
原 著

マウス歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) 遺伝子の cDNA のクローニング

新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野 (主任: 辻省次教授)

小 宅 睦 郎

Molecular Cloning of Murine Homologue Dentatorubral-
pallidolusian Atrophy (DRPLA) cDNA

Mutsuo OYAKE

*Department of Neurology, Clinical Neuroscience branch,
Brain Research Institute, Niigata University
(Director: Prof. Shoji TSUJI)*

Dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA) is an autosomal dominant neurodegenerative disease caused by expansion of an unstable CAG repeat in a novel gene mapped to chromosome 12p. Although nucleotide sequence of this gene transcript and its expression in both normal and affected individuals are determined, the functions of this gene product and the mechanisms responsible for selective neuronal death remain to be elucidated. As a first step to develop an animal model for DRPLA, we isolated a murine homologue cDNA for DRPLA. The consensus cDNA spanned 4103 bp. encoding 1175 amino acids protein. The murine homologue exhibited 86% nucleotide and 92% amino acid identities to the corresponding human sequences. Nucleotide sequence analysis revealed that murine cDNA contained shorter CAG repeat than that of human DRPLA cDNA. The CAG repeat ranged from three to eight repeat. The numbers of CAG repeats varied among different phylogenetic mice but were constant within the same phylogenetic ones. Northern blot analysis revealed that a single 4.5 kb. transcript

Reprint requests to: Mutsuo Oyake M.D.
Department of Neurology, Brain Research
Institute, Niigata University
Niigata City 951-8585 JAPAN.

別刷請求先: 〒951-8585 新潟市旭町通1
新潟大学脳研究所
臨床神経科学部門神経内科学分野

小宅睦郎

was widely expressed in all tissues examined and most abundant in brain. During embryonal stages, DRPLA mRNA was expressed with little variation.

Key words: Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA), cDNA cloning, murine homologue, CAG repeat
歯状核赤核蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA), cDNA クローニング, マウス相同遺伝子, CAG リピート

はじめに

歯状核赤核蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) は常染色体優性遺伝系式を示す脊髄小脳変性症の一種である。DRPLA は発症年齢により多彩な臨床型を示すことが知られ、進行性ミオクロヌステンカンを示す若年型と進行性の小脳失調と痴呆を主徴とする成人型に大別される¹⁾。DRPLA 患者家系では世代を経るごとに患者の発症年齢が若年化し表現型がより重症化するという表現促進現象が知られ、特に父親から病的遺伝子を受け継いだ場合に顕著である¹⁾。DRPLA の原因遺伝子は1994年に同定され²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾、第12番染色体短腕に存在する未知の遺伝子のポリグルタミンをコードする CAG リピートが患者では特異的に伸長していることが明らかとなった。そして表現促進現象の分子病態メカニズムとして CAG リピート数が世代を経るごとに増大していくことが明らかとなった⁶⁾。今日までポリグルタミンをコードする CAG リピートの増大が病因として同定されている疾患が DRPLA を含めて8つ、すなわち Spinocerebellar ataxia type 1⁷⁾、2⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾、6¹¹⁾、7¹²⁾、Huntington 病¹³⁾、Machado Joseph 病¹⁴⁾、球脊髄性筋萎縮症¹⁵⁾、が知られている。これらの疾患には共通した特徴として、球脊髄性筋萎縮症を除き常染色体優性遺伝形式をとること、中枢神経系の特定の神経細胞が変性すること、病気を起こすために必要なポリグルタミンの長さが Spinocerebellar ataxia type 6 を除いて40リピート程度であることなどがあげられる。異常な遺伝子産物が神経細胞に対して何らかの有害な機能を獲得して神経細胞死をもたらし、そのメカニズムにも共通した機序があると推定されるが詳細は不明である。そこで本研究においては DRPLA 遺伝子産物の機能を推定し遺伝子発現の時間的空間的な推移を明らかにし、さらに疾患モデルマウスの作成を通じて神経細胞死のメカニズムを解明することを目的としてマウス DRPLA cDNA のクローニングを行った。

材料と方法

(1) cDNA ライブラリーのスクリーニングとマウス cDNA の全塩基配列の決定

ヒト DRPLA cDNA 断片をプローブとして、マウス脳 cDNA ライブラリー (ICR マウス由来, Stratagene 社製) 及びマウス奇形腫由来細胞 (PCC 4細胞) 株 cDNA ライブラリー (Stratagene 社製) をスクリーニングした。スクリーニングに際してプローブとして用いた2種のヒト DRPLA cDNA 断片の位置は 図 1 に示す。それぞれのライブラリーについて約 1.5×10^6 個のファージクローンをスクリーニングした。プローブはランダムプライマー法を用いて [α -³²P] dCTP で標識した。ハイブリダイゼーションは以下の条件で行った。すなわち $5 \times$ SSC, 50%ホルムアミド, $1 \times$ デンハルト液, 20 mMリン酸ナトリウム, 10%デキストラン, 50 mg/dl の変性サケ精子 DNA 存在下に 42°C で18時間行なった。その後フィルターを $0.1 \times$ SSC, 0.1% SDS の溶液で 60°C で30分洗いオートラジオグラフィーを行なった。得られたファージクローンは in vivo excision 法にてプラスミドへ転換した。

得られたプラスミドについて制限酵素地図を作成してその相互関係を決定した。これらのうち 図 1 に示す3種類のプラスミドを塩化セシウム超遠心法により大量調整した。このプラスミドを鋳型としてジデオキシ法にて蛍光自動シーケンサーを用いて全塩基配列を決定した。

(2) マウス DRPLA 遺伝子座の決定

クローン化した DRPLA cDNA の3' 側非翻訳領域に PCR プライマーとしてオリゴヌクレオチド, 5'-CAGCACCCACTGCTCCTTCA-3', 5'-CTTC CCACCTCTGCACACAA-3', を設定し PCR-SSCP 法にて多型の有無を検索した。次に2種類の近交系マウス C57B1/6 と MSM の雑種 F1 マウスをさらに戻し交配した得られた F2 マウス 130 個体について、マウス 6 番染色体上の多型マーカー, GLUT 3, D6 Jpk 2, D6 Jpk 3 とマウス DRPLA cDNA の3' 側非翻訳領域の多型についてタイピングした。このタイ

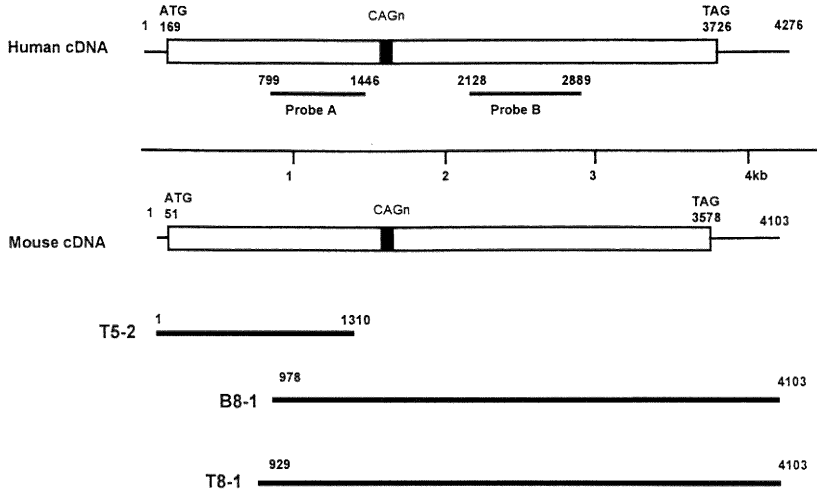


図1 単離したマウス cDNA クローンとヒト及びマウス cDNA の対応
アミノ酸をコードする部分は四角, 非翻訳領域は線で示す. 図中に示す数字は対応する塩基番号を表わす. 塩基配列を決定した3クローンを線でしめす. ヒト cDNA の下にスクリーニングに用いたプローブの位置を示す.

ピングに基づきハプロタイプごとのアレル数を計測した.

(3) マウス DRPLA 遺伝子の CAG リピートの多型の解析

マウス DRPLA 遺伝子の CAG リピート数に多型が認められるかを検討するため, 異なる亜種に属する7系統19種類の野生マウスと人工的に樹立されたマウス6種類についてその CAG リピート数を決定した. 検索したマウスを図6に示す. CAG リピートをはさむように2種類のオリゴヌクレオチド, 5'-CCAGCAGC CCCTACACATCACCAT-3', 5'-GTAAGGGT GTGCATGATGGGAGTT-3'を設定し PCR 法にて CAG リピートを含む DNA 断片を得た. PCR 条件は変性94°C 1分, アニーリング57°C 1分, 伸長72°C 1分で30サイクル行った. 各亜種について図5に示すマウスについては得られた PCR 産物を pT7 blue プラスミドベクター (Novagen 社製) にサブクローニングレジデオキシ法にて塩基配列を決定し CAG リピート数を決定した. 次にすべてのマウスについて [α -³²P] dCTP 存在下に PCR を行い, 5%変性ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し, PCR 産物の大きさにより CAG リピート数を決定した.

(4) ノーザン解析による遺伝子発現の解析

生後1週齢から12週齢までの BALB/C マウスより脳を採取し, イソチオシアン化 Guanidinium 存在下にホモ

ジナイズした後, 塩化セシウム超遠心法にて全 RNA を抽出した¹⁶⁾. 次に全 RNA よりオリゴデックス dT 30 (ロッシュ社製) を用いてポリ A (+) RNA を得た. ポリ A (+) RNA 2 μ g を 0.6 M ホルムアルデヒド入り 1.2%アガロースゲルで電気泳動し, ニトロセルロース膜に転写した. 臓器別並びに胎生期における発現の検索については, Multiple Tissue Northern Blots 膜 (Clontech 社製) を用いた. プローブとして cDNA の 5' 端 1310 bp. を用いた. また発現の強度を定量的に検索するため β アクチンの発現を内部標準とし DRPLA の転写産物のシグナルとの強度比を富士フィルム社製 BAS 2000 で計測した.

結 果

(1) マウス DRPLA cDNA クローンの単離と cDNA 全長の塩基配列

2種類の cDNA ライブラリーより計32クローンをプラスミドとして単離した. プローブ A とプローブ B の双方にハイブリダイズしたものが4クローン, プローブ A のみにハイブリダイズしたものが9クローン, プローブ B のみにハイブリダイズしたものが19クローンであった. 各クローンについて制限酵素地図を作成した後図1に示す T5-2, B8-1, T8-1の3クローンについてプラスミドを大量調整し全塩基配列を決定し

```

1          CGTATTCAGCTGCCAGGCAGAGGAGAATGGGGTCTCCACAGCCTGAAGA
51  ATGAAGACACGACAGATAAAAGACTCGATGTCAATGAGGAGTGGACGGAAAGAGGCC
1   M K T R Q N K D S M S M R S G R K K E A

111  CCCGGGCCCCGGGAAGAGCTGAGATCAAGGGCCGGGCTCCCTCGGAGGGTCAGCACA
21  P G P R E E L R S R G R A S P G G V S T

171  TCCAGCAGTGATGGCAAAGCTGAGAAGTCCAGGCAGACAGCCAAGAAGCCCGGATAGAG
41  S S S D G K A E K S R Q T A K K A R I E

231  GAGCCCTCTGCCCCAAAGCCAGCAAGCAGGGCCGGAGCGAGGAGATCTCAGAGAGTGAG
61  E P S A P K A S K Q G R S E E I S E S E

291  AGCGAGGAGACCAGTGCGCCAAAAAGACCAAAACCAGCAGGAGCTCCCTCGCCCGCAG
81  S E E T S A P K K T K T E Q E L P R P Q

351  TCTCCCTCGGATCTGGCAGCTTGGATGGGCGCAGCATTAAACGATGACGGCAGCAGCGAC
101 S P S D L D S L D G R S I N D D G S S D

441  CCTAGAGATATAGACCAGGACAACCGAAGCACATCCCCAGCATCTACAGCCCGGGCAGC
121 P R D I D Q D N R S T S P S I Y S P G S

471  GTGAAATGACTCGGACTCATCCTCTGGCCTGTCCAGGGCCCCGCCCTACCAC
141 V E N D S D S S S G L S Q G P A R P Y H

531  CCACCTCCACTCTTCCCTCCTCCCTCCACCACCAGACAGCACTCCCCGACAGCCAGAG
161 P P P L F P P S P P P P D S T P R Q P E

591  TCTGGCTTTGAACCTCATCCTTCTGTGCCGCTACTGGATATCATGCTCCGATGGAGCCC
181 S G F E P H P S V P P T G Y H A P M E P

651  CCCACATCGAGATTATTCAGGGCCACCACCTGGAGCTCCTCCACACACCACAGCTC
201 P T S R L F Q G P P P G A P P T H P Q L

711  TACCCTGGGAATGCTAGTGGAGGTGTTTTATCTGGACCCCCCATGGGTCCCAAAGGGGGA
221 Y P G N A S G G V L S G P P M G P K G G

771  GCCGCTGCCTCCTCAGTGGGTGCCCTTAGCGGAGGCAAGCAACACCCCCACCCACTACC
241 A A A S S V G A P S G G K Q H P P P T T

831  CCAATTCCAATATCAAGTCTGGGGCCAGTGGTGTCTCCTCCAGCAAAGCCACCCAGTGT
261 P I P I S S S G A S G A P P A K P P S A

891  CCAGTGGGTGGTGGGAGCTTACCTTCTGCACCACCACCAGCTTCTTCCCCCATGTGACA
281 P V G G G S L P S A P P P A S F P H V T

951  CCAAACCTGCCTCCTCCACCTGCCCTGAGACCCCTCAACAATGCCTCAGCCTCTCCTCCT
301 P N L P P P P A L R P L N N A S A S P P

1011 GGCATGGGGCTCAGCCAATCCCTGGGCATCTGCCCTCCTCCCATGCCATGGGGCAGGGC
321 G M G A Q P I P G H L P S P H A M G Q G

1071 ATGAGTGGACTTCTCCTGGCCCAGAGAAGGGTCCAACCCCTGGCCCCCTTCTCCCCACCT
341 M S G L P P G P E K G P T L A P S P H P

1131 TTGCCCCAGCTTCTTCTCCTGCCCCGGGCTCCAATGCGATATCCATATTCATCTCC
361 L P P A S S S A P G P P M R Y P Y S S S

1191 AGTAGTCTGCCGAGCCTTCTTAGTTCCTCCTCCTCCTCCTGCTCCAGTACCCTGCT
381 S S S A A A S S S S S S S S S A S Q Y P A

```

図2 マウス DRPLAcDNA 全長の塩基配列と予想されるアミノ酸配列

塩基配列の下に予想されるアミノ酸配列を示す。セリン，プロリン，グルタミンの単一アミノ酸の繰り返し配列，アルギニン，グルタミン酸の繰り返し配列を下線で示す。SH3ドメインのリガンドのモチーフを満たす部分を二重下線で示す。

1251 TCCCAGGCCCTGCCAGTTATCCTCATTCTTCCCCcACCAACTAGTATGTCTGTCTCT
 401 S Q A L P S Y P H S F P P P T S M S V S

1311 AATCAGCCACCCAAGTACCCAGCCTTCTCTCCCATCCCAAGCTGTGTGGAGCCAGGGT
 421 N Q P P K Y T Q P S L P S Q A V W S Q G

1371 CCACCTCCTCCTCCTCCCTATGGGCGCCTCTTGGgCAACAACAACCCCATCCAGGCCCT
 441 P P P P P P Y G R L L G N N N T H P G P

1431 TTCCCTCCTACTGGGGTCAATCTACAGCCCACCCAGCAGCCCTACACATCACCATCAC
 461 F P P T G G Q S T A H P A A P T H H H H

1491 CAGCAGCAGCCACAGCAACAACATCATCATGGAAACTCTGGGGCCCTCCACCCGGAGGG
 481 Q Q Q P Q Q Q H H H G N S G A P P P G A

1551 TATCCTCACCTCTAGAGAGCAGTAACTCCCATCATGCACCCCTTACAACATGTACCC
 501 Y P H P L E S S N S H H A H P Y N M S P

1611 TCCCTGGGGTCTTTAAGGCCCTACCCCCAGGGGCAGCACCTGCCTCCACCTCATGGC
 521 S L G S L R P Y P P G A A H L P P P H G

1671 CAGGTGTCTATAACCAAGCAGGTCCCAATGGTCCCCAGTTTCTTCTTCCAACCTCTCC
 541 Q V S Y N Q A G P N G P P V S S S N S S

1731 GGGTCTTCTCTCAAGCCTCCTATTATGTTCACACCCCTTTCATCCAGGGCCCCAA
 561 G S S S Q A S Y S C S H P S S S Q G P Q

1791 GGAGCATCCTACCCCTTCCACCAGTCCCTCCAGTACCACCTCCTCAGCTACCCTTTCC
 581 G A S Y P F P P V P P V T T S S A T L S

1851 ACTGTATCGCCACCGTGGCTTCCTCGCCAGCAGGCTACAAAACAGCTTCGCCACCTGGG
 601 T V I A T V A S S P A G Y K T A S P P G

1911 CCCCCTCAGTACAGCAAGAGACCCCATCCCAGGGTCTACAAGACAGCCACCCCGCCT
 621 P P Q Y S K R A P S P G S Y K T A T P P

1971 GGATACAAACCGGGGTACCACCTCCTTCAGAACAGGGACCCACCCGGCTATCGAGGC
 641 G Y K P G S P P S F R T G T P P G Y R G

2031 ACCTCTCCGCCAGCAGGCCACGGACCTTCAAACAGGTTCCACCGACCGTGGGGCCGGG
 661 T S P P A G P G T F K P G S P T V G P G

2091 CCCCTGCCACCCCGGGGCTTCAAGTTTGCTATCTCTGCCTCCGCCACCTGGGGCCCC
 681 P L P P A G P S S L L S L P P P P A A P

2151 ACTACAGGGCCGCCCTGACCGCCACGCAGATCAAACAGGAGCCGGCGGAAGATATGAA
 701 T T G P P L T A T Q I K Q E P A E E Y E

2211 CCTCCGAGAGTCCGGTGCCTCCGGCCCGCAGCCCTCGGCCCTCCCAAGTGGTGGAC
 721 P P E S P V P P A R S P S A P P K V V D

2271 GTGCCAGCCATGCCAGCCAGTCAGCCAGGTTCAATAAGCACTTGGACCGCGCTTCAAC
 741 V P S H A S Q S A R F N K H L D R G F N

2331 TCGTCCGCGCAGCACCCCTGTACTTCTGTCCGCTGGAGGGCTCCAAGCTGGCCAAGAAG
 761 S C A R S T L Y F V P L E G S K L A K K

2391 CGCGCGACCTGGTGGAGAAAAGTGGCGCGAGGCCGAGCAGCGCGCGCGAGGAGAAA
 781 R A D L V E K V R R E A E Q R A R E E K

2451 GAGCGGAGCGCGAGCGgGAACGCGAAAAGGAGCGCGAGCGGAGAAAGCGCGAGCTG
 801 E R E R E R E R E K E R E R E R E K E R E L

2511 GAGCGCAGTGTGAAACTGGCCCAGGAGGGCCGTGCTCCAGTGGAGTGCCCATCTCTGGGT
 821 E R S V K L A Q E G R A P V E C P S L G

2571 CCAGTGCCCATCGGCTCCCTTTGAGCCTGGCAGCGCTGTGGCTACAGTGCCCCCTTAC
 841 P V P H R P P F E P G S A V A T V P P Y

```

2631 CTGGGTCCTGATACTCCGGCCTTGCGCACTCTCAGTGAATACGCCCGACCTCATGTTCATG
861  L G P D T P A L R T L S E Y A R P H V M

2691 TCTCTGGCAATCGCAACCACCCATTCTATGTGCCCTTGGGGGCAGTGGACCCGGGGCTT
881  S P G N R N H P F Y V P L G A V D P G L

2751 CTGGGTTACAATGTCCCAGCCCTGTACAGCAGCGACCCAGCTGCCCGAGAACGGGAGCGG
901  L G Y N V P A L Y S S D P A A R E R E R

2811 GAAGCCCCTGAACGTAACTCCGTGACCGGCTCAAGCCTGGCTTTGAGGTGAAACCTAGT
921  E A R E R N L R D R L K P G F E V K P S

2871 GAGCTGGAACCCCTACATGGGGTTCCCGGGCCAGGCTGGATCCCTTTCCCGACACGGG
941  E L E P L H G V P G P G L D P F P R H G

2931 GGCCTGGCTCTACAGCCCGGGCCACCTGGCCTGCATCCTTTCCCTTTTCATCCGAGCCTG
961  G L A L Q P G P P G L H P F P F H P S L

2991 GGGCCCTGGAACGAGAACGGCTAGCGCTGGCAGCTGGGCCAGCCTTGCCTCCTGCATG
981  G P L E R E R L A L A A G P A L R P D M

3051 TCTTATGCTGAGCGGTTGGCAGCTGAAAGGCAGCATGCAGAAAGGGTGGCAGCCCTGGGC
1001 S Y A E R L A A E R Q H A E R V A A L G

3111 AATGATCCACTAGCCCGGCTGCAGATGCTCAACGTGACTCCCATCACCACCAGCACTCC
1021 N D P L A R L Q M L N V T P H H H Q H S

3171 CACATCCACTCTCACCTTCACCTGCACCAGCAGGATGCTATCCACGCAGCCTCTGCCTCG
1041 H I H S H L H L H Q Q D A I H A A S A S

3231 GTGCACCCTCTCATTGACCCCTGGCCTCAGGGTCTCACCTTACCCGGATCCCTTACCCA
1061 V H P L I D P L A S G S H L T R I P Y P

3291 GCTGGGACCCTCCCCAACCCCTTCTCCTCACCCCTCTGCACGAGAACGAAGTCTCTCGT
1081 A G T L P N P L L P H P L H E N E V L R

3351 CACCAGCTTTTTGTGTCGCCCTTACCGGGACCTGCCGGCCTCCCTTTCTGCTCCAATGTCA
1101 H Q L F A A P Y R D L P A S L S A P M S

3411 GCGGCTCATCAGCTGCAGCCATGCACGCGCAGTCAGCTGAGCTGCAGCGCTTGGCGCTG
1121 A A H Q L Q A M H A Q S A E L Q R L A L

3471 GAACAGCAGCAGTGGCTACATGCTCATCACCCATTGCACAGCGTGCCTACCTGCCCCAG
1141 E Q Q Q W L H A H H P L H S V P L P A Q

3531 GAAGACTACTACAGTACCTGAAGAAGGAGAGTGACAAGCCGCTGTAGAGCTGCCATCCA
1161 E D Y Y S H L K K E S D K P L *

3591 GACAGCACCCTGCTCCTTCATCCAGACCTTGGAGGACCACCCCAACCTTTTGACCCCA
3651 CCCCACCCCGAGCCGAGGAGAGGGTGTGCCCCTTGCGAGCTCCTGCAGCTGGGTAGA
3711 GGGAGGGAGGAAGAAGGACAGACAAGGTCAGGGCCCGGGTTGTGTGCAGAGGTGGGA
3771 AGTGGCAAGGTTGGGGCAGAAATGCACAGTATCTTGGACCAGGTCCTCCTCCTATCC
3831 CCTGCTTTTCTTCCTCTATGCCGAATCCTTGGTGGCCACTGCCCTCCCTCAACCCAT
3891 TGGTGTGATTTTTTTCATCTGTTAGATGTGGCTGTTTTCGCTAGCATGTGTGTGCTGCCCC
3951 GCCCATCCCTGTGTGTGCACCCCTCCCTCGGCGATATGFGCCCTTACCCGCTCCACACA
4011 TTAATAATTTATATATATAAATATCTATATGATGCTCTTTAAAAAACATCCTGACCAAAA
4071 CCAACCAAAACAAAAACATCCTCACAGTCCCCAG(A)n

```

た。全塩基配列と遺伝子産物のアミノ酸配列を 図 2 に示す。得られた cDNA はポリ A 尾部を除いて全長 4103 塩基対であった。翻訳開始点と推定される ATG コドンの周辺の前 -9 から +4 までの塩基配列は GCCTGAAGAATGA でありヒト cDNA と同様に Kozak のコンセンサス配列¹⁷⁾ とは完全には一致して

いなかった。またヒトと同様にマウス cDNA においても通常認められるポリ A 付加シグナルを認めなかった。マウス DRPLA cDNA のオープンリーディングフレームは 3525 塩基対で 1175 アミノ酸残基をコードしており推定分子量は 125 kDa. であった。マウス cDNA では異なるライブラリーから得られた独立した 2 クローン

において CAG リピート数はいずれも 3 リピートで、正常では 8 から 35 リピートを有するヒト遺伝子と著しい違いを示した。GenBank (release 83) を用いた塩基配列の相同性検索では、ヒト 1 番染色体にマップされる EST, M 78755 と 64.4 % と高い相同性を認めた。ヒト、マウス、ラット cDNA¹⁸⁾ 同士のオープンリーディングフレーム内での塩基配列の相同性はヒト、マウス間では 86%、マウス、ラット間では 92% であった。

(2) マウス DRPLA タンパクについて

マウス DRPLA タンパクは 1175 アミノ酸残基より成っていた (図 2)。既知のタンパクとの相同性はなく機能を推定するドメインやモチーフ構造は認められなかった。ヒト DRPLA タンパクとのアミノ酸配列の相同性は 92% と非常に高い相同性を認めた。一方両タンパクでの相違点としてはポリグルタミンの部分に認められた。即ちマウスタンパクではポリグルタミンは 6 回のグルタミン残基の繰り返しより形成されプロリン残基の挿入を伴っているのに対し、ヒトでは正常では 8 から 35 回のグルタミン残基の繰り返しより成り他のアミノ酸残基の挿入を伴っていなかった (図 3)。DRPLA タンパクにはヒト、マウスともポリグルタミンの他にプロリン残基とセリン残基の繰り返し配列が認められるが、その長さは両種間で保存されており、ポリグルタミンにおける種間の著しい相違と対照を成していた (図 3)。

(3) マウス DRPLA 遺伝子座の決定

戻し交配したマウス 130 匹について GLUT3, DRPLA, D6Jpk2, D6Jpk3 の 4 つの遺伝子座について genotype を決定し、各ハプロタイプのアリル数を記した結果を図 4 に示す。各遺伝子座の遺伝的距離は GLUT3 と DRPLA/D6Jpk2 間で 0.77 cM, DRPLA/D6Jpk2 と D6Jpk3 間が 8.46 cM と推定された。

(4) マウス亜種間における CAG リピート数の多型について

異なる亜種に属する 7 種類のマウスゲノム DNA より得られた DRPLA 遺伝子の CAG リピートとその前後の塩基配列を図 5 に示す。CAG リピートのコンセンサス配列としては (CAG)_nCCACAG であり、n が 3, 4, 5, 8 回と多型を示した。多型は CCA の 5' 側の CAG にのみ認められ 3' 側の CAG には認められなかった。さらに野生マウス 12 種、人為的に系統を樹立されたマウス 6 種について CAG リピート数を計測した。CAG リピート数と野生マウス属の種分化における系統樹を対応させたものを図 6 に示す。野生マ

ウスでは同一の亜種内では CAG リピート数は一致していた。また人為的に系統樹立されたマウスでは MSM マウスを除いて全て 3 リピートであった。

(5) マウス DRPLA 遺伝子の発現

ノーザン解析の結果では検索した全ての臓器、即ち心、脳、脾、肺、肝、骨格筋、腎、精巣で 4.5 kb. の単一のバンドを認めた (図 7-A)。βアクトチンの発現を内部標準として臓器ごとの発現を比較すると脳で最も強い発現が認められた。胎生期においては少なくとも胎生 7 日より発現が確認され、その後ほぼ一様な強さの発現を認めた (図 7-B)。一方脳においては生後 1 週齢から 12 週齢まではほぼ一様な発現を示した (図 7-C)。

考 察

今回マウス DRPLA cDNA 全長をクローニングしその発現についてノーザン解析により検討した。次にその遺伝子座を決定し、DRPLA の CAG リピートの多型の有無について検討した。

マウス DRPLA cDNA は 3525 塩基対のオープンリーディングフレームを有し 1175 アミノ酸残基よりなる未知のタンパクをコードしていた (図 2)。マウス DRPLA 遺伝子はマウス 6 番染色体に存在し 12 番染色体の存在するヒト遺伝子と syntenic であることがわかった (図 4)。ヒト DRPLA 遺伝子とポリグルタミンの長さを除いて非常に高い相同性を有していた。DRPLA タンパクは既知の遺伝子とは相同性がなくその機能は未知であるが、その機能を推定する上で興味深いアミノ酸配列がいくつか認められる。中央よりやや C 末にアルギニンとグルタミン酸の繰り返し配列から成る荷電アミノ酸の連続した部位が 2 箇所認められる (図 3)。ポリグルタミンとアルギニン、グルタミン酸の繰り返し配列の両方を有する既知のタンパクとしてショウジョウバエのホメオタンパクである Bar H2¹⁹⁾ や fsh membrane protein²⁰⁾ が知られており、DRPLA タンパクの機能を推定する上で興味深い。またアミノ酸残基 585 から 590 まで Src homology 3 (SH3) ドメインのリガンドの共通配列 XpΦPpXp²¹⁾ を満たすプロリンに富んだ配列がある (図 3)。これらのモチーフはヒト、マウス、ラットすべてにおいて保存されており、DRPLA タンパクの機能を考えていく上で重要と考えられる。

マウス DRPLA タンパクにおいてはポリグルタミンはプロリン残基の挿入をいれて 6 残基よりなり、正常なヒトで認められる 8 から 35 回のくりかえしと著しい

Human	1	MKTRQNKDSMSMRSGRKKKEAPGREELRSRGRASPGGVSTSSSDGKAEKSRQTAKKARVE	60
Mouse	1I.	60
Rat	1V.	60
Human	61	EASTPKVNQGRSEEISESESEETNAPKKTKEQELPRPQSPDLDSLDRSLNDDGSSD	120
Mouse	61	.P.A..SK.....S.....Q.....I.....	120
Rat	61	.T.T..NK.....S.....I.....	119
Human	121	PRDIDQDNRSTSPSIYSPGSVENDSDSSSGLSQGPARYHPPPLFPSPQPPDSTPRQPE	180
Mouse	121P.....T.....	180
Rat	120P.....I.....	179
Human	181	ASFEPHPSVPTPTGYHAPMEPPTSRMFQ-APPGAPPPHPQLYPG-GTGGVLSGPPMGPKGK	238
Mouse	181	SG.....P.....L..GP.....T.....NAS.....	240
Rat	180	SG.....P.....L..GP.....P.....SAG.....	239
Human	239	GAASSVGGPNGGKQHPPTTPIVSSSSGASGAPPTKPTTTPVGGGNLPSAPPPANFPHVT	298
Mouse	241	A.....A.S.....PI.....A...SA...G.S.....S.....	300
Rat	240	A.....P.S.....PI.....A...NT...A.N.....T.....	299
Human	299	PNLPPPALRPLNNASAPPLGAQPLPGHLPSPHAMGQGMGLPPGPEKPTLAPSPHS	358
Mouse	301M...I.....S.....P.....	360
Rat	300M...I.....S.....P.....	359
Human	359	LPPASSAPAPPMRFYSSSSSSAAAASSSSSSSSASPPASQALPSYPHSFPPPTSL	418
Mouse	361G...Y...S...-A.A...SSS--A.QY...A.....M.....	417
Rat	360G...Y...C...SV...---AAT.QY...T.....M.....	416
Human	419	SVSNQPPKYTQPSLPSQAVWSQG-PPPPPYGRLLANSNAHPGPPFPSTGAQSTAHPPVS	477
Mouse	418-.....G.NNT.....-G.....AAP.....	475
Rat	417P.....P.NST.....G.....PAP.....	475
Human	478	THHHHHQQQQQQQQQQQQQ-HHGNSGPPPPGAFPHLEGGSSHHHAHYAMSPSLGLRP	536
Mouse	476	T...-QQQ--PQ---QOH.....A.....Y.....SSN.....N.....	527
Rat	476	A...-QQQQQPQPQPQOH.....P.....Y.....SSN.....N.....	534
Human	537	YPPGPAHLPPPHSQVSYSQAGPNGPPVSSSSNSSSSTSQGSYPCSHSPSQGQAPYEF	596
Mouse	528	...A...P.G...N.....GS...AS.S...S.....S...F.....	586
Rat	535	...P...S.G...S.....S.....SG...AA.S...S...S...L.....	594
Human	597	PPVPTVTSSATLSTVIATVASSPAGYKTASPPGPPPYGKRAPSPGAYKTATPPGYKPGS	656
Mouse	587	...PV.....Q.S.....S.....	646
Rat	595	...PI.....Q.S.....S.....	654
Human	657	PPSFRGTGTPPYRGTSPPAGPGTFKPGSPTVGPGPLPPAGPSGLPLPPPPAAPASGPPL	716
Mouse	647P.....S.L.....TT....	706
Rat	655R.....S.S.....TT....	715
Human	717	SATQIKQEPAEYEYTPESPVPPARSPSPPKVVDVPSHASQSARFNKHLDRGFNSCARSD	776
Mouse	707	T.T.....P.....A...A.....T.....	766
Rat	715	T.M...T.....V...P.....D.....	774
Human	777	LYFVPLEGSKLAKKRADLVEKVRREAEQRAREEKERERERERERERERELERSVKL	836
Mouse	767	826
Rat	775	834
Human	837	AQEGRAPVECPSLGVPVHRPPFEPGSAVATVPPYLGPDTPALRTLSEYARPHVMSPGNRN	896
Mouse	827	886
Rat	835	894
Human	897	HPFYVPLGAVDPGLLGYNPVALYSSDPAARERERERERDRDLRDLKPGFEVKPSELEPLH	956
Mouse	887N.....	946
Rat	895D.....	954
Human	957	GVPGGLDPPFRHGLALQPGPPGLHPFFHPSLGLERERLALAAGPALRPDMSYAERL	1016
Mouse	947P.....	1006
Rat	955	1013
Human	1017	AAERQHAERVAALGNDPLARLQMLNVTPHHHQSHIHSHLHLHQDAIHAASAVHPLID	1076
Mouse	1007	1066
Rat	1014	1073

Human	1077	PLASGSHLTRIPYPAGTLPNPLPHPLHENEVLRHQLFAAPYRDLPASLSAPMSAAHQIQ	1136
Mouse	1067	1126
Rat	1074	1133
Human	1137	AMHAQSAELQRLALEQQQWLHAHPLHSVPLPAQEDYYSHLKKESDKPL	1185
Mouse	1127	1175
Rat	1134	1182

図 3 ヒト, マウス, ラットの DRPLA タンパクのアミノ酸配列の比較
 共通するアミノ酸は点で, 欠失している部分はハイフンで示す. セリン, プロリン, グルタミンの単一アミノ酸の繰り返し配列, アルギニン, グルタミン酸の繰り返し配列 SH 3 ドメインのリガンドのモチーフを満たす部分を下線で示す.

DRPLA Locus

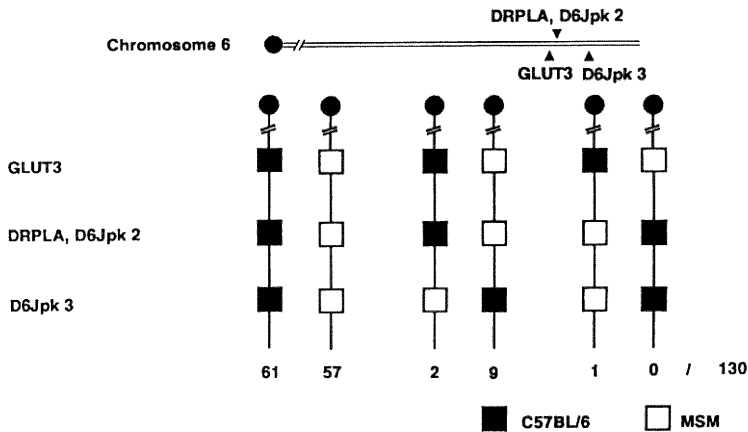


図 4 マウス DRPLA 遺伝子のマッピング

上段にマウス 6 番染色体上の遺伝子座の位置を示す. 下段には C57BL / 6 と MSM マウスの F1 マウスに戻し交配をした F2 マウス 130 個体の各遺伝子のタイピングとハピロタイプごとのアレル数を示す.

相違を示している. 同じポリグルタミン病に属する Huntington 病や Spinocerebellar ataxia 1 の原因遺伝子についてもそのマウスの相同遺伝子²²⁾²³⁾ においてはポリグルタミンはヒトに比べて著しく短いことが知られている. またヒトの疾患とは関連していないが TATA 結合タンパクに存在するポリグルタミンもヒトに比較しマウスでは著しく短い²⁴⁾. 従って長いポリグルタミンは DRPLA タンパクを含めてこれらの遺伝子産物の生理的な機能にとっては必須なものではない可能性がある.

ノーザン解析によると DRPLA 遺伝子は脳を含めて全ての臓器で発現が認められ, また胎生期より発現しており, 生後の脳においても一様に発現し続けていた

(図 7-ABC). 従って空間的・時間的にもほぼ一様な発現していることがわかる. ラット DRPLA 遺伝子の in situ ハイブリダイゼーションによる検討では胎生期より神経系組織をはじめとして一様に発現していることが知られている¹⁸⁾. これらの事実から DRPLA 遺伝子は細胞にとってハウスキーピング遺伝子として機能している可能性が考えられる.

7 亜種 19 系統の野生マウスおよび 6 系統の実験室マウスの CAG リピート数の解析から, マウス DRPLA 遺伝子においては CAG リピートに 3 から 8 リピートの多型が存在することがわかった (図 5). さらに野生マウスについては, 核遺伝子とミトコンドリア遺伝子の多型に基づいて考えられた遺伝的な系統分類²⁵⁾ と

1.	CAT CAC	CAG CAG CAG	---	---	---	---	---	---	---	CCA	CAG	CAA	CAA	CAT
2.	CAT CAC	CAG CAG CAG	---	---	---	---	---	---	---	CCA	CAG	CAA	CAA	CAT
3.	CAT CAC	CAG CAG CAG	---	---	---	---	---	---	---	CCA	CAG	CAA	CAA	CAT
4.	CAT CAC	CAG CAG CAG CAG CAG	---	---	---	---	---	---	---	CCA	CAG	CAA	CAA	CAT
5.	CAT CAC	CAG CAG CAG CAG CAG	---	---	---	---	---	---	---	CCA	CAG	CAA	CAA	CAT
6.	CAT CAC	CAG CAG CAG CAG CAG	---	---	---	---	---	---	---	CCA	CAG	CAA	CAA	CAT
7.	CAT CAC	CAG CAG CAG CAG CAG	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG	CCA	CAG	CAA	CAA	CAT
8.	CAT CAC	CAG CAG CAG CAG	---	---	---	---	---	---	---	CCA	CAG	CAA	CAA	CAT

- H H Q Q Q Q Q Q Q Q P Q Q Q H
1. original cDNA clone (ICR outbred)
 2. *Mus musculus domesticus* Pgn2
 3. *Mus musculus breviostris* Mpl
 4. *Mus musculus musculus* Blg2
 5. *Mus musculus castaneus* Mal
 6. *Mus musculus molossinus* Aiz1
 7. *Mus spretus* Seg
 8. *Mus leggada* Per

図5 様々のマウス亜種における CAG リピート部分の塩基配列

CAG リピートには3, 4, 5, 8リピートの多型が認められる。プロリンをコードする CCA の後も CAG コドンが存在するがこの部分には多型は認められなかった。

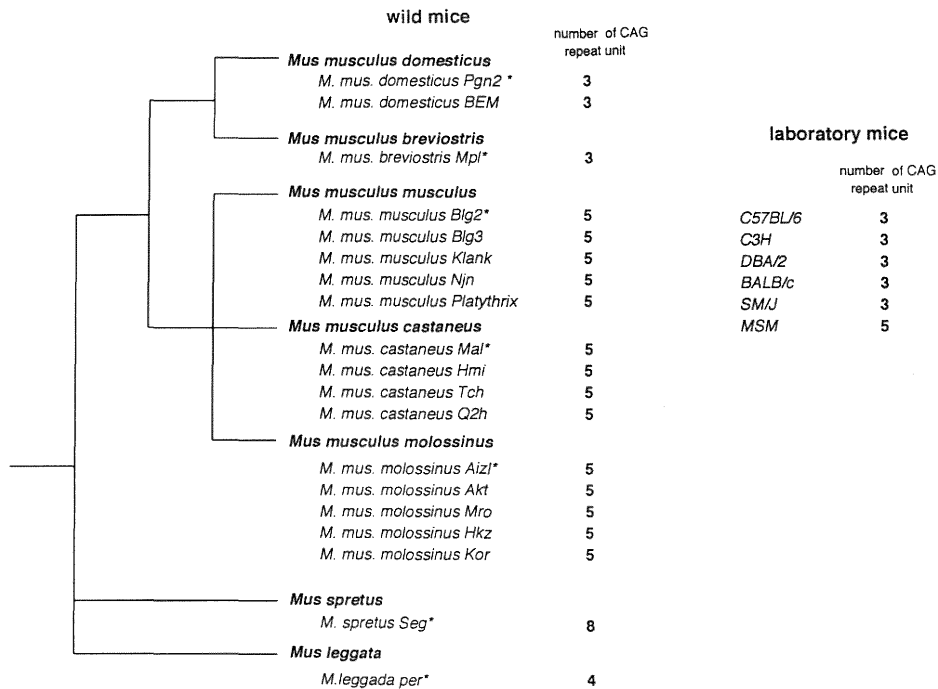


図6 マウス属の亜種に関する系統樹系図と CAG リピート数, 人工的に系統樹立された実験室マウスの CAG リピート数の関係

野生マウスにおいては亜種ごとに CAG リピート数が共通していた。マウス属の亜種の分化に従って CAG リピート数の多型が生じたことが推定された。実験室マウスは MSM を除いて全て 3 リピートを示した。

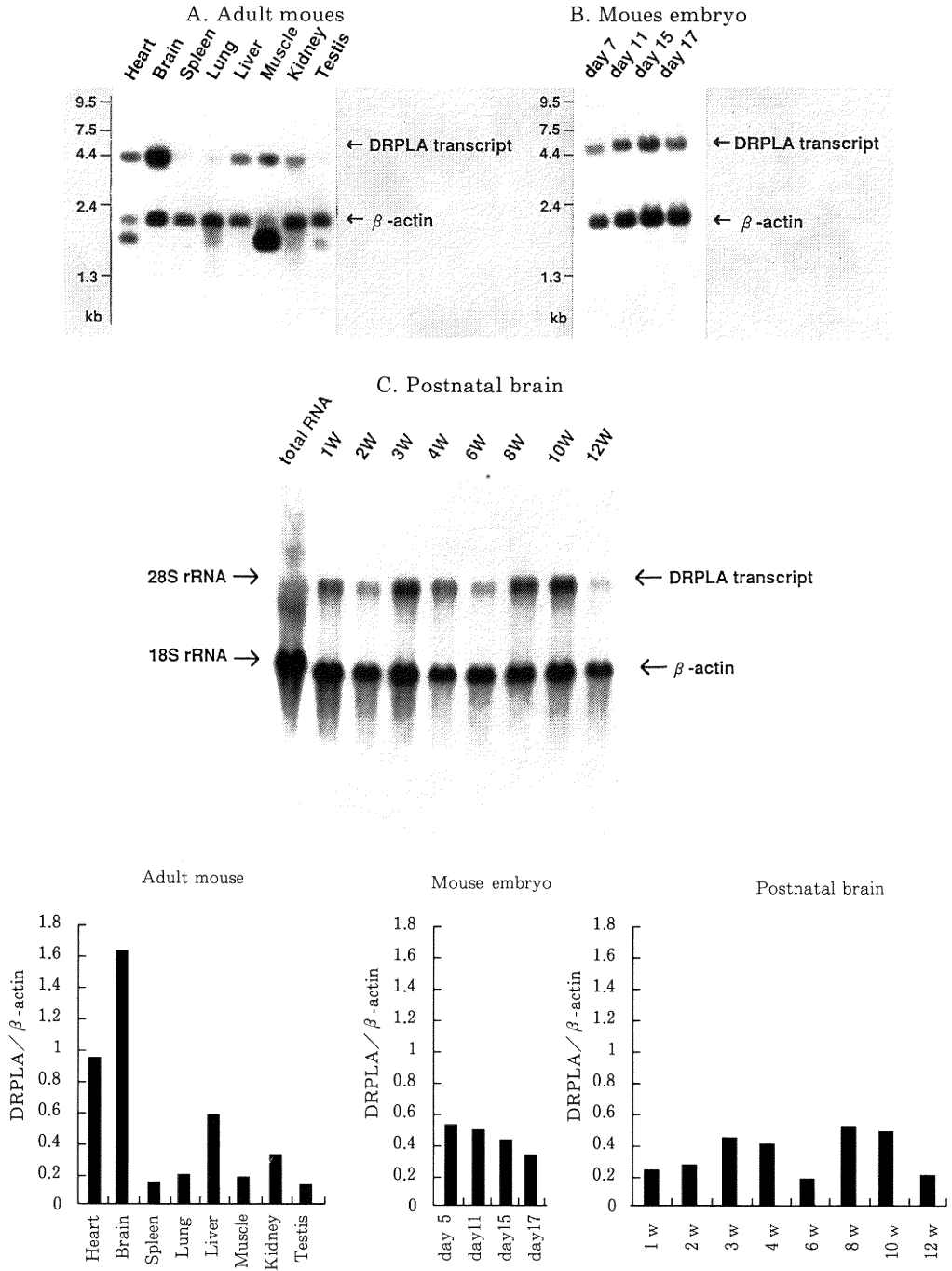


図7 マウス DRPLA 遺伝子のノーザン解析

臓器ごとの発現 (A), 胎生期における発現の経時的検索 (B), 脳における生後の経時的推移 (C), βアクトンを内部標準としたシグナルの相対比をグラフに示す。

DRPLA 遺伝子の CAG リピート数を対応させてみると、亜種ごとに CAG リピート数が異なることがわかった (図 6)。この結果から DRPLA 遺伝子の CAG リピート数の多型はマウス属の種分化に伴い生じてきたことを示唆される。また実験室マウスにおいては CAG リピート数は MSM の 5 リピートを除きく全て 3 リピートであった (図 6)。これは現在の実験室マウスのほとんどが *Mus musculus domesticus* に由来すること、MSM 系統が *Mus musculus molossinus* 由来であること²⁵⁾ から説明できる。これまでマウスの Huntingtin や ataxin 1 遺伝子においては CAG リピート数の多型はないとされてきたが²²⁾²³⁾、実験室マウスの他に複数の野生マウスについて検討することで、これらにおいても多型が見出される可能性がある。

本研究及びヒト DRPLA cDNA のクローニングにより明らかになったように、DRPLA タンパクはマウスとヒトでポリグルタミンの長さを除き高度に保存されており、その発現様式は一様であった。従って今後の課題としては、なぜこのような発現分布を示すタンパクが中枢神経系の特定の神経細胞のみに障害をもたらすのか、タンパクの生理的な機能に必須ではない可能性が示唆されるポリグルタミンが異常に伸長することによりいかなる機能を獲得し神経細胞障害性に働くのかといった点を解明する必要がある。特に部位選択的な神経細胞障害の問題にあたっては個体レベルでの検討、すなわち疾患モデル動物の作成が有用であることは論を持たない。今後はさらにマウスゲノム DNA のクローニングと遺伝子ノックアウトマウスの作成による遺伝子の機能の検索や異常遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作成が必要と考えられる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり貴重なマウスゲノム DNA を提供いただいた本学医学部生化学第一教室の木南凌教授、国立遺伝学研究所の森脇和郎先生、城石俊彦先生、遺伝子座決定について御教示いただいた本学医学部生化学第一教室高橋由明先生、終始御指導頂いた小野寺理先生、辻省次教授に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Naito, H. and Oyanagi, S.: Familial myoclonus epilepsy and choreoathetosis: Hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy. *Neurology* 32: 798~807, 1980.
- 2) Koide, R., Ikeuchi, T., Onodera, O., Tanaka, H., Igarashi, S., Endo, K., Takahashi, H., Kondo, R., Ishikawa, A., Hayashi, T., Saito, M., Tomoda, A., Miike, T., Naito, A., Ikuta, F. and Tsuji, S.: Unstable expansion of CAG repeat in hereditary Pentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA). *Nature Genet.* 6: 9~13, 1994.
- 3) Nagafuchi, S., Yanagisawa, H., Sato, K., Shirayama, T., Ohsaki, E., Bundo, M., Takeda, T., Tadokoro, K., Kondo, I., Murayama, N., Tanaka, Y., Kikushima, H., Umino, K., Kurosawa, H., Furukawa, T., Nihei, K., Inoue, T., Sano, A., Komure, O., Takahashi, M., Yoshizawa, T., Kanazawa, I. and Yamada, M.: Dentatorubral and pallidolusian atrophy expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 12p. *Nature Genet.* 6: 14~18, 1994.
- 4) Onodera, O., Oyake, M., Takano, H., Ikeuchi, T., Igarashi, S. and Tsuji, S.: Molecular cloning of cDNA for dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA) and regional expressions of the expanded alleles in the central nervous system. *Am. J. Hum. Genet.* 57: 1050~1060, 1995.
- 5) Nagafuchi, S., Yanagisawa, H., Ohsaki, E., Shirayama, T., Tadokoro, K., Inoue, T. and Yamada, M.: Structure and expressions of the gene responsible for the triplet repeat disorder, dentatorubral and pallidolusian atrophy (DRPLA). *Nature Genet.* 8: 177~182, 1995.
- 6) Ikeuchi, T., Koide, R., Tanaka, H., Onodera, O., Igarashi, S., Takahashi, H., Kondo, R., Ishikawa, A., Tomoda, A., Miike, T., Sato, K., Ihara, Y., Hayabara, T., Isa, F., Tanabe, H., Tokiguchi, S., Hayashi, M., Shimizu, N., Ikuta, F., Naito, H. and Tsuji, S.: Dentatorubral Pallidolusian Atrophy (DRPLA): Clinical Features Are Closely Related to Unstable Expansions of Trinucleotide (CAG) Repeat. *Ann. Neurol.* 37: 769~775, 1995.
- 7) Orr, H. T., Chung, M., Banfi, S., Kwiatkowski Jr., T. J., Servadio, J., Beaudet, A. L., McCall, A. E., Duvick, L. A., Ranum, L. P. W. and Zoghbi, H. Y.: Expansion of an unstable trinucleotide

- CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature Genet.* 4: 221~226, 1993.
- 8) Pulst, S. M., Nechiporuk, A., Nechiporuk, T., Gispert, S., Chen, X. N., Lopes-Cendes, I., Pearlman, S., Starkman, S., Orozco-Diaz, G., Lunkes, A., DeJong, P., Rouleau, G. A., Auburger, G., Korenberg, J. R., Figueroa, C. and Sahba, S.: Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nature Genet.* 14: 269~276, 1996.
 - 9) Sanpei, K., Takano, H., Igarashi, S., Sato, T., Oyake, M., Sasaki, H., Wakisaka, A., Tashiro, K., Ishida, Y., Ikeuchi, T., Koide, R., Saito, M., Sato, A., Tanaka, T., Hanyu, S., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Shimizu, N., Nomura, Y., Segawa, M., Iwabuchi, K., Eguchi, I., Tanaka, H., Takahashi, H. and Tsuji, S.: Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion cloning technique, DIRECT. *Nature Genet.* 14: 277~284, 1996.
 - 10) Imbert, G., Saudou, F., Yvert, G., Devys, D., Trottier, Y., Garnier, J. M., Weber, C., Mandel, J. L., Cancel, G., Abbas, N., Durr, A., Didierjean, O., Stevanin, G. and Agid, Y.: Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia type 2 reveals a locus with highly sensitivity to expanded CAG / polyglutamine repeats. *Nature Genet.* 14: 285~291, 1996.
 - 11) Zhuchenko, O., Bailev, J., Bonnen, P., Ashizawa, T., Stockton, D. W., Amos, C., Dobvns, W. B., Subramony, S. H., Zoghbi, H. Y. and Lee, C. C.: Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA 6) associated with small polyglutamine expansion in the $\alpha 1A$ - voltage-dependent calcium channel. *Nature Genet.* 15: 62~69, 1997.
 - 12) David, G., Abbas, N., Stevanin, G., Durr, A., Yvert, G., Cancel, G., Weber, C., Imbert, G., Saudou, F., Antoniou, E., Drabkin, H., Gemmill, R., Giunti, P., Benomar, A., Wood, N., Ruberg, M., Agid, Y., Mandel, J. L. and Brice, A.: Cloning of the SCA 7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nature Genet.* 17: 65~70, 1997.
 - 13) The Huntington's Disease Collaborative Research Group: A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72: 971~983, 1993.
 - 14) Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I., Kimura, J., Naruyama, S. and Kakizuka, A.: CAG expansion in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet.* 8: 221~228, 1994.
 - 15) La Spada, A. R., Wilson, E. M., Lubahn, D. B., Harding, A. E. and Fischbeck, H.: Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352: 77~79, 1991.
 - 16) Sambrook, J., Trifiro, M. A. and Maniatis, T.: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. 1989.
 - 17) Kozak, M.: An analysis of 5' - noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucl. Acids Res.* 15: 8125~8148, 1987.
 - 18) Schmitt, I., Bachner, D., Megow, D., Henklein, P., Hameister, H., Epplen, J. H. and Riess, O.: Expression of the Huntington disease gene in rodents: cloning the rat homologue and evidence for downregulation in non-neuronal tissues during development. *Hum. Mol. Genet.* 4: 1173~1182, 1995.
 - 19) Higashijima, S., Kojima, T., Michiue, T., Ishimaru, S., Emori, Y. and Saigo, K.: Dual Bar homeobox genes of *Drosophila* required in two photoreceptor cells, R1 and R6, and primary pigment cells for normal eye development. *Genes Dev.* 6: 50~60, 1992.
 - 20) Haynes, S. R., Mozar, B. A., Bhatia-Dey, N. and Dawid, I. B.: The *Drosophila fsh* locus, a maternal effect homeotic gene, encodes apparent membrane proteins. *Dev. Biol.* 134: 246~257, 1989.
 - 21) Yu, H., Chen, J. K., Feng, S., Dalgarno, D. C., Brauer, A. W. and Schreiber, S. L.: Structural Basis for the Binding of Proline-Rich Peptides to

- SH3 Domains. *Cell* **76**: 933~945, 1994.
- 22) **Lin, B., Nasir, J., MacDonald, H., Hutchinson, G., Graham, R. K., Rommens, J. M. and Hayden, M. R.:** Sequence of the murine Huntington disease gene: evidence for conservation, and polymorphism in a triplet (CCG) repeat alternate splicing. *Hum. Mol. Genet.* **3**: 85~92, 1994.
- 23) **Servadio, A., Koshy, B., Armstrong, D., Antalfv, B., Orr, H. T. and Zoghbi, H. Y.:** Expression analysis of the ataxin-1 protein in tissues from normal and spinocerebellar ataxia type 1 individuals. *Nature Genet.* **10**: 94~98, 1995.
- 24) **Tamura, T., Sumita, K., Fujino, I., Aoyama, A., Horokoshi, M., Hoffmann, A., Roeder, R. G., Muramatsu, M. and Mikoshiba, K.:** Striking homology of the variable N-terminal as well as the conserved core domains of the mouse and human TATA-factors (TFIID). *Nucl. Acids Res.* **19**: 3861~3865, 1991.
- 25) **Moriwaki, K.:** Wild Mouse from a Geneticist's Viewpoint: in *Genetics in Wild mice*. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, Japan, 1994.

(平成10年2月6日受付)
