



## 三毛猫の毛色をつかさどるオレンジ遺伝子の発見 ～ 60年越しの謎への挑戦～



九州産業大学 生命科学部 教授 松田 美穂

九州大学 高等研究院 特別主幹教授 佐々木 裕之

### 1. はじめに

私たちに身近な存在のイエネコ。そのなかで三毛猫やサビ猫がほぼメスばかりであること、逆にオレンジ毛の個体がオスに多いことはよく知られています。これは、オレンジ/黒の毛色を決める「オレンジ遺伝子」がX染色体上に存在するためと説明されてきました。

1961年には英国の遺伝学者 Mary Lyon 博士によって「メスの細胞では一對のX染色体の片方がランダムに選ばれて不活性化される」という説が提唱され、三毛猫やサビ猫の模様はこの仮説と合致する例として広く受け入れられてきました。つまり、「オレンジ遺伝子に関するヘテロ接合体のメスにおいて、初期胚の各細胞で二本のX染色体のうち一方が不活性化され、それが増殖して身体各領域を占めるのでオレンジ/黒の斑ができる」というわけです。しかし、それから60年以上経っても、オレンジ遺伝子の実体は明らかではありませんでした。このような背景のなか、私たちは「三毛猫遺伝子探索プロジェクト」チームを結成し、この謎を解くべく始動しました。

### 2. オレンジ毛色に関連する遺伝的変異の同定

実は私たちの研究以前にも、各国の科学者がイエネコのオレンジ遺伝子を明らかにすべく研究していました。2009年にはマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析が、2018年には一塩基多型 (SNP) アレイを用いたゲノムワイド関連解析が行われ、オレンジ遺伝子のX染色体上の大まかな位置が明らかにされていました。

このような状況のもと、私たちは動物病院の協力を得て、イエネコ18個体(三毛猫8, サビ猫1, オレンジ毛1, 対照8)の血液からDNAを採取し、次世代シーケンサーを用いて全ゲノムの塩基配列を決定しま

した。これを国立遺伝学研究所と麻布大学のチームが決定した高精度なイエネコゲノム配列データにマッピングしたところ、三毛猫やサビ猫を含むオレンジ毛を持つ個体にのみ共通して *ARHGAP36* 遺伝子内におよそ5.1 kb (キログ塩基対) の欠失が見られました(図1)。この遺伝子は、先に決定されたX染色体上の候補領域内にありました。さらに、メスの三毛猫では次世代シーケンサーのデータの厚みが半分であったことから、欠失に関するヘテロ接合体であることが示唆されました。まさにオレンジ遺伝子に期待される特徴を持っていたわけです。

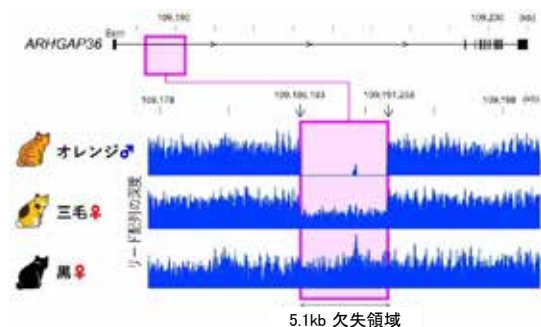


図1 ゲノムDNA配列の比較によるオレンジ遺伝子の同定

### 3. オレンジ毛と5.1 kb欠失との関連

この欠失とオレンジ毛との関係を確立するには、さらに多くの個体のゲノムDNAを調べる必要があります。そこで、さらに40個体の追加サンプルからDNAを抽出し、全ゲノム配列の決定より簡便で安価なポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 解析によって一対一の関係を確認しました。ちなみに、私たちはイエネコへの負担を最小限にするため、動物病院で診療の際に採取さ

れた血液の剰余サンプルや、獣医師の方たちによるボランティア活動で地域猫（野良猫）の不妊手術を行う際に出た不要な組織の一部を分与していただきました。

たいへん興味深いことに、私たちが幸運にも入手することができた稀なオスの三毛猫のサンプルにも同じ欠失がありました（図2；三毛♂）。上段のPCR産物の電気泳動写真で、欠失の存在は「オレンジ（O）」と記したバンドで表され、欠失のない方は「野生型（o）」と記したバンドで表されています。一番右のオスの三毛猫では、すぐ左隣のメスのサビ猫と同様に、欠失を表すバンドと野生型を表すバンドの両方が見られます。つまり、オスであるにもかかわらず、X染色体上の*ARHGAP36*遺伝子を2つ持っていたのです。この個体は、Y染色体上のオス化遺伝子*SRY*を持っており（図2、下段）、おそらくXXY等の染色体の異数性があるのだらうと推測されます（X染色体が2本あっても、Yが存在すればオスの表現型を示すことは、ヒトの場合を含めてよく知られています）。

さらに、ゲノムデータベースに登録された海外のイエネコ258個体のうち毛色がカラー写真で確認できた9個体（アメリカ、ヨーロッパ、中東、アジアの個体を含む）の配列を調べたところ、オレンジ毛を持つ個体にだけ同じ欠失が認められ、欠失の有無とオレンジ毛の有無が完全に一致しました。5.1 kbの欠失は世界中のイエネコに広く分布し、オレンジ毛の表現型が単一起源に由来する可能性が示唆されました。

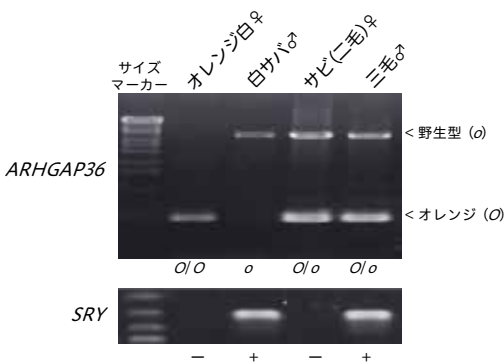


図2 PCR解析による遺伝子型判定の例

#### 4. *ARHGAP36* 遺伝子とその働き

さて、私たちが欠失を確認した*ARHGAP36*遺伝子とは如何なる遺伝子なのでしょう？イエネコの*ARHGAP36*遺伝子に関するデータや過去の報告はほとんどなかつ

たので、ヒトやマウスのデータベースを用いて情報を集めました。すると、この遺伝子は哺乳類の間で保存されており、下垂体、副腎、視床下部など神経堤細胞由来の細胞を含む組織で発現が高いことが分かりました。色素細胞も神経堤細胞由来の細胞です。ただし、*ARHGAP36*が色素合成や皮膚・毛の色に関わるという知見は、どの生物種においても報告されていませんでした。

一方、この遺伝子がコードする*ARHGAP36*というタンパク質は、細胞内のタンパク質リン酸化酵素であるプロテインキナーゼAを分解し、そのシグナル経路を阻害すると報告されていました（遺伝子の名称はRho GTPase activating proteinファミリーのタンパク質との構造的な類似性由来しますが、このファミリーに共通のGTP分解活性は失っているようです）。私たちが発見した5.1 kbの欠失は*ARHGAP36*遺伝子のイントロン内にあるため、コードするタンパク質の構造や機能への直接の影響はないと考えられますが、この欠失の範囲内に、遺伝子の発現調節に関与することが示唆される高度に保存された配列が発見されました。すなわち、この調節配列の有無が、*ARHGAP36*遺伝子の発現量又は発現様式を変化させ、最終的に毛色の変化に関与する可能性が考えられました。

#### 5. *ARHGAP36* 遺伝子の発現変化とメラニン合成系への影響

次に、イエネコの皮膚における*ARHGAP36*遺伝子を含む全遺伝子の網羅的な発現解析を試みました。そのため、たまたま亡くなった個体から頂戴した皮膚片や、地域猫のボランティア活動で得られた耳介片などを活用しました。オレンジ、黒、白の毛色を持つ皮膚片からそれぞれRNAを抽出し、RNAシーケンシングという方法で全遺伝子の発現量を網羅的に調べました。その結果、*ARHGAP36*遺伝子は、オレンジ毛の皮膚片でのみ恒常的に強く発現することが分かりました。つまり、欠失の範囲内に存在する保存された配列は、*ARHGAP36*遺伝子の発現を抑制する負の調節配列であり、この配列が欠落すると*ARHGAP36*が発現上昇するのだと考えられます。

さらに、*ARHGAP36*遺伝子と他の遺伝子の発現との関連を調べ、*ARHGAP36*の発現と正の相関を示す遺伝子341個と、負に相関する遺伝子517個を同定し

ました。これらの遺伝子について、京都大学のKEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) データベースで生物学的パスウェイの解析を行ったところ、負の相関を示す遺伝子が集中している経路のトップにメラニン合成経路がランクされました (図3A)。この結果は、*ARHGAP36* 遺伝子 (タンパク質) とメラニン合成関連遺伝子 (タンパク質) との間に、機能的な関係があることを強く示唆しています。

図3Bにメラニン合成経路と、この経路で働くさまざまな遺伝子 (タンパク質) を示しています。*ARHGAP36* 遺伝子の発現増加に伴って、発現が低下する遺伝子を太枠で囲んでいます。それらの遺伝子には、チロシナーゼ (*TYR*)、ドーパクロムトートメラーゼ (*DCT*)、チロシナーゼ関連タンパク質1 (*TYRP1*) などユウメラニン (黒色メラニン色素) 合成に直接関わる酵素群のほか、アデニル酸シクラーゼ7 (*ADCY7*) をはじめとするシグナル伝達系因子や転写調節因子をコードする遺伝子が含まれていました。ちなみに、図3Bの左上の細胞膜上に MC1R という分子がありますが、これはメラニン合成刺激を受け取るメラノコルチン1受容体であり、この遺伝子に変異のあるヒトの家系は赤毛になることが分かっています。最も重要なことは、このシグナル経路にプロテインキナーゼ A が関与していることです (図3B 上部の PKA)。上述のように、*ARHGAP36* タンパク質はプロテインキナーゼ A を分解することから、ここが重要な作用点である可能性があります。

図3Bの下部には、色素細胞内でメラニンが合成される「メラノソーム」を二重線枠で示しました。メラニンはアミノ酸の一種であるチロシンから作られます

が、*TYR*, *DCT*, *TYRP1* などの酵素の存在下では、反応はまっすぐ右に進んでユウメラニンが多く作られます。一方、これらの酵素が十分に供給されないとユウメラニン合成は進まず、余った中間代謝物は上方のフェオメラニン (黄〜赤色メラニン) 合成へとシフトすると考えられます。

以上を総合すると、遺伝的な 51 kb の欠失→*ARHGAP36* 遺伝子の発現上昇→プロテインキナーゼ A の抑制→メラニン合成関連遺伝子の発現低下→ユウメラニン合成からフェオメラニン合成へのシフト→オレンジ毛の出現というシナリオが考えられます。まだまだ分からないことがたくさんあるのですが、以上から、*ARHGAP36* 遺伝子こそが長年探し求められてきたオレンジ遺伝子であると言ってよいと思われます。この遺伝子が X 染色体上にあつたため、性別によって頻度が異なるイエネコの毛色パターンが現れたのでしょう。

## 6. *ARHGAP36* 遺伝子は X 染色体不活性化を受けるか?

最後に、*ARHGAP36* 遺伝子がオレンジ遺伝子だとすると、Lyon 博士が予測したように X 染色体不活性化を受けるはずですが、X 染色体不活性化は、性染色体構成が XX であるメスと XY であるオスの間で、X 染色体上の遺伝子の発現量を均等化する役割があります。しかし、ヒトやマウスでは X 染色体上の遺伝子の一部が不活性化を免れることも知られています。*ARHGAP36* 遺伝子は果たしてどうでしょうか。

通常、一对の遺伝子の両方が発現するのか、片方だけが発現するのかを区別するには、mRNA として転写されるエクソン領域内の一塩基多型 (SNP) を利用します。しかしながら、私たちが RNA を抽出すること

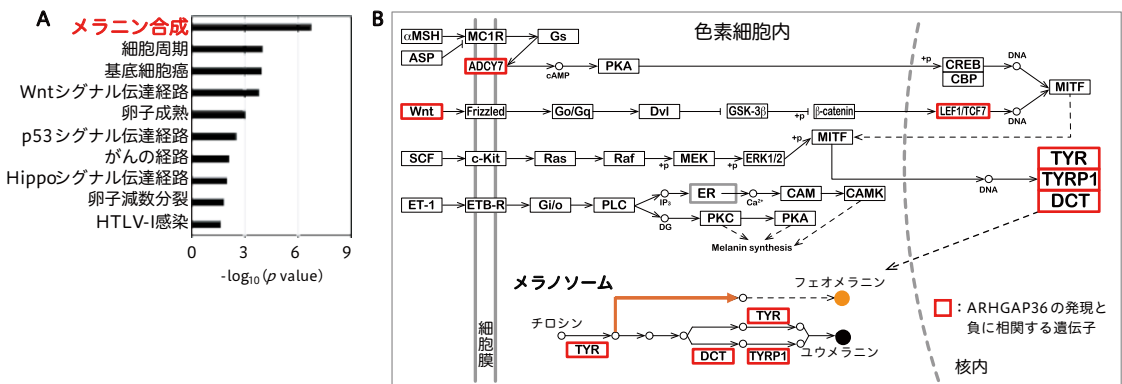


図3 *ARHGAP36* の発現と負に相関するメラニン合成関連遺伝子

ができたイエネコのサンプルには、残念なことにそのような SNP がありませんでした。そこで、X 不活性化の研究が進んでいるヒトやマウスの論文やデータを調べたところ、これらの生物種では *ARHGAP36* 遺伝子が明らかに不活性化を受けていました。2 種類の哺乳動物で不活性化を受けるなら、イエネコでも不活性化を受けるだろうと推測できますが、これだけでは不十分です。

そこで私たちは、X 染色体不活性化の影響を受ける遺伝子に特徴的に見られる DNA の修飾であるメチル化に着目しました。X 染色体上の遺伝子のプロモータは、不活性な X 染色体では高度にメチル化される一方、活性のある X 染色体ではほとんどメチル化されないことが知られています。私たちのオス、メスのイエネコの DNA サンプルを、バイサルファイトシーケンシングという方法で解析したところ、*ARHGAP36* 遺伝子は不活性化を起こすメスでのみメチル化されること、しかもそのメチル化は中等度であり、2 本の X 染色体のうち一方だけがメチル化されていると考えて矛盾しない結果でした。ちなみに、ヒトやマウスで不活性化を免れることが知られている X 染色体上の遺伝子を、同じイエネコの DNA サンプルで調べてみると、全くメチル化されていませんでした。このことから、メスで特異的に観察されたメチル化は、X 染色体の不活性化に伴うメチル化であると推測されました。

## 7. まとめ

以上の結果を図 4 にまとめました。三毛猫の黒毛の領域では、5.1 kb の欠失のない X 染色体が活性を持ち (Xa), *ARHGAP36* 遺伝子は抑制の効いた低めの発現を示します。その結果、メラニン合成遺伝子群の発現が誘導されて、ユウメラニン合成が行われます (右側)。一方、オレンジ毛の領域では、5.1 kb の欠失のある X 染色体が活性を持つので、*ARHGAP36* 遺伝子の発現が亢進し、プロテインキナーゼ A の分解と、引いてはメラニン合成遺伝子群の発現抑制が生じます。これによりユウメラニン合成が減少し、代わってフェオメラニン合成経路が促進されて、オレンジ毛になるものと考えられます (左側)。つまり、黒毛とオレンジ毛の領域の色素細胞では、活性のある X (Xa) と不活性な X

(Xi) が入れ替わっているのです。

最後に、三毛猫の白毛にも触れておきます。これは常染色体上にある別の遺伝子の変異によるもので、白毛の毛包には色素細胞がありません。つまり、色素細胞の分布異常といえます。この場合、神経堤細胞から生まれた色素細胞が分布する範囲やサイズはさまざまな要因によって支配されるため、双子やクローンの三毛猫でさえ模様は変わってきます。そして、どの有色部分が黒になり、どの部分がオレンジになるかは X 染色体の不活性化で決まります。発生の初期にそれぞれの細胞で起きたランダムな不活性化は、細胞が増殖する過程で維持されるため、まだら状に黒毛やオレンジ毛の領域ができると推察されます。

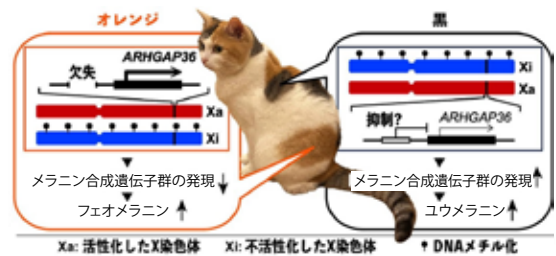


図 4 まとめ

## 8. おわりに

本研究の成果は 2025 年 5 月に Current Biology 誌に発表しましたが、実は同じ号に Stanford 大学の Greg Barsh 教授らの論文も掲載されました。私たち以外にも同じ研究を行なっているグループがいたのです。結論は私たちと同じで、*ARHGAP36* 遺伝子がオレンジ遺伝子であることを報告していますが、ユウメラニンからフェオメラニンへの切り替えはこの遺伝子の新機能なので、まだまだ調べるべきことがたくさんあります。最近報告されたイエネコの iPS 細胞を活用すれば、この謎が解けるかも知れません。また、世界中のオレンジ毛の個体が同じ欠失を持つことから、この変異の歴史的な起源が注目されるどころです。ヒトではこの遺伝子が減毛症、皮膚の基底細胞癌、異所性骨化症などと関連するため、この遺伝子の機能解析はヒトの病気の解明にも役立つことが期待されます。私たちもこれからの展開にまだまだワクワクしています。