

表 4. ビタミン B₆ 含 70%カゼイン食群の KA, XA, Nam およびその代謝産物の尿中排泄量, (2-Py + 4-Py)/MNA の排泄率および Trp からナイアシンの転換率 (実験 1)

	+NiA & +B ₆	-NiA & +B ₆
Food intake (g/day)	14.3 ± 0.3	15.0 ± 0.7
KA	198 ± 17	163 ± 15
XA	79 ± 5	62 ± 5
Nam	16 ± 1	3 ± 1*
MNA	87 ± 3	15 ± 3*
2-Py	80 ± 3	11 ± 2*
4-Py	331 ± 9	96 ± 5*
Sum ¹	514 ± 13	125 ± 10*
(2-Py+4-Py)/MNA	4.7 ± 0.3	7.1 ± 0.8
NiA intake	487 ± 0	0
Trp intake	38783 ± 0	38783 ± 0
Conversion ratio of Trp to Niacin (%)	Not calculated	0.32 ± 0.03

¹Sum, Nam + MNA + 2-Py + 4-Py.

Values are means ± SEM for five rats, expressed as nmol/ g of food, except for (2-Py + 4-Py)/MNA and the conversion ratio of Trp to niacin and means ± SEM for five rats.

* Statistically significant difference at $p < 0.05$, compared with the +NiA group, as evaluated by Student's *t* test.

表 5. ビタミン B₆ 含 70%カゼイン食群の Trp からナイアシンの代謝に関連する酵素活性(実験 1)

	+NiA & +B ₆	-NiA & +B ₆
Trp oxygenase	2.03 ± 0.22	1.77 ± 0.22
Kynureninase	1.57 ± 0.05	1.55 ± 0.04
Kynurenine aminotransferase	1.14 ± 0.10	1.03 ± 0.02
Kynurenine 3-hydroxylase	1.54 ± 0.15	1.96 ± 0.40
3-HA oxygenase	551 ± 35	550 ± 22
ACMSDase	11.3 ± 1.4	12.1 ± 1.1
NMN adenylyltransferase	8.97 ± 0.71	8.31 ± 0.46
NAD ⁺ synthetase	0.59 ± 0.12	0.61 ± 0.04
Nam methyltransferase	1.85 ± 0.03	1.89 ± 0.04
2-Py-forming MNA oxidase	0.68 ± 0.07	0.71 ± 0.06
4-Py-forming MNA oxidase	1.70 ± 0.08	1.59 ± 0.03

Values are expressed as $\mu\text{mol/h/g}$ of liver and means \pm SEM for five rats.

表 6. ビタミン B₆ 欠 70%カゼイン食群の体重増加量, 飼料摂取量および食事効率(実験 2)

	+NiA & -B ₆	-NiA & -B ₆
Initial body weight (g)	106 ± 1	102 ± 2
Final body weight (g)	139 ± 5	115 ± 4*
Body weight gain (g/19 days)	33 ± 4	13 ± 4*
Food intake (g/19 days)	162 ± 2	141 ± 5*
FER ¹	0.20 ± 0.02	0.09 ± 0.01*

¹FER, Food Efficiency Ratio.

Values are means ± SEM for five rats, expressed as μmol/h/g of liver and means ± SEM for five rats.

* Statistically significant difference at $p < 0.05$, compared with the +NiA group, as evaluated by Student's *t* test.

表 7. ビタミン B₆ 欠 70%カゼイン食群の KA, XA, Nam およびその代謝産物の尿中排泄量, (2-Py + 4-Py)/MNA の排泄率および Trp からナイアシンの転換率 (実験 2)

	+NiA & -B ₆	-NiA & -B ₆
Food intake (g/day)	7.4 ± 1.3	5.8 ± 1.1
KA	145 ± 5	144 ± 34
XA	1775 ± 173	2100 ± 234
Nam	16 ± 2	11 ± 4
MNA	295 ± 30	65 ± 11*
2-Py	23 ± 3	7 ± 1*
4-Py	137 ± 18	70 ± 6*
Sum ¹	471 ± 48	153 ± 14*
(2-Py+4-Py)/MNA	0.54 ± 0.04	1.2 ± 0.06*
NiA intake	487 ± 0	0
Trp intake	38783 ± 0	38783 ± 0
Conversion ratio of Trp to Niacin (%)	Not calculated	0.39 ± 0.05

¹Sum, Nam + MNA + 2-Py + 4-Py.

Values are means ± SEM for five rats, expressed as nmol/ g of food, except for (2-Py + 4-Py)/MNA and conversion ratio of Trp to niacin and means ± SEM for five rats.

* Statistically significant difference at $p < 0.05$, compared with the +NiA group, as evaluated by Student's *t* test.

表 8. ビタミン B₆ 欠 70%カゼイン食群の Trp からナイアシンの代謝に関連する酵素活性(実験 2)

	+NiA & -B ₆	-NiA & -B ₆
Trp oxygenase	1.82 ± 0.09	1.81 ± 0.14
Kynureninase	0.39 ± 0.09	0.32 ± 0.03
Kynurenine aminotransferase	0.38 ± 0.04	0.35 ± 0.04
Kynurenine 3-hydroxylase	3.07 ± 0.17	2.79 ± 0.18
3-HA oxygenase	511 ± 39	565 ± 43
ACMSDase	11.1 ± 1.6	12.6 ± 1.5
NMN adenylyltransferase	8.16 ± 0.27	8.75 ± 0.57
NAD ⁺ synthetase	0.56 ± 0.07	0.56 ± 0.06
Nam methyltransferase	1.79 ± 0.02	1.82 ± 0.03
2-Py-forming MNA oxidase	0.05 ± 0.02	0.10 ± 0.04
4-Py-forming MNA oxidase	0.18 ± 0.09	0.74 ± 0.10*

Values are expressed as $\mu\text{mol/h/g}$ of liver and means \pm SEM for five rats.

* Statistically significant difference at $p < 0.05$, compared with the +NiA group, as evaluated by Student's t test.

表 9. 20%, 40%および 60%カゼイン食群の体重増加量, 飼料摂取量および効率 (実験 3)

	20% Casein diet ¹		40% Casein diet		60% Casein diet	
	+NiA	-NiA	+NiA	-NiA	+NiA	-NiA
Initial body weight (g)	103 ± 2	106 ± 2	102 ± 2	102 ± 2	102 ± 1	102 ± 1
Final body weight (g)	216 ± 4	216 ± 4	217 ± 5	223 ± 5	213 ± 4	212 ± 4
Body weight gain (g/19 d)	113 ± 4	110 ± 3	115 ± 4	121 ± 4	111 ± 3	110 ± 4
Food intake (g/19 d)	273 ± 5	287 ± 5	284 ± 5	294 ± 6	262 ± 6	260 ± 3
Food efficiency ratio*	0.41 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.40 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.02

*FER, body weight gain (g/19 d)/food intake (g/19 d).

Each value is the mean ± SEM for five rats.

¹Data were drawn from reference 1.

表 10. 20%, 40%および60%カゼイン食群の KA, XA, Nam およびその代謝産物の尿中排泄量, (2-Py + 4-Py)/MNA の排泄率および Trp からナイアシンの転換率 (実験 3)

	20% Casein diet ¹		40% Casein diet		60% Casein diet	
	+NiA	-NiA	+NiA	-NiA	+NiA	-NiA
Food intake (g/day)	16.7 ± 0.6	18.0 ± 0.8	17.9 ± 0.6	18.5 ± 0.7	17.9 ± 0.6	16.5 ± 0.4
KA	35 ± 2.1	40 ± 5.6	105 ± 7.5	126 ± 20.5	156 ± 26.7	191 ± 8.7
XA	28 ± 2.5	36 ± 4.7	55 ± 6.4	51 ± 4.2	67 ± 7.8	81 ± 3.1
Nam	16 ± 0.8	13 ± 1.3	17 ± 1.4	9 ± 0.4	9 ± 1.4	7 ± 0.3
MNA	55 ± 1.1	18 ± 1.8*	57 ± 4.9	22 ± 2.2*	84 ± 8.1	24 ± 1.1*
2-Py	61 ± 2.4	16 ± 2.7*	55 ± 5.3	20 ± 1.9	66 ± 4.1	21 ± 0.9*
4-Py	484 ± 19	161 ± 21*	449 ± 53	199 ± 14*	257 ± 30	149 ± 19*
Sum ¹	616 ± 18	208 ± 27*	578 ± 57	250 ± 17*	416 ± 35	201 ± 20*
(2-Py + 4-Py)/MNA	9.9 ± 0.4	9.8 ± 0.5	8.8 ± 1.5	10.0 ± 1.1	3.8 ± 0.6	7.1 ± 0.7
NiA intake	487 ± 0	0	487 ± 0	0	487 ± 0	0
Trp intake	11081 ± 0	11081 ± 0	22162 ± 0	22162 ± 0	33242 ± 0	33242 ± 0
Conversion ratio of Trp to niacin (%)	Not calculated	1.90 ± 0.25	Not calculated	1.13 ± 0.07	Not calculated	0.60 ± 0.08

¹Sum, Nam + MNA + 2-Py + 4-Py.

Values are means ± SEM for five rats, expressed as nmol/ g of food, except for (2-Py + 4-Py)/MNA and conversion ratio of Trp to niacin and means ± SEM for five rats.

* Statistically significant difference at $p < 0.05$, compared with the respective the +NiA group, as evaluated by Student's *t* test.

¹Data were drawn from reference 1.

表 11. 20%, 40%および 60%カゼイン食群の ACMSDase 活性(実験 3)

	20% Casein diet ¹		40% Casein diet		60% Casein diet	
	+NiA	-NiA	+NiA	-NiA	+NiA	-NiA
ACMSDase ($\mu\text{mol/h/g}$ of liver)	2.4 \pm 0.6	2.3 \pm 0.6	3.81 \pm 0.37	3.69 \pm 0.57	8.85 \pm 0.36	7.90 \pm 1.16

¹Data were drawn from reference 1.

平成 16 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究
主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

II. 主任研究者の報告書

13. 幼児の尿中ビタミン排泄量

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

水溶性ビタミンの 1 歳以上の食事摂取基準は成人の推定平均必要量からの外挿で算出されている。この方法が妥当かどうかの検証の 1 つとして 3~5 歳の幼児の 24 時間尿中の水溶性ビタミンの排泄量を測定した。

A. 目的

成人の食事摂取基準(1)の外挿により算出している年齢層のうち、3~5歳の幼児に関して、陰膳法による食事調査と同日の24時間尿の採取を行い、食事中的水溶性ビタミン量と尿中の水溶性ビタミン排泄量を測定し、その関係を明らかにし、外挿による算出が妥当かどうかの検証を行うことを最終目的として本研究を開始した。

平成16年度は、解析ができた尿中の水溶性ビタミン含量について報告する。

B. 実験方法

1. 被験者

3~5歳の幼児を持つ母親に調査の目的を説明し、協力の了解を得られた9名で、全員5歳であった。被験者は9名(男4名;女5名)で年齢は5歳であった。身長は 107.5 ± 3.9 cm(平均 \pm SEM)、体重は 17.7 ± 1.1 kgであった。男女の区別はしなかった。

2. 食事調査と尿採取

食事は、調査日の起床後から就寝前までに被験者が口にした食物と全く同じ物を食事ごとにフリーザーバックに入れ、明朝の回収まで各家庭の冷蔵庫で保管した。同時に食事記録用紙に食事の内容と時刻を記録した。尿は、調査日の起床すぐの尿は捨て、第2回目の尿から次の日の起床後すぐの第1回目の尿までを遮光のボトルに集め、氷と蓄冷材詰めのコOLERボックスに、回収まで保管した。

回収後直ちに食事は、記録用紙と照らし合わせながら分類し直し、汁気の多い物は液体と固体に分け、 -20°C で冷凍保存した。24時間尿は、尿量を測定した後、分注し、ビタミンごとに処理を行い、分析まで -20°C で冷凍保存した。

3. 分析

尿中のビタミン B_1 、ビタミン B_2 、ビタミン B_6 の異化代謝産物である4-ピリドキシン酸(4-PIC)、ニコチンアミドの異化代謝産物である N^1 -メチルニコチンアミド(MNA)、 N^1 -メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド(2-Py)、 N^1 -メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド(4-Py)、ビタミン B_{12} 、葉酸、パントテン酸、ビオチンおよびビタミンCの測定は、平成15年度厚生労働科学研究費補助金、効果的医療技術の確立推進臨床研究事

業、日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究、平成15年度 総括・分担研究報告書、主任研究者 柴田克己、平成16(2004)年4月(2)に記載されている方法にしたがって測定した。

C. 結果と考察

表1に5歳児の水溶性ビタミン排泄量を示した。今回は、摂取量を解析していないので、仮に3~5歳児の水溶性ビタミンの推奨量あるいは目安量を摂取したと仮定した場合の排泄率を計算した。比較として、平成14年3月に行った介入試験である女子学生を被験者とした時の値を示した(3)。排泄率を若年成人女子と幼児間で比較してみると、一言で言えば、いずれのビタミンにおいても顕著な差異は認められなかった。若干の差異が認められたのは、ビタミン B_1 とビオチンとビタミンCであった。幼児の摂取量はあくまでも推定値であるため、今回は参考程度としておきたい。若年成人でも幼児でも葉酸の尿中排泄割合が他の水溶性ビタミンに比して低いのは、葉酸の異化代謝産物であるアセトアミドベンゾイルグルタミン酸が尿中の主要な葉酸異化代謝産物である(4)ことに起因しているものと思われる。この異化代謝産物の測定方法の開発が必要である。

表2には各水溶性ビタミンの平均値 \pm SD、最低値、最高値、中央値を示した。また、図1には尿中排泄量の分布図を示した。ビタミン B_2 の尿中排泄量の分布は、最低値が16 nmol/day、最高値が611 nmol/dayと非常に幅が広がった。ビタミン B_{12} (10→148 pmol/day)もビタミンC(14→348 μ mol/day)も幅が広がった。

被験者は、地元の地域活動栄養士会に所属する、3~5歳の幼児を持つ母親に呼びかけ、最終的に採尿がうまくできた幼児が9名であった。実際の実施者である母親は栄養士ということもあり、調査の目的を良く理解し、協力的であった。調査日は、1日分の尿を採取するために、必然的に幼稚園、保育園に通園していない休日に限定された。あらかじめ調査日を設定していても、対象の幼児が急に体調を崩すことがあり、サンプル採取を中止したこともあった。尿採取の条件としてはおむつが外れている、尿意

を伝えることができる，日中および就寝時にお漏らしをしないなどが要求された．幼児の24時間尿の採取は，想像以上に難しかった．しかし，試料採取を今後もつづけ，外挿法の妥当性を確認したい．

D. 健康危機情報

特記する情報なし

E. 研究発表

1. 発表論文
なし
2. 学会発表
なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許予定
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

G. 引用文献

1. 日本人の食事摂取基準（2005年版），厚生労働省
2. 平成15年度厚生労働科学研究費補助金，効果的医療技術の確立推進臨床研究事業，日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究，平成15年度総括・分担研究報告書，主任研究者 柴田克己，平成16（2004）年4月．
3. 厚生労働科学研究費補助金，効果的医療技術の確立推進臨床研究事業，日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究，平成14年度総括・分担研究報告書，主任研究者 柴田克己，平成15（2003）年4月．
4. McPartlin J, Halligan A, Scott JM, Darling M, Weir DG, (1993) Accelerated folate breakdown in pregnancy. *Lancet* 341:148-149.

表1. 5歳児の水溶性ビタミン排泄量と18~29歳女性の水溶性ビタミン排泄量との比較

ビタミン名	18~29歳女性 ビタミン摂取 量* ¹	同排泄 量	同排泄 率 (%)	推定摂取量 * ²	3~5歳排泄 量	同排泄 率 (%)
ビタミンB ₁ (チアミン塩 酸塩)	2668 nmol/d	503 nmol/d	18.9	2075 nmol/d	657 nmol/d	31.7
ビタミンB ₂ (リボフラビ ン)	2656 nmol/d	957 nmol/d	36.0	2125 nmol/d	349 nmol/d	16.4
ナイアシン (ニコチンア ミド異化代謝 産物排泄量)	106 μmol/d	83 μmol/d	78.0	61 μmol/d	50 μmol/d	82.0
ビタミンB ₆ (4-PIC 排泄 量)	7.3 μmol/d	3.33 μmol/d	45.6	3.55 μmol/d	1.97 μmol/d	55.5
葉酸	453 nmol	22.7 nmol/d	5.0	249 nmol/d	8.99 nmol/d	3.6
ビタミンB ₁₂	1771 pmol/d	150 pmol/d	8.5	812 pmol/d	84 pmol/d	10.3
パントテン酸	26 μmol/d	18.2 μmol/d	71.1	20.5 μmol/d	14 μmol/d	68.3
ビオチン	123 nmol/d	83.2 nmol/d	67.8	102.3 nmol/d	39.8 nmol/d	38.9
ビタミンC	567 μmol/d	24.7 μmol/d	24.7	256 μmol/d	174 μmol/d	68.0

*¹ 「厚生労働科学研究費補助金，効果的医療技術の確立推進臨床研究事業，日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究，平成14年度 総括・分担研究報告，主任研究者 柴田克己，平成15（2003）年4月」より引用。

*² 3~5歳の水溶性ビタミンの推奨量あるいは目安量を推定摂取量と仮定した。男女で異なる場合は，平均値とした。

表 2. 幼児の尿中への水溶性ビタミン排泄量

幼児 (n = 9)	Mean	SD	Minimum	Maximum	Median
Thiamin (nmol/day)	657	297	302	1065	732
Riboflavin (nmol/day)	349	168	16	611	303
Cyanocobalamin (pmol/day)	84	45	10	148	83
Sum (MNA+2-Py;4-Py) (μ mol/day)	50	18	22	72	43
Pantothenic acid (μ mol/day)	14.0	5.1	7.1	22.2	13.8
Folates (nmol/day)	8.99	3.81	3.77	17.91	8.32
Biotin (pmol/day)	39.8	17.1	22.9	64.7	34.4
Ascorbic acid (μ mol/day)	174	120	14	348	186

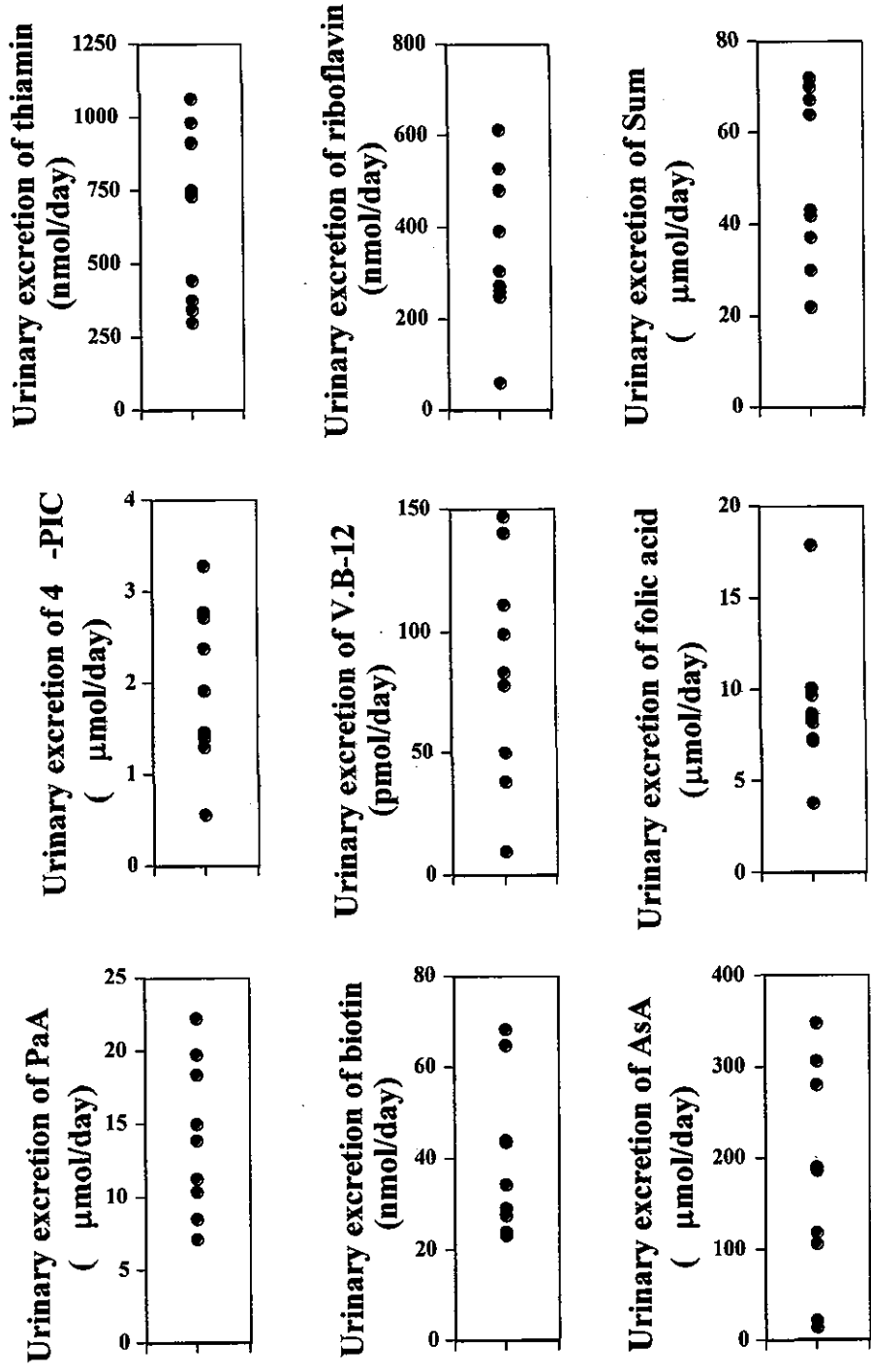


図1. 5歳児の24時間尿中への水溶性ビタミン排泄量

平成 16 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究
主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

Ⅲ. 分担研究者の報告書

1. トリプトファン-NAD変換系の分子生物学的解析

分担研究者 福岡伸一 青山学院大学理工学部 教授

研究要旨

食餌性NADの必要量を決定するためには、トリプトファンから変換されて合成される内的なNADの変換効率を正確に知り、これを差し引いた上で策定する必要がある。これまでになされた多数の研究から変換効率が推定されているが、いずれも直接的な方法ではない。ここでは分子生物学的な方法によって、トリプトファンからNADが変換される代謝経路（de novo 合成系）の鍵酵素であるキノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ（QPRT）遺伝子を人為的に欠損させたマウス（QPRTノックアウトマウス）を作出することを試みた。内的なNAD変換をゼロにしたこの動物モデルは食餌性NAD必要量の決定に重要な知見を提供できる。今年度は、マウスQPRT遺伝子の解析、ノックアウトコンストラクトの作成、組み換えES細胞の選抜およびキメラマウス作成を行った。

A. 目的

食餌性 NAD の必要量を決定するためには、トリプトファンから変換されて合成される内的な NAD の変換効率を正確に把握し、これを差し引いた上で策定する必要がある。これまでになされた多数の研究から変換効率は推定されているものの、いずれも直接的な方法ではない。正確な食餌性 NAD の必要量を明らかにするためには、トリプトファンから NAD に変換する経路 (de novo 合成系) を完全に遮断した上で、食餌性 NAD のみの寄与を測定することが重要であると考えた。その de novo 合成系の律速酵素として機能しているのが QPRT (キノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ; EC2.4.2.19) である。QPRT は、de novo 合成系においてキノリン酸から NaMN (ニコチンアミドモノヌクレオチド) に変換する反応を触媒している。ヒト¹⁾において、QPRT の一次構造が明らかにされ、297 のアミノ酸からなり、肝臓、腎臓、そして脳に局在することが確認されている。また、マウスでの脳における QPRT 遺伝子発現量及び QPRT 活性は、ともに肝臓の 1%未満とされている²⁾。本研究では、内的 NAD 変換を遮断する目的で QPRT 遺伝子を人為的に欠損させたマウス (QPRT ノックアウトマウス) を作出することを試みた。今年度は、マウス QPRT 遺伝子の解析、ノックアウトコンストラクトの作成、組み換え ES 細胞の選抜およびキメラマウス作成を実施するとともに、ジェノタイプング法による遺伝子型解析法を確立した。

B. 研究方法

マウス QPRT ゲノム解析

シーケンシングによって決定したマウス QPRT 遺伝子の cDNA 配列をアミノ酸配列に変換し、エキソンの分岐位置を推定した。次に、イントロン部分の解析を行うために各エキソン上にプライマーを設計し、ICR マウスのゲノム DNA をテンプレートに LA PCR を行った。PCR は LA Taq (TaKaRa) を使用し、94°C 1 分の熱変性の後、98°C 20 秒、68°C 20 分を 30 サイクル、72°C で 10 分間反応させた。PCR 増幅産物を電気泳動で確認した後、検出したバンドについて SUPREC-01 (TaKaRa) を用いて精製し、各エ

キソンプライマーでシーケンス解析を行った。解析により決定した塩基配列を基に新たにプライマーを作製し、順次シーケンシングを繰り返すことによってイントロン部分の解析を行った。

QPRT 遺伝子ターゲティングベクターの構築

QPRT 遺伝子ターゲティングベクターの 5' 相同領域のゲノム DNA フラグメントをクローニングするために、このゲノム DNA をもとに PCR プライマーを設定した。ターゲティングを受けた QPRT 遺伝子座からのタンパク質合成がエキソン 1 でストップするように、リバースプライマーにインフレームの翻訳停止コドンを導入した。このプライマーの組み合わせで、マウス ES 細胞から調製したゲノム DNA をテンプレートにして、LA Taq (TaKaRa) を用いて 5' 相同領域のゲノム DNA フラグメントを増幅した。その PCR 産物を TA クローニングベクター (pGEM-T Easy, Promega) にサブクローニングし、シーケンス解析を行って目的のゲノム DNA であることを確認した。

一方、ターゲティングベクターの 3' 相同領域は 129 系マウスの QPRT 遺伝子、エキソン 4 を含む 4.3 kb のゲノム DNA クローンを使用した。

制限酵素を用いてこれらのプラスミドクローンから 3' および 5' 相同領域のゲノム DNA フラグメントを切り出して、1% アガロースゲル電気泳動によりベクターと分離させ、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて相同領域の DNA フラグメントをそれぞれ精製した。これらの DNA フラグメントを順次、PGK- β -geo フラグメント、および MC1-diphtheriatoxin A 遺伝子を持つプラスミドベクターにサブクローニングし、QPRT 遺伝子ターゲティングベクターを構築した。

ES 細胞への QPRT 遺伝子ターゲティングベクターの導入と G418 耐性株の樹立

QPRT 遺伝子ターゲティングベクターを QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN) を用いて精製し、Kpn I により直鎖状にしたものを ES 細胞への導入に用いた。不活性化処理したマウス胎児繊維芽細胞をフィーダー細胞にして、129Sv/J マウス由来 ES 細胞 (Genome Systems) および、129Sv マウス由来 ES 細胞

(Cell & Molecular Technologies)を培養した。1.0×10⁷個のES細胞をエレクトロポレーションバッファー500 µlに懸濁し、40 µgの直鎖にしたQPRT遺伝子ターゲティングベクターを加えて、室温で5分間インキュベートした。その後、0.4 cmのギャップのジーンパルサーキューベット (BIO-RAD)にES細胞懸濁液を加え、ジーンパルサーII (BIO-RAD)を用いて、電圧240V、キャパシタンス500 µFでエレクトロポレーションを行った。PGK/Neo遺伝子のトランスジェニックマウス由来の胎児繊維芽細胞をフィーダー細胞にして、40~60%の生存率のES細胞を一晩培養し、その後は250 µg/mlのG418を含む培地を1日2回ずつ交換しながら7日間培養した。これらのコロニーをピックアップして培養することにより、ターゲティングベクターが導入されたES細胞をクローニングした。これらのES細胞株を凍結保存するとともに、さらにフィーダー細胞の上に継代して増殖させ、それぞれの細胞株からゲノムDNAを抽出しG418耐性ES細胞株のサザンおよびPCRスクリーニングを行い、ターゲティングを受けたQPRT遺伝子座を持つ細胞株を選択した。

キメラマウスの作製

ES細胞を回収して4°Cで1時間以上冷却した後、ピエゾマニピュレーターを用いてC57BL/6N系統マウス(日本チャールズリバー)の子宮に移植した。分娩後3週を過ぎた時点で得られた産子を離乳させ、ES細胞を注入した宿主胚であるC57BL/6N系統マウスの黒毛とは異なった毛色、あるいは毛色が混ざった産子をキメラマウスと同定した。さらに、毛色におけるその混合率を判定して、ES細胞のキメラマウス個体に対する寄与率を評価した。

ジェノタイプピング法の確立

まず、QPRT遺伝子検出用プライマー7種類及びネオマイシン耐性遺伝子配列(neo)特異的プライマー6種類を設計した。ICRマウスならびにGP-2ノックアウトマウスのヘテロ型から抽出したゲノム溶液を約25 µg/□になるようにTEで希釈した。PCR1反応あたり、Ex taqTM (5 U/µl TaKaRa 京都)を0.25 µl、10×Ex taqTM buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 % Tween 20, 0.5 %

Nonident P-40, 50 % Glycerol TaKaRa 京都)を5 µl, dNTP (各2.5 mM TaKaRa 京都)を4 µl, senseプライマー (20 µM)とanti-senseプライマー(20 µM)それぞれ1 µl, ゲノム溶液(約25 µg/µl)を2 µl, MilliQを36.75 µlそれぞれを混ぜ、計50 µlとした。その際、QPRTaseプライマーの条件検討に関しては、ICRマウスから抽出したゲノム溶液を利用した。またneoプライマーの条件検討に関しては、GP-2ノックアウトマウスから抽出したゲノム溶液を利用した。調製したPCR溶液を用いてPCRを行なった。PCR条件は94 °C 30秒を1サイクル後、94 °C 30秒, 65 °C 30秒, 72 °C 30秒を計35サイクル行なった。PCR産物を4%アガロースゲルにて電気泳動を行なった。このPCR条件で数本のバンドが見られたプライマーセットについて、同じ組成のPCR溶液を用いてアニーリング温度を65 °Cから70 °Cの間で変化させ、PCRを行ない最適条件を導いた。

C. 結果

マウスQPRTゲノム解析

マウスQPRTゲノム解析を行った結果、4つのエクソンからなることが判明した。また、マウスゲノムプロジェクトで公開されているゲノム配列と比較した結果、マウスQPRT遺伝子は、マウス7番染色体F4領域の存在していることが明らかになった(図1)。それらの領域の全シーケンスを解明した。

ターゲティングベクターの作製とキメラマウスの作出

これらの解析結果をもとに、QPRT遺伝子のエクソン2から3の領域をβ-galactosidase/Neomycin phosphotransferase遺伝子と組み換えたジーンターゲティングベクターを構築した(図2)。このターゲティングベクターをES細胞に導入し、サザン解析、ゲノムPCRによるスクリーニングを行い、変異型ES細胞クローンを確立した。以降、上記方法に記載したごとくキメラマウスを作製した結果、計14匹のキメラマウスが産まれ、そのうち3匹がES細胞の寄与率が高かった。

ジェノタイプピング法の確立

QPRT遺伝子検出用プライマー7種類を

設計し (表 1), ジェノタイピングの条件検討を行った。その結果, S1×AS1, S2×AS1, S4×AS3 のプライマーセットにおいて, 初期に設定した。PCR 条件 (94 °C 30 秒を 1 サイクル後, 94 °C 30 秒, 65 °C 30 秒, 72 °C 30 秒を計 35 サイクル) で特異的バンド以外に非特異的なバンドも見られた。それ以外のプライマーセットにおいては特異的なバンドのみが検出された。非特異的なバンドが検出された 3 つのプライマーセットにおいてアニーリング温度を 65 °C から 70 °C に変化させた PCR 条件で PCR を行なった。しかし, アニーリング温度を変化させても 3 つのプライマーセットで非特異的なバンドが見られた (図 3)。このことから 7 ペアー中 4 ペアー (S3×AS1, S1×AS2, S3×AS2, S3×AS3) が使用可能だということが判明した。

次に, ネオマイシン耐性遺伝子(neo)検出用プライマーを 6 種類設計した (表 2)。neo プライマーは設計した 6 ペアー全て目的の特異的なバンドのみが検出された (図 4)。よって neo プライマーは 6 ペアー全て使用可能だと判断した。

これら使用可能な QPRT プライマーならびに neo プライマーを組み合わせることで QPRT ノックアウトマウスの遺伝子型解析ができるかと判断した。

D. 考察

本研究は, 食餌性 NAD 必要量の決定するために, トリプトファンから NAD に変換される代謝経路 (de novo 合成系) の鍵酵素であるキノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (QPRT) 遺伝子を人為的に欠損させたマウス (QPRT ノックアウトマウス) を作出することを試みた。内的な NAD 変換を遮断したこの動物モデルは食餌性 NAD 必要量の決定に重要な知見を提供できる。今年度は, マウス QPRT 遺伝子の解析, ノックアウトコンストラクトの作成, 組み換え ES 細胞の選抜を行い, それからキメラマウスを作出し, 成功した。現在, F1 世代ヘテロミュータントマウスを鋭意作成中である。また, ノックアウトマウスを安定して供給できるシステムを構築する一環として, マウス尾部組織を用いジェノタイピングの実験系の確立を行った。この実験には, 当

研究室が既に今回と同様な方法で作出した GP2 ノックアウトマウスを用いることにより可能になった³⁾。このマウスのゲノム DNA 中には, ターゲティングベクター由来の PGK-β-geo 遺伝子配列を有しているため, ヘテロ型, ホモ型を確定する条件を見出すことが可能になる。その結果, ジェノタイピング法の条件検討が完了し, ジェノタイピングが可能になった。

E. 健康危機情報

特記する情報なし

F. 研究発表

1. 発表論文

Kobayashi K, Yanagihara K, Ishiguro K, Fukuoka S. (2004) GP2/THP gene family of self-binding, GPI-anchored proteins forms a cluster at chromosome 7F1 region in mouse genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322** 659-64.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許予定

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 引用文献

1. Fukuoka S, Nyaruhucha M, Shibata K. (1998) Characterization and functional expression of the cDNA encoding human brain quinolinate phosphoribosyltransferase. *Biochim Biophys Acta.* **1395**, 192-201.
2. Fukuoka S, Ishiguro K, Yanagihara K, Tanabe A, Egashira Y, Sanada H, Shibata K. (2002) Identification and expression of a cDNA encoding human alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-n-semialdehyde decarboxylase (ACMSD). A key enzyme for the tryptophan-niacine pathway and "quinolinate hypothesis". *J Biol Chem.* **277**, 35162-7.
3. Kobayashi K, Yanagihara K, Ishiguro K, Fukuoka S. (2004) GP2/THP gene family

of self-binding, GPI-anchored proteins
forms a cluster at chromosome 7F1 region
in mouse genome. *Biochem. Biophys. Res.
Commun.* **322** 659-64.

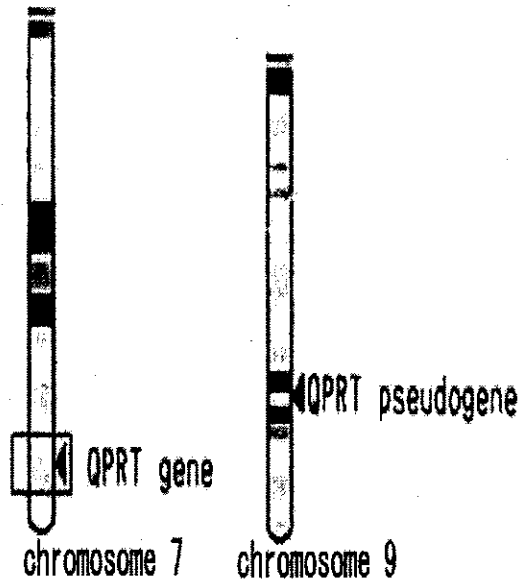


図1. マウス QPRT 遺伝子の染色体マッピング
 マウス QPRT 遺伝子 (QPRTgene) は, マウス7番染色体 F4 領域に存在していることが判明した. また, マウス9番染色体上に QPRT 偽遺伝子(QPRT pseudogene)の存在が明らかになった.

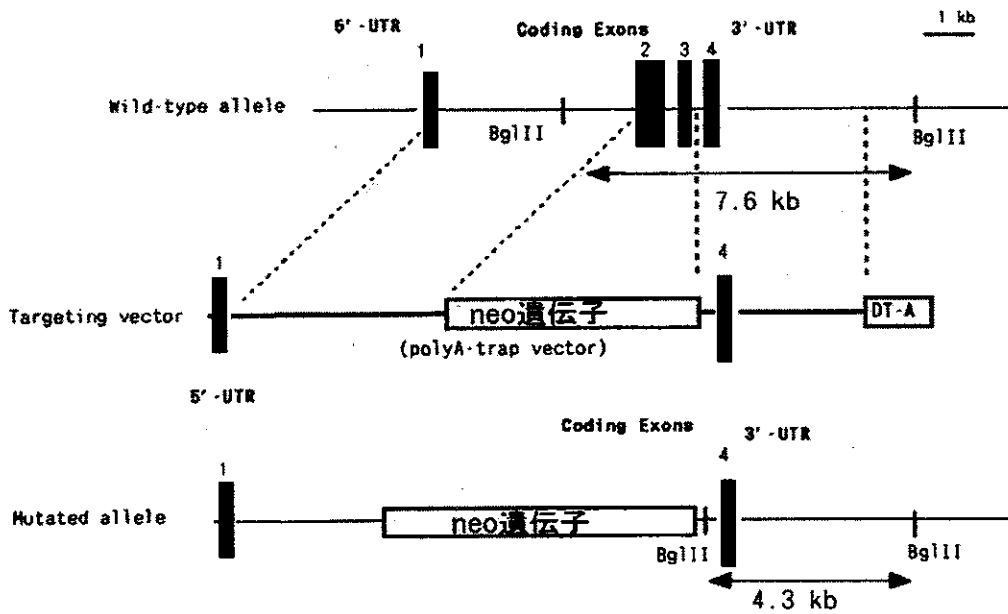


図2 マウス QPRT 遺伝子のターゲティングストラテジー