

# 動物の生殖系列分化の高次調節に関与する遺伝子の解析

*Search for genes that may be involved in higher order regulation of  
germ-cell differentiation in animals*

藤谷英男, 藤瀬 浩, 若尾義人

麻布大学大学院獣医学研究科

Hideo Fujitani, Hiroshi Fujise, Yoshito Wakao

Graduate School of Veterinary Sciences, Azabu University

**Abstract.** The Japanese silver crucian carp, a rare but ideal model animal for investigation of genes that could regulate mode of vertebrate reproduction. These fish naturally occur in normal bisexual diploid form as well as their triploid gynogenetic counterparts. Notably, the latter form reproduce themselves by parthenogenetic, or clonal, development of unreduced and unfertilized eggs, thus giving rise to genetically identical all-female offspring. The primary objective of this study was to identify and analyze genes that play crucial roles in the complicated cascade or network for induction of meiotic division to produce the gametes in almost all multicellular organisms at the final step of formation of their germ cells. In gynogenetic fish that skip meiosis and lay triploid eggs whose genomes are identical to that of somatic cells, a certain set of genes must be different from that of bisexual kin. This difference was studied by comparing genes and their expression in the ovaries of both diploid and triploid fishes. Namely, ovarian RNAs were extracted and compared between the two forms for their nucleotide sequences and subtype variation. Differential-display analyses for RT-PCR products resulting from twenty different primer sets singled out a convincing candidate gene fragment referred to as KD16 that could be linked to mechanism for regulation of germ cell differentiation. This gene was shown to have five or more alleles, each of which was expressed differently between diploid and triploid fishes and appeared to be ovary-specific. The entire stretch (approx. 1.7 kb) of cDNA of KD16 gene obtained by 5' RACE method was analyzed for its nucleotide sequence and searched for homology with data-bank sequences. The results indicate that each of five subtypes encodes the "TRIM proteins", i.e., proteins with the RING domain and the B-box domain. This implies a possible role of this gene in reproductive regulation.

## 1. 目 的

日本国内の河川・湖沼に生息するギンブナ (*Carassius auratus langsdorfi*) には、通常の有性生殖をする2倍体ギンブナの他に、雌性生殖をしてクローン発生をする3倍体ギンブナが存在している<sup>1)</sup>。この3倍体ギンブナは、1. 卵成熟過程における減数分裂回避による3倍体卵子の形成、および2. 精子貫

入刺激後における精子核排除により雌性生殖を成立させていることが知られている<sup>2)</sup>。生殖制御に関して変異体をもつこのようなギンブナは、脊椎動物の基本的生殖制御機構である減数分裂や卵成熟調節などの分子機構を解明する上でのモデル生物として、大変有用である。本研究では脊椎動物の生殖制御に関与している遺伝子を探索するために、ギンブナの2倍体個体と3倍体個体の成熟卵巣における遺伝子発

現の差異を調べた。

## 2. 方法

雌性生殖3倍体ギンブナと有性生殖2倍体ギンブナの複数個体の卵巣から ISOGEN (日本ジーン) を用いて RNA を抽出し, Gene Fishing DEG Kit (Seegene 社)<sup>3)</sup> を用いたディファレンシャルディスプレイ法<sup>4)</sup> を行った。20種のプライマー (ACP1~20) を用いて PCR 増幅を行い, アガロースゲル電気泳動により2倍体と3倍体で発現量に差異の見られる増幅産物を選別した。ACP16を用いて得られた差異のある DNA 断片を TA クローニングし, インサートの配列を決定した。得られた配列情報に基づき, 候補遺伝子を特異的に増幅するプライマーを設定し, RT-PCR により各倍数体での発現を調べた (特異的プライマーを用いた RT-PCR 解析)。また, PCR 増幅産物を Mbo1 制限酵素で消化して, 電気泳動パターンを各倍数体で比較した (RT-PCR-RFLP 解析)。さらに, 5'RACE 法により, 得られた候補遺伝子の cDNA 全長配列を決定し, DNA データベースとの同一性検索を行った。

## 3. 結果と考察

ディファレンシャルディスプレイ法において用いた20種類の任意プライマーのうち, ACP16プライマーによる PCR により, 約 570 bp の大きさに2倍体個体では多量の, 3倍体個体では微量の, 顕著な差異のある増幅産物が得られた。この差異のある増幅断片を各倍数体からクローニングして配列解析をしたところ, いずれも同様の塩基配列をもつ候補遺伝子 (KD16 と呼ぶ) が得られた。詳細な配列解析の結果, これには5種類のサブタイプ (部分的に配列が異なる, KD161~165) が存在しており, 2倍体個体と3倍体個体では発現しているサブタイプが異なっていることがわかった。すなわち, 2倍体個体では KD161 と KD162 が, 3倍体個体では KD163, KD164 と KD165 が存在していた。続いて, 2倍体個体と3倍体個体での各サブタイプの発現パターンの相違を詳細に確認するため, サブタイプ特異的なプライマーを用いた RT-PCR 解析および RT-PCR-RFLP 解析を行ったところ, 2倍体では KD161, KD162, KD163, KD164 の発現が見られるが, KD165 の発現はないこ

と, 一方, 3倍体では KD165 の発現は見られるが, KD161 と KD162 の発現は認められないことがわかった。このように, 2倍体個体と3倍体個体での卵巣におけるサブタイプの発現パターンには相違があることが確認できた。また, 卵巣以外の肝臓や筋肉組織では KD16 遺伝子は発現していないことを確認した。さらに, 5'RACE 法により, 各サブタイプの cDNA 全長約 1.7 kb の塩基配列を決定した。BLAST 検索の結果, 塩基配列レベルでは, KD161~KD165 はいずれも既知配列との相同性は認められなかったが, アミノ酸配列レベルでは, N 末端側に, TRIM (Tripartite motif protein family)<sup>5)</sup> と呼ばれる一群のタンパク質と相同性が見られた。TRIM は RING (Really interesting new gene) ドメイン, B-box ドメイン, Coiled-coil という3つの基本構造をもっており, 様々なサブタイプが各種組織で発現している<sup>6)</sup>。今回の候補遺伝子 KD16 でも, RING ドメインと B-box ドメインが保存されていた。これらのドメインはともに Zinc finger タンパク質であり, 主にユビキチンを介したタンパク質分解に関与していると考えられている<sup>7)</sup>。今後は KD16 タンパク質の各サブタイプの機能について生殖制御機構 (特に減数分裂) との関連を調べていく予定である。また卵巣の成熟度の違いによる発現量あるいは発現パターンの差も検討していく。

## 4. 要約

脊椎動物の生殖制御に関与する遺伝子を探索するため, 有性生殖および雌性生殖をするギンブナ (*Carassius auratus langsdorfi*) を実験材料として, ディファレンシャルディスプレイ法により各卵巣に発現する遺伝子を比較した。その結果, 生殖制御に関与する1つの候補遺伝子断片である KD16 を得た。この KD16 には少なくとも5つの対立遺伝子があり, 対立遺伝子特異的なプライマーによる RT-PCR 法および RT-PCR-RFLP 法により, 有性生殖と雌性生殖の卵巣の間では, それらの発現パターンが異なっていることがわかった。また, KD16 遺伝子の発現は卵巣特異的であると思われた。さらに, 5'RACE 法により KD16 遺伝子の cDNA (約 1.7 kb) の全長を決定し, 同一性検索を行ったところ, RING ドメインと B-box ドメインをもつ TRIM (Tripartite motif

protein family) と呼ばれる一群のタンパク質の一つと考えられた。

#### 文 献

- 1) Kobayasi H, Jpn. Women's Univ. J., 29, 145-161, 1982
- 2) Ojima Y, Asano M, Proc. Jpn. Acad., Ser. B, 53, 138-142, 1977.
- 3) Kim YJ, Kwak CI, Gu YY, Hwang IT, Chun JY., Biotechniques, 36, 424-426, 428, 430 passim. 2004.
- 4) Liang P, Pardee AB, Science, 257, 967-971, 1992.
- 5) Reddy BA, Etkin LD, Freemont PS, Trends Biochem. Sci., 17, 344-345, 1992.
- 6) Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzi L, Riganelli D, Zanaria E, Messali S, Cainarca S, Guffanti A, Minucci S, Pelicci PG, Ballabio A., EMBO J., 20, 2140-2151, 2001.
- 7) Borden KL, Biochem. Cell Biol. 76, 351-358, 1998.