

図1. TCDDとTCDFのPercellomeデータ：TEF依存遺伝子の抽出法(1)

TCDDおよびTCDFの単回経口投与をC57BL/6雄マウスに行った。用量は両実験とも0(溶媒対照), 1, 3, 10, および30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ とし、投与後2, 4, 8, および24時間後に肝を採取しマイクロアレイ解析を行った(両動物実験は1カ月を隔てて、国立医薬品食品衛生研究所、環境保全型動物実験施設内にて厳重管理の下に実施された)。代表例としてcytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp1a1; Affymetrix probe ID 1422217_a_at)を示す。A: TCDDによるCyp1a1の発現変動のSurface(反応曲面)表示。B: TCDFによるCyp1a1の発現変動のSurface表示。丁度、用量について10倍ずれた反応を示している。C: TCDDの3, 1, 0から作製したSurfaceとD: TCDFの30, 10, 0から作製したSurfaceが形状および発現値ともにほぼ完全に一致している。このような遺伝子をTEF依存性とした。

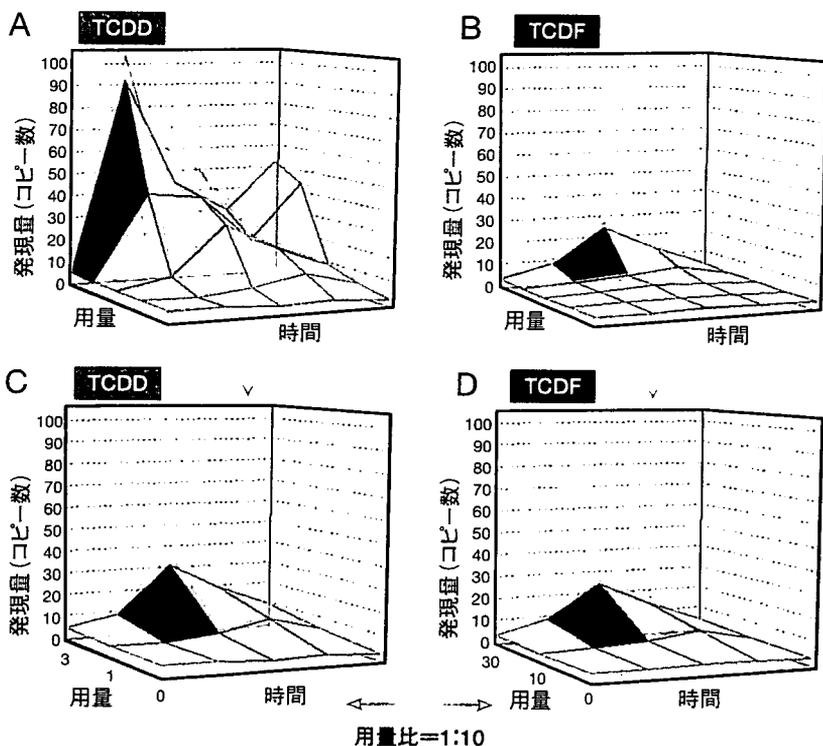


図2. TCDDとTCDFのPercellomeデータ：TEF依存遺伝子の抽出法(2)

TEFに従うもう一つの例としてTCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase (Tiparp; 1452160_at)を示す。A, B, C, Dは図1と同様の表示。AとBを比較すると一見違った反応をしているようだが、CとDを比較するとTEF依存性であることがわかる。

度の向上が図られている。例えば、高密度マイクロアレイで問題となるプローブの飽和によるダイナミックレンジの狭小化の検証・回避に役立っている。新世代Affymetrix GeneChipにおいて高発現遺伝子プローブが容易に飽和し高用量域で定量性を失う現象は、一般的なデータ標準化手法

では検出困難であり、Percellome法を用いて初めて直接的に感知することができる。現在、筆者らはサンプルRNA量をメーカー推奨プロトコルの半量にすることなどにより効率的にこれを回避している。

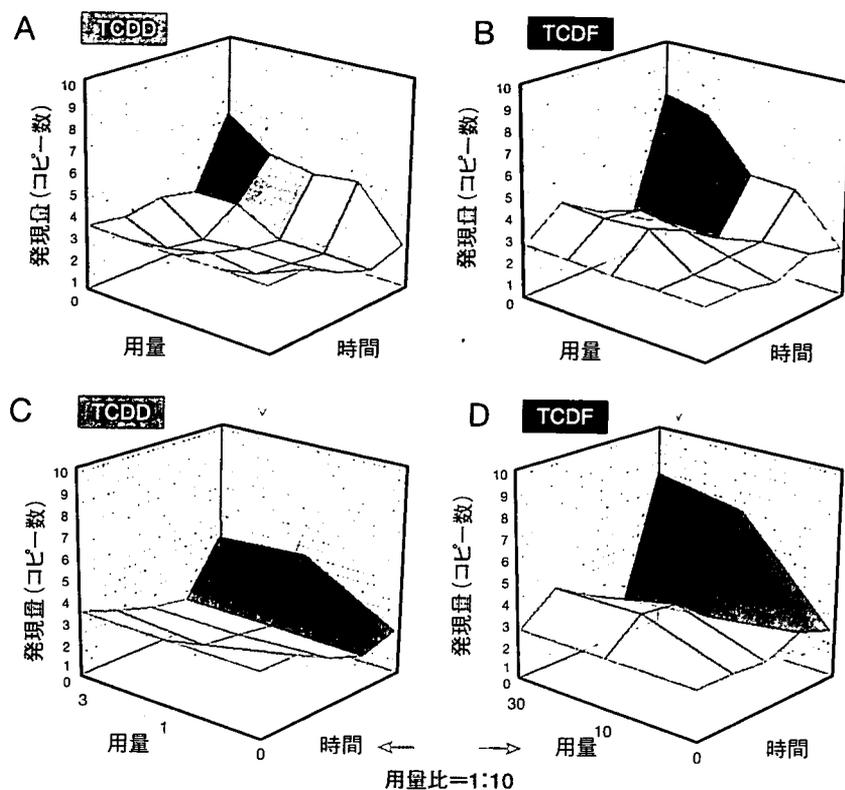


図4. TEF 非依存遺伝子

TEF に従わない遺伝子の一例として, Hectd2 (HECT domain containing 2, 1433944_at) の Surface を示す. A, B, C, D は図1と同様の表示. 2時間目の応答の違いのほか, 24時間目の応答が TCDF > TCDD である.

factor) ⑥に従う遺伝子と従わない遺伝子を検討した事例を紹介する.

ダイオキシン類, すなわちダイオキシン, ジベンゾフラン, およびコプラナー-PCBは, そのいずれにもベンゼン環に結合する塩素の数の違う異性体や同族体が多数あり, 個々はそれぞれダイオキシンとしての生物活性の強さ, 例えば *in vitro* 実験系で Cyp1a1 の発現を誘導する能力に違いがある. 他方, 環境中では, これらダイオキシン類の同族体などを様々な比率で含む混合物として検出されることから, その生物影響の総体強度を推定するために, 個々の同族体の活性を合計して評価することが行われている. その際の強度の単位に TEF が用いられる. TEF は最も活性が強い 2,3,7,8-TCDD を 1 とし, 2,3,7,8-TCDF は 0.1, 1,2,3,7,8-pentachlorodibenzofuran は 0.05, などとして表す. なお, TEF の値は, ほぼ, AhR 結合能に比例していることが経験的に知られている.

ダイオキシン毒性は, 受容体原性毒性の典型であり, その説明には“AhRノックアウトマウスがダイオキシン投与に対し事実上無反応”であることが用いられる. すなわち, このノックアウトマウスでは, 体中に広がった TCDD はそこにある酵素や膜などの生体分子に対して何の影響も与えないということを示している. 野生型のマウスが TCDD で死ぬのは AhR が存在するからであり, 言い換えれば, AhR からの異常なシグナルによるという

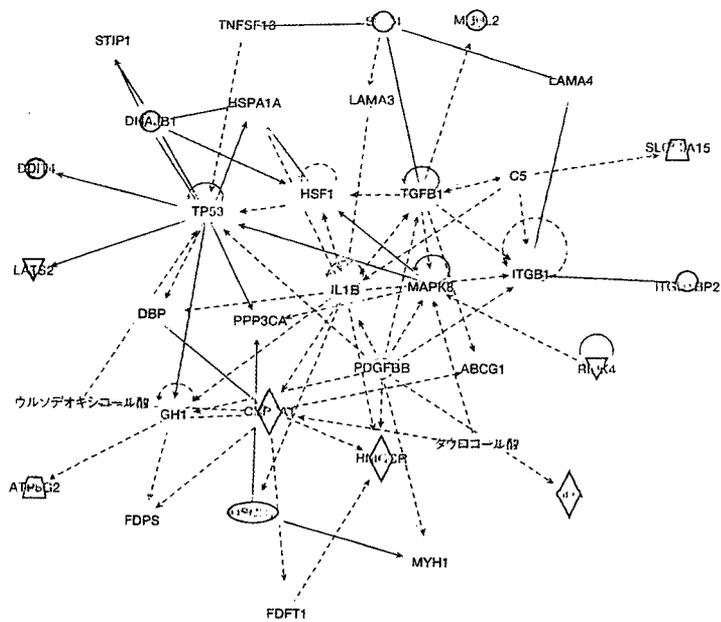


図5: TEF 非依存遺伝子の描く Pathway

図1の方法を利用し抽出された TEF 非依存遺伝子約 20 を Ingenuity Pathways Analysis 5.5 (Ingenuity Systems, Inc.) に投入し, 得られる Pathway の代表的なものを示す. AhR は含まれず, p53, TGF-β, MAPK8 などが見られる. 赤色; 計算に投入した TEF 非依存遺伝子のうち, この Pathway に含まれるもの. 灰色; Pathway のメンバーとしてソフトウェアが拾ったもの.

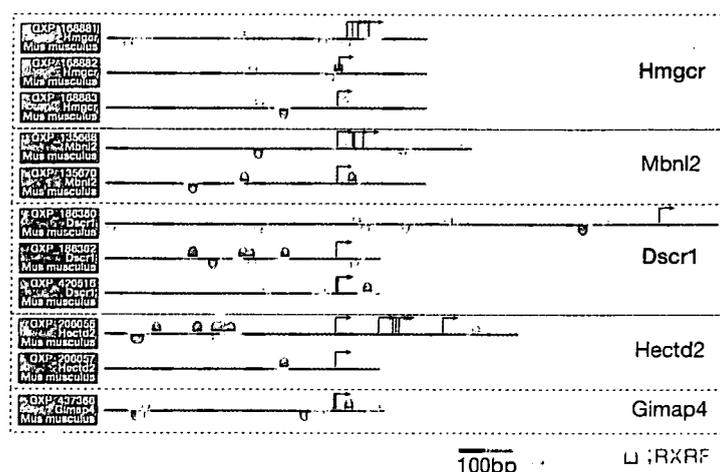


図6: TEF非依存遺伝子の *in silico* プロモーター解析

TEF非依存遺伝子約20のうち、TCDF優位の5遺伝子を絞り込み、Genomatix Software GmbHの提供する *in silico* プロモーター解析の結果を示す。5つの遺伝子に共通して、ETSファミリーとRXRファミリーの転写因子の結合配列を認めた。Hmgcr; 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, Mbnl2; muscleblind-like 2, Dscr1; Down syndrome critical region homolog 1 (human), Hectd2; HECT domain containing 2, Gimap4; GTPase, IMAP family member 4.

ことになる。この際の毒性も概してTEFに従うことが知られており、TCDDの1に対してTCDFの10が同等の影響を及ぼす。しかし、リガンド分子個有の作用には受容体毒性学上、興味があるところであり、培養細胞に対する影響を検討した際にこの値が逆転する場合があることを見いだしたことから、TCDF特有の作用がある可能性をマウス肝において遺伝子発現レベルで検討することとした。

TCDDとTCDFについて、以下のような同一プロトコールを用いての実験を行った。12週齢雄C57BL/6マウスの1群3匹、20群を用意し、0, 1, 3, 10, および30 μ g/kgの用量で単回強制経口投与後、2, 4, 8, および24時間後に肝を採取し、Affymetrix GeneChip, MOE430 2.0によりPerccellome遺伝子発現データを得た。2時間目の反応を見やすくするために、仮想0時間に2時間溶媒対照群の値を流用し、用量軸5点、時間軸5点から成る5×5の三次元Surfaceを作製した。さらに、TCDD = 1, TCDF = 0.1というTEF値に従った反応を示す遺伝子を抽出するために、TCDDの0, 1, 3 μ g/kg群から成る3×5のSurfaceとTCDFの0, 10, 30 μ g/kg群から成る3×5のSurfaceを用意した。そして、この3×5のSurface同士について、上述のtmfアルゴリズムにより類似度を計算し、類似性の十分に高い遺伝子のリストを得た。次にコピー数が同等であるか、反応が投与依存的変動として生物学的蓋然性があるかを3×5および5×5のSurfaceにより確認し、TEFに忠実に従うTEF依存遺伝子(図1, 2)を約140, 従わないTEF非依存遺伝子を約20得た。TEFに従うと判定

された遺伝子群を、Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, Inc.)により既知情報と照合するとAhRの下流の第1相代謝酵素やNrf2下流の第2相代謝酵素を中心に、AhRを中心としたPathwayの構成要員であることが示され(図3)、上述したTEFについて現在想定されている分子背景に合致するものであった。従わない遺伝子についても、5×5のSurface同士を比較し、TCDDとTCDFで反応のパターンが異なるもの、および類似していてもTEF値の10倍差を説明できないもの、すなわち、TCDFが同等あるいはより強い反応を示すものを抽出した(図4)。TEF非依存遺伝子群は既知情報との照合で予想どおりAhRを含まないPathwayを描き出した(図5)。*In silico* プロモーター解析ソフトウェア (Genomatix Software GmbH)に甘い条件で遺伝子リストを投入した結果、すべてに共通するものとして多数のエレメント、例えば、E2F, EKL, ETS, HES, NR2, RXR, SP1, TBPなどのファミリーが見いだされたが、AhR結合配列は抽出されなかった。さらに、非依存遺伝子のうちTCDF優位の5遺伝子を絞り込みパスウェイ解析を行った結果、TNFを中心とし、ESR1やABCA1を含むネットワークが描かれ、*in silico* プロモーター解析では5遺伝子に共通するものとしてETSファミリーとRXRファミリーの結合部位が選択された(図6)。ETSはERK/MAPKシグナル系の下流に位置し、その1つであるETS2の強制発現系の実験などからp53系を介する胸腺系のアポトーシス、あるいはダウン症候群との関連性などが指摘される。これらの既知情報ベースの解析結果は限られた共通の公開情報源を基にしているため、概して同じリストに収束する。しかし、得られたリストのうち、この検索に投入しなかった遺伝子(図5中の灰色)について、再度Surfaceを吟味すると選定基準ぎりぎりでは排除されていた遺伝子が見つかる。ここでは、図5中のTgfb1 (transforming growth factor beta 1), Hspala (heat shock protein 1A), およびFdft1 (farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1)が該当する。このような既知情報と実際のデータとの往復が、データ解釈の向上と今後の検証実験の計画立案に役立つものと見込まれる。

おわりに

おわりに

このTCDDとTCDFの実験結果の比較によるダイオキシン類化合物の生体影響に関わる分子メカニズム解析はまだまだ途上にあり、追加としてAhRノックアウトマウスを用いた投与実験やChIP(クロマチン免疫沈降)解析などによる確認作業が考えられる。ここでは、Perccellome Projectの投与実験の組み合わせと、それらに対するPerccellome法の利点を生かした網羅的な解析が、環境化学物質をはじめとする外来性化学

物質 (Xenobiotics) の生体影響に関する分子生物学的メカニズム解明研究のユニークな糸口を提供する手段としても利用可能であることを示すことができたと考える。誌面の都合上、他に譲るが、ヒトに対する催奇形性があり使用禁止となっていたが、癌や難治性炎症性疾患の治療薬として再登場したサリドマイドについて、成獣雄マウスの肺に及ぼす影響と経胎盤的にマウス胎仔に及ぼす影響とを Percellome 解析により対比すると、間葉系成分に対する共通の抑制シグナルの存在が示唆される事例を見いだした。異なったプロトコールで異なった組織に対して行われた実験の間でも、このように共通のメカニズムを抽出しうる可能性を見ており、今後の複合的展開に大きな期待を抱いているところである。今後、本法の利点を生かした解析をさらに進めるとともに、データ・

解析ツールの公開Webサイトの充実、および、実験のみならずデータ解析・データマイニングについての共同研究を含めた展開を加速させていきたい。

謝辞 本Percellome Projectの遂行にあたっては、当毒性部の全メンバー、特に松田菜恵、辻昌貴、森田紘一、今井あや子、安東朋子、安部麻紀、森山紀子、近藤優子、青柳千百合、相原妃佐子、渡辺忍の各氏の卓越した働きに深謝する。三次元Surface可視化およびそれを用いた解析ツール群のアルゴリズム開発は共筆者の相崎健一主任研究官による。データベース関連、MADIC実装などのIT開発はNTTコムウェア、日本NCR（日本テラデータ）との共同研究に負うところ大である。本研究は厚生労働科学研究費補助金H13-生活-012、H13-生活-013、H14-トキシコ-001、H15-化学-002、H18-化学-一般-001などによる。

- 文献

- 1) Kanno J, et al: BMC Genomics (2006) 7: 64
- 2) 菅野 純ら: 細胞工学 (2004) 23: 685-693
- 3) 菅野 純ら: 細胞工学 (2007) 26: 71-77
- 4) Matsumoto S, et al: Genome Informatics (2005) 16: 183-194
- 5) 相崎健一ら: 細胞 (ニュー・サイエンス社), 印刷中
- 6) Van den Berg M, et al: Toxicol Sci (2006) 93: 223-241