

鳥類プロラクチンに関する分子遺伝学的研究

麻布大学大学院獣医学研究科動物応用科学専攻

動物資源育種学 檜山 源

2006 年度

博士論文

鳥類プロラクチンに関する分子遺伝学的研究

麻布大学大学院獣医学研究科動物応用科学専攻博士後期課程

動物資源育種学

DA0404 檜山 源

目次

第 1 章	総合緒言	…1 頁
第 2 章	ニワトリ胚発生期及び繁殖周期における PRL アイソフォーム解析	
	Ⅰ. 緒言	…6 頁
	Ⅱ. 材料及び方法	…8 頁
	Ⅲ. 結果	…10 頁
	Ⅳ. 考察	…12 頁
	Ⅴ. 要約	…14 頁
	Ⅵ. 図	…15 頁
第 3 章	キジ目鳥類における成熟 PRL cDNA 及びウエスタンブロット解析	
	Ⅰ. 緒言	…22 頁
	Ⅱ. 材料及び方法	…24 頁
	Ⅲ. 結果	…27 頁
	Ⅳ. 考察	…29 頁
	Ⅴ. 要約	…31 頁
	Ⅵ. 図	…32 頁
	Ⅶ. 表	…38 頁
第 4 章	キジ目鳥類における PRL プロモーター構造解析	
	Ⅰ. 緒言	…39 頁
	Ⅱ. 材料及び方法	…41 頁
	Ⅲ. 結果	…43 頁
	Ⅳ. 考察	…44 頁
	Ⅴ. 要約	…46 頁
	Ⅵ. 図	…47 頁
	Ⅶ. 表	…51 頁
第 5 章	晩成性鳥類における PRL cDNA 及びプロモーター構造解析	
	Ⅰ. 緒言	…52 頁
	Ⅱ. 材料及び方法	…53 頁

III. 結果	…55 頁
IV. 考察	…56 頁
V. 要約	…58 頁
VI. 図	…59 頁
VII. 表	…65 頁
第 6 章 総合考察	…67 頁
総合要約	…72 頁
謝辞	…74 頁
引用文献	…75 頁

第1章 総合緒言

プロラクチン (PRL) は、脊椎動物の下垂体前葉において合成、分泌されるペプチドホルモンであり、成長ホルモン (GH)、胎盤性ラクトジェン (PL) 等と類似した高次構造や生物学的特徴を持つことから、共通の祖先遺伝子より遺伝子重複により分化したと考えられており、系統遺伝学的には極めて古いホルモンであるとされている (Niall *et al.*, 1971; Miller and Eberhardt, 1983; Nicoll *et al.*, 1986)。PRL は広範な脊椎動物種において多彩な生理作用を示すことが知られている (Ensor, 1978)。主な機能として、哺乳類においては、乳タンパク質合成促進、黄体刺激作用等が挙げられる (Astwood, 1941; Nevill and Daniel, 1987)。両生類においては、早発性変態を妨げ、幼生のまま発育、成長するように調節を行う、変態抑制機能を示すことが知られている (Tata *et al.*, 1991)。また、魚類においては、多くの硬骨魚において、水、電解質調節を介し淡水適応をに關与する (Hirano, 1986)。鳥類においても PRL は非常に多くの作用を示すことが明らかとされており、他の動物種と類似した機能として、免疫機能の向上 (Skwarlo-Sónta, 1992; Moreno *et al.*, 1994)、ハトにおける素囊ミルク産生 (Nicoll, 1967)、尿中 NaCl の再吸収促進による浸透圧調節 (Doneen *et al.*, 1982; Murphy *et al.*, 1986)、性腺機能抑制 (Zadworny *et al.*, 1989)、性腺刺激ホルモン分泌の制御 (El Halawani *et al.*, 1991) 等が挙げられる。一方、鳥類特有の機能としては、換羽制御 (Dawson, 2006)、抱卵及び育雛行動からなる就巢行動の誘起 (Sharp *et al.*, 1989; Youngren *et al.*, 1991)、抱卵行動中の個体に認められる前腹部羽毛の脱離による就巢斑形成の制御 (Hutchison, 1967) が挙げられる。

鳥類における PRL と就巢行動に関する研究は、Riddle ら (1935) が、ヒツジ PRL をニワトリに投与することにより、抱卵誘起の効果が報告されたことに始まる。さらに、就巢期及び非就巢期におけるニワトリ下垂体抽出物を、ハト素囊に対し投与することによる素囊ミルク産生量を比較したバイオアッセイにより、就巢期下垂体においては PRL 濃度が高いことが明らかとされた (Nakajo and Tanaka, 1956)。その後、ニワトリ、シチメンチョウ下垂体より PRL が抽出、精製され、特異的かつ高感度なラジオイムノアッセイが開発され (Scanes *et al.*, 1975; Burke and Papkoff, 1980; Proudman and Opel, 1981; Etches and Cheng, 1982)、血液や下垂体に含まれる PRL の測定が可能となったことにより、PRL と就巢行動との関連性解明のため、様々な鳥種において数多くの研究がなされてきた (Goldsmith and Williams, 1980; Dawson and Goldsmith, 1982; Hall and Goldsmith, 1983; Goldsmith *et al.*, 1984; Hector and

Goldsmith, 1985; Myers *et al.*, 1989; Seiler *et al.*, 1992; Dawson and Sharp, 1998; Vleck *et al.*, 2000; Sockman *et al.*, 2000; Lormée *et al.*, 2000)。

それらの研究により、シチメンチョウ、ニワトリ等といった、孵化直後から親鳥による給餌を必要とせず、雛鳥が能動的に摂食を行う早成性鳥類においては、産卵後期から血漿 PRL 濃度が急激に上昇し、抱卵期においてピークに達し、孵化直前あるいは孵化と同時に急激な減少を示すことが明らかとされた (Sharp *et al.*, 1979, 1988; Lea *et al.*, 1981; Lea and Sharp, 1982; Zadworny *et al.*, 1985, 1988; El Halawani *et al.*, 1986; Youngren *et al.*, 1991; Kuwayama *et al.*, 1992)。一方、ハトやモズ等といった、孵化後一定期間において親鳥による給餌を必要とする晩成性鳥類においては、産卵後期及び抱卵初期における血漿 PRL 濃度の急激な増加は認められず、抱卵後期において急激に上昇し、孵化後の育雛初期においても高濃度が維持されることが明らかとなった (Buntin, 1979; Goldsmith *et al.*, 1981; Goldsmith, 1982; Janik and Buntin, 1985; Ramsey *et al.*, 1985; Lea *et al.*, 1986; Wingfield and Goldsmith, 1990; Wang and Buntin, 1999; Kikuchi *et al.*, 1999)。これら多くの報告から、早成性と晩成性の鳥種では、就巢行動に対する PRL 作用が異なることが明らかにされた。また、ニワトリやシチメンチョウの下垂体前葉における PRL mRNA 量においても、血漿 PRL 濃度と同様に、産卵後期に上昇し、抱卵期において非常に高い値を示すことも明らかにされている (Shimada *et al.*, 1991; Talbot *et al.*, 1991; Wong *et al.*, 1992; Kansaku *et al.*, 1994; Karatzas *et al.*, 1997)。さらに、PRL に対する受動免疫により、産卵期の延長や就巢行動が抑制されることが明らかとされている (Crisóstomo *et al.*, 1997; March *et al.*, 1994)。

PRL の合成及び分泌は、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) (Murdoch *et al.*, 1983, 1985)、エストロゲン (Maurer, 1982; Shull and Gorski, 1984)、血管作動性腸ポリペプチド (VIP) (Carrillo *et al.*, 1985; Escalada *et al.*, 1996)、上皮成長因子 (EGF) (Supowit *et al.*, 1984; Stanley, 1988) 等により促進的制御を受け、ドーパミン (Maurer, 1981; Albert *et al.*, 1990)、TGF- β (Delidow *et al.*, 1991)、 γ -アミノ酪酸 (GABA) (Loeffler *et al.*, 1985) 等により抑制的制御を受けることが知られている。特に哺乳類においては、PRL 合成及び分泌における主要因子はドーパミンであり、抑制的に制御されていることが明らかとされている (MacLeod and Lehmeyer, 1974)。一方、鳥類においては、哺乳類とは大きく異なり、主として VIP により促進的に制御されていることが明らかとされている。

早成性鳥類であるニワトリ及びシチメンチョウにおいて、VIP は下垂体前葉前部に作用し、PRL 転写量、PRL 分泌量及び PRL mRNA 量を増加させる働きを持ち、その経路には cAMP が関与していることが明らかとされている (Macnamee *et al.*, 1986; Knapp *et al.*, 1988; Talbot *et al.*, 1991, 1995; Pitts *et al.*, 1994; Youngren *et al.*, 1994; Tong *et al.*, 1998; Chaiseha and El Halawani, 1999; Kang *et al.*, 2002)。さらに、ニワトリ下垂体細胞を用いた初代培養実験により、VIP は細胞内 cAMP 濃度を増加させ、プロテインキナーゼ A を介し PRL の合成分泌を促進することも報告されている (Kansaku *et al.*, 1998)。また、PRL と同様に、VIP に対する受動免疫や能動免疫により、産卵数の上昇や就巢行動の抑制を行うことが可能であることも報告されている (Sharp *et al.*, 1989; El Halawani *et al.*, 1995)。晩成性鳥類であるハトにおいても同様に、抱卵行動、育雛行動と視床下部 VIP 量の間には正の関係が認められることが報告されている (Lea *et al.*, 1991)。以上のことから、VIP により PRL 遺伝子発現が制御され、PRL の発現及び合成が就巢行動誘起あるいは維持に作用する機構は、晩成性、早成性を問わず、鳥類全体において共通した機構であると考えられている。

また、脊椎動物における PRL は、翻訳後修飾による糖鎖付加型アイソフォーム (G-PRL) が存在することが知られている (Sinha, 1995)。哺乳類における G-PRL は、妊娠や下垂体疾患等といった生理的、病理的状态により、その存在比率が変動することが知られている (Sinha *et al.*, 1990; Hoffmann *et al.*, 1992)。また、G-PRL は非糖鎖付加型 PRL (NG-PRL) と比較し、レセプターへの結合性及び免疫反応性等の生物活性が低いことが明らかとされている (Pellegrini *et al.*, 1988; Haro *et al.*, 1990)。このことから、哺乳類 PRL における糖鎖修飾は、標的組織に対する PRL 作用を選択的に抑制するための機構であると考えられている (Hoffmann *et al.*, 1993)。多くの哺乳類における G-PRL は、Asn (N) 型糖鎖結合によるものであり、ヒト、ヒヒ、ヒツジ、ブタ等における N 型糖鎖結合部位は共通しており、成熟 PRL 領域アミノ酸配列 31 番目における Asn-X-Ser (N-X-S) であることが明らかとされている (Lewis *et al.*, 1984, 1985; Pankov and Butnev, 1986; Cole *et al.*, 1991)。

鳥類においても同様に、G-PRL の存在が認められている (Corcoran and Proudman, 1991; Bédécarrats *et al.*, 1999a, b, c; Kansaku *et al.*, 2005)。シチメンチョウにおいては、繁殖周期等の生理的状态により G-PRL アイソフォームの存在比率が変動することが明らかとされている (Bédécarrats *et al.*, 1999a, b)。この変動は、体内における PRL 濃度の上昇と同調した変化を示し、就巢期においては G-PRL が 70%以上を占め

ることが報告されている。このことから、G-PRL が就巢行動発現に対し、何らかの機能を持つ可能性が示されているが、その詳細な機構は未だ不明である。シチメンチョウにおける結合糖鎖は、Bédécarrats ら (1999a) により N 結合型であることが明らかとされている。しかしながら、ヒトを含めた哺乳類においては、N 型糖鎖コンセンサス配列 (N-X-S/T) が存在するのに対し、シチメンチョウにおいてはコンセンサス配列が認められない。従って、N-X-S ではなく、56 及び 197 番目において認められる Asn-X-Cys (N-X-C) の配列が機能すると考えられている (Corcoran and Proudman, 1991)。56 番目における N-G-C 配列は、ニワトリ (Hanks *et al.*, 1989; Watahiki *et al.*, 1989) 及びアヒル (Kansaku *et al.*, 2005) においても同様に認められることから、機能的糖鎖結合配列である可能性が考えられる。しかしながら、アヒルにおいては 6 番目に哺乳類と同様の N-G-S 配列が存在することが明らかとされている。さらに、197 番目における N-N-C は、シチメンチョウにおいてのみ認められ、ニワトリ及びアヒルにおいては認められないが、PRL と類似した構造を持つニワトリ GH においても G-PRL の存在が報告されており (Berghman *et al.*, 1987)、N 型糖鎖結合部位は C 末端 188 番目における N-C-T であると考えられていることから (Souza *et al.*, 1984; Berumen *et al.*, 2004)、シチメンチョウ PRL C 末端に対する糖鎖付加の可能性も否定できない。従って、何れの配列においてもその機能の是非は明らかとされておらず、鳥類 PRL における機能的糖鎖コンセンサス配列は未だ決定されていない。

鳥類 PRL は、VIP により促進的に制御され、就巢行動を引き起こすことが明らかとされている。しかしながら、VIP による PRL 遺伝子発現経路及び PRL による就巢行動発現機構における詳細は未だ不明な点が多く、転写調節因子等の仲介物質や就巢期における G-PRL の意義等は解明されないまま今日に至っている。様々な鳥種において PRL 構造及び G-PRL アイソフォームにおける機能を含む作用機構の解析を行うことは、種特異的なアッセイ系の確立による、より詳細な機能及び作用機構の解明を可能とし、さらに鳥類共通の PRL 遺伝子発現機構及び就巢行動発現機構の解明に繋がると考えられ、将来的な鳥類における繁殖周期の人為的制御を可能とし、産業的にも動物応用科学的にも大きな意味を持つと言える。産業的には、産卵能力の改良による卵生産、特に付加価値卵の生産に応用することが可能である。一方、野生動物への応用を含めた動物応用科学的には、稀少鳥種の人為的繁殖による個体増加を試みる際に、産卵及び就巢行動の人為的誘起を制御することが将来的に可能となると考えられる。従って、本研究の第 2 章では、ニワトリにおける様々な生理的状态における G-PRL ア

イソフォーム比率変動の詳細及びその意義の解明、第 3 章では、ニワトリを含むキジ目鳥類における G・PRL の存在解明及び cDNA クローニングによるキジ目共通糖鎖コンセンサス配列の推定、第 4 章においては、キジ目鳥類共通の PRL 遺伝子発現調節機構解明のため、PRL プロモーター構造解析を行い、第 5 章においては、キジ目等の早成性鳥類とは繁殖期における PRL 作用が異なると考えられる晩成性鳥類における PRL cDNA 及びプロモーターの構造解析を行い、PRL の合成及び分泌、そして機能における鳥類共通性を分子遺伝学的な面から解析を行うことを目的とした。

第2章 ニワトリ胚発生期及び繁殖周期における PRL アイソフォーム解析

I. 緒言

脊椎動物における PRL は、糖鎖付加、リン酸化、ジスルフィド結合形成、脱アミノ化等といった翻訳後修飾を受けることにより、異なる特性を持つ様々なアイソフォームが存在することが知られている (Sinha, 1995)。中でも糖鎖付加は重要な修飾作用であると考えられており、下垂体 PRL において、クロコダイル及びアリゲーターにおいては約 60% (Noso *et al.*, 1992)、サル及びヒヒにおいては約 50% (Cole *et al.*, 1991) が糖鎖付加型 PRL (G-PRL) であることが明らかとされている。一方、ヒト、ラット、マウス及びウシ等においては、G-PRL の占める割合は 1~15% と低く、非糖鎖付加型 PRL (NG-PRL) が主であることが知られている (Lewis *et al.*, 1984, 1985; Sinha and Jacobsen, 1987)。この様に、G-PRL の存在量は動物種により大きな違いが認められているが、多くの動物種において、総 PRL における G-PRL の存在比率は、年齢、病理的状态の他、妊娠等といった生体内における生理的状态により大きな変動を示すことが知られている (Sinha *et al.*, 1990; Sinha, 1995)。

鳥類においても同様に、G-PRL の存在が認められている (Corcoran and Proudman, 1991; Bédécarrats *et al.*, 1999a, b, c; Kansaku *et al.*, 2005)。また、シチメンチョウにおける G-PRL は、分子量のほぼ等しい複数のアイソフォームが存在し、結合糖鎖は全て N 型糖鎖であり、その末端においてはシアル酸が結合していることが報告されている (Bédécarrats *et al.*, 1999a)。さらに、シチメンチョウにおいては、他の脊椎動物と同様、生理的状态の変化により G-PRL の存在比率が変動を示すことが報告されている。繁殖周期における G-PRL の比率は、生体内における総 PRL 濃度が高い就巢期において、非常に高い値を示し、総 PRL 濃度が低い換羽及び非産卵期においては低い値を示す (Bédécarrats *et al.*, 1999a)。さらに、胚発生期においても同様に、G-PRL の比率は、総 PRL 濃度と同調した変化を示す。シチメンチョウ胚発生期における PRL は、孵化 5 日前から孵化後の急速成長期へ向け急激に上昇するが、孵化 5 日前においては NG-PRL が主であり、孵化前後においては NG-及び G-PRL はほぼ 1 対 1 となり、孵化後 1 週間においては G-PRL が優勢となることが明らかとされている (Bédécarrats *et al.*, 1999b)。また、*in vitro* におけるシチメンチョウ下垂体に対する VIP 投与実験により、VIP は NG-PRL 及び G-PRL の合成を促進するが、それらの存在比率に対しては影響を与えないことが明らかとされている (Bédécarrats *et al.*, 1999c)。

鳥類における PRL cDNA クローニングは、ニワトリ (Watahiki *et al.*, 1989; Hanks *et al.*, 1989)、シチメンチョウ (Wong *et al.*, 1991)、及びアヒル (Kansaku *et al.*, 2005) において行われている。その結果、3 種における推定 N 型糖鎖コンセンサス配列において、興味深い相違が認められた。一般に、N 型糖鎖はセリン (Ser) またはスレオニン (Thr) の 2 残基上流に位置するアスパラギン (Asn) を認識し (N-X-S/T)、結合する。しかしながら、N 型糖鎖コンセンサス配列である N-X-S/T 配列は、アヒル成熟 PRL 領域アミノ酸配列 6 番目においてのみ認められ、ニワトリ及びシチメンチョウにおいては認められない。一方、哺乳類における上皮成長因子受容体 (EGFR) や Alpha1 Tubulin- β 等において報告されている N 型糖鎖に対する新型コンセンサス配列 Asn-X-Cys (N-X-C: Araki *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2000) は成熟 PRL 領域アミノ酸配列 56 番目において、3 種に共通して認められる。また、シチメンチョウにおいては、成熟 PRL 領域 C 末端においても N-X-C 配列の存在が確認されている。しかしながら、2 箇所の N-X-C 及び N-X-S 配列における機能は未だ明らかとされていない。

PRL と類似した構造を持つ、ニワトリ GH においても G-PRL の存在が報告されている (Berghman *et al.*, 1987)。ニワトリ GH における N 型糖鎖コンセンサス配列は C 末端 188 番目における N-C-T のみであることから、C 末端におけるこの配列が糖鎖結合部位であると考えられている (Souza *et al.*, 1984; Berumen *et al.*, 2004)。このことから、シチメンチョウ PRL においては 56 番目における N-G-C のみならず、C 末端に存在する N-N-C に対し、糖鎖が結合する可能性が考えられ、推定糖鎖コンセンサス配列が 56 番目のみであるニワトリ等における繁殖周期や胚発生期等の生理的状态の変化によるアイソフォーム比率がシチメンチョウと同様の変化を示すか否かは不明である。従って、本章においては、キジ目 PRL における糖鎖結合部位決定のための第一歩として、シチメンチョウとは異なり、N-X-C 配列が 56 番目のみに認められるニワトリにおいて、異なる繁殖期及び胚発生期における PRL アイソフォームを同定することを目的とした。

II. 材料及び方法

試薬は特に記述のないものについては和光純薬の特級を用いた。

試薬の調整には MilliQ ラボ (MILLIPORE) によりフィルターろ過した蒸留水をジエチルピロカーボネート処理し一晚放置後オートクレーブしたものを用いた。

ニワトリ下垂体前葉採取及び下垂体前葉からの細胞質タンパク質抽出

本実験においては、愛知県農業総合試験場より提供されたナゴヤを用いた。繁殖周期におけるサンプルを得るため、ナゴヤ成鶏 15 羽を用い、自由給餌、自由給水、個別平飼ケージにて飼育を行った。まず、産卵停止及び換羽を促すため、短日条件（6 時間明期、18 時間暗期）において 6 週間飼育し、その後長日条件（15 時間明期、9 時間暗期）に変更し、産卵及び就巢行動を誘起した。胚発生期におけるサンプルは、ナゴヤ受精卵を用い、37.5℃に保温した孵卵器内にて孵卵した。

ニワトリにおける異なる繁殖期（非産卵、産卵、就巢、 $n=3\sim5$ ）、異なる胚発生期（孵卵 15、17、19 日目、孵化 1、3 日目、 $n=4$ ）より採取した下垂体前葉を、組織と等量の 10mM Tris-HCl（pH 8.0）、1mM EDTA、0.5% Tween 20 を加え、ポッターホモゲナイザー（Weaton）を用い、氷上にてホモジネートを行った。その後、等量の 10mM Tris-HCl、1mM EDTA、0.1mM Benzylsulfonil Fluoride、1 μ M pepstatin、及び 1 μ M leupeptin を加え、15000rpm、10 分間の遠心分離を行い、上清を回収した。回収した下垂体タンパク質は、1 μ g/ μ l に濃度を調製した。

Glycopeptidase F 及び neuraminidase による酵素処理

Glycopeptidase F (Takara) を用い、抽出した下垂体タンパク質における N 型糖鎖解離を試みた。抽出タンパク質 25 μ g、0.2M 2-Mercaptoethanol を添加したキット付属の Denature Buffer 2.5 μ l を混和し、100℃、3 分の熱変性を行った。その後、Stabilizer Solution 5 μ l、ミリ Q 水 13 μ l、Glycopeptidase F 1mU を加え混和した後、37℃、15 時間インキュベートし、SDS-PAGE に用いた。また、neuraminidase (Roche) を用い、糖鎖末端におけるシアル酸除去を試みた。酵素処理は Bédécarrats ら (1999a) の方法に従い行い、SDS-PAGE に用いた。

ウエスタンブロット解析

異なる生理的状态におけるニワトリ下垂体前葉より抽出したタンパク質及び

Glycopeptidase F 処理タンパク質、neuraminidase 処理タンパク質をそれぞれ 10 μ g 用い、25mM Tris、192mM Glycine を緩衝液とし、35mA 定電流条件下にて SDS・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS・PAGE) を行い、タンパク質を分画した。また、2-Mercaptoethanol によるジスルフィド結合の還元及び非還元状態におけるバンドパターンの変化についても検証した。SDS・PAGE ゲルは、シチメンチョウにおける報告 (Bédécarrats *et al.*, 1999a) に準じたショートゲル (0.75mm 厚、8cm 長) 及び、より高分離能を得るため、ロングゲル (1mm 厚、20cm 長) の 2 種を用いた。その組成は、分離ゲル : 375mM Tris-HCl (pH 8.8)、0.1% SDS、15% アクリルアミド溶液、濃縮ゲル : 125mM Tris-HCl (pH 6.5)、0.1% SDS、4.5% アクリルアミド溶液とした。また、分子量マーカーとして、Prestained SDS・PAGE Standards Broad Range (6.5-195.7kDa : Bio-Rad Laboratories) を用いた。SDS・PAGE 終了後、25mM Tris、192mM Glycine、20% methanol を緩衝液とし、セミドライ式ブロッキング装置 (Trans Blot SD Cell : Bio-Rad Laboratories) を用い、15V 定電圧条件下にて 45 分間のエレクトロブロットにより、タンパク質を PVDF メンブレン (GE Healthcare) へ転写した。その後、PBS-T (137mM NaCl、2.68mM KCl、1.47mM KH₂PO₄、1.69mM Na₂HPO₄、0.5% Tween 20)、5% non fat dry milk を用いメンブレンのブロッキングを 1 時間行い、PBS-T により洗浄した (10 分 3 回)。洗浄後、テキサス A&M 大学 Dr. Berghman より提供されたマウス抗リコンビナントニワトリ PRL モノクローナル抗体を PBS-T により 2000 倍希釈し、メンブレンを 1 時間インキュベートした。インキュベートの後、再びメンブレンの洗浄 (10 分 3 回) を行い、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare) を TBS-T により 25000 倍希釈し、1 時間インキュベートした。2 次抗体によるインキュベートの後、10 分 3 回の洗浄を行い、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) をメンブレン表面へ添加し、5 分間室温にてインキュベートした後、化学発光シグナルを ECL Mini-Camera (GE Healthcare) によりボラロイドフィルム (FP-3000B : 富士フィルム) へ感光させ検出した。

得られた結果における、PRL アイソフォームの存在比率は、画像をデジタル化した後、Scion Image (Scion Corporation) を用い、面積解析により測定した。

Ⅲ. 結果

ニワトリにおける PRL アイソフォーム検出のため、8cm のショートゲルを用い、SDS-PAGE を行った結果、孵卵 15 日目を除く全てのステージにおいて、分子量約 23kDa 及び 25kDa 付近において PRL が検出された (図 1-A、2-A)。さらに、各ステージにおいて検出された PRL シグナル強度は、胚発生期においては、孵卵 17 日目より孵化へ向け増加し、繁殖周期においては、非産卵、産卵、就巢の順での増加が認められた。また、Glycopeptidase F 処理を行ったところ、孵卵 15 日目を除く全てのステージにおいて 23kDa のバンドのみが検出された (図 1-D、2-D)。このことから、24~25kDa 付近において認められた PRL は、N 型糖鎖付加型アイソフォーム (G-PRL) であり、23kDa に認められた PRL が非糖鎖付加型 PRL (NG-PRL) であることが明らかとなった。

さらに、より明確に PRL アイソフォームを分画するため、20cm のロングゲルを用いた SDS-PAGE を行ったところ、胚発生期における孵卵 15 日目を除く全てのステージにおいて、少なくとも 2 つの分子量の異なる G-PRL が共通して検出された (図 1-B、C)。一方、繁殖ステージにおいては、非産卵期においては少なくとも 2 つ、産卵期においては少なくとも 3 つ、就巢期においては少なくとも 5 つの分子量の異なる G-PRL が 24~26kDa 付近において検出された (図 2-B、C)。また、異なる繁殖期及び胚発生期において認められるアイソフォームの分子量を比較した結果、胚発生期において認められる 2 つの G-PRL は、非産卵期において認められるアイソフォームと分子量が一致した (図 3)。また、各 G-PRL アイソフォームの凡その分子量は、胚発生期及び非産卵期 (24.6kDa、25.0kDa)、産卵期 (24.6kDa、25.0kDa、25.5kDa)、就巢期 (24.0kDa、24.3kDa、24.6kDa、25.0kDa、25.5kDa) であった。

neuraminidase によりシアル酸除去を行ったところ、非産卵期及び産卵期における G-PRL アイソフォームは 1 本のバンドとして検出されたことから、非産卵期及び産卵期において認められた分子量の異なる G-PRL は、シアル酸の結合数の違いによるものであることが明らかとなった。一方、就巢期における G-PRL は、シアル酸除去により、バンドの数は減少したが、複数の分子量の異なる G-PRL が認められた。従って、就巢期における G-PRL アイソフォームはシアル酸の結合数に加え、結合糖鎖の分岐構造が異なる G-PRL が存在することが明らかとなった (図 4)。

ジスルフィド結合非還元状態におけるウエスタンブロットの結果は、異なる繁殖期

及び胚発生期ともに、還元状態と比較し大きな変化は認められなかった(図1-E、2-E)。また、ニワトリ GH においては、ジスルフィド結合の非還元状態におけるウエスタンブロット解析により、通常の NG-GH、G-GH の他、分子量の大きな多量体が存在することが明らかとされている (Aramburo *et al.*, 2000)。同様に、ブタ PRL においても 2 量体の存在が報告されている (Pankov and Butnev, 1986)。これは、GH 及び PRL 各々の分子間におけるジスルフィド結合形成によるものであると考えられているが、本実験におけるニワトリ PRL においては非還元状態においても多量体は検出されなかった。

また、ウエスタンブロット解析により検出した PRL における G-PRL の平均面積率は、胚発生期においては、孵卵 17 日目：15.52% (内、分子量の大きい順に 10.83%、4.69%)、孵卵 19 日目：35.03% (16.21%、18.81%)、孵化 1 日目：48.11% (25.15%、22.96%)、孵化 3 日目：51.11% (25.83%、25.28%) となり、G-PRL 存在比率は総 PRL におけるシグナルの増加と同調し、孵卵 17 日目より孵化へ向け上昇傾向を示すことが明らかとなった (図 5、7-A)。また、胚発生期における 2 種の G-PRL 各々における存在比率の変動に関し、両者に大きな差異は認められず、何れのステージにおいてもほぼ同等の存在比率が示された。繁殖周期においては、非産卵期：17.51% (6.51%、11.00%)、産卵期：47.65% (18.67%、15.50%、13.48%)、就巢期：70.98% (19.14%、11.07%、15.35%、14.71%、10.71%) であり、G-PRL 存在比率は非産卵、産卵、就巢と上昇を示し、やはり総 PRL における検出シグナルと同調した変化を示した (図 6、7-B)。また、各アイソフォーム間における存在比率においては大きな差は認められなかった。

IV. 考察

本実験は、ニワトリ繁殖周期及び胚発生期における PRL アイソフォームの比率変動における詳細を、世界で初めて明らかにした研究である。本実験における新しい知見は、鳥類 PRL において初めて、胚発生期において 2 種、繁殖周期においては少なくとも 5 種の分子量の異なる G-PRL が検出された点である。さらに、検出された複数の G-PRL アイソフォームは、ブタ (Sinha *et al.*, 1991)、ヒト (Hoffmann *et al.*, 1992) 等における報告と同様、糖鎖分岐及びシアル酸結合数といった糖鎖構造が異なるアイソフォームであることが明らかとなった。また、G-PRL 存在比率は、繁殖周期及び胚発生期ともに総 PRL 量と同調した変化を示すが、その内容は大きく異なり、胚発生期においては、孵卵 17 日目以降、常に 2 つの G-PRL が主として存在し、G-PRL 存在比率の上昇は、既存のアイソフォーム種の増加によるものであるのに対し、異なる繁殖期における G-PRL の比率は、主として時期特異的アイソフォームの出現による種の増加によるものであることが明らかとなり、各 PRL アイソフォームにおける機能が異なる可能性が強く考えられた。

一般に、PRL 等のタンパク質に対し、糖鎖が結合することにより生物活性が低下し、レセプターへの結合性が低下することが知られている (Sinha *et al.*, 1991; Keeler *et al.*, 2003)。シチメンチョウ PRL においても同様に、G-PRL は PRL レセプターに対する結合能が低下することが報告されている (Corcoran and Proudman 1991)。しかし一方、ブタにおいては、G-PRL は NG-PRL と比較し、より高い活性を示すことが明らかとされている (Young *et al.*, 1990)。これらのことから、現段階においては鳥類 PRL における G-PRL アイソフォームの機能に関する明言は不可能である。従って、非産卵期または産卵期におけるニワトリに対し、G-PRL のみ、あるいは NG-PRL のみを投与することにより就巢行動が誘起されるか否かを検討する必要があると考えられる。また、各 PRL アイソフォームにおける固有の糖鎖構造及び機能解明のためには、より正確な分子量の測定及び各種レクチンへの反応性、さらに二次元電気泳動を用いた等電点の検討等を行うことにより各アイソフォームを同定した後、レセプターへの結合性等を検討する必要があると考えられる。

ニワトリ胚発生期において、孵卵 17 日目より下垂体における PRL 産生細胞の分化が始まり (Woods and Porter, 1998)、ほぼ同時期に PRL 量の増加 (Harvey *et al.*, 1979; Scanes *et al.*, 1987) 及び PRL mRNA 量の増加が認められ (Ishida *et al.*, 1991;

Kansaku *et al.*, 1994)、孵化後 1 週間の急速成長期へ向け上昇することが明らかとされている (Ishida *et al.*, 1991)。また、ニワトリ繁殖周期における PRL 量は換羽及び非産卵期において最も低く、産卵後期から就巢期へ向け上昇を示すことが明らかとされている (Sharp *et al.*, 1979; El Halawani *et al.*, 1986; Kansaku *et al.*, 1994)。胚発生期孵卵 17 日目以降において PRL が検出され、その後のステージにおいて検出されたシグナル強度が増加を示した点、及び繁殖周期において非産卵期から就巢期へ向け検出シグナルが増加した点に関しては、これまでの報告と一致した。しかしながら、孵卵 17 日目以降全てのステージにおいて、共通した 2 つの G-PRL が検出され、異なる繁殖期においては時期特異的な G-PRL が複数検出されたことから、ニワトリ胚発生期及び繁殖周期における下垂体 PRL 量の上昇は、単一種の PRL のみではなく、NG-PRL 及び 2~5 種の G-PRL による総合的な変化であることが明らかとなった。

本実験によるニワトリ各生理的状态における G-PRL の変化は、Bédécarrats ら (1999a, b) によるシチメンチョウにおける報告と比較し、生体内における PRL 濃度と同調した変化を示す点においては一致した。しかしながら、シチメンチョウにおいては分子量の異なる G-PRL は検出されていないことに対し、本実験においては複数の G-PRL が検出されたことから、G-PRL 内における比率変動様式は大きく異なることが明らかとなった。この要因として、第一には成熟 PRL 領域アミノ酸配列 197 番目における糖鎖コンセンサス配列 (N·N·C) の有無により糖鎖結合部位が変化した結果、G-PRL 構造が変化した可能性が考えられる。第二に、種特異的な糖鎖構造が存在し、シチメンチョウ及びニワトリにおいて、結合糖鎖構造が異なる可能性が考えられる。従って、ニワトリ及びシチメンチョウと近縁種である他のキジ目鳥類における糖鎖コンセンサス配列の保存性及び特異性、さらに G-PRL アイソフォームの存在を明らかにする必要があると考えられる。

V. 要約

ニワトリ、シチメンチョウ及びアヒル PRL において、G-PRL の存在が明らかとされており、成熟 PRL アミノ酸配列における糖鎖コンセンサス配列は、3 種において共通して 56 番目に認められる N-G-C、シチメンチョウにおいて 197 番目に認められる N-N-C、アヒルにおいて 6 番目に認められる N-G-S が考えられるが、それらの機能は未だ明らかとされていない。また、シチメンチョウにおいては、生理的状态の変化により、総 PRL における G-PRL の存在比率が変動を示すことが明らかとされている。従って、本実験においては、シチメンチョウとは異なり、糖鎖コンセンサス配列を 56 番目のみに持つニワトリにおける異なる繁殖期及び胚発生期における PRL 及び G-PRL 存在比率がどのような変動を示すかを明らかにすることを目的とし、ウエスタンブロット解析を行った。その結果、ニワトリ各繁殖期及び胚発生期においては、シチメンチョウにおける報告とは異なり、時期特異的アイソフォームを含め、少なくとも 5 種の分子量の異なる G-PRL が検出され、さらにそれら G-PRL アイソフォームはシアル酸の結合数及び糖鎖分岐構造が異なることが明らかとされ、各アイソフォームにおける機能が異なる可能性が考えられた。シチメンチョウにおける報告及び本実験結果との相違の原因として、197 番目における糖鎖コンセンサス配列の有無により、G-PRL アイソフォームにおける立体構造が異なる、又は種特異的糖鎖構造が存在する可能性が考えられた。

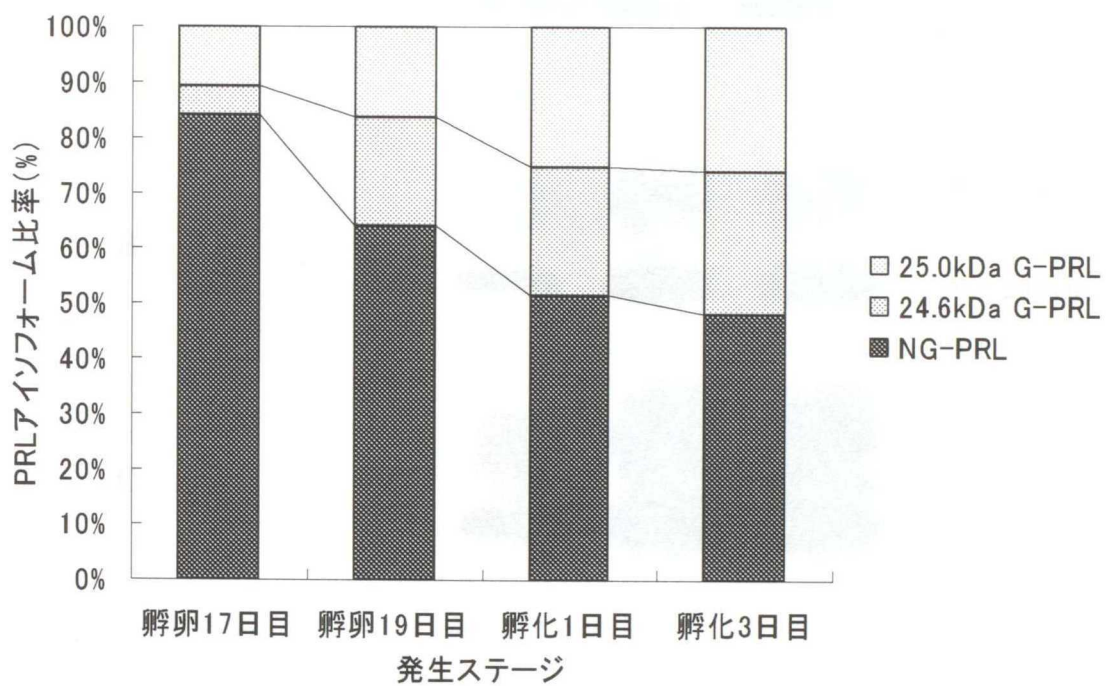


図5 ニワトリ胚発生期における PRL アイソフォームの面積解析結果

VI. 図

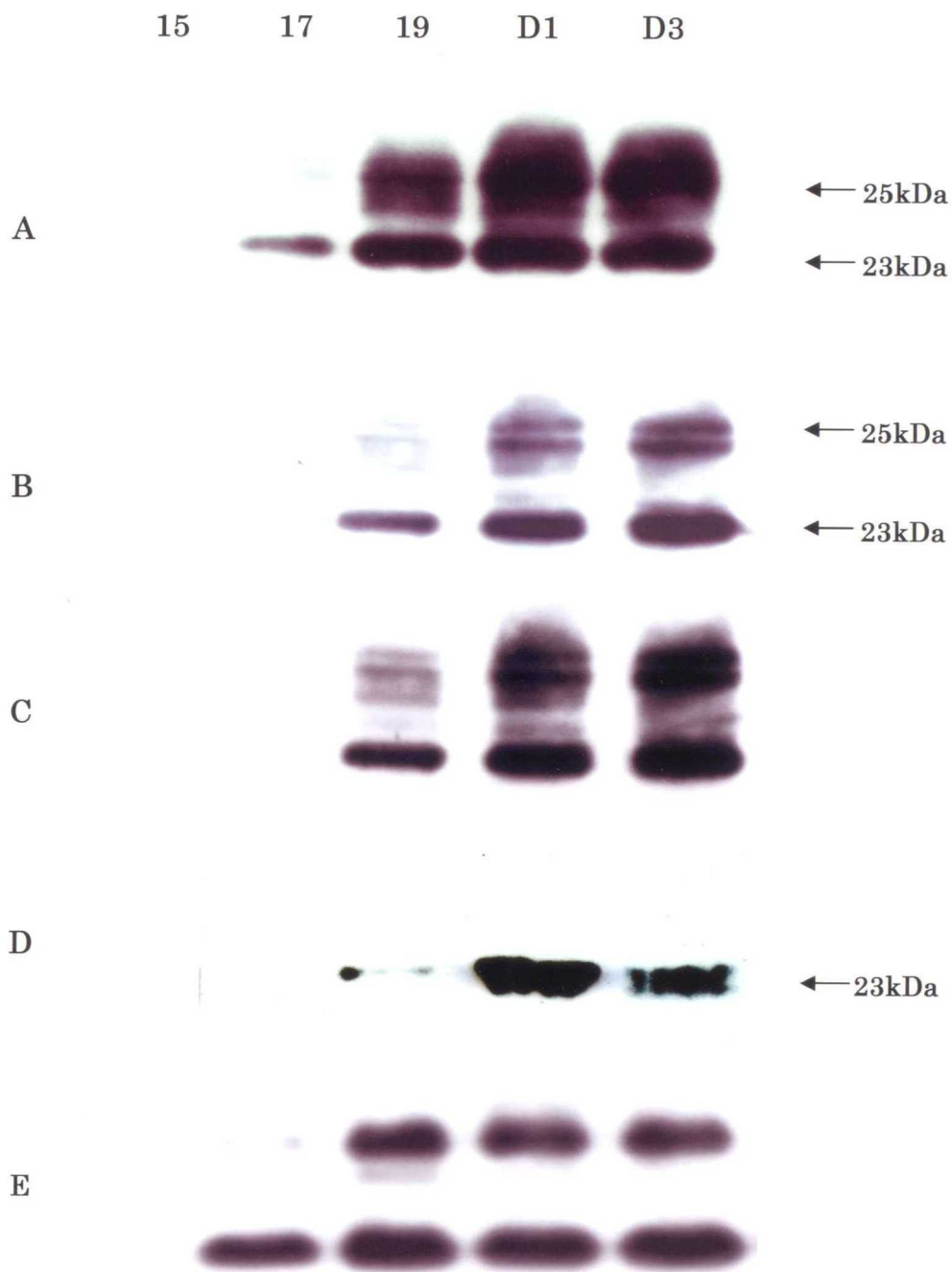


図 1 ニワトリ胚発生期 PRL におけるウエスタンブロット解析
レーン左から、孵卵 15、17、19 日目及び孵化 1 日目、3 日目
A：ショートゲル（8cm）、B：ロングゲル（20cm）、短時間露光、C：ロングゲル、長
時間露光、D：Glycopeptidase F 処理、E：ジスルフィド結合非還元

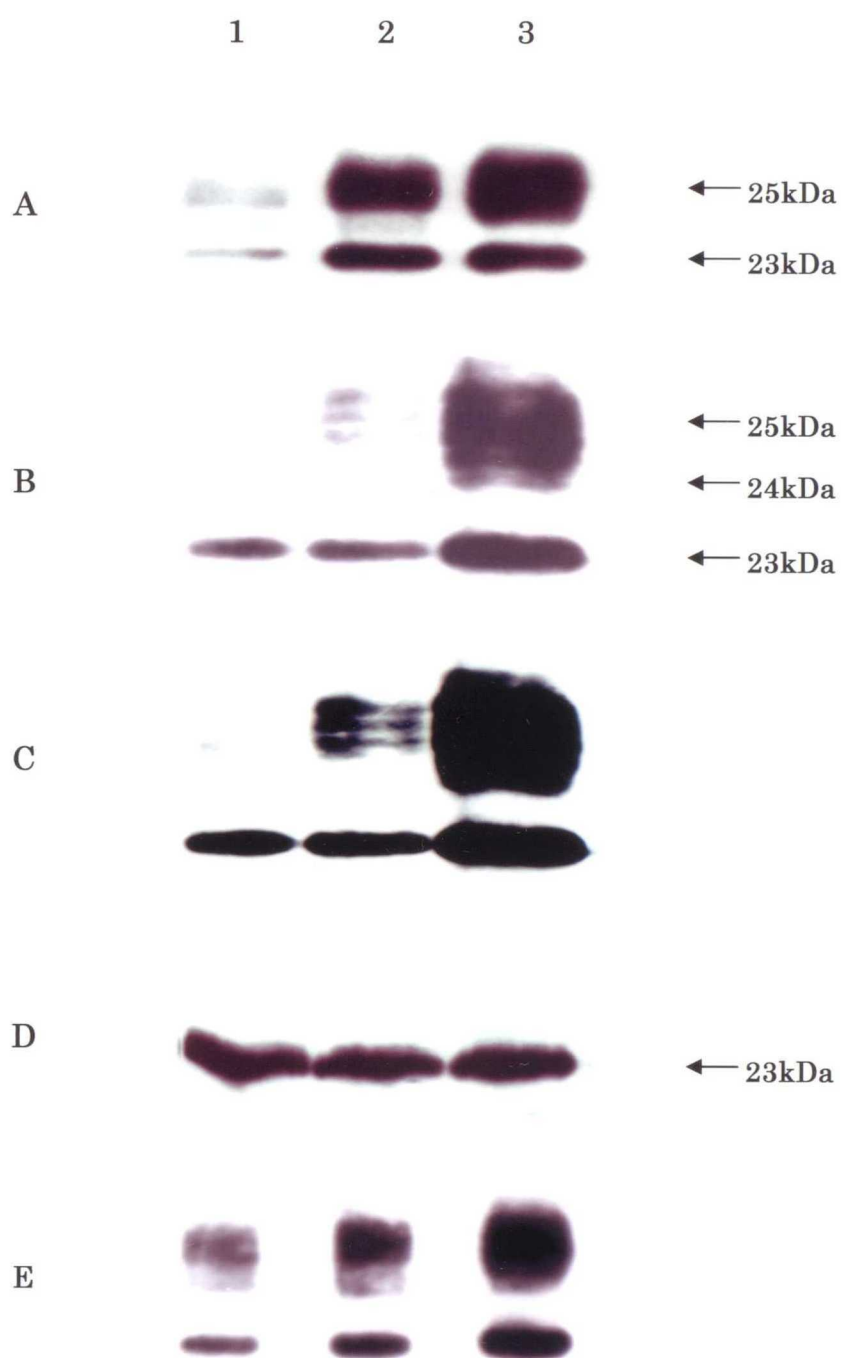


図 2 ニワトリ繁殖周期 PRL におけるウエスタンブロット解析

レーン 1 : 非産卵期、2 : 産卵期、3 : 就巢期

A : ショートゲル (8cm)、B : ロングゲル (20cm)、短時間露光、C : ロングゲル、長時間露光、D : Glycopeptidase F 処理、E : ジスルフィド結合非還元

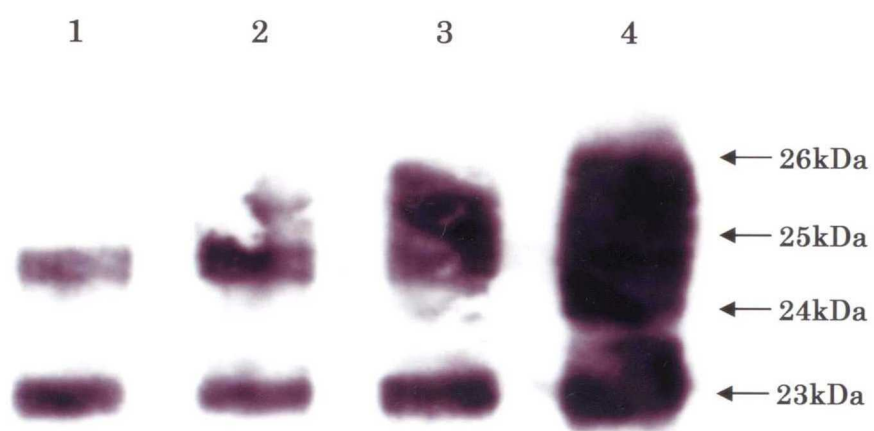


図 3 ニワトリ胚発生期及び繁殖周期における PRL アイソフォーム比較

レーン 1 : 孵化 3 日目、2 : 非産卵期、3 : 産卵期、4 : 就巢期

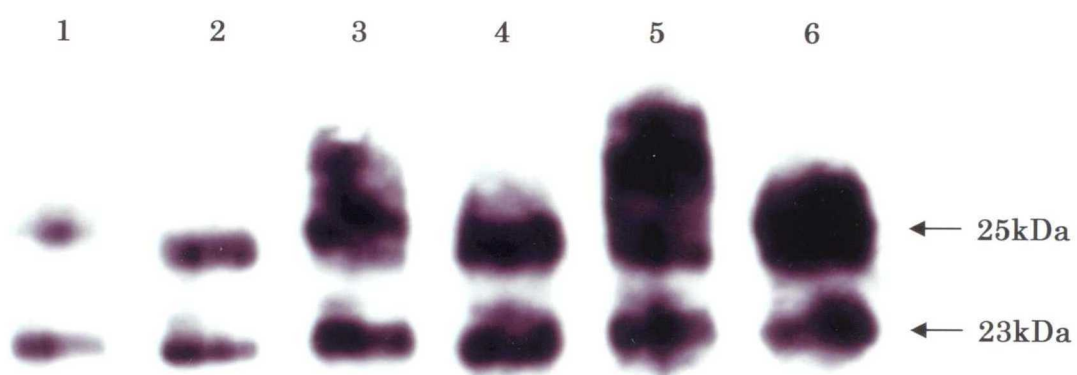


図 4 neuraminidase 処理 PRL におけるウエスタンブロット解析

レーン 1、2 : 非産卵期、3、4 : 産卵期、5、6 : 就巢期

レーン 2、4、6 : neuraminidase 処理

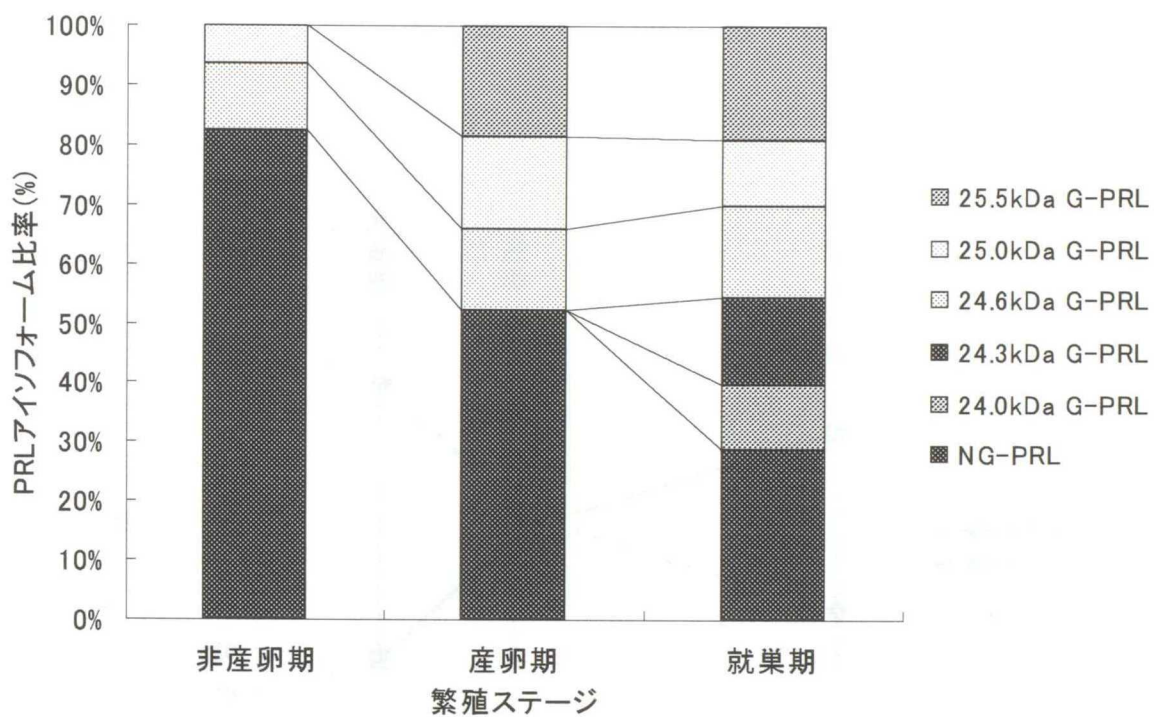


図 6 ニワトリ繁殖周期における PRL アイソフォームの面積解析結果

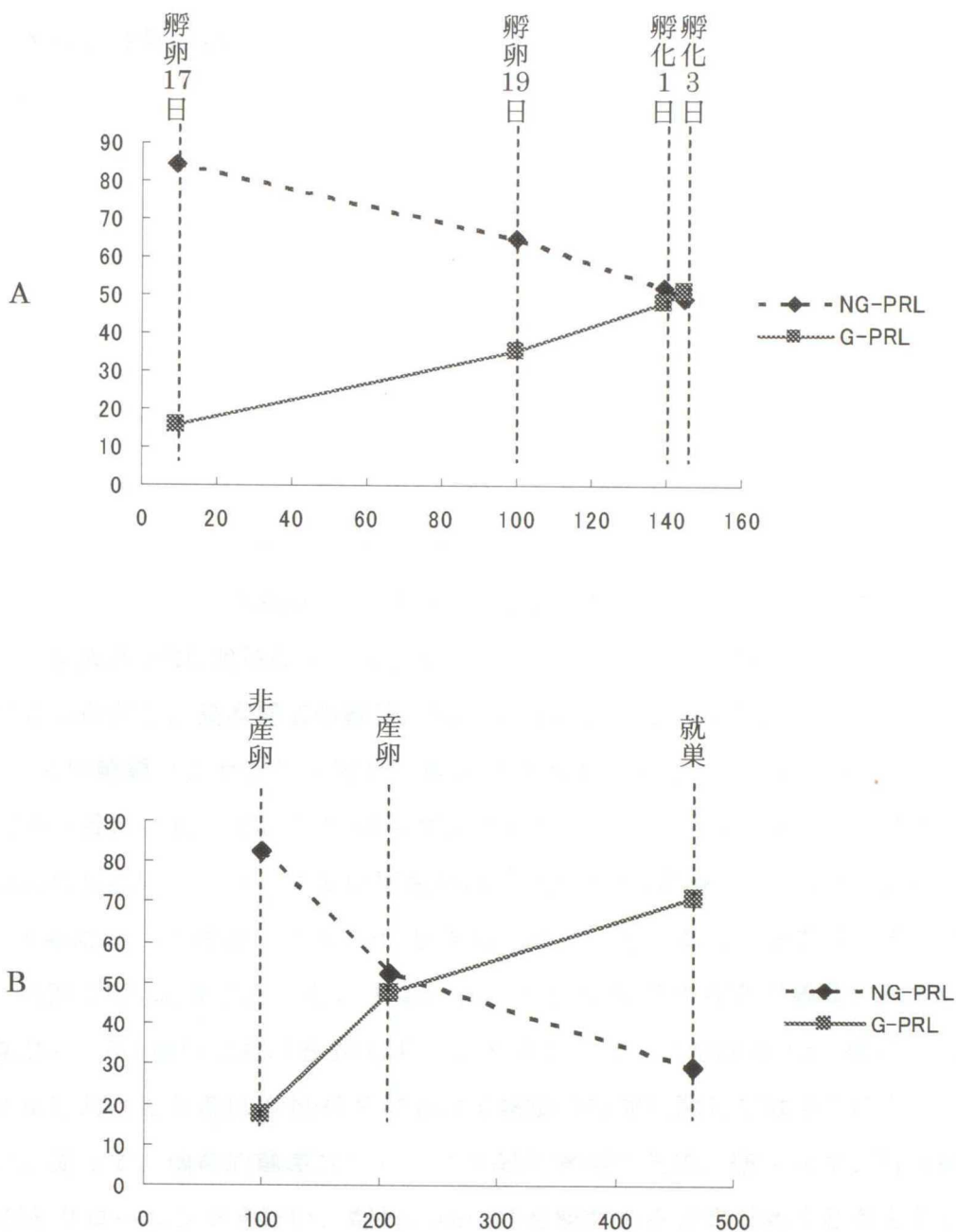


図 7 異なる生理的状態における総 PRL 量及びアイソフォーム比率の変化

A：胚発生期における総 PRL 量及びアイソフォーム比率の変化

横軸は孵卵 19 日目を基準（100%）とした総 PRL 面積率（%）、縦軸は PRL アイソフォームの存在比率（%）を示している。

B：繁殖周期における総 PRL 量及びアイソフォーム比率の変化

横軸は非産卵期を基準（100%）とした総 PRL 面積率（%）、縦軸は PRL アイソフォームの存在比率（%）を示した。

第3章 キジ目鳥類における成熟 PRL cDNA 及びウェスタンブロット解析

I. 緒言

ニワトリ PRL の cDNA クローニングは、Watahiki ら (1989) 及び Hanks ら (1989) により行われ、塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、30 個のアミノ酸残基からなるシグナルペプチド領域と 199 個のアミノ酸残基からなる成熟プロラクチン領域から構成されていると予測されている。また、Wong ら (1991) はシチメンチョウにおいて、Kansaku ら (2005) はアヒルにおいて、PRL の cDNA クローニングを行い、その結果、ニワトリと同様に、30 個のアミノ酸によるシグナルペプチド領域と 199 個のアミノ酸からなるプロラクチン領域とから成り、ニワトリ、シチメンチョウ及びアヒル間における PRL cDNA の相同性は 90% 以上と高い相同性を示すことが報告された。さらに、鳥類成熟 PRL 領域において、システイン (Cys) 残基間におけるジスルフィド結合が 3 つ存在し、高次構造の維持に関与していることが知られている。

また、N 型糖鎖コンセンサス配列である N-X-S/T 配列は、アヒル成熟 PRL 領域アミノ酸配列 6 番目においてのみ N-G-S が認められ、ニワトリ及びシチメンチョウにおいては認められない。一方、N-X-C 型配列は、成熟 PRL 領域アミノ酸配列 56 番目において、3 種において共通して N-G-C が認められている。また、シチメンチョウにおいては、成熟 PRL 領域における C 末端においても N-N-C の存在が確認されている。しかしながら、56 番目における N-G-C、シチメンチョウにおける 197 番目の N-N-C 及びアヒルにおける 6 番目の N-G-S における糖鎖の付加に関しては未だ明らかとされていない。従って、機能的糖鎖コンセンサス配列解明のため、様々なキジ目鳥種における cDNA クローニングを行い、配列の保存性を検討する必要があると考えられる。

さらに、シチメンチョウにおける報告においては、G-PRL アイソフォームは、少なくとも 2 種が存在し、その分子量はほぼ等しいとされ (Corcoran and Proudman, 1991)、生理的状态による G-PRL 存在比率の変動は、これら 2 種のアイソフォームの増加によるものであると考えられている (Bédécarrats *et al.*, 1999a, b, c)。しかしながら、前章において、N-X-C 型推定糖鎖コンセンサス配列が 56 番目のみに認められるニワトリにおける異なる生理的状态において、糖鎖構造及び分子量が異なる G-PRL アイソフォームが少なくとも 5 種存在し、その内 3 種は時期特異的アイソフォームであることが明らかとなった。シチメンチョウ及びニワトリにおける G-PRL 分子量に関する差異は、機能的糖鎖コンセンサス配列の違いや、種間における糖鎖構造の違いによ

る可能性が考えられるが、現段階においては不明である。しかしながら、少なくともニワトリにおいては、シアル酸の結合数及び糖鎖の分岐といった糖鎖構造が異なることにより分子量が変化した G-PRL が多種存在することが明らかとなった。従って、その他のキジ目鳥種において、ニワトリと同様に複数の G-PRL アイソフォームが存在するか否か検討する必要がある。

以上のことから、本章においては、キジ目における共通 PRL 作用機構解明のため、キジ目鳥類 PRL における cDNA 及びアミノ酸配列における相同性解析を行い、糖鎖修飾に関与する領域における共通保存性を検討するとともに、その他のキジ目鳥類において PRL アイソフォームの存在を検証した。

II. 材料及び方法

下垂体採取及び下垂体トータル RNA 抽出

静岡大学森教授、笹波教官より提供されたホロホロチョウ、愛好家より提供されたインドクジャク、及びブリーダーより購入したコウライキジ成鳥を用い、断頭、開頭後、下垂体前葉を採取し、急速凍結を行い RNA 抽出に使用するまで -80°C にて凍結保存した。トータル RNA 抽出は、TRIzol (Invitrogen) を用い、Chomczynski (1993) の方法に従った。抽出したトータル RNA 量は、吸光度測定器 (Gene Spec V : Naka Instruments) により測定した。

キジ目鳥類 PRL cDNA クローニング

下垂体前葉より抽出したトータル RNA (1 μg)、3'-Full RACE Core Set (Takara) 及び付属の Oligo dT-3 sites Adaptor Primer を用い、キットのプロトコールに従い逆転写反応を行った。逆転写反応後、既に報告されているニワトリ、シチメンチョウ、及びアヒルにおける PRL cDNA 配列を基に、5'-非翻訳領域 (5'-UTR) における高保存領域において設計した ORF-5' (TTCTGGTAGAGCAAGTCATC: アヒル (AB158610) における 17~36) 及びキット付属の 3 site Adaptor Primer を用い PCR を行った。PCR 条件は、変性 (94°C , 30 秒)、アニーリング (55°C , 20 秒)、伸長 (72°C , 30 秒) を 35 サイクルの反応を行い、 72°C を 5 分間、最終伸長反応として行った。PCR により目的領域が増幅されたか否かの確認には、サブマリン式電気泳動槽 (Mupid) を使用し、2% アガロースゲルにて電気泳動 (50V, 60 分間) を行った。その後、エチジウムブロマイド (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$) にて 5 分間染色し、トランスイルミネーター (ATTO DT40MP) 上で紫外線照射により産物の有無及び分子量を確認し、ボラロイドカメラで撮影した。

PCR 産物の精製及び塩基配列決定

PCR により増幅された産物は、Rapid PCR Purification System 50 Reaction (MARIGEN BIOSCIENCE) により精製した後、直接塩基配列決定に用いた。塩基配列決定は、まず ORF-5' 及び ORF-5' と同様、既に報告されている鳥種における cDNA 配列を基に 3'-非翻訳領域 (3'-UTR) において設計した ORF-3' (TGAAAAGTGGCAAAGCAACA: アヒルにおける 791~810) を用い行った。次に、ORF-5' 及び ORF-3' により決定した塩基配列及び既に報告されているアヒル、ニワトリ

PRL cDNA 塩基配列を基に、保存領域において新たなプライマー PRL 3' RACE (GATGAGGACTCCAGACTCTT : アヒルにおける 620~639) を設計し、3'-UTR における塩基配列決定を行った。塩基配列決定は、ジデオキシ法 (Sanger *et al.*, 1977) により行い、Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、PCR 産物、Premix を各 2 μ l、プライマーを 1 μ l 及び 5 \times Sequencing Buffer を 1 μ l の合計 5 μ l を Gene Amp PCR system 9700 を使用し反応を行った。反応条件は、予備変性 (96 $^{\circ}$ C, 60 秒) を行った後、変性 (96 $^{\circ}$ C, 10 秒)、アニーリング (50 $^{\circ}$ C, 5 秒)、伸長 (60 $^{\circ}$ C, 75 秒) を 35 サイクル行った。反応終了後、エタノール沈殿によりプライマー及び未反応蛍光標識 ddNTP の除去を行った。反応産物 5 μ l に同量の Milli Q 水、10 倍量の 100%エタノール、1/10 倍量の 2M 酢酸ナトリウムを加えた後、10 分間ボルテックスを行った。その後遠心分離 (15000 rpm, 15 分) を行い、上澄みを除去し、70%エタノールを 200 μ l 加え、2 分間ボルテックスの後、15000rpm、5 分遠心した。上澄みを除去し、風乾した。風乾したサンプルに Hi Di Folmamid (Applied Biosystems) を 20 μ l 加えよく混和した後、98 $^{\circ}$ C、2 分間の熱変性を行い、水中で急冷し、蛍光式自動オートシーケンサー; ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) を用いて、塩基配列を決定した。

キジ目鳥類 PRL cDNA 及びアミノ酸配列における相同性比較

本実験において決定したキジ、クジャク、ホロホロチョウ、及び既に報告されているニワトリ、ウズラ及びシチメンチョウにおける cDNA 配列を基に、DNASIS Pro (Hitachi) を用い、ATG コドン - poly A 間、アミノ酸コード領域、成熟 PRL 領域 cDNA 配列及びアミノ酸配列それぞれにおける相同性解析を行った。さらに、成熟 PRL 領域 cDNA 配列及びアミノ酸配列における相同性を基に、距離行列を Jin and Nei (1990) の方法を用いて算出し、PHILIP を用いて平均距離法 (UPGMA 法) により分子系統樹を作成した。

キジ目鳥類 PRL におけるウェスタンブロット解析

キジ、クジャク、ホロホロチョウ、及び愛知県農業総合試験場より提供されたニワトリ、名古屋大学大学院塚田教官より提供されたウズラ成鳥より下垂体前葉を摘出した後、前章と同様の方法により下垂体細胞質タンパク質を抽出した。その後、サンプルの一部に対し、Glycopeptidase F 処理を行い、非処理群と共に SDS-PAGE 及びウ

エスタンプロット解析に用いた。さらに、SDS-PAGE 及びウエスタンプロットにおいて、2-Mercaptoethanol によるジスルフィド結合の還元及び非還元状態におけるバンドパターン変化についての検証も合わせて行った。その他の条件及び方法は前章と同様に行った。

Ⅲ. 結果

cDNA を合成後、PRL 5'-UTR における保存性配列において設計したプライマー (ORF-5') 及び 3 site Adaptor Primer を用いた PCR により、キジ、クジャク及びホロホロチヨウ共に約 1000bp の産物が得られた。得られた PCR 産物を用い、塩基配列決定を行った結果、ニワトリ等において報告されている翻訳開始点とほぼ同じ位置においてメチオニン (ATG) コドンが認められた。また、ATG コドンから 688 塩基下流において、翻訳終止点を示す TAA コドンが認められた (図 8)。

さらに、3' RACE 法により得られた 3'-UTR において、今回用いた全ての鳥種において共通し、TAA コドンより下流約 220 塩基に poly A シグナル (AATAAA: Proudfoot and Brownlee, 1976) が検出された。一方、ホロホロチヨウにおいては、シチメンチヨウ及びニワトリと同様、更に下流域においても poly A シグナルが認められ (図 9)、選択的 poly A 付加に関与している可能性が示された。ATG コドン - poly A 間、アミノ酸コード領域、成熟 PRL 領域及びアミノ酸配列それぞれにおける相同性解析の結果を表 1-A 及び 1-B に示した。

決定した cDNA 配列におけるアミノ酸コード領域より推定したアミノ酸配列は、疎水性解析により、これまでに報告されているニワトリ、シチメンチヨウ及びウズラと同様に、229 個のアミノ酸から成り、30 個のシグナルペプチド領域及び 199 個の成熟 PRL 領域に分かれると考えられた (図 10)。また、成熟 PRL 領域 cDNA 塩基配列及びアミノ酸配列における相同性を基に作成した分子系統樹において、両者は一致した (図 11)。また、分子系統樹において、キジ及びシチメンチヨウは、他のキジ目鳥種とは独立したクラスターを形成することから、両種は非常に近縁であることが明らかとなった。

キジ目鳥類成熟 PRL 領域におけるアミノ酸配列を図 12 に示した。キジ目成熟 PRL 領域においてシステイン (Cys) は、4、11、58、174、191 及び 199 番目において共通して認められることが明らかとなった。また、N-X-C タイプの推定 N 型糖鎖コンセンサス配列が 56~58 番目において共通して認められた。さらに、キジにおいては、シチメンチヨウと同様、197~199 番目においても N-X-C 型配列が認められた。一方、本実験において用いたキジ目鳥種においては、哺乳類やアヒルにおいて認められる N-X-S タイプの推定 N 型糖鎖コンセンサス配列は認められなかった。

ウエスタンブロット解析を行った結果、今回用いた全てのキジ目鳥種において分子

量の異なる複数の PRL が検出された (図 13・A、B)。また、Glycopeptidase F 処理を行うことにより、単一の分子量の PRL のみが検出された (図 13・C)。これらのことから、キジ目鳥類においては N 型糖鎖付加型 PRL が複数存在することが明らかとなった。さらに、ジスルフィド結合非還元状態においても分子量に大きな変化は認められず、前章と同様、ニワトリ GH において認められる多量体 (Aramburo *et al.*, 2000) はキジ目 PRL においては認められなかった (図 13・D)。

IV. 考察

本実験により、用いた全てのキジ目鳥種において、前章におけるニワトリと同様、分子量の異なる複数の G-PRL が検出され、さらに cDNA 解析の結果、アヒル、ニワトリ、シチメンチョウ PRL と同様に、56 番目において N-G-C が共通して認められた。さらに注目すべき点として、アミノ酸配列 C 末端において、クジャク、ホロホロチョウ、ウズラにおける配列は、S-N-C であり、ニワトリと一致するが、キジにおける配列は、N-N-C であり、シチメンチョウと一致した。このことから、キジ成熟 PRL においてはシチメンチョウと同様に、N-X-C 型糖鎖コンセンサス配列が 2 箇所存在することが明らかとなり、キジ目鳥種内において、推定糖鎖コンセンサス配列を 1 箇所に持つニワトリ型、及び 2 箇所に持つキジ型に大別されると考えられ、この結果は成熟 PRL 領域による分子系統樹と一致した。また、シチメンチョウと構造的に非常に近縁であることが明らかとなったキジにおいても、他の鳥種と同様、複数の分子量の異なる G-PRL が認められたことから、シチメンチョウにおいても同様に複数の G-PRL の存在が推測された。

鳥種により検出されたバンドの濃さ、アイソフォーム数及びその分子量に差異が認められた点において、ニワトリ、ウズラ、クジャク及びホロホロチョウにおいては、cDNA 解析により推定糖鎖コンセンサス配列が一致したことから、コンセンサス配列における違いが原因ではなく、繁殖ステージが異なる、または種特異的糖鎖構造が存在する可能性が考えられた。一方、キジにおいてはシチメンチョウと同様、197 番目においても推定糖鎖コンセンサス配列である N-N-C が認められることから、キジ及び他の鳥種との違いにおいては、N 型糖鎖コンセンサス配列に関する差異が関与、起因している可能性も考えられた。

56、197 番目に認められる Cys 残基は、両者ともにジスルフィド結合形成に関与することから、キジ及びシチメンチョウにおける 197 番目において、N 型糖鎖が結合すると仮定した場合、翻訳後修飾であるジスルフィド結合と糖鎖修飾との順番も問題となる。糖鎖修飾が先行する場合、ジスルフィド結合形成を阻害する可能性が考えられ、ジスルフィド結合非還元状態における SDS-PAGE において、キジ及び他の鳥種では C 末端におけるジスルフィド結合の有無により大きなバンドのずれが生じると考えられるが、本実験においては、非還元状態における鳥種によるバンドパターンのずれや変化は認められなかった。このことから、キジ及び構造的に非常に近縁であるシチ

メンチヨウにおける 197 番目の N·N·C は機能を持たない可能性が考えられた。従って、今回用いたキジ目鳥種全てにおいて共通して 56 番目において認められた N·G·C 配列が機能的糖鎖結合部位である可能性が強く示唆された。しかしながら、N·X·C 型とは異なる未知の糖鎖コンセンサス配列が存在する可能性も否定できないことから、今後、臭化シアン等により PRL を断片化し、NG·PRL とのバンドパターンを比較する等の手法を用い、糖鎖結合部位の同定が必要であると考えられる。

ATG コドン - poly A 間、アミノ酸コード領域、成熟 PRL 領域における cDNA 及びアミノ酸配列における相同性解析により、全ての領域、全てのキジ目鳥種において、ほぼ 90%以上と非常に高い相同性が示され、さらに成熟 PRL 領域における Cys 残基間のジスルフィド結合による 2 次構造は共通であると考えられ、キジ目 PRL における基本構造は強く保存されていることが明らかとなった。以上のことから、ニワトリを含むキジ目鳥種において、種特異的糖鎖構造の存在は否定できないが、基本的な糖鎖修飾機構は共通していると考えられ、少なくとも糖鎖構造の異なる複数の G·PRL の存在は共通であり、さらに N 型糖鎖コンセンサス配列は 56 番目における N·G·C が共通の糖鎖結合部位である可能性が示唆された。

V. 要約

本章においては、キジ目共通 PRL 作用機構解明のため、他のキジ目鳥種を含めた cDNA 及びアミノ酸配列における類似性及び G・PRL の有無を検討した。その結果、キジにおいてはシチメンチョウと同様、197 番目において糖鎖コンセンサス配列 N・N・C が認められたが、他の鳥種と同様に複数の G・PRL が検出されたことから、シチメンチョウにおいても複数の G・PRL の存在が推測された。また、ジスルフィド結合還元及び非還元状態におけるバンドパターンの比較の結果、各種とも大きな違いは認められなかったことから、56 番目において共通して認められた N・G・C が機能的糖鎖コンセンサス配列である可能性が考えられた。キジ目鳥種における cDNA 及びアミノ酸配列は強く保存されており、さらに用いた全ての鳥種において複数の分子量の異なる G・PRL が検出されたことから、キジ目において基本的な PRL 糖鎖修飾機構は共通していると考えられた。

VI. Ⅷ

Chicken	ATGAGCAACA	GAGGGGCTTC	ATTGAAAGGT	TTGTTTCTGG	CGGTTCTTCT	GGTCTCCAAC
J. Quail	ATGGGGCAACA	GAGGGGCTTC	ACTGAAAGGT	TTGTTGCTGG	CGGTTCTTCT	GGTGTCCAAC
Guineafowl	ATGAGCAACA	GAGGGGTTTC	ACTGAAAGGT	TTGTTGCTGG	CAGTTCTTCT	GGTGTCCAAC
Peafowl	ATGAGCAACA	GAGGGGCTTC	ATTGAAAGGT	TTGTTGCTGG	CGGTTCTTCT	GGTGTCCAAC
Turkey	ATGAGCAACA	CAGGGGCTTC	ATTGAAAGGT	TTGTTGCTGG	CGGTTCTTCT	GGTATCCAAC
Pheasant	ATGAGCAACA	CAGGGGCTTC	ACTGAAAGGT	TTGTTGCTGG	CGGTTCTTCT	GGTGTCCAAC
Chicken	ACACTTCTGA	CCAAGGAAGG	AGTGACCTCC	CTGCCAATCT	GCCCCATTGG	ATCAGTCAAC
J. Quail	ATGCTTTTGA	CCAAGGAAGG	AGTGACCTCC	TTGCCAATCT	GCCCCAGTGG	ATCTGTCAAC
Guineafowl	ATGCTTCTGA	CCAAGGAAGG	AGTGACCTCC	TTGCCAATCT	GCCCCAGTGG	ATCTGTCAAC
Peafowl	ATGCTTCTGA	CCAAGGAAGG	AGTGACCTCC	TTGCCAATCT	GCCCCAGTGG	ATCTGTCAAC
Turkey	ATGCTTCTGA	CCAAGGAAGG	AGTGACCTCC	TTGCCAATCT	GCTCCAGTGG	ATCTGTCAAC
Pheasant	ATGCTTCTGA	CCAAGGAAGG	AGTGACCTCC	TTGCCAATCT	GCTCCAGTGG	ATCTGTCAAC
Chicken	TGCCAAGTTT	CCCTTGGGGA	ACTTTTGTAT	CGGGCAGTTA	AACTTTCACA	CTACATACAC
J. Quail	TGTCAGATGT	CCCTTGGGGA	ACTTTTGTAT	CGGGCAGTTA	AACTTTCACA	CTACATACAC
Guineafowl	TGCCAAGTTT	CCCTTGGGGA	ACTTTTGTAT	CGGGCAGTTA	AACTTTCACA	CTACATACAC
Peafowl	TGCCAAGTTT	CCCTTGGGGA	ACTTTTGTAT	CGGGCAGTTA	AACTTTCACA	CTACATACAT
Turkey	TGCCAAGTTT	CCCTTGGGGA	GCTTTTGTAT	CGGGCAGTTA	GACTTTCACA	CTACATACAC
Pheasant	TGCCAAGTTT	CCCTTGGGGA	ACTTTTGTAT	CGGGCAGTTA	GACTTTCACA	CTCCCTACAC
Chicken	TACCTCTCTT	CAGAAATATT	CAATGAATTT	GATGAACGTT	ATGCTCAGGG	TCGGGGTTTC
J. Quail	TACCTCTCTT	CAGAAATATT	CAATGAATTT	GATGAACGCT	ATGCTCAGGG	TCGGGGTTTC
Guineafowl	TTCCCTCTCTT	CAGAAATATT	CAATGAATTT	GATGAACGCT	ATGCTCAGGG	TCGGGGTTTC
Peafowl	TTCCCTCTCTT	CAGAAATATT	CAATGAATTT	GATGAACGCT	ATGCTCAGGG	TCGGGGTTTC
Turkey	TTCCCTCTCTT	CAGAAATATT	CAATGAATTT	GATGAACGCT	ATGCTCAGGG	TCGGGGTTTC
Pheasant	TTCCCTCTCTT	CAGAAATATT	CAATGAATTT	GATGAACGCT	ATGCTCAGGG	TCGGGGTTTC
Chicken	ATTACAAAAG	CTGTTAATGG	CTGCCACACT	TCCTCCTTAA	CCACTCCTGA	AGATAAGGAG
J. Quail	ATTACAAAAG	CTGTTAATGG	CTGCCACACT	TCCTCCTTAA	CCACTCCTGA	AGATAAGGAG
Guineafowl	ATTACAAAAG	CTGTTAATGG	CTGCCACACT	TCCTCCTTAA	CCACTCCTGA	AGATAAGGAG
Peafowl	ATTACAAAAG	CTGTTAATGG	CTGCCACACT	TCCTCCTTAA	CCACTCCTGA	AGATAAGGAG
Turkey	ATTACAAAAG	CTGTTAATGG	CTGCCACACT	TCCTCCTTAA	CCACTCCTGA	AGATAAGGAG
Pheasant	ATTGCAAAAAG	CTGTTAATGG	CTGCCACACT	GCCTCCTTAA	CCACTCCTGA	AGATAAGGAG
Chicken	CAAGCTCAGC	AGATTTCATCA	TGAAGACCTA	CTGAATTTAG	TAGTGGGAGT	GCTGCGTTCC
J. Quail	CAAGCTCAGC	AGATTTCATCA	CGAAGACCTA	CTGAATTTAG	TACTTGGAGT	GCTGCGTTCC
Guineafowl	CAAGCTCAGC	AGATTTCATCA	TGAGGACCTG	CTGAATTTAG	TACTGGGGGT	ACTGCGTTCC
Peafowl	CAAGCTCAGC	AGATTTCATCA	CGAAGACCTA	CTGAATTTAG	TACTGGGAGT	GTTGCGTTCC
Turkey	CAAACTCAGC	AGATTTCATCA	CGAAGAGCTA	CTGAATTTGA	TACTGGGAGT	GCTGCGTTCC
Pheasant	CAAACTCAGC	AGATTTCATCA	CGAAGAGCTA	CTGAATTTGA	TACTGGGAGT	GCTGCGTTCC
Chicken	TGGAATGATC	CCCTGATCCA	TCTGGCCTCT	GAAGTGCAAA	GAATCAAAGA	AGCTCCAGAT
J. Quail	TGGAATGATC	CTCTGATCCA	TCTGGCCTCT	GAAGTGCAAA	GAATCAAAGA	AGCTCCAGAT
Guineafowl	TGGAATGATC	CCTTGATCCA	TCTGGCCTCT	GAAGTGCAAA	GAATCAAAGA	AGCTCCAGAT
Peafowl	TGGAATGATC	CCCTGATCCA	TCTGGCCTCT	GAAGTGCAAA	GAATCAAAGA	AGCTCCAGAT
Turkey	TGGAATGATC	CCCTGATCCA	TCTGGCCTCT	GAAGTGCAAA	GAATCAAAGA	AGCTCCAGAT
Pheasant	TGGAATGATC	CCCTGATCCA	TCTGGCCTCC	GAAGTGCAAA	GAATCAAAGA	AGCTCCAGAT
Chicken	ACCATCTCTCT	GGAAGGCTGT	AGAGATTGAG	GAGCAAAACA	AGAGGCTTCT	AGAAGGAATG
J. Quail	ACCATCTCTCT	GGAAGGCTGT	AGAGATTGAG	GAGCAAAACA	AGAGGCTTCT	AGAAGGAATG
Guineafowl	ACCATCTCTCT	GGAAGGCTGT	AGAGATTGAG	GAGCAAAACA	AGAGGCTTCT	AGAAGGAATG
Peafowl	ACCATCTCTCT	GGAAGGCTGT	AGAGATTGAG	GAGCAAAACA	AGAGACTTCT	AGAAGGAATG
Turkey	ACCATCTCTCT	GGAAGGCTGT	AGAGATTGAG	GAGCAAAACA	AGAGGCGTTT	AGAAGGAATG
Pheasant	ACCATCTCTCT	GGAAGGCTGT	AGAGATTGAA	GAGCAAAACA	AGAGGCTTCT	AGAAGGAATG
Chicken	GAGAAAATAG	TTGGGCGGGT	TCATTCTGGT	CATGCTGGAA	ATGAAATTTA	CTCTCACTCG
J. Quail	GAGAAAATAG	TTGGGCGGGT	TCATTCTGGC	GATGGTGGAA	ATGAAATTTA	CTCTCACTGG
Guineafowl	GAGAAAATAG	TTGGGCGGGT	TCATTCTGGC	GATGCTGGAA	ATGAAATTTA	CTCTCACTGG
Peafowl	GAGAAAATAG	TTGGGCGGGT	TCATTCTGGC	GATGCTGGAA	ATGAAATTTA	CTCTCACTGG
Turkey	GAGAAAATCG	TTGGGCGGGT	TCATTCTGGC	GATGCTGGAA	ATGAAATTTT	CTCTCACTGG
Pheasant	GAGAAAATAG	TTGGGCGGGT	TCATTCTGGA	GATGCTGGAA	ATGAAATTTT	CTCTCACTGG
Chicken	GACGGCCTTC	CATCCCTGCA	ACTCGCTGAT	GAGGACTCCA	GACTCTTTGC	TTTTTATAAC
J. Quail	GACGGCCTTC	CATCCCTGCA	ACTTGCTGAT	GAGGACTCCA	GACTCTTTGC	TTTTTACAAC
Guineafowl	GATGGCCTTC	CATCCCTGCA	ACTTGCTGAT	GAGGACTCCA	GACTCTTTGC	TTTTTACAAC
Peafowl	GATGGCCTTC	CATCCCTGCA	ACTCGCTGAT	GAGGACTCCA	GACTCTTTGC	TTTTTACAAC
Turkey	GACGGCCTTC	CATCCCTGCA	ACTCGCTGAT	GAGGACTCCA	GACTCTTTGC	TTTTTACAAC
Pheasant	AACGGCCTTC	CATCCCTGCA	ACTCGCTGAT	GAGGACTCCA	GACTCTTTGC	TTTTTACAAC
Chicken	CTGCTGCATT	GCCACCGCAG	AGATTCCCAC	AAAATTGACA	ACTATCTTAA	AGTTTTGAAG
J. Quail	CTGCTGCATT	GCTTCCGCAG	AGATTCCCAC	AAAATCGACA	ACTATCTTAA	AGTTTTGAAG
Guineafowl	CTGCTGCATT	GCTTCCGCAG	AGATTCCCAC	AAAATTGACA	ACTATCTTAA	AGTTTTGAAG
Peafowl	CTGCTGCATT	GCTTCCGCAG	AGATTCCCAC	AAAATCGACA	ACTATCTTAA	AGTTTTGAAG
Turkey	CTGCTGCATT	GCTTCCGCAG	AGATTCCCAC	AAAATCGACA	ACTATCTTAA	AGTTTTGAAG
Pheasant	CTGCTGCATT	GCTTCCGCAG	AGATTCCCAC	AAAATCGACA	ACTATCTTAA	AGTTTTGAAG
Chicken	TGCCGCCTAA					
J. Quail	TGCCGCCTAA					
Guineafowl	TGCCGCCTAA					
Peafowl	TGCCGCCTAA					
Turkey	TGCCGCCTAA					
Pheasant	TGCCGCCTAA					

Ⅷ キジ目鳥類 PRL アミノ酸コード領域 cDNA 塩基配列
 成熟 PRL 領域は太字により示した。

Chicken	GTACCTGTGG	G-----CTGC	ATTACTCACT	GAAACCATT	ATCATGGTGT	TCTTGTGCT
J. Quail	GTACCTCTGG	G-----CTGC	ATTACTCACT	GAAACCATT	ATCACAGTTT	TCCTGTTGCT
Guineafowl	GTACCTCTGG	G-----CTGC	ATTACTCACT	GAAACCATT	ATCATGGTGT	TCTTGTGCT
Peafowl	GTACCTCTGG	G-----CTGC	ACTACTCACT	GAAACCATT	ATCACGGTGT	TCTTGTGCT
Turkey	GTACCTCTGG	G-----CTGC	ATAACTCACC	GCAACCATT	ACCGTGGTGT	TCTTGTGCT
Pheasant	GTACCTCTGG	GTACAGCCGC	GTAACCTCGT	GCAACCATT	ATCATGGTGT	TCTTGTGCT
Chicken	TTGCCACTTT	TCATGCGAA	CTTTAGCAAA	AA-CCACATT	GTACAGCACC	AGGATCATCA
J. Quail	TTGCCACTTT	TCATTGCAAA	CCTTACAAAA	AAGCCACATT	GGACGGCACC	AGGATCATCA
Guineafowl	TTGCCACTTT	TCATTGTGAA	CTTTACAAAA	AG-CCACATT	GTACAGCATC	AGGGTCATCA
Peafowl	TTGCCACTTT	TCATTGCAAA	CTTTACAAAA	AG-CCACATT	GTACAGCACC	AGGATCATCA
Turkey	TTGCCACTTT	TCCTTGCGAA	CTTTATGAAA	AG-CCACATC	GTACGGCACC	AGGATCATCA
Pheasant	TTGCCACTTT	TCATTGCGAA	CTTTATGAAA	AG-CCACATT	GCACAGCACC	AGGATCATCA
Chicken	GTAACCTTCA	GGCATGCTTG	TGTGAATTCT	GGCTGCAACT	ATTAGTGCCA	TTTATCTTGG
J. Quail	ATAATTTTGA	GGCAAGCTTG	TGTGAGGTCT	GGCTGCAACT	ATTAATGCCA	TTTTTCTTGG
Guineafowl	GTAACCTTCA	GGCATGTTTG	TGTGAATTCT	GGCTGCAATG	ATTAGTGCCA	TTTATCTTGG
Peafowl	GTAATTTTCA	GGCATGCTTG	TGTGAATTCT	GGCTGCAACT	ATTTGTGCCA	TTTATCTTGG
Turkey	GTAACCTTCA	GGCATGCTTG	TGTGAATTCT	GGCTGCAACT	CTCAGTGCCA	TTTATCTTAG
Pheasant	GTAACCTTCA	GGCGTGCTTG	TGTGAATTCT	GCCTGCAATT	ATTAGTGCCA	TTTATCTTAG
Chicken	TG-TTTAAA-	TGCTGTAAAT	CACCTGTGTA	ACAAGAATAA	ACCTTTCTGT	CTAATTTCCCT
J. Quail	TGTTGAAAA-	TTCTGCAAGT	CACCTGTGTA	ACAAGAATAA	ACTCCTCTGC	CTAATTTCCCT
Guineafowl	TG-TTTAAGA	TGCTATAAAT	CACCTGTGTA	ACAAGAATAA	ACTTTTCTGT	CTAATTTCCCT
Peafowl	TG-TTTAAAA	TTCTGTAAAT	CACCTGTGTA	ACTAGAATAA	ACTTTTCTGT	CTCATTTCCT
Turkey	TG-TTTAAAA	TGCTGCAAGT	CACCTGTGTA	ACAAGAATAA	ACTCCTCTGC	CTAATTTCCCT
Pheasant	TG-TTTAAAA	TGCTGTAAAT	CACCTGTGTA	ACAAGAATAA	ACTTCTCTGC	CTAATTTCCCT
Chicken	CACCTATTAG	CATTTTCATTG	ATAAGTAGAT	CA-TGT-AGA	TACAAATAAA	AATATTATTA
J. Quail	Caaaaaaaaa					
Guineafowl	CACCTTAC-AG	CATTTTCATTG	ATAATTTG-T	CATTGGCAGA	TACAAATAAA	AATATTATTA
Peafowl	Caaaaaaaaa					
Turkey	CACCTTAGTAG	CATTTTCACTG	ATAAGTTGAT	CG-TGT-AGA	TACAAATAAA	AATATTATTA
Pheasant	Caaaaaaaaa					
Chicken	AATTCAAAAC	CACGTAACAA	CAAGTGGTAT	CATGAACAAA	AATAATAGCT	GGGATGGCTT
Guineafowl	AATTCaaaaa	aaaaaaaaa				
Turkey	AATTCAAAAT	CACATAACGT	CAAGTGGTAT	CCaaaaaaaa		
Chicken	TCTACCTTTA	GCAAACTTT	TTCTTTTGGG	TCTCTTCATT	TATGGCCTGG	CAAGCCTAGC
Chicken	TGTGGTGGTT	TCAAATACaa	aaaaa			

図 9 キジ目鳥類 PRL 3'-UTR cDNA 塩基配列

poly A シグナルは下線、poly A テイルは小文字により示した。

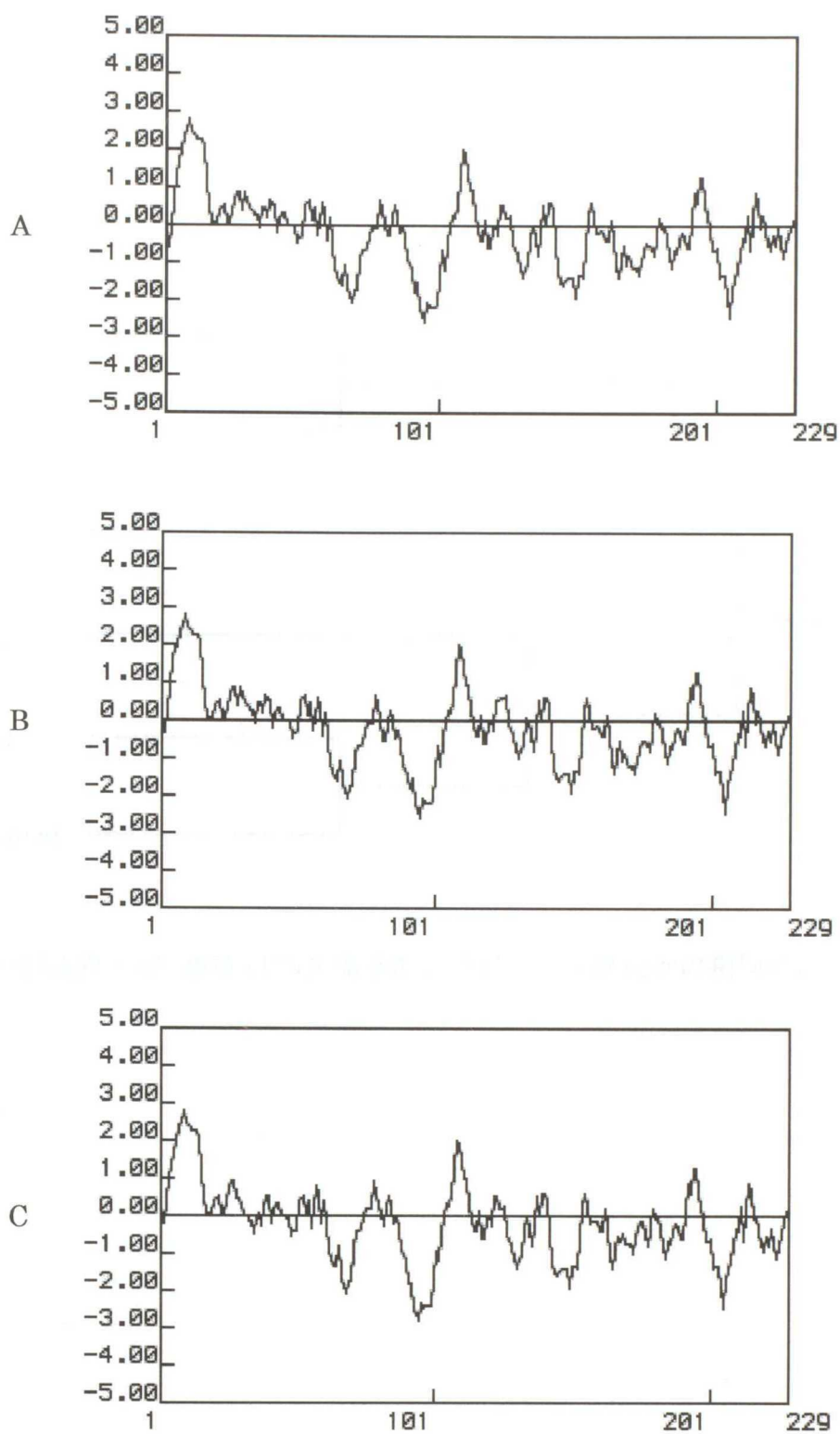


図 10 キジ目鳥種 PRL における疎水性解析結果

A: クジャク、B: キジ、C: ホロホロチョウ

横軸はアミノ酸残基数を示している。

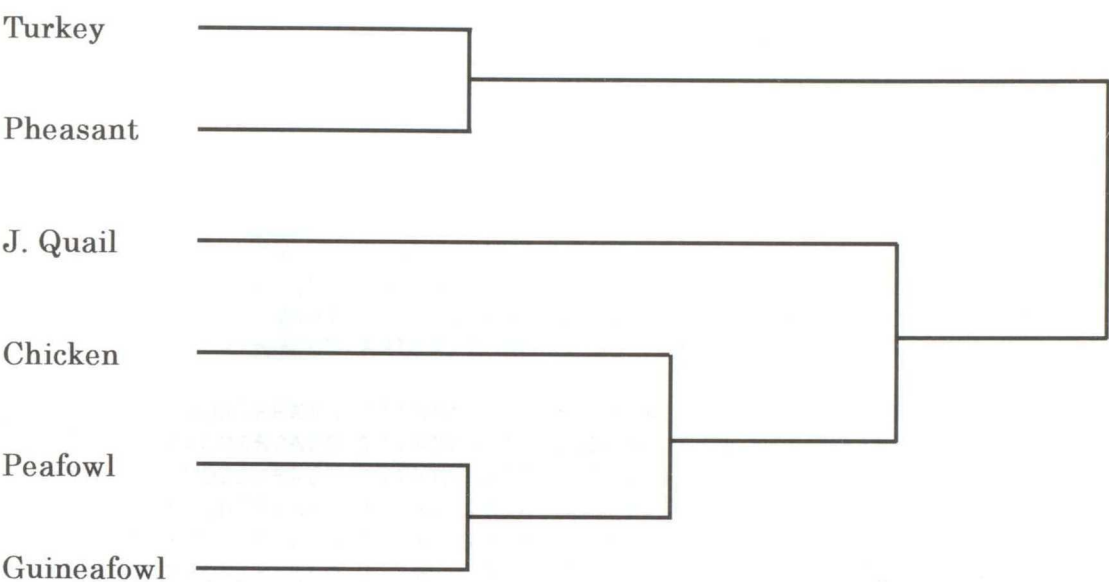


図 11 キジ目成熟 PRL 領域 cDNA 塩基配列及びアミノ酸配列の相同性による分子系統樹

Chicken	LPICPIGGSVN	CQVSLGELFD	RAVKLSHYIH	YLSSEIFNEF	DERYAQGRGF
J. Quail	LPICPSGGSVN	CQMSLAELFD	RAVKLSHYIH	YLSSEIFNEF	DERYAQGRGF
Guineafowl	LPICPSGGSVN	CQVSLGELFD	RAVKLSHYIH	FLSSEMFNEF	DERYAQGRGF
Peafowl	LPICPSGGSVN	CQVSLGELFD	RAVKLSHYIH	FLSSEMFNEF	DERYAQGRGF
Turkey	LPICSSGGSVN	CQVSLGELFD	RAVRLSHYIH	FLSSEIFNEF	DERYAQGRGF
Pheasant	LPICSSGSGN	CQVSLGELFD	RAVRLSHSLH	FLSSEIFNEF	DERYAQGRGF
Chicken	ITKAV <u>NG</u> CHT	SSLTTPEDKE	QAQQIHHDLD	LNLVVGVLRS	WNDPLIHLAS
J. Quail	ITKAV <u>NG</u> CHT	SSLTTPEDKE	QAQQIHHDLD	LNLVLGVLR	WNDPLIHLAS
Guineafowl	ITKAV <u>NG</u> CHT	SSLTTPEDKE	QAQQIHHDLD	LNLVLGVLR	WNDPLIHLAS
Peafowl	ITKAV <u>NG</u> CHT	ASLTTPEDKE	QAQQIHHDLD	LNLVLGVLR	WNDPLIHLAS
Turkey	ITKAV <u>NG</u> CHT	SSLTTPEDKE	QTQQIHHEEL	LNLILGVLR	WNDPLIHLAS
Pheasant	IAKAV <u>NG</u> CHT	ASLTTPEDKE	QTQQIHHEEL	LNLILGVLR	WNDPLIHLAS
Chicken	EVQRIKEAPD	TILWKAVEIE	EQNKRLLEGM	EKIVGRVHSG	DAGNEIYSHW
J. Quail	EVQRIKEAPD	TILWKAVEIE	EQNKRLLEGM	EKIVGRVHSG	DGGNEIYSQW
Guineafowl	EVQTIKEAPD	TILWKAVEIE	EQNKRLLEGM	EKIVGRVHSG	DAGNEVYSQW
Peafowl	EVQRIKEAPD	TILWKAVEIE	EQNKRLLEGM	EKIVGRVHSG	DAGNEIYSQW
Turkey	EVQRIKEAPD	TILWKAVEIE	EQNKRRLLEG	EKIVGRIHSG	DAGNEVFSQW
Pheasant	EVQRIKEAPD	TILWKAVEIE	EQNKRLLLEG	EKIVGRIHSG	DAGNEVFSQW
Chicken	DGLPSLQLAD	EDSRLFAFYN	LLHCLRRDSH	KIDNYLKVLK	CRLIHDSNC
J. Quail	DGLPSLQLAD	EDSRLFAFYN	LLHCFRRDSH	KIDNYLKVLK	CRLIHDSNC
Guineafowl	DGLPSLQLAD	EDSRLFAFYN	LLHCLRRDSH	KIDNYLKVLK	CRLIHDSNC
Peafowl	DGLPSLQLAD	EDSRLFAFYN	LLHCLRRDSH	KIDNYLKVLK	CRLIHDSNC
Turkey	DGLPSLQLAD	EDSRLFAFYN	LLHCLRRDSH	KIDNYLKVLK	CRLIHD <u>NNC</u>
Pheasant	NGLPSLQLAD	EDSRLFAFYN	LLHCLRRDSH	KIDNYLKVLK	CRLIHD <u>NNC</u>

図 12 キジ目鳥類成熟 PRL 領域アミノ酸配列におけるアライメント
 推定糖鎖コンセンサス配列は太字及び 2 重下線により示した。

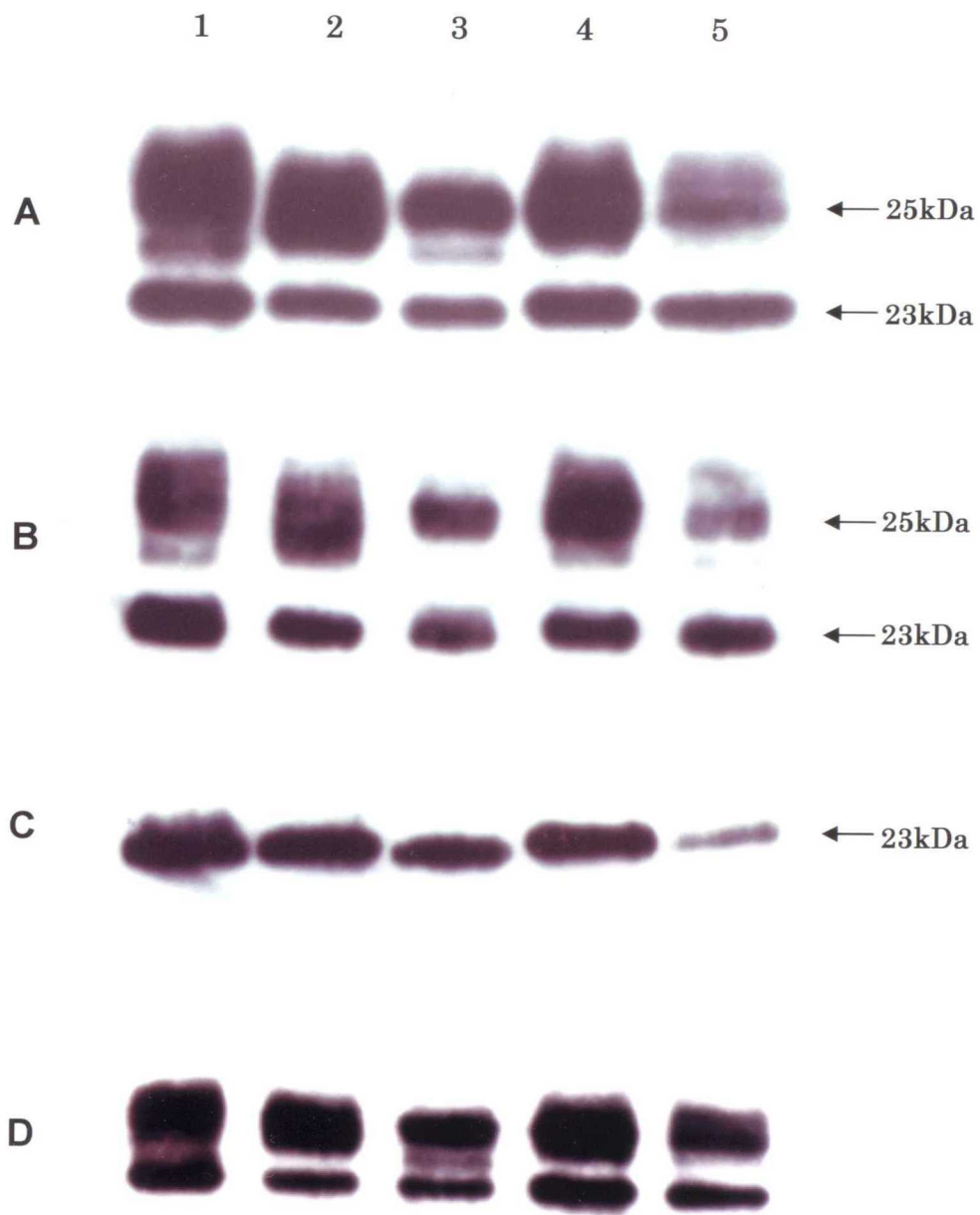


図 13 キジ目鳥類 PRL におけるウエスタングロート解析

レーン 1: ニワトリ、2: ウズラ、3: キジ、4: ホロホロチョウ、5: クジャク

A: ショートゲル、B: ロングゲル、C: Glycopeptidase F 処理、D: ジスルフィド結合非還元

Ⅶ. 表

表 1 キジ目鳥類 PRL 遺伝子における相同性

A ATG・poly A 間及びアミノ酸コード領域における相同性 (%)

	Chicken	Turkey	J. Quail	Peafowl	Pheasant	Guineafowl
Chicken		94.9	94.9	96.2	93.9	94.9
Turkey	92.7		95.4	96.7	97.2	95.1
J. Quail	92.2	92.4		96.2	94.3	94.9
Peafowl	95	94	94		95.8	96.7
Pheasant	92.5	95.3	91.6	93.8		94.2
Guineafowl	93.9	92.2	92.3	95	92.7	

上段はアミノ酸コード領域、下段は ATG・poly A 間における cDNA 塩基配列による相同性を示した。

B 成熟 PRL 領域 cDNA 塩基配列及びアミノ酸配列における相同性 (%)

	Chicken	Turkey	J. Quail	Peafowl	Pheasant	Guineafowl
Chicken		95.7	96.2	97	94.7	95.7
Turkey	93		95.2	96.5	97.2	94.8
J. Quail	96.5	92.5		96.5	94	94.8
Peafowl	97	94	96.5		95.5	96.3
Pheasant	90.5	96.5	89.9	92.5		93.5
Guineafowl	95.5	93.5	95	97.5	91	

上段は成熟 PRL 領域アミノ酸配列、下段は cDNA 塩基配列による相同性を示した。

第4章 キジ目鳥類における PRL プロモーター構造解析

I. 緒言

鳥類における PRL の合成、分泌量は、胚発生期及び就巢期において顕著な上昇を示すことが広く知られており、特に早成性鳥類における就巢行動は、産卵後期に始まる血漿 PRL 濃度の急激な上昇が引き金となると考えられている (Ishida *et al.*, 1991; El Halawani *et al.*, 1986; Youngren *et al.*, 1991)。また、この血漿 PRL 濃度の上昇は、視床下部からの VIP 刺激により引き起こされていると考えられている (Sharp *et al.*, 1989; Youngren *et al.*, 1994)。しかしながら、鳥類における VIP 刺激による PRL 遺伝子発現及び PRL による就巢行動発現の詳細な機構は現在のところ不明である。

哺乳類における PRL 転写制御機構は、ドーパミンを主とし、cAMP を介した経路により抑制的に制御されていることが知られている (MacLeod and Lehmeyer, 1974)。また、ラット PRL において、下垂体特異的転写因子である Pit-1 に対する認識配列が、近位プロモーターに 4 箇所、遠位プロモーターに 4 箇所存在することが認められており (Gourdji and Laverriere, 1994)、これらの認識配列に対し、Pit-1 が結合することにより、cAMP を介し、PRL 転写機能を促進することも明らかとされている (Howard and Maurer, 1995)。

cAMP を介する遺伝子発現においては、cAMP 反応性領域 (CRE) 及び CRE 結合タンパク質 (CREB) が関与していると考えられている (Bokar *et al.*, 1988; Deutsch *et al.*, 1988)。ラット PRL 近位プロモーターにおいても、CRE 類似領域が認められたことから、PRL においても同様の機構の存在が考えられている (Iverson *et al.*, 1990)。このように、哺乳類における PRL プロモーターにおいては、Pit-1 や CREB、及び他の様々な転写因子、ホルモンに対し反応を示す転写調節配列が存在することが明らかとされている (Cohen *et al.*, 1996)。

一方、鳥類における PRL 転写制御機構は、主として視床下部から分泌される VIP により促進的制御を受けている。VIP は下垂体前葉前部において、PRL 転写量、PRL 分泌量及び PRL mRNA 量を増加させる作用を持ち、さらにその経路には cAMP が関与していることが明らかとされている (Macnamee *et al.*, 1986; Knapp *et al.*, 1988; Talbot *et al.*, 1991, 1995; Pitts *et al.*, 1994; Youngren *et al.*, 1994; Tong *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 2002)。また、VIP は細胞内 cAMP を増加させ、プロテインキナーゼ A を介し PRL 合成分泌を促進する働きも持つことが報告されている (Kansaku *et al.*,

1998)。

キジ目鳥類におけるプロモーター領域を含む PRL ゲノム DNA のクローニングは、まず 1995 年に Kurima らによりシチメンチョウにおいて報告された。次に、ニワトリにおける PRL ゲノム DNA クローニング及びレポータージーンアッセイ等による PRL プロモーター領域における構造及び発現制御機構の解析が行われ、その結果、近位プロモーターにおいて、哺乳類における Pit-1 結合部位との相同性が高く、フォルスコリンによる刺激に応答し PRL 転写活性を示すシスエレメントの存在が報告された (Ohkubo *et al.*, 2000)。また近年、Kang ら (2004) により、シチメンチョウ PRL 近位プロモーターにおいて、VIP 刺激に応答し、PRL 転写の促進を示す 35bp から成るシスエレメント (VRE) の存在が報告されたが、その経路に存在する結合タンパク質等に関しては未だ不明である。

以上のように、鳥類における PRL 転写調節機構においては、決定的な転写因子となりうる結合タンパク質及び転写因子認識配列は同定されておらず、未だ不明な点が多く残されている。従って、本章においては、cDNA における保存性解明に次ぐ段階として、鳥類 PRL 共通制御機構解明のため、キジ目鳥類における PRL プロモーターにおける塩基配列決定及び相同性比較を行うことにより、共通性、特異性の解明を目的とした。

II. 材料及び方法

血液サンプルからのゲノム DNA 抽出

本実験においては、前章において用いたコウライキジ、インドクジャク、シチメンチョウ、ニホンウズラ、愛知県農業総合試験場より提供された白色レグホーン及びウコッケイより採取した血液サンプル、東京農大桑山教授より提供されたセイロン野鶏及びホロホロチョウの血液サンプルを用いた。血液サンプル 10 μ l に対し、1 \times SSC(0.15M NaCl, 15mM Na-Citrate) 500 μ l を加え混和し溶血させた後、遠心分離 (3000 rpm, 10 分, 4 $^{\circ}$ C) により核を沈殿させ上澄みを除去した。上澄み除去後、生理食塩液 (0.935% NaCl, 0.5mM EDTA) 700 μ l による核洗浄を二回行った。その後遠心分離 (3000 rpm, 5 分, 4 $^{\circ}$ C) により得られた核分画に 50 μ l の生理食塩液を加え混和した後、500 μ l の核分解液 (0.01% proteinase K, 10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0.5% SDS) を加え 37 $^{\circ}$ C で一晩放置した。翌日、フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール (25: 24: 1) を等量加え、20 分間緩やかに混和した後、遠心分離 (8000 rpm, 12 分, 4 $^{\circ}$ C) を行い、上澄みを新しいチューブに移し替え、再度フェノール-クロロホルム処理によりタンパク質を除去した。その後、新しいチューブに移した上澄みに対して 2.5 倍量の 100% エタノール、1/10 倍量の 2M 酢酸ナトリウム (pH=4.0) を加え、-20 $^{\circ}$ C で一時間放置した後に混和、遠心分離 (10000 rpm, 5 分, 4 $^{\circ}$ C) によりゲノム DNA を沈殿させ、70% エタノールにより洗浄し、風乾後 100 μ l の TE 液 (10mM Tris, 1mM EDTA) に溶解させた。

PCR 法による PRL プロモーターの増幅

プライマーは、これまでにデータベースに登録されている、シチメンチョウ(U05953)、白色レグホーン(AB011434)、ニホンウズラ(AB162005)、コウライキジ(AB162004)、及びニワトリゲノムプロジェクトによる PRL 遺伝子塩基配列を基に、保存配列を検索し、ニワトリにおける PRL プロモーターを Exon 1 の 3'末端から上流約 3kb における塩基配列を 9つのフラグメントに分けるように、かつ各フラグメントが重複するように、各フラグメントが 350bp 程の大きさに設計したものをを用いた。その詳細は図 14 に示した。PCR には DNA 自動増幅装置 (PERKIN ELMER GeneAmp PCRsystem 9700) をを用いた。

各キジ目鳥種ゲノム DNA を用い、各フラグメントそれぞれのプライマーの組み合

わせ (AF·AR, BF·BR, CF·CR, DF·DR, EF·ER, FF·FR, GF·GR, HF·HR, IF·IR, IF·Exon1R) における増幅を試みた。PCR 条件は前章と同様とした。1 サンプル中の反応液の組成としては、10×PCR Buffer を 2.5μl、2.5mM each dNTP Mixture を 0.5μl、10pmol プライマー (Forward, Reverse) を 0.25μl ずつ、MilliQ 水を 20.25μl、ゲノム DNA を 1μl、Z-Taq (Takara) を 0.25μl 加え、全量を 25μl とした。PCR 反応後、2%アガロースゲル電気泳動により産物の確認を行った。

その後、各増幅産物が連続した一つの産物となることを証明するために、センスプライマーとして AF、アンチセンスプライマーとして Exon1R を用いて上記と同様に、PCR を行った後、電気泳動によりバンドを確認した。

キジ目鳥類 PRL プロモーターにおける塩基配列決定

各フラグメントにおける PCR 産物の精製及び塩基配列決定は、前章と同様の方法にて行い、決定した各種キジ目鳥種における PRL プロモーターの全塩基配列を、既に報告されている配列と比較し相同性を検討した。

PRL プロモーター領域における相同性アライメントは DNASIS Pro (Hitachi) を用いて作成し、そのアライメント配列を基に、前章と同様の方法により分子系統樹を作成した。

Ⅲ．結果

各フラグメントにおいて増幅した PCR 産物は、白色レグホーン、セイロン野鶏、ウコッケイ、ウズラ、キジ、シチメンチョウ、及びクジャクにおいては約 300~350bp、ホロホロチョウにおいては約 300~600bp の産物が PCR により得られた。PCR により増幅された産物の塩基配列を決定し、各産物の配列重複部位を基に作成した全塩基数は、白色レグホーン (3064b)、セイロン野鶏 (3037b)、ウコッケイ (3040b)、ウズラ (3155b)、シチメンチョウ (3017b)、キジ (2988b)、クジャク (3059b)、ホロホロチョウ (3639b) であった。次に、全ての鳥種において、プライマーAFとプライマーExon1Rを用いてPCRを行った結果、大きさが約 3.0~3.6kb の産物が得られ、各フラグメントにおける PCR 産物の合計と一致したことから、PRL プロモーターの各領域から増幅されたものであることが確認された。

本実験において塩基配列決定を行った全てのキジ目鳥種における相同性解析を行った。その模式図及び近位プロモーターにおけるアライメント図を図 15 及び 16 に示した。その結果、大きな変異としては、ホロホロチョウにおいて、転写開始点から上流 2289b において、615b の挿入配列が認められた。この挿入配列に関し、データベースにおいて Blast 検索を行った結果、哺乳類や鳥類において多く報告されているレトロポゾン的一种であることが明らかとなり、ホロホロチョウにおける 615bp の配列は種の成立以降に挿入されたものであると考えられた。

本実験において決定した全塩基配列を基にした他の鳥種との相同性及び分子系統樹は表 2 及び図 17 に示した。分子系統樹において白色レグホーン、ウコッケイ及びセイロン野鶏における相同性は 97%以上と非常に高い値を示した。また、独立したクラスターを形成したシチメンチョウ - キジ間における相同性においても 90%を上回った。一方、ウズラにおいては平均 82.5%、ホロホロチョウにおいては平均 72.01%と低い値が示された。

IV. 考察

本研究は、ミトコンドリア DNA、生態、行動等を基に行われてきた、これまでの系統学、進化学における遺伝的類縁関係の解析とは異なり、核 DNA レベル、特に機能遺伝子発現調節領域における直接比較により類縁関係を検討した。

相同性比較の結果、白色レグホーン、セイロン野鶏、ウコッケイ、キジ、シチメンチョウ、クジャクにおいては、何れにおいても 89%以上と非常に高い相同性が認められた（表 1）。一方、ウズラ及びホロホロチョウにおける他のキジ目との相同性は、他のキジ目鳥種間と比較し低い値を示した。さらに、PRL プロモーターにおける相同性より作成した分子系統樹においては、ウズラ及びホロホロチョウは、ニワトリ等と比較し、遺伝的に遠い結果となった。ホロホロチョウに関しては、これまでの系統学、生態学においてミトコンドリア DNA、行動、生態等により作成された系統樹と一致する。しかしながら、ウズラ、ニワトリ間においては、機能遺伝子の相同性やマイクロサテライトの共通性から、分類学的にも近縁であると考えられているが、本実験においては異なる結果となった。

ウズラ（AB162005）においては、転写開始点から 146bp 上流において、約 120bp の挿入が認められており、ホロホロチョウにおいても、転写開始点から上流約 2.5kb において認められた 615bp からなる、特異的な挿入配列が認められた（図 15）。ウズラ及びホロホロチョウにおけるこれらの挿入配列を除去した後、再び相同性解析を行った結果、分子系統樹に関しては変化が認められなかったが、相同性は何れにおいても 85%以上と高い値が示された。これらのことから、ウズラ及びホロホロチョウにおける大きな挿入配列以外の PRL プロモーター構造は、他のキジ目鳥種と大きな差異は認められないことが明らかとなった。

また、今回解析を行った PRL プロモーターにおいて、特に転写開始点から上流約 130bp までの近位プロモーターにおいて強い保存性が示された（図 16）。哺乳類型 Pit-1 結合配列と類似した 2 箇所の推定 Pit-1 結合配列（Ohkubo *et al.*, 2000）は、転写開始点から上流 92bp 及び 118bp において、全ての鳥種に共通して認められた。さらに、シチメンチョウ PRL 転写開始点から上流 40~74bp において、VIP 刺激に応答し、PRL 転写促進作用を示す領域（VRE）（Kang *et al.*, 2004）もまた、今回用いたキジ目鳥種全てにおいて保存されており、特にコア配列とされる 56~67bp（TGCTGAATGTAT）は完全に一致することが明らかとなった。

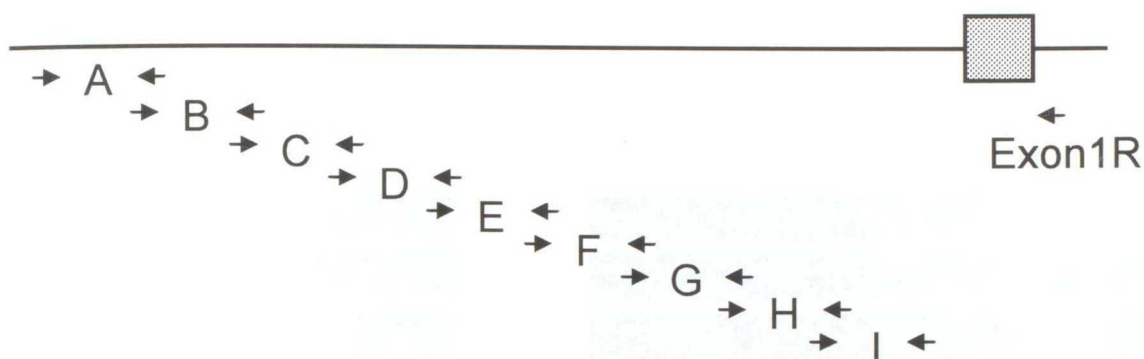
*in vivo*における実験により、鳥類 PRL 産生細胞内においては Pit-1 が存在しないことが明らかとされたことから (Weatherly *et al.*, 2001)、鳥類における基本的な PRL 転写制御においては、Pit-1 は主要因子ではない可能性が示されているが、2 箇所の推定 Pit-1 結合配列及び VRE は非常に近接しており、これらの領域における機能解析により、何らかのタンパク質が結合していることが明らかとされていることから、VIP による PRL 転写促進を介在する転写因子結合配列がこれらの高保存領域において存在する可能性が強く考えられた。

PRL 遺伝子転写開始点から上流約 3.0kb において、相同性がキジ目内において 81% 以上と高い値であることは、極めて稀である。哺乳類において比較的近縁であるとされるマウス (AL591843) 及びラット (J00766) 間における PRL プロモーターにおいて、転写開始点から上流約 2.5kb における相同性は 52.7% であることから、鳥類 PRL プロモーターにおける保存性は著しく高く、注目すべき点である。以上のことより、キジ目鳥類においては、PRL プロモーターの基本構造は強く保存されていると考えられ、PRL 遺伝子の発現調節機構においても共通していると考えられた。

V. 要約

鳥類 PRL における遺伝子発現制御機構に関しては未だ不明な点が多く残されている。従って、本章においては、キジ目鳥類 PRL 遺伝子発現共通制御機構解明のため、キジ目鳥類 PRL プロモーターにおける構造解析及び遺伝的類縁関係の検討を行った。その結果、系統解析において、キジ及びシチメンチョウは、cDNA 解析と同様、他の鳥種とは独立したクラスターを形成し、非常に近縁であることが明らかとなった。また、ウズラ及びホロホロチョウにおいては、大きな挿入配列が認められるが、その他の領域においては、転写開始点より上流約 3kb における相同性は非常に高いことが明らかとなった。特に近位プロモーターにおいて、これまでの研究により PRL 転写調節因子が作用するとされている領域は全ての鳥種において完全に一致した。これらのことから、キジ目鳥類における PRL 遺伝子発現制御機構は共通していると考えられた。

VI. 図



A フラグメント	Forward : 5'-AAGTACAGGTCTGGGAATCT-3'
	Reverse : 5'-GAAGGGAGAAGCAATCAACT-3'
B フラグメント	Forward : 5'-CATAAGTCATATGAGGATCC-3'
	Reverse : 5'-GGTGGAAAGATAGCTGTCTT-3'
C フラグメント	Forward : 5'-AAGAGCACAAACCATGTATG-3'
	Reverse : 5'-GGGACTTTGGACTCAGTGAT-3'
D フラグメント	Forward : 5'-ATAGGGGTTGGAAGGCACAT-3'
	Reverse : 5'-GAGGAGATTGAGTGGATCTC-3'
E フラグメント	Forward : 5'-CTGACCCCATTTCTCATCCCT-3'
	Reverse : 5'-GACCTAGATGTCCTGGTAGA-3'
F フラグメント	Forward : 5'-GTCAACCTGTTGTCTACCAG-3'
	Reverse : 5'-GTTCTGTACATGTGGAACAGG-3'
G フラグメント	Forward : 5'-ATAGTTACGAAATAATGGAG-3'
	Reverse : 5'-GTCGTAATCAGTGGAATCT-3'
H フラグメント	Forward : 5'-CACAGACACATTAGATCAGG-3'
	Reverse : 5'-ATGGAGGCTTCTGGCAAGAC-3'
I フラグメント	Forward : 5'-GCTGTATGGAGACAAACACA-3'
	Reverse : 5'-GAGTATGGCTGGATGTAGAG-3'
Exon1R	: 5'-AGCTTCTTCTTAATTCAATC-3'

図 14 PRL プロモーターにおける各プライマーの位置関係及びその配列

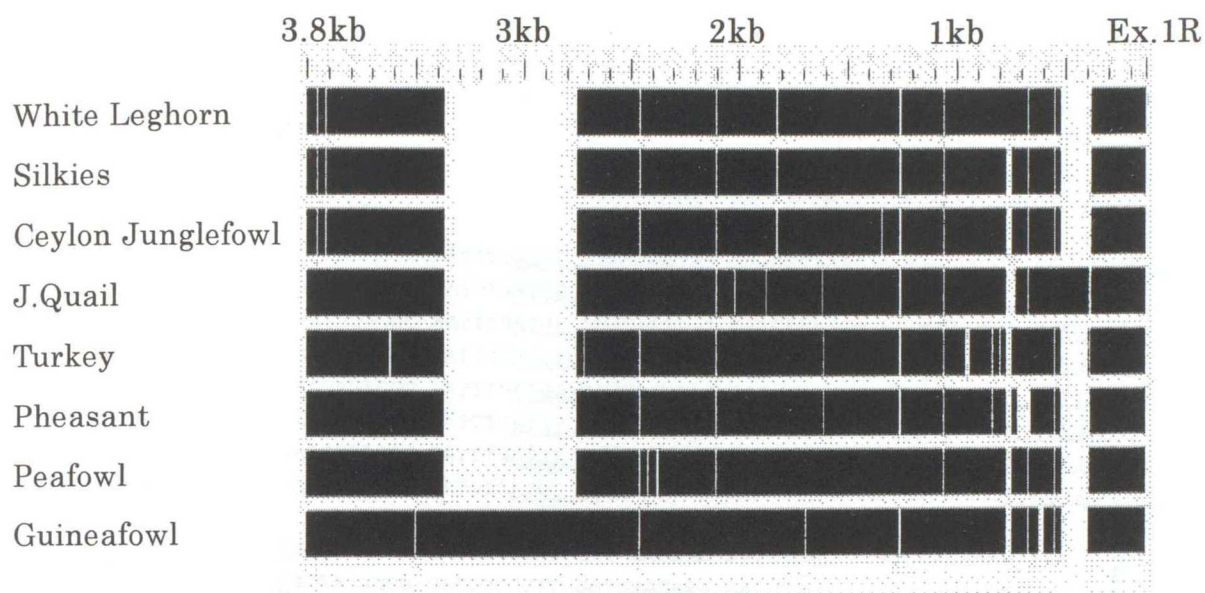


図 15 キジ目 PRL プロモーターにおけるアライメント模式図

White Leghorn	-----	-----	-----	-----	AGGTATTGAA	<u>TATGAATGTG</u>
Silkies	-----	-----	-----	-----	AGGTATTGAA	<u>TATGAATGTG</u>
Ceylon J. Fowl	-----	-----	-----	-----	AAGTATTGAA	<u>TATGAATGTG</u>
J. Quail	ACAACAACAA	CAAAAAAAG	AAACACAAC-	-----C	AAGTATTGAA	<u>TATGAATGTG</u>
Turkey	-----	-----	---AGAACC	---CAAAAGC	AAGTATTGAA	<u>TATGAATGTG</u>
Pheasant	-----	-----	-----CC-	---CAAAAGC	AAGTATTGAA	<u>TATGAATGTG</u>
Peafowl	-----	-----	-----	AACCAAAAAC	AAGTATTGAA	<u>TATGAATGTG</u>
Guinea Fowl	-----	-----	-----CAACC	AACCAAAAAC	AAGTATTGAA	<u>TATGAATGTG</u>
White Leghorn	GAAGAGAGGC	AATTTGATGT	TTGTAATTAT	CGAGGTAAAC	TCCACGACCT	<u>GCTGAATGTA</u>
Silkies	GAAGAGAGGC	AATTTGATGT	TTGTAATTAT	CGAGGTAAAC	TCCACGACCT	<u>GCTGAATGTA</u>
Ceylon J. Fowl	GAAGAGAGGC	AATTTGATGT	TTGTAATTAT	TGAGGTAAAC	TCCACGACCT	<u>GCTGAATGTA</u>
J. Quail	GAAGAGAGAC	AATTTGATGT	TTGTAATTAT	CGAGGTAAAC	TCCACGACCT	<u>GCTGAATGTA</u>
Turkey	GAAGAGAGGC	AATTTGATGT	TTGTAATTAC	CGAGGTAAAC	TCCACAACCT	<u>GCTGAATGTA</u>
Pheasant	GAAGAGAGGC	AATTTGATGT	TTGTAATTAC	CGAGGTAAAC	TCCACAACCT	<u>GCTGAATGTA</u>
Peafowl	GAAGAGAGGC	AATTTGATGT	TTGTAATTAT	CGAGGTAAAC	TCCACAACCT	<u>GCTGAATGTA</u>
Guinea Fowl	GAAGAGAGGC	AATTTGATGT	TTGTAATTAT	CGAGGTAAAC	TCCACGACCT	<u>GCTGAATGTA</u>
White Leghorn	<u>TGCAAAAGTG</u>	GACCCCGGAT	GGTGTATATA	AATCTGAC--	GTGCAGAAAG	TAAGAGCAGG
Silkies	<u>TGCAAAAGTG</u>	GACCCCGGAT	GGTGTATATA	AATCTGAC--	GTGCAGAAAG	TAAGAGCAGG
Ceylon J. Fowl	<u>TGCAAAAGTG</u>	GACCCCGGAT	GGTGTATATA	AATCTGAC--	GTGCAGAAAG	TAAGAGCAGG
J. Quail	<u>TGCAAAATG</u>	GACCCCGGAT	GGTGTATATA	AATCTGA--T	GTGCAGAAAG	TAAGAGCAGG
Turkey	<u>TGCAAAC-TG</u>	GACCCCGGAT	GGTGTATATA	AATCTGACA-	-TGCAGAAAG	TAAGAGCAGG
Pheasant	<u>TGCAAAC-TG</u>	GACCCCGGAT	GGTGTATATA	AATCTGACA-	-TGCAGAAAG	TAAAGCAGG
Peafowl	<u>TGCAAAAGTG</u>	GACCCCGGAT	GGTGTATATA	AATCTGACA-	-TGCAGAAAG	TAAGAGCAGG
Guinea Fowl	<u>TGCAAAAGTG</u>	GACCCCGGAT	GGTGTATATA	AATCTGACAT	GTGCAGAAAG	TAAGAGCAGG
White Leghorn	TATTGAGATT	TCTTTCTGGT	AGAGCAAGTC	ATCACACAGA	ATCCCTACCA	<u>TGAGCAACAG</u>
Silkies	TATTGAGATT	TCTTTCTGGT	AGAGCAAGTC	ATCACACAGA	ATCCCTACCA	<u>TGAGCAACAG</u>
Ceylon J. Fowl	TATTGAGATT	TCTTTCTGGT	AGAGCAAGTC	ATCACACAGA	ATCCCTACCA	<u>TGAGCAACAG</u>
J. Quail	TATTGAGACT	TCTTTCTGGT	AGAGCAAGTC	ATCACACAGA	ATCCCTACCA	<u>TGAGCAACAG</u>
Turkey	TATTGAGACT	TCTTTCTGGT	AGAGCAAGTC	ATCACAGAGA	ATCCCTACCA	<u>TGAGCAACAC</u>
Pheasant	TATTGAGACT	TCTTTCTGGT	AGAGCAAGTC	ATCACAGAGA	ATCCCTATCA	<u>TGAGCAACAC</u>
Peafowl	TATTAAGACT	TCTTTCTGGT	AGAGCGAGTC	ATCACACAGA	ATCCCTACCA	<u>TGAGCAACAG</u>
Guinea Fowl	TATTGAGACT	TCTTTCTGGT	AGAGCAAGTC	ATCACACAGG	ATCCCTACCA	<u>TGAGCAACAG</u>

図 16 キジ目 PRL 近位プロモーターにおけるアライメント

推定 TATA ボックスは太字、予測転写開始点は白抜き文字、メチオニンコドンは太字及び下線で示した。また、ニワトリにおいて報告されている推定 Pit-1 結合サイトは二重下線、シチメンチョウにおいて報告されている VRE コア配列は太下線により示した。

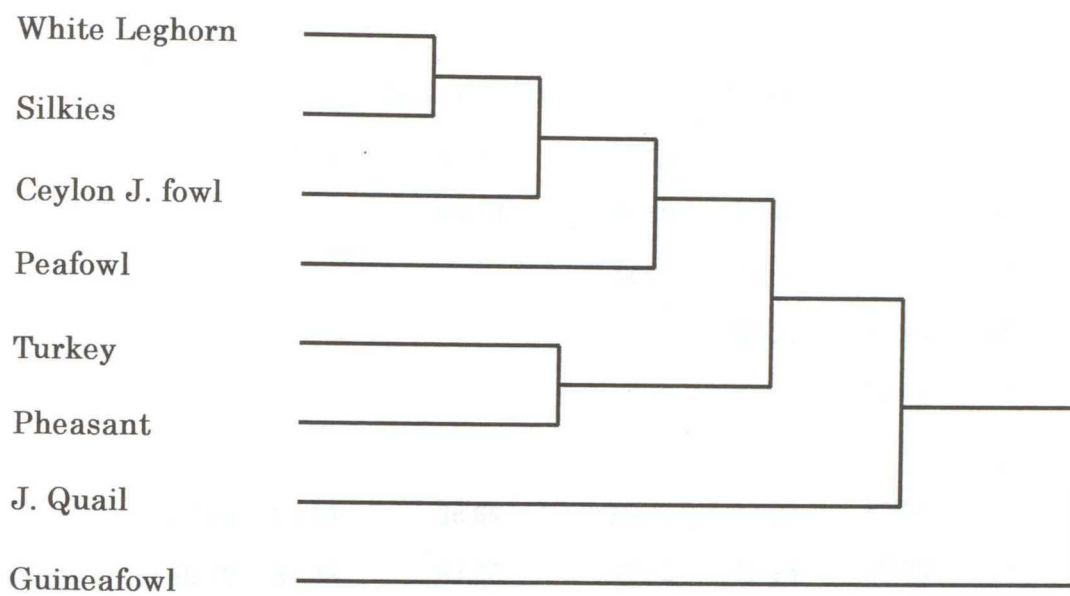


図 17 キジ目鳥類 PRL プロモーターにおける相同性による分子系統樹

Ⅶ. 表

表 2 キジ目鳥類 PRL プロモーターにおける相同性 (%)

	WL	Silkies	Ceylon J. Fowl	Peafowl	Turkey	Pheasant	Quail	Guineafowl
WL		99.05	97.43	91.50	89.17	89.20	84.49	72.51
Silkies			98.10	91.80	89.80	89.87	85.12	72.90
Ceylon J. Fowl				92.08	89.86	89.82	85.22	72.92
Peafowl					89.92	89.86	85.18	73.34
Turkey						90.94	84.25	71.64
Pheasant							84.37	71.94
J. Quail	87.86	88.55	88.69	88.17	87.07	87.54		68.84
Guineafowl	86.75	87.33	87.38	87.86	85.88	86.30	81.85	

上段は、AF-Exon1R 間全塩基配列における相同性、下段は、ウズラ及びホロホロチヨウにおける大きな挿入配列を排除し解析した他のキジ目鳥種との相同性を示した。

第5章 晩成性鳥類における PRL cDNA 及びプロモーター構造解析

I. 緒言

キジ目を初めとする早成性鳥類と同様、ハトやインコ等の晩成性鳥類においても、PRL と就巢行動との関連性が認められているが、その機構は大きく異なり、早成性鳥類においては、産卵後期から血漿 PRL 濃度が急激に上昇し、抱卵期においてピークに達し、その後の育雛期に入る直前あるいは孵化と共に急激に減少することが明らかとされており (Sharp *et al.*, 1979, 1988; El Halawani *et al.*, 1986; Zadworny *et al.*, 1988; Youngren *et al.*, 1991; Kuwayama *et al.*, 1992; March *et al.*, 1994)、PRL 濃度の上昇は抱卵行動の開始及び維持に関与していると考えられている。一方、晩成性鳥類においては、抱卵初期における血漿 PRL 濃度の急激な増加は認められず、抱卵後期において急激な上昇が認められ、育雛初期においても高濃度が維持されることが明らかとなった (Buntin, 1979; Goldsmith *et al.*, 1981, 1984; Dawson and Goldsmith, 1982; Goldsmith, 1982; Silverin and Goldsmith, 1984; Janik and Buntin, 1985; Ramsey *et al.*, 1985; Lea *et al.*, 1986; Wingfield and Goldsmith, 1990; Seiler *et al.*, 1992; Buntin *et al.*, 1996; Wang and Buntin, 1999; Kikuchi *et al.*, 1999; Lormée *et al.*, 2000)。これらの報告から、早成性と晩成性では、就巢行動における PRL 作用が異なり、晩成性鳥類においては、抱卵行動よりもむしろ孵化及び育雛において重要であると考えられる。

前章までの実験により、ニワトリ及び各種キジ目鳥類における PRL の構造及び機能に関する共通性を明らかとした。鳥類共通の PRL 機能解明及び繁殖制御機構解明のためには、次段階として系統遺伝学的に遠縁であり、繁殖期における PRL 作用機構が異なる晩成性鳥類を含めた共通性の解明が必要であると考えられる。しかしながら、晩成性鳥類における PRL 遺伝子構造に関しては未だ報告されていない。従って、本章においては、晩成性鳥類における PRL cDNA 及びプロモーターにおける構造解析を行い、早成性鳥類との比較により、PRL 構造及び転写制御機構における共通性を明らかとすることを目的とした。

II. 材料及び方法

下垂体前葉及び血液サンプル採取

本実験においては、晩成性鳥種として、業者より購入したセキセイインコ及びブンチョウを用いた。採血を行った後、放血、断頭し、下垂体前葉を採取した。採取した血液サンプル及び下垂体前葉は、実験に用いるまで -80°C にて凍結保存した。

下垂体前葉からのトータル RNA 抽出及び PRL cDNA 塩基配列決定

トータル RNA 抽出は、TRIzol (Invitrogen) を用い、Chomczynski (1993) の方法に従った。抽出したセキセイインコ及びブンチョウトータル RNA (1 μg) を用い、第 3 章と同様、3'-Full RACE Core Set (Takara)、ニワトリ、シチメンチョウ、及びアヒル PRL cDNA 配列に基づき設計した ORF-5'を用い、逆転写反応による一本鎖 cDNA 合成及び PCR による cDNA の増幅を行った。PCR により増幅された産物は、精製を行った後、第 3 章において作成したプライマー ORF-5'、ORF-3'及び PRL 3' RACE を用い、アミノ酸コード領域及び 3'-UTR における塩基配列決定を行った。塩基配列決定の方法は、前章と同様に行った。

血液サンプルからのゲノム DNA 抽出及び PRL プロモーターにおける塩基配列決定

セキセイインコ及びブンチョウにおけるゲノム DNA 抽出は前章と同様の方法にて行った。抽出したゲノム DNA は、センスプライマーとして、ニワトリ、シチメンチョウ及びアヒルにおける PRL プロモーター塩基配列を基に作成され、本研究室においてダチョウにおける相当領域を増幅可能であることが確認されているプライマー PRL-PROM-S (TGAATATGAATGTGGAAGAA: アヒル PRL (AB158611) における 61~80)、アンチセンスプライマーとして、セキセイインコ及びブンチョウ cDNA 塩基配列及びアヒル PRL Exon I における塩基配列を基に作成した PRL-PROM-A (CTTGGTGCTCATGGTAGAGA: アヒル PRL における 235~254) を用い PCR を行った。PCR 条件及び PCR 後の塩基配列決定は、前章と同様の方法により行った。

晩成性及び早成性鳥類における相同性解析

本実験において決定したセキセイインコ及びブンチョウにおける PRL cDNA 塩基配列は、第 3 章において決定したキジ、クジャク、ホロホロチョウ及び既に報告され

ているニワトリ、ウズラ、シチメンチョウ及びアヒルにおける PRL cDNA 塩基配列との相同性解析に用いた。相同性解析は DNASIS Pro (Hitachi) を用い、成熟 PRL 領域における cDNA 塩基配列及び推定アミノ酸配列において行い、さらに分子系統樹を作成した。また、PRL プロモーターにおける塩基配列は、前章において用いた各キジ目鳥種との相同性解析及び分子系統樹作成を同様の方法により行った。

Ⅲ. 結果

一本鎖 cDNA 合成後の PCR においてセキセイインコ及びブンチョウ共に、キジ目鳥類と同様、約 1000bp の産物が得られた。得られた PCR 産物を用い、塩基配列決定を行った結果、既に明らかとなっているキジ目鳥類とほぼ同じ位置において翻訳開始点を示す ATG コドンが認められ、ATG コドンから 688 塩基下流において翻訳終止点を示す TAA、TGA がセキセイインコ及びブンチョウそれぞれにおいて認められた (図 18)。

決定した cDNA 塩基配列におけるアミノ酸コード領域より推定したアミノ酸配列は 229 個のアミノ酸により構成され、疎水性解析の結果、他の鳥種と同様、30 個のアミノ酸から成るシグナルペプチド領域及び 199 個のアミノ酸から成る成熟 PRL 領域に分かれると考えられた (図 19)。セキセイインコ及びブンチョウにおける成熟 PRL 領域アミノ酸配列において、推定糖鎖コンセンサス配列は、アヒルと同様 6 番目において N-G-S、アヒル及びキジ目鳥類と同様 56 番目において N-G/S-C が認められた。また、ブンチョウにおいては、197 番目においてもキジ及びシチメンチョウと同様 N-N-C が認められた (図 20)。

成熟 PRL 領域 cDNA 及びアミノ酸配列における、アヒル及びキジ目鳥類との相同性比較及び分子系統樹は表 3 及び図 21 に示した。cDNA における早成性鳥類との相同性は、セキセイインコにおいては 90.1%以上、ブンチョウにおいては 88.6%以上であり、アミノ酸配列における相同性はセキセイインコにおいては 89.9%以上、ブンチョウにおいては 88.4%以上と何れにおいても比較的高い値が示された。また、成熟 PRL 領域 cDNA 塩基配列における分子系統樹においては、早成性鳥類であるキジ目、アヒルよりも外側に晩成性鳥類であるセキセイインコ、ブンチョウは配置されたが、アミノ酸配列による分子系統樹においては早成性、晩成性が混在する結果となった。

セキセイインコ及びブンチョウ PRL プロモーターにおいて、ATG コドンより上流 183 塩基までの塩基配列が決定された (図 22)。その結果を用い、キジ目鳥類及びアヒルとの相同性解析及び分子系統樹を作成した結果を表 4 及び図 23 に示した。分子系統樹においては、キジ目鳥類と比較し、成熟 PRL cDNA 配列による系統樹と同様、遺伝的類縁関係が遠い結果となったが、相同性解析において、セキセイインコにおいては 86.6%以上、ブンチョウにおいては 84.6%以上と高い値が示され、さらに 2 箇所の推定 Pit-1 結合配列及び VRE は保存されていることが明らかとなった。

IV. 考察

本実験は、晩成性鳥類における PRL 構造を世界で初めて明らかとした報告である。アヒル及びキジ目鳥種において共通して認められ、機能的糖鎖コンセンサス配列であると考えられた 56 番目における N-X-C は、晩成性鳥類であるセキセイインコ及びブンチョウにおいても同様に認められたことから、早成性、晩成性を問わず鳥類共通の機能的糖鎖コンセンサス配列である可能性が示された。また、キジ及びシチメンチョウ成熟 PRL 領域 197 番目において認められる N-N-C は、分類学的に遠縁であるブンチョウにおいても同様に認められることから、これらの種の分岐以前に既に存在していた可能性が推測された。さらに、アヒル成熟 PRL 領域 6 番目において認められる N-G-S に関し、セキセイインコ及びブンチョウにおいても同様に認められたことから、これらの種の成立以前に有していたものであることが推測された。また、Cys 残基はセキセイインコ及びブンチョウ共に、4、11、58、174、191 及び 199 番目において認められ、他の鳥種と完全に一致したことから、鳥類においては Cys 残基間におけるジスルフィド結合によるループ構造は共通していると考えられた。

PRL 構造の類似性が高いことから、セキセイインコ及びブンチョウにおいてもキジ目等と同様に G-PRL が存在する可能性が強く考えられた。しかしながら、現段階においては、これらの鳥種における G-PRL の存在性は明らかとされておらず、今後解析を行う必要があると考えられる。キジ目鳥類におけるウエスタンブロット解析において用いた抗ニワトリ PRL モノクローナル抗体が使用可能であるか否かは不明であるが、本実験において PRL cDNA 構造解析に成功したことにより、種特異的抗 PRL 抗体あるいは晩成性、早成性鳥類共通の抗 PRL 抗体を作成することが可能となり、今後の発展に対し大きく貢献する情報を提供すると言える。

PRL 近位プロモーター及び成熟 PRL 領域 cDNA 塩基配列による系統解析により、晩成性鳥類は早成性鳥類と比較し、遺伝的類縁関係が遠いことが明らかとなった。しかしながら、哺乳類における PRL cDNA における相同性は、ヒト (NM_000948) - マウス (NM_011164) 間において 71.4% であるのに対し、晩成性及び早成性鳥類における相同性はほぼ 85% 以上と高く、キジ目各鳥種間における相同性と大きな差は認められず、強く保存されていることが明らかとなった。さらに成熟 PRL 領域アミノ酸配列による系統樹においては、早成性、晩成性による分類は認められず、混在することが明らかとなった。また、早成性鳥類における PRL 近位プロモーターにおいて転写調

節に関与すると考えられた2箇所の推定 Pit-1 結合配列及び VRE を含む高保存領域は、晩成性鳥類においても非常に強く保存されていた。以上のことから、早成性及び晩成性鳥類における基本的な PRL 構造及び近位プロモーターにおける転写調節機構は類似性が高く、鳥類共通性が存在する可能性が強く考えられた。

V. 要約

キジ目を始めとする早成性鳥類とは繁殖期における PRL 作用が異なると考えられる晩成性鳥類であるセキセイインコ及びブンチョウにおける PRL cDNA 及び近位プロモーターにおける構造解析及び早成性鳥類との比較により、鳥類 PRL 共通性解明を目的とした。その結果、セキセイインコ及びブンチョウ共に、キジ目鳥種等と同様、成熟 PRL 領域アミノ酸配列 56 番目において推定糖鎖コンセンサス配列 N-X-C が認められたことから、56 番目における N-X-C が鳥類共通の機能的糖鎖コンセンサス配列である可能性が示され、晩成性鳥類においても G-PRL が存在する可能性が考えられた。また、成熟 PRL 領域における cDNA、アミノ酸配列及び近位プロモーターにおける相同性をキジ目鳥種等と比較した結果、非常に高い相同性が認められたことから、鳥類における基本的な PRL 構造及び転写調節機構は、早成性、晩成性を問わず共通している可能性が強く示された。

VI. 図

Budgerigar	ATGAGCACCA	AGGAGGCTTC	ACTGAAAGGT	TTGTTCTCTGG	CAGCCCTTCT	GGTGTCCAAC
Java Sparrow	ATGAGCACCA	AGGGGGCTTC	ACTGAAAGGT	TTGTTGCTGG	CAGCCCTTCT	GGTGTCCCAC
Budgerigar	ATGCTCCTGA	CAAAGAAGG	AGTGACTTCC	TTACCAATCT	GTCCCAATGG	ATCTGTCAAT
Java Sparrow	ATGCTTCTGA	CAAAGGAAGG	AGTGACCTCT	TTGCCAATCT	GCCCAATGG	ATCTGTCAAT
Budgerigar	TGCCAAGTTT	CCCTTGGGGA	ACTTTTTTGAC	CGAGCAGTTA	AACTTTCACA	CTACATTAC
Java Sparrow	TGCCAACTCT	CCCTTGAGGA	GCTTTTTTGAC	CGAGCAGTTA	AACTTTCACA	CTACATTAC
Budgerigar	TTCCTCTCTT	CAGAAATGTT	CAATGAATTT	GATGAACGCT	ATGCTCAGGG	CAGAGGTTTT
Java Sparrow	TTCCTCTCTT	CGGAAATGTT	CAATGAATTT	GATGAACGCT	ACGCCCAGGG	CCGGGGTTTT
Budgerigar	ATTACAAAAG	CTGTTAATGG	CTGCCACACT	TCCTCCTTAA	CCACCCCTGA	AGATAAGGAG
Java Sparrow	ATTGCAAAAAG	CTGTCAACAG	CTGCCACACT	GCGTCTTTAA	CCACTCCTGA	AGATAAGGAG
Budgerigar	CAAGCTCAGC	AGATTCATCA	TGAAGACCTG	CTGAATTTAA	TACTGGGAGT	GCTGCGGTCC
Java Sparrow	CAGGCTCAGC	AGATTCATCA	CGAAGACCTA	CTGAATTTAA	TACTGGGAGT	TCTGCGTTCC
Budgerigar	TGGAATGACC	CCCTGATCCA	TCTGGCCTCT	GAAGTACAAA	GAATCAAAGA	AGCTCCAGAT
Java Sparrow	TGGAATGATC	CCCTGATACA	CCTGGCCTCT	GAAGTACAAA	GAATCAAAGA	AGCTCCAGAA
Budgerigar	ACCATCCTCT	GGAAGGCTGT	AGAGATCGAA	GAGCAAAAACA	AGCGTCTTCT	AGAAGGAATG
Java Sparrow	ACCATTCTCT	GGAAGGCTGT	GGAGATTGAA	GAACAAAACA	AGCGACTTCT	AGAAGGAATG
Budgerigar	GAGAAAATAG	TAGGGCGGGT	TCATTCTGGT	GAGATTGGAA	ATGAAATTTA	CTCTCCATGG
Java Sparrow	GAGAAAATAG	TTGGGCGGGT	TCACTCTGGG	GAGGTCGAAA	ATGACATTTA	CACCTCTTGG
Budgerigar	GAAGGCCTTC	CTTCCCTGCA	ACTCGATGAT	GAGGACTCCA	GACTCTTTGC	CTTTTACAAC
Java Sparrow	GATGGACTCC	CATCCCTGCA	GCTTGCTGAT	GAGGACTCCA	GGCTCTTTGC	CTTTTACAAC
Budgerigar	TTGCTGCATT	GCCTCCGCCG	AGATTCCCAC	AAAATTGACA	ACTATCTCAA	AGTTCTGAAG
Java Sparrow	CTGCTTCACT	GCCTCCGCCG	AGATTCCCAC	AAAATTGACA	ACTATCTCAA	GGTTTTGAAG
Budgerigar	TGCCGCCTAA	TACACGATAG	CAATTGTTAA	CTACTCATGG	GCCTGATCAC	TTACCAAAAT
Java Sparrow	TGCCGCCTAA	TCCACGACAA	CAATTGTTGA	GTAGTCATGG	GCCTGATCAT	GTACTGAAGT
Budgerigar	CATTTCATCAT	GATGTTCTTG	TTGCTTTGCC	ACTTTTCATT	GCAAACTTTA	TGAAAAGTCA
Java Sparrow	CATTTCATCAT	G-TGTTCTTG	ATGCTTTCCC	ACTTT-----	-----A	TGAAAA-TCA
Budgerigar	CATTTCACAG	TATCAGAATC	ATCAGTACTT	TTCAGACATG	TTAGTGTAAT	TTCTGGCTAC
Java Sparrow	CATTGTGCAG	AAGCTGTATA	ATCAGTAACT	TTCAGGCATG	TTTGTATGAA	TTCTGGCTGC
Budgerigar	AACAATTAGG	ATCATTTATC	TTGGTG-TTT	AAAATGTTAT	AAA-TACTTG	TATGACAAGA
Java Sparrow	AACAATTAGC	ACCACACGTG	TCAGTGCTTT	AAAATACTAC	CAACTACTTG	TATGACAAGA
Budgerigar	ATACACTTTT	GTGTCTAATC	TCCTCACCTG	GTAGAATTTT	AGTGGTAATC	AGATAATGTA
Java Sparrow	ATATACTTTT	CCGTCTAATC	TTCTCCCCTA	GTAGTATTTT	AGTGACAAAC	AGGTAATGCA
Budgerigar	GATAAAAAAA	AAAA				
Java Sparrow	TATAAAAAATA	AAAATTCTTA	AATCCAAAA			

図 18 セキセイインコ及びブンチョウにおける PRL アミノ酸コード領域及び 3'-UTR cDNA 塩基配列
成熟 PRL 領域は太字で示した。

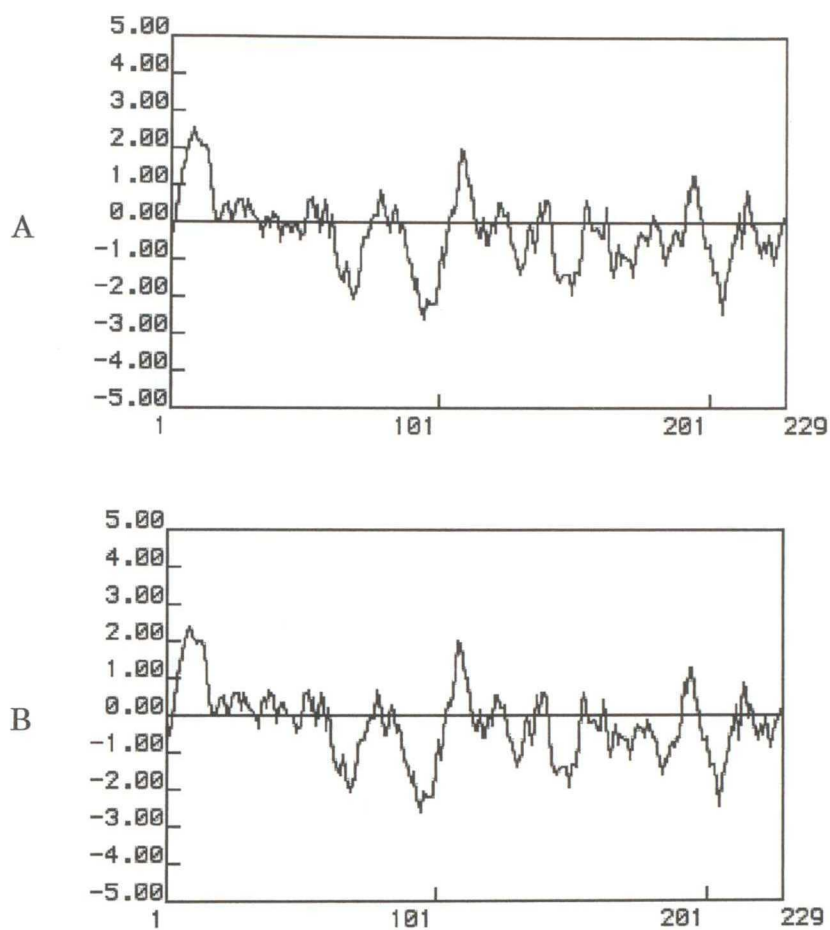


図 19 セキセイインコ及びブンチョウにおける疎水性解析結果

A：ブンチョウ、B：セキセイインコ

横軸はアミノ酸残基数を示している。

Budgerigar	LPICP <u>NGS</u> VN	CQVSLGELFD	RAVKLSHYIH	FLSSEMFNEF	DERYAQGRGF
Java Sparrow	LPICP <u>NGS</u> VN	CQLSLEELFD	RAVKLSHYIH	FLSSEMFNEF	DERYAQGRGF
Budgerigar	ITKAV <u>NGC</u> HT	SSLTTPEDKE	QAQQIHHEDL	LNLILGVLRS	WNDPLIHLAS
Java Sparrow	IAKAV <u>NSC</u> HT	ASLTTPEDKE	QAQQIHHEDL	LNLILGVLRS	WNDPLIHLAS
Budgerigar	EVQRIKEAPD	TILWKAVEIE	EQNKRLLEGM	EKIVGRVHSG	EIGNEIYSPW
Java Sparrow	EVQRIKEAPE	TILWKAVEIE	EQNKRLLEGM	EKIVGRVHSG	EVENDIYTPW
Budgerigar	EGLPSLQLDD	EDSRLFAFYN	LLHCLRRDSH	KIDNYLKVLK	CRLIHDSNC
Java Sparrow	DGLPSLQLAD	EDSRLFAFYN	LLHCLRRDSH	KIDNYLKVLK	CRLIHD <u>NNC</u>

図 20 セキセイインコ及びブンチョウにおける成熟 PRL 領域アミノ酸配列
 推定糖鎖コンセンサス配列は太字及び下線により示した。

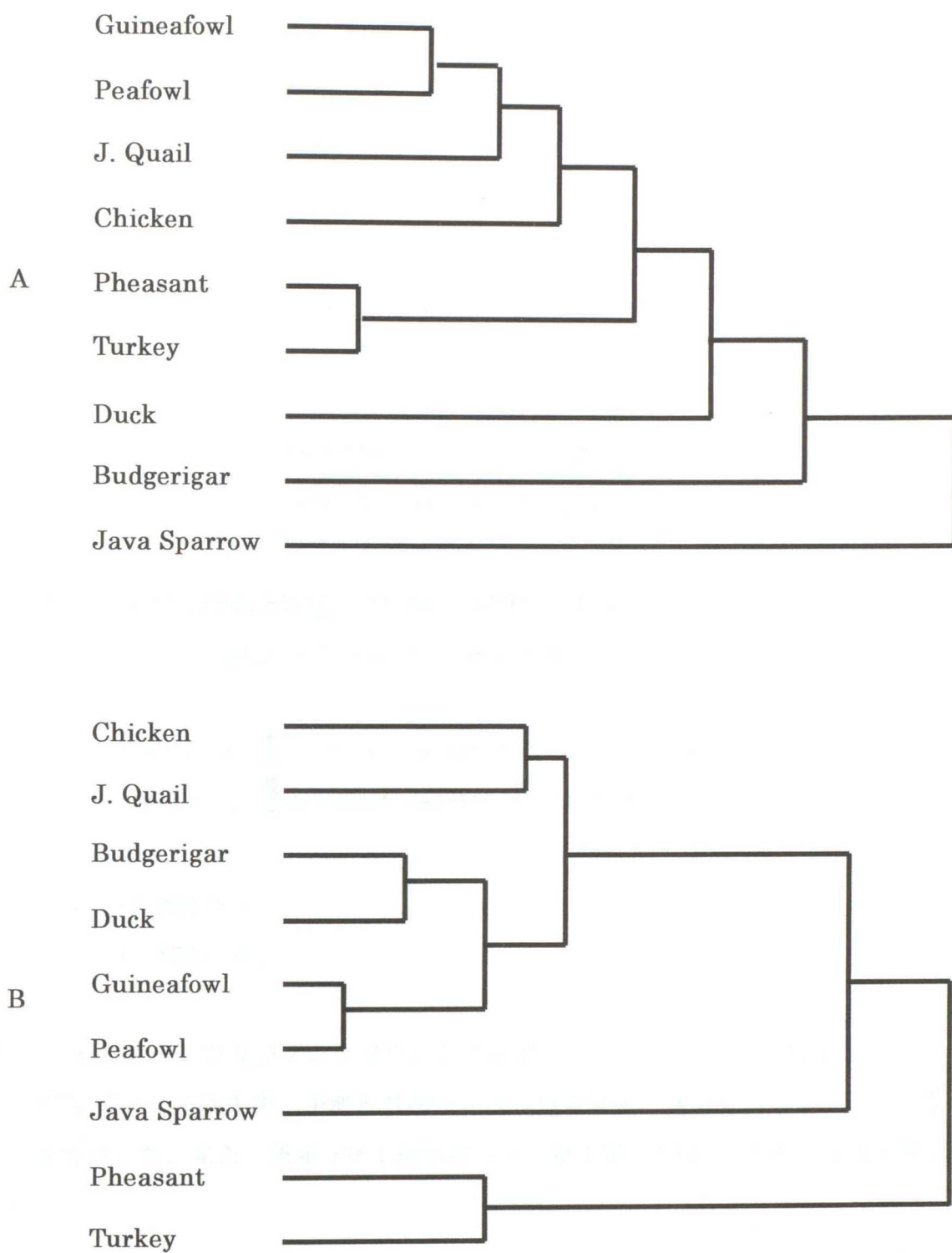


図 21 セキセイインコ、ブンチョウ、アヒル及びキジ目鳥種成熟 PRL 領域における
 相同性による分子系統樹

A : 成熟 PRL 領域 cDNA 塩基配列による分子系統樹、B : 成熟 PRL 領域アミノ酸配列
 による分子系統樹

Budgerigar CTGAATATGA ATGTGGAAGA AAGGCAATTT GATGTTTGTA ATTATCGAGG CAAACTCCAT

Java Sparrow CTGAATATGA ATGTGGAAGA AAGGCAATTT GATGTTTGTA ATTATGGAGG CAAACTCCAC

Budgerigar GACCTGCTGA ATGTATGCAA AATGGACCAT GGATGGTGTA **TATA**AAAAGTG GCATGTGCAG

Java Sparrow AACCTGCTGA ATGTATGCAA AATGGACCCT GCATGGTGTA **TATA**AAGAGCA GTATGTGCAG

Budgerigar AGAATAAGAA **CA**AGTATTGA GACTTCTTTC CGGTAGAGCA AGTCATCATA CAGGATCTCT

Java Sparrow AGAATAGCAG **CA**AGAATTGA GATTTCTTTC TGGTAAAGAA AGTCATCATC CAGAATCTCT

Budgerigar ACCATGAGCA

Java Sparrow ACCATGAGCA

図 22 セキセイインコ及びブンチョウにおける PRL 近位プロモーター塩基配列
 推定 TATA ボックスは太字、予測転写開始点は白抜き文字、メチオニンコドンは太字
 及び下線で示した。また、推定 Pit-1 結合部位は二重下線、VRE コア配列は太下線に
 より示した。

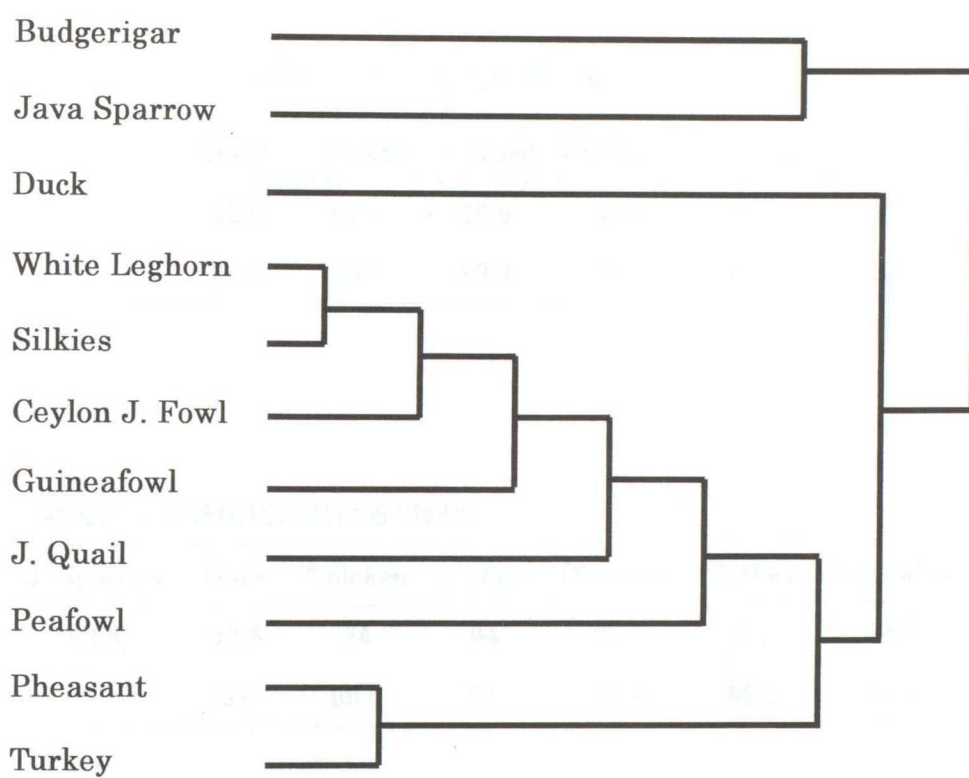


図 23 セキセイインコ、ブンチョウ、キジ目鳥種及びアヒル近位 PRL プロモーター
における相同性による分子系統樹

Ⅶ. 表

表 3 セキセイインコ及びブンチョウ成熟 PRL 領域におけるキジ目鳥種及びアヒルとの
の相同性比較

A 成熟 PRL 領域 cDNA 塩基配列における相同性 (%)

	J. Sparrow	Duck	Chicken	J. Quail	Pheasant	Turkey	Guineafowl	Peafowl
Budgerigar	90.1	92.6	92.1	90.9	90.6	91.1	92.1	92.6
J. Sparrow		89.6	88.7	89.3	88.6	88.6	88.9	90.1

B 成熟 PRL 領域アミノ酸配列における相同性 (%)

	J. Sparrow	Duck	Chicken	J. Quail	Pheasant	Turkey	Guineafowl	Peafowl
Budgerigar	93.5	97.5	94	94	89.9	92	95.5	96
J. Sparrow		92	89.9	91	88.4	88.9	91.5	93

表 4 セキセイインコ及びブンチョウ PRL 近位プロモーターにおけるキジ目鳥種及び
アヒルとの相同性 (%)

	Silkies	Ceylon J.	J.Quail	Pheasant	Turkey	G.fowl	P.fowl	Duck	Budgerigar	J.sparrow
W.L.	98.9	98.4	96.2	94.1	95.2	97.8	96.2	89.8	89.2	87.6
Silkies		98.4	96.2	94.1	95.2	97.8	96.2	89.8	89.2	87.6
Ceylon J.			95.7	93.5	94.6	97.3	95.7	89.2	88.7	87.6
J.Quail				93.6	94.6	97.3	95.2	90.3	89.2	87.1
Pheasant					97.3	94.7	94.7	88.2	86.6	84.9
Turkey						95.7	95.7	88.2	87.6	85.5
G.fowl							96.8	91.9	91.4	85.5
P.fowl								88.7	88.2	86
Duck									90.5	86.1
Budgerigar										89.3

第6章 総合考察

本研究により、早成性鳥類であるキジ目及びアヒルのみならず、晩成性鳥類であるセキセイインコ及びブンチョウを含めた様々な鳥種における成熟PRL領域アミノ酸配列において、糖鎖コンセンサス配列は種により複数箇所に認められたが、56番目に認められるN-X-Cは全ての鳥種において共通して認められた(図24)。また、成熟PRL領域cDNA、アミノ酸及び近位プロモーターにおける構造は、早成性、晩成性を問わず強く保存されており、特に近位プロモーターにおける、推定Pit-1結合配列及びVREは全ての鳥種において保存されていた(図25)。これらのことから、鳥種におけるPRL発現機構及び構造は共通していると考えられ、基本的PRL遺伝子発現はVIPにより制御されていると考えられた。さらに、56番目におけるN-X-Cが鳥類共通に保存された機能的糖鎖コンセンサス配列であり、晩成性鳥類を含めた鳥類全体において糖鎖の分岐やシアル酸の結合様式等といった構造の異なる糖鎖が結合した分子量の異なる複数のG-PRLが共通して存在すると考えられ、早成性、晩成性を問わず鳥類全体において、PRLが有する機能は、非常に高い類似性を持つ可能性が強く示された。従って、ニワトリのみならず、他の鳥種においても、生理的状态変化に伴う時期特異的G-PRLが存在し、各アイソフォームにおけるレセプターに対する親和性等の機能が異なる可能性が強く考えられた。また、翻訳後修飾である糖鎖修飾過程において、結合糖鎖構造を作り分ける機構は明らかとされておらず、その共通性においても現在のところ不明であり、鳥種によりアイソフォーム種や各アイソフォームにおける機能が異なる等の種特異性が存在する可能性も考えられた。

シチメンチョウにおける報告において、G-PRLは複数存在するが、その分子量はほぼ等しいとされ、ウエスタンブロット解析においてもG-PRLはシングルバンドとして検出されている(Corcoran and Proudman, 1991; Bédécarrats *et al.*, 1999a, b, c)。しかしながら、シチメンチョウにおける報告は長さ8cm、濃度12%のゲルを用いた結果であり、本実験において用いた長さ20cm、濃度15%のゲルと比較し、分離能が低いため、各アイソフォーム間における分子量に差が現れなかった可能性が考えられた。その根拠として、本実験におけるPRLプロモーター及びcDNAにおける相同性解析により、他の鳥種と比較し、シチメンチョウとの遺伝的類縁関係が非常に近いことが明らかとなったキジにおいても、ニワトリや他のキジ目鳥種と同様に複数の分子量の異なるG-PRLが検出されたことから、シチメンチョウにおいても同様の結果が得られる

ことが推測された。

また、56 番目に認められる N-X-C における Cys 残基は、174 番目に認められる Cys 残基との間にジスルフィド結合を形成することから、この配列に対し糖鎖が結合することにより PRL 高次構造が変化し PRL レセプターに対する親和性が低下する可能性が考えられ、PRL に対する糖鎖修飾は、PRL 作用を抑制するための機構であると考えられる。これに関連し、ニワトリ GH においては、糖鎖コンセンサス配列が C 末端における N-C-T のみであることから、糖鎖結合部位は 1 箇所のみであるとされているが (Souza *et al.*, 1984; Berumen *et al.*, 2004)、鳥類 PRL においては、糖鎖コンセンサス配列が鳥種により複数認められることから、鳥類共通に機能的糖鎖コンセンサス配列が 56 番目における N-X-C のみであると限定することはできない。C 末端における N-N-C に関しては、本研究により機能を持たない可能性が示されたが、アヒル、セキセイインコ及びブンチョウにおける 6 番目に認められた N-G-S が機能を有し、機能的糖鎖コンセンサス配列の数の違いにより、種特異的アイソフォームが形成される可能性も考えられる。

以上のことから、鳥類における人為的な繁殖制御の手法として、視床下部における VIP 合成及び分泌を制御することにより、PRL 発現制御と同等の効果が得られ、就巢行動の抑制及び停止や、産卵期間の延長が可能となると考えられる。また、非産卵期または産卵期におけるニワトリ等に対し G-PRL のみを過剰投与し、就巢行動が誘起されるか否かを検討することにより、G-PRL の機能を明らかにすることが可能であると考えられ、G-PRL における機能が NG-PRL とは異なることが証明された場合、将来的な繁殖制御において、VIP 及び PRL 発現制御とは異なるアプローチも可能となると考えられる。

また、ダチョウを含む走鳥類は、他の鳥類と比較し、体格等が大きく異なり、系統遺伝学的に遠縁であると考えられ、PRL 構造及び機能は不明である。従って今後、鳥類における糖鎖構造及び糖鎖結合部位に関する共通性及び特異性解明、さらに本研究において明らかとされた早成性及び晩成性鳥類における PRL 発現制御機構及び構造の共通性をより確固たるものとするため、走鳥類における PRL 構造を明らかとする必要があると考えられる。これにより、包括的な鳥類共通 PRL 発現及び作用機構解明が可能となり、人為的鳥類繁殖制御法の確立へ繋がると考えられる。なお、これまでに明らかとされていたニワトリ、シチメンチョウ、アヒル及びウズラに加え、キジ、クジャク及びホロホロチョウといったキジ目鳥類のみならず、系統遺伝学的に遠縁である

セキセイインコ及びブンチョウを含めた、様々な鳥種における PRL cDNA 及びプロモーター構造を明らかとした本研究の結果は、今後の鳥類繁殖機構、中でも抱卵行動及び育雛行動の発現機構に関する研究に対し、有用な情報を提示し、家禽においては卵産生、稀少鳥類においては種の保存に大きく貢献すると言える。

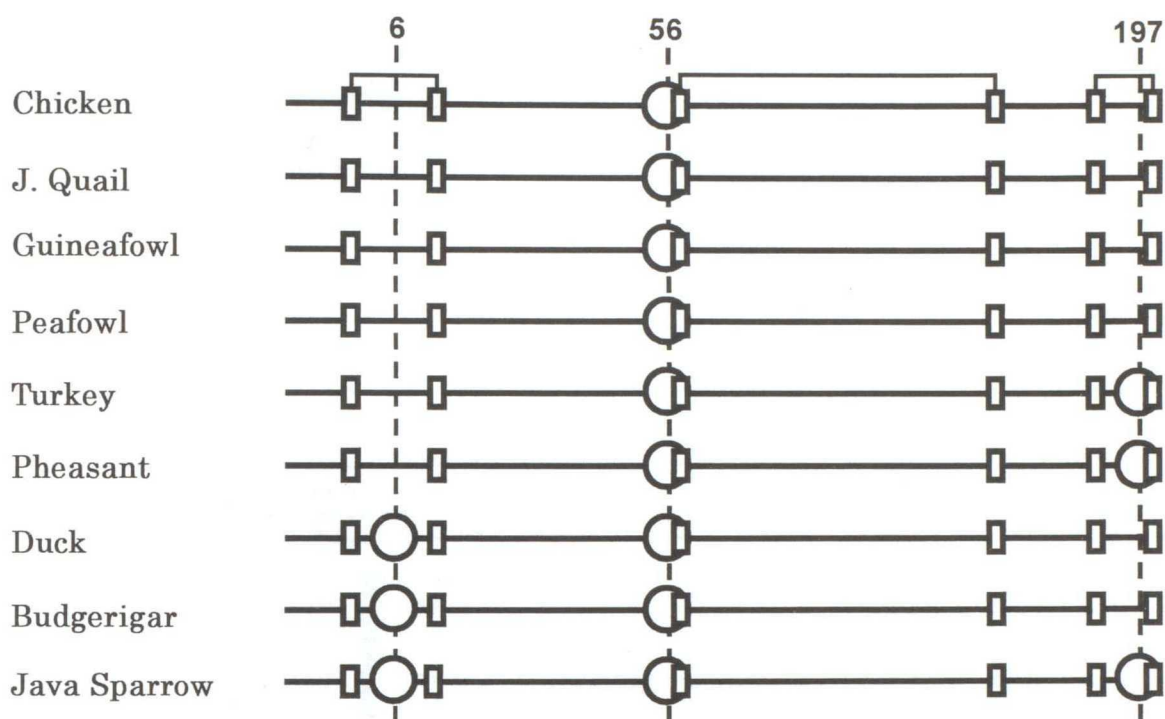


図 24 鳥類成熟 PRL 領域アミノ酸配列模式図

○：推定糖鎖コンセンサス配列、□：Cys 残基及びジスルフィド結合

White Leghorn	TGAATATGAA TGTGGAAGAG	AGGCAATTTG	<u>ATGTTTGTAA</u>	TTATCGAGGT	AAACTCCACG
Silkies	TGAATATGAA TGTGGAAGAG	AGGCAATTTG	<u>ATGTTTGTAA</u>	TTATCGAGGT	AAACTCCACG
Ceylon J.	TGAATATGAA TGTGGAAGAG	AGGCAATTTG	<u>ATGTTTGTAA</u>	TTATTGAGGT	AAACTCCACG
J. Quail	TGAATATGAA TGTGGAAGAG	AGACAATTTG	<u>ATGTTTGTAA</u>	TTATCGAGGT	AAACTCCACG
Pheasant	TGAATATGAA TGTGGAAGAG	AGGCAATTTG	<u>ATGTTTGTAA</u>	TTACCGAGGT	AAACTCCACA
Turkey	TGAATATGAA TGTGGAAGAG	AGGCAATTTG	<u>ATGTTTGTAA</u>	TTACCGAGGT	AAACTCCACA
Peafowl	TGAATATGAA TGTGGAAGAG	AGGCAATTTG	<u>ATGTTTGTAA</u>	TTATCGAGGT	AAACTCCACA
Guineafowl	TGAATATGAA TGTGGAAGAG	AGGCAATTTG	<u>ATGTTTGTAA</u>	TTATCGAGGT	AAACTCCACG
Duck	TGAATATGAA TGTGGAAGAA	AGGCAGTTTG	<u>ATGTTTGTAA</u>	TTATCGAGGT	AAACTCCACG
Budgerigar	TGAATATGAA TGTGGAAGAA	AGGCAATTTG	<u>ATGTTTGTAA</u>	TTATCGAGGC	AAACTCCATG
J. Sparrow	TGAATATGAA TGTGGAAGAA	AGGCAATTTG	<u>ATGTTTGTAA</u>	TTATGGAGGC	AAACTCCACA
White Leghorn	ACCTGCTGAA TGTATGCAAA	AGTGGACCCC	GGATGGTGTA	TATAAA TCTG	AC--GTGCAG
Silkies	ACCTGCTGAA TGTATGCAAA	AGTGGACCCC	GGATGGTGTA	TATAAA TCTG	AC--GTGCAG
Ceylon J.	ACCTGCTGAA TGTATGCAAA	AGTGGACCCC	GGATGGTGTA	TATAAA TCTG	AC--GTGCAG
J. Quail	ACCTGCTGAA TGTATGCAAA	AATGGACCCC	GGATGGTGTA	TATAAA TCTG	A--TGTGCAG
Pheasant	ACCTGCTGAA TGTATGCAAA	C-TGGACCCC	GGATGGTGTA	TATAAA TCTG	ACA--TGCAG
Turkey	ACCTGCTGAA TGTATGCAAA	C-TGGACCCC	GGATGGTGTA	TATAAA TCTG	ACA--TGCAG
Peafowl	ACCTGCTGAA TGTATGCAAA	AGTGGACCCC	GGATGGTGTA	TATAAA TCTG	ACA--TGCAG
Guineafowl	ACCTGCTGAA TGTATGCAAA	AGTGGACCCC	GGATGGTGTA	TATAAA TCTG	ACATGTGCAG
Duck	ACCTGTTGAA TATATGCAAA	A-TGGACCCC	GGATGGTGTA	TATAAA TCTG	GTATGTGCAG
Budgerigar	ACCTGCTGAA TGTATGCAAA	A-TGGACCAT	GGATGGTGTA	TATAAA AGTG	GCATGTGCAG
J. Sparrow	ACCTGCTGAA TGTATGCAAA	A-TGGACCCT	GCATGGTGTA	TATAA AGGCA	GTATGTGCAG
White Leghorn	AAAGTAAGAG CAGGTATTGA	GATTTCTTTC	TGGTAGAGCA	AGTCATCACA	CAGAATCCCT
Silkies	AAAGTAAGAG CAGGTATTGA	GATTTCTTTC	TGGTAGAGCA	AGTCATCACA	CAGAATCCCT
Ceylon J.	AAAGTAAGAG CAGGTATTGA	GATTTCTTTC	TGGTAGAGCA	AGTCATCACA	CAGAATCCCT
J. Quail	AAAGTAAGAG CAGGTATTGA	GACTTCTTTC	TGGTAGAGCA	AGTCATCACA	CAGAATCCCT
Pheasant	AAAGTAAAAG CAGGTATTGA	GACTTCTTTC	TGGTAGAGCA	AGTCATCACA	GAGAATCCCT
Turkey	AAAGTAAGAG CAGGTATTGA	GACTTCTTTC	TGGTAGAGCA	AGTCATCACA	GAGAATCCCT
Peafowl	AAAGTAAGAG CAGGTATTGA	GACTTCTTTC	TGGTAGAGCA	AGTCATCACA	GAGAATCCCT
Guineafowl	AAAGTAAGAG CAGGTATTGA	GACTTCTTTC	TGGTAGAGCA	AGTCATCACA	CAGGATCCCT
Duck	AAAATAAAAG CAAGTATTGA	GACTTCTTTC	TGGCAGAGCA	AGTCATCCTA	CAGGGTCTCT
Budgerigar	AGAATAAGAA CAAGTATTGA	GACTTCTTTC	CGGTAGAGCA	AGTCATCATA	CAGGATCTCT
J. Sparrow	AGAATAGCAG CAAGAATTGA	GATTTCTTTC	TGGTAAAGAA	AGTCATCATC	CAGAATCTCT
White Leghorn	ACC ATG				
Silkies	ACC ATG				
Ceylon J.	ACC ATG				
J. Quail	ACC ATG				
Pheasant	ATC ATG				
Turkey	ACC ATG				
Peafowl	ACC ATG				
Guineafowl	ACC ATG				
Duck	ACC ATG				
J. Sparrow	ACC ATG				

図 25 鳥類 PRL 近位プロモーターにおける塩基配列

推定 TATA ボックスは太字、予測転写開始点は白抜き文字、メチオニンコドンは大文字及び下線で示した。また、推定 Pit-1 結合部位は二重下線、VRE コア配列は太下線により示した。

総合要約

本研究は、鳥類共通繁殖機構解明のため、PRL 合成及び分泌、そして機能を分子遺伝学的に解析することを目的とした。ニワトリにおける異なる繁殖期及び胚発生期における G-PRL 存在比率の変動を解析した結果、シチメンチョウにおける報告とは異なり、少なくとも 5 種の糖鎖構造が異なる G-PRL の存在が認められ、時期特異的アイソフォームの存在が明らかとなった。このことから、各アイソフォームにおける機能が異なる可能性が考えられた。また、シチメンチョウにおける報告との相違の原因として、197 番目における糖鎖コンセンサス配列の有無、又は糖鎖構造が異なる種特異的アイソフォームが存在する可能性が考えられた。

従って、次段階として、他のキジ目鳥種における G-PRL の有無及び cDNA 及びアミノ酸配列における類似性の検討を行った。その結果、キジ目鳥種における cDNA 及びアミノ酸配列は強く保存されており、用いた鳥種全てにおいて複数の糖鎖構造が異なる G-PRL が認められたことから、キジ目鳥類 PRL における基本的な糖鎖修飾機構は共通しており、機能的糖鎖コンセンサス配列は 56 番目において共通して認められる N-G-C である可能性が考えられた。

次段階として、発現制御機構における共通性の解明のため、キジ目 PRL プロモーターにおける構造解析及び類縁関係の検討を行った。その結果、キジ目 PRL プロモーターにおける相同性は、近位プロモーターならびにその他の領域においても非常に高いことから、キジ目鳥類における PRL 遺伝子発現制御機構は共通していると考えられた。

さらに、鳥類共通性を明らかにするため、キジ目鳥類を含む早成性鳥類とは繁殖期における PRL 作用が異なると考えられる晩成性鳥類における PRL cDNA 及びプロモーターにおける構造解析を行った結果、晩成性及び早成性鳥類における PRL は非常に類似性が高く、強く保存されていることが明らかとなった。さらに、アミノ酸配列 56 番目において N-X-C 配列が認められたことから、この配列が鳥類共通の糖鎖結合部位である可能性が示された。

以上のことから、少なくともキジ目鳥類における G-PRL 及び G-PRL 内における糖鎖構造が異なるアイソフォームの存在は共通であり、さらにプロモーター及び cDNA における構造及び発現制御機構においては、キジ目鳥類に限らず晩成性鳥類においても類似性が高く認められることから、早成性、晩成性を問わず、鳥類全体において G-PRL

が存在し、PRL の機能もまた非常に高い類似性を持つ可能性が強く示された。しかしながら、PRL における糖鎖修飾機構において、種間における糖鎖構造及び糖鎖結合部位に関する共通性及び特異性に関しては現段階においては不明である。従って今後、他の鳥類と比較し、系統遺伝学的に遠縁であると考えられる走鳥類等において PRL 構造解析を行う必要があると考えられる。これにより、本研究において明らかとなった早成性及び晩成性鳥類における PRL 発現制御機構及び構造の共通性はより確固たるものとなり、包括的な鳥類共通 PRL 発現及び作用機構解明が可能となると考えられる。

謝辞

本研究の遂行、論文の作成にあたり多大な御指導、御校閲を承りました、政岡俊夫大学院担当教授、ならびに神作宜男助教授に深く感謝の意を表します。

適切なる御助言を賜りました、有嶋和義教授、ならびに滝沢達也教授に厚く御礼申し上げます。

試料を御提供頂きました、東京農業大学桑山岳人教授、静岡大学森誠教授、笹波知弘教官、名古屋大学大学院塚田光教官、愛知県農業総合試験場家きんグループ野田賢治班長、中村明弘博士に深く感謝いたします。

ウエスタンブロット解析における抗ニワトリ PRL 抗体をご提供頂きました、Texas A&M 大学 Dr. Luc Berghman に深く感謝の意を表します。

適切なる御助言、御指導を承りました、香川大学大久保武助教授、名古屋大学大学院島田清司教授、McGill 大学 Dr. David Zadworny、Guelph 大学 Dr. Gregory Bédécarrats に厚く御礼申し上げます。

研究遂行上様々な面において御助力頂きました、動物資源育種学研究室卒業生である印藤哲平、戸田美紀、宮崎裕子、在学生である池上奈央子、木下みほこ、小林正直、佐藤典、長戸路瑞樹、矢島彩子（敬称略）、ならびに3年生の皆様に心より御礼申し上げます。

最後に、心病める時も健やかなる時も、いついかなる時も温かく見守り、励まし、心身共に支えて頂きました、我が父、母、姉、兄、ならびに和賀央子氏に心の底より厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Albert PR, Neve KA, Bunzow JR, and Civelli O. (1990). Coupling of a cloned rat dopamine-D2 receptor to inhibition of adenylyl cyclase and prolactin secretion. *J. Biol. Chem.* 265, 2098-2104.
- Aramburo C, Luna M, Carranza M, Reyes M, Martinez-Coria H, and Scanes CG. (2000). Growth hormone size variants: changes in the pituitary during development of the chicken. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223, 67-74.
- Araki T, Haupt H, Hermentin P, Schwick HG, Kimura Y, Schmid K, and Torikata T. (1998). Preparation and partial structural characterization of alpha1T-glycoprotein from normal human plasma. *Arch. Biochem. Biophys.* 351, 250-256.
- Astwood EB. (1941). The regulation of corpus luteum function by hypophysial luteotrophin. *Endocrinology* 29, 309-319.
- Bédécarrats G, Guémené D, Morvan C, Crisostomo-Pinto S, Kühnlein U, and Zadworny D. (1999c). In vitro release of isoforms of prolactin from pituitary glands of turkey hens at different physiological stages. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 105-111.
- Bédécarrats G, Guémené D, Morvan C, Kühnlein U, and Zadworny D. (1999b). Quantification of prolactin messenger ribonucleic acid, pituitary content and plasma levels of prolactin, and detection of immunoreactive isoforms of prolactin in pituitaries from turkey embryos during ontogeny. *Biol. Reprod.* 61, 757-763.
- Bédécarrats G, Guémené D, Kühnlein U, and Zadworny D. (1999a). Changes in levels of immunoreactive prolactin isoforms during a reproductive cycle in turkey hens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 96-104.
- Berghman LR, Lens P, Decuyper E, Kuhn E, and Vandesande F. (1987). Glycosylated chicken growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68, 408-414.

- Berumen LC, Luna M, Carranza M, Martinez-Coria H, Reyes M, Carabez A, and Aramburo C. (2004). Chicken growth hormone: further characterization and ontogenic changes of an N-glycosylated isoform in the anterior pituitary gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* 139, 113-123.
- Bokar JA, Roesler WJ, Vandenbark GR, Kaetzel DM, Hanson RW, and Nilson JH. (1988). Characterization of the cAMP responsive elements from the genes for the alpha-subunit of glycoprotein hormones and phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). Conserved features of nuclear protein binding between tissues and species. *J. Biol. Chem.* 263, 19740-19747.
- Buntin JD. (1979). Prolactin release in parent ring doves after brief exposure to their young. *J. Endocrinol.* 82, 127-130.
- Buntin JD, Hnasko RM, Zuzick PH, Valentine DL, and Scammell JG. (1996). Changes in bioactive prolactin-like activity in plasma and its relationship to incubation behavior in breeding ring doves. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102, 221-232.
- Burke WH, and Papkoff H. (1980). Purification of turkey prolactin and the development of a homologous radioimmunoassay for its measurement. *Gen. Comp. Endocrinol.* 40, 297-307.
- Carrillo AJ, Pool TB, and Sharp ZD. (1985). Vasoactive intestinal peptide increases prolactin messenger ribonucleic acid content in GH3 cells. *Endocrinology* 116, 202-206.
- Chaiseha Y, and El Halawani ME. (1999). Expression of vasoactive intestinal peptide/peptide histidine isoleucine in several hypothalamic areas during the turkey reproductive cycle: relationship to prolactin secretion. *Neuroendocrinology* 70, 402-412.
- Chomczynski P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15, 532-4, 536-7.
- Cohen LE, Wondisford FE, and Radovick S. (1996). Role of Pit-1 in the gene expression of growth hormone, prolactin, and thyrotropin. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 25, 523-540.

- Cole ES, Nichols EH, Lauziere K, Edmunds T, and McPherson JM. (1991). Characterization of the microheterogeneity of recombinant primate prolactin: implications for posttranslational modifications of the hormone in vivo. *Endocrinology* 129, 2639-2646.
- Corcoran DH, and Proudman JA (1991). Isoforms of turkey prolactin: Evidence for differences in glycosylation and tryptic peptide mapping. *Comp. Biochem. Physiol. B* 99, 563-570.
- Crisóstomo S, Guémené D, Garreau-Mills M, and Zadworny D. (1997). Prevention of the expression of incubation behavior using passive immunization against prolactin in turkey hens (*Meleagris gallopavo*). *Reprod. Nutr. Dev.* 37, 253-266.
- Dawson A. (2006). Control of molt in birds: association with prolactin and gonadal regression in starlings. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 314-322.
- Dawson A, and Goldsmith AR. (1982). Prolactin and gonadotrophin secretion in wild starlings (*Sturnus vulgaris*) during the annual cycle and in relation to nesting, incubation, and rearing young. *Gen. Comp. Endocrinol.* 48, 213-221.
- Dawson A, and Sharp PJ. (1998). The role of prolactin in the development of reproductive photorefractoriness and postnuptial molt in the European starling (*Sturnus vulgaris*). *Endocrinology* 139, 485-490.
- Delidow BC, Billis WM, Agarwal P, and White BA. (1991). Inhibition of prolactin gene transcription by transforming growth factor-beta in GH3 cells. *Mol. Endocrinol.* 5, 1716-1722.
- Deutsch PJ, Hoeffler JP, Jameson JL, Lin JC, and Habener JF. (1988). Structural determinants for transcriptional activation by cAMP-responsive DNA elements. *J. Biol. Chem.* 263, 18466-18472.
- Doneen BA, and Smith TE. (1982). Ontogeny of endocrine control of osmoregulation in chick embryo. II. Actions of prolactin, arginine vasopressin, and aldosterone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 48, 310-318.

- El Halawani ME, Silsby JL, Behnke EJ, and Fehrer SC. (1986). Hormonal induction of incubation behavior in ovariectomized female turkeys (*Meleagris gallopavo*). Biol. Reprod. 35, 59-67.
- El Halawani ME, Silsby JL, Rozenboim I, and Pitts GR. (1995). Increased egg production by active immunization against vasoactive intestinal peptide in the turkey (*Meleagris gallopavo*). Biol. Reprod. 52, 179-183.
- El Halawani ME, Silsby JL, Youngren OM, and Phillips RE. (1991). Exogenous prolactin delays photo-induced sexual maturity and suppresses ovariectomy-induced luteinizing hormone secretion in the turkey (*Meleagris gallopavo*). Biol. Reprod. 44, 420-424.
- Ensor DM. (1978). Comparative endocrinology of prolactin. Chapman and Hall Ltd.
- Escalada J, Cacicedo L, Ortego J, Melian E, and Sanchez-Franco F. (1996). Prolactin gene expression and secretion during pregnancy and lactation in the rat: role of dopamine and vasoactive intestinal peptide. Endocrinology 137, 631-637.
- Etches RJ, and Cheng KW. (1982). A homologous radioimmunoassay for turkey prolactin: changes during the reproductive and ovulatory cycle. Poult. Sci. 61, 1354-1362.
- Goldsmith AR. (1982). Plasma concentrations of prolactin during incubation and parental feeding throughout repeated breeding cycles in canaries (*Serinus canarius*). J. Endocrinol. 94, 51-59.
- Goldsmith AR, and Williams DM. (1980). Incubation in mallards (*Anas platyrhynchos*): changes in plasma levels of prolactin and luteinizing hormone. J. Endocrinol. 86, 371-379.
- Goldsmith AR, Burke S, and Prosser JM. (1984). Inverse changes in plasma prolactin and LH concentrations in female canaries after disruption and reinitiation of incubation. J. Endocrinol. 103, 251-256.

- Goldsmith AR, Edwards C, Koprucu M, and Silver R. (1981). Concentrations of prolactin and luteinizing hormone in plasma of doves in relation to incubation and development of the crop gland. *J. Endocrinol.* 90, 437-443.
- Gourdji D, and Laverriere JN. (1994). The rat prolactin gene: a target for tissue-specific and hormone-dependent transcription factors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 100, 133-142.
- Hall MR, and Goldsmith AR. (1983). Factors affecting prolactin secretion during breeding and incubation in the domestic duck (*Anas platyrhynchos*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 49, 270-276.
- Hanks MC, Alozi JA, Sharp PJ, and Sang HM. (1989). Molecular cloning and sequence analysis of putative chicken prolactin cDNA. *J. Mol. Endocrinol.* 2, 21-30.
- Haro LS, Lee DW, Singh RN, Bee G, Markoff E, and Lewis UJ. (1990). Glycosylated human prolactin: alterations in glycosylation pattern modify affinity for lactogen receptor and values in prolactin radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71, 379-383.
- Harvey S, Davison TF, and Chadwick A. (1979). Ontogeny of growth hormone and prolactin secretion in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 39, 270-273.
- Hector JAL, and Goldsmith AR. (1985). The role of prolactin during incubation: comparative studies of three diomedea albatrosses. *Gen. Comp. Endocrinol.* 60, 236-243.
- Hirano T. (1986). The spectrum of prolactin action in teleosts. *Prog. Clin. Biol. Res.* 205, 53-74.
- Hoffmann T, Gunz G, Brue T, Jaquet P, and Ronin C. (1992). Prolactin isoforms secreted by human prolactinomas. *Horm. Res.* 38, 164-170.
- Hoffmann T, Penel C, and Ronin C. (1993). Glycosylation of human prolactin regulates hormone bioactivity and metabolic clearance. *J. Endocrinol. Invest.* 16, 807-816.

- Howard PW, and Maurer RA. (1995). A composite Ets/Pit-1 binding site in the prolactin gene can mediate transcriptional responses to multiple signal transduction pathways. *J. Biol. Chem.* 270, 20930-20936.
- Hutchison RE, Hinde RA, and Steel E. (1967). The effects of oestrogen, progesterone and prolactin on brood patch formation in ovariectomized canaries. *J. Endocrinol.* 39, 379-385.
- Ishida H, Shimada K, Sato K, Seo H, Murata Y, Matsui N, and Zadworny D. (1991). Developmental expression of the prolactin gene in the chicken. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83, 463-467.
- Iverson RA, Day KH, d'Emden M, Day RN, and Maurer RA. (1990). Clustered point mutation analysis of the rat prolactin promoter. *Mol. Endocrinol.* 4, 1564-1571.
- Janik DS, and Buntin JD. (1985). Behavioural and Physiological effects of prolactin in incubating ring doves. *J. Endocrinol.* 105, 201-209.
- Jin L, and Nei M. (1990). Limitations of the evolutionary parsimony method of phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 7, 82-102.
- Kang SW, Gazzillo LC, You S, Wong EA, and El Halawani ME. (2004). Turkey prolactin gene regulation by VIP through 35-bp cis-acting element in the proximal promoter. *Gen. Comp. Endocrinol.* 138, 157-165.
- Kang SW, Youngren OM, and El Halawani ME. (2002). Influence of VIP on prolactinemia in turkey anterior pituitary cells: role of cAMP second messenger in VIP-induced prolactin gene expression. *Regul. Pept.* 109, 39-44.
- Kansaku N, Ohkubo T, Okabayashi H, Guémené D, Kuhnlein U, Zadworny D, and Shimada K. (2005). Cloning of duck PRL cDNA and genomic DNA. *Gen. Comp. Endocrinol.* 141, 39-47.
- Kansaku N, Shimada K, Saito N, and Hidaka H. (1998). Effects of protein kinase A inhibitor (H-89) on VIP- and GRF-induced release and mRNA expression of prolactin and growth hormone in the chicken pituitary gland. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 119, 89-95.

- Kansaku N, Shimada K, Terada O, and Saito N. (1994). Prolactin, growth hormone, and luteinizing hormone- β subunit gene expression in the cephalic and caudal lobes of the anterior pituitary gland during embryogenesis and different reproductive stages in the chicken. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96, 197-205.
- Karatzas CN, Guémené D, Zadworny D, and Kühnlein U. (1997). Changes in expression of the prolactin and growth hormone gene during different reproductive stages in the pituitary gland of turkeys. *Reprod. Nutr. Dev.* 37, 69-79.
- Keeler C, Dannies PS, and Hodsdon ME. (2003). The tertiary structure and backbone dynamics of human prolactin. *J. Mol. Biol.* 328, 1105-1121.
- Kikuchi M, Ishii S, Imanishi S, Kansaku N, and Shimada K. (1999). Changes in plasma levels of prolactin, luteinizing hormone and progesterone in relation to breeding activities in the bull-headed shrike (*Lanius bucephalus*). In "Recent Progress in Molecular and Comparative Endocrinology. (edited by Kwon HB, Joss JMP, and Ishii S)." pp. 471-476.
- Knapp TR, Fehrer SC, Silsby JL, Porter TE, Behnke EJ, and El Halawani ME. (1988). Gonadal steroid modulation of basal and vasoactive intestinal polypeptide-stimulated prolactin release by turkey anterior pituitary cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 72, 226-236.
- Kurima K, Proudman JA, El Halawani ME, and Wong EA. (1995). The turkey prolactin-encoding gene and its regulatory region. *Gene* 156, 309-310.
- Kuwayama T, Shimada K, Saito N, Ohkubo T, Sato K, Wada M, and Ichinoe K. (1992). Effects of removal of chicks from hens on concentrations of prolactin, luteinizing hormone and oestradiol in plasma of brooding Gifujidori hens. *J. Reprod. Fert.* 95, 617-622.
- Lea RW, Talbot RT, and Sharp PJ. (1991). Passive immunization against chicken vasoactive intestinal polypeptide suppresses plasma prolactin and crop sac development in incubating ring dove. *Horm. Behav.* 25, 283-294.

- Lea RW, and Sharp PJ. (1982). Plasma prolactin concentrations in broody turkeys: lack of agreement between homologous chicken and turkey prolactin radioimmunoassays. *Br. Poult. Sci.* 23, 451-459.
- Lea RW, Dods ASM, Sharp PJ, and Chadwick A. (1981). The possible role of prolactin in the regulation of nesting behaviour and the secretion of luteinizing hormone in broody bantams. *J. Endocrinol.* 91, 89-97.
- Lea RW, Vowles DM, and Dick HR. (1986). Factors affecting prolactin secretion during the breeding cycle of the ring dove (*Streptopelia risoria*) and its possible role in incubation. *J. Endocrinol.* 110, 447-458.
- Lewis UJ, Singh RN, Lewis LJ, Seavey BK, and Sinha YN. (1984). Glycosylated ovine prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 385-389.
- Lewis UJ, Singh RN, Sinha YN, and Vanderlaan WP. (1985). Glycosylated human prolactin. *Endocrinology* 116, 359-363.
- Loeffler JP, Kley N, Pittius CW, and Holtt V. (1985). Gamma-Aminobutyric acid decreases levels of messenger ribonucleic acid encoding prolactin in the rat pituitary. *Neurosci. Lett.* 53, 121-125.
- Lormée H, Jouventin P, Lacroix A, Lallemand J, and Chastel O. (2000). Reproductive endocrinology of tropical seabirds: sex-specific patterns in LH, steroids, and prolactin secretion in relation to parental care. *Gen. Comp. Endocrinol.* 117, 413-426.
- MacLeod RM, and Lehmeyer JE. (1974). Studies on the mechanism of the dopamine-mediated inhibition of prolactin secretion. *Endocrinology* 94, 1077-1085.
- Macnamee MC, Sharp PJ, Lea RW, Sterling RJ, and Harvey S. (1986). Evidence that vasoactive intestinal polypeptide is a physiological prolactin-releasing factor in the bantam hen. *Gen. Comp. Endocrinol.* 62, 470-478.

- March JB, Sharp PJ, Wilson PW, and Sang HM. (1994). Effect of active immunization against recombinant-derived chicken prolactin fusion protein on the onset of broodiness and photoinduced egg laying in bantam hens. *J. Reprod. Fert.* 101, 227-233.
- Maurer RA. (1981). Transcriptional regulation of the prolactin gene by ergocryptine and cyclic AMP. *Nature* 294, 94-97.
- Miller WL, and Eberhardt NL. (1983). Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr. Rev.* 4, 97-130.
- Moreno J, Vicente A, Heijnen I, and Zapata AG. (1994). Prolactin and early T-cell development in embryonic chicken. *Immunol. Today* 15, 524-526.
- Murdoch GH, Franco R, Evans RM, and Rosenfeld MG. (1983). Polypeptide hormone regulation of gene expression: Tyrotropin releasing hormone rapidly stimulates both transcription of the prolactin gene and the phosphorylation of a specific nuclear protein. *J. Biol. Chem.* 258, 15329-15335.
- Murdoch GH, Waterman M, Evans RM, and Rosenfeld MG. (1985). Molecular mechanisms of phorbol ester, thyrotropin-releasing hormone and growth factor stimulation of prolactin gene expression. *J. Biol. Chem.* 260, 11852-11858.
- Murphy MJ, Brown PS, and Brown SC. (1986). Osmoregulatory effects of prolactin and growth hormone in embryonic chicks. *Gen. Comp. Endocrinol.* 62, 485-492.
- Myers SA, Millam JR, and El Halawani ME. (1989). Plasma LH and prolactin levels during the reproductive cycle of the cockatiel (*Nymphicus hollandicus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 73, 85-91.
- Nakajo S, and Tanaka K. (1956). Prolactin potency of the cephalic and the caudal lobe of the anterior pituitary in relation to broodiness in the domestic fowl. *Poult. Sci.* 55, 990-994.
- Nevill ME, and Daniel CW. (1987). The mammary gland: Development, regulation and function. Plenum Press, New York.

- Niall HD, Hogan ML, Sauer R, Rosenblum Y, and Greenwood FC. (1971). Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 866-869
- Nicoll CS. (1967). Bio-assay of prolactin. Analysis of the pigeon crop-sac response to local prolactin injection by an objective and quantitative method. *Endocrinology* 80, 641-655.
- Nicoll C, Meyer GL, and Ruseel SM. (1986). Structural features of prolactin and growth hormone that can be related to their biological properties. *Endocr. Rev.* 7, 169-203.
- Noso T, Swanson P, Lance VA, and Kawauchi H. (1992). Isolation and characterization of glycosylated and non-glycosylated prolactins from alligator and crocodile. *Int. J. Peptide Protein Res.* 39, 250-257.
- Ohkubo T, Tanaka M, and Nakashima K. (2000). Molecular cloning of the chicken prolactin gene and activation by Pit-1 and cAMP-induced factor in GH3 cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119, 208-216.
- Pankov YuA, and Butnev VYu. (1986). Multiple forms of pituitary prolactin, a glycosylated form of porcine prolactin with enhanced biological activity. *Int. J. Peptide Protein. Res.* 28, 113-123.
- Pellegrini I, Gunz G, Ronin C, Fenouillet E, Peyrat JP, Delori P, and Jaquet P. (1988). Polymorphism of prolactin secreted by human prolactinoma cells: immunological, receptor binding, and biological properties of the glycosylated and nonglycosylated forms. *Endocrinology* 122, 2667-2674.
- Pitts GR, Youngren OM, Silsby JL, Rozenboim I, Chaiseha Y, Phillips RE, Foster DN, and El Halawani ME. (1994). Role of vasoactive intestinal peptide in the control of prolactin-induced turkey incubation behavior. I. Acute infusion of vasoactive intestinal peptide. *Biol. Reprod.* 50, 1344-1349.
- Proudfoot NJ, and Brownlee GG. (1976). 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* 263, 211-214.

- Proudman JA, and Opel H. (1981). Turkey prolactin: validation of a radioimmunoassay and measurement of changes associated with broodiness. *Biol. Reprod.* 25, 573-580.
- Ramsey SM, Goldsmith AR, and Silver R. (1985). Stimulus requirements for prolactin and LH secretion in incubating ring doves. *Gen. Comp. Endocrinol.* 59, 246-256.
- Riddle O, Bates RW, and Lahr EL. (1935). Prolactin induces broodiness in fowl. *Am. J. Phy.* 111, 352-360.
- Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5476.
- Sato C, Kim JH, Abe Y, Saito K, Yokoyama S, and Kohda D. (2000). Characterization of the N-oligosaccharides attached to the atypical Asn-X-Cys sequence of recombinant human epidermal growth factor receptor. *J. Biochem.* 127, 65-72.
- Scanes CG, Bolton NJ, and Chadwick A. (1975). Purification and properties of an avian prolactin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 27, 371-379.
- Scanes CG, Hart LE, Decuypere E, and Kuhn ER. (1987). Endocrinology of the avian embryo: an overview. *J. Exp. Zool. Suppl.* 1, 253-264.
- Seiler HW, Gahr M, Goldsmith AR, and Güttinger HR. (1992). Prolactin and gonadal steroids during the reproductive cycle of the Bengalese finch (*Lonchura striata* var. *domestica*, *estrildidae*), a nonseasonal breeder with biparental care. *Gen. Comp. Endocrinol.* 88, 83-90.
- Sharp PJ, Macnamee MC, Sterling RJ, Lea RW, and Pedersen HC. (1988). Relationships between prolactin, LH and broody behaviour in bantam hens. *J. Endocrinol.* 118, 279-286.
- Sharp PJ, Scanes CG, Williams JB, Harvey S, and Chadwick A. (1979). Variations in concentrations of prolactin, luteinizing hormone, growth hormone and progesterone in the plasma of broody bantams (*Gallus domesticus*). *J. Endocrinol.* 80, 51-57.

- Sharp PJ, Sterling RJ, Talbot RT, and Huskison NS. (1989). The role of hypothalamic vasoactive intestinal polypeptide in the maintenance of prolactin secretion in incubating bantam hens: observation using passive immunization, radioimmunoassay and immunohistochemistry. *J. Endocrinol.* 122, 5-13.
- Shimada K, Ishida H, Sato K, Seo H, and Matsui N. (1991). Expression of prolactin gene in incubating hens. *J. Reprod. Fert.* 91, 147-154.
- Shull JD, and Gorski J. (1984). Estrogen stimulates prolactin gene transcription by a mechanism independent of pituitary protein synthesis. *Endocrinology* 114, 1550-1557.
- Silverin B, and Goldsmith A. (1984). The effects of modifying incubation on prolactin secretion in free-living pied flycatchers. *Gen. Comp. Endocrinol.* 55, 239-244.
- Sinha YN. (1995). Structural variants of prolactin: Occurrence and physiological significance. *Endocr. Rev.* 16, 354-369.
- Sinha YN, and Jacobsen BP. (1987). Glycosylated prolactin in the murine pituitary: detection by a novel assay and alteration of concentrations by physiological and pharmacological stimuli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148, 505-514.
- Sinha YN, Klemcke HG, Maurer RR, and Jacobsen BP. (1990). Changes in the glycosylated and nonglycosylated forms of prolactin and growth hormone in lean and obese pigs during pregnancy. *Endocrinology* 127, 410-418.
- Sinha YN, DePaolo LV, Haro LS, Singh RN, Jacobsen BP, Scott KE, and Lewis UJ. (1991). Isolation and biochemical properties of four forms of glycosylated porcine prolactin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 80, 203-213.
- Skwarlo-Sonta K. (1992). Prolactin as an immunoregulatory hormone in mammals and birds. *Immunol. Lett.* 33, 105-121.
- Sockman KW, Schwabl H, and Sharp PJ. (2000). The role of prolactin in the regulation of clutch size and onset of incubation behavior in the American kestrel. *Horm. Behav.* 38, 168-176.

- Souza L, Boone T, Murdock D, Langley K, Wyupych J, and Fenton D. (1984). Application of DNA technologies to studies on chicken growth hormone. *J. Exp. Zool.* 232, 465-473.
- Stanley F. (1988). Stimulation of prolactin gene expression by insulin. *J. Biol. Chem.* 263, 13444-13448.
- Supowit SC, Potter E, Evans RM, and Rosenfeld MG. (1984). Polypeptide hormone regulation of gene transcription: Specific 5' genomic sequences are required for epidermal growth factor and phorbol ester regulation of prolactin gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2975-2979.
- Talbot RT, Dunn IC, Wilson PW, Sang HM, and Sharp PJ. (1995). Evidence for alternative splicing of the chicken vasoactive intestinal polypeptide gene transcript. *J. Endocrinol.* 15, 81-91.
- Talbot RT, Hanks MC, Sterling RJ, Sang HM, and Sharp PJ. (1991). Pituitary prolactin messenger ribonucleic acid levels in incubating and laying hens: Effects of manipulating plasma levels of vasoactive intestinal polypeptide. *Endocrinology* 129, 496-502.
- Tata JR, Kawahara A, and Baker BS. (1991). Prolactin inhibits both thyroid hormone-induced morphogenesis and cell death in cultured amphibian larval tissues. *Dev. Biol.* 146, 72-80.
- Tong Z, Pitts GR, You S, Foster DN, and El Halawani ME. (1998). Vasoactive intestinal peptide stimulates turkey prolactin gene expression by increasing transcription rate and enhancing mRNA stability. *J. Mol. Endocrinol.* 21, 259-266.
- Vleck CM, Ross LL, Vleck D, and Bucher TL. (2000). Prolactin and parental behavior in adelic penguins: effects of absence from nest, incubation length, and nest failure. *Horm. Behav.* 38, 149-158.
- Wang Q, and Buntin JD. (1999). The role of stimuli from young, previous breeding experience, and prolactin in regulating parental behavior in ring doves (*Streptopelia risoria*). *Horm. Behav.* 35, 241-253.

- Watahiki M, Tanaka M, Masuda N, Sugisaki K, Yamamoto M, Yamakawa M, Nagai J, and Nakashima K. (1989). Primary structure of chicken prolactin deduced from cDNA sequence. *J. Biol. Chem.* 264, 5535-5539.
- Weatherly KL, Ramesh R, Strange H, Waite KL, Storrie B, Proudman JA, and Wong EA. (2001). The turkey transcription factor Pit-1/GHF-1 can activate the turkey prolactin and growth hormone gene promoters in vitro but is not detectable in lactotrophs in vivo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 123, 244-253.
- Wingfield JC, and Goldsmith AR. (1990). Plasma levels of prolactin and gonadal steroids in relation to multiple-brooding and renesting in free-living populations of the song sparrow, *Melospiza melodia*. *Horm. Behav.* 24, 89-103.
- Wong EA, Ferrin NH, Silsby JL, and El Halawani ME. (1991). Cloning of a turkey prolactin cDNA: expression of prolactin mRNA throughout the reproductive cycle of the domestic turkey (*Meleagris gallopavo*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 83, 18-26.
- Wong EA, Silsby JL, Ishii S, and El Halawani ME. (1992). Pituitary luteinizing hormone and prolactin messenger ribonucleic acid levels are inversely related in laying and incubating turkey hens. *Biol. Reprod.* 47, 598-602.
- Woods KL, and Porter TE. (1998). Ontogeny of prolactin-secreting cells during chick embryonic development: effect of vasoactive intestinal peptide. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112, 240-246.
- Young KH, Buhi WC, Horseman N, Davis J, Kraeling R, Linzer D, and Bazer FW. (1990). Biological activities of glycosylated and nonglycosylated porcine prolactin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 71, 155-162.
- Youngren OM, El Halawani ME, Silsby JL, and Phillips RE. (1991). Intracranial prolactin perfusion induces incubation behavior in turkey hens. *Biol. Reprod.* 44, 425-431.
- Youngren OM, Silsby JL, Rozenboim I, Phillips RE, and El Halawani ME. (1994). Active immunization with vasoactive intestinal peptide prevents the secretion of prolactin induced by electrical stimulation of the turkey hypothalamus. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95, 330-336.

- Zadworny D, Shimada K, Ishida H, and Sato K. (1989). Gonadotropin-stimulated estradiol production in small ovarian follicles of the hen is suppressed by physiological concentrations of prolactin in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 74, 468-473.
- Zadworny D, Walton JS, and Etches RJ. (1985). The relationship between plasma concentrations of prolactin and consumption of feed and water during the reproductive cycle of the domestic turkey. *Poult. Sci.* 64, 401-410.
- Zadworny D, Shimada K, Ishida H, Sumi C, and Sato K. (1988). Changes in plasma levels of prolactin and estradiol, nutrient intake and times spent nesting during the incubation phase of broodiness in the chabo hen (*Japanese bantam*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 71, 406-412.

本論文に関連した公表

Gen Hiyama, David Zadworny, and Norio Kansaku. (2006). Detection of prolactin isoforms in Chicken. Proceedings of XII th Asian–Australasian Association of Animal Production Societies. Animal Science Congress. Korea.