

ニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA のクローニングおよび

その遺伝子産物の生化学的性状に関する研究

1994

佐々木えりか

①

ニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA のクローニングおよび
その遺伝子産物の生化学的性状に関する研究

筑波大学大学院
農学研究科
農林学専攻

佐々木えりか

目次

| | |
|---|-----|
| I. 緒言 | |
| 1. 本研究の背景 | 1 |
| 2. <i>c-kit</i> 遺伝子の産物であるKitタンパク質の構造と機能 | 3 |
| 3. Kitタンパク質のリガンド | 5 |
| 4. マウスの <i>W</i> 突然変異体 | 5 |
| 5. 生体内における <i>c-kit</i> 遺伝子およびKitタンパク質の発現とその機能 | 7 |
| 6. ポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) について | 9 |
| 7. 本研究の目的および概要 | 10 |
| II. PCRによるニワトリ <i>c-kit</i> 遺伝子のcDNAプローブの作製 | |
| 1. はじめに | 14 |
| 2. 材料および方法 | 14 |
| 3. 結果 | 23 |
| 4. 考察 | 32 |
| 5. 表および図 | 36 |
| III. ニワトリ <i>c-kit</i> 遺伝子cDNAのクローニングおよび塩基配列の決定 | |
| 1. はじめに | 53 |
| 2. 材料および方法 | 53 |
| 3. 結果 | 57 |
| 4. 考察 | 63 |
| 5. 表および図 | 70 |
| IV. 大腸菌内におけるchKitタンパク質の生産と抗chKit抗体の作製 | |
| 1. はじめに | 76 |
| 2. 材料および方法 | 76 |
| 3. 結果および考察 | 82 |
| 4. 表および図 | 86 |
| V. 真核細胞内におけるchKitタンパク質の発現 | |
| 1. はじめに | 93 |
| 2. 材料および方法 | 93 |
| 3. 結果 | 99 |
| 4. 考察 | 101 |
| 5. 表および図 | 104 |
| VI. ニワトリ生体内におけるKitタンパク質の発現 | |
| 1. はじめに | 107 |
| 2. 材料および方法 | 107 |
| 3. 結果および考察 | 109 |
| 4. 表および図 | 112 |
| VII. 総括 | 115 |
| 謝辞 | 118 |
| 引用文献 | 119 |

第 I 章 緒言

I - 1 本研究の背景

有用な遺伝資源を保存し、それらを有効に利用することは畜産学上の大きな課題の一つである。哺乳動物ではすでに受精卵の凍結保存および移植技術が確立し、これらは体外受精などの関連技術とともに家畜生産に応用されている。一方、繁殖様式が哺乳動物とは大きく異なる鳥類についてみると、卵は卵黄が大きいため凍結保存が困難であり、現在のところ配偶子の片方である精子の凍結保存以外にはこれといった方法がない。したがって、遺伝的に重要な系統や産業的に価値の高いニワトリ原種などは、いずれも多大な費用と時間をかけて累代飼育されているのが現状である。このような背景から、鳥類における遺伝資源の保存については、哺乳動物の場合とは異なる新技術の開発が望まれており、その中で近年とくに注目を浴びているものの一つに始原生殖細胞 (PGC) の保存および利用に関する研究がある。PGCは個体発生のごく初期に出現し、生殖腺に移住した後、卵祖細胞あるいは精粗細胞へ分化する生殖細胞系列の始原細胞で、鳥類ではこのPGCが発生初期の一時期に血液中を循環するという特徴を有する。このPGCを採取し、これを他の系統の胚に移植することにより、移植されたPGCに由来する子孫を得ることができれば、哺乳動物の受精卵移植に匹敵する新技術になり得る。事実、ごく最近になってこの方法によりニワトリで生殖系列キメラが作出できることが実験的に示され^{31, 54)}、PGCを利用した新技術への期待が高まっている。

近年PGCがとくに注目を浴びている幾つかの理由の中でも最も大きな理由の一つは、PGCが次世代を生む生殖細胞系列の始原細胞であるという点にある。形質転換動物を作出する際、PGCに外来遺伝子を導入すれば、他の細胞の場合より容易に次世代に継承されるはずであり、外来遺伝子を導入する際の対象として

PGCは好ましい細胞なのである。また、その他の理由としては、「PGCは如何にして体細胞系列より分化するのか」という前世紀から続く発生学的な謎に対する興味がある。いずれの場合も、近年における分子生物学的あるいは細胞生理学的知見の蓄積を背景に研究の急速な進展が期待されている。しかしながら、前述のとおり、PGCは発生初期の一時期にのみ存在し、しかもその数が少ない（ニワトリ初期胚の血液中では数百個）という特徴を有し、如何にして研究に供試できるPGC数を確保するかが、今後の研究の進展を左右する大きな要因となっている。最近になって、マウスおよびニワトリでPGCの体外培養に関する研究が盛んに行われるようになったが、PGCの性格を失うことなく増殖し、しかも継代培養できる系は確立していない。PGCの体外培養が他の細胞に比べて難しい理由の一つは、PGCそのものの性質に関する知見が乏しいことにある。PGCの発生学的な挙動や形態的知見の蓄積に比べてPGCを他の細胞と区別しうる生化学的知見は極めて少ない。

本研究で取りあげた*c-kit*遺伝子およびその産物のKitタンパク質は（I-2で後述）PGCの分化・増殖に関与することが知られている数少ない細胞内因子の一つである。Kitタンパク質は膜受容体タンパク質の一種であり、そのリガンドである stem cell factor⁶⁵⁾（以下SCFと称する）とともにPGCの分化・増殖に深く関わっていることがマウスを用いた実験で明らかにされている^{3,44)}。また、これらの知見に基づき、マウスのPGCについては、SCFを用いた体外培養法が開発され（I-5を参照）、この培養系によって樹立した細胞株を用いてキメラマウスが得られている²⁹⁾。

*c-kit*遺伝子は、これまでに調べられたすべての哺乳動物においてその存在が知られており、その塩基配列には高い相同性が認められる（I-2で詳述）。このことから、*c-kit*遺伝子は脊椎動物に広く保存されている遺伝子であり、ニワトリにおいてもこの遺伝子が存在し、かつ、PGCの分化・増殖に重要な役割を

演じているものと予想される。しかしながら、ニワトリを含めて鳥類では*c-kit* 遺伝子の存在が明らかではなく、Kitタンパク質についても記載がない。そこで、本研究では、ニワトリにも哺乳動物と相同の*c-kit* 遺伝子が存在するとの推測に基づき、この遺伝子およびその産物であるKitタンパク質の存在とその役割を明らかにすることは、ニワトリPGCの分化・増殖の機構を明らかにする上で必須の要件であると考え、後述する一連の実験を試みた（I-7に後述）。

I-2 *c-kit* 遺伝子の産物であるKitタンパク質の構造と機能

c-kit 遺伝子はRNAウイルスであるネコのHardy-Zuckerman 4肉腫ウイルス（HZ4-FeSV）のゲノムに見いだされたウイルス性癌遺伝子*v-kit*²⁾の塩基配列と相同性の高い、正常細胞に存在する細胞性癌遺伝子（またはがん原遺伝子）である。細胞性癌遺伝子の多くは、細胞増殖の制御に関与するタンパク質をコードしており、それらの遺伝子の変異や遺伝子増幅に基づく発現異常は、細胞増殖制御の異常をもたらし、さらには、発がんやがんの進展の要因となると考えられている。

これまでにネコ²⁾、マウス³⁹⁾、ウシ¹⁹⁾およびヒト⁵⁹⁾の*c-kit* 遺伝子相補的DNA（cDNA）がクローニングされ、それぞれ塩基配列が決定されており、これらの塩基配列から予想されるアミノ酸配列が種を越えて高い相同性を持つことから、*c-kit* 遺伝子は脊椎動物全般に広く保存されている遺伝子と考えられる。

c-kit 遺伝子cDNAによってコードされるKitタンパク質は受容体型タンパク質チロシンリン酸化酵素（以下受容体型チロシンリン酸化酵素と略称する）の1つであることが示されている。受容体型チロシンリン酸化酵素は、細胞外に存在する細胞成長因子などのリガンドを認識して結合し、それにより細胞内に存在するリン酸化酵素領域が活性化される結果、細胞内の標的タンパク質中のチロシン残基をリン酸化する事により、細胞内に増殖等のシグナルを伝達する機能をもってい

る⁵²⁾。Kitタンパク質は、細胞外領域（マウスKitタンパク質ではアミノ酸配列中21番目から519番目）、細胞膜を貫通するトランスメンブレン領域（520番目から543番目）ならびに細胞内領域（544番目から975番目）から構成されている^{39,59)}。Kitタンパク質の細胞外領域は、リガンドの結合に重要であると考えられている5つの免疫グロブリン様繰り返し構造をもち、Kitタンパク質のリガンドであるSCFを認識して結合する部位、およびKitタンパク質の二量体形成²³⁾に関わる部位が存在すると考えられている。また細胞内領域には、チロシンリン酸化酵素活性を担うリン酸化酵素領域（586番目から685番目および762番目から929番目）が存在し、キナーゼ挿入配列（686番目から761番目）によって、ATP結合部位を含む領域と自己リン酸化部位を含む領域の2つの領域に分けられている。このキナーゼ挿入配列はKitタンパク質およびKitタンパク質のリン酸化の基質であるホスファチジルイノシトール3'キナーゼとが結合するのに関与している²²⁾。これらの構造上の特徴からKitタンパク質は、血小板由来成長因子受容体（PDGFR）、コロニー刺激因子1受容体（CSF1R）と共に受容体型チロシンリン酸化酵素サブクラス III に分類されている³⁹⁾。

多くの受容体型チロシンリン酸化酵素と同様に^{24,48,52,60)}、ヒト、マウスのKitタンパク質については、細胞膜表面のKitタンパク質にリガンドであるSCFが結合すると直ちにKitタンパク質の二量体が形成され²³⁾、Kitタンパク質中のチロシン残基に対する自己リン酸化が起こることが示されている^{23,24)}。また、それに引きつづき、リン酸化されたKitタンパク質はホスファチジル3'キナーゼの85Kサブユニット、ホスホリパーゼC- γ およびRaf-1キナーゼなどのsrc homology 2 (SH2) 領域に結合する^{23,42)}ことが示されており、これらの諸過程がKitタンパク質による細胞内へのシグナル伝達に必須の過程であると考えられている。

I-3 Kitタンパク質のリガンド

Kitタンパク質のリガンドであるSCF⁶⁵⁾はマスト細胞成長因子(MGF,⁵⁶⁾、あるいはキトリガンド(KL,¹⁴⁾)とも呼ばれている。SCFは当初マスト細胞を増殖する可溶性タンパク質として精製された^{14,56)}。その後、SCF遺伝子cDNAはラット¹⁾、ヒト²⁶⁾ウシ⁶⁴⁾およびニワトリ⁶³⁾でクローニングされ、その塩基配列が決定されている。マウスのSCF遺伝子は第10染色体上のSteel(SI)遺伝子座と同一の遺伝子座であることが明らかにされている^{14,56,65)}。SCF遺伝子産物には、シグナルペプチド配列を含み273個のアミノ酸配列からなるKL-1型とオルタナティブスプライシングによって細胞外領域の一部(マウスのSCFのアミノ酸配列の174番目から202番目)を欠いたKL-2型の2種のアイソフォームが存在する^{1,7,15)}。SCFの1次産物はKL-1型、KL-2型のいずれもトランスメンブレン領域を有する膜タンパク質である^{1,7,15)}。膜タンパク質として生産されたSCFは膜結合型SCFとしても機能するが、この一部は膜貫通領域の近くでプロテアーゼにより切断され、可溶性のSCF(マウスのSCFのアミノ酸配列の26番目から189番目)として機能する²⁶⁾。生体内におけるKL-1およびKL-2型SCFの比率は組織によって異なり、脳や繊維芽細胞ではKL-2型SCFに対して約100倍のKL-1型SCFが存在するが、骨髄、脾臓ではほぼ同量である¹⁵⁾。

I-4 マウスのW突然変異体

マウスにおいては古くから、メラニン細胞の欠損(皮膚に白い斑点をもつ)、生殖細胞の増殖不全、造血幹細胞等の増殖不全等を呈するW(Dominant White spotting)突然変異体の存在が知られていた^{5,9,44)}。近年、このW遺伝子座が第5染色体上にあり、*c-kit*遺伝子座と同一のものであることが明らかにされた^{3,10)}。W変異体マウスにはいくつかの独立に見出された多くの変異体系統

がある。なかでも、 W^V 、 W^{37} 、 W^{41} 、 W^{42} 突然変異体マウスでは、*c-kit*遺伝子のリン酸化酵素領域にアミノ酸置換を伴う点突然変異が起きたため、Kitタンパク質が有するチロシンリン酸化酵素活性が様々な程度に低下しており、それぞれの変異型Kitタンパク質のリン酸化酵素活性の低下の程度と、それぞれの W 変異体マウスが呈する変異形質の程度とが相関することが示されている^{34,41,51)}。これらの知見から、1)マウスKitタンパク質がSCFに対する細胞膜表面受容体として、メラニン細胞、生殖細胞および造血幹細胞等の正常な増殖、分化に重要な機能を果たしていること、および、2)その機能にとってKitタンパク質のもつチロシンリン酸化酵素活性が必須であること、が明らかとなっている。

多くの W 変異体遺伝子座のなかでも、 W^{42} 遺伝子座⁹⁾は、そのホモ接合体およびヘテロ接合体が呈する体毛の白色、貧血等の変異形質が、他の W 変異遺伝子座を有する変異体のそれに比べてより重度である点で興味深い遺伝子座である。特に、そのヘテロ接合体($W^{42}/+$)においては、 W^{19H} 遺伝子座を有するヘテロ接合体($W^{19H}/+$)の場合²¹⁾と比べて、より重度の体毛の白色化、貧血がみられる。 W^{19H} 遺伝子座は染色体上の*c-kit*遺伝子が欠失している遺伝子座であることが示されており³⁾、 W^{42} ヘテロ接合体が示す重度の変異形質は、単に機能を有する遺伝子数の減少に由来する野生型Kitタンパク質の発現量の低下ということでは説明できない。Tan et al.⁵¹⁾は、 W^{42} 遺伝子座によってコードされる変異Kitタンパク質はリン酸化酵素領域にAsp⁷⁹⁰からAsnへのアミノ酸置換を有し、その結果、リン酸化酵素活性を完全に失っていること、しかし、その細胞表面への発現レベルや細胞内で付加される糖鎖に関しては野生型Kitタンパク質の場合と同程度であることを示した。さらに、これらの知見に基づき、 W^{42} ヘテロ接合体が重度の変異形質を示すのは、 W^{42} ヘテロ接合体においては W^{42} 変異体型タンパク質が共に発現している野生型タンパク質と会合してシグナル伝達機能を持たない二量体を形成する結果、機能を有するKitタンパク質複合体の数が W^{19H} ヘテロ接合

体の場合と比べてより少なくなるためであろうとの示唆をおこなった。さらに、Ray等⁴⁰⁾は、 W^{42} 変異体Kitタンパク質を発現する遺伝子を有するトランスジェニックマウスを作製し、このマウスが W 変異体と類似の変異形質を呈することを示している。本来の機能を失い、かつ、ともに存在する野生型タンパク質の機能を阻害する活性をもつ変異体タンパク質は、ドミナントネガティブ変異体とよばれ、インシュリン受容体⁵⁵⁾等、他の受容体型チロシンリン酸化酵素についてもその存在が報告されている。また、その性質を利用し、野生型タンパク質がもつ生物学的機能を明らかにする目的で、人工的に作製したドミナントネガティブ変異体を生体内に導入してその効果を調べた多くの研究例が報告されている。

I-5 生体内におけるc-kit遺伝子およびKitタンパク質の発現とその機能

マウスのc-kit遺伝子の生体内での発現は、ノザンプロットハイブリダイゼーション^{33,39)}、*in situ* ハイブリダイゼーション^{18,27,28)}およびモノクローナル抗体^{32,34,62)}を用いた蛍光染色などを用いて調べられている。ノザンプロットハイブリダイゼーションの結果^{33,39)}、正常なマウスにおいてc-kit遺伝子のメッセンジャーRNA(mRNA)の発現は、成獣の胎盤、脳、卵巣、骨髄、脾臓、精巣、肺で認められ、胎児(交尾後13日および14日)では肝臓でc-kit遺伝子mRNAの発現が認められる。これらの全ての組織においては、長さ約5500塩基の1種類のmRNAが発現している。また、タンパク質レベルでの発現に関しては、ネコの脳、およびマウスの脳、脾臓、精巣、肥満細胞でKitタンパク質の発現が確認され、それらが*in vitro*リン酸化反応実験においてチロシンリン酸化酵素活性を示すこと、また、シアル酸やN-グリコシド型糖鎖による修飾を受けている²⁵⁾ことが報告されている。

Manova²⁷⁾らは、*in situ* ハイブリダイゼーションにより、マウス胎児(17.5日)の卵巣のうち、一部の卵胞でc-kit遺伝子mRNAが発現すること、誕生

直後から成熟にいたるまで卵巣中の全ての卵胞はmRNAを発現していること、Kitタンパク質はPGCならびに発達中および成熟した卵胞のいずれの細胞表面にも発現していることを示した。さらに生後6日から成熟マウスまでの精巣におけるc-kit遺伝子mRNAおよびタンパク質の発現はA₂型からB型の早期の精原細胞のみで認められる⁶²⁾こと、また、マウスKitタンパク質に対するモノクローナル抗体を用いた実験の結果、Kitタンパク質は精子形成の過程で、精原細胞がA₁型からA₄型へ発達する際に必要なシグナルのレセプターとして働くことが示されている⁶²⁾。

また、c-kit遺伝子はマウスの胎児（交尾後14.5日前後）のメラニン細胞が外胚葉の下を通過して背側から側方へ移動する際に必要であり¹⁶⁾、出生後も生涯を通してメラニン細胞の活性化に関与している³²⁾ことが知られている。

小川³⁵⁾らは、抗Kitタンパク質モノクローナル抗体ACK2の投与により、マウスの骨髄球系の細胞および赤血球系の細胞の分化・増殖が阻害されること、また、マウスの骨髄中の全有核細胞のうち7~8%がKit分子を発現しており、Kitタンパク質を発現している細胞はいずれも未分化な細胞であることを報告している。

マウスの10日胚のPGCが背部腸間膜から生殖隆起へ移動する移動経路にc-kit遺伝子が発現している¹⁸⁾。このc-kit遺伝子の発現は、この時期のPGCの存在位置と対応している。またSCF遺伝子が生殖隆起で強く発現しており、PGCの移動経路に向かって濃度勾配が認められる。生殖細胞が生殖隆起に到達するとc-kit遺伝子、SCF遺伝子のいずれも生殖隆起でのみ発現し、移動経路に沿ったSCFの濃度勾配はなくなる¹⁸⁾。このことから、マウスのSCFが走化性物質として働き、PGCに発現しているKitタンパク質がこれに反応して始原生殖が生殖細胞に向かって移動することが示唆される。

マウスPGCでは*in vitro*培養法が開発されており^{6,11)}、胚幹細胞様の細胞株が樹立されている²⁹⁾。SCF遺伝子を欠損したフィーダー細胞上でマウスの8.5日

胚のPGCを培養すると培地に加えたSCFに依存して4日間のみ増殖し、プロモデオキシウリジンの取り込みを促進する²⁸⁾。また、SCFを生産するSTO繊維芽細胞をフィーダーとしてPGCを培養するとSCFを加えなくても増殖する。さらにACK2モノクローナル抗体を培地に加えるとPGCの増殖が阻害された結果から、SCFがPGCのマイトジェンとして働くことにより、PGCのKitタンパク質が応答してPGCが増殖することが示されている²⁸⁾。

マウスの13.5日胚ではPGCの増殖が停止するが、8.5日胚のPGCを*in vitro*培養した場合にもこの現象が再現された²⁹⁾。また、これより発生段階の遅いPGCを培養した場合においても、マウスの胚の中でPGCの増殖停止に対応する時期に停止する²⁹⁾。*in situ*ハイブリダイゼーションにより、13.5日胚のPGCにおける*c-kit*遺伝子の発現は減少することが認められている¹⁸⁾ことから、この時期のPGCが増殖停止する1つの要因としてSCFに対する反応性を失うことが示唆されている。

I-6 ポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) について

遺伝子をクローニングするには、これまで多くの時間と労力が必要とされてきたが、近年、微量の試料から酵素を用いてDNAを増幅するPolymerase Chain Reaction (PCR) 法が開発された⁴⁵⁾。PCRの原理は、増幅したいDNAの領域をはさんで+鎖、-鎖に対する相補的なオリゴヌクレオチドを合成したものをプライマーとし、

1. 鋳型DNAを熱変性により一本鎖に解離する。
2. プライマーのアニーリング。
3. DNAポリメラーゼ (Taq DNA ポリメラーゼ) により相補鎖を合成する。

のステップを1サイクルとし、通常30~50サイクル繰り返すことによりDNAを増幅するものである。原理的には、このステップを1サイクル行うごとに

DNAが理論的には2倍に増幅されることになる。

同一の機能をもつ遺伝子のアミノ酸配列が動物種を越えて保存されている例は多い。そこで目的とする遺伝子が他の種でクローニングされている場合、この保存されているアミノ酸配列を利用して、PCR法で目的の遺伝子のcDNAをクローニングする方法が報告されている^{8,36)}。この方法では、20塩基に2,3塩基のミスマッチをもつプライマーでも十分に機能し得るという特徴を活かし、目的とする遺伝子がコードしているタンパク質中に保存されているアミノ酸配列から推定される塩基配列（もしくは、他の種の同一遺伝子における塩基配列）を用いて作製したプライマー、またはランダムプライマーを用いpoly A⁺RNAを鋳型にcDNAを合成する。さらにこれらのプライマーを用いて合成したcDNAを鋳型としてPCR反応を行うことによりcDNA断片を増幅する。

I-7 本研究の目的および概要

前述のとおり、鳥類、特にニワトリでは、有用な遺伝資源を保存、または利用するために受精卵に替わり、PGCを利用する方法が注目されている。このニワトリのPGCが初期胚の血管中を循環するという特性を利用し、PGCをドナーの初期胚の血管に戻すことにより生殖系列キメラを作製することが可能となっている³¹⁾。また、この技術を応用すれば、PGCに遺伝子を導入することによりトランスジェニックニワトリを作出することも将来的には可能であると考えられる。これらの技術を用いる際、採取した血液中からPGCと赤血球を分離することが必要であるが、マウスと同様にニワトリの*c-kit*遺伝子がPGCで発現していれば、ニワトリKitタンパク質は初期胚から採取した血液中のPGCと赤血球を区別するための有効なマーカーとなり得る。また、ニワトリKitタンパク質がPGCの増殖に関与しているとするれば、マウスのPGCと同様に、Kitタンパク質のリガンドであるSCFを用いたニワトリPGCの*in vitro*培養法の開発も期待される。生殖系

列キメラニワトリを作出するために有効な数のPGCをニワトリの初期胚から収集するにはかなりの労力を必要とするが、ニワトリPGCの*in vitro*培養法が確立されれば、より効率的に生殖系列キメラ、トランスジェニックを作出することが可能となる。しかしながら、本章の1節でも述べたようにニワトリの*c-kit*遺伝子は、まだクローニングされておらず、ニワトリKitタンパク質の存在も確認されていない。

そこで本研究は、ニワトリ*c-kit*遺伝子の存在を明らかにすると共に、その生物学的役割を解明する第一歩として、ニワトリKitタンパク質の構造・生化学的特性とその遺伝子の発現パターンを明らかにする目的で行った。すなわち、まず、ニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAのクローニングを行い、次いで、得られたニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAを用いてニワトリKitタンパク質に対する抗体を作製し、ニワトリKitタンパク質の生化学的特性および生体内での発現について検討した。その概要は以下のとおりである。

- 1) ニワトリの*c-kit*遺伝子cDNAをクローニングするためのプローブを作製する
目的で、PCR法を用いてニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAの一部をクローニングした(第II章)。
- 2) 作製した上記プローブを用いてニワトリ脳のcDNAライブラリーのスクリーニングを行い、24個のニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAクローンを得た。これらのうちニワトリ*c-kit*遺伝子mRNAのほぼ全体に相補的なcDNAを含んでいた1クローンを用いて全塩基配列を決定した。その結果、このcDNAの塩基配列から、予想されるアミノ酸配列はマウスKitタンパク質のアミノ酸配列と高い相同性を示し、得られたcDNAがニワトリの*c-kit*遺伝子のcDNAであることが強く示唆された。さらに、このcDNAをプローブとして、ニワトリ各組織から抽出したpolyA⁺RNAのノザンプロットハイブリダイゼーション解析を行った結果、約5.5kbのmRNAが脳、ファブリシユウス嚢、心臓、腎臓、

肺，脾臓，胸腺，卵巣，および精巣で発現していることが認められた（第三章）。

- 3) 得られたニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA を大腸菌発現用ベクターに挿入して，大腸菌内でニワトリ Kit (chKit) タンパク質と大腸菌のマルトース結合タンパク質との融合タンパク質を発現させ，さらにこれを精製して，ウサギに免疫する事により，抗chKitタンパク質抗血清を作製した．次いで大腸菌内でchKitタンパク質の細胞外領域とグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質を発現させ，これを精製した後，これをリガンドとしたアフィニティカラムを作製した．このカラムを用いて抗chKitタンパク質抗血清をアフィニティ精製することにより，chKitタンパク質の細胞外領域に特異的な抗chKit抗体を作製した（第四章）。
- 4) 野生型ニワトリKitタンパク質 (chKit+) および Asp⁷⁷⁷ から Asn へのアミノ酸置換を有するニワトリKitタンパク質 (chKit42) を発現する真核細胞発現用ベクターを作製し，Cos-1細胞を用いて強制発現させ，抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロット解析および *in vitro* リン酸化反応実験を行い，これらのタンパク質のチロシンリン酸化酵素活性について検討した．その結果，本研究において得られたcDNAが正常な生化学的活性をもつニワトリKitタンパク質をコードするものであることを示した（第五章）。
- 5) 抗ニワトリKitタンパク質抗体を用いることにより，ニワトリの脳において発現しているニワトリKitタンパク質を検出し，グリコシダーゼ処理実験，および *in vitro* リン酸化反応実験を行い，ニワトリの生体内で発現しているKitタンパク質が145kDaの見かけの分子量を持つこと，また，少なくともシアル酸残基が付加していること，自己リン酸化酵素活性を有することを明らかにした（第六章）。

以上、本研究の成績から，ニワトリにおける *c-kit* 遺伝子の存在がはじめて明

らかにされた。また、この遺伝子がコードするニワトリKitタンパク質の生物学的役割については、各組織におけるニワトリ*c-kit*遺伝子mRNAの発現が、マウス、ネコの*c-kit*遺伝子の発現パターンとよく対応していることから、哺乳類におけるKitタンパク質の生物学的役割に類似しているものと推察された。さらに、ニワトリKitタンパク質は、1)ニワトリSCFに応答すること、2)自己リン酸化酵素活性を示すこと、3)糖鎖が付加していることなど、マウスKitタンパク質と極めて類似する生化学的特性を示した。このことから、ニワトリKitタンパク質もマウスKitタンパク質と同様にPGCなどの特定の細胞の分化・増殖に関わるシグナル伝達に関与していることが示唆された。

これらの知見は、今後ニワトリのPGCをはじめとする生殖細胞、造血幹細胞およびメラノサイトなどの分化・増殖にニワトリKitタンパク質が果たす役割の解明、PGCの*in vitro*培養法の開発、PGCを用いた遺伝資源の保存法、およびトランスジェニックニワトリの作出法の開発を行っていく上で重要な基礎となるものである。

第 II 章 PCRによるニワトリ*c-kit*遺伝子のcDNAプローブの作製

II-1 はじめに

ヒト、マウスの*c-kit*遺伝子^{39,59)}およびネコの*v-kit*遺伝子²⁾の塩基配列は、すでに報告されている。そこで、ニワトリの*c-kit*遺伝子のcDNAをクローニングするために、ニワトリcDNAライブラリーをスクリーニングする際のプローブを作製する目的で、マウス、ヒトの*c-kit*遺伝子cDNAおよびネコの*v-kit*遺伝子cDNAの塩基配列に基づいてオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、ニワトリmRNAから合成した1本鎖cDNAを鋳型としてポリメラーゼチェーンリアクション法(PCR法)によってニワトリ*c-kit*遺伝子cDNA断片の増幅を試みた。その結果、いくつかのニワトリ*c-kit*遺伝子cDNA断片を増幅し、大腸菌にクローニングした。また、そのうちの1つがcDNAライブラリーをスクリーニングする際のプローブとして有用であることを確認した。

II-2 材料および方法

(1) 材料

ホワイトレグホーン(白河系)は、農林水産省畜産試験場遺伝資源研究室から供与された。PCR反応に用いたオリゴヌクレオチドプライマーは、農林水産省生物資源研究所遺伝子構造研究室に合成を依頼した。プラスミドpUC18(*Xho*I)およびホワイトレグホンゲノムDNAは、櫻井通陽博士(農林水産省家畜衛生試験場分子免疫研究室)より供与された。cDNA合成キット(cDNA合成システム・プラス)はアマーシャム社より購入した。PCR反応キット(Gene Amp DNA Amplification reagent Kit with AmpliTaq)およびOligotex-dT30は、宝酒造より購入した。プラスミドpUC18DNA、各種制限酵素、T4DNAリガーゼ、アルカリフォスファターゼは、東洋紡績より購入した。塩基配列決定用の

オリゴヌクレオチドプライマー (M13シーケンスプライマー#1213および#1233) は、ニューイングランドバイオラボ社より購入した。DNAシーケンスキット (Sequenase Version 2.0 Sequencing kit) は、ユナイテッド・ステイツ・バイオケミカル社より購入した。

(2) ニワトリ脳からの全RNAの調製

ニワトリ脳からの全RNAの調製は、Sambrook et al. の方法⁴⁶⁾に従った。調製に用いた滅菌水および緩衝液は、混入したRNA分解酵素を除去するため、ジエチルピロカーボネイト (最終濃度0.5%) を加え一晩放置後、オートクレーブで処置したものをを用いた。ふ化後8日齢のホワイトレグホン2羽を頸部切断した後、脳を採材し、その重量を測定した (1.0g および 0.95g)。採材した脳は細切し、脳1個当たり10.2mlの溶解用緩衝液 [4Mグアニジン酸チオシアネイト, 25mMクエン酸ナトリウム, 0.5%ラウロイルサルコシン・ナトリウム塩, 0.1Mβ-メルカプトエタノール] の中にいれ、ポッター型ホモジェナイザーを用いてホモジェナイズした。次いでホモジェネイト中のDNAを断片化するため、ホモジェネイトを18ゲージの針を付けた注射筒を用い、20回急速に出し入れを行った。ベックマンSW50.1ローター用ポリアロマーチューブに1.6mlの塩化セシウム溶液 [5.7M CsCl, 0.1Mエチレンジアミンテトラアセテイト] を入れ、その上にホモジェネイト (約3.50ml/チューブ) を重層した。これを、SW50.1ローターを用い、ベックマンL-8型超遠心機で36,000rpm, 20℃の条件で12時間遠心した。遠心後、チューブの底部から約1mlを残し、バスツールピペットで注意深く上清を除去した。次にチューブ内壁面を200μlの溶解用緩衝液で3回洗浄した後、上清を完全に除去し、チューブの底面に沈澱したRNAの表面を200μlの70%エタノールで洗浄した。沈澱を5分間風乾した後、これを400μlのTSE緩衝液 [500mM トリス (pH7.5), 1% SDS, 5mM EDTA] に溶かし、エッ

ベンドルフチューブに移した。さらにこれを400 μ lのクロロフォルム-ブタノール液[80%クロロフォルム, 20%ブタノール]で抽出して水層を回収し、次いでクロロフォルム-ブタノール層を400 μ lのTSE緩衝液で逆抽出して得られた水層と合わせた。これに80 μ lの3M酢酸カリウム溶液(pH5.0)および1760 μ lのエタノールを加えて、-70 $^{\circ}$ Cで15分間冷却しRNAを沈澱させた後、15,000rpm, 10分間遠心を行った。遠心後、上清を除去し、さらに沈澱したRNAを1mlの70%エタノールで洗浄した後10分間風乾した。その後RNAを900 μ lの滅菌水に溶かし、等量のエタノールを加えた後、-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

得られたRNA溶液の濃度は適当希釈のUV吸光度から、1OD(260nm)=30 μ g/mlとして算出した。紫外吸光度測定には、ベックマンDU-20型分光光度計を用いた。

12週齢のニワトリの脳的全RNAも同様に調製した。

(3) poly A⁺RNAの調製

上記的全RNA溶液から大田らの方法³⁷⁾に従いOligotex-dT30を用いてpoly A⁺RNAを調製した。

前述した全RNA溶液900 μ l(RNA500 μ g)に40 μ lの3M酢酸ナトリウム溶液(pH5.0)および900 μ lのエタノールを加え、-70 $^{\circ}$ Cで1時間放置した後、15,000rpm, 5分間遠心してRNAを沈澱させた。上清を除去し、沈澱したRNAを1mlの70%エタノールで洗浄した後、沈澱を250 μ lの滅菌水に溶かした。これに250 μ lの2 \times 溶出用緩衝液[20mM トリス(pH7.5), 2mM EDTA, 0.2% SDS]および500 μ lのOligotex-dT30懸濁液(20mg/ml)を加え、65 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した。次いで、これに100 μ lの5M塩化ナトリウム溶液を加え、37 $^{\circ}$ Cで10分間加熱後、15,000rpm, 10分間遠心し、poly A⁺RNAを吸着したOligotexを沈澱させた。上清を除去後、沈澱を洗浄するために、沈澱を500 μ lの洗浄用緩衝液

[20mM トリス(pH7.5), 2mM EDTA 0.1% SDS 0.1M NaCl]に再懸濁し, 15,000rpm, 10分間遠心後, 上清を除去した. 次いで, poly A⁺RNAを Oligotexから解離するため, 沈澱を400 μ lの滅菌水に懸濁し, 65 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した. これを15,000rpm, 10分間遠心後, 上清を取りpoly A⁺RNA標品とし, 等量のエタノールを加えた後, -20 $^{\circ}$ Cで保存した. またその濃度は, RNAの調製と同様に決定した. また, 12週齢のニワトリ脳のパoly A⁺RNAも同様に調製した.

(4) オリゴヌクレオチドプライマー溶液の調製

生物資源研究所遺伝子構造研究室より供与されたオリゴヌクレオチド (SAK47, SAK48, SAK49, SAK50, SAK51, SAK52, SAK54, SAK55, SAK56, SAK57, SAK58, SAK59) 溶液を真空乾燥機で乾固させ溶液中のアンモニアを除去した後, 適当量の滅菌水に再溶解し, -20 $^{\circ}$ Cで保存した. この溶液のオリゴヌクレオチド濃度は, 適当希釈の後, 紫外吸光度より1OD(260nm)=30mg/mlとして算出した.

(5) cDNAの合成

第II章2節(3)項で述べた方法で調製したpoly A⁺RNAを鋳型とし, 合成オリゴヌクレオチド (SAK48, SAK49, SAK54, SAK56, SAK58, SAK59) をプライマーとしてcDNA合成を行った. 合成にはcDNA合成キット (Invitrogen社, cDNA cycle kit) を用い, 反応条件はキットに添付されたマニュアルに従った.

poly A⁺RNAの50%エタノール溶液のうちRNA量1mg相当分に1/20容の3M酢酸ナトリウム溶液(pH5.0)と等容のエタノールを加えてエタノール沈澱を行った後, 得られたRNA沈澱を11 μ lの滅菌水に溶かし, 65 $^{\circ}$ Cで5分間加熱後, 氷上で急冷した. これにキット中の5 \times ファーストストランド合成用緩衝液, ピロリ

ン酸ナトリウム溶液，ヒト胎児リボヌクレアーゼインヒビター，デオキシヌクレオチド三リン酸混液を各所定量および1 μ lのオリゴヌクレオチドプライマー溶液(20 μ M)を加え，全量を20 μ lとした後，キット中の逆転写酵素1 μ lを加え，42 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた．反応後，500 μ lのTE緩衝液[10mM トリス (pH8.0), 1mM EDTA]を加え，これをcDNA標品として-20 $^{\circ}$ Cで保存した．

(6) PCRによる*c-kit*遺伝子cDNA断片の増幅

前項で述べたcDNA標品を鋳型とし，適当なオリゴヌクレオチドプライマーの組み合わせを用いてPCRによるcDNA断片の増幅を行った．PCR反応には，PCR反応キットを用いた．反応条件は，基本的にキットに添付されたマニュアルに従った．

cDNA溶液10 μ lにキット中の10 \times 反応緩衝液，デオキシヌクレオチド三リン酸混液および滅菌水を各所定量，および適当な2種のオリゴヌクレオチドプライマー溶液(20 μ M)を各5 μ lづつを加えて全量を99.5 μ lにした．これを95 $^{\circ}$ Cで5分間加熱後，氷上で急冷し，キット中のTaqDNAポリメラーゼ0.5 μ l(5ユニット)を加え，さらに約30 μ lのミネラルオイルを重層した後，DNAサーマルサイクラー(シータス社)上でPCR反応を行った．

(7) cDNA断片のクローニング

PCR反応後，反応液5 μ lを0.8%アガロースゲル上で電気泳動し，生成物の検出を行った．cDNA断片の増幅が認められたものについては，そのcDNA断片をプラスミドベクターへクローニングした．プラスミドDNA操作，アガロースゲル電気泳動およびアガロースゲルからのDNAの回収はSambrook et al.⁴⁶⁾の方法に従った．また，プラスミドDNAによる形質転換のためのコンピテントセルは，大腸菌HB101株を用いHanahannの方法¹²⁾に準じて調製，凍結保存し，用

時氷上で融解して用いた。

SAK55およびSAK58をプライマーとしたPCR反応後、反応液95 μ lをエタノール沈澱し、20 μ lのTE緩衝液に再溶解した。これを分取用0.8%アガロースゲル上で電気泳動し、エチジウムブロミドで染色して約500塩基対の長さを示すDNAバンドをカミソリで切りだした後、DNAを電気泳動によりアガロースから溶出・回収した。次いでフェノール抽出によりDNA溶液に残存するアガロースを除き、制限酵素*EcoRI*および*BamHI*で消化した。消化後フェノール抽出により制限酵素を失活させ、DNAをエタノール沈澱後適当量のTE緩衝液に溶解した。一方、プラスミドベクター-pUC18⁵⁷⁾を*EcoRI*および*BamHI*で切断した後、切断末端の5'リン酸基をアルカリフォスファターゼで除去した。次いで、フェノール抽出により酵素を失活させた後、DNAをエタノール沈澱し、適当量のTE緩衝液に溶解した。このように調製したcDNA断片およびpUC18ベクターをT4DNAリガーゼで結合させた後、これをコンピテントセルに形質転換し、アンピシリン耐性の形質転換大腸菌クローンを得た。複数個の大腸菌クローンからアルカリ溶解法でプラスミドDNAを抽出・精製し、これを*EcoRI*および*BamHI*で切断した後、アガロースゲル上で電気泳動を行い、プラスミドへのcDNA断片の組み込みを確認した。SAK52およびSAK59をプライマーとして用いたPCR反応後に得られた約500塩基対の断片についてもほぼ同様の方法によりクローニングした。すなわち、cDNA断片をアガロースゲル電気泳動による精製後、制限酵素*XhoI*および*BclI*で切断した。一方プラスミドベクター-pUC18 (*XhoI*) を*XhoI*および*BamHI*で切断し、アルカリフォスファターゼで末端リン酸基を除去した。この両者からcDNA断片が組み込まれた複数のプラスミドクローンを得た。pUC18 (*XhoI*) は、pUC18の*SphI*切断部位をリンカーライゲーションにより、*XhoI*切断部位に変換したプラスミドである。

(8) cDNAの塩基配列の決定

塩基配列の決定にはシーケンスキットを用い、ダイデオキシ法⁴⁷⁾により塩基配列を決定した。cDNA部分の塩基配列決定は、前項で得た2本鎖プラスミドDNAおよび1本鎖M13ファージDNA³⁰⁾を鋳型に塩基配列の決定を行った。シーケンス反応および7M尿素存在下でのポリアクリルアミド電気泳動はキットに添付されたマニュアルに従って行った。

シーケンス反応の鋳型とした2本鎖DNAはアルカリ溶解法⁴⁶⁾によって調製した。また、1本鎖M13ファージDNAはMessingの方法³⁰⁾によって調製した。2本鎖プラスミドDNA (3 μ g) 水溶液 (全量20 μ l) にアルカリ液 [2M NaOH, 2mM EDTA] 2 μ lを加え、5分間静置して1本鎖に変性させた。このサンプルに3M 酢酸ナトリウム溶液3 μ lおよび蒸留水7 μ lを加えて中和した後、エタノール75 μ lを加え、-80 $^{\circ}$ Cに1時間以上放置しDNAを沈澱させた。その後、15,000rpm, 10分間遠心を行い、上清を除去した。さらに、エタノール150 μ lで沈澱を洗浄した後、エタノールを除去し、風乾した。風乾したサンプルは、蒸留水2 μ lに溶かし、これをシーケンス用のサンプルとした。プライマーはM13DNA塩基配列決定用プライマー#1212および#1233 (New England Biolabs社) を用いた。ついでシーケンス用のサンプルにキット中の5 \times 反応緩衝液を2 μ l, 10ng/mlのプライマー溶液6 μ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートして、プライマーをアニーリングさせた。アニーリング終了後、キット中のラベリングミックスの15倍希釈液を2 μ l, ジチオトレイトール1 μ l, [α -³²P]dCTP 1 μ l, シークエナーゼ希釈用緩衝液で9倍希釈したシークエナーゼ2 μ lを加え室温に5分間静置し、ラベリング反応を行った。次いで、96穴プレートにキット中のターミネーションミックス4種類 (デオキシヌクレオチドの混合液にデオキシヌクレオチドの類似体であるジデオキシヌクレオチドのうちの1種類を加えたもので、これを取り込んだところでDNAの伸長反応が停止する) 2.5 μ lを各々別の

穴に入れ、ここにラベリング反応が終了したサンプルを3.5 μ lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートして5'末端から3'末端方向に様々な長さの相補DNA鎖を合成させた。15分間の反応終了後、反応停止液4 μ lを加え、75 $^{\circ}$ Cで2分間インキュベートした後、氷上で急冷した。このサンプルを7M尿素存在下のポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。電気泳動終了後ポリアクリルアミドゲルを固定液[10%酢酸、10%メチルアルコール]に20分間浸し、固定した。固定したアクリルアミドゲルは、3MMワットマンのフィルターペーパーに張り付け、ゲルドライヤーで乾燥させた。ついでオートラジオグラフィーを行い塩基配列を解析した。

1本鎖M13ファージDNA1 μ gは、滅菌水7 μ l、キット中の5 \times 反応緩衝液2 μ l、M13 mp18 Primer(-40)プライマー(2.8 μ g/ml)を1 μ lを加え、65 $^{\circ}$ Cで2分間加熱した後、30分間かけて65 $^{\circ}$ Cから30 $^{\circ}$ Cまで温度を下げアニーリングを行った。これを塩基配列決定用のサンプルとし、この後の手順は前述の方法と同様に行った。

(9) ニワトリDNAのサザンブロット分析

1) サザンブロットハイブリダイゼーション

ニワトリのゲノムDNAを、各種の制限酵素で消化した。この消化物についてそれぞれ5 μ gずつ0.8%アガロースゲル上で電気泳動を行った。ついで、アガロースゲルをアルカリ液[0.5M NaOH, 1.5M NaCl]150mlに浸し20分間振とうを2回繰り返す。ゲル中のDNAをアルカリ変性させた。次に蒸留水でゲルを洗浄した後、中和液[1M トリス(pH7.4) 1.5M NaCl]150mlに浸し、20分間振とうを2回繰り返す。ゲルを中和させた。そして、泳動槽の支持台の上に10 \times SSC緩衝液(1 \times SSC緩衝液の組成は、[150mM NaCl, 15mM クエン酸ナトリウム(pH7.0)])で湿らせた濾紙(ワットマン3MM)を敷き、その上にこのゲルをのせた。濾紙の両端は常に10 \times SSC緩衝液中に浸っているようにした。ゲルと同じ大きさのニトロセルロース膜を蒸留水で湿らせたのち10 \times SSC緩衝液に浸

し、ゲルの上ののせ、この上にゲルと同じ大きさの濾紙を10×SSC緩衝液に湿らせた物2枚、乾いた濾紙1枚をのせ、この上にゲルと同じ大きさに切ったキムタオル（十條キンバリー社）を10～12cmの高さに積み、さらに重り（約500g）をゲル全体に均一にかかるように乗せ、一晚静置しプロットティングを行った。翌日、ニトロセルロースフィルターを6×SSC緩衝液で30秒間洗浄した後、乾燥した濾紙の上で、ニトロセルロースフィルターを乾かした。ニトロセルロースフィルターが完全に乾燥した後、80℃で2時間、真空オーブンでフィルターを加熱し、DNAをフィルターに固着させた。ついでフィルターを、適量のプレハイブリダイゼーション液[50%ホルムアミド、5×SSC緩衝液、1×デンハルト、0.5% SDS、10mM EDTA、100mg/mlサケ精子DNA]で約1分間洗浄した後、プラスチックバッグに入れ、40mlのプレハイブリダイゼーション液を加えた後、封をし、42℃で一晩プレハイブリダイゼーションを行った。

プレハイブリダイゼーション終了後、ハイブリバッグ中のプレハイブリダイゼーション液を捨て、ハイブリダイゼーション液[50%ホルムアミド、5×SSC緩衝液、1×デンハルト、0.5% SDS、10mMEDTA、100μg/mlサケ精子DNA]を入れた。ついで[α -³²P]dCTPで標識されたプローブを100℃で10分間加熱し氷上で急冷し、1本鎖に変性した後、これをハイブリダイゼーション液に加えた。これを42℃で終夜振とうして、ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後フィルターを、洗浄液[2×SSC緩衝液、1% SDS]を用い、室温で、ゆっくり振とうしながら15分間洗浄した。この操作を2回繰り返す、次に65℃で45分間、2回洗浄した。洗浄が終了した後フィルターを、オートラジオグラフィに供した。

2) プローブの標識

プローブの標識には、MegaprimeTM DNA labelling systems RPN 1604（

Amersham社)を用いた。プローブDNA 25ngを滅菌水に溶かし全量28 μ lとしたものにキット中のランダムプライマー5 μ lを加え、100 $^{\circ}$ Cで10分間加熱した後急冷してDNAを変性させた。これに5 \times メガプライム反応緩衝液10 μ l, [α - 32 P] dCTP 5 μ l, DNAポリメラーゼI (Klenow fragment, 1unit/ μ l) 2 μ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで10分間反応させた。反応終了後、1 \times STE緩衝液[0.1M NaCl, 10mM トリス(pH8.0), 1mM EDTA(pH8.0)]20 μ lを加え70 μ lに調製した反応液を1 \times STE緩衝液70 μ lで膨潤させたプッシュカラム (Stratagene社)に添加し、70 μ lの1 \times STEで溶出させた。この溶出液から1 μ lを取り、クリアゾル10mlに加え、液体シンチレーションカウンター (アロカ)で放射活性を測定した。標識されたDNAの比活性が 5×10^8 cpm/mg DNA以上であることを確認してプローブとして用いた。

II-3 結果

(1) PCR用プライマーの設計

ニワトリc-kit遺伝子が、既に報告されているマウス・ヒトc-kit^{39,59)}遺伝子およびネコのv-kit遺伝子³⁾とアミノ酸配列レベルで相同であると仮定して、ニワトリc-kit遺伝子cDNAあるいはその断片をPCRによって増幅するためのプライマーを設計した。その際、以下の諸点を考慮した。

1. PCRで遺伝子増幅を行った研究例^{8,36)}に従って、プライマーの長さを25塩基程度とした。
2. マウス・ヒト・Kitタンパク質、ネコのv-kitタンパク質の間で保持されているアミノ酸配列はニワトリにおいても保持されている可能性が高いと考えられるので、報告されているそれらの塩基配列およびそれから予想されるアミノ酸配列^{2,39,59)}を比較し、この三つのタンパク質間で7アミノ酸以上(塩基配列上で21塩基以上に相当する)にわたってほぼ保存されているアミノ酸配

列を探し、それをコードしているマウス *c-kit* 遺伝子中の核酸塩基配列あるいは相補的な配列をプライマーの配列の候補とした。

3. アミノ酸コドンの重複性から、アミノ酸配列が同一であってもそれをコードする塩基配列が異なっている可能性があるため、保存されたアミノ酸配列のうち、メチオニンあるいはトリプトファン残基を含むものを選び、これらのアミノ酸残基をコードする塩基配列がプライマーの3'末端あるいはその近傍に含まれるようにした。すなわち、アミノ酸残基に対応するコドンはそれぞれ1通り（メチオニン：AUG，トリプトファン：UGG）しかないため、これらのアミノ酸残基が保存されているならば、塩基配列も1通りに決まるからである。またこれらのアミノ酸残基をコードする塩基配列がプライマーの3'端近傍に含まれるようにしたのは、PCR反応の効率に対して、プライマーの3'端近傍の配列と鋳型DNAとの相同性の方がプライマーの5'末端近傍での相同性よりも大きな影響を持つことが予想される⁵⁰⁾からである。

4. 増幅されたDNA断片のプラスミドへのクローニングを容易にするため、必要な場合は以上のような基準に基づき選定された塩基配列中の1～2塩基を変更することにより6塩基認識の制限酵素認識配列を導入した。

5. PCR反応の効率は、増幅されるDNAの長さが長くなる（1000塩基対以上）と低下するので、増幅されるべきDNAの長さが500～700塩基対となるようにプライマーの位置を選定した。

このように設計されたオリゴヌクレオチドプライマーのSAK48～SAK58および、のちにニワトリ *c-kit* 遺伝子cDNAの配列に基づき作製したプライマーSAK59の塩基配列をマウスおよびヒトの *c-kit* 遺伝子の配列と比較して図2-1、図2-2に示す。

(2) PCR反応によるニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA 断片のクローニング

ニワトリの *c-kit* 遺伝子の cDNA 断片をクローニングする目的で、ニワトリの脳の PolyA⁺RNA を鋳型とし、mRNA に相補的な配列をもつことが期待される SAK48, SAK49, SAK56, SAK58, SAK59 をプライマーとして、第 1 鎖合成 (first strand synthesis) を行った。この 1 本鎖 cDNA を鋳型とし、前述の PCR 用プライマーを用いて PCR 反応を行った。ニワトリ *c-kit* 遺伝子の塩基配列がマウス *c-kit* 遺伝子と相同性が高いことを仮定すると、それぞれのプライマーの組み合わせによって増幅される cDNA 断片の長さが予想できる (表 2-1)。そこで PCR 反応後、反応生成物のアガロースゲル電気泳動を行い、予想される長さの cDNA 断片が認められるか否かを確認した。予想される長さの cDNA 断片の増幅が認められたものは大腸菌にクローニングした後、塩基配列を決定し、cDNA 断片の増幅を確認した。

PCR 反応の鋳型 DNA とプライマーの組み合わせ、反応条件およびその結果は表 2-2 に示した。

実験 1

実験 1 においては、マウスの塩基配列を基に作製した 4 種類のプライマー (SAK48, SAK49, SAK56, SAK58) をそれぞれ使い、12 週齢のニワトリの脳の mRNA を鋳型に cDNA を合成した。この cDNA を鋳型に 5 種類のプライマーの組み合わせ (SAK48 と SAK57, SAK49 と SAK57, SAK56 と SAK51, SAK52 と SAK58, SAK55 と SAK58) で PCR 反応を行った。

PCR 反応は、変性 94℃ 1 分、アニーリング 42℃ 2 分、伸長反応 72℃ 3 分を 1 サイクルとして 50 サイクル行った。PCR 反応後、生成物の一部をアガロースゲル電気泳動で cDNA 断片の増幅を調べたところ、SAK55 と SAK58 のプライマーの組み合わせで行った PCR 反応で、予想される長さ (515 塩基対) の DNA の増幅が認められた (図 2-3)。

実験 2

実験 1 の結果，増幅，クローニングされたニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA 断片の塩基配列（後述）に基づきプライマー SAK59（図 2-1）を作製した．SAK59 を用い，12 週齢のニワトリの脳の mRNA を鋳型に cDNA 合成を行った．この cDNA を鋳型に 4 種類のプライマーの組み合わせ（SAK59 と SAK50，SAK59 と SAK51，PCR 反応は変性 94℃ 1 分，アニーリング 48℃ 2 分，伸長反応 72℃ 3 分を 1 サイクルとし，50 サイクル行った．SAK59 と SAK52，SAK59 と SAK57）で PCR 反応を行った（表 2-2）．PCR 反応後，アガロースゲル電気泳動で PCR 反応生成物の確認を行ったところ，SAK52 と SAK59 の組み合わせにおいて予想される長さ（478 塩基対）の DNA 断片の増幅が認められた（図 2-4）．

実験 3 ～ 実験 5

実験 3 ～ 実験 5 においては PCR 反応条件検討のため実験 2 と同じ cDNA およびプライマーの組み合わせで，PCR 反応の際の温度・時間を変えて（表 2-2）増幅に対する影響を検討した．その結果実験 3 ～ 実験 5 のいずれにおいても実験 2 と同様 SAK52 と SAK59 の組み合わせにおいて予想される長さ（478 塩基対）の DNA 断片の増幅が認められた．

実験 6 および 実験 7

実験 6 および 実験 7 においては，10 日齢のニワトリの脳の mRNA を鋳型として，SAK59 をプライマーに用いて cDNA 合成を行った．この cDNA を鋳型に実験 2 ～ 実験 5 と同じプライマーの組み合わせ（SAK59 と SAK50，SAK59 と SAK51，SAK59 と SAK52，SAK59 と SAK57）で PCR 反応を行った（表 2-2）．PCR 反応は，実験 6 では変性 94℃ 1 分，アニーリング 47℃ 2 分，伸長反応 72℃ 2 分を 1 サイクルとし 50 サイクル行い，実験 7 では変性 94℃ 1 分，アニーリング 52℃ 2 分，伸長反応 72℃ 2 分を 1 サイクルとし 50 サイクル行った．PCR 反応後，PCR 反応生成物をアガロースゲル電気泳動で生成物の確認を行ったところ，実

験6, 実験7のいずれの実験でもSAK59とSAK52のプライマーの組み合わせで予想される長さ(478塩基対)のDNAの増幅が認められた。

実験8

実験8では, 実験6および実験7と同じcDNAを鋳型とし, 3組のプライマーの組み合わせ(SAK59とSAK50, SAK59とSAK51, SAK59とSAK52, SAK59とSAK57)でPCR反応を行った。アガロースゲル電気泳動でPCR反応生成物の確認を行ったところ, 予想される長さのDNAの増幅は認められなかった(表2-2)。

実験9～実験13

実験9～実験13では, 12週齢のニワトリの脳のmRNAおよび10日齢のニワトリの脳のmRNAを鋳型として, SAK56とSAK47, SAK56と50, SAK56とSAK51, SAK56とSAK57, SAK54と55, SAK49とSAK47, SAK48とSAK57, SAK48とSAK47のプライマーの組み合わせでPCR反応を行った(表2-2)。これらの反応では, アニール温度, 伸長反応時間を変えても, また12週齢および10日齢のニワトリの脳のmRNAを鋳型にしたcDNAのどちらでも目的の長さのDNA断片は得られなかった(表2-2)。

以上の結果, SAKプライマーのうちSAK55とSAK58の組み合わせ, SAK52とSAK59の組み合わせによるPCR反応において, cDNA断片と思われるものの増幅が認められた。このうちSAK52とSAK59PCRの組み合わせで, 反応の条件について検討したところ, アニール温度が47℃から55℃の間ではDNA断片の増幅に対するアニール温度の影響に一貫性は認められなかった(実験2～実験5)。また, 伸長反応の時間の变化も2分と3分とでは増幅効率に影響を与えなかった。(実験2～実験5)。

cDNAを合成する際, 鋳型となるニワトリのpoly A+mRNAは, 12週齢および10日齢のどちらを用いてもPCR反応によるDNAの増幅に差は認められなかつ

た（実験2～実験7）。

（3）クローニングされたcDNA断片の塩基配列の決定

前項の実験1においてSAK55とSAK58の組み合わせによって増幅されたDNA断片および実験2においてSAK52とSAK59の組み合わせによって増幅されたDNA断片がニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAに由来するものであることを確かめるため、それらが大腸菌にクローニングして得られたプラスミドクローンを各3個づつ任意に選び、以下の手順で塩基配列を決定した。

SAK55とSAK58による増幅の結果得られたDNA断片は、プラスミドベクターpUC18の*Bam*H Iおよび*Eco*R Iサイトの間に挿入されている。従ってまずM13シーケンスプライマー#1212および#1233を用い、プラスミドDNAを鋳型として塩基配列決定を行い、挿入されたDNA断片の両端からそれぞれ約220塩基対および約100塩基対の配列を決定した。ついで挿入されたDNA断片の*Hind*IIIサイトから*Bam*HIサイトまでの部分をM13mp18およびmp19ファージ⁵³⁾に再クローニングし、得られた一本鎖ファージDNAを鋳型として、DNA断片中央部の塩基配列を決定した（図2-5）。その結果、3つのプラスミドに含まれる挿入DNAの塩基配列は、完全に一致した。それを図2-6に示す。そこで、3つのクローンのうちの1つを任意に選び、プラスミドpSAK5558と名付け、以後の実験に用いた。

SAK52とSAK59による増幅の結果得られたDNA断片は、プラスミドベクターpUC18（*Xho*I）の*Xho*Iおよび*Bam*HIサイトに挿入されているDNA断片をM13mp18およびmp19ファージに再クローニングした。得られた一本鎖ファージDNAを鋳型として、DNA断片の全体の塩基配列を決定した。その結果、3つのプラスミドに含まれる挿入DNAの塩基配列は、完全に一致した。それを図2-9に示す。

プライマーSAK55およびSAK58の塩基配列は、それぞれマウス*c-kit*遺伝子cDNAの塩基配列の2174番目から2196番目、2666番目から2688番目に相当している（図2-1、図2-2）。従って、ニワトリの*c-kit*遺伝子のcDNAの塩基配列とマウスの*c-kit*遺伝子のcDNAの塩基配列の相同性が高ければ、SAK55とSAK58の組み合わせによって増幅されたcDNA断片の塩基配列は、マウスの*c-kit*遺伝子cDNAの塩基配列（2197番目から2665番目まで）と相同性が高いはずである。そしてこのマウスcDNA領域は、マウスKitタンパク質の724番目から878番目までのアミノ酸残基をコードしている。

pSAK5558にクローニングされたDNA断片が、ニワトリの*c-kit*遺伝子のcDNAの一部であるかどうかを確かめる目的で、その塩基配列とこれに対応するマウス*c-kit*遺伝子cDNAの配列とを比較した結果、図2-6に示したように、pSAK5558に含まれる挿入DNAの塩基配列は、マウスの*c-kit*遺伝子cDNAの塩基配列（2197番目から2665番目）と高い（75.9%）相同性を示した。

さらに、pSAK5558に含まれる挿入DNA部分の塩基配列をアミノ酸配列に読み変えたところ終止コドンがその中に出現しないアミノ酸読みとり枠（オープンリーディングフレーム）が1つあることがわかった（図2-7）。それから予想されるアミノ酸配列をマウスのKitタンパク質のアミノ酸配列（724番目から878番目）と比較したところ、非常に高い（85.9%）相同性が認められた（図2-8）。この結果は、pSAK5558にクローニングされたDNA断片がニワトリ*c-kit*遺伝子のcDNA由来であることを強く示唆するものである。

pSAK5259に含まれる挿入DNAの配列についてもpSAK5558と同様にマウス*c-kit*遺伝子cDNAの塩基配列との比較を行った（図2-9）。SAK52の塩基配列はマウスの*c-kit*遺伝子のcDNAの塩基配列の1751番目から1773番目に対応し、pSAK5558の塩基配列から作製したSAK59の塩基配列は、マウスの*c-kit*遺伝子cDNAの塩基配列の2204番目から2228番目に相当する。従って、pSAK5259

中の挿入DNAの塩基配列は，マウスの*c-kit*遺伝子cDNAの塩基配列の1174番目から2203番目までと相同性が高いことが予想される．図2-9に示すようにpSAK5259中の挿入DNAの塩基配列とマウス*c-kit*遺伝子cDNAの対応する領域の塩基配列との間に高い相同性（77.7%）が認められた．そしてこのマウス*c-kit*遺伝子cDNA領域（1174番目から2203番目）は，マウスKitタンパク質中の582番目から725番目のアミノ酸残基をコードしている．

さらにpSAK5259中に含まれる挿入DNAの塩基配列をアミノ酸に読み替えると読みとり枠が認められた（図2-10）．これをマウスKitタンパク質の583番目から725番目までのアミノ酸配列と比較したところ89.5%の相同性が認められた（図2-11）．

以上のことから，pSAK5259中の挿入DNAの塩基配列もニワトリ*c-kit*遺伝子cDNA由来であることが強く示唆された．

pSAK5558およびpSAK5259に含まれる挿入DNA配列はマウス*c-kit*遺伝子cDNA塩基配列のそれぞれ2197番目から2664番目および1774番目から2203番目に対応している．従って2つの挿入DNA配列がともにニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAに由来するものであるならば，この2つの配列は一部重複するはずである．実際に，pSAK5558の挿入DNA塩基配列中の1番目から7番目まで（図2-6）とpSAK5259の挿入DNA配列中の424番目から430番目まで（図2-9）の塩基配列は完全に一致している．さらに2つのDNA配列に認められたアミノ酸読みとり枠も連続していた．以上のことからpSAK5558およびpSAK5259はそれぞれニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAの一部であり，2つの挿入DNAを合わせると，ニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAのうち，マウス*c-kit*遺伝子cDNA中の1774番目から2664番目の塩基配列に相当する領域がクローニングされたと考えられる．

(4) サザンプロット解析

PCRで得られたpSAK5558に含まれるcDNAがニワトリの*c-kit*遺伝子のcDNAをクローニングするためのプローブとして有効であるかどうかをサザンプロットハイブリダイゼーションを行って確認した。

PCR反応によるDNAの増幅効率は極めて高いため、ごく少量の混入DNAに起因するDNA増幅が得られる可能性がある。従って得られたcDNA断片についてもそれがニワトリ由来のものであることを確認する必要がある。また、一般に真核細胞のゲノムDNAには、多くの反復配列が含まれており^{17,38)}、pSAK5558中の塩基配列にニワトリゲノムDNAの反復配列が含まれていないことを確認する必要がある。そこで、得られたpSAK5558中のcDNA断片がニワトリ由来であるかどうか、また、このcDNA断片の塩基配列がニワトリのゲノムDNAの中の反復配列を含まないかを、サザンプロットハイブリダイゼーションにより検討した。

pSAK5558を*EcoRI*および*HindIII*で消化した後アガロースゲル電気泳動で*c-kit*遺伝子cDNA部分を精製しプローブとした。このプローブを用い、ニワトリのゲノムDNAの、それぞれ*BamHI*、*EcoRI*、*EcoRI*および*BamHI*、*EcoRI*および*SaII*、*XbaI*による消化物のサザンプロットハイブリダイゼーションを行った。この結果、pSAK5558プローブは、*BamHI*では11kb、*EcoRI*では4.3および13kb、*EcoRI*および*BamHI*では2.4および9.0kb、*EcoRI*および*SaII*では4.3kb、*XbaI*では4.7、3.8および0.75kbの長さのバンドとハイブリダイズした(図2-12)。このプローブを用いてマウスのゲノムDNAとサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、バンドは認められなかった(櫻井未発表データ)。これらの事からpSAK5558に含まれるcDNA断片は、ニワトリ由来の遺伝子であること、また、それにはニワトリゲノムDNAの反復配列は含まれないことがわかった。よってpSAK5558に含まれるcDNA配列は、ニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAのスクリーニングを行うためのプローブとして有効であると考えられた。

II-4 考察

(1) PCRの結果について

16通りのプライマーの組み合わせでPCR反応を行った結果、SAK55とSAK58、SAK52とSAK59の2通りの組み合わせによってニワトリ*c-kit*遺伝子cDNA断片を増幅しクローニングする事ができた。プライマーがDNAを増幅したか否かは、プライマーの塩基配列がニワトリの*c-kit*遺伝子のcDNAの塩基配列と相同性が高いかどうかによって依存すると考えられるので、プライマーの塩基配列と第三章で述べるニワトリの*c-kit*遺伝子のcDNAの塩基配列との相同性を検討した。その結果、DNAを増幅したプライマーのニワトリ*c-kit*遺伝子との相同性は、SAK55が78%、SAK58が86%、SAK52が100%、SAK59が92%であった(図2-13)。特にいずれのプライマーも3'末端側の相同性が高く、3'末端から数えてSAK55は12塩基、SAK58は11塩基、SAK59は18塩基がニワトリcDNAの塩基配列と一致していた。また、SAK52はその塩基配列すべてがニワトリcDNA配列と一致していた。これらのプライマーの塩基配列がニワトリcDNAの配列と完全に一致していないのに増幅が認められるのは、PCR反応の温度サイクルのうちアニーリングの温度が42℃から55℃と低いためであると考えられる。またアニーリング温度がこの範囲内であるならば、温度変化はDNAの増幅にあまり影響しなかった(第二章3節(2)項)。

一方増幅しなかったものについては1. プライマーとmRNAの配列の相同性が低かった。2. プライマー間の長さが長いためPCR反応の効率が低かった。という2つの可能性が考えられる。cDNAが増幅されなかったプライマーとニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAとの相同性は、SAK47が66%、SAK48が61%、SAK49が57%、SAK50が73%、SAK51が65%、SAK56が85%、SAK57が47%だった(図2-13)。増幅したプライマーの組み合わせから、PCR反応を行うとき2つのプライマーが両方とも鋳型と高い相同性を示す必要があると考えられる。し

かしながら，SAK52とSAK58，SAK50とSAK59，SAK51とSAK59，SAK50とSAK56の組み合わせでは，両方のプライマーともに相同性が高かったにもかかわらず，cDNAの増幅が認められなかった。これらの組み合わせによって増幅されることが予想されるcDNA断片の長さは，それぞれ938塩基対，1359塩基対，1170塩基対，914塩基対であり，増幅が認められたSAK55とSAK58およびSAK52とSAK59の場合（それぞれ515塩基対，478塩基対）に比べて長い。従って，これらの組み合わせでcDNA断片の増幅が認められなかった理由として，増幅されるべきDNA断片の長さが長く，PCRによる増幅の効率が低かったことが考えられる。

（2）増幅したcDNA断片の塩基配列

結果（第II章3節（3）項）で述べたように，塩基配列およびそれから予想されるアミノ酸配列の比較から，pSAK5558およびpSAK5259中の2つの挿入DNAによってニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAのうち，マウス*c-kit*遺伝子cDNA配列の1774番目から2664番目に相当する領域がクローニングされたことが示唆された。Kitタンパク質はそのアミノ酸配列上の相同性から，コロニー成長活性化因子1受容体（CSF1-R）および血小板由来成長因子受容体（PDGF-R）とともに受容体型チロシンリン酸化酵素サブクラスIIIの一員とされており⁶¹⁾，この3つのタンパク質は部分的に高いアミノ酸配列の相同性を示す。そこでPCRによって増幅・クローニングされた二つのDNA断片がニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAの一部であることをさらに確認するため，それらの塩基配列から予想されるアミノ酸配列をマウスKit，CSF1-RおよびPDGF-Rタンパク質のアミノ酸配列^{43,58)}と比較した。

多種類のチロシンリン酸化酵素間のアミノ酸配列の比較およびそれらの酵素の機能解析の結果から，マウスKitタンパク質中の586番目から929番目までのア

ミノ酸配列がこのタンパク質の持つリン酸化活性に関与する部分（リン酸化酵素領域）であることが示唆されている¹³⁾。またこの領域内の、686番目から761番目までのアミノ酸配列は*c-kit*などの受容体型チロシンリン酸化酵素サブクラスⅢに特有の領域（カイネース・インサート領域）であり、他のチロシンリン酸化酵素はこれに対応する領域を持たないことが示されている³⁹⁾。PCRによって増幅された2つのDNA断片によってクローニングされたと考えられるニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAの領域に対応するマウス*Kit*遺伝子cDNAの領域（1774番目から2664番目）は、マウス*Kit*タンパク質の583番目から878番目までのアミノ酸残基をコードしており、この領域にはマウス*Kit*タンパク質中のリン酸化酵素領域のアミノ末端側（586番目から685番目までのアミノ酸配列）、カイネース・インサート領域（686番目から761番目）およびリン酸化酵素領域のカルボキシル末端側の一部（762番目から878番目）が含まれる。そこで2つのDNA断片の塩基配列から予想されるアミノ酸配列をマウス*Kit*、CSF1-R、PDGF-Rタンパク質中の対応する領域のアミノ酸配列と比較した（図2-14）。図から分かるように、2つのDNA断片から予想されるアミノ酸配列（ニワトリ配列と略称する）は、リン酸化酵素領域（ニワトリ配列の4番目から103番目まで、および180番目から296番目まで）においては3つのマウスタンパク質の配列のいずれとも高い相同性を示すのに対し、カイネース・インサート領域（ニワトリ配列の104番目から179番目）においてはニワトリ配列とマウス*Kit*タンパク質の配列との間においてのみ高い相同性が認められ（65.7%）、PDGF-R、CSF1-Rのそれとの間には、はっきりした相同性が認められなかった。

以上のことから、PCRによって増幅・クローニングされた2つのDNA断片は、ニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAの一部であると結論した。

(3) サザンブロット解析による考察

プラスミドSAK5558中のcDNA部分をプローブとしてニワトリゲノムDNAのサザンブロット分析を行った結果、そのcDNA部分の配列は、ニワトリ由来であり、ニワトリのDNAの中でも*c-kit*特有の塩基配列で、反復配列は含まないと結論できる。

以上の結果から、pSAK5558に含まれるcDNAが、ニワトリの*c-kit*遺伝子cDNAの一部であり、ニワトリ*c-kit*遺伝子クローニングのためのスクリーニングのプローブとして有用であることが示された。

表2-1.各プライマーの組み合わせにおいて

PCRで増幅が予想されるDNA断片の長さ

| プライマー の組み合わせ | PCRで増幅が予想される DNA断片の長さ |
|-----------------|--------------------------|
| SAK48-SAK57 | 812塩基対 |
| SAK49-SAK57 | 989塩基対 |
| SAK54-SAK55 | 578塩基対 |
| SAK56-SAK47 | 1767塩基対 |
| SAK56-SAK50 | 915塩基対 |
| SAK56-SAK51 | 726塩基対 |
| SAK56-SAK57 | 1680塩基対 |
| SAK58-SAK52 | 938塩基対 |
| SAK58-SAK55 | 515塩基対 |
| SAK59-SAK50 | 1348塩基対 |
| SAK59-SAK51 | 1159塩基対 |
| SAK59-SAK52 | 478塩基対 |
| SAK59-SAK57 | 2113塩基対 |

表2-2. PCR反応の条件および結果

| 実験NO. | 鋳型cDNA | | PCR | | | 結果 ^{b)} | |
|-------|-------------|-------------------------------|---------------------|-------------|-------|------------------|------|
| | ニトリ mRNA | cDNA合成 ^{a)} プライマー | プライマー ^{a)} | PCR反応 温度 | 時間 | | サイクル |
| 実験1 | 12週齢 脳 mRNA | 48 | 48-57 | 94°C | 1min. | 50 | NSB |
| | | 49 | 49-57 | 42°C | 2min. | | NSB |
| | | 56 | 56-51 | 72°C | 3min. | | NSB |
| | | 58 | 58-52 | | | | NSB |
| | | 58 | 58-55 | | | | ES |
| 実験2 | 12週齢 脳 mRNA | 59 | 59-50 | 92°C | 1min. | 50 | NSB |
| | | 59 | 59-51 | 48°C | 2min. | | NSB |
| | | 59 | 59-52 | 72°C | 3min. | | ES |
| | | 59 | 59-57 | | | | NSB |
| 実験3 | 12週齢 脳 mRNA | 59 | 59-50 | 94°C | 1min. | 50 | NSB |
| | | 59 | 59-51 | 52°C | 2min. | | NSB |
| | | 59 | 59-52 | 72°C | 2min. | | ES |
| | | 59 | 59-57 | | | | NSB |
| 実験4 | 12週齢 脳 mRNA | 59 | 59-50 | 94°C | 1min. | 50 | NSB |
| | | 59 | 59-51 | 55°C | 2min. | | NSB |
| | | 59 | 59-52 | 72°C | 2min. | | ES |
| | | 59 | 59-57 | | | | NSB |
| 実験5 | 12週齢 脳 mRNA | 59 | 59-50 | 94°C | 1min. | 50 | NSB |
| | | 59 | 59-51 | 47°C | 2min. | | NSB |
| | | 59 | 59-52 | 72°C | 2min. | | ES |
| 実験6 | 10日齢 脳 mRNA | 59 | 59-50 | 94°C | 1min. | 50 | NSB |
| | | 59 | 59-51 | 47°C | 2min. | | NSB |
| | | 59 | 59-52 | 72°C | 2min. | | ES |
| | | 59 | 59-57 | | | | NSB |
| 実験7 | 10日齢 脳 mRNA | 59 | 59-50 | 94°C | 1min. | 50 | NSB |
| | | 59 | 59-51 | 52°C | 2min. | | NSB |
| | | 59 | 59-52 | 72°C | 2min. | | ES |
| | | 59 | 59-57 | | | | NSB |
| 実験8 | 10日齢 脳 mRNA | 59 | 59-50 | 94°C | 1min. | 50 | ND |
| | | 59 | 59-51 | 42°C | 2min. | | ND |
| | | 59 | 59-57 | 72°C | 2min. | | ND |

次ページに続く

(表2-2の続き)

| | | | | | | |
|------|-------------|----|-------|------------------|----|-----|
| 実験9 | 12週齢 脳 mRNA | 56 | 56-50 | 94°C 1min. | 50 | NSB |
| | | 56 | 56-51 | 48°C 2min. | | NSB |
| | | 56 | 56-57 | 72°C 2min. | | NSB |
| | | 54 | 54-55 | | | NSB |
| 実験10 | 12週齢 脳 mRNA | 56 | 56-50 | 94°C 1min. | 50 | NSB |
| | | 56 | 56-51 | 52°C 2min. | | NSB |
| | | 56 | 56-57 | 72°C 2min. | | NSB |
| 実験11 | 12週齢 脳 mRNA | 56 | 56-51 | 94°C 1min. | 50 | NSB |
| | | | | 52°C 2min. | | NSB |
| | | | | 72°C 2min. | | NSB |
| 実験12 | 10日齢 脳 mRNA | 56 | 56-50 | 94°C 1min. | 50 | ND |
| | | 56 | 56-51 | 47°C 2min. | | ND |
| | | 56 | 56-57 | 72°C 2min. | | ND |
| | | 56 | 56-47 | | | ND |
| 実験13 | 10日齢 脳 mRNA | 56 | 56-50 | 94°C 40sec. | 40 | NSB |
| | | | | 50°C 2min. | | NSB |
| | | | | 72°C 3min. | | NSB |
| | | | | 40 cycles終了後 | | NSB |
| | | | | ↓ 72°C 15min. | | |

a: プライマーはいずれもSAKの番号を表す.

b: NSB: 非特異的DNAの増幅, ND: DNAの増幅が検出されなかった, ES: 予想した長さのDNAの増幅が認められた

| | | | | | |
|--------|--------|---|--------------|------|--|
| | | <i>Xho</i> I | | | <i>Bam</i> HI |
| SAK47 | (5') | ATGAGAGGCGCTCG <u>AGGCGCCTGG</u> (3') | SAK54* | (5') | TCAG <u>GAT</u> CCCCAGCAAGTCTTCAT (3') |
| | | M R G A R G A W | | | D A D W C T K M |
| Mouse | (29) | ATGAGAGGCGCTCGGCGCGCCTGG | Mouse (2751) | | TCAGCGTCCCAGCAAGTCTTCAT |
| Human | (22) | ----- | Human (2750) | | --T--A----- |
| | | <i>Eco</i> RI | | | <i>Eco</i> RI |
| SAK48* | (5') | CCAAAAG <u>A</u> TTCTTGGCATAACACAT (3') | SAK55 | (5') | TCAAATGAAT <u>TCATGGACATGAA</u> (3') |
| | | G F T N N A Y C M | | | S N E Y M D M K |
| Mouse | (927) | CCAAAAGTATTCTTGGCATAACACAT | Mouse (2174) | | TCAAATGAATATATGGACATGAA |
| Human | (911) | ----- | Human (2173) | | A-T-----G--C----- |
| | | <i>Bam</i> HI | | | <i>Hind</i> III |
| SAK49* | (5') | GCCG <u>G</u> ATCCTGTTCATATATATCCA (3') | SAK56* | (5') | ACT <u>A</u> GC <u>T</u> GTTTCTGGGAAACTCCCA (3') |
| | | A S T R N M Y I W | | | S L R N R P F E W |
| Mouse | (1104) | GCCGAGGTCCTGTTCATATATATCCA | Mouse (1795) | | ACTCAGCCTGTTTCTGGGAAACTCCCA |
| Human | (1088) | -TGA----T-----G----- | Human (1791) | | ----- |
| | | <i>Bam</i> HI | | | <i>Bam</i> HI |
| SAK50 | (5') | GTTGA <u>G</u> AT <u>C</u> TGGAGTGTTCATGTG (3') | SAK57 | (5') | AGTCCAGGGGA <u>T</u> CCGTCTCCGCC (3') |
| | | V D D S G V F M C | | | S P G E P S P P |
| Mouse | (881) | GTTGACGATTCTGGAGTGTTCATGTG | Mouse (116) | | AGTCCAGGGGAGCCGTCTCCGCC |
| Human | (865) | ---A-T----- | Human (109) | | -----A----- |
| | | <i>Pvu</i> II | | | <i>Bam</i> HI |
| SAK51 | (5') | CACCAGC <u>T</u> GTGGATATATATGAA (3') | SAK58* | (5') | ATCCGG <u>G</u> ATCCTTCCTTGATCAT (3') |
| | | H Q Q W I Y M N | | | M R F G E K I M |
| Mouse | (1070) | CACCAGCAGTGGATATATATGAA | Mouse (2688) | | ATCCGGAAGCCTTCCTTGATCAT |
| Human | (1054) | -----C----- | Human (2687) | | ----- |
| | | <i>Bcl</i> I | | | <i>Xho</i> I |
| SAK52 | (5') | CTTCCTTATGATCACAAATGGGA (3') | SAK59* | (5') | <u>GGCTCG</u> AGGGGAACAGCATATGACAC (3') |
| | | L P Y D H K W E | | | |
| Mouse | (1751) | CTTCCTTATGATCACAAATGGGA | Mouse (2163) | | CTTTTGGGGGAACAGCATATGACAC |
| Human | (1747) | ----- | | | |

図2-1 PCR用プライマーの塩基配列

PCR反応によるcDNA増幅に用いたプライマーの塩基配列を示す。各プライマー(SAK47-SAK58)の配列の下には参考のためにそれに対応するマウスおよびヒト*c-kit*遺伝子cDNAの塩基配列(各cDNA中での配列の位置は括弧内に表示した)を示した。ヒトcDNA配列中のハイフォンはマウスのcDNA配列と同じ塩基であることを示す。ニワトリcDNAの塩基配列に基づいて合成したプライマーSAK59については、ニワトリcDNAの配列を付した。またマウスcDNAの配列によってコードされているアミノ酸配列をマウスcDNA配列の上に一文字記号によって示した。アスタリスクを付したプライマーはmRNAに相補的な配列を持つ。プライマーに制限酵素切断部位を導入するためマウスcDNA(SAK59についてはニワトリcDNA)の配列を変更した箇所は下線を記して示した。プライマーの上に記した制限酵素名はプライマー中の制限酵素切断部位を示す。

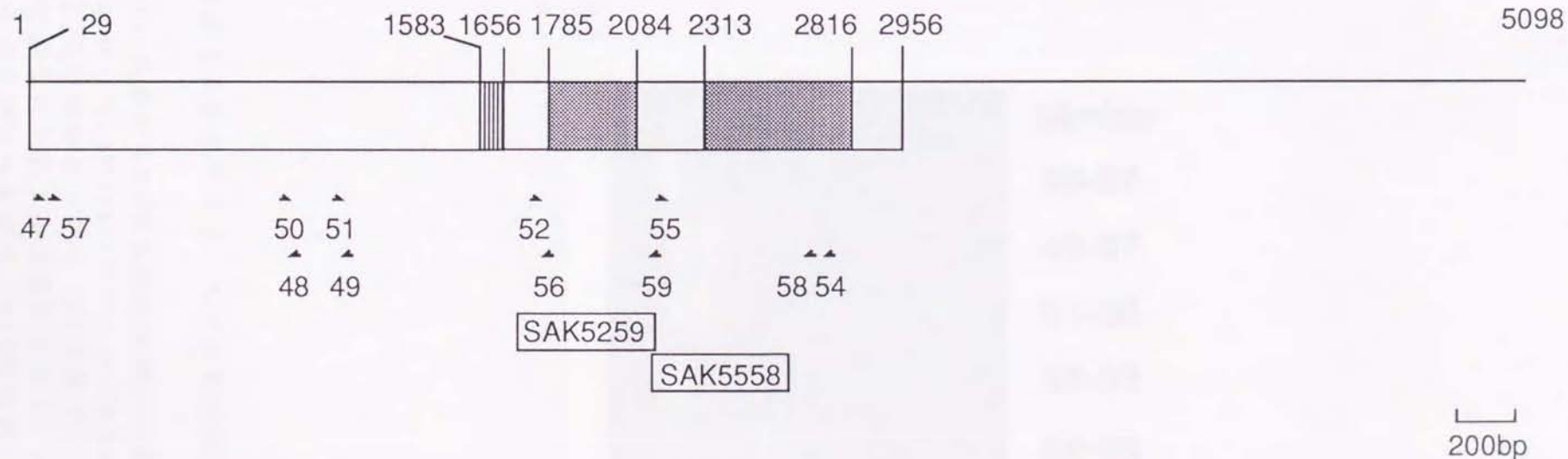


図2-2 PCR用プライマーのマウス*c-kit*遺伝子cDNAにおける位置

上段の実線はマウス*c-kit*遺伝子cDNAの塩基配列を表す。そのうちKitタンパク質をコードする領域を白抜き長方形で示す。マウスKitタンパク質のトランスメンブレン領域をストライプで、リン酸化酵素領域は網掛けで示す。また、それらの境界の塩基およびアミノ酸残基の番号を上に表示した。マウスの*c-kit*遺伝子cDNAの塩基配列に基づき作製したPCR用プライマー(SAK47-SAK59)の配列に対応する箇所を矢印で示した。矢印の方向はプライマーの塩基配列の5'端から3'端の方向を表す。プライマーの番号を矢印の上に表示した。SAK52とSAK58およびSAK52およびSAK59の組合せによってPCRで増幅されたcDNA断片の位置を白抜き長方形(pSAK5558およびpSAK5259)で示す。

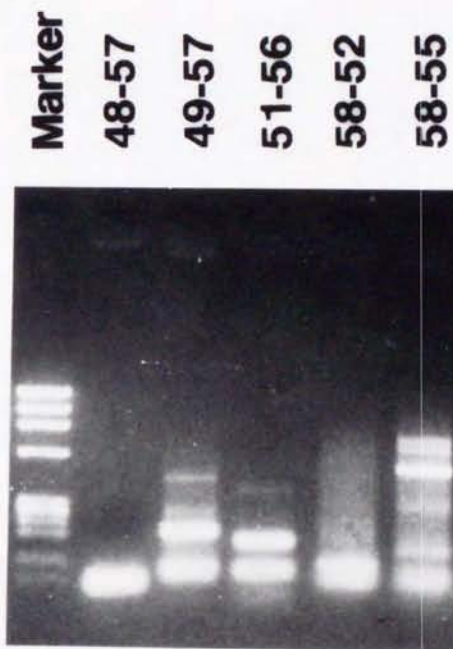


図2-3 PCR反応生成物のアガロースゲル電気泳動による分析

(実験1) におけるPCR反応生成物の一部を0.8%アガロースゲル電気泳動で分析した。Markerのレーンは ϕ X174ファージDNAのHaeIII消化物を、その他のレーンは、PCR用プライマーのそれぞれの組合せ(番号で示した)による生成物である。この結果、SAK55とSAK58の組合せで予想される長さ(515塩基対)のDNA断片の増幅が認められた(黒丸)。

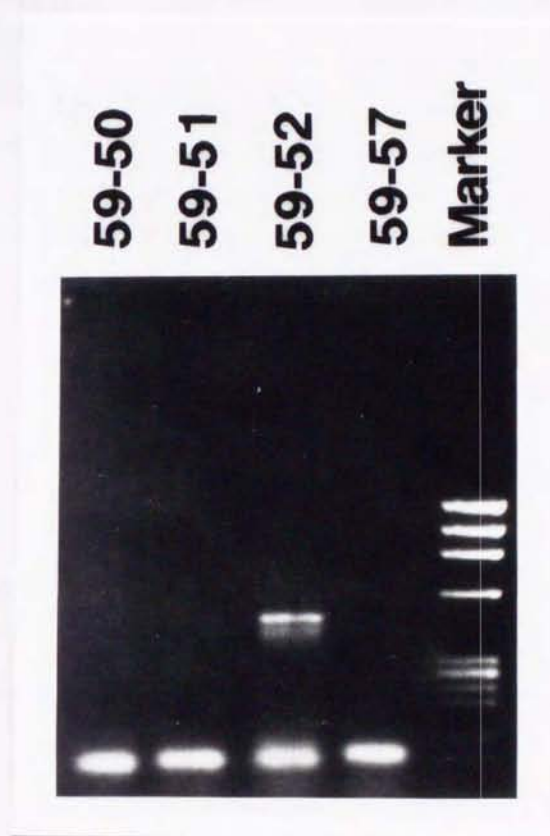


図2-4 PCR反応生成物のアガロースゲル電気泳動による分析

(実験2)におけるPCR反応生成物の一部を0.8%アガロースゲル電気泳動で分析した。Markerのレーンは ϕ X174ファージDNAのHaeIII消化物を、その他のレーンは、PCR用プライマーのそれぞれの組合せ(番号で示した)により生成物である。この結果、SAK52とSAK59の組合せで予想される長さ(478塩基対)のDNA断片の増幅が認められた。

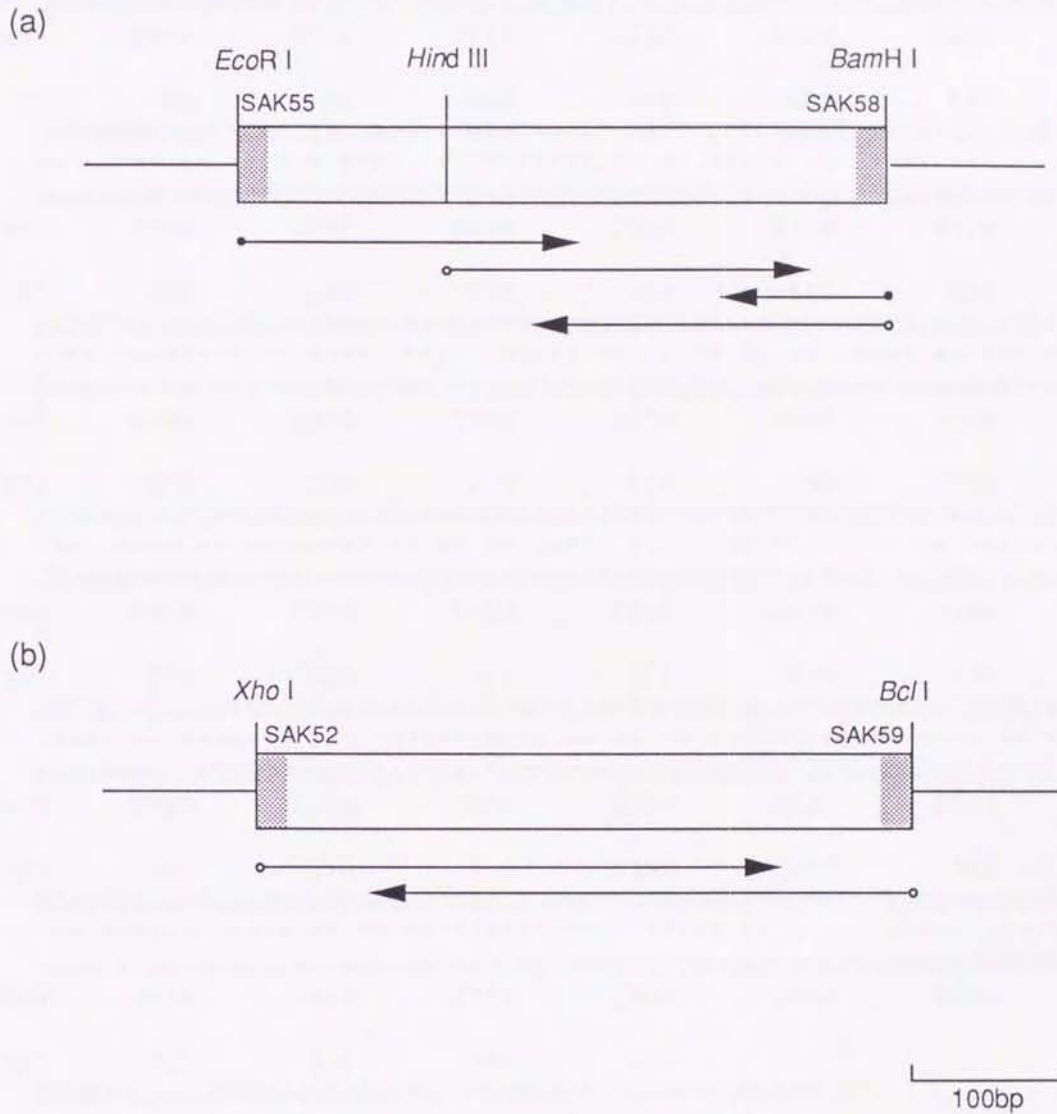


図2-5 pSAK5558 (a) およびpSAK5259 (b) 中の挿入DNAの塩基配列決定ストラテジー

プライマーSAK55とSAK58の組合せで行ったPCR反応で増幅したDNAを挿入したプラスミドpSAK5558 (a) およびSAK52とSAK59の組合せで増幅したDNAを挿入したプラスミドpSAK5259 (b) 中に含まれるDNAを白抜き長方形で表す。PCRに用いたプライマーの配列の部分に網掛けで表す。実線はそれぞれのベクターのDNA部分を表す。増幅したDNA配列中の制限酵素切断部位は其上に付した。黒丸付きの矢印はプラスミドDNAを鋳型として決定した塩基配列を示し、白抜き丸付きの矢印は、M13ファージDNAを鋳型として決定した塩基配列を示す。

```

1      10      20      30      40      50      60      70
5' ACCAGGAGTGCATATGCTGTTCCCCAAAAGCTGATAAAAAAAGCCGGTCAAATCTGGATCTTACACC
   ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
5' GCCTGGCGTTTCCCTACGTGGTGCCAACCAAGACAGACAAGAGGAGATCCGCAAGAATAGACTCGTACATA
2197   2206   2216   2226   2236   2246   2256   2266

71     80     90     100    110    120    130    140
GATCAGGATGTTACCCCTTCCATGTTGGAAGATGACGAACCTGCTCTAGATGTTGAAGATCTATTAAGCT
**   ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
GAAAGAGACGTGACTCCTGCCATCATGGAAGATGACGAGCTGGCTCTGGACCTGGATGATTTGCTGAGCT
2267   2276   2286   2296   2306   2316   2326   2336

141    150    160    170    180    190    200    210
TCTCTTACCAGGTGGCAAAGGGCATGAGCTTCTGGCCTCTAAAAACTGCATTCATAGGGATCTGGCAGC
**** ***** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
TCTCCTACCAGGTGGCAAAGGGCATGGCGTTCCTCGCCTCCAAGAATTGTATTCACAGAGATTTGGCAGC
2337   2346   2356   2366   2376   2386   2396   2406

211    220    230    240    250    260    270    280
AAGAAATATTCTTCTCACTCATGGTCAATAACAAAAATCTGTGACTTTGGTCTGGCAAGAGATATAAGG
** ***** ** ***** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
CAGGAATATCCTCCTCACTCACGGGCGGATCACAAAGATTTGCGATTTGGGCTAGCCAGAGACATCAGG
2407   2416   2426   2436   2446   2456   2466   2476

281    290    300    310    320    330    340    350
AATGACTCAAATTACGTGGTTAAAGGAAATGCTCGTCTCCCTGTGAAGTGGATGGCACCTGAAAGCATT
***** ** ***** ***** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
AATGATTCAATTACGTGGTCAAAGGAAATGCACGACTGCCCGTGAAGTGGATGGCACCAGAGAGCATT
2477   2486   2496   2506   2516   2526   2536   2546

351    360    370    380    390    400    410    420
TCAACTGCGTTTACACCTTCGAGAGTGATGTCTGGTCTTATGGAATATTGCTTTGGGAACCTTCTCCTT
*** ***** ***** ** ** ***** ***** ** ** * ** * ** * ** * ** *
TCAGCTGCGTGTACACATTTGAAAGTGATGTCTGGTCTTATGGGATTTTCTCTGGGAGCTTCTCCTT
2547   2556   2566   2576   2586   2596   2606   2616

421    430    440    450    460
AGGAAGCAGCCCTTACCCAGGGATGCCCGTGGACTCCAAGTTCTATAAA 3'
***** ***** ** ***** **
AGGAAGCAGCCCTTACCCAGGGATGCCCGTGGACTCCAAGTTCTACAAG 3'
2617   2626   2636   2646   2656

```

図2-6 pSAK5558に挿入されたDNA断片の塩基配列とマウスの*c-kit*遺伝子cDNAの塩基配列との比較。

各上段はpSAK5558に挿入されたDNA断片の塩基配列を示す。塩基配列の5'端はSAK55側，3'端はSAK58側である。各下段はマウス*c-kit*遺伝子cDNAの塩基配列（2197番目から2665番目）を示す。アスタリスクはpSAK5558に挿入されたDNA断片の塩基配列とマウスの*c-kit*遺伝子cDNAの塩基配列の塩基が一致していることを示す。

```

5' ACC AGG AGT GTC ATA TGC TGT TCC CCC AAA AGC TGA TAA AAA AAG GCC GGT GAA
-----
T R S V I C C S P K S * * K K A G E
P G V S Y A V P P K A D K K R P V K
Q E C H M L F P Q K L I K K G R * N

          63          72          81          90          99          108
ATC TGG ATC TTA CAC CGA TCA GGA TGT TAC CCT TTC CAT GTT GGA AGA TGA CGA
-----
I W I L H R S G C Y P F H V G R * R
S G S Y T D Q D V T L S M L E D D E
L D L T P I R M L P F P C W K M T N

          117          126          135          144          153          162
ACT TGC TCT AGA TGT TGA AGA TCT ATT AAG CTT CTC TTA CCA GGT GGC AAA GGG
-----
T C S R C * R S I K L L L P G G K G
L A L D V E D L S F S Y Q V A K G
L L * M L K I Y * A S L T R W Q R A

          171          180          189          198          207          216
CAT GAG CTT CCT GGC CTC TAA AAA CTG CAT TCA TAG GGA TCT GGC AGC AAG AAA
-----
H E L P G L * K L H S * G S G S K K
M S F L A S K N C I H R D L A A R N
* A S W P L K T A F I G I W Q Q E I

          225          234          243          252          261          270
TAT TCT TCT CAC TCA TGG TCG AAT AAC AAA AAT CTG TGA CTT TGG TCT GGC AAG
-----
Y S S H S W S N N K N L * L W S G K
I L L T H G R I T K I C D F G L A R
F F S L M V E * Q K S V T L V W Q E

          279          288          297          306          315          324
AGA TAT AAG GAA TGA CTC AAA TTA CGT GGT TAA AGG AAA TGC TCG TCT CCC TGT
-----
R Y K E * L K L R G * R K C S S P C
D I R N D S N Y V V K G N A R L P V
I * G M T Q I T W L K E M L V S L *

          333          342          351          360          369          378
GAA GTG GAT GGC ACC TGA AAG CAT TTT CAA CTG CGT TTA CAC CTT CGA GAG TGA
-----
E V D G T * K H F Q L R L H L R E *
K W M A P E S I F N C V Y T F E S D
S G W H L K A F S T A F T P S R V M

          387          396          405          414          423          432
TGT CTG GTC TTA TGG AAT ATT GCT TTG GGA ACT CTT CTC CTT AGG AAG CAG CCC
-----
C L V L W N I A L G T L L L R K Q P
V W S Y G I L L W E L F S L G S S P
S G L M E Y C F G N S S P * E A A L

          441          450          459          468
TTA CCC AGG GAT GCC CGT GGA CTC CAA GTT CTA TAA A 3'
-----
L P R D A R G L Q V L *
Y P G M P V D S K F Y K
T Q G C P W T P S S I

```

図2-7 pSAK5558に挿入されたDNA断片の塩基配列のアミノ酸への翻訳

pSAK5558に挿入されたDNA断片の塩基配列を全ての読みとり枠でアミノ酸配列に読み変えた結果、終止コドンの出現しない読みとり枠（下線で示す）が1つ認められた。アミノ酸残基は一文字記号で示した。

| | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 |
| N- PGVSYAVPPKADKKRPVKSGSYTDQDVTLMSLEDELALDVEDLLSFSYQVAKGMSFLASKNCIHRDLAA | | | | | | | |
| ***** ** * * * * * ** *** ***** ***** * ***** | | | | | | | |
| N- PGVSYVVP TKTKRRSARIDS YIERDVTPA IMEDDELALD LDDLLSFSYQVAKAMAFLASKNCIHRDLAA | | | | | | | |
| 724 | 733 | 743 | 753 | 763 | 773 | 783 | 793 |
| | | | | | | | |
| 71 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 |
| RNILLTHGRITKICDFGLARDIRNDSNYVVKGNARLPVKWMAPESIFNCVYTFESDVWSYGILLWELFSL | | | | | | | |
| ***** | | | | | | | |
| RNILLTHGRITKICDFGLARDIRNDSNYVVKGNARLPVKWMAPESIFSCVYTFESDVWSYGIFLWELFSL | | | | | | | |
| 794 | 803 | 813 | 823 | 833 | 843 | 853 | 863 |
| | | | | | | | |
| 141 | 150 | | | | | | |
| GSSPYPGMPVDSKFKYK -C | | | | | | | |
| ***** | | | | | | | |
| GSSPYPGMPVDSKFKYK -C | | | | | | | |
| 864 | 873 | | | | | | |

図2-8 pSAK5558に挿入されたDNA断片の塩基配列から予想されるアミノ酸配列とマウスKitタンパク質のアミノ酸配列との比較

各上段がpSAK5558に挿入されたDNA断片の塩基配列から予想されるアミノ酸配列を一文字記号で示した。各下段はマウスKitタンパク質のアミノ酸配列(724番目から879番目)を示す。アスタリスクは、pSAK5558のアミノ酸配列とマウスKitタンパク質のアミノ酸配列が一致したことを示す。

```

1      10      20      30      40      50      60      70
5' GTTTCCTAGAAACCGGTTGAGTTTTGGTAAAACCCCTGGTGCTGGAGCTTTTGGAAAGGTTGTTGAAGCC
***** ***** ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
5' GTTTCCTAGAAACCGGTTGAGTTTTGGTAAAACCCCTGGTGCTGGAGCTTTTGGAAAGGTTGTTGAAGCC
1774 1783 1793 1803 1813 1823 1833 1843

71      80      90      100     110     120     130     140
ACTGCTTATGGCCTATTTAAATCTGATGCCGCTATGACAGTAGCAGTGAAAATGTTGAAACCAAGCGCCC
***** ***** * ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** * ***** *****
ACTGCATATGGCTTGATTAAGTCGGATGCTGCCATGACAGTTGCCGTGAAGATGCTCAAACCAAGTGCCC
1844 1853 1863 1873 1883 1893 1903 1913

141     150     160     170     180     190     200     210
ATTTAACTGAAAGAGAAGCCTTGATGTCAGAGCTAAAAGTTCTCAGTTACCTTGGAACCAACATTAATAT
***** ***** ** * ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
ATTTAACAGAAAGAGAGGCCCTAATGTCGGAAGTGAAGGTCCTGAGCTACCTGGGCAATCACATGAATAT
1914 1923 1933 1943 1953 1963 1973 1983

211     220     230     240     250     260     270     280
TGTGAATCTACTTGGAGCTTGCACCTATTGGAGGGCCACGCTGGTCATTACAGAATATTGCTGCTATGGC
***** ** ***** ** ***** * ***** ***** ***** ***** *****
TGTGAACCTGCTTGGCGCATGCACGGTGGGAGGGCCACCCTGGTCATTACAGAATATTGTTGCTATGGT
1984 1993 2003 2013 2023 2033 2043 2053

281     290     300     310     320     330     340     350
GATCTCTTAAATTTCTGAGGCGGAAGCGAGATTCATTCATTTGTCCAAAGCATGAAGAGCACGCAGAAG
***** ** ***** ***** ***** ** * ** * ** * ***** ***** *****
GATCTTTTGAATTTTTTGAAGAAGCGTGAAGGTCGTTATTTTCTCAAAGCAAGAAGAGCAGGCAGAAG
2054 2063 2073 2083 2093 2103 2113 2123

351     360     370     380     390     400     410     420
CAGCTGTTTATGAGAACCTTTTGCACCAGGCAGAGCCCACAGCGGATGCTGTCAATGAGTACATGGACAT
* ** ***** ***** ***** * ***** * ** * ***** ** *****
CGGCACTTTATAAGAACCTTCTGCACTCAACGGAGCCTTCCTGTGACAGTTCAAATGAATATATGGACAT
2124 2133 2143 2153 2163 2173 2183 2193

421     430
GAAACCAGGA 3'
*** ** **
GAAGCCTGGC 3'
2194 2203

```

図2-9 pSAK5259に挿入されたDNA断片の塩基配列とマウスの*c-kit*遺伝子cDNAの塩基配列との比較。

各上段はpSAK5259に挿入されたDNA断片の塩基配列を示す。塩基配列の5'端はSAK52側、3'端はSAK59側である。各下段はマウス*c-kit*遺伝子cDNAの塩基配列（1774番目から2203番目）を示す。アスタリスクはpSAK5259に挿入されたDNA断片の塩基配列とマウスの*c-kit*遺伝子cDNAの塩基配列の塩基が一致していることを示す。

```

5'  GTT TCC TAG AAA CCG GTT GAG TTT TGG TAA AAC CCT TGG TGC TGG AGC TTT TGG
    V  S  *  K  P  V  E  F  W  *  N  P  W  C  W  S  F  W
    F  P  R  N  R  L  S  F  G  K  T  L  G  A  G  A  F  G
    F  L  E  T  G  *  V  L  V  K  P  L  V  L  E  L  L  E

    63      72      81      90      99      108
AAA GGT TGT TGA AGC CAC TGC TTA TGG CCT ATT TAA ATC TGA TGC CGC TAT GAC
    K  G  C  *  S  H  C  L  W  P  I  *  I  *  C  R  Y  D
    K  V  V  E  A  T  A  Y  G  L  F  K  S  D  A  A  M  T
    R  L  L  K  P  L  L  M  A  Y  L  N  L  M  P  L  *  Q

    117      126      135      144      153      162
AGT AGC AGT GAA AAT GTT GAA ACC AAG CGC CCA TTT AAC TGA AAG AGA AGC CTT
    S  S  S  E  N  V  E  T  K  R  P  F  N  *  K  R  S  L
    V  A  V  K  M  L  K  P  S  A  H  L  T  E  R  E  A  L
    *  Q  *  K  C  *  N  Q  A  P  I  *  L  K  E  K  P  *

    171      180      189      198      207      216
GAT GTC AGA GCT AAA AGT TCT CAG TTA CCT TGG TAA CCA CAT TAA TAT TGT GAA
    D  V  R  A  K  S  S  Q  L  P  W  *  P  H  *  Y  C  E
    M  S  E  L  K  V  L  S  Y  L  G  N  H  I  N  I  V  N
    C  Q  S  *  K  F  S  V  T  L  V  T  T  L  I  L  *  I

    225      234      243      252      261      270
TCT ACT TGG AGC TTG CAC TAT TGG AGG GCC CAC GCT GGT CAT TAC AGA ATA TTG
    S  T  W  S  L  H  Y  W  R  A  H  A  G  H  Y  R  I  L
    L  L  G  A  C  T  I  G  G  P  T  L  V  I  T  E  Y  C
    Y  L  E  L  A  L  L  E  G  P  R  W  S  L  Q  N  I  A

    279      288      297      306      315      324
CTG CTA TGG CGA TCT CTT AAA TTT CCT GAG GCG GAA GCG AGA TTC ATT CAT TTG
    L  L  W  R  S  L  K  F  P  E  A  E  A  R  F  I  H  L
    C  Y  G  D  L  L  N  F  L  R  R  K  R  D  S  F  I  C
    A  M  A  I  S  *  I  S  *  G  G  S  E  I  H  S  F  V

    333      342      351      360      369      378
TCC AAA GCA TGA AGA GCA CGC AGA AGC AGC TGT TTA TGA GAA CCT TTT GCA CCA
    S  K  A  *  R  A  R  R  S  S  C  L  *  E  P  F  A  P
    P  K  H  E  E  H  A  E  A  A  V  Y  E  N  L  L  H  Q
    Q  S  M  K  S  T  Q  K  Q  L  F  M  R  T  F  C  T  R

    387      396      405      414      423
GGC AGA GCC CAC AGC GGA TGC TGT CAA TGA GTA CAT GGA CAT GAA ACC AGG A 3'
    G  R  A  H  S  G  C  C  Q  *  V  H  G  H  E  T  R
    A  E  P  T  A  D  A  V  N  E  Y  M  D  M  K  P  G
    Q  S  P  Q  R  M  L  S  M  S  T  W  T  *  N  Q

```

図2-10 pSAK5259に挿入されたDNA断片の塩基配列のアミノ酸への翻訳

pSAK5259に挿入されたDNA断片の塩基配列を全ての読みとり枠でアミノ酸配列に読み変えた結果、終止コドンの出現しない読みとり枠（下線で示す）が1つ認められた。アミノ酸残基は一文字記号で示した。

```

1      10      20      30      40      50      60      70
N- FPRNRLSFGKTLGAGAFGKVVVEATAYGLFKSDAAMTVAVKMLKPSAHLTEREALMSELKVLVSYLGNHINI
*****
N- FPRNRLSFGKTLGAGAFGKVVVEATAYGLIKSDAAMTVAVKMLKPSAHLTEREALMSELKVLVSYLGNHMNI
583      592      602      612      622      632      642      652

71      80      90      100      110      120      130      140
VNLLGACTIGGPTLVITEYCCYGDLLNFLRRKRDSFICPKHEEHAEAAVYENLLHQAEPTADAVNEYMDM
*****
VNLLGACTVGGPTLVITEYCCYGDLLNFLRRKRDSFIFSKQEEQAEAAALYKNLLHSTEPSCDSSNEYMDM
653      662      672      682      692      702      712      722

141
KPG -C
***
KPG -C
723

```

図2-11 pSAK5259に挿入されたDNA断片の塩基配列から予想されるアミノ酸配列とマウスKitタンパク質のアミノ酸配列との比較

各上段がpSAK5259に挿入されたDNA断片の塩基配列から予想されるアミノ酸配列を一文字記号で示した。各下段はマウスKitタンパク質のアミノ酸配列(583番目から725番目)を示す。アスタリスクは、pSAK5259のアミノ酸配列とマウスKitタンパク質のアミノ酸配列が一致したことを示す。

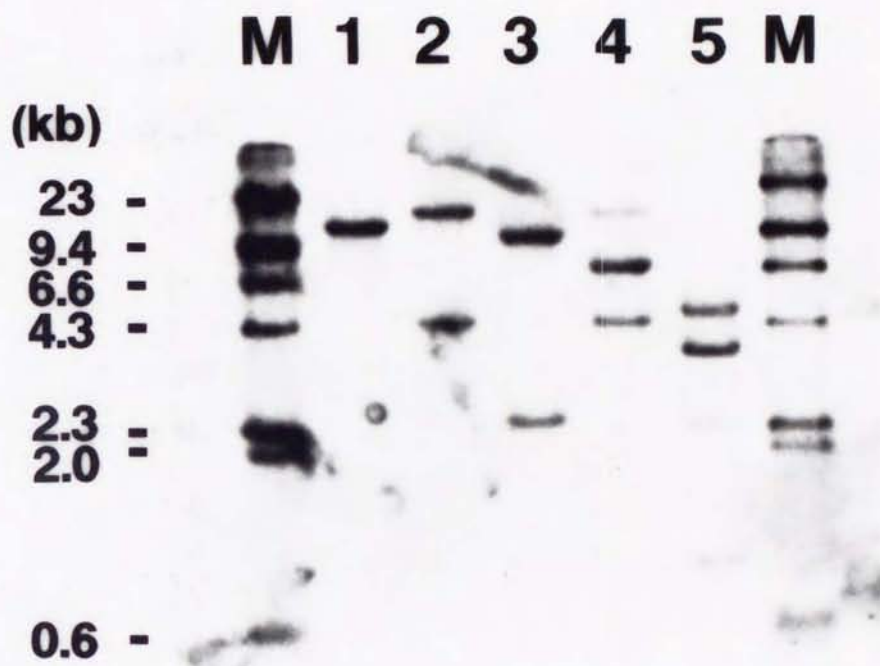


図2-12 pSAK5558に挿入されたcDNAをプローブとしたニワトリゲノムDNAとのサザンブロットハイブリダイゼーション

ニワトリゲノムDNAを各種制限酵素で消化した後，pSAK5558プローブを用いてサザンブロットハイブリダイゼーションを行った．MはλファージDNAのHindIII消化物，レーン1: BamHI消化物，レーン2: EcoRI消化物，レーン3: EcoRIおよびBamHI消化物，レーン4: EcoRIおよびSalI消化物，レーン5: XbaI消化物．

SAK47 (5') ATGAGAGGCGCTCGAGGCGCCTGG (3')
 Chicken ---GGG-----G-ACCT-----

SAK48 (5') CCAAAAGAATTCTTGGCATAACACAT (3')
 Chicken -CA--CC-A--AG-----CC-----C--

SAK49 (5') GCCGGGATCCTGTTTCATATATATCCA (3')
 Chicken TG-AATG-TTC-----G--C-----

SAK50 (5') GTTGAGGATCCTGGAGTGTTCATGTG (3')
 Chicken ---A-T---T-----AA-----CA--

SAK51 (5') CACCAGCTGTGGATATATATGAA (3')
 Chicken G-AG-AG-C-----G--A-----

SAK52 (5') CTCCTTATGATCACAAATGGGA (3')
 Chicken -----

SAK54 (5') TCAGGATCCCAGCAAGTCTTCAT (3')
 Chicken --G-C-----C-----

SAK55 (5') TCAAATGAATTCATGGACATGAA (3')
 Chicken GTC-----G-A-----

SAK56 (5') ACTAAGCTTGTTTCTGGGAAACTCCCA (3')
 Chicken ---CG--CG-----A-----

SAK57 (5') AGTCCAGGGGATCCGTCTCCGCC (3')
 Chicken -TC--C-CA-G-GGT--AGT---

SAK58 (5') ATCCGGGATCCTTCCTTGATCAT (3')
 Chicken -----AT-----C-----

SAK59 (5') GGCTCGAGGGAACAGCATATGACAC (3')
 Chicken --T-T-G-----

図2-13 PCR用プライマーの塩基配列とニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAの塩基配列との比較

PCR用プライマーの塩基配列とニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAの塩基配列とを比較した。各上段は、PCR用プライマーの塩基配列を示す。各下段は、PCR用プライマーの位置に対応するニワトリ*c-kit*遺伝子cDNA（第III章参照）の塩基配列を示す。プライマーの塩基配列と一致したニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAの塩基配列はハイフンで示した。

| | | |
|-------------|---|-----|
| CHICKEN | FPRNRLSFGKTLGAGAFGKVVVEATAYGLFKSDAAMTVAVKMLKPS.AHLTEREALMSELK | |
| MOUSE c-kit | -----I----- | 641 |
| MOUSE CSF1R | ----N-Q-----F--G-E--VLK-----.-T--AD-K----- | 633 |
| MOUSE PDGFR | L--DQ-VIGR---S---Q-----H--SH-QAT-K-----.-T-RSS-KQ----- | 652 |
| CHICKEN | VLSYLGHNHINIVNLLGACTIGGPTLVITEYCCYGDLLNFLRRKRDSFICPKHEEH...AE | |
| MOUSE c-kit | -----M-----V-----FS-Q--Q...-- | 698 |
| MOUSE CSF1R | IM-H--Q-E-----H--V--Y-----H-----AEAMLG-SLSPGQDSEG | 693 |
| MOUSE PDGFR | IM-H--P-L-V-----K---IYI-----R---VDY-H-NKHT-LQRHSNKHC.PPS | 712 |
| CHICKEN | AAVYENLL...HQAEPT.ADAVNE...YMDMKPGVS..YAPP..KAD.KKRPVKSGSY | |
| MOUSE c-kit | --L-K---...-ST--SC.-SS--...-V-T..-T.-R-SARID-- | 745 |
| MOUSE CSF1R | DSS-K-IHLEKKYVRRDSGFSSQGVD TYVE-R-VSTSSSDSFFK..Q-LD-..... | 742 |
| MOUSE PDGFR | -EL-S-A-PVG..FLPSHLNLPG-SDGG----SKDE-ID-VPMLDM-G-I-YADIE-P-- | 769 |
| CHICKEN | T.....DQDVTLSMLEDELALDVEDLLSFSYQVAKGMSFLASKNCIHRDLAAR | |
| MOUSE c-kit | I.....ER---PAIM-----LD-----A-A----- | 794 |
| MOUSE CSF1R |EHSRP-ELW---H--S---Q-----V--- | 780 |
| MOUSE PDGFR | MAPYDNYVPSAPER.TYRAT-IN-SPV-SYT--VG-----N--D-----V----- | 828 |
| CHICKEN | NILLTHGRITKICDFGLARDIRNDSNYVVKGNARLPVKWMAPESIFNCVYTFESDVWSYG | |
| MOUSE c-kit | -----S----- | 855 |
| MOUSE CSF1R | -V---S-HVA--G-----M-----D--I-VQ----- | 839 |
| MOUSE PDGFR | -V-ICE-KLV-----G-----MR---IS--STY--L-----SL--TL-----F- | 888 |
| CHICKEN | ILLWELFSLGSSPYPGMPVDSKIFYK | |
| MOUSE c-kit | -F----- | 880 |
| MOUSE CSF1R | -----I----LN-L-GIH-NN---- | 864 |
| MOUSE PDGFR | -----I-T--GT---EL-MNDQ--N | 913 |

図2-14 PCRによって増幅したDNAの塩基配列から予想されるアミノ酸配列とマウスのKit,CSF1RおよびPDGFRタンパク質のアミノ酸配列との比較

ニワトリ配列はpSAK5558およびpSAK5259中の挿入DNAの塩基配列から予想されるアミノ酸配列を示す。これをマウスのKit(583番目から879番目),CSF1R(575番目から864番目)およびPDGFR(594番目から913番目)タンパク質のアミノ酸配列と比較した。また右端の数字は各列の右端のアミノ酸残基のそれぞれのアミノ酸配列におけるアミノ酸番号を示す。ハイフオンはニワトリ配列のアミノ酸残基と一致したものを,点はギャップを表す。

第 III 章 ニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA のクローニングおよび塩基配列の決定

III - 1 はじめに

第 II 章においてクローニングしたニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA 断片をプローブとして、ニワトリ脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、24 個のポジティブクローンを得た。そのうち最長の cDNA をもつクローンの全塩基配列を決定した。その結果、この cDNA クローンがニワトリ Kit タンパク質全領域をコードしていることが示された。それから予想されるニワトリ Kit タンパク質のアミノ酸配列とマウス Kit タンパク質のそれとの相同性等について検討した。

次いで、ニワトリの各組織における *c-kit* 遺伝子 mRNA の発現を検討することにより、ニワトリ *c-kit* 遺伝子が生体内においてどのような生物学的役割を持つのかを知る手がかりとするため、得られたニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA をプローブとしてニワトリの各組織由来の polyA⁺RNA のノザンプロットハイブリダイゼーションによる解析を行った。

III - 2 材料および方法

(1) ニワトリ脳 cDNA ライブラリーのスクリーニング

農林水産省家畜衛生試験場 分子免疫研究室 櫻井通陽博士より供与された 8 日齢ニワトリ脳 cDNA ライブラリーを用い、pSAK5558 中に挿入されたニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA 断片 (SAK5558 プローブと呼ぶ) をプローブとしてブラックハイブリダイゼーションを行うことにより、ニワトリ *c-kit* 遺伝子の cDNA クローンを得た。用いたニワトリ脳 cDNA ライブラリーは、ラムダファージ λ ZAPII⁴⁹⁾ をベクターとして作製されている。1 次スクリーニングは以下のように行った。大腸菌 XL1-Blue 株 1 コロニーを L-Broth 培地 [1% バクトトリプトン (w/v), 0.5% イーストエキストラクト (w/v), 0.5% NaCl (w/v), (pH 7.5)]

で終夜培養したものを50mlのチューブに移し3,000rpm, 5分間遠心した後, 上清を捨て, 600nmの吸光度が0.5になるように10mM MgSO₄に懸濁した. この菌液600mlにcDNAライブラリー溶液 (1.6×10⁷PFU/ml) 3mlを加え, 37℃ 15分間保温して組換えファージを大腸菌に感染させた. これに7.5mlのNZY軟寒天[0.5% NaCl(w/v), 0.2% MgSO₄(w/v), 0.5% イーストエキストラクト(w/v), 1% NZ アミン(w/v), 0.7%アガロース(w/v)(pH7.5)]を加えNZY寒天培地[0.5% NaCl(w/v), 0.2% MgSO₄(w/v), 0.5% イーストエキストラクト(w/v), 1% NZ アミン(w/v), 1.5%アガー(w/v), (pH7.5)]を直径15cmのプレートに広げ室温で40分間寒天を凝固させた後, 37℃で6時間孵卵器内で培養した. 同様に全部で12枚のプレートを作製し, 合計約1.1×10⁶の組換えファージのプラークを得た. 培養終了後, プレートを4℃に30分間以上放置し, 十分にNZY軟寒天を冷やして固め, 直径15cmのニトロセルロースフィルターを寒天上にのせ, ファージをフィルターに移した. フィルターをプレートから剥し, アルカリ変性液[0.5M NaOH, 1.5M NaCl]を浸した濾紙(3MMワットマン)にのせ, 室温で5分間静置してファージのDNAを1本鎖に変性した. 次いで, 中和液[0.5M トリス(pH8.0), 1.5M NaCl]を浸した濾紙の上で室温で5分間静置し中和した. これを乾いた濾紙の上に静置し, 風乾した後, 適量の20×SSC[3M NaCl, 0.3M クエン酸ナトリウム (pH7.0)]液にフィルターを入れ約20秒間洗浄し, 再度乾燥した濾紙の上で風乾した. 完全に乾燥したフィルターは, 真空オーブンで80℃で2時間加熱しファージDNAをフィルターに架橋した. 以降のハイブリダイゼーションは, 第II章2節(9)項に準じて行った.

1次スクリーニングでプローブにハイブリダイズしたプラークの中の組換えファージを回収するため, 滅菌したバスツールピペットでプラークを軟寒天ごと突き, SM 緩衝液[100mM NaCl, 80mM MgSO₄, 50mM トリス(pH 7.5), 10% ゼラチン(w/v)]500μlおよび20μlのクロロホルムを入れたエッペンドルフチューブに

移し、ファージ粒子を溶出させた。これらをさらに2回再クローニングする事により純化した。

大腸菌XL1-Blue株を600nmの吸光度が0.5になるように調製した菌液200 μ lに、 1×10^3 pfu/mlに調整した各クローンのファージ液2 μ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで15分間保温しファージを感染させた。これにNZC軟寒天3mlを加え、プレートに均一に広げ、室温に30分間静置し、NZC軟寒天を凝固させた後、ふ卵器に37 $^{\circ}$ Cで一晩静置し培養を行った。これを1次スクリーニングと同じ手順に従ってブラックハイブリダイゼーションを行った。再クローニングの結果、純化されたラムダファージクローン24個を得た。得られた組換えファージ中に含まれるcDNA部分はShort et al⁴⁹⁾の方法によって、プラスミドpBluescript SK(-)へ再クローニングを行った。

(2) 得られたクローンの定性

ニワトリの脳のcDNAライブラリーより得られたクローンについてのクローンに含まれるcDNAの長さの解析および制限酵素切断部位地図の作製はSambrook et al.の方法²⁶⁾、サザンプロット解析は、第II章2節(9)項に述べた方法に準じて行った。

(3) 塩基配列の決定

塩基配列の決定は、第II章2節(8)項の方法に従って行った。塩基配列決定用のオリゴヌクレオチドプライマーの合成は農業生物資源研究所遺伝子構造研究室に依頼した。

(4) ニワトリの各組織からの全RNAの調製

7週齢のニワトリを頸部切断した後、脳、ファブリシユウス囊、心臓、腎臓、

肝臓，肺，脾臓，胸腺，卵巣，精巣の各組織を採材した．ニワトリの各組織からの全RNAの調製は，第Ⅱ章2節（2）項に記述した方法を用いた．

（5）poly A⁺RNAの調製

poly A⁺RNAの調製は第Ⅱ章2節（3）項に記述した方法を用いた．

（6）ニワトリpolyA⁺RNA のノザンプロット解析

各組織から得たpoly A⁺RNA（各5μg）を2Mのホルムアルデヒド溶液を含む1.2%アガロースゲル上で電気泳動を行った．次いでアガロースゲルを蒸留水150mlに浸し15分間振とうを2回繰り返した後，泳動槽の支持台に20×SSC（1×SSC緩衝液の組成は[150mM NaCl, 15mM クエン酸ナトリウム(pH7.0)]で湿らせた濾紙（ワットマン3MM）を敷き，その上にこのゲルをのせた．濾紙の両端は常に20×SSC緩衝液中に浸っているようにした．ゲルと同じ大きさのナイロン膜を蒸留水で湿らせたのち20×SSC緩衝液に浸し，ゲルの上へのせ，この上に20×SSC緩衝液に湿らせたゲルと同じ大きさの濾紙を2枚，乾いた濾紙1枚をのせ，ゲルと同寸に切ったキムタオル（十條製紙）を10～20cmの高さに積み，さらにこの上に約500gの重りをゲル全体に均一に荷重がかかるように載せ，一晚静置してプロットングを行った．翌日，ナイロン膜を6×SSC緩衝液中で30秒間洗浄した後，乾燥した濾紙の上でナイロン膜を乾かした．これをUVクロスリンカー（Stratagene社）によりナイロン膜にpolyA⁺RNAを架橋させた．次いでハイバインドオープン用のボトルの中にナイロン膜と50mlのプレハイブリダイゼーション液[1M NaCl, 1% SDS, 10% 硫酸デキストラン]を入れてハイバインドオープン（ストラタジーン社）で60℃で30分間プレハイブリダイゼーションを行った．プレハイブリダイゼーション終了後，ボトルの中のプレハイブリダイゼーション液を捨て，ハイブリダイゼーション液[1M NaCl, 1% SDS,

10%硫酸デキストラン, 100 $\mu\text{g/ml}$ サケ精子DNA]を入れ, 次いで第II章2節(9)項に既述した方法を用いて $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ で標識したプローブを100 $^{\circ}\text{C}$ で10分間加熱し氷上で急冷した後に加え, 60 $^{\circ}\text{C}$ のハイバインドオープン中で終夜ハイブリダイゼーションを行った. ハイブリダイゼーション終了後, ナイロン膜を洗浄液[2 \times SSC緩衝液, 1%SDS]を用い60 $^{\circ}\text{C}$ のハイバインドオープン中で15分間, 2回繰り返し洗浄した. 洗浄が終了した後, このナイロン膜をオートラジオグラフィに供した.

(7) プローブの標識

プローブには, 得られたニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAの全領域を用いた. またノザンプロットハイブリダイゼーションに用いられた各組織のpolyA⁺RNAの量が一定であることを確認する目的で同一のフィルターをニワトリ β アクチン遺伝子を用いて再度ハイブリダイゼーションを行った. プローブの標識は第II章2節(9)項に既述した方法を用いた.

III-3 結果

(1) ニワトリ脳cDNAライブラリーのスクリーニングおよびpBluescript SK(-)プラスミドベクターへの再クローニング

櫻井通陽博士より供与されたニワトリ脳cDNAライブラリーの作製法を以下に簡単に述べる. 8日齢のニワトリの脳から得たpoly A⁺RNAから二本鎖cDNAを合成した後, これの両端に*NotI*および*EcoRI*切断部位を含むアダプターオリゴヌクレオチドを付加させた. それを λ ZAPIIベクターの*EcoRI*切断部位に挿入し組換えファージのライブラリーを得た.

ニワトリの*c-kit*遺伝子cDNAをクローニングする目的で, 第II章で得られたSAK5558プローブを用い, 上述のcDNAライブラリーからブランクハイブリダ

イゼーションにより、ニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA を含む組換えラムダファージのスクリーニングを行った。

1.1×10^6 個の組換えラムダファージクローンより第1スクリーニングを行った結果、24個の組換えファージクローンを得た。λZAPIIベクターには、プラスミド pBluescript SK(-) の全ゲノムが含まれており、cDNA部分はこの pBluescript SK(-) のゲノム中の *EcoRI* 切断部位に挿入されている。そこで、f1ヘルパーファージを大腸菌 XL1-Blue 株に感染させることにより、cDNA部分を含む pBluescript SK(-) プラスミドを回収することができる。24個のラムダファージクローンをさらに2回純化した後、組換えファージをそれぞれ f1ヘルパーファージ R408 と大腸菌 (XL1-Blue 株) に共感染させることにより、cDNA部分を含む pBluescript SK(-) プラスミド DNA を得、以後の解析はこれらのプラスミドを用いて行った。

(2) 得られた cDNA クローンの定性

まず、得られた24個の cDNA クローンについて、組み込まれている cDNA 部分の長さの解析および *EcoRI*、*HindIII* を用いての制限酵素切断地図の作製を行った。

用いたニワトリの脳 cDNA ライブラリーにおいては、cDNA 断片はその両端に *NotI* および *EcoRI* 制限酵素切断部位を含むアダプターオリゴヌクレオチドを付加されたのち、λZAPIIベクターのマルチクローニング部位の *EcoRI* 切断部位に挿入されている。このうち8塩基認識の制限酵素である *NotI* の切断部位は、真核細胞のゲノム中には希にしか存在せず、数千塩基対程度の cDNA 部分中に *NotI* 切断部位が存在する確率は低いと思われる。さらに、組換え pBluescript SK(-) DNA 中には cDNA が挿入された *EcoRI* 切断部位から約40塩基対のところ *NotI* 切断部位があり、挿入された cDNA をはさんで逆側に *EcoRI* 切断部位か

ら約15塩基対の所に *Hind*III 切断部位がある。また、第II章で得られた SAK5558 プローブの塩基配列中に *Hind*III 切断部位がある (図2-5参照) ことから、ニワトリの *c-kit* 遺伝子 cDNA 中に少なくとも1つの *Hind*III 切断部位があることが予想された。

そこでまず、24個のプラスミドクローン DNA を *Not*I で切断し、各プラスミド中の cDNA 部分の長さを調べた。その結果、プラスミドクローン No.3 中の cDNA 部分が最も長く (約5100塩基対、図3-1参照)、プラスミドクローン No.34 に挿入された cDNA 部分が最も短かった (約770塩基対)。SAK5558 プローブを用いてニワトリの脳の mRNA のノザンプロット解析を行ったところ、約5.5kbの長さのメッセンジャー RNA (mRNA) が一本認められた (櫻井未発表データ) ことからクローン No.3 中の cDNA 部分は *c-kit* 遺伝子 mRNA のほぼ全体の配列を含んでいることが予想された。

ついで各クローンの制限酵素切断地図を作製するため、各クローン DNA の *Hind*III 単独、*Eco*RI 単独、*Hind*III および *Not*I、*Hind*III および *Eco*RI による消化物をアガロースゲル上で電気泳動を行い、生成した DNA 断片の長さを決定した。さらに、各プラスミドクローンの *Hind*III および *Eco*RI による消化の結果、生成する DNA 断片のうち、どれが第II章で得られた SAK5558 プローブおよび pSAK5259 中の cDNA 部分とハイブリダイズするかをサザンプロット解析によって調べた。

なおデータは示さないが、クローン No.34 に含まれる cDNA 部分は770塩基対と短く、また *Hind*III 切断部位も *Eco*RI 切断部位も存在しないことが分かったののでこの cDNA 部分の構造についてはこれ以上解析を行わなかった。

以上の実験の結果に基づき作製した各クローンの制限酵素切断地図を図3-1に示す。最長の cDNA 部分をもつクローン No.3 の制限酵素切断地図に基づいて他のクローンの制限酵素切断地図を整列させることにより、図3-1に示したよう

にクローンNo.34を除く23個のクローン中のcDNA部分の制限酵素切断地図は互いにオーバーラップすることが分かった。このことは、得られた23個のクローン中のcDNA部分が1種類のmRNAに由来していることを示唆する。これは、上述したノザンプロット解析の結果と一致する。なお第三章3節(3)項で述べるようにクローンNo.3中のcDNA部分の一方の端にポリアデニル酸配列が認められたことから、このcDNA部分はmRNAの3'端の配列を含んでいることが分かった。図3-1においては、クローンNo.3中のcDNA部分のポリアデニル酸配列が右側にくるように地図を示した。従ってこの図において左側がmRNAの5'端に相当する。

以上のことからほぼ全長に近いcDNAを含むと考えられるクローンNo.3を用い、以下の実験を行った。

(3) 制限酵素地図の作製

ニワトリc-kit遺伝子cDNAにおける主な制限酵素の切断部位を知る目的で、クローンNo.3中のcDNA部分の11種類の制限酵素の切断部位を調べた。クローンNo.3 DNAを*SacI*, *XbaI*, *BamHI*, *SmaI*, *PstI*, *ClaI*, *Sall*, *XhoI*, *KpnI*, *EcoRI*, *HindIII*の11種類の制限酵素で消化し、0.8%アガロースゲル上で電気泳動を行い、切断されたDNAの長さを調べ、制限酵素地図を作製した。その結果作製した地図を図3-2に示す。

(4) ニワトリc-kit遺伝子cDNAの塩基配列決定

クローンNo.3中のcDNA部分の全塩基配列を決定するために、クローンNo.3中のcDNA部分を*NotI*消化により精製し、pUC118 (*NotI*) ベクターの*NotI*切断部位に再クローニングした (pKitN)。プラスミドpUC118 (*NotI*) は、pUC118⁵³⁾ベクター中の*SmaI*切断部位をリンカーライゲーションにより*NotI*切

断部位に変換したベクターである。塩基配列の決定には主にこのプラスミド DNAを鋳型として用い、順次決定された配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いることにより塩基配列の決定を進めた。5'末端側から約1000塩基対の領域については、その配列を含む一本鎖M13ファージDNAを調製し、これを鋳型として塩基配列の決定を行った。塩基配列決定のストラテジーを図3-2に示す。この結果、クローンNo.3に含まれるcDNA部分である5111塩基対の塩基配列が決定された(図3-3)。

この塩基配列決定を行った部分についてアミノ酸配列に読み変えたところ、読みとり開始コドンと思われるメチオニンコドン(ATG)および終止コドン(TGA)を両端にもち、960個のアミノ酸残基をコードする長いオープンリーディングフレーム(図3-5中の塩基配列の2番目から2884番目)が1つ認められた。また、この塩基配列の1708番目から2599番目はpSAK5558およびpSAK5259中のcDNA部分の塩基配列(第II章図2-6および図2-9参照)と完全に一致していた。クローンNo.3中のcDNA部分の一方の端には2つのポリアデニル酸配列の付加シグナルAATAAA配列(塩基配列の4949番目から4954番目、5024番目から5029番目)が認められた。したがって、クローンNo.3はmRNAの3'端を含んでいると考えられる。

クローンNo.3のcDNA配列中のオープンリーディングフレームから予想されるアミノ酸配列を図3-4に示す。予想されたアミノ酸配列をマウスのKitタンパク質のアミノ酸配列^{43,58)}と比較した(図3-4)。比較の結果、このアミノ酸配列はマウスのKitタンパク質全領域と63%の同一性を示した。また、マウスKitタンパク質との相同性から、このアミノ酸配列中に、メチオニン残基から始まるシグナルペプチド配列(図3-4中のアミノ酸配列の1番目から24番目)、細胞外領域(1番目から505番目)トランスメンブレン領域(506番目から530番目)、細胞内領域(531番目から960番目)と考えられる領域が推定された。さらに細胞

内領域の中にリン酸化酵素領域（563番目から671番目，748番目から910番目），カインースインサート領域（672番目から747番目）と考えられるアミノ酸配列がそれぞれ推定された。

細胞外領域，トランスメンブレン領域および細胞内領域における領域ごとのニワトリマウスタンパク質間の相同性は，それぞれ48%，74%，83%であり，トランスメンブレン領域を境に，細胞外領域の相同性に比べ，細胞内領域のアミノ酸配列は非常に高い相同性を示した。

クローンNo.3に含まれるcDNAは，全長5111bの長さを有し，一方の端にポリA付加シグナルおよびポリアデニル酸配列が認められたことからニワトリ*c-kit*遺伝子mRNAのほぼ全体と相補的なcDNAであり，ニワトリKitタンパク質をコードする領域全体を含むものであると結論した。

（5）各組織におけるニワトリ*c-kit*遺伝子の発現

ニワトリの生体内におけるKitタンパク質の機能を知る手がかりの一つとして，ニワトリのどのような組織においてニワトリ*c-kit*遺伝子mRNAの発現が認められるかを調べた。

7週齢のニワトリの脳，ファブリシユウス囊，心臓，腎臓，肝臓，肺，脾臓，胸腺，卵巣，精巣から得たpolyA⁺RNA 5 μgを用い，ニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAの全領域をプローブとしてニワトリ*c-kit*遺伝子mRNAを検出した（図3-6）。その結果，7週齢のニワトリでは脳，ファブリシユウス囊，心臓，腎臓，肺，胸腺，卵巣，精巣で5.5kbの*c-kit*遺伝子mRNAの発現が認められた。この中でもニワトリ*c-kit*遺伝子mRNAは，脳，精巣で最も多量に発現しているのが認められた。

III - 4 考察

(1) 得られたcDNAクローンの定性

12週齢のニワトリの脳のcDNAライブラリーからニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAのクローニングを行った結果、 1.1×10^6 個の組換えラムダファージより24個のニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAを持つ組換えラムダファージが得られた。これらのクローンをプラスミドベクターpBluescript SK(-)へ再クローニングを行い、得られた24個のクローンのうち23個のクローンについてマッピングを行った。この結果、*c-kit*遺伝子cDNAのほぼ全体が含まれていると考えられるクローンが1つ(No.3)得られた。

他のクローンの制限酵素切断地図は、クローンNo.3とオーバーラップしており、それら全てが1種類のmRNAから由来していることを示唆した。マッピングを行った23個のクローン中7個のクローンがmRNAの3'端に相当すると思われる領域を含まず、このうち6クローン(クローンNo.4, No.13, No.16, No.17, No.31, No.44)はmRNAの3'端から約1800塩基上流までの配列を含んでいた。これらのクローンについては、mRNAの3'端から約1800塩基の塩基配列中にアデニル酸残基が連続している領域(塩基配列の3151番目から3207番目)があり、ここにcDNA合成の際のプライマーであるオリゴチミチル酸プライマーが結合し、cDNA合成が開始されたと考えられる。

(2) cDNAの塩基配列から予想された、ニワトリKitタンパク質のアミノ酸配列について

ニワトリの*c-kit*遺伝子mRNAのほぼ全長を含むと思われるクローンNo.3中のcDNA部分の全塩基配列を決定した結果、この塩基配列から予想される制限酵素切断部位とクローンNo.3を用いて作製した制限酵素地図は一致した(図3-2, および図3-3)。この塩基配列中には、開始コドンと考えられるメチオニンコ

ドンおよび終止コドンを含み、2883塩基対（960アミノ酸残基）の長さのオープンリーディングフレームが1つ認められた。マウス、ヒトの*c-kit*遺伝子cDNA中では開始コドンがそれぞれのcDNA塩基配列中29番目および22番目の塩基から始まっている^{39,59}。ニワトリの*c-kit*遺伝子cDNAの開始コドンと考えられるメチオニンコドンはクローンNo.3に含まれるcDNA部分の配列中の2番目の塩基から始まっている。したがって、得られたニワトリの*c-kit*遺伝子cDNAクローンに、このメチオニンコドンより5'端側の20塩基対前後の配列が含まれていない可能性は否定できない。しかしながら、このオープンリーディングフレームのアミノ酸配列をマウスのKitタンパク質のアミノ酸配列と比較した結果、上記のメチオニンコドンに続いて細胞膜タンパク質のアミノ末端側に共通して認められるシグナルペプチド配列（図3-4 アミノ酸配列の1番目から24番目）が認められたことから、このメチオニンコドン（図3-3および図3-4 塩基配列の2番目から4番目）が読みとり開始コドンであると考えられる。

塩基配列から予想されるニワトリのKitタンパク質のアミノ酸配列はマウスのKitタンパク質のそれと相同性が高く、特にトランスメンブレン領域を境に細胞外領域と比較すると、細胞内領域において非常に相同性が高かった。これは、細胞内領域の大部分を占めるリン酸化酵素領域においては、後にも述べるように、リン酸化酵素活性に関与する多くのアミノ酸配列が保存される必要があるためと考えられる。一方、マウスKitタンパク質の細胞外領域には、そのリガンドであるSCFを認識し結合する部位が存在しており、ニワトリKitタンパク質の細胞外領域もそれに対応する部位を有していると考えられる。従って、細胞外領域においてニワトリ-マウスのタンパク質間のアミノ酸配列の同一性が低い（48%）理由として、ニワトリのKitタンパク質のリガンドとなるニワトリSCFタンパク質はマウスとアミノ酸配列の同一性が53%と低いため⁶³、それに対応して、SCFを認識するマウスのKitタンパク質の細胞外領域とニワトリKitタンパク質

の細胞外領域の構造も異なるという可能性が考えられる。一方、リン酸化酵素領域については、CSF-1RおよびPDGFRタンパクのアミノ酸配列と高い相同性を示したが、その他の領域では相同性が低かった（図3-5）。

また、ニワトリKitタンパク質の細胞外領域には、11の糖鎖付加部位配列アスパラギン-任意の残基-セリンまたはトレオニン（NXT/S、以下、アミノ酸の1文字記号で配列を示す）が認められ、そのうち5つがマウスのKitタンパク質においても保存されていた（図3-4）。さらに、この領域には12個のシステイン残基が認められ、その全てがマウスのKitタンパク質とニワトリのKitタンパク質の間で保存されていた。このことから、ニワトリKitタンパク質もマウスと同様に免疫グロブリン様構造を持っていることが示唆された。

Hanksら¹³⁾は、マウスKitタンパク質を含む65種類のチロシンリン酸化酵素およびタンパク質セリンおよびトレオニンリン酸化酵素（以下受容体型セリンおよびトレオニンリン酸化酵素）のアミノ酸配列の比較、およびこれらについてのX線結晶構造解析、変異体による解析等の実験結果に基づき、これらのリン酸化酵素領域間で非常に良く保存された特徴的なアミノ酸配列およびアミノ酸残基があること、また、これらのアミノ酸配列およびアミノ酸残基の多くが、リン酸化酵素として機能するために重要な役割を担っていることを報告している。

そこで、得られたニワトリの*c-kit*遺伝子cDNAが受容体型チロシンリン酸化酵素として機能するか否かを予測するため、これらのアミノ酸残基およびアミノ酸配列がニワトリのKitタンパク質のアミノ酸配列においても保存されているかを検討した。Hanksらは、サイクリックAMP依存性タンパク質キナーゼ触媒サブユニット- α （cAPK- α ）のアミノ酸配列を基準としているが、以下に述べるアミノ酸配列は、マウスKitタンパク質中において全て保存されているので、ここでは、マウスKitタンパク質のアミノ酸配列を基準として述べる。

65種類のタンパク質リン酸化酵素において、リン酸化酵素領域のアミノ末端近

くには、G X G X X Gの保存されたアミノ酸配列があり、これはリン酸化反応の基質の1つであるアデノシン-5'-3リン酸 (ATP) が結合する部位である。マウスのKitタンパク質のアミノ酸配列において595番目から600番目にG X G X X Gが認められる。本研究で明らかにしたニワトリのKitタンパク質のアミノ酸配列においても582番目から587番目に、このG X G X X Gの配列認められた。

マウスKitタンパク質の621番目のリシン残基は、65個の全てのタンパク質リン酸化酵素のアミノ酸配列で保存されており、リン酸基転移反応に直接的に関与していると考えられている。ニワトリのKitタンパク質のアミノ酸配列においては、609番目に保存されていたリシン残基がこれに相当すると思われる。

マウスKitタンパク質のアミノ酸配列における790番目から795番目のDLAARNの配列および830番目から837番目のP V K W M A P E (全てのチロシンリン酸化酵素間の共通配列としてはP(I/V)(K/R)W(T/M)A P E)の配列は、チロシンリン酸化酵素に特異的な配列である。また、DLAARNの配列に含まれる790番目のアスパラギン酸残基および795番目のアスパラギン残基は、ATPの結合に関与しており、P V K W M A P Eの配列中の835番目から837番目までのA P Eの配列は、リン酸化酵素活性を示すのに必要な配列である。ニワトリのKitタンパク質のアミノ酸配列の777番目から782番目にATP結合部位を含むDLAARNの配列が、817番目から824番目にリン酸化酵素活性を有するのに必要なA P Eの配列を含むP V K W M A P Eの配列が保存されている。

マウスのKitタンパク質のアミノ酸配列の808番目から810番目のD F Gの配列もまた、ATPの結合に関与している。この配列も、ニワトリKitタンパク質のアミノ酸配列の795番目から797番目に保存されていた。

マウスのKitタンパク質のアミノ酸配列の821番目のチロシン残基は自己リン酸化を受けるアミノ酸残基である³⁹⁾。これに対応してchKitタンパク質のアミノ酸配列の808番目に自己リン酸化を受けるとされるチロシン残基が保存されて

いる。

マウスのKitタンパク質のアミノ酸配列の639番目のグルタミン酸残基，849番目のアスパラギン酸残基，854番目のグリシン残基および912番目のアルギニン残基は，機能は分かっていないが，全てのタンパク質リン酸化酵素のアミノ酸配列で保存されている。ニワトリのKitタンパク質のアミノ酸配列においても639番目に相当するグルタミン酸残基（626番目），849番目に相当するアスパラギン酸残基（836番目），854に相当するグリシン残基（841番目）および912番目に相当するアルギニン残基（899番目）の全てが保存されていた。

マウスのW変異体には，c-kit遺伝子内の点突然変異のため，Kitタンパク質のリン酸化酵素活性が失われているか，もしくはその活性が著しく低くなっている変異体株がある。W³⁷，W⁴¹，W⁴²，W⁵⁵（W^V）変異体においては，c-kit遺伝子内にアミノ酸置換を伴う点突然変異が認められ，その結果Kitタンパク質のリン酸化酵素活性が失われているか，または非常に低下していることが報告されており^{33,41,51}，それらに見られるアミノ酸置換は，Kitタンパク質のリン酸化酵素活性に大きな影響を与えることが考えられる。W³⁷変異体では582番目のグルタミン酸残基からリシン残基への置換，W⁴¹変異体では831番目がバリン残基からメチオニン残基への置換，W⁴²変異体では，790番目がアスパラギン酸残基からアスパラギン残基へ置換，W⁵⁵（W^V）変異体では，660番目がトレオニン残基からメチオニン残基への置換がなされている。予想されるニワトリのKitタンパク質のアミノ酸配列において，これらのW変異体における置換部位に対応するアミノ酸残基は，それぞれグルタミン酸残基（569番目），バリン残基（818番目），アスパラギン酸残基（777番目）トレオニン残基（607番目）であり，すべての箇所においてマウスKitタンパク質の正常型と一致していた。

以上，ニワトリのKitタンパク質のアミノ酸配列は，とくにそのチロシンリン酸化酵素領域でマウスKitタンパク質との相同性が高く，さらにその活性にとっ

て重要と考えられるアミノ酸配列がよく保存されていること、またW突然変異マウスにおいて置換が報告されているアミノ酸残基がすべて野生型であったことから、得られたニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAが、チロシンリン酸化酵素活性を持つタンパク質をコードしていることが強く示唆された。

また、Reithらによって成獣のマウスの骨髄、15日胚の肝臓から得た肥満細胞および妊娠15日目の胎盤のmRNAから得られたcDNAクローン中に、アミノ酸配列の512番目と513番目の間にGNNKというアスパラギン残基を多く含むアミノ酸配列が挿入したKitA+というアイソフォームがこの挿入配列を含まないアイソフォームKit+と共に存在することが報告されている⁴²⁾。マウスのKit+タンパク質をコードするcDNAとKitA+タンパク質をコードするcDNAの割合は、成獣の肥満細胞では7:3、15日齢の胎児の肝臓中の肥満細胞では2:1、妊娠15日の胎盤では5:3ある⁴²⁾。クローンNo.3の配列はKit+型アイソフォームに相当している。ニワトリにおいてもこのアイソフォームが存在するかを、マウスのKitA+アイソフォームに相当するタンパク質がニワトリにおいても存在する可能性を調べるため、今回得られたニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAクローン23個のうち、上述の挿入配列が存在すると思われる部位を含んでいるクローンNo.4、No.5、No.13、No.14、No.15、No.16、No.17、No.31、No.33、No.44の10個のクローンについてその塩基配列を決定したが、KitA+アイソフォームに相当するcDNAクローンは認められなかった。このことから、少なくともニワトリ脳においては、マウスのKit+型アイソフォームに相当するタンパク質が主要な分子種であることが推測された。

(3) 各組織におけるニワトリ*c-kit*遺伝子の発現

成獣のマウスでは胎盤、脳、卵巣、骨髄、脾臓、精巣、肺で5.5kbの*c-kit*遺伝子mRNAの転写が認められることが報告されており³³⁾、またネコでも脳、骨

髓，脾臓，末しょう血，リンパ節で*c-kit*遺伝子の発現が認められている³⁹⁾。本研究でのノザンプロット解析の結果，ニワトリの脳，ファブリシユウス嚢，心臓，腎臓，肺，脾臓，胸腺，卵巣および精巣において*c-kit*遺伝子の発現が認められ，特に脳および精巣において多量の発現が認められた。ニワトリにおける*c-kit*遺伝子の発現パターンは，マウス，ネコのそれとよく対応していることが示された。このことからニワトリにおける*Kit*タンパク質の生物学的役割はマウス，ネコなどの哺乳類における*Kit*タンパク質の生物学的役割と類似していることが示唆された。

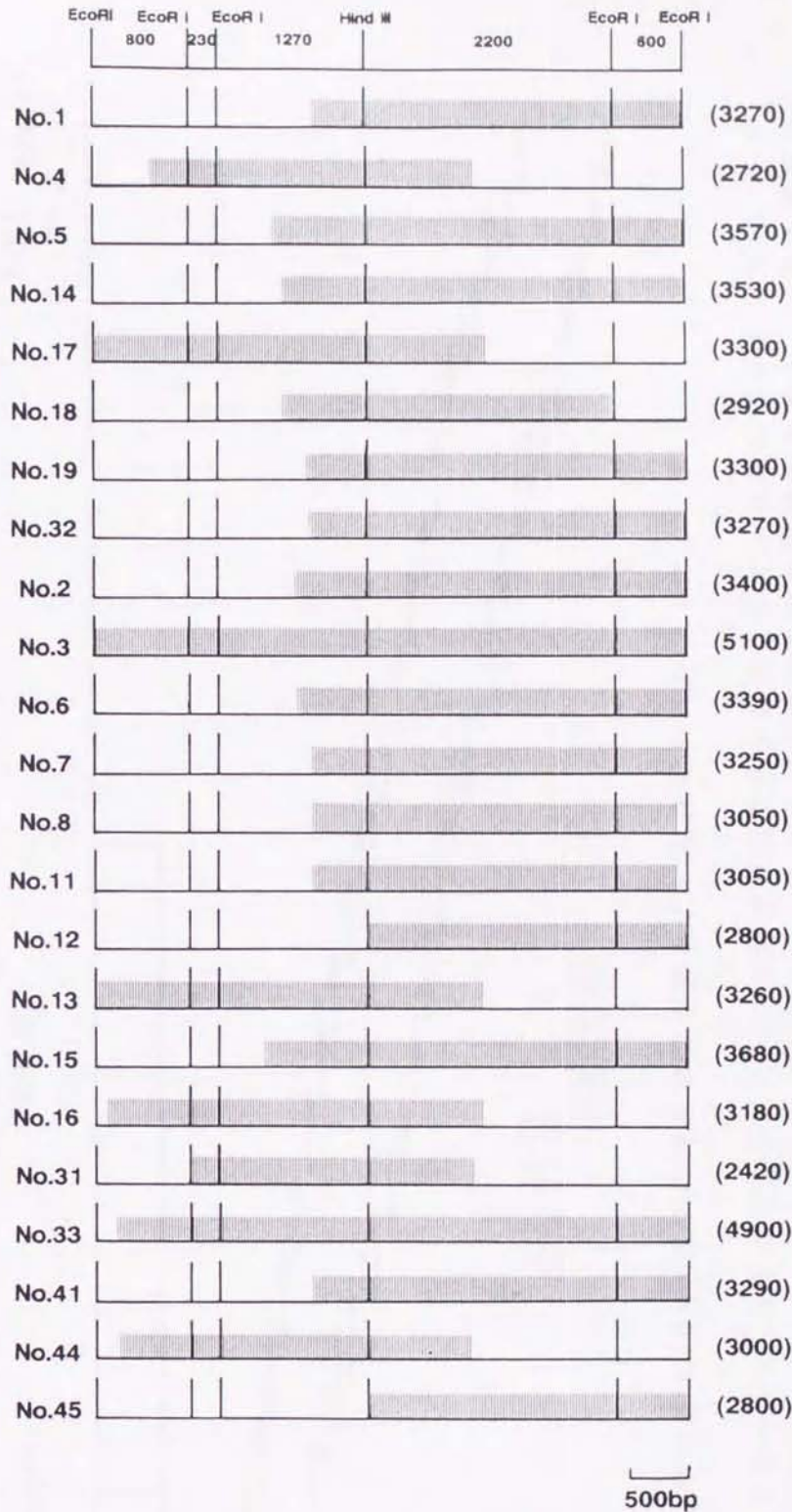


図3-1 No. 34を除く23個の組替えプラスミドクローンの制限酵素地図

各実線はクローンNo. 3に含まれるcDNA部分を表し、左側が5'端、右側が3'端を示す。各組替えプラスミドクローン中に含まれるcDNA部分の長さを縦線で示した。括弧内は各クローン中に含まれているcDNA部分の推定塩基数を示す。最上段は、クローンNo. 3中に含まれるcDNAのEcoRIおよびHindIII切断部位とこれらの制限酵素による消化で得られる各cDNA断片の長さを表す。

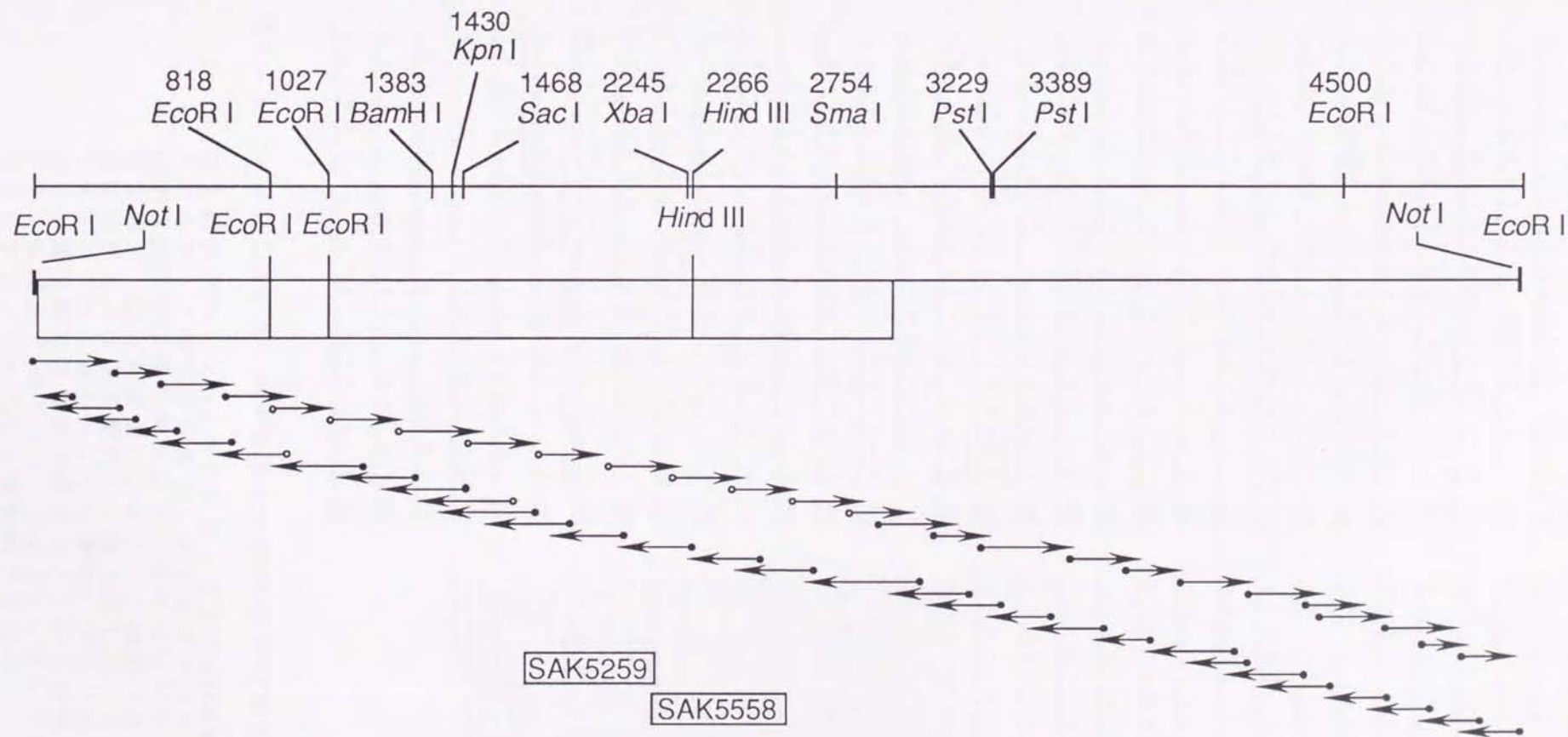


図3-2 クローンNo.3中の挿入cDNA部分の制限酵素地図および塩基配列決定ストラテジー

上段の実線はクローンNo.3中に挿入されたcDNA部分の制限酵素地図を示す。実線は左が5'末端側，右が3'末端側を，数字はクローンNo.3中に含まれたcDNA部分の5'末端側からの塩基数を表す。下段の実線はクローンNo.3中に挿入されたcDNA部分を，白抜き長方形はオープンリーディングフレームを表す。*EcoRI*切断部位をその上に付した。矢印は決定した塩基配列の長さおよびその方向を示す。黒丸付きの矢印はプラスミドDNAを鋳型として決定した塩基配列を，白抜き丸付きの矢印は，M13ファージDNAを鋳型として決定した塩基配列を示す。最下段の白抜き長方形はSAK5558プローブおよびSAK5259プローブの位置を示す。

M E G A H L A W E L A H A V L L L S L I 20
 CATGGAGGGGGCCAGCTGGCCGGGAGCTGGCCAGCCCGCTGCTGGTGGCCGCTAT 80
 P A G C S V P H E E S S L Y V N K G E E 40
 CCCCCAGGTGGTTCAGTGGCTCATGAAGATTCCTGGTGGTGTGAACAAAGGGGAGGA 120
 L R L K G N E E G P V T W N F Q N S D P 80
 GTTAAAGCTGAAAGTCCAATGAGGAAGGAGCCCTGACTTGGAAATTCAGAACTCAGATCC 180
 S A K T R I S N E K E W H T K N A T I R 80
 ATCGGCAAAAACAAGGATTTCCAATGAGGAAGGAGTGGACACCAAAAATGCAACAACTCAG 240
 D I G R Y E C X S X G S I V V S F Y V F 100
 AGACATAGCAGATATGAGTCCAAAAGCAAGGGAGTATTGCAACTCTTCTATGTTTTT 300
 V X D P N V L F L V D S L I Y G K E D S 120
 TGTTAAAGATCCAAATGCTCTCTCTGTTGATTCCTGATCTATGGGAAAGCAAGACAG 360
 D I L L Y C P L T D P D V L N F T L R K 140
 TGACATCGTGGTGGTCCCACTAACAGATCCAGATGTTTTAAAGCTTCACTCGAGAAA 420
 C D G G K P L P K N M T F I P N P Q K G I 180
 ATGGCATGGCAAACTCTCCCAAAAACATGACATTCATCCCAATCCACAGAAAGGCTAT 480
 I I K N V Q A G R S F K G C Y Q L A K H N 180
 CATTATAAGAACCTCAGGGCTTCAAGGGCTGCTACAGTGTGGCAAGGCATAA 540
 G Y E K I S E H I F L N V R P V H K A L 200
 TGGAGTTCAGAAAATCAGAGGCATTTCTGAAATGTGAGACCACTTCAAAAAGCTCT 800
 P V I T L S K S Y E L L K E G E F E V 220
 TCCAGTCAATCCTTCAAAAAGCTATGAGCTTCTCAAAAAGGGGAAAGATTTGAAAT 880
 T I I T D V D S S Y R A S W I S Y K S 240
 TACATGCATAAATCAGGATTCGATAGCAGCTAAAAGCTAGTGGATTTCTTACAAAAG 720
 A I Y T L S X S R N L G D Y G Y E R K L T 280
 TGGATGTTTCAAGCAAAAGCAGAAATTTGGGTGATACGGATACCAAAAGAAATTAAC 780
 L N I R S V G Y N D S G E F T Q A E N 280
 ATTGAACATCCGTCAGTGGGATTAATGATTCGAGAAATTCACATCCCAAGCAGAA 840
 P F G K T N A T Y T L K A L A X G F Y R 300
 CCTTTGGCAAAAACAATGGCCAGCTAAGCTTGAAGCACTAGCTAAAGGATTTGTCGG 900
 L F A T X N T T I D I N A G Q N G N L T 320
 TTTGTTGGCAAAATGCAAAATGCAATAAATGCAAGCAAAAATGCAAAATTAAC 960
 V E Y E A Y P K P X E E Y W M Y M N E T 340
 AGTTGAATATGAGCGCTATCCAAAACCAAAAGGAAGAGTGGATGATACATGAAGAAAAC 1020
 L Q N S S D H Y V X F K T Y G N N S Y T 380
 ATTCAGCAATTCATCGGACCAATGTGCAAGTTCAGACCTGCGGCAATAAAGCAATTAAC 1080
 S E L H L T R L K G T E G G I Y T F F V 380
 AAGCGAATTCACCTTACCGGATTAAGAAAGCAAGAGGGAGGCAATTAACATTTTTTGT 1140
 S N S D A S S S Y T F N V Y X T X P E 400
 GTCCACCTCAGATGACCTCTCTGTAACATTTAATGTACGTGAAAACAACCAACCA 1200
 I L T L D M L G N D I L Q Y A T G F P 420
 GATCCTTACCTTGGATATGCTCGGCAATGACATTTCTCACTGTGTGGCAACTGGATCCC 1260
 A P T I A C Y Y F C P C T E Q R L D S P 440
 AGCCCTTACCTTACTGGATTTTTGCCAGGCACTGAAACAGAGTGTGATGACTCACC 1320
 T I S P N D V K V S Y T N S S V P S F E 480
 AACATATCCCCATGGATGTGAAAAGTCACTTACACAACTCATCCGTCACCTCTTGA 1380
 R I L V E S T V N A S M F K S T G T I 480
 CGGATCCCTGGTCCGAGGCACTGTGAAGCCAGCATGTTCAAGCCACTGGTAAACCTCG 1440
 E A S S N G D K S S V F F N F A I K E 500
 CTGTGAGGATCCAGCAATGGTGAAGAGCCTCTGTTTTCTTTAAGCTTGGTATTAAGA 1500
 Q I R T H T L F T P L L I A F G V A A G 520
 GCAAACTCGGTACCCAGCCCTTTCCACACCTTACTAATCCGATTTGGGGTCCCGCTCG 1560
 L W C I I V M I L V Y I Y L Q K P X Y E 540
 ACTGATGGCATCATAGTCAATGATCCTGGTGTACATATATTGGCAAAAACCAAAATAGA 1820
 Y Q W K Y V E E I N G N N Y V Y I D P T 560
 AGTCCAGTGGAAAGTTGTGAAGAAAATAAGTGAAGCAACTGTTTACATAGACCCCAAC 1880
 Q L P Y D H K W E F P R N R L S F C K T 580
 GCAACTTCTTATGATCACAATGGGAGTTTCTTGAAGAAACCGTTCAGCTTTGGTAAAG 1740
 L G A G A F G K V V E A T A Y G L F K S 800
 CCTTGGTGGTGGGAGCTTTGGAAAGGTTGTGAAGCCACTGCTTATGGCTATTTAAATC 1800
 D A A M T V A V X W L K P S A H L T E R 820
 TGATCCCGCTATCAGACTAGCAGTGAAGATGTTGAAGCAAGCCCAATTTAAGTCAAG 1860
 E A L N S E L K V L S Y L G N H I N I V 840
 AGAAGCTTGTATGTCAGAGTAAAGTTCCTCAGTACCTGCTAAAGCAATTAATTTGT 1920

N L L G A C T I G G P T L Y I T E Y C C 880
 GAATCTACTGGAGCTTGGAGTATTTGGAGGGCCCGCTGGTGTATTACAGAAATTTGGT 1980
 Y G D L L N F L R R K R D S F I C P K N 880
 CTATGGGATCTCTTAAATTTCTGAGGGGGAGGAGGATTCATTCATTTGTCDAAGCA 2040
 E E H A E A A Y Y E N L L H Q A E P T A 700
 TGAAGCAGCCAGGAGGAGGCTGTTATGAGAACTTTTGCAGCAGGAGGAGCCACAGC 3100
 D A Y N E Y M D M K P G Y S Y A Y P P K 720
 GGATGCTCAATGACTACATGACATGAAACCCAGGAGTGCATATGCTGTTCCDCCAAA 2180
 A D X K R P Y X S C S Y T D Q D Y T L S 740
 AGCTATAAAAAGGGGGTGAATCTGCTGATCTTACACCGATCAGGATGTTACCGGTTT 2220
 M L E D D E L A L O Y E D L L S F S Y Q 780
 CATGTTGGAAAGTACGAACTGCTCTAGATGTTGAAGATCTATTAACTTCTCTTACCA 2280
 Y A X G N S F L A S K N C I H R D L A A 780
 GGTGGCAAGGGCATGAGCTTCTGGCTCTAAAAGCTGCATTCATAGGATGCTGGCAGC 2340
 R N I L L T H D R I T K I C D F C L A R 800
 AAGAAATTTCTTCACTCATGCTGAAATACAAAAATCTGCTGACTTTGGTCTGGCAAG 2400
 D I R N D S N Y V V Y K G N A R L P Y E W 820
 AGATAAAGGAATGACTCAAAATTAAGTGGTAAAGGAAATGCTCCTCTCCCTGGAAGT 2480
 M I P E S I F N C V Y T F E S D V W S Y 840
 GATGGCAGCTGAAAGCATTTCAGCTGCTTACACCTTCGAGAGTGAATGCTGCTGCTTA 2520
 G I L L W E L F S L G S S P Y P G M P Y 860
 TGGAAATGCTTTGGGAACTTCTCTTGGAAAGCAGCCCTTACCCAGGATGCGCGT 2580
 D S K F Y E M I K E G Y R M F S P E C S 880
 GACATCCAAATCTATAAAATGATCAAGGAGGATATCCGATGTTACCCCGCAGCTCTC 2640
 P P E N Y D I M X S C W D A D P L Q R P 900
 ACCCCCCGAAATGATCAGCATAAATGAAGAGTGGTGGATCCCGATCCCTTGCAGAGACC 2700
 T F X Q I Y Q L I E Q Q L S D N A P R V 920
 CACATTCAAACAGATGCTGAGCTGATAGAACAGGAGCTTTCCGATAATGCCCCCGGGT 2760
 Y A N F S T P P S T Q G N A T O H S Y R 940
 GTATGCAAACTTTCCACTCCGCTTCCACTCAAGGCAATGCTACAGATCATCGGTGAG 2720
 I N S V G S S A S S T Q P L L Y R E D Y 960
 GATTAACCTCAGTGGTAGCAGCCCTCATCTACTCAGCCCTCTGCTGAGCCGAAAGATG 2880
 TTGAGTGGCATCTGGAAGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2940
 GTGAGAGAGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3000
 AAATGTGTTGATAAATCTGCTCTTACCACACACTGTTACACATAAAGCTTAAATGCTCA 3060
 GCACGGTTCAGGATCATTTGCAATGTAAGTGAAGCTGTATATATTTTGTCTATTTGCT 3120
 TGTATTTGGAGTACAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3180
 TGGGCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3240
 TGGATCCATGCTTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 3300
 AGAAATAAAGCAGATATAAAGCAAAAGGCTTGGCAAAAGGCTTCCATATCCAGGCAAGC 3360
 TGAATGCTTCCCGGGCAGACACTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3420
 GGTGGGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3480
 CACTCTGGGGCATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3540
 GCAGTCCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 3600
 TGAAGTCCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3660
 GACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3720
 GACATCTTATCTGGCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3780
 CTTATGATATGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3840
 GCTCTCTCCCAAGTCAATTCATCTTCTATCTGCTGAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG 3900
 GGAAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3960
 TCTTGTGTTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 4020
 TTAAGTCTTATAAATTCCTTTCTCTGTTGGAAACAGCTGTTGGTCTTTTTTTTTTT 4080
 TTTTTTTAACCTTGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 4140
 TCGACAGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 4200
 CTTATGTTTACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 4260
 CCAAAATGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 4320
 ACCACACTCTTATAAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 4380
 TTAGCTGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 4440
 TTAGCTGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 4500
 AGCCAGTGTGTTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 4560
 TATAAAGGCTCTTCCAGTGTGTTGGCTTTCAGAGCAAGCTGAGCAAAAGCTAGTTTTAT 4620
 AATCAATGAGTGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 4680
 TCTTAAATTTATTTTTTAAATTTGGGGGGGTTGAAACTATTTTGAAGTGGCTTAC 4740
 TGTGTGAAGGTTTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 4800
 TGACTTCTCAGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 4860
 ATATGTATAAATGATGAGTGTGCAAAAGCTTAAAGCAACTATGATGATGCTGCTGCTGCT 4920
 TGTAGAAATTCAGTTCAGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 4980
 CGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG 5040
 AAGCAAAAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 5100
 AA 5111

図3-3 クローンNo.3に挿入されたcDNA部分の塩基配列。

各上段はクローンNo.3中に挿入されたcDNA部分の塩基配列から予想されるアミノ酸残基を表す。各下段はクローンNo.3中に挿入されたcDNA部分の塩基配列を示す。矢印はシグナルペプチド配列の切断部位を示す。細胞外領域のシステイン残基を丸で囲んで示した。糖鎖付加部位配列には塩基配列に下線を付した。太い実線は膜貫通領域を、アスタリスクは終止コドンを表す。アミノ酸残基の上の二重線は多くのリン酸化酵素領域間で保存されている特徴的なアミノ酸配列およびアミノ酸残基¹³⁾がクローンNo.3中に挿入されたcDNA部分の塩基配列から予想されるアミノ酸配列でも保存されていることを示す。イガタは自己リン酸化を受けると考えられるチロシン残基を示す。

| シグナル配列 | | | |
|-------------|---|-----|--|
| Chicken | MEGAHLAWELAHAVLLSLIPAGG.....SVPHEESSLVVNKGEELRLKNEEGPVWTFQNSDPSAKTRISNEK.EWHTKNATIRDIGRYE | 86 | |
| Mouse | -R--RG--D-LCVL-V-LRGQTATSQPSASPGEPSP-IPHAQ-E-I-EA-DT-S-T-IDPDF-R-T-K,..TYFNEMVE-K-N--IQEK-EATRT-T-T | 97 | |
| Chicken | CKSKGSIVNSFYVFKDPNVLFVDSLIYKEDSDILLVCP L TDPDVLNFTLRKCDGKPLPKNMTFIPNPQKGI I IKNVQRSF.KCCYOCLAKHNGVEKI | 185 | |
| Mouse | *SNSNGLTS-I----R--AK----GLPLF-----A-VR+-----Q-S-YS-IE----S--TDL--V---KA--T----K-AYHRL-VR+A-QRD-TWLH | 197 | |
| Chicken | SEHIFLNVRPVHKALPVITLSKSYELLKEGEEFEVTCIITDVS SVKASWISYKS.....AIVTSKSRNLGDYGERKLTNIRSVGVNDSGEFTQQAEN | 280 | |
| Mouse | -DKFT-K--EAI--I--VSPETSH---K-DT-T-V-T-K--ST--NSM-LKMNPPQHI-Q-KHN-WHR--FN---QE--T-S-AR-D---V-M-Y-N- | 297 | |
| Chicken | PFGKTNATVTLKALAKGFVRLFATMNTTIDINAGQNGNLTVEYEAYPKPKKEEVWMMNETLQNSSDHYVKFTVGNNSTSELHLRLKGTGGIYTFV | 380 | |
| Mouse | T--SA-V-T---VVE---INISPVK---VFVTD-E-VD-V-----EHQQ-I---R-SA-KGKD---SDNKS-IR-VNQ-R-----T---L- | 397 | |
| Chicken | SNSDASSVTFNVYVTKPEILTLDMGNDILQCVATGFPAPTIYWFYCPGTEQRGLDSPTISPMVKVSYTNSVSPFERILVESTVNASMFKSTGTIC | 480 | |
| Mouse | -----A-----N-----Y-R-I-GM-----E---E---D---T-A-----..TTPV--V--Q-.Q-V--SP-GKLV-Q-SIDS-V-RHN--VE | 493 | |
| トランスメンブレン配列 | | | |
| Chicken | CEASSNGDKSSVFFNFAL...KEQIRTHTLFTPLLIAFGVAAGLMCIIVMILVYIYLQPKPYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHWKWFPRNRLS | 576 | |
| Mouse | -K--NDVG--A-----F....--QA-----G-V---A-G---V-T-K---M----- | 589 | |
| キナーゼドメイン I | | | |
| Chicken | FGKTLGAGAFGKVVEATAYGLFKSDAAMTVAVKMLKPSAHLTEREALMSELKVLVSYLGNHINI V NLLGACTIGGPTLVITEYCCYGDLLNFLRRKRDSFI | 676 | |
| Mouse | -----I-----M-----V----- | 689 | |
| キナーゼ挿入配列 | | | |
| Chicken | CPKHEEHAEAAVYENLLHQAEPT.ADAVNEYMDMKPGVSYAVPPKADKKRPVKSGSYTDQDVTLSMLEDELALDVEDLLSF SYQVAKGMSFLASKNCIH | 775 | |
| Mouse | FS-Q--Q-----L-K---ST--SC.-SS-----V--T--R-SARID--IER--PAIM-----LD-----A-A----- | 788 | |
| キナーゼドメイン II | | | |
| Chicken | RDLAARNILLTHGRITKICDFGLARDIRNDSNYVVKGNARLPVKWMAPE SIFNCVYTFESDVSWSYGI LLWELFSLGSSPYGMPVDSKFYKMIKEGYRMF | 875 | |
| Mouse | -----S-----F-----F--V | 888 | |
| Chicken | SPECSPPPEMYDIMKSCWDADPLQRPTFKQIVLIEQQLSDNAPRVYANFSTPPSTQGNA..TDHSVRINSVGSASSTQPLLVEDV | 960 | |
| Mouse | ---HA-A---V--T-----K-----V-----K-I--STKHI-S-LANCPNPE-PVVV-----V-----H--A | 975 | |

図3-4 クローンNo.3中のcDNAから予想されるアミノ酸配列とマウスKitタンパク質のアミノ酸配列との比較

クローンNo.3中のcDNAから予想されるアミノ酸配列とマウスKitタンパク質のアミノ酸配列とを比較した。ハイフオンは、クローンNo.3中に含まれるcDNAの塩基配列から予想されるアミノ酸配列とマウスのKitタンパク質のアミノ酸残基と一致したことを示す。2つのアミノ酸配列の間で保存されているシステイン残基および糖鎖付加部位配列は網掛けで示す。トランスメンブレン配列およびキナーゼドメインは長方形で囲って示す。点はギャップを表す。

| | | |
|-------------|---|------|
| Chicken Kit | MEGAHLAWELAHAVLLLSLIPA.GG.....SVPHEESSLVNKGELRLKCNNEEGPVTWNF..QNSDPSAK,TRISNEK.EWHT...KNAT | 78 |
| Mouse Kit | -R--RG--D-LCVL-V-LRGQT.ATSQPSASPGEPSPP-IHPAQ-E-I-EA-DT-S-T-IDPDF-R-T..K...TYFN,EMVE-K-N--IQ...EK-E | 89 |
| Mouse CSF1R | --LGPPLVL-LATVWHGQG.....A-V-EPGPELV-EP-ETVT-R-VSN-S-E-DG..P...I-PIWLY...-SP.GSTLTTNSA | 73 |
| Mouse PDGFR | -GLIPGVIPALVLRGQ--LSVLWLLGPQTSRG.....LVITPPGPEF-L-ISSTFV-T-SGSA--M-EQ..M...SQVP,WQEAANNQDGTSSVLTLTN | 89 |
| Chicken Kit | IR..DIGRYECKSK.GSIVNS.....FYVFKDPNVLFLV...DSLIYKEDSDILLVCPLTDPDV.LNFTLRKCDGKPLPKNMTFIPNPQKGIKN | 164 |
| Mouse Kit | AT..RT-T-T-SNS,NGLTS-.....I---R--AK----...GLPLF-----A-VR-----Q-,S-YS-IE----S--TDL--V---KA--T--- | 176 |
| Mouse CSF1R | TFKNT-T-R-TELEDPMAG-TT.....IHLY-----HSWNLLAQE.VTVV..EGQEA-V-P-LI---ALKDSVS-MREG-RQVLRKTVYFFS-WR-SI-RK | 165 |
| Mouse PDGFR | VTGG-T-E-F-VYN.N-LGPELSEKRI-I--P--TMG--PMSDE-F-FVTDVTEITP-RV---QLE..V--HEKVD,I-LHVPYDHO..R-FTG.. | 181 |
| Chicken Kit | VQRSF.KGCYQCLAKHNGVEKISEHIFLNVRPVHKALPVITLSKSYELLKEGEEFEVTCII..TDVDSVKASWISYK.S...AIVTSKSRNLGDYGY | 255 |
| Mouse Kit | -K-AYHRL-VR-A-QRD-TWLH-DKFT-K--EAI--I--VSPVETSH--K-DT-T-V-T..K--ST--NSM-LKMN.PQPQHI-Q-KHN-WHR--FN- | 273 |
| Mouse CSF1R | A-VLDSNT,-V-KTMV--R-ST-TGIW-K-NR--PEP-Q-K-EP-KLVRIR--AAQIV-SATNAE-GFN-ILKRGDT-LEIPLNSDFQDNYKVRALS | 264 |
| Mouse PDGFR | ..T-EDKT-I-KTTIGDR-VD-DTY.YVYSEQLSSIN-SVNAVQTVVRQ--SITIR--VMGN--VNFQWYPRMKSGRLEVPVTDYLVGVPSSRIGSIL | 276 |
| Chicken Kit | ERKLTINIRSVGVNDSGEFTCQAEPPFGKTNATVTKAL..AKGFVRLFATMNTTIDINAGQN.GNLTVEYEAYPKPKKEEVWMMNETLQNSSD.HYVKF | 351 |
| Mouse Kit | --QE--T-S-AR-D---V-M-Y-N-T--SA-V-T--VV, .E---INISPVK---VFVD-E-.VD-V-----EHQQ-I---R-SA-KGK.D---S | 369 |
| Mouse CSF1R | NAVDFQ.....-A-TYS-V-S-DV-TRT--MNFQV ESAYLN-TSEQSLQEVSV-DS.LI---HAD---SIQHYN-T-LGPFETQ..RKLEFI | 351 |
| Mouse PDGFR | HIT.....AELS---TY--NVSVDHGDGKAINISVIEN-Y---L.ETLGDVE-AELHRSRT-R-VF---M-SVL.-LKD-R--GD-GAGEL-LS | 367 |
| Chicken Kit | KTV.GNNSYSELHLRLKGTGGIYTFVSNDSASSVTFVNYVTKPEI..LTLDMLGNDI..LQCVATGFPAPTIIYWFYFCPGTEQRCLDSPTISP.. | 444 |
| Mouse Kit | DNK.S-IR-VNQ-R-----T---L-----A-----N-----..Y-R-I-GM,-----E---E---D---T-A-----TTPV--.. | 460 |
| Mouse CSF1R | TQRAIY.R--FK-F-N-V-AS-A-Q-FLMAQ-KAGWNL--ELTLRYP--V..SVTW-PV-GSDV-F-DVS-Y-Q-SVT-ME-R-HTD--..DEAALHL | 446 |
| Mouse PDGFR | TRNMSETR-V---I-V-V-VS-A-Y--MRAFND-DEVQLS-KLQ-NVPPVLE-SESHA-GEQITRGR-M-Q-NVT-ST-RDL.K--..PRKL--TP | 464 |
| Chicken Kit | .MDVKVSYTNSVPSFERILVESTVNASM.....FKSTGTICCEASSNGDKSSVFFN...FAIKEQIRHTLFTPLLIAGVAAGLMCIIVMLVYIY | 533 |
| Mouse Kit | .V--Q-.Q-V--SP-GKLV-Q-SIDS-V.....-RHN--VE-K--NDVG--A-----F-----QA-----G-V---A-G---V-T-K- | 547 |
| Mouse CSF1R | WN-THP..EVL-QKP-DKVIQ-QLTIGP.....L-HNM-YF-KTHNSVGN--QY-RAVSLGQSK-LPDES---VVV-CMSVMS-LVLLLLL-L-K- | 537 |
| Mouse PDGFR | LGNSSK..EE-QLETNVTFW-E-DQEYEVVSTLRLRHVDQPLSVR-MLQNSMGGD-QEV....TVVPHSLPFKVVVISA-LAL-VLTVISL-II-MLWQK | 557 |
| Chicken Kit | LQPKYEVQKVVVEI..NGNNYVIDPTQLPYDHKEWEPFRNRLSFGKTLGAGAFGKVEATAYGLFKSDAAMTVAVKMLKPS.AHLTEREALMSELKVL | 630 |
| Mouse Kit | -----M-----I----- | 644 |
| Mouse CSF1R | K-----Q-R--II-RY..E--S-TF-----NE-----N-Q-----F--G-E--VLK-----,T--AD-K-----IM | 634 |
| Mouse PDGFR | K,-R---IR---I-SVSSD-HD-I-V--V---ST--L--DQ-VIGR---S---Q-----H--SH-QAT-K-----,T-RSS-KQ-----IM | 655 |
| Chicken Kit | SYLGNHINIVNLLGACTIGGPTLVITEYCCYGDLLNFLRRKRDSFICPKHEEH...AEAAVYENLL...HQAEP.T.ADAVNE...YMDMKPGVS..YA | 716 |
| Mouse Kit | -----M-----V-----FS-Q-Q...--L-K-----ST--SC--SS--...-----V | 730 |
| Mouse CSF1R | -H--Q-E-----H--V--Y-----H-----AEAMLG-SLSPGQDSEGSS-K-IHLEKRYVRRDSSGSSQGVDTYVE-R-VSTSSDS | 733 |
| Mouse PDGFR | -H--P-L-V-----K--IYI-----R---VDY-H-NKHT-LQRHSNKHC.PPS-EL-S-A-PVG..FLPSHLNLPG-SDGG---SKDE-ID-VP | 752 |
| Chicken Kit | PP..KAD.KKRPVKSGSYT.....DQDVTLSMLEDDELALDVEDLLSFSYQVAKGMSFLASKNCIHRDLAARNILLTHGRITKICDFGLARDIR | 803 |
| Mouse Kit | -T.-T-.R-SARID--I.....ER--PAIM-----LD-----A-A----- | 816 |
| Mouse CSF1R | FFK..Q-LD-----EHSRP-ELW--H--S--Q-----V---V---S-HVA--G-----M | 801 |
| Mouse PDGFR | MLDM-G-I-YADIE-P--MAPYDNYVPSAPER.TYRAT-IN-SPV-SYT--VG-----N--D-----V-----V-ICE-KLV-----G-----M | 851 |
| Chicken Kit | NDSNYVVKGNARLPVKWMAPESTFNCVYTFESDVVSYGILLWELFSLGSSPYGMPVDSKFYKMIKEGYRMFSPECSPPPEMYDIMKSCWDADPLQRPTFK | 903 |
| Mouse Kit | -----S-----F-----F--V--HA-A--V--T-----K----- | 916 |
| Mouse CSF1R | -----D--I-VQ-----I---LN-L-GIH-NN---LVKDGQMAQ-VFA-KN1-S--QS---LE-TR---Q | 900 |
| Mouse PDGFR | R---IS--STY--I-----SI--TL---F-----I-T--GT---EL-MNDQ--NA-K-GYRMAQ-AHASD-I-E--QK--EEKFET--P-S | 951 |
| Chicken Kit | QIVOLIEQQ.LSDNAPRVYANFS.....TPPSTQGNA..TDHSVRINSVGSASSTOPLLVREDV | 960 |
| Mouse Kit | -V----K-,I--STKHI-S-LA.....NCNPNPE-PVVV---V-----H--A | 975 |
| Mouse CSF1R | --CF-LQE-ARLERRDQD---LPSSGGSSGSDSGGSSGSSSEPEEES-SEHL-CCEPGDIAQPLLPNNYQFC | 975 |
| Mouse PDGFR | -L-L-L-R.L-GEYKKK-QQVD.....EEFLR-DHPAILRSQA-FPGIH-LR-PLDTSVLYTAVOPNESDNDYIIPLPDPKPDVADEGLPEGSPSL | 1043 |
| Mouse PDGFR | ASSTLNEVNTSSTISPLELQEEPQQAEPQAEQLEQPDGSGCPGLAEAEEDSFL | 1095 |

図3-5 クローンNo.3中のcDNAから予想されるアミノ酸配列とマウスのKit, CSF1RおよびPDGFRタンパク質のアミノ酸配列との比較

クローンNo.3中のcDNAから予想されるアミノ酸配列とマウスのKit, CSF1RおよびPDGFRタンパク質のアミノ酸配列とを比較した。ハイフオンはクローンNo.3中のcDNAから予想されるアミノ酸配列と同じアミノ酸残基を示す。点はギャップを表す。

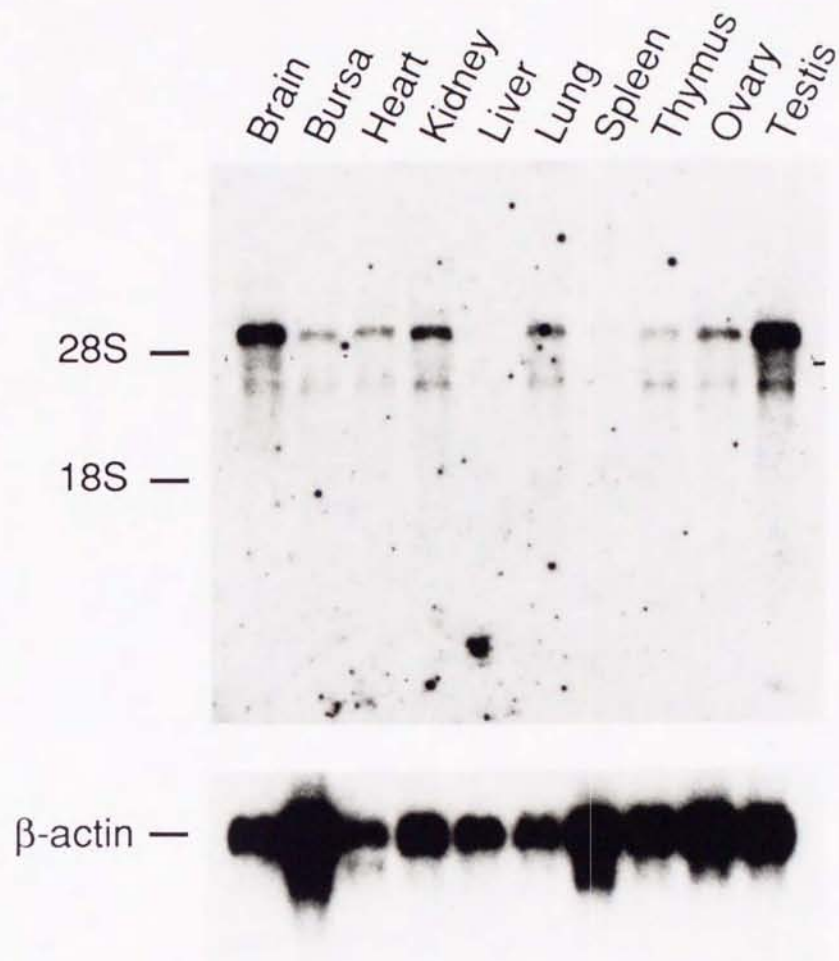


図3-6 各組織におけるニワトリ*c-kit*遺伝子のmRNAの発現

各組織のpoly A⁺RNAを用いてニワトリクローンNo.3中に挿入されたニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAをプローブとしたノザンプロット解析を行い、各組織におけるニワトリ*c-kit*遺伝子mRNAの発現を検討した。上段はニワトリ*c-kit*遺伝子の発現を、下段はニワトリ β -アクチン遺伝子の発現を表す。

第 IV 章 大腸菌内における chKit タンパクの生産と抗 chKit 抗体の作製

IV-1 はじめに

ニワトリ Kit タンパク質 (chKit) に対するウサギ血清を作製する目的でニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA を大腸菌発現用ベクターに挿入し、大腸菌内で chKit タンパク質を発現させた上でこれを精製した。まず、大腸菌発現用ベクターとして、マルトース結合タンパク質 (MBP) と目的とするタンパク質との融合タンパク質を生産する pMalc2 ベクターを用い、大腸菌内で MBP と chKit タンパク質との融合タンパク質 (MBPchKit) を生産し、その精製を行った。このタンパク質をウサギに免疫して抗 chKit 抗血清を作製した。次いでグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と目的タンパク質の融合タンパク質を大腸菌内で発現する大腸菌発現用ベクター pGEX3X に chKit タンパク質の細胞外領域および細胞内領域の一部をコードするニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA (塩基配列 73 番目-1434 番目, 2757 番目-3088 番目) が挿入された発現ベクターを作製し、これにより形質転換された大腸菌で GST と chKit タンパク質との融合タンパク質 (GSTchKit) を発現させ、その精製を行った。この融合タンパク質を用いてアフィニティカラムを作製し、MBPchKit をウサギに免疫して得られた抗 chKit 抗血清のアフィニティ精製を行った。

IV-2 材料および方法

(1) 大腸菌発現用ベクターの構築

i) MBPchKit 融合タンパク質発現用ベクター pMalchKit の作製

第 III 章で塩基配列の決定に使用した pKitN プラスミドを制限酵素 *Sal I* で切断し、T4 ポリメラーゼを用いて切断部位を平滑化させた後、再度自己連結させてこのプラスミド中の *Sal I* 制限酵素切断部位を消失させた。このプラスミドの制

制限酵素 *Hpa* I 切断部位 (*c-kit* 遺伝子 cDNA 塩基配列の 3089 番目) を *Hpa* I で消化した後, *Sal* I リンカーを接続する事により制限酵素 *Sal* I 切断部位を挿入した. このプラスミドを制限酵素 *Sph* I および *Sal* I で消化した後, ニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA の塩基配列を含む断片を 0.8% アガロースゲルを用いて第 II 章 2 節 (7) 項に述べた方法で精製した. これを, *Sph* I および *Sal* I で切断した pUC18 ベクターに常法で挿入し, このプラスミドを pKitP と命名した. 次にシグナルペプチド配列を除いた成熟型 chKit タンパク質を発現させるため, 合成オリゴヌクレオチドプライマー [(5')-CCGCATGCAGTACTTCAGTGCCTCATGAA-(3')] および [(5')-TGCTATCCACATCCGTGATT-(3')] を用いてプラスミド pKitN を鋳型とした PCR 反応を行い, ニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA の塩基配列の 73 番目の塩基の 5' 側に *Sph* I および *Sca* I 切断部位を挿入した. *Sph* I および *Eco*T22 I 制限酵素で消化した PCR 産物を, pKitP プラスミドの *Sph* I および *Eco*T22 I サイト間に挿入したプラスミドを pKitC と命名した. pKitC プラスミドの *Sca* I および *Sal* I 切断部位で挟まれた領域をアガロースゲルを用いて常法により精製した. ニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA の塩基配列の 73 番目から 3088 番目を含むこの DNA 断片を大腸菌発現用ベクター pMALc2 (New England Biolabs 社) のマルチクローニングサイト中の *Xmn*I 切断部位および *Sal* I 切断部位の間に挿入し pMalchKit ベクターを作製した. pMalchKit ベクターによって発現するタンパク質 (MBPchKit) は, MBP と chKit タンパク質中のアミノ酸配列 (25 番目から 960 番目) との融合タンパク質であり, MBP と chKit タンパク質との間にはトレオニン残基が 1 残基挿入していると考えられる.

ii) GSTchKit タンパク質発現用ベクター pGSTchKit の作製

pKitC ベクターを, 制限酵素 *Sca* I および *Sal* I で消化した後, ニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA を含む DNA 断片をアガロースゲル精製し, *Sal* I 切断部位を T4 ポリメラーゼにより平滑化した. この DNA 断片をグルタチオン-S-トランスフェ

ラーゼとの融合タンパク質発現用ベクター-pGEX-3X (Pharmacia社) のマルチクローニングサイト中の *Sma* I 切断部位に挿入した。次いでこのプラスミドを制限酵素 *Kpn* I および *Sma* I により消化した後、pGEX-3Xベクターを含むDNA断片をアガロースゲルより精製し、T4ポリメラーゼを用いて平滑化した後、T4ライゲースを用いて自己連結させることによりpGSTchKitを作製した。

pGSTchKitは、GSTにchKitタンパク質中シグナルペプチド配列を除いた細胞外領域（アミノ酸配列の25番目から477番目）および細胞内領域の一部（920番目から960番目）が融合した融合タンパク質をコードしていると考えられる。

(2) MBPchKitおよびGSTchKitの大腸菌内での発現

chKitタンパク質の大腸菌内発現用ベクター-pMalchKitおよびpGSTchKitを大腸菌JM109に第II章2節(7)項に既述した方法により形質転換した。形質転換した大腸菌を終濃度50 µg/mlのアンピシリンナトリウムを添加した2×TY培地中で37℃、一晚培養した。その培養液800 µlを終濃度50 µg/mlのアンピシリンナトリウムを添加した80 mlのリッチブロス培地[1%トリプトン、0.5%イーストエキストラクト、0.5%塩化ナトリウム、0.2%グルコース]に植菌し、菌濃度が 2×10^8 cell/ml (600 nmの吸光度が0.4)に達するまで37℃で振とう培養を行った。次いで菌液1 mlから15,000 rpm 2分間の遠心により大腸菌体を回収してSDS-PAGEサンプル緩衝液[50 mM トリス(pH6.8), 100 mM ジチオスレイトール, 2% SDS, 0.1% プロモフェノールブルー, 10% グリセロール, 50 µl/ml βメルカプトエタノール]に懸濁する事により大腸菌体を溶解した。残りの培養液には、イソプロピル-β-D-チオガラクトシド (IPTG) を終濃度0.3 mMになるように加えた後、37℃で振とう培養することにより、融合タンパク質の発現を誘導した。IPTG添加1時間後に培地1 mlから、大腸菌体を回収してSDS-PAGEサンプル緩衝液を用いて溶解した。

(3) chKitタンパク質の検出

i) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

大腸菌内での融合タンパク質の発現を検討するために大腸菌の溶解液5 μ lを、7.5%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した⁴⁶⁾。電気泳動が終了したゲルは0.25%クマジー染色液[0.25%クマジーブリリアントブルー-R 250, 45%メタノール, 9.2%酢酸]で30分間染色した後、ゲルを脱色液[25%メタノール, 10%酢酸]に移し室温で一晩振とうして余分なクマジー染色液を除いた。

ii) ウェスタンブロット解析

大腸菌溶解液5 μ lを7.5%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した後、このゲルをトランスファー緩衝液[250mM トリス, 1.92M グリシン]中へ移して5分間振とうを行った。その後、ポリアクリルアミドゲル中のタンパク質をセミドライブロットニング装置(日本エイダー)を用いて170mA, 45分間の電気泳動を行うことにより、イモビロンPフィルター(MILLIPORE社)に転写した。転写終了後、フィルターをTBS-NP40[20mM トリス(pH7.6), 150mM NaCl, 0.3% NP40]溶液中で15分間洗浄した。次いで5%スキムミルクを含むPBS中に移して2時間室温で振とうしてブロッキングを行った。次いでフィルターをTTBS[20mM トリス(pH7.6), 150mM NaCl, 0.02% Tween 20]で各1時間3回洗浄した後、4000倍希釈した抗chKitペプチド抗血清, 1%スキムミルクおよび0.02% Tween20を含むPBS中で終夜4℃で振とうした。続いてフィルターをTTBSバッファーで各1時間3回洗浄した後、4000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体(Tagco社), 1%スキムミルク, 0.02% Tween 20を含むPBS中で終夜, 4℃で反応させ、TTBSで1時間3回洗浄した。chKitタンパク質のカルボキシル末端の10アミノ酸残基に対応する合成ペプチド(櫻井通陽博士より供与)を用いた抗chKitペプチド抗血清の吸収実験においては、一次抗

体反応を行う際，予め1 μ lの合成ペプチド溶液(10 μ g/ml)と抗chKitペプチド抗血清7.5 μ lを1時間氷上でプレインキュベーションしたものを抗chKitペプチド抗血清の代わりに使用した．二次抗体反応が終了したフィルターを，20mlの呈色反应用緩衝液 [0.4M トリス(pH9.5), 0.1M NaCl, 0.05M MgCl₂]中で5分間洗浄を行った後，5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルフォスフェート p-トルイジン塩およびニトロブルーテトラゾリウムクロライド (GIBCO BRL) と反応させることにより抗体反応陽性バンドを検出した．

(4) MBPchKitおよびGSTchKitの精製

i) MBPchKitタンパク質の精製

800mlのリッチプロス培養液を用いて培養した大腸菌 (600nmの吸光度が0.4) を，45分間のIPTG処理後，4000rpm，10分間の遠心により回収した．回収した菌体は，45mlの溶解用緩衝液[10mM リン酸ナトリウム (pH)，30mM NaCl, 0.25% Tween 20, 10mM β -メルカプトエタノール，10mM EDTA, 10mM EGTA]に懸濁し，5mlのリゾチーム溶液 (10mg/ml) (和光純薬) を加えて30分間氷上にて静置した．次いでこれを-80℃に30分間放置して凍結させ，次いで30分間水中で融解した．この凍結-融解を3回繰り返すことにより大腸菌体を溶解した．次いでこのサンプルを18ゲージの注射針および50mlの注射筒を用いて10回出し入れした後，11,000rpm 10分間遠心を行い，沈殿を6mlのSDS-PAGEサンプル緩衝液に溶解した．この試料を7.5%の分取用ポリアクリルアミドゲル上で100ボルト 12時間電気泳動し，融合タンパク質のみを含む溶出画分を集めることによってMBPchKitの精製を行った．この操作を5回を繰り返し，全量4リットルの大腸菌培養液からタンパク質を精製した．

ii) GSTchKit融合タンパク質の精製

500mlのリッチブロス培養液を用いて培養した大腸菌（600nmの吸光度が0.4）を、60分間のIPTG処理後、MBPchKitタンパク質と同様に精製を行った。精製したGSTchKitタンパク質溶液は、アフィニティカラム用緩衝液[0.2M NaHCO₃, 0.5M NaCl]1リットルで3回透析を行うことにより、緩衝液を置換した。

(5) 抗ニワトリchKit抗血清の作製

分取用SDS-PAGEにより精製したMBPchKitタンパク質4.6mgを、ウサギ2羽に免疫して抗ニワトリchKit抗血清を作製した。抗血清の作製は、日本バイオテスト（株）に依頼して行った。

(6) 抗chKit抗血清のアフィニティ精製

i) chKitタンパク質アフィニティカラムの作製

chKitタンパク質アフィニティカラムは、HiTrap NSH-activatedカラム（ベッドボリューム1ml, Pharmacia）を用い添付のマニュアルに従って作製した。第IV章2節（5）項で精製した融合タンパク質GSTchKit（1.2mg/ml）溶液2mlをカラム内に注入してカラムに固定させた。リガンドの固定終了後、マニュアルに従ってカラム内を洗浄し、2mlのPBSを注入してpHを調整した。

ii) 抗chKit抗血清のアフィニティ精製

GSTchKitタンパク質を固定させたカラムを、10mlの10mM トリス緩衝液（pH7.4）、10mlの100mMグリシン緩衝液（pH2.5）を用いて洗浄した後、10mlの10mMトリス緩衝液（pH8.8）を注入してカラム内をpH8.8に調整した。次いで10mlの100mM トリエチルアミン緩衝液（pH11.5）を用いて洗浄した後、

10mlの10mM トリス緩衝液 (pH7.5)を注入し、カラム内がpH7.5に戻っていることを確認した。続いて10mM トリス緩衝液 (pH7.5)で10倍希釈した抗chKit抗血清1mlをカラム内に流して5分間静置してリガンドと抗chKit抗体を結合させた。この操作を10回繰り返す、合計10mlの10倍希釈抗血清をカラム内に流した。続いてカラム内を5mlの10mM トリス緩衝液 (pH7.4)、5mlのNTB緩衝液[500mM NaCl, 10mMトリス緩衝液 (pH7.4)], 5mlの10mM トリス緩衝液(pH7.4)で洗浄した後、9mlの100mM グリシン緩衝液 (pH2.5)を用いて抗chKit抗体を溶出した(グリシン-1)。溶出液は予め1mlの1M トリス緩衝液(pH8.0)を入れておいたチューブに集めた。続いて4mlの10mM トリス緩衝液(pH8.8)でカラム内を洗浄しカラム内のpHを8.8にした後、9mlの100mM トリエチルアミン緩衝液 (pH11.5)でカラム内の抗chKit抗体を同様に回収した(トリエチルアミン-1)。これらの溶出液には10mg/mlのウシ血清アルブミンを含むPBSを全体積の1/100量加えた後、2リットルのPBSで3回透析を行った。

IV-3 結果および考察

(1) 融合タンパク質MBPchKitの発現

ニワトリ*c-kit*遺伝子cDNA (塩基配列の73番目から3089番目)を挿入した大腸菌発現用ベクター-pMalchKitを大腸菌株JM109に導入し、MBPchKitタンパク質を発現させた。その結果、培地へのIPTG添加後、新しいタンパク質の発現が認められた(図4-1)。このタンパク質のみかけの分子量はMBPchKitタンパク質のアミノ酸配列から予想される分子量(150kDa)と一致した。

図には示さないが、培地へのIPTG添加後15分、30分、45分、1時間、2時間、および4時間に大腸菌体を回収してIPTG添加後のMBPchKitタンパク質の発現量の経時的変化を調べた結果、IPTGを添加してから45分から1時間後にはすで

にMBPchKitタンパク質の発現が認められ、2時間、4時間後の発現量は1時間後の発現量と比較すると減少している傾向にあった。そこで、これから先の実験では、IPTG処理時間は45分間に統一した。IPTG添加後培養時間を長くしてもMBPchKitタンパク質の発現量が増加しなかった理由として、発現した融合タンパク質が大腸菌のタンパク質分解酵素によって分解されてしまうために見かけの発現量が少なく見えるためであると考えられる。

(2) ウェスタンブロット解析

上述の150kDaのタンパク質がMBPとchKitタンパク質との融合タンパク質であるかを確認する目的でウェスタンブロット解析を行った。そこで用いた抗chKitペプチド抗血清（家畜衛生試験場 分子免疫研究室 櫻井通陽博士より供与）は、chKitタンパク質のカルボキシル末端の配列をもつ10アミノ酸残基からなる合成ペプチド（TQPLLVRDV）を認識する抗血清である。図4-2に示すようにウェスタンブロット解析の結果、IPTG処理によって新たに産生したタンパク質が抗chKitペプチド抗血清と特異的に反応することが示された。一方、免疫原である合成ペプチドで予め吸収した抗chKit抗血清を用いるとこのタンパク質との反応が消失した。このことからIPTGの添加によって発現したタンパク質が、chKitタンパク質のカルボキシル末端までを含むものであることが示された。

(3) MBPchKitタンパク質の精製

抗chKitタンパク質抗血清を作製する目的でMBPchKitタンパク質の大量精製を行った。MBPchKitタンパク質は常法²⁰⁾では可溶化しなかったため、大腸菌体溶解物中の不溶性画分から分取用SDS-PAGEにより分離・精製を行った。全体で4リットルの大腸菌液から、4.6mgのMBPchKit融合タンパク質が得られた（図4-3）。このタンパク質でウサギを免疫し、抗chKit抗血清を作製した。

(4) GSTchKitタンパク質の発現

第IV章3節(3)項で作製した抗chKit抗血清から、chKitタンパク質の細胞外ドメインに対して特異性を持つ抗体を精製する目的で、大腸菌発現用ベクターpGEX-3Xにニワトリc-kit遺伝子cDNAの塩基配列の73番目から1434番目と2757番目から3088番目をつないだものを挿入しpGEXchKitを作製した。これを大腸菌株JM109に形質転換し、アンピシリン耐性の形質転換大腸菌クローンを得、MBPchKitタンパク質の場合と同様に融合タンパク質GSTchKitを発現させた。IPTG添加後1時間後に回収した大腸菌体はSDS-PAGEサンプル緩衝液を用いて溶解した。この溶解液を7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにより解析を行ったところpGSTchKitがコードすると考えられるアミノ酸配列から予想される分子量(80kDa)のタンパク質の発現が認められた(図4-4)。

(5) ウェスタンブロット解析

培地へのIPTG添加後に発現した80kDaのタンパク質がGSTchKitであることを確認するためにウェスタンブロット解析を行った。一次抗体としては、前述の抗chKitペプチド抗血清を用いた。その結果、発現したタンパク質は抗chKitペプチド抗血清と反応することが示された(図4-5)。このことから、このタンパク質がchKitタンパク質のC末端までを含むものであることが示された。

(6) GSTchKitタンパク質の精製

chKitタンパク質の細胞外領域に特異的なアフィニティ精製抗chKit抗体を抗chKitタンパク質抗血清から精製するアフィニティカラムを作製するために、GSTchKitタンパク質を大腸菌の不溶性画分から分取用SDS-PAGEにより分離・

精製した。500mlの大腸菌液から2.4mgのGSTchKitタンパク質が精製された（図4-6）。これをアフィニティカラム用緩衝液で透析を行うことにより、緩衝液を交換した。このGSTchKitタンパク質溶液を用いてアフィニティカラムを作製した。

（7）抗chKit抗血清のアフィニティ精製

GSTchKitタンパク質を固定化したアフィニティカラムを用いて抗chKit抗血清のアフィニティ精製を行いchKit抗体を作製した。アフィニティ精製の際にグリシン緩衝液で溶出した画分をグリシン-1画分、トリエチルアミン緩衝液で溶出した画分をトリエチルアミン-1画分とした。それぞれの画分の抗体としての力価を調べるためにGSTchKITを発現した大腸菌の溶解液2.5 μ lを抗原としてウェスタンブロット解析を行った。その結果、図4-7に示すようにグリシン-1画分の方がトリエチルアミン-1画分よりも力価が高かった。また、グリシン-1画分は、抗chKit抗血清を20倍希釈したものとほぼ同様の力価が認められたことから、この画分はchKitタンパク質を認識する抗体として有効であると判断し、次章以降の実験においてアフィニティ精製抗chKit抗体として用いた。



図4-1 大腸菌内でのMBPchKitタンパク質の発現

大腸菌発現用pMalchKitベクターを用いて形質転換した大腸菌培養液にIPTGを添加してMBPchKitタンパク質を発現させた。3×SDS-PAGE緩衝液を用いて溶解した大腸菌溶解物を7.5%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。矢印はIPTG添加により発現したMBPchKitタンパク質を示す。レーン1：IPTGを添加する前の大腸菌溶解液，レーン2：IPTG添加後1時間の大腸菌溶解液。

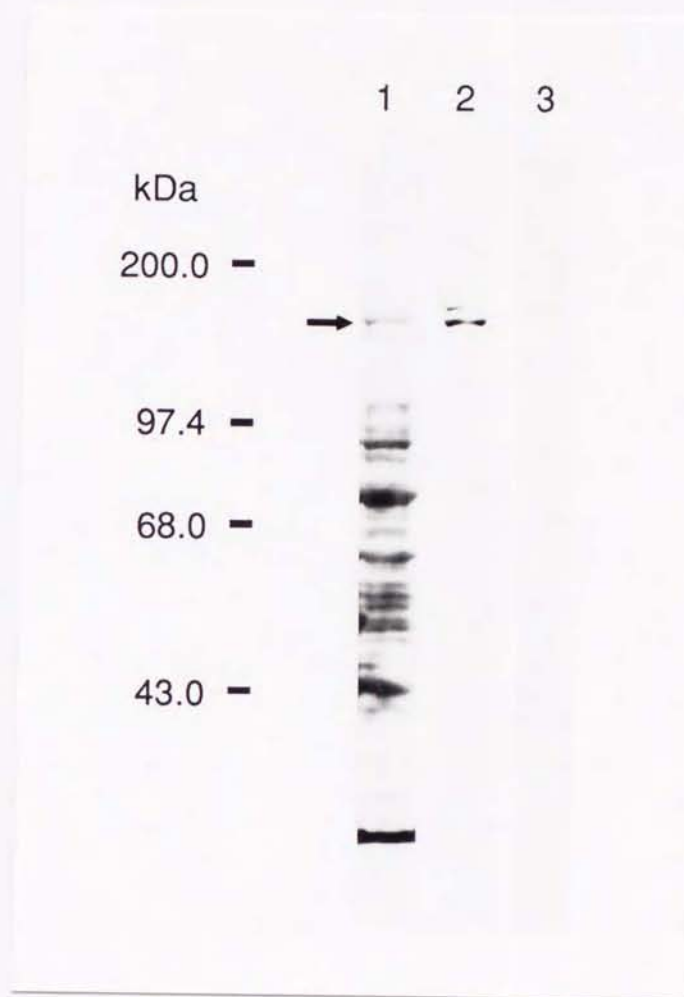


図4-2 MBPchKitタンパク質のウェスタンブロット解析

IPTG添加後45分培養を行った大腸菌培養液から回収した大腸菌体の溶解物を抗chKitペプチド抗血清を用いてウェスタンブロット解析した。二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体を用い、抗体反応陽性バンドの検出にはBCIPおよびNBTを用いた。矢印はMBPchKitタンパク質を示す。レーン1：大腸菌溶解液のアミノブラック染色，レーン2：抗ペプチド抗血清を用いたウェスタンブロット解析，レーン3：chKitタンパク質のカルボキシル末端の配列を持つ10アミノ酸残基からなる合成ペプチドで吸収した抗ペプチド抗血清を用いたウェスタンブロット解析。

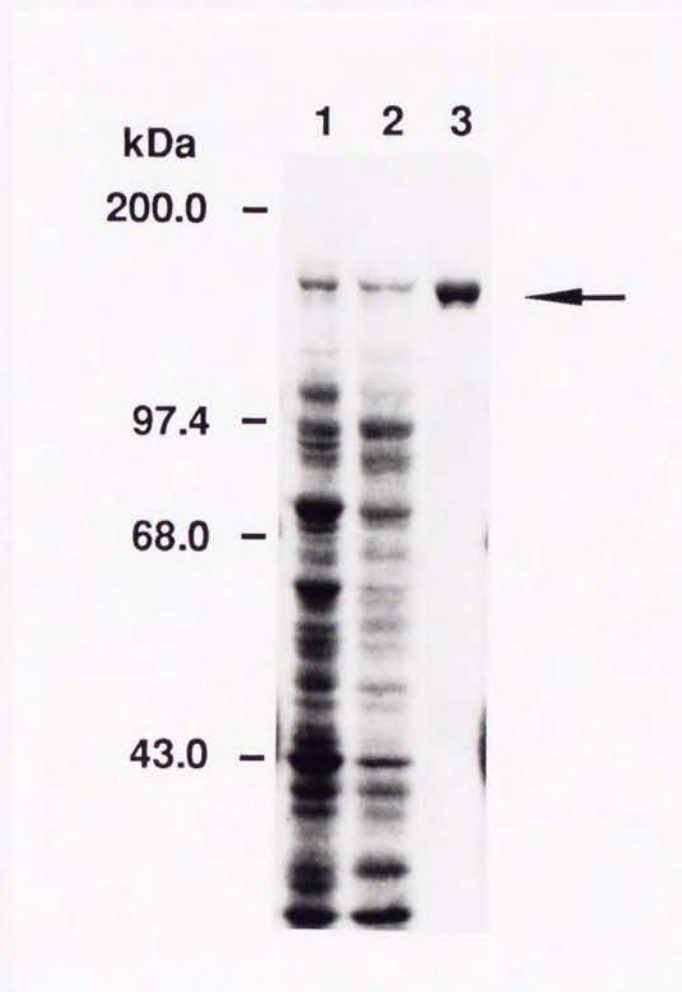


図4-3 MBPchKitタンパク質の精製

IPTG添加後45分間培養を行った大腸菌培養液から回収した大腸菌体溶解物の不溶性画分より分取用SDS-PAGEを用いてMBPchKitタンパク質を精製した。矢印はMBPchKitを示す。レーン1：大腸菌体溶解物，レーン2：大腸菌体溶解物の不溶性画分，レーン3：精製したMBPchKit。



図4-4 大腸菌内でのGSTchKitタンパク質の発現

大腸菌発現用pGSTchKitベクターを用いて形質転換した大腸菌培養液にIPTGを添加してGSTchKitタンパク質を発現させた。3×SDS-PAGE緩衝液を用いて溶解した大腸菌体溶解物を7.5%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。矢印はIPTG添加により発現したGSTchKitタンパク質を示す。レーン1：IPTGを添加する前の大腸菌溶解液，レーン2：IPTG添加後1時間の大腸菌溶解液。

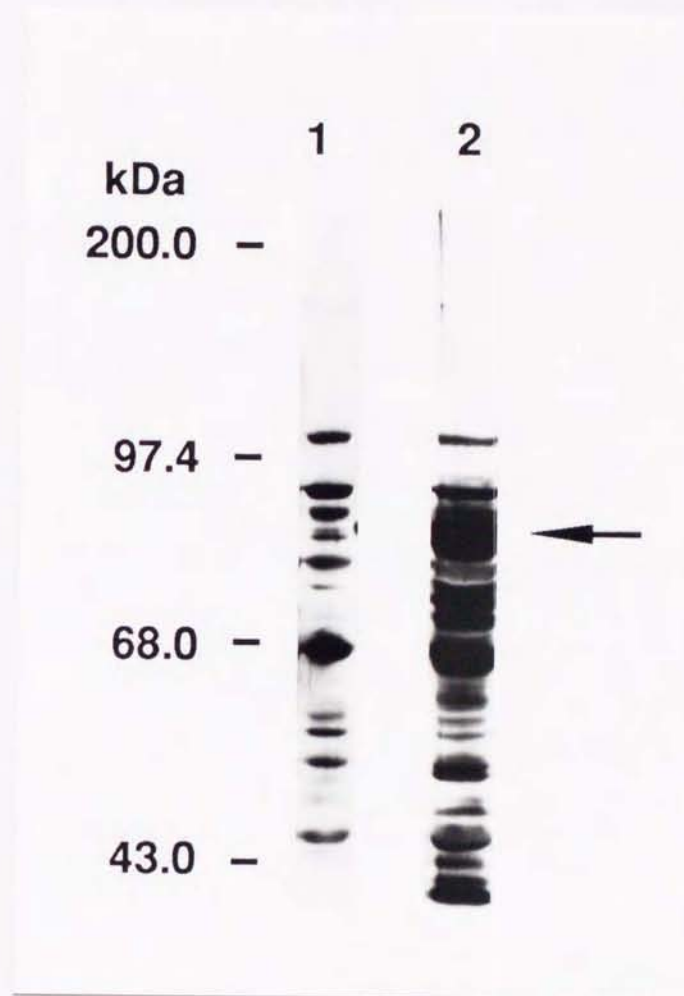


図4-5 GSTchKitタンパク質のウェスタンブロット解析

IPTG添加後1時間培養を行った大腸菌培養液から回収した大腸菌体の溶解物を抗chKitペプチド抗血清を用いてウェスタンブロット解析した。二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体を用い、抗体反応陽性バンドの検出にはBCIPおよびNBTを用いた。矢印はGSTchKitタンパク質を示す。抗chKitペプチド抗血清に反応したGSTchKitタンパク質より小さい分子量のタンパク質はGSTchKitタンパク質の分解産物であると考えられる。レーン1：IPTG添加前の大腸菌体溶解液、レーン2：IPTG添加後1時間の大腸菌体溶解液。

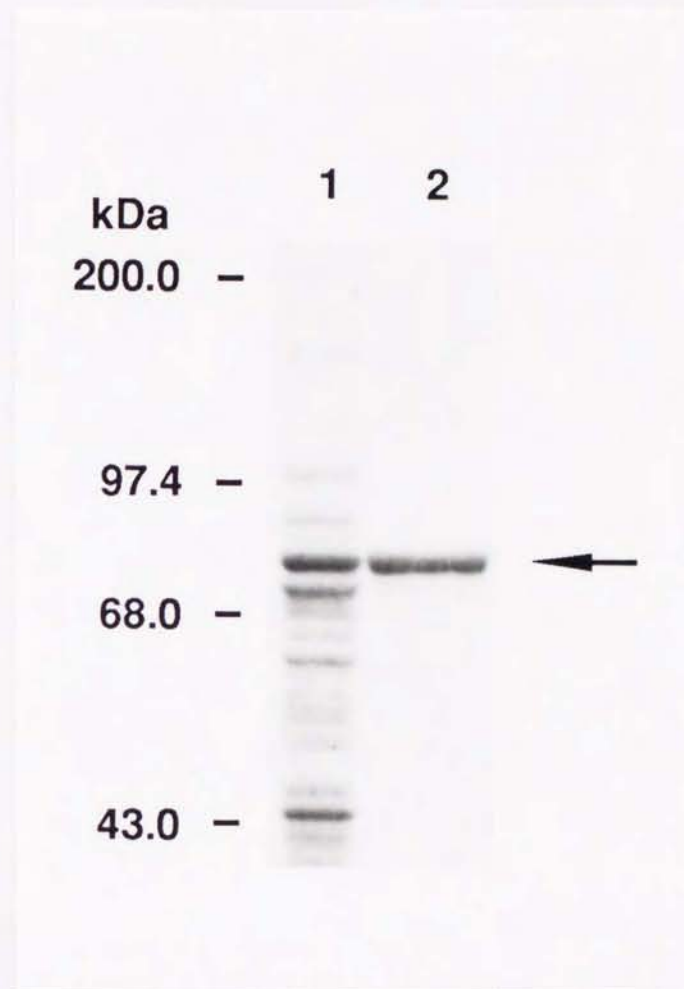


図4-6 GSTchKitタンパク質の精製

IPTG添加後45分間培養を行った大腸菌培養液から回収した大腸菌体溶解物の不溶性画分より分取用SDS-PAGEを用いてGSTchKitタンパク質を精製した。矢印はGSTchKitを示す。レーン1：大腸菌体溶解物，レーン2：精製したMBPchKit。



図4-7 アフィニティ精製抗chKit抗体を用いたウェスタンブロット解析

GSTchKitタンパク質を発現した大腸菌体溶解物のウェスタンブロット解析によりアフィニティ精製抗chKit抗体の力価を検討した。レーン1:20倍希釈した抗chKit抗血清, レーン2:アフィニティ精製抗chKit抗体のグリシン-1画分, レーン3:トリエチルアミン-1画分, レーン4:抗chKit抗血清。これらの抗体をそれぞれ500倍希釈したものを一次抗体として用いた。二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体を用い, 抗体反応陽性バンドの検出にはBCIPおよびNBTを用いた。矢印はGSTKitタンパク質を示す。抗chKitペプチド抗血清に反応したGSTchKitタンパク質より小さい分子量のタンパク質はGSTchKitタンパク質の分解産物であると考えられる。

第V章 真核細胞内におけるchKitタンパク質の発現

V-1 はじめに

chKitタンパク質の生化学的性状を調べる目的で、得られたニワトリc-kit遺伝子cDNAを真核細胞発現用ベクターpSVLへ挿入し、野生型のニワトリKitタンパク質(chKit+タンパク質)および、マウスのW⁴²変異体で見いだされている変異体型Kitタンパク質に相当する変異体型ニワトリKitタンパク質(chKit42タンパク質)を発現する発現ベクターを作製し、これらをCos-1細胞に導入してchKitタンパク質を発現させた。これらのchKitタンパク質の組換えニワトリSCF(chSCF)に対する反応性を調べる目的で、Cos-1細胞をchSCFで刺激後、2種のchKitタンパク質中のチロシン残基に対するリン酸化の程度をウエスタンブロット解析により調べた。さらに、chKit+タンパク質およびchKit42タンパク質のリン酸化酵素活性について検討する目的で*in vitro*リン酸化反応実験を行った。その結果、マウス、ヒトのKitタンパク質と同様にchKit+タンパク質もまたリン酸化酵素活性を有し、リガンドによる刺激に应答して活性化されることが示された。一方、chKit42タンパク質はチロシンリン酸化酵素活性を持たないことが示された。

V-2 材料および方法

(1) 細胞およびタンパク質発現用ベクターの作製

ニワトリc-kit遺伝子cDNA中の読み取り開始コドンATGの直上流に塩基配列の5'末端にXhoI制限酵素切断部位を挿入する目的で、pKitNプラスミドを鋳型とし、プライマー[(5') CAGCAGGATGTCCTGTCTT (3') および (5') GGCTCGA GCCATGGAGGGCGCGCAC (3')]を用いてニワトリc-kit遺伝子cDNAの塩基配列の1番目から373番目をPCRにより増幅した。増幅したDNA断片はXhoIおよび

片は *Xho*I および *Hinc*II で消化し, pBlueskript SK(-) プラスミドの *Xho*I および *Hinc*II 切断部位に挿入し, 得られたプラスミドを pMIC とした. プラスミド pKitN (第 V 章参照) の *Sal*I 切断部位をリンカーライゲーションにより *Not*I 切断部位に変換した後, cDNA 配列を含む *Hinc*II および *Not*I 切断断片を精製した. 次いでこの DNA 断片を pMIC の *Hinc*II および *Not*I 切断部位に挿入し, このプラスミドを pCCKit とした. pCCKit を *Not*I で消化して切断末端を平滑化した後, *Xho*I 消化を行った. これにより生じたニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA を含む DNA 断片を精製し, Cos-1 細胞発現用ベクター pSVL の *Sma*I 切断部位へ挿入することにより, 野生型 chKit を発現する発現プラスミド pchKit+ を作製した. マウスの *W*⁴² 変異体に相当する chKit タンパク質の変異体を発現する発現ベクターを作製する目的で, Saiki et al⁴⁵⁾ の 2 段階 PCR 法により, ニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA 中の 2330 番目のグアノシン残基をアデノシン残基に置換した. すなわち, 2 組のオリゴヌクレオチドプライマー [(5') AAAAGGCCGGTGAAATCTGG (3') (プライマー-1) と (5') TTGCTGCCAGATTCCTATGAATGCA (3') (プライマー-2), および, (5') ACAGTGGTAGTAGTGAGTAA (3') (プライマー-3) と (5') TGCATTCATAGGAATCTGGCAGCAA (3') (プライマー-4)] を用い, pKitN を鋳型として PCR 反応を行い, それぞれ cDNA 配列の 2191 番目から 2317 番目, および 2343 番目から 2973 番目までを増幅した. その結果得られた DNA 断片の配列においては 2330 番目のグアノシン残基がアデノシン残基に置換されている. 次いで, この 2 つの断片を接続するため, これら 2 つ断片を鋳型とし, プライマー-1 および 2 を用いて PCR を行った. この結果得られた DNA 断片を制限酵素 *Bgl*I および *Sma*I で消化し, これを pchKit+ の *Bgl*I-*Sma*I 部分と入れ換えることにより, pKit42 を作製した. PCR で増幅した部分の塩基配列はシーケンシングで確認した. この点突然変異の導入により chKit+ タンパク質の 777 番目のアスパラギン酸残基がアスパラギン残基に置換した chKit42 タンパク質が発現すると考えられる.

(2) Cos-1細胞へのDNAトランスフェクション

Cos-1細胞へのDNAトランスフェクションにはリポソーム法を用いた。リポソーム法は、DNAを人工的脂質小胞であるリポソームに取り込ませリポソームを細胞膜と融合させその内容物を直接細胞質内へ搬送する方法である。この方法には、リポフェクタミン (GIBCO BRL社) を用いた。10 μ gのプラスミドDNAと無血清培地OPTI-MEM (GIBCO BRL社) を混合して全量500 μ lとした溶液と、480 μ lのOPTI-MEM培地と20 μ lのリポフェクタミンを混合した溶液とをポリスチレンチューブ内で混合し、室温で20分間放置した。その後、DNA-リポフェクタミン溶液に4mlのOPTI-MEM培地を加え全量5mlとした。この溶液をOPTI-MEM培地2mlで洗浄したCos-1細胞 (細胞数約1 \times 10⁶個) の培養皿に加えた。Cos-1細胞を37 $^{\circ}$ C、5.0%CO₂濃度の条件下で5時間培養した後、20%のウシ胎児血清 (FCS) 添加ダルベッコ変法イーグル基礎培地 (DME) を5ml加え一晩37 $^{\circ}$ C、5.0%CO₂濃度の条件で培養した。翌日、培養皿から培地を除き、1mlのトリプシン-EDTA溶液 (GIBCO BRL社) で洗浄した後、再度1mlのトリプシン-EDTA溶液を培養皿に加えて37 $^{\circ}$ C、5.0%CO₂濃度のインキュベーターの中に5分間静置した。細胞を培養皿から完全に剥がして回収し、800rpm、5分間の遠心により細胞を沈殿させた。細胞を10mlの10%FCS添加DMEに懸濁して、新しい培養皿にまき直し、CO₂インキュベーターで培養した。

(3) 細胞タンパク質の³⁵S-メチオニン標識

DNAトランスフェクションを行ってから72時間後、細胞の³⁵S-メチオニン標識を行った。細胞の入った培養皿から培地を除いた後、10%透析ウシ胎児血清を含むメチオニン不含のDME (GIBCO BRL社) 5mlを培養皿に加えた。これに118.5 μ Ciの³⁵S-メチオニンを加えて37 $^{\circ}$ C、5.0%CO₂濃度の条件下で5時間培養した。その後、培地を除きPBS⁻で細胞を洗浄した後、2.4mlの冷PBS⁻を培

養皿に注ぎ細胞をはがした。次いで3,000rpm 3分間の遠心により細胞を沈殿させた。細胞の沈殿を2.4mlの免疫沈降用緩衝液[50mMトリス(pH7.4), 150mM NaCl, 20mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% デオキシコール酸ナトリウム, 0.1% ラウリル硫酸ナトリウム, 1mM フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF), 20µg/ml ロイペプチン, 1mM オルトバナジン酸(V)ナトリウム]で溶解した後, 22Gの注射針と2.5mlの注射筒を用いて溶解液を10回出し入れした。これを30分間氷上に静置した後, 15,000rpm 10分間遠心して上清を回収した。

一部の実験において, 細胞タンパク質の³⁵S-メチオニンラベルを行う際に終濃度10 µg/mlのツニカマイシンを培地に加えることにより, 細胞のツニカマイシン処理を行った。

(4) 免疫沈降

上記のように作製した細胞溶解液1mlにプロテインAセファロースCL4B[以後プロテインAセファロースと略する (Pharmacia)] 100µlを加え4℃で60分間混和した後, 15,000rpm, 5分間遠心を行い上清を回収した。この上清に5µlの抗chKit抗血清および10µlのプロテインAセファロースを加え, 4℃で一晩混和する事により免疫沈降を行った。その後, 15,000rpm, 5分間遠心を行い上清を除いた。沈殿したプロテインAセファロースに500µlの免疫沈降用緩衝液を加え4℃で20分間回転混和し, 遠心して上清を除いた。この操作を4回繰り返すことによりプロテインAセファロースの洗浄を行った。洗浄が終了したプロテインAセファロースを10µlの3×SDS-PAGEサンプル緩衝液に懸濁した。この試料を100℃, 5分間煮沸した後, 7.5%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。電気泳動が終了したゲルは固定液[10% 酢酸, 25% メタノールを含む水溶液]中で20分間振とうしてゲルを固定させた。続いて増感剤[ENLIGHTNING(New England Nuclear社)]中で15分間振とうを行った後, 80℃, 1時間ゲル乾燥機

でゲルを乾燥させオートラジオグラフィーに供した。

(5) chKit+タンパク質およびchKit42発現細胞のSCF処理

Cos-1細胞をまき直してから8時間後、培地を10mlの0.5%FCS添加DMEに交換し、16時間培養した。その後、すなわちCos-1細胞へトランスフェクションを行ってから2日後に組換えchSCF（櫻井通陽博士より供与）および組換えマウスSCF（R&D Systems社）による処理を行った。すなわち、Cos-1細胞の培地から4mlを抜き取り、これに40 μ lの1mM オルトバナジン酸（V）ナトリウムおよび終濃度100ng/mlのchSCFまたは終濃度200ng/mlのマウスSCFを加えた。培養皿に残った培地を除いた後、SCFの入った培地を加えて37 $^{\circ}$ C、CO₂濃度5.0%のCO₂インキュベーターの中で2分間SCF処理を行った。その後直ちに培地を除き、1mlの溶解緩衝液[50mM N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸（以降HEPESと略称する）（pH 7.2）、150mM NaCl、10%グリセロール、1% triton X-100、1.5mM MgCl₂、1mM EGTA、10mg/ml ロイペプチン、1mM PMSF、200mM オルトバナジン酸（V）ナトリウム]で細胞を溶解した。この溶液を回収し、22Gの注射針と2.5mlの注射筒を用いて10回出し入れした。これを30分間氷上に静置した後、15,000rpm 10分間遠心して上清を回収して、細胞溶解液とした。

(6) chKit+およびchKit42タンパク質のチロシンリン酸化の検出

333 μ lの細胞溶解液に667 μ lの溶解用緩衝液を加えて体積を1mlとした。この細胞溶解液を100 μ lのプロテインAセファロースと共に4 $^{\circ}$ Cで16時間転倒混和を行った後、遠心して上清を回収した。上清に5 μ lの抗chKit抗血清および10 μ lのプロテインAセファロースを加え、4 $^{\circ}$ Cで16時間転倒混和を行うことにより免疫沈降を行った。免疫沈降物は、500 μ lの溶解緩衝液を用いて4 $^{\circ}$ C、20分間、4回洗浄した後、遠心して沈殿を回収した。この沈殿を10 μ lの3 \times SDS-PAGEサンプル

緩衝液に懸濁し、7.5%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動を行った。

SDS-PAGE終了後ゲルを第IV章2節(3)項に述べた方法でイモビロン-P
-メンブレン(Milipore社)にプロットした。次いでSCF処理によるchKit
+タンパク質のチロシンリン酸化を検出する実験では、メンブレンを5%ウシ血
清アルブミンを含むPBS溶液中で1時間30分間、室温で振とうした後、TTBSで
20分間1回、5分間4回洗浄した。次いで一次抗体溶液[3%ウシ血清アルブミ
ン、0.02% Tween 20、1 µg/ml 抗フォスフォチロシンマウスモノクローナル
抗体4G10(UBI社)を含むPBS]中で4℃、一晚反応させた後、TTBSで20分間
1回、5分間4回洗浄した。続いて二次抗体溶液[3%ウシ血清アルブミン、
0.02% Tween 20、1000倍希釈 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マ
ウスIgG血清(Jackson Immuno Research laboratories社)を含むPBS]中
にメンブレンを移して室温、2時間の振とうを行った後、同様に洗浄を行った。

chKit+およびchKit42タンパク質の検出は、5%スキムミルクを含むPBSで
フィルターをブロッキングした後、一次抗体溶液として1%スキムミルク、0.02
% Tween 20、1000倍希釈抗chKitウサギ血清を含むPBS、二次抗体溶液とし
て1%スキムミルク、0.02% Tween 20、1000倍希釈 西洋ワサビペルオキシダ
ーゼ標識ロバ抗ウサギIgG血清(Amersham社)を含むPBSを用い、抗体反応お
よびフィルターの洗浄はチロシンリン酸化酵素活性の検出と同じ条件で行った。
抗体に反応するバンドの検出はECL(Amersham社)検出キットを用い、添付
されていたマニュアルに従った。

(7) *In vitro* カイネーション解析

第V章2節(5)項に既述した方法を用いて5分間のchSCF処理を行った
Cos-1細胞およびchSCF処理を行っていないCos-1細胞の細胞溶解液それぞれ
500 µlを50 µlのプロテインAセファロースと共に4℃で16時間転倒混和を行った

後、遠心して上清を回収した。上清に5 μ lの抗chKit抗血清および10 μ lのプロテインAセファロースを加え、4 $^{\circ}$ Cで16時間転倒混和を行うことにより免疫沈降を行った。免疫沈降物は、500 μ lの洗浄用緩衝液1[PBSに0.5% TritonX-100, 200 μ M オルトバナジン酸(V)ナトリウム, 1mM PMSF, 10 μ g/mlロイペプチンを添加した溶液]で4 $^{\circ}$ C, 20分間, 1回洗浄した後, 500 μ lの洗浄用緩衝液2[20mM トリス(pH7.2), 0.5M NaCl, 5mMEDTA, 200 μ M オルトバナジン酸(V)ナトリウム, 1mM PMSF, 10 μ g/mlロイペプチン]を用いて4 $^{\circ}$ C, 20分間, 2回洗浄した。その後, 500 μ lの20mM ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸) (以後PIPESと略称する) 緩衝液 (pH7.2) に懸濁した後, 遠心して沈殿を回収した。この沈殿を15 μ lのリン酸化反応用緩衝液[20mM PIPES(pH7.2), 10mM MnCl₂, 10 μ M ATP, 10 μ Ci [γ -³²P]ATP]に懸濁し, 37 $^{\circ}$ C, 10分間反応させた後, 直ちに7.5 μ lの3 \times SDS-PAGEサンプル緩衝液を加え, 7.5%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。

V-3 結果

(1) Cos-1細胞におけるchKitタンパク質の発現およびその検出

Cos-1細胞にはサルの腫瘍ウイルスであるSV40のウイルスゲノム的一部分が組み込まれており, ウイルスDNAの複製に必要なT抗原が発現できるようになっている。一方, 本研究で作製した発現用ベクターは, SV40ウイルスの複製起点を含んでおり, それらがCos-1細胞の中へ取り込まれるとCos-1細胞で発現しているT抗原によりプラスミドのウイルスの複製起点が認識されこれらのプラスミドが細胞中で多量に複製される。その結果, プラスミドから発現されるタンパク質が細胞内に多量に蓄積される。

Cos-1細胞に真核細胞発現用ベクターpchKit+およびpchKit42をトランスフェクトする事により, 野生型chKit+タンパク質(chKit+)および変異型chKit

タンパク質 (chKit42) を強制発現させ、細胞タンパク質を³⁵S-メチオニン標識した後、第IV章において作製した抗chKitタンパク質抗血清を用いて免疫沈降を行うことによりこれらのchKitタンパク質を検出した。

その結果、chKit+, chKit42タンパク質のいずれの場合においても145kDaおよび130kDaの2つのタンパク質の発現が認められた。ツニカマイシンはタンパク質へのN-グリコシド型糖鎖の付加を阻害する抗生物質である。Cos-1細胞で発現した2種のchKitタンパク質にN-グリコシド型糖鎖が付加しているかを検討する目的でこれらのchKitタンパク質を発現させたCos-1細胞のツニカマイシン処理を行った。その結果、pchKit+, pchKit42いずれの場合においても110kDaのタンパク質の発現が認められた (図5-1)。

(2) 抗リン酸化チロシンマウスモノクローナル抗体による

ウェスタンブロット解析

chKit+タンパク質およびchKit42タンパク質を発現するCos-1細胞に2分間のchSCF処理を行った後、抗リン酸化チロシンマウスモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット解析により、chKit+タンパク質およびchKit42タンパク質のチロシンリン酸化の程度を検討した。その結果、chKit+タンパク質については、chSCF処理を行わない場合でも一定程度のチロシンリン酸化が認められたが、chSCF処理によりこれが顕著に増加することが認められた (図5-2)。一方、マウスSCFによる処理によってはchKit+タンパク質のチロシンリン酸化の増加は認められなかった。chKit42タンパク質については、SCF処理の有無に関わらずそのチロシンリン酸化は全く認められなかった。

(3) *In vitro*リン酸化反応解析

Cos-1細胞に発現したchKit+タンパク質およびchKit42タンパク質のリン酸

化酵素活性を *in vitro* リン酸化反応により検討した。その結果、chKit+タンパク質ではSCF処理の有無に拘わらず見かけの分子量130kDaおよび145kDaの自己リン酸化したchKit+タンパク質が認められた(図5-3)。また、SCF処理の有無に拘わらずchKit42タンパク質の自己リン酸化は全く認められなかった。

V-4 考察

(1) Cos-1細胞におけるchKit+タンパク質の発現

Reith et al.⁴²⁾によってマウスKitにおいては、Kitタンパク質のアミノ酸配列の512番目と513番目の間に、GNNKというアスパラギン残基を多く含むアミノ酸配列が挿入したKitA+と呼ばれるアイソフォームとこの挿入配列を含まないKit+と呼ばれるアイソフォームが共に存在することが報告されている。さらに彼らは、この2つのアイソフォームをCos-1細胞に発現させた結果、いずれの場合も、見かけの分子量124kDaおよび145kDaのタンパク質として発現すること、また、ツニカマイシン処理の結果、いずれのタンパク質の場合も糖鎖が付加していない分子量106kDaのKitタンパク質が発現することを示している⁴²⁾。この結果は、これらのKitタンパク質がN-グリコシド型糖鎖を有する糖タンパク質であることを示すものである。

pchKit+およびpchKit42をトランスフェクトしたCos-1細胞の溶解液を抗chKit抗血清を用いて免疫沈降を行った結果、いずれの場合においてもマウスのKit+と同様に、145kDaおよび130kDaの2つのタンパク質が発現すること、また、chKit+とchKit42タンパク質の発現レベルは互いに同程度であることが示された。さらにCos-1細胞のツニカマイシン処理の結果、110kDaのタンパク質のみが発現することが認められ、145kDaと130kDaのバンドがN-グリコシド型糖鎖の付加の程度が異なるchKitタンパク質のバンドであることが示された。ツニカマイシン存在下でのchKitタンパク質の見かけの分子量(110kDa)はア

ミノ酸配列から予想されるchKitタンパク質の分子量(105kDa)に近いことから、マウスの場合と同様にchKit+タンパク質に付加している糖鎖の多くがN-グリコシド型糖鎖であることが示唆された。

(2) chKit+タンパク質のチロシンリン酸化酵素活性

抗リン酸化チロシンマウスモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果、chKit+タンパク質はchSCFに反応してそのチロシンリン酸化レベルが上昇したことから、chKitタンパク質も哺乳類のKitタンパク質と同様にリン酸化酵素活性を有し、そのリガンドに反応してその活性が上昇することが示唆された。

Reith et al⁴²⁾はマウスのKit+およびKitA+タンパク質をマウスSCFで処理した実験の結果から、Kit+、KitA+のいずれもマウスSCFの刺激に反応して、そのチロシンリン酸化レベルの上昇が見られること、しかしながら、Kit+の場合はマウスSCFの刺激が無い状態においても一定程度のチロシンリン酸化があるのに対し、KitA+の場合においてはチロシンリン酸化が全くないという点において両者の酵素活性に違いがあることを示している。

抗リン酸化チロシンマウスモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果、マウスのKit+型アイソフォームの場合と同様に、chSCF処理をしない場合においてもchKit+タンパク質でそのチロシンリン酸化が認められた。

pchKit+プラスミドに挿入されているニワトリ*c-kit*遺伝子cDNAの塩基配列はマウスにおけるKit+型のアイソフォームの配列に対応しているものであることが第III章ですでに示されている。また、第III章でニワトリの脳においては、マウスのKit+型に対応する分子種がchKitの主要な分子種である可能性が示唆されているが、これに加えて、上記の結果からchKit+型タンパク質がマウスKit+型タンパク質と同様の酵素学的特性を持っていることが示された。

以上の結果に対応して、*in vitro* リン酸化反応実験の結果は、chKit+タンパク質が自己リン酸化酵素活性を有するのに対し、chKit42タンパク質は酵素活性を持たないことを示した。この結果は、抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロット解析において見られたKit+のチロシンリン酸化が、Kit+タンパク質自身による自己リン酸化の結果であることを示している。さらに、chKit42タンパク質において置換されている777番目のAsp残基は、マウスKitタンパク質と同様に、chKitタンパク質がチロシンリン酸化酵素活性を有するのに必須のアミノ酸残基であることが示された。

また、マウスのSCF処理ではchKit+タンパク質のチロシンリン酸化のレベルは上昇しないことから、chKit+はchSCFには応答するが、マウスSCFによる刺激には応答しないことが示された。Lev et alは、ラットのSCFはマウスのKitタンパク質と、また親和力は低いもののヒトのKitタンパク質とも結合するが、ヒトSCFはマウスのKitタンパク質には結合しないと報告している²³⁾。chSCFとマウスSCFとのアミノ酸配列の同一性は53%であり⁶³⁾、ヒトとマウスSCFとの同一性(83%)と比較してかなり低い同一性を示している。chKit+タンパク質がmSCFによる刺激に対して応答しないという結果はこの低い同一性を反映するものであると考えられる。

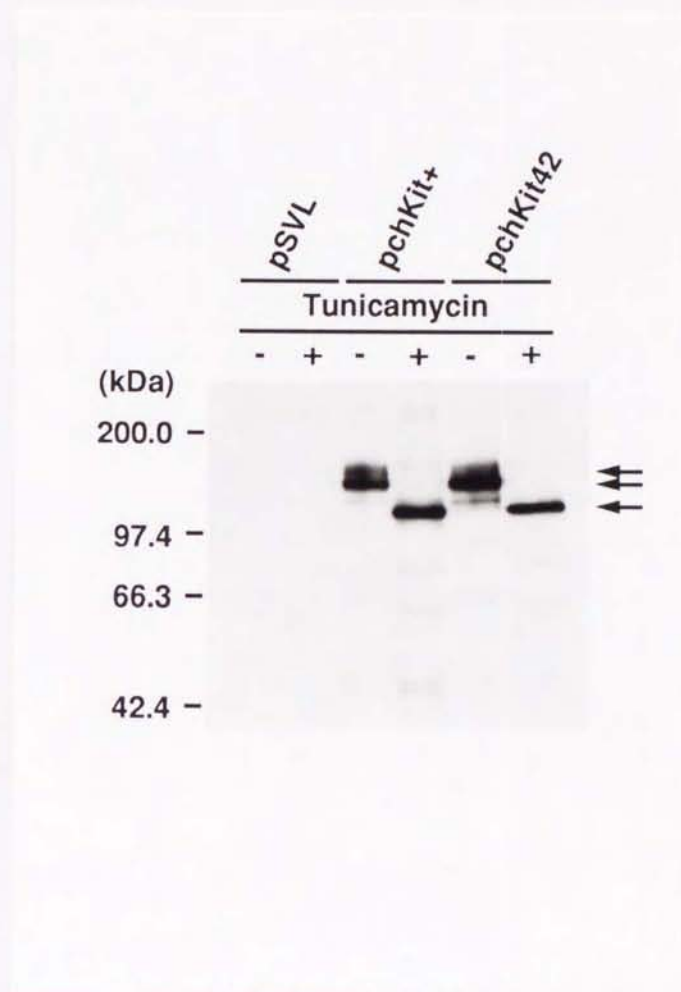


図5-1 chKit+およびchKit42タンパク質のCos-1細胞における発現

発現用ベクター-pSVL, pchKit+, pchKit42をトランスフェクトしたCos-1細胞を³⁵S-メチオニン標識した後, 免疫沈降を行った. 各レーンの上の+は³⁵S-メチオニン標識する際にツニカマイシン処理を行ったもの, -はツニカマイシン処理を行っていないものを示す.

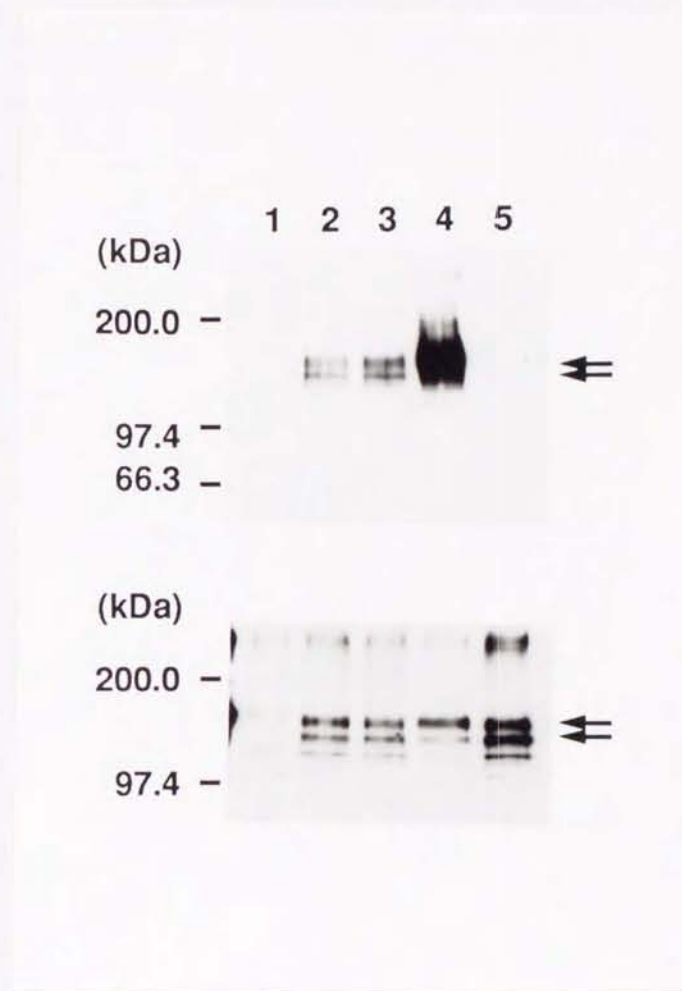


図5-2 chKit+およびchKit42タンパク質のSCF処理によるチロシンリン酸化の上昇

pSVL (レーン1), pchKit+ (レーン2,3,4), pchKit42 (レーン5) 発現ベクターをトランスフェクトしたCos-1細胞をニワトリSCF (レーン1,4,5) あるいは、マウスSCF (レーン3) で処理した。レーン2は、SCF処理を行わなかった細胞を示す。これらの細胞溶解液をアフィニティ精製抗chKit抗体を用いて免疫沈降を行い、この免疫沈降物のウェスタンブロット解析を行った。上段は、抗リン酸化チロシンマウスモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果を、下段はアフィニティ精製抗chKit抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果を示す。矢印はchKitタンパク質のバンドを示す。

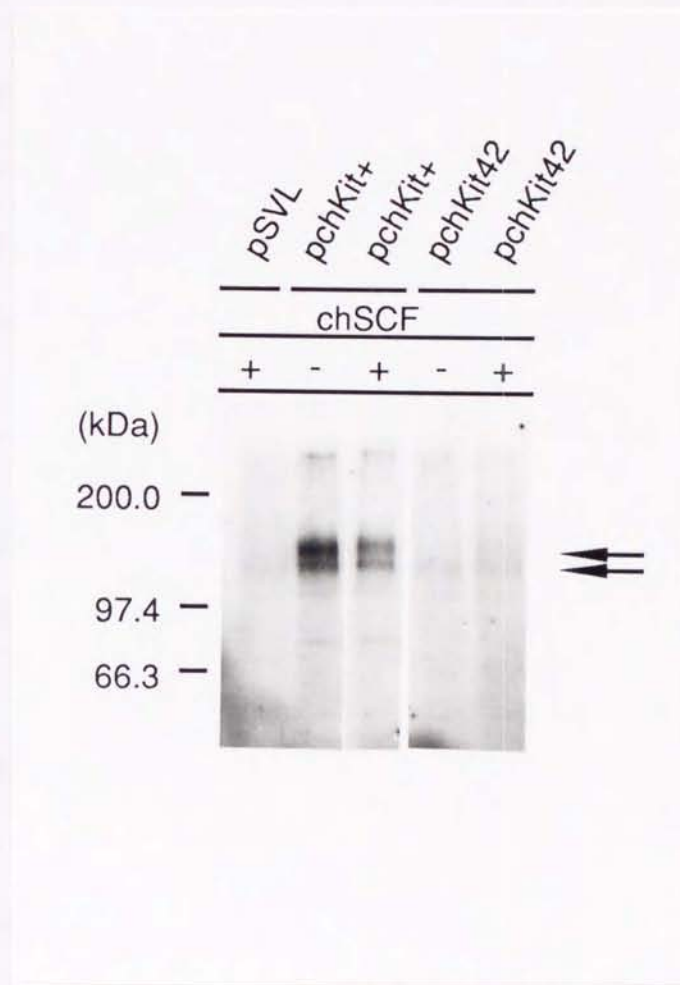


図5-3 chKit+およびchKit42タンパク質の*in vitro*リン酸化反応

発現ベクター-pSVL, pchKit+, pchKit42をトランスフェクトしたCos-1細胞の細胞溶解液を用いて*in vitro*リン酸化反応を行った。各レーンの上の+および-は、ニワトリSCF処理の有無を表す。矢印はchKitタンパク質を示す。

第VI章 ニワトリ生体内におけるKitタンパク質の発現

VI-1 はじめに

ニワトリ生体内において発現しているchKitタンパク質の性状を検討する目的で、アフィニティ精製抗chKit抗体を用いた免疫沈降により、ニワトリ脳中のchKitタンパク質を検出した。次いで*in vitro*リン酸化反応実験を行うことにより、このchKitタンパク質がリン酸化酵素活性を有することを示した。さらにchKitタンパク質のグリコシダーゼ処理を行い、chKitタンパク質にはシアル酸が付加されていることを示した。

VI-2 材料および方法

(1) ニワトリ脳からの細胞溶解液の調製

2ヶ月齢（家畜衛生試験場慢性毒性研究室山中典子博士より供与）のニワトリをクロロホルムを用いてと殺した後、速やかに脳を採集した。採集した脳は細切して組織の湿重量1gあたり5mlの溶解用緩衝液（第V章2節（5）項参照）を加えガラスホモジェナイザーですり潰した。これを30分間氷上に静置した後、15,000rpm、15分間遠心を行い上清を回収し、細胞溶解液とした。この細胞溶解液はウェスタンブロット解析およびグリコシダーゼ処理に供するまで-20℃で保存した。

(2) ウェスタンブロット解析

プロテインAセファロースに非特異的に吸着するタンパク質を取り除くために、1mlのニワトリ脳細胞溶解液にプロテインAセファロース100 μ lを加えて4℃で1時間転倒混和を行った後、15,000rpm、5分間遠心して上清を回収した。回収した上清に、10 μ lのプロテインAセファロースおよび10 μ lの抗chKitタンパク質抗

血清を加え一晩4℃で免疫沈降を行った。次いで、15,000rpm、5分間の遠心を行い免疫沈降物を回収した。回収した免疫沈降物を500μlの溶解用緩衝液に懸濁して4℃、20分間転倒混和を行って洗浄した。これを4回繰り返した後、10μlの3×SDS-PAGEサンプル緩衝液に懸濁し、7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。電気泳動終了後、第IV章2節(3)項に既述した方法を用いてナイロン膜にプロットした。抗体との反応は、第IV章2節(3)項に既述した方法に従って行った。一次抗体反応には、アフィニティ精製抗chKit抗体を50倍希釈して用いた。次いで二次抗体反応には西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ロバ抗ウサギIgG抗体(アマシャム社)を1000倍希釈して用いた。

(3) ニワトリ脳chKitタンパク質の*in vitro*リン酸化反応解析

第VI章2節(1)項に既述した方法により得られた2ヶ月齢のニワトリの脳の細胞溶解液500μlを第VI章2節(2)項に既述した方法で免疫沈降した。免疫沈降にはウルトラフリーC3(Milipore社)を用いて20倍に濃縮したアフィニティ精製抗chKit抗体10μlを用いた。免疫沈降物は、第V章2項(6)節に既述した方法により*in vitro*リン酸化反応実験を行った後、100μlの2×SDS-PAGEサンプル緩衝液に懸濁し、5分間煮沸した。これに900μlの溶解用緩衝液を加え15,000rpm、5分間遠心を行った後、上清を2等分した。それぞれに15μlのプロテインAセファロースおよび20倍に濃縮したアフィニティ精製抗chKit抗体10μlあるいは陰性対照として10μlの抗chKitタンパク質抗血清の前血清を加え、4℃で一晩転倒混和を行うことにより免疫沈降を行った。免疫沈降物は既述した方法で洗浄した後、7.5%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。ゲルは乾燥させた後、オートラジオグラフィーに供した。

(4) ニワトリ生体内におけるchKitタンパク質のグリコシダーゼ処理

第VI章2項(1)節に既述した方法により得られた2ヶ月齢のニワトリの脳の細胞溶解液500 μ lを第VI章2節(2)項に既述した方法で免疫沈降した。免疫沈降には抗chKitペプチド抗血清10 μ lを用いた。次いで免疫沈降物を、ノイラミニダーゼ(Genzyme社)およびエンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ(宝酒造)により消化した。ノイラミニダーゼ処理は、30ミリユニットのノイラミニダーゼを加えた反応用緩衝液[0.1M NaOAc (pH6.5), 10mM CaCl₂]50 μ lに免疫沈降物を懸濁し、37°Cで1時間保温することにより行った。エンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ処理は、ノイラミニダーゼ処理を行ったサンプルに5 μ lの0.1M D-ガラクトノ- γ -ラクトン, 2ミリユニットのエンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼを加え37°C, 8時間保温することにより行った。酵素処理が終了したサンプルは15,000rpm, 5分間遠心を行い上清を除いて3 \times SDS-PAGEサンプル緩衝液に懸濁し、7.5%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動を行った後、ウェスタンブロット解析を行った。一次抗体として抗chKitペプチド抗血清, 二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗血清をそれぞれ1000倍希釈して用い、ウェスタンブロット解析の操作は第IV章2節(3)項に既述した方法によって行った。

VI-3 結果および考察

(1) ニワトリの脳におけるchKitタンパク質の発現

ニワトリ生体内のKitタンパク質を検出する目的で2ヶ月齢のニワトリ脳, 心臓, 大腸, 小腸の溶解液をアフィニティ精製抗chKit抗体を用いて免疫沈降を行った後, アフィニティ精製抗chKit抗体によるウェスタンブロット解析を行った。その結果, 脳で145kDaのchKitタンパク質が検出されたが, 心臓, 大腸, 小腸においてはchKitタンパク質と思われるタンパク質は検出できなかった。心臓で

は、ノザンロット解析によりc-kit遺伝子mRNAの発現が認められた（第III章3節（5）項参照）が、ウエスタンプロット解析の結果、タンパク質の発現が認められなかった。このことから、chKitタンパク質の発現はc-kit遺伝子mRNAが翻訳される段階で何らかの調節を受けていることが示唆された。

（2）ニワトリ脳のchKitタンパク質のリン酸化酵素活性

ネコの脳、およびマウスの各組織の細胞溶解液を用いた*in vitro*リン酸化反応実験の結果、ネコおよびマウスの脳で検出される145kDaのKitタンパク質、精巣、脾臓、胸腺から検出される150kDaおよび160kDaのKitタンパク質がそれぞれリン酸化酵素活性を持つことが示されている²⁵⁾。

*in vitro*リン酸化反応実験によりニワトリの脳で発現しているchKitタンパク質のリン酸化酵素活性について検討した。その結果、145kDaのchKitタンパク質がネコ、マウスのKitタンパク質と同様に自己リン酸化酵素活性を持つことが示された（図6-2）。

（3）ニワトリchKitタンパク質のグリコダーゼ処理

Majumdar et alは、ネコの脳の細胞溶解液から検出される分子量145kDaのKitタンパク質をノイラミニダーゼ、および糖タンパク質からN-グリコシド型糖鎖を遊離させる酵素であるエンドグリコシダーゼHおよびエンドグリコシダーゼFの3種類のグリコシダーゼで処理した結果、ネコの脳に存在するKitタンパク質には、シアル酸およびN-グリコシド型糖鎖が付加していることを示している²⁵⁾。ニワトリの脳で発現しているchKitタンパク質への糖鎖の付加を検討する目的で免疫沈降物のグリコシダーゼ処理を行った。本実験に使用したノイラミニダーゼは、糖タンパク質中のシアル酸残基を加水分解的に遊離させる酵素であり、エンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼは、O-グリコシド型糖鎖とタン

パク質との結合部位を特異的に切断する酵素である。免疫沈降物のノイラミニダーゼによる処理の結果、chKitのみかけの分子量は135kDaに減少した。また、ノイラミニダーゼおよびエンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼで処理した場合には、chKitの見かけの分子量はノイラミニダーゼのみによる処理後と比べて変化しなかった（図6-3）。データには示さないが、免疫沈降物をN-グリコシダーゼで処理した場合には明確なタンパク質のバンドが認められなかった。これは、N-グリコシダーゼ標品中に混入するタンパク質分解酵素によるものと思われる。以上の結果から、ニワトリ脳のchKitタンパク質に付加した糖鎖末端には、シアル酸が付加していること、一方、O-グリコシド型の糖鎖はほとんど付加していないことが示された。また、ノイラミニダーゼおよびエンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ処理により検出されたchKitタンパク質の見かけの分子量はアミノ酸配列から予想される分子量よりも大きかった。この結果は、chKitタンパク質に対するN-グリコシド型糖鎖の付加を示唆するものであると思われる。chKitタンパク質細胞外領域のアミノ酸配列中には、11のN-グリコシド型糖鎖付加配列が認められている。また、第V章においてはCos-1細胞で発現しているchKitタンパク質に対するN-グリコシド型糖鎖の付加が示されている。さらに、ネコの脳のKitタンパク質のグリコシダーゼ処理の結果は、Kitタンパク質に対するシアル酸とN-グリコシド型糖鎖の付加を示している。以上の点も、ネコの脳のKitタンパク質と同様にchKitタンパク質においてもシアル酸の他にN-グリコシド型糖鎖が付加しているとの推測を支持するものである。



図6-1 ニワトリ各組織におけるchKitタンパク質の発現

2ヶ月齢のニワトリの脳、心臓、大腸、小腸の溶解液をアフィニティ精製抗chKit抗体で免疫沈降を行った後、ウェスタンブロット解析を行った。一次抗体としてアフィニティ精製抗chKit抗体を、二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ロバ抗ウサギIgG抗体を用いた。抗体反応陽性バンドの検出にはECL検出キットを用いた。矢印はchKitタンパク質を示す。レーン1：脳、レーン2：心臓、レーン3：大腸、レーン4：小腸。

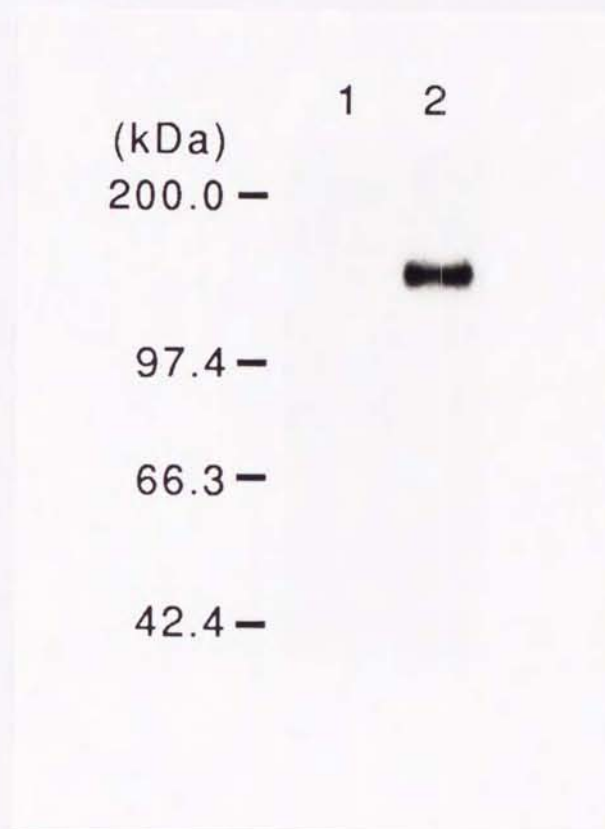


図6-2 ニワトリ脳のchKitタンパク質の*in vitro*リン酸化反応

ニワトリ脳の溶解液をアフィニティ精製抗chKit抗体により免疫沈降を行った後、*in vitro*リン酸化反応を行った。次いでこの免疫沈降物を100 μ lの3 \times SDS-PAGE緩衝液に懸濁し5分間煮沸した後、900 μ lの溶解用緩衝液を加え上清を2等分し、それぞれ抗chKitタンパク質抗血清の前血清（レーン1）およびアフィニティ精製抗chKit抗体（レーン2）を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物は7.5%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。



図6-3 ニワトリ脳のchKitタンパク質のグリコシダーゼ処理

ニワトリ脳の溶解液を抗chKitペプチド抗血清により免疫沈降を行った後、グリコシダーゼ処理を行った。グリコシダーゼ処理した免疫沈降物を7.5%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。レーン1：グリコシダーゼ未処理の免疫沈降物，レーン2：ノイラミニダーゼ処理した免疫沈降物，レーン3：エンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ処理した免疫沈降物。

第 VII 章 総括

本研究は、ニワトリ *c-kit* 遺伝子の生物学的役割を明らかにする第一歩として、ニワトリ Kit タンパク質の構造・生化学的特性とその遺伝子の発現パターンを明らかにする目的で行った。まず、ニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA のクローニングを試み、次いで、得られたニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA を用いてニワトリ Kit タンパク質に対する抗体を作製し、ニワトリ Kit タンパク質 (chKit) の生化学的特性および生体内での発現を検討した。

第 II 章では、ニワトリの *c-kit* 遺伝子 cDNA をクローニングする目的で、PCR を用いてニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA の一部をクローニングし、これが cDNA ライブラリーをスクリーニングするためのプローブとして有効であることを確かめた。

第 III 章では、第 II 章で作製したプローブを用いてニワトリ脳の cDNA ライブラリーから、24 個のニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA クローンを得た。これらのうち 1 クローンは、ニワトリ *c-kit* 遺伝子 mRNA のほぼ全体に相補的な 5111 塩基対の cDNA を含んでおり、これの全塩基配列を決定した。得られた cDNA の塩基配列中には開始コドン (ATG) および終止コドン (TGA) を含む長い (960 アミノ酸残基) 1 つのオープンリーディングフレームが認められた。このオープンリーディングフレームの塩基配列から予想されるアミノ酸配列がマウスの Kit タンパク質のアミノ酸配列と高い相同性を示したことから、得られた cDNA はニワトリの *c-kit* 遺伝子の cDNA であることが強く示唆された。さらに、この cDNA をプローブとして、ニワトリ各組織から抽出した polyA⁺RNA のノザンプロットハイブリダイゼーション解析を行った結果、約 5.5 kb の mRNA の発現が脳、ファブリシユウス嚢、心臓、腎臓、肺、脾臓、胸腺、卵巣、および精巣で認められ、特に脳、精巣において高い発現が認められた。

第IV章では、得られたニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA を大腸菌発現用ベクターに挿入して、大腸菌内で chKit タンパク質と大腸菌のマルトース結合タンパク質との融合タンパク質を発現させ、さらにこれを精製して、ウサギに免疫する事により、抗 chKit タンパク質抗血清を作製した。次いで大腸菌内で chKit タンパク質の細胞外領域とグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質を発現させ、これを精製した後、これをリガンドとしたアフィニティカラムを作製した。このカラムを用いて抗 chKit タンパク質抗血清をアフィニティ精製することにより、chKit タンパク質の細胞外領域に特異的な抗 chKit 抗体を作製した。

第V章では、野生型 chKit タンパク質 (chKit+) および Asp⁷⁷⁷ から Asn へのアミノ酸置換を有する chKit42 タンパク質を発現する真核細胞発現用ベクターを作製し、Cos-1細胞を用いて強制発現させ、これらのタンパク質のチロシンリン酸化酵素活性について検討した。抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロット解析および *in vitro* リン酸化反応実験の結果から、ニワトリ SCF 刺激に反応して chKit+ タンパク質のチロシンリン酸化酵素活性が顕著に上昇すること、一方、マウス SCF に対しては chKit タンパク質は反応しないことが示された。この結果は、本研究において得られた cDNA が正常な生化学的活性をもつ chKit タンパク質をコードするものであることを示した。また、Kit+ タンパク質については、chSCF による刺激のない状態においても一定程度のチロシンリン酸化が認められたので、この結果とマウス Kit タンパク質に関する類似の研究結果との関連について考察した。さらに、chKit42 タンパク質はチロシンリン酸化酵素活性を完全に失っていることから、chKit タンパク質の場合もマウス Kit タンパク質の場合と同様に、リン酸化酵素領域内の Asp⁷⁷⁷ がそのリン酸化酵素活性にとって必須のアミノ酸残基であることを示した。

第VI章では抗 chKit 抗体を用いることにより、ニワトリの脳において発現している chKit タンパク質を検出し、それが 145 kDa の見かけの分子量をもつこと、

少なくともシアル酸残基を含むこと，および *in Vitro* リン酸化反応実験において自己リン酸化酵素活性を示すことを明らかにした。

本研究でクローニングされたニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA は，鳥類においてはじめてクローニングされた *c-kit* 遺伝子である。このことは，哺乳類のみならず鳥類でも *c-kit* 遺伝子が保存されていることを示しており，ひいては，*c-kit* 遺伝子が脊椎動物に広く保存しているという可能性を支持している。ニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA の塩基配列から予想される chKit タンパク質とマウスの Kit タンパク質との同一性は，マウスとヒトの Kit タンパク質の同一性に比べて低かった。特に細胞外領域におけるアミノ酸配列の同一性は低く，マウスとヒトとの同一性が 73% であるのに対し，ニワトリとマウスの同一性は 48% である。この低い同一性は，ニワトリがマウスおよびヒトとは進化的に距離があるためであると考えられる。しかしながら，各組織におけるニワトリ *c-kit* 遺伝子 mRNA の発現は，マウス，ネコの *c-kit* 遺伝子の発現パターンとよく対応していることから，ニワトリにおける Kit タンパク質の生物学的役割が哺乳類における Kit タンパク質の生物学的役割と類似していることが示唆された。また，本研究で得られたニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA がコードしているニワトリ Kit タンパク質が chSCF に応答すること，ニワトリの脳における Kit タンパク質が自己リン酸化酵素活性を示したこと，また，このタンパク質に糖鎖が付加していたことから，ニワトリ Kit タンパク質は，ニワトリの生体内の細胞の細胞膜表面に発現しており，マウスと同様にニワトリの生体内における様々な細胞の分化・増殖等のシグナルを伝達していることが示唆された。

これらの知見は，今後ニワトリの PGC 等の生殖細胞，造血幹細胞およびメラノサイトなどの分化・増殖にニワトリ Kit タンパク質が果たす役割の解明，PGC の *in vitro* 培養法の開発，PGC を用いた遺伝資源の保存法，およびトランスジェニックニワトリの作出法の開発を行っていく上で重要な基礎となるものである。

謝辞

本論文をまとめるにあたり，終始ご指導，ご鞭撻を賜りました近宗干城教授に深甚なる謝意を捧げます。

本研究を遂行するにあたり，5年間にわたって実験の基礎から始まり論文をまとめるまで終始ご指導，ご鞭撻を賜りました農林水産省家畜衛生試験場分子免疫室室長櫻井通陽博士に謹んでお礼を申し上げます。また，本研究をまとめるにあたって様々なご尽力を賜りました農林水産省家畜衛生試験場生物物理研究室室長関川賢治博士に心よりお礼を申し上げます。

本論文を作成するにあたって，金井幸雄助教授には多くのご指導，ご助言を戴きましたこと，深く感謝しております。また，田島敦史助教授，本間秀彌講師にも折りに触れご助言を多々戴きましたことをここに感謝いたします。

さらに，農林水産省畜産試験場育種資源研究室の内藤充博士，農林水産省家畜衛生試験場慢性毒性研究室の山中典子博士には，種々のご助言を戴き，また実験に使用するニワトリも提供して戴きました。ここに厚くお礼を申し上げます。

農林水産省分子免疫研究室の窪田宣之博士，彦野弘一先生，中谷加世子氏，農林水産先端技術研究所の周建華博士，大瀧芽久美先生には多くのご助言，ご助力を戴きましたことを深く感謝いたします。

畜産研究室の山崎順子氏にはいつも重要事項の連絡をしていただくなど5年間にわたり大変お世話になりありがとうございました。

最後になりましたが，5年間にわたる多くの皆さまのご好意とご助力の上に本研究が成り立っていることを申し上げたいと思います。紙面の関係上，5年間にお世話になりました多くの皆さま一人ひとりにお礼を申し上げられませんことをお詫びいたしますと共に感謝の意を表したいと思います。

引用文献

1. Anderson, D. M., Lyman, S. D., Baird, A., Wignall, J. M., Eisenman, J., Rauch, C., March, C. J., Boswell, H. S., Gimpel, S. D., Cosman, D., and Williams, D. (1990) Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell*, 63, 235-243.
2. Besmer, P., Murphy, J. E., George, P. C., Qiu, F., Bergold, P. J., Lederman, L., Snyder Jr., H. W., Brodeur, D., Zuckerman, E. E., and Hardy, W. D. (1986) A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene *v-kit* with the protein kinase gene family. *Nature*, 320, 415-421.
3. Chabot, B., Stephenson, D. A., Chapman, V. M., Besmer, P., and Bernstein, A. (1988) The proto-oncogene *c-kit* encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse *W* locus. *Nature*, 335, 88-89.
4. Chang, I. K., Tajima, A., Yasuda, Y., Chikamune, T., and Ohno, T. (1994) Proliferation of chick primordial germ cells on stroma cells from the germinal ridge. *Cell Biol. Int. Rep.*, (in press).
5. Coulombre, J. L., and Russell, E. S. (1954) An analysis of the pleiotropism at the *W*-locus in the mouse: The effects of *W* and *W^v* substitutions upon postnatal development of germ cells. *J. Exp. Zool.*, 126, 277-296.
6. Dolci, S., Williams, D. E., Ernst, M. K., Resnick, J. L., Brannan, C. I., Lock, L. F., Lyman, S. D., Boswell, H. S., and Donovan, P. J. (1991) Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature*, 352, 809-811.
7. Flanagan J. G., and Leder, P. (1990) The Kit ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts. *Cell*, 63, 185-194.
8. Frohman, M. A., Dush, M. K. and Martin, G. R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 8998-9002.
9. Geissler, E. N., McFarland, E. C., and Russell, E. S. (1981) Analysis of pleiotropism at the Dominant White spotting (*W*) locus of the house mouse: a description of ten new *W* alleles. *Genetics*, 97, 337-361.
10. Geissler, E. N., Ryan, M. A., and Housman, D. E. (1988) The Dominant-White spotting (*W*) locus of the mouse encodes the *c-kit* proto-oncogene. *Cell*, 55, 185-192.
11. Godin, I., Deed, R., Cooke, J., Zsebo, K., Dexter, M., and Wylie, C. C. (1991) Effects of the *Steel* gene product on mouse primordial germ cell in culture. *Nature*, 352, 807-809.

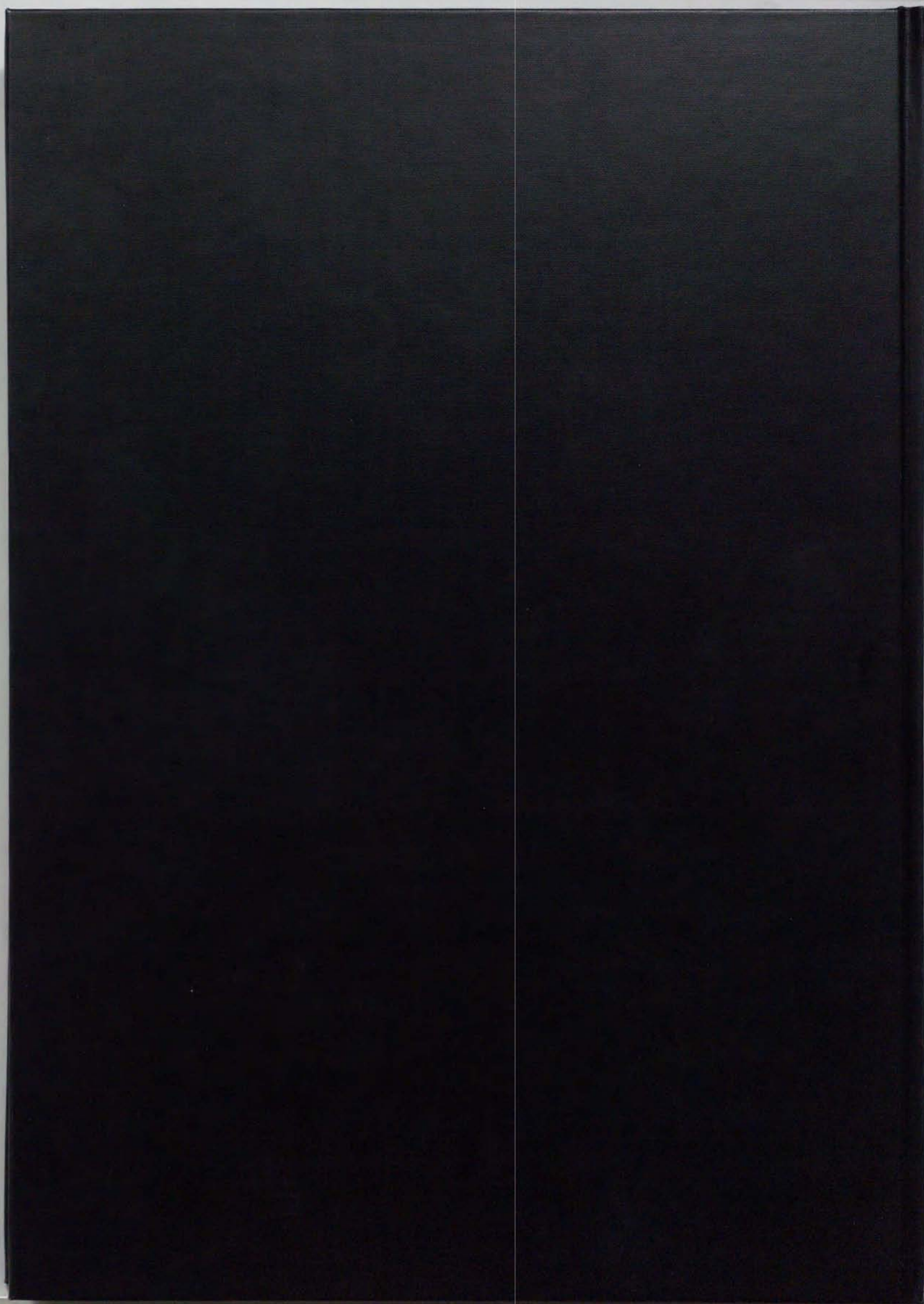
12. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166, 557-580.
13. Hanks, S. K., Quinn, A. M., Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 241, 42-52.
14. Huang, E., Nocka, K., Beier, D. R., Chu, T., Buck, J., Lahm, H., Wellner, D., Leder, P., and Besmer, P. (1990) The hematopoietic growth factor KL is encoded by the *Sl* locus and is the ligand of the *c-kit* receptor, the gene product of the *W* locus. *Cell*, 63, 225-233.
15. Huang, E., Nocka, K. C., Buck, J., and Besmer, P. (1992) Differential expression and processing of two cell associated forms in *S^l/S^l* mice. *Mol. Biol. Cell*, 3, 349-362.
16. Huszar, D., Sharpe, A., and Jaenisch, R. (1991) Migration and proliferation of cultured neural crest cells in *W* mutant neural crest chimeras. *Development*, 112, 131-141.
17. Jorgensen, A. L., Bostock, C. J., and Bak, A. L. (1986) Chromosome-specific subfamilies within human aliphid repetitive DNA. *J. Mol. Biol.*, 187, 185-196.
18. Keshet, E., Lyman, S. D., Williams, D. E., Anderson, D. M., Jenkins, N. A., Copeland, N., G., and Parada, L. F. (1991) Embryonic RNA expression patterns of the *c-kit* receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *EMBO J.*, 10, 2425-2435.
19. Kubota, T., Hikono, H., Sasaki, E., Sakurai, M. (1994) Sequence of bovine *c-kit* proto-oncogene cDNA. *Gene*, 141, 305-306.
20. Langley, K. E., Wypych, J., Mendiaz, E. A., Clogston, C. L., Parker, V. P., Farrar, D. H., Brothers, M. O., Satygal, V. N., Leslie, I., Birkett, N. C., Smith, K. A., Baltera, R. F., Lyons, D. E., Hogan, J. M., Crandall, C., Boone, T. C., Pope, J. A., Karkare, S. B., Zsebo, K. M., Sachdev, R. K., and Lu, H. S. (1992) Purification and characterization of soluble forms of human and rat stem cell factor recombinantly expressed by *Escherichia coli* and by chinese hamster ovary cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 295, 21-28.
21. Lyon, M. F., Glenista, P. H., Evans, E. P., and Peters, J. (1984) A presumed deletion covering the *W* and *Ph* loci of the mouse. *Genet. Res.*, 44, 161-166.
22. Lev, S., Givol, D., and Yarden, Y. (1992) Interkinase domain of Kit contains the binding site for phosphatidylinositol 3' kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 678-682.

23. Lev, S., Yarden, Y., and Givol, D. (1992) Dimerization and activation of the Kit receptor by monovalent and bivalent binding of the stem cell factor. *J. Biol. Chem.*, 267, 15970-15977.
24. Li, W., and Stanley, E. R. (1991) Role of dimerization and modification of the CSF-1 receptor in its activation and internalization during the CSF-1 response. *EMBO J.*, 10, 277-288.
25. Majumder, S., Brown, K., Qiu, F., and Besmer, P. (1988) *c-kit* protein, a transmembrane kinase: identification in tissues and characterization. *Mol. Cell. Biol.*, 8, 4896-4903.
26. Martin, F. H., Suggs, S. V., Langley, K. E., Lu, H. S., Ting, J., Okino, K. H., Morris, C. F., McNiece, I. K., Jacobsen, F. W., Mendiaz, E. A., Birkett, N. C., Smith, K. A., Johnson, M. J., Parker, V. P., Flores, J. C., Patel, A. C., Fisher, E. F., Erjavec, H. O., Herrera, C. J., Wypych, J., Sachdev, R. K. Pope, J. A., Leslie, I., Wen, D., Lin, C., Cupples, R. L. and Zsebo, K. M. (1990) Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell*, 63, 203-211.
27. Manova, K., Nocka, K., Besmer, P., and Bachvarova, R. F. (1990) Gonadal expression of *c-kit* encoded at the *W* locus of the mouse. *Development*, 110, 1057-1069.
28. Matsui, Y., Zsebo, K. M., and Horgan, B. L. M. (1990) Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the *Sl* locus and the ligand for *c-kit*. *Nature*, 347, 667-669.
29. Matsui, Y., Zsebo, K., and Horgan, B. L. M. (1992) Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, 70, 841-847.
30. Messing, J. (1983) New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.*, 101, 20-41.
31. Naito, M., Tajima, A., Yasuda, Y., and Kuwana, T. (1994) Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 39, 153-161.
32. Nishikawa, S., Kusakabe, M., Yoshinaga, K., Ogawa, M., Hayashi, S., Kunisada, T., Era, T., Sakakura, T., and Nishikawa, S. (1991) *In utero* manipulation of coat color formation by a monoclonal anti-*c-kit* antibody: two distinct waves of *c-kit* -dependency during melanocyte development. *EMBO J.*, 10, 2111-2118.
33. Nocka, K., Majumder, S., Chabot, B., Ray, P., Cervone, M., Bernstein, A., and Besmer, P. (1989) Expression of *c-kit* gene products in known cellular targets of *W* mutations in normal and *W* mutant mice — evidence for an impaired *c-kit* kinase in mutant mice. *Genes Dev.*, 3, 816-826.

34. Nocka, K., Tan, J. C., Chiu, E., Chu, T. Y., Ray, P., Traktman, P., and Besmer, P. (1990) Molecular bases of dominant negative and loss of function mutations at the murine *c-kit*/white spotting locus: W^{37} , W^v , W^{41} , and W . *EMBO J.*, 9, 1805-1813.
35. 小川峰太郎, 西川里美, 西川伸一 (1991) 造血における *c-kit* 分子の役割とB細胞分化. *蛋白質 核酸 酵素*, 36, 696-703.
36. Ohara, O., Dorit, R. L., and Gilbert, W. (1989) One-sided polymerase chain reaction: the amplification of cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 5673-5677.
37. 大田恵子, 宮本力, 古市泰宏 (1990) Oligotex-dT30を利用したmRNAのhybrid subtraction. *蛋白質 核酸 酵素*, 35, 2257-2265.
38. Posakony, J. W., Scheller, R. H., Anderson, D. M., Britten, R. J. (1981) Repetitive sequences of the sea urchin genome. *J. Mol. Biol.*, 149, 41-67.
39. Qiu, F., Ray, P., Brown, K., Barker, P. E., Jhanwar, S., Ruddle, F. H., and Besmer, P. (1988) Primary structure of *c-kit*: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family — oncogenic activation of *v-kit* involves deletion of extracellular domain and C terminus. *EMBO J.*, 7, 1003-1011.
40. Ray, P., Higgins, K. M., Tan, J. C., Chu, T. Y., Yee, N. S., Nguyen, H., Lacy, E., Besmer, P. (1991) Ectopic expression of a *c-kit*^{W42} minigene in transgenic mice: recapitulation of W phenotypes and evidence for *c-kit* function in melanoblast progenitors. *Genes Dev.*, 5, 2265-2273.
41. Reith, A. D., Rottapel, R., Giddens, E., Brady, C., Forrester, L., and Bernstein, A. (1990) W mutant mice with mild or severe developmental defects contain distinct point mutations in the kinase domain of the *c-kit* receptor. *Genes Dev.*, 4, 390-400.
42. Reith, A. D., Ellis, C., Lyman, S. D., Anderson, D. M., Williams, D. E., Bernstein, A., and Pawson, T. (1991) Signal transduction by normal isoforms and W mutant variants of the Kit receptor tyrosine kinase. *EMBO J.*, 10, 2451-2459.
43. Rothwell, V. M., Rohrschneider, L. R. (1987) Murine *c-fms* cDNA: cloning, sequence analysis and retroviral expression. *Oncogene Res.*, 1, 311-324.
44. Russell, E. S. (1979) Hereditary anemias of the mouse: A review for geneticists *Adv. Gen.*, 20, 357-459.
45. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491.
46. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

47. Sanger, F. (1981) Determination of nucleotide sequence in DNA. *Science*, 214, 1205-1210.
48. Schlessinger, J. (1988) The epidermal growth factor receptor as a multifunctional allosteric protein. *Biochem.*, 27, 3119-3123.
49. Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A., and Huse, W. D. (1988) λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res.*, 16, 7583-7600.
50. Sommer, R. and Tautz, D. (1989) Minimal homology requirements for PCR primers. *Nucleic Acids Res.*, 17, 6749-6749.
51. Tan, J. C., Nocka, K., Ray, P., Traktman, P., Bessmer, P. (1990) The Dominant W^{22} Spotting phenotype results from a missense mutation in the *c-kit* receptor kinase. *Science*, 247, 209-212.
52. Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61, 203-212.
53. Vieira, J., and Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.*, 153, 3-11.
54. Watanabe, M., Naito, M., Sasaki, E. Sakurai, M., Kuwana, T., and Oishi, T. (1994) Liposome — mediated DNA transfer into chicken primordial germ cells *in vivo*. *Mol. Reprod. Dev.*, 38, 268-274.
55. Whittaker, J., Soos, M. A., and Siddle, K. (1990) Hybrid insulin receptors. Molecular mechanisms of negative-dominant mutations in receptor-mediated insulin resistance. *Diabetes Care*, 13, 576-581.
56. Williams, D. E., Eisenman, J., Baird, A., Rauch, C., Ness, K. V., March, C. J., Park, L. S., Martin, U., Mochizuki, D. Y., Boswell, H. S., Burgess, G. S., Cosman, D., and Lyman, S. D., (1990) Identification of a ligand for the *c-kit* proto-oncogene. *Cell*, 63,167-174.
57. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33, 103-119.
58. Yarden, Y., Escobedo, J. A., Kuang, W. J., Yang-Feng, T. L., Daniel, T. O., Tremble, P. M., Chen, E. Y., Ando, M. E., Harkins, R. N., Francke, U., Fried, V. A., Ullrich, A., and Williams, L. T. (1986) Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature*, 323, 226-232.

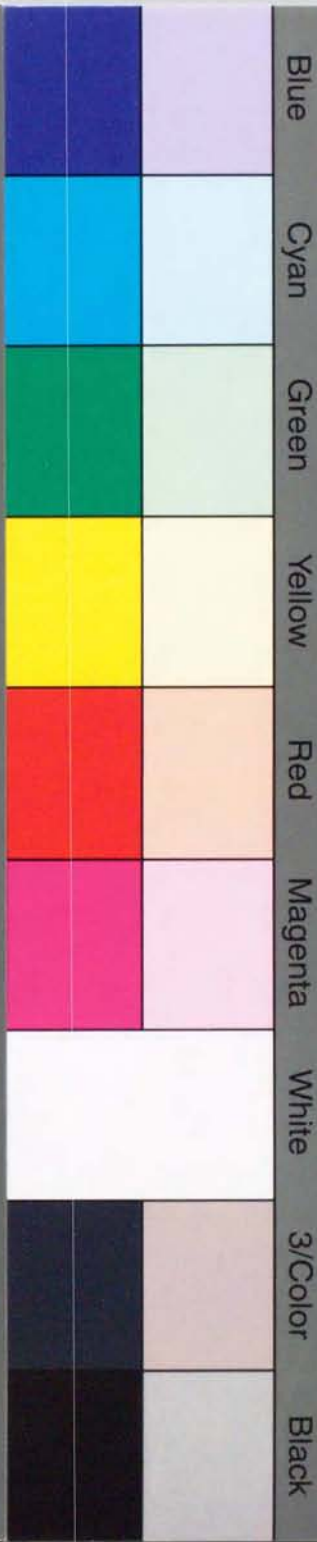
59. Yarden, Y., Kuang, W., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T. J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U., and Ullrich, A. (1987) Human proto-oncogene *c-kit*: a new cell surface receptor tyrosine kinase for unidentified ligand. *EMBO J.*, 6, 3341-3351.
60. Yarden, Y., and Schlessinger, J. (1987) Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochem.*, 26, 1443-1451.
61. Yarden, Y. (1988) Growth factor receptor tyrosine kinase. *Ann. Rev. Biochem.*, 57, 443-478.
62. Yoshinaga, K., Nishikawa, S., Ogawa, M., Hayashi, S., Kunisada, T., Fujimoto, T., and Nishikawa, S. (1991) Role of *c-kit* in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of *c-kit* expression and function. *Development*, 113, 689-699.
63. Zhou, J., Ohtaki, M., and Sakurai, M. (1993) Sequence of a cDNA encoding chicken stem cell factor. *Gene*, 127, 269-270.
64. Zhou, J., Hikono, H., Ohtaki, M., Kubota, T., Sakurai, M., (1994) Cloning and characterization of cDNAs encoding two normal isoforms of bovine stem cell factor. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1223, 148-150.
65. Zsebo, K. M., Williams, D. A., Geissler, E. N., Broudy, V. C., Martin, F. H., Atkins, H. L., Hsu, R., Birkett, N. C., Okino, K. H., Murdock, D. C., Jacobsen, F. W., Langley, K. E., Smith, K. A., Takeishi, T., Cattanaach, B. M., Galli, S. J., and Suggs, S. V. (1990) Stem cell factor is encoded at the *Sf* locus of the mouse and is the ligand for the *c-kit* tyrosine kinase receptor. *Cell*, 63, 213-224.



inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Blue

Cyan

Green

Yellow

Red

Magenta

White

3/Color

Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A

1

2

3

4

5

6

M

8

9

10

11

12

13

14

15

B

17

18

19