Genetic Relationship of Two Mutant Genes Which Producing Three Different Syndromes in the Mouse

Shigekatsu TSUJI¹, Ann D. MacPIKE²,

Eisaku OHKOUCHI¹ and Hans MEIER²

*Department of Physiology, Wakayama Medical College¹,
Wakayama-shi, Japan and The Jackson Laboratory²,
Bar Harbor, Maine, U. S. A.*

We determined that leaner gene (*la*) is located in the linkage group XVIII and closely linked to *Es-1*, which is known to be located closely to tottering gene (*tg*). Double heterozygote (*la/tg*) produced by mating between *la* heterozygote and *tg* heterozygote showed an intermediate syndrome between those seen in tottering (*tg/tg*) and leaner (*la/la*) mice. Both leaner and tottering mice showed neuromuscular disorders, but their clinical and pathological characteristics were different. Leaner mice were found to represent a so-called cerebellar mutant having the reduced size of cerebellum and severe cytoarchitectonic abnormalities with focal losses of Purkinje and granular layer cells. Tottering was, however, another mutation having epileptiform seizures, and it was characterized pathologically by cellular losses and shrinkage as well as vesiculations of cytoplasmic membranous structures in the cerebellum. The double heterozygote was shown to have both pathologic characteristics seen in each homozygote, and also showed shrinkage of Purkinje cells and vesiculation of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. These clinical and pathological findings supported the genetic data suggesting that *la* and *tg* constitute an allele.

二つの異なる症状を発現する神経系異常突然変異 形質の遺伝的相関性

辻 繁勝¹・A. D. マックパイク²・大河内英作¹

H. マイヤー²

和歌山県立医科大学生理学教室¹

ジャクソン研究所²

マウスに見出されている tottering ならびに leaner 形質はそれぞれ *tg* 及び *la* という常染色体劣性遺伝子によって発現される突然変異形質である。いずれも神経一筋組織系の機能障害を発症するが、互いに独立に見出され、その臨床的病理学的症状が著しく相違することから両者の間の遺伝的相関性に就いては考慮されていなかった。発現形質による分類では tottering 形質はいわゆる epileptiform seizures のグループに属し、一方 leaner 形質は主として小脳に病理学的欠陥が認められることから cerebellar mutant のグループに入れられている[10]。又遺伝学的には *tg* 遺伝子は第 XVIII 連鎖群に属し、*Es-1* 遺伝子 (esterase-1 アイソザイムを発現す

る) と密接して存在することが知られているが[2]、*la* 遺伝子の連鎖群に就いてはこれまで不明であった。

われわれは種々の神経一筋組織突然変異体におけるエステラーゼアイソザイムの遺伝的調節を研究する過程[12, 13]で tottering マウスと leaner マウスでの esterase-1 発現形質に違いが存在することを見出し、この三遺伝子の間に連鎖が存在することを報告している[15]。

本論文では *la* 遺伝子と *tg* 遺伝子の相互関係について交配実験、発現症状の比較、および電子顕微鏡、光学顕微鏡による脳組織の微細構造の変化等の面から検討を加えた結果を報告する。

Table 1 Test for allelism of *la* and *tg* with reference to *Es-1* phenotypes

Type of mating	Number of matings	Normal			Affected			Total
		$\frac{Es-1^a}{Es-1^a}$	$\frac{Es-1^a}{Es-1^b}$	$\frac{Es-1^b}{Es-1^b}$	$\frac{Es-1^a}{Es-1^a}$	$\frac{Es-1^a}{Es-1^b}$	$\frac{Es-1^b}{Es-1^b}$	
1. $\frac{Es-1^a}{Es-1^a} \frac{la}{la} \times \frac{Es-1^b}{Es-1^b} \frac{tg}{tg}$	3	0	9	0	0	18	0	27
2. $\frac{Es-1^a}{Es-1^a} \frac{la}{la} \times \frac{Es-1^a}{Es-1^b} \frac{tg}{tg}$	8	40	21	0	0	13	0	74
3. $F_1(\text{affected}) \times \frac{Es-1^a}{Es-1^b} \frac{tg}{tg}$	5	7	8	1	1	7	9	33
4. $F_1(\text{affected}) \times \frac{Es-1^a}{Es-1^a} \frac{la}{la}$	3	5	3	0	4	4	0	16

材料および方法

C57BL/10JGn 系統で *tg* 遺伝子と *Es-1^b* 遺伝子が同一染色体上に位置しているマウスを *tg* 遺伝子用として使用し、*Es-1^b* を指標として検定を行った(ジャクソン研究所 M. C. Green 博士の好意による)。*la* 遺伝子用には *Es-1^a* 遺伝子をホモに有する *la* ヘテロ個体を用い *Es-1^a* を指標として検定した。*esterase-1* の表現型は尾部から採血して得た血清を用いて、通常の寒天電気泳動ザイモグラム法で検定した[14]。

tg 遺伝子と *la* 遺伝子の対立性検定には次の組合せて交配実験を行った。

(1) *Es-1^a* をホモに *la* をヘテロに保有する雌と *Es-1^b* および *tg* をホモに有する雄とを交配させる。

(2) *Es-1^a* と *Es-1^b* を有し *tg* をヘテロに保持する雌と *Es-1^a* をホモに *la* をヘテロに有する雄とを交配させる。

以上の交配により、もし *Es-1*, *tg*, *la* の三遺伝子が全て密接して存在するとすれば三重異型接合体の仔マウスが交配(1)から1/2の率で、又交配(2)からは1/4の率で発現するはずである。さらに、もし *la* と *tg* が対立遺伝子であれば、これら三重異型接合体は神経系異常の形質を発症するはずである。

光学顕微鏡用切片は取出した脳標本を通常の10%中性ホルマリンで固定し、パラフィン切片作製後、ヘマトキシリン・エオシン単独染色及びラキソール・ファストブルーとの二重染色[5]を行い神経細胞、髄鞘の同定に用いた。

電子顕微鏡による検査は病変が主として小脳中心に見られることから生後18日乃至20日の *la/la*, *la/+*, *+/+* 各同腹マウス、生後4ヶ月の *la/tg* マウス、及び生後3ヶ月の同腹 *tg/tg*, *tg/+*, *+/+* マウスの小脳をそれぞれ使用した[6]。

標本作製は、まずマウスを CO_2 で麻酔後直ちに4.5% グルタルアルデヒド、アルカリ燐酸緩衝液 (pH7.4) で灌流し[9]、取り出した脳を同じ緩衝液に0.2M サッカロースを加えた溶液で一夜洗滌する。約1mm³ のブロックを小脳の後葉虫部から切出し、ペロナル・酢酸緩衝液 (pH 7.4) に1% OsO_4 を入れた溶液中で氷冷で60分間静置した後室温に戻す[7]。固定後アルコール・シリーズ及びプロピレンオキサイドで脱水し、Mara-glass655[11] 或いは ACM Durcupan (Eluka) で包埋し、Porter-Blum MT-1 ウルトラ・ミクロトームで切片を作った。

成 績

交配実験の結果は Table 1 のごとくである。血清 *esterase-1* 表現型を指標として検定を行い、その区分中での疾病の発現を調べると、交配(1)では仔マウスに *Es-1^a/Es-1^b* 型のみが発現し27頭のうち18頭(67%)が行動異常を示した (Fig. 1)。残りの9頭は外見的に全く正常であった。この結果から *tg* と *la* 両遺伝子は少なくとも相補的に働いて疾病を発現させ得ることが確かめられたわけである。さらに交配(2)では *Es-1^a/Es-1^a* と *Es-1^a/Es-1^b* の二型のみが発現し、*Es-1^b/Es-1^b* 個体は見られなかった。

Es-1^a/Es-1^a 個体は全て正常であったが *Es-1^a/Es-1^b* 個体34頭のうち13頭(38%)に行動異常が認められた。これは *tg* と *la* が対立遺伝子である場合の出現率を十分に満足させている。そこで次に行動異常を発現した F_1 雄マウスをそれぞれのヘテロ親にもどし交配させた所 (交配(3)及交配(4))、交配(3)で2頭の組換え型が発現した。そのうち1頭は *Es-1^b · tg* と *Es-1^a · la* の間に組換えが起こった *la/tg* 個体で、他は *Es-1^a · +* と *Es-1^b · tg* との間に起こった *tg/+* ヘテロ個体であった。交配(1)及び(2)での行動異常マウスの発現率及び交配(3)及び(4)での分

Fig. 1 An agar-gel zymogram of serum esterase; alpha-naphthyl butyrate was used as substrate.

(a) $\frac{Es-1^b}{Es-1^b} \frac{tg}{tg}$ (b) $\frac{Es-1^a}{Es-1^b} \frac{+}{tg}$ (c) $\frac{Es-1^a}{Es-1^b} \frac{la}{tg}$ (d) $\frac{Es-1^a}{Es-1^a} \frac{la}{+}$
 Channels (a), (b) and (d) are of the parental types, and channel (c) represents double heterozygote of *la* and *tg* with clinically abnormal behavior.

Fig. 2 An *la/tg* mouse, age 10 weeks, assuming characteristic posture of stiffening of hind limbs and extending them sideways when lifted by the tail.

離比から考えて *tg* と *la* は対立遺伝子であり、且第 XVIII 連鎖群に属する *Es-1* 遺伝子と密接した座位に存在することは明らかである。

la/tg マウスの外見的特徴：行動異常が発現するのは生後15乃至17日である。運動失調、硬直痙攣状態及び運動遅滞がその主な症状であるが、初期症状としてはまず

Fig. 3 Photomicrograph of cerebellar lobe of mice with three different syndromes. In leaner cerebellum, there is shrinkage of Purkinje cells with focal losses and the granular layer consists mostly of Golgi type II cells. (3, a) The granular layer of tottering contains both small dense type cells and large pale Golgi type II cells (3, b). The aberration of heterozygote (*la/tg*) cerebellum resembles quantitatively those found in tottering but considerably more severe (3, c).

ゆらゆら歩き、断続的な痙攣発作等が起り、生後4週間頃になるとすべてのマウスに完全な痙攣状態が発現し、その後、この症状はマウスの生涯を通じて続く。痙攣は突然発生し、途中小康状態があるが歩行を始めると再び発作が起り、この繰返しが一時間程続く。

痙攣発作のない時でも常にゆらゆら歩き、尾を持って持ち上げると後肢を硬直させハの字形に両側に広げる (Fig. 2)。大部分のマウスが乳離れ期迄、その不自由さに打勝って生残り、成体になってもやせて小型ではあるが正常マウスとほぼ同じ寿命を全うする。成体ではいわゆる *runt disease* 様の外見を呈し、生後1ヶ月での体重は 7.5 ± 0.1 g (10頭の平均) と正常同腹マウスの体重 12.7 ± 0.2 g (10頭の平均) のほぼ半分程度である。生殖は可能であるが雌雄共にやや困難である。

組織学的所見: *leaner* マウスでは正常対照と比較して、小脳がいちじるしく小型になっていることが特徴的であるが、組織学的変化は Fig. 3a のごとく顆粒層が著しく萎縮し、細胞数が減少して居り、特にプルキンエ細胞が極くまばらになっている状態が認められる。一方 *tottering* マウスの方は小脳の大きさ、その他脳全体の外見は正常と変わりなく顆粒層の細胞数も正常である。わずかにプルキンエ細胞の数が減少しまばらに分布しているのが認められる (Fig. 3b)。

これに対して *la/tg* マウスの小脳ではやはりプルキンエ細胞が減少しているのは認められるが、顆粒層の細胞数は *leaner* 程極端に減少してはいない。即ち *la/tg* マウスの組織学的変化は全体として *leaner* と *tottering* の中間的状态を示しているといえる (Fig. 3c)。

微細構造所見: Fig. 4 は正常対照, Fig 5, 6, 7 はそれぞれ *tottering*, *leaner* および *la/tg* マウスの小脳虫部の電顕像である。3形質共に顆粒層中の細胞数が減少し、プルキンエ細胞の萎縮が認められるが、特に *tottering* マウスではプルキンエ細胞の萎縮がいちじるしく、核は引延ばされて不整形になり核膜は凹凸になり所々に陥入部が生じている。さらに粗面小胞体は空胞化し、リボゾームを消失しているが、わずかに残存しているリボゾームはしばしば群をなしポリゾームを形成し、ときにボール型をしたミエリン様構造が形成されているのが認められた。神経束には変化なく、グリア細胞も殆んど無変化であった (Fig 5)。*leaner* マウスでは細胞構造の変化が3形質のうちで最も激しく、プルキンエ細胞は萎縮し、粗面小胞体は空胞化し、多くのミトコンドリアのクリステは消失している。また、多数のミエリン様残存構造が認められた。*leaner* 形質で特徴的なのはプルキンエ細胞の著しい萎縮と欠損であるが、同時にゴルジII型細胞にも強い変化が認められ、細胞膜及び他の膜構造物であるミトコンドリア、粗面小胞体等が破損し基質中に四散しているの認められる。軸索の多くが胞状構造を失い、わずかにミトコンドリア等の残存物を含んでいるが対照的に内部の線維はほとんど無変化である (Fig. 6)。*la/tg* マウスの小脳組織像は *leaner*, *tottering* 両形質

Fig 4 Control mouse (+/- or +/+), 20 days old. Cerebellar Golgi type II cell surrounded by network of axons ($\times 22,000$). There are neither real nor artifactual changes in structural cell components. The cell components are identified as follows: A, axons; Cm, cell membrane; ER, endoplasmic reticulum; G, Golgi apparatus; M, myelin; N, nucleus; Nc, nucleolus; Nm, nuclear membrane.

Fig. 5 Tottering mouse, 3 month old. Purkinje cell with surrounding neuropile. The cell is shrunken, and nuclei elongated and irregularly indented ($\times 29,000$).

Fig. 6 Leaner mouse, 20 days old. Purkinje cell cytoplasm reveals vacuolation and vesiculation of endoplasmic reticulum, mitochondrial swelling and degenerative myelin figures ($\times 13,500$).

Table. 2 Comparison of histological changes in cerebellum of the mice with the three syndromes

Mutation	Molecular layer	Granular layer	Purkinje cell layer
Leaner (<i>la/la</i>)	Absence of nerve cells noted in this layer. Nerves myelinated normally.	Excess number of Golgi II cells and evidence of leakage of cytoplasm.	P-cells scattered and do not form layer. Loss of ultrastructure.
Tottering (<i>tg/tg</i>)	Several Golgi II cells show degeneration as the other cells of this layer.	Cells are in normal numbers but are somewhat shrunken.	Loss of ribosomes from the endoplasmic reticulum. Shrinkage of nuclear and cytoplasmic material.
Leaner-Tottering (<i>la/tg</i>)	Very Similar to the Tottering mutant.	Some loss of cells and those remaining are severely shrunken, especially Golgi II cells. Also evidence of leakage.	Loss of ultrastructure especially in endoplasmic reticulum. Both ER and Golgi apparatus are severely vacuolated.

Fig. 7 Heterozygous mouse (*la/tg*), 4 month old. Granular cell. Some mitochondria are severely swollen and elongated, and others are shrunken. They undergo degenerative changes including loss of cristae ($\times 29,000$).

の特徴を合わせた変化を示している。特にプルキンエ細胞の萎縮、小胞体及びゴルジ装置の空胞化が目立っているが、*la/tg* マウスには leaner マウスで見られる様な膜構造の欠損は認められなかった (Fig. 7)。

Table. 2 は小脳微細構造の変化を3形質それぞれの

特徴としてまとめたものである。

これら3形質に共通して認められるミトコンドリア、小胞体、及び細胞全体の萎縮或いは膨潤等の変化は、*tg/+*, *la/+*, *+/+* 等の対照マウスではまったく認められなかった。

考 察

la 遺伝子と *tg* 遺伝子の二重異型接合体での症状発現時期は leaner マウスと同じく生後15日頃であり、症状は tottering マウスのそれに類似してはいるが、やや重症である[3]。totttering マウスの症状は生後3～4週間で発現し、発作時を除いてその行動は比較的穏かで、ほぼ正常に発育し寿命も正常である。これに対して leaner マウスは生後約3週間ですべて死亡するので系統維持のためにはヘテロ個体同志の交配が必要である。小脳は小型で顆粒層の萎縮、プルキンエ細胞内構造物のいちじるしい欠損、グリア細胞の増殖等が認められる[10]。一方 *la/tg* 二重異型接合体はやせて小型ではあるが組織学的に leaner より軽症の変化が認められる程度で、数ヶ月にわたって生存し、生殖は困難ではあるが可能である。

以上のごとく症状及び組織学的変化をそれぞれのマウスについて比較すると *la* 遺伝子と *tg* 遺伝子が形質発現に関して相補的に働いていることは明らかである。すなわち両突然変異は同一遺伝子座内において異った部分に欠損を有し、互の正常部分がある程度これを補っているものと考えることができる[1]。さらに推論すれば *la* と *tg* は同一のオペロン中の異った部分に発生した突然変異であり、*la* の方が *tg* よりも欠損部分が大きく且つオペレーター遺伝子に近接した部分に存在するため症状がより重く現われ、*la/tg* では *tg* 遺伝子側の正常部分からの選択模写によって *la* 遺伝子の欠損がある程度補正されるので leaner マウスに比較して軽度の症状を示すものと推測することができる[4]。勿論 *la* と *tg* の表現型の違いはオペレーター遺伝子自体の違いであるかもしれないし、また、leaner が致死なのは、*la* が隣接した致死座位の欠損をも含んでいるためである可能性を否定することはできないが、*la/tg* 二重異型接合体の症状が leaner よりもむしろ tottering の症状に類似していることは両遺伝子の欠損部分のうち、互にオーバーラップしている部分によって発現されるためであると仮定すると説明しやすくなる。

交配実験の結果は期待値によく一致し、両遺伝子が対立遺伝子であることを充分示唆しているが、この結果のみでは両遺伝子が非常に近接した別個の独立した遺伝子、即ち疑似対立遺伝子である可能性を完全に否定することはできないし、そのためには膨大な数の交配実験を行い、シス配置のヘテロ個体が存在し得ないことを統計的に確める必要があるが[8]、一方電子顕微鏡による検索結果は、外見的症状の観察と合せて、*la* 遺伝子と *tg* 遺伝子が対立遺伝子であることを強く支持している。すなわ

ち、3形質ともにプルキンエ細胞及び顆粒層中の細胞群が減少または欠失しているが、totttering マウスでは顆粒層中に2つのタイプの細胞群が存在するのに対して *la/tg* マウスにはゴルジII型細胞のみが存在する。また小胞体の空胞化と細片化は3形質に共通な現象ではあるが、*la/tg* が最も重症である。膜の破損による細胞内容物の基質への流出は leaner マウスのみに関与し、ポリリボソームの形成は tottering マウスに特徴的な現象である。

以上のような電子顕微鏡所見から、*la/tg* 形質は明らかに leaner 形質と tottering 形質の中間的特徴を多く有しており、*la* と *tg* が対立遺伝子であると考えるのは妥当である。また leaner マウスに認められる膜構造物の破損という現象は最も重症な変化であり、このことがほとんどの leaner マウスが幼児期に死亡する原因のひとつとなっているものと推測される。

要 約

la 遺伝子が第 XVIII 連鎖群に属していることを見出した[15]。さらに *Es-1* 遺伝子と密接して存在する事が知られている *tg* 遺伝子[14]と *la* 遺伝子が複対立遺伝子の関係にあることが確められた。

両遺伝子の二重異型接合体 (*la/tg*) は leaner マウス (*la/la*) と tottering マウス (*tg/tg*) の中間的な症状を示すが後者により強く類似している。症状の発現は leaner とほぼ同じく、生後約2週間で tottering より早い。また組織学的所見も外見症状とほぼ平行していた。すなわち leaner では顆粒層中の細胞数の著しい減少、プルキンエ細胞の欠失、膜の破損に伴う原形質の流出という強い小脳欠陥が見られるが、totttering と *la/tg* マウスでは細胞数の減少と萎縮及び細胞内膜構造物の空胞化という特徴が認められる。一方 tottering ではこの症状がゆるやかに長期間にわたって発現するので、生後4ヶ月でも顆粒層に2タイプの細胞が存在する。

一方 *la/tg* マウスでは leaner とほぼ同じ生後2週間で症状発現が見られるが、その進行程度は leaner よりも遅い。以上の組織学的観察からも *la* 遺伝子と *tg* 遺伝子が対立関係にあることが強く支持された。

文 献

- [1] Benzer, S. (1957). The elementary units of hereditary. In The chemical basis of heredity 70—93, Ed. W. D. McElroy and H. B. Glass, Johns Hopkins Press, Baltimore.
- [2] Green, M. C. (1965). Mutant genes and linkages. In Biology of the laboratory mouse.

- 2nd Ed. 87—150, Ed. E. L. Green, McGraw-Hill, New York.
- [3] Green, M. C. and Sidman, R. L. (1962). Tottering, a neuromuscular mutation in the mouse and its linkage with oligosyndactylism. *J. Hered.* 53, 233—237.
- [4] Jacob, F. and Monod, J. (1961). On the regulation of gene activity. *Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol.* 26, 193—211.
- [5] Margolis, G. and Pickell, J. P. (1956). New applications of the luxol fast blue myelin-stain. *Lab. Invest.* 5, 459—474.
- [6] Meier, H. and MacPike, A. D. (1971). Three syndromes produced by two mutant genes in the mouse. *J. Hered.* 62 (5), 297—302.
- [7] Palade, G. E. (1952). A study of fixation for electron microscopy. *J. Exptl. Med.* 95, 258—297.
- [8] Phillips, R. J. S. (1966). A cis-trans position effect at the A locus of the house mouse. *Genetics* 54, 485—495.
- [9] Sabatini, D. D., Bensch, K. and Barnet, R. J. (1963). Cytochemistry and electron microscopy : The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.* 17, 19—58.
- [10] Sidman, R. L., Green, M. C. and Appel, S. H. (1965). Catalog of the neurological mutants of the mouse. Harvard Univ. Press, Cambridge Mass.
- [11] Spurlock, B. O., Kattinean, V. C. and Freeman, J. A. (1963). Technical modifications in maraglass embedding. *J. Cell Biol.* 17, 203—207.
- [12] Tsuji, S. and Meier, H. (1970). Esterase alterations in the liver of dystrophic mice. *Experientia* 26, 547—548.
- [13] Tsuji, S. and Meier, H. (1971). Liver seterase abnormalities in hereditary neurological diseases of mice. *Experientia* 27, 258—259.
- [14] Tsuji, S. and Meier, H. (1969). Linkage of serum esterase and tottering in the mouse. *J. Hered.* 60, 221—222.
- [15] Tsuji, S. and Meier, H. (1971). Evidence for allelism of leaner and tottering in the mouse. *Genet. Res., Camb.* 17, 83—88.