



マウス染色体における不安定な遺伝要素に関する分子生物学的研究ーヨーロッパ産野生マウスにみられる高頻度染色体変異とリボソームRNA遺伝子

栗原, 靖之

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

1989-03-31

(Date of Publication)

2008-03-24

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0811

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000811>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博 士 論 文

マウス染色体における
不安定な遺伝要素に関する
分子生物学的研究

— ヨーロッパ産野生マウスにみられる
高頻度染色体変異と
リボソームRNA遺伝子 —

昭和64年 1月

神戸大学大学院自然科学研究科

栗 原 靖 之

目次

I	緒言	1
II	ヨーロッパの野生マウスで起こった高頻度の R b 転座には N O R は関与しない	
1	序論	7
2	仮定	8
	a) ヨーロッパ以外で発見されている R b 転座を持つマウスについて	
	b) 考察する染色体の数	
	c) 異なるマウス集団で同一の染色体の組合せの R b 転座が見つかること	
	d) N O R の染色体分布	
3	結果	20
	a) データベースの作成	
	b) 統計計算	
4	考察	24
III	ヨーロッパ産野生マウスとそれに由来する実験用マウス系統における リボソーム R N A 遺伝子の染色体上の位置とその発現	
1	序論	26
2	方法と材料	28
	a) マウス	
	b) 脾臓細胞の培養と染色体標本作製法	
	c) その他の組織からの染色体標本作製法	
	d) G - バンド法	
	e) 銀染色法	
	f) <u>i n S i t u</u> H y b r i d i z a t i o n	
3	結果	34
	a) ヨーロッパ産野生マウスにおけるリボソーム R N A 遺伝子の 染色体分布	
	b) 実験用マウス系統におけるリボソーム R N A 遺伝子の	

染色体分布

- c) 実験用マウスにおけるNORの染色体分布
- d) 亜系統間におけるリボソームRNA遺伝子の染色体分布の変異
- e) 組織別のリボソームRNA遺伝子の発現

4 考察 -----41

- a) リボソームRNA遺伝子の染色体分布と従来のRb転座生成機構の妥当性
- b) ヨーロッパ産野生マウス (M.m.domesticus) に見られる染色体末端領域のリボソームRNA遺伝子
- c) 細胞遺伝学的に検出されるリボソームRNA遺伝子の発現の変異
- d) 亜系統間のリボソームRNA遺伝子の染色体分布の多型
- e) リボソームRNA遺伝子の発現の組織特異性

IV ロバートソン型染色体変異を多く持つヨーロッパ産野生マウスにおけるリボソームRNA遺伝子のDNA多型

1 序論 -----47

2 材料と方法 -----52

- a) 野生マウス
- b) サザンプロット法
 - ① 高分子DNAの抽出
 - ② 高分子DNAの制限酵素による切断
 - ③ アガロースゲル電気泳動とサザントランスファー
 - ④ プロブDNAの³²Pによるラベリング
 - ⑤ ハイブリダイゼーションとオートラジオグラフィ
 - ⑥ DNA分子量の決定
- c) リボソームRNA遺伝子のクローニング
 - ① 野生マウス
 - ② マウス高分子DNAの制限酵素による切断とDNAサイズ分画
 - ③ マウスゲノムDNAとファージDNAとのライゲーションと in vitro packaging

④	スクリーニング	
⑤	得られたクローンの同定	
⑥	プラスミドへのサブクローニング	
d)	DNA塩基配列の決定	
①	一本鎖DNAの調製	
②	プライマーの作成	
③	DNA塩基配列の決定	
3	結果	-----59
a)	Rbマウスと通常の核型を持つ野生マウスにおける リボソームRNA遺伝子のEcoRIとBamHI切断による 切断片長の多型	
b)	Rbマウスといくつかの亜種に共通にみられるDNA断片の クローニング	
c)	Rbマウスといくつかの亜種に共通にみられるDNA断片の DNA塩基配列の決定	
4	考察	-----68
a)	リボソームRNA遺伝子を指標としたRbマウスの分類	
b)	クローン化したリボソームRNA遺伝子のファージ中での 長さの変化	
V	総合討論	
1	Rbマウスの遺伝的特性と起源	-----72
2	高頻度Rb転座生成機構	-----74
VI	要旨	-----78
	謝辞	-----81
	参考文献	-----82

医学、生物学を始め幅広い領域で利用されている実験用マウスは、現在ヒトやショウジョウバエと並んで最も遺伝学的な解析の進んだ高等動物である。マウスでは、近交系が数多く樹立され、これらを用いて今までに約550の遺伝子座が染色体上にマップされ、その数は近年急激に増加しており、今後も一層の実験動物としての有用性が期待されている。実験用マウス系統は、汎世界的に分布する野生種ハツカネズミ (Mus musculus) に由来しているが、この野生種についても遺伝学的な解析が精力的に進められている。その結果、野生マウスでは、実験用マウスには見られない多くの有用な遺伝的変異を保有していることが新しくわかってきた。例えば、免疫担当細胞のT細胞に特異的に発現する分化抗原の一つLy-2抗原における新しい対立遺伝子の発見⁽¹⁾やフレンドウイルスに対する抵抗性遺伝子の発見⁽²⁾、形態形成に関与していると考えられている遺伝子群のt-遺伝子複合体の発見⁽³⁾、さらに主要組織適合性抗原遺伝子複合体の中に見いだされた、遺伝的組換えを促進する領域の発見⁽⁴⁾などが野生マウスを使って新しく明らかにされた遺伝的変異である。特に、最後に挙げた遺伝的組換えを促進する領域は、組換え機構を解明する上で優れた実験系である。さらに注目すべき野生マウスの遺伝的変異として、ヨーロッパの一部の野生マウスにみられる多くのロバートソン(Rb)型転座染色体を持つマウス集団を挙げるができる。

実験用マウス系統も含めて野生マウスの核型は通常 $2n = 40$ ですべてアクロセントリック染色体である。1970年にGroppらは、スイスの山中で7対のRb転座を持ち、見かけ上著しく染色体数の減っている野生マウスを発見した⁽⁵⁾。その後世界中で広範囲に野生マウスの核型が調べられたが、いろいろな組合せの染色体間におけるRb転座をもつマウスがヨーロッパのいくつかの地域に点在して生息していることが知られるようになった(図I-1)。

Rb転座とは、2対のアクロセントリック染色体が動原体部位で接着し、メタセントリック染色体を形成していることをいう(図I-2)。このため、Rb転座が起こると見かけ上染色体の数が減っている。しかし動原体のヘテロクロマチンを特異的に染めるC-バンド法での解析やゲノムの総DNA量の比較から、Rb

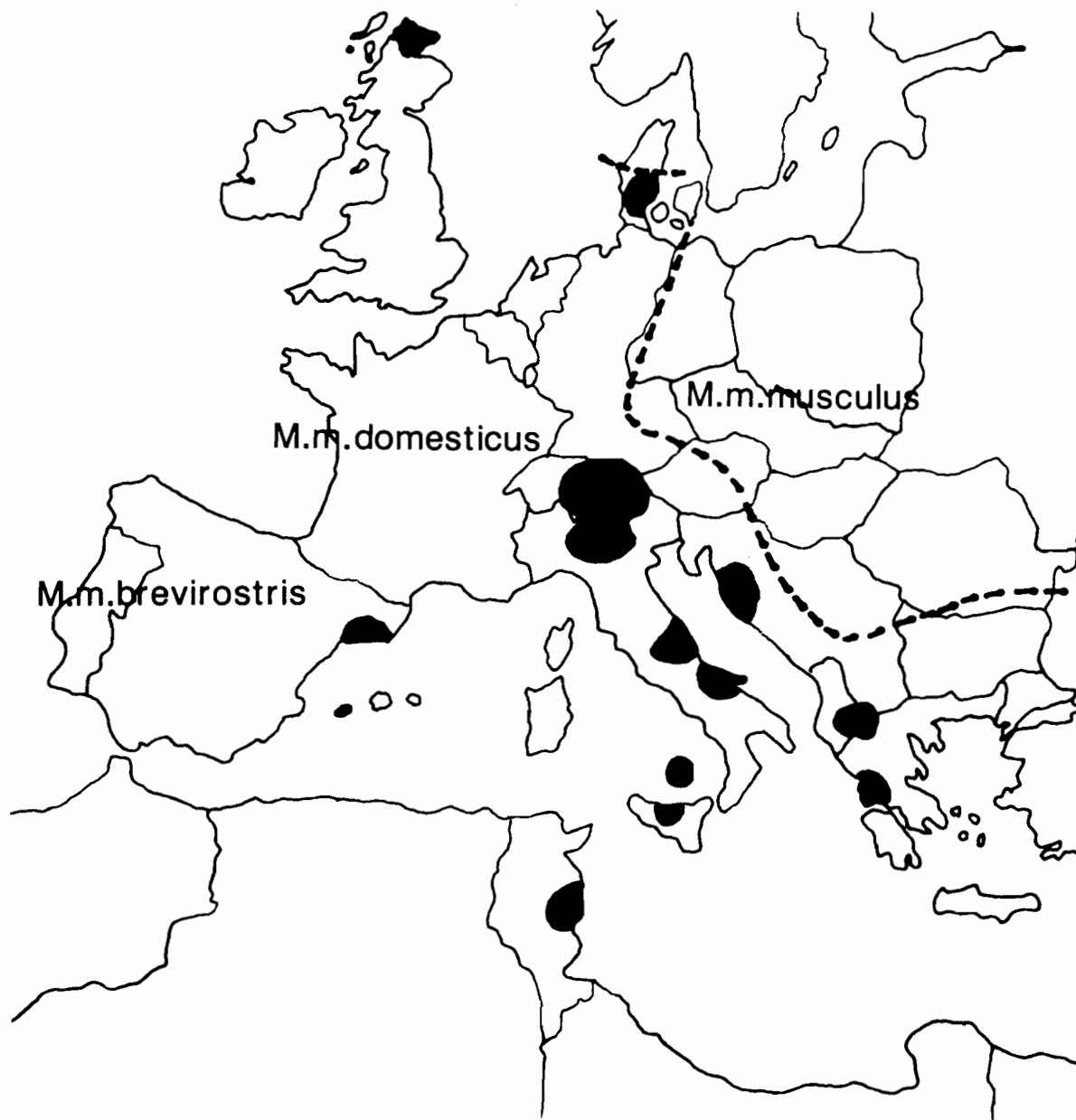


図 I - 1 ヨーロッパで R b 転座を多く持った野生マウスの生息地域
 黒く塗りつぶした地域が、今までに R b マウスの発見された地域である。
 ヨーロッパに生息する 3 つのハツカネズミ亜種の分布を示した。
 破線は *M.m.musculus* と *M.m.domesticus* の境界線をあらわす。

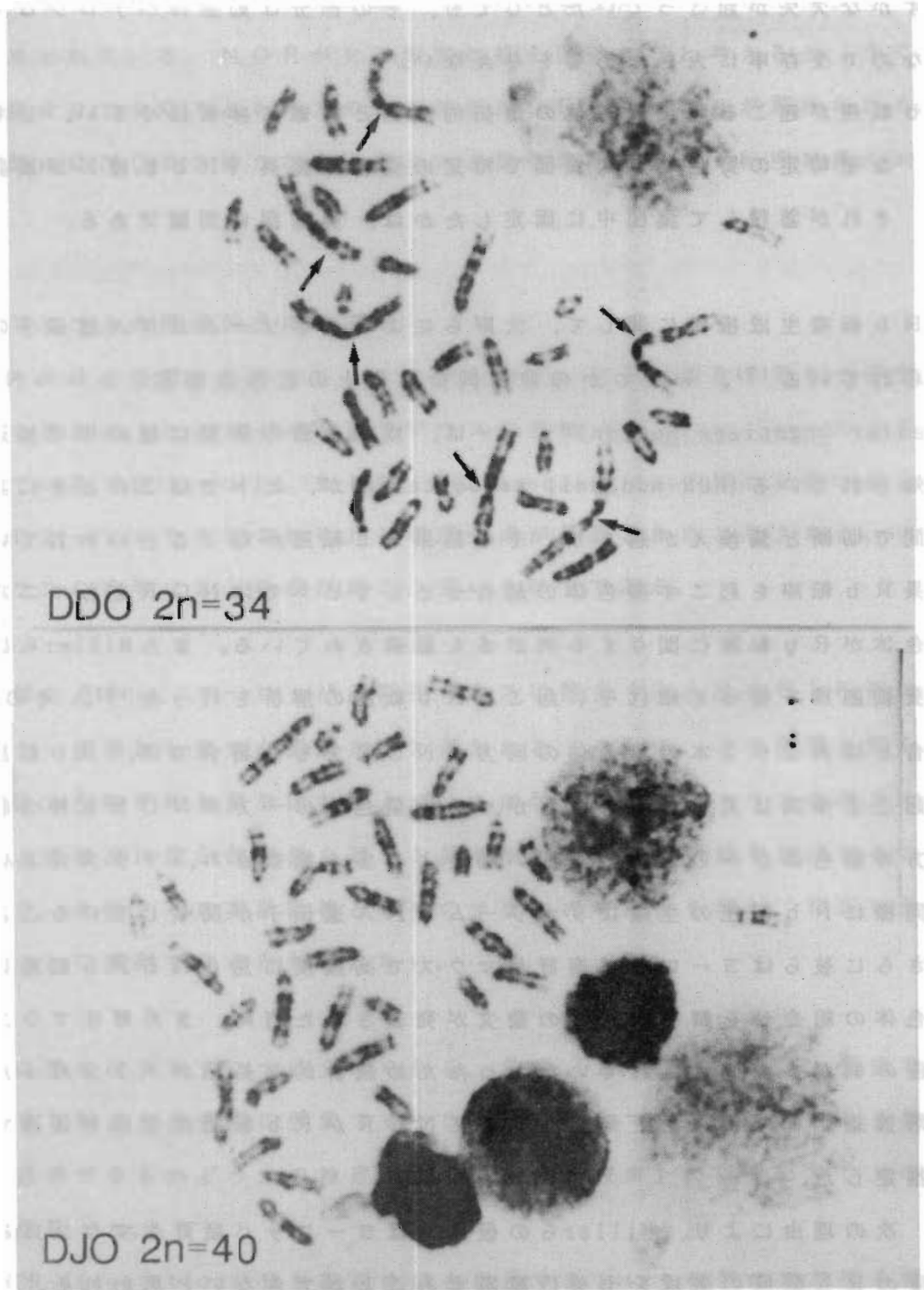


図 I - 2 3 対の R b 転座を持つマウス (D D O) と通常の核型を持つマウス (D J O) の G - バンド染色像
矢印で R b 転座を示した。

転座に伴う欠失は細胞遺伝学的に検出することはできない。(6)。たとえ分子レベルでわずかな欠失が起こっていたとしても、その部分は動原体ヘテロクロマチン領域中なので生存率に大きな影響を与えない。

本来 R b 転座が起こる頻度は、他の遺伝的変異と同様に非常に小さい。にもかかわらず、なぜ特定の野生マウス集団で特定の染色体変異 (R b 転座) が高頻度で起こり、それが蓄積して集団中に固定したかは、興味深い問題である。

従来、R b 転座生成機構に関して、大野らによりリボソーム RNA 遺伝子の関与が考えられている(7)。いくつかの非同相染色体上の仁形成部位 (NOR (Nucleolar Organizer Region)) は、成熟分裂の初期に核の中で接近する現象が知られている (NOR-nucleoli association) が、ヒトではこのときに非同相染色体間で切断と繋換えが起こり、その結果 R b 転座が起こるといわれている。この結果 R b 転座を起こす染色体の組合せとしてヒトでは NOR をもつ二本の非同相染色体が R b 転座に関与する例が多く観察されている。また Miller らはマウスの培養細胞株を使って継代中に起こる R b 転座の解析を行った(8)。その結果ヒトの場合とは異なり 2 本の染色体の両方が NOR をもつ場合では、R b 転座を高頻度で起こす傾向は見られなかったが、その染色体の一方が NOR を持つ組合せが、両方の染色体が NOR を持たない場合より多く観察され、マウスにおいてもヒトと同様に R b 転座の生成にリボソーム RNA 遺伝子が関与していることを示した。さらに彼らはヨーロッパ産野生マウスで高頻度に見られる R b 転座に関与する染色体の組合せを調べた。この論文が発表された当時、まだ野生マウスで R b 転座の例が多く発見されていなかったため統計的な処理が不十分だったが、彼らは培養細胞株で得られた知見と同様に NOR が R b 転座の生成を促進するだろうと推定した。

しかし、次の理由により、Miller らの仮説ではヨーロッパ産野生マウスにみられる高頻度の R b 転座の生成を十分に説明することができないと思われる。

1) NOR だけで説明するには多すぎる R b 転座の数

現在までにヨーロッパ産野生マウスから、Miller の調べた当時の約 2 倍に当たる 82 種の異なる染色体の組合せからなる R b 転座が見つかっている。これは $2n$

= 40 の核型をもつマウスで可能な非相同染色体の組合せの約半分がすでに発見されていることになる。マウスの場合 20 対の染色体の内、5 対程度が NOR を持つと思われる。NOR が Rb 転座生成を促進すると考えると、全ての Rb 転座の組合せで少なくとも一方の染色体が NOR を持つことが期待される。しかし、実際には NOR を持たないと思われる染色体間での Rb 転座が多く知られている。

2) Rb マウスの地理的分布の偏り

野生マウスは全世界に分布するにもかかわらず、Rb 転座を多数もつ野生マウスの分布を見ると、ヨーロッパ産野生マウスの亜種 M.m.domesticus の生息地域に限られている (図 I-1)。もしも、NOR-association の様な動物一般に普遍的な現象によってマウスにおける Rb 転座生成が促進されたと考えれば、世界中の野生マウスに均等に Rb 転座が起こっているはずである。

以上の様な点から、ヨーロッパ産野生マウスに数多くみられる Rb 転座の生成機構をもう一度検討し直す必要があると思われる。そして、この機構を明らかにすることは、生物学的な興味はもとより、この特性を近交系マウスに導入することにより、高頻度に遺伝的変異を起こし得る実験用マウス系統を育成することが可能になり、今後さらに実験動物としてのマウスの有用性を増し、幅広い分野に応用することに貢献できるかもしれない。

本研究の構成は大きく二つに分けられる。前半 (II、III 章) では、従来考えられている Rb 転座生成機構の仮説でヨーロッパ産野生マウスに起こった多数の Rb 転座も説明できるかどうかの検定を行い、後半 (IV 章) では Rb マウスの遺伝的特性を解析した。

まず NOR-association が Rb 転座生成を促進するという仮説の妥当性を再検討することから始めた。NOR が Rb 転座を促進するという従来の仮説に従うとヨーロッパ産野生マウスですでに発見されている数多くの Rb 転座の組合せの中で一方または両方の染色体が NOR を持つ組合せが持たない組合せに比べて多くみられるはずである。そこで、文献調査を行い今まで発見されている全ての Rb 転座

を収録したデータベースを作成し、これを使って前述の作業仮説の妥当性を統計的に検討した。その結果、この作業仮説は棄却された。この統計検定を行う上でヨーロッパ産野生マウスにおけるNORの染色体分布を12、15、16、18、19番染色体と仮定したが、この分布はわずかなヨーロッパ産野生マウスと近交系マウスで調べられた結果であり、今回の検定に使う仮定として十分な信頼性を持たない。そこで、ヨーロッパ産野生マウスとそれに由来する近交系マウスでNORの染色体分布を広範囲に調査した。これによって、NORの染色体分布は統計検定に使った仮定と一致したので、作業仮説の棄却という検定結果の正当性が証明された。次に、Rb転座生成機構を新たに考える上で、Rbマウスに関する基礎的データの蓄積が必要と考え、これらマウスの分類学的位置付けを行うのに有効なマーカーである、リボソームRNA遺伝子の変異性を指標にしてRbマウスの遺伝的特性を調べた。これらの結果に基づいて、ヨーロッパ産野生マウスにみられる高頻度のRb転座が如何なる遺伝的背景によって起こったかの推察を試みた。また、今回の研究によって、近交系マウス系統におけるリボソームRNA遺伝子の不活性化という現象についてもいくつかの知見が得られたので考察する。

ヨーロッパの野生マウスで起こった 高頻度のR b転座には N O Rは関与しない

1 序論

ヨーロッパ産野生マウスで高頻度にみられるR b転座の生成に関する従来の仮説は、N O R (nucleolar organizer region--活性を持つリボソームRNA遺伝子領域)がその生成を促進するというものである(7,8)。この仮説に従いR b転座の生成にN O Rが関与しているとする、N O Rを持つ染色体が関与するR b転座の組合せが、N O Rを持たない染色体の組合せに比べて有意に多く観察されることが期待される。そこで実際に今まで発見されているR bマウスの染色体の組合せが期待される通りかどうかを検討することにした。

現在までにヨーロッパでは82種の違った染色体の組合せのR b転座が観察されている。この数は、Millerが調べたときの約2倍に当たり、また、20対のアクロセントリック染色体を持つマウスにおける理論的な全ての染色体の組合せの約半分の組合せがすでに発見されていることになり、統計的処理の母集団として妥当と考えられる。そこで本章では、以前の論文からヨーロッパ産野生マウスにみられるR b転座を抜粋してデータベースを作成し、マウスにおける高頻度のR b転座にN O Rが関与しているかどうかを統計的に検定した。

2 仮定

統計的処理を行うに当たりヨーロッパ産野生マウスに特異的に起こった高頻度の R b 転座を対象とするために以下の仮定を設けた。

a) ヨーロッパ以外で発見されている R b 転座を持つマウスについて

ヨーロッパ以外でも例は少ないが 1 組の R b 転座を持つ野生マウスが知られている。しかし今回の研究では、ヨーロッパと北アフリカで発見された M.m.domesticus に属する、多くの R b 転座を保有する野生マウスからのデータを統計計算に使った。

b) 考察する染色体の数

培養細胞株では相同染色体間の R b 転座がしばしば観察される。しかし生体でこれが起こるとトリソミーになり生存に重大な影響がある。従って今回の考察には相同染色体間の R b 転座は考慮にいけない。また、19番と性染色体が関与する R b 転座は野生マウスで見つかっていないので、1から18番までの染色体の組合せに対する検定を行った。また、19番と性染色体が関与する R b 転座が発見されないのは偶然であることも想定して、全ての染色体の組合せに対する検定も行った。

c) 異なるマウス集団で同一の染色体の組合せの R b 転座が見つかること

(5,15), (9,14)などは、ヨーロッパの各地で発見されているが、これらがある場所である時に一回だけおこった R b 転座がヨーロッパ中のマウス集団に広がったものなのか、あるいは、違った場所で、違ったときに起こったものなのかは不明である。この研究では前者の仮説を取り入れた。従って、複数の地点から同一の染色体の組合せからなる R b 転座が見つかっていてもそれらを重複して計算しなかった。

d) NORの染色体分布

例数が少ないながら、ヨーロッパ産野生マウス M.m.domesticus やそれに由来する

実験用マウスの系統では、12、15、16、18、19番染色体の動原体近傍と4、13番染色体の末端部にリボソームRNA遺伝子が分布することが報告されている^(9,10)。これらの全てが細胞遺伝学的にNORとして検出できる可能性があるが、末端部にリボソームRNA遺伝子を持つ染色体の場合は、NOR-associationによる動原体接着を説明することはできないので除外して計算した。

表Ⅱ-1 マウスで現在までに見つかっているRb転座のデータベース

Origin	名前	都市名	国名、地方名	報告者	出典(雑誌、年、巻、初項、終項)
Lab.	Rb(X,2)2Ad	Lipari	S. Italy	I.-D. Adler	"MNL", 1987, 77, 141, 141
E. Wild	Rb(1,2)18Lub	Y. Goyder	Central Italy		"MNL", 1983, 68, 67, 67
Lab.	Rb(1,2)5H	Apennine Ancarano	Swiss	A. Gropp	"Cytogenetics", 1970, 9, 9, 23
E. Wild	Rb(1,2)18Lub	Poschiavo		A. Gropp	"Chromosoma", 1972, 39, 265, 288
E. Wild	Rb(1,3)1Bnr	Mesolcina	Greece	H. Tichy	"Chromosoma", 1987, 95, 31, 36
E. Wild	Rb(1,3)1Bnr	Peloponnesus	N. Italy	H. Winking	"MNL", 1977, 57, 26, 28
E. Wild	Rb(1,3)28Tu	Orobie Alps			
E. Wild	Rb(1,3)1Lub	Chiavenna	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(1,3)	Valtellina Migiondo			
E. Wild	Rb(1,3)56Lub	Mesolcina			
E. Wild	Rb(1,3)	Tubingen	Southern Germany	S. Adolph	"Genet. Res.", 1983, 41, 117, 134
E. Wild	Rb(1,5)19Tu	Cremona	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(1,6)47Lub	Apennine Abruzzi	Central Italy	E. Capanna	"Chromosoma", 1976, 58, 341, 345
E. Wild	Rb(1,7)1Rma	Bondo			
E. Wild	Rb(1,10)10Bnr	Dalmatian	Yugoslavia	H. Tichy	"Chromosoma", 1987, 95, 31, 36
E. Wild	Rb(1,11)	Zadar	Yugoslavia		
E. Wild	Rb(1,11)33Lub	Thebe	Greece	H. Tichy	"Chromosoma", 1987, 95, 31, 36
E. Wild	Rb(1,11)36Tu	Monastir	Tunisia	K. Said	"Genetica", 1986, 68, 151, 156
E. Wild	Rb(1,11)2Mpl	Caithness	Scotland	P. C. Brooker	"Hered.", 1982, 48, 305, 309
E. Wild	Rb(1,11)	Lab.		B. M. Cattanaach	"MNL", 1977, 56, 37, 37
Lab.	Rb(1,15)2Ct	Apennine Molise	Central Italy	E. Capanna	"Experientia", 1977, 33, 173, 174
E. Wild	Rb(1,18)10Rma	Luino		A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(2,4)	Milano	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(2,4)25Lub	Ravensburg	Southern Germany	S. Adolph	"Genet. Res.", 1983, 41, 117, 134
E. Wild	Rb(2,5)2Tu	Peloponnesus	Greece	H. Tichy	"Chromosoma", 1987, 95, 31, 36
E. Wild	Rb(2,5)29Tu		Southern Germany	S. Adolph	"J. Hered.", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb(2,5)2Tu				

Origin	名前	都市名	国名、地方名	報告者	出典 (雑誌、年、巻、初項、終項)
Lab.	Rb(2,6)4Iem	Cremona	N. Italy	V. S. Baranov	"Tsitologiya", 1981, 23, 1362, 1362
E. Wild	Rb(2,8)49Lub	Milano	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(2,8)40Lub	Carcinato	Rhaeto-Lombardia	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(2,8)	Orobie Alps	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(2,8)2Lub	I Casoni	Rhaeto-Lombardia	H. Winking	"MNL", 1977, 57, 26, 28
E. Wild	Rb(2,8)	Valtellina Migiondo	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(2,8)57Lub	Mesolcina	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(2,14)11Bnr	Thebe	Greece	A. Gropp	Chromosoma", 1972, 39, 265, 288
E. Wild	Rb(2,15)37Tu	Palermo Sicily	S. Italy	A. Gropp	Chromosoma", 1987, 95, 31, 36
E. Wild	Rb(2,15)2Sic	Tripura	India	H. Tichy	
A. Wild	Rb(2,16)	Monastir	Tunisia	K. Said	Genetica", 1986, 68, 151, 156
E. Wild	Rb(2,16)3Mpl			A. J. M. Crocker	MNL", 1980, 63, 14, 14
Lab.	Rb(2,17)4H			E. Capanna	Experientia", 1977, 33, 173, 174
E. Wild	Rb(2,17)11Rma	Apennine Molise	Central Italy	E. Capanna	Chromosoma", 1976, 58, 341, 345
E. Wild	Rb(2,18)6Rma	Apennine Abruzzi	Central Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(3,4)39Lub	Milano	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(3,4)	I Casoni	Rhaeto-Lombardia	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(3,4)1Sic	Palermo Sicily	S. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(3,4)48Lub	Cremona	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(3,4)	Carcinato	Rhaeto-Lombardia	P. M. Borodin	MNL", 1983, 69, 41, 41
Lab.	Rb(3,5)1Icg			A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(3,6)26Lub	Milano	N. Italy	A. Gropp	J. Hered.", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb(3,6)3Tu	Ravensburg	Southern Germany	S. Adolph	Genet. Res.", 1983, 41, 117, 134
E. Wild	Rb(3,6)3Tu	Ravensburg	Southern Germany	S. Adolph	Hered.", 1982, 48, 305, 309
E. Wild	Rb(3,8)	Caithness	Scotland	P. C. Brooker	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(3,8)	Luino		A. Gropp	Chromosoma", 1976, 58, 341, 345
E. Wild	Rb(3,8)2Rma	Apennine Abruzzi	Central Italy	E. Capanna	
E. Wild	Rb(3,9)20Lub	Lipari	S. Italy		

Origin	名前	都市名	国名、地方名	報告者	出典 (雑誌、年、巻、初項、終項)
E. Wild	Rb (3, 9) 12Lub	Apennine Ancharano	Central Italy	H. Winking	MNL", 1981, 64, 69, 70
E. Wild	Rb (3, 10)	Amoudia	Greece	K. Said	Genetica", 1986, 68, 151, 156
E. Wild	Rb (3, 12) 4Mp1	Monastir	Tunisia	E. Capanna	Experientia", 1977, 33, 173, 174
E. Wild	Rb (3, 13) 14Rma	Apennine Molise	Central Italy	P. C. Brooker	Hered.", 1982, 48, 305, 309
E. Wild	Rb (3, 14)	Orkney	Scotland	S. Adolph	J. Hered.", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb (3, 14) 7Tu	Orkney island	Scotland	S. Adolph	J. Hered.", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb (3, 14) 7Tu			M. T. Davisson	MNL", 1978, 58, 48, 48
Lab.	Rb (3, 15) 2Rk			P. C. Brooker	Hered.", 1982, 48, 305, 309
E. Wild	Rb (3, 16)	Caithness	Scotland	H. Tichy	Chromosoma", 1987, 95, 31, 36
E. Wild	Rb (4, 6) 30Tu	Peloponnesus	Greece	H. Winking	MNL", 1977, 57, 26, 28
E. Wild	Rb (4, 6) 3Lub	Orobie Alps	N. Italy	A. Gropp	CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb (4, 6) 58Lub	Valtellina Migiondo	N. Italy	K. Said	Genetica", 1986, 68, 151, 156
E. Wild	Rb (4, 6) 5Mp1	Monastir	Tunisia	A. Gropp	Cytogenetics", 1970, 9, 9, 23
E. Wild	Rb (4, 6) 2Bnr	Poschiavo	Swiss	P. C. Brooker	Hered.", 1982, 48, 305, 309
E. Wild	Rb (4, 8)	Caithness	Scotland	S. Adolph	J. Hered.", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb (4, 10) 8Tu	Orkney island	Scotland	P. C. Brooker	Hered.", 1982, 48, 305, 309
E. Wild	Rb (4, 10)	Orkney	Scotland	S. Adolph	J. Hered.", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb (4, 10) 8Tu	Caithness	Scotland	S. Adolph	J. Hered.", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb (4, 10) 8Tu			E. Capanna	Experientia", 1977, 33, 173, 174
E. Wild	Rb (4, 11) 12Rma	Apennine Molise	Central Italy	Sage	Review", "
E. Wild	Rb (4, 12)	Bottmingen	Belgium	R. Hubner	MNL", 1985, 72, 116, 116
E. Wild	Rb (4, 12) 1Nam	Wallonia		A. Gropp	Chromosoma", 1972, 39, 265, 288
E. Wild	Rb (4, 12) 9Bnr	Mesolcina		S. Adolph	Genet. Res.", 1983, 41, 117, 134
E. Wild	Rb (4, 12)	Albula		S. Adolph	Genet. Res.", 1983, 41, 117, 134
E. Wild	Rb (4, 12) 1Tu	Ravensburg	Southern Germany	K. Belkhir	MNL"
E. Wild	Rb (4, 12) 1Tu	Reutlingen	Southern Germany	S. Adolph	Genet. Res.", 1983, 41, 117, 134
E. Wild	Rb (4, 12) 1Tu	Alsace	N. E. France	S. Adolph	Genet. Res.", 1983, 41, 117, 134
E. Wild	Rb (4, 12) 1Tu	Heidelberg	Southern Germany		

Origin	名前	都市名	国名、地方名	報告者	出典 (雑誌、年、巻、初項、終項)
E. Wild	Rb (4, 12) 1Tu	Ravensburg	Southern Germany	S. Adolph	J. Hered. ", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb (4, 12)	Mesolcina	Southern Germany	A. Gropp	Chromosoma ", 1972, 39, 265, 288
E. Wild	Rb (4, 12) 1Tu	Tubingen	S. Italy	S. Adolph	J. Hered. ", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb (4, 13) 19Lub	Lipari	Spain	S. Adolph	J. Hered. ", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb (4, 14) 11Tu	Thebe	Greece	H. Tichy	Chromosoma ", 1987, 95, 31, 36
E. Wild	Rb (4, 14) 38Tu		Spain	S. Adolph	J. Hered. ", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb (4, 14) 11Tu	Apennine Abruzzi	Central Italy	E. Capanna	Chromosoma ", 1976, 58, 341, 345
E. Wild	Rb (4, 15) 4Rma		Central Italy	M. T. Davisson	MNL ", 1978, 58, 48, 48
Lab.	Rb (4, 15) 1Rk	Apennine Ancarano	Central Italy	M. F. Lyon	MNL ", 1979, 60, 44, 44
E. Wild	Rb (4, 17) 13Lub	Lab.	Belgium	R. Hubner	MNL ", 1987, 77, 134, 134
Lab.	Rb (4, 18) 3H	Namur	N. E. France	K. Belkhir	MNL "
E. Wild	Rb (5, 7) 3Nam	Alsace	Greece	H. Tichy	Chromosoma ", 1987, 95, 31, 36
E. Wild	Rb (5, 10) 11MPL	Thebe	S. Italy	A. Gropp	"MNL ", 1983, 68, 74, 74
E. Wild	Rb (5, 12) 39Tu	Palermo Sicily	Central Italy	A. Gropp	"CCG ", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb (5, 13) 4Sic	Luino	Tunisia	K. Said	"Genetica ", 1986, 68, 151, 156
E. Wild	Rb (5, 13) 70Lub	Apennine Ancarano	Southern Germany	S. Adolph	"Genet. Res. ", 1983, 41, 117, 134
E. Wild	Rb (5, 13) 11Lub	Luino	S. Italy	A. Gropp	"Cytogenetics ", 1970, 9, 9, 23
E. Wild	Rb (5, 13)	Monastir	Swiss	S. Adolph	"J. Hered. ", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb (5, 14) 6Mpl	Heidelberg	Spain	A. Gropp	"CCG ", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb (5, 14) 18Tu	Lipari	Yugoslavia	H. Winking	"MNL ", 1977, 57, 26, 28
E. Wild	Rb (5, 14) 21Lub	Poschiavo	N. Italy	A. Gropp	"CCG ", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb (5, 15) 3Bnr	Zadar	N. Italy	A. Gropp	"CCG ", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb (5, 15) 12Tu	Valtellina Migiondo	N. Italy	A. Gropp	"CCG ", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb (5, 15) 34Lub	Orobie Alps	N. Italy	A. Gropp	"CCG ", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb (5, 15) 59Lub	Cremona	N. Italy	A. Gropp	"CCG ", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb (5, 15) 4Lub	Milano	N. Italy	A. Gropp	"CCG ", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb (5, 15) 50Lub				
E. Wild	Rb (5, 15) 27Lub				

Origin	名前	都市名	国名、地方名	報告者	出典(雑誌、年、巻、初項、終項)
E. Wild	Rb(5,15)15Rma	Apennine Molise	Central Italy	E. Capanna	"Experientia", 1977, 33, 173, 174
E. Wild	Rb(5,15)	San Martino(Pavia)	Rhaeto-Lombardia	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(5,15)	Dalmatian	Yugoslavia	H. Tichy	"Chromosoma", 1987, 95, 31, 36
E. Wild	Rb(5,15)42Lub	Milano	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(5,15)16Tu	Reutlingen	Southern Germany	S. Adolph	"Genet. Res.", 1983, 41, 117, 134
E. Wild	Rb(5,17)7Rma	Apennine Abruzzi	Central Italy	E. Capanna	"Chromosoma", 1976, 58, 341, 345
Lab.	Rb(5,19)1Wh	Lab.	N. Italy	B. J. White	"Hereditas", 1968, 58, 284, 296
E. Wild	Rb(6,7)41Lub	Milano	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(6,7)	Luino	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(6,7)13Rma	Apennin Molise	Central Italy	E. Capanna	"Experientia", 1977, 33, 173, 174
E. Wild	Rb(6,9)40Tu	Thebe	Greece	H. Tichy	"Chromosoma", 1987, 95, 31, 36
E. Wild	Rb(6,10)21Tu	Heidelberg	Southern Germany	S. Adolph	"Genet. Res.", 1983, 41, 117, 134
E. Wild	Rb(6,10)13Tu		Spain	S. Adolph	"J. Hered.", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb(6,10)13Tu		Spain	S. Adolph	"J. Hered.", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb(6,12)3Sic	Palermo Sicily	S. Italy	H. Tichy	"Chromosoma", 1987, 95, 31, 36
E. Wild	Rb(6,12)	Dalmatian	Yugoslavia		
E. Wild	Rb(6,12)35Lub	Zadar	Yugoslavia		
Lab.	Rb(6,13)1H	Lab.			
E. Wild	Rb(6,13)3Rma	Apennine Abruzzi	Central Italy	R. J. Phillips	"MNL", 1976, 55, 14, 14
E. Wild	Rb(6,13)9Tu		Scotland	E. Capanna	"Chromosoma", 1976, 58, 341, 345
E. Wild	Rb(6,13)9Tu	Caitness	Scotland	S. Adolph	"J. Hered.", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb(6,14)	Orkney	Scotland	S. Adolph	"J. Hered.", 1981, 72, 219, 221
Lab.	Rb((6,15)1A1d	Lab.	Scotland	P. C. Brooker	"Hered.", 1982, 48, 305, 309
E. Wild	Rb(6,16)14Lub	Apennine Ancarano	Central Italy	A. Leonard	"Nature", 1967, 214, 504, 505
E. Wild	Rb(6,16)24Lub	Lipari	S. Italy	S. I. Agulnik	"MNL", 1986, 75, 39, 39
Lab.	Rb(6,19)21cg	Lab.	USSR	A. Gropp	"Chromosoma", 1972, 39, 265, 288
E. Wild	Rb(7,8)12Bnr	Mesolcina		A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(7,8)28Lub	Milano	N. Italy	A. Gropp	

Origin	名前	都市名	国名、地方名	報告者	出典 (雑誌、年、巻、初項、終項)
E.Wild Lab.	Rb (7, 8) Rb (7, 13) 10xe	Mesolcina		A. Gropp	"Chromosoma", 1972, 39, 265, 288
E.Wild	Rb (7, 18) 7Mpl	Monastir	Tunisia	T. Evans	"MNL", 1984, 70, 94, 94
E.Wild	Rb (7, 18)	Carcinatio	Rhaeto-Lombardia	K. Said	"Genetica", 1986, 68, 151, 156
E.Wild	Rb (7, 18) 9Lub	Orobie Alps	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E.Wild	Rb (7, 18) 22Tu	Reutlingen	Southern Germany	H. Winking	"MNL", 1977, 57, 26, 28
E.Wild	Rb (7, 18) 55Lub	Cremona	N. Italy	S. Adolph	"Genet. Res.", 1983, 41, 117, 134
E.Wild	Rb (7, 18) 9Lub	Valtellina Migiondo	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E.Wild	Rb (8, 9) 8Mpl	Monastir	Tunisia	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E.Wild	Rb (8, 10) 23Tu	Reutlingen	Southern Germany	K. Said	"Genetica", 1986, 68, 151, 156
E.Wild	Rb (8, 12) 5Bnr	Poschiavo	Swiss	S. Adolph	"Genet. Res.", 1983, 41, 117, 134
E.Wild	Rb (8, 12) 31Tu	Peloponnesus	Greece	A. Gropp	"Cytogenetics", 1970, 9, 9, 23
E.Wild	Rb (8, 12) 22Lub	Lipari	S. Italy	H. Tichy	"Chromosoma", 1987, 95, 31, 36
E.Wild	Rb (8, 14) 15Lub	Apennine Ancarano	Central Italy		
E.Wild	Rb (8, 14) 16Rma	Apennine Molise	Central Italy	E. Capanna	"Experientia", 1977, 33, 173, 174
E.Wild	Rb (8, 14)	Caithness	Scotland	P. C. Brooker	"Hered.", 1982, 48, 305, 309
A.Wild	Rb (8, 14)	Calcutta	India		
E.Wild	Rb (8, 15)	Caithness	Scotland	P. C. Brooker	"Hered.", 1982, 48, 305, 309
E.Wild	Rb (8, 17) 6Sic	Palermo Sicily	S. Italy		
E.Wild	Rb (8, 17) 38Lub	Zadar	Yugoslavia		
E.Wild	Rb (8, 17)	Caithness	Scotland	P. C. Brooker	"Hered.", 1982, 48, 305, 309
E.Wild	Rb (8, 17) 4Tu	Ravensburg	Southern Germany	S. Adolph	"Genet. Res.", 1983, 41, 117, 134
Lab.	Rb (8, 17) 11em	Lab.	Greece	V. S. Baranov	"Ontogenez", 1971, 2, 164, 176
E.Wild	Rb (8, 17) 41Tu	Thebe	Greece	H. Tichy	"Chromosoma", 1987, 95, 31, 36
E.Wild	Rb (8, 17)	Dalmatian	Yugoslavia	H. Tichy	"Chromosoma", 1987, 95, 31, 36
E.Wild	Rb (8, 17)	Ravensburg	Southern Germany	S. Adolph	"J. Hered.", 1981, 72, 219, 221
Lab.	Rb (8, 19) 1Ct	Lab.		B. M. Cattanach	"MNL", 1976, 54, 38, 38
E.Wild	Rb (9, 11) 14Tu		Spain	S. Adolph	"J. Hered.", 1981, 72, 219, 221

Origin	名前	都市名	国名、地方名	報告者	出典 (雑誌、年、巻、初項、終項)
E. Wild	Rb(9, 11)14Tu		Spain	S. Adolph	"J. Hered.", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb(9, 12)10Tu	Caithness	Scotland	S. Adolph	"J. Hered.", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb(9, 12)10Tu	Orkney island	Scotland	S. Adolph	"J. Hered.", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb(9, 12)10Tu		Scotland	S. Adolph	"J. Hered.", 1981, 72, 219, 221
Lab.	Rb(9, 12)1Cam			M. Wallace	"MNL", 1981, 64, 49, 49
E. Wild	Rb(9, 12)	Amoudia	Greece	H. Winking	"MNL", 1981, 64, 69, 70
E. Wild	Rb(9, 12)	Orkney	Scotland	P. C. Brooker	"Hered.", 1982, 48, 305, 309
E. Wild	Rb(9, 13)37Lub	Zadar	Yugoslavia		
E. Wild	Rb(9, 13)	Dalmatian	Yugoslavia	H. Tichy	"Chromosoma", 1987, 95, 31, 36
E. Wild	Rb(9, 14)	Luino		A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(9, 14)	Carcinato	Rhaeto-Lombardia	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(9, 14)	Caneto Pavese	Rhaeto-Lombardia	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(9, 14)62Lub	Valtellina Migiondo	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(9, 14)7Lub	Orobic Alps	N. Italy	H. Winking	"MNL", 1977, 57, 26, 28
E. Wild	Rb(9, 14)24Tu	Ravensburg	Southern Germany	S. Adolph	"Genet. Res.", 1983, 41, 117, 134
E. Wild	Rb(9, 14)53Lub	Cremona	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(9, 14)	Cascina Florida	Rhaeto-Lombardia	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(9, 14)	I Casoni	Rhaeto-Lombardia	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(9, 14)45Lub	Milano	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(9, 14)31Lub	Milano	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(9, 14)6Bnr	Poschiavo	Swiss	A. Gropp	"Cytogenetics", 1970, 9, 9, 23
A. Wild	Rb(9, 15)1Ms	Ogasawara	Japan	K. Moriwaki	"Genet. Res."
E. Wild	Rb(9, 16)9Rma	Apennine Abruzzi	Central Italy	E. Capanna	"Chromosoma", 1976, 58, 341, 345
E. Wild	Rb(9, 16)7Sic	Palermo Sicily	S. Italy		
E. Wild	Rb(9, 16)18Rma	Apennine Molise	Central Italy	E. Capanna	"Experientia", 1977, 33, 173, 174
E. Wild	Rb(9, 16)32Tu	Peloponnesus	Greece	H. Tichy	"Chromosoma", 1987, 95, 31, 36
Lab.	Rb(9, 19)163H	Lab.		E. P. Evans	"Cytogenetics", 1967, 6, 105, 119
E. Wild	Rb(10, 11)	Chiavenna			

Origin	名前	都市名	国名、地方名	報告者	出典 (雑誌、年、巻、初項、終項)
E. Wild	Rb(10, 11)8Bnr	Mesolcina	Central Italy	A. Gropp	"Chromosoma", 1972, 39, 265, 288
E. Wild	Rb(10, 11)5Rma	Apennine Abruzzi	Central Italy	E. Capanna	"Chromosoma", 1976, 58, 341, 345
E. Wild	Rb(10, 11)	Vicosoprano	Central Italy	E. Capanna	"Experientia", 1977, 33, 173, 174
E. Wild	Rb(10, 12)17Rma	Apennine Molise	Rhaeto-Lombardia	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(10, 12)	Carcinato	N. Italy	H. Winking	"MNL", 1977, 57, 26, 28
E. Wild	Rb(10, 12)5Lub	Orobic Alps	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(10, 12)60Lub	Valtellina Migiondo	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(10, 12)43Lub	Milano	Central Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(10, 12)16Lub	Apennine Ancarano	Central Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(10, 12)	Luino	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(10, 12)51Lub	Cremona	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(10, 12)29Lub	Milano	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(10, 13)42Tu	Thebe	Greece	H. Tichy	"Chromosoma", 1987, 95, 31, 36
E. Wild	Rb(10, 14)36Lub	Zadar	Yugoslavia	S. Adolph	"J. Hered.", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb(10, 14)	Ravensburg	Southern Germany	I.-D. Adler	"MNL", 1984, 71, 40, 40
Lab.	Rb(10, 14)1Ad		Scotland	P. C. Brooker	"Hered.", 1982, 48, 305, 309
E. Wild	Rb(10, 14)	Caithness	Greece	H. Tichy	"Chromosoma", 1987, 95, 31, 36
E. Wild	Rb(10, 14)33Tu	Peloponnesus	S. Italy	S. Adolph	"Genet. Res.", 1983, 41, 117, 134
E. Wild	Rb(10, 14)5Sic	Palermo Sicily	Southern Germany	S. Adolph	"Genet. Res.", 1983, 41, 117, 134
E. Wild	Rb(10, 14)25Tu	Ravensburg	Southern Germany	H. Tichy	"Chromosoma", 1987, 95, 31, 36
E. Wild	Rb(10, 14)25Tu	Reutlingen	Yugoslavia	K. Said	"Genetica", 1986, 68, 151, 156
E. Wild	Rb(10, 14)	Dalmatian	S. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(10, 15)23Lub	Lipari	Tunisia	S. Adolph	"J. Hered.", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb(10, 17)9Mpl	Monastir	Rhaeto-Lombardia	H. Winking	"MNL", 1977, 57, 26, 28
E. Wild	Rb(11, 13)	Carcinato	Southern Germany	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(11, 13)6Tu	Ravensburg	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(11, 13)6Lub	Orobic Alps	Rhaeto-Lombardia	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(11, 13)	I Casoni	Rhaeto-Lombardia	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77

Origin	名前	都市名	国名、地方名	報告者	出典 (雑誌、年、巻、初項、終項)
E. Wild	Rb(11, 13)44Lub	Milano	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(11, 13)30Lub	Milano	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(11, 13)52Lub	Cremona	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(11, 13)4Bnr	Poschiavo	Swiss	A. Gropp	"Cytogenetics", 1970, 9, 9, 23
E. Wild	Rb(11, 13)6Tu	Ravensburg	Southern Germany	S. Adolph	"Genet. Res.", 1983, 41, 117, 134
E. Wild	Rb(11, 13)61Lub	Valtellina Migiondo	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(11, 14)	Caithness	Scotland	P. C. Brooker	"Hered.", 1982, 48, 305, 309
Lab.	Rb(11, 14)1Dn			M. T. Davisson	"MNL", 1983, 69, 26, 26
E. Wild	Rb(11, 15)17Lub	Apennine Ancarano	Central Italy		
Lab.	Rb(11, 16)2H	Lab.		M. F. Lyon	"MNL", 1977, 56, 37, 37
E. Wild	Rb(11, 16)26Tu	Reutlingen	Southern Germany	S. Adolph	"Genet. Res.", 1983, 41, 117, 134
E. Wild	Rb(11, 17)	Caithness	Scotland	P. C. Brooker	"Hered.", 1982, 48, 305, 309
E. Wild	Rb(11, 17)34Tu	Peloponnesus	Greece	H. Tichy	"Chromosoma", 1987, 95, 31, 36
E. Wild	Rb(11, 18)	Luino		A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(12, 13)15Tu			S. Adolph	"J. Hered.", 1981, 72, 219, 221
Lab.	Rb(12, 13)3Ct	Lab.		B. M. Cattanaach	"MNL", 1979, 60, 44, 44
E. Wild	Rb(12, 13)15Tu			S. Adolph	"J. Hered.", 1981, 72, 219, 221
E. Wild	Rb(12, 14)8Rma	Apennine Abruzzi	Central Italy	E. Capanna	"Chromosoma", 1976, 58, 341, 345
E. Wild	Rb(13, 14)17Tu	Reutlingen	Southern Germany	S. Adolph	"Genet. Res.", 1983, 41, 117, 134
E. Wild	Rb(13, 15)10Mp1	Monastir	Tunisia	K. Said	"Genetica", 1986, 68, 151, 156
E. Wild	Rb(13, 15)35Tu	Peloponnesus	Greece	H. Tichy	"Chromosoma", 1987, 95, 31, 36
E. Wild	Rb(13, 16)1Mp1	Ibiza		J. Britton	"MNL", 1983, 69, 35, 35
E. Wild	Rb(13, 16)13Bnr	Mesolcina		A. Gropp	"Chromosoma", 1972, 39, 265, 288
E. Wild	Rb(15, 17)64Lub	Amoudia	Greece	H. Winking	"MNL", 1981, 64, 69, 70
E. Wild	Rb(15, 17)	Caithness	Scotland	P. C. Brooker	"Hered.", 1982, 48, 305, 309
E. Wild	Rb(16, 17)	Chiavenna			
E. Wild	Rb(16, 17)	San Martino (Pavia)	Rhaeto-Lombardia	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(16, 17)75Lub			A. Gropp	"MNL", 1983, 68, 74, 74

Origin	名前	都市名	国名、地方名	報告者	出典 (雑誌、年、巻、初項、終項)
E. Wild	Rb(16, 17)	I Casoni	Rhaeto-Lombardia	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(16, 17)74Lub			A. Gropp	"MNL", 1983, 68, 74, 74
E. Wild	Rb(16, 17)	Carcinato	Rhaeto-Lombardia	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(16, 17)	Cascina Florida	Rhaeto-Lombardia	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(16, 17)54Lub	Cremona	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(16, 17)63Lub	Valtellina Migiondo	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(16, 17)7Bnr	Poschiavo	Swiss	A. Gropp	"Cytogenetics", 1970, 9, 9, 23
E. Wild	Rb(16, 17)	Cascina Chiarello	Rhaeto-Lombardia	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(16, 17)8Lub	Orobie Alps	N. Italy	H. Winking	"MNL", 1977, 57, 26, 28
E. Wild	Rb(16, 17)	Barbianello	Rhaeto-Lombardia	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(16, 17)	Luino		A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(16, 17)	Dorno	Rhaeto-Lombardia	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(16, 17)	Caneto Pavese	Rhaeto-Lombardia	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(16, 17)46Lub	Milano	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(16, 17)32Lub	Milano	N. Italy	A. Gropp	"CCG", 1982, 34, 67, 77
E. Wild	Rb(17, 18)	Caithness	Scotland	P. C. Brooker	"Hered.", 1982, 48, 305, 309

3 結果

a) データベースの作成

今までもいくつかの論文の中で、R b マウスに関するデータベースが作成されているが、どれ一つとして、全ての染色体の組合せを採録したものはなかった。今回作成したデータベースは、1988年10月までに発表されたR b マウスに関する論文の中から網羅的に抜粋し、ロータスディベロップメント社のデータベースソフトLotus 1-2-3に入力したものである(表II-1)。R b 転座は命名規約により、その関与する染色体の組合せを括弧の中に示し、その後に見出した研究者または、研究グループの記号と通し番号が表記される。データベースの中に示したように同じ染色体の組合せのR b 転座が多くみられる。しかし、同じ染色体の組合せでも異なる研究者または異なる場所で発見されれば、別のデータとした。

今までに発表された267例のR b 転座の内、ヨーロッパ産野生マウスでは242例、アジア産野生マウスでは3例、実験用マウスまたは実験室で飼育中に起こったR b 転座では22例報告されており、全体の90%以上のR b 転座がヨーロッパ産野生マウス由来である。この中で特に興味ある点は、実験用マウスの中で発見されたR b 転座の例である。ヨーロッパ産野生マウスのR b 転座を実験用マウスに導入した系統から新たにR b 転座が起こったのが22例の内5例で見られる。これらのデータをまとめたものが、図II-1である。ここでは斜線はNORを持つことが可能な染色体を示す。

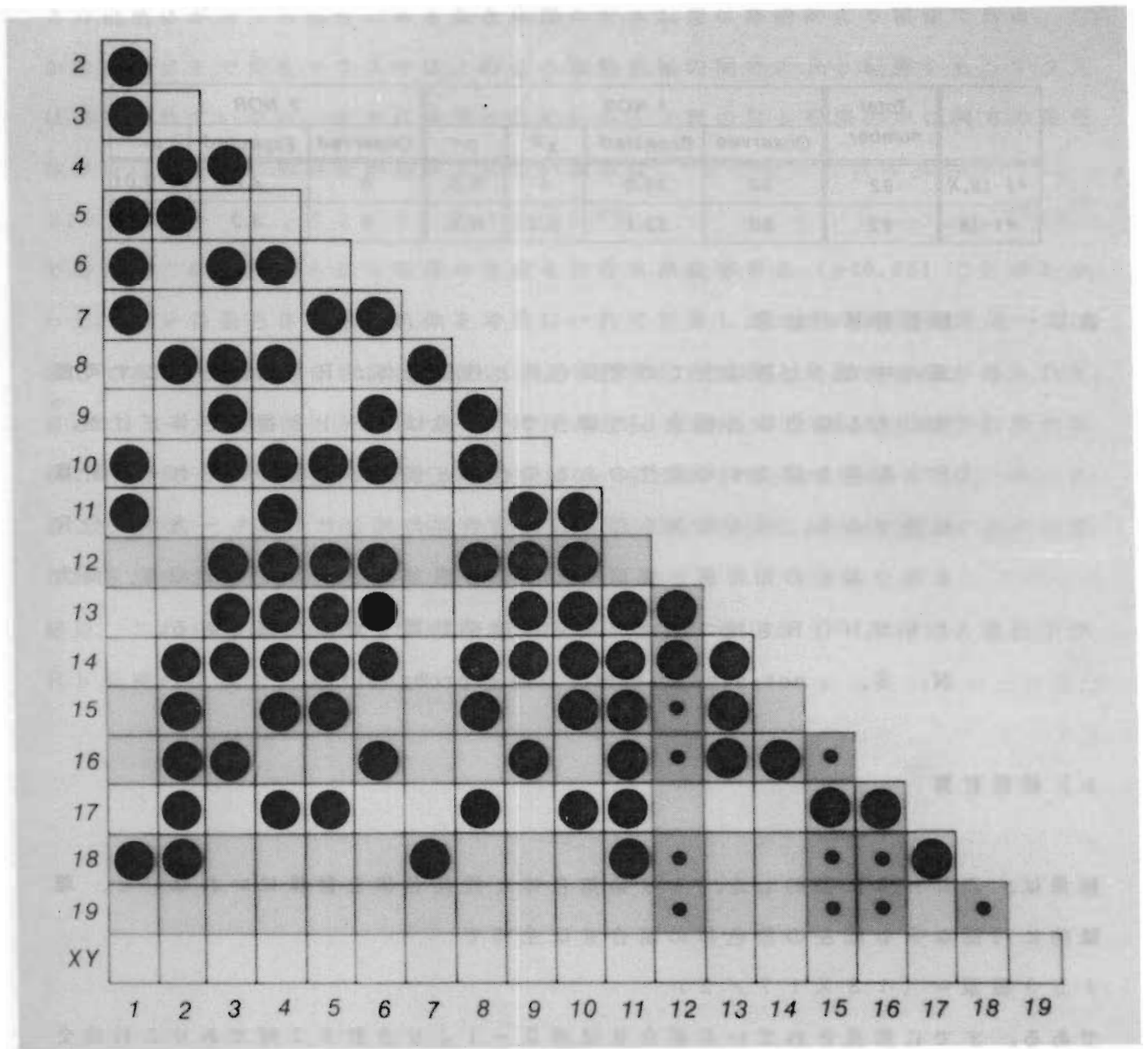


図 II - 1 ヨーロッパ産野生マウスの中でみられる R b 転座に関与する染色体の組合せと NOR を持つ可能性のある染色体

丸で示したのは、今までに見つかっている R b 転座で、斜線で示したのは、II 章で明らかにした様に動原体に NOR を持つ可能性のある染色体である。また小さな丸で示したのは 2 対とも NOR を持つ可能性のある R b 転座であるが、この組合せはまだ野生マウスから見つかっていないことがわかる。

	Total number	1 NOR				2 NOR		
		Observed	Expected	χ^2	$p <$	Observed	Expected	$p <$
#1-19,X	82	30	36.0	1	N.S.	0	4.8	$p < 0.01$
#1-18	82	30	33.2	0.3	N.S.	0	3.2	$p < 0.05$

表 II - 2 統計計算の結果

表の中で、上段は全ての常染色体と性染色体が R b 転座を起こす可能性のある染色体と仮定した場合で、下段は 1 - 18 番染色体だけが、R b 転座を起こす可能性のある染色体と仮定した場合のそれぞれ計算結果である。R b 転座を起こした染色体の組合せのうち一方が NOR を持つ場合の期待値と観察値の間の有意差検定はカイ 2 乗法を、両方ともが NOR を持つ場合の検定は確率計算で求めた値である。

N. S. ; not significant, p ; probability

b) 統計計算

結果は、表 II - 2 に要約した。19 番染色体と性染色体を計算にいれないと、理論的に可能な R b 転座の染色体の組合せは全部で

$$153 \text{ 種類} = (18 \times 17 / 2)$$

である。すでに発見されている組合せは表 II - 1 より合計 82 対でありこれは全体の 53.6% に当たる。従って、R b マウスでは可能な組合せの半数以上がすでに見つかっていることになる。R b 転座の内一方が NOR を持つ組合せは、理論的に 153 対の中で 62 対であり、全体の 40.5% に当たる。R b マウスではすでに発見されている 82 対の内 30 対が一方の染色体が NOR を持つ可能性がある。この場合の観察値は

$$36.6\% = 30 / 83 \times 100$$

でカイ 2 乗法で検定すると、理論値 (40.5%) と有意な差はみられない。従って、培養細胞株を用いた研究で得られた様な、R b 転座の中で一方の染色体が

NORを持つ組合せが他に比べて多くみられることはなかった。次にNORを両方の染色体が持つ可能性のある染色体間のRb転座は理論的に6種類である。しかし、今日まで野生マウスではこのような染色体の間でのRb転座をもつマウスは発見されていない。すでに発見されている82種のRb転座の中に両方の染色体がNORを持つ組合せが発見されない確率は

$$3.76\% = ((153 - 6) \times 153)^{-2}$$

であり、この結果からRb転座の生成をNORが阻害する ($p < 0.05$) ことがわかった。19番染色体と性染色体を考慮に入れて計算したときの結果も表II-2に示してある。この場合も前掲の仮定により計算した結果と同様の結果が得られた。従って、一方の染色体がリボソームRNA遺伝子を持つRb転座も両方の染色体がこの遺伝子を持つ場合もNORを持たない染色体の組合せと比べて多くみられることはない。逆に、両方の染色体がNORを持つ場合はRb転座の生成が阻害される傾向すら観察された。

結局、これらの結果から、従来考えられていたようなりボソームRNA遺伝子がRb転座の生成を促進するという仮説は棄却された。

考 察

この章では、Rbマウスが由来したと考えられるヨーロッパ産野生マウスと実験用マウス系統におけるリボソームRNA遺伝子の染色体分布の結果から、高頻度に起こったRb転座が従来考えられているようにNORによって促進されることはなく、逆にNORはその生成を阻害する傾向にあることを示した。

このことは、少なくともNOR-associationによるものだけでヨーロッパ産野生マウスにおける高頻度に起こったRb転座生成を説明することができないことを示している。

しかし、ここで使ったいくつかの仮定に信頼性について考察を加える必要がある。まず第一の仮定である、ヨーロッパ以外で発見されているRb転座をこの章では除外して検定した。ヨーロッパ以外でもアジア産野生マウスから3例、近交系マウスからは22例のRb転座が報告されている。(表II-1参照)。しかし、これらはおのおの一組のRb転座のみを含み、ここでのRb転座生成がヨーロッパ産野生マウスで高頻度に起こったRb転座と同一の機構によるものか否かは不明である。そこで、今回の検定には、ヨーロッパ産野生マウスの中で発見されている多数のRb転座を持つマウスだけを使用した。仮に、アジア産野生マウスや近交系マウスにみられる散発的なRb転座が、ヨーロッパ産野生マウスの場合と同じ機構によるものとしても、Rb転座の発見例の90%以上を占めるRbマウスを使って検定すれば、そこでみられる傾向は全体のRb転座の生成機構を反映する。

第二に考察する染色体の数であるが、実験用マウスではRb(5,19)1Wh、Rb(X,2)2Adが発見されているのに、なぜ19番染色体と性染色体がヨーロッパ産野生マウスのRb転座の中で発見されないかは疑問である。このことを説明するには、これら染色体が積極的にRb転座を起こさない特別な機構を持っているのか、あるいは偶然まだ発見されていないだけなのかと2つの可能性が考えられる。本章では、両方の場合を想定して、それぞれに対する仮定を設けた。もし、これら染色体がRb転座を起こさない特別な機構を持っているとするときには、19番と性染色体を除外した仮定を、そして偶然に見つからないことに対しては、全ての染色体を考慮にいった仮定を設けて計算した。しかし、いずれの場合も結果は同じ

だった。

第三の点は同じ染色体の組合せの R b 転座が、ヨーロッパのいくつかの場所で発見されることである。今回の計算ではこの R b 転座を一カ所で一回だけ起こった R b 転座がヨーロッパ各地に伝播したと仮定した。実際には同じ染色体の組合せの R b 転座が異なる場所で独立に複数回起こったと考えることも可能であるが、その場合今回のような計算はできない。しかし、結果としては仮に後者が事実だったとしても前者を仮説に取り入れて得られた結果とは大きな差がないと思われる。なぜなら両方の染色体が N O R を持つ組合せの R b 転座の観察値が 0 なので後者を仮定として取り入れても全体数が増すだけで、表 II - 2 の p 値がさらに低くなり有意水準の信頼性が高くなるだけである。従って、どちらが事実にせよ今回計算に使った仮定は妥当なものであろう。

最後に N O R を持つ染色体を 1 2、1 5、1 6、1 8、1 9 番染色体の 5 対とした点である。これは、ごくわずかなヨーロッパ産野生マウスと 4 系統の近交系マウスの結果から導いた仮定である。ここで行われた調査方法を見ると銀染色法か in situ hybridization のどちらか一方しか行われていない。III 章で詳述するが、銀染色法では全てのリボソーム R N A 遺伝子の染色体上の位置を決めることができない。これらのことから、上記 5 対の染色体をヨーロッパ産野生マウスが N O R を持ち得る染色体とするという仮定は再検討すべき問題であろう。

従って最後の仮定以外はすべて妥当なものと考えられるので、従来の R b 転座生成機構に関する仮説を十分な信頼性を持って棄却するにはヨーロッパ産野生マウスにおけるリボソーム R N A 遺伝子の染色体分布の調査を行い、その結果が本章の仮定と一致するかどうかを調べればよいことになる。

III ヨーロッパ産野生マウスと

それによ来する

実験用マウス系統における リボソームRNA遺伝子の 染色体上の位置とその発現

1 序論

II章では、ヨーロッパ産野生マウスにおける高頻度のRb転座生成をNORが促進するという従来の仮説を棄却するには、ヨーロッパ産野生マウスにおけるリボソームRNA遺伝子の染色体分布を広範囲に調べる必要があることを述べた。そこで、全てのリボソームRNA遺伝子の染色体上の位置を決定することのできる in situ hybridization法により広範囲に M.m.domesticus 集団中でのこの遺伝子の染色体分布を調べることにした。また、この考察をさらに確かにするため、主に、M.m.domesticus から育成されてきたと考えられている実験用マウス⁽¹¹⁾についても同様の調査を行った。

ほ乳類のリボソームRNAを構成するサブユニットのうち18S, 28S RNAをコードする遺伝子は、並んで配列し一つのユニットを形成し、それが数十コピータンデムに重複しクラスターをつくり染色体上に存在する。現在までに、リボソーム遺伝子の染色体上の位置を細胞遺伝学的に調べるにはいくつかの方法が知られている。このうちよく使われるのは、銀染色法と in situ hybridization の二つの方法である。銀染色法によるNORの染色機構の詳細は不明であるが、発現している18S, 28Sリボソーム遺伝子を検出する方法であることが、ヒトーマウスの雑種細胞を使って示されている^(12,23)。 in situ hybridizationは発現の有無にかかわらず、当該遺伝子の染色体上の位置を決めることができる。従って、活性を失っているリボソームRNA遺伝子があるとすれば、 in situ hybridizationでは検出されるが、銀染色法では検出されないことになる。換言すれば in situ hybridizationと銀染色法の両方法を併用することによってリボソームRNA遺伝子の染色体上の位置とその遺伝子の発現とを同時に知ることが可能であ

る。Warburtonらは⁽¹³⁾、ヒトにこの方法を応用し、以下のことを明らかにした。一般的にいえば銀染色法で検出されるNORに密着する銀粒子の数と in situ hybridization で検出される粒子の大きさとは比例していた。しかしこの傾向は絶対的なものではなく、銀染色法による銀粒子の大きさ、言い換えれば染色体毎のリボソーム遺伝子クラスターの活性を調節する要因があることが示唆されている。

そこで本論文では、野生マウスについて、in situ hybridization法によってその染色体分布を調査した。実験用マウスにはin situ hybridization法と銀染色法を併用し、リボソームRNA遺伝子の染色体分布に加えて、その発現及びその組織特異性も調べた。また、2つの代表的な近交系マウスの亜系統間におけるその分布と発現についても調査した。

2 材料と方法

a) マウス

野生マウス

この実験に使ったヨーロッパ産野生マウスはフランス国モンペリエ大学のF. Bonhomme博士より分与されたものであり、採集地・性別は、表Ⅲ-1に示した。

亜種名	系統名	採集地	性別
<u>M. m. domesticus</u>	B F M	France Montpellier	Male
	B I B A	Israel Afula	Male
	B I B B	Israel Sede Boger	Female
	B I K	Israel Haifa	Female
	B N C	Egypt Le Caire	Male
	B Z O	Algerie Oran	Male
	D B P	Burgarie Pomorie	Female
	D B V	Bulgarie Vlas	Male
	D F C	France Corse	Female
D S D	Senegal Dakar	Female	

表Ⅲ-1 使用した野生マウスの亜種、系統名と採集地

近交系マウス

調査した近交系マウスの系統は表Ⅲ-2に示した。近交系マウスでは調べた全ての系統で5-15週令の雄から染色体標本を作成した。また、ここにあげた近交系のうち、BALB/c Aは実験動物中央研究所の加藤秀樹博士から分与されたもので、そのほかは、すべて国立遺伝学研究所で現在維持飼育されている。

系統名	入手元	年代	系統名	入手元	年代
A/J	?	?	CBA/StMs	?	?
A/WySnJ	Jax	1984	CE/J	Jax	1984
AKR/J	Jax	1984	DBA/1J	Jax	1982
BALB/cA	?	?	DBA/2J	Jax	1984
BALB/cAnN	NIH	1984	DM/Shi	Shi	1982
BALB/cByJ	?	?	I/J	?	?
BALB/cHeA	?	?	MA/MyJ	Jax	1983
BALB/cJ	Jax	1986	NZB/B1NJ	Jax	1982
BALB/cUCSD	Os	1978	R111S/J	Jic	1985
C3H/HeJ	Jax	1984	SJL/J	Jax	1982
C57BL/10Sn	?	?	SM/J	Jax	1982
C57BL/6J	Jax	1984	SWM/Ms	CHMC	1953
C57L/J	Jax	1984	SWR/J	Jax	1984
C58/J	Jax	1985	WB/ReJ-W	Jax	1982
CBA/CaHN	NIH	1984	129/J	Jax	1984
CBA/J	Jax	1984			

表Ⅲ - 2 使用した実験用マウス系統

Jax: Jackson Laboratory, NIH: National Institute of Health,
Os : Osaka University, Shi: Shionogi Pharm. Aburabi Laboratory
Jic: Central Institute of Experimental Animals
CHMC: City of Hope Medical Center

b) 脾臓細胞の培養と染色体標本作製法

マウスを麻酔し、屠殺後、脾臓を摘出し生理的リン酸緩衝液中に懸濁した。5-10時間 4℃に保存後、遠心分離して単一細胞を集めたのち、5 mlのCon-A(25 μg/5ml)と20% Fetal Calf Serumを含むRPMI1640に(2X10⁷ cells/ml)浮遊させた。64時間、37℃、5% CO₂のもとで静置培養し、コルヒチン(0.5 μg/5ml)と臭化エチジウム(50 μg/5ml)を加え⁽¹⁴⁾、さらに1時間培養した。細胞を遠心分離で集めたのち、2 mlの0.56% KClに再浮遊させ、37℃で15分間保温し低張処理を行った。そして、冷やした固定液(エタノール:酢酸=3:1)を加えて固定し、遠心分離した。さらに細胞塊を固定液で再浮遊させ遠心分離し、この操作を3回繰り返した。最後に、2 mlの固定液に再浮遊させて-30℃で保存した。固定した標本は、温度20℃、湿度60%の環境のもとで、予めきれいに洗浄しておいたスライドグラスに滴下して自然乾燥させ、これを染色体標本として以後の実験に用いた。

c) その他の組織からの染色体標本作製法

骨髄細胞からの染色体標本作成は通常使われている方法⁽⁵⁰⁾によった。また、雄の精巣からの染色体標本作成は、Imaiの方法⁽¹⁵⁾によった。

d) G-バンド法

上記の方法で作成した染色体標本は37℃で24時間乾燥した。6M尿素を含むリン酸緩衝液(pH6.8)に染色体標本を作成したスライドグラスを3秒漬け、すぐに水洗してリン酸緩衝液に10秒浸した。続いて、4%ギムザ液で5分染色して、水洗乾燥して検鏡した。染色体の位置を記録しながら、よく広がり、染色体バンドパターンの識別し易い核板の写真をとった。染色体の同定はNesbittらの基準⁽¹⁶⁾に基づいて分類した。銀染色法では最低30核板以上、in situ hybridizationでは最低15核板以上、写真を撮影した。写真撮影後、50%酢酸で脱色し、銀染色とin situ hybridizationに用いた。

e) 銀染色法⁽¹⁷⁾ (図III-1)

ギムザ液を脱色した染色体標本に50% AgNO₃を2滴とコロイド現像液

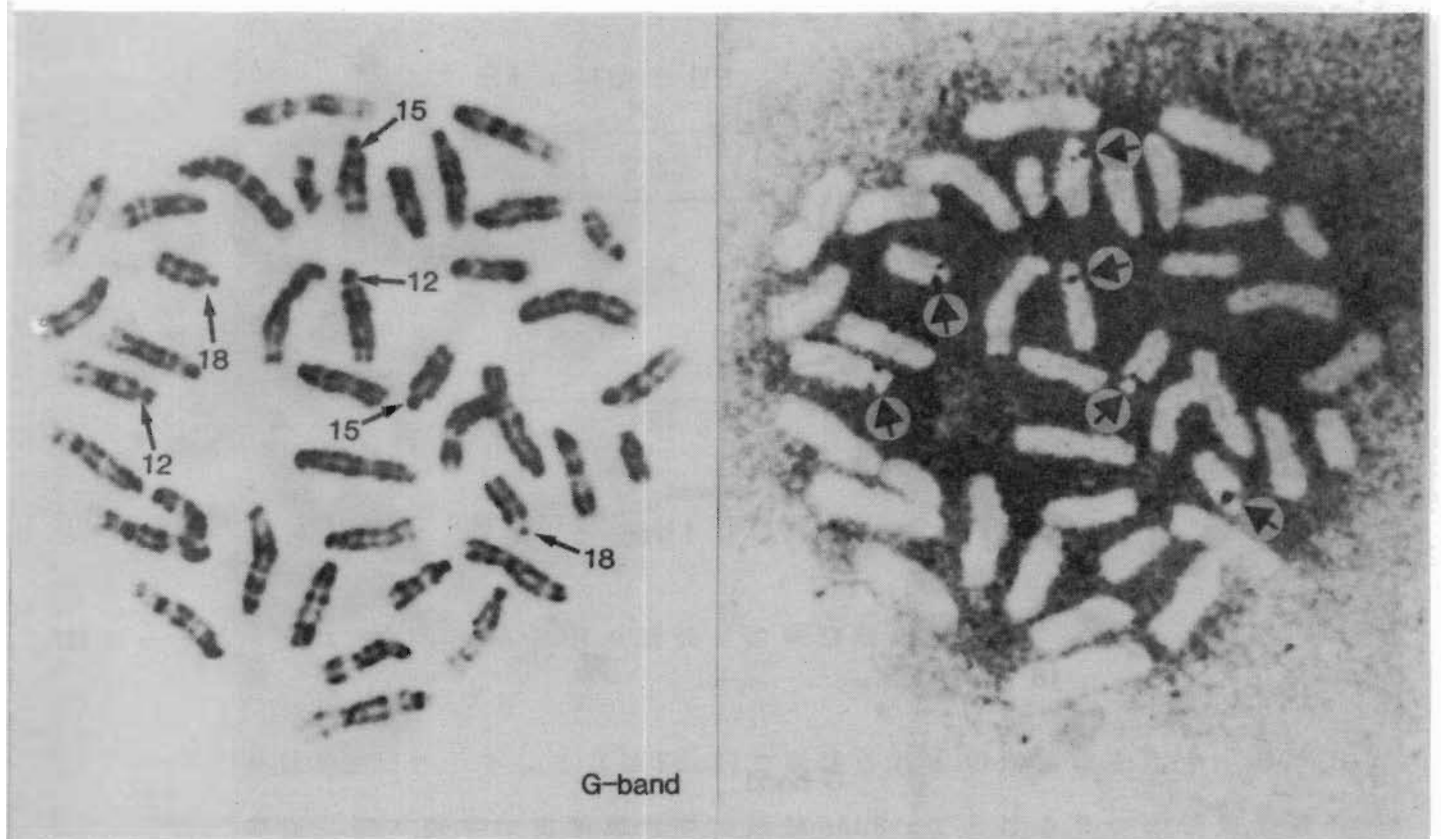


図 III - 1 銀染色の例

左側は短期間培養した近交系マウス BALB/c By J の脾臓細胞から作成した G - バンド像で、右側は同じ核板に銀染色を行ったもの。ここでは、12、15、18番染色体に銀粒子が検出される。

(2% Gelatin, 1% formic acid) 1 滴をスライドグラス上で混合し、ナイロンメッシュをかぶせて⁽¹⁸⁾ 70℃に加湿保温し、4分後に水洗して乾燥した。染色体の輪郭を鮮明にするため、10秒間4%ギムザ液にて染色した。G-bandの時に記録した染色体の位置を確認しながら、写真と対比しながら、NORをもつ染色体を同定した。

f) in situ hybridization (図 III - 2)

G-Bandのギムザ液を脱色後1週間ほど真空乾燥させたサンプルに対して in situ hybridizationを行った。用いたDNAプローブは木南らによって単離された28SリボソームRNA遺伝子の下流のHinfI-BamHI断片0.7kbをpBR322のBamHI siteに組み込んだものである(図 III - 3)^(19,20)。³H-dCTP (Amersham Japan)

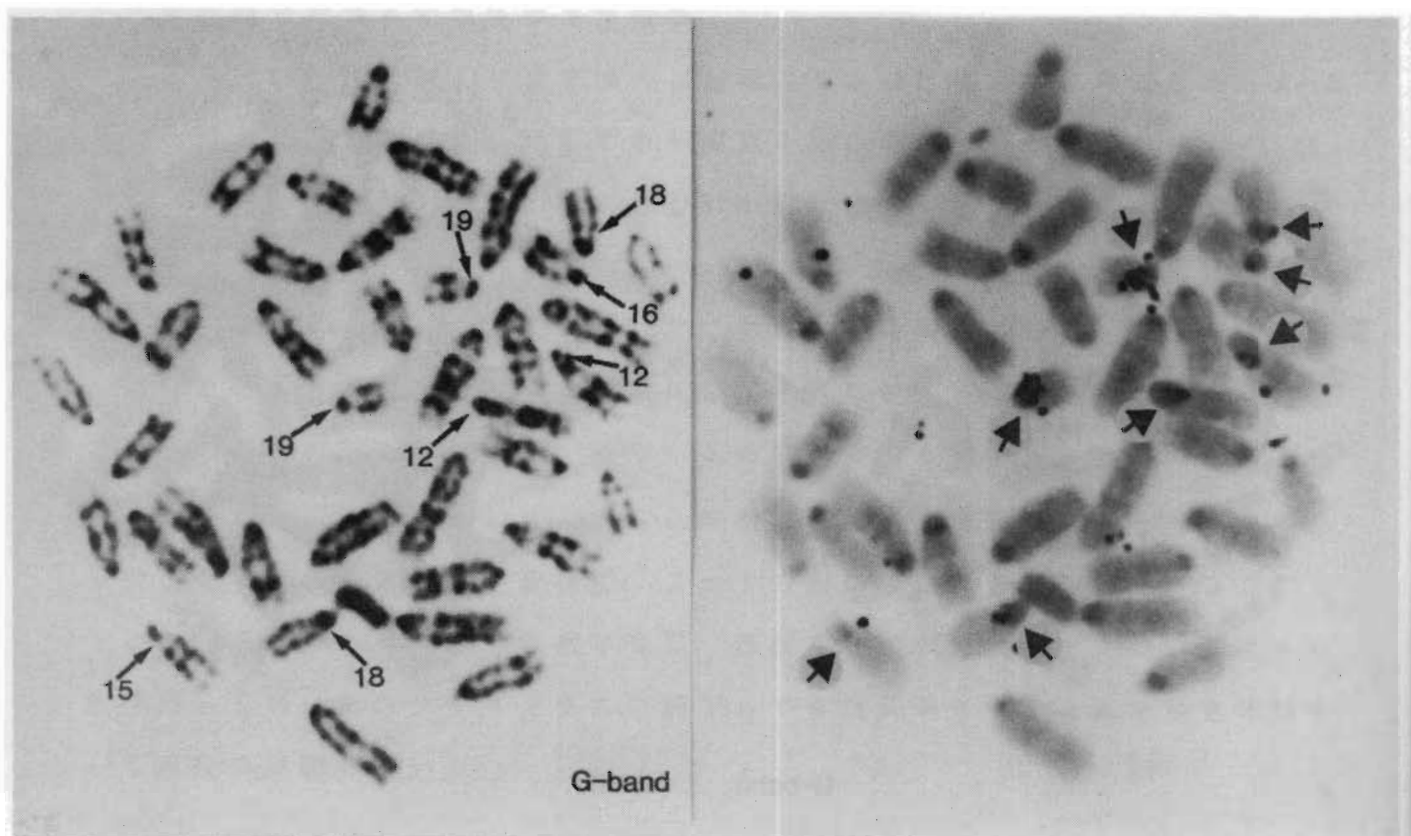


図 III - 2 in Situ Hybridization の例

左側は短期間培養した近交系マウス C 5 7 L / J の脾臓細胞から作成した G - バンド像で、右側は同じ核板にリボソーム R N A 遺伝子特異的なプローブを使って、in situ hybridization を行ったもの。ここでは、1 2、1 5、1 6、1 8、1 9 番染色体に粒子が検出される。しかし、1 5、1 6 番染色体は相同染色体のうち的一方しか、粒子が検出できない。

と ^3H - d T T P (Amersham Japan) を用いニクトランスレーション (Amersham Japan) 法にて全プラスミドをラベルし、 $2 \times 10^8 \text{cpm}/\mu\text{g}$ 以上の比活性を持つプローブを得た。このプローブを用い in situ hybridization を行った⁽²¹⁾。オートラジオグラフィーは乳剤に N R M - 2 (サクラ) を用い、露出は 4°C で 2 週間行った。現像はレンドール (フジ) で 20°C 5 分行い、4 % ギムザ液で 10 分染色した。リボソーム遺伝子を持つ染色体は、銀染色の場合と同じように G - バンドの時記録した染色体の位置を確認しながら、写真撮影して同定した。得られたデータは、調べた全ての染色体の中で検出された粒子の現れる頻度で示した。

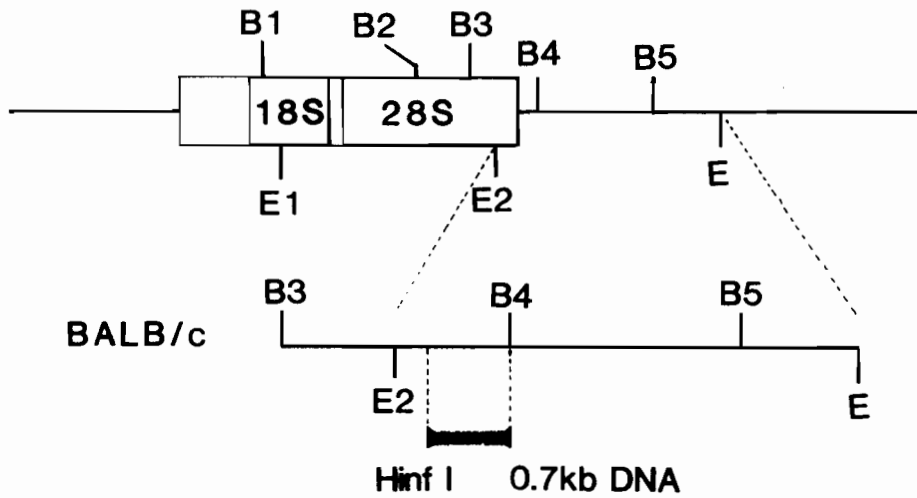


図 III - 3 マウスリボソーム RNA 遺伝子の制限酵素地図と

今回使用したプローブ

B は BamHI で、そして E は EcoRI で認識される切断部位を示す。B, E の後に続く数字は実験用マウス系統 BALB/c における 2 つの制限酵素の切断点を示すのに木南らによって用いられたものである (19, 20)。今回使用した DNA プローブは E 2 - B 4 断片中の Hinf I - BamHI 断片の 0.7 kb を pBR322 の BamHI site に組み込んだものである。

3 結果

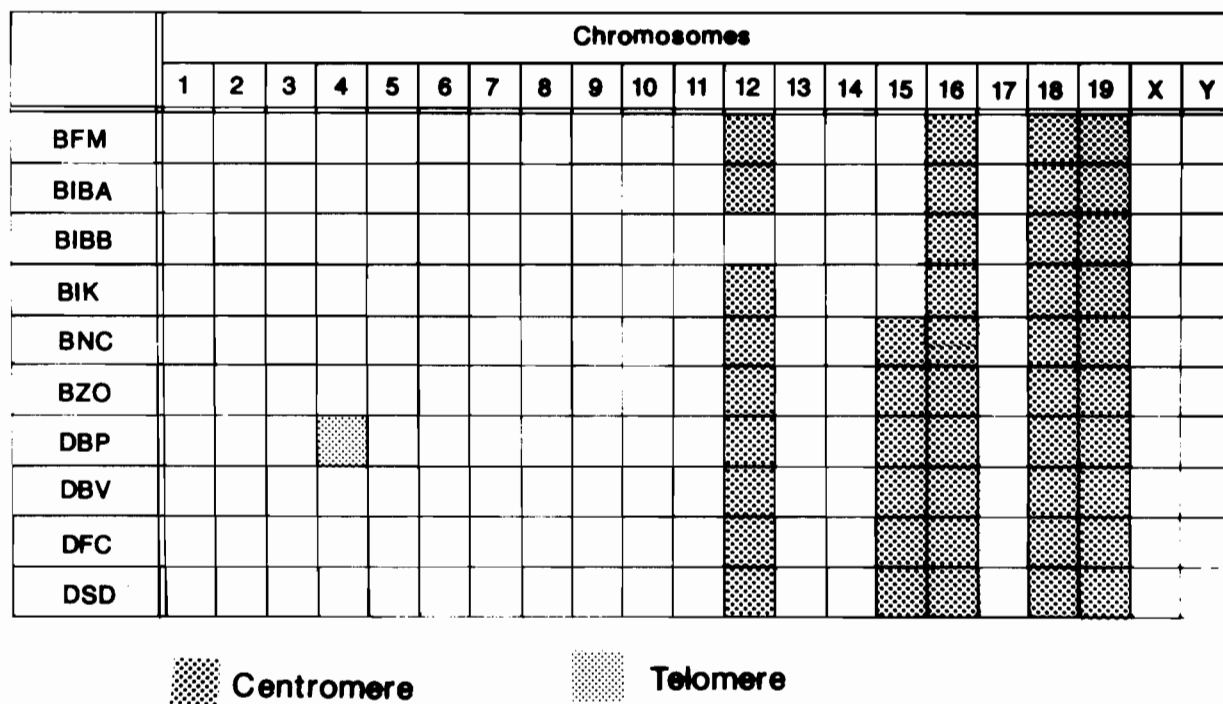


図 III - 4 in situ hybridizationによって明らかになった通常の核型を持つヨーロッパ産野生マウス (M.m.domesticus) のリボソームRNA遺伝子の染色体分布

a) ヨーロッパ産野生マウスにおけるリボソームRNA遺伝子の染色体分布
in situ hybridizationによって調べた10系統のヨーロッパ産野生マウス (M.m.domesticus) のリボソームRNA遺伝子の染色体分布を図 III - 4 に示した。

その分布は、12、15、16、18、19番染色体の動原体近傍に分布するほかに、4番染色体の末端部にも分布していた。4番染色体上の末端部に存在するリボソームRNA遺伝子は例外としてヨーロッパ産Rbマウスでも報告されており⁽⁹⁾、今回が初めての報告ではない。このほかに13番染色体の末端にリボソームRNA遺伝子があることが報告されているが、今回の調査では見つからなかった。通常の核型を持つ野生マウスの中にも、4番染色体の末端部にリボソーム

R N A 遺伝子を持つマウスが見つかったことから、今まで R b マウスに特異的に現れると思われていたこの特性が、実はヨーロッパ産野生マウスに比較的広く見られるものであることがわかった。また、調べた全ての野生マウスで 1 6、1 8、1 9 番染色体にリボソーム R N A 遺伝子が検出されたが、1 2 と 1 5 番染色体上にこの遺伝子を持っていないマウスもいた。

b) 実験用マウス系統におけるリボソーム R N A 遺伝子の染色体分布

in situ hybridizationによって明らかにされた 2 0 系統の実験用マウス系統における、リボソーム R N A 遺伝子の染色体分布を図 III - 5 に示した。

以前に報告されていた C57BL/6J⁽¹⁰⁾ のリボソーム R N A 遺伝子の染色体分布は、今回の結果でも確かめられた。さらに他の系統についてもその分布は、1 2、1 5、1 6、1 8、1 9 番染色体の動原体近傍に限られていた。また、リボソーム R N A 遺伝子を持つ染色体対の数は、CBA/CaHN の 3 対から BALB/cJ などのように 5 対までと異なった。しかし、ほとんどの系統で 4 - 5 対の染色体がリボソーム遺伝子を持っていた。平均すると一系統当りのリボソーム R N A 遺伝子を持つ染色体の数は 4. 4 対だった。

c) 実験用マウス系統における N O R の染色体分布

3 1 系統の実験用マウス系統の N O R の染色体分布は図 III - 6 に示した。

以前に報告されていた、BALB/cJ と C3H/HeJ は今回の実験でも同じ染色体に N O R を持っていた⁽¹⁰⁾。さらに図 III - 6 に示した系統のうち 1 0 系統に対しては異なる個体で同じ条件で銀染色を行った。その結果、N O R の染色体分布並びに各染色体における銀粒子の出現頻度の再現性が確かめられた。従って N O R は一つの系統内ではここで用いた実験条件で行う限りどのマウスを使っても同じ結果を得ることができたので、N O R は遺伝的に安定に継代的に伝えられることがわかった。全ての実験用マウスの N O R の染色体分布は従来知られていた 1 2、1 5、1 6、1 8、1 9 番染色体の動原体近傍に限られそのほかの染色体上には N O R を検出することはできなかった。個々の系統について見ると、N O R を持つ染色体の数は、SM/J の 2 対から BALB/cJ の 5 対までと異なった。平均すると N O R をもつ染色体は一系統当り 3. 9 対だった。以前 BALB/cJ の 1 6 番染色体では銀粒子

系統名	核板数	染色体							
		1 2	1 3	1 4	1 5	1 6	1 7	1 8	1 9
129/J	2 4	●				○		●	●
A/J	2 0	●			●			●	
A/WySnJ	1 8	●			●	●		●	●
AKR/J	4 6	●			●			●	
BALB/cA	1 7	●			●	○		●	○
BALB/cAnN	2 2	●			●	●		●	●
BALB/cHeA	1 9	●			●	●		●	●
BALB/cJ	2 3	●			●	●		●	●
BALB/cUCSD	2 4	●			●	●		●	●
C3H/HeJ	2 2				●	●		●	●
C57BL/10SnJ	5 2	●			●	○		●	●
C57BL/6J	4 0	●			○	●		●	●
C57BL/J	8	●			●	●		●	●
CBA/CaHN	3 9				●	●		●	
CBA/StMs	2 1				●	●		●	●
DBA/2J	2 1	●				○		●	●
MA/MyJ	1 5	●			●	●		●	●
SJL/J	2 2	●			●			●	●
SM/J	2 2	●				●		●	●
SWR/J	1 9	●			●	●		●	●

図 III - 5 *in situ* hybridizationによって明らかにされた20系統の近交系マウスにおけるリボソームRNA遺伝子の染色体分布
 黒丸は調べた核板のうち40%以上に銀粒子が検出されるものを示し、
 白丸は10%から40%の染色体に銀粒子検出されるものを示す。こ
 こでは全て場合で動原体近傍に銀粒子が検出された。

系統名	核板数	染色体							
		1 2	1 3	1 4	1 5	1 6	1 7	1 8	1 9
129/J	7 4	●			○	●		●	●
A/J	3 1				●			●	
A/WySnJ	7 5	●			●			●	
AKR/J	7 5	●			●			●	
BALB/cA	3 7	●			●	○		●	
BALB/cAnN	6 6	○			●			●	○
BALB/cByJ	5 3	●			●			●	
BALB/cHeA	7 4	●			●			●	
BALB/cJ	4 3	●			●	○		●	○
BALB/cUCSD	1 0 2	●						●	
C3H/HeA	3 8				●	●		●	
C57BL/10SnJ	4 1	●			●				●
C57BL/6J	6 0	●			●	●		●	●
C57L/J	4 4	●			●	○			●
C58/J	4 2	●			●	●		●	●
CBA/CaHN	3 8				●	●		●	
CBA/J	4 0				●			●	●
CBA/StMs	3 7				●			●	●
CE/J	4 4	●			●			●	
DBA/1J	7 2	●				●		●	●
DBA/2J	5 5	●				●		●	●
DM/Shi	3 9	●			●			●	●
I/J	3 9	●			●			●	●
MA/MyJ	3 9	○			●	●		●	○
NZB/B1NJ	3 8	●				○		●	●
R111S/J	4 1	●			●			●	●
SJL/J	4 1	●						●	●
SM/J	4 0					●		●	
SWM/Ms	3 7	●			●	●		●	
SWR/J	6 0	●			●			●	●
WB/ReJ-W	3 8	●				●			●

図 III - 6 銀染色によって明らかにされた 3 1 系統の近交系マウスの NOR の染色体分布
 図 II - 5 と同様に黒丸で示したのは、40%以上の核板に銀粒子が検出されるものを示し、白丸は5%から40%の核板で検出されるものである。ここでも、動原体近傍しか銀粒子は検出されなかった。

の出現頻度が低いという報告⁽²²⁾があったが、このほかにもC57BL/6Jの16番染色体のように明らかに銀染色で染まるにもかかわらず銀粒子の出現頻度が低い染色体があった。また個々の染色体についてみると、NORを持つ染色体の分布は5対の中でも一様ではない。18番染色体は30例中28の系統でNORを持ち、その出現頻度も高いのに対し、16番染色体では30例中15系統がNORを持ち、その出現頻度も低い系統が多い。

d) 亜系統間におけるリボソームRNA遺伝子の染色体分布の変異

表III-7に今回調べた実験用マウス系統の内、CBA3系統とBALB/c6系統の亜系統の結果をまとめた。

CBAでは、in situ hybridizationによるリボソームRNA遺伝子の染色体分布と銀染色によるその発現から二つのグループに分けられた。一つは、CBA/CaHNでリボソームRNA遺伝子は15、16、18番染色体上にあり、その全てが発現していた。一方、CBA/JとCBA/StMsでは15、16、18番染色体に加えて、19番染色体上にリボソームRNA遺伝子を持つが、16番染色体上のリボソームRNA遺伝子は銀染色によって染色されなかった。

また、BALB/cは全ての亜系統でin situ hybridizationで粒子の出現頻度には少しずつ変異がみられるが、その染色体分布は5対(12、15、16、18、19)で一致した。しかしNORの染色体分布からみるとBALB/cUCSDの2対からBALB/cJの5対までと変化に富んでおりこれら亜系統を分類することはできない。

これらの結果は、少なくとも今回調べた2つの亜系統において、リボソームRNA遺伝子の位置と銀染色により検出される発現に関して、亜系統間においても差異があることを示している。

e) 組織別のリボソームRNA遺伝子の発現

この論文の中で示したように脾臓細胞の初代培養から調製した染色体標本を使うと、多くの実験用マウス系統の中で、in situ hybridizationではリボソームRNA遺伝子が検出されるのに、銀染色では検出されないことがあることがわかった。そこでここでみられた傾向がほかの組織から調製された染色体標本でも見られるかどうかをCBA/Jの雄を用いて調べた(図III-8)。CBA/Jの雄の15、16、

系統名	in situ hybridizationに よって示されたリボソーム RNA 遺伝子の染色体分布					銀染色によって示された N O R の染色体分布				
	#12	#15	#16	#18	#19	#12	#15	#16	#18	#19
CBA/CaHN		●	●	●			●	●	●	
CBA/J [#]		●	●	●	●		●		●	●
CBA/StMs		●	●	●	●		●		●	●
BALB/cJ	●	●	●	●	●	●	●	○	●	○
BALB/cA	●	●		●		●	●	○	●	
BALB/cAn	●	●	●	●	●	○	●		●	○
BALB/c*	●	○	○	●	●	●			●	
BALB/cHe	●	●	●	●	●	●	●		●	
BALB/cBy						●	●		●	

表Ⅲ-7 亜系統間でのリボソーム遺伝子の分布と発現の違い

3つのCBA亜系統と6つのBALB/c亜系統におけるNORとリボソームRNA遺伝子の染色体分布を図Ⅲ-5, 6より抜すいた。黒丸は40%以上の核板で検出されるものを示し、白丸は5%以上40%未満の核板に検出されるものを示す。また#で示したNORの分布はSuzuki, H (昭和59年神戸大学学位論文)より引用した。系統名の欄中、*で示した系統はBALB/cUCSDである。

18、19番染色体上に存在するリボソームRNA遺伝子の内、NORの調査から16番染色体のリボソームRNA遺伝子は銀染色されない。

培養しないで直接、体細胞組織から染色体標本を作成するのに、骨髓細胞を使った。ここでは一核板当りの平均NORの銀粒子数は2.7個と、脾臓細胞培養の

Mouse strain:CBA/J(♂)	#15	#16	#18	#19	一核板当りの平均 N O R 数
rRNA遺伝子の染色体分布	◎	◎	◎	◎	
精原細胞*					4. 1
骨髄細胞	●		●	○	2. 7
脾臓細胞培養 (FCS 20%)	●		●	●	4. 1

図 III - 8 組織別のリボソーム遺伝子の発現

◎は Suzuki, H. (昭和59年神戸大学学位論文) から抜すいた in situ hybridization によって調べたリボソーム遺伝子を持つ染色体で、黒丸は40%以上の核板でNORが検出される染色体、そして白丸はNORの出現頻度の低い染色体(5<○<40%)を示す。

*: 個別染色体の同定が困難であった。

場合の4.1個と比べて低かったが、その染色体分布は15、18、19番染色体上に検出され、16番染色体上には検出されなかった。

また、雄の精巣から調製した染色体標本に対して行った銀染色では、成熟分裂期の染色体標本はいずれの染色体でも銀粒子は検出されず、精原細胞のみにNORが検出された。精原細胞の染色体は、G-bandによる同定が困難だったので⁽²⁴⁾、一核板当りのNORの銀粒子数を数えた。その結果、一核板当りの平均銀粒子数は4.1個で、これは、20%FCSで培養した脾臓細胞から調製した染色体標本における平均銀粒子数と同じだった。さらに一つの核板で観察された最高銀粒子数は6個だった。従って、ここで調べた限りの組織においてCBA/Jの雄でみられた16番染色体のリボソームRNA遺伝子は銀染色されないことがわかった。

4 考察

a) リボソームRNA遺伝子の染色体分布と従来のRb転座生成機構の妥当性
今回の研究から、ヨーロッパ産野生マウスとそれに由来する実験用マウス系統における主要なリボソームRNA遺伝子の染色体分布は、12、15、16、18、19番染色体の動原体近傍であり、一部の野生マウスではそれに加えて4、13番染色体の末端部にリボソームRNA遺伝子を持つことがわかった。この結果は従来の報告と一致する^(9,10)。従って、ヨーロッパ産野生マウスでは個体毎にその染色体分布は多型的であるが、リボソームRNA遺伝子を持つことのできる染色体は前に述べた5対の染色体の動原体近傍と、2対の染色体の末端部に限られるといえる。これらリボソームRNA遺伝子はすべてNORとして検出され得る可能性を持つが、このうちNOR-associationにより動原体接着を起こすと考えられるのは動原体近傍に位置するNORだけである。ここで得られた結果は、II章の仮定の正当性を支持する。従って、II章の統計検定で用いた全ての仮定は妥当であり、NORはRb転座生成の誘因であるという作業仮説は十分な信頼性を持って棄却することができた。

b) ヨーロッパ産野生マウス (M.m.domesticus) に見られる染色体末端部領域のリボソームRNA遺伝子

アジア産野生マウスでは、ヨーロッパ産野生マウスの動原体部位にみられた分布のほかに、4、8、9、10、11、17番染色体の動原体近傍にもリボソームRNA遺伝子は分布している(鈴木仁 投稿準備中)が、末端部には見つからない。従って、4、13番染色体の末端部にあるリボソームRNA遺伝子はヨーロッパ産野生マウスに特異的に現れるであろう。

ほかのリボソームRNA遺伝子がすべて動原体近傍にあるのに、なぜ4、13番染色体のみが、染色体の異なる領域にリボソームRNA遺伝子を持つのかに関して一つの興味ある事実が報告されている⁽⁹⁾。ハツカネズミの近縁種でヨーロッパに生息するMus spretusもハツカネズミの4、13番染色体と相同な染色体の末端部にリボソームRNA遺伝子を持つ。Mus spretusとMus musculusの間では、F1の雌が妊性を持つことから遺伝子の交流が示唆されている⁽²⁵⁾。従って、ヨ

ヨーロッパ産野生マウスに見られる末端部のリボソームRNA遺伝子は、Mus spretusとの交雑による種間の遺伝子交流の結果かも知れない。また、Mus musculusの亜種分化の後に動原体近傍にあったリボソームRNA遺伝子が、転座によってこれらの染色体の末端部に移ったとも考えられる。リボソームRNA遺伝子は、非相同染色体間の組換えによって、異なる染色体に転座するという考え方がある(20)。今までは、一つの染色体の動原体近傍からもう一つの染色体の同じ領域への転座しか考えられていなかったが、異なる領域への転座も起こるのかも知れない。このことを明らかにするためには、末端部にあるリボソームRNA遺伝子の構造が、Mus spretusのそれに似ているのか、あるいはMus musculusの動原体にあるリボソームRNA遺伝子に似ているのかをDNA塩基配列レベルで比較する必要がある。

c) 細胞遺伝学的に検出されるリボソームRNA遺伝子の発現の変異

一つのマウス系統に対し、活性のあるリボソームRNA遺伝子を検出する銀染色法とin situ hybridizationを併用することにより以下の二点が明らかになった。まず第一に、NORの出現頻度の低い染色体があることが以前から知られていた(22)が、今回、その染色体上のリボソームRNA遺伝子クラスターに含まれる遺伝子ユニットの数が少ない傾向が観察された。しかしいくつかの例外もあった。例えば、129/JとNZB/BlNJの16番染色体はNORの出現頻度が低く、in situ hybridizationでも粒子の出現頻度は低かった。しかし、MA/MyJの12番染色体のようにin situ hybridizationで粒子の出現頻度が高いにもかかわらず、NORの銀粒子の出現頻度が低い場合もあった。

第二にin situ hybridizationで調べると、リボソームRNA遺伝子を含んでいる染色体であることが明らかなのに、銀染色では、全く銀粒子が検出されないことがあった。例えばSM/Jでは、リボソームRNA遺伝子は、12、16、18、19番染色体にあるが、銀染色では、このうち16、18番染色体にしか検出できない。銀染色は発現しているリボソームRNA遺伝子を検出する方法と考えられているのでSM/Jでは12、19番染色体上のリボソームRNA遺伝子は全く発現していないことになる。一系統当りの平均NORの出現染色体数に比べて、in situ hybridizationによって示されるリボソームRNA遺伝子を持つ染色体数は

0. 5対多いことから、リボソームRNA遺伝子を持つにもかかわらず銀染色法でNORとして検出されないという現象は、実験用マウス系統にかなり普遍的にみられることがわかった。

この in situ hybridizationによる結果と銀染色による結果の食い違いは、これら方法自体の信頼性によるものかも知れない。in situ hybridizationは、単一遺伝子でさえその位置を染色体上で決めることができる鋭敏な方法であるのに対し、銀染色法はその染色機構が明らかでなく、活性のあるリボソームRNA遺伝子のみを検出するといっても直接的な証明は行われていない。銀染色によって、如何なる染色体構造または物質が染色されるかという問題点と銀染色法が本当に活性を持っているリボソームRNA遺伝子を染色しているかについての再検討も必要であろう。

しかし、いままで得られている間接的な証明から、銀染色法は確かに活性のあるリボソームRNA遺伝子を染色し、その銀粒子の大きさは遺伝子活性の指標となると信じられている。リボソームRNA遺伝子は、真核生物の場合RNA polymerase I (RNA pol I) で転写される。ヒトでは、抗RNA pol I抗体を使って染色体上のRNA pol Iの分布を蛍光抗体法で調べられているが、その分布と蛍光の強さは、銀染色法によって示されるNORの染色体分布と銀粒子の大きさと完全に一致した⁽⁵¹⁾。また、ヒトとマウスの雑種細胞を作ると細胞株によってどちらか一方の種のリボソームRNA遺伝子しか転写されないことがノーザンブローディング法で確認されている^(12, 23)。個々の細胞株で銀染色法を行うと、一方の種由来の染色体上にしか銀粒子は検出できず、それはノーザンブローディング法で得られた結果と一致する。これらの結果から、いままで信じられているように銀染色活性のあるリボソームRNA遺伝子を検出する方法であると考えたい。すると、今回の実験で食い違ったin situ hybridizationの結果と銀染色の結果から次のような推論も可能であろう。つまり、マウスではいくつかの染色体上にリボソームRNA遺伝子を持つが発現しているのはそのうちの一部の染色体上のリボソームRNA遺伝子で、他の染色体上の遺伝子は不活性化しているのかもしれない。また、NORの染色体分布はマウス系統毎に一定なので、ある染色体上のリボソームRNA遺伝子の活性の有無は系統毎に決まっているのではないだろうか。遺伝子の発現を抑えるような機構の一つにメチル化が重要な働きをしていること

が知られている。ほ乳類の場合、雌雄での遺伝子量補正のため雌の一本のX染色体の全体をメチル化し遺伝子発現を抑えると考えられている。リボソームRNA遺伝子でも、発生過程でその遺伝子上流のメチル化がおこり、これにより遺伝子発現の調節が行われていることがラットや Xenopus を使って報告されている^(26,27)。ここで示した実験用マウスにおけるリボソームRNA遺伝子のある染色体上の全てのリボソームRNA遺伝子の発現抑制が、これらと同じようにメチル化によるものであるとすると、なぜ特定の染色体上のリボソームRNA遺伝子領域のみが特異的にメチル化されるかは興味深い。初期発生段階におけるリボソームRNA遺伝子の活性を調べることも今後の課題であろう。

リボソームRNA遺伝子の発現を抑えている機構の二つ目の可能性は、染色体毎にリボソームRNA遺伝子のプロモーターの強度が決まっているかも知れないということである⁽²⁸⁾。これにより、全てのクラスターが発現可能な状態にありながら、生理的条件下で活性化しているリボソームRNA遺伝子が一定に決められているという可能性がある。今回予備実験として、5、10、15% FCSで脾臓細胞を培養し、銀染色を行ったが、その結果 NOR の染色体分布は変化しないにもかかわらず、一核板当りの平均 NOR 数は、FCS の濃度が低いほど少なくなることがわかった。従って個体の生理的条件、言い換えればリボソームRNA分子の必要量に応じて、それをコードする遺伝子の発現量を変化させるのかも知れない。リボソームRNA遺伝子の 18S code 領域上流のプロモーター近傍には、V_r と呼ばれる一つの個体内で多型性に富む領域がある⁽²⁹⁾。この領域は一つの染色体上のクラスター内では均一化しており、ここでみられる一個体内での多型は、異なる V_r 領域を持つリボソームRNA遺伝子クラスターをいくつかの非同染色体が持っていることによることが示唆されている。従って、この領域がプロモーターの強度を決めており、その結果生理的条件下でのリボソームRNA遺伝子の発現の優位性を決めているのかも知れない。

また、この抑制機構の三番目の可能性は、ある染色体上の全てのリボソームRNA遺伝子ユニットが、偽遺伝子として構造的に不活化していることである。ショウジョウバエでは一部の 28S RNA の code 領域に挿入配列を持っており、リボソームRNA分子をつくることができない例が見つかっている⁽³⁰⁾。

いずれの機構がここでみられる発現の抑制に関与するかは今のところ不明である

が、不活化している染色体からリボソームRNA遺伝子断片をとりだし、そのDNA塩基配列レベルでの構造解析や、in vivo系、in vitro系での転写活性能力の検討などが必要であろう。また、発生過程における、リボソームRNA遺伝子の発現も今後の課題として残っている。

ラットにおいて系統内の交配ではNORのパターンは親から子へ遺伝するが、系統間交雑を行うと、その仔のNORの銀粒子の大きさが変化する例がある⁽³¹⁾。上記に述べたいずれの機構が関与しているとしてもマウスにおいてもラットの場合と同様に、系統間交雑の結果、その発現を完全に抑制したり活性化したりすることができるかもしれない。今回調べた実験用マウスでのNORの染色体分布を利用しNORを持つ染色体の数を増減させることにより、この遺伝子の発現と表現型の変化を調べることは興味深い。

d) 亜系統間のリボソームRNA遺伝子の染色体分布の多型

一つの系統から分岐した亜系統は一般的には遺伝的な違いはないと考えられているが、最近いくつかのよく使われる近交系マウスの亜系統での遺伝的な違いが報告されている。このような違いは、この系統の分岐点における残余の系統内多型性あるいは系統育成後の遺伝的汚染、または新たな変異によっていることが考えられる。今回BALB/cとCBAの亜系統において、リボソームRNA遺伝子の発現とその染色体上の位置に関して変異を見いだした。

CBAの亜系統は、19番染色体にリボソームRNA遺伝子を持っているか否かで二つのグループに分けられた。CBA/CaHNとCBA/Jの間には、すでにそのほかの遺伝子マーカーによっても大きな遺伝的多型を有することが知られている⁽⁵²⁾。また、CBA/JとCBA/StMsは、共にStrongの研究室由来の系統で、CBA/CaHNはジャクソン研究所由来の系統である。これらの結果は、CBAにおいては新たに起こった突然変異ではなく系統作成後の遺伝的汚染または系統作成段階での残余の系統内多型性により少なくとも19番染色体と16番染色体においてこの多型が生成したらしいことを示す。

BALB/cに見られるNORの染色体分布の亜系統間での変異を説明することはCBAの場合より複雑である。BALB/cでも亜系統間での遺伝的差異はいくつか見いだされているが、これらは遺伝的汚染によるものではないらしく、おそらく突然変異

あるいは系統内多型性の分離によるものと考えられている。今回の実験では全ての亜系統においてリボソームRNA遺伝子の染色体分布は同じだったが、NORの染色体分布からは、これらをグループ分けすることはできない。従って、ここでみられた差異は遺伝的汚染によらない。BALB/cAnNとBALB/cByJはBALB/c系統の育成を始めてから40年ほど後の1961年に分岐した亜系統であるにもかかわらず少なくとも19番染色体上のリボソームRNA遺伝子の発現は変化している。このことは、おそらくBALB/c亜系統にみられる染色体分布の多型は亜系統育成後に起こった遺伝子発現の変化によるものである。

e) リボソームRNA遺伝子の発現の組織特異性

CBA/Jの雄マウスでは、脾臓細胞の培養でみられた不活化している16番染色体上のリボソームRNA遺伝子は、他の体細胞においても不活化していた。骨髄細胞などでは、一核板当りの平均NOR数が20%FCSで培養した脾臓細胞よりも少なくなっている。骨髄細胞でみられたNOR数の減少は、細胞を取り巻く栄養条件に左右されていると考えたい。生体から直接に染色体標本を作成しNORを調べる場合には、技術的な問題に加えて、そのときのマウスの生理的条件による一核板当りのNOR数の変動も考慮する必要がある(32, 33)。

精細胞では一核板当りの平均NOR数が、20%FCSの脾臓細胞と同じだったことと、一核板当りの最大NOR数が6個だったことから、体細胞と同じようにCBA/Jでは、15、18、19番染色体の3対のみが活性化しており、16番染色体は不活化していると考えられる。精細胞についてはさらに詳細な研究が必要であるが、CBA/Jの不活化している16番染色体のリボソームRNA遺伝子は、調べた限りでは組織によらず不活化していた。

IV ロバートソン型染色体変異を多く持つ

ヨーロッパ産野生マウスにおける

リボソームRNA遺伝子の

DNA多型

1 序論

R b 転座はマウスに限って見つかるわけではなく、広く動物植物にわたって観察されている(34, 35, 36, 37, 38)。しかし、これらの中でもマウス程多くのR b 転座を保有している例はなく、たいてい1組のR b 転座を持っているに過ぎない。従って、これらすべてのR b 転座が同一の機構によって引き起こされているかどうかは不明である。この研究では、普遍的な現象としてR b 転座を考えるのではなく、ヨーロッパ産野生マウスに発見されている高頻度のR b 転座を特別な現象として捕らえ、R b 転座の生成機構を解析する上でこの野生マウスだけを研究の対象とした。

II章とIII章の結果からヨーロッパ産野生マウスにみられる高頻度のR b 転座生成について新たな機構を推定する必要があることを明らかにした。この機構を推察する上で、このマウスに関する広範囲で基礎的なデータの蓄積が必要であろう。そこで、本章ではR b マウスの遺伝的特性がどの野生マウスに最もよく似ているかを調べ、R b マウスのMus musculusにおける分類学的位置づけを試みた。

もともとスイス山岳地帯からイタリア全土にかけて分布するR b マウスはハツカネズミとの間の雑種に一部不稔が見られることから分類学上Mus poschiavinusと呼ばれハツカネズミとは別の種に分類されていた(39)。しかし1980年代に入ってから、R b マウスの生化学的標識遺伝子(従来の下種分類に有効な下種特異的な対立遺伝子を持つ遺伝子)が広範囲に調べられたが、R b マウス集団の遺伝子構成は通常のコ型を持つM.m.domesticus集団中の遺伝的多型の中に含まれることがわかった(40, 41)。つまり、通常のコ型を持つ M.m.domesticus と R b マウスの遺伝子構成には差がなく、コ型だけが異なっていることになる。このため、現在ではR b マウスは、M.m.domesticusのの一つの変種であると一般には信じられている。しかし、R b マウスとそれに隣接して生息する通常のコ型を持つM.m.dom-

esticusとの間では、一部不妊であるが妊性を完全に喪失するわけではないので、2つの集団の間では常に遺伝子の交流が起こっていることが示唆されている(41)。従って、高頻度にR b転座を起こした後の遺伝子交流により、R bマウス集団の遺伝子が近隣のM.m.domesticusからの移入により置き換わったと考えれば、生化学的標識遺伝子の解析で得られた、2つの集団間では遺伝的距離がないという実験結果が、正しくR b転座を起こした当時のR bマウスの遺伝的特性を反映しているかどうかは疑問である(図IV-1)。このため、R bマウスの遺伝的特性を調べる上で有効な遺伝子マーカーを選び、それを指標にしてR bマウスの分類を行うことにした。

リボソームRNA遺伝子は、R bマウスの遺伝的特性を知る上で非常に有効なマーカーと考えられる。この遺伝子は、いくつかの染色体上の動原体近傍に位置するが(II、III章参照)、このため、R b転座を起こした動原体と物理的に近くにあるリボソームRNA遺伝子の間で遺伝的組換えが起こらない限りこの二つは分離しない(図IV-2)。従って、リボソームRNA遺伝子はテロメア側に位置する生化学的標識遺伝子より遺伝子交流の影響を受けにくく、R b転座とリボソームRNA遺伝子のその集団内での挙動は強く連鎖しているといえる。また、ある種のR b転座で、その機構は不明であるが、動原体近傍の遺伝子は、通常のアクロセントリック染色体との間の遺伝的組換えは抑制されることが報告されている(42)。従って、R bを起こした染色体上のリボソームRNA遺伝子は、R b転座を高頻度に起こした当時の遺伝的特性を保存していることが期待される。さらに、リボソームRNA遺伝子がR bマウスの分類のための指標として有効である理由は、このDNA多型性が、鈴木らによってすでに野生マウス全般にわたってサザンブロット法で解析が進んでおり、亜種特異的なRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) パターンが知られていたことである(20)。従って、R bマウスのリボソームRNAのDNA断片が、サザンブロット法でどの亜種と同一のRFLPパターンを持つかを調べれば、高頻度にR b転座を起こした当時のこれらマウスの遺伝的特性を知ることができる。

そこでこの章では、R bマウスと通常の核型を持つ M.m.domesticus、M.m.musculus、M.m.brevirostris、M.m.bactrianus からDNAを抽出し、リボソームRNA遺伝子を特異的に検出することのできるプローブを使ってサザンブロット

法で RFLP 解析を行った。さらに、これらのマウス亜種からこの遺伝子をクローニングして DNA 塩基配列を決定し、その相同性を比較した。

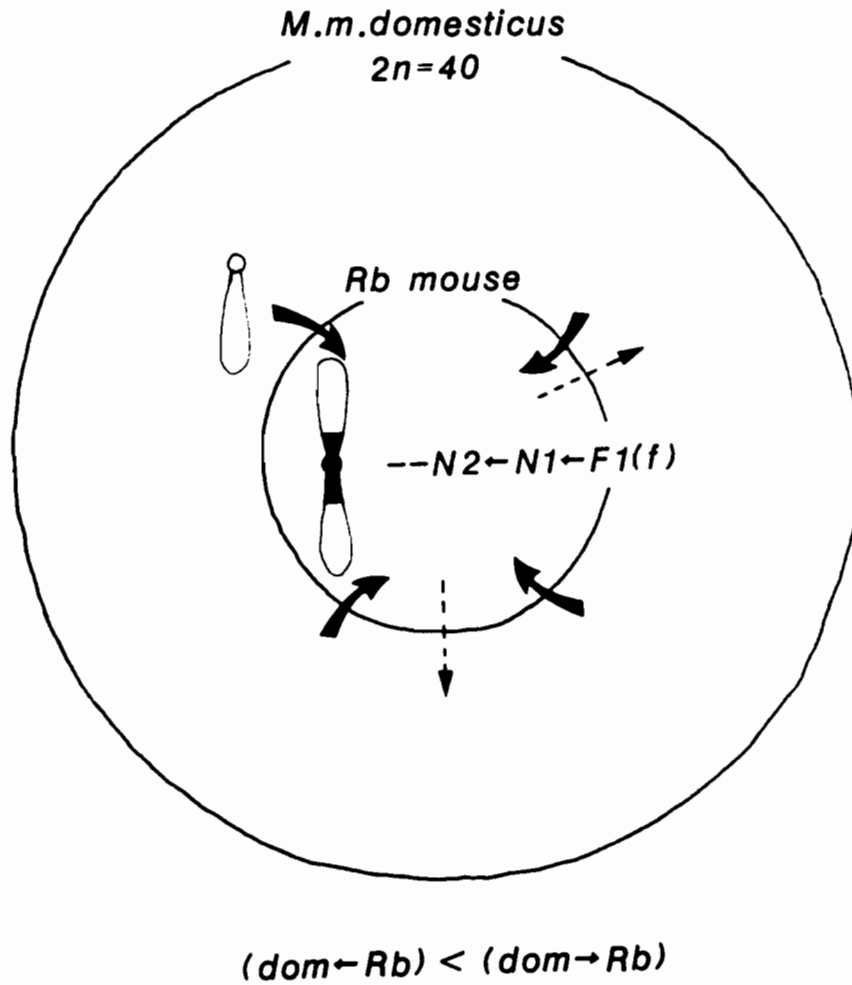


図 IV - 1 通常の核型を持つマウス集団から R b 集団への遺伝子の流入と流出
R b マウスを取り巻いて生息している M.m.domesticus と R b マウスの
間の生殖的隔離は不完全にしか起こらないので、母集団の多い M.m.
domesticus の遺伝子が断続的に R b マウスに入り込み、最終的には
R b マウスの遺伝子はほとんどすべて domesticus 型に置換されること
を示している。

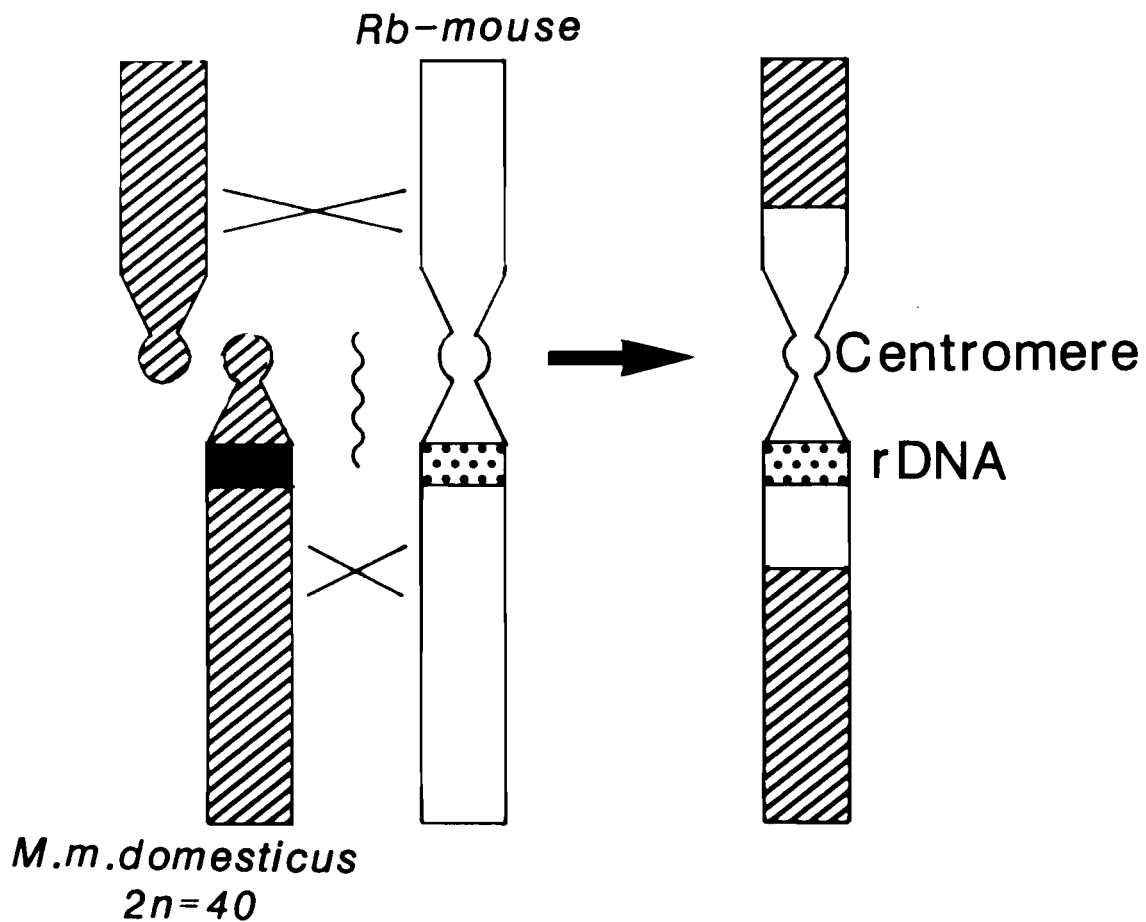


図 IV - 2 R b マウスにおける動原体近傍の遺伝子の保存性

R b マウスが *M.m.domesticus* からの断続的な遺伝子の流入を受けると、染色体の多くの領域が *domesticus* 型に置換される。しかし、R b 転座を起こした動原体とリボソーム RNA 遺伝子の間の波線で示した狭い領域で遺伝的組換えを起さない限りこの二つの領域は分離しない。また R b 転座を持つ染色体とアクロセントリック染色体との間の遺伝的組換えが動原体近傍の遺伝子間では抑制されていることもあり、この領域は *M.m.domesticus* からの遺伝子の流入にもかかわらず *domesticus* 型に置換されずに、R b 転座を起こした当時の遺伝的特性を保存している可能性が高い。

2 材料と方法

a) 野生マウス

本研究で使用した野生マウスは、各亜種毎に採集地と共に表IV-1に示してある。

b) サザンブロット法

① 高分子DNAの抽出

マウス肝臓を5%クエン酸液中でホモジナイズしたものを2000rpm/min5分間遠心分離し、沈降物を3mlの5%クエン酸液に懸濁した。この懸濁液を30%蔗糖5%クエン酸液の上に重層し2500rpm/min8分間の遠心分離により核画分を得た。これをRSB液(10mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH7.4, 25mM EDTA)で2回洗い、最後に4mlのPK-SDS-RSB液(RSB, 100 μ g/ml protenase K(Boehringer manheim社), 0.1% SDS)に懸濁し37 $^{\circ}$ Cで一晩保温した。翌日、RNase A(100 μ g/ml Boehringer Mannheim社)を加え、さらに一時間37 $^{\circ}$ C保温した。その後、フェノール抽出を2回、フェノール/クロロフォルム抽出を2回、クロロフォルム抽出を2回行った後、2.5倍量のエタノールを加え、DNAを沈澱させ、70%エタノールで1回洗った。沈澱物を乾燥させた後、適当量のTE溶液(10mM Tris-HCl pH8.0, 0.1mM EDTA)に溶解し、4 $^{\circ}$ Cにて保存した。

② 高分子DNAの制限酵素による切断

抽出した肝DNAは、十分量(3 units/ μ g DNA)の制限酵素(宝酒造 京都、New England Biolab CA)により、最低5時間以上37 $^{\circ}$ C保温して切断した。

③ アガロースゲル電気泳動とサザントランスファー

制限酵素により切断したDNA(2 μ g)は、0.7%アガロースゲル(BRL MD)で、3V/cm、18時間、TAE緩衝液中(40mM Tris-acetate pH8.0, 2mM EDTA)で泳動した。泳動後ゲルをエチジウムブロマイドにて染色し、写真撮影した。このゲルを0.5M NaOH、1.5M NaCl中で30分間アルカリ

Rb-mouse	ZADAR CREM MILI CB TRA WMP CD MILI 24CI 22MO TA	Yugoslavia Northern Italy Northern Italy Central Italy Southern Germany Tunisia Central Italy Northern Italy Central Italy Tunisia Northern Italy
<u>M. m. domesticus</u>	CAL GLA BNC DGD DOT DBV BLG SK LBL GRC BIB BIK	Northern Italy (Hybrid zone) Northern Germany Egypte Tahiti Bulgaria Bulgaria England Canada Greece Israel Israel
<u>M. m. brevisrostris</u>	BEP MPL BFM1 BFM2	Spain France France France
<u>M. m. bactrianus</u>	LAH KAB IRN	Pakistan Afghanistan Iran
<u>M. m. urbanus</u>	BDW	Sri Lanka
<u>M. m. musculus</u>	OLA ARH BLG3 NJL	Sweden Denmark Bulgaria Denmark

表 IV - 1 使用した野生マウスの亜種、系統名と採集地

処理した後、0.5 M Tris-HCl (pH 7.5)、3 M NaCl 中で40分間中和した。続いて、ゲル中のDNA断片をナイロンメンブレン (Amersham Japan) に10時間キャピラリー法でトランスファーした。このDNAを含むフィルターを3分間UV照射し、DNAのフィルターへの結合を行った。

④ プローブDNAの³²Pによるラベリング

この実験で使ったプローブは III章の in situ hybridization で使ったのと同じ木南らによってクローン化されたマウス 28S リボソームRNA 遺伝子 3' 領域を含む 0.7 Kb を pBR322 に組み込んだものである (図 III-3) (19,20)。全体のDNAを α -³²P-dCTP (比放射活性 ~ 3000 Ci/mmol, Amersham Japan) でランダムプライマー (Boehringer Mannheim) 法を使ってラベルし、 $1 \sim 2 \times 10^9$ cpm/ μ g を得た。

⑤ ハイブリダイゼーションとオートラジオグラフィ

プレハイブリダイゼーションとして、DNAをトランスファーしたメンブレンを熱処理で変性したサケ精子DNA (0.1mg/ml) を含む 10 ml のハイブリダイゼーション液 (Denhardt's solution, 0.5% SDS, 6X SSC, 10% Dextran Sulfate) 中で、67°C 4時間保温した。ハイブリダイゼーションは上記のサケ精子DNAを含むハイブリダイゼーション液に³²PでラベルしたプローブDNA (25ng) を加えた液の中で、67°C 16時間行った。フィルターは、プレウォッシング (2X SSC, 0.5% SDS) 液にて、室温で20分振とうした後、ウォッシング液 (0.1X SSC, 0.25% SDS) で68°C 1時間洗った。さらにもう一度ウォッシング液で68°C 1時間洗い、風乾した。オートラジオグラフィはFuji-RXフィルムと増強板 (極光) を使い、-80°Cにて、20時間、露光させた。

⑥ DNA分子量の決定

分子重量マーカーとして、2.3 Kb と 6.5 Kb の BALB/c の BamHI 切断片と λ -DNA の HindIII 切断片を使った。

c) リボソームRNA遺伝子のクローニング

①野生マウス

今回クローニングに使ったマウスは、サザンブロット法で解析したマウスのうち、SK (M.m.domesticus)、BRV-MPL (M.m.brevirostris)、BAC-KAB (M.m.bactrianus)、WMP (Rb mouse)、TA (Rb mouse) の5系統の野生マウスである。

②マウス高分子DNAの制限酵素による切断とDNAサイズ分画

マウス高分子DNA (50 μ g) を制限酵素EcoRI (5 units/ μ g DNA、宝酒造 京都) で12時間切断した。その後、10~30%蔗糖の不連続勾配上で20時間26000 rpm/minでDNAを遠心分離した。フラクションコレクターにより、200 μ lずつ分別し、各々の分画から少量のDNA溶液を使って、サザンブロット法で必要なDNAを含む分画を得た。これからエタノールでDNAを回収し、ゲノムDNAライブラリーを作成した。

③マウスゲノムDNAとファージDNAとのライゲーションと

in vitro packaging

λgt10 EcoRI arm (Stratagene社) と前節で調整したDNAをモル比で2:1になるように混合し、ライゲーション溶液 (50mM Tris-HCl pH8.0, 7mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, 1mM ATP) 中で十分量 (350 units/1 reaction) のT4 DNA ligase (宝酒造 京都) とともに4℃一晩反応させた。翌日、反応させた溶液を、Giga-pack Gold (Stratagene CA) を使って、in vitro packagingを行った。これにより、 5×10^6 pfu/ μ g以上のプラークを得た。

④スクリーニング

パッケージングしたファージをサザンブロットで使った28SリボソームRNA遺伝子に特異的なプローブで、10万~40万プラーク、スクリーニングし、各々のライブラリーから12~72個の陽性のシグナルを得た。この陽性シグナルからファージを回収し、大腸菌C-600に吸着させ、プラークが重ならない濃

度 (30-100 plaques/1 plate) で N Z Y 寒天プレートに蒔き、もう一度スクリーニングし、単一プラークから陽性シグナルを拾った。

⑤ 得られたクローンの同定

得られたクローンは、大腸菌 C-600 に吸着後、一枚の N Z Y 寒天プレート (85 mm の円形シャーレ) に 1 万プラークの割合で蒔き、37℃ で一晚培養し、溶菌させた。翌日、5 ml の S M 緩衝液 (5.8g NaCl, 2g MgSO₄, 50ml 1M Tris-HCl pH7.5, 5ml 2% Gelatin /11) をプレート上に加え、室温で3時間軽く振とうした。このファージ懸濁液から以下の手順で DNA を抽出した。

1.4 ml のファージ懸濁液をチューブにとり、15000 rpm/min で 10 分遠心分離し、丁寧に上清を 1 ml を別のチューブに移した。これに DNase I (Sigma) と RNase A (Boehringer Mannheim) を最終濃度 1 μg/ml になるように加え、37℃ で 15 分間保温した。これに 250 μl の 2.5 M NaCl-20% PEG 6000 を加え攪はん後、氷上で 15 分静置した。15000 rpm/min で 10 分遠心分離し、上清を除きもう一度 15000 rpm/min で 30 秒遠心分離し、ピペットで丁寧に上清を完全に除いた。この沈降物を 200 μl の S M 緩衝液に完全に溶解し、最終濃度 0.5% になるように SDS を、20 mM になるように EDTA を、50 μg/ml になるように Proteinase K (Boehringer Mannheim) を加え、56℃ で 15 分保温した。これから GeneClean (Bio101 CA) を使ってガラスビーズ法で DNA を抽出した。なお、ガラスビーズへの吸着は 3 分、DNA の抽出は 50 μl の TE 緩衝液中で 50℃、一時間行った。以上のようにして得た DNA 溶液から 10 μl とり、20 ユニットの EcoRI (宝酒造 京都) で 37℃ 12 時間切断し、アガロース電気泳動でクローニングした DNA の断片の長さを調べ、必要なクローンを得た。

⑥ プラスミドへのサブクローニング

サブクローニングに使ったプラスミドは、Stratagene 社の pBluescript SK(-) である。これを EcoRI で切断し、その後にアルカリフォスファターゼ処理をして EcoRI Arm とした。このプラスミドと EcoRI で切断したファージ DNA のライゲーションの後、大腸菌 XL1-Blue に形質転換し、LB 寒天

培地 (100 μ g/ml Ampicillin, 80 μ g/ml X-gal, 2mM IPTG) で 37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。白いコロニーを選択し、テトラサイクリン (10 μ g/ml) とアンピシリン (100 μ g/ml) を加えて一晩振とう培養し、ミニプレパレーション法で DNA を抽出して必要なクローンを選択した。XL1-Blue は F' を保持している菌の選択にテトラサイクリンを用いることによってその後のヘルパーファージ R408 の感染を受けることができる。

d) DNA 塩基配列の決定

① 一本鎖 DNA の調製

大腸菌 XL1-Blue に保持されている、プラスミドヘサブクロニングしたクローンをテトラサイクリン (10 μ g/ml) とアンピシリン (100 μ g/ml) を含む LB 培地で一晩培養し、それを 3 ml の 2X YT (Bacto tryptone 16g, Yeast extract 10g, NaCl 5g / 1l pH 7.5) 培地に 100 μ l 加え 37 $^{\circ}$ C で振とう培養した。OD₆₀₀ = 0.1 になったところで、大腸菌 XL1-Blue のヘルパーファージ R408 を m.o.i. = 0.1 になるように加え、さらに 18 時間 37 $^{\circ}$ C で振とう培養した。この培養液を 2 本のチューブにとり 15000 rpm/min で 10 分遠心分離した。それぞれ上清を 1 ml ずつとり、それに 250 μ l の 2.5 M NaCl - 20% PEG 6000 を加え、室温で 15 分放置した。これを 15000 rpm/min で 10 分間遠心分離し、上清を除き、さらに 15000 rpm/min で 30 秒遠心分離し完全に上清をピペットで除いた。この沈澱物を 50 μ l の TE 緩衝液に完全に溶解し、2 本のチューブをまとめて合計 100 μ l のファージ液を得た。50 μ l の TE 飽和フェノールを加え 30 秒間ボルテックスで攪はんし、室温に 5 分放置した。さらに 50 μ l のクロロフォルムを加え攪はんした後 15000 rpm/min で室温 10 分間遠心分離した。上清を 2 回クロロフォルム抽出し、最後に 1/10 量の 3 M 酢酸アンモニウムと 2.5 倍量のエタノールを加え DNA を沈澱させた。DNA を 70% エタノールで洗った後に乾燥し、10 μ l の滅菌蒸留水に溶解した。

② プライマーの作成

図 IV-3 に示したように、すでに報告されている実験用マウス系統 BALB/c

3 結果

a) R b マウスと通常の核型を持つ野生マウスにおけるリボソーム R N A 遺伝子の E c o R I と B a m H I 切断による切断片長の多型 (図 IV - 4)

まず最初に、R b 転座を多く保有するヨーロッパ産野生マウスとそれを取り巻く地域に生息するいくつかの野生マウス亜種を使って、in situ hybridization の時と同じ、28SリボソームR N A 遺伝子3'末端領域をプローブ (図 III - 3) にしてサザンブロッティングを行った (図 IV - 5) 。使った制限酵素はSuzukiらの報告⁽²⁰⁾と対応できるようにE c o R I と B a m H I である。なおB a m H I で切断したときの6.4 K b と 6.5 K b と、E c o R I で切断したときの6.5 K b と 6.6 K b は、区別が困難だったのでまとめて図に示した。また、図 IV - 5 の中に # で示したデータは、Suzuki et al⁽²⁰⁾ から抜粋し今回再確認したものである。

まず、全体の傾向としては、Suzukiらの報告⁽²⁰⁾を確認する結果を得た。つまり、このプローブを使って野生マウスを調べると、各亜種によって特異的な切断片長の多型がみられる。特に、E c o R I で切断したときの多型性は、よい亜種分類のマーカーとなる。おもにM.m.domesticusは6.5 K b ないしは6.6 K b 断片

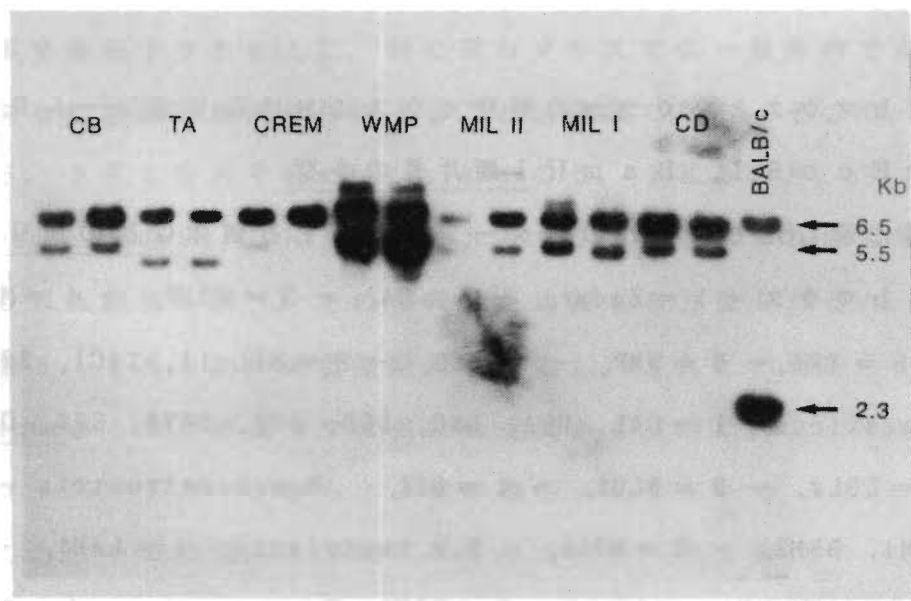


図 IV - 4 E c o R I 切断による R b マウスのサザンブロットパターン
B A L B / c は B a m H I 切断したサイズマーカーである。

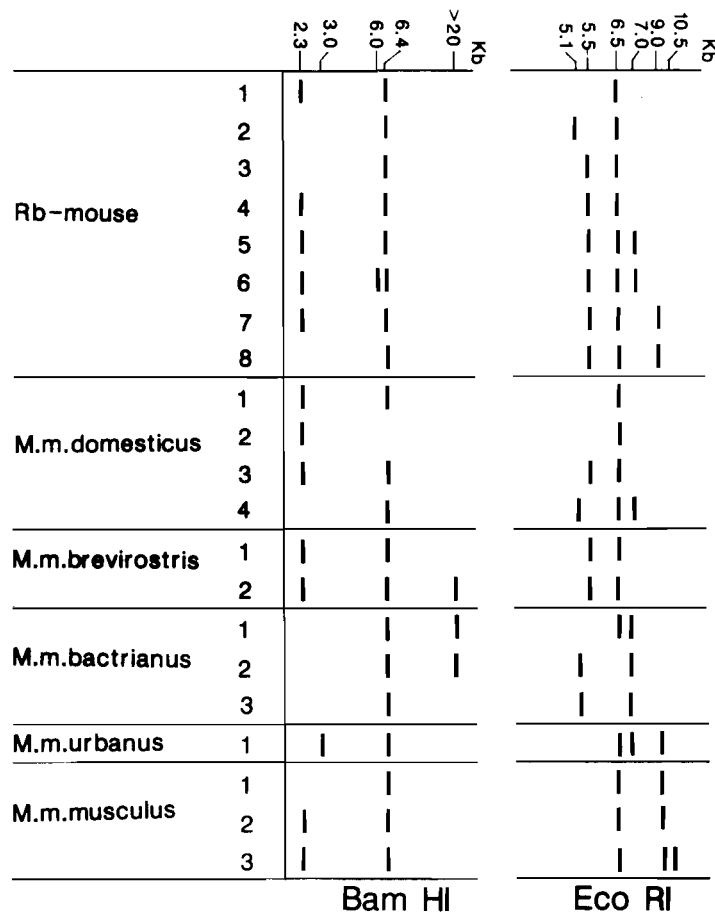


図 IV - 5 R b マウスといくつかの野生マウスにおけるリボソーム RNA 遺伝子の Eco RI, Bam HI 断片長の多型

図に示したそれぞれのパターンに対応する個体は次の通りである。

R b マウス - 1 = Zadar, - 2 = TA, - 3 = CREM, - 4 = MIL I, CB, - 5 = TRA, - 6 = WMP, - 7 = CD, - 8 = MIL II, 24CI, 22MO, M.m. domesticus - 1 = CAL, GLA, BNC, DGD, DOT, DBV#, SK#, GRC, BIB, - 2 = LBL#, - 3 = BLG#, - 4 = BIK, M.m.brevirostris - 1 = BEP, BFM1, BFM2, - 2 = MPL#, M.m.bactrianus - 1 = LAH#, - 2 = KAB#, - 3 = IRN, M.m.urbanus - 1 = BDW#, M.m.musculus - 1 = OLA, BLG3#, - 2 = ARH, - 3 = NJL#. #で示した結果は、Suzukiら⁽²⁰⁾より抜粋し今回再確認したものである。

のみを持つが、2つの例外が観察された。一つは、BLGの5.5 Kbであり、他方はBIKの5.1 Kbである。M.m.brevirostrisは5.5 Kbと6.5 Kbないしは6.6 Kbの二つの断片を持つ。M.m.bactrianusは5.1 Kbと7.0 Kbの断片を持ち、M.m.musculusは9.0 Kbを持つ。これをRbマウスと比較してみると、全てのマウスが6.5 Kbないしは6.6 Kbの断片を持つほかに、BamHI切断によりM.m.domesticusに特異的な2.3 KbがみられるのでM.m.domesticusの遺伝子がRbマウスにも含まれていることが確認された。さらに、多くのRbマウスがM.m.brevirostrisと共通な5.5 Kbの断片を持ち、TAの5.1 Kb断片、TRAとWMPの7.0 Kbは、M.m.bactrianusと共通である。そして、CD、MILII、24CIと22MOはM.m.musculusと共通な9.0 Kbの断片を持つことがわかった。このようにRbマウスは、リボソームRNA遺伝子のRFLPに関していえば非常に多型性に富むといえよう。また、ここにみられる多型性が、M.m.domesticus以外の亜種とも一致するという点は興味深い。

b) Rbマウスといくつかの亜種に共通にみられるDNA断片のクローニング
前節のRFLP解析の結果からみると、Rbマウスは、M.m.domesticus以外の亜種のリボソームRNA遺伝子も保有しているように見える。これを確認する方法の一つの方法は、詳細な制限酵素地図を作成することである。しかし、リボソームRNA遺伝子は多重遺伝子である上に、特にRbマウスでは一個体内での多型性が高いため、詳細な制限酵素地図を作成することは困難である。そこで、M.m.brevirostrisの5.5 Kb断片やM.m.bactrianusの5.1 Kb断片、7.0 Kb断片そしてM.m.musculusの9.0 Kb断片とRbマウスのそれぞれの対応する大きさの断片とのDNA配列を調べ、その相同性を比較する方法をとった。また、M.m.domesticusの6.6 Kb断片の塩基配列も決定し、これとの相同性も比較した。M.m.domesticusからは、野生マウス由来の近交系SKのDNA配列を決定した。10万個のファージプラークから12個の陽性シグナルを得、このうち3つをクローニングした。その結果、1つは7 Kbのインサートを持っていたが、残りの二つのクローンは、6.6 Kbのインサートを持っていた。DNAシーケンシングは、この6.6 Kb断片を使った。SKのゲノムDNAをEcoRIで切断しサザンプロテイングを行うと、時々、6.6 Kb断片のほかにごく薄くマイナ

一な 7 K b の断片がみられる (図 IV - 6) 。 これは、今まで、不完全な切断によるものと思われてきたが、今回この 7 . 0 K b のクローンがとれたことにより、なぜ、ときどきこの断片が現れるかを決定することができよう。しかしこの 7 K b のインサートを持つファージクローンで興味ある点は、E c o R I で切断したときに、主要な 7 K b の断片のほかにマイナーなそれより短い 3 本のバンドが検出されることである。そのうちの一本は、明らかに 6 . 6 K b と対応するが、ほかの二本は対応しない。この単一ブランク由来のクローンが制限酵素に対して、いく通りかの切断パターンを示すことは興味深い。

次にクローニングしたのは R b マウスの W M P の持つ 5 . 5 K b 断片である。20 万個のファージブランクから 1 8 個の陽性シグナルを得、このうち、9 個をクローニングした。その結果、2 つのクローンが 5 . 5 K b 断片を持っており、残りのクローンは、ゲノム D N A を切断したときには現れない長さの断片だった。今回 D N A の塩基配列を決定したのは、2 つの 5 . 5 K b のインサートを持つファージのうちの一つである。T A の 5 . 1 K b 断片は、1 0 万個のファージブランクから 1 5 個の陽性シグナルを得た。このうち、6 個をクローニングし、そのうち 1 つのクローンが 5 . 1 K b の断片を持っていた。ほかのクローンは W M P

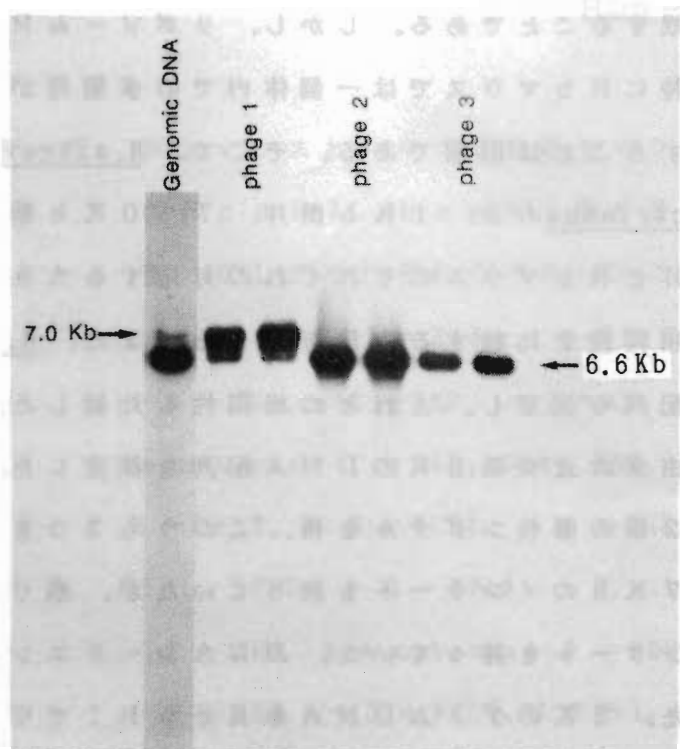
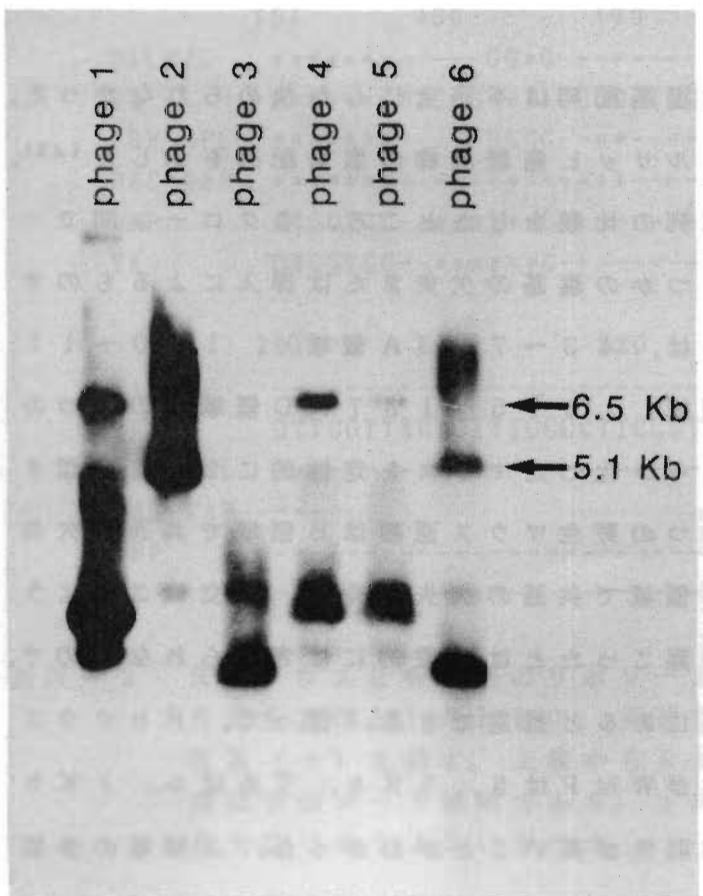


図 IV - 6

S K のリボソーム R N A 遺伝子のクローンを E c o R I 切断した時のサザンプロットパターン。左端は、S K のゲノム D N A を E c o R I 切断したものである

の時と同様にゲノムDNAを切断したときには現れないバンドである。さらにこれらファージをEcoRIで切断して、アガロース電気泳動しサザンブロティングすると、SKの時と同じように一つのクローンであるにもかかわらず、複数のバンドが検出される(図IV-7)。DNAシーケンシングに使ったのは、図に示した5.1Kb断片を主要にもつTA-2というクローンである。M.m.brevirostrisの5.5KbのクローニングはBRV-MPLから2回行った。一回は、10万個のファージプラークをスクリーニングして20個の陽性シグナルを得、全てをクローニングしたが、その全てが6.6Kbの断片しか得られなかった。そこで、もう一度ゲノムDNAのサイズ分画を行いサザンプロットで確認する限り5.5Kbのみを得られるフラクションからライブラリーを作成しクローニングを行った。30万個のファージプラークをスクリーニングし、62個の陽性プラークを得、このうち40個のクローニングを行った。しかし、今度はゲノムDNAを切断したときにサザンプロット法で検出される長さのインサートを持つファージクローンが一つも得られなかった。そこで、5.5Kbに最も近い5.8Kb断片を持つクローンのDNAシーケンシングを行った。M.m.bacterianusの5.1Kb断片のクローニングも同様に困難だった。BAC-KABの



図IV-7

TAのリボソームRNA遺伝子のクローンをEcoRIで切断したときのサザンプロットパターン。異なるクローンなのに、共通のバンドが見える。

DNAライブラリーから10万個のファージブランクをスクリーニングし、16個の陽性シグナルを得た。このうち、9個をクローニングしたが、その全てがゲノムDNAを切断したときには現れない1.5Kb断片がファージにクローン化されていた。ここでも、クローニングに使ったDNA分画が、サザンプロット法で確認する限り5.1Kbのみを含むので、この内の一つをDNAシーケンシングに使用した。

そのほか、RbマウスのWMPの7.0Kb、CDの9.0Kb、M.m.musculusのOLAから9.0Kbなどのクローニングも試みたが、いずれもうまくいかなかった。

c) Rbマウスといくつかの亜種に共通にみられるDNA断片の

DNA塩基配列の決定

上記のように得られたクローンのうちのいくつかは、本来ゲノムDNAを制限酵素で切断してサザンプロット法で得られるものとは異なる長さのDNA断片を持っており、目的のクローンかどうかの検定が必要であろう。それは今後解決すべき問題であるが、今回はこれらを使ってDNA塩基配列の決定を行った。結果は、表IV-2に示してある。

M.m.bactrianusとM.m.brevirostrisの塩基配列は不完全にしか決められなかった。また、比較として、マウス由来のエールリツヒ癌細胞株の塩基配列を示した⁽⁴³⁾。野生マウスとRbマウスの間で塩基配列の比較をしたところ、各クローン間で一番大きな多型性を生むのは、主にいくつかの塩基の欠失または挿入によるものであることがわかった。特に大きなものは、43~78(A領域)、110~118(B領域)、146~157(C領域)、175~187(D領域)の4つの領域の多型性で、これにより今回クローン化したマウスを定性的に2つに分類することができる。通常の核型を持つ3つの野生マウス亜種はB領域で共通の欠失を持つ。Rbマウスの2系統はCとD領域で共通の欠失を持つ。独立にこのような欠失または複数の同じ塩基の挿入が起こったとは一般的には考えられないので、これらは、それぞれ進化的に近縁関係にあると推定できる。従って、RbマウスのRFLP解析では、EcoRI断片がWMPは5.5Kb、TAは5.1Kbと異なっていたが、塩基配列では、相同性が高いことがわかった。A領域の多型

	1	10	20	30	40	50
BALB/C	-----T-----					GGGCGGT-
SK	GGGTTTGTCTCTGCGGGCTTTCCCGTCGCACGCCCG*CTCGC*****TC					
BRV-MPL	-----*					*****
BAC-KAB	-----*					*****
WMP	-----*					*****--
TA	-----G-----					T-----*****--
	51	60	70	80	90	100
BALB/C	--ACGCGACCGTGTTCGCCGCCCGGGCGTCACG*****GTGTGGTTC					
SK	GC***ACGCGACCGTGTTCGCC***CCGGGCGTCA*CGGGG**GCGG					
BRV-MPL	*****--+++-----*****CGC-----+-*-----*****--					
BAC-KAB	*****--+++++++-----GC--A----*CGT--C					
WMP	--TCGC-----TCGC-----*A-----GGT--C					
TA	--TCGC*****-----*A-----GGT--C					
	101	110	120	130	140	150
BALB/C	GC**C-----*					AAGAAC*-----*****
SK	TCGC*TCGGCCCCCGCGGGTCGCCCGAACGACCG*TGTGGTGG*****					
BRV-MPL	-+C++-----*-G-C-----**-----*****					*****
BAC-KAB	*-GGC-*-----+++++-----CG-----*****					*****
WMP	---GGC-C-*****-----*CG-----TGCTG					---
TA	---GGC-C-*****-----*CG-----TGCTG					---
	151	160	170	180	190	200
BALB/C	*****-----GG*G-----*-----*****					
SK	*****TTGGG+++GGGGATCGTCCTTCTCCTCCGTCTCCCGAGGACG					
BRV-MPL	*****-----GGGG-----*-----*****					
BAC-KAB	*****-----+++++++-----*					-----CC---
WMP	GTGGTGG-----*G-----*****-----*****					
TA	GTGGTGG-----*G-----*****-----*****					
	201	210	220	230	240	
BALB/C	-----					
SK	GTTTCGTTTCTCTTTCCCTTCCGTTCGCTCTCCTTGGGTGTGGGAGC					
BRV-MPL	-----					
BAC-KAB	---					
WMP	-----					
TA	-----G-----					

表IV-2 Rbマウスと各亜種のリボソームRNA遺伝子下流の塩基配列の比較
SKを基準としたときの、共通な塩基(-)、欠失(*)、未決定の塩基(+)
を示す。上流から9bpまでが、28SリボソームRNA遺伝子のコード領域である。また、各々の塩基配列は比較する配列が最大限に合うように並べた。

性は、TCGCの4つの塩基が関連しているように思われる。39から始まるTCGCは、BRV-MPLとBAC-KABではこの一回だけだが、SKではもう一回、Rbマウスでは2回TCGCが繰り返す。更にWMPでは75からもう一度TCGCが現れる。TAは、WMPと比べて57から79までの欠失しているが、この領域の両末端はTCGCであり、この欠失にTCGCの重複が直接関係していることが示唆される。同様のことは、CとD領域にも見られる。C領域はTG(G/C)の繰り返しの回数、D領域はT(T/C)Cの繰り返しの回数によって、大きな長さの多型を生んでいる。また、塩基置換を見てみると、80~110の領域が特に多いように思われる。そこで、各野生マウス亜種とRbマウスの関連を塩基配列の相同性で比較した。一般的に塩基相同性を定量的に調べる場合には、欠失/挿入は評価できないので、塩基置換に限って計算した。結果は、表IV-3に示した通りである。M.m.brevirostrisとM.m.bactrianusのDNA塩基配列が不完全なため、これだけで断定することは難しいが、3つのマウス亜種間で比較すると、M.m.domesticusとM.m.brevirostrisの間の相同性が高く、M.m.bactrianusとこの二つの亜種を比較すると相同性が低かった。これは、従来か

%	SK	BRV-MPL	BAC-KAB	WMP	TA
SK		170/173	86/95	185/190	197/204
BRV-MPL	98		81/86	156/160	147/151
BAC-KAB	91	94		75/80	74/79
WMP	97	98	94		180/181
TA	97	97	94	99	

表IV-3 挿入/欠失を除いたときの塩基の置換による相同性

上段は、比較した塩基の数とその中でマッチする塩基数を示す。下段は、それを%で表した。

ら考えられているようなマウス亜種分化の道筋と一致する⁽⁴⁹⁾。また、R b マウス間では塩基相同性でもほとんど差がなく、欠失／挿入からみた定性的な推測と一致した。このR b マウスと最も相同性が高い野生マウス亜種はM.m.brevirostris であり、この塩基配列の相同性の解析から、少なくとも、R b マウスの E c o R I で切断したときの 5. 1 K b と 5. 5 K b 断片は、M.m.brevirostris の 5. 5 K b 断片と最も相同性が高いことがわかった。

4 考察

a) リボソームRNA遺伝子を指標としたRbマウスの分類

この研究では、ヨーロッパ産野生マウスで高頻度にRb転座を起こした当時の遺伝的特性を今も保存していることが期待される、リボソームRNA遺伝子領域の多型性を調べた。まず、RFLP解析を行ったが、その結果は、Rbマウスは、M.m.domesticusに特異的な多型を持つほか、これに隣接して生息するM.m.brevirostris、M.m.bactrianusそしてM.m.musculusに特異的な多型も持っていた(図IV-8)。このことから、Rb転座を起こした当時は、これらいくつかの亜種が複雑に入り交じった、亜種間雑種であった可能性が示唆された。今回、この内、RbマウスとM.m.brevirostrisが共通に持つEcoRIで切断したときの5.5Kb断片、M.m.bactrianusと共通に持つ5.1Kb断片の塩基配列を調べた。一般的に、二つの塩基配列の相同性を調べるときには、挿入/欠失の集団遺伝学的な評価が困難であることから、塩基置換に基づいた遺伝的距離の推定が行われる。それに従えば、Rbマウスの5.5Kbもbactrianusタイプと思われた5.1Kb断片も、両方brevirostrisタイプであることがわかった。しかし、M.m.brevirostrisとの間には、大きな、挿入/欠失による多型性が観察され、典型的なbrevirostrisタイプとは若干異なっていた。この結果はRbマウスのミトコンドリアDNAの多型性の調査⁽⁴³⁾と完全に一致する。RbマウスのミトコンドリアDNAの多型性はM.m.brevirostrisに最もよく似ているが、やはり典型的なbrevirostrisタイプと同一ではない。これらの結果から、調べた限りのRbマウスのリボソームRNA遺伝子領域は、少なくともM.m.domesticusやM.m.brevirostrisと同一ではないが似ている遺伝子領域を持っているといえよう。しかし、今後の問題としていくつかの点をあげることができる。まず、今回DNA配列を決めた、M.m.brevirostrisとM.m.bactrianusのクローンが本当にそれぞれ5.5Kbと5.1Kb断片に対応するかは、解決すべき大きな問題である。DNAサイズ分画したDNAをサザンブロットィング法で確認した限りでは、それぞれの断片に対応するクローンが取れてよいはずであるが、最終的にクローン化したDNAの大きさが、期待された長さとは異なっているのもう一度クローン化して確認する必要がある。また、Rbマウスと塩基配列はもとより挿入/欠失のパタ

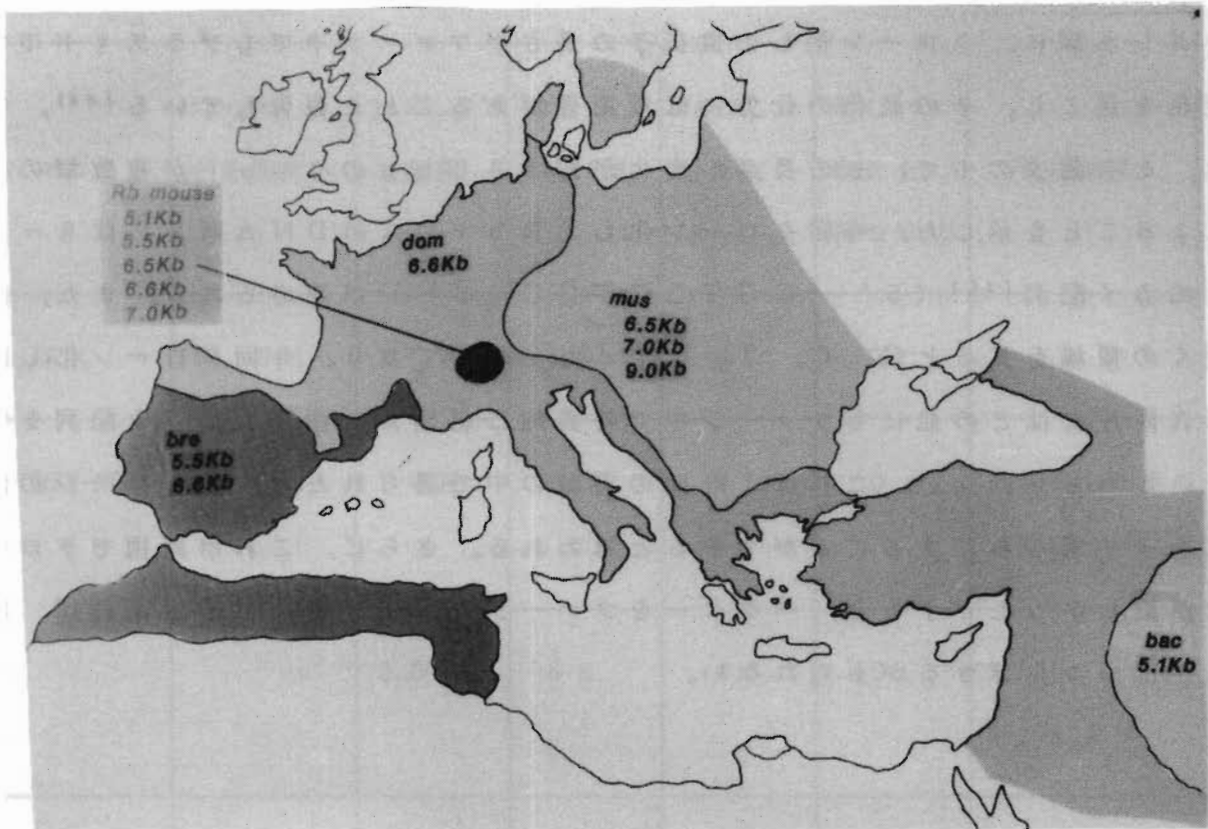


図 IV - 8 R b マウスと各亜種のサザンプロットパターンのまとめ

ーンの一致する野生マウスを見つけることが、直接このリボソームRNA遺伝子の起源、つまりR b マウスの起源を知ることになる。最後に、R b マウスと M.m. bactrianus に共通にみられた7.0Kbと、そして M.m.musculus に共通な9.0Kb断片の塩基配列の解析は早急に行うことが必要である。これらは、今後の課題として残っている。

b) クローン化したリボソームRNA遺伝子領域のファージ中での長さの変化
 今回、リボソームRNA遺伝子領域をクローニングするに当たり、クローン化したDNA断片の長さが、ゲノムDNAを制限酵素で切断したときに検出できる長さとは異なる長さに変化するケースが多かった。結果の中で述べたように、別のクローンでありながら共通の長さに変化していることと、6.5または6.6Kbをクローニングするときには顕著でなかったのにそのほかの断片ではほとんど全てのDNAの長さを変化していたことから(表IV-4)、大腸菌中でクローニングする際に長さの変化し易いDNA領域が、このDNA断片には含まれているかも知れない。ArnheimらはマウスリボソームRNA遺伝子の18S上流領域をクロー

ニングした際に、クローン化した遺伝子の長さがファージ中でもプラスミド中でも変化を起し、その変化の仕方には規則性があることを報告している⁽⁴⁴⁾。彼らは、その論文の中で、その長さの変化が約130bpのユニットが複数個の欠失によることを示した。今回クローン化したRbマウスのDNA断片には8-merのカイ配列⁽⁴⁵⁾(5'-GCTGGTGG-3')が認められる。また、この近くの領域を見るとG, C, T-richとなっており、今回クローン化したDNA断片にはこの他にもファージ中で特異的に組換えを頻繁に起こす配列を含んでいるかも知れない。これは、今回の実験の中で得られた個々のクローンの解析によって明らかにすることができると思われる。さらに、これが原因でクローン化が難しかったとすると、ベクターをファージからプラスミドへ変えれば、容易にクローン化できるかも知れない。

マウス	クローン化する断片	スクリーニングした数	陽性シグナル数	クローン化した数	欲しい断片を持つクローン	特記事項
SK	6.6Kb	10万	12	3	2	
BRV-MPL	5.5Kb	10万	20	20	0	クローン化した全てが6.6Kb
		30万	62	40	0	5.5Kbのみ含むフラクションより
BAC-KAB	5.1Kb	10万	16	9	0	5.1Kbのみ含むフラクションより クローン化した全てが1.5Kbに
TA	5.1Kb	10万	15	6	1	
WMP	5.5Kb	20万	18	9	2	

表IV-4 リボソームRNA遺伝子をクローン化する経過

V 総合討論

本研究の主なねらいは、ヨーロッパ産野生マウスの中で見られる多数のR b転座がいかなる機構で起きたかを明らかにすることだった。そこで最初に、従来N O RがR b転座生成を促進するという説が一般的に受け入れられていたので、R bマウスで起こった高頻度のR b転座もこの生成仮説で説明できるかどうかを検定した。その結果、R bマウスのR b転座の染色体の組合せの中でN O Rを持つ染色体が多くみられることはなく、逆にN O Rを持つ染色体ではR b転座の生成が阻害されている傾向すら観察され、従来の仮説ではこの生成機構を説明できないことを明らかにした。そこで、新たな機構を推定する上でR bマウスに関する基礎的なデータを得ることが重要と考え、このマウスの分類学的位置づけを試みた。具体的には高頻度にR b転座を起こした当時の遺伝的特性を保存していることが期待されるリボソームRNA遺伝子領域のDNA多型性を検討した。RFLP解析の結果から、R bマウスは、このマウスの近隣に生息しているM.m.domesticusの特性を持つほかに、地理的に離れた地域に生息しているいくつかの亜種に特異的な多型性を持っていることがわかった。さらに、この遺伝子の塩基配列を調べてみると、少なくともM.m.brevirostrisと相同性の高い配列を持つこともわかった。

ここでは、主としてこれらの実験結果とその問題点、さらに現在までに明らかになっているR bマウスの興味ある点について述べ、そこから考えられる今後の展開を考察する。

1 R b マウスの遺伝的特性と起源

この研究では主にこの点を中心に解析を進めたが、残念ながら最終的な結論を得ることはできなかった。しかし、いくつかの興味深い結果を得ることができた。それは、従来の生化学的標識遺伝子の研究ではR bマウス集団と通常の核型を持つM.m.domesticus集団との間には、R bマウスを特徴づける特性が見つからなかったのに対し、今回リボソームRNA遺伝子領域において、両マウス集団はそれぞれ異なる多型性を持っていることを初めて明らかにした。さらにこの多型は地

理的に離れた地域に生息している別亜種 M.m.brevirostris と最も相同性が高かった。これは、RFLP解析でも、塩基配列の比較でも確かめられた。さらにRFLP解析のデータは M.m.musculus、M.m.bactrianus 等の別亜種の多型性をRbマウスが持っている可能性を示唆している。このことはRbマウスが高頻度にRb転座を起こした当時、いくつかの亜種の中の雑種であったことを示していると考えたい。日本でも小笠原諸島父島で1984年に、1対(9,15)のRb転座を持つ野生マウスが発見された⁽⁴⁸⁾。このマウスの遺伝的特性を調べたところ、日本産野生マウスに特異的なヘモグロビンβ遺伝子の対立遺伝子を持つほか、ミトコンドリアDNAの多型は M.m.domesticus と一致し、このマウスが日本産野生マウスと M.m.domesticus の亜種間雑種であることが明らかになった。ヨーロッパ産のRbマウスが亜種間雑種であったということを証明するには次の二つの方向からの研究が可能であろう。

まず第一はRFLP解析の結果から、EcoRI切断したときRbマウスは M.m.domesticus 以外に M.m.brevirostris、M.m.musculus、M.m.bactrianus と同じRFLPを持っていることがわかったので、これらDNA断片をクローン化しDNA塩基配列の相同性を比較ことである。今回はこのうち M.m.bactrianus と共通の5.1Kbと M.m.brevirostris と共通の5.5Kbをクローン化した M.m.bactrianus と共通の7.0Kbと M.m.musculus と共通の9.0Kbのクローン化とその解析は今後の課題である。

第二は、5.5Kbと5.1Kb断片の塩基配列で明らかになった大きな欠失/挿入が、通常の核型を持つ野生マウスには見られるかどうかを調べることである。もしも、同じ塩基配列部位で欠失/挿入を起こしている野生マウスがどこかで見つければ、それがRbマウスの起源であると言えよう。その挿入/欠失を簡単に検出する方法として最近開発されたPCR (Polymerase Chain Reaction) 法が有効かも知れない。この方法は、ゲノムDNAの特定の領域を増幅する方法で、これによって増幅されたDNAは、直接DNA塩基配列の決定に利用することができ、クローン化することなしに、塩基配列を決定することができる。増幅しようとするDNA領域の両端に対する逆向きプライマーを作成して、それとゲノムDNAと、高熱細菌から得たTaq I polymeraseを使って、ゲノムDNAの2本鎖の解離-プライマーの結合-プライマーからのDNA合成を繰り返すことによ

り、増幅が行われるが、今回見られた欠失／挿入を利用してR bマウス特異的なプライマーを作成することができる。R bマウスには、特異的に146位からTGC TGG TGG TGGという12bpにわたる挿入がある。この塩基配列に相補的なプライマーをつくり、もう一方に塩基配列決定に使ったプライマー（図IV-4）を使ってPCR法を行えば、この挿入を持つリボソームRNA遺伝子領域のみが増幅されるはずである。これにより、クローン化という煩雑な操作なしに、多くの野生マウスでR bマウス特異的な挿入／欠失を持つもののスクリーニングが可能であろう。

本研究ではR bマウスの分類学的位置づけを確定することはできなかったが、少なくとも近隣に生息するM.m.domesticusとは異なる遺伝的特性を持っていることを初めて明らかにした。さらにR bマウスの起源を探るために上記二方向からの研究が必要であろう。

2 高頻度 R b 転座生成機構

現時点で得られたデータをもとにこの機構を考察することは難しい。そこで、この機構を考える上でわれわれが考えなければならない、いくつかのR bマウスに関する事実を列挙し、そこから今後の研究の方向性を考察することが、最も実りあるものであろう。

まず第一にR bマウスの地理的分布に関して興味ある相関が2つ観察される。緒言」の章でも述べたが、このマウスがヨーロッパ、特にM.m.domesticusの生息している地域に発見されていることが一つである。ヨーロッパにはM.m.domesticus、M.m.brevirostris、M.m.musculusという3つのハツカネズミ亜種がいるが、この内R bマウスはM.m.domesticusの生息域の中にみつかると。最近デンマークでもR b転座を多く持つマウスが発見された⁽⁴⁷⁾。ここは、M.m.domesticusとM.m.musculusの亜種境界線に当たるが、R b転座はM.m.domesticusの生息している地域のみ発見された。このことは、R b転座を起こすにはヨーロッパ産野生マウス亜種、M.m.domesticusが、関与していなければならないことを示しているのではないだろうか。

この地理的分布にからもう一つ興味あることがわかる。それは、ヨーロッパの

R b マウスの分布をよくみると、北部イタリア／スイスと中央イタリアを除くと全て、海に面した地域に R b マウスが見つかる。この2つの地域はもともと R b 転座を起こした地域であると想定されており、Winking は船によるヒトの移動に付随してこの地域のマウスの R b 転座を起こしやすい遺伝的な性質が伝播したのだらうと推定している⁽⁴⁷⁾。ここで注目すべき点は、R b 転座は、ある時にある地方で特に放射能が強かったとか、変異原があったというような外因によって起こったのではなく、この地域のマウス自体が、遺伝的に R b 転座を起こし易い性質を持っているということである。このことは、実験用マウスで起こった R b 転座のうち、いくつかは、ヨーロッパ産野生マウス由来の R b 転座を導入された系統で起こっていることから推定できる。

今回の研究で調べた地理的に離れた地域からの2つの R b マウスの塩基配列は興味ある事実を示している。T A というマウスは、スイスで採集した R b マウスで、W M P は北部アフリカのチュニジアで採集した R b マウスである。この二つの系統の R b 転座に関わる染色体構成を見る(表 V - 1) と、共通な R b 転座は (4, 6) しかない。この2本の染色体のうち、W M P は4番染色体の末端にリボソーム R N A 遺伝子を持つ (H. Winking 未発表) が、T A は持たない⁽⁹⁾。従って、今回クローニングして配列を決めたリボソーム R N A 遺伝子がどの染色体上のも

	R b 転座の染色体構成
T A	(1, 3), (4, 6), (5, 1 5), (8, 1 2), (9, 1 4), (1 1, 1 3), (1 6, 1 7)
W M P	(1, 1 1), (2, 1 6), (3, 1 2), (4, 6), (5, 1 4), (7, 1 8), (8, 9), (1 0, 1 7), (1 3, 1 5)

表 V - 1 W M P と T A の染色体構成

R b 転座にかかわらない染色体と性染色体はこの表から省いた。

のかは不明だが、もし19番染色体上のものではないとすると少なくともこのリボソームRNA遺伝子を持つ染色体は異なるRb転座の中にあることになる。それにもかかわらず、非常に相同性が高いということはこのリボソームRNA遺伝子を持つ染色体は別の場所で、独立に少なくとも2回、Rb転座を起こしたことになる。つまり、特定の染色体上にRb転座を起こし易い性質があるということができる。染色体の末端領域は常にRbマウス集団と通常の核型を持つマウスと遺伝子交流によって変化する。従って、このRb転座を起こし易い遺伝的な性質は、動原体またはその近傍にあると考えられるのではないだろうか。ごく最近、一つの興味ある論文が発表された⁽⁴⁹⁾。それによると、ヒトのRb転座を起こした動原体部には、fragile siteという不安定な構造を持っている。これは、先ほどマウスのRb転座でも、それを起こし易くする性質が動原体にあると述べたがその推測と一致する。また、マウス染色体の動原体は非相同染色体間で組換えがある頻度で起こっていると信じられているが、もしも動原体中にfragile siteがあるとすると、このfragile siteは異なる染色体にも伝播することができ、高頻度のRb転座を起こすことに役立っているかもしれない。さらにfragile siteは、減数分裂において染色体切断を生じ易い部位であるらしい^(55,56)。すると、2本の染色体の動原体部のfragile siteで減数分裂中に染色体切断が起こり、その後2本の染色体間で動原体接着が起これば理論的にはRb転座が生成することになる。今後、Rbマウス、またはRbマウスの起源となった野生マウスに、このfragile siteがあるかどうかを調べることも一つの重要な研究方向であろう。また別の研究方向として、Rb転座とある種の遺伝子変異との関連からの解析に意義があるかも知れない。ペルー産野生マウス由来の系統は、高頻度に遺伝子変異を起こすことが知られている⁽⁵³⁾。この系統を、実験室で維持しているとかなり高率に毛色や、酵素遺伝子の構造遺伝子の突然変異を得ることができる。その機構は今だに不明であるが、この系統から、1対のRb転座を持つマウスが得られている(Rb(9,12)1Cam、表II-1参照)。また、小笠原諸島で採集した野生マウスの1対のRb転座(Rb(9,15)1Ms)を近交系マウス系統BALB/cに導入している最中に、無毛の突然変異を得た(未発表)。これらの変異は、ごく稀にしか起こらないはずなのにRb転座と共に観察されているということは、もしかしたら、Rb転座という染色体変異とある種の遺伝子変異には、その機構の一部

で関連があるのかも知れない。これら遺伝子変異の解析からR b転座生成機構に対して一つのアプローチができるかも知れない。

ここで述べたようにR bマウスが多数のR b転座を起こした当時、亜種間雑種であつたらしいこと、そしてR bマウスはその染色体の動原体部位にfragile siteを持っているかも知れないこと、遺伝子変異とR b転座の関連という3つの結果が得られたときに、ヨーロッパ産野生マウスの一部で見つかっている多数のR b転座の生成機構に関して解答が得られるのではないだろうか。

VI 雑 言

通常、近交系マウスとその野生種であるハツカネズミ (Mus musculus) の核型は $2n = 40$ ですべてアクロセントリック染色体である。しかし、ヨーロッパの一部の地域には、たくさんのロバートソン型 (R b) 染色体変異を保有している野生マウス集団が点在して生息していることが知られている。本来、このような染色体変異が起こる確率は非常に低く、稀にしか起こらないはずである。にもかかわらず、なぜ特定の野生マウスの中で高頻度に R b 転座を起こし、そしてそれが蓄積したかは興味ある問題である。本研究の主なねらいはヨーロッパ産野生マウス中にみられるこのように多数の R b 転座が如何なる機構によるものかを明らかにしようとするものであった。この目的のために、従来考えられている R b 転座生成に関する仮説が、R b マウスにも当てはまるのかどうかの検討を行い、続いて、R b マウスの遺伝的特性を解析した。

ヒトでみられる R b 転座は、N O R (活性のあるリボソーム R N A 遺伝子) が成熟分裂期に核の中で、空間的接近を起こし、その後の切断と繋替えによって R b 転座が起こるといふ仮説が大野らにより発表された。さらに、Millerらは、マウスの培養細胞株を使った解析から、R b マウスにおいても、N O R が R b 転座生成を促進すると発表した。そこで、N O R が R b マウスの R b 転座生成の誘因となるならば、このマウスでみられる R b 転座の染色体の組合せに N O R を持つ染色体がより多く関与しているはずである。そこで、R b マウスの近隣に生息する野生マウス (M. m. domesticus) のリボソーム R N A 遺伝子がどの染色体上に位置するかを調べ、それらの結果を統計的処理することによりに上記の仮説の検討を行った。

II 章

今までの報告に基づいて、ヨーロッパ産野生マウス由来、そして例数は少ないが、アジア産野生マウスと実験用マウス系統由来の R b 転座の全てを収録したデータベースを作成した。それを使って、今まで知られている N O R を持つ染色体である 1 2、1 5、1 6、1 8、1 9 番染色体が本当に R b 転座に多く関与する傾向があるかどうかを調べた。その結果、R b 転座を起こした 2 対の染色体の両方が N O R を持つ例は一つも観察されず、かえってこの組合せでは有意に転座が阻害

されている傾向があることを示した。さらに、R b 転座を起こした染色体のどちらか一方がN O Rをもつ場合は、期待値に対し有意な差がみられなかった。これらの結果から、少なくともN O Rのみによっては、ヨーロッパ産野生マウスにみられる高頻度のR b 転座生成機構を説明することができないことを示唆した。

III 章

II 章の検定に使ったいくつかの仮定のうち、N O Rの染色体分布は今までに報告されていた、わずかな系統のマウスの結果に基づくものであった。そこで、この検定結果の信頼性を高めるためにヨーロッパ産野生マウスとそれに由来すると考えられている実験用マウス系統におけるリボソームRNA遺伝子の染色体分布を広範囲に調査した。マウスリボソームRNA遺伝子領域に特異的なプローブを使って in situ hybridization を行うと、近交系マウスでは 1 2、1 5、1 6、1 8、1 9 番染色体の動原体近傍に、ヨーロッパ産野生マウスではそれに加えて 4、1 3 番染色体の末端部にリボソームRNA遺伝子があることがわかった。このことから、R b 転座に関与することができて、なおかつ、リボソームRNA遺伝子の活性を持ち得る染色体は、これらマウスの中では1 2、1 5、1 6、1 8、1 9 番染色体に限られることがわかった。この結果は、II 章の検定に使った仮定と一致し、このことからN O Rだけではヨーロッパ産野生マウスにおける高頻度のR b 転座生成機構が説明できないという推定を強く支持した。

IV 章

そこで、このR b 転座生成に関して新たな機構を考える必要があり、そのためにはR b マウスの遺伝的特性を知ることが重要である。生化学的標識遺伝子の調査を基にしたR b マウス遺伝学的分類はすでに広範に行われている。それによると、このマウスは、近隣に生息するM.m.domesticusと遺伝的にはまったく差がない。R b マウスと通常の核型を持つマウスとの間には不完全な生殖的隔離しかないのので、この結果は、R b 転座を起こした後M.m.domesticusとR b マウス集団との遺伝子の流入／流出による均一化として説明されるかも知れない。そこで、動原体近傍にあって、非常に遺伝子の流入／流出の影響を受けにくいと考えられるリボソームRNA遺伝子領域のDNA多型を調べることによりR b マウスの遺伝的特

性を調査することを試みた。

結果として、R b マウスのリボソームRNA遺伝子領域は、ヨーロッパ産亜種のそれとよく似てはいるが、同一ではなく、その意味ではR b マウスに特異的にみられる多型性を持っていることを示された。一方、RFLP解析により、アジア産亜種 M.m.musculus や M.m.bactrianus 等の遺伝子も保有している可能性も示唆された。これらの結果に基づいて、R b マウスは高頻度にR b 転座を起こした当時は、典型的な M.m.domesticus ではなく、いくつかの亜種が複雑に混じり合った遺伝子を保有していた可能性を考えることができる。しかしながら本研究は、その機構もまだ不明である銀染色法による実験結果とリボソームRNA遺伝子領域一次構造の部分的解析結果のみを基にしたものであり、一切の推論は今後の解析を待つて行うべきであると考えている。

謝 辞

この研究を進めるに当たって、深い理解と適切な指導を与えてくださった国立遺伝学研究所細胞遺伝部門教授森脇和郎博士と神戸大学理学部教授金久武晴博士並びに東邦大学理学部教授河野晴一博士に言葉では尽くせぬ感謝を捧げます。そして本論文の校閲の労を取られた神戸大学理学部教授磯野克己博士と伊東敬祐博士に深甚の謝意を表します。国立遺伝学研究所細胞遺伝部門城石俊彦博士には、全ての面で暖かいご支援とご助言をいただきました。深くお礼申し上げます。また、研究協力の労を惜しまれなかった徐東祥博士、鈴木仁博士並びに鈴木恭子さんに感謝致します。野生マウス及び近交系マウス系統を分与して下さったH.Winking博士、F.Bonhomme博士、M.L.Petras博士、J.T.Nielsen博士と加藤秀樹博士そして、マウスリボソームRNA遺伝子のプローブを下さった村松正実博士と木南凌博士に感謝致します。実験と考察を進めるに当たり、有益な助言を頂いたJ.Klein博士、F.Figueroa博士、H.Tichey博士、P.Boursot博士、高畑尚之博士、藤山秋佐夫博士、宝来聡博士、安田成一博士、中島衛博士に感謝致します。また、実験の手伝いをしていただいた、佐野富子さんにお礼申し上げます。また、研究遂行に当たり、暖かいご支援をいただいた国立遺伝学研究所細胞遺伝部門の方々、特に三田旻彦さん、嵯峨井知子さんと後藤英夫君には謝意を表します。

父と母には、この研究を進めている間、暖かい愛情で見守ってくれたこと、そして経済的に支えてくれたことに心からの感謝を捧げます。

最後に、祖母 故栗原喜代子の霊前にこの論文を捧げます。

本論文は博士号申請のため神戸大学自然科学研究科へ提出したものであり、これらの研究内容は3編の論文にして投稿準備中である。

参考文献

- 1) Kurihara, Y., M. Sakaizumi, Y. Hoi-Sen, T. Kanehisa, and K. Moriwaki. 1988. Ly-2.3 antigen derived from subspecies of the Asian mouse (Mus musculus castaneus). Immunogenetics, 28:289-291
- 2) Odaka, T., H. Ikeda, H. Yoshikura, K. Moriwaki, and S. Suzuki. 1981. Fv-4: Gene controlling resistance to NB-tropic Friend murine leukemia virus. Distribution in wild mice, introduction into genetic background of BALB/c mice, and mapping of chromosomes. J.N.C.I., 67:1123-1127
- 3) Silver, L.M. Mouse t haplotype. 1985. Ann.Rev.Genet. 19:179-208
- 4) Shiroishi, T., T. Sagai, and K. Moriwaki. 1982. A new wild-derived H-2 haplotype enhancing K-IA recombination. Nature, 300:370-372
- 5) Gropp, A., U. Tettenborn, and E. Lehmann. 1970. Chromosomenvariation vom Robertson'schen Typus bei der Tabakmaus, M. poschiavinus, und ihren Hybriden mit der Laboratoriumsmaus. Cytogenetics, 9:9-23
- 6) Coming, D.E., and Avelino, E. 1972. DNA loss during Robertsonian fusion in studies of the tobacco mouse. Nature, New Biol. 237:199
- 7) Ohno, S., J.M. Trujillo, W.D. Kaplan, and R. Kinoshita. 1961. Nucleolus-organizers in the causation of chromosomal anomalies in man. Lancet ii, 123-126
- 8) Miller, O.J., D.A. Miller, R. Tantravahi, and V.G. Dev. 1978. Nucleolus organizer activity and the origin of Robertsonian translocations. Cytogenet. Cell Genet., 20:40-50
- 9) H. Winking, K. Nielsen, and A. Gropp. 1980. Variable positions of NORs in Mus musculus. Cytogenet. Cell Genet., 26:158-164
- 10) Davisson, M.T. Nucleolus organizer regions. 1981. in "Genetic variants and strains of the laboratory mouse" (ed. Green, M.C.), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- 11) Yonekawa, H., K. Moriwaki, O. Gotoh, N. Miyashita, S. Migita, F. Bonhomme,

- J.P.Hjorth, M.L.Petras, and Y.Tagashira. 1982. Origins of laboratory mice deduced from restriction patterns of mitochondrial DNA. *Differentiation*, 22:222-226
- 12) Miller, D.A., V.G.Dev, R.Tantravahi, and O.J.Miller. 1976. Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. *Exp. Cell Res.*, 101:235-243
- 13) Warburton, D., and A.S.Henderson. 1979. Sequential silver staining and in situ nucleolus organizing regions in human cells. *Cytogenet. Cell Genet.*, 24:168-175
- 14) Ikeuchi, T. 1984. Inhibitory effect of ethidium bromide on mitotic chromosome condensation and its application to high resolution banding. *Cytogenet. Cell Genet.*, 38:56-61
- 15) Imai, H.T., Y.Matsuda, and K.Moriwaki. 1981. High frequency of X-Y chromosome dissociation in primary spermatocytes of F1 hybrids between Japanese wild mice (*Mus musculus molossinus*) and inbred laboratory mice. *Cytogenet. Cell Genet.* 29:166-175
- 16) Nesbitt, M.N. and U. Francke. A system of nomenclature for band patterns of mouse chromosomes. *Chromosoma*, 41:145-158
- 17) Howell, W.M. and D.A.Black. 1980, Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36:1014-1015
- 18) Kodama, Y., M.C.Yoshida, and M.Sasaki. An improved silver staining technique for nucleolus organizer regions by nylon cloth. *Jpn.J. Hum.Genet.* , 25:229-233
- 19) Kominami, R., Y.Mishima, Y.Urano, M.Sakai, and M.Muramatsu. 1982. Cloning and determination of the transcription termination site of ribosomal RNA gene of the mouse. *Nucleic Acid Res.*, 10:1963-1979
- 20) Suzuki, H., N.Miyashita, K.Moriwaki, R.Kominami, M.Muramatsu, T.Kanehisa, F.Bonhomme, M.L.Petras, Z.-C.Yu, and D.-Y.Lu. 1986. Evolutionary implications of heterogeneity of the nontranscribed

- spacer region of ribosomal DNA repeating units in various subspecies of Mus musculus. *Mol.Bio.Evol.*, 3:126-137
- 21)Mattei,M.G., N.Philip, E.Passage, J.P.Moisan, J.L.Mandel, and J.F.Mattei. 1985 DNA probe localization at 18p113 band by in situ hybridization and identification of a small supernumerary chromosome. *Hum.Genet.* 69:268-271
- 22)Dev,V.G., R.Tantravahi, D.A.Miller, and O.J.Miller. 1977. Nucleolus organizers in Mus musculus and in the RAG mouse cell line. *Genetics*, 86:389-398
- 23)Croce,C.M., A.Talavera, C.Basilico, and O.J.Miller. 1977. Suppression of production of mouse 28S ribosomal RNA in mouse-human hybrids segregating mouse chromosomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 74:694-697
- 24)Fang,J.-S., and G.Jagiello. 1981. A pachytene map of the mouse spermatocyte. *Chromosoma*, 82:437-445
- 25)Avner,P., L.Amar, L.Dandolo, and J.L.Guenet. 1988. Genetic analysis of the mouse using interspecific crosses. *Trend in Genet.* 4:18-23
- 26)Kunnath,L., and J.Locker. 1982. Variable methylation of ribosomal RNA genes of the rat. *Nucleic Acid. Res.* 10:1963-1979
- 27)Bird,A.M., M.Taggart, and D.Macleod. 1981 Loss of rDNA methylaton accompanies the onset of ribosomal gene activity in early development of X.laevis. *Cell*, 26:381-390
- 28)Kuehn,M., and N.Arnhelm. 1983. Nucleotide sequence of the genetically labile repeated elements 5' to the origin of mouse rRNA transcription. *Nucleic Acid Res.* 11:211-224
- 29)Arnhelm,N., D.Treco, B.Taylor, and E.Eicher. 1982. Distribution of ribosomal gene length variants among mouse chromosomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 79:4677-4680
- 30)Long,E.O., and I.B.Dawid. 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Ann.Rev.Biochem.*, 49:727-764
- 31)M.Sasaki, C.Nishida, and Y.Kodama. 1986. Characterization of

- silver-stained nucleolus organizer regions (Ag-NORs) in 16 inbred strains of the Norway rat, Rattus norvegicus. Cytogenet. Cell Genet. 41:83-88
- 32) A. de Capoa, P. Marlekaj, A. Baldini, A. Archidiacono, and M. Rocchi. 1985. The transcriptional activity of individual ribosomal DNA gene clusters is modulated by serum concentration. J. Cell Sci., 74:21-35
- 33) Reeves, B.R., G. Casey, and H. Harris. 1982. Variations in the activity of nucleolar organizers in different tissues, demonstrated by silver staining of human normal and leukemic cells. Cancer Genet. and Cytogenet. 6:223-230
- 34) Searle, J.B. 1986. Factors responsible for a karyotypic polymorphism in the common shrew, Sorex araneus. Proc. R. Soc. Lond. B, 229:277-298
- 35) Qumisiyeh, M.B., M.J. Hamilton, and D.A. Schlitter. 1987. Problems in using Robertsonian rearrangements in determining monophyly: examples from the genera Tatera and Gerbillurus. Cytogenet. Cell Genet., 44:198-208
- 36) Phillips, R.B., and A.R.D. Kapuscinski. 1987. A Robertsonian polymorphism in pink salmon (Oncorhynchus gorbuscha) involving the nucleolar organizer region. Cytogenet. Cell Genet., 44:148-152
- 37) Almeida, E.J.C., and Y. Yonenaga-Yassuda. 1985. Robertsonian fusion, pericentric inversion and sex chromosome heteromorphism in Oryzomys subflavus (Cricetidae, Rodentia). Caryologia, 38:129-137
- 38) Schwartz, S., Palmer, C.G., P.-L. Yu, J.A. Boughman, and M.M. Cohen. 1986. Analysis of translocations observed in three different populations II. Robertsonian translocations. Cytogenet. Cell Genet. 42:53-56
- 39) Fatio, V. 1869. Faune des vertebres de la suisse. I Geneva and Basle Geor.
- 40) Britton-Davidian, J., F. Bonhomme, H. Croset, E. Capanna, and L. Thaler. 1980. Variabilite genetique chez les populations de souris (genre Mus L.) a nombre chromosique reduit. C.R. Acad. Sc. Paris,

- 41) Said, K., T. Jacquart, C. Montgelard, H. Sonjaya, A. N. Helal, and J. Britton-Davidian. 1986. Robertsonian house mouse populations in Tunisia: A karyological and biochemical study. *Genetica*, 68:151-156
- 42) Cattanach, B.M. 1978. Crossingover suppression in mice heterozygous for tobacco mouse metacentrics. *Cytogenet. Cell Genet.* 20:264-281
- 43) Moriwaki, K., N. Miyashita, H. Suzuki, Y. Kurihara, and H. Yonekawa. 1986. Genetic features of major geographical isolates of Mus musculus. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 127:55-61
- 44) Grummt, I., U. Maier, A. Ohrlein, N. Hassouna, and J. P. Bachellerie. 1985. Transcription of mouse rDNA terminates downstream of the 3' end of 28S RNA and involves interaction of factors with repeated sequences in the 3' spacer. *Cell*, 43:801-810
- 45) Arnheim, N., and M. Kuehn. 1979. The genetic behavior of a cloned mouse ribosomal DNA segment mimics mouse ribosomal gene evolution. *J. Mol. Biol.*, 134:743-765
- 46) Smith, G.R. 1983. Chi hotspots of generalized recombination. *Cell*, 34:709-710
- 47) Winking, H. 1986. Some aspects of Robertsonian karyotype variation in European wild mice. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 127:68-74
- 48) Moriwaki, K., H. Yonekawa, O. Gotoh, M. Minezawa, H. Winking, and A. Gropp. 1984. Implications of the genetic divergence between European wild mice with Robertsonian translocations from the viewpoint of mitochondrial DNA. *Genet. Res. Camb.* 43:277-287
- 49) Frias, S., A. Carnevale, M. Zavaleta, and B. Molina. 1988. Mitomycin C effect on Robertsonian translocations. *Ann. Genet.* 31:162-166
- 50) 宮下信泉、鈴木恭子、栗原靖之、森脇和郎。 1988。染色体バンドパターン解析法・マウス免疫遺伝学 (ソフトサイエンス社)、217-248

- 51) Haaf, T., T. Reimer, and M. Schmid. 1988. Immunocytogenetics: localization of transcriptionally active rRNA genes in nucleoli and nucleolus organizer regions by use of human autoantibodies to RNA polymerase I. *Cytogenet. Cell Genet.* 48:35-42
- 52) Roderrick, T.H., J. Staats, and J.E. Womack. 1981. Strain distribution of polymorphic variants. in "Genetic variants and strains of the laboratory mouse. (ed. M.C. Green)". pp.377-396, Gustav Fischer Verlag.
- 53) Wallace, M.E., and H.R. Nash. 1984. A tiger mouse and its relatives. -Variants caused by an active transposable elements? *J. Hered.* 75:2-7
- 54) Babu, K.A., and R.S. Verma. 1985. Structural and functional aspects of nucleolar organizer regions (NORs) of human chromosomes. *Int. Natl. Rev. Cytology* 94:151-176
- 55) Hecht, F., and B.K. Hecht. 1984. Fragile sites and chromosome breakpoints in constitutional rearrangements I. *Clin. Genet.* 26:169-173
- 56) Hecht, F., and B.K. Hecht. 1984. Fragile sites and chromosome breakpoints in constitutional rearrangements II. *Clin. Genet.* 26:174-177