

網羅的遺伝子発現変動解析による毒性発現メカニズム解明



Perce llome 法：サンプルのDNA濃度を精密に計測し、
添加した外部標準mRNA（スパイクRNA）の測定値を基準として、
サンプルの測定値を細胞1個当たりのmRNA発現コピー数に
換算することでmRNA発現絶対量を得ることができる。

↓
化学物質による遅発中枢影響について
分子レベルで見落としなく解析することができる。

17

網羅的遺伝子発現変動解析による毒性発現メカニズム解明

トリアゾラム投与による遅発性の情動認知行動影響は、
幼若期投与群のみで認められた

投与初期での網羅的な遺伝子発現変動解析により、
この分子メカニズムを明らかにする

→ 遅発性の情動認知行動毒性の分子基盤を明らかにする

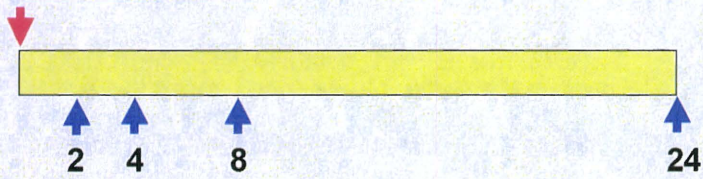
昨年度研究にて検討したイボテン酸(1 mg/kg)投与でも、トリアゾラム
投与時と同様、幼若期投与群のみで遅発性の学習記憶障害が認められた

⇒ トリアゾラム投与の際との比較・検討

18

トリアゾラム単回強制経口投与の際の
海馬における網羅的遺伝子発現変動解析
[幼若期投与]

単回強制経口投与
V: 0.5% MC
L: 0.1 mg/kg
M: 0.3 mg/kg
H: 1 mg/kg

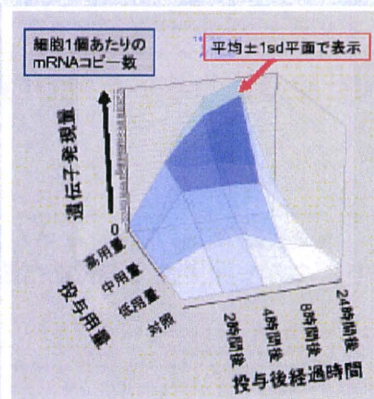


↑ : 海馬RNAサンプリング
(投与後時間)

19

遺伝子発現変動解析実験 表示例
C57BL/6 マウス (♂) (各点n=3、計48匹)

濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての3次元グラフ。
あわせて、各平面の上下に標準偏差(SD)平面(薄い色)を示す。



20

RSortによる解析：

各遺伝子 (probe set: ps) につき、用量、経時変化及び発現コピー数を各軸とした3次元グラフにおいて、発現を表す平面につき凹凸を評価し、全てのpsを生物学的に有意な順に並び替える、独自に開発したソフト

→ 網羅性を考慮した解析ができる

21

トリアゾラム幼若期投与 海馬 RSort解析結果 [NTG024HC]

RSort条件:

More than 1
Max group: 3
H, M
2, 4, 8, 24 h

AND EVALUATE 1
P < 0.05

SUBTRACT Y=0

■ 発現増加: 2,062 ps [without SUBT Y=0: 1,205]

→ 目視後: 194 ps

□ 発現減少: 5,635 ps [without SUBT Y=0: 5,341]

→ 目視後: 97 ps Npas4の顕著な発現減少が認められた

22

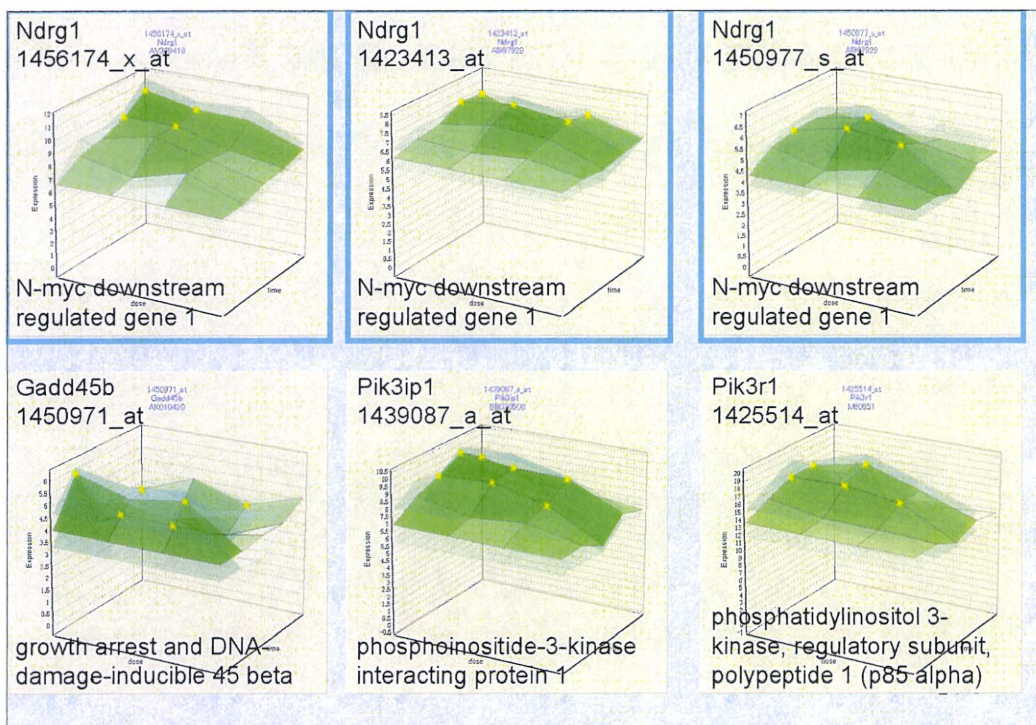
トリアゾラム幼若期投与の際の 海馬における網羅的遺伝子発現変動解析 [Perce llome法]

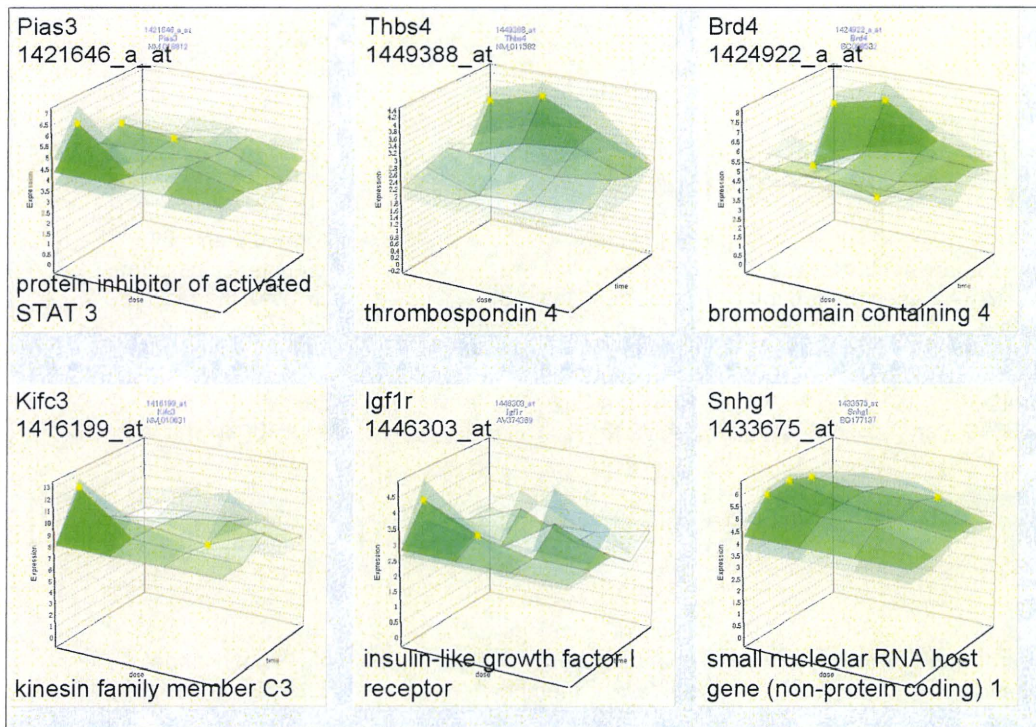
発現増加分 :

- ・ 生物学的に発現増加が示唆されたもの : **194 ps**
- ・ 市販のインフォマティクス (IPA) による検索 :
シグナルネットワークの抽出なし
- ・ ミエリン鞘の維持に関与する**Ndr g1遺伝子**の発現増加が認められたが、この他の関連遺伝子の変動は認められなかった。現時点でこの他の神経伝達に関連する遺伝子・シグナルネットワークは認められなかった。
- ・ 現時点で、アポトーシスや酸化的ストレスを含め、有害影響に関する遺伝子・シグナルネットワークは認められなかった。

発現が有意に増加あるいは減少した遺伝子の多くが、神経系での機能が不明であることから、神経系における遺伝子機能の基礎研究をさらに推進する必要がある

23



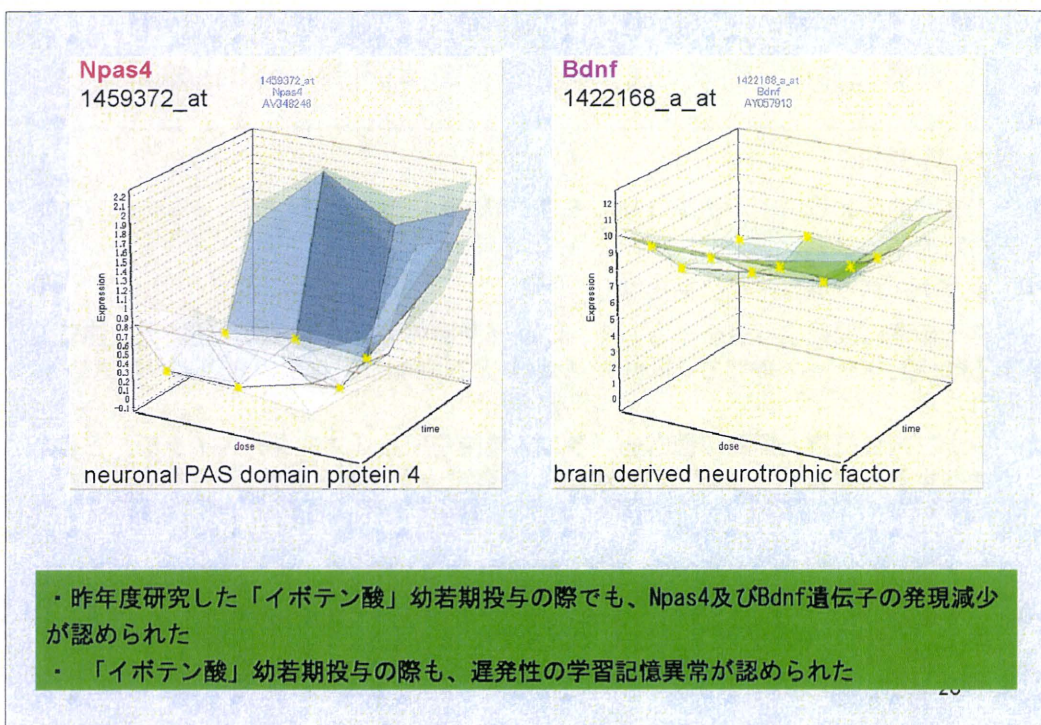
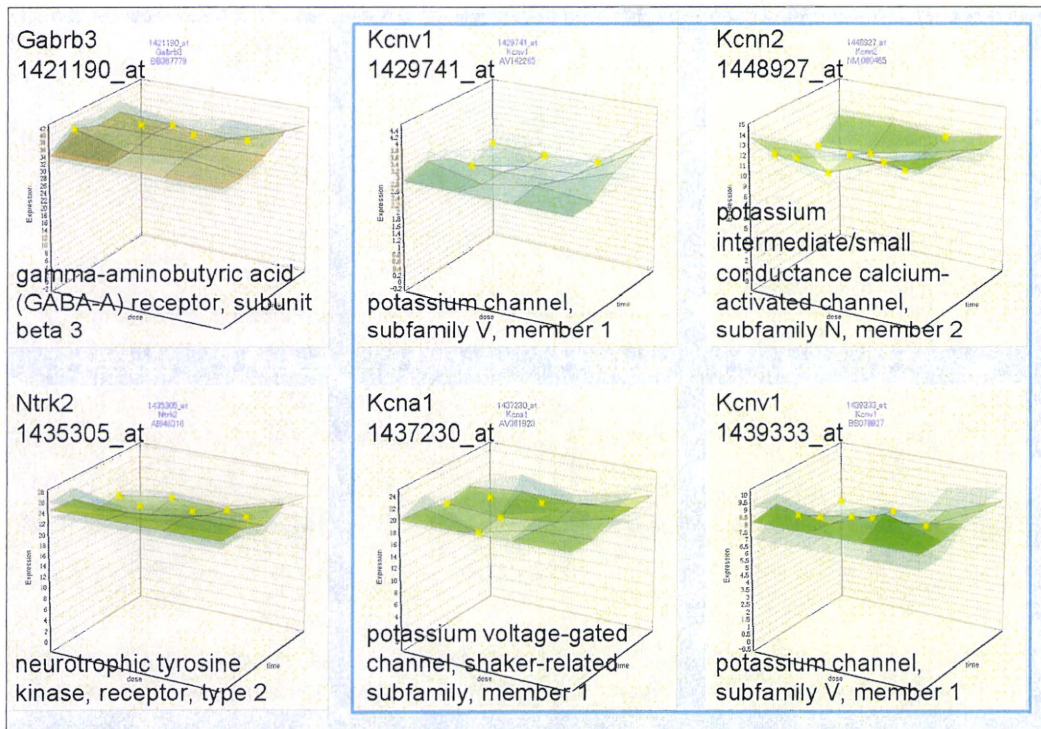


トリアゾラム幼若期投与の際の 海馬における網羅的遺伝子発現変動解析 [PerceI lome法]

発現減少分:

- ・ 生物学的に発現増加が示唆されたもの : 97 ps
- ・ 市販のインフォマティクス (IPA) による検索 :
シグナルネットワークの抽出なし
- ・ 神経伝達に関連する遺伝子として、**GABA-A受容体であるGabbr3、BDNF受容体であるNtrk2、KチャンネルであるKcnv1、Kcna1 及びKcnn2** 遺伝子の発現減少が認められた。
- ・ シナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持を司る「マスタースイッチ」として機能する転写因子**Npas4**遺伝子の顕著な発現減少が認められた。

発現が有意に増加あるいは減少した遺伝子の多くが、神経系での機能が不明であることから、神経系における遺伝子機能の基礎研究をさらに推進する必要がある

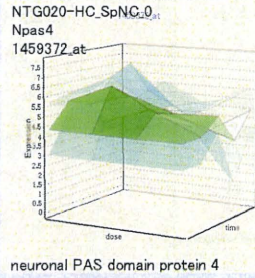


- ・ 昨年度研究した「イボテン酸」幼若期投与の際でも、Npas4及びBdnf遺伝子の発現減少が認められた
- ・ 「イボテン酸」幼若期投与の際も、遅発性の学習記憶異常が認められた

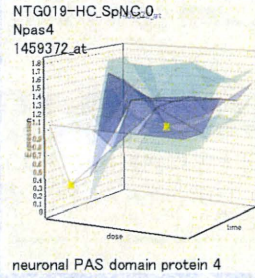
昨年度に発表した「イボテン酸」投与実験での解析結果

シナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持に働く「マスタースイッチ」である転写因子Npas4遺伝子の発現は、イボテン酸を幼若期に投与した際に減少する

成熟期投与群



幼若期投与群



Nature. 2008 October 30; 455(7217): 1198-1204. doi:10.1038/nature07319.

Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by Npas4

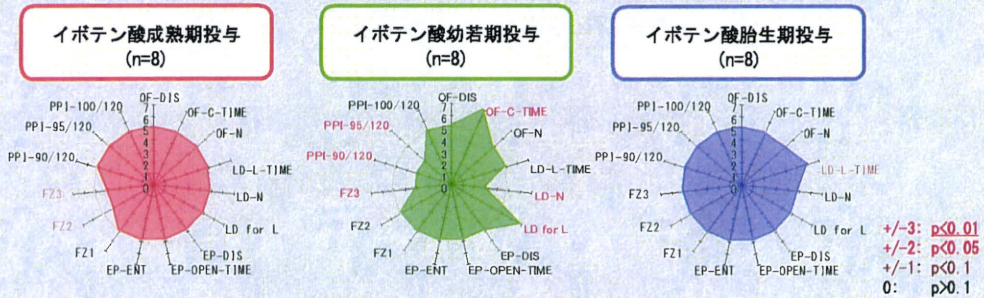
Yingxi Lin¹, Brenda L. Bloodgood¹, Jessica L. Hauser^{1,†}, Ariya D. Lapan², Alex C. Koon^{1,†}, Tae-Kyung Kim¹, Linda S. Hu¹, Athar N. Malik^{1,3}, and Michael E. Greenberg¹

29

昨年度に発表した「イボテン酸」投与実験での解析結果

イボテン酸投与時期による行動逸脱レベルの比較

イボテン酸：キノコ毒の成分、NMDA型グルタミン酸受容体のアゴニスト
1mg/kg、強制経口投与（溶媒は0.5%メチルセルロース溶液）



イボテン酸 (1mg/kg) を生後2週齢の幼若期雄マウスに強制経口投与した結果、成熟後の12-13週齢時に、

①不安関連行動逸脱と②記憶異常及び③情報処理能低下が生じた。

30

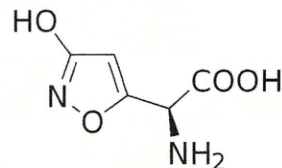
昨年度に発表した「イボテン酸」投与実験

イボテン酸の選択理由

[C₅H₆N₂O₄、分子量：158.1、CAS No.：2552-55-8]

1: アミノ酸系神経伝達物質受容体に作用するため、発達期での情動・認知障害を誘発する可能性が示唆された

2: 種村研究分担者により、成熟期、幼若期、胎生期（経胎盤投与）のマウスに、同一用量のイボテン酸を単回経口投与し、各群ともに成熟後のマウスの情動認知行動を解析した結果、行動異常が幼若期において強く認められたという情報を得た



イボテン酸：

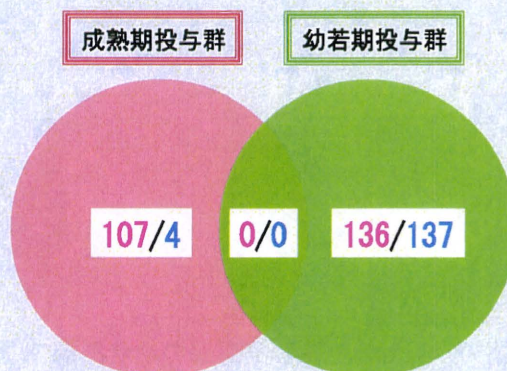
毒キノコ（テングダケ類）に含まれるアミノ酸で、グルタミン酸受容体のアゴニストであるが、体内に摂取されると脱炭酸化され、GABA受容体のアゴニストであるムシモールに変化する。

半数致死量：
38 mg/kg（マウス、経口）

31

昨年度に発表した「イボテン酸」投与実験での解析結果

イボテン酸投与により、海馬において発現増加/減少を示す遺伝子プロファイルは、幼若期投与と成熟期投与で異なる



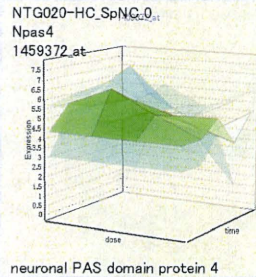
海馬において発現が増加/減少した遺伝子（プローブセット：PS）数

32

昨年度に発表した「イボテン酸」投与実験での解析結果

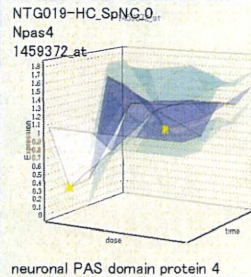
シナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持に働く「マスタースイッチ」である転写因子Npas4遺伝子の発現は、イボテン酸を幼若期に投与した際に減少する

成熟期投与群



neuronal PAS domain protein 4

幼若期投与群



neuronal PAS domain protein 4

Nature. 2008 October 30; 455(7217): 1198–1204. doi:10.1038/nature07319.

Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by Npas4

Yingxi Lin¹, Brenda L. Bloodgood¹, Jessica L. Hauser^{1,†}, Ariya D. Lapan², Alex C. Koon^{1,†}, Tae-Kyung Kim¹, Linda S. Hu¹, Athar N. Malik^{1,3}, and Michael E. Greenberg¹

33

解析のストラテジー

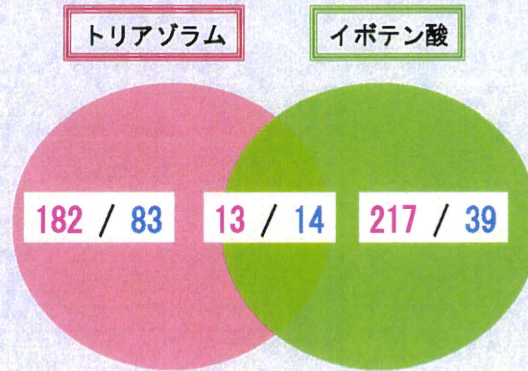
- 「トリアゾラム」、「イボテン酸」共に、幼若期投与の際、
- ・ 遅発性の学習記憶異常が認められた。
 - ・ Npas4及びBdnf遺伝子の発現減少が認められた

両化学物質を幼若期投与した際に、共通して発現**減少**が認められたNpas4、Bdnfを含む遺伝子リスト：

「遅発性の情動認知行動異常を誘発するシグナルネットワーク」である可能性がある

34

幼若期のマウスに、トリアゾラム及びイボテン酸を
単回経口投与した際の、
海馬における変動した遺伝子数の比較[増加 / 減少]

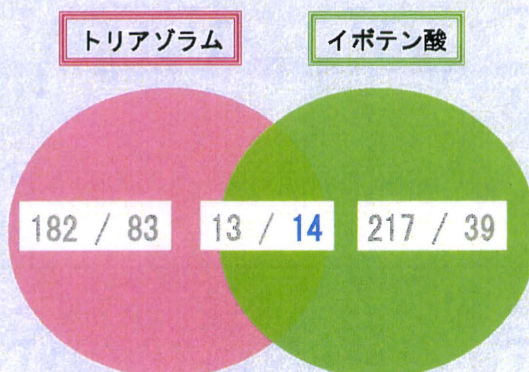


海馬において発現が**増加/減少**した遺伝子(プローブセット: PS)数

35

両化学物質を幼若期投与した際に、共通して発現**減少**が認められたNpas4、
Bdnfを含む遺伝子リスト =

「遅発性の情動認知行動異常を誘発するシグナルネットワーク」
である可能性がある

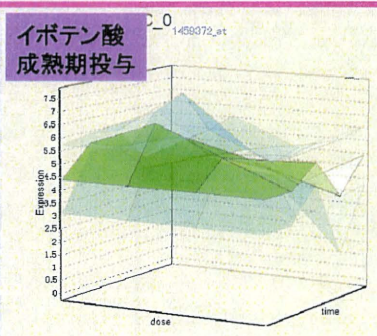
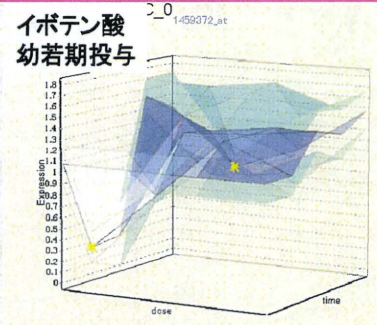
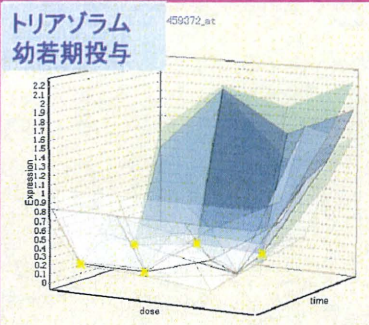


共通して発現減少する
14 psについて、

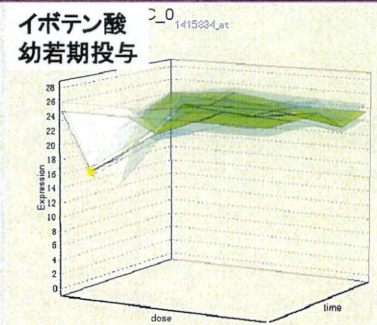
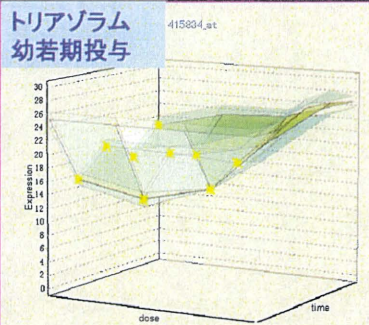
発現変動を比較したも
のを示す

36

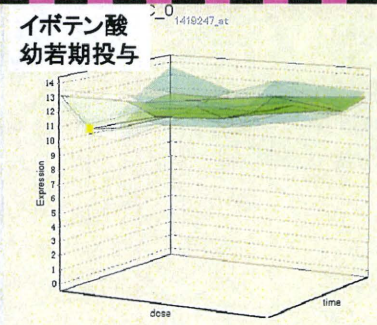
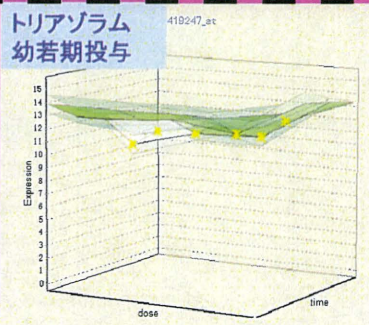
Npas4
neuronal PAS domain protein 4



Dusp6
dual specificity phosphatase 6



Rgs2
regulator of G-protein signaling 2

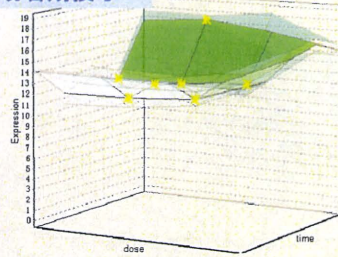


Spry2

sprouty homolog 2
(Drosophila)

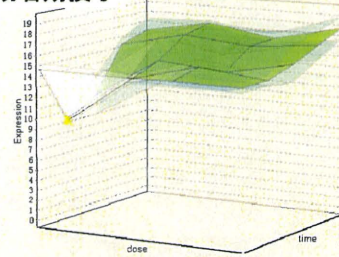
トリアゾラム 幼若期投与

436584_at



イボテン酸 幼若期投与

436584_at

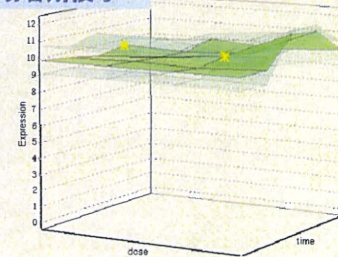


Mycn

v-myc
myelocytomatosis
viral related
oncogene,
neuroblastoma
derived (avian)

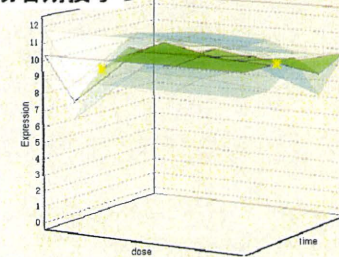
トリアゾラム 幼若期投与

417155_at



イボテン酸 幼若期投与

417155_at

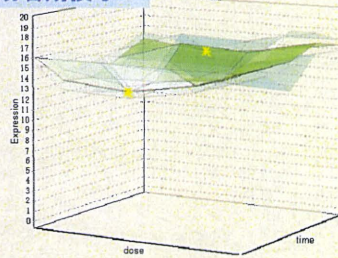


Flrt2

fibronectin
leucine rich
transmembrane
protein 2

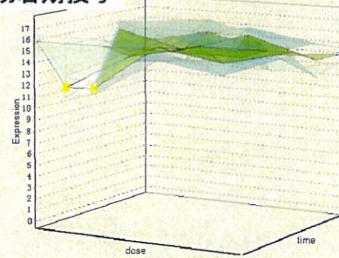
トリアゾラム 幼若期投与

436702_at



イボテン酸 幼若期投与

436702_at

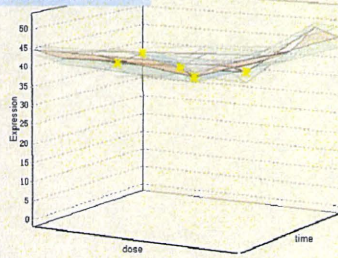


Rgs4

regulator of G-
protein signaling
4

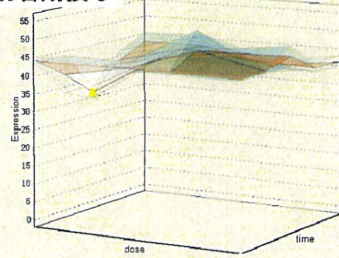
トリアゾラム 幼若期投与

416286_at

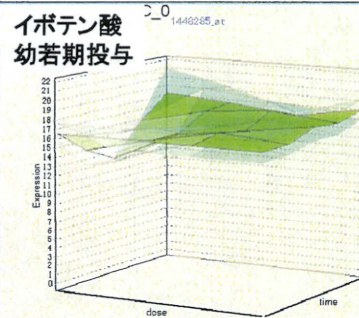
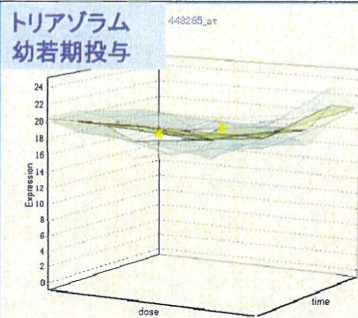


イボテン酸 幼若期投与

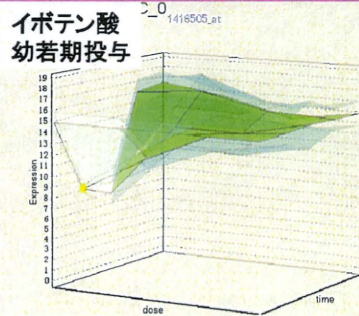
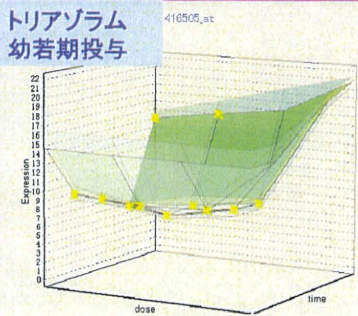
416286_at



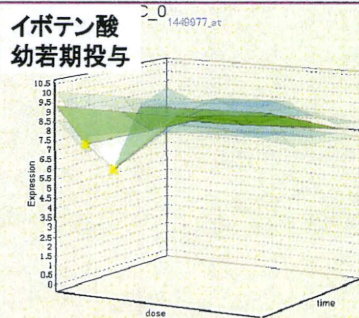
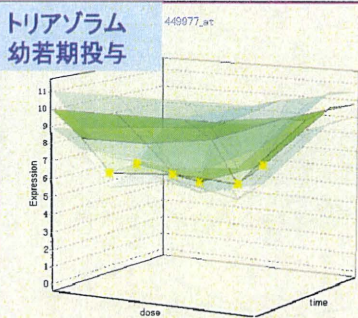
Rgs4
regulator of G-protein signaling 4



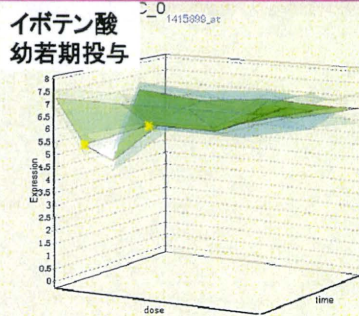
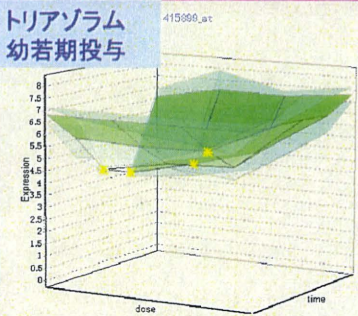
Nr4a1
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
= nerve Growth factor IB (NGFIB)



Egr4
early growth response 4
Bdnfの標的



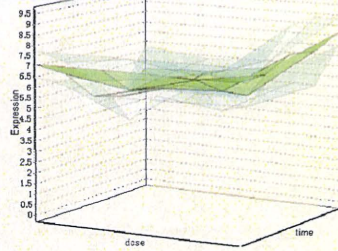
Junb
Jun-B oncogene



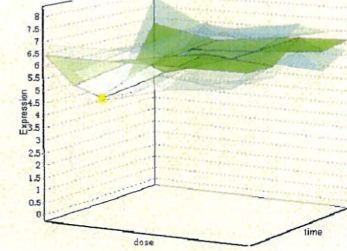
Ptgs2

prostaglandin-endoperoxide synthase 2

トリアゾラム 417262_at
幼若期投与



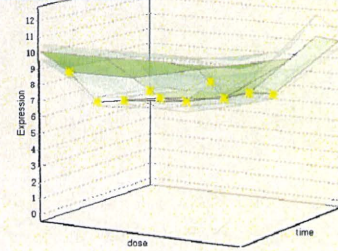
イボテン酸 1417262_at
幼若期投与



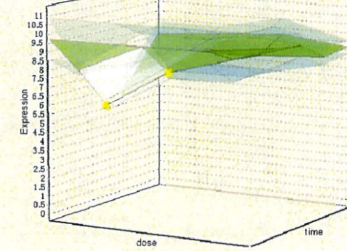
Bdnf

brain derived neurotrophic factor
Npas4の標的

トリアゾラム 422188_at
幼若期投与



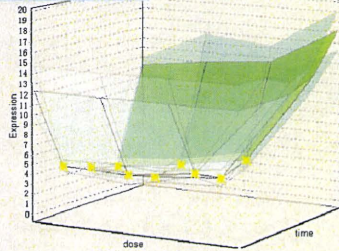
イボテン酸 1422188_at
幼若期投与



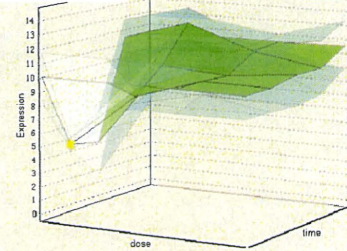
Arc

activity regulated cytoskeletal-associated protein

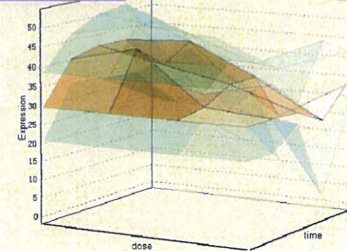
トリアゾラム 418687_at
幼若期投与



イボテン酸 1418687_at
幼若期投与

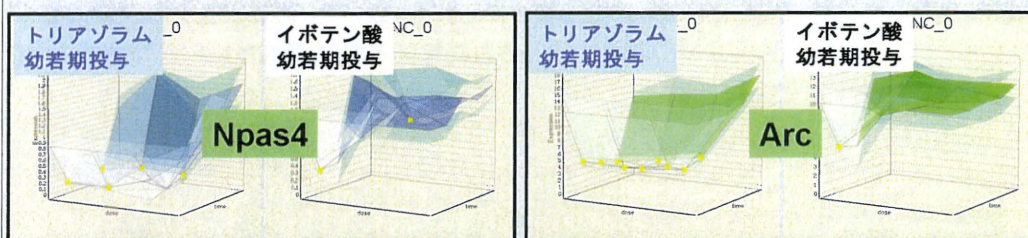


イボテン酸 C_0_1418687_at
成熟期投与



両化学物質を幼若期投与した際に、共通して発現減少が認められたNpas4、Bdnfを含む遺伝子リスト =

「遅発性の情動認知行動異常を誘発するシグナルネットワーク」である可能性が高い



14 ps [13遺伝子]のほとんどが「トリアゾラム」、「イブテン酸」共に、Npas4の場合と同様な発現パターンを示した
⇒ Npas4と同じ局所シグナルネットワークである可能性が高い [発見]
= 「遅発性の情動認知行動異常を誘発するシグナルネットワーク」である可能性がある

14 ps [13遺伝子]のほとんどが「トリアゾラム」、「イブテン酸」共に、Npas4の場合と同様な発現パターンを示した
⇒ Npas4と同じ局所シグナルネットワークである可能性が高い

Q: 幼若期に「トリアゾラム」、「イブテン酸」を投与した際に共通して発現減少した、Npas4遺伝子を含む13遺伝子には、転写開始点上流に共通した結合配列は存在するのか？（同じ局所ネットワークか？）

共通した配列があれば同一のネットワークである可能性が高い



*in silico*でのプロモーター解析

市販のGenomatixを利用

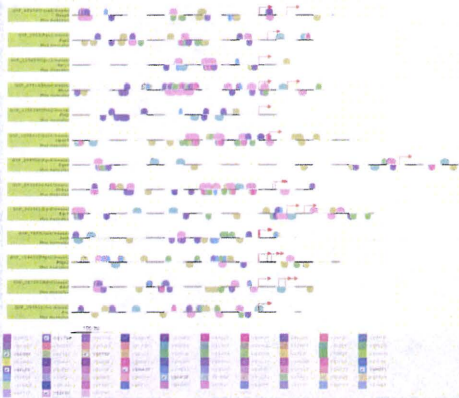
海馬

by Dr Igarashi, K

一幼若期に「トリアゾラム」「イボテン酸」を投与した際に共通して発現減少した
Npas4遺伝子を含む13遺伝子について

遺伝子リスト14 probe sets = 13遺伝子

Genomatix



- 13遺伝子全てのプロモーターに共通する転写因子結合配列はV\$ETSFであった。
- 12遺伝子のプロモーターに共通する転写因子結合配列は8種、0\$VTBP、V\$EGRF、V\$KLFS、V\$MAZF、V\$MZF1、V\$NR2F、V\$ZF02、V\$ETSFであった。

47

by Dr Igarashi, K

V\$ETSF: Human and murine ETS1 factors

Promoter Matches
93.4 % (vertebrate promoters)

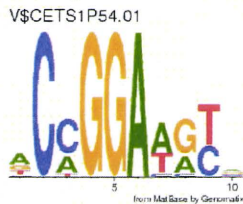
Matrix name	IUPAC
V\$CETS1P54.01	NCCGGAA GTN
V\$ENF.01	A NCCGGAA GTN
V\$ELF2.01	NNNCAGGAA GNE
V\$ELF3.01	A NNKGGAA STNA
V\$ELE1.01	CNEACRGGAA GTNCA
V\$ELE1.02	NCCGGAA GTN
V\$ELE1.03	NCCGGAA GTN
V\$EST1.01	V\$KGGAA GTN
V\$EST2.01	DACAGGAA GTV NE
V\$FLI1.01	NNEA CCGGAA GTN
V\$GARF.01	EC CGGAA GNGSE
V\$GARPA.01	NNACCGGAA GTN
V\$GARPT1.01	NCCGGAA GTGAC
V\$NRF2.01	ACCGGAA GNS
V\$PDEF.01	NCAAGGATGN
V\$PEA3.01	EVACGGAA GTN
V\$PU1.01	NNDDGAGGAA STGV D
V\$PDEF.01	NNATCCGGATGTN
V\$SP11_PU1.01	NHAAAAGCGGAA GTSE AWNV
V\$SP11_PU1.02	NCCGGAA GTN
V\$SP11_PU1.03	NNAWGNGGAA GTN
V\$SP18.01	NAAWGHGGAA GTN

V\$CETS1P54.01

Random Expectation: 0.76 matches per 1000 basepairs

Promoter Matches: 32.1 % (Vertebrate promoters)

Sequence logo



48

O\$VTBP: Vertebrate TATA binding protein factor

Promoter Matches
72.8 % (vertebrate promoters)

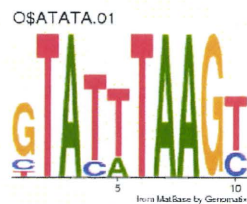
Matrix name	IUPAC
O\$ATATA.01	GTATTTAAGT
O\$LTATA.01	A TATAAATAGWKS
O\$MTATA.01	YW NNTWTAAANCNEM
O\$VTATA.01	VSS
O\$VTATA.01	STATAAAWBNM
O\$VTATA.02	NCATATAAAG

O\$ATATA.01

Random Expectation: 0.02 matches per 1000 basepairs

Promoter Matches: 43.8 % (Vertebrate promoters)

Sequence logo



49

V\$EGRF: EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors

Promoter Matches
62.7 % (vertebrate promoters)

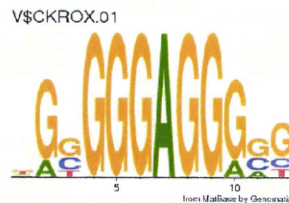
Matrix name	IUPAC
V\$CKROX.01	NGSGGGAGGS
V\$EGRI.01	W TGCCTGGCCCK
V\$EGRI.02	SSSKNGGGGGCCCK
V\$EGRI.03	NNTGCCTGGGGCCG
V\$EGRI.03	N
V\$EGRI.01	N TGCCTGGCCCK

V\$CKROX.01

Random Expectation: 0.03 matches per 1000 basepairs

Promoter Matches: 28.6 % (Vertebrate promoters)

Sequence logo



50

V\$KLFS: Krueppel like transcription factors

Promoter Matches
83.9 % (vertebrate promoters)

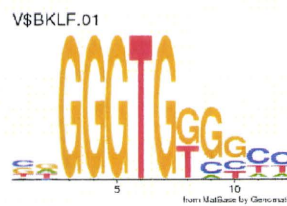
Matrix name	IUPAC
V\$EELF.01	5NGGCTGGGCG
V\$EELF.01	5NRGGGAGTNEYR
V\$EELF.01	5C5EVRAGGTD
V\$EELF.02	5NNWCGGTCTGGYR
V\$EELF.01	5NAAWR3E6AAGG
V\$EELF.01	5

V\$BKL.F.01

Random Expectation: 0.23 matches per 1000 basepairs

Promoter Matches: 22.8 % (Vertebrate promoters)

Sequence logo



51

V\$MAZF: Myc associated zinc fingers

Promoter Matches
46.9 % (vertebrate promoters)

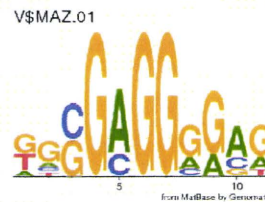
Matrix name	IUPAC
V\$MAZ.01	5KGGAGGGGAG
V\$MAZ.01	5NCGGGGGGGMCG

V\$MAZ.01

Random Expectation: 0.79 matches per 1000 basepairs

Promoter Matches: 36.5 % (Vertebrate promoters)

Sequence logo



52

V\$NR2F: Nuclear receptor subfamily 2 factors

Promoter Matches
84% (vertebrate promoters)

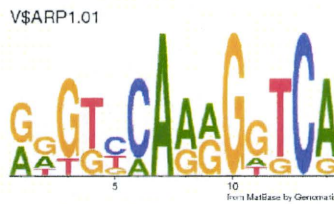
Matrix name	IUPAC
V\$ARP1.01	GGGTCAGGTTCA
V\$COP1.01	GGGTCAGGTTCA
V\$COP2.01	GGGTCAGGTTCA
V\$COP3.01	GGGTCAGGTTCA
V\$COP4.01	GGGTCAGGTTCA
V\$COP5.01	GGGTCAGGTTCA
V\$COP6.01	GGGTCAGGTTCA
V\$COP7.01	GGGTCAGGTTCA
V\$COP8.01	GGGTCAGGTTCA
V\$COP9.01	GGGTCAGGTTCA
V\$COP10.01	GGGTCAGGTTCA
V\$COP11.01	GGGTCAGGTTCA
V\$COP12.01	GGGTCAGGTTCA
V\$COP13.01	GGGTCAGGTTCA
V\$COP14.01	GGGTCAGGTTCA
V\$COP15.01	GGGTCAGGTTCA
V\$COP16.01	GGGTCAGGTTCA
V\$COP17.01	GGGTCAGGTTCA
V\$COP18.01	GGGTCAGGTTCA
V\$COP19.01	GGGTCAGGTTCA
V\$COP20.01	GGGTCAGGTTCA

V\$ARP1.01

Random Expectation: 0.08 matches per 1000 basepairs

Promoter Matches: 20.4 % (Vertebrate promoters)

Sequence logo



53

V\$ZF02: C2H2 zinc finger transcription factors 2

Promoter Matches
59.7% (vertebrate promoters)

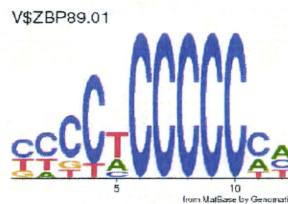
Matrix name	IUPAC
V\$ZBP1.01	CCCCCCCC
V\$ZBP2.01	CCCCCCCC
V\$ZBP3.01	CCCCCCCC
V\$ZBP4.01	CCCCCCCC
V\$ZBP5.01	CCCCCCCC
V\$ZBP6.01	CCCCCCCC
V\$ZBP7.01	CCCCCCCC
V\$ZBP8.01	CCCCCCCC
V\$ZBP9.01	CCCCCCCC
V\$ZBP10.01	CCCCCCCC
V\$ZBP11.01	CCCCCCCC
V\$ZBP12.01	CCCCCCCC
V\$ZBP13.01	CCCCCCCC
V\$ZBP14.01	CCCCCCCC
V\$ZBP15.01	CCCCCCCC
V\$ZBP16.01	CCCCCCCC
V\$ZBP17.01	CCCCCCCC
V\$ZBP18.01	CCCCCCCC
V\$ZBP19.01	CCCCCCCC
V\$ZBP20.01	CCCCCCCC

V\$ZBP89.01

Random Expectation: 0.37 matches per 1000 basepairs

Promoter Matches: 32.2 % (Vertebrate promoters)

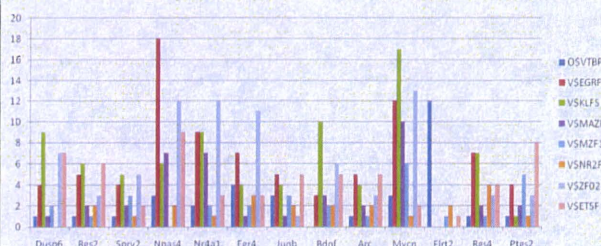
Sequence logo



54

各プロモーターにおける転写因子結合モチーフ数

	Dusp6	Rgs2	Spry2	Npas4	Nr4a1	Egr4	Junb	Bdnf	Arc	Mycn	Flrt2	Rgs4	Ptgs2
OSVTBP	1	1	1	3	2	4	3	0	1	3	12	1	1
V\$EGRF	4	5	4	18	9	7	5	3	5	12	0	7	4
V\$KLFS	9	6	5	6	9	4	4	10	4	17	0	7	1
V\$MAZF	1	2	2	7	7	1	1	3	2	10	0	2	2
V\$MZF1	2	1	3	0	2	2	3	2	1	6	1	1	5
V\$NR2F	0	2	1	2	1	3	2	2	2	1	2	4	1
V\$ZF02	7	3	5	12	12	11	1	6	3	13	0	3	3
V\$EVSF	7	6	2	9	3	3	5	5	5	2	1	4	8



V\$EGRF及び V\$ZF02は、
Npas4遺伝子のプロモーター
上に結合モチーフ数が多い

55

目的：化学物質による遅発性の情動認知行動毒性の分子基盤を明らかにする

まとめ 1

- 1) トリアゾラム (1 mg/kg) 経口投与により、幼若期投与群では、成熟期ならびに胎生期投与群と異なり、情動認知行動異常が誘発される
- 2) トリアゾラム (0, 0.1, 0.3, 1.0 mg/kg) 投与後、経時的 (2, 4, 8, 24時間後) に採取した、幼若期の海馬サンプルを用いた網羅的遺伝子発現変動解析：
 - 2-A) 発現増加分：
 - ・生物学的に発現増加が示唆されたもの：194 ps
 - ・現時点で、アポトーシスや酸化ストレスを含め、有害影響に関する遺伝子・シグナルネットワークは認められなかった。
 - 2-B) 発現減少分：
 - ・生物学的に発現増加が示唆されたもの：97 ps
 - ・神経伝達に関連する遺伝子として、GABA-A受容体であるGabbr3、BDNF受容体であるNtrk2、KチャンネルであるKcnv1、Kcna1 及びKcnn2 遺伝子、及び、
 - シナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持を司る「マスタースイッチ」として機能する転写因子Npas4遺伝子