

## ウズラ *PBCF* 遺伝子の構造と発現 Structure and expression of quail *PBCF* gene

釘本 綾子・相澤 清香・御輿 真穂・高橋 純夫・竹内 栄  
Ayako Kugimoto, Sayaka Aizawa, Maho Ogoshi, Sumio Takahashi, Sakae Takeuchi

岡山大学大学院自然科学研究科生体統御学グループ  
Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

### はじめに

羽は鳥類を特徴づける代表的な皮膚付属器である。羽の構造は、中心軸となる羽軸、羽軸から分岐する羽枝軸、羽枝軸から分岐する小羽枝の3段階の階層的な分岐構造を基本とし、羽の部位による多様性を示す。例えば、からだを覆う正羽の露出部では、小羽枝の先端部に小さなフック構造が存在し、これが隣り合う小羽枝と絡み合うことで、羽板とよばれる頑丈な平面構造をとる。これに対して、体表として露出していない羽の基部は、小羽枝にフック構造が無く、ふわふわと柔らかな綿羽とよばれる構造をとる。羽板は飛行や種間でのコミュニケーションなどに役立ち、綿羽は体温維持などの役割を担っている[1]。このような羽の分岐構造は、皮膚から生える羽包と呼ばれる鞘状の構造体の中で形成される[2]。

羽は定期的な換羽だけではなく、負傷による羽の損失、人為的に羽を抜くことによって再生が可能であることから、器官形成のモデルとして古くから研究されてきた。その結果、羽形成に関与する様々な因子が同定されてきたが、羽の分岐構造形成のメカニズムについては、今なお不明な点が多く残されている。

我々は最近、羽分岐構造形成のメカニズムの解明に向けた研究の中で、ニワトリ (*Gallus gallus*) において、羽形成に関与する可能性のある新規遺伝子を同定した。この遺伝子は、108 アミノ酸残基から成る分泌性の糖タンパクをコードすると推定され、羽板部形成時の羽包基部において、羽枝軸に隣接する小羽枝細胞に特異的に発現する。我々はこの遺伝子を *PBCF* (*proximal barbule cell factor*) と名付けた。*PBCF* 遺伝子は、比較ゲノム解析により、データベースが公開されている鳥類5種 (chicken, turkey, duck, zebra finch, flycatcher) に存在し、鳥類以外の生物種には存在しないことが分かった。しかし、現在のところこの遺伝子の発現が確認されているのはニワトリのみであり、他の鳥類での発現は報告されていない。

本研究では、ニホンウズラ (*Coturnix japonica*) の *PBCF* 遺伝子の構造を初めて解明すると

もに、ウズラにおいてもこの遺伝子が羽包で発現していることを示した。

### 材料と方法

#### 実験動物

本実験では、広島大学日本鶏資源開発プロジェクト研究センターから譲り受け、自家繁殖させたニホンウズラ WT/HU 系統を用いた。すべての実験は、岡山大学の動物実験ガイドラインに従って行われた。

#### RNA 抽出と逆転写

羽包サンプルから TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA に含まれるメラニン色素を除去するために、塩化セシウム勾配超遠心法により全 RNA を更に精製した。得られた RNA は DPEC 処理した蒸留水に溶解した。得られた RNA は ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用して逆転写を行い、RT-PCR 解析に用いた。

#### PCR 法

0.2 ml PCR チューブに 10×PCR Buffer Minus Mg 2.5  $\mu$ l, 10 mM dNTP mix 0.5  $\mu$ l, 50 mM MgCl<sub>2</sub> 0.75  $\mu$ l, Primer mix (10  $\mu$ M each) 0.5  $\mu$ l, Template DNA 1 $\mu$ l (75ng/ $\mu$ l), Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) 0.1  $\mu$ l, D.W. 19.65  $\mu$ l を加え、94°C で 2 分間処理した。熱変性 (94°C, 30 秒間) とアニーリング・伸長反応 (60°C もしくは 63°C, 1 分間) のサイクル数は、半定量的解析ができるよう、遺伝子によって変えた (サイクル数はそれぞれの図の説明に記載)。

#### BigDye シーケンシング

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) と 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, HITACHI, Tokyo, Japan) を使用した。

#### 3'RACE 法

ニホンウズラ鞍羽の羽包から調製した RNA

を ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて逆転写した。逆転写用のプライマーは Oligo dT の代わりに、GeneRacer™ Oligo dT Primer (5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') (GeneRacer® Core Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いた。First PCR では、GeneRacer™ 3' Primer (5'-GCTGTCAACGATAACGCTACGTAACG-3') (GeneRacer® Core K-it, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と PBCF 特異的プライマーのセットを、Nested PCR では、GeneRacer™ 3' Nested Primer (5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3') (GeneRacer® Core Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と PBCF 特異的プライマーのセットをそれぞれ用いた。得られた PCR 産物は精製の後、BigDye シーケンシングによって塩基配列を決定した。

## 結果

### ニホンウズラの *PBCF* 遺伝子構造

ゲノム PCR, RT-PCR および 3'RACE により、ニホンウズラ *PBCF* 遺伝子の構造が判明した。図 1 に示すように、ウズラの *PBCF* 遺伝子はニワトリと同じく 3つのエクソンと 2つのイントロンから構成されていた。興味深いことに、ニホンウズラの *PBCF* 遺伝子配列では、ニワトリの配列と比べたとき、第 2 エクソン中に G の一塩基欠失が見られた。

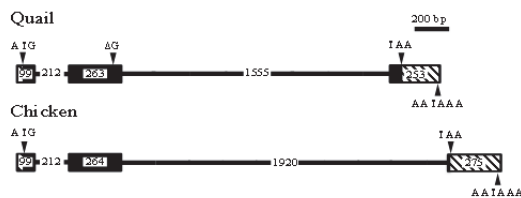


図 1 ニホンウズラとニワトリの *PBCF* 遺伝子構造の比較

ニホンウズラの *PBCF* 遺伝子構造とニワトリの *PBCF* 遺伝子構造を模式図で示す。ボックスがエクソン、棒線部がイントロンを表している。また、ボックスの斜線部は非翻訳領域を、黒塗り部分は翻訳領域を示す。Scale bar=200 bp。

### ウズラにおける *PBCF* 遺伝子構造の多様性

ニホンウズラ(WT/HU)の *PBCF* 遺伝子にみられた G の一塩基欠失が変異によるものか、他のウズラでも共通なものなのかを検討するために、6種のウズラ(ニホンウズラの羽色変異体 3種、同属別系統 1種、別属別系統 2種)の *PBCF* 遺伝子の相当領域の塩基配列を決定した。その結果、ニホンウズラではすべての系統で同じ箇所

に G の一塩基欠失が確認された。一方、種や属の異なる 3種のウズラでは、G の一塩基欠失は見られなかった。さらに、興味深いことに、同属別系統であるヒメウズラ(*Coturnix chinensis*)では、G の一塩基欠失がない代わりに、すぐ下流の位置で 4塩基の欠失が見られた(図 2)。

<i>Coturnix japonica</i> (WT/HU)	267:CTCAAATATG-AGTCAACAAA	287
<i>Coturnix japonica</i> (Pansy)	:CTCAAATATA-AGTCAACAAA	
<i>Coturnix japonica</i> (Silver)	:CTCAAATATA-AGTCAACAAA	
<i>Coturnix japonica</i> (DVD-WT)	:CTCAAATATA-AGTCAACAAA	
<i>Coturnix chinensis</i>	:CTCAAATGTGGAATC---AAA	
<i>Colinus virginianus</i>	:CTCAAGCGTGGAGTCAACAAAC	
<i>Callipepla californica</i>	:CTCAAGTGTGGAGTCAACAAAC	

図 2 ウズラの *PBCF* 第 2 エクソン中の部分配列の比較

ニホンウズラの系統 4 系統 (WT/HU, Pansy, Silver, DVD-WT) と、ヒメウズラ、コリンウズラ、カンムリウズラの第 2 エクソン中の部分配列を示す。

### ニホンウズラの羽包内における *PBCF* mRNA 発現

ニホンウズラの羽包を均等に三分割し、それぞれの領域における *PBCF* mRNA の発現量を RT-PCR で解析した。その結果、ウズラの *PBCF* mRNA は羽包全体で発現しており、その中でも中間部から先端部にかけて高い発現を示すことが分かった(図 3)。



図 3 ニホンウズラ鞍羽の羽包における mRNA 発現の分布

ニホンウズラの鞍羽の羽包を三分割した基部①、中間部②、先端部③における *PBCF*, *TYR*, *TYRP1* mRNA 発現の RT-PCR 産物の電気泳動像を示す。各部位につき、3つのプールサンプルの結果を示している。また、*GAPDH* は内部標準として用いた。PCR には以下のプライマーセットを用いている。*PBCF* (5'-CACCTGTTAGCCCTGTGCTTGAG-3', 5'-CAGTGAATTCTGCCTTCCATCCAG-3'), *GAPDH* (5'-GTGTTATCATCTCAGCTCCCTCAG-3', 5'-AAAGGTGGAAGAATGGCTGTCACC-3'), *TYR* (5'-CCTCATGGCAGGTAATCTGCACTC-3', 5'-CAATGGGTGCGTTGGCTGCTGG-3'), *TYRP1* (5'-CTGAAATGTTGCACGGCCTA-3', 5'-CGTGTATCCAGGTTTCTGGTGC-3')。

また、メラニン合成に関与する *TYR* と *TYRP1* mRNA の発現パターンとの比較から、*PBCF* mRNA はメラニン合成が終了し、ケラチナイズが行われる羽形成の後期に高発現していた。

### 考察

本研究の結果から、ニホンウズラの *PBCF* 遺伝子配列が同定され、ウズラにも *PBCF* 遺伝子が保存されていることが明らかとなった。このことは *PBCF* 遺伝子が鳥類特異的な遺伝子であるとする我々の仮説の重要な証拠と成り得る。また *PBCF* は他の鳥類でもニワトリと同様に羽包内で発現しており、羽形成に関与している可能性が強く示された。特にウズラ *PBCF* においては、*PBCF* が羽発達の初期段階ではなく、細胞がケラチナイズされ羽が完成してくる後期の段階ではたらいている可能性が示唆された。

*PBCF* にはアミノ酸配列だけでなく発現パターンにも種差がみられることから、はたらきにもバリエーションがあることが推察される。

これらの結果は、*PBCF* 遺伝子が鳥類で共通して羽形成に関与する可能性を示しただけではなく、鳥類の進化や種分化を考える上で非常に興味深い遺伝子であることを示した。

### 引用文献

1. Yu, M., et al., The biology of feather follicles. *Int J Dev Biol*, 2004. 48(2-3): p. 181-91.
2. Matulionis, D., Morphology of the developing down feathers of chick embryos. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 1970. 132(2): p. 107-157.