

学 位 論 文

三叉神経におけるカプサイシン刺激時の  
非コード領域における遺伝子発現動態

大木 絵美

松本歯科大学病院 総合診療室  
(主指導教員：金銅 英二 顎口腔機能制御学講座 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士（歯学）学位申請論文

Gene expression from non-coding region in trigeminal  
ganglion induced by capsaicin stimulus

Emi Oki

Department of Oral Sciences, Matsumoto Dental University  
(Chief Academic Advisor : Professor Eiji Kondo)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

## 要旨

### 【背景】

細胞は、その機能を正常に維持するために状況に応じてさまざまな遺伝子の発現を変化させる必要があり、神経細胞においてもカプサイシン刺激後には多くの遺伝子の発現変動が検出されている。また、このような発現の変動は既知のタンパク質のみでなく機能性 RNA から未知の転写産物にまで広く及んでいる。

### 【目的】

カプサイシン侵害刺激を与えた後の三叉神経節内転写産物の発現変動について、特にイントロン領域に相当する配列に注目し、その発現の実証と、経時的な発現動態の解析を目的とした。

### 【実験動物と方法】

すでに報告されているマイクロアレイの結果から対象配列を選び出した。Sprague Dawley 系 (SD) 雄性ラットの左側口髭部にカプサイシンを注入したカプサイシン群、生理食塩水注入した生食群、及び未処置群に分け、注入後 1 時間、3 時間で三叉神経節を摘出した。total RNA を抽出し DNase 処理後、RT-PCR 及び real time PCR を行った。

### 【結果】

カプサイシン刺激により発現が上昇する転写産物には、多くの未知配列が含まれており、そのうち 24 種はイントロン相当配列であった。RT-PCR では、これら全てが転写産物として発現していることが確認でき、real time PCR ではそのうち Chd2, Ankh, Gnas, Tra2 $\alpha$ -1, Tra2 $\alpha$ -2, Pik3ip1, Tcf4 の 8 種にてカプサイシン刺激による有意な発現上昇を認めた。

### 【考察】

有意な発現上昇を示した 8 種については，カプサイシンに相当する TRPV1 を経由する発現調節を受けていると考えられる．

カプサイシン刺激による発現変動が，イントロン領域にまで及んでいることが示された．

### 【結論】

対象としたうちの 8 種の転写産物は，カプサイシン刺激により有意な発現上昇を示したことにより，カプサイシン依存的な因子の可能性，機能的な意義があるのではないかということを示唆しているが，詳細については不明であり，今後の課題とも言える．

## 緒言

およそ 30 億塩基対あるヒトゲノムにはタンパク質のアミノ酸配列をコードする領域，いわゆる「遺伝子」と呼ばれる領域が 2 万個以上存在する．しかし，ゲノム全体からみると遺伝子と同定されている領域は全体の 2%程度に過ぎず，テロメアやセントロメアといった構造部位を除いても，残りの領域のほとんどについては機能不明もしくは機能を持たない領域と考えられてきた<sup>1)</sup>．さらに，遺伝子領域内においてもアミノ酸配列コード領域は長いイントロン配列によりいくつものエクソンに分断されており，このイントロンについても機能的意義はないとされてきた．しかし，ゲノム配列が解明された後にトランスクリプトーム解析として mRNA を含めた転写産物全体の解析が進むと，遺伝子領域以外の部分からもイントロンからも大量の RNA が転写されていることが明らかになってきた．イントロンからの転写産物の多くは，未発見の選択的スプライシングエクソンである可能性が高く，従来考えられてきたよりも著明に多くの遺伝子が発現時に選択的スプライシングを受けることを示している．また，その他のアミノ酸をコードしない RNA 群は，翻訳されることなく機能する「機能性 RNA」として miRNA, snRNA 等が数多く同定されているものの，その多くは機能が未知のままである．細胞は細胞種や組織によって，また環境や外的刺激に応じても発現するタンパク質のパターンを変化させる．それは神経細胞も同様であり，神経細胞特異的タンパク質を発現していると同時に炎症や損傷といった外的刺激や神経興奮によっても発現パターンは変化する<sup>2,3,4)</sup>．このような細胞の性質と機能は，タンパク質とその選択的スプライシング産物，機能性 RNA 群，さらに機能未知のものまで含めたこれら全ての RNA の転写制御によって決定されるものと考えられる．

神経細胞を興奮させる物質としてカプサイシンがよく知られている．カプサイシンは，唐辛子に含まれる辛み成分として発見

された物質で，末梢神経の中でも小型神経特異的に発現する **Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1 (TRPV1)** を受容体としている<sup>5・8)</sup>．陽イオンチャネル型受容体である **TRPV1** はカプサイシンが結合することで開口し，カルシウムイオンを細胞内に流入させることで脱分極を誘発して痛みや熱感を発生させる．カプサイシン刺激による神経細胞内の遺伝子発現変動はすでに報告されており，マイクロアレイチップを用いた結果として数多くの遺伝子の発現が上昇，もしくは減少している<sup>9)</sup>．使用されたマイクロアレイのチップには，4万以上の配列がスポットされているが，これには既知の遺伝子のみではなく上述のような機能性RNAや未知の配列まであらゆる転写産物の配列が用いられている．そのため，発現変動が検出された配列にも機能不明の配列が多く含まれている．

本研究では，カプサイシン刺激によって1.7倍以上発現上昇が検出された配列のうち，既知のアミノ酸配列をコードするもの以外，なかでもイントロン領域からの転写産物に相当するものに注目し，その発現変動について解析を行った．

## 実験動物及び方法

### 1) 実験動物

実験には，6～8週齢（200～250 g）の **Sprague Dawley** 系（SD）雄性ラット（日本エスエルシー株式会社，静岡）を用いた．実験動物の取り扱いについては，松本歯科大学動物実験委員会の承認を得て，『松本歯科大学動物実験取り扱い規定』ガイドラインに従い行った．

### 2) マイクロアレイの配列の分類

マイクロアレイの各スポットに用いられた配列は，マイクロアレイチップに添付の **Gene List**（アジレントテクノロジー株式会

社，東京）から得た．

ラットゲノム配列との比較には国立生物工学情報センター（NCBI）遺伝子配列解析プログラム（BLAST）を使用し，ラットゲノム配列は NCBI のデータベース（GenBank）から得た．

### 3) プライマー設計

プライマーはデータベースから得た標的部位周辺のラットゲノム配列をもとに，プライマー設計プログラム Primer3（オープンソース）を用いて設計した．標的配列は 150～250 bp 程度とした（Table 1）．プライマーの合成は，日本遺伝子研究所（宮城）及び株式会社日本バイオサービス（埼玉）に依頼した．

### 4) カプサイシン刺激と組織摘出

カプサイシン刺激は濃度 3 mg/ml（10% エタノール，8% Tween 80，生理食塩水）のカプサイシン 50  $\mu$ l をラットの左側口髭部に皮下注射し，カプサイシン群とした．また，対照として生食群は生理食塩水 50  $\mu$ l を左側の同じ部位に注入した．注入後 1 時間，もしくは 3 時間で三叉神経節を摘出した．

組織摘出時には，ラットをジエチルエーテルにて深麻酔した後，剪刀にて断頭し，頭蓋腔から脳幹部などを除去し，脳底部の脳硬膜を丁寧に剥離して三叉神経節を露出し，三叉神経節第 3 枝の分岐部から中枢側に向かいピンセットで鈍的に第 3 枝領域と第 1・2 枝領域を分離し（Fig. 1）第 1・2 枝領域の組織のみを取り出し，直ちに液体窒素にて凍結させた．またカプサイシン群・生食群・未処置群はそれぞれ n=5 とした．

### 5) RNA の抽出と cDNA の作製

凍結させた組織から RNA を抽出するにあたり NucleoSpin® RNA II（タカラバイオ株式会社，滋賀）を使用した．使用方法に関しては本商品の『培養細胞・組織からの RNA 抽出プロトコル

ル』に基づき行い,抽出した total RNA は RQ1 RNase-Free DNase (プロメガ株式会社, 大阪) と, ランダムヘキサマー (株式会社日本バイオサービス, 埼玉), M-MLV RT 逆転写酵素 (プロメガ株式会社, 大阪) を使用し, 添付説明書通りに合成を行った.

## 6) RT-PCR

未処置ラットの組織から合成した cDNA を用いて, Master-cycler® ep (Eppendorf) にて PCR 反応を行った.

プライマーは, マイクロアレイで用いられた配列を挟むように設計し, アニーリング 62℃, サイクル数 35 回で行い, 増幅が認められなかったものに関しては, アニーリングを 55℃に変更し, サイクル数を 45 回とした. また, 対照プライマーとして, Tra2α 遺伝子のイントロンのうちマイクロアレイに用いられていない部分に対するプライマーを設計して同様の RT-PCR を行った.

PCR 反応は TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を添付説明書に従って行った. 初期変性 (94℃, 5 分) の後, 変性 (94℃, 1 分), アニーリング (55 または 62℃, 1 分), 伸長 (72℃, 1 分 30 秒) を 35~45 回繰り返した. 増幅については 4.5% アクリルアミドゲル (30% アクリルアミド, 水) にて電気泳動を行い発現を確認した.

## 7) real time PCR

カプサイシン刺激 1 時間後と 3 時間後の間で生食群を対照としてカプサイシン群との比較, また未処置群を 1.00 として未処置群とカプサイシン群とも比較を行うため, RT-PCR と同様のプライマーを用いて real time PCR を行った. real time PCR 反応は SYBR® GreenER™ qPCR SuperMIX (Life Technologies Corporation, California, USA) を用い, アニーリングの温度条件は RT-PCR と同様とした. real time PCR 及び解析は DNA Engine Opticon™ System (Bio-Rad, California, USA) で行っ

た．各サンプルの測定値はそれぞれ 18S rRNA で補正し，相対定量とした．

また，各サンプルは  $n=5$  で計測しているが，反応がなかったものは除外し，Ankh（生食群 1 時間： $n=4$ ），Gnas（未処置群： $n=3$ ，生食群 1 時間： $n=3$ ），Crebbp（未処置群： $n=3$ ，生食群 3 時間： $n=4$ ），Camk2d（未処置群： $n=3$ ，生食群 3 時間： $n=4$ ，カプサイシン群 3 時間： $n=4$ ）とした．

## 8) 統計処理

データの統計解析は，SPSS statistics 17.0 を用いて Mann-Whitney 検定にて比較を行い， $p<0.05$  を有意差ありとした．

# 結果

## 1) マイクロアレイ配列の分類

カプサイシン刺激後の三叉神経節においてマイクロアレイで 1.7 倍以上の発現上昇が認められたものは 80 種と報告されているが<sup>9)</sup>，それぞれのスポットに用いられた配列を BLAST にて検索した結果，既知のタンパク質のアミノ酸配列に相当するものは 32 種であり，48 種が未知の転写産物であった．さらに詳細なラットゲノムと比較すると 24 種が遺伝子間領域に，残りの 24 種がイントロン領域に相当した．

また，マイクロアレイで発現の 0.56 倍以下の減少が認められたもの 17 種についても同様に調べたところ，未知の転写産物は 1 種のみであり，これはイントロン領域のものであることが分かった．更に上昇を認めたイントロン領域 24 種 (Table 2) について検証を行った．

## 2) 発現の実証 (RT-PCR)

24 種全てにおいて増幅を確認した (Fig. 2)．また，対照プラ



イマーについては，いずれの条件下においても，増幅は認められなかった．この結果から 24 種全て RNA として存在していることが実証された．

### 3) real time PCR

明確な発現を認めたものが 24 種中 10 種であった．また，そのうち，有意差を認めたものが Chd2, Ankh, Gnas, Tra2 $\alpha$ -1, Tra2 $\alpha$ -2, Dctn2, Pik3ip1, Tcf4 の 8 種であった (Fig. 3:A-H)．

また残りの Crebbp, Camk2d の 2 種については有意差を認めなかったもののカプサイシン群が未処置群や生食群に比べ上昇傾向であることがわかった (Fig. 3:I, J)．

## 考察

ヒトゲノムの解析が始まった当初，そこに含まれるタンパク質をコードする部分であるエクソン領域は約 2%程度に過ぎず，残りの領域には重要な機能はないと考えられていた．ところが DNA チップや網羅的 cDNA ライブラリーによる大規模な転写物解析が行われるにつれ，既知のエクソン以外の領域からもタンパク質をコードしない RNA が多数転写されていることが明らかにされている<sup>1,9,10)</sup>．

本研究ではカプサイシン刺激による遺伝子発現変動のうち，非コード領域，特にイントロン領域からの転写に注目して研究を行った．対象とした配列は，いずれも DNase 処理しても検出されたことから RNA として存在していることが確認された．非コード領域からの転写産物のうち，遺伝子間領域に由来するものは miRNA や snRNA のように独立した転写単位としてプロモーター等を備えているものが多く<sup>10)</sup>，その役割は他の遺伝子の mRNA の安定性や翻訳効率を調節するなど，非常に多岐にわたっている．一方で，イントロン由来の転写産物は，独立した転写単位である可能性よ

りも、前後のエクソンと独立した転写産物である可能性が高い<sup>11)</sup>。本研究にて検証した 24 種の配列は、いずれもイントロンであるため、選択的スプライシングを受ける未知のエクソンである可能性が高く、そのうちの 8 種の配列については、カプサイシン依存적スプライシングである可能性が考えられる。

選択的スプライシングについては、組織特異的なものは多く知られている他<sup>12,13)</sup>、神経疾患<sup>14,15,16)</sup>や癌<sup>17,18,19)</sup>など、疾患特異的なものがいくつか報告されているが、単一の刺激により変化するものはほとんど知られていない。今回の研究結果で有意な発現上昇が確認された 8 種が選択的スプライシングであるならば、5'側、3'側のスプライス部位の同定ができれば、カプサイシン刺激依存적スプライシングを制御する配列、もしくはスプライシング制御タンパク質の特定へとつながると考えられる。RT-PCRではサイクル数を増加させないと検出ができなかったことや、real time PCRで明確な発現変動が得られないものが多かったことから、これらの部位の発現量が極めて少ないと予想されるため、この少量の発現量における選択的スプライシングにどれ程の機能的意義があるのかは現段階では不明である。しかしながら、カプサイシン依存적選択的スプライシング制御因子が特定できれば、他のカプサイシン依存적選択的スプライシングを受ける関連遺伝子が発見されると期待できる。

非コード領域の RNA の機能解明が遅れている理由の 1 つは機能が分かっているものにおいてもその配列が動物種間で保存されていない、又は配列の保存度が極めて低いことによる。従って機能的に重要である配列の特定は現行の遺伝子発現プログラムを用いておこなうことは極めて難しい<sup>20)</sup>、ということがあげられる。非コード領域の機能については、依然として未知な部分が多いが、本研究ではカプサイシン刺激を受けた神経細胞にて刺激後、早期で多くの非コード領域からの転写産物の発現変動が起きていることが明らかになった。また選択的スプライシングの変動が起き

ていることが示唆された．このことより，非コード領域は，既知のタンパクをコードする転写産物の増減と同様に神経細胞の性質に重要な影響を与えていると考えられ，今後の研究が期待される．

## 結 論

ラット左側口髭部のカプサイシン刺激により，三叉神経節において複数のイントロン領域の RNA が増加しており，更に追求したところ，8 種において未処置群・生食群と比較して有意差のある遺伝子発現量の上昇を示していた．これはカプサイシン刺激依存的な選択的スプライシングの可能性，機能的な意義があるのではないかということを示唆している．また，この発現上昇が TRPV1 活性化特異的であるかどうかについては不明であり今後の課題とも言える．

今後の研究の進展により，現時点でまだ結論の出ていない詳細な分子機構の解明や，その結果に基づく医療を含む様々な分野への応用を期待している．

## 参 考 文 献

- 1) Green ED, Chakravarti A (2001) The human genome sequence expedition: views from the "base camp". *Genome Res* 11: 645-51.
- 2) Sessle BJ, Lavigne GJ, Lund JP, Dubner R (2008) Orofacial Pain: From Basic Science To Clinical Management, second edition, 195-202, Quintessence Publishing, Chicago.
- 3) Zhang X, Dagerlind A, Elde RP, Castel MN, Broberger C (1993) Marked increase in cholecystokinin B receptor messenger RNA levels in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy. *Neuroscience* 57: 227-33.

- 4 ) Zhang X, Wiesenfeld-Hallin Z, Hokfelt T (1994) Effect of peripheral axotomy on expression of neuropeptide Y receptor mRNA in rat lumbar dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci* 6 : 43-57.
- 5 ) Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389 : 816-24.
- 6 ) Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413 : 203-10.
- 7 ) Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain producing stimuli. *Neuron* 21 : 531-43.
- 8 ) 田中丈也, 奥村雅代, 岩田幸一, 姫野勝仁, 時崎匡史, 山田一尋, 岡藤範正, 栗原三郎, 岩上朋代, 金銅英二 (2009) 顎関節炎モデルラットにおける三叉神経節細胞の遺伝子発現 (TRP チャネル群の動態). *日本疼痛学会誌* 24 : 147-58.
- 9 ) Okumura M, Iwata K, Yasuda K, Inoue K, Shinoda M, Honda K, Shibuta K, Yasuda M, Kondo E (2010) Alternation of gene expression in trigeminal ganglion neurons following complete Freund's adjuvant or capsaicin injection into the rat face. *J Mol Neurosci* 42 : 200-9.
- 10 ) Mattick JS, Makunin IV (2005) Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet* 14 : R121-32.
- 11 ) Barmak B, Alissa R, Catherine G, Christopher L (2001) Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res* 29 : 2850-9.
- 12 ) Maniatis T, Tasic B (2002) Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* 418 : 236-43.

- 1 3 ) Li Q, Lee JA, Black DL (2007) Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Nat Rev Neurosci* 8 : 819-31.
- 1 4 ) Citron BA, SantaCruz KS, Davies PJ, Festoff BW (2001) Intron-exon swapping of transglutaminase mRNA and neuronal Tau aggregation in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 276 : 3295-301.
- 1 5 ) Pellizzoni L, Kataoka N, Charroux B, Dreyfuss G (1998) A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* 95 : 615-24.
- 1 6 ) Shehadeh LA, Yu K, Wang L, Guevara A, Singer C, Vance J, Papapetropoulos S (2010) SRRM2, a potential blood biomarker revealing high alternative splicing in Parkinson's disease. *PLoS One* 5 : e9104.
- 1 7 ) Taylor MD, Gokgoz N, Andrulis IL, Mainprize TG, Drake JM, Rutka JT (2000) Familial posterior fossa brain tumors of infancy secondary to germline mutation of the hSNF5 gene. *Am J Hum Genet* 66 : 1403-6.
- 1 8 ) Kurahashi H, Takami K, Oue T, Kusafuka T, Okada A, Tawa A, Okada S, Nishisho I (1995) Biallelic inactivation of the APC gene in hepatoblastoma. *Cancer Res* 55 : 5007-11.
- 1 9 ) Narla G, Difeo A, Reeves HL, Schaid DJ, Hirshfeld J, Hod E, Katz A, Isaacs WB, Hebring S, Komiya A, McDonnell SK, Wiley KE, Jacobsen SJ, Isaacs SD, Walsh PC, Zheng SL, Chang BL, Friedrichsen DM, Stanford JL, Ostrander EA, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Xu J, Thibodeau SN, Friedman SL, Martignetti JA (2005) A germline DNA polymorphism enhances alternative splicing of the KLF6 tumor suppressor gene and is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Res* 64 : 1213-22.
- 2 0 ) Ponting CP, Oliver PL, Reik W (2009) Evolution and

functions of long noncoding RNAs. Cell 136 : 629-41.

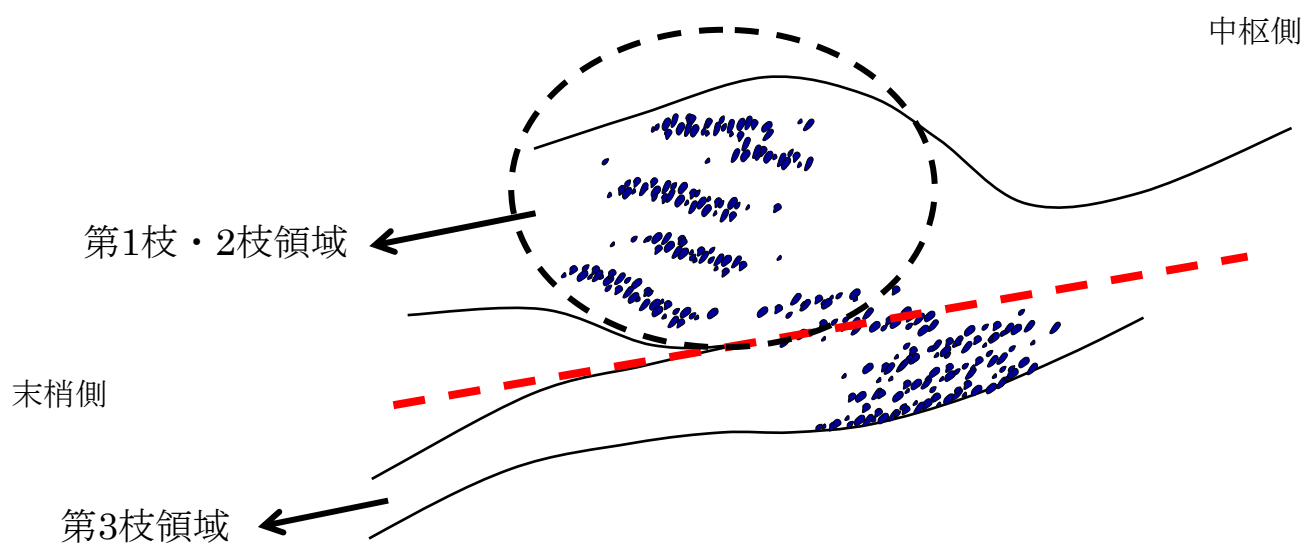


Fig. 1

Table 1

遺伝子名	プライマー配列 (5' to 3')	
	F	R
Chd2	GAAAGCATTCCAGAGGATTCG	TTGTGTGTGTTACTGTGACAATGG
Sorbs1	GZGTTTGAGAGTCTGCCCTTCC	TTCCAGACACATGGGAAACTG
Zfp74	CCATCTTTCCAGAACCAATCC	ATAAGCACACACTGCCACACTC
Ankh	TCTCCATCTCCACGGCTCTC	GAAGCTTGTTTATGCCAAAGTGC
Camk2d	ACACACTCCAGCAAAGCCATTAC	TCTGGGTTGATTTCGTTTTATCTCC
Ccn1l	AAGGACACTAACTGTGCTCAAAGTATC	TCGTGGGAAAGGTACAAAGC
Baz2b	ACGATTTCAAACCCCTTTCTTG	CACAGTTGCACAGAAGTTCAAGG
Gnas	CTCCATTTAAACCAACGACTTGC	TGCTGCCTAAGGGCTACAGTG
Prkcbp1	TTTTCTCAAGCCCCAGGATG	GGGCTGTTACAGATCCTTCCAG
Rbm39-1	TGGATTTCTTTCCCAATGCTG	CCGGAGCCCTCTTGATTATCT
Rbm39-2	CCGGAGCCCTCTTGATTATCT	GTGGCTCGTGCAATTTAGTTCC
Zeb2	AAACAGGCTCCCTACAGCAAG	CTATACACACCAAAGCAGGATGG
Srpk2	CTTGTCAGTTTGCTATGGAACG	GCGATCTGCTGTGTATGGTG
Tra2α-1	CACGTTGGGTTCAAGTCTAACTC	TGGTTGTGAGCTACCAAGGAC
Tra2α-2	TGTTAGGTGTGCACCAGCAG	GGAGCATGTTAATCCCACCTC
Tra2α (対照プライマー)	GAACCTACTGTGTTGGCCCAGA	CTAAGCAGGCAGCTGAGGGTA
Cadm1	CCCAGCTTCTTCAGTACAGCAAC	TTGACGCCAGTCAGATGGTC
LOC685917	ATTGGAGCCCAAGAAGATGG	ACCTTTCTGCTGAGTTAGCTTGG
Crebbp	CCCGACTCACTAAATAGCTTCCT	CATTGGCAAGGTTATCATAGAGC
Gas5	GAACCATTTCTAAGCCAGATGAGTAAG	AATCAGTGAGAGAGTTCAAGTTGGAG
Pik3ip1	GAAGCAAGGACAAACTTGCAG	GCACTCTACCACTGAGCTAAATCC
Mbln2	CTCACAGAGATGGACACTTCCTG	TGCTCTGGAATGCTGAAACC
Csnk1a1	CCATGTTCAGACTAGAGCAGTCTTTC	TCCGTGTTACTGACTCCCTGTG
Tcf4	AATTGCAGTCCCAGCCAAAG	GTCCAGAATGAAGACAGAGAGTGG
18S rRNA	CCGCGGTTCTATTTTGTTC	TCGTCTTCGAACCTCCGACT



Table 2

遺伝子名	正式名称	遺伝子座
Chd2	Chromodomain helicase DNA-binding protein 2	1q31
Sorbs1	Sorbin-and-SH3-domain containing 1 isoform 3	1q53
Zfp74	Zinc finger protein 74	1q21
Ankh	progressive ankylosis homolog	2q22
Camk2d	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	2q42-q43
Ccnl1	Cyclin L1	2q31
Baz2b	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B	3q21
Gnas	GNAS complex locus	3q42
Prkcbp1	Protein kinase C-binding protein 1	3q42
Rbm39-1	RNA-binding motif protein 39 (1)	3q42
Rbm39-2	RNA-binding motif protein 39 (2)	3q42
Zeb2	Zinc finger E-box-binding homeobox 2	3q12
Srpk2	Serine/arginine-rich protein specific kinase 2	4q11
Tra2 $\alpha$ -1	Transformer-2 alpha (1)	4q24
Tra2 $\alpha$ -2	Transformer-2 alpha (2)	4q24
Dctn2	Dynactin 2	7q22
Cadm1	cell adhesion molecule 1	8q23
LOC685917	hypothetical protein LOC685917	9q36
Crebbp	CREB binding protein	10q12
Gas5	Growth arrest specific 5	13q22
Pik3ip1	Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1	14q21
Mbln2	Muscleblind-like 2	20p12
Csnk1a1	Casein kinase 1, alpha 1	18q12.1
Tcf4	Transcription factor 4	18q12.1

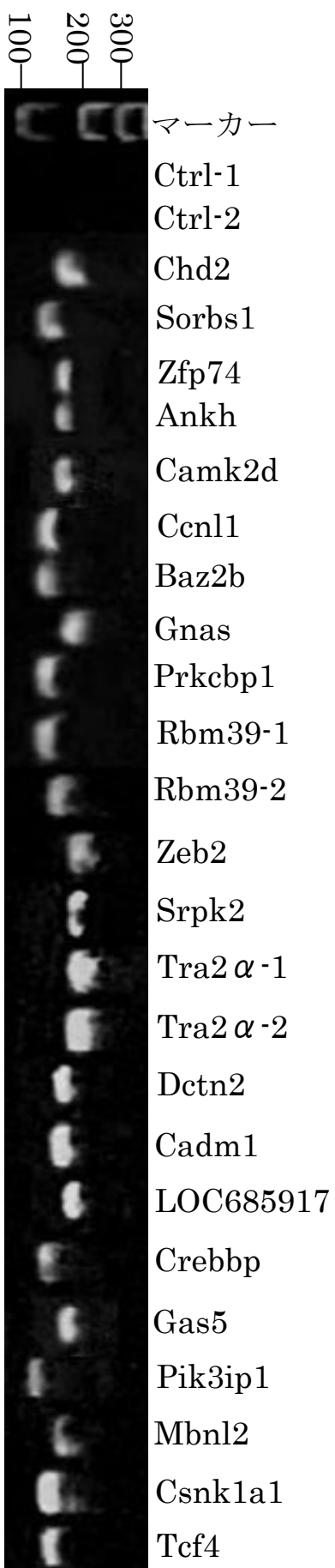


Fig. 2

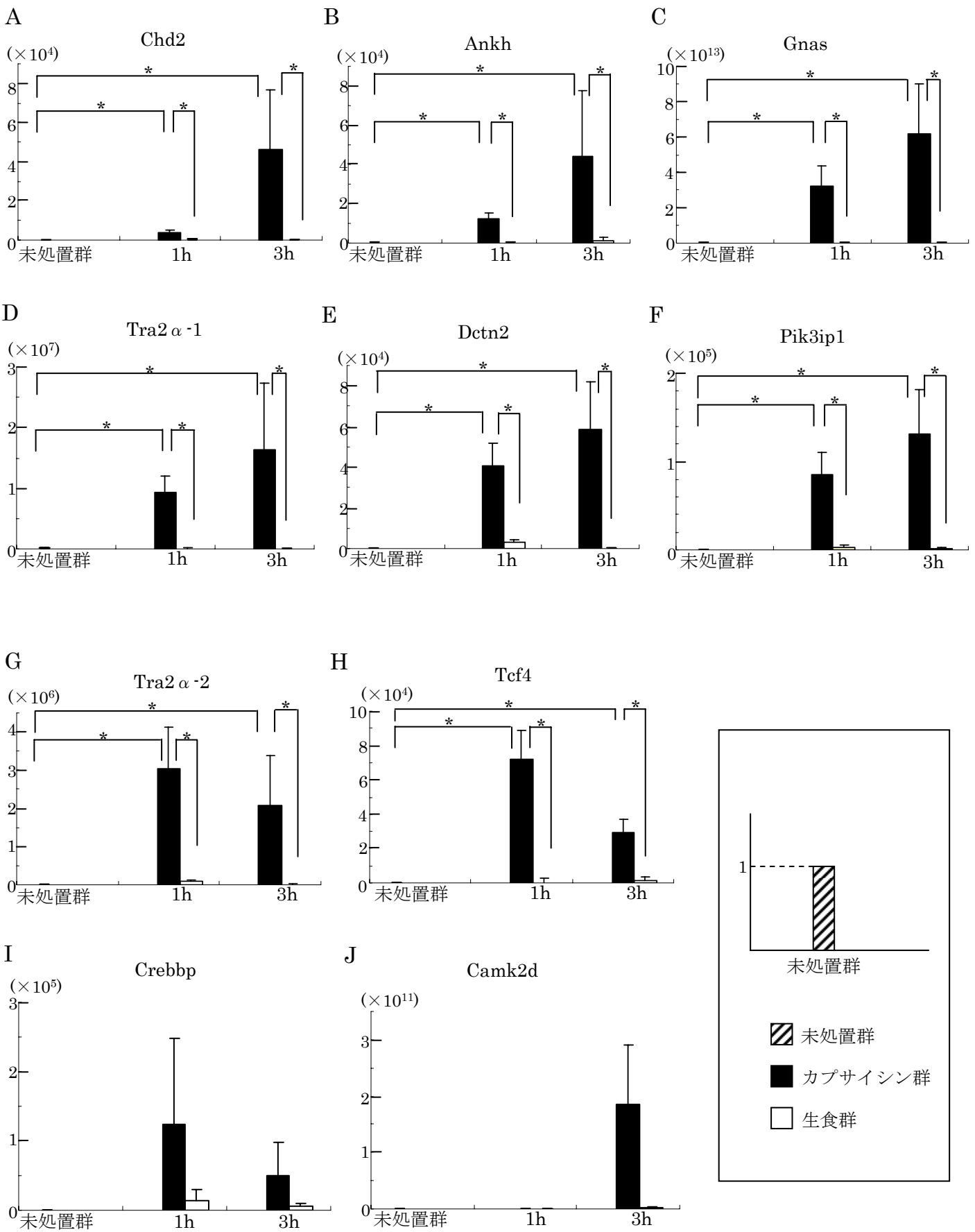


Fig.3

## 図の説明

**Fig. 1** 三叉神経節の第1・2枝領域摘出方法

ラットの三叉神経節の神経細胞局在の模式図を示す。直線（点線）に沿って，末梢側から中枢側に向け，ピンセット等で鈍的に第1・2枝領域と第3枝領域に分離して円（点線）に示す第1・2枝領域を摘出した。

**Table 1** RT-PCR 及び real time PCR に用いたプライマー

**Table 2** 対象遺伝子の正式名称とその遺伝子座

**Fig. 2** RT-PCR の結果（発現の実証）

対象 24 種の RT-PCR の発現結果を示す。一番左の反応はマーカーを示しており，下から 100, 200, 300bp を示す。アニーリング 55℃, 45 サイクルで RT-PCR を行った配列は, *Ankh*, *Camk2d*, *Gnas*, *Rbm39-1*, *Rbm39-2*, *Gas5*, *Mbnl2* であり，それ以外の配列は全てアニーリング 62℃, 35 サイクルの条件とした。

Ctrl-1: アニーリング 55℃, 45 サイクルの条件下で *Tra2α* 対照プライマーを使用。

Ctrl-2: アニーリング 62℃, 35 サイクルの条件下で *Tra2α* 対照プライマーを使用。

**Fig. 3** real time PCR の結果

10 種の遺伝子の real time PCR の結果を示す。グラフ上，未処置群を 1 とした場合，カプサイシン群の発現上昇の数値との大きな格差により表示されないためグラフ欄外にて補足している。

斜線棒グラフは未処置群 (=1.00) を示す。黒棒グラフはカプサイシン群を示す。白棒グラフは生食群を示す。また、横軸は未処置群，刺激 1 時間後 (1h)，刺激 3 時間後 (3h) を示している。

エラーバーは SE を示し，有意差が認められたものに関しては \* にて示し， \* =  $P < 0.05$  とした．