

の培養液は 500 μ l とした。

1well に つ き 0.8 μ g の pGEM-MIP-EGFP-hGh を 50 μ l の Opti-MEM (GIBCO) でエッペンドルフチューブ溶解した。別のチューブに表 2 に示された量の Opti-MEM と Lipofectamine 200 を混和し、5 分間室温放置した。両溶液を混ぜ合わせ計 100 μ l とし、20 分間室温放置した。その後、混合液を各 well に加えて軽く揺らし、37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。5 時間後に、抗生物質の含まれた Ham's F12k medium + 10%FBS + 1% PcSM の培養液に培地交換し、再び 37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。

トランスフェクション 24 時間後、48 時間後に教育支援センターのオールインワン顕微鏡 BZ-9000 (KEYENCE) で細胞を観察した。GFP 蛍光の観察は、励起波長 470nm、吸収波長 535nm で行った。

表2 トランスフェクション条件

Well No.	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5
細胞数	4.0×10^5	2.0×10^5	1.0×10^5	0.5×10^5	0.25×10^5
Lipofectamine 2000 (μ l)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Opti-MEM (μ l)	49.2	49.2	49.2	49.2	49.2
Well No.	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5
細胞数	4.0×10^5	2.0×10^5	1.0×10^5	0.5×10^5	0.25×10^5
Lipofectamine 2000 (μ l)	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
Opti-MEM (μ l)	48.4	48.4	48.4	48.4	48.4
Well No.	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5
細胞数	4.0×10^5	2.0×10^5	1.0×10^5	0.5×10^5	0.25×10^5
Lipofectamine 2000 (μ l)	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
Opti-MEM (μ l)	47.6	47.6	47.6	47.6	47.6

細胞増殖アッセイ

pGEM-MIP-EGFP-hGH 導入によるトランスフェクション効率の検討によって 24well プレートを用いる場合 1well あたり細胞数は 4.0×10^5 , プラスミド DNA は 0.8μ g, Lipofectamine 2000 は 1.6μ l, Opti-MEM は 48.4μ l が適当であった。よって, NIT-1 に pGEM-MIP-m INFRRG-hGH を導入する場合も 24well プレートを用いて同じ条件でトランスフェクションした。

pGEM-MIP-mTyk2-hGH を導入した NIT-1 のトランスフェクション後の増殖を調べるためにコントロールとしてトランスフェクションを行っていない NIT-1, pGEM-MIP-EGFP-hGH を導入した NIT-1 の計 3 系列の NIT-1 について細胞増殖アッセイを行った。

24well プレートの 1well あたり NIT-1 を 4.0×10^5 個, Ham's F12k medium + 10%

FBS (37°C, 5%CO₂) 条件下で一晩培養した。翌日, pGEM-MIP-EGFP-hGH と pGEM-MIP-m INFRRG-hGH をそれぞれ先述した条件でトランスフェクションした。トランスフェクション 6 時間後, 24 時間後, 48 時間後, 72 時間後, 96 時間後の細胞の生存をトリパンブルー色素排泄試験で観察し, 生細胞と死細胞の細胞数をカウントし, 濃度, 生存率, 増殖率を算出した。なお n=3 で行った。

色素排泄試験の具体的な方法は, 1well あたり 300μ l のトリプシン EDTA を加え, 2 分間 37°C でインキュベートした後, 新しい培地 500μ l を加えピペッティングして細胞を剥離した。その後培養液 50μ l をとり, トリパンブルーを 50μ l と混合し, Burker-Truk 計算板に細胞含染色液を流し込み, 光学顕微鏡下で Burker-Turk 計算板の大区画 2 個に存在する細胞数を数えた。2 区画の平均細胞数 \times 希釈倍率 $\times 10^4$ 個/ml の

計算により、細胞数を求めた。

C. 結果

インスリン産生能の確認

NIT-1 にマウスのインスリン遺伝子である Ins1 および Ins2 が発現しているかを RT-PCR 法にて検索した。ネガティブコントロールとしてインスリン遺伝子を発現し

ていないとされるマウス EF 細胞を用いた。プライマーの設計は過去の論文を参考にし、各溶液の濃度およびサーマルサイクルは標準的な設定で行うと、NIT-1 に特異的に Ins1 のバンド 317bp、および Ins2 のバンド 247bp が確認できた (図 4)。

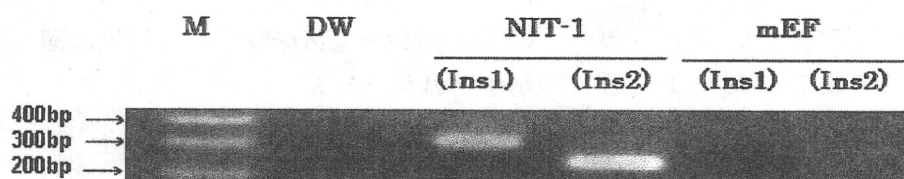
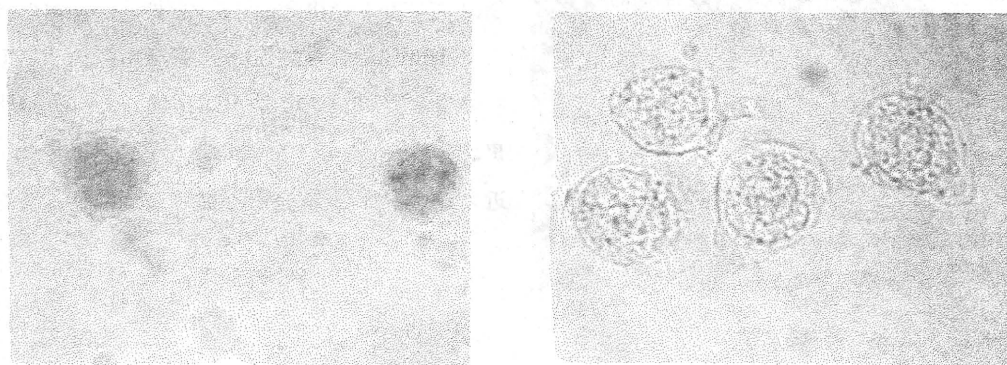


図 4 Ins1, Ins2 遺伝子の RT-PCR

サンプルは、NIT-1, mEF を用いた。培養細胞から RNA を抽出し、RT-PCR のプライマーで Ins1 遺伝子と Ins2 遺伝子を増幅し、PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動することにより RNA レベルでの発現を調

べた。Ins1 遺伝子は 317bp に、Ins2 遺伝子は 247bp にバンドが確認された。次いで、インスリン染色を行うと、NIT-1 に褐色の陽性像が見られた (図 5)。



(a) NIT-1

(b) K562

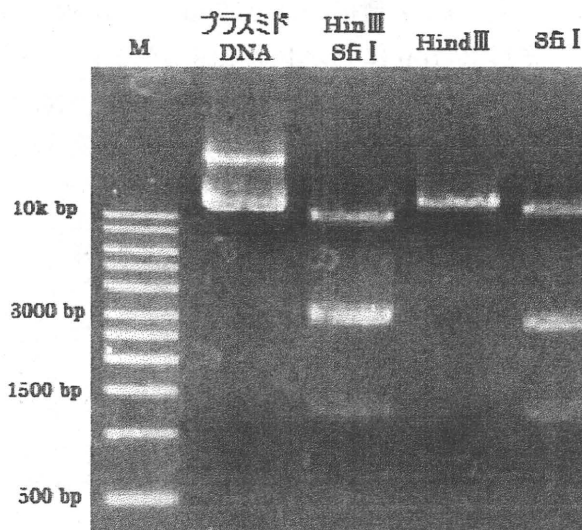
図 5 インスリン染色の結果 (光学顕微鏡×40)

サンプルは、NIT-1, K562 を用いた。細胞をサイトスピン法によって貼り付け、一次抗体にマウスインスリン抗体を用いて mouse ABC Staining System で染色し光学顕微鏡で観察した。

以上のように、RT-PCR、インスリン染色の結果から NIT-1 はインスリン遺伝子である Ins1, Ins2 遺伝子を発現し、そのメッセージである mRNA が翻訳されインスリン産生能有する膵島β細胞であることが確認できた。

プラスミド DNA の抽出およびインサート部位の確認

大腸菌 DH5 α より pGEM-MIP-EGFP-hGH および pGEM-MIP-m INFRRG ·hGH をそれぞれ抽出した後、MIP·m INFRRG-hGH がインサートされているかの確認を制限酵素によってプラスミド DNA を切断し



プラスミド DNA で 2 本のバンドが出現しているのは、プラスミド DNA には環状、直鎖状のものがあ、環状のプラスミド DNA はプラスミド DNA 本来の大きさより小さい位置にバンドが現れるためである。HindIII のみで切断した場合は切断部位が 1 箇所であるためバンドは 1 本出現している。

電気泳動して確認した。図 6 に示したインサート部分を切り出すために制限酵素は、HindIII, Sfi I を用いた。次いで電気泳動にて DNA 断片の大きさを比較するために、pGEM-MIP-mINFRRG ·hGH の

プラスミド DNA 状態のままのもの、HindIII および Sfi I で切断したもの、HindIII のみで切断したもの、Sfi I のみで切断したものの 4 種類を電気泳動した。結果は図 6 に示すとおりである。

図 6 pGEM-MIP-mTyk2-hGH を図中に示すそれぞれの制限酵素で切断した後、0.6%アガロースゲルで 25 分間、100V で電気泳動し、EtBr にて 20 分間染色した結果である。プラスミド DNA は 10kbp 以上の大きさの 2 本のバンド、III および Sfi I で切断した場合は一見 3 本だが 4 本のバンド、HindIII のみの場合には 1 本のバンド、Sfi I のみの場合には、3 本のバンドが出現している。HindIII および SfiI で切断した場合の 3000bp 付近のバンドは 2 本重なっているため太く濃くなっている。

一方、Sfi I のみで切断した場合は、想定していた切断部位以外に、INFRRG 遺伝子のなかに 2 箇所切断部位が存在していたため 3 本のバンドが出現している。HindIII および Sfi I の両酵素で切断した場合は、HindIII の認識部位が 1 箇所、Sfi I の認識部位が 3 箇所存在するためバンドは 4 本出現する

はずである。結果を見ると、3本のバンドしか出現していない。これは、切断された4つのプラスミドDNA断片のうち2つが同じ大きさ（約3 kbp）であったためバンドが重なり3本のバンドとして出現しているからである。想定していた以外の部位で切断された断片もあるが、断片の大きさからMIP-INFRRG-hGhがインサートされていることが確認できた。

トランスフェクション効率の検討

トランスフェクションの準備段階として、NIT-1のインスリン産生能の確認、NIT-1に導入するMIP-INFRRG-hGHの抽出およびインサート部位の確認が出来たので、MIP-INFRRG-hGHを導入する前実験としてMIP-EGFP-hGHをNIT-1に導入しトランスフェクションの効率およびその最適条件を検討した。

今回採用したトランスフェクション法は、最終的に一過性の発現で解析を行うためトランジェントで行い、簡便かつ導入効率が高く、導入後の細胞生存率も高いとされるリポフェクション法で行った。用いたリポフェクション法試薬は、Lipofectamine 2000である。

リポフェクション法で導入効率を左右する因子は、細胞数とDNA:Lipofectamine溶液の比であるため、24 well細胞培養ディッシュを用いて細胞数およびDNA:Lipofectamin比を表2のように組み合わせでトランスフェクションを行った。

トランスフェクション後、細胞の様子およびGFP蛍光の強度を、位相差と蛍光顕微鏡で観察した。観察は、トランスフェクション24時間後と48時間後の2回行った。蛍光画像中の蛍光緑色がGFPである(図7-10)。

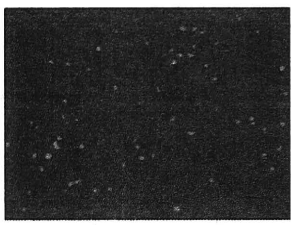
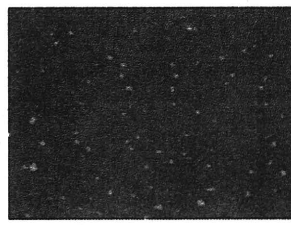
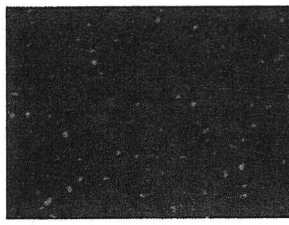
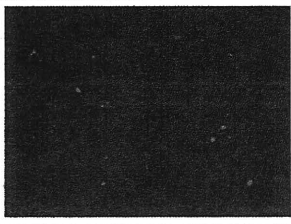
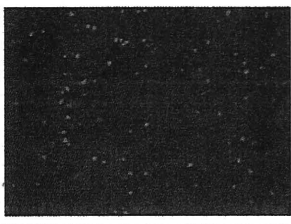
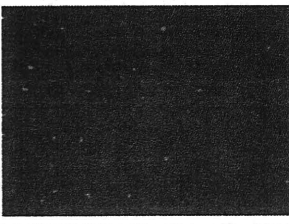
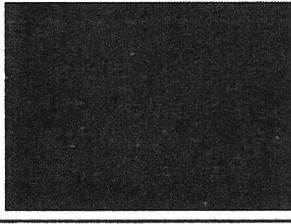
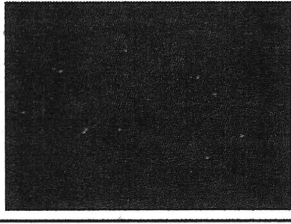

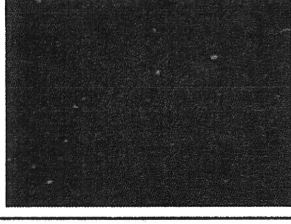
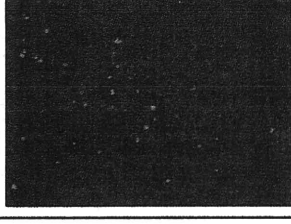
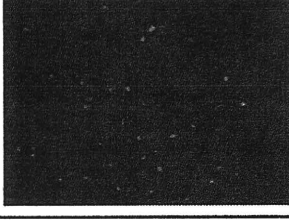
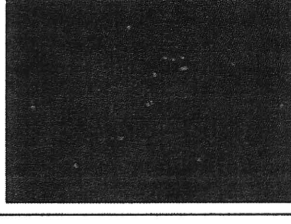
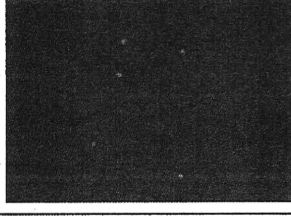
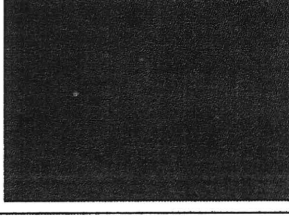
		DNA : Lipofectamine		
		1 : 1	1 : 2	1 : 3
細胞数	4.0×10^5 /well			
	2.0×10^5 /well			
	1.0×10^5 /well			
	0.5×10^5 /well			
	0.25×10^5 /well			

図 トランスフェクション 24 時間後の蛍光顕微鏡 (470 / 535nm) による観察 (×10)

図 7

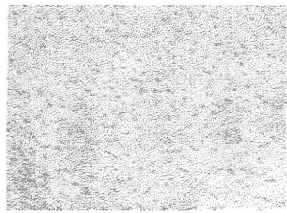
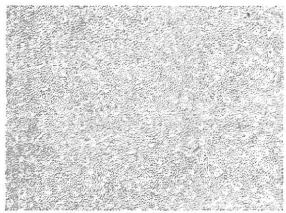
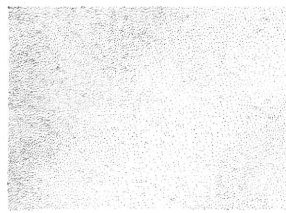
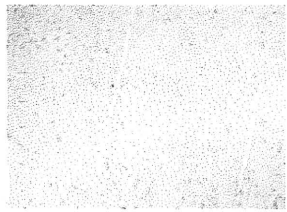
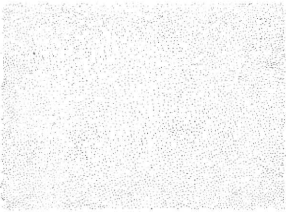
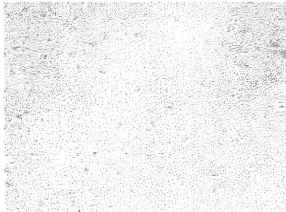
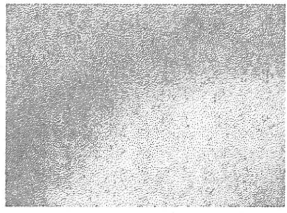
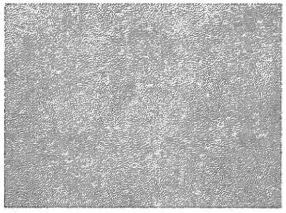
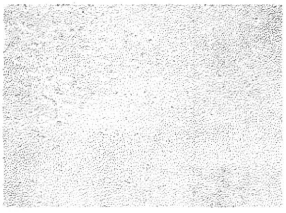
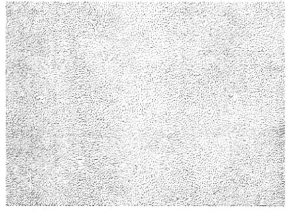
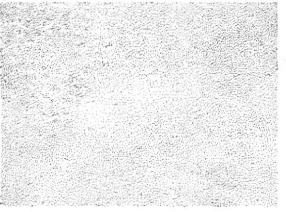
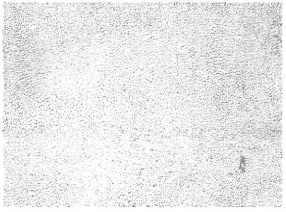
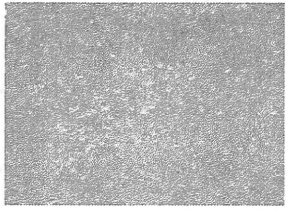
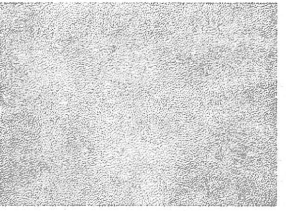
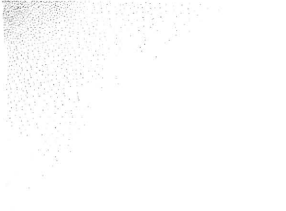
		DNA : Lipofectamine		
		1 : 1	1 : 2	1 : 3
細胞数	4.0×10^5 /well			
	2.0×10^5 /well			
	1.0×10^5 /well			
	0.5×10^5 /well			
	0.25×10^5 /well			

図 トランスフェクション 24 時間後の位相差・蛍光顕微鏡 (470 / 535nm) による観察 (×10)

図 8

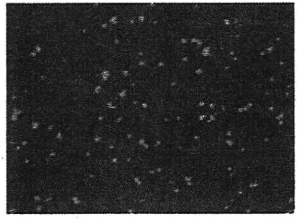
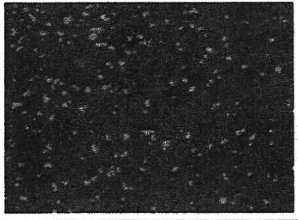
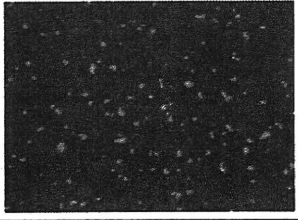
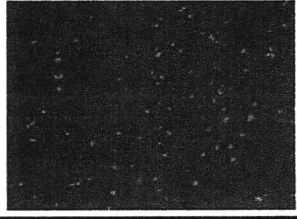
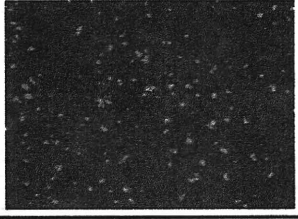
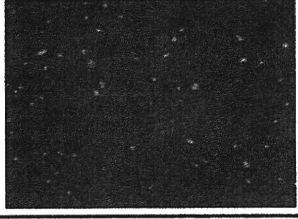

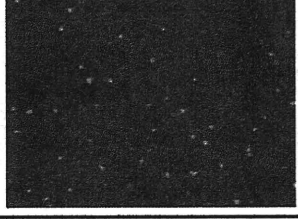
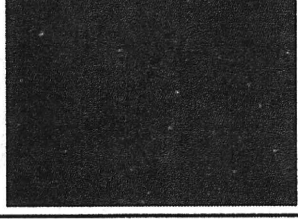
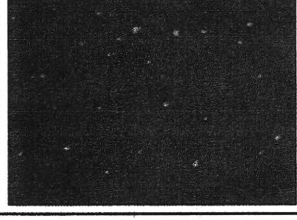
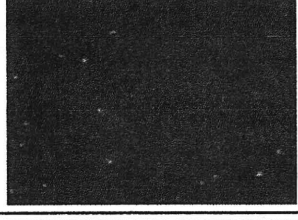
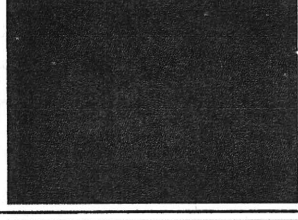
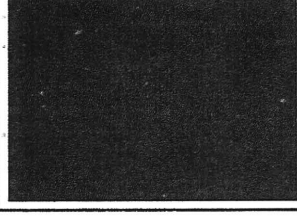
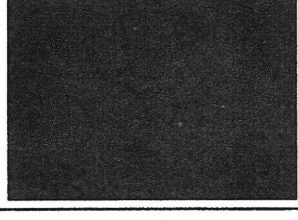
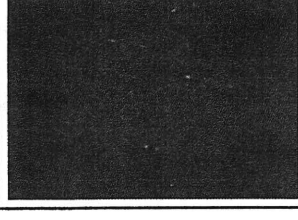
		DNA : Lipofectamine		
		1 : 1	1 : 2	1 : 3
細胞数	4.0×10^5 /well			
	2.0×10^5 /well			
	1.0×10^5 /well			
	0.5×10^5 /well			
	0.25×10^5 /well			

図 トランスフェクション 48 時間後の蛍光顕微鏡 (470 / 535nm) による観察 (×10)

図 9

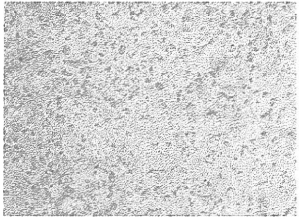
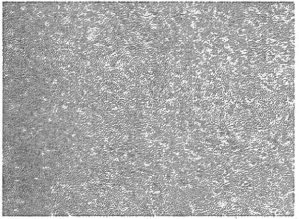
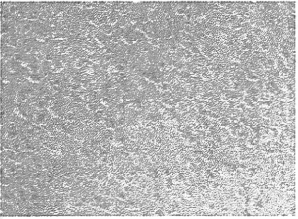
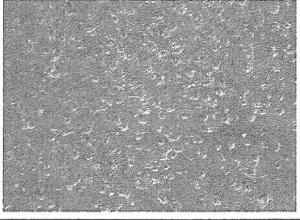
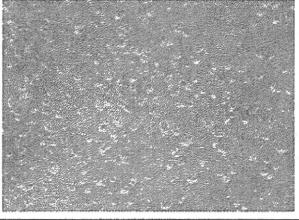
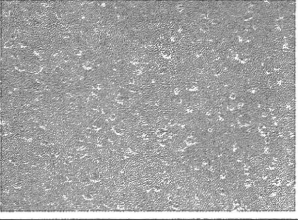
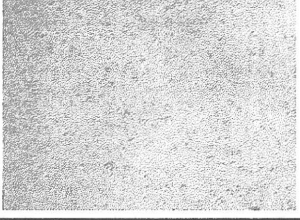
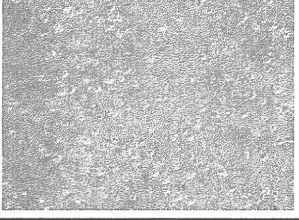
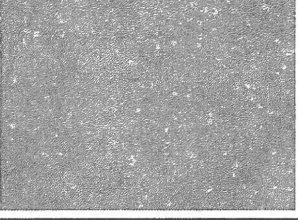
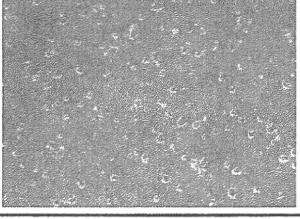
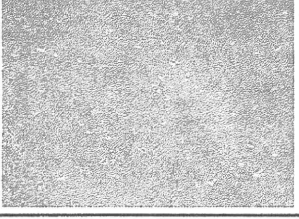
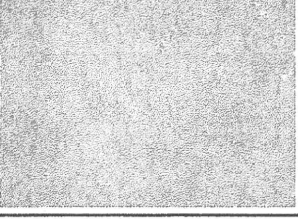
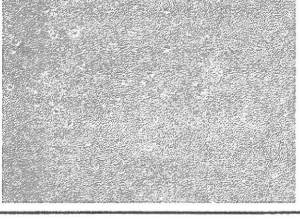
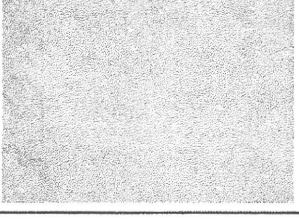

		DNA : Lipofectamine		
		1 : 1	1 : 2	1 : 3
細胞数	4.0×10^5 /well			
	2.0×10^5 /well			
	1.0×10^5 /well			
	0.5×10^5 /well			
	0.25×10^5 /well			

図 トランスフェクション48時間後の位相差・蛍光顕微鏡(470/535nm)による観察(×10)

図10

1well 当たり, 約 200,000 個の細胞数をカウントし, GFP 陽性率を算出した (表).

表 3 トランスフェクション 24 時間後 GFP 陽性率

		DNA : Lipofectamine		
		1 : 1	1 : 2	1 : 3
細胞数	4.0×10^5 /well	12%	15%	11%
	2.0×10^5 /well	10%	11%	9%
	1.0×10^5 /well	7%	8%	11%
	0.5×10^5 /well	9%	12%	10%
	0.25×10^5 /well	6%	2%	3%

表 4 トランスフェクション 48 時間後 GFP 陽性率

		DNA : Lipofectamine		
		1 : 1	1 : 2	1 : 3
細胞数	4.0×10^5 /well	17%	27%	20%
	2.0×10^5 /well	19%	25%	15%
	1.0×10^5 /well	11%	15%	12%
	0.5×10^5 /well	12%	14%	9%
	0.25×10^5 /well	9%	6%	3%

蛍光画像では, GFP 陽性が観察された. その中でも, 表 3, 4 に示すとおり, 最も陽性率が高かったのが細胞数 4.0×10^5 /well, DNA : Lipofectamine = 1 : 2 でトランスフェクションしたときの 48 時間後である. つまり, 最適なトランスフェクション条件は, 細胞数 4.0×10^5 /well, DNA : Lipofectamine = 1 : 2 であり, GFP の発現は 24 時間後より 48 時間後のほうが強いので, 発現の解析は 48 時間後が適していることが分かった.

細胞増殖試験

NIT-1 への MIP-EGFP-hGH 導入によるトランスフェクション効率検討により, NIT-1 へのトランスフェクション最適条件は細胞数 4.0×10^5 / well, DNA :

Lipofectamine = 1 : 2 であることが分かった.

この最適条件下で NIT-1 に MIP-INFRRG-hGH を導入し Tyk2 過剰発現が NIT-1 の生死にどのような影響を与えるか検討するために, 細胞増殖アッセイを行った. 対照として, トランスフェクションを行わない NIT-1, MIP-EGFP-hGH をトランスフェクションした NIT-1 を準備した.

まず細胞の状態を揃えるために, トランスフェクション前日に細胞数を 4.0×10^5 / well とした. トランスフェクション当日, 細胞が十分に増殖していることを確認し, MIP-EGFP-hGH および MIP-INFRRG-hGH をそれぞれ導入した. トランスフェクション 6, 24, 48, 72, 125

時間後の細胞数をカウントし細胞数 (図 1 1) と生存率 (図 1 2) の変化を記録した
(a) 細胞増殖数

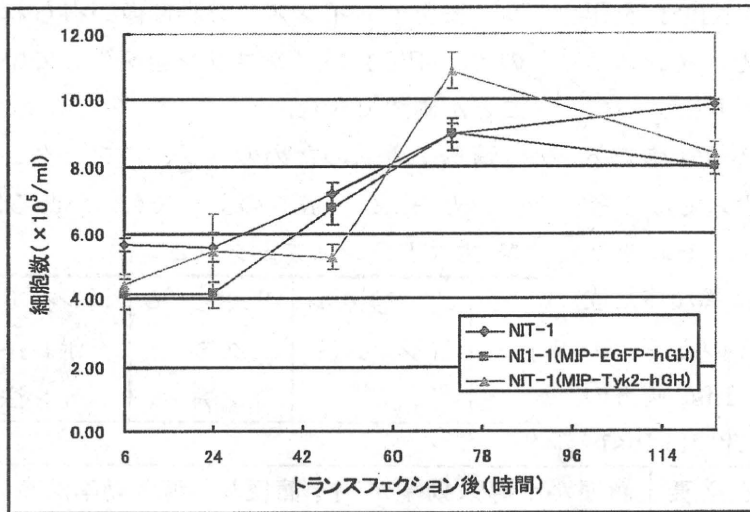
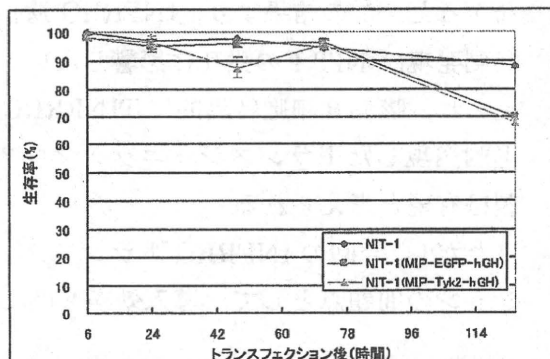


図 1 1 細胞増殖曲線

(b) 生存率

トランスフェクション後 6, 24, 48, 72, 125 時間後の生存率の平均値変化を示す。それぞれ n = 3 で行った。Y 軸誤差は $SE = SD / \sqrt{n-1}$ を用いた。

細胞数 (図 1 1) は、24 時間後から徐々に上昇し始め、72 時間後まで上昇し続け 125 時間後にはコンピテントになった。増殖数の変化は、トランスフェクションしていない NIT-1 も MIP-EGFP-hGH, MIP-INFRRG-hGH をそれぞれ導入した NIT-1 でも有意差はみられなかった。



トランスフェクション後 6, 24, 48, 72, 125 時間後の細胞増殖数の平均値変化を示す。それぞれ n = 3 で行った。Y 軸誤差は $SE = SD / \sqrt{n-1}$ を用いた。

生存率 (図 1 2) は、徐々に減少していきトランスフェクションを行った NIT-1 では 125 時間後には 70% 程度にまで減少した。生存率も細胞数

図 1 2 生存率

と同様に、有意差みられなかった。

細胞増殖アッセイの結果で MIP-EGFP-hGH, MIP-INFRRG-GH それぞれを導入した NIT-1 で細胞数, 生存率に有意差はみられなかったことから INFRRG 過剰発現は細胞の生死に影響しないと考えられる。

D. 考察

今回の研究では、INFRRG トランスジェニックマウス作製のための課題として、INFRRG の過剰発現が膵島β細胞の生死へ影響するか否かを検討することために、NIT-1 へ INFRRG 遺伝子を導入し、細胞増殖アッセイでその影響を観察した。

まず実験に用いる NIT-1 が膵島β細胞としての機能をもっているかインスリン産生能で確認することから始めた。NIT-1 を作製した浜口氏の論文¹⁾によると、インスリン染色およびノーザンブロットによって NIT-1 はインスリンを産生するβ細胞であることが確認されている。マウスでは2種類のインスリン遺伝子があり、それぞれ Ins1, Ins2 とよばれ、遺伝子は異なった位置にあり遺伝子構造も異なっている⁷⁾。インスリン産生のためには Ins1, Ins2 両方の遺伝子が必要である。今回の研究では Ins1,

Ins2 をそれぞれ RT-PCR で確認したところ、NIT-1 は両遺伝子を発現していた。インスリン染色でもインスリン陽性像が得られたので、NIT-1 はインスリンを産生していることが確認できた。

遺伝子導入のためのトランスフェクション方法には、表5のようなものがある。

表 主なトランスフェクション法

	リン酸カルシウム法	リポフェクション法	エレクトロポレーション法
長所	特別な試薬や器具を必要としない。	簡便かつ導入効率が高い。 細胞毒性が低い。	簡便かつ導入効率が高い。 短時間でできる。
短所	細胞毒性が高く、トランスフェクション後の細胞生存率が低い。導入効率が低い。	試薬がやや高価。	機械が非常に高価。 ある程度の条件検討が必要。

今回は、NIT-1 は比較的弱い細胞なので、細胞毒性が低く導入効率が高いリポフェクション法を採用した。トランスフェクション効率を検討するために MIP-EGFP-hGH をトランスフェクションしたところ、最適条件は 24well 細胞培養ディッシュでは、細胞数 4.0×10^5 / well, DNA : Lipofectamine = 1 : 2 であった。このときの導入効率は 27% である。同じ Lipofectamine2000 を用いた NIT-1 への EGFP 導入によって 48 時間後の導入効率が 90% であったという報告⁹⁾があるため、今回行ったトランスフェクション効率は低く、導入効率を上げる必要があると考えられる。導入効率を上げるための方法として、DNA の純度を上げる、細胞の状態をよりよいものにするなどが考え

られる。

EGFP 導入で得られた 27% の導入効率のもと、MIP-INFRRG-hGH を導入し、対照としてトランスフェクションしていない NIT-1 および MIP-EGFP-hGH を導入した NIT-1 を用いて細胞増殖アッセイを行った。MIP-INFRRG-hGH 導入 NIT-1 と MIP-EGFP-hGH 導入 NIT-1 との間に細胞増殖および生存率について有意差はみられなかった。この結果より、INFRRG 遺伝子過剰発現は NIT-1 の生死に影響しないと考えられ、膵島β細胞特異的に TINFRRG を過剰発現したトランスジェニックマウス作製は有望と考えられる。

ただし、今回の INFRRG トランスフェクションの問題点として、導入効率 27% とい

う仮定のもとでの導入であるため、INFRRG が本当に導入されたかどうかの検討が行われていない。今回用いている導入遺伝子は17.3kbであり、このような15kbを超えるようなサイズの遺伝子は一般的に導入効率が低くなるため INFRRG が発現されていない可能性もある。よって今後の課題として RT-PCR 等でトランスフェクション後の INFRRG 遺伝子発現のレベルを、ウエスタンブロットや免疫染色で INFRRG 蛋白の発現のレベルを確認する必要がある。

E. 結論

今回の研究によって、インスリン産生能を有する膵島β細胞である NIT-1 への INFRRG 遺伝子の導入による細胞の増殖・生存率への影響はみられなかったことから、INFRRG2 の過剰発現は NIT-1 の生死に影響を与えないと推測された。従って、膵島β細胞特異的に T INFRRG を発現させたトランスジェニックマウスの作製は有望である。

ただし、今回の INFRRG のトランスフェクションは、EGFP トランスフェクションで得られた 27%の導入効率という仮定のもとで行っているため、今後の課題として、トランスフェクションによる INFRRG 遺伝子および蛋白の発現レベルを RT-PCR、ウエスタンブロットおよび免疫染色で検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

（分担） 研究報告書

劇症 I 型糖尿病のウイルス原因説に関する研究

—ヒト劇症1型糖尿病感受性遺伝子変異の探索と意義に関する研究—

—

分担者 栗崎宏憲：九州大学大学院医学研究院保健学部門検査技術科学分野病態情報学・助教

研究要旨

ヒト劇症1型糖尿病のウイルス原因説を解明する目的で、遺伝的感受性要因を明らかにする目的で、インターフェロン受容体関連シグナル分子である INFRRG (interferon receptor related gene) 遺伝子多型と劇症1型糖尿病、1型糖尿病、健常対照を対象にプロモーター部位の多型解析を行った。その結果、プロモーター領域、Exon1, Exon2の3つの非翻訳領域のうち、プロモーター領域とExon1にそれぞれ3カ所の1塩基置換を認めた。プロモーター領域では4071G/A, 4072T/A, 4897A/Cを認め、Exon1では5001A/G, 5062G/A, 5063G/Aを認めた。今後、この遺伝子多型が劇症1型糖尿病患者の感受性に関与しているのかを、1型糖尿病患者、2型糖尿病患者、健常者対照者と比較することにより検討する予定である。

A. 研究目的

1 型糖尿病は膵β細胞の破壊によるインスリンの絶対的不足を示す病態である。さらに、1 型糖尿病は自己免疫性か否かによって、1A型と1B型に分類される。1A型は自己免疫性であるとされ、1B型は非自己免疫性の特発性糖尿病であるとされる。1B型ではさらに、亜型として劇症型が存在する。急激な発症様式を示す劇症1型糖尿病患者では約70%の症例に、発熱、上気道炎などの風邪症状を伴うことから、ウイルス感染が糖尿病発症の原因であることが示唆されている。しかしそのメカニズムあるいは感受性遺伝子は不明である。

さて、IFNはウイルス感染防御の主要な因子である。IFN α レセプターの下流に存在するINFRRG遺伝子はIFN α の産生によって活性化され、抗ウイルスタンパクを産生する。このようにT INFRRGは抗ウイルス作用に関与している。

そこで本研究では、ウイルス感染と関連の認められた、ヒト1型糖尿病患者のINFRRGプロモーター領域、Exon1およびExon2の遺伝子変異、多型の有無を検索し、その意義を検討した。対象は、ウイルス先行感染を認めた1型糖尿病患者末梢血液検体22例の末梢血液検体である。

B. 方法

血液検体収集

大分大学付属病院、岡田内科クリニック、九州大学病院心療内科、九州大学病院第一および第二内科、早良病院、新小倉病院、内科阿部病院、福岡市立こども病院、松山赤十字病院、南昌江内科クリニック、山口赤十字病院(以上、五十音順)において1型糖尿病患者の末梢静脈血採血を依頼し、血液検体を収集した。

血液検体到着後、血清分離剤入り採血管中の血液を2,500rpmで20分間遠心し、2本の2mlアシストチューブに均等に分注した。また、全血は転倒混和後、0.5mlアシストチューブに420 μ l分注し、残りを2本の2mlアシストチューブに均等に分注した。これら血清と全血の検体は-30 $^{\circ}$ C下で保存した。収集した患者の血液検体のうち、1型糖尿病の発症が急性または劇症型であり、1型糖尿病発症前にウイルス感染の先行が認められた患者22名(男性11名、女性11名)の検体を選択し、DNA抽出を行った。このとき選択した患者の情報を表に示す。

表 INFRRG 遺伝子解析の対象とした患者の情報

患者番号	年齢	性別	発症様式	家族歴	備考
1	49	M	劇症	なし	
2	47	F	急性	なし	
3	61	F	劇症	長男と次男(1型糖尿病)	
4	31	F	急性	なし	
5	36	F	急性	なし	
6	40	F	劇症	なし	
7	59	F	劇症	なし	
8	9	M	急性	なし	
9	10	M	急性	なし	
10	43	M	急性	なし	
11	52	M	急性	なし	
12	53	M	劇症	なし	
13	34	F	急性	なし	
14	24	F	急性	なし	
15	62	F	劇症	なし	
16	35	M	急性	なし	
17	25	M	急性	なし	
18	30	M	急性	なし	
19	48	F	急性	不明	
20	40	F	急性	なし	
21	24	M	急性	なし	
22	27	M	急性	母(甲状腺疾患)	

DNA 抽出

全血から DNA を抽出した。

- ① 1.5ml マイクロチューブに Protease (EDB) を $30\mu\text{l}$, 全血を $200\mu\text{l}$, Lysis Buffer (LDB) を $250\mu\text{l}$ 分注した。なお, EDB および LDB は核酸抽出キット (Quick Gene DNA whole blood kits Cat.No. DB-S FUJIFILM 社製) に含まれたものを使用した。
- ② Vortex MIX で 15 秒混和し, 12,000rpm, 10 秒間遠心した。
- ③ 56°C で 2 分間加温した。
- ④ 99.9%エタノールを $250\mu\text{l}$ 加えた。
- ⑤ 再び Vortex MIX で 15 秒混和し, 12,000rpm, 10 秒間遠心した。
- ⑥ 自動核酸抽出システム QuickGene-800 (FUJIFILM 社製) 上のカートリッジへ, 完成したライセート (全量 $730\mu\text{l}$) を添加し稼働させて DNA の抽出を行った。
- ⑦ 抽出した DNA 濃度は, RNA/DNA Calculator (Gene Quant pro) を用いて, 230nm, 260nm, 280nm で吸光度を測定し, 確認した。

プロモーター領域の仮定

ヒト INFRRG 遺伝子のプロモーター領域はまだ完全には解明されていない。また, プロモーター領域は mRNA 転写開始点

の上流 1kb の領域に存在することが多いと考えられている。そこで mRNA 転写開始点データベース (DBTSS) を用いてヒト INFRRG 遺伝子の mRNA の転写開始点を予測したところ, いくつかの候補点が予測された。この転写開始予測点のうち, 5' 側から上流 1kb の地点から, Exon1 の開始点までをプロモーター領域だと仮定した。

PCR の条件

PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa) を使用して PCR を行った。

以下に反応液の内容を示した。なお, 用いた試薬は $10\times$ buffer (TOYOBO), 反応液の酵素は TaKaRa LA Taq[®] である。PCR のプロトコルは図 2 に示し, 使用した primer の塩基配列は表に示した。PCR 終了後には 2% Agarose Gel と泳動槽として Mupid-2X Submarine electrophoresis System (ADVANCE) を使用し, 100V, 30 分間の電気泳動を行った。その際, PCR 産物 $4\mu\text{l}$ と $10\times$ Loading Buffer $1\mu\text{l}$ を混和し, ゲルに注入した。また, マーカーは Stable 1kb DNA Ladder (GENOSYS, SIGMA) を使用した。

反応液

試薬	量 [μ l]
10×buffer	2
2.5mM dNTP	1.6
25mM MgCl ₂	0.8
dmsO	1.0
5U/ μ l LA Taq	0.2
10ng/ μ l DNA	3
10 μ M Primer (F)	0.4
10 μ M Primer (R)	0.4
蒸留滅菌水	up to 20
Total	20

Hold	94°C	5min
Cycle	94°C	15sec
	63°C	30sec
	72°C	90sec
Hold	72°C	7min
	4°C	30sec
	25°C	store

プロモーター PCR プロトコル

primer の塩基配列

目的部位	5' -3' 塩基配列 (Forward)	5' -3' 塩基配列 (Reverse)
プロモーター	GCCAGACCCCATCTCTACAAA	GGGAAGACAAGCTCGAACC

Exon1 の PCR の条件

以下の表 3 に反応液の内容を示した。なお、用いた試薬は 10×buffer (TOYOBO), 反応液の酵素は rTaq DNA Polymerase (TOYOBO) である。PCR のプロトコルは図に示し、使用した primer の塩基配列は表 4 に示した。PCR 終了後には 2% Agarose Gel と泳動槽として Mupid-2X

Submarine electrophoresis System (ADVANCE) を使用し、100V, 30 分間の電気泳動を行った。その際、PCR 産物 4 μ l と 10×Loading Buffer 1 μ l を混和し、ゲルに注入した。また、マーカーは Stable 100bp DNA Ladder (GENOSYS, SIGMA) を使用した。

反応液

試薬	量 [μ l]
10×buffer	2
2.5mM dNTP	1.6
25mM MgCl ₂	1.2
5U/ μ l rTaq	0.2
10ng/ μ l DNA	3
10 μ M Primer(F)	0.4
10 μ M Primer(R)	0.4
蒸留滅菌水	up to 20
Total	20

Hold	94°C	5min
Cycle	94°C	15sec
	62°C	30sec
	72°C	1min
Hold	72°C	7min
	4°C	30sec
	25°C	store

Ex1 PCR プロトコル

primer の塩基配列

目的部位	5' -3' 塩基配列(Forward)	5' -3' 塩基配列(Reverse)
Ex1	AATCGCGGCTGAGTGACGAATG	GACCCAGACCCAGCTTTGAAGA

Exon2 の PCR 条件

以下に反応液の内容を示した。なお、用いた試薬は 10×buffer (TOYOBO), 反応液の酵素は rTaq DNA Polymerase (TOYOBO) である。PCR のプロトコルは図 4 に示し、使用した primer の塩基配列は表 6 に示した。PCR 終了後には 2% Agarose Gel と泳

動槽として Mupid-2X Submarine electrophoresis System (ADVANCE) を使用し、100V、30 分間の電気泳動を行った。その際、PCR 産物 4 μ l と 10×Loading Buffer 1 μ l を混和し、ゲルに注入した。また、マーカーは Stable 100bp DNA Ladder (GENOSYS, SIGMA) を使用した。

反応液

試薬	量 [μ l]
10×buffer	2
2.5mM dNTP	1.6
25mM MgCl ₂	1.2
5U/ μ l rTaq	0.2
10ng/ μ l DNA	3
10 μ M Primer(F)	0.4
10 μ M Primer(R)	0.4
蒸留滅菌水	up to 20
Total	20

Hold	94°C	5min
Cycle	94°C	15sec
	56°C	30sec
	72°C	1min
Hold	72°C	7min
	4°C	30sec
	25°C	store

Ex2 PCR プロトコル

primer の塩基配列

目的部位	5' -3' 塩基配列 (Forward)	5' -3' 塩基配列 (Reverse)
Ex2	CTGGACATAAACTCTCCTAGGC	GACCATCTTGACCAACATGGTG

PCR 産物の精製

QIA quick[®] PCR Purification Kit (QIAGEN) を使用して, PCR 産物の精製を行った.

- ① 1.5ml マイクロチューブに PCR 産物を 15 μ l, Buffer PB を 75 μ l 分注した.
- ② 全量をカラムへ移し, 12,000rpm, 1 分間遠心した.
- ③ カラムを通った Buffer を捨て, Buffer PE をカラムへ 750 μ l 加え, 12,000rpm, 1 分間遠心した.
- ④ 再びカラムを通った Buffer を捨て, 12,000rpm, 1 分間遠心した.
- ⑤ 1.5ml マイクロチューブにカラムをセットし, Buffer EB を 30 μ l 分注し, 1 分間静置した後, 12,000rpm, 1 分間遠心した.

反応液

試薬	量 [μ l]
5 \times buffer	2
1.6pM Primer	1
Big Dye	2
DNA	最終量 5-10ng
蒸留滅菌水	up to 10
Total	10

Hold	96 $^{\circ}$ C	1min
Cycle	96 $^{\circ}$ C	10sec
	50 $^{\circ}$ C	5sec
	60 $^{\circ}$ C	4min
Hold	4 $^{\circ}$ C	store

図 シークエンス PCR プロトコル

- ⑥ カラムを通った DNA を -30 $^{\circ}$ C に保存した.

遺伝子配列の決定

精製して得られた PCR 産物濃度を吸光度計 NanoDrop[®] (ナノドロップ) ND-1000 にて確認した. 滅菌蒸留水を用いて精製して得られた PCR 産物を約 10ng/ μ l に調整し, シークエンス用反応液を製作した (表 7 参照). また, 反応液には 5 \times Sequencing buffer (Applied Biosystems) を使用し, 酵素は Big Dye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を使用した. なお, シークエンスはジデオキシ法である. 図にシークエンスのプロトコルを示した.