

学 位 論 文 題 名

Genetic analysis of the hooded phenotype in the rat

（ラット頭巾斑表現型の遺伝学的解析）

学位論文内容の要旨

げっ歯類における被毛色研究は、その明らかな表現型故に古くから研究がなされており、現在までに約150個の遺伝子座と約1,000個の対立遺伝子の存在が明らかとなっている。一般的に被毛色は、発生初期段階において神経堤より派生する神経堤細胞から分化、誘導されるメラノサイトが産生するメラニンによって規定される。神経堤細胞はメラノサイト以外にも骨細胞や軟骨細胞、末梢神経細胞、内分泌細胞など様々な系列に分化できる多能性を持っており、ワーデンプルグ症候群に代表される神経堤細胞の分化異常の疾患では、被毛色異常と同時に難聴や腸管神経節欠損など、皮膚以外の臓器にも異常が見られることが報告されている。

頭巾斑表現型はラット特有の被毛色表現型で、その遺伝子座は第14染色体に座位し常染色体劣性遺伝様式を示すことが明らかとなっている。頭巾斑遺伝子座には複数の対立遺伝子が存在することや、頭巾斑の表現型を修飾する遺伝子座が存在することが報告されているが、それらの責任遺伝子は未だに明らかとなっていない。また、頭巾斑表現型は被毛色のみに現れ、その他の神経堤細胞由来の細胞系列は正常であると考えられる。従って、頭巾斑遺伝子座の解析は被毛色異常のメカニズムを明らかにするだけでなく、神経堤細胞の分化、遊走のメカニズム解明にも有用であると考えられる。よって本研究では、頭巾斑表現型ならびに頭巾斑表現型修飾因子の遺伝学的解析を試みた。

第一章では野生型のISラットと頭巾斑表現型のLEAラットの戻し交配個体795匹を用いて詳細マッピングを行った。その結果、頭巾斑遺伝子座はマイクロサテライトマーカー*D14Hok1*と強く連鎖し、*D14Rat84*から*D14Got40*までの約0.4 Mbpに存在することを明らかにした。この領域に含まれるタンパク

質をコードする遺伝子は*Kit*のみであり、ゼブラフィッシュからヒトに至るまで多くの脊椎動物において*Kit*遺伝子の変異により色素産生異常を呈することが報告されている。このことから*Kit*が頭巾斑遺伝子座の有力な原因遺伝子であると考えられた。しかしながら*Kit*のコーディング領域には野生型と頭巾斑表現型の間で1つの同義変異が存在するのみで、胎齢期から新生子期、成体まで*Kit*のmRNAの発現量に有意な差は見られなかった。さらに、免疫染色によるとメラニンが存在しないLEAラットの白色被毛部位においてもメラノサイトマーカーである*Kit*陽性の細胞が検出された。このことから頭巾斑表現型は*Kit*の単純な発現量の変化ではなく、何らかのメカニズムによるメラノサイトの機能異常が原因であると推測された。

次に、頭巾斑表現型の修飾遺伝子座を同定するために、野生型に類似した表現型を示す頭巾斑の対立遺伝子が保持するBNラットとLEAラットを用いて遺伝解析を行った。F₂個体において体表面積に占める有色被毛で覆われた面積を背側、腹側、全体についてそれぞれ調べたところ、その値は全て明らかな2群に分離せず連続的な値を示したことから複数の遺伝子座による制御が示唆された。そこでQTL解析を行ったところ、全ての場合において*D14Got40*近傍に非常に強いQTLが検出された。また背側における第17染色体に強いQTLが、ならびに腹側における第15染色体に弱いQTLが検出された。次に遺伝子座間の相互作用、エピスタシス解析を行ったところ、背側の表現型に関して*D14Got40*と*D20Mit1*間、および*D14Got40*と*D17Rat2*間において強い相互作用があることが明らかとなった。*D14Got40*は頭巾斑遺伝子座のまさに近傍であり、これらの結果から頭巾斑遺伝子座そのものがその他の遺伝子座と相互作用して頭巾斑表現型を調節している事、つまり*Kit*と他の遺伝子座にコードされるタンパク質の相互作用が頭巾斑表現型の調節に重要である事が示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	安居院	高志
副査	教授	昆	泰寛
副査	教授	木村	和弘
副査	准教授	佐々木	宣哉

学位論文題名

Genetic analysis of the hooded phenotype in the rat

(ラット頭巾斑表現型の遺伝学的解析)

げっ歯類における被毛色研究は、その明らかな表現型故に古くから研究がなされており、現在までに多数の遺伝子座と対立遺伝子の存在が明らかとなっている。一般的に被毛色は、発生初期段階において神経堤より派生する神経堤細胞から分化、誘導されるメラノサイトが産生するメラニンによって規定される。神経堤細胞はメラノサイト以外にも骨細胞や軟骨細胞、末梢神経細胞、内分泌細胞など様々な系列に分化できる多能性を持っており、ワーデンプルグ症候群に代表される神経堤細胞の分化異常の疾患では、被毛色異常と同時に難聴や腸管神経節欠損など、皮膚以外の臓器にも異常が見られることが報告されている。頭巾斑表現型はラット特有の被毛色表現型で、その遺伝子座は第 14 染色体に座位し常染色体劣性遺伝様式を示すことが明らかとなっている。頭巾斑遺伝子座には複数の対立遺伝子が存在することや、頭巾斑の表現型を修飾する遺伝子座が存在することが報告されているが、それらの責任遺伝子は未だに明らかとなっていない。また、頭巾斑表現型は被毛色のみに現れ、その他の神経堤細胞由来の細胞系列は正常であると考えられる。従って、頭巾斑遺伝子座の解析は被毛色異常のメカニズムを明らかにするだけでなく、神経堤細胞の分化、遊走のメカニズム解明にも有用であると考えられる。よって申請者は、頭巾斑表現型ならびに頭巾斑表現型修飾因子の遺伝学的解析を試みた。

まず申請者は野生型の IS ラットと頭巾斑表現型の LEA ラットの戻し交配個体 795 匹を用いて詳細マッピングを行った。その結果、頭巾斑遺伝子座はマイクロサテライトマーカー *D14Hok1* と強く連鎖し、*D14Rat84* から *D14Got40* までの約 0.4 Mbp に存在することを明らかにした。この領域に含まれるタンパク質をコードする遺伝子は *Kit* のみであり、このことから *Kit* が頭巾斑遺伝子座の有力な原因遺伝子であると考えられた。しかしながら *Kit* のコーディング領域には野生型と頭巾斑表現型の間で 1 つの同義塩基置換が存在するのみで、胎齢期から新生子期、成体まで *Kit* の mRNA の発現量に有意な差は見られなかった。

さらに、免疫染色によるとメラニンが存在しない LEA ラットの白色被毛部位においてもメラノサイトマーカーである *Kit* 陽性の細胞が検出された。このことから申請者は、頭巾斑表現型は *Kit* の単純な発現量の変化ではなく、何らかのメカニズムによるメラノサイトの機能異常が原因であると推測した。

次に申請者は、頭巾斑表現型の修飾遺伝子座を同定するために、野生型に類似した表現型を示す頭巾斑の対立遺伝子 *h* を保持する BN ラットと *H* を保持する LEA ラットを用いて遺伝解析を行った。F₂ 個体において体表面積に占める有色被毛面積の割合を背側、腹側、全体についてそれぞれ調べたところ、その値は全て明らかな 2 群に分離せず連続的な値を示したことから複数の遺伝子座による制御が示唆された。そこで quantitative trait locus (QTL) 解析を行ったところ、全ての場合において *D14Got40* 近傍に非常に強い QTL が検出された。また背側における第 17 染色体に強い QTL が、ならびに腹側における第 15 染色体に弱い QTL が検出された。次に遺伝子座間の相互作用、エピスタシス解析を行ったところ、背側の表現型に関して *D14Got40* と *D20Mit1* 間、および *D14Got40* と *D17Rat2* 間において強い相互作用があることが明らかとなった。*D14Got40* は頭巾斑遺伝子座のまさに近傍であり、これらの結果から頭巾斑遺伝子座そのものがその他の遺伝子座と相互作用して頭巾斑表現型における有色被毛率を調節している事、つまり *Kit* と他の遺伝子座にコードされるタンパク質の相互作用が頭巾斑表現型の有色被毛率調節に重要である事が示唆された。

以上一連の研究成果は獣医学の分野において新しい知見を与えるものと判断された。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者、鳥越大輔氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規定第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。