

一般財団法人残留農薬研究所 化学部

平成 30 年度調査研究計画書

平成 30 年 4 月 2 日

平成 30 年度調査研究計画書

課題 1

部・室名及び 担当者名	代謝第 1 研究室 林 靖 (研究総括), 上田洸平, 杉岡大介
課 題 名	植物における農薬等有機化合物の代謝・動態に関する基礎研究: 水耕栽培法を利用した ¹⁴ C有機化合物の作物根部からの吸収, 移行及び代謝に関する研究
目 的	土壌中に残留する農薬が次の栽培作物 (後作物) へ移行, 残留して, 農薬の残留基準値を超えて検出される事例がある。農薬が後作物へ残留するメカニズムには, 植物根部からの吸収, 移行及び代謝の要因が関与するが, 各要因の基礎的な知見が少ないため後作物への残留メカニズムを科学的に説明する事が難しく未解明な部分が多い。本研究では, 適切なモデル有機化合物を用い植物根部からの吸収, 移行及び代謝を含む化合物の挙動を調査し, 農薬の後作物残留のメカニズムの解明を支援する基礎的データを得ることを目的とする。
調 査 研 究 期 間	平成 27 年 4 月 1 日から平成 32 年 3 月 31 日 5 年計画の 4 年目
前年度まで の 結 果 の 概 要	平成 27 年度は約 20 種類の農作物を種子から幼植物まで水耕栽培で生育する方法を確立した。さらに 3 種類のモデル有機化合物, ¹⁴ Cbisphenol A, [2- ¹⁴ C]2-amino-4,6-dimethoxypyrimidine (DMP) 及び ¹⁴ C2,4-dichlorophenol を 2 種類の幼植物 (コマツナ及びキュウリ) 根部に 100 ppb (µg/L) で 24 時間暴露し, 水耕栽培液に溶解した被験物質の幼植物根部からの吸収, 移行を調査した。 平成 28 年度はさらに 8 種の作物 (ズッキーニ, ダイコン, ダイズ, ラッカセイ, トマト, ナス, トウモロコシ及びコムギ) の幼植物根部に ¹⁴ C]DMP を暴露し, 幼植物根部からの吸収, 移行, 代謝について調査を行った。各作物の地上部, 根部及び植物体全体の放射能濃度はそれぞれ, 208.3 ~ 1044.4 µg eq./kg, 179.8 ~ 622.5 µg eq./kg 及び 253.7 ~ 822.5 µg eq./kg であり, 植物種により大きな差が認められた。一方, 蒸散量当たりの ¹⁴ C]DMP の植物体全体への取込量は, コムギで最低値 62.8 µg/L, ラッカセイで最高値 101.6 µg/L であり, 植物間差は最大でも 2 倍以内であった。これらの結果から植物種間で DMP に対する吸収能力に大きな差はなく, 植物体中で濃度差が生じた原因は各植物の

	<p>成長量の差など他の要因によると考えられた。</p> <p>地上部及び根部試料中の未変化^[14C]DMP の各部位中の放射性総残留物に対する比率 (%TRR) 値はそれぞれ 4.5 ~ 90.8 %及び 29.6 ~ 87.7 %の範囲であり植物種により大きな差が認められた。その中で特にアブラナ科植物(ダイコン及びコマツナ)の%TRR 値は 4.5 ~ 6.0 %, 29.6 ~ 39.8 %と低く、一方ウリ科植物では 81.6 ~ 90.8 %, 82.2 ~ 87.7 %と高い値を示す傾向であった。すなわち植物種や科によって代謝の程度に差があることが示めされた。</p> <p>平成 29 年度は、9 種の幼植物 (カボチャ, カリフラワー, キャベツ, ゴボウ, スナップエンドウ, タマネギ, チンゲンサイ, ブロッコリー, 及びホウレンソウ) を用いて ^[14C]DMP の吸収・移行・代謝を調査し、過年度の 10 作物を含めた計 19 作物について、吸収・移行・代謝に関するパラメータを比較した。各植物における水耕液の取込量は 29.3 ~ 113.1 mL であった。また、^[14C]DMP の取込量は 1.76 ~ 9.61 µg eq. であった。水耕液の取込量と^[14C]DMP 取込量に高い正の相関があり、DMP は水の取込に伴って植物へ吸収されると考えられた。植物の各部位の放射能濃度について地上部が 210.8 ~ 1254.8 µg eq./kg, 根部が 164.7 ~ 622.5 µg eq./kg であり、一部の植物を除き地上部の放射能濃度の方が高かった。また、全ての植物において取り込まれた放射能は地上部に多く分布した。^[14C]DMP の各部位中の%TRR はアブラナ科作物で低く (地上部 : 3.9 ~ 8.0 %, 根部 : 29.6 ~ 49.0 %), ウリ科作物, タマネギ, ゴボウ及びホウレンソウで高かった (地上部 : 79.8 ~ 92.5 %, 根部 : 60.3 ~ 87.7 %)。%TRR 値はマメ科を除き同一科で類似した値を示した。以上の結果は、これまでに得られた知見と同様の傾向であり、さらに充実した情報量に基づく解析結果を得ることができた。</p>
<p>調査研究 法の概要</p>	<p>土耕栽培による根部からの吸収, 移行及び代謝実験では、土壌中での農薬の挙動・分解等の影響を受けることから実験結果の解析が複雑となる。そこで当研究では比較的単純な実験系となる水耕栽培を用いて、根部からの吸収, 移行及び代謝を調査する事とした。多くの作物での有機化合物の動態を比較するため、対象作物として水耕栽培が可能な 1 年生農作物を多数選択した。平成 29 年度までの調査では、モデル化合物として特に^[14C]DMP を選択し、幼植物根部からの吸収, 移行及び代謝を詳細に調査した。平成 30 年度は昨年度まで調査した^[14C]DMP (logPow: 推定値として 0.95) とは、物理化学的特性の異なる ^[14C]dibutyl phthalate (^[14C]DBP (logPow: 4.72 または 4.90)) をモデル化合物として選択し、多種類の幼植物を用いて、その根部からの吸</p>

	<p>収, 移行及び代謝の作物間差について調査する。なお, $[^{14}\text{C}]\text{DBP}$ について, キュウリ及びコマツナを用いて予備的な検討を行ったところ, 両植物の根部で同化合物が分解され, 暴露実験中の水耕液成分に分解物が含有される事が示唆された。水耕液中に被験物質以外の成分が多く分布する場合, 被験物質自体の根部からの吸収性を正しく評価できない可能性があるため, より適切な他の化合物での検討も考慮して実験を進める。</p>
試験条件	<p>1) 被験物質 平成 29 年度に予備検討を実施した $[^{14}\text{C}]$ 標識モデル有機化合物の $[^{14}\text{C}]\text{DBP}$ を選択する。</p> <p>2) 処理方法 予備検討にて検討した 2 種作物 (キュウリ及びコマツナ) 以外の植物種を主に実験に使用する。ただし, 同化合物は根部で分解され, 分解物が水耕液中に滲出される傾向が示唆されているため, さらに複数の作物種を用いて水耕液中の分解物の有無を予備調査する。具体的な実験方法としては, $[^{14}\text{C}]\text{DBP}$ を約 250 mL の水耕液に溶解し, これを作物根部へ約 100 ppb 濃度で, 約 24 時間暴露する。暴露後に試験植物を採取し, 地上部 (茎葉部) と根部に切り分けて採取し, 生重量を測定する。</p> <p>3) 試料分析 茎葉部及び根部をアセトン/水で抽出した後に固相抽出などで精製した後に適切な条件の HPLC で分析する。植物体中の総放射性残留物量及び生成した代謝分解物量を定量する。また, 植物培養後の水耕液を HPLC により分析する。</p> <p>4) 結果の取纏め 地上部及び根部中の被験物質や代謝物の被験物質換算残留濃度 ($\mu\text{g eq./kg}$), %TRR 及び添加放射能に対する比率 (%AR) 等を求める。本実験の目的に適した作物の選択や水耕栽培液中と植物体中に残留した被験物質濃度の比較, 作物による代謝物の違いを比較する。また, 可能であれば $[^{14}\text{C}]\text{DMP}$ の動態との比較を行う。</p>
平成 30 年度 経 費	<p>研究職職員の年間従事時間: 約 400 時間 放射性標識被験物質の合成/購入費: 約 150 万円</p>
備 考	<p>成果の公表 日本農薬学会第 42 回大会 2017 年 3 月 8 日, 一般講演, タイトル: 水耕栽培法を利用したモデル有機化合物 $[^{14}\text{C}]\text{DMP}$ の幼植物根部からの吸収, 移行及び代謝に関する研究</p>

一般財団法人残留農薬研究所 毒性部

平成 30 年度調査研究計画書

平成 30 年 4 月 2 日

平成 30 年度調査研究計画書

課題 1

室名及び担当者	生殖・発生毒性研究室 青山博昭（研究総括）、北條仁、佐藤旭、高橋研、遠藤直子、西岡康
課題名	アウトブレット動物に保持される突然変異遺伝子およびステロイドホルモンに対する感受性を修飾する遺伝子群の解析
目的	<p>通常の毒性試験では、遺伝的に不均一なヒト集団のモデルとして、ある程度の遺伝的多様性を持たせたアウトブレットの動物集団が好んで用いられる。近親交配を避けて維持されるアウトブレット動物の集団内には様々な遺伝子多型（変異）が含まれており、これらの中には化学物質に対する反応性に個体差を生み出すものも数多く含まれると推測される。このような個体差を持つことが、アウトブレット動物をヒトのモデルとして利用する最大の利点である。しかし、これらの遺伝子多型や変異の存在が、実験結果に悪影響を及ぼす場合もある。例えば、投与物質に対する感受性の鈍い個体ばかりが特定の投与群に偏って出現すると、用量反応関係が見かけ上消失し、実験結果に誤った結論が下される恐れがある。また、動物集団に含まれる様々な劣性突然変異遺伝子は、特に生殖・発生毒性試験で観察される胎児奇形を始めとして、しばしば毒性評価に支障を来す形質を誘発する。そこで、本研究では、アウトブレット動物の集団に保持される様々な遺伝子多型のうち、特に試験成績を解釈する上で支障となるような多型や変異に注目して、それらを可能な限り同定するとともに確定診断技術の開発に努め、実験動物の遺伝的基盤を整備することを目的とする。また、これらの成果として明らかにされる遺伝子多型には、化合物の毒性を模倣する作用や毒性そのものを修飾する効果を持つものも含まれると期待される。そこで、化合物の毒性発現の機序を理解する上で興味深い遺伝子多型や変異についてはそれらが表現型に及ぼす影響についても積極的に調査して、得られた成果を毒性学の進展に還元する。</p>
調査研究期間	平成 29 年 4 月 1 日から平成 32 年 3 月 31 日 3 年計画の 2 年目
前年度までの結果の概要	<p>本研究は、毒性実験を実施するに当って極めて重要であるにも拘らず見落とされることの多い項目として実験動物の遺伝学的な特性に注目し、これらが毒性実験の結果に及ぼす影響を詳細に検討するとともに、得られた成果を毒性実験の精度向上を目的とした基盤情報として整備</p>

することにより、毒性学への貢献を目的とするものである。初年度となる平成 29 年度は、前事業から継続する研究課題として、生殖・発生毒性試験に汎用される SD ラットに由来する合計 2 種類の突然変異遺伝子の解析に取り組むと共に、新たに発見された遺伝性と疑われる 5 種類の先天異常症候群と呼吸異常症を対象として交配実験や候補遺伝子のシーケンシング解析に取り組み、アウトブレッ德拉ットの遺伝学的基盤の拡充に努めた。また、*Ift140* 変異体をモデルとした奇形発現メカニズムの解析にも着手した。さらに、前事業では実施することのできなかった内的・外的因子に対する感受性を修飾する遺伝要因の解析として、近交系マウス間でみられるエストロゲン投与後の子宮肥大反応の差と *Aqp12* 遺伝子にみられる SNP との関連について、遺伝子改変マウスを用いた検証実験に着手した。

SD ラットに由来する突然変異の解析では、前事業から継続して取り組む *mgpd* および *clest* の 2 遺伝子について、主として候補領域（候補遺伝子）のシーケンス解析による突然変異の同定に努めた。その結果、小下顎や軸前性多指症の原因となる *mgpd* 変異の本態が、*Rpgrip11* 遺伝子の全長と *Fto* 遺伝子の一部を含む約 211 kbp に亘る欠失であることを明らかにするとともに、前事業から通算して 4 種類目となる遺伝子診断法の確立にも成功した。一方、欠指や口蓋裂等の原因となる *clest* に関しては、有力な候補遺伝子である *Meox1* 遺伝子のシーケンス解析においても突然変異が検出されなかったこと、およびその他に注目すべき遺伝子候補がないこと等から、平成 29 年度をもって原因遺伝子の同定を断念した。

新たに発見された遺伝性と推測される 5 形質の解析では、各形質が遺伝性であるか否かを調べるため、交配による検証実験に取り組んだ。初年度は、5 形質のうち 2 形質（いずれも内臓逆位症）について少なくとも単純な遺伝形質ではないことを確認したものの、残る 3 形質（鎖肛・短尾等の合併、無顎・無舌、表皮水泡症）については現在も解析が続いている。

前年度は、Wistar Hannover GALAS ラットの集団にしばしば観察される呼吸異常症の解析にも取り組んだ。この呼吸異常症は、比較的高週齢になってから顕在化する先天異常であると考えられ、多くの場合に後肢拘縮の併発が観察される。症状の特徴からヒトやイヌで知られる筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic Lateral Sclerosis ; ALS）に類似した疾患であると予想されたため、初年度は ALS 関連遺伝子の一つである *Sod1* 遺伝子に注目して変異解析を行った。しかし、症状の発症に関連

	<p>するような多型 (変異) は認められなかった。</p> <p>Wistar ラットの集団から発見された多指症誘発突然変異 <i>pd</i> に関しては、前事業で実施した解析の結果から、原因遺伝子である <i>Ift140</i> の突然変異の強度によって表現型が大きく変化することが確認されている。一般に、遺伝子の突然変異であれ化学物質等の催奇形性作用であれ、最終的な表現型として生ずる奇形は両者で共通した型 (フェノコピー) である場合が多く、<i>Ift140</i> の変異にみられる多指症や外脳症といった奇形も例外ではない。これらの奇形は化学物質の催奇形性作用と共通したメカニズムによって発現していると予想されることから、本事業では、突然変異ラットをモデルとした解析を通じて化学物質の催奇形性作用を理解することを試みた。初年度は、<i>pd</i> と <i>Ift140</i> null アレル (<i>Ift140</i>) の各アレルが持つ効果について基礎的な知見を得るべく、両アレルのコンパウンドヘテロ個体に現れる外表と内臓の異常を詳細に調べ、外脳症が 100% の頻度で観察されること、四肢の表現型が重篤化する (四肢の短縮、過剰指の増加) こと、および一部の個体には臍帯ヘルニアや口蓋裂等の併発もみられること等を明らかにした。</p> <p>マウスを用いた解析では、B6-C3H 両系統間でエストロゲン投与後の子宮肥大反応にみられる系統差に注目して、背景に存在する遺伝子多型の探索に着手した。これまでの解析により、子宮実質重量の指標に影響を及ぼし得る候補遺伝子の一つとして、アクアポリン 12 (<i>Aqp12</i>) にアミノ酸置換を伴う SNP が検出されている。そこで、本指標に関して高感受性である B6 系統の背景に低感受性である C3H 系統が持つ SNP を導入することにより、エストロゲンに対する応答性が変化するか否かを検証することとした。初年度は、ゲノム編集技術により、目的とする SNP を保有する個体と、<i>Aqp12</i> 遺伝子の第一エクソンに 7 塩基の欠失を持つ個体をそれぞれ作製し、以後の解析実施に備えて動物の系統化を進めた。</p>
調査研究方法の概要	<p>平成 30 年度は、アウトブレッドラットの集団に由来する先天異常誘発突然変異の探索と解析を第一課題とし、Wistar Hannover GALAS ラットまたは SD ラットの 2 集団から発見された 4 種類の先天異常 (鎖肛・短尾等の合併、無顎・無舌、表皮水泡症、呼吸異常症) を対象として交配実験等の解析に取り組むと共に、<i>Ift140</i> 変異体をモデルとした奇形発症メカニズムの解析を継続する。また、可能であれば、昨年度に原因遺伝子の同定に至った <i>mgpd</i> 変異について、新たな表現型 (体重と摂餌量の増加) の有無に注目した解析に努める。</p> <p>さらに、第 2 課題として、実験用マウスの遺伝学的基盤の整備にも</p>

	<p>取り組む。これまでに実施した解析から、C57BL/6J (B6), C3H/HeN (C3H) または 129S2/SvPas (129) といった代表的な近交系マウスには、ステロイドホルモンに対する反応性に明瞭な系統差が存在することが明らかである。その原因となる遺伝子変異 (群) は市販のアウトブレッッドマウスの集団内にも含まれると推測されるため、これらの遺伝子変異の同定に努めると共に、それらが表現型に及ぼす効果を調べる。</p>
<p>試験方法</p>	<p>1. 試験動物 (SOP/ADM/005)</p> <p>本研究所で実施する動物試験は、一般財団法人残留農薬研究所動物実験倫理規程に従って実施する。</p> <p>1.1. 動物の種および系統 (SOP/ATC/101)</p> <p>先に述べた突然変異ラットや近交系マウスと共に、必要に応じて、日本チャールス・リバー株式会社生産の BN/Cr1Cr1j (BN) 系統ラットや WKY/NCr1Cr1j (WKY) 等を正常な近交系ラットとして実験に使用する。</p> <p>2. 動物管理方法</p> <p>2.1. 飼育方法</p> <p>2.1.1. 飼育環境 (SOP/ATC/331, 340)</p> <p>試験期間中、動物を温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$、湿度 $50 \pm 20\%$、換気回数毎時 10 回以上 (オールフレッシュエアー方式) および照明時間 1 日当り 12 時間 (午前 7 時点灯、午後 7 時消灯) のバリアーシステム動物飼育室 (動物室 307 および 308) で飼育する。動物飼育室の温度および湿度は毎日記録する。</p> <p>2.1.2. ケージおよびラック (SOP/REP/004-007, SOP/TER/004, ATC/353)</p> <p>育成期間中のラットは、原則としてステンレス鋼製金網ケージ (W310×D440×H230 mm) に收容する。これらのケージをステンレス鋼製可動ラック (16 ケージ/ラック) に懸垂して固定する。ケージの下には、ステンレス鋼製のトレイを置く。トレイは、少なくとも 1 週間に 1 回の割合で滅菌済のものと交換する。</p> <p>繁殖中のラットは、巣材 (サンフレーク、オリエンタル酵母工業株式会社、東京都) を入れたアルミニウム製繁殖用ケージ (W260×D400×H200 mm または W350×D460×H200 mm) に收容する。これらのケージをステンレス鋼製可動ラック (20 または 16 ケージ/ラック) に載せる。ケージは、少なくとも 2 週間に 1 回の割合で滅菌済のものと交換する。</p> <p>マウスを飼育する必要がある場合は、繁殖中のラットの飼育方法に</p>

準じて巢材を入れたアルミニウム製繁殖用ケージに収容し、これらのケージをステンレス鋼製可動ラックに載せる。ケージは、少なくとも2週間に1回の割合で滅菌済のものと交換する。

2.2. 飼料 (SOP/ATC/329, 332, ADM/113)

動物には、オリエンタル酵母工業株式会社（東京都）製保証飼料 MF 固型を固型飼料用ステンレス鋼製給餌器を用いて与え、自由に摂取させる。

2.3. 飲料水 (SOP/ATC/326, 330, 333, 357, ADM/113)

動物には、プラスチック製給水器を用いて市上水（茨城県常総市）を与え、自由に摂取させる。

3. 実験の概要

解析手法の大まかな流れを以下に記す。遺伝性であると疑われる形質が出現した場合には、まず交配実験によって注目する表現型が遺伝形質であることを確認するとともに、遺伝様式や表現型といった基礎的な情報を明らかにする。次いで、連鎖解析等の手法を用いて原因遺伝子の存在する染色体領域を特定するとともに、その領域内で注目する表現型に関連し得る候補遺伝子を探索し、それらの塩基配列や発現異常の有無を調べることにより原因となる変異の同定を行なう（ポジショナルクローニング）。候補となる突然変異や遺伝子多型が検出された場合は、最終的にノックダウンやノックアウト等の手法によって検出された変異が表現型に及ぼす効果の有無を検証する。検出した変異が原因遺伝子であることを証明することができた場合は、遺伝子診断技術の確立を試みるとともに、市販のアウトブリード動物集団中における変異の頻度を調査する。これらの実験と共に、生殖・発生毒性の発現を理解する上で特に興味深い形質を示す遺伝子変異（多型）に関しては、表現型の発現機序についても可能な限り調査する。

本年度の第1課題として実施する「アウトブリードラットの集団に由来する先天異常誘発突然変異の探索および解析」と、第2課題として実施する「マウスにおけるステロイドホルモンに対する感受性を修飾する遺伝子群の解析」について、以下に概要を記す。

3.1. 新たに出現した遺伝的と推測される先天異常症の解析

昨年度に引き続き、以下の3形質が遺伝性であるか否かについて、交配実験による検証を行う。

形質	表現型	由来系統	交配相手として用いた系統
<i>STAA</i> (<i>Short Tail and Anal Atresia</i>)	短尾, 鎖肛, 腎臓位置異常など	SD	WKY
<i>AG</i> (<i>Agnathia</i>)	無顎, 無舌	Wistar Hannover GALAS	WKY
<i>BL</i> (<i>Blister</i>)	表皮水泡症	SD	Wistar Hannover GALAS

これらの表現型は, 常染色体上の劣性突然変異遺伝子に支配される形質であると推測される。いずれの形質についても, 奇形児の親動物と正常系統との交配によって既に F1 世代の動物が得られているため, 順次ホモ型の児動物が得られると期待される組み合わせ (奇形児の雄親×F1 雌または F1 雄×F1 雌) で交配を行い, 得られた児動物に注目する表現型が出現するか否かを調べる。ただし, *STAA* については, 得られた F1 雌雄の数が少なく (雌雄各 4 匹), 昨年度に十分な検証を行うことができなかったため, 引き続き F2 世代を生産してそれらを交配実験に用いる。検証に当たっては, 戻し交配と F1 同士の交配の場合について, それぞれ 7 腹および 11 腹の検査を目標とする。

上記の 3 形質とは別に, Wistar Hannover GALAS ラットを用いた毒性試験において呼吸異常と後肢拘縮を発症する個体の出現事例が相次いでおり, 生産業者 (日本クレア株式会社) の維持する基礎集団からも同一の形質の出現が確認されている。本研究では, この呼吸異常症に関する解析を日本クレア株式会社と共同で実施することとし, 原則として当研究所が実験方法の提案と候補遺伝子のシークエンシング等の分子生物学的な解析を分担し, 日本クレア株式会社が動物飼育を伴う解析を分担する。現在, 日本クレア株式会社において, 症状を発症した雌と RCS ラット (近交系) の雄との交配を実施しており, F1 世代の生産とそれらの表現型解析を進めている。F1 世代で症状の発症が確認される (形質が優性である) 場合は, 浸透度を調べるとともに, 発症例を RCS ラットに戻し交配して, 連鎖解析用の交雑群を生産する。また, F1 同士の交配も行い, 変異遺伝子をホモ型に持つ個体の表現型も調べる。F1 世代で症状の発症がない (劣性である) 場合は, 引き続き F1 同士を交配して, F2 世代の表現型を調べるとともに, 各個体の組織サンプルを採取して連鎖解析の実施に備える。

3.2. *Ift140* 変異体を用いた奇形発症メカニズムの探索

pd⁺個体と *Ift140*⁺個体との交配から得られる F1 児を用い, 骨格

の異常を調べる。また、部位（神経管、肢芽など）ごとに *pd* アレルが *Ift140* mRNA の発現にどのような影響を及ぼしているかを、分子生物学的手法（リアルタイム PCR 法、Western blotting 法、Whole mount *in situ* hybridization 法等）や形態学的手法（電子顕微鏡による観察等）によって調べ、アレルの組み合わせによって表現型が変化するメカニズムを探る。また、可能であれば、四肢奇形や神経管閉鎖不全を誘発することが知られているレチノイン酸やバルプロ酸といった代表的な催奇形性物質を表現型が正常なヘテロ個体に投与して、これらのアレルが催奇形性作用に影響を及ぼすか否かについても予備的に検討する。

3.3. *mgpd*/+ラットの体重・摂餌量に関する検討

マウスでは、*Rpgrip11* 遺伝子の欠失突然変異をヘテロで持つ場合に、明らかな奇形を伴うことなく、体重と摂餌量の増加が起こると報告されている。そこで、当該遺伝子の全長に亘る欠失である *mgpd* 変異に関しても、ヘテロ型個体において同様の形質を引き起こすか否かを検討する。本年度は、予備的な検討として、ヘテロ型と野生型の雄を各 5 匹生産し、3 ヶ月齢前後まで体重と摂餌量を継続的にモニターする。

3.4. 近交系マウス間でみられるステロイドホルモンに対する感受性の差に関する遺伝学的解析

本年度は、前年度に作製した遺伝子改変マウス 2 系統の雌離乳児を用いて、*Aqp12* 遺伝子がエストロゲンに対する応答性に影響を及ぼすか否かについて予備的に調べる。生後 21 日齢の雌マウスにエチニルエストラジオールを 3 日間連続して皮下投与し、最終投与の翌日に子宮を摘出して、子宮湿重量（絶対重量および体重比）、子宮実質重量（絶対重量および体重比）および子宮腔内に貯留する水分量の各指標を調べる。解析に用いる動物の数は、6 匹/遺伝子型/系統を目標とする。これらの実験は国立遺伝学研究所に外注することとし、解剖の際は必要に応じて担当者が現地まで赴く。注目する遺伝子多型が子宮肥大反応に何らかの効果を持つことを示唆する結果が得られた場合には、解析に用いる動物の数を増やして検証を行うと共に、さらなる解析に向けて、当研究所への遺伝子改変マウスの導入についても検討する。

上記の解析の進捗状況に応じて、以下の解析の実施も検討する。我々は、過去に実施した B6×129 リコンビナントインブリード (RI) 系統を用いた QTL 解析によって、ステロイドホルモンに対する感受性を左右し得るその他の遺伝子候補として、*Amh* 遺伝子にも注目している。そこで、まずこれらの系統間で本遺伝子に多型があるか否かを調べ、変異が確認された場合はゲノム編集技術を利用して一方の多型を他方の系統に導入し、

	その効果を検証する。
平成30年度 経費	研究職職員の年間従事時間：約 400 時間 B6 マウスの遺伝子編集及び表現型スクリーニング：約 150 万円 候補遺伝子のクローニング等：約 150 万円 試薬等：約 100 万円
備考	