

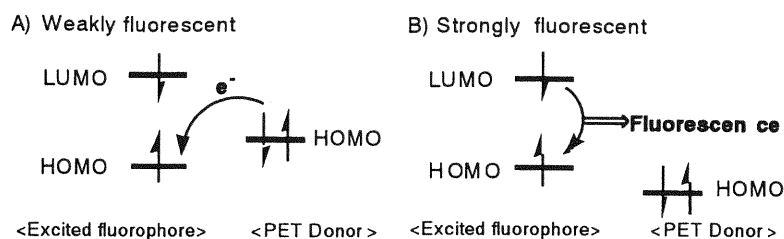
$^1\text{O}_2$ のバイオイメーキング検出を目的とした超高感度な $^1\text{O}_2$ プローブの開発を目的として研究に着手した。初めに不明であった DPAX 類の蛍光の消光機構の解明を行ない、得られた知見に基づいてプローブの合理的な分子設計を行った。

B 方法、結果

(i) fluorescein 誘導体の蛍光 OFF/ON 機構の解明

DPAX 類は fluorescein 骨格を分子内に有するにもかかわらずほとんど蛍光を生じない。 $^1\text{O}_2$ と反応して endoperoxide 体になることで初めて強い蛍光を有する特性がある。しかし、これまでこの蛍光の OFF/ON 機構については不明であった。我々は DPAX 類では、diphenylanthracene 部から xanthene 部への分子内での光誘起電子移動 (Photo-induced Electron Transfer,

PET) により消光が起こるとの仮説を立て (Scheme 1)、この考えの妥当性を分子軌道計算及び縮合芳香環を持つ fluorescein の誘導体を合成することにより検証した。PET ドナーの HOMO レベルが異なる化合物として、fluorescein の phenyl 基を anthryl 基に変換した AX、naphthyl 基に変換した NX をそれぞれ合成し、量子収率を測定した。その結果、NX は強い蛍光をもつが、芳香環が一つ多い AX はほとんど蛍光を持たないことが明らかとなった。DPAX 類や他の fluorescein 誘導体においても HOMO レベルの計算結果と蛍光量子収率は非常によい相関を持ち、-9 eV 付近の HOMO レベルを境として蛍光の OFF/ON を説明することが可能であった (Fig. 1)。結論として、fluorescein 類における蛍光の OFF/ON が PET 機構に基づいていることが示された。



Scheme 1 PET の概念図

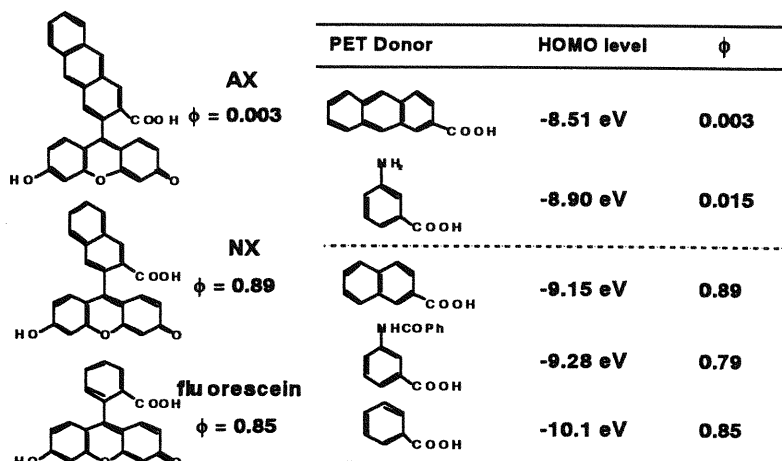


Fig. 1 PET ドナーの HOMO レベルと fluorescein 誘導体の蛍光量子収率

(ii) 蛍光プローブのデザイン・合成
 DPAX 類より高感度の蛍光プローブの開発を目指し、前述の PET 原理を応用した $^1\text{O}_2$ 検出プローブとして Fig. 2 に示す DMAX 類をデザイン、合成した。DMAX 類は $^1\text{O}_2$ と反応するトラップ部分の構造が $^1\text{O}_2$ との反応速度定数が非常に大きい dimethylantracene (DMA) であり、感度の増加が期待できる。PM3 計算によると、DMA-2-CO₂H は anthracene-2-CO₂H よりも HOMO レ

ベルが高く、 $^1\text{O}_2$ と反応し DMA-EP-2-CO₂H になると naphthalene-2-CO₂H 程度まで HOMO レベルが低下することから、DPAX 類と同様の蛍光の OFF/ON が可能であると考えた。合成した DMAX 類の蛍光特性を測定したところ、計算結果からの予想どおり DMAX 自身はほとんど蛍光を持たないが、 $^1\text{O}_2$ と反応して DMAX-EP となることで蛍光量子収率が約 50 倍に増加することが明らかとなった。

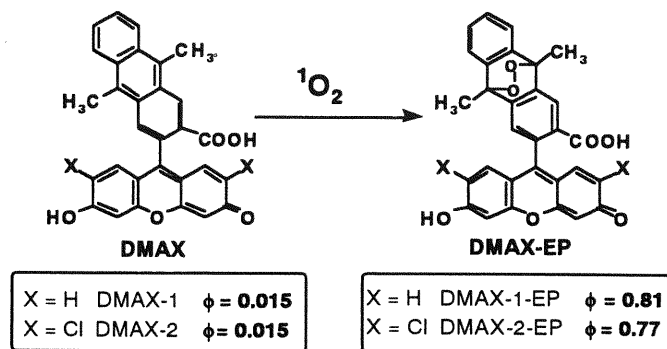


Fig. 2 DMAX類と $^1\text{O}_2$ の反応

(iii) 一重項酸素の検出

DMAX-1 による $^1\text{O}_2$ の検出及び DPAX-1 との感度の比較を行った。DMAX-1 の中性バッファー水溶液に、熱的に分解して $^1\text{O}_2$ を生成する化合物 EP-1 (37 °Cでの半減期：約 25 分) を添

加すると蛍光が増大した (Fig. 3)。蛍光は EP-1 の濃度依存的に増大し、DMAX-1 は中性条件下 $^1\text{O}_2$ を定量的に検出できることが明らかとなった。蛍光増加の初速度の比較により DMAX-1 の感度は DPAX-1 のそのの 53 倍に増加した。

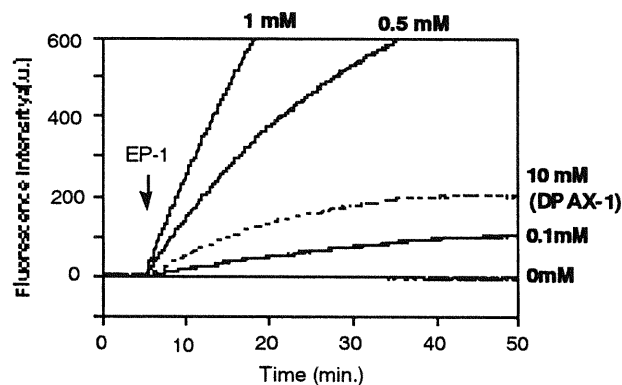


Fig. 3 DMAX-1と $^1\text{O}_2$ との反応による蛍光強度の経時変化 (Ex. 491 nm, Em. 520 nm)

また蛍光増加初速度、EP-1、 $^1\text{O}_2$ の半減期などを用いて $^1\text{O}_2$ との反応速度定数を算出したところそれぞれ、 $7.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (DMAX-1), $1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (DPAX-1) となり、DMAX-1 の反応速度定数は、DPAX-1 に比べて約 70

倍に増加することが明らかとなった。以上の結果から、DMAX 類は非常に感度の良い優れた $^1\text{O}_2$ 検出蛍光プローブであることが示された。

(iv) DMAX による好中球からの $^1\text{O}_2$ の

検出

DMAX-2 を好中球などの細胞系に適応し、生理的条件下での $^1\text{O}_2$ 検出を行った。好中球では PMA 刺激により Medium の蛍光強度の増加が観察され、生理的条件下での $^1\text{O}_2$ の検出に初めて成功した。今後、マクロファージや好中球を用いて DMAX-2 による $^1\text{O}_2$ のイメージングを試みる予定である。

C 考察

fluorescein 誘導体の消光が PET 機構に基づくことを示した。次にこの消光機構に基づき、高感度 $^1\text{O}_2$ 検出蛍光プローブ DMAX 類の開発を行った。DMAX 類は当教室で開発された DPAX 類に比べて感度が 53 倍、 $^1\text{O}_2$ との反応速度は約 70 倍に増加し、非常に高感度なプローブであることが示された。さらに DMAX 類を用いて生理的条件下の好中球からの $^1\text{O}_2$ 検出に初めて成功した。この結果は従来混沌としていた $^1\text{O}_2$ の生体における生理機能を解析する上で強力な研究手段となることは疑いない。

D 研究発表

・ "Rational Design of Fluorescein-based Fluorescence Probes. -Mechanism-based Design of a Maximum Fluorescence Probe for Singlet Oxygen-" Kumi Tanaka, Tetsuo Miura, Naoki Umezawa, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, **J. Am. Chem. Soc.**, in press.

・ "Selective Inhibition of Human Inducible Nitric Oxide Synthase by S-alkyl-L-isothiocitrulline-containing Dipeptides" Jung-Min Park, Tsunehiko Higuchi, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Hiroyuki Hori, Takeshi Nishino, Junken Aoki, Keizo Inoue and Tetsuo Nagano, **British Journal of Pharmacology**, in press.

・ "Small Molecule-based Laser Inactivation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor" Takanari Inoue, Kazuya Kikuchi, Kenzo Hirose, Masamitsu Iino and Tetsuo Nagano, **Chemistry and Biology**, in press.

・ "Intramolecular Fluorescence Resonance Energy Transfer System with Coumarin Donor Included in beta-Cyclodextrin" Hideo Takakusa, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, **Anal. Chem.**, in press.

・ "Bioimaging of Nitric Oxide with Fluorescent Indicators Based on Rhodamine Chromophore" Hirotatsu Kojima, Miki Hirotani, Naoki Nakatsubo, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi, Yasunobu Hirata and Tetsuo Nagano, **Anal. Chem.**, in press.

・ "Visualization of Oxygen Concentration-dependent

Production of Nitric Oxide in Rat Hippocampal Slices during Aglycemia" Hirotatsu Kojima, Mihoko Hirata, Yoshihisa Kudo, Kazuya Kikuchi and Tetsuo Nagano, **J. Neurochem.**, in press.

• "Highly Zinc-Selective Fluorescent sensor Molecules Suitable for Biological Applications" Tomoya Hirano, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, **J. Am. Chem. Soc.**, 122, 12399-12400 (2000).

• "First Synthetic NO-heme-thiolate Complex Relevant to Nitric Oxide Synthase and Cytochrome P450nor" Noriyuki Suzuki, Tsunehiko Higuchi, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Takeshi Uchida, Masahiro Mukai, Teizo Kitagawa and Tetsuo Nagano, **J. Am. Chem. Soc.**, 122, 12059-12062 (2000).

• "Fluorescence Switching by O-dearylation of 7-Aryloxy coumarines. -Development of Novel Fluorescence Probes to Detect Reactive Oxygen Species with High Selectivity-" Ken-ichi Setsukinai, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, **J. Chem. Soc. Perkin Transaction 2**, (2000) 2453-2457.

• "Development of Time-resolved

Fluorometric Detection System Using Diffusion-enhanced Energy Transfer" Mitsunori Koresawa, Kazuya Kikuchi, Shin Mizukami, Hirotatsu Kojima, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, **Anal. Chem.**, 72, 4904-4907 (2000).

• "Design and Synthesis of Intramolecular Resonance Energy Transfer Probes for Use in Aqueous Solution" Yasutomo Kawanishi, Kazuya Kikuchi, Hideo Takakusa, Shin Mizukami, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, **Angew. Chem., Int. Ed.**, 39, 3438-3440 (2000).

• "Novel Zinc Fluorescent Probes Excitable with Visible Light for Biological Applications" Tomoya Hirano, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, **Angew. Chem., Int. Ed.**, 39, 1052-1054 (2000).

• "A New Thioether-ligated Iron Porphyrin as a Model of a Protonated Form of P450 Active Site" Takashi Dokoh, Noriyuki Suzuki, Tsunehiko Higuchi, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi and Tetsuo Nagano, **Journal of Inorganic Biochemistry**, 82, 127-132 (2000).

• "Fluorescent Indicators for Nitric Oxide Based on Rhodamine Chromophore" Hirotatsu Kojima, Miki

Hirotsu, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, **Tetrahedron Lett.**, 41, 69-72 (2000).

• "Remarkable Axial Thiolate Ligand Effects on the Oxidation of Hydrocarbons by Active Intermediate of Iron Porphyrin and Cytochrome P450" Tomoe Ohno, Noriyuki Suzuki, Takashi Dokoh, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Masaaki Hirobe, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, **Journal of Inorganic Biochemistry**, 82, 123-125 (2000).

• "Determination and Bioimaging Method for Nitric Oxide in Biological Specimens by Diaminofluorescein Fluorometry" Yoshinori Itoh, Fu Hai Ma, Hanae Hoshi, Michiko Oka, Kumiko Noda, Yojiro Ukai, Hirotsu Kojima, Tetsuo Nagano and Noboru Toda, **Anal. Biochem.**, 287, 203-209 (2000).

• "Fluorescent Indicators for Nitric Oxide" Hirotsu Kojima and Tetsuo Nagano, **Advanced Materials**, 12, 763-765(2000).

• "Synthesis and Superoxide Dismutase Activity of Novel Iron Complexes" Masakazu Tamura, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi, Masaaki Hirobe and Tetsuo Nagano, **J. Organomet. Chem.**, 611, 586-592 (2000).

• "Superoxide Dismutase Activity of Iron(II)TPEN Complex and Its Derivatives" Masakazu Tamura, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi, Masaaki Hirobe and Tetsuo Nagano, **Chem. Pharm. Bull.**, 48, 1514-1518 (2000).

• "Mechanism of Superoxide Dismutase Activity of Fe(II) and Fe(III) Complexes of Tetrakis-N,N,N',N'-(2-pyridylmethyl)ethylenediamine" Tomohisa Hirano, Masaaki Hirobe, Kazuo Kobayashi, Akira Odani, Osamu Yamauchi, Masanori Ohsawa, Yoshinori Satow and Tetsuo Nagano, **Chem. Pharm. Bull.**, 48, 223-230 (2000).

• "Effects of Tetrahydrobiopterin on Endothelial Dysfunction in Rats with Ischemic Acute Renal Failure" Masao Kakoki, Yasunobu Hirata, Hiroshi Hayakawa, Etsu Suzuki, Daisuke Nagata, Akihiro Tojo, Hiroaki Nishimatsu, Kazuya Kikuchi, Tetsuo Nagano and Masao Omata, **J. Am. Soc. Nephrol.**, 11, 301-309 (2000).

• "Synthesis of Various Water-Soluble C60 Derivatives and Their Superoxide-Quenching Activity" Kensuke Okuda, Takashi Hirota, Masaaki Hirobe, Tetsuo Nagano, Masataka Mochizuki and Tadahiko Mashino, **Fullerene Science and Technology**, 8, 89-104 (2000).

• "Adrenomedullin and Nitric Oxide Inhibit Human Endothelial Cell Apoptosis via a Cyclic GMP-Independent Mechanism" Masataka Sata, Masao Kakoki, Daisuke Nagata, Hiroaki Nishimatsu, Etsu Suzuki, Teruhiko Aoyagi, Seiryō Sugiura, Hirotatsu Kojima, Tetsuo Nagano, Kenji Kangawa, Hisayuki Matsuo, Masao Omata, Ryozo Nagai and Yasunobu Hirata, **Hypertension**, 36, 83-88 (2000).

7. 光照射による皮膚細胞突然変異の検出

分担研究者 林 真 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部部長

研究要旨

紫外線特異的変異である CC から TT への変化を、マウス癌抑制遺伝子 *p53* 遺伝子を指標として検出するための変異アレル特異的 PCR 法の確立を行った。*p53* 遺伝子のコドン238に CC から TT の変異を持つマウス皮膚癌細胞株を入手し、変異DNAサンプルを一定濃度で含むサンプルを作成して条件検討を行った結果、 10^{-6} レベルの検出感度を得ることができた。一方、新しい試みとして、最近利用可能となったDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析技術を用い、約1000個の遺伝子についてヒト培養細胞株TK6におけるリボフラビンの光毒性発現時に発現の変化を解析したところ、数種の遺伝子について2倍以上の発現変化が認められた。

A. 研究目的

ヒトにおける紫外線等の環境変異原物質による発癌のリスクを早い段階から評価するためには、癌抑制遺伝子など、その遺伝子上の変異が重要な意味を持つ内在性の遺伝子を標的として、高感度に変異を検出する必要がある。光毒性を考える上で基本となる紫外線の作用に関しては、隣接するピリミジン塩基部位でのCからTへの変異を誘発する事が知られており、特に CC から TT へのタンデム変異は紫外線特異的な変異として遺伝子型に基づく変異の検出に適している。これまで、ヒト材料を用いて検討を行ってきたが、サンプルの入手などの制約もあるため、今年度は実験動物の系への応用をめざし、マウスの遺伝子を使って同様の検討を行うことを目的とした。

また、光毒性発現の際のメカニズム解析のため、DNAマイクロアレイの技術を用いて遺伝子発現の変化を網羅的に解析するこ

とにより、光毒性発現に関与する遺伝子群の解析を試みる。

このように、本研究では1)紫外線特異的突然変異を高感度に検出する手法の確立、2)遺伝子発現変化の網羅的解析という二つの側面から、光毒性発現の際のメカニズム解析および、紫外線によるリスク評価への応用をめざす。

B. 研究方法

1. マウス *p53* 遺伝子上の紫外線特異的変異の検出

XPA遺伝子ノックアウトマウスに紫外線照射することにより発生した皮膚癌組織 (Fibrosarcoma)より樹立された細胞株で、*p53*遺伝子のコドン238部位にCCからTTの変異をヘテロに持つ161株を、大阪大学細胞生体工学センターの田中亀代次教授よりご供与いただき、変異検出の陽性対照とした。この変異に特異的なプライマーを数種デザ

インし、変異配列が特異的に増幅されるPCRの条件検討を行った。条件検討の後、最良な結果を与えたプライマー対を用いたアレルト異的 PCR 法により、一定量の変異DNAを含む正常マウス DNA サンプルを標準としてその検出感度を測定した。また、リアルタイム定量的PCR機 (LightCycler) を用いて、増幅産物の定量的な解析をおこなった。

2. DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析

約 1000 種類のヒト由来遺伝子に対する特異的 cDNA 配列に対する約 80bp のオリゴヌクレオチドがスライドガラス上にスポットされている Atlas Glass Human 1.0 Array を用い、光毒性に伴い発現の変化する遺伝子を解析した。ヒトリンパ腫由来培養細胞株 TK6 を $2.5 \times 10^6/60\text{mm}$ シャーレを 2 枚用い、PBS(+)に溶解したリボフラビン溶液を最終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ にて 10vol%添加した。添加後、1 時間 CO_2 インキュベータで静置後、SOL500 を用いて UVA 1.6mW/cm² 50 分照射 (5J/cm²) した。照射後、培地で $10^5/\text{mL} \times 50\text{mL}$ に希釈し、 CO_2 インキュベータ中で 4 時間静置後に、細胞を PBS(+)で 2 回リンスし、液体窒素にて凍結した。陰性対照として、UVA 非照射、溶媒処理した細胞も同様に保存した。そして、TRIzol 試薬によりそれぞれの細胞より total RNA を抽出し、AtlasGlass Fluorescent Labeling Kit を用いて、cDNA への逆転写を行い、UVA+リボフラビン処理した細胞由来の cDNA を Cy3、陰性対照由来の cDNA を Cy5 という異なる蛍光色素にてラベルしたのち、マイクロアレイ上に競合的にハイブリダイゼーションさせた。得られた各スポットの蛍光強度を、GenePix4000 スライドスキャナーにて読みとり、それぞれの細胞での各遺伝子の発現

強度の比を算出した。この際データの信頼性から、シグナル強度の S/N 比が両波長で 1.5 以上もしくは片側で 2 以上となる遺伝子のデータのみ採用した。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

1. マウス p53 遺伝子上の紫外線特異的変異の検出

p53 コドン 238 に変異を持つ培養細胞 161 株および正常マウス肝臓より抽出した DNA を用い、まず p53 遺伝子の exon7-8 部位を PCR により増幅した。この増幅産物を用い、4 種類のアレルト異的プライマーによる選択的な増幅検討した結果、非転写鎖側の配列 22 塩基対 (3'末端が変異部位) を 5'側、exon7 の転写鎖 17bp を 3'側の PCR プライマーとして用いた場合に最良の結果が得られた。次にこのプライマー対を用いて、最適なアニーリング温度の検討を行ったところ、62 度において最良の結果が得られたため、以下この条件にてアレルト異的 PCR 反応を行った。検出感度の検討のため、前述の PCR 生成物を、mutant と正常 p53 遺伝子 (アレルト) の比が $5 \times 10^{-4} \sim 5 \times 10^{-7}$ となるような標準サンプルを作成し、アレルト異的 PCR 反応を行ったところ、 5×10^{-6} レベルの変異体まで検出が可能であることがわかった。定量的リアルタイム PCR を用いて、増幅産物の定量を行ったところ、濃度依存的な増幅が 2.5×10^{-6} レベルまで観察できた。さらに、DNA サンプルを直接同様の濃度比にて混合した後、p53 exon7-8 の PCR およびアレルト異的 PCR 反応を行った場合にも、 5×10^{-6} レベルの変異体まで検出が可能であることが確認できた。

2. DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺

伝子発現解析

TK6 細胞にリボフラビン 1 μ g/ml 存在下で UVA 5J/cm² を 50 分照射した結果、生細胞数の減少並びに染色体異常 (小核) 誘発が認められた。UVA 処理開始 4 時間後の細胞より抽出した total RNA より逆転写反応で調製した cDNA を用い、未処理対照群から得られた cDNA と発現量の比較を、Cy5, Cy3 色素ラベルによるディファレンシャルハイブリダイゼーションにより、マイクロアレイ上で検討した。その結果、451 遺伝子について評価可能なシグナルが得られたが、全体としては発現の変化は小さかった。しかし以下の遺伝子について 2 倍を越える発現量の変化が認められた。

(発現が 2 倍以上に上昇)

1) KIAA0033 (機能未知)	2.5 倍
2) deoxyribonuclease II	2.2 倍
3) interleukin-11	2.1 倍
4) nuclear mitotic apparatus protein 1	2.1 倍
5) plasminogen precursor	2.0 倍
6) bone morphogenetic protein 2A	2.0 倍
7) orphan G protein-coupled receptor 39	2.0 倍

(発現が 1/2 以下に減少)

8) ubiquitin carrier protein E2-C	0.41 倍
9) neuregulin 1	0.44 倍
10) delta-like protein precursor	0.47 倍
11) Machado-Joseph disease protein 1	0.47 倍
12) cadherin 3	0.48 倍
13) activating transcription factor 2	0.49 倍
14) VEGF receptor 2	0.49 倍
15) ADP/ATP carrier protein	0.49 倍
16) angiotensin 1 receptor precursor	0.49 倍
17) protein kinase C beta I	0.50 倍

さらに、これらの他に変化の大きかった遺伝子としては、18) regulator of G protein signaling 14 (1.9), 19) Rab3B Ras-related

GTP-binding protein (1.9), 20) tissue inhibitor of metalloproteinase (1.8), 21) Wnt-13 (1.6), 22) ubiquitin-activating enzyme E1-related protein (1.6), 23) XPA (1.5), 24) p35 (1.5) および 25) Rab5a Ras-related GTP-binding protein (0.51), 26) transcription elongation factor SII (0.51), 27) fte-1 (0.52), 28) transferrin receptor (0.53), 29) Rad 52 (0.54), 30) G2/mitotic-specific cyclin B1 (0.56), 31) ubiquitin (0.60) などが注目された。

D. 考察

今回のマウス *p53* 遺伝子に関する紫外線特異的変異検出系により 10⁻⁶ レベルの高感度での検出が可能となったが、これはサンプル中にほぼ 1 分子の変異体が存在する濃度に相当するため、これ以上の感度は期待できない。さらに感度を高めるためには、最初に用いる DNA サンプルから何らかの形で標的となる *p53* 遺伝子を濃縮する必要がある。

発現解析においては大きく発現量の変化する遺伝子は見つからなかったが、いくつかの遺伝子について 2 倍を越える変化が得られた。このなかで細胞周期の M 期に関わる遺伝子 (4, 8, 30), ミトコンドリア関連遺伝子 (15), G タンパク関連遺伝子 (7, 18, 19, 25) ユビキチン関連遺伝子 (8, 22, 31), DNA 修復酵素 (23, 29) などが注目される。これらの遺伝子がどのように光毒性の発現と関連しているかは、再現性を含め今後さらに解析例を増やして検討を進める必要がある。

E. 結論

1) 目的とする *p53* 遺伝子の紫外線特異的な CC to TT 変異を 10⁻⁶ という高感度で検出する試験系が確立できた。今後実際に UV 照射を行ったマウスでの変異の検出に応用が可能と考えられる。

2) DNA マイクロアレイを用いることにより, 一度に多数の遺伝子についてその発現変化を調べることができた. 今後さらに検討を進めることにより, 光毒性発現に関与する遺伝子をクローズアップしてゆきたい.

F. 研究発表

1. 論文発表

Kawasaki K, Suzuki T, Ichihashi M, Reguer G, Yamasaki H,

CC to TT mutation in the mitochondrial DNA of normal skin: Relationship to ultra-violet exposure.

Mutation Res. 468: 35-43 (2000)

Kohara A, Suzuki T, Honma M, Hirano N, Ohsawa K, Ohwada T, Hayashi M,

Mutation spectrum of *o*-aminoazotoluene in the *cII* gene of lambda/*lacZ* transgenic mice (MutaMouse)

Mutation Res. in press (2001)

Nohmi T, Masumura K, Suzuki T,

Recent advances in the protocols of transgenic mouse mutation assays

Mutat. Res. 455: 191-215 (2000)

Suzuki T, Wang X, Miyata Y, Saeki K, Kohara A, Kawazoe Y, Hayashi M, Sofuni T, Hepatocarcinogen quinoline induces G:C to C:G transversions in the *cII* gene in the liver of lambda/*lacZ* transgenic mice (MutaMouse)

Mutation Res. 456: 73-81 (2000)

Itoh T, Suzuki T, Nishikawa A, Fukawa F, Takahashi M, Wang X, Sofuni T, Hayashi M, In vivo genotoxicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline in *lacI* transgenic (Big Blue) mice

Mutation Res. 468: 19-25 (2000)

2. 学会発表

川崎健太郎, 鈴木孝昌, 上田正登, 市橋正光, 山崎 洋

ミトコンドリア DNA における太陽光線によって誘導される CC-TT 変異と人皮膚組織に関する検討

第 59 回 日本癌学会総会 (横浜) 2000

鈴木孝昌, 小原有弘, 西川秋佳, 古川文夫, 広瀬雅雄, 本間正充, 林 真

がん細胞における遺伝的不安定性と p53 遺伝子 -p53 ヘテロノックアウト Big Blue マウスを用いた検討-

第 59 回 日本癌学会総会 (横浜) 2000

小原有弘, 鈴木孝昌, 大和田智彦, 本間正充, 林 真

ジニトロピレンによりマウスに誘発された突然変異の特徴

第 59 回 日本癌学会総会 (横浜) 2000

鈴木孝昌, 本間正充, 小原有弘, 坂本浩子, 林 真

DNA マイクロアレイを用いた発現解析による遺伝子傷害性の検索に関する基礎的検討

環境変異原学会 第 29 回大会 (仙台) 2000

鈴木孝昌, 佐伯憲一, 小原有弘, 宮田裕子, 王 雪, 林 真

肝発がん物質 quinoline は MutaMouse の肝臓において G:C to C:G transversion を特徴的に誘発する

環境変異原学会 第 29 回大会 (仙台) 2000

Ramadan Ali, 鈴木孝昌, 小原有弘, 本間正充, 林 真

Organ specific genotoxicity of ochratoxin A detected by single cell gel electrophoresis (Comet) assay and the micronucleus assay
環境変異原学会 第 29 回大会 (仙台) 2000

小原有弘, 鈴木孝昌, 王 雪, 大和田智彦,
本間正充, 林 真
クロスリンク型 DNA 付加体を形成する化合物の *cII* 突然変異スペクトル
環境変異原学会 第 29 回大会 (仙台) 2000

Suzuki T, Kohara A, Wang X, Honma M, Hayashi M,
 λ *cII* gene is useful for sequence analysis in the transgenic mouse mutation assay
Environmental Mutagen Society 31st Annual Meeting (USA) 2000

Suzuki T, Kohara A, Wang X, Honma M, Hayashi M,
Mutagenicity and mutation spectra of various antitumor agents in the MutaTMMouse
The 30th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (Hungary) 2000

小原有弘, 鈴木孝昌, 西川秋佳, 古川文夫, 広瀬雅雄, 大和田智彦, 本間正充, 林 真
p53 ノックアウトマウスを用いた MeIQX の変異原性解析
日本薬学会 第 120 年会 (岐阜) 1999

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
なし
3. その他
なし

別添5

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Gocke, E., Mueller, L., Guzzie, P.J., Brendler-Schwaab, S., Bulera, S., Chignell, C.F., Henderson, L.M., Jacobs, A., Murli, H., Snyder, R.D., <u>Tanaka, N.</u>	Consideration on photochemical genotoxicity: Report of the international workshop of genotoxicity test procedure working group	Env. Mol. Mutagenesis	35	173-184	2000
Okuda, K., Hirata, T., Hirobe, M., <u>Nagano, T.</u> , Mochizuki, M., Mashino, T.	Synthesis of various water-soluble C60 derivatives and their superoxide-quenching activity	Fullerene science and technology	8	89-104	2000
Ohno, T., Suzuki, N., Dokoh, T., Urano, Y., Kikuchi, K., Hirobe, M., Higuchi, T., <u>Nagano, T.</u>	Remarkable axial thiolate ligand effect on the oxidation of hydrocarbons by active intermediate of iron porphyrin and cytochrome P450	J. of Inorganic Biochemistry	82	123-125	2000
Suzuki, T., Wang, X., Miyata, Y., Saeki, K., Kohara, A., Kawazoe, Y., <u>Hayashi, M.</u> , Sofuni, T.	Hepatocarcinogen quinoline induces G:C to C:G transversion in the <i>cII</i> gene in the liver of lambda/ <i>lacZ</i> transgenic mice (Muta Mouse)	Mutation Research	456	73-81	2000
Itoh, T., Suzuki, T., Nishikawa, A., Furukawa, F., Takahashi, M., Wnag, X., Sofuni, T., <u>Hayashi, M.</u>	In vivo genotoxicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in lacI transgenic (Big Blue) mice	Mutation Research	468	19-25	2000
Sato, M., Wada, K., Marumo, H., Nagao, T., Imai, K., <u>Ono, H.</u>	Influence of corn oil and diet on reproduction and kidney in female sprague-dawley rats	Toxicological science	56	156-164	2000
Nagao, T., Ohta, R., Marumo, H., Shindo, T., Yoshimura, S., <u>Ono, H.</u>	Effect of butyl benzyl phthalate in sprague-dawley rats after gavage administration: a teo-generation reproductive study	Reproductive toxicology	14	513-532	2000