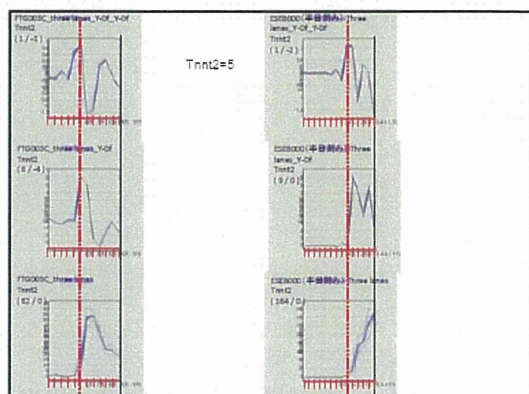
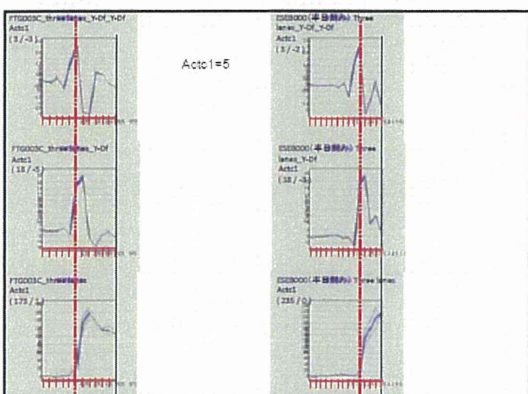
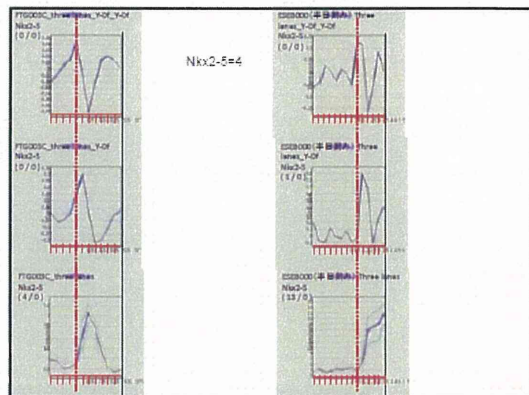
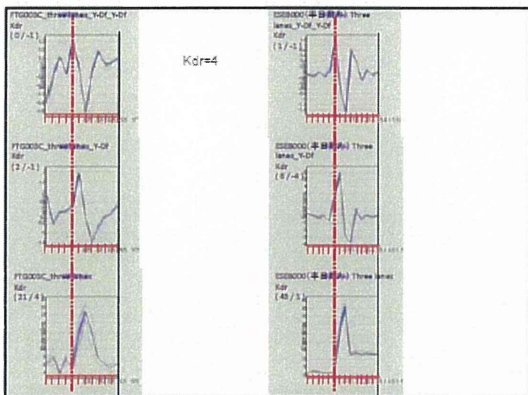
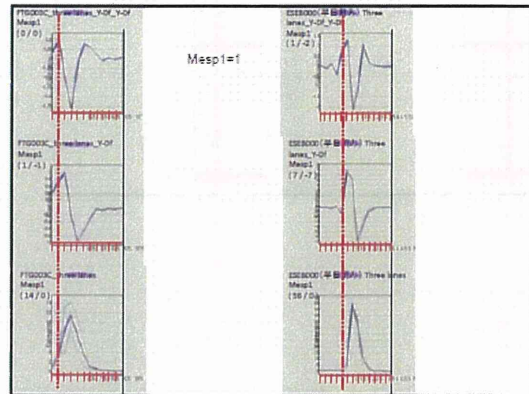
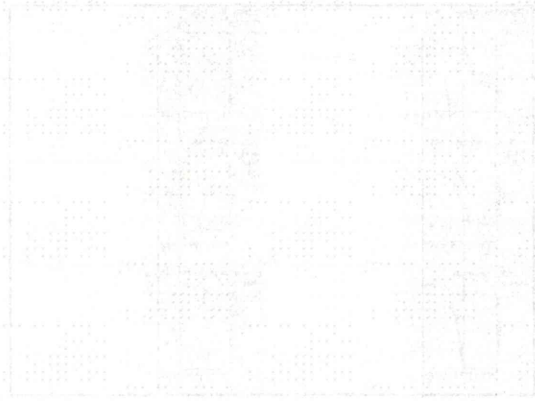
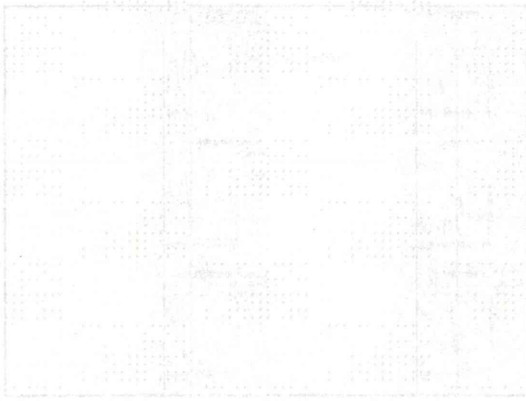
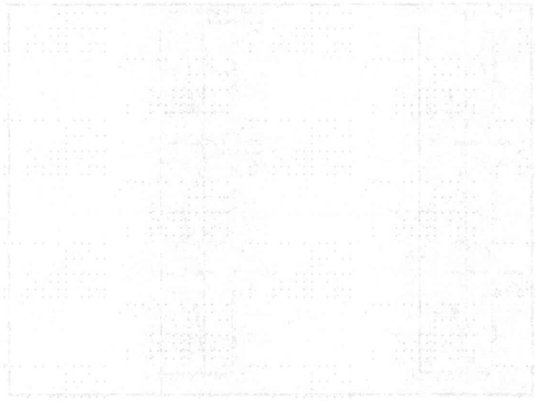
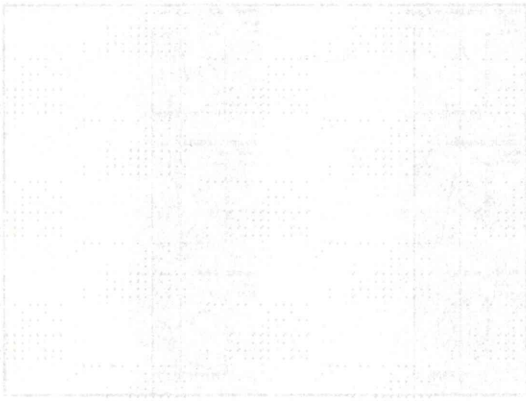
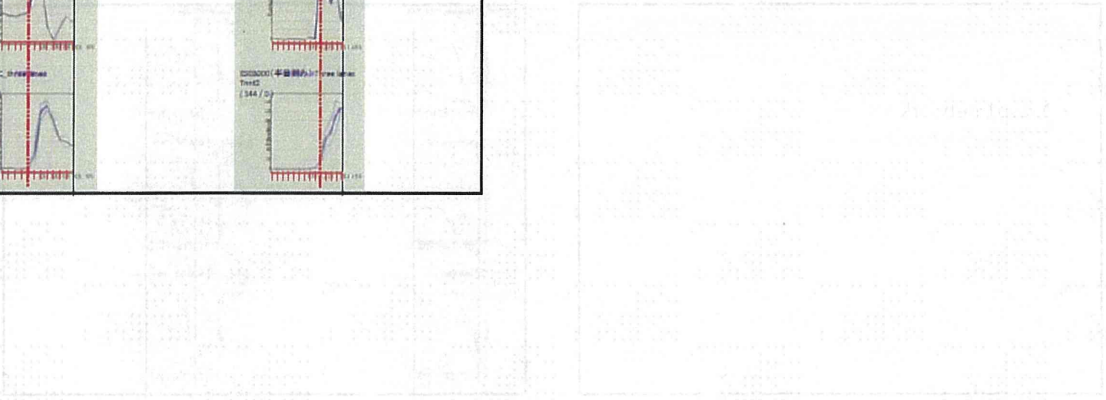
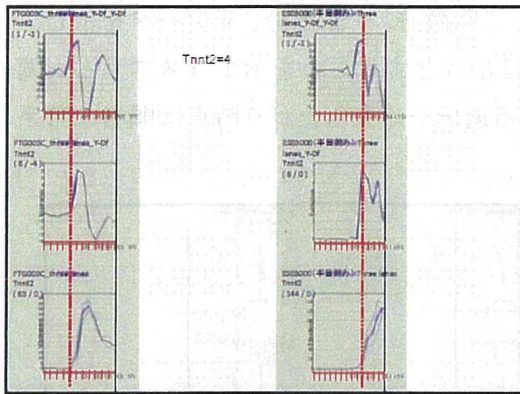


参考図 3 : Mesp1 下流の各遺伝子について、上から二回微分、一回微分、元データを示し、二回微分ピークが元データの立ち上がり時点にほぼ沿うとすることを示す (スプライン関数微分による)。Mesp1 を最上流にその下流とされる遺伝子の立ち上がり時点は順当な時系列を示した。

• Mesp1 network





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

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

— 自律的な遺伝子発現に着目し、これが多く認められる発生過程に焦点をあて、
この過程での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 —

- ・胎児発生過程 = 自律的な遺伝子発現が多い
連続性のある遺伝子発現変動現象として長時間にわたるものであり、
遺伝子発現シグナルの流れを解析するのに適している
→ 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、
要素分析が困難
- 先行研究にて確立した局所ネットワーク描出技術を検討

平成24年度：
胎児発生過程における複雑なトランスクリプトームからのマスター遺伝子の網羅的抽出

平成25年度：
マスター遺伝子を基軸とした関連遺伝子の連鎖的捕捉

平成26年度：
胎児発生過程に関与する遺伝子発現ネットワーク情報の網羅的導出

先行研究

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

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

先行研究 局所シグナルネットワークの描出の効率化を計る

周期性に着目した 概日変動リズム関連遺伝子Dbpの局所ネットワークの描出 —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—

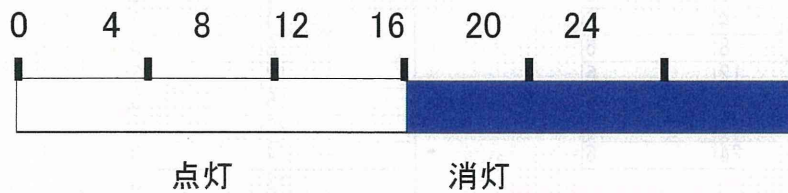
- ・周期性を検討する為に、遺伝子発現変動をフーリエ変換した
[解析ソフト:MF Wave analyzerを利用]
→この波長分布について当該遺伝子を基としたピアソン相関解析
- ・Dbp遺伝子を基準に異なる位相、即ち発現ピークがDbp遺伝子とは異なる時刻に現れる周期性遺伝子を抽出
⇒[結論] Dbp遺伝子と同じ波長分布や位相が異なるものだけでなく、1/2日周期成分を含む概日遺伝子も網羅性をもって同時に抽出できた

- ・無処置成熟期マウス肝の遺伝子発現変動の経時データベース
= [Time point:7点(4時間毎:0, 4, 8, 12, 16, 20 and 24h), n = 6]
→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。
- ・得られたgene listを、解析ソフトRSortを用いて各時点毎に並び替えし、解析ソフトMF Surfaceを用いて目視により、変動が生物学的変化と考えられるgene listを各時点毎に抽出
[Dbp遺伝子は点灯8時間後に発現ピークをもつ(48時間配置では8及び20時間後)]

先行研究
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/6N CrSlc (♂)12週齢 [個別飼いで3週間馴化]

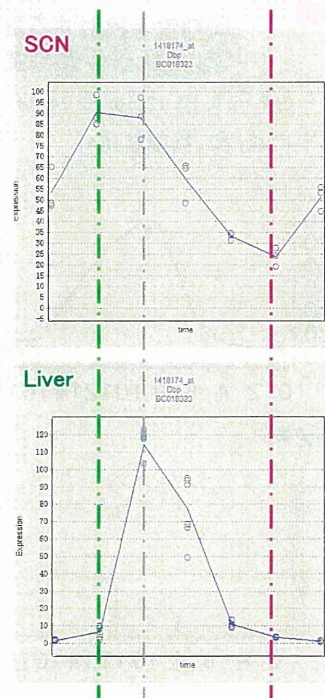


ご協力: 近畿大学大学院医学研究科生理学系解剖学教授 重吉康史 先生

先行研究

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



先行研究

Dbp遺伝子[概日変動リズム1周期(=24時間)]の発現変動を2周期(=48時間)とする雛形作成の際の、各時点でのサンプル配置方法

無処置成熟期マウス肝の遺伝子発現変動の経時データベース
 = [Time point: 7点 (4時間毎; 0, 4, 8, 12, 16, 20 and 24h), n = 6]

サンプル番号順で前半・後半の各3例に分割(0時間は6例のまま)
 ← 採取時も各3例ずつ2回に分けてサンプリング

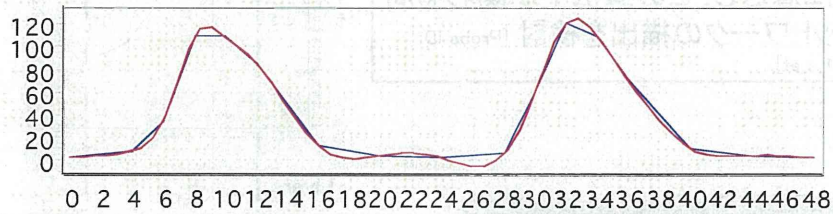


先行研究

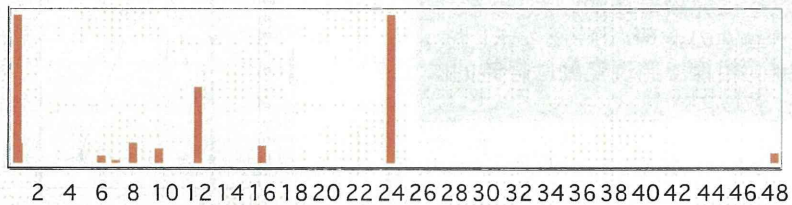
周期性を検討する為に MF Wave analyzer を利用し、
 Dbp遺伝子の発現変動をフーリエ変換した

0, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 30, 32, 34, 36, 40, 44 and 48h (17 time points)

スプライン計算 [補関数: 64]



波長分布



先行研究

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、
RSortで経時的に並びかえ(24時間のフォーマットで)、MF Surface上で
目視により、変動が生物学的変化と考えられるgene listを各時点毎に抽出

結果

0 or 24h	→	43 ps
4h	→	37 ps
8h	→	90 ps [含Dbp 2 ps]
12h	→	176 ps
16h	→	73 ps
20h	→	41 ps

総計 → 460 ps [含Dbp 2 ps]

Setting:

Explore Direction: Peak>>>Valley
Posi,Intermed,Nega:全てcheck

24時間周期のもののみ抽出された

← 4,635 ps

- ・Dbp遺伝子と同じ波長分布を示す遺伝子が抽出できた
- ・位相の異なる遺伝子も同時に効率よく抽出できた

先行研究

得られた遺伝子リストには、多くの時計遺伝子が含まれていた

0 or 24h	→	Arntl(=Bmal1)、Npas2、LOC100046232 /// Nfil3
4h	→	該当なし
8h	→	Dbp、Nr1d1(=Rev-erba-alpha)、 Nr1d2、Ppara
12h	→	Per1、Per3
16h	→	Per2
20h	→	Cry1、Rorc

※Clock, Bhlhb2, Bhlhb3,
Rora, Rorbなどはリストになし
⇨肝では、発現の顕著な概日リズム変動
は認められなかった

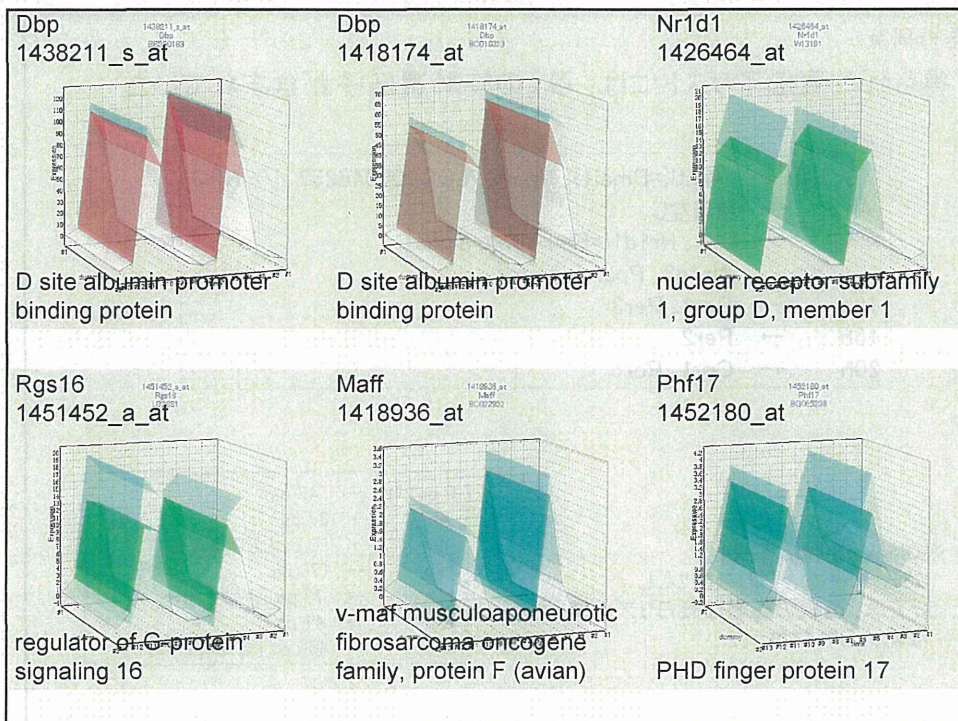
0 or 24h	→	43 ps
4h	→	37 ps
8h	→	90 ps [含Dbp 2 ps]
12h	→	176 ps
16h	→	73 ps
20h	→	41 ps
総計	→	460 ps [含Dbp 2 ps]

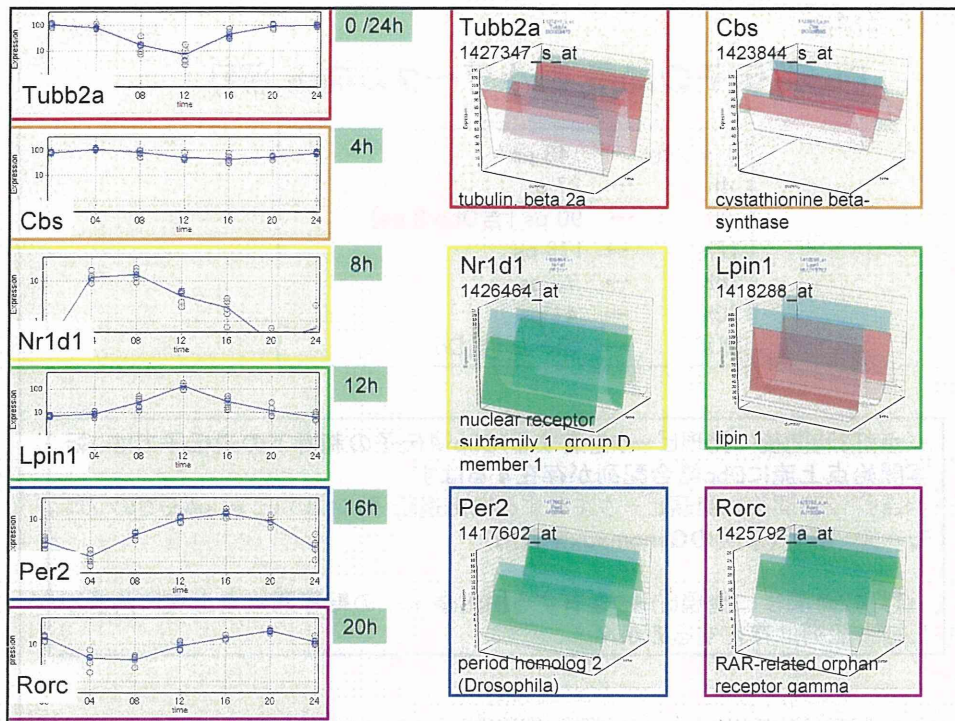
先行研究

抽出された遺伝子の発現変動の一例 [48時間表示]

8h [含、Dbp]

0 or 24h	→	43 ps
4h	→	37 ps
8h	→	90 ps [含Dbp 2 ps]
12h	→	176 ps
16h	→	73 ps
20h	→	41 ps
総計	→	460 ps [含Dbp 2 ps]





先行研究

Dbp遺伝子と似た経時変化を示す遺伝子の抽出

— 90 ps [含Dbp 2 ps] (72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: 9遺伝子

: Rgs16, Ppara, Ppargc1b, Nr1d2, Nr1d1, Junb, Cirbp, 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

(Dbp遺伝子の発現パターンを雛形とした、以前の解析法では、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、Nr1d1遺伝子の4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9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

点灯12時間後

先行研究

Dbp遺伝子の局所ネットワークの描出 [肝]

0 or 24h	→	43 ps
4h	→	37 ps
8h	→	90 ps [含Dbp 2 ps]
12h	→	176 ps
16h	→	73 ps
20h	→	41 ps
総計	→	460 ps [含Dbp 2 ps]

・(点灯8時間後に発現ピークを有する)Dbp遺伝子の制御下の遺伝子では、転写開始点上流にDbp結合配列が存在するはず
⇒点灯12時間後に発現ピークを有する抽出遺伝子について、*in silico*でのプロモーター解析(市販のGenomatixを利用)

・点灯12時間後に発現ピークを有する抽出遺伝子の転写開始点上流に共通した結合配列は存在するのか？

Dbp遺伝子の局所ネットワークの描出 [肝]

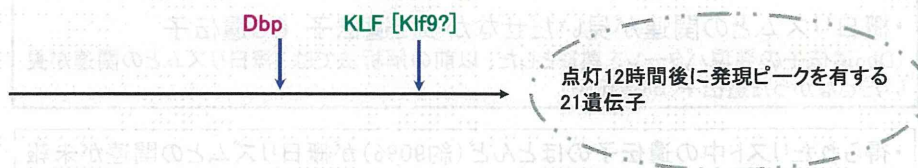
先行研究

*in silico*でのプロモーター解析のまとめ

点灯12時間後に発現ピークを有する遺伝子の
転写開始点上流に共通した結合配列の有無

Dbp結合部位を有するもの

35遺伝子中21遺伝子



35遺伝子中14遺伝子

Dbp結合部位を有しないもの

KLF [Klf9?]

