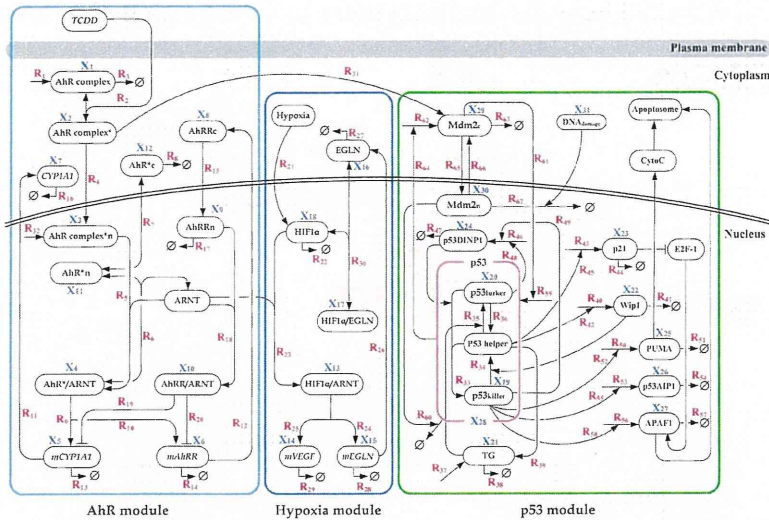


A circuit diagram of TCDD-mediated AhR pathway.



Gim J et al. Bioinformatics 2010;26:2169-2175

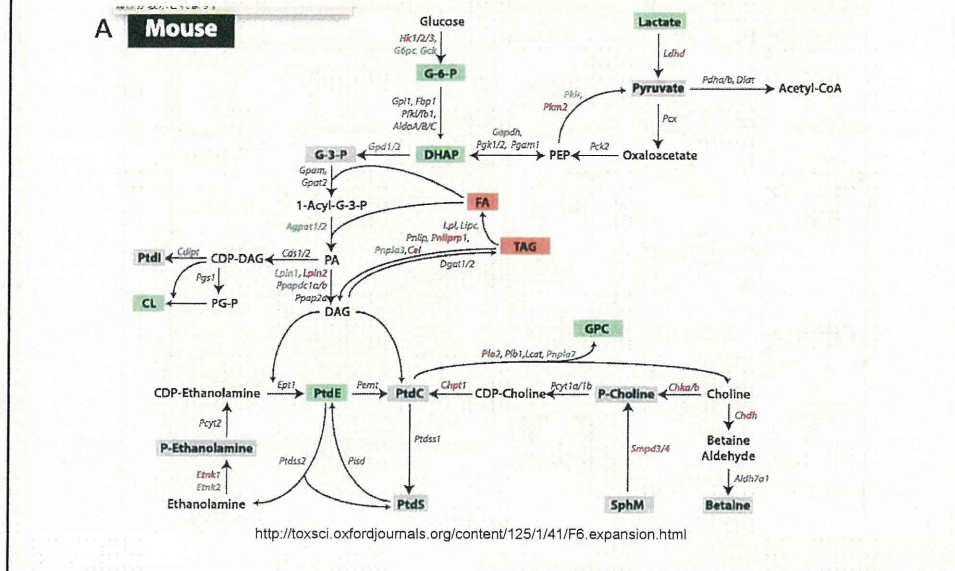
© The Author 2010. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oxfordjournals.org

Bioinformatics

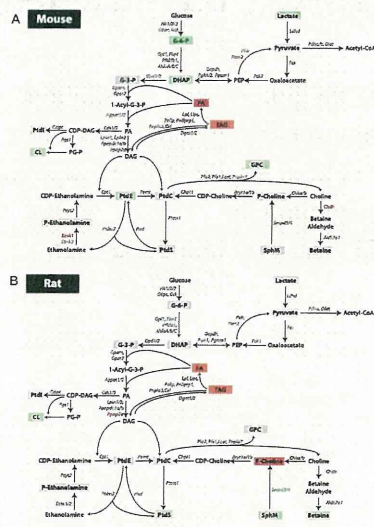
## Kanno-sensei's selection

- **Cyp1a1:** cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1
- **Cyp1a2:** cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2
- **Tiparp:** TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase
- **Lmo7:** LIM domain only 7
- **Nqo1:** NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1

## Comparative Metabolomic and Genomic Analyses of TCDD-Elicited Metabolic Disruption in Mouse and Rat Liver



Metabolic pathways illustrating TCDD-elicited changes in the mouse (A) and rat (B).



厚生労働科学研究補助金（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

胎児・ES細胞データをモデルとした遺伝子カスケード描出研究  
—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—

研究分担者 北嶋 聡

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・室長

## 研究要旨

本分担研究では、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局所シグナルネットワークの描出を目的としている。このために先行研究において取得・構築済みの野生型マウス胚、マウスES（胚性幹）・EB（胚葉体）分化系及び、成熟期マウス肝および視交叉上核（SCN）の遺伝子発現の経時データベースを活用する。

平成21年度は、マウス野生型胚の網羅的トランスクリプトームデータを用い、T遺伝子に着目し、この発現の経時変化を基としたピアソン相関係数の利用及びISHによる発現部位の可視化を組み合わせる解析を通して、当該遺伝子ネットワークに関連す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ることを報告した。平成22年度は、概日変動リズム1周期（=24時間）の肝およびSCNサンプルの網羅的トランスクリプトームデータを用い[Time point: 7点(4時間毎)]、概日変動リズム関連遺伝子の一つDbp遺伝子に着目し、この発現の経時変化を基としたピアソン相関解析及び*in silico*でのプロモーター解析を通して、当該遺伝子ネットワークに関連す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ること、また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。

今年度（平成23年度）は、局所シグナルネットワークの描出の効率化を計るため遺伝子発現の経時変化の「周期性」に着目し、成熟期マウス肝の網羅的トランスクリプトームデータの利用し検討した。周期性を検討する為に、遺伝子発現変動をフーリエ変換した上で、その波長分布についてピアソン相関解析をおこなった。その結果、Dbp遺伝子と同じ波長分布（点灯8時間後に発現ピーク）を示す遺伝子だけではなく、位相あるいは波長が異なるものを同時に抽出する事ができた。*in silico*でのプロモーター解析とあわせ、周期性に着目した本解析手法により、網羅性をもって局所シグナルネットワークの描出の効率化を計れたものとする。

## A. 研究目的

本研究は、先行実施された化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクス研究の成果を受け継ぎ拡充しつつ、毒性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のインフォマティクス技術を開発することを目的とする。これには、更なる高度な知識と技術を要するが、今までのトキシコゲノミクスが「関連した遺伝子のリスト」や「バイオマーカー」等の静止画的な情報しか提供しない状況を打破し「どのネットワークが反応すると、どのような毒性と直結するか」という時間的要素を含む動的な因果関係を導き出すことが可能となり、遺伝子発現情報からの毒性予測の精度の格段の向上が見込まれる。

本分担研究では、特に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局所シグナルネットワークの描出を目的としている。

平成21年度は、先行研究において取得・構築済みのマウス野生型胚およびマウスES・EB分化系の網羅的トランスクリプトームデータベースを利用し、脊索を含む中胚葉の形成と原腸陥入に関わるT(Brachyury)遺伝子に着目し、この局所シグナルネットワークの描出を目的とし検討した。T遺伝子に関しては、その発現時期から、野生型胚およびES・EB分化系、双方の経時データベースを活用できるため、両者共に活用し比較・検討することとした。なお、ES・EB分化系における網羅的トランスクリプトームデータベースは、ES・EB分化系が、マウス胚の採取が困難な着床前後の胎生4～6日の代替となりうることから作成した経緯があ

る。T遺伝子の発現の経時変化を基としたピアソン相関係数の利用およびISHによる発現部位の可視化を組み合わせる解析を通して、当該遺伝子ネットワークに関連す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ることを報告した。

平成22年度は、発生期ではなく成熟期の、概日リズムに関わるシグナルネットワークに着目した。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。概日リズムは、狭義には外部環境からの時刻の手がかりを遮蔽した後も持続する自律的に振動する内因性リズムであるが、広義には飲食、光や温度など外的環境因子の影響を受ける周期現象を含んでいる。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。この内因性リズムは、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。ヒトでは24.8時間周期(24.18時間周期という報告もある)、マウスでは約23時間周期と報告され、これは光や温度など外界の刺激によって修正を受けることが知られている。関与する遺伝子として、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、いわゆる夜時計遺伝子Bmal1(Arntl)等が報告されている。

当方では、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)の遺伝子発現変動の網羅的トランスクリプトームデータベース[Time point: 7点(4時間毎)]を有している。そこで今年度は、このデータベースを利用し、概日変動リズム関連遺伝子のひとつ Dbp 遺伝子[bZIP型転写因子 Dbp (D-site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein)]に着目し、この遺伝子が関わる局所ネットワークの描出を検討した。Dbp 遺伝子に着目した理由として、この遺伝子は、視交叉上核をはじめ末梢臓器に発現するため、肝及びSCNでの発現がシャープな概日変動が報告されているため選択した。DBP 遺伝子欠失マウスでは、興味深い事に、他の概日リズム関連遺伝子の発現に影響は認められない。また発生・生殖機能は正常であり、肝機能への影響は認められないが、概日リズムに関連した歩行運動(locomotor)の抑制という行動影響が報告されている(Lopez-Molina Lら、EMBO J 16(22): 6762-6771, 1997)。加えて、肝およびSCNの組織間連関についても検討した。その結果、Dbp 遺伝子の発現の経時変化を基としたピアソン相関解析及び *in silico*でのプロモーター解析を通して、当該遺伝子ネットワークに関連す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ること、また 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を報告した。さらに、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、抽出した遺伝子リストの妥

当性を示す事ができた。肝において Dbp 遺伝子の発現を特に強く抑制する化学物質は、化審法での所謂白物質 2-クロロ-4,6-ジメチルアニリン[0, 3, 10, 30mg/kg]、有機リン系殺虫剤アセフェート[0, 7, 20, 70 mg/kg]及び、食品添加物の保存料デヒドロ酢酸ナトリウム[0, 30, 100, 300 mg/kg]の3化合物であった。

今年度(平成23年度)は、局所シグナルネットワークの描出の効率化を計ることを目的として、遺伝子発現の経時変化の「周期性」に着目し、成熟期マウス肝の網羅的トランスクリプトームデータの利用し検討した。周期性を検討する為に、遺伝子発現変動をフーリエ変換した上で、その波長分布についてピアソン相関解析をおこなった。あわせて、得られた遺伝子が同じシグナルネットワークを共有しているか否かを検討する為に、各遺伝子の転写開始点上流での共通した結合配列の有無を *in silico*でのプロモーター解析により検討した。

## B. 研究方法

B-1: 概日変動リズム1周期(=24時間)の成熟期マウス肝の網羅的トランスクリプトームデータの構築:

12週齢の雄性 C57BL/6NCrSlc マウス(日本エスエルシー)を実験に用いた。個別飼いにて3週間馴化したものを実験に供した。経時的(12時間明暗サイクルの下、点灯0, 4, 8, 12, 16, 20及び24時間後)に採取した肝及びSCN RNA サンプルを用い(n=6)、マイクロアレイ[Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0]を用いて、網羅的遺伝子発現変動解析を検討することにより、遺伝子発現経時データベース [Time

point: 7 点 (4 時間毎)]を作成した。

#### B-2: Total RNA の分離精製

RNA 抽出にあたっては、マウス組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4°C で一晩浸漬し、RNase を不活化した。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。肺は気管から RNA later を注入し、RNase の不活化を促した後、採取した。その後、RNA 抽出操作までは -80°C にて保存した。抽出にあたっては、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砕液を調製した。得られた破砕液の 10  $\mu$ L 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 RNA 5 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。

#### B-3: GeneChip 解析

全 RNA 5  $\mu$ g 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 Affymetrix 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 RNA 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、我々が独自に開発した解析ソフトを用いて解析した。解析ソフト「RSort」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。

有意差の検定は、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の配慮を十分行い、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: 周期性に着目した、成熟期マウス肝の網羅的トランスクリプトームデータを用いた Dbp 遺伝子に関わる局所シグナルネットワークの描出:

局所シグナルネットワークの描出の効率化を計ることを目的として、遺伝子発現の経時変化の「周期性」に着目し、成熟期マ

ウス肝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、n=6 (12 時間明暗サイクルの下、点灯 0、4、8、12、16、20 及び 24 時間後)] を利用し検討した。Dbp 遺伝子は、肝において点灯 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。この結果を図 1 に示す。

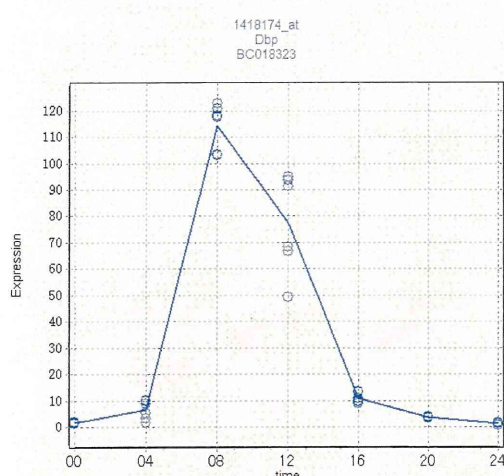


図 1 概日変動リズム 1 周期 (=24 時間) の成熟期マウス肝の網羅的トランスクリプトームデータにおける Dbp 遺伝子の発現変動  
 グラフの線は各平均値を結び、点は各データの素点を表す (n=6)。縦軸は、発現量 (細胞一個あたりのコピー)、横軸は点灯後の時間 (各 0、4、8、12、16、20 及び 24 時間後) を表す。

周期性を検討する為に、遺伝子発現変動を、当方で開発した独自の解析ソフト [MF Wave analyzer] を利用しフーリエ変換をおこなった。この際、フーリエ変換の精度向上の為に、概日変動リズム 1 周期 (=24 時間) の連続サンプリングデータを二分し、2 周期 (=48 時間) として扱った。

その結果、Dbp 遺伝子の発現変動の波長分布は 24 時間周期を中心に、12 時間周期の要素も存在していた (図 2)。

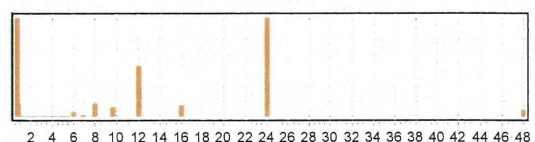


図 2 成熟期マウス肝の網羅的トランスクリプトームデータにおける Dbp 遺伝子の発現変動の波長分布

横軸は各波長 (単位: 時間) を、縦軸は最大要素の振幅を基準とした相対値を表す。24 時間周期を中心に、12 時間周期の要素も存在していた。

次いで、標準化 (normalize) した波長分布についてピアソン相関解析をおこない、相関係数が高い順に並び替えた。この際、発現コピー数に制限を設けなかった。例えば Dbp 遺伝子に着目し検討した結果、相関係数が 1) 0.85 以上の場合は 8,890 プローブセット (ps) [Dbp 遺伝子の 2 ps を含む]、2) 0.90 以上の場合は 4,635 プローブセット (ps) [Dbp 遺伝子の 2 ps を含む]、3) 0.99 以上の場合は 43 ps [Dbp 遺伝子の 2 ps を含む] と求められた。なお、昨年度の Dbp 遺伝子の経時変化を基としたピアソン相関解析の結果では、相関係数が 1) 0.85 以上の場合は 1,002 ps、2) 0.90 以上の場合は 438ps であった。

この Dbp 遺伝子を雛形としフーリエ変換して得られた波長分布について、ピアソン相関解析の結果得られた (相関係数 > 0.90) 4,635 ps [含 Dbp 2 ps] について、



独自に開発した解析ソフト RSort を用いて発現のピークを示す時点について経時的に並び替え、解析ソフト MF Surface 上で、主として変動幅と標準偏差の大きさをもとに、目視により変動が生物学的変化と考えられる遺伝子リストを、遺伝子発現のピークについて「各時点」毎に分類し抽出した。

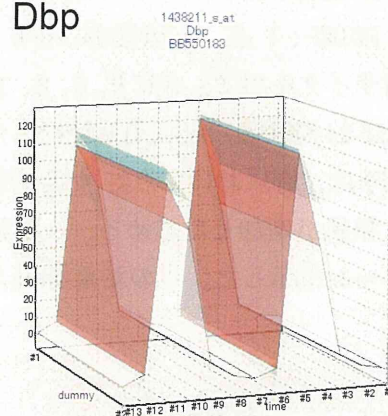
その結果、計 460 ps [Dbp 遺伝子の 2 ps を含む] の遺伝子リストが得られた。いずれも 24 時間周期であった。下記に、発現ピークを示す時点ごとに遺伝子数を記す。

0/24h : 43 ps  
 4h : 37 ps  
 8h : 90 ps [Dbp 遺伝子 2 ps を含む]  
 12h : 176 ps  
 16h : 73 ps  
 20h : 41 ps

したがって本解析手法により、Dbp 遺伝子と同じ波長分布を示す遺伝子だけではなく、位相が異なるものを同時に抽出する事ができたものと考える。

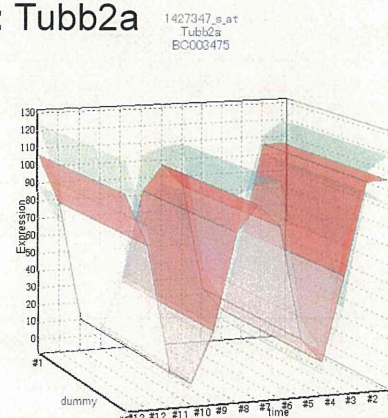
図 3 として、Dbp 遺伝子（点灯 8 時間後にピーク）及び各時点に発現のピークを示す遺伝子リストから選んだ特定の遺伝子の発現変動を示す。

### A: Dbp



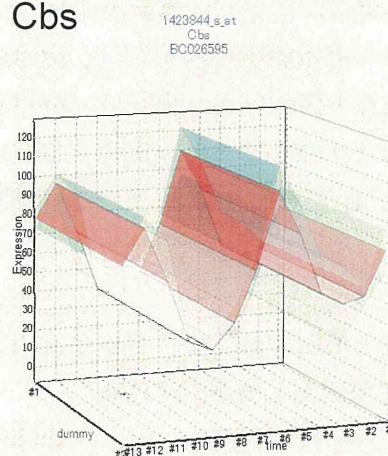
[8 時間後]

### B: Tubb2a



[0/24 時間後]

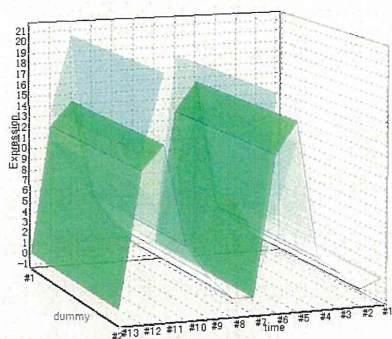
### C: Cbs



[4 時間後]

D: Nr1d1

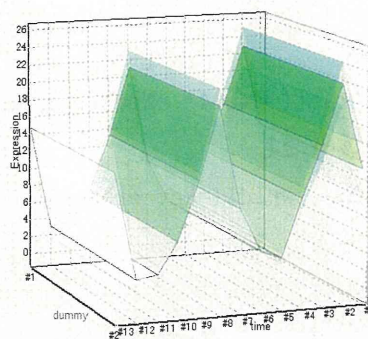
1426464\_at  
Nr1d1  
Wt3191



[8 時間後]

G: Rorc

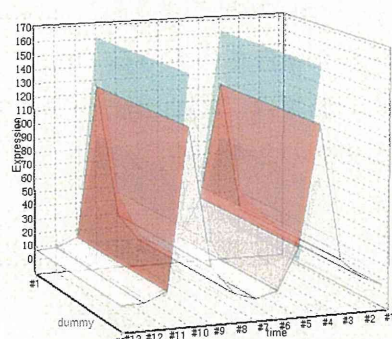
1425792\_at  
Rorc  
A1132394



[20 時間後]

E: Lpin1

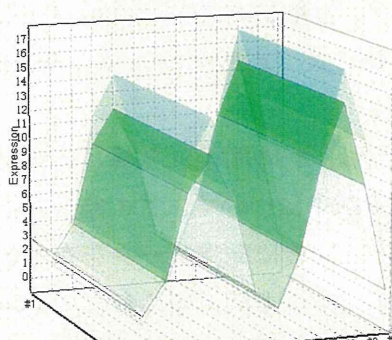
1418289\_at  
Lpin1  
NM\_015763



[12 時間後]

F: Per2

1417602\_at  
Per2  
AF035330



[16 時間後]

図 3 成熟期マウス肝の網羅的トランスクリプトームデータにおける Dbp 遺伝子と同位相の波長分布を示す遺伝子の発現変動

Dbp 遺伝子 (点灯 8 時間後に発現のピークが認められる) (A) 及び各時点に発現のピークを示す遺伝子リストから選んだ特定の遺伝子の発現変動を示す。B : *Tubb2a* 遺伝子 [点灯 0/24 時間後]、C : *Cbs* 遺伝子 [点灯 4 時間後]、D : *Nr1d1* 遺伝子 [点灯 8 時間後]、E : *Lpin1* 遺伝子 [点灯 12 時間後]、F : *Per2* 遺伝子 [点灯 16 時間後]、G : *Rorc* 遺伝子 [点灯 20 時間後]。

図は、各遺伝子につき経時変化、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、横軸(Y 軸)には経時変化を取り、各条件の平均値曲面(n=3)で表示した。加えてこの平均曲面の上下に標準偏差(SD)平面 (薄い色) を示した。

興味深い事にこれらの遺伝子リストの中に、多くの時計遺伝子が含まれていた。下記に各時点について含まれていた時計遺伝子を記す。

0/24h: Arntl(=Bmal1)、Npas2、Nfil3

4h: 該当なし

8h: Dbp、Nr1d1(=Rev-erba-alpha)、Nr1d2、Ppara

12h: Per1、Per3

16h: Per2

20h: Cry1、Rorc

上記リストに抽出されてこなかった他の時計遺伝子である Clock、Bhlhb2、Bhlhb3、Rora、Rorb 遺伝子について発現変動を再検討したところ、明らかな周期性が認められない、あるいは標準偏差が大きいものであり、これらの遺伝子は肝においては、少なくとも顕著なリズム変動を示さないものと考えられた。

したがって、この結果からも、周期性に着目した本解析手法は、網羅性をもって効率よく当該局所シグナルネットワークに関わる遺伝子を抽出できるものと考える。

次いで、この Dbp 遺伝子と同じ波長分布（点灯 8 時間後に発現ピーク）を示す遺伝子 90 ps（72 遺伝子）について PubMed による遺伝子機能の検索をおこない、概日リズムとの関連が既知の遺伝子と関連が見いだせなかった遺伝子に分類した。下記にその遺伝子数と既知のものについては遺伝子名を記載する。

・概日リズムとの関連が既知の遺伝子；

9 遺伝子: Rgs16、Ppara、Ppargc1b、Nr1d2、Nr1d1、Junb、Circp、Csnk2a2、Gabarapl1

・概日リズムとの関連が見いだせなかった遺伝子； 63 遺伝子

以上のことから、得られたリスト中の遺伝子のほとんど（72 遺伝子中 63 遺伝子、約 90%）が、概日リズムとの関連が未報告の遺伝子であることが示唆された。概日リズムとの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、Nr1d1、Nr1d2 遺伝子の 4 つであった。したがって本抽出法により、概日リズムとの関連が既知の遺伝子が実際に 9 遺伝子抽出でき、この中には Dbp 遺伝子との関連が報告されている 4 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。

C-2: 得られた Dbp 遺伝子と同周期を有する各時点での遺伝子リストについての、*in silico*でのプロモーター解析：

この Dbp 遺伝子と同周期を示す遺伝子が同じシグナルネットワークを共有しているか否かを検討する為に、時点毎に各遺伝子の転写開始点上流での共通した結合配列の有無を *in silico*でのプロモーター解析により検討した（市販のソフト：Genomatix を使用）。

まず点灯 8 時間後に発現ピークを有する Dbp 遺伝子について、この結合部位が、点灯 12 時間後に発現ピークを有する遺伝子の転写開始点上流領域に存在するか否かについて検討した。点灯 12 時間後に発現ピークを有する遺伝子は上述の様に 176 ps で

あったが、Genomatix を使用するにあたり、周期的な発現変動が、より明確な 54 ps (35 遺伝子) を選択し検討した。その結果、転写開始点上流に Dbp 結合部位を有する遺伝子は 35 遺伝子中 21 遺伝子であった。この検討と並行し、これら 35 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を検索したところ、転写因子 Klf の結合部位が見いだされた。この観点から、点灯 8 時間後に発現ピークを示す遺伝子リストを検討した結果、Klf ファミリーに属する遺伝子として Klf9 遺伝子が見いだされた。したがって、検討した 35 遺伝子は転写開始点上流に、1) 少なくとも Dbp 結合部位及び Klf 結合部位を有する 21 遺伝子と、2) Dbp 結合部位を有していないが、少なくとも Klf 結合部位を有する 14 遺伝子、の 2 種に分類される事が明らかとなった。

次いで、さらに上流の局所ネットワークを描出する目的で、Dbp 遺伝子が属する点灯 8 時間後に発現ピークを有する遺伝子 (90ps) について、転写開始点上流領域に共通した結合配列を検索した。この場合も、市販ソフト Genomatix を使用するにあたり、周期的な発現変動が、より明確な 53 ps (38 遺伝子) を選択し検討した。その結果、転写因子 Ets の結合部位が見いだされた。この観点から、点灯 4 時間後に発現ピークを有する遺伝子リストを検討したが、この中には Ets ファミリーに属する遺伝子は見いだせなかった。そこでこの 38 遺伝子の内、35 遺伝子のプロモーターに共通する転写因子結合配列を検索した結果、Egr、Ets、Klf 及び SP1 結合配列が見いだされた。Dbp 遺伝子の転写開始点上流には、これら Egr、Ets、Klf 及び SP1 結合配列が見いだされ

た。そこで、これらの結合配列に結合する転写因子の遺伝子の有無を、点灯 4 時間後に発現ピークを有する遺伝子リストについて検討したところ、該当する遺伝子として Klf11 が見いだされた。したがって、この Klf11 が、Dbp 遺伝子を含む点灯 8 時間後に発現ピークを有する遺伝子の発現を誘導し、さらに Dbp 遺伝子が点灯 12 時間後に発現ピークを有する上述した少なくとも 21 遺伝子の発現を誘導する可能性が示唆された。

### C-3: 12 時間周期を有する各時点での遺伝子リストについての、Dbp 遺伝子に関わる局所シグナルネットワークの描出:

本解析手法により抽出された遺伝子は、全て 24 時間周期を有するものであった。他方、Dbp 遺伝子の発現変動の波長分布は、図 2 に示した様に、24 時間周期だけではなく、12 時間周期の要素も存在していた。そこでこの 12 時間周期成分を強調したものを雛形としてピアソン相関解析をおこなった。発現コピー数に制限を設けず相関係数が高い順に並び替えた。その結果、相関係数が最も高いものでも 0.87 であり、0.85 以上の場合には 83 ps と求められた。この 83 ps について、独自に開発した解析ソフト RSort を用いて、発現のピークを示す時点毎に経時的に並びかえ、解析ソフト MF Surface 上で、主として変動幅と標準偏差の大きさをもとに、目視により変動が生物学的変化と考えられる遺伝子リストを「各時点」毎に抽出した。その結果、意外な事に、点灯 4 時間後に発現のピークを有する 14 ps のみ只得られた。この遺伝子リストの中には、いわゆる時計遺伝子は含まれていなかった。

次いで、この 12 時間周期を示す遺伝子 14 ps (12 遺伝子) について PubMed による 遺伝子機能の検索をおこない、概日リズムとの関連が既知の遺伝子と関連が見いだせなかった遺伝子に分類した。その結果、Hspa5 遺伝子のみ、概日リズムとの関連が既知のものであり、残り 14 遺伝子については未知のものであった。

したがって本抽出法により、Dbp 遺伝子と同じ波長分布を示す遺伝子や位相が異なるものだけではなく、波長が異なるものも同時に抽出する事ができたものと考える。

この 14 遺伝子の中から例として 3 遺伝子についての発現変動を図 4 として示す。

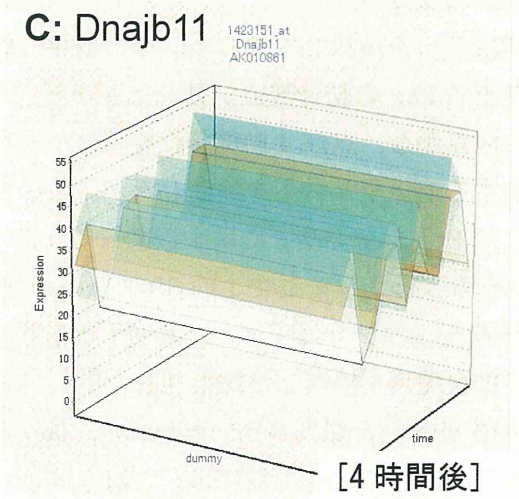
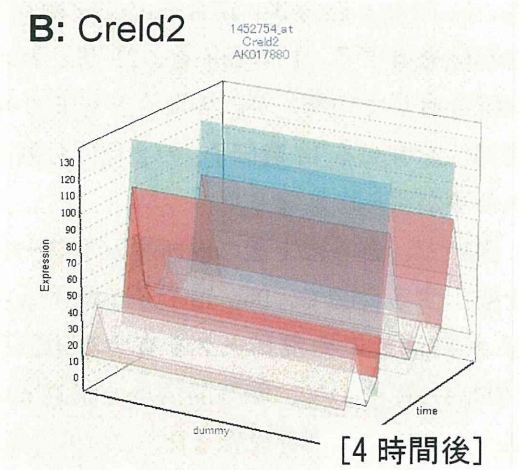
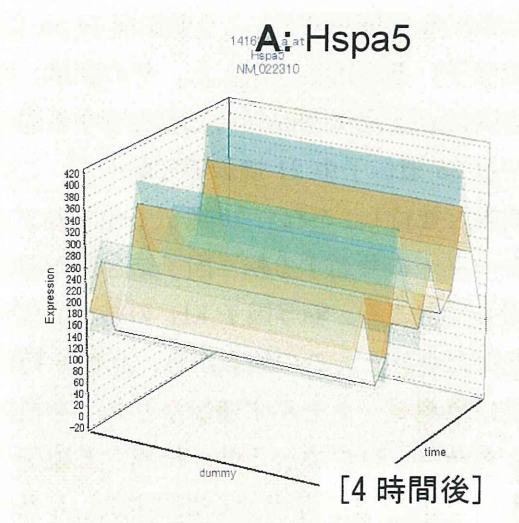


図 4 成熟期マウス肝の網羅的トランスクリプトームデータにおける 12 時間周期の波長分布を示す遺伝子の発現変動

A: Hspa5 遺伝子、B: Creld2 遺伝子、C: Dnajb11 遺伝子。いずれも点灯 4 時間後に発現ピークが認められる。

次いで、この 12 時間周期を示す 12 遺伝子が同じシグナルネットワークを共有しているか否かを検討する為に、各遺伝子の転写開始点上流での共通した結合配列の有無を *in silico* でのプロモーター解析により検討した（市販のソフト：Genomatix を使用）。その結果、12 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として、Creb、E2f、Ebox、Egr 及び Hand 結合配列が見いだされた。

#### D. 結論

本研究の目的は、毒性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のインフォマティクス技術を開発することである。今年度の本分担研究では、局所シグナルネットワークの描出の効率化を計ることを目的として、遺伝子発現の経時変化の「周期性」に着目し、成熟期マウス肝の網羅的トランスクリプトームデータの利用し解析・検討した。周期性を検討する為に、遺伝子発現変動をフーリエ変換した上で、その波長分布についてピアソン相関解析をおこなった。あわせて、得られた遺伝子が同じシグナルネットワークを共有しているか否かを検討する為に、各遺伝子の転写開始点上流領域での共通した結合配列の有無を *in silico* でのプロモーター解析により検討した。

その結果、Dbp 遺伝子の発現変動の波長分布は 24 時間周期を中心に、12 時間周期の要素も存在していた（図 2）。また、この Dbp 遺伝子を雛形としフーリエ変換して得られた波長分布について、ピアソン相関解析の結果得られた（相関係数  $> 0.90$ ）4,635 ps [含 Dbp 2 ps] について、発現のピーク

を示す時点毎に経時的に並びかえ、生物学的変化と考えられる遺伝子リストを抽出したところ、計 460 ps [Dbp 遺伝子の 2 ps を含む] の遺伝子リストが得られた。いずれも 24 時間周期であった。また、遺伝子発現のピークについて、時点毎に分類し抽出する事ができた。興味深い事にこれらの遺伝子リストの中に、多くの時計遺伝子が含まれていた。

この結果は、Dbp 遺伝子と同じ波長分布を示す遺伝子だけではなく、位相が異なるものを同時に抽出する事ができたものと考ええる。周期性に着目した本解析手法は、網羅性をもって効率よく当該局所シグナルネットワークに関わる遺伝子を抽出できるものとする。

この Dbp 遺伝子と同じ波長分布を示す遺伝子 90 ps (72 遺伝子) について、概日リズムとの関連が既知の遺伝子は 9 遺伝子であり、他方、概日リズムとの関連が見いだせなかった遺伝子は 63 遺伝子であった。この事は、本解析の技術的な妥当性を示すと共に、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であることを示唆しており、当該遺伝子ネットワークに関連す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るものと考えられた。

さらに、Dbp 遺伝子の発現変動の波長分布で認められた 12 時間周期成分について検討する為に、これを強調したものを雛形としてピアソン相関解析を検討したところ、意外な事に、点灯 4 時間後に発現のピークを有する 14 ps のみ得られた。この遺伝子リストの中には、いわゆる時計遺伝子は

含まれていなかった。この 12 時間周期を示す遺伝子 14 ps (12 遺伝子) について、Hspa5 遺伝子のみ、概日リズムとの関連が既知のものであり、残り 14 遺伝子については未知のものであった。この結果から、本抽出法の適用により、Dbp 遺伝子と同じ波長分布を示す遺伝子や位相が異なるものだけではなく、波長が異なるものも網羅性をもって同時に抽出する事ができたものとする。

局所シグナルネットワークを描出する為に、まず点灯 8 時間後に発現ピークを有する Dbp 遺伝子に着目し、この結合部位が、点灯 12 時間後に発現ピークを有する遺伝子のプロモーター領域に存在するか否かについて検討した。その結果、検討した 35 遺伝子は、転写開始点上流領域に 1) 少なくとも Dbp 結合部位及び Klf 結合部位を有する 21 遺伝子と、2) Dbp 結合部位を有しないが、少なくとも Klf 結合部位を有する 14 遺伝子、の 2 種に分類される事が明らかとなった。

次いでさらに局所シグナルネットワークの上流を描出する目的で、Dbp 遺伝子が属する点灯 8 時間後に発現ピークを有する遺伝子について、転写開始点上流領域に共通する結合配列を検索した。その結果、38 遺伝子の内、35 遺伝子のプロモーターに共通する転写因子結合配列として、Egr、Ets、Klf 及び SP1 結合配列が見いだされた。Dbp 遺伝子の転写開始点上流領域には、これら Egr、Ets、Klf 及び Sp1 結合配列が見いだされた。この観点から、これらの結合配列に結合する転写因子の遺伝子の有無を、点灯 4 時間後に発現ピークを有する遺伝子リスト中で検討したところ、該当する遺伝子として Klf11 が見いだされた。したがっ

て、この Klf11 が、Dbp 遺伝子を含む点灯 8 時間後に発現ピークを有する少なくとも 35 遺伝子の発現を誘導し、さらに Dbp 遺伝子が点灯 12 時間後に発現ピークを有する少なくとも 21 遺伝子の発現を誘導する事が示唆された。

このように転写因子 KLF ファミリー (Klf9 及び Klf11) が Dbp 遺伝子が関与する局所シグナルネットワークに関与する事が示唆されたが、KLF ファミリーと概日リズムとの関連について文献検索の結果、Guillaumond ら (Mol Cell Biol 30(12):30, 3059-3070, 2010) の 1 報のみを見いだす事が出来た。この論文では、Klf10 遺伝子を欠失したマウスを作製し解析したところ、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示している。本実験では、Dbp の発現制御 (Klf11) 及び Dbp の標的遺伝子の制御 (Klf9) に関し、KLF 結合部位を見だし、概日リズムにおける転写因子 KLF の関与は大きいものと考えられたが、その分子機序、生理的な役割の点で未解明な点が多く、今後、この観点から詳細に検討する必要があると考える。

上田ら (Nature 418: 534-539, 2002) は、マウス肝を 4 時間ごとに採取し、遺伝子発現変動を網羅的に解析した結果、発現が概日リズムを示す 393 遺伝子を見出し、これらが 5 種類のクラスターに分類できることを報告し、各クラスターに属する代表的な遺伝子として、それぞれ Rev-ErbA、Per2、Cry1、Bmal 及び Id 遺伝子を挙げている。この遺伝子リストについて、KLF ファミリーに属する遺伝子を検索したところ、Klf9 遺伝子のみが見いだされ、これは Rev-ErbA 遺伝子のクラスターに分類されていた

(Supplementary Table2)。したがって、本研究において見出した、Dbp 遺伝子の局所シグナルネットワークへの関与が示唆された Klf11 遺伝子についての新規性は高いものとする。

本分担研究では、局所シグナルネットワークの描出の効率化を計るため遺伝子発現の経時変化の「周期性」に着目し、成熟期マウス肝の網羅的トランスクリプトームデータの利用し検討した。周期性を検討する為に、遺伝子発現変動をフーリエ変換した上で、その波長分布についてピアソン相関解析をおこなった。その結果、Dbp 遺伝子と同じ波長分布を示す遺伝子だけではなく、位相あるいは波長が異なるものを、網羅性をもって同時に抽出する事ができた。 *in silico* でのプロモーター解析とあわせ、周期性に着目した本解析手法により、網羅性をもって局所シグナルネットワークの描出の効率化を計れたものとする。

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ことが期待される。今までのトキシコゲノミクスが「関連した遺伝子のリスト」や「バイオマーカー」等の静止画的な情報しか提供しない状況を打破し「どのネットワークが反応すると、どのような毒性と直結するか」という時間的要素を含む動的な因果関係を導き出すことが可能となり、遺伝子発現情報からの毒性予測の精度の格段の向上が見込まれる。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1-1) 書籍

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Yukio Kodama, Kiyoshi Sekita, Atsuya Takagi and Satoshi Kitajima

Chapter11 Application of Percellome Toxicogenomics to Food Safety Hormone-Disruptive Chemical Contaminants in Food, 2011, 184-198. Editor(s): Ingemar Pongratz, Linda Bergander, Royal Society of Chemistry. ISBN:978-1-84973-297-0,

DOI:10.1039/9781849732970-00184

#### 1-2) 学術雑誌

Katsuhide Igarashi, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Kentaro Tanemura, Yuhji Taquahashi, Noriko Moriyama, Eriko Ikeno, Nae Matsuda, Yumiko Saga, Bruce Blumberg, and Jun Kanno

Development of Humanized Steroid and Xenobiotic Receptor Mouse by homologous knock-in of the human Steroid and Xenobiotic Receptor Ligand Binding Domain sequence. J Toxicol Sci. 2012, Vol.37, No.2, 373-380.

### 2. 学会発表

北嶋 聡, 小川幸男, 長野嘉介, 相崎健一, 五十嵐勝秀, 高橋祐次, 安彦行人, 山本雅也, 菅野 純

Percellome 法によるシックハウス症候群レベルの極低濃度暴露下での吸入トキシコゲノミクス [第 38 回日本トキシコロジー学



会学術年会]2011年7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  
ヒト型リガンド結合ドメインノックイン  
PXR マウスの遺伝子発現応答特性 [第 29 回  
内分泌代謝学サマーセミナー] 2011年7月

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北  
嶋 聡、菅野 純  
中枢神経系の発生-発達期における神経活  
動かく乱による遅発性中枢影響解析  
-幼若期雄マウスへのアセフェートによる  
成熟後の脳高次機能障害について- [第 38  
回日本トキシコロジー学会学術年会]2011  
年7月

五十嵐 勝秀、北嶋 聡、相崎 健一、菅野 純  
ヒト型 PXR 生理的発現マウス系の全身臓器  
トランスクリプトーム解析[第 38 回日本ト  
キシコロジー学会学術年会]2011年7月

相崎 健一、五十嵐 勝秀、種村 健太郎、安  
彦行人、高橋祐次、高木篤也、北嶋 聡、菅  
野 純  
Percellome プロジェクト・オンライン解析  
システム[第 38 回日本トキシコロジー学会  
学術年会]2011年7月

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡  
パーセローム (Percellome) 法を用いた定  
量的トランスクリプトミクスによる遺伝子  
発現ネットワーク描出による毒性解析の試  
み [第 34 回日本高血圧学会総会]2011年 10  
月

## F. 知的財産所有権の出願・登録状況

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

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

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の描出

平成23年度：  
局所シグナルネットワークの描出の効率化を計るため、遺伝子発現の経時変化の「周期性」に着目し、成熟期マウス肝の網羅的トランスクリプトームデータの利用した解析・検討

## 背景1

- ・ 日常生活で暴露される数万種と言われる化学物質の毒性評価：  
実験動物における毒性所見を人に外挿することで実施  
⇒ 種差や個体差は「安全係数」或は「不確実係数」により、  
量的な安全マージンをとる
- ・ しかしサリドマイドに代表されるように、これには科学的な限界  
人の安全性確保をより確実にするための「毒性学の近代化」が必要  
⇒ 従来法に加え、**網羅的**遺伝子発現プロファイリングからなるトキシコ  
ゲノミクスとそれを活用するインフォマティクスの構築が有効  
◇ 網羅的変動遺伝子情報から、毒性に関わる遺伝子ネットワークの描出を  
可能とするインフォマティクスの開発を推進する必要

これまでのトキシコゲノミクスが「関連した遺伝子のリスト」や「バイオマーカー」等の静的な情報しか提供しない状況を打破し「どのネットワークが反応すると、どのような毒性と直結するか」という**時間的要素を含む動的な因果関係を導き出す**ことを目指す

⇒ 遺伝子発現情報からの毒性予測の精度の格段の向上が見込まれる

→ 自律的な遺伝子発現が認められる概日リズム関連遺伝子に着目し、成熟期マウス肝及び視交叉上核における概日リズムに関わる局所シグナルネットワークの描出の検討 ◇ **機能が既知の遺伝子だけでなく未知のものも対象**

## 概日リズム(サーカディアンリズム)

Circadian: 1959年にHalberg が提唱した  
“約1日の”という意味を持つラテン語由来

狭義：外部環境からの時刻の手がかりを遮蔽した後でも持続する  
自律的に振動する内因性リズム

広義：飲食、光や温度など外的環境因子の影響を受ける周期現象を含む

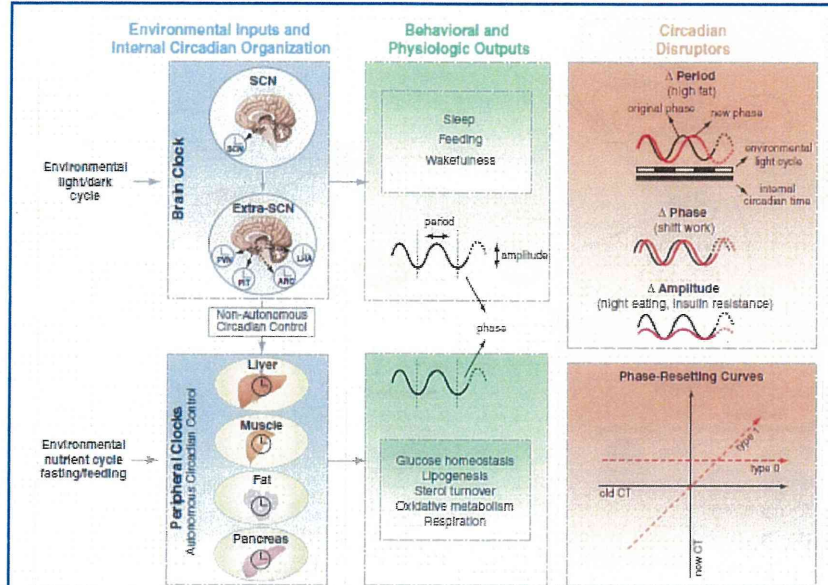
・ 概日リズムのシステムは視床下部にある視交叉上核で約24時間周期のリズムを発生し、末梢臓器に同期のシグナルを送る。末梢臓器を構成する細胞も約24時間周期のリズムを発生している(ヒトでは24.8時間(24.18時間という報告もある)、マウスでは約23時間)。光や温度など外界の刺激によって修正を受ける。  
⇒ 時計遺伝子の転写・翻訳・翻訳後修飾などからなるフィードバック機構によって、周期的な振動が生み出されていることが明らかになってきている

・ 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(= Arntl)等

脂肪細胞にBMAL1 の過剰発現すると、SREBP-1をはじめとする多くの脂質代謝制御転写因子、それらの標的の脂質代謝系の酵素群の発現が誘導される

(棟葉繁紀 (しんば・しげき) 准教授・日本大学薬学部 基礎薬学系衛生化学ユニット)  
「夜に食べると太る」

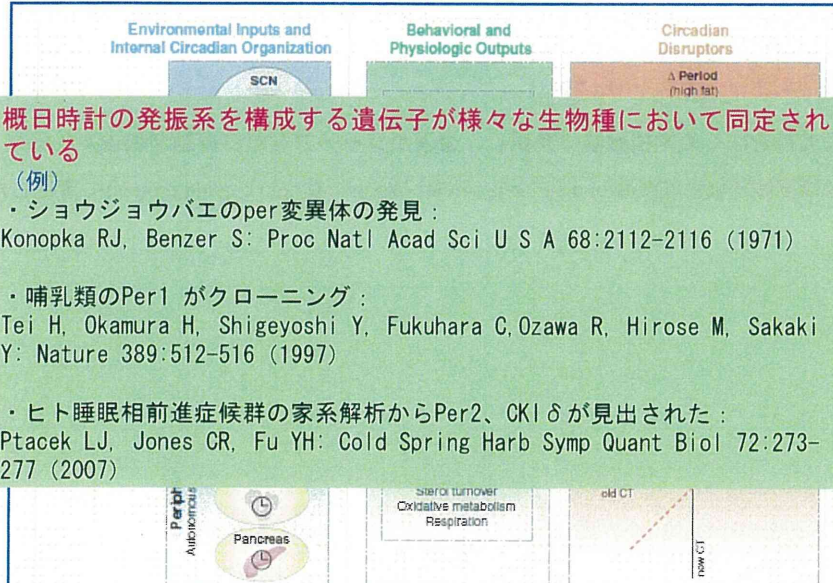
## 概日リズム(サーカディアンリズム)



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)



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.