

氏 名 (本籍)	まん だ まさ はる 萬 田 正 治 (宮城県)
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 第 4 7 号
学位授与年月日	昭和 4 6 年 1 1 月 1 1 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
最終学歴	昭和 4 2 年 3 月 東北大学大学院農学研究科 修士課程修了
学位論文題目	血清エステラーゼ多型現象の育種学的 研究

(主査)
学位審査委員 教授 西田周作 教授 津田恒之
教授 勝野正則

論文内容要旨

酵素蛋白質の多型現象は育種学的には次の2つの点で意義がある。1つは既に用いられているようにこれらを支配する遺伝子を標識として、家畜の進化の過程、品種の成立過程、家畜集団の遺伝的構成、親子鑑別の分析に利用することであり、他の1つは分子構造に差異を持つこれらが生体内でなんらかの機能的差異をもたらすのであるから、それを追究することにより究極的には重要な経済的形質としての成長、繁殖、産肉、産毛、産卵ならびに抗病性、適応性などの諸形質と酵素蛋白質の多型との関連性を明らかにし、家畜選抜上の有効な指標として利用しうるであろうということである。

しかしながら、動物体で認められる酵素蛋白質の多型現象は遺伝、生理的および様々の環境要因によつて変動し、その発現は極めて複雑な様相を呈している。故に育種的应用をはかるには、まずこれらの変異の基本的な支配法則性を解明することが前提となる。

本研究では、マウス、ラットにおける血清エステラーゼ多型現象の遺伝および生理的支配様式を明らかにするとともに、生産諸形質との関連性を追求し、家畜および実験動物への育種的应用をはかることを目的として検討をおこなつたものである。

1 血清エステラーゼの電気泳動像とその分類 (第1章)

血清エステラーゼ多型の育種的应用を検討するには、まず本酵素の適確な分画法を確立し、その活性帯の分布状況を把握することが必要である。またエステラーゼは一連のエステル化反応を触媒する酵素群の総称であるので、個々の活性帯についてはさらに基質特異性、阻害剤および賦活剤によつて同定をおこない、いくつかのアイソザイム群に分類する必要がある。これらの点を検討するために、垂直式澱粉ゲル電気泳動法を用いて分析した。

血清エステラーゼの分画は、ポウリックの考案した不連続緩衝液系 (pH 8.65のトリス・クエン酸とpH 8.81のホウ酸緩衝液) を若干修正することによつて、分離性能を向上せしめることが出来た。電気泳動像は、系統および性によつてかなりの変異を示すが、基本的にはマウスで13本、ラットでは14本の活性帯が検出された (図-1)。その中の主要な活性帯は、アリルエステラーゼ、アリエステラーゼ、コリンエステラーゼの3群に分類される。アリエステラーゼは移動度のはやい順にA₁, A₂, A₃, A₄の4本の活性帯から成り、コリンエステラーゼはC₁, C₂, C₃, C₄ (ラットではC₅, C₆も存在) の4本から構成されていることが判明した (図-1)。両酵素群とも移動度のおそい順に活性は高く、A₄, C₄がそれぞれのアイソザイムの主成分である。アルブミン域に検出されるE₈₋₃とE₈₋₄はアリルエステラーゼの1タイプである。

2 血清エステラーゼ多型の生理的変異 (第3章)

一般に血清酵素の活性は年令的に変化するとともに、種々の生理的条件の変動に応じて消長することはよく知られた事実である。したがって血清エステラーゼ多型の遺伝分析にはいる前に、まずこれらが幼若、成熟、妊娠、泌乳等の生理的变化によつていかなる変動を示すかを検討した。

血清コリンエステラーゼ、アイソザイムのうち、マウスではC₃の活性に顕著な雌雄差が認められ、成熟雌マウスは幼若および成熟雄マウスよりも高い活性値を示した(図-2)。C₃の活性は妊娠とともに著しく上昇するが、分娩後はしだいに低下し、泌乳末期には正常に戻る(図-2)。ラットではC₄活性に全く同様の明瞭な生理的変動が認められた。

マウスの血清アリエステラーゼ、アイソザイムのうち、A₄の活性は成熟雌マウスよりも雄で高く、妊娠期には著しく低下し、その生理的変動は前者と全く逆の様相を呈していた。またC₃、C₄は出生時にすでに産生されているのに対して、A₄は離乳期までは産生されない。

3 血清エステラーゼ多型の臓器起源 (第3章)

血清中に含まれる酵素は、各種臓器内の組織細胞で合成されたものの反映である。したがって血清エステラーゼ多型がどのような臓器から由来するかを検討した。

血清コリンエステラーゼ、アイソザイムの主成分であるC₄はマウス、ラットともに種々の主要臓器に認められた。故に血清中のC₄は各種臓器内で生合成されるが、ラットで特に本酵素活性が雄よりも雌で高く、妊娠期に著しく高くなるのは、主に子宮および胎盤酵素の影響によると思われる。マウスの血清中に高い活性で存在するC₃は子宮、胎盤をはじめいかなる臓器にも認めることが出来なかつた。しかしその反面、C₁、C₄が子宮と胎盤には高い活性値で存在し、特に妊娠期では著しく高くなることが認められた。したがって血清中のC₃の由来は臓器中のC₁とC₄に関係し、その雑種化によつて出現すると推定した。血清中のA₄は各種臓器に認められた。

4 血清コリンエステラーゼ・アイソザイムの性ホルモン調節 (第3章)

前項で認められた血清エステラーゼ多型の生理的変異には、性ホルモンが関与していると推定した。この点を確かめるため、去勢および性ホルモン投与の種々の実験を試みた。

成熟雌マウス、ラットのC₃、C₄の活性は卵巣除去によつて減少したが、エストロゼンを投与することによつて正常値に戻つた。成熟雄マウス、ラットのC₃、C₄の活性は、精巣除去によつて上昇したが、テストステロンの投与によつて正常値に戻つた。去勢雌マウスに対するプロジェステロン投与の効果は認められなかつた。子宮においてマウスのC₁、C₄とラットのC₄

活性もまた卵巣除去によつて低下し、エストロゼンの投与によつて正常値に戻つた。

以上のことから、マウス、ラットにおけるコリンエステラーゼ、アインザイムの活性はエストロゼン分泌によつて促進されるが、テストステロン分泌によつて抑制されると思われる。

5 血清エステラーゼ多型の系統間変異 (第2章)

血清エステラーゼ多型の遺伝分析をおこなうためには、本酵素多型が系統、個体間でどのような変異性を示すかをまず検討することが必要である。そこで起源の異なる種々の系統マウス、ラットを用いて分析した。

マウスでは E_s-1, E_s-4, C₃, C₄ に顕著な系統間変異が認められた。C₃ は高活性 (CFW, CF#1, SS, RR)、中間活性 (DDK, C₅₇BL/6, NC, AA)、低活性 (KK, C₃H/He, DSD) の3つの型に分けられる (表-1)。A₄ は高活性 (CFW, CF#1, C₃H/He, DDK)、低活性 (DSD, NC, RR, C₅₇BL/6)、陰性 (SS, AA, KK) の3つの型に分けられる。また去勢ならびに幼若マウスの C₃, A₄ 活性は、成熟マウスの場合と同様に、明瞭な系統間変異を示した。このことは本酵素活性の系統間変異は、性ホルモン分泌能の差異によるものではなく、本酵素の合成能力そのものの差異に起因することを示す。E_s-4 は11系統マウスのうちで C₅₇BL/6 のみに欠失する。陽極端の E_s-1 の活性は CF#1 で最も高く、KK, C₃H/He では検出されない。

ラットでは、E_s-1, C₄, C₅, C₆ に顕著な系統間変異が認められた。E_s-1 は3系統のうち、USC のみに欠失する。原点に近い域に検出される C₄, C₅, C₆ のアインザイム群は系統、個体間で著しく変異しており、これらの活性帯の組合せによつて6種の型が考えられた。

6 血清エステラーゼ多型の遺伝的支配 (第4章)

系統間変異の認められた C₃ と A₄ 活性が遺伝的に支配されているかどうかを検討するために種々の交雑実験をおこなつた。

F₁, F₂, 戻し交雑において C₃, C₄ 活性の分離比はメンデルリズムに従うことが判明した。また正逆交配の結果は、これらの遺伝子は常染色体上に存在することを示す (表-2)。故に C₃, A₄ は1対の共優性遺伝子 (ChE と Che, AIIE と AIie) によつて支配されていると推定される。

7 C₃ と繁殖能力との関連性 (第5章)

前述の遺伝的変異を検討する過程で、C₃ と繁殖能力 (産子数) との間に一定の平行関係のあることが暗示された。この点をさらに明らかにするために、種々の系統マウスの繁殖成績を調査し、また C₃ 活性の高低系統マウスの交雑実験をおこない、酵素型の分離と繁殖能力との関係を検討した。

C₃ 活性の高い系統は、妊娠率、産子数ともに高いのに対して、C₃ 活性の低い系統は妊娠率産子数ともに低い傾向にあり、C₃ 活性と繁殖能力との間に一定の平行関係にあることが判明した (図-3)。また交雑実験の結果、F₂ において分離する C₃ 活性型と繁殖能力との関係が平行していることは、両形質間にかなり密接な関係があることをさらに裏付けている。

8 体重大小選抜系マウスにおける血清エステラーゼ多型の変異 (第7章)

血清エステラーゼ多型と成長、繁殖能力の関連性をさらに検討するために、当研究室で育種された体重大小選抜系マウスを用いて分析した。

L系と S_M系マウスの間には45日令体重による選抜の顕著な効果として成熟時において12~14gの体重差を示した。しかし各選抜系マウスにおける C₃ と A₄ 活性と体重との間には有意な相関関係は認められなかつた。(表-3)。S_M系はL系、RB系マウスに比べて産子数は著しく低い傾向を示した。しかし産子数と C₃ 活性との間に、L系とRB系統内では有意な相関関係が得られたが、S_M系統内では認められない (表-3)。

以上のことから、各選抜系統内における A₄ 活性の遺伝子構成の差異は、体重選抜にもなつて無作為的に生じたものであつて、生理機能に結びつくところの相関反応ではないこと、また一方体重小への選抜によつて生ずる産子数の低下には C₃ は関与せず、何らかの別の要因が作用しているものと思われる。

9 不妊症肥満マウスにおけるエステラーゼ多型の変異 (第6章)

当研究室飼育の A A 系マウスの中から、異常に肥満しかつ繁殖障害をともなつた雄マウス (同腹兄弟2匹) が発見された。本マウスはホルモン治療の結果、正常雌マウスとの間に6匹の子マウスを生産した。これらの子マウスも著しく肥満し繁殖不能であつた。本実験では血清エステラーゼ多型の基礎的知見を指標に肥満マウスの発生機序の原因解明を試みた。

不妊症肥満雄マウスの C₃ 活性は、正常マウスのそれより異常に高く、本雌マウスの場合は異常に低い値を示した。このことはそれぞれのテストステロン、エストロゼン分泌能が低下していることを示す。この推定は肥満マウスにテストステロンを投与したところ、C₃ 活性が正常値に

戻つたことから裏付けられた。このような不妊症肥満マウスに対するホルモン投与の効果は、胎盤性ホルモンあるいは脳下垂体前葉性腺刺激ホルモンもかなり効果的ではあつたが、その反応には著しい個体差が認められた。

以上のことから、AA系マウスに出現した不妊症肥満マウスは、何らかの遺伝的欠陥によつて最終的には性ホルモン分泌能の低下を来し、その結果その調節下にあるエステラーゼその他酵素系に不均衡が生じ、異常な肥満と繁殖障害を起すにいたる一種の遺伝的な代謝病と推定される。

10 そ の 他

以上のように本研究ではマウス、ラットの血清エステラーゼ多型のうち、特にC₃とA₄活性に種々の系統的、生理的変異が認められ、それらが遺伝的に支配されていると同時に性ホルモンによつて調節されていること、またこれらの活性帯は妊娠生理と関連して変異し、特にC₃活性は繁殖能力と密接な関連を有していることを明らかにし、本酵素多型の育種的应用を可能にした。またこれらの基礎的知見を応用して、不妊症肥満マウスの発生機序の原因解明を試み、その有効性を確認した。

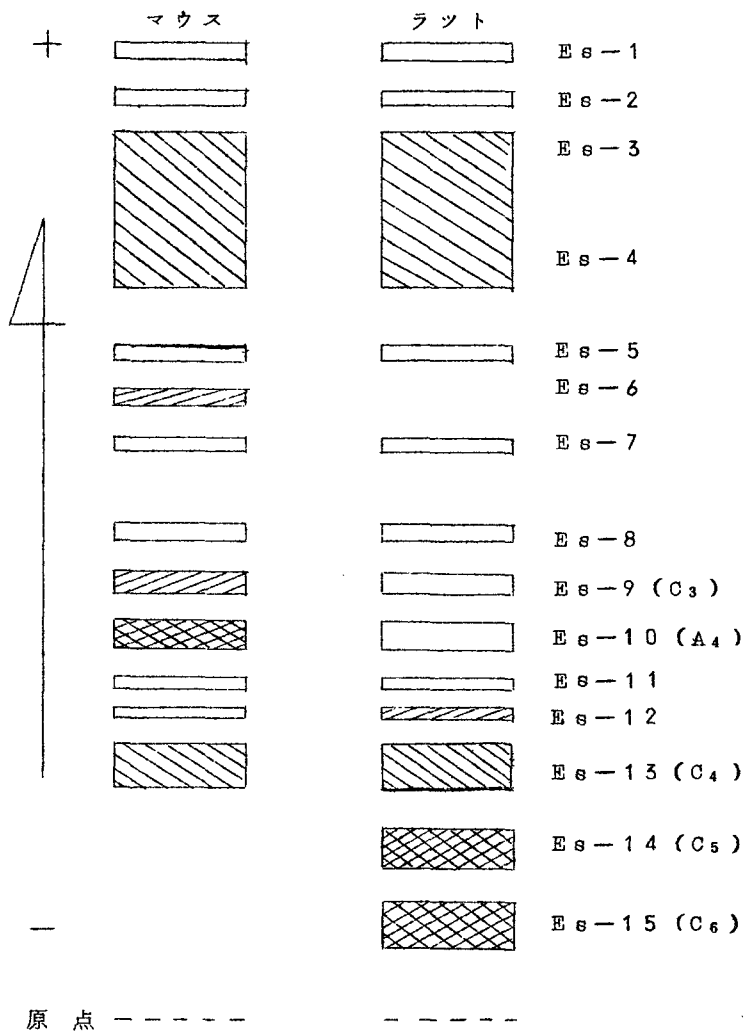
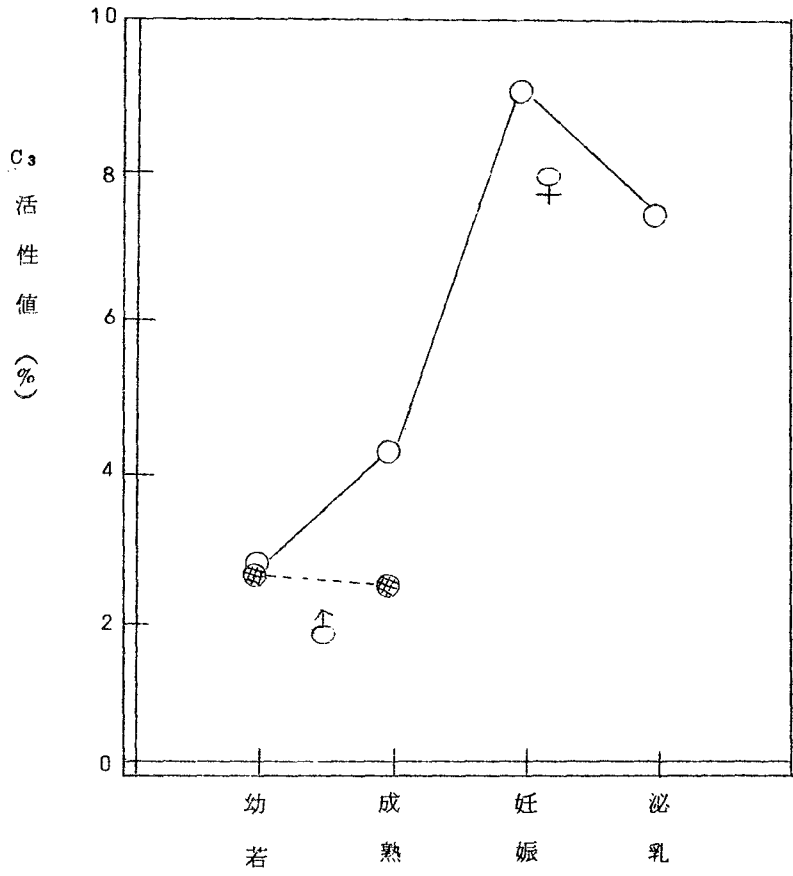
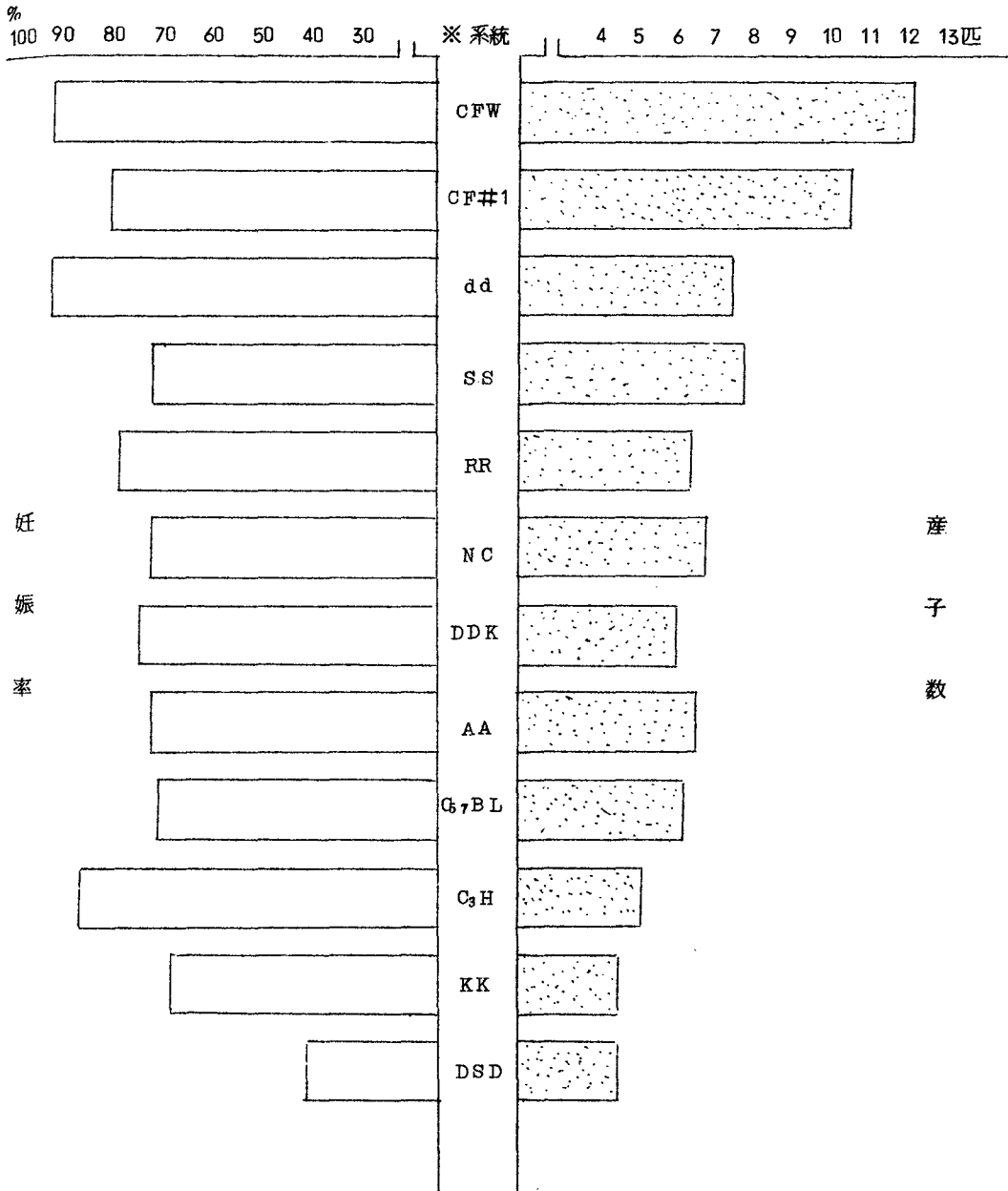


図-1 血清エステラーゼ電気泳動像の模式図



図一2 マウス血清コリンエステラーゼC₃ 活性の生理的変化

図-3 C₃ 活性と産子数、妊娠率との関連



※ C₃ 活性の高い順に上から記載されている。

表一 1 マウス血清コリンエステラーゼ C₃ 活性の系統間変異

系 統	CFW	CF#1	SS	RR	DEK	C ₅₇ BL	NC	AA	C ₃ H	KK	DSD
月 令	5~8	5~7	4~7	5~7	3~10	5~7	4~7	2~12	3~6	3~7	3~6
例 数	9	6	5	6	9	6	6	5	5	5	8
成 熟 雌 マ ウ ス	###	###	###'	###	###'	##	##	###'	##	##	##
	###	###'	###'	###'	##	##	##	##	##	##	##
	###	###'	###'	###'	##	##	##	##	##	##	##
	###	##	##	###'	##	##	##	##	##	##	##
	###	##	##	###'	##	##	##	##	##	##	##
	###	##		###'	##	##	##				##
	###				##						+
	###				##						+

~ ###' : 高活性

: 中間活性

~ + : 低活性

表-2 CFW, KK およびそれらの交雑種マウスにおける
血清コリンエステラーゼ・アインザイム C₃ 活性型の遺伝

交配	仔数	C ₃ 活性型の分布							
		雌			x ² -検定	雄			x ² -検定
		高	中	低		高	中	低	
CFW×CFW	75	30	0	0		45	0	0	
KK×KK	45	0	0	25		0	0	20	
(CFW×KK) F ₁	79	0	36	2		0	41	0	
(KK×CFW) F ₁	39	0	16	0		0	23	0	
F ₁ × F ₁	112	13	24	10	0.403	16	34	15	0.169
F ₁ × CFW	49	14	16	0	0.133	10	9	0	0.053
F ₁ × KK	55	0	18	16	0.118	0	11	10	0.048

表-3 血清エステラーゼ多型と体重、産子数の相関係数

系統	例数	体 重		産 子 数	
		C ₃	A ₄	C ₃	A ₄
L	12	0.331	0.339	0.708*	0.002
RB	7	0.633	0.674	0.828**	0.142
SM	11	0.270	0.565	0.050	0.490
計	30	0.071	0.059	0.294	0.017

* P < 0.05

** P < 0.01

審査結果の要旨

酵素蛋白質の多型現象の意義、遺伝形質としての役割などについては、なお不明な点が少なくないが、この現象の検出、識別の方法は進歩し、医学的応用面などが開かれてきた。家畜育種では個体、系統の判別、特定の生産形質・能力との関係が問題であるが、特に後者については研究が進んでいない。

1. 血清エステラーゼの電気泳動による分類：実験小動物（マウス，ラット）で血清エステラーゼの分画法を改良し、得られた活性帯の分布、基質特異性、その阻害や賦活による同定をおこない、マウスで13本、ラットで14本の活性帯を検出し、それぞれにアリル，アリ，およびコリン・エステラーゼの3群を分類することができた。アリエステラーゼはA₁～A₄，コリンエステラーゼはC₁～C₄ アイソザイムをもつ。
2. 血清エステラーゼ多型の生理的変異：コリンエステラーゼ・アイソザイムC₃（マウス）とC₄（ラット）は動物の生理条件で活性が変化し、雌雄差がみられる。成熟雌マウスでは幼若なものや、成熟雌マウスよりも高く、C₃は特に妊娠時に活性を増す。逆にA₄は成熟雌マウスよりも雄で高く、雌では妊娠時に低下する。
3. 血清エステラーゼ多型の臓器起原：C₄は各臓器に認められるが、特に子宮・胎盤に高い活性がみられ、C₃はそれが認められない。
4. 血清コリンエステラーゼ・アイソザイムの性ホルモン調節：雌の卵巣を除去するとC₃，C₄の活性は低下し、エストロセン投与で回復する。雄の精巣除去でC₃，C₄活性は増すがテストステロン投与で正常に復する。
5. 血清エステラーゼ多型の遺伝支配：異なる11系統のマウスについてアイソザイム群を比較すると系統間変異がみられ、C₃，C₄の活性の高低両系統を交雑し、F₁，F₂および戻し交雑によって、これらの単純遺伝方式と遺伝子型を確めた。
6. C₃と繁殖能力との関連：C₃活性の高低と産子数・妊娠率には系統により並行的な関係がある。不妊症肥満マウスのC₃活性は異常に高く、同じく雌マウスでは異常に低い。この雌にテストロンを投与するとC₃活性は正常になり繁殖力を得る。

以上、血清エステラーゼ多型のうち、生理的に、また性的に差のあるC₃とA₄の活性は、系統によって遺伝的支配をうけると同時に、性ホルモンによって調節され、それが繁殖力と密接な関係をもつことを認めた。

これらの問題にはなお未知のものが多く含まれるが、家畜育種の方法の基礎的な探究の試みとして、新知見を加えたものとみなされ、審査員一同は、これを農学博士の学位を授与するに値するものと認定した。