



Wild-type mouse (Cd exposure)

図26 DNAマイクロアレイによるスクヤタープロット
 (カドミウム曝露におけるメタロチオネイン-I/II欠損マウスと野生型マウスとの比較)

表4 DNAマイクロアレイによる遺伝子発現

Genes (Description)	Ratio
homolog to hypothetical 55.4 kda protein	0.5
riken cdna 2010012 10; 2010012 10rik	0.5
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5b; htr5b	0.5

MT-I/II null mice (Cd exposure) / Wild-type mice (Cd exposure) < 0.5

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告

胎生期の水銀およびカドミウム曝露による新生仔脳中遺伝子発現への
影響評価とメタロチオネインの関与に関する研究

分担研究者 佐藤雅彦 岐阜薬科大学衛生学助教授

研究協力者 本田晶子 岐阜薬科大学衛生学

研究要旨:

野生型(C57BL/6J系)マウスおよびメタロチオネイン-I/II欠損マウスを用いて、胎生期のカドミウムおよびメチル水銀曝露によって新生仔脳において発現が変動する遺伝子をDNAマイクロアレイ法並びにリアルタイムRT-PCR法により解析した。その結果、カドミウムの胎生期曝露では、野生型マウスおよびメタロチオネイン-I/II欠損マウスでTrfr [transferrin receptor] の発現が促進されることが明らかとなった。一方、メチル水銀の胎生期曝露では、両系統のマウスともにTIMP4 [tissue inhibitor of metalloproteinase] の発現が促進されることが見いだされた。従って、Trfr(カドミウム曝露で変動)あるいはTIMP4(メチル水銀曝露で変動)の発現変動は、カドミウムあるいはメチル水銀の胎生期曝露による次世代の神経行動毒性に関与する可能性が示された。

【研究目的】

これまで有害金属による健康影響としては、水俣病やイタイイタイ病などのように産業職場や環境汚染による比較的高用量の有害金属曝露によって種々の中毒症状が認められたが、今日わが国においては、産業職場や環境汚染による金属中毒はほとんど認められていない。しかしながら、その一方で、カドミウムやメチル水銀はそれぞれコメなどの食品や魚類などの食品を介し

て生涯にわたって身体に取り込まれるため、最近ではカドミウムやメチル水銀の微量長期曝露による健康影響が問題となっている。特に、胎生期における低濃度のこれらの重金属の曝露により仔に現れる健康影響が危惧されている。毒性発現が遺伝子発現の変化に伴うとすれば、胎生期の水銀およびカドミウム曝露による脳神経系の次世代への影響を評価する上で、毒性発現に関与する遺伝子を特定することは重要である。

水銀やカドミウムの毒性を修飾する因子の中でも、最もよく知られている重要な因子としてメタロチオネインが挙げられる。メタロチオネインは、金属結合タンパク質であり、生理的には亜鉛・銅を結合しているが、多くの有害金属と結合するほか、重金属をはじめとする有害化学物質、ストレスなどの因子によって誘導されることが知られている。カドミウム・水銀とも非常に親和性が高く、予めメタロチオネインを誘導しておいた動物にこれらの金属を投与すると、その毒性が著しく軽減されることから、メタロチオネインは両者と結合して、生体にとって危険な遊離型をなくすことにより、解毒剤として働くものと考えられている。近年、吉田ら[Yoshida et al., 2001]は、ヒト集団の中に、メタロチオネインが誘導されにくいサブグループがあることを見出しており、重金属などに対する感受性の個体差の少なくとも一部がこうしたメタロチオネインの誘導能の差として説明される可能性が考えられる。胎仔・新生仔期における水銀やカドミウム曝露のリスクが明確でない現在、この時期の曝露においてメタロチオネインが果たす役割についても当然明確にされていない。

そこで、本分担研究では、胎生期の水銀およびカドミウム曝露による仔マウスの神経行動毒性に関与する遺伝子を特定することを目的とする。また、個体側の感受性要因としてメタロチオネインに着目して、胎生期の水銀およびカドミウム曝露による新生仔脳における遺伝子発現に及ぼすメタロチオネインの影響を評価する。

昨年度までに、カドミウムの胎生期曝露後の新生仔脳における遺伝子発現をDNAマイクロアレイ法により解析したところ、Htr5b [5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5b] 遺伝子を含めて4種類の遺伝子がカドミウム曝露により高発現することを見いだした。本年度は、カドミウムの胎

生期曝露による新生仔脳における遺伝子発現の再現性を DNA マイクロアレイ法およびリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。さらに、吉田 稔分担研究者が実施した胎生期のメチル水銀曝露やメチル水銀および水銀蒸気の複合曝露後の仔マウス脳についても DNA マイクロアレイ法並びにリアルタイム RT-PCR 法により遺伝子発現の変動を解析した。また、胎生期の水銀およびカドミウム曝露による新生仔脳における遺伝子発現に及ぼすメタロチオネインの影響をメタロチオネイン-I/II 欠損マウスを用いて検討した。

【メタロチオネイン-I/II 欠損マウス】

遺伝子ターゲティング法によりメタロチオネインの I 型と II 型の発現を抑えたメタロチオネイン-I/II 欠損マウスは、Dr. A. Choo(オーストラリア王立小児病院マードック研究所)によって 1993 年に作製され、供与を受けた。このメタロチオネイン-I/II 欠損マウスは、129/Sv 系と C57BL/6 系の 2 系統を含んでいるが、現在では C57BL/6J マウスで 6 回戻し交配したマウスを用いている。メタロチオネイン-I/II 欠損マウスおよびその野生型マウスは、当実験動物舎遺伝子改変マウス専用飼育室で繁殖・維持している。飼育室内は、室温が $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度が $55 \pm 10\%$ に保たれ、20 時から 8 時までを暗時とする 12 時間ごとの明暗周期に設定されている。餌および水は自由摂取させている。

【実験方法】

1. DNA マイクロアレイ法およびリアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現の解析

1) カドミウム胎生期曝露

メタロチオネイン-I/II 欠損マウス(コントロール群:25 匹、カドミウム曝露群:25 匹)および野生型マウス(コントロール群:23 匹、カドミウム曝露群:23 匹)をそれぞれ雌雄番いで 1 日交配し、翌日(妊娠 1 日目)から 10 ppm のカドミウムを含む飲料水を自由に与えた。7 匹以上の仔マウスを出産した場合には、出生 1 日後(授乳 1 日目)に母マウス 1 腹につき新生仔が 6 匹になるように間引

きを行った。また、3 匹以下の仔マウスを出産した場合は、その後の実験を行わなかった。授乳 10 日目に新生仔をエーテル麻酔下で脳を摘出し、瞬時にドライアイスを用いて脳を凍結してから -80℃フリーザーで保存した。

カドミウム曝露によって新生仔脳中で発現が変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により解析し、発現量に変動が認められた遺伝子のうち一部の遺伝子についてはリアルタイム RT-PCR 法により mRNA の発現量を確認した。

2)メチル水銀胎生期曝露(授乳 10 日目の仔マウス)

動物処理については、吉田 稔分担研究者の分担研究報告書に記載されている(“胎生期における水銀蒸気とメチル水銀の複合曝露が行動に及ぼす影響”[実験方法](2)メチル水銀曝露を参照)。吉田 稔分担研究者より送られてきた新生仔脳の検体については、直ちに-80℃フリーザーで保存した。送付された新生仔脳の内訳は、野生型マウスにおいてコントロール群が雄 3 検体と雌 2 検体で、メチル水銀曝露群が雄 1 検体と雌 1 検体であり、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスにおいてコントロール群が雄 3 検体と雌 1 検体で、メチル水銀曝露群が雄 1 検体と雌 3 検体であった。メチル水銀曝露によって新生仔脳中で発現が変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により解析し、発現量に変動が認められた遺伝子のうち一部の遺伝子についてはリアルタイム RT-PCR 法により mRNA の発現量を確認した。

3)メチル水銀胎生期曝露(授乳 1 年目の仔マウス)

動物処理については、吉田 稔分担研究者の分担研究報告書に記載されている(同セクション [実験方法](2)メチル水銀曝露 を参照)。吉田 稔分担研究者より送られてきた仔マウス脳の検体については、直ちに-80℃フリーザーで保存した。送付された仔マウス脳の内訳は、野生型マウスにおいてコントロール群が雌 2 検体で、メチル水銀曝露群が雌 2 検体であり、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスにおいてコントロール群が雌 2 検体で、メチル水銀曝露群が雌 2 検体であった。メチル水銀胎生期曝露によって授乳 1 年目の仔マウス脳中で発現が変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により解析した。

4)メチル水銀および水銀蒸気複合曝露(授乳10日目の仔マウス)

動物処理については、吉田 稔分担研究者の分担研究報告書に記載されている(同セクション [実験方法](3)水銀蒸気とメチル水銀複合曝露 を参照)。吉田 稔分担研究者より送られてきた新生仔脳の検体については、直ちに-80℃フリーザーで保存した。送付された新生仔脳の内訳は、野生型マウスにおいてコントロール群が雌6検体で、メチル水銀曝露群が雌3検体であり、メタロチオネイン-I/II欠損マウスにおいてコントロール群が雌5検体で、メチル水銀曝露群が雌3検体であった。メチル水銀および水銀蒸気の複合曝露によって新生仔脳中で発現が変動する遺伝子をDNAマイクロアレイ法により解析した。

5)DNAマイクロアレイ法(二蛍光標識法による競合的ハイブリダイゼーション)

コントロール群と金属曝露群の臓器からそれぞれ Total RNA を抽出し、逆転写反応を行った。それぞれの cDNA に Cy3 または Cy5 を蛍光標識して、DNA チップ上で競合的ハイブリダイゼーションを行い、各遺伝子の発現量の差をマイクロアレイ検出器で解析した。なお、DNA チップは、マウス 10,000 遺伝子 (Old-type) あるいは 30,000 遺伝子 (New-type) からデザインしたオリゴヌクレオチドを搭載したオリゴ DNA チップ (AceGene、Mouse Oligo Chip 30K、日立ソフト) を用いた。また、ハイブリダイゼーションは当研究室所有のマイクロアレイ用自動ハイブリダイゼーション装置 (Lucidea SlidePro、Amersham) を用い、マイクロアレイ検出器は当大学共通機器のマイクロアレイスキャナ (CRBIO IIe、日立ソフト) を使用した。

DNA マイクロアレイの解析は global normalization 法により行い、コントロール群と比べて2倍以上の増減を示したものを変動遺伝子の候補とした。また、発現量 (Fluorescence intensity signal) の低い遺伝子については、DNA マイクロアレイの信頼性が低いため、変動遺伝子の候補から除外した。

マイクロアレイ解析は、以下に示すような群間比較を行った。

5-1)カドミウム曝露:

- ①コントロール群(メタロチオネイン-I/II 欠損マウス)/コントロール群(野生型マウス)
- ②カドミウム曝露群(野生型マウス)/コントロール群(野生型マウス)
- ③カドミウム曝露群(メタロチオネイン-I/II 欠損マウス)/コントロール群(メタロチオネイン-I/II 欠損マウス)
- ④カドミウム曝露群(メタロチオネイン-I/II 欠損マウス)/カドミウム曝露群(野生型マウス)

オリゴ DNA チップは 10,000 遺伝子チップを用いた。また、同一母体から出生した新生仔脳をプールし、さらに母体ごとにプールした新生仔脳を 1 検体にプールして DNA マイクロアレイ解析を行った。

5-2)メチル水銀曝露(授乳 10 日目の仔マウス):

- ①メチル水銀曝露群(野生型マウス)/コントロール群(野生型マウス)
- ②メチル水銀曝露群(メタロチオネイン-I/II 欠損マウス)/コントロール群(メタロチオネイン-I/II 欠損マウス)

オリゴ DNA チップは 10,000 遺伝子チップを用いた。また、新生仔脳を群ごとに 1 検体にプールして DNA マイクロアレイ解析を行った。

5-3)メチル水銀胎生期曝露(授乳 1 年目の仔マウス):

- ①メチル水銀曝露群(野生型マウス)/コントロール群(野生型マウス)
- ②メチル水銀曝露群(メタロチオネイン-I/II 欠損マウス)/コントロール群(メタロチオネイン-I/II 欠損マウス)

オリゴ DNA チップは 30,000 遺伝子チップを用いた。また、仔マウス脳を群ごとに 1 検体にプールして DNA マイクロアレイ解析を行った。

5-4)メチル水銀および水銀蒸気複合曝露(授乳10日目の仔マウス):

①メチル水銀&水銀蒸気複合曝露群(野生型マウス)/コントロール群(野生型マウス)

②メチル水銀&水銀蒸気複合曝露群(メタロチオネイン-I/II欠損マウス)/コントロール群(メタロチオネイン-I/II欠損マウス)

オリゴDNAチップは30,000遺伝子チップを用いた。また、新生仔脳を群ごとに1検体にプールしてDNAマイクロアレイ解析を行った。

マイクロアレイフローチャート

<操作の流れ>

total RNA の抽出

↓

cDNA の作製

↓

CyDye 標識プローブの作製

↓

ハイブリダイゼーション:Lucidea SlidePro (Amersham Biosciences)

↓

画像の取込み:CRBIO™IIe (日立ソフトエンジニアリング)

↓

画像解析:DNASIS Array (日立ソフトエンジニアリング)

【RNA の抽出】

SV Total RNA Isolation System を用いて RNA を抽出

(Cy3 標識用 RNA = Cy5 標識用 RNA = 約 90 μg)

【RNA エタノール沈澱】

RNA90 μg 相当を含む溶液

↓ + サンプル 1/10 量 3 M 酢酸ナトリウム、2.5 倍量 100% エタノール

-80°C、20 分冷却

↓ 20000 x g (4°C)、60 分遠心

上清を除く

↓ + 1 mL 80% エタノール

↓ 15000 x g (4°C)、10 分遠心

上清を除き、室温乾燥

【逆転写反応】

total RNA + DW = 27 μL

↓ + 4 μL Oligo (dT) 12-18 Primer

70°C、10 分加熱

↓

氷上 5 分

↓ + 12 μL 5 × First-Strand Buffer

↓ + 6 μL 0.1 M DTT

↓ + 6 μL dNTPmix *

↓ + 1 μL 40 U RNase Inhibiter

42°C、2 分加熱

↓ + 4 μL Super Script II™ Reverse Transcriptase

42°C、60 - 90 分加熱

↓ +10 μ L 0.5 M EDTA

↓ +20 μ L 1 N NaOH

70°C、20 分加熱

↓ +24 μ L 1 N HCl

cDNA の精製へ

*dNTPmix

100 mM dATP 5 μ L

100 mM dGTP 5 μ L

100 mM dCTP 5 μ L

100 mM dTTP 3 μ L

50 mM Aminoallyl-dUTP 4 μ L

DW 78 μ L

total 100 μ L

【cDNA の精製】

調整した cDNA を QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製

(ただし、cDNA の溶出には 130 μ L の DW を用いた)

【cDNA エタノール沈澱】

精製 cDNA を含む溶液

↓ +サンプルの 1/10 量 3 M 酢酸ナトリウム、グリコーゲン (2.5 μ g/100mL サ
ンプル溶液)、2.5 倍量 100% エタノール

-80°C, 20 分冷却

↓ 20000 x g (4°C)、60 分遠心

上清を除く

↓ +250 μL 70% エタノール

↓ 15000 x g (4°C)、10 分遠心

上清を除き、室温乾燥

【カップリング反応】

cDNA

↓ +9 μL 0.2 M *Sodium Bicarbonate buffer

↓ +1 μL CyDye

↓ 遮光しながら、40°C, 1 時間加熱

↓ +45 μL DW

マイクロバイオスピнкаラム P30 により標識された cDNA を精製

↓

Cy3 標識用 cDNA と Cy5 標識用 cDNA をまとめる

↓ +10 μL 5 × Competitor

cDNA エタノール沈殿へ

[*0.2 M Sodium Bicarbonate buffer]

(1) NaHCO₃ 1.68 g を 100 mL の H₂O に溶解する

(2) Na₂CO₃ 2.12 g を 100 mL の H₂O に溶解する

(3) 1 に 2 に加えながら pH 9.0 に調整する

(4) フィルターろ過し (0.22 μm)、適量に分注する (-20°C 保存)。

【cDNA エタノール沈澱 (5、cDNA エタノール沈澱参照)】

【ハイブリダイゼーション】

20 x SSC	50 μ L
10% SDS	10 μ L
50 x Denhardt's solution	16 μ L
Hybridization solution	40 μ L
DW	<u>62 μL</u>
計	178 μ L (ターゲット溶液)

標識したサンプルにターゲット溶液を加える

↓ サンプル+ターゲット溶液を 95°C で 2 分加熱後、遠心 (4°C) により冷ます

サンプル+ターゲット溶液	178 μ L
salmon sperm DNA (10 mg/mL)	2 μ L
formamide	<u>20 μL</u>

計 200 μ L

↓

16 時間ハイブリダイゼーション

↓

洗浄

↓

乾燥

6)リアルタイム RT-PCR 法

6-1)カドミウム曝露

DNA マイクロアレイ解析によって発現量に変動が認められた遺伝子のうち、Trfr [transferrin receptor]、Itgb4 [integrin beta 4 subunit]、Sema5a [sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (tm) and short cytoplasmic domain]、Sep15 [15-kda selenoprotein]、Akt1s1 [matrix protein (ma), p15 containing protein data source: pfam, source key: pf01140, evidence: iss putative]、Def8 [expressed sequence ai449518]、Hmg20b [high mobility group protein 20 b]、Nfat5 [nuclear factor of activated t-cells 5]および Htr5b [5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5b]の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。

なお、母体ごとにプールした新生仔脳を 1 検体として、母体数 n=4-5 でリアルタイム RT-PCR 解析を行った。

6-2)メチル水銀曝露(授乳 10 日目の仔マウス)

DNA マイクロアレイ解析によって発現量に変動が認められた遺伝子のうち、Akt1s1、RPS12 [ribosomal protein s12]、PLP [6.8 kda mitochondrial proteolipid]、RPS20 [ribosomal protein s20]、RPL38 [ribosomal protein L38]、Nme2 [expressed in non-metastatic cells 2, protein (nm23b)]、Cox7b [cytochrome C oxidase subunit VIIb]、Xist [nuclear-localized inactive X-specific transcript]および TIMP4 [tissue inhibitor of metalloproteinase 4]の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。

なお、群ごとにプールした新生仔脳を 1 検体とし、n=1 でリアルタイム RT-PCR 解析を行った。

リアルタイム RT-PCR フローチャート

RNA 抽出 (1 μ g) \rightarrow cDNA \rightarrow

PCR 反応

SYBR Green Supermix	25	μL	熱変性	95°C 3分
Template cDNA	2	μL	熱変性	95°C 15秒
Primer (forward- 250 nM)	2.5	μL	アニーリング+伸長反応	1分
Primer (reverse- 250 nM)	2.5	μL	40 サイクル	
Water	18	μL	↓	
Total volume	50	μL	融解曲線分析	

2. 行動影響評価のための胎生期カドミウム経口曝露仔マウスの作製

胎生期および授乳期におけるカドミウム(10 ppm)経口曝露後の仔マウスの行動影響評価の再現性を確認するために、マウスにカドミウム(10 ppm)の妊娠期および授乳 10 日間経口曝露を実施した。

メタロチオネイン-I/II 欠損マウス(コントロール群:23 匹、カドミウム曝露群:40 匹)および野生型マウス(コントロール群:21 匹、カドミウム曝露群:40 匹)をそれぞれ雌雄番いで1日交配し、翌日(妊娠1日目)から 10 ppm のカドミウムを含む飲料水を自由に与えた。7 匹以上の仔マウスを出産した場合には、出生 1 日後(授乳 1 日目)に母マウス 1 腹につき新生仔が 6 匹になるように間引きを行った。また、3 匹以下の仔マウスを出産した場合は、その後の実験を行わなかった。授乳 10 日目にカドミウム含有飲料水を蒸留水に交換して飼育した。

仔マウスの行動影響評価を行うため、出生 7 週後に 1 腹につき雌雄それぞれ 1-2 匹の仔マウスを東京大学へ搬送した。

[結果]

1. カドミウム胎生期曝露

1) マウスの出産割合

メタロチオネイン-I/II 欠損マウス(コントロール群:25 匹、カドミウム曝露群:25 匹)および野生型マウス(コントロール群:23 匹、カドミウム曝露群:23 匹)をそれぞれ雌雄番いで1日交配した結果、4 匹以上の仔マウスを出産したマウスは、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスのコントロール群で 25 匹中 5 匹、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスのカドミウム曝露群で 25 匹中 5 匹、野生型マウスのコントロール群で 23 匹中 5 匹、野生型マウスのカドミウム曝露群で 23 匹中 4 匹であった。

2)DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現の解析

野生型マウスとメタロチオネイン-I/II 欠損マウスのコントロール群間において新生仔脳中で変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により解析したところ、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスでは、野生型マウスと比較して約 10,000 遺伝子中 1 種の遺伝子発現が増大し、5 種の発現が減少した (Fig. 1, Table 1)。次に、カドミウム胎生期曝露によって新生仔脳中で変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により解析した。その結果、野生型マウスでは、3 種の遺伝子発現が増大し、1 種の発現が減少した (Fig. 2, Table 2)。メタロチオネイン-I/II 欠損マウスでは、発現が増大した遺伝子は認められず、3 種の遺伝子発現が減少した (Fig. 3, Table 3)。また、野生型マウスとメタロチオネイン-I/II 欠損マウスのカドミウム曝露群間において新生仔脳中で変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により解析したところ、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスでは、野生型マウスと比較して発現が増大した遺伝子は認められず、19 種の遺伝子発現が減少した (Fig. 4, Table 4)。なお、上記 DNA マイクロアレイ解析の結果において、新生仔脳中で 5 倍以上の増減を示した遺伝子は認められなかった (Figs. 1-4)。

3)リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現の解析

カドミウムを胎生期曝露した野生型マウスの新生仔脳において、DNA マイクロアレイ解析によって発現量に変動が認められた 4 種の遺伝子 (Trfr, Itgb4, Sema5a, Sep15) の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、新生仔脳中 Trfr の mRNA 量は、カドミウム曝露

によって野生型マウスおよびメタロチオネイン-I/II 欠損マウスともに有意に増加した (Fig. 5)。また、Itgb4、Sema5a および Sep15 の mRNA 量については、両系統のマウスともにカドミウム曝露による有意な変動は認められなかった (Figs. 5 and 6)。

次に、カドミウムを胎生期曝露したメタロチオネイン-I/II 欠損マウスの新生仔脳において、DNA マイクロアレイ解析によって発現量に変動が認められた 3 種の遺伝子のうち Akt1s1 と Def8 の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、両遺伝子の mRNA 量は、野生型マウスおよびメタロチオネイン-I/II 欠損マウスともにカドミウム曝露によって有意な変動は認められなかった (Fig. 7)。

また、野生型マウスとメタロチオネイン-I/II 欠損マウスのカドミウム曝露群間において、DNA マイクロアレイ解析によって新生仔脳で発現量に変動が認められた 19 種の遺伝子のうち Hmg20b、Nfat5 および Htr5b の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、3 遺伝子の mRNA 量は、野生型マウスおよびメタロチオネイン-I/II 欠損マウスともにカドミウム曝露によって有意な変動は認められなかった (Figs. 8 and 9)。しかも、野生型マウスとメタロチオネイン-I/II 欠損マウスのカドミウム曝露群間においても 3 遺伝子の mRNA 量に有意な差は認められなかった (Figs. 8 and 9)。

2. メチル水銀曝露 (授乳 10 日目の仔マウス)

1) DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現の解析

メチル水銀の胎生期曝露によって新生仔脳中で変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により解析したところ、野生型マウスでは、約 10,000 遺伝子中発現が増大した遺伝子は認められず、9 種の遺伝子発現が減少した (Fig. 10, Table 5)。メタロチオネイン-I/II 欠損マウスでは、2 種の遺伝子発現が増大し、発現が減少した遺伝子は認められなかった (Fig. 10, Table 6)。なお、メチル水銀の胎生期曝露によって新生仔脳中で 5 倍以上の増減を示した遺伝子は、両系統のマウス共に認められなかった (Fig. 10)。

2)リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現の解析

メチル水銀を胎生期曝露した野生型マウスの新生仔脳において、DNA マイクロアレイ解析によって発現量が減少した遺伝子のうち、Akt1s1、RPS12、PLP、RPS20、RPL38、Nme2 および Cox7b の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、野生型マウスでは、Nme2 を除く 6 遺伝子の mRNA 量がメチル水銀曝露によって減少傾向を示した (Figs. 11-14)。一方、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスでは、RPS12、PLP、RPL38 および Cox7b の 4 遺伝子の mRNA 量がメチル水銀曝露によって増加傾向を示した (Figs. 11-14)。なお、Akt1s1 および Nme2 の mRNA 量は、メチル水銀曝露による差はほとんど認められなかった (Figs. 11 and 13)。

また、メチル水銀を胎生期曝露したメタロチオネイン-I/II 欠損マウスの新生仔脳において、DNA マイクロアレイ解析によって発現量が増大した 2 種の遺伝子 (Xist, TIMP4) の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスでは、両遺伝子の mRNA 量はともにメチル水銀曝露によって増加傾向を示した (Fig. 15)。一方、野生型マウスでは、メチル水銀曝露によって Xist の mRNA 量には変化が認められなかったが、TIMP4 の mRNA 量は増加傾向を示した (Fig. 15)。

3. メチル水銀胎生期曝露(授乳 1 年目の仔マウス)

1)DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現の解析

メチル水銀の胎生期曝露によって授乳後 1 年目の仔マウス脳中で変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により解析したところ、野生型マウスおよびメタロチオネイン-I/II 欠損マウスともに、約 30,000 遺伝子中発現が増減した遺伝子は認められなかった (Fig. 16)。

4. メチル水銀および水銀蒸気複合曝露(授乳 10 日目の仔マウス)

1)DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現の解析

メチル水銀-水銀蒸気複合曝露によって新生仔脳中で変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により解析したところ、野生型マウスでは、約 30,000 遺伝子中発現が増大した遺伝子は認められず、1 種の遺伝子発現が減少した (Fig. 17, Table 7)。メタロチオネイン-I/II 欠損マウスでも、発現が増大した遺伝子は認められず、野生型マウスで認められた遺伝子とは異なる 1 種の遺伝子発現が減少した (Fig. 17, Table 8)。なお、メチル水銀-水銀蒸気複合曝露によって新生仔脳中で 5 倍以上の増減を示した遺伝子は、両系統のマウスともに認められなかった (Fig. 17)。

5. 行動影響評価のための胎生期カドミウム経口曝露仔マウスの作製

メタロチオネイン-I/II 欠損マウス(コントロール群:23 匹、カドミウム曝露群:40 匹)および野生型マウス(コントロール群:21 匹、カドミウム曝露群:40 匹)をそれぞれ雌雄番いで1日交配した結果、4 匹以上の仔マウスを出産したマウスは、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスのコントロール群で 23 匹中 6 匹、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスのカドミウム曝露群で 40 匹中 6 匹、野生型マウスのコントロール群で 21 匹中 6 匹、野生型マウスのカドミウム曝露群で 40 匹中 8 匹であった。仔マウスの行動影響評価を行うため、出生 7 週後に 1 腹につき雌雄それぞれ 1-2 匹の仔マウスを東京大学へ搬送した。

【考察】

DNA マイクロアレイ法およびリアルタイム RT-PCR 法の解析により、野生型マウス並びにメタロチオネイン-I/II 欠損マウスともにカドミウムの胎生期曝露によって新生仔脳中で Trfr の発現が促進されることが見いだされた。従って、カドミウム胎生期曝露による仔マウスの神経行動毒性に脳内の鉄の動態が関与している可能性が示された。しかしながら、カドミウム胎生期曝露による仔マウスの神経行動毒性と Trfr 遺伝子との関係は不明であり、今後、詳細な検討が必要であると思われる。一方、Ifgb4、Sema5a、Sep15、Akt1s1 および Def8 については、DNA マイクロアレイ解析ではカドミウム曝露によって発現の変動が認められたものの、リアルタイム RT-PCR 解析では

有意な差は認められなかった。また、カドミウム胎生期曝露によって新生仔脳中で変動した遺伝子について、昨年度実施した DNA マイクロアレイ解析の結果と本年度実施した DNA マイクロアレイ解析の結果を比較したところ、一致した遺伝子は認められず、再現性が得られなかった。ただし、カドミウムを曝露した野生型マウスとメタロチオネイン-I/II 欠損マウスとの比較では、昨年度の結果と本年度の結果で Hmg20b、Nfat5 および Htr5b の 3 遺伝子がともに変動した。しかしながら、リアルタイム RT-PCR 解析では、これら 3 遺伝子の mRNA 発現量には両マウス間で差は認められなかった。このように、DNA マイクロアレイ法は多数の遺伝子の発現変動をスクリーニングする手段としては良いシステムであるが、最終的にはリアルタイム RT-PCR 法やノーザンブロット法による遺伝子発現の確認が必要であると思われる。

メチル水銀を胎生期曝露した野生型マウスの新生仔脳において、Akt1s1、RPS12、PLP、RPS20、RPL38 および Cox7b の発現が抑制され、TIMP4 の発現が促進される傾向が、DNA マイクロアレイ法およびリアルタイム RT-PCR 法の解析により見いだされた。メチル水銀の胎生期曝露による野生型仔マウスの神経行動毒性とこれらの遺伝子発現の変動との関係については、今後、詳細に検討する必要があると思われる。また、メチル水銀を胎生期に曝露した野生型マウスの新生仔脳において、DNA マイクロアレイ解析によって発現量が減少した遺伝子のうち 7 種の遺伝子についてリアルタイム RT-PCR 解析を行ったところ、6 種の遺伝子が DNA マイクロアレイ解析と同様の結果を示した。従って、DNA マイクロアレイ解析とリアルタイム RT-PCR 解析とでほぼ一致した結果が得られた。一方、メチル水銀を胎生期曝露したメタロチオネイン-I/II 欠損マウスの新生仔脳では、RPS12、PLP、RPL38、Cox7b、Xist および TIMP4 の発現が促進される傾向が見いだされた。このように、胎生期メチル水銀曝露による新生仔脳での遺伝子発現において、野生型マウスとメタロチオネイン-I/II 欠損マウスとで正反対の変動を示したが、その理由については今後の課題である。なお、胎生期メチル水銀曝露実験におけるリアルタイム RT-PCR 解析は n=1 であったため、今後、検体数を増やして統計学的な解析を行う必要がある。

また、DNA マイクロアレイ解析において、胎生期のメチル水銀曝露によって新生仔脳中では数