

高血圧、脳卒中、動脈硬化の遺伝的素因解明に向けて
—モデル動物を用いた遺伝学的解析—

真下知士

高血圧、脳卒中、動脈硬化の遺伝的素因解明に向けて
—モデル動物を用いた遺伝学的解析—

真下知士

博士学位論文

高血圧、脳卒中、動脈硬化の遺伝的素因解明に向けて
—モデル動物を用いた遺伝学的解析—

京都大学大学院人間・環境学研究科
文化地域環境学専攻

真下知士

目次

第1章 緒言	3
1.1 成人病の遺伝的素因解明に向けて	
1.2 本態性高血圧遺伝子を同定するための戦略	
1.3 モデル動物を用いる利点	
1.4 高血圧自然発症ラット (SHR) と脳卒中易発症ラット (SHRSP)	
1.5 SHRSP を利用した戦略	
第2章 本態性高血圧遺伝子の解明に向けて	23
2.1 本態性高血圧遺伝子の染色体マッピング	
2.2 年齢、環境因子による QTL(量的形質遺伝子座位)の継時的推移	
第3章 脳卒中遺伝子の解明に向けて	48
3.1 脳卒中遺伝子の染色体マッピング	
3.2 位置候補遺伝子アプローチ	
第4章 脂質代謝異常の原因遺伝子解明に向けて	66
4.1 脂質代謝異常の原因遺伝子の染色体マッピング	
4.2 SHRSP における脂質代謝異常と脳卒中発症	
第5章 総括	99
5.1 コンジェニック系統	
5.2 ヒトへの外挿	
5.3 原因遺伝子解明に向けて	
謝辞	110
参考文献	112
投稿論文	130

第1章

緒言

1.1 成人病の遺伝的素因解明に向けて

まもなく開発途上国を含め全ての国において、心筋梗塞や脳卒中などの血管系成人病が死因の第一位になると予測されている。その最大のリスクファクターは高血圧であり、現在 60 歳以上高齢者の約半分は高血圧症に罹患しているといわれている。本症は、1) 自覚症状を伴わない点や 2) ほおっておくと脳卒中や心筋梗塞によりある日突然倒れ、寝たきり、半身不随といった後遺症に悩まされるため、QOL (生活の質) の点からも非常に重要な問題となっている。高齢化社会がますます進むであろうと予測される 21 世紀を迎え、健康問題に対する人々の関心がますます高まるなか、高血圧症のような成人病をいかに治療し、予防するかということは人類の最重要課題である。

本態性高血圧症や糖尿病などの成人病は多因子遺伝性疾患とも言われ、図 1 に示したように複数の遺伝因子に環境因子が加わって発症すると考えられている。毎日の生活習慣 (環境因子) をコントロールすることである程度予防ができるし、病気を改善することも可能である。しかしながらその遺伝素因を解明することで、1) 病気の新しい診断法を確立し、2) 素因の在る者を選び分けて効率的な予防を行うことができ、3) その遺伝子産物を標的とした本質的な治療法を開発することも可能となる。すなわち病気を発症する前の若年時に診断し、遺伝素因のある人に対してのみ環境因子を制御することで、その病気を完全に予防することが期待される。これこそが経済的、効率的な 21 世紀の予防医療であるといえる。現在本態性高血圧症のような成人病の遺伝素因 (原因遺伝子) を解明するために、どのような研究戦略がとられているのかを次節で説明する。

1.2 本態性高血圧遺伝子を同定するための戦略

1980年に Bostein ら[1]により連鎖解析を主体とした病因遺伝子同定のための方法論（ポジショナルクローニング法と呼ばれている）が提唱されて以来、Huntington 舞踏病[2]や cystic fibrosis [3]などたくさんの遺伝性疾患の原因遺伝子がこれまで同定されてきた（表1）。この方法の特徴は、それら遺伝性疾患の病態発症機序がわからない場合でも遺伝学的理論と分子生物学的手法を駆使してその原因遺伝子を見つけ出すことが可能な点にある。その戦略を図2に示す。

- 1) 遺伝病の患者家系を集める。
- 2) 集めた患者家系を対象に連鎖解析などの手法によって、その遺伝病の原因遺伝子座位が染色体上のどの位置にあるかを決定する。
- 3) 決定された染色体上領域の詳細な遺伝子地図を作成し、その領域に存在するいくつかの候補遺伝子を選び出す。
- 4) 候補遺伝子を1つ1つを詳細に調べることによって、最終的に原因遺伝子を同定する。

ポジショナルクローニング法は、表1に示したようにその対象となる疾患が単一の遺伝子異常による遺伝性疾患の場合においては目覚ましい成果をあげてきた。しかしながら本態性高血圧症などのような複数の遺伝因子と環境因子が複雑に相互作用して発症する多因子遺伝性疾患の場合、従来の遺伝学的手法をそのまま適用するにはいくつかの問題点が考えられる（図3）。

- 1) 原因遺伝子が複数存在する (multigenic inheritance)。
- 2) それら遺伝子が複雑に相互作用する (epistasis)。
- 3) 家系ごとに原因遺伝子が異なる可能性がある (genetic heterogeneity)。
- 4) 食習慣、ストレスといった環境因子がその発症に大きく影響する (environmental effects)。
- 5) 原因遺伝子を有するにもかかわらず発症しない、あるいは発症してもその年齢が高く発症時期も人によりばらつく (incomplete penetrance)。

以上のような要因が、ポジショナルクローニング法を用いて多因子遺伝性疾患の原因遺伝子を同定しようとする際に重大な障害となっている。さらに本態性高血圧症の場合は、

- 6) 診断の指標となる血圧値は、測定条件や精神状態、あるいは一日のなかでの測定時間によっても変動しやすい。
 - 7) 腎機能障害などの2次的変化として生じた血圧上昇と区別しがたい。
- などの要因が、より高血圧遺伝子解明を困難なものにしている。

1.3 モデル動物を用いる利点

以上に述べたようなヒト本態性高血圧症における遺伝学的解析の“難しさ”を克服する一つの戦略として、遺伝的モデル動物を利用して高血圧遺伝子を同定しようとする試みがなされている。動物モデルを用いて多因子遺伝性疾患の遺伝的解析することの利点を以下に述べる (図4)。

- I) ラットやマウスなど近交化されたモデル動物は遺伝的に均一であり、一個

体ずつが同じ遺伝子を持つ。

II) 飼育条件などの環境因子を制御することができる。

III) 実験的交配により巨大な家系を作製することができる。

IV) Congenic 系統や Transgenic 動物など、人為的にゲノムを操作することができる。

動物モデルを用いることにより実験系をより単純に、かつ分析力を高めることができ、ヒト多因子遺伝性疾患における問題点を改善あるいは克服することが可能となる。具体的には、図3であげたヒトにおける genetic heterogeneity の問題 (3) はモデル動物では遺伝的に均一であり、(I) environmental effects (4) は環境因子を制御すること (II) によりある程度抑えることができる。incomplete penetrance の問題 (5) は巨大な交配系の作製 (III) により分析力を高めることで改善され、epistasis (2) もゲノム操作をしたモデル動物 (IV) を用いることにより、遺伝子単独の作用を解析することも、遺伝子間相互作用を解析することも可能となる。さらに高血圧に関して言えば、実験ラットにおいては血圧を繰り返し測定することにより、測定誤差が少なく信頼性の高い血圧値を得ることも可能となる。このようにヒト多因子遺伝性疾患の原因遺伝子を解明しようとする場合、動物モデルを利用した戦略が非常に有用であることから、これまでヒト本態性高血圧症や脳卒中と病因、病態学的に非常に類似した (適した) いくつかの動物モデルが開発されてきている。

1.4 高血圧自然発症ラット (SHR) と脳卒中易発症ラット (SHRSP)

現在までに、数系統の遺伝的高血圧ラットが確立されている（表2）[4]。1963年岡本と青木らは、血圧値を指標とした選択的交配によりヒト本態性高血圧症のモデル動物として高血圧自然発症ラット（spontaneously hypertensive rat : SHR）を開発した[5,6]。SHRは正常血圧ラットのWKY（Wistar Kyoto rat）より系統分離され（図5）、加齢に伴い200 mmHg前後の収縮期血圧を示す[7]。これまでのSHRを用いた生理学的研究により、交感神経系の亢進、細胞膜におけるイオン透過性の亢進、血管平滑筋細胞の増殖能亢進、血管反応性の異常など、ヒト本態性高血圧症と類似する所見がいくつか得られている[8,9]。またSHRは他の近交系高血圧ラットにはない特性として、血圧上昇に伴い腎障害、心肥大などの2次性障害を併発する点があげられ、ヒト本態性高血圧症のすぐれたモデル動物として世界中で広く賞用されている。

1974年家森らは、SHRの亜系（A, B, C 亜系）の中で脳卒中を多発する傾向のある亜系（A 亜系）の子孫のみを選択交配することにより、ヒト脳卒中のモデル動物としてほぼ100%脳卒中を発症する、脳卒中易発症ラット（Stroke-prone SHR : SHRSP）を樹立した[10]。一方、SHRの亜系の中で脳卒中をほとんど（10%以下）おこさないB, C 亜系も継代され、SHRSR（Stroke-resistant SHR）と呼ばれている。SHRSPは、SHRSRに比べ若年期より高血圧を急速に発症し（図6）、220 mmHgをこえる重篤高血圧症を持続しながら、ついには脳卒中（脳出血あるいは脳梗塞）によりWKYやSHRSRに比べ短命で死亡する（図7）[11-13]。この脳卒中モデル動物が開発されたことは、脳卒中発症における遺伝的素因の重要性を示唆するものであり、これによってモデル動物を用いた脳卒中の遺伝学的解析が可能となった。

1.5 SHRSP を利用した戦略

それでは、本態性高血圧症や脳卒中のモデル動物である SHRSP を用いて、その遺伝素因（高血圧遺伝子、脳卒中遺伝子など）を解明するための戦略について説明する（図 8）。詳細については原稿[14-16]を参照されたい。①最初に SHRSP と正常血圧ラット WKY を交配して F2 世代を作製する。②F2 世代を用いて“連鎖解析”と呼ばれる遺伝学的手法によって、原因遺伝子が存在する染色体領域を決定する。連鎖解析の手法については、後に説明を加える。本態性高血圧症などのような多因子遺伝性疾患の場合は、その分析力などの問題によりこの時点で連鎖解析により絞り込まれる染色体領域は 10~20 cM（センチモルガン：100 回の染色体交叉あたり 1 回の組み換えが起こると推測される距離を 1 センチモルガンとしている）が限界である。従って、次のステップとして③さらにその染色体領域を狭めるためにコンジェニック系統を作製する。このコンジェニック系統の利用こそがまさしくモデル動物を用いることの最大の利点である。その詳細については第 5 章で説明する。コンジェニック系統を用いて 1~2 cM まで染色体領域を狭めれば、④あとはポジショナルクローニング法と同様にその領域内に存在する候補遺伝子を選出し、⑤最終的に原因遺伝子を同定する。

本研究において重要な位置を占める“連鎖解析”の原理について、もう少し説明を加える（図 9）。疾患ラットと対照ラットを任意に交配し、得られた F1 世代同志をさらに兄妹交配して F2 世代を作製する。このとき F1 世代は親ラ

ット (F0 世代) から相同染色体を 1 本ずつ受け継ぐため、全ての個体は遺伝的に同一である。F1 世代の配偶子が F2 世代へと受け継がれる際に組み換え現象、すなわち各染色体において F0 世代由来の領域をモザイク状に持つことになり、結果として F2 世代は遺伝的に多様となる。ここで疾患ラット由来の原因遺伝子を受け継いだ F2 世代ラットがその疾患形質を相対的に強く発現するとすれば、そのような原因遺伝子を含む染色体領域を検出することが連鎖解析の特性である。具体的には個々の染色体領域がどちらの近交系ラットから由来したかを識別できる遺伝マーカーを調べてその遺伝型を決定し、注目する領域が疾患ラットから由来することで疾患形質の発現が有意に強調されているかどうか (“連鎖” があるかどうか) を統計学的に検定することになる。このような検索をラット全ゲノムにわたり行うことにより、未知の疾患遺伝子をスクリーニングできると考えられる (この手法をゲノムスキャンという)。原因遺伝子と調べている遺伝マーカーとの距離が近づくにつれて、疾患形質との連鎖の程度がより強くなると期待される。様々な遺伝マーカーの中でもこのような目的で一般的に用いられるのはマイクロサテライトマーカーとよばれるものである。マイクロサテライトとは二~数塩基の単純な繰り返し配列であり、全ゲノムにわたって蛋白に翻訳されない領域に広く分布している[17,18]。また 別々の近交系ラット間では繰り返し数が異なる頻度が高い (多型性が高い) ため、上述のような連鎖解析のマーカーとして適している。通常、繰り返し配列をはさむ領域を Polymerase Chain Reaction (PCR) 法にて増幅し、長さの違いを電気泳動によって明らかにする (図 9)。

本文では、ヒト本態性高血圧症および脳卒中のモデル動物である SHRSP

を用いて、高血圧遺伝子（第2章）、脳卒中遺伝子（第3章）、動脈硬化に関する原因遺伝子（第4章）の解明に向けた研究（主に連鎖解析を中心としたもの）を行ったのでその結果を紹介している。第5章では、コンジェニック系統の現状、ラットから得られた原因遺伝子のヒトへの外挿について述べている。

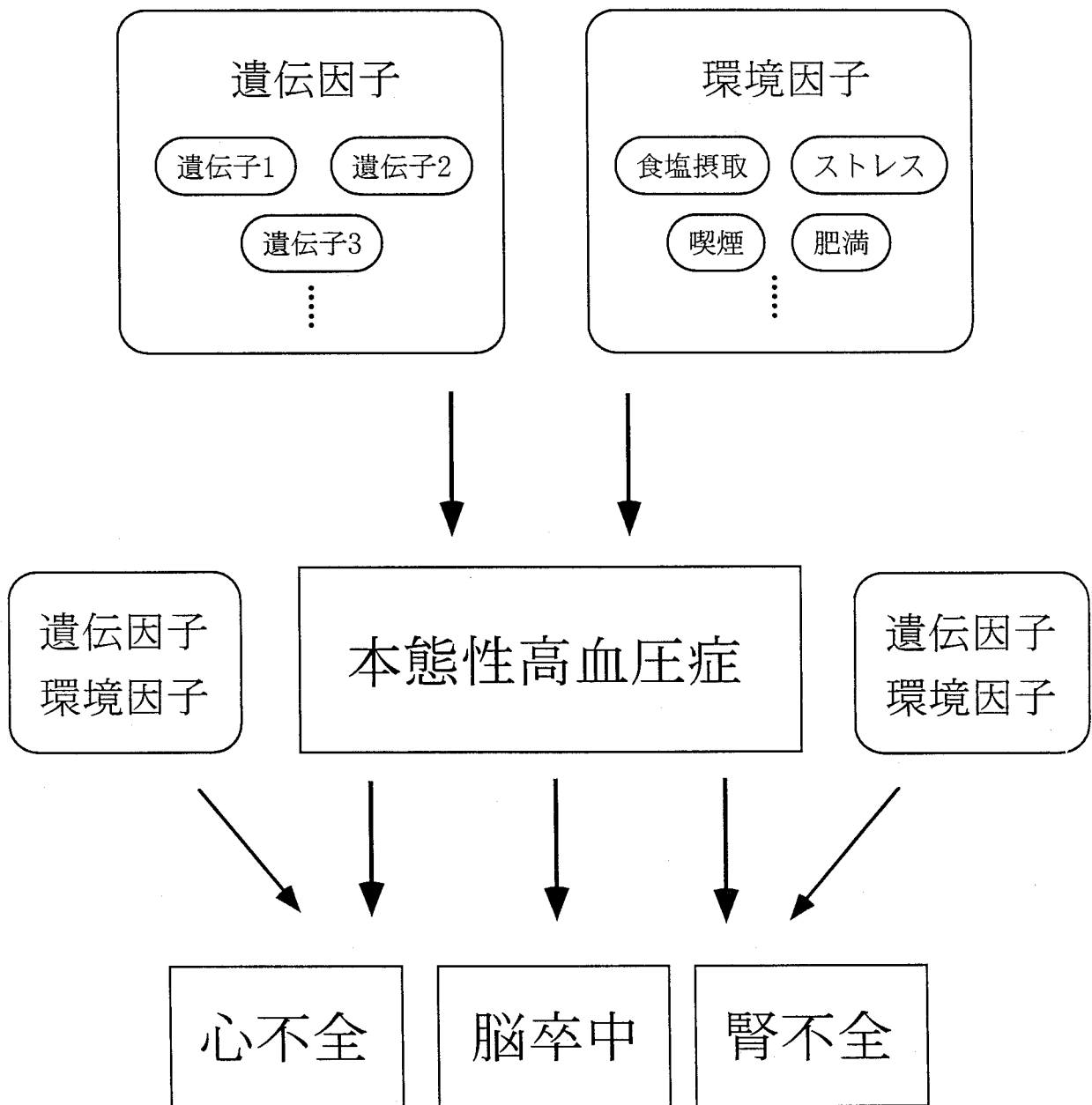


図1 成人病（高血圧、脳卒中、心不全、etc）への多因子の関与

表1 ポジショナルクローニングで単離同定された遺伝病 (1997年8月末現在)

病名 (和名)	病名 (英語)	MIM番号 ^{a)}	遺伝子記号	cDNA#
Aarskog-Scott症候群	Aarskog-Scott syndrome	305400	FGD1	U11690
骨形成不全症	achondroplasia	100800	FGFR3	M58051
家族性大腸腺腫症	adenomatous polyposis coli	175100	APC	M74088
副腎白質ジストロフィー	adrenoleukodystrophy, X-linked	300100	ALD	Z21876
アルツハイマー病	Alzheimer disease	104300	AD	L40391
無ガンマグロブリン血症	agammaglobulinemia, X-linked	300300	XLA	S65927
筋萎縮性側索硬化症	amyotrophic lateral sclerosis	105400	SOD1	K00065
無虹彩症	aniridia	106210	PAX6	M77844
毛細血管拡張性運動失調症	ataxia telangiectasia	208900	ATM	U26455
基底細胞母斑症候群	basal cell nevus syndrome	109400	BCNS	U59464
Bloom症候群	Bloom syndrome	210900	BLM	U39817
乳癌と卵巣癌、早期発症型	breast & ovarian cancer, early onset	113705	BRCA1	U14680
乳癌、早期発症型	breast cancer, early onset	600185	BRCA2	U43746
チェディアック-栗症候群	Chediak-Higashi syndrome	214500	CHS1	U67615
斑点状軟骨形成不全症	chondrodysplasia punctata	302950	ARSE	X83573
脈絡膜変性症	choroideremia	303100	CHM	X78121
慢性肉芽腫症	chronic granulomatous disease	306400	NCF1	M55067
先天性副腎過形成	congenital adrenal hyperplasia	201910	CYP21	M26856
嚢胞線維症	cystic fibrosis	219700	CFTR	M28668
diastrophic dysplasia	diastrophic dysplasia	222600	DTD	U14528
Duchenne型筋ジストロフィー	Duchenne muscular dystrophy	310200	DMD	M18533
Emery-Dreifuss型筋ジストロフィー	Emery-Dreifuss muscular dystrophy	310300	STA	X82434
手掌足底角皮症	epidermolytic palmoplantar keratoderma	144200	KRT9	X75015
多発性外骨腫	exostoses multiple type II	133701	EXT2	U64511
顔面性器異形質	faciogenital dysplasia	305400	FGDY	U11690
腎性Fanconi症候群	Fanconi syndrome, renal	300009	CLCN5	X91906
脆弱X症候群	fragile X syndrome	309550	FMR1	S65791
Friedreich失調症	Friedreich ataxia	229300	FRDA	U43747
生殖腺發育不全	gonadal dysgenesis	306100	SRX	L08063
グリセロールキナーゼ欠損症	glycerol kinase deficiency	307030	GK	L13943
遺伝性多発性外骨腫症	hereditary multiple exostoses	133700	EXT1	S79639
遺伝性非ポリポージス性大腸癌	hereditary non-polyposis colon cancer	120436	MLH1	U07418
遺伝性非ポリポージス性大腸癌	hereditary non-polyposis colon cancer	120436	MSH2	U03911
hyperekplexia	hyperekplexia	149400	GLRA2	X52009
低リン酸血症 (ビタミンD抵抗性クル病)	hypophosphatemia	307800	PEX	なし
ハンチントン病	Huntington disease	143100	HD	L12392
カルマン症候群	Kallmann syndrome	308700	KAL	M97252
脳回欠損症	lissencephaly	247200	KIS1	L13385
QT延長症候群	long QT syndrome, type 1	192500	KVLQT1	U40990
Lowe症候群	Lowe syndrome	309000	OCLR	M88162
Machado-Joseph病	Machado-Joseph	109150	MJD1	S75313
マルファン症候群	Marfan syndrome	154700	FBN1	L13923
Menkes症候群	Menkes syndrome	309400	MNK	X69208
McLeod症候群	McLeod syndrome	314850	XK	Z32684
多内分泌腺腫瘍症 1型	multiple endocrine neoplasia type 1	131100	MEN1	U93236
多内分泌腺腫瘍症 2A型	multiple endocrine neoplasia type 2A	171400	RET	M57464
筋緊張性ジストロフィー	myotonic dystrophy	160900	DM	L19268
筋細管ミオパチー	myotubular myopathy 1	310400	MTM1	U46024
神経線維腫 1型	neurofibromatosis, type 1	162200	NF1	M89914
神経線維腫 2型	neurofibromatosis, type 2	101000	NF2	L11353
ニーマン-ピック病	Niemann-Pick disease	257220		なし
Norrie病	Norrie disease	310600	NDP	X65882
眼白子症	ocular albinism	260350	OA1	Z48804
肥満	obesity	164160	OB	U18915
膵臓癌	pancreatic carcinoma	260350	DPC4	U44378
多発性嚢胞腎 1型	polycystic kidney disease, type 1	173900	PKD1	R96145
多発性嚢胞腎 2型	polycystic kidney disease, type 2	173910	PKD2	U50928
進行性ミオクローヌスてんかん	progressive myoclonus epilepsy	254800	EMP1	U46692
網膜色素変性症	retinitis pigmentosa-3	312610	RP3	X97668
網膜芽細胞腫	retinoblastoma	180200	RB1	M15400
脊髄性筋萎縮症	spinal muscular atrophy	253300	SMA	U18423
脊髄小脳変性症 1型	spinocerebellar ataxia type 1	164400	SCA1	X79204
脊髄小脳変性症 2型	spinocerebellar ataxia type 2	183090	SCA2	U70323
Thomsen病	Thomsen disease	160800	CLC1	Z25884
Treacher Collins症候群	Treacher collins syndrome	154500	TCOF1	U40847
多発性硬化症	tuberous sclerosis	191090	TSC	X75621
Von Hippel-Lindau病	Von Hippel-Lindau disease	193300	VHL	L15409
Waardenburg病	Waardenburg syndrome	193500	PAX3	U02309
Werner症候群	Werner syndrome	277700	WRN	L76937
Wilms腫瘍	Wilms tumor	194070	WT1	X51630
Wilson病	Wilson disease	277900	WND	R18562
Wiskott-Aldrich症候群	Wiskott-Aldrich syndrome	301000	WASP	U12707

この表のポジショナルクローニングはポジショナルcandidateを含む。a) "Mendelian Inheritance in Man" での遺伝病のID番号。

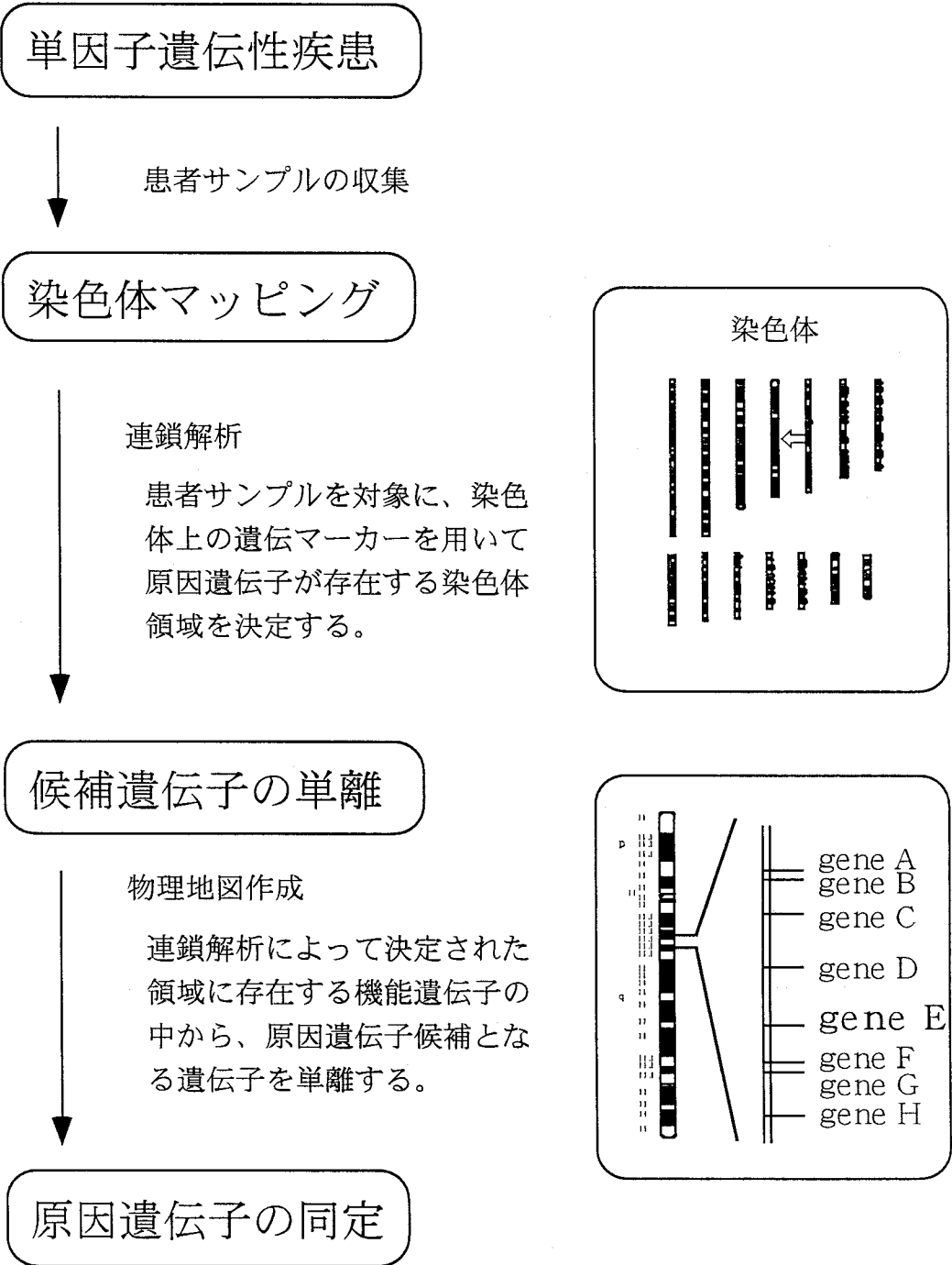


図2 ポジショナルクローニングの戦略

多因子遺伝性疾患の原因遺伝子同定に向けた問題点

- 1) 複数の高血圧遺伝子が存在する (multigenic inheritance) 。
- 2) それら原因遺伝子が複雑に相互作用する (epistasis) 。
- 3) 家系ごとに異なる原因遺伝子のセットを持つ (genetic heterogeneity) 。
- 4) 食事、ストレスなどの環境因子がその発症に大きく影響する (environmental effects) 。
- 5) 原因遺伝子を有していても発症しない、あるいは発症年齢が高く発症時期もばらつく (incomplete penetrance) 。

図3 多因子遺伝性疾患の原因遺伝子同定に向けた問題点

モデル動物の利点

- 1) 遺伝的に均一な近交系として維持できる。
→ Genetic heterogeneity (3) がない。
- 2) 飼育条件などの環境因子を制御しやすい。
→ Environmental effects (4) を抑えることができる。
- 3) 実験的交配により巨大な家系を作製することができる。
→ Incomplete penetrance (5) に対して分析力を高める。
- 4) Cogenic系統やTransgenic動物など、人為的にゲノムを操作することができる。
→ Epistasis (2) を解析することが可能である。

→ : 図3の問題点に対して有利な点

図4 遺伝解析においてモデル動物を利用することの利点

表2 遺伝性高血圧モデルラットの各系統

国際系統名	系統名	分離元の系統	主な特色
*SHR WKY	spontaneously hypertensive rat Wistar-Kyoto	Wistar Kyoto	高血圧
*SHRSP	stroke-prone SHR	SHR	脳卒中
*DS DR	Dahl salt-sensitive rat Dahl salt-resistant rat	Sprague-Dawley	食塩感受性高血圧
*MHS MNS	Milan hypertensive rat Milan normotensive rat	Wistar	軽傷高血圧
*GH	genetically hypertensive rat	Wistar Otago	高血圧
*SBH SBN	Sabra hypertensive rat Sabra normotensive rat	Sabra rat	DOCA-食塩感受性高血圧
*LH LN LL	Lyon hypertensive rat Lyon normotensive rat Lyon low blood pressure rat	Sprague-Dawley	高血圧

*高血圧系統とそのコントロール系統を示している。

a)

脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP)
Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat



b)

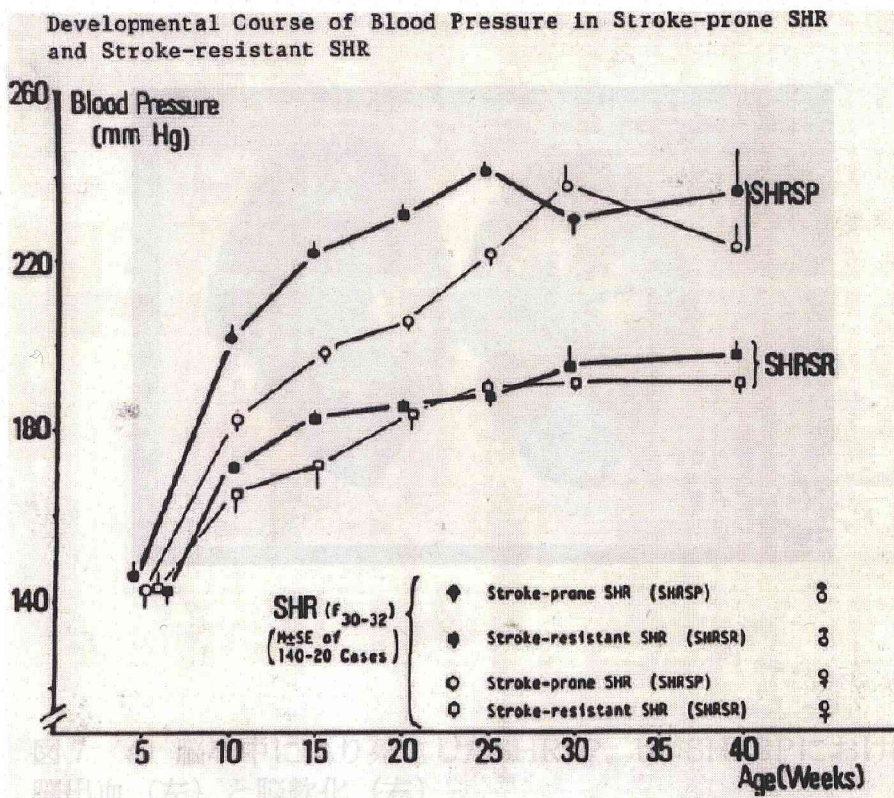
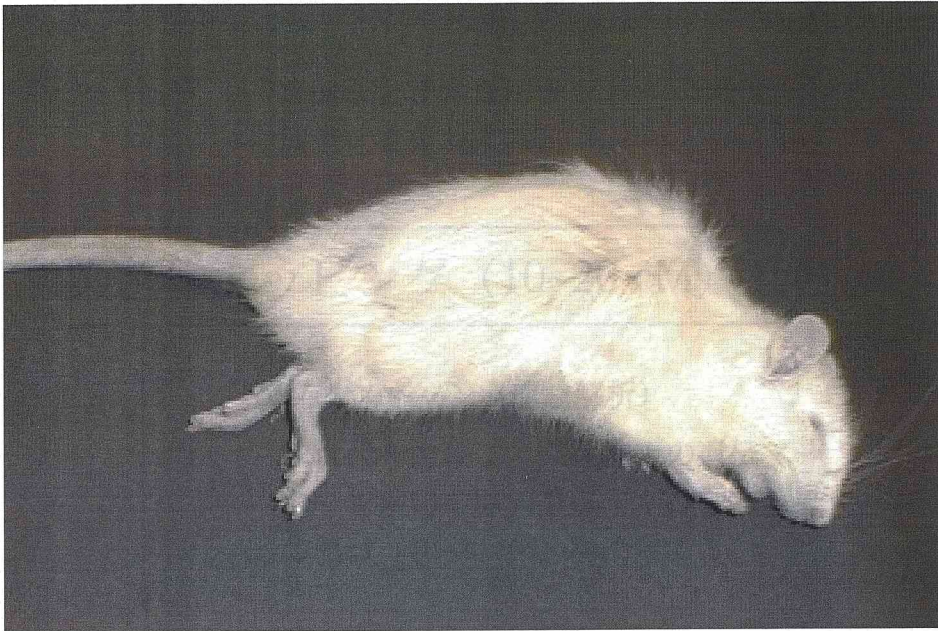


図6 a) 脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) の写真 b) SHRSP とSHRSRの血圧 (Blood Pressure)

a)

自発性高血圧モデルラット(SHRSP)



コンジェニック系統 (1~2 cM)

b)



原因遺伝子の同定

図7 a) 脳卒中により死亡したSHRSP。b) SHRSPにおける脳出血(左)と脳軟化(右)

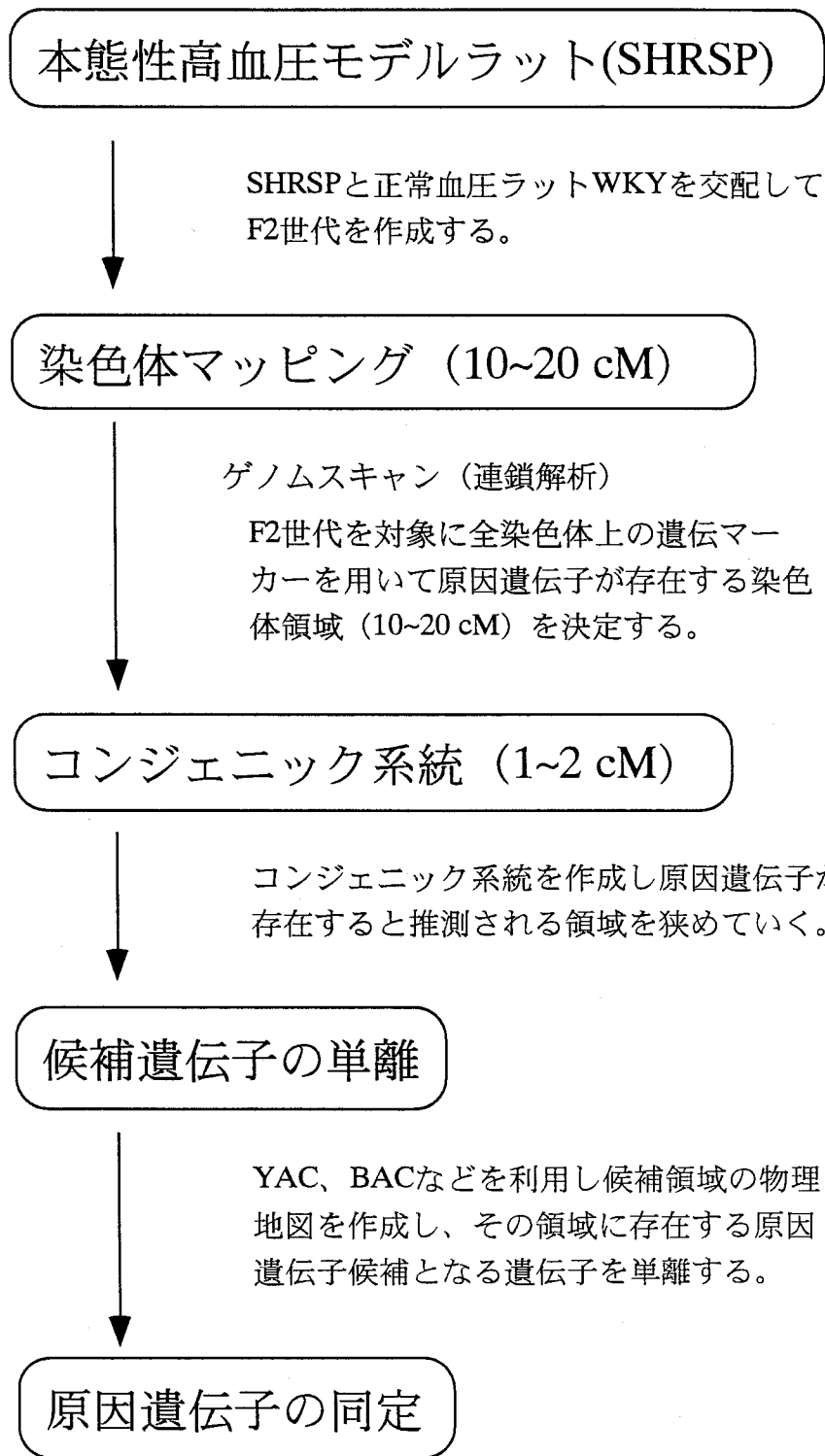


図8 SHRSPを利用した本態性高血圧遺伝子同定への戦略

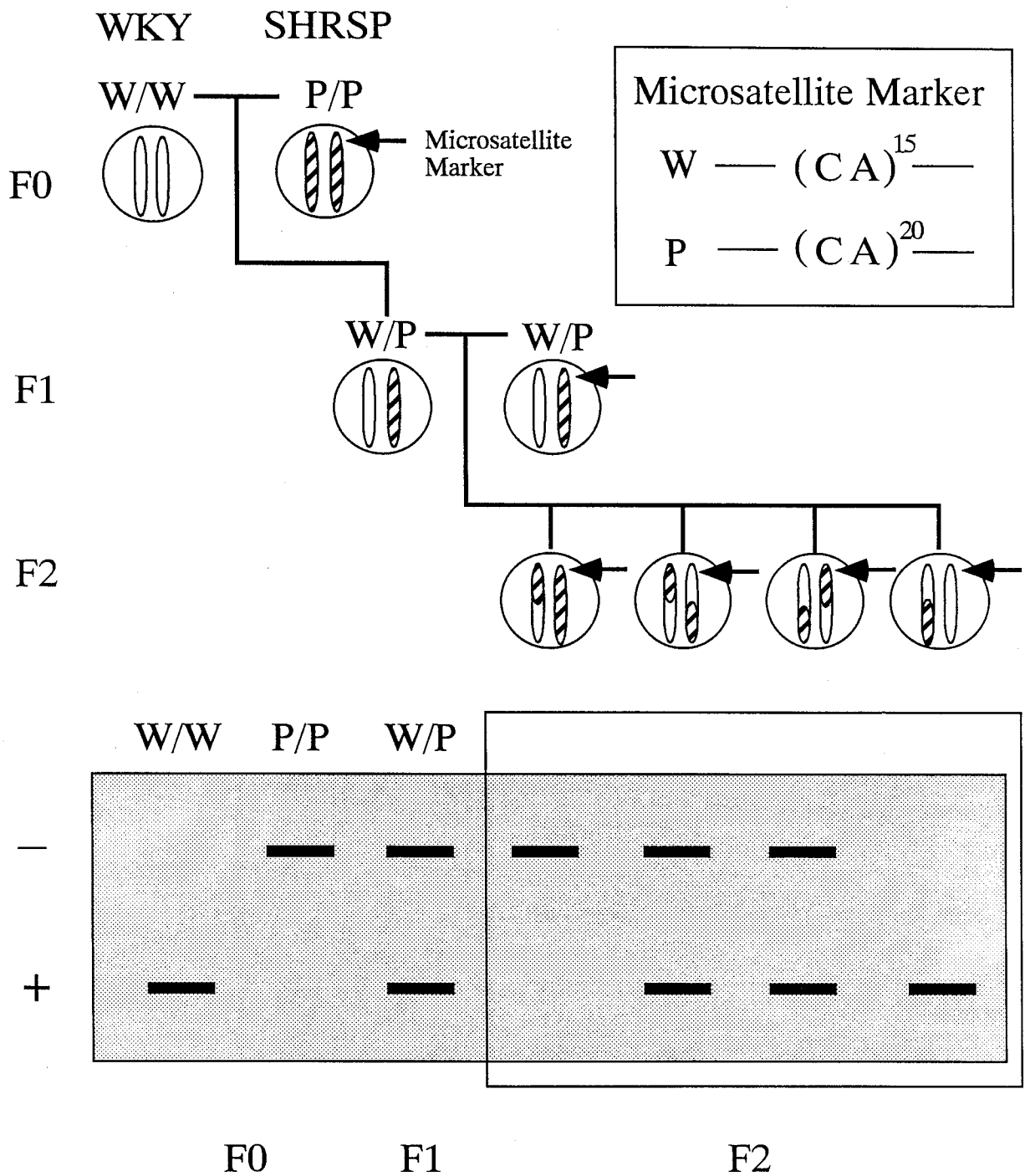


図9 連鎖解析の原理

第 2 章

本態性高血圧遺伝子の解明に向けて

2.1 本態性高血圧遺伝子の染色体マッピング

【目的】

1983年 Huntington 舞踏症の原因遺伝子がヒト第4染色体上に同定されて以来[2]、ポジショナルクローニング法を用いて数々の遺伝性疾患の原因遺伝子が同定されている。この手法が多因子性疾患の解析にも用いられ、これまで我々をはじめ世界中の多くの研究者が SHR や SHRSP のような高血圧モデル動物を用いた遺伝解析により高血圧遺伝子の検索を行ってきた[19-30]。1991年、Hilbert ら[22]と Jacob ら[23]は同時に、SHRSP と正常血圧対照ラットである WKY を交配して得た F₂ ラットを用いて連鎖解析を行い、第10染色体上のアンギオテンシン変換酵素 (ACE) 遺伝子、成長ホルモン (GH) 遺伝子を含む領域に有意な連鎖を報告している。この結果はあくまでこれら遺伝子の近傍に原因遺伝子が存在することを示すものであって、これら遺伝子が即、高血圧遺伝子であるとは言えないことに注意が必要である。我々の研究グループも SHRSP と WKY を交配して得た F₂ ラットを対象として、遺伝マーカーとその血圧値の連鎖解析を行った[24]。その結果、第1染色体上の Leukosianin (LSN) 遺伝子座位、Myosin light chain 2 (MYL2) 遺伝子座位において雌雄共に基礎的高血圧と強い連鎖が認められた。

しかしながら SHRSP における高血圧には複数の遺伝子が関与しており、第1、10染色体上の高血圧遺伝子以外にもいくつかの高血圧遺伝子が存在すると考えられる。これまで行われてきたモデル動物を用いた高血圧遺伝子の遺伝解析は、血圧の一部を説明する一つあるいは二つの高血圧主要遺伝子の検索を中心に行われてきたものがほとんどであった。よって本研究では SHRSP に

における高血圧発症に関与する複数の高血圧遺伝子を検索するために、F2 世代 125 匹を対象として、ラット全染色体を網羅する遺伝マーカー（201 マーカー）と血圧値との連鎖解析を行った（ゲノムスキャン）。

【実験材料と方法】

実験動物

我々が自家繁殖している SHRSP/Izm と WKY/Izm とを交配して F1 世代を作製し、その F1 世代をランダムに交配して F2 世代（雄：125匹）を作製した。F2 ラットは標準飼育条件（温度：23-28℃、湿度：60%、日照時間：AM6:00 - PM6:00）下において飼育した。F2 ラットの飼育実験スキーマを図 10 に示す。離乳期から生後 5 ヶ月齢までは標準飼料（SP 飼料：船橋農場）と水道水を自由摂取させた（食塩負荷前のこの期間を第 1 段階とした）。その後、食塩負荷による血圧への影響を評価するために、7 ヶ月間（生後 1 年齢まで）1%食塩水を飲料水として与えた（食塩負荷後のこの期間を第 2 段階とした）。

血圧測定

F2 ラットの血圧は生後 5, 8, 10, 13, 20 週齢（第 1 段階）と 6, 7, 8, 12 ヶ月齢（第 2 段階）に間接法（photo electric oscillometric tail-cuff method : UR1000、UEDA）[31]により尻尾から測定した（図 9）。すべての血圧（収縮期血圧：SBP）は午前中（AM6:00- AM12:00）に 3 回測定し、その平均を血圧値として用いた。

F2 世代のゲノム DNA 抽出[32]

F2 ラットは生後 1 年齢にネンブタール麻酔下で屠殺し、肝臓を摘出した。肝臓切片を TNM (20mM Tris-HCl pH=7.5, 0.1M NaCl, 1.5mM MgCl₂) 緩衝液中でホモジナイズし、遠心処理 (3000 r.p.m., 10min) 後、上清を捨てもう一度 TNM 緩衝液で洗浄、遠心処理を行った。沈殿を TNE (10mM Tris-HCl pH=7.5, 0.1M NaCl, 1mM EDTA) 緩衝液に懸濁し、10%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS) 溶液(最終濃度0.3%)と10mg/ml プロテアーゼK(Nacalai Tesque, Inc., JAPAN) を 1/100 容加え、55°Cで一晩インキュベートした。室温にもどした後、フェノール-クロロホルム法でゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA は TE (10mM Tris-HCl pH=7.5, 1mM EDTA)緩衝液に溶解した後、10ng/ μ l になるように蒸留水で調整して PCR 反应用テンプレートとして使用した。

遺伝マーカー

連鎖解析に用いる遺伝マーカーには、親系統である SHRSP/Izm と WKY/Izm との間に遺伝的多型 (電気泳動などにより識別できる DNA 塩基配列の違い) が存在しなければならない。従ってまず、ラット全染色体上に存在する 676 個の遺伝マーカー (マイクロサテライトマーカー) において SHRSP/Izm と WKY/Izm の遺伝型を調べた (この段階を多型検索という)。それらマイクロサテライトマーカーのうち約 400 個は Research Genetics 社より購入し、残りの約 300 個は以前報告された DNA 塩基配列に基づいて自動 DNA 合成装置により合成した[33-36]。調べられた 676 のマイクロサテライトマーカーのうち 237 個において SHRSP/Izm と WKY/Izm との間に遺伝的多

型が存在した (約 35%)。

F2 世代の遺伝子型決定

SHRSP/Izm と WKY/Izm との間に遺伝的多型を示したマイクロサテライトマーカーのうち 201 個を用いて、F2 世代の遺伝子型を決定した。遺伝子型決定には、F2 世代のゲノム DNA をテンプレートとしマイクロサテライトマーカーをプライマーとして PCR 反応を行い、その PCR 産物を電気泳動する事によって行った。

PCR 反応は以下の条件により行い、マイクロサテライト領域を増幅した。

PCR 反応液：

ゲノム DNA	: 50ng
両方向プライマー	: 各最終濃度 0.5 μ M
dNTPs	: 各最終濃度 125 μ M
MgCl ₂	: 最終濃度 1.5mM

PCR Buffer

Taq DNA polymerase : 0.5 unit

(Perkin Elmer Co., USA)

滅菌蒸留水にて全量を 15 μ l とした。

96well-plate (HYBAID, USA) に PCR 反応液 15 μ l を入れ、ミネラルオイル (Nacalai Tesque, Inc., JAPAN) を重層させ、以下の条件で反応させた。

PCR 条件：

94°C	3 min	1 回
94°C	1 min	7
55-65°C	2 min	35 回
72°C	1.5 min	4
72°C	5 min	1 回

PCR 反応後、PCR 産物を 7.5%または 9%アクリルアミドゲル(Nacalai Tesque, Inc., JAPAN)で電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後UV 撮影装置 (TOYOBO, JAPAN) によって遺伝子型を決定した。アクリルアミドゲル電気泳動で判別不可能な遺伝マーカーについては、自動シークエンサー (ABI 377 DNA Sequencer : Applied Biosystems, USA) を用いて識別した。第1染色体上の K8OPA18 と N3.2U181 座位における遺伝子型決定は RAMP (randomly amplified microsatellite polymorphism) 法[37,38] により行った。

コンピュータによる遺伝解析

全染色体上の 201 個の遺伝マーカーにおける F2 世代の遺伝型をもとに、ラット全染色体の遺伝地図を作製した (図 10)。Dr. Eric Lander (Whitehead Institute, USA) より供与を受けた MAPMAKER/EXP 3.0 program [39] を用いて、各マーカー間の距離を計算した。

F2 世代において測定した収縮期血圧値を、201 個の遺伝マーカーによって決定された遺伝型によって SHRSP ホモ型、WKY ホモ型、ヘテロ型の 3 群に分けて一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行った。

interval mapping 解析には MAPMAKER/QTL program を用いた。ANOVA の結果は、染色体上の各遺伝マーカーにおける血圧との関係を示しているのに対し、interval mapping 解析は隣接する2つのマーカー間において高血圧遺伝子がどの程度血圧に関与するかを最大値で計算し、高血圧遺伝子の位置を決定することが可能である。従って、interval mapping 解析は各マーカーがカバーしている染色体上の全ての領域を検討することができる。interval mapping 解析では、高血圧遺伝子はその血圧にどの程度関与するかを評価する基準として Lod score を用いている。Lod score とは、マーカーと原因遺伝子の関係において、2つが関連しているとした場合の確率と、全く無関係であるとした場合の確率を比較し、その比較した値を \log_{10} で計算したものである。すなわち、Lod score = 3.0 とすると、マーカーと原因遺伝子が無関係であると仮定した場合よりも 1000 倍の確率で、マーカーと原因遺伝子が関連していることを意味している。

F 2 の収縮期血圧に対する高血圧遺伝子の寄与率 (R^2) は、JMP program (SAS Inc., Cary, USA) を用いて linear regression analysis (回帰分析) により計算した。

【結果】

遺伝地図

ラット全染色体上の 676 個 の遺伝マーカーにおいて SHRSP と WKY のゲノム中に散在するマイクロサテライト領域における多型検索の結果、35 % 程度 (237 個/676 個) のマイクロサテライト領域が SHRSP と WKY の間で

多型性を示した。これら多型性を示したうちの 201 個の遺伝マーカーによって作成されたラット全染色体の遺伝地図を図 11 に示した。各染色体におけるマーカー数と各染色体の長さを表 3 にまとめた。ラット全染色体（第 1～20 常染色体、X 性染色体）を 201 個の遺伝マーカーによって全て網羅することができた。また、各染色体においては少なくとも 3 つ以上のマーカーが存在した。2 つのマーカー間における距離は、最も離れているところで 37.9 cM（センチモルガン）、平均すると 9.4 cM であった。これら遺伝マーカーの存在する領域は全部でラット染色体上 1891 cM にわたり、これはラット染色体のおよそ 86% をカバーしていることになる。

高血圧遺伝子の検索

表 4 に F2 世代の各週齢で測定された収縮期血圧において、SHRSP ホモ型、WKY ホモ型、ヘテロ型の 3 群の間に、ANOVA によって有意水準が $p < 0.01$ の基準をみたすマーカーをあげた。p 値及び Lod score の有意水準をどこに設定するかは現在世界中で議論されており、結論は未だでていない[14-16,40]。本研究の $p < 0.01$ の有意水準は、一般的に言われている基準より低く設定してある。これは本研究の目的が高血圧発症に関与する複数の遺伝子を検索することであり、この段階で真に血圧に関与している遺伝子が検出されない事がないようにする為である。この段階で収縮期血圧に連鎖したマーカーは、第 1、3、4、9、10、13、15 染色体上の 17 個のマーカーであった。

次に、ANOVA により連鎖が認められた染色体上の遺伝マーカーと各週齢における収縮期血圧との interval mapping 解析の結果を図 12 に示した。

Lander と Kruglyak は、モデル動物の F₂ を用いた QTL (Quantitative trait locus : 量的形質遺伝子座位) 解析において Lod score 2.8 以上を有意水準に提言している[40]。今回、この有意水準をみたす領域は第 1 染色体 (図 12a) 上 D1Mit2 座位近傍 (LOD score 5.6)、第 3 染色体 (図 12b) 上 D3Mgh16 座位近傍 (LOD score 3.1)、第 4 染色体 (図 12c) 上 TRY1 遺伝子座位近傍 (LOD score 3.2)、第 10 染色体 (図 12d) 上 RR1023 座位近傍 (LOD score 4.6) の 4 カ所であった。それぞれ 100 : 1 の信頼区間をしるした。これら 4 カ所の領域にそれぞれ高血圧遺伝子が存在すると推測される。

【考察】

本研究では本態性高血圧症の遺伝素因を解明するために、遺伝的モデルラット SHRSP を用いてその高血圧遺伝子の遺伝解析を行った。その結果、Lander と Kruglyak が提言している Lod score 2.8 以上[40]の有意水準をみたす領域が第 1、3、4、10 染色体上の 4 カ所に認められた。

第 1 染色体については、我々以外にも二つの研究グループ[41,42] が SHRSP とは別の高血圧モデルラットを用いて遺伝解析を行い、いずれも今回我々が明らかにした領域とほぼ同じ領域が血圧と連鎖することを報告している。Gu ら[41]は、食塩負荷によってはじめて高血圧を発症する Dahl 食塩感受性ラットを用いて、Brown ら[42]は高血圧と共に慢性の腎障害をきたす FHH (fawn-hooded hypertensive) ラットを用いて行っている。それぞれ異なった形質 (病態) を示す遺伝的モデルラットにおいて、ほぼ同じ領域に高血圧遺伝子が存在することは興味深い。これら領域によって引き起こされる高血圧が

同じ遺伝子によるものかどうかはわからないが、第1染色体上の D1Mit2 座位近傍の領域が、高血圧モデルラットの高血圧発症に関して非常に重要な領域であるといえる。また、この領域には高血圧候補遺伝子として SA 遺伝子が存在することが報告されている[43-46]。SA 遺伝子はもともと SHR の腎臓において WKY よりも 10 倍程度発現量が多い遺伝子として発見された[47]。SA 遺伝子の生理的機能は未だ不明だが、SA が腎内では唯一近位尿細管だけで発現している点など、生体内で非常に重要な働きをしていると考えられている[48,49]。しかし Ishinaga ら[50] は、我々が自家繁殖している WKY/Izm において SA 遺伝子の腎での発現量が SHR/Izm と同じであることを報告している。すなわちこれは以前に報告された研究に用いられた WKY と WKY/Izm における遺伝的背景の違い[51] によるものであるといえる。SA 遺伝子が高血圧遺伝子かどうかはまだ定かではないが、今後この領域における詳細な解析によって明らかにされるであろう。

Katsuya ら[52]は SHR と WKY の F₂ を用いた遺伝解析を行い、第4染色体上の TRY1 遺伝子座位より 14 cM 下流に存在する NPY (Neuropeptide Y) 遺伝子座位が高血圧と連鎖することを報告している。NPY 遺伝子は膵臓ポリペプチドの一種で、食欲の調節や血管の収縮に関与していると言われている[53,54]。残念ながら、NPY 遺伝子座位のマーカーにおいて SHRSP と WKY の間に多型性がなかった為に、この座位における遺伝解析はできなかったが、この領域近傍に SHR、SHRSP の両系統において高血圧遺伝子が存在することが明らかになった。NPY 遺伝子は高血圧候補遺伝子として今後の検討が期待される。

Clark ら[29]は、本研究において連鎖が認められた D3Mgh16 座位近傍の領域が、同様に SHRSP/Glasgow と WKY/Glasgow の F2 においても高血圧と連鎖することを報告している。この領域において高血圧遺伝子が存在することは明らかであろうが、彼らは雄の F2 ラットにおいてのみ、この領域と血圧との連鎖が認められるという雌雄差のデータを示しており、我々の結果と一致しない結果でもある。追試も含めて、この領域におけるさらなる解析が期待される。

ラット第 10 染色体上で血圧と連鎖が見られた領域には、Hilbert ら、Jacob らをはじめ、複数の連鎖解析で連鎖が認められている[22-25]。この領域には昇圧物質の一つであるアンジオテンシンⅡを産生する酵素である ACE 遺伝子、ノルエピネフリンからエピネフリンを合成する酵素である PNMT (Phenylethanolamine N-methyltransferase) 遺伝子が存在する[55]。これら遺伝子もヒト及びモデル動物における高血圧との関連が注目されている[56-58]。

2.2 QTL(量的形質遺伝子座位)の継時的推移について

上述 2.1 高血圧遺伝子の染色体マッピングの研究でさらに注目すべきは、第 1、3、4 染色体上の QTLs (高血圧遺伝子) は食塩負荷前の週齢 (第 1 段階) の血圧値と連鎖が認められたのに対し、10 染色体上の QTL は食塩負荷後の 12 ヶ月齢 (第 2 段階) の血圧値と強い連鎖を示したことである。近年、Schork らはコンピューターシミュレーション研究を行うことによって、血圧のような

量的形質（表現型）が複数の異なる時期に働く遺伝子によって説明されることを示している[59]。すなわち QTLs の働きが年齢により変わっていくのではないかという仮説をシュミレーション研究を用いることで提示している。本研究はその仮説と一致するものであり、Schork らが示しているシュミレーション研究をモデル動物を用いて実験的に証明したのものである。

QTLs の継時的推移をもう少しわかりやすく示すために、各週齢（年齢）において四つの染色体（第 1、3、4、10 染色体）上の QTLs が血圧に与える影響の大きさ（LOD score）を図 13 のグラフに示した。図に示されるようにそれぞれの QTLs の LOD score の大きさが週齢（年齢）によって大きく変動することがわかる。この中で、もっとも血圧に対して強い影響を示したのは第 1 染色体の QTL で、生後 10 週齢時に LOD score 5.6 であり、 R^2 値は 21% であった（すなわち F₂ における血圧の分散の 21% を第 1 染色体の QTL で説明できる）。また前述したように、他のグループからも第 1 染色体上に高血圧遺伝子が存在する連鎖解析の結果が報告されている[41-46]。本研究における結果とあわせて考えれば、おそらく第 1 染色体上に主要な高血圧遺伝子が存在すると推察される。

第 1 染色体の QTL は、ほぼ生涯を通じて血圧に対する影響が認められたのに対して、第 3、4 染色体上の QTLs は生後 8-10 週齢時にしか有意な影響を示さなかった（図 13）。F₂ 世代においては生後 5 週齢から血圧が上昇し始め、生後 20 週齢でほぼ血圧上昇が認められなくなる。第 1、3、4 染色体上 QTLs の血圧に対して強く影響が認められる生後 8-12 週齢は、ちょうど F₂ 世代における血圧上昇時期と一致する。すなわちこの時期にみられる血圧上昇はこれ

ら3つの QTLs の働きによるものであることが推測される。また、これら3つの QTLs によって F₂ におけるこの時期の血圧分散の約 30%を説明できた (R² 値 30%)。これは F₂ における遺伝素因に起因する分散が 40~60%と推定されていることを考えると、そのうちの5割から8割近くをこの3つの QTLs で説明できることになる。

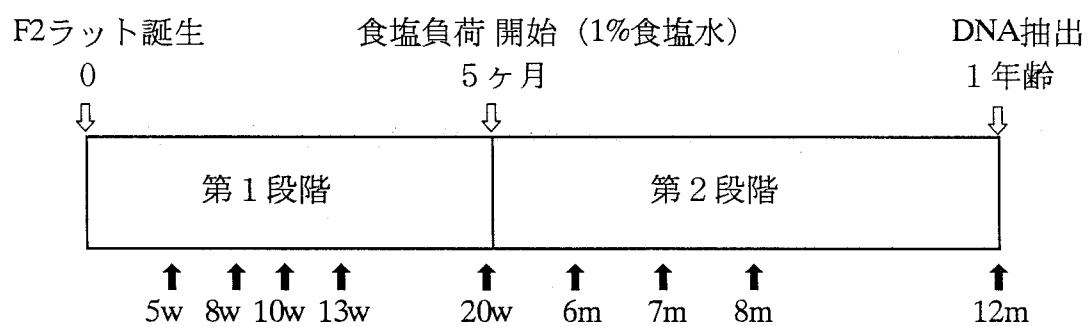
第10染色体上 QTL は、第1、3、4染色体上 QTLs とは異なり長期の食塩負荷によってはじめて有意な影響を示した (図12: 生後12ヶ月齢時、LOD score 4.5)。R² 値は18%であり、F₂ における血圧の分散の18%を説明できることになる。1) 第10染色体上に QTL の存在が推測された領域 (100:1 信頼区間) は、他のグループの連鎖解析[22-25]およびコンジェニックラットを使った研究[60] からも食塩負荷後の血圧上昇にかかわる遺伝子の存在が示唆されている点、2) SHRSP の血圧上昇は若い時期から認められ、5ヶ月齢時以降にはほとんど血圧上昇が認められない点[61]、から考えると第10染色体上の QTL は食塩負荷による血圧上昇にかかわる遺伝子、すなわち食塩感受性高血圧遺伝子であると推察される。

【結論】

1) 4つの染色体、第1、3、4、10染色体上領域に高血圧遺伝子 (QTLs) の存在が示唆された。2) それら QTLs の血圧に対する影響は年齢や食塩負荷のような環境因子により変動するということが、実験的に証明された。

今後、本研究において明らかになった領域に存在するいくつかの高血圧候補遺伝子に関して検討していくと共に、これら領域におけるコンジェニック系

統を作製しその領域を詳細に調べることによって、SHRSP における高血圧遺伝子が解明されると期待する。

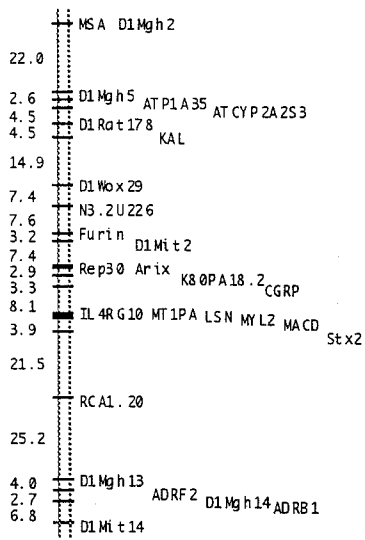


↑：血圧測定日 (w：週齢、m：月齢)

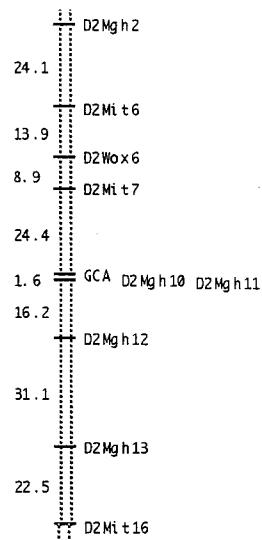
飼育条件：第1段階：SP 飼料+水道水

第2段階：SP 飼料+飲料水 (1%食塩水)

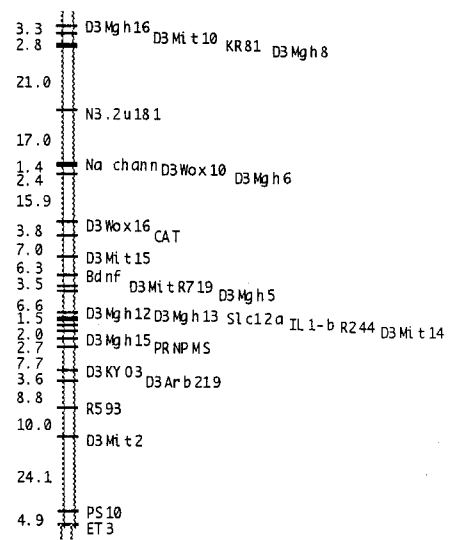
図10 F2世代の飼育実験スキーマ



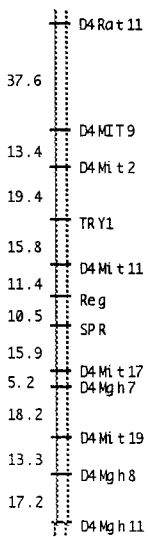
Chromosome 1



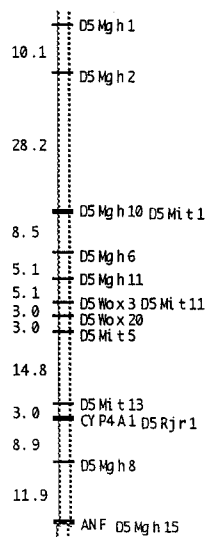
Chromosome 2



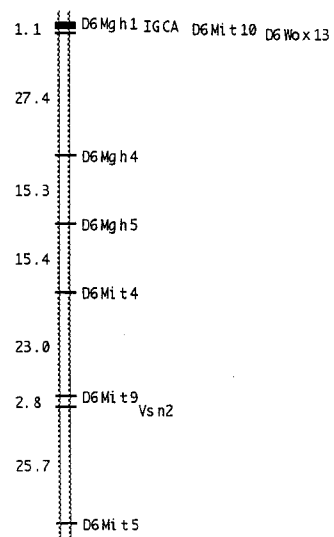
Chromosome 3



Chromosome 4

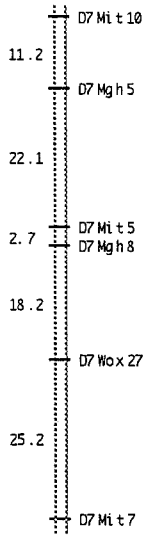


Chromosome 5

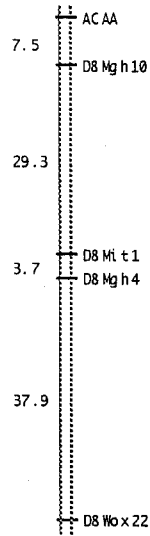


Chromosome 6

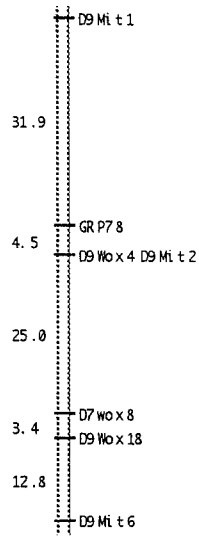
図11 F2世代において作成されたラット全染色体の遺伝地図
染色体左側の数字はマーカー間の距離をセンチモルガン
(cM : Kosambi's Unit) で表している



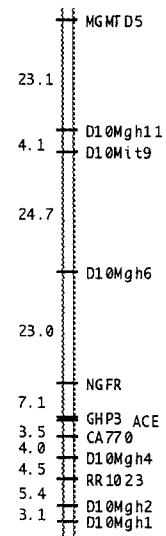
Chromosome 7



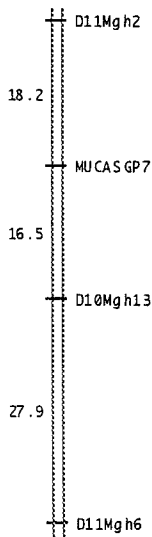
Chromosome 8



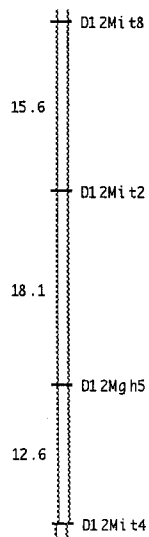
Chromosome 9



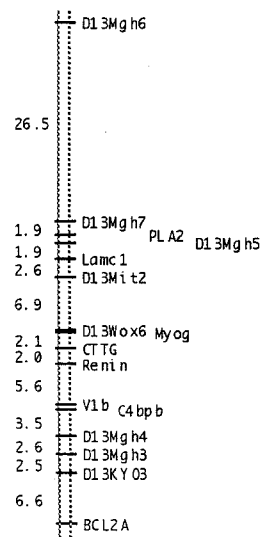
Chromosome 10



Chromosome 11

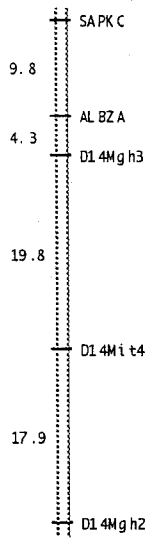


Chromosome 12

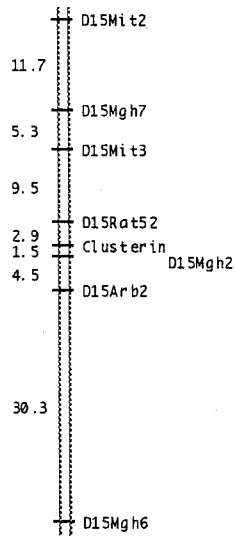


Chromosome 13

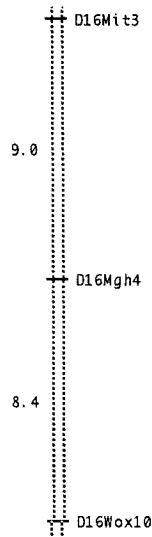
図11 続き



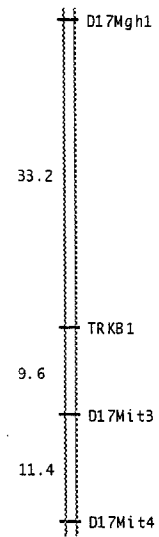
Chromosome 14



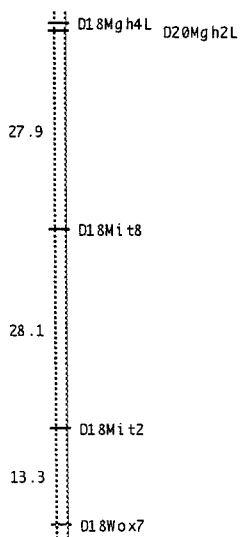
Chromosome 15



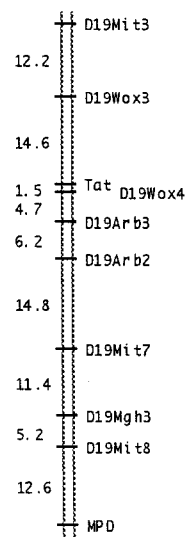
Chromosome 16



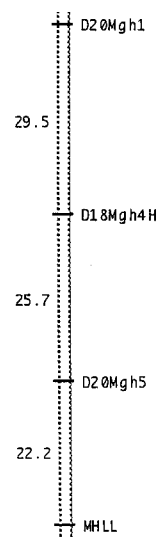
Chromosome 17



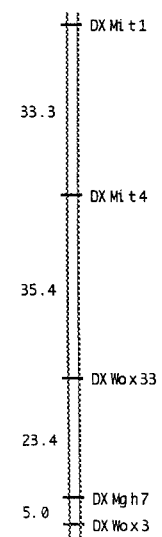
Chromosome 18



Chromosome 19



Chromosome 20



Chromosome X

図11 続き

表3 F2世代の連鎖解析（ゲノムスキャン）に使われた遺伝マーカー

Chr.	Number of Markers	Map Length(cM)
1	27 (12)	155.6
2	10 (10)	168.4
3	28 (12)	133.1
4	12 (10)	126.1
5	16 (16)	124.3
6	10 (10)	125.0
7	6 (6)	83.1
8	5 (5)	115.1
9	7 (5)	92.7
10	12 (7)	104.3
11	4 (4)	63.1
12	4 (4)	50.3
13	16 (7)	67.2
14	5 (5)	53.2
15	8 (4)	78.4
16	3 (3)	17.3
17	4 (4)	16.0
18	5 (5)	82.3
19	10 (10)	56.9
20	4 (4)	95.8
X	5 (5)	82.5
Total	201 (148)	1890.7

The number of markers used in QTL mapping is listed for each chromosome. The number of markers used in initial genome screening is also listed in parentheses. The size of chromosomal regions covered by typed markers is represented in Kosambi's unit.

表4 Linkage Between SBP and Markers Studied in the Initial Genome Screening

Chr.	Marker	Dist.*(cM)	Early Developing Stage (第1段階)				Late Salt-Loaded Stage (第2段階)			
			8w	10w	13w	20w	6m	7m	8m	12m
1	D1Mit2	0.0	.0038	.000004	.0002	.0068	.0023	.00005	.0011	.0003
	D1Smu11	13.4	.0037	.00002	.000009	-	.0056	.0011	.0015	-
	Mt1pa	21.8	-	.0007	.0002	-	.0068	-	-	-
3	D3Mgh16	0.0	.0016	.0011	-	-	-	-	-	.0048
	D3Mgh8	4.0	.0071	.0007	-	-	-	-	-	.0075
4	Try1	0.0	.0012	.0079	-	-	-	-	.0081	-
	D4Mit11	17.3	.0033	-	-	-	-	-	-	.0041
9	D9Mit2	0.0	.0040	.010	-	-	.0072	-	-	-
	D9Wox16	30.0	-	-	-	-	-	-	-	.0014
	D9Mit6	45.5	-	-	-	-	-	-	-	.0027
10	Ghp	0.0	-	-	-	-	-	-	-	.0015
	Ace	7.0	-	-	-	-	-	-	-	.0004
	RR1023	12.9	-	-	.0087	-	-	-	-	.00004
13	D13Wox6	0.0	-	.003	-	-	-	-	-	-
	D13Mgh3	16.0	-	-	.0054	-	.0010	-	-	-
	Bcl2a	21.5	-	-	-	-	.0069	-	-	.0089
15	D15Mit2		-	.0083	-	-	.0047	-	-	-

Numbers indicate *P* values for one-way ANOVA. Only *P* values less than .01 are shown.

-: $P > .01P$

*: Location of individual markers is shown as distance from D1Mit2, D3Mgh16, Try1, D9Mit2, Ghp, and D13Wox6 on each chromosome.

(a)

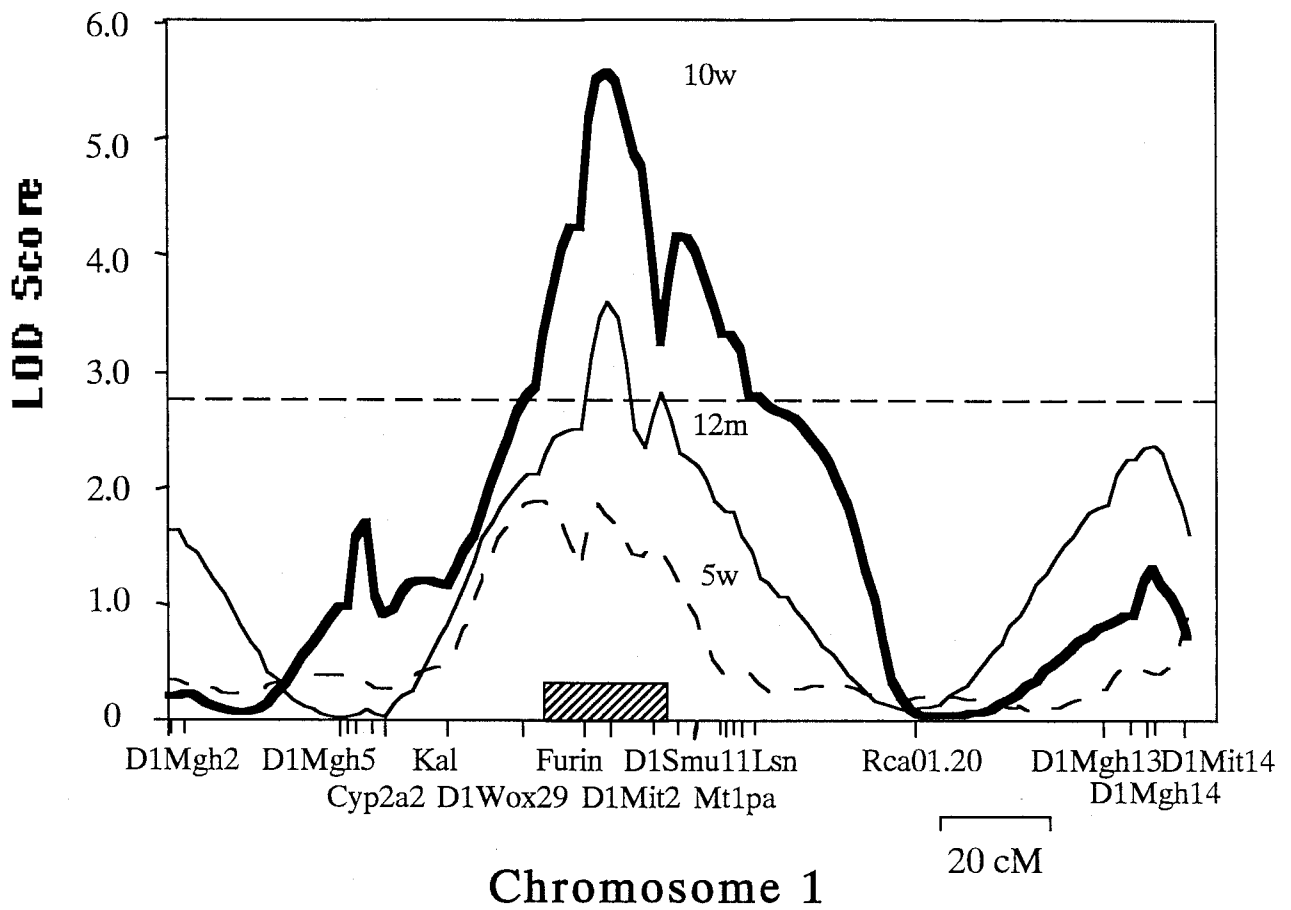
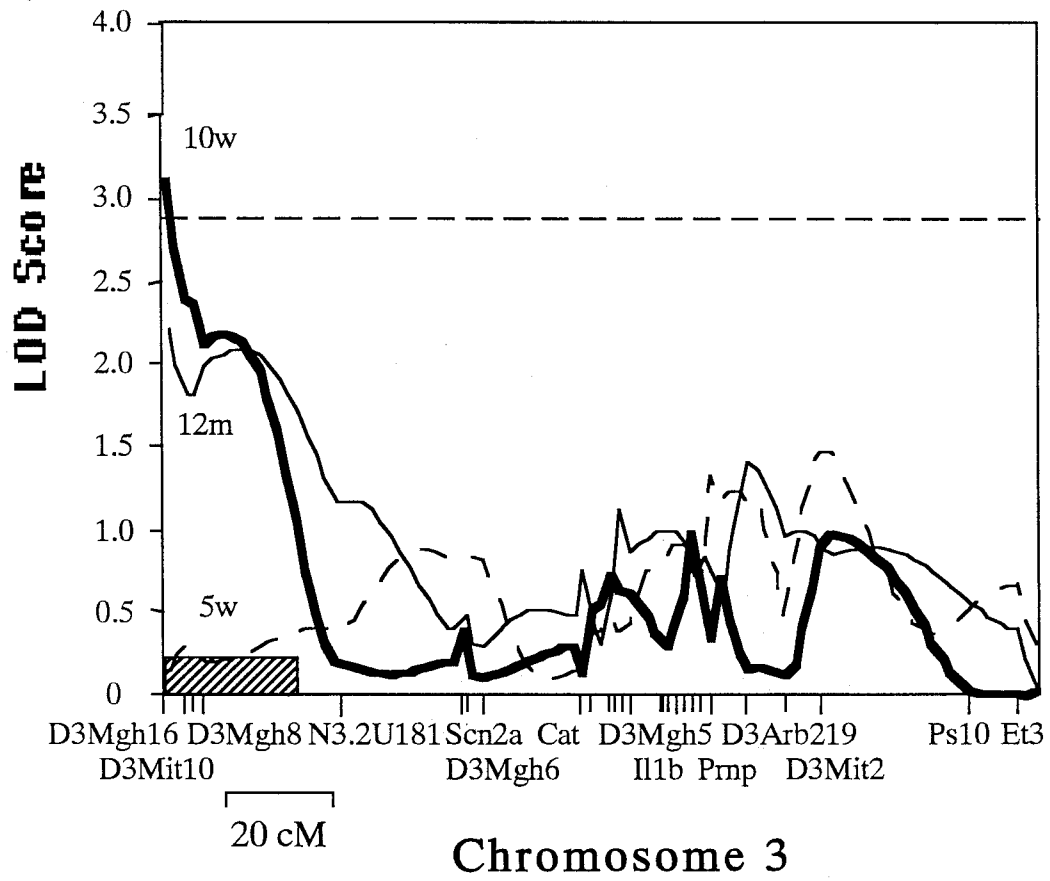


図12 F2世代における、a) 第1染色体、b) 第3染色体、c) 第4染色体、
d) 第10染色体上の高血圧遺伝子座位 (QTLs) のマッピング
▨ : 100 : 1 信頼区間

(b)



☒12 b)

(c)

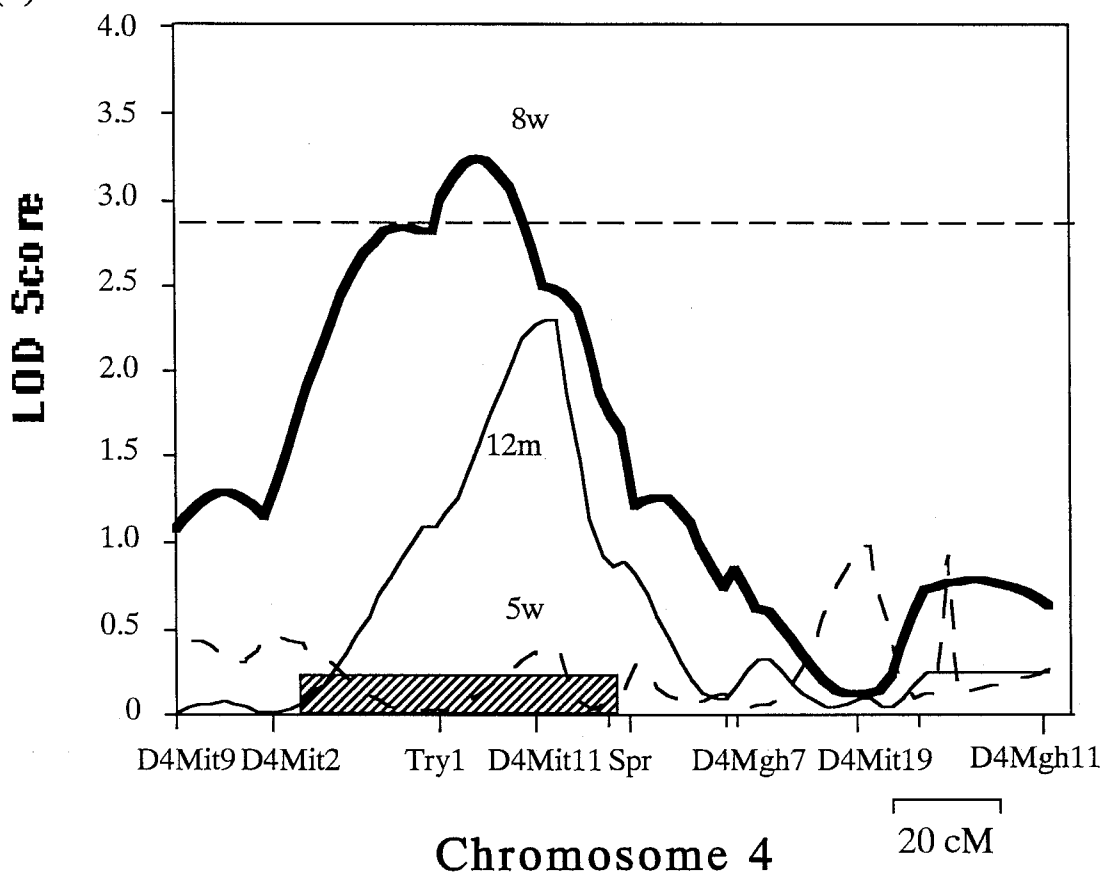
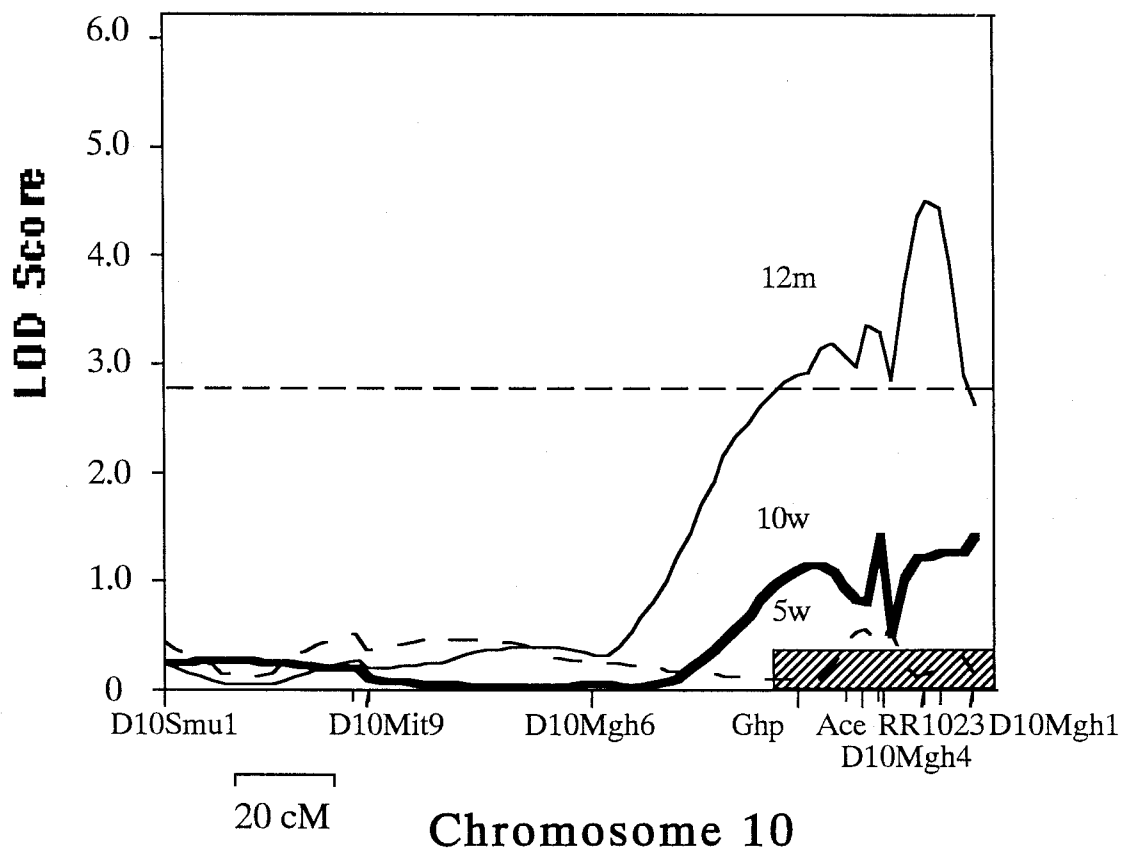


图12 c)

(d)



☒12 d)

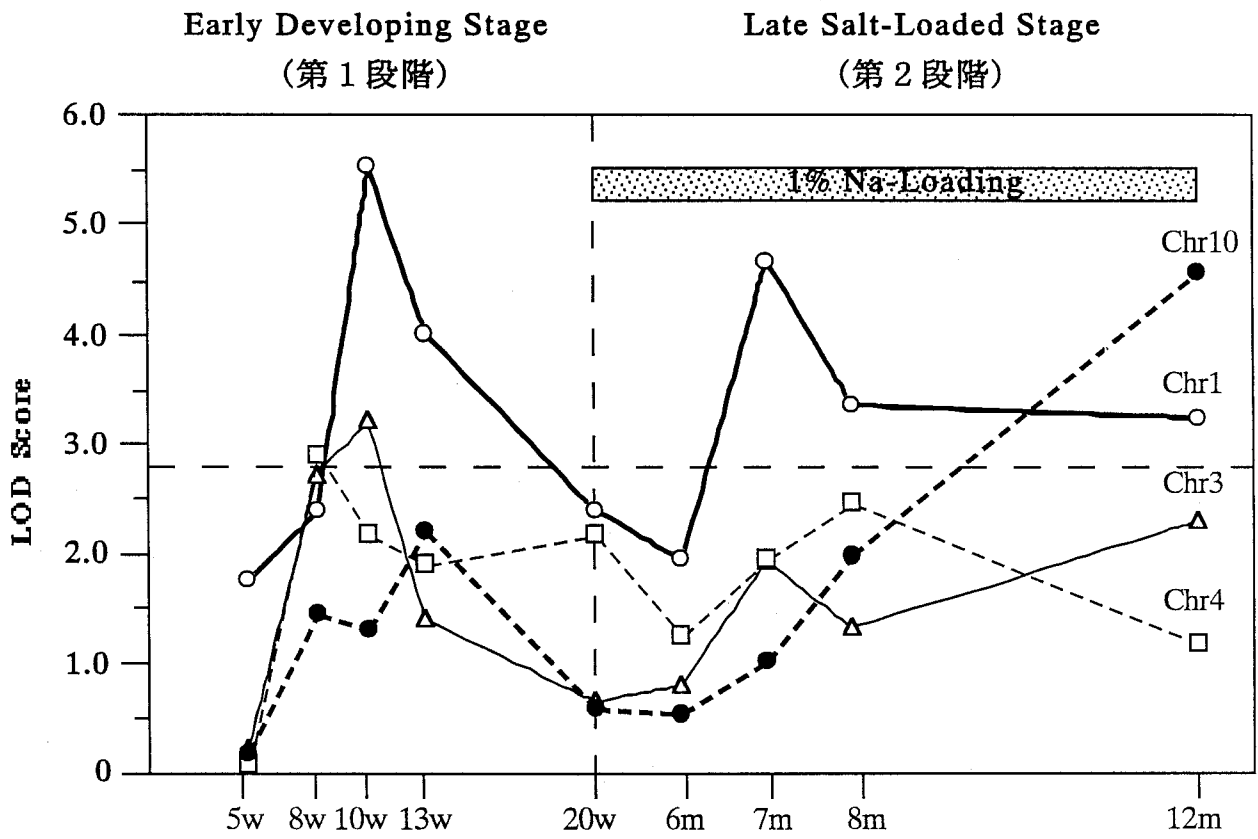


図13 第1、3、4、10染色体上の高血圧遺伝子 (QTLs) における LOD score の時間的推移

第3章

脳卒中遺伝子の解明に向けて

3.1 脳卒中遺伝子の染色体マッピング

【目的】

高血圧が脳卒中発症における主要な危険因子であることは明らかなが、糖尿病、肥満、食塩摂取などの食習慣あるいは喫煙などの環境因子がその発症をさらに増進させている。また1) これら危険因子をもたない症例の存在（血圧があまり高くない人が脳卒中を発症したり）、2) 若年齢で発症しやすい家族性の脳卒中（遺伝的素因により脳血管障害をきたしやすい家系）の報告もこれまでいくつかなされている[62-64]。以上ような報告は、脳卒中発症における高血圧素因とは別の“脳卒中感受性”を決定する遺伝素因（脳卒中遺伝子）の存在を示唆している。近年そのような脳卒中遺伝子を解明しようと、ヒトやモデル動物を用いた研究が盛んに行われている[65-68]。

ヒト脳卒中のモデル動物である SHRSP は、SHR の亜系（A, B, C 亜系）の中で脳卒中を多発する傾向のある亜系（A 亜系）の子孫のみを選択交配することにより成立した[10]。1) SHRSP（A 亜系）は脳卒中を 100%発症するのに対し、SHRSR（B, C 亜系）は高血圧があってもほとんど脳卒中を発症しない[11]。2) SHRSP に含硫アミノ酸などを多く含んだ食餌を与えると、血圧はあまり下がらないが脳卒中発症は劇的に押さえられる[13]などの知見は、SHRSP においても高血圧遺伝子とは別の脳卒中遺伝子をもつ可能性を示唆している。

本研究ではヒト脳卒中のモデル動物である SHRSP を用いて“脳卒中感受性”を決定する遺伝子を同定する目的で、SHRSP と WKY を交配して作製した F2 世代を対象とした遺伝解析を行った。

【実験材料と方法】

実験動物

高血圧遺伝子の染色体マッピング (2.1) の際に使用した F2 世代 (雄:125 匹) を本研究における連鎖解析においても同様に使用した。

脳卒中形質

F2 ラットは、血圧測定後 (最終 12 ヶ月齢) にペントバルビタール麻酔下において屠殺した。ラット脳を脳幹と脊髄との間で切除し、重量測定後、10%ホルマリン液で固定した。肉眼的所見により脳卒中の兆候を示したラットの脳組織は、大脳皮質前内方部から後頭部にかけて6枚の脳切片を作製し、最終的に顕微鏡下において脳卒中 (脳出血あるいは脳梗塞) 発症を確認した。

遺伝マーカー

親系統である SHRSP/Izm と WKY/Izm との間に遺伝的多型が存在した遺伝マーカーのうち 125 個 (ラット第 1 ~ 20 常染色体および X 性染色体のすべての染色体を網羅している) を用いて、F2 世代の遺伝子型を決定した。遺伝子型決定には、F2 世代のゲノム DNA をテンプレートとし遺伝マーカーをプライマーとして PCR 反応を行い、その PCR 産物を電気泳動する事によって行った。

遺伝解析

脳卒中発症が認められた F2 世代において、125 個の遺伝マーカーによって決定された遺伝型をもとに SHRSP ホモ型、WKY ホモ型、ヘテロ型の 3 群に分け、期待値 1:2:1 とした χ^2 検定により連鎖分析を行った。

さらに全 F2 世代ラットを対象に、脳重量と 125 個の遺伝マーカーによって決定された遺伝型との一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行った。F1 世代と F2 世代における脳重量の分散を F 検定により比較した。

【結果】

雄 F2 ラット 125匹のうち肉眼的所見および顕微鏡検査により 9 匹のラットにおいて脳卒中発症が確認された。そのうち 7 匹のラットは脳梗塞を 2 匹のラットは脳出血を認めた。これら 9 匹の F2 ラットにおいて 125 個の遺伝マーカーを用いた連鎖分析 (χ^2 検定) の結果、第 2、4、9、10 染色体上の 6 つの遺伝マーカーにおいて有意な連鎖が認められた (表 5)。

F1 世代と F2 世代の脳重量はそれぞれ 2.21 ± 0.07 g と 2.19 ± 0.14 g であった。F2 世代における脳重量の分散は F1 世代の分散よりも有意に大きな値を示した (F2 世代 : 0.019, n = 107 vs. F1 世代 : 0.005, n = 7, $P < 0.05$)。従って脳重量は F1、F2 世代を通して一部分遺伝的に規定されていることが推定される。F2 世代における脳重量は血圧値 ($r = -0.065$)、体重 ($r = 0.109$) とともに有意な相関は認められなかった。さらに高血圧遺伝子の染色体マッピングの研究 (2.1) の際に血圧値と連鎖が認められた遺伝マーカーと脳重量との間には有意な連鎖は認められなかった。以上のことは、体重や血圧値が直接的には脳重量に影響を与えないということを示唆している。また F2 世代において脳

卒中発症が確認されたラットの脳重量は発症しなかったラットに比べて有意な高値を示した (2.49 ± 0.13 g, $n = 9$ vs. 2.17 ± 0.10 g, $n = 98$, $P < 0.001$)。ANOVA による脳重量と遺伝マーカーとの連鎖解析の結果、D4Mit9、D4Mgh7、D4Mgh8 の3つのマーカーが有意な連鎖を示した (表6)。これら遺伝マーカーは χ^2 検定による脳卒中発症との連鎖分析においても有意な連鎖を示していたが、F2 世代で測定された血圧値とは有意な連鎖が認められなかった。

【考察】

血圧上昇とは別の“脳卒中になりやすさ”を決定する遺伝子 (脳卒中遺伝子) を同定する目的で、本研究ではモデル動物を用いた遺伝解析が行われた。脳卒中感受性の遺伝解析研究における問題点として、脳卒中発症の指標となるような明確な (量的) 形質 (たとえば高血圧症における血圧値のように遺伝解析に簡単に利用できるもの) が存在しないということがあげられる。そのため我々は2種類の解析方法を用いて連鎖解析を行った。

まず1) 脳卒中発症が認められた F2 世代における 125 個の遺伝マーカーを用いた χ^2 検定による連鎖解析を行った。その結果、第2、4、9、10 染色体上の6つの遺伝マーカーにおいて有意な連鎖が認められた。2) 以前我々は外見上にふらつきや明らかな神経障害が認められない SHRSP においても、脳出血や脳軟化、脳組織の膨張により脳重量が上昇することを報告している[69]。すなわち肉眼的所見により脳卒中発症が確認される以前から、脳卒中発症を引き起こした SHRSP では脳組織重量の有意な上昇を示す。また F2 世代における体重や血圧との相関解析の結果からは、脳重量はそれら形質とは有意な相関

が認められなかった。従って脳卒中発症における量的形質として脳重量を用いてラット全染色体上の遺伝マーカーとの連鎖解析を行った結果、D4Mit9、D4Mgh7、D4Mgh8 の3つのマーカーが有意な連鎖を示した。これら2種類の連鎖解析の結果は、ラット第4染色体上に高血圧遺伝子とは別の脳卒中発症に関わる遺伝子（脳卒中遺伝子）が存在することを示唆している。

これまでに我々の他にも2つのグループが、SHRSP を用いて脳卒中遺伝子を解明するために連鎖解析をおこなっている[67,68]。Rubattu ら[67]は SHRSP と SHR を交配して作製した F2 を用いて食塩負荷から脳卒中が発症する日までの長さを指標とし、脳卒中発症を促進する遺伝子を第1染色体上に、逆に発症を抑制する遺伝子を第4、5染色体上にマッピングした。Jeffs ら[68]は SHRSP と WKY の F2 で脳内中大動脈結紮による局所的虚血によってできる脳梗塞の大きさを指標とし、脳虚血に対する脳組織の脆弱性に関連する遺伝子を第5染色体上にマッピングした。我々を含め3つの連鎖解析において互いに一致した結果が得られていないが、それぞれの用いた実験手法、および脳卒中を量的形質としてとらえるときの用いた指標の違いによるものと考えられる。脳卒中の遺伝解析における量的形質あるいは中間形質（intermediate phenotype）がいかに重要であるかがわかるとともに、追試も含めて今後の研究の進展が待たれる。

【結論】

SHRSP と WKY を交配して作成した F2 世代を対象に 125 個の遺伝マーカーを用いた連鎖解析の結果、D4Mit9、D4Mgh7、D4Mgh8 の3つのマーカー

が脳重量（脳卒中になりやすさに対する一つの指標）と有意な連鎖を示した。これら遺伝マーカーは血圧値とは有意な連鎖が認められず、よってラット第4染色体上には、2.1 でマッピングされた高血圧遺伝子とは別の脳卒中発症に関わる遺伝子（脳卒中遺伝子）が存在するものと考えられる。

3.2 位置候補遺伝子アプローチ

【目的】

連鎖解析（3.1）によって脳卒中遺伝子が第4染色体上領域に存在することが推定された。次の戦略としては以下の2通りが考えられる。1）コンジェニック系統を作製して脳卒中連鎖領域をさらに狭めていく。2）位置候補遺伝子アプローチとしてその連鎖領域内に存在する脳卒中発症の候補遺伝子となるものをできるだけ選出し、それら遺伝子が実際に脳卒中遺伝子であるかどうかを生理機能学的研究により検討する。前者1）の場合、コンジェニック系統を作製するのに2～4年、さらにサブコンジェニックを作製し連鎖領域を狭めるためには最低でもさらに2、3年が必要である。従ってコンジェニック系統作製までの期間に、次のステップとして位置候補遺伝子アプローチを行った。

現在、染色体上の位置が決定されているラット遺伝子総数は、ヒトやマウスの数に比べるとはるかに少ないのが現状である[34,70,71]。従ってマッピングされた染色体領域における候補遺伝子をラット染色体上で選出することはヒトやマウスの場合に比べると困難である。しかしながら近年の広範なゲノムプロジェクトの発展により、だんだんとラット染色体がヒトやマウスのどの染色

体に相同するかがわかってきている（ラット、マウス、ヒト間の比較遺伝子地図が作製されている）[70-72]。この比較遺伝子地図を利用すれば、希望するラット染色体上に候補遺伝子を選出することも可能となる。従って本研究では脳卒中遺伝子がマッピングされた（3.1）ラット第4染色体上領域に相同するヒト、マウス染色体上から候補遺伝子をいくつか選出し、それら候補遺伝子のラット染色体上での位置を明らかにするとともに、脳卒中遺伝子との関係について検討した。

【実験材料と方法】

ライブラリースクリーニング

脳卒中遺伝子の候補として、Taurine transporter 遺伝子(*Taut*), tumor necrosis factor receptor 遺伝子(*Tnfr*), GABA transporter 遺伝子(*Gat1*) and glucose transporter-3 遺伝子(*Glut3*)を選んだ。これら4つの遺伝子は、以前の報告からラット第4染色体に相同すると推測されるヒトあるいはマウスの染色体上より選出した。これら遺伝子におけるSSRマーカー（遺伝マーカー）開発のためのラットゲノムライブラリーのスクリーニングを行うプロトコールの概略を図14に示す[35]。まずGenebankに登録されている遺伝子のcDNA配列をもとに、ラット脳から抽出したtotal RNAをテンプレートとしてRT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) を行い、ハイブリダイゼーション用のプローブを作成する。ラットゲノムライブラリー[73]をそれらプローブによりスクリーニングし、Positiveなクローンを選出する。選出したクローンを制限酵素Sau3Aで切断後、プラスミドベクター（pBluescript;

Stratagene, USA) に組み入れる。そのプラスミドベクターでライブラリーを作成し、(CA)₁₅あるいは(GA)₁₅ Oligomer をプローブとして再度スクリーニングする。Positive なクローンを選出後、そのクローンをシークエンスして塩基配列を読む。決定された塩基配列をもとに候補遺伝子における遺伝マーカーを作成する。

候補遺伝子のマッピング

開発された候補遺伝子における遺伝マーカーを用いて、ラット近交系 8 系統 (SHRSP/Izm, WKY/Izm; Wistar Kyoto, SHR/kyo, DRY/Sankyo; Donryu, OLETF; Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty, LETO; Long-Evans Tokushima Otsuka, WTC/Kyo; Wistar-derived tremor control, BN/N; Brown-Norway) において多型検索を行った[74]。多型検索において遺伝型に差が認められた近交系にもとづき、3つの交配群を利用して候補遺伝子の染色体マッピングを行った。SHRSP/Izm と WKY/Izm を交配して作製された F2 世代 125 匹、SHR/kyo と DRY/Sankyo を交配して作製された戻し交雑仔 (BC1 世代) 87 匹、WTC/Kyo と BN/N を交配して作製された BC1 世代 48 匹において、候補遺伝子における遺伝マーカーの遺伝型を決定した。遺伝マーカーおよびその PCR 反応条件を表 7 に示す。D4Smu4 の遺伝マーカーは touchdown PCR 法により増幅された[75]。PCR 産物は 4% アクリルアミドゲルにより電気泳動後、エチジウムブロマイド染色により検出された。各交雑群において決定された遺伝型により MAPMAKER/EXP 3.0 [39]を用いて遺伝子地図を作成した。

【結果】

Taurine transporter 遺伝子においては、報告されているその cDNA 配列 (Genebank M96601) の 3'非翻訳領域 (3' UTR) 内において 22 回の CA くり返し配列を検出した。従ってその (CA)₂₂ をもとに Taurine transporter 遺伝子の SSR マーカーを作成し (表 7)、BC1 世代 (WTC x BN) x BN において決定された遺伝型により、ラット第 4 染色体上にマッピングした (図 15、D4Smu1)。

Tumor necrosis factor receptor 遺伝子, GABA transporter 遺伝子, glucose transporter-3 遺伝子における SSR マーカーは、ラットゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより新しく開発された。tumor necrosis factor receptor 遺伝子は BC1 世代 (WTC x BN) x BN において決定された遺伝型をもとに、GABA transporter 遺伝子は BC1 世代 (SHR x DRY) x SHR において決定された遺伝型をもとにして、ともにラット第 4 染色体上にマッピングされた (図 15、D4Smu2 と D4Smu3)。

D4Smu4 (glucose transporter-3 遺伝子の SSR マーカー) は、多型検索された 8 つのラット近交系において遺伝型に差がなかった。よってラット、マウス交雑クローンパネル[76]を用いて D4Smu4 がどの染色体にあるかを決定した。D4Smu4 において positive な交雑クローンはラット第 4 染色体のクローンパネルと完全に一致した。

【考察】

本研究において新たに開発された SSR マーカーを用いて、脳卒中遺伝子の候補である tumor necrosis factor receptor 遺伝子と GABA transporter 遺伝子をラット第 4 染色体上の D4Mgh7 と D4Mgh11 の間の領域にマッピングした (図 15)。この領域は脳卒中遺伝子の染色体マッピング (3.1) で脳卒中感受性と連鎖が認められた遺伝マーカーが存在する領域と一致する。一方、Taurine transporter 遺伝子はその領域とは少しはなれた Neuropeptide Y 遺伝子 (*Npy*) 近傍にマッピングされた。これら結果により、ラット第 4 染色体とマウス第 6 染色体とはかなり広範な領域においてその相同性が認められることがわかる。本研究において glucose transporter-3 遺伝子の染色体マッピングはできなかったが、1) ラット、マウス交雑クローンパネルを用いた解析により第 4 染色体上に存在すること、2) 本研究により明らかにされたラット、マウス、ヒト間の比較遺伝子地図 (図 15) から、glucose transporter-3 遺伝子はラット第 4 染色体上の tumor necrosis factor receptor 遺伝子と GABA transporter 遺伝子の間に存在することが強く示唆される。

Tumor necrosis factor (TNF) は生体内において細胞のアポトーシスを誘起するカスケードにおいて重要な役割を果たしていることが知られている。また脳卒中などの脳障害性虚血状態において脳内 TNF タンパク量の著しい上昇が認められる[77]。さらには tumor necrosis factor receptor 遺伝子のノックアウトマウス (ある遺伝子のみを遺伝子操作技術により人為的に働かなくしてしまった動物モデル) において、脳中大動脈結紮 (MCAO: 脳内の動脈において手術的処置により血液の流れを止めた人工的脳梗塞障害モデル) を処置することにより、コントロールマウスに比べ有意な脳障害程度を呈するという報

告がある[78]。以上の知見は TNF を介したシグナル伝達カスケードが脳内神経細胞の虚血細胞死において重要な役割を果たしていることを提示しており、本研究における染色体マッピングの結果とあわせて考えれば tumor necrosis factor receptor 遺伝子は SHRSP における脳卒中遺伝子の重要な候補であるといえる。

GABA transporter のインヒビターは脳内の虚血障害の程度を抑制するという報告がある[79]。glucose transporter-3 は neuron 特異的に存在しており、脳中大動脈結紮処置されたラット脳内において glucose transporter-3 遺伝子発現の上昇がみとめられ、これら発現上昇が脳内血流量低下にともない虚血状態に陥った神経細胞の不足した代謝エネルギーを補足していると考えられている[80]。これら報告から GABA transporter 遺伝子や glucose transporter-3 遺伝子もまた SHRSP における脳卒中遺伝子の候補であることが推察される。

タウリンは脳内神経細胞における虚血傷害からその神経細胞死を防ぐ働きが報告されている[81]。SHRSP では、タウリンを与えることによりその脳卒中発症を抑えることができるといわれている[82]。従って、生体内において細胞内外の濃度を調節している Taurine transporter 遺伝子は SHRSP における脳卒中発症に関与しているのではないかと考えられた。しかしながら本研究においてはその因果関係が証明されず、今後さらなる詳細な検討が必要であると考えられる。

【結論】

ラット、マウス、ヒト比較遺伝子地図を利用した位置候補遺伝子アプローチの結果、tumor necrosis factor receptor 遺伝子, GABA transporter 遺伝子, glucose transporter-3 遺伝子が脳卒中遺伝子がマッピングされた第4染色体上の領域 (3.1) に存在することが確認された。それら3つの遺伝子の機能および生理学的研究から、SHRSP における脳卒中発症の重要な候補遺伝子として推測される。今回これら遺伝子と脳卒中発症との直接の因果関係は明らかにされなかったが、さらなる検討 (SHRSP と WKY における発現レベルの比較、塩基配列の決定など) により SHRSP における脳卒中遺伝子としての評価が期待される。

表 5 Cosegregation of overt stroke with SSR markers on chromosome 2, 4, 9 and 10.

Marker	Chromosome	Observed genotypes in apoplectic 9 F2 rats			P
		sp/sp	sp/wky	wky/wky	
D2Mgh10	2	6	2	1	<0.01
D4Mgh7	4	6	2	1	<0.01
D4Mgh8	4	6	3	0	<0.01
D4Mit19	4	6	3	0	<0.01
D9Mit6	9	6	2	1	<0.01
NGFRR	10	6	3	0	<0.01

Observed genotype frequencies were tested against the expected frequency, sp/sp:sp/wky:wky/wky=1:2:1 under the null hypothesis by the χ^2 test.

表 6 Cosegregation of brain weights with the SSR markers on chromosome 4.

Marker	Brain weights (g)			F	P
	sp/sp	sp/wky	wky/wky		
D4Mgh7	2.30±0.18 (19)	2.19± 0.12 (47)	2.15±0.12 (31)	7.032	0.0014
D4Mit19	2.27±0.17 (26)	2.19±0.12 (50)	2.14±0.11 (28)	6.907	0.0015
D4Mgh8	2.29±0.18 (20)	2.19±0.11 (49)	2.16±0.12 (28)	5.849	0.0040

(), number of observations.

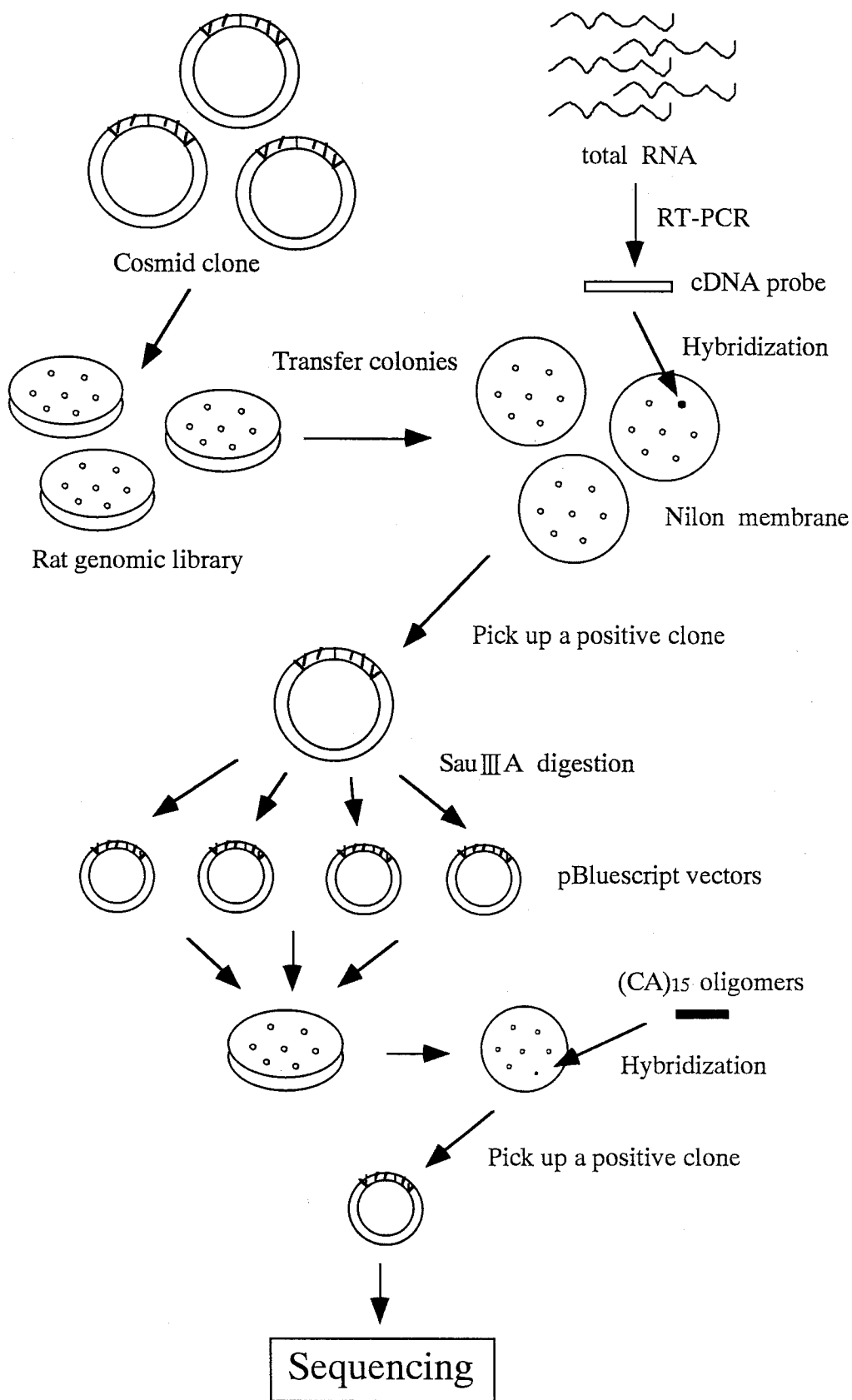


図14 ラットSSR marker 作製のプロトコール

表 7 A list of newly developed simple sequence repeat (SSR) markers on rat chromosome 4.

Loci (<i>gene symbols</i>) : Gene names	Accession No.	Primers	Product sizes PCR conditions (SSRs) ^a Ann.temp./MgCl ₂ Alleles ^b	
D4Smu1(<i>Taut</i>) : Taurine transporter	M96601	5' CGCTTTCCTGCCGTTACTA 3' 5' GCCCATGGGTTTCTTTTTTG 3'	223bp (CA) ²²	60°C/1.5mM P=W=S=D=O=WT>F=B
D4Smu2(<i>Thfr</i>) : Tumor necrosis factor receptor	AF128408	5' TTCGGGGAAGGAACCACACTT 3' 5' CGGAGACCTGAGAA GCCCACAC 3'	206bp (CA) ²⁹	65°C/1.5mM P=W=S=D=F=O=WT>B
D4Smu3(<i>Gat1</i>) : GABA transporter	AF128409	5' GGCATGGTATTGGCATGGTAGA 3' 5' AGGTTTTTCACAAGGGGAGGG 3'	147bp (CA) ²⁴	65°C/1.5mM P=W=S=F=O=WT>D=B
D4Smu4(<i>Glut3</i>) : Glucose transporter-3	AF128410	5' TGCCCTGGTTTTCTTCATCATC 3' 5' AACCCAGGGCCTTGCGCTTCTT 3'	156bp (GA) ²³	TD63-58°Cc 1.5mM P=W=S=D=F=O=WT=B

^aProduct sizes and numbers of repeats are based on sequenced plasmid clones or on the reference.

^b Genotyped rat strains are; P, SHRSP/Izm; W, WKY/Izm; S, SHR/kyo; D, DRY/Sankyo; F, OLETF; O, LETO; WT, WTC/Kyo; BN, BN/N.

^c Touchdown PCR; Annealing temperature was decreased from 63°C to 58°C by 1 degree at every cycle and then fixed at 58°C for 25 cycles.

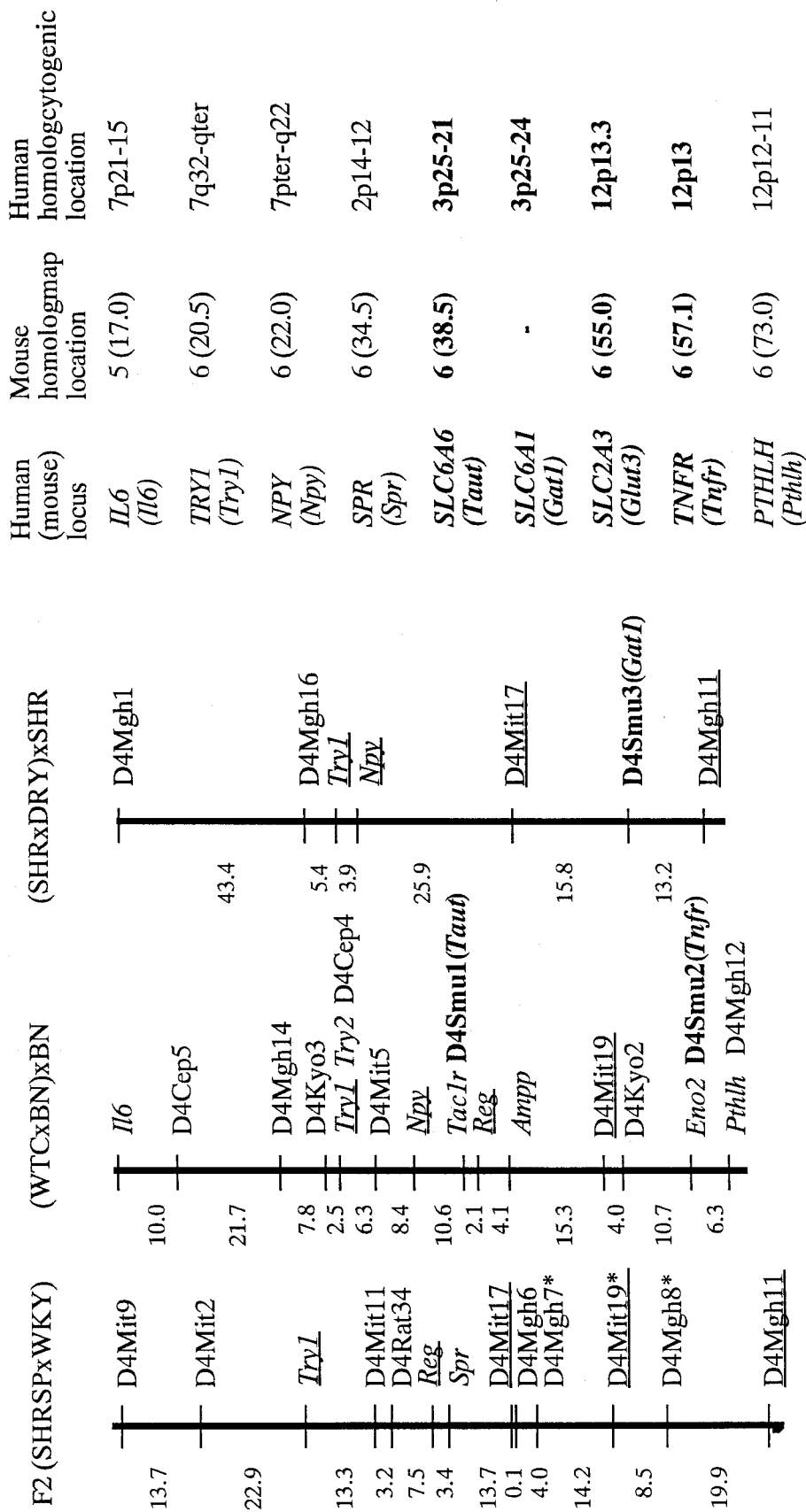


Fig 15 Linkage maps of rat chromosome 4. The left panel is the map for an F2 (SHRSP x WKY) cross of 125 progenies, the center panel for a backcross (WTC x BN)x BN of 48, and the right panel for a backcross (SHR x DRY) x SHR of 87. Map distance is calculated by MAPMAKER/EXP 3.0 program and represented in Kosambi's unit. Human and mouse homologous location is indicated on the right. Markers in bold letters were newly developed in this study. Underlined markers are mapped by more than two crosses. *Markers previously showed a significant linkage with stroke in SHRSP (3.1).

第4章

脂質代謝異常の原因遺伝子解明に向けて

4.1 脂質代謝異常に関する遺伝子の染色体マッピング

【目的】

血中のコレステロールやトリグリセライドが高くなる高脂血症は、遺伝因子と環境因子の両者が作用して発症する多因子性の疾患であると考えられている。高コレステロール血症が動脈硬化性疾患（特に虚血性心疾患）の重大なリスクファクターであるということが（今日では常識だが）、1949年米国 Framingham における大規模な疫学調査によって初めて明らかにされた[83]。また Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) とよばれる大規模な疫学調査によると、血中総コレステロール値の上昇に伴い総死亡率も上昇する傾向が認められるものの、ある閾値以下においてはコレステロール値低下とともに逆に総死亡率が上昇するという“Jカーブ”を描くことが示された。同じ調査において、虚血性心疾患による死亡率はコレステロール値の上昇とほぼ正の相関を示すが、脳卒中の死亡率はコレステロール値が非常に高い群でむしろ低下していることも示された[84]。低コレステロール血症の集団に脳卒中の発症が多く認められるという疫学的研究報告もいくつかなされている[85,86]。これら疫学調査は脳卒中発症におけるコレステロールの役割の重要性を示唆するものであり、その関連性を明らかにすることは重要なテーマであると考えられる。

ヒト脳卒中のモデル動物である SHRSP は、普通食飼育下において対照動物 WKY よりも血中総コレステロール値の低下が報告されている[87]。澤村ら[88]はその原因の一つとして、細胞質画分中におけるコレステロール合成経路の中の酵素の一つであるメバロン酸二リン酸脱炭酸酵素 (MPD) の活性低下が認められ、それにより SHRSP のコレステロール合成が低下していることを報

告している。またコレステロール含有量が少ない食餌を与えた場合には、血管壁の平滑筋細胞が壊死に陥りやすいという報告もある[89]。一方、SHRSP に高脂肪・高コレステロール(HFC)食を負荷すると WKY と比較して容易に血中コレステロール値の上昇（高脂血症）をきたし、腸間膜動脈や脳底動脈にまで脂肪沈着が認められる[90,91]。SHRSP における培養平滑筋細胞では WKY に比べ脂肪（LDL コレステロール）を取り込みやすく増殖能が亢進しているという報告もあり[92]、SHRSP の血管における動脈硬化をおこしやすいという特徴あるいは遺伝的素因の存在が示唆されている。以上の知見は SHRSP が遺伝的に脂質代謝の異常をもち、その脂質代謝の異常が血管の障害性（動脈硬化）さらには脳卒中易発症性に関連している可能性を示唆している。

本研究では SHRSP における脂質代謝異常の遺伝的素因を解明するとともに、それら脂質代謝異常と脳血管障害発症との関係を明らかにするために、SHRSP と WKY を交配して F2 世代を作製して複数の脂質形質（リポ蛋白、アポ蛋白、脂肪重量）を測定し、それら形質の遺伝様式を相関解析により検討した。さらに F2 世代を対象として、それら脂質形質と全染色体上 168 個の遺伝マーカーにおける遺伝型との連鎖解析を行った（ゲノムスキャン）。

【実験材料と方法】

実験動物

SHRSP/Izm と WKY/Izm は SHR 等疾患モデル共同研究会（京都、日本）より購入した。SHRSP/Izm 雄 1 匹と WKY/Izm 雌 3 匹あるいは、WKY/Izm 雄 1 匹と SHRSP/Izm 雌 3 匹を交配して F1 世代 60 匹（♂28 匹、♀32 匹）

を作製した。F1 世代同志を兄妹交配して F2 世代 358 匹 (♂174 匹、♀184 匹) を作製した。SHRSP/Izm、WKY/Izm、F1 ラット、F2 ラットは標準飼育条件 (温度: 23-28℃、湿度: 60%、日照時間: AM6:00 - PM6:00) 下において飼育した。生後 13 週齢までは標準飼料 (SP 飼料: 船橋農場) と水道水を自由摂取させ、その後 HFC 食 (5% lard, 2% cholesterol, 0.5% cholic acid) を 2 週間負荷した。

形質測定

全ての形質は SHRSP/Izm (♂6 匹、♀6 匹)、WKY/Izm (♂6 匹、♀6 匹)、F1 ラット (♂28 匹、♀32 匹)、F2 ラット (♂174 匹、♀184 匹) において測定された。血圧は間接法 (photo electric oscillometric tail-cuff method: UR1000, UEDA) により尻尾から測定した。血圧 (収縮期血圧: SBP) は午前中 (AM6:00- AM12:00) に 3 回測定し、その平均を血圧値として用いた。

採血 (血液 1 ml) は HFC 食負荷前 (13 週齢: Chow) と HFC 食負荷 2 週間後 (15 週齢: HFC) の 2 回、それぞれ 6 時間 (AM7:00 - PM2:00) の絶食後にエーテル軽麻酔下において右頸静脈より行った。採血後ただちに遠心処理 (3000 r.p.m., 20min) により血清を分離し、4℃において保存した。分離後 4 日以内に血清総コレステロール値 (TC)、総トリグリセライド値 (TG)、高比重リポタンパク質コレステロール値 (HDL-C)、低比重リポタンパク質コレステロール値 (LDL-C) を自動測定装置により測定した。TC、TG は測定用試薬 (ピュアオート S CHO-N: 第一化学薬品、デターミナル TG: 協和メデ

ックス)を用いて酵素法により、HDL-C、LDL-Cは測定用試薬(デターミナル HDL-C: 協和メデックス、コレステスト LDL: 第一化学薬品)を用いて直接法により測定した。

さらに採血後の血清を段階的密度勾配超遠心法により、超低比重リポタンパク(VLDL: $d < 1.006$)と低比重リポタンパク+高比重リポタンパク(LDL+HDL: $d > 1.006$)とに分画した。そして各分画中のアポ蛋白E(ApoE)含量をLaurell法[93]に準拠したRocket免疫電気泳動法[94]により定量した。ただしApoEはHDLおよびVLDLを構成するアポタンパクとして従来より報告されており、LDL+HDL分画中に存在するApoEはHDLを構成するアポタンパク(HDL-ApoE)のみを定量していることに注意を要する。

ラットは15週齢において採血した後、ネンブタール麻酔下で屠殺した。肝臓、心臓、精巣(子宮)周囲脂肪を摘出し、重量を測定した。

ゲノムDNA抽出

F2世代のゲノムDNAは摘出した肝臓切片(約25mg)から市販のDNA抽出用キット(Dneasy 96 Tissue Kit: QIAGEN, USA)を用いて抽出した。最終濃度10ng/ μ lになるようにDNAサンプルを調整して、PCR反应用テンプレートとして使用した。

F2世代の遺伝子型決定

SHRSP/IzmとWKY/Izmとの間に遺伝的多型が存在した(第2章2.1本態性高血圧遺伝子の染色体マッピングで多型検索を行った)遺伝マーカーのう

ち 168 個を用いて F2 世代の遺伝子型を決定した。PCR 反応は第 2 章 2.1 と同様に行った。以下の 2 種類の電気泳動法を用いて F2 世代の遺伝子型を決定した。

1) PCR 増幅後、その産物を 4% アガロースゲル(FMC, USA)上で電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後 UV 撮影装置 (TOYOBO, JAPAN) によって遺伝子型を決定した。

2) 4% アガロースゲルで判別不可能な PCR 産物は 6% アクリルアミド (Wako Junyaku Co., JAPAN) 上で電気泳動し、Hybond-N+ ナイロンメンブレン (Amersham, UK) 上へアルカリトランスファーした。引き続いて PCR 反応 に用いたプライマーの片方を Terminal transferase (Boehringer Mannheim, Germany) により [α 32P]dCTP (Amersham, UK) でアイソトープ・ラベルしたものをプローブとしてハイブリダイゼーション反応 (42°C、3 時間) を行った。反応溶液にはチャーチバッファー (0.5M リン酸ナトリウムバッファー pH 7.2, 7% SDS, 1mM EDTA) を用いた。反応終了後メンブレンを室温にて 2×SSC (0.3M NaCl, 30mM Na3Citrate) / 0.1% SDS 中でリンス洗浄し、オートラジオグラフィーにより遺伝子型を決定した。

コンピュータによる解析

親系統 (SHRSP/Izm と WKY/Izm) の間で測定した脂質形質に関しては、雄雌および高脂肪食負荷前後 (Chow, HFC) において Boferroni 検定により多重比較を行った。

F2 世代において測定された脂質形質においてそれぞれの関係を見るために

雄雌それぞれの F2 群において相関解析 (Correlation analysis) を行った。

SHRSP と WKY の間で多型性を示す 168 個 (全染色体を網羅する) の遺伝マーカーによって、ラット全染色体の遺伝地図を作製した。F2 世代において測定した複数の脂質形質に対して、168 個の遺伝マーカーにより決定された遺伝型をもとに one-way ANOVA により連鎖解析を行った (ゲノムスキャン)。連鎖が認められた染色体においては MAPMAKER/QTL program を用いて interval mapping 解析を行った。

【結果】

親系統間における脂質形質の比較

SHRSP および WKY において測定された脂質形質のプロファイルを表 8 に示す。いくつかの脂質形質において SHRSP と WKY 間に有意な差が認められた。まず普通食飼育下 (Chow) における SHRSP の血中総コレステロール値 (TC) は WKY に比べて雌雄ともに有意に低下していた (male: 72 ± 5.3 vs. 100 ± 7.0 mg/dl, $P < 0.05$, female: 81 ± 5.0 vs. 115 ± 3.5 mg/dl, $P < 0.01$) (図 16 a)。同様に、SHRSP では血中 HDL-C の有意な低下も認められた (male: 60 ± 4.1 vs. 87 ± 7.2 mg/dl, $P < 0.001$, female: 70 ± 5.3 vs. 96 ± 4.4 mg/dl, $P < 0.001$)。また HFC 食負荷 (HFC) により SHRSP では WKY に比べて TC、LDL-C の顕著な上昇が認められたが、雌の方が雄よりもさらに著明な上昇を示した (LDL-C, male: 20 ± 5.4 vs. 44 ± 3.2 mg/dl, $P < 0.001$, female: 73 ± 11.7 vs. 97 ± 2.6 mg/dl, $P < 0.001$) (図 16 a)。さらに SHRSP は WKY に比べて HDL および VLDL の構成アポ蛋白の一種である血中の apolipoprotein E

(ApoE)、特に HDL 中の apolipoprotein E (HDL-ApoE) の減少が HFC 食負荷前後で認められた (図 16 b)。また SHRSP の血中 TG 値は HFC 食負荷前後で WKY よりもともに高い値を示した (male: 103 ± 18.7 vs. 67 ± 11.1 mg/dl, $P < 0.05$, female: 120 ± 42.9 vs. 89 ± 35.5 mg/dl, $P < 0.05$) (図 16 c)。精巣 (子宮) 周囲脂肪重量 (Fat-Pad) は SHRSP が WKY に比べ有意な低下、あるいは低下傾向を示した (male: 3.00 ± 0.20 vs. 4.00 ± 0.60 mg/dl, $P < 0.01$, female: 2.83 ± 0.60 vs. 3.21 ± 0.60 mg/dl, ns)。

以上まとめると 1) 普通食飼育下において SHRSP は WKY に比べ低コレステロール血症 (低 HDL コレステロール血症)、高トリグリセライド血症および血中 apolipoprotein E の低下を示した。さらに 2) HFC 食負荷により SHRSP では WKY よりも有意な反応性高脂血症が認められた。また 3) SHRSP は WKY に比べ脂肪組織重量の低下が認められた。

相関解析

次に親系統において有意な差が認められた形質に関して F2 世代を対象に相関解析を行い、いくつかの形質に関して有意な相関関係が認められた (表 9)。TG と HDL-C の間に有意な負の相関 ($\rho = -0.28$, $P = 0.0002$) が (図 17 a)、TG と体重、脂肪重量との間に有意な正の相関 ($\rho = 0.34$, $P < 0.0001$) が (図 17 b) 認められた。このような血中トリグリセライド値と血中 HDL-C との逆相関、あるいは体重との正相関はヒト疫学的研究からも一致する結果が報告されている [95]。

興味深い点として F2 世代において脂肪重量と HFC 食負荷後の TC、LDL-C

の間に有意な負の相関 ($\rho = -0.34$, $P < 0.0001$) が認められた (図 17 c)。すなわち SHRSP における高脂肪・高コレステロール食に対する血中コレステロールの上昇において、脂肪組織の異常 (脂肪細胞の分解あるいは合成に関与する因子) が関係している可能性が示唆された。SHRSP では若齢時から交感神経が亢進しており、WKY に比べて体重および脂肪重量の減少が報告されている [8]。交感神経の亢進がその一要因である可能性も考えられる。

遺伝子地図作製

168 の遺伝マーカーによってによって決定された F2 世代の遺伝型をもとにラット全染色体の遺伝地図を作製した (図 18)。各染色体におけるマーカー数とカバーされる染色体の長さを表 10 にまとめた。ラット全染色体 (第 1 ~ 20 常染色体、X 性染色体) 全て網羅しており、各染色体において少なくとも 5 つ以上のマーカーが存在した。これら遺伝マーカーの存在する領域は全部でラット染色体上 1457 cM にわたり、2 つのマーカー間における距離は最も離れているところで 40.0 cM で、平均すると 8.7 cM であった。

低コレステロール血症に関わる遺伝子座位

SHRSP の脂質代謝異常 (特に、低コレステロール血症と反応性高脂血症) に関わる遺伝子座位を決定するため、普通食飼育下 (Chow) および HFC 食飼育下における複数の脂質形質を対照としたゲノムスキャンを行った。その結果、6 カ所の染色体領域において複数の脂質形質と連鎖を示す遺伝子座 (QTLs) の存在が示唆された。それら QTLs は 1) SHRSP における血中コレ

ステロール値の低下に関連する遺伝子座と、2) 血中コレステロール値の上昇に関連する遺伝子座の2種類にわけられた。

ラット第5染色体、第15染色体上の最も強い連鎖を示した遺伝マーカーにおける脂質形質とのANOVA解析の結果を表11に示した。F2世代において測定された脂質形質において遺伝マーカーの遺伝型によりSHRSPホモ、WKYホモ、ヘテロの3群に分けて見てみると、どちらの染色体も遺伝マーカーにおけるSHRSPアレルが血中コレステロール値の低下に関与していることがわかる。すなわち両染色体上に存在すると推測されるQTLsは、SHRSPの低コレステロール血症に関わる遺伝子座であると考えられる。

雌雄F2世代の両染色体におけるinterval mapping解析の結果を図19に示す。Landerら[40]が提言しているLod score 2.8以上の有意水準を複数の脂質形質においてみたしている。またどちらの染色体も測定された複数の脂質形質において同じ様なLod scoreのピーク(波形)を示しており、それぞれ1つの遺伝子座が複数の脂質形質に関与していると推測される。

高コレステロール血症に関わる遺伝子座位

同様にラット第3、7、8、16染色体上におけるANOVA解析の結果を表11に示す。第5、15染色体とは異なり、これら4つの染色体上の遺伝子座はSHRSPアレルが血中コレステロール値の上昇、特にHFC食負荷によるTC、LDL-Cの上昇に関与していることがわかる。4つの染色体におけるinterval mapping解析の結果、複数の脂質形質においてLod score 2.8以上の有意水準をみたしていた(図20)。

さらに注目すべきは、ラット第 8、16 染色体上の遺伝子座は血中コレステロール値および血中トリグリセライド値とともに脂肪組織重量とも有意な連鎖を示している点である。相関解析における脂肪重量と TC、LDL-C (HFC) との間の有意な逆相関の結果を併せて考えると、第 8、16 染色体上の遺伝子座が血中のコレステロール値、トリグリセライド値を制御するとともに脂肪組織の重量を調節している可能性が示唆された。

【考察】

我々は以前、SHRSP と WKY を交配して作製した雌雄の F2 世代を対象にしたゲノムスキャンによって、SHRSP における血中低コレステロール値の低下と有意な連鎖を示す遺伝子座をラット第 15 染色体上に認め、また雄 F2 世代のみを対象にした場合第 5 染色体上に、雌 F2 世代のみを対象にした場合第 7 染色体上に同様に連鎖する領域を認めた[96]。本研究では 1) 高脂肪食負荷による血中コレステロール値の上昇（反応性高脂血症）に関する遺伝子座位をさらに検索すること、および 2) リポ蛋白、アポ蛋白、中性脂肪、脂肪重量など血中コレステロール値以外の intermediate phenotype となる脂質形質を加えてより詳細な遺伝解析をおこなうことで、より信頼性の高いデータあるいは新たな結果を得ることを目的とした。

ラット全染色体上 168 個の遺伝マーカーを用いたゲノムスキャンの結果、合計 6 つの染色体連鎖領域において複数の脂質形質と有意な連鎖が認められた。表 13 に 6 つの染色体領域における interval mapping 解析によって得られた最大 LOD score を示した。前回の連鎖解析と同様、第 5、15 染色体上の領域

において血中コレステロール値の低下と有意な連鎖が確認された。さらにこれら領域の遺伝子座は血中 HDL コレステロール値の低下とも有意な連鎖を示した。通常、ラット血中コレステロールの大部分が HDL コレステロールであることから鑑みても、この領域の QTLs が何らかの作用により SHRSP において血中の HDL コレステロールを低下させ、それにより血中のコレステロール値の低下が起こっていると考えられる。

今回新たに第 3、7、8、16 染色体上の 4 つの領域が高脂肪食負荷による血中コレステロール値の上昇に有意な連鎖を示した。本研究の結果から SHRSP における血中低コレステロール血症に関わる遺伝子座と、高脂肪食負荷による高コレステロール血症に関わる遺伝子座は別の染色体領域に存在し、それぞれ別の生体内機序により血中のコレステロール量を調節していると考えられる。さらに興味深いことは、第 8、16 染色体上の遺伝子座は血中コレステロール値と血清トリグリセライド値とともに脂肪組織重量とも有意な連鎖を示している点である。これまで SHR の脂肪細胞においてはインスリン刺激に対するグルコース取り込みの傷害、ならびにカテコールアミン刺激に対する脂肪酸分泌の異常が報告されている[97]。また SHR において血中トリグリセライドおよび血中遊離脂肪酸の上昇も報告されている[87]。本研究の結果とあわせると、SHR の直系である SHRSP においても脂肪細胞の遺伝的異常が存在し、脂肪細胞に取り込まれない遊離脂肪酸、トリグリセライドが血中で上昇し、それが直接あるいは間接的に血中コレステロール値の上昇につながる可能性が考えられる。そういった脂質代謝および脂肪細胞の異常の原因となる遺伝子が、ラット第 8、16 染色体上の連鎖領域に存在していると推測される。

Bottger ら[98]は SHR にコントロールラット BN の第 8 染色体上断片を導入したコンジェニック系統 (SHR.Lx) を作製して、血中の IDL および HDL2 コレステロール量を調節する遺伝子座がその第 8 染色体上領域に存在することを報告している。またラット第 8、16 染色体上領域には、トリグリセライドの加水分解酵素として知られている 2 つのリパーゼ酵素 hepatic lipase (Lipc) と lipoprotein lipase (Lpl) 遺伝子座位がそれぞれに存在することが報告されている[98]。Lpl 酵素は主として脂肪組織に存在し血中のカイロミクロンや VLDL 粒子のトリグリセライドを加水分解し、水解された脂肪酸とグリセロールを脂肪組織に供給している。Lipc 酵素は肝臓で産生され、主に IDL や HDL 粒子のトリグリセライドの加水分解に作用している。これら 2 つのリパーゼ遺伝子は、その機能および染色体上の位置から SHRSP における脂質代謝異常の重要な候補遺伝子と考えられ、さらなる解析が期待される。

【結論】

ゲノムスキャンを通して合計 6 つの染色体上領域に、SHRSP の脂質代謝異常に関する QTLs がみつかった。その内ラット第 5、15 染色体上の 2 つの QTLs は SHRSP の血中コレステロール値の低下に、ラット第 3、7、8、16 染色体上の 4 つの QTLs は血中コレステロール値の上昇に関与していた。さらに第 8、16 染色体上の QTLs は脂肪重量とも連鎖が認められ、F2 世代における相関解析からもこれら遺伝子座は血中脂質代謝に関与すると同時に脂肪組織の分解あるいは合成に関係する因子であると推測される。

4.2 SHRSP における脂質代謝異常と脳卒中発症

本研究の結果からは直接の SHRSP における脂質代謝異常と脳卒中発症との関係を示唆する直接のデータは得られていない。しかしながら、Jeffs ら[68] は SHRSP と WKY の F2 で脳内中大動脈結紮による局所的虚血によってできる脳梗塞の大きさを指標とし、脳虚血に対する脳組織の脆弱性に関連する遺伝子を第 5 染色体上にマッピングした。この領域は本研究における血中コレステロール値の低下に関わる遺伝子がマッピングされた第 5 染色体上の領域とほぼ重複しており、SHRSP における脂質代謝異常脳卒中発症の原因遺伝子との関係を示唆する知見として非常に興味深い。

表8 SHRSP, WKYにおける高脂肪・高コレステロール(HFC)食負荷前後の血圧、体重、血清脂質レベル

Trait	Sex	Chow		HFC	
		WKY/Izm	SHRSP/Izm	WKY/Izm	SHRSP/Izm
Systolic BP (mmHg)	Male	145 (10.8)	224 (5.9) ***	142 (4.8)	222 (4.5) ***
	Female	133 (7.8)	212 (13.8) ***	129 (4.5)	194 (7.9) ***
Heart Rate (bpm)	Male	387 (32.5)	361 (24.8)	360 (21.5)	379 (37.0)
	Female	411 (34.0)	383 (31.9)	425 (16.8)	398 (39.5)
Body Weight (g)	Male	308 (9.9)	251 (3.8) ***	319 (15.1)	273 (5.6) ***
	Female	194 (7.0)	165 (4.9) ***	215 (12.8)	182 (5.0) ***
TC (mg/dl)	Male	100 (7.0)	72 (5.3) *	122 (15.3)	193 (13.3) ***
	Female	115 (3.5)	81 (5.0) **	359 (47.3)	436 (22.7) ***
HDL-C (mg/dl)	Male	87 (7.2)	60 (4.1) ***	78 (4.8)	70 (2.9) *
	Female	96 (4.4)	70 (5.3) ***	97 (6.7)	86 (5.3) **
LDL-C (mg/dl)	Male	9 (1.3)	6 (0.8)	20 (5.4)	44 (3.2) ***
	Female	10 (0.5)	7 (0.6)	73 (11.7)	97 (2.6) ***
TG (mg/dl)	Male	67 (11.1)	103 (18.7) *	36 (4.8)	68 (17.6) *
	Female	89 (35.5)	120 (42.9) *	52 (11.0)	63 (26.4)
ApoE (mg/dl)	Male	61 (5.7)	37 (4.9) ***	35 (4.3)	32 (2.0)
	Female	80 (7.5)	60 (9.7) ***	35 (2.4)	25 (4.0) **
HDL-ApoE (mg/dl)	Male	44 (7.5)	25 (3.9) ***	26 (3.6)	24 (2.4)
	Female	60 (6.1)	46 (9.4) ***	26 (1.9)	16 (3.5) **
Heart Weight /BW	Male	-	-	2.95 (0.25)	3.99 (0.13) ***
	Female	-	-	3.03 (0.19)	4.37 (0.40) ***
Fat-Pad (g)	Male	-	-	4.00 (0.60)	3.00 (0.20) **
	Female	-	-	3.21 (0.60)	2.83 (0.60)

WKY vs. SHRSP; * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$, ANOVA followed by Boferroni correction

(a)

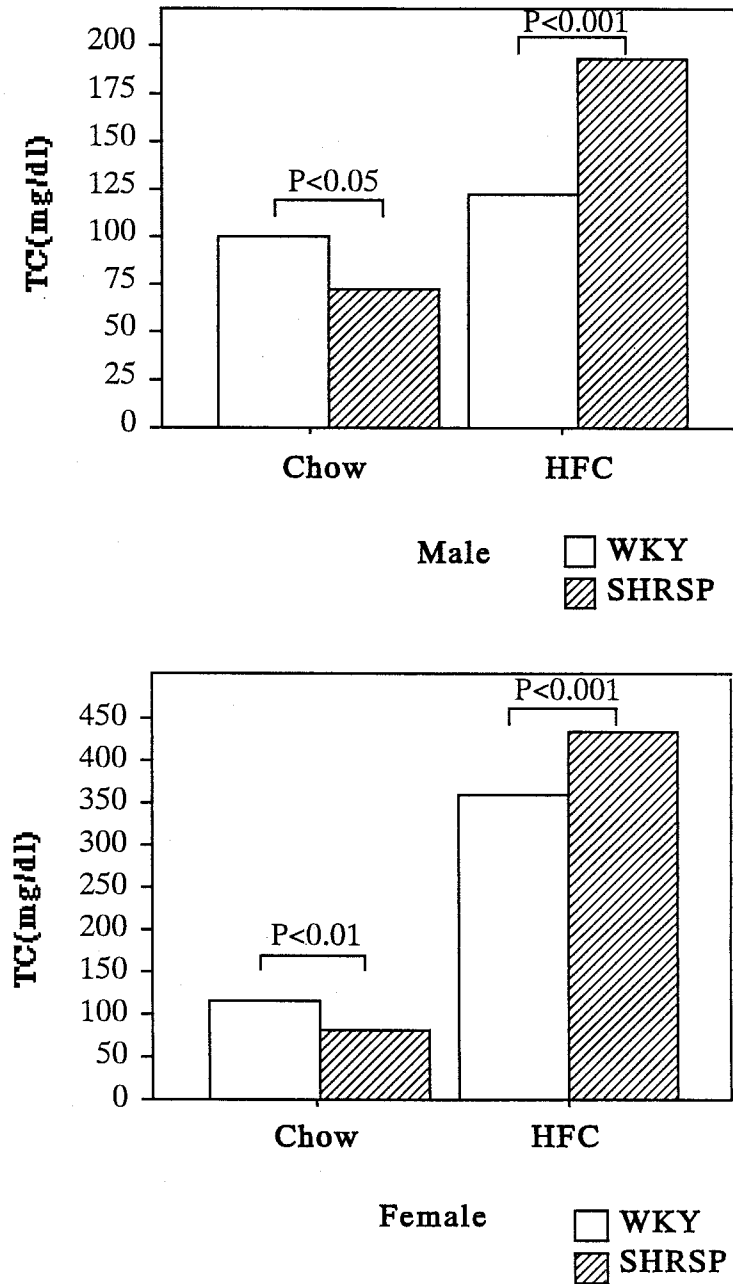


図16(a) SHRSP、WKYにおける血清総コレステロール値(TC)の比較

(b)

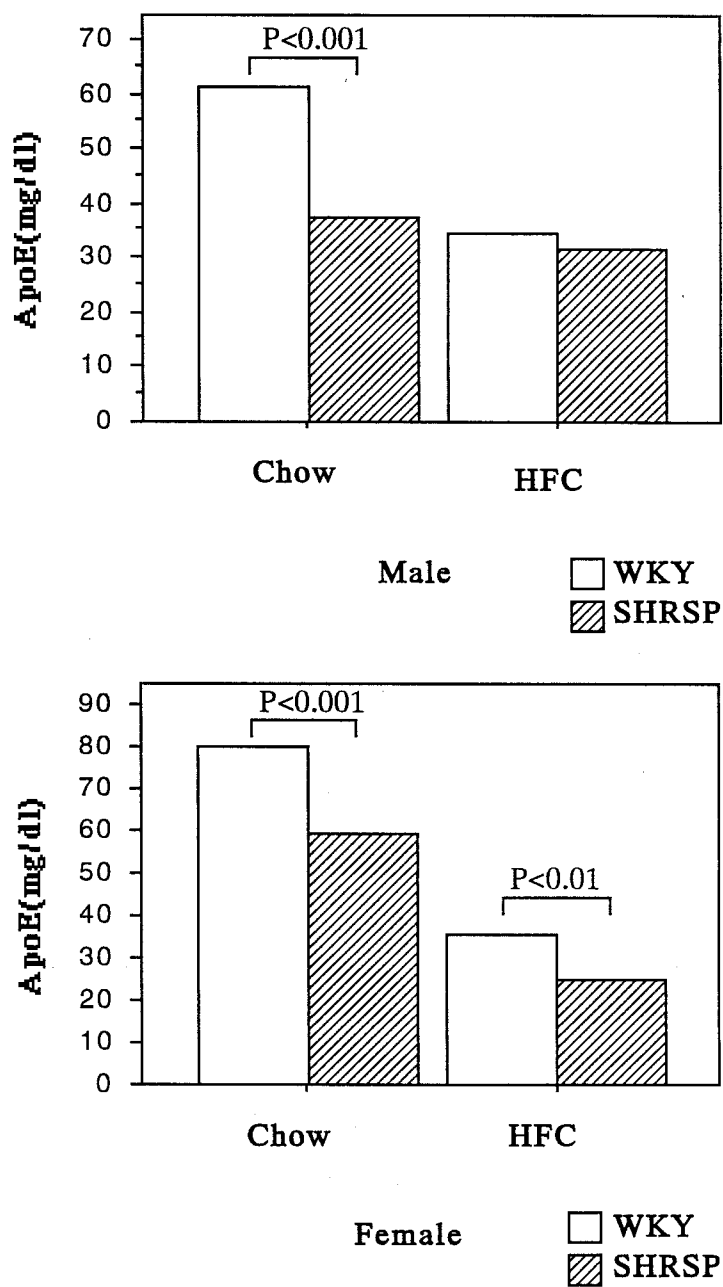


図16 (b) SHRSP、WKYにおける血清 apolipoprotein E (ApoE) 含量の比較

(C)

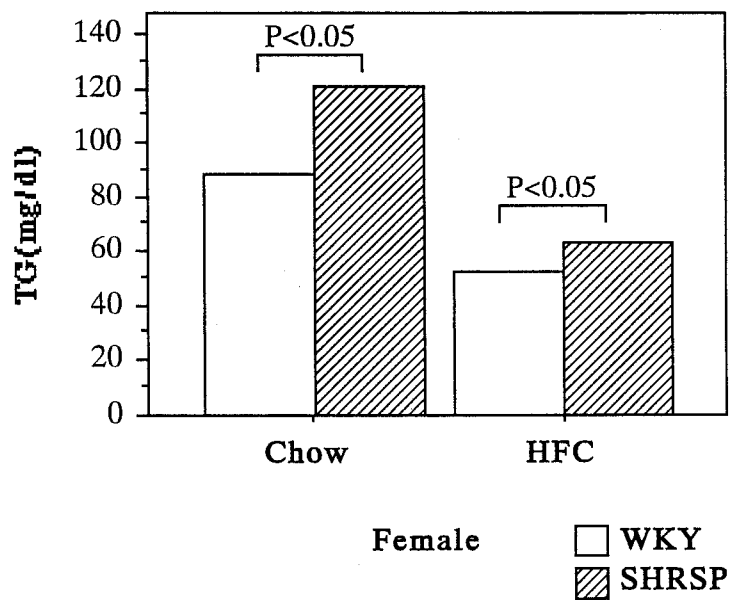
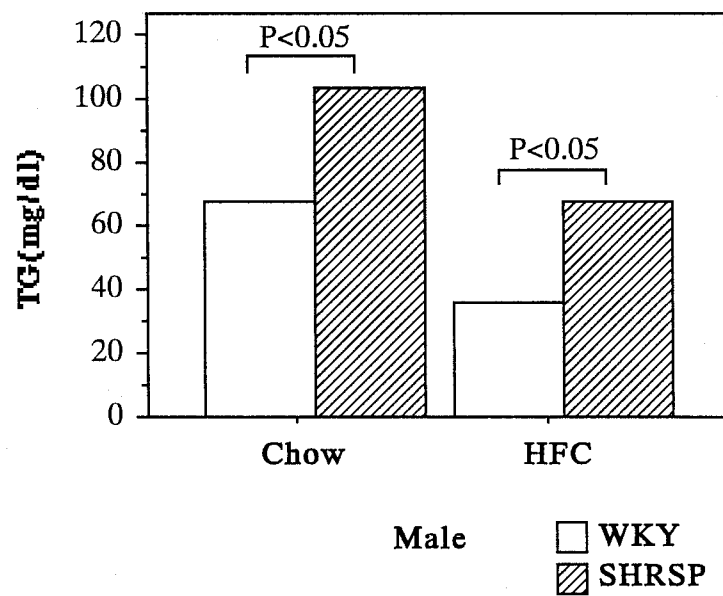
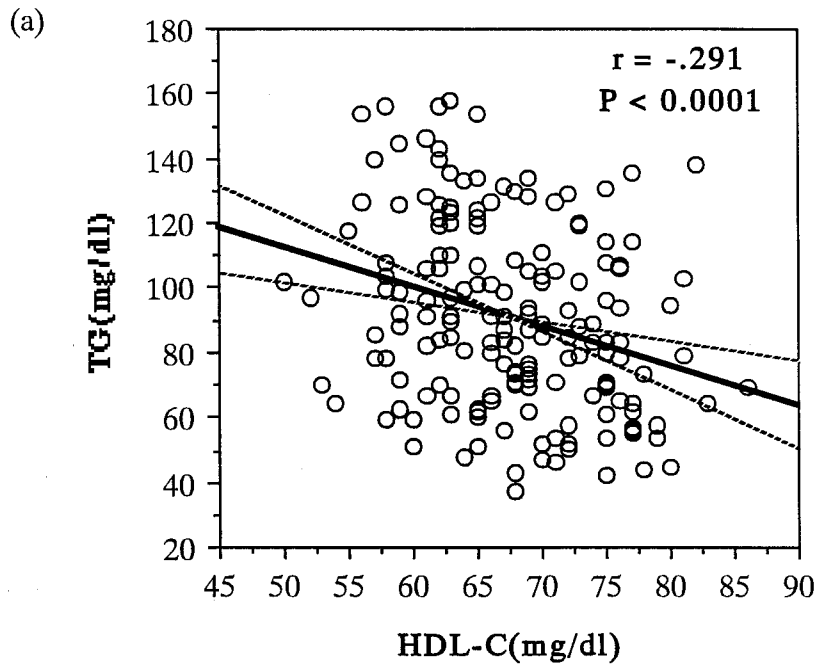


図16(c) SHRSP、WKYにおける血清総トリグリセライド値(TG)の比較

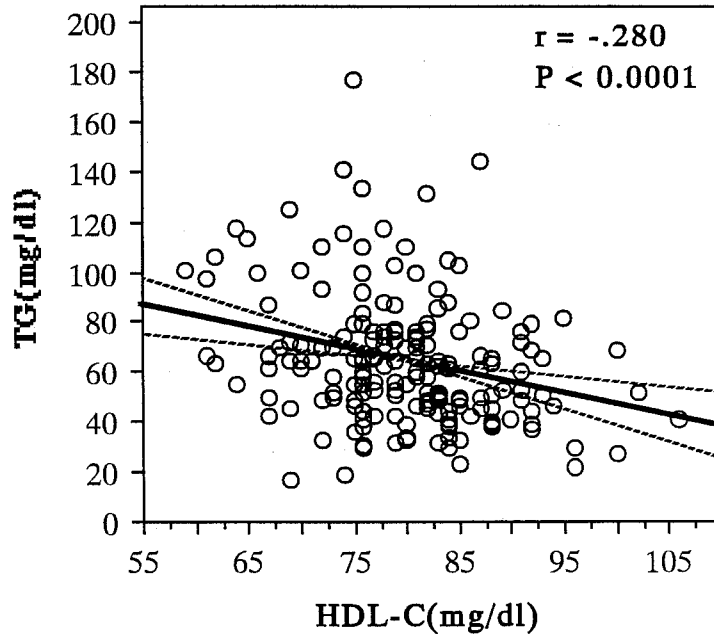
表9 Correlation Matrices between Blood Pressure and Plasma Lipoprotein and Apolipoprotein in F2(WKY x SHRSP) rats

	Chow										HFC									
	SBP	BW	TC	HDL-C	LDL-C	TG	ApoE	H-ApoE	SBP	BW	TC	HDL-C	LDL-C	TG	ApoE	H-ApoE	HW/BW	Fat-Pad		
Chow																				
Systolic BP	0.08	0.01	0.02	-0.13	-0.05	0.12	0.13	0.61	0.09	0.08	0.08	-0.04	-0.08	-0.02	0.00	-0.02	0.33	0.10		
Body Weight	0.06		0.07	0.08	0.00	0.20	0.06	-0.07	0.92	-0.09	0.05	0.05	-0.12	0.18	0.31	0.11	-0.14	0.43		
TC	0.01	0.27		0.69	0.17	0.11	0.09	0.09	0.06	0.32	0.49	0.25	0.09	0.04	0.31	0.20	0.05	0.02		
HDL-C	0.00	0.24	0.73	0.41	-0.28	0.24	0.14	-0.01	0.07	0.23	0.47	0.17	0.04	0.31	0.20	0.06	0.06	0.03		
LDL-C	-0.03	0.30	0.60	0.55	-0.07	0.04	0.03	-0.07	0.05	0.40	0.37	0.40	-0.03	0.27	0.10	0.00	0.00	-0.19		
TG	-0.08	0.08	-0.03	-0.23	-0.20	-0.09	-0.15	0.06	-0.02	-0.07	-0.18	-0.11	0.35	-0.22	-0.21	-0.11	-0.11	0.32		
ApoE	0.04	0.06	0.13	0.32	0.00	0.19	0.63	0.03	0.27	0.02	0.09	-0.03	0.04	0.11	-0.06	-0.01	-0.01	0.14		
HDL-ApoE	-0.05	-0.02	0.20	0.35	0.06	0.11	0.75	0.02	0.09	0.08	0.14	0.06	-0.08	0.10	-0.13	0.00	0.00	-0.07		
HFC																				
Systolic BP	0.47	-0.03	0.11	0.10	-0.11	-0.06	0.06	0.01	-0.08	0.10	0.06	0.09	0.01	-0.10	0.01	0.39	0.00	0.00		
Body Weight	0.07	0.91	0.23	0.17	0.25	0.16	0.04	-0.04	-0.02	-0.14	0.04	-0.17	0.22	0.24	0.15	-0.18	0.43	0.43		
TC	0.03	-0.05	0.16	0.02	0.29	-0.05	-0.08	0.01	0.05	-0.06	0.66	0.97	0.10	0.10	-0.14	0.13	-0.32	-0.32		
HDL-C	0.07	-0.03	0.22	0.16	0.33	-0.18	-0.04	-0.04	0.11	-0.08	0.87	0.57	-0.03	0.26	0.18	0.06	-0.20	-0.20		
LDL-C	0.06	-0.08	0.13	-0.01	0.28	-0.09	-0.01	-0.01	0.08	-0.10	0.95	0.87	0.00	0.08	-0.19	0.14	-0.34	-0.34		
TG	-0.11	0.03	0.03	0.05	-0.09	0.28	0.06	0.01	-0.03	0.00	-0.22	-0.15	-0.23	-0.09	-0.01	-0.10	0.34	0.34		
ApoE	0.00	0.13	0.17	0.20	0.31	-0.20	-0.05	-0.08	0.10	0.04	0.59	0.61	0.59	-0.13	0.47	0.03	0.04	0.04		
HDL-ApoE	-0.03	0.13	0.11	0.12	0.06	-0.15	-0.18	-0.18	0.10	0.12	0.18	0.24	0.16	-0.01	0.42	-0.06	-0.03	-0.03		
Heart Weight/BW	0.17	-0.10	-0.02	0.00	-0.02	-0.14	-0.17	-0.21	0.28	-0.20	0.06	0.10	0.09	0.04	0.24	0.10	-0.10	-0.10		
Fat-Pad	-0.01	0.20	0.06	-0.14	-0.05	0.19	0.03	0.05	-0.07	0.23	0.05	0.04	0.04	-0.02	-0.16	-0.24	-0.17	-0.17		

Correlation coefficient involving plasma lipoproteins and apolipoproteins. Values to the right of the diagonal are for males, values to the left of the diagonal are for females. Values in bold are significant at the P<0.01 level.



Male



Female

図17(a) F2世代における血清総トリグリセライド値 (TG) とHDL-Cとの関係

(b)

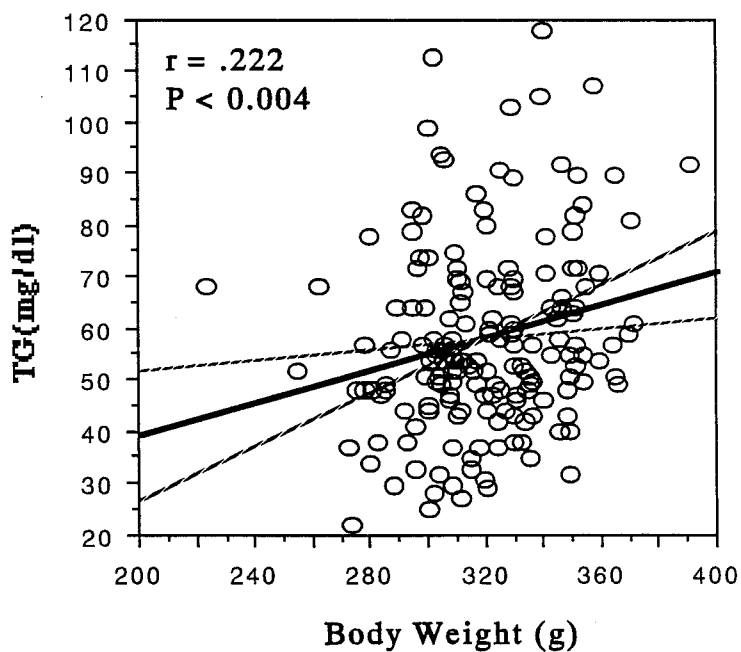
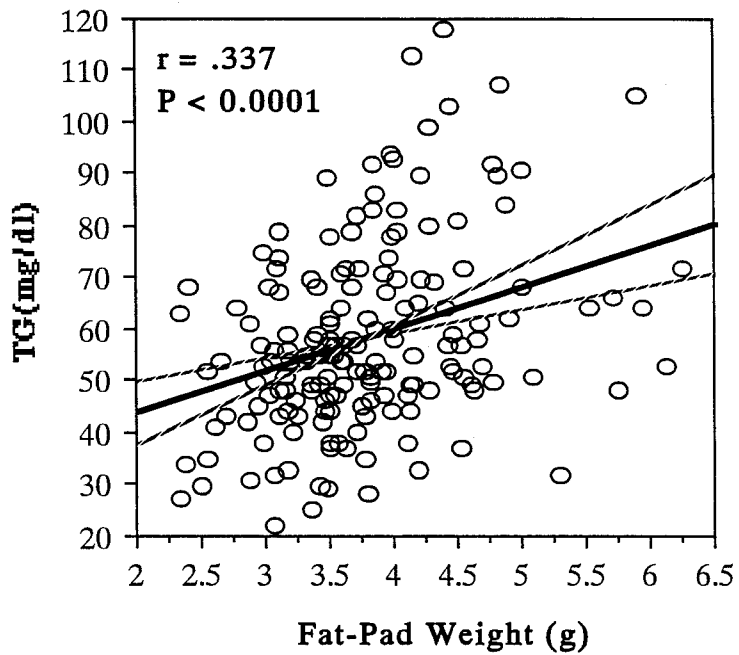


図17(b) F2世代における血清総トリグリセライド値 (TG) と体重 (Body Weight)、脂肪組織重量 (Fat-Pad Weight) との関係

(c)

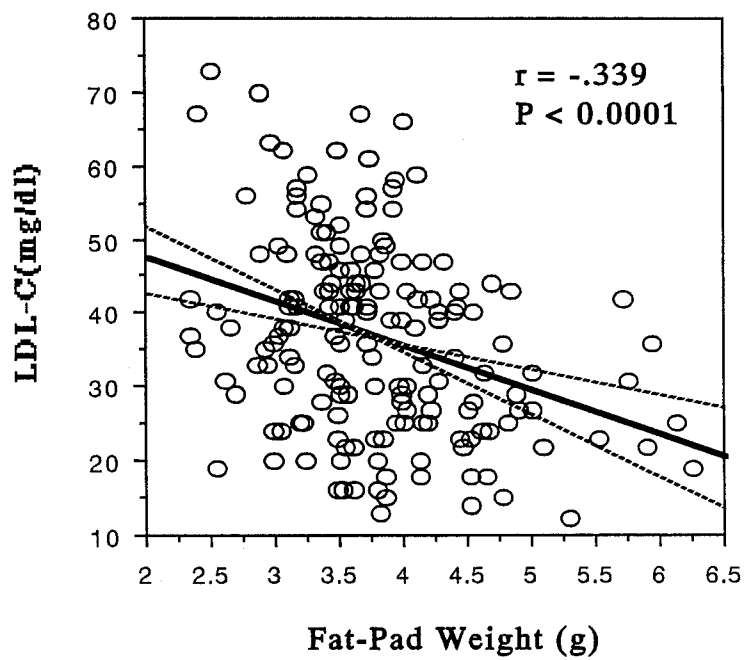
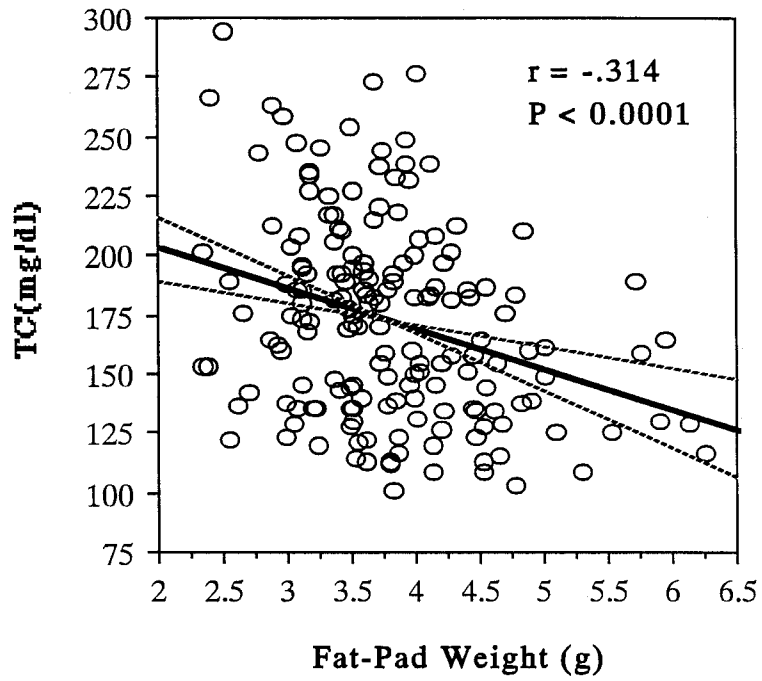
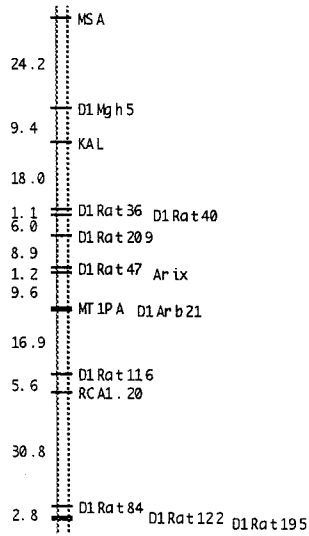


図17(c) F2世代における脂肪組織重量 (Fat-Pad Weight) とHFC食負荷後の血清総コレステロール値 (TC)、LDL-Cとの関係

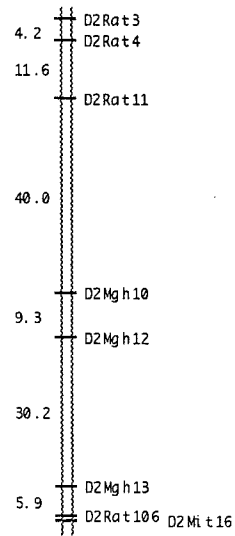
表10 F2世代の連鎖解析（ゲノムスキャン）に使われた遺伝マーカー

Chr.	Number of Markers	Map Length(cM)
1	15	135.3
2	8	102.3
3	12	102.2
4	11	90.3
5	12	87.3
6	10	91.5
7	7	76.4
8	6	66.8
9	7	80.9
10	12	86.6
11	6	48.6
12	5	65.1
13	7	49.8
14	5	53.0
15	9	61.2
16	6	26.1
17	6	59.9
18	7	52.3
19	6	23.9
20	5	41.7
X	6	55.7
Total	168	1456.9

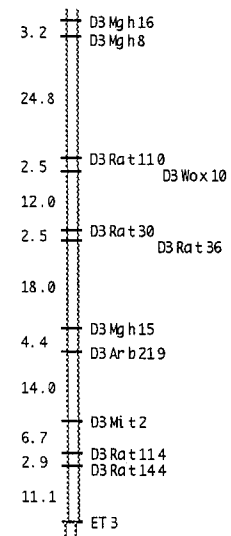
The number of markers used in QTL mapping is listed for each chromosome. The size of chromosomal regions covered by typed markers is represented in Kosambi's unit.



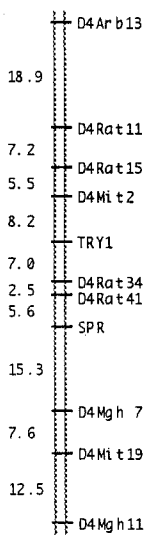
Chromosome 1



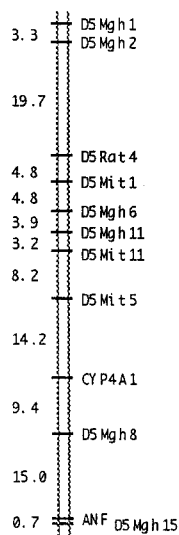
Chromosome 2



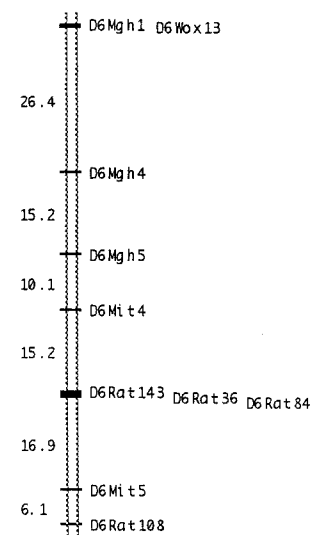
Chromosome 3



Chromosome 4

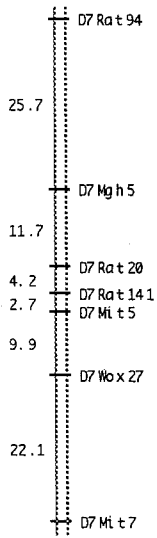


Chromosome 5

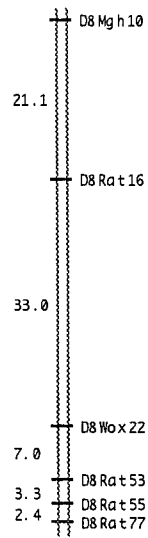


Chromosome 6

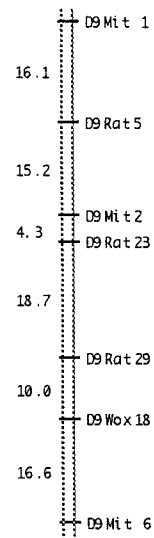
図18 F2世代において作成されたラット全染色体の遺伝地図
染色体左側の数字はマーカー間の距離をセンチモルガン (cM : Kosambi's Unit) で表している



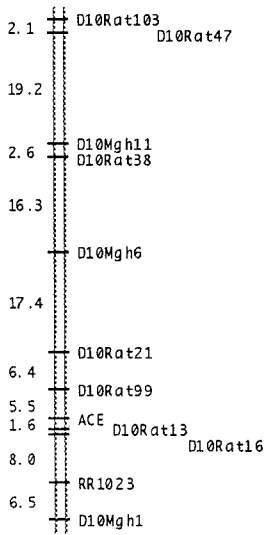
Chromosome 7



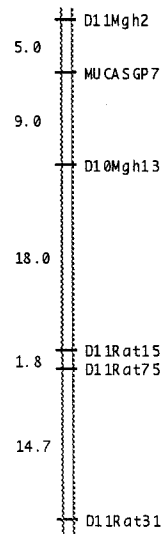
Chromosome 8



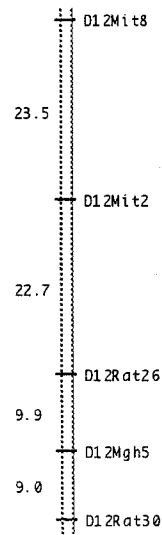
Chromosome 9



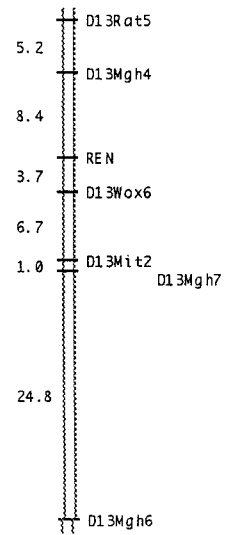
Chromosome 10



Chromosome 11

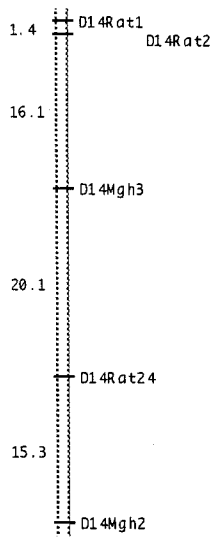


Chromosome 12

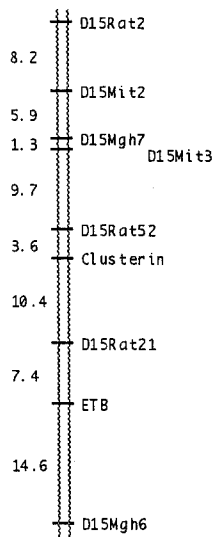


Chromosome 13

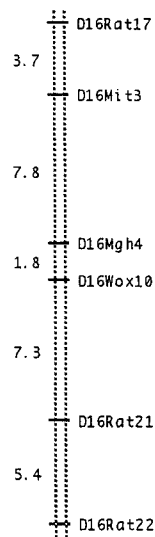
図18 続き



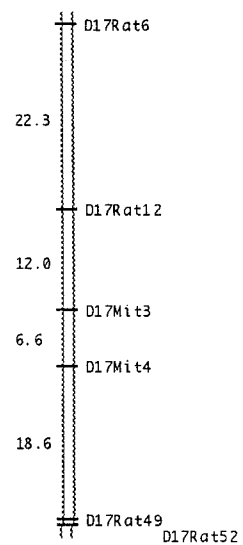
Chromosome 14



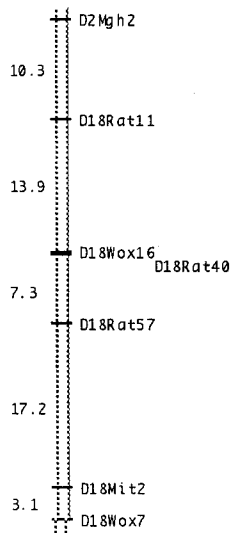
Chromosome 15



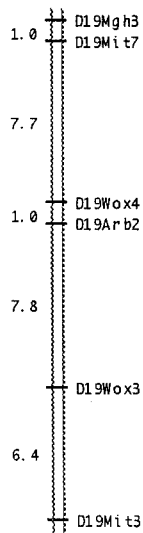
Chromosome 16



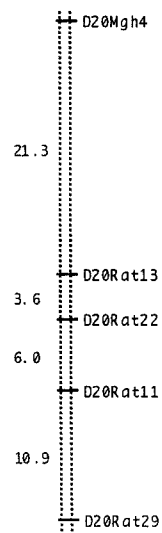
Chromosome 17



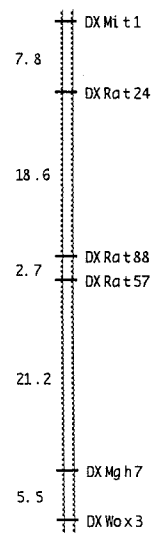
Chromosome 18



Chromosome 19



Chromosome 20



Chromosome X

図18 続き

表11 第5, 15染色体上のDNAマーカーと各種血清脂質レベルとの連鎖解析

Locus (Chromosome)	Sex	Trait	PP	PW	WW	P value
D5Mgh11 (Chromosome 5)	Male	TC(Chow)	97.0 (1.89)	100.0 (1.31)	105.0 (1.86)	<0.01
	Female	TC(Chow)	111.7 (2.11)	118.0 (1.24)	113.5 (2.08)	<0.02
		ApoE(Chow)	57.1 (2.49)	67.5 (1.46)	60.3 (2.45)	<0.0006
		TC(HFC)	469.1 (25.5)	568.2 (15.0)	594.8 (25.1)	<0.0009
		HDL-C(HFC)	96.5 (2.45)	104.5 (1.44)	108.4 (2.42)	<0.002
		LDL-C(HFC)	106.5 (6.46)	127.3 (3.80)	138.9 (6.37)	<0.002
	ApoE(HFC)	34.4 (1.52)	38.7 (0.89)	40.8 (1.50)	<0.01	
D15Mit3 (Chromosome 15)	Male	HDL-C(Chow)	65.4 (1.05)	68.1 (0.71)	68.9 (1.09)	<0.04
		HDL-C(HFC)	71.9 (1.12)	72.6 (0.76)	75.8 (1.17)	<0.034
	Female	TC(Chow)	112.8 (2.04)	115.7 (1.23)	119.9 (1.98)	<0.04
		HDL-ApoE(Chow)	49.6 (1.81)	47.8 (1.09)	52.9 (1.76)	<0.05
		TC(HFC)	455.1 (24.7)	570.8 (14.9)	591.7 (24.0)	<0.00009
		HDL-C(HFC)	96.5 (2.41)	104.8 (1.46)	106.1 (2.35)	<0.006
	LDL-C(HFC)	101.6 (6.16)	129.9 (3.73)	132.1 (6.00)	<0.0002	
	HDL-ApoE(HFC)	18.2 (1.23)	19.3 (0.74)	23.0 (1.20)	<0.01	

Values are mean (SEM). The units for these measurements are: TC, HDL-C, LDL-C, TG, ApoE and HDL-ApoE (mg/dl), and Fat-Pad Weight (g). P, allele of SHRSP strain; W, allele of WKY strain.

(a)

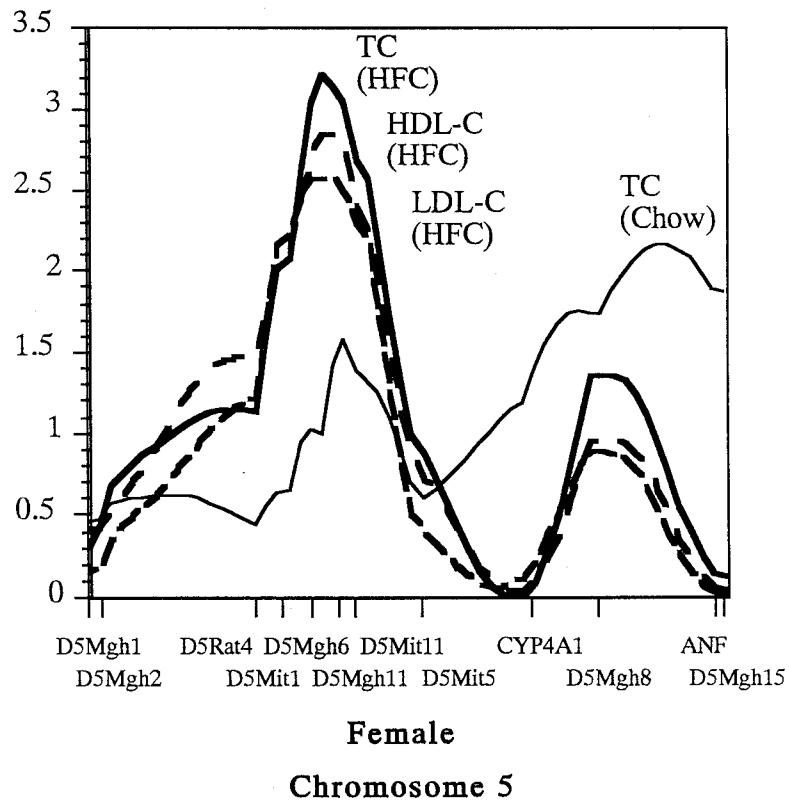
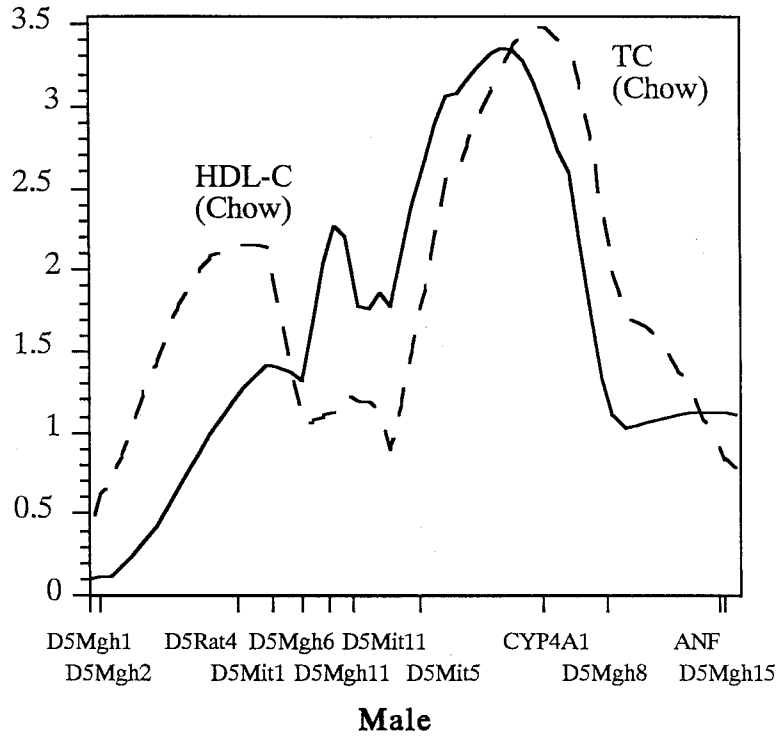
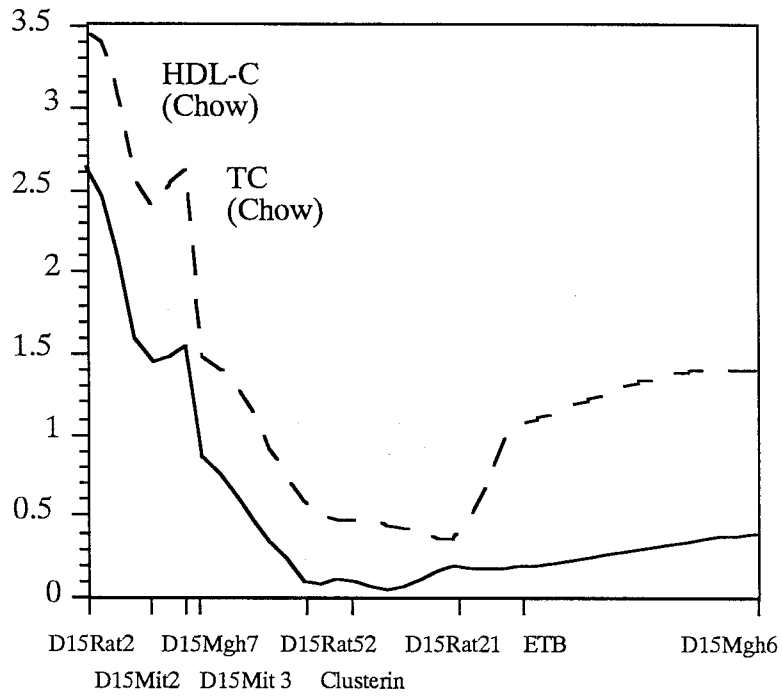
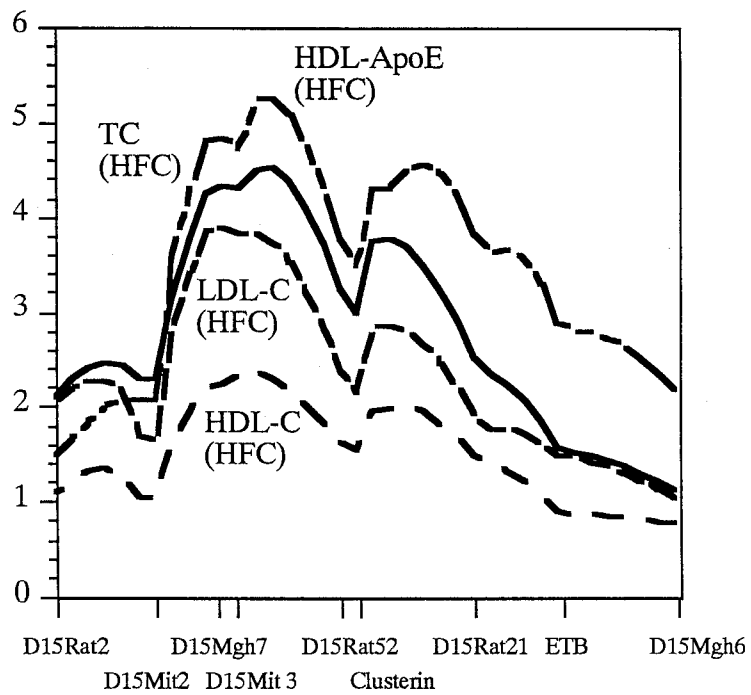


図19 F2世代における、a) 第5染色体、b) 第15染色体上の低コレステロール低下に関する量的形質遺伝子座位 (QTLs) のマッピング

(b)



Male



Female

Chromosome 15

☒19 (b)

表12 第3、7、8、16染色体上のDNAマーカーと各種血清脂質レベルとの連鎖解析

Locus (Chromosome)	Sex	Trait	PP	PW	WW	P value
ET3 (Chromosome 3)	Male	TC(HFC)	187.9 (6.07)	169.2 (4.22)	154.2 (6.47)	<0.0009
		LDL-C(HFC)	42.3 (1.90)	35.4 (1.32)	30.0 (2.02)	<0.00007
		ApoE(HFC)	33.2 (1.13)	35.7 (0.78)	37.3 (1.20)	<0.05
	Female	HDL-ApoE(HFC)	21.8 (1.03)	23.5 (0.72)	25.9 (1.10)	<0.03
		HDL-C(Chow)	76.2 (1.30)	81.5 (0.92)	80.2 (1.41)	<0.005
		HDL-ApoE(HFC)	17.8 (1.19)	21.4 (0.85)	20.8 (1.31)	<0.05
D7Rat94 (Chromosome 7)	Male	TC(HFC)	186.6 (6.29)	169.9 (4.48)	163.1 (5.89)	<0.02
		LDL-C(HFC)	41.9 (1.99)	35.6 (1.42)	33.4 (1.86)	<0.0056
	Female	TC(HFC)	645.1 (23.6)	531.5 (15.0)	515.9 (23.0)	<0.00008
		HDL-C(HFC)	109.1 (2.31)	102.1 (1.47)	101.3 (2.26)	<0.02
		LDL-C(HFC)	144.8 (5.94)	120.8 (3.78)	116.0 (5.80)	<0.00008
		HDL-ApoE(HFC)	22.7 (1.18)	18.9 (0.75)	19.7 (1.15)	<0.03
D8Rat16(Chromosome 8)	Male	ApoE(HFC)	38.6 (1.23)	35.2 (0.73)	32.7 (1.16)	<0.003
		Fat-Pad	3.64 (0.13)	3.70 (0.07)	4.11 (0.12)	<0.008
	Female	TC(HFC)	612.3 (22.4)	524.9 (16.8)	539.6 (21.9)	<0.007
		HDL-C(HFC)	109.5 (2.13)	101.2 (1.60)	101.3 (2.08)	<0.005
		LDL-C(HFC)	138.5 (5.60)	118.7 (4.21)	121.8 (5.48)	<0.02
		ApoE(HFC)	42.3 (1.31)	36.6 (0.98)	37.0 (1.28)	<0.0016
Fat-Pad	HDL-ApoE(HFC)	22.3 (1.08)	20.1 (0.81)	17.7 (1.06)	<0.01	
	Fat-Pad	1.77 (0.12)	2.08 (0.09)	2.39 (0.12)	<0.0014	
D16Rat17 (Chromosome 16)	Male	TC(HFC)	187.0 (5.35)	177.3 (4.24)	143.1 (5.96)	<0.0000003
		LDL-C(HFC)	40.8 (1.72)	38.3 (1.37)	27.7 (1.92)	<0.000002
		Fat-Pad	3.49 (0.10)	3.78 (0.08)	4.15 (0.11)	<0.0002
	Female	TG(HFC)	52.3 (4.66)	36.3 (3.12)	34.6 (4.95)	<0.01
		ApoE(HFC)	40.2 (1.37)	38.4 (0.92)	35.4 (1.46)	<0.05
		HDL-ApoE(HFC)	22.3 (1.13)	19.1 (0.75)	19.4 (1.20)	<0.05

Values are mean (SEM). The units for these measurements are: TC, HDL-C, LDL-C, TG, ApoE and HDL-ApoE (mg/dl), and Fat-Pad Weight (g). P, allele of SHRSP strain; W, allele of WKY strain.

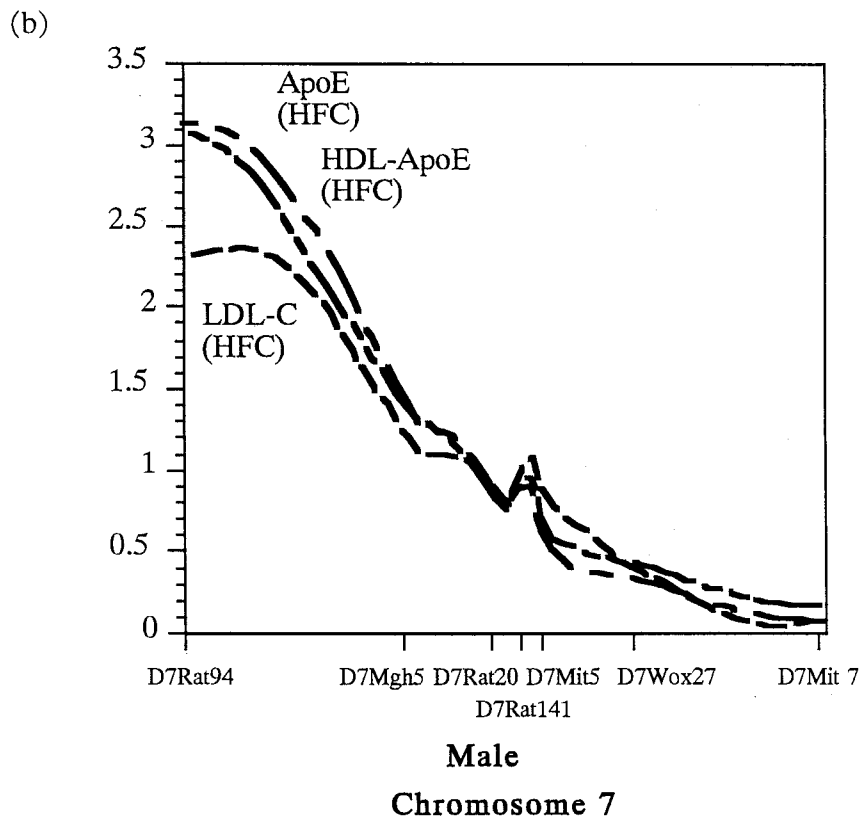
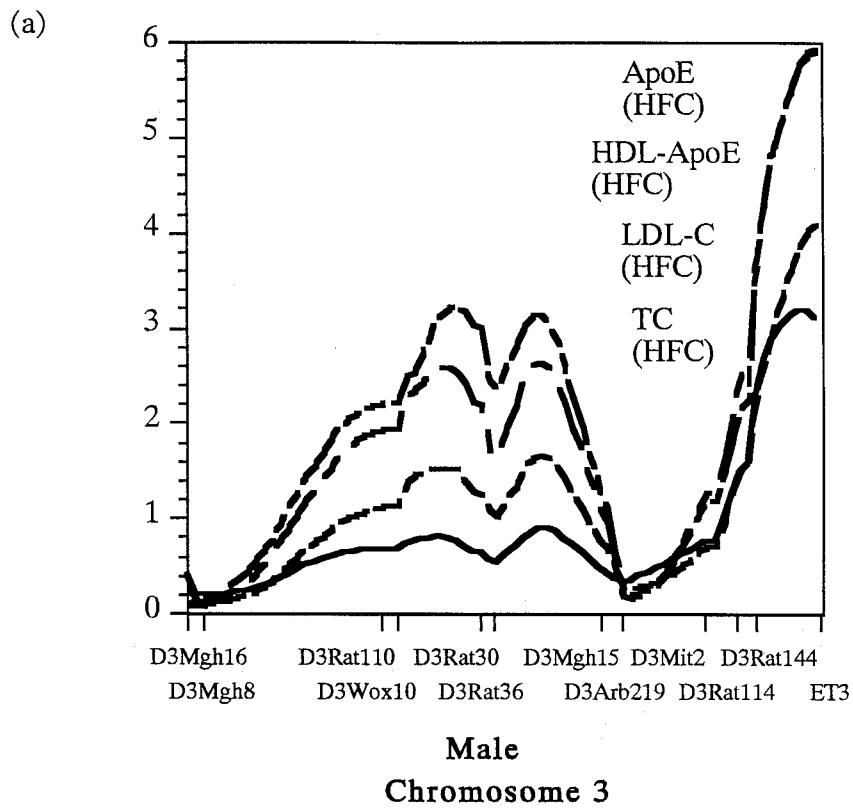
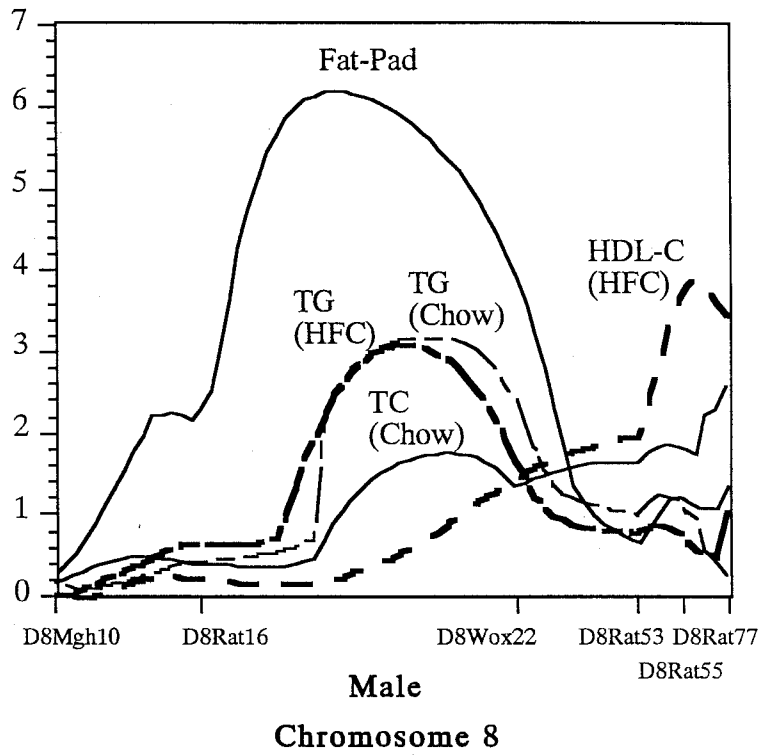


図20 a) 第3染色体、b) 第7染色体上のHFC食負荷後の血清コレステロール値上昇（反応性高脂血症）に関する量的形質遺伝子座位（QTLs）のマッピング

(c)



(d)

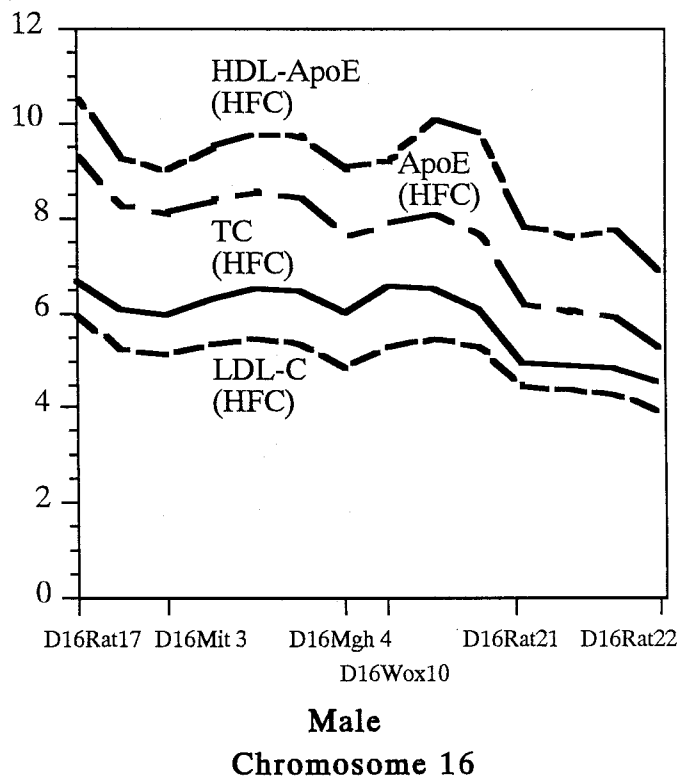


図20 c) 第8染色体、d) 第16染色体上の血清コレステロール値、トリグリセライド値および脂肪組織重量に関する量的形質遺伝子座位 (QTLs) のマッピング

表13 SHRSPにおける脂質代謝異常に関わる量的形質遺伝子座位 (QTLs)

Chromosome	Nearest Marker	Sex	Trait	LOD score
3	ET3	Male	TC(HFC)	3.2
			LDL-C(HFC)	4.1
			ApoE(HFC)	5.9
		Female	HDL-ApoE(HFC)	5.9
			HDL-C(Chow)	2.0
5	D5Mgh11	Male	TC(Chow)	3.4
			HDL-C(Chow)	3.5
		Female	TC(HFC)	3.2
			HDL-C(HFC)	2.6
			LDL-C(HFC)	2.9
			HDL-ApoE(HFC)	2.5
7	D7Rat94	Male	LDL-C(HFC)	2.4
			ApoE(HFC)	3.1
			HDL-ApoE(HFC)	3.1
		Female	TC(HFC)	5.1
			HDL-C(HFC)	2.3
			LDL-C(HFC)	4.6
			ApoE(HFC)	2.8
			HDL-ApoE(HFC)	4.1
8	D8Rat16	Male	TC(Chow)	2.6
			TG(Chow)	3.2
			TG(HFC)	3.1
		Female	Fat-Pad	6.2
			TC(HFC)	2.2
			HDL-C(HFC)	2.4
			Fat-Pad	4.0
15	D15Mit3	Male	TC(Chow)	2.6
			HDL-C(Chow)	3.5
		Female	TC(HFC)	4.5
			HDL-C(HFC)	2.4
			LDL-C(HFC)	3.9
			ApoE(HFC)	2.6
			HDL-ApoE(HFC)	5.3
16	D16Rat17	Male	TC(HFC)	6.6
			LDL-C(HFC)	5.9
			ApoE(HFC)	9.3
			HDL-ApoE(HFC)	10.6
			Fat-Pad	3.9
		Female	LDL-C(HFC)	2.1

MAPMAKER/QTLを用いた解析により、LOD score 2.0 以上のQTLsのみを記した。

第5章

総括

5.1 コンジェニック系統

コンジェニック系統の作製方法

第2, 3, 4章において、高血圧や脳卒中（あるいは関連する表現形質）の原因遺伝子がラット染色体上のどの領域に存在するかを明らかとした。第1章で述べたように、多因子遺伝性疾患のモデル動物を用いた研究では連鎖解析の段階でいくら総数を増やしても疾患遺伝子座位の信頼区間を効率的に狭めることは理論的に困難である。また連鎖解析において統計学的にぎりぎりの有意水準を示した QTLs に関しては、結果が偽陽性でないことを確認しなければならない。そこで連鎖解析の次のステップとして、示唆された染色体断片のみをコントロールラットに導入した動物（コンジェニックラット）を作製する事になる。コンジェニックラットの作製方法を図 21 に示した。

どちらの染色体断片を導入するかで2種類のコンジェニックラットが作製される。すなわち1) QTL がマッピングされた染色体領域だけを SHRSP 型に持ち、他の染色体はすべて WKY 型にもつコンジェニックラットと、その反対に2) QTL がマッピングされた染色体領域だけを WKY 型に持ち、他の染色体はすべて SHRSP 型にもつコンジェニックラットが作製され得る。1) のコンジェニックラットの場合、当該領域だけを SHRSP 由来の染色体断片（高血圧遺伝子が存在するはずである）にもつため、WKY に比べて血圧が高くなると予想される。2) のコンジェニックラットは WKY 由来の染色体断片をもつため SHRSP に比べて血圧が低くなると予想される。2) のコンジェニックラットの場合、導入する染色体断片を脳卒中遺伝子が存在する領域にすれば、血圧は SHRSP とは変わらないが脳卒中を発症しない、あるいは SHRSP と比べて

発症し難いモデル動物が開発され得る。

現在まで高血圧モデル動物を用いた連鎖解析により QTLs の存在が示唆された染色体領域においていくつかのコンジェニックラットが作製され、それぞれの血圧に対する効果を裏付ける結果が得られている (表 14) [99-114]。この血圧に対する効果を見ながら戻し交配をさらに繰り返し残存する染色体断片をさらに小さくすることによって、限りなくその領域を狭めていくことが理論的には可能なはずである。コンジェニックラットの意義はこのように染色体領域を狭めるだけではない。高血圧遺伝子の存在する染色体断片のみを導入されたコンジェニックラットを用いて、その一つの遺伝子の働きだけを生理学的、生化学的に研究することも可能であり、さらには別の高血圧遺伝子のコンジェニックラットを作製して遺伝子間相互作用の研究も可能となってくる。

しかしながらコンジェニックラットを作製するには戻し交配を 10 世代以上繰り返すという大変時間と労力を要する作業を必要とし、最低でも 4 年程度の年数が必要である。近年その期間を半分に減らす方法として、スピードコンジェニック法が開発された (表 15)。詳細な原理に関しては原書[115]を参照されたい。現在第 2～4 章において高血圧、脳卒中遺伝子がマッピングされた染色体領域に関してスピードコンジェニック法を用いてコンジェニックラット作製を試みており、いくつかの新しい知見が得られている。そのなかで第 1 染色体上の染色体領域におけるコンジェニックラット[102] に関して次に述べたい。

第 1 染色体上領域におけるコンジェニックラット

我々は第 2 章で高血圧遺伝子がマッピングされたラット第 1 染色体上の領

域について、連鎖領域のみを SHRSP ホモ型として有するコンジェニックラットを作製した。従来の方法で第1染色体上の遺伝マーカーを用いて高血圧連鎖領域をスクリーニングしながら WKY に戻し交配を繰り返し、BC5 世代の時点で兄妹交配して当該領域 (D1Wox29~D1Rat112 まで約 60cM) のみを SHRSP 型ホモとなるコンジェニックラットを得た (図 22a)。この領域以外の染色体は計算上 97%以上が WKY ホモ型となっていると期待される。このコンジェニックラットは 80 日齢で血圧上昇を認め、90 日齢では 165 ± 7.5 mmHg にまで達し同週領域をもつコンジェニックラット) を作製することにより、より狭い領域に高血圧遺伝子座を追いつめることが期待される。

5.2 ヒトへの外挿

これまで遺伝的高血圧ラットを用いた連鎖解析の結果から、その連鎖領域内に存在する有力な候補遺伝子についてヒトの本態性高血圧症で検討されてきた。SHR 以外の高血圧モデルで原因遺伝子として同定され、ヒトでさらに検討されている遺伝子も存在する。表 16 にその一部を紹介する。ラットで原因遺伝子、あるいは候補遺伝子とされたもののなかで唯一 Milan 高血圧ラットの高血圧遺伝子として同定された α -adducin [116] が、ヒトでも高血圧との間で遺伝的連鎖、遺伝的関連があるというデータが示された。しかしヒトにおける生理学的な証拠はまだ示されておらず、遺伝学的な追試でもその結果を否定するものがでてきている[117-119]。ヒトの本態性高血圧は複数の高血圧症の集団であり、SHR と同じ高血圧遺伝子に起因する高血圧“SHR 型”があったとしても人種、

民族によってその割合が異なるかもしれない。従って検討した集団によって出てくる結果がまちまちになることは十分ありうる。それら成果は慎重に評価される必要がある。

5.3 原因遺伝子解明に向けて

本態性高血圧症や高脂血症などの多因子遺伝性疾患の遺伝解析においては、動物モデルを用いた戦略により素因遺伝子を同定しようとする研究が現在も精力的に進められている。ラット高血圧において現時点ではその素因遺伝子の染色体上の位置がおおよそつきとめられ、それら領域におけるコンジェニック系統もいくつか作製されている（表 14）。しかし素因遺伝子の同定まではさらに 1～2 cM までコンジェニック断片を狭め、物理地図の作製、候補遺伝子の検索といった非常に手間のかかる作業が必要であり、いまだ道なかばといった感もある。

我々が研究をはじめた頃は、まだラット遺伝学的解析の分野においてはヒトや同じげっ歯類であるマウスに比べゲノムライブラリーや遺伝子地図の開発などはるかに遅れをとっていた。最近になってようやく約 5000 個を超える遺伝マーカーや YAC, BAC などのライブラリーといった分子遺伝学的道具が整えられてきた。また 2002 年には世界中で現在推し進められているヒトゲノムプロジェクトにより、ヒト全ゲノム（遺伝子）が解読されると言われている。多因子遺伝性疾患におけるヒトやラットの遺伝学的解析も、さらに飛躍的に進展していくと思われる。高血圧、脳卒中、動脈硬化など成人病の素因遺伝子が同定

される日も近いのかもしれない。本研究における知見がその端緒となることを期待したい。

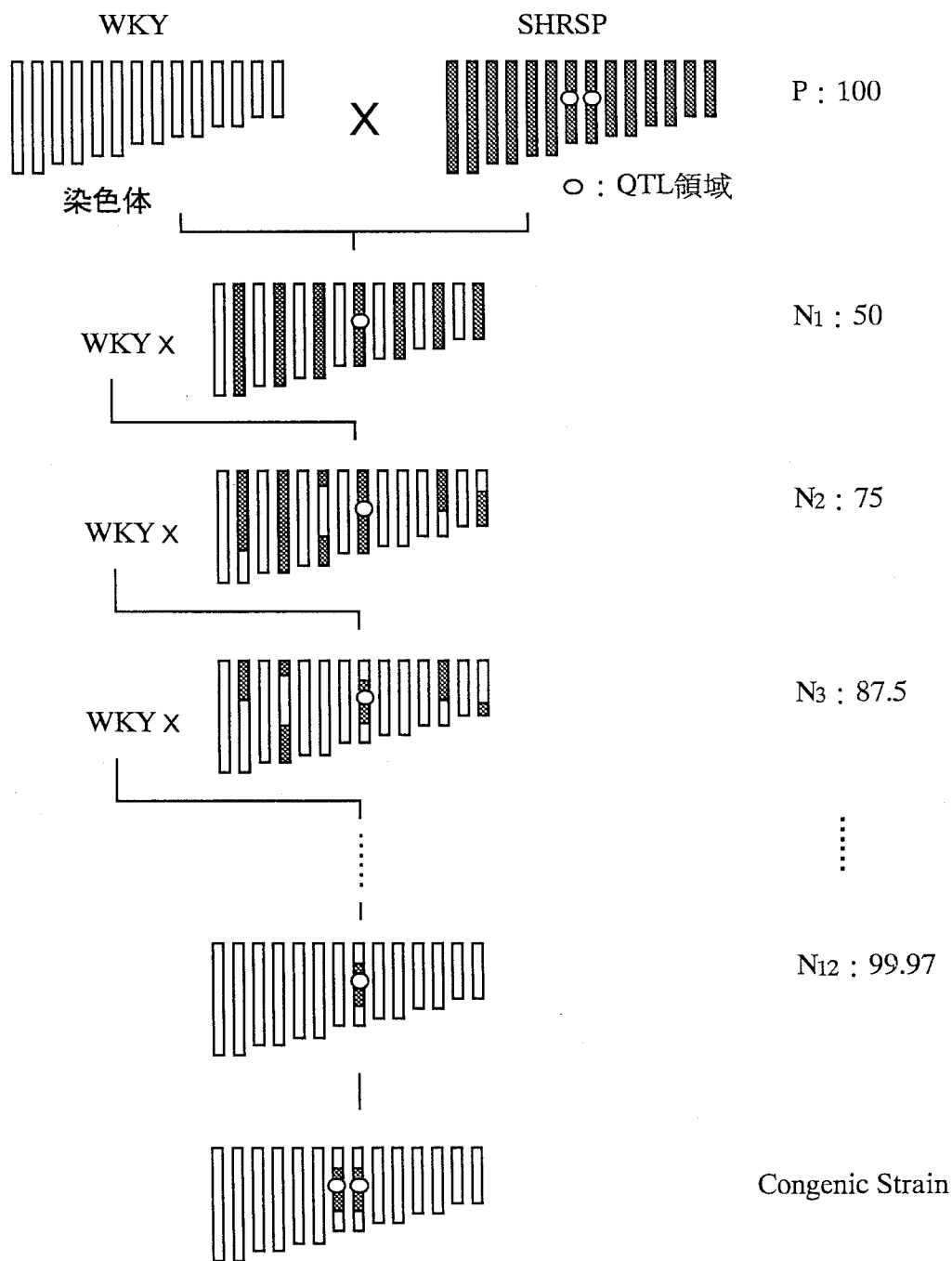


図21 コンジェニック系統の作製法。SHRSPのQTLが存在する染色体領域をWKYに戻し交配で導入する方法を示した。世代が進むに従いSHRSPの染色体はWKYに置き換わっていくが、QTL存在領域は遺伝マーカーを利用した選択により残されている。QTLの染色体断片以外がWKYになった時点 (N:2) 世代で、N₁₂世代同士を交配してコンジェニックラットを得る。

表14 高血圧連鎖領域におけるコンジェニックを用いた研究

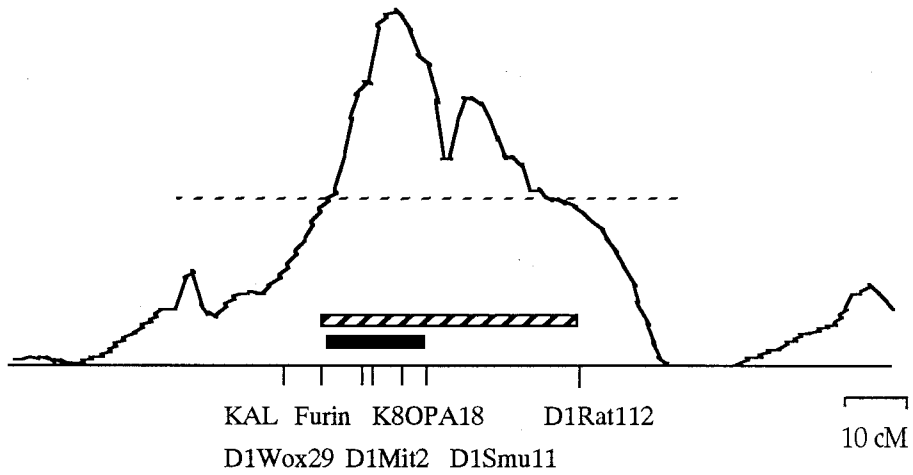
Donor	Recipient	Chr.	Segment	Phenotype	Author
BN/Cr	SHR/Ola	1	D1Mit3-Igf2	BP ↓	Lezin et al, 1997[99]
SHRSP	WKY		D1Mit2-mD7mit206	BP ↑	Frntz et al, 1998[100]
WKY	SHRSP		D1Wox34-mD7mit206	BP ↓	Frntz et al, 1998
SHRSP	WKY		D1Mit3-D1Rat57	BP ↑, NaBP ↑	Iwai et al, 1998[101]
SHRSP	WKY		D1Wox29-D1Rat112	BP ↑	Nabika et al, 1999[102]
SHRSP	WKY		D1Rat200-D1Rat57	BP ↑, NaBP ↑	Hubner et al, 1999[103]
WKY	DS	2	D2N35-Nep	NaBP ↓	Deng et al, 1997[104]
DR/Jr	DS/Jr	3	Edn3	NaBP ↓	Cicila et al, 1999[105]
BN	SHR	4	Il6-Npy	BP ↓	Pravenic et al, 1999[106]
DR/Jr	DS/Jr	7	D7Mit11-D7Uia1	NaBP ↓	Cicila et al, 1997[107]
BN-Lx	SHR/Ola	8	D8Mit5-D8Mgh6	BP ↓	Kren et al, 1997[108]
DR/Jr	DS/Jr	9		NaBP ↓	Rapp et al, 1998[109]
SHRSP/HD	WKY/HD	10	RNMHCG-RATALDCAA	BP ↑	Kreutz et al, 1995[60]
MNS	DS/Jr		D10Mco1-D10Mco6	NaBP ↓	Dukhanina et al, 1997[110]
DS/Jr/Hsd	DR/Jr/Hsd	13	D13Mit1-Renin	NaBP ↑	Lezin et al, 1996[111]
DS/Jr/Hsd	DR/Jr/Hsd		D13N1-Syt2	NaBP ↑	Jiang et al, 1997[112]
DR/Jr	DS/Jr		D13M1Mit108-Syt2	NaBP ↓	Zhang et al, 1997[113]
BN	SHR	19	D19Rat57-D19Rat49	BP ↓	Lezin et al, 1999[114]

表15 従来のコンジェニック系統作製法とスピードコンジェニック作製法

各世代におけるドナー系統の遺伝子の残る率		
世代	従来の方法	スピードコンジェニック法
P	100	100
N ₁	50	15
N ₂	25	3
N ₃	12.5	0.2
N ₄	6.3	0.03
N ₅	3.2	
N ₆	1.6	
N ₇	0.8	
N ₈	0.4	
N ₉	0.2	
N ₁₀	0.1	
N ₁₁	0.05	
N ₁₂	0.03	

スピードコンジェニック法で作製すると、N₅世代で従来の方法のN₁₂世代に相当する個体を得られる。すなわち従来の方法の約2.4倍ほどのスピードアップが期待される。

(a)



■ : 100 :1 confidence interval

▨ : コンジェニックラットでSHRSPホモ型となっている領域

(b)

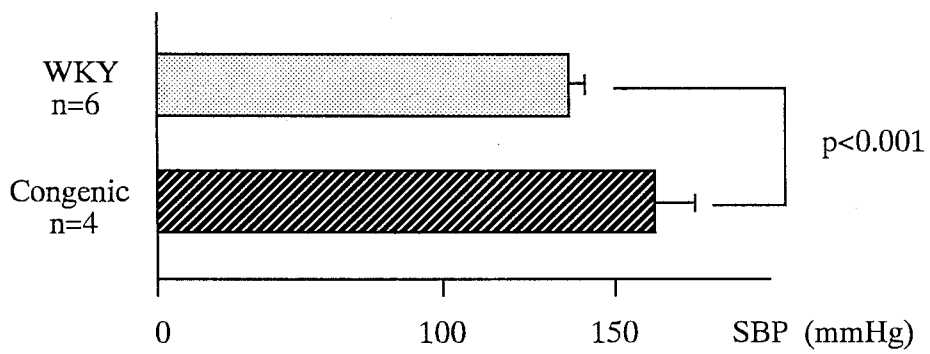


図22 (a) ラット第1番染色体連鎖領域とコンジェニックとした領域。
(b) ラット第1番染色体コンジェニックラットの血圧(90日齢)

表16 ヒトで遺伝的解析がなされたラット高血圧候補遺伝子

	ラット		ヒト	
	連鎖	遺伝子変異	連鎖	関連
ACE	+ (SHR*)	nr	-	-
Sa	+ (SHR, DS, FH)	nr	-	-/+
α -adducin	+ (MHS)	+ (MHS)	+	-/+
11 β -hydroxylase	+	+ (DR)	nr	nr

*：カッコ内はラットの系統を示す。SHRはSHRSPも含む。DS (Dahl salt-sensitive rats), FH (fawn-hooded rats), MHS (Milan hypertensive strain), DR (Dahl salt-resistant rats)。

nr：未報告

謝辭

謝辞

京都大学大学院人間・環境学研究科に入学して以来、修士課程、博士後期課程の間、家森幸男教授には終始懇切なる御指導、御助言をいただき、あたたかい目で御支援いただいた。島根医科大学臨床検査医学講座の並河徹助教授には、実際に研究に取り組むにあたり全面的なご指導、多大なる御支援をいただいた。京都大学大学院人間・環境学研究科国際予防栄養医学講座の池田克巳助教授には、脳卒中に関する最新の研究状況、およびその解析方法に関して御指導いただいた。東亜大学大学院総合学術研究科の奈良安雄教授、帝京大学医学部の加藤規弘先生、京都大学大学院人間・環境学研究科の澤村誠先生には、本研究の遂行にあたり適切な御助言、御指導をいただいた。島根医科大学臨床検査医学講座の益田順一教授には出雲で研究を行う機会を与えていただき、島根医科大学動物実験施設の権田辰夫先生、川上浩平氏にはモデル動物の飼育管理にご協力いただいた。近畿大学医学部衛生学講座の小川博教授にはラット脂質代謝について御指導、御教示いただいた。京都大学大学院医学部附属動物実験施設の芹川忠夫教授、北田一博先生にはラット遺伝学の現状について御指導いただいた。家森研究室を卒業された松本千穂女史、上野敬太氏、崔宗虎氏、実験助手の矢木利香女史、町田浩子女史には研究遂行にあたり様々な面で御支援、御協力をいただいた。家森研究室在籍学生諸氏にもいろいろと御世話になった。これら方々にまとめて心から感謝の意を表したい。

1999年12月3日

参考文献

参考文献

1. Botstein D. White RL. Skolnick M. Davis RW. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32(3): 314-31.
2. Gusella JF. Wexler NS. Conneally PM. Naylor SL. Anderson MA. Tanzi RE. Watkins PC. Ottina K. Wallace MR. Sakaguchi AY. (1983) A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*. 306(5940): 234-8.
3. Riordan JR. Rommens JM. Kerem B. Alon N. Rozmahel R. Grzelczak Z. Zielenski J. Lok S. Plavsic N. Chou JL. Drumm ML. Iannuzzi MC. Collins FS. Tsui LC. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 245: 1066-73.
4. 家森幸男ほか (1986) 遺伝モデル(高血圧の実験モデル). *日本臨床*. 44 (増刊号: 高血圧): 832.
5. Okamoto K. & Aoki K. (1963) Development of a spontaneously hypertensive rat. *Japanese Circulation Journal*. 27: 282-293.
6. Yamori Y. (1984) Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR) and its various rat models, and their implications. & The stroke-prone spontaneously hypertensive rat: contribution to risk factor analysis and prevention of hypertensive diseases. In *Hand book of Hypertension*, Vol. 4, W. de Jong, editor. Elsevier, Amsterdam, 224-240.
7. Horie R. Kihara M. Lovenberg W. Ben-Ishay D. Bianchi G. Iwai J. Nagaoka A. Rapp JP. Sassard J. Simpson FO. (1986) Comparison of various genetic hypertensive rat strains. *Journal of Hypertension*. 4(3) Supl: S11-14.
8. 家森幸男. 堀江良一. 奈良安雄. 木原正博. 並河徹. (1982) 高血圧モデルの比較病因論と高血圧成因論. *病態生理* 1: 475-483.

9. 岡本耕造. (1982) 高血圧モデル動物の生成とそれによる研究の発展. 病態生理 1: 459-474.
10. Okamoto K. Yamori Y. Nagaoka A. (1974) Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR). *Circulation Research*. 34-35: 1143-153.
11. Yamori Y. Nagaoka A. Okamoto K. (1974) Importance of genetic factors in hypertensive cerebrovascular lesions; an evidence obtained by successive selective breeding of stroke-prone and -resistant SHR. *Japanese Circulation Journal*. 38: 1095-1100
12. Yamori Y. Horie R. Sato M. Handa H. (1976) Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. *Stroke*. 7: 46-53.
13. Yamori Y. (1984) The stroke-prone spontaneously hypertensive rats: contribution to risk factor analysis and prevention of hypertensive diseases. In *Hand book of Hypertension*, Vol. 4, W. de Jong, editor. Elsevier, Amsterdam, 240-255.
14. Lander ES. Schork NJ. (1994) Genetic dissection of complex. *Science*. 18: 19-23.
15. Rapp JP. Deng AY. (1994) Detection and positional cloning of blood pressure quantitative trait loci: is it possible? *Hypertension*. 25: 1121-1128.
16. Darvasi A. (1998) Experimental strategies for genetic dissection of complex traits in animal models. *Nature Genetics*. 18: 19-23.
17. Hamada H. Kakunaga T. (1982) Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome. *Nature*. 298: 396-398.
18. Montagutelli X. Serikawa T. Guenet JL. (1991) PCR-analyzed microsatellites: data concerning laboratory and wild-derived mouse inbred strains. *Mammalian*

Genome. 1: 255-259.

19. Rapp JP, Wang SM, Dene H. (1989) A genetic polymorphism in the renin gene of Dahl rats cosegregates with blood pressure. *Science*. 243: 542-544.
20. Lindpaintner K, Takahashi S, Ganten D. (1990) Structural alterations of the renin gene in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: examination of genotype-phenotype correlations. *J Hypertens*. 8: 763-773.
21. Kurtz TW, Simonet L, Kabra PM, et al. (1990) Cosegregation of the renin allele of the spontaneously hypertensive rat with an increase in blood pressure. *J Clin Invest*. 85: 1328-1332.
22. Hilbert P, Lindpaintner K, Beckmann JS, et al. (1984) Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature*. 353: 521-529.
23. Jacob HJ, Lindpaintner K, Lincoln SE, et al. (1991) Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell*. 67: 213-224.
24. Nara Y, Nabika T, Ikeda K, et al. (1991) Blood pressure cosegregates with a microsatellite of angiotensin I converting enzyme (ACE) in F2 generation from a cross between original normotensive Wistar-Kyoto rat (WKY) and stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP). *Biochem Biophys Res Commun*. 181: 941-946.

25. Deng Y, Rapp JP. (1992) Cosegregation of blood pressure with angiotensin converting enzyme and atrial natriuretic peptide receptor genes using Dahl salt-sensitive rats. *Nat Genet.* 1: 267-272.
26. Dubay C, Vincent M, Samani NJ, et al. (1993) Genetic determinants of diastolic and pulse pressure map to different loci in Lyon hypertensive rats. *Nat Genet.* 3: 354-357.
27. Pravenec M, Gauguier D, Schott JJ, et al. (1995) Mapping of quantitative trait loci for blood pressure and cardiac mass in the rat by genome scanning of recombinant inbred strains. *J Clin Invest.* 96: 1973-1978.
28. Schork NJ, Krieger JE, Trolliet MR, et al. (1995) A biometrical genome search in rats reveals the multigenic basis of blood pressure variation. *Genome Res.* 5: 2701-2709.
29. Clark JS, Jeffs B, Davidson AO, et al. (1996) Quantitative trait loci in genetically hypertensive rats. Possible sex specificity. *Hypertension.* 28: 898-906.
30. Samani NJ, Gauguier D, Vincent M, et al. (1996) Analysis of quantitative trait loci for blood pressure on rat chromosomes 2 and 13. Age-related differences in effect. *Hypertension.* 28: 1118-1122.
31. Ikeda K, Nara Y, Yamori Y. (1991) Indirect systolic and mean blood pressure determination by a new tail cuff method in spontaneously hypertensive rats. *Laboratory Animals.* 25: 26-29.

32. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Isolation of High-molecular-weight DNA from Mammalian Cells, *in* Nolan C (ed): Molecular cloning. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 9, p14-23.
33. Jacob HJ, Brown DM, Bunker RK, et al. (1995) A genetic linkage map of the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. *Nat Genet.* 9: 63-69.
34. Serikawa T, Kuramoto T, Hilbert P, et al. (1992) Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics.* 131: 701-721.
35. Nabika T, Ito T, Kitada H, Serikawa T, et al. (1997) Comparative mapping of novel simple sequence repeat markers in a hypertension-related region on rat chromosome 1. *Mamm Genome.* 8: 215-217.
36. Bihoreau MT, Gauguier D, Kato N, et al. (1997) A linkage map of the rat genome derived from three F2 crosses. *Genome Res.* 7: 434-440.
37. Richardson T, Cato S, Ramser J, et al. (1995) Hybridization of microsatellites to RAPD: a new source of polymorphic markers. *Nucleic Acids Res.* 23: 3798-3799.
38. Matsumoto C, Nabika T, Mashimo T, et al. (1998) Construction of a rat genetic map using the randomly amplified microsatellite polymorphism (RAMP) markers. *Mamm Genome.* 9: 531-535.
39. Lander ES, Green P, Abrahamson J, et al. (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics.* 1: 174-181.

40. Lander E, Kruglyak L. (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet.* 11: 241-247.
41. Gu L, Dene H, Deng AY, Hoebee B, et al: Genetic mapping of two blood pressure quantitative trait loci on rat chromosome 1. *J Clin Invest* 1996; 97: 777-788.
42. Brown DM, Provoost AP, Daly MJ, et al: Renal disease susceptibility and hypertension are under independent genetic control in the fawn-hooded rat. *Nat Genet* 1996; 12: 44-51.
43. Iwai N, Inagami T. (1992) Identification of a candidate gene responsible for the high blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 10: 1155-1157.
44. Lindpaintner K, Hilbert P, Ganten D, Nadal-Ginard B, Inagami T, Iwai N. (1993) Molecular genetics of the SA-gene: cosegregation with hypertension and mapping to rat chromosome 1. *J Hypertens.* 11: 19-23.
45. Harris EL, Dene H, Rapp JP. (1993) SA gene and blood pressure cosegregation using Dahl salt-sensitive rats. *Am J Hypertens.* 6: 330-334.
46. Samani NJ, Lodwick D, Vincent M, Dubay C, Kaiser MA, Kelly MP, Lo M, Harris J, Sassard J, Lathrop M, Swales JD. (1993) A gene differentially expressed in the kidney of the spontaneously hypertensive rat cosegregates with increased blood pressure. *J Clin Invest.* 92: 1099-1103.
47. Iwai N, Inagami T. (1991) Isolation of preferentially expressed genes in the kidneys of hypertensive rats. *Hypertension.* 17: 161-169.

48. Patel HR. Thiara AS. West KP. Lodwick D. Samani NJ. (1994) Increased expression of the SA gene in the kidney of the spontaneously hypertensive rat is localized to the proximal tubule. *J Hypertens.* 12: 1347-1352.
49. Yang T. Hassan SA. Singh I. Smart A. Brosius FC. Holzman LB. Schnermann JB. Briggs JP. (1996) SA gene expression in the proximal tubule of normotensive and hypertensive rats. *Hypertension.* 27: 541-551.
50. Ishinaga Y. Nabika T. Shimada T. Hiraoka J. Nara Y. Yamori Y. (1997) Re-evaluation of the SA gene in the spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 24(1): 18-22.
51. Nabika T, Nara Y, Ikeda K, et al. (1991) Genetic heterogeneity of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 18: 12-6
52. Katsuya T, Higaki J, Zhao Y, et al. (1993) A neuropeptide Y locus on chromosome 4 cosegregates with blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 192: 261-267.
53. Gray TS. Morley JE (1986) Neuropeptide Y: anatomical distribution and possible function in mammalian nervous system. *Life Sci.* 38: 389-401.
54. Stanley B G. Leibowitz SF. (1985) Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82: 3940-3943.
55. Koike G, Jacob HJ, Krieger JE, Szpirer C, Hoehe MR, Horiuchi M, Dzau VJ. (1995) Investigation of the phenylethanolamine N-methyltransferase gene as a candidate gene for hypertension. *Hypertension.* 26(4): 595-601
56. Jeunemaitre X. Lifton RP. Hunt SC. Williams RR. Lalouel JM. (1992) Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential

- hypertension. *Nature Genet.* 1: 72-75.
57. Zee RY, Lou YK, Griffiths LR, Morris BJ. (1992) Association of a polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene with essential hypertension. *Biochem Biophys Res Commun.* 184(1): 9-15.
 58. Hoehe MR, Plaetke R, Otterud B, Stauffer D, Holik J, Byerley WF, Baetge EE, Gershon ES, Lalouel JM, Leppert M. (1992) Genetic linkage of the human gene for phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT), the adrenaline-synthesizing enzyme, to DNA markers on chromosome 17q21-q22. *Hum molecucl genet.* 1:175-178.
 59. Schork NJ, Nath SP, Lindpaintner K, et al. (1997) Extensions to quantitative trait locus mapping in experimental organisms. *Hypertension* 1996; 28: 1104-1111.
 60. Kreutz R, Hubner N, James MR, et al. (1995) Dissection of a quantitative trait locus for genetic hypertension on rat chromosome 10. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 8778-8782.
 61. Yamori Y. (1994) Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR), the stroke-prone SHR (SHRSP) and their various substrain models for hypertension-related cardiovascular diseases. In *Hand book of Hypertension*, Vol. 16, W. de Jong, editor. Elsevier, Amsterdam, 346-364.
 62. Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, et al. (1996) Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature.* 383(6602): 707-10.
 63. Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, Shimoizumi H, Nihei K, Yanagisawa M, Kagawa Y, Ohta S. (1991) Respiration-deficient cells are caused by a single point mutation in the mitochondrial tRNA-Leu (UUR) gene in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS). *Am J Hum*

- Genet. 49(3): 590-9.
64. Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots GT, Luyendijk W, Frangione B. (1990) Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*. 248(4959): 1124-6.
 65. Alberts MJ. (1991) Genetic aspects of cerebrovascular disease. *Stroke*. 22: 276-280.
 66. Margaglione M, Seripa D, Gravina C, et al. (1998) Prevalence of apolipoprotein E alleles in healthy subjects and survivors of ischemic stroke: an Italian Case-Control Study. *Stroke*. 29: 399-403.
 67. Rubattu S, Volpe M, Kreutz R, Ganten U, Ganten D, Lindpaintner K. (1996) Chromosomal mapping of quantitative trait loci contributing to stroke in a rat model of complex human disease. *Nat Genet*. 13: 429-434.
 68. Jeffs B, Clark JS, Anderson NH, et al. (1997) Sensitivity to cerebral ischaemic insult in a rat model of stroke is determined by a single genetic locus. *Nat Genet*. 16: 364-367.
 69. Tagami M, Kubota A, Nara Y, Yamori Y. (1991) Detailed disease processes of cerebral pericytes and astrocytes in stroke-prone SHR. *Clin Exp Hypertens*. A13(5):1069-75
 70. Yamada J, Kuramoto T, Serikawa T. (1994) A rat genetic linkage map and comparative maps for mouse or human homologous rat genes. *Mamm Genome*. 5: 63-83.
 71. Serikawa T, Cui Z, Yokoi N, Kuramoto T, Kondo Y, Kitada K, Guenet JL. (1998) A comparative genetic map of rat, mouse and human genomes. *Exp Anim*. 47(1): 1-9.

72. DeBry RW, Seldin MF. (1996) Human/mouse homology relationships. *Genomics*. 33(3): 337-51.
73. Oda T, Funai T, Ichiyama A. (1990) Generation from a single gene of two mRNAs that encode the mitochondrial and peroxisomal serine:pyruvate aminotransferase of rat liver. *J Biol Chem*. 265: 7513-7519.
74. Nara Y, Gao M, Ikeda K, et al. (1997) Genetic analysis of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 24: 200-204.
75. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res*. 19: 4008.
76. Yasue M, Serikawa T, Yamada J. (1991) Chromosomal assignments of 23 biochemical loci of the rat by using rat x mouse somatic cell hybrids. *Cytogenet Cell Genet*. 57: 142-148.
77. Liu T, Clark RK, McDonnell PC, et al. (1994) Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke*. 25: 1481-1488.
78. Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, et al. (1996) Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med*. 2: 788-794.
79. Phillis JW. (1995) CI-966, a GABA uptake inhibitor, antagonizes ischemia-induced

- neuronal degeneration in the gerbil. *Gen Pharmacol.* 26: 1061-1064.
80. Urabe T, Hattori N, Nagamatsu S, Sawa H, Mizuno Y. (1996) Expression of glucose transporters in rat brain following transient focal ischemic injury. *J Neurochem.* 67: 265-271.
81. Schurr A, Tseng MT, West CA, Rigor BM. (1987) Taurine improves the recovery of neuronal function following cerebral hypoxia: an in vitro study. *Life Sci.* 40: 2059-2066.
82. Nara Y, Yamori Y, Lovenberg W. (1978) Effects of dietary taurine on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Pharmacol.* 27: 2689-2692.
83. Thomas HE Jr, Kannel WB, Dawber TR, McNamara PM. (1966) Cholesterol-phospholipid ratio in the prediction of coronary heart disease. The Framingham study. *N Engl J Med.* 274(13): 701-5.
84. Neaton JD, Blackburn H, Jacobs D, Kuller L, Lee DJ, Sherwin R, Shih J, Stamler J, Wentworth D. (1992) Serum cholesterol level and mortality findings for men screened in the multiple risk factor intervention trial: Multiple risk factor intervention trial research group. *Arch. Intern. Med.* 152: 1490-1500.
85. Tanaka H, Ueda Y, Hayashi M, Date C, Baba T, Yamashita H, Shoji H, Tanaka Y, Owada K, Datels R. (1982) Risk factors for cerebral hemorrhage and cerebral infarction in a Japanese rural community. *Stroke.* 13: 62-73.
86. Kagan A, Popper JS, Rhoads GG, Yano K. (1985) Dietary and other risk factors for

- stroke in hawaiian Japanese men. *Stroke*. 16: 390-396.
87. Iritani N, Fukuda E, Nara Y, Yamori Y. (1977) Lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Atherosclerosis*. 28: 217-222.
88. Sawamura M, Nara Y, Yamori Y. (1992) Liver mevalonate 5-pyrophosphate decarboxylase is responsible for reduced serum cholesterol in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *J Biol Chem*. 267: 6051-6055.
89. Takayama Y. (1975) *J Jpn Coll Angiol*. 15: 455-465.
90. Yamori Y, Horie R, Sato M, Fukase M. (1976) Hypertension as an important factor for cerebrovascular atherogenesis in rats. *Stroke*. 7(2): 120-5.
91. Yamori Y, Horie R, Ohtaka M, Nara Y. (1977) Effect of high fat cholesterol diet on cerebrovascular circulation and the heart in stroke-prone SHR. *Jpn Heart J*. 18(4): 533-5.
92. Yamori Y, Nara Y, Tagami M, Mano M, Kihara M, Fujiwara K, Horie R, Kamino K. (1984) Common cellular disposition to hypertension and atherosclerosis. *J Hypertens*. 2(3): S213-5.
93. Laurell CB. (1966) Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal Biochem*. 15(1): 45-52.
94. Ogawa H, Nioshikawa T, Sasagawa S. (1991) Effect of cholesterol feeding on the compositions of plasma lipoproteins and plasma lipolytic activities in SHRSP. *Clin*

Exp Hypertens.13(5): A999-1008.

95. Castelli WP. (1992) Epidemiology of triglycerides: a view from Framingham. *Am J Cardiol.* 70(19): 3H-9H.
96. Kato N, Tamada T, Nabika T, Ueno K, Gotoda T, Matsumoto C, Mashimo T, Sawamura M, Ikeda K, Nara Y, Yamori Y. Identification of quantitative trait loci for serum cholesterol levels in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. (投稿中)
97. Aitman TJ, Gotoda T, Evans AL, Imrie H, Heath KE, Trembling PM, Truman H, Wallace CA, Rahman A, Dore C, Flint J, Kren V, Zidek V, Kurtz TW, Pravenec M, Scott J. (1997) Quantitative trait loci for cellular defects in glucose and fatty acid metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet.* 16(2): 197-201.
98. Bottger A. Lith HA. Kren V. Krenova D., Bila V. Vorlicek J. Zidek V. Musilova A. Zdobinska M. Wang J. Zutphen BF. Kurtz TW. Pravenec M. (1996) Quantitative trait loci influencing cholesterol regulating blood pressure in spontaneously hypertensive rat. *J Clin Invest.* 97: 777-788.
99. Lezin E. Liu W. Wang JM. Wang N. Kren V. Krenova D. Musilova A. Zdobinska M. Zidek V. Lau D. Pravenec M. (1997) Genetic isolation of a chromosome 1 region affecting blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 30(4): 854-9.
100. Frantz SA, Kaiser M, Gardiner SM, Gauguier D, Vincent M, Thompson JR, Bennett T, Samani NJ. (1998) Successful isolation of a rat chromosome 1 blood

- pressure quantitative trait locus in reciprocal congenic strains. *Hypertension*. 32(4): 639-46.
101. Iwai N, Tsujita Y, Kinoshita M (1998) Isolation of a chromosome 1 region that contributes to high blood pressure and salt sensitivity. *Hypertension*. 32(4): 636-8.
102. 並河徹、川上浩平、池田克巳、権田辰夫、益田順一、真下知士、加藤規弘、家森幸男、奈良安雄「第1染色体高血圧連鎖領域を SHRSP ホモ型として有するコンジェニックラットの作成」 *血圧* 1999, 6(3): 45-48
103. Hubner N, Lee YA, Lindpaintner K, Ganten D, Kreutz R. (1999) Congenic substitution mapping excludes Sa as a candidate gene locus for a blood pressure quantitative trait locus on rat chromosome 1. *Hypertension*. 34(4 Pt 1): 643-8.
104. Deng AY, Dene H, Rapp JP. (1997) Congenic strains for the blood pressure quantitative trait locus on rat chromosome 2. *Hypertension*. 30(2 Pt 1): 199-202.
105. Cicila GT, Choi C, Dene H, Lee SJ, Rapp JP. (1999) Two blood pressure/cardiac mass quantitative trait loci on chromosome 3 in Dahl rats. *Mamm Genome*. 10(2): 112-6.
106. Pravenec M, Zidek V, Simakova M, Kren V, Krenova D, Horky K, Jachymova M, Mikova B, Kazdova L, Aitman TJ, Churchill PC, Webb RC, Hingarh NH, Yang Y, Wang JM, Lezin EM, Kurtz TW. (1999) Genetics of Cd36 and the clustering of multiple cardiovascular risk factors in spontaneous hypertension. *J Clin Invest*. 103(12): 1651-7.

107. Cicila GT. Dukhanina OI. Kurtz TW. Walder R. Garrett MR. Dene H. Rapp JP. (1997) Blood pressure and survival of a chromosome 7 congenic strain bred from Dahl rats. *Mammalian Genome*. 8(12): 896-902.
108. Kren V. Pravenec M. Lu S. Krenova D. Wang JM. Wang N. Merriouns T. Wong A. St. Lezin E. Lau D. Szpirer C. Szpirer J. Kurtz TW. (1997) Genetic isolation of a region of chromosome 8 that exerts major effects on blood pressure and cardiac mass in the spontaneously hypertensive rat. *Journal of Clinical Investigation*. 99(4): 577-81.
109. Rapp JP, Garrett MR, Dene H, Meng H, Hoebee B, Lathrop GM. (1998) Linkage analysis and construction of a congenic strain for a blood pressure QTL on rat chromosome 9. *Genomics*. 51(2): 191-6.
110. Dukhanina OI. Dene H. Deng AY. Choi CR. Hoebee B. Rapp JP. (1997) Linkage map and congenic strains to localize blood pressure QTL on rat chromosome 10. *Mammalian Genome*. 8(4): 229-35.
111. St. Lezin EM. Pravenec M. Wong AL. Liu W. Wang N. Lu S. Jacob HJ. Roman RJ. Stec DE. Wang JM. Reid IA. Kurtz TW. (1996) Effects of renin gene transfer on blood pressure and renin gene expression in a congenic strain of Dahl salt-resistant rats. *Journal of Clinical Investigation*. 97(2): 522-7.
112. Jiang J. Stec DE. Drummond H. Simon JS. Koike G. Jacob HJ. Roman RJ. (1997) Transfer of a salt-resistant renin allele raises blood pressure in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*. 29(2): 619-27.

113. Zhang QY, Dene H, Deng AY, Garrett MR, Jacob HJ, Rapp JP. (1997) Interval mapping and congenic strains for a blood pressure QTL on rat chromosome 13. *Mamm Genome*. 8(9): 636-41.
114. St Lezin E, Zhang L, Yang Y, Wang JM, Wang N, Qi N, Steadman JS, Liu W, Kren V, Zidek V, Krenova D, Churchill PC, Churchill MC, Pravenec M. (1999) Effect of chromosome 19 transfer on blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 33(1 Pt 2): 256-60.
115. Markel P, Shu P, Ebeling C, Carlson GA, Nagle DL, Smutko JS, Moore KJ. (1997) Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nat Genet*. 17(3): 280-4.
116. Cusi D, Barlassina C, Azzani T, Casari G, Citterio L, Devoto M, Glorioso N, Lanzani C, Manunta P, Righetti M, Rivera R, Stella P, Troffa C, Zagato L, Bianchi G. (1997) Polymorphisms of alpha-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. *Lancet*. 349(9062): 1353-7.
117. Kato N, Sugiyama T, Nabika T, Morita H, Kurihara H, Yazaki Y, Yamori Y. (1998) Lack of association between the alpha-adducin locus and essential hypertension in the Japanese population. *Hypertension*. 31(3): 730-3.
118. Kamitani A, Wong ZY, Fraser R, Davies DL, Connor JM, Foy CJ, Watt GC, Harrap SB. (1998) Human alpha-adducin gene, blood pressure, and sodium metabolism. *Hypertension*. 32(1): 138-43.
119. Ishikawa K, Katsuya T, Sato N, Nakata Y, Takami S, Takiuchi S, Fu Y, Higaki J,

Ogihara T. (1998) No association between alpha-adducin 460 polymorphism and essential hypertension in a Japanese population. *Am J Hypertens.* 11(4 Pt 1): 502-6.

投稿論文

平成 11 年 12 月 3 日

履 歴 書

本籍地 京都府
現住所 〒606-8395
京都市左京区東丸太町 47 フェリセカサ 101

ましも ともじ

氏 名 真 下 知 士

昭和 46 年 6 月 5 日生

学 歴

平成 2 年 3 月 23 日	兵庫県私立灘高等学校卒業
平成 2 年 4 月 1 日	京都大学農学部畜産学科入学
平成 6 年 3 月 24 日	同 上 卒 業
平成 7 年 4 月 1 日	京都大学大学院人間・環境学研究科文化地域環境学専攻修士課程入学
平成 9 年 3 月 24 日	同 上 修 了
平成 9 年 4 月 1 日	京都大学大学院人間・環境学研究科文化地域環境学専攻博士後期課程進学
平成 12 年 3 月 23 日	同課程所定の研究指導認定見込

研 究 歴

平成 6 年 4 月 1 日	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設において 研究生としてラット遺伝学の研究に従事。(平成 7 年 3 月 31 日まで)
平成 9 年 4 月 1 日	日本学術振興会特別研究員としてモデル動物を用いた 遺伝解析の研究に従事。(平成 12 年 3 月 31 日まで)
平成 10 年 7 月 1 日	島根医科大学臨床検査医学講座において特別研究学生 としてモデル動物を用いた遺伝解析の研究に従事。 (平成 10 年 12 月 31 日まで)

文献目録 (1995-2000)

1. Mashimo T, Tamada T, Matsumoto C, Sawamura M, Nabika T, Ikeda K, Nara Y and Yamori Y: A linkage analysis of the salt-sensitive hypertensive gene in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP). *Jap Heart J* 1996, 37(4): 553
2. Mashimo T, Nara Y, Nabika T, Tamada T, Matsumoto C, Ikeda K, Sawamura M and Yamori Y: A linkage analysis of basal hypertensive genes in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 1996, 14 (Suppl.1): S23
3. Matsumoto C, Nara Y, Ikeda K, Tamada T, Mashimo T, Nabika T, Sawamura M and Yamori Y: Cosegregation of the new region on chromosome 3 with salt-induced hypertension in female F2 progeny from stroke-prone spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996, 23(12): 1028-1034
4. Nara Y, Ikeda K, Mashimo T, Tamada T, Matsumoto C, Koh M, Sawamura M, Nabika N and Yamori Y: A new candidate locus for basal high blood pressure in male and female stroke-prone SHR (SHRSP/Izm). *J Hypertens* 1996, 14(Suppl.1): S11
5. Matsumoto C, Nara Y, Tamada T, Mashimo T, Ikeda K, Nabika T, Sawamura M and Yamori Y: Salt sensitive loci on chromosome 3 in female stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP). *J Hypertens* 1996, 14(Suppl.1): S23
6. Tamada T, Nara Y, Mashimo T, Matsumoto C, Ikeda K, Nabika T, Sawamura M and Yamori Y: Comparison of the genetic background among normotensive and hypertensive rat models using microsatellite markers. *J Hypertens* 1996, 14(Suppl.1): S23
7. Ikeda K, Nara Y, Matsumoto C, Mashimo T, Tamada T, Sawamura M, Nabika T and Yamori Y: The region responsible for stroke on chromosome 4 in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1996,

13(229): 658-62

8. 奈良安雄、池田克巳、松本千穂、真下知士、玉田知子、並河徹、澤村誠、家森幸男：「雌性脳卒中易発症ラットにおける食塩感受性遺伝子の検索」 血圧 1996, 3(2): 62-67
9. Nabika T, Ito T, Kitada K, Serikawa T, Mashimo T, Soubrier F, Julier C, Ohno Y, Saruta T, Tanase H, Masuda J, Yamori Y and Nara Y: Comparative mapping of novel simple sequence repeat markers in a hypertension-related region on rat chromosome 1. *Mamm Genome* 1997 8(3): 215-7
10. Hiraoka J, Hosoda K, Ogawa Y, Ikeda K, Nara Y, Masuzaki H, Takaya K, Nakagawa K, Mashimo T, Sawamura M, Koletsky RJ, Yamori Y and Nakao K: Augmentation of obese (ob) gene expression and leptin secretion in obese spontaneously hypertensive rats (obese SHR or Koletsky rats). *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 231(3): 582-5
11. Yamori Y, Nara Y, Ikeda K, Mizushima S, Matsumoto C, Mashimo T, Tamada T, Mtabaji JP, Moriguchi E and Moriguchi Y: Genetic variation of sodium sensitivity. *in* Guesry P, Hennerici M, Sitzer G (eds): Nutrition and Stroke. Vevey/Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997, p109-118.
12. Mashimo T, Kato N, Matsumoto C, Ueno K, Nabika T, Ikeda K, Nara Y and Yamori Y: Genetic analysis of the rat Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2) gene in SHRSP/Izm : Positional candidate approach. *Jap Heart J* 1998, 39(4): 555
13. Mashimo T, Kato N, Matsumoto C, Ueno K, Nabika T, Ikeda K, Nara Y and Yamori Y: Investigation of the Na-K-2Cl cotransporter gene as a candidate for salt-sensitive hypertension in SHRSP rats. *J Hypertens* 1998, 16(Suppl.2): S48
14. Matsumoto C, Nabika T, Mashimo T, Kato N, Yamori Y and Masuda J: Construction of a rat genetic map by using randomly amplified microsatellite

- polymorphism (RAMP) markers. *Mamm Genome* 1998, 9(7): 531-5
15. Matsumoto C, Nabika T, Mashimo T, Kato N, Yamori Y and Masuda J: A rat genetic map using the randomly amplified microsatellite polymorphism (RAMP) markers. *J Hypertens* 1998, 16(Suppl.2): S40
 16. 並河徹、川上浩平、池田克巳、権田辰夫、益田順一、真下知士、加藤規弘、家森幸男、奈良安雄：「第1染色体高血圧連鎖領域を SHRSP ホモ型として有するコンジェニックラットの作成」 *血圧* 1999, 6(3): 45-48
 17. Nara Y, Mashimo T, Tamada T, Matsumoto C, Ishinaga Y, Nabika T, Ikeda K, Sawamura M, Yamori Y: Analysis in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999, 26(7): 536-8
 18. Mashimo T, Nabika T, Matsumoto C, Tamada T, Ueno K, Sawamura M, Ikeda K, Kato N, Nara Y and Yamori Y: Aging and salt-loading modulate blood pressure QTLs in rats. *Am J Hypertens* 1999, 12(11): 1098-104
 19. Mashimo T, Nabika T, Kitada K, Serikawa T, Matsumoto C, Ikeda K, Nara Y, Masuda J and Yamori Y: Mapping of four simple sequence repeat (SSR) markers on rat chromosome 4. *Hypertens Res* 2000, 23(1): 47-50
 20. Mashimo T, Ogawa H, Ikeda K, Kawakami K, Cui Z, Gonda T, Masuda J, Yamori Y and Nabika T: A Genetic and Correlation Analysis of Lipid Metabolism in Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertens Res* 2000, 23(1): 76
 21. Mashimo T, Ogawa H, Ikeda K, Kawakami K, Cui Z, Gonda T, Masuda J, Yamori Y and Nabika T: A Genetic and Correlation Analysis of Lipid Metabolism in Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Kidney Blood Press Res* 2000, 23(1): 66
 22. Kato N, Tamada T, Nabika T, Ueno K, Gotoda T, Matsumoto C, Mashimo T, Sawamura M, Ikeda K, Nara Y, Yamori Y: Identification of quantitative trait loci for

serum cholesterol levels in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20(1): 223-9

発表目録 (1995-2000)

1. 真下知士、玉田知子、松本千穂、澤村誠、並河徹、池田克美、奈良安雄、家森幸男 「脳卒中易発症ラット (SHRSP) における食塩感受性高血圧原因遺伝子の検索」 高血圧自然発症ラット学会総会、横浜、1995年9月
2. Mashimo T, Nara Y, Nabika T, Tamada T, Matsumoto C, Ikeda K, Sawamura M and Yamori Y: A Linkage analysis of basal hypertensive genes in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. 16th International Society of Hypertension, Glasgow, UK, June 1996
3. Mashimo T, Nabika T, Matsumoto C, Sawamura M, Kato N, Ikeda K, Nara Y and Yamori Y: Time Series Study to Evaluate Effects of Non-Genetic Factors on Blood Pressure Quantitative Trait Loci in Rats. 9th International Symposium on SHR and Cardiovascular Genetics, Montreal, CANADA, November 1997
4. 真下知士、加藤規弘、松本千穂、上野敬太、並河徹、池田克巳、奈良安雄、家森幸男 「SHRSP/Izm における Na-K-2Cl cotransporter 遺伝子座の検討-Positional Candidate Approach-」 第33回 高血圧自然発症ラット学会総会、静岡、1997年10月
5. Mashimo T, Kato N, Matsumoto C, Ueno K, Nabika T, Ikeda K, Nara Y and Yamori Y: Investigation of the Na-K-2Cl Cotransporter Gene as a Candidate for Salt-Sensitive Hypertension in SHRSP Rats. 17th International Society of Hypertension, Amsterdam, Netherlands, June 1998

6. 真下知士、小川博、池田克巳、川上浩平、催宗虎、権田辰夫、益田順一、家森幸男、並河徹 「SHRSP における脂質代謝に関する遺伝的素因解析」 第 35 回 高血圧自然発症ラット学会総会、札幌、1999 年 8 月
7. 真下知士、小川博、川上浩平、催宗虎、池田克巳、権田辰夫、益田順一、家森幸男、並河徹 「脳卒中易発症ラットにおける動脈硬化の遺伝的素因解析—高血圧、脂質代謝異常およびその雌雄差について—」 第 22 回日本高血圧学会総会、高松、1999 年 10 月
8. Mashimo T, Ogawa H, Ikeda K, Kawakami K, Cui Z, Gonda T, Masuda J, Yamori Y and Nabika T: A Genetic and Correlation Analysis of Lipid Metabolism in Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rats. International Symposium on Obesity and Hypertension, Berlin, Germany, October 1999

Original Article

Mapping of Four Simple Sequence Repeat (SSR) Markers on Rat Chromosome 4

Tomoji MASHIMO^{*1,2}, Toru NABIKA^{*2}, Kazuhiro KITADA^{*3}, Tadao SERIKAWA^{*3}, Chiho MATSUMOTO^{*1}, Katsumi IKEDA^{*4}, Yasuo NARA^{*5}, Junichi MASUDA^{*2}, and Yukio YAMORI^{*1}

We previously reported that several markers on rat chromosome (Chr) 4 cosegregated with the occurrence of cerebral stroke and brain edema in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). To obtain insights into the positional candidate genes for stroke susceptibility in this region, we mapped four genes, Taurine transporter (*Tau*), tumor necrosis factor receptor (*Tnfr*), GABA transporter (*Gat1*) and glucose transporter-3 (*Glut3*) genes, using newly developed simple sequence repeat (SSR) markers on rat Chr 4. We isolated the SSRs for the genes either by screening a rat genomic library or by searching the GenBank database. By linkage analysis using two sets of backcrosses, *Gat1* and *Tnfr* were mapped in the region associated with stroke, while *Taut* was located distant from the region. The *Glut3* locus was also assigned to rat Chr 4 using a rat x mouse hybrid clone panel. These results indicated that the *Tnfr*, *Gat1* and *Glut3* genes were good positional candidates for the stroke susceptibility in SHRSP, suggesting that further evaluation of these genes by functional studies could prove useful. (*Hypertens Res* 2000; 23: 47-50)

Key Words: stroke susceptibility, stroke-prone spontaneously hypertensive rat, candidate genes, simple sequence repeat markers, comparative map

Introduction

Although hypertension is a major risk factor for cerebral stroke, other genetic and environmental factors, such as abnormalities in lipid metabolisms, diabetes mellitus, dietary habits and cigarette smoking, are also stroke risk factors. Recently, genes related to stroke susceptibility have been sought by linkage analysis in humans (1, 2) and in experimental animal models (3-6). Based on our study of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP), we previously reported that several markers on rat

chromosome (Chr) 4 cosegregated with the occurrence of cerebral stroke and brain edema (4). These markers did not cosegregate with blood pressure, suggesting that the putative stroke susceptibility gene in this region was present independent of hypertension. In this study, we mapped 4 genes on rat Chr 4 to make a comparative map between the rat and the mouse or the human to obtain positional candidate genes for stroke susceptibility in this region.

From the ^{*1}Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University, Kyoto, Japan, ^{*2}Department of Laboratory Medicine, Shimane Medical University, Izumo, Japan, ^{*3}Institute of Laboratory Animals, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan, ^{*4}Otsuka Department of International Preventive Nutritional Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan, and ^{*5}Graduate School of Integrated Science and Art, University of East Asia, Shimonoseki, Japan.

This study was partly supported by a grant from Research Fellowships of the Japan Society for the Promotion of Science for Young Scientists.

Address for Reprints: Tomoji Mashimo, Department of Environmental Conservation and Development, Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University, Yoshida Nihonmatsu-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8316, Japan.

Received June 25, 1999; Accepted in revised form August 27, 1999.

Table 1. A List of Newly Developed Simple Sequence Repeat (SSR) Markers on Rat Chromosome 4.

Loci (gene symbols) : Gene names	Accession No.	Primers	Product sizes (SSRs) ^a	PCR conditions	
				Ann.temp./MgCl ₂	Alleles ^b
D4Smu1 (<i>Taut</i>) : Taurine transporter	M96601	5' CGCTTTCCTGCCGTTACTA 3' 5' GCCCATGGGTTTCCTTTTG 3'	223bp(CA) ₂₂	60°C/1.5 mM	P=W=S=D=O=WT>F=B
D4Smu2 (<i>Tnfr</i>) : Tumor necrosis factor receptor	AF128408	5' TTCGGGAAAGGAACACACTT 3' 5' CGGAGACCTGAGAAGCCACAC 3'	206bp(CA) ₂₉	65°C/1.5 mM	P=W=S=D=F=O=WT>B
D4Smu3 (<i>Gat1</i>) : GABA transporter	AF128409	5' GGCATGGTATGGCATGGTAGA 3' 5' AGGTTTTTCAACAAGGGGAGGG 3'	147bp(CA) ₂₄	65°C/1.5 mM	P=W=S=F=O=WT>D=B
D4Smu4 (<i>Glut3</i>) : Glucose transporter-3	AF128410	5' TGCCCTGGTTTCTTCATCATC 3' 5' AACCCAGGGCCTTGCGCTTCTT 3'	156bp(GA) ₂₃	TD63-58°C ^c 1.5 mM	P=W=S=D=F=O=WT=B

^aProduct sizes and numbers of repeats are based on sequenced plasmid clones or on the reference. ^bGenotyped rat strains are P, SHRSP/Izm; W, WKY/Izm; S, SHR/kyo; D, DRY/Sankyo; F, OLETF; O, LETO; WT, WTC/Kyo; BN, BN/N. ^cTouchdown PCR: Annealing temperature was decreased from 63°C to 58°C by 0.5 degree at every cycle and then fixed at 58°C for 25 cycles.

Methods

Library Screening

Genomic library screening was carried out as described previously (7). Briefly, a rat genomic library constructed in the cosmid vector pHC79 (8) was screened with cDNA fragments amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) used as probes. Total RNA from the rat brain was used in the RT-PCR. Positive cosmid clones were digested with *Sau* 3A and subcloned into the pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA). These plasmid libraries were then screened with ³²P-end-labeled (CA)₁₅ or (GA)₁₅ oligomers. Positive clones were picked up, minipreped and sequenced to identify simple sequence repeats (SSRs) and their flanking sequences.

Genotyping and Linkage Mapping

Polymorphisms of SSR markers were examined using 8 inbred strains of rats, SHRSP/Izm, Wistar Kyoto (WKY/Izm), SHR/kyo, Donryu (DRY/Sankyo), Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF), Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO), Wistar-derived tremor control (WTC/Kyo) and Brown-Norway (BN/N). SHRSP and WKY rats were maintained in our institute as described previously (9). OLETF and LETO rats were maintained in the Tokushima Research Institute (10), and other strains except for DRY/Sankyo rats were maintained in the Institute of Laboratory Animals, Faculty of Medicine, Kyoto University. The animals were treated with appropriate care, in accordance with the guideline for animal experimentation issued by the Japan Association for Laboratory Animal Science (11).

Three sets of intercrossed or backcrossed animals, 125 progenies of F2 (SHRSP × WKY), 48 of (WTC × BN) × BN and 87 of (SHR × DRY) × SHR, were genotyped with SSR markers on Chr 4. The PCR conditions are summarized in Table 1. D4Smu4 were amplified by touchdown PCR (12). The annealing temperature was decreased by 0.5 degree/cycle from 63°C to 58°C and then fixed at 58°C for 25 cycles (Table 1). PCR products were electrophoresed on either 7.5% polyacrylamide or 4% agarose gels and visualized with ethidium bromide staining. Genotype data were analyzed with the MAPMAKER/EXP 3.0 program to make linkage maps (13).

Results

Taurine transporter (*Taut*), tumor necrosis factor receptor (*Tnfr*), GABA transporter (*Gat1*) and glucose transporter-3 (*Glut3*) genes were selected from the mouse and the

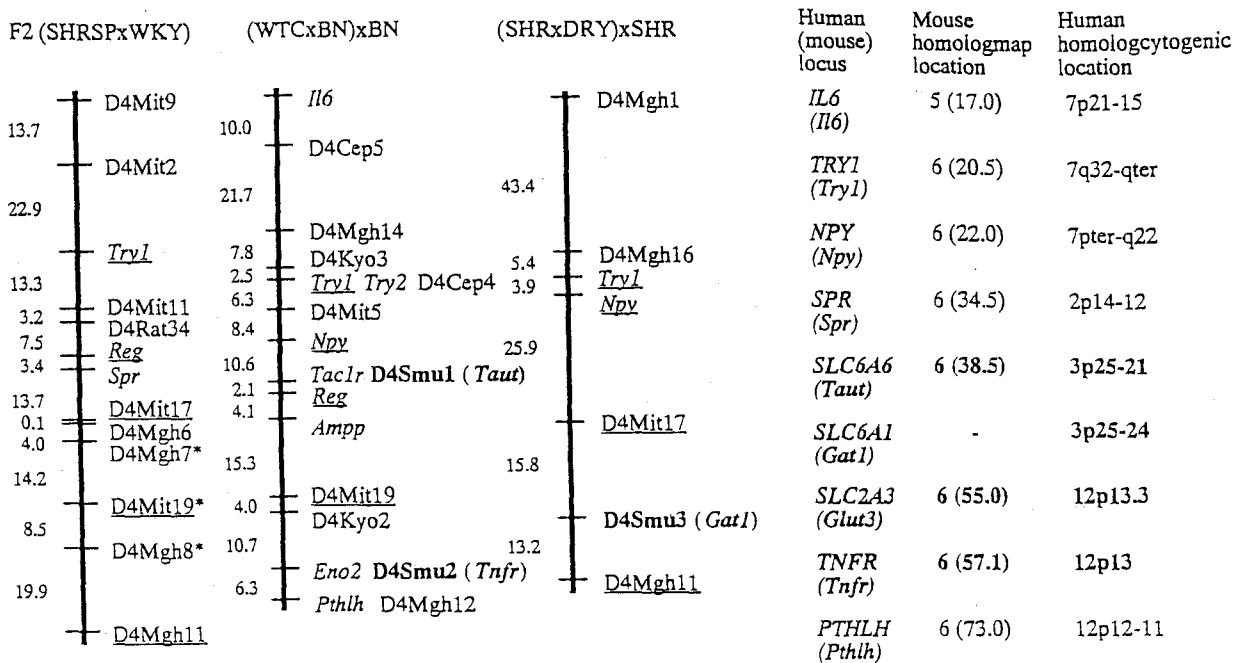


Fig. 1. Linkage maps of rat chromosome 4. The left panel is the map for an F2 (SHRSP×WKY) cross of 125 progenies, the center panel is for a backcross (WTC×BN)×BN of 48, and the right panel is for a backcross (SHR×DRY)×SHR of 87. Map distance is calculated by MAPMAKER/EXP 3.0 program and represented in Kosambi's unit. Human and mouse homologous locations are indicated on the right. Markers in bold letters were newly developed in this study. Underlined markers are mapped by more than two crosses. *Markers previously showed a significant linkage with stroke in SHRSP (4).

human chromosomal regions that were expected to be homologous to rat Chr 4. A (CA)₂₂ repeat was found in the 3' untranslated region (3'UTR) of the reported *Taut* cDNA sequence (GenBank M96601). We accordingly designed a SSR marker for the *Taut* locus, as shown in Table 1, and mapped it on rat Chr 4 by linkage analysis using a (WTC×BN)×BN cross (Fig. 1, D4Smu1).

Three SSRs for *Tnfr*, *Gat1* and *Glut3* were newly isolated through the screening of a rat genomic library. *Tnfr* and *Gat1* were mapped on Chr 4 by linkage using a (WTC×BN)×BN or a (SHR×DRY)×SHR cross (Fig. 1, D4Smu2 and D4Smu3, respectively). D4Smu4, a SSR for the *Glut3* locus, was not polymorphic among the eight strains examined in this study, so it was assigned to rat Chr 4 using a rat×mouse hybrid clone panel (14). Somatic hybrids positive for D4Smu4 were completely concordant with the rat Chr 4 (data not shown).

Discussion

The present study showed that the *Gat1* and *Tnfr* loci were located between D4Mgh7 and D4Mgh11, which were reported to link with stroke susceptibility (4), while *Taut* was located near the *Npy* locus, substantially distant from the region (Fig. 1). These results indicated that a

wide region on rat Chr 4 was homologous to mouse Chr 6. Although *Glut3* could not be mapped by linkage, we concluded after considering the homology among rat, mouse and human chromosomes that it is probably between *Gat1* and *Tnfr* (Fig. 1).

Tumor necrosis factor (TNF) is known as a cytokine that plays an important role in putative cascade-evoking apoptosis. TNF levels were shown to increase in the presence of ischemic brain injury (15). Further, in *Tnfr*-knocked out mice, the brain damage caused by the middle cerebral artery occlusion (MCAO) was significantly greater than that in normal mice (16). The TNF signal, therefore, may be one of the determinants of the neuronal susceptibility to ischemia. The *Tnfr* locus mapped in this study indicated that *Tnfr* is a good candidate as a stroke susceptibility gene in SHRSP rats. Functional studies also implicated *Gat1* and *Glut3*. Recent studies showed that an inhibitor of the GABA transporter reduced the extent of ischemic injury (17). *Glut3*, known as a neuron-specific glucose transporter, was also reported to be increased in the rat brain after MCAO (18). The authors argued that up-regulation of *Glut3* levels in neurons might spare metabolic energy during the postischemic depression of cerebral blood flow.

Taurine was reported to protect neural cells from

exotoxin-induced ischemia (19). In SHRSP, dietary taurine was shown to prevent cerebral stroke (20). Although *Taut* was thought to be a good candidate as a stroke susceptibility gene in SHRSP rats, it was mapped distant from the stroke-linked markers on rat Chr 4. Further study is necessary to evaluate whether *Taut* can be a positional candidate or not.

The present study indicated that the *Tnfr*, *Gat1* and *Glut3* genes were good positional candidates for stroke susceptibility in SHRSP rats. Although we found no difference in the coding sequence of *Tnfr* between SHRSP/Izm and WKY/Izm rats (data not shown), future studies of these genes, including a comparison of the expression levels as well as the sequence of them between the SHRSP and the WKY rat, will allow further evaluation of them as candidates for stroke susceptibility genes.

References

- Alberts MJ: Genetic aspects of cerebrovascular disease. *Stroke* 1991; 22: 276-280.
- Margaglione M, Seripa D, Gravina C, et al: Prevalence of apolipoprotein E alleles in healthy subjects and survivors of ischemic stroke: an Italian case-control study. *Stroke* 1998; 29: 399-403.
- Rubattu S, Volpe M, Kreutz R, Ganten U, Ganten D, Lindpaintner K: Chromosomal mapping of quantitative trait loci contributing to stroke in a rat model of complex human disease. *Nat Genet* 1996; 13: 429-434.
- Ikeda K, Nara Y, Matsumoto C, et al: The region responsible for stroke on chromosome 4 in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229: 658-662.
- Jeffs B, Clark JS, Anderson NH, et al: Sensitivity to cerebral ischaemic insult in a rat model of stroke is determined by a single genetic locus. *Nat Genet* 1997; 16: 364-367.
- Tagami M, Yamagata K, Ikeda K, et al: Genetic vulnerability of cortical neurons isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats in hypoxia and oxygen reperfusion. *Hypertens Res* 1999; 22: 23-29.
- Nabika T, Ito T, Kitada H, et al: Comparative mapping of novel simple sequence repeat markers in a hypertension-related region on rat chromosome 1. *Mamm Genome* 1997; 8: 215-217.
- Oda T, Funai T, Ichiyama A: Generation from a single gene of two mRNAs that encode the mitochondrial and peroxisomal serine: pyruvate aminotransferase of rat liver. *J Biol Chem* 1990; 265: 7513-7519.
- Mashimo T, Nabika T, Matsumoto C, et al: Aging and salt-loading modulate blood pressure QTLs in rats. *Am J Hypertens* (in press).
- Nara Y, Gao M, Ikeda K, et al: Genetic analysis of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 24: 200-204.
- Japanese Association for Laboratory Animal Science: Guideline for animal experimentation. *Exp Anim* 1987; 36: 285-288.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS: 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 4008.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, et al: MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1987; 1: 174-181.
- Yasue M, Serikawa T, Yamada J: Chromosomal assignments of 23 biochemical loci of the rat by using rat × mouse somatic cell hybrids. *Cytogenet Cell Genet* 1991; 57: 142-148.
- Liu T, Clark RK, McDonnell PC, et al: Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke* 1994; 25: 1481-1488.
- Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, et al: Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 1996; 2: 788-794.
- Phillis JW: CI-966, a GABA uptake inhibitor, antagonizes ischemia-induced neuronal degeneration in the gerbil. *Gen Pharmacol* 1995; 26: 1061-1064.
- Urabe T, Hattori N, Nagamatsu S, Sawa H, Mizuno Y: Expression of glucose transporters in rat brain following transient focal ischemic injury. *J Neurochem* 1996; 67: 265-271.
- Schurr A, Tseng MT, West CA, Rigor BM: Taurine improves the recovery of neuronal function following cerebral hypoxia: an *in vitro* study. *Life Sci* 1987; 40: 2059-2066.
- Nara Y, Yamori Y, Lovenberg W: Effects of dietary taurine on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Pharmacol* 1978; 27: 2689-2692.