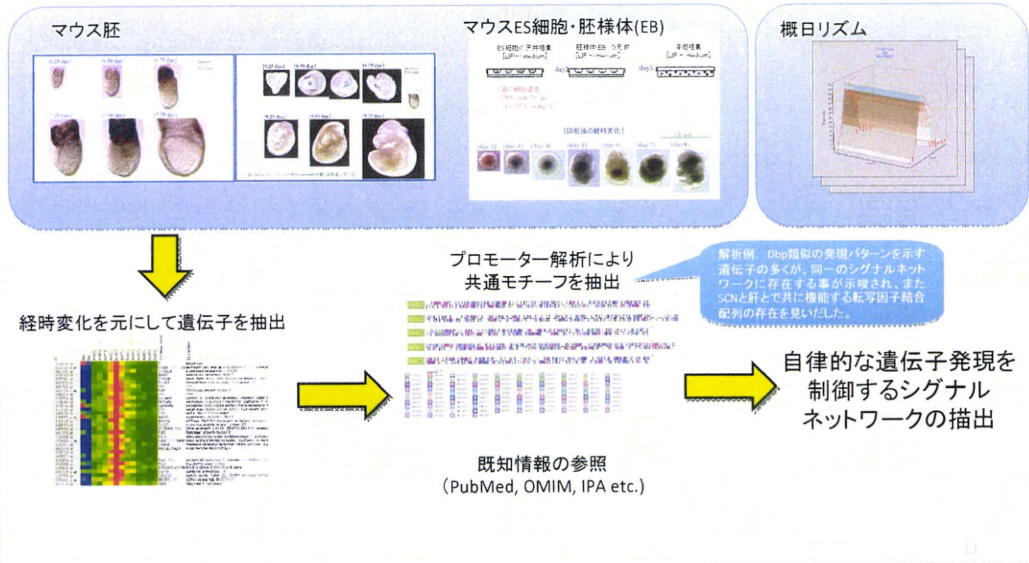
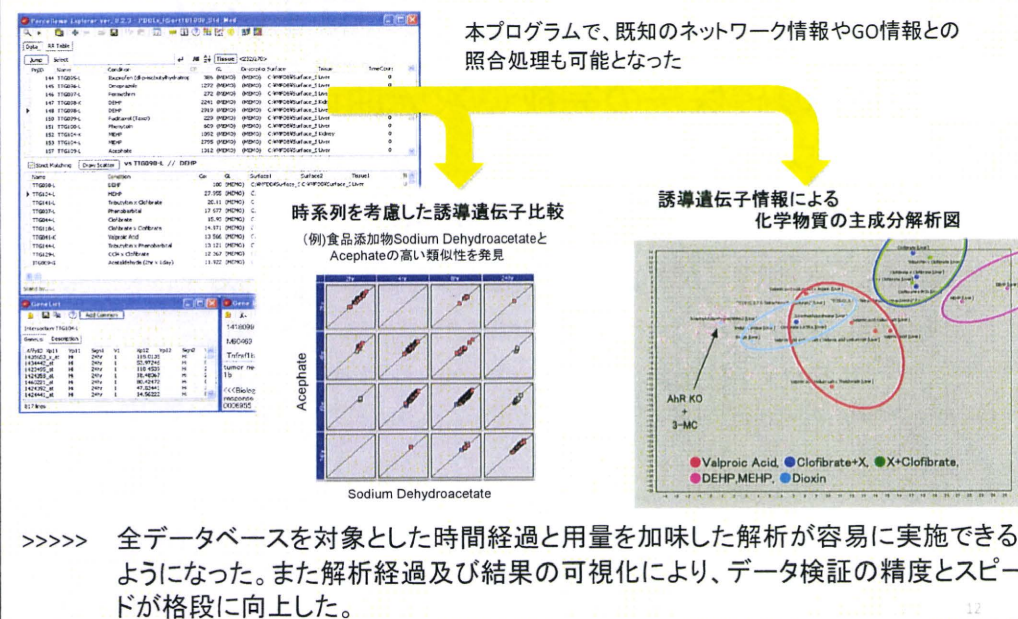


胎児、ES細胞、概日変動等の自律的なシグナルネットワークの描出

自律的な遺伝子発現が認められる発生過程や概日リズム等のシグナルネットワークの描出アルゴリズムを開発し、その成果をより複雑な毒性シグナルネットワークの描出に応用する。

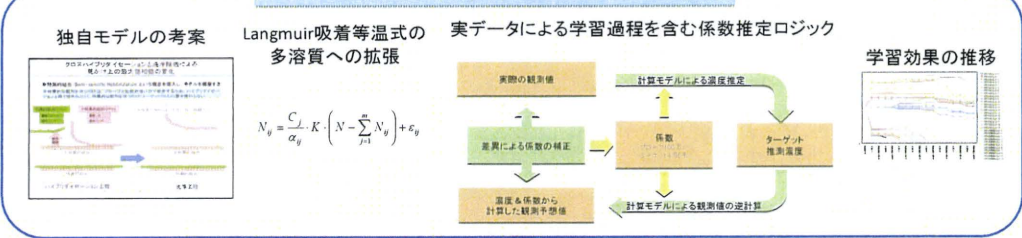


複数の化学物質のクラスタ交差点からのカスケード描出のための基盤ソフトウェア開発～PercellomeExplorer



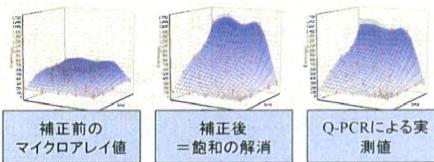
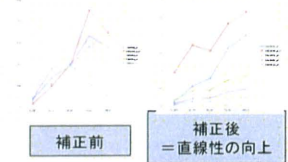
in silico処理によるマイクロアレイデータの高精度化

クロスハイブリダイゼーション補正～MLANG



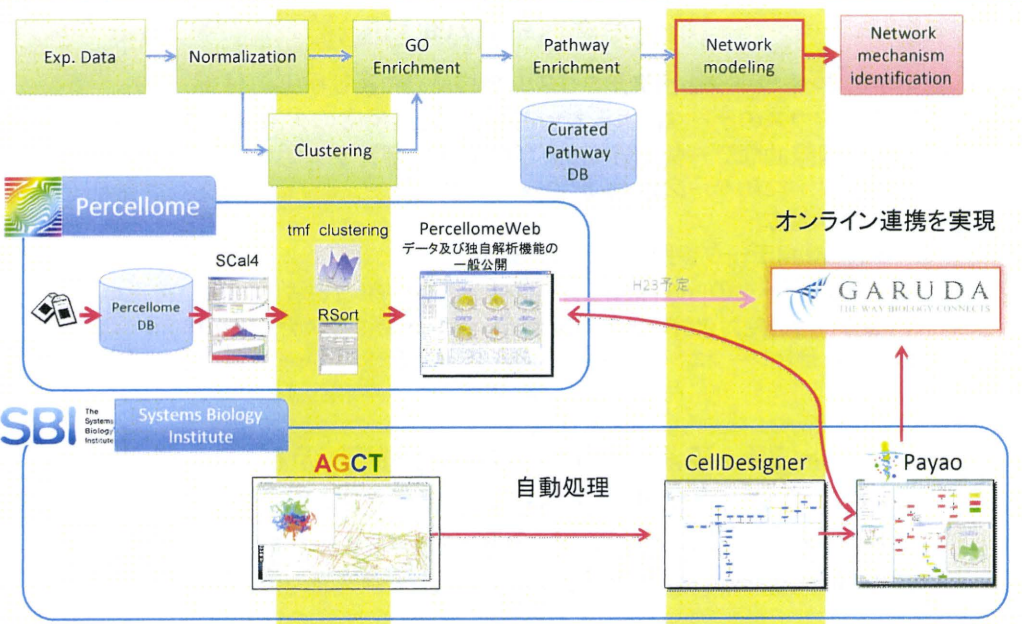
飽和したデータ等を補正し、データの定量性(直線性)を高めた

補正処理によって、マイクロアレイデータの飽和が補正され、定量RT-PCR と同等の結果を得た

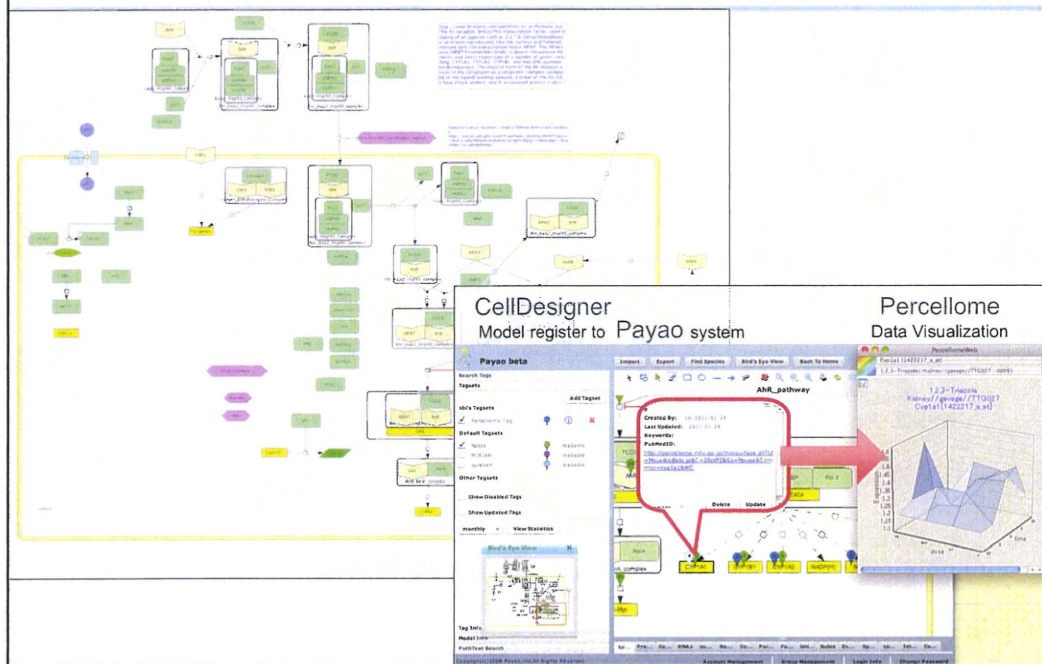


特許出願済み

遺伝子発現ネットワーク描出と国際公開(SBIとの共同開発)



(例) AhR pathway built by CellDesigner and Payao



研究計画

H23年度(3年目/3年計画)

- 構築中のネットワーク描出アルゴリズムの検証(SBI及びNIHS毒性部)
- 遺伝子KOマウスのデータによるネットワーク確認(反応の欠落部分による検証)
- 国内及び国際的なデータ公開(SBI及びNIHS毒性部)
 - オンラインアプリケーションPercellomeWebの拡張
 - GARUDA対応
- PubMed, OMIMデータ参照システムの完成
- TGP1のラットデータのPercellomeデータベースへの統合と活用
 - TGPデータの絶対化計算とQC、3D表示、Percellome マウスデータとの対比
- 将来対応:次世代シーケンサへのPercellome法適用及び、RNAseq技術の性能評価



In silico 予測システムへの高速移行、及び
利用者拡大によるデータ解析の促進

ヒト型マウスによる人外挿性の向上などを含む検証実験の追加を含む
(PXR・CARヒト型マウスの利用など:鳥取大学押村研究室との共同開発)

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究
－網羅的定量的大規模トキシコゲノミクスデータベースの維持・拡充と
毒性予測評価システムの実用化の為のインフォマティクス技術開発－
(H21-化学-一般-001)

分担研究報告書

既構築Percellomeデータベース解析
－特定の分子標的を共有する化学物質群のデータと既知情報からの局所カスケードの描出－

研究分担者 菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 部長

研究要旨

本研究は、分子メカニズムに依拠した毒性予測評価システムの実用化の最終段階として、関連遺伝子発現ネットワーク描出の為のインフォマティクス開発を目的とする。本分担研究では、特定の分子標的を共有する化学物質群のデータと既知情報からの局所カスケードの描出することを目的とする。

今年度(平成22年度)は、ダイオキシン受容体(AhR)シグナルのネットワークの検証の為に、AhR欠失マウスに、AhRのリガンドである3-メチルコラントレン(3MC)(0, 10, 30, 100 mg/kg)を単回経口投与(4用量、16群構成、各群3匹)し、投与2、4、8及び24時間後の肝サンプルにつき網羅的遺伝子発現データを解析した。またこの結果を、既に取得済みの、野生型マウスに3MCを同様の条件にて投与した際の遺伝子発現変動の経時データベースと比較検討した。野生型マウスでは3MCの投与により、AhRシグナル関連遺伝子、酸化的ストレス関連遺伝子をはじめとして多くの遺伝子発現変動が認められた。生物学的な発現変動が示唆された遺伝子として685ps(増加：659ps、減少26ps)が見いだされた。これと比較し、AhR欠失マウスでは、3MCの投与により変動した遺伝子では特定のシグナルネットワークは見いだせず、変動する遺伝子数も少なく、また発現の変動幅も狭いものであった。具体的には生物学的な発現変動が示唆された遺伝子として216ps(増加：172ps、減少44ps)が見いだされた。また両者に共通して発現変動が認められた遺伝子数は11psであった。AhRの活性化に伴い、3MCを代謝する薬物代謝酵素の誘導が生じる。したがって、AhR欠失マウスでは3MCの代謝が引き起されないことを考慮する必要があるが、AhRシグナルに関連すると考えられる遺伝子の多くはAhR欠失マウスにて発現変動が著しく抑制されたため、その関

連遺伝子である事が再確認されたと共に、野生型及びAhR欠失マウスの両者で発現変動を示した少なくとも11psの遺伝子については、3MC投与の際、AhRを介さない経路で発現変動するものであることが明らかとなった。このように、当該遺伝子欠失マウスを用いる本解析法は、当該局所ネットワークの描出に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

本研究は、分子メカニズムに依拠した毒性予測評価システムの実用化の最終段階として、関連遺伝子発現ネットワーク描出の為にインフォマティクス開発を目的とする。今年度(平成22年度)は、ダイオキシン受容体(AhR)シグナルのネットワークの検証をおこなった。そのために、AhR欠失マウスに、AhRのリガンドである3-メチルコラントレン(3MC)(0, 10, 30, 100 mg/kg)を単回経口投与(4用量、16群構成、各群3匹)し、投与2、4、8、24時間後の肝サンプルにつき網羅的遺伝子発現データを解析した。また既に取得済みの、野生型マウスに3MCを同様の条件にて投与した際の遺伝子発現変動の経時データベースと比較検討した。

B. 研究方法

試薬及び動物：

3-メチルコラントレン(3-methylcholanthrene; 分子量：268.35、Cas No. : 56-49-5、純度98%、Sigma-Aldrich)についてデータ解析を進めた。12週齢の雄性C57BL/6CrSlcマウス(日本エスエルシー)に4用量(0, 10, 30, 100 mg/kg)(溶媒：コーンオイル)の3MCを、金属ゾンデを用いて単回強制経口投与をおこない、経時的(投与2、4、8及び24時間後)に肝を採取した。AhR欠失マウスは、藤井 義明教授(東北大学)らのグループが作製した

AhR欠失マウス(Mimuraら、Genes Cells 2: 645-654, 1997)を使用し、当研究所にて自家繁殖させた後に実験に供した。

Total RNAの分離精製：

マウス組織を採取後すみやかにRNA later (Ambion社)に4℃で一晩浸漬し、RNaseを不活化する。肝は5mm径の生検トレパンにより3ヶ所を各々別チューブに採取した。その後、RNA抽出操作までは-80℃にて保存した。抽出に当たっては、RNA laterを除いた後、RNeasyキット(キアゲン社)に添付されるRLT bufferを添加し、ジルコニアビーズを用いて破碎液を調製した。得られた破碎液の10 µLを取り、DNA定量蛍光試薬Picogreenを用いてDNA含量を測定した。DNA含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合でSpike cocktail (Bacillus由来RNA5種類の濃度を変えて混合した溶液)を添加し、TRIZOLにより水層を得、RNeasyキットを用いて全RNAを抽出した。100ngを電気泳動しRNAの純度及び分解の有無を検討した。

GeneChip解析：

全RNA 5 µgを取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7プロモーターが付加したオリゴdTプライマーを用いて逆転写しcDNAを合成し、得たcDNAをもとに第二鎖を合成し、二本鎖DNAとした。次

に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はアフィメトリクス社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス) を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。得られた肝サンプルについて、我々が開発した Percellome 手法 (遺伝子発現値の絶対化手法) を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現データを、我々が開発した「RSort」を用いて、網羅的に解析した。このソフトは、各遺伝子 (probe set: ps) につき、用量、経時変化及び遺伝子の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ソフトである。また、既知情報をもとにしたシグナルネットワークとの対比は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程 (平成 19 年 4 月版)」。

C. 研究結果及び考察

C-1: 野生型マウスに 3MC を単回経口投与した際の肝における遺伝子発現変動解析:

発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に増加するものとして 2,088 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 659 ps が認められた。IPA による検索では、Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling, Xenobiotic Metabolism Signaling, Metabolism of Xenobiotics by P450, Nrf2-mediated Oxidative Stress が抽出され、Cyp1a1, Cyp1b1, Nfe2l2, Nqo1 遺伝子をはじめ多くの、また変動幅の大きな発現増加が認められた。このうち Cyp1a1 と Nfe2l2 遺伝子 (別名: Nrf2) について、その発現変化を図 1 に示す。図は下記のように、各遺伝子につき濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての 3 次元グラフとして示した。具体的には、縦軸 (Z 軸) に絶対値化した (細胞 1 個あたりのコピー数) mRNA の発現量を取り、X, Y 軸にはそれぞれ、投与用量と投与後経過時間を取り、各条件の n=3 の平均値曲面で表示する。加えてこの平均曲面の上下に標準偏差 (SD) 平面 (薄い色) を示す。



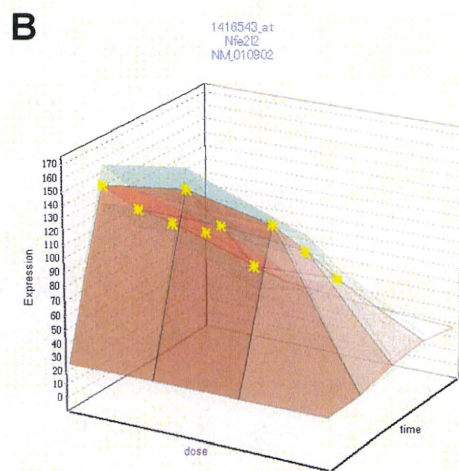
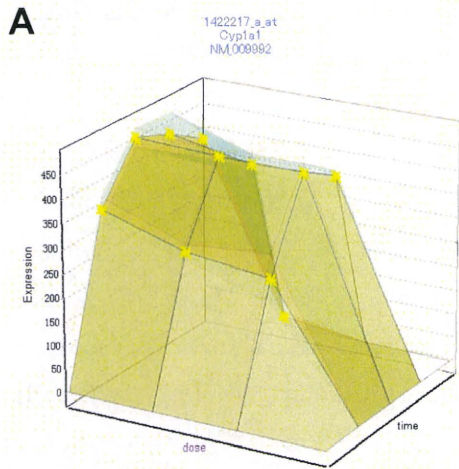


図1 Cyp1a1(A)とNfe2l2(B)遺伝子の遺伝子発現変動

溶媒群と投与群の間の有意差の検定をStudentのt検定によりおこないP値が0.05未満の場合を有意と判定し、図中に*を付した。

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に減少するものとして304ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして26psが認められた。IPAによる既存情報検索では特定のシグナルネッ

トワークは抽出されなかった(AhRに関する遺伝子はリストアップされなかった。

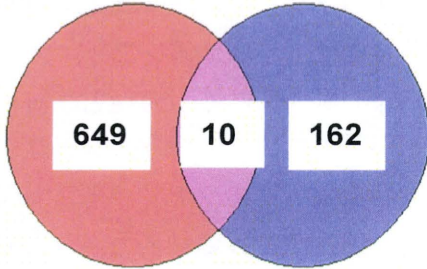
C-2: AhR欠失マウスに3MCを単回経口投与した際の肝における遺伝子発現変動解析:

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に増加するものとして692ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして172psが認められた。また増加が認められた遺伝子は変動幅の小さなものであった。IPAとの照合では特定のシグナルネットワークは示されず、発現が有意(t検定でのP値<0.05)に減少するものとして2,025ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして44psが見いだされた。IPAとの照合では特定のシグナルネットワークは示されなかった。

C-3: 3MCを単回経口投与した際の肝における遺伝子発現変動解析のAhR欠失マウスと野生型マウスにおける比較:

上述したC-1, C-2において得られた遺伝子リストを用いて、3MCを単回経口投与した際の肝における遺伝子発現変動解析について、AhR欠失マウスと野生型マウスの場合を比較・検討した。結果を図2にベン図として示す。遺伝子リストは両者でかなり異なり、両者に共通して含まれていた遺伝子は、Ugt2b35, Rpl13a, B3galnt2, Pqlc1, Srda5a3, Abcc2, Pir遺伝子など11ps(増加:10ps; 減少:1ps)のみであった。

A: 発現増加分



B: 発現減少分

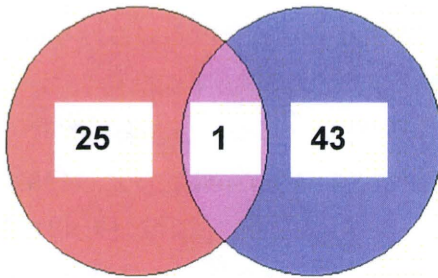
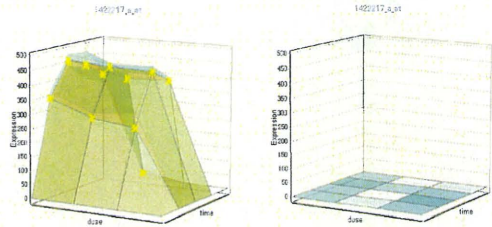


図 2 3MC を単回経口投与した際の肝において発現変動を示した遺伝子数について、野生型マウス(赤)と AhR 欠失マウス用いた場合(青)における比較(A: 発現増加分、B: 発現減少分)

したがって、AhR シグナルに関連すると考えられる遺伝子の多くは AhR 欠失マウスにて発現変動が著しく抑制されたこととなる。このことを確認する為に、例として図

1 で示した遺伝子の発現変動について、野生型マウスと AhR 欠失マウスで比較したものを図 3 に示す。したがって野生型マウスのみで発現変動した遺伝子は、AhR 関連遺伝子である事が示唆された。

A: Cyp1a1



B: Nfe2l2

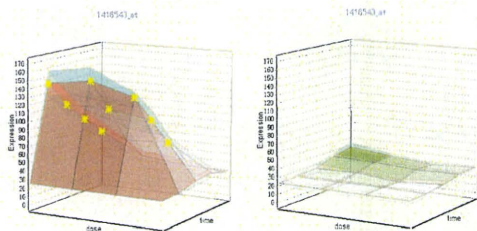


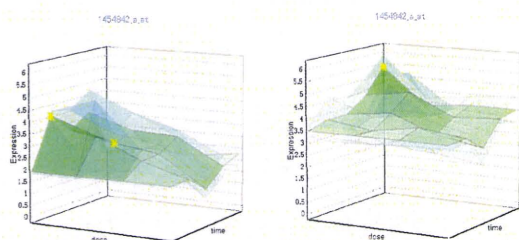
図 3 野生型マウス(左)と AhR 欠失マウス(右)での Cyp1a1(A)と Nfe2l2(B)の遺伝子発現変動の比較

両者共に発現量の軸を同一縮尺とした。溶媒群と投与群の間の有意差の検定を Student の t 検定によりおこない P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定し、図中に*を付した。

他方、野生型及び AhR 欠失マウスの両者で発現変動を示した 11ps の遺伝子については、3MC 投与の際、AhR を介さない経路で発現変動するものであることが示唆された。例として B3galnt2 及び Srd5a3 遺伝子の発

現変動について、野生型マウスと AhR 欠失マウスで比較したものを図 4 に示す。

A: B3galnt2



B: Srd5a3

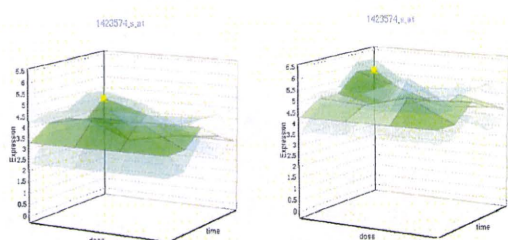


図 4 野生型マウス(左)と AhR 欠失マウス(右)での Srd5a3 (A)と B3galnt2 (B)の遺伝子発現変動の比較

両者共に発現量の軸を同一縮尺とした。溶媒群と投与群の間の有意差の検定を Student の t 検定によりおこない P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定し、図中に * を付した。

D. 結論

本研究は、分子メカニズムに依拠した毒性予測評価システムの実用化の最終段階として、関連遺伝子発現ネットワーク描出の為のインフォマティクス開発を目的とする。

即ち、先行研究にて構築済みの延べ 3.5 億遺伝子情報からなるトキシコゲノミクスデータベース及び毒性学的意味付けを網羅的に抽出するプログラム群の開発及び実装の実績を基盤に、バイオインフォマティクスの専門家の参加を得て、「毒性と直結したネットワークの反応」という結論を導き出すことを可能にするネットワーク描出技術の開発と、毒性予測評価システムの実用化を目指す。本分担研究では、特定の分子標的を共有する化学物質群のデータと既知情報からの局所カスケードの描出することを目的とする。

今年度(平成 22 年度)は、ダイオキシン受容体(AhR)シグナルのネットワークの検証の為に、AhR 欠失マウスに、AhR のリガンドである 3-メチルコラントレン(3MC)(0, 10, 30, 100 mg/kg)を単回経口投与(4用量、16 群構成、各群 3 匹)し、投与 2、4、8、24 時間後の肝サンプルにつき網羅的遺伝子発現データを解析した。また既に取得済みの、野生型マウスに 3MC を同様の条件にて投与した際の遺伝子発現変動の経時データベースと比較検討した。野生型マウスでは、3MC の投与により、AhR シグナル関連遺伝子、酸化ストレス関連遺伝子をはじめとして多くの遺伝子発現変動が認められた。生物学的な発現変動が示唆された遺伝子として 685ps(増加: 659ps、減少 26ps)が見いだされた。これと比較し、AhR 欠失マウスでは、3MC の投与により変動した遺伝子では特定のシグナルネットワークは見いだせず、変動する遺伝子数も少なく、また発現の変動幅も狭いものであった。具体的には、生物学的な発現変動が示唆された遺伝子として 216ps(増加: 172ps、減少 44ps)が見いださ

れた。また両者に共通して発現変動が認められた遺伝子数は11psであった。

野生型マウスでは、AhRの活性化に伴い、3MCを代謝する薬物代謝酵素の誘導が生じる。したがって、AhR欠失マウスでは3MCの代謝が引き起されないことを考慮する必要がある。その上で、AhRシグナルに関連すると考えられる遺伝子の多くはAhR欠失マウスにて発現変動が著しく抑制されたため、その関連遺伝子である事が再確認された。野生型及びAhR欠失マウスの両者で発現変動を示した少なくとも11psの遺伝子については、3MC投与の際、AhRを介さない経路で発現変動するものであることが明らかとなった。既にPercellomeデータベースに取得済の野生型マウスのTCDDデータとの比較を行い、3MCの野生型マウスにおけるAhR直下のネットワークと3MCの代謝活性化体によるネットワークとの分離が可能となった。このように、当該遺伝子欠失マウスを用いる本解析法は、当該局所ネットワークの描出に有用であることが示唆された。

来年度は、エストロゲン(ER)シグナルのネットワークの検証の為に、ER欠失マウスに、3用量のERのリガンドを単回経口投与(4用量、16群構成、各群3匹)し、投与2、4、8及び24時間後の肝サンプルにつき網羅的遺伝子発現データを解析し、これと、取得済みの野生型マウスにおける経時データベースとを比較検討する予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

Yoshida T, Sekine T, Aisaki K, Mikami T, Kanno J, Okayasu I., CITED2 is

activated in ulcerative colitis and induces p53-dependent apoptosis in response to butyric acid., *J Gastroenterol* 2011 46(3): 339-49.

Arase S, Ishii K, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, Shimohigashi Y, Arima K, Kanno J, Sugimura Y., *Endocrine Disrupter Bisphenol A Increases In Situ Estrogen Production in the Mouse Urogenital Sinus.*, *Biol Reprod.* 2011 84(4):734-42.

Atsushi Baba, Fumiaki Ohtake, Yosuke Okuno, Kenichi Yokota, Maiko Okada, Yuuki Imai, Min Ni, Clifford A Meyer, Katsuhide Igarashi, Jun Kanno, Myles Brown, and Shigeaki Kato, *Signal-sensing activation of a histone lysine demethylase complex*, *Nature Cell Biology*, accepted 2011.3

菅野 純、Percellome トキシコゲノミクスの進捗、医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社 Vol.236 no.12, p1125-1126, 2011

2. 学会発表

Jun Kanno, Katsuhide Igarashi, Kentaro Tanemura, Hirotugu Asano, Kinichi Nakashima, *Glucocorticoid induces expression of astrocyte marker GFAP mRNA in mouse neural stem cells.* 14th International Congress of Endocrinology, 2010.3.29, Kyoto, poster

菅野 純、インフォマティクス局面にある Percellome トキシコゲノミクスの食品・食品添加物への適用、第 37 回日本トキシコロジー学会 学術年会(2010. 6. 16) (沖縄)、口演

北嶋 聡、菅野 純、Percellome 発生トキシコゲノミクスの進捗、第 37 回日本トキシコロジー学会 学術年会(2010. 6. 16) (沖縄)、口演

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、松上 稔子、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、脳発生-発達期の神経シグナルかく乱による遅発性中枢影響解析-幼若期雄マウスへのイボテン酸投与による脳高次機能障害について-、第 37 回日本トキシコロジー学会 学術年会(2010. 6. 18) (沖縄)、口演

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、Percellome トキシコゲノミクスの抗がん剤研究への応用、第 69 回日本癌学会学術総会(2010. 9. 24) (大阪)口演

Natalia Polouliakh, Jun Kanno, Yukiko Matsuoka, Ken-Ichi Aisaki, Richard Nock, Frank Nielsen, Keigo Oka, Satoshi Kitajima and Hiroaki Kitano, Discovery of Gene Network Regulated by the Toxicity Equivalent Factor of 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) and 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzofuran (TCDF) chemicals. the 11th International Conference on System Biology(2010. 10. 11) (Edinburgh, UK), Poster

F. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

(1) 特許出願 2010 年 12 月、「競合的ハイブリダイゼーションにおける遺伝子データの補正方法及び補正装置」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

委託研究報告書 (STEP9)

低発現領域の精度向上のためのアルゴリズム生成研究

1. テーマ

平成21年度の研究では、化合物クラスタリングや同期率計算の精度向上のための検討を行った。この中で飽和現象による影響(H21年度に対処済み)とは独立で、低発現遺伝子の精度もこれらの解析精度に影響を及ぼしていた。平成22年度では、低発現領域における精度向上のための補正方法を検討した。

2.存在量と蛍光値の比例関係を逸脱させる要因

存在量と蛍光値の比例関係(直線性)を逸脱させる要因として、次のことが想定できる

	支配的物化学的現象	原因・解決策
高レベル	飽和現象 saturation	Langmuir等温式
中レベル	半特異的結合 semi-specific hybridization	MLANG基本概念 competitive hybridization
低レベル	非特異的結合	MLANGで計算不可能な大量な半特異的結合の存在
	光学的背景レベル	偶発的現象が存在する可能性
その他	2次構造	MLANG係数学習による解決
	配列依存結合力	MLANG係数学習による解決
	RNA同士の結合	未知(小さいと想定)
	断片化・増幅	MLANG係数学習による解決
	RNA枯渇	未知(小さい)

高レベル、中レベルに対する処置を講じてきたが、低レベルでの特性を考慮した、補正手法を構築する

3.MLANGのmRNA/プローブの結合名称

MLANGにおける結合を次のように分類し、名称を与えている。

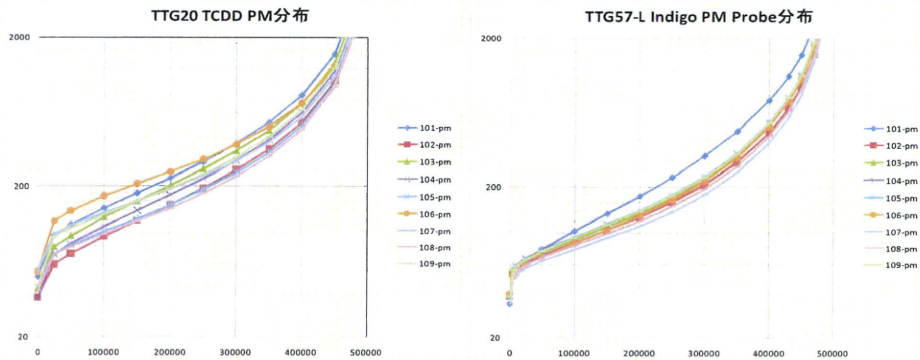
特異的結合 Specific hybridization	•25-merの配列一致
半特異的結合 semi-specific hybridization	•端12-mer以上、中央13-mer以上~24-mer以下の配列一致
非特異的結合 Non-specific hybridization	•端12-mer未満、中央13-mer未満の配列一致

プローブの設計位置以外を含む、全RNAの全ての位置と全プローブの間での関係をチェックして、半特異的結合が発生し得る組み合わせを抽出した

マイクロアレイの設計情報、コンピュータの処理能力を考慮し、このように分類している。

4. マイクロアレイProbe-levelの蛍光値分布

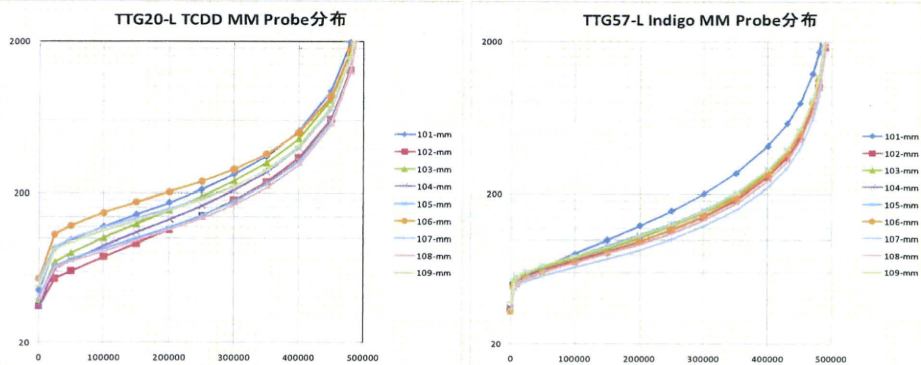
マイクロアレイ実験におけるPerfectMatchプローブの蛍光値の分布状況を、横軸に蛍光値の順位、縦軸に蛍光値を示すグラフで確認した。



TTG20は、ベースラインが異なるが、似たような分布をしている
TTG57は、1チップを除き、ほぼ同じ値となっている。

4. マイクロアレイProbe-levelの蛍光値分布

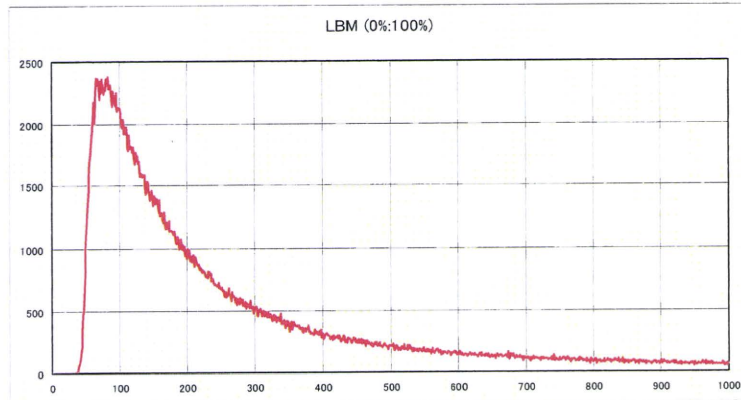
マイクロアレイ実験におけるMisMatchプローブの蛍光値の分布状況を、横軸に蛍光値の順位、縦軸に蛍光値を示すグラフで確認した。



PMとほぼ同じような形状を示す

4. マイクロアレイProbe-levelの蛍光値分布

低発現域の蛍光強度ヒストグラムで確認する



多少の変動を含むが、何らかの規則的な分布をしていると思われる

Copyright(C)2010-2011 NTT DATA Corporation

5. べき乗分布によるアプローチ

偶然に発達したものはべき乗分布になるものが多い

山火事の規模

地震の規模

都市のサイズ

通販売上

生体内のRNAの存在量はべき乗分布になるのではないかと？

マイクロアレイの蛍光値もべき乗分布すると仮定し、背景補正を提唱している研究者もいる

Wu 2004 : A Model-Based Background Adjustment for Oligonucleotide Expression Arrays

Copyright(C)2010-2011 NTT DATA Corporation

5.べき乗分布によるアプローチ

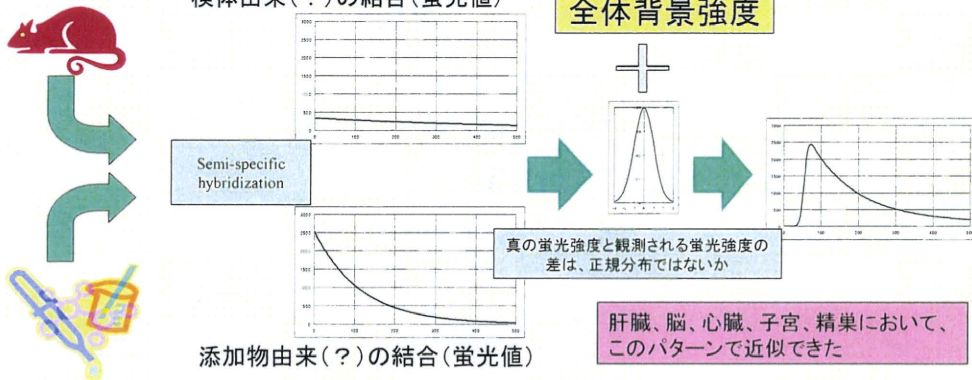
次の仮説を用いて、蛍光値の分布を近似できるか確認する

仮説

発現している特異的結合による蛍光強度はべき乗分布に従う

半特異的結合による蛍光強度は指数分布に従う

蛍光強度の結果測定時に正規分布の揺らぎが発生している



Copyright(C)2010-2011 NTT DATA Corporation

5.べき乗分布によるアプローチ

更に、飽和による影響を考慮した蛍光強度の分布を探る

1. 生体由来の分布 (べき乗分布と思われる)
2. 添加物のクロスハイブリダイゼーションによる分布 (指数分布)
3. スキャナー誤差 (正規分布)
4. プローブ飽和によるLangmuir曲線

仮説

$$\text{観測蛍光強度} = \text{真の蛍光強度} + \text{背景強度} + \text{観測誤差(正規分布)}$$

$$\text{真の蛍光強度} = \text{目標RNA蛍光強度} + \text{非目標RNA蛍光強度}$$

べき乗分布

指数分布

飽和による影響を受ける

Copyright(C)2010-2011 NTT DATA Corporation

5.べき乗分布によるアプローチ

べき乗分布がクロスハイブリダイゼーションによる変形を受けている分布の数式モデル

べき乗分布	$f_1(x) = \begin{cases} a_1 \cdot x^{k_1} & x > 0 \\ a_1 \cdot x_0^{k_1} & 0 < x \leq x_0 \\ a_0 & x = 0 \\ 0 & x \leq 0 \end{cases}$	通常のべき乗分布
		低レベルの一定値
指数分布	$f_2(x) = \begin{cases} \lambda \cdot e^{-\lambda x} & x > 0 \\ 0 & x \leq 0 \end{cases}$	結合しないプローブ
		定義外

飽和 レベルの低い部分では、線形であるとみなす

合成

$$h(s) = \int_{-\infty}^{+\infty} (f_1(s-t) + f_2(t)) dt$$

$$d(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} h(x+s-bg) \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left(-\frac{(s)^2}{2\sigma^2}\right) \right) ds$$

この方程式の解を求めるのは、非常に困難であった。数値計算として求めようとしても、収束せず発散してしまい求められなかった。

5.べき乗分布によるアプローチ

MLANGにおいて、添加物と各プローブの間の係数は用意してある。蛍光値が低くて、学習が進まないのでは、

特別な学習方法が必要

検体無しのハイブリダイゼーション実験 (?)

複数実験を用いて、活動していないRNAの場合の輝度を求め、係数を求める

べき乗分布の広がりを表す係数で正規化し、複数の臓器の実験間で比較した。発現していないような状況では、同じ値を示しているようである (発現していない状況を定義するのが困難)

5.ベキ乗分布によるアプローチ

- ・ 生命内のRNAは、遺伝子カスケードというネットワークを形成している。自然発生的なネットワーク構造である。自然発生的なネットワーク構造はベキ乗分布になることが知られており、その存在量はベキ乗分布となっていると思われる。
- ・ Semi-specific hybridizationによる蛍光強度、つまり、洗浄工程での残る可能性はゼロではない。洗浄工程の残りではないか？
 - 合致長が1増えると、結合力が1増加し、存在比は4分の1になる。
 - 特に、グリッド識別用の添加物の残りではないか？

ベキ乗則では、低レベルで膨大な数が存在するが分布だが、プローブの数に限りがある

汎用的な分布法則が見つからない

方針転換

実験結果をもとに係数を見つけ出す

6.一定比で添加している系列によるアプローチ

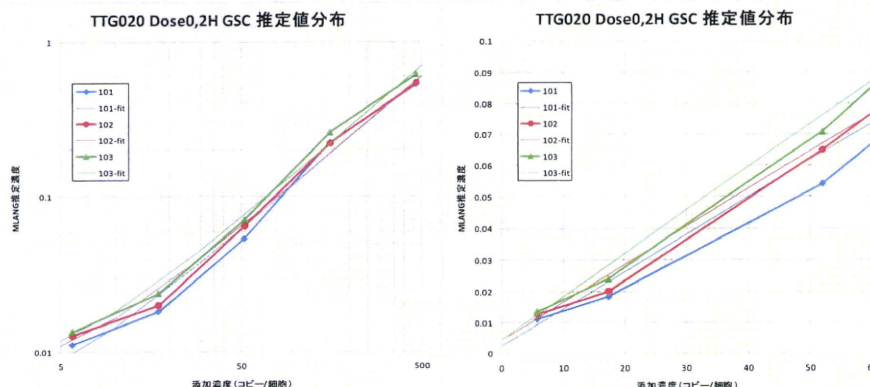
- ・ 既定の比率で実験の際に添加しているRNAが2系列存在する。
 - GSC
 - BioB,C,D,Cre
- ・ これらの系列を用いて、背景補正が可能か検討する。

GSC(コピー/細胞)			BioBCD (pM)	
	Liver用			
	新	旧		
Trpn	1.450	5.800	BioB	1.5
Dap	4.325	17.300	BioC	5.0
Phe	13.000	52.000	BioD	25.0
Lys	39.000	156.000	BioCre	100.0
Thr	117.025	468.100		

6.一定比で添加している系列によるアプローチ TTG20 GSCの添加量と推定値



原点を通る直線に乗るように、推定結果に何らかの数値を加える



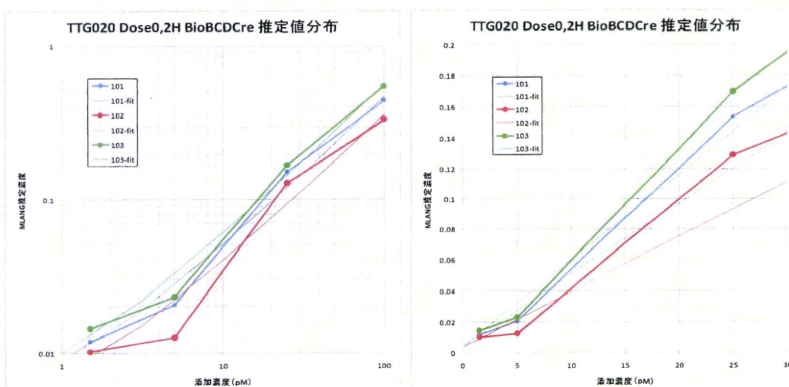
細い線は補正用直線
GSCは、最低濃度のTrpnは、高い値を示す傾向がある。

Copyright(C)2010-2011 NTT DATA Corporation

6.一定比で添加している系列によるアプローチ TTG20 BioBCDの添加量と推定値



原点を通る直線に乗るように、推定結果に何らかの数値を加える



細い線は補正用直線
BioBCDも最低濃度が高めにでる傾向がある。

Copyright(C)2010-2011 NTT DATA Corporation