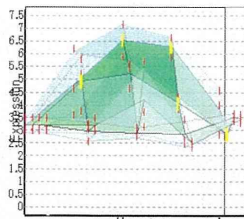
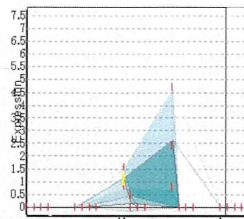


TTG212-L_SpNC₄0_{41818_at}



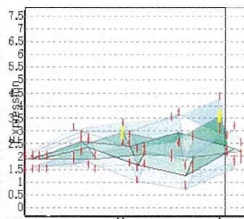
neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 9

TTG212-L_mlang803_0



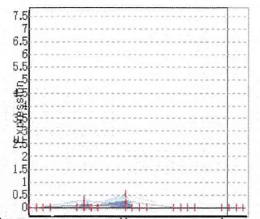
neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 9

TTG037-L_SpNC₄0_{41818_at}



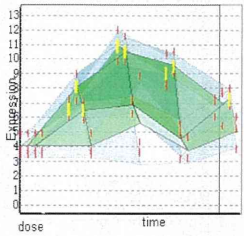
neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 9

TTG037-L_mlang803_0



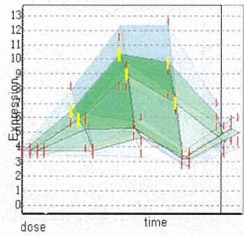
neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 9

TTG212-L_SpNC₄0_{4171_a_at}



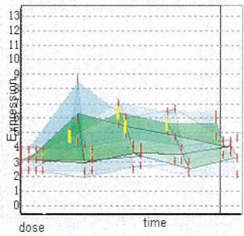
shroom family member 1

TTG212-L_mlang803_0



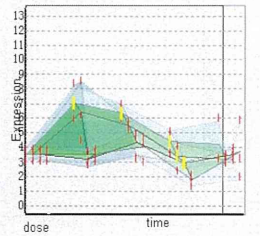
shroom family member 1

TTG037-L_SpNC₄0_{4171_a_at}



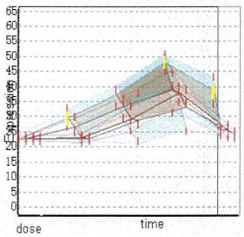
shroom family member 1

TTG037-L_mlang803_0



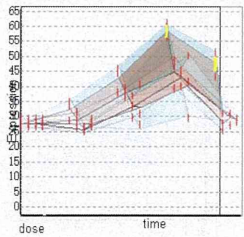
shroom family member 1

TTG212-L_SpNC₄0_{41330_at}



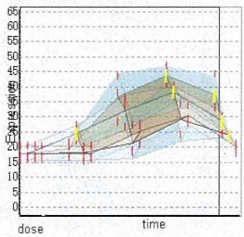
tubulin folding cofactor E-like

TTG212-L_mlang803_0



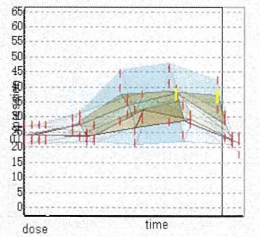
tubulin folding cofactor E-like

TTG037-L_SpNC₄0_{41330_at}



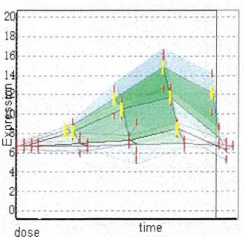
tubulin folding cofactor E-like

TTG037-L_mlang803_0



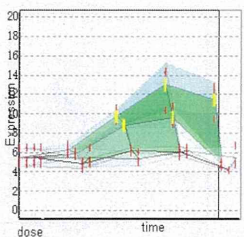
tubulin folding cofactor E-like

TTG212-L_SpNC₄0_{41291_at}



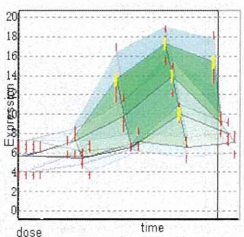
exosome component 8

TTG212-L_mlang803_0



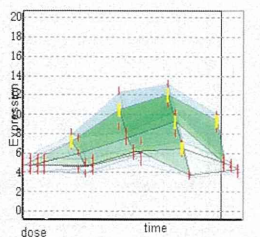
exosome component 8

TTG037-L_SpNC₄0_{41291_at}



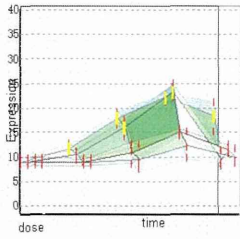
exosome component 8

TTG037-L_mlang803_0



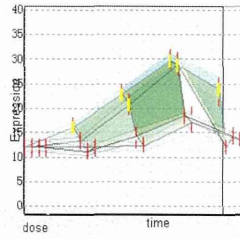
exosome component 8

TTG212-L_SpNC_{1150_a.at}



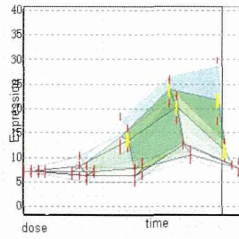
solute carrier family 25, member 37

TTG212-L_mlang_{803_a.0}



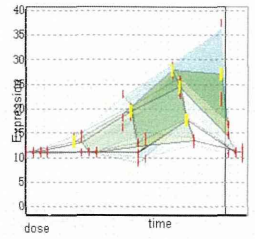
solute carrier family 25, member 37

TTG037-L_SpNC_{1150_a.at}



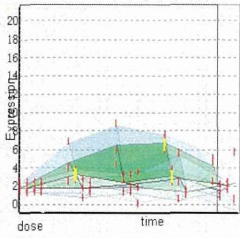
solute carrier family 25, member 37

TTG037-L_mlang_{803_a.0}



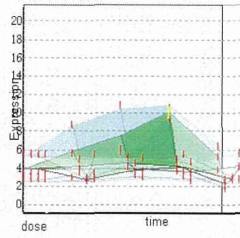
solute carrier family 25, member 37

TTG212-L_SpNC_{242_a.at}



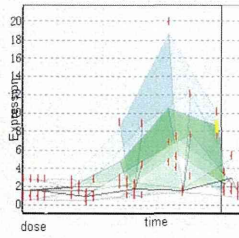
myelocytomatosis oncogene

TTG212-L_mlang_{803_a.0}



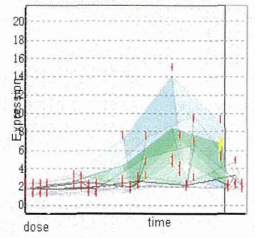
myelocytomatosis oncogene

TTG037-L_SpNC_{242_a.at}



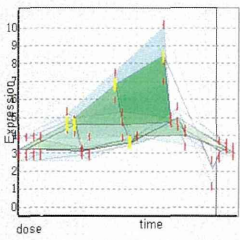
myelocytomatosis oncogene

TTG037-L_mlang_{803_a.0}



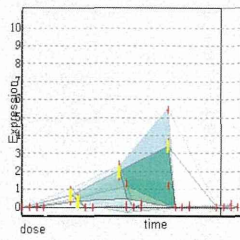
myelocytomatosis oncogene

TTG212-L_SpNC_{417_s.at}



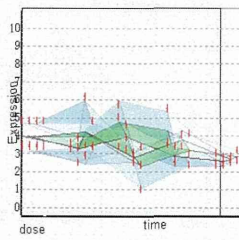
regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 2

TTG212-L_mlang_{803_a.0}



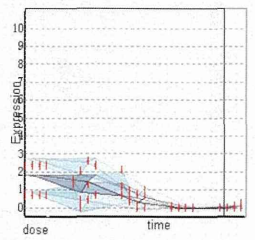
regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 2

TTG037-L_SpNC_{417_s.at}



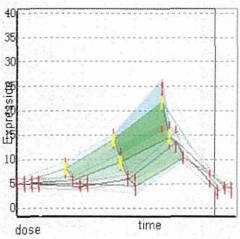
regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 2

TTG037-L_mlang_{803_a.0}



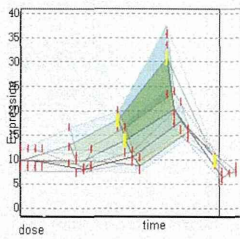
regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 2

TTG212-L_SpNC_{221_a.at}



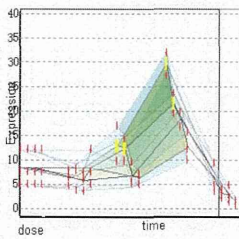
RIKEN cDNA 1810055G02 gene

TTG212-L_mlang_{803_a.0}



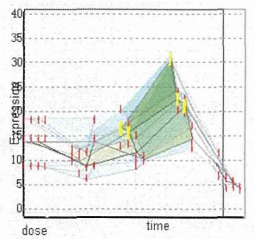
RIKEN cDNA 1810055G02 gene

TTG037-L_SpNC_{221_a.at}



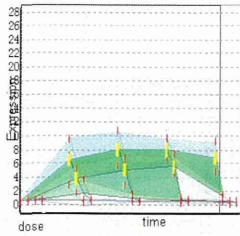
RIKEN cDNA 1810055G02 gene

TTG037-L_mlang_{803_a.0}



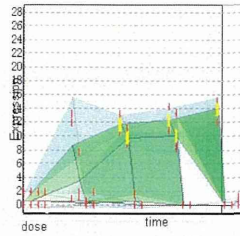
RIKEN cDNA 1810055G02 gene

TTG212-L_SpNC_{420971_at}



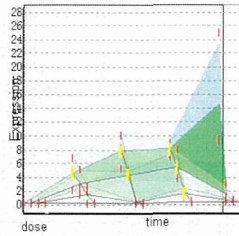
growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta

TTG212-L_mlang_{803_0}



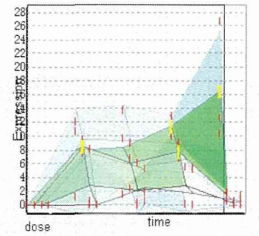
growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta

TTG037-L_SpNC_{420971_at}



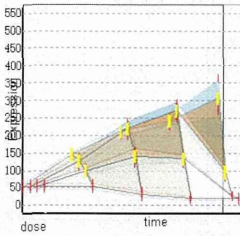
growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta

TTG037-L_mlang_{803_0}



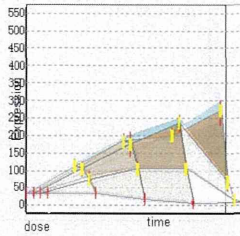
growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta

TTG212-L_SpNC_{42045_s_at}



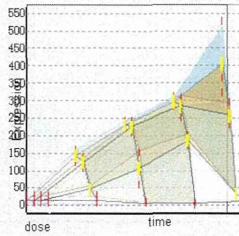
cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10

TTG212-L_mlang_{803_0}



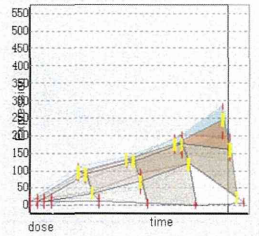
cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10

TTG037-L_SpNC_{42045_s_at}



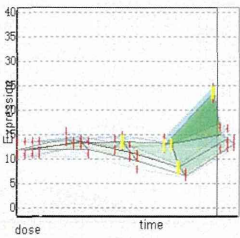
cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10

TTG037-L_mlang_{803_0}



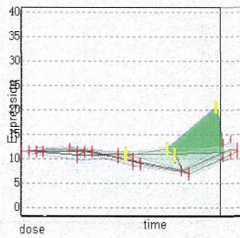
cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10

TTG212-L_SpNC_{40946_at}



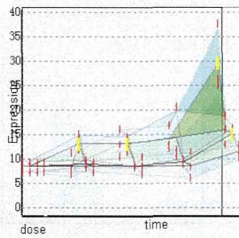
ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1

TTG212-L_mlang_{803_0}



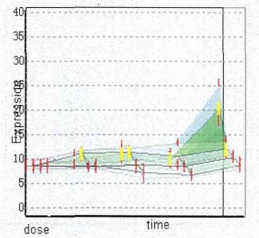
ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1

TTG037-L_SpNC_{40946_at}



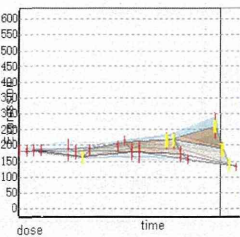
ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1

TTG037-L_mlang_{803_0}



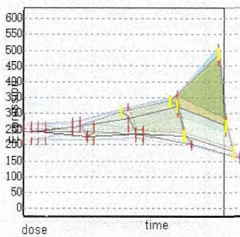
ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1

TTG212-L_SpNC_{41075_at}



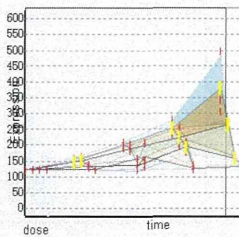
carboxylesterase 2A

TTG212-L_mlang_{803_0}



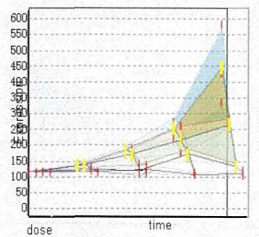
carboxylesterase 2A

TTG037-L_SpNC_{41075_at}



carboxylesterase 2A

TTG037-L_mlang_{803_0}



carboxylesterase 2A

平成27年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業、H27-化学-指定-001）
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
— 新型反復暴露実験と単回暴露実験の網羅的定量的遺伝子発現情報の対比による毒性予測
の精緻化と実用版毒性予測評価システムの構築 —

分担研究報告書

分担研究課題：「化学物質の反復暴露による基線反応成立のエピジェネティクス
機構解析」

研究分担者 北嶋 聡 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部
研究協力者 小野竜一 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

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、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。反復投与時の過渡反応を修飾する基線反応の成立には、当該遺伝子のヒストン修飾やDNAメチル化等の遺伝子発現修飾機構（所謂Epigenetics）が関わる可能性が指摘されることから、本分担研究では次世代シーケンサーを利用し、反復経口投与した際の肝サンプルについてヒストン修飾やDNAメチル化状態を網羅的に検討することを目的とする。

平成27年度は、まず次世代シーケンサーを利用するDNAメチル化解析手法の性能評価を陽性対照サンプルを用いて行った。陽性対照サンプルとして、雄性C57BL/6Jと雌性JF1とのF1マウス（4週齢）の肝サンプルを実験に用いた。C57BL/6JとJF1系統間には系統間に約1千万の一塩基多型(SNPs)が存在する。このサンプルを用いる事で、親由来のメチル化の違いにより発現制御される事が既知のインプリンティング遺伝子のDNAメチル化について、親の由来に分けて決定でき、本解析法の性能評価が可能となる。加えて、DNAのメチル化の測定法としてPost-bisulfite adaptor-tagging (PBAT)法が知られているが、この手法と最近になって市販された、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kitを用いる手法（Accel-NGS法）との比較検討もおこなった。

検討の結果、PBAT法よりも、Accel-NGS法の方が、網羅的にDNAメチル化状態を把握できる事が明らかとなった。またC57BL/6Jマウス及びJF1マウスの遺伝子多型を用いて、既知の父性発現インプリンティング遺伝子であるPeg10及びMestのDMR (Differentially Methylated Region)にマップされるリードの親由来を解析したところ、全てのメチル化されたシーケンスリードはC57BL/6Jマウス由来であり、他方、全ての非メチル化されたシーケンスリードはJF1マウス由来であることが確認できたことから、ゲノムDNAのbisulfite処理は完全に行われており、Accel-NGS法を利用する次世代シーケンサーを用いた本解析法により、DNAメチル化状態を網羅的に検討できることが確認できた。

引き続き本解析手法を用いて、先行研究において取得済みの、溶媒（コーンオイル）を単回投与した際、及び四塩化炭素を14日間反復投与した際の、12週齢の雄性C57BL/6Jマウスの肝サンプルについて、DNAメチル化状態を網羅的に解析中であり、平成27年度中に解析が終了する見通しである。

(*） mRNA発現値を細胞1個当たりのコピー数として絶対定量する方法。

A. 研究目的

本研究は、化学物質が生体に及ぼす毒性影響の評価手法を、生体反応の分子メカニズムに基いて迅速化、高精度化、省動物化し、インフォマティクス技術と統合して実用化する事を目的とする。即ち、先行研究にて構築済みの延べ6.5億遺伝子情報からなる高精度トキシコゲノミクスデータベースと単回暴露時の毒性ネットワーク解析技術を基盤に、これらを維持・拡充しつつ、反復暴露のネットワーク解析、及び、その予測評価技術を開発する。ここにインフォマティクス専門家によるシステムトキシコロジーの概念を導入し、反復暴露にも対応する網羅的毒性予測評価システムの構築を進める。

反復暴露影響の分子機序解析による、既存の単回暴露実験データベースからの反復毒性予測の性能評価においては、先行研究において、肝及び肺における四塩化炭素の新型反復暴露実験により、単回暴露時に発現変動した遺伝子のほぼ全てについて、基線反応成分（暴露回数を重ねるに連れて発現値のベースライン（基線）が徐々に変動する反応成分）は、過渡反応成分（単回暴露時の2, 4, 8, 24時間のうちに発現が変動する速い変化の成分）が増加する場合は増加、減弱する場合は減少することを見いだした。増加する事例があることから、反復投与による代謝誘導による化学物質の分解促進では説明できない事象であると考えられた。むしろ、この過渡反応と基線反応の関連性に関する知見は、生物学的・毒性学的に新規性が高くエピジェネティクスに関わる分子機序の関与が示唆されることから、これを明らかにすることは、反復毒性の分

子毒性学的理解の促進、及び、単回暴露実験データベースからの反復毒性予測法を開発するにあたり重要と考えられる。

本分担研究では、反復投与時の過渡反応を修飾する基線反応の成立には、当該遺伝子のヒストン修飾やDNAメチル化等の遺伝子発現修飾機構（所謂、Epigenetics）が関わる可能性が指摘される事から、この可能性を検討する為、次世代シーケンサーを利用し、反復経口投与した際の肝サンプルについてヒストン修飾やDNAメチル化状態を網羅的に検討することを目的とする。平成27年度は、次世代シーケンサーを利用するDNAメチル化解析手法の性能評価と、先行研究において取得済みの、四塩化炭素を14日間反復投与した際の肝サンプルのDNAメチル化状態につき網羅的に検討した。

B. 研究方法

B-1: サンプル

12週齢の雄性 C57BL/6J マウス（日本チャールスリバー）について、先行研究において取得済みの、溶媒（コーンオイル）を単回投与した際、あるいは四塩化炭素を14日間反復投与した際の肝サンプルを実験に用いた。また本解析系の陽性対照サンプルとして、雄性 C57BL/6J と雌性 JF1 との F1 マウス（4週齢）の肝サンプルを実験に用いた。

B-2: bisulfite 処理

肝サンプルを、ProK (10mg/ml) 55 °C 0/N 処理後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿、及び 70 % エタノール洗浄により、DNA を抽出、精製した。抽出した DNA は Pico Green dsDNA 定量試薬 (Thermo) を用いて DNA 濃度を決定し、DNA

500 ng を用いて bisulfite 処理を EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research 社) により行った。

B-3: 次世代シーケンサーを用いた whole genome bisulfite sequencing

Bisulfite 処理後の DNA 500 ng 用いて、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit (Swift 社) を用いて、Illumina 社の次世代シーケンサー NextSeq500 用の whole genome bisulfite sequencing に対応したライブラリーを作成した。ライブラリーは、0.2 N NaOH による denature を行った後に、NextSeq500 v1 試薬に付属の HT1 溶液を用いて 1.8 pM に希釈し、コントロールとして phiX ライブラリーを 20% 加えてシーケンスを行った。シーケンス反応は、dual index (8bp x 2), 151 cycle single read の設定とした。シーケンス終了後は、bcl2fastq ソフトウェアにより fastq ファイルを生成し、fastq groomer ソフトウェアによる grooming を行った後に、マッピングソフト bowtie2 による bisulfite 処理済みのマウスゲノム (MM10) に対してマッピングを行った。マッピング後は、シーケンス可視化ソフト IGV の bisulfite mode を用いて DNA メチル化を解析した。

(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 27 年 4 月版)」。

C. 研究結果及び考察

C-1: 次世代シーケンサーを利用する DNA メチル化解析手法の性能評価

反復投与時の過渡反応を修飾する基線反応の成立には、当該遺伝子のヒストン修飾や DNA メチル化等の遺伝子発現修飾機構 (所謂 Epigenetics) が関わる可能性が指摘される事から、本分担研究では次世代シーケンサーを利用し、反復経口投与した際の肝サンプルについて DNA メチル化状態を網羅的に検討する。

平成 27 年度は、まず本解析系の陽性対照サンプルとして、雄性 C57BL/6J と雌性 JF1 との F1 マウス (4 週齢) の肝サンプルを実験に用いた。C57BL/6J と JF1 系統間には系統間に約 1 千万の一塩基多型 (SNPs) が存在する。このサンプルを用いる事で、親由来のメチル化の違いにより発現制御される事が既知のインプリンティング遺伝子の DNA メチル化について、親の由来に分けて決定でき、本解析法の性能評価が可能となる。

加えて、DNA のメチル化の測定法として Post-bisulfite adaptor-tagging (PBAT) 法が知られているが、この手法と最近になって市販された、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を用いる手法 (Accel-NGS 法) との比較検討もおこなった。1 枚のフローセルを用いてシーケンスを行い、得られたシーケンス数は、PBAT 法で、およそ 1.6 億リードに対し、Accel-NGS 法では 2.7 億リードと、Accel-NGS 法の方が 1.7 倍多いシーケンスが得られた。また、得られたシーケンスをマウスゲノムに対してマッピングすると、PBAT 法では 3 千万リード、他方 Accel-NGS 法ではおよそ 1.4 億リードと、Accel-NGS 法の方がおよそ 5 倍のシーケンスリードをマッピングできた。この結果は、

ランダムプライミングによってアダプターを付加する PBAT 法よりも、酵素によってアダプターを付加する Accel-NGS 法の方が次世代シーケンスライブラリーの作製効率が低いことを意味している。以上のことから、PBAT 法よりも、Accel-NGS 法の方が、網羅的に DNA メチル化状態を把握できる事が明らかとなった。

上記の通り、Accel-NGS 法では、1.4 億リードのシーケンスがマップされたことから、各 150bp の長さがあるので、総計 210 億塩基対のシーケンスを得た計算であり、マウスゲノムのリポートを除いた部分はおよそ 12 億塩基対であることから、約 20 倍の depth でシーケンスができる。網羅的メチル化解析にあたり、1 サンプルあたり、約 10 倍の depth でシーケンスする必要がある為、1 フローセルあたり 2 サンプルまでシーケンス可能である。

次いで、陽性対照サンプルを用いた解析を検討した。凍結肝サンプルよりゲノム DNA を抽出し、bisulfite 処理後、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を用いてライブラリを作成後、NextSeq500 V1 試薬 (150 cycles) を用いて whole genome bisulfite シーケンスを行った結果、Q30 値 (シーケンスのエラー率が 0.1% 以下の比率) は、80.0%、計 2 億 8 千万リードの出力を得た。また、得られたシーケンスリードをマウスゲノム (MM10) に対してマップさせたところ、8 千万リードがマップし、シーケンスの depth はおよそ 20x であった。C57BL/6J マウス及び JF1 マウスの遺伝子多型を用いて、既知の父性発現インプリンティング遺伝子である Peg10 及び Mest の DMR (Differentially Methylated Region) にマ

ップされるリードの親由来を解析したところ、全てのメチル化されたシーケンスリードは C57BL/6J マウス由来であり、また、全ての非メチル化されたシーケンスリードは JF1 マウス由来であることが確認できた。この結果より、ゲノム DNA の bisulfite 処理は完全に行われており、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を利用する次世代シーケンサーを用いた本解析法により、DNA メチル化状態を網羅的に検討できることが確認できた。

C-2: 四塩化炭素を 14 日間反復投与した際の肝サンプルにおける DNA メチル化状態の網羅的な解析

引き続き本解析手法を用いて、12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスについて、先行研究において取得済みの、溶媒 (コーンオイル) を単回投与した際、及び四塩化炭素を 14 日間反復投与した際の肝サンプルについて (投与 2 時間後のもの、それぞれ n=3)、DNA メチル化状態を網羅的に解析した。現在までに、これら全てのサンプルのシーケンスを終了しており、Q30 値は全てのサンプルで 70%を超える出力を得た。得られたシーケンスを、quality による trimming のある場合とない場合でマッピング率の検討を行なったところ、Q20 以上の塩基が 90%以上で trimming を行なった結果、51505499 リードがマップされ、trimming をしない場合は 77454276 リードがマップされた。マッピングの効率を上げるためにシングルリードで 150bp をシーケンスしているため、多少 quality の低い塩基があってもマッピング可能であると考えられる。また、陽性対照部位であるインプリンティング遺伝子、

Peg10 遺伝子の DMR 部位を観測したところ、通常のインプリント型メチル化をしており、bisulfite 処理などに問題はないと考える。

基線反応の変動が認められる遺伝子上流に位置すると考えられる Rictor、E2f1 および Xbp1 遺伝子について、プロモーター部位の DNA メチル化状態について検討したところ、大きな変化は認められなかった。引き続き、網羅的な解析を検討中であり、今年度中に解析を終了する予定である。

D. 結論

平成 27 年度は本解析手法の性能評価を行った結果、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を利用する次世代シーケンサーを用いた本解析法により、DNA メチル化状態を網羅的に検討できることが確認できた。引き続き、四塩化炭素を 14 日間反復投与した際の肝サンプルについて、DNA メチル化状態を網羅的に解析中であり、平成 27 年度中に解析終了の見込みである。この結果により、反復投与時の過渡反応を修飾する基線反応の成立への、当該遺伝子の DNA メチル化による遺伝子発現修飾機構（所謂 Epigenetics）の関与について明らかになるものと考え。来年度は、先行研究あるいは今年度研究において、基線反応の著しかった物質を反復投与した際の肝サンプルについて、同様な検討を実施する予定である。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

Ono R., Ishii M., Fujihara Y., Kitazawa M.,

Usami T., Kaneko-Ishino T., Kanno J., Ikawa M., Ishino F. Double strand break repair by capture of retrotransposon sequences and reverse-transcribed spliced mRNA sequences in mouse zygotes. Scientific Reports 2015 Jul 28;5:12281.

Irie M., Yoshikawa M., Ono R., Iwafune H., Furuse T., Yamada I., Wakana S., Yamashita Y., Abe T., Ishino F., Kaneko-Ishino T. Cognitive Function Related to the Sirh11/Zcchc16 Gene Acquired from an LTR Retrotransposon in Eutherians. PLoS Genetics 2015 Sep 24;11(9):e1005521.

2. 学会発表

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki and Jun Kanno, Dynamic biomarkers translatable to clinical outcomes generated by Percellome Toxicogenomics, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX2015) (2015.6.24), Jeju, Korea

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純
医療現場への還元に向けた Percellome Toxicogenomics による中枢神経毒性の動的バイオマーカー抽出研究
第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015.6.29)

北嶋 聡、種村健太郎、古川佑介、小川幸男、高橋祐次、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、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と遅発性中枢影響解析

第 42 回日本毒性学会学術年会(2015. 6. 30)

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡

Percellome Toxicogenomics における動的バイオマーカー(Dynamic Biomarker)のカタログ化とその毒性予測利用

第 42 回日本毒性学会学術年会(2015. 7. 1)

Ono, R.

Double strand break repair by capture of retrotransposon and mRNA sequences via reverse transcription in the mouse zygote. FASEB "Mobile DNA in Mammalian Genomes", Palm Beach (2015.6.)

H. 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

化学物質の反復暴露による基線反応成立の エピジェネティクス機構解析

研究分担者 北嶋 聡

研究協力者 小野 竜一

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



目 的

次世代シーケンサーを利用し
反復経口投与した際の肝サンプルについて
ヒストン修飾やDNAメチル化状態を
網羅的に検討すること

平成27年度:

次世代シーケンサーを利用するDNAメチル化解析手法の性能評価と、四塩化炭素を14日間反復投与した際の肝サンプル(先行研究にて取得済み)における網羅的メチル化解析

平成28年度:

基線反応の著しかった化学物質を反復投与した際の肝サンプルにおける網羅的メチル化解析およびヒストン修飾状態の解析

平成29年度:

基線反応の著しかった化学物質を反復投与した際の肝サンプルにおける網羅的メチル化解析およびヒストン修飾状態の解析と、3年間のデータを統合解析。

背景

先行研究:

(例)四塩化炭素の新型反復暴露実験: 肝及び肺:

単回暴露時に発現変動した遺伝子のほぼ全て:

基線反応成分*は、過渡反応成分**が、増加する場合は増加、減弱する場合は減少

*: 暴露回数を重ねるに連れて発現値のベースライン(基線)が徐々に変動する反応成分

** : 単回暴露時の2, 4, 8, 24時間のうちに発現が変動する速い変化の成分

増加する事例の存在:

反復投与による代謝誘導による化学物質の分解促進では説明できない事象

→ エピジェネティクス***に関わる分子機序の関与を示唆

***: DNAの配列変化によらない、ゲノムの変異以外のメカニズムで、細胞分裂後も継承される、遺伝子発現あるいは表現型の変化を制御・伝達するシステム

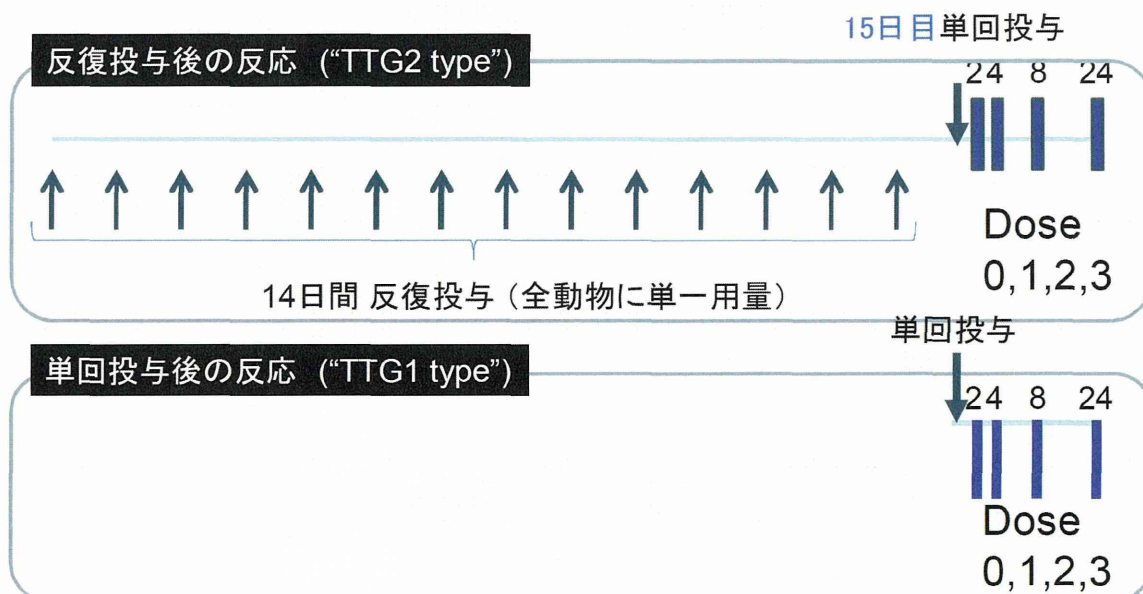
(例)DNAのメチル化・脱メチル化、ヒストンのメチル化・アセチル化、non-coding RNA、ゲノムインプリンティング、X染色体不活性化等

先行研究

新型反復暴露

単回投与 vs 反復投与後の反応

A+A' protocol 四塩化炭素



先行研究

四塩化炭素を、単回及び反復強制経口投与した際の
Percellome法による網羅的遺伝子発現変動の比較解析

四塩化炭素 [Carbon tetrachloride]

投与用量:

単回

[0, 0.7, 2, 7 mg/kg] : TTG119 (多臓器)

反復

5 mg/kg (for 14 days) + [0, 0.7, 2, 7 mg/kg] : TTG130

先行研究

四塩化炭素 単回および反復強制経口投与時の網羅的遺伝子発現変動解析

RSort解析 肝 TTG119L(単回)、TTG130L(反復)

■有意($P < 0.05$)に変動したPS数と、目視により生物学的変化と示唆されたPS数(→)

単回

増加: 827 ps → 265 ps

減少: 936 ps → 19 ps

計284 ps

反復

増加: 1,069 ps → 279 ps

減少: 1,880 ps → 14 ps

計293 ps

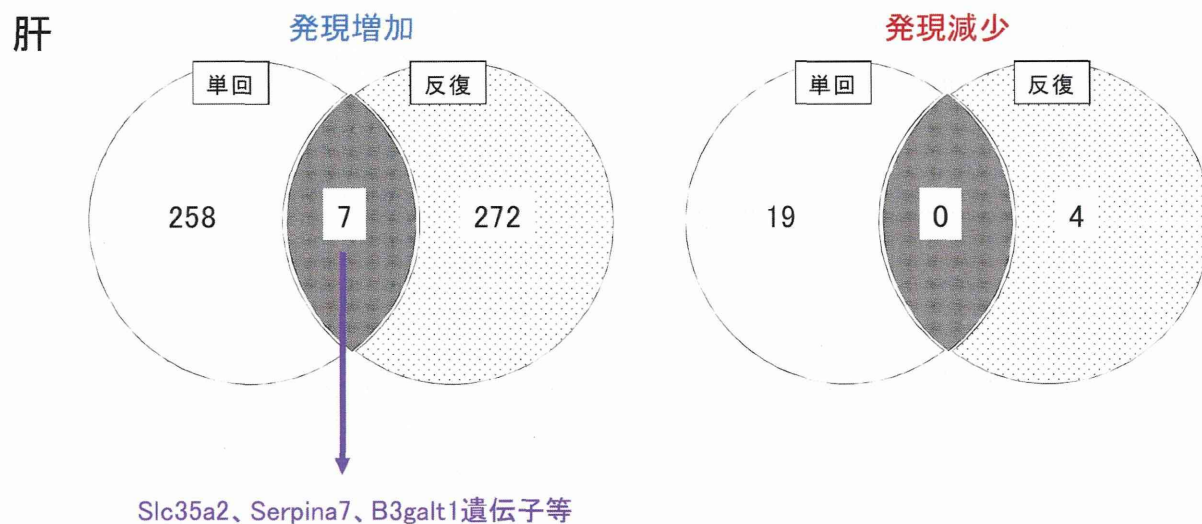
RSort条件:

More than 3
Max Gr No 3
And evaluate 1
 $P < 0.05$
Subt Y= 0
(Hor, Ver)

先行研究

四塩化炭素 単回及び反復経口投与時の肝での発現変動比較
—発現プロファイルは似ていない_増加分で共通するのはSerpina7等の7 ps —

単回 : TTG119L、反復 : TTG130L



先行研究

四塩化炭素_肝_単回:TTG119L、反復:TTG130L

反復投与により、発現が減弱あるいは増強する遺伝子を見いだす為に、単回及び反復投与の際の発現変動を、目視にて比較・確認し、gene listを作成:

発現ピークが顕著に減弱した遺伝子(ps)数:219 ps

発現ピークが顕著に増強した遺伝子(ps)数: 20 ps

発現ピークが同程度の遺伝子(ps)数: 8 ps

両者で発現パターンが異なり判別ができない遺伝子(ps)数:290 ps

[単回の際の発現変動遺伝子数:265 ps(増加)、19ps(減少)、計284ps]

[反復の際の発現変動遺伝子数:279 ps(増加)、14ps(減少)、計293ps]

・単回投与時に発現変動した遺伝子の約8割が、反復投与時に顕著に発現減弱

先行研究

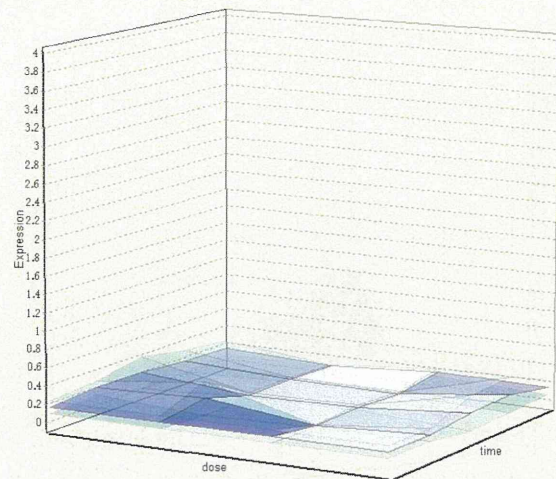
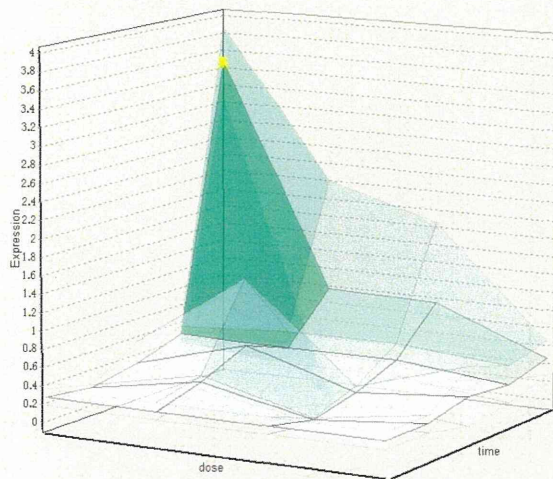
単回暴露時と比較して、新型反復暴露で発現増加が抑制された遺伝子の例

TTG119-L_SpNC_0

14379 四塩化炭素 肝 単回

TTG130-L_SpNC_0

14379[†] 四塩化炭素 肝 反復



Ubqln1
ubiquilin-like

先行研究

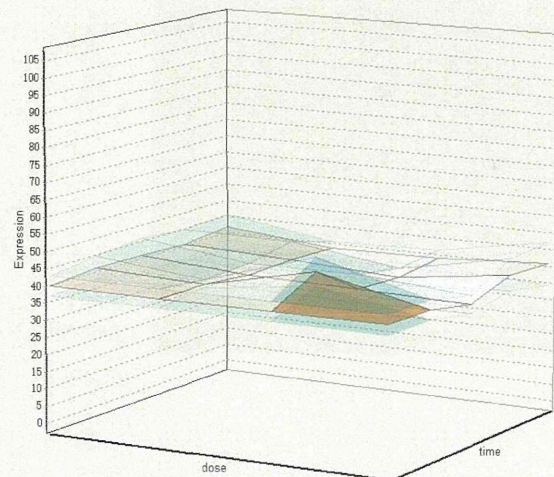
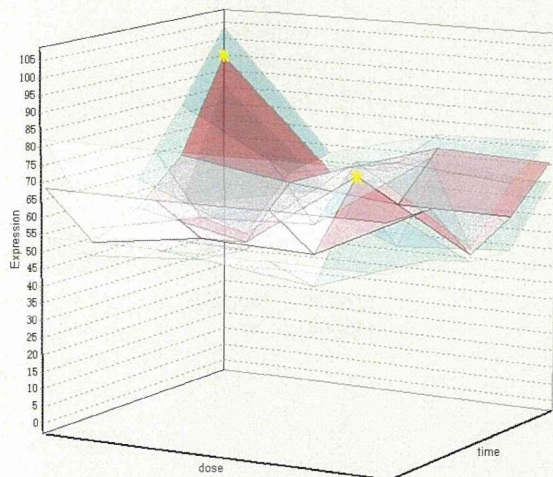
単回暴露時と比較して、新型反復暴露で発現増加が抑制された遺伝子の例

TTG119-L_SpNC_0

14550C 四塩化炭素 肝 単回

TTG130-L_SpNC_0

1455001 四塩化炭素 肝 反復



Rpl13a
ribosomal protein L13a

先行研究

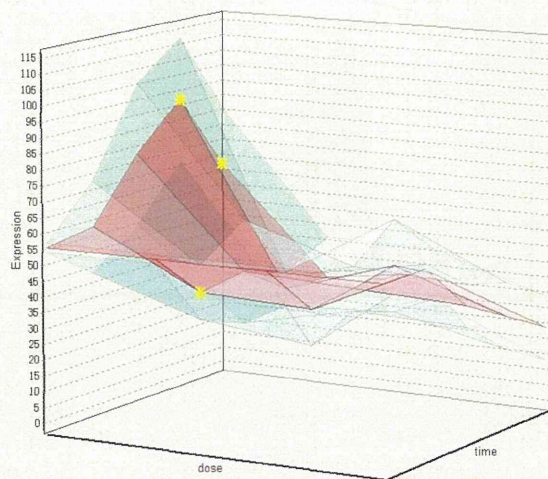
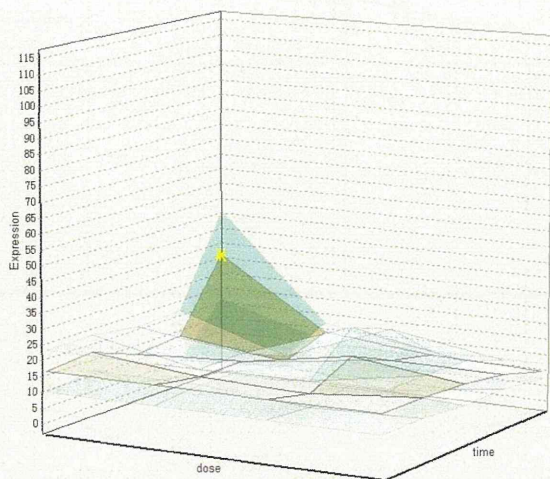
単回暴露時と比較して、新型反復暴露で発現増加が增強された遺伝子の例

TTG119-L_SpNC_0

14386 四塩化炭素 肝 単回

TTG130-L_SpNC_0

1438617 四塩化炭素 肝 反復



Serpina7

serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 7 T4-binding globulin

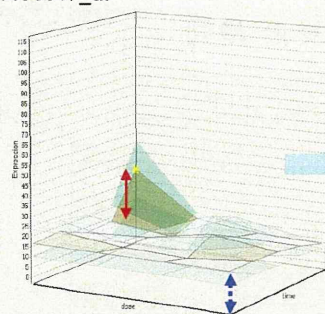
先行研究

●反復投与が毎回の投与による反応に大きな影響を与える物質

Transient Response
(T-Res)
過渡反応

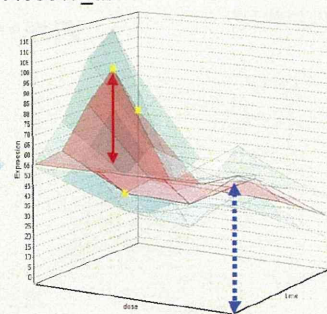
Baseline Response
(B-Res)
基線反応

TTG119-L_SpNC_0,
1438617_at



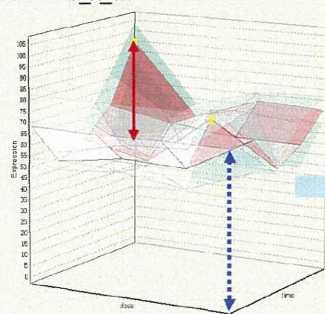
Single

TTG130-L_SpNC_0,
1438617_at



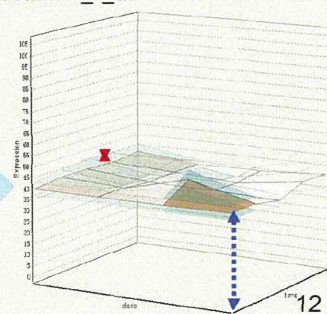
Repeated

TTG119-L_SpNC_0,
1455601_x_at



Single

TTG130-L_SpNC_0,
1455601_x_at



Repeated

背景（再）

先行研究：

四塩化炭素の新型反復暴露実験：肝及び肺：

単回暴露時に発現変動した遺伝子のほぼ全て：

基線反応成分*は、過渡反応成分**が、増加する場合は増加、減弱する場合は減少する

*： 暴露回数を重ねるに連れて発現値のベースライン(基線)が徐々に変動する反応成分

**： 単回暴露時の2, 4, 8, 24時間のうちに発現が変動する速い変化の成分

増加する事例の存在：

反復投与による代謝誘導による化学物質の分解促進では説明できない事象

→ エピジェネティクス***に関わる分子機序の関与を示唆

***： DNAの配列変化によらない、ゲノムの変異以外のメカニズムで、細胞分裂後も継承される、遺伝子発現あるいは表現型の変化を制御・伝達するシステム

(例)DNAのメチル化・脱メチル化、ヒストンのメチル化・アセチル化・ユビキチン化、non-coding RNA、ゲノムインプリンティング、X染色体不活性化等

背景

エピジェネティクス(epigenetics)

ゲノム変異以外のメカニズムで遺伝子発現を制御し、細胞や生体に変化を生じさせる現象

(例)DNAのメチル化・脱メチル化、ヒストンのメチル化・アセチル化・ユビキチン化、non-coding RNA、ゲノムインプリンティング、X染色体不活性化等

図表1 生体现象の中でのエピジェネティクスの位置づけ

遺伝子発現の変化が
関連する生体の現象

発生・再生
細胞分化
老化
一部の病気
(がん、生活習慣病、精神神経疾患等)
など

現象の発生の原因

ゲノム変異による
遺伝子発現の変化

ゲノム変異以外による
遺伝子発現の変化
(エピジェネティクス)

環境の影響
が大きい

科学技術動向研究センターにて作成



クローン猫(右)は、三毛猫(左)とゲノムが同一であるが、毛の模様が異なる

- ・三毛猫: オレンジ(茶)を決定するO遺伝子はX染色体上に存在→伴性遺伝(雌)
(ぶち(白斑)や黒などを決定する遺伝子は常染色体上に存在)
- ・哺乳類の雌: 胚発生の初期に2つのX染色体のうち、どちらか一方がランダムに不活性化→毛色がオレンジになる(O遺伝子が発現)部分と、他の色になる部分に、モザイク状に分かれる(ヘテロ接合型の場合)

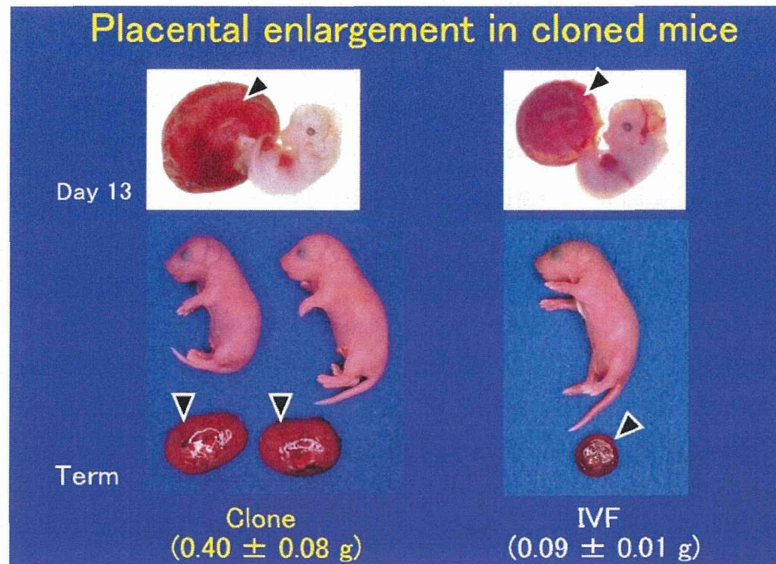


Kian and Remea Hodgson

<http://littlemisschatterbox89.wordpress.com/2010/04/23/extraordinary-twins/>

一卵性双生児: 全ての遺伝情報は同じはず
→ 全く同じDNA情報を持つはずの一卵性双生児
においても肌の色の違う場合がある

クローンマウスの胎盤は、異常な大きさ



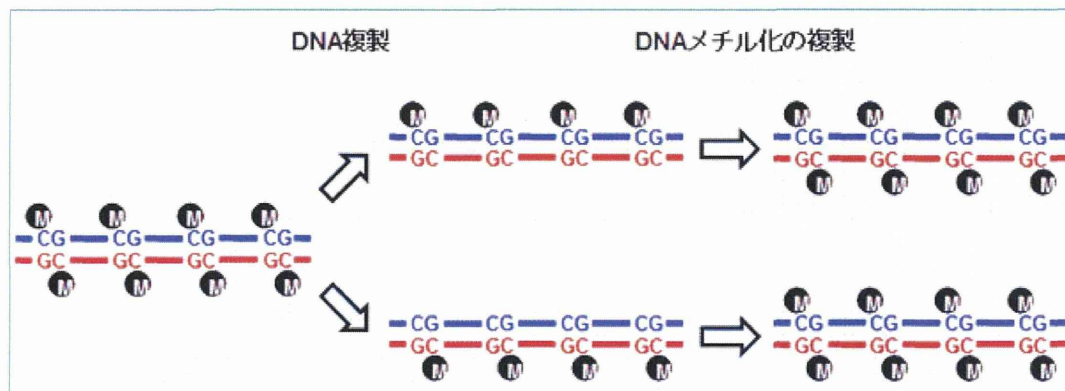
Inoue K et al, Faithful expression of imprinted genes in cloned mice.
Science 295(5553): 297-, 2002.

栄養膜細胞ではDNAメチル化が高頻度で起きており、代償的に細胞の数や種類が変わったと考えられている

体細胞クローン技術：ドナー個体の体細胞から核を取り出し、核を抜いた未受精卵(レシピエント)に移植し、電気的刺激により融合させた再構成胚を雌の子宮へ移植・受胎させ、クローン個体を出産させる。分化した体細胞を使用することから、再構築胚が全能性を有する状態にする(リプログラミング)必要がある。

哺乳類の場合のDNAのメチル化：安定

5'-CG-3' (CpG) (シトシン-ホスホジエステル結合-グアニン)という塩基配列中のC(シトシン)に生じるメチル化。シトシンの5位の炭素についている水素がメチル基(CH₃)に置き換わる



DNAメチル化状態の維持：

複製された直後のDNAは、新しく作られた方のDNAがメチル化されていないが、DNAメチル化を複製するタンパク質 [DNAメチル基転移酵素1 (Dnmt1)] の働き(メチル基供与体:S-アデノシルメチオニン)により、DNAメチル化も複製される。Dnmt1欠失マウスは、胎生9日目に致死。

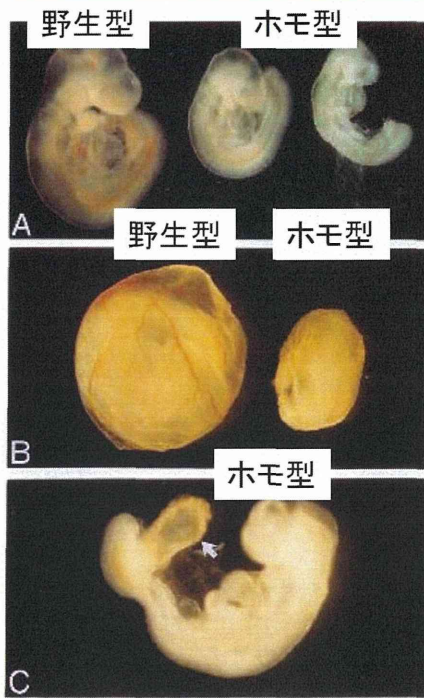
・de novo型のDNAメチル化酵素Dnmt3aとDnmt3b：

全くメチル化されていない相補DNAも、ヘミメチル化されたDNAでも、区別なくメチル化できる

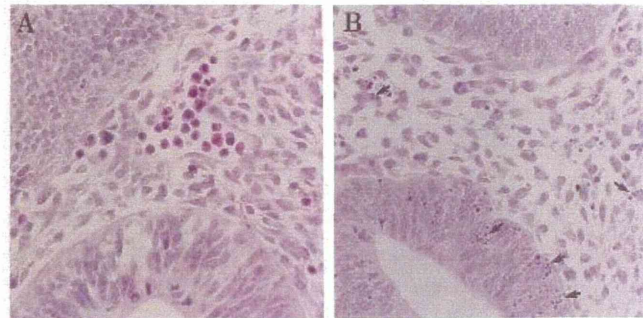
Dnmt1欠失マウス胚

Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality.
Li E et al, Cell 69(6): 915-926, 1992.

Homozygous embryos were stunted, delayed in development, and did not survive past midgestation. ゲノムはほぼ完全に脱メチル化されている



脳切片 野生型 ホモ型



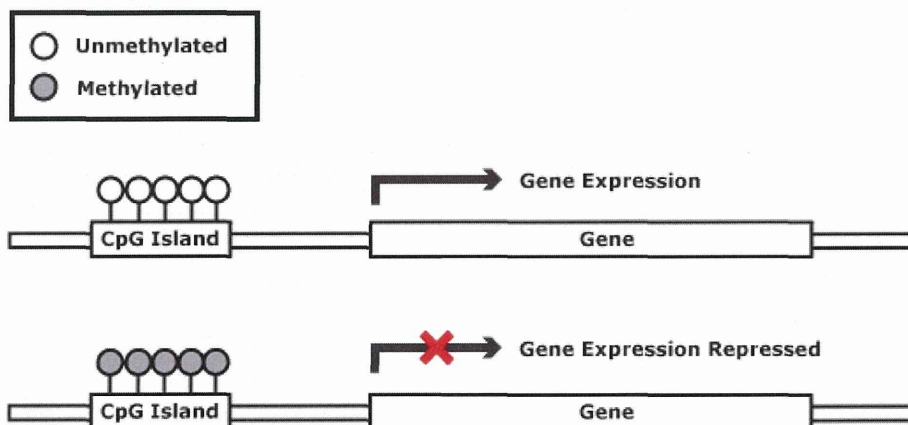
矢印: 細胞死

Table 2. Genotype of Offspring Derived from Heterozygous Parents

Stage	Litter	Total	Resorption	Genotype of Live Embryos		
				+/+	+/-	-/-
p1-7	5	18	0	9	9	0
E12.5-15.5	5	44	19	11	14	0
E9.5-10.5	5	39	0	6	20	13

p1-7 represents mice of postnatal day 1-7, while E12.5-15.5 and E9.5-10.5 represent embryos of gestation day 12.5-15.5 and day 9.5-10.5, respectively. Resorbed embryos were excluded from genotyping. +/+, +/-, and -/- refer to mice that were wild-type, heterozygous, and homozygous for the mutant allele, respectively. All 13 homozygous mutant embryos of E9.5-10.5 were distinguishable from their normal littermates in that they were severely stunted.

メチル化DNAによる発現制御



神経, 精神疾患の病態に關与するDNA メチル化の例:

Rett 症候群: 知能や言語・運動能力が遅れ、常に手をもむような動作。
メチル化CpG 結合タンパク質の一つであるMeCP2の変異