

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
- 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 -

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・第五室長

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。

初年度（平成24年度）は、無処置野生型マウス全胚の胎生6.25～9.75日（12時点）の網羅的トランスクリプトームデータを対象に、全期間を1周期と仮想して周波数解析を実施した。データベース中の全ての遺伝子発現変動を、フーリエ変換を利用する独自の解析ソフトMF Wave analyzerを用いて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等の解析をおこなった。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ところ、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法についての課題が残った。これは、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、発現値の微分解析を試み、その有用性を示唆した。

そこで今年度（平成25年度）は、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することとした。本データベースのサンプリング期間である胎生6.25日から9.75日（3.5日間＝84時間）をSpline補間し1時間毎の補間値を得た。さらにその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

形成する時点を発現変動起点とした。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、*in silico*のプロモーター解析及びwhole mount ISH データベースの利用しつつ解析した結果、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する事ができた。今後は、複数回目のピークも含めて抽出する技術開発をおこない解析精度を上げ、この事を通して、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。

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。

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局限して発現するため、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。

先行3年間研究では、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、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。

そこで初年度(平成24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。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、フーリエ変換を利用する独自の解析ソフトMF Wave analyzerを用いて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等の解析をおこなった。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。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(平成25年度)は、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こととした。モデルとして初年度に検討したShh及びNkx2-5遺伝子シグナルネットワークに着目し、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腹分ブールした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 μ 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、T7RNA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。

発現変動起点候補と発現ピークの時点を抽出する解析は、3次元 Spline 補間とその微分関数を利用する独自の解析ソフト SeekESP を用いて実施した。

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 遺伝子が関与し、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。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)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。

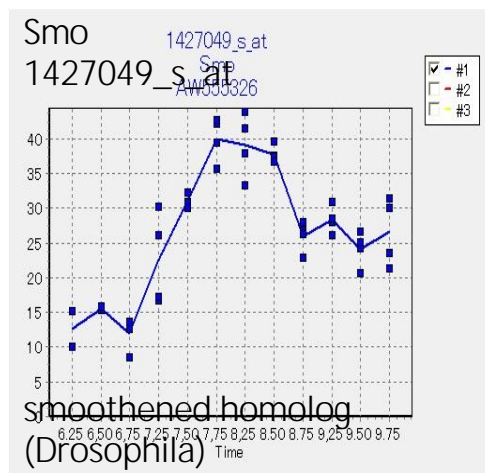
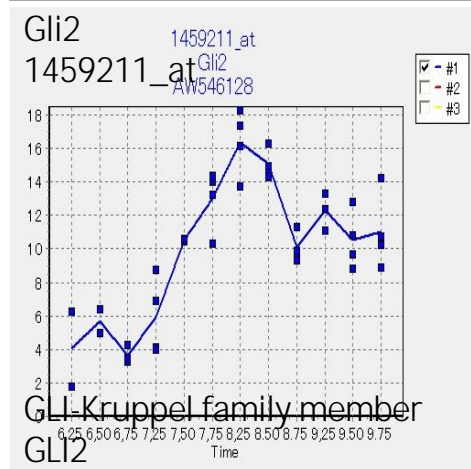
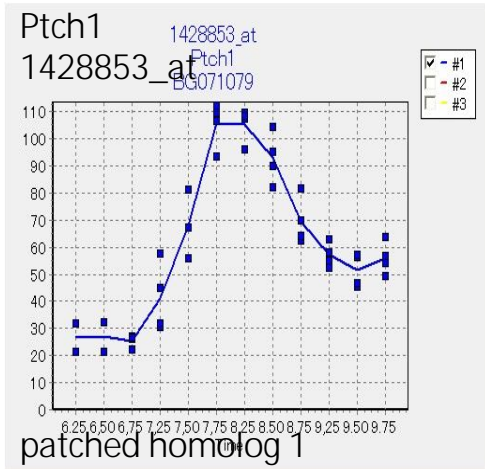
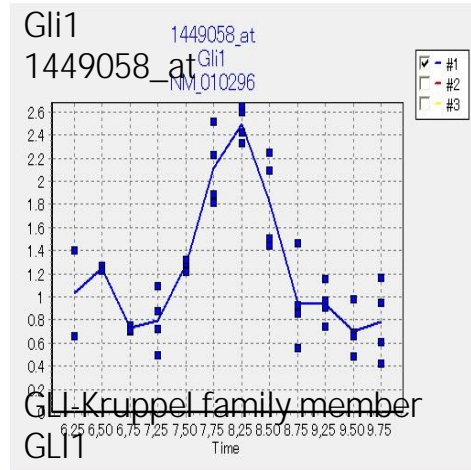
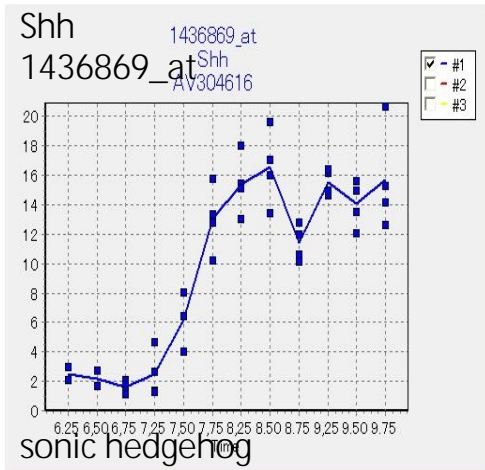


図1 無処置野生型マウス・全胚遺伝子発現経時データベースにおける Shh 関連遺伝子 (Ptch1、Smo、Gli 遺伝子) の発現変動：グラフの線は各平均値を結び、点は各データの素点を表す (n=2~4)。縦軸は、発現コピー数、横軸は胎齢(各胎生 6.25、6.50、6.75、7.25、7.50、7.75、8.25、8.50、8.75、9.25、9.50、9.75 日)を表す。

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、主に脊索に発現が認められる。



図2 無処置野生型マウス・全胚における Shh 遺伝子の発現 (胎生 9.5 日胚)

次いで、胎児の遺伝子発現経時データベース (12 時点) につき、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解析ソフト SeekESP を用いて検討した。具体的には、無処置野生型マウス・全胚遺伝子発現経時データベースのサンプリング期間である胎生 6.25 日から 9.75 日 (3.5 日間 = 84 時間) を Spline 補間し 1 時間毎の補間値を得た。さらにその 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、発現変動起点とした。

Shh 遺伝子についての解析結果を図 3 として示す。

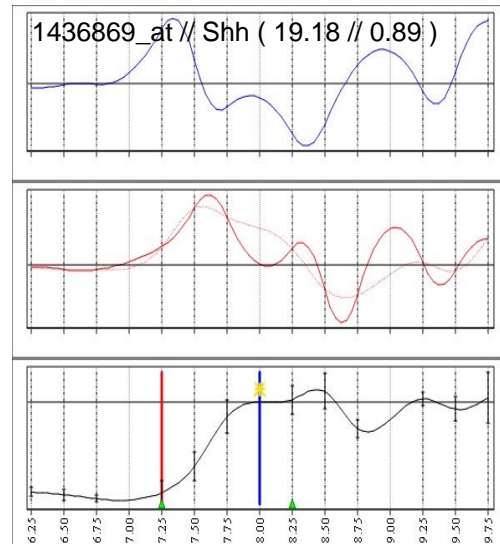


図3 Shh 遺伝子についての 3 次元 Spline 補間とその微分関数を利用した解析

縦軸は発現量 (ノーマライズしたもの)、横軸は胎齢を示し、上段が 2 階微分曲線を、中段が 1 階微分曲線を、下段が発現データを 3 次元 Spline 補間曲線を示す。赤の線は発現変動起点を、青の線は発現ピークの時点を示す。*: 発現変動起点と発現ピークの時点での発現コピー数の比較において有意 ($P < 0.05$) である事を示す。

本解析手法を Shh 関連遺伝子について検討した結果、各関連遺伝子の発現変動起点及び発現ピークの時点は表 1 の通りとなった。すなわち、Shh 関連遺伝子の発現変動起点は胎生 7.00~7.25 日に、発現ピークの時点は胎生 7.75~8.50 日に存在することが明らかとなった。

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)

表 1 Shh 関連遺伝子の発現変動起点及び発現ピークの時点

次いで本解析手法の有用性を検証する目的で Shh シグナルネットワークに属する候補遺伝子を抽出することとした。Shh 関連遺伝子が属していた、発現変動起点が 18 ~ 24 (胎生 7.00 ~ 7.25) 且つ発現ピークの時点が 36 ~ 54 (胎生 7.75 ~ 8.50) を示す遺伝子を対象に検討した。

まず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した上で、抽出条件として、発現ピークの時点の発現コピー数が 2 コピー以上、且つ、両時点にもっとも近接する実測データの存在する時点での各発現コピー数につき有意 ($P < 0.05$) という条件のもと検討した結果、9,311 ps が抽出された。この内、Shh 関連遺伝子が含まれる、発現変動起点が 18 ~ 24 (胎生 7.00 ~ 7.25) 且つ発現ピークの時点が 36 ~ 54 (胎生 7.75 ~ 8.50) を示す遺伝子として 8,306 ps が得られた。この 8,306 の遺伝子につき、目視により生物学的変動を示すと考えられる遺伝子を検討した結果、上述した Shh 関連遺伝子を含む 648 ps が得られた。

次いで、これら 648 の遺伝子が Shh シグナルの制御を受けているか否かを、既存の発現制御データベースである Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) における Upstream Analysis を用いて検討した。その結果、Shh 関連遺伝子である Ptch1、Smo、Gli 遺伝子を除くと下記 37 遺伝子が抽出されてきた。したがって、発現変動起点に着目する本解析手法により、少なくとも転写制御を受ける遺伝子につき、効率よく Shh シグナルネットワークに属すると考えられる遺伝子が抽出できたものとする。

BNC1、CCND2、COL2A1、FOXA1、FOXC2、FOXF1、FOXN1、FZD2、HOXA5、IGF2、IGFBP5、IRS1、LAMA4、LUM、MAN1C1、MEF2C、MEST、MET、MMP2、MSX1、NCAM1、NKD1、NREP、NRP2、OCLN、PDGFA、PITX2、SALL1、SFRP2、SLC2A2、SNAI2、TAL1、TGFB2、VCAN、VEGFC、WNT5A、ZC3HAV1L

上記 37 遺伝子について、胚における発現の空間的局在につき、Pubmed 検索による文献調査あるいは、公開データベース Emage (http://www.emouseatlas.org/emagewebapp/pages/emage_gene_browse.jsf) による検索をおこなった。ほとんどの遺伝子について胎生 7.00 ~ 8.50 日相当の wholemount ISH データを見いだすことが出来なかったが、胎生約 9.5 日の胚では、FOXC2、FOXF1、IGFBP5、MEST、MSX1、NCAM1、SFRP2、WNT5A 遺伝子について、Shh 発現部位に隣接する中胚葉に、空間的に限局する発現

パターンが認められ、少なくともこれらの遺伝子はこの時期の発生過程において、Shh シグナルネットワークに属し機能しているものと考えられた。今後、wholemout ISH の実施による確認作業が必要であると考えられるが、本手法により効率よく Shh シグナル関連遺伝子の抽出ができたものとする。

上記の 37 遺伝子のうち、FOXC2、MEST IGFBP5 遺伝子の発現変動につき Shh 遺伝子の場合とあわせ図 4 に示す。

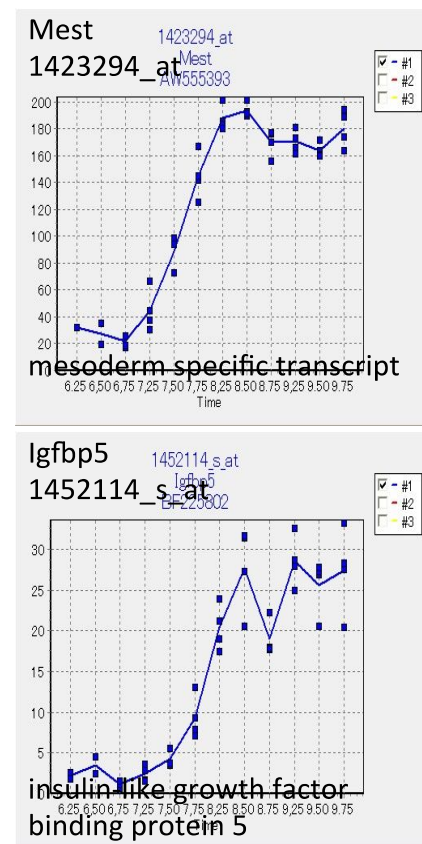
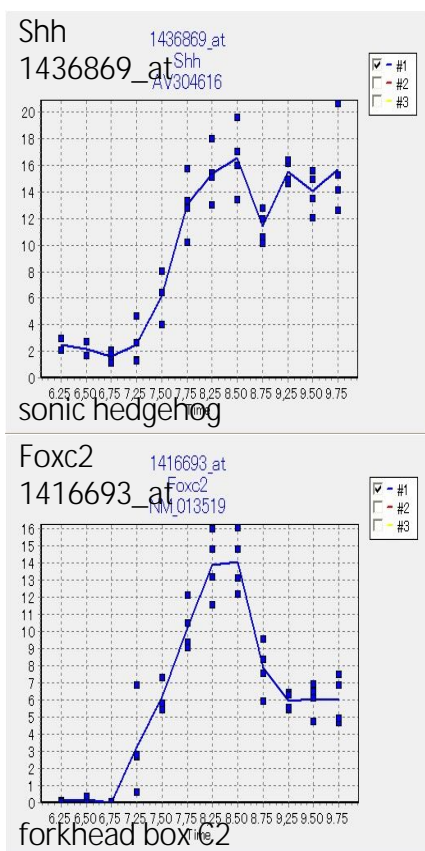


図 4 無処置野生型マウス・全胚遺伝子発現経時データベースにおける Shh 関連遺伝子と発現制御から Shh シグナルネットワークに属すると考えられる 37 遺伝子の内、FOXC2、MEST 及び IGFBP5 遺伝子の発現変動：グラフの線は各平均値を結び、点は各データの素点を表す (n=2~4)。縦軸は、発現コピー数、横軸は胎齢を表す。

加えて、上記 37 遺伝子以外のものについて Shh シグナルとの関連を文献検索したところ、Shh シグナルの仲介分子である事が知られている Sufu 遺伝子、及び Irs1 遺伝子が Shh シグナルの標的分子とする報告 (Parathath SR et al., Development 135(19): 3291-3300, 2008)が見いだされた。

いずれの遺伝子ともに胎生 6.25-9.75 日で検討した ISH データが見いだせなかったため、この発生時期での機能については今後検討を要する。

一方、Shh の標的遺伝子である Gli2 及び Gli3 遺伝子の発現変動起点は、19 時間(胎生 7.00~7.25 日)に存在するのに対して、Shh 及びその受容体 Ptch1 の場合は 24 及び 23 時間と、両方で逆転が認められた。この事は昨年度の予備的検討でも報告しており、この理由として、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]) を挙げたが、Ihh 遺伝子の発現変動起点は 22 時間であり (Ihh 遺伝子は、上述した Shh 関連遺伝子を含む 648 ps に含まれていた) 該当せず、より早期に Shh の受容体を介さずに、Gli 遺伝子の発現を制御する因子の存在が想定された。そこで発現変動起点が 19 時間の Gli2、Gli3 遺伝子の発現と類似の 18 遺伝子について、プロモーター解析(in silico, IPA 解析)を検討した結果、Hoxb9、Smad3 及び Ctnnb1 が見いだされたが、各発現変動起点につき検討した結果、Smad3 のみが妥当と考えられた。論文検索の結果、胎児期での検討ではなく発現制御に関する論文ではあるが、Smad3 が Shh-Patch を介さずに直接 Gli 遺伝子を制御するという報告を見いだした (Dennler S et al., Cancer Res 67(14):6981-6, 2007)。Smad3 は TGF β シグナル関連遺伝子であるため、TGF β の発現変動を検討したところ、発現変動起点が 19 時間のものとして、TGF β 2 が見いだされた。したがって、TGF β 2-Smad3 を介して、Shh の受容体を介さずに Gli 遺伝子の発現を制御する候補因

子と考える。今後、wholmount ISH の実施による確認作業や機能解析が必要であると考えられるが、本解析により、発生初期における非標準的な(non-canonical)新たな Shh シグナル制御系を見いだした可能性がある。Gli3、Tgfb2 及び Smad3 遺伝子の発現変動につき図 5 に示す。

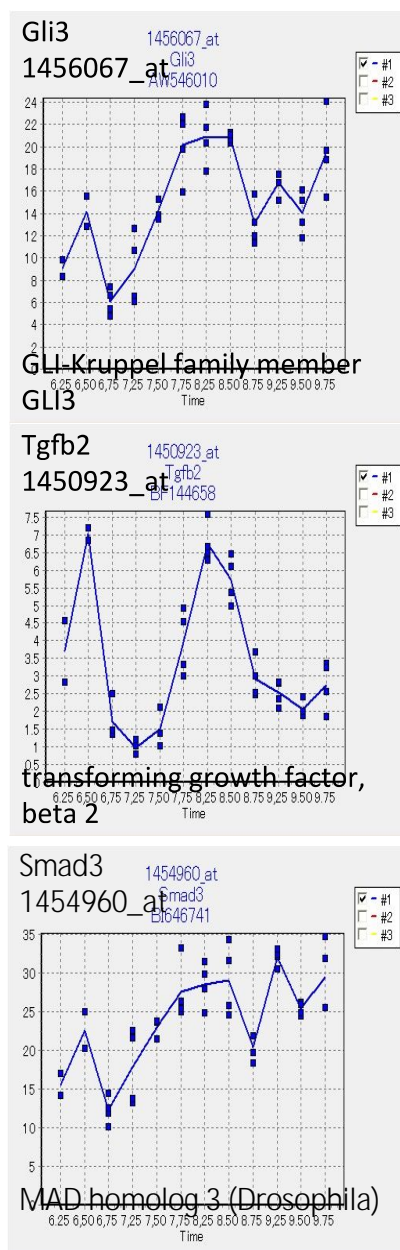


図5 無処置野生型マウス・全胚遺伝子発現経時データベースにおける Shh 関連遺伝子 Gli3 と Tgf シグナルネットワークに属すると Tgfb2 及び Smad3 遺伝子の発現変動:
 グラフの線は各平均値を結び、点は各データの素点を表す (n=2~4)。縦軸は、発現コピー数、横軸は胎齢を表す

C-2: Nkx2-5 遺伝子を基とした解析:

Shh シグナルの検討に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) における、Nkx2-5 関連遺伝子の発現変動を図 6 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。

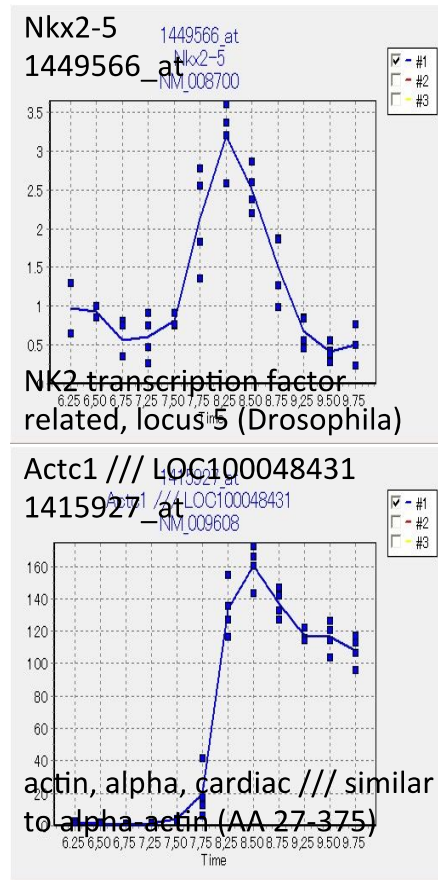
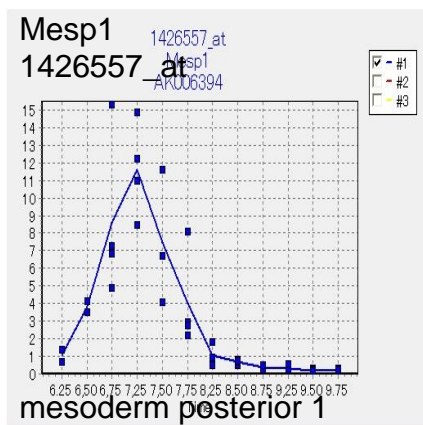


図6 無処置野生型マウス・全胚遺伝子発現経時データベースにおける Nkx2-5 関連遺伝子 (Mesp1、Nkx2-5 及び Actc1 遺伝子) の発現変動:

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 7 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。

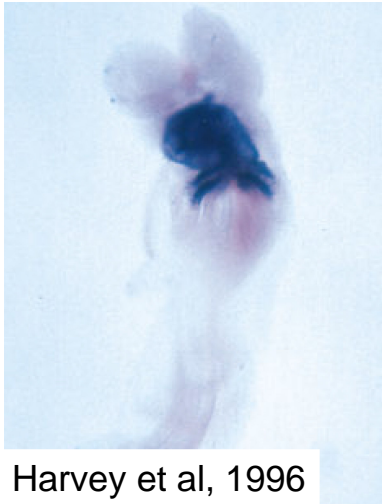


図7 無処置野生型マウス・全胚における Nkx2-5 遺伝子の発現

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(12 時点)につき、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解析ソフト SeekESP を用いて検討した。

Nkx2-5 遺伝子についての解析結果を図8として示す。

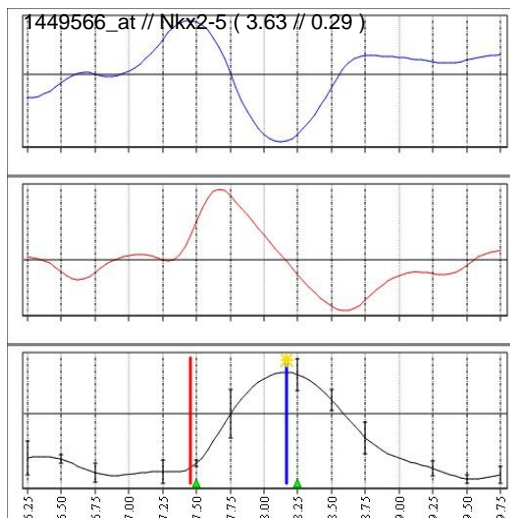


図8 Nkx2-5 遺伝子についての3次元 Spline 補間とその微分関数を利用した解析
縦軸は発現量(ノーマライズしたもの)、横軸は胎齢を示し、上段が2階微分曲線を、中段が1階微分曲線を、下段が発現データを3次元 Spline 補間曲線を示す。赤の線は発現変動起点を、青の線は発現ピークの時点を示す。*: 発現変動起点と発現ピークの時点での発現コピー数の比較において有意($P < 0.05$)である事を示す。

本解析手法を Nkx2-5 関連遺伝子について検討した結果、各関連遺伝子の発現変動起点及び発現ピークの時点は表2の通りとなった。すなわち、Nkx2-5 関連遺伝子の発現変動起点は Mesp1 遺伝子以外の場合、胎生 7.25~7.75 日に(Mesp1 遺伝子は胎生 6.25~6.50 日)、また発現ピークの時点は胎生 8.00~8.50 日(Mesp1 遺伝子は胎生 7.00~7.25 日)に存在することが明らかとなった。

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)
Mesp1 (1426557_at)	3 (胎生 6.25~6.50日)	21 (胎生 7.00~7.25日)
Kdr (1449379_at)	30 (胎生 7.50日)	44 (胎生 8.00~8.25日)
Nkx2-5 (1449566_at)	29 (胎生 7.25~7.50日)	46 (胎生 8.00~8.25日)
Actc1 (1415927_at)	36 (胎生 7.75日)	54 (胎生 8.50日)
Tnnt2 (1418726_a_at)	34 (胎生 7.50~7.75日)	52 (胎生 8.25~8.50日)

表2 Nkx2-5 関連遺伝子の発現変動起点及び発現ピークの時点

次いで本解析手法の有用性を検証する目的で Nkx2-5 シグナルネットワークに属する候補遺伝子を抽出することとした。Mesp1 遺伝子を除く Nkx2-5 関連遺伝子が

属していた、発現変動起点が 24 ~ 36 (胎生 7.25 ~ 7.75) 且つ発現ピークの時点が 42 ~ 54(胎生 8.00 ~ 8.50)を示す遺伝子を対象に検討した。つまり、この関連シグナルは「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が、今回の解析では「Kdr/Nkx2-5 Actc1/Tnnt2 遺伝子」について解析する事とした。

Shh 遺伝子での解析の場合と同様に、まず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 コピー以上という条件のもと、両時点にもっとも近接する実測データのある時点での各発現コピー数につき有意差検定 ($P < 0.05$)をおこなったところ、9,311 ps が抽出された。この内、発現変動起点が 24 ~ 36 (胎生 7.25 ~ 7.75) 且つ発現ピークの時点が 42 ~ 54(胎生 8.00 ~ 8.50)を示す遺伝子として 227 ps が得られた。この 227 の遺伝子につき、目視により生物学的変動を示すと考えられる遺伝子を検討した結果、上述した Nkx2-5 関連遺伝子を含む 155 ps が得られた。

次いで、これら 155 の遺伝子が Nkx2-5 シグナルの制御を受けているか否かを、既存の発現制御データベースである Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) における Upstream Analysis を用いて検討した。その結果、Nkx2-5 関連遺伝子を除くと下記 13 遺伝子が抽出されてきた。したがって、発現変動起点に着目する本解析手法により、

少なくとも転写制御を受ける遺伝子につき、効率よく Nkx2-5 シグナルネットワークに属すると考えられる遺伝子が抽出できた。

ANKRD1、COL1A2、EGR2、MYH6、MYH7、MYL4、MYL7、MYOM1、PLAGL1、TNNI1、TTN、VCAM1、VCAN

上記 13 遺伝子について、胚における発現の空間的局在につき、Pubmed 検索による文献調査あるいは、公開データベース Emage (http://www.emouseatlas.org/emagewebsite/pages/emage_gene_browse.jsf) による検索をおこなった。全ての遺伝子について胎生 7.25 ~ 8.50 日を含め wholemount ISH データを見いだすことが出来なかったが、少なくとも Myh6 (心房型ミオシン重鎖遺伝子)をはじめ、心臓に発現する細胞骨格系遺伝子である COL1A2、Myh7、Myl4、Myom1、Tnni1、Ttn、Vcam1、Vcan 遺伝子については、Nkx2-5 シグナルネットワークに属し機能しているものと考えられた。今後、wholemount ISH の実施による確認作業が必要であると考えられるが、本手法により効率よく Nkx2-5 シグナル関連遺伝子の抽出ができたものとする。

上記の 13 遺伝子のうち、Myh6、TTN 遺伝子の発現変動につき Actc1 遺伝子の場合とあわせ図 9 に示す。

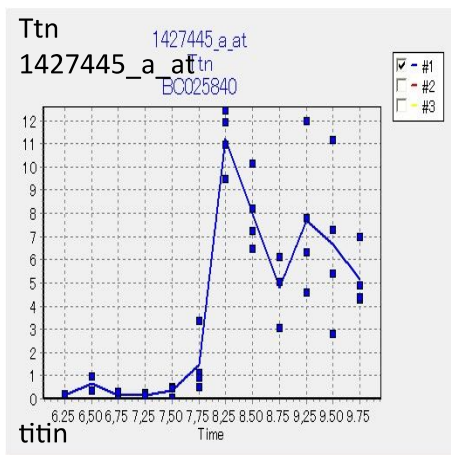
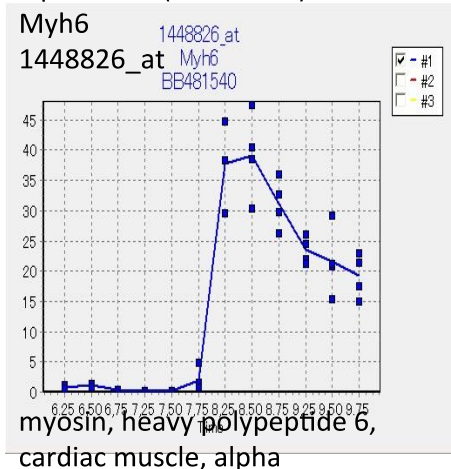
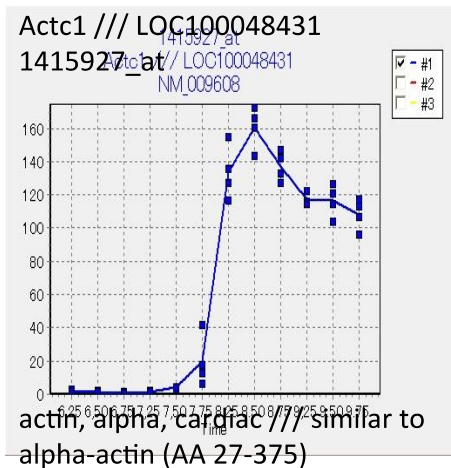


図9 無処置野生型マウス・全胚遺伝子発現経時データベースにおける Nkx2-5 関連遺伝子 Actc1 と発現制御から Nkx2-5 シグナルネットワークに属すると考えられる 13 遺伝子の内、Myh6 及び Ttn 遺伝子の発現変動：

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もとに算出した上で、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が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、Cend1 遺伝子等が含まれ、また Tgf 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.), Seeoul, 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.), Seeoul, 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