

平成22年 4月12日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19500373

研究課題名（和文） 多因子による肛門直腸奇形症の遺伝解析

研究課題名（英文） Genetic analysis of multifactorial anorectal malformation

研究代表者

須藤 淳一（Jun-ichi Suto）

独立行政法人 農業生物資源研究所 生殖機構研究ユニット 主任研究員

研究者番号：19500373

研究成果の概要：♀DDD×♂DH-Dh/+ F₁雄 Dh/+マウスに生じる多因子性肛門直腸奇形症に關する独立3遺伝子座（1番、X、およびY染色体上）における原因遺伝子を同定すべく遺伝解析を行った。結果的に、候補遺伝子 *Gli2*, *Mid1*, *Sry* には、塩基配列上特別な変異は見出せず、候補遺伝子からは除外された。しかしながら、本研究のために樹立した17系統のY染色体コンソミック系統を用いることにより、*Dh* が雄の生殖機構に果たす役割などが解明され、精巢重量・性決定などの解析に成果を得た。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：動物遺伝学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：遺伝学、解剖学、ゲノム、発生・分化、性染色体

1. 研究開始当初の背景

肛門直腸奇形症（Anorectal Malformations, 以降 ARM）は後腸の発生異常により生じる先天異常症である。ヒトでは約5,000出産に1例の割合で発症するとされており、稀な疾患ではない。ARMは、軽度の場合、単なる肛門狭窄のみに留まるが、重度の場合、肛門は閉鎖し、直腸と泌尿生殖器間に瘻管の異常形成を伴う場合もある。これらの異常の多くは尿直腸中隔の偏位に起因すると考えられて

いる。多くの場合、ARMの発症には明らかに遺伝的な影響が認められ、しばしば複数遺伝子および環境要因の寄与が示唆される。また、ARM小児の約50%に他の奇形が合併するといわれている（例えばヒトでは、Currarino, Townes-Brocks, Pallister-Hall, VACTERL など、数々の特徴的な合併症を伴う症候群が報告されている）ため、ARMの病因・病態は極めて多様な複雑形質であると考えられている。その一方で、*Shh* (Sonic

Hedgehog)-Patched-Gli (GLI-Krüppel family member GLI2) 遺伝子 Pathway の関与が、これら症候群に共通して認められることから、多様な ARM の発症に中心的な役割を果たす分子機構は比較的少数であることが想定される。従って、ヒトでは困難であると思われる ARM 発症に関与する遺伝子 (群) の同定を、モデル動物の利用により行うことは合理的である。

2. 研究の目的

研究代表者が発見した多因子性 ARM モデルマウス (♀DDD×♂DH-Dh/+ F1♂-Dh/+) において、これまでに判明している 3 原因遺伝子座 (第 1 染色体 *Dh* 座、X 染色体 *Grdhq1* 座、数種の近交系 Y 染色体に連鎖する遺伝子座) における原因遺伝子を同定し、未だ不十分な理解に留まっている ARM の解明のための端緒とすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

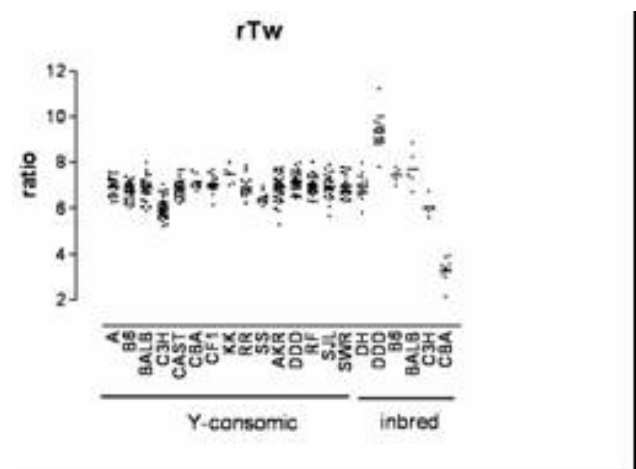
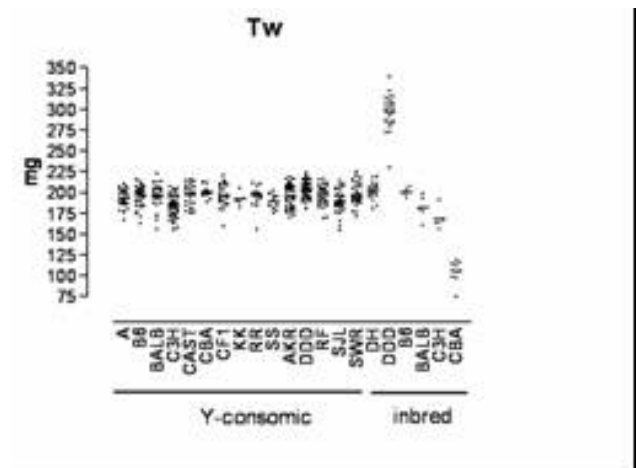
第 1 染色体 *Dh* 座の候補として *Gli2* 遺伝子などの妥当性を検討する。X 染色体 *Grdhq1* 座の詳細マッピングおよび候補遺伝子 *Mid1* の妥当性を検討する。現在までに DH 系統の遺伝背景下に A/J, AKR/J, BALB/cA, C3H/HeJ, C57BL/6J, CAST/EiJ, CBA/N, CF1/Sgn, DBA/2J, DDD, KK/Ta, RF/J, RR/Sgn, SJL/J, SS/Sgn, SWR/J の各系統に由来する Y 染色体を導入した Y 染色体コンソミック系統を確立しており、ARM 発症の有無と Y 染色体の相関が明らかになっている。Y 染色体遺伝子についての塩基配列データを集積し、発症と相関する遺伝子・塩基置換を同定する。

4. 研究成果

DH-+/+ の *Gli2* シークエンスを決定したところ、*Dh/Dh* のそれと全く同一であった。また、*Gli2* 遺伝子は +/+, *Dh*/+, *Dh/Dh* の全てでほぼ同レベルで発現しており、従って *Gli2* は候補遺伝子から除外された。*Dh* 原因遺伝子は現在まで不明である。*Mid1* ORF 全長を一遍に PCR 増幅し、発現レベルの正常性、および cDNA 塩基配列の決定を行った。一部再確認をまだ終えていないが、*Mid1* を原因遺伝子とする理由は全く無くなった。(DDD×CAST)×DH-Dh/+, および(DDD×SPRET)×DH-Dh/+ に由来する生存産仔の解析の結果、第 4 の遺伝子座の存在が示唆されたが、現在までに単一の遺伝子座としては同定されておらず、さらに追求中である。C3H/HeJ RF/J, CAST/EiJ に加えて、KK/Ta, RR/Sgn などが非発症型 Y 染色体であることが判った (約 20 系統のうち Y コンソミックで確認したのは 17 系統ほどである。)。結果としては、これまでどおり、発症型 Y 染色体を持つものが多数派であった。疾患発症に相関する遺伝子

の同定はできなかった。しかしながら、精巣重量・性決定における Y 染色体の機能解析がうまく進展し成果が得られたので (発表文献 1 および 2)、本結果を以下に述べる。

精巣重量に関する Y 染色体の効果: マウスの精巣重量は系統間で大きく異なっており、例えば最重量の精巣を持つと思われる系統の 1 つ DDD 系統では 80 日齢時の精巣重量が約 300mg なのに対し、最軽量の精巣を持つと思われる系統の 1 つ CBA 系統でのそれは約 100mg 程度である。このような系統間差の全てが Y 染色体の差に起因するわけではないが、過去の多くの研究報告によれば、過半数の結果が Y 染色体の精巣重量への貢献を支持している。しかしながら、Y 染色体の効果を検証するためには Y コンソミック系統による解析が不可欠であるにも関わらず、2 系統を超えた系統由来の Y 染色体間の違いについては全く検証が行われてこなかった。そこで研究代表者は、上述の Y コンソミック系統を相互に比較し、Y 染色体間に差があるか否かの検証を行った。下図 (上段は絶対重量、下段は体重で補正した相対重量) に示すよう



に、近交系 DDD の最高精巣重量も CBA の最

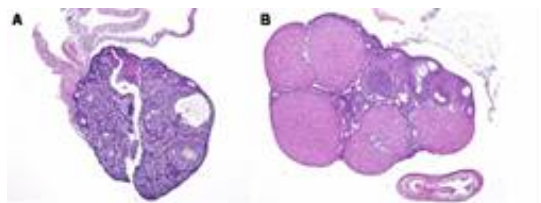
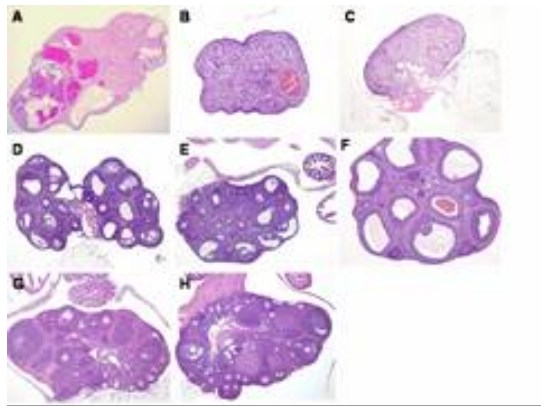
低精巣重量も DH の遺伝背景に戻した場合（すなわち Y コンソミック）、DH 系統の精巣重量と有意な差は認められなかった。従って精巣重量を決定する主たる遺伝子は常 (X) 染色体性であると結論された。しかしながら、Y コンソミック間にも有意差は明らかに存在し、特に C3H 系の低精巣重量が顕著であった。すなわち、体重による補正を加えても結果は極めて告示していることから、Y 染色体に精巣重量を決定する遺伝子が存在することを示すものである。現在遺伝子同定を目指している。本 Y コンソミックは *Dh* 座遺伝子型に関して、上述の ++ の野生型に加えて、*Dh*/+ の変異型も同時に維持している。この Y コンソミック-*Dh*/+ を ++ とともに、より標準系統の C57BL/6J (以下 B6) に置き換えようと試みた。AKR 由来の Y 染色体を持つ Y コンソミック系統 (DH-Chr Y^{AKR}-*Dh*/+) の戻し交配の 2 世代目産仔の 2 匹の ♂*Dh*/+ が半陰陽 (hermaphrodite) であった。adult gonad に関する限り、ovotestis は認められず、右側には卵巣・子宮が、左側には精巣がそれぞれ発生した。(Y コンソミックの全てではないが) 他の Y 染色体についても同様の戻し交配を実施したところ、RF の Y でも同様の半陰陽が得られたが、DH, B6, C3H, DDD の Y では得られなかった。



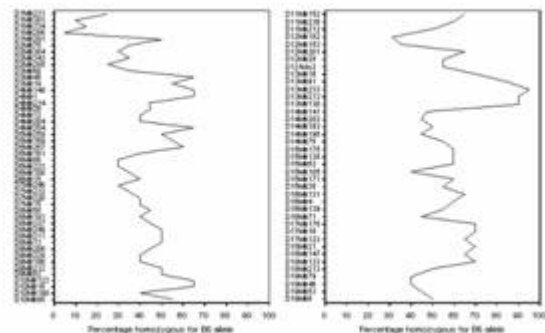
AKR/J, RF/J の Y に由来する 2 世代目戻し交配産仔について、表現型解析から正常の ♀ であると判断された ♀*Dh*/+ のうち、約 15% の個体が *Sry* 陽性であった。すなわちこれらの ♀ は性転換 XY 雌であった。半陰陽の場合と同様に、DH, B6, C3H, DDD の Y では (adult gonad に関する限り) 性転換は生じなかった。現在のところ、自然交配ではこれらの性転換 XY 雌からの産仔は得られていない。

半陰陽および性転換雌の卵巣を組織学的に解析したところ、原則として、卵巣が萎縮しており、原始卵胞が認められないことが特徴的であった (下上図半陰陽 D-F)。また、加齢にともない組織学的異常は著しくなり、ほとんどの場合、80 日齢時には黄体細胞の過形成が顕著に認められ、以後黄体は退行しない

ようであった (下上図半陰陽 A-C)。このように半陰陽個体の卵巣と性転換個体のそれとは酷似した異常を示した (下下図)。



半陰陽・性転換は戻し交配の 1 世代目、すなわち F1 には生じないことから、発症には常染色体座における C57BL/6J 由来の homozygous alleles の関与が必要である。組織学的な解析結果から性転換は半陰陽の延長上の重篤化と考えられ、従って、半陰陽・性転換個体をまとめた上で異常とみなし連鎖解析による C57BL/6J 上の原因遺伝子座マッピングを行った。85 マイクロサテライト座に関して Binomial test による関連解析を行ったところ、13, 17, 18 の 3 染色体に連鎖が示唆された。



さらに異常個体を獲得し、解析を繰り返した結果、13番染色体に極めて有意な連鎖を認めた。マウス13番染色体にはこれまで性転換遺伝子は知られていない。現在、個体数を増やし、詳細マッピングを試みている。

Locus	No. of hermaphrodites or sex-reversed XY females		P value
	B6/B6	B6/DH	
D13Mit16	21	8	
D13Mit275	22	7	
D13Mit91	24	5	
D13Mit279	26	3	0.0000068
D13Mit254	27	2	0.00000076
D13Mit233	27	2	0.00000076
D13Mit106	27	2	0.00000076
D13Mit213	26	3	0.0000068
D13Mit130	27	2	0.00000076
D13Mit262	25	4	0.000044

D13Mit@@@はマイクロサテライトマーカー。

$$P(X=x) = \binom{n}{x} p^x (1-p)^{n-x}, \text{ where } \binom{n}{x} = {}_n C_x$$

$$= \frac{n!}{x!(n-x)!}$$

の binomial test により検定した。

また、上記の戻し交配の途上、戻し交配の2世代目から、雌雄ともに *Dh*/+ 個体が高頻度で離乳前までに死亡した。F1では致死性は認められないため、やはり発症には常染色体座における B6由来の homozygous alleles の関与が必要である。また、戻し交配を重ねるに従い致死率が高まるようで、N5を超えた戻し交配産仔は得られていない。死亡は生後の3日～一週間程度に生じた。死亡にいたるマウスは明らかな成長障害を示したが、これは♀DDD×♂DH-*Dh*/+ F1♂*Dh*/+で観察されたそれと発症時期、程度の両点において告示していた。異なる点は雌にも生じること、および、RFのY染色体（これはF1♂*Dh*/+の致死症を生じない）でも生じることである。BALBの遺伝背景下では発症しないことから、B6ゲノムが特異的であることが示唆された。これについても、特に2つの疾患の共通性の解明を考慮しつつ、現在解析を急いでいる。DDDと異なり、B6ゲノムは非常に詳細に解析されているため、本致死症の解明は♀DDD×♂DH-*Dh*/+ F1♂*Dh*/+の病因解明に大

きく資することが期待される。

以上のように、*Dh*は精巣重量のみならず性決定にも関わることが明らかとなった。従来知られていない新知見であり、*Dh*は脾臓、骨格、消化管をはじめ、かなり広範に発生異常を誘発する遺伝子であることが明らかとなった。

Y染色体遺伝子群に関するデータも次第に集積され、今後は対象とする表現型の範囲を広げ、本コンソミック系を用いた量的形質遺伝子座解析を行うことが可能となりつつある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Suto J (2008) Genetic dissection of testis weight in a mouse strain having an extremely large testis: major testis weight determinants are autosomal rather than Y-linked on the basis of comprehensive analyses in Y-chromosome consomic strains. **Proceedings of the Japan Academy, Ser. B** 84: 393-406.
2. Suto J (2009) Hermaphroditism and sex reversal associated with the *dominant hemimelia* mutation in XY mice. **Proceedings of the Japan Academy, Ser. B** 85: 337-347.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
須藤 淳一
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし