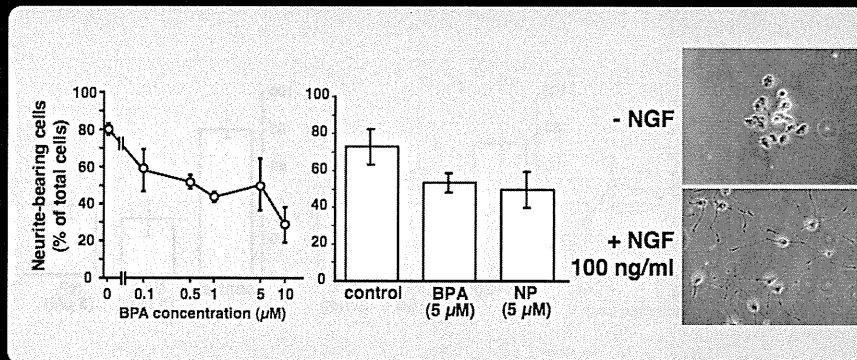
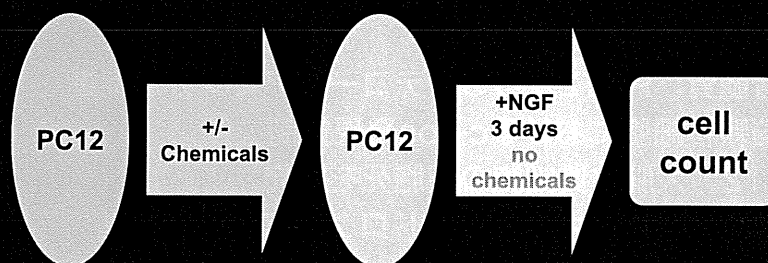


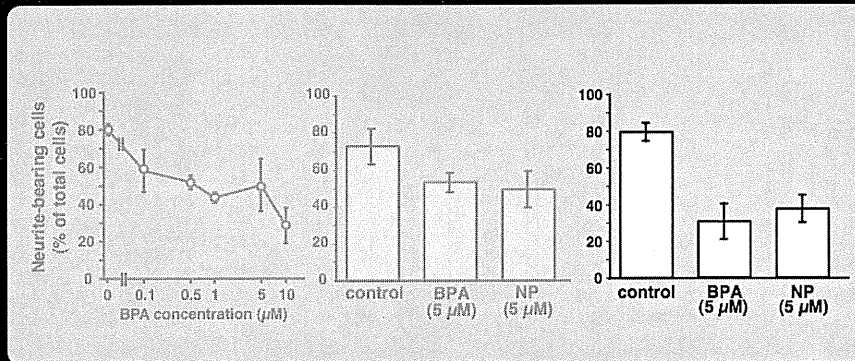
## PC12細胞の神経分化に対する BPAまたはNPの作用



## 化学物質前処理の作用を評価する



## BPAまたはNPで前処理した PC12細胞の神経分化



## 神経系細胞における BPAまたはNPのin vitro作用

- ・スタウロスポリンによる海馬、大脳皮質神経細胞の細胞死の抑制
- ・副腎髄質、PC12からのカテコールアミン分泌促進
- ・小脳顆粒細胞におけるc-fos発現抑制
- ・PC12、大脳皮質細胞の細胞死を誘発
- ・大脳皮質細胞のオリゴデンドログリア分化を促進
- ・PC12細胞の分化を抑制

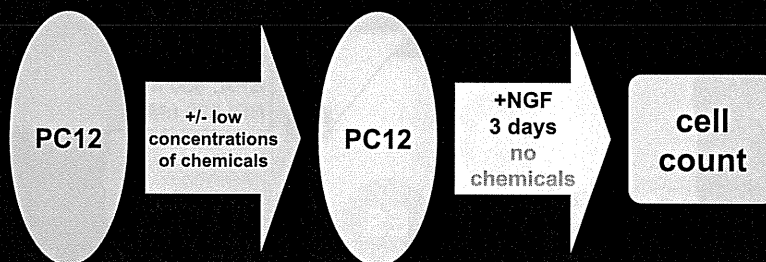
## 神経系細胞における BPAまたはNPのin vitro作用

- 10  $\mu\text{M}$ , 24 hr
- 0.01  $\mu\text{M}$ , ~3 day
- 10~100  $\mu\text{M}$ , 100 min
- 100~500  $\mu\text{M}$ , 12~72 hr
- 100 fM~100  $\mu\text{M}$ , 24 hr
- 0.04, 2  $\mu\text{M}$ , 5 day
- 100 fM~1  $\mu\text{M}$  24 hr

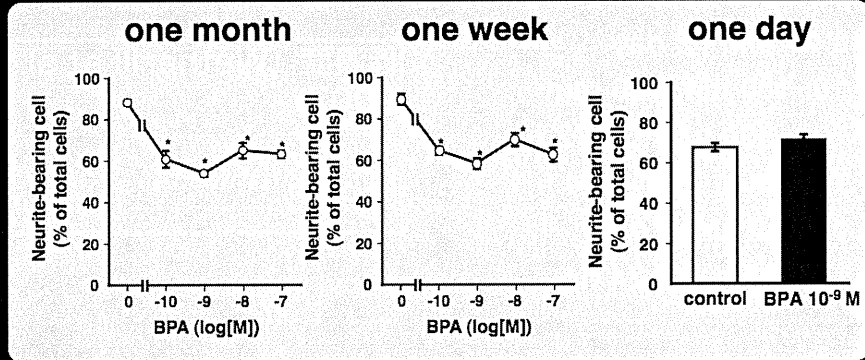
低濃度 (Wetherill et al.,  
2007)

↓  
50 ng/ml = ~0.2  $\mu\text{M}$

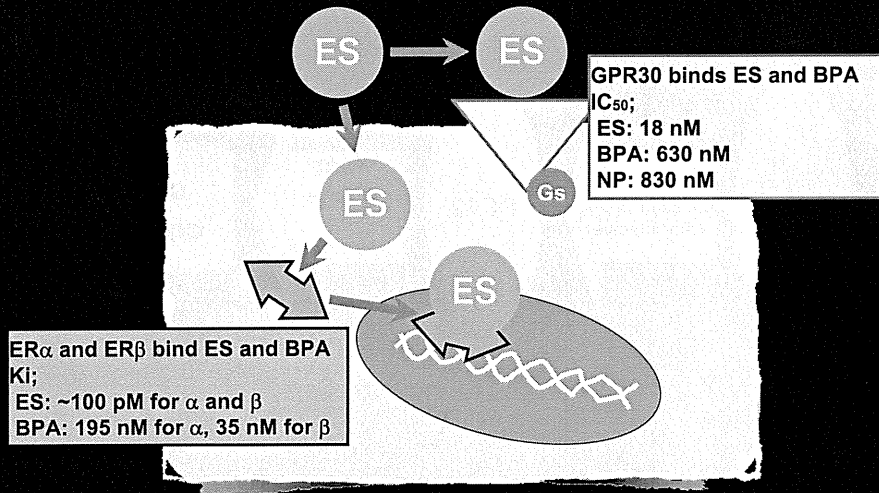
## 低濃度化学物質前処理の作用を評価する



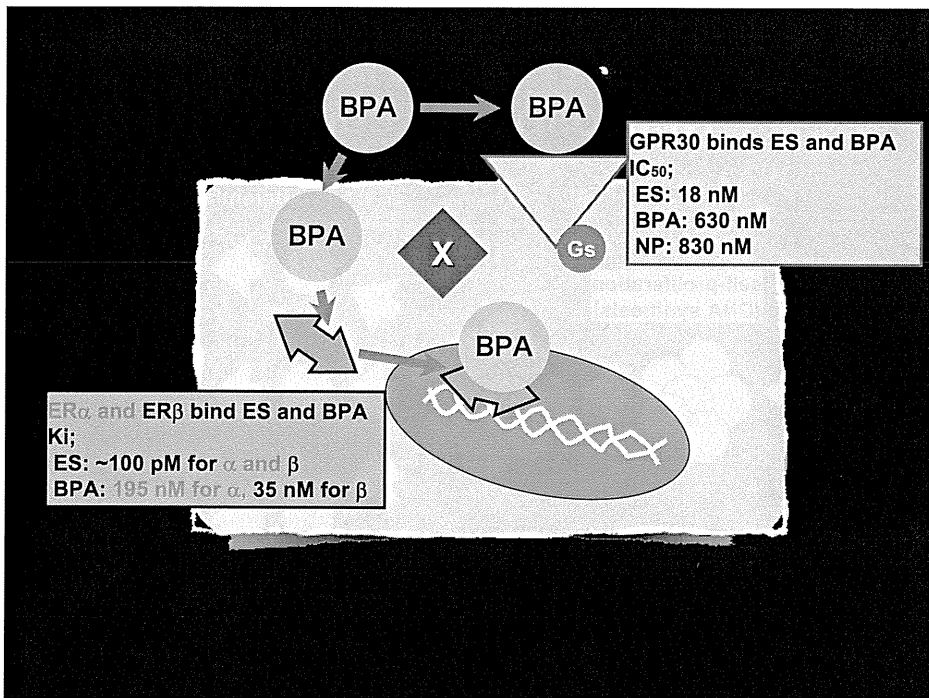
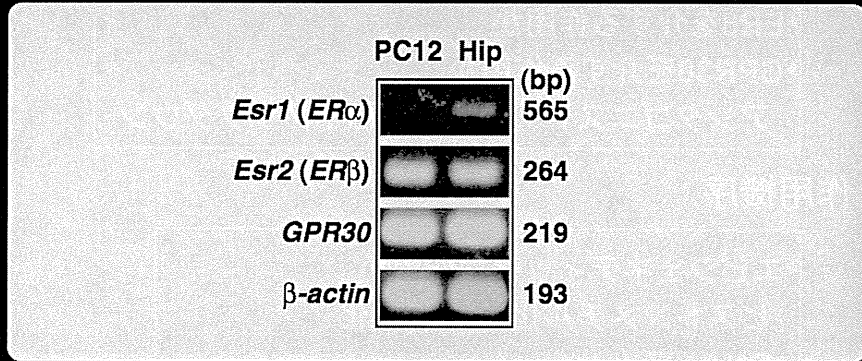
## 低濃度BPAで前処理した PC12細胞の神経分化



## エストロゲン受容体



## エストロゲン受容体遺伝子の発現



## およびNPの作用

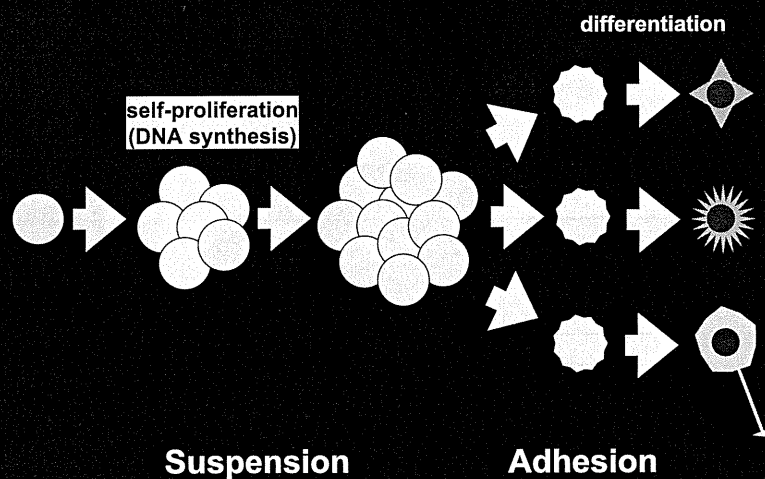
### ・標的分子

- ER $\beta$ を介する作用か
- GPR30を介する作用か  
アンタゴニスト、受容体遺伝子ノックダウン

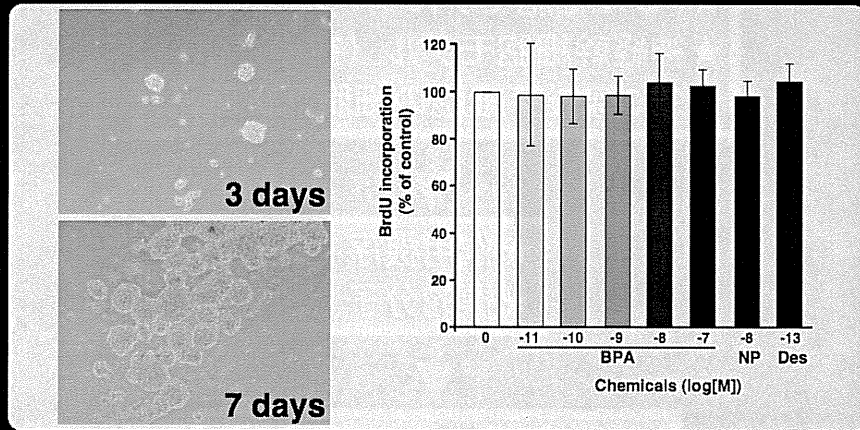
### ・作用機序

- エピジェネティックな作用か  
ヒストンメチル化/アセチル化  
DNAメチル化
- NGFの情報伝達経路に作用するのか

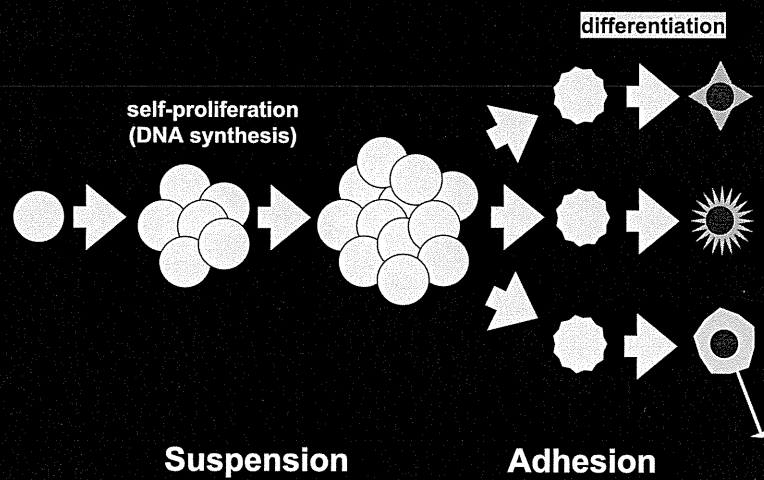
## 神経幹細胞培養系 Neurosphere culture



## 低濃度の化学物質で前処理した 神経幹細胞のBrdU取込み量



## 神経幹細胞培養系 Neurosphere culture



## BPAおよびNPの作用

★PC12細胞モデル  
★神経幹細胞モデル（神経分化）  
★3T3線維芽細胞の細胞死実験系

★作用機序  
★標的分子

★インビトロ評価系の確立



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

化学物質の子どもへの影響評価に関する研究

- 発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と、  
それに基づく試験スキームの最適化 -

(H23-化学-一般-002)

分担研究報告書

Tau融合エストロゲン受容体レポーター マウスを用いた化学物質の神経標的解析

研究分担者 渡邊 肇 大阪大学大学院工学研究科教授

**研究要旨** 化学物質に対する高感受性が懸念される子どもへの有害性発現メカニズムの解明を目的として、エストロゲン受容体遺伝子の発現部位を可視化したマウスを作製する。新生児期にエストロゲン様化学物質の曝露を行い、神経系を中心とした解析を行うことにより、発生・発達期の脳が示す高感受性の作用メカニズムを明らかにする。

#### A. 研究目的

化学物質に対する高感受性が懸念される子どもへの有害性発現メカニズムの解明を目的として、エストロゲン受容体が発現する部位を可視化したマウスを構築する。特に神経系においてエストロゲン受容体を発現する部位とその投射を明らかにするために、tau融合レポーター遺伝子をエストロゲン受容体遺伝子の制御化に挿入したマウスを作製する。このマウスを用いて、エストロゲン様作用を有する化学物質を新生児期マウスに曝露し、エストロゲン受容体の量的、機能的変化を明らかにすることにより、幼若期特有の変化のメカニズムを遺伝子レベルから明らかにする。

#### B. 研究方法

マウスBACライブラリーよりエストロゲン受容体遺伝子領域を含むクローンを入手する。このBACクローンに tau遺伝子を融合させた

lacZ遺伝子を導入し、エストロゲン受容体遺伝子の発現制御下で発現するトランスジーンを作製する。このトランスジーンをマウス受精卵にインジェクションすることにより、トランスジェニックマウスを得る。このトランスジェニックマウスの新生児期にBPAなどのエストロゲン様化学物質、もしくはエストロゲンを曝露し、新生児期の曝露影響を確認したのちに、脳におけるlacZ遺伝子の発現を確認し、曝露影響について解析を行う。

(倫理面への配慮)

動物実験については、大阪大学大学院工学研究科動物実験委員会の承認を得ている。またトランスジェニックマウス作製を含む、組換えDNAについては、大阪大学大学院工学研究科組換えDNA実験委員会の承認を得ている。

#### C. D. 研究結果および考察

UCSCゲノムデータベースを検索し、マウスBACライブラリーからエストロゲン受容体 $\alpha$ 遺伝子上流域を含むBACクローンを選択した。レポーター遺伝子をインフレームで挿入するために、翻訳開始ATGコドンを含むクローン、RP23-7D5を選択し、ライフテクノロジー社から入手した。一方、レポーター遺伝子は、神経軸索を可視化することを目的としてtau-lacZを用いることとした。

tau遺伝子はウシ由来のN末端側383アミノ酸を含む領域で大腸菌由来の $\beta$ ガラクトシダーゼ遺伝子とインフレームで融合しており、この融合遺伝子の下流にはSV40由来のポリAシグナルを配している。このtau-lacZ遺伝子については、UCSDのThomas教授から分与を受けた。

BACクローンにtau-lacZレポーター遺伝子を組込むために、Red/ET相同組換え法(GeneBridges社)を用いた。BAC側の挿入予定部位の配列を合成し、tau-lacZレポーター遺伝子の両末端にPCR法によって融合させたのちに、このDNA断片をリコンビナーゼと共にRP23-7D5BACクローンを有する大腸菌に導入した。薬剤耐性を指標として、最終的にRP23-7D5BACクローンにtau-lacZレポーター遺伝子が挿入されたクローンを得た。

得られたクローンを大量精製し、塩基配列を確認したところ、予定通りの組換えが生じており、エストロゲン受容体 $\alpha$ 遺伝子の翻訳開始ATG以下がtau-lacZに置換されていることを確認した。一方、6塩基切断型の制限酵素数種類を用いて、詳細な制限酵素地図を作製し全体の構造を確認したところ、tau-lacZ遺伝子由来のDNA断片が確認されただけでなく、本来相同組換えによって除去されたはずのDNA断片の存在も確認されたことから、BACク

ローンが二量体となって存在していることが明らかになった。この二量体とRP23-7D5BACクローンをパルスフィールドゲル電気泳動で解析したところ、ほぼ同等の大きさを示していたことから、もともと配布しているRP23-7D5BACクローンがすでに二量体となっていることが推察された。

これらは制限酵素PI-SceIで切断すると単量体となり、tau-lacZ組換えクローンとオリジナルのRP23-7D5クローンに分けることができ、現在この組換え単量体を大腸菌に再導入しクローン化を進めると同時に、一方で環状のままインジェクションを行いトランスジェニックマウスの作製を進めている。

またこれら一連のトランスジェニックマウス作製と並行して、新生児期のエストロゲン曝露とその解析法のセットアップを進めており、トランスジェニックマウスが取得できれば、速やかに解析できる体制を整えている。

一方、新生児期のBPAやエストロゲン曝露の長期的な影響を解析するために、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子とし、その上流にエストロゲン応答配列を反復して有するトランスジェニックマウスを岐阜薬科大学から導入した。新生児期エストロゲン曝露マウスではさまざまな影響が報告されており、例えば膈上皮ではエストロゲン非依存的な細胞増殖、性周期については連続発情が観察されている。これはあたかもエストロゲンとエストロゲン受容体の関係が破綻したかの現象であるが、その詳細は未解明のままであり、エストロゲン受容体がエストロゲン非存在下で機能しうるのか否かについても明確になっていない。このエストロゲン応答配列を有するレポーターマウスを併用することで、エストロゲン受容体の機能的な解析を進める予定である。

#### E. 結果

入手したBACクローンが想定外の形状であったために、当初の計画よりも遅れをみているものの、予定通りのコンストラクトを構築し、マウスの作製を進めているところであり、来年度にかけて解析を開始する。

#### F. 以下 該当なし

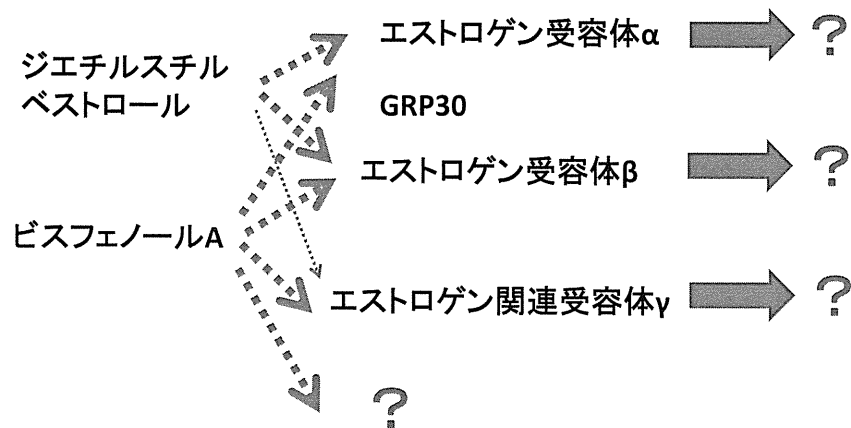
# Tau融合エストロゲン受容体 レポーター マウスを用いた 化学物質の神経標的解析

大阪大学大学院工学研究科  
生命先端工学専攻  
渡邊 肇

## 研究目的

エストロゲンおよびエストロゲン様作用を有する化学物質を、新生児期マウスに曝露し、エストロゲン受容体の量的、機能的変化を明らかにすることにより、幼若期特有の有害性発現のメカニズムを遺伝子レベルから明らかにする。

## 有害性発現メカニズムの解明



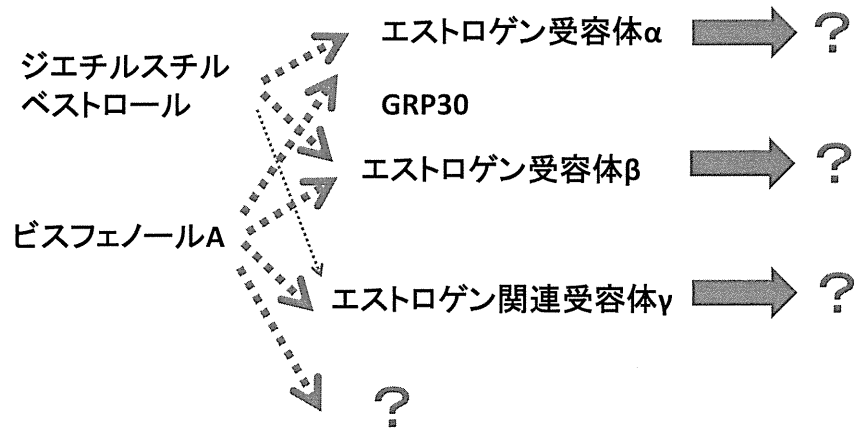
## 発生・発達期における脳に対するBisphenol Aの 低用量暴露により成長後に誘発される「遅発影響」

Studies of BPA Effects on Sex-Differentiation and BPA Sex-Specific Effects on Behavior Using 40 µg/kg d Dose by o.i. in SD Rats

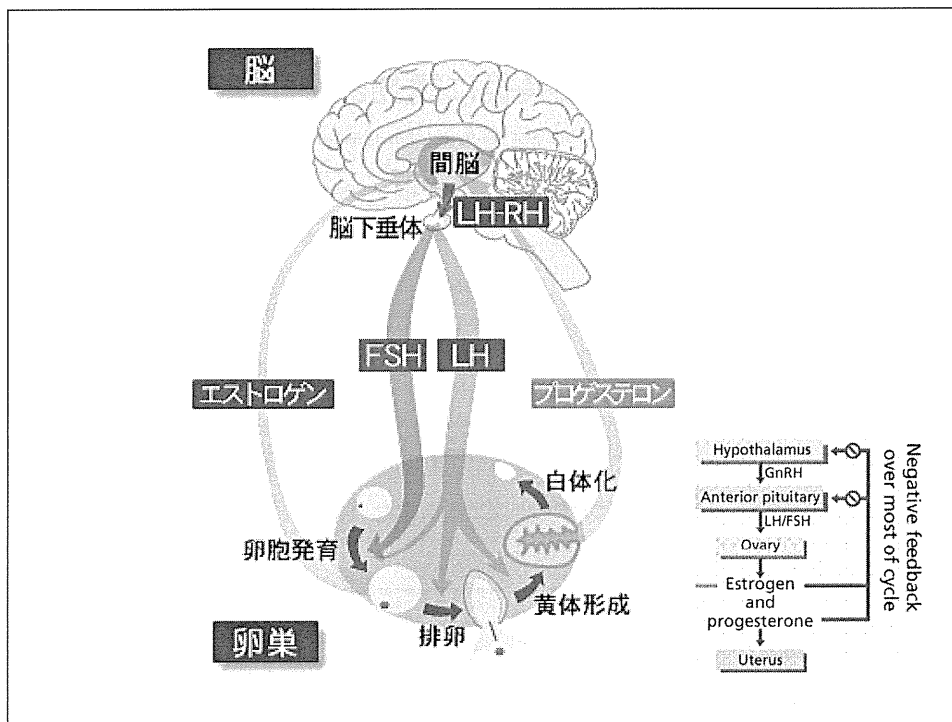
Study	Exposure period dose	Endpoint age at assessment	Findings
<i>Prenatal or postnatal exposure</i>			
Farabollini et al. (2002)	Pregnancy or lactation (cross fostered)	Socio sexual behavior, PND 100	↑ latency to intromission (pre) ↑ number of intromissions (post)
NTP-A EU (2008)	40 µg/kg d o.i.		↑ genital sniffing (pre)
Aloisi et al. (2002)	Pregnancy or lactation (cross fostered)	Pain response, PNW 22	↑ limb flexion (pre) ↓ paw jerk (post)
NTP-A EU (2008)	40 µg/kg d o.i.		
<i>Prenatal and postnatal exposure</i>			
Farabollini et al. (1999)	Pregnancy and lactation	Exploration, (holeboard) anxiety (elevated plus maze)	↓ head dipping ↓ activity ↓ anxiety
NTP-A EU (2008)	40 µg/kg d; or GD 14-PND 6	PND 85	
	400 µg/kg d o.i.		
Dessi-Fulgheri et al. (2002)	Pregnancy and lactation	Juvenile social interaction, 8 factors derived from PCA of behavior scoring	↑ play directed to females ↓ low intensity mating behavior ↓ sociosexual exploration males ↑ sociosexual exploration females ↓ social interest
NTP-A EU (2008)	40 µg/kg d; or GD 14-PND 6	PND 25, 35, 45	
	400 µg/kg d o.i.		
Della Seta et al. (2005)	Pregnancy and lactation; 40 µg/kg d o.i.	Maternal behavior PND 3, 4; PND 8, 9	↓ duration licking grooming pups
NTP-A			
Porrini et al. (2005)	Pregnancy and lactation; 40 µg/kg d	Social behavior of female offspring	↑ social/nonsoc explore ↓ play with males ↓ social grooming
EU (2008)	40 µg/kg d	PND 35, 45, 55	
NTP-A	o.i.		
Adriani et al. (2003)	Pregnancy and lactation	Novelty preference PND 30-45	↓ females
NTP-A	40 µg/kg d o.i.	Activity PND 35-45	↑ males and females
EU (2008)		Impulsive behavior "adult" Amphetamine response "adult"	↓ males and females ↓ males
Della Seta et al. (2006)	PND 23-30	Male social and sexual behavior	↓ latency to intromission
NTP-A	40 µg/kg d o.i.	PND 45, 90	
EU (2008)			

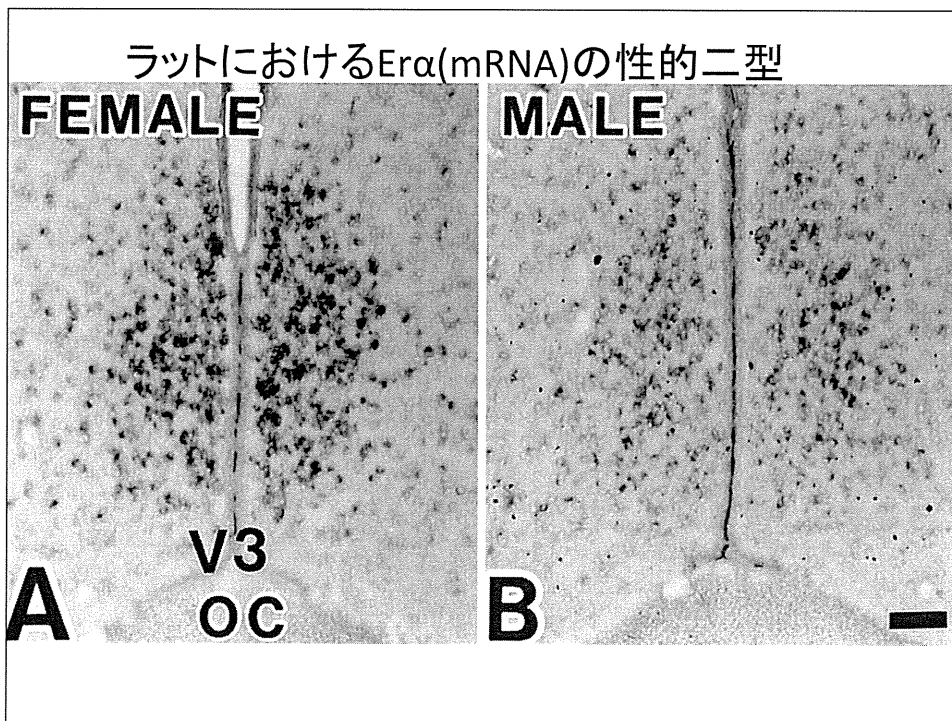
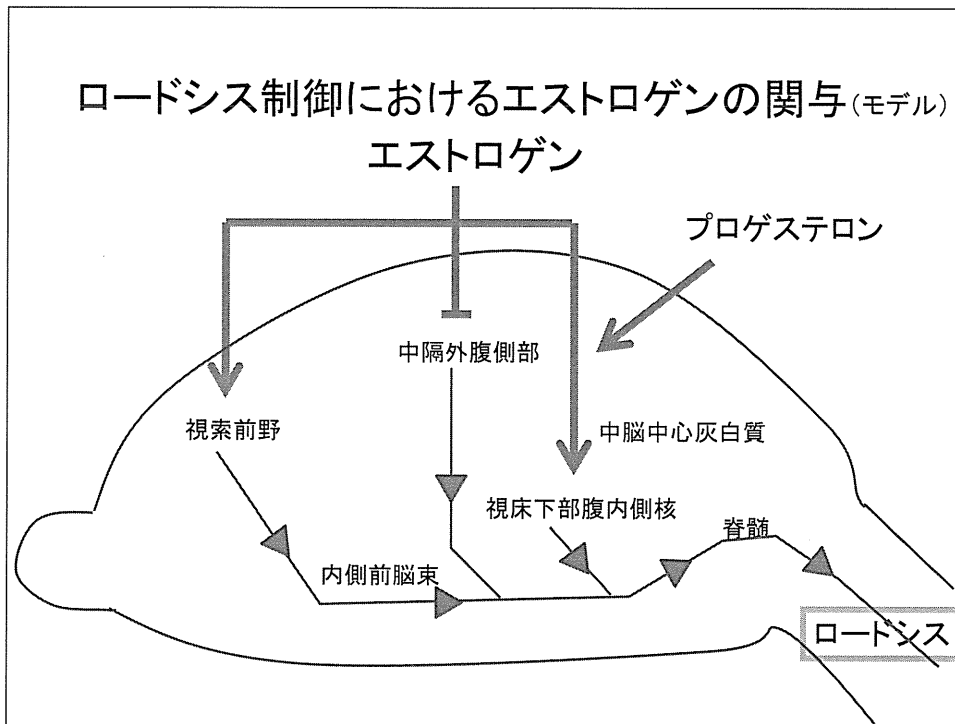
PCA, principal components analysis; o.i., oral instillation; PND, postnatal day; GD, gestation day; BPA, bisphenol A.

## 有害性発現メカニズムの解明

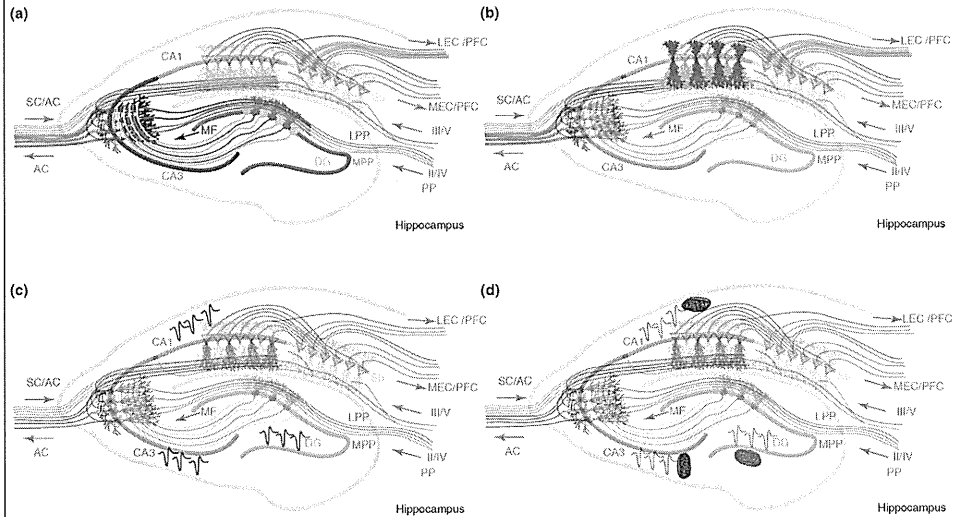


- 問題点: どの程度エストロゲン曝露影響と共通しているか?  
 -ビスフェノールA とジエチルスチルベストールとの比較  
 エストロゲン受容体がどの程度関与しているか?  
 -レポーターマウスの解析、ノックアウトマウスの解析  
 エストロゲン受容体を対象としたスキームで十分かを検証





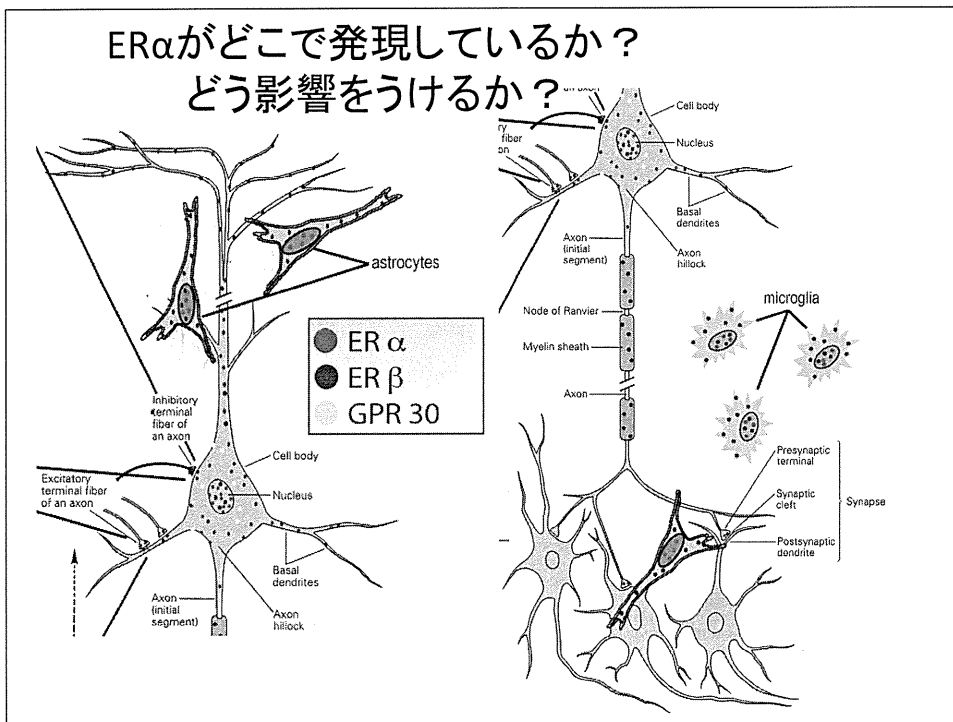
## ER $\alpha$ を発現しているニューロンの投射は？



海馬においても発現

→ BAC-レポーター システムを用いて検証する

## ER $\alpha$ がどこで発現しているか？ どう影響をうけるか？





## まずER $\alpha$ が発現する細胞、投射を 明らかにする

- BACの利用
  - 挿入位置の影響を受けない安定な発現
  - 本来の発現パターンに近い時空間的な発現
  - ホモでEr $\alpha$ を残せる
- レポーター遺伝子の利用
  - 発現細胞を可視化可能 ( $\beta$ ガラクトシダーゼ)
- タグの利用
  - Tau遺伝子との融合により軸索を可視化  
(神経投射の可視化)

BAC-レポーター システム の利用

articles

### **A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes**

Shiaoching Gong<sup>1</sup>, Chen Zheng<sup>1</sup>, Martin L. Doughty<sup>1</sup>, Kasia Losos<sup>1</sup>, Nicholas Didkovsky<sup>2</sup>, Uta B. Schambra<sup>3</sup>, Norma J. Nowak<sup>4</sup>, Alexandra Joyner<sup>5</sup>, Gabrielle Leblanc<sup>6</sup>, Mary E. Hatten<sup>7</sup> & Nathaniel Heintz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>GENSAT Project, <sup>2</sup>Laboratory of Developmental Neurobiology and <sup>3</sup>Laboratory of Molecular Biology, Howard Hughes Medical Institute, The Rockefeller University, 1230 York Avenue, Box 260, New York 10021, USA

<sup>4</sup>Department of Anatomy and Cell Biology, East Tennessee State University, Tennessee 37614, USA

<sup>5</sup>Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York 14263, USA

<sup>6</sup>Developmental Genetics Program, Skirball Institute of Biomolecular Medicine, Department of Cell Biology, New York University School of Medicine and Howard Hughes Medical Institute, New York 10016, USA

<sup>7</sup>National Institute of Neurological Disorders and Stroke, NIH, Bethesda, Maryland 20892, USA

The mammalian central nervous system (CNS) contains a remarkable array of neural cells, each with a complex pattern of connections that together generate perceptions and higher brain functions. Here we describe a large-scale screen to create an atlas of CNS gene expression at the cellular level, and to provide a library of verified bacterial artificial chromosome (BAC) vectors and transgenic mouse lines that offer experimental access to CNS regions, cell classes and pathways. We illustrate the use of this atlas to derive novel insights into gene function in neural cells, and into principal steps of CNS development. The atlas, library of BAC vectors and BAC transgenic mice generated in this screen provide a rich resource that allows a broad array of investigations not previously available to the neuroscience community.

Nature (2003) 425 917-925

Cited 462 times

GENSAT Daily Showcase for Sat, Jul 23, 2011

## The GENSAT Project at The Rockefeller University

GENSAT is an NIH-funded, publicly available gene expression atlas of the developing and adult central nervous system in the mouse. The project also generates transgenic BAC-EGFP reporter, and BAC-Cre recombinase driver mouse lines, which are available as research resources to the scientific community.

Enter GENSAT (Gene Expression Nervous System Atlas)

Principle Investigator: Nathaniel Heintz

Project Officer: Laura Mamounas

Supported by: National Institute of Neurological Disorders and Stroke, contract # NO1-NS-7-2370

BAC Modification Core  
Shiaoching Gong  
Sanjay Mehta  
Sri Ramolla Pullagura  
Lalit Rajeev Reddybhattul  
Caifeng Wang

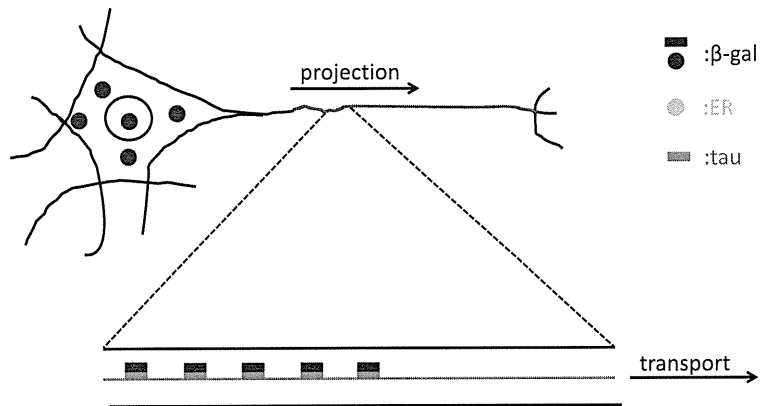
BAC Transgenic Core  
Huifen Feng  
Jesse Lizena  
Kim Schwaeb  
Lanthen Yan

Histology Core  
Terece Duarte  
Ana Milesevic  
Paul Dyer  
Christine Grevstad  
Nedya Kiyochiko  
Christine Lai  
Ming Pearcy  
Su Wei

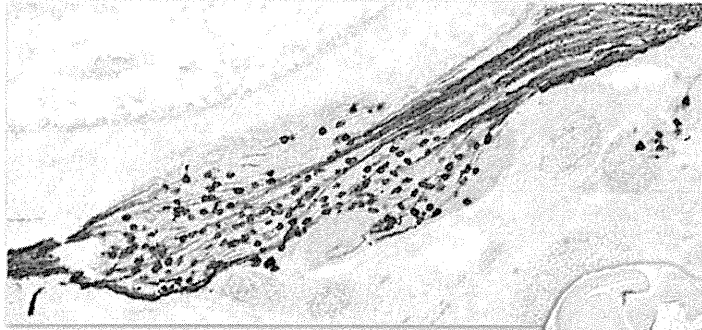
Annotation Core  
Chen Zheng  
Laura Kus  
Ana Milesevic

Bioinformatics Core  
Nick Dilikovsky

## Tau-LacZ gene



*tau-lacZ*, a fusion of the microtubule-associated protein tau and β-galactosidase



WWW.GENSAT.ORG

ER $\alpha$ 遺伝子に融合させることにより、  
ER $\alpha$ 遺伝子を発現しているニューロンの投射を  
明らかにする

Cells of embryonic mouse brain (right) can be tagged by replacing the coding region of a native gene (*TrkC*, in this example) with that of the EGFP 'reporter'. Immunohistochemical detection of EGFP, magnified in the image above, reveals that *TrkC* is normally expressed in nerves that carry sensory information from the face to the brain. The technique allows the nerve-cell projections as well as the cell bodies (small round dots) to be traced.

## 研究の流れ

1. ER $\alpha$ 遺伝子を含むBACクロンの選択と取得
2. BACクロンにレポーター遺伝子を挿入
3. トランスジェニックマウスの作製
4. レポーター遺伝子の発現の確認  
- TGラインの選択
5. 胎児期のBPAおよびエストロゲン曝露
6. 曝露マウスにおけるレポーター遺伝子の発現の確認

ER $\alpha$ ノックアウトマウスの利用

EREレポーターマウスの利用

トランスジーンおよび本来の遺伝子の制御領域の修飾

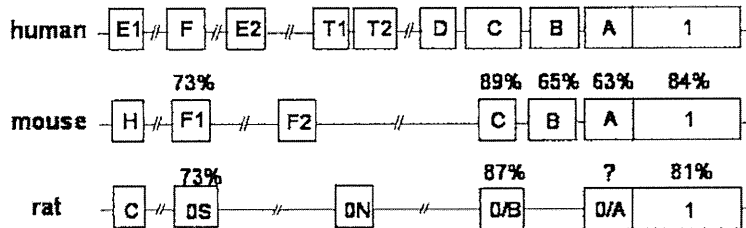
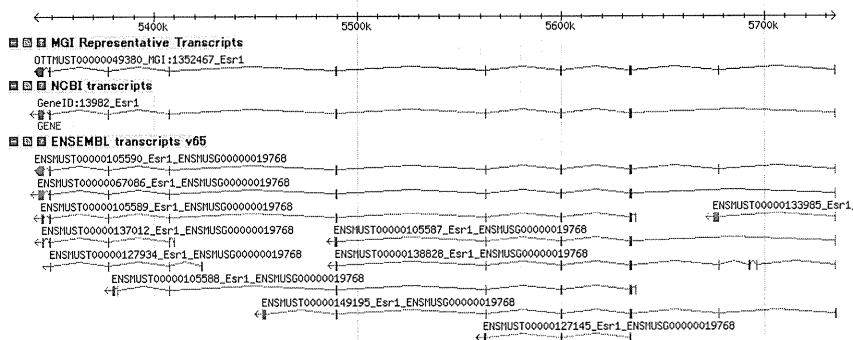
関連遺伝子のBAC-レポーターTGマウスの構築など

# Esr1遺伝子のゲノム構造

■ オーバービュー



■ 詳細



ヒト、マウス、ラットエストロゲン受容体 $\alpha$ 遺伝子のプロモーター配列