

**脳機能発達に対する環境因子の影響：
オリジナル oligonucleotide array を用いた遺伝子発現解析**

青山学院大学 理工学部 化学・生命科学科
田代朋子

はじめに

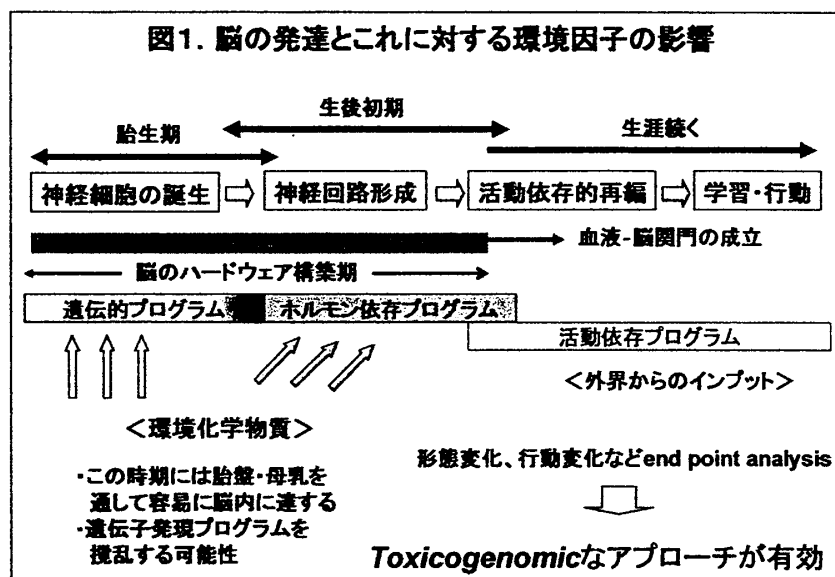
生物に対する環境因子、なかでも天然あるいは人工の毒物といった外来分子、の影響は、個体の死、形態的な異常の発生、発がん、催奇形性など、目に見える最終像によって分析されてきた。このような古典的な毒性学に対して、そこに到る過程の遺伝子発現変化を解析することにより鋭敏に影響を検出し、毒性発揮のメカニズムを解明しようとするのが遺伝情報の解読をベースとして急速に発展しているトキシコジェノミクス (Toxicogenomics ゲノム毒性学) である。脳の場合は特に、最終像である「行動変化」や「知的障害」などから原因となる過程や分子を明らかにするのは容易ではないことから、トキシコジェノミクスによるアプローチが有効と考えられる。

本稿ではまず、脳の機能的発達過程の特殊性をとりあげ、このようなシステムに対する環境因子の影響評価を目的とした独自の DNA マイクロアレイの開発について述べ、実際にこれを用いた結果の一例を示したい。

脳の発達と遺伝子発現

個体を構成するすべての細胞は同じセットの遺伝子 DNA を持つが、ある一つの細胞が蛋白質合成のために使用しているものはその一部で、その選び方は細胞の種類によって異なり、同じ細胞でも発育時期によって異なる。神経細胞であれば、信号分子である神経伝達物質を合成する酵素やこれをキャッチする受容体など、数多くの「神経固有」蛋白の遺伝子を使用する。一方、栄養分子を分解してエネルギーを取り出す反応を触媒する酵素群のように、どの細胞も共通に利用する遺伝子も多数あり、「ハウスキープینگ遺伝子」と呼ばれている。このように、ある遺伝子の情報が実際に蛋白質を合成するために利用されている時、その遺伝子が「発現」しているという。

それぞれの細胞がその役割に応じた形と機能を持つように変化していくことを「細胞分化」と呼ぶ。それは各細胞がその種類の細胞に特有の蛋白質を合成するようになること、すなわち特定のセットの遺伝子を発現するようになることを意味する。ところが脳は神経細胞が分化しただけでは完成しない。神経細胞が移動し、神経突起を伸ばし、互いに接合部「シナプス」を介して回路を作ることによってはじめて機能し、この回路を使って外界からの刺激に応答してゆく過程で再編成されながら完成する。言い換えれば、細胞間の相互作用や外界からの刺激によって遺伝子発現が順次変化して脳はできあがるのである。胎生後期から生後初期の限られた期間内に起こるこの一連の「神経回路形成過程」は、わずかな移動のタイミングや位置のずれによっても修復不可能な変化を脳に残す最も危険な時期である。その上、この時期にはまだ血液-脳関門と呼ばれる防御機構は未完成で、さまざまな外来分子が血流を介して脳内に侵入する危険性も高く、二重の意味で感受性が高い。実際、甲状腺ホルモンが不足することによるクレチン症をはじめ、低酸素、栄養不良、アルコールやある種の化学物質に対する曝露など、「感

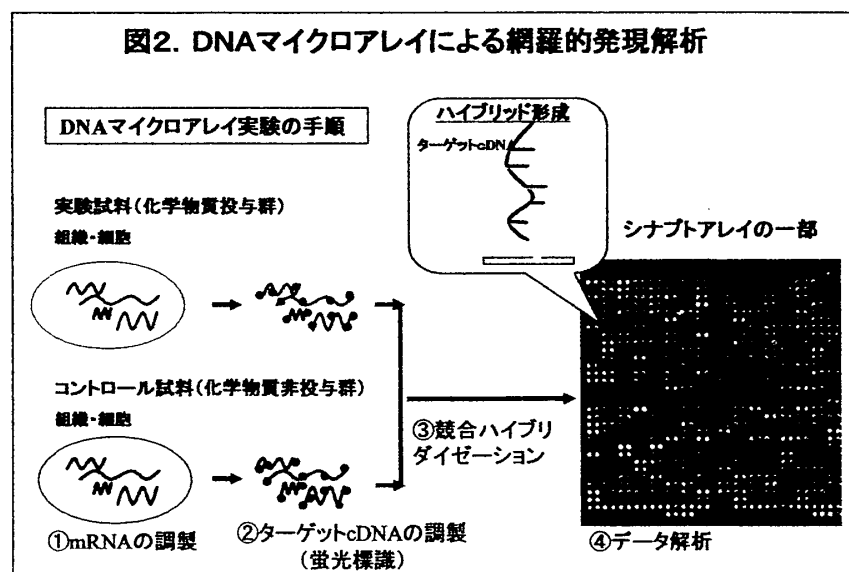


受性期」に受けた攪乱が知的障害を起こすことが知られている。近年注目されている「自閉症」、「注意欠陥多動障害 (ADHD)」など、社会性の発達不全ともいえる子供の行動異常も、遺伝的要因だけでは説明できず、何らかの環境要因が感受性期に加わって脳の機能発達が一部阻害された結果としての「発達障害」と考えられている(図1)。

様々な新規化学物質が農薬、食品添加物、可塑剤などとして開発され利用されているが、それらが最も感受性の高い発達期の脳に与える影響はほとんど未知である。その最大の理由は、定量的かつ感度の高い評価法がないことによる。脳の発達過程を通じた遺伝子発現のプログラムに注目し、これが化学物質によってどのように変化するかを解析することができれば、行動解析や形態観察に代わる現実的な毒性評価法となるに違いない。私達は、このような目的に沿って感度と定量性の高い DNA マイクロアレイの開発を試みている。

トキシコジェノミクスと DNA マイクロアレイ

トキシコジェノミクスの最大の道具といえるのが、多数の遺伝子の発現を網羅的に解析できる DNA マイクロアレイ法である。これは図2に示すように、多数の遺伝子に対応する DNA



断片またはオリゴヌクレオチドをプローブとしてスライドガラス、チップなどに固定したものである。ここに二種類の試料、例えば正常サンプルと化学物質に曝露した試料、から抽出した RNA を逆転写して得られた cDNA をそれぞれ別々の二種類の蛍光色素で標識し、等量ずつ混合して反応させる。プローブと相補的な cDNA があれ

ば二重らせんを形成する（ハイブリダイゼーションする）ので、洗浄後、各プローブに結合している二種類の蛍光色素の比からその遺伝子の発現比を知ることができる（図2）。

現在使われている DNA マイクロアレイは、(1)プローブの種類、(2)プローブ合成・固定法、(3)プローブ数により、いくつかのタイプに分類される。(1)については、当初は cDNA が用いられたが、定量性や精度（アイソフォームの識別など）の点で優る 60～70 塩基長までのオリゴヌクレオチドが主流となりつつある。オリゴ・プローブの場合、合成・固定法として、光リソグラフィック法あるいはインクジェット法により基板上でプローブを合成する *in situ* 合成型と、予め合成したプローブを基板にスタンピングする Stanford 型がある。また、数万種類のプローブを載せた市販の大集積アレイと、特定の機能、臓器など研究目的に合わせて数百～数千のプローブを選定して作成するカスタムアレイ、の二つの方向性がある。現実には *in situ* 合成型はそれぞれ特定のメーカーの市販品に限られ、研究室固有のカスタムアレイの製作は Stanford 型となる。最近はカスタムアレイの受託製作を行う企業もある（光リソグラフィック法は本質的にカスタムアレイには向かない）。

すべての遺伝子に対応するプローブを載せた大集積アレイがあれば、これで解決するように見えるかもしれないが、大集積アレイには現時点で以下のような問題点と限界がある。その第一は感度と定量性である。発現量の異なる多数の遺伝子群を同一条件で検出することは難しく、発現量の低いものをどこまで検出できるかは今後の課題でもある。また、一枚のアレイに各プローブが一点ずつしか存在しないため、その定量性、再現性の範囲を知ることができない。第二の本質的な問題は、数万種類の遺伝子プローブに対して、実際に実験ごとに発現変化するものは通常、数%（数百～千；次項参照）に過ぎないという点である。実験ごとに得られる多くのデータの中から数%の意味のあるものを抽出しなければならない訳である。その上、現段階ではその半分以上が機能未知の遺伝子である。特に、脳機能発達に対する影響を評価するような場合は、長期間にわたる時間経過の解析が必須であり、そのデータ量は膨大なものとなる。第三に、市販の大集積アレイではコスト面からも十分な解析は不可能である。

以上のような理由から、大集積アレイはある生命現象に伴う遺伝子発現変化の範囲を知るための最初のスクリーニングに利用し、その結果も参考にして、個々の現象の解析に適した数百～千種類程度の遺伝子群を集めた「目的別カスタムアレイ」を作製するという方向が現実的な選択となる。その際、「目的別アレイ」はより高い定量性と感度を具えたものでなければならない。以下にカスタムアレイの一例として、脳機能発達過程、特にシナプス形成過程に関与する遺伝子群に焦点を当てた独自のマイクロアレイ「シナプトアレイ」を作成し、進化させていく我々の試みを紹介する。

シナプトアレイの特徴と性能

シナプトアレイでは、a)プローブの長さ（45 塩基長）や GC 含量（55～65%）などを最適化し一定にすることで、より厳密なハイブリダイゼーション条件（55℃、16 時間、攪拌付き）としたこと、2)一種類のプローブを二回ずつスタンプしてグリッドを作り、一枚のスライド上にこれを三回繰り返すことにより、同一プローブに対して各 6 スポットとしたこと（図3参照）、3)新規に開発した表面金蒸着スライドと末端リンカー（日清紡）を使用してバックグラウンド値を下げ、S/N 比を上げたこと、4)6 種類の内部標準遺伝子を用いた標準化法を確立したこと、などの改良を行った。実際に生後 10 日齢マウス小脳由来の cDNA を Cy3、Cy5 の二種類の色

素で蛍光標識し、競合ハイブリダイゼーションを行った結果を図3に示す。三つのグリッドの結果は直線性が良く、互いに良く一致していた。一枚のスライド上の同一プローブに対する6個のスポット間で蛍光強度比のばらつきは平均約7.5%、90%のスポットで±20%以内であった。即ちこのアレイでは±20%以上の発現比は信頼性をもって評価できる。市販アレイの多くは2倍以上の差がないと検出できないとされ、最も性能の良いもので±50%となっている。

アレイ搭載遺伝子としては、シナプス形成に重要な役割を果たすと考えられるシナプス構造蛋白、細胞骨格およびその調節蛋白、成長因子類、神経伝達物質受容体および代謝酵素などをピックアップするとともに、市販の大集積アレイ (Agilent 社、20,800 プローブ) を用いて実験的スクリーニングを行った。サンプルとしてシナプス密度の大幅な低下が認められている実験的甲状腺機能低下症 (hypothyroid; 以下 hypo と略) マウス小脳を用い、正常マウスのもものと比較することで、シナプス形成に関与する遺伝子群の抽出を試みた。甲状腺機能低下マウスは、母マウスに妊娠 15 日目より産後 28 日目まで 0.025% メチマゾール (MMI) を飲水投与して作成した。形態的なシナプス密度の差が最も顕著な 15 日齢 (P15) 小脳での遺伝子発現を正常 P15 と比較するとともに、正常 7 日齢 (P7) と正常 P15 の比較を行った結果、前者の比較 (hypo-P15/control-P15) では 835 遺伝子、後者 (control-P7/control-P15) では 1173 遺伝子で有意な発現差が見られた。両者に共通の遺伝子は 73 個あった。

Control-P7/control-P15 の比較で P7 の方が高い発現を示したのは、細胞周期調節蛋白、ユビキチン-プロテアソーム系の蛋白、転写活性化因子、細胞骨格蛋白および制御蛋白などの遺伝子であり、この時期における活発な細胞増殖と細胞移動を反映する「成長関連遺伝子群」といえる。P15 で発現が高かったのはイオン・チャネルやトランスポーター類、プルキンエ細胞特異蛋白、ミエリン蛋白 (PLP) などの「成熟関連遺伝子群」であった。これに対し、P15 で甲状腺機能低下により発現上昇した遺伝子群のうち 58 遺伝子が正常 P7 で発現の高いものと共通する細胞周期調節蛋白およびユビキチン-プロテアソーム系蛋白の遺伝子であった。その他に、正常では検出されないストレス応答遺伝子がいくつか検出された。一方、前述の「成熟関連遺伝子群」に加えて、CAM-kinase II、KifC3 などが発現低下していた。以上の結果を基に最初の実用アレイとして製作した version 4 には表 1 に示す 172 遺伝子 496 プローブを搭載した。

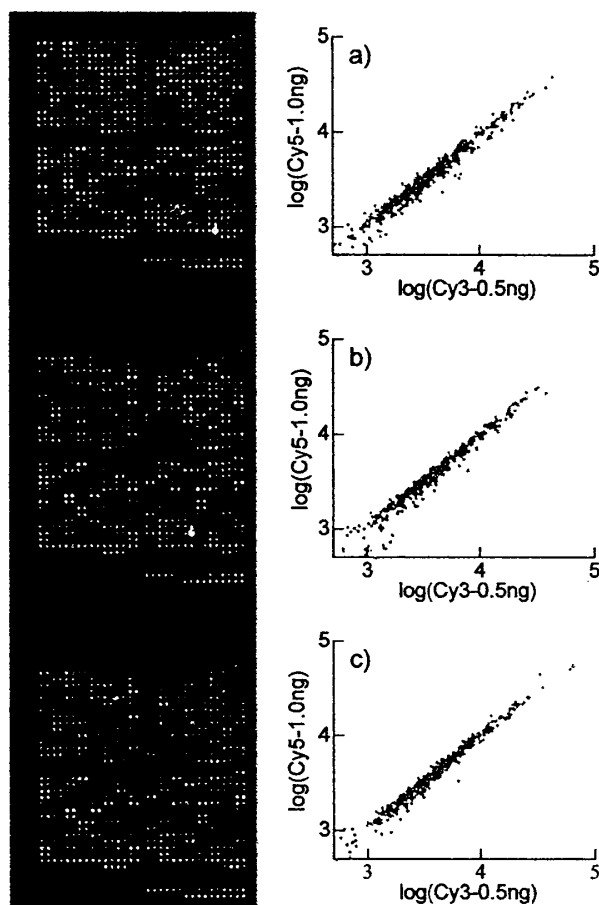


図3. シナプトアレイのハイブリダイゼーション像。

Cy3, Cy5 標識した同一サンプルによる self-self 競合ハイブリダイゼーション。各グリッドにおける直線性を右側に示す。

classification (number of genes)	representative genes
Synaptic proteins (35)	VAMP, Stx, SNAP25
Growth factors & receptors (11)	BDNF, NT-3, TrkB
Cytoskeletal proteins (15)	MAP1B, MAP2, tau
Ion channels & transporters (21)	Cacna1b, Cacna1d, Kir-6.2, EAAT
Translation factors (4)	eIF-1A, eIF-4E, mTOR/FRAP
Cell cycle & apoptosis (21)	Cdc2, p21waf-1, Apaf-1
Signal transduction (16)	Erk-1, MEK, NF- κ B
Stress response (7)	Fmr-1, Prdx4, TrxR1
Ubiquitin-proteasome system (5)	Wdr-1, FBX35, Psmd5
Steroid/thyroid related proteins (15)	THR, RXR-a, b, ZAKI-4a, b
Others (13)	Glut3, GAD
Standard genes (6)	Cyclophilin, ubiquitin1e, rpl

表 1. シナプトアレイ version 4 搭載遺伝子

シナプトアレイを用いた正常マウス小脳発育過程における遺伝子発現変化の解析

シナプトアレイを用いて、生後4日～28日にわたるマウス小脳での遺伝子発現変化を解析した結果を図4に示す。この実験では標準サンプル(Std)を用意し、各時点のサンプルは常に標準サンプルと競合ハイブリダイゼーションさせることにより、一連の変化を追跡する方法をとった。標準サンプルとして、各時点のサンプルを等量ずつ混合したものを用いることで、極端に用いることで、極端に発現量の低いプローブによる不適切な比の値が出ないようにしてある。また、各時点でそれぞれ10個体から抽出した mRNA をプールしてサンプルとした。図4から明らかなように、P7をピークとし、P15を底とする遺伝子発現の波が捉えられている。

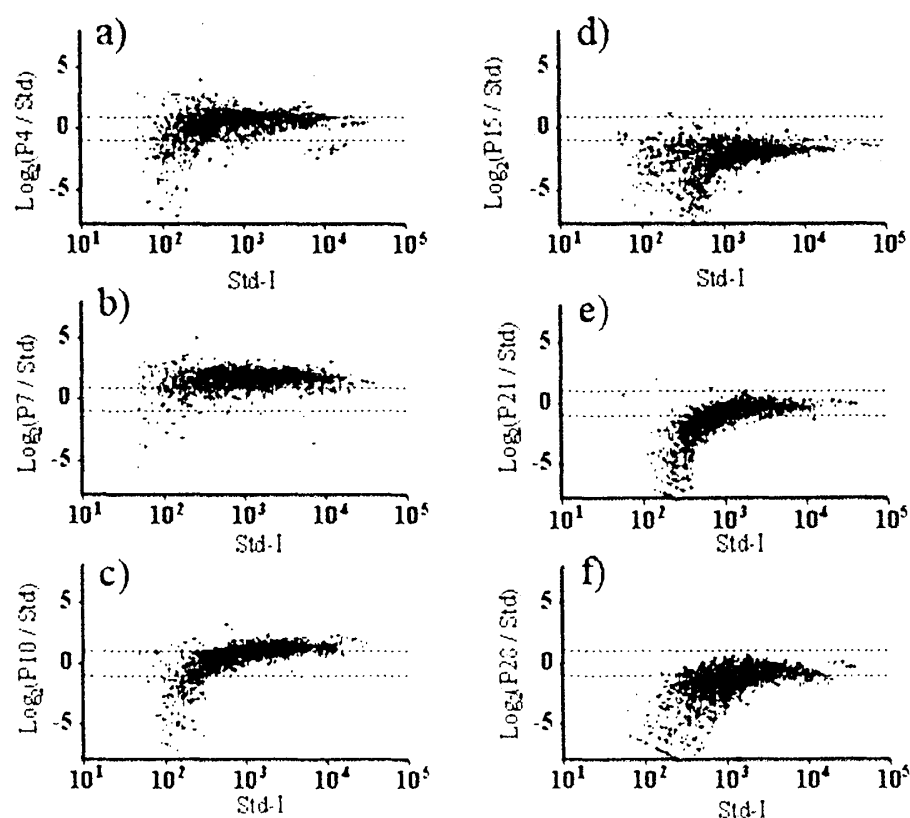


図 4. マウス小脳発育過程における遺伝子発現変化。

- a) P4
- b) P7
- c) P10
- d) P15
- e) P21
- f) P28

の各時点で得られた cDNA を Std(本文参照)と競合ハイブリダイゼーションした。結果を、横軸に Std における各プローブの蛍光強度、縦軸に Std に対する発現比を log2 で表した(変化なしが 0 となる)。点線は上が二倍、下が 1/2 倍を示す。

形態的には小脳におけるシナプス形成は P7 から始まり P21 で完了するとされている。形態変化は蛋白レベルの蓄積変化を反映すると考えられることから、mRNA レベルの変化がこれに先立つのは妥当である。また、このようにいわば同期した変化には大きな転写スイッチが関与することが予想される。

このように、シナプトアレイにより、シナプス形成に関与する遺伝子群の発現を一連の波として検出できることが確認され、これを利用すればシナプス形成の遅れといった異常を検出できる可能性が示された。

甲状腺ホルモン低下による遺伝子発現変化の解析

前項と同様、シナプトアレイを用いて、正常マウスと実験的甲状腺ホルモン低下マウスの小脳発育過程における遺伝子発現の差を比較解析した。前述のように母マウスに MMI を投与して甲状腺機能低下状態にし、甲状腺ホルモン・レベルの低下した仔を得た。生後 4 日～28 日の各時点でそれぞれ 3 個体の甲状腺ホルモン低下マウス小脳から mRNA を抽出して一連のアレイ用蛍光標識サンプルを調製した(hypo 実験群 A)。更に別の各 3 個体由来のサンプルを hypo

実験群 B として調製し、独立した二系統のサンプルを得た (n=2)。各時点において hypo と正常のサンプルを競合ハイブリダイゼーションによって比較し、同じような時間変化を示す遺伝子同士をグループ化したところ、図 5 に示すような典型的な 3 群が得られた。群 1 は生後 15 日の hypo (hypo-P15) で大きく発現低下したものの、群 2 は hypo-P15 で大きく発現上昇したものの、群 3 は生後 4 日(P4)でのみ hypo の発現が低下したものの、である。群 1 は、正常マウスで成熟に伴って発現上昇する遺伝子を含む。群 2 に属する遺伝子は、細胞周期の進行にかかわるものや膜輸送にかかわるものと、ストレスに対する防御因子群の大きく二つに分かれる。前者は[A]で示した成長関連遺伝子群である。群 3 は RyR3, ER-1, RXR-a などの受容体を含む。

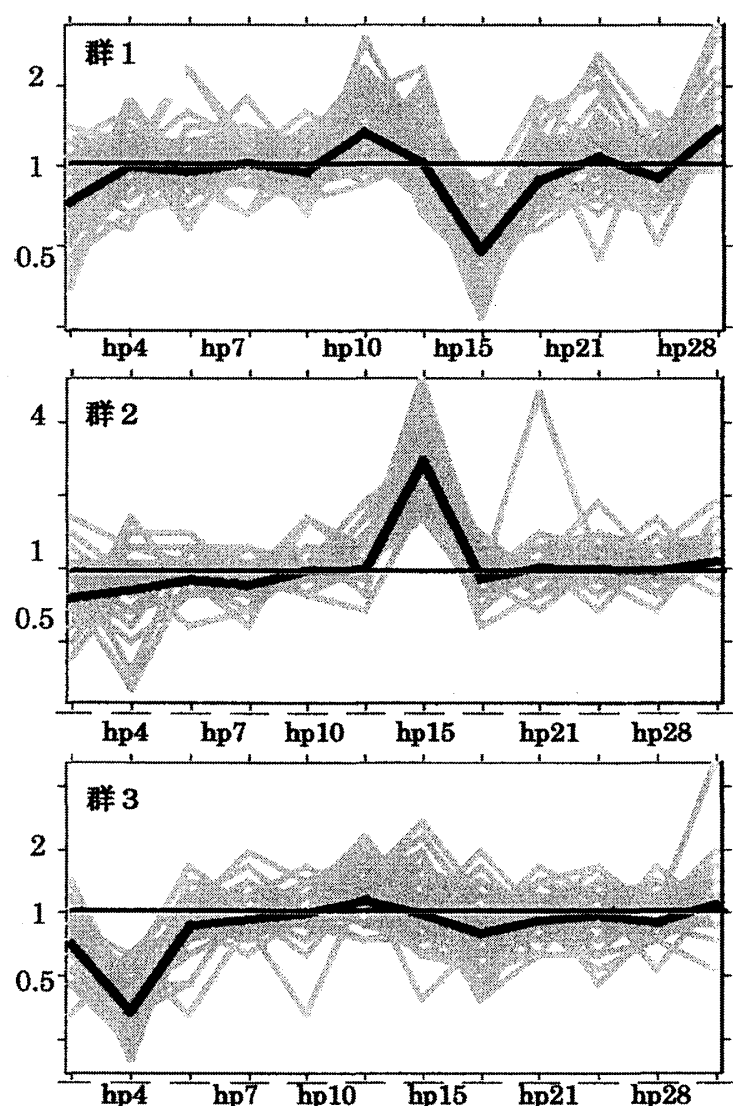


図 5. 群 1～3 に属する個々の遺伝子の発現プロファイル。

このように、甲状腺機能低下マウスではP15で正常と大きく異なる発現パターンを示すのみならず、P4で既にアクチン系制御因子群に明らかな発現差があることが分かった。アクチン・ダイナミクスの抑制因子は **hypo** で発現上昇し、活性化因子は発現低下することから、甲状腺機能低下によってアクチン・ダイナミクスが抑制されることが判明した。IGF-1, BDNF の二種類の成長因子、レチノイン酸受容体 $RaR\alpha$ なども発現低下した。以上から P4 の時点で、1) アクチン系制御因子の発現変化と 2) BDNF の発現低下により、神経突起やグリア突起の伸展が阻害され、3) IGF-1 の発現低下により全体的な代謝低下と成長遅滞が生じると推察される。

おわりに

DNA マイクロアレイは、癌研究の分野で成果を挙げてきた比較的新しい手法であり、神経科学分野への応用についてはまだ2, 3年の実績しかない。内容的にも一次スクリーニングとして利用し、他の方法でこれを確認するというものがほとんどである。本研究の過程で我々が到達した「定量性の高いカスタムアレイ」は、今後のマイクロアレイの一つの重要な方向性となりつつある。実験結果を反映してシナプトアレイは進化し、現段階でプローブ遺伝子数 440 の **version 6** を完成している。このアレイは長期にわたる緩慢な変化を正確に追跡する目的に適しており、神経毒性の評価に活用できるものと期待される。