

氏名(本籍)	佐々木 えりか (東京都)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第1,335号		
学位授与年月日	平成7年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	ニワトリ <i>c-kit</i> 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		
主査	筑波大学教授	農学博士	近宗千城
副査	筑波大学教授	農学博士	正野俊夫
副査	筑波大学助教授	農学博士	金井幸雄
副査	筑波大学教授	工学博士	片岡 廣
副査	農林水産省家畜衛生試験場研究室長	理学博士	櫻井通陽

論文の要旨

c-kit 遺伝子は、ネコの Hardy-Zuckerman 4 肉腫ウイルス性癌遺伝子 *v-kit* の塩基性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である。*c-kit* 遺伝子によってコードされている Kit タンパク質は受容体系チロシンリン酸化酵素の一種で、マウスでは、Kit タンパク質とそのリガンドである stem cell factor (SCF) が、生殖細胞、造血幹細胞およびメラノサイトの分化・増殖に関与している。*c-kit* 遺伝子はこのように動物の生命活動の基本的な部分に関与していることから、ニワトリにおいても、Kit タンパク質が生殖細胞の分化・増殖等に重要な役割を果たしていることが予想される。この研究は、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、生化学的特性および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ものである。

〔ニワトリ *c-kit* 遺伝子の cDNA プロープの作成〕 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、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プとして有効であることを確かめた。

〔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〕 このプロープを用いてニワトリ脳の cDNA ライブラリーから 23 個の *c-kit* 遺伝子 cDNA クローンを得た。このうちの 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、この全塩基配列を決定した。この塩基配列に含まれている開始コドンと終止コドンから予想されるアミノ酸配列 (960 アミノ酸塩基) が、マウスの Kit タンパク質のアミノ酸配列と高い相同性 (63%) 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 poly A⁺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5500塩基のニワトリ *c-kit* 遺伝子 mRNA の発現が多くの組織で認められ、その発現パターンはネコおよびマウスのそれと対応していた。このことはニワトリにおける Kit タンパク質がマウス、ネコと同様の生物学的役割を持つことを示唆するものである。

〔大腸菌における chKit タンパク質の生産および抗 chKit 抗体の作製〕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 タンパク質を生産させ、これを精製してウサギに免疫することにより、抗 chKit タンパク質抗血清を作製した。次いで、これを用いて 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 抗体を作製した。

〔真核細胞内における chKit タンパク質の発現〕野生型 chKit タンパク質および chKit 42タンパク質 (Asp⁷⁷⁷から Asn へのアミノ酸置換を有する) を発現する真核細胞発現用ベクターを作製して強制発現させ、これらの細胞溶解物を用いて、抗リン酸化チロシン抗体によるウェスタンブロット解析および *in vitro* リン酸化実験を行い、chKit 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、ニワトリ SCF による刺激の場合はそれに反応して chKit タンパク質のチロシンリン酸化酵素活性が上昇するが、マウス SCF では反応しないこと、chKit タンパク質もマウス Kit タンパク質と同様に、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アミノ酸残基であることが明らかになった。

〔ニワトリ生体内における chKit タンパク質の発現〕ニワトリ核組織溶解液の抗 Kit 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行い、ニワトリの脳において分子量が145 kDa の chKit タンパク質が発現していることを明らかにした。また *in vitro* リン酸化反応実験を行い、この chKit タンパク質が自己リン酸化酵素活性を有することを示した。

審 査 の 要 旨

本研究でクローニングされたニワトリ *c-kit* 遺伝子 cDNA は、鳥類において始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* 遺伝子が保持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存在している可能性を示すものである。また本研究では、ニワトリにおける Kit タンパク質の生化学的性質や生物学的役割が、哺乳類における Kit タンパク質の性質や役割と類似したものであることを明らかにしており、その内容は独創性に富んでいる。得られた知見は、今後ニワトリの始原生殖細胞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、chKit タンパク質が果たす役割を研究してゆく上で重要な基礎を設け、鳥類における遺伝資源保存技術の開発や遺伝子転換動物の作製に、道を拓いたものといえる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。