

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 29 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310044

研究課題名（和文）脊椎動物共通 DOP-PCR プライマーを用いた大規模遺伝子発現解析法の開発

研究課題名（英文）Large-scale differential display system with vertebrate-common degenerate oligonucleotide primers

研究代表者

寺岡 宏樹（Teraoka Hiroki）

酪農学園大学 獣医学部・教授

研究者番号：50222146

研究成果の概要（和文）：マイクロアレイ法はあらかじめ明確なトランスクリプトームを必要とするため、環境中の多様な動物種には必ずしも適当でない。本研究では魚類から高等哺乳類までの 7 種の動物に共通した 8mer 程度の反復倒置配列がトランスクリプトームの約 30% に存在することを明らかにした。Degenerate oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR)法に基づき、誤増幅率を考慮すれば 40-70%を増幅する可能性がある 275 種の共通プライマーを選定した。このシステムを用いて、ダイオキシン感受性遺伝子をニワトリの他、遺伝的背景に乏しいカワウ胚の肝臓でも見いだすことが出来た。

研究成果の概要（英文）：To study possible impacts of environmental pollutants on gene expression in a variety of organisms, we developed a large-scale differential display system with primer sets that are common in 7 vertebrate species with detailed molecular background, based on degenerate oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR). Inverse repeat motif of 8 mer was found in most transcripts for 7 vertebrates examined from fish to primates and more than ten thousand motifs were commonly recognized in transcripts of these 7 species. Among these, we chose 275 common motifs that cover roughly 30% of transcripts throughout these species, making seven vertebrates-common DOP-PCR primers (common DOP primers). This system enabled us to find some genes responsive to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in fetal livers of chicken and common cormorant.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	11,700,000	3,510,000	15,210,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：オミックス、エコトキシコロジー、カワウ、ゼブラフィッシュ、ダイオキシン、ニワトリ

1. 研究開始当初の背景

環境中に生息する多様な生物は人類以上

に農薬を含めた様々な環境汚染物質の危険にさらされている。生物は汚染物質に対して毒性を示すより低濃度から、毒性作用の機序として、あるいは防御などの生体反応を反映した遺伝子発現量の変化として応答する。これまで、汚染物質に対する生物影響を検討するためにマイクロアレイ法が使用されてきた。マイクロアレイ法は 2~3 万といわれる遺伝子の発現状態を網羅的に調べることができる非常に有効な方法であるが、システムが商業的に提供されている動物種は限られている。このため、環境中の多様な動物種を対象とした場合、研究グループが全く独自に、あるいは業者受託によるマイクロアレイ・システムの構築が試みられてきた。それぞれの動物ごとに膨大な努力が費やされた結果、多くの知見が得られてきたが、対象遺伝子数が数百から千程度に限られ、対象外遺伝子については全く対応できない。さらに致命的な問題は、開発したマイクロアレイ・システムを量産して多くの研究者に提供することが困難な点である。一方、発現変化遺伝子の探索法として、ランダムプライマーを用いたディファレンシャル・ディスプレイ法が以前から用いられてきたが、未知遺伝子をも検出する優れた点をもつ一方、再現性の低さが問題になっていた。

Degenerate oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR) 法はもともと遺伝子多型の研究に必要なゲノム上の反復配列の探索に使用されてきた (Telenius et al., 1992 Genomics)。これは短いランダム配列に数 mer の縮重配列 (NNN...) にアンカー配列を加えた特殊プライマー (DOP プライマー) を 2 段階のアニーリング温度によるサイクルで反応させることにより PCR 反応の再現性を向上させる方法である。

我々は mRNA の増幅法とし DOP-PCR 法に注目した。

2. 研究の目的

本研究では、脊椎動物に共通した互いに逆向きの繰り返し配列 (反復倒置配列) がトランスクリプトーム中に多数存在することを明らかにした。この反復倒置配列をプライマーとして DOP-PCR 法を応用し、遺伝的背景が明らかでない環境中の多様な脊椎動物を対象とした大規模遺伝子発現解析法を開発した。この解析法を用いて、代表的な環境毒性物質であるダイオキシンによる遺伝子発現変化をニワトリ胚と、国内でダイオキシンに高度汚染され、分子生物学的背景がほとんど不明な琵琶湖沿岸のカワウ胚を題材に、有効性を検討した。

3. 研究の方法

①我々が独自に開発したコンピュータープログラム (Mono Search RGU ver.1 mRNA) を用いて、mRNA データベースが確立されているゼブラフィッシュからニホンザルまでの 7 種の脊椎動物について遺伝子上の反復倒置配列を探索し、これらに共通した反復倒置配列を絞り込んだ。

②探索した共通反復倒置配列から脊椎動物共通 DOP プライマーを作成し、既報のマーカー遺伝子の検出を指標としてプライマーの最適条件を決定した。

③ダイオキシンによる高濃度汚染が明らかにされている野生動物試料 (カワウ胚肝臓) と、ダイオキシン投与したニワトリ胚肝臓について、脊椎動物共通 DOP-PCR によるディファレンシャル・ディスプレイ法を実施し、既報の遺伝子発現情報と比較して有効性を確認する他、新規標的遺伝子を探索した。

④本研究成果である DOP プライマー関連データベースを公開するためのホームページを作成した。

4. 研究成果

公開されている魚類から霊長類までの 7 種の脊椎動物の UniGene データベースから (カニクイザル、イヌ、ウシ、マウス、ニワトリ、ニシツメガエル、ゼブラフィッシュ)、トランスクリプトームにおいて、8 mer の場合、1 万種を超える共通反復倒置配列 (互いに逆向きの繰り返し配列) が存在することがわかった。この中から 50~500 の転写配列を標的とするなどの条件を満たす 275 種を選定したところ、この 275 配列は各動物種の全トランスクリプトームのうち約 20~43 % に存在することがわかった。さらに DOP-PCR は 3' 末端に 1 ないし 2 塩基の誤増幅を高率に起こすことから、動物種により 40~70% のトランスクリプトームを網羅できることを示唆した。

これら 275 種を特異配列とした DOP-PCR プライマー (脊椎動物共通プライマー) を用いて ディファレンシャル・ディスプレイ法を実施した結果、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 暴露により、ニワトリ胚の肝臓で発現量を変化させる 10 種の既知遺伝子を検出できた。さらに前述の 8 種以外で、遺伝的背景に乏しいカワウ胚の肝臓でも、TCDD で発現量を変化させる未知遺伝子およびアミノ酸をコードしない転写配列をそれぞれ 1 種ずつ見いだした (Teraoka et al., 2012)。

本研究では 275 種の脊椎動物共通プライマーを選定したが、対照遺伝子群をある程度絞り込むことで、プライマー数を飛躍的に減少させることが可能と思われる。現在、シトクローム P450 (CYP) を対象とした脊椎動

物共通プライマーを検討している。なお、今回解析した7種の脊椎動物のトランスクリプトームに存在する反復倒置配列を検索できる website を公開している (<http://dop.ver2.asia/login>)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件) 全て査読有り

1) Miura Y, Shiomi A, Shiraishi J, Makita K, Asakawa M, Kitazawa T, Hiraga T, Momose Y, Momose K, Masatomi H, Teraoka H. Large-scale survey of mitochondrial D-loop of the Red-crowned Crane *Grus japonensis* in Hokkaido, Japan by convenient genotyping method. *J Vet Med Sci. in press*

2) Teraoka H, Tagami Y, Kudo M, Miura Y, Okamoto E, Matsumoto F, Koga K, Uebayashi A, Shimura R, Inoue M, Momose K, Masatomi H, Kitazawa T, Hiraga T, Subramanian A. Changes of Mercury Contamination in Red-Crowned Cranes, *Grus japonensis*, in East Hokkaido, Japan. *Arch Environ Contam Toxicol. in press*

3) Teraoka H, Ito S, Ikeda H, Kubota A, Elmagd M M A, Kitazawa T, Kim EY, Iwata H, Endoh D. 2012. Differential display system with vertebrate-common degenerate oligonucleotide primers: uncovering genes responsive to dioxin in avian embryonic liver. *Environ Sci Technol.* 46: 27-33

4) Kubota A, Stegeman JJ, Woodin BR, Iwanaga T, Harano R, Peterson RE, Hiraga T, Teraoka H. 2011. Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. *Toxicol Appl Pharmacol.* 253: 244-252.

5) Honda K, Komatsu T, Koyama F, Kubota A, Kawakami K, Asakura H, Uno Y, Kitazawa T, Hiraga T, Teraoka H. 2011. Expression of two novel cytochrome P450 3A131 and 3A132 in liver and small intestine of domestic cats. *J Vet Med Sci.* 73: 1489-1492.

6) Teraoka H, Ogawa A, Kubota A,

Stegeman JJ, Peterson RE, Hiraga T. 2010. Malformation of certain brain blood vessels caused by TCDD activation of Ahr2/Arnt1 signaling in developing zebrafish. *Aquat Toxicol.* 99: 241-247.

7) Komatsu T, Honda K, Kubota A, Kitazawa T, Hiraga T, Teraoka H. 2010. Molecular cloning and expression of cytochrome P450 2D6 in the livers of domestic cats. *J Vet Med Sci.* 2010. 72: 1633-1636.

[学会発表] (計13件)

1) Teraoka H, Yamakoshi A, Okuno A, Kitazawa T. Quantification of pericardial edema using high-speed camera: Involvement of prostanoid signaling in pericardial edema in early larvae of zebrafish exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 51th Society of Toxicology Annual Meeting. 2012年3月14日. Moscone Center (San Francisco, CA, USA)

2) 岡本絵梨佳, 久道萌, 北澤多喜雄, 寺岡宏樹, 水野直治, 古賀公也, 志村良治, 井上雅子, 百瀬邦和, 正富宏之, 中山翔太, 池中良徳, 石塚真由美. 北海道におけるタンチョウの水銀汚染の原因についての検討. 日本鳥学会 2011年度大会. 2011年9月18日. 大阪市立大学杉本キャンパス (大阪市)

3) 寺岡宏樹, 小川輝, 久保田彰, 北澤多喜雄, 平賀武夫. ダイオキシンによるAhR/Arnt経路を介した発達中ゼブラフィッシュ脳血管走行の異常. 第50回日本先天異常学会. 2011年7月22日. シェーンバツハサポー(東京都千代田区)

4) 山越あゆ美, 奥野悠樹, 平賀武夫, 北澤多喜雄, 寺岡宏樹. ダイオキシンによる発達中ゼブラフィッシュの鰓弓動脈循環障害と心臓周囲浮腫との関係. 第38回日本トキシコロジー学会年会. 2011年7月11日, パシフィコ横浜 (横浜市)

5) Teraoka H, Ito S, Ukai N, Kim E-Y, Iwata H, Kitazawa T, Hiraga T and Endoh D. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin responsive transcripts in avian embryonic liver, identified by large-scale differential display system with vertebrate-common degenerate oligonucleotide primers. 50th Society of Toxicology Annual Meeting. 2011年3月8日. Washington Convention Center

(Washington, D.C., USA)

6) 鶴飼典佳, 遠藤大二, 池田晴喜, 伊藤知子, 伊東志野, 金恩英, 岩田久人, 北澤多喜雄, 平賀武夫, 寺岡宏樹. 脊椎動物共通プライマーを用いた大規模ディファレンシャル・ディスプレイ法によるダイオキシン応答遺伝子の探索. 第150回日本獣医学会学術集会

2010年9月16日. 帯広畜産大学(北海道帯広市)

7) 寺岡宏樹, 河村幸浩, 大井啓希, 白石順也, 笹野憲吾, 北澤多喜雄, 平賀武夫. 発達期ゼブラフィッシュにおける早期浮腫評価系を用いたダイオキシンによる浮腫発生機構の検討. 第37回日本中毒学会学術年会. 2010年6月18日. 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

8) 伊東志野, 遠藤大二, 池田晴喜, 伊藤知子, 鶴飼典佳, 金恩英, 岩田久人, 北澤多喜雄, 平賀武夫, 寺岡宏樹. エコトキシコゲノミクスへの応用を目的とした半網羅的ディファレンシャル・ディスプレイ法. 第37回日本中毒学会学術年会. 2010年6月17日. 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

9) 寺岡宏樹, 池田晴喜, 伊藤知子, 鶴飼典佳, 白石順也, 金恩英, 岩田久人, 平賀武夫, 遠藤大二. 半網羅的ディファレンシャル・ディスプレイ法システムの構築. 第32回日本分子生物学会年会. 2009年12月10日. パシフィコ横浜(横浜市)

10) Kubota A, Ogawa A, Stegeman JJ, Hiraga T and Teraoka H. AHR2-ARNT1 signalling- dependent deformities of vascular structures in prosencephalic artery in the zebrafish embryo exposed to TCDD. SETAC North America 30th Annual Meeting. 2009年11月20日. New Orleans Hilton Riverside (New Orleans, LA, USA)

11) Kubota A, Harano R, Iwanaga T, Woodin BR, Stegeman JJ, Hiraga T and Teraoka H. Role of CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the zebrafish embryo. 27th New England Membrane Enzyme Group (NUTMEG) Conference. 2009年10月5日. Woods Hole Oceanographic Institution (Woods Hole, MA, USA)

※Karen Wetterhahn best poster award 受賞

12) 河村幸浩, 笹野憲吾, 久保田彰, 平賀武夫, 寺岡宏樹. 発達期ゼブラフィッシュにおける早期浮腫評価系を用いたダイオキシンによる浮腫発生機構の検討. 第15回小型魚類研究会. 2009年9月12日. 名古屋大学野依記念学術交流館(名古屋市)

13) 池田晴喜, 伊藤知子, 鶴飼典佳, 白石順也, 遠藤大二, 平賀武夫, 寺岡宏樹. 2009. 新規 differential display 法の開発: 8種の脊椎動物における共通反復倒置配列を用いた degenerate oligonucleotide-primed PCR モノプライマーの設計. 2009年9月12日. 第15回小型魚類研究会. 名古屋大学野依記念学術交流館(名古屋市)

〔図書〕(計1件)

1) 藤田正一, 板倉隆夫, 石塚真由美, 寺岡宏樹. 魚類のP450酵素系. 大村恒雄, 石村巽, 藤井義明 編 「P450の分子生物学 第2版」. pp.195-208, 2009. 講談社

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://dop.ver2.asia/login>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺岡 宏樹 (TERAOKA HIROKI)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号: 50222146

(2)研究分担者

遠藤 大二 (ENDOH DAIJI)
酪農学園大学・獣医学群・教授
研究者番号：40168828

(3)研究分担者

岩田 久人 (IWATA HISATO)
愛媛大学・学内共同利用施設・教授
研究者番号：10271652

(4)連携研究者

古川 龍彦 (FURUKAWA TATSUHIKO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：40219100

(5)連携研究者

寶來 佐和子 (HORAI SAWAKO)
鳥取大学・地域学部・准教授
研究者番号：60512689