

次世代シーケンサー：Miseq(イルミナ)



特長

- 最速のランタイム： サンプルからデータまで最短8時間
- 使いやすさを追求したデザイン： 圧倒的なスピードを誇るサンプル調製と、クラスター形成とデータ解析を一体化した自動化システム
- 高いスループット： **1ランあたり約8Gbのデータ量と、最高で2000万-2500万リードを産出**
- 実績のある次世代シーケンスケミストリー： 最も高精度な変異検出と高品質データ
- 幅広いアプリケーション： キャピラリーシーケンサーアプリケーションに加えて、強力で低コスト、スピーディな次世代シーケンサーアプリケーションもカバー

33

イルミナ社次世代シーケンサーの原理

クラスターごとに1塩基ずつ測定

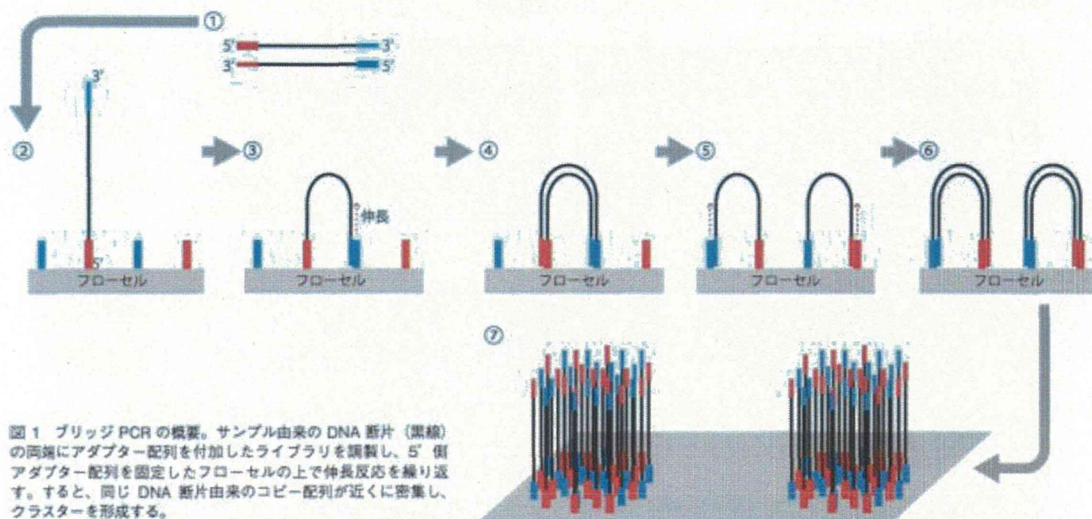
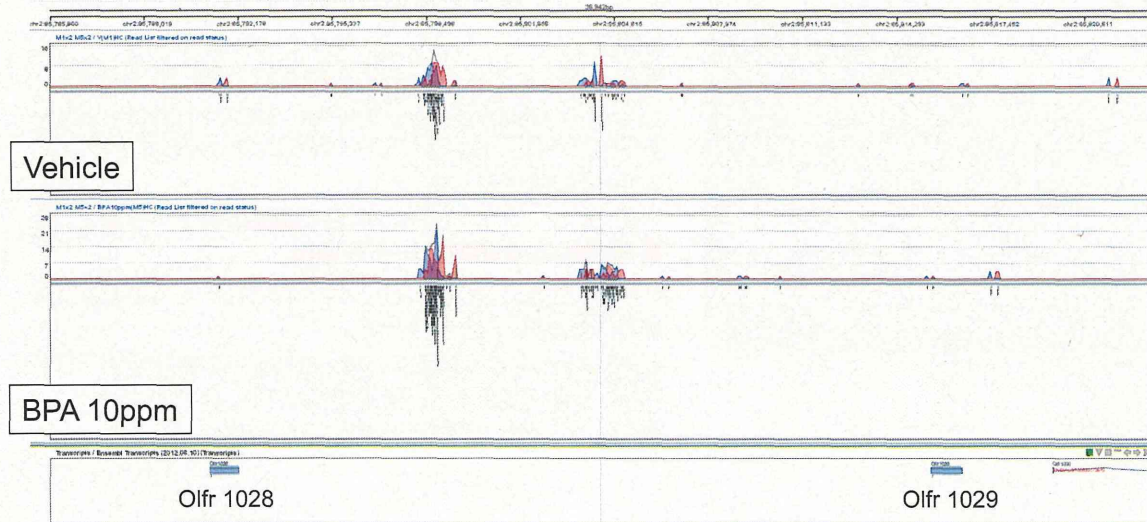


図1 ブリッジPCRの概要。サンプル由来のDNA断片（黒線）の両端にアダプター配列を付加したライブラリを調製し、5'側アダプター配列を固定したフローセルの上で伸長反応を繰り返す。すると、同じDNA断片由来のコピー配列が近くに密集し、クラスターを形成する。

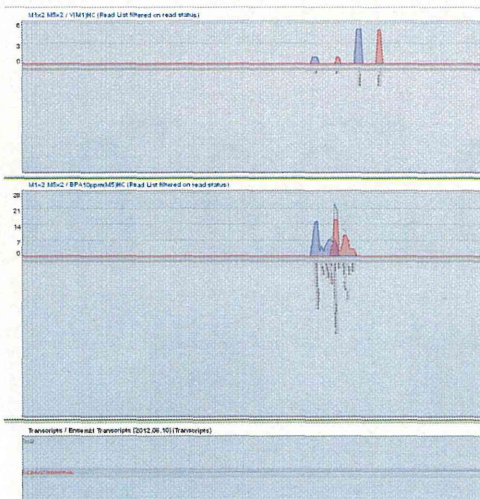
Olf1r近傍におけるメチル化上昇



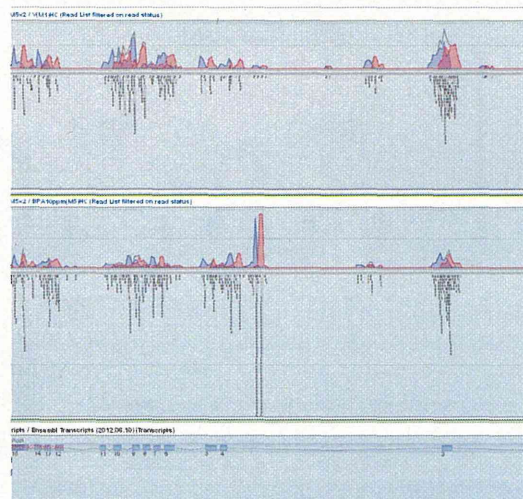
35

Olf1r以外において見出されたメチル化上昇領域候補

Grind2

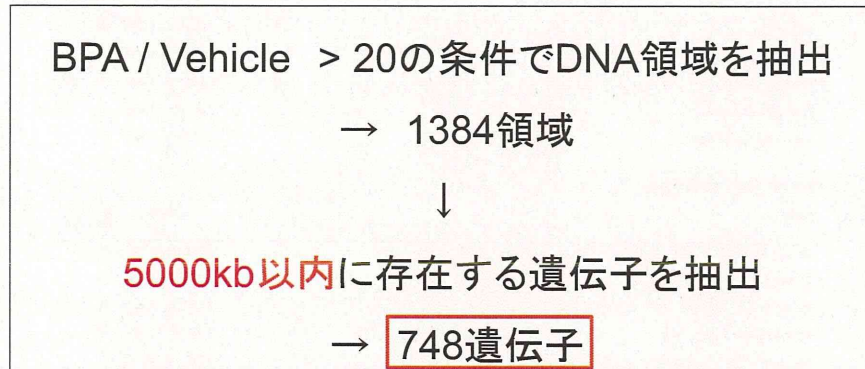


Plcd1



36

高メチル化DNA領域の近傍遺伝子リスト



Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

37

IPA解析

| Top Networks | | |
|--------------|---|-------|
| ID | Associated Network Functions | Score |
| 1 | Cellular Assembly and Organization, Cellular Function and Maintenance, Cell Morphology | 38 |
| 2 | Embryonic Development, Organismal Development, Connective Tissue Development and Function | 38 |
| 3 | Cell Morphology, Cellular Function and Maintenance, Glomerular Injury | 34 |
| 4 | Drug Metabolism, Energy Production, Hereditary Disorder | 28 |
| 5 | Gene Expression, Cellular Development, Cancer | 28 |

| Top Canonical Pathways | | |
|---|----------|-------------------|
| Name | p-value | Ratio |
| Neuropathic Pain Signaling In Dorsal Horn Neurons | 8.24E-05 | 12/108 (0.111) |
| tRNA Splicing | 8.37E-05 | 7/45 (0.156) |
| Molecular Mechanisms of Cancer | 9.3E-05 | 25/378 (0.066) |
| Axonal Guidance Signaling | 1.06E-04 | 29/466 (0.062) |
| fMLP Signaling in Neutrophils | 1.74E-04 | 12/129 (0.093) |

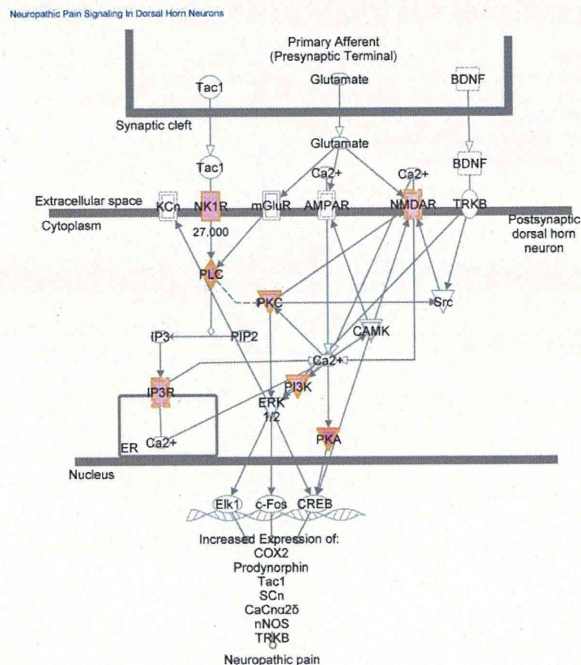
38

IPA解析

| Top Bio Functions | | |
|--|---------------------|-------------|
| Diseases and Disorders | | |
| Name | p-value | # Molecules |
| Hereditary Disorder | 7.03E-06 - 3.20E-02 | 100 |
| Auditory Disease | 7.26E-06 - 3.20E-02 | 16 |
| Neurological Disease | 7.26E-06 - 3.20E-02 | 118 |
| Ophthalmic Disease | 7.26E-06 - 3.20E-02 | 22 |
| Cardiovascular Disease | 3.28E-05 - 3.20E-02 | 70 |
| Molecular and Cellular Functions | | |
| Name | p-value | # Molecules |
| Cellular Assembly and Organization | 1.35E-05 - 3.20E-02 | 93 |
| Cellular Function and Maintenance | 1.35E-05 - 1.93E-02 | 75 |
| Nucleic Acid Metabolism | 2.16E-05 - 3.07E-02 | 30 |
| Small Molecule Biochemistry | 2.16E-05 - 3.20E-02 | 54 |
| DNA Replication, Recombination, and Repair | 3.36E-05 - 2.52E-02 | 11 |
| Physiological System Development and Function | | |
| Name | p-value | # Molecules |
| Behavior | 2.18E-05 - 1.41E-02 | 22 |
| Cardiovascular System Development and Function | 1.27E-04 - 3.20E-02 | 60 |
| Endocrine System Development and Function | 1.27E-04 - 2.44E-02 | 6 |
| Nervous System Development and Function | 1.27E-04 - 3.17E-02 | 80 |
| Tissue Development | 1.27E-04 - 3.20E-02 | 96 |

Canonical Pathways

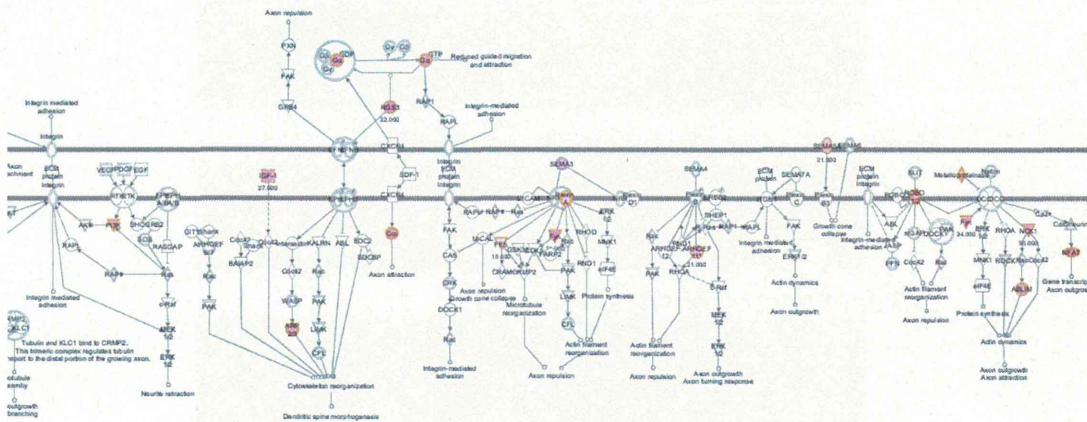
Neuropathic Pain Signaling in Dorsal Horn Neurons



Canonical Pathways

Axonal Guidance Signaling

Axonal Guidance Signaling

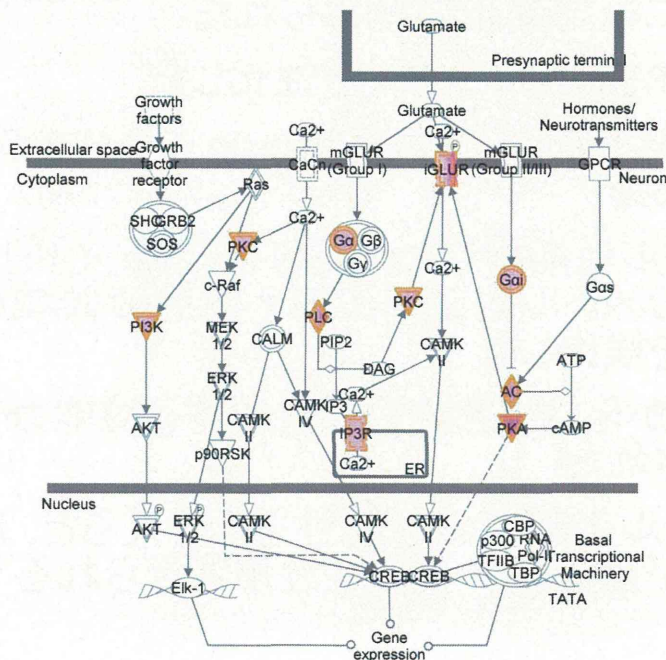


© 2000-2013 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Canonical Pathways

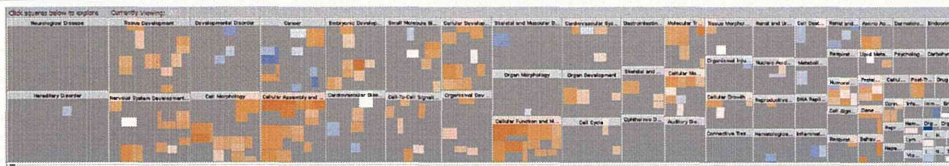
CREB Signaling in Neurons

CREB Signaling in Neurons



© 2000-2013 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

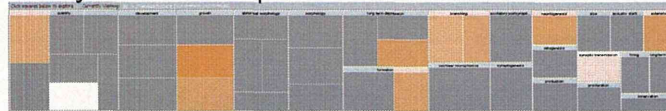
Bio Functions



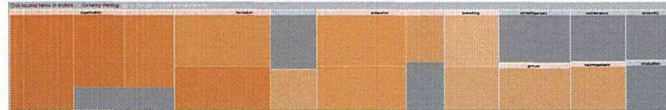
Cellular Assembly and Organization



Nervous System Development and Function



Cellular Function and Maintenance



Molecular Transport



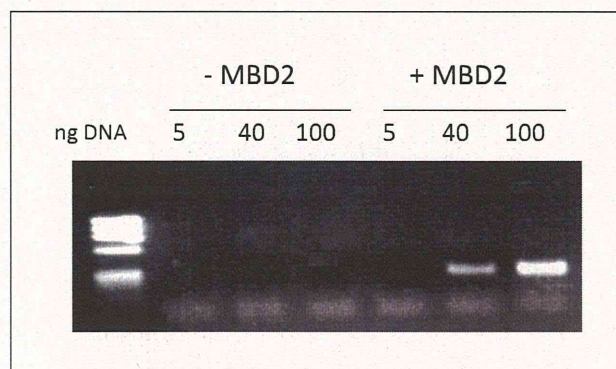
BPA解析まとめと考察

- 成長後に行動変化が認められた
- ヒト型SXRを*in vivo*で弱く活性化した
- 免疫組織解析においてSynapsin とMAP2の上昇が認められた
- DNAメチル化解析 (MBD2-IP) の結果、OlfRレセプター近傍のメチル化上昇に加え複数の領域のメチル化変化を検出した
- IPA解析から、神経機能に関連する機能カテゴリーが抽出された
- DNAメチル化影響の持続性を踏まえると、成長に伴い影響が重篤化する可能性が考えられる

End

45

メチル化DNA断片濃縮の検証 - GFAP Ex1 -



用いたゲノムDNA量依存的にPCR増幅

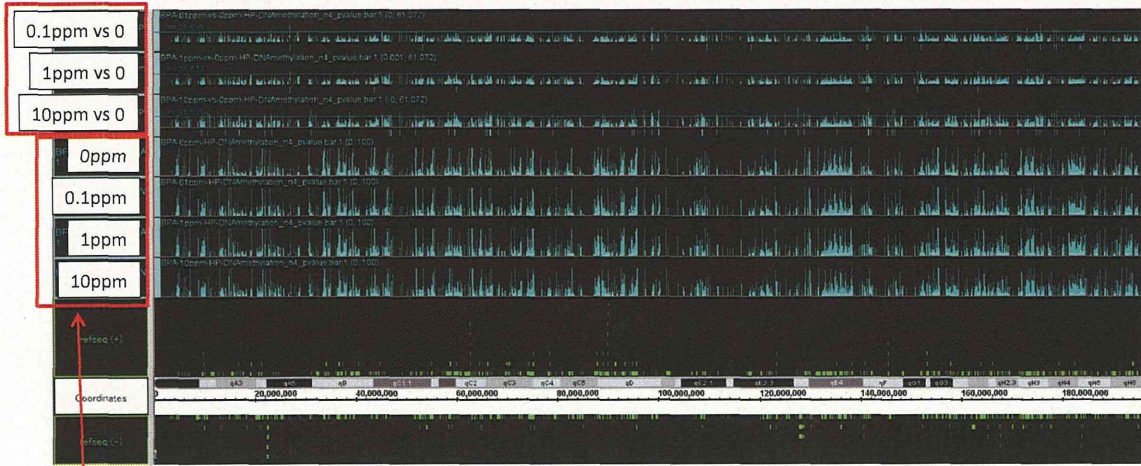


本手法によりメチル化DNA断片が濃縮されることを確認

46

Chr1

変化領域の同定用: 違いを程度を示すグラフの下に、一定の閾値以上の領域を示すバーがある

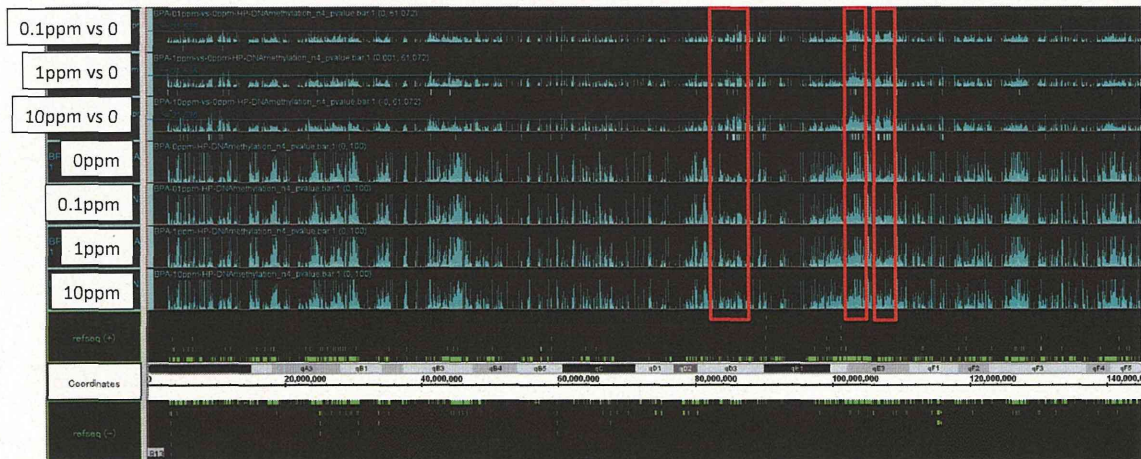


各群のデータ

BPA投与群でDNAメチル化変化を示唆する領域は認められなかった

Genome version:
mm8 47

Chr7

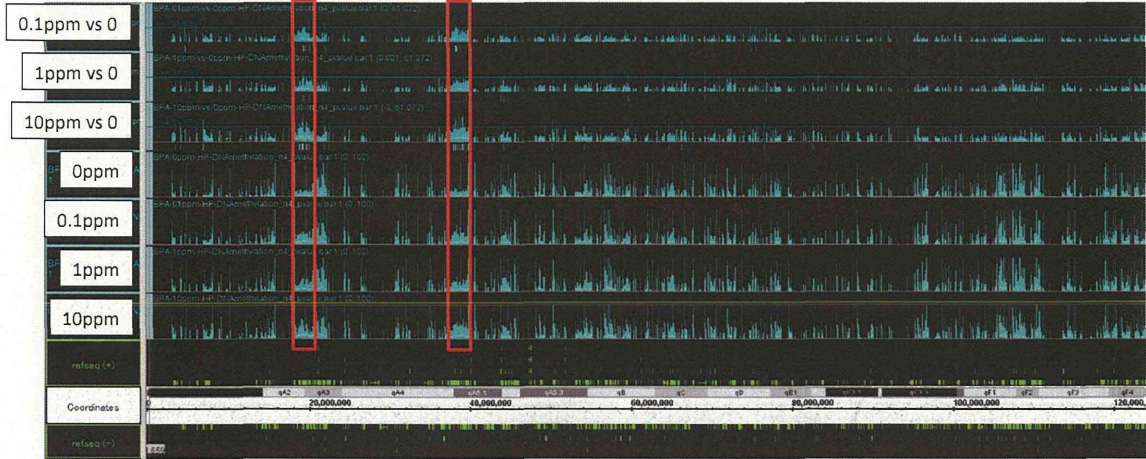


| | |
|---|---------|
| UCSC Known Genes Based on UniProt, RefSeq, and GenBank mRNA | |
| 01fr387 | 01fr298 |
| 01fr384 | Fo1h1 |
| UCSC Known Genes Based on UniProt, RefSeq, and GenBank mRNA | |
| Dub2a | 01fr598 |
| 01fr597 | 01fr604 |
| 01fr472 | 01fr477 |
| 01fr474 | 01fr476 |
| 01fr475 | |
| 01fr485 | 01fr486 |
| 01fr486 | 01fr487 |
| 01fr487 | 01fr488 |
| 01fr488 | 01fr489 |
| 01fr489 | 01fr490 |
| 01fr490 | 01fr491 |
| 01fr491 | 01fr492 |
| 01fr626 | Hbb-b2 |
| 01fr628 | Hbb-b1 |
| 01fr629 | Hbb-y1 |
| 01fr65 | 01fr632 |
| 01fr66 | 01fr66 |
| R0311853 | 01fr64 |
| Hbb-0b1 | 01fr631 |
| 01fr586 | 01fr587 |

Olf1r cluster

Genome version:
mm8 48

Chr9

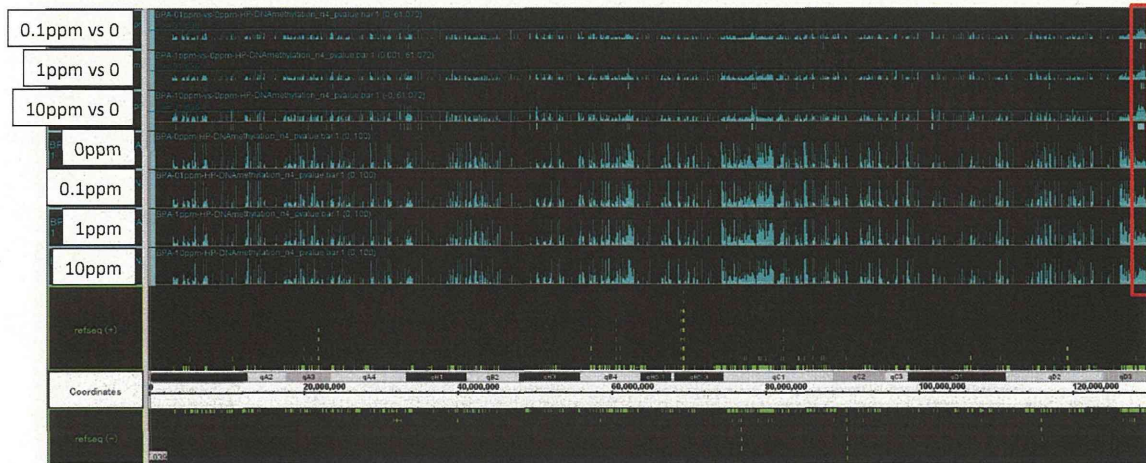


| UCSC Known Genes Based on UniProt, RefSeq, and GenBank mRNA | | | | | | |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 |
| 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 |
| 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 |
| 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 |
| 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 |
| 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 | 01fr936 |

Olf cluster

Genome version:
mm8 49

Chr10

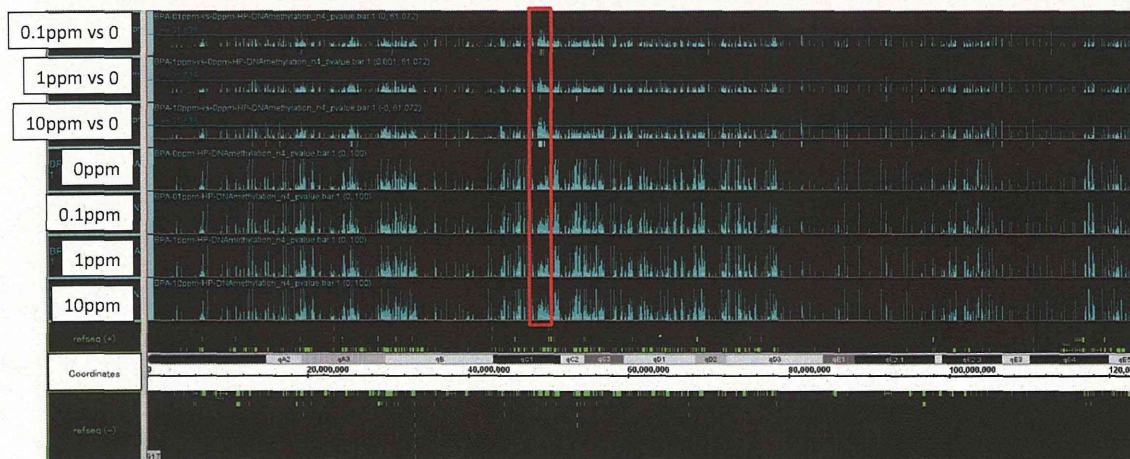


| UCSC Known Genes Based on UniProt, RefSeq, and GenBank mRNA | | | | | | |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 |
| 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 |
| 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 |
| 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 |
| 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 |
| 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 |
| 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 | 01fr703 |

Olf cluster

Genome version:
mm8 50

Chr14

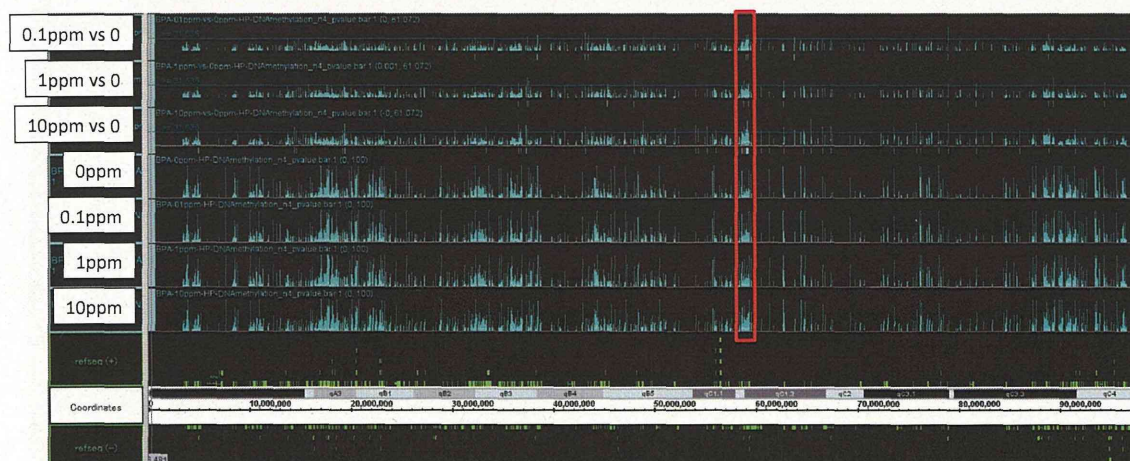


UCSC Known Genes Based on UniProt, RefSeq, and GenBank mRNA
 01fr723 | 01fr724 | 01fr730 | 01fr732 | Tlr11 | 01fr747 |
 | | | | | Tlr11 | | |
 | | | | | 01fr735 | | |

Olfcr cluster

Genome version:
mm8 51

Chr16

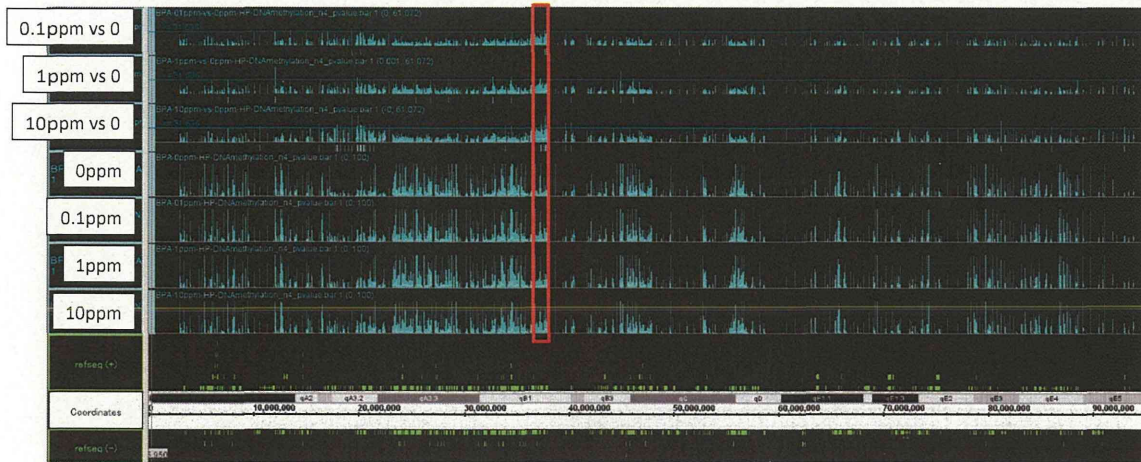


UCSC Known Genes Based on UniProt, RefSeq, and GenBank mRNA
 Olhd1 | 01fr183 | 01fr191 | 01fr196 |
 | | | |
 | | | |
 | | | |
 | | | |

Olfcr cluster

Genome version:
mm8 52

Chr17

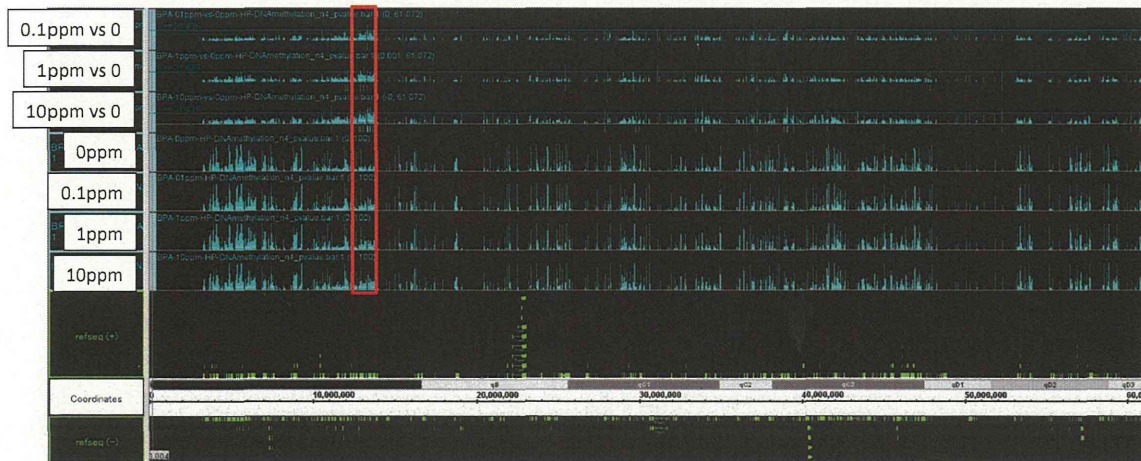


UCSC Known Genes Based on UniProt, RefSeq, and GenBank mRNA
 01fr121 | 01fr124 | 01fr125 | 01fr138

O1fr cluster

Genome version:
mm8 53

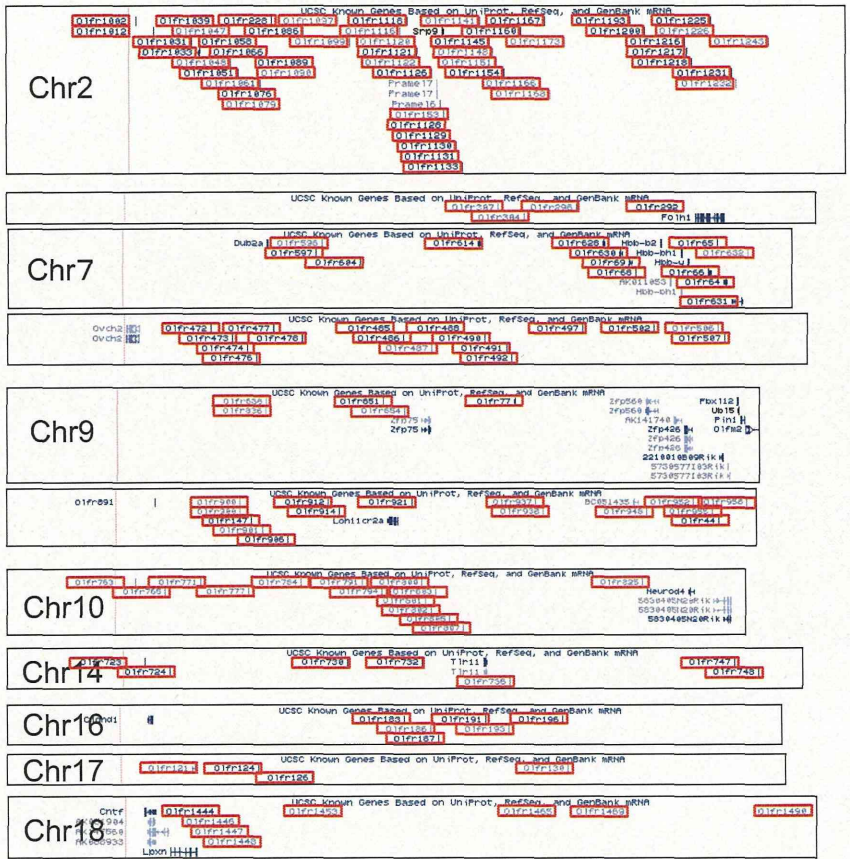
Chr19



UCSC Known Genes Based on UniProt, RefSeq, and GenBank mRNA
 Cntf | 01fr1444 | 01fr1453 | 01fr1465 | 01fr1469 | 01fr1498
 RK051994 | 01fr1446 | 01fr1447 | 01fr1448
 RK147258 | 01fr1447 | 01fr1448
 RK089933 | 01fr1448
 Loxn HHH

O1fr cluster

Genome version:
mm8 54



発生-発達期におけるビスフェノール類の代謝動態と遅発性行動影響に関する研究

研究分担者 氏名岩野 英知 酪農学園大学 獣医学類 准教授

研究要旨

これまでの研究成果から、BPA に対する胎仔期の代謝活性が脆弱であることが分かっており、特に胎盤移行の関連から妊娠後期のリスクが高いと考えている。本プロジェクトにおいては、2011 年度に胎仔から新生仔期の UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT2B1) の発現、ならびに BPA、BPF、BPAF に対する代謝活性を調べ比較した。また、2012 年度には、妊娠時期の母親の葉酸摂取量の違いにより、BPA の出生成熟後の行動影響に違いを与えるのか比較した。本年度は、それらのデータを再検証し、報告する。特に遅発性行動影響に関しては、妊娠前期と後期の感受性の違いを比較検討する。

以下すべて 10.5 ポイント

A. 研究目的

BPA および BPA 類似体の次世代リスクを①代謝動態と②遅発性行動影響という点から評価する。

① 代謝動態

BPA の代謝を担う UGT2B1 は、胎仔期の発現が低く、それに伴い BPA 代謝活性も低いため胎仔期のリスクが高い事が知られている。妊娠前から出生前後において、BPA 類似物質 (BPF、BPAF) の母親、胎仔における代謝動態を明らかにして BPA と比較し、これら物質のリスクを推測する。今年度はデータを取り直し精査してまとめた。

② 遅発性行動影響

前年度までに母親の栄養状態 (低葉酸の状態) により BPA の影響が出やすくなり、子供の成熟後の不安行動を増強することを示してきた。今年度は特に BPA による不安行動の感受性が高い時期が妊娠後期のみであるのかを調べるために、妊娠前期のみの BPA 投与群を作り、比較検討した。

B. 研究方法

① 代謝動態

胎齢 18 日マウス胎仔、新生仔 (日齢 0 日)、3 日齢、7 日齢、14 日齢、21 日齢の各仔マウス、また各々の母胎の肝臓における UGT の遺伝子発現量を定量的 RT-PCR により測定した。また、仔マウスの肝臓ミクロゾーム画分における BPA、BPF、BPAF に対する UGT 酵素活性を測定した。

② 遅発性行動影響

交配 2 週間前から低葉酸餌 (11ug / kg) と高葉酸餌 (260ug / kg)、通常餌 (260ug / kg) を給餌し、1) 前期投与群 (妊娠 5 日~12 日齢投与) 2) 後期投与群 (妊娠 11~18 日齢投与) に BPA を胃内強制投与した (高 BPA : 10mg / kg / day、低 BPA : 50ug / kg / day、BPA 無し : オリーブオイルのみ)。出生後、3 週齢までは、それぞれの群で同様の餌を給餌し、その後全ての群で通常餌にて 10 週齢まで飼育し、行動試験 (高架式十字迷路試験) を行った。

本実験は、酪農学園大学動物実験委員会にて審査、受理され、適切な実験計画のもとに行われた。

(倫理面への配慮)

C. 研究結果

① 代謝動態

● UGT2B1 の遺伝子発現

BPA の代謝を担う UGT2B1 の肝臓における遺伝子発現量は、胎仔期、新生仔期のオス、メスともに母親のおよそ 1/20 程度まで低い事が分かった (図 1)。その後 3 日齢からは、遺伝子発現が上昇してくることが分かった。母親に関しては、大きな変動は見られなかった。

● UGT 酵素活性

BPA、BPF に対する UGT 酵素活性は、同様な挙動を示し、胎仔期、新生仔期 7 日齢までが低く、その後日齢とともに上昇した (図 2)。一方、BPAF に対する UGT 酵素活性は、どの日齢においても BPA や BPF のおよそ 1/50 程度まで低かった (図 2)。

母親に関しては、出生前後で活性が少し低い

傾向があった(図3)。

② 遅発性行動影響

妊娠母親への低葉酸餌給仕において、BPA 投与によりメスで不安行動が増強されやすく、低容量の BPA 投与によっても不安行動が高くなる傾向があった(図5)。また、BPA の感受性が高い時期は、妊娠後期であることが明らかになった(図4、5)。

D. 考察

① 代謝動態

BPF に対する UGT 酵素活性の結果から、その代謝を担うのは BPA と同様に、UGT2B1 である事が推察された。また両基質の代謝は、胎仔期から7日齢までが低く、この時期に影響を受けやすい可能性が示唆された。また、BPAF に関しては、どの日齢でも UGT 酵素活性が低く、代謝を受けにくい基質であることが示唆された。出生後7日まで UGT 酵素活性が低い事から、この時期の子の直接暴露もリスクが高い可能性がある。特に BPAF は、母、子ともに代謝を受けにくい可能性があるため、今後、UGT 以外の代謝活性も調べて行く必要がある。

② 遅発性行動影響

通常餌より、低葉酸餌においてメスにのみ BPA による行動に影響が見られた。この行動影響は、妊娠前期では有意な影響は無く、妊娠後期のみ BPA 暴露で有意な影響が見られた。これまで我々が報告してきた胎盤通過による胎仔への抱合体移行が関与している事が示唆される。また妊娠後期は、神経発生が盛んな時期でもあり、神経発達の何らかのシステムに影響を与えている可能性もある。今回の低葉酸餌の状態は、人の食事に含まれる葉酸量とほぼ同程度であり(体重換算)、興味深いデータである。今後、栄養状態と BPA の影響については、さらに検討を重ねて行く必要がある。

E. 結論

妊娠後期胎仔から新生仔7日齢までは、BPA、BPAF の代謝能力は低く、どちらも UGT2B1 の低発現によるものと推察された。一方、BPAF に対する酵素活性はかなり低く、特に妊娠後期から出生前後において、リスクが高い可能性がある。BPAF の毒性

と代謝排泄に関してさらに詳細な検討が必要である。また、遅発性行動影響に関しては、通常餌では大きな影響は見られず、低葉酸餌においてメスにのみ行動影響が見られた。栄養状態と化学物質の影響については、人の食生活を考える上で興味深いデータであり、さらなる検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表 (本研究に関わる主なもの3編に◎を付けてください)

1) 書籍
なし

2) 雑誌

- ① Iwano H, Ujita W, Nishikawa M, Ishii S, Inoue H, Yokota H. Effect of dietary eugenol on xenobiotic metabolism and mediation of UDP-glucuronosyltransferase and cytochrome P450 1A1 expression in rat liver. *Int J Food Sci Nutr.* (2013) in press
- ② L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in canine mammary gland tumors. Fukumoto, S., Hanazono, K., Komatsu, T., Iwano, H., Kadosawa, T. and Uchide, T. *J. Vet. Med. Sci.* 75:431-437. (2013.)
- ③ L-type amino acid transporter 1 (LAT1): a new therapeutic target for canine mammary gland tumour. Fukumoto, S., Hanazono, K., Komatsu, T., Ueno, H., Kadosawa, T. Iwano, H. and Uchide, T. *Vet. J.* 198: 164-169. 2013
- ④ A new treatment for human malignant melanoma targeting L-type amino acid transporter 1 (LAT1): a pilot study in a canine model. Fukumoto, S., Hanazono, K., Dah-Renn, FU., Endo, Y., Kadosawa, T., Iwano, H. and Uchide, T *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 439: 103-108. (2013)
- ⑤ *Mycoplasma* species isolated from intramammary infection of Japanese dairy cows. Higuchi, H., Gondaira, S., Iwano, H., Hirose, K., Nakajima, K., Kawai, K., Hagiwara, K., Tamura, Y., Nagahata, H. *Vet. Rec.* 172:557. (2013)

- ⑥ Effects of vitamin E supplementation on cellular α -tocopherol concentrations of neutrophils in Holstein calves. Higuchi H, Ito E, Iwano H, Oikawa S, Nagahata H. *Can J Vet Res.* 77:120-125. (2013)
- ⑦ Relationship between concentration of lingual antimicrobial peptide and somatic cell count in milk of dairy cows. Kawai, K., Akamatsu, H., Obayashi, T., Nagahata, H., Higuchi, H., Iwano, H., Oshida, T., Yoshimura, Y., Isobe, N. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 15:298-301. (2013)

2. 学会発表

1) 環境ホルモン学会第16回研究発表会(2013年12月)

- ① 小池菜々子、岩野英知、大谷尚子、柳沢梨沙、井上博紀、横田博 胎仔腸におけるビスフェノール A グルクロン酸抱合体の動態
- ② 大谷尚子、岩野英知、須田光紫、井上博紀、横田博 妊娠期ビスフェノール A 暴露による次世代個体の行動影響
- ③ 井上博紀、大谷尚子、柳沢梨沙、小池奈々子、細川佳純、岩野英知 ラット子宮灌流モデルを用いたビスフェノール F グルクロン酸/硫酸抱合体動態の解明

2) 第156回日本獣医学会学術集会(2013年9月)

- ④ 藪崎梨沙、岩野英知、大谷尚子、須田光紫、井上博紀、横田博 胎仔腸におけるビスフェノール A グルクロン酸抱合体の動態
- ⑤ 大谷尚子、岩野英知、須田光紫、井上博紀、横田博 妊娠期ビスフェノール A 暴露による次世代の行動影響

H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

- ① 特許取得
なし
- ② 実用新案登録
なし
- ③ その他

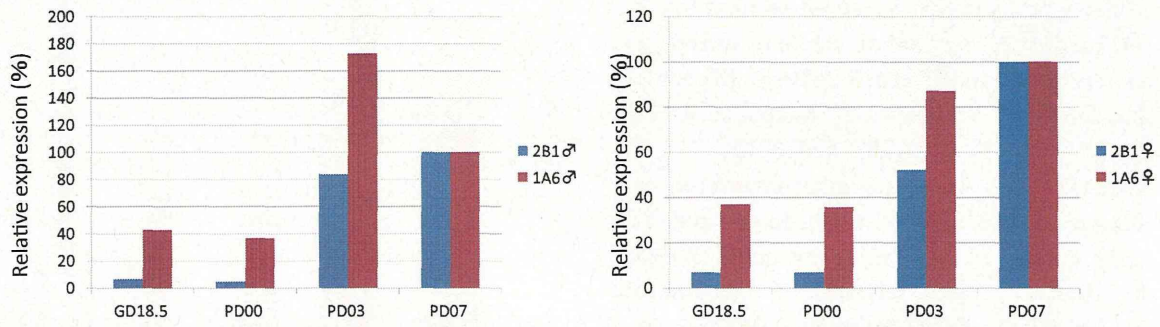


図1 新生仔におけるUGT発現の変動比較
 妊娠18.5日、出生0日、3日、7日でのUGT2B1の発現量は、7日と比較すると約5%前後である。
 一方、UGT1A6では、40%前後の発現がみられた。

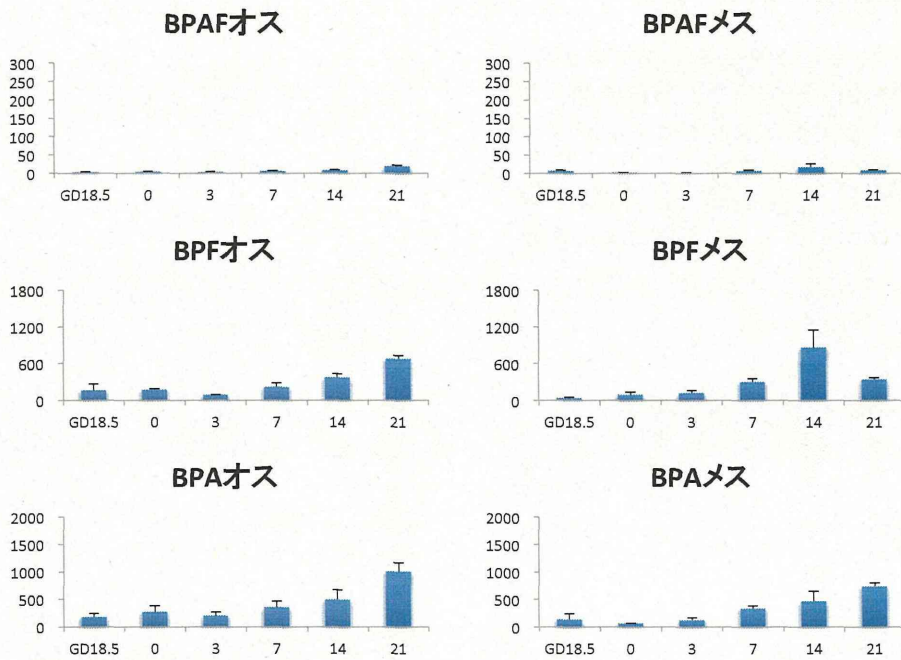


図2 発生一発達期における代謝動態
 ・ 妊娠18.5日、出生0日、3日、7日、14日、21日の肝臓におけるBPAF、BPA、BPFに対するグルクロン酸抱合活性を調べた。
 ・ BPAFの活性が特に低い。BPF、BPAの1/30~1/50くらい
 ・ 雌雄差はあまりない
 ・ 7日目くらいまで活性が低い

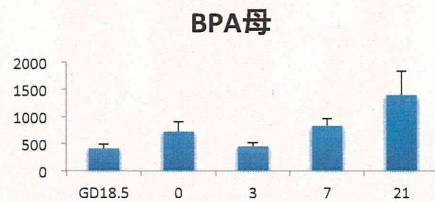
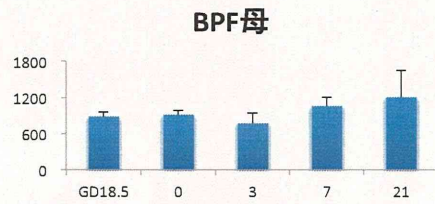
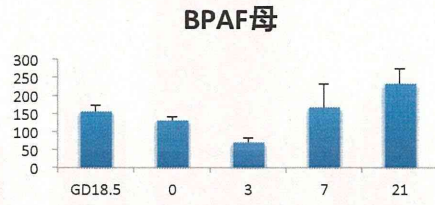


図3 母親の肝臓におけるグルクロン酸抱合活性

- BPAFの活性が低い(1/5くらい)
- BPAは妊娠、出産前後で若干活性が低くなるが、大きな活性の変動はない。

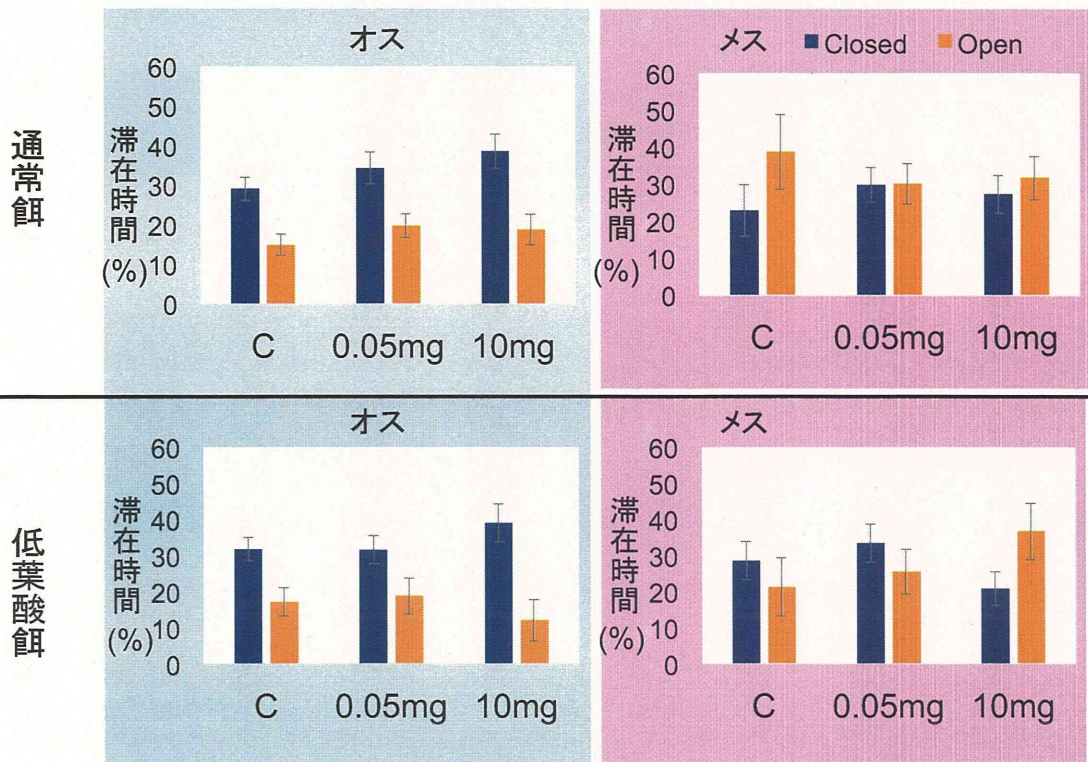


図4 BPAの前期投与による遅発性行動影響
高架式十字迷路により行動影響を調べた結果である。
全投与群において、BPA投与の影響に有意差はなかった。

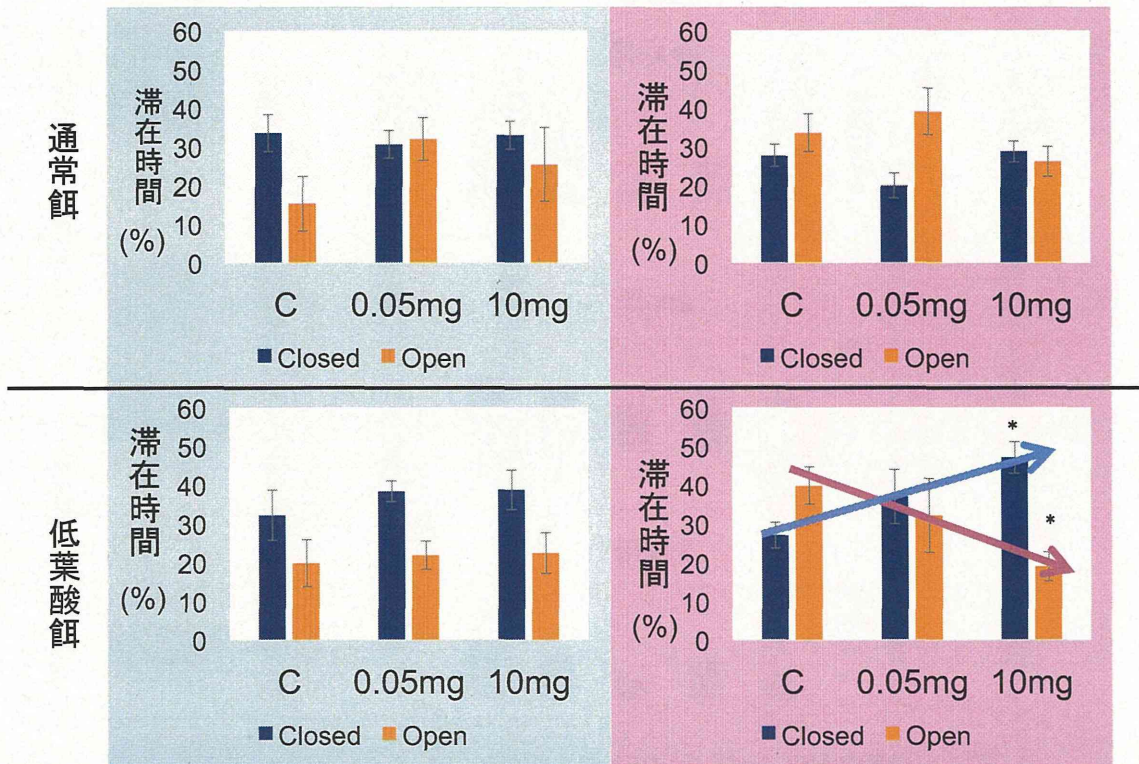


図5 BPAの後期投与による遅発性行動影響
 高架式十字迷路により行動影響を調べた結果である。
 低葉酸餌のメスにてBPAの影響が大きく、クローズドアームへの滞在時間が増えていた。

平成25年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）
神経系発生-発達期の化学物質暴露による遅発中枢影響解析に基づく
統合的な情動認知行動毒性評価系確立に資する研究（H23-化学-一般-004）
分担研究報告書

分担研究課題：「情動認知行動異常発現メカニズムの解明」
-エストロゲン受容体 β 欠失マウスの脳における遺伝子発現プロファイル-

研究分担者 北嶋 聡
国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・室長

研究要旨

本分担研究では、本研究班全体の目的に則り、特に胎児や子どもへの化学物質暴露による遅発性の情動認知行動異常を今後の行政施策へ反映させる必要性を考慮し、標準プロトコルの確立、及び客観的評価指標の提案を目指す中、網羅的遺伝子発現変動解析によって、「情動認知行動異常に至る分子メカニズム」を明らかにする事を目的とする。本研究班では、情動認知行動異常の客観的評価指標の為の基準点として、特徴的な異常を示す遺伝子改変マウス等が位置付けられ、この中でも、既に情動認知行動異常等を同定済みである複数のエストロゲン受容体（ER）関連遺伝子改変マウスに着目している。

今年度（平成25年度）はこの目的に向け、成熟期の雄性ER β 欠失マウスの脳3部位（大脳皮質、海馬、脳幹）について網羅的に遺伝子発現変動を解析し、野生型のものと比較・検討した。その結果、野生型と比較しER β 欠失マウスの大脳皮質、海馬及び脳幹では、それぞれ752（増加：728、減少：24）、315（増加：162、減少：153）及び27（増加：11、減少：16）プローブセット（ps）の有意な発現変動が認められた。脳3部位に共通して、発現が有意に増加した遺伝子はSnapcl（snRNA-activating protein complex subunit 1）の1つ、他方、減少した遺伝子はEsr2（Estrogen receptor 2 = ER β ）とSstr1（Somatostatin receptor 1）遺伝子の2つであった。エストロゲンがSstr1遺伝子の発現制御に関わるとの報告があるが、昨年度検討したER α 欠失マウスの脳3部位では野生型と同様であったことから、この発現制御はER β を介したものと考えられる。

各部位における解析の結果、ER β 欠失マウスの大脳皮質では、神経活動が低下（過分極）及び概日リズムが乱れる可能性が示唆された。海馬及び脳幹では、野生型マウスとの間に有害事象に関わる違いは認められなかった。昨年度検討したER α 欠失マウスでは、大脳皮質と脳幹で共通して、神経活動の活性化及び概日リズムが乱れる可能性が示唆された。ER β 欠失マウスの大脳皮質でも概日リズムが乱れる可能性が示唆された為、今後、特にエストロゲンと概日リズムのシグナルネットワークとの関連に着目した検討により、遅発性の情動・認知行動毒性の分子基盤が、より明らかになることが期待される。

A. 研究目的

本分担研究では、本研究班全体の目的に則り、特に胎児や子どもへの化学物質暴露による遅発性の情動認知行動異常を今後の行政施策へ反映させる必要性を考慮し、標準プロトコールの確立、及び客観的評価指標の提案を目指す中、網羅的遺伝子発現変動解析によって、「情動認知行動異常に至る分子メカニズム」を明らかにする事を目的とする。

本研究班では、情動認知行動異常の客観的評価指標の為の基準点として、特徴的な異常を示す遺伝子改変マウス等が位置付けられ、この中でも、既に情動認知行動異常等を同定済みである複数のエストロゲン受容体 (ER) 関連遺伝子改変マウスに着目している。今年度 (平成 25 年度) は、この目的遂行の為に、成熟期 (15 週齢) の雄性 ER β 欠失マウスの脳 3 部位 (大脳皮質、海馬及び脳幹) のサンプルについて、Percellome 法により網羅的に遺伝子発現変動を解析し、野生型のものと比較・検討した。

B. 研究方法

マウスの系統は C57BL/6NCrSlc (日本エスエルシー) を用いた。ER β 欠失マウスは、Pierre Chambon 教授 (フランス、ルイパスツール大学) より供与いただいた。比較に際し、野生型マウスと ER β 欠失マウスは同腹のものを使用した。

遺伝子発現変動解析に際しては、15 週齢の成熟期マウスの脳 3 部位 (大脳皮質、海馬、脳幹) (午前 10 時) (各 n=4) について、Percellome 法 (遺伝子発現値の絶対化手法) (Kanno J et al. BMC Genomics 7:64, 2006) による網羅的遺伝子発現解析をマイクロア

レイ [Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0] を用いて検討した。この際、我々が独自に開発した「MF analyzer」を用いて網羅的に解析した。脳 3 部位は、氷冷下にて左脳につき、小脳、脳幹部、海馬、大脳皮質の順に採取することにより得た (右脳はホルマリン固定した)。

有意差の検定は、Student の t 検定によりおこない、P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定した。実験データは、平均値±標準偏差 (SD) にて示した。

Total RNA の分離精製

RNA 抽出にあたっては、マウス組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4°C で一晩浸漬し、RNase を不活化し、RNA 抽出操作までは -80°C にて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy キット (キアゲン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破砕液を調製した。得られた破砕液の 10 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

GeneChip 解析

全 RNA 5 μ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7 プロモーターが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ