

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のインフォマティクス技術開発—」
(H24-化学-指定-006)

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、網羅的解析の一つのモデル事例として、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。

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として、全期間を1周期と仮想して周波数解析を実施した結果、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、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実施し、その有用性、及び転写制御の時系列評価では、発現ピークよりも、発現が開始する時点が重要であること等を確認した。平成25年度は、3次元Spline補間とその微分関数を利用し、一階微分及び二階微分により発現変動起点及び発現ピークの時点を同定する技術の開発を進め、Shh遺伝子シグナルネットワークを局所モデルとして、発生過程のマスター遺伝子である可能性の高い遺伝子を網羅的に抽出出来る事を示し、その過程において、Shhの標的遺伝子であるGli遺伝子の発現は、Shhの受容体を介さずにTGFβ2-Smad3を介して制御されるという、発生初期における非標準的（non-canonical）な新たなShhシグナル制御系を見いだした可能性を報告した。

平成26年度は、この発現変動起点候補を抽出する技術を用いて、全ての発現変動起点について候補遺伝子を抽出・分類し、網羅的に発生初期過程に絡むシグナルネットワークの描出について検討した。発現変動起点が胎生8.25日の遺伝子について、*in silico*のプロモーター解析及びwhole mount ISH データベースを利用し局在情報を加味して解析した結果、発生過程に絡むシグナルネットワークを効率よく描出することができた。この手法により変動を示すすべての遺伝子について同様にシグナルネットワークの描出が可能となったと考えられた。これらの結果により、胎児発生時の遺伝子発現ネットワークの網羅的解析手法とそれに資するの為の網羅的かつ有効なデータの抽出と発現パターンによる分類が完了し、全体像描出の為の最も重要な段階を完了した。更に、Shhでの手法をモデルとした網羅的解析を進めるとともに執筆準備を開始した。

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。

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。

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。

そこで昨年度（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遺伝子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に解析したところ、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648 psが抽出された。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、Ccnd1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、Shhの標的遺伝子であるGli遺伝子の発現を制御する可能性を示唆する結果を得、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を報告した。

平成26年度は、平成25年度の成果を踏まえ、この発現変動基点及び発現ピークの時点を同定する技術を利用しつつ、全ての発現変動起点について候補遺伝子を抽出・分類し、網羅的に発生初期過程に絡むシグナルネットワークを描出する事を検討する事とした。

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 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 RNA 5 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 μ g 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。遺伝子発現変動は、独自の解析ソフト MF analyzer を用いて解析した。

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: 発現変動起点ごとの遺伝子の抽出:

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、全ての遺伝子発現変動につき、解析ソフト SeekESP_s.exe を用いて、発現変動起点ごとに自動抽出した。この際、発現変動起点における発現コピー数が 0.3 以上のものを選択した。その結果、発現変動起点別に、全部で 4,395 プロブセット (PS) が抽出された。次いでこの中から、生物学的変動と考えられる遺伝子を抽出するために、解析ソフト MF analyzer で抽出した Surface グラフにおける目視により検討した。その結果、2,218 ps を抽出することができた。この検討時に 1) 本トランスクリプトームデータの開始点である胎生 6.25 日に、ほぼ全ての遺伝子において発現が認められる事 (98%、2,166 ps)、2) 胎生 6.25 日時点で発現変動あるいは発現のピークを示し、その後再び発現変動する (二峰性) 遺伝子が多い事 (40%、895ps) が明らかとなった。二峰性の発現変動を示す遺伝子の場合、はじめの発現変動と次の発現変動とが重なり、境目が不明確となり、次の発現変動起点がどの時点となるのか定めることはできなかった。そこで本解析では、二峰性の発現変動を示す遺伝子は選択せず、一峰性の発現変動を示す遺伝子 (60%、1,323 ps) について検討を進めることとした。図 1 に、二峰性の発現変動を示す遺伝子の例として Met 遺伝子、一峰性の発現変動を示す遺伝子の例として Aldob 遺伝子の発現変動を示す。

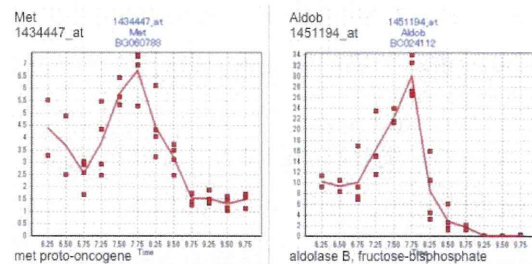


図 1 無処置野生型マウス・全胚遺伝子発現経時データベースにおける二峰性の発現変動を示す遺伝子の例として Met 遺伝子 (左)、一峰性の発現変動を示す遺伝子の例として Aldob 遺伝子 (右) の発現変動:

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。

得られた、目視による生物学的変動と考えられる遺伝子の内、一峰性を示す遺伝子 1,323 ps について、発現変動起点別に遺伝子数を記すと以下の通りとなった。なお解析ソフト SeekESP_s.exe を用いて、発現変動起点ごとに自動抽出した際、発現変動起点が胎生 8.50、8.75、9.25、9.50、9.75 のものは得られなかった。この理由として、これらの場合、発現ピークが定まらない為、抽出されなかったものと考えられた。

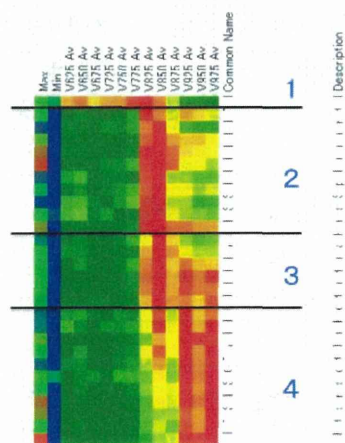
発現変動起点	遺伝子数(ps)
6.50	3
6.75	7
7.25	239
7.50	837
7.75	209
8.25	28
計	1,323

表に示した通り、発現変動起点が胎生 7.50 の遺伝子数が最も多い事が明らかとなった。

次いで、発現制御因子とその標的遺伝子の発現変動は、発現変動起点は前者が早いですが、発現変動パターンは両者で似ているとの仮説から、発現変動起点について、遺伝子の発現変動パターン毎に分類し、それぞれについて、プロモーター解析 (*in silico*) 及び、wholemout ISH による発現の空間局在を検討することにより、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の検討をおこなった。まず、発現変動起点がもっとも遅い 8.25 日の場合について解析する事とした。

C-2: 発現変動起点が胎生 8.25 日の場合の検討:

発現変動起点が胎生 8.25 日を示す 28 ps について、発現変動パターンにより、下記の通り、4 つのグループに分類した。横軸は胎齢を示しており、各色は、赤、オレンジ、黄色、黄緑、緑、青緑、青の順に発現量が多い事を示している。



各グループそれぞれについて、含まれている遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.)における Upstream Analysis を用いて検討した。当該遺伝子について、転写調節する上流遺伝子が得られるが、その中から、発現変動起点が、当該遺伝子のものの直前の観測時点のもの、またその発現変動起点以降の発現変動パターンが当該遺伝子のものと似ているものを選択した。

グループ 1 の遺伝子では上流遺伝子は得られなかった。グループ 2 の遺伝子では、上流遺伝子として多くのものが得られたが、この内、発現変動起点が胎生 7.75 日で、発現変動が当該遺伝子と似たものを示すものとして、発現変動が一峰性を示す Sox10 (当該遺伝子 PLP1、RET)、Tnnt2 (当該遺伝子 Myh7)、Zfp2 (Fog2) (当該遺伝子 MYH6、MYH7) 遺伝子、及び二峰性を示す Myocd (当該遺伝子 MYH6、MYH7)、Foxp1 (当該遺伝子 MYH6、MYH7) 遺伝子の計 5 つの上流遺伝子が得られた。グループ 3 では上流遺伝子は得られなかった。グループ 4 では、発現変動が二峰性を示す Snai2 (当該遺伝子 Cxcl12 [SDF1]) の一つの上流遺伝子が得られた。

上流遺伝子と当該遺伝子の発現の空間的局在が一致もしくは隣接しないと、当該遺伝子発現は、上流遺伝子により制御されないと考えられる為、上記 6 遺伝子について、マウス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/emagewebap>)

p/pages/emap_gene_browser.jsf)による検索をおこなった。発現変動起点以降の胎生約 9.5~10.5 日の胚では、上記当該遺伝子の発現は全て、上流遺伝子の発現部位と同様な、あるいは隣接して限局する空間的発現パターンが認められた。したがって、当該遺伝子はこの時期の発生過程において、各上流遺伝子の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る。この内、上流遺伝子 Sox10 と Ret 遺伝子の whole mount ISH による空間的発現パターンを図 2 に示す。

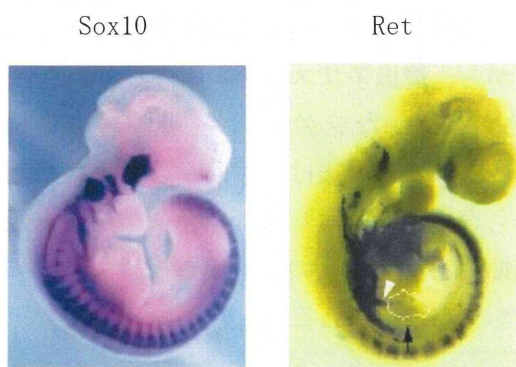


図 2 マウス全胚における Sox10 (左) 及び Ret (右) 遺伝子の発現 (胎生 9.5 日)

したがって、発現変動起点が胎生 8.25 日の 28 ps について本解析を検討したところ、それぞれの当該遺伝子の転写調節する上流遺伝子が得られ、下記のシグナルネットワークが得られた。

上流遺伝子	→	当該遺伝子
Sox10	→	Plp1*, Ret
Tnnt2	→	Myh7*
Zfpm2	→	Myh6*, Myh7*
Myocd	→	Myh6*, Myh7*
Foxp1	→	Myh6, Myh7

Snai2 → Cxcl12*

当該遺伝子に*印がついているものは、Pubmed 検索にて、マウス初期胚において、上流遺伝子による当該遺伝子の転写調節に関する報告が見いだされなかったものであり、未報告と考えられるものである。

以上、発現変動起点が胎生 8.25 日を示す 28 ps について解析を進めたが、本解析手法により、その他の発現変動起点の遺伝子についても同様なシグナルネットワークの描出が可能と考える。

C-3: 転写調節上の、より上流のシグナルネットワークの描出:

次いで、これまで得られたシグナルネットワークについて、転写調節上の、より上流の遺伝子の探索とシグナルネットワークの描出の検討をおこなった。一例として、「Tnnt2→Myh7」のネットワークにつき検討した。Tnnt2 遺伝子は、発現変動起点が胎生 7.75 日の遺伝子リスト (209 ps) 中に存在した。発現変動起点が胎生 7.75 日の遺伝子リストは、発現変動パターンにより 9 つのグループに分類でき、Tnnt2 遺伝子はグループ 7 の中に存在した。このグループ 7 について、プロモーター解析 (*in silico*) を検討したところ、発現変動起点が胎生 7.50 日で、発現変動が当該遺伝子と似たものを示すものとして、発現変動が一峰性を示す Gata4 遺伝子 (当該遺伝子 ACTC1、ACTN2、ANKRD1、ATP2A2、MYL4、TNNT2)、及び二峰性を示す Tbx5 (当該遺伝子 ACTC1、ACTN2、ANKRD1、ATP2A2、MYL4、TNNT2)、Mef2c (当該遺伝子 ACTC1、ACTN2、ATP2A2、MYL4、TNNT2) 遺伝子の計 3 つの上流遺伝子が得られた。この 3 遺伝子について、マウス胚に

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 による検索をおこなった。発現変動起点以降の胎生約 9.5~10.5 日の胚では、上記当該遺伝子の発現は全て、上流遺伝子の発現部位と同様な、あるいは隣接して限局する空間的発現パターンが認められた。したがって、当該遺伝子はこの時期の発生過程において、各上流遺伝子の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る。この内、上流遺伝子 Gata4 と Tnnt2 遺伝子の whole mount ISH による空間的発現パターンを図 3 に示す。

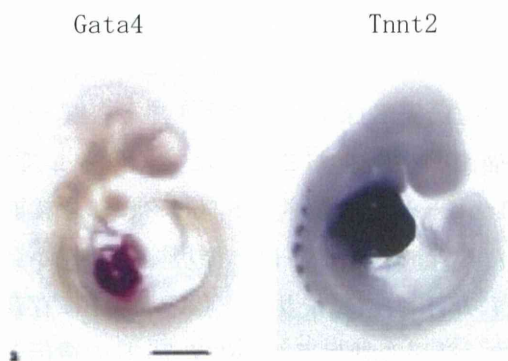


図 3 マウス全胚における Gata4 (左) 及び Tnnt2 (右) 遺伝子の発現 (胎生 9.5 日)

したがって、「Tnnt2→Myh7」のネットワークの上流遺伝子として Gata4、Tbx5 及び Mef2c 遺伝子が見いだされ、結果として下記のシグナルネットワークが得られた。

Gata4、Tbx5、Mef2c → Tnnt2 → Myh7

この点、この GATA4、Mef2c、Tbx5 の 3 遺伝子をマウス線維芽細胞に導入することにより、誘導心筋細胞 (iCM 細胞) を作製し

たとの報告 (Ieda M et al, Cell 142(3): 375-386, 2010) があり、本解析結果は、この iCM 細胞作製の際のシグナルネットワークの一端を見いだした可能性がある。

以上の結果から、*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、発現変動起点に着目した本解析手法により、網羅的に発生初期過程に絡むシグナルネットワークの描出シグナルネットワークを効率的に描出することができるものと考えられる。

他方、本解析では、発現ピークが二回、すなわち二峰性の発現変動を示す遺伝子については、発現変動起点が不明確であることから、遺伝子リストから除外している。

さらに詳細なシグナルネットワークの描出に向けて、今後は、2 回目の発現変動起点も含めて抽出する技術開発、条件設定及び抽出パラメータの最適化を検討する必要があるものと考えられる。

D. 結論

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については発現変動基点及び発現ピークの時点に着目する微分関数を利用した解析手法の開発と解析を進め、すでに昨年度 (平成 25 年度) に Shh 遺伝子シグナルネットワークをモデルに、発生過程のマスター遺伝子である可能性の高い遺伝子を網羅的に抽出出来る事を報告したが、今年度 (平成 26 年度) は、全ての発現変動起点について候補遺伝子を抽出・分類し、網羅的に発生初期過程に絡むシグナルネットワークの描出について検討した。発現変動起点が胎生 8.25 日の遺伝子について検討した

結果、報告されていない発生過程に絡むシグナルネットワークを効率よく描出することができた。その他の発現変動起点の遺伝子についても同様なシグナルネットワークの描出が可能と考える。これらの結果により、胎児発生時の遺伝子発現ネットワークの網羅的解析手法とそれに資するの為の網羅的かつ有効なデータの抽出と発現パターンによる分類が完了し、全体像描出の為の最も重要な段階を完了した。更に、Shhでの手法をモデルとした網羅的解析を進めるとともに執筆準備を開始した。

E. 研究発表

1. 論文発表

Janesick A, Nguyen TT, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Chandraratna RA, Kanno J and Blumberg B, Active Repression by RAR γ Signaling is Required for Vertebrate Axial Elongation. Development 141(11): 2260-2270, 2014.

Tanaka M, Aisaki K, Kitajima S, Igarashi K, Kanno J and Nakamura T, Gene expression response to EWS-FLI1 in mouse embryonic cartilage. Genomics Data 2: 296-298, 2014.

2. 学会発表

Kitajima S and Kanno J, Progress of Percellome Toxicogenomics Project, 2014 Spring International Symposium of Korean Society of Toxicology (KSOT) (2014. 5. 22) Seoul, Korea.

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純

毒性の網羅的把握のための遺伝子発現ネットワーク描出と動的バイオマーカー抽出、第41回日本毒性学会学術年会(2014. 7. 2)

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吸入暴露時の海馬 Percellome トキシコゲノミクス-化学構造が異なる3物質の比較-、第41回日本毒性学会学術年会(2014. 7. 3)

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡

Percellome Project の進捗-新型反復暴露による慢性毒性の予測に向けての分子背景の解析-、第41回日本毒性学会学術年会(2014. 7. 2)

相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純

遺伝子発現からみた毒性学-Percellome トキシコゲノミクスの進捗-、第36回日本中毒学会総会・学術集会(2014. 7. 25)

Kanno J, Aisaki K and Kitajima S, Percellome toxicogenomics project as the 3R-toxicology and the foundation of in vitro- and in silico-toxicology, the 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC9) (2014. 8. 27) Prague, Czech Republic

Kanno J, Aisaki K and Kitajima S, Percellome Toxicogenomics, 50th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2014) (2014. 9. 9) Edinburgh, UK

古川佑介、種村健太郎、相崎 健一、北嶋 聡、
菅野 純

アセチルコリンエステラーゼ阻害作用をも
つ殺虫剤の暴露による遅発性の中樞神経影
響の比較、第 17 回環境ホルモン学会研究発
表会(2014. 12. 10)

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

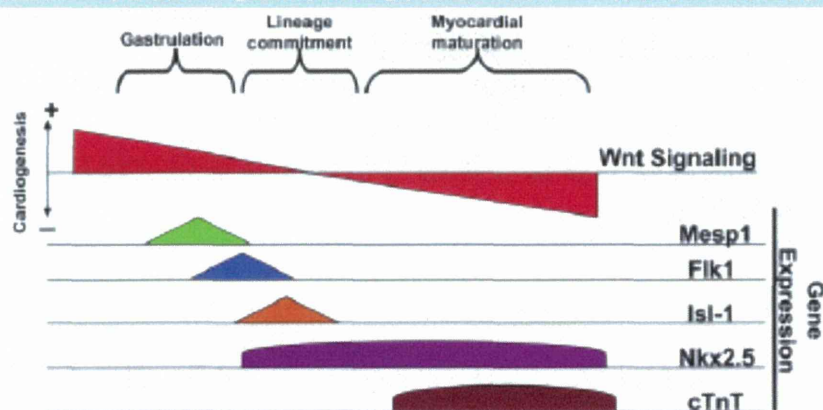


Figure 1. The Biphasic Effect of Wnt Signaling in Cardiac Mesoderm Induction and Myocardial Differentiation

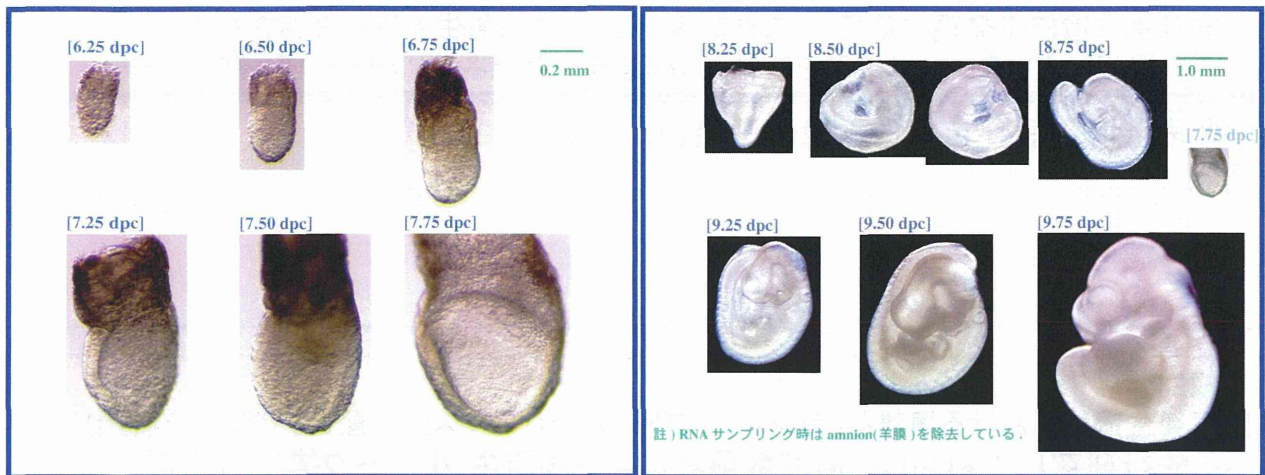
The role of Wnt signaling in cardiovascular lineage specification and differentiation is depicted in the context of the expression of mesoderm and cardiac transcription factors during embryogenesis. cTnT, cardiac troponin T.

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、卵黄囊膜は除去)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

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が多く、変動の方向もわかっている

遺伝子発現シグナルの流れを解析するのに向いている

・発生過程： 活発な細胞増殖や多様な細胞分化が同時並行で起こる

・発生過程： 遺伝子発現変動の解析が困難

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

- ◁ 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抽出技術の適用拡大を検討(性能評価)

平成25年度：

マスター遺伝子を基軸とした網羅的な遺伝子発現変動の解析

平成26年度：

発生過程における遺伝子発現変動の解析と発生過程の解析

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

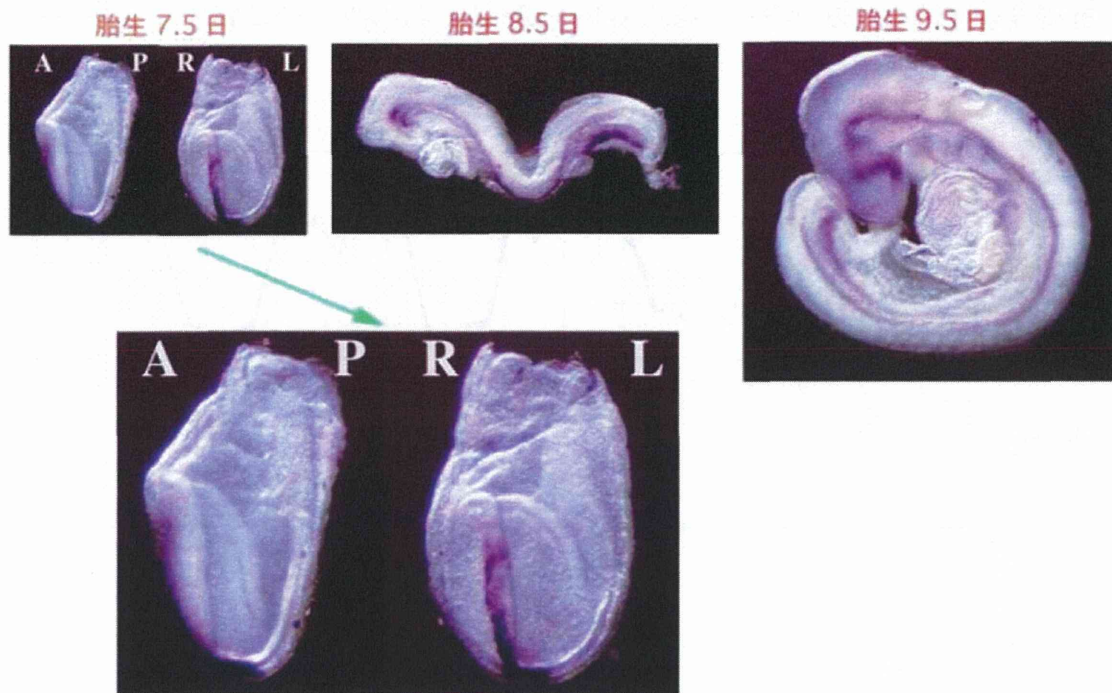
= [Time point:12点(6時間毎、n = 2~4)]

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

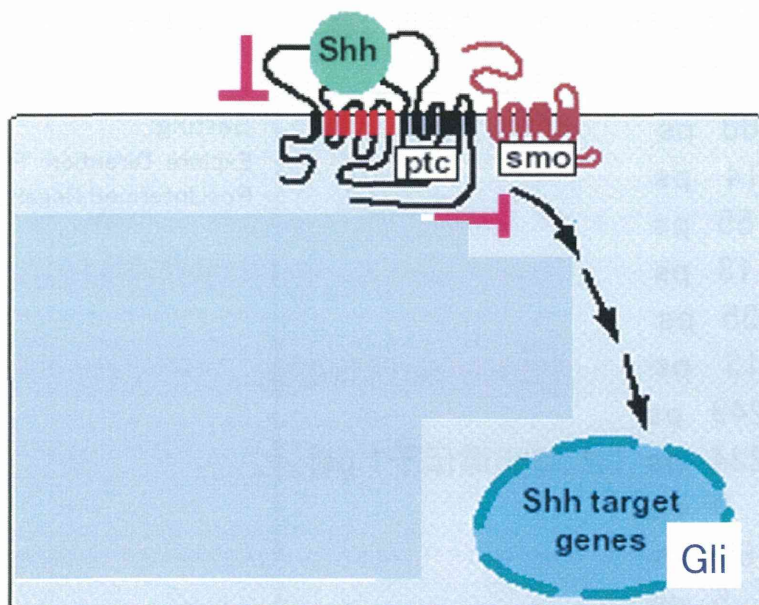
胎生7.5-9.5日マウス胚におけるShhの発現



mRNAの発現局在を全胚にて可視化
(whole mount ISH)

Shhシグナリング

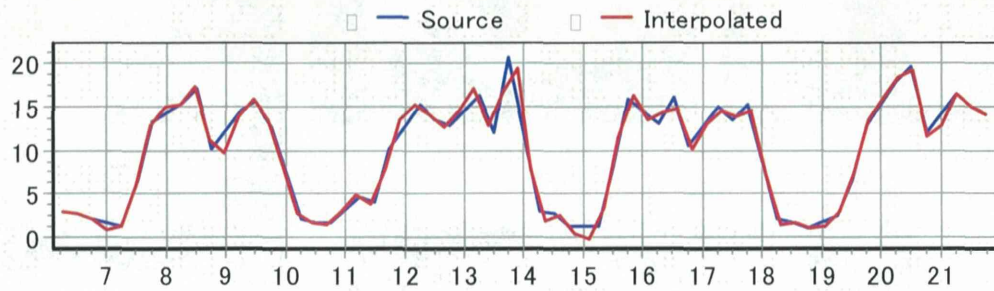
Shh→Ptch1→Smo→Gli



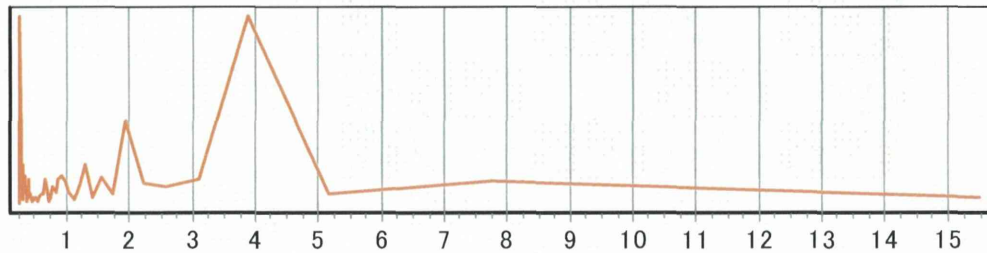
平成24年度(初年度)研究

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



平成24年度(初年度)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

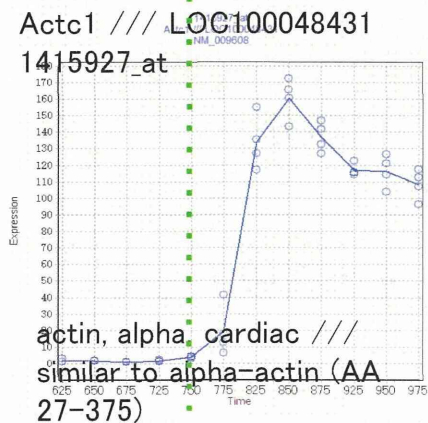
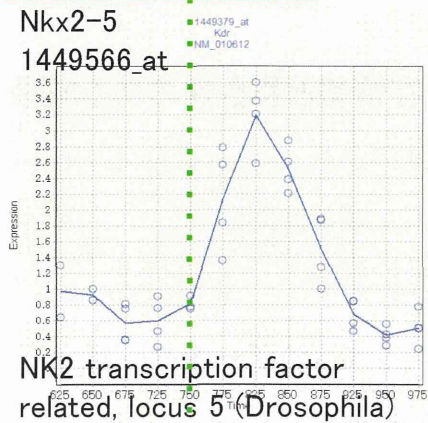
結果 ← 7,039 ps

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

平成24年度(初年度)研究



・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

・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

平成24年度(初年度)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

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

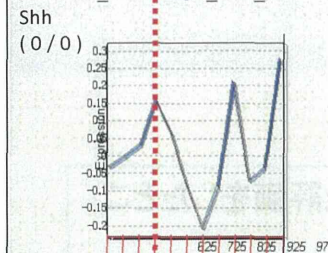
ES・EBのデータベース

2階微分

1階微分

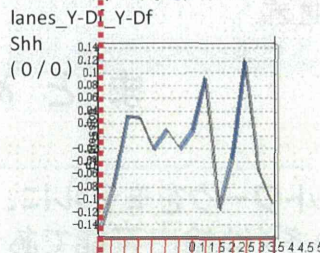
元の遺伝子発現

FTG003C_three_lanes_Y-Df_Y-Df

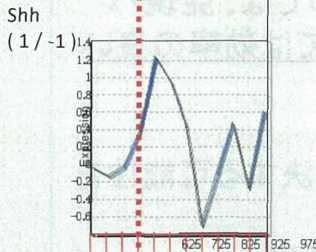


Shh=3

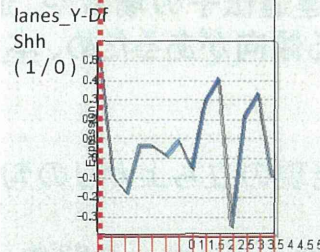
ESEB000(半日刻み) Three



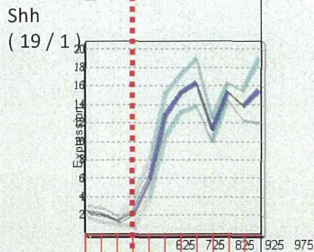
FTG003C_three_lanes_Y-Df



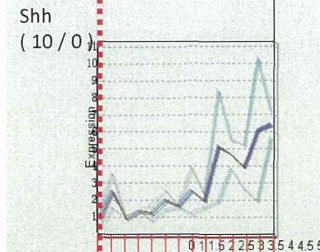
ESEB000(半日刻み) Three



FTG003C_three_lanes



ESEB000(半日刻み) Three lanes



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、
遺伝子発現ネットワークの流れを解析するのに適している

→ 発生過程の多様性や様々な細胞分化が同時進行、異なる遺伝子
発現が併存する

・解析手法

発生過程の自律的な遺伝子発現変動現象を捉えるためのマスター遺伝子の網羅的解析

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

発生過程の自律的な遺伝子発現変動現象を捉えるためのマスター遺伝子の網羅的解析

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)：
サンプリング期間： 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、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

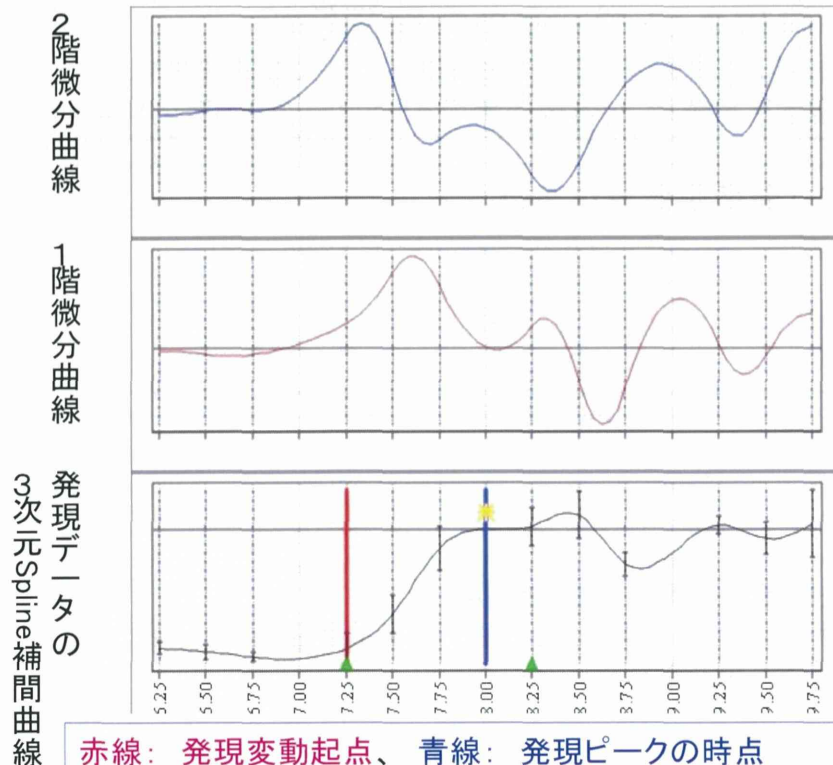
- ・プロモーター解析(*in silico*)
- ・wholemoutt ISHによる発現の空間局在を検討

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

解析ソフト
SeekESP
を利用
By Dr Aisaki



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)

モデル

Shhシグナリング

Shh → Ptch1 → Smo → Gli

