

加えて、当毒性部が所有する100化合物を超える Percellome データベースを利用し、肝において Dbp 遺伝子の発現を抑制する化学物質の探索を経て、その際の経時データベースを活用する事で、抽出した遺伝子リストの妥当性を示す事ができた。

このような結果を踏まえ、来年度は腎、肺等の多臓器にわたる概日リズムの局所ネットワークを描出する予定である。また ES・EB 分化系において、アンタゴニスト適用時の RAR 分子ネットワークを描出し、非適用時の自律的ネットワークと比較・検証する予定である。本解析手法は、当該局所ネットワークに関わる既知の遺伝子の抽出だけでなく機能未知の遺伝子の探索を効率よくおこなえ、また発現制御を含む多臓器間の連携についても新知見を得ることが出来るものとする。本分担研究により、実験動物を用いながら、人に於ける毒性作用を毒性発現の分子メカニズムに基づいて、より迅速、正確、詳細、且つ見落とし無く予測可能となる事が期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

1-1) 書籍

なし

1-2) 学術雑誌

T Oginuma M, Takahashi Y, Kitajima S, Kiso M, Kanno J, Kimura A and Saga Y, The oscillation of Notch activation, but not its boundary, is required for somite border formation and rostral-caudal patterning within a somite.

Development 137: 1515-1522, 2010.

2. 学会発表

北嶋 聡、高橋 祐次、五十嵐 勝秀、相崎 健一、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 年 6 月

菅野 純、北嶋 聡、高橋 祐次、五十嵐 勝秀、相崎 健一

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 年 6 月

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 μ 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 年 6 月

高木篤也、北嶋 聡、五十嵐 勝秀、相崎 健一、江馬 眞、菅野 純

Percellome 手法を用いた TCDD 投与マウスの胎児口蓋の遺伝子発現解析(3) [第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会]2010 年 6 月

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi and Satoshi Kitajima

Percellome Toxicogenomics Project and its possible contribution to study anticancer agents [第 69 回日本癌学会学

術総会] 2010年9月

Polouliakh N, Kanno J, Matsuoka Y, Aisaki K, Nock R, Nielsen F, Oka K, Ghosh S, Kitajima S, Kitano H, 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 Systems Biology] October. 10-16, 2010, Edinburgh, England

F. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

胎児、ES細胞、概日変動等の 自律的な遺伝子ネットワークの描出研究

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

北嶋 聡



目 的

「胎児、ES細胞、概日変動等の自律的な遺伝子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のシグナルネットワークを描出する
- ・マウス胚およびES・EB培養分化系に化学物質を暴露し、遺伝子発現データを得て、発生過程のシグナルネットワークに対する影響を検証する

平成21年度：

野生型胚およびES・EB分化系の局所ネットワークの描出を行う。ES・EB分化系にレチノイン酸受容体(RAR)関連物質を暴露し、データを得て、ES分化系における局所ネットワークを描出する。

平成22年度：

概日変動リズム1周期(=24時間)の成熟期マウス肝および視交叉上核(SCN)の網羅的トランスクリプトームデータを用い、特定の概日変動リズム関連遺伝子の局所ネットワーク描出をおこなう。

平成23年度：

腎、肺等の多臓器の概日変動シグナルネットワークを描出する。野生型胚におけるRAR関連局所ネットワークを描出し、先の結果と比較・検証する。

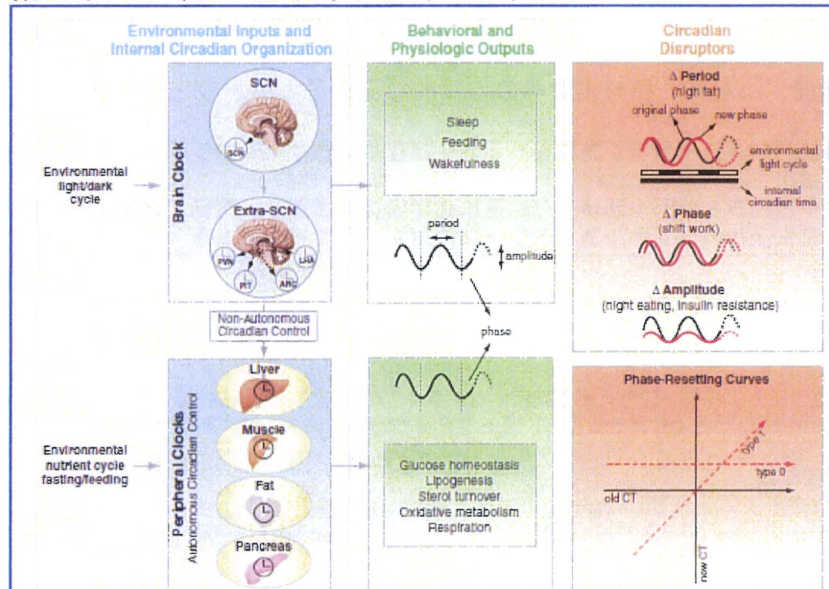
概日リズム(サーカディアンリズム)

・生物は太陽が作り出す光環境の変化をあらかじめ予想して、体内の代謝や行動を制御することが出来る概日リズム(サーカディアンリズム)というシステムを作り出している

・このシステムは視床下部にある視交叉上核で約24時間周期のリズムを発生し、末梢臓器に同期のシグナルを送る。末梢臓器を構成する細胞も約24時間周期のリズムを発生している(ヒトでは24.8時間(24.18時間という報告もある)、マウスでは約23時間)。光や温度など外界の刺激によって修正を受ける
 ⇒時計遺伝子の転写・翻訳・翻訳後修飾などからなるフィードバック機構によって、周期的な振動が生み出されていることが明らかになってきている

・昼に発現が高くなるいわゆる昼時計遺伝子Per1, Per2, Cry1, Cry2等と、夜に高くなる夜時計遺伝子Bmal1等

概日リズム(サーカディアンリズム)

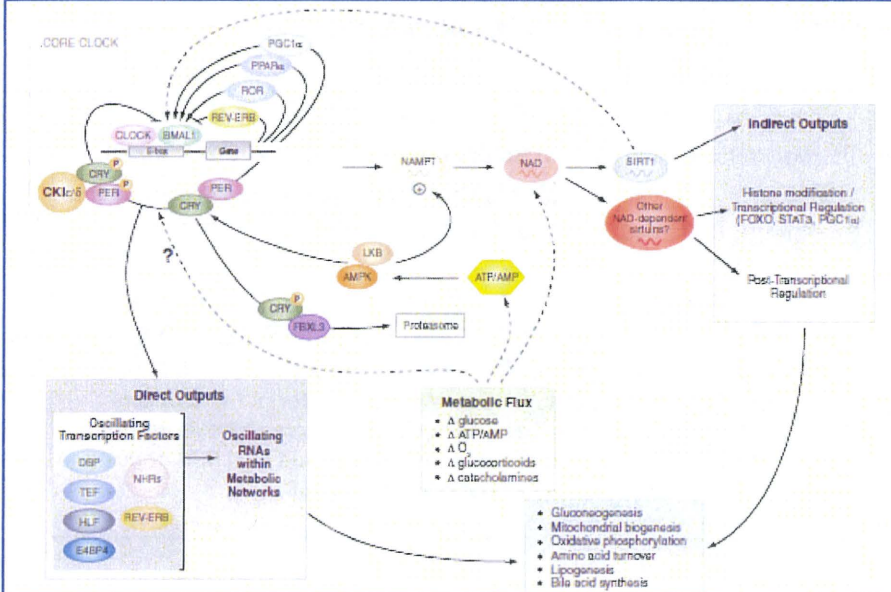


Bass J, Takahashi JS, Circadian integration of metabolism and energetics. Science 330:1349-1354, 2010.

Department of Medicine, Northwestern University, Feinberg School of Medicine, Chicago, IL 60611, USA.

概日リズム(サーカディアンリズム)

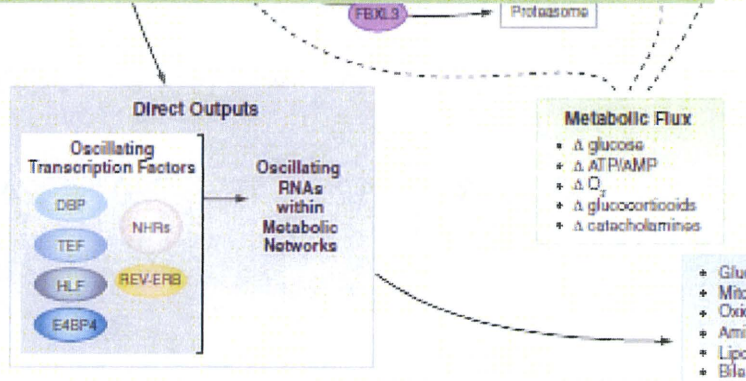
Bmal1 = Arntl



Bass J, Takahashi JS, Circadian integration of metabolism and energetics. Science 330:1349-1354, 2010. Department of Medicine, Northwestern University, Feinberg School of Medicine, Chicago, IL 60611, USA.

概日リズム(サーカディアンリズム)

視交叉上核をはじめ末梢臓器に発現し、発現がシャープな概日振動が報告される **bZIP型転写因子Dbp** (D-site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein)に着目した
 ⇒SCNと肝の連関も含めて、局所ネットワークの描出へ



Bass J, Takahashi JS, Circadian integration of metabolism and energetics. Science 330:1349-1354, 2010. Department of Medicine, Northwestern University, Feinberg School of Medicine, Chicago, IL 60611, USA.

bZIP型転写因子Dbp

D SITE OF ALBUMIN PROMOTER-BINDING PROTEIN

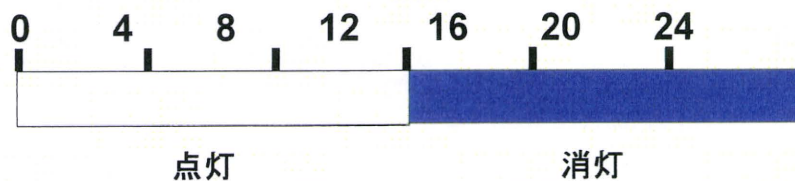
・アルブミンプロモーターのDサイトに結合する転写因子として同定 (Mueller CR, Maire P and Schibler U, Cell. 61(2): 279-291, 1990)。
発見直後からシャープな概日振動が報告されている (Wuarin J and Schibler U, Cell. 63(6):1257-1266.1990)。

・DBPノックアウトマウスでは、発生・生殖など正常で、肝機能への影響の報告はなく、また他の概日リズム関連遺伝子の発現に影響はないが、locomotorが抑制されるという概日リズムに関連した行動影響が認められる (Lopez-Molina L, Conquet F, Dubois-Dauphin M and Schibler U, The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior.EMBO J 16(22): 6762-6771, 1997)。

背景

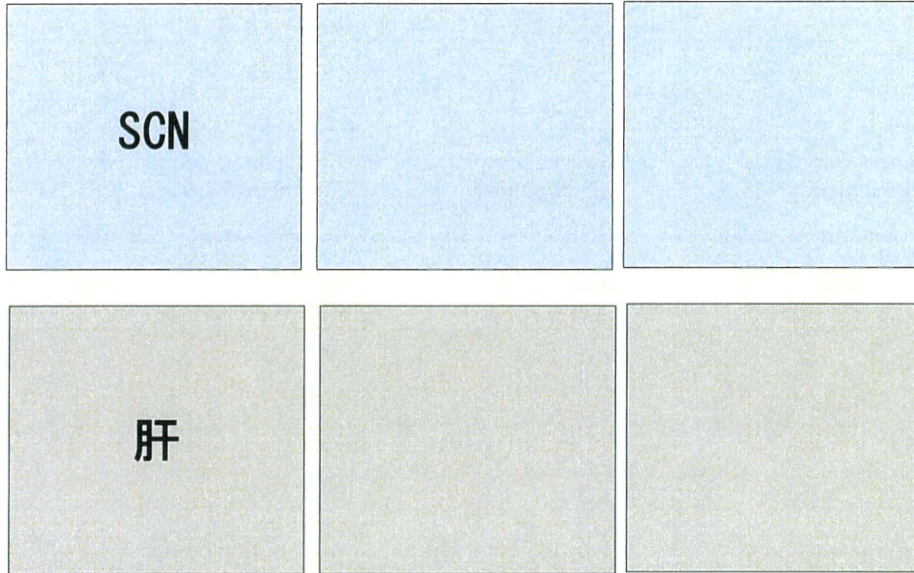
取得・構築済みの概日変動リズム1周期 (=24時間) の
成熟期マウス肝および視交叉上核 (SCN)
遺伝子発現変動の経時データベース [Time point: 7点 (4時間毎)]

マウス : C57BL/6NCrSlc (♂) 12週齢 [個別飼いで3週間馴化]

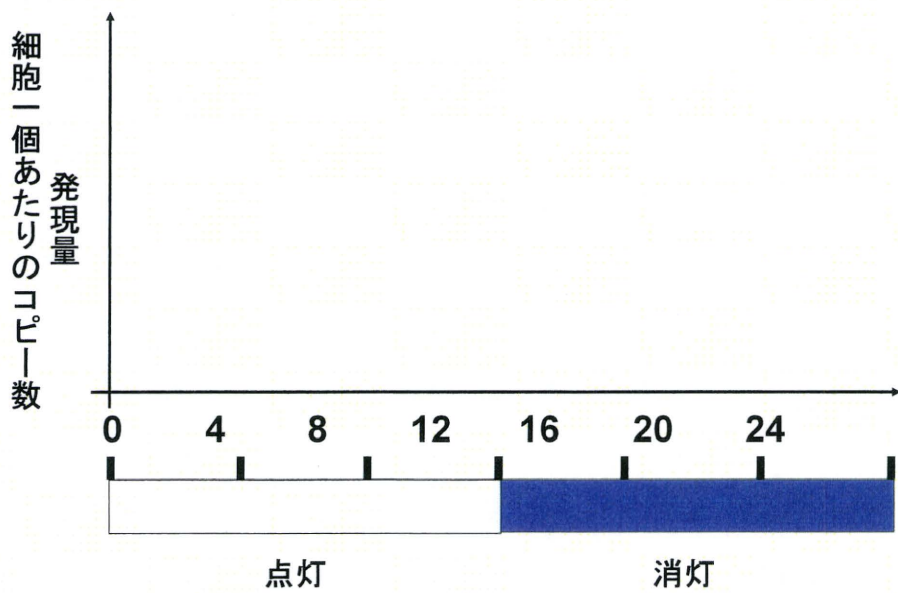


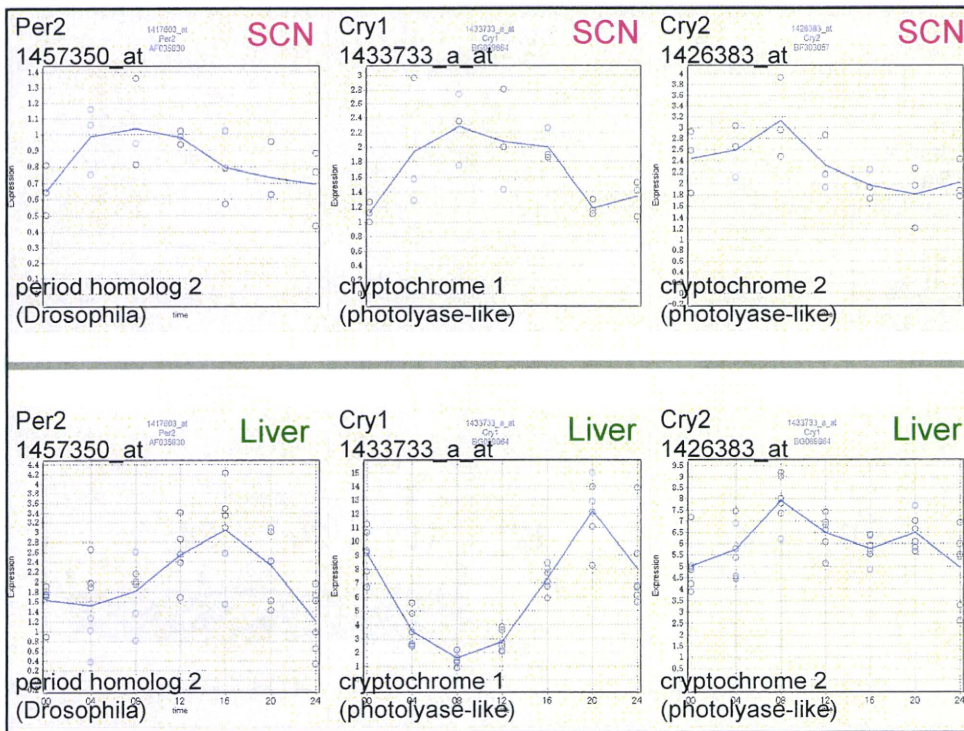
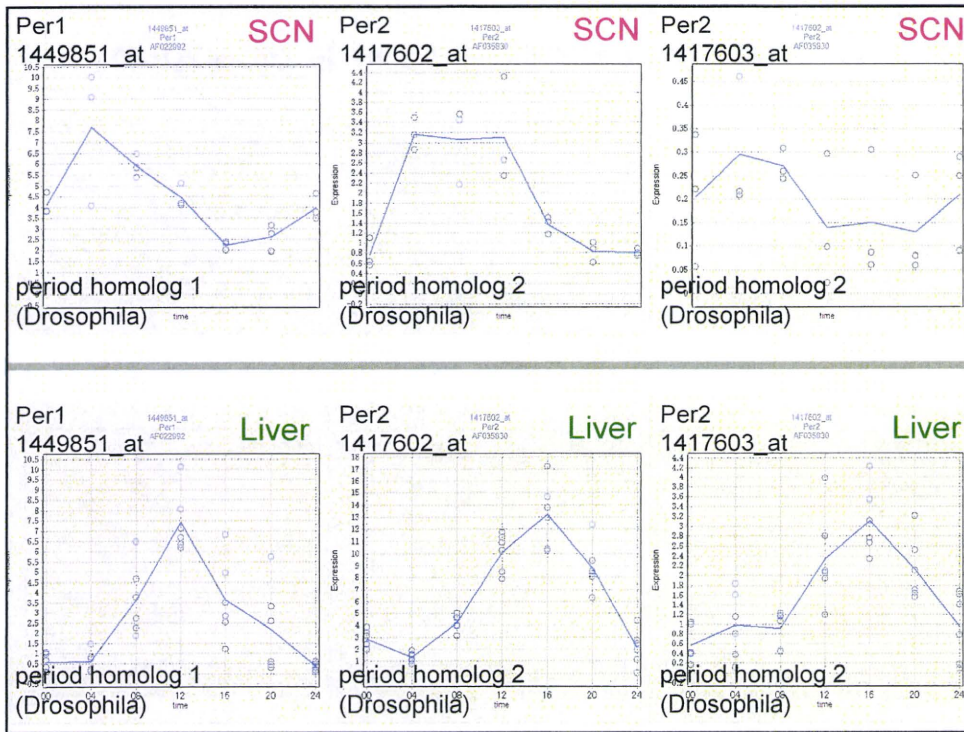
ご協力 : 近畿大学大学院医学研究科生理学系解剖学教授 重吉康史 先生

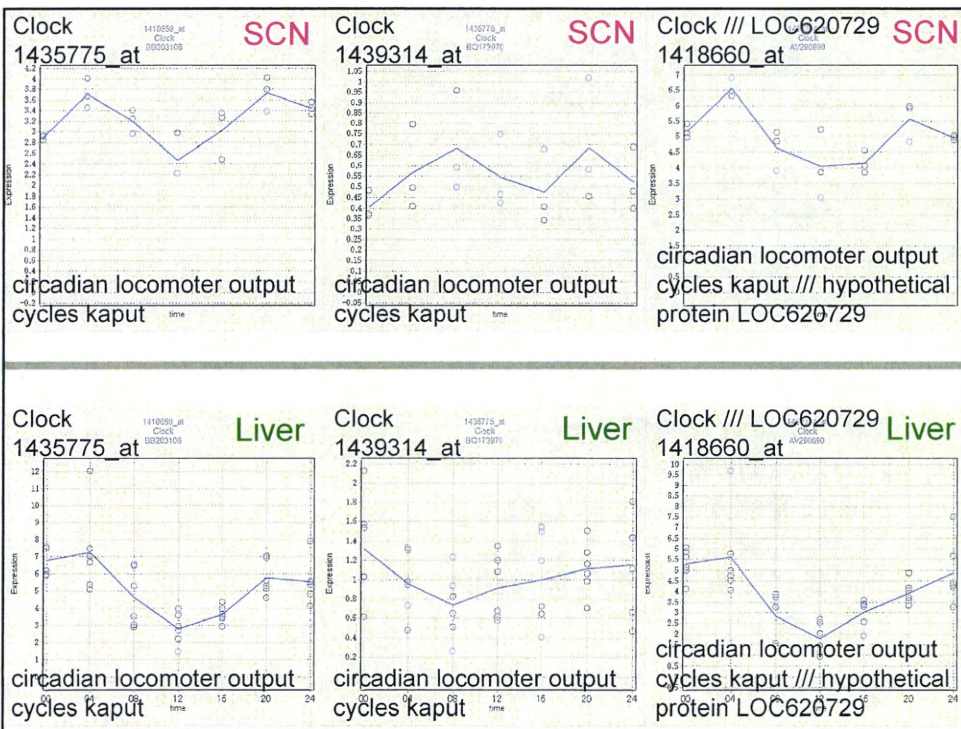
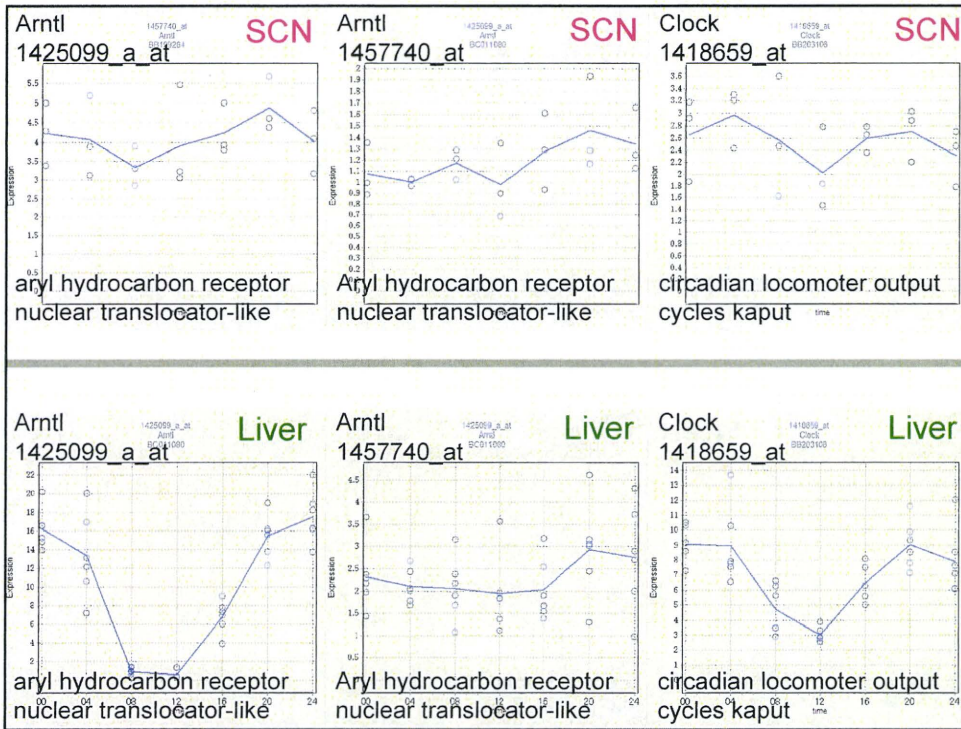
代表的な概日リズム関連遺伝子のSCNと肝との発現比較

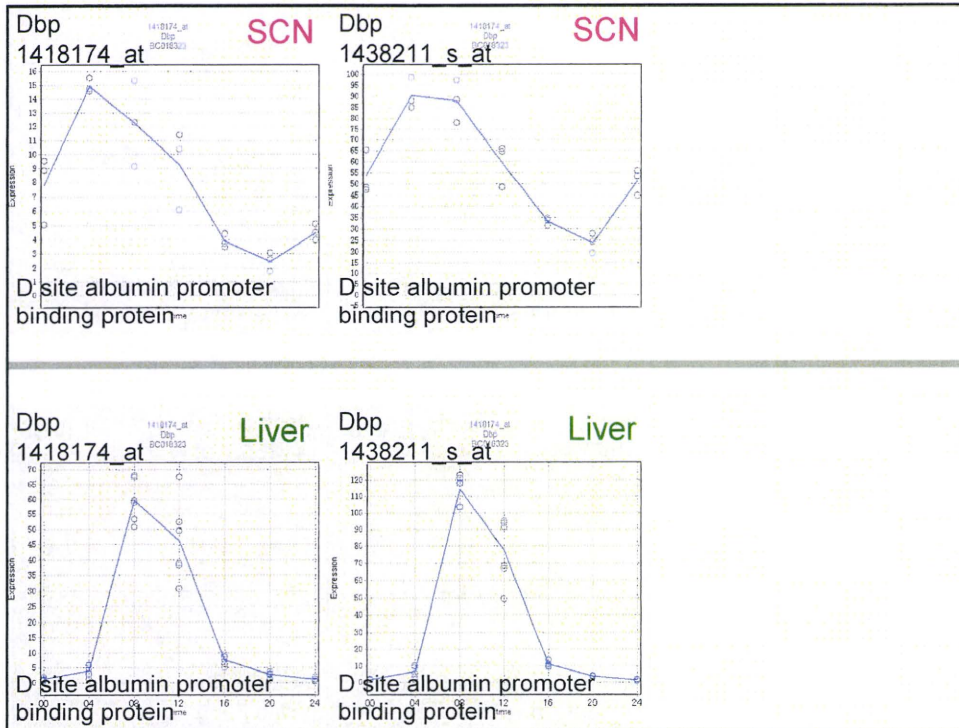


表示









概日リズム関連遺伝子の中で、肝及びSCNでの発現変動がシャープなDbp (D site albumin promoter binding protein) 遺伝子に着目し、この遺伝子に関わる局所ネットワークの描出を検討 [Probe ID: 1438211_s_at]

SCNでは点灯20時間後から、肝では点灯4時間後から急速に発現が増加しはじめる、一過性の発現パターンを示した → 両組織で発現変動は経時的に一致しない

Figure showing the expression of Dbp 1438211_s_at in SCN and Liver tissues over a 24-hour period. The graphs show a peak in expression at 8 hours in both tissues. Vertical dashed lines indicate the timing of light onset (0h) and light offset (20h).

Tissue	0h	4h	8h	12h	16h	20h	24h
SCN	10	100	100	80	40	20	10
Liver	5	10	110	80	10	5	5

Dbp遺伝子と似た経時変化を示す遺伝子の抽出 [SCN]

標準化 (normalize) したT遺伝子の各時点の平均値の経時変化を基に
ピアソンの相関係数を求め α 値が高い順に並び替えた

ID	Max	Min	V00_Av	V04_Av	V08_Av	V12_Av	V16_Av	V20_Av	V24_Av	Common	Descript
1438211	s										Dbp D site albumin promoter bindina orotein
1428315	at										Fhna1bo2 FRNA1 bindina orotein 2
1450865	s										Mros24 mitochondrial ribosomal orotein S24
1432380	s										4933426G2Coasdermin domain containina 2 /// RIKE
1436100	at										Sh2d5 SH2 domain containina 5
1416772	at										Cot2 carnitine palmitovltransferase 2
1453278	a										Clio4 CAP-GLY domain containina linker prote
1427915	s										Treb1 transcription elongation factor B (SII) p
1427905	at										1810063R07RIKEN cDNA 1810063R07 oene
1429436	at										Prpf40a PRP40 pre-mRNA processing factor 40 h
1451474	a										Paro8 nolv (ADP-ribose) nolvmerase familv m
1436252	at										Slc45a1 solute carrier familv 45 member 1
1417557	at										Ubx1 UBX domain containina 1
1417960	at										Coeh1 cytoplasmic nolvadentlation element b
1429600	at										1110019K23RIKEN cDNA 1110019K23 gene
1428732	at										1700008J07RIKEN cDNA 1700008J07 oene
1435016	at										Trak2 trafficking orotein, kinesin bindina 2
1423869	s										Txnd3 thioredoxin reductase 3
1436846	x										EGS46165 //tyrosine 3-monooxoasenase/trvotophan :
1438026	at										Zfp560 zinc finger orotein 560
1429216	at										Panr3 proaestin and adinaO receptor familv m
1421046	a										LOC100048Folv A bindina orotein cytoplasmic 4 /
1446129	at										-
1456213	x										Oars nlutaminvl-tRNA svnthesase
1423300	at										Zdhhc6 zinc finger, DHHC domain containina 6
1418107	at										Tcea2 transcription elongation factor A (SII). 2
1441081	a										1110038B12RIKEN cDNA 1110038R12 oene
1423159	at										Dld dihvdroloamide dehvdroasenase
1450779	at										Fabp7 fatty acid bindina orotein 7, brain
1440484	at										Unc5d unc-5 homolog D (C. elegans)
1417450	a										Tacc3 transformina, acidic coiled-coil containii
1423083	at										Rab33b RAB33B, member of RAS oncoene fam

Dbp遺伝子と似た経時変化を示す遺伝子の抽出 [SCN]

ピアソンの相関係数を求め α 値が高い順に並び替えた

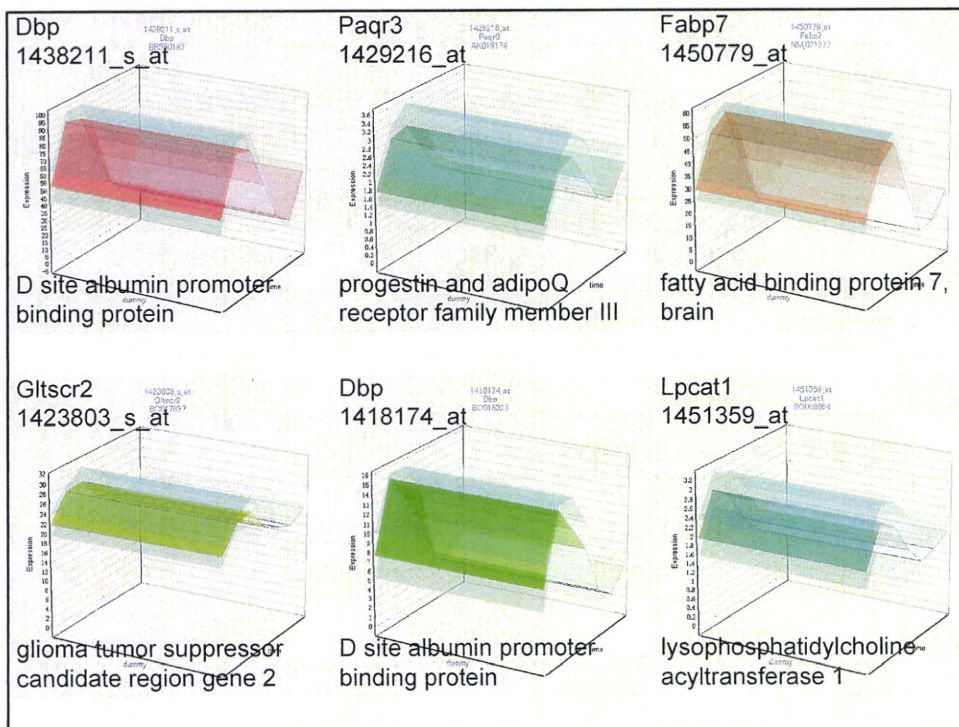
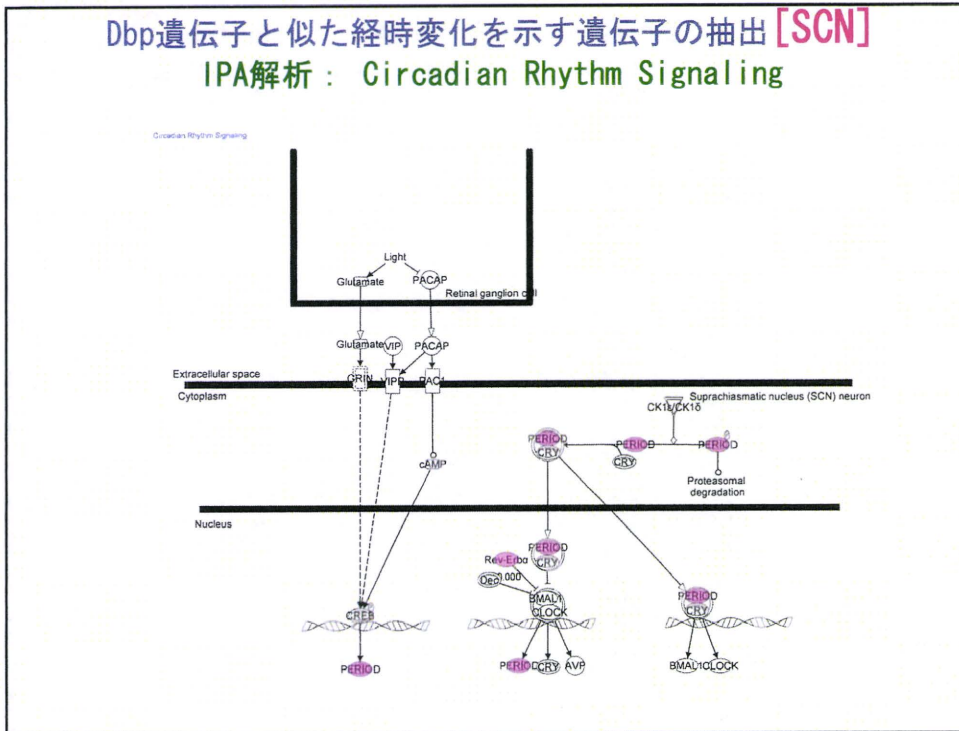
発現コピー数に制限を設けなかった

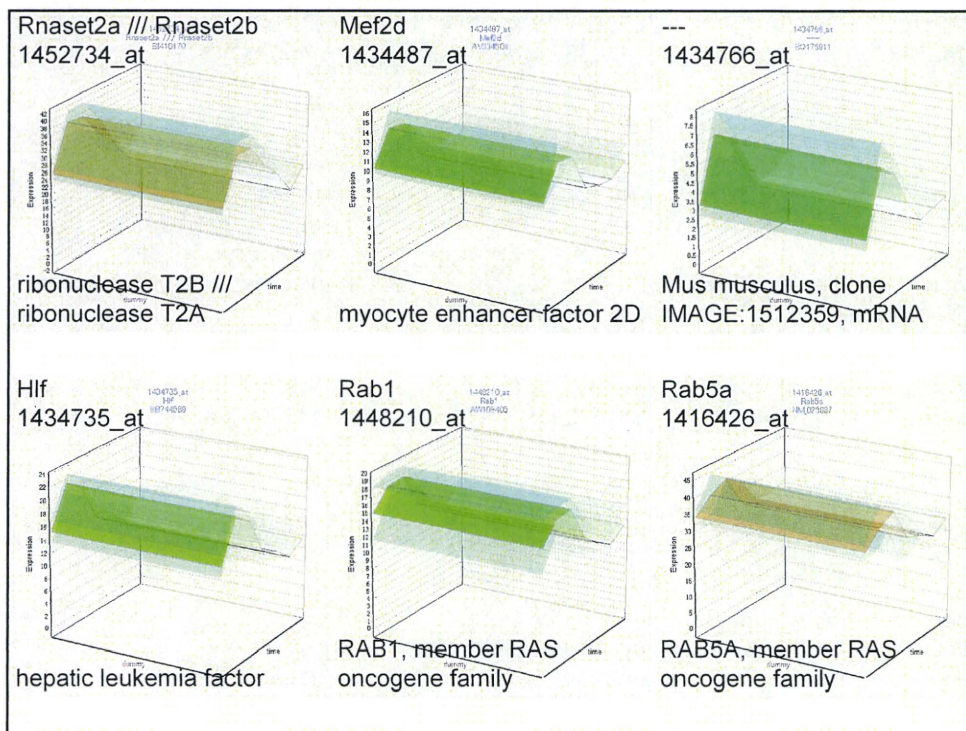
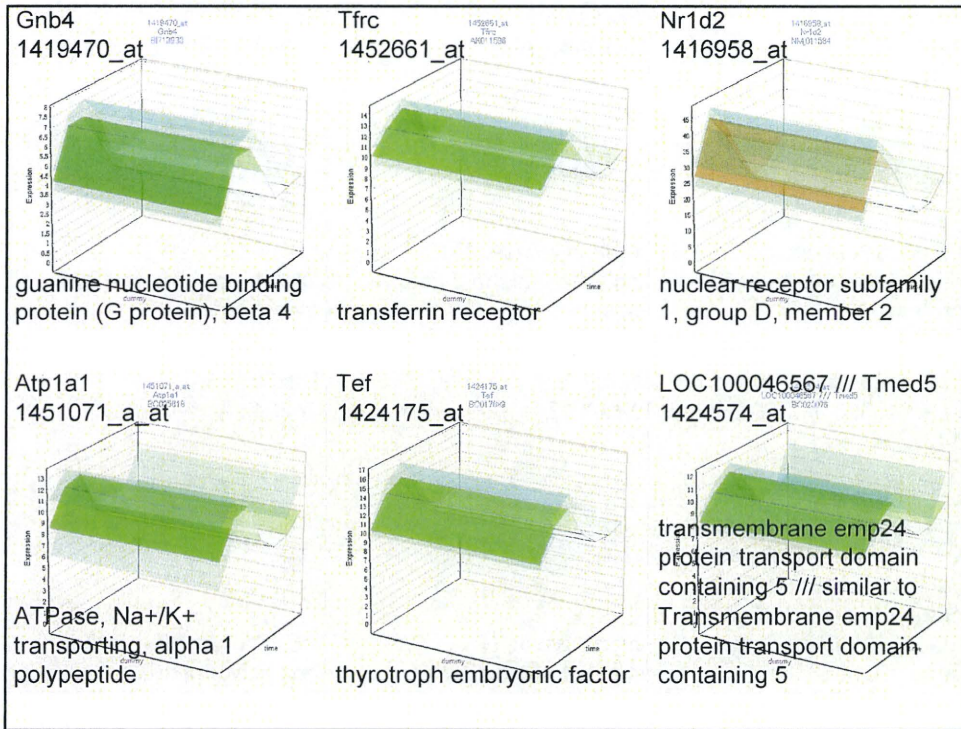
α 値が0.90以上を示す遺伝子リスト「843 ps」について、
主として標準偏差の大きさをもとに、目視による発現の経時変化
の再検討

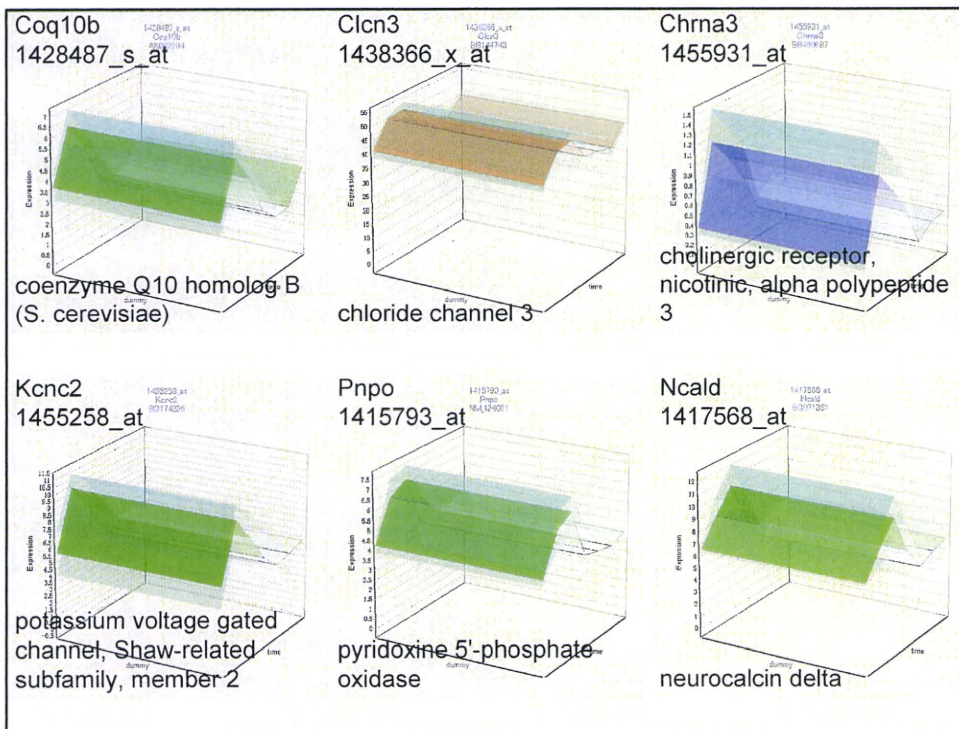
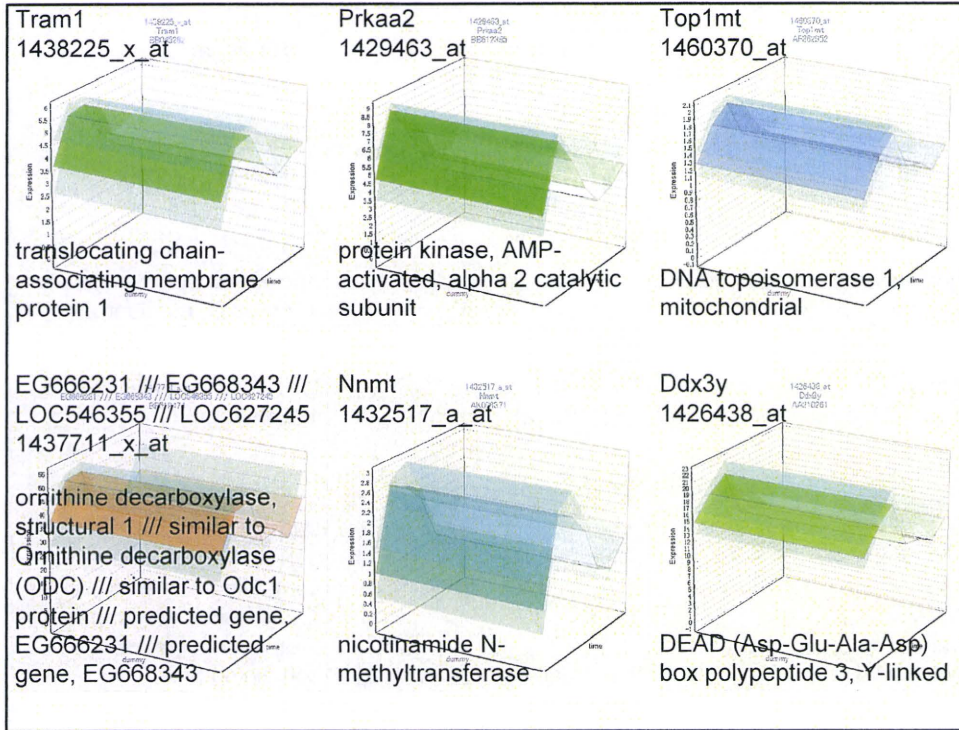
→「44 ps」の遺伝子リスト

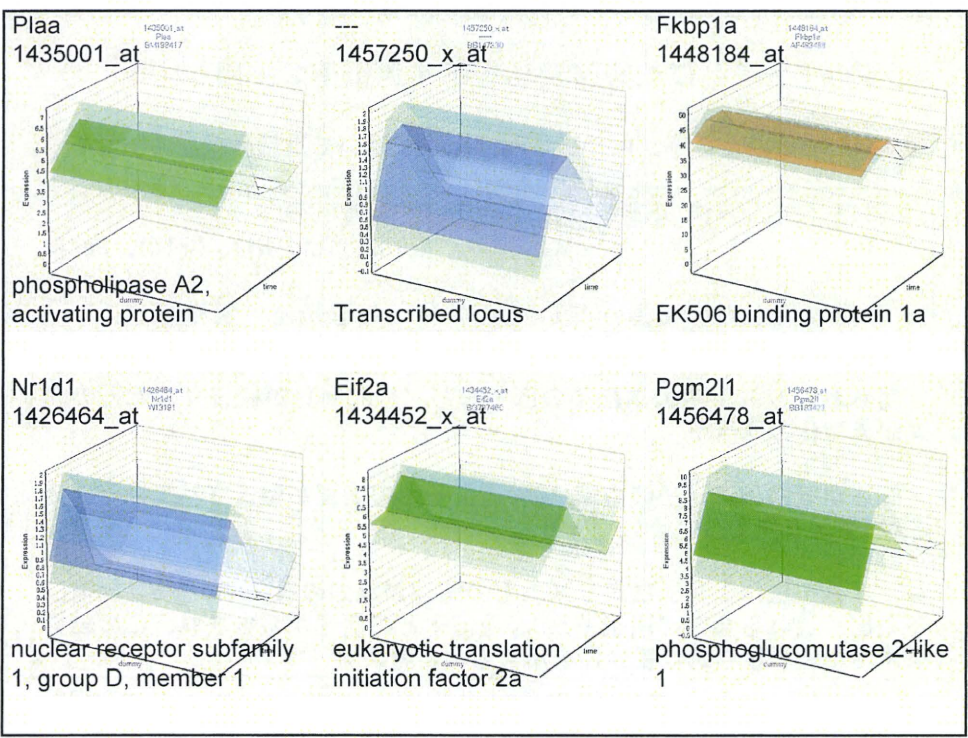
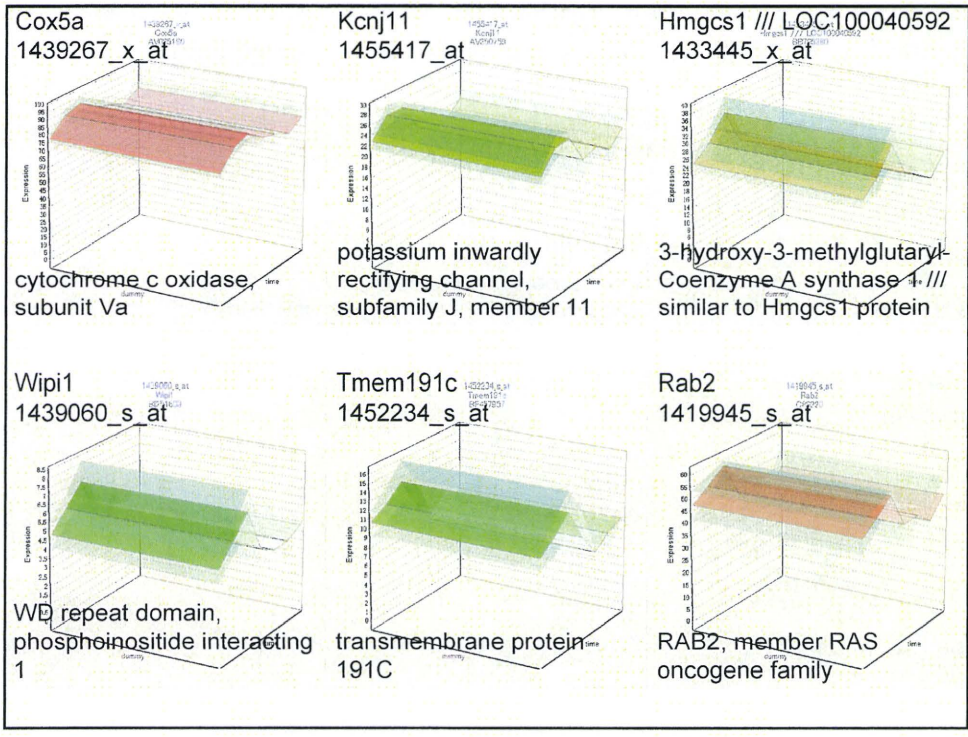
→市販のIPAによる検索では、Circadian Rhythm Signalingのネット
ワークが抽出されてきた

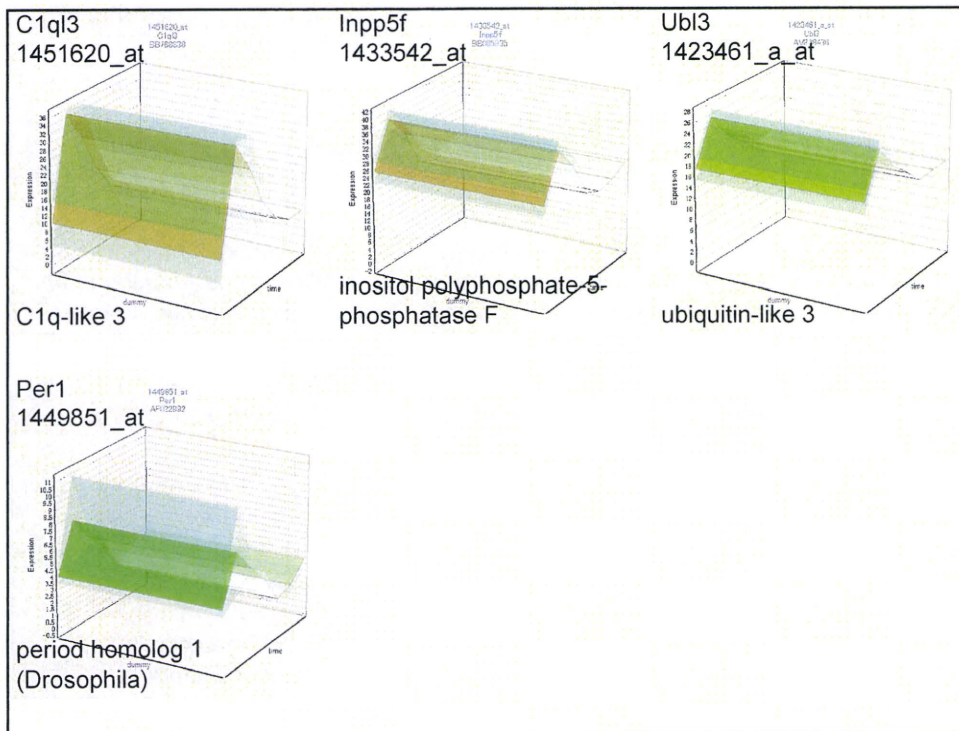
Dbp遺伝子と似た経時変化を示す遺伝子の抽出 [SCN]
 IPA解析: Circadian Rhythm Signaling











Dbp遺伝子と似た経時変化を示す遺伝子の抽出 [SCN]

—44 ps (39遺伝子) についてPubMed等を用いて遺伝子機能の検索—

- ・ 概日リズムとの関連が既知の遺伝子：4遺伝子
： Nr1d2、Tef、Hlf、Nr1d1、Per1
- ・ 概日リズムとの関連が見いだせなかった遺伝子：35遺伝子

・ 得られたリスト中の遺伝子のほとんど（約90%）が概日リズムとの関連が未報告の遺伝子

・ 関連が既知の遺伝子の中で、Dbp遺伝子との関連が報告されている遺伝子は4遺伝子全て

⇒ 本抽出法により、概日リズムとの関連が既知の遺伝子が実際に4遺伝子抽出、これら全ての遺伝子がDbp遺伝子との関連が報告され、この結果は本抽出法の技術的な妥当性を示すものとする

Dbp遺伝子と似た経時変化を示す遺伝子の抽出 [Liver]

標準化 (normalize) したT遺伝子の各時点の平均値の経時変化を基に
ピアソンの相関係数を求め α 値が高い順に並び替えた

ID	Max	Min	V00_Av	V04_Av	V08_Av	V12_Av	V16_Av	V20_Av	V24_Av	Common Name	Description
1438211_s_at										Dbp	D site albumin promoter binding protein
1418174_at										Dbp	D site albumin promoter binding protein
1418065_s_at										Rag2	recombination activating gene 2
1418071_s_at										Cdyl	chromodomain protein, Y chromosome-like
1451452_s_at										Rgs16	regulator of G-protein signaling 16
1458370_at										Bmp2k	BMP2 inducible kinase
1445574_at										---	Transcribed locus
1450173_at										Ripk2	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase
1423086_at										Npc1	Niemann Pick type C1
1449051_at										Ppara	peroxisome proliferator activated receptor alpha
1449945_s_at										Ppargc1b	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, c
1437992_x_at										Gja1	gap junction protein, alpha 1
1442007_at										Zmym5	zinc finger, MYM-type 5
1455265_s_at										Rgs16	regulator of G-protein signaling 16
1429514_at										Ppap2b	phosphatidic acid phosphatase type 2B
1451326_s_at										Abhd14b	abhydrolase domain containing 14b
1422653_at										Cep70	centrosomal protein 70
1418070_at										Cdyl	chromodomain protein, Y chromosome-like
1454815_s_at										Sertad2	SERTA domain containing 2
1424376_at										Cdc42ep1	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1
1434261_at										Sipa1l2	signal-induced proliferation-associated 1 like 2
1439675_at										4933429D07Rik	RIKEN cDNA 4933429D07 gene
1428081_at										Klhl21	kelch-like 21 (Drosophila)
1454786_at										5031439G07Rik	RIKEN cDNA 5031439G07 gene
1428834_at										Dusp4	dual specificity phosphatase 4
1457770_at										Slc39a14	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14
1416029_at										Klf10	Kruppel-like factor 10
1435628_x_at										BC005512 ///	ECcDNA sequence BC005512 /// hypothetical protein LI
1426037_s_at										Rgs16	regulator of G-protein signaling 16
1434918_at										Sox6	SRY-box containing gene 6
1431764_at										---	---

Dbp遺伝子と似た経時変化を示す遺伝子の抽出 [Liver]

ピアソンの相関係数を求め α 値が高い順に並び替えた

発現コピー数に制限を設けなかった

α 値が0.90以上を示す遺伝子リスト「439 ps」について、
主として標準偏差の大きさをもとに、目視による発現の経時変化
の再検討

→ 「81 ps」の遺伝子リスト

→市販のIPAによる検索では、特定のシグナルネットワークは抽出
されてこなかった

