

野生マウスの体内回路網形態と行動

「形とはたらき」領域 小出 剛

要 旨

遺伝的に異なった動物が示す多様な行動パターンを制御する遺伝的プログラミングを解明し、行動の進化の問題にアプローチするために、一連の野生由来マウス系統（Mishima Battery of Mouse Strains）を用いた行動遺伝学を行ってきた。

これまでに、野生由来の12系統と一般的実験用系統3系統を用いて様々な行動テストを行い、各マウス系統の行動パターンの解析を進めてきた。その結果、野生由来のマウス系統を用いることで実験用系統よりも容易に行動形質の差を見出すことができることが分かった。このような行動形質の系統間での違いは、遺伝子により制御されていると考えられるので、その遺伝的機構を解明するための遺伝的解析を進めてきた。

自発運動性の解析：野生マウス由来のKJR系統は高活動性であるのに対し、BLG2系統は低活動性を示す。連鎖解析の結果、KJR系統の高い自発運動性に関わる遺伝子は染色体の3番遠位部位に存在することが示され、現在この領域にある候補遺伝子の探索を進めている。

受動的回避行動の解析：明暗箱内での嫌悪記憶に基づいた回避行動について、様々な系統を用いて解析し比較したところ、C57BL/6系統は高い学習能力を示したのに対し、BLG2系統は低い学習能力を示した。この能力差に関わる遺伝子の連鎖解析を行った結果、染色体の2番、7番と18番に受動的回避行動に関わる遺伝子が存在することが示された。

以上のように、これまで難しいと考えられていた、行動に関わる遺伝子座を明らかにするアプローチは、世界的にもユニークな一連の野生由来マウス系統を用いることで遺伝子座の同定まで行うことが可能となってきた。今後は実際の遺伝子の同定に向けた解析を進める予定である。

1. 研究のねらい

1-1 目 的

世界各地で多様に進化を遂げた動物たちは、行動という面から観察しても種特異的な非常に多様な行動パターンを見せている。更に同じ種内でも、遺伝的に異なる動物達がそれぞれ

異なった行動を示していることが観察できる。身近なところでは、人の行動がそれぞれの人により特徴が異なることはよく観察される。このような行動の違いは環境要因と遺伝的要因の影響を受け形成されると考えられている。私は遺伝的に異なった動物が示す行動の個体差、集団差、あるいは種差といった表現型としての多様性が生じる遺伝的機構を明らかにしたいと考えこの研究を行った。この研究が進むことによって、本来形としてはとらえがたい行動表現型を、遺伝子や遺伝子産物あるいは体内回路網という形で説明していきたいと考えている（図1）。

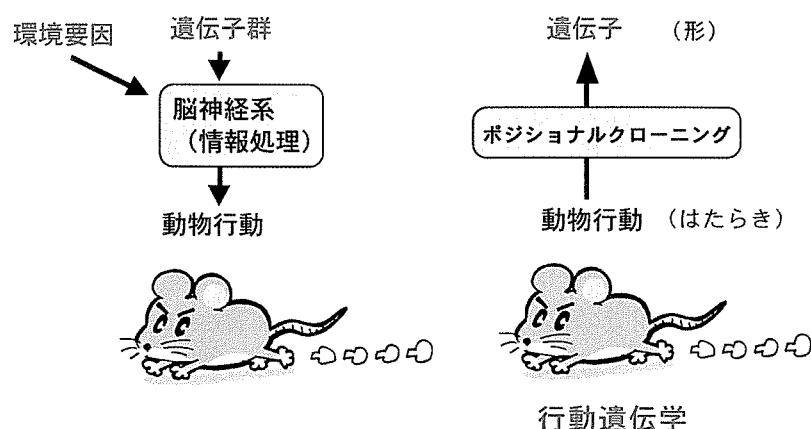


図1 行動発現の流れと行動遺伝学の流れ。行動遺伝学は脳の複雑なプロセスを経て現れた行動形質から遺伝子という物質を突きとめていくことが特徴である。

1-2 背景

これまでもマウスを用いて行動の遺伝学的解析を行う試みはあった。特にゲノム情報が充実してきた現在においては、様々な行動に関わる遺伝子を遺伝学的手法で明らかにすることは不可能ではないと考えられるようになってきている。しかし、従来のアプローチでは行動遺伝学が困難な理由がいくつかある。第一に、表現型としての行動の顕著な差を従来の実験用系統間で見出すことが容易ではない。これは従来の実験用系統はお互い遺伝的に似ているので、行動の違いもあまり存在していないためである。第二に、従来の実験用系統間でたとえ行動の差を見出しても、それに続く遺伝学的解析に必要な遺伝的マーカー（マイクロサテライトマーカー）の多型が少ないために、容易には遺伝的マッピングができない。第三に実験用系統はその樹立以前の過程で愛玩化を受けているために、本来のマウスが示す行動の一部を失っている。以上の問題点は、遺伝研で樹立され維持されている野生由来近交系マウスを行動遺伝学に用いることで克服できると考えた。以下に本研究で使用した一連のマウス系統を示す（表1）。

表1 本研究の特徴である野生由来マウス系統のリストとその由来。世界各地の野生マウスに起源があり、それぞれ遺伝的には大きく異なっている。これらの野生由来マウス系統と代表的な実験用系統をあわせて Mishima Battery of Mouse Strains と呼ぶ。

Mishima Battery of Mouse Strains

| Origin | Strains | Group | Place of collection |
|-------------|-----------|------------|---------------------|
| Wild mouse | PGN2 | Domesticus | Canada |
| | BFM/2 | Domesticus | France |
| | AVZ3 | Bactrianus | Iran |
| | HMI | Castaneus | Taiwan |
| | CAST/Ei | Castaneus | Thailand |
| | CHD | Musculus | China |
| | NJL | Musculus | Denmark |
| | BLG2 | Musculus | Bulgaria |
| | KJR | Musculus | Korea |
| | SWN | Musculus | Korea |
| MSM | Musculus | Japan | |
| Fancy mouse | JF1 | Musculus | Japan |
| Laboratory | BALB/cAnN | Domesticus | |
| | C57BL/6 | Domesticus | |
| | DBA/1 | Domesticus | |

このように、野生由来系統は遺伝的にも多型性に富むことが期待できるが、その樹立後も行動遺伝学の研究には利用されておらず、行動パターンはもちろんのこと、その遺伝的マーカー多型情報や交配実験による繁殖性についてもほとんどデータが無い状況であった。そこで、一連の野生由来系統について、遺伝的マーカーの多型情報を解析し、更に各系統の行動特性を解

析した上で、その中から選択した興味深い行動に関わる遺伝子のマッピングを行い、遺伝子単離に向けた研究を進めることにした。

2. 研究方法と成果

2-1 マイクロサテライトマーカー多型の解析

実際に連鎖解析を行おうとすると、数百個体のマウスに対して、それぞれ100個程度のマイクロサテライトマーカー遺伝子座における遺伝子型を解析する必要がある。その遺伝解析に必須のマイクロサテライトマーカー多型を、PCR 反応後にアガロースゲル電気泳動を行い、PCR 産物の長さの多型 (SSLP) を検出することで解析した。現在までに約300個近い数のマーカーに関して SSLP 情報を得ることができた。それらのデータをもとに、系統間での多型頻度を比較した結果、実験用系統間では多型頻度が低いが、野生由来系統間での多型頻度は顕著に高く、多くのマーカーが遺伝的解析に使用できることがわかった。このデータは同時に、野生由来系統が遺伝的多様性に富んでいることを直接的に示している。

2-2 各系統の行動特性の解析

一連の野生由来マウス系統に関して、各系統の行動パターンはこれまでに全く調べられていなかった。今後野生由来マウス系統を行動遺伝学に用いる際に、対象とする行動パターン

に関するそれぞれの系統が示す行動特性を調べて明らかにしておくことは不可欠である。そこで、各系統の行動特性を、複数の行動テストにより様々な側面から解析した。これまでにを行った行動解析テストの一部、自発運動性テスト (Locomotor activity)、受動的回避行動テスト (Passive avoidance test)、明暗箱テスト (Light-dark box test, Transitions)、痛覚テスト (Tail flick test, Hot plate test) について結果を示した (図2)。行動テスト

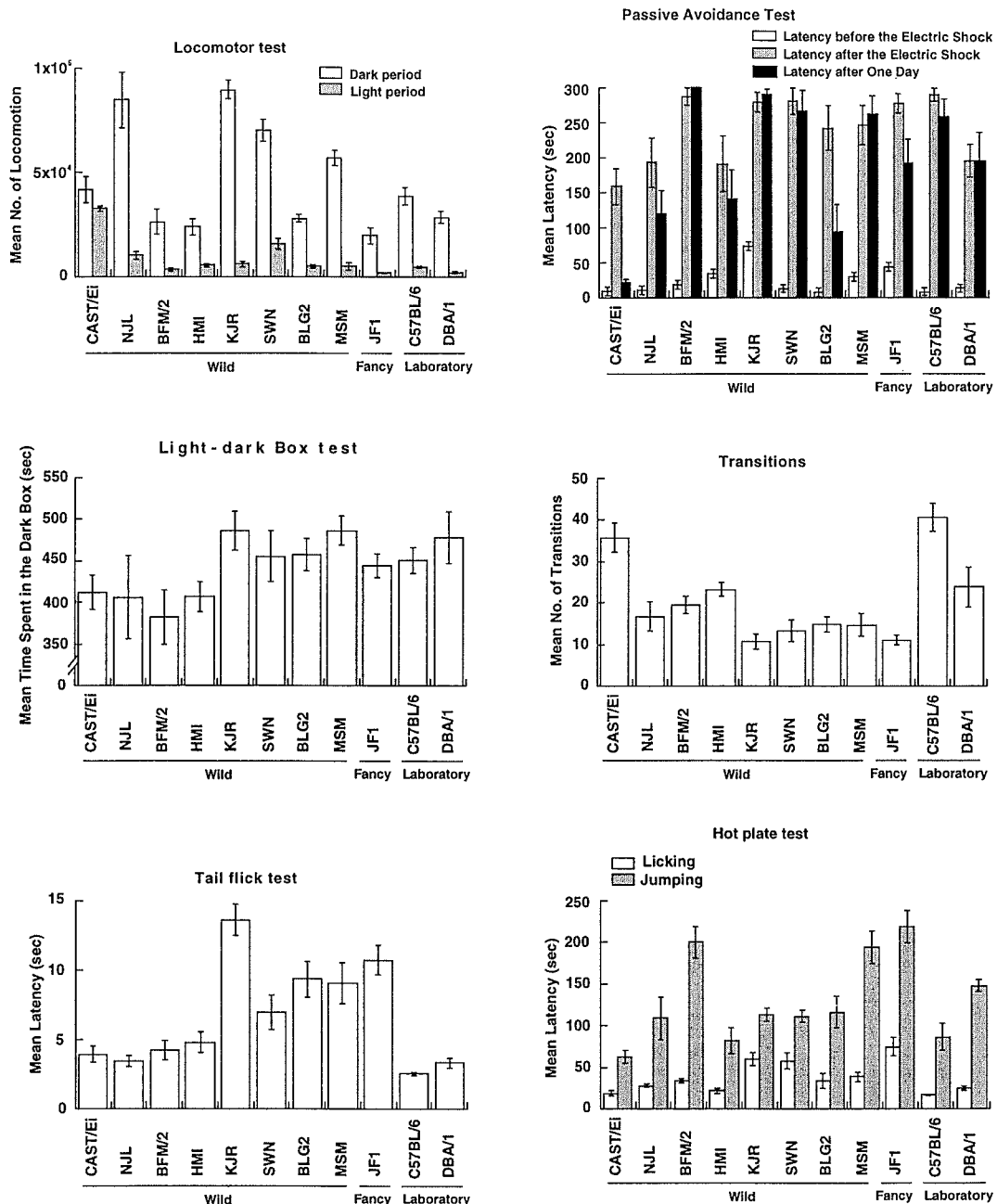


図2 これまでに Mishima Battery of Mouse Strains に対して行った行動テストの一部の結果を示す。いずれのテストにおいても、系統間で行動パターンに大きな差がみられた。この中で、自発運動性 (Locomotor activity) と受動的回避行動 (Passive avoidance) の二つの行動パターンについて、行動の系統差に関与する遺伝子のマッピングとポジショナルクローニングを進めることにした。

の詳細はここでは省略するが、いずれの行動テストにおいても、系統間で大きな行動パターンの差が検出された。

このように野生由来系統間の行動特性の差は、一般的な実験用系統を利用して解析するよりも顕著な違いとして検出できることが分かった。様々な行動テストを行った理由は、各系統の行動的プロファイルを明らかにすることもあるが、後の遺伝学的解析にどの行動テスト系を採用するか見極めるといふ大きな目標も兼ねていた。一個体の行動解析に長く時間がかかったり、労力がかかりすぎるテストは、数百個体のマウスを解析する遺伝的マッピングには適していない。また、表現型としての行動が安定して定性的又は定量的に解析できないと詳細な遺伝的地図作製が不可能となる。以上のような点を考慮した結果、これまでに解析したテストの中では自発運動性テストと受動的回避行動テストが最も後の遺伝学的解析に適していると考えられた。

2-3 自発運動性の遺伝学的解析

自発運動性の高い系統としてKJR、低活動性系統としてBLG2を選び交配し、得られたF1雑種は高活動性であることから、それをBLG2系統に戻し交配した(図3)。こうして得られた戻し交配個体群(KLxL)に関して、自発運動性に関する遺伝子の連鎖解析を行った。282個体の解析の結果、第3番染色体遠位部位に自発運動性に関わる遺伝子の中の一つが存在することが明らかとなった(図4)。このような自発運動性に関わる遺伝子が特定の染色

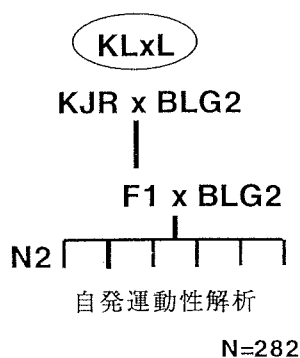


図3 自発運動に関わる遺伝子のマッピングのための交配実験。

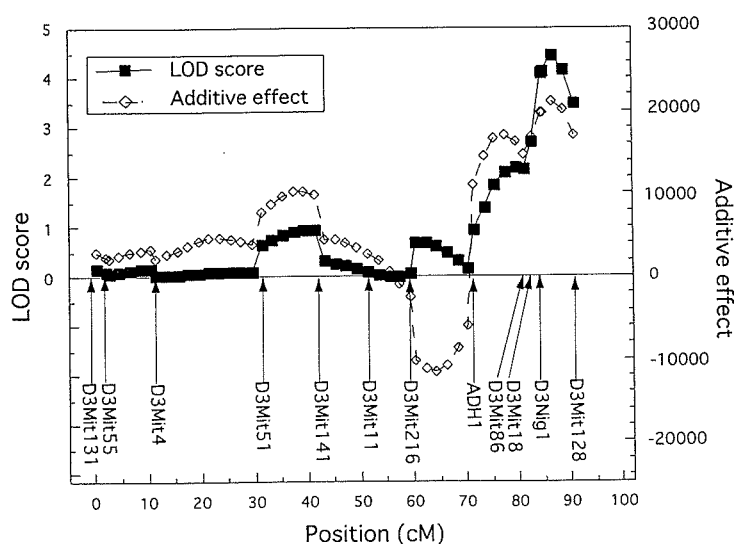


図4 自発運動性の系統差に関わる遺伝子座。連鎖解析の結果、マウス第3番染色体遠位部位に遺伝子が存在することが示された。横線の左端がセントロメア側、右がテロメア側を示す。LOD scoreのピークはその領域に遺伝子が存在することが統計的に有意であることを示す。

体領域に存在することを示したのはこの研究が初めてである。現在、この領域にマップされている遺伝子の中で、どの遺伝子が実際に自発運動の違いに関与しているのか、遺伝子の特定を目指して解析を進めている。自発運動は、生物が自然界で生存していく上で、自然選択の要素となる重要な表現形質であると考えられる。今後、遺伝子を解明する事によって、自然界で動物の活動性を進化的に左右する遺伝的機構を明らかにできると考えている。

2-4 受動的回避行動の遺伝的マッピング

受動的回避行動テストで高い回避能力を示す系統として C57BL/6、低い回避能力を示す系統として BLG2 を選び交配し、得られた F1 雑種が高い回避能力を示すことから BLG2 系統に戻し交配した (図 5)。こうして得られた戻し交配個体群 (BLxL) に関して、受動的回避行動に関する遺伝子の連鎖解析を行った。282 個体の解析の結果、第 18 番染色体上に受動的回避行動の差に関わる遺伝子の中の一つが存在することが示唆された。更に染色体の 2 番と 7 番とが候補遺伝子座としてあがってきた。このように受動的回避行動には複数の遺伝子座が複雑に関与していると考えられる (図 6)。また、受動的回避行動に関して、遺伝的背景を回避能力が低い BLG2 系統にそろえながら、表現型はもとの C57BL/6 系統が示す高い回避能力を保有するコンジェニック系統を作成している (図 7)。この系統は遺伝的マップが正しいかどうか、より直接的な証拠を示すものと期待できる。実際、戻し交配 5 世代目の時点で、高い回避能力を示した個体が、ドナー系統である C57BL/6 系統のどの遺伝子領域を保有しているか、ゲノムスキャンを行い解析した。その結果、染色体の 2 番と 7 番のマップされた領域がコンジェニック系統でも保有されていることが示された。この結果は連鎖解析による遺伝子マッピングが正しいことを別のアプローチから示すものである (図 6)。

3. 今後の展望

現在までに、BLxL 交配群を用いた解析で受動的回避行動に関わる遺伝子座が少しずつ分かってきた。今後は複数見いだされた候補遺伝子座に関して、コンジェニック系統を用いて更に詳細な遺伝的地図を作製し、候補遺伝子の絞り込みに取り組む必要がある。

自発運動性に関しては、その原因遺伝子のうちの一つが第 3 番染色体の遠位部位にあることを示した。今後は実際の遺伝子同定を進める必要がある。これまでに、脳の領域の中で活

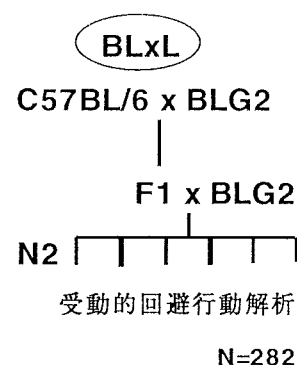


図 5 受動的回避行動に関わる遺伝子のマッピングのための交配実験。

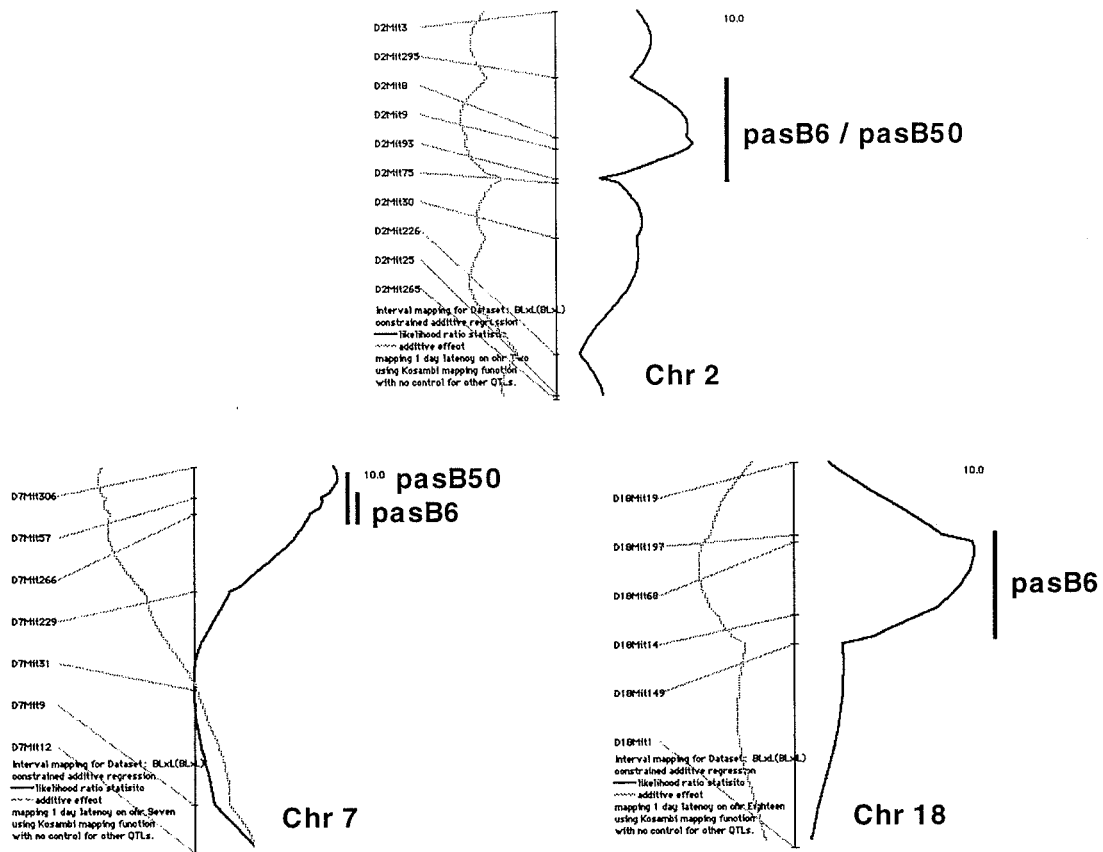


図6 受動的回避行動の系統差に関わる遺伝子の候補領域。統計的値（曲線が示す）は低いものの、3つの染色体に遺伝子の存在を示唆する領域が見いだされた。更にコンジェニック系統のゲノムを解析した結果、これらの領域はコンジェニック系統でもドナー系統由来のゲノム領域として維持されていることが判明した（縦の線に pasB6 あるいは pasB50 と書かれた領域）。

動に関わる線条体でのドーパミンの量を解析したところ、高い活動量を示す KJR 系統ではドーパミンの量が BLG2 系統よりも多いことが分かっている。従って、KJR の高い自発運動性に関わる遺伝子は、ドーパミンの量の調節に直接あるいは間接的に関与していると考えられる。現在飛躍的に充実しつつあるゲノム情報を駆使して、今後原因遺伝子の同定とその解析に取り組みたい。

このさきがけ研究では行動の多様性

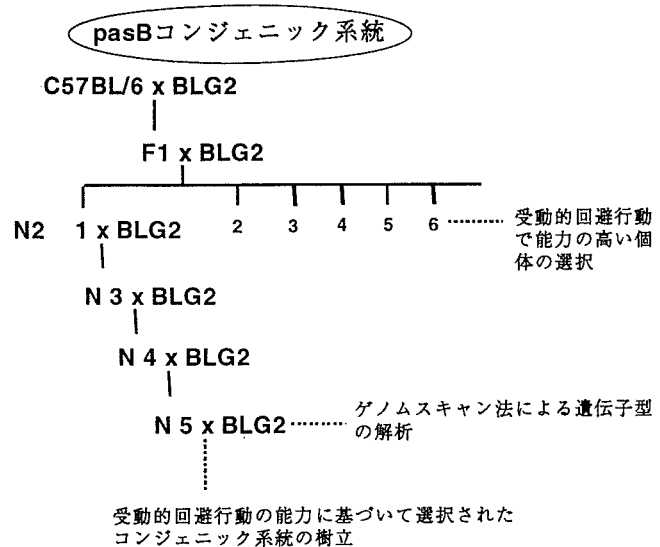


図7 受動的回避能力の高いマウスを選択し、コンジェニック系統を作出するための交配方法。

を生み出す遺伝的機構の解明を目的としている。これまで、遺伝子の機能を阻害することによって生じた異常で遺伝子の機能が議論されてきた。しかし生物が進化する際には、主に遺伝子の働きを微妙に調整し変化させながら、行動の多様性を生み出していると考えられる。このさきがけ研究で単離を目指している遺伝子が明らかになる事によって、遺伝子の活性や発現量をほんの少し変化させることにより新たな表現型が生まれる、そのような進化レベルでの遺伝的機構の多様な側面を明らかにしたいと考えている。

4. 発表リスト

(1) 論文

- 1) Sato, H., Koide, T., Sagai, T. Ishiguro, S., Tamai, M., Saitou, N., Shiroishi, T.: The genomic organization of type I keratin genes in mice. *Genomics*, 56, 303-309, 1999
- 2) Shum, A. S. W., Poon, L. L. M., Tang, W. W. T., Koide, T., Chan, B. W. H., Leung, Y-C. G., Shiroishi, T. and Coop, A. J.: Retinoic acid induces down regulation of Wnt-3a, apoptosis and diversion of tail bud cells to a neural fate in the mouse embryo. *Mechanisms of Development* 84, 17-30, 1999.
- 3) Koide, T., Moriwaki, K., Ikeda, K., Niki, H. and Shiroishi, T.: Multi-phenotype behavioral characterization of inbred strains derived from wild stocks of *Mus musculus*. *Mammalian Genome* 11, 664-670, 2000
- 4) Watanabe, T., Yoshimura, A., Mishima, Y., Endo, Y., Shiroishi, T., Koide, T., Sasaki, H., Asakura, H., Kominami, R.: Differential chromatin packaging of genomic imprinted regions between expressed and non-expressed alleles. *Human Molecular Genetics* 9, 3029-3035, 2000.
- 5) Furuse, T., Blizard, D. A., Moriwaki, K., Miura, Y., Yagasaki, K., Shiroishi, T., Koide, T.: Genetic diversity underlying capsaicin intake in the Mishima battery of mouse strains. *Brain Research Bulletin* (special issue) in press.

(2) 総・解説

- 1) 小出 剛：野生マウスの行動遺伝学. *アニテックス* 12: 63-70, 2000.

(3) 口頭発表

- 1) 小出 剛、森脇和郎、城石俊彦：野生由来マウス系統にみられる受動的回避行動多様性

- とその遺伝学的解析へのアプローチ、第59回日本動物心理学会、金沢、5月、1999
- 2) 小出 剛：近交系マウスの使い分け 野生由来マウスを用いた行動研究、第5回日本行動薬理研究会、岡山、8月、1999
 - 3) 小出 剛、森脇和郎、城石俊彦：野生由来近交系マウスに見られる行動の遺伝学的解析、第71回日本遺伝学会、広島、9月、1999
 - 4) Koide T., Moriwaki K., Shiroishi T., Characterization of behavioral diversity in the inbred strains established from wild mice. 13th International Mouse Genome Conference, Philadelphia, USA, October-November, 1999
 - 5) 小出 剛、森脇和郎、城石俊彦：学習記憶能力と自発運動性の行動遺伝学的解析、第47回日本実験動物学会、徳島、5月、2000
 - 6) Koide T., Furuse T., Moriwaki K., Shiroishi T. Mapping of the genes responsible for the performance in the passive avoidance test using strains derived from wild mice. Narita, Japan, November, 2000
 - 7) Shimizu K., Ishijima J., Kikkawa Y., Yonekawa H., Tsukahara K., Hirasawa T., Makino S., Koide T., Wakana S., Balling R., Shiroishi T. Ribosomal protein L38 is essential for early embryogenesis and skeletal patterning of mice. Narita, Japan, November, 2000
 - 8) 小出 剛、古瀬民生：野生由来マウス系統を用いた行動遺伝学、国立遺伝学研究所研究会「動物行動の遺伝学」、三島、10月、2000
 - 9) 小出 剛、古瀬民生、森脇和郎、城石俊彦：受動的回避能力に関わる遺伝子の単離に向けた行動遺伝学的研究、第48回日本実験動物学会、横浜、5月、2001