

ゲノムサイエンスとともに歩む小動物臨床獣医学（Ⅱ）

新田由美子[†]（鈴峯女子短期大学准教授・広島県獣医師会会員）



1 はじめに

哺乳動物の被毛は、色の種類（色域）と配色様式において多様である。人は、哺乳動物たちの美しく珍しい被毛の色や配色に興味を惹かれた。ある飼育者は選択的に育種し被毛の再現を楽しみ、遺伝学者らはその遺伝様式の決定、遺伝子の同定と遺伝子間の相互作用について研究を重ねた。毛色域の多様性は、育種・遺伝学研究の比較的初期から、たった二つの色素（eumelaninとpheomelanin）の量、質およびその分布だけで決定されると考えられており、Wright Sは「毛色の多様性は、哺乳動物全体にまたがって単一のメカニズムが支配する」と予測した[1]。メンデルの法則再発見から約1世紀を歩み、昨今のゲノム解析により、予測どおり責任遺伝子が同定されてきた。

ラボラトリー・マウスだけでも、現在までに100種類以上の被毛の変異が報告されている（<http://www.informatics.jax.org>）。被毛の変異は、表現型から遺伝子を見つける遺伝学（forward genetics）の発展に大きく貢献した。特に、①器官形成や細胞内小器官の発生に関わる細胞生物学分野、②ホルモンとその受容体の相互作用を研究する生化学分野において、多くの知見が得られた。

筆者は、①の個体発生過程での色素細胞の体内移動を、Cattanach B.M. が執筆したDalmatianの黒色斑点発現のメカニズムを解説する中で紹介した[2, 3]。今回は、②のmelanocortin受容体（Mc1r）とそのリガンドについて、Wright予測の例外として長い間謎であった犬の『優性黒色』の分子機構を、Cattanachらが昨年解明したので紹介する[4]。

紹介する論文は、1世紀にわたる遺伝学分野の知見を積み重ねた成果であり、多少難解と思われた。そこで理解の一助になればと、以下に色素細胞の表現型転換、犬の優性黒色の歴史的背景および犬ゲノム解析の現状について、概略を記載した。文章全体を通して、犬とは、特に断らない限り食肉目イヌ科イヌ族オオカミ種イエイヌ

亜種のことである[5]。

2 色素細胞の表現型転換とは

人の毛髪や体毛は原則単一色であるが、多くの哺乳動物の被毛は一本一本が縞模様（Agouti）になっている。被毛の色は毛幹に含まれる色素により決定される。色素には2種類あり、黒褐色色素のeumelaninと黄色色素のpheomelaninである[6]。これらの色素は、毛包に分布する色素細胞が産生・分泌し、角化上皮細胞が取込んで毛幹へと移動させる。色素細胞は2種類の色素産生を、1種類の受容体（Mc1r）を介して転換させる。この仕組みを『色素細胞の表現型転換』といい、これに関与する遺伝子群の変異が、哺乳動物の毛色域の多様性をもたらす。色素細胞の表現型転換を制御する受容体とリガンドの関係を簡単な表にした（表1）。

3 犬の優性黒色の歴史的背景

人は約15,000年前から、犬を家畜化してきた[7]。本格的な育種は約200年前からで、ごく少数の母集団で育種を開始し、利用目的に応じて多様な犬種を作出した。その交配記録とミトコンドリアDNAの多様性を調べることで、多くの犬種について相互の近縁関係を遡ることができる。

被毛の色域に着目すると、犬の祖先であるオオカミは野生型（暗褐色、Agouti）であるが、犬には黄色や黒色がある。Little C.C.は、人に最も身近な哺乳動物の犬がWrightの予測の例外であることを、克明なリンケージ解析により報告した[8]。犬に『優性黒色』をみつけたのである。Littleも当初はそのメカニズムをAgouti領域の変異の一つと考えたが、リンケージ不均一性が残り、これを説明する遺伝子座としてK領域を想定せざるを得なかった[9]。

20世紀後半になって、遺伝子が一つずつ同定されてゆく過程で、人でpropiomelanocortinから派生するペプチド類（ α -melanocortin stimulating hormoneなど）と反応する分子として受容体、MC1Rがみつかった[10]。これによりWrightの予測は、「ほとんどの哺乳動物で、毛色発現はMc1rを介して制御される。Mc1r遺

[†] 連絡責任者：新田由美子（鈴峯女子短期大学食物栄養学科）

〒733-8623 広島市西区井口4-6-18 ☎082-278-1103 FAX 082-277-0301 E-mail: yumiko-n@df7.so-net.ne.jp



図1 黄色のGolden Retriever (左)と黒色の雑種犬 (右)

ついに2007年、犬の被毛の黄色/黒色は、3つの遺伝子：Mc1r, Agouti及び β -defensin103, により制御されていることが明らかになった [4]。3遺伝子とも野生型の場合、Mc1rへ拮抗リガンドであるAgoutiが結合してeumelanin形成を抑制し、黄色の表現型になる。Mc1rが機能喪失性変異型の場合、残りの2遺伝子の変異の有無にかかわらずeumelaninが形成されず、黄色の表現型になる。Mc1rとAgoutiが野生型で、 β -defensin103がグリシン欠損変異型の場合、Mc1rに β -defensin103グリシン欠損型が結合してeumelaninを産生し、黒色の表現型になる。

表1 色素細胞の表現型転換を制御する遺伝子Mc1rとAgouti

	Mc1r	Agouti
機能	ホルモン受容体	Mc1rリガンドの一つ
発現している細胞	メラニン産生細胞	特殊な皮膚上皮細胞
存在部位	細胞膜	細胞質
シグナル伝達上の特徴	セカンドメッセンジャー：cAMP*	N-末のペプチドを細胞外へ分泌
Eumelanin産生への関与と表現型	機能獲得性変異により色素産生を活性化し、黒色。	野生型は、優性ホモ (AA), ヘテロ (Aa) で縞模様, 暗褐色. 劣性ホモ (aa) で黒色。
Pheomelanin産生への関与と表現型	色素産生を抑制し、黒色。	機能獲得性変異により色素産生を活性化し、黄色。
人ゲノム情報	OMIM** #155555	OMIM#600201

* : cyclic adenine monophosphate ** : online Mendelian inheritance in man

伝子の変異は劣性ホモで黄色を、Mc1rのリガンドの一つであるAgouti遺伝子の野生型は優性で灰褐色を、Agouti遺伝子の変異は劣性ホモで致死性黄色を、対立遺伝子であるagoutiは劣性ホモで黒色を、もたらす。」と、科学的に説明できた。しかしまだ、犬の『優性黒色』発現の詳細なメカニズムを説明できなかった。図1に犬の代表的な毛色を示す。

4 犬ゲノム解析の現状

犬の『優性黒色』発現メカニズムの解明には、ゲノムサイエンスにおける2つの進展が大きく貢献した。犬ゲノムの解読と [11], 人ゲノムとのシンテニー検索による遺伝子地図の完成である (<http://vega.sanger.ac.uk>)。驚くことに犬の『優性黒色』発現機構は、皮膚の自然免疫を担当する β -defensinをリガンドとするMc1rを介する反応であった。

β -defensinは比較的小型のペプチド分子で、上皮細胞で発現されて細菌やカビ類に対する生体の自然免疫の

役割を果たす。人では、気道及び肺胞, 消化管, 尿道, 子宮の上皮細胞で発現され、発現低下はクローン病や嚢胞性繊維症と、過剰発現は皮膚の過敏性反応と、それぞれ関係があることが報告されている (OMIM #606611)。

地球上で、哺乳綱に分類される動物は約4120種であるが [5], β -defensinsをリガンドとするMc1rを介した毛色制御機能の報告は犬だけである。黒色被毛のうち『優性黒色』の遺伝子型を持つ犬は、自然免疫能が高いのだろうか。もしそうなら、ペットとして犬を選択する人へ、『黒色』を推薦することには意味がある。一方、黒色被毛犬の遺伝子型とメラノーマの発生頻度との相関について、検証の必要性もある。このように、犬の毛色域が犬の一般的健康状態すなわち小動物臨床獣医学と関連することが、ゲノム研究でまた一つ判明した。少なくとも人や犬のゲノムはdefensin遺伝子クラスターを有し、それは、外界からの微生物の侵入に抵抗してきた歴史であった。

以下にCattanachらの論文を紹介する。

β -defensin のグリシン欠損変異が イエイヌの優性黒色被毛をもたらす

Canlille SI, Kaelin CB, Cattanach BM, Yu B, Thompson DA, Nix MA, Karens JA, Schmutz SM, Millhauser GL, Barsh GS : Science, 318, 1418-1423 (2007)

犬の K 領域

ほとんどの哺乳動物の毛色発現は2つの遺伝子が鍵を握り、色素細胞の表現型転換を行う(表1参照)。犬では黒色被毛の発現に優性黒色というリンケージ不均一性があり、2つの遺伝子では説明できず、第3の遺伝子が予測された[8]。第3の遺伝子は、犬染色体16番長腕K領域にマップされ、3つの変異型：黒色(K^B)、茶褐色(k^{br})および黄色(k^y)があった[12]。

育種家内あるいは育種家間の毛色多様性の解析

BoxerとGreat Daneで、各々 k^y の雌に K^B の雄を交配させてF1世代を、F1の雄を k^{br} または k^y 雌と交配させF2世代をそれぞれ作出し、2家系3世代の犬についてリンケージ解析を行った。一方で、人ゲノムとのシクエンスから、犬のK領域は人 β -defensins遺伝子のクラスター領域と一致した。両者の結果から、K領域を320Kbにまで狭めた[12]。この領域に存在する12個の β -defensins遺伝子のうち9遺伝子についてゲノムをシクエンスし、 K^B の多型をみつけた。この多型を示した遺伝子は人の β -defensin103遺伝子に相当し、exon2のN-末を3bp欠失するグリシン欠損変異であった。

K^B で黒色、 k^y で黄色という表現型の違いがグリシン欠損によるのかどうかを調べた。38の独立した育種家から、454匹の犬の血液サンプルを集めた。このうち441匹においてグリシン欠損と表現型とが一致した。グリシン欠損の表現型に合致しない13匹についてAgouti及びMc1r遺伝子をシクエンスしたところ、Mc1rとAgouti遺伝子の相互作用という、色素発現におけるK領域が及ぼす作用より上位の作用により全て説明できた。

以上のことから、 K^B 変異は世界中の犬に共通で、 β -defensinの多型こそがMc1rとAgoutiとによる単純で普遍的な『色素細胞の表現型転換』では説明できなかった『優性黒色』をもたらすK領域機能の本質で、犬の毛色域の表現型を決定する第3の遺伝子と考えられた。

育種家間のリンケージ不均一性もみられ、これは、多型の速度が速いということで説明できた。 β -defensin遺伝子周囲に28多型を確認した。このうち22個が単一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism : SNPs)で、6個が挿入・欠失変異であった。そこで、 K^B と k^y の犬それぞれ16匹について K^B 領域を9146bpの範囲にまで狭めてシクエンスすることにより多型をみつけ、そ

の多型が表現型と連動することを確認した。この9146bpは犬 β -defensin103遺伝子のexon2つとEST2つを含んでいた[13]。 β -defensin103はK領域そのものであり、グリシン欠損変異が K^B 変異であると、結論できた。

β -defensin 遺伝子の発現と機能

β -defensin 遺伝子群の皮膚におけるmRNA発現を調べた。黄色(k^y/k^y) Dobermanの皮膚と黒色(K^B/k^y)雑種犬の皮膚から、RNAを採取した。19個の β -defensin 遺伝子についてmRNAの発現をRT-PCR法で調べたが、発現を認めたのは2種類(β -defensin101と β -defensin103)のみであった。定量的RT-PCR法で β -defensin101、 β -defensin103及びAgouti遺伝子のmRNA発現量を調べたところ、発現量と毛色表現型との関係はなかった。

β -defensin103遺伝子のペプチド発現を調べた。マウス皮膚細胞株に犬 β -defensin103あるいはそのグリシン欠損型のDNAを導入してペプチド発現量を調べたところ、グリシン欠損型の発現量の方が多かった。グリシンの欠損は、細胞内 β -defensin103のRNAプロセッシングに影響を与えないものの、細胞外濃度を高めることが判った。

β -defensin103ペプチドの機能を調べた。犬の β -defensin103または β -defensin103グリシン欠損型のcDNAをもつトランスジェニック・マウス(TGマウス)を作製した。マウスの毛色の遺伝的背景にはagoutiを用いた。グリシン欠損型cDNAのTGマウスは黒色であったものの、正常型cDNAのTGマウスは黄色でなく20/21個体で黒色となった。このことから、 β -defensin103ペプチドのmelanocortinシグナル伝達経路への関与に、3つの可能性が考えられた。①Mc1rに結合して活性化する。②Mc1rに結合してAgoutiタンパク質による抑制を妨げる。③Agoutiタンパク質に結合して、Agoutiタンパク質を分解・変性させる。

これらの可能性を検証するため、 β -defensinペプチドを合成し、Mc1r及びAgoutiタンパク質との反応実験を行った。株化色素細胞中で、melanocortin stimulating hormone (Mc1rの既知リガンド)はシグナル伝達系を活性化させる一方、 β -defensin103ペプチド及び β -defensin103グリシン欠損ペプチドはその活性化を起さなかった。Mc1rとの結合実験で、両ペプチドとAgoutiタンパク質との相互作用はなく、 β -defensin103グリシン欠損ペプチドのMc1rへの親和性が最も高かった。犬の皮膚における β -defensin103のmRNA発現量はAgoutiのその300倍であった。犬の β -defensin103遺伝子を導入したTGマウスが黒色の表現型を呈した事実と一致した。

β -defensin103ペプチド及び β -defensin103グリシ

ン欠損ペプチドは、人でもマウスでも Mc1r リガンドの一つであることが判った。β-defensins の一般的機能は、本来のリガンドがない場合に、Mc1r シグナル伝達の基礎レベルを上げるのではないか。

K領域のゲノム進化

グリシン欠損変異 (K^B) は、k^v を祖先として起こったのであろう。しかも、哺乳動物のβ-defensin103ゲノムには、動物種間の塩基配列相同性を比較しても gap や insertion はないので、イヌ科イヌ族オオカミ種からイエヌ亜種が分岐した直後に起こった変異に違いない。

最後に、図1の写真を提供いただいた末永昌美獣医師（長崎県諫早市食肉衛生検査所）と和田安弘獣医師（広島県東広島市わだ動物病院院長）に感謝する。

参 考 文 献

- [1] Wright S : Colour inheritance in mammals, *Journal of Hereditary*, 8, 224-235 (1917)
- [2] Cattanaach BM : The Dalmatian dilemma, *Journal of Small Animal Practice*, 40, 193-200 (1999)
- [3] 新田由美子 : ゲノムサイエンスとともに歩む小動物臨床獣医学, *日本獣医師会雑誌* 60, 165-167 (2007)
- [4] Candille SI, Kaelin CB, Cattanaach BM., Yu B, Thompson DA, Nix MA, Kerns JA, Schmutz SM, Millhauser GL, Brash GS : A β-defensin mutation causes black coat colour in domestic dogs, *Science*, 318, 1418-1423 (2007)
- [5] 原田英司, 西川輝昭, 吉村克生 : 生物分類表, 生物学事典, 岩槻邦男編, 1535-1617, 岩波書店, 東京 (1996)
- [6] 若松一雅, 伊藤祥輔 : メラニンの構造と機能, 色素細胞, 松本二郎, 溝口昌子編, 119-134, 慶応大学出版, 東京 (2001)
- [7] Wayne RK, Vila C : Phylogeny and origin of the domestic dog. *The genetics of the dog*, Ruvinsky A, Sampson J eds, 1-13, CABI Publishing, Oxford (2001)
- [8] Little CC : *The inheritance of coat color in dogs*, Comstock, NY (1957)
- [9] Sponenberg DP, Rothschild MF : Genetics of coat colour and hair texture. *The genetics of the dog*, Ruvinsky A, Sampson J eds, 61-85, CABI Publishing, Oxford (2001)
- [10] Mountjoy K, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD : The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors, *Science*, 257, 1248-1251 (1992)
- [11] Lindblad-Toh K, et al : Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog, *Nature*, 438, 803-819 (2005)
- [12] Kerns JA, Cargill EJ, Clark LA, Candille SI, Berruere TG, Olivier M, Lust G, Todhunter RJ, Schmutz SM, Murphy KE, Barsh GS : Linkage and segregation analysis of black and brindle coat color in domestic dogs, *Genetics*, 176, 1679-1689 (2007)
- [13] Palmer LE, O'Shaughnessy AL, Preston RR, Balija VS, Nascimento LU, Zutavern TL, Henthorn PS, Hannon GJ, McComnil WR : A survey of canine expressed sequence tags and a display of their annotations through a flexible web-based interface, *Journal of Hereditary*, 94, 15-22 (2003)