

哺乳類の分子遺伝学

国 枝 哲 夫

(家畜機能調節学講座)

Molecular Genetics of Mammals

Tetsuo Kunieda

(Department of Animal Science and Technology)

Recent advances in molecular genetics of mammals, including construction of genetic linkage maps, identification of mutations responsible for inheritable diseases, mapping of quantitative trait loci, and findings about sex determination are reviewed in the present paper. Information about genomes of humans, laboratory animals and domestic animals has been rapidly accumulated in the last decade. Establishment of polymorphic linkage markers and construction of chromosomal linkage maps of mammalian species enable us to identify the genes responsible for particular genetic traits. Various mutations have been found in genes responsible for human inheritable diseases. We have constructed genetic linkage maps for rats and identified a mutation responsible for mucopolysaccharidosis in rats. Mapping of loci affecting the quantitative traits of domestic animals, including growth rate, litter size, and milk production, as well as identification of the genes responsible for inheritable diseases of domestic animals, are also being carried out. Recently, the testis-determining gene on the Y chromosome, which determine the sex of mammals by differentiating the testis in the embryos, have been identified in humans and mice. Functions of the sex-determining gene in sexual differentiation of the mammalian embryos have been intensively analyzed. We have found a sexual difference in the growth rate of mouse preimplantation embryos. An application of the recent findings in the molecular genetics of mammals will contribute to animal science and agricultural science.

Key words : chromosome mapping, linkage, inheritable disease, sex determination

はじめに

近年の分子生物学の発展は、ヒトを含む哺乳類の遺伝学にも大きな変化をもたらしている。すなわち、表現型を主な対象とした従来の遺伝学から、DNAをはじめとする分子を対象とした遺伝学へとその中心は移行しつつある。この傾向に拍車をかけたのがここ数年話題になることの多いヒトゲノムプロジェク

トであり、またヒトの遺伝病の原因遺伝子の解析と遺伝子診断、遺伝子治療の進展である。農学や畜産学の分野でも、分子育種という概念が確立しつつあり、分子生物学を基礎とした新たな育種法が試みられている。本論文ではヒト、家畜および実験動物を対象とした哺乳類の分子遺伝学の最近の動向につ

Received October 4, 1995

いて、我々の研究結果を含めて概説したい。

ヒトゲノムプロジェクト

ヒトの22対の常染色体とXおよびY染色体からなるゲノムの全塩基配列(約30億塩基対)を明かにしようとの巨大プロジェクトが進められている。ヒトの持つ全遺伝情報を明らかにすることによってヒトの生物学的特性を体系的に理解し、その結果を、ヒトの病気と関連する遺伝子や、新たな生理活性物質の検索などに利用しようというものである。さらにこのヒトゲノム解析と平行して行われる、他の生物のゲノム解析をも含めることにより医学の領域だけではなく農学も含めて、生物の持つ種々の遺伝的特性を明らかとし、それを応用することも目的とされている。このプロジェクトはマンハッタン計画やアポロ計画とも比較される巨大プロジェクトであり、その目的や進め方をめぐって、様々な批判や懸念が存在することも事実であるが、現在すでに米国を中心として欧州諸国や日本が分担する形で、本計画は進行している。

本プロジェクトの概要は、染色体の遺伝学的な地図の作成、染色体上の特定の領域の塩基配列の決定、自動化されたDNA解析装置の開発と大量のゲノム情報の処理技術の開発等に大きく分けられる。30億塩基対という広大な海を航海するするためには、正確な海図と高性能な船が必要ということである。海図に当たるのが染色体地図であり、この染色体地図には、物理的な地図と遺伝学的な連鎖地図がある。物理的な地図は核酸という物質の基盤に基づくものであり、特定のDNA断片が染色体上のどの位置に存在するか、あるいはDNA断片同士がどのような順序で並んでいるかを示したものである。それに対して、連鎖地図は、相同染色体間の交差による組み換えの頻度から特定の遺伝子間の相対的距離を求め、染色体上の遺伝子の配列を求めるといったメンデル遺伝学的な手法に基づくものである。近年この連鎖地図の作成に当たっても、特定の塩基配列をマーカー遺伝子として用いた分子遺伝学的手法を利用することによって、ヒトやマウスなどで飛躍的に詳細な連鎖地図が作成されている。このような連鎖地図が作成されることによって、遺伝病などの特定の形質を支配する遺伝子の染色体上の位置を明らかとすることが可能となる。そこで、分子遺伝学的手法を用い

た連鎖地図の作成について、ラットの連鎖地図の作成に関する我々の研究結果を例にして次に紹介する。

ラット染色体の連鎖地図の作成

ラットは実験動物として医学、生物学の様々な分野において広く用いられているにも関わらず、その遺伝学的な解析はマウスに比べて決して十分ではなかった。特に、ヒト疾患のモデルとなりうる様な、特定の疾患を遺伝的に自然発症する系統が多数樹立されているが、それら疾患の原因遺伝子が同定されているものは希である。そこで我々は、まずラット染色体の詳細な連鎖地図を作成し、特定の疾患の原因遺伝子の染色体上の位置を明らかとすることを試みた。

従来、連鎖地図の作成のためのマーカー遺伝子遺伝子としては毛色や、アイソザイムによる生化学的マーカー遺伝子等が用いられてきたが、近年、DNAの塩基配列上の変異を直接に検出することにより、その変異をマーカーとして用いることが可能となっている。マーカー遺伝子として用いることのできる塩基配列上の変異としては、特定の制限酵素の認識部位における変化を制限酵素によるDNAの切断断片の長さの変化としてサザンブロット方により検出されるRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)と、ゲノム中に散在する単純反復配列の反復の回数の変異を検出するマイクロサテライトあるいはミニサテライトマーカーが一般的に用いられている^{3,22)}。特にマイクロサテライトマーカーは、個体間で反復回数の変異がきわめて大きく顕著な多型性を示すので、連鎖解析のための有効なマーカー遺伝子であることが明らかとなっている。ヒトおよびマウスでは主にマイクロサテライトDNAを、特定の塩基配列の特異的な増幅法であるPCR (Polymerase Chain Reaction)法により検出することにより、詳細な連鎖地図が作成されている^{4,29)}。そこで、これらのマーカー遺伝子を用いてラットの連鎖地図の作成を試みた。RFLPの一例をFig. 1に、ミニサテライトの一例をFig. 2に示す。Fig. 1ではヒトの*c-myc*癌遺伝子をプローブとしてラットDNAのサザンブロットを行った結果、制限酵素*EcoRI*の認識部位における変異によって、近交系ラットの系統で異なった長さの*EcoRI*断片が検出されている¹⁸⁾。これらはいずれも近交系でありホモ個体で

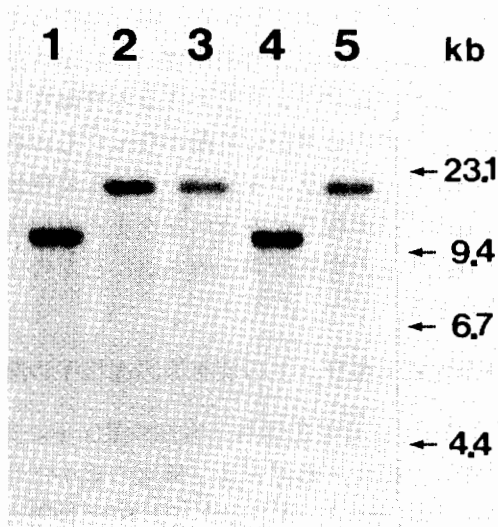


Fig. 1 Southern blot hybridization of *Eco*RI fragments of genomic DNAs from five inbred rat strains hybridized with human *c-myc* cDNA. Lanes: 1, LEA/Hok; 2, F344/Hok; 3, SDJ/Hok; 4, LEJ/Hok; 5, TO/Hok. Length of marker fragments are shown on the right.

あるが、系統間の交配による F₁ では両方の断片を持つヘテロ個体が得られる。Fig. 2 では、インターロイキン 3 遺伝子の第 2 イントロン中に存在する 15 塩基対を単位とする反復配列の反復数の違いにより、近交系ラットの系統によって少なくとも 4 種の異なる長さの DNA 断片が PCR 法により検出されている¹⁶⁾。マイクロサテライトについては、DNA データベースよりラット DNA において CA および GA の 2 塩基が 20 回以上繰り返しているマイクロサテライト領域を検索した。その結果、300 以上の配列が検出され、そのうちの 40 について反復領域を挟む形でプライマーを設計し、PCR 法により特定のマイクロサテライト領域を増幅したところ、34 について近交系ラットの系統間で多型性が認められ、連鎖解析のためのマーカー遺伝子として利用可能であることが明らかとなった⁷⁾。

これらのマーカー遺伝子、およびこれまでに報告されているいくつかの生化学的遺伝子座について、近交系ラット系統間の戻し交配を用いて、各遺伝子座間の連鎖を調べたところ 9 の連鎖群が形成されそれぞれが特定の染色体に当てはめられた。以上の結果より、ラットの第 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 13 染色体の連鎖地図が新たに作成された^{12-13, 16-17)}。さらに、常染色体劣性の遺伝様式をと

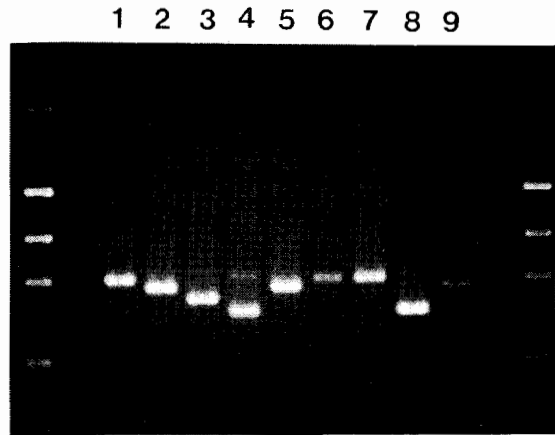


Fig. 2 Polymorphic fragments of interleukin-3 gene amplified from nine inbred rat strains. Lanes: 1, F344/Hok; 2, KYN/Hok; 3, ACI/Hok; 4, LEA/Hok; 5, SDJ/Hok; 6, TO/Hok; 7, WKAM/Ms; 8, LEJ/MS; 9, ALB/Ms. Left and right lanes contain DNA sizemarker: 2016, 1360, 1107, 926, and 658 bp, respectively.

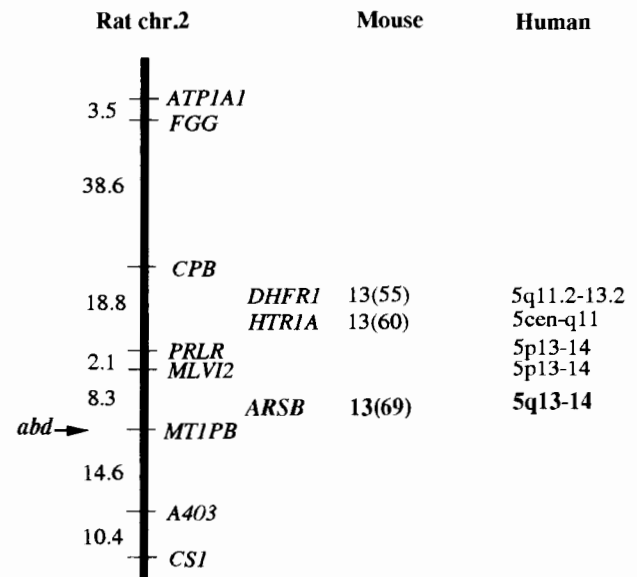


Fig. 3 Genetic linkage map of rat chromosome 2. The recombination frequency in percentage is shown for each pair of loci on the left of the map. Chromosomal locations of the corresponding loci in the mouse and human are shown on the right of the map.

るいくつかの遺伝性疾患の原因遺伝子について、連鎖解析により染色体上の位置を求めたところ、Fig. 3 に示すようにムコ多糖症 VI 型の原因遺伝子が第 2 染色体上に存在し³⁰⁾、雄性仮性半陰陽の原因遺伝子が第 7 染色体上に存在することが明らかとなった。

遺伝性疾患の原因遺伝子の解析

近年のヒトをはじめとする哺乳類の分子遺伝学の発展は、遺伝性疾患の原因遺伝子とその変異を分子レベルで明らかとすることも可能としている。一般的に疾患は環境的な要因と遺伝的要因の相互作用により発症すると考えられるが、ヒトにおいては医学の発展や保健衛生の向上により、環境的要因が減少した結果として疾患の遺伝的要因が逆に大きくクローズアップされている。血友病や鎌形赤血球貧血症のように単一の突然変異遺伝子による遺伝性疾患はもちろんのこと、癌や高血圧、糖尿病といった、従来の概念では遺伝性疾患とはいいがたい疾患に関与する遺伝子の解析も進んでいる^{8,10)}。さらに、現時点では疑問点も多くその真偽については明らかではないが、精神分裂症や躁鬱病といった精神疾患についても特定の遺伝子の変異との関連が報告されている²⁸⁾。良くも悪しくも疾患と特定の遺伝子を結びつけることがブームのような状態になっている。

特定の遺伝性疾患に関する未知の原因遺伝子を見つけ出す方法は、大きく二つの方法、すなわちファンクショナルクローニングとポジショナルクローニングに分けられる。前者は疾患の病態の解析から、酵素活性など欠損している生理的機能を明らかとし、対応する遺伝子の変異を同定する方法である。従来、単一遺伝子に由来する遺伝病の原因遺伝子は主にこの方法で同定されてきた。それに対し、後者は、機能の明確でない原因遺伝子を染色体上の位置に関する情報から同定しようとする方法である。すなわち、前述の様に多数のマーカー遺伝子を用いた染色体の詳細な連鎖地図が得られれば、特定の遺伝性疾患の発症と連鎖するマーカー遺伝子を見つけ出すことによって、その遺伝子の染色体上の位置を明らかにすることができるであろう。そしてさらに強く連鎖するマーカー遺伝子を得ることができれば、より正確な位置が求められる。このようにして、未知の疾患原因遺伝子のきわめて近傍に位置するマーカー遺伝子を明らかとし、そのマーカー遺伝子を指標として疾患原因遺伝子のクローニングを行うという方法である。このような方法が可能となるためには0.1センチモルガン (cM) 単位での連鎖が要求され、そのためには数百例以上の個体を含む家系解析と詳細な染色体の連鎖地図が必要である。その様な莫大な労力

を必要とする方法でありながら、最近多くの遺伝性疾患の原因遺伝子がこの方法を用いて同定されている。これはゲノムプロジェクトによる詳細なヒト染色体地図の作成の結果から可能となったものと思われる。我々はやはりラットにおいて、常染色体単一劣性の遺伝子に支配される遺伝性疾患の原因遺伝子とその遺伝子上の突然変異を明らかにしたので、以下に紹介する。

ムコ多糖症VI型ラットの疾患原因遺伝子の解析

MPR ラットは常染色体単一劣性の遺伝子に支配され、体型の小型化、頭部および鼻梁の短小化等の表現型を示すミュータントラットである³⁰⁾。前述のマイクロサテライトマーカー遺伝子を用いた連鎖解析により本病態の原因遺伝子はラットの第2染色体上に存在することが明らかとなった。ところでラットの第2染色体はマウスの第13染色体、ヒトの第5染色体と相同性が高いことが知られている。そしてFig. 3に示すように、本遺伝子のラットの染色体上の位置に対応するマウスおよびヒトの染色体上の領域にはアシルスルファターゼBというライソゾームのムコ多糖分解酵素の遺伝子が存在している。この染色体上の位置に関する情報に加えて、本ラットでは全身の各臓器の細胞にライソゾーム酵素欠損症に特有の空胞化が観察され、尿中にムコ多糖が排出され、またアシルスルファターゼBの活性が低下していることから、本病態がアシルスルファターゼB遺伝子の突然変異に起因することが推測された。一方、ヒトではアシルスルファターゼB遺伝子の突然変異により、ムコ多糖症VI型と呼ばれる遺伝性疾患が引き起こされ、その病態は多発性発育異常症を特徴とし、MPR ラットのそれときわめて類似している。そこで、MPR ラットの疾患原因遺伝子とその変異を同定するため、ラットのアシルスルファターゼB遺伝子の解析を行った¹⁵⁾。

ラット肝臓 cDNA ライブラリーを、ネコアシルスルファターゼB cDNA をプローブとして用いてスクリーニングし、正常ラットアシルスルファターゼB cDNA クローンを得て、その塩基配列を決定した。さらに、体細胞雑種法を用いて同遺伝子の染色体上の位置を決定したところ、MPR ラットの疾患原因遺伝子と同一の第2染色体上に存在することが明らかとなり、染色体上の位置からも MPR ラットの疾患

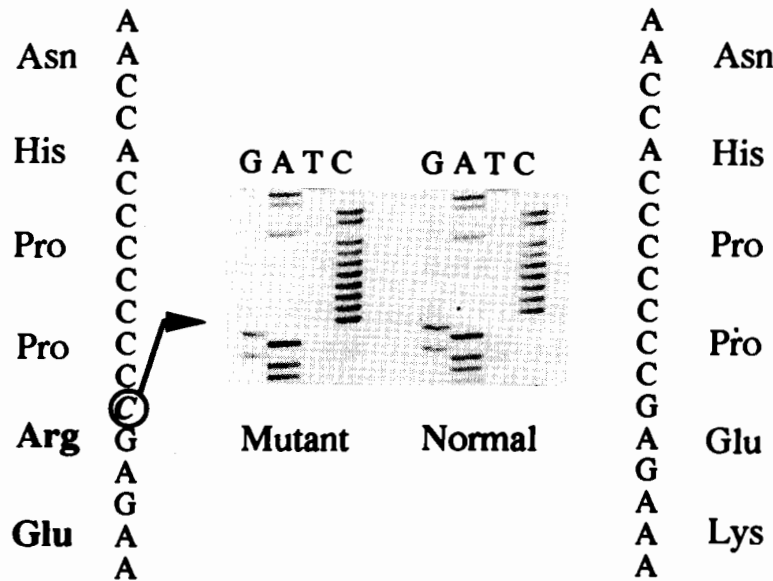


Fig. 4 Part of nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of rat arylsulfatase B gene in the MPR rat. A circle indicates an additional cytosine found in the MPR rat.

原因遺伝子がアリルスルファターゼB遺伝子であることが強く示唆された。そこで、次に正常ラットアリルスルファターゼB cDNAの塩基配列に基づいて、肝臓のmRNAを用いたRT-PCR法により、MPRラットと同遺伝子の塩基配列を決定した。MPRラットの塩基配列を正常ラットと比較したところ、507番目の位置に1塩基の挿入が存在し、このフレームシフト突然変異の結果、258番目のコドンに終止コドンが出現していることが明らかとなった(Fig. 4)。この結果、MPRラットのアリルスルファターゼBはC末端側の約半分が欠失していることになり、酵素活性は持たないことが強く示唆された。また、MPRラットコロニーの中の各個体において、発症個体はすべてこの突然変異をホモで持ち、正常個体はすべて野性型のホモかヘテロであり、遺伝子型と表現型は完全に一致していた。以上の結果より、MPRラットにおけるムコ多糖症の原因遺伝子はアリルスルファターゼB遺伝子における突然変異であることが結論づけられた。

家畜の分子遺伝学 — 遺伝病

上記の様にヒトおよびマウス、ラット等の実験動物における、単一遺伝子によって支配される遺伝形質について、その分子遺伝学的解析は近年飛躍的に前進している。一方、家畜についてはどうであろうか？ 家畜においてもヒトや実験動物と同様に単一遺

伝子に起因する遺伝病などが数多く存在することが知られており、その解析が進められている。特に産業動物としての家畜は、特定の方向への選抜による育種が、過去の長い間にわたって行われてきた結果、近交系数が高くなり常染色体劣性の遺伝病が発生しやすい状況にあると考えられる。このような遺伝病の原因遺伝子を家畜の集団内から除去するためには、当然ながら発症個体を淘汰するだけでは効果は少なく、ヘテロのキャリアー個体を同定し、除去することが必要である。疾患の原因遺伝子とその突然変異が分子レベルで同定されていれば、いわば遺伝子診断としてキャリアー個体を同定することが可能である。したがって、疾患原因遺伝子の分子遺伝学的な解析が、これらの遺伝病の原因遺伝子の集団内よりの除去にとってきわめて重要であると考えられる。ヒトに比べて、家畜における疾患原因遺伝子の分子遺伝学的な解析はまだ端緒についたばかりではあるが、これまでにウシの白血球粘着不全症(BLAD)¹¹⁾、ウマの高カリウム周期性麻痺²⁴⁾、ブタのストレス症候群²⁾等の原因遺伝子が分子レベルで解析され、遺伝子診断によるキャリアーの同定が実際に行われている。特にBLADについては、わが国でも遺伝子診断によってキャリアーでないことが確認された個体のみを種雄牛として用いるようにしているとのことである。また、和牛においても、たとえば褐毛和種において比較的高い頻度で軟骨形成不全症の個体が発生

することが知られており²¹⁾、現在我々の研究室ではこの軟骨形成不全症の原因遺伝子を解析中である。

家畜の分子遺伝学 — 量的形質の遺伝

一方、家畜の遺伝学にとって成長、産仔数、乳量といった生産形質の遺伝が重要であることはいうまでもない。これらの量的形質は単一遺伝子に支配されるものではなく、その遺伝様式は複雑であり、従来分子遺伝学的な解析の利用は困難と考えられていた。しかし、最近の分子遺伝学の発展は、量的形質に関与する遺伝子もその対象としつつある。たとえば、前述のようにヒトでは高血圧や糖尿病といった、環境的要因と多数の遺伝子に支配される複雑な遺伝的要因との相互作用によって発症すると考えられている疾患についても、連鎖解析により主要な原因遺伝子の染色体上の位置が明らかとされている^{8,10)}。このような量的形質の連鎖解析を行うには、多数のマーカー遺伝子よりなる詳細な染色体の連鎖地図が必要であるが、ヒトゲノムプロジェクトに代表されるような近年の哺乳類の分子遺伝学の発展により、ヒトはもちろんのことウシ、ブタなどの家畜についても詳細な連鎖地図がつくられている^{2,23)}。したがって、これらのマーカー遺伝子を用いて、多数の家系の個体を調べることにより、家畜においてもこれらの生産形質に関与する QTL (Quantitative Trait Loci) と呼ばれる遺伝子の、染色体上の位置を明らかにすることが可能であると考えられる。染色体上の位置が明らかとなれば、その近傍の位置にマッピングされている遺伝子が当該する形質の有力な候補遺伝子となるであろう。また、もし近傍に候補となるような遺伝子が見いだせない場合でも、連鎖するマーカー遺伝子を指標として当該遺伝子を選抜することによる効率的な育種が可能となると思われる。現在、米国、欧州諸国、日本等において、このような方法による家畜の QTL の同定が大規模に行われている。生産形質を中心とした量的形質に関する分子遺伝学、いわば分子育種学は今後の畜産学にとって重要な課題となるであろう。

哺乳類の性決定の機構に関する分子遺伝学

生物にとって有性生殖は、多様性の獲得と維持にとって重要なメカニズムであり、有性生殖は個体が性的二型性を持つことによって可能となる。したが

って、性決定の機構を解明することは動物の遺伝学にとって重要な課題の一つであろう。脊椎動物における性決定は、たとえばある種の爬虫類では孵化時の温度によって性決定が行われるように環境的要因によって決定される場合もあるが、哺乳類および鳥類の場合は遺伝的な性決定であり、そのために常染色体とは別に性染色体が存在している。鳥類では性染色体の構成が、雌ヘテロ、雄ホモであるのに対し、哺乳類は雌ホモ、雄ヘテロであり、染色体異常の個体の解析から Y 染色体の存在のみが雄性を決定していることが明らかとなっている。したがって Y 染色体上に性決定に直接関与する遺伝子が存在することが推測され、この仮定上の遺伝子は TDF (Testis Determining Factor) と名付けられていたが、その実体は長い間不明であった。しかし、近年 Y 染色体を持ちながら雄性に分化しない性決定異常の個体の解析から、この TDF の実体が明らかとなってきた^{9,25)}。すなわち、これらの個体では Y 染色体上の特定の領域が共通に欠失しており、その領域に特定の機能を持つと思われる遺伝子が存在することが明らかとなったのである。この遺伝子は *SRY* 遺伝子と名付けられ、その後の解析からこの遺伝子こそが TDF として性決定に直接関与する遺伝子であることを示す多くの結果が得られている^{11,14)}。すなわち *SRY* 遺伝子の存在により、未分化な生殖組織が精巣への分化へと誘導されるものと考えられる。我々も性決定に以上を生じるマウスの系統の解析から、間接的ながら *SRY* が性決定に関与することを示すと思われる結果を得ているので次に紹介する。

性決定に関与する遺伝子のマウス亜種間での差異

マウスでは特定の亜種に由来する Y 染色体を持つ個体において、性決定に異常が生じることが知られている。すなわち、マウスの亜種である *M. m. domesticus* に由来する Y 染色体を、他の亜種である *M. m. musculus* に由来する Y 染色体を持つ C57BL/6 系統のマウスに導入すると、核型は XY でありながら、正常に精巣が形成されない個体が高頻度で発生する⁹⁾。これは Y 染色体上の性決定に関与する遺伝子にマウスの亜種間で機能的な差が存在するためと考えられている。したがって、亜種間で性決定の機能的な差に対応する *Sry* 遺伝子 (ヒトでは *SRY* と標記されるのに対し、マウスでは *Sry* と標記される)

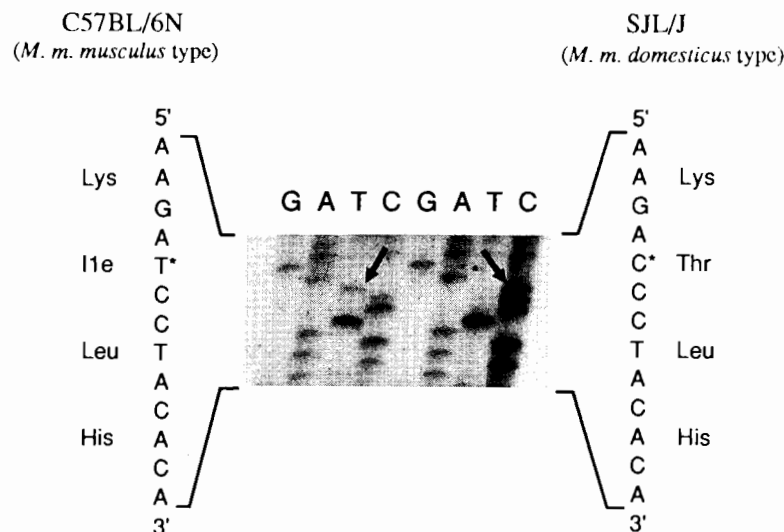


Fig. 5 Part of the nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the *Sry* gene. The nucleotide difference between *M. m. musculus* type and *M. m. domesticus* type Y chromosome is indicated by arrows.

の変異が存在することが推測され、本研究では、異なる亜種に由来するY染色体の*Sry*遺伝子の塩基配列を比較することにより、上記変異について解析した²⁰⁾。

マウス*Sry*遺伝子のDNA結合ドメインであるHMGボックスの領域を挟む形でPCR用プライマーを合成し、*M. m. domesticus*に由来するY染色体の*Sry*遺伝子と*M. m. musculus*に由来するY染色体の*Sry*遺伝子について増幅しその塩基配列を決定した。その結果、両亜種の*Sry*遺伝子の間で1塩基の置換が存在し、その結果*Sry*遺伝子産物において1アミノ酸の変異が存在することが明らかとなった(Fig. 5)。この変異は*Sry*遺伝子産物の機能的に重要なドメインに存在することから、*Sry*遺伝子の機能に影響を与えているものと推測された。最近*Sry*遺伝子の他の領域において、やはり亜種間でアミノ酸配列上の大きな変異が存在することが報告され⁵⁾、両亜種間で*Sry*遺伝子の構造上大きな違いがあることが明らかとなっている。以上の結果は、*Sry*遺伝子の変異が亜種間交配における性決定の異常に関与していることを示唆している。

初期胚の発生速度に与えるY染色体の影響

哺乳類の性は遺伝的には、受精時にY染色体を持つ精子が受精するかX染色体を持つ精子が受精するかによって決定されるが、表現型としての性は前述の様にY染色体上の遺伝子の機能により、未分化な

生殖組織が精巣への分化へと誘導されることによってはじめて決定されると考えられている。しかし、精巣の分化以前には雌雄の間で表現型に全く差はないのだろうか？従来より、哺乳類の着床前の初期胚において発生速度に雌雄差が存在する可能性が示唆されている。もしそうだとするならば、初期胚の段階ですでに表現型としての性差が存在することになるだろう。また、胚の性によって発生速度に差があるか否かを明らかにすることは、初期胚における遺伝子発現の観点から興味ある課題である。さらに、初期胚の発生速度に明確な雌雄差が存在するならば、発生速度の違いによって雌雄の胚を選別することが可能となり、効率的な雌雄の産み分け法として実用的な利用価値も極めて高いであろう。これまでに雄胚は雌胚に比べて僅かに早く発生することを示唆する成績が報告されているが²⁶⁾、詳細な解析は未だ行われていない。そこで発生開始時刻を正確に制御できる体外受精由来マウス胚を用いて胚盤胞への発生過程を培養条件下に観察し、得られた胚の遺伝的な性すなわちY染色体が存在するか否かを判定して発生速度との関係を検討した²⁷⁾。

初期胚の性判別はY染色体特異的配列をPCR法により検出することにより行なった¹⁹⁾。すなわち、マウスのY染色体上に存在する*Zfy*遺伝子と*Sry*遺伝子についてプライマーを同一の領域をはさむ形で外側および内側の各2組み合成し、初期胚より各々の配列について外側のプライマーを用いて1回目の

増幅を行い、さらにその産物を内側のプライマーを用いて2回目の増幅を行う2重PCR法を行った。Fig. 6に示すように、*Zfy* 遺伝子、*Sry* 遺伝子の目的とする配列と同一の分子量のバンドが検出された胚を雄とし、検出されなかった胚は雌とした。マウスの過排卵卵子と精巣上体精子を用いて体外受精を行い、培養後75-81時間後に胞胚腔の出現を指標として発生速度の速いもの、中間のもの、および遅いものの3群に分け、性別を上記のPCR法により調べた。その結果、検査した237個の胚のうち、速、中間、および遅胚における雄胚数：雌胚数（雄胚の%）はそれぞれ、60：18（76.9%）、46：42（52.3%）および30：41（42.3%）であり、発生速度の速い群では

雄の比率が有為に高く、遅い群では低いことが示された。したがって、体外受精を用いて受精時間を制御した場合、胚の発生速度に有為な性差が生じることが確認された。

以上の結果は、マウス初期胚の発生速度に雌雄差が存在することが明らかとしているが、この差はどのようなメカニズムによって発生しているのであろうか？いくつかの可能性が考えられるが、そのうちの一つは、Y染色体上の遺伝子が初期胚の発生速度に影響を与えることである。Y染色体上には前述の*Sry* 遺伝子を始め、機能的な遺伝子がいくつか存在することが明らかとなっている。これらの遺伝子の機能は不明な点が多いが、そのうちのいくつかは精子形成に関与しているようである。これらのY染色体上の遺伝子が雄の初期胚において発現することにより発生速度に影響を与えていることが考えられる。また、逆にX染色体上の遺伝子が発生速度に影響を与えている可能性も考えられる。すなわち、X染色体数は雄が1であるのに対し雌では2であり、通常このX染色体の数の違いによる遺伝子の発現量の違いは、雌において片方のX染色体が不活化することによって補正されている。しかし、初期胚においてはX染色体の不活化は起こっていないことから、X染色体上の遺伝子の発現量に雌雄間で差が出現し、胚の発生速度に影響を与えている可能性である。もう一つの可能性は、Y染色体あるいはX染色体の存在自身が胚の分裂速度に影響を与えていることである。すなわち、染色体の領域によって細胞分裂における複製の時期が異なることから、Y染色体を持つか、X染色体を持つかによって、染色体複製の時期が微妙に異なり、分裂速度に影響を与える可能性がある。以上のようにいくつかの可能性が考えられるが、現時点では胚発生の雌雄差の機構は明らかではなく、その解明は今後の課題である。しかし、上記の初期胚の発生速度の性差をより強調するような培養条件が設定できるならば、発生速度を指標とした効率的な胚の雌雄選別が可能であり、畜産分野への貢献は大きいものと思われる。

ま と め

以上、ゲノムプロジェクト、遺伝病、分子育種、性決定といった哺乳類の分子遺伝学の最近の話題について、我々の実験結果を含めて概説した。これら

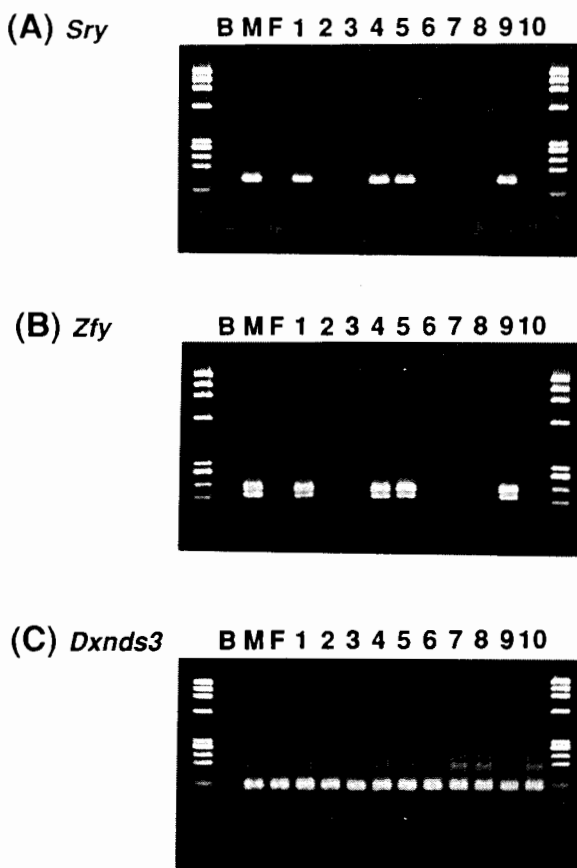


Fig. 6 Products of two-step PCR method amplified from blastocyst stage embryos.

(A) The PCR products amplified with primers for *Sry* gene. (B) The PCR products amplified with primers for *Zfy* gene. (C) The PCR products amplified with primers for *DXNds3* gene. Lane B: sample without DNA; lane M: 0.1 ng DNA of male mouse; lane F: 0.1 ng DNA of female mouse; lanes 1-10: blastocysts. Left and right lanes contain DNA size marker of *Hae* II-digested Φ X174 DNA.

のことは見れば明確な様に、近年の分子遺伝学あるいは分子生物学の飛躍的發展は基礎生物学的に多くの新たな知見を明らかとし、生物に対する体系的な理解を可能とただけでなく、医学、農学などの生物学を基礎とした応用科学の分野においても大きな貢献をしている。しかし、医学の分野ではいち早く、分子生物学の成果を取り入れ免疫学、ウィルス学、腫瘍学などの領域を中心に大きな発展を遂げ、また遺伝子診断や遺伝子治療など臨床医学の領域でもその成果が広く応用されているのに比べて、同じく生物学を基礎とした応用科学でありながら、農学の領域では必ずしも有効に応用されていないように思われる。畜産の分野でも分子育種学といった概念はやっと確立されつつある状況であり、実用化されている例は決して多くはない。今後、いわば分子農学といったような分子生物学、分子遺伝学を基礎とし、生物生産を対象とした新たな概念の体系化が必要とされているのではないだろうか。

文 献

- 1) Berta, P., J. R. Hawkins, A.H. Sinclair, A. Taylor, B. L. Griffiths, P. N. Goodfellow, and M. Fellous : Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, **348**, 448-450 (1990)
- 2) Bishop, M.D., S. M. Kappes, J. W. Keele, R. T. Stone, S. L.F. Sunden, G. A. Hawkins, S. S. Toldo, R. Fries, M. D. Grosz, J. Yoo, and C. W. Beattie : Genetic linkage map for cattle. *Genetics*, **136**, 619-639 (1994)
- 3) Botstein, D. R., R. L. White, M. Scolnick, and R. W. Davis : Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, **32**, 314-331 (1980)
- 4) Cornall, R. J., T. J. Aitman, C. M. Herne, and J. A. Todd : The generation of a library of PCR-analyzed microsatellite variant for genetic mapping of the mouse genome. *Genomics*, **10**, 874-881 (1991)
- 5) Coward, P., K. Nagai, D. Chen, H. D. Thomas, C. M. Nagamine, and Y-F. C. Lau : Polymorphism of a CAG trinucleotide repeat within Sry correlates with B6. Y^{Dom} sex reversal. *Nature Genetics*, **6**, 245-250 (1994)
- 6) Eicher, E. M., L. L. Washburn, J. B. Whitney III, and K. E. Morrow : *Mus poschiavinus* Y chromosome in the C57BL/6J murine genome causes sex reversal. *Science*, **217**, 535-537 (1982)
- 7) Fujii, J., K. Otsu, F. Zorzato, S. De Leon, V. K. Khanna, J. F. Weiler, P. J. O'Brien, and D. H. MacLennan : Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, **253**, 448-451 (1991)
- 8) Ghosh, S., S. M. Palmer, N. R. Rodrigues, H. J. Cordell, C. M. Hearne, R. J. Cornall, J. -B. Prins, P. McShane, G. M. Lathrop, L. B. Peterson, L. S. Wicker, and J. A. Todd : Polygenic control of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Nature Genetics*, **4**, 404-409 (1993)
- 9) Gubbay, J., J. Collignon, P. Koopman, B. Capel, A. Economou, A. Munsterberg, N. Vivian, P. Goodfellow, and R. Lovell-Badge : A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, **346**, 245-250 (1990)
- 10) Hilbert, P., K. Lindpaintner, J. S. Beckman, T. Serikawa, F. Soubrier, C. Dubay, P. Cartwright, B. De Gouyon, C. Julier, S. Takahashi, M. Vincent, D. Ganten, M. Georges, and G. M. Lathrop : Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature*, **353**, 521-529 (1991)
- 11) Kehrli, M. E., F. C. Schmalstieg, D. C. Anderson, M. J. van der Maaten, B. J. Hughes, M. R. Ackermann, C. L. Wilhelmsen, G. B. Brown, M. G. Stevens, and C. A. Whetstone : Molecular definition of bovine granulocytopeny syndrome: Identification of deficiency of Mac-1 (CD11b/CD18) glycoprotein. *Am. J. Vet. Res.*, **15**, 1826-1836 (1990)
- 12) Kobayashi, E., M. Tachibana, H. Ikadai, and T. Kunieda : Linkage among Esterase-6 (Es-6), neural cell adhesion molecule (NCAM), and apolipoprotein C-III (apoc-3) genes on rat chromosome 8. *Mammalian Genome*, **3**, 656-658 (1992)
- 13) Kobayashi, E., M. Tachibana, H. Ikadai, and T. Kunieda : A genetic linkage map of rat chromosome 5 reveals extensive linkage conservation with mouse chromosome 4. *Mammalian Genome*, **5**, 222-224 (1994)
- 14) Koopman, P., J. Gubbay, N. Vivian, P. Goodfellow, and R. Lovell-Badge : Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* **351**, 117-121 (1991)
- 15) Kunieda, T., C. M. Simonaro, M. Yoshida, H. Ikadai, G. D. Levan, R. J. Desnick, and E. H. Schuchman : Mucopolysaccharidosis type VI: Isolation of cDNA encoding arylsulfatase B, chromosomal localization of

- the gene, and identification of the mutation. *Genomics*, **29**, 582-587 (1995)
- 16) Kunieda, T., E. Kobayashi, M. Tachibana, H. Ikadai, and T. Imamichi : Localization of the interleukin-3 gene to rat chromosome 10 by linkage analyses with a variable number of tandem repeats (VNTR). *Mammalian Genome*, **3**, 464-466 (1992)
- 17) Kunieda, T., E. Kobayashi, M. Tachibana, H. Ikadai, and T. Imamichi : Polymorphic microsatellite loci of rat (*Rattus norvegicus*). *Mammalian Genome*, **3**, 564-567 (1992)
- 18) Kunieda, T., M. Matsui, N. Nomura, R. Ishizaki, M. C. Yoshida, and T. Imamichi : Restriction fragment length polymorphism as a marker of the *c-myc* oncogene in rats. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **51**, 1295-1298 (1989)
- 19) Kunieda, T., M. Xian, E. Kobayashi, T. Imamichi, K. Moriwaki, and Y. Toyoda : Sexing of mouse preimplantation embryos by detection of Y chromosome-specific sequences using polymerase chain reaction. *Biol. Reprod.*, **46**, 692-697 (1992)
- 20) Kunieda, T. and Y. Toyoda : Nucleotide sequence of mouse *Sry* gene is different between Y chromosome originating from *M. m. musculus* and *M. m. domesticus*. *Genomics*, **13**, 236-237 (1992)
- 21) Moritomo, Y., T. Ishibashi, and H. Miyamoto : Morphological Changes of epiphyseal plate in the long bone of chondrodysplastic dwarfism in japanese brown cattle. *J. Vet. Med. Sci.*, **54**, 453-459 (1992)
- 22) Nakamura, Y., M. Leppert, P. O'Connell, R. Wolff, T. Holm, M. Culver, C. Martin, E. Fujimoto, M. Hoff, E. Kumlin, and R. White : Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, **235**, 1619-1622 (1987)
- 23) Rohere, G.A., L. E. Alexander, J. W. Keele, T. P. Smith, and C. W. Beattie : A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics*, **136**, 231-245 (1994)
- 24) Rudolph, J. A., S. J. Spier, G. Byrns, C. V. Rojas, D. Bernoco, and E. P. Hoffman : Periodic paralysis in quarter horses: a sodium channel mutation disseminated by selectivebreeding. *Nature Genetics*, **2**, 144-147 (1992)
- 25) Sinclair, A. H., P. Berta, M. S. Palmer, J. R. Hawkins, B. L. Griffiths, and M. J. Smith, J. W. Foster, A-M. Frischauf, R. Lovell-Badge, and P. N. Goodfello : A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**, 240-244 (1990)
- 26) Tsunoda, Y., T. Tokunaga, and T. Sugie : Altered sex ratio of live young after transfer of fast and slow developing mouse embryos. *Gamete Res.*, **12**, 301-304 (1985)
- 27) Valdivia, R. P. A., T. Kunieda, S. Azuma, and Y. Toyoda : PCR sexing and developmental rate differences in preimplantation mouse embryos fertilized and cultured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, **35**, 121-126 (1993)
- 28) Wang, S., C-e., Sun, C. A. Walczak, J. S. Ziegle, B. R. Kipps, L. R. Goldin and S. R. Diehl : Evidence for susceptibility locus for schizophrenia on chromosome 6pter-p22. *Nature Genetics*, **10**, 41-46 (1995)
- 29) Weber, J. L. : Informativeness of human (dC-dA)n (dG-dT)n polymorphisms. *Genomics*, **7**, 524-530(1990)
- 30) Yoshida, M., M. Tachibana, E. Kobayashi, H. Ikadai, and T. Kunieda : The locus responsible for mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome) is located on rat chromosome 2. *Genomics*, **20**, 145-146 (1994)