

鳥類における就巢行動制御遺伝子の解析

Analysis of regulatory gene of broody behavior in bird

神作宜男

麻布大学獣医学部

Norio Kansaku

Graduate School of Veterinary Science, Azabu University

Abstract: Complementary DNA (cDNA) of prolactin (PRL) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) of the Java sparrow (*Padda oryzivora*) were cloned and sequenced. Java sparrow PRL was found to have 88.3, 88.3, and 89.1 % sequence identity to PRL cDNA of chicken, turkey, and duck, respectively. The predicted amino acid sequence had an overall similarity with a comparable region of chicken (91.4 %), turkey (88.9 %) and duck (92.0 %) PRL. Based on the cDNA sequence and genomic DNA sequence of the chicken PRL gene, the proximal promoter was characterized. Sequence analysis of the proximal region of Java sparrow PRL promoter revealed a high degree of similarity to that of chicken, turkey and duck PRL promoter. Moreover, cDNA of prepro-VIP was also cloned and sequenced. Java sparrow prepro-VIP shows high similarity to chicken and turkey prepro-VIP. However, upstream of the 5' untranslated region of Java sparrow prepro-VIP did not show similarity to that of chicken. These results suggest that the mechanisms, which regulate expression of the VIP gene, may be different between precocial and altricial birds, but expression of the PRL gene may be widely conserved in avian species.

目 的

鳥類特異的に認められる就巢行動は、抱卵と育雛に分ける事が出来る。下垂体ホルモンであるプロラクチン (PRL) は鳥類の就巢行動と深い関係があることが示されている (1, 2)。晩成性と早成性鳥類において、就巢行動と PRL の血中濃度には大きな違いがあることが知られている。早成性鳥類では産卵期の後期より濃度が上昇し始め、抱卵行動の間は非常に高い血中濃度を示し、育雛行動の開始とともに濃度は急激に低下する。一方、晩成性鳥類では就巢行動の中頃から PRL 濃度は上昇し、抱卵行動末期から育雛行動初期にかけて最も濃度は高くなる。このように PRL の合成-分泌時期が早成性と晩成性鳥類では

大きく異なる事が明らかにされている。早成性及び晩成性鳥類ともに、PRL の血中濃度変化と対応するように視床下部ペプチドである小腸血管作用ペプチド (VIP) の濃度や免疫組織学的応答性が変化する事が知られており、VIP に対する受動免疫や能動免疫により PRL 濃度が変化する事から、PRL の合成や分泌は視床下部において合成される VIP により制御されていることが明らかにされている。さらに、シチメンチョウの PRL 近位プロモーターには VIP に対して反応する VIP レスポンスエレメントが存在することが近年示されている (3)。しかしながら、鳥類における VIPcDNA のクローニングは早成性であるニワトリ及びシチメンチョウにおいてのみ報告されているに過ぎない (4, 5)。一方、晩成性鳥類の

VIPcDNA や VIP 遺伝子の構造解明は報告されておらず、どのような機構により VIP 遺伝子発現が制御されているか不明である。従って、早成性及び晩成性鳥類における共通発現機構の解明が切に望まれている。本研究では、系統遺伝学的に特異である走鳥類から晩成性鳥類まで様々な鳥類の PRLcDNA のクローニングを行なうとともに、現在までに報告されていない晩成性鳥類の VIPcDNA のクローニングを行ない、系統遺伝学的な解析を行なう事を目的とした。

材料および方法

晩成性鳥類であるブンチョウの下垂体および視床下部を採取し、RNA を抽出した後、オリゴdT プライマーを用いて逆転写反応を行った。また、VIP 遺伝子の部分断片を得るために、血液よりゲノム DNA の抽出を行った。PRLcDNA のクローニングに関しては、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒルにおいて保存されている配列より 5' および 3' 非翻訳領域領域にプライマーを設定し、コード領域の増幅を下垂体より抽出した RNA の逆転写産物を用いて行った。増幅後に塩基配列をサンガー法により決定した。得られた塩基配列をもとに 3' 比翻訳領域およびポリ A 付加部位を明らかにするために 3' RACE 法により PCR 産物を得た後、配列の決定を行った。VIPcDNA のクローニングはヒト VIP 遺伝子のゲノム構造をもとにエクソン領域を推定し、ニワトリおよびシチメンチョウ cDNA よりプライマーを設定し、ブンチョウゲノム DNA より VIP 遺伝子断片を増幅した。得られた部分断片の塩基配列を決定後、あらたなプライマーを設計し、視床下部由来の RNA を逆転写した後、5' および 3' RACE により上流域と下流域の増幅を行い、塩基配列を決定した。得られたデータを Blast 検索により統合し全コード領域の配列を決定した。

結果と考察

およそ 700 塩基対からなるブンチョウ PRLcDNA 断片が得られ、これらの配列から 3' 非翻訳領域の増幅が行われ、ブンチョウ PRLcDNA の配列が決定された。全体では 983 塩基の PRLcDNA 配列が決定され、予想される PRL はシグナルペプチドを含めて 229 アミノ酸であった (Fig. 1)。血液中に放出されるブンチョウ成熟 PRL のニワトリ、シチメンチョウお

よびアヒル PRL に対する相同性は 91.0, 88.9, 及び 92.0 % であった。翻訳開始コドン領域を含めた上流域はおよそ 200 塩基対がクローニングされ、ニワトリ、シチメンチョウおよびアヒルに対する相同性はそれぞれ 87.7 %, 85.8 % および 87.1 % であった (Fig. 2)。また、翻訳開始コドンの上流は ACCATGA を示し、真核生物のコンセンサス配列である ACCATGG (6) と類似した配列を示した。VIP 遺伝子の予想エクソン 5 および 6 に設定したプライマーにより 790 塩基対の遺伝子断片が得られ、断片配列から RACE 法により完全長ブンチョウ VIPcDNA の配列が決定された。全体では 1045 塩基対からなり、VIP 前駆体は 198 アミノ酸からなることが明らかにされた (Fig. 3)。さらにハイドロパシー解析からシグナルペプチドをのぞいた領域は 178 アミノ酸により構成される事が明らかになった。ブンチョウ VIPcDNA はニワトリおよびシチメンチョウと 94.2 % 及び 92.3 % という高い相同性を示した。ブンチョウの PRL 放出因子として実際に機能する 28 アミノ酸残基より構成される VIP の配列はニワトリやシチメンチョウと完全に一致した。VIP は PRL と比べると非常に長い非翻訳領域を 5' に有するが、5' 領域の非翻訳領域における類似性はほとんど認められなかった。以上の事から、晩成性鳥類であるブンチョウの PRL 近位プロモーターにはシチメンチョウにおいて機能が同定されている VIP レスポンス領域が存在し、早成性鳥類と同様に VIP により合成と分泌の制御を受けている事が証明された。また、ブンチョウ VIPcDNA は非常に高い相同性をニワトリとシチメンチョウ VOPcDNA と示すが、5' 非翻訳領域は類似性を示さない事から、ブンチョウ VIP 遺伝子のプロモーターはニワトリやシチメンチョウなどの早成性鳥類と異なる構造を有している可能性が高い事が推測される。このプロモーター領域の構造的な違いが早成性鳥類と晩成性鳥類の VIP 遺伝子の発現の違いとして反映され、VIP により誘導される PRL の合成と分泌時期の違いとして認められると考えられる。

要約

ブンチョウのプロラクチン (PRL) 及び小腸血管作用性ペプチド (VIP) cDNA のクローニングを行なった。さらに、PRL の近位プロモーター領域の配列

AGAGCAAGTCAATCMTCCAGNATCCCACCC	29
ATGAGCACCCMGGGGGECTTCACTGMAAGGTTTGGTTGCTGGCCAGCCCTTCTGGTGTCCCAC	89
MetSerThrLysGlyAlaSerLeuLysGlyLeuLeuLeuAlaAlaLeuLeuValSerHis	20
ATGCTTCTGACAAAGENAGGAGTGAACCTCTTGGCCAACTGCCCCMAGGATCTGTCAAT	149
MetLeuLeuThrLysGluGlyValThrSerLeuProIleCysProAsnGlySerValAsn	40
TGCCAACTCTCCCTTENGAGACTTTTGGACCGAGCAGTTAACTTTTCACTACATTCAC	209
CysGlnLeuSerLeuGluGluLeuPheAspArgAlaValLysLeuSerHisTyrIleHis	60
TTCTCTCTTCGGMAATGTTCAATGATTTGATGACCECTACGCCMAGGCCGEGGGTTC	269
PheLeuSerSerGluMetPheAsnGluPheAspGluArgTyrAlaGlnGlyArgGlyPhe	80
ATGCAAAAGCTGTCAACAGCTGCCACACTGCCTCTTAAACCACTCCCGAAGATAAGGAG	329
IleAlaLysAlaValAsnSerCysHisThrAlaSerLeuThrThrProGluAspLysGlu	100
CAGGCCTCAGCAGATTCACTACGAAACCTACTGNAATTAATACTGGGAGTTCTGGCCTCC	389
GlnAlaGlnGlnIleHisHisGluAspLeuLeuAsnLeuIleLeuGlyValLeuArgSer	120
TGGAAAGATCCCCCTGATACACCTGGCCTCTGAAGTACAAAGNATCAAAAGAGCTCCAGAA	449
TrpAsnAspProLeuIleHisLeuAlaSerGluValGlnArgIleLysGluAlaProGlu	140
ACCATCTCTCGMAAGCTGTGGAGATGGAAACAAACAAAGCGACTTCTAGAAAGGAATG	509
ThrIleLeuTrpLysAlaValGluIleGluGluGlnAsnLysArgLeuLeuGluGlyMet	160
GAGMAATAGTTGGGCGGGTTCACCTCTGGGGAGGTTGAAATAEACATTTACACTCCCTGGG	569
GluLysIleValGlyArgValHisSerGlyGluValGluAsnAspIleTyrThrProTrp	180
GATGGACTCCCATCCCTGCAGCTTGTCTGATGAGGACTCCAGGCTCTTGGCTTTTACAAAC	629
AspGlyLeuProSerLeuGlnLeuAlaAspGluAspSerArgLeuPheAlaPheTyrAsn	200
CTGCTTCACTGCCTCCGCCGAGATTCCACAAATAAGCAACATCTCAAGGTTTTGAAAG	689
LeuLeuHisCysLeuArgArgAspSerHisLysIleAspAsnTyrLeuLysValLeuLys	220
TGCCGCCTAATCCACGACAAACAAATTGTTGAGTAGTCAAGGGCCTGATCATGTACTGAAGT	749
CysArgLeuIleHisAspAsnAsnCys***	229
CATTCATCATGTGTCTTTGAGGCTTTCCCACTTTATGAAAATCACACTGTGCAGAAAGCTG	809
TATAACTCAGTAAGTTTCAGGCATGTGTGTAGTAATTCCTGGCTGCACAAATTAACCCACA	869
CGTGTCAAGTGCCTTTAAATACTACCAACTACTTGTATGACAAAGAAATGACTTFTCCGGCT	929
AATCTTCTCCCTAGTAGTAACTTCAGTGCACAAACAGGTAATGCATATAAA <u>AAATAAA</u> AAT	989
CTTAA	995

Figure 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of Java sparrow PRL cDNA. Nucleotides are numbered on the right side of the sequence. Untranslated regions of Java sparrow PRL cDNA are reported in lowercase letters and the open reading frame in uppercase letters. Poly A signal is underlined.

Sparrow	<u>CTGAA</u> ENTGA NTGTGGAAAG AAGCCAA SET <u>GATGTTT</u> GTA ATATTCGAGG 50
Duck	CTGAAENTGA NTGTGGAAAG AAGCCAG SET GATGTTTGTG ATATTCGAGG 50
Chicken	TTGAAENTGA NTGTGGAAAG GAGCCAA SET GATGTTTGTG ATATTCGAGG 50
Turkey	TTGAAENTGA NTGTGGAAAG GAGCCAA SET GATGTTTGTG ATATTCGAGG 50
Sparrow	CAAA ACC CCAC <u>AACCTGGCTGA</u> <u>ATGAT</u> TGCA <u>AA-TGG</u> ACC <u>TC</u> CATG GTGT 100
Duck	TAA ACC CCAC GACCTGGCTGA ATATENTGCA AA-TGGACC CCGATG GTGT 100
Chicken	TAA ACC CCAC GACCTGGCTGA ATGATGCA AAGTGG ACC CCGATG GTGT 100
Turkey	TAA ACC CCAC AACCTGGCTGA ATGATGCA A-CTGGACC CCGATG GTGT 100
Sparrow	<u>ATATA</u> AGAGC AGTATGTGCA GAGAA TAG CA GCAGAA ATG AGATTTCTTT 150
Duck	ATATAAATCT GGTATGTGCA GAA AA TAAA GCAGT ATG A ACT TTCTTT 150
Chicken	ATATAAATCT G--ACGTGCA GAA AG TAA GA GCAGG TATG A ACT TTCTTT 150
Turkey	ATATAAATCT G--ACATGCA GAA AG TAA GA GCAGG TATG A ACT TTCTTT 150
Sparrow	CTGGTAAAGC AAGTCATCAC CCAGAA TCTC TACCATGAGC ACCA AG ... 200
Duck	CTGGCAGAGC AAGTCATCC T ACAGGG TCTC TACCATGAGC ACCA AG ... 200
Chicken	CTGGTAGAGC AAGTCATCAC ACAGAA TCC TACCATGAGC AAC AGA ... 200
Turkey	CTGGTAGAGC AAGTCATCAC A GA AA TCC TACCATGAGC AAC ACA ... 200

Figure 2 Comparison of Java sparrow, duck, turkey and chicken PRL promoter. Potential TATA box was double underlined. Highly conserved sequence between birds and mammalian PRL gene is underlined. VIP response element and translation starting codon were indicated by dashed-underlined and bold letters, respectively.

も同定された。ブンチョウ PRL の cDNA 及び近位プロモーターはニワトリ、シチメンチョウ、アヒルと高い相同性を示し、中でも近位プロモーターは VIP 反応領域が晩成性と早成性鳥類ともに保存されている事が明らかになった。晩成性と早成性ともに生理的 PRL 放出因子と考えられる VIP の cDNA クローニングも行なった。ブンチョウの VIP 前駆体基本構造はニワトリやシチメンチョウと類似しているが、5' 非翻訳領域の上流はニワトリのものとは類似性がほとんど認められなかった。晩成性鳥類において、みられる血中 PRL の濃度変化は早成性鳥類と異なり抱卵後期に上昇する。晩成性と早成性ともに PRL 遺伝子の発現は VIP により制御されているが、VIP 遺伝子の発現時期が異なることにより、結果として PRL 遺伝子の発現増加時期が異なっている可能性が考えられた。

引用文献

- 1) Macnamee MC, Sharp PJ, Lea RW, Sterling RJ, Harvey S. 1986. Evidence that vasoactive intestinal polypeptide is a physiological prolactin-releasing factor in the bantam hen. *General and Comparative Endocrinology* 62, 470-478.
- 2) El Halawani ME, Silsby JL, Mauro LJ. 1990a. Vasoactive intestinal peptide is a hypothalamic prolactin-releasing neuropeptide in the turkey (*Meleagris gallopavo*). *General and Comparative Endocrinology* 78, 66-73.
- 3) Kang SW, Gazzillo LC, You S, Wong EA, El Halawani ME. 2004. Turkey prolactin gene regulation by VIP through 35-bp cis-acting element in the proximal promoter. *General and Comparative Endocrinology* 138, 157-165.
- 4) You S, Silsby JL, Farris J, Foster DN, El Halawani ME. 1995. Tissue-specific alternative splicing of turkey preprovasoactive intestinal peptide messenger ribonucleic acid, its regulation, and correlation with prolactin secretion. *Endocrinology* 136, 2602-2610.
- 5) Talbot RT, Dunn IC, Wilson PW, Sang HW, Sharp PJ. 1995. Evidence for alternative splicing of the chicken vasoactive intestinal polypeptide gene transcript. *Journal of Molecular Endocrinology* 15, 81-91.
- 6) Kozak M. 1986. Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 2850-2854.

AGAGCGTGCGGGGAGACGGAGCCCTCCTCTTCATCCCTCCTCCTCCTCCTC	50
ACTCTCTGCTECTGCCGCCCGGGAGCGCGCCAGCGGAGCAGGGCGACTGCCCGGGCAC	110
CGCTCCCGCTCCCGCGCCCGCCAGCCAGACCCACCGACGGACTCGCGGGCTCCGCGGGCGCC	170
ATGGAGCACCGCGGGCGCCCTCCCGCGTCCTCCTCCTCGCCCTCGCCCTCCTCAGCGCCCTCTGGC	230
MetGluHisArgGlyAlaSerProLeuLeuLeuAlaLeuAlaLeuLeuSerAlaLeuCys	20
TGGCGGGCGCGGGCGCTGCCCGCGCGGGCGCCCGCTTCCTCCTCCGTCGGCGENTTGGGA	290
TrpArgAlaArgAlaLeuProProArgGlyAlaAlaPheProProValProArgLeuGly	40
AACAGATGCCATTTGENTGGAGCCAGTGAACCTGACCATGCCCGTGGGTCAATTAAGTCA	350
AsnArgMetProPheAspGlyAlaSerGluProAspHisAlaArgGlySerLeuLysSer	60
GATCAGATACTTTGCAGAACACACTACCTGAAATGAGAACTCTACTTTGATCTGTCC	410
GluSerAspIleLeuGlnAsnThrLeuProGluAsnGluLysPheTyrPheAspLeuSer	80
AGAAATATTGATAGAAATGCAGGCCATGCTGATGGAACTTTCACCAGTGTCTACAGCCAT	470
ArgIleIleAspArgAsnAlaArgHisAlaAspGlyIlePheThrSerValTyrSerHis	100
CTTTTGGCTAACTTCTGTGANGAGATATCTGCATTGCTTATTAGAAACGAGTTAGC	530
LeuLeuAlaLysLeuAlaValLysArgTyrLeuHisSerLeuIleArgLysArgValSer	120
TCCCAGGACAGTCTCTGTCAACGCCACTCTGENTGCTGTCTTCACTGACAACTACAGCCGC	590
SerGlnAspSerProValLysArgHisSerAspAlaValPheThrAspAsnTyrSerArg	140
TTTCGAAAGCAGATGGCTGTGANGAAATACTTAACTCAGTTTAAACCGAAVAAGAAAGC	650
PheArgLysGlnMetAlaValLysLysTyrLeuAsnSerValLeuThrGlyLysArgSer	160
CAGGAGAGCTAAATCCTGCTAACTTCGAGATGAAAGCAGAACATCTGAAACCATCCCTT	710
GlnGluGluLeuAsnProAlaLysLeuArgAspGluAlaGluHisLeuGluProSerPhe	180
TCAGAAACTACGATGCTGTAGNTGAGCTGCGAGCCACCTCCCCTGACCTCTGAAAGG	770
SerGluAsnTyrAspAlaValAspGluLeuLeuSerHisLeuProLeuAspLeu***	198
ACACCCTGGTAAAGTCTGATGACAAAGAACAGCATTTTTGGAGTCCACATAGTATTTCAA	830
GAGATGACTTTAGTCATCAAAACGAGAACAAATATGTTGTGAAATGAAAGTTGTGATAGAT	890
TTGTTTCTTACGTAAAGAAAGTTGATATTTACNTTGTAAATACTACTCTAGCATTCCCTA	950
CTGAAAGCTGTAACATAGGATGCCAGTTTAACTCATEAGAACTCTGTGAGTCCATATGCTG	1010
TAATCTTTACTTCAATAAAGTCATTTGAAATGA	1045

Figure 3 Nucleotide and deduced amino acid sequence of Java sparrow VIP cDNA. Nucleotides are numbered on the right side of the sequence. Untranslated regions of Java sparrow VIP cDNA are reported in lowercase letters and the open reading frame in uppercase letters. Poly A signal is underlined.