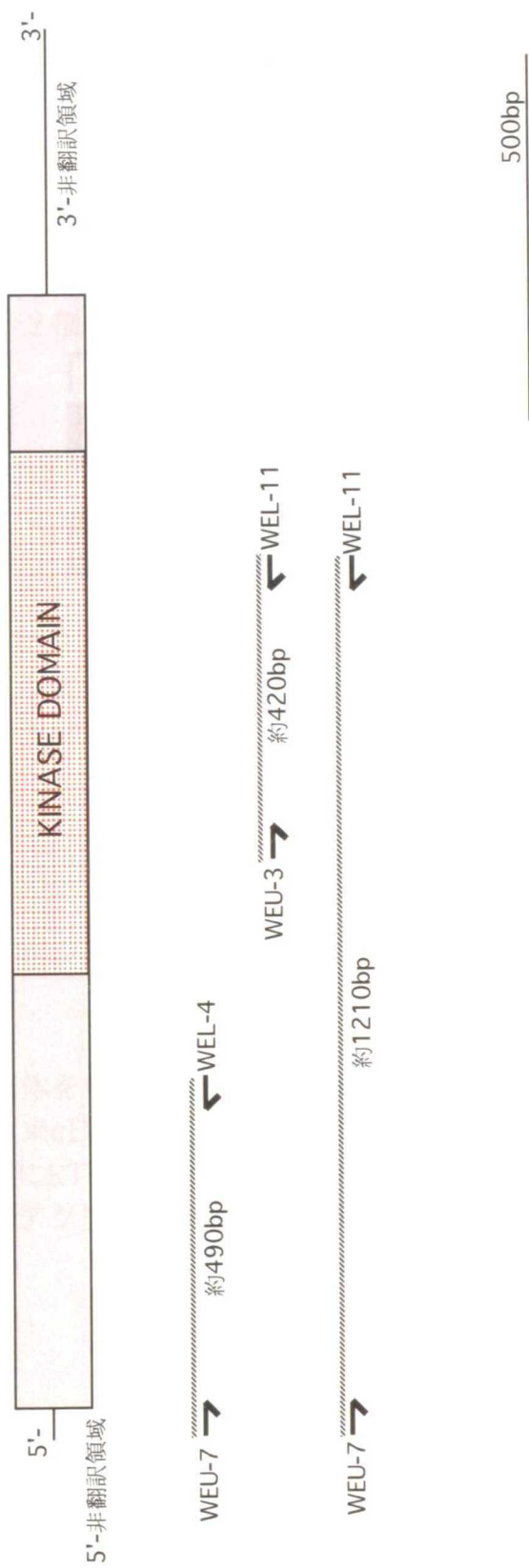


図 1 3 3 倍体ギンブナの卵巣由来wee1 cDNAとRT-PCRに用いたプライマーの位置の模式図：実線は非翻訳領域を、ボックスはORFを示す。ボックス内が の領域は、キナーゼドメインを表している。矢印は、各プライマーの位置を示す。

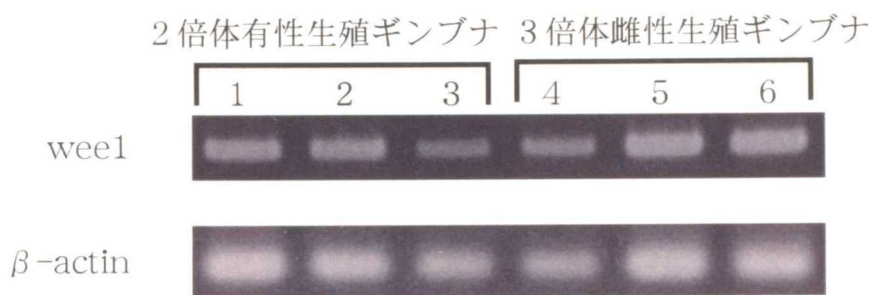


図14 複数個体を用いたRT-PCRの結果：レーン番号1～3は有性生殖ギンブナの卵巢由来cDNAを、レーン番号4～6は雌性生殖ギンブナの卵巢由来cDNAを鋳型にRT-PCRを行った。wee1の検出にはプライマーWEU-7とWEL-4を、 $\beta$ -アクチンの検出にはプライマーAUとAL690を使用した。

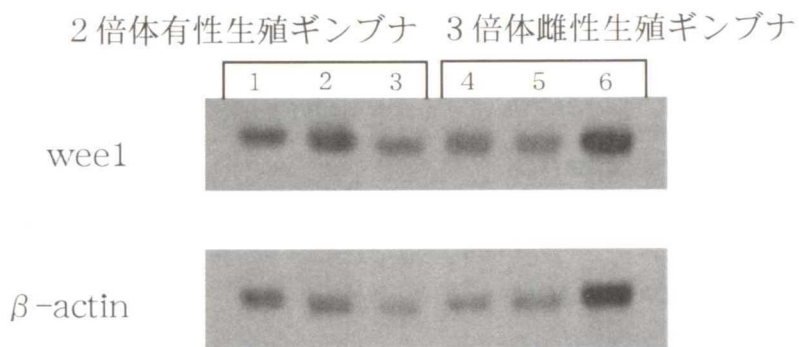


図15 ノーザンブロットハイブリダイゼーションの結果：レーン番号1～3は有性生殖ギンブナの卵巢由来cDNAを、レーン番号4～6は雌性生殖ギンブナの卵巢由来cDNAを鋳型にRT-PCRを行った。wee1の検出にはプライマーWEU-7とWEL-4を、 $\beta$ -アクチンの検出にはプライマーAUとAL690を使用した。

表1 プライマー各種

Primer name	used for	Sequence (5'-3')
wee1-5	PCR/Sequencing	G TSAAYATYAAYCCYTTYACHCC
wee1-3	PCR/Sequencing	DGCYARRAAVCGACTRRCMCC
WEU-1	Sequencing	ATGCTGTCGCGTTATGAGAG
WEL-2	5'-RACE/PCR/Sequencing	ATAGCATCATGGAGGCTACC
WEL-4	PCR/Sequencing/Probe synthesis	ATCACTCCTTTGGCTCTTCC
WEU-3	PCR/Sequencing	TGTTGTGCGTTACTACTCCG
WEU-5	3'-RACE/Sequencing	GATGAAAGCCCCTCCTATGG
WEU-6	Sequencing	GAGAGGATAGGCAAACCTGGC
WEU-7	PCR/Sequencing/Probe synthesis	GGACCTCATTAAAGTTTTTCG
WEL-8	PCR/Sequencing	CAACAGCAAACCTATAAATATG
WEU-9	Sequencing	TTGTGACTCTCCCAGTACACC
WEL-10	Sequencing	GGTGAGGTAGCAGCCAGTCGG
WEL-11	PCR/Sequencing	GAAGATGTGTATAGTCCTCTCGC
WEL-12	Sequencing	AAGGTTGGAGGGGGAAACGG
WEL-13	Sequencing	GGGCATACGACAAAAAGAGG
Not1(dT18)	3'-RACE	AACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGGAAT(18)
Adaptor1	3'-RACE	TGGAAGAATTCGCGGCCGCAG
AU ( $\beta$ -actin)	PCR/Probe synthesis	ATGGATGAGGAAATCGCTGC
AL690 ( $\beta$ -actin)	PCR/Probe synthesis	CCAGAGAGGAAGAGGAGGCG

表2 シークエンシング用FITC付きプライマー各種

Primer name	used for	Sequence (5'-3')
WEGU-1	Sequencing	CCTCTTCCCACAGAGTTTGC
WEGL-2	Sequencing	GTCTCTCACTCAAAGAAACC
WEGU-3	Sequencing	TGTGATGGTAGGACAGAAGC
WEGL-4	Sequencing	GAAAATGTCCCCTTGTGCGG
WEGU-5	Sequencing	TTTCAGACTAAATGTCACC
WEGL-6	Sequencing	CGTACACATTGGCGTTTCTC
WEGU-7	Sequencing	CTCAGAGTTTACACTTTCCG
WEGL-8	Sequencing	AAACCGATACCATACCTCTC
WEGU-9	Sequencing	GTCACAATGCTGTCTATCTC
WEGL-10	Sequencing	TCTTCACTATCTCCCTCTCC
WEGU-11	Sequencing	CACAAAACCAGTCATAAGGG
WEGL-12	Sequencing	TGAAGGGCAACAGATGGGAG



## 第2章

# 生殖システムの異なる日本産ギンブナ *Carassius auratus langsdorfi* の卵巣における特異的発現遺伝子の検出

### 概 要

日本産ギンブナ (*C. a. langsdorfi*) は、2 倍体個体では有性生殖による繁殖が行われるが、多倍数体個体では雌性生殖により母個体にクローナルな娘個体を産出する。雌性生殖個体の卵成熟過程では、有性生殖個体の場合とは異なり、第一減数分裂時に分裂せずに極体を放出しないまま第二減数分裂に進行する現象が観察されており、卵成熟過程の制御において何らかの遺伝子発現の違いが予測される。そこで、雌性生殖を行う 3 倍体ギンブナの卵巣と有性生殖を行う 2 倍体ギンブナの卵巣において、発現の異なる遺伝子を網羅的に検出するために、2 倍体有性生殖ギンブナの卵巣由来 cDNA から 3 倍体雌性生殖ギンブナの卵巣にも存在する cDNA を除く、逆に 3 倍体卵巣由来の cDNA から 2 倍体ギンブナの卵巣にも存在する cDNA を除くという、cDNA サブトラクションを行った。cDNA サブトラクション法により得られた計 334 個のクローンについて塩基配列を決定し、クローン同士の相同性、およびデータベース上の既知遺伝子との相同性を解析した。この結果、データベースの既知遺伝子に 60bp 以上の長さで 40%以上の相同性を示したクローンは 226 個、相同性を示さなかったクローンは 108 個であった。既知遺伝子に相同性を示した 226 個のクローンは、複数のクローンがひとつの遺伝子に相同性を示すものもあり、計 132 種の遺伝子種に分類された。また、相同性を示さなかったクローンの中でも、クローン同士で相同性のあるものがあり、108 個のクローンは計 104 種の遺伝子種に分類された。このように分類された計 236 種の遺伝子種のなかから、特に、クローン数の多い遺伝子種あるいは細胞周期に関わる遺伝子に相同性のある遺伝子種について、発現量の解析を行った。あわせて 11 種の遺伝子種について、クローンの塩基配列をもとに

各々プライマーを設定し、これらのプライマーを用いて、雌性生殖ギンブナと有性生殖ギンブナの卵巢由来の cDNA を鋳型に RT-PCR を行った結果、それぞれの個体に特異的な 4 種の増幅産物を得た。雌性生殖個体に特異的な増幅産物は、ヒト DOCK180 (dedicator of cyto-kinesis) に相同性が高い産物と、新規遺伝子の産物であった。また有性生殖個体に特異的増幅を示す遺伝子は、ゼブラフィッシュのアポリポプロテイン E 前駆体タンパク質に相同性の高い産物と、新規遺伝子の産物の二つであった。さらに、得られた増幅産物をプローブとして、ノーザン・ハイブリダイゼーションを行い、有性生殖個体と雌性生殖個体で発現量が異なることを確認した。

キーワード ; 雌性生殖、ギンブナ、cDNA サブトラクション法

## 1. 序 論

現在のところ、魚類の減数分裂期に発現しているさまざまな遺伝子がどのように卵成熟に関わっているかは、ほとんど明らかになってはいない。そこで、第1章では、細胞周期を制御する遺伝子のひとつに注目し、その遺伝子の単離および発現の解析を試みた。

また、雌性生殖魚の卵成熟過程には、すでに有性生殖生物で単離されている遺伝子以外に、さらに未知遺伝子の関与の可能性が考えられる。従って、現在までに知られている減数分裂を制御する遺伝子のみでなく、日本産ギンブナにおける雌性生殖個体の卵巣と有性生殖個体の卵巣において、異なる発現を示す遺伝子を網羅的に検出することも、雌性生殖を分子レベルで理解する上で非常に重要である。そこで、サブトラクション法 (subtractive hybridization) によって、雌性生殖ギンブナと有性生殖ギンブナの成熟した卵巣で発現量の異なる遺伝子の検出を行った。

ある組織由来の cDNA は、その組織で発現しているさまざまな遺伝子の転写産物の混合物であって、その組織特有のさまざまな遺伝子を含んだプールとなっている。2つの遺伝子プールを比較し、遺伝子の発現量の差を解析する方法には、cDNA サブトラクション法、ディファレンシャル・ディスプレイ法 (Liang & Pandee, 1992) やマイクロアレイ法 (Schena, et al., 1995) などがある。しかし、マイクロアレイ法にはアレイを作る機械やシグナル検出用の特殊な機器を必要とし非常にコストがかかる。本研究の前に行った、有性生殖ギンブナと雌性生殖ギンブナの卵巣由来の cDNA を用いたディファレンシャル・ディスプレイ法の結果、有性生殖ギンブナと雌性生殖ギンブナで異なる電気泳動像 (バンドパターン) を得た。しかし、各々に特異的に現れたバンドをクローニングして塩基配列を決定し、各々のバンドを増幅するプライマーを設定して、プローブを合成し、ディファレンシャル・ディスプレイ法に用いた個体のみでなく複数個体についてノーザンハイブリダイゼーションを行った結果、有性生殖ギンブナあるいは雌性生殖ギンブナの

卵巣に特異的な発現を示す遺伝子は得られなかった。ディファレンシャル・ディスプレイ法は、10塩基長の短いプライマーを用いてPCRを行うので、プライマーの塩基配列と相同な配列をもてばバンドが検出されるが、プライマーがアニールするはずの領域に塩基置換が含まれる場合はバンドは現れないことになる。上記の結果から、ディファレンシャル・ディスプレイ法は、野生集団のギンブナを用いると、遺伝的なバックグラウンドが均一でない個体同士の遺伝子プールを比較するため、対立遺伝子の塩基配列の違いなどにも敏感に反応する場合があると考えられる。サブトラクション法では、2つの遺伝子プールに含まれるcDNA分子の中から、一方に多く含まれる分子を特異的に増幅し、クローニングすることが可能である。すなわち、比較したい2つの遺伝子プールAとBのcDNAを、*Rsa* Iなどの4塩基切断の制限酵素で処理して断片化し、まず遺伝子プールAの断片化されたcDNAにアダプターを添加する。このアダプターを添加された遺伝子プールA（テスターと呼ばれる）を熱変性により1本鎖にし、同様に熱変性した遺伝子プールB（ドライバーと呼ばれる）を10~100倍量加えハイブリッド形成させると、遺伝子プールAにのみ存在するcDNA分子の断片だけが両端にアダプター領域を持つ断片として再生する。そして、アダプター領域をプライマーとして用いることにより、遺伝子プールAにのみ存在する遺伝子断片をPCR増幅することができる。次に、テスターとドライバーを入れ換えることにより、遺伝子プールBにのみ存在する遺伝子断片をクローニングし、比較したいそれぞれの遺伝子プールで特異的に発現している遺伝子の単離が可能となる。このように、サブトラクション法は、マイクロアレイ法より簡便で、特別な機器を必要とせず、またディファレンシャル・ディスプレイ法のように1塩基の置換も逃さないという厳しい条件での検出ではなく、数100から1000塩基の長さのcDNAをハイブリダイゼーションすることで、多少の塩基置換があってもほぼ同じ配列を除くという検出方法である。そこで、今回は、PCR (polymerase chain reaction) 法を用いるなど

のさまざまな改良によって、希少な転写産物であっても感度よく検出することが期待できる cDNA サブトラクション法 (Diatchenko, et al., 1996) を用い、有性生殖ギンブナあるいは雌性生殖ギンブナの卵巣の遺伝子プールに特異的に存在する遺伝子を検出した。

## 2. 材料および方法

**2.1. 供試魚および RNA の精製** 2001 年 5 月、三重県櫛田川において採取された野生のギンブナについて DAPI 染色法 (Hamada and Fujita, 1983; 高山, 1989) にて倍数性の判定を行った。2 倍体魚、3 倍体魚それぞれ 1 尾から、卵巢を摘出した。卵巢内部から卵を含んだ 1cm 角程の組織片を、RNA 溶出液 (Isogen; ニッポンジーン) 1ml 中にて氷上でホモジェナイズし、クロロホルム 0.2ml を加えて激しく転倒混和しさらに室温にて 3 分間程放置した。このホモジェネートを 4°C、12,000×g にて 5 分間遠心し、上清を回収した。これにイソプロパノール 0.5ml を加え、混ぜ合わせた後、室温にて 10 分間放置し、4°C、12,000×g にて 10 分間遠心することにより、RNA の沈澱を得た。75%エタノールで洗浄後、DEPC 水に溶解し、分光光度計により濃度を計測した。Oligotex (Oligotex dT30; Takara) を用いて、使用法の指示通りに実施し、約 250 $\mu$ g の全 RNA から約 7 $\mu$ g の mRNA を回収した。

**2.2. 二本鎖 cDNA 合成** cDNA の合成には、cDNA Synthesis System (GIBCO BRL, USA) を用いた。抽出した mRNA 5 $\mu$ g に、CLONTECH 社の PCR-Select cDNA Subtraction Kit に添付の *RsaI* サイトと *HindIII* サイトを含んだ cDNA synthesis primer (5'-TTTTGTACAAGCTT<sub>30</sub>N<sub>1</sub>N-3') を 20pmol 加え 70°C で 2 分間変性した後、第一鎖合成の為の反応液 50 $\mu$ l (最終濃度; 0.5mM dNTP、0.01M DTT、1×1st strand buffer、M-MLV Reverse Transcriptase 500 units) にて、37°C で 1 時間合成反応を行った。反応終了後、第一鎖の合成反応液 50 $\mu$ l を氷上に置き、第二本鎖を合成するために反応液 (最終濃度; 0.225mM dNTP、1×2nd strand buffer、100 units *E. coli* DNA Polymerase、3.4 units *E. coli* RNase H、12.0 units *E. coli* DNA Ligase) 350 $\mu$ l を混ぜ合わせた後、16°C で 2 時間反応した。得られた二本鎖 cDNA はフェノール・クロロホルム抽出の後、エタノール沈澱によって精製し、滅菌蒸留水に溶解し濃度を測定した。

**2.3. cDNA サブトラクション** PCR-Select cDNA Subtraction Kit を用いてサブトラクションを行い、反応はその使用法に従った。合成された二本鎖 cDNA  $2\mu\text{g}$  を制限酵素 *Rsa* I 15 units で消化し、フェノール・クロロホルム抽出の後、エタノール沈澱によって精製し、滅菌蒸留水  $5.5\mu\text{l}$  に溶解した。まず、*Rsa* I で消化した cDNA 約  $1.5\mu\text{l}$  を分けとり、滅菌蒸留水  $5\mu\text{l}$  を加えてドライバーとした。残った *Rsa* I 消化した cDNA  $4\mu\text{l}$  を 2 分し、プライマー部位をもつ 2 種類のアダプター、Adaptor 1 (図 1) と Adaptor 2R (図 1) のどちらかを、それぞれ結合した。結合反応は、*Rsa* I 消化した cDNA  $2\mu\text{g}$  に反応液 (最終濃度 ;  $2\mu\text{M}$  Adaptor 1 あるいは  $2\mu\text{M}$  Adaptor 2R、 $1\times$  Ligation buffer、T4 DNA Ligase 400 units)  $8\mu\text{l}$  を加えて、 $16^\circ\text{C}$  で一晩の条件で行った。有性生殖ギンブナの卵巢 cDNA と雌性生殖ギンブナの卵巢 cDNA の各々について、ドライバー、Adaptor 1 を結合した cDNA (テスター 1) と Adaptor 2R を結合した cDNA (テスター 2R) を準備した。テスター 1 とテスター 2R に、各々独立に対照個体のドライバーをハイブリダイズさせた後、2 つを混ぜ合せ、更にもう一度対照個体のドライバーを加えて 2 回目のハイブリダイゼーションを行った。詳しい条件を以下に述べる。 $1.5\mu\text{l}$  のテスター 1 あるいはテスター 2R に、対照個体のドライバー  $1.5\mu\text{l}$  と  $4\times$ Hybridization buffer  $1\mu\text{l}$  を加えた、計  $4\mu\text{l}$  の反応液を  $98^\circ\text{C}$  で 1 分 30 秒間変性した後、続いて  $68^\circ\text{C}$  で 8 時間で 1 回目のハイブリダイゼーションを行った。続けて、これらの 1 回目のハイブリダイゼーション・テスター 1  $4\mu\text{l}$  とハイブリダイゼーション・テスター 2R  $4\mu\text{l}$  を混ぜ合せ、さらにドライバー  $3\mu\text{l}$  に  $4\times$ Hybridization buffer  $1\mu\text{l}$  を加えて熱変性した反応液  $4\mu\text{l}$  を加えて、2 回目のハイブリダイゼーションを  $68^\circ\text{C}$  で一晩行った。反応終了後、Dilution buffer  $200\mu\text{l}$  を加え、 $68^\circ\text{C}$  で 7 分間反応した後、 $-20^\circ\text{C}$  で保存した。

**2.4. サブトラクション産物の PCR 増幅および産物のクローニング** テスターサンプルにのみ存在し、同時に末端のアダプターが異なる分子種を増幅するために、上記の

ように作製したハイブリダイゼーション後のサブトラクション産物を鋳型に、PCR 増幅を二段階で行った。1 回目の PCR は、添加した 2 種類のアダプターの 5'末端に共通な配列をもつ PCR プライマー（キットに添付、図 1）を用いて、32 サイクルで行った。2 回目の PCR では、1 回目の PCR 産物を鋳型に、2 種類のアダプターに特異的な Nested PCR primer 1（キットに添付、図 1）と Nested PCR primer 2R（キットに添付、図 1）を用いて、12 サイクルで行った。

サブトラクトした cDNA 1 $\mu$ l を鋳型として加えた反応液 25 $\mu$ l（最終濃度；0.4 $\mu$ M CLONTEC PCR primer 1、0.8mM dNTP、1 $\times$ PCR buffer、TaKaRa Ex *Taq* DNA polymerase 2.5 units）を、一本鎖のままであるアダプター末端を二本鎖にするために、まず 75 $^{\circ}$ C で 7 分間インキュベートした後に、PCR サイクルを 94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、66 $^{\circ}$ C で 30 秒間、72 $^{\circ}$ C で 1 分 30 秒間を 32 回繰返した。1 回目の PCR 反応液を 10 倍希釈して、1 $\mu$ l を鋳型に 2 回目の PCR を行った。反応液 25 $\mu$ l（最終濃度；0.4 $\mu$ M CLONTEC Nested primer 1、0.4 $\mu$ M CLONTEC Nested primer 2R、0.8mM dNTP、1 $\times$ PCR buffer、TaKaRa *Taq* DNA polymerase 2.5 units）を 94 $^{\circ}$ C 30 秒間、68 $^{\circ}$ C 30 秒間、72 $^{\circ}$ C 1 分 30 秒間で 12 サイクルの PCR 反応を行った。得られた PCR 産物は T ベクター（pGEM-T Easy Vector; Promega, USA）でクローニングした。ライゲーション反応は、Promega 社(USA)のプラスミドベクター pGEM-T Easy Vector 50ng に対し数 10~100ng の PCR 産物と T4 DNA リガーゼ 3 units（Promega, USA）、最終濃度が 1 $\times$ になるように Rapid Ligation buffer を加えて、16 $^{\circ}$ C で 4 時間以上インキュベートした。組換えプラスミドとコンピテントセル JM109 大腸菌を混ぜ、氷上に 30 分間放置後、42 $^{\circ}$ C 1 分間の熱ショックを加えて大腸菌を形質転換し、LB 寒天培地で 37 $^{\circ}$ C で 15 時間培養した。

**2.5. 塩基配列決定および塩基配列の解析** クローニングした PCR 断片の塩基配列の決定には、ABI Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit（Perkin-Elmer Applied



Biosystems, USA) と ABI DNA Sequencer Model 373A (ABI, USA)、あるいは Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit v2.0 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, USA) と DNA アナライザ ABI PRISM 3700 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, USA) を用いた。決定した塩基配列は、ソフトウェア GENETYX-MAC version 8.0 を用いて解析した。データベースとの相同性の検索は、NCBI (the National Center for Biotechnology Information, USA) のウェブサイト上での BLAST search により行った。

**2.6. RT-PCR** サブトラクション産物のクローンを分類し、クローン数の多い遺伝子種あるいは細胞周期に関わる遺伝子に相同性のある遺伝子種について、RT-PCR 法により発現量の解析を行った。プライマーの設計には、OLIGO version 4.04 DNA 解析ソフトウェアを用い、プライマーの合成は Invitrogen 社に依頼した。サブトラクションした有性生殖個体と雌性生殖個体の卵巣由来 cDNA を鋳型に、反応液 50 $\mu$ l (最終濃度 ; 1 $\mu$ M 各プライマー、0.2mM dNTP、1 $\times$ PCR buffer、TaKaRa *Taq* DNA polymerase 2.5 units) で 94 $^{\circ}$ C 1 分間、55 $^{\circ}$ C 30 秒間、72 $^{\circ}$ C 1 分間の PCR 反応を行い、15 サイクルから 5 サイクル毎に 35 サイクルまで、5 $\mu$ l ずつサンプリングした。有性生殖個体と雌性生殖個体で増幅量に差が認められた 4 遺伝子種のプライマーを用いて、神奈川県渋田川上流部 (笠張川) で捕獲した 2 倍体有性生殖ギンブナ 2 個体と 3 倍体雌性生殖ギンブナ 2 個体の卵巣由来 cDNA を鋳型にし、複数個体で増幅量を解析した。RT-PCR の反応条件は先に行った反応を基準にし、サイクル数は先の RT-PCR で差が確認されたサイクル数で行った。

**2.7. ノーザンハイブリダイゼーションによる発現解析** DIG プローブの合成は、PCR DIG プローブ合成キット (Roche, USA) を用いて行なった。希釈した cDNA を鋳型に反応液 50 $\mu$ l (最終濃度 ; 0.2 $\mu$ M 各プライマー、0.4mM dNTP、0.4mM PCR DIG 合成ミックス、1 $\times$ PCR buffer、Expand High Fidelity DNA polymerase 2.6 units) 中で、94 $^{\circ}$ C 1 分間、55 $^{\circ}$ C 30 秒間、72 $^{\circ}$ C 1 分間、30 から 35 サイクルの PCR 反応を行い、標識した。

雌性生殖個体 3 尾、有性生殖個体 3 尾の卵巣から、上述の **2.1.** と同様に全 RNA を抽出した。全 RNA 5  $\mu$ g をホルムアルデヒド変性アガロースゲルで 1×MOPS 泳動バッファー中で泳動した。泳動終了後、ゲルを 20×SSC 中に浸して、1 回につき 15 分間の平衡化を、2 回行った。20×SSC を用い、ナイロンメンブレンに一晩キャピラリートランスファーした。終了後、UV クロスリンカーにて紫外線を 120mJ/cm<sup>2</sup> 照射し RNA をメンブレンに固定した。

シグナルの検出には、Roche 社の DIG 発光検出キットを用いた。RNA を固定したメンブレンをハイブリダイゼーション・バッグにいれ、1 枚につき 10ml のハイブリダイゼーション・バッファー (50% ホルムアミド、5×SSC、0.1% N-ラウロイルサルコシン、0.02% SDS、2% Roche ブロッキング試薬) を加えて、50°C で 1.5 から 2 時間のプレハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション・バッファーを除き、95°C で 5 分間熱変性した DIG 標識プローブ (最終濃度 ; 10~20ng/ml) を含んだハイブリダイゼーション・バッファーをメンブレン 1 枚につき、10ml 加えて、50°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、メンブレンを室温の洗浄液 1 (2×SSC、0.1% SDS) を用いて室温で 5 分間ずつ 2 回、洗浄液 2 (0.5×SSC、0.1% SDS) を用いて室温あるいは 68°C で 15 分間ずつ 2 回洗った。シグナルの検出には、DIG 標識核酸検出キット (Roche, USA) 用いた。メンブレンを、0.3% Tween 20 入りマレイン酸バッファー (100mM マレイン酸、150mM NaCl; pH7.5; 0.3% Tween 20) で 1 分間平衡化した。続いて、ブロッキング溶液 (1% Roche ブロッキング試薬、100mM マレイン酸、150mM NaCl; pH7.5) 中に 1 時間浸した後、ブロッキング溶液で 10,000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体 (キットに添付) 液中で 30 分間インキュベートした。抗体溶液を捨て、0.3% Tween 20 入りマレイン酸バッファーで 2 回、1 回当たり 15 分間、メンブレンを洗浄した。洗浄液を捨てた後、検出バッファー (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl; pH

9.5) で 2 分間平衡化した。DIG 標識プローブに結合したアルカリフォスファターゼの基質である CSPD (1 章の **2.11** を参照) を検出バッファーで 100 倍に希釈した溶液 (0.25mM CSPD) にメンブレンを浸し、37°C で 30 分間インキュベートした後、X 線フィルムに 3 時間感光した。

### 3. 結果

サブトラクションを行う際に、テスターサンプルを雌性生殖ギンブナ卵巢由来の cDNA、ドライバーサンプルに有性生殖ギンブナ卵巢由来の cDNA を用いたサンプルを ST、テスターサンプルを有性生殖ギンブナ卵巢由来の cDNA、ドライバーサンプルに雌性生殖ギンブナ卵巢由来の cDNA を用いたサンプルを SD とする (表 1)。

**3.1. サブトラクション産物クローン (ST クローンと SD クローン) の分類** サブトラクション産物を各々クローニングし、塩基配列を決定した ST クローンと SD クローンは、それぞれ 196 個であった。クローニングされたサブトラクション産物の長さが 80bp 以上であった ST クローン 170 個と SD クローン 164 個について、その塩基配列とデータベースの既知遺伝子との相同性の検索を行った (表 1)。ST クローン 170 個のうち、60bp 以上の長さで既知遺伝子と 40%以上の相同性が見られたクローンは 119 個、既知遺伝子との相同性が 40%以下であったクローンは 51 個であった。SD クローン 164 個のうち、60bp 以上の長さで既知遺伝子と 40%以上の相同性が見られたクローンは 107 個、既知遺伝子との相同性が 40%以下であったクローンは 57 個であった (表 1、2)。相同性の高かった遺伝子を分類し、その遺伝子に高い相同性を示したクローン数を ST と SD で比較すると、ST では代謝系の遺伝子と増殖、分化に関与する遺伝子の占める割合が SD より高く、SD ではシグナル伝達系の占める割合が ST に比べ高かった。続いて、クローン数の多い遺伝子にはどういったものがあるのかを検証するために、それぞれのクローンが属する遺伝子種を分類した (表 2)。まず、既知遺伝子との相同性が低い (40%以下) クローンは、それぞれ未知遺伝子とし、そのなかで同じ塩基配列を持つクローン同士の場合はひとつの遺伝子種として分類した。また、既知遺伝子に相同性が高いクローンの中で、複数のクローンがデータベース上の同じ遺伝子に相同性が高い場合は、同じ塩基配列を含んでいなくてもそれらのクローンはひとつの遺伝子種とみなした。ST クローンは、

111種の遺伝子種に分かれ、62種が既知遺伝子に相同で、49種が未知遺伝子であった。SD クローンは、125 遺伝子種に分かれ、70 種が既知遺伝子に相同で、55 遺伝子種が未知遺伝子であった。リボゾームタンパク質以外に特に高い頻度でクローンが得られた遺伝子種には、ST では、未知遺伝子に1種、Arf (GTP 結合タンパク質)、28S rRNA、チューブリン $\beta$ -2、ZP2、ZP3 等が見られた。また、SD では、未知遺伝子2種、アポリポプロテイン E、シスタチン、TSC1 (tuberous sclerosis 1)、ZP2、ZP3 に複数のクローンが得られた。

**3.2. RT-PCR** 上記のように分類した遺伝子種の中から、複数のクローンを含む遺伝子種、あるいは 細胞周期に関与する可能性がある遺伝子種、の2点のどちらかを充たす遺伝子種を選び、ST、SD のどちらにも含まれる遺伝子種とハウスキーピング遺伝子に相同性のある遺伝子種は除いて、計 11 種の遺伝子種に注目した。ST クローンで分類された遺伝子種の中からは、細胞分裂に関与する遺伝子と相同性のあるもの 5 種と、複数のクローンを含んだ Arf と未知遺伝子 1 種の計 7 遺伝子種 (表 3) を選んだ。また、SD クローンで分類された遺伝子種の中からは、複数のクローンを含んだ遺伝子種であったアポリポプロテイン E、シスタチン、TSC1 と未知遺伝子 1 種の計 4 種 (表 3) を選んだ。これらの遺伝子種に相同なクローンの塩基配列をもとに RT-PCR 用のプライマーを作成し、それぞれのプライマーによって増幅される遺伝子は、それぞれ候補遺伝子として表 3 の通りに名付けた。SD クローンには複数クローンを含む未知遺伝子がもう 1 種あったが、得られた塩基配列が短くプライマーが設定できなかった。サブトラクションを行った有性生殖個体と雌性生殖個体の卵巣由来の cDNA を鋳型に、上記のプライマー 11 組を用いて PCR を行い、15 サイクル目から 35 サイクル目迄 5 サイクルごとにサンプリングした (図 2、3)。

ST の候補遺伝子では (図 2)、T12、は 30 サイクル目で 3 倍体雌性生殖個体の方に増

幅産物の濃い電気泳動バンドが認められ、35 サイクル目ではほぼ同じ濃さのバンドであった。T34、T56 はバンドが得られなかった。T78 はバンドは得られたが、いずれのサイクルでもバンドの濃さに差はなかった。T910 は、25、30 サイクル目で3倍体雌性生殖ギンブナの方に濃いバンドが認められ、35 サイクル目ではほぼ同じ濃さであった。T1112 は 30 サイクル目で3倍体雌性生殖ギンブナの方が濃いバンドが現れ始め、35 サイクル目も3倍体ギンブナの卵巣 cDNA を鋳型にした方がバンドが濃いことが確認された。T1314 は、20 サイクル目で3倍体雌性生殖ギンブナにバンドが認められ、35 サイクル目まで3倍体ギンブナの卵巣 cDNA を鋳型にした方がバンドが濃いことが確認された。このときのコントロールとして用いた $\beta$ -アクチンはバンドが現れ始めた 25 サイクル目から 35 サイクル目まで、雌性生殖ギンブナと有性生殖ギンブナでバンドの濃さに差は見られなかった。

SD の候補遺伝子 (図3) で、D12 は、20 サイクル目からバンドが現れ 30 サイクル目まで2倍体有性生殖ギンブナの方に濃いバンドが認められ、35 サイクル目でほぼ同じ濃さのバンドになった。D34 は増幅がほとんど見られず、35 サイクル目に3倍体雌性生殖ギンブナにバンドが現れた。D56 はバンドの濃さに差は見られなかった。D78 は 20 サイクル目から2倍体ギンブナの卵巣を鋳型にした方にバンドが現れ始め、25~30 サイクル目では2倍体有性生殖ギンブナの方が濃いバンドを示した。この時にコントロールとして用いた $\beta$ -アクチンは、3倍体雌性生殖ギンブナの方に濃いバンドが現れた。

サイクル数が増えるとバンドの濃さに差が見られなくなったことについては、増幅量が飽和状態となり、増幅量差がアガロースゲルでは検出できないためと判断し、サイクル数が少ない段階でバンドの濃さに差があった候補遺伝子 T12、T910、T1112、T1314、D12、D78 について、捕獲場所の違う別集団の複数個体について増幅に差が出るか確認した。それぞれの候補遺伝子の増幅において見られた増幅量の差が、有性生殖ギンブナ集団あ

るいは雌性生殖ギンブナ集団に普遍的であるかどうかを判断するために、サブトラクションを行った個体の cDNA 以外に神奈川県渋田川上流部（笠張川）で捕獲された有性生殖個体 2 尾、雌性生殖個体 2 尾の卵巣由来の cDNA について、同様に RT-PCR を行った（図 4）。このときの PCR のサイクル数は、上述の、それぞれの候補遺伝子の増幅で差が見られたサイクル数を基準にした。また、鋳型となる cDNA 量が各サンプルで等しくなるように、cDNA を合成する時に用いた全 RNA は全ての個体で等量としたが、同時に調製した 2 倍体有性生殖個体 1、2 と 3 倍体雌性生殖個体 2、3 の 4 個体では、 $\beta$ -アクチンの増幅において、3 倍体雌性生殖個体のバンドがわずかに濃かった。T12 は雌性生殖ギンブナ 3 個体には明瞭な増幅産物のバンドが見られたが、有性生殖個体にはサブトラクションに用いた個体にのみわずかな増幅が見られただけで、有性生殖個体と雌性生殖個体で増幅量に差が見られた。候補遺伝子 T910 と T1112 は、全ての個体からバンドが得られ、3 倍体雌性生殖ギンブナのバンドがやや濃い、 $\beta$ -アクチンでも 3 倍体がやや濃いことから、有性生殖個体と雌性生殖個体で増幅に明確な差は認められなかった。T1314 は、全ての個体から増幅が見られたが、有性生殖個体の方に濃いバンドが得られた。D12 と D78 は、有性生殖個体全てに濃いバンドが得られ、雌性生殖個体では、2 個体に薄いバンド、1 個体に濃いバンドが見られたが、コントロールの  $\beta$ -アクチンと比較すると相対的に雌性生殖個体に見られたバンドは濃さが薄かったので、全体的には増幅量は有性生殖ギンブナの方が多かった。

**3.3. ノーザンブロットハイブリダイゼーション** RT-PCR の結果から、増幅量に明瞭な差が見られた T12、T1314、D12、D78 の 4 つの候補遺伝子についてプローブを合成し、ノーザンブロットハイブリダイゼーションによって発現量を確認した（図 5）。野生ギンブナを用いているので個体間の差を検出してしまいう可能性もあると考え、解析には複数個体を用いた。サブトラクションを行った個体の全 RNA 以外に、神奈川県笠張川で

捕獲された有性生殖個体 2 尾、雌性生殖個体 2 尾の卵巣由来の全 RNA を加え、有性生殖ギンブナ 3 サンプル、雌性生殖ギンブナ 3 サンプルについて解析を行った。シグナルバンドの大きさは、RNA サイズマーカー (0.28~5.58kb, Promega, USA) に基づいて計算した。また、シグナルの強度のコントロールとして、 $\beta$ -アクチンのプローブを用いたノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。RT-PCR において雌性生殖個体の卵巣に特異的な増幅の見られた候補遺伝子 T12 のプローブを用いたノーザンブロットハイブリダイゼーションにおいては、シグナルが得られなかった。雌性生殖個体の卵巣に特異的な増幅の見られたもうひとつの候補遺伝子 T1314 のプローブを用いた場合は、約 6,500b の大きさのバンドのが得られたが、シグナルは有性生殖個体にも雌性生殖個体にも有り、シグナルの強度は $\beta$ -アクチンの結果にほぼ比例した。RT-PCR において有性生殖個体の卵巣に特異的な増幅のあった候補遺伝子 D12 のプローブについては、有性生殖個体の 3 サンプルにのみ約 1,270b のシグナルが認められ、シグナルの強度は $\beta$ -アクチンの結果に比例していたが、雌性生殖個体にはシグナルは認められなかった。また、有性生殖個体の卵巣に特異的な増幅が認められたもうひとつの候補遺伝子 D78 のプローブも同様に、有性生殖個体の 3 サンプルに約 1,000b のシグナルが認められ、シグナルの強度は $\beta$ -アクチンの結果に比例していた。しかし、サブトラクションに用いた 3 倍体雌性生殖個体 1 にも同じ大きさの弱いシグナルが得られた。コントロールとしての $\beta$ アクチンのシグナルの強さと比較すると、相対的に 3 倍体雌性生殖個体 1 の発現量は少なく、候補遺伝子 D78 は有性生殖個体での発現量の方が多いと認められた。



#### 4. 考 察

サブトラクション法によって得られた約 400 個のクローンから、塩基配列を決定し、その塩基配列の解析を行ったクローンは 310 個であった。これらのクローンは、219 個の遺伝子種に分類され、その中から、候補遺伝子として 11 種の遺伝子種の発現を検討した（表 4）。RT-PCR の結果から、これら 11 種の候補遺伝子は、雌性生殖個体にも有性生殖個体にも増幅が見られ、どちらの個体群でも発現していることが示された。しかしながら、増幅産物のバンドの濃さを発現量として計った結果、4 種の候補遺伝子において特徴的な発現量を認めた。さらに、このうち 2 種の候補遺伝子については、ノーザン・ハイブリダイゼーションにおいても、雌性生殖個体と有性生殖個体では発現量が異なることが示された。ここで、複数個体に対して行った RT-PCR において特徴的な発現を示した 4 種の候補遺伝子それぞれについて述べる。

**4.1. 候補遺伝子 D12** D12 は、テスターサンプルに有性生殖ギンブナ卵巢由来の cDNA、ドライバーサンプルに雌性生殖ギンブナ卵巢由来の cDNA を用いたサブトラクションサンプル SD から得られた 2 つの相同な、長さ 212bp クローンから得られた塩基配列で、ゼブラフィッシュのアポリポタンパク質 E（ApoE）前駆体 cDNA に 88.1% の相同性を示した。哺乳類においてリポタンパク質は、血漿中に含まれる脂質とタンパク質の複合体で、脂質の輸送に重要な機能を果たしている。アポリポタンパク質は、リポタンパク質のコアであるトリアシルグリセロールやコレステロールエステルの表面を被う膜を構成するタンパク質として知られている。アポリポタンパク質には A から E まであり、アポリポタンパク質 E は特に低密度リポタンパク質（LDL）受容体との結合によりリポタンパク質の組織への輸送の方向性を決定していることが知られているが、現在のところ細胞分裂や減数分裂への関与は知られていない。魚類ではこれまでに、ゼブラフィッシュにおいて ApoE およびアポリポタンパク質 A-I（ApoA-I）の cDNA が単離されている。ゼブラ

フィッシュ卵では *apoE* 遺伝子は卵黄多層膜に多く発現していたり (Babin et al., 1997)、ニワトリにおいては ApoE がビテロジェニンに対する受容体に結合したりすることが知られており (Steyrer et al., 1990)、卵母細胞が成熟する過程でのタンパク質の取込みに関与していると考えられる。*apoE* 遺伝子の発現の少ない雌性生殖ギンブナ卵では、減数分裂時の鍵となるタンパク質の取込みが、阻害されることにより正常な減数分裂が進まない可能性も考えられる。また、細胞分裂や減数分裂への関与ではないが、ApoE が近年とくに注目されているのは、アルツハイマー病などにおけるアミロイド繊維形成に関わっていることである (Bales et al., 1999, Yamaguchi et al., 2001)。

**4.2. 候補遺伝子 T12** T12 は、テスターサンプルに雌性生殖ギンブナ卵巣由来の cDNA、ドライバーサンプルに有性生殖ギンブナ卵巣由来の cDNA を用いたサブトラクションサンプル ST から得られたひとつのクローンを基に塩基配列を設定した。このクローンは、長さ 213bp で、ヒト DOCK180 に 77% の高い相同性を示す。ヒト DOCK180 は、Crk (CT-10 regulated kinase, cdc2-related kinase) の SH3 (Src homology 3) ドメインに結合する主要タンパク質のひとつとして単離され (Hasegawa et al., 1996)、線虫の CED-5 やキイロシヨウジョウバエの MBC (Myoblast City) (Nolane et al., 1998) とともに CDM ファミリーと呼ばれる (Wu & Horvitz, 1998)。線虫では DOCK タンパク質が CrkII とともに細胞の移動や食作用の促進、細胞の形を変える働きをすることが示唆されている。T12 は、ギンブナ卵巣においてはノーザンブロットハイブリダイゼーションではシグナルが得られなかったため、卵巣における発現量は非常に少ないと考えられる。しかしながら、T12 が DOCK180 のようにさまざまな遺伝子上流に位置する調節因子としての働きがあるとするならば、この遺伝子の発現量が微量であっても下流の遺伝子の発現や活性化の調節に大きく関わっている可能性もある。RT-PCR の結果からは雌性生殖ギンブナの卵巣でより多く発現していることが確認されており、このような差が何を意味するのかは突き止めるにはこの遺伝

子の機能などを知る必要があるが、雌性生殖に関与する遺伝子である可能性は高いと考えられる。

**4.3. 候補遺伝子 D78** D78 はサブトラクションサンプル SD から得られた二つのクローンを基に塩基配列を設定した。2つのクローンは、長さ 364bp と 697bp で、短い方のクローンの塩基配列は長い方のクローンに全て含まれる。このクローンは、データベース上の既知遺伝子に相同性がなく、その機能は未知である。D78 プローブを用いたノーザンハイブリダイゼーションでは、有性生殖個体 3 個体だけでなく雌性生殖個体にも 1 個体にシグナルが得られたが、この雌性生殖個体でのシグナルの強さは有性生殖個体のシグナルに比べて弱く、さらに、他の雌性生殖個体 2 個体ではシグナルはなかったことから、D78 プローブは有性生殖個体で発現量の多い遺伝子を認識していると考えられる。

**4.4. 候補遺伝子 T1314** T1314 はサブトラクションサンプル ST から得られた 3 つのクローンを基に塩基配列を設定した。この 3 つのクローンのうちの 2 つは長さ 147bp の同じ領域を含むクローンで、もう 1 つは長さ 310bp で先の二つのクローンの領域を含んでいる。これらのクローンは、データベース上の既知遺伝子に相同性はなく、機能などは未知である。RT-PCR の結果では、その増幅産物のバンドの濃さの違いから、雌性生殖ギンブナでの発現量が多いことが示唆されたが、T1314 プローブを用いたノーザンハイブリダイゼーションでは、約 6,500b の大きさのバンドのシグナルが雌性生殖個体にも、有性生殖個体にも認められたので、この遺伝子の発現量は個体差が大きいのかもしれない。

候補遺伝子 T1314 はテスターに雌性生殖ギンブナ卵巣を用いたサブトラクションから得られたクローンであったが、雌性生殖ギンブナ卵巣に特異的な発現はないことが明らかとなった。一方、候補遺伝子 D12、T12、D78 は、それぞれ有性生殖ギンブナ、雌性生殖ギンブナ、有性生殖ギンブナの卵巣で特徴的な発現を示した。相同性のある既知遺伝子の機能も考えあわせると、候補遺伝子 D12 の有性生殖ギンブナでの特徴的発現、T12 の

雌性生殖ギンブナでの特徴的発現は、雌性生殖に何らかの関与がうかがえる。また、既知遺伝子とは相同性のない候補遺伝子 D78 も、雌性生殖ギンブナでは明らかに発現量が少ないことから、これも雌性生殖に何らかのかかわりがあることが示唆され、今後の解析が興味深い。

最後に、本研究での結果と、日本産ギンブナと同様に有性生殖個体と雌性生殖個体が同所的に生息することが知られている中国産ギベリオブナ (*Carassius auratus gibelio*) を用いたサブトラクションにおける結果 (Xie et al., 2001 ; Lian et al., 2001) と比較したい。中国産ギベリオブナの雌性生殖個体の成熟卵と有性生殖個体の成熟卵由来の cDNA を用いたサブトラクション法による解析によって、発現量に差が見られた遺伝子として、サイクリン A2 遺伝子、ヒストン H2A 遺伝子、CB102 遺伝子、YA2 遺伝子 (Xie et al., 2001) と ZP3 遺伝子 (Lian et al., 2001) の 5 種の遺伝子が報告された。本研究の日本産ギンブナを用いたサブトラクション法による解析では、これら 5 種類のうちヒストン H2A 遺伝子、CB102 遺伝子、YA2 遺伝子については検出されなかった。サイクリン A2 遺伝子については、本研究でも、雌性生殖ギンブナからサイクリン A2 遺伝子に相同性の高いクローンがひとつではあるが得られた。そこで、プライマーを作製し雌性生殖個体と有性生殖個体での卵巣由来 cDNA を鋳型に RT-PCR を行ったが、PCR 増幅に違いは確認できなかった (データは示していない)。ZP3 遺伝子については、日本産ギンブナでも多数のクローンが得られた。雌性生殖ギンブナ (ST クローン) からは 5 つのクローンが得られ、有性生殖ギンブナ (SD クローン) からは 22 個のクローンが得られた。中国産ギベリオブナの場合は雌性生殖型と有性生殖型から別々に異なる配列の ZP3 が単離されたが、日本産ギンブナの場合は、いずれのギンブナのクローン群も大きく二つのタイプの ZP3 に分けられた。ひとつは、中国産雌性生殖ギベリオブナ ZP3 とコイ ZP3 により高い相同性 (>88.7%) を示すタイプで、もうひとつは、金魚 (*Carassius auratus*) の ZP3 により高い相同性 (>96.3%)

を示すタイプである。付加的な事柄ではあるが、Lian らは、中国産ギベリオブナの起源について、得られた ZP3 の相同性の検索から、雌性生殖ギベリオブナはコイに近い ZP3 をもっており、祖先種において雑種形成があったことを示唆しているが、日本産ギンブナにおいては、雌性生殖ギンブナにも有性生殖ギンブナにも 2 つのタイプの ZP3 が見られることから、日本産ギンブナでは異なる生殖システムを持つようになる以前に雑種形成が起ったことが示唆された。

本研究は、雌性生殖がどのような分子機構によって成り立っているのかを理解するためにおこなったものである。サブトラクションの結果から注目した、11 種の候補遺伝子の中には、サブトラクションに用いた個体同士では確かに発現に差が見られるが、複数個体で比較すると、生殖システムによる違いは見られないものなども存在した。最終的には、候補遺伝子 T12 が雌性生殖ギンブナ卵巣に、D12、D78 が有性生殖ギンブナ卵巣に特徴的な発現を示したが、それぞれの遺伝子が卵形成においてどのように関わっているかは、未知である。雌性生殖機構の分子レベルでの理解に向けて、今後、これら 3 つの候補遺伝子の全長が明らかにされ、その機能や発現が子細に解析されることが望まれる。また、今回と同様の解析を行う場合、PCR 法を利用したサブトラクション法については、どの程度発現に差があれば特異的遺伝子が検出されるのか、あるいは発現量の非常に少ない遺伝子は検出できるのかといったことが、今後の課題となるだろう。

## 5. 参 考 文 献

- Babin, P. J., Thisse, C., Durliat, M., Andre, M., Akimenko, M-A., and Thisse, B. (1997)  
Both apolipoprotein E and A-I genes are present in a nonmammalian vertebrate and are highly expressed during embryonic development.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 8622-8627
- Diatchenko, L., Lau, Y.-F. C., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D., and Siebert, P. D. (1996)  
Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 6025-6030
- Chun, F. L., Yang, S. T., and Gui, J. F. (2001)  
Differential screening and characterization analysis of the egg envelope glycoprotein ZP3 cDNAs between gynogenetic and gonochoristic crucian carp.  
Cell Research, 11, 17-27
- Hamada, S., and Fujita, S. (1983)  
DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry.  
Histochemistry, 79, 219-226
- Hasegawa, H., Kiyokawa, E., Tanaka, S., Nagashima, K., Gotoh, N., Shibuya, M., Kurata, T., and Matsuda, M. (1996)  
DOCK 180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane.  
Mol. Cell Biol., 4, 1770-1776
- Liang, P. & Pardee, A. B. (1992)  
Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction  
Science, 257, 967-971
- Nolane, K. M., Barrett, K., Lu, Y., Hu, K. Q., Vincent, S., and Settleman J. (1998)  
Myoblast city, the Drosophila homolog of DOCK180/CED-5, is required in a Rac signaling pathway utilized for multiple developmental processes.  
Genes Dev., 12, 3337-3342
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. (1995)  
Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray.  
Science, 270, 467-470
- Steyrer, E., Barber, D. L., and Schneider, W. J. (1990)  
Evolution of lipoprotein receptors.  
J. Biol. Chem., 265, 19575-19581

Wu, Y. C. & Horvitz, H. R. (1998)

*C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180.

*Nature*, 392, 442-443

Xie, J., Wen, J.-J., Chen, B. and Gu, J. F. (2001)

Differential gene expression in fully-grown oocytes between gynogenetic and gonochoristic crucian carps.

*Gene*, 271, 109-116

Yamaguchi, I., Hasegawa, K., Takahashi, N., Gejyo, F., and Nakai, N. (2001)

Apolipoprotein E inhibits the depolymerization of beta 2-microglobulin-related amyloid fibrils at neutral pH.

*Biochemistry*, 40, 8499-8507





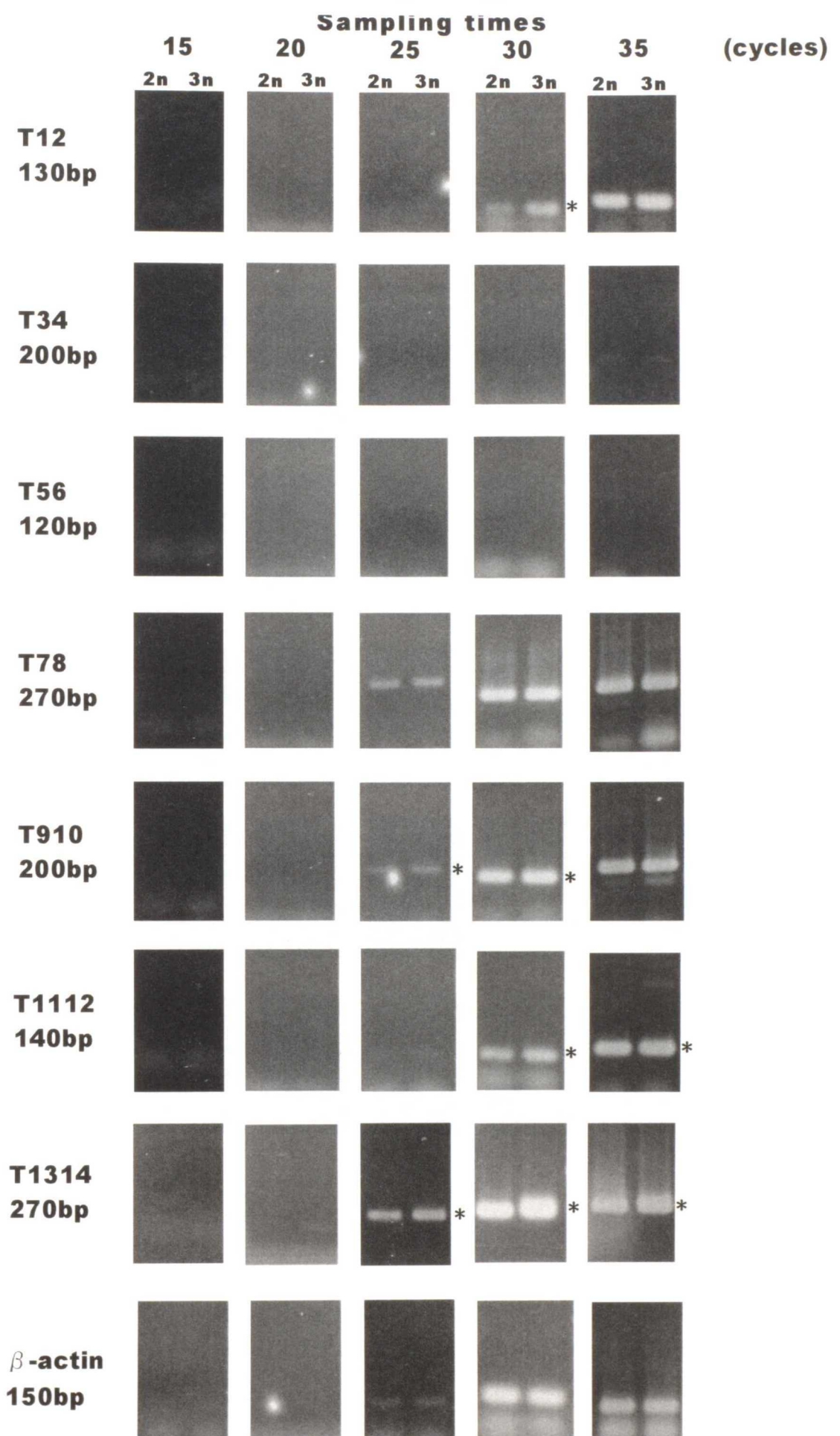


図2 STの候補遺伝子についてのRT-PCRの結果：2nと3nはそれぞれ2倍体有性生殖個体、3倍体雌性生殖個体を示す。\*は3倍体雌性生殖ギブナのほうが濃いバンドを示す。

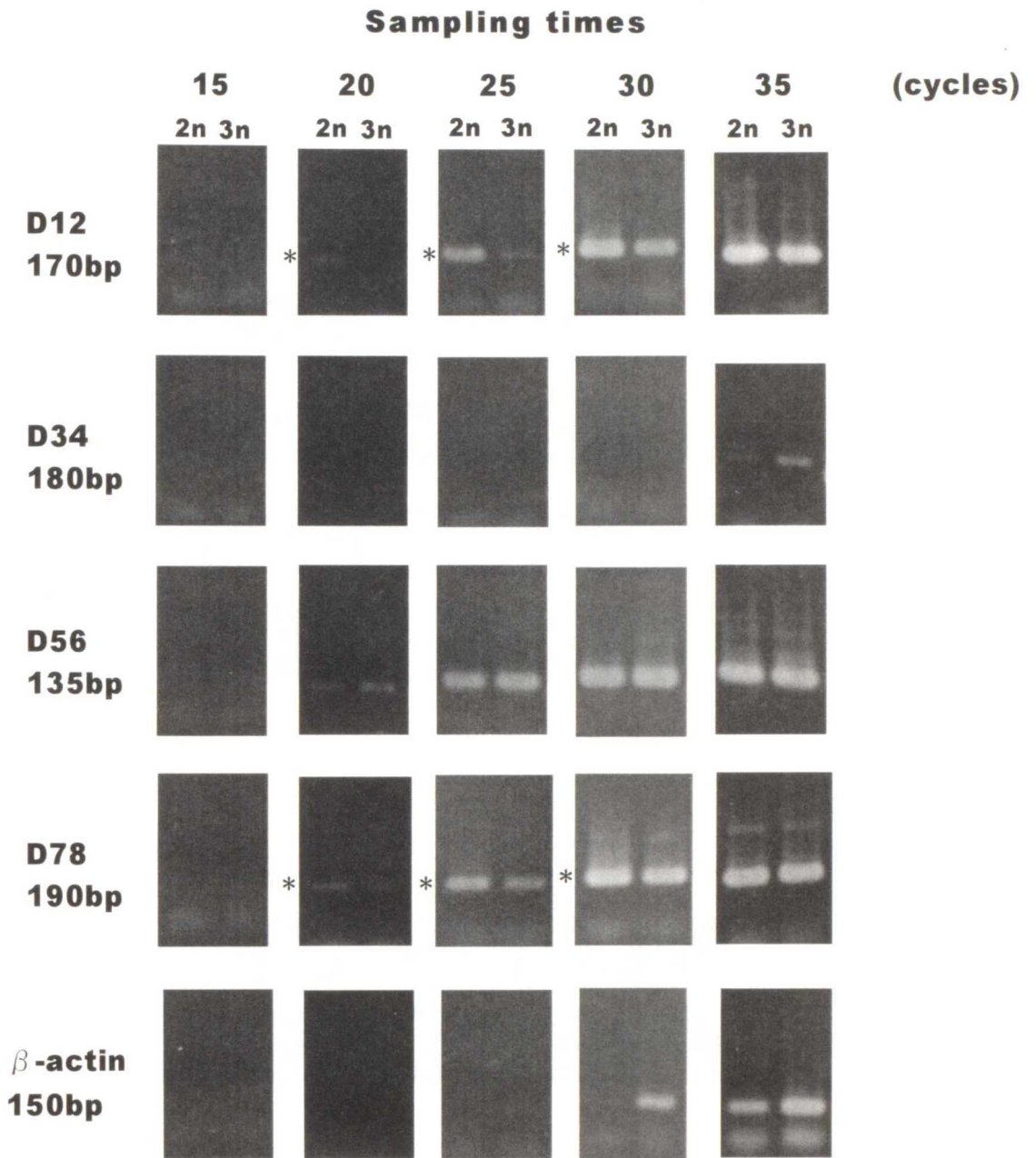


図3 SDの候補遺伝子についてのRT-PCRの結果：2nと3nはそれぞれ、2倍体有性生殖個体、3倍体雌性生殖個体を示す。  
\*は2倍体有性生殖ギンブナのほうが濃いバンドを示している。

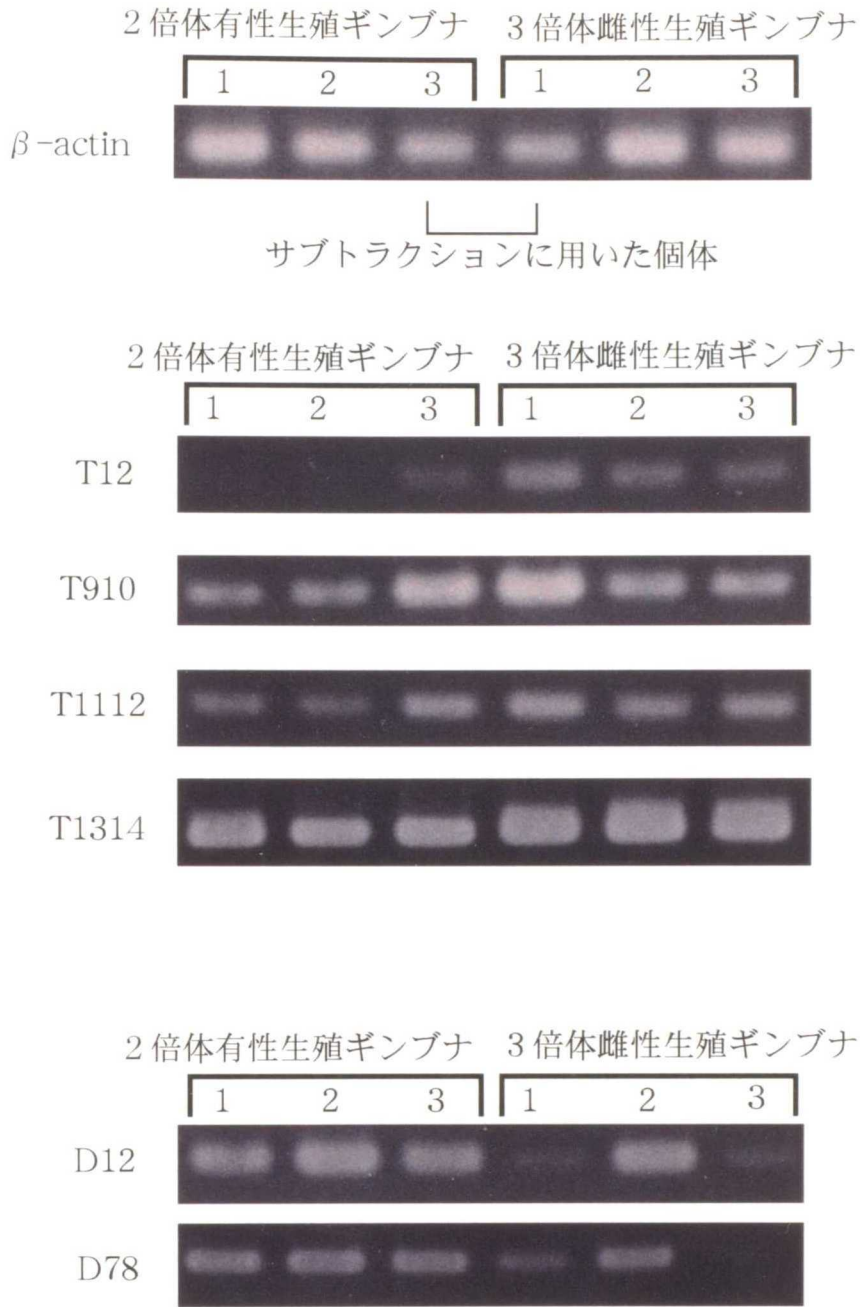


図4 複数個体を用いたRT-PCRの結果: 2 倍体有性生殖ギンブナ 3 と 3 倍体雌性生殖ギンブナ 1 はサブトラクションに用いた個体である。写真右に候補遺伝子名を示した。

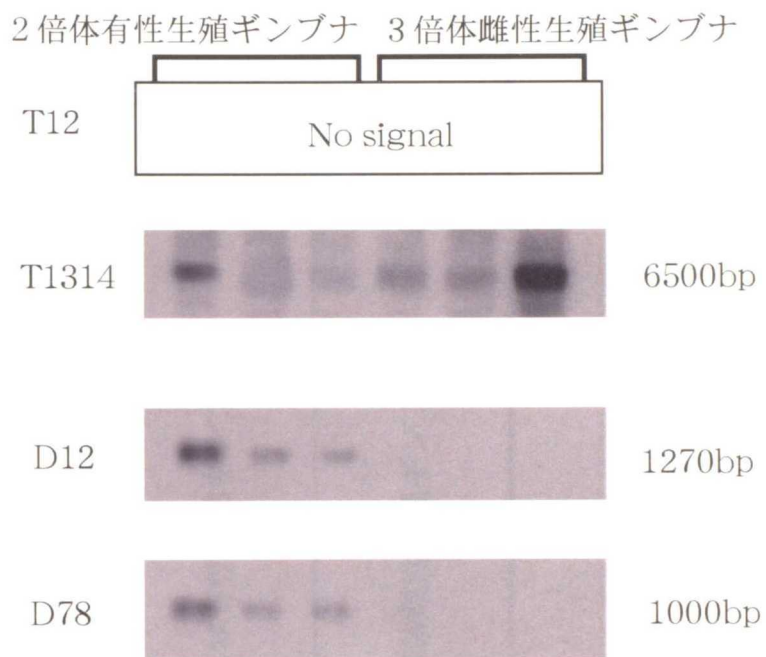
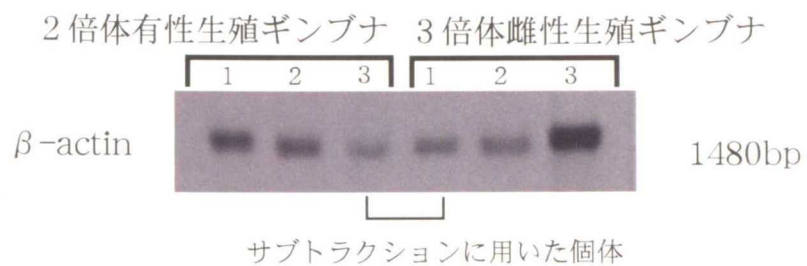


図5 ノーザンブロットハイブリダイゼーションの結果：写真の左にプローブとして用いた候補遺伝子を示した。写真右はRNAマーカを基に計算されたバンドサイズ。2倍体有性生殖ギンブナ3と3倍体雌性生殖ギンブナ1は、サブトラクションに用いた個体である。

表1 サブトラクション・クローンの種類

	既知遺伝子に相同性が	
	40%以下のクローン	40%以上のクローン
	テスターサンプル	ドライバーサンプル
	クローン数 (80bp以上の長さ)	クローン数 (80bp以上の長さ)
ST*	3 倍体雌性生殖ギンブナ	2 倍体有性生殖ギンブナ
	170	51
	119	
SD*	2 倍体有性生殖ギンブナ	3 倍体雌性生殖ギンブナ
	164	57
	107	

\* 本文を参照

表2 遺伝子種の分類

	ST		SD	
	クローン数	遺伝子種	クローン数	遺伝子種
総数	170	111	164	125
未知遺伝子	51	49 (44.1%)	57	55 (44%)
既知遺伝子	119	62 (55.9%)	107	70 (56%)
相同性の高かった既知遺伝子の主な分類				
核タンパク質/DNA複製	4	4	4	4
細胞骨格系	11	6	12	7
シグナル伝達系	11	7	30	8
転写	1	1	3	3
代謝系	9	9	2	2
アポトーシス	1	1	4	4
細胞内輸送系	6	5	6	5
増殖、分化	6	6	2	1
リボゾームタンパク質	51	4	19	17
その他	19	19	25	19

表3 候補遺伝子

候補遺伝子名	遺伝子種	クローン数	Primer name	Sequence (5'-3')
T12	Homo sapiens DOCK180 (dedicator of cyto-kinesis)	1	ST1 ST2	GAAGATTCGTGGGAGCACTG TTCTCCTTGTCTCGTCGTGC
T34	Danio rerio ERK (extracellular signal-related kinase) 1	1	ST3 ST4	GACATCCCTCATAACAATCG TATGGGATGGTCTGTTCAGC
T56	Mus musculus MAD2 (mitotic arrest deficient, homologue)-like 1	1	ST5 ST6	ACTCCCTTCAGTGTGATTCC CGCACACGATTTTCAGACG
T78	Xenopus laevis mis5 (minichromosome maintenance deficient)	1	ST7 ST8	CCGCCGCTGTGGTCAAAGACG CGTTCTGTTTGAGAGACTTGGCG
T910	Danio rerio receptor for activated protein kinase C (RACK1)	1	ST9 ST10	GGACGAGAGTCACACAGAGTGGG GAGGCACAGAGAGACCCCATCAGG
T1112	Rattus norvegicus ADP-ribosylation factor 3	2	ST11 ST12	GCAAGAGTGTGAACGCTAAAAAG ACTGGACAAAAAGCAGGAGGC
T1314	未知遺伝子	3	ST13 ST14	CACAGGAGTCACCTTTGCCG TGTGTTCTTCTGCCAAC
D12	Danio rerio apolipoprotein E precursor	2	SD1 SD2	GCTTGACACCCCTGATTAGTG TGGTGGTGGTTCCTTAGC
D34	Cyprinus carpio cystatin	6	SD3 SD4	CGATGCGTTTGTGCGTAAGG TAATGTCGCACCTGAATGGC
D56	Homo sapiens TSC (tuberous sclerosis) 1	2	SD5 SD6	GACTGTGTACCAAAAACGCC GGATTCACCTGATGGAGGAGC
D78	未知遺伝子	2	SD7 SD8	GGTTGGTAGGAAGGGTTAGG TGCTGCTATGGAGGTTTGTC

表4 RT-PCRとノーザンハイブリダイゼーションの結果のまとめ

候補遺伝子名	サブトラクションに用いた 2個体でのRT-PCR	複数個体でのRT-PCR	ノーザンプロット ハイブリダイゼーション
T12	雌性生殖ギンブナに濃いバンド	雌性生殖ギンブナで増幅大	シグナルなし
T34	増幅なし	-	-
T56	増幅なし	-	-
T78	差なし	-	-
T901	雌性生殖ギンブナに濃いバンド	差なし	-
T1112	雌性生殖ギンブナに濃いバンド	差なし	-
T1314	雌性生殖ギンブナに濃いバンド	雌性生殖ギンブナで増幅大	発現量の差は不明確
D12	有性生殖ギンブナに濃いバンド	有性生殖ギンブナで増幅大	有性生殖ギンブナで発現大
D34	増幅なし	-	-
D56	増幅なし	-	-
D78	有性生殖ギンブナに濃いバンド	有性生殖ギンブナで増幅大	有性生殖ギンブナで発現大



## 謝 辞

本論をまとめるにあたり、終始懇切なる御指導と御助言を賜りました麻布大学獣医学部分子生物学研究室教授、藤谷英男博士、動物工学研究室教授、舘 鄰博士および生理学第一研究室教授、松下博治博士に深く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なる御指導御鞭撻を賜りました獣医学部分子生物学研究室講師、村上賢博士に心より感謝いたします。

実験手法について、御指導を賜りました農業資源生物研究所室長、野田博明博士に心より感謝いたします。

本研究を行うにあたり、多大な御指導と御協力を頂いた麻布大学分子生物学研究室の皆様、厚く御礼申し上げます。最後に、研究生生活を支えていただいた父・健四、母・訓子に感謝いたします。