

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8時間後にピークを有する遺伝子

KLF [Klf11?]

点灯4時間後に発現ピークを有する
遺伝子

Dbp, Klf9遺伝子、及び
点灯8時間後に発現ピークを有する
遺伝子

点灯12時間後にピークを有し、Dbp結合部位を有するもの

Dbp

KLF [Klf9?]

点灯12時間後に発現ピークを有する
14遺伝子

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ために、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)]

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
- ◇ 先行研究にて利用した周波数解析による局所ネットワーク描出技術の
適用拡大を検討

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

マスター遺伝子

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

代表的なマスター遺伝子：
体の位置情報を制御するHox遺伝子、
筋肉の発生を制御するMyoD遺伝子、
中枢神経の発生を制御するPax遺伝子、
眼の形成にかかわるPax6遺伝子

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する

特徴：
[時間的に]一過性に発現し、[空間的に]特定の部位に限局して発現することが多い

マスター遺伝子

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

特徴:

[時間的に]一過性に発現し、[空間的に]特定の部位に限局して発現することが多い

一例

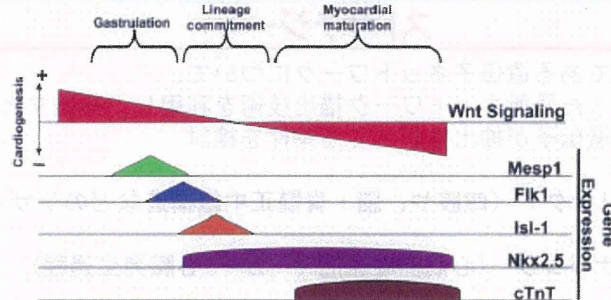


Figure 1. The Biphasic Effect of Wnt Signaling in Cardiac Mesoderm Induction and Myocardial Differentiation

The role of Wnt signaling in cardiovascular lineage specification and differentiation is depicted in the context of the expression of mesoderm and cardiac transcription factors during embryogenesis. cTnT, cardiac troponin T.

Wu SM, Mesp1 at the heart of mesoderm lineage specification. Cell Stem Cell 2008 3: 1-2, 2008.

発生過程でのマスター遺伝子に着目した理由

- ・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

- ・マスター遺伝子は一過性に発現し、空間的に特定の部位に限局して発現することが多いため、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

- ・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

※先行研究にて利用した、網羅性を有する、周波数解析による局所ネットワーク描出技術の適用拡大を検討(性能評価)

マスター遺伝子

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

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する

ストラテジー

ある程度既知である遺伝子ネットワークについて、周期性に着目した局所ネットワーク描出技術を利用し、当該マスター遺伝子を含む関連遺伝子が抽出されてくる条件を検討

- ・ Shhシグナリング (四肢や、脳・脊髄正中線構造などのデザイン形成)
- ・ Nkx2.5シグナリング (心筋前駆細胞マーカー、心臓発生過程) :

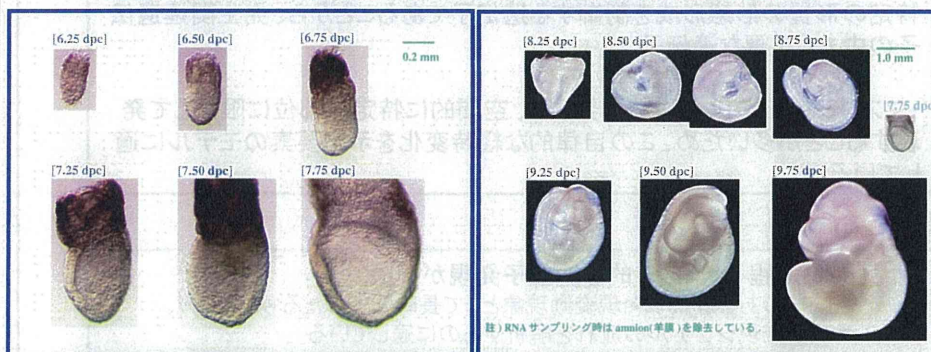
※全胚由来の発現データであるため、機能未知の遺伝子についてはISHIによる発現の局在の確認が必要

→ 網羅性を有する、周期性に着目した局所ネットワーク描出技術の利用
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について、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

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

マウス胎生6.25-9.75日胚 [C57BL/6CrSlc] Time point 12点

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



・経時的にサンプリングした各ステージのマウス胚(全胚、卵黄嚢膜は除去)を1腹分プールしたRNAサンプル使用

・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

・マイクロアレイは、[Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0]を使用。

プラグが確認された日の15時を胎生0.5日とした

胎生7.5, 8.5, 9.5日のマウス胚

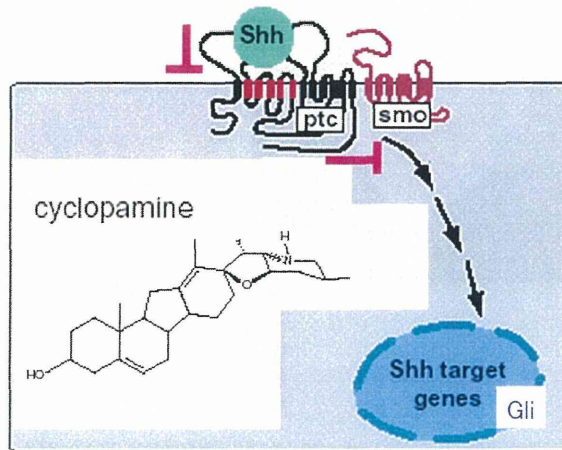


☆プラグ確認日を0.5日とした

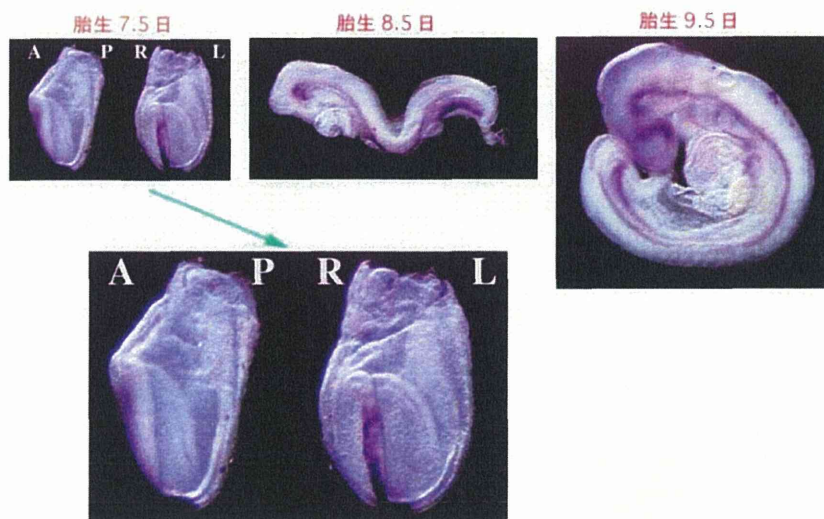
Shhシグナリング (四肢や、脳・脊髄正中線構造などのデザイン形成)
についての検討

Shhシグナリング

細胞内シグナル伝達



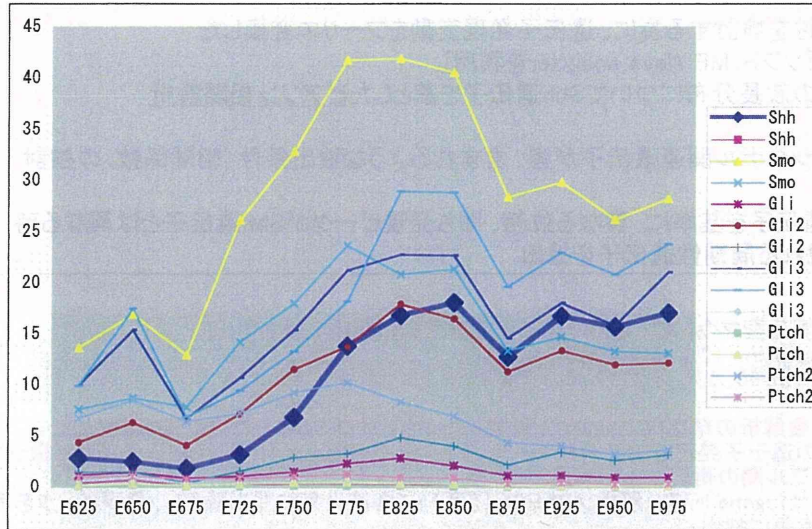
胎生7.5-9.5日マウス胚におけるShhの発現



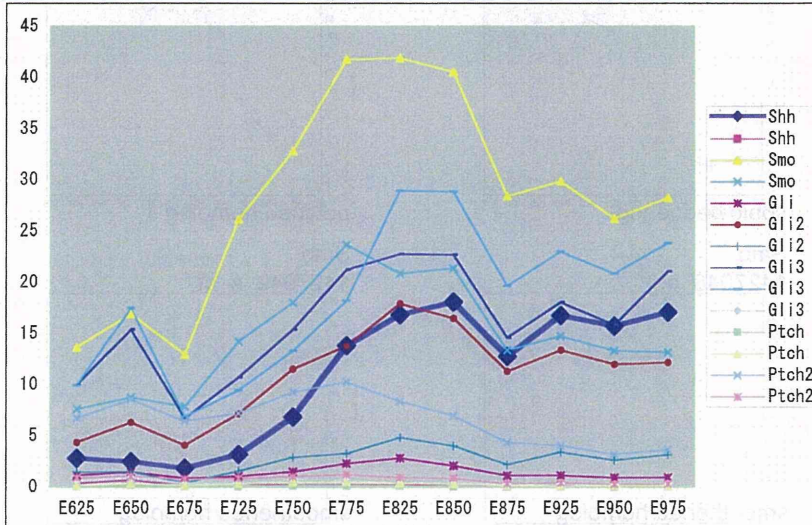
mRNAの発現局在を全胚にて可視化
(whole mount ISH)

Shhシグナル関連遺伝子の発現変動

—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—



- ・胎児発生過程においては、化学物質を投与しなくとも、多くの発生関連遺伝子が自律的な変動を示す。
- ・あるシグナルネットワークの関連遺伝子の発現変動は、それぞれ同様なパターン(発現のタイミング差を含む)を示す事が多い



Shh遺伝子と同じ波長分布を示す遺伝子を網羅的に抽出

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

・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Shh遺伝子を基としたピアソン相関解析

■ Shhシグナル関連遺伝子が皆、含まれるような抽出条件 (相関係数) の検討

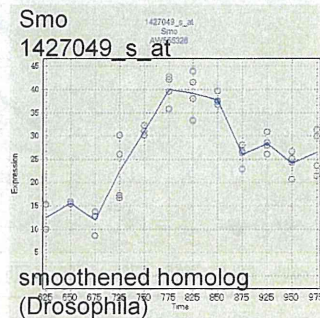
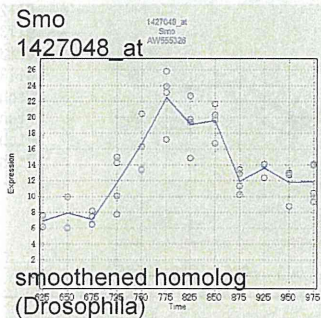
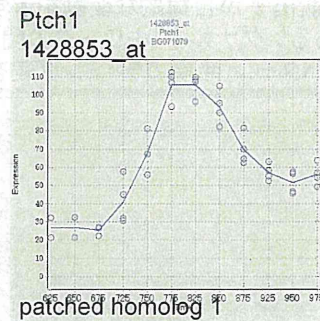
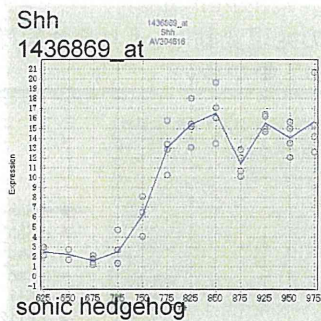
・Shh遺伝子を基準に、異なる位相、即ち発現ピークがShh遺伝子とは異なる時刻に現れる周期性遺伝子を抽出

・無処置野生型マウス胚・全胚の遺伝子発現変動の経時データベース
= [Time point: 12点 (6時間毎、n = 2~4)]
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

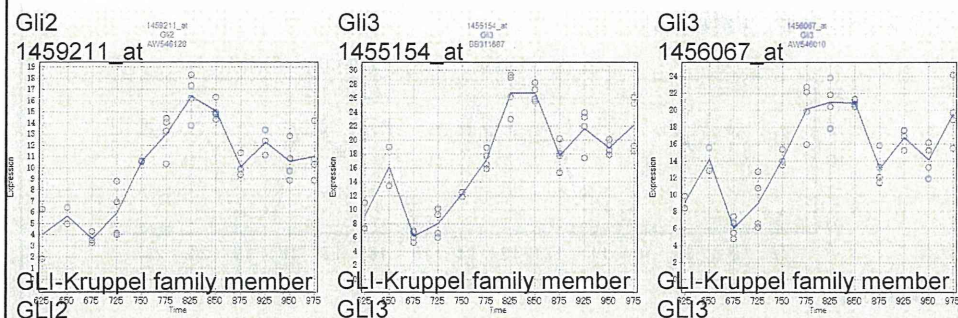
→周波数解析の精度向上の為に、胎生6.25から9.75日(3.50日間)を仮想1周期とし、胎児の遺伝子発現経時データベース (各点4例) を四分し、4周期 (= 14日間) として扱った (サンプル間の再現性を考慮)

・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、発現ピークを示す各時点毎に抽出

Shhシグナル関連遺伝子の発現変動



Shhシグナル関連遺伝子の発現変動

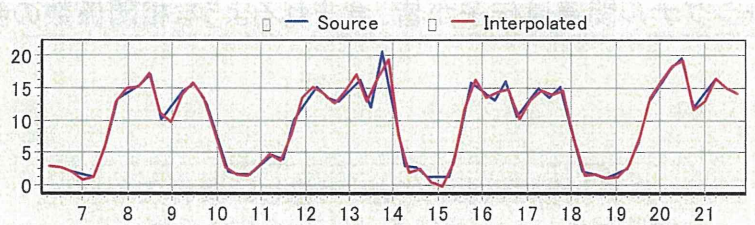


周期性を検討する為に MF Wave analyzer を利用し、
Shh 遺伝子の発現変動をフーリエ変換した

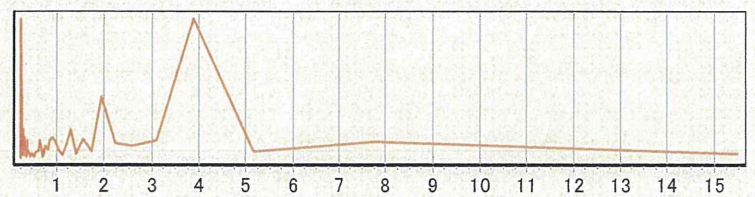
胎生 6.25、6.50、6.75、7.25、7.50、7.75、8.25、8.50、8.75、9.25、9.50、9.75 = [Time point: 12点 (6時間毎、n = 2~4)]

→ 解析精度を上げるため、データ (各点 4 例) を四分し、4 周期 (= 14 日間) として扱った

スプライン計算 [補関数: 64]



波長分布

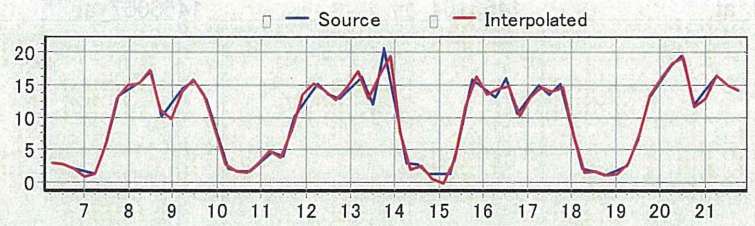


周期性を検討する為に MF Wave analyzer を利用し、
Shh 遺伝子の発現変動をフーリエ変換した

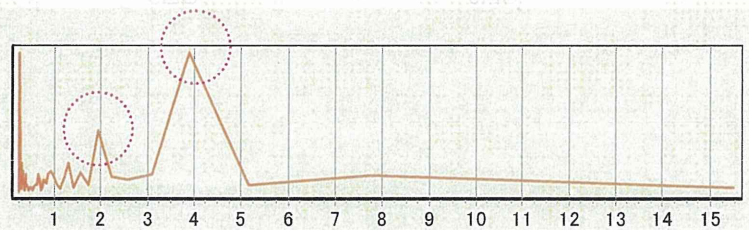
胎生 6.25、6.50、6.75、7.25、7.50、7.75、8.25、8.50、8.75、9.25、9.50、9.75 = [Time point: 12 点 (6 時間毎、n = 2~4)]

→ 解析精度を上げるため、データ(各点 4 例)を四分し、4 周期 (= 14 日間)として扱った

スプライン計算 [補関数: 64]



波長分布



- ・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 Shh 遺伝子を基としたピアソン相関解析

■ Shh シグナル関連遺伝子が皆、含まれるような相関係数の検討

まず、相関係数 0.98 という厳しい条件で
抽出されてきた遺伝子 (21 ps) の 3 次元表示
(目視による選別なし)