

## 研究協力者

白根聖子, 小林奈麻子, 太田玲子, 加我牧子, 船田正彦 国立精神・神経センター

## 文献

1. Deol MS, Gluecksohn-Waelsch S. The role of inner hair cells in hearing. *Nature* 1979; **278**: 250-2.
2. Bussoli TJ, Kelly A, Steel KP. Localization of the bronx waltzer (bv) deafness gene to mouse chromosome 5. *Mamm Genome*. 1997; **8**: 714-7.
3. Whitlon DS, Gabel C, Zhang X. Cochlear inner hair cells exist transiently in the fetal Bronx Waltzer (bv/bv) mouse. *J Comp Neurol*. 1996; **364**: 515-522.
4. Sobkowicz HM, Inagaki M, August BK, Slapnick SM. Abortive synaptogenesis as a factor in the inner hair cell degeneration in the Bronx Waltzer (bv) mutant mouse. *J Neurocytol*. 1999; **28**: 17-38.
5. Weltman AS, Sackler AM. Metabolic and endocrine function in whirler mice. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1966, **123**: 58-62.
6. Elwan MA, Ishii T, Sakuragawa N. Detection of dopamine D2 receptor mRNA and binding sites in monkey amniotic epithelial cells, *J Neurosci Res* 1999; **56**: 316-322.
7. Elwan MA, Ishii T, Ono F, et al : Evidence for the presence of dopamine D1 receptor mRNA and binding sites in monkey amniotic epithelial cells, *Neuroscience Let* 1999; **262**: 9-12.
8. Paule MG, Rowland AS, Ferguson SA, Chelonis JJ, Tannock R, Swanson JM, Castellanos FX. Attention deficit/hyperactivity disorder: characteristics, interventions and models. *Neurotoxicol Teratol* 2000; **22**: 631-51.
9. Luthman J, Bassen M, Fredriksson A, Archer T. Functional changes induced by neonatal cerebral 6-hydroxydopamine treatment: effects of dose levels on behavioral parameters. *Behav Brain Res* 1997; **82**: 213-21.
10. Jones SR, Gainetdinov RR, Hu XT, Cooper DC, Wightman RM, White FJ, Caron MG. Loss of autoreceptor functions in mice lacking the dopamine transporter. *Nat Neurosci* 1999; **2**: 649-55.
11. Jones MD, Williams ME, Hes EJ. Abnormal presynaptic catecholamine regulation in a hyperactive SNAP 25 deficient mouse mutant. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2001; **68**: 669-676.
12. Sackler AM, Weltman AS. Effects of Methylphenidate on whirler mice: an animal model for hyperkinesis. *Life Sci*. 1985; **37**: 425-31.
13. Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. Attention-deficit hyperactivity disorder: a study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. *Am J Med Genet* 2001; **105**: 471-8.

## F. 健康危険情報

とくになし。

## G. 研究発表

学会発表

1. 稲垣真澄, 昆かおり, 白根聖子, 加我牧子, 伊藤雅之: 常染色体劣性遺伝性難聴マウス bronx waltzer(bv)にみられる hyperactivity disorder 第44回日本小児神経学会総会 平成14年6月27-29日 仙台

2. 小林奈麻子, 稲垣真澄, 船田正彦, 太田玲子, 大杉圭子: bronx waltzer mouse の多動性行動異常の病態: 行動的・生化学的検討 第 32 回日本神経精神薬理学会 平成 14 年 10 月 17-18 日 前橋

5 Apomorphine 投与後のモノアミン値変化: 生理食塩水 (saline) 投与に比べて Apomorphine (APO) 投与後の線条体 DA 値は回転群で増加する反応を示した.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

#### 図の説明

##### 1 マウス聴力検査:

回転群 (bv-R) と非回転群 (bv-N) は対照群 (C) に比べて ABR (a) および OAE (b) 閾値の上昇がみられた. しかし回転群と非回転群の間には有意な差はなかった. バーは  $\pm 1$  標準偏差

##### 2 脳内モノアミン値:

線条体ドパミン値に 3 群間の差はなかった (a) が, 中脳ドパミン値は回転群 (bv-R) 非回転群 (bv-N) とともに対照 (C) より低下していた (b). 代謝率に関して bv は線条体, 中脳ともに DOPAC/DA 比が亢進し, 逆に HVA/PA 比は低下し, 回転群でその傾向が明瞭であった.

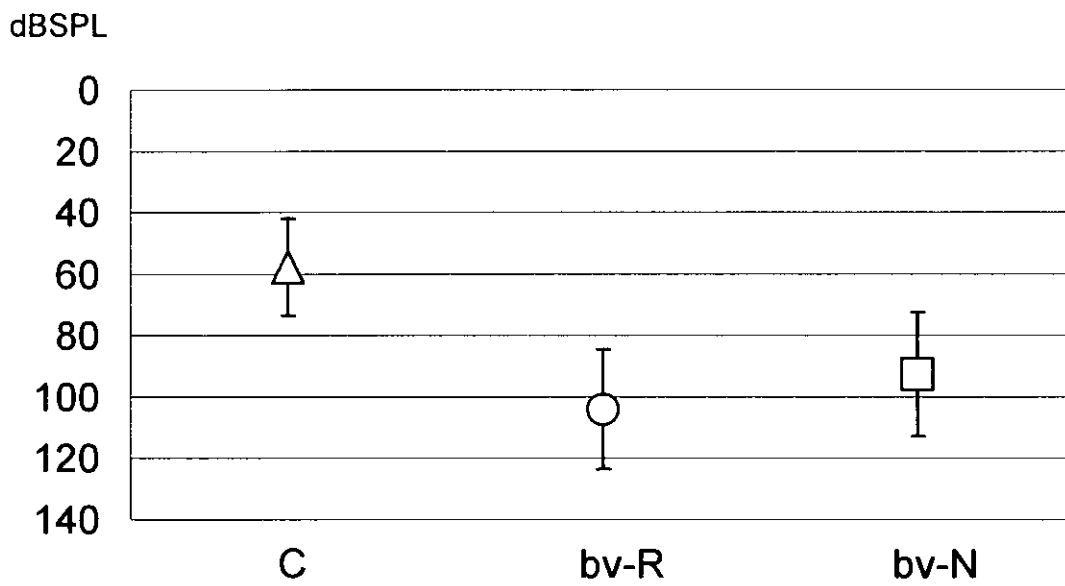
##### 3 ドパミン受容体結合能 (線条体):

回転群では D1 受容体機能が低下しており, 受容体数は増加していた (a-1, a-2). 一方, D2 受容体にも同様の傾向がみられたが, 統計学的有意差はなかった (b-1, b-2).

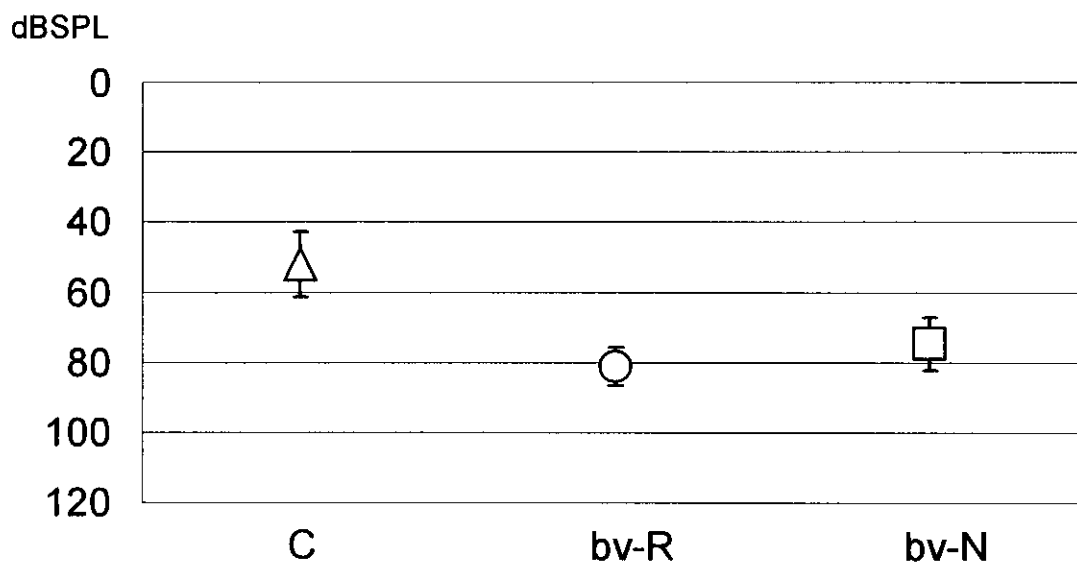
##### 4 各薬物に対する行動量変化 (投与前 20 分積算値を 100 としたときのパーセント表示):

回転群 (a) は DA 受容体拮抗薬がもっとも早くかつ強く行動を抑制し, 作動薬, 間接的作動薬 (Methamphetamine) の順に行動量低下がみられた.

図 1 a



b



2 脳内モノアミン値 a 線条体 b 中脳

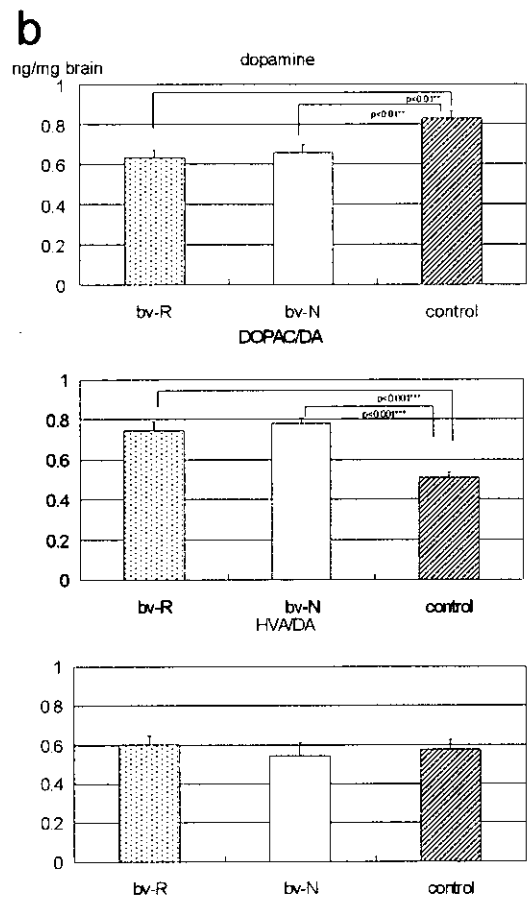
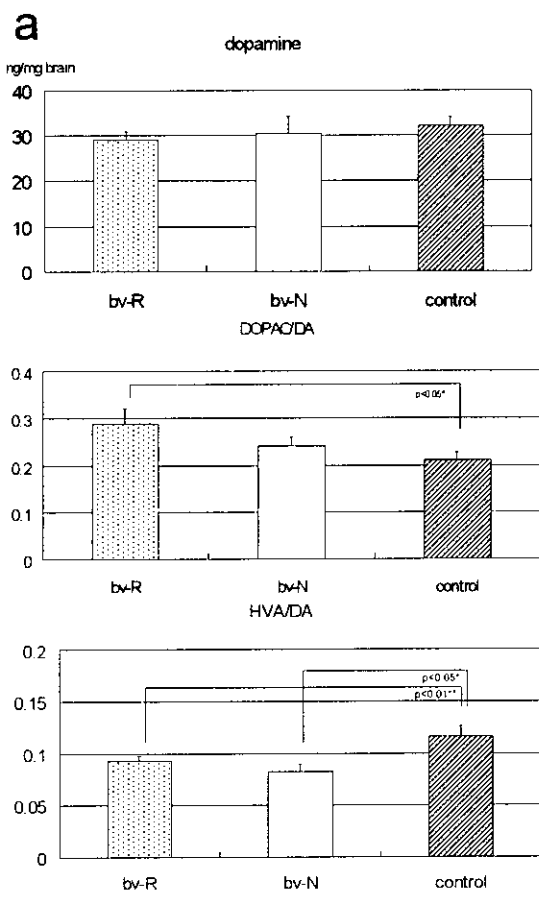


図3 ドパミン受容体結合能(線条体)

a : D1-R (1,Kd, 2,Bmax), b : D2-R (1,Kd, 2,Bmax)

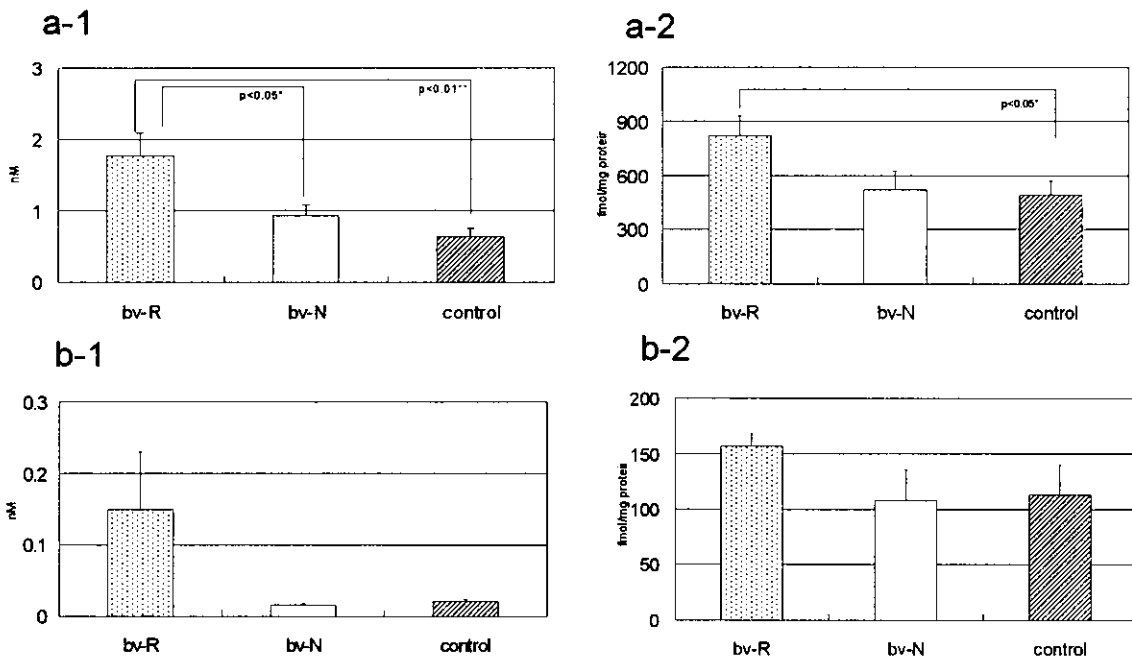
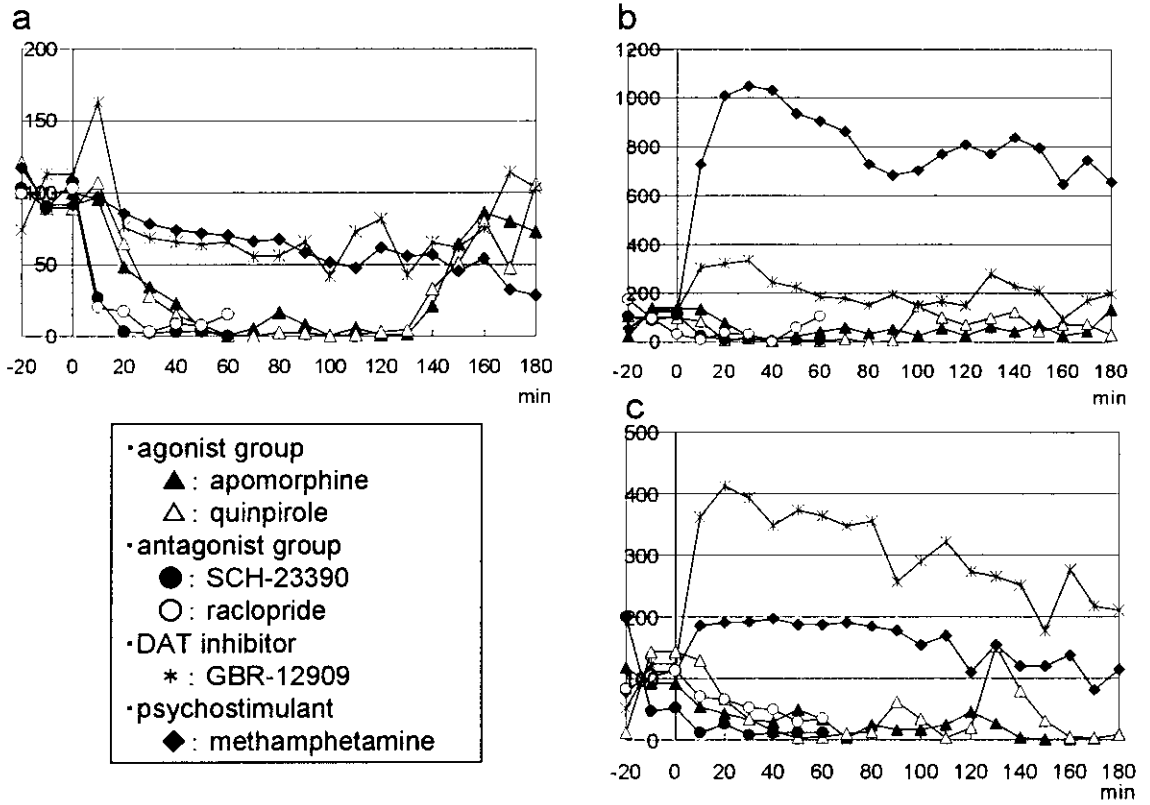
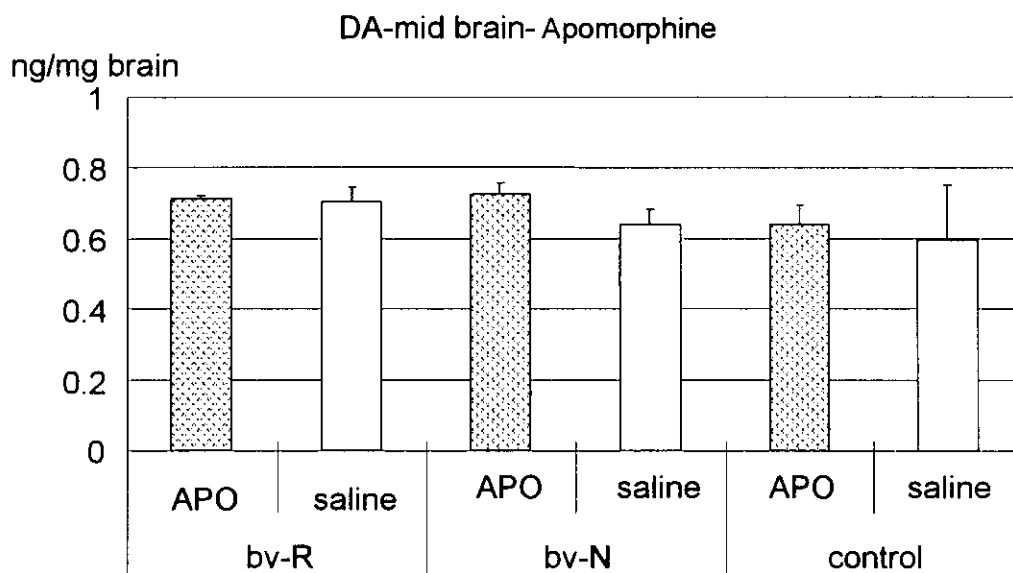
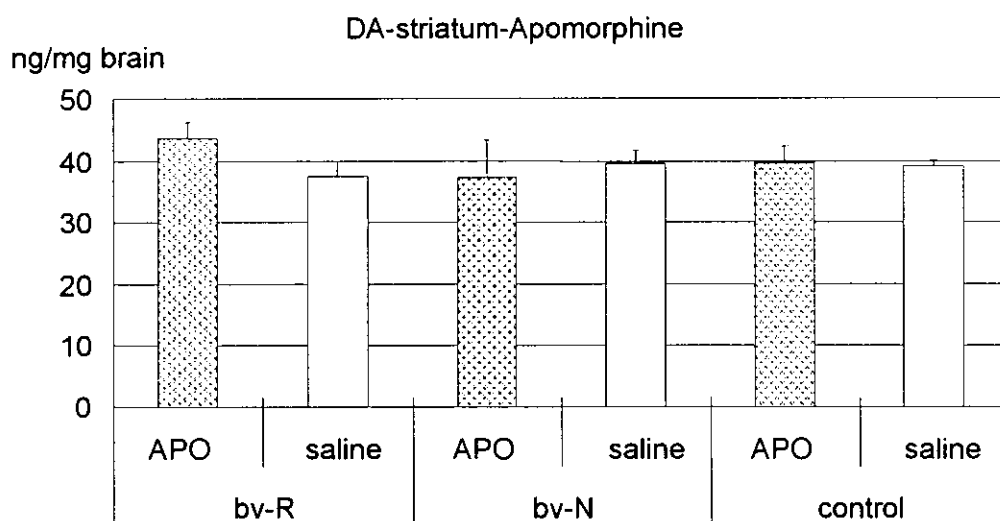


図 4





## Ⅱ. 分担研究報告

### 3. 遺伝性難聴bvの原因遺伝子クローニング

難波栄二



遺伝性難聴 bv の原因遺伝子クローニング

分担研究者 難波栄二

鳥取大学遺伝子実験施設 助教授

研究要旨

遺伝性難聴モデルマウス Bronx waltzer mouse (bv) の行動異常に関する分子病態および遺伝子診断システムの研究を行った。bv マウスの行動異常に関する分子病態を明らかにするために、ドーパミン関連遺伝子、MAO 関連遺伝子などの線条体、中脳における発現に関してリアルタイム PCR を用いて検討した。10 種類の遺伝子のうち線条体で 4 種類、中脳で 5 種類の遺伝子を解析することができた。行動異常マウスでは、行動異常のないマウスに比べて線条体において Snap25 遺伝子発現が 0.73 倍に、また中脳において dopamine-1A receptor の発現が 0.54 倍に減少していた。その他の遺伝子では差がみられなかった。難聴マウスを早期から区別するために、近傍の D5Mit209 を用いて遺伝子診断を行うことが可能になった。D5Mit209 は、原因遺伝子から 0.39cM の距離と考えられるマーカーで、異常のないアレルは 325bp の長さの PCR 産物を検出した。一方、bv の異常があるアレルでは 34bp 長い 359bp の長さのアレルであった。この方法により、190 サンプルを解析したところ、bv 遺伝子異常アレルのホモの個体が 149、異常と正常のヘテロ個体が 30、正常のホモ個体が 6、PCR 不能であったものが 5 であった。

A. 研究目的

遺伝性難聴モデルマウス Bronx waltzer mouse (bv) では行動異常を呈すること明らかになっている。この分子病態を解明するために、昨年度は tyrosine hydroxylase, Snap25 などの遺伝子発現を定量するリアルタイム PCR 法のシステムを確立した。これらの遺伝子に加えて本年度はドーパミン関連遺伝子、MAO 関連遺伝子などの発現を脳の線条体、中脳で解析した。

また、原因遺伝子の単離には至らなかったが、間接的な遺伝子診断を行うために、

近傍の遺伝子マーカーである D5Mit25, D5Mit209 および D5Mit187 の解析を行った。

B. 研究方法

1. 行動異常の分子病態の解析

材料: 遺伝性難聴 bv で行動異常のあるマウスとないコントロールのマウス一例ずつの脳内線条体、中脳を用いた(表1)。

方法: RNA は RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて分離した。検討した遺伝子と用いたプライマーは表2に示した。遺伝子発現

は、Light Cycler (Roche)を用いたリアルタイムPCR法で定量した。試薬はLightCycler Fast DNA Master SYBR Green I (Roche)を用いた。方法は Light Cycler のマニュアルに従った。検量線を作成するために  $10^{-3}$ ~ $10^{-7}$  または  $10^{-5}$ ~ $10^{-9}$  に希釈した PCR 産物を用いた。解析は Fit point 法による定量分析を行った。また、融解曲線分析で特異性を確認し、アガロースゲルにより目的産物のサイズの確認も行った。

## 2.bv の遺伝子診断

マウスの染色体 5 番上のマーカー

D5Mit209 と D5Mit25, さらに D5Mit187 の解析を行った(図 1)。解析に使ったプライマーのシーケンスは以下である。

D5Mit209:

F(TCTGAGCAAGGTCGTCCAC),  
R(CCCTGTCTCAAGATAAAAGCTAGG)

D5Mit25:

F(AACACACCTCCATACTGGTTCG),  
R(GGCTAACTGAAATTGTTTTGTGC)

D5Mit187:

F(GGACCCACAAGATGGAAAGA),  
R(CCTCAGTGGATACATGTTTAAACTT)

マウスの尾から ProteinaseK と自動抽出装置 MagExtractor (Toyobo)を用いて DNA を分離した。DNA 200ng, 250  $\mu$  MdNTPs, PCR バッファー, 1U Taq polymerase Gold (Perkin-Elmer), 1  $\mu$  M の各プライマーを含む 10  $\mu$  l の溶液を作成し, 95°C 5 分を 1 サイクルの後, 95°C 1 分, 55°C 1 分, 72°C 1 分のサイクルを 35 回繰り返して PCR を行った。

解析後に 3%アガロースゲル電気泳動にて長さを検討した。同時に、直接シーケンス法により塩基配列を検討した。

## C. 研究結果

### 1. 行動異常の分子病態の解析

表 3 に抽出した RNA の量を示した。リアルタイム PCR 法で解析可能な 4~8  $\mu$  g までの範囲の RNA が抽出できた。このサンプルを用いて、リアルタイム PCR にて各遺伝子の発現量を検討した。

まず、融解曲線分析を行い 85°C 以上の高温で単一のピークのみが検出されることを確認した(図 2)。同時に電気泳動にてサイズの確認を行った。これらにより、特異的な産物のみでの定量が行われていることを確認した。スタンダードサンプルの解析により、Fit point 法による検量線を作成した(図 3)。エラーが 0.2 以下の正確な検量線を用いて、サンプルの解析を行った。Aromatic L amino acid 遺伝子, MAOA 遺伝子, MAOB 遺伝子の解析では融解曲線が 2 峰性となり、特異的な産物の定量が行えなかった(図 4)。また、中脳の Snap25 の解析では、検量線のエラーが 0.2 を超えたために定量ができなかった。その他の遺伝子解析での検量線の評価を表 4 に示した。各遺伝子発現は  $\beta$ -actin を内部標準遺伝子としてその比率を求めた。そして、行動異常(hyper)マウスと行動異常のないマウス(normal)の遺伝子発現量を比較した(表 5)。その結果、行動異常マウスでは線条体において Snap25 の発現が 0.73 倍に減少していた。また中脳においては、行動異常マウスにおいて dopamine 1A receptor の発現が

0.54 倍に減少していた。

## 2.bv の遺伝子診断

bv 近傍のマーカー D5Mit209, D5Mit25, D5Mit187 の解析を行った。D5Mit25 と D5Mit187 は、難聴の有無にかかわらず、すべてのマウスで同じサイズの PCR 産物を確認した。しかしながら、D5Mit209 の解析では2種類のサイズの産物を確認した(図5)。これらの産物のシーケンスを確認してみると繰り返し配列の長さに違いがあり、325bp と 359bp であることが確認できた(図6)。このサイズと難聴の有無を検討してみると、難聴のマウス(bv/bv)では 359bp のサイズのアレルのみを持つことが明らかになった。現在までに、190 サンプルを解析し、359bp の bv アレルのホモが 149 サンプル、359bp アレルと 325bp アレルのヘテロが 30 サンプル、325bp の正常アレルのホモが 6 サンプルであった。また、PCR 産物が確認できなかったものが5サンプルであった。

## D. 考察

### 1.行動異常の分子病態の解析

今回、検討した中脳や線条体では RNA は、4 から 8  $\mu$ g 程度しか得ることができなかった。従来のノーザンブロット法では通常 20  $\mu$ g 程度の RNA が最低必要になるために、この方法ではマウスの脳の部分ごとの遺伝子発現を正確に検討するには限界がある。そのためにリアルタイム PCR 法を用いた。今回は、Taq Man プローブを用いる方法ではなく、より簡便で多くの遺伝子解析に適する Cyber Green を用いる方法で行った。この方法で正確な定量を行うには、特異的

PCR を正確な検量線のもとに解析する必要がある。融解曲線は特異的 PCR 産物のみを同定するのに有効な方法である。その結果 Aromatic L amino acid 遺伝子, MAOA 遺伝子, MAOB 遺伝子では特異的な反応が得られなかった。特に MAOA と B 遺伝子ではホモロジーの高い遺伝子が存在するために、電気泳動でも 2 本のバンドを検出した。これらの遺伝子に対しては、今後プライマーのデザインを工夫することにより特異的な解析を行う予定である。

今回の検討で、行動異常マウスで dopamine 1A receptor 遺伝子発現に異常がある可能性が示された。また、神経細胞のシナプ스에서重要な役割を果たしていると考えられている Snap25 遺伝子発現も若干の差があり、注目される。今後、さらに詳細なドーパミン代謝遺伝子の解析、セロトニン関連遺伝子などの解析を行う必要がある。

## 2.bv の遺伝子診断

bv 遺伝子のクローニングは未だ成功していないが、bv の診断を早期から行うことは、研究を進める上で重要である。今回は近傍のマーカーを検討することにより、D5Mit209 の解析から遺伝子診断可能であることが明らかになった。現在までの解析では難聴と遺伝子診断はすべて一致しており、この方法により胎児期を含むあらゆるステージで研究を進めることが可能になった。しかしながら、このマーカーは bv の遺伝子領域から 0.39cM の遺伝的距離があるために、解析結果にはエラーを生じる可能性がある。このために、さらに多くの検体を他のマーカーで解析する必要がある。また、これらの解

析から bv 領域をさらに絞り込んで遺伝子クローニングを行うことが可能と考えられる。

#### E. 結論

1. bv マウス線条体, 中脳の遺伝子発現と行動異常の関係に関してリアルタイムPCRを用いて検討した。
2. 検討した10種類のうち線条体で4種類, 中脳で5種類の解析ができた。
3. 行動異常マウスでは線条体においてSnap25の発現が0.73倍に減少し, 中脳においてdopamine-1A receptorの発現が0.54倍に減少していた。しかしその他の遺伝子では差が見られなかった。
4. マウス染色体5番上のマーカー, D5Mit209を用いてbvの遺伝子診断システムが確立できた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Saito Y, Geyer A, Sasaki R, Kuzuhara S, Nanba E, Miyasaka T, Suzuki K, Murayama S. Early-onset, rapidly progressive familial tauopathy with R406W mutation. *Neurology* 58:811-813, 2002

Kotani K, Shimomura T, Shimomura F, Ikawa S, Nanba E. A polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region and frequency of migraine attacks. *Headache* 42:893-5, 2002

Saito Y, Suzuki K, Nanba E, Yamamoto T, Ohno K, Murayama S. Niemann-Pick type C disease: accelerated neurofibrillary tangle formation and amyloid beta deposition associated with apolipoprotein E · 4 homozygosity. *Ann Neurol.* 52:351-355, 2002

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 材料

	OAE	behavior	sample weight(mg)
striatum	緩徐進行	hyper	14.1
	緩徐進行	normal	12.2
mid brain	緩徐進行	hyper	88.9
	緩徐進行	normal	96.9

表 2 遺伝子発現解析のプライマー (F:forward primer, R:reverse primer)

<b><i>β</i>-actin</b>	<b>F:CCTCTATGCCAACACAGT</b> <b>R:AGCCACCGATCCACACAG</b>	<b>Snap25 (synaptosomal-associated protein, 25kD)</b> <b>F: GGATGAAAACCTAGAGCAG</b> <b>R:GCAGAACGGCAGATTTAAC</b>
<b>Aromatic-L-amino-acid decarboxylase</b>	<b>F:AGTCATTCTTGGGTTGGTCT</b> <b>R:AGATCACTGATGTGTTCCCA</b>	<b>Th (tyrosine hydroxylase)</b> <b>F:CCCTACCAAGATCAAACCTA</b> <b>R:GGTGGTACCCTATGCATTTA</b>
<b>Comt (catechol-O-methyltransferase)</b>	<b>F: CGCTACCTTCCAGACACACT</b> <b>R:GGTAGACTGCCTTCTCCAAC</b>	<b>Dat (dopamine transporter)</b> <b>F:TGCTGGTCATTGTTCTGCTC</b> <b>R:ATCCACACAGATGCCTCACA</b>
<b>D1A (dopamine-1A receptor)</b>	<b>F:CTACAGGATTGCCCAGAAGC</b> <b>R:TCGACAGGGTTTCCATTACC</b>	<b>MAO-A (monoamine oxidase-A)</b> <b>F:GCAGGATTTACTTTGCAGGC</b> <b>R:GAGCTGGAACATCCTTGGAC</b>
<b>Drd2 (dopamine receptor D2)</b>	<b>F:CCACATAGGAAAGCAGGGAA</b> <b>R:GAGTTGGGGTGGAAAACAGA</b>	<b>MAO-B (monoamine oxidase-B)</b> <b>F:TATTCTGGGGGCTGCTACAC</b> <b>R:GTGCAGGGACATCCAAAGAT</b>

表 3 抽出したRNAの量

	behavior	concentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	total ( $\mu\text{g}$ )
striatum	hyper	0.344	6.192
	normal	0.431	7.758
mid brain	hyper1	0.0218	4.1
	hyper2	0.022	4.14
	hyper3	0.0388	7.29
	normal1	0.0376	7.07
	normal2	0.0264	4.96
	normal3	0.0238	4.47

表 4 検量線の評価

<b>striatum</b>			
	slope	error	r
actin	-3.889	0.0253	-1.000
D1A	-3.328	0.0481	-1.000
Drd2	-3.329	0.170	-0.097
Snap25	-3.355	0.165	-0.998
<b>mid brain</b>			
actin	-5.878	0.000117	-1.000
D1A	-3.440	0.101	-0.999
Drd2	-2.983	0.154	-0.998
Dat	-2.833	0.198	-0.989
Th	-3.680	0.167	-0.997

表 5 リアルタイム PCR による各遺伝子発現の解析結果

striatum					
	hyper	/ $\beta$ -actin	normal	/ $\beta$ -actin	hyper/normal
$\beta$ -actin	1.17		0.83		
D1A	137.85	117.62	102.80	124.27	0.95
Drd2	194.25	165.74	140.70	170.09	0.97
Snap25	1.73	1.47	1.66	2.01	0.73
mid brain					
	hyper	/ $\beta$ -actin	normal	/ $\beta$ -actin	hyper/normal
$\beta$ -actin	1953.73		2776.50		
D1A	35.59	0.02	94.22	0.03	<u>0.54</u>
Drd2	261.27	0.13	289.93	0.10	1.28
Dat	2159.00	1.11	3421.33	1.23	0.90
Th	20.06	0.01	25.07	0.01	1.14

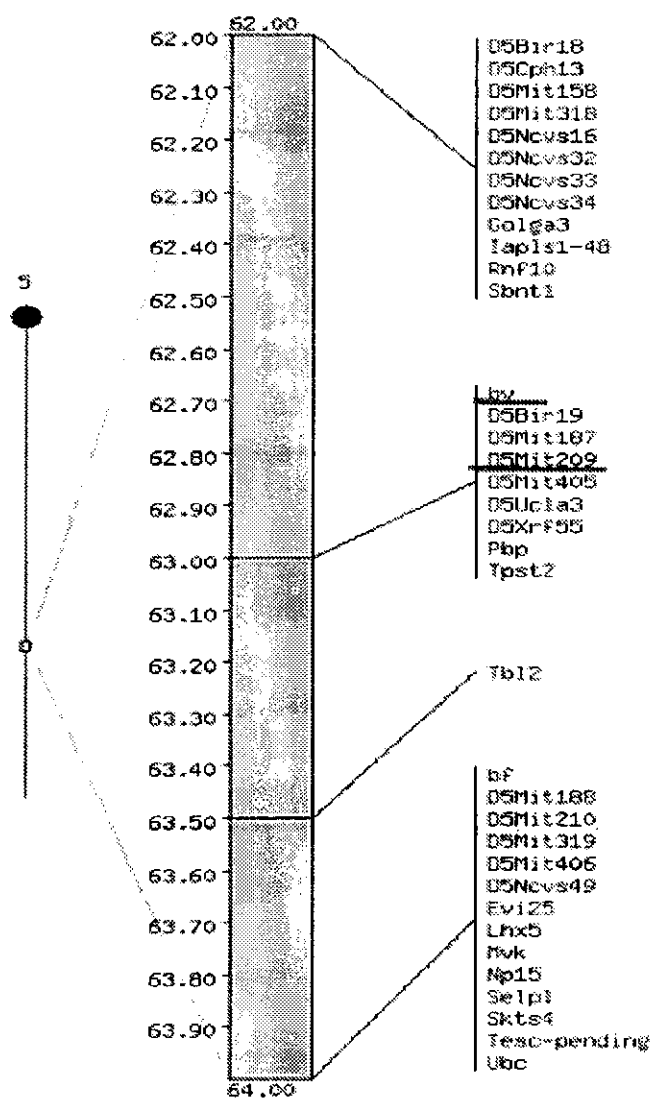


図1 マウス染色体5番上のマーカー

D5Mit209:0.39cM from bv locus

D5Mit25:1.49cM from bv locus



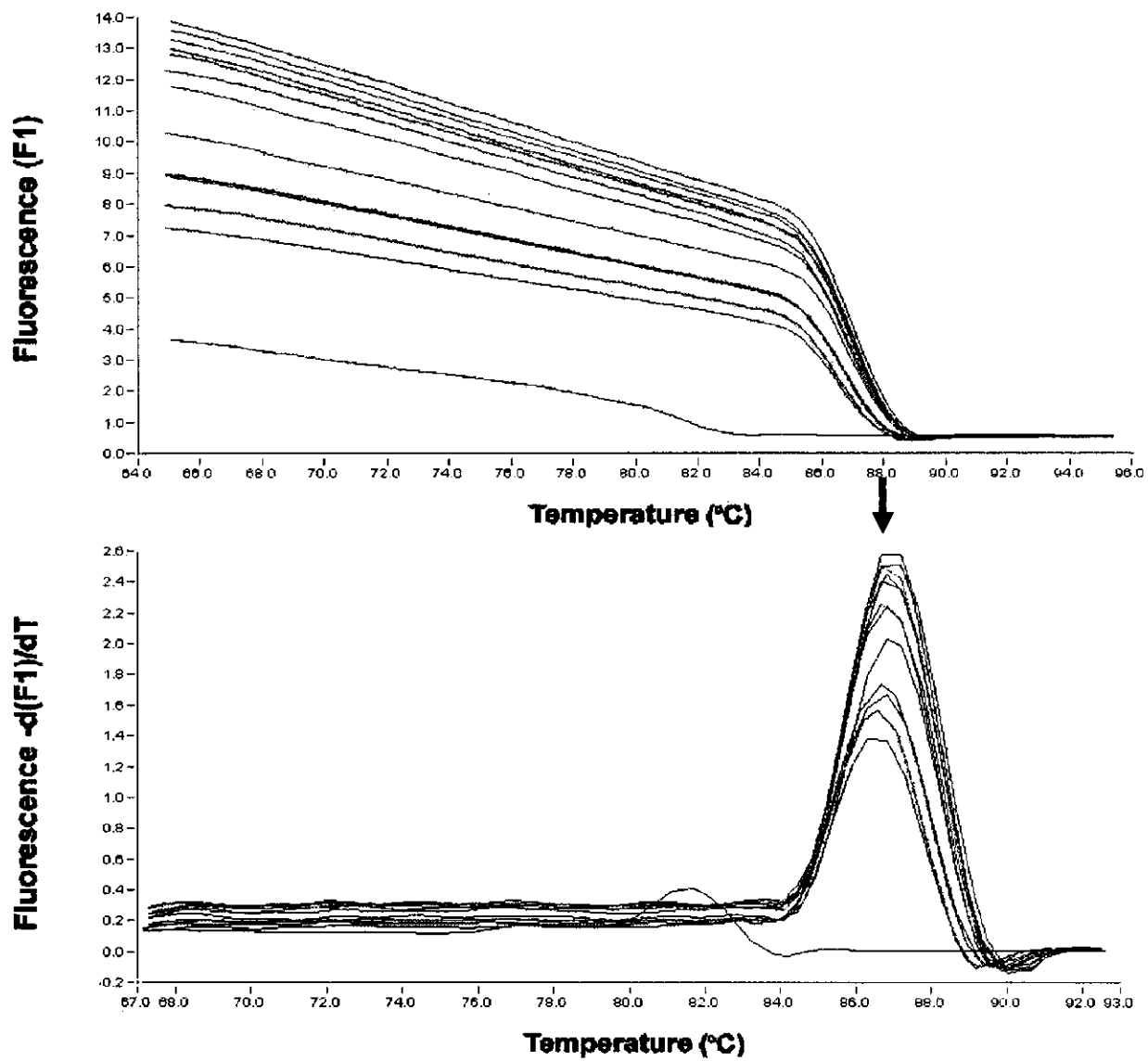


図2 特異的産物のみ融解曲線分析

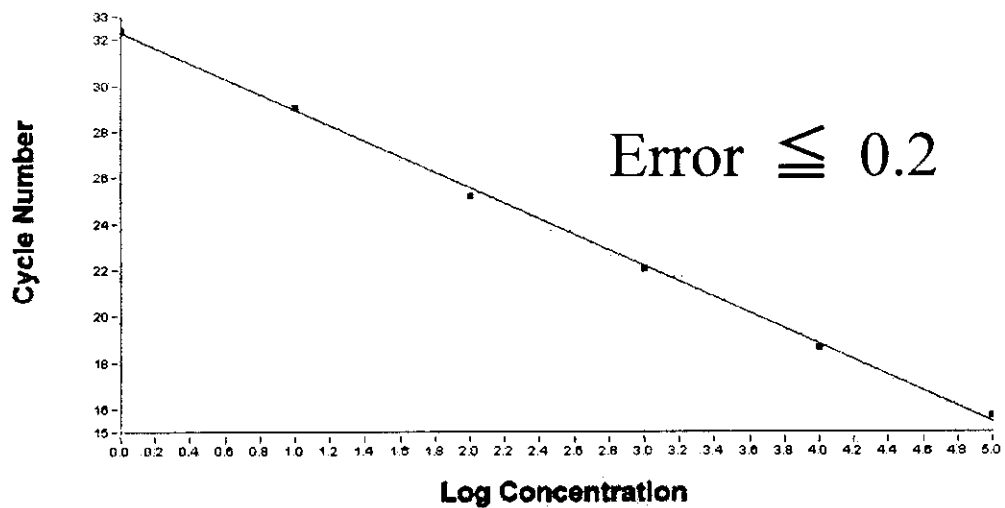
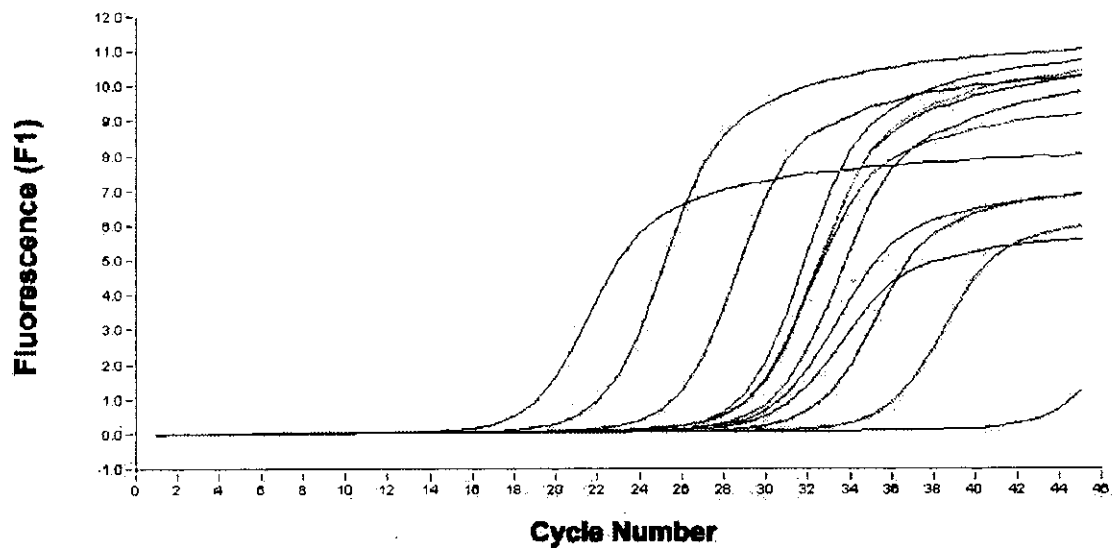


图3 定量分析(Fit point 法)

### Aromatic L amino acid decarboxylase 遺伝子

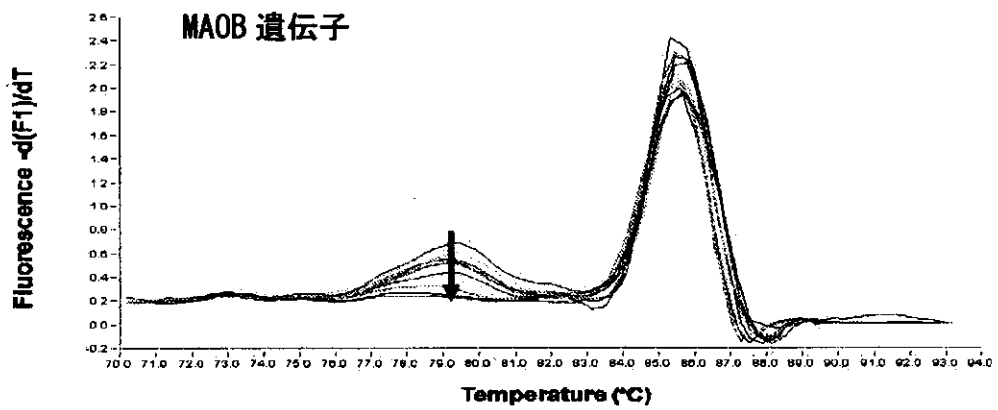
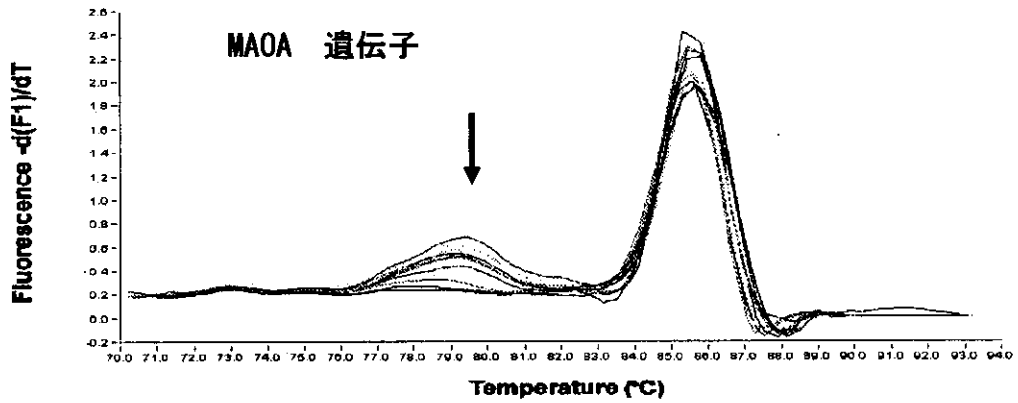
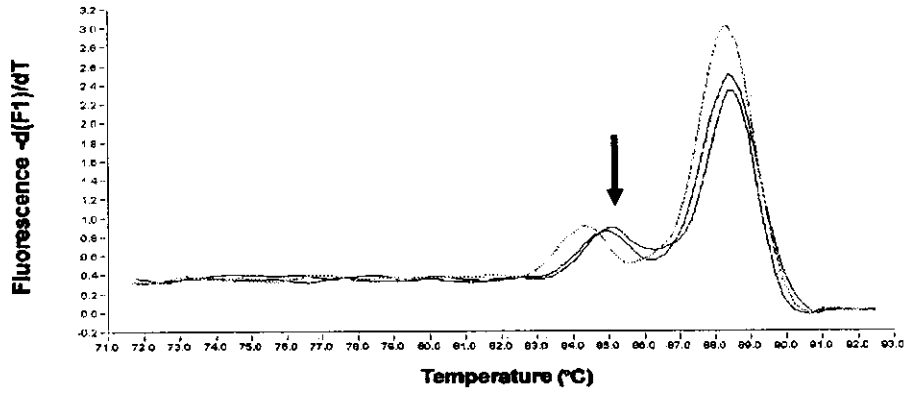


図4 非特異産物を含む融解曲線  
矢印が非特異的産物を示す

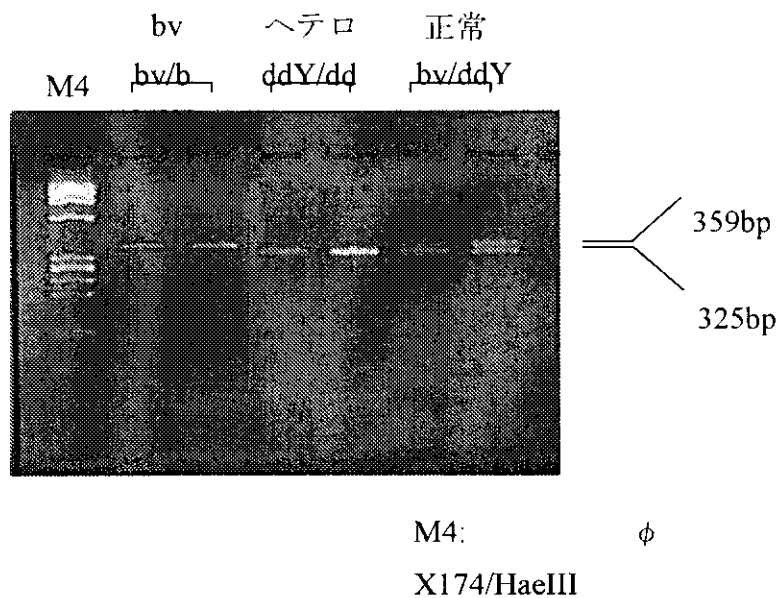


図5 D5Mit209の解析

3%アガロースゲル電気泳動法

[67.3% / 541 bp]      INT/OPT.Score : < 867 / 1103 >

```

Normal 1' CAGGAAGGGGCTGCCTCTGGTCAAGTTCTGCCTTCGGTAGGTTTCATTAGGGGAATCCCA
          *****
bv      1' CAAGGAAGGGGCTG-CTCTGGTCAAGTTCTGCCTTCGGTAGGTTTCATTAGGGGAATCCCA
          *****
        60' CTCCCACCTGTGTGTATGTGTGTTTCATGTGTCCATGTGTGCATGAGTGTGTGGTGTGTG
          *****
        60" CTCCCACCTGTGTGTATGTGTGTTTCATGTGTCCATGTGTGCATGAGTGTGTGGTGTGTG
          *****
       120' TGTGTTTGTGTGTATGGTATATGTGCTGTGTTCA-----TGTGTCCGTG
          *****
       120" TGTGTTTGTGTGTATGGTATATGTGCTGTGTTTCATGTGTCCGTGTGTCCTGTGTCCGTG
          *****
       164' TGTCCCTGTGTCCGTGTGTCCGTGTGTCC-----GTGTGTGTGTGTG
          *****
       180" TGTCCCTGTGTCCGTGTGTCCGTGTGTCCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
          *****
       206' TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGNTCACGCRAAAGNNAGAGCTCACCTCANGANNATACNTAG
          *****
       240" TGTGTGTGTGTGTGTGTGCGCNCACANAARAAGAGANATCTCANTCTCNANATATATATAT
          *****
       266' GTTNTGTGNCNCCGCGNNAGCG-AGCGCGCGCTCGCGGNCCTGTGTGTGTGTGTG
  
```

図6 D5Mit209のシーケンス

上:Normal(325bp), 下: bv: 359bp