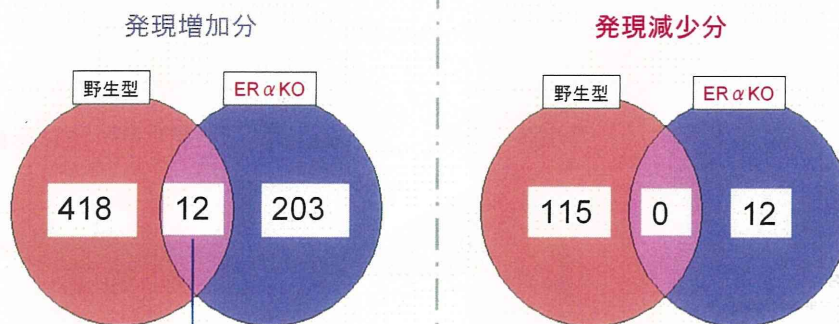


BPAを単回経口投与した際の肝における遺伝子発現変動解析

野生型マウスの場合とER α 欠失マウスの場合との比較

BPA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
野生型マウスの場合とER α 欠失マウスの場合との比較

—野生型のみで発現変動する遺伝子 = ER α シグナル関連遺伝子—



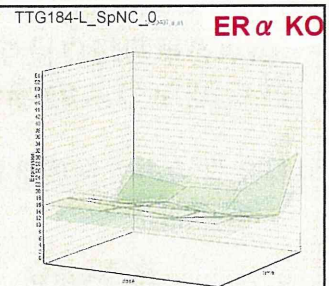
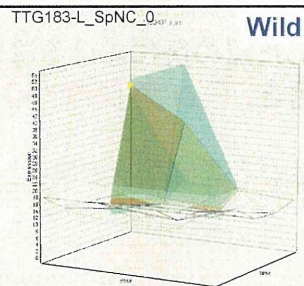
Dnajb9, Nfxl1, Dnaja1, Mat2a, Slc20a1, LOC100045887, Rangap1, Egln3, Gmppb, 4930570C03Rik, Hyou1, Aox1

野生型マウスのみで発現変動を示したものを
 解析ソフトMulti Surface Viewerにて目視で再検討
89 psが野生型マウスのみで発現変動

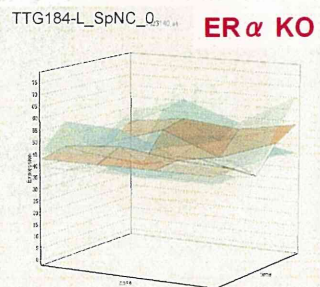
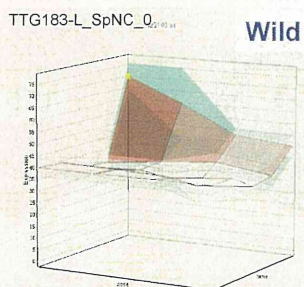
遺伝子の発現変動について、
 野生型マウスの場合とER α 欠失マウスの場合とで比較 例

野生型マウスのみで発現変動を示したもの
 = ERシグナルに関連する遺伝子と考えられる

Anp32a
 acidic (leucine-rich) nuclear
 phosphoprotein 32 family, member A



Lipa
 lysosomal acid lipase A



BPA単回投与により、野生型マウスの場合のみで発現変動を示したこれらの遺伝子がER α の標的遺伝子であるならば

→ 各遺伝子の転写開始点上流域にER結合配列が存在するはず

→ 発現変動の差が著しい35遺伝子について、*in silico*のプロモーター解析を検討(市販のソフト: Genomatixを使用)

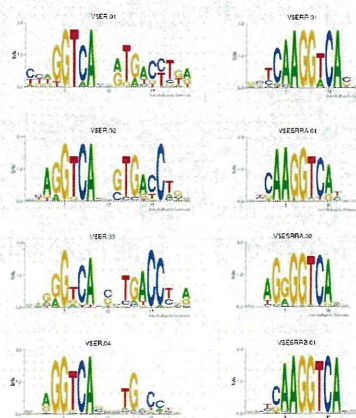
*in silico*のプロモーター解析[市販ソフトGenomatix使用]

by Dr Igarashi, K

BPA単回投与により、野生型マウスの場合のみで発現変動を示した35遺伝子の中でER結合配列が存在するのは20遺伝子だった



ERE: consensus sequences



24

ER結合配列以外に、

- ・ 35遺伝子全てに共通する転写因子結合配列としてE2Fの結合配列が見いだされた。

- ・ 34遺伝子に共通して見出されたものとして5種類 (E2F, CTC, ETS, KLF, SP1) の結合配列が見いだされた。

BPA単回投与により、野生型マウスの場合のみで発現変動を示した35の遺伝子のうち、

- ・ 20遺伝子にの転写開始点上流域にER結合配列が存在
= ER α の標的遺伝子

- ・ 残り15遺伝子

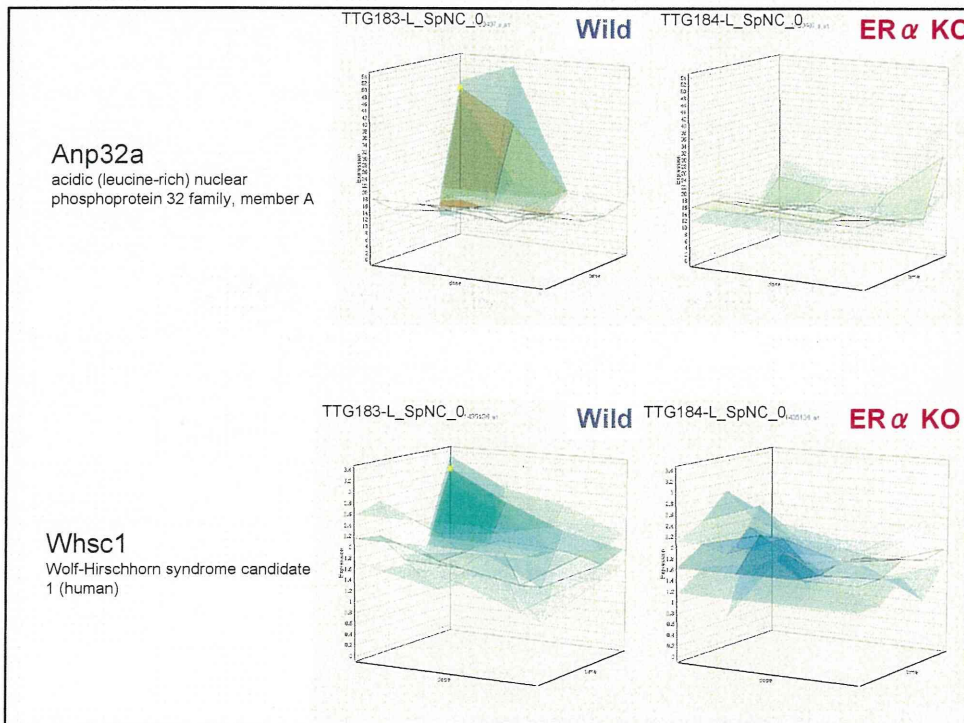
- ER α 欠失マウスの場合との比較解析結果から、これらの発現制御はER α に依存することが示唆された

- ER α と他の転写因子との相互作用を介して、発現制御を受ける機序が存在する可能性が示唆された

⇨この転写因子として、ER結合配列以外に認められた結合配列 (E2F, CTC, ETS, KLF, SP1) が結合する転写因子が関与する可能性がある

ER α 欠失マウスにおける、
 BPA投与時に発現変動が認められた
 ヒストンアセチル化・ヒストンメチル化関連遺伝子、
 RNA processing関連遺伝子
 の発現変動は？

Multi Surface Viewerにて比較検討



H3K36me3特異的 ヒストンメチル基転移酵素Whsc1
(Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1)

OMIM

Gene Function

[Nimura et al. \(2009\)](#) showed that the H3K36me3-specific histone methyltransferase Whsc1 functions in transcriptional regulation together with developmental transcription factors whose defects overlap with the human disease Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS). [Nimura et al. \(2009\)](#) found that mouse Whsc1, 1 of 5 putative Set2 homologs, governed H3K36me3 along euchromatin by associating with the cell type-specific transcription factors Sall1 ([602218](#)), Sall4 ([607343](#)), and Nanog ([607937](#)) in embryonic stem cells, and Nkx2-5 ([600584](#)) in embryonic hearts, regulating the expression of their target genes. Whsc1-deficient mice showed growth retardation and various WHS-like midline defects, including congenital cardiovascular anomalies. The effects of Whsc1 haploinsufficiency were increased in Nkx2-5 heterozygous mutant hearts, indicating their functional link. [Nimura et al. \(2009\)](#) proposed that WHSC1 functions together with developmental transcription factors to prevent the inappropriate transcription that can lead to various pathophysiologies.

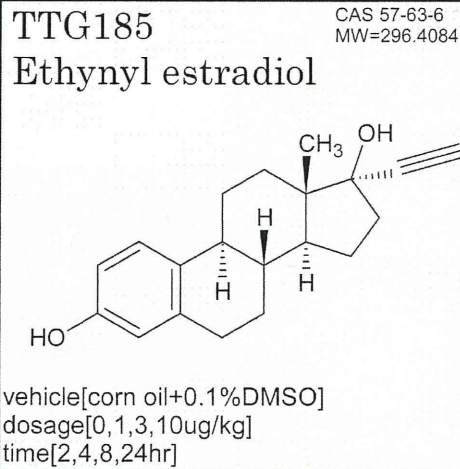
エチニルエストロジオール投与の場合

Percellome法による網羅的遺伝子発現変動解析
TTG185L [wild], TTG186L [ER α KOマウス (Dr Chambon)]

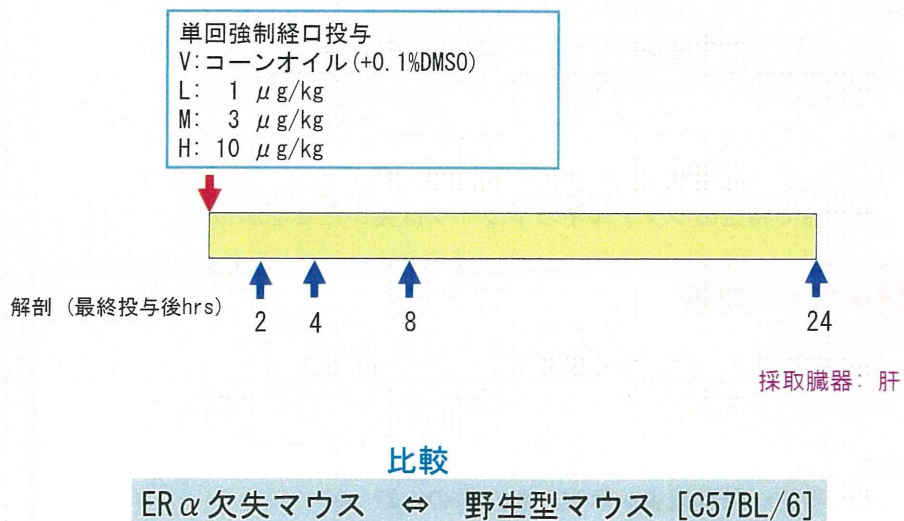
エチニルエストラジオール [Ethinylestradiol]

[0, 1, 3, 10 μ g/kg]

・合成エストロゲン薬



エチニルエストラジオール (EE) 単回経口投与時の 肝における網羅的遺伝子発現変動解析



RSort解析 EE 肝

野生型マウスとER α 欠失マウスとの比較

有意 ($P < 0.05$) に増加および減少したPS数と、目視により生物学的変化と示唆されたPS数 (→)

野生型マウス

増加

1,409 ps
→ 268 ps

減少

949 ps
→ 15 ps

ER α 欠失マウス

増加

957 ps
→ 135 ps

減少

830 ps
→ 21 ps

エチニルエストラジオール投与時の 肝における網羅的遺伝子発現変動解析

野生型マウス

増加

- ・生物学的に発現増加が示唆されたもの：268 ps
- ・現時点で特定のシグナルネットワークは見いだせなかった。

減少

- ・生物学的に発現減少が示唆されたもの：15 ps
- ・現時点で特定のシグナルネットワークは見いだせなかった。

ER α 欠失マウス

増加

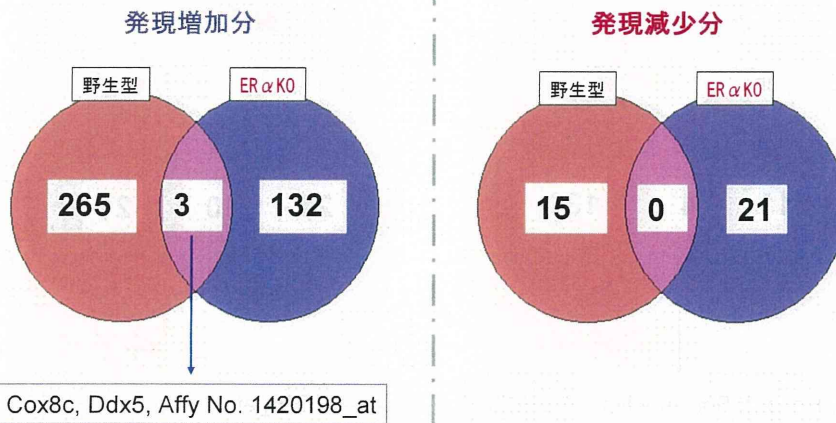
- ・生物学的に発現増加が示唆されたもの：135 ps
- ・現時点で特定のシグナルネットワークは見いだせなかった。

減少

- ・生物学的に発現減少が示唆されたもの：21 ps
- ・現時点で特定のシグナルネットワークは見いだせなかった。

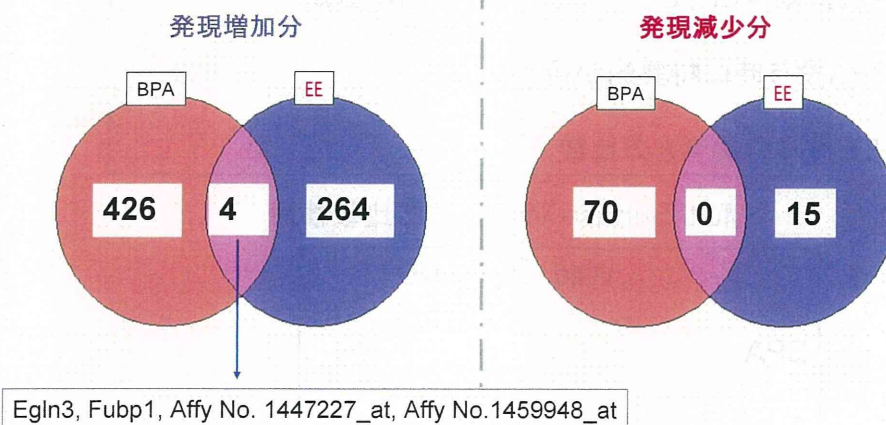
EEを単回経口投与した際の肝における遺伝子発現変動解析
 野生型マウスの場合とER α 欠失マウスの場合との比較

—野生型のみで発現変動する遺伝子 = ER α シグナル関連遺伝子—



BPA投与の場合とEE投与の場合との発現比較
 野生型マウス肝

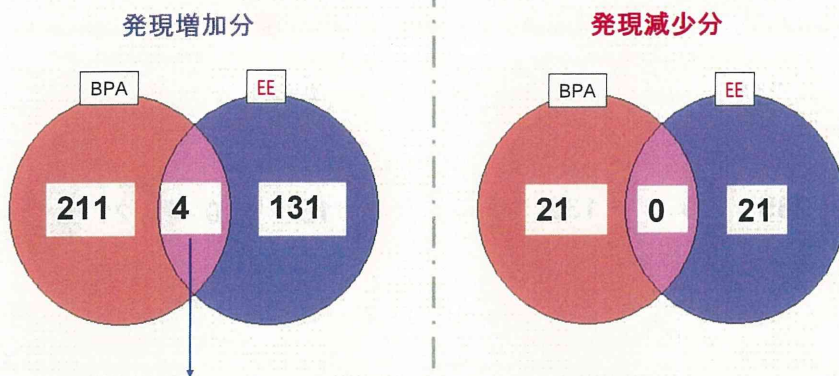
—発現プロファイルは似ていない—



参考

BPA投与の場合とEE投与の場合との発現比較
ER α 欠失マウス肝

—発現プロファイルは似ていない—



Fli1,Gt(Rosa)26Sor, Affy No. 1452008_at, Affy No.1426726_at

BPA投与の場合とEE投与の場合との比較:

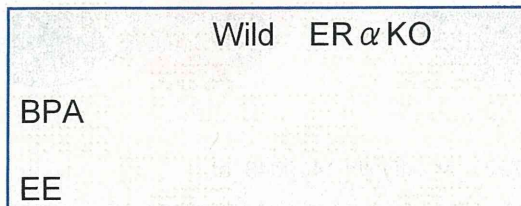
BPA 投与時、
野生型マウス肝のみで発現変動が顕著に認められた遺伝子
(ER α 欠失マウス肝では顕著ではない)
の発現変動はEE投与時でも認められるか否か

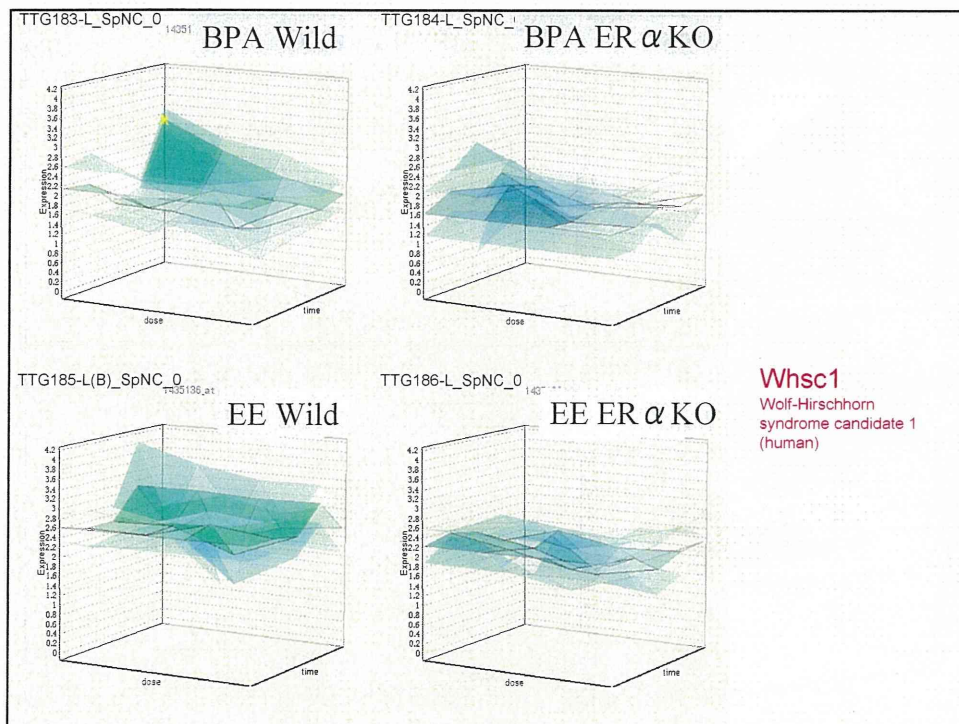
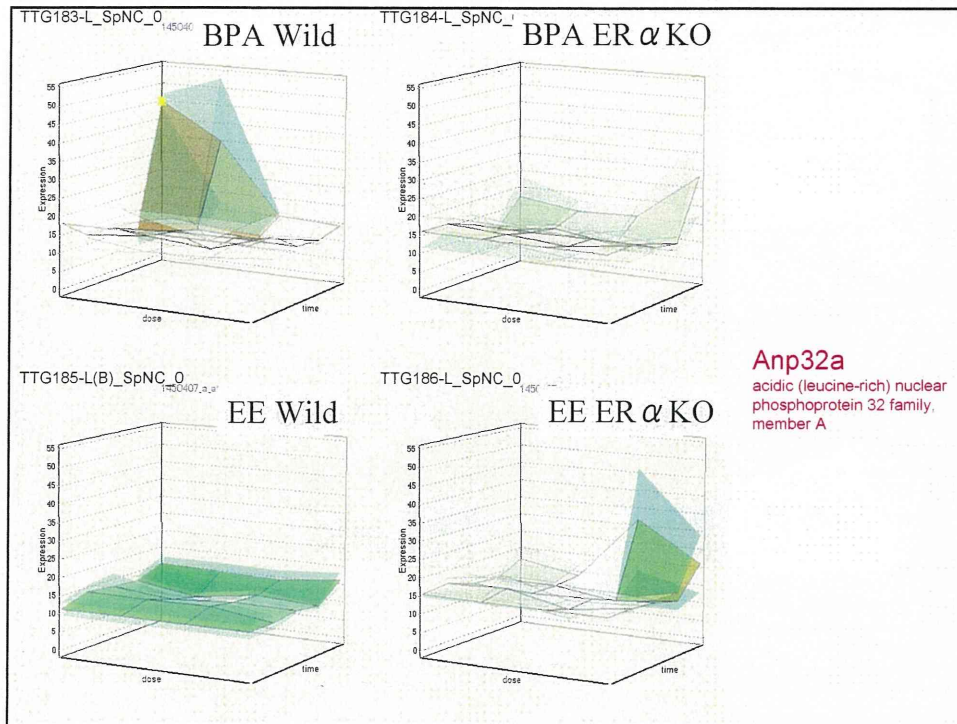
= BPA投与時に特異的か否か

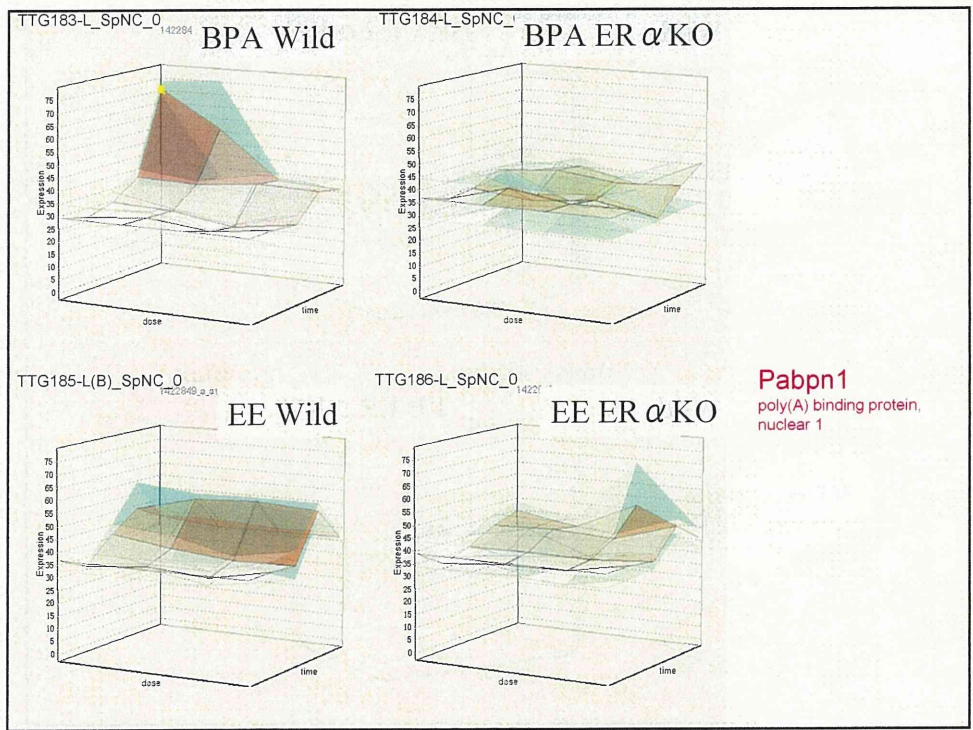
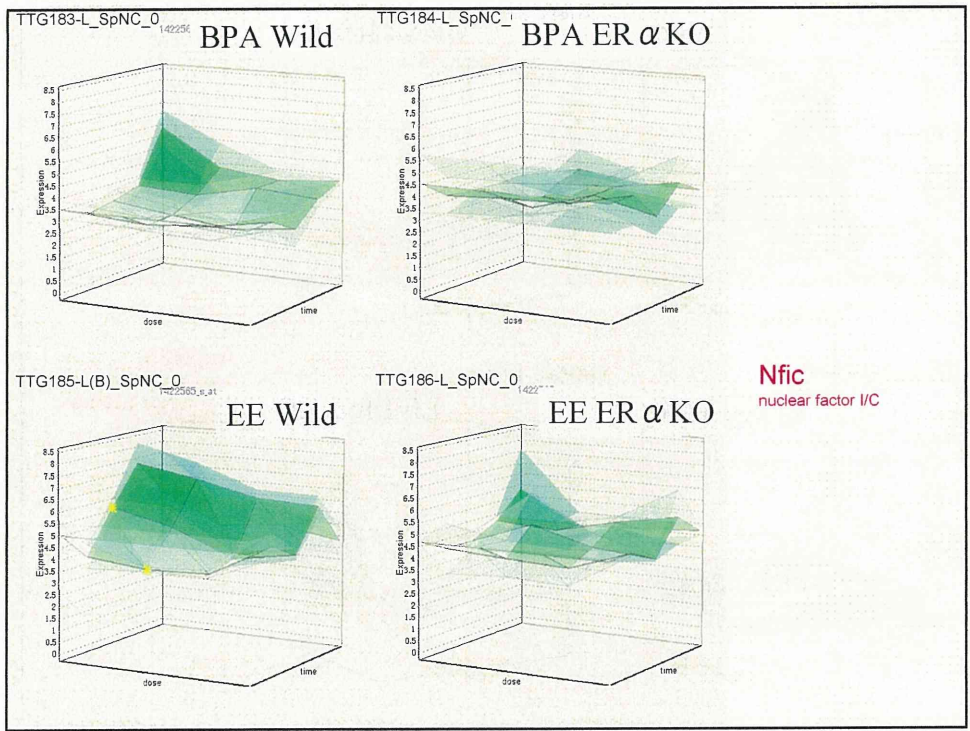
→ EE投与の場合との比較

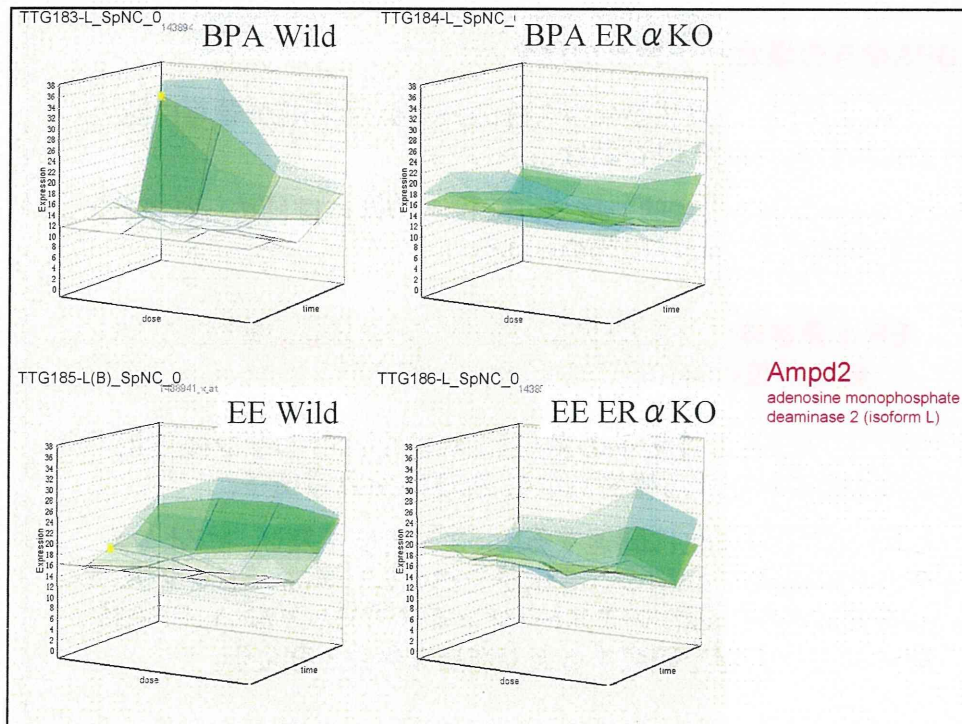
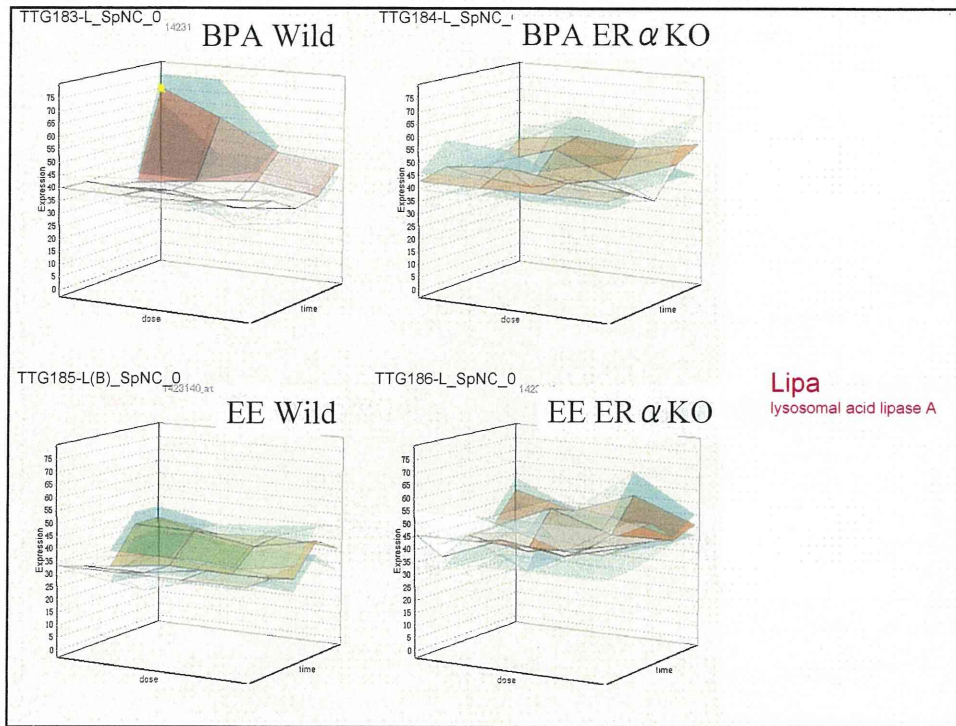
Multi Surface Viewerにて比較検討

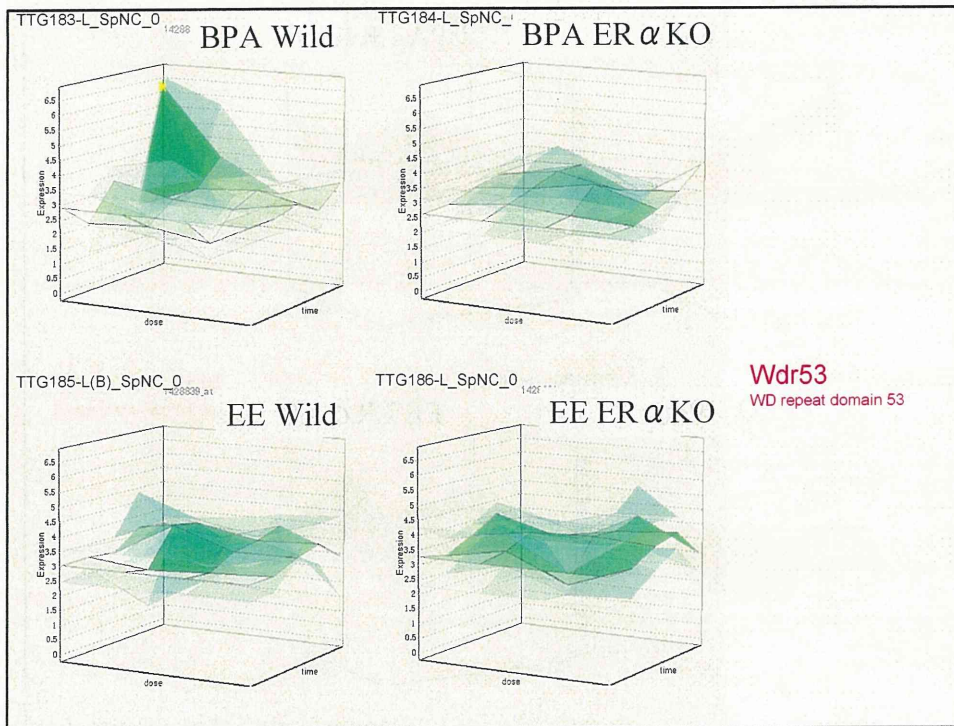
以降、示
す図の
配置図











BPA投与の場合とEE投与の場合との比較:

BPA 投与時に、野生型マウス肝のみで発現変動が顕著に認められ遺伝子の発現変動は、
ER α 受容体に依存的で且つ、EE投与の際には認められず
BPA投与の場合だけに認められる

ER α 受容体に対するBPAとEEの作用が異なる事例
◇ 結合部位の違いか、co-factorの違いか

加えて、これらの遺伝子の多くはこれまでエストロゲン様作用との関連を示唆する報告はなく、新規の関連遺伝子。

ヒストンアセチル化に関連するAnp32a遺伝子及び、ヒストンメチル化に関連するWhsc1遺伝子を抽出した事は、ERシグナルを介するが内因性のエストロゲンでは認められない、BPA特異的な生体影響を研究する上で重要な発見と考える。

結 論

・野生型マウスとER α 欠失マウスに投与した場合との比較、及び*in silico*でのプロモーター解析から、ER α 局所シグナルネットワークに関係する遺伝子を抽出する事が出来、この中の多くのものは、新規のER α の標的遺伝子である事が示唆された。

・この中には、ヒストンアセチル化・ヒストンメチル化関連遺伝子(Anp32a遺伝子等)やRNAプロセッシング関連遺伝子が含まれていた。

・このBPA投与時に認められたER α 関連遺伝子の発現変動は、EE投与時では認められない場合もある事から、当該核内受容体に関する詳細な局所シグナルネットワークの抽出には、*in silico*でのプロモーター解析、当該遺伝子欠失マウスを用いる手法に加えて、複数の当該受容体リガンド投与の比較・検討が有用である事が示唆された。

・ER α 依存的で、EE投与の際には発現変動が認められずBPA投与時に発現変動が認められた遺伝子、例えばヒストンアセチル化に関連するAnp32a遺伝子及び、ヒストンメチル化に関連するWhsc1遺伝子を抽出した事は、ERシグナルを介するが、内因性のエストロゲンでは認められないBPA特異的な生体影響を研究する上で重要な発見と考える。

委託研究報告書 (STEP10)

次世代シーケンサによるRNA定量の数値化
アルゴリズムに関する業務コンサルティング

平成24年2月24日
株式会社NTTデータ

テーマ

大量の核酸配列解読性能を持つ次世代シーケンサを応用し、エクソンレベルの遺伝子発現情報や非翻訳領域の情報など、マイクロアレイでは高精度に測定することが難しかった対象を含む、網羅的定量解析技術(RNA-Seq)が実用化されつつあるが、トキシコゲノミクスへの応用の可能性を評価するための予備的な検討では、数値化アルゴリズムの性能が不十分であることが判明している。本業務では、より高精度の網羅的遺伝子発現解析を行うための基盤技術としてRNA-Seqの可能性を探り、現行の数値化アルゴリズムの問題点を検討する。

1. シークエンスデータ

- ・ 肝臓(Liver)と脳(Brain)を、細胞数をベースに、5パターン(肝臓100%、肝臓75%:脳25%、肝臓50%:脳50%、肝臓25%:脳75%、脳100%)の割合で混合したサンプル(Liver-Brain-Mixture)を、次世代シーケンサ(イルミナ社 Genome Analyzer IIx)で読み込んだ。
- ・ これらのシーケンズデータを用いて、RNA-Seqの可能性を探る

2. 既存のRNA-Seq数値化アルゴリズムの性能検討

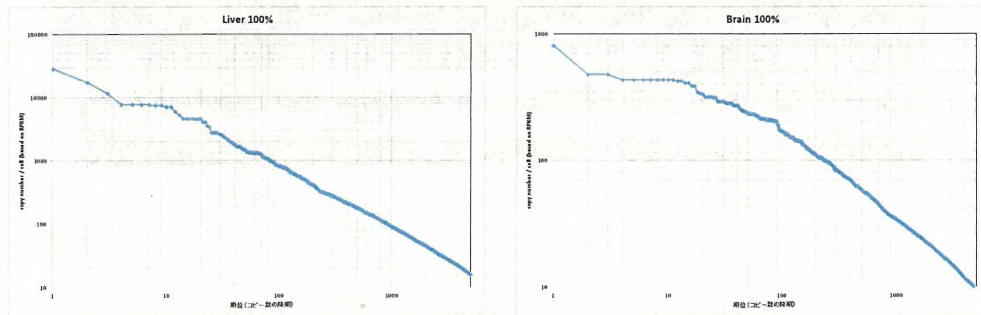
- ・ 次世代シーケンズデータからRNAの量を求める方法が2008年に発表されている。この方法では、RPKMという単位を用いる
- ・ RPKMとは、読み込んだタグ配列が、その遺伝子に割り振られた塩基数の合計を、遺伝子配列の塩基配列長で除した値の1000分の1である。
- ・ このRPKMを用いて、既存の割り振り方法がよいのか検討する

RPKM = reads per kilobase of exon per million mapped sequence reads

2.1.次世代シーケンサによる読込結果の傾向把握



細胞あたりコピー数を多い順に遺伝子(Affymetrix Moe430v2 Probesetに変換)を並べた。

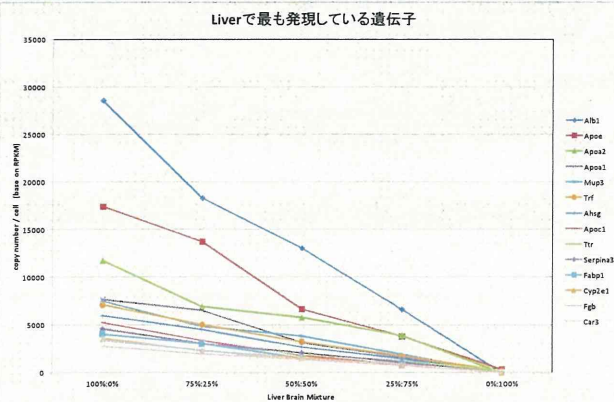


自然発生的に出来上がったものは、その数がべき乗法則(両対数グラフ上で直線となる)に従うことが多い。本結果も100位までは、同一遺伝子を複数プローブセットで表現しているなどの理由があり、従っていないが、それ以降はべき乗法則にしたがっていると考えられる

2.2.RPKM直線性比較



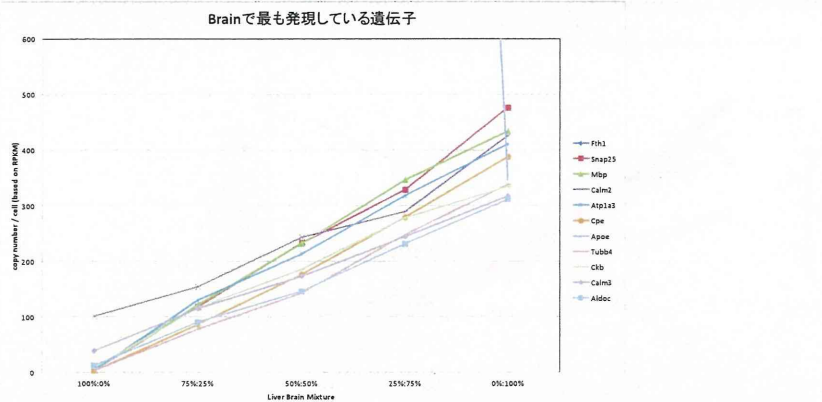
肝臓で多く発現している順に遺伝子を選び直線性を確認した



多少の誤差はあるが、線形と考えられる。

2.2.RPKM直線性比較

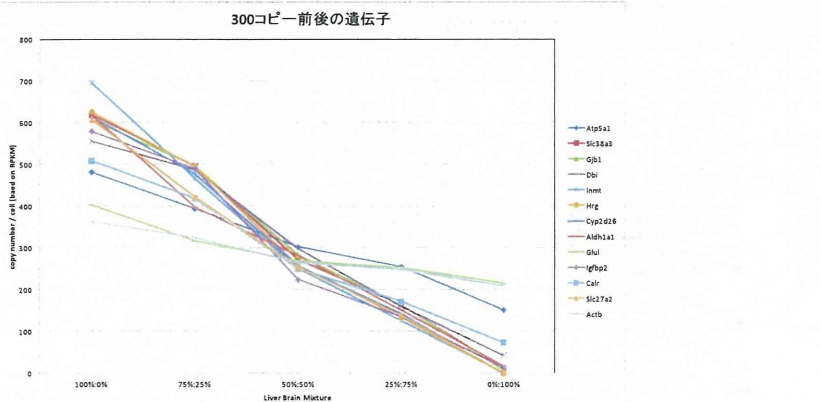
脳で多く発現している順に遺伝子を選び直線性を確認した



多少の誤差はあるが、線形と考えられる。
Apoa1は、肝臓と脳の両方で大量に発現している。細胞あたりでは肝臓のほうが多いため、脳100%で、一部しか見えていない

2.2.RPKM直線性比較

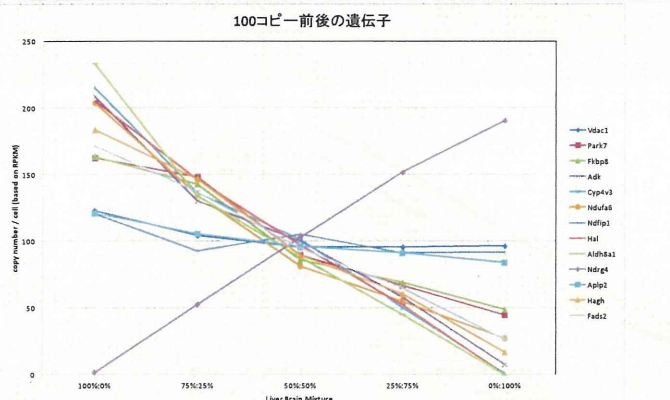
平均で300コピー前後発現している遺伝子を選び直線性を確認した



多少の誤差はあるが、線形と考えられる。

2.2.RPKM直線性比較

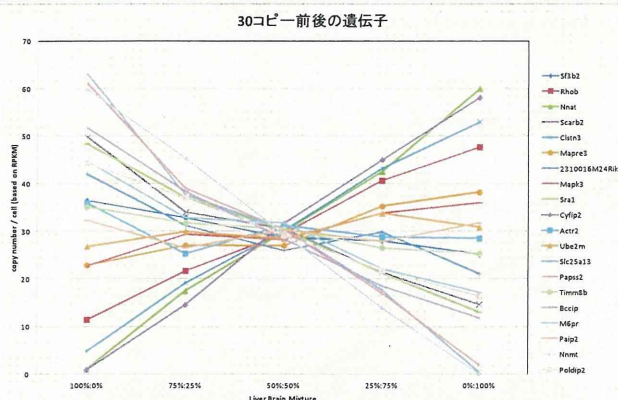
平均で100コピー前後発現している遺伝子を選び直線性を確認した



多少の誤差はあるが、線形と考えられる。

2.2.RPKM直線性比較

平均で30コピー前後発現している遺伝子を選び直線性を確認した



多少の誤差はあるが、線形と考えられる。