

図9 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 Actc1 と発現制御から Nkx2-5 シグナルネットワークに属すると考えられる 13 遺伝子の中、Myh6 及び Ttn 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、横軸は胎齢を表す。

C-3: 発現変動起点 6 時間区間ごとの遺伝子数の分布：

今後の網羅的な検索に向けて、本解析手法により、発現変動起点 6 時間区間ごとに、抽出される遺伝子数を求めた。抽出条件は、これまで同様、発現変動起点と発現ピークの時点を算出した上で、発現ピークの時点の発現コピー数が 2 コピー以上で、両時点にもっとも近接する実測データが存在する時点での各発現コピー数が有意(P<0.05)に異なるというものである。その結果、下記の表3のように、発現変動起点が胎生 7.00 ~ 7.25 日に存在する遺伝子数が非常に多い結果となった。この区間は、本報告にて Shh シグナルを検討した区間に相当する。この時期は中胚葉誘導や器官形成が活発な時期であり生物学的に妥当と考えられる。一方、本解析手法では、Spline 関数を 2 回微分して得た曲線にて、最初に有意なピークを形成する時点を発現変動起点としているため、発現ピークが複数回、つまり発現変動起点が複数存在する遺伝子の場合、最初のピークにより分類され、第二、第三のピーク時点での抽出が困難になることが考えられる。したがって、網羅的な検索に向けては、最初だけではなく、複数回目のピークも含めて抽出する必要があるものと考えられ、この点は今後の課題である。

発現変動起点(時間) (胎齢)	抽出された 遺伝子数 (P.S.)
0~6 (胎生6.25~6.50日)	60
7~12 (胎生6.25~6.50日)	20
13~18 (胎生6.75~7.00日)	704
19~24 (胎生7.00~7.25日)	7,844
25~30 (胎生7.25~7.50日)	405
31~36 (胎生7.50~7.75日)	119
37~42 (胎生7.50~7.75日)	43
43~48 (胎生8.00~8.25日)	17
49~54 (胎生8.25~8.50日)	8
55~60 (胎生8.50~8.75日)	44
61~66 (胎生8.75~9.00日)	46
67~72 (胎生9.00~9.25日)	0
73~78 (胎生9.25~9.50日)	0
79~84 (胎生9.50~9.75日)	0

表 3 発現変動起点 6 時間区間ごとの遺伝子数の分布

D. 結論

初年度は、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、周波数解析を実施した。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する試みである。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課題が残った。この解決として、発現の立ち上がりの勾配に着目する方策の可能性を見だし、一階微分及び二階微分を暫定的に適用し、既存情報と整合性のある結果を得たことから、その有用性が示唆された。

そこで今年度は、一階微分及び二階微分することで発現変動基点及び発現ピークの時点を同定する技術を開発し解析を行うこととした。3 次元 Spline 補間とその微分関数を解析に利用する独自の解析ソフト SeekESP を用いてデータベース中の全ての遺伝子発現変動につき解析を行った。モデルとして初年度に検討した Shh 遺伝子及び Nkx2-5 シグナルネットワークに着目し、条件設定及び抽出パラメータの最適化を検討後解析したところ、Shh シグナル関連候補遺伝子として 8,306 ps、Nkx2-5 シグナル関連候補遺伝子として 227 ps が自動抽出され、この内、目視により生物学的変動と考えられるものとしてそれぞれ 648 及び 155 ps が抽出された。発現の局在を検討する whole mount ISH データベースの利用及び *in silico* のプロモーター解析により、機能が既知の関連遺伝子だけではなく未知のものも抽出できた。この中には、Shh シグナルと関連することが報告されている Irs1、Foxf1、Foxc2、Ccmd1 遺伝子等が含まれ、また Tgf β シグナルが、Shh の受容体を介さずに Gli 遺伝子の発現を制御する可能性を示唆する結果を得た。

他方、本解析手法では、Spline 関数を 2 回微分して得た曲線にて、最初に有意なピ

ークを形成する時点を発現変動起点として
いる。そのため、発現ピークが複数回、つ
まり発現変動起点が複数存在する遺伝子の
場合、第二、第三のピーク時点での抽出が
困難になる可能性がある。今後、網羅的な
検索に向け、最初だけではなく、複数回目
のピークも含めて抽出する技術の開発、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

(1)-1) 書籍
なし

(1)-2) 雑誌

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima
S, Matsuda N, Morita K, Tsuji M,
Moriyama N, Furukawa Y, Otsuka M,
Tachihara E, Nakatsu N, Kodama Y,
Oral administration of
pentachlorophenol induces interferon
signaling mRNAs in C57BL/6 male
mouse liver. J Toxicol Sci 38: 643-654,
2013.

(2) 学会発表

北嶋 聡, 小川幸男, 大西 誠, 相磯成敏, 相
崎健一, 五十嵐勝秀, 高橋祐次, 菅野 純
シックハウス症候群レベルの極低濃度暴
露の際の海馬における Percellome 法によ
る吸入トキシコゲノミクス
第40回日本トキシコロジー学会学術年会

(2013.6.18)

Kitajima S, Aisaki K, Igarashi K, Kanno
J. Application of Percellome
Toxicogenomics approach to food safety:
A flavor, estragole appears to be a
PPAR-alpha agonist.
The XIII International Congress of
Toxicology 2013 (ICT 2013)] (2013.7.3.),
Seoul, Korea

Tanemura K, Igarashi K, Furukawa Y,
Otsuka M, Aisaki K, Kitajima S, Sato E,
Kanno J. Delayed Effects on CNS
Induced by Disturbance of Neural
Activity during Development -
Behavioral Impairment in Male Adult
Mice Induced by Postnatal Oral Intake
of Acephate.

The XIII International Congress of
Toxicology 2013 (ICT 2013)] (2013.7.3.),
Seoul, Korea

F. 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

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

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

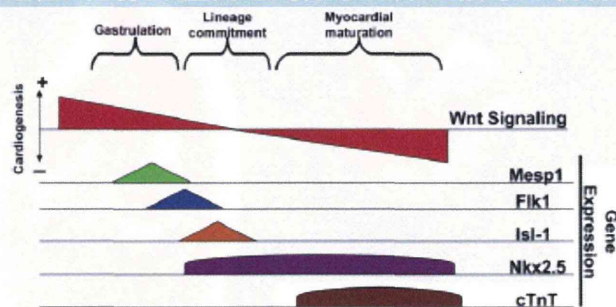


Figure 1. The Biphasic Effect of Wnt Signaling in Cardiac Mesoderm Induction and Myocardial Differentiation

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.

-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

初年度(昨年度)研究

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

胎児発生過程は、発生初期から発生後期にかけて、発生速度が速く、発生期間が短い。この過程では、自律的な遺伝子発現が多く認められる。また、この過程では、発生速度が速く、発生期間が短い。この過程では、自律的な遺伝子発現が多く認められる。また、この過程では、発生速度が速く、発生期間が短い。この過程では、自律的な遺伝子発現が多く認められる。

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

⇨ 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(性能評価)

胎児発生過程における自律的な遺伝子発現のメカニズムの解明

初年度(昨年度)研究

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

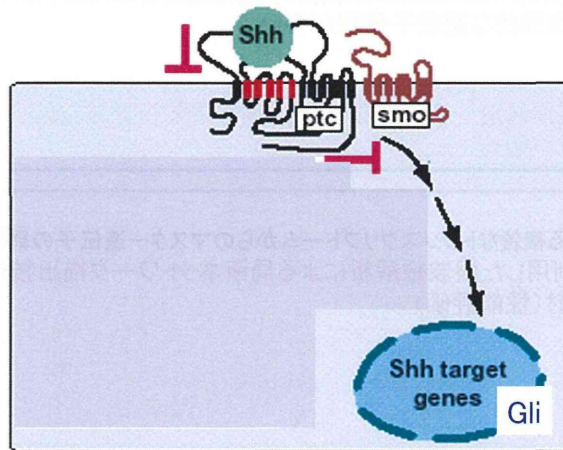
- ・Shhシグナリング (四肢や、脳・脊髄正中線構造などのデザイン形成)
- ・Nkx2.5シグナリング (心筋前駆細胞マーカー、心臓発生過程) :

※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

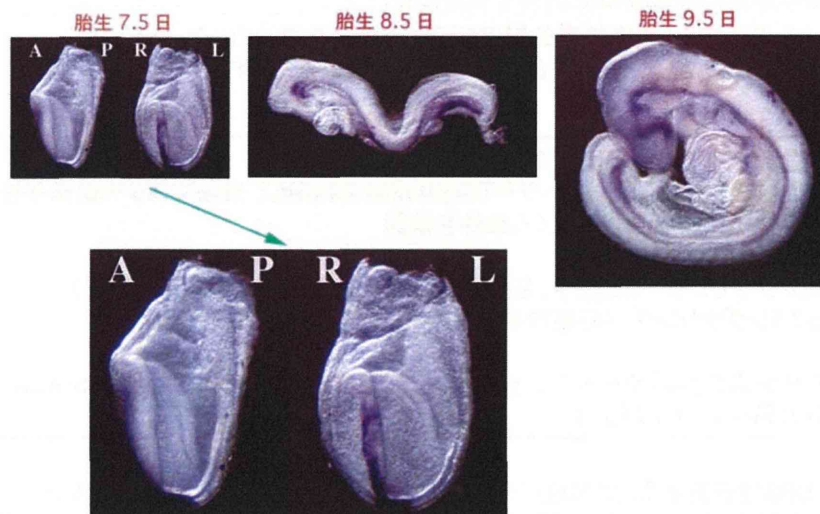
→ 網羅性を有する、周期性に着目した局所ネットワーク描出技術の利用
無処置野生型マウス胚・全胚の網羅的トランスクリプトームデータについて、胎生6.25~9.75日の遺伝子発現変動を1周期と仮想して、周波数解析

Shhシグナリング

Shh→Ptc1→Smo→Gli



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)

初年度(昨年度)研究

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

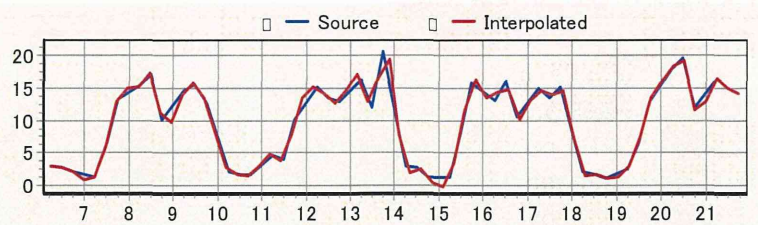
・無処置野生型マウス胚・全胚の遺伝子発現変動の経時データベース
= [Time point: 12点 (6時間毎、n = 2~4)]
胎生6.25、6.50、6.75、7.25、7.50、7.75、8.25、8.50、8.75、9.25、9.50、9.75

- 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

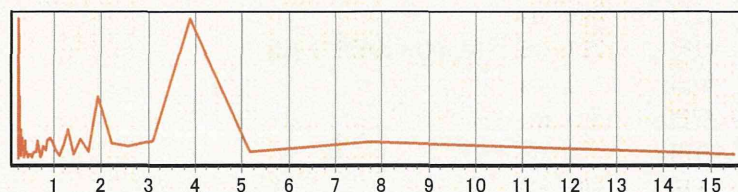
初年度(昨年度)研究

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
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



初年度(昨年度)研究

- ・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

遺伝子名	ProbeID	RSQ
Shh	1436869_at	1
Ptch1	1428853_at	0.980764928
Smo	1427048_at	0.958205938
Smo	1427049_s_at	0.976874254
Gli2	1459211_at	0.982810558
Gli3	1455154_at	0.966309734
Gli3	1456067_at	0.900446781

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たきた

→ 相関係数が0.9以上という条件により、7,039 psが抽出されてきた

初年度(昨年度)研究

Shh遺伝子を基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)

7,039 psについて、

RSortで経時的に並びかえ(3.5日間のフォーマットで)、発現の最大ピークを示す各時点毎に抽出(目視の検討はなし)

Shh遺伝子: 胎生8.5日に発現ピークを持つ遺伝子として抽出されてきた

結果 ← 7,039 ps

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 [含、Shh遺伝子1 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

Setting:

Explore Direction: Peak>>>Valley

Posi,Intermed,Nega:全てcheck

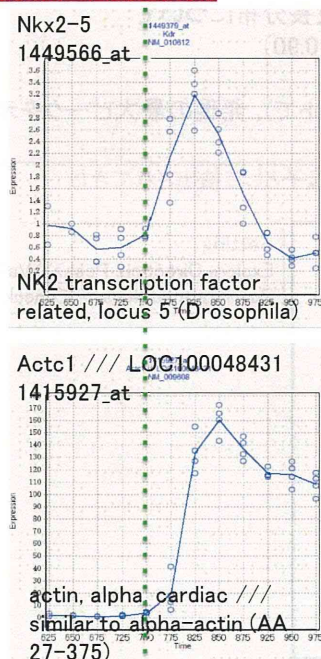
初年度(昨年度)研究

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

Q1: どの程度、発現パターンを反映しているのか？

- ・Shh遺伝子が含まれる発現の最大ピークを含む時点・胎生8.5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
- ・Shh遺伝子が含まれる発現の最大ピークを含む時点・胎生8.5日以降の時点では発現パターンが比較的似ているものが抽出されてきたが、それ以前の時点の場合、発現パターンがかなり異なるものが抽出されてきた。

初年度(昨年度)研究



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
→ 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

初年度(昨年度)研究

Q2: 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？

→Shh関連遺伝子について、それぞれどの時点で発現の最大ピークを示すのかの確認

Shh、Ptch1、Smo、Gli2、Gli3

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
→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

Shh遺伝子を基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)

7,039 psについて、

RSortで経時的に並びかえ(3.5日間のフォーマットで)、発現の最大ピークを示す各時点毎に抽出(目視の検討はなし)

Shh遺伝子: 胎生8.5日に発現ピークを持つ遺伝子として抽出されてきた

結果 ← 7,039 ps

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	Ptch1、Smo
胎生8.25日:	249 ps	Gli2、Gli3
胎生8.50日:	234 ps	Shh
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	

Setting:

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

初年度(昨年度)研究

まとめ

- ・既知のシグナルネットワークをモデルに、本解析手法の性能評価をしたところ既知関連遺伝子の多くは検出可能であった。
- ・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いだした。来年度、そのためのアルゴリズムの開発(微分値の利用)を予定

初年度(昨年度)研究

発現の立ち上がりの勾配に着目する:
一階微分及び二階微分を暫定的に適用し、既存情報と整合性のある結果を得たことから、その有用性が示唆された

Shh network

マウス胎児のデータベース

2階微分

1階微分

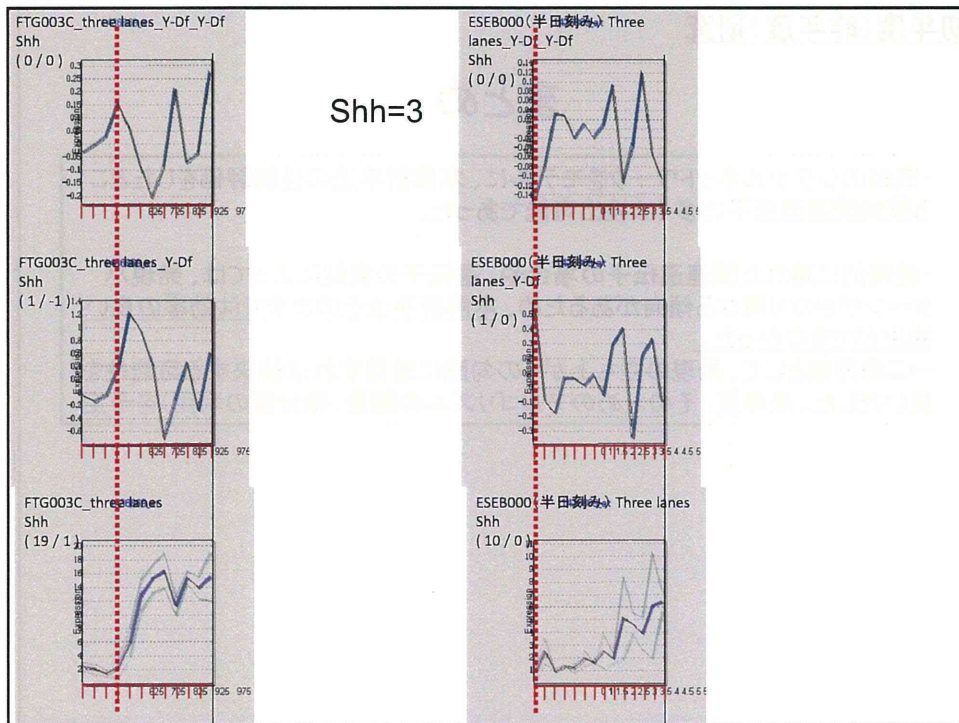
元の遺伝子発現

ES・EBのデータベース

2階微分

1階微分

元の遺伝子発現



Shh=3

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

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
← 3次元Spline補間とその微分関数を利用し、遺伝子毎に発現変動起点候補と発現
ピークの時点を抽出する技術を開発し解析を行う

平成26年度：
胎児発生過程に関する遺伝子発現ネットワーク情報の網羅的抽出

方法

無処置野生型マウス・全胚遺伝子発現経時データベース(12時点):
 サンプル期間: 胎生6.25日から9.75日(3.5日間=84時間)につき、
 3次元Spline補間とその微分関数を利用し、
 全ての遺伝子について、発現変動起点と発現ピークの時点を描出
 ← 解析ソフトSeekESPを用いて検討

・Spline補間し1時間毎の補間値を得た
 ・このSpline関数を2回微分して得た曲線にて、この区間内で最初に有意なピークを形成する時点をも、発現変動起点とした。

■ Shh関連遺伝子が存在する発現変動起点及び発現ピークの時点を基に候補遺伝子を抽出

→ 候補遺伝子の妥当性を検証

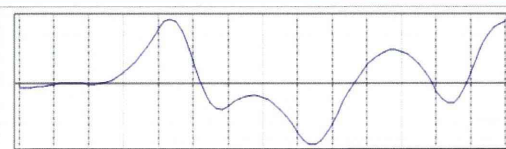
- ・プロモーター解析(*in silico*)
- ・wholmount ISHによる発現の空間局在を検討

本解析手法の性能評価

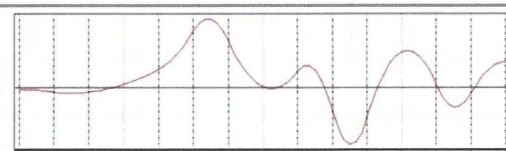
Shh遺伝子についての3次元Spline補間とその微分関数を利用した解析

縦軸: 発現量(ノーマライズしたもの)、横軸: 胎齢

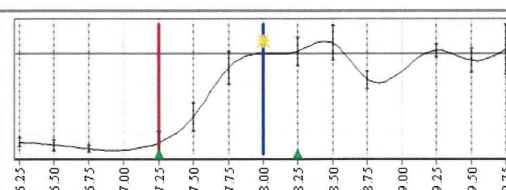
2階微分曲線



1階微分曲線



3次元Spline補間の発現データの



1436869_at // Shh

赤線: 発現変動起点、青線: 発現ピークの時点

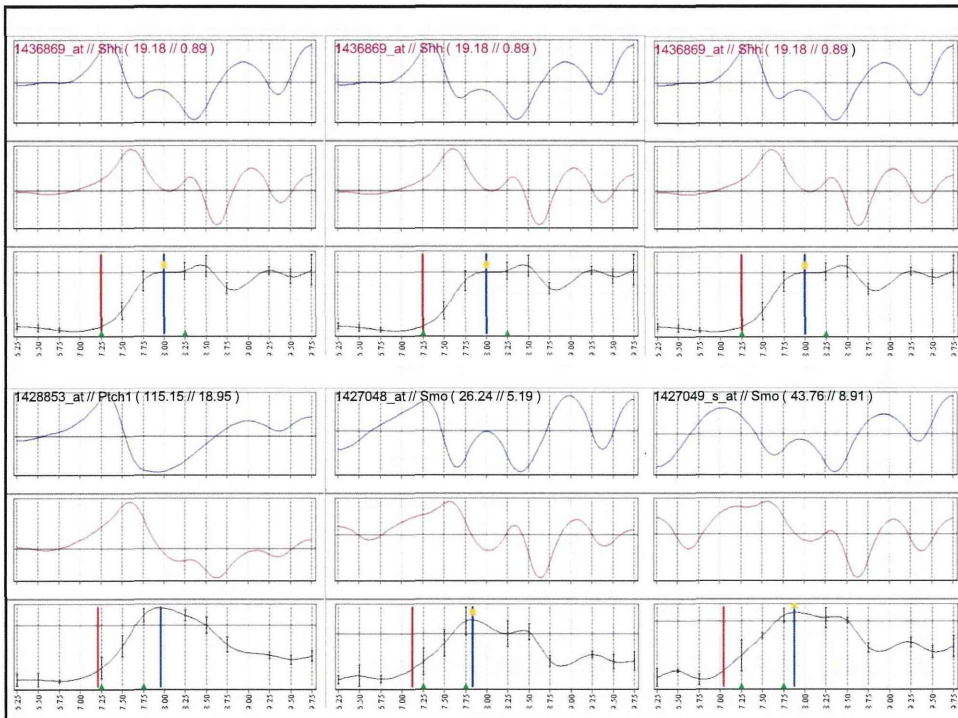
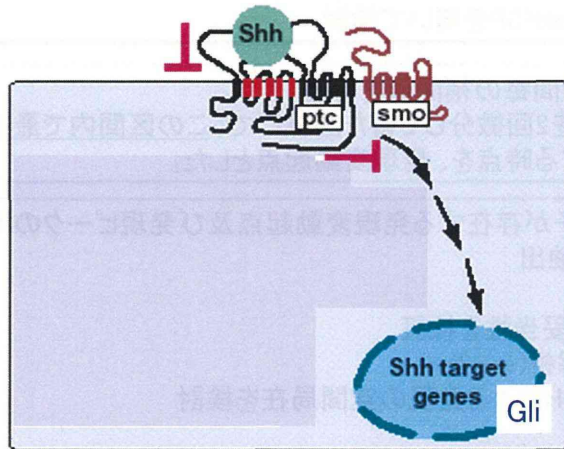
★ 発現変動起点と発現ピークの時点での発現コピーデータ間で有意差有 ($P < 0.05$)

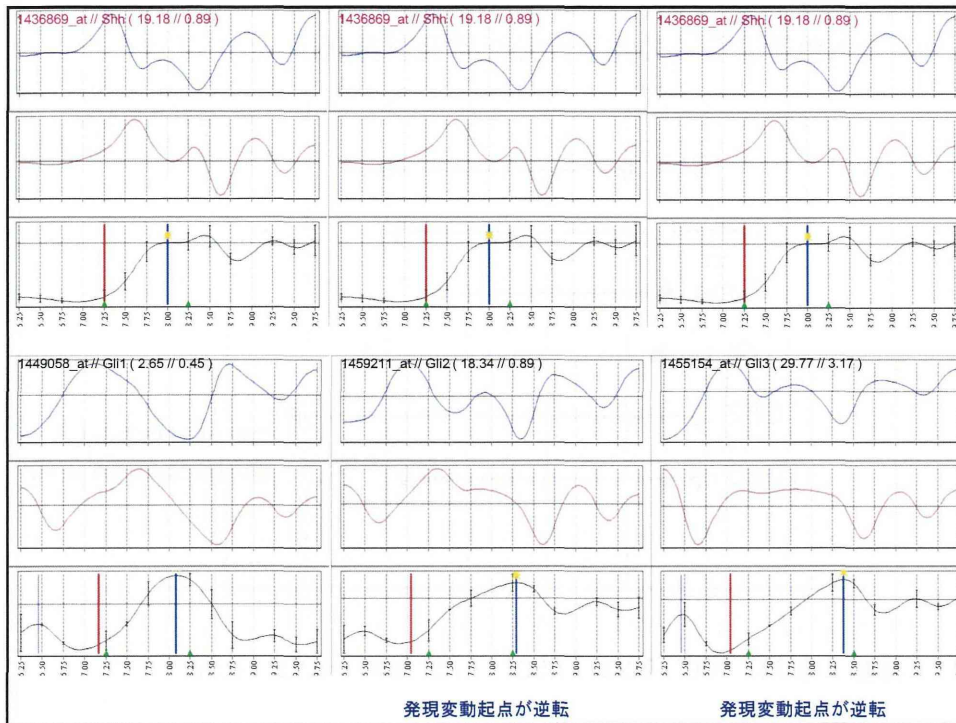
解析ソフト
 SeekESP
 を利用
 By Dr Aisaki

モデル

Shhシグナリング

Shh → Ptch1 → Smo → Gli





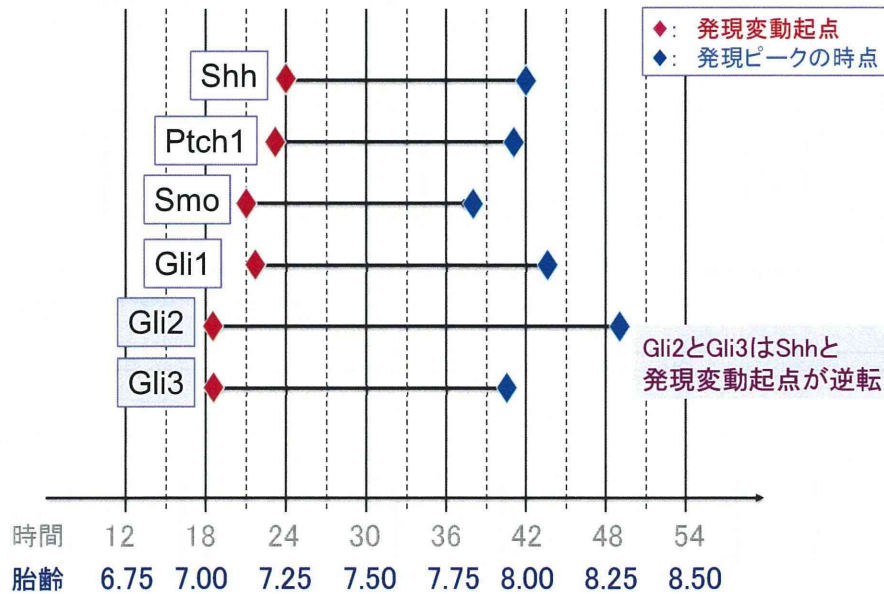
Shh関連遺伝子の発現変動起点及び発現ピークの時点

遺伝子名 (Affymetrix No.)	発現変動起点(時間) (胎齢)	発現ピークの時点(時間) (胎齢)
Shh (1436869_at)	24 (胎生7.25日)	42 (胎生8.00日)
Ptch1 (1428853_at)	23 (胎生7.00～7.25日)	41 (胎生7.75～8.00日)
Smo (1427048_at)	21 (胎生7.00～7.25日)	38 (胎生7.75～8.00日)
Gli1 (1449058_at)	22 (胎生7.00～7.25日)	44 (胎生8.00～8.25日)
Gli2 (1459211_at)	19 (胎生7.00～7.25日)	49 (胎生8.25～8.50日)
Gli3 (1456067_at)	19 (胎生7.00～7.25日)	40 (胎生7.75～8.00日)

Shh関連遺伝子

- ・発現変動起点: 18～24 (胎生7.00～7.25)
- ・発現ピークの時点: 36～54 (胎生7.75～8.50) に存在

Shh関連遺伝子の発現変動起点及び発現ピークの時点



本手法を利用したShh関連遺伝子の抽出

全ての遺伝子について、本解析手法により発現変動起点と発現ピークの時点を算出

[抽出条件]

- ・発現ピークの時点の発現コピー数(平均値)が2コピー以上
 - ・発現変動起点と発現ピークの各時点にもっとも近接する実測データのある時点での発現データにつき有意差有り($P < 0.05$)
- 9,311 psが抽出

■ Shh関連遺伝子が存在する

発現変動起点: 18~24 (胎生7.00~7.25)
発現ピークの時点: 36~54 (胎生7.75~8.50)

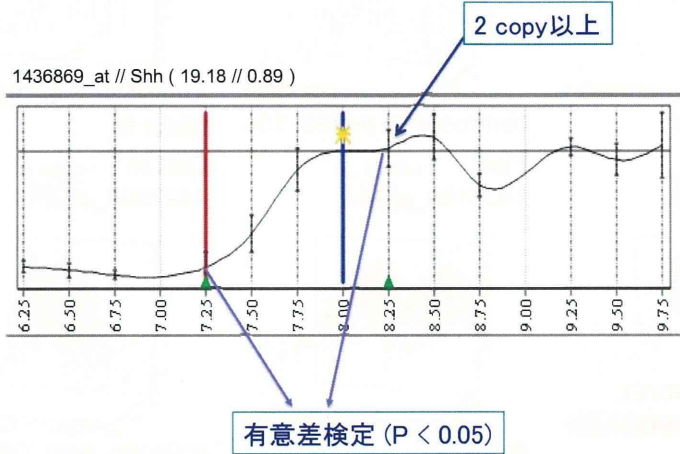
→ 8,306 psが抽出

目視により生物学的変動を示すと考えられる遺伝子数:

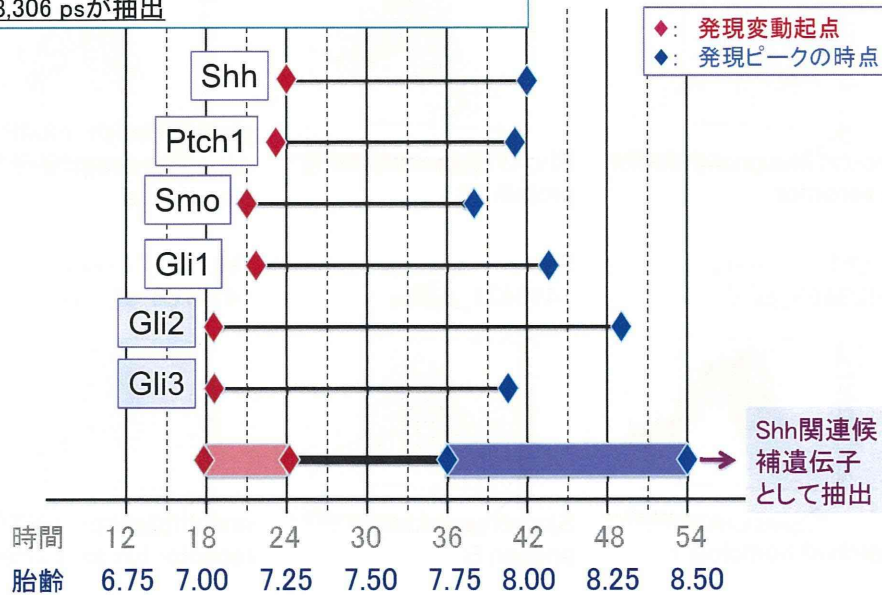
→ 648 ps (Shh関連遺伝子を含む)

[抽出条件]

- ・発現ピークの時点の発現コピー数(平均値)が2コピー以上
 - ・発現変動起点と発現ピークの各時点にもっとも近接する実測データのある時点での発現データにつき有意差有り(P<0.05)
- 9,311 psが抽出



- [抽出条件]** ■ Shh関連遺伝子が存在する
- 発現変動起点: 18~24 (胎生7.00~7.25)
 - 発現ピークの時点: 36~54 (胎生7.75~8.50)
- 8,306 psが抽出



生物学的変動を示すと考えられる遺伝子数: 648 ps

