

## 2種類のリプログラミング(=ゲノムの修飾状態の書き換え)

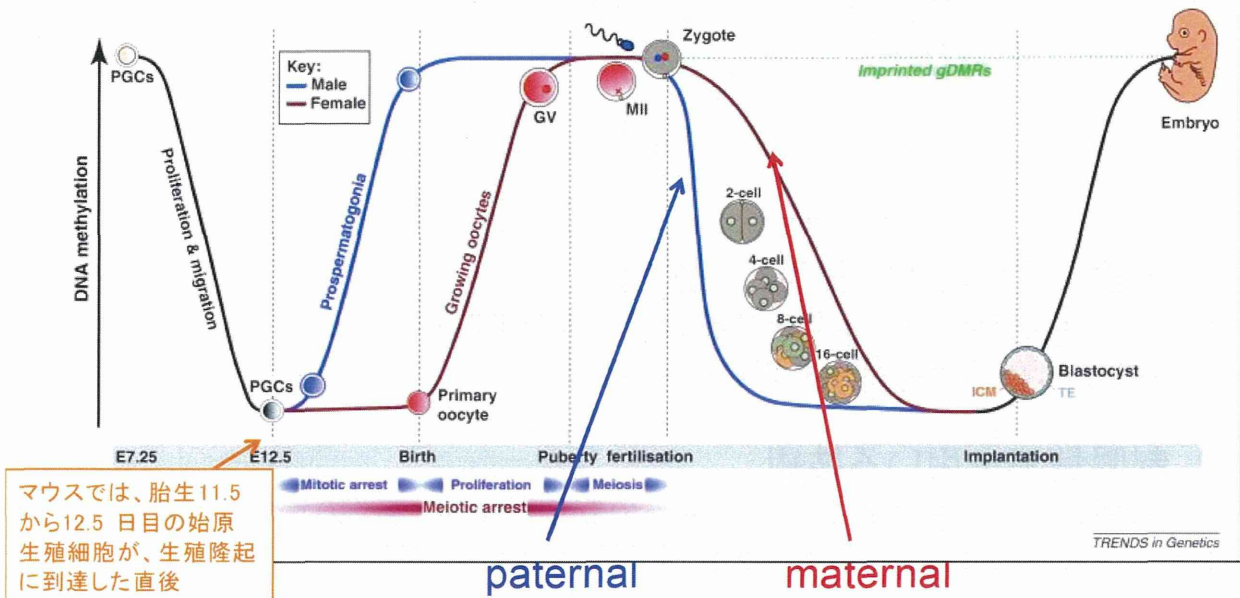
### 1. 配偶子形成期に生じるリプログラミング:

→インプリントを含むすべての修飾が一時的に消去され、配偶子形成後に、配偶子に特異的な修飾が確立

### 2. 受精後の卵割期に生じるリプログラミング:

→ゲノム全体の脱メチル化が生じるが、インプリントは維持

Smallwood SA & Kelsey G, Trends Genet 28(1): 33-42, 2012.



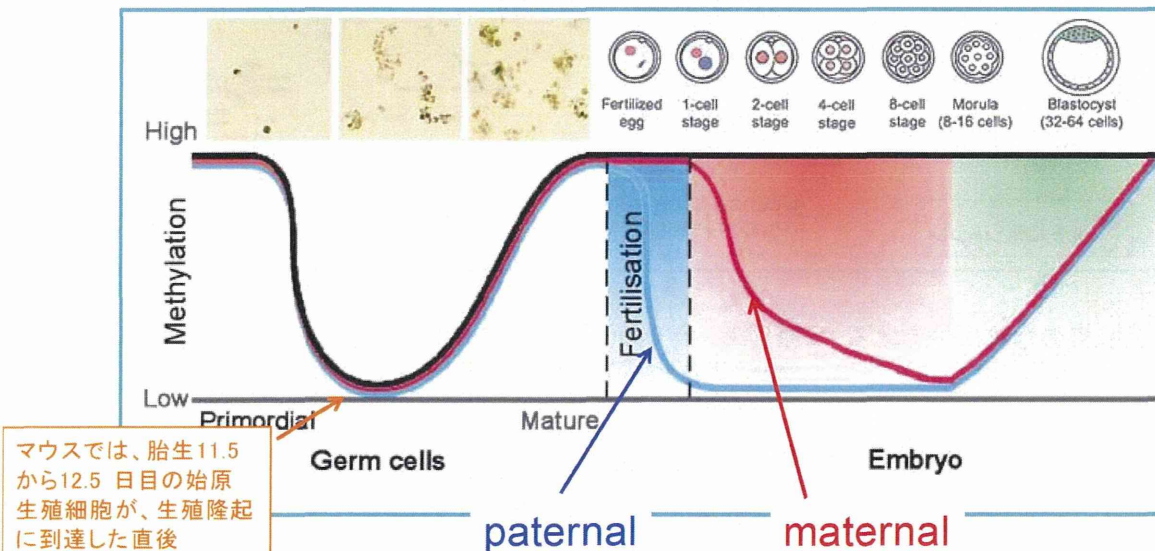
### 卵割中の雌性ゲノム: 複製依存的DNA脱メチル化

→ Dnmt1の活性がなくなり、DNA複製によって希釈的に5-メチルシトシン(5mC)のレベルが減少していく

### 1細胞期の雄性ゲノム: TET3依存的DNA脱メチル化

→ ten-eleven translocation (TET)ファミリーのTET3が5mCを酸化し、5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)に変換し、5mCが急激に低下する

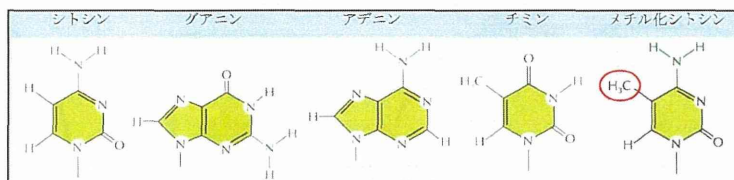
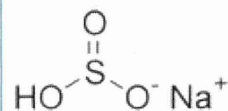
Santos F & Dean W, Epigenetic reprogramming during early development in mammals. Reproduction 127(6): 643-651, 2004.



# ゲノムのメチル化を解析する技術

## 1. 化学修飾を利用した技術:

化学修飾法として、亜硫酸水素塩 (bisulfite、バイサルファイト) を用いる方法: バィサルファイト法  
 →シトシン塩基(C)はバイサルファイト処理により酸化的脱アミノ反応でウラシル(U)に変換されるのに対して、5位がメチル化されていると、バイサルファイト処理に抵抗性を示し、Cのまま残る



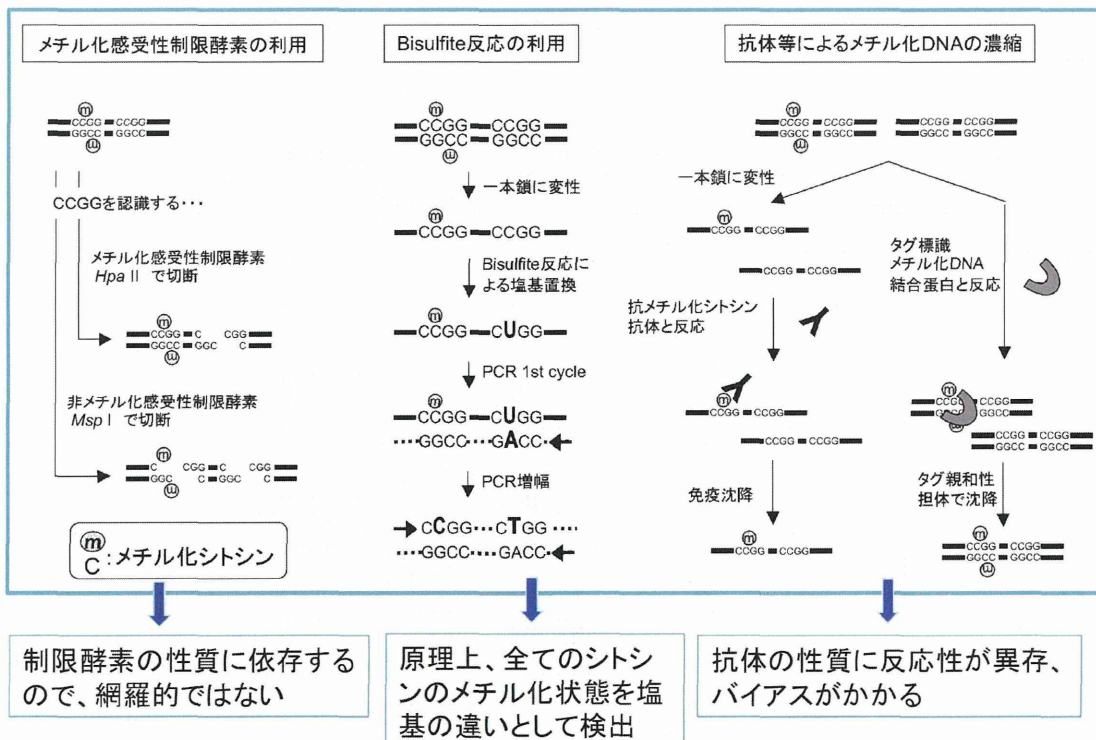
## 2. 抗体、組換え体を利用した技術:

5mCに対する抗体とメチル化DNA結合蛋白質(MBD)を使用し、ゲノム内の5mCを選択的に認識して沈降させる方法

## 3. 制限酵素を用いる技術:

CpGを標的制限配列内にもつ細菌由来の制限酵素は、多くの場合Cがメチル化修飾を受けている場合、切断できず、これを利用した方法

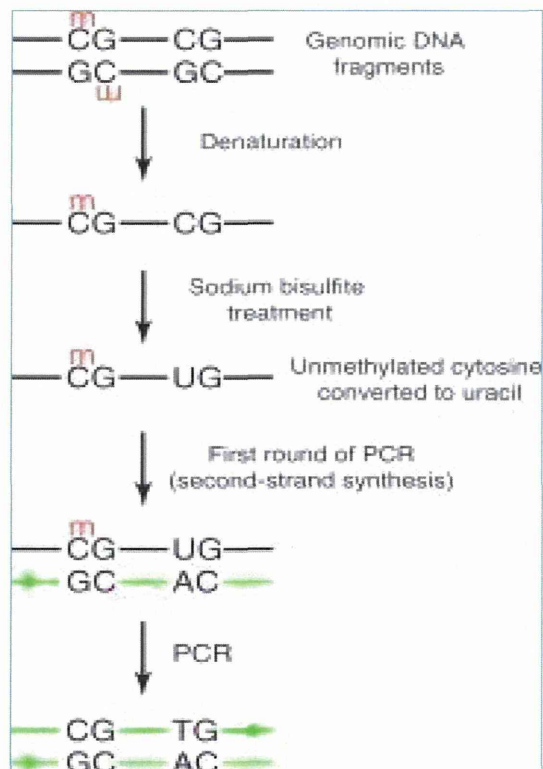
## メチル化シトシンの検出原理



**毒性学: 網羅性、信頼性、再現性が必須**  
 → バィサルファイト法しか採用できない



## Bisulfite処理によるDNAメチル化解析



## 全ゲノムバイサルファイトシーケンシング (WGBS)の問題点と Post-bisulfite Adaptor Tagging (PBAT)法

バイサルファイト処理: ハイサルファイト(亜硫酸水素)塩とDNAを混合し50~70°Cに加熱: DNAはこの過程で切断、収率も極めて低い→5  $\mu$ gのDNAとPCRによる増幅(バイアス)

←ゲノムDNA断片にアダプターを付加した後に、ハイサルファイト処理を施すことが、収率低下の大きな原因

・両端にアダプター配列を付加したDNA(鋳型)を、ハイサルファイトで処理するとDNAの切断が起き、片側にしかアダプターが付いていない形、つまりシーケンスできない構造になってしまう

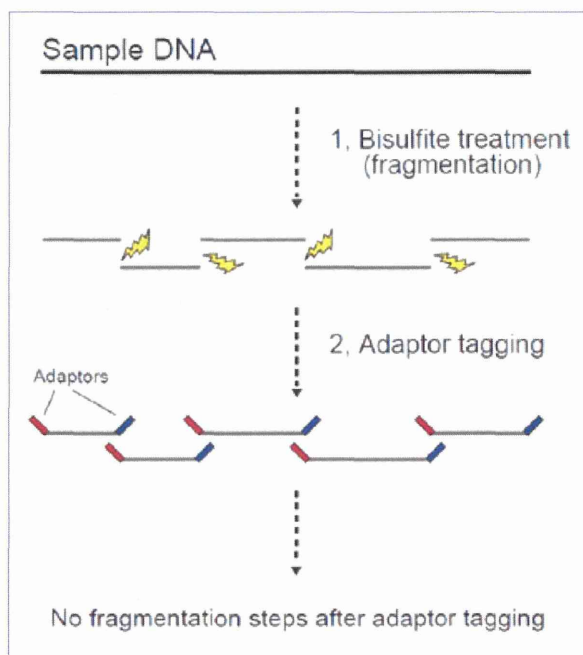
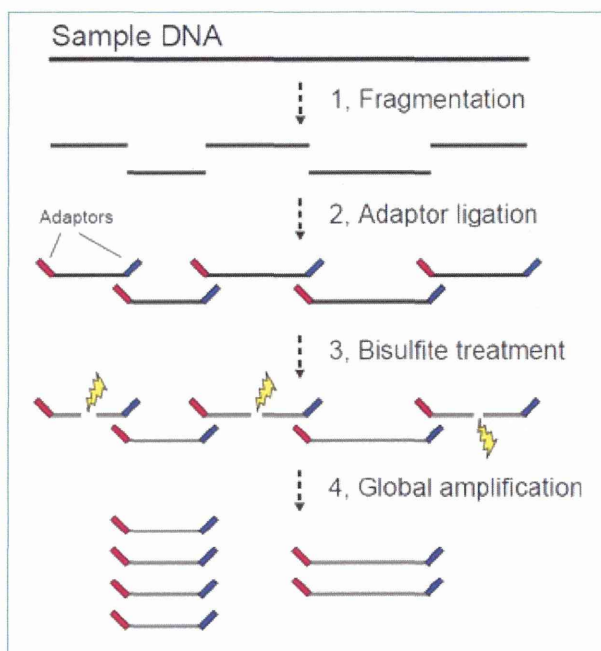
→バイサルファイト処理(DNA切断)後にアダプター付加を行えばよい:  
アダプターが両端に付加されたDNAは、切断されことなく配列決定の際の鋳型として利用可能: Post-bisulfite Adaptor Tagging(PBAT)法

Miura F et al,  
Amplification-free whole-genome bisulfite sequencing by post-bisulfite adaptor tagging.  
Nucleic Acids Res 40(17): e136- , 2012.

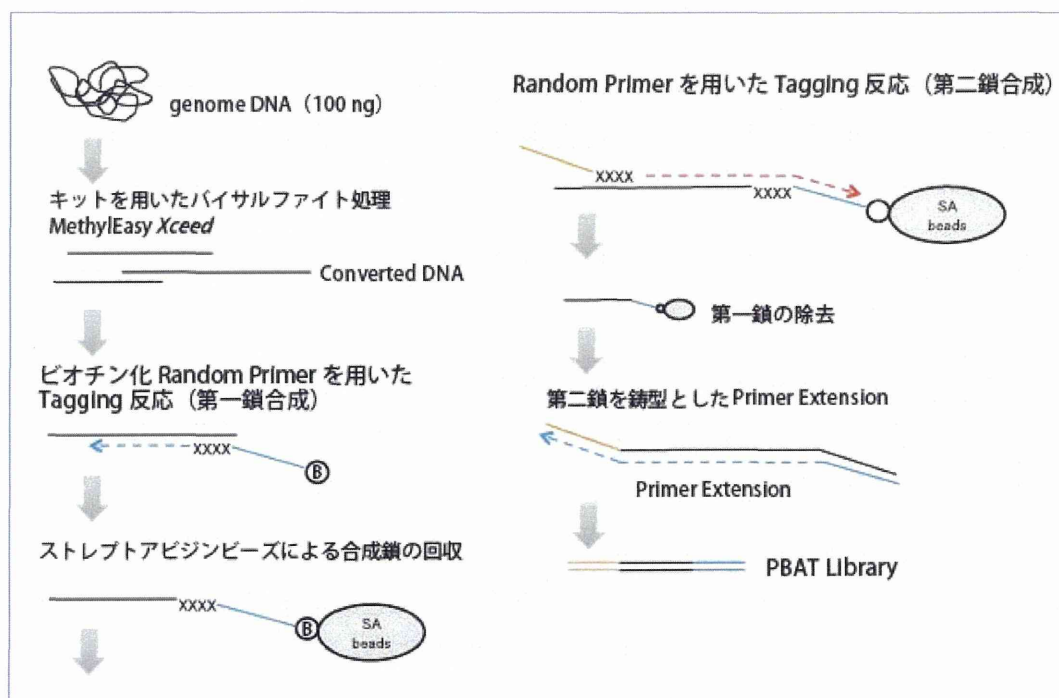
# 全ゲノムバイサルファイトシーケンシング (WGBS)の問題点と Post-bisulfite Adaptor Tagging (PBAT)法

バイサルファイト処理における鋳型構造の破壊

PBAT法:  
バイサルファイト処理の後でアダプターを付加



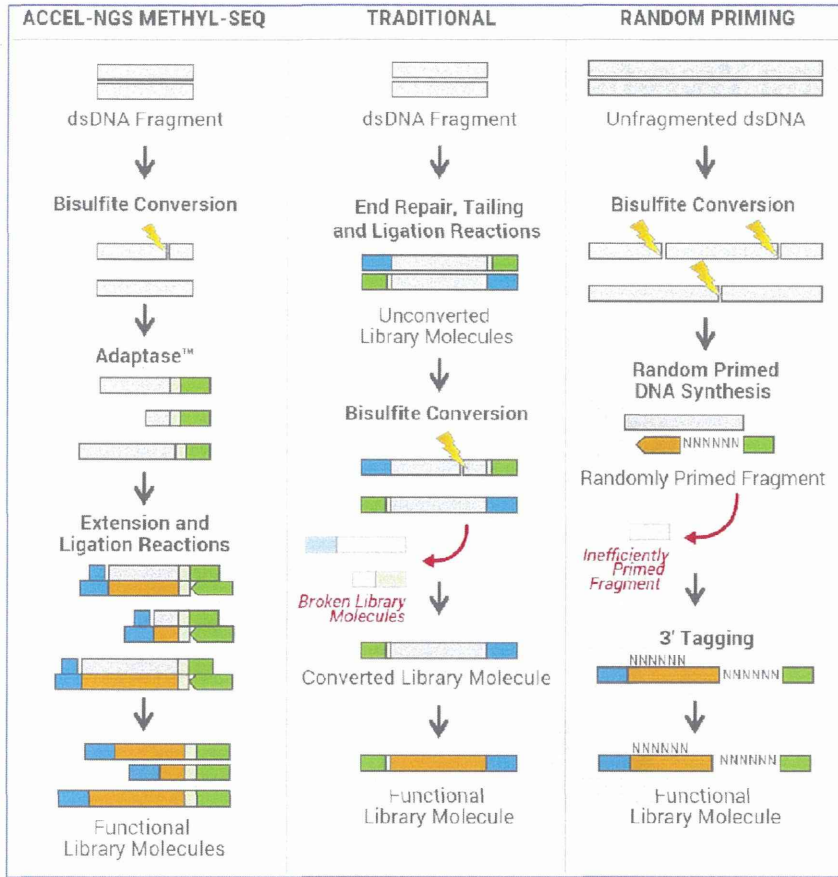
## Post-bisulfite Adaptor Tagging (PBAT)法



ビーズ回収時のバイアスの懸念

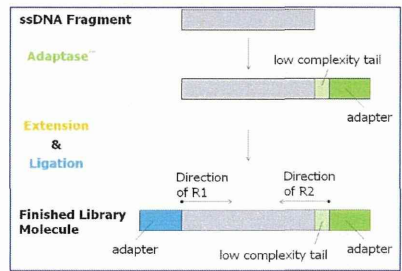


# Accel-NGS法 (Swift Biosciences) Methyl-Seq DNAライブラリ調製キット



Q: 「Adaptaseテクノロジー」とは何ですか？

A: 1本鎖DNAにアダプター配列を付加する技術です。DNAフラグメントには末端修復と同時に、3' 端に平均8塩基程度のフラグメント(テイル配列)が付加されます。その外側にアダプターが付加されます。反応には酵素 Adaptaseを用いるため、「Adaptaseテクノロジー」と呼ばれます。その後、そのアダプターを起点として相補鎖伸長を行い、2本鎖DNAにします。反対側にはP5に相当する2本鎖アダプターを付加します。



## 次世代シーケンサーを用いた網羅的DNAメチル化解析

illumina sequencers www.illumina.com 20140120	 MiSeq	 NextSeq 500	 HiSeq 2500	 HiSeq X
No. of flow cells (FC)	1 FC	1 FC	2 FC	2 FC
Lanes/FC	1 lane/FC	4 lanes/FC	2* or 8 lanes/FC	8 lanes/FC
Maxm. clusters/run	25M	400M	600M* or 4,000M	6000M
Maxm. read length	Up to 2x300 bp	Up to 2x150 bp	Up to 2x150* or 2x125bp	Up to 2x150 bp
Maxm. Gb/run	15Gb/run	120Gb/run	180Gb* or 1000Gb/run	1,800Gb/run
Maxm. Hrs/run	< 56 hrs	< 30 hrs	40 hrs* or 6 days	3 days
Samples per run				
Human WGS (100Gb/sample)		1 Hu WG/run	≤ 10 HuWG's/run	≤ 18 HuWG's/run
Exomes (25M clusters/sample)	1 exome/run	≤ 16 exomes/run	≤ 160 exomes/run	
Bacterial WGS (0.5Gb/sample)	≤ 30 Bact WG/run	≤ 240 Bact WG/run	≤ 2000 Bact WG/run	
Gene expression (20M clusters/sample)	1 RNA-seq/run	≤ 20 RNA-seq/run	≤ 200 RNA-seq/run	
TF ChIP-Seq (5M clusters/sample)	≤ 5 ChIPSeq/run	≤ 80 ChIPSeq/run	≤ 800 ChIPSeq/run	
Gene panels (2M clusters/sample)	≤ 12 gene panels/run	≤ 200 gene panels/run		
Dimensions (WxHxD)	68.6 x 56.5 x 52.3 cm	58.5 x 53.4 x 63.5 cm	119 x 76 x 94 cm	119 x 76 x 94 cm
Weight	54.5 Kg	83 Kg	225 Kg	226 Kg

\*Lower output modes are not described above

\*Applies to Rapid Run mode

網羅的DNAメチル化解析を行う為にIllumina社のNextSeq500を導入  
NextSeq500では、遺伝子発現解析やwhole genome DNA解析が可能

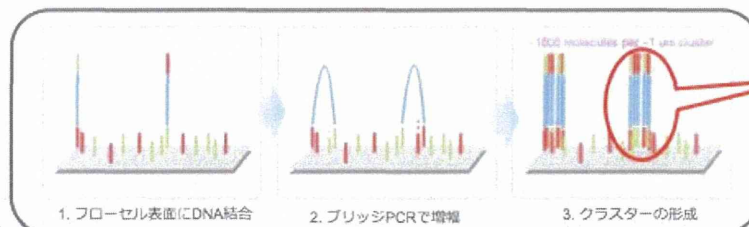
# 測定方法

## Illumina Sequencing Workflow



### 2 Cluster Generation

- クラスター形成は、シーケンスの際に DNA を検出可能な充分量に増やす目的で行う
- クラスターは、シーケンスされるフローセルの表面上の DNA が増幅された領域である
- 各クラスターは増幅された異なる DNA を含む
- クラスター形成では 5 つの主要なプロセスを経る
  1. Hybridize sample to flowcell
  2. Amplify sample
  3. Linearize fragments
  4. Block fragments
  5. Hybridize sequencing primer

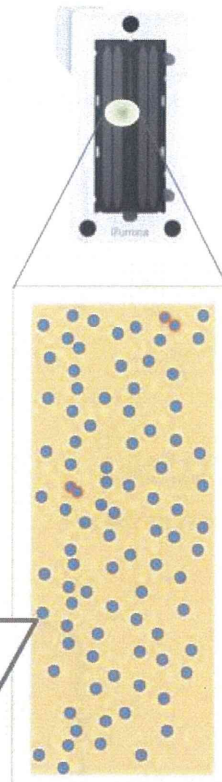


クラスター

illumina

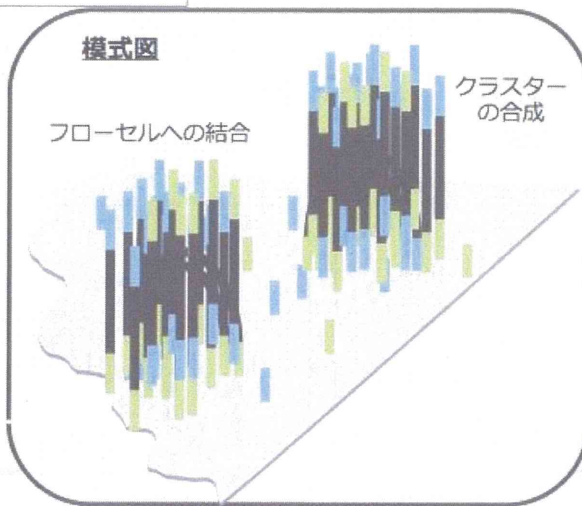
2

## Cluster Generation



- 簡単で確実なDNA増幅：  
フローセル上でのブリッジPCRによるクラスター形成

**クラスター：**  
フローセルに結合したDNA分子を、  
フローセル上で複数コピーし、  
シーケンス単位に加工したものを、DNAの束。



8

COMPANY CONFIDENTIAL - DO NOT DISTRIBUTE

illumina

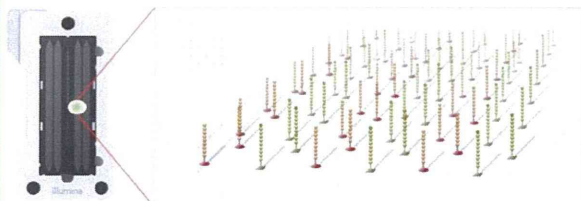
2

## Cluster Generation



Flowcell の模式図

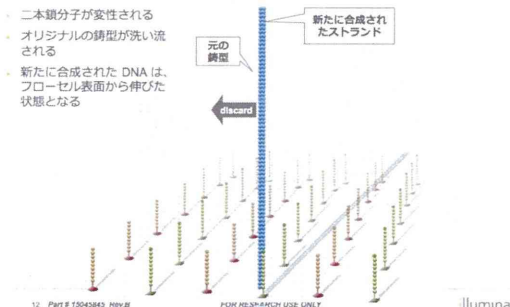
- フローセルにはライブラリ断片のアダプタに相補的なプライマーの '芝' がある
- ライブラリ断片はまず始めにフローセル表面のプライマーにハイブリダイズする



2

## Cluster Generation

1. Hybridize sample to flowcell  
Denature Double-stranded DNA

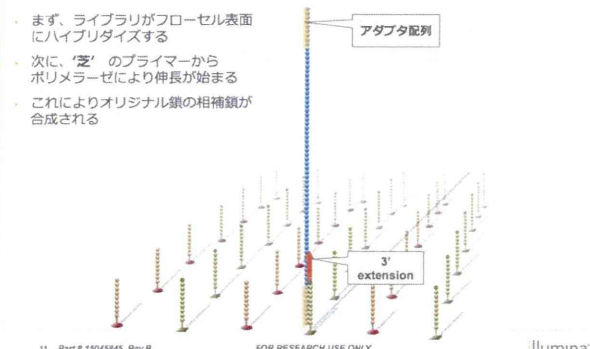


2

## Cluster Generation

1. Hybridize sample to flowcell  
Hybridize Fragment & Extend

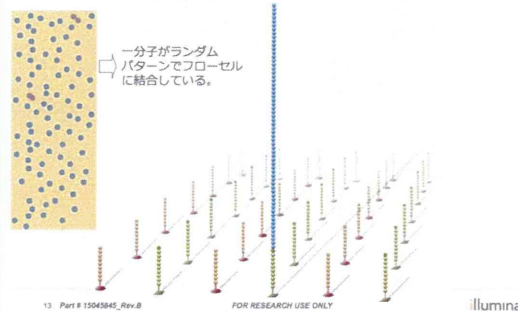
- まず、ライブラリがフローセル表面にハイブリダイズする
- 次に、'芝' のプライマーからポリメラーゼにより伸長が始まる
- これによりオリジナル鎖の相補鎖が合成される



2

## Cluster Generation

1. Hybridize sample to flowcell  
Denature Double-stranded DNA





**2 Cluster Generation**  
2. Amplify sample  
*Bridge Amplification*

- 一本鎖が曲って 近傍のプライマーとハイブリダイズしてブリッジを形成する
- ハイブリダイズしたプライマーはポリメラーゼによって伸長する

14 Part # 15045845\_Rev.B FOR RESEARCH USE ONLY Illumina

**2 Cluster Generation**  
2. Amplify sample  
*Bridge Amplification*

- 二本鎖ブリッジが 変性される
- 結果: 一对のフローセルに 結合した一本鎖の鋳型となる

10 Part # 15045845\_Rev.B FOR RESEARCH USE ONLY Illumina

**2 Cluster Generation**  
2. Amplify sample  
*Bridge Amplification*

- 二本鎖のブリッジが形成される

15 Part # 15045845\_Rev.B FOR RESEARCH USE ONLY Illumina

**2 Cluster Generation**  
2. Amplify sample  
*Bridge Amplification*

- 多数のブリッジが形成されるまで サイクルが繰り返される。

17 Part # 15045845\_Rev.B FOR RESEARCH USE ONLY Illumina

**2 Cluster Generation**  
3. Linearize fragments  
*Linearization*

dsDNA のブリッジが変性される  
逆鎖が開裂され、洗い流される

18 Part # 15045845\_Rev.B FOR RESEARCH USE ONLY Illumina

**2 Cluster Generation**  
4. Hybridize sequencing primer  
*Primer Hybridization*

シーケンスプライマーがアダプタ配列にハイブリダイズする

シーケンス反応へ

Sequencing primer

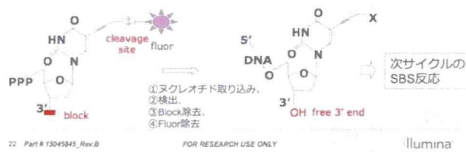
20 Part # 15045845\_Rev.B FOR RESEARCH USE ONLY Illumina

### 3 Sequencing

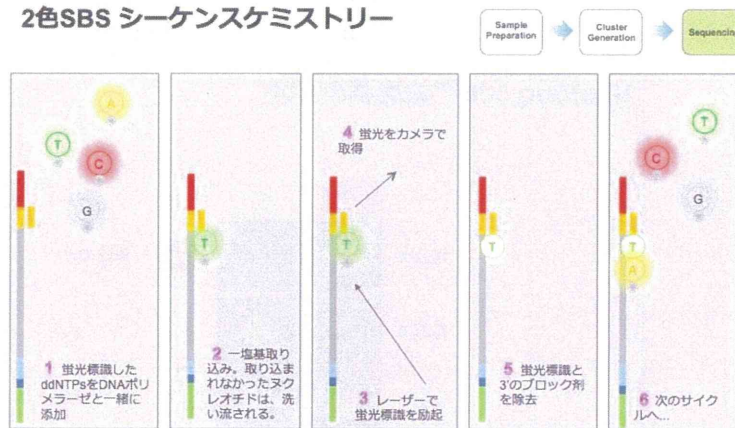
NextSeq は可逆的ターミネーター法として信頼のあるイリミナ Sequencing By Synthesis (SBS) 反応を用いて DNA クラスターをシーケンスする (NextSeq では2色SBS法を採用)

#### Reversible Terminator Chemistry

- 1 反応に蛍光ラベルされた4ヌクレオチドを加える
- 高精度
- ホモポリマー領域も問題ない



### 2色SBS シーケンスケミストリー

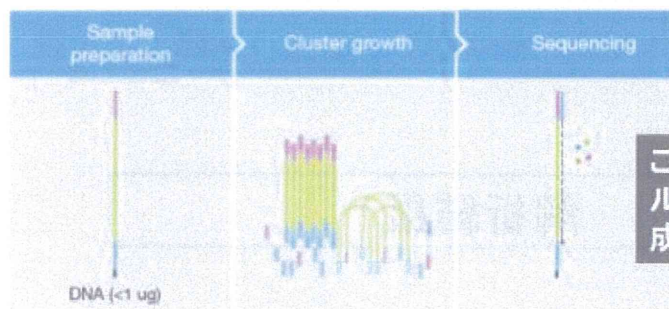


25 Part # 15045845\_Rev.B

FOR RESEARCH USE ONLY

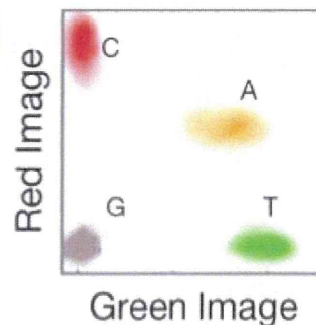
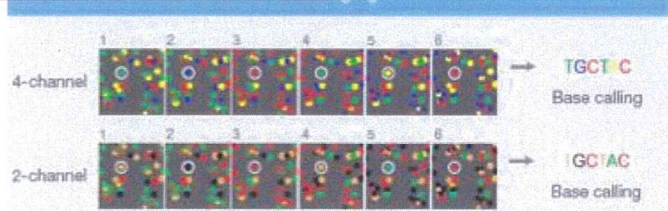
illumina

## SBSの進化: 2色によりイメージング処理を50%短縮



これまでと同じサンプル調製、クラスター形成、シーケンス(SBS)

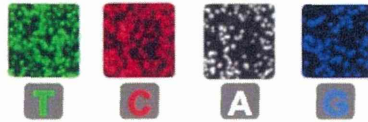
### 新しい2色のイメージング



### SBSの進化:2色チャンネル

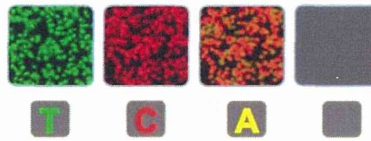
#### 4色チャンネルのSBS

- 塩基ごとに4色設定
- 4イメージ必要
- HiSeq, MiSeq



#### 2色チャンネルのSBS

- 2色で4塩基を検出
- 2イメージのみ  
(イメージ処理の短縮)
- NextSeq 500



### NextSeq 500での塩基の識別

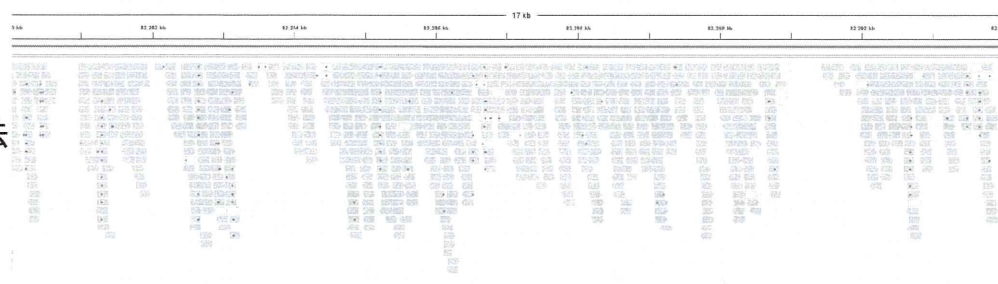
	red channel	green channel		
Type 1				Redのみ
Type 2				Greenのみ
Type 3				Green / Red 両方
Type 4				蛍光無し

## 解析結果

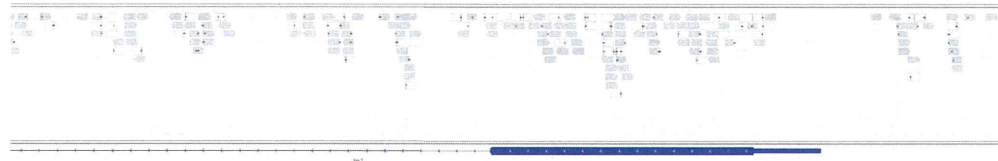


## Accel-NGS法とPBAT法の比較 —マッピング— マウス肝サンプル使用

Accel-NGS法



PBAT法



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:

PBAT法: 3千万リード、 Accel-NGS法: 1.4億リード

→ Accel-NGSの方がPBATよりも5倍多くのリードがマップされる

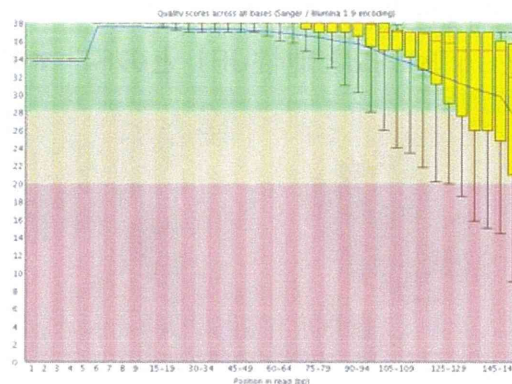
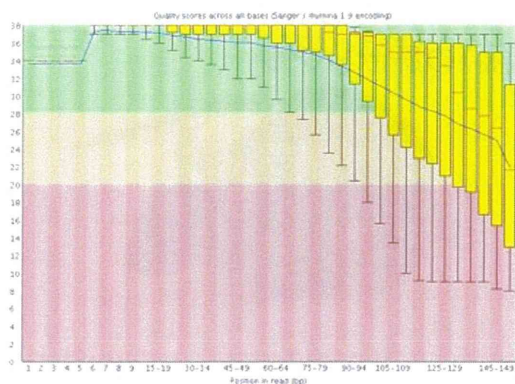
■ Accel-NGSの方が、より多くのDNAメチル化情報が得られることが判明

得られたシーケンス数:

PBAT法: 1.6億リード、 Accel-NGS法: 2.7億リード

・ Accel-NGS法の方が1.7倍多いシーケンスが得られた

## Accel-NGS法とPBAT法の比較 —Quality scores—



PBAT (左)および Accel-NGS(右)のQuality scores  
(X軸 base position, Y軸 Quality score)

## 1フローセルあたりのサンプル数

Accel-NGS法では、1.4億リードのシーケンスがマップされた

- 各150bpの長さがあるため、総計210億塩基対のシーケンスを得た計算
- マウスゲノムのリピ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でシーケンスが可能
- 網羅的メチル化解析にあたり、1サンプルあたり、およそ10倍のdepthでシーケンスする必要があると考えられる
- 1フローセルあたり2サンプルまでシーケンス可能

## 結果

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

→ 陽性対照サンプルを用いて検討

—(JF1 x C57BL/6J) F1 マウスにおけるDNAメチル化解析—

陽性対照サンプル:

雄性C57BL/6Jと雌性JF1 とのF1 マウス(4週齢)の肝サンプル



JF1

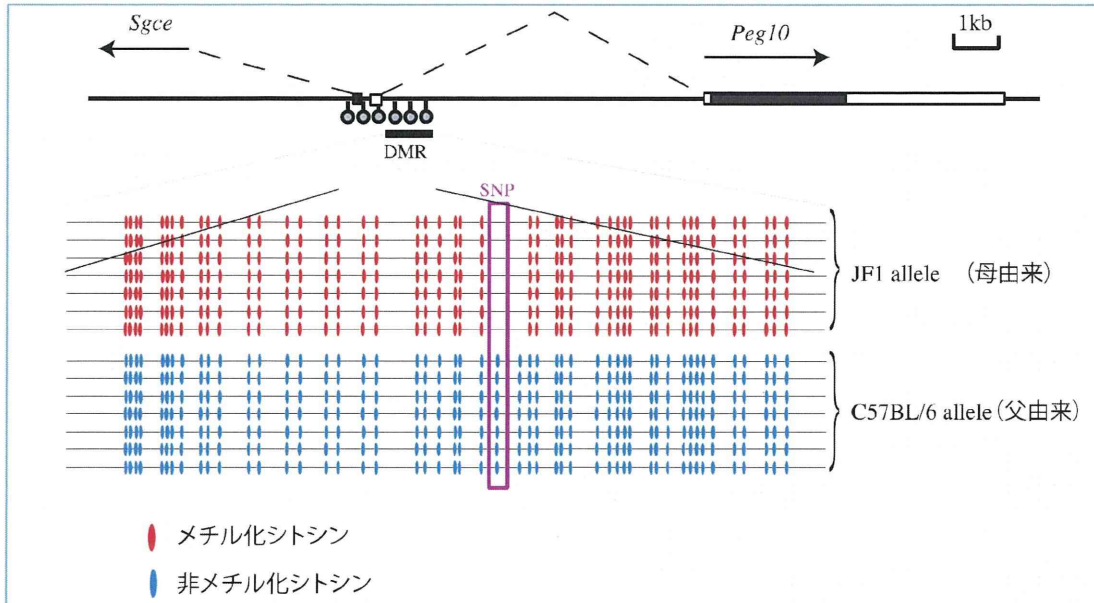


C57BL/6J

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

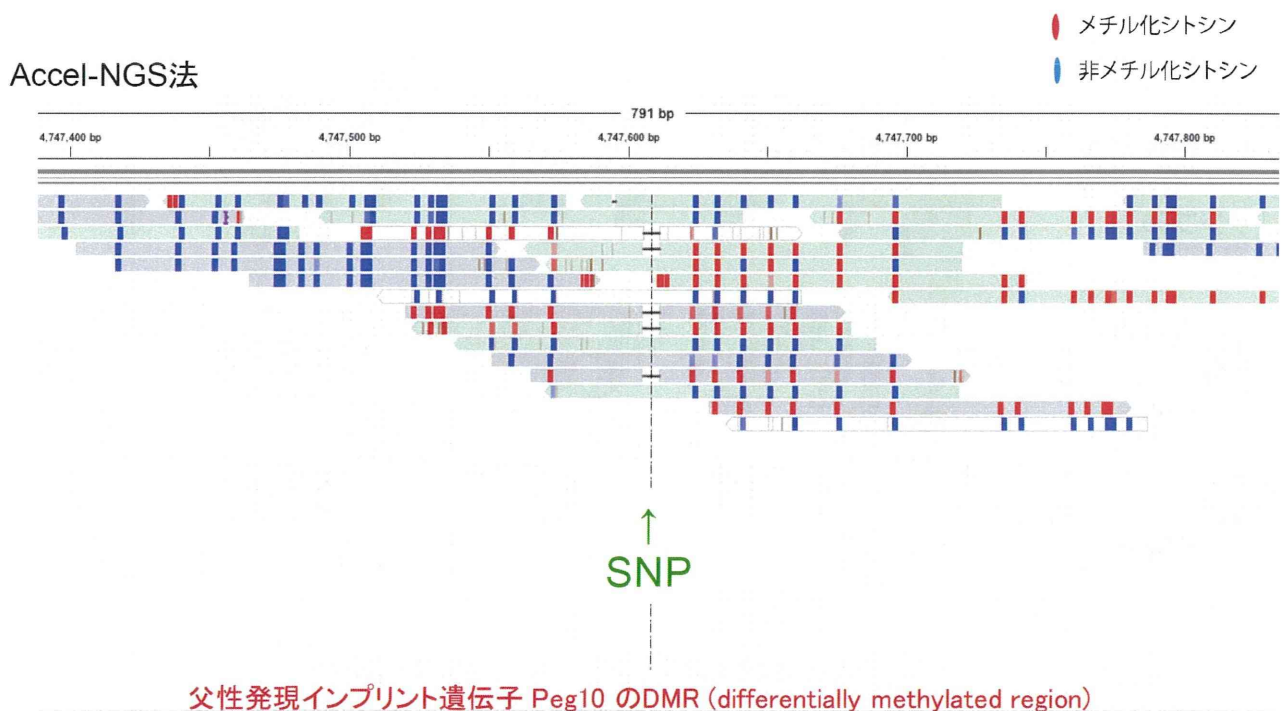
→親由来のメチル化の違いにより発現制御される事が既知の、インプリンティング遺伝子のDNAメチル化について検討することにより、親の由来に分けて決定でき、本解析法の性能評価が可能となる。

父性発現インプリント遺伝子Peg10のプロモーター領域は、母由来(JF1)のアレルのみDNAメチル化を受けるDMR (Differential Methylated Region)になっている (Ono, R., et. al., Genome Research, 2003)



SNP情報より、母親由来のDNAのみメチル化されていることを確認

—(JF1 x C57BL/6J) F1 マウスにおけるDNAメチル化解析—





# DNAメチル化状態の網羅的な解析に使用する肝サンプル

- 以下の4プロジェクト(各n=3)
  - 四塩化炭素の新型慢性暴露(4日間反復と14日間反復)の場合、および溶媒対照(マウス亜系統2種)
- 投与2時間後の肝Cサンプル(RNA later中、-80°C保存)
  - 4プロジェクト、計12サンプル
- 1フローセルあたり2サンプル使用

まずこちらを測定

- 溶媒対照(C57BL6/NCrSlc):  
TTG132 Curcumin: [0+1](溶媒投与群、投与2時間後)[C57BL6/NCrSlc]
- 新型反復暴露(14日間反復)(C57BL6/NCrSlc):  
TTG130 TTG2: A)CCI4, B)CCI4: [14+1](定用量 5 mg/kg、投与2時間後)[C57BL6/NCrSlc]
- 溶媒対照(C57BL6/J):  
TTG187 紫色201号: [0+1](溶媒投与群、投与2時間後)[C57BL6/J]
- 新型反復暴露(4日間反復)(C57BL6/J):  
TTG191 TTG4: A)CCI4, B)CCI4: [4+1](定用量 5 mg/kg、投与2時間後)[C57BL6/J]

## (JF1 x C57BL/6J) F1 マウスにおけるDNAメチル化解析

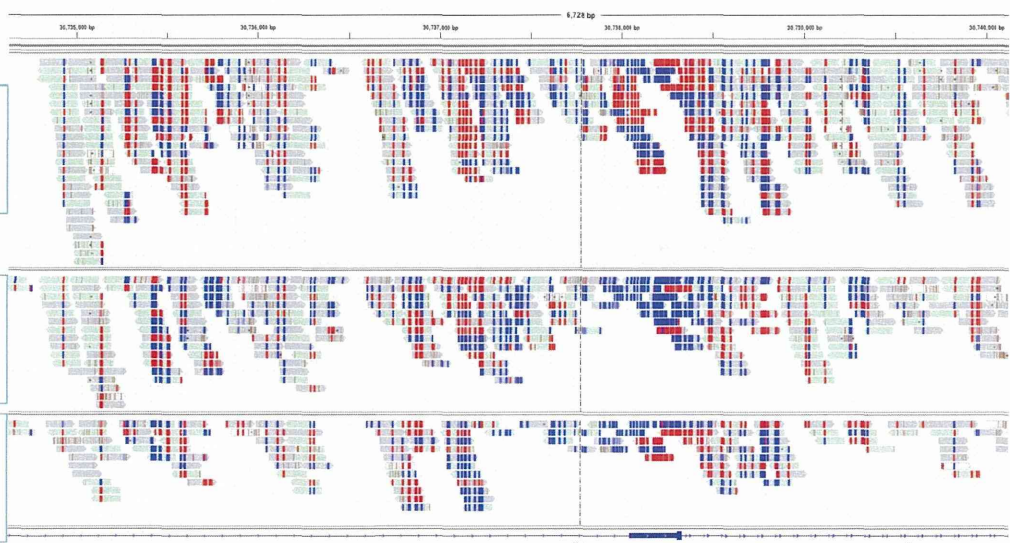
メチル化シトシン

非メチル化シトシン

J x B 陽性対照  
[フローセル1枚に  
1サンプル]

四塩化炭素投与  
[フローセル1枚に  
2サンプル]

コーンオイル投与  
[フローセル1枚に  
2サンプル]



父性発現インプリント遺伝子 Mest のDMR

# (JF1 x C57BL/6J) F1 マウスにおけるDNAメチル化解析

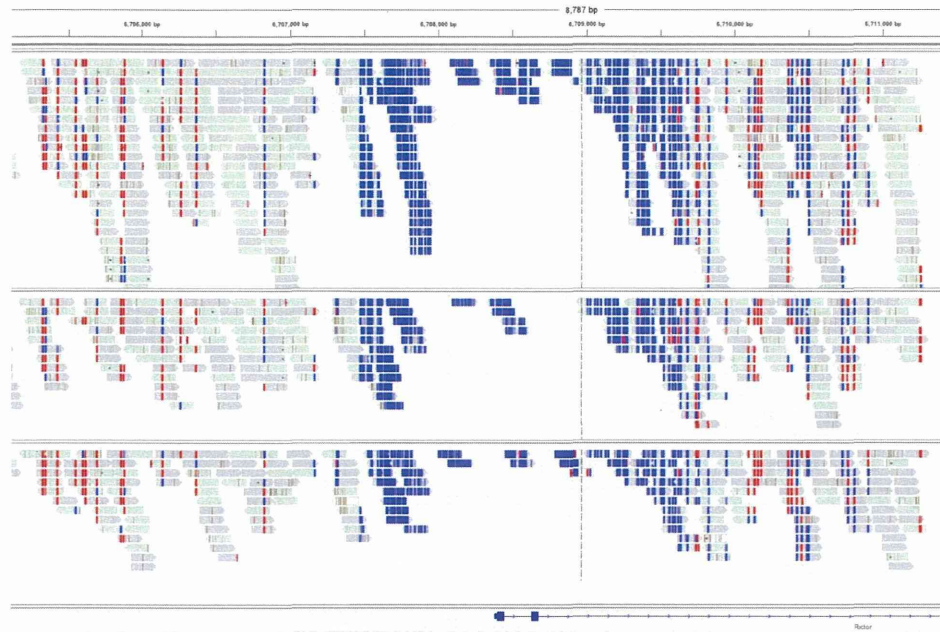
メチル化シトシン

非メチル化シトシン

J x B 陽性対照  
[フローセル1枚に  
1サンプル]

四塩化炭素投与  
[フローセル1枚に  
2サンプル]

コーンオイル投与  
[フローセル1枚に  
2サンプル]



RICTOR 遺伝子プロモーター領域

# (JF1 x C57BL/6J) F1 マウスにおけるDNAメチル化解析

メチル化シトシン

非メチル化シトシン

J x B 陽性対照  
[フローセル1枚に  
1サンプル]

四塩化炭素投与  
[フローセル1枚に  
2サンプル]

コーンオイル投与  
[フローセル1枚に  
2サンプル]



E2f1 遺伝子プロモーター領域



## (JF1 x C57BL/6J) F1 マウスにおけるDNAメチル化解析

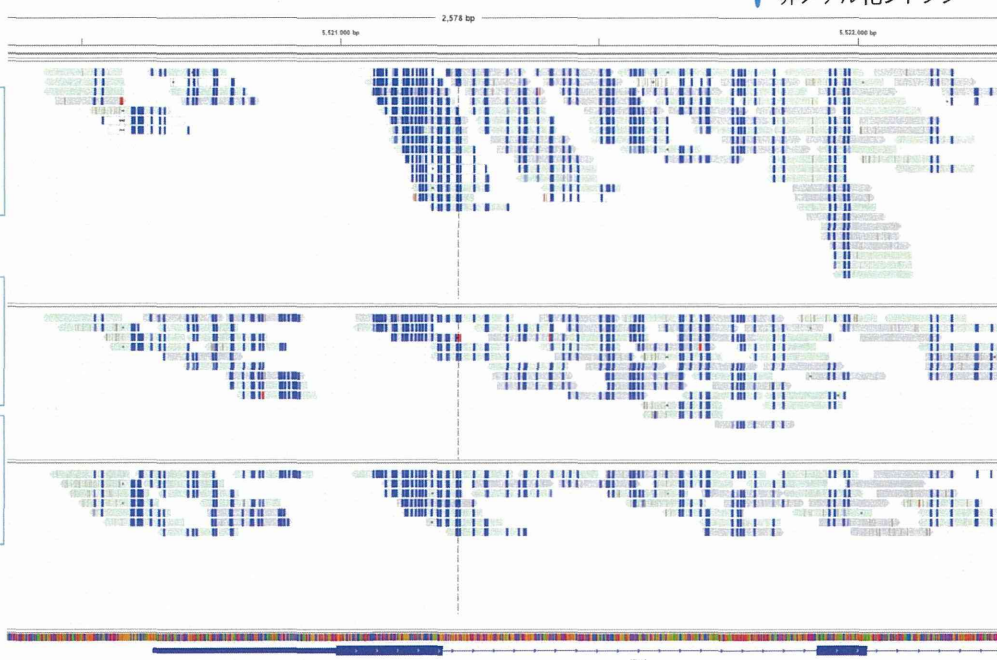
メチル化シトシン

非メチル化シトシン

J x B 陽性対照  
[フローセル1枚に  
1サンプル]

四塩化炭素投与  
[フローセル1枚に  
2サンプル]

コーンオイル投与  
[フローセル1枚に  
2サンプル]



Xbp1 遺伝子プロモーター領域

DNAメチル化状態を網羅的に解析中

## 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

## まとめ

・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。

・雄性C57BL/6Jと雌性JF1とのF1マウス(4週齢)の肝サンプルを陽性対照サンプルとして用い、インプリンティング遺伝子に着目し検討した結果、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。

・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、12週齢の雄性C57BL/6Jマウスの肝サンプル: DNAメチル化状態を網羅的に解析中(平成27年度中に解析が終了する見通し)。



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  
— 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 —  
(H27-化学-指定-001)

化学物質の反復暴露によるノンコーディング RNA の発現解析  
及び

Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進

分担研究者 相崎 健一

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 第一室 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、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。

特に先行3年間に実施した「新型」反復暴露実験\*\*により、化学物質の反復投与による生体影響が分子レベルにおいて数日で定常化する所見を複数見出した\*\*\*。これを利用すれば、現在は長い時間と多額の費用を要している長期反復暴露の毒性評価を大幅に効率化できる可能性が高い。

本分担研究では、(a) 化学物質の反復暴露におけるノンコーディング RNA の発現変動解析、および (b) Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進、を行った。

(a) では、ノンコーディング RNA のうち、成熟マイクロ RNA については短鎖であるゆえの誤差発生を低減する目的で抽出・測定方法の検討を行った。また本分担研究で主な解析手段となる次世代シーケンサーによる RNA-Seq について、ライブラリ調整段階からシーケンス後のデータ処理段階まで Percellome 手法適用の最適化を進め、実用レベルのデータ処理パイプラインを構築した。これらの最適化技術を適用し、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、解析中である。

(b) では、各ソフトウェアを機能単位で評価し、オンライン化に即して再編成を行いつつ、実装方法を検討した。またこれらソフトウェアを職務著作物として届け出、併せてエンドユーザーに提供する際のライセンスを選定した。

(\*) 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。

(\*\*) 全動物に同量の検体を反復投与し、遺伝子発現測定直前の投与時に、溶媒群、低用量群、中用量群、高用量群に分けて最終投与を一回行う。

(\*\*\*) 先行3年間の研究により、反復暴露による生体影響は分子レベルでは、暴露の都度の変化を示す成分である「過渡反応」と、回を重ねるに連れ発現値の基線を徐々に移動させる成分である「基線反応」に分けて解釈できることが判明している。

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づいて迅速

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。

特に本分担研究では、ノンコーディング RNA の発現

変動解析を以て、化学物質の反復暴露による基線反応の分子機序の解明を目的とする。また併行して、既存のPercellome専用解析ソフトウェアのオンライン化を進めて研究成果の速やかな社会還元を目指す。

## B. 研究方法

### (a) 化学物質の反復暴露によるノンコーディングRNAの発現解析

ノンコーディングRNAの一種であるマイクロRNAは成熟すると20bp前後の短鎖となるため、通常のmRNAや長鎖ノンコーディングRNAとは生体サンプルからの精製効率が異なる。そこでRNA-Seqに用いるtotal RNAを抽出する方法を選定するために、マイクロアレイと同様のプロトコル(RNeasy Kit (QIAGEN)を使用)の他、Allprep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN)或いはZR-Duet DNA/RNA MiniPrep Kit (Epigenetics)を用いてRNAを抽出し、BioAnalyzer (Agilent Technology)、Qubit Fluorometer (Life Technologies)、Nanodrop (Thermo Scientific)によって収量及び品質、サイズ分布等を評価した。

具体的には、マウス肝を5mm径の生検トレパンにより3ヶ所を各々別チューブに採取し、採取後すみやかにRNA later (Ambion社)に4℃で一晩浸漬して、RNaseを不活化する。その後、RNA抽出操作までは-80℃にて保存した。抽出に当たっては、RNA laterを除いた後、各RNA精製キットのホモジナイズバッファを添加し、ジルコニアビーズ及びMM300 (Retsch)を用いて破砕液を調製した。得られた破砕液の10 µLを取り、DNA定量蛍光試薬Picogreenを用いてDNA含量を測定し、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種類の濃度を公比3で混合した溶液)を添加し、TRIZOLにより水層を得、RN easy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。

次世代シーケンサーにはIllumina社のNextSeq500を用いた。シーケンスするライブラリは同社のTruSeq Stranded Total RNA Library Preparation Kit或いはTruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kitを用いて作成した。

次世代シーケンサーデータの数値化等、データ処理には、Percellome手法に対応させたカスタムゲノムを用意した上で、RNA-Seq解析ソフトウェアの主流となっているTophat, Cufflinksを利用した。Cufflinksから出力されたrawデータの絶対量計算は、独自開発のConvertTET.exeでフォーマット変換した後、マイクロアレイと同様に、SCal4.exeを用いた。

## 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、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守している。(国立医薬品食品衛生研究所は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程(平成27年4月版))

## C. 研究結果

### (a) 化学物質の反復暴露によるノンコーディングRNAの発現解析

#### i) 短鎖RNA抽出の検討

ノンコーディングRNAとはタンパク質をコードしないRNAの総称であり、メッセンジャーRNA(mRNA)と同等の長鎖を有するものから、成熟すると20bp前後の短鎖となるマイクロRNAまで、様々な長さのRNA分子を含む概念である。生体サンプルからの精製効率はRNA鎖長により異なるため、まずtotal RNA抽出キット各々のRNA鎖長別の収率、品質、及び再現性を評価した。マイクロアレイ用のtotal RNAを抽出するために使用してきたRNeasy Kit(Qiagen)の他、同一サンプルからDNAとRNAを同時に抽出する事の出来るAllprep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN)或いはZR-Duet DNA/RNA MiniPrep Kit (Epigenetics)を用いてtotal RNAを抽出した結果、mRNA等の長鎖RNAの抽出効率や品質については、製品間に大きな差異はなかったが、短鎖RNAの抽出効率は製品間で差が見られた。

また次世代シーケンサーのメーカー推奨のライブラリ合成キットTruSeq Stranded Total RNA Library Preparation Kit及びTruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit (Illumina)の標準プロトコルにおいて、RNA鎖長による選別が掛かることが判明した。つまり成熟型マイクロRNA専用のライブラリ合成キットを用いない限り、短鎖RNA(或いはそれ由来のcDNA)は各プロトコルの精製ステップで相当量が失われることが判明した。

#### ii) 次世代シーケンサーによるRNA-SeqへのPercellome手法の適用

データの高精度化を実現し、尚且つ既存のマイクロアレイデータとのブリッジングを行うために、次世代シーケンサーによるRNA-Seqについても、Percellome手法を適用し、RNA発現量の絶対量計算を試みた。

Percellome Wetプロトコルで最も重要なPercellome用外部RNAスパイクカクテル(枯草菌ゲノム配列由来のRNAスパイク5種を公比3の異なる濃度で混合したもの。GSC)の添加プロトコルについては、マイクロアレイと同じ方法で可能であることを確認した。スパイ

ク添加量についてもデータレベルでの検討を行った結果、マイクロアレイと同じ添加比率を採用すべきであること、すなわち GSC の RNA スパイク 5 種のうち最も多い RNA スパイクであってもトランスクリプトーム全体に対して過剰ではなく RNA-Seq のリードを無駄にしていること、及び 1 サンプルあたりの総リード数が少なくなり低発現 RNA の検出が難しくなる 10 サンプル/フローセルのマルチプレックス解析においても、GSC の RNA スパイク 5 種のうち最も少ない RNA スパイクを検出できていること、を確認した。

一方、シーケンス後の数値化に際しては、枯草菌ゲノム由来の配列を持つ GSC の RNA スパイク 5 種の発現量計算方法の検討を行った。従来、マウスゲノムと枯草菌ゲノムの双方に対して独立にマッピングを実施していたが、計算時間が倍化し計算処理効率が悪かった。またマッピングソフトウェアのパラメータ設定によってはミスマッピングが発生する恐れもあり、特に RNA スパイク定量に際して誤差発生懸念があった。

そこで平成 27 年度はマウスゲノム配列 mm10 に RNA スパイク 5 種の配列を追加したカスタムゲノムを作成し、一括マッピングする手法を検討した。この手法でもミスマッピングの懸念が残るが、マウスゲノム mm10 に対してマッピングした結果とカスタムゲノムに対してマッピングした結果を比較し、問題ないことを確認した。

さらに、Linux のコマンドライン操作に精通していない Wet 研究者でもデータ処理を簡便に行えるよう、ローカルサーバーに構築したグラフィカルユーザーインターフェイス (GUI) ベースの Web 統合プラットフォーム Galaxy 上で、カスタムゲノムへのマッピングを中心に、アダプタ配列の除去やクオリティチェック、転写産物毎の数値化の各プロセスを包含・自動化した解析パイプラインを作成した。

上記成果を反映した上で、引き続き、先行研究において取得済みの、12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに溶媒 (コーンオイル) を単回投与した肝サンプル、及び同様のマウスに四塩化炭素を 14 日間反復投与した肝サンプルについて、全種類の RNA を網羅的に解析中である。

#### (b) Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進

先行研究にて in house 開発した Percellome 専用解析ソフトウェアは ほぼ全て Delphi 言語にて記述した Windows 専用プログラム (Win32) であり、オンライン化や Garuda 準拠が容易ではないため、本研究では、これらソフトウェアを Java 等のコンピュータ言語に移植することになる。また取り扱うデータ容

量に制限のないローカルプログラムに比し、オンラインプログラムでは通常、サーバーサイドに保持可能なデータ量や、サーバー/クライアント間のデータ通信量に制限がかかるため、既存のプログラムを単純にそのまま移植するのではなく、機能単位に分解して必要な機能のみを移植したり、データ内容や形式などを見直して軽量化する必要がある。

そこで平成 27 年度は機能別に優先順位を割り振り、データ処理内容を吟味して、毒性評価・予測に必要な情報提供が優先されるよう、開発スケジュールの調整を行った。具体的には、既存のオンライン Percellome データベースを拡張することとし、RSort プログラムによる候補遺伝子リスト提供、及び Percellome Explorer プログラムの化合物間比較結果を参照する機能の追加を優先することとした。また Percellome による絶対量化計算や、Percellome 非対応データの絶対量推計計算を行うサービスについても提供方法を検討することとした。

これと並行して、オンライン Percellome データベースからエンドユーザーが引き出したデータの取り扱いや配布したソフトウェアの使用ライセンスを明確化すべく、これらソフトウェアを正式に職務著作物として届け出るとともに、エンドユーザーに提供する際のライセンスとして、Creative Commons License や Apache License ver.2 を選定した。

#### D. 考察

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 (及び一部、肺) における四塩化炭素、バルブプロ酸ナトリウム、クロフィブレード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多くについて、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) と過渡反応成分 (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) との関連性が見いだされた。反復投与により発現量が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、むしろ、エピジェネティクス分子機序の関与が示唆されたことから、これを確認すべく、北嶋聡分担研究者が化学物質の反復投与による DNA メチル化変動等を網羅的に解析しているに合わせ、本分担研究では、エピジェネティクスとの関連性が明らかになりつつあるノンコーディング RNA の発現変動解析を進めた。

類似配列の多いマイクロ RNA 群を含む、ノンコーディング RNA の検出は、マイクロアレイより次世代シーケンサの利用が効果的であり、本研究では先



行研究でマイクロアレイ解析を実施する際に重要な役割を果たした Percellome 手法を次世代シーケンサによる RNA-Seq に適用することにより、データの高精度化やプラットフォーム間データ比較を実現しつつある。

化学物質の反復暴露におけるノンコーディング RNA の発現解析においては、total RNA サンプルから次世代シーケンサ用のライブラリを作成する過程で核酸鎖長による抽出効率の差異が大きく、成熟型マイクロ RNA をメッセンジャー RNA や長鎖ノンコーディング RNA と同時に定量するのは困難であることが確認された。しかしマイクロ RNA 前駆体であれば成熟型より長いいため同時測定可能であること、また RNA-Seq の原理上、前駆体由来のリードカウントと成熟型由来のリードカウントを厳密に分解することは難しいこと、から、他の RNA と同時にマイクロ RNA 前駆体の定量を行いつつ、成熟マイクロ RNA を独立に測定して、前駆体と成熟型の存在量に相関関係があるかどうかを検証することとした。

Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進については、権利や利用ライセンス関係の整理を進めたことで、より幅広い分野から利用されるようになり、安全性評価技術の普及による国民生活の安全性確保の強化が期待される。

## E. 結論

本分担研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

化学物質の反復暴露におけるノンコーディング RNA の発現解析については、平成 27 年度で測定基盤の整備をほぼ終えた。測定・解析中の四塩化炭素反復暴露に引き続き、平成 28 年度からは他の化学物質の反復暴露実験についても解析を進め、反復暴露毒性に関与するノンコーディング RNA の抽出と機序解析を進める。

Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進においても、平成 27 年度、データやソフトウェアの利用ライセンスを明確化した。引き続き研究成果の速やかな社会還元を推進してゆく。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表 (抜粋)

Janesick A, Nguyen TT, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Chandraratna RA, Kanno J, Blumberg B. Active repression by RAR $\gamma$  signaling is required for vertebrate axial elongation., *Development*. (2014);141(11):2260-70.

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.

Tanaka M, Yamazaki Y, Kanno Y, Igarashi K, Aisaki K, Kanno J, Nakamura T. Ewing's sarcoma precursors are highly enriched in embryonic osteochondrogenic progenitors. *J Clin Invest*. (2014);124(7):3061-74.

### 2. 学会発表 (抜粋)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura and Ken-ichi Aisaki, "Signal Toxicity" to study Endocrine Disruptors Issues and Children's Toxicology, and to make molecular-based linkage with Classical Toxicology (2015.10.29), 2nd Malaysian Congress of Toxicology (MyCOT2015), Chulan Kuala Lumpur, Malaysia, Keynote

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for Mechanistic Analysis Towards Chronic Toxicity by a Newly Designed Repeated Dose Study, 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2015) (2015.9.15), Porto, Portugal

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)

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)

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

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録