

Dbp遺伝子と似た経時変化を示す遺伝子の抽出 [Liver]

—81 ps (64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 : 6遺伝子
: Rgs16, Ppara, Ppargc1b, Klf10, Gnat1, Nr1d2

- ・ 概日リズムとの関連が見いだせなかった遺伝子 : 58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Ppara, Ppargc1b, Nr1d2遺伝子の3つ

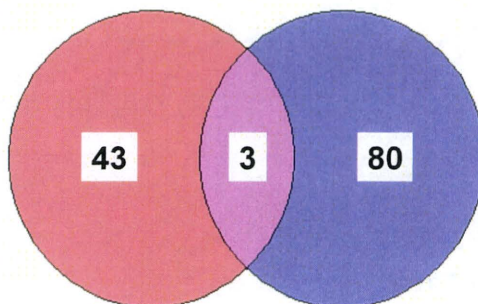
⇒ 本抽出法により、概日リズムとの関連が既知の遺伝子が実際に6遺伝子抽出、この中にはDbp遺伝子との関連が報告されている3遺伝子が含まれ、この結果は本抽出法の技術的な妥当性を示すものとする

Dbp遺伝子と似た経時変化を示す遺伝子の抽出

- ・ SCNでの遺伝子発現の経時データベースから得た
46 psの遺伝子リスト (含、Dbp 2ps)
- ・ 肝での遺伝子発現の経時データベースから得た
83 psの遺伝子リスト (含、Dbp 2ps)

SCN及び肝での遺伝子リストの比較・検討

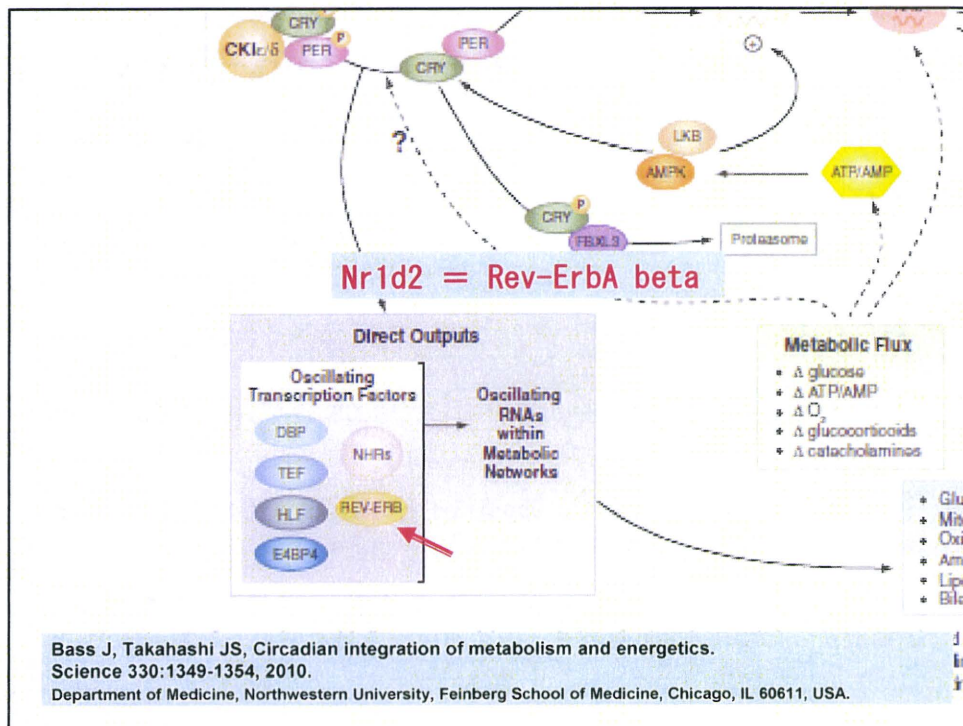
赤 : SCNでの経時データベース
青 : 肝での経時データベース



→ 両者でかなり異なる

両者に含まれていた
遺伝子 (Dbp 2ps以外) :

Nr1d2
(nuclear receptor
subfamily 1, group D,
member 2; 別名 :
Rev-ErbA beta)



Dbp遺伝子と似た経時変化を示す遺伝子の抽出 [SCN & Liver]

- SCNでの遺伝子発現の経時データベースから得た 46 psの遺伝子リスト (含、Dbp 2ps)
- 肝での遺伝子発現の経時データベースから得た 83 psの遺伝子リスト (含、Dbp 2ps)
- 両者共通の遺伝子は1つのみ

Q1: Dbp遺伝子と似た経時変化を示す遺伝子は、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？)

Q2: SCNと肝とでは発現制御が異なるのか？

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

Liver

by Dr Igarashi, K

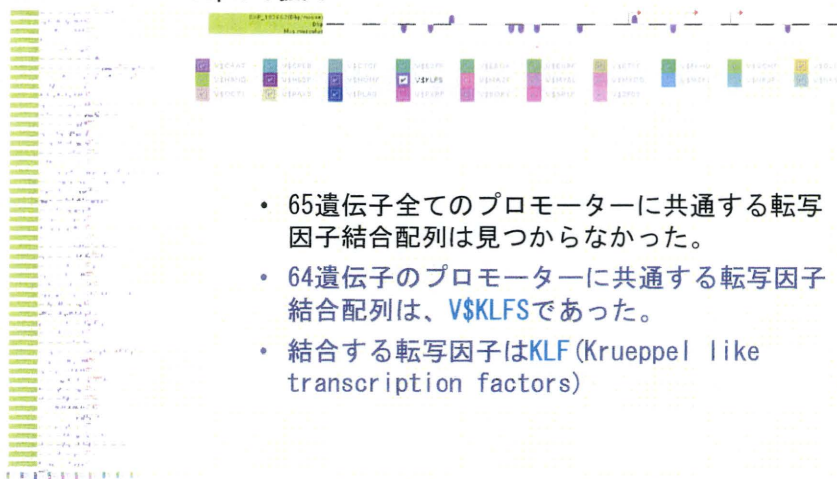
—Dbp遺伝子と似た発現パターンを示す遺伝子について—

遺伝子リスト83 probe sets = 65遺伝子

Genomatix

64遺伝子に共通

Dbpのみ拡大



- 65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見つからなかった。
- 64遺伝子のプロモーターに共通する転写因子結合配列は、V\$KLF5であった。
- 結合する転写因子はKLF (Krueppel like transcription factors)

SCN

by Dr Igarashi, K

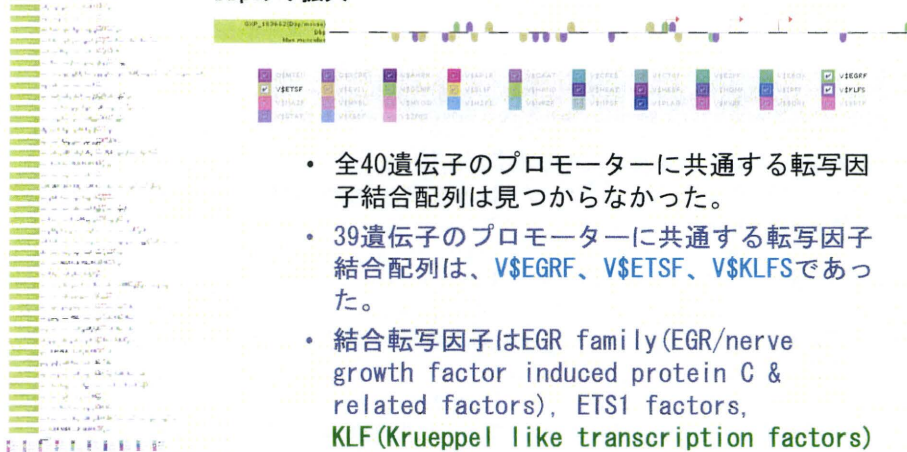
—Dbp遺伝子と似た発現パターンを示す遺伝子について—

遺伝子リスト44 probe sets = 40遺伝子

110127
Genomatix

39遺伝子に共通

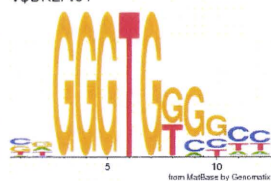
Dbpのみ拡大



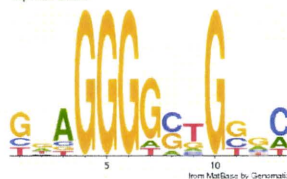
- 全40遺伝子のプロモーターに共通する転写因子結合配列は見つからなかった。
- 39遺伝子のプロモーターに共通する転写因子結合配列は、V\$EGRF、V\$ETSF、V\$KLF5であった。
- 結合転写因子はEGR family (EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors), ETS1 factors, KLF (Krueppel like transcription factors)

KLF 結合配列

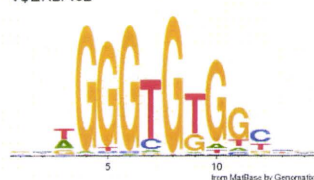
V\$BKLF.01



V\$KLF6.01



V\$EKLF.02



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を用いた
Dbp遺伝子に関わる局所シグナルネットワークの描出

- ・ Dbp遺伝子の経時変化を基としたピアソンの相関係数の利用

SCNにおいて抽出されてきた40遺伝子
肝において抽出されてきた65遺伝子

*In silico*でのプロモーター解析！

- ・ SCNでは39遺伝子で、EGR family (EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors), ETS1 factors, KLF (Krueppel like transcription factors) の結合配列が存在
- ・ 肝では64遺伝子で、KLF (Krueppel like transcription factors) の結合配列が存在

本解析により得た、Dbp類似の発現パターンを示す遺伝子のほとんどが、同一のシグナルネットワークに存在する事が示唆され、またSCNと肝とで転写開始点上流に共通した結合配列、KLF結合配列が存在することがわかった。

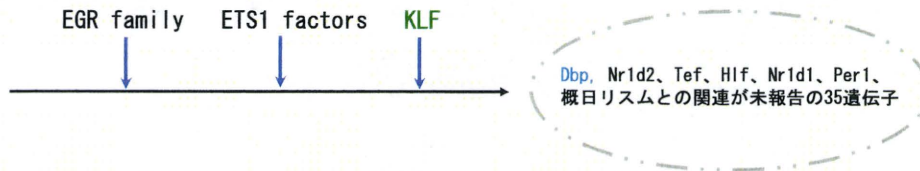
経時データベースおよび*In silico*でのプロモーター解析を組み合わせる本解析を通し、当該遺伝子ネットワークに関連する既知だけでなく制御未知の遺伝子を効率よく探索できるものと考え

Dbp遺伝子と似た経時変化を示す遺伝子の抽出 [SCN & Liver]

*in silico*でのプロモーター解析のまとめ

転写開始点上流に共通した結合配列の有無

SCN 抽出されてきた40遺伝子中39遺伝子



肝 抽出されてきた65遺伝子中64遺伝子



KLFと概日リズムとの関連の文献検索

[Kruppel-like factorと circadianあるいはclockによる検索で4報. 内、関係するのは1報のみ.]

KLF10遺伝子を欠失したマウスを作製し、KLF10が肝エネルギー代謝の概日リズムと関連する転写因子である事を報告

Mol Cell Biol. 2010 Jun;30(12):3059-70. Epub 2010 Apr 12.

Kruppel-like factor KLF10 is a link between the circadian clock and metabolism in liver.

Guilleumond F, Gréchez-Cassiau A, Subramaniam M, Brangoué S, Peterfi-Brünback E, Staels B, Flévet C, Spelsberg TC, Delaunay F, Teboul M.

Université de Nice Sophia-Antipolis, Institute of Developmental Biology and Cancer, CNRS UMR 6543 28 Avenue Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France.

Abstract

The circadian timing system coordinates many aspects of mammalian physiology and behavior in synchrony with the external light/dark cycle. These rhythms are driven by endogenous molecular clocks present in most body cells. Many clock outputs are transcriptional regulators, suggesting that clock genes primarily control physiology through indirect pathways. Here, we show that Krüppel-like factor 10 (KLF10) displays a robust circadian expression pattern in wild-type mouse liver but not in clock-deficient *Bmal1* knockout mice. Consistently, the *Klf10* promoter recruited the BMAL1 core clock protein and was transactivated by the CLOCK-BMAL1 heterodimer through a conserved E-box response element. Profiling the liver transcriptome from *Klf10*^{-/-} mice identified 158 regulated genes with significant enrichment for transcripts involved in lipid and carbohydrate metabolism. Importantly, approximately 56% of these metabolic genes are clock controlled. Male *Klf10*^{-/-} mice displayed postprandial and fasting hyperglycemia, a phenotype accompanied by a significant time-of-day-dependent upregulation of the gluconeogenic gene *Pepck* and increased hepatic glucose production. Consistently, functional data showed that the proximal *Pepck* promoter is repressed directly by KLF10. *Klf10*^{-/-} females were normoglycemic but displayed higher plasma triglycerides. Correspondingly, rhythmic gene expression of components of the lipogenic pathway including *Srebp1c*, *Fas* and *Elovl6*, was altered in females. Collectively, these data establish KLF10 as a required circadian transcriptional regulator that links the molecular clock to energy metabolism in the liver.

我々の解析結果では肝とSCN双方共に、KLF結合配列がDbp遺伝子に関連するネットワークを制御している事が示唆され、肝ではKLF結合配列のみ見いだせた事から今後、概日リズムにおけるKLFの関与を詳細に検討する必要があると考える

まとめ1

概日変動リズム1周期(=24時間)の成熟期マウスの肝および視交叉上核 (SCN) サンプルの網羅的トランスクリプトームデータ [Time point:7点(4時間毎)]を利用概日変動リズム関連遺伝子の一つDbp遺伝子について局所ネットワークの描出

・ Dbp遺伝子の発現変動パターン：SCNでは点灯20時間後から、肝では点灯4時間後から急速に一過性に発現増加⇒両組織での発現は経時的に一致しない

・ Dbpと似た発現パターンを示す遺伝子の抽出

ピアソン相関係数を利用し (α 値0.9以上) 抽出、さらに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：

肝：81 ps (64 遺伝子)、SCN：44 ps (39遺伝子)

このうち、概日リズムとの関連が既知の遺伝子：

肝：6遺伝子、SCN：4遺伝子

⇒本解析の技術的な妥当性を示す；ほとんどが概日リズムとの関連が未報告の遺伝子；Nr1d2遺伝子(Rev-ErbA beta)のみ両遺伝子リストに含まれる；肝とSCNでDbp局所ネットワークの発現制御がかなり異なる事が示唆された。

・ 両リストにつき *in silico*でのプロモーター解析：

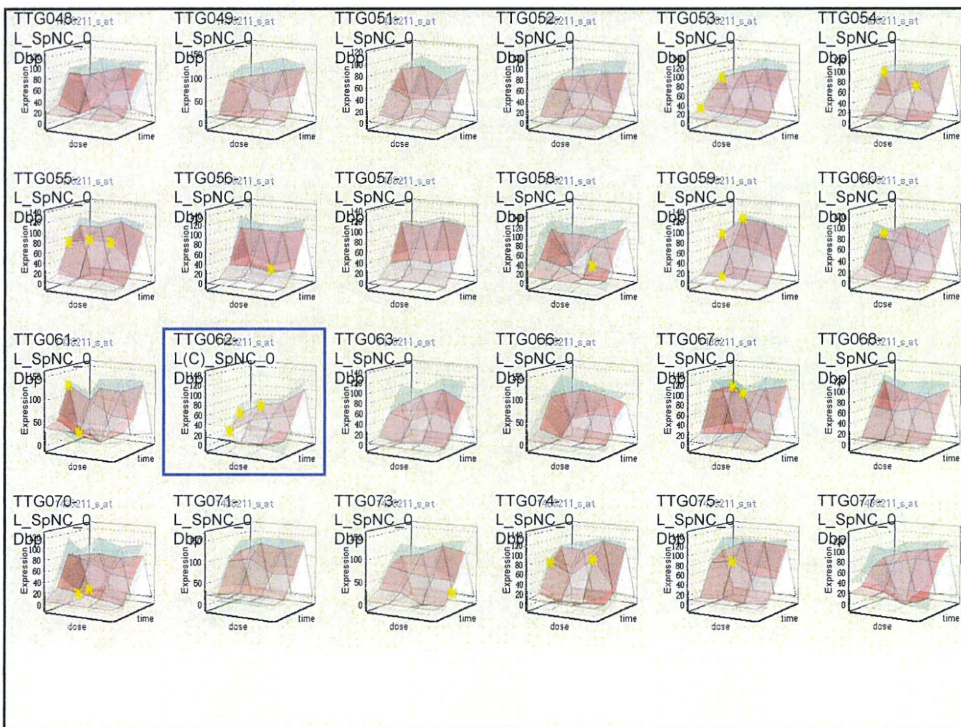
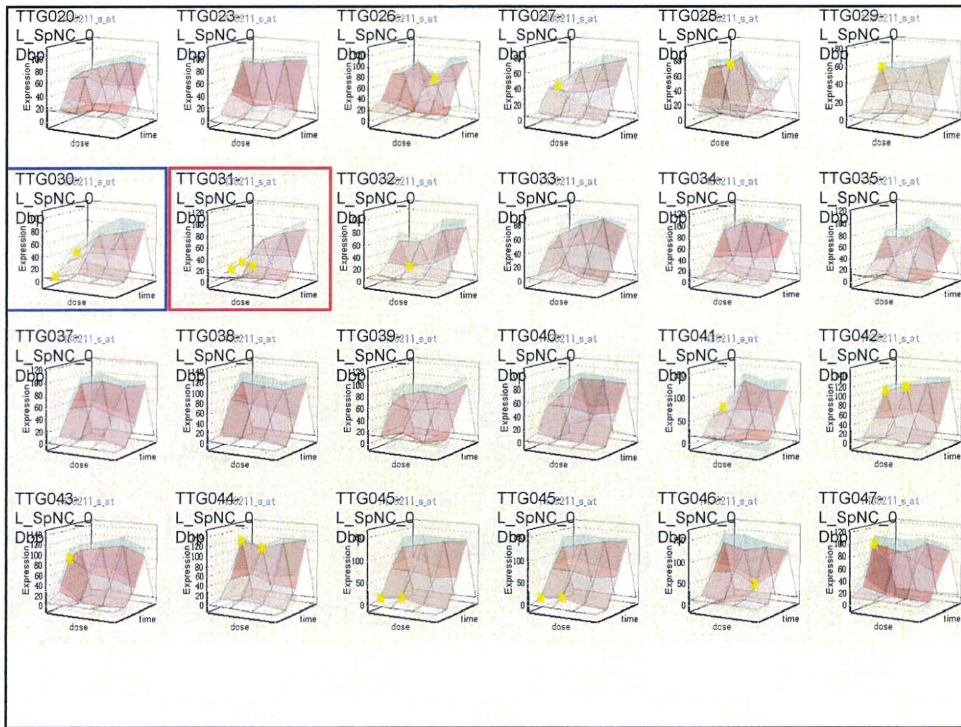
肝：KLFの結合配列、SCN：EGR family、ETS1及びKLFの結合配列が見いだされた

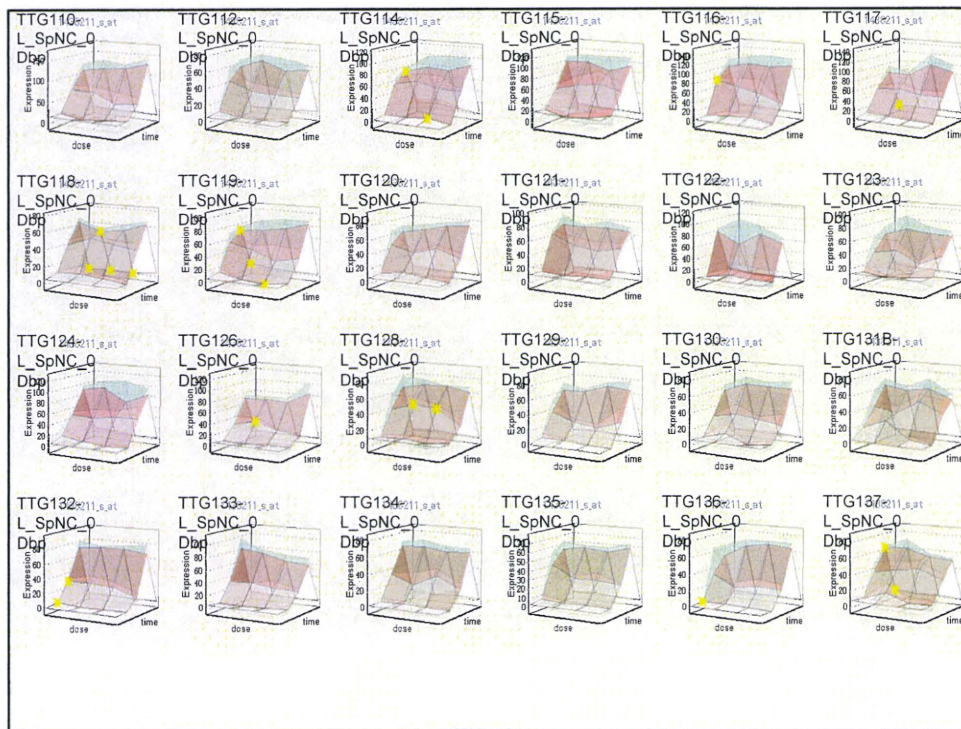
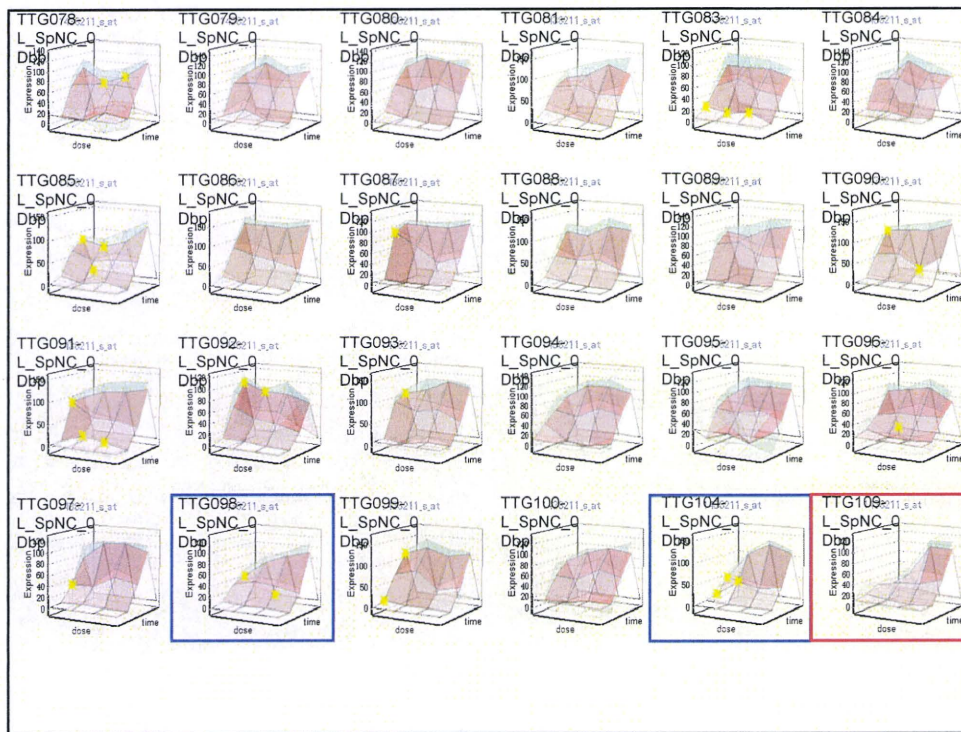
⇒Dbp遺伝子の関与する局所ネットワークの発現制御は肝とSCNでは異なるが、KLFが関与する制御は共通である事が示唆された

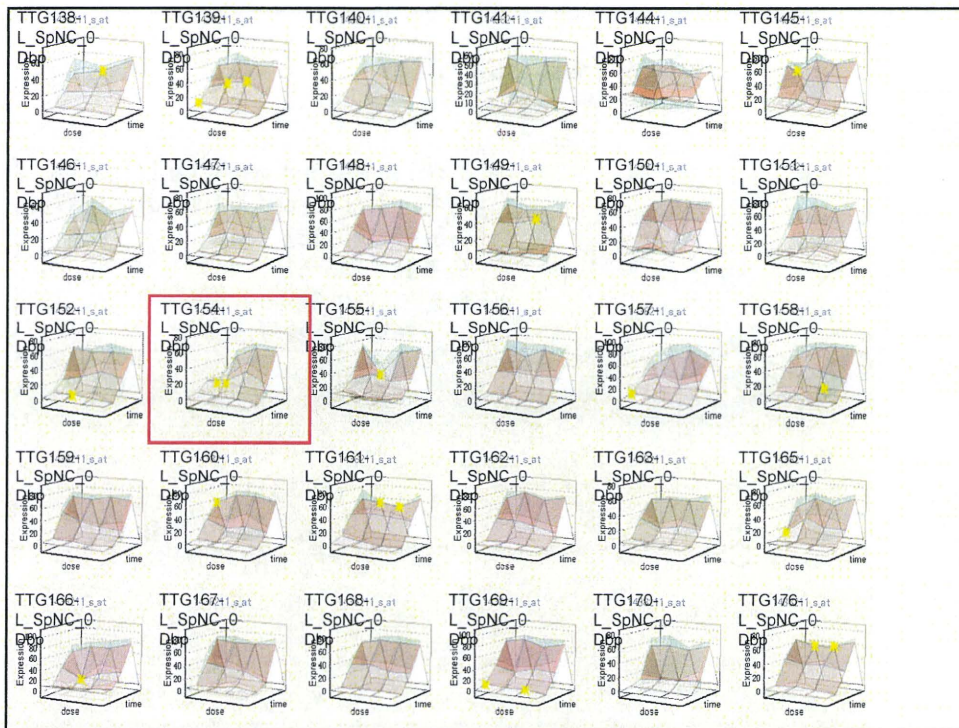
本解析手法は、当該局所ネットワークに関わる既知の遺伝子の抽出だけでなく機能未知の遺伝子の探索を効率よくおこなえ、発現制御を含む多臓器間の連携についても新知見を得ることが出来るものとする

肝においてDbp遺伝子の発現に影響を与える化学物質

—Perce llome Data Baseを利用—



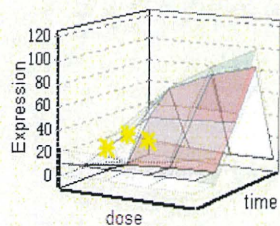




肝においてDbp遺伝子の発現を強く抑制する化学物質 —Perccellome Data Baseを利用—

2-クロロ-4,6-ジメチルアニリン
(化審法 白物質)
(白物質通し番号: 494)

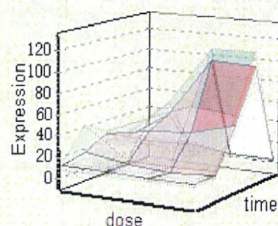
TTG031-L_SpNC_0
Dbp 1438211_s.at



[0, 3, 10, 30 mg/kg]
0.5% MC

アセフェート
(有機リン系殺虫剤)

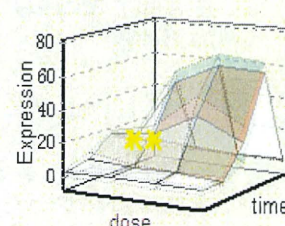
TTG109-L_SpNC_0
Dbp 1438211_s.at



[0, 7, 20, 70 mg/kg]
0.5% MC

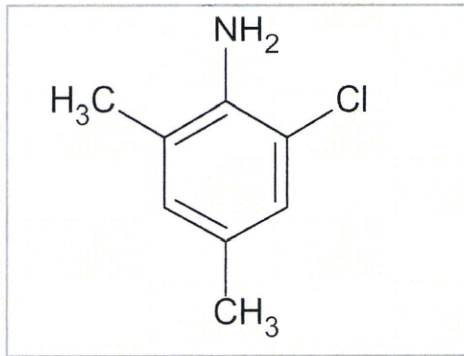
デヒドロ酢酸ナトリウム
(食品添加物・保存料)

TTG154-L_SpNC_0
Dbp 1438211_s.at



[0, 30, 100, 300 mg/kg]
0.5% MC

2-クロロ-4,6-ジメチルアニリン



2-Chloro-4,6-dimethylaniline
別名：2-chloro-4,6-xylidine化審法
CAS番号：63133-82-4
分子量：155.625
化審法 白物質
(白物質通し番号：494)

TTG031L
[0, 3, 10, 30 mg/kg]
0.5% MC

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

肝においてDbp遺伝子と似た経時変化を示す
「81 ps」の遺伝子の発現変動に対する
2-クロロ-4,6-ジメチルアニリンの影響



抽出した遺伝子リストの妥当性

多くの遺伝子の発現について、
2-クロロ-4,6-ジメチルアニリンの
投与影響が認められた

