

3.3.初期係数作成

次の条件を満たす部分一致の場合にプローブ／ターゲット間で、関係があるとみなす。

13塩基以上の連続一致

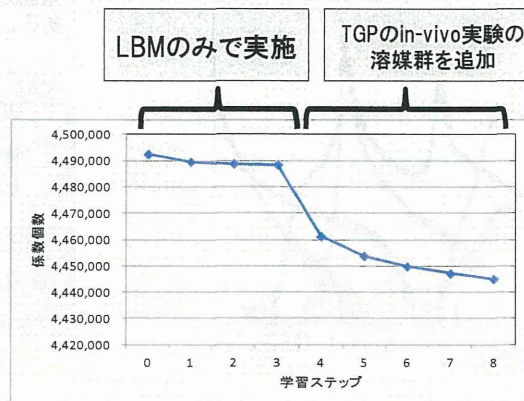
計算対象数を増やさないため、ここで打ち切る。

12塩基の連続一致かつ端を含む一致

ミスマッチプローブと、ターゲットの関係を作る条件。

3.4.係数学習/係数個数推移

係数学習を行い、異常を示した係数を削除していった。

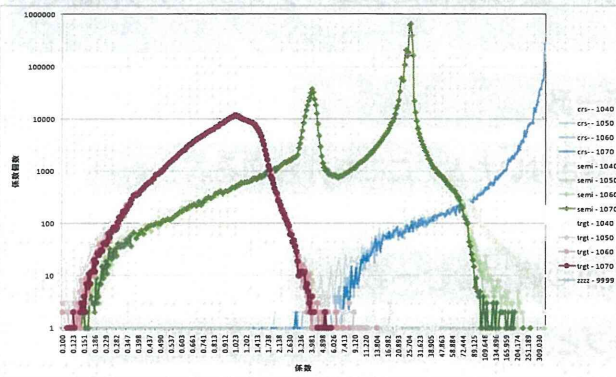


最初は、異常を示した係数が多かったが、徐々に安定していった。

3.4.1.ラット係数学習における係数分布（4週目-7週目）



係数の値に対する個数の分布を種類ごとに示した。



個数の軸が対数なので、確認の際に留意が必要である。

- trgtは、完全特異的關係
- semiは、半特異的關係
- Crsは、非特異的關係
- 1040は、4週目
- 1050は、5週目
- 1060は、6週目
- 1070は、7週目

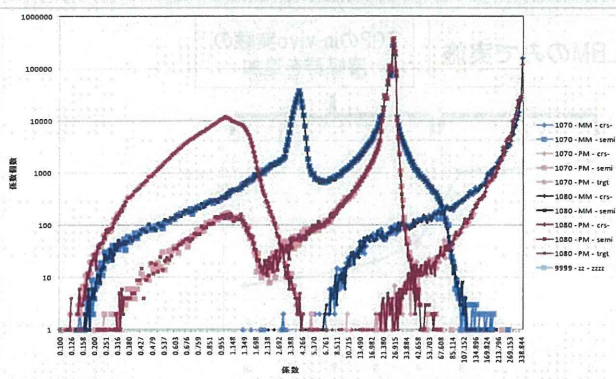
グラフは、学習が進むごとに濃い色で表わしている。各種類の端部分の個数が徐々に少なくなっている。

Copyright(C)2012-2013 NTT DATA Corporation

3.4.1.ラット係数学習における係数分布（7週目-8週目）



係数の値に対する個数の分布を種類ごとに示した。



個数の軸が対数なので、確認の際に留意が必要である。

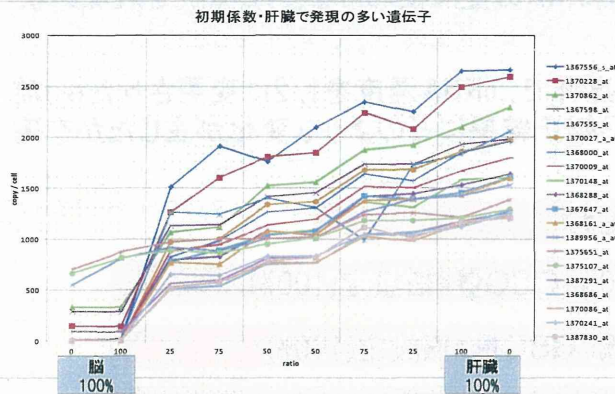
- 1070は、7週目
- 1080は、8週目
- PMは、PMブローブ
- MMは、MMブローブ
- trgtは、完全特異的關係
- semiは、半特異的關係
- Crsは、非特異的關係

グラフは、学習が進むごとに濃い色で表わしている。各種類の端部分の個数が徐々に少なくなっている。

Copyright(C)2012-2013 NTT DATA Corporation

3.4.2.初期係数による補正結果

初期係数を用いた補正計算結果を示す。

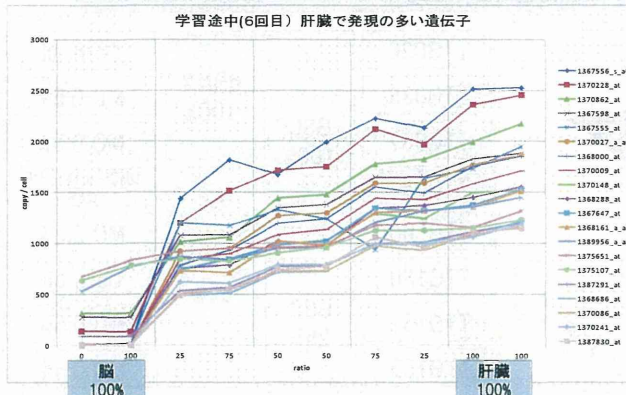


脳100%(肝臓なし)の場合を除けば、おおむね直線を表しているように見える。

Copyright(C)2012-2013 NTT DATA Corporation

3.4.3.学習途中係数による補正結果

学習途中の係数を用いた補正計算結果を示す。



初期係数と比較して、異常係数の削除による悪影響はない。これを、ラット用の係数とする。

Copyright(C)2012-2013 NTT DATA Corporation

4.cRNA量を半減させた前後における差異

極端にcRNA量を減少させた場合には、Langmuir熱平衡方程式の仮定(結合しても自由なRNAの量は変わらない)が満たされない状況となった。

同一臓器(肝臓)、溶媒群で、cRNA濃度を1/2に変更させた(*1)前後において、MLANG補正結果にどのような変化が生じたかを確認する。

次の3パターンを検証した

*1: マイクロアレイの飽和を避けるため

cRNA量=100%、GSC量=旧設定(100%)

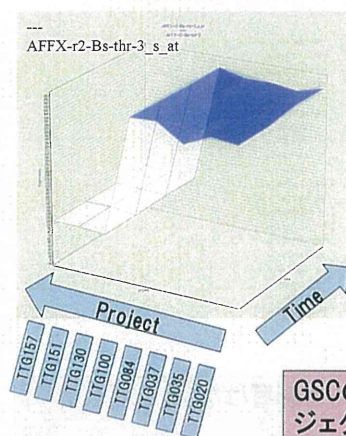
cRNA量=50%、GSC量=旧設定(100%)

cRNA量=50%、GSC量=新設定(25%)(*2)

*2: GSCの飽和を避けるため

4.1.確認を行ったプロジェクト

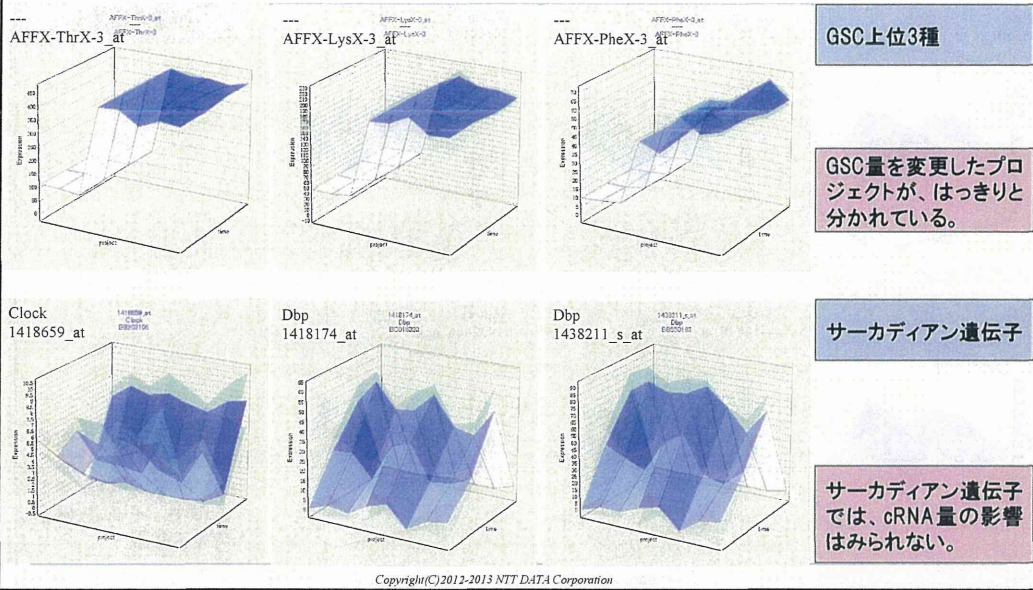
次のプロジェクトを用いて確認を行った。



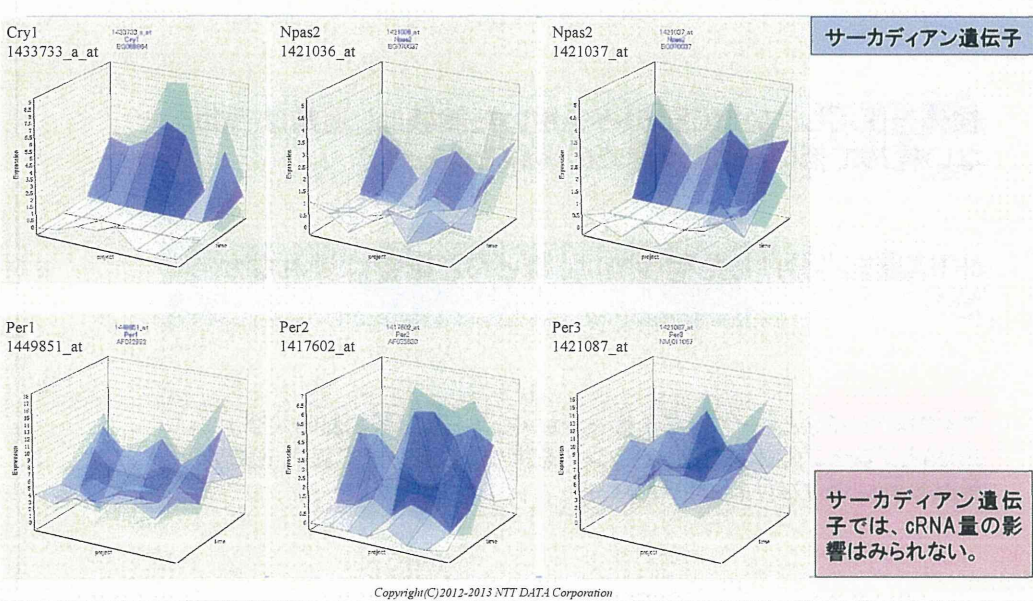
TTG020	GSC 100%	cRNA 100%	Corn oil
TTG035			MC 0.5%
TTG037			MC 0.5%
TTG084			DMSO 0.1% + MC 0.5%
TTG100	GSC 25%	cRNA 50%	MC 0.5%
TTG130			Corn oil
TTG151			MC 0.5%
TTG157			MC 0.5%

GSCのプローブセットであるが、変化を与えたプロジェクトがきちんと表れている。

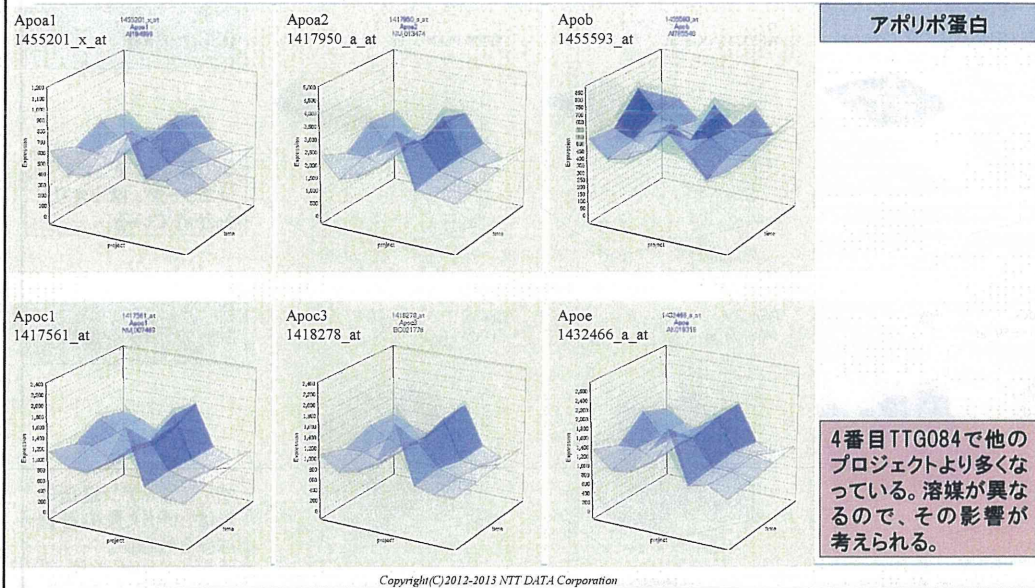
4.2.溶媒群による確認①



4.2.溶媒群による確認②



4.2. 溶媒群による確認③



4.3. cRNA量を半減させた前後における差異の影響

検体を使用しないでGSCのみを用いた実験は、通常は行わない極めて低いcRNA濃度での実験であった。

cRNA量を半分にした程度では、ほとんど影響は表れなかった。

マイクロアレイなどハイブリダイゼーションによる測定系においては、cRNAとプローブの量・濃度はバランスを持って設計されており、極端な濃度変更は避けなければいけない。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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
ー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にインフォマティクス技術開発ー

分担研究課題：「胎児発生過程におけるマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現
ネットワークの網羅的解析」

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

本研究は、先行実施されたPercellomeトキシコゲノミクス研究を基盤に、化学物質による生体影響の分子メカニズムに依拠した網羅的毒性評価手法を構築し、毒性予測と評価の一層の迅速化、高精度化を進めることを目的とする。本分担研究では、自律的な遺伝子発現に着目し、これが多く認められる胎児発生過程に焦点をあて、この過程におけるマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現ネットワークを網羅的に解析することを目的とする。

今年度(平成24年度)は、取得・構築済みの無処置野生型マウス胚・全胚の胎生6.25～9.75日（TIME POINT：12点）の網羅的トランスクリプトームデータを対象に、遺伝子発現変動を1周期と仮定して、周波数解析を実施した。これは、発生過程に於いて重要なマスター遺伝子は一般的に、この期間中に単相性の発現を示し、一群の下流遺伝子に連鎖的な発現を誘発し、特定の形質の形態形成を制御することを利用している。各時点4サンプルのデータを1サンプルずつの4周期に展開し、その周期性を持って、それがマスター遺伝子候補であるか否かの程度を推定するパラメータとする試みである。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。

まず、モデルとして、既知のShh及びNkx2-5遺伝子が関与するシグナルネットワークを選択し、本解析手法の性能評価を検討した。その結果、既知関連遺伝子の多くは検出可能であったが、経時的に離れた関連遺伝子のうち発現パターンが異なるものについての、高調波（ハーモニクス）成分の扱いによる効率の良い抽出についての検討が残った。時系列の決定については、別途に発現の立ち上がり微分値を基に検討し、統合してネットワーク要素の網羅性を確保する試みを開始した。これらの手順を経て、発生過程におけるシグナルネットワークの新たな起点、すなわちマスター遺伝子を見いだす事を含め、遺伝子発現ネットワークを網羅的に解析する事ができるものとする。

A. 研究目的

本研究は、先行実施されたPercellomeトキシコゲノミクス研究を基盤に、化学物質による生体影響の分子メカニズムに依拠した網羅的毒性評価手法を構築し、毒性予測と評価の一層の迅速化、高精度化を進めることを目的とする。本分担研究では、自律的な遺伝子発現に着目し、これが多く認められる胎児発生過程に焦点をあて、この過程におけるマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現ネットワークを網羅的に解析することを目的とする。

先行3年間研究では、分担研究課題：「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」と題し、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遺伝子ネットワークの描出を目的として検討した。このために、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した。マウス胎児、ES細胞における初期発生プロセスや概日変動における自律的な遺伝子発現をモデルとして、トランスクリプトームデータから遺伝子発現ネットワークを描出するための基本的な技術開発を行った。特に概日変動における自律的な遺伝子発現については、遺伝子発現の経時変化の「周期性」に着目し、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行うという、効率的で網羅性の高い結果を得られる方法を見出すことができた。

他方、胎児発生過程における遺伝子発現については、自律的な遺伝子発現が多く認

められる為、遺伝子発現シグナルの流れを解析するのに適しているが、活発な細胞増殖や多様な細胞分化が同時並行で起こるため、従来技術では要素分析が困難であった。そこで本分担研究では、経時データベースを有する胎生6.25～9.75日の遺伝子発現変動を1周期と仮想して、周波数解析を実施することとした。マスター遺伝子は一般的に、生物の個体発生において、他の一群の遺伝子に連鎖的な発現を誘発し、特定の形質の形態形成を制御する遺伝子を指すが、ここでは組織特異的転写因子（組織分化マーカー）、あるいは組織の発生・分化に必須な遺伝子も含むこととした。発生過程でのマスター遺伝子に着目した理由として、多くのマスター遺伝子は頭記の発生期間中に一過性、即ち単相性に発現し、空間的に特定の部位に限局して発現するため、この自律的な経時変化を示す要素のモデルに適している事、加えて、生物の個体発生において、他の一群の遺伝子に連鎖的な発現を誘発し、特定の形質の形態形成を制御する遺伝子であることから、発生関連遺伝子の中でも重要な遺伝子である事が挙げられる。各時点4サンプルのデータを1サンプルずつの4周期に展開し、その周期性を持って、それがマスター遺伝子候補であるか否かの程度を推定するパラメータとする試みである。

本研究ではモデルとして、既知のShh（四肢や、脳・脊髄正中線構造などのデザイン形成に関与）及びNkx2-5遺伝子（心筋前駆細胞マーカーであり、心臓発生過程に関与）が関与するシグナルネットワークを選択し、本解析手法の性能評価を検討した。

B. 研究方法

無処置野生型マウス胚・全胚の網羅的トランスクリプトームデータ：

C57BL/6CrSlc マウス(日本エスエルシー)を実験に用いた(プラグが確認された日の15時を胎生0.5日とした)。経時的にサンプリングした各ステージのマウス胚(全胚、ただし卵黄嚢膜は除去した)を1腹分プールしたRNAサンプルを用い、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[胎生6.25-9.75日](TIME POINT:12点)を作製した。マウス胚は、直接、1%の2-メルカプトエタノール含有RLTバッファー(QIAGEN社)に変性・溶解させた。RLTバッファーは、RNeasyキット(QIAGEN社)に含まれる。

Total RNA の分離精製

RNA抽出にあたっては、サンプルの入ったRLT buffer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。

全胚サンプルについては、2段階増幅によりcDNAを得た。すなわち、全RNAの100ngにとり、T7プロモーターの付加したオリゴdTプライマーを用い逆転写しcDNAを得、2本鎖とした後、T7 RNAポリメラーゼ(Ambion社)を用いてcRNAを合成(この段階ではビオチン化塩基は用いない)した(増幅1回

目)。そのcRNAを鋳型にrandom primerを用いて逆転写してcDNAを得、2本鎖にし、T7 RNAポリメラーゼ(ENZO社)を用い、ビオチン化CTP, UTP共存下cRNAを合成し、断片化した後、GeneChipへのハイブリダイゼーションに供した。

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。

各時点4サンプルのデータを1サンプルずつの4周期に展開し、その周期性を持って、それがマスター遺伝子候補であるか否かの程度を推定するパラメータとした。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。これらのデータ解析は当方で開発したソフトウェアMFWaveanalyzer等を使用して実施した。

whole mount ISH

当該プローブセット(ps)についてGeneChipにて使用している塩基配列を調べ、その配列を基に、ジゴキシゲニンでラベル

した dNTP を用いて RNA プローブを作製した。作製した RNA プローブを用いて、固定後プロテナーゼ K 処理したマウス胚とハイブリダイゼーションをおこない、検出は抗ジゴキシゲニン抗体、発色は BM purple でおこなった。

(倫理面への配慮)

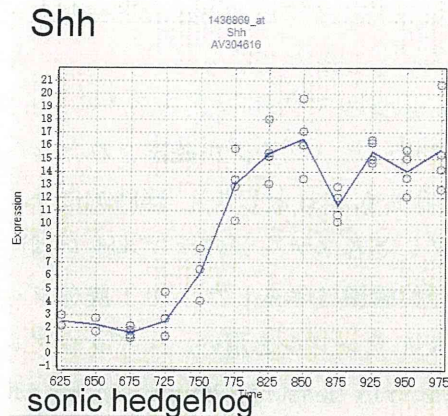
動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程 (平成 19 年 4 月版)」。

C. 研究結果及び考察

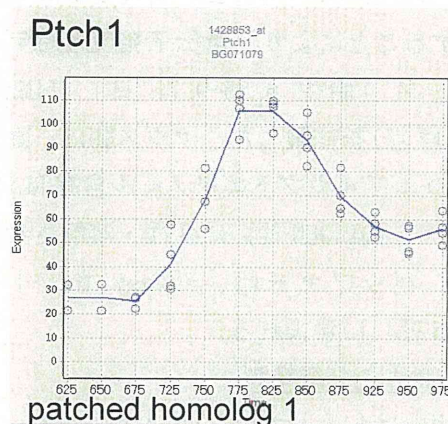
C-1: Shh 遺伝子を基とした解析:

モデルとして、先ずシグナルネットワークが、ある程度既知の Shh 遺伝子を選択した。このネットワークには、Ptch1、Smo、Gli 遺伝子が関与する。胎生 6.25 から 9.75 日の無処置野生型マウス・全胚 RNA サンプルから得た遺伝子発現経時データベース (TIME POINT: 12 点) をにおける、Shh 関連遺伝子の発現変動を図 1 に示す。Shh 遺伝子は、胎生 7.25 日から急速に発現が増加しはじめ、胎生 8.50 日でピークを示す発現パターンを示す。

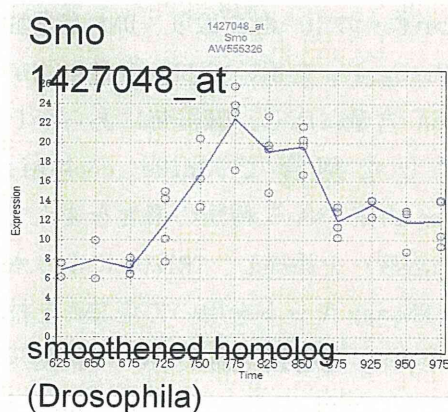
Shh



Ptch1



Smo



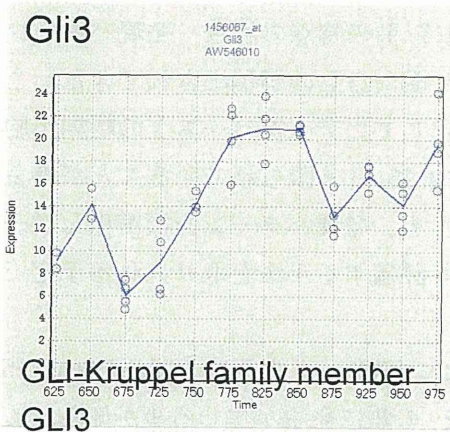
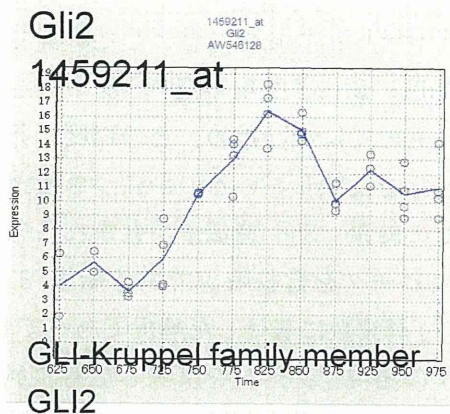


図2 無処置野生型マウス・全胚における Shh 遺伝子の発現

図1 無処置野生型マウス・全胚遺伝子発現経時データベースにおける Shh 関連遺伝子 (Ptch1、Smo、Gli 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=2~4)。縦軸は、発現コピー数、横軸は胎齢 (各胎生 6.25、6.50、6.75、7.25、7.50、7.75、8.25、8.50、8.75、9.25、9.50、9.75 日) を表す。

この Shh 遺伝子の胎生 9.5 日胚における発現を whole mount ISH により可視化したものを図 2 に示す。既に報告されている通り、脊索に発現が認められる。

次いで、胎児の遺伝子発現経時データベース (TIME POINT : 12 点) が存在する胎生 6.25 から 9.75 日の 3.50 日間を 1 周期と仮想し、周期性を検討する為に、データベース中の全ての遺伝子発現変動を、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、胎生 6.25 から 9.75 日 (3.50 日間) の胎児の遺伝子発現経時データベースを四分し、4 周期 (= 14 日間) として扱った。その結果、Shh 遺伝子の発現変動の波長分布は 3.50 日間周期を中心に、1.75 時間周期等の要素も存在していた (図 3)。

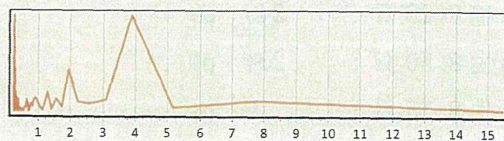


図 3 無処置野生型マウス胚・全胚の網羅的トランスクリプトームデータ (胎生 6.25 から 9.75 日) における Shh 遺伝子の発現変動の波長分布

横軸は各波長 (単位: 日) を、縦軸は最大要素の振幅を基準とした相対値を表す。3.50 時間周期を中心に、1.75 時間周期等の要素も存在していた。

標準化 (normalize) した波長分布について Shh 遺伝子を基としたピアソン相関解析をおこない、Shh シグナル関連遺伝子 (Ptch1、Smo、Gli 遺伝子) が皆、含まれるような相関係数を検討したところ、相関係数が 0.9 以上という条件で、既知の Shh シグナル関連遺伝子が抽出されてくることがわかった。この相関係数の条件により、7,039 ps の遺伝子が抽出されてきた。この遺伝子につき、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かえ、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。下記に、発現ピークを示す時点ごとに遺伝子数を記す。

胎生 6.25 日 :	460 ps
胎生 6.50 日 :	2,714 ps
胎生 6.75 日 :	55 ps
胎生 7.25 日 :	13 ps
胎生 7.50 日 :	235 ps
胎生 7.75 日 :	2,813 ps
胎生 8.25 日 :	249 ps
胎生 8.50 日 :	234 ps
胎生 8.75 日 :	0 ps
胎生 9.25 日 :	80 ps
胎生 9.50 日 :	5 ps

胎生 9.75 日 : 181 ps

周波数解析は周波数に着目した解析であり、直接、遺伝子発現の経時パターンを反映したものではないため、どの程度、発現パターンを反映しているのかにつき検討した。その結果、Shh 遺伝子が含まれる発現の最大ピークを含む時点である胎生 8.50 日では、周波数に着目した解析であっても、遺伝子の発現パターンを反映したものが抽出できていることがわかった。他方、胎生 8.5 日以前の時点の場合、発現パターンがかなり異なるものが抽出されてきた。この原因として、データベース上の時期が胎生 6.25-9.75 日と限られていることが考えられたため、発現パターンを標準化しピーク特性を評価する手法を取り入れる予定である。

次に、Shh シグナルは「Shh→Ptch1→Smo→Gli」の順に発現が生じる事が知られているため、この確認のため、これらの Shh 関連遺伝子は、発現の最大ピークを示すどの時点に分類されているのかにつき検討した。その結果、発現のピークを示す時点は、逆となり、具体的には、Shh 遺伝子が胎生 8.50 日に、Gli2 及び Gli3 遺伝子は胎生 8.25 日に、Ptch1、Smo 遺伝子は胎生 7.75 日となった。したがって、発現の最大ピークだけを指標に分類し、解析していく手法では不十分であることが明らかとなった。転写過程では、発現ピークを与える時点よりも、発現の開始時期の方が重要であるため、発現の立ち上がりの勾配 (微分値等) を考慮すれば解決する可能性が高いものと考えられ、これらについての微分及び 2 回微分を Whole Embryo および ES・EB 検体につい

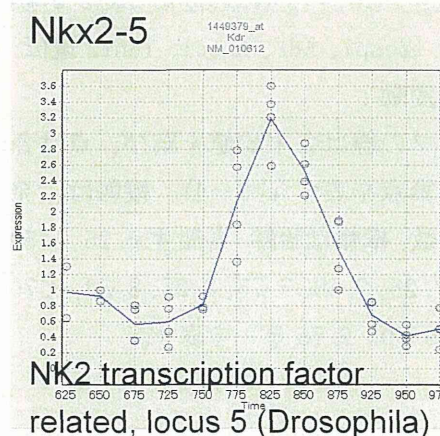
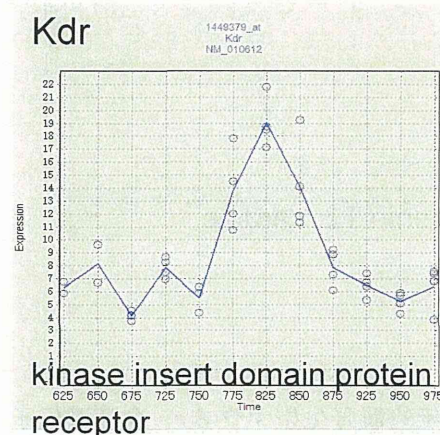
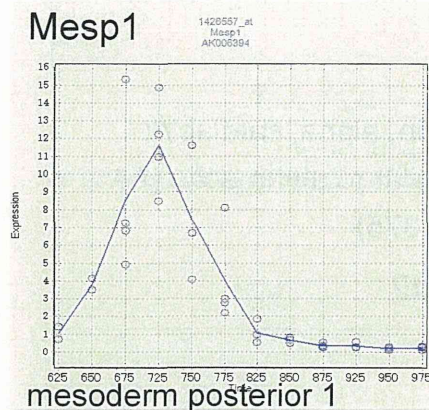
て試験的に検討した(文末参考図1)。暫定的結論として、Shh系は既存情報による発現順番と異なる因子(Ihh遺伝子[Zhang XM et al, Cell 106: 781-792, 2001]等、文末参考図2)があること、マイクロアレイのクロスハイブリダイゼーションによる誤差の可能性があることなど、さまざまな要因が指摘される可能性があり、今後、ISHとの対比を含む確認作業が必要であると考えられた。

加えて、この発現の最大ピークを示す時点による分類リストを用いても、本手法によりシグナルネットワークを検索できるか否かにつき検討した。Shh関連遺伝子の発現ピークを与える時点以降の胎生9.25日に発現の最大ピークを示す遺伝子(80 ps)について、Shhシグナルとの関連をPubMedを用いて検索した。その結果、Irs1(insulin receptor substrate 1)およびCp(ceruloplasmin)遺伝子といった、2つの新たなShh関連遺伝子を見いだす事ができた。今後、これらの発現の局在を検討する為にも、wholemout ISHならびにin silicoのプロモーター解析を組み合わせ、抽出精度の向上を計る。

C-2: Nkx2-5 遺伝子を基とした周波数解析:

続いてモデルとして、シグナルネットワークが、ある程度既知のNkx2-5遺伝子を選択した。このネットワークには、Mesp1、Kdr、Actc1、Tnnt2遺伝子が関与する。胎生6.25から9.75日の無処置野生型マウス・全胚RNAサンプルから得た遺伝子発現経時データベース(TIME POINT: 12点)をにおける、Nkx2-5関連遺伝子の発現変動を図4に示す。

Nkx2-5 遺伝子は、胎生 7.50 日から急速に発現が増加しはじめ、胎生 8.25 日でピークを示す発現パターンを示す。



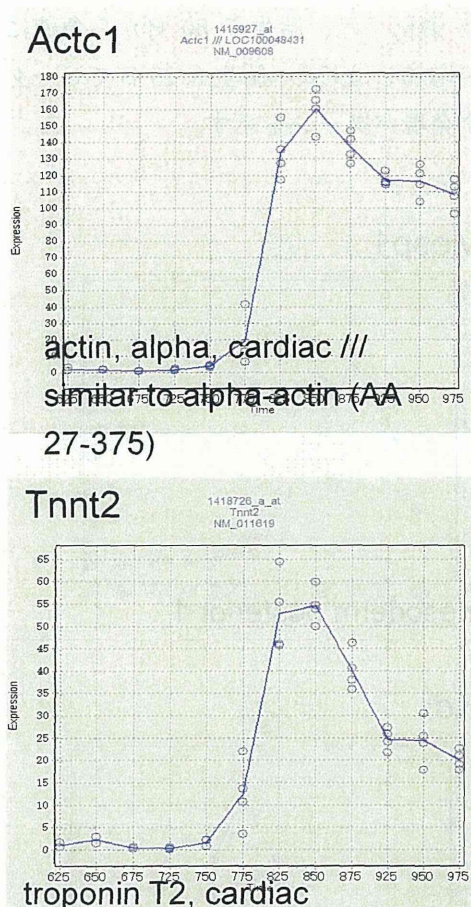


図4 無処置野生型マウス・全胚遺伝子発現経時データベースにおける Nkx2-5 関連遺伝子 (Mesp1、Kdr、Actc1、Tnnt2 遺伝子) の発現変動：

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=2~4)。縦軸は、発現コピー数、横軸は胎齢 (各胎生 6.25、6.50、6.75、7.25、7.50、7.75、8.25、8.50、8.75、9.25、9.50、9.75 日) を表す。

この Nkx2-5 遺伝子の胎生 8.75 日胚における発現を whole mount ISH により可視化したものを図 5 に示す。既に報告されている

通り、心臓前駆細胞に発現が認められる。

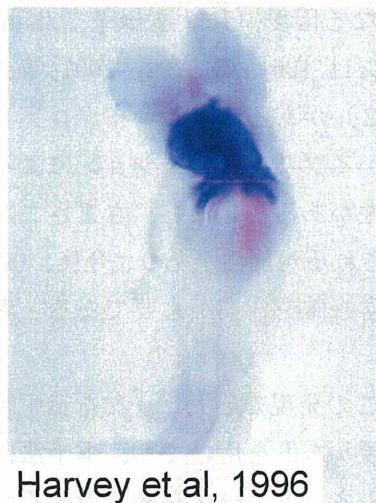


図5 無処置野生型マウス・全胚における Nkx2-5 遺伝子の発現

次いで Shh 関連ネットワークでの検討と同様に、胎児の遺伝子発現経時データベース (TIME POINT: 12 点) が存在する胎生 6.25 から 9.75 日の 3.50 日間を 1 周期と仮想し、周期性を検討する為に、データベース中の全ての遺伝子発現変動を、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、胎生 6.25 から 9.75 日 (3.50 日間) の胎児の遺伝子発現経時データベースを四分し、4 周期 (= 14 日間) として扱った。その結果、Nkx2-5 遺伝子の発現変動の波長分布は 3.50 日間周期を中心に、1.75 時間周期等の要素も存在していた (図 6)。

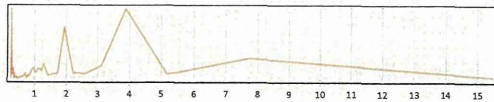


図 6 無処置野生型マウス胚・全胚の網羅的トランスクリプトームデータ（胎生 6.25 から 9.75 日）における Nkx2-5 遺伝子の発現変動の波長分布

横軸は各波長（単位：日）を、縦軸は最大要素の振幅を基準とした相対値を表す。3.50 時間周期を中心に、1.75 時間周期等の要素も存在していた。

標準化(normalize)した波長分布について Shh 遺伝子を基としたピアソン相関解析をおこない、Nkx2-5 関連遺伝子 (Mesp1、Kdr、Actc1、Tnnt2 遺伝子) が皆、含まれるような相関係数を検討したところ、相関係数が 0.81 以上という条件で、これらの Nkx2.5 シグナル関連遺伝子が抽出されてくることがわかった。この相関係数の条件により、25,254 ps の遺伝子が抽出されてきた。この遺伝子数は、マイクロアレイ上の全 ps の約半数であり、このままの解析手法では不十分であることが明らかとなった。この原因は、関連遺伝子 Actc1 はアクチンであり細胞骨格であるが、この発現パターンが Nkx2-5 とは異なり、発現が維持されているためと考えられた。発現誘導のシグナルネットワークを考える場合、細胞骨格等の細胞構造物の遺伝子、あるいは feed back 機構により別の発現制御を受ける等の場合には、発現の最大ピーク後の発現変動を考慮しない方が良い可能性が高いものと考え

られた。すなわち、発現の立ち上がりの勾配（微分値等）を考慮すれば解決する可能性が高いものと考えられた。

Actc1 遺伝子を除いた場合、相関係数が 0.91 以上という条件で、これらの Nkx2.5 シグナル関連遺伝子が抽出されてくることがわかった。この相関係数の条件により、3,319 ps の遺伝子が抽出されてきた。この遺伝子につき、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かえ、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。下記に、発現ピークを示す時点ごとに遺伝子数を記す。

胎生 6.25 日 :	292 ps
胎生 6.50 日 :	1,150 ps
胎生 6.75 日 :	8 ps
胎生 7.25 日 :	3 ps
胎生 7.50 日 :	16 ps
胎生 7.75 日 :	1,364 ps
胎生 8.25 日 :	280 ps
胎生 8.50 日 :	139 ps
胎生 8.75 日 :	0 ps
胎生 9.25 日 :	14 ps
胎生 9.50 日 :	3 ps
胎生 9.75 日 :	50 ps

周波数解析は周波数に着目した解析であり、直接、遺伝子発現の経時パターンを反映したものではないため、Shh 関連遺伝子での検討と同様に、どの程度、発現パターンを反映しているのかにつき検討した。その結果、Nkx2-5 遺伝子が含まれる発現の最大ピークを含む時点である胎生 8.25 日では、周波数に着目した解析であっても、遺

伝子の発現パターンを反映したものが抽出できていることがわかった。また、周波数が半分のものも比較的多く抽出されてきた

他方、データベース上の発生時期の両端に近い時点（胎生 6.25、6.50、9.50、9.75 日）の場合、発現パターンがかなり異なるものが抽出されてきた。この原因として、データベース上の時期が胎生 6.25-9.75 日と限られていることが考えられたため、発現パターンを標準化しピーク特性を評価する手法を取り入れる予定である。

次に、Nkx2-5 シグナルは「Mesp1→Kdr→Nkx2-5→Actc1/Tnnt2 遺伝子」の順に発現が生じる事が知られているため、この確認のため、これらの Nkx2-5 関連遺伝子は、発現の最大ピークを示すどの時点に分類されているのかにつき検討した。その結果、発現のピークを示す時点は、Mesp1 遺伝子は胎生 7.25 日、Nkx2-5 および Kdr1 遺伝子は胎生 8.25 日、Tnnt2 遺伝子は胎生 8.50 日となり、一応、タイミング通りとなったが、実際の各遺伝子の機能のタイミングと比べ、異なる事が示唆された。したがって、Shh シグナル関連遺伝子での検討時と同様に、発現の最大ピークだけを指標に分類し、解析していく手法では不十分であることが明らかとなった。この場合も、発現の立ち上がり勾配（微分値等）を考慮すれば解決する可能性が高いものと考えられ、これについても、微分及び 2 回微分を Whole Embryo および ES・EB 検体について試験的に検討した（文末参考図 3）。暫定的結論として、Mesp1 を最上流とする nkx2-5 を含む系は観測期間内に収まっており、既存情報と整合性のある結果を示したと考えられた。今後、さらに ISH 等との整合性を含めた確

認および、これ以外のネットワーク構成因子の抽出をすすめる予定である。

発現の最大ピークを示す時点による分類リストを用いて、本手法によりシグナルネットワークを検索できるか否かにつき検討した。Nkx2-5 関連遺伝子の発現ピークを与える時点以降の胎生 8.50 日に発現の最大ピークを示す遺伝子 (139 ps) について、Nkx2-5 シグナルあるいは心臓発生との関連を PubMed を用いて検索した。その結果、Mybpc3

(myosin binding protein C, cardiac) および Tpm1 (tropomyosin 1, alpha) 遺伝子といった、2 つの心筋の細胞骨格遺伝子を見いだした。今後、これらの微分による解析法の適用、発現の局在を検討する wholemount ISH ならびに in silico のプロモーター解析を組み合わせて、抽出精度の向上を計る。

D. 結論

今年度(平成 24 年度)は、取得・構築済みの無処置野生型マウス胚・全胚の網羅的トランスクリプトームデータを対象に、胎生 6.25~9.75 日 (TIME POINT: 12 点) の遺伝子発現変動を 1 周期と仮想して、周波数解析を実施した。マスター遺伝子は一般的に、生物の個体発生において、他の一群の遺伝子に連鎖的な発現を誘発し、特定の形質の形態形成を制御する遺伝子を指すが、ここでは組織特異的転写因子 (組織分化マーカー)、あるいは組織の発生・分化に必要な遺伝子も含むこととした。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。モデルとして、既

知の Shh 及び Nkx2-5 遺伝子が関与するシグナルネットワークを選択し、本解析手法の性能評価を検討した。その結果、既知関連遺伝子の多くは検出可能であったが、経時的に離れた関連遺伝子の場合や、遺伝子の機能によっては、発現パターンがかなり異なる傾向があるため、本解析手法そのままでは効率の良い抽出ができなかった。この方策として、発現の立ち上がりの勾配に着目すれば解決する可能性を見だし、微分及び二回微分について暫定的に適用を試みた結果、その有用性が示唆されたことから、今後、それらを含めた条件設定及び抽出パラメータの最適化を検討する予定である。

これらの手法を通して、発生過程におけるシグナルネットワークの新たな起点、すなわちマスター遺伝子を見いだす事を含め、遺伝子発現ネットワークを網羅的に解析する事ができるものとする。

E. 研究発表

1. 論文発表

Igarashi K, Kitajima S, Aisaki K, Tanemura K, Taquahashi Y, Moriyama N, Ikeno E, Matsuda N, Saga Y, Blumberg B, Kanno J

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 37: 373-380, 2012

2. 学会発表

種村健太郎、古川佑介、大塚まき、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、佐藤英明、

菅野 純、発生-発達期の神経シグナルかく乱による遅発中枢影響解析-幼弱期マウスへのイボテン酸投与による成熟期の脳高次機能障害について-、第 39 回日本毒性学会学術年会 (2012. 7. 17)

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、菅野 純、食品の安全性確認に向けた Percellome トキシコゲノミクスの適用-香料エストラゴールの場合-、第 39 回日本毒性学会学術年会 (2012. 7. 17)

北嶋 聡、高橋 祐次、五十嵐 勝秀、相崎健一、菅野 純

Percellome 網羅的定量的トキシコゲノミクス、

平成 24 年度公益社団法人日本実験動物学会 維持会員懇談会(2012. 11. 16)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

なし

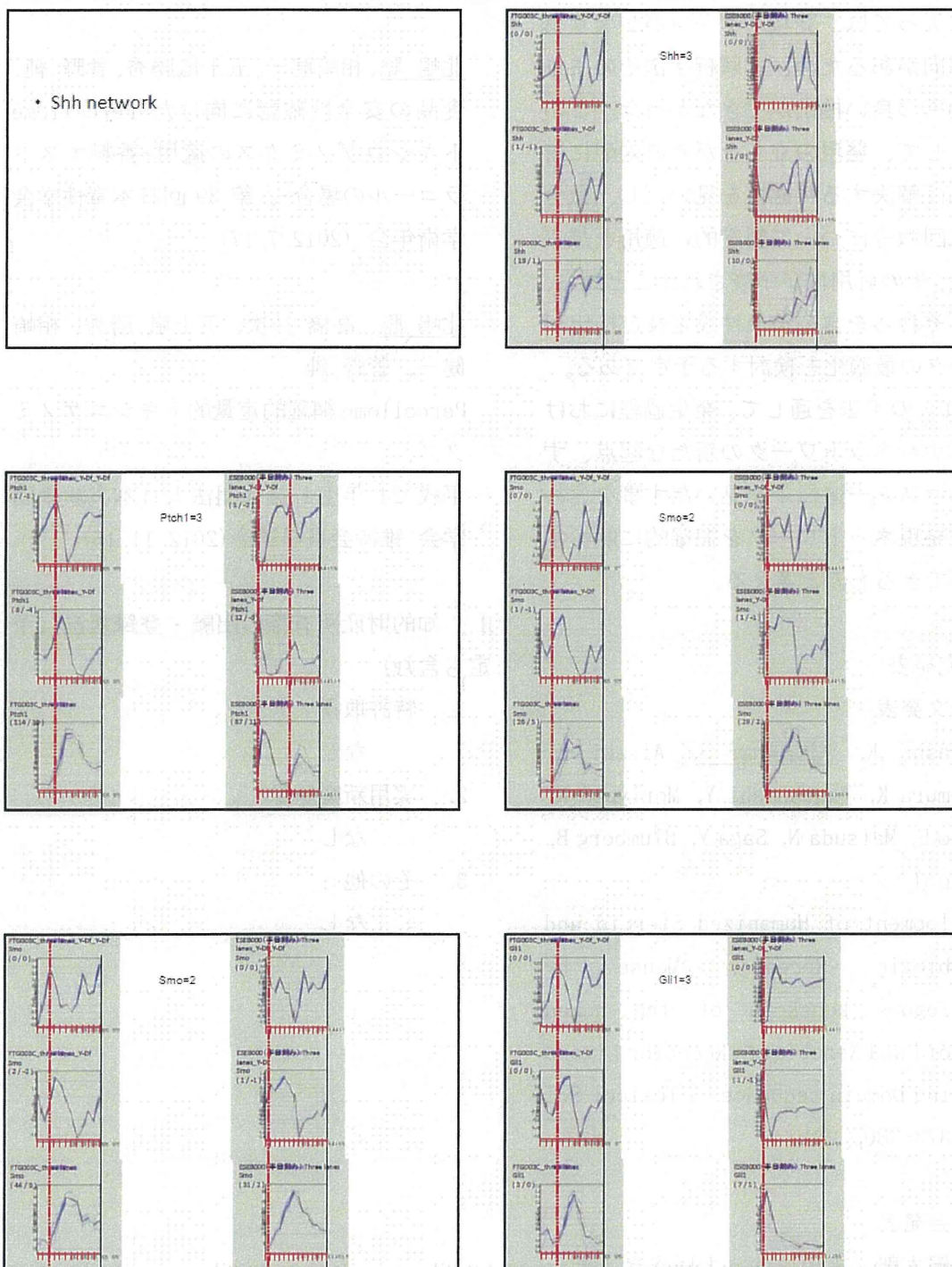
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

参考図1： Shh 系の各遺伝子について、上から二回微分、一回微分、元データを示し、二回微分ピークが元データの立ち上がり時点にほぼ沿うとすることを示す（スプライン関数微分による）。Shh とその下流とされる遺伝子の立ち上がり時点にも逆転がみられた（参考図2参照）。



参考図2： Shh 系を制御する可能性のある Ihh と他の関連遺伝子について、上から二回微分、一回微分、元データを示す（スプライン関数微分による）。Ihh の立ち上がりの時点は Shh とほぼ一致した（参考図1 参照）。

