

高多回反復DNA配列を用いた  
ラット染色体の連鎖解析

1994年

小林 栄 治

①

高多型反復 DNA 配列を用いた

ラット染色体の連鎖解析

1994 年

小 林 栄 治

# 目 次

緒 言	1
第一章 反復 DNA 配列を用いた新たな遺伝標識の確立	
第一節 はじめに	5
第二節 材料と方法	9
第三節 結 果	14
第四節 考 察	18
第五節 要 約	21
図 表	23
第二章 ラット染色体上の連鎖地図の作成	
第一節 はじめに	48
第二節 材料と方法	51
第三節 結 果	54
第四節 考 察	60
第五節 要 約	69
図 表	71
第三章 疾患原因遺伝子の染色体マッピング	
第一節 はじめに	99
第二節 材料と方法	102
第三節 結 果	107
第四節 考 察	110
第五節 要 約	117
図 表	119
総 括	133
謝 辞	138
参 考 文 献	139

## 緒 言

実験動物は、医学、農学、生物学を含む広範囲な研究分野に使用される重要な研究材料である。動物実験には、それぞれの研究に適した動物の種または系統の選択と、良質の実験動物—遺伝学および微生物学的に統御され、適正な環境条件下で飼育された動物—の使用が不可欠で、個々の実験動物の生物学的特性を明らかにすることは、実験動物学の重要な分野の一つである。

ある特定のヒト疾患に類似する病態を呈する実験動物は、基礎医学の分野において貴重な研究材料であり、その病因や病態を解析することにより、疾患の原因を解明し、診断や治療法の開発に貢献できる点で重要である（松下，1983）。特に、ヒトと同一の遺伝子の異常により発症する疾患モデル動物は、実験動物として極めて大きな価値を持つ（Sundberg, 1991; Cooper, 1993）。したがって、各種疾患モデル動物において疾患原因遺伝子を含む遺伝学的特性を明らかにすることは、実験動物学の重要な課題である。

遺伝病は、特定の遺伝子における変異が疾患の原因である。このような遺伝病に限らず、高血圧・動脈硬化・糖尿病といった成人病、あるいは自己免疫疾患を含むアレルギー性疾患などにおいても、患者の遺伝的素因が関与していることが明らかとなっている（McLean et al., 1987; Bell et al., 1991; Sandford et al., 1993）。そのため、多くのヒト疾患に関する遺伝的要因の解析が、現代医学の重要課題の一つとして進められている。

遺伝性疾患の原因となる遺伝子を特定するには、まず候補となる遺伝子を限定する必要がある。一般的には、生化学的および病理学的検



査等からその病態を把握し、原因となる物質や酵素欠損等から予想される遺伝子を候補として選択し、その遺伝子について重点的に解析を行う方法がとられている。これはファンクショナル・クローニングといわれるもので、多くの疾患の原因遺伝子がこの方法で解明されている (Kwok et al., 1985; Persico et al., 1986)。

これに対し、具体的な候補遺伝子の特定が困難な疾患では、染色体上の位置を決定し、その位置から候補となる遺伝子を予測する方法がとられる。疾患原因遺伝子の染色体マッピングはヒト遺伝性疾患では有効な方法として用いられており (Botstein et al., 1980)、これまでに幾つかの原因遺伝子が至近の遺伝標識を利用することで単離されている (Riordan et al., 1989; Wallace et al., 1990; Cawthon et al., 1990)。こうした方法は逆行遺伝学的方法と呼ばれていたが (Ruddle, 1984; Orkin et al., 1986)、染色体上の位置を基に単離されることから、ポジショナル・クローニングと呼ばれるようになった (Collins, 1992)。このようにして単離された疾患原因遺伝子の機能の解析から、いくつかの疾患における病因や病態が明らかになっている (Ballabio, 1993)。さらに、複数の遺伝子の関与する疾患においても連鎖解析の有効性が指摘されており (Lander and Botstein, 1986)、最近では I 型糖尿病マウスで実際の解析に利用されている (Todd et al., 1991)。

実験動物として古い歴史を持つラットは、マウスに次いで医学、生物学の分野に広く用いられている (Gill et al., 1989)。特に、内分泌学、代謝学、栄養学、繁殖学等の研究には極めて重要な位置を占めている。その体型の大きさは様々な実験的処置が可能という点で、マウスよりも有利である。また、ラットには高血圧症 (Okamoto and Aoki, 1963)、糖尿病 (Nakhlooda et al., 1976)、雄性不妊症 (Ikadai et al., 1987)をはじめ、未だ疾患原因遺伝子が解明されていない、ヒト疾

患に類似した自然発症の疾患モデル動物が多数開発・育成されている (Robinson, 1979)。しかし、そのような疾患モデルラットに関する遺伝学的解析は、最近に至るまでほとんど進展が見られなかった。

自然発症高血圧ラット (Spontaneous hypertensive rat; SHR) は広く世界中で使用されており、疾患モデルラットの中では比較的遺伝学的解析が進んでいる。このラットにおける原因遺伝子は数個の遺伝子が関与していると推測されており (Tanase et al., 1970; Tanase and Suzuki, 1971; Yamori et al., 1972; Yen et al., 1974; Harrap, 1986; Pravenec et al., 1989)、レニン遺伝子 (Rapp et al., 1989),  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase 遺伝子 (Nojima et al., 1989), およびホスホリパーゼ C 遺伝子 (Yagisawa et al., 1991) の突然変異が報告されている。また、血圧と DNA 遺伝標識との連鎖解析から、レニン遺伝子では肯定 (Rapp et al., 1989; Kurtz et al., 1990; Pravenec et al., 1991) および否定 (Lindpaintner et al., 1990) の報告があり、カリクレイン遺伝子の DNA 遺伝標識との連鎖も報告されている (Hilbert et al., 1991a)。さらに、広範囲の染色体部位と血圧との連鎖解析を行った結果、アンギオテンシン変換酵素 (Angiotensin converting enzyme: ACE) が候補遺伝子としてクローズアップされている (Hilbert et al., 1991; Jacob et al., 1991; Nara et al., 1991)。しかし、このような SHR の場合はむしろ例外的で、他の多くの疾患モデルラットでの遺伝学的解析は緒についたばかりである。そのため、今後も多くの遺伝標識の確立や詳細な連鎖地図作成が求められている。

したがって、ラットに関するこれらの遺伝学的知見の充実は、多くの疾患モデルラットについても遺伝学的解析を可能にするという点で、実験動物としてのラットにさらなる有効性を与えるものと考ええる。本研究の目的は、ラットにおける遺伝学的解析、特に各種遺伝子の連鎖解析

に必要な連鎖地図の作成を進めることにある。そのため、本研究では、まず連鎖地図作成に利用できる高多型で検出の容易な遺伝標識を確立し、次に、他の遺伝標識を含めた多くの遺伝標識からなる幾つかの染色体上の連鎖地図を作成した。最後に、疾患モデル動物における病因解析への応用として、疾患原因遺伝子の染色体上の位置の検討を行った。

# 第 一 章

## 反復 DNA 配列を用いた新たな遺伝標識の確立

### 第一節 はじめに

ラットにおける遺伝学的解析は、遺伝子本体に関する研究、すなわち遺伝子の単離や塩基配列の決定などに関しては比較的多くの報告があるものの (Stolc, 1990)、染色体の連鎖解析に関してはマウスに比べ極めて遅れた状態にある (Levan et al., 1991; Hillyard et al., 1992)。遺伝標識の開発に関する研究は、百を超える生化学的および免疫学的遺伝子座等が開発されているに過ぎず (Cramer, 1989; Levan et al., 1992; Festing, 1992)、実際に利用できるものはさらに少ない。そのため、十分な連鎖群が構成されず、また、連鎖群と染色体の対応も不十分である (Cramer, 1989; Hedrich, 1990)。したがって、各染色体上の連鎖地図の作成を行うためには、新たな遺伝標識の開発、特に連鎖解析に有効な高多型で染色体の明らかな遺伝標識の開発が強く求められている。

これまで遺伝標識としては、生化学的遺伝子座や RFLP (Restriction fragment length polymorphisms) と呼ばれる DNA 多型が主に利用されてきた。生化学的遺伝子座は酵素やタンパクの電気泳動法によるゲル上の易動度の差として検出される。しかし、系統間で多型性を示す酵素やタンパクが少ないこと、多くの遺伝子座を検査する場合

にはそれぞれの遺伝子座に応じた臓器サンプルや泳動条件を用いなければならないこと、酵素の至適 pH が限られていて失活しやすいこと、および対立遺伝子の数が少ないこと等の問題がある。そのため、現在有効な遺伝標識として活用できるのは約 30 に過ぎない (Bender et al., 1984)。

また、特定の DNA の塩基配列を認識して切断する制限酵素を用いて検出される RFLP 遺伝子座は、ヒトでは遺伝標識として各種疾患の連鎖解析に広く用いられているが (White et al., 1985)、ラットではヒトやマウスに比べて少数の RFLP 遺伝子座が見つかるに過ぎない (Rapp et al., 1989; Kunieda et al., 1989a; 1989b; 1989c; 1990; Hoh and Revel, 1991)。また、それぞれの RFLP 遺伝子座によって各種の制限酵素を用いることが必要であり、プロットングやハイブリダイゼーションの実験手技は時間がかかるなどの難点があった。したがって、以上のような問題点を克服する新たなタイプの遺伝標識の確立が強く望まれている。

そのような状況の中、高多型を示すヒト反復配列を含む DNA 領域が、Wyman と White によって最初に報告された (1981)。続いて、多くの反復配列が報告され (Higgs et al., 1981; Bell et al., 1982; Proudfoot et al., 1982; Capon et al., 1983)、哺乳動物ゲノムに広く分布していることが示された (Jeffreys et al., 1985)。この高多型 DNA 領域は、比較的短い配列の直列反復 (ミニサテライト DNA) からなり、個人や個体によって反復回数が異なっており、そのため直列反復数の変異 (Variable number of tandem repeat, VNTR) と名付けられている (Nakamura et al., 1987)。最近では、多くの VNTR がポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を用いて検出されている (Jeffreys et al., 1988; Boerwinkle et al., 1989)。PCR 法は合成したオリゴヌクレオタイドプ



ライマーを用いて特定の DNA 領域を特異的に検出する方法であり、迅速かつ容易に目的の配列を検出できる特徴がある (Saiki et al., 1988)。

さらに最近では、反復 DNA 配列のうち二塩基対の反復からなる DNA 多型が遺伝標識として利用されている (Tautz, 1989, Weber and May, 1989, Litt and Lucy, 1989)。このタイプの DNA 領域は総じてマイクロサテライトと名付けられており (Litt and Lucy, 1989)、ほとんどの真核生物で見いだされ (Hamada, 1982; Nordheim and Rich, 1983; Epplen, 1988)、哺乳類ゲノム中 20 から 30 kb に一つ程度の割合で無作為に分布していると考えられている (Hamada et al., 1982; Stallings et al., 1991)。このような領域は、ヒトの連鎖解析に非常に有用であることが明らかになっており (Richards et al., 1991; Edwards et al., 1992)、マウスでも数多くのマイクロサテライト DNA を用いた遺伝標識が確立されている (Love et al., 1990; Cornall et al., 1991; Dietrich et al., 1992; Fowles et al., 1992)。このような検出の容易な遺伝標識の増加は、様々な遺伝解析を飛躍的に進展させた。

ラットでも、レニン (Fukamizu et al., 1988)、 $\alpha$ -カゼイン (Hobbs and Rosen, 1982)、精嚢腺分泌タンパク II (Harris et al., 1990) と IV (Harris et al., 1983)、およびインターロイキン-3 (Cohen et al. 1986) 遺伝子等にミニサテライト領域の存在が報告されている。一方、ラットにおけるマイクロサテライト DNA 領域の存在も多数報告されている (Hilbert et al., 1991; Beckmann and Weber, 1992)。このように、ラットゲノム中にも多くの反復 DNA 領域が存在していることから、これらの領域はヒトやマウス同様に連鎖解析のための遺伝標識として利用できる可能性が大きいと思われる。

本章では、検出が容易で染色体上の位置が明らかな多数の遺伝標識の開発を行うため、2つのミニサテライトおよび40のマイクロサテライトを含むラット遺伝子をPCR法を用いて検出し、その多型性を検討した結果について記述する。このような遺伝標識の開発は、遺伝解析のために必要な染色体地図作成に必須のものであり、詳細な染色体上の連鎖地図を作成するためにはより多くの遺伝標識の開発が必要であると考える。

## 第二節

## 材料と方法

### 1. ミニサテライト DNA 領域の多型性

#### 1) 供試動物

ミニサテライト DNA 領域の多型性検討には、亜系を含め 27 系統のラットを用いた。12 系統、すなわち、ACI/Hok, ALB/Hok, BN/Hok, BUF/Hok, F344/Hok, KYN/Hok, LEJ/Hok, NIG-III/Hok, SDJ/Hok, TO/Hok, W/Hok および WKAH/Hok は、北海道大学理学部附属動物染色体研究施設の吉田伸弘博士から分与された。15 系統、すなわち、BEG, BN/Iar, TF, TS, TU, TX, COP/Iar, F344/Iar, IS/Iar, LEO/Iar, LET/Iar, NIG-III/Iar, TOM/Iar, WKS/Iar および WM/Iar は、(財)動物繁殖研究所・第五研究部で維持している系統を用いた。各系統の詳細については表 1 に示した。

遺伝様式検討のための交配実験として、WKS/Iar と IS/Iar の  $F_1$  世代およびその WKS/Iar への戻し交雑世代を用いた。動物は温度  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 10\%$  の室内で飼育し、飼料 (MM-3, 船橋農場) および水は自由摂取させた。

#### 2) DNA の抽出

高分子量ゲノム DNA は、基本的に Hughes ら (1979) により記されたフェノール抽出法を用い、肝臓から抽出した。すなわち、動物をエーテル過麻酔により屠殺後、肝臓を摘出した。マイクロチューブ内で、肝臓約 50 mg あたり 70  $\mu\text{l}$  の NP-40 溶液 [140 mM NaCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM Tris-HCl, 0.5 % Nonidet P-40 (半井化学)] 中で細切

した。その後、500  $\mu$ l の SDS 溶液 [1 % Sodium dodecylsulfate, 10 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 50  $\mu$ g/ml Proteinase K (MERCK)] を加えて攪拌し、55  $^{\circ}$ C の恒温槽中に一晩置いた。さらに、4  $\mu$ l の Pancreatic RNase A (0.1 mg/ml, SIGMA) を加え、37  $^{\circ}$ C の恒温槽中で 2 時間反応させた。30  $\mu$ l の 3 M 酢酸ナトリウムおよび 300  $\mu$ l のフェノールを加えて激しく攪拌後、4  $^{\circ}$ C, 15,000 回転で 5 分間遠心分離した。1 ml の 100 % エタノール中に水層を移して攪拌し、DNA を沈澱させた後、-20  $^{\circ}$ C に一晩静置した。その後、遠心してエタノールを除去した後、70 % エタノールで洗浄し、乾燥した。この DNA 粉末を TE 溶液 [5 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA (pH 7.6)] に溶解した後、260 nm の吸光度を測定し、DNA 濃度を計算した。こうして調製した高分子量ゲノム DNA 溶液は、増幅反応を行うまで 4  $^{\circ}$ C に保存した。

### 3) プライマー

DNA 増幅 (PCR 法) に用いたプライマーは、IL-3 遺伝子の第 2 イントロンおよび SVS-4 遺伝子の第 2 イントロンのミニサテライト領域に隣接する独特な塩基配列から選んだ。プライマーの配列は、5' CTGCTTAGAGCCTTCACAC 3' と 5' AGGAATTCGTCCAGGTTTACT 3' (IL-3 遺伝子) および 5' TGCATTCCGTTTCAGGGATTC 3' と 5' AGGCTTCATCCAGGCAATGT 3' (SVS-4 遺伝子) を用いた。IL-3 遺伝子 および SVS-4 遺伝子上のプライマーの位置は、それぞれ図 1, 2 に示した。

### 4) DNAの増幅 (PCR)

PCR は、鋳型として 0.1  $\mu$ g の各近交系の DNA、プライマーとしてそれぞれ 0.2  $\mu$ g のオリゴヌクレオチド、それぞれ 200  $\mu$ M の

dGTP, dCTP, dTTP, および dATP (Pharmacia)、50 mM KCl、10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、1.5 mM  $MgCl_2$ 、0.01 % ゼラチン、および 2.5 ユニットの Taq ポリメラーゼ (Biotech) を含む 50  $\mu$ l の反応液で行った。サンプルにはミネラルオイル (Sigma) を被せ、その後サーマルシーケンサ (TSR-300, 岩城ガラス) を用いて 94 °C で 1 分 (denaturation)、55 °C で 2 分 (annealing) および 72 °C で 2 分 (extension) から成る増幅サイクルを 40 回繰り返し、最後に 72 °C に 10 分間置いた。増幅された PCR 産物は電気泳動まで 4 °C に保存した。

#### 5) 電気泳動

増幅された PCR 産物は TBE 溶液 [0.09 M Tris-Borate, 2.5 mM EDTA (pH 8.3)] 中の 2 % アガロースゲルによる電気泳動法で分離し、エチジウムブロマイド染色により検出した。染色したゲルは UV トランスイルミネーターにより可視化し、ポラロイドカメラで撮影した。PCR 産物のアガロースゲル中の易動度により多型性を判定した。



## 2. マイクロサテライト DNA 領域の多型性

### 1) 供試動物および DNA の抽出

マイクロサテライト DNA 領域の多型性検討には、1 組の亜系を含む 8 系統の近交系ラットを用いた。ACI/Hok および NIGIII/Hok は北海道大学吉田勉弘博士より分与された。BN/Iar, COP/Iar, IS/Iar, NIGIII/Iar, TF, および WKS/Iar は(財)動物繁殖研究所で維持されている系統を用いた。

交配実験には 2 組の戻し交雑系、WKS/Iar と IS/Iar の  $F_1$  世代およびその WKS/Iar への戻し交雑世代、BN/Iar と TF の  $F_1$  世代およびその TF への戻し交雑世代を用いた。NIGIII の 2 つの亜系、NIGIII/Hok (北海道大学理学部) と NIGIII/Iar (動物繁殖研究所) は、約 15 年間、30 世代以上独立して維持・継代されており、この亜系を用いて数十世代を経ることにより多型性に変化が生じているかどうかを検討した。

これらの系統の肝臓から前項に示したフェノール抽出法により DNA を抽出し、TE 溶液に溶解後使用まで 4 °C に保存した。

### 2) プライマー

EMBL (Release 28.0) および GenBank (Release 69.0) の DNA データベース中の (CA) $_n$  または (GA) $_n$  の 2 塩基対を最低 10 回繰り返す領域を、VAX/VMS コンピュータ (東京大学医科学研究所) の UWCGC プログラム (Devereux et al., 1984) を用いて検索した。

得られたラットの配列のうち、ヒトおよびマウスにおいて既に染色体上にマッピングされている遺伝子を中心に 40 遺伝子を選択した。

表 2 に 40 遺伝子のラットおよびマウスの染色体上の位置およびマイクロサテライト領域の構成を示した。それらのマイクロサテライト領域に隣接する配列に対応する 18 から 24 ヌクレオチドの PCR プライマーを、Lowe ら (1990) による報告に基づいて選択し、Bio-Synthesis 社で合成した。PCR プライマーの塩基配列および期待される PCR 産物の大きさを表 3 に示した。合成されたオリゴヌクレオチドは TE 溶液に溶解し、使用まで  $-20^{\circ}\text{C}$  に保存した。

### 3) DNAの増幅 (PCR)

前項と同様な組成の反応溶液中で、サーマルシーケンサを用いて  $94^{\circ}\text{C}$  で 45 秒、 $55^{\circ}\text{C}$  で 60 秒および  $72^{\circ}\text{C}$  で 60 秒から成る増幅サイクルを 40 回繰り返し、最後に  $72^{\circ}\text{C}$  に 10 分間置いた。増幅された PCR 産物は電気泳動まで  $4^{\circ}\text{C}$  に保存した。

### 4) 電気泳動

増幅された PCR 産物を TBE 溶液中の 4% アガロースゲルまたは 8% ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により分離し、エチジウムブロマイド染色により検出した。これらの方法で系統間に多型性を検出できなかった場合には、25 cm の長さの 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて再分析した。

### 第三節 結 果

#### 1. ミニサテライト DNA 領域の多型性

ラット IL-3 遺伝子のミニサテライト領域を、特異的なプライマーを用い、各近交系の DNA を鋳型として PCR 法により増幅した。6 系統の近交系における増幅された PCR 産物の電気泳動像を図 3 に示した。それぞれの系統で単一の増幅断片が観察された。断片の長さは系統間で変異を示し、930 塩基対 (1 および 6 列), 880 塩基対 (2 および 5 列), 820 塩基対 (3 列), および 780 塩基対 (4 列) の 4 種類の多型が 27 近交系に検出された。これらの長さはプライマーの位置から期待される長さの範囲であった。

一方、ラット SVS-4 遺伝子のミニサテライト領域を、特異的なプライマーを用いて PCR 法により増幅した。図 4 に各近交系における増幅された断片の泳動像を示した。増幅された断片の長さは近交系間で異なり、3 種類の長さの増幅断片が検出された。WKS/Iar は 750 塩基対を、一方、IS/Iar および TU はそれぞれ 490 および 390 塩基対の長さを示した。これらの断片の長さは SVS-4 遺伝子上の合成したプライマーの位置から期待される長さの範囲であり、750, 490, および 390 塩基対の断片はそれぞれ 28, 15, および 10 回の反復単位を含んでいと判断された。

(WKS/Iar x IS/Iar) の  $F_1$  世代および [(WKS/Iar x IS/Iar) $F_1$  x WKS/Iar] の戻し交雑世代を用いて、IL-3 および SVS-4 遺伝子におけるミニサテライト領域の多型性の遺伝様式を検討した。WKS/Iar および IS/Iar はそれぞれの遺伝子で異なる長さのミニサテライト領域の断片

を持ち、全ての  $F_1$  雑種個体は WKS/Iar タイプ および IS/Iar タイプの両方の断片を持っていた。戻し交雑世代は両親の断片を持つ  $F_1$  タイプと片方だけを持つ WKS/Iar タイプの 2 種類に分かれた。IL-3 遺伝子では、解析した 57 匹中、 $F_1$  タイプが 28 個体、WKS/Iar タイプが 29 個体あり、SVS-4 遺伝子では 45 匹中、 $F_1$  タイプが 22 個体、WKS/Iar タイプが 23 個体あった。両遺伝子とも、2 タイプの分離比は単一の共優性遺伝子と仮定した場合の分離比 (1 対 1) と有為差はなく ( $P > 0.75$ )、それぞれの断片は単一遺伝子座における共優性遺伝の遺伝様式を示した。したがって、我々はこれらの遺伝子座をそれぞれ IL3 および SVS4 と命名した。

表 4 に IL3 遺伝子座の 27 近交系における対立遺伝子の系統間分布を示した。また、SVS4 遺伝子座における対立遺伝子の系統間分布を表 5 に示し、併せて精囊腺分泌タンパクの生化学的遺伝子座である SVPI の系統間分布も示した。SVS4 遺伝子座における対立遺伝子の系統間分布は、SVPI 遺伝子座のものとやや異なっていた。SVPIa 対立遺伝子を持つ系統は全て SVS4 遺伝子座の 750 塩基対を持っていたが、SVPIb 対立遺伝子を持つ系統では SVS4 遺伝子座の 3 種類の対立遺伝子を持っていた。すなわち、BN/Hok, BUF/Hok および LEO/Iar は 750 塩基対を、IS/Iar および TO/Hok は 490 塩基対を、および TU は 390 塩基対の SVS4 対立遺伝子を持っていた。

## 2. マイクロサテライト DNA 領域の多型性

EMBL および GenBank データベースに登録されている全ての DNA 塩基配列の中で、(CA) または (GA) という 2 塩基反復の 10 回以上の繰り返しがある遺伝子を検索した。全部で 1059 個のマイクロサテライト領域が検出された。これらのうち、ラットでは 331 個、マウスでは 218 個、ヒトでは 289 個、その他 241 個であった。331 個のラット配列の中で CA/GT の反復を含むものが 215 個で、残りの 96 個は GA/CT の反復であった。このうち、本研究では、CA/GT 配列からなる 22 遺伝子、GA/CT 配列からなる 2 遺伝子、および CA/GT および他の二塩基対との混合配列からなる 10 遺伝子、様々な 2 塩基対の複合配列からなる 6 遺伝子、合計 40 遺伝子のマイクロサテライト配列を PCR 法を用いて増幅した。

40 遺伝子のうち 34 遺伝子で、プライマーの位置に相当する長さの断片が増幅され、企図した遺伝子を増幅できたと思われた。残りの 6 遺伝子では、A2UG および PKL の 2 遺伝子が予期しない長さの断片が増幅され、4 遺伝子、MHC2, RAS, SMT, および TAT 遺伝子では PCR 法での DNA の増幅を行えなかった。増幅された 34 遺伝子は、すべての遺伝子で系統間に多型性が観察された。また、 $F_1$  世代および戻し交雑世代を用いて遺伝様式を検討した結果、それぞれの遺伝子で検出された PCR 産物は共優性遺伝の遺伝様式を示した。したがって、これらの遺伝子における多型性は遺伝子座として確認されたと思われた。

多型性の検出できた 34 遺伝子座では、4 % アガロースゲル電気泳動法でも判定できる対立遺伝子が存在した。また、ほとんどの遺伝子座で 8 % および 10 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により新た



な対立遺伝子が観察された。検討した 7 系統における多型性および対立遺伝子の数を表 6 に示した。検出されたマイクロサテライト DNA 領域の多型性のうち、*GLUT1* 遺伝子座における 4 % アガロースゲル電気泳動像、8 % および 10 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動像を、それぞれ図 5, 6, および 7 に示した。

マイクロサテライト DNA 領域の長さの多型における世代間の安定性を検討するため、NIGIII の 1 組の亜系、NIGIII/Hok および NIGIII/Iar の間で 34 遺伝子座における対立遺伝子の比較を行った。検討した全ての遺伝子座で両系統間に同一の対立遺伝子が観察され、少なくとも 30 世代にわたって、これらの遺伝子座は安定して遺伝することが示された。いくつかの遺伝子座における電気泳動像を図 8 に示した。

#### 第四節 考 察

ラット IL-3 遺伝子のミニサテライト領域が PCR 法を用いて検出され、検討した 27 近交系の中に 4 種類の多型が確認された。それぞれの対立遺伝子は、広く近交系に分布していることからラットの連鎖解析のための有効な遺伝標識であると思われた。また、ラット SVS-4 遺伝子のミニサテライト領域では、検討した 27 近交系の中に 3 種類、750, 490, および 390 塩基対 (bp) からなる多型を確認した。Harris らは サザンブロット法を用い、*EcoRI* により切断された 3.3 および 3.5 kbp の切断片からなる二つの対立遺伝子を報告している (1983)。SVS-4 遺伝子の塩基配列から、本研究における 490-bp はサザンブロット法における 3.3-kbp の対立遺伝子に、一方、750-bp は 3.5-kbp に対応していることが明らかとなった。さらに、本研究により、3 番目の対立遺伝子、3.3-kbp の切断片よりも 100-bp 短い配列の対立遺伝子が存在することが明らかになった。ラット SVS4 遺伝子座は第 3 染色体上に存在することが確認されたが、遺伝標識として広く用いられているラット第 3 染色体上の他の遺伝子座 (*SVP1* および *B*) の検出が性や毛色によって限定され、必ずしも効率的ではないことから、SVS4 遺伝子座はより有用で効率の良い第 3 染色体の遺伝標識であると思われた。

ミニサテライト領域は反復数の違いにより高い多型性を有し、連鎖地図を作成するのに有用であることが示されている (Nakamura et al. 1987)。ラットにおいても多くの遺伝子にミニサテライト領域が存在するが、本研究によりラットにおけるこの種の DNA 領域は遺伝標識として有効であることが確認された。

一方、マイクロサテライト DNA 領域が哺乳類のゲノム中に広く散

在していることは既に知られている (Hamada et al., 1982)。現在、ヒトやマウスでは、この領域は連鎖解析に用いられる遺伝標識の主流にまでなっている (Love, 1990; Dietrich, 1992)。ラットでもこの領域はヒトやマウスと同様に広く染色体上に分布していると推測されており (Stallings et al., 1991)、本研究でもヒトやマウスよりも多い 311 個のラットマイクロサテライト領域が、EMBL および GenBank の DNA データベースに見つかった。本研究では、ラットの 40 個のマイクロサテライト領域における多型性が PCR 法を用いて分析され、増幅された 34 遺伝子全てに二つ以上の対立遺伝子が存在することが明らかになった。マウスでは、検討したマイクロサテライト領域 50 個のうち 39 個 (Love et al., 1990)、および 43 個のうち 23 個 (Cornall et al., 1991) が多型的であることが報告されている。したがって、ラットにおける多型的マイクロサテライト領域の頻度はマウスに比べ高いようであった。このことがマウスとラットの間のマイクロサテライト領域の安定性の違いによるものかあるいは近交系間の遺伝的変異がラットではマウスに比べて大きいことによるものかどうかは不明である。

遺伝標識の必要条件として、容易に正確に効率よく検出できることがあるが、反復 DNA 領域の多型性はこれらの条件を十分に満たすものであった。また、対立遺伝子の数が多いことは連鎖解析において極めて重要な要素の一つであり、その点からも有用であるといえる。したがって、こうした反復 DNA 配列を用いた遺伝標識は、これまでの生化学的および免疫学的遺伝子座に比べ、連鎖解析のためには極めて有効な手法であることが明かになった。また、系統の同定等にこの反復 DNA 領域を応用する場合には、同じ系統で世代を経てもその多型の領域が変化しない必要がある。本研究で検討したミニサテライト領域における 3 亜系およびマイクロサテライト領域における NIGIII の亜系間には、検討

された 36 遺伝子座での変異は観察されなかった。したがって、系統の  
同定等の目的に有効な程度には安定であることが示された。

また、表 2 に示すように、確立された 34 遺伝子のうち 14 遺伝  
子が既に染色体に当てはめられており (Levan et al., 1991; Szpirer  
et al., 1990; Yasue et al., 1992)、残る 20 遺伝子のうち 17 遺伝  
子がマウスとラットの染色体上の連鎖地図の比較からその位置が予想さ  
れている。したがって、本研究で開発した遺伝子座は染色体上の連鎖地  
図を作成するための有用な遺伝標識となり得ると思われる。以上のよう  
に、多くの高多型遺伝標識の確立の結果、連鎖試験によりそれぞれの遺  
伝子座の間の連鎖関係を明らかにすることで、詳細な染色体上の連鎖地  
図の作成が可能となった。

さらに、マイクロサテライト領域は、染色体の先端部に比較的多  
く存在すると考えられているミニサテライト領域とは異なり (Royle et  
al., 1988)、ゲノム中の分布はランダムであると考えられていること  
(Luty et al., 1990)、この領域の多型性が PCR 法を用いて容易にかつ  
迅速に分析できること、哺乳動物種の間で位置が保存されていること  
(Stallings et al., 1991; Moore et al., 1991) などの特徴がある。  
このような特徴から、本研究で用いた方法は、現在蓄積されている多く  
のラット塩基配列データに適用することにより、今後も新たな遺伝標識  
の開発に利用できると思われる。その上、ヒトではこのマイクロサテラ  
イト領域は *In situ* hybridization 法を用いた遺伝子マッピングに  
(Weber and May, 1989)、また、コスミドクローンのフィンガープリン  
トを含む物理的なマッピングにも利用されている (Stallings et al.,  
1990)。したがって、ヒトやマウス同様に、ラットにおける遺伝子マッ  
ピングや染色体地図作成は、反復 DNA 領域を遺伝標識として用いるこ  
とによって大きく進展すると思われる。

## 第五節 要 約

哺乳類のゲノム中に広く散在している、数塩基から数百塩基対よりなる反復 DNA 領域を用いて、ラットでの新たな遺伝標識の確立を試みた。まず、十数塩基対の反復よりなる 2 つの遺伝子（精囊腺分泌タンパク IV およびインターロイキン 3 遺伝子）のミニサテライト DNA 領域について PCR 法を用いて増幅した。27 系統での多型性を検討したところ、それぞれ 3 および 4 つの変異が存在していることが明らかとなった。交配実験の結果、それぞれの変異は単純共優性遺伝する遺伝子座であることが明らかとなった。

一方、CA または GA の 2 塩基対を単位とするマイクロサテライト DNA 領域について、EMBL および GenBank の DNA データベースを検索したところ、その数はヒトやマウスよりも多く、ヒトおよびマウス同様に連鎖解析のための遺伝標識として利用できることが期待された。このうち 40 遺伝子について、反復 DNA 配列を挟むようにプライマーを合成し、PCR 法を用いて増幅したところ、34 遺伝子において期待する長さのバンドが検出された。この PCR 産物は系統間で多型性があり、7 系統における対立遺伝子の数はほとんどが 3 から 5 であった。また、交配実験によりその遺伝様式の検討を行った結果、すべて単純共優性遺伝していることおよび 30 世代以上独立して維持・継代された系統においてもその多型性に変化はないことが明らかとなった。一方、これらの検討に要した時間や労力を考慮すると、これまでの生化学的及び免疫学的遺伝標識に比べ連鎖解析のためには極めて有効な遺伝標識であることが明かとなった。

これらの結果、高多型で検出の容易なこのような反復配列の多型



性は、ラットにおいてもヒトおよびマウス同様に有用な遺伝標識として利用できることが明かとなり、今後、数多くの新しい遺伝標識が同様の方法により確立できるものと考えられた。

Table 1. Origins and coat colors of the inbred rat strains examined in this study.

---

ACI/Hok

The ACI strain was originated from an accidental mating between an August male with Irish coat and COP female in 1926.

Black with white belly and feed.

ALB/Hok

The ALB strain was originated from rats of some breeders at Albany Medical College in 1930.

Dilute brown.

BEG

The BEG strain was originated from a non-inbred stock of Wistar-Imamichi rats. The Wistar-Imamichi rats were separated from the W strain in 1957.

Albino.

BN/Hok, BN/Iar

The BN strain was developed from a brown mutation maintained in pen-bred stock in 1958. This stock had presumably been selected out of wild rats trapped around Philadelphia in about 1930.

Brown.

BUF/Hok

The BUF strain has descended directly from the Buffalo stock of outbred commercial colony in 1946.

Albino.

COP/Iar

The COP strain was established in 1921 at Columbia University.

Agouti hooded.

F344/Hok, F344/Iar

The F344 strain was established from rats of local vender (Fisher) in 1920 at Columbia University.

Albino.

---

Table 1. (continued)

---

IS/Iar

The IS strain was established from a mating between a wild male rat and Wistar female at Azabu University in 1968.

Agouti.

KYN/Hok

The KYN strain was established in 1960 at Hokkaido University from a stock carrying the "notched" character isolated from wild rats in Kyoto, and from a cross involving WKA strain.

Black with some white on ventral surface.

LEJ/Hok

The LEJ strain was established from non-inbred Long-Evans rats at National Institute of Genetics in 1956. The Long-Evans rats were originated from a mating of Wistar female and a wild male rat caught at Berkeley in 1915.

Black hooded.

LEO/Iar

The LEO strain was established from non-inbred Long-Evans rats at National Institute of Genetics.

Black hooded.

LET/Iar

The LET strain was established from non-inbred Long-Evans rats at National Institute of Genetics.

Albino.

NIGIII/Hok, NIGIII/Iar

The NIGIII strain was established from a mating between a wild rat trapped in Mishima and Castele's black rat.

Pink-eyed yellow.

---

Table 1. (continued)

---

SDJ/Hok

The SDJ strain was established from non-inbred stock of SD rat. The SD rat was originated from mating among females of probable Wistar descent and "hybrid" male of unknown origin.

Albino.

TF

The TF strain was originated from a non-inbred stock of Wistar-Imamichi rats. The Wistar-Imamichi rats were separated from the W strain in 1957.

Albino.

TO/Hok

The TO strain was established at Hokkaido University from rats from a breeder in Tokyo in 1952.

Albino.

TOM/Iar

The TOM strain was originated from rats from some breeders, and established at Toma Institute in 1954.

Albino.

TS

The TS strain was originated from WKA outbred stock. The WKA strain was established from an albino stock of University of Chicago in 1909.

Albino.

TU

The TU strain was originated from a mating between a Wistar-Imamichi female and a wild male rat at Omiya.

Agouti hooded.

---

Table 1. (continued)

---

TX

The TX strain was originated from a mating between a Wistar-Imamichi female and a wild male rat at Omiya.

Black.

W/Hok

The W strain was originated from three pairs of rats in Wistar Institute Standard Strain Lot No. 1359, and established at Tokyo University in 1974.

Albino.

WKAH/Hok

The WKA strain was established from an albino stock of University of Chicago in 1909.

Albino.

WKS/Iar

The WKS strain was established from an albino stock of University of Chicago in 1909.

Albino.

WM/Iar

The WM strain was separated from the W strain in 1951 at National Institute of Genetics.

Albino.

---



Table 2. Genes including microsatellite regions and its chromosomal locations. Rat chromosome numbers in parentheses are those estimated by comparison between chromosomal maps in mice and rats (Levan et al., 1991).

	Symbol	Gene	Rat Mouse		Repeat unit
			Chr	Chr	
1	A2UG	$\alpha$ -2U globulin	5	4	(GT) <sub>27</sub>
2	APOC3	apolipoprotein C-III	(8)	(9)	(CA) <sub>27</sub>
3	ATP1A1	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase $\alpha$ -1	2	3	(CA) <sub>3</sub> TA(CA) <sub>25</sub>
4	ATP1A2	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase $\alpha$ -2	13	1	(GT) <sub>26</sub> GA(GT) <sub>3</sub>
5	ATPE	ecto-ATPase	-	-	(CA) <sub>13</sub> TG(CA) <sub>3</sub> N <sub>5</sub> (CA) <sub>6</sub> TG(CA) <sub>3</sub> CG(CA) <sub>5</sub>
6	CPB	carboxypeptidase B	2	-	(CA) <sub>13</sub>
7	CRBP2	cellular retinol binding protein II	(8)	9	(GT) <sub>24</sub>
8	CRYG	$\gamma$ -crystallin	9	1	(GT) <sub>19</sub>
9	CSNA	$\alpha$ -casein	14	5	(CA) <sub>2</sub> GA(CA) <sub>4</sub> TA (CA) <sub>2</sub> GA(CA) <sub>23</sub>
10	CYP1A1	cytochrome P450 IA1	(8)	9	(CA) <sub>21</sub>
11	CYP2A3	cytochrome P450 IIA3	(1)	7	(CA) <sub>20</sub>

Table 2. (Continued)

	Symbol	Gene	Rat Mouse		Repeat unit
			Chr	Chr	
12	CYP2B2	cytochrome P450 IIB2	1	7	(CA) <sub>25</sub>
13	CYP2D2	cytochrome P450 IID2	(7)	15	(CA) <sub>17</sub> (GA) <sub>7</sub> (GA) <sub>22</sub>
14	CYP4A1	cytochrome P450 IVA1	(5)	4	(CA) <sub>24</sub>
15	ELA1	elastase I	(7)	15	(GT) <sub>24</sub>
16	ELA2	elastase II	-	-	(CT) <sub>20</sub>
17	FABP	liver fatty acid binding protein	(4)	6	(GT) <sub>24</sub>
18	FGG	$\gamma$ -fibrinogen	2	3	(GT) <sub>21</sub>
19	GLS	glutaminase	9	1	(CA) <sub>24</sub>
20	GLUT1	brain glucose transporter 1	5	4	(CA) <sub>20</sub>
21	HP	haptoglobin	(19)	8	(GT) <sub>28</sub> (AT) <sub>5</sub>
22	IL6	interleukin-6	4	5	(GT) <sub>26</sub>
23	INH1	inhibin $\alpha$	(9)	1	(GT) <sub>27</sub>
24	JUN	c-jun oncogene	(5)	4	(GT) <sub>25</sub>

Table 2. (continued)

Symbol	Gene	Rat Chr	Mouse Chr	Repeat unit
25	LALBA $\alpha$ -lactalbumin	(7)	15	(GT) <sub>15</sub> CT(GT) <sub>2</sub> GA(GT) <sub>3</sub>
26	MHC1 major histocompatibility complex class I region	20	6	(AG) <sub>46</sub> (CAG) <sub>2</sub> (AG) <sub>9</sub> (GT) <sub>25</sub>
27	MHC2 major histocompatibility complex class II region	20	6	(GT) <sub>5</sub> GC(GT) <sub>12</sub>
28	MLVI2 MoMuLV integration site 2	2	15	(GT) <sub>27</sub>
29	MYC c-myc oncogene	7	15	(CA) <sub>25</sub>
30	NCAM neural cell adhesion molecule	8	9	(CT) <sub>7</sub> (CA) <sub>21</sub>
31	NTS ribosomal DNA non transcribed spacer	-	-	(CT) <sub>12</sub> (GT) <sub>15</sub>
32	PKL L-type pyruvate kinase	2	3	(CA) <sub>23</sub>
33	PND pronatriodilatin (atrial natriuretic factor)	5	4	(GT) <sub>9</sub> GATG(GT) <sub>27</sub>
34	RAS H-ras proto-oncogene	1	7	(CA) <sub>24</sub>
35	SMT somatostatin	11	16	(TG) <sub>25</sub> (TCTG) <sub>5</sub>
36	SPT salivary proline-rich protein	(4)	6	(GATA) <sub>15</sub>

Table 2. (continued)

Symbol	Gene	Rat Mouse		Repeat unit	
		Chr	Chr		
37	TAT	tyrosin aminotransferase	19	8	(CT) <sub>24</sub>
38	THY1	thymus cell antigen-1	(8)	9	(CA) <sub>15</sub> TT(CT) <sub>34</sub>
39	TRY1	trypsin I	(4)	6	(GT) <sub>26</sub> (GA) <sub>3</sub> (GT) <sub>5</sub>
40	TRY2	trypsin II	(4)	(6)	(CA) <sub>15</sub> (NA) <sub>19</sub> (CAG) <sub>3</sub> (AN) <sub>12</sub> (CA) <sub>14</sub> A(GA) <sub>14</sub>

Table 3. Nucleotide sequences of primers used for detection of microsatellite regions in the GenBank DNA database. Primer sequences are given with the forward primer listed first and the reverse primer second. Both are shown in the 5' to 3' orientation.

	Entry name	Product	Forward primer sequence
Gene	Accession Number	size	Reverse primer sequence
1. A2UG	Ratgba2ua J04465	132	CCCTACTACCATTATCTTGTG CTAGTAGAAAGTTTGACTGGG
2. APOC3	Ratapoa02 J02596	92	GGGGGTAAACAGTAATAGG CCCACAGGAGATCTTTTCAC
3. ATP1A1	Ratnkaalb X53234	188	AACCCAGTGGTAGCTCCATCC TACTTGCTCGTCCAACCTACG
4. ATP1A2	Ratatpa2s D90049	127	AGTGTGCGCTCCTATGCATAC AGAACATGCTGTGTGAGGCTG
5. ATPE	Ratecto J04963	155	TGTCACGGAGAGCCCTGCAC TTAACACGGAAAGGAGTCAATAGAG
6. CPB	Ratcarb05 M23951	109	TCTCCCTTCTAAGCATACTTTCC GTGAAAATTCCTGTATCTGGGTG
7. CRBP2	Ratcrbp21 M16400	148	TAACCTCCCTGAGCCTTGCTG CCACACTTCAAGTTCATTTTGTG
8. CRYG	Ratcrygf M19357	209	TTGTTGCACAGTCATGTCTG CTCAGCATAATGCCGCTGC
9. CSNA	Ratcasagl X03584	165	AGAGTGAGTACTTGATTACAC GGTGGCAGTTTAGCTGTAC
10. CYP1A1	Ratcyp45c K02246	136	CTGTCCATGGAGCGCCTTG GATAGGCAAGAAGCCAAATGG
11. CYP2A3	Ratcyp2a3a M33190	101	TACACATGCACCTGCATGCAC TCTTGCCAGTTGCTAAAAATGAG
12. CYP2B2	Ratcypb4 D00250	169	AGCAATATAGAACCCACAC CAGAATACACAGGACAAAAGG



Table 3. (Continued)

	Entry name		Product size	Forward primer sequence
	Gene	Accession Number		Reverse primer sequence
13.	CYP2D2	Ratid2g X52027	160	GAACAAGGTTCAATAAGTACCATC ACACAAGTCTTTGTCCCTGACC
14.	CYP4A1	Ratcyp4a1 M57718	124	CTCATAGAATAACGAAGCCACC AAACAGTCCATGAGATCAAAGTC
15.	ELA1	Ratelail L00112	102	TACCTATCTATGCACCTCATGG TTGTCCCCTGACCACAACG
16.	ELA2	Ratelaii1 L00118	145	TAGGGTAGACTTAGGAAGTTGC TTCAGGACAGCCAGGGCTAC
17.	FABP	Ratfabplg M13501	128	ATTTCTCATTGTGGTCTATTG TCACATGTGTGAGACCTTGG
18.	FGG	Ratfibg2 X05861	113	GTCCATACCAATTATAGTAGG CAACTGTCAAATGGCATGC
19.	GLS	Ratglut M65150	156	TGAAGGGTATGTTAGTGAGGAC TATCTGTGCAGTTGAGAATGTTG
20.	GLUT1	Ratgtg3 M22063	132	GAATTGACCTTAGGTCAGCTGG GTGCTTTTCTCTGTTGGGTGAG
21.	HP	Rathpa3 M34232	143	CAACAGTACAGGAACACTGC GACGATTACATATGTATGTAGG
22.	IL6	Ratil6g M26745	114	ACTCTACAAGACCAGAAAGTG GCATCTTAGCTGGGCTGACC
23.	INHA	Ratinhbab1 M32754	112	TGACTGGCCAAACCTAAGCACC GACCTGACCCATTGAGGCAAGC
24.	JUN	Ratrjg9 X17215	139	CCTTTCACGGGTGTCTTCG TCCAGAAAGCTGGGGAGAC
25.	LALBA	Ratalac X00461	110	GCTAGACATTGTTAATCAACTGC ATGTATATCCGTGTCTTTTCG

Table 3. (Continued)

	Gene	Entry name	Product size	Forward primer sequence
		Accession Number		Reverse primer sequence
26.	MHC1	Ratmhrt1 M64795	206	TCCCTTCCACAGCCAACTTC TCCATGGAGCTCCCAAGATAC
27.	MHC2	Ratmhc2i X14254	109	GGCTAACAATTATTAGCAAGG TGCATTACAGTACATGAATGG
28.	MLVI2	Ratmlvi2e X03855	183	GTTAATATGGGTTTCTTACCAC ATTATCCTCTTCTGACCTCAGC
29.	MYC	Ratmyc Y00396	113	TGATAGTAGGAGTAAAAGAGTG CCTTTCAGCCTGCTGTACTTC
30.	NCAM	Ratncaml4 X06564	160	GGCTTCACCAGAGCATCC AAAGCAATCCCATGTTTATC
31.	NTS	Ratnts2 X04084	191	TCCTGATGCTTTCCCTCG TAGTGCTGCTGAGATTAAGG
32.	PKL	Ratpklg X05684	603	TTCCAAGGATAAGGACGGCTG TTTATCTGCTGAGCATGCTGAG
33.	PND	Ratanf K02062	184	CACCACTTCTTGCGGTCCAC CAGAGCATGTTGAGGGCCATAG
34.	RAS	Ratraspha M61-16	104	GATGCCCTTCTCGGCCTCTG AGCACGTGCGTGTGCACGTAC
35.	SMT	Ratsoml41 K02248	159	AGAGCTGTTTCCAGGTGCC TTGTGACAAAAGAAAGGCACC
36.	SPT	Ratrp4 M64791	185	TTATGTAGAGATAAAGGATCAG CGTGTC AACCTAACTCAC
37.	TAT	Rattat5e M29576	147	ACTTTTCTGCCCAGGGCTGAG AGCAGAGCCAGACCTATGTTT
38.	THY1	Ratthy1g X02002	210	AAGAAACCCCTTCTTGAAAAACC CCTTCAATTTCCATCTAATCTAC

Table 3. (Continued)

	Gene	Entry name	Product	Forward primer sequence
		Accession Number	size	Reverse primer sequence
39.	TRY1	Ratptryi	137	AGGCTCTGTCTCAAACCTTAC
		J00778		GACACATGAACAGACATATGC
40.	TRY2	Ratptry24	210	ACTTCCTGCTGGCCTGGATG
		L00130		CACCTGGGAAATTGATGAAACTC

Table 4. Strain distribution of allelic fragments of the *IL3* locus in inbred rat strains.

Amplified fragment	Strains
930 bp	BUF/Iar, F344/Hok, F344/Iar, LEO/Iar, NIGIII/Hok, NIGIII/Iar, TO/Hok, TS, WKS/Iar, WM/Iar
880 bp	ALB/Hok, BEG/Iar, IS/Iar, KYN/Iar, SDJ/Hok, TF, TOM/Iar, TU, TX, W/Hok, WKAH/Hok
820 bp	ACI/Hok, BN/Hok, BN/Iar, COP/Iar
780 bp	LEJ/Hok, LEJM/Ms, LET/Iar

Table 5. Strain distribution of the alleles of the *SVS4* and *SVPI* loci

LOCI	<i>SVS4</i>		
	750-bp	490-bp	390-bp
aa	ACI/Hok, ALB/Hok, BEG, COP/Iar, F344/Hok, F344/Iar, KYN/Hok, LEJ/Hok, LET/Iar, NIG-III/Hok, NIG-III/Iar, SDJ/Hok, TF, TOM/Iar, TS, TX, W/Hok, WKAH/Hok, WKS/Iar, WM/Iar		
bb	BN/Hok, BN/Iar, BUF/Hok, LEO/Iar	IS/Iar, TU	TO/Hok



Table 6. Allelic variations in the microsatellite loci analyzed by PCR. " $=$ " indicates alleles that are identical in size on a 25-cm long polyacrylamidegel. ">" indicates that one allele is larger than another.

Locus	Size variations	Number of alleles
1 ANF	COP = NIGIII = BN = ACI = WKS > TF > IS	3
2 APOC3	IS = COP > TF > WKS > NIGIII = ACI = BN	4
3 ATP1A1	BN > COP = NIGIII > IS > TF = WKS = ACI	4
4 ATP1A2	WKS = ACI = BN = COP > IS > NIGIII > TF	4
5 ATPE	ACI = BN = COP = NIGIII = TF > IS = WKS	2
6 CPB	WKS > COP = IS = BN = TF > NIGIII > ACI	4
7 CRBP2	IS = WKS = NIGIII > COP > TF > ACI > BN	5
8 CRYG	ACI > BN > IS	3
9 CSNA	NIGIII = ACI > IS = WKS > BN = COP > TF	4
10 CYP1A1	IS > BN = TF = WKS	2
11 CYP2A3	BN = COP = ACI = NIGIII = TF > WKS > IS	3
12 CYP2B2	BN > COP = NIGIII > IS > TF = WKS = ACI	4
13 CYP2D2	NIGIII > ACI > BN = TF > COP > IS > WKS	6

Table 6. (continued).

Locus	Size variations	Number of alleles
14 <i>CYP4A1</i>	IS > COP = NIGIII = TF > ACI > WKS > BN	5
15 <i>ELA1</i>	ACI > IS > BN > TF = WKS = NIGIII = COP	4
16 <i>ELA2</i>	IS > BN = TF = WKS	2
17 <i>FABP</i>	IS > TF = BN = NIGIII > WKS > ACI = COP	4
18 <i>FGG</i>	TF = IS > COP = ACI > NIGIII = WKS > BN	4
19 <i>GLS</i>	WKS = BN > NIGIII = TF > ACI = COP > IS	4
20 <i>GLUT1</i>	ACI > WKS > IS = NIGIII = TF > COP > BN	5
21 <i>HP</i>	BN = IS = COP > TF = ACI = WKS > NIGIII	3
22 <i>IL6</i>	ACI = WKS > COP > IS > NIGIII > TF > BN	6
23 <i>INH1</i>	BN = TF > ACI = NIGIII > IS = WKS > COP	4
24 <i>JUN</i>	BN > COP > ACI > WKS > TF = NIGIII > IS	6
25 <i>LALBA</i>	BN > IS > WKS	3
26 <i>MHC1</i>	COP = WKS > IS = NIGIII > BN	3
27 <i>MLVI2</i>	IS > BN > ACI = NIGIII	3

Table 6. (continued).

Locus	Size variations	Number of alleles
28 <i>MYC</i>	BN > IS > WKS > TF = ACI = COP > NIGIII	5
29 <i>NCAM</i>	BN > ACI = TF = IS > NIGIII > COP > WKS	5
30 <i>NTS</i>	COP = TF = WKS > IS > NIGIII > BN	4
31 <i>SPT</i>	TF > BN	2
32 <i>TRY1</i>	BN > TF = NIGIII > IS = WKS > COP > ACI	5
33 <i>TRY2</i>	BN > IS > WKS	3
34 <i>THY1</i>	BN > ACI > COP > NIGIII > IS > TF > WKS	7

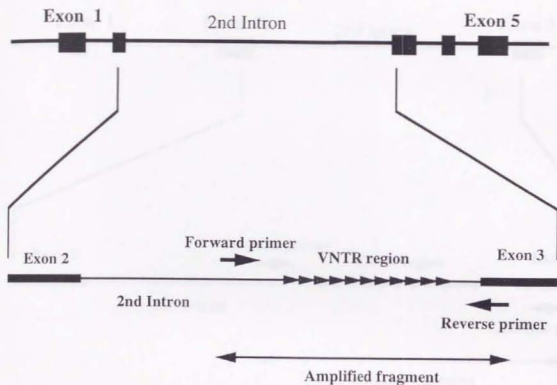


Figure 1. Schematic structure of the region around the VNTR of the rat IL-3 gene. The positions of the primers are indicated by arrows.

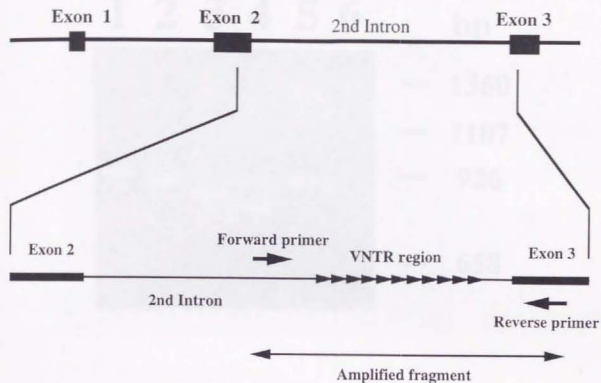


Figure 2. Schematic structure of the region around the VNTR of the rat SVS-4 gene. The positions of the primers are indicated by arrows.





Figure 3. Ethidium bromide stained electrophoretic fragments amplified from the VNTR region of the rat IL-3 gene. Liver DNAs from inbred rats were amplified by PCR as described in the text. Lanes 1, F344/Hok; 2, KYN/Hok; 3, ACI/Hok; 4, LEA/Hok; 5, SDJ/Hok; 6, TO/Hok. Lengths of marker fragments are shown on the right.



Figure 4. Ethidium bromide stained electrophoretic fragments amplified from the VNTR region of the rat SVS-4 gene. Liver DNAs from inbred rats were amplified by PCR as described in the text. Lanes 1, BEG; 2, COP/Iar; 3, IS/Iar; 4, NIGIII/Iar; 5, WKS/Iar; 6, TU; 7, TX; 8, WM/Iar. Lengths of marker fragments are shown on the right.

**Locus; ratgtg3**

**4% Agarose gel**



Figure 5. Fragments amplified from the microsatellite region of the rat GLUT-1 gene and electrophoresed in 4 % agarose gel. Lanes 1, IS/Iar; 2, WKS/Iar; 3, BN/Iar; 4, COP/Iar; 5, NIGIII/Iar; 6, TF; M, marker. Lengths of marker fragments are shown on the right.

Locus; ratgtg3

8% Submarine PAG

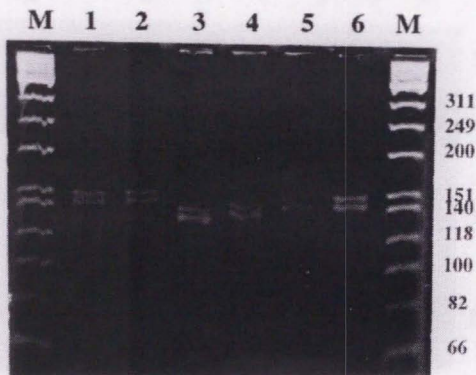


Figure 6. Fragments amplified from the microsatellite region of the rat GLUT-1 gene and electrophoresed in 8 % polyacrylamide mini-gel and stained. Lanes 1, IS/Iar; 2, WKS/Iar; 3, BN/Iar; 4, COP/Iar; 5, NIGIII/Iar; 6, TF/Iar; M, marker. Lengths of marker fragments are shown on the right.

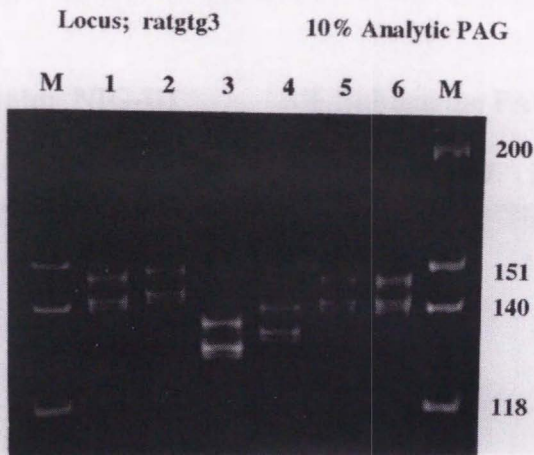


Figure 7. Fragments amplified from the microsatellite region of the rat GLUT-1 gene and electrophoresed in 10 % analytic polyacrylamide gel. Lanes lane 1, IS/Iar; 2, WKS/Iar; 3, BN/Iar; 4, COP/Iar; 5, NIGIII/Iar; 6, TF; M, marker. Lengths of marker fragments are shown on the right.

Strain; NIG-III

8% Submarine PAG

M 1 2 3 4 5 6 7 M



Figure 8. Fragments amplified from the microsatellite region of the seven loci and electrophoresed in 8 % polyacrylamide mini-gel. Lanes 1, *PND*; 2, *ATP2D2*; 3, *GLUT1*; 4, *IL6*; 5, *JUN*; 6, *NCAM*; 7, *FABP*; M, marker. Left and right lane of each locus represent NIGIII/Hok and NIGIII/Iar, respectively. Lengths of marker fragments are shown on the right.



## 第二章

### ラット染色体上の連鎖地図の作成

#### 第一節 はじめに

染色体地図作成には、連鎖解析に用いることのできる多数の遺伝標識を開発することが不可欠であることから、第一章に述べたように、本研究ではまず高多型で検出の容易な多数の遺伝標識を開発した。その結果、連鎖解析による染色体地図の作成が可能となり、これらの遺伝標識を用いたラット染色体上の連鎖地図の作成を試みた。

既にヒトにおいて約 3000 個の多型的遺伝標識が分離され (Williamson et al., 1991)、詳細な染色体地図が作成されている (Guyer et al., 1992; Weissenbach et al., 1992)。特に、最近では検出の容易なマイクロサテライト遺伝子座が数多く利用され、染色体上の連鎖地図の大半を構成している (Weber et al., 1991; McInnis et al., 1991; Kwiatkowski et al., 1992; Decker et al., 1992; Hazan et al., 1992)。またマウスにおいてもミュータント遺伝子座を含めたかなり詳細な染色体地図が作成されている (Backwalter et al. 1991; Watanabe et al., 1991; Kay et al. 1991; Hillyard et al., 1992; Hameister et al., 1992; Watson et al., 1992; Jones et al. 1993; D'Eustachio and Davisson, 1993)。ヒトとマウスにおけるこのような染色体地図作成の進展の結果、染色体上の遺伝子の構成には両者の間に

かなりの類似性があることが明かになった (Nadeau and Taylor, 1984; Nadeau and Reiner, 1989; Nadeau et al., 1992)。すなわち、ある特定の染色体領域の遺伝子座の構成は種間で保存されており、そのような遺伝子構成の類似性は多くの遺伝子でヒト染色体上の位置からマウス染色体上の位置を予測すること、また、その逆にマウスの位置からヒトの位置を予測できることを示している。こうした染色体領域における遺伝子構成の保存は他の哺乳動物においても認められている (O'Brien and Graves, 1991; O'Brien, 1991)。したがって、このような遺伝子構成の比較から、ヒトおよびマウスにおける詳細な染色体地図は、ほとんどの哺乳動物における各種遺伝子の染色体上の位置を予測するのに利用できると考えられている (O'Brien et al., 1993)。本研究では、第一章に述べたように、ヒトおよびマウスとの遺伝子構成の比較から染色体上の位置が予測できることを基準とし、新たな遺伝標識を開発した。そこで次に、ラット染色体上の連鎖地図を作成すると共に、得られた染色体地図をヒトおよびマウスの染色体地図と比較することにより、各染色体領域のラット、マウスおよびヒトとの間での対応について検討した。

これまでのラットにおける遺伝子マッピングは主に体細胞融合系 (Yoshida et al., 1978; Szperer et al., 1984, 1990; Yasue et al., 1991, 1992) や *In situ* hybridization 法 (Takahashi et al., 1986; Zhang et al., 1988; Mori et al., 1989) を用いて行われてきた。しかし、これらの方法によってマッピングされた遺伝子は、他の遺伝標識 (遺伝子座) との連鎖試験には利用できない。連鎖試験には多型性を示す遺伝標識が必要であるが、第一章に述べたように、ラットにおける多型性を示す遺伝標識の数がごく限られていたため、連鎖に関しては特定の遺伝標識について解析されたもの (Womack, 1973; van Zutphen et al., 1985; Cramer et al., 1986) あるいは新たな遺伝標識の確立に伴

い、その周辺の連鎖地図が作成されたもの (Moutier et al., 1973; Matsumoto, 1980; Matsumoto et al., 1982; Adams et al., 1984; Cramer et al., 1985) が中心であった。それらは限られた数のミュータント遺伝子座、生化学的および免疫学的遺伝子座、および RFLP 遺伝子座等からなり、20 本の常染色体のうち連鎖群としては 13 群が作成され、そのうち 6 群、第 I, II, VI, VIII, IX, および X 連鎖群が第 1, 5, 14, 6, 20, および 9 染色体に当てはめられているに過ぎない (Hedrich, 1990; Levan et al., 1992)。

最近では第一章に記述したミニサテライトおよびマイクロサテライト遺伝子座がヒトやマウスにおける連鎖解析のための遺伝標識の主流になっている。ラットにおいてもこのような遺伝標識を用いた連鎖地図の作成が幾つか報告されている (Hilbert et al., 1991; Serikawa et al., 1992; Remmer et al., 1992; 1993a; 1993b)。すなわち、第 1 (構成する遺伝子座数: 16), 2 (9), 3 (7), 4 (10), 10 (9), 18 (5), 19 (7), および X (4) 染色体では染色体のかなりの領域を網羅すると思われる単一の連鎖群が報告されている。しかし、残りの染色体では依然として十分な連鎖群は確立されておらず、染色体全域を網羅する連鎖地図は現在のところ作成されていない。したがって、ラットの遺伝解析のためにより完全な連鎖地図が求められており、本章の目的はラット染色体におけるより詳細な連鎖地図の作成にある。前述の反復 DNA 遺伝標識に加えて、生化学的遺伝子座など多くの遺伝子座を用いることにより、より詳細な染色体上の連鎖地図作成を試みた。

## 第二節 材料と方法

### 1) 供試動物および 材料の準備

用いた 4 系統の近交系 BN/Iar, IS/Iar, TF, および WKS/Iar は (財) 動物繁殖研究所、第五研究部で維持されている。交配試験のために、2 組の戻し交雑世代を用いた。一つは IS/Iar と WKS/Iar の組み合わせ、もう一つは BN/Iar と TF の組み合わせである。111 匹の [(WKS/Iar x IS/Iar) $F_1$  x WKS/Iar] 戻し交雑世代および 57 匹の [(BN/Iar x TF) $F_1$  x TF] 戻し交雑世代を用いた。高分子量ゲノム DNA を前章第二節に記述したように各個体の肝臓から抽出した。生化学的遺伝標識の解析には、それぞれ肝臓・腎臓・胃・脾臓・小腸・精巣・精巣上体・ハーダー氏腺のホモジェネートの遠心上清、および溶血赤血球・血清・精嚢分泌液または尿のサンプルを用いた。

### 2) 生化学的遺伝子座のタイピング

2 組の戻し交雑世代における 12 生化学的遺伝子座 (*AC01*, *ACP2*, *AHD2*, *AHDC*, *AKP1*, *CS1*, *ES6*, *ES8*, *ES19*, *FH1*, *MUP1*, および *SVPI*) における対立遺伝子の分離を既報の方法により検討した (Adams et al., 1984, Bender et al., 1979, 1985, Cramer et al., 1985, 1986, Gasser, 1972, Matsumoto, 1980, Nikaido et al., 1982, van Zutphen et al., 1981, Yamada et al., 1981)。生化学的標識遺伝子座の検出方法を表 7 にまとめた。*AOX1* および *AOX2* 遺伝子座はそれぞれ肝臓およびハーダー氏腺のアルデヒドオキシダーゼを特異的な基質を用いて染色することにより検出した。7 つの生化学的遺伝子はセルロースアセテート膜 (Titan -III, Helena Lab.)、残りの 7 つはポリアクリルアミド

ゲルを用いた電気泳動法によりタイピングを行った。

### 3) RFLP 遺伝子座のタイピング

以下の 4 つの RFLP 遺伝子座は既に報告されている方法を用いて検討した: *A403* (Takahashi et al., 1992), *GH* (Kunieda et al., 1989), *NRAS1*, *NRAS2* (Kunieda et al., 1990)。また、*TRP53L1* および *TRP53L4* は Kunieda により記述されている方法により検討した (1990)。これらの RFLP の検出に用いたプローブを表 8 に示した。

各種の制限酵素で切断されたゲノム DNA は、1 % (*GH* 遺伝子座)あるいは 0.7 % (他の遺伝子座) アガロースゲルの電気泳動により分離され、ナイロンメンブレンフィルターに転写された。5 つの RFLP (*A403*, *GH*, *NRAS1*, *TRP53L1*, および *TRP53L4*) のハイブリダイゼーションは厳しい条件下で行った。すなわち、フィルターを放射性同位体 ( $^{32}\text{P}$ ) で標識したプローブを含むハイブリダイゼーション溶液 (50 % ホルムアミド, 5 X SSC, 1 mM EDTA, 0.5 % SDS, 5 X Denhardt's 溶液, および 100 mg/ml の超音波処理したニシン精子 DNA からなる) を用いて 42 °C で 24 時間処理し、1 X SSC, 0.1 % SDS 溶液で室温で 30 分間の洗浄を 3 回繰り返す、その後 0.1 X SSC, 0.1 % SDS で 50 °C で 1 時間洗浄した。*NRAS2* では、緩い条件下で行った。すなわち、40% ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液で処理し、最後の洗浄を 0.1 X SSC, 0.1% SDS を用いて 40 °C で行った。洗浄後、フィルターを X 線フィルムに露光させ、RFLP を検出した。

### 4) その他の遺伝子座のタイピング

毛色遺伝子座 (*A*, *H* および *C*) の遺伝子型は肉眼的に判定した。第一章で確立したマイクロサテライトによる 34 遺伝子座およびミニサ



テライトによる 2 遺伝子座は第一章の方法で判定した。それ以外の 14 のマイクロサテライト遺伝子座を Hilbert ら (1991) および Serikawa ら (1992) の方法で判定した。これらのマイクロサテライト遺伝子座の存在する染色体およびプライマーの塩基配列を表 9 に示した。

#### 5) 連鎖解析

上記の遺伝子座を用いてラット染色体の連鎖解析を行った。各遺伝子座間の分離比を基に、報告されている方法により連鎖の有無についてカイ二乗検定を行い、組換え率を計算した (Green, 1981)。カイ二乗検定により 5 % 水準で有為な連鎖の認められる遺伝子座間を連鎖があると判定し、複数の遺伝子座の順序は組換えの回数が最小となるように組み合わせた。本研究では遺伝子座間の距離は全て組換え率を百分率で表したものをを用いた。



### 第三節 結 果

全体で 67 遺伝子座について、2 組の交雑群を用いて連鎖解析を行った。[(IS/Iar x WKS/Iar) $F_1$  x WKS/Iar] の戻し交雑群で 46 個の遺伝子座を検討した結果、8 個の連鎖群が形成された。一方 [(BN/Iar x TF) $F_1$  x TF] の戻し交雑群で 35 個の遺伝子座を検討した結果、9 個の連鎖群が形成された。それぞれの連鎖群は特定の染色体に当てはめられた。

前章で確立した 36 個の遺伝標識のうち 29 個の遺伝子座で連鎖が検出された。3 毛色遺伝子座、14 生化学的遺伝子座、6 RFLP 遺伝子座、14 マイクロサテライト遺伝子座を加えた 67 遺伝子座のうち 56 遺伝子座の間に有為な連鎖を認め、第 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, および 13 染色体上にそれぞれ 7, 8, 5, 2, 8, 7, 7, 5, 4, および 3 個の遺伝子座よりなる連鎖群が構成された。第 4, 6, 11, および 20 染色体上の *IL6*, *D3*, *MRCOX2*, および *MHC1* 遺伝子座は連鎖が検出できなかった。第 14 および 19 染色体ではそれぞれ 2 つの遺伝子座があったが、交雑群が違いため連鎖を検討できなかった (*CSNA* と *H* および *ES8* と *HP* 遺伝子座)。

また、本研究により新たに 4 生化学的遺伝子座 (*CSI*, *ES6*, *AOX1*, および *AOX2*) および 4 RFLP 遺伝子座 (*A403*, *NRAS2*, *TRP53L1*, および *TRP53L4*)、2 ミニサテライト遺伝子座 (*IL3* および *SVS4*)、8 マイクロサテライト遺伝子座 (*APOC3*, *CYP1A1*, *CYP2A3*, *CYP2D2*, *CYP4A1*, *ELA2*, *JUN*, および *TRY2*) の染色体上の位置を明らかにした。さらに、染色体に当てはめられていたが連鎖の認められていない 10 遺伝子座 (*A8*, *ACP2*, *ATP1A1*, *ATP1A2*, *CRYG*, *GLS*, *GH*, *LALBA*, *MLV12*,

および NCAM の連鎖を新たに検出した。なお、本研究においても 6 遺伝子座、AKP1, ATPE, ES19, NRAS1, NTS, および SPT の染色体上の位置は明らかにできなかった。

各染色体毎の結果を以下に述べる。

### 1) 第 1 染色体

図 9 に示すように、 $[(IS/Iar \times WKS/Iar)F_1 \times WKS/Iar]$  の戻し交雑世代で 7 つの遺伝子座間に有為な連鎖が検出された。既に第 1 染色体上に位置付けられている C, CYP2B2, KAL, および PKC 遺伝子座に加えて、TRP53L4, NRAS2, および CYP2A3 遺伝子座の間に連鎖が検出された。各遺伝子座の構成および組換え頻度は以下の通りであった：  
PKC- 5.3 +/- 3.0 % -TRP53L4- 1.8 +/- 1.7 -CYP2A3/2B2- 8.8 +/- 3.7 -KAL- 22.8 +/- 5.6 -C- 7.0 +/- 3.4 -NRAS2。

### 2) 第 2 染色体

図 10 に示すように、 $[(IS/Iar \times WKS/Iar)F_1 \times WKS/Iar]$  の戻し交雑世代で 6 つの遺伝子座間に有為な連鎖が検出された。既に第 2 染色体上に位置付けられている CPB, MLVI2, MT1PB, および PRLR 遺伝子座に加えて、A403 および CSI 遺伝子座に連鎖が検出された。各遺伝子座の構成および組換え頻度は以下の通りであった：CPB- 18.8 +/- 5.6 % -PRLR- 2.1 +/- 2.1 -MLVI2- 8.3 +/- 4.0 -MT1PB- 14.6 +/- 5.1 -A403- 10.4 +/- 4.4 -CSI。

また、 $[(BN/Iar \times TF)F_1 \times TF]$  の戻し交雑世代で有為な連鎖が ATP1A1 と FGG 遺伝子座の間 (3.5 +/- 2.4 %) に観察されたが、ATP1A1 と CPB 遺伝子座の間および FGG と CPB 遺伝子座の間には有為な連鎖は観察されなかった。

### 3) 第 3 染色体

[(IS/Iar x WKS/Iar) $F_1$  x WKS/Iar] の戻し交雑世代で *ACP2* と *CAT* 遺伝子座の間 (16.7 +/- 5.1 %) および *SVP1* と *A* 遺伝子座の間 (12.0 +/- 6.5) に有為な連鎖が検出された。*SVP1* と *SVS4* 遺伝子座の間には組換えは認められなかった。*ACP2* を含むグループと *SVP1* を含むグループとの間には有為な連鎖は検出されなかった。

### 4) 第 4 染色体

[(BN/Iar x TF) $F_1$  x TF] の戻し交雑世代において *TRY1* と *TRY2* 遺伝子座の間に組換え個体は観察されず、連鎖が確認できたが、*IL6* 遺伝子座とは連鎖が認められなかった。

### 5) 第 5 染色体

111 匹の [(IS/Iar x WKS/Iar) $F_1$  x WKS/Iar] の戻し交雑世代で解析した結果、6 遺伝子座間に連鎖が検出された。図 11a に示したように、54 匹の解析から 4 つの遺伝子座、*JUN*, *CYP4A1*, *ELA2*, および *AHD2* の間に有為な連鎖が検出された。また、図 11b に示したように、76 匹の解析から 3 つの遺伝子座、*A8*, *MUP1*, および *JUN* の間に緩い連鎖が検出された。各遺伝子座の構成および組換え頻度を計算して総合すると、以下の通りであった: *A8*- 32.9 +/- 5.4 % -*MUP1*- 27.6 +/- 5.1 % -*JUN*- 22.2 +/- 5.7 % -*CYP4A1*- 20.4 +/- 5.5 % -*ELA2*- 16.7 +/- 5.1 % -*AHD2*。

一方、図 11c に示したように 57 匹の [(BN/Iar x TF) $F_1$  x TF] の戻し交雑世代で *AHD2*, *CYP4A1*, *GLUT1*, *JUN*, および *PND* 遺伝子座の間の 2 組に連鎖が検出され、また、*A8* と *ACO1* の間 (15.8 +/- 4.8

%) にも連鎖が検出されたが、両者の間に有為な連鎖は認められなかった。また、*CYP4A1* と *GLUT1* 遺伝子座の間には組換えは認められなかった。前者の各遺伝子座の構成および組換え頻度は以下の通りであった：  
*JUN*- 12.3 +/- 4.3 % -*CYP4A1/GLUT1*- 22.8 +/- 5.6 -*AHD2*- 14.0 +/- 4.6 -*PND*。

#### 6) 第 7 染色体

図 12 に示したように、54 匹の [(IS/Iar x WKS/Iar) $F_1$  x WKS/Iar] の戻し交雑世代で 5 つの遺伝子座、*CYP2D2*, *ELAI*, *LALBA*, *MYC*, および *PERF* の間に緩い連鎖が検出されたが、*IGF1* 遺伝子座とは連鎖が認められなかった。また、*ELAI* と *PERF* 遺伝子座の間には組換えは認められなかった。各遺伝子座の構成および組換え頻度は以下の通りであった：*MYC*- 20.4 +/- 5.4 % -*CYP2D2*- 18.5 +/- 5.3 -*ELAI/PERF*- 5.6 +/- 3.1 -*LALBA*。

一方、57 匹の [(BN/Iar x TF) $F_1$  x TF] の戻し交雑世代では *MYC* と *PERF* 遺伝子座の間 (24.6 +/- 5.7 %) に有為な連鎖が検出されたが、*E5* 遺伝子座との間には有為な連鎖は認められなかった。

#### 7) 第 8 染色体

図 13a に示したように、48 匹の [(IS/Iar x WKS/Iar) $F_1$  x WKS/Iar] の戻し交雑世代で 5 遺伝子座、*APOC3*, *CYP1A1*, *ES6*, *NCAM*, および *PKATA* の間に有為な連鎖が検出された。各遺伝子座の構成および組換え頻度を計算して総合すると、以下の通りであった：*ES6*- 16.7 +/- 5.4 % -*APOC3*- 4.2 +/- 2.9 -*NCAM*- 4.2 +/- 2.9 -*CYP1A1*- 31.3 +/- 6.7 -*PKATA*。

一方、図 13b に示したように、57 匹の [(BN/Iar x TF) $F_1$  x TF]

の戻し交雑世代で 3 遺伝子座, *APOC3*, *ES6*, および *THY1* の間に連鎖が検出され、また、*CRBP2* と *PKATA* 遺伝子座の間 (21.1 +/- 5.4 %) にも連鎖が検出されたが、両者の間に有為な連鎖は認められなかった。前者の遺伝子座の構成および組換え頻度は以下の通りであった: *ES6*-12.3 +/- 4.3 % -*THY1*- 8.8 +/- 3.7 -*APOC3*。

#### 8) 第 9 染色体

[(IS/Iar x WKS/Iar) $F_1$  x WKS/Iar] の戻し交雑世代で 5 遺伝子座間に連鎖が検出された。図 14a に示したように 54 匹の解析から 4 つの遺伝子座, *AOX1*, *AOX2*, *CRYG*, および *GLS* の間に有為な連鎖が検出された。各遺伝子座の構成および組換え頻度は以下の通りであった: *AOX2*-18.5 +/- 5.3 % -*AOX1*-14.8 +/- 4.8 -*GLS*-9.3 +/- 3.9 -*CRYG*。

また、図 14b に示したように、57 匹の解析から 4 つの遺伝子座, *AOX1*, *CRYG*, *GLS* および *TRP53L1* 遺伝子の間に連鎖が検出された。各遺伝子座の構成および組換え頻度は以下の通りであった: *TRP53L1*-21.1 +/- 5.4 % -*GLS*-3.5 +/- 2.4 -*CRYG*-10.5 +/- 4.1 -*AOX1*。各遺伝子座の構成および組換え頻度を計算して総合すると、以下の通りであった: *TRP53L1*-21.1 +/- 5.4 % -*CRYG*-6.3 +/- 5.1 -*GLS*-13.5 +/- 5.7 -*AOX1*-18.5 +/- 5.3 -*AOX2*。

#### 9) 第 10 染色体

[(IS/Iar x WKS/Iar) $F_1$  x WKS/Iar] の戻し交雑世代で *GH* と *IL3* 遺伝子座の間に緩い連鎖が観察された (33.9 +/- 6.4 %)。また、図 15 に示したように、57 匹の [(BN/Iar x TF) $F_1$  x TF] の戻し交雑世代で 3 つの遺伝子座, *ABP*, *IL3*, および *NGFR* の間に有為な連鎖が検出され



た。3 遺伝子座の構成および組換え頻度は以下の通りであった: *IL3*-  
8.8 +/- 3.7 % -*ABP*- 17.5 +/- 5.0 % -*NGFR*。

#### 10) 第 13 染色体

図 16 に示したように [(BN/Iar x TF)<sub>1</sub> x TF] の戻し交雑世代  
で 3 つの遺伝子座, *AHDC*, *ATP1A2*, および *FHI* の間に有為な連鎖が検  
出された。3 遺伝子座の構成および組換え頻度を計算して総合すると、  
以下の通りであった: *AHDC*- 14.0 +/- 4.6 % -*ATP1A2*- 7.0 +/- 3.4 % -  
*FHI*。



#### 第四節 考 察

本章では、毛色遺伝子座、生化学的遺伝子座、RFLP 遺伝子座、ミニサテライトおよびマイクロサテライト遺伝子座等、計 67 遺伝子座について、2 組の交配実験系を用いて連鎖解析を行った。その結果、ラット第 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, および 13 染色体における 9 個の広範囲な染色体地図が作成された。染色体地図が作成されたこれらの染色体はラット染色体の中では比較的大きな染色体であり、全染色体の約 3 分の 2 の領域を占めている (Committee for a standard karyotype of *Rattus norvegicus*, 1973)。本研究により、これらの染色体のかんりの領域の遺伝子に関して基本的に連鎖解析が可能となった。また、これまで染色体の明らかでなかった 4 生化学的遺伝子座および 4 RFLP 遺伝子座を含む 18 遺伝子座の染色体上の位置を明らかにした。さらに、染色体に当てはめられていたが連鎖の認められていない 9 遺伝子座の連鎖を新たに検出した。総合的に、本研究で作成した染色体地図により、ラット染色体約 2400 cMのうち約 3 分の 1 が網羅されていると推定された。

これまでに報告されているラットの幾つかの染色体地図では、第 5, 7, および 8 染色体上に 2 つ以上の分離した連鎖群が存在し、全域を網羅する連鎖地図は作成されていない。本研究では、これらの染色体における分離した 2 つの連鎖群を単一の連鎖群に統一することを含めて、より詳細で広域な染色体地図が作成された。また、第 9 染色体では最初の連鎖地図の作成となった。したがって、本研究によりラット染色体地図の作成は大きく前進したと考えられる。

このようなラットにおける連鎖解析による遺伝子マッピングの結

果は、個々の染色体部位における各遺伝子座の構成の動物種間での比較を可能にした。ヒト・マウスおよびラットにおける染色体の遺伝子構成の比較から、いくつかの染色体部位で遺伝子座の構成が種間で保存されていることが明かとなった。特に、第 5, 7, 8, 9, および 13 染色体の広い範囲の新たな連鎖群を構築することにより、それぞれ連鎖群に対応するヒトやマウス染色体の領域が明らかとなった。また、本研究の結果により、ラット染色体とヒトやマウス染色体領域との間の形態的な相同性が連鎖地図の上でも確認された (Levan et al., 1991)。このような染色体の相同性は、ラットにおける疾患原因遺伝子等の各種遺伝子の解析に利用できることが期待される。例えば、肥満症ラットの疾患原因遺伝子 (FA 遺伝子) はラット第 5 染色体上に位置付けられ、マウスの肥満を伴う糖尿病の *db* 遺伝子との相同性が推測されている (Truett et al., 1991)。また免疫機構の欠如を伴う無毛症遺伝子 (*RNU* 遺伝子) でも、マウス *nu* 遺伝子と対応するラット第 10 染色体上に位置付けられている (Cash et al., 1993)。したがって、多くの遺伝標識の連鎖と染色体の相同性に関する知見は、疾患原因遺伝子の特定にとって極めて有用であると考えられる。

以下に個々の染色体に関して考察する。

## 1) 第 1 染色体

ラット第 1 染色体の連鎖地図は、第 I 連鎖群としてラットの連鎖群としては初期に構成された (Castle and King, 1944)。第 I 連鎖群には毛色遺伝子の *C* 遺伝子座があり、他の遺伝子座を含む多くの連鎖が見つかった (Matsumoto et al., 1984; van Zutphen et al., 1985)。その後、ヘモグロビン  $\beta$  鎖 (*HBB*) 遺伝子がマッピングされたことから、第 I 連鎖群は第 1 染色体に当てはめられた (Soares et

al., 1985)。最近ではマイクロサテライト遺伝標識を用いた 16 遺伝子座からなる大きな連鎖地図が報告されている (Hilbert et al., 1991; Serikawa et al., 1992)。

本研究で検討したラット第 1 染色体上の 7 つの遺伝子の連鎖を図 17 に示した。図 17 のような広い範囲の連鎖地図が作成され、その結果、*CYP2A3*, *NRAS2* および *TRP53L4* 遺伝子座の染色体上の位置が新たに明らかとなった。

## 2) 第 2 染色体

これまで特定の連鎖群が当てはめられていなかった第 2 染色体には、最近 9 遺伝子座からなる比較的大きな連鎖地図が当てはめられたが、それにはこれまで報告されている連鎖群は含まれていなかった (Hilbert et al., 1991; Serikawa et al., 1992)。

本研究で検討したラット第 2 染色体上の 8 つの遺伝子の連鎖を図 18 に示した。本研究では *FGG* と *CPB* との間の連鎖は検出されなかった ( $c2=2.9649$ ) が、組換え率 ( $38.6 \pm 5.5 \%$ ) はこれまでの報告と一致するものであり (Serikawa et al., 1992)、表 10 および図 18 に併せて示した。また、本研究により、カタラーゼの電気泳動でのゲル易動度を支配する *CSI* 遺伝子座を含む第 XIII 連鎖群が第 2 染色体上にあることが新たに明らかとなった。このことから *CSI* 遺伝子座はカタラーゼをコードする第 3 染色体上の *CAT* 遺伝子と異なることが明らかとなり、*CSI* 遺伝子座はカタラーゼのゲル易動度を変化させるような修飾遺伝子であると考えられた。

## 3) 第 3 染色体

*CAT* と *SVP1* 遺伝子座は第 IV 連鎖群を構成し、既に第 3 染色体

に当てはめられている (Serikawa et al., 1992)。本研究では有為な連鎖は検出できなかった *CAT* と *SVP1* 遺伝子の組換え率は、Serikawa らの報告では 40.7 % である。これらの結果を総合すると、以下のような遺伝子構成が考えられる: *SVS4/SVP1-A-CAT-ACP2* (図 19)。ここで新たに *ACP2* 遺伝子座の染色体上の位置が明らかとなった。*ACP2* 遺伝子座は、*PEPC* 遺伝子座との連鎖から、*CAT* と *SVP1* とは異なる第 X 連鎖群に属していると考えられていたが (Bender et al., 1985)、一方で体細胞融合系を用いて第 3 染色体に当てはめられていた (Yasue et al., 1991)。本研究により、*ACP2* は *CAT* に連鎖し、第 3 染色体上に位置することが確かめられた。

第一章に記述したように、*SVS4* 遺伝子座は精囊分泌タンパクをコードする遺伝子のイントロン部分の多型性であり、一方、生化学的遺伝子座である *SVP1* 遺伝子座は精囊分泌タンパクのゲル移動度すなわちエクソン部分の多型性である。しかし、その対立遺伝子の系統間分布は極めて似ており、連鎖解析の結果、組換えが認められないことから、*SVS4* と *SVP1* 遺伝子が同一遺伝子である可能性が高いと思われた。

#### 4) 第 4 染色体

第 4 染色体上の 4 遺伝子座について連鎖試験を行ったが、2 つのトリプシン遺伝子座の間以外には連鎖は認められなかった (図 20)。

#### 5) 第 5 染色体

ラット第 5 染色体の連鎖地図は、当初第 II 連鎖群として 6 つの遺伝子、*AN*, *B*, *CUI*, *IN*, *S*, および *SH*, から構成された (Robinson, 1979)。次に、*ACO1* と *MUP1* 遺伝子座の *B* 遺伝子座との連鎖が検出され、これに加えられた (Nikaido et al., 1982; Cramer et

al., 1986; Stolc, 1987)。その後、この第 II 連鎖群は第 5 染色体に当てはめられた (Levan et al., 1990)。最近、4 遺伝子、*AHD2*, *GLUT1*, *PGD*, および *PND*, を含む第 5 染色体上の他の連鎖群が報告されたが (Hilbert et al., 1991; Serikawa et al., 1992)、2 つの連鎖群の関係は不明であった。

本研究で検討したラット第 5 染色体上の 7 つの遺伝子の連鎖地図を図 21 に示した。これまでの報告では *ACO1* と *MUP1* の組換え率は  $13 \pm 4\%$  である (Stolc, 1987)。本研究では *ACO1* と *MUP1* は直接連鎖を検討していないが、*A8* と *ACO-1* および *A8* と *MUP-1* との組換え率を考慮すると 3 つの遺伝子構成は *A8-ACO1-MUP1* となる。本研究における *JUN* と *MUP1* または *GLUT1* 遺伝子との間の連鎖により、上記の 2 つの連鎖群は一つの大きな連鎖群に結合し、ラット第 5 染色体の大半を占めると考えられる広い範囲の連鎖地図が作成された。また、*A8*, *ELA2* および *JUN* 遺伝子が新たに染色体上に位置付けられた。

本研究の結果は、ラット第 5 染色体とマウス第 4 染色体との間に広範囲な遺伝子構成の保存を示している (表 10 および図 21)。ラット第 5 染色体はラット染色体の中で一番多くの遺伝子がマッピングされている (Levan et al., 1992)。ラット第 5 染色体におけるこれまでの研究でもマウス第 4 染色体との間に連鎖の保存が確認されており (Nikaido et al., 1982; Cramer et al., 1986; Stolc, 1987; Truett et al., 1991; Serikawa et al., 1992)、ラット第 5 染色体上の遺伝子に対応する多くのマウス遺伝子がマウス第 4 染色体上に位置することが知られている (Szpirer et al., 1990; Levan et al., 1991; Abbott et al., 1991)。例えば、ラットの *B* (brown), *IFA* (Interferron a), *AN* (anemia), および *FA* (fatty) 遺伝子に対応するマウス遺伝子がマウス第 4 染色体の対応する部位に位置付けられてい



る。本研究における 7 遺伝子間の連鎖も基本的にマウスのものによく一致し、ラット第 5 染色体とマウス第 4 染色体との間の相同性を示している (Ceci et al., 1989; Bahary et al., 1991; Greenfield et al., 1992)。

マウスでは第 15 染色体に位置付けられているエラストーゼ遺伝子 (*Ela-1*; Honey et al., 1984a)の他に 2 つのエラストーゼ遺伝子の存在が報告されている。一つはエラストーゼ 1 関連遺伝子 (*Ela1rs1*) で、第 4 染色体に位置付けられている (Harper et al., 1984; Elliot and Yen, 1991)。本研究の結果は、ラット *ELA2* 遺伝子座の染色体上の位置がマウス *Ela1rs1* 遺伝子座に対応していることを示し、これらの遺伝子が同一である可能性を示している。

#### 5) 第 7 染色体

本研究で検討したラット第 7 染色体上の 6 つの遺伝子座の連鎖地図を図 22 に示した。これまで、第 7 染色体の 2 つの独立した連鎖群、一つは *IGF1* および *MYC* 遺伝子座を含むグループ、もう一つは *ELA1* および *PERF* 遺伝子座を含むグループが報告されている (Serikawa et al., 1992)。本研究ではこれらの第 7 染色体の 2 つの独立した連鎖群を *CYP2D2* と *MYC* または *ELA1* の間の連鎖により一つの大きな連鎖群に統一した。また、新たに *LALBA* および *CYP2D2* 遺伝子を第 7 染色体に位置付けた。この結果、ラット第 7 染色体の大半を占める連鎖群が構成された。

これまでの研究は、マウス第 15 染色体上の多くの遺伝子がラット第 7 染色体に位置付けられることを示している (表 11 および図 22)。本研究で検出した第 7 染色体上の 4 つの遺伝子もマウス第 15 染色体上に位置付けられており、その遺伝子座の構成もよく一致してい



る。しかし、幾かの遺伝子座がこのような対応を持たず、異なる染色体に位置している。例えば、*IGF1* 遺伝子座はマウス第 10 染色体上に位置付けられている (Taylor and Grieco, 1991)。また、マウス第 15 染色体はヒトの 4 つの染色体領域 (第 5, 8, 22, および 12 染色体) と相同な領域からなっており、後半の 3 つの領域はラットの第 7 染色体においても同様の構成となっている (表 11)。前述の *IGF1* 遺伝子座を含むグループは、*ELAI* 遺伝子座を含むグループと同一の、ヒト第 12 染色体上に位置している。これらの知見は、ラット、マウス、ヒトの各染色体の形成過程を考察する上で大変興味深い。

#### 6) 第 8 染色体

ラットの第 VII 連鎖群は 3 つの遺伝子座、*LX*, *ES6*, および *RT5* からなっている (Pravenec et al, 1987)。本研究の結果、*ES6* と第 8 染色体上に位置する *NCAM* 遺伝子座 (Yasue et al., 1992) との連鎖が検出され、第 VII 連鎖群は第 8 染色体に当てはめられた。

ラット第 8 染色体上には 9 つの遺伝子座からなる 3 つの連鎖群が報告されている (Serikawa et al., 1992)。ラット第 8 染色体は形態的および遺伝的にマウス第 9 染色体に相同であり、幾つかの遺伝子が両方の染色体上に位置付けられている (Levan et al, 1991)。しかし、それらの遺伝子のラット第 8 染色体上の位置関係は明らかにされておらず、遺伝子座の構成も比較されてはいない。表 12 および図 23 にラット第 8 染色体上の遺伝子に対応するヒトおよびマウス遺伝子の染色体上の位置を示した。本研究の連鎖解析の結果から、これらのラット第 8 染色体の遺伝子座の構成がマウス第 9 染色体およびヒト第 11 染色体との間でよく保存されていることが明らかとなった。

一方、アセチルエステラーゼの一つである *ES6* (EC 3.1.1.6;

Simmon et al., 1985) 遺伝子は他の 12 のエステラーゼ遺伝子が形成している遺伝子クラスター (Hedrich and Deimling, 1987) には属さず、酵素学的にマウスの *Es-17* (Otto and von Deimling, 1983) およびヒトの *ES-4A* (Bender et al., 1982) に対応している。マウス *Es-17* およびヒト *ES-4A* 遺伝子座はともに *NCAM* および *APOC3* 遺伝子座と連鎖していることから、ラットの *ES6*、マウスの *Es-17*、およびヒトの *ES-4A* は相同な遺伝子座であることが示唆された。

#### 7) 第 9 染色体

第 9 染色体には *CRYG*, *GLS*, *SPAT*, および *INHA* 遺伝子座などが当てはめられているが (Donner et al., 1985; Mock et al., 1989; Yasue et al., 1991; Serikawa et al., 1992)、これまでは連鎖は検出されてはいなかった。本研究により初めて第 9 染色体上の連鎖地図が作成された。またマウス *Aox* 遺伝子座と同様に、ラットにおける新たな生化学的遺伝子座であるアルデヒド脱水素酵素 (*AOX1* および *AOX2*) は *GLS* や *CRYG* 遺伝子座との連鎖が検出された。したがって、図 24 および表 13 に示したように、この連鎖群はマウス第 8 染色体およびヒト第 2 染色体と相同であることが確認された。

#### 8) 第 10 染色体

本研究で検討したラット第 10 染色体上の 4 つの遺伝子座の連鎖を図 25 に示した。ラット第 10 染色体はマウス第 11 染色体と高い相同性があり (Levan et al. 1991)、*IL3*, *NGFR*, および *GH* 遺伝子座はマウス第 11 染色体に位置付けられている (Buchberg et al., 1989; Elliott et al., 1990)。これらの知見は、ラット第 10 染色体とマウス第 11 染色体との間に遺伝子座の構成が保存されていることを示して

いる。

#### 9) 第 13 染色体

本研究で検討したラット第 13 染色体上の 3 つの遺伝子の連鎖を図 26 に示した。第 X 連鎖群は当初第 9 染色体に当てはめられていたが、体細胞融合系や *In situ* hybridization 法を用いた遺伝子マッピングから、この連鎖群に属する大半の遺伝子が現在第 13 染色体に当てはめられている (Cramer et al., 1986; )。本研究では新たに *ATPIA2* 遺伝子の連鎖を検出し、体細胞融合系を用いて既に第 13 染色体に当てはめられていた *ATPIA2* 遺伝子座の連鎖地図上の位置を決定した。

一方、染色体の分染パターンからマウス第 1 染色体の先端部とラット第 13 染色体が類似していることが知られている (Levan et al., 1991)。本研究において新たに連鎖を検出した *ATPIA2* 遺伝子座のマウスにおける染色体上の位置は、ラット第 13 染色体上の他の遺伝子同様に、第 1 染色体上にある (表 14)。したがって、本研究の結果からも、ラット第 13 染色体とマウス第 1 染色体との相同性が確認された。

#### 10) その他の染色体

第 14 および 19 染色体上のそれぞれ 2 遺伝子座については、異なる戻し交雑世代を用いたため連鎖は検討できなかった (図 27)。また、第 20 染色体上の *MHC1* 遺伝子座は他のいずれの遺伝子座とも連鎖が検出されなかった。

## 第五節 要 約

第一章に記述した新たな DNA 遺伝標識に加えて、毛色遺伝子座、生化学的遺伝子座および RFLP 遺伝子座等、計 64 遺伝子座について、3 組の交配実験系を用いて連鎖解析を行った。その結果、第 1・2・3・5・7・8・9・10 および 13 染色体上の 9 つの連鎖地図が作成された。また、本研究により、既に報告されている 4 RFLP および 4 生化学的遺伝子座について、その染色体上の位置が明らかとなった。本研究で得られた、連鎖による遺伝子マッピングの結果は、Levan らが概説した 214 のラット遺伝子における染色体マッピングの知見を連鎖により関連付け、様々な遺伝学的解析や考察への適用を可能にし、個々の染色体部位における遺伝子構成の比較を可能にした。特に、本研究の結果は第 2・5・7・8 および 10 染色体の遺伝子構成を明らかにすることにより、広い範囲の連鎖群を新たに作成した。

これらの結果、大半のラット染色体において連鎖地図が作成され、ヒト・マウスおよびラットにおける染色体の遺伝子構成の比較から、いくつかの染色体部位において遺伝子の構成が種間で保存されていることが明らかとなった。特に、ラット第 1・3・5・8・9 および 10 染色体はそれぞれマウス第 7・2・4・9・1 および 11 染色体に広い範囲で遺伝子構成が保存されていることが明らかとなった。このような染色体部位の相同性はラットにおける疾患原因遺伝子を含む各種遺伝子の解析に利用できることが期待され、遺伝子の機能や各種疾患の遺伝子レベルでの解明を可能にするものと考えられた。一方、多重遺伝子族に属するいくつかの遺伝子について染色体上の位置を検討したところ、ヒトまたはマウスとの比較から対応する遺伝子は対応する染色体位置に存在することが

明かとなった。

このような反復配列を用いた遺伝標識は、多くのラット染色体における連鎖地図を作成することに有効であることが示されるとともに、今後、そのような多くの有効な遺伝標識からなる連鎖地図は、遺伝子マッピングを含めた遺伝学的解析を可能にするものとして利用できることが期待された。



Table 7. Methods for typing of biochemical loci.

Locus	Sample	Gel	Buffer	Substrate	Reference
<i>ACO1</i>	kidney	Titan-III Lipo	Phosphate pH 7.0	<i>cis</i> -aconitate	Adams et al. 1984
<i>ACP2</i>	testis	Titan-III Lipo	Tris-Histidine pH 5.9	$\alpha$ -naphtyl phosphate	Bender et al. 1985
<i>AHD2</i>	liver	Titan-III Lipo	Tris-Glycine pH 8.6	acetaldehyde	Adams et al. 1984
<i>AHDC</i>	liver	Titan-III Lipo	Tris-Glycine pH 8.6	acetaldehyde	Adams et al. 1984
<i>AKP1</i>	kidney	Titan-III Lipo	EBT pH 7.8	$\beta$ -naphtyl acid phosphate	Adams et al. 1984
<i>AOX1</i>	liver	Titan-III Lipo	Tris-Glycine pH 8.6	benzaldehyde	
<i>AOX2</i>	harderian gland	8 % PAGE	Tris-Glycine pH 8.6	acetaldehyde	
<i>CS1</i>	red blood cell	Titan-III Lipo	EBT pH 8.6	hydrogen peroxide	Yamada et al. 1981
<i>ES6</i>	testis	8 % PAGE	Tris-Glycine pH 8.6	5-bromo indoxyl acetate	Bender et al. 1979
<i>ES8</i>	testis	8 % PAGE	Tris-Glycine pH 8.6	$\alpha$ -naphtyl butyrate	Matsumoto et al. 1980
<i>ES19</i>	testis	8 % PAGE	Tris-Glycine pH 8.6	$\alpha$ -naphtyl butyrate	Tachibana et al. 1992
<i>FH1</i>	kidney	8 % PAGE	Tris-Glycine pH 8.6	fumalic acid	Cramer et al. 1985
<i>MUP1</i>	urine	10 % PAGE	EBT pH 8.6	Coomassie blue	Nikaido et al. 1982
<i>SWP1</i>	seminal fluid	8 % PAGE	Tris-Glycine pH 8.6	Coomassie blue	Gasser 1972



Table 8. Probes used for detecting RFLPs

Loci	Probes	Clones	Fragments	References for probe	References for locus
<i>A403</i>	arbitral sequence	$\alpha 403$	<i>EcoRI</i> 733 bp	Takahashi et al. 1992	Takahashi et al. 1992
<i>GH</i>	growth hormone	pMGH	<i>PstI</i> 0.8 kbp	Palmiter et al. 1982	Kunieda et al. 1988
<i>NRAS1</i>	N-ras	pP485-4	<i>PvuII</i> 0.9 kbp	Eva et al. 1983	Kunieda et al. 1990a
<i>NRAS2</i>	N-ras	pP485-4	<i>PvuII</i> 0.9 kbp	Eva et al. 1983	Kunieda et al. 1990a
<i>TRP53L1</i>	p53	pSP65	<i>EcoRI-BamHI</i> 2 kbp	Lamb and Crawford 1986	Kunieda et al. 1990b
<i>TRP53L4</i>	p53	pSP65	<i>EcoRI-BamHI</i> 2 kbp	Lamb and Crawford 1986	Kunieda et al. 1990b

Table 9. Chromosomal location and primer sequence of microsatellite loci. Primer sequences are given with the forward primer listed first and the reverse primer second. Both are shown in the 5' to 3' orientation

Locus	Chromosome	Primer sequences	References
<i>A8</i>	5	TTGGTGGTCTGCATCTATTG CTTAAGGCAATATAGGAACTAC	Hilbert et al. 1991
<i>ABP</i>	10	CGCTGGGAGGAAAGAGAG AGGCTTGCACTCTGTGTTTG	Hilbert et al. 1991
<i>CAT</i>	3	CTTATGTTACCTCACAGCCTGG GGTGGGCCATCTTTATAATC	Hilbert et al. 1991
<i>D3</i>	6	GAAATCTGAGTCGGATGGTAG CAGCAAACTGCCAGTCAGTG	Hilbert et al. 1991
<i>E5</i>	7	GGACTCTCGTCTCCGATTTC GCGATTGGGTGAGTTCTAC	Hilbert et al. 1991
<i>IGF1</i>	7	GCCAGCTGGTATTATTGGGA CAGTATGGGAGGCACACT	Serikawa et al. 1992
<i>KAL</i>	1	TCACTCTCATTAACTAGGAATGC ACTGTTGGGTAACAAAGTTATGG	Hilbert et al. 1991
<i>MRCOX2</i>	11	CACCTTGAGGCCATTCTGAA CCTTCTCTTTGTGAAAAATAAAGTC	Hilbert et al. 1991
<i>MT1PB</i>	2	GGTCTCTATGGGTACCTGCA TGCTTCCCTCACAAATTCA	Serikawa et al. 1992
<i>NGFR</i>	10	ACCCCAATCCAACACTATAC GCAGGATCTAGTCTCAGCCC	Hilbert et al. 1991
<i>PERF</i>	7	AGCCTCAATCTGCCTAGCTC TGACTCTTGACAATGGCACA	Serikawa et al. 1992
<i>PKATA</i>	8	GGTATGAGATCAATGCTGCC GGTGCAATTGGACATTGTAG	Hilbert et al. 1991

Table 9. (Continued)

Locus	Chromosome	Primer sequences	References
PKC	1	AGAACCCCTTCACTGCTCACC AGAAAGTCCCAGAAAGTGGC	Hilbert et al. 1991
PRLR	2	CTCACGTGGTGATATCTATCTTTC AAGCATGAAGCAAGTTGGAG	Serikawa et al. 1992

Table 10. Genes on rat chromosome 5 and their location  
in human and mouse.

Locus (rat symbol)	Chromosomal location		
	Human	Mouse <sup>a</sup>	Rat <sup>b</sup>
Random cloned microsatellite sequence (A8)	-	-	5 (0)
Moloney sarcoma oncogene ( <i>MOS</i> )	8q11	4 (0)	5
Glycoprotein 4- $\beta$ -galactosyl transferase ( <i>GGTB2</i> )	9p21-22	4 (19)	5
Aldolase B ( <i>ALDOB</i> )	9q21.2-3	-	5
Aconitase-1 ( <i>ACO1</i> )	9q22-32	4 (21)	5 (15.8)
Male urinary protein-1 ( <i>MUP1</i> )	-	4 (28)	5 (32.9)
Orosomucoid ( <i>ORM</i> )	9q32	4 (29)	5
Anemia ( <i>AN</i> )	-	4 (36)	5
Brown ( <i>B</i> )	9p23	4 (38)	5
Interferon $\alpha$ ( <i>IFA</i> )	9p22	4 (43)	5
Avian sarcoma virus oncogene homolog ( <i>JUN</i> )	1p31-32	4 (44)	5 (60.5)
Phosphoglucomutase-1 ( <i>PGM1</i> )	1p22.1	4 (47)	5
Fatty ( <i>FA</i> )	-	4 (48)	5
DNA segment from MMU4 ( <i>D4RPI</i> )	-	4 (51)	5
Blain glucose transporter ( <i>GLUT1</i> )	1p31	4 (52)	5 (77.6)
Cytochrome P450 IVA1 ( <i>CYP4A1</i> )	1p	4 (56)	5 (77.6)
Lymphocyte tyrosine kinase 1 ( <i>LCK1</i> )	1p32-35	4 (59)	5
Adenylate kinase 2 ( <i>AK2</i> )	1p34	-	5
Elastase-2 ( <i>ELA2</i> )	-	4 (65)?	5 (91.0)
$\alpha$ -L-fucosidase-1 ( <i>FUCA</i> )	1p34-35	4 (66)	5
Moloney murine leukemia virus integration site ( <i>DSI</i> )	-	4 (68)	5
Aldehyde dehydrogenase 2 ( <i>AHD2</i> )	12q24.2	4 (69)	5 (107.7)
Enolase 1 ( <i>ENO1</i> )	1p36	4 (75)	5
Pronatriodilatin ( <i>PND</i> )	1p36	4 (76)	5 (121.7)
6-phosphogluconate dehydrogenase ( <i>GPD</i> )	1p36	4 (77)	5
Glucose dehydrogenase ( <i>GDH</i> )	1p36	-	5

a: Chromosomal location of candidate genes of mouse homologue with centimorgan from centromere.

b: Chromosomal location of the loci with recombination frequency from the *ACO1* locus

Table 11. Genes on rat chromosome 7 and their location  
in human and mouse.

Locus (rat symbol)	Chromosomal location		
	Human	Mouse <sup>a</sup>	Rat <sup>b</sup>
Phenylalanine hydroxylase ( <i>PAH</i> )	12q22-q24.1	10 (53)	7
Insulin-like growth factor I ( <i>IGF1</i> )	12q23	10 (54)	7 (0)
Peptidase B ( <i>PEP2</i> )	12q21	10 (61)	7
Random cloned microsatellite sequence ( <i>E5</i> )	-	-	7
Plasmaecytoma variant translation-1 ( <i>PVT1</i> )	8q24	15 (27)	7
c-myc oncogene ( <i>MYC</i> )	8q24	15 (27)	7 (40)
Thyroglobulin ( <i>TG</i> )	8q24	15 (29)	7
Platelet-derived growth factor $\beta$ ( <i>PDGFB SIS</i> )	22q12.3-q13.1	15 (37)	7
Cytochrome P450 IID2 ( <i>CYP2D2</i> )	22q11.2-qter	15 (40)	7 (60.4)
Acrosin ( <i>ACR</i> )	22q13-qter	15 (45)	7
Elastase I ( <i>ELA1</i> )	12	15 (46)	7 (78.9)
Peripherin ( <i>PERF</i> )	12q12-q13	15	7 (78.9)
$\alpha$ -lactalbumin ( <i>LALBA</i> )	12q13	-	7 (84.5)
Retinoic acid receptor $\gamma$ ( <i>RARG</i> )	12q13	15 (58)	7
Transcription factor SP1 ( <i>SPI</i> )	12q	15 (58)	7

a: Chromosomal location of candidate genes of mouse homologue with centimorgan from centromere.

b: Chromosomal location of the loci with recombination frequency from the *IGF1* locus

Table 12. Genes on rat chromosome 8 and their location  
in human and mouse.

Locus (rat symbol)	Chromosomal location		
	Human	Mouse <sup>a</sup>	Rat <sup>b</sup>
Tumor progression 1 ( <i>TPL1</i> )		9 (14)	8
Esterase 6 ( <i>ES6</i> )	11q23	9 (22)	8 (0)
Polydactyly-luxate syndrome ( <i>LX</i> )	-	9 (23)	8
Thymus cell antigen 1 ( <i>THY1</i> )	11q22-23	9 (26)	8 (12.3)
Apolipoprotein C-III ( <i>APOC3</i> )	11q23	9 (27)	8 (21.1)
Neural Cell Adhesion Molecule ( <i>NCAM</i> )	11q23	9 (28)	8 (25.3)
Hexose aminidase A ( <i>HEXA</i> )	15q23-24	9 (29)	8
Cytochrome P450 C6 ( <i>CYP1A1</i> )	15q22-24	9 (31)	8 (29.5)
Mannose phosphate isomerase ( <i>MPI</i> )	15q22	9 (32)	8
Glutathion S-transferase $\alpha$ -type ( <i>GSTZA</i> )	6q12.2	9 (43)	8
Malic Enzyme ( <i>ME1</i> )	6q12	9 (49)	8
Cellular retinoic acid binding protein II ( <i>CRBP2</i> )	3p11-ter	9 (51)	8 (39.7)
Transferrin ( <i>TF</i> )	3q21-26.1	9 (54)	8
Propionyl Co A carboxylase $\beta$ ( <i>PCCB</i> )	3q21-22	-	8
Acylpeptide hydrolase ( <i>APEH</i> )	3p21	9 (58)	8
$\beta$ -Galactosidase ( <i>GLBI</i> )	3p22-23	9 (64)	8
Peroxisomal 3-ketoacyl Co A thiolase ( <i>PKATA</i> )	3p22-23	-	8 (60.8)

a: Chromosomal location of candidate genes of mouse homologue with centimorgan from centromere

b: Chromosomal location with recombination frequency from the *ES6* locus.



Table 13. Genes on rat chromosome 9 and their location  
in human and mouse.

Locus (rat symbol)	Chromosomal location		
	Human	Mouse <sup>a</sup>	Rat <sup>b</sup>
Complement component 3 ( <i>C3</i> )	19p13	17 (32)	9
Aldehyde oxidase 1 ( <i>AOX1</i> )	-	1 (8)	9 (0)
Aldehyde oxidase 2 ( <i>AOX2</i> )	-	1 (8)	9 (18.5)
Glutaminase ( <i>GLS</i> )	2q32-34	1 (13)	9 (32.0)
Isocitrate dehydrogenase ( <i>IDH</i> )	2q32-ter	1 (15)	9
$\gamma$ -crystallin ( <i>CRYG</i> )	2q33-35	1 (17)	9 (38.3)
Transition protein 1 ( <i>TNP1</i> )	2q35-36	1 (24)	9
Inhibin a ( <i>INHA</i> )	2q33-ter	1 (27)	9
Tumor protein p53 related sequence ( <i>TRP53LI</i> )	-	-	9 (59.4)
Glutathione-S-transferase $\alpha$ ( <i>GST2B</i> )	-	1	9
Serine pyruvate aminotransferase ( <i>SPAT</i> )	2q36-37	-	9

a: Chromosomal location of candidate genes of mouse homologue  
with centimorgan from centromere

b: Chromosomal location of the loci with recombination  
frequency from the *AOX1* locus

Table 14. Genes on rat chromosome 13 and their location  
in human and mouse.

Locus (rat symbol)	Chromosomal location		
	Human	Mouse <sup>a</sup>	Rat <sup>b</sup>
C4 binding protein $\alpha$ ( <i>C4BPA</i> )	1q32	1 (53)	13
C4 binding protein $\beta$ ( <i>C4BPB</i> )	1q32	1 (53)	13
Renin ( <i>REN</i> )	1q32	1 (55)	13
6-phosphoflucto-2-kinase/ fluctose-2,6-bisphosphatase ( <i>PFKFB2</i> )	1q31	-	13
Peptidase C ( <i>PEPC</i> )	1q25	1 (56)	13
Leucocyte common antigen ( <i>LCA</i> )	1q31-32	1 (59)	13
Fumarate hydratase ( <i>FH1</i> )	1q42.1	-	13 (0)
Cell surface alloantigen ( <i>RT3</i> )	-	-	13
Coagulation factor V ( <i>F5</i> )	1q21-25	1 (72)	13
Kidney endothelial antigen ( <i>EAG1</i> )	1q22-25	1 (72)	13
Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> ATPase $\alpha$ -2 ( <i>ATP1A2</i> )	1q21-23	1 (79)	13 (7.0)
Aldehyde dehydrogenase c ( <i>AHDC</i> )	-	-	13 (21.0)
Hepatocyte antigen ( <i>A39</i> )	-	-	13
Breakage region for raf-rearrangement ( <i>RAFAS</i> )	-	-	13

a: Chromosomal location of candidate genes of mouse homologue  
with centimorgan from centromere

b: Chromosomal location of the loci with recombination  
frequency from the *FH1* locus

<i>PKC</i>	□	■	■	□	□	■	■	■	□	□	□
<i>TRP53L4</i>	□	■	□	□	□	■	■	■	■	■	□
<i>CYP2A3</i>	□	■	□	□	□	■	■	□	□	□	□
<i>CYP2B2</i>	□	■	□	■	□	■	■	■	□	□	□
<i>KAL</i>	□	■	□	■	■	□	■	□	■	□	□
<i>C</i>	□	■	□	■	■	■	□	■	■	□	■
<i>NRAS2</i>	□	■	■	■	■	□	□	□	■	■	□
Total	17	15	3	1	3	2	7	5	1	2	1

Figure 9. Segregation of seven loci on rat chromosome 1 in 57 [(WKS x IS)F1 x WKS] backcross progeny. Shaded boxes represent the homozygous WKS type and open boxes represent the heterozygous F1 type. The number of offspring inheriting each type of chromosome is listed at the bottom of each column.

A

<i>CPB</i>	□	■	■	□	□	□	■	□	□	■
<i>PRLR</i>	□	■	□	■	■	□	■	□	□	□
<i>MLVI2</i>	□	■	□	□	□	□	■	□	□	□
<i>MT1PB</i>	□	■	□	□	□	■	■	□	□	□
<i>A403</i>	□	■	□	■	□	■	□	■	□	□
<i>CSI</i>	□	■	□	■	□	■	□	■	■	■
Total	13	12	5	1	1	4	4	3	2	3

B

<i>ATPIA1</i>	□	■	■	■	□
<i>FGG</i>	□	■	□	■	□
<i>CPB</i>	□	■	□	□	■
Total	14	19	2	12	10

Figure 10. A: Segregation of six loci on rat chromosome 2 in 48 [(WKS x IS)F1 x WKS] backcross progeny.

Shaded boxes represent the homozygous WKS type and open boxes represent the heterozygous F1 type. B:

Segregation of three loci on rat chromosome 2 in 57 [(BN x TF)F1 x TF] backcross progeny. Shaded boxes represent the homozygous TF type and open boxes represent the heterozygous F1 type. The number of offspring inheriting each type of chromosome is listed at the bottom of each column.

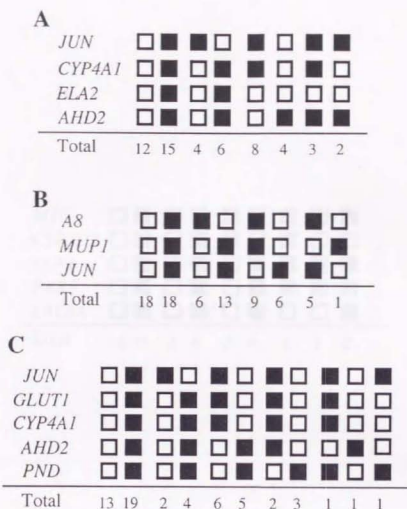


Figure 11. A: Segregation of four loci on rat chromosome 5 in 54 [(WKS x IS)F1 x WKS] backcross progeny. Shaded boxes represent the homozygous WKS type and open boxes represent the heterozygous F1 type. B: Segregation of three loci on rat chromosome 5 in 76 [(WKS x IS)F1 x WKS] backcross progeny. Shaded boxes represent the homozygous WKS type and open boxes represent the heterozygous F1 type. C: Segregation of five loci on rat chromosome 5 in 57 [(BN x TF)F1 x TF] backcross progeny. Shaded boxes represent the homozygous TF type and open boxes represent the heterozygous F1 type. The number of offspring inheriting each type of chromosome is listed at the bottom of each column.

<i>MYC</i>	□	■	■	□	■	□	■	□	■
<i>CYP2D2</i>	□	■	□	■	■	□	■	□	□
<i>ELA1</i>	□	■	□	□	□	■	■	■	■
<i>PERF</i>	□	■	□	■	□	■	■	■	■
<i>LALBA</i>	□	■	□	■	□	■	□	□	■
Total	18	15	3	6	3	4	2	1	2

Figure 12. Segregation of five loci on rat chromosome 7 in 54 [(WKS x IS)F1 x WKS] backcross progeny.

Shaded boxes represent the homozygous WKS type and open boxes represent the heterozygous F1 type. The number of offspring inheriting each type of chromosome is listed at the bottom of each column.



**A**

<i>ES6</i>	□	■	■	□	□	■	■	□	□	□	■
<i>APOC3</i>	□	■	□	■	□	■	■	□	■	■	□
<i>NCAM</i>	□	■	□	■	■	■	■	□	■	■	■
<i>CYP11A1</i>	□	■	□	■	■	□	■	■	□	□	■
<i>PKATA</i>	□	■	□	■	■	□	■	■	□	□	■
Total	10	14	2	3	1	1	9	5	1	1	1

**B**

<i>ES6</i>	□	■	■	□	■	■
<i>THY1</i>	□	■	□	■	■	□
<i>APOC3</i>	□	■	□	■	□	■
Total	25	21	2	4	4	1

Figure 13. A: Segregation of five loci on rat chromosome 8 in 48 [(WKS x IS)F1 x WKS] backcross progeny. Shaded boxes represent the homozygous WKS type and open boxes represent the heterozygous F1 type. B: Segregation of three loci on rat chromosome 8 in 57 [(WKS x IS)F1 x WKS] backcross progeny. The number of offspring inheriting each type of chromosome is listed at the bottom of each column.

**A**

<i>AOX2</i>	□	■	■	□	■	■	□	■	■	■	□
<i>AOX1</i>	□	■	□	■	■	■	□	□	□	■	■
<i>GLS</i>	□	■	■	□	■	■	■	■	■	■	■
<i>CRYG</i>	□	■	□	■	□	□	■	■	■	■	□

Total	14	24	3	2	2	1	1	3	1	2	1
-------	----	----	---	---	---	---	---	---	---	---	---

**B**

<i>TRP53L1</i>	□	■	■	□	□	■	□	□
<i>GLS</i>	□	■	□	■	□	■	□	■
<i>CRYG</i>	□	■	□	■	■	■	■	■
<i>AOX1</i>	□	■	□	■	■	□	■	□

Total	16	22	4	7	2	2	3	1
-------	----	----	---	---	---	---	---	---

Figure 14. A: Segregation of four loci on rat chromosome 9 in 54 [(WKS x IS)F1 x WKS] backcross progeny. Shaded boxes represent the homozygous WKS type and open boxes represent the heterozygous F1 type. B: Segregation of four loci on rat chromosome 9 in 57 [(WKS x IS)F1 x WKS] backcross progeny. Shaded boxes represent the homozygous WKS type and open boxes represent the heterozygous F1 type. The number of offspring inheriting each type of chromosome is listed at the bottom of each column.

A

<i>NGFR</i>	□	■	■	□	■	■	□	□
<i>ABP</i>	□	■	□	□	■	■	□	■
<i>IL3</i>	□	■	□	□	□	■	□	□
Total	18	25	4	5	3	1	1	

Figure 15. Segregation of three loci on rat chromosome 10 in 57 [(BN x TF)F1 x TF] backcross progeny. Shaded boxes represent the homozygous TF type and open boxes represent the heterozygous F1 type. The number of offspring inheriting each type of chromosome is listed at the bottom of each column.

<i>FH1</i>	□	■	■	■	□	□	■
<i>ATPIA2</i>	□	■	□	■	□	■	□
<i>AHDC</i>	□	■	□	□	■	□	■
Total	22	25	2	4	2	1	1

Figure 16. Segregation of three loci on rat chromosome 13 in 57 [(BN x TF)F1 x TF] backcross progeny. Shaded boxes represent the homozygous TF type and open boxes represent the heterozygous F1 type. The number of offspring inheriting each type of chromosome is listed at the bottom of each column.

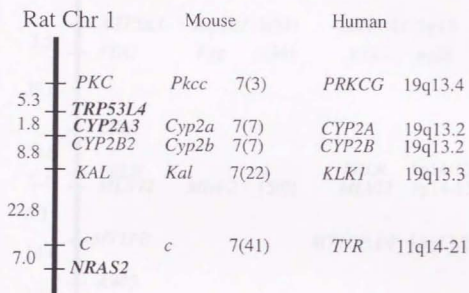


Figure 17. A linkage map on rat chromosome 1 showing a summary of the linkage analysis. The recombination frequencies are shown on the left. The chromosomal locations of homologous loci in the mouse and human are noted to the right of the rat loci. The boldface indicate loci which are newly placed on the linkage map in this study.

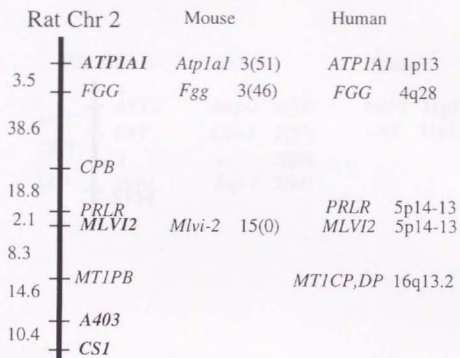


Figure 18. A linkage map on rat chromosome 2 showing a summary of the linkage analysis. The recombination frequencies are shown on the left. The chromosomal locations of homologous loci in the mouse and human are noted to the right of the rat loci. The boldface indicate loci which are newly placed on the linkage map in this study.



Rat Chr 3	Mouse	Human
16.7 — <b>ACP2</b>	<i>Atcp-2</i> 2(53)	<i>ACP2</i> 11p11
— <i>CAT</i>	<i>Cas-1</i> 2(57)	<i>CAT</i> 11p13
28.7 — <i>A</i>	<i>a</i> 2(88)	
12.0 — <i>SVP1</i>	<i>Svp-1</i> 2(94)	
— <b>SVS4</b>		

Figure 19. A linkage map on rat chromosome 3 showing a summary of the linkage analysis. The recombination frequencies are shown on the left. The chromosomal locations of homologous loci in the mouse and human are noted to the right of the rat loci. The boldface indicate loci which are newly placed on the linkage map in this study.

Rat Chr 4		Mouse		Human
+	<i>IL6</i>	<i>Il-6</i>	5(19)	<i>IL6</i> 7p21-14
+	<i>TRY1</i>	<i>Try-1</i>	6(24)	<i>TRY1</i> 7q32-ter
	<b><i>TRY2</i></b>			
+	<i>FABP</i>	<i>Fabp-1</i>	6(33)	<i>FABP1</i> 2p11

Figure 20. A linkage map on rat chromosome 4 showing a summary of the linkage analysis. The recombination frequencies are shown on the left. The chromosomal locations of homologous loci in the mouse and human are noted to the right of the rat loci. The boldface indicate loci which are newly placed on the linkage map in this study.

Rat Chr 5		Mouse		Human
15.8	<b>A8</b>			
17.1	<b>ACO1</b>	<i>Aco-1</i> 4(21)		<i>ACO1</i> 9q22-32
27.6	<b>MUP1</b>	<i>Mup-1</i> 4(28)		
17.1	<b>JUN</b>	<i>Jun</i> 4(44)		<i>JUN</i> 1p32-31
20.4	<b>GLUT1</b>	<i>Glut-1</i> 4(52)		<i>GLUT1</i> 1p35-31
16.7	<b>CYP4A1</b>	<i>Cyp4a</i> 4(56)		<i>CYP4A</i> 1p12-34
14.0	<b>ELA2</b>	<i>Ela-1rs1</i> 4(71)		
	<b>AHD2</b>	<i>Ahd-1</i> 4(69)		<i>ALHD2</i> 12
	<b>PND</b>	<i>Pnd</i> 4(76)		<i>PND</i> 1p36.3-36.1

Figure 21. A linkage map on rat chromosome 5 showing a summary of the linkage analysis. The recombination frequencies are shown on the left. The chromosomal locations of homologous loci in the mouse and human are noted to the right of the rat loci. The boldface indicate loci which are newly placed on the linkage map in this study.

Rat Chr 7		Mouse		Human	
40.7	— <i>IGF1</i>	<i>Igf-1</i>	10(54)	<i>IGF1</i>	12q23
	— <i>MYC</i>	<i>Myc</i>	15(27)	<i>MYC</i>	8q24
20.4	— <i>CYP2D2</i>	<i>Cyp2d</i>	15(40)	<i>CYP2D</i>	22q11.2-ter
18.5	— <i>ELA1</i>	<i>Ela-1</i>	15(46)	<i>ELA1</i>	12
	— <i>PERF</i>	<i>Prph</i>	15	<i>PRPH</i>	12
5.6	— <i>LALBA</i>			<i>LALBA</i>	12q13

Figure 22. A linkage map on rat chromosome 7 showing a summary of the linkage analysis. The recombination frequencies are shown on the left. The chromosomal locations of homologous loci in the mouse and human are noted to the right of the rat loci. The boldface indicate loci which are newly placed on the linkage map in this study.

Rat Chr 8	Mouse	Human
12.3 — <b>ES6</b>	<i>Es-17</i> 9(22)	<i>ESA4</i> 11q13-22
8.8 — <b>THY1</b>	<i>Thy-1</i> 9(26)	<i>THY1</i> 11q22.3-23
4.2 — <b>APOC3</b>	<i>Apoc-3</i> 9(27)	<i>APOC3</i> 11q23-ter
4.2 — <b>NCAM</b>	<i>Ncam</i> 9(28)	<i>NCAM</i> 11q23
— <b>CYP1A1</b>	<i>Cyp1a</i> 9(31)	<i>CYP1A</i> 15q22-ter
10.2 — <b>CRBP2</b>	<i>Crbp-2</i> 9(51)	<i>RBP2</i> 3p11-ter
21.1 — <b>PKATA</b>		<i>ACAA</i> 3p23-22

Figure 23. A linkage map on rat chromosome 8 showing a summary of the linkage analysis. The recombination frequencies are shown on the left. The chromosomal locations of homologous loci in the mouse and human are noted to the right of the rat loci. The boldface indicate loci which are newly placed on the linkage map in this study.

Rat Chr 9		Mouse		Human
	+	<i>INHA</i>	<i>Inha</i> 1(37)	<i>INHA</i> 2q33-ter
	+	<b><i>TRP53L1</i></b>		
21.1	+			
6.3	+	<b><i>CRYG</i></b>	<i>Cryg-1</i> 1(30)	<b><i>CRYG</i></b> 2q33-35
13.5	+	<b><i>GLS</i></b>	<i>Gls</i> 1(25)	<b><i>GLS</i></b> 2q32-34
	+	<b><i>AOX2</i></b>	<i>Aox-2</i> 1(21)	
18.5	+	<b><i>AOX1</i></b>	<i>Aox-1</i> 1(20)	

Figure 24. A linkage map on rat chromosome 9 showing a summary of the linkage analysis. The recombination frequencies are shown on the left. The chromosomal locations of homologous loci in the mouse and human are noted to the right of the rat loci. The boldface indicate loci which are newly placed on the linkage map in this study.



Rat Chr 10		Mouse		Human	
	— <b><i>IL3</i></b>	<i>Il-3</i>	11(32)	<b><i>IL3</i></b>	5q23-31
8.8					
	— <i>ABP</i>	<i>Abp</i>	7(10)		
17.5	— <b><i>NGFR</i></b>	<i>Ngfr</i>	11(60)	<b><i>NGFR</i></b>	17q21-22
8.8					
	— <b><i>GH</i></b>	<i>Gh</i>	11(66)	<b><i>GH1</i></b>	17q22-24

Figure 25. A linkage map on rat chromosome 10 showing a summary of the linkage analysis. The recombination frequencies are shown on the left. The chromosomal locations of homologous loci in the mouse and human are noted to the right of the rat loci. The boldface indicate loci which are newly placed on the linkage map in this study.

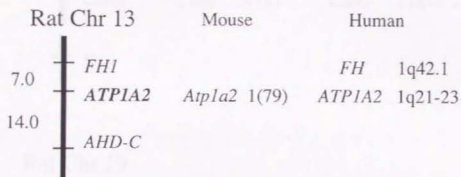


Figure 26. A linkage map on rat chromosome 13 showing a summary of the linkage analysis. The recombination frequencies are shown on the left. The chromosomal locations of homologous loci in the mouse and human are noted to the right of the rat loci. The boldface indicate loci which are newly placed on the linkage map in this study.

Rat Chr 14		Mouse		Human	
<b>+</b>	<i>CSNA</i>	<i>Csna</i>	5(48)	<i>CSNI</i>	11q14-21
<b>+</b>	<i>H</i>				

Rat Chr 19					
<b>+</b>	<i>HP</i>	<i>Hp</i>	8(54)	<i>HP</i>	16q22.1
<b>+</b>	<i>ES</i>	<i>Es</i>	8(42)	<i>ES</i>	19q13.2

Rat Chr 20					
<b>+</b>	<i>MHCI</i>	<i>H-2</i>	17(18.5)	<i>HLA</i>	6p21.3

Figure 27. Linkage maps on other chromosomes. The chromosomal locations of homologous loci in the mouse and human are noted to the right of the rat loci. The boldface indicate loci which are newly placed on the linkage map in this study.

### 第 三 章

#### 疾患原因遺伝子の染色体マッピング

##### 第一節 はじめに

疾患原因遺伝子を含む各種遺伝子の染色体マッピングには詳細な染色体上の連鎖地図が必要であることから、第一章、第二章で述べたように、本研究ではまずラットにおける遺伝標識を開発し、次に染色体上の連鎖地図を作成した。その結果、ほとんどの染色体における連鎖解析が可能となった。そこで、疾患原因遺伝子の連鎖解析およびその染色体マッピングへの応用を試みた。

既に述べたように、ラットでは多くの自然発症性疾患モデル動物が開発されている。これまで、ラットにおける疾患モデル動物の解析としては、ファンクショナルクローニングから無アルブミン血症（アルブミン遺伝子）、高ビリルビン血症（UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ遺伝子）、遺伝性小人症（成長ホルモン遺伝子）、および睾丸性女性化症ラット（アンドロゲンレセプター遺伝子）等の病因解析が行われ、遺伝子レベルでの原因が明らかにされている（Esumi et al., 1983; Iyanagi et al., 1989; Takeuchi et al., 1990; Yarbrough et al., 1990）。また、マウスとの病態の類似性から幾つかの疾患原因遺伝子（*rds* および *sey* 遺伝子）が単離されている（Begy and Bridges, 1990; Matsuo et al., 1993）。

また、候補遺伝子の特定できない疾患においても、自然発症高血圧ラットを中心に (Hilbert et al., 1991; Jacob et al., 1991; Deng and Rapp, 1992; Cicila et al., 1993; Dubey et al., 1993)、いくつかの疾患原因遺伝子の染色体上の位置が決定され、ヒトおよびマウスとの病因の比較が可能になった (Chao et al., 1989; Jacob, 1992)。例えば、肥満症ラット (*FA* 遺伝子) では第 5 染色体上に位置付けられ、マウス *db* 遺伝子との相同性が推測されている (Truett et al., 1991)。また、免疫機構の欠如を伴う無毛症遺伝子 (*RNU* 遺伝子) でもマウス遺伝子 (*nu* 遺伝子) の位置と対応する染色体上の領域に位置付けられている (Cash et al., 1993)。こうした連鎖解析を用いた疾患原因遺伝子の染色体マッピングは、ほとんどの遺伝性疾患に応用でき、その病因解析の進展に大きく貢献することが期待できる。特に、候補遺伝子の特定が困難な疾患には極めて有効な手法となる。したがって、連鎖解析により疾患原因遺伝子の染色体上の位置を明らかにすることは、病因解析の有力なアプローチであるといえる。

(財) 動物繁殖研究所では、幾つかの特定のヒト疾患モデルラットが開発・維持されている (Tauchi et al., 1980; Wakafuji et al., 1984; Ikadai et al., 1985; 1987; 1988a; 1988b; 1992; Noguchi et al., 1990; Yoshida et al., 1993a)。本研究ではこれらのラット系統について遺伝学的解析を行った。各系統の近交世代数、毛色、遺伝様式、および疾患の特徴を表 15 に示した。これまでの交配実験の結果、幾つかの表現型が単一の常染色体性劣性遺伝子によって支配されていることが明らかとなっている (Wakafuji et al., 1984; Ikadai et al., 1988a; 1988b; 1992; Noguchi et al., 1990; Yoshida et al., 1993a)。

本章ではまず、疾患原因遺伝子の連鎖解析を行う前段階として、各系統の生化学的遺伝子座および RFLP 遺伝子座における遺伝的プロフィールを明らかにし、できるだけ多くの遺伝標識との連鎖解析が行える交配の組み合わせを計画した。続いて、第二章で記述した染色体上の連鎖地図を基にして、雄性仮性半陰陽および VI 型ムコ多糖症ラットの疾患原因遺伝子の染色体マッピングを試みた。



## 第二節 材料と方法

### 1. 各種疾患モデルラット系統の遺伝的プロフィールの同定

#### 1) 供試動物

(財) 動物繁殖研究所で維持されている 11 系統の疾患モデルラットを用いた。表 15 はそれらの近交世代数、毛色、遺伝様式および疾患の特徴を示している。このうち 7 系統、HN, SC, TA, TE, TF, TT および TW は非近交系の Wistar-Imamichi ラットコロニーに由来し、BEG は SC と TE の  $F_2$  世代に由来している。Wistar-Imamichi ラットコロニーは Wistar 研究所より導入した非近交系の Wistar ラットに由来している。TU は Wistar-Imamichi 系雌ラットと野性雄ラットとの交配に由来している。TS は当研究所で維持していた非近交系の Wistar King-A に由来している。ISM は麻布大学・石橋教授より分与された IS に由来する貧毛ラットから確立したものである。

#### 2) 生化学的遺伝子座のタイピング

ラット系統間で遺伝的多型性を示す 28 の生化学的遺伝子座を検討した。生化学的遺伝子座の解析には、既に報告されている方法にしたがって、各系統からのサンプルを酢酸セルロース膜 (Titan-III, Helena Lab., USA) または ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、適切な染色法により検出した (Yamada et al., 1981; Bender et al., 1984; 1985; Cramer et al., 1986; Finley, 1988)。13 遺伝子座は第二章で示した方法で検討し (ACO1, ACP2, AHD2, AHDC, AKP1, AOX1,

CS1, ES6, ES8, ES19, FH1, MUP1, および SVPI)、新たな 15 遺伝子座については表 16 に示した。

### 3) RFLP 遺伝子座のタイピング

5 つの RFLP 遺伝子座 (*GH*, *CMHC*, *MYC*, *NRAS1* および *NRAS2*) のタイピングをサザンブロット法により行った。*GH*, *NRAS1*, および *NRAS2* 遺伝子座については、第二章に示した方法で解析した。*CMHC* と *MYC* 遺伝子座は、表 17 に示したプローブを用いて同様にサザンブロット法により検出した (Kunieda et al., 1989b; 1989c)。

## 2. 雄性仮性半陰陽ラットの原因遺伝子 (*mp*) の染色体マッピング

### 1) 供試動物

仮性半陰陽雄は表現型が雌型を呈するため交配できないこと、および、雌では *mp* 遺伝子の判定ができないことから、交配実験には産仔に異常個体を認めた雄 (*mp/+*) を用いた。異常動物は膣開口の遅れた個体を候補動物とし、剖検で精巣を認めた個体を異常とした。動物は BN/Iar 雌 (+/+) と TF キャリア雄 (*mp/+*) を交配した  $F_1$  世代を得、そのうち *mp* 遺伝子のキャリア雌 (*mp/+*) を選抜し、TF キャリア雄 (*mp/+*) に戻し交雑した世代の雄 (精巣を持つ個体すなわち外見上雌である異常雄を含む) のみを用いた。戻し交雑世代の雄 57 匹について、以下の遺伝子座のタイピングを行った。

### 2) 遺伝子座

第二章に記述した遺伝子座を含む計 35 遺伝子座についてタイピングを行った。具体的には、2 毛色遺伝子座 (*C* および *H*)、7 生化学的遺伝子座 (*ACO1*, *AHD2*, *AHDC*, *AKP1*, *ES6*, *FH1*, および *SVP1*)、25 マイクロサテライト遺伝子座 (*A8*, *ABP*, *ATP1A1*, *ATP1A2*, *APOC3*, *CPB*, *CRBP2*, *CYP4A1*, *D3*, *E5*, *FGG*, *GLUT1*, *IL6*, *JUN*, *MRCOX2*, *MYC*, *NGFR*, *NTS1*, *PERF*, *PKATA*, *PND*, *SPT*, *THY1*, *TRY1*, *TRY2*)、および 1 ミニサテライト遺伝子座 (*IL3*) のタイピングを行った。各遺伝子座の染色体上の位置については第二章に示した。

### 3) 連鎖解析

供試動物の項に示したように、本研究に用いた交配の組み合わせで

は他の遺伝子座については戻し交雑であるが、*mp* 遺伝子については雑種交雑となる。したがって、まず交雑世代における正常と仮性半陰陽個体の分離が単純なメンデル遺伝をするか否かを検定し、次に  $2 \times 2$  のカイ二乗検定により他の遺伝標識との概観的な連鎖を判断した。さらに、有為な連鎖の認められた染色体上の遺伝子座については、より正確な連鎖を検討した。すなわち、連鎖の認められた遺伝子座と *mp* 遺伝子との間のロッド得点 (LOD score) を計算し、連鎖の判定および組換え率を求めた。ロッド得点とは、2 遺伝子座がある遺伝的距離 ( $\theta$ ) だけ離れて連鎖していると仮定した時に得られる確率と、全く連鎖していないと仮定した時に得られる確率との比の対数値である。以下にロッド得点 ( $Z$ ) の計算式を示す。

$$\begin{aligned} Z &= r \log_{10} (\theta) + (n-r) \log_{10} (1-\theta) - n \log_{10} (0.5) \\ &= r \log_{10} (\theta) + (n-r) \log_{10} (1-\theta) + 0.3 n \end{aligned}$$

$n$ : 組み換えを検討できる全動物数

$r$ : 組み換えを起こした動物数

$\theta$ : 組み換え率

このように、ロッド得点は組み換え率 ( $\theta$ ) の関数として表わされる。一般にある遺伝的距離におけるロッド得点が 3 以上の時、連鎖ありと判定され、ロッド得点が最大となる遺伝的距離の値が組換え率 ( $\theta$ ) として表される。また、ロッド得点が -2 以下の時、連鎖ありと判定される。

### 3. VI型ムコ多糖症ラットの原因遺伝子 (*abd*) の染色体マッピング

#### 1) 供試動物

VI型ムコ多糖症ラットは雌雄とも交配が困難であるため、交配実験には産仔に異常個体を認めたキャリア動物 (*abd*+) を用いた。異常動物は体長および鼻梁の短い、ムコ多糖症の特徴を持つ個体を異常と判定した。WKS/Tar 雌 (+/+) と ISM キャリア雄 (*abd*+) を交配した  $F_1$  世代を得、そのうち *abd* 遺伝子のキャリア雌 (*abd*+) を選抜し、ISM キャリア雄 (*abd*+) に戻し交雑した世代を用いた。戻し交雑世代の産仔 45 匹について、以下の遺伝子座のタイピングを行った。

#### 2) 遺伝子座

生化学的遺伝子座として以下の 5 個の遺伝子座をタイピングした; *AHD2*, *ES6*, *ES8*, *MUP1*, および *SVP1*。また、推測された第 2 染色体上の以下の 3 つのマイクロサテライト遺伝子座についてタイピングを行った; *CPB*, *PRLR*, および *MT1PB*。

#### 3) 連鎖解析

供試動物の項に示したように、本研究に用いた交配の組み合わせでは遺伝標識については戻し交雑であるが、*abd* 遺伝子については雑種交雑になる。したがって、まず交雑世代における正常とムコ多糖症個体の分離が単純なメンデル遺伝をするか否かを検定し、次に、2 x 2 のカイ二乗検定により他の遺伝標識との概観的な連鎖を判断した。さらに、有為な連鎖の認められた染色体上の遺伝標識と *abd* 遺伝子とのロッド得点により連鎖を判定し、組換え率を求めた。



### 第三節 結 果

#### 1. 各種疾患モデルラット系統の遺伝的プロファイルの同定

表 18 および 19 に、12 系統のラットにおける生化学的遺伝子座および RFLP 遺伝子座の対立遺伝子の分布を示した。3 遺伝子座 (*AC01*, *ALP1* および *PGD*) の対立遺伝子は幾つかの系統で検出できなかった。*NRAS1* および *NRAS2* 遺伝子座の対立遺伝子は TE で検出できなかった。8 つの生化学的遺伝子座 (*AHD2*, *AHDC*, *AMY1*, *ES7*, *FH1*, *GC*, *HA01*, および *PG1*) および 2 つの RFLP 遺伝子座 (*MYC* および *NRAS1*) では、調べた 11 系統の間で多型性は見られなかった。他の遺伝子座ではこれらの系統間で 2 つ以上の対立遺伝子が観察され、一方、*SVPI* および *ES1* 遺伝子座では BEG および TU で対立遺伝子が固定されていないことが明らかとなった。AN, BEG および SC および TE と TW では全ての生化学的遺伝標識が同一の対立遺伝子を持っていたが、AN と TE は *GHb* を持つのに対し、BEG, SC, TW は *GHa* または *GHc* を持つこと、および、SC は *NRAS2b* を持つのに対し、AN, BEG, TE, TW は *NRAS2a* を持つことから、これらの系統は *GH* と *NRAS2* 遺伝子座の対立遺伝子で区別することができた。したがって、11 系統全てが特定の遺伝標識の組み合わせを持っていることが明らかとなった。



## 2. 雄性仮性半陰陽ラットの原因遺伝子 (*mp*) の染色体マッピング

交雑世代における正常と雄性仮性半陰陽の分離比 (41: 16) は、常染色体性単純劣性遺伝すると仮定した分離比 3: 1 と有為には違わなかった ( $\chi^2 = 0.287$ ,  $P > 0.5$ )。

次に、35 遺伝子座をタイピングし、雄性仮性半陰陽の出現との連鎖を判定した。カイ二乗検定の結果、第 7 染色体上の *MYC* 遺伝子座 ( $\chi^2 = 10.02$ ,  $P < 0.001$ ) および *PERF* 遺伝子座 ( $\chi^2 = 26.51$ ,  $P < 0.001$ ) と有為な連鎖が認められた。第 7 染色体上の E5 遺伝子座を含む他の遺伝子とは有為な連鎖は検出されなかった ( $P > 0.05$ )。表 20 に *mp* 遺伝子と第 7 染色体上の 3 遺伝子座との分離を示した。

また、上記の分離比から計算した *mp* 遺伝子と他の遺伝標識との間のロッド得点を表 21 に示した。E5 遺伝子座との間には組換え率 50 % の時ロッド得点が最大となり、連鎖は検出されなかったが、*MYC* 遺伝子座との間には組換え率 19.2 % で緩い連鎖が認められた ( $Z = 1.69$ )。 *PERF* 遺伝子座との間のロッド得点は組換え率 0 % のとき最大となり ( $Z = 6.63$ )、*mp* 遺伝子と *PERF* 遺伝子座は極めて近くに位置することが明らかとなった。

### 3. VI 型ムコ多糖症ラットの原因遺伝子 (*abd*) の染色体マッピング

交雑世代における正常とムコ多糖症の分離比 (32: 11) は、常染色体性単純劣性遺伝すると仮定した分離比 3: 1 と有為には違わなかった ( $\chi^2 = 0.400$ ,  $P > 0.5$ )。

5 生化学的遺伝子座および連鎖の予想される第 2 染色体上の 3 マイクロサテライト遺伝子座をタイピングし、ムコ多糖症の出現との関係を判定した。カイ二乗検定の結果、第 2 染色体上の *PRLR* ( $\chi^2 = 6.61$ ,  $P < 0.02$ ) および *MT1PB* ( $\chi^2 = 20.68$ ,  $P < 0.001$ ) 遺伝子座と有為な連鎖が認められた。第 2 染色体上の *CPB* 遺伝子座を含む他の遺伝子座とは有為な連鎖は検出されなかった ( $P > 0.05$ )。表 23 に *abd* 遺伝子と第 2 染色体上の 3 遺伝子との分離を示した。

また、上記の分離比から計算した 2 遺伝子座間のロッド得点を表 24 に示した。*CPB* 遺伝子座との間には組換え率 50 % の時ロッド得点が最大となり、連鎖は検出されなかったが、*PRLR* 遺伝子座との間は組換え率 20.0 % で緩い連鎖が認められた ( $Z = 1.14$ )。*MT1PB* 遺伝子座との間のロッド得点は組換え率 0 % のとき最大となり (5.20)、極めて近くに位置することが明らかとなった。

#### 第四節 考 察

本章ではまず疾患原因遺伝子の連鎖解析を行う前段階として、(財)動物繁殖研究所で維持している 11 系統の疾患モデルラットの各系統が持つ遺伝標識のタイピングを行い、その遺伝的プロフィールを明らかにした。これらの系統の病態は、ヒトおよび家畜で原因の解明が遅れている遺伝性の疾患に類似しており、疾患モデル動物として有用であると考えられている。これらの系統における遺伝学的解析が進み、病因が解明されれば、特定の疾患の予防法や治療法の開発に向けた基礎研究分野に大きく貢献することが期待できる。

28 生化学的遺伝子座および 5 RFLP 遺伝子座を用いることにより、11 系統すべてが特異的な対立遺伝子の組み合わせを持ち、それによって他の系統と区別できることが明らかとなった。したがって、本研究で得られた各近交系における対立遺伝子の分布は、系統の特徴づけに役立つことが明らかとなった。系統維持の観点、すなわち、遺伝的モニタリングという意味では、それぞれの系統に特有の標識遺伝子が見つかり、系統の識別が可能となった。

この結果を踏まえて、できるだけ多くの遺伝標識との連鎖解析が行える交配の組み合わせを計画し、雄性仮性半陰陽と VI 型ムコ多糖症の原因遺伝子の染色体マッピングを試みた。その結果、第二章で作成されたラット染色体の連鎖地図を基にして、雄性仮性半陰陽の原因遺伝子は第 7 染色体上に位置付けられ、また、VI 型ムコ多糖症の原因遺伝子は第 2 染色体上に位置付けられた。これらの疾患モデルラットは、それぞれヒトの雄性仮性半陰陽および VI 型ムコ多糖症モデル動物として期待されているが、疾患原因遺伝子の染色体マッピングは原因遺伝子を



# 1. 雄性仮性半陰陽ラットの原因遺伝子 (mp) の染色体マッピング

雄性仮性半陰陽は Y 染色体を持ち精巢を有するにもかかわらず、外見上雌の表現型をとる性分化異常であり、その原因は、精巢のアンドロゲン合成異常を含むアンドロゲンの分泌異常および分泌されたアンドロゲンに対する組織の感受性の減少に大別されている。疾患モデル動物としては後者の原因によるマウスおよびラットが報告されている (Lyon and Hawkes, 1970; Vanha-Perttula et al., 1970)。(財) 動物繁殖研究所で樹立された TF ラットは雄性仮性半陰陽の表現型を持ち、血中のテストステロンレベルが極めて低く、hCG 投与によっても変化しないこと、また、テストステロン投与によりアンドロゲン感受性臓器は反応することが報告されている (Ikadai et al., 1988b)。また、精巢の組織学的検索ではライディッヒ細胞は認められず、副性器の原器の形成は認められることから、本ラットの病態の原因はライディッヒ細胞の形成分化異常によるアンドロゲン分泌異常の可能性が高いと考えられている (Ikadai et al., 1988b)。さらに、交配実験により、このラットの表現型は常染色体性の単一劣性遺伝子によって支配されていることが既に明らかにされている (Ikadai et al., 1988b)。以上のように、このラットはヒト常染色体性雄性仮性半陰陽に類似する動物モデルとして期待されている。したがって、本ラットの遺伝的要因を解析することは、本疾患の病因解析およびライディッヒ細胞の発生分化機構の解明に貢献できると思われる。

ヒト、マウスおよびラットでは精巢性女性化症 (Testicular feminization, TFM) という、Y 染色体を持ち精巢を有するにもかかわらず、雌型の外見を呈する疾患が報告されている (Morris and Mahesh,



1963; Lyon and Hawkes, 1970; Vanha-Perttula et al., 1970)。この疾患ではアンドロゲン感受性器管がテストステロン投与によっても反応しないことから、アンドロゲンレセプター (AR) の異常が推察されていた (Lyon and Hawkes, 1970; Bardin et al., 1970)。最近の報告から、これらの原因は X 染色体上の AR 遺伝子のアンドロゲン結合部位の突然変異であることが明らかとなっている (Yarbrough et al., 1990)。本系統の雄性仮性半陰陽の原因遺伝子は常染色体上にあり、しかもアンドロゲン感受性があるため、AR 遺伝子の異常とは異なるものと思われる。

ヒト常染色体性の雄性仮性半陰陽の原因遺伝子の一つである *SRA1* 遺伝子は、第 17 染色体上の *HOX2*, *RARA*, および *COL1A1* 遺伝子座の近傍に位置付けられている (Tommerup et al., 1993)。*SRA1* 遺伝子のヒト染色体上の位置は *mp* 遺伝子のラット染色体上の位置と対応せず、*SRA1* と *mp* 遺伝子が同一である可能性は低い。しかし、この領域は *HOX3*, *RARG*, および *COL2A1* 遺伝子を含むヒト第 12 染色体と相同性のあることが知られており (Nadeau et al., 1992; Lundin, 1993)、*mp* 遺伝子が *HOX3*, *RARG*, および *COL2A1* 遺伝子の近傍に位置すると推測されることは、*SRA1* 遺伝子との関係から大変興味深い。

一方、ヒトではテストステロンをより活性の高いヒドロテストステロンに変換する酵素である 5 $\alpha$ -リダクターゼ 2 酵素の欠損による雄性仮性半陰陽の発症が報告されている (Walsh et al., 1974)。5 $\alpha$ -リダクターゼ 1 遺伝子 (*SRD5A1*)、1 偽遺伝子 (*SRD5P1*) および 5 $\alpha$ -リダクターゼ 2 遺伝子 (*SRD5A2*) はそれぞれヒト第 5、X および第 2 染色体に当てはめられている (Thigpen et al., 1992; Jenkins et al., 1991)。したがって、染色体上の位置は *mp* 遺伝子とは対応していない。さらに、本系統の雄性仮性半陰陽では、テストステロン濃度が著しく低



いことから、*mp* 遺伝子が 5 $\alpha$ -リダクターゼ 遺伝子と同一である可能性は低いものと考えられる。

また、ミューラー管抑制因子 (Antimüllerian hormone, AMH) の遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの一部のラインが本症に類似した病態を取ることから (Behringer et al., 1990)、AMH も候補遺伝子と考えられるが、ヒトおよびマウスでこの遺伝子がそれぞれ第 19 および 10 染色体に位置することから、やはり可能性は低いものと思われる。しかしながら、マウスの AMH 関連遺伝子 7 が *mp* 遺伝子の位置に対応するマウス第 15 染色体上に位置することは大変興味深い (King et al., 1991)。

このように、本疾患モデルの原因遺伝子は、本遺伝子の染色体上の位置から、これまでに報告されている雄性仮性半陰陽の原因遺伝子と異なることが明らかとなり、病理組織学的解析から示唆されているように、ライディッシュ細胞の発生、分化に関する遺伝子の異常である可能性が高いと思われた。本研究におけるマイクロサテライト遺伝子座を用いた連鎖解析から、その原因遺伝子はラット第 7 染色体上のペリフェリン遺伝子の近傍に位置づけられた。図 28 および表 22 に示したように、ラット第 7 染色体のこの領域はマウス第 15 染色体およびヒト第 12 染色体に対応するが、現時点では候補となる遺伝子の特定は行えなかった。今後より詳しい連鎖地図を作成し、原因遺伝子に密接に連鎖する遺伝子座を用いることにより、疾患原因遺伝子の解明が可能となるものと考ええる。

## 2. VI型ムコ多糖症ラットの原因遺伝子 (*abd*) の染色体マッピング

ムコ多糖症は、ライソゾーム内の酵素欠損により細胞質内にムコ多糖が蓄積する先天性代謝異常の一つである。ヒトにおいては、成長や知能の遅延および肝脾腫等の臨床症状を呈し、欠損する酵素の種類により 10 の亜系に分類されている。疾患モデル動物としては、そのうち I 型のイヌ (Shull et al., 1982) とネコ (Haskins et al., 1981)、VI 型のネコ (Cowell et al., 1976)、および VII 型のマウス (Birkenmeier et al., 1989) とイヌ (Haskins et al., 1984) が知られている。これらの疾患モデル動物の中でも特にマウスモデルは、様々な解析や治療法の検討に広く用いられており (Wolfe et al., 1992a; 1992b; Moullier et al., 1993)、他のタイプについても実験小動物モデルの開発が望まれている。

VI 型ムコ多糖症は、ライソゾーム内の酵素であるアリルサルファターゼ B 酵素が欠損して生ずる常染色体性の劣性遺伝病である。本症で蓄積する基質はデルマタン硫酸であり、成長の遅延、角膜混濁、肝脾腫、四肢の湾曲を特徴とする。最近、VI 型ムコ多糖症ラットが (財) 動物繁殖研究所で樹立された (Yoshida et al., 1993a)。このラットは、体型が小型で、アリルサルファターゼ B 酵素活性が正常の 5 % 以下しかなく、尿中に大量のデルマタン硫酸を排泄していることが報告されている (Yoshida et al., 1993a)。また、病理学的解析から、各臓器を構成する細胞のライソゾームにもムコ多糖の蓄積が認められ、マクロファージ系、軟骨、結合組織、血管中膜および子宮間質細胞等に空胞化が認められている (Yoshida et al., 1993b)。以上のように、このラットはヒト VI 型ムコ多糖症との類似点が多く、本症の疾患モデル動物とし

て期待されている。したがって、このラットの遺伝的要因を解明することは、本疾患の診断や治療のための動物モデルとして本ラットを利用するために重要であると思われる。

ヒトおよびマウスのアリルサルファターゼ B 遺伝子は、それぞれ第 5 染色体 (Daniel, 1976) および第 13 染色体 (Fidzianska et al., 1984; Fox et al., 1984) 上に位置付けられている。本研究の結果、VI 型ムコ多糖症ラットの原因遺伝子の染色体上の位置は、ラット第 2 染色体上のメタロチオネイン 1B 偽遺伝子の近傍であることが明らかとなった。図 29 および表 25 に示したように、ラットにおけるこの領域はヒト第 5 染色体及びマウス第 13 染色体に相当すると考えられる。したがって、本疾患の原因遺伝子は、ヒトおよびマウスにおけるアリルサルファターゼ B 遺伝子の染色体上の位置と対応するラット染色体領域に位置することが明らかとなった。これまでの生化学的及び病理学的病因解析から、本疾患がアリルサルファターゼ B 酵素活性の欠損に起因していることが明かとされていたが (Yoshida et al., 1993a)、染色体上の位置からも本疾患の原因はアリルサルファターゼ B 遺伝子の異常にあると推測された。したがって、今後ラットアリルサルファターゼ B 遺伝子が単離され、本ラットにおける変異を解析することにより、本ラットをヒト VI 型ムコ多糖症のモデル動物として確立することができるものと思われる。

## 第五節 要 約

まず、疾患原因遺伝子の染色体マッピングを行う前に、(財)動物繁殖研究所で開発された疾患モデルラット系統について、遺伝標識の分布調査を行い、より有効な交配の組合わせを検討した。続いて、第二章に記述したラット染色体の連鎖地図を基にして、交配実験により常染色体性単一劣性遺伝子によって支配されていることが明かにされている、2 疾患(雄性仮性半陰陽および VI 型ムコ多糖症)の原因遺伝子の染色体上の位置を検討した。我々は既に精巣のアンドロゲンレセプターの異常に起因しない雄性仮性半陰陽ラットを開発しており、その原因は精巣のライディッヒ細胞の発生障害あるいはアンドロゲン代謝酵素の欠損と推測されている。マイクロサテライト遺伝標識を用いた連鎖解析を行ったところ、この原因遺伝子は、ラット第 7 染色体上のペリフェリン遺伝子の近傍に位置づけられた。ラット第 7 染色体のこの領域はマウス第 15 染色体およびヒト第 12 染色体に対応するが、現時点では候補となる遺伝子の特定は行えなかった。今後より詳しい連鎖地図を作成することにより、疾患原因遺伝子の単離が可能となるものと考えられた。

また同様に、VI 型ムコ多糖症の原因遺伝子の染色体上の位置を明らかにしたところ、ラット第 2 染色体上のメトロチオネイン 1 偽遺伝子の近傍に位置づけられた。この領域はマウス第 13 染色体およびヒト第 5 または 16 染色体に相当する。これまでの生化学的及び病理学的病因解析から本疾患はアリルサルファターゼ B 酵素の欠損に起因していることが明かとなっている。ヒトおよびマウスのアリルサルファターゼ B 遺伝子が本疾患原因遺伝子と対応する染色体領域に位置することから、同一遺伝子であることが強く示唆された。またヒト・ネコおよびマウス



におけるこの遺伝子が既に単離されていることから、ラットでも近い将来単離され、分子生物学的な病因解析が可能となると思われる。こうした連鎖解析を用いた疾患原因遺伝子の染色体マッピングは、ほとんどの遺伝性疾患に応用でき、その病因解析の進展に大きく貢献することが期待できる。

したがって、本研究で検討したような高多型 DNA 遺伝標識を用いた連鎖解析は、各種遺伝子の染色体マッピングのみならず、ほとんどの遺伝性疾患における有力な候補遺伝子を選択し、疾患原因遺伝子の解明および病因・病態解析に向けて重要な役割を果たすと考えられた。

Table 15. Genetics and characteristics of the mutant strains used in this study.

Strains	Genetics	Characteristics	References
BEG	F21, Albino single ( <i>rg</i> )	Ragged hair and rexoid mutant with large sebaceous gland	Noguchi et al. 1990
HN	F56, Albino polygenic	Hydronephrosis	Tauchi et al. 1980
ISM	F15, Agouti single ( <i>abd</i> )	Mucopolysaccharidosis type VI	Yoshida et al. 1993a
SC	F50, Albino single ( <i>sc</i> )	Microphthalmia and cataract	
TA	F23, Albino single ( <i>ol</i> )	Oligospermia by hypospermatogenesis	Wakafuji et al. 1984
TE	F50, Albino polygenic	Sperm retention cysts in the efferent duct	Ikadai et al. 1987
TF	F20, Albino single ( <i>mp</i> )	Male pseudohermaphroditism	Ikadai et al. 1988
TS	F14, Albino polygenic	Suprainguinal ectopic scrota	Ikadai et al. 1988
TT	F32, Albino single ( <i>as</i> )	Aspermia	Ikadai et al. 1992
TU	F17, Agouti hooded polygenic	Urogenital abnormalities	
TW	F45, Albino polygenic	Aplasia of the epididymis and ductus deferens	Ikadai et al. 1985

( ): gene symbol



Table 16. Methods for typing of biochemical loci.

Locus	Sample	Gel	Buffer	Substrate	Reference
ALP1	serum	Titan-III Lipo	Phosphate pH 7.0	$\beta$ -naphthyl phosphate	Jimenez-Marin et al. 1974
AMY1	pancreas	Titan-III Lipo	EBT pH 8.6	starch	Mizuno and Suzuki 1978
ES1	serum	10 % PAGE / 2/ 14	Tris-Glycine pH 8.6	$\alpha$ -naphthyl acetate	Womack 1972
ES3	small intestine	8 % PAGE	Tris-Glycine pH 8.6	$\alpha$ -naphthyl acetate	Womack 1972
ES4	kidney	8 % PAGE	Tris-Glycine pH 8.6	$\alpha$ -naphthyl acetate	Womack 1972
ES7	testis	8 % PAGE / 9/ 10	Tris-Glycine pH 8.6	$\alpha$ -naphthyl butyrate	Matsumoto 1980 Moutier et al. 1973
GC	serum	8 % PAGE	Tris-Glycine pH 8.6	coomassie blue	Moutier et al. 1973
GDC1	liver	Titan-III Lipo	Tris-Citrate pH 8.3		Eriksson et al. 1976
HAO1	liver	Titan-III Lipo	Tris-Citrate pH 7.5	$\alpha$ -hydroxy isocaproic acid	Cramer et al. 1986
PG1	stomach	10 % PAGE	Tris-Glycine pH 8.6	hemoglobin	Cramer et al. 1981
PGD1	kidney	Titan-III Lipo	Phosphate pH 7.0	6-phospho -gluconate	Carter and Parr 1969

Table 17. Probes used for detecting RFLPs

Loci	Probes	Clones	Fragments	References for probe	References for locus
<i>CMHC</i>	cardiac myosine heavy chain	pMHC21	<i>Pst</i> I fragments	Mahdavi et al. 1982	Kunieda et al. 1989b
<i>MYC</i>	<i>c-myc</i>	pMC41-3RC	<i>Cla</i> I- <i>Eco</i> RI 1.4 kbp	Dalla Fevera et al. 1982	Kunieda et al. 1989c

Table 18 Strain distribution of biochemical marker loci

LOCI	STRAINS										
	BEG	HN	ISM	SC	TA	TE	TF	TS	TT	TU	TW
<i>ACO1</i>	b	b	b	b		b	b			b	
<i>ACP2</i>	b	b	b	b	b	b	b	a	b	a	b
<i>AHD2</i>	c	c		c	c	c	c	c	c	c	c
<i>AHDC</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>AKP1</i>	b	b	a	b	b	b	b	a	b	a	b
<i>ALP1</i>	b	a	b	b	b		b		b		
<i>AMY1</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>AOX1</i>	a	a	a	a	a	a	a	b	a		a
<i>CS1</i>	b	b	b	b	b	b	b	a	b	b	b
<i>ES1</i>	a	a	b	a	a	a	b	a	a	a/b	a
<i>ES2</i>	c	c	c	c	c	d	c	d	c	d	d
<i>ES3</i>	b	b	a	b	b	c	b	d	b	c	c
<i>ES4</i>	a	a	a	a	a	b	a	b	a	b	b
<i>ES6</i>	a	a	b	a	a	a	a	a	a	b	a
<i>ES7</i>	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
<i>ES8</i>	b	b	b	b	b	a	b	a	b	a	a
<i>ES9</i>	a	a	a	a	a	c	a	c	a	c	c
<i>ES10</i>	a	a	a	a	a	b	a	b	a	b	b
<i>ES14</i>	b	b	a	b	b	b	a	b	b	a	b
<i>ES19</i>	b	b	a	b	b	b	b	b	b	b	b
<i>FH1</i>	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
<i>GC</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>GDC1</i>			a								
<i>HAO1</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>MUP1</i>	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a

Table 18. (Continued)

LOCI	STRAINS										
	BEG	HN	ISM	SC	TA	TE	TF	TS	TT	TU	TW
<i>PGI</i>	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>PGD</i>	b	c	c		b	b					
<i>SVPI</i>	a	a	b	a	a	a	a	a	a	b	a

Table 19 Strain distribution of RFLP loci

LOCI	STRAINS										
	BEG	HN	ISM	SC	TA	TE	TF	TS	TT	TU	TW
<i>CMEC</i>	b	b	b	b	b	b	a	b	b	b	a
<i>GH</i>	a	b	a	a	a	b	a	b	b	b	a
<i>MYC</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
<i>NRAS1</i>	a	a	a	a	a		a	a	a	a	a
<i>NRAS2</i>	a	a	b	b	a		a	a	a	a	a

Table 20. Segregation of phenotype of male pseudohermaphroditism and marker loci on rat chromosome 7 in backcross progeny. "F1" indicates heterozygous type and "TF" indicates homozygous type.

Pseudohermaphroditism	Marker loci						Total
	<i>E5</i>		<i>MYC</i>		<i>PERF</i>		
	F1	TF	F1	TF	F1	TF	
normal ( <i>mp/+</i> or <i>+/+</i> )	27	14	29	12	31	10	41
affected ( <i>mp/mp</i> )	8	8	4	12	0	16	16
Total	35	22	33	24	31	26	57



Table 21. Two point LOD scores between chromosome 7 markers and *mp* locus.

Marker	Recombination frequency ( $\theta$ )								Zmax	$\theta$
	0.000	0.001	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4		
<i>E5</i>	-	-18.58	-10.61	-5.16	-2.96	-1.07	-0.30	-0.04	0	0.5
<i>MYC</i>	-	-5.98	-2.04	0.49	1.33	1.69	1.40	0.72	1.69	0.192
<i>PERF</i>	6.63	6.62	6.53	6.14	5.62	4.45	3.10	1.54	6.63	0.000

Table 22. Regional conservation  
among the human, mouse, and rat chromosomes.

Locus (symbol)	Chromosomal location		
	Human	Mouse <sup>a</sup>	Rat <sup>b</sup>
$\alpha$ 2 macroglobulin receptor ( <i>A2MR</i> )	12q13-14	15	
Procollagen type II $\alpha$ -1 ( <i>COL2A1</i> )	12q13	15 (43)	
Elastase 1 ( <i>ELAI</i> )	12	15 (46)	7
peripherin ( <i>PERF</i> )	12q12-q13	15	7 (0)
Male pseudohermaphrodite ( <i>mp</i> )			7
Homeo box-3 ( <i>HOX3</i> )	12q12-13	15 (50)	
Wingless-related MMTV integration site 1 ( <i>WNT1</i> )	12q13	15 (54)	
Glycerol phosphate dehydrogenase 1 ( <i>GPD1</i> )	12	15 (56)	
Keratin type II acidic ( <i>KRT4</i> )	12q11-12	15 (58)	
retinoic acid receptor $\gamma$ ( <i>RARG</i> )	12q13	15 (58)	7
transcription factor SP1 ( <i>SP1</i> )		15 (58)	7
Integrin $\alpha$ -5 ( <i>ITGA5</i> )	12q11-13	15 (60)	7
1,25-dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> receptor ( <i>VDR</i> )	12q12-13		7
$\alpha$ -lactalbumin ( <i>LALBA</i> )	12q13	-	7

a: Chromosomal location of candidate genes of mouse homologue  
with centimorgan from centromere

b: Chromosomal location of examined loci with recombination  
frequency from the *mp* locus

Table 23. Segregation of phenotype of mucopolysaccharidosis type VI and marker loci on rat chromosome 2 in backcross progeny. "F1" indicates heterozygous type and "ISM" indicates homozygous type at each marker locus.

Mucopolysaccharidosis	Marker loci						Total
	<i>CPB</i>		<i>PRLR</i>		<i>MT1PB</i>		
	F1	IS	F1	IS	F1	IS	
normal ( <i>abd</i> /+ or +/+)	17	15	21	11	24	8	32
affected ( <i>abd</i> / <i>abd</i> )	5	8	3	10	0	13	13
Total	22	23	24	21	24	21	45

Table 24. Two point LOD scores between chromosome 2 markers and *abd* locus.

Marker	Recombination frequency ( $\theta$ )								Zmax	$\theta$
	0.000	0.001	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4		
<i>CPB</i>	-	-11.91	-6.91	-3.46	-2.03	-0.76	-0.22	-0.04	0	0.5
<i>PRLR</i>	-	-4.71	-1.74	0.18	0.83	1.14	0.95	0.47	1.14	0.20
<i>MTIPB</i>	5.20	5.19	5.13	4.82	4.40	3.48	2.41	1.16	5.20	0.000

Table 25. Regional conservation  
among the human, mouse, and rat chromosome.

Locus (gene symbol)	Chromosomal location		
	Human	Mouse <sup>a</sup>	Rat <sup>b</sup>
Interleukin-9 ( <i>IL9</i> )	5q22-32	13 (44)	
Neuroendocrine convertase-1 ( <i>NEC1</i> )	5q15-21	13	
HMG Co A reductase ( <i>HMGCR</i> )	5q13-14	13	
Dihydrofolate reductase ( <i>DHFR</i> )	5q11-13	13 (57)	2
Arylsulfatase B ( <i>ARSB</i> , <i>abd</i> )	5q11-13	13 (58)	2
Hexosaminidase B ( <i>HEXB</i> )	5q13	13 (59)	
RAS p21 protein activator ( <i>RASA</i> )	5q13	13 (59)	
5-hydroxytryptamine 1a reductase ( <i>HTR1A</i> )	5q11-q14	13 (65)	2
Cytotoxic T-lymphocyte associated protein-3 ( <i>CTLA3</i> )	5	13 (70)	
Guanylate cyclase A ( <i>GCA</i> )	5p13-14		2
Prolactin receptor ( <i>PRLR</i> )	5p13-14		2 (20)
MoMuLV integration site 2 ( <i>MLV12</i> )	5p13-14	15 (0)	2
Complement component 6 ( <i>C6</i> )	5p13	15 (0)	
Growth hormone receptor ( <i>GHR</i> )	5p13-14	15 (3)	
Carboxypeptidase B ( <i>CPB</i> )			2 (50)

a: Chromosomal location with centimorgan from centromere.

b: Chromosomal location of examined loci with recombination  
frequency from the *abd* locus

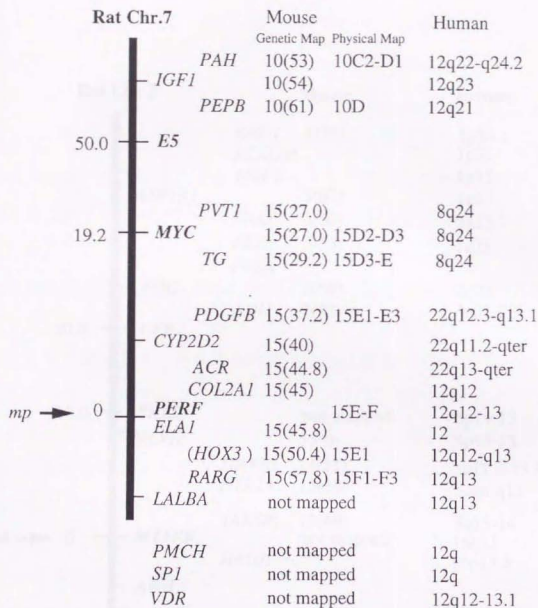


Figure 28. The linkage map of rat chromosome 7 showing the location of the *mp* locus. The recombination frequencies between the *mp* locus and each marker locus are shown on the left. Locations of corresponding loci in mouse and human chromosomes are shown on the right of the map. The boldface indicate loci which are tested for linkage with *mp* locus.



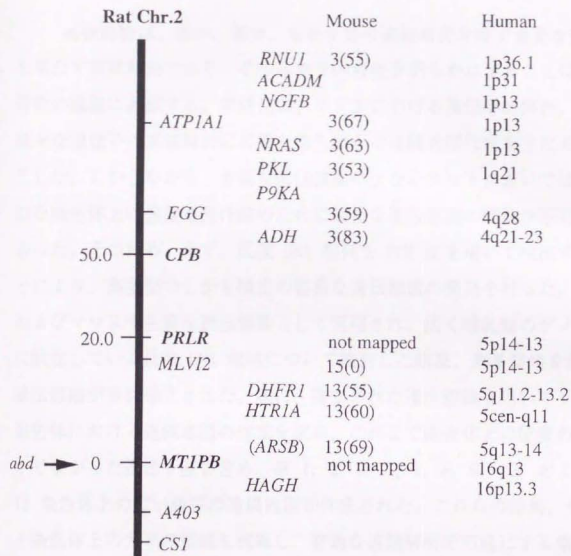


Figure 29. The linkage map of rat chromosome 2 showing the location of the *abd* locus. The recombination frequencies between the *abd* locus and each marker locus are shown on the left. Locations of corresponding loci in mouse and human chromosomes are shown on the right of the map. The boldface indicate loci which are tested for linkage with *abd* locus.

## 総 括

実験動物は、医学、農学、生物学等の基礎研究分野で重要な役割を果たす実験材料であり、その生物学的特性を明らかにすることは広く研究の進展に貢献する。本研究は、ラットにおける遺伝学的解析、特に様々な遺伝子の連鎖解析に必要な染色体上の連鎖地図作成を主たる目的とした。しかしながら、有効な遺伝標識の少ないラットにおいては、詳細な染色体上の連鎖地図作成のために新たな遺伝標識の開発が不可欠であった。そのため、まず、反復 DNA 配列を PCR 法を用いて検出することにより、高多型でしかも検出の容易な遺伝標識の開発を行った。ヒトおよびマウスで主要な遺伝標識として利用され、広く哺乳類のゲノム中に散在している反復 DNA 領域について検討した結果、高多型性を示す遺伝標識が多数確立された。次に、確立された遺伝標識を用いてラット染色体における連鎖地図の作成を試み、これまで染色体上の位置の明らかでなかった遺伝子座を含め、第 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, および 13 染色体上の広い範囲の連鎖地図が作成された。これらの結果、ラット染色体上の大半の領域を網羅し、有効な連鎖解析を可能にする染色体地図が確立された。

ヒトおよびマウスでは数多くの遺伝子が染色体上に位置づけられ、ほぼ完全な連鎖地図が作成されている (Wissenbach, 1992; Hillyard et al., 1992)。そのような染色体地図作成の進展の結果、染色体上の遺伝子座の配列にはヒトと他の哺乳動物の間にかなりの相同性があることが明らかとなり (Nadeau et al., 1992; O'brien et al., 1993)、疾患モデル動物における疾患原因遺伝子を含む各種遺伝子の染色体上の位置とヒト染色体上の位置とを対応させることが可能となっている。これ

は実験動物とヒトとの間で遺伝学的な情報を共有できることを意味し、同一の原因遺伝子により発症する動物を特定し、疾患モデル動物として利用することを可能にすると考えられる。本研究の結果、ラットにおいてもヒトおよびマウスとの広い範囲の連鎖地図の比較が可能となり、ラットの疾患原因遺伝子の染色体上の位置から、対応するヒト遺伝子のヒト染色体上の位置を類推することが可能となった。

マウスでは詳細な連鎖地図を利用した緻密な連鎖解析を行うことにより、疾患原因遺伝子の染色体上の位置をヒトとの間で比較でき、ヒト疾患の病因解析に貢献している。例えば、*Sp* (Spotch) マウスはヒト I 型ワーデンブルグ症候群と病態が類似し、染色体上の位置が対応していることが明らかにされていた (Erickson et al., 1990; Foy et al., 1990)。Sp マウスで Paired box-3 (*Pax-3*) 遺伝子の変異が原因であることが明らかとなり (Epstein et al., 1991)、その後の解析からヒト疾患においても *PAX3* 遺伝子の突然変異が I 型ワーデンブルグ症候群の原因であることが明らかとなった (Tassabehji et al., 1992)。また、病態、遺伝様式および原因遺伝子の染色体上の位置から、*Small eye* (*Sey*) マウスはヒト無虹彩症の疾患モデルマウスと考えられている (Glaser et al., 1990; van der Meer-de Jong et al., 1990)。Sey マウスにおける原因が *Pax-6* 遺伝子の突然変異であることが明らかとなり (Hill et al., 1991)、ヒト無虹彩症の *PAX6* 遺伝子に突然変異が確認された (Jordan et al., 1992; Glaser et al., 1992)。さらに最近、*PAX6* 遺伝子の突然変異に起因する小眼症ラット (*rSey*) も発見され、その病因解析が進められている (Matsuo et al., 1993)。したがって、多くのヒト疾患に類似した疾患モデル動物では、その原因遺伝子の染色体上の位置とヒト疾患原因遺伝子の位置との対応を明らかにすることが、病因解析に向けた重要な一歩になると思われる。

既に述べたように、実験動物としてのラットでは、自然発症の疾患モデル動物が多数開発されているにもかかわらず、遺伝学的解析が遅れている。それらのラットはヒト疾患に類似した表現型を持つものが多く、有用な動物モデルとして利用するためにその病因の解析が待たれている。本研究では、多数の遺伝標識を確立し、ラット染色体上の詳細な連鎖地図を作成し、さらに、連鎖解析により二つの疾患原因遺伝子の染色体マッピングを試みた。その結果、各々特定の染色体上に位置づけられ、特にムコ多糖症では、病理学および生化学的に推測される原因遺伝子と染色体上の位置が対応していることが明らかとなり、本研究で確立した遺伝標識と連鎖地図は、疾患モデル動物における連鎖解析による疾患原因遺伝子の特定に十分に有効であることが確認された。

こうしたラットにおける遺伝標識と連鎖地図を用いた疾患原因遺伝子の染色体マッピングは、ほとんどの遺伝性疾患に応用でき、その病因解析の進展に大きく貢献できることが期待される。すなわち、原因遺伝子の染色体上の位置を、ヒトやマウス染色体との相同性を考慮して比較検討することにより、候補遺伝子を類推することが可能となる。最近では、高血圧症モデルラット (Deng and Rapp, 1992; Dubey, 1993; Cicila et al., 1993) を含むいくつかの疾患モデルラットにおける原因遺伝子の染色体上の位置が決定され、ヒトおよびマウスとの疾患原因遺伝子の位置の比較から、同一の原因遺伝子により発症すると推測されている (Truett et al., 1991; Jacob et al., 1992; Cash et al., 1993)。したがって、本研究で検討したような高多型遺伝標識を用いた疾患原因遺伝子の連鎖解析から、原因遺伝子の染色体上の位置が特定された疾患モデルラットは、ヒト疾患のモデル動物として病因解明および病態解析に向けて重要な役割を果たすと考えられる。

一方、最近のポジショナル・クローニングにより単離された疾患



原因遺伝子数の増加も、詳細な染色体地図の確立によってもたらされている (Collins, 1992; Ballabio, 1993)。すなわち、疾患を発症する家系の詳細な連鎖解析を行うことによって、原因遺伝子の存在する染色体領域が限定され、近傍の遺伝標識を利用して遺伝子の単離ができることによるものである。このような手法は、これまで病因の明らかにできなかったヒト疾患においても、その染色体上の位置情報を利用して原因遺伝子の特定を可能とした。例えば、筋緊張性ジストロフィー症の原因遺伝子はヒト第 19 染色体上に位置付けられ (Davies et al., 1983)、それを基に遺伝子が単離された (Buxton et al., 1992; Fu et al., 1992)。特に現在、一見遺伝因子が主因とは思えない疾患へもこのような手法が応用され、原因遺伝子解明に貢献している (Egeland et al., 1987; Basett et al., 1988)。さらに、I 型糖尿病マウスで解析されたように、複数の遺伝子の関与する遺伝性疾患においても連鎖解析が有効であることが明らかにされている (Todd et al., 1991; De Gouyon et al., 1993)。したがって、本研究の結果は、原因遺伝子の特定できない疾患や複数の遺伝子の関与する疾患のモデルラットにおける解析にも応用可能であり、多くの疾患モデルラットの遺伝学的解析に貢献できるものと思われた。

以上のように、本研究の結果、ラット染色体上の大半の領域を網羅する連鎖地図が作成され、ラットにおいても連鎖解析を行うことにより、各種遺伝子を特定の染色体上に位置付けることが可能となり、多くの疾患モデルラットで原因遺伝子を特定することが可能であることが明らかとなった。また、ヒトおよびマウスとの間に染色体上の遺伝子構成の類似性があることが明らかとなり、哺乳動物の進化等を考察する上でも、貴重な知見となると期待される。これらのことは、疾患モデルラットの遺伝学的解析を含む医学、農学、生物学等の基礎研究分野における

実験動物としてのラットの価値を高めるものであると考える。また、本研究の結果は、ラットを含む哺乳類のゲノム構成を比較検討し、その形成の過程を明らかにする上で重要な知見を与えるものと考ええる。



## 謝 辞

本論文を作成するにあたり、御指導を賜りました東京大学農学部  
獣医実験動物学教室、土井邦雄教授に厚く御礼申し上げます。加えて、  
有益な御助言を賜りました徳島大学医学部動物実験施設、松本耕三助教  
授、多くの近交系ラット肝臓を提供して頂いた北海道大学理学部附属動  
物染色体研究施設、吉田廸弘教授および各種 DNAプローブを分与頂いた  
日本獣医畜産大学、石崎良太郎教授並びに日本医科大学、野村信夫助教  
授に感謝致します。

また、本研究は（財）動物繁殖研究所、今道友則理事長、筏井洋  
部長および国枝哲夫室長の御指導と御鞭撻の賜物であり、ここに深く感  
謝いたします。また、本研究の遂行にあたり、多大な協力や助言を頂き  
ました（財）動物繁殖研究所、立花資和、吉田緑の両氏に感謝いたしま  
す。さらに、本研究の遂行および本論文の作成に当たり、御理解頂きま  
した（財）動物繁殖研究所の諸氏に感謝いたします。

## 参 考 文 献

- Abbott, C., Jackson, I.J., Cariott, B., and Povey, S. (1991).  
The human homolog of the mouse brown gene maps to the short  
arm of chromosome 9 and extends the known region of homology  
with mouse chromosome 4. *Genomics* 11: 471-473.
- Adams, M., Baverstock, P.R., Watts, C.H.S., and Gutman, G.A.  
(1984). Enzyme markers in inbred rat strains: Genetics of  
new markers and strain profiles. *Biochem. Genet.* 22: 611-  
629.
- Bahary, N., Zorich, G., Pachter, J.E., Liebel, R.L., and  
Friedman, J.M. (1991). Molecular genetic linkage maps of  
mouse chromosome 4 and 6. *Genomics* 11: 33-47.
- Ballabio, A. (1993). The rise and fall of positional cloning.  
*Nature Genet.* 3: 277-279.
- Bardin, C.W., Bullock, L.P., Schneider, G., Allison, J.E., and  
Stanley, A.J. (1970). Pseudohermaphrodite rat: end organ  
insensitivity to testosterone. *Science* 167: 1136-1137.
- Bardin, C.W., Bullock, L.P., Sherins, R.J., Mowszowicz, I., and  
Blackburn, W.R. (1973). Androgen metabolism and mechanism  
of action in male pseudohermaphroditism: a study of  
testicular feminization. *Recent Prog. Hor. Res.* 29: 65-109.
- Basett, A.S., McGillivray, B.C., Jones, B.D., and Pantzar, J.T.  
(1988). Partial trisomy chromosome 5 cosegregating with  
schizophrenia. *Lancet* 1: 799-801.

- Beckmann, J.S. and Weber, J.L. (1992). Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 12: 627-631.
- Begy, C. and Bridges C.D. (1990). Nucleotide and predicted protein sequence of rat retinal degeneration slow (*rds*). *Nucleic Acids Res.* 18: 3058.
- Behringer, R.R., Cate, R.L., Froelick, G.J., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. (1990). Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing mullerian inhibiting substance. *Nature* 345: 167-170.
- Bell, G.I., Selby, M.J., and Rutter, W.J. (1982). The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature* 295: 31-35.
- Bell, G.I., Xiany, K.-S., Newman, M.V., Wu, S.-H., Wright, L.G., Fajans, S.S., Spielman, R.S., and Cox, N.J. (1991). Gene for non-insulin-dependent diabetes mellitus (maturity-onset diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on human chromosome 20q. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 1484-1488.
- Bender, K., Nagel, M., Muller, C.R., and Gunther, E. (1979). Electrophoretic protein variants in inbred strains of *Rattus norvegicus*: Strain distribution, description of a new esterase polymorphism, and linkage studies. *Transpl. Proc.* 11: 1653-1656.
- Bender, K., Nagel, M., and Gunther, E. (1982). Es-6, a further polymorphic esterase in the rat. *Biochem. Genet.* 20: 221-228.

- Bender, K., Adams, M., Baverstock, P. R., den Bieman, M., Bissbort, S., Brdicka, R., Butcher, G.W., Cramer, D.V., von Deimling, O., Festing, M.F.W., Guenther, E., Guttman, R.D., Hedrich, H.J., Kendall, P.B., Kruge, R., Moutier, R., Simon, B., Womack, J.E., Yamada, J., and van Zutphen, L.F.M. (1984). Biochemical markers in inbred strains of the rat (*Rattus norvegicus*). Immunogenet. 19: 257-266.
- Bender, K., Bissbort, S., Kuhn A, Nagel, M., and Gunther, E. (1985). Genetic variation of an Acid Phosphatase (*Acp-2*) in the laboratory rat: Possible homology with mouse AP-1 and human ACP-2. Biochem. Genet. 24: 1-11.
- Birkenmeier, E.H., Davison, M.T., Beamer, W.G., Ganschow, R.E., Vogler, C.A., Gwynn, B., Lyford, K.A., Maltais, L.M., and Wawrzyniak, C.J. (1989). Murine mucopolysaccharidosis type VII. Characterization of a mouse with  $\beta$ -glucuronidase deficiency. J. Clin. Invest. 83: 1258-1266.
- Boerwinkle, E., Xiong, W.J., Fourest, E., and Chan, L. (1989). Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: Application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 212-216.
- Botstein, D., White, R., Skolnick, M., and Davis, R. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 32: 314-331.
- Buchberg, A.M., Brownell, E., Nagata, S., Jenkins, N.A., and

- Copeland, N.G. (1989). A comprehensive genetic map of murine chromosome 11 reveals extensive linkage conservation between mouse and human. *Genetics* 122: 153-161.
- Buckwalter, M.S., Katz, R.W., and Camper, S.A. (1991). Localization of the panhypopituitary dwarf mutation (*df*) on mouse chromosome 11 in an interspecific backcross. *Genomics* 10: 515-526.
- Buxton, J., Shelbourne, P., Davies, J., Jones, C., van Tongeren, T., Aslanidis, C., de Jong, P., Jansen, G., Anvret, M., Riley, B., Williamson, R., and Johnson, K. (1992). Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature* 355: 547-548.
- Capon, D.J., Chen, E.Y., Levinson, A.D., Seeburg, P.H., and Goeddel, D.V. (1983). Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature* 302: 33-37.
- Carter, N.D. and Parr, C.W. (1969). Phosphogluconate dehydrogenase polymorphism in british wild rats. *Nature* 224: 1214-1215.
- Cash, J.M., Remmers, E.F., Goldmuntz, E.A., Crofford, L.J., Zha, H., Hansen, C.T., and Wilder, R.L. (1993). Genetic mapping of the athymic nude (*RNU*) locus in the rat to a region on chromosome 10. *Mammalian Genome* 4: 37-42.
- Castle, W.E. and King, H.D. (1944). Linkage studies of the rat (*Rattus norvegicus*) VI. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 30: 79-82.



- Cawthon, R.M., Weiss, R., Xu, G., Viscochil, D., Culver, M., Stevens, J., Robertson, M., Dunn, D., Gestesland, R., O'Connell, P., and White, R. (1990). A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell* 62: 193-201.
- Ceci, J.D., Siracusa, L.D., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (1989). A molecular genetic linkage map of mouse chromosome 4 including the localization of several proto-oncogenes. *Genomics* 5: 699-709.
- Chao, N.J., Timmerman, L., McDevitt, H.O., and Jacob, C.O. (1989). Molecular characterization of MHC class II antigen ( $\beta$ 1 domain) in the BB diabetes-prone and -resistant rat. *Immunogenet.* 29: 231-234.
- Cicila, G.T., Rapp, J.P., Wang, J.-M., Lezin, E.S., Ng, S.C., and Kurtz, T.W. (1993). Linkage of 11 $\beta$ -hydroxylase mutations with altered steroid biosynthesis and blood pressure in the Dahl rat. *Nature Genet.* 3: 346-353.
- Cohen, D.R., Hapel, A.J., and Young, I.G. (1986). Cloning and expression of the rat interleukine-3 gene. *Nucleic Acids Res.* 14: 3641-3658.
- Collins, F.S. (1992). Positional cloning: let's not call it reverse anymore. *Nature Genet.* 1: 3-6.
- Comitee for a standard karyotype of *Rattus norvegicus* (1973). Standard karyotype of the norway rat, *Rattus norvegicus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 12: 199-205.
- Cooper, B.J. (1993). Animals models of muscular dystrophy:



- characteristics and applications. *Lab Anim.* 22: 33-37.
- Cornall, R. J., Aitman, T. J., Hearne, C. M., and Todd, J. A. (1991). The generation of a library of PCR-analyzed microsatellite variants for genetic mapping of the mouse genome. *Genomics* 10: 874-881.
- Cowell, K.R., Jezyk, P.F., Haskins, M.E., and Patterson, D.F. (1976). Mucopolysaccharidosis in a cat. *J. Am. Vet. Med.* 109: 334-339.
- Cramer, D.V. (1981). Genetic variation of urinary pepsinogen and its probable linkage to albinism in the rat. *Immunogenet.* 13: 555-558.
- Cramer, D.V., Blankert, J.J. and Paul, L.C. (1985). Linkage of loci encoding a kidney endothelial antigen and fumarate hydratase (*Fh-1*) in the rat. *Biochem. Genet.* 23: 623-629.
- Cramer, D.V., Mowery, P.A., and Adams, M. (1986). Biochemical markers in rats: Linkage relationships of aconidase (*Acon-1*), aldehyde dehydrogenases (*Ahd-2* and *Ahd-c*), alkaline phosphatase (*Akp-1*), and aldehyde hydroxyacid oxidase (*Hao-1*). *Biochem. Genet.* 24: 217-227.
- Cramer, D.V. (1989). Biochemical loci of the rat (*Rattus norvegicus*). *Rat News Letter* 20: 15-20.
- Dalla Favera R, Wong-Staal F, Gallo R C. (1982). Oncogene amplification in promyelocytic leukemia cell line HL-60 and primary leukemic cells of the same patient. *Nature* 299: 61-63.
- Daniel, W.L. (1976). Genetic control of heat sensitivity and

- activity level of murine arylsulfatase B. *Biochem. Genet.* 14: 1003-1018.
- Davies, K.E., Jackson, J., Williamson, R., Harper, P.S., Ball, S., Sarfarazi, M., Meredith, L., and Fey, G. (1983). Linkage analysis of myotonic dystrophy and sequences on chromosome 19 using a cloned complement 3 gene probe. *J. Med. Genet.* 20: 259-263.
- Davisson, M.T., Roderick, T.H., Doolittle, D.P., Hillyard, A.L., and Guidi, J.N. (1990). *Mus musculus* (mouse) nuclear genes. pp. 4.3-4.35. In "Genetic maps: Locus maps of complex genomes". (O'Brien, S.J. ed., Fifth ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Decker, R.A., Moore, J., Ponder, B., and Weber, J.L. (1992). Linkage mapping of human chromosome 10 microsatellite polymorphisms. *Genomics* 12: 604-606.
- De Gouyon, B., Melanitou, E., Richard, M.F., Requarth, M., Hahn, I.H., Guenet, J.L., Demenais, F., Julier, C., Lathrop, G.M., Boitard, C., and Avner, P. (1993). Genetic analysis of diabetes and insulinitis in an interspecific cross of the nonobese diabetic mouse with *Mus spretus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1877-1881.
- Deng, Y. and Rapp, J.P. (1992). Cosegregation of blood pressure with angiotensin converting enzyme and atrial natriuretic peptide receptor genes using Dahl salt-sensitive rats. *Nature Genet.* 1: 267-272.
- D'Eustachio, P. and Davisson, M.T. (1993). Resolution of the

- staggerer (*sg*) mutation from the neural cell adhesion molecule locus (*Ncam*) on mouse chromosome 9. *Mammalian Genome* 4: 278-280.
- Devereux, J., Haeblerli, P., and Smithies, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis program for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12: 387-395.
- Dietrich, W., Katz, H., Lincoln, S.E., Shin, H.-S., Freidman, J., Dracopoli, N.C., and Lander, E.S. (1992). A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics* 131: 423-447.
- Donner, M.E., Skow, L.C., Kunz, H.W., and Gill, III, T.J. (1985). Electrophoretic variation in low molecular weight lens crystallins from inbred strains of rats. *Biochem. Genet.* 23: 787-800.
- Dubay, C., Vincent, M., Samani, N.J., Hilbert, P., Kaiser, M.A., Beressi, J.-P., Kotelevtsev, Y., Beckmann, J.S., Soubrier, F., Sassard, J., and Lathrop, G.M. (1993). Genetic determinants of diastolic and pulse pressure map to different loci in Lyon hypertensive rats. *Nature Genet.* 3: 354-357.
- Edwards, A., Hammond, H.A., Jin, L., Caskey, C.T., and Chakraborty, R. (1992). Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12: 241-253.
- Egeland, J.A., Gerhard, D.S., Pauls, D.S., Sussex, J.N., Kidd, K.K., Allen, C.R., Hostetter, A.M., and Housman, D.E.

- (1987). Bipolar affective disorders linked to DNA markers on chromosome 11. *Nature* 325: 783-787.
- Elliott, R.W. (1989). DNA polymorphisms. pp.537-558. In "Genetic variants and strains of the laboratory mouse". 2nd ed. Lyon, M.F. and Seale, A.G. eds., Oxford University Press, New York.
- Elliott, R.W., Lee, B.K., and Eicher, E.M. (1990). Localization of the growth hormone gene to the distal half of mouse chromosome 11. *Genomics* 8: 591-594.
- Elliott, R.W. and Yen, C.-H. (1991). DNA variants with telomere probe enable genetic mapping of ends of mouse chromosomes. *Mammalian Genome* 1: 118-122.
- Eppig, J.T. (1992). Mouse DNA clones and probes. *Mammalian Genome* 3: 300-430.
- Eppien, J.T. (1988). On simple repeated AT/CA sequences in animal genomes: A critical reappraisal. *J. Hered.* 79: 409-417.
- Epstein, D..J., Vekemans, M., and Gros, P. (1991). Splotch (*Sp<sup>sh</sup>*), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3. *Cell* 67: 767-774.
- Eriksson, K., Halkka, O., Lokki, J., and Saura, A. (1976). Enzyme polymorphism in feral, outbred and inbred rats (*Rattus norvegicus*). *Heredity* 37: 341-349.
- Erickson, R.P. (1990). Mapping dysmorphic syndromes with the aid of the human/mouse homology map. *Am. J. Hum. Genet.*

46: 1013-1016.

Esumi, H., Takahashi, Y., Sato, S., Nagase, S., and Sugimura, T. (1983). A seven-base-pair deletion in an intron of the albumin gene of analbuminemic rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 95-99.

Eva, A., Tronick, S.A., Gol, R.A., Pierce, J.H., and Aaronson, A. (1983). Transforming genes of human hematopoietic tumors: frequent detection of *ras*-related oncogenes whose activation appears to be independent of tumor phenotype. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4926-4930.

Festing, M.F.W. (1992). Polymorphic loci in inbred rat strains and substrains: a consolidated list for 71 loci. Rat News Letter 26: 23-48.

Fidzianska, E., Abramowicz, T., Czartoryska, B., Glogowska, I., Gorska, D., and Rodo, M. (1984). Assignment of the gene for human arylsulfatase B, *ARSB*, to chromosome region 5p11-5qter. Cytogenet. Cell Genet. 38: 150-151.

Finley S L. (1988). Rat alkaline phosphatase: the identification of a new allele. Biochem. Genet. 26: 361-365.

Fletcher, C., Norman, D.J., and Heintz, N. (1991). Genetic mapping of meander tail, a mouse mutation affecting cerebellar development. Genomics 9: 647-655.

Fowles, G.A., Adelman, S., Knight, A.M., and Simpson, E. (1992). PCR-analysed microsatellites of the mouse genome -- additional polymorphisms among ten inbred mouse strains.



Mammalian Genome 3: 192-196.

- Fox, M.F., Du Toit, D.C., Warnick, L., and Retief, A.E. (1984). Regional localization of alpha-galactosidase (*GLA*) to Xpter-q22, hexosaminidase B (*HEXB*) to 5q13-qter, and arylsulfatase B (*ARSB*) to 5pter-q13. *Cytogenet. Cell Genet.* 38: 45-49.
- Foy, C., Newton, V., Wellesley, D., Harris, R., and read, A.P. (1990). Assignment of the locus for Waardenburg syndrome type 1 to human chromosome 2q37 and possible homology to the Splotch mouse. *Am. J. Hum. Genet.* 46: 1017-1023.
- Fu, Y.-H., Pizzuti, A., Fenwick, R.G. Jr., King, J., Rajnarayan, S., Dunne, P.W., Dubel, J., Nasser, G.A., Ashizawa, T., de Jong, P., Wieringa, B., Korneluk, R., Perryman, M.B., Epstein, H.F., and Caskey, C.T. (1992). An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255: 1256-1258.
- Fukamizu, A., Nishi, K., Cho, T., Saitoh, M., Nakayama, K., Ohkubo, H., Nakanishi, S., and Murakami, K. (1988). Structure of the rat renin gene. *J. Mol. Biol.* 201: 443-450.
- Gasser, D.L. (1972). Seminal vesicle protein in rats: A gene in the fourth linkage group determining electrophoretic variants. *Biochem. Genet.* 6: 61-63.
- Gill, T.J. III., Smith, G.J., Wissler, S.R., and Kunz, H.W. (1989). The rat as an experimental animal. *Science* 245: 269-276.
- Glaser, T., Lane, J. and Housman, D.E. (1990). A mouse model of



- the aniridia-wilms' tumor deletion syndrome. Science 250: 823-827.
- Glaser, T., Walton, D.S., and Maas, R.L. (1992). Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human *PAX6* gene. Nature Genet. 2: 232-239.
- Goldmuntz, E.A., Remmers, E.F., Zha, H., Cash, J.M., Mathern, P., Crofford, L.J., and Wilder, R.L. (1993). Genetic map of 12 polymorphic markers on rat chromosome 1. Genomics 16: 761-764.
- Goffinet, A.M. and Dernoncourt, C. (1991). Localization of the reeler gene relative to flanking loci on mouse chromosome 5. Mammalian Genome 1: 100-103.
- Green, M.C. (1981). Gene mapping. pp. 105-116. In "The mouse in biomedical research I". (H.L.Foster, J.D.Small, and J.G.Fox Eds), Academic Press, New York.
- Greenfield, A.J., Brown, S.D.M., Freidman, J.M., and Bahary, N. (1992). Mapping of clone *D4Smh6b* to the distal end of mouse chromosome 4. Mouse Genome 90: 94.
- Guyer, H., (1992). A comprehensive genetic linkage map of the human genome. Science 258: 67-86.
- Hamada, H., Petrino, M. G. and Kakunaga, T. (1982). A novel repeated element with Z-DNA- forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6465-6469.
- Hamada, H., Seidman, M., Howard, B. H., and Gorman, C. M. (1984). Enhanced gene expression by the poly(dT-dG) poly

- (dC-dA) sequence. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2622-2630.
- Hameister, H., Schulz, W.A., Meyer, J., Thoma S., Adolph, S., Gaa, A., and von Deimling, O. (1992). Gene order and genetic distance of 13 loci spanning murine chromosome 15. *Genomics* 14: 417-422.
- Harper, M.E., Blatt, C., Marks, S., Nesbitt, M.N., and Simon, M.I., (1984). Gene mapping in the mouse by analysis of RFLP segregation in recombinant inbred strains. *Cytogenet. Cell Genet.* 37: 488.
- Harrap, S.B. (1986). Genetic analysis of blood pressure and sodium balance in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens.* 8: 572-582.
- Harris, S.E., Mansson, P.E., Tully, D.B., and Burkhart, B. (1983). Seminal vesicle secretion IV gene: Allelic difference due to a series of 20-base-pair direct tandem repeats within an intron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 6460-6464.
- Harris, S.E., Harris, M.A., Johnson, C.M., Bean, M.F., Dodd, J.G., Matusik, R.J., Carr, S.A., and Crabb, J.W. (1990). Structural characterization of the rat seminal vesicle secretion II protein and gene. *J. Biol. Chem.* 265: 9896-9903.
- Haskins, M.E., Aguirre, G.D., Jezyk, P.F., Desnick, R.J., and Patterson, D.F. (1981). Animal model for human disease: mucopolysaccharidosis I, Hunter, Scheie and Hunter/Scheie syndrome. *Comp. Pathol. Bull.* 8: 3-4.

- Haskins, M.E., Desnick, R.J., DiFerrante, N., Jezyk, P.F., and Patterson, D.F. (1984). b-Glucuronidase deficiency in a dog: a model of human mucopolysaccharidosis VII. *Pediatr. Res.* 18: 980-984.
- Hazan, J., Dubay, C., Pankowiak, M.-P., Becuwe, N., and Weissenbach, J. (1992). A genetic linkage map of human chromosome 20 composed entirely of microsatellite markers. *Genomics* 12: 183-189.
- Hedrich, H.J. (1990). Linkage map. In "Genetic monitoring of inbred strains of rats" (H.J.Hedrich, ed). pp. 405-409. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Higgs, D.R., Goodbourn, S.E.Y., Wainscoat, J.S., Clegg, J.B., and Weatherall, D.J. (1981). Highly variable regions of DNA flank the human globin genes. *Nucleic Acids Res.* 9: 4213-4224.
- Hilbert, P., Lindpaintner, K., Beckmann, J.S., Serikawa, T., Sourbrier, F., Dubay, Cartwright, P., De Gouyon, B., Julier, C., Takahashi, S., Vincent, M., Ganten, D., Georges, M., and Lathrop, G.M. (1991). Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* 353: 521-529.
- Hill, R.E., Favor, J., Hogan, B.M.L., Ton, C.C.T., Saunders, G.F., Hanson, I.M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N.D., and van Heyningen, V. (1991). Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354: 522-525.

- Hillyard, A.L., Doolittle, D.P., Davisson, M.T., and Roderick, T.H. (1992). Locus map of mouse. *Mouse Genome* 90: 8-21.
- Hobbs, A.A. and Rosen, J.M. (1982). Sequence of rat  $\alpha$ - and  $\gamma$ -casein mRNAs: evolutionary comparison of the calcium-dependent rat casein multigene family. *Nucleic Acids Res.* 10: 8079-8098.
- Hoh, J.H. and Revel, J.-P. (1991). A strain specific restriction fragment length polymorphism near the rat connexin-32 (Cx32) gap junction gene. *Mammalian Genome* 1: 193-195.
- Honey, N.K., Sakaguchi, A.Y., Lalley, P.A., Quinto, C., MacDonald, R.J., Creik, C., Bell, G.I., Rutter, W.J., and Naylor, S.L. (1984). Chromosomal assignments of the genes for trypsin, chymotrypsin B, and elastase in mouse. *Som. Cell Mol. Genet.* 10: 377-383.
- Hughes, S.H., Payvar, F., Spector, D., Schimke, R.T., Robinson, H.L., Payne, G.S., Bishop, J.M., and Varmus, H.E. (1979). Heterogeneity of genetic loci in chickens: Analysis of endogenous viral and nonviral genes by cleavage of DNA with restriction endonuclease. *Cell* 18: 347-359.
- Ikadai H, Sakuma Y, Suzuki K, Imamichi, T. (1985). Congenital abnormalities of the male genital organs in the newly established TW rat strain. *Cong. Anim.* 25:65-71.
- Ikadai H, Fujita H, Ajisawa C, and Imamichi, T. (1987). Sperm retention cysts in the efferent duct and testicular atrophy of TE inbred rats. *J. Reprod. Fert.* 81:635-641.
- Ikadai H, Ajisawa C, Taya K, and Imamichi, T. (1988a).

- Suprainguinal ectopic scrota of TS inbred rats. J. Reprod. Fert. 84:701-707.
- Ikadai H, Ajisawa C, Tsujimura S, Watanabe, G., Taya K, and Imamichi, T. (1988b). A new male pseudohermaphrodite rat mutant with androgen deficiency. J. Reprod. Fert. 84:303-312.
- Ikadai H, Noguchi, J., Yoshida, M., and Imamichi, T. (1992). An aspermia rat mutation (*as/as*) with spermatogenic failure at meiosis. J. Vet. Med. Sci. 54: 745-749.
- 猪貴義 (1982). 実験動物の種と系統: ヒト疾患モデル動物. pp. 59-65, "実験動物学" (株) 養賢堂, 東京.
- Iyanagi, T., Watanabe, T., and Uchiyama, Y. (1989). The 3-methylcholanthrene-inducible UDP-glucuronosyltransferase deficiency in the hyperbilirubinemic rat (Gunn rat) is caused by  $\alpha$ -1 frameshift mutation. J. Biol. Chem. 264: 21302-21307.
- Jacob, H.J., Lindpaintner, K., Lincoln, S.E., Kumumi, K., Bunker, R.K., Mao, Y.-P., Ganten, D., Dzau, V.J., and Lander, E.S. (1991). Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. Cell 67: 213-224.
- Jacob, H.J., Pettersson, A., Wilson, D., Mao, Y.-P., Lernmark, A., and Lander, E.S. (1992). Genetic dissection of autoimmune type I diabetes in the BB rat. Nature Genet. 2: 56-60.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., and Thein, S.L. (1985).



- Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., Neumann, R., and Keyte, J. (1988). Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 10953-10971.
- Jenkins, E.P., Hsieh, C.-L., Milatovich, A., Normington, K., Berman, D.M., Francke, U., and Russell, D.W. (1991). Characterization and chromosomal mapping of a human steroid 5 $\alpha$ -reductase gene and pseudogene and mapping of the mouse homologue. *Genomics* 11: 1102-1112.
- Jimenez Marin, D. (1974). Enzyme inheritance in the laboratory rat. *J. Hered.* 65: 235-237.
- Jones, J.M., Albin, R.L., Feldman, E.L., Simin, K., Schuster, T.G., Dunnick, W.A., Collins, J.T., Chrisp, A.E., Taylor, B.A., and Meisler, M.H. (1993). *mnd2*: a new mouse model of inherited motor neuron disease. *Genomics* 16: 669-677.
- Jordan, T., Hanson, I., Zaletayev, D., Hodgson, S., Prosser, J., Seawright, A., Hastie, N., and van Heyningen, V. (1991). The human *PAX6* gene is mutated in two patients with aniridia. *Nature Genet.* 1: 328-332.
- Kay, G., Thakker, R.V., and Rastan, S. (1991). Determination of a molecular map position for Hyp using a new interspecific backcross produced by in vitro fertilization. *Genomics* 11: 651-657.
- King, T.H., Lee, B.K., Behringer, R.R., and Eicher, E.M. (1991).



- Mapping anti-mullerian hormone (*AMH*) and related sequences in the mouse: identification of a new region of homology between MMU10 and HSA19p. *Genomics* 11: 273-283.
- Kunieda T, Ikadai H, Matsui M, Nomura, N., Imamichi, T., and Ishizaki, R. (1989a). Novel restriction fragment length polymorphism of the growth hormone gene in inbred rats. *Biochem. Genet.* 27:591-602.
- Kunieda T, Matsui M, Nomura N, Imamichi, T., and Ishizaki, R. (1989b). Restriction fragment length polymorphism of cardiac myosin heavy chain gene in rats and its strain distribution. *Exp. Anim.* 38:333-336.
- Kunieda T, Matsui M, Nomura N, Ishizaki, R., Yoshida, M.C., and Imamichi, T. (1989c). Restriction fragment length polymorphism as a genetic marker of the c-myc oncogene in rats. *Jpn. J. Vet. Sci.* 51:1295-1298.
- Kunieda, T., Kobayashi, E., Ikadai, H., Imamichi, T., Nomura, N, and Ishizaki, R. (1990a). Restriction fragment length polymorphisms detected in N-ras-related sequences of rats and their linkage analyses. *Biochem. Genet.* 28: 631-642.
- Kunieda, T. (1990b). Studies on DNA rearrangement on mammalian genome. Ph.D. thesis, University of Tokyo.
- Kurtz, T.W., Simonet, L., Kabra, P.M., Wolfe, S., Chan, S., and Hjelle, B.L. (1990). Cosegregation of the renin allele of the spontaneously hypertensive rat with an increase in blood pressure. *J. Clin. Invest.* 85: 1328-1332.
- Kwiatkowski, D.J., Henske, E.P., Weimer, K., Ozelius, L.,

- Gusella, J.F., and Haines, J. (1992). Construction of a GT polymorphism map of human 9q. *Genomics* 12: 229-240.
- Kwok, K., Ledley, F.D., DiLella, A.G., Robson, K.J.H., and Woo, S.L.C. (1985). Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* 24: 556-561.
- Lamb, P. and Crawford, L. (1986). Characterization of human p53 gene. *Mol. Cell. Biol.* 6: 1379-1385.
- Lander, E.S. and Botstein, D. (1986). Mapping complex genetic traits in humans: new strategies using a complete RFLP linkage map. Cold spring harbor symp. Quant. Biol. 51: 46-61.
- Levan, G., Klinga, K., Szpirer, C., and Szpirer, J. (1990). Gene map of the rat (*Rattus norvegicus*). pp. 4.80-4.87. In "Genetic maps: locus maps of complex genomes". (O'Brien, S.J., ed., 5th ed.), Cold spring harbor laboratory press, New York.
- Levan, G., Szpirer, J., Szpirer, C., Klinga, K., Hanson, C., and Islam, M.Q. (1991). The gene map of the rat (*Rattus norvegicus*) and comparative mapping with mouse and man. *Genomics* 10: 699-718.
- Levan, G., Levan, K.K., Hanson, C., Szpirer, C., and Szpirer, J. (1992). The rat gene map 1992. *Rat news Letter* 28: 10-34.
- Lindpaintner, K., Takahashi, S., and Ganten, D. (1990). Structural alterations of the renin gene in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: examination of genotype-

- phenotype correlations. *J. Hypertens.* 8: 763-773.
- Litt, M. and Lucy, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 397-401.
- Love, J. M., Knight, A. M., McAleer, M. A., and Todd, J. A. (1990). Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatellites. *Nucleic Acids Res.* 18: 4123-4130.
- Lowe, T., Sharefkin, J., Yang, S.Q., and Dieffenbach, C.W. (1990). Computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reactions. *Nucleic Acids Res.* 18: 1757-1761.
- Lundin, L.G. (1993). Evolution of the vertebrate genome as reflected in paralogous chromosomal regions in man and the house mouse. *Genomics* 16: 1-19.
- Luty, J.A., Guo, Z., Willard, H.F., Ledbetter, D.H., Ledbetter, S., and Litt, M. (1990). Five polymorphic microsatellite VNTRs on the human X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 46: 776-783.
- Lyon, M.F. and Hawkes, S.G. (1970). X-linked gene for testicular feminization in the mouse. *Nature* 227: 1217-1219.
- Lyon, M.F. and Kirby, M.C. (1992). Mouse chromosome atlas. *Mouse Genome* 90: 22-44.
- Mahdavi, V., Periasamy, M., and Nadal-Ginard, B. (1982).

- Molecular characterization of two myosin heavy chain genes expressed in the adult heart. *Nature* 297: 659-664.
- Matsumoto, K. (1980). New polymorphisms of esterase 7 and esterase 8 in inbred strains of rats: Tissue expression and linkage studies. *Biochem. Genet.* 18: 879-887.
- Matsumoto, K., Matsuhashi, A., and Aizawa, M. (1982). A new genetic variation of the malate dehydrogenase-like enzyme (*MDL-1*) in inbred rats and its possible linkage. *Biochem. Genet.* 20: 443-448.
- Matsumoto, K., McCafferty, E., Neilson, E.G., and Gasser, D.L. (1984). Mapping of the genes for tubular basement membrane antigen and a submaxillary gland protease in the rat. *Immunogenet.* 20: 117-123.
- Matsuo, T., Osumi-Yamashita, N., Noji, S., Ohuchi, H., Koyama, E., Myokai, F., Matsuo, N., Taniguchi, S., Doi, H., Iseki, S., Ninomiya, Y., Fujiwara, M., Watanabe, T., and Eto, K. (1993). A mutation in the Pax-6 gene in rat amall eye is associated with impaired migration of midbrain crest cells. *Nature Genet.* 3: 299-304.
- 松下宏 (1983). ヒト疾患モデル動物: 疾患モデル動物, その現状と将来. pp. 365-376. "実験動物ハンドブック". 長澤弘, 藤原公策, 前島一淑, 松下宏, 山田淳三, 横山昭 共編. (株)養賢堂, 東京.
- McInnis, M.G., Lutfalla, G., Slauchhaupt, S., Petersen, M.B., Uze, G., Chakravarti, A., and Antonarakis, S.E. (1991). Linkage mapping of highly informative DNA polymorphisms

- within the human interferon- $\alpha$  receptor gene on chromosome 21. *Genomics* 11: 573-576.
- McLean, J.W., Tomlinson, J.E., Kuang, W.-J., Eaton, D.L., Chen, E.Y., Fless, G.M., Scanu, A.M., and Lawn, R.M. (1987). cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen. *Nature* 330: 132-137.
- Miesfeld, R., Krystal, M., and Arnheim, N. (1981). A number of new repeated sequence family which is conserved throughout eukaryotic evolution is found between the human delta- and beta-globin genes. *Nucleic Acids Res.* 9: 5931.
- Mizuno, M. and Suzuki, K. (1978). Genetic variation of pancreatic  $\alpha$ -amylase in the rat, *Rattus norvegicus*. *Jpn. J. Gent.* 53: 137-142.
- Mock, A., Nordan, R., Justice, M., Kozak, C., Jenkins, N., Copeland, N., Clark, N., Wong, G., and Rudikoff, S. (1989). The murine *IL-6* gene maps to the proximal region of chromosome 5. *J. Immunol.* 142:1372-1376.
- Moore, S.S., Sargeant, L.L., King, T.J., Mattick, J.S., Georges, M., and Hetzel, J.S. (1991). The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterogenous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics* 10: 654-660.
- Mori, M., Ishizaki, K., Yamada, H., Chen, H., Suguyama, T., Serikawa, T., and Yamada, J. (1989). Restriction fragment length polymorphisms of the angiotensinogen gene in inbred rat strains and mapping of the gene on chromosome 19q.



- Cytogenet. Cell Genet. 50: 42-49.
- Morris, J.M. and Mahesh, V.B. (1963). Further observations on the syndrome, "testicular feminization". Amer. J. Obst. Gynecol. 87: 731-748.
- Moullier, P., Bohl, D., Heard, J.-M., and Danos, O. (1993). Correction of lysosomal storage in the liver and spleen of MPS VII mice by implantation of genetically modified skin fibroblasts. Nature Genet. 4: 154-159.
- Moutier, R., Toyama, K., and Charrier, M.F. (1973). Linkage of a plasma protein marker (*Gl-I*) nad the hooded locus in the rat, *Rattus norvegicus*. Biochem. Genet. 10: 395-398.
- Nadeau, J.H. and Taylor, B.A. (1984). Lengths of chromosomal segments conserved since divergence of man and mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 814-818.
- Nadeau, J.H. and Reiner, A.H. (1989). Linkage synteny homologies in mouse and human. pp.506-536. In "Genetic variants and strains of the laboratory mouse". (Lyon, M.F. and Seale, A.G. eds., 2nd ed.), Oxford University Press, New York.
- Nadeau, J.H., Compton, J.G., Giguere, V., Rossant, J., and Varmuza, S. (1992a). Close linkage of retinoic acid receptor genes with homeobox- and keratin-encoding genes on paralogous segments of mouse chromosomes 11 and 15. Mammlian Genome 3: 202-208.
- Nadeau, J.H., Davisson, M.T., Doolittle, D.P., Grant, P., Hillyard, A.L., Kosowsky, M.R., and Roderick, T.H. (1992b).



- Comparative map for mice and humans. *Mammalian Genome* 3: 480-536.
- Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E., and White, R. (1987). Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235: 1616-1622.
- Nakhoda, A.F., Like, A.A., Chappel, C.I., Murray, F.T., and Marliiss, E.B. (1976). The spontaneous diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. *Diabetes* 26: 100-112.
- Nara, Y., Nabika, T., Ikeda, K., Sawamura, M., Endo, J., and Yamori, Y. (1991). Blood pressure cosegregates with a microsatellite of angiotensin I converting enzyme (ACE) in F2 generation from a cross between original normotensive Wistar-Kyoto rat (WKY) and stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 941-946.
- Nikaido, H., Yamada, J., and Kondo, Y. (1982). Male urinary protein-1 (MUP-1) in the rat: Mup-1 assigned to linkage group II. *J.Hered.* 73: 119-122.
- 野口純子, 味沢千代, 筏井洋, 今道友則. (1990). 脂腺肥大を伴う被毛異常ラット (Ragged ラット). *実験動物* 39: 383-388.
- Nordheim, A. and Rich, A. (1983). The sequence (dC-dA)n (dG-dT)n forms left handed Z-DNA in negatively supercoiled plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1821-1825.
- Nojima, H., Yagawa, Y., and Kawakami, K. (1989). The Na, K-

- ATPase alpha 2 subunit gene displays restriction fragment length polymorphisms between the genomes of normotensive and hypertensive rats. *J. Hypertens.* 7: 937-940.
- O'Brien, S.J., Womack, J.E., Lyons, L.A., Moore, K.J., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (1993). Anchored reference loci for comparative genome mapping in mammals. *Nature Genet.* 3: 103-112.
- Okamoto, K. and Aoki, K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circ. J.* 27: 282-293.
- Orkin, S.H. (1986). Reverse genetics and human disease. *Cell* 47: 845-850.
- Otto, J. and von Deimling, O. (1983). Esterase-17 (*Es-17*). Characterization and genetic location on chromosome 9 of a bis-p-nitrophenyl phosphate-resistant esterase of the house mouse (*Mus musculus*). *Biochem. Genet.* 21: 37-48.
- Palmiter R D, Brinster R L, Hammer R E, et al. (1982). Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with a metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300: 611-615.
- Persico, M.G., Viglietto, G., Martini, G., Toniolo, D., Paonessa, G., Moscatelli, C., Dono, R., Vulliamy, T., Luzzatto, L., and D'Urso, M. (1986). Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary structure of the protein and unusual 5' no-coding region. *Nucleic Acids Res.* 14: 2511-2522.
- Pilz, A., Moseley, H., Peters, J., and Abbott, C. (1991).

- Comparative mapping of mouse chromosome 4 and human chromosome 9: *Lv*, *Orm*, and *Hxb* are closely linked on mouse chromosome 4. *Mammalian Genome* 3: 247-249.
- Pravenec, M., Kren, V., and Klir, P. (1987). Assignment of the *Es-6* locus to linkage group VII of the rat (*Rattus norvegicus*) by the use of HXB recombinant inbred rat strains. *J. Immunogenet.* 14: 313-316.
- Pravenec, M., Klir, P., Kren, V., Zicha, J. and Kunes, J. (1989). An analysis of spontaneous hypertension in spontaneously hypertensive rats by means of new recombinant inbred strains. *J. Hypertens.* 7: 217-222.
- Pravenec, M., Simonet, L., Kren, V., Kunes, J., Levan, G., Szpirer, J., Szpirer, C., and Kurtz, T. (1991). The rat renin gene: assignment to chromosome 13 and linkage to the regulation of blood pressure. *Genomic* 9: 466-472.
- Proudfoot, N.J., Gil, A., and Maniatis, T. (1982). The structure of the human zeta-globin gene and a closely linked, nearly identical pseudogene. *Cell* 31: 553-563.
- Rapp J P, Wang S-M, Dene H. (1989). A genetic polymorphism in the renin gene of Dahl rats cosegregates with blood pressure. *Science* 243: 542-544.
- Remmers, E.F., Goldmuntz, E.A., Cash, M.J., Crofford, L.J., Misiewicz-Poltorak, B., Zha, H., and Wilder, R.L. (1992). Genetic map of nine polymorphic loci comprising a single linkage group on rat chromosome 10: evidence for linkage conservation with human chromosome 17 and mouse chromosome

11. Genomics 14: 618-623.
- Remmers, E.F., Goldmuntz, E.A., Zha, H., Crofford, L.J., Cash, J.M., Mathern, P., Du, Y., and Wilder, R.L. (1993a). Linkage map of seven polymorphic markers on rat chromosome 18. Mammalian Genome 4: 265-270.
- Remmers, E.F., Goldmuntz, E.A., Cash, M.J., Zha, H., Crofford, L.J., Misiewicz-Poltorak, B., Mathern, P., and Wilder, R.L. (1993b). Map of seven polymorphic markers on rat chromosome 14: linkage conservation with human chromosome 4. Mammalian Genome 4: 90-94.
- Richards, R.I., Holman, K., Shen, Y., Kozman, H., Harley, H., Brook, D., and Shaw, D. (1991). Human glandular kallikrein genes: genetic and physical mapping of the *KLK1* locus using a highly polymorphic microsatellite PCR marker. Genomics 11: 77-82.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B.-S., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.-L., Drum, M.L., Iannuzzi, M.C., Cillins, F.S., and Tsui, L.-C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 245: 1066-1073.
- Robinson, R. (1979). Taxonomy and genetics. pp. 37-54. In "The laboratory rat I". (Baker, H.J., Lindsey, J.R., Weisbroth, S.H. eds.), Academic Press, New York.
- Royle, N.J., Clarkson, R.E., Wong, Z., and Jeffreys, A.J. (1988). Clustering of hypervariable minisatellites in the

- proterminal regions of human autosomes. *Genomics* 3: 352-360.
- Ruddle, F.H. (1984). The william allan memorial award adress:  
reverse genetics and beyond. *Am. J. Hum. Genet.* 36: 944-953.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988)  
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a  
thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sandford, A.J., Shirakawa, T., Maffatt, M.F., William, S.I., Ra, C., Young, R.P., Cookson, W.O., and Lathrop, G.M. (1993).  
Localization of atopy and beta subunit of high-affinity IgE  
receptor (Fc epsilon RI) on chromosome 11q. *Lancet* 341: 332-334.
- Seldin, M.F., Saunders, A.M., Rochelle, J.M., and Howard, T.A. (1991). A proximal mouse chromosome 9 linkage map that  
further defines linkage groups homologous with segments of  
human shromosomes 11, 15, and 19. *Genomics* 9: 678-685.
- Serikawa, T., Kuramoto, T., Hilbert, P., Mori, M., Yamada, J.,  
Dubay, C.J., Lindpaintner, K., Ganten, D., Guenet, J.-L.,  
Lathrop, G.M., and Beckmann, J.S. (1992). Rat gene mapping  
using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics* 131: 701-721.
- Shull, R.M., Munger, R.J., Spellacy, E., Hall, C.W.,  
Constantopoulos, G., and Neufeld, E.F. (1982). Canine  $\alpha$ -L-  
iduronidase deficiency: a model of mucopolysaccharidosis I.  
*Am. J. Pathol.* 109: 244-248.
- Simmon, B., DeLooze, S., Ronai, A., and Deimling, O.v. (1985).



- Identification of rat liver carboxyesterase isozymes (EC3.1.1.1) using polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing. *Electrophoresis* 6: 575-582.
- Sladka, M., Kren, V, and Prevenec, M. (1990). Question of homology between rat chromosome 8 and mouse chromosome 9. *Transpl. Proc.* 22: 2563.
- Soare, M.B., Schon, E., Henderson, A., Karathanasis, K., Cate, R., Zettlin, S., Chirgwin, J., and Efstratiadis, A. (1985). RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin I gene is a functional retroposon. *Mol. Cell. Biol.* 5: 2090-2103.
- Stallings, R. L., Torney, D. C., Hildebrand, C. E., Longmire, J. L., Deaven, L. L., Jett, J. H., Doggett, N. A., and Moyzis, R. K. (1990). Physical mapping of human chromosomes by repetitive sequence fingerprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6218-6222.
- Stallings, R. L., Ford, A. F., Nelson, D., Torney, D. C., Hildebrand, C. E., and Moyzis, R. K. (1991). Evolution and distribution of (GT)<sub>n</sub> repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* 10: 807-815.
- Stolc, V. (1987). Genetics of aconitase-1 and major urinary protein-1 in the rat. *Transpl. Proc.* 19: 3144-3145.
- Stolc, V. (1990). DNA and mRNA sequences in the rat. *Rat news Let.* 23: 2534.
- Sundberg, J.P. (1991). Mouse mutations: inherited disease models and biomedical tools. *Lab Anim.* 20: 40-49.
- Szpirer, J., Levan, G., Thom, M., and Szpirer, C. (1984). *Gene*



- mapping in the rat by mouse-rat somatic cell hybridization synteny of the albumin and  $\alpha$ -fetoprotein genes and assignment to chromosome 14. *Cytogenet. Cell Genet.* 38: 142-149.
- Szpirer, C., Riviere, M., Szpirer, J., Genet, M., Dreze, P., Islam, M.Q., and Levan, G. (1990). Assignment of 12 loci to rat chromosome 5: Evidence that this chromosome is homologous to mouse chromosome 4 and human chromosome 1 (1p arm). *Genomics* 6: 679-684.
- 立花資和, 筏井洋, エルザ・ガティカ, 今道友則. (1992). ラットにおける新しい esterase の遺伝子座、*Es-19*. *実験動物* 41: 235-237.
- Takahashi, R., Mihara, K., Maeda, S., Yamaguchi, T., Chen, H.-L., Aoyama, N., Murano, S.-H., Hatanaka, M., and Suguyama, T. (1986). Secondary activation of *c-abl* may be related to translocation to the nucleolar organizer region in an in vitro cultured rat leukemia cell line (K3D). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1079-1083.
- Takahashi, M., Yokota, H., Ayusawa, D., Oishi, M., and Kunieda, T. (1992). A restriction fragment length polymorphism (RFLP) locus of rat (*Rattus norvegicus*) linked to the *Cs-1* locus of rat linkage group XIII. *Biochem. Genet.* 30: 537-544.
- Takeuchi, T., Suzuki, H., Sakurai, S., Nogami, H., Okuma, S., and Ishikawa, H. (1990). Molecular mechanism of growth hormone (GH) deficiency in the spontaneous dwarf rat:

- detection of abnormal splicing of GH messenger ribonucleic acid by the polymerase chain reaction. *Endocrinol.* 126: 31-38.
- Tanase, H., Suzuki, Y., Ooshima, A., Yamori, Y., and Okamoto, K. (1970). Genetic analysis of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circ. J.* 34: 1197-1212.
- Tanase, H. and Suzuki, Y. (1971). Strain difference and genetic determination of blood pressure in rats. *Exp. Anim.* 20: 1-8.
- Tassabehji, M., Read, A.P., Newton, V.E., Harris, R., Balling, R., Gruss, P., and Strachan, T. (1992). Waardenburg syndrome patients have mutations in the human homologue of the *Pax-3* paired box gene. *Nature* 355: 635-636.
- Tassabehji, M., Read, A.P., Newton, V.E., Patton, M., Gruss, P., Harris, R., and Strachan, T. (1993). Mutations in the *PAX3* gene causing waardenburg syndrome type 1 and type 2. *Nature Genet.* 3: 26-30.
- 田内清憲, 鈴木勝士, 今道友則. (1980). 高頻度に先天性水腎症を発生するラットの育成とその形態学的特徴. *先天異常* 20: 1-6.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17: 6463-6471.
- Taylor, B.A. and Grieco, D. (1991). Localization of the gene encoding insulin-like growth factor I on mouse chromosome 10. *Cytogenet. Cell Genet.* 56: 57-58.
- Thigpen, A.E., Davis, D.L., Milatovich, A., Mendonca, B.B.,

- Imperato-McGinley, J., Griffin, J.E., Francke, U., Wilson, J.D., and Russell, D.W. (1992). Molecular genetics of steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. *J. Clin. Invest.* 90: 799-809.
- Todd, J.A., Aitman, T.J., Cornall, R.J., Ghosh, S., Hall, J.R.S., Hearne, C.M., Knight, A.M., Love, J.M., McAleer, M.A., Prins, J., Rodrigues, N., Iathrop, M., Pressey, A., Delarato, N.H., Peterson, L.B., and Wicker, L.S. (1991). Genetic analysis of autoimmune type 1 diabetes mellitus in mice. *Nature* 351: 542-547.
- Tommerup, N., Schmp, W., Meinecke, P., Pedersen, S., Bolund, L., Brandt, C., Goodpasture, C., Guldberg, P., Held, K.R., Reinwein, H., Saugstad, O.D., Scherer, G., Skjeldal, O., Toder, R., Westvik, J., van der Hagen, C.B., and Wolf, U. (1993). Assignment of an autosomal sex reversal locus (*SRA1*) and campomelic dysplasia (*CMPD1*) to 17q24.3-q25.1. *Nature Genet.* 4: 170-173.
- Truett, G.E., Bahary, N., Friedman, J.M., and Liebel, R.L. (1991). Rat obesity gene fatty (*fa*) maps to chromosome 5: Evidence for homology with the mouse gene diabetes (*db*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7806-7809.
- van der Meer-De Jong, R., Dickinson, M.E., Woychik, R.P., Stubbs, L., Hetherington, C.M., and Hogan, B.L.M. (1990). Location of the gene involving the small eye mutation on mouse chromosome 2 suggests homology with human aniridia 2 (*AN2*). *Genomics* 7: 270-275.

- Vanha-Perttula, T., Bardin, C.W., Allison, J.E., Gumbreck, L.G., and Stanley, A.J. (1970). "Testicular feminization" in the rat: morphology of the testis. *Endocrinol.* 89: 611-619.
- van Zutphen, L.F.M., Lagerwerf, A., Bouw, J., and den Bieman, M.G.C. (1981). Biochemical polymorphism in the rat: Genetics of three electrophoretic variants and characterization of inbred strains. *Biochem. Genet.* 19: 173-186.
- van Zutphen, L.F.M., den Bieman, M.G.C., Hedrich, H.J., and Kluge, R. (1985). Assignment of *Lap-1* to lineage group I of the rat (*Rattus norvegicus*). *Biochem. Genet.* 23: 599-606.
- 若藤靖匡, 外尾亮治, 黄坤正, 高倉元史, 高橋和明, 今道友則. (1984). 遺伝的に低産仔を示す雄ラットと低産仔発現の原因について. *家畜繁殖誌* 30: 146-153.
- Wallece, M., Marchuk, D., Andersen, L., Letcher, R., odeh, H., Saulino, A., Fountain, J., Brereton, A., Nicholson, J., Mitchell, A., Brownstein, B., and Collins, F. (1990). Type 1 neurofibromatosis gene: identification of large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 249: 181-186.
- Walsh, P.C., Madden, J.D., Harrod, M.J., Goldstein, J.L., McDonald, P.C., and Wilson, J.D. (1974). Familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 2. Decreased dihydrotestosterone formation in pseudovaginal perineoscrotal hypospadias. *N. Engl. J. Med.* 291: 944-949.
- Watanabe, T., Sakai, Y., Miyawaki, S., Shimizu, A., Koiwai, O., and Ohno, K. (1991). A molecular genetic linkage map of

- mouse chromosome 19, including the *lpr*, *Ly-44*, and *Tdt* genes. *Biochem. Genet.* 29: 325-335.
- Watson, M.L., D'Eustachio, P., Mock, B.A., Steinberg, A.D., Morse III, H.C., Oakey, R.J., Howard, T.A., Rochelle, J.M., and Seldin, M.F. (1992). A linkage map of mouse chromosome 1 using an interspecific cross segregating for the *gld* autoimmunity mutation. *Mammalian Genome* 2: 158-171.
- Waye, J.S. and Fourney, R.M. (1990). Identification of complex DNA polymorphisms based on variable number of tandem repeats (VNTR) and restriction site polymorphism. *Hum. Genet.* 84: 223-227.
- Weber, J.L. and May, P.E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 288-296.
- Weber, J.L. (1990). Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics* 7: 524-530.
- Weber, J.L., Polymeropoulos, M.H., May, P.E., Kwitek, A.E., Xiao, H., McPherson, J.D., and Wasmuch, J.J. (1991). Mapping of human chromosome 5 microsatellite DNA polymorphisms. *Genomics* 11: 695-700.
- White, R., Leppert, M., Bishop, D.T., Barker, D., Berkowitz, J., Brown, C., Callahan, P., Holm, T., and Jerominski, L. (1985). Construction of linkage maps with DNA markers for human chromosomes. *Nature* 313: 101-105.
- Williamson, R., Bowcock, A., Kidd, K., Pearson, P., Schmidtke, J., Ceverha, P., Chipperfield, M., Cooper, D.N., Coutelle,



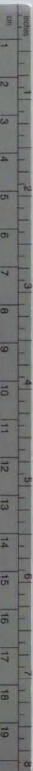
- C., Hewitt, J., Klinger, K., Langley, K., Beckmann, J., Tolley, M., and Maidak, B. (1991). Report of the DNA committee and catalogues of clones and mapped genes, markers formatted for PCR and DNA polymorphisms. *Cytogenet. Cell Genet.* 58: 1190-1832.
- Wissenbach, J., Gyapay, G., Dib, C., Vignal, A., Morissette, J., Millasseau, P., Vaysseix, G., and Lathrop, M. (1992). A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 359: 794-801.
- Wolfe, J.H., Sands, M.S., Barker, J.E., Gwynn, B., Rowe, L.B., Vogler, C.A., and Birkenmeier, E.H. (1992a). Reversal of pathology in murine mucopolysaccharidosis type VII by somatic cell gene transfer. *Nature* 360: 749-753.
- Wolfe, J.H., Deshmare, S.L., and Fraser, N.W. (1992b). Herpesvirus vector gene transfer and expression of  $\beta$ -glucuronidase in the central nervous system of MPS VII mice. *Nature Genet.* 1: 379-384.
- Womack, J.E. (1972). Genetic control of the major electrophoretic component of rat plasma esterase. *J. Hered.* 63: 41-42.
- Womack, J.E. (1973). Biochemical genetics of rat esterases: polymorphism, tissue expression, and linkage of four loci. *Biochem. Genet.* 9: 13-24.
- Wyman, A.R. and White, R. (1981). A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 6754-6758.
- Yagisawa, H., Emori, Y., and Nojima, H. (1991). Phospholipase C



- genes display restriction fragment length polymorphisms between the genomes of normotensive and hypertensive rats. *J. Hypertens.* 9: 303-307.
- Yamada J, Nikaido H, Kondo Y. (1981). Genetic studies of RBC catalase in the rat. *Jpn. J. Genet.* 56:447-455.
- Yamori, Y., Ooshima, A., and Okamoto, K. (1972). Genetic factors involved in spontaneous hypertensive rats. An analysis of F2 segregate generation. *Jpn. Circ. J.* 36: 561-568.
- Yarbrough, W.G., Quarmby, V.E., Simental, J.A., Joseph, D.A., Sar, M., Lubahn, D.B., Olsen, K.L., French, F.S., and Wilson, E.M. (1990). A single base mutation in the androgen receptor gene causes androgen insensitivity in the testicular feminized rat. *J. Biol. Chem.* 265: 8893-8900.
- Yasue, M., Serikawa, T., and Yamada, J. (1991). Chromosomal assignments of 23 biochemical loci of the rat by using rat x mouse somatic cell hybrids. *Cytogenet. Cell Genet.* 57: 142-148.
- Yasue, M., Serikawa, T., Kuramoto, T., Mori, M., Higashiguchi, T., Ishizaki, K., and Yamada, J. (1992). Chromosomal assignments of 17 structural genes and 11 related DNA fragments in rats (*Rattus norvegicus*) by southern blot analysis of rat x mouse somatic cell hybrid clones. *Genomics* 12: 659-664.
- Yen, T.T., Yu, P., Roeder, H., and Willard, P.W. (1974). A genetic study of hypertension in Okamoto-Aoki spontaneously

- hypertensive rats. *Heredity* 33: 309-316.
- Yoshida, M.C. (1978). Rat gene mapping by rat-mouse somatic cell hybridization and a comparative Q-banding analysis between rat and mouse chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 22: 606-609.
- Yoshida M, Noguchi J, Ikadai H, Takahashi, M., and Nagase, S. (1993a). Arylsulfatase B-deficient mucopolysaccharidosis in rats. *J. Clin. Invest.* 91: 1099-1104.
- Yoshida M, Ikadai H, Maekawa, A., Takahashi, M., and Nagase, S. (1993b). Pathological characteristics of mucopolysaccharidosis in rats. *J. Comp. Pathol.* 109: 141-153.
- Zha, H., Wilder, R.L., Goldmuntz, E.A., Cash, J.M., Crofford, L.J., Mathern, P., and Remmers, E.F. (1993). Linkage map of 10 polymorphic markers on rat chromosome 2. *Cytogenet. Cell Genet.* 63: 117-122.
- Zhang, J., Dirckx, L., Maryen, P., Rombauts, W., Deraey, B., van Den Berghe, H., and Cassiman, J.-J. (1988). Mapping of rat prostatic binding protein genes C1, C2 and C3 to rat chromosome 5 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 48: 121-123.





# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue    Cyan    Green    Yellow    Red    Magenta    White    3/Color    Black



## Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A    1    2    3    4    5    6    M    8    9    10    11    12    13    14    15    B    17    18    19

