

核内受容体を介したビタミンDによる 脂質代謝遺伝子発現調節機構の解明

京都府立大学生命環境科学研究科分子栄養学研究室：亀井 康富

要旨

本研究では、GPAT1 遺伝子に関する解析をモデルとして、胎仔期（妊娠期）～新生仔期（授乳期）～成獣期の仔マウスの肝臓における GPAT1 遺伝子の発現制御の分子機構を検討した。その結果、GPAT1 遺伝子は DNA メチル化を介して転写因子 SREBP1c による発現制御を受け、かつ母マウスの栄養条件によって DNA メチル化が変動することが示された。さらに、胎仔期～新生仔期においてビタミン D などの影響により確立された肝臓の DNA メチル化状態が成獣期まで維持されるのか否か、これが栄養環境により変化するか否かを検討するため、妊娠期～授乳期の母マウスにビタミン D を投与したところ、母マウスの体重減少および産仔の食殺が生じた。そこで新生仔肝臓の初代培養を用いてビタミン D 投与により発現変動および DNA メチル化変動する遺伝子を網羅的に解析した。複数の遺伝子の DNA メチル化変動が認められ、ビタミン D による新たな遺伝子発現制御機構の存在が示唆された。しかし、DNA メチル化変化と遺伝子発現変化に明らかな相関は認められず、これまで考えられて来た様式に加え、何らかの付加的な制御機構が存在することが示唆された。

緒言

幼年期のビタミン D の不足は骨機能に長期的な悪影響を与える可能性が指摘されているが、それ以外の疾患についての情報は少ない。乳製品はビタミン D 強化に最適な食品である。そのため、ビタミン D 強化牛乳を妊娠・授乳期の母親が摂取する、あるいはビタミン D を強化した粉ミルクを乳幼児期に摂取することの、子供の長期的な疾患予防に対する効果を検証することは意義あるものである。

我々はマウスビタミン D 受容体の遺伝子クローニングを世界に先駆けて行なった¹⁾。また、活性型ビタミン D₃ によりビタミン D 受容体の発現量の増加とともに前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化過程が顕著に抑制することを見出した²⁾。さらに、ビタミン D 受容体をはじめとした核内受容体の作用機序に、核内受容体とタンパク質—タンパク質相互作用をする転写共役因子が重要であることを明らかにした³⁾。そして、この転写共役因子は脂質代謝（脂肪酸分解）に重要であり、活性化により高脂肪食摂取によるマウスの肥満が予防できることを明らかにした⁴⁾。一方、ビタミン D 受容体をはじめとした核内受容体とタンパク質—タンパク質相互作用することが知られるチミン DNA グリコシラーゼは DNA 脱メチル化に必須であることが最近判明し、核内受容体を介した DNA メチル化制御の可能性が示唆されるが詳細は不明である。

ビタミン D は核内受容体を介して生理作用を発揮するが、近年核内受容体と DNA メチル化の関係が報告されている。DNA メチル化は長期的な遺伝子発現のメモリーに寄与するため、本研究では、ビタミン D の長期的な影響に関して、DNA メチル化に着目した検討を試みるものである。また、合わせて他の栄養素で活性化される核内受容体についても検討する。特に、これまでの検討で肝臓の脂質代謝遺伝子は乳児期に DNA メチル化制御を受ける可能性が示唆されるため、脂質代謝関連疾患と幼年期のビタミン D 摂取に着目する。

従来、エピジェネティクス概念は、個体発生におけるインプリンティング遺伝子の片親性発現パターンの成立や発がんにおけるがん抑制遺伝子の不活性化において注目されてきたが、肥満や生活習慣病のような成人期に発症する慢性疾患における病態生理的意義は不明である。我々は既に、離乳前後に GPAT1 遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化のダイナミックな変動を確認しており、脂肪蓄積におけるエピジェネティクス制御の具体的な分子機序として DNA メチル化を想定するものである。すなわち、胎仔期あるいは個体の成長が著しい新生仔期は全身臓器の可塑性が高い時期であり、胎生期や離乳前後の急激な栄養環境の変化が特定の遺伝子の DNA メチル化を制御し、成獣期に発症する肥満や脂肪肝に対する疾患感受性を決定する可能性を示唆するものである。

本研究が成功した場合、肝臓における *de novo* 脂肪合成をモデルとして、新生児期の栄養環境の変化によりどのようなメカニズムで成人期の疾患感受性が付与されるのかが明らかになる。本研究は、詳細が不明なエピジェネティクス制御の分子機構を新生児期において明らかにするものであり、特に、母体の栄養状態に左右される胎生期と比較して新生児期は人工乳のビタミン D 添加による栄養学的介入が容易であり、新しい栄養環境づくりや食品由来成分による、肝臓の *de novo* 脂肪合成のエピジェネティクス制御により、DNA メチル化を標的とする「疾患になりにくい体質づくり」が可能となる。以上より、根本的な肥満や生活習慣病の新しい予防戦略の手掛かりになる。さらに、本研究により、食品成分と胎生期・新生児期のエピジェネティクスの関係が明らかになると、女性（妊娠の可能性のある女性～妊娠女性）の栄養補給を目的とした健康食品の開発が可能となり、次世代を担う人達の健康を左右することから社会に大きなインパクトを与えられられる。

当初の実験計画：

1) 肝脂肪合成律速酵素・GPAT1 遺伝子プロモーターに関する解析

本研究では、先行している GPAT1 遺伝子に関する解析をモデルとして、胎仔期（妊娠期）～新生仔期（授乳期）～成獣期の仔マウスの肝臓における GPAT1 遺伝子の発現制御の分子機構を検討する。マウスにビタミン D を与え、GPAT1 を制御する転写因子 SREBP1c や、ビタミン D 受容体などが相互作用して DNA メチル化制御する可能性を検討する。

2) 肝臓における DNA メチル化パターンの網羅的解析

本研究では、DNA メチル化の網羅的解析法である MIAMI 法（Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers）（Oncogene 25: 3059-3064, 2006）⁵⁾ により、妊娠・授乳期の母獣へのビタミン D 投与により、経母乳的にビタミン D を摂取した胎仔期～新生仔期マウスの肝臓における DNA メチル化状態の変化を網羅的に解析する。cDNA 発現マイクロアレイ法により、発現が変化する遺伝子との比較を行なう。

3) マウスモデルを用いた病態生理的意義の検討

胎仔期～新生仔期においてビタミン D などの影響により確立された肝臓の DNA メチル化状態が成獣期まで維持されるのか否か、これが栄養環境により変化するのか否かを検討する。更に、離乳後の仔マウスの生活習慣病に関連する表現型（体重、脂肪蓄積、糖脂質代謝、エネルギー消費、肝臓代謝関連の組織像など）を解析する。また骨密度などのパラメーターに関しても同時に検討する。

実験方法

実験 1 (GPAT1 に関する解析)

1) 肝脂肪合成律速酵素・GPAT1 遺伝子プロモーターに関する解析では、DNA メチル化が変動する *de novo* 脂肪合成酵素遺伝子の代表例として GPAT1 遺伝子のプロモーター領域を解析する。胎仔期～新生仔期～成獣期のマウス初代培養肝細胞において、DNA メチル化酵素を過剰発現あるいはノックダウンして、GPAT1 遺伝子プロモーターにおける DNA メチル化の変化を詳細に検討する。同時に GPAT1 の遺伝子発現と肝細胞の脂肪合成能を検討し、肝細胞における GPAT1 遺伝子プロモーターにおける DNA メチル化の変動の機能的意義を検討する。2) マウスモデルを用いた病態生理的意義の検討では、DNA メチル化酵素の遺伝子操作マウスを用いて、*de novo* 脂肪合成酵素の遺伝子発現とプロモーター領域の DNA メチル化の変化を解析し、成獣期に肥満や脂肪肝を誘導し、新生仔期の DNA メチル化状態との関連を検討する。胎仔期（妊娠期）～新生仔期（授乳期）に新生仔マウスあるいは母マウスの栄養環境を変化させ、離乳後の仔マウスの生活習慣病に関連する表現型（体重、脂肪蓄積、糖脂質代謝、エネルギー消費、肝臓代謝関連の組織像など）を解析し、DNA メチル化による肝臓での脂肪蓄積における機能的意義の解析を行なう。

結果

肝臓は、出生前後から離乳までの新生児期の栄養環境の変化に応じて代謝機能がダイナミックに変化する。例えば、マウス肝臓における *de novo* (新規) 脂肪合成は出生直後には強く抑制されているが離乳後に急増する。これは脂質が豊富な母乳から炭水化物が主体の経口摂取に変化するために離乳後には糖質から脂質の合成 (新規脂肪合成) が必要であることに関連する。研究代表者らは、離乳後のマウス肝臓において新規脂肪合成の律速酵素であり、核内受容体リガンドの代謝にも重要であることが示唆される glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 (GPAT1) の遺伝子発現の増加とプロモーター領域の DNA メチル化の著しい減少を見出しており、DNA メチル化の程度は遺伝子発現と逆相関していた。この発現制御には転写因子 SREBP1 の関与が示唆された。また DNA メチル化の変化は GPAT 遺伝子プロモーターに特異的であり、他の脂肪合成遺伝子には認められなかった。レポーターアッセイの検討により、DNA メチル化により GPAT 遺伝子プロモーター転写活性が抑制され、またクロマチン免疫沈降法により、この DNA メチル化の減少にはプロモーター領域における新規 DNA メチル化酵素 Dnmt3b の結合の減弱が関連することを明らかにした。さらに、妊娠期～授乳期の母マウスを過栄養にすることにより新生仔マウスの肝臓ではプロモーター領域の DNA メチル化の減少とともに GPAT1 遺伝子発現の増加が認められ、肝脂肪蓄積が増加することを明らかにした (図 1～10 参照)。以上の研究成果は、胎仔期あるいは個体の成長が著しい新生仔期は全身臓器の可塑性が高い時期であり、胎生期や離乳前後の急激な栄養環境の変化が DNA メチル化を制御し、成獣期に発症する肥満や脂肪肝に対する疾患感受性を決定する可能性を示唆するものである。

実験 2

【方法（当初の予定）】

妊娠した母マウスを 2 群に分け、一方をリガンド投与群(Vitamin D 群)、もう一方をコントロール群(Veh 群)とする。Vitamin D 群には妊娠期 14~18 日、授乳期 2~21 日の間、母マウスに Vitamin D リガンドを 40mg/kg/day および 80mg/kg/day 腹腔内投与する。Veh 群にはリガンドの溶媒である DMSO を腹腔内投与する。そして授乳期 16 日目の仔マウス(d16)を解剖し、肝臓脂質代謝遺伝子の DNA メチル化、遺伝子発現、また組織重量を測定した。離乳後、1 週間普通食で育てリガンドの効果を wash out する。そして wash out 後の仔マウス(d28)を解剖し、同様に測定する (図 1 1)。

さらに wash out 後、2 群に分けた親の仔マウスをそれぞれさらに 2 群に分ける。一方を高脂肪食負荷群(High fat)、もう一方を普通食負荷群(Chow)として分け、Veh-Chow(VC)、Veh-High fat(VH)、Vitamin D-Chow(DC)、Vitamin D-High fat(DH)の 4 群を作った後、10 週間食餌負荷する。そして負荷後の仔マウス(10w)を解剖し、先ほどの項目に加えて肝臓トリグリセリド含有量(LivTG)も測定する。

遺伝子発現は、肝臓から抽出した Total RNA を cDNA に逆転写し、それを Real Time-PCR にかけることで測定した。DNA メチル化は、Bisulfite 反応を施した gDNA から標的遺伝子を PCR による増幅後シーケンス解析し、フリーソフトの QUMA を使用して図として描出することで測定する。重量測定した組織は全身(BW)、肝臓(Liv)と白色脂肪組織(Epi)である。

結果：

ビタミン D を投与した。妊娠した母マウスを 2 群に分け、一方をリガンド投与群(Vitamin D 群)(N=4)、もう一方をコントロール群(Veh 群)(N=6)とした。Vitamin D 群には妊娠期 14~18 日、授乳期 2~21 日の間、母マウスに Vitamin D リガンドを 40mg/kg/day(N=4)および 80mg/kg/day(N=4)腹腔内投与した。母マウスの体重測定結果を示す。40mg/kg/day の群で投与開始 3 日目に母マウスが 1 匹死亡した。40mg/kg/day および 80mg/kg/day 腹腔内投与の両群で、vehicle 投与群に比べ徐々に母マウスの体重減少が認められた (図 1 2、表 1)。ビタミン D 40mg/kg/day および 80mg/kg/day の両群ともに出産がなされたことを確認した。出産 2 日後、授乳中の母マウスに再びビタミン D の投与を行なったところ、3 日令において産仔の死亡が認められた。ここで、予想外に産仔が死亡したため、授乳期のみの影響を調べるために vehicle 群(N=6)のうち 2 匹について、ビタミン D 40mg/kg/day 投与に切り替えた。その結果、ビタミン D 投与により母マウスの体重減少が認められた (図 1 3、表 2)。また、2 匹の母マウスともに仔マウスを食殺したため、実験を中止した。

実験 3

新生仔初代培養に対するビタミン D 投与、網羅的な DNA メチル化解析、発現パターン変化

網羅的 DNA メチル化法の確立

本研究では、網羅的な DNA メチル化解析法である MIAMI 法 (Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers) (Oncogene 25:3059-3064, 2006) を用いた。ゲノム DNA をメチル化感受性酵素 HpaII および非感受性酵素 MspI で処理、アダプター添加後、PCR 増幅し、プロモーターゲノム DNA アレイとハイブリさせて、DNA メチル化の有無によるシグナルの変化を比較した (図 1 4)。

マイクロアレイによる発現パターンの変化

1,25(OH)₂D₃ ビタミン D₃ 添加または vehicle を添加したマウス新生仔肝臓初代培養より RNA を調製した。逆転写反応および Cy3-CTP の取り込み後、マウス cDNA アレイとハイブリし、遺伝子発現変化を計測した。得られた結果はバイオインフォマティクスの手法を用いて解析した。すなわち、新生仔肝臓初代培養における遺伝子発現プロフィールを検討し、プロモーター領域の DNA メチル化の変動と遺伝子発現の変化が逆相関する「DNA メチル化標的遺伝子」の同定を試みた。

方法、Methylation profiling by the MIAMI method ⁵⁾

The MIAMI method was performed using 1 µg of genomic DNA. The complete experimental procedure is available at <http://grc.dept.med.gunma-u.ac.jp/~gene/image/MIAMI20Protocol20V4.pdf>. In brief, to examine the changes in DNA methylation, we analyzed the sample differences between methylation-sensitive HpaII cleavage and methylation-insensitive MspI cleavage. Adaptors were ligated and PCR-amplified, and the products were hybridized with microarrays containing 41,332 probes. Transcriptional start sites for the genes were characterized on the basis of the Ensembl database annotation (MGSCv37, dated Sept. 17, 2011) using the BioMart program. The MIAMI probes were mapped on MGSCv37 using Bowtie 0.12.5 to yield their chromosomal positions, and the distances to the MIAMI probes from the transcription start sites of the nearest genes were calculated.

発現アレイは Takahashi らの論文⁶⁾ で述べられている方法に従って行なった。

結果

MIAMI 法による DNA メチル化変化の解析

コントロールと比較し、ビタミン D₃ 処理により 50 個の遺伝子で DNA メチル化の減少(0.8 倍以下)が観察された。さらに 31 個の遺伝子で 1.5 倍以上 DNA メチル化が増加した。この結果から、ビタミン D 処理により、ある特定の遺伝子群が DNA メチル化制御を受けることが示唆された。また、バイオインフォマティクス解析により、これらには MAPK signaling pathway, Sphingolipid metabolism (メチル化減少)、Arginine and proline metabolism (メチル化増加)に関わる遺伝子が多く含まれることが判明した。(図 15、表 3、4)

ビタミン D により発現増加した遺伝子のマイクロアレイ解析

ビタミン D 添加により多数の遺伝子の発現増加が認められた。(2.5 倍以上、116 遺伝子)。また、ビタミン D 受容体 mRNA の発現が 15 倍増加しており、これは我々の以前の結果と一致しており、マイクロアレイデータの信頼性を確認した。バイオインフォマティクス解析 (GO 解析) を行なったところ、表に示すように免疫系に関する遺伝子の発現増加が認められた。ビタミン D により免疫系が活性化されている可能性がある。(図 16~18、表 5、6)

ビタミン D 添加による遺伝子発現変化 (リアルタイム PCR 解析)

マイクロアレイで見られたビタミン D 添加による遺伝子発現変動をリアルタイム PCR 法により確認した。マイクロアレイの結果と一致して、ビタミン D 添加によりビタミン D 受容体の遺伝子発現の顕著な増加が認められた。脂肪酸酸化酵素に関連する遺伝子 Acox, Cpt1 に関しては、やや減少する結果になった。また、DNA 脱メチル化に関与するといわれる遺伝子類の発現を検討した。その結果、Tet や DNA グルコシラーゼ Tdg, Mbd4) は発現減少する傾向が見られた。(図 19)

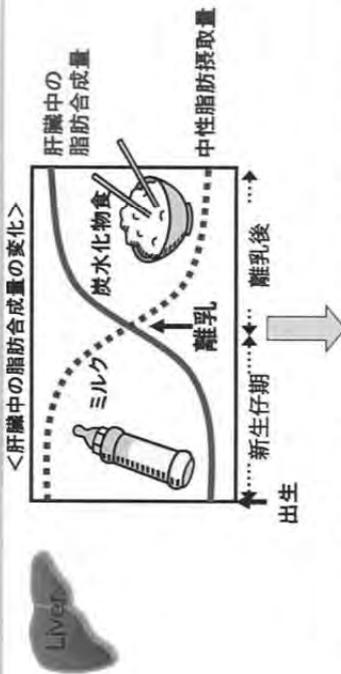
新生仔肝臓におけるビタミン D による DNA メチル化標的遺伝子の同定と機能解析

本研究では、ビタミン D 処理により DNA メチル化が著しく減少した遺伝子に焦点を当て、DNA メチル化標的遺伝子の絞り込みを試みた。すなわち、cDNA 発現マイクロアレイ法により、新生仔肝臓におけるビタミン D による遺伝子発現プロフィールを検討し、プロモーター領域の DNA メチル化の変動と遺伝子発現の変化が逆相関する「DNA メチル化標的遺伝子」の同定を試みた。しかしながら、DNA メチル化変化と、遺伝子発現変化には明らかな相関 (正あるいは負) は観られなかった。これまで考えられてきた「DNA メチル化=遺伝子発現減少」という単純な図式に加え、何らかの付加的な制御機構が存在することが示唆された。

文献

- 1) Y. Kamei, T. Kawada, T. Fukuwatari, T. Ono, S. Kato, and E. Sugimoto, Cloning and sequencing of the mouse vitamin D receptor **Gene** 152: 281-282, 1995.
- 2) Y. Kamei, T. Kawada, R. Kazuki, T. Ono, S. Kato, and E. Sugimoto. Vitamin D receptor gene expression is up-regulated by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in 3T3-L1 preadipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 193:948-955,1993.
- 3) Y. Kamei, L. Xu, T. Heinzl, J. Torchia, R. Kurokawa, B. Gloss, S.C. Lin, R.A. Heyman, D.W. Rose, C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld. A CBP Integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. **Cell** 85: 403-414, 1996.
- 4) Y. Kamei, H. Ohizumi, Y. Fujitani, T. Nemoto, T. Tanaka, N. Takahashi, T. Kawada, M. Miyoshi, O. Ezaki, and A. Kakizuka, PPARgamma coactivator 1beta/ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. **Proceedings of National Academy of Sciences USA** 100:12378-12383, 2003.
- 5) I. Hatada, M. Fukasawa, M. Kimura, S. Morita, K. Yamada, T. Yoshikawa, S. Yamanaka, C. Endo, A. Sakurada, M. Sato, T.Kondo, A. Horii, T.Ushijima, and H. Sasaki, Genome-wide profiling of promoter methylation in human. **Oncogene** 25: 3059-3064, 2006
- 6) M. Takahashi, Y. Kamei, T Ehara, X Yuan, T Suganami, T Takai-Igarashi, I Hatada, Y. Ogawa. Analysis of DNA methylation change induced by Dnmt3b in mouse hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 434, 873-8, 2013.

離乳前後の肝脂肪代謝



- ・脂肪合成遺伝子のDNAメチル化による制御？
- ・栄養環境の変化がDNAメチル化の変化を引き起こす？

図1、新生仔期は肝臓の脂肪合成は低く、離乳後に急激に上昇する。

肝臓の脂肪合成代謝マップ

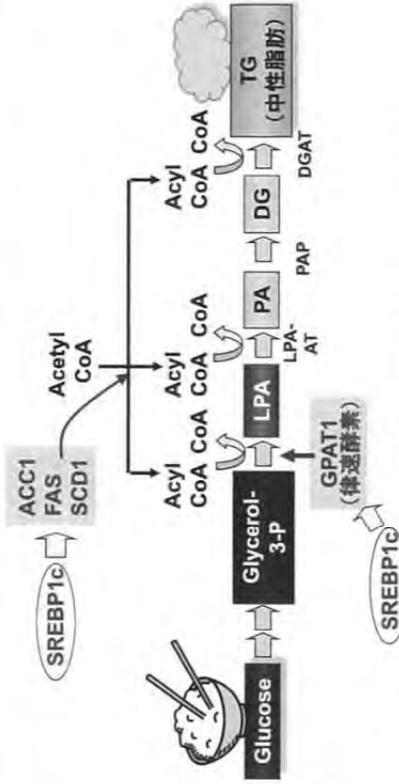


図2、SREBP1cは脂肪合成を活性化する転写因子である。

DNAメチル化解析 (新生仔・成獣肝臓)

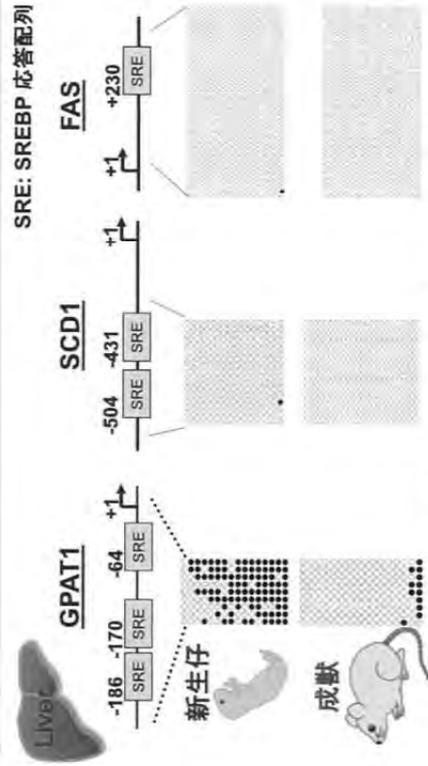


図3、SREのDNAメチル化は律速酵素GPAT1に特異的
・新生仔期のGPAT1の遺伝子発現を抑制する可能性

DNAメチル化解析 (骨格筋、肝初代培養細胞)

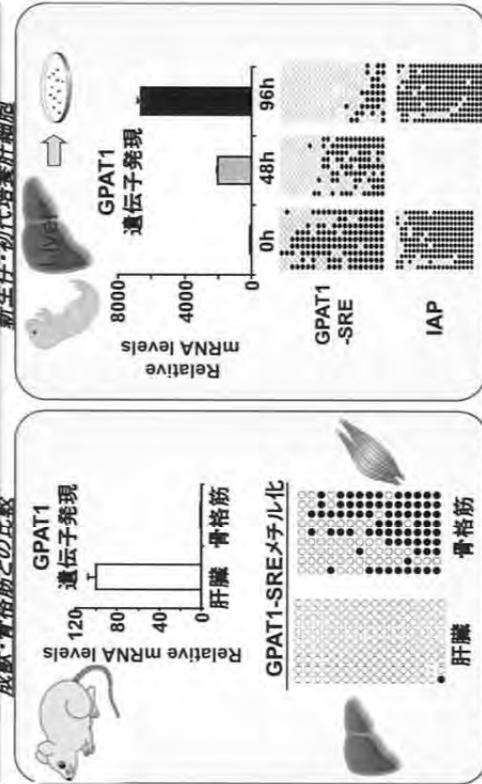


図4、SREのDNAメチル化がGPAT1の遺伝子発現に対して抑制的に働く可能性

ChIPアッセイ (Dnmt)

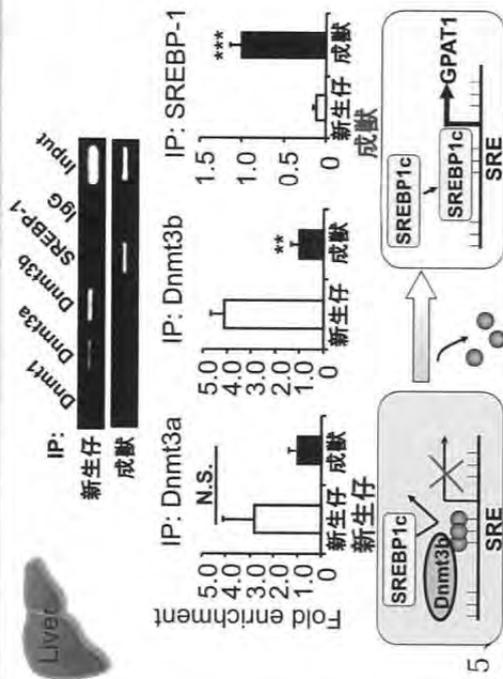


図5

Dnmt3bによるGPAT1メチル化

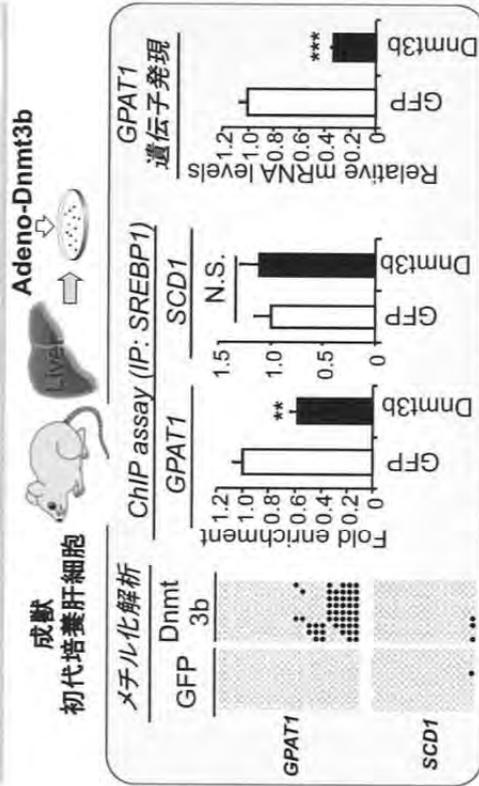


図6、Dnmt3bはDNAメチル化を介したGPAT1の発現制御に重要

Dnmt3bによるTG合成抑制

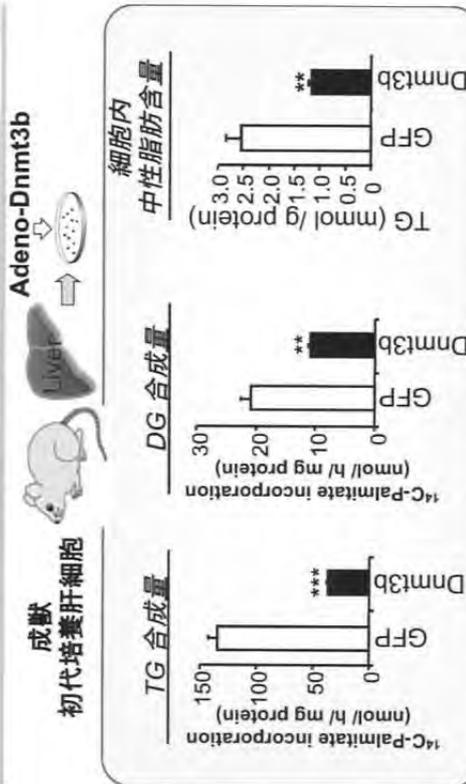


図7、Dnmt3bは肝細胞の中性脂肪合成に抑制的に働く

母親の栄養環境と仔の肝臓脂肪合成 (既報)

- 妊娠～授乳期の母獣に高脂肪食を与えると、産仔が成獣になった時に肝臓の脂肪合成が亢進し、脂肪肝になる。



(Hepatology. 2009, 50:1796-808)

図8、

GPAT1プロモーターはDNAメチル化により発現制御をうける。このDNAメチル化は食餌などの環境因子により影響されるか？

母獣の栄養条件変化とGPAT1メチル化制御

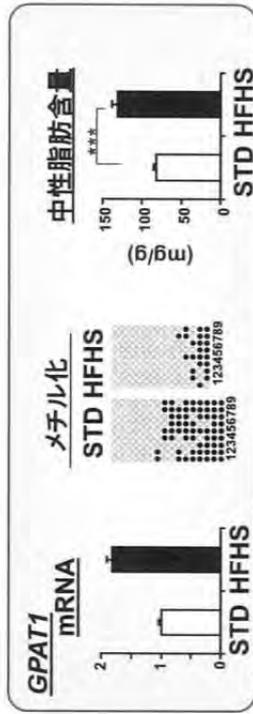


図9、母獣に高脂肪高シヨ糖食を与えることにより、産仔のGPAT1プロモーターのDNAメチル化は減少し、GPAT1遺伝子発現は増加した。

まとめ図

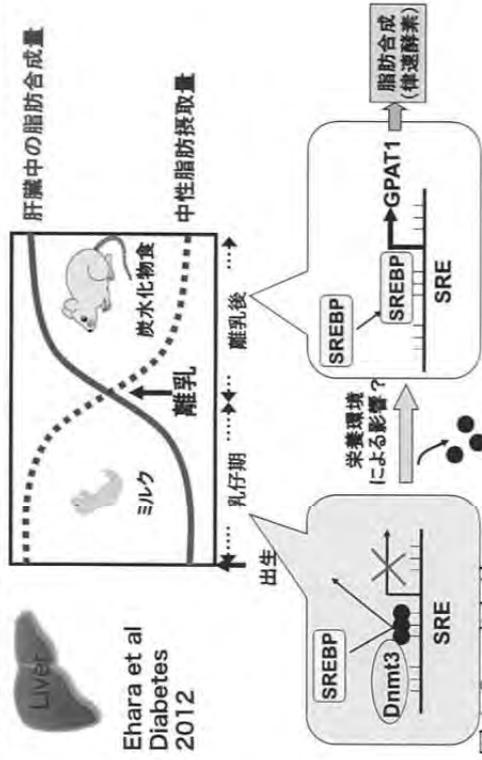


図10、まとめ

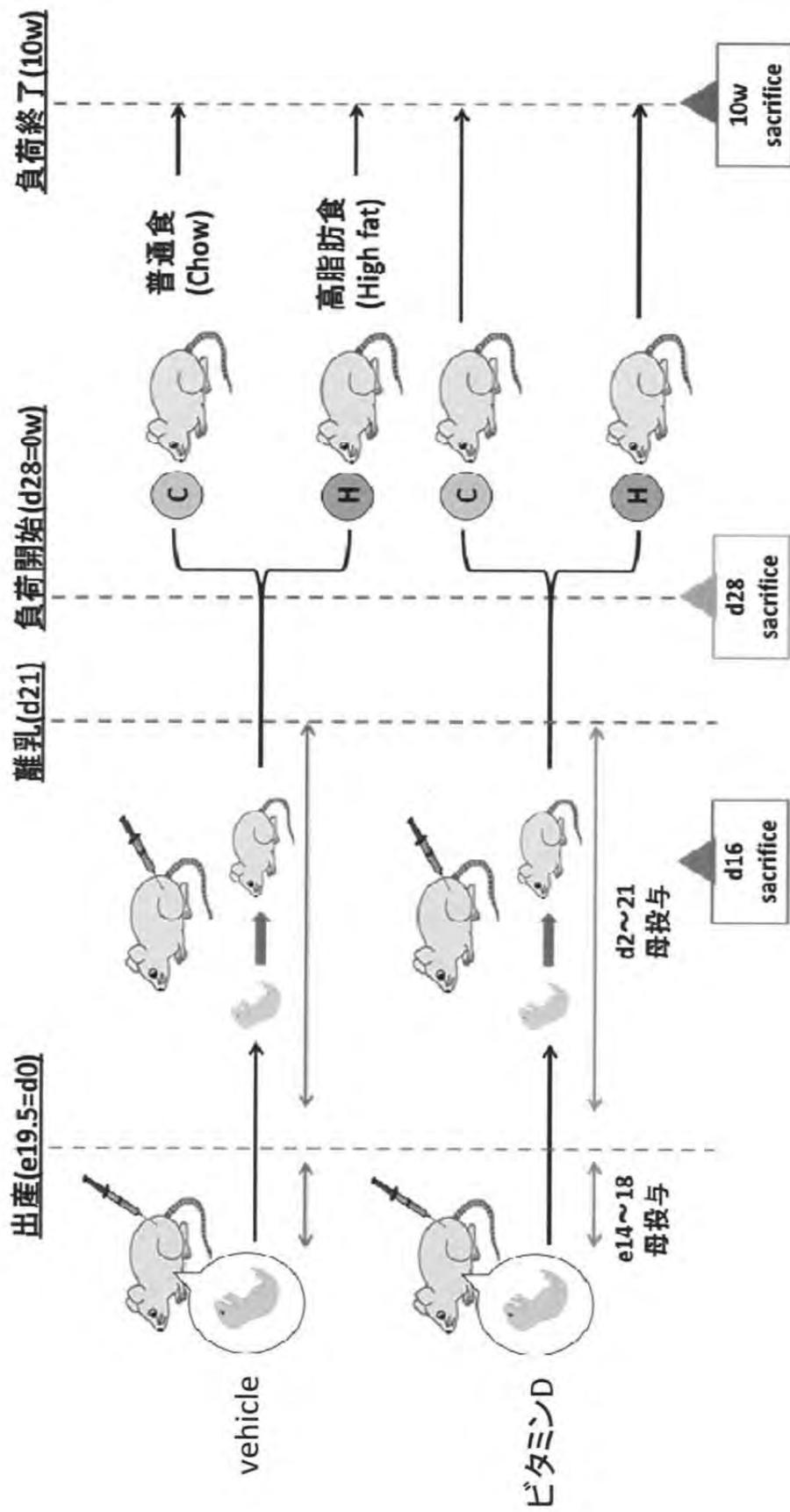


図11、ビタミンD投与実験 当初の実験計画

VitaminD投与による母マウス体重変化

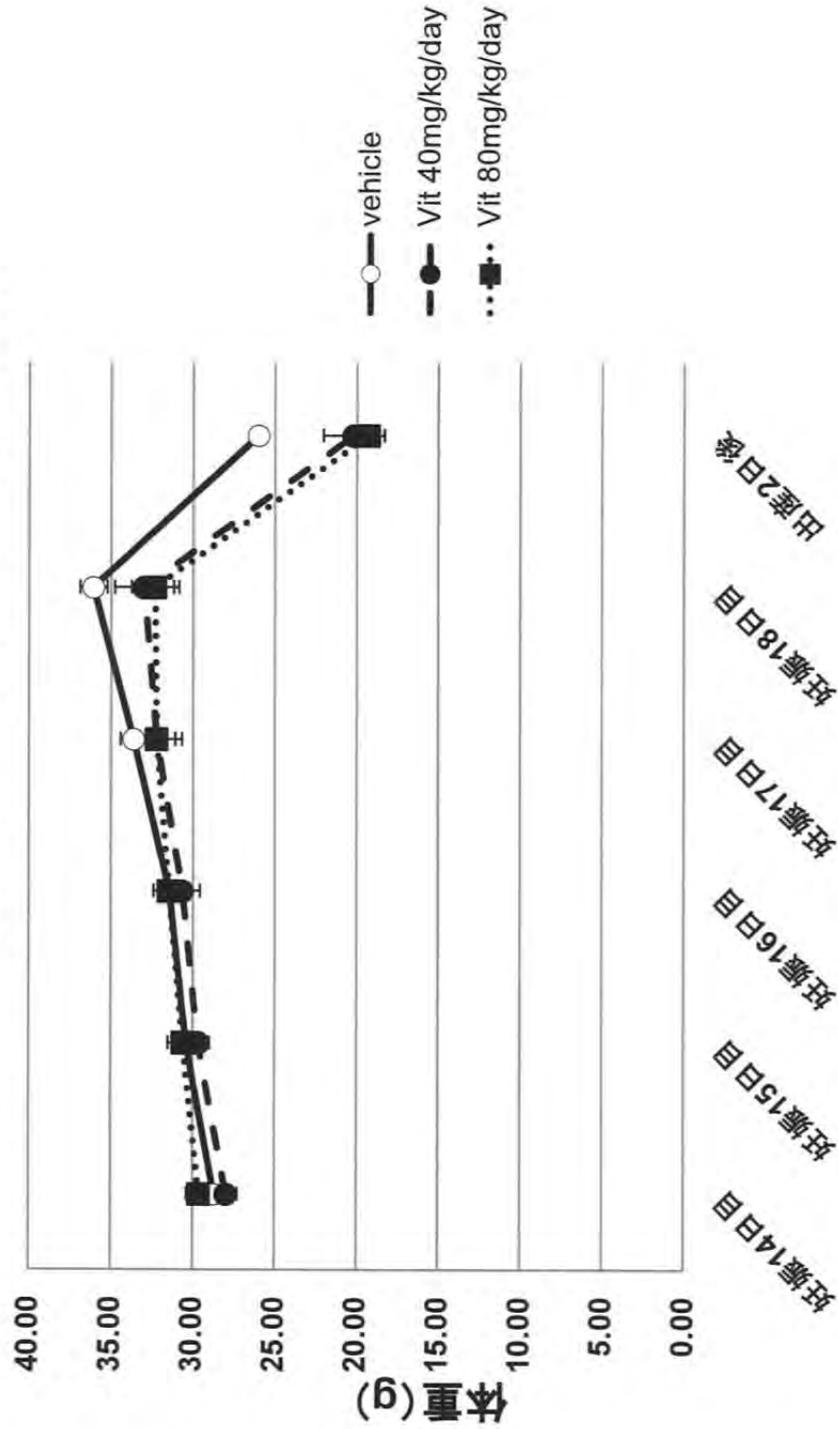


図12、ビタミンDを妊娠期の母獣に投与した際の体重の頃日変化グラフ

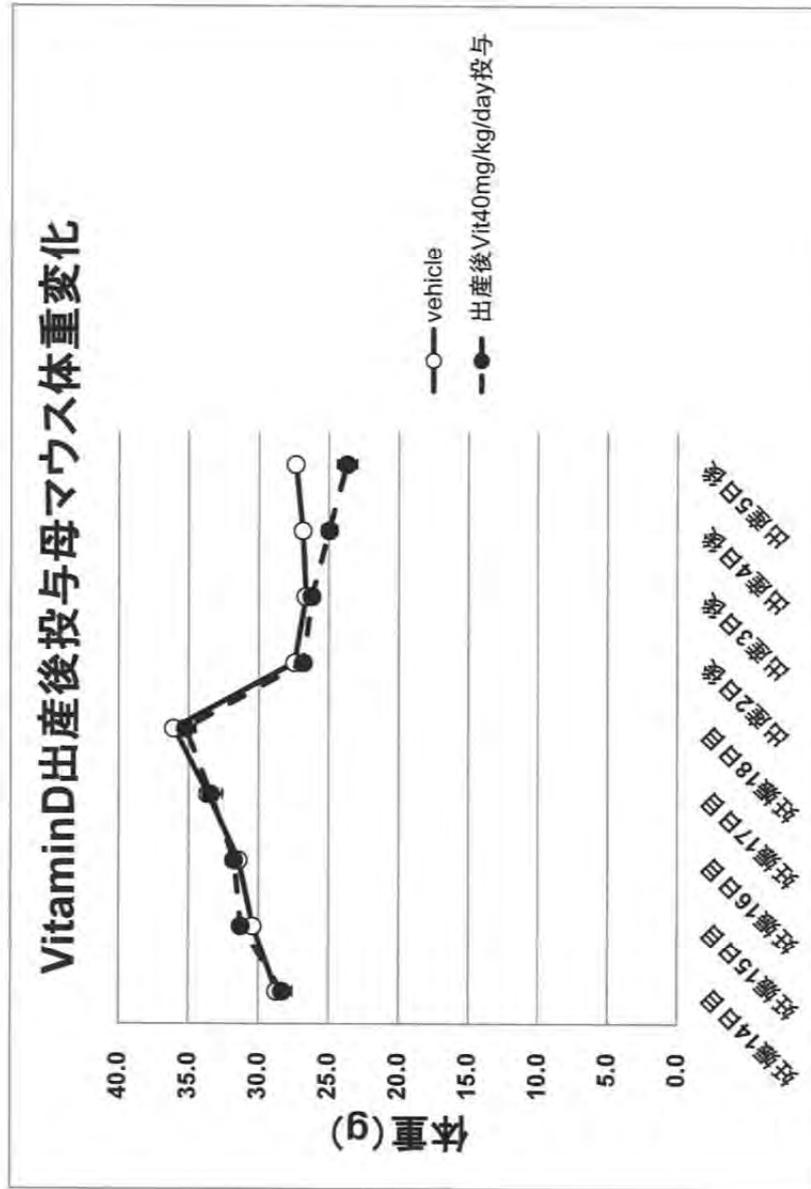
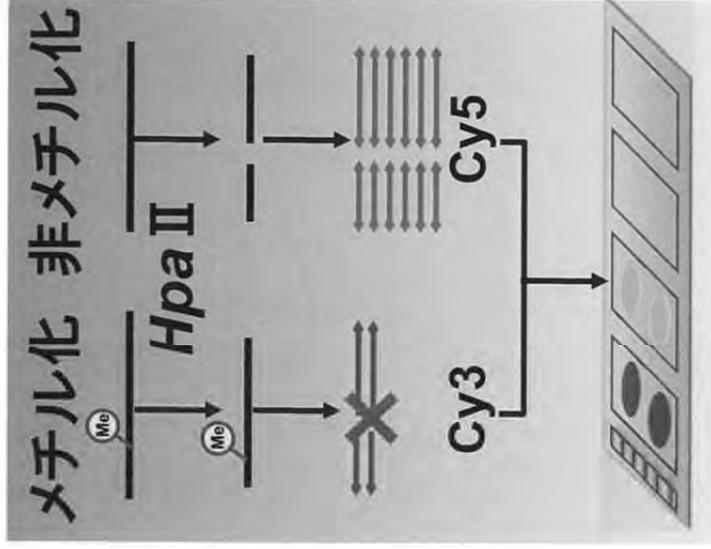
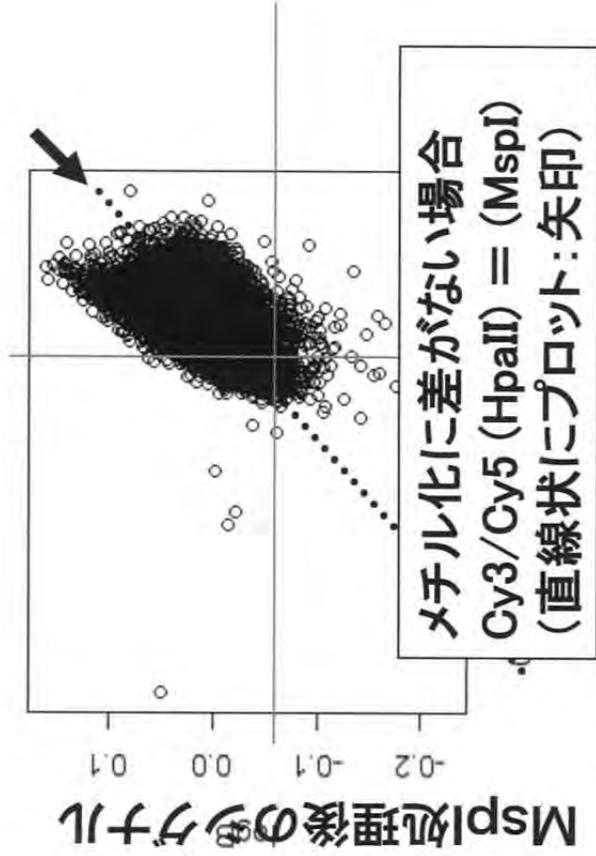


図13、ビタミンDを出産後のマウスに投与した際の体重変化

ビタミンD vs vehicle



HpaII処理後のシグナル(Cy3/Cy5)

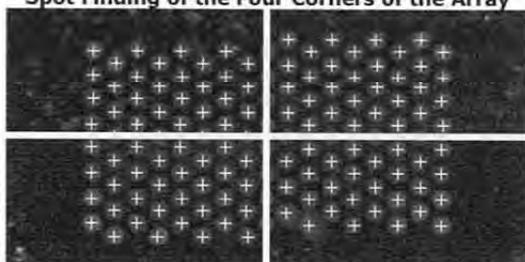
CCGGを認識するメチル化感受性の制限酵素とPCRを組み合わせ、プロモーターアレイでメチル化変化を網羅的に解析する (Oncogene 25:3059-64, 2006)

図14、ビタミンD処理によるDNAメチル化変化の網羅的解析 (MIAMI法)

QC Report - Agilent Technologies : 2 Color CGH

Date	Tuesday, March 26, 2013 - 23:43	BG Method	No Background
Image	US45102915_251550910106_S01 [1_4]	Background Detrend	On(NegC)
Protocol	ChIP_1100_Jul11 (Read Only)	Multiplicative Detrend	True
User Name	admin	Dye Norm	Linear
Grid	015509_D_F_20070508	Linear DyeNorm Factor	1.19(Red)0.782(Green)
FE Version	11.0.1.1	Additive Error	3(Red)3(Green)
Sample(red/green)		Saturation Value	65511 (r), 65511 (g)
DyeNorm List	NA	Derivative of Log Ratio Spread	0.11
No of Probes in DyeNorm List	NA		

Spot Finding of the Four Corners of the Array



Grid Normal

Feature	Local Background			
	Red	Green	Red	Green
Non Uniform Population	52	36	71	50
Population	61	47	823	549

Net Signal Statistics

Non-Control probes:

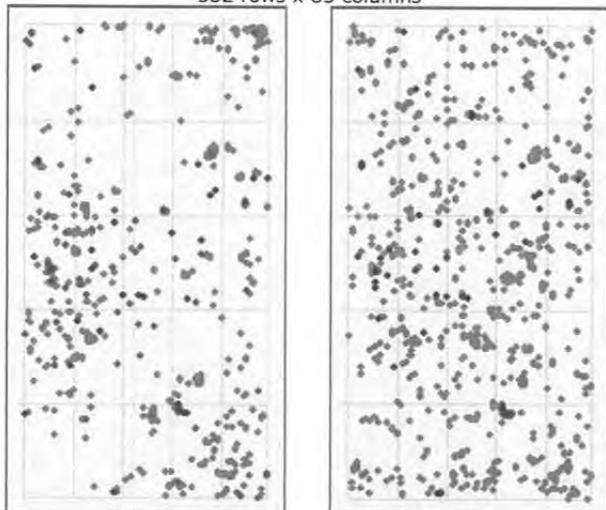
	Red	Green
# Saturated Features	1	3
99% of Sig. Distrib.	5525	7757
50% of Sig. Distrib.	1431	2273
1% of Sig. Distrib.	29	63

Negative Control Stats

	Red	Green
Average Net Signals	28.54	64.20
StdDev Net Signals	3.00	6.59
Average BG Sub Signal	0.39	1.11
StdDev BG Sub Signal (BG Noise)	2.42	4.28

Spatial Distribution of All Outliers on the Array

532 rows x 85 columns

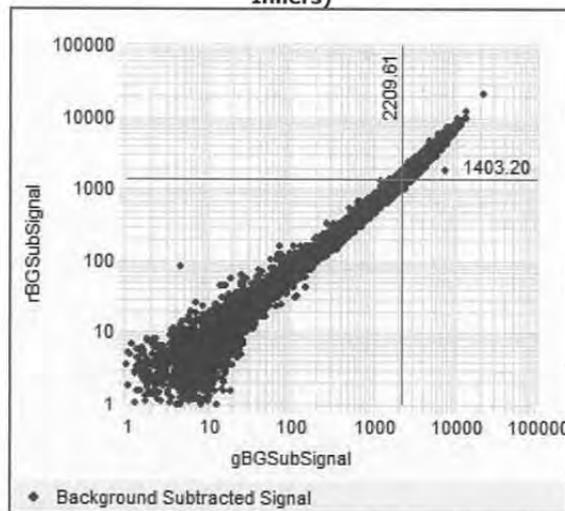


FeatureNonUnif (Red or Green) = 58(0.13%)

GeneNonUnif (Red or Green) = 49 (0.119 %)

- BG NonUniform
- BG Population
- Red FeaturePopulation
- Red Feature NonUniform
- Green FeaturePopulation
- Green Feature NonUniform

Red and Green Background Corrected Signals (Non-Control Inliers)



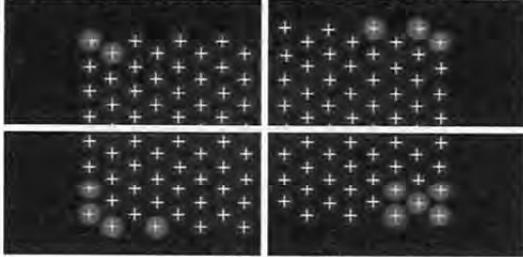
Features (NonCtrl) with BGSubSignals < 0: 291 (Red); 298 (Green)

図15、MIAMI法 アレイ Quality Checkデータ

QC Report - Agilent Technologies : 1 Color Gene Expression

Date	Thursday, May 02, 2013 - 22:52	Grid	026655_D_F_20100123
Image	US45102915_252665513747_S01 [1_4]	BG Method	No Background
Protocol	GE1_1100_Jul11 (Read Only)	Background Detrend	On(FeatNCRRange, LoPass)
User Name	admin	Multiplicative Detrend	True
FE Version	11.0.1.1	Additive Error	8(Green)
Sample(red/green)		Saturation Value	778020 (g)

Spot Finding of the Four Corners of the Array



Grid Normal

Net Signal Statistics

Agilent SpikeIns:

	Green
# Saturated Features	0
99% of Sig. Distrib.	269602
50% of Sig. Distrib.	809
1% of Sig. Distrib.	62

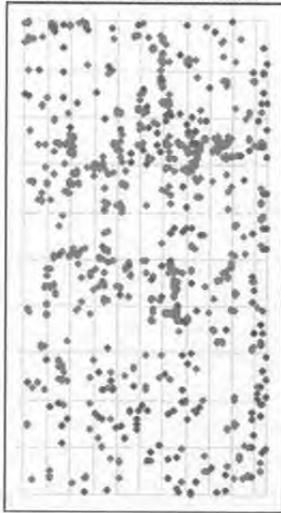
Non-Control probes:

	Green
# Saturated Features	0
99% of Sig. Distrib.	101589
50% of Sig. Distrib.	153
1% of Sig. Distrib.	52

Feature Local Background

	Green	Green
Non Uniform	1	1
Population	171	698

Spatial Distribution of All Outliers on the Array
532 rows x 85 columns

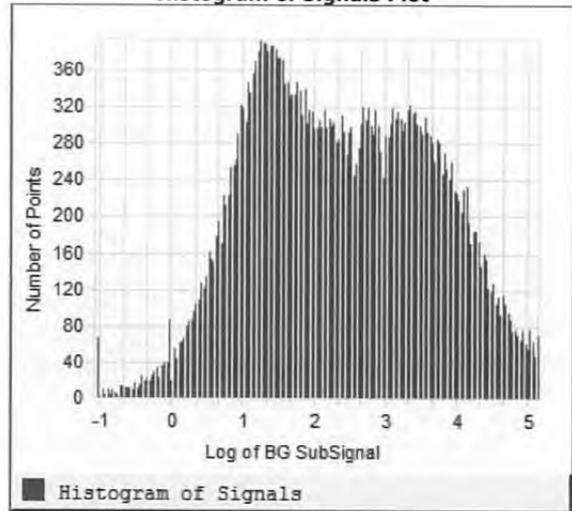


FeatureNonUnif (Green) = 1(0.00%)

GeneNonUnif (Green) = 0 (0.000 %)

- BG NonUniform
- BG Population
- Green FeaturePopulation
- Green Feature NonUniform

Histogram of Signals Plot



Features (NonCtrl) with BGSubSignal < 0: 6329 (Green)

図16、発現アレイ Quality Checkデータ1

Negative Control Stats

	Green
Average Net Signals	62.48
StdDev Net Signals	3.82
Average BG Sub Signal	-6.31
StdDev BG Sub Signal	3.97

Local Bkg (inliers)

	Green
Number	43699
Avg	46.46
SD	2.19

Foreground Surface Fit

	Green
RMS_Fit	4.46
RMS_Resid	7.57
Avg_Fit	92.87

Multiplicative Surface Fit

	Green
RMS_Fit	0.11

Reproducibility: %CV for Replicated Probes

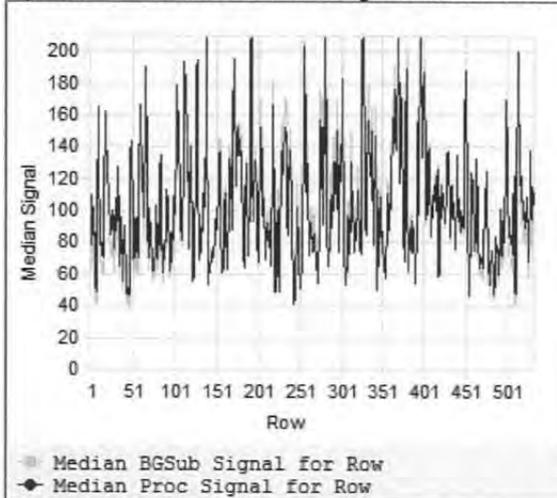
Median %CV Signal (inliers)	
Non-Control probes	Agilent SpikeIns
Green	Green

BGSubSignal	12.39	11.96
ProcessedSignal	3.69	3.31

Agilent SpikeIns Signal Statistics

Probe Name	Log (Relative Conc.)	Median (Log Proc. Sig.)	% CV	StdDev
(+)E1A_r60_3	0.30	1.14	43.71	0.18
(+)E1A_r60_a104	1.30	0.89	37.18	0.10
(+)E1A_r60_a107	2.30	1.39	44.18	0.13
(+)E1A_r60_a135	3.30	2.39	9.69	0.04
(+)E1A_r60_a20	3.83	2.79	3.31	0.01
(+)E1A_r60_a22	4.30	3.27	3.26	0.01
(+)E1A_r60_a97	4.82	3.94	3.18	0.01
(+)E1A_r60_n11	5.30	4.52	2.67	0.01
(+)E1A_r60_n9	5.82	4.75	3.90	0.02
(+)E1A_r60_1	6.30	5.40	5.61	0.02

Spatial Distribution of Median Signals for each Row



Spatial Distribution of Median Signals for each Column

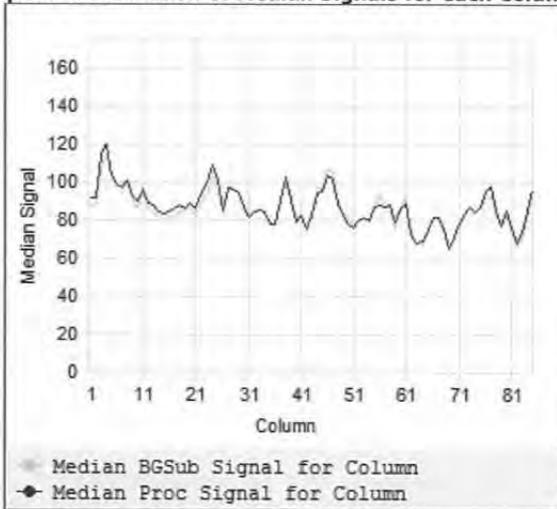
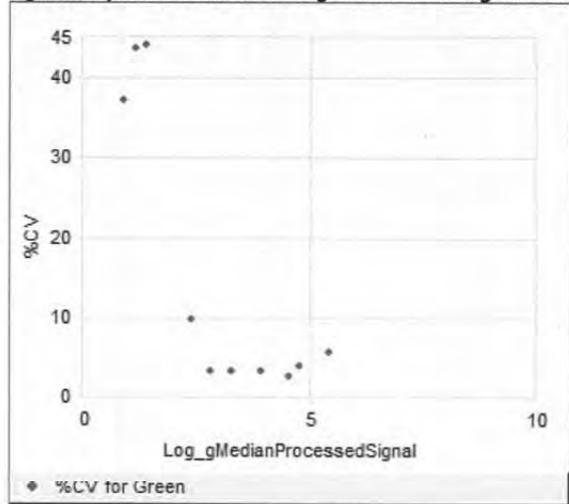


図17、発現アレイ Quality Checkデータ2

Agilent SpikeIns: %CV of Avg. Processed Signal Plot



Median %CV:3.31

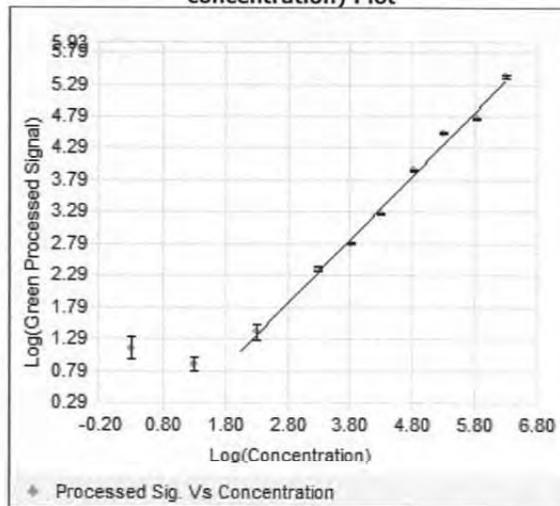
Evaluation Metrics for GE1_QCMT_Jul11 :

Good (10) ; Evaluate (1)

Metric Name	Value	Excellent	Good	Evaluate
IsGoodGrid	1.00		>1	<1
AnyColorPrcntFeatNonUn...	0.00		<1	>1
gNegCtrlAveNetSig	62.48		<40	>40
gNegCtrlAveBGSubSig	-6.31		-10 to 5	<-10 or >5
gNegCtrlSDevBGSubSig	3.97		<10	>10
gSpatialDetrendRMSFilt...	7.57		<15	>15
gNonCntrlMedCVProcSign...	3.69		0 to 8	<0 or >8
gE1aMedCVProcSignal	3.31		0 to 8	<0 or >8
absGE1E1aSlope	1.00		0.90 to 1.20	<0.90 or >1.20
DetectionLimit	1.32		0.01 to 2	<0.01 or >2
gDDN	-1.00		-15 to 15	<-15 or >15
rDDN	-		-15 to 15	<-15 or >15

◆ Excellent ◆ Good ◆ Evaluate

Agilent SpikeIns: Log(Signal) vs. Log(Relative concentration) Plot



Agilent Spike-In Concentration-Response Statistics

Linear Range Statistics:

Low Signal	1.10
High Signal	5.77
Low Relative Concentration	2.05
High Relative Concentration	6.71
Slope	1.00
R^2 Value	0.99

Signal Detection Limit Statistics

Saturation Point	5.89
Low Threshold	0.85
Low Threshold Error	0.24
Spike-In Detection Limit	1.32

図18、発現アレイ Quality Checkデータ3

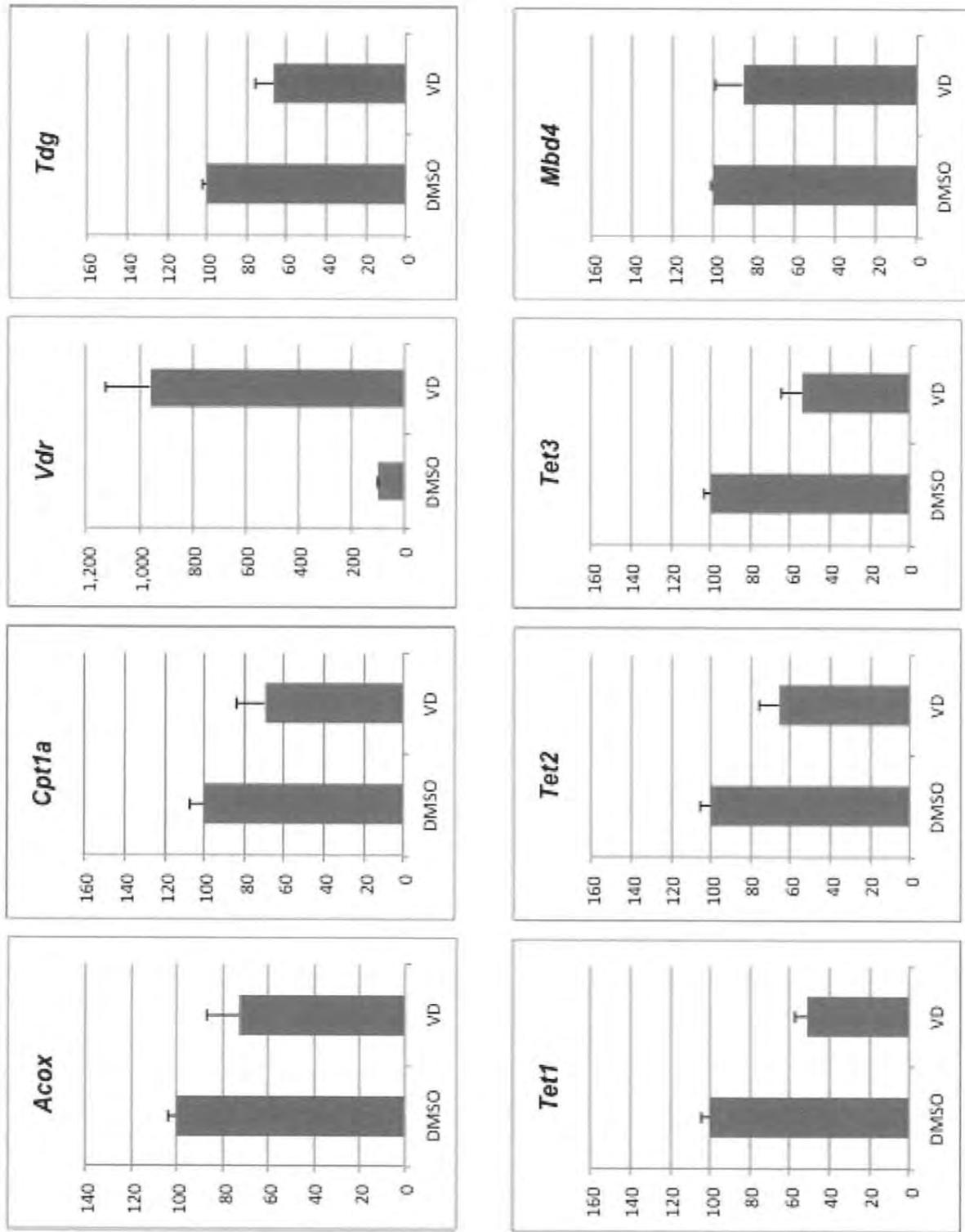


図19、ビタミンDを添加した肝臓初代培養における遺伝子発現(リアルタイムPCR)

表1、ビタミンDを妊娠期の母獣に投与した際の体重の経日変化

・VitaminD投与による体重変化

	妊娠14日目	妊娠15日目	妊娠16日目	妊娠17日目	妊娠18日目	出産2日後
vehicle①	27.9	30.1	30.4	31.4	33.8	出産 25.2
vehicle②	27.5	29.2	31.2	34.0	36.2	出産 25.0
vehicle③	29.8	31.8	32.9	35.3	37.8	出産 26.5
vehicle④	29.6	30.5	31.2	33.7	36.4	出産 26.6
vehicle 平均	28.7	30.4	31.4	33.6	36.05	出産 25.98
Vit40①	26.7	28.8	28.8	29.9	30.1	出産 18.2
Vit40②	28.1	29.2	30.6	31.6	32.5	出産 18.4
Vit40③	29.1	31.0	32.5	35.1	36.3	出産 23.9
Vit40 平均	27.97	29.67	30.63	32.20	32.97	出産 20.17
Vit80①	28.5	30.4	30.5	30.5	32.2	出産 16.9
Vit80②	28.4	28.7	29.3	30.8	30.0	出産 21.4
Vit80③	30.0	30.2	32.4	32.1	30.6	出産 18.9
Vit80④	31.6	33.1	33.6	35.4	36.4	出産 19.8
Vit80 平均	29.63	30.60	31.45	32.20	32.30	出産 19.25

グラフ使用データ

	妊娠14日目	妊娠15日目	妊娠16日目	妊娠17日目	妊娠18日目	出産2日後
vehicle	28.70	30.4	31.4	33.6	36.05	25.98
Vit 40mg/kg/day	27.97	29.67	30.63	32.20	32.97	20.17
Vit 80mg/kg/day	29.63	30.6	31.45	32.2	32.3	19.25

SE

	妊娠14日目	妊娠15日目	妊娠16日目	妊娠17日目	妊娠18日目	出産2日後
vehicle	0.5845226	0.5400617	0.5265849	0.8113774	0.8301606	0.3424787
Vit 40mg/kg/day	0.69602043	0.6765928	1.068228	1.530795	1.8049315	1.8675593
Vit 80mg/kg/day	0.75318767	0.9156054	0.9596006	1.1217546	1.4433757	0.9385272

表2、ビタミンDを授乳期の母獣に投与した際の体重の経日変化

・VitaminD 出産後投与群

	妊娠14日目	妊娠15日	妊娠16日	妊娠17日	妊娠18日	出産2日後	出産3日後	出産4日後	出産5日後
vehicle①	27.9	30.1	30.4	31.4	33.8	25.6	24.9	26.1	26.4
vehicle②	27.5	29.2	31.2	34.0	36.2	27.4	26.2	26.1	27.0
vehicle③	29.8	31.8	32.9	35.3	37.8	28.2	27.3	26.2	27.0
vehicle④	29.6	30.5	31.2	33.7	36.4	28.5	28.1	29.0	29.0
平均	28.70	30.40	31.43	33.60	36.05	27.43	26.63	26.85	27.35
vehicle⑤	29.0	31.2	31.5	32.6	34.5	27.0	25.9	24.4	23.0
vehicle⑥	27.6	31.3	32.0	34.2	35.9	26.6	26.5	25.5	24.4
平均	28.30	31.25	31.75	33.40	35.20	26.80	26.20	24.95	23.70

グラフ使用データ

	妊娠14日目	妊娠15日	妊娠16日	妊娠17日	妊娠18日	出産2日後	出産3日後	出産4日後	出産5日後
vehicle	28.7	30.4	31.425	33.6	36.05	27.425	26.625	26.85	27.35
出産後 Vit40mg/kg/day投 与	28.3	31.25	31.75	33.4	35.2	26.8	26.2	24.95	23.7

SE

	妊娠14日目	妊娠15日	妊娠16日	妊娠17日	妊娠18日	出産2日後	出産3日後	出産4日後	出産5日後
vehicle	0.5845226	0.5400617	0.5265849	0.8113774	0.8301606	0.6511208	0.6944722	0.7170542	0.56789083
Vit 40mg/kg/day	0.7	0.05	0.25	0.8	0.7	0.2	0.3	0.55	0.7

表3、MIAMI法、メチル化減少遺伝子リスト

ProbeName	GeneName	染色体位置	メチル化(fold)
A_68_P03320004	Slc2a5	chr4:148963828-148963887	0.17
A_68_P02825895	Rps27	chr3:090299226-090299281	0.45
A_68_P02263084	Atf2	chr2:073693297-073693342	0.48
A_68_P09137589	Recql5	chr11:115748501-115748554	0.55
A_68_P13375297	Rab40c	chr17:025647832-025647882	0.74
A_68_P11925017	Ppara	chr15:085563849-085563893	0.74
A_68_P11534471	Lgals3	chr14:046290270-046290329	0.75
A_68_P04003490	Efnf2	chr4:141146639-141146689	0.76
A_68_P09416681	Gal3st1	chr11:003883515-003883559	0.76
A_68_P07219220	Mt1	chr8:097068781-097068837	0.77
A_68_P10401129	Sgpp1	chr12:076654695-076654745	0.77
A_68_P02514547	Bola1	chr3:096282876-096282928	0.77
A_68_P02090840	Lhx2	chr2:038173022-038173066	0.77
A_68_P01482765	Hoxd12	chr2:074476289-074476336	0.77
A_68_P01714766	Dnajc17-Zfyve19	chr2:118900204-118900255	0.77
A_68_P07842272	Usp4	chr9:108205594-108205644	0.77
A_68_P09010836	Cbx2	chr11:118839329-118839373	0.77
A_68_P12395773	Ddx17	chr15:079373691-079373735	0.77
A_68_P00957880	Eif5b	chr1:037942826-037942874	0.77
A_68_P14100974	Gnal	chr18:067214857-067214916	0.77
A_68_P03939392	C79267	chr4:138872800-138872851	0.78
A_68_P04940007	Barhl2	chr5:106697413-106697461	0.78
A_68_P05063891	Hibadh	chr6:052569624-052569668	0.78
A_68_P05384087	Mtpn	chr6:035469691-035469736	0.78
A_68_P05706787	Plxnd1	chr6:115959386-115959430	0.78
A_68_P03875018	Oprd1	chr4:131416392-131416436	0.78
A_68_P07759159	Nktr	chr9:121567580-121567624	0.78
A_68_P13405393	Clic1	chr17:034658511-034658565	0.78
A_68_P11729373	Nkx3-1	chr14:068144106-068144150	0.78
A_68_P00192776	Dnpep	chr1:075200910-075200954	0.79
A_68_P01855476	Stk39	chr2:068271944-068271988	0.79
A_68_P02733796	2010200O16Rik-Tal	chr3:108690485-108690532	0.79
A_68_P06183534	4632419K20Rik-Cn	chr7:105274068-105274112	0.79
A_68_P04910817	Atp6v0a2	chr5:124890369-124890413	0.79
A_68_P03053574	Crct1	chr3:093099946-093099990	0.79
A_68_P09372981	Prkca	chr11:108159637-108159682	0.79
A_68_P12353771	Mapk11	chr15:088977579-088977634	0.79
A_68_P11855467	Cdc42ep1	chr15:078671414-078671463	0.79
A_68_P10021270	Fos	chr12:086363870-086363923	0.79
A_68_P07029198	Sh3rf1	chr8:064116069-064116113	0.80
A_68_P07045110	4930481F22Rik	chr8:116521849-116521899	0.80
A_68_P06144788	Apoc2	chr7:018834572-018834623	0.80
A_68_P13569249	Skiv2l	chr17:034458056-034458110	0.80
A_68_P06826875	Pcm1	chr8:042739069-042739113	0.80
A_68_P05363657	2410066E13Rik	chr6:054611368-054611412	0.80
A_68_P09121608	Rpa1-Smyd4	chr11:075164515-075164559	0.80

表4、MIAMI法、メチル化増加遺伝子リスト

ProbeName	GeneName	染色体位置	メチル化(fold)
A_68_P11688120	A_68_P11688120	A_68_P11688120	1.98
A_68_P05495854	Casd1	chr6:004551145-004551189	1.94
A_68_P07955703	5730536A07Rik	chr9:065926007-065926066	1.76
A_68_P14356802	Dmrt2	chr19:025739342-025739386	1.74
A_68_P03228980	Acof7	chr4:151021766-151021810	1.74
A_68_P00451766	Nmnat2	chr1:154711906-154711950	1.72
A_68_P07424530	Hsbp1	chr8:122225535-122225594	1.62
A_68_P09389342	Slc4a1	chr11:102180830-102180876	1.62
A_68_P14420912	Slc1a1	chr19:028901693-028901748	1.61
A_68_P14448901	Ints5	chr19:008959941-008959985	1.60
A_68_P08096796	AB124611	chr9:021276175-021276234	1.58
A_68_P04397082	Cops6	chr5:138391613-138391672	1.57
A_68_P02216243	Grem1	chr2:113557779-113557838	1.56
A_68_P08005228	Acy1	chr9:106296653-106296699	1.56
A_68_P08799615	Cdc216	chr10:040038632-040038678	1.55
A_68_P14612493	Pnck	chrX:069912615-069912659	1.55
A_68_P12203093	Asb8	chr15:097973159-097973218	1.55
A_68_P10676248	Irx1	chr13:072428309-072428367	1.55
A_68_P14343810	Tmem180	chr19:046411098-046411157	1.54
A_68_P05221993	Prmt8	chr6:127736063-127736122	1.53
A_68_P05030578	Cd27	chr6:125202292-125202346	1.53
A_68_P04263889	Emilin1	chr5:031191082-031191132	1.53
A_68_P08699753	Sim1	chr10:050582566-050582624	1.53
A_68_P14844556	Rs1	chrX:156110156-156110201	1.52
A_68_P05562612	Cav2	chr6:017231963-017232020	1.51
A_68_P12069491	Tars	chr15:011343671-011343716	1.51
A_68_P04586643	Fbxl10	chr5:123249054-123249098	1.50
A_68_P09135125	Scarf1	chr11:075330670-075330729	1.50
A_68_P10760761	Hist1h1b	chr13:021790243-021790302	1.50
A_68_P12033275	4930570C03Rik	chr15:097606948-097606997	1.50
A_68_P04813304	Pi4k2b	chr5:053030379-053030438	1.50
A_68_P12390812	pPtp4a3	chr15:073574600-073574650	1.49
A_68_P06832441	Junb	chr8:087867885-087867929	1.49
A_68_P04238078	Grsf1	chr5:089754345-089754401	1.49
A_68_P09050344	Irgm	chr11:048715343-048715402	1.49
A_68_P12654603	Ifngr2	chr16:091435299-091435346	1.48
A_68_P07379479	Npy1r	chr8:069627275-069627329	1.48
A_68_P06466329	Bckdha	chr7:025367311-025367370	1.47
A_68_P04238078	Grsf1	chr5:089754345-089754401	1.47
A_68_P05408741	1700073E17Rik	chr6:145344552-145344611	1.47
A_68_P13919239	Polr2d	chr18:031932592-031932651	1.47
A_68_P06476641	Fbxl19	chr7:127536160-127536219	1.47
A_68_P09337026	Pycr1	chr11:120458030-120458074	1.47
A_68_P10440107	D13Wsu177e	chr13:054599078-054599137	1.47
A_68_P01878180	Phf19	chr2:034735859-034735904	1.47
A_68_P09671123	Socs3	chr11:117790702-117790749	1.46
A_68_P14319765	Ifit2	chr19:034617021-034617066	1.46
A_68_P14039545	ENSMUST00000083	chr18:065374456-065374515	1.46
A_68_P04552462	4930515G01Rik	chr5:115035255-115035311	1.46

表5、発現アレイ ビタミンD 発現増加遺伝子リスト

ProbeName	GeneName	SystematicName	Description	VD(fold)
A_55_P2141088	ENSMUST000CENSMUST0000010	ens Teneurin-4 (Ten-4)(Tenascin-M4)(Ten-m4)(Protein Od	41.1	
A_55_P2141084	Odz4	NM_011858	ref Mus musculus odd Oz/ten-m homolog 4 (Drosophila) (O	31.5
A_55_P2027083	Kcnj10	NM_001039484	ref Mus musculus potassium inwardly-rectifying channel, su	24.6
A_55_P1979491	Cd28	NM_007642	ref Mus musculus CD28 antigen (Cd28), mRNA [NM_007642	16.3
A_51_P123625	Irg1	NM_008392	ref Mus musculus immunoresponsive gene 1 (Irg1), mRNA [I	16.0
A_51_P123625	Irg1	NM_008392	ref Mus musculus immunoresponsive gene 1 (Irg1), mRNA [I	15.7
A_51_P123625	Irg1	NM_008392	ref Mus musculus immunoresponsive gene 1 (Irg1), mRNA [I	15.6
A_51_P123625	Irg1	NM_008392	ref Mus musculus immunoresponsive gene 1 (Irg1), mRNA [I	15.2
A_52_P334562	Vdr	NM_008504	ref Mus musculus vitamin D receptor (Vdr), mRNA [NM_009	15.0
A_51_P123625	Irg1	NM_008392	ref Mus musculus immunoresponsive gene 1 (Irg1), mRNA [I	14.8
A_51_P322640	Ccl24	NM_019577	ref Mus musculus chemokine (C-C motif) ligand 24 (Ccl24),	14.6
A_51_P123625	Irg1	NM_008392	ref Mus musculus immunoresponsive gene 1 (Irg1), mRNA [I	14.5
A_51_P123625	Irg1	NM_008392	ref Mus musculus immunoresponsive gene 1 (Irg1), mRNA [I	14.5
A_51_P123625	Irg1	NM_008392	ref Mus musculus immunoresponsive gene 1 (Irg1), mRNA [I	14.4
A_55_P1963920	A430084P05Rii	NM_001045526	ref Mus musculus RIKEN cDNA A430084P05 gene (A430084	13.1
A_51_P123625	Irg1	NM_008392	ref Mus musculus immunoresponsive gene 1 (Irg1), mRNA [I	12.8
A_55_P2076777	Mdf1	NM_001109973	ref Mus musculus MyoD family inhibitor (Mdf1), transcript va	12.0
A_51_P123625	Irg1	NM_008392	ref Mus musculus immunoresponsive gene 1 (Irg1), mRNA [I	11.6
A_55_P2145711	Tox3	NM_172913	ref Mus musculus TOX high mobility group box family memb	7.3
A_55_P2015292	Ltc4s	NM_008521	ref Mus musculus leukotriene C4 synthase (Ltc4s), mRNA [I	7.0
A_51_P283499	Drd4	NM_007878	ref Mus musculus dopamine receptor 4 (Drd4), mRNA [NM_0	6.8
A_55_P2162727	Accn3	NM_183000	ref Mus musculus amiloride-sensitive cation channel 3 (Acc	6.3
A_51_P182572	Phactr1	NM_001005748	ref Mus musculus phosphatase and actin regulator 1 (Phact	6.2
A_51_P115715	Asb2	NM_023049	ref Mus musculus ankyrin repeat and SOCS box-containing	5.7
A_52_P609868	Timd4	NM_178759	ref Mus musculus T-cell immunoglobulin and mucin domain	5.7
A_55_P2000027	Spink2	NM_183284	ref Mus musculus serine peptidase inhibitor, Kazal type 2 (S	5.7
A_52_P119060	Acpp	NM_207668	ref Mus musculus acid phosphatase, prostate (Acpp), transc	5.7
A_52_P577662	Ednrb	NM_007904	ref Mus musculus endothelin receptor type B (Ednrb), trans	5.6
A_55_P2049867	Ccr12	NM_017466	ref Mus musculus chemokine (C-C motif) receptor-like 2 (C	5.1
A_51_P509573	Ccl4	NM_013652	ref Mus musculus chemokine (C-C motif) ligand 4 (Ccl4), ml	5.0
A_55_P2258216	8030425K09Rii	AK020195	ref Mus musculus 15 days embryo male testis cDNA, RIKEN	4.6
A_66_P119034	Pla2g7	NM_013737	ref Mus musculus phospholipase A2, group VII (platelet-acti	4.2
A_55_P2166833	Ms4a14	XM_357051	ref PREDICTED: Mus musculus gene model 1276, (NCBI) (G	4.2
A_55_P2094034	Nrg2	NM_001167891	ref Mus musculus neuregulin 2 (Nrg2), mRNA [NM_00116789	4.1
A_51_P303424	Itgax	NM_021334	ref Mus musculus integrin alpha X (Itgax), mRNA [NM_02133	4.0
A_55_P2052106	BC049762	NM_177567	ref Mus musculus cDNA sequence BC049762 (BC049762), r	3.9
A_52_P66226	Rab33a	NM_011228	ref Mus musculus RAB33A, member of RAS oncogene famil	3.8
A_55_P1960238	Slc2a6	NM_172659	ref Mus musculus solute carrier family 2 (facilitated glucose	3.8
A_55_P2045007	Hrh1	NM_008285	ref Mus musculus histamine receptor H1 (Hrh1), mRNA [NM	3.8
A_66_P132496	ENSMUST000CENSMUST0000011	ens Amiloride-sensitive cation channel 3 (Acid-sensing ion	3.7	
A_55_P1964348	Gdpd2	NM_023608	ref Mus musculus glycerophosphodiester phosphodiesterase	3.7
A_66_P114784	Pla2g7	NM_013737	ref Mus musculus phospholipase A2, group VII (platelet-acti	3.6
A_51_P246653	Clec7a	NM_020008	ref Mus musculus C-type lectin domain family 7, member a	3.5
A_55_P1988310	Rnf183	NM_153504	ref Mus musculus ring finger protein 183 (Rnf183), mRNA [N	3.5
A_52_P444637	Rcbbt2	NM_134083	ref Mus musculus regulator of chromosome condensation (F	3.5
A_55_P2002757	Blnk	NM_008528	ref Mus musculus B-cell linker (Blnk), mRNA [NM_008528]	3.4
A_55_P2175579	Olf1466	NM_146694	ref Mus musculus olfactory receptor 1466 (Olf1466), mRNA	3.4
A_51_P246066	Slamf9	NM_029612	ref Mus musculus SLAM family member 9 (Slamf9), mRNA [3.4
A_52_P40293	Hgd	NM_013547	ref Mus musculus homogentisate 1, 2-dioxygenase (Hgd), tr	3.3
A_55_P2386622	A730015C16Rii	AK042682	ref Mus musculus 7 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN	3.3
A_65_P15245	Nrp2	NM_001077406	ref Mus musculus neuropilin 2 (Nrp2), transcript variant 5, r	3.3
A_52_P556140	Vapb	NM_019806	ref Mus musculus vesicle-associated membrane protein, as	3.3
A_55_P1991773	Icos	NM_017480	ref Mus musculus inducible T-cell co-stimulator (Icos), mRN	3.3

A_51_P162162	Inmt	NM_009349	ref Mus musculus indolethylamine N-methyltransferase (Inr	3.3
A_55_P1960237	Slc2a6	NM_172659	ref Mus musculus solute carrier family 2 (facilitated glucose	3.3
A_51_P244531	ENSMUST000C	ENSMUST0000010	(ens Putative uncharacterized protein Fragment [Source:Un	3.3
A_52_P570240	Kbtbd11	NM_029116	ref Mus musculus kelch repeat and BTB (POZ) domain cont	3.3
A_55_P2044932	Gpr84	NM_030720	ref Mus musculus G protein-coupled receptor 84 (Gpr84), r	3.2
A_51_P170178	B3gnt8	NM_146184	ref Mus musculus UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylgl	3.2
A_51_P449325	H2-Oa	NM_008206	ref Mus musculus histocompatibility 2, O region alpha locus	3.1
A_51_P324838	Evpl	NM_025276	ref Mus musculus envoplakin (Evpl), mRNA [NM_025276]	3.1
A_55_P2085905	Anpep	NM_008486	ref Mus musculus alanyl (membrane) aminopeptidase (Anpep	3.1
A_51_P494992	Runx3	NM_019732	ref Mus musculus runt related transcription factor 3 (Runx3	3.1
A_52_P308413	1810011H11Ri	NM_001163616	ref Mus musculus RIKEN cDNA 1810011H11 gene (1810011	3.1
A_52_P466147	Rarres2	NM_027852	ref Mus musculus retinoic acid receptor responder (tazarotc	3.0
A_55_P2007470	Pdgfa	NM_008808	ref Mus musculus platelet derived growth factor, alpha (Pdg	3.0
A_51_P270733	Syngn1	NM_009303	ref Mus musculus synaptogyrin 1 (Syngn1), transcript varian	2.9
A_55_P1991770	Pdlim4	NM_019417	ref Mus musculus PDZ and LIM domain 4 (Pdlim4), mRNA [E	2.9
A_55_P2079009	Slco2b1	NM_175316	ref Mus musculus solute carrier organic anion transporter fe	2.9
A_55_P2066301	Gpr137b-ps	NR_003568	ref Mus musculus G protein-coupled receptor 137B, pseudo	2.9
A_51_P450549	Padi3	NM_011060	ref Mus musculus peptidyl arginine deiminase, type III (Padi3	2.8
A_55_P2121877	Gpr137b	NM_031999	ref Mus musculus G protein-coupled receptor 137B (Gpr137	2.8
A_55_P2022890	Slc12a8	NM_134251	ref Mus musculus solute carrier family 12 (potassium/chlori	2.8
A_55_P2057877	Pou2f2	NM_001163554	ref Mus musculus POU domain, class 2, transcription factor	2.8
A_51_P242930	Lat2	NM_020044	ref Mus musculus linker for activation of T cells family, mem	2.8
A_51_P323812	Slc6a12	NM_133661	ref Mus musculus solute carrier family 6 (neurotransmitter t	2.8
A_55_P2125588	Pdgfa	NM_008808	ref Mus musculus platelet derived growth factor, alpha (Pdg	2.8
A_51_P485421	ENSMUST000C	ENSMUST0000010	(ens Immunoglobulin heavy chain C gene segment [Source:JN	2.8
A_55_P2037662	Atp1a3	NM_144921	ref Mus musculus ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 3 pol	2.8
A_51_P139108	Cpxm1	NM_019696	ref Mus musculus carboxypeptidase X 1 (M14 family) (Cpxm	2.8
A_55_P2030155	Slco2b1	NM_175316	ref Mus musculus solute carrier organic anion transporter fe	2.8
A_55_P2187121	Gpr137b-ps	NR_003568	ref Mus musculus G protein-coupled receptor 137B, pseudo	2.7
A_51_P195875	Notch4	NM_010929	ref Mus musculus Notch gene homolog 4 (Drosophila) (Notc	2.7
A_55_P1960097	Epb4.1l3	NM_013813	ref Mus musculus erythrocyte protein band 4.1-like 3 (Epb4	2.6
A_51_P412225	Tbc1d16	NM_172443	ref Mus musculus TBC1 domain family, member 16 (Tbc1d1	2.6
A_55_P2163873	Uox	NM_009474	ref Mus musculus urate oxidase (Uox), mRNA [NM_009474]	2.6
A_55_P1961444	Plcb2	NM_177568	ref Mus musculus phospholipase C, beta 2 (Plcb2), mRNA [E	2.6
A_55_P1992555	Gys2	NM_145572	ref Mus musculus glycogen synthase 2 (Gys2), mRNA [NM_1	2.6
A_55_P1956627	Gpr160	NM_001134385	ref Mus musculus G protein-coupled receptor 160 (Gpr160)	2.6
A_66_P128453	Muc12	XM_916715	ref PREDICTED: Mus musculus similar to hCG1817833 (LOC	2.6
A_51_P343517	Ly6d	NM_010742	ref Mus musculus lymphocyte antigen 6 complex, locus D (L	2.6
A_55_P1981994	Krt17	NM_010663	ref Mus musculus keratin 17 (Krt17), mRNA [NM_010663]	2.6
A_55_P2066299	Gpr137b	NM_031999	ref Mus musculus G protein-coupled receptor 137B (Gpr137	2.6
A_55_P1960735	Gdf15	NM_011819	ref Mus musculus growth differentiation factor 15 (Gdf15), n	2.6
A_55_P2112302	A_55_P2112302	A_55_P2112302	Unknown	2.6
A_51_P445683	4931406C07Ri	NM_133732	ref Mus musculus RIKEN cDNA 4931406C07 gene (4931406	2.6
A_52_P589568	Foxo6	NM_194060	ref Mus musculus forkhead box O6 (Foxo6), mRNA [NM_194	2.6
A_55_P2089362	Wfdc13	NM_001012704	ref Mus musculus WAP four-disulfide core domain 13 (Wfdc	2.5
A_55_P2103011	Sema4d	NM_013660	ref Mus musculus sema domain, immunoglobulin domain (Ig),	2.5
A_55_P2073338	Syn1	NM_013680	ref Mus musculus synapsin I (Syn1), transcript variant a, mF	2.5
A_51_P469951	Srgap3	NM_080448	ref Mus musculus SLIT-ROBO Rho GTPase activating prot	2.5
A_55_P1958165	Ms4a7	NM_001025610	ref Mus musculus membrane-spanning 4-domains, subfamily	2.5
A_55_P1962224	Afap1l2	NM_146102	ref Mus musculus actin filament associated protein 1-like 2	2.5
A_51_P439299	Relt	NM_177073	ref Mus musculus RELT tumor necrosis factor receptor (Re	2.5
A_51_P485421	ENSMUST000C	ENSMUST0000010	(ens Immunoglobulin heavy chain C gene segment [Source:JN	2.5
A_51_P260683	Rgs1	NM_015811	ref Mus musculus regulator of G-protein signaling 1 (Rgs1),	2.5
A_55_P1974189	Ptges	NM_022415	ref Mus musculus prostaglandin E synthase (Ptges), mRNA [2.5
A_55_P1976224	Ckb	NM_021273	ref Mus musculus creatine kinase, brain (Ckb), mRNA [NM_0	2.5
A_55_P2107203	Gpr137b	NM_031999	ref Mus musculus G protein-coupled receptor 137B (Gpr137	2.5

表 6、肝臓初代培養にビタミンDを添加し、発現増加した遺伝子群のバイオインフォマティクスGO解析

DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discover...seases (NIAID); Science Applications International Corporation (SAIC) 13/12/06 15:55



DAVID Bioinformatics Resources 6.7
National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH

Functional Annotation Chart

[Help and Manual](#)

Current Gene List: List_1

Current Background: Mus musculus

1724 DAVID IDs

Options

[Rerun Using Options](#) [Create Sublist](#)

35 chart records

[Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	inflammatory response	RT	8	0.5	8.8E-4	5.6E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	immune response	RT	11	0.6	1.4E-3	4.8E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	lymphocyte activation	RT	7	0.4	2.0E-3	4.6E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	response to wounding	RT	9	0.5	2.6E-3	4.5E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	positive regulation of developmental process	RT	7	0.4	3.5E-3	4.8E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	leukocyte activation	RT	7	0.4	3.9E-3	4.6E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	locomotory behavior	RT	7	0.4	5.9E-3	5.5E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	chemotaxis	RT	5	0.3	6.6E-3	5.4E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	taxis	RT	5	0.3	6.6E-3	5.4E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	cell activation	RT	7	0.4	6.8E-3	5.1E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	defense response	RT	9	0.5	1.2E-2	6.6E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	cell adhesion	RT	10	0.6	1.4E-2	7.1E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	biological adhesion	RT	10	0.6	1.5E-2	6.8E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	behavior	RT	8	0.5	2.1E-2	7.8E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	cell motion	RT	7	0.4	4.0E-2	9.3E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	L-phenylalanine catabolic process	RT	2	0.1	4.0E-2	9.2E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	mesenchymal cell development	RT	3	0.2	4.1E-2	9.1E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	mesenchymal cell differentiation	RT	3	0.2	4.4E-2	9.2E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	T cell activation	RT	4	0.2	4.5E-2	9.1E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	mesenchyme development	RT	3	0.2	4.6E-2	9.0E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	activated T cell proliferation	RT	2	0.1	4.7E-2	8.9E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	L-phenylalanine metabolic process	RT	2	0.1	5.3E-2	9.1E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	epidermis development	RT	4	0.2	5.4E-2	9.1E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	angiogenesis	RT	4	0.2	6.3E-2	9.3E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	ectoderm development	RT	4	0.2	6.3E-2	9.3E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	lipid catabolic process	RT	4	0.2	6.4E-2	9.2E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	tyrosine metabolic process	RT	2	0.1	6.6E-2	9.2E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	positive regulation of immune response	RT	4	0.2	6.6E-2	9.2E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	aromatic amino acid family catabolic process	RT	2	0.1	7.3E-2	9.3E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	amine catabolic process	RT	3	0.2	7.3E-2	9.2E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	leukocyte differentiation	RT	4	0.2	7.4E-2	9.1E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	cell differentiation involved in embryonic placenta development	RT	2	0.1	7.9E-2	9.2E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	positive regulation of nitric oxide biosynthetic process	RT	2	0.1	9.8E-2	9.6E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	aromatic compound catabolic process	RT	2	0.1	9.8E-2	9.6E-1	
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_FAT	B cell activation	RT	3	0.2	1.0E-1	9.5E-1	

1678 gene(s) from your list are not in the output.

Please cite *Nature Protocols* 2009; 4(1):44 & *Genome Biology* 2003; 4(5):P3 within any publication that makes use of any methods inspired by DAVID.

<http://david.abcc.ncifcrf.gov/chartReport.jsp?annot=25>

1/2 ページ