Importance of Biochemical Marker Genes in Inbred Strains of Mice

Some Problems on Checking Genetic Purity of Inbred Strains

Michiru MIZUNO*, Kiyoshi SUZUKI**, Takeshi TOMITA***, and Kyoji KONDO***

* *Shizuoka Laboratory Animal Agricultural Cooperative
Association, Koike-cyo, 1616, Hamamatsu, 435*

** *Institute of Medical Science, Tokyo University,
Shirogane-dai, 4-6-2, Tokyo, 180*

*** *Laboratory of Animal Genetics, Faculty of Agriculture,
Nagoya University, Nagoya, 464*

(Received for publication : September 14, 1976)

In order to check genetic purity of inbred strains of mice, we surveyed five biochemical variants in certain 69 strains, some of which had established from Japanese fancy mice. The loci examined were Hemoglobin beta-chain, Malic enzyme (supernatant form), Isocitrate dehydrogenase (supernatant form), Serum esterase-1, and Serum esterase-2. These loci were all in homozygous states as far as examined, however, some subline divergences were found in a few strains, that is to say, sublines were found to be fixed with different alleles at some loci. Importance of biochemical marker genes to check genetic purity of strains and several derived problems are mentioned.

近交系マウスにおける生化学的 標識遺伝子の重要性

——系統の遺伝的チェックの際生じた問題点

水野 充*・鈴木 潔**・富田 武***・近藤 恭司***

* 静岡実験動物農業協同組合

** 東京大学医科学研究所実験動物研究施設

*** 名古屋大学農学部家畜育種学教室

Smithies [14] により考案されたデンブングル電気泳動法の発展に伴い種々の蛋白・酵素の遺伝的解析が可能となり, house mouse (*Mus musculus*) においては今日まで少なくとも30以上の電気泳動的に検出されうる変異——生化学的変異 (biochemical variant)——が報告されている。又これらのうちのいくつかの変異が既存の系統間に存在する変異として認められ [9] (表1), 多数の情報が得られている [9, 15]。

一方実験動物の立場からは, Roderick ら [9] や水野・近藤 [8] が示唆するように, 毛色を支配する遺伝子座位と共にこれら系統間変異を有する生化学的変異を標識として, 系統の遺伝的斉一性をチェックすることが重要であると考えられる。

我々はこのような観点からこれら系統間変異を有するいくつかの生化学的変異について, (1) 既に報告されている系統についてはそれらのチェックを, (2) まだ報告

Table 1. Biochemical Variants Found in Inbred Strains and Their Linkage Groups

Linkage Group	Locus	Linkage Group	Locus
I	Gpi-1	XI	Ldr-1
I	Hbb	XIII	Dip-1
I	Mod-2	XIII	Id-1
II	Mod-1	XVII	Pgm-1
VII	Es-3	XVIII	Es-1
VIII	Gpd-1	XVIII	Es-2
VIII	Pgm-2	XVIII	Got-2

されていない系統（主に K-group, N-group [6] など我が国を起源としている系統）については、それらの調査を行い、今回はこれまでに得られた調査結果と更に結果をもとにして試みた系統チェックの問題、およびその際得られたいくつかの問題について報告する。

生化学的標識遺伝子の選定条件

我々は生化学的標識遺伝子の条件として次の点を問題とした。

(1) 系統間変異が適当に存在すること（たとえば lactate dehydrogenase regulaor 遺伝子座位（遺伝子座位記号 Ldr-1, 以下同様）は常染色体上の一対の対立遺伝子である Ldr-1^a および Ldr-1^b を支配している。しかし報告されている限りでは Ldr-1^b 型の系統は稀であり、LP/J 系など数系統にしか観察されておらず [9, 12] これでは標識遺伝子としての効果が得られ難いため）。

(2) 染色法が容易なこと（一次反応で検出される蛋白、酵素であること）。

(3) 遺伝子型が判定しやすいこと。

(4) 毛色を支配する遺伝子座位（A, B, C, D, S）を含め、なるべく異なる連鎖群に属していること（多くの染色体を把握したいため）。

(5) 試料にはなるべく血液（血漿・血球）が用いられること（臓器を試料とする場合には対象とする動物を殺さなくてはならないため）。

以上の諸条件を考慮し、我々は次の 5 つの生化学的変異を今回の調査の際に標識遺伝子として選定した。

Hemoglobin beta- chain (Hbb)

Malic enzyme, supernatant form (Mod-1)

Isocitrate dehydrogenase, supernatnat form (Id-1)

Serum esterase-1 (Es-1)

Serum esterase-2 (Es-2)

これらは前述の条件を満足しているとは言えない。特に Es-2 型変異は系統間のバラツキがあまりなく [9, 10], 標識遺伝子としての価値があまりないと考えられたが、この Es-2 型変異は Es-1 型変異と同じ泳動像で検出・判定ができるため標識遺伝子に加えた。

材料および方法

今回の調査対象となった系統は現在東京大学医科学研究所実験動物研究施設で維持されている 33 系統、および名古屋大学農学部で維持・育成されている 36 系統の 52 系統、のべ 69 系統である。これらのなかにはまだ近交系として確立していない系統が含まれており、これらの系統の調査時における世代数は、Crn 系 (F16), Pink 系 (F16), Pon 系 (F17), Ponel 系 (F15), Pony 系 (F17), SIIIb 系 (F15) および Xbi 系 (F17) である。各系統の維持集団のカナメを成す一組の交配ペアである

Table 2. Methods for Detection of Biochemical Variants

Locus	Buffer System	Tissue	Substrate	Coenzyme Dye	Other
Hbb	Tris-Borate (pH 9.0)	alkylated RBC		Amido Black 10 B	
Mod-1	Tris-Citrate (pH 6.2)	Kidney	L-Malic acid	NADP NBT*, PMS**	MnCl ₂
Id-1	Tris-Citrate (pH 7.0)	Liver	Na ₃ -Isocitric acid	NADP NBT, PMS	MnCl ₂
Es-1	Tris-EDTA-Borate (pH 8.6)	Plasma	Beta-naphtylacetate	Fast Blue BB Salt	
Es-2		Kidney			

* Nitro Blue Tetrazolium

** Phenazine Methosulfate

Table 3. The Distribution of Alleles at 5 Loci in Certain 69 Strains

Strain	Hbb	Mod-1	Id-1	Es-1	Es-2	Strain	Hbb	Mod-1	Id-1	Es-1	Es-2
A/Jms	d	a	a	b	b	KSB/Nga	s	a	b	b	a
A/Nga	d	a	a	b	b	KR/Nga	s	a	b	b	b
AKR/Jms	d	b	b	b	b	LP/J #	d	a	a	b	b
AY/Nga	d	a	b	b	b	NBR/Nga	s	a	b	b	b
BALB/cJms*	d	a	a	b	b	NC/Jms	s	a	b	b	b
BALB/cJms**	d	a	a	b	b	NC/Nga	s	a	b	b	b
BALB/c ##	d	a	a	b	b	NZB/Jms	d	b	a	a	b
BRSUNT/Jms	d	b	b	b	b	NZB/Nga	d	b	a		b
BS/Nga	s	a	a	b	b	Pink/Nga	p		b	b	b
CBA/Jms	d	b	b	b	b	Pon/Nga	p	a	a	a	b
CBA/Nga	d	a	b	b	b	Ponel/Nga	p	a	b	a	b
CFW/Jms	d	a	b	b	b	Pony/Nga	p	a	b	a	b
CF#1/Jms	d	b	b	b	b	RR/Jms	d	a	a	b	b
Crn/Nga	s	a	b	b	a	SJL/Jms	s	a	b	b	b
CS/Nga	s	a	b	b	b	SS/Jms	s	a	b	b	b
C3H/Jms	d	a	a	b	b	STR/Jms	s	b	b	b	b
C3Hf/Nga	d	a	a	b	b	SW/CNga	d	a	b	b	b
C57BL/6Jms	s	b	a	a	b	SII/Jms	s	a	b	b	a
C57BL/Nga	s	b	a	a	b	SIIT/Nga	s	a	b	b	a
C57BL/10Sn #	s	b	a	a	b	SIIb/Nga	s		a	a	b
C57L/Jms	s	b	b	a	b	WHT/Ht #	s	a	a	b	b
C57L/Nga	s	a	b	a	b	WN/Nga	s	b	a	a	b
DBA/Jms	d	a	b	b	b	Xbi/Nga	s	b	a	a	b
DBA/1Jms	d	a	b	b	b	129/J #	d	a	a	b	b
DBA/1J #	d	a	b	b	b	129/Re ##	d	a	a	b	b
DBA/2Jms	d	a	b	b	b	I-TES/Nga	s	a	b	b	a
DBA/2Nga	d	a	b	b	b	II-TES/Nga	s	a	b	b	b
DCR/CNga	s	a	b	b	b	IX-BL/Nga	s	a	a	b	b
DDD/Jms	s	a	b	b	b	IX-BL-at/Nga	s	a	a	b	b
DDK/Nga	s	a	a	b	b						
FM/Jms	d	a	b	b	b						
HTH/Jms	s	b	a	b	b						
HTH/Nga	s	b	a	b	b						
HTI/Jms	s	b	a	a	b						
HTI/Nga	s	b	a	a	b						
HR/Jms	d	a	a	b	b						
IMV/Nga	d	a	b	b	b						
KK/Jms	s	a	a	b	a						
KK/Nga	s	a	a	b	a						
KOMA/Jms	s	a	a	b	b						

Es-1 locus of NZB/Nga was found to be heterozygous.

Details are shown in the paper of Mizuno and Kondo (1976).

* from Simonsen Laboratories, Inc.

** from Sloan-Kettering Institute

maintained by Institute of Medical Science

maintained by Nagoya University

雌雄各一匹づつを試料に供した。

方法にはデンブングルを支持体とした水平電気泳動法を用い、更に各々の蛋白酶素に特異的な組織化学反応により各生化学的変異の遺伝子型を判定した。泳動条件および染色法は、Hbb 型変異には Hutton [2], Mod-1 型変異には Chapman ら [1] の変法, Id-1 型変異には Shaw and Prasad [11], Es-1 型および Es-2 型の各変異には Ruddle ら [10] の変法をそれぞれ用いた。なおこれらの方法の詳細を表 2 に示す。

今回選んだ標識遺伝子に関し、C 57 BL/6J 系および DBA/2 系両系統の遺伝子型は下記のようになっており、[9], Es-2 遺伝子座を除く他の 4 遺伝子座が互いに対立する遺伝子に固定しているため、今回の調査においてはこれら両系統を比較対照の基準とした。

C57BL/6J Hbb^b Mod-1^b Id-1^a Es-1^a Es-2^b
DBA/2 Hbb^a Mod-1^a Id-1^b Es-1^b Es-2^b

又 Hbb^p は Pink 系 (この Pink 系の Hbb^p については後に AU/J 系 [9] で同定した) を、Es-2^a は KK 系をそれぞれ基準とした。なお本調査は 1974 年 9 月より 1976 年 3 月にかけて行われた。

成績および考察

得られた泳動像を図 1-4 に、調査結果を表 3 に示す。表 3 の配列は縦に系統を、横に遺伝子座を取ってある。系統はアルファベット順に掲げ、調査対象となった両維持機関で重複する系統も省略せずに示した。

今回の調査より我が国を起源とする系統の生化学的変異が総合的に明記された。材料および方法の項で示した近交系育成途中の 7 系統に関して調査された遺伝子座位は既に固定していることが判明した。更に当然ではあるが前回報告した NZB 系の Es-1 遺伝子座位以外の調査個体における遺伝子座位はすべて固定していた。

次に A 系, KK 系など医科学研究所・名古屋大学農学部の間機関で維持されており、しかも既に亜系として確立している系統の遺伝子組成の比較、あるいは既に報告のある同一名の系統との比較を行った場合、NZB 系を含む次の 3 系統では一部の遺伝子座位がそれぞれ異なった対立遺伝子に固定していることが発見された (表 4)。すなわち CBA 系に関して CBA/J 系は Mod-1 遺伝子座位および今回の調査には加えなかったが Ldr-1 遺伝子座位がそれぞれ Mod-1^b および Ldr-1^a である [9] のに対し、CBA/Jms 系 (Sweden の Karolinska 研究所由来) は Mod-1^b および Ldr-1^b, CBA/Nga 系

Table 4. Strains Found to be Fixed with Different Alleles

Strain	Allele
CBA/Jms	Mod-1 ^b , Ldr-1 ^b
CBA/Nga	Mod-1 ^a , Ldr-1 ^a
CBA/J*	Mod-1 ^b , Ldr-1 ^a
CBA/Lon**	— Ldr-1 ^b
C57L/Jms	Mod-1 ^b
C57L/Nga	Mod-1 ^a
NZB/Jms #	Es-1 ^a
NZB/Nga #	Heterozygous
NZB/Hz*	Es-1 ^b

* Roderick et. al., (1971)

** Martin and Petras (1971)

Mizuno and Kondo (1976)

(国立遺伝学研究所由来) は Mod-1^a および Ldr-1^a にそれぞれ固定していることが判明した。これら 3 亜系について他の 4 遺伝子座位 (Hbb, Id-1, Es-1, Es-2) がすべて一致していること、Mod-1 遺伝子座位と連関している Serum transferrin (Trf) 遺伝子座位 [3, 13] が、CBA/Jms 系と CBA/Nga 系の両系統とも Trf^a に固定しており Shreffler の報告 [13] と一致していることから、上記の原因として単純な交配ミスとは考えられない。又 CBA/Lon 系が Ldr-1^b であるという報告 [7] もあることから、この原因としてこれら両遺伝子座位がまだ均一になっていない段階で他の機関へ譲渡された後、それぞれ対立する遺伝子に固定した可能性が強いと思われる。同様のことが C57L 系の Mod-1 遺伝子座位にも観察され、C57L/Jms 系 (Sweden の Karolinska) 研究所由来は Mod-1^b, C57L/Nga 系 (国立遺伝学研究所由来) は Mod-1^a であった。このような例は著者の前回の報告 [8] にもあるように、NZB 系の Es-1 遺伝子座位にも観察されており、前回の報告にも述べたようにこれらの事柄は実験動物を利用する立場から見れば、異なる機関、研究所で維持されている同一名の系統を遺伝的に同一視して良いか否かという問題を提起していると考えられる。

今回の調査対象となった系統を近藤 [4] に従い、その起源により分類すれば次のようになる。

(1) KK, NC など我が国では古くから愛玩動物として維持されているマウスを起源としている系統

(2) BALB/c, CBA, C3H のように戦後主にアメリカ

Fig. 1. Plasma (channels 1-4) and kidney (channels 5-8) esterase zymograms using beta-naphthylacetate as a substrate. Mice and their esterase (Es-1 and Es-2) genotypes are follows.
 Channels (1) and (5); SII, Es-1^b/Es-1^b, Es-2^a/Es-2^a.
 Channels (2) and (6); C57BL/10, Es-1^a/Es-1^a, Es-2^b/Es-2^b.
 Channels (3) and (7); SII × C57BL/10) F₁, Es-1^a/Es-1^b, Es-2^a/Es-2^b.
 Channels (4) and (8); DBA/2, Es-1^b/Es-1^b, Es-2^b/Es-2^b.

カから導入された系統

(3) ドイツマウスと呼ばれており、明治以後輸入されて広く医学界で用いられている conventional mice. 系統化されたものもある。

(4) 異なる起源の系統の交雑により育成された系統
 および今回の調査対象となった系統は属していないが、

(5) 日本の野生マウス (*Mus musculus molossinus*) から育成された系統

この分類に従い今回の調査結果から得られた遺伝子分布を対応させてみると、次のような興味ある知見が得られた。すなわち、(1)のカテゴリーに属する系統群の Hbb 遺伝子座位がすべて Hbb^a に固定しており、C57 祖先の系統を除く(2)の系統群は Hbb^a に固定している。更に(2)の系統群には見られない Es-2^a が(1)の系統群の K

Fig. 2. Zymogram of Hemoglobin beta-chain (Hbb). The lower 4 samples are alkylated with iodoacetate and the upper 4 are untreated. Mice and their Hbb genotypes are follows.
 Channels (1) and (5); DBA/2, Hbb^a/Hbb^a.
 Channels (2) and (6); C57BL/6, Hbb^a/Hbb^a.
 Channels (3) and (7); Pink/Nga, Hbb^b/HHbb^b.
 Channels (4) and (8); (C57BL/10 × DBA/2) F₁, Hbb^a/Hbb^a.

Fig. 3. Zymogram of Isocitrate dehydrogenase, supernatant form (Id-1). Mice and their Id-1 genotypes are follows.
 Channels (1) and (5); C57BL/6, Id-1^a/Id-1^a.
 Channels (2) and (4); (C57BL/6 × DBA/2) F₁, Id-1^a/Id-1^b.
 Channel (3); DBA/2, Id-1^b/Id-1^b.

Fig. 4. Zymogram of Malic enzyme, supernatant form (Mod-1). Mice and their Mod-1 genotypes are follows.

Channel (1); C57BL/6, Mod-1^b/Mod-1^b.

Channel (2); (C57BL/6 × DBA/2) F₁, Mod-1^a/Mod-1^b.

Channel (3); DBA/2, Mod-1^a/Mod-1^a.

K, KSB などの系統に認められた。同じく Pink 系および Pink 系と他系統との交雑により育成された Pon, Pony などの系統が Hbb^p に固定しており、他系統に比ベユニークな存在であることが判明した。なお Pink 系は(5)のカテゴリーに属する野生マウスとの交雑があったと思われるマウスを起源としている系統である。このほかには顕著な特徴は見られないが、特に Hbb 遺伝子と起源の対応が明確に見いだされたことは、ヘモグロビンの生理機能との関連を暗示するかも知れない。

どのような原因であれ、系統の遺伝的組成が変化する危険性はないとは言えず、かりにこのような事態が生じたとしてもこれを早期に発見できれば混乱は最少限におさえられる筈である。そのためには常時系統の遺伝的チェックが必要であろう。それゆえ今回の標識とした Hbb, Mod-1, Id-1, Es-1, Es-2 の各遺伝子座位と毛色を支配する遺伝子座位 (A, B, C, D, S) の合計10遺伝子座位を用いた系統の遺伝的チェックの問題について多少の考察を加える。

本調査では AY, KK などの系統がこれら 10 遺伝子座位に関してユニークなパターンを示した。この意味で

はこれらの系統のチェックは可能となるわけである。しかしこれは調査した系統の範囲内で論ずる場合であり、必ずしも絶対的というわけではない。しかしこれら10遺伝子座位のチェックを行うことによりある程度の効果は得られるものと期待される。これに反し、異なる系統が同一のパターンを示した例も見られ、表3に見られるようにA系および BALB/c 系ではいずれもアルビノ (—cc—), Hbb^a, Mod-1^a, Id-1^a, Es-1^b, Es-2^b のパターンを、C57BL/6 系・C57BL/10 系および HTI 系ではいずれもブラック (aaBBCCDDSS), Hbb^s, Mod-1^b, Id-1^a, Es-1^a, Es-2^b のパターンを示した。現在の段階ではこれら系統間での交雑が生じた場合にはチェックは不可能となるが、前者の例では更に Tester 系 (aabbCCddss) [5] と交配すれば、A 系 (aabbcc) と BALB/c 系 (AAbbcc) の区別が可能となり両系統間の交雑の有無の判断は容易になる。しかしこの場合でも検定する動物が交配可能でなければならず、しかも後代検定によるという煩しさを持つことは言うまでもない。このような系統についてチェックを容易にするためには生化学的標識遺伝子の数を増やすか、あるいは H-2 遺伝子座位のような他の標識遺伝子を導入する必要があると考えられる。

いずれにせよ系統の維持、生産の段階で同じ毛色を有する系統、特にアルビノの系統同志の交雑があった場合や、不可視的な突然変異が生じたりした場合は現場で判断することは不可能である。このような事態を見のがすことにより系統を用いた動物実験に重大な誤りを犯すことのないように、これらの系統を同じ室で維持しないとといった面での配慮が必要であろう。しかし我が国の現状では実行することは不可能に近く、この点からも生化学的標識遺伝子を用いた系統の遺伝的チェックを行うことは重要であろう。又生化学的標識遺伝子は老令マウスを試料とした場合でも十分に調査可能であり、しかも遺伝子座位の大部分が共優性を示すため、遺伝子型が直接判定できるという長所を持つ。生化学的変異を支配する遺伝子座位が多数知られていることも有利な条件のひとつである。

このような遺伝的チェックが日常化され、その際ある系統に從來持っていた遺伝子と異なる遺伝子が出現した場合、他の標識遺伝子を総合的に検討することによりその異なった遺伝子が交配ミスによるものか、突然変異によるものかの判断を容易にするであろう。

要 約

東京大学医科学研究所および名古屋大学農学部で維持されている系統の生化学的標識遺伝子 (Hbb, Mod-1, Id-1, Es-1, Es-2) の調査を行い,

(1) CBA 系の Mod-1 遺伝子座位および今回の調査には加えなかったが Ldr-1 遺伝子座位, C57L 系の Mod-1 遺伝子座位がそれぞれ異なった対立遺伝子に固定している垂系の存在することが明らかになった。

(2) 我が国を起源とする系統と, 戦後外国より輸入された系統について, 特に Hbb 遺伝子座位に顕著な差が見られた。

(3) 交配ミスや突然変異による系統の遺伝子組成の変化を早期に発見するため, これらの生化学的標識遺伝子を用いて系統の遺伝的チェックを行うことの重要性を示唆し, チェックの際の問題点について多少の考察を加えた。

文 献

- [1] Chapman, V. M., Ruddle, F. H., and Roderick, T. H. (1971). Linkage of Isozyme Loci in the Mouse: Phosphoglucosmutase-2 (Pgm-2), Mitochondrial NADP Malate Dehydrogenase-2 (Mod-2), and Dipeptidase-1 (Dip-1). *Biochem. Genet.*, 5, 101-110.
- [2] Hutton, J. J. (1969). Linkage Analyses Using Biochemical Variants in Mice. I. Linkage of the Hemoglobin Beta-Chain and Glucosephosphate Isomerase Loci. *Biochem. Genet.*, 3, 507-515.
- [3] Hutton, J. J., and Roderick, T. H. (1970). Linkage Analyses Using Biochemical Variants in Mice. III. Linkage relationships of Eleven Biochemical Markers. *Biochem. Genet.*, 4, 339-350.
- [4] Kondo, K. (1971). Improvement and Establishment of Inbred Mouse Strain in Japan. *Exp. Animals*, 22 Suppl., 271-276.
- [5] 近藤恭司・江崎孝三郎(1961), マウスの毛色遺伝子に対するテスター系統の育成, 実験動物, 11, 194-196.
- [6] 近藤恭司・野沢謙・富田武・江崎孝三郎(1957). 日本在来マウスから育成した系統, 実験動物, 6, 107-112.
- [7] Martin, J. E., and Petras, M. L. (1971). Two erythrocytic lactate dehydrogenase variants in the house mouse, *Mus musculus*. *Anim. Blood Grps Biochem. Genet.*, 2, 229-237.
- [8] 水野充・近藤恭司(1976). NZB 系マウスの Es-1 遺伝子座位に見られた多型性の研究. 実験動物, 25, 291-295.
- [9] Roderick, T. H., Ruddle, F. H., Chapman, V. M., and Shows, T. B. (1971). Biochemical Polymorphisms in Feral and Inbred Mice (*Mus musculus*). *Biochem. Genet.*, 5, 457-466.
- [10] Ruddle, F. H., Shows, T. B., and Roderick, T. H.: Esterase Genetics in *Mus musculus* (1969). Expression, Linkage, and Polymorphism of Locus *Es-2*. *Genet.*, 62, 399-399.
- [11] Shaw, C. R., and Prasad, R. (1970). Starch Gel Electrophoresis of Enzymes — A Compilation of Recipes. *Biochem. Genet.*, 4, 297-320.
- [12] Shows, T. B., and Ruddle, F. H. (1968). Function of the Lactate Dehydrogenase B Gene in Mouse Erythrocytes. Evidence for Control by a Regulatory Gene. *Proc. N. A. S.*, 61, 574-581.
- [13] Shreffler, D. C. (1963). Linkage of the Mouse Transferrin Locus. *J. Hered.*, 54, 127-129.
- [14] Smithies, O. (1953). Zone Electrophoresis in Starch Gels. Group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, 61, 629-641.
- [15] Sttats, J. (1972). Standarized Nomenclature for Inbred Strains of Mice: Fifth Listing. *Cancer Res.*, 32, 1609-1646.