

動物モデルによる多因子性疾患の QTL 解析： その基礎的理論と解析方法（改訂版）

石川 明
名古屋大学大学院生命農学研究科
qtl@nagoya-u.jp

1. はじめに

我々の周囲を見渡すと、実に様々な遺伝形質が存在する。例えば、農業上重要な経済形質（穀物の生産量や家畜の肉質等）やヒトの遺伝性疾患を挙げることができる。これらの形質の大部分は連続的な変異を示す量的形質(quantitative traits)であり、その他少数の不連続変異を示す単一遺伝子支配の質的形質(qualitative traits)とは異なる。一般に、量的形質は、複数の遺伝子座、すなわち量的形質遺伝子座群(QTLs: quantitative trait loci)によって支配され、環境の影響を受ける(Falconer and Mackay, 1996; Lynch and Walsh, 1998)。そのために、量的形質の遺伝子支配は極めて複雑であり、その遺伝解析はほとんど手付かずに残されてきた。

しかし、1980 年代後半よりヒトを含めた様々な生物種において、DNA マーカーに基づく高精度の遺伝的連鎖地図が構築されるとともに、統計遺伝学が急速に発展した。こうして、量的形質の遺伝解析 (QTL 解析と呼ぶ) が容易になり、動植物の様々な量的形質に関与する QTLs の染色体上の位置が明らかにされてきた。近年では、QTL の候補遺伝子内に塩基置換等の変異、すなわち QTNs (quantitative trait nucleotides)が見られるという論文がいくつか報告されるようになった(Mackay, 2001)。また、近年、トマトの fruit weight を支配する QTL *fw2.2* が世界で始めてポジショナルクローニングされた(Frary *et al.*, 2000)。こうして、21 世紀中には、いろいろな QTLs が実際の遺伝子として同定されるようになり、量的形質の変異の分子メカニズムの一端が解明され始めるものと期待される。

ヒトのアトピー性皮膚炎をはじめとして、肥満、高血圧、糖尿病、通風等のいわゆる“ありふれた病気(common diseases)”は複数の遺伝子座が関わる多因子性疾患(multifactorial diseases)であり、量的形質の一つである。これらの疾患原因遺伝子の同定・機能解析を目指して、飼育環境・遺伝的統御が容易なマウスやラット等の動物モデルを活用した QTL 解析が国内外において精力的に進められている。そこで、本稿では、マウス・ラットのような実験用近交系動物を用いて量的形質の QTL 解析を行う際に必須の基礎的理論と解析方法について概説する。なお、本稿の内容の大部分は“実験動物ニュース”(石川, 2002)と同じであるが、本稿の方が詳しく記載してある部分や適時加筆・修正等を行った部分があることを申し添える。

2. 量的形質の種類

量的形質は、その分布の型により以下の 4 つに大別できる(Falconer and Mackay, 1996; 石川ら, 1998)。

- (1) 連続的形質(continuous trait)
- (2) 分裂形質(meristic trait)
- (3) 閾値形質(threshold trait)
- (4) カテゴリー形質(categorical trait)

(1)は表現型が連続している形質であり、例として、体重や身長を挙げることができる。(2)の例として、一腹産仔数と腫瘍数があり、表現型が不連続な段階として示される形質である。(3)の例として、糖尿病があり、あるレベルを越えたら発症するといった形質である。最後に、(4)は表現型をいくつかのタイプに分類できる形質である。例えば、ある疾患の症状の程度がこれに相当し、正常、やや異常、異常、のようにカテゴリーとして分類できる形質である。

要するに、質的形質のように明らかに不連続ではないが、着目した形質変異が遺伝しており、計測可能でさえあれば、基本的には全てのを量的形質として取り扱うことができる。当然のことながら、解剖学上の計測値、生理学的機能、心理学的能力等も量的形質として含めることができる。

3. 量的形質の遺伝学的基礎

3.1. 量的形質の遺伝子支配

図1に量的形質の遺伝子支配の概念を示す。この図は、様々な二倍体生物種における QTL 解析の論文を参考にし、筆者の考えをまとめたものである。図1に示したように、量的形質の変異、すなわち量的変異(quantitative variation)は、遺伝要因、環境要因及び両要因の相互作用によって支配されている。換言すれば、これは教科書等でよく見かける量的形質の遺伝モデル

$$P = G + E + G \times E$$

を示している(Falconer and Mackay, 1996)。ここで、 $G \times E$ の効果は、いろいろな環境条件下でデータ収集し統計解析を行うことが困難であるために、実際には無視される。しかし、今後、environment-specific QTLs(後述)がマッピングされるようになると、遺伝要因と環境要因との相互作用に関する研究が進展し、生物進化の分子メカニズム解明の一助となるかもしれない。

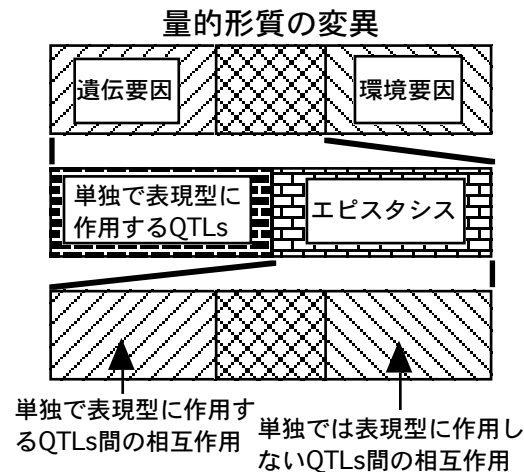


図1. 量的形質の遺伝子支配の概念。

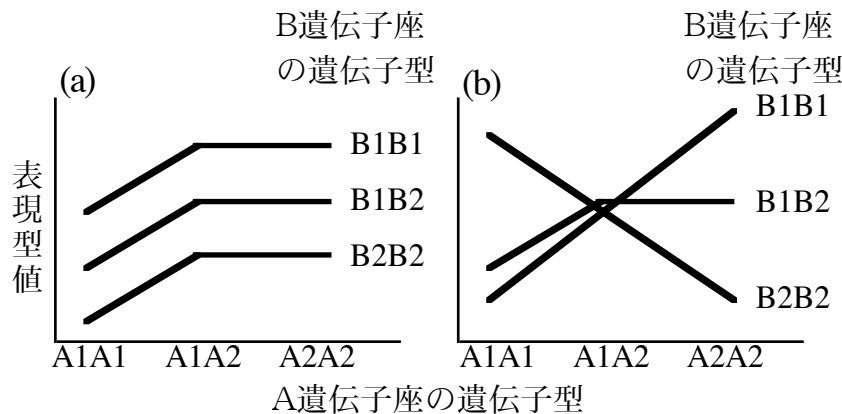


図2. 2遺伝子座(AとB)の間で、(a)エピスタシスがない場合と(b)エピスタシスがある場合。説明は本文参照。

上述の遺伝要因のうち、おおよそ50%は単独で表現型に作用するQTLsであり(図5b参照)、残りの50%はQTLs間の相互作用、すなわちエピスタシス(epistatic interaction)によるものである。ここで、エピスタシスについて簡単に説明する。図2に示したように、今、2つの遺伝子座AとBがあり、それぞれの遺伝子座には2つの対立遺伝子A1, A2及びB1, B2があるとすると、各遺伝子座において3種類の遺伝子型が存在するので、合計9種類の遺伝子型の組み合わせが生じる。それぞれの表現型値は図2のようになったとする。遺伝子座AとBとの間でエピスタシスがない場合には(図2a)、遺伝子座Aのそれぞれの遺伝子型について、遺伝子座Bの3つの遺伝子型B1B1、B1B2とB2B2との間で表現型値の差異を見てみると、その割合は一定であることがわかる。すなわち、表現型値の差異は平行に推移している。一方、遺伝子座AとB間でエピスタシスがある場合には、表現型値

の差異は一定ではないので、例えば図 2b に見られるように、平行にはならない。このような 2 遺伝子座間のエピスタシスに限らず、エピスタシスは実際には 3 遺伝子座以上の間でも考えられる。しかし、そのような高次元のエピスタシスを検出することは統計学的に困難であるので、通常は 2 遺伝子座間のエピスタシスしか考慮しない(Cheverud and Routman, 1995; Mackay, 2001)。

図 1 に示したように、エピスタシスは以下の 3 つのタイプに分類できる。

- (1) 単独で表現型に作用する QTLs 間の相互作用
2 つの遺伝子座があり、それぞれの遺伝子座が単独で表現型効果を持つとする (例えば、それぞれの効果を 1 とする)。2 遺伝子座間である特定の遺伝子型が組み合わさった時に表現型値が $1+1=2$ ではなく $1+1=3$ になる場合をいう。
- (2) 単独では表現型に作用しない QTLs 間の相互作用
各遺伝子座単独の表現型効果はゼロであるが、ある特定の遺伝子型の組み合わせになると表現型値が $0+0=1$ になる場合をいう。
- (3) 単独で表現型に作用する QTL と単独では表現型に作用しない QTL との相互作用
 $1+0=2$ になる場合をいう。

今までに様々な動植物種において QTL 解析が行われているが、エピスタシスに注意を払っているものは少ない。エピスタシスの中でも、特に、(2)と(3)のタイプを明らかにすることが非常に重要であると筆者は考えている (後述)。実際に、(2)のタイプは、マウスの肺ガン(Fijneman *et al.*, 1996) 及び大腸ガン(van Wezel *et al.*, 1996)感受性 QTLs の解析で報告されている。筆者は(3)のタイプのエピスタシスをマウス体重の QTL 解析において発見している(Ishikawa *et al.*, 2000, 2005; Ishikawa and Namikawa, 2004)。

3.2. QTL の種類

上述の量的形質の遺伝子支配の概念は、理解しやすいように単純化したものである。実際には、量的形質を支配する QTLs は、個体発生 (ontogeny) を通して、時間的にも空間的にも相互に関連しながらネットワークを形成して遺伝子発現しているものと推測される。ここでは、QTL の及ぼす表現型効果に着目して、以下のように QTL を分類した。

- (1) main-effect QTL
単独で表現型に作用し、雌雄両性において発現する QTL である。換言すれば、後述する simple interval mapping や composite interval mapping で検出される QTLs の大部分がこの QTL に相当する。
- (2) interaction-effect QTL
以下の 4 種類があり、同時に 2 つ以上の特性を持つことがある。
QTL×QTL interaction: 上記「3.1. 量的形質の遺伝子支配」のエピスタシス QTL である。
QTL×sex interaction: 片方の性のみにおいて発現する sex-specific QTL である(Mackay, 2001)。
QTL×age interaction: ある特定の時期や期間に発現する age-specific QTL である。
QTL×environment interaction: 例えば、温度、飼料成分の差異等により誘発される environment-specific QTL である(Mackay, 2001)。
- (3) genomic-imprinting QTL
文字通りゲノムインプリンティングを示す QTL である。この QTL 特性は、今までにほとんど注目されていないが、今後、重要になるものと考えられる(de Koning *et al.*, 2000)。

注意点として、ある一つの QTL が、同時に 2 つ以上の上記特性を持つことがある。また、今、ある一つの QTL がある特定の特性を示したとしても、環境条件や交配相手を替えることにより、全く別の特性を呈することもありえる。筆者はマウス体重の QTL 解析において上記(2)の sex-specific QTL と age-specific QTL を実際に発見している(Ishikawa *et al.*, 2005)。

3.3. QTL の対立遺伝子の優劣関係

図 3 に、ある一つの QTL における 2 つの対立遺伝子 Q1 と Q2 間の優劣関係を推定するための原理を示した。ヘテロ接合体の遺伝子型値 d が、他の 2 つのホモ接合体の遺伝子型値 $+a$ と $-a$ に対して、どのような値をとるかによって対立遺伝子の優劣関係が決まる。すなわち、図 3 に示したように、優性の度合 d/a の値によって 7 つの優劣関係が存在することになる。しかし、 a と d の推定値には誤

と Q2Q2 が分離し、それぞれの遺伝子型間で表現型値に差異が生じる。したがって、QTL 解析を行えば、この QTL を検出することができる。一方、別の QTL において、A と B 両系統が同じ対立遺伝子、例えば Q3 のみを持っている場合、F2 の遺伝子型は全て Q3Q3 となり分離してこない。したがって、いくら QTL 解析を行っても、このような QTL は検出することができない。換言すれば、QTL 解析によって、A と B 両系統間の体重の“差異”に関与する QTLs は検出することができるが、体重の“差異”に関与しない QTLs は検出できないということである。

次に、大型の A 系統と中型の C 系統を交雑して QTL 解析を行ったらどうなるであろうか。検出される QTLs は上述の A と B 系統間で検出される QTLs と同じものもあるが、当然、異なる QTLs もあるはずである。これは、用いた系統が異なれば、その系統に特有の QTLs が存在するものと考えられるからである。しかし、たとえどんなに多くの系統を用いたとしても、用いた系統全てに共通する QTLs は決して検出することができない。

3.5. 植物の QTL 解析結果から学ぶ QTLs の諸特性

今までに、植物では非常に多くの量的形質について QTL 解析が行われ、図 5 に示すような QTLs の重要な諸特性が明らかとなっている。これらは、従来の統計遺伝学が仮定してきた QTLs の特性（例えば、全ての QTLs の遺伝子効果は等しく、相加的に作用する）が必ずしも正しくないことを明確に示している。

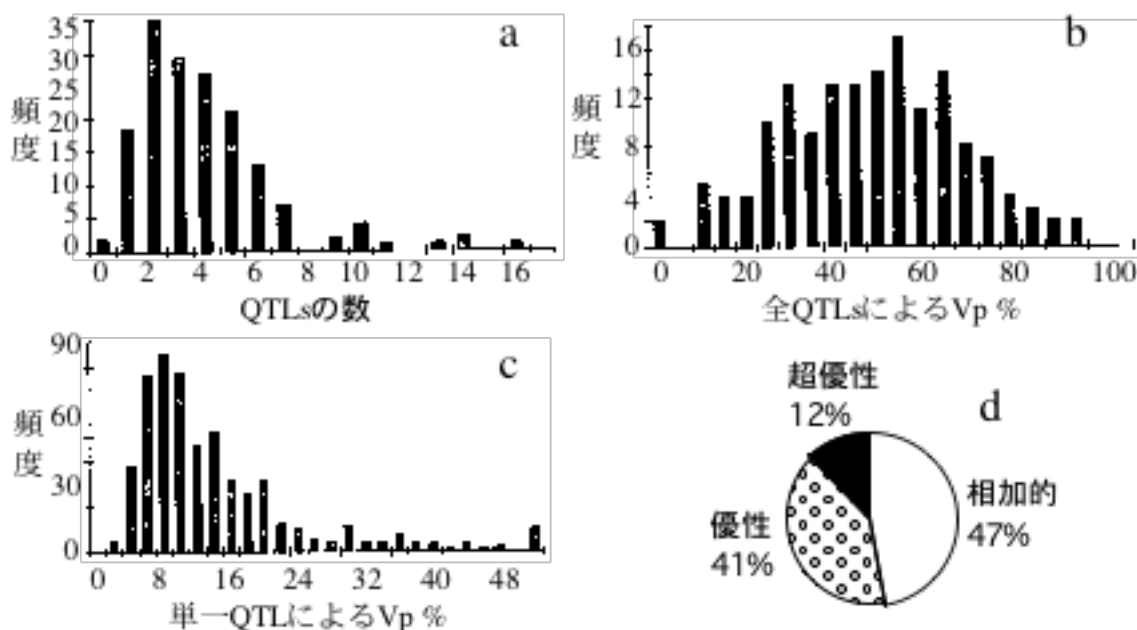


図 5. 植物において明らかにされた QTLs の特性。(a) 検出された QTLs の数の分布, (b) 検出された全ての QTLs によって説明される表現型分散 (Vp) の割合 (%), (c) 検出された個々の QTLs によって説明される Vp の %, (d) 相加的、優性及び超優性効果を示す QTLs の割合. Kearsley and Farquhar (1998) を改変。

図 5a に示したように、QTL 解析の結果検出される QTLs の数は、0 から 16 個の範囲内（平均 4 個）であり、大部分の研究では 8 個以下という結果になっている。ここでゼロは全く QTLs が検出されなかったことを意味する。検出された QTLs を全て合わせた場合、表現型分散のいったいどのくらいの割合を説明しているのであろうか。図 5b にあるように、多くの場合が 50% 前後であることがわかるが、残りの分散が全て環境要因によるものであるとは単純には言えない。なぜならば、この割合を遺伝率と比較したとき、遺伝率より下回る場合がほとんどである。これは、検出されていない QTLs がまだ存在していることを意味する。検出できない QTLs の大部分は、QTL 解析ソフト自身の検出力の問題もあるが、上述したエピスタシス効果を持つ QTLs であると筆者は考えている。一方、個々の QTL では、1 から 50% の表現型分散を説明しており、8% 程度のところでピークが見られる（図 5c）。最後に、検出された QTL の対立遺伝子の優劣関係を見ると、相加的なものは

たった47%にすぎない。このことは、従来の量的遺伝学では相加的効果のみに着目していたが、今後は優性効果（図3の優性偏差d）にも注意を払う必要があることを明確に示している（図5d）。

以上のQTLsの諸特性は植物の結果から明らかにされたことではあるが、その多くは動物においても十分当てはまるものと考えられる。

4. QTL 解析

4.1. QTL 解析の概略

図6にQTL解析の流れを示す。QTL解析は、次の3つの段階に大別できる。第1段階では、着目した量的形質について差異が見られる両親系統を選抜し、F2または戻し交雑群を作製する。QTL解析ソフト等により相関分析(association analysis)を行い、QTLsの染色体上のおおよその位置を決定する。第2段階では、コンジェニック系統等の作製・利用により、本当にその染色体上にQTLが存在するの否かを確認するとともに、QTLの染色体上の位置を正確に決定し、均一な遺伝的背景下における表現型効果を明らかにする。第3段階では、比較染色体地図やヒト・マウスの全ゲノム塩基配列情報等を利用して候補遺伝子を探索し、QTN解析や機能解析を行う。最終的にはトランスジェニック動物を作出してレスキュー実験等を行い、着目した候補遺伝子が本当にQTLの原因遺伝子であるの否かを証明する。

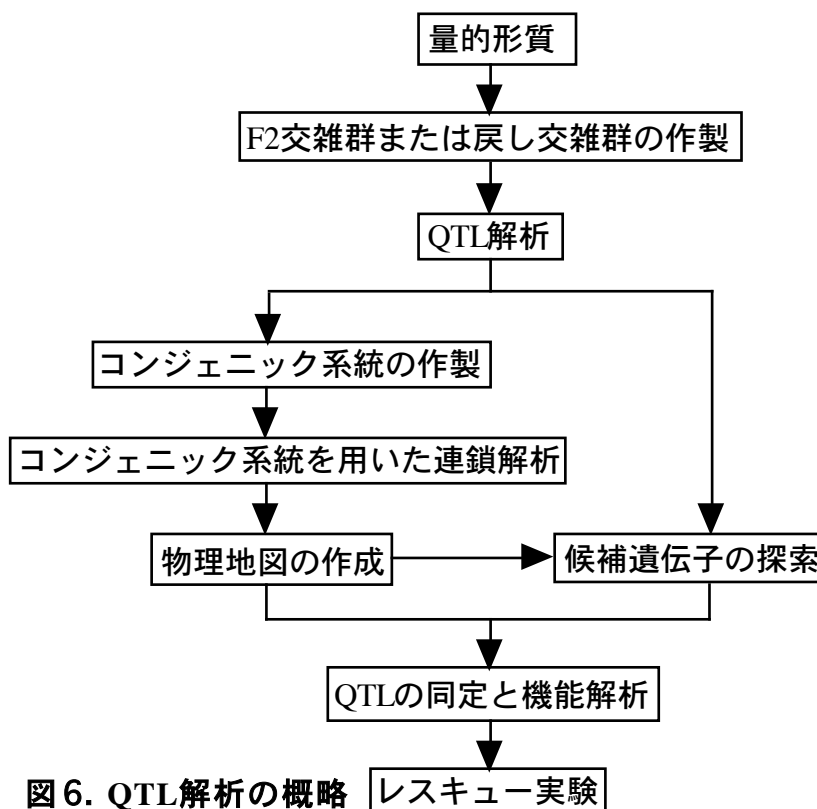


図6. QTL解析の概略

以下のセクションでは、QTL解析を遂行する上での重要な点または注意する点を中心に述べる。したがって、不足している点に関しては、石川ら(1998)、Lynch and Walsh (1998)、Belknap *et al.* (2001)、Flint and Mott (2001)及びMackay (2001)を参照してほしい。

4.2. 交雑群

マウス、ラット等の実験動物においてQTL解析を行うためには、基本的に、F2または戻し交雑群を作出するのがよい。一般的に、F2を用いた方がQTLsの検出力が高く、対立遺伝子の優劣関係を推定することができる点で、戻し交雑群を用いた場合より優れている。戻し交雑群を用いた時の唯一の利点は、QTLの遺伝様式が完全優性の時に、F2を用いた時よりもQTLsの検出力が高くなることである。しかし、閾値形質やカテゴリー形質についてQTL解析を行う場合には、異常形質を持つ個体の割合が高くなる戻し交雑群を用いた方がよいかもしれない。また、genomic-imprinting

QTLs を検出しようとするれば、正逆交配が必要になるかもしれない。個体数は、着目した量的形質や検出したい QTLs の種類にもよるが、最低でも 200 個体程度は必要である。QTLs の検出力が上がるので個体数は多ければ多い程よいが、400~500 個体が現実的な目安であると考えられる(Darvasi, 1998; Lynch and Walsh, 1998)。

その他に QTL 解析に利用できる既存のツールとして、リコンビナント近交系とコンソミック系統(chromosome substitution strains (Nadeau *et al.*, 2000)とも呼ばれている)がある。例えば、マウスやラットのリコンビナント近交系を用いた場合、1 セット当たりの系統数が 20 程度と少ないので、QTL 解析を行っても、QTL の存在を示す統計学上の有意水準、すなわち genome-wide 5%を越える QTLs を検出することは比較的難しいと考えられている。最善策は、リコンビナント近交系の 1 セットを着目した量的形質についてスクリーニングした後、両極端の形質の値を示す系統間を交雑して F2 を作出することであろう。

次に、コンソミック系統を用いた場合、着目した染色体以外の遺伝的背景は均一であるので、単独で表現型に作用する QTLs (図 1) の検出力は格段に向上するものと期待される。しかし、エピスタシス効果を示す QTLs の検出については、Nadeau *et al.* (2000)の意見とは異なり、筆者は、たとえコンソミック系統を用いたとしても必ずしも容易ではないと考えている。なぜならば、「3.1. 量的形質の遺伝子支配」の項で説明したように、エピスタシスには(1)~(3)の 3 つのタイプが存在する。コンソミック系統を用いて効率良く検出できるエピスタシスのタイプは、(1)のみであると考えられる。すなわち、このタイプが、Nadeau *et al.* (2000)の論文中で説明されているエピスタシスに相当するものであろう。(2)と(3)のタイプのエピスタシスを検出しようとする、コンソミック系統間の総当たり交雑が必要となり、上述の F2 または戻し交雑群を作出する場合と比較して、検出力は格段に上がると予想されるが、莫大な労力・時間・飼育場所が必要となるであろう。

4.3 QTL 解析の前に必要な統計処理

前述した遺伝モデル $P = G + E + G \times E$ を思い出してほしい。実験動物を用いた QTL 解析では、通常、ある研究室の一定の飼育環境下で得られたデータしか用いないので、 $G \times E$ の効果を考える必要はない。しかし、QTL 解析を行う際には、 E の環境要因をできる限り小さくすることが望ましい。すなわち、環境要因について統計学的にデータ補正することにより、QTLs の検出力が上昇する。大部分の汎用 QTL 解析ソフトのモデルの中に、補正すべき環境要因を直接導入することができないので、あらかじめ補正しておいたデータを用いて QTL 解析を行う必要がある。QTLs の検出力は、モデルに直接組み入れた場合に比べて劣る。

ここで、環境要因には一体どのようなものがあり、どの環境要因についてデータ補正を行えばよいのかを簡単に説明する。例として、近交系マウスの体重計測値を考えてみよう。体重に影響を与える環境要因として、性差、一腹産仔数、出産回数、母親の保育能力等を挙げることができる。一腹産仔数の影響について見てみると、理論的には、近交系マウスであるので、個体によって体重のバラツキがあってはならない。しかし、実際には、一腹産仔数が少ない個体の体重は一腹産仔数が多い個体の体重よりも重いという傾向が見られる。このバラツキがここで言う環境要因であり(厳密には、実験誤差と言うべきかもしれない)、体重について QTL 解析を行う際には補正すべき環境要因となる。一般に、補正すべき環境要因を見つけ出すためには、SAS や JMP 等の汎用統計解析ソフトを用いて統計解析を行う必要がある。通常用いる 5%有意水準で有意差が見られた場合、その環境要因についてデータ補正すべきであろう。

次に、QTL 解析ソフトは一般的にデータの正規分布を仮定しているので、SAS や JMP 等の統計解析ソフトを用いてデータの正規性を検定する必要がある。検定の結果、5%レベルで有意差が見られた場合には、常用対数等の尺度変換を行い正規性に適合させる必要がある。そして、オリジナル尺度のデータと尺度変換後のデータの両方を用いて QTL 解析を行い、両 QTL 解析結果を比較する。解析結果にほとんど差異がない場合には、オリジナル尺度データの結果を採用してもよい。解析結果が著しく矛盾する場合には、正規分布に適合しない明確な理由がない限り、正規性に適合したデータ解析結果を報告すべきである。また、データが正規分布から著しく逸脱しており、かつ、マーカー間隔が広い染色体部分では、最尤法に基づく QTL 解析(後述)を行った場合、ゴースト QTL を検出することがあるので注意が必要である(Broman 2003; Bolor *et al.* 2006)。

4.4. マーカー遺伝子座のタイピング戦略

QTL 解析を行う際には、ゲノム全体に 10~20cM 間隔で設置された多数のマーカー遺伝子座をタイピングする必要がある。QTL の検出パワーは用いた交雑群の個体数と組換頻度に依存し、この種

の QTL 解析では最善を尽くしても 10~30cM の範囲内にしか QTL をマッピングすることができないので、これ以上に細かくマーカーを設定してもあまり意味がない。ただし、エピスタシスの解析で QTL に近接したマーカーが必要となるので、可能であれば後から LOD スコアのピークの近傍にマーカーを追加すべきである。QTL 解析用に作出した交雑群 400~500 個体を全てタイピングするには大変骨の折れる仕事である。そこで、労力、時間、研究費を節約して効率良くゲノム全体をスクリーニングする方法として、DNA プーリング法と selective genotyping 法が挙げられる。以下に、その概略を説明する。

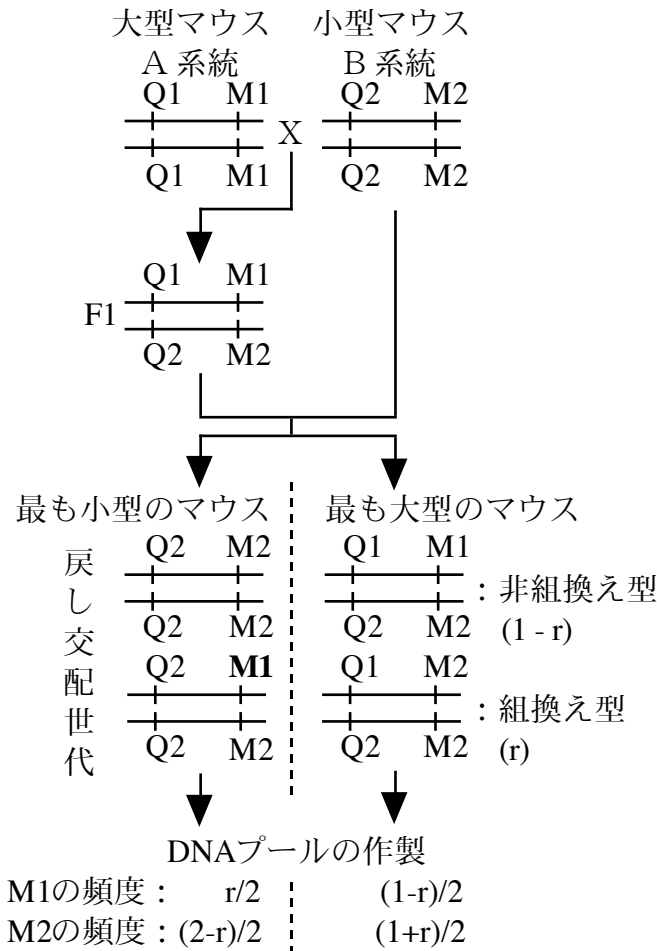


図 7. DNA プーリング法の原理。 大型マウスの A 系統と小型の B 系統との交配より戻し交配世代を作製して、表現型の分布から両極端の個体群を選抜し、2つの DNA プールを作製した。各 DNA プールにおけるマーカー対立遺伝子の頻度を示した。Q1~Q2 は QTL の、M1~M2 はマーカー遺伝子座の対立遺伝子を示す。r は QTL とマーカー遺伝子座間の組換え率を示す。石川ら (1998) を改変。

はじめに、DNA プーリング法について説明する。この方法は、戻し交配世代や F2 世代において、ある形質の表現型に注目して個体を集め、それらの DNA を等量ずつ 1 本のチューブにプールし、この DNA プールを遺伝子のマッピングに用いる方法である (Taylor *et al.*, 1994; Wang and Paterson, 1994)。この方法を QTL 解析に応用した時の理論を図 7 に示す。今、大型マウスの A 系統と小型の B 系統との交配から得られた戻し交配世代において体重計測を行い、その分布は正規性に適合していると仮定する。A と B 両系統間の体重差に関与するある 1 つの QTL があり、これがある 1 つのマーカー遺伝子座と連鎖しているものと仮定する。DNA プールを作製するために、戻し交配世代の中で、最も小型のマウスと最も大型のマウスを選んだとき、これらの QTL とマーカー遺伝子座に関する遺伝子型は図 7 のようになる。組換え率を r としたとき、各 DNA プールにおけるマーカー対立遺伝子 M1 と M2 の頻度は図 7 に示したようになる。ここで、小型マウスの DNA プールに注目すると、組換えによってのみ、M1 対立遺伝子が発見することがわかる。そこで、 r と M1 対立遺伝子頻度の関係を見ると、 $r=0$ (完全に連鎖している、すなわち、QTL とマーカー遺伝子座が一致する) のとき、小型マウスの DNA プールでは 0、大型マウスの DNA プールでは 0.5 となる。 $r=0.2$ のときは、それぞれ 0.1 と 0.4、 $r=0.5$ (連鎖していない) のときは、0.25 と 0.25 となる。筆者の経験によれば、小型マウスの DNA プールと大型マウスの DNA プールとの間で M1 対立遺伝子のバンドの濃さを比較したとき、 $r=0\sim 0.2$ までならば肉眼によって区別できる。これは、Taylor *et al.* (1994)

の報告と一致する。したがって、各染色体にマーカー遺伝子座を最大 40cM 間隔に設定すればよいことになる。

各 DNA プールを作製するために必要な個体数は、得られた交雑個体群の約 10%とするという報告(Darvasi and Soller, 1994)と 10 個体でよいという報告(Wang and Paterson, 1994)がある。DNA pooling 法を用いてスクリーニングできる QTL は、その遺伝子効果が約 $0.75 SD$ (標準偏差) 以上の、いわゆる主働遺伝子(major gene)であるといわれている(Wang and Paterson, 1994)。注意点として、DNA pooling 法により、QTL があると推測される候補染色体を選抜した後、次に説明する selective genotyping 法を用いてマーカー遺伝子座のタイピングを行い、QTL 解析を行う必要がある。DNA pooling 法を用いた実例として、Suzuki *et al.* (2001)の論文を参照して欲しい。

次に、selective genotyping 法について説明する。この方法は、交雑群の表現型分布から両極端の個体をそれぞれ 20~25% (総計 40~50%) 選び、これらの個体のみを用いてマーカー遺伝子座のタイピングを行う方法である。QTLs の検出力は、全個体をタイピングした場合と変わらないか、それ以上である。ただ、両極端の個体を選んでタイピングしているので、QTL の周囲の遺伝距離は、全個体をタイピングした際の遺伝距離とは異なっていると考えられる。1 つの染色体上に 2 つ以上の QTLs が存在する場合、遺伝距離にかなりの歪みが生じているものと考えられるので、40% (総計 80%) 以上選択する必要がある(Darvasi, 1997)。また、上述の DNA pooling 法とこの方法を合わせた方法は、selective DNA pooling と呼ばれている(Darvasi and Soller, 1994)。

注意点として、QTL 解析のために一度交雑群を作製すると、なるべく多くの量的形質について計測を行い、QTL 解析を行うのが一般的である。上述した DNA pooling 法と selective genotyping 法は、着目したある 1 つの量的形質についてのみ有効な手法である。したがって、別の量的形質について QTL 解析を行う際には、再度、表現型分布から両極端の個体を選抜し直す必要がある。なぜならば、2 つの量的形質間で表現型の分布が 100%一致することはほとんどあり得ないからである。もし、選抜し直さずに QTL 解析を行った場合、genome-wide 5%有意水準を越えるゴースト QTL を検出することがあるので注意が必要である。次の注意点として、量的形質の表現型分布に基づいて個体を選抜する際には、環境要因について補正したデータを使用すべきである。例えば、今、表現型分布から両極端の個体を 20%ずつ選抜したとする。データ補正前と補正後の選抜個体群を比較すると、多かれ少なかれ個体の入れ替わりがあるはずである。個体の入れ替わりが多ければ、QTL 解析結果に影響を及ぼすことは自明である。また、selective genotyping データのみを用いて QTL 解析を行った場合、用いた解析ソフトによっては LOD や遺伝子効果等の推定値に影響を及ぼすものがある。そこで、より正確な LOD 値や遺伝子効果等を推定するために、LOD ピークの近傍にあるいくつかのマーカーについて、必ず全個体タイピングすることを推奨する。

4.5. 単独で表現型に作用する QTLs のマッピング方法

表 1 に示すように、単独で形質に作用する QTLs をマッピングするための方法として、近年では、simple interval mapping (Lander and Botstein, 1989; Haley and Knott, 1992)と composite interval mapping (Zeng, 1993, 1994)の 2 つの方法が主として使われている。以下にそれぞれの特徴を簡単に説明する。

表 1. QTL マッピングの方法.

方法	統計理論	代表的な解析ソフト
Simple interval mapping	最尤法	MAPMAKER/QTL
	最尤法	QTL Cartographer
	重回帰分析法	Map Manager QTX
	重回帰分析法	QTL express
Composite interval mapping	重回帰分析法+最尤法	QTL Cartographer

Simple interval mapping は、統計理論として最尤法または重回帰分析法を用いている。最尤法に基づく simple interval mapping は、重回帰分析法に基づくものよりパラメータの推定 (例えば、相加的効果 a や優性効果 d) が正確である。しかし、重回帰分析法に基づく simple interval mapping では、計算時間が短い、量的形質の分布が不連続のゼロ・イチ形質の解析にも利用できる利点がある。代表的な QTL 解析ソフトを表 1 に示した。

Composite interval mapping は、simple interval mapping の欠点を補った方法である。ここで、simple interval mapping の欠点とは、1) 対象とする染色体領域以外にある QTL の遺伝的変異が QTL 解析モデルの残差に含まれるために、遺伝率がたとえ同じであったとしても、量的形質に関与する QTLs

の数が多ければ QTL の検出力が低くなる、2) 一つの染色体上に複数の QTLs が連鎖している場合、QTLs の遺伝子効果の方向により、LOD のピークが重なり合ったり、打ち消しあったりするために、正しく QTLs の位置を推定することができないことである。そこで、対象とする QTL 以外の遺伝的変異を前もって重回帰分析法により取り除き、その残差について最尤法に基づく simple interval mapping を行う方法が composite interval mapping である。この代表的なソフトとして QTL Cartographer を挙げるができる (表 1)。

次に、QTLs の存在を宣言するための有意水準について説明する。可能な場合は必ず permutation test (Churchill and Doerge, 1994)により experiment-wise 有意水準を求め、この値を genome-wide 有意水準として用いる方が良いと筆者は考えている。なぜならば、たとえ同じ量的形質を解析したとしても、交配に用いる親系統が異なれば、QTLs として検出されない background genes は異なっていると考えるのが普通である。当然、これらの background genes は、推定しようとする有意水準の P 値 (または LOD 値) に影響を与える。このような状況下で、Lander and Kruglyak (1995)が提唱した genome-wide 有意水準を全ての交配群に一律的に適用してもよいのであろうか。Lander and Kruglyak は、有意水準を推定する際に、マーカー遺伝子座が無限に染色体上に配置されていること (すなわち、マーカー間隔が 0 cM) を仮定し、ゲノムサイズ、染色体数と交叉率を考慮に入れているが、交配の違いによる background genes の影響は全く無視している。また、彼らの有意水準は simple interval mapping には適用できるが、残念ながら composite interval mapping には適用できないという欠点がある。したがって、議論の余地は未だあるかもしれないが、genome-wide 有意水準を推定する際には、permutation test を用いた方が無難であると考えられる。注意点として、正規分布を仮定できないカテゴリ形質を解析した場合には、必ず permutation test を行うべきである。Permutation の実行回数は genome-wide 5% レベルまで正しく推定できる 1,000 回で十分であり、10,000 回では genome-wide 1% レベルまで正しく推定できる (Churchill and Doerge, 1994)。

ところで、QTL 解析に用いる動物種によっては、ゲノム全体をカバーするようなマーカー遺伝子座が開発されていない場合もあると考えられる。このような状況下では、上述の permutation test を適用できないことは自明である。しかし、QTL 解析結果を報告するためには、おおよその genome-wide 有意水準を推定して利用したほうがよい。もし、染色体数とおおよそのゲノムサイズ (cM) が判明していれば、van Ooijen (1999)の方法に従っておおよその genome-wide 有意水準を計算できる。もし、ゲノムサイズが不明な場合は、使用したマーカー情報のみを用いて、chromosome-wide 有意水準を Cheverud (2001)が提唱した方法に従って求めることになる。

4.6. エピスタシス QTLs のマッピング方法

エピスタシス効果を示す QTLs を検出するための基本原理は、QTL 解析に用いた全てのマーカー遺伝子座について、総当たりで二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を行うことである。次に、エピスタシスの 3 つのタイプ、すなわち、相加的×相加的 (additive × additive)、相加的×優性 (additive × dominance) 及び 優性×優性 (dominance × dominance) の遺伝効果を推定し、さらに、これら 3 タイプの中でどのタイプが統計的に有意であるのかを決定するためには、Cheverud and Routman (1995) と Routman and Cheverud (1997) の提唱した方法に従えばよい。

現在、エピスタシス QTLs の検出を考慮に入れたコンピューターソフトがいろいろ開発されつつある (Kao *et al.*, 1999; Sen and Churchill, 2001)。現在のバージョンの Map Manager QTX でもエピスタシスの解析が可能であるので利用の価値がある。しかし、このソフトを用いた場合、エピスタシス QTL がマーカーの真上にあるという仮定のもとで解析が行われる。また、得られた結果には LRS スコアのみしか表示されていないので、有意差が見られたマーカーの組み合わせのパラメーターを推定するために、二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を行う必要がある。

エピスタシス QTLs の存在を宣言するためには、用いたソフトに関係なく、2 段階の有意差検定を行う必要がある。今、2 つの QTLs、QTL1 と QTL2 があるとする。第 1 段階として、モデル式 $Y = QTL1 + QTL2 + QTL1 \times QTL2$ が成り立つか否かを検定する。対立仮説は、このモデル式が成り立たない、すなわち、QTL1、QTL2、 $QTL1 \times QTL2$ のいずれの効果もないことである。有意水準は、permutation test (例えば、Map Manager QTX ではエピスタシス用) により推定する。第 2 段階として、交互作用 $QTL1 \times QTL2$ の検定を行う。対立仮説は交互作用なしである。有意水準として、Sen and Churchill (2001) は nominal $P < 0.01$ を用いているが、ゴースト QTLs の検出をできる限り避けるために、前述の simple interval mapping の際に用いたゲノムワイド有意水準を適用した方がよいと考えられる。その際に、simple interval mapping で得られた有意水準と交互作用検定のための有意水準では自由度が異なるので χ^2 分布表を用いて、simple interval mapping で得られた有意水準を変換する必要

がある。例えば、F2 の時、simple interval mapping の自由度は 2、交互作用の自由度は 4 である。

Map Manager QTX を用いたエピスタシス QTLs の検出例として、Ishikawa *et al.* (2005)があるので参考にして欲しい。今後、さらにユーザーフレンドリーなコンピューターソフトが開発・普及すれば、エピスタシスの解析も益々容易になるものと期待される。

4.7. QTL 解析結果の報告

上述の方法によりいくつかの QTLs を検出できたとする。実際に QTLs を論文等に報告する際には、各 QTL について以下のパラメーター推定値を示すことになる。適時コメントを付記した。

- (1) ピーク LOD スコアの値
- (2) ピーク LOD スコアの染色体上の位置(cM)
- (3) 95%信頼区間

ブーツストラップ法により求めることができる。この方法は表 1 の QTL express ソフトにより実行できる。他のソフトを用いた場合は、Darvasi and Soller (1997)の式を利用すればよい。最も簡便な方法はピーク LOD スコアから 1 を引いた、いわゆる one LOD score drop を求めることであるが、LOD スコアプロファイルの影響を強く受けるのであまり推奨できない。

- (4) 表現型分散(%)

通常、QTL 解析ソフトがこの値を自動的に計算するので、ピーク LOD スコアのところで読み取ればよい。

- (5) 相加的効果(a)及び優性偏差(d)

図 3 を参照してほしい。通常、QTL 解析ソフトがこれらの値を自動的に計算するので、ピーク LOD スコアのところで読み取ればよい。各値を表現型の標準偏差(standard deviation)で割って SD units として示すと、形質間での遺伝子効果の比較が可能となる。

次に、genome-wide 5%有意水準を越えた場合、遺伝子命名規約に従って QTL に遺伝子名を付けることになる。しかし、suggestive レベルの QTL には決して命名してはいけない。ただし、別の実験でその suggestive QTL が再確認された場合には遺伝子名を付けることができる。同様なことは Members of the Complex Trait Consortium (2003)によっても提言されている。

注意点として、QTL 解析の結果、ある染色体領域に genome-wide 5%レベルを超える LOD 値のピークが見られたからと言って、必ずしも本当にその染色体領域に責任遺伝子が存在するとは言いきれない。なぜならば、QTL の位置は実際には LOD 値や P 値により“確率”として示されているに過ぎないからである。したがって、QTL の存在を証明するための確認実験が必要となる。確認実験は、後述する QTL の詳細な染色体上の位置の決定とともに行われるのが普通である。

5. QTL の詳細な染色体上の位置決定

QTL の詳細な染色体上の位置を決定(fine mapping または high-resolution mapping)するためには交配実験が必要となる。Darvasi (1998)の総説にはいろいろな戦略が述べられているので一読して欲しいが、QTL が存在すると考えられる染色体領域を導入したコンジェニック系統を作出することが一般的な方法であろう。コンジェニック系統の作出は、8 世代以上の戻し交配を必要とする標準法よりも、現在では 5~6 世代の戻し交配で済むスピードコンジェニック(speed congenic)法が好まれる(Wakeland *et al.*, 1997)。スピードコンジェニックの作製にはいろいろな方法が提唱されているが、基本原理は次のとおりである。例えば、マウスの A 系統(ドナー)に存在する QTL を B 系統(レシピエント)に導入したいとする。A と B 両系統間の交雑 F1 を B 系統に戻し交配する。得られた個体を再び B 系統に戻し交配する。これを 5~6 世代続ける。この時に、QTL が存在するドナー染色体領域を持つが、その他はレシピエントの染色体領域を多く持つ個体を選抜し、次世代の交配に用いる。ドナー染色体領域の選抜は、マーカー依存選抜(marker-assisted selection)法を用いる。コンジェニック系統の樹立により、10~30 cM の染色体領域内に QTL を位置づけることが可能となる。

コンジェニック系統が完成したらレシピエント系統と交配して F2 または戻し交配世代を生産し、サブコンジェニック系統を樹立する。サブコンジェニック系統を用いた表現型の詳細な解析により、1~5 cM の染色体領域内に QTL を位置づけることができる。

さらに、サブコンジェニック系統の利用により次のことも明らかにできる。検出された QTL が本当に 1 つであるのか。すなわち、見かけ上、LOD スコアのピークが 1 つであったとしても、複数の QTLs が密接に連鎖している場合がある。実例として、Podolin *et al.* (1998)の *Idd*(insulin-dependent diabetes)遺伝子座のマッピングを挙げることができる。次に、遺伝的背景(genetic

background)を均一にしたときの QTL の遺伝子効果は実際にはどのくらいであるのか。複数の量的形質について解析を行い、ほぼ同じ染色体上の位置に QTL が検出された場合、本当に 1 つの QTL の多面発現作用(pleiotropy)によるのか。

6. 責任遺伝子の同定

QTL を実際の責任遺伝子(量的形質遺伝子)として同定する方法には、質的形質の場合と同様に、ポジショナルクローニング法と候補遺伝子探索法がある。ポジショナルクローニング法に基づく例は、本稿の最初に述べたようにトマトの QTL *fw2.2* がある(Frary *et al.*, 2000)。候補遺伝子探索法に基づく QTNs の解析例は、Mackay (2001)によっていくつか述べられている。いずれの方法にしる、最終的に候補遺伝子が QTL の責任遺伝子であるか否かを立証するためには、レスキュー実験等が必要となろう。責任遺伝子同定のための“formal proof”に関するガイドラインが Glazier *et al.* (2002) と Members of the Complex Trait Consortium (2003)によって述べられているので一読してほしい。

今までの報告から判断すると、責任遺伝子が同定された QTL は比較的大きな遺伝子効果を持つもののみである。また、1つの候補遺伝子内または責任遺伝子内には複数の QTNs が存在するのが一般的である。たとえ、レスキュー実験により責任遺伝子が同定されたとしても、現在のところ、実際にどの QTN が量的形質の表現型値に影響を及ぼしているのかを統計学的な相関の有無のみならず生物学的に解明したものはほとんど無く、今後の重要課題である。例外として、ショウジョウバエの *Adh* 遺伝子に発見された QTNs 間の相互作用が大きな QTL 遺伝子効果を引き起こしているという報告例がある(Stam *et al.*, 1996)。ブタでは *IGF2* 遺伝子内の 1 個の塩基置換によって大きな QTL 効果が説明できることが報告されている(van Laere *et al.*, 2003)。また、Flint *et al.* (2005)の総説には、QTL のマッピングから責任遺伝子のクローニングまでの最新戦略とそれらの長所・短所がまとめられているので一読の価値がある。

7. おわりに

近年、ヒトやマウスを含めたいくつかの真核生物種において、全ゲノム塩基配列の解読が完了または完了間近となり、我々は極めて少数の遺伝子の機能しか理解していないことに気づいたはずである(例えば、International Human Genome Sequencing Consortium, 2001)。日米欧では、遺伝子機能を体系的に解析する目的で、ランダムミュータジェネシスによる突然変異マウスのスクリーニング研究が開始されている。Nadeau and Frankel (2000)は、この表現型主導のミュータジェネシス研究によって量的形質の遺伝子支配が解明できると示唆している。確かに、ミュータジェネシスは、量的形質に関わるいくつかの新しい遺伝子座の同定や新規の生理的制御機構の発見に有効な手法であると考えられる。しかし、ミュータジェネシスでは、量的形質の変異、すなわち量的変異に関わっている複数の遺伝子座群の全体像(遺伝子座の数や遺伝子効果等)や遺伝的統御関係(エピスタシスや多面発現作用等)を包括的に理解することは非常に難しく、特に、自然集団の中に存在する量的変異については解析不可能である(Belknap *et al.*, 2001; Flint and Mott, 2001; Mackay, 2001)。

ここで、ヒトの多因子性疾患である“ありふれた病気”を例として、もう少し理解しやすく説明する。ありふれた病気の罹りやすさに関与する感受性遺伝子座は複数存在することは今日では疑いの余地が無い事実である。これらの遺伝子座の中には比較的最近の突然変異によってヒト集団中に生じたものもあるであろう。しかし、その大部分は、ヒトの長い進化の過程の中で幾多の自然選択に曝されながらもヒトの“自然集団”の中に未だに残存している変異遺伝子座であると考えられる。すなわち、個々の遺伝子効果はそれほど小さくなく、環境や他の遺伝子座との相互作用を受ける、いわゆる QTLs であり、各 QTL 内には進化過程の間に生じた複数の QTNs が存在するものと考えられる。マウスにおけるミュータジェネシスでは、このような特性を有する遺伝子座 QTLs を解析することは非常に困難であると推測される。したがって、本稿で説明した QTL 解析は、今なお、量的変異の遺伝子支配を理解する上での必須の手法であると言える。

本稿では QTL 解析の基本的理論を中心に述べてきたが、その全てを説明できたわけではないが、これから QTL 解析を始めようとする研究者の一助になれば幸いである。

QTL 解析用ソフトの入手先

MAPMAKER/QTL	http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/software
Map Manager QTX	http://mapmgr.roswellpark.org/mapmgr.html
QTL Cartographer	http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/cartographer.html
QTL express	http://qtl.cap.ed.ac.uk

引用文献

- Belknap, J. K., Hitzemann, R., Crabbe, J. C., Phillips, T. J., Buck, K. J., and Williams, R. W. (2001). QTL analysis and genome-wide mutagenesis in mice: complementary genetic approaches to the dissection of complex traits. *Behav. Genet.*, 31: 5-15.
- Bolor, H., Wakasugi, N., Zhao, W., and Ishikawa, A. (2006). Detection of quantitative trait loci causing abnormal spermatogenesis and reduced testis weight in the small testis (Smt) mutant mouse. *Exp. Anim.*, 55:97-108.
- Broman, K. W. (2003). Mapping quantitative trait loci in the case of a spike in the phenotypic distribution. *Genetics*, 163:1169-1175.
- Cheverud, J. M., and Routman, E. J. (1995). Epistasis and its contribution to genetic variance components. *Genetics*, 139:1455-1461.
- Cheverud, J. M. (2001). A simple correction for multiple comparisons in interval mapping genome scans. *Heredity*, 87: 52-58.
- Churchill, G. A., and Doerge, R. W. (1994). Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, 138: 963-971.
- Darvasi, A. (1997). The effect of selective genotyping on QTL mapping accuracy. *Mammal. Genome*, 8:67-68.
- Darvasi, A. (1998). Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. *Nat. Genet.*, 18: 19-24.
- Darvasi, A., and Soller, M. (1994). Selective DNA pooling for determination of linkage between a molecular marker and a quantitative trait locus. *Genetics*, 138: 1365-1373.
- Darvasi, A., and Soller, M. (1997). A simple method to calculate resolving power and confidence interval of QTL map location. *Behav. Genet.*, 27: 125-132.
- de Koning, D.-J., Rattink, A. P., Harlizius, B., van Arendonk, A. M., Brascamp, E. W., and Groenen, A. M. (2000). Genome-wide scan for body composition in pigs reveals important role of imprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 7947-7950.
- Falconer, D. S., and Mackay, T. F. C. (eds.) (1996). *Introduction to Quantitative Genetics*, 4th ed., Longman, London.
- Fijneman, R. J. A., de Vries, S. S., Jansen, R. C., and Demant, P. (1996). Complex interactions of new quantitative trait loci, *Sluc1*, *Sluc2*, *Sluc3*, and *Sluc4*, that influence the susceptibility to lung cancer in the mouse. *Nat. Genet.*, 14: 465-467.
- Flint, J., and Mott, R. (2001). Finding the molecular basis of quantitative traits: successes and pitfalls. *Nat. Rev. Genet.*, 2: 437-445.
- Flint, J., Valdar, W., Shifman, S., and Mott, R. (2005). Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents. *Nat. Rev. Genet.*, 6: 271-286.
- Frery, A., Nesbitt, T. C., Frery, A., Grandillo, S., van der Knaap, E., Cong, B., Liu, J., Meller, J., Elber, R., Alpert, K. B., and Tanksley, S. D. (2000). *fw2.2*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science*, 289: 85-88.
- Glazier, A. M., Nadeau, J. H., and Aitman, T. J. (2002). Finding genes that underlie complex traits. *Science*, 298: 2345-2349.
- Haley, C. S., and Knott, S. A. (1992). A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity*, 69: 315-324.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409: 860-921.
- 石川明 (2002). 動物モデルによる多因子性疾患の QTL 解析：その基礎的理論と解析方法. *実験動物ニュース*, 51: 51-61.
- 石川明、鈴木亨、海老原史樹文 (1998). QTL 解析：基礎理論と行動遺伝学への応用. *比較生理生化学*, 15: 49- 58.
- Ishikawa, A., Hatada, S., Nagamine, Y., and Namikawa, T. (2005). Further mapping of quantitative trait loci for postnatal growth in an intersubspecific backcross of wild *Mus musculus castaneus* and C57BL/6J mice. *Genet. Res.*, 85: 127-137.
- Ishikawa, A., Matsuda, Y., and Namikawa, T. (2000). Detection of quantitative trait loci for body weight at 10 weeks from Philippine wild mice. *Mammal. Genome*, 11: 824-830.
- Ishikawa, A., and Namikawa, T. (2004). Mapping major quantitative trait loci for postnatal growth in an intersubspecific backcross between C57BL/6J and Philippine wild mice by using principal component

- analysis. *Genes Genet. Syst.*, 79: 27-39.
- Kao, C.-H., Zeng, Z.-B., and Teasdale, R. D. (1999). Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics*, 152: 1203-1216.
- Kearsey, M. J., and Farquhar, A. G. L. (1998). QTL analysis in plants; where are we now? *Heredity*, 80: 137-142.
- Lander, E. S., and Botstein, D. (1989). Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 121: 185-199.
- Lander, E. and Kruglyak, L. (1995). Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat. Genet.*, 11: 241-247.
- Lynch, M., and Walsh, B. (eds.) (1998). *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associated, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Mackay, T. F. C. (2001). The genetic architecture of quantitative traits. *Annu. Rev. Genet.*, 35: 303-339.
- Members of the Complex Trait Consortium (2003). The nature and identification of quantitative trait loci: a community view. *Nat. Rev. Genet.*, 4: 911-916.
- Nadeau, J. H., and Frankel, D. (2000). The roads from phenotypic variation to gene discovery: mutagenesis versus QTL. *Nat. Genet.*, 25: 381-384.
- Nadeau, J. H., Singer, J. B., Matin, A., and Lander, E. S. (2000). Analysing complex genetic traits with chromosome substitution strains. *Nat. Genet.*, 24: 221-225.
- Podolin, P. L., Denny, P., Armitage, N., Lord, C. J., Hill, N. J., Levy, E. R., Peterson, L. B., Todd, J. A., Wicker, L. S., and Lyons, P. A. (1998). Localization of two insulin-dependent diabetes (*Idd*) gene to the *Idd10* region on mouse chromosome 3. *Mammal. Genome*, 9: 283-286.
- Routman, E. J., and Cheverud, J. M. (1997). Gene effects on a quantitative trait: two-locus epistatic effects measured at microsatellite markers and at estimated QTL. *Evolution*, 51: 1654-1662.
- Sen, S. and Churchill, G. A. (2001). A statistical framework for quantitative trait mapping. *Genetics*, 159: 371-387.
- Stam, L. F., and Laurie, C. C. (1996). Molecular dissection of a major gene effect on a quantitative trait: the level of alcohol dehydrogenase expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 144: 1559-1564.
- Stuber, C. W., Edwards, M. D., and Wendel, J. F. (1987). Molecular marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. II. Factors influencing yield and its component traits. *Crop Sci.*, 27: 639-648.
- Suzuki, T., Ishikawa, A., Yoshimura, T., Namikawa, T., Abe, H., Honma, S., Honma, K., and Ebihara, S. (2001). Quantitative trait locus analysis of abnormal circadian period in CS mice. *Mammal. Genome*, 12: 272-277.
- Taylor, B. A., Navin, A., and Phillips, S. J. (1994). PCR-amplification of simple sequence repeat variants from pooled DNA samples for rapidly mapping new mutation of the mouse. *Genomics*, 21:626-632.
- van Laere, A.-S., Nguyen, M., Braunschweig, M., Nezer, C., Collette, C., Moreau, L., Archibald, A. L., Haley, C. S., Buys, N., Tally, M., Andersson, G., Georges, M., and Andersson, L. (2003). A regulation mutation in *IGF2* causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature*, 425: 832-836.
- van Ooijen, J. W. (1999). LOD significance thresholds for QTL analysis in experimental populations of diploid species. *Heredity*, 83: 613-624.
- van Wezel, T., Stassen, A. P. M., Moen, C. J. A., Hart, A. A. M., van der Valk, M. A., and Demant, P. (1996). Gene interaction and single gene effects in colon tumour susceptibility in mice. *Nat. Genet.*, 14: 468-470.
- Wakeland, E., Morel, L., Achey, K., Yui, M., and Longmate, J. (1997). Speed congenics: a classic technique in the fast line (relatively speaking). *Immunol. Today*, 18: 472-477.
- Wang, G.-L., and Paterson, A. H. (1994). Assessment of DNA pooling strategies for mapping of QTLs. *Theor. Appl. Genet.*, 88: 355-361.
- Zeng, Z.-B. (1993). Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 10972-10976.
- Zeng, Z.-B. (1994). Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, 136: 1457-1468.