

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 2月25日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成21年度～平成23年度

課題番号：21500393

研究課題名（和文）Y染色体コンソミック系統群による量的形質遺伝子座解析

研究課題名（英文）Quantitative trait locus analysis using Y chromosome consomic mouse strains

研究代表者

須藤 淳一（SUTO JUN-ICHI）

独立行政法人 農業生物資源研究所 家畜ゲノム研究ユニット 上級研究員

研究者番号：60355740

研究成果の概要（和文）：Y染色体コンソミックマウスの解析により、80日齢時の精巣重量に関して、有意に関連する SNP・遺伝子多型を複数同定した。また、80日齢時の体重、および16週齢時の体重・体長に関して、近交系マウス KK/Ta 系統由来の Y染色体がボディーサイズ減少に関連することを示した。

研究成果の概要（英文）：We identified several SNPs and gene polymorphisms that were significantly associated with testis weight in Y-consomic strains. In addition, we showed that the Y chromosome of the inbred mouse KK/Ta strain was associated with reduced body size in Y-consomic strains.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,200,000	360,000	1,560,000
22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
23年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：量的形質、Y染色体、コンソミックマウス系統

1. 研究開始当初の背景

哺乳類 Y染色体は、対をなす X染色体と比べて非常に小さく（ヒトではゲノムの2%程度）、わずかの遺伝子しか持っていない。すなわち、X染色体が1,098個の遺伝子を持つのにに対し、ヒト Y染色体の95%を占める雄特異的領域は156個の転写単位を含み、78個のタンパク質コード遺伝子がそれら単位に含まれ、27種類のタンパク質をコードするのみである。Y染色体遺伝子のうち、働きが判っているのは、Sry 遺伝子が精巣決定遺伝子であるという事実のみである。その Sry 遺伝子についてさえ、作用する標的分子は完全には同定されておらず、精巣決定の分子機構に

は依然未解明な部分が多い。また、Y染色体の特定の領域(AZF)の欠損により無精子症が発症することも知られており、AZFには精子形成に必要な遺伝子が存在することを示唆している。いずれにせよ、従来、Y染色体の機能は精巣決定・精子形成などに限定されたと考えられてきた。しかしながら、Y染色体遺伝子が関与する形質は決してここに留まらない。たとえば、① 研究代表者らは、マウス雌 DDD 系統と雄 DH-Dh/+ 系統間の F₁ のうち雄 Dh/+のみが、直腸肛門奇形症のため、生後の数日で死亡することを発見した (Suto *et al.*, *Exp Anim* 45: 99-101, 1996; Suto and Imamura, *Exp Anim* 45: 399-402, 1996)。本

疾患は第1染色体座、X染色体座、および特定系統に由来するY染色体座の組み合わせで発症するが、Y染色体座については、発症型Y染色体と非発症型Y染色体の2種類がマウス近交系間に共存することが明らかとなった (Suto *et al.*, *Mamm Genome* 10: 777-783, 1999; Suto and Sekikawa, *Mamm Genome* 13: 149-152, 2002)。

②複数の研究者により、マウス骨格サイズおよび形状に関して、Y染色体遺伝子の関与が示されている (Komeda and Goto, *Lab Anim* 18: 237-242, 1984; Lovell and Totman, *Genet Res* 43: 65-73, 1984)。

③血圧、血中脂質レベルには繰り返しY染色体遺伝子の関与が示唆されており、最近、ヒトでは血中中性脂肪の減少・HDL-コレステロールの上昇、すなわち動脈硬化抵抗性、と関連する特定ハプロタイプが同定された (Negrin *et al.*, *Hypertension* 37: 391-397, 2001; Kren *et al.*, *Hypertension* 37: 1147-1152, 2001; Charchar *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 308-312, 2004; Russo *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1569-1574, 2008)。

④多数の研究者により、Y染色体遺伝子がマウスの雄間闘争に関与するという報告が行われている (Maxson *et al.*, *Behav Genet* 9: 219-226, 1979; Carlier *et al.*, *Behav Genet* 20: 137-156, 1990; Le Roy *et al.*, *Behav Genet* 29: 131-136, 1999)。

⑤マウス不安関連行動に関する遺伝子座がY染色体に存在する結果が報告された (Marijke *et al.*, *Behav Genet* 38: 159-184, 2008)。

2. 研究の目的

背景に記述した事実から明らかなように、Y染色体遺伝子の機能は精巣決定・精子形成に限定されるものではない。ところが、一般形質の遺伝解析において、Y染色体遺伝子の関与が考慮されるケースはまれである。Y染色体の機能について再考し、どのY染色体遺伝子が特定の形質に関与するのかを明らかにすべき時が来た。様々な形質に関して、Y染色体遺伝子が関与することを実証し、かつ関与する遺伝子変異を明らかにする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

形態生理(成長、体重、肥満、臓器重量、骨格サイズ・形状)、生殖(精巣発生・精子形成)、代謝(血糖値・尿糖値・血中脂質レベル)、その他疾病(直腸肛門奇形症)などの形質に関するY染色体遺伝子(変異)を同定すべく、Y染色体ワイド関連解析(Y chromosome-wide association study)を実施する。解析手法は、以下に述べるような3ステップから構成される。すなわち、①まず、Y染色体機能を解析するため

には、常染色体あるいはX染色体遺伝子によるノイズを除外しなければならない。このためには、Y染色体のみが異なる複数の系統群を比較解析することが最も効果的である。研究代表者は、17系統のマウス近交系(A/J, AKR/J, BALB/cA, C3H/HeJ, C57BL/6J, CAST/EiJ, CBA/N, CF1/Sgn, DBA/2J, DDD/Sgn, DH/Sgn, KK/Ta, RF/J, RR/Sgn, SJJ/J, SS/Sgn, SWR/J)に由来する17種類のY染色体を、近交系DH/Sgn系統の遺伝背景に20世代以上の戻し交配で単離したY染色体コンソミック(以降Yコンソミック)系統群を樹立している。これらの系統は、Y染色体のみが異なる近交系であり、正味のY染色体効果の比較が可能である。表現型値は正規化し、以降の統計解析はパラメトリックに行う。②当該形質が真にY連鎖であるか否かを決定するために、ダネットの多重比較検定(Dunnett's multiple comparison test)により、各Yコンソミック系統の表現型値が遺伝背景のDH/Sgn(DH-Chr Y^{DH})と有意に異なるか否かの検定を行う。有意差が認められた場合、Y染色体置換が表現型の差をもたらしたと判断する。すなわち、当該形質がY連鎖であると結論する。③SNPおよび他の遺伝子の遺伝子型多型を判別する。SNP・遺伝子多型データをもとに、すべてのYコンソミック系統マウスを2および3群に分類し、群間での平均値の差の検定を行う。Y染色体の場合、有効なSNPおよび遺伝子多型は少なく、1,000個程度である。したがって、Bonferroni補正により、実際にタイプしたSNP・遺伝子多型の総数をnとした場合、 $P < 0.05/n$ を統計的有意とする。本手法により、80日齢時における体重・精巣重量等に関する解析を行う。また、DH系統は常染色体性優性変異Dhを保有する。Dhは体重・精巣重量に強く影響する。したがって、+/+およびDh/+の両遺伝背景下を利用した解析を行う。さらに、♀B6.Cg-A^gマウスと上述の各Yコンソミック系統との交配によりF1マウスを作出する。A^gは常染色体性優性の変異アリル(アグーチ座)F1マウスの半分は肥満(A^g)マウスである。体重(肥満)・体長・血中脂質・血糖値・臓器重量などの形質について、+/+およびA^g/+の両遺伝背景下における解析を行う。

4. 研究成果

① 80日齢時精巣重量に関する関連解析：本解析はDH-Chr Y-+/+系統マウス(n=472)において実施した。

Yコンソミック系統における精巣重量(以下Tw)および相対精巣重量(体重に対する相対的な精巣重量、以下rTwとする)はベル型に、幅広く分布した。分布をBox-Cox変換

により正規化し、以下の解析はパラメトリックに行った。

Twに関して、DH-Chr Y^{C3H}、DH-Chr Y^{CBA}、DH-Chr Y^{DBA}、DH-Chr Y^{KK}、DH-Chr Y^{RR}、およびDH-Chr Y^{SIL}はDH-Chr Y^{DH}に比べ、有意に低下した値を示した。rTwに関しては、DH-Chr Y^{C3H}、およびDH-Chr Y^{SS}はDH-Chr Y^{DH}に比べ、有意に低下した値を示したが、DH-Chr Y^{KK}はDH-Chr Y^{DH}に比べ、有意に増加した値を示した。

合計、30のSNPと9つのSry遺伝子多型(塩基置換およびCAGリピートの反復回数多型を含む)をYコンソミックマウスにおいてタイプした。Mouse Phenome Databaseにより、利用可能な18個の非同義置換型SNPのうち、17個をタイプした(タイプできなかったSNPはrs51394161で、これはZfy2のエキソン5に存在する)。加えて、25個の同義置換型SNPのうち、13個をタイプした。

マウスはSNP多型およびSry遺伝子多型により、2ないし3のグループに分けることができた。39多型をタイプしたので、 $\alpha=0.05$ での有意水準は0.0013であった。rs46947134(Uty)はTwおよびrTwに有意に関連した。DH-Chr Y^{C3H}、DH-Chr Y^{CBA}、DH-Chr Y^{DBA}、およびDH-Chr Y^{RR}はGアシルを持ち、これはTwおよびrTwの減少を伴った。rs46947134は非同義置換型SNPであり、AspからHisへのアミノ酸置換を伴うことが推定された。rs51766109(Usp9y)はrTwに有意に関連した。DH-Chr Y^{C3H}、DH-Chr Y^{CBA}、DH-Chr Y^{DBA}、DH-Chr Y^{RR}、DH-Chr Y^{CAST}、および全てのDH-Chr Y^{Dom}(DomはDomesticus型を示す。Domesticus型でないY染色体は原則として、Musculus型であり、以下Y^{Mus}と表記する)系統はTアシルを保有し、これがrTwの低下を伴った。rs51766109は非同義置換型SNPであり、GlyからGluへのアミノ酸置換を伴った。

25個の多型はほぼY^{Dom}・Y^{Mus}の分類に従った。Y^{Dom}はY^{Mus}に比べ、有意に高いTw・rTw値を示した。

Sry遺伝子ヌクレオチド8733から始まるCAGリピート多型はTw・rTwと有意に関連した。すなわち、12リピートを持つ系統(DH-Chr Y^{C3H}、DH-Chr Y^{CBA}、DH-Chr Y^{DBA}、およびDH-Chr Y^{RR})は9リピートを持つ系統および11リピートを持つ系統に比べて有意に軽い精巣を持った。ヌクレオチド8811から開始されるCAGリピート多型もまたTw・rTwと有意に関連した。10リピートを持つ系統(DH-Chr Y^{C3H}、DH-Chr Y^{CBA}、DH-Chr Y^{DBA}、およびDH-Chr Y^{RR})は12リピートを持つ系統および13リピートを持つ系統に比べて有意に軽い精巣を持った。これらのリピート多型はポリグルタミンストレッチの長さの差に反映されることが推定された。

常染色体およびX染色体遺伝子とは異なり、Y染色体遺伝子に関しては、遺伝子マッピングが行えないため、その表現型効果を評価するために、本研究手法は唯一の方法であると思われる。ヒトと異なり、近交系マウスの場合、その集団遺伝学的構造のため、ゲノムワイドアソシエーション(GWAS)は適用できないとされている。一方で連鎖マッピングとの併用により、マウスにおいても関連解析は有力な研究手段となりうることを示唆されている。Y染色体領域は極端に小さいため、本研究でのYコンソミックマウスの作出は、いわば連鎖マッピングで特定の染色体領域を限定したことに相当する。その上で、関連解析を行うことは非常に合理的である。

本研究で同定された二つのSNP、rs46947134とrs51766109について、それらが存在する遺伝子、すなわちUtyおよびUsp9yの精巣重量決定に果たす機能を推測することが可能である。UtyとUsp9yは組織適合性抗原、いわゆるHY抗原の異なるエピトープをコードすることが知られている。言い換えると、HY抗原は異なったY連鎖遺伝子によりコードされたエピトープの混合であるといえる。マウスのみならず人においても、UtyとUsp9yはHY抗原コード遺伝子である。HY抗原コード遺伝子は広範に発現しているが、生理的機能はほぼ不明である。したがって本研究成果はこれら遺伝子の生理的機能を初めて示唆するものである。特にUsp9yに関してはヒトにおいて、精子減少を伴う男性不妊の原因ではないかと論じられていたが、最近の研究により完全に否定された。Y^{Dom}はY^{Mus}に比べ、大きな精巣を持つことが明らかとなった。多くの遺伝子がY^{Dom}・Y^{Mus}の分類に従った多型パターンを示したが、その中でも、re4868451およびrs48834187はKdm5d(以前はjarid1dといわれた)遺伝子中に存在する。Kdm5dはやはりHY抗原コーディング遺伝子である。

SryのCAGリピート多型は、かつてはB6.Y^{Dom} sex reversalの重症度に伴うと考えられたが、今日では完全に否定されている。むしろ、本研究結果を見る限り、CAGリピート数が精巣重量と完全にパラレルに相関することを考えると、本遺伝子の役割の一つがここにある可能瀬を排除することはできない。

② 80日齢時および16週齢時体重に関する解析：

上述の①において、体重に関しても同様の関連解析を試みたが有意なSNP・遺伝子多型を同定することはできなかった。しかしながら、KK/Ta系統由来のYコンソミックマウスY^{KK}が他の系統に比べ、明らかに軽量であったため、4つの異なった遺伝背景下にてこれを解析した。4つの遺伝背景とは以下の通りであ

る：[1]DH-Chr Y-+/+, [2]DH-Chr Y-Dh/+, [3](♀B6.Cg-A^y×♂DH-Chr Y-+/+)F1-+/+および [4](♀B6.Cg-A^y×♂DH-Chr Y-+/+)F1-A^y/+である。Dh は腰椎数を一つ減らすなど、骨要素減少の効果を持ち、Dh/+マウスでは通常体重は減少する。A^yは肥満を生じるほか、体長を伸長させる働きを持つ。したがってA^y/+マウスは+/+マウスに比べ、高体重かつ長体長となり、総じて高ボディーサイズであると考えられる。

[1] DH-Chr Y-+/+の遺伝背景下において、Y染色体置換はDH-Chr Y^{kk}-+/+およびDH-Chr Y^{SIL}-+/+の体重を有意に減少させた。また、DH-Chr Y^{kk}-+/+系統の体重は17Y コンソミック系統中最軽量であった。[2] DH-Chr Y-Dh/+の遺伝背景下において、Y染色体置換は有意な体重変化は認められなかった。しかしながら、DH-Chr Y^{kk}-Dh/+系統の体重は17Y コンソミック系統中最軽量であった。[3] (♀B6.Cg-A^y×♂DH-Chr Y-+/+)F1-+/+の遺伝背景下において、Y染色体置換は(♀B6.Cg-A^y×♂DH-Chr Y^{KK}-+/+)F1-+/+マウスのみ体重および体長を有意に減少させた。[4] (♀B6.Cg-A^y×♂DH-Chr Y-+/+)F1-A^y/+の遺伝背景下において、Y染色体置換は(♀B6.Cg-A^y×♂DH-Chr Y^{KK}-+/+)F1-A^y/+マウスのみ体重および体長を有意に減少させた。以上の実験結果から、Y^{KK}のボディーサイズ減少効果は4つの異なった遺伝背景下にて確認されたため、Y^{KK}は低ボディーサイズを伴う遺伝子を保有すると結論した。

ヒトのY染色体には、低身長に関係する遺伝子が存在することがかなり以前から予測されてきた。実際にSHOX遺伝子がX染色体偽常染色体領域に同定され、機能的なY連鎖ホモログSHOXYの存在が示唆された。しかしながらマウスではShoxは常染色体性であり、Y^{KK}がShox変異に起因する可能性は否定された。

体重・体長に加えて、Y^{KK}はBMI(ボディーマスインデックス)に関しても最低であった。すなわち、Y染色体には肥満抵抗型遺伝子が存在する可能性を示唆するものである。非常に興味深いことに、KKおよびKK.Cg-A^y(KK-A^yと同義)マウスは肥満型のインスリン非依存型糖尿病モデルとして知られているが、肥満は概して軽度である。このマウス系統のY染色体を違ったY染色体で置換することにより、肥満をさらに顕著に発症させる可能性がある。KKマウスに比べ、KK.Cg-A^yマウスで糖尿病が顕性となるのは、主として肥満が亢進したためと考えられている。したがってY染色体置換により、肥満のみならず、糖尿病の病態も顕性化させる可能性が示唆された。

最後に研究代表者は、DDD/Sgn系統の遺伝背景下にY^{KK}およびY^{CBA}を導入したYコン

ソミック系統を樹立した。完全にデータ収集が完了していないが、すでに精巣重量などに対するY染色体効果を確認している。DDD/Sgn背景での体重効果の確認を急いでいる。

③ (♀B6.Cg-A^y×♂DH-Chr Y-+/+)F1-+/+マウスおよび(♀B6.Cg-A^y×♂DH-Chr Y-+/+)F1-A^y/+マウスにおける、その他の形質に関する解析：上記の②において利用した二種類のF1マウスについて、体重・体長・BMI以外の形質についても解析した。具体的には臓器重量形質(精巣重量、腎臓重量、および脾臓重量)と代謝形質(血糖値、血漿総コレステロール値、および血漿トリグリセリド値)に大別される。概して、Y染色体置換は代謝形質に影響を及ぼすことがなかった。一方、臓器重量はY染色体置換による影響を強く受けた。特に、精巣重量に関して、DH-Chr Y-+/+の遺伝背景下において観察されたY染色体置換効果と、(♀B6.Cg-A^y×♂DH-Chr Y-+/+)F1-+/+の遺伝背景下において観察されたY染色体置換効果は明らかに異なった。すなわち、Y染色体効果は常染色体、およびX染色体の影響を受けること、換言すれば、Y染色体は常染色体・X染色体との相互作用によりその効果を表すことが示唆された。これは、体重に及ぼすY染色体の効果とは対照的であり、体重に関しては、むしろY染色体が単独でその効果を発揮することが示唆された。KK系統のみで異なる遺伝子型を示すY染色体連鎖遺伝子は、現在までのところ不明である。

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)

Suto J (2011) Genetic dissection of testis weight in mice: quantitative trait locus analysis using F₂ intercrosses between strains with extreme testis weight, and association study using Y-consomic strains. *Mammalian Genome* 22: 648-660.

Suto J (2013) Y chromosome of the inbred mouse KK/Ta strain is associated with reduced body size in Y-consomic strains.

BMC Research Notes 6: 64.

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 淳一 (SUTO JUN-ICHI)

研究者番号：60355740

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：