

一群3匹の雄 C57BL6 マウスに対し、トログリタゾン、ロジグリタゾン、ピオグリタゾンを20および200mg/kgで、単回腹腔内投与を行い、1, 4, 24, 72時間後にマウスを解剖し、肝臓および腎臓を摘出し、直ちに、RLTバッファー中にスライスした臓器を保存した。個体ごとに保存した臓器をTRIzol溶液中にてホモジナイズし、total RNAの抽出を行った後、RNeasy mini キット(Qiagen)を用いて精製を行った。

1-2 cRNAの調製とハイブリダイゼーション

各群3匹の個体から得られたtotal RNAを混合し、その5 μ gを用いて、reverse transcriptaseによりcDNAを合成した。この際、プライマーとして、T7プロモーターを結合させたpoly dTを用いることにより、引き続きT7RNA polymeraseによる転写を行い、増幅されたcRNAを合成した。cRNA合成時にピオチンラベル化dNTPを用いて標識した。これを断片化したのち、50度にて16時間GeneChipにハイブリさせた。

1-3 チップの洗浄、ラベル化とスキャナーによるシグナルの検出

ハイブリ溶液を除いた後、Affymetrix社のGeneChip用フルイディックステーションにて洗浄および、ストレプトアビジン・フィコエリスリンによる蛍光ラベル化を行った後、GeneChip専用スキャナーにてスキャンを行い、チップの蛍光イメージを取得した。

1-4 チップイメージの解析

チップイメージをGeneChip用データ解

析ソフトMicroarray Suiteにて解析し、数値化するとともに、パーフェクトマッチおよびミスマッチプローブ間の蛍光強度比かPresence/Marginal/Absenceの判定を行った。その後、GeneSpringソフトウェアにデータを取り込み、標準化を行った後、コントロール群と処理群の発現比を算出した

1-5 マウス多臓器におけるアリストロキア酸処理による遺伝子発現変化の解析

一群3匹の7週令の雄C57BL6マウスに対し、植物由来の遺伝子傷害性物質であるアリストロキア酸(AA; I体とII体の混合物)を20mg/kg単回強制経口投与し、6, 24, 48時間後にマウスより臓器を回収した。昨年度は肝臓と腎臓に関して24時間後のみの検討を行ったが、今年度はさらにサンプリング時間を増やして実験を繰り返すとともに、肝臓、腎臓以外の臓器として、膀胱、前胃、腺胃、脾臓に関する検討を行った。個体ごとに臓器をRNA later溶液(Qiagen)中にてホモジナイズし、RNeasy mini キット(Qiagen)を用いて情報に従い、totalRNAを単離した。GeneChipによる解析には、プールしたtotal RNAを用いて解析を行った。

1-6 ヒト培養細胞TK6に対する遺伝子傷害性物質による遺伝子発現変化

ヒトリンパ腫由来の細胞株であるTK6細胞を用い、対数増殖期において各種遺伝子傷害性物質にて4時間処理し、薬物を洗い除いた後、Total RNAを細胞より抽出し、GeneChip (HG-U133A)を用いて同様に遺伝子発現解析を行った。

実験では、予試験及び過去のデータより約50%の細胞毒性を示す用量を設定した。実験に用いた薬物と用量を以下に示す。

(実験1)

- Paraquate (PQ) 150 µg/ml
- Ethylmethanesulfonate(EMS)
50 µg/ml
- N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) 0.005µg/ml
- Furylfuramide (AF2) 20 µg/ml
- Arabinofuranosylcytosine (AraC)
20 µg/ml
- Monocrotaline (MQ) 2000µg/ml

(実験2)

- 5-Fluorouracil (5FU) 3 µg/ml
- 6-Mercaptoethanol (6MP) 0.6 µg/ml
- Bleomycin (BLM) 1 µg/ml
- Potassium Bromate (KBrO₃) 2.5 mM
- Furazolidone (FZ) 80 µg/ml
- Sodium Chloride (NaCl) 5 mg/ml
- Phtalic anhydrite (PA) 500 µg/ml
- Cycloheximide (Chx) 150 µg/ml
- Ethanol (EtOH) 4 %

以上、合計15化合物に関して検討を行った。このうち、最後の4化合物に関しては、非遺伝子傷害性の細胞毒性物質として、比較に用いた。用いた化合物に関してその作用機序を元に分類すると表1のようになる。

2. タンパク発現変化の2次元電気泳動による解析

2-1 タンパク質試料の調製

MutaMouse、雄7週令に、肝発がん物質であるDENを週一回25 mg/kgにて腹腔内投与し、最終投与28日後にマウスを解剖し臓器を回収した。未処置群、およびDEN処理群3匹のマウスより得られた少量の肝臓組織を混合して、タンパク質抽出用細胞破碎液 (urea/thiourea/CHAPS/dithiothreitol/spermine) 中にて、ホモジネートした。

2-2 二次元電気泳動

得られた溶液のタンパク質含量を測定後、タンパク量として300µgに相当する量を、固定化PH勾配(PH3-10)イモビランドライストリップゲルによる一次元目となる等電点電気泳動を行い、続いてSDS-ポリアクリルアミドゲルによる分子量に基づく二次元目の電気泳動を行った。得られたゲルを、クマシーブルーにより染色し、スポットを検出した。

2-3 質量分析装置による解析

2次元電気泳動ゲル上の、発現が変化していると思われるスポットを切り出し、トリプシンにてゲル内消化し、ZipChip (Qiagen)にて脱塩後、マトリックスとしてαCHCAと混合して、MALDI測定用ターゲット上へスポットした。MALDI-TOF/TOF型質量分析装置であるAB4700にて、目的とするペプチド混合物のMSおよびMS/MS解析を行った。

3.二次元液体クロマトグラフィーによるタンパク質分離システムに関する基礎検討

本年度の別予算において当研究室にプロテオミクス研究のための二次元液体クロマトグラフィーシステム (Gilson) を導入したことより、本システムをこのプロジェクトにおける二次元電気泳動の代替法として用いることにより、より詳細なタンパクの分離およびより微量のタンパク質の同定をめざした検討を開始した。タンパク質の分離については、ベックマンコールター社の ProteomeLab PF2D キットを用いて、1次元目をクロマトフォーカシングカラムによる等電点に基づいた分離、2次元目を C18 逆相カラムによる分離を行うことにより、多数のフラクションに分画した。タンパク質の検出、定量にはマイクロフローセル1を使ったUV検出器を用いて214nmの吸光度により測定した。

C. 研究結果

1. 遺伝子発現変化の解析

1.1 グリタゾン系糖尿病治療薬処理マウスの肝臓における遺伝子発現変化

トログリタゾン(T)、ロジグリタゾン(R)、ピオグリタゾン(P)処理によるマウス肝臓での遺伝子発現の解析を、まず高用量である200 mg/kgに関して行った。3匹のマウスから別個に抽出したtotalRNAをプールしてGeneChip解析を行い、得られたRawデータをチップごとにノーマライズ(中間値を500)した後、GeneSpring解析ソフトを用いて、コントロール群に対する各遺伝子の発現比を求めた。なおこの際、1時間後のコントロールサンプルに関してデータの

質に問題があったため、1時間後以外のコントロールデータの平均値を対象として求めた。そして、得られた発現比の値を基に、シグナル強度に基づいて、2倍(>1000)、2.25倍(500-1000) 2.5倍(100-500)以上を有意な変化として遺伝子を選択した(表2)。その結果、いずれかの薬物、いずれかのタイミングで有意となった遺伝子の総数は1277であり、その重なりは図1に示すとおりである。いくつかの遺伝子に関して、2種および3種の薬剤に共通した変化が認められた。

次に、共通性の高かった50遺伝子をリストアップしたのが表3である。表中でいくつかの遺伝子に関して重複がみられるが、これはGeneChip上の別プローブとしてデザインされていることによるもので、重複して近くに存在することは、データの再現性を裏付けている。選ばれた遺伝子のうち、PPAR γ 作用薬との関連が示唆される遺伝子も含まれていた。3種のacyl-CoA thioesteraseはベルオキシゾーム増殖剤にて誘導がかかることが知られている。Lipin 1は脂質代謝やインシュリン耐性に関わり、正常な脂肪細胞の形成に必要な遺伝子である。Thyroid hormone responsive SPOT14 homologは、ストレプトゾトシンにて誘発された糖尿病にて発現の変化する遺伝子として報告されている。(Grillasca et al. (1997)) Regulator of G-protein signaling 16 (RGS16)はmitogenにて誘導されることが知られており、MAPキナーゼシグナル系を活性化することが知られている。

得られた各薬物、各サンプリングタイムにおける遺伝子発現のパターンを利用して

階層的クラスタリングを行った結果を図2に示す。その結果、PとRは1時間後、RとTは4時間後、PとTは24時間と72時間後に類似したパターンを示し、Pの4時間後とRの24時間後も類似したパターンを示し、時間経過が少しずつながら相互に類似した変化を示した。

1.2 アリストロキア酸投与マウスの多臓器での遺伝子発現解析

アリストロキア酸(AA)処理後の各種臓器での遺伝子発現を解析した。用いた臓器のうち、AAによる変異原性が強く現れる臓器としては、腎臓、膀胱、前胃を、弱い臓器として肝臓、脾臓、腺胃を用いた (Kohara et al. 2002)。投与6時間後と24時間後のサンプルを中心に、ステップワイズ選択法による発現変化遺伝子の選択を行った結果、選ばれた遺伝子の数を表にまとめた。肝臓および腎臓において6時間後に多くの遺伝子に変化が見られたが、24時間後の変化は他の臓器同様に少なかった。24時間後の肝臓および腎臓での変化は、昨年度に報告した独立した実験の結果とよく一致していた。

発現の変化した遺伝子を個々に見てみると、まず臓器間で異なる動きを示した遺伝子群を表5にまとめた。期待されたのは、非標的臓器と、標的臓器の間で異なる動きをする遺伝子であったが、両者を完全に区別できる遺伝子は存在しなかった。次に、発現上昇した遺伝子の中で、複数の臓器に共通したものを表6に示す。このなかで、標的臓器のみで発現上昇した遺伝子として、cysteine rich protein 61, cycline-dependent kinase inhibitor 1A

(p21), serum-induced kinase, pleckstrin homology-like domain family A, activating transcription factor 3, CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) delta, crystalline alpha B, cyclin G1, Jun-B oncogene, transformed mouse 3T3 cel double minute 2 (mdm2) が見つかった。これらのうちいくつかは、p53遺伝子と関係がある遺伝子である。

次に、共通性を持って発現が減少した遺伝子群を表7に示した。同様にして、標的臓器のみで発現減少した遺伝子は、serine protease 8 (Prostasin), mitochondrial isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), selenium binding protein 1, mevalonate (diphospho) decarboxylase, nardilysin N-arginine dibasic convertase 1, RIKEN cDNA 3110006P09 gene, LPS-rsponsive beige-like anchor, inositol

1,4,5-triphosphate receptor 5, inhibitor of DNA binding 1 などであった。これらのうちいくつかは、遺伝子傷害性の強さと関連した変化であることが期待できる。

1.3 ヒト培養細胞 TK6 に対する遺伝子傷害性物質による遺伝子発現変化

まず初回の検討として、PQ, EMS, MNNG, AF2, AraC, MQ の6種の遺伝子傷害性物質に関して処理を行った。これらの処理による細胞毒性 (Relative survival) の値を表8に示す。予備検討より50%の細胞毒性が予想される用量を用いたが、EMSとAF2についてはやや毒性が強かった。遺伝子発現強度に応じた段階的基準値により、発現変化が認められると判定された遺伝子

数を図3に示す。全体に発現上昇する遺伝子に比べて、発現が減少する遺伝子が多かった。これは毒性によるものとも考えられるが、変化した遺伝子数は必ずしも細胞毒性の強さとは比例しなかった。

変化の見られた遺伝子のうち、複数の化合物で変化していた遺伝子を表9にまとめた。遺伝子傷害性物質間での共通性は思ったよりも低く、上昇で最高3化合物、減少で5化合物であった。これらの中には、ATF3, p21, Gadd45a など、遺伝子傷害に伴って発現が誘導されることが知られている遺伝子が含まれていた。一方で、直接関連性の報告されていない遺伝子も多く含まれており、その作用が注目される。これら共通性が見られた遺伝子を使って K-mean 法によるクラスタリング解析を行うと、図4に示すようにアルキル化剤どうしが近傍にクラスターされ、中でも monofunctional な EMS と MNNG がもっとも近い位置にあり、作用機序との良い相関性が認められた。なお、遺伝子を限定しないで解析した場合には、作用機序との相関は見られなかったことより、遺伝子を限定してクラスタリング解析を行う有効性が示された。

これら共通性を持って変化した遺伝子のうち、表10に示すように上昇、減少それぞれ4遺伝子、計8遺伝子を選び、GeneChip 解析に用いた RNA サンプルを使って定量的 RT-PCR を行った。コントロールに対する発現比の値を算出し、GeneChip のデータと比較したところ、図4に示すように比較的良い相関が得られ、GeneChip データの信頼性が裏付けられた。そこで、次にこれらの選択した遺伝子を指標として、さらに多くの遺伝子傷害性物質

に関して RT-PCR 法にて遺伝子発現を調べたところ、図5に示すように、これらの化合物に関して比較的共通性を持って変化する遺伝子であることがわかった。ただし、これだけの限られた遺伝子によるクラスタリングでは、必ずしも作用メカニズムの類似した化合物が近くに分類されるという傾向は見られなかった。

次に、GeneChip 解析実験として、新たに5種類の遺伝子傷害性物質と4種の新遺伝子傷害性物質を追加して検討を行った。代謝拮抗剤として 5FU, 6MP, AraC、活性酸素を産生させる薬剤として BLM, KBrO₃、ニトロフルフリル化合物として FZ、非遺伝子傷害性物質として NaCl, PA, Chx, EtOH を新たに選び実験を行った。これらの化合物を表12に示した濃度において4時間 TK6 細胞を処理した際の細胞毒性は、コントロールに対する plating efficiency の差 (RS%) として、50%前後の値を示した。そして、この細胞より調製した RNA を使って定法に従い GeneChip による解析を行った。先に行った6化合物のデータと一緒に、再解析を行ったところ表13に示すような数の遺伝子に関して、発現変化が認められた。ここで、先に示した6化合物に関して遺伝子数が異なるのは、異なったデータセットによってデータの標準化を行ったためである。遺伝子の数は化合物ごとに大きく異なり、最も少ない PQ で 19、最も多い PA で 537 であった。細胞毒性の強さとの相関はやはりなく、遺伝子傷害性の有無に関しても、変化する遺伝子数としては特に差が見られなかった。

次に、変化の見られた遺伝子のうちで共通性の高いものに関して、表14にまとめ

た。やはり全ての化合物に共通して変化する遺伝子は存在しなかったが、発現変化の共通性の高い遺伝子をリストアップすることができた。ここで、遺伝子傷害性物質のみで共通して変化する遺伝子を拾い出してみると、表15のように、13 遺伝子が選択された。これらの遺伝子は、遺伝子傷害性の予測に有用であることが期待される。また、それぞれ共通した作用機序の薬物間で共通性をもって動いた遺伝子を検索してみると、表16の様な遺伝子がリストアップされた。これらの中には、それぞれの作用機序と関連した遺伝子が含まれていると考えられる。

以上の結果をまとめると、遺伝子傷害性に常に共通して変化する遺伝子は存在せず、比較的共通性は低かったが、遺伝毒性との関連性が報告されている遺伝子を含め、ある程度の共通性を持って変化した遺伝子が存在し、これらが遺伝毒性の指標として有効である可能性が示唆された。また、共通性を持って変化する遺伝子群を用いてクラスタリング解析を行うと作用メカニズムとの関連した結果が得られ、その有効性が示された。また、RT-PCRの結果は GeneChip データとよく関連していた。

2. タンパク発現変化の解析

2-1 2次元電気泳動による解析

昨年度、2次元電気泳動による検討では銀染色で検出したスポットのタンパク量が質量分析機による解析に十分ではなかったため、今年度はアブライするタンパク量を増やし、染色はクマシーブルー染色にて行

った。DEN 処理 28 日後の肝臓ホモジネートの可溶性タンパクを2次元電気泳動により分離し、コントロールと比較した結果、図7に示すようなスポットを検出できた。これらを肉眼的に比較することにより、DEN 処理により明らかに発現量が減少したスポットとして、3つのスポットを、移動度が酸性側にシフトした1つのスポットが確認できた。スポットを切り出し、ゲル内にて還元アルキル化した後にトリプシン消化し生成したペプチドを回収し、マトリクス溶液として、 α CHCA と混合したのち Zip チップにて脱塩、精製をした後、MALDI プレート上に滴下し結晶化した。AB4700 タンデム型質量分析装置にて測定を行ったところ、ペプチドマスフィンガープリンティング (MASCOT サーチ) により図の上から順に、hsc70, heat shock protein, actin, にと同定できた。MASCOT による解析例を図8に示す。移動度が変化していたスポットは thioester S-methyltransferase と同定された。移動度の変化はリン酸化によることが予想される。

2-2 2次元液体クロマトグラフィーシステムの構築

2次元電気泳動を用いたタンパク質の分離能をさらに向上する目的で、電気泳動の代わりに液体クロマトグラフィーを用いた2次元液体クロマトグラフィーシステムの構築をはかった。2次元 LC として、ギルソン社の Proteome 2 DLC システムを基本として図9に示すような2次元クロマトグラフィーのシステムを構築した。1次元目の分離はクロマトフォーカシング法を用

いて、タンパク質の等電点に基づいた分離をし、分画した各フラクションに対して2次元目の分離を逆相クロマトグラフィーにて疎水性に基づいた分離をし、多数のフラクションへと分画を行った。予試験として、HL-60細胞の細胞破砕液より得られたタンパク質混合液の分離を試みた例を図10に示す。約5mgの総タンパク量からスタートし、1次元目のフラクションをさらに細かく分画することにより、かなり詳細な分離が可能となり、2次元電気泳動をこえる分離能が得られることが期待できた。今後さらに前処理や分離条件、および検出法の検討を行い、ハイスループットな解析システムの構築をめざす予定である。

D. 考察

1. 遺伝子発現変化の解析

GeneChipを用いた解析により、以前使用したガラスアレイに比べて、よりハイスループットに信頼度の高いデータが得られるようになった。これは、定量的RT-PCRによる検討結果との一致性により裏付けられた。GeneChipのデータ解析においては、データの標準化、変化した遺伝子の選択法が重要であり、今年度までに、我々独自の手法をほぼ確立できた。弱い発現の遺伝子に対して単純な足切りをする代わりに、発現強度に応じて段階的に有意水準を変化させることにより、なるべく見落としのない選択を行うことにした。また、より信頼性の高いデータを得るためには、個体やチップに関するn数を増やし統計的手法を導入

することが一般に有効であるとされるが、今回比較的マウス個体間でのデータのばらつきが小さかったことと、チップが高価であることから、最小限のチップ数で、ある程度信頼性をおけるデータを取得することが重要である。この観点においては、遺伝傷害性物質の検討のように、解析する化合物を増やすことにより、得られた結果の共通性を探る方向性も有用であると考えられる。

1-1 グリタゾン系糖尿病治療薬

PPAR_γレセプター作用薬であるグリタゾン系化合物は、その作用を介してインシュリン低感受性のII型糖尿病の治療薬となる。3種の構造の類似した化合物のうち、トログリタゾンは市販後重篤な肝毒性のため使用が中止された。この毒性発現のメカニズムを、構造活性相関の立場から予測することを目的として、本研究班では一連の新たに合成した類縁体の遺伝子発現に与える影響を検討することを目的としている。その際、従来の動物実験では肝毒性が十分予見できなかったため、ヒトでの毒性予測としてのヒト初代培養肝細胞で遺伝子発現の比較を行うことの有効性を検討している。本分担研究においては、この*in vitro*のヒト細胞でデータとの比較を目的として、*in vivo*でのマウスのデータの取得を行う。マウスのフェノタイプとしては、トログリタゾンの毒性予測が十分できなかったため、毒性発現において種差があると予想されるが、フェノタイプとして毒性が観察されなかったが、遺伝子発現レベルでは何らかそれを補償するための変化が起きている可能

性はあり、遺伝子発現変化を調べることに
より予見が可能なることも期待される。一方
で、種差が根本的な問題であるなら、ヒト
とマウスの間で遺伝子発現応答に関しても
差があると予想され、その検証のためにヒ
ト細胞で得られた結果とマウスでの結果と
を比較検討することが重要となる。そこで、
相互に得られた GeneChip データの比較手
法を検討した。直接異なるチップ間での各
プローブの比較ができないため、まず遺伝
子ホモログの情報を活用するため、
Unigene のデータベースを検索して、マウ
スとヒトチップ間で対応する遺伝子を結び
つけるためのホモロジーテーブルを作成し
た。これにより、個々の遺伝子に対して、
Gene Spring ソフト上にて種間のデータを
プローブレベルで比較することが可能とな
った。現在、全体を一括して比較すること
を目的として、ホモロジーテーブルを利用
したデータ変換システムの構築に取り組ん
でいる。

1-2 マウスに対するアリストロキア酸 に関する検討

昨年度は AA 投与 24 時間後のデータのみ、
肝臓と腎臓（高感受性と低感受性）の比較
を行い、変異誘発に関して高感受性な腎臓
においてより多くの遺伝子発現変化が認め
られるという結果を得た。今年度は、経時
変化に関してさらに検討を加えると同時に、
他の臓器に関して解析を行った。まず、
毒性発現に関して主な標的臓器となる腎臓
に関して、6 時間、24 時間、48 時間後のデ
ータを比較したところ、6 時間後において
最も多くの発現変化が得られたため、初期

の変化が重要であることが予想され、まず
6 時間後に関して標的、非標的の臓器間で
の比較を行った。その結果、6 時間後では
非標的臓器である肝臓においても多くの遺
伝子発現変化が観察された。これは経口投
与後の初回通過効果として、肝臓では他の
組織に比べて、初期に高濃度で AA に暴露
されるためであるとも予想される。しかし、
遺伝毒性の本体は、代謝活性化により生じ
た環状ナイトレニウムイオンによるもので
あるため、作用発現に時間がかかることも
考えられる。そこで、24 時間後における変
化を 5 臓器において検討した。その結果、
昨年度と同様に、標的臓器において、非標
的臓器よりも多くの変化が認められる傾向
にあった。個々の遺伝子に関して見てみる
と共通性をもって変化した遺伝子のうち、
いくつかは標的臓器でのみ共通性を示して
おり、これらの遺伝子が遺伝毒性の指標と
なる可能性が示唆された。

1-3 TK6 細胞に対する遺伝子傷害性物 質に関する検討

多くの遺伝子傷害性物質に関して検討を
行った結果、共通性をもって変化する遺伝
子は少なく、全てに共通して変化する遺伝
子は存在しなかった。コントロールデータ
の安定性などを考慮すると、全般的に、in
vivo での実験に比べて細胞を使った実験の
方がばらつきが大きい傾向にあり、発現解
析が難しいことも一因であるとも考えられ
るが。しかし、今回の検討では、処理後 4
時間での発現のみを比較しているため、化
合物によっては、作用発現の経時変化に差
があることも十分予測されるため、今後は、

より詳細に経時変化を検討することにより、化合物間の共通性が上がることが期待される。ただし、全てに関して GeneChip 解析を行うことは費用の面からも無理があるため、ある程度共通性が見られた遺伝子をピックアップし、定量的 RT-PCR 法を使って詳しい検討を行いたい。既に、化合物に関しては、初期の検討において共通性の高かった 6 遺伝子を使って網羅的に解析を行った結果、他の遺伝子傷害性物質においても比較的共通性高く変化していることが観察できた。ただし、この数の遺伝子のみの変化からは作用機序による分類は難しく、化合物の作用機序ごとに特徴的な遺伝子を用いる必要があると考えられる。

2. タンパク質発現変化の解析

ゲルへのアプライ量を増やすことにより、2次元電気泳動で得られた差のあるスポットでのタンパク質の同定が可能であった。MALDI-TOF/TOF 型マスを使ったペプチドマスフィンガープリンティング法が有効であったが、感度の面からまだ発現の弱いスポットの同定は難しかった。これは、ゲルからの回収効率の低さやゲルへのアプライ量の制限からも、大幅な感度上昇が見込めないため、これらの問題を解決する上でも、ゲル電気泳動の代わりに液体クロマトグラフィーを使った分離を試みることにした。幸い別予算にて 2次元液体クロマトウラフィーシステムの導入が可能となったため、本研究への応用が可能となった。検出系として、蛍光の利用、同位体ラベルによる同時比較、マスによる直接検出、1次元 SDS-PAGE との組み合わせなどによ

る感度の向上に関して検討を行う予定である。また、安定同位体ラベル法 (ICAT) による、LC-MS/MS を使った解析系の検討も行う予定である。

E. 結論

GeneChip を用いた解析により、各種薬剤処理により変動する遺伝子群を、ある程度信頼性をもって検出することができた。PPAR 作用薬での検討では、脂質代謝に関わる遺伝子等、PPAR レセプターとの関連性の示唆される遺伝子が選択された。今後より詳細に構造活性相関を検討することにより、肝毒性の発現に重要であると考えられる遺伝子の絞り込みを行いたい。また、同時に行っているヒトプライマリー肝細胞との比較についても、遺伝子ホモログの情報を用いて相互のデータを変化するシステムの構築を開始した。

タンパク質の発現解析については、2次元電気泳動を用いて、薬物処理により発現変化する数種のスポット検出し、質量分析機による分析によりタンパクを同定できたが、さらに高感度、ハイスループットな解析を可能とするため、2次元液体クロマトグラフィーによる分離法や安定同位体ラベル法の導入を開始した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Zhan L, Sakamoto H, Sakuraba M, Wu de S, Zhang LS, Suzuki T, Hayashi M, Honma M., Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat Res.*, 557, 1-6. (2004)

Yamada K, Suzuki T, Hakura A, Mizutani T, Saeki K. Metabolic activation of 10-aza-substituted benzo[a]pyrene by cytochrome P450 1A2 in human liver microsomes. *Mutat Res.* 557, 159-165. (2004)

Thybaud V, Dean S, Nohmi T, de Boer J, Douglas GR, Glickman BW, Gorelick NJ, Heddle JA, Heflich RH, Lambert I, Martus HJ, Mirsalis JC, Suzuki T, Yajima N., In vivo transgenic mutation assays. *Mutat. Res.*, 540, 141-151 (2003)

Itoh T, Kuwahara T, Suzuki T, Hayashi M, Ohnishi Y., Regional mutagenicity of heterocyclic amines in the intestine: mutation analysis of the *cII* gene in lambda/lacZ transgenic mice, *Mutat. Res.*, 539, 99-108. (2003)

鈴木孝昌：変異原性（イニシエーター）から見たリスク評価
Environ. Mutagen. Res., 25, 181-186 (2003)

鈴木孝昌：トランスジェニックマウス変異原性試験の有用性に関する研究
Environ. Mutagen. Res., 25, 119-125 (2003)

2. 学会発表

山田勉也, 羽倉昌志, 鈴木孝昌, 加藤隆

明, 竹本育世, 水谷隆治, 佐伯憲一
一連の含窒素芳香族化合物の代謝活性化に関わるヒト CYP 分子種
日本薬学会第 124 年会 (2004.3)

小原有弘, 鈴木孝昌, 鈴木孝禎, 宮田直樹, 二宮真一, 須藤哲司
GeneChip[®] を用いた薬剤曝露時の遺伝子発現解析 (Toxicogenomics への応用を目指して)
日本薬学会第 124 年会 (2004.3)

小原有弘, 鈴木孝昌, 小貫慶昭, 佐藤陽美, 板井昭子, 鈴木孝禎, 宮田直樹, 二宮真一, 須藤哲司
チアゾリジンジオン誘導体曝露ヒトプライマリー肝細胞の GeneChip[®] 遺伝子発現解析 (KeyMolnet を用いた分子ネットワーク解析への展開)
日本薬学会第 124 年会 (2004.3)

鈴木孝昌

トキシコゲノミクス研究から見た大集積アレイの有用性と臨床診断用の次世代カスタムアレイに求められるもの
文部科学省科学技術振興調整費ゲノムフロンティア開拓研究シンポジウム
一次世代のマイクロアレイ - カスタムアレイの展開 - (2004.3)

戸部香織, 仲地豊, 近藤恭光, 中嶋圓, 浜田修一, 鈴木孝昌, 兵庫淳志, 田代英夫, 榊佳之, 降旗千恵
マウス肝発癌初期過程における遺伝子発現解析に用いる Oligonucleotide Microarray の開発

日本分子生物学会 (2003.12)

鈴木孝昌

環境化学物質のリスク評価のためには、
現行遺伝毒性試験に何が欠けているか
日本環境変異原学会微生物変異原性試験
研究会第 31 回定例会 (2003.11)

JEMS/MMS マイクロアレイ共同研究グ
ループ (世話人代表: 鈴木孝昌)
DNA マイクロアレイの変異原性試験への
応用に関する共同研究
日本環境変異原学会第 32 回大会
(2003.11)

バラニサミー・ラジャグル、鈴木孝昌、
坂本浩子、菅野 純、林 真、本間正充
ヒトリンパ腫由来 TK6 細胞における遺
伝子傷害性物質による遺伝子発現変化の
解析
日本環境変異原学会第 32 回大会
(2003.11)

Suzuki, T.

Toxicogenomics in the genetic toxicology.
Annual Meeting of the Chinese
Environmental Mutagen Society (2003.11)

鈴木孝昌、小原有弘、山田勉也、佐伯憲
一、本間正充、山口照英、林 真
ニトロソアミン類がマウスに誘発する突
然変異の多様性
第 62 回日本癌学会総会 (2003.9)

山田勉也、鈴木孝昌、羽倉昌志、佐伯憲
一
10 位窒素置換ベンズピレンのヒト肝

microsome を用いた Ames 試験での変異原
性評価
第 62 回日本癌学会総会 (2003.9)

T. Suzuki, P. Rajaguru, J. Kanno, H.
Sakamoto, M. Hayashi, T. Yamaguchi, and M.
Honma
GeneChip analysis on transcriptional changes
induced in human lymphoblastoid (TK6)
cells by six genotoxic chemicals.
33rd Annual Meeting of the European
Environmental Mutagen Society (2003.8)

T. Kanayasu-Toyoda, T. Oshizawa, T.
Suzuki, E. Uchida, T. Hayakawa, T.
Yamaguchi
Role of PKC. on G-CSF signaling pathway in
differentiating HL-60 cells into neutrophils
6th World Congress on Inflammation
(2003.8)

K. Tobe, K. Kawai, Y. Nakachi, Y. Kondoh ,
M. Nakajima, S. Hamada, T. Suzuki, A.
Hyogo, T. Tashiro, H. Ito, Y. Sakaki, H.
Tashiro, C. Furihata
Oligonucleotide Microarray for
Examining Gene Expression Clustering in
Early Mouse Liver Chemical
Carcinogenesis

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表1 遺伝子傷害性物質の作用機序による分類

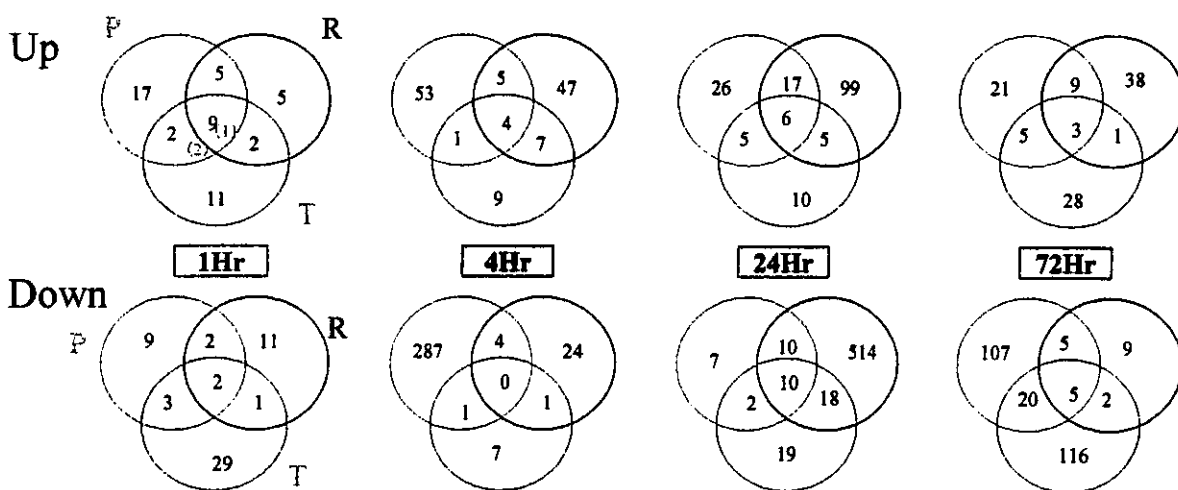
Antimetabolite			Active oxygen			Nitrofuryl compound	
5FU	6MP	AraC	BLM	KBrO ₃	PQ	AF2	FZ
Alkylating agent			Non-genotoxic chemical				
EMS	MNNG	MQ	NaCl	PA	CHX	EtOH	

表2 グリタゾン系化合物によりマウス肝臓にて発現変化した遺伝子数

	P	1Hr		P	4Hr		P	24Hr		P	72Hr	
		R	T		R	T		R	T		R	T
Up	33	21	29	63	63	21	54	127	26	38	51	37
Down	19	17	35	292	29	9	29	553	49	137	21	143

※ P: Pioglitazone, R: Rosiglitazone, T: Troglitazone

図1 化合物間での遺伝子の重複



※ () は逆の動きを示した遺伝子数

表3 グリタゾン系化合物に関して共通性をもって変化した50遺伝子

	1 h					4 h					24 h					72 h					Gene name				
	P	R	T	Score	Description	P	R	T	Score	Description	P	R	T	Score	Description	P	R	T	Score	Description					
046A	5	120 A	22	100 A	27	018 P	22	022 P	83	127 P	178	028 P	85	022 P	20	218 P	83	028 P	148	123 P	224	467 P	100	87 regulator of G-protein signaling 18	
031P	182	418 P	140	309 P	188	031A	336	055 A	48	133 P	92	445 P	84	104 A	24	213 A	26	222 P	70	112 P	84	733 A	59	59 peptidyl acyl-CoA thioesterase 2A	
032P	521	325 P	324	418 P	483	154 P	332	071 P	133	128 P	302	033 P	264	109 P	233	238 P	80	227 P	139	878 P	225	233 P	133	45 regulator of G-protein signaling 16	
033P	422	345 P	324	333 P	355	048 P	131	055 P	145	038 P	273	033 P	69	238 P	69	238 P	76	333 P	135	843 P	225	132 P	66	34 regulator of G-protein signaling 18	
034P	603	258 P	420	385 P	578	058 P	282	078 P	239	114 P	338	058 P	322	032 P	230	183 P	106	151 P	653	843 P	225	132 P	66	32 Ism 1	
035P	93	233 P	23	234 P	34	135 P	242	035 A	12	134 P	245	325 P	104	211 P	110	384 M	35	843 P	60	843 P	225	132 P	66	32 ES1L, highly similar to 211818A ormyelocytos leukemia	
036P	33	135 P	34	234 P	88	216 P	141	103 P	63	143 P	85	150 P	340	017 P	88	018 P	149	384 M	35	843 P	432	233 P	620	29 ES1L, moderately similar to A47643 hypothetical prot	
037P	24	184 M	12	184 A	17	021 P	34	028 P	30	403 P	23	143 P	78	131 A	11	045 A	3	028 A	12	233 P	224	124 A	233	28 lactocyte cell derived chemokine 1	
038P	162	178 P	155	212 P	239	259 P	258	324 P	239	222 P	237	033 P	329	038 P	235	182 P	98	078 P	137	112 P	120	048 P	1014	28 cycloheximide (CHX), 1s1	
039P	421	122 P	352	288 P	333	051 P	282	033 P	707	181 P	451	048 P	659	309	328 P	420	040 P	104	135 P	3425	037 P	2323	28 thyroid hormone responsive SPOT14 homolog (Rattus)		
040P	672	128 P	706	225 P	080	181 P	1133	183 P	647	133 P	621	077 P	1142	338 P	126	312 P	635	048 P	254	187 P	730	037 P	5357	28 thyroid hormone responsive SPOT14 homolog (Rattus)	
041P	22	051 P	14	210 P	59	291 P	86	112 P	23	323 P	63	112 P	103	369 P	69	545 P	93	282 P	80	113 P	173	078 P	155	24 taurin	
042P	155	143 P	333	224 P	627	147 P	330	133 P	631	173 P	678	248 P	1171	138 P	181	189 P	239	328 P	854	847 P	2731	212 P	2818	23 metallothionein 1	
043P	378	119 P	403	119 P	352	028 P	534	318 P	262	028 P	475	268 P	1532	288 P	1178	178 P	735	119 P	853	132 P	765	037 P	432	21 hypothetical protein LOC285576	
044P	153	233 P	132	284 P	263	040 P	65	040 P	75	082 P	124	285 P	734	018 P	32	425 P	107	138 P	72	241 P	833	133 P	712	21 FROEN cDNA 130007021 gene	
045P	74	131 P	86	151 P	125	078 P	254	057 P	222	135 P	349	333 P	403	301 P	49	152 A	219	249 P	819	804 P	1833	119 P	854	21 O sial albumin promoter binding protein	
046P	38	027 P	63	021 P	87	204 P	235	181 P	155	148 P	433	234 P	434	004 P	132	177 P	62	111 P	84	117 P	610	048 P	279	21 cycloic acyl-CoA thioesterase 1	
047P	376	228 P	483	128 P	327	138 P	421	228 P	189	248 P	153	128 P	659	078 P	139	081 P	139	128 P	263	218 P	3039	108 P	1651	20 FROEN cDNA 211002210 gene	
048P	141	140 A	84	131 A	63	248 A	694	038 P	134	181 A	39	101 A	35	136 A	65	153 A	69	088 A	98	081 A	387	031 A	478	20 cycloheximide (CHX), 2s20	
049P	129	118 P	192	228 P	372	033 P	225	101 P	333	120 P	340	111 P	68	110 P	68	185 P	103	388 P	334	235 P	1835	134 P	1632	23 metallothionein 2	
050P	69	115 P	74	055 P	61	183 P	183	228 P	89	133 P	118	274 P	149	226 P	032	221 P	120	137 P	100	165 P	919	078 P	858	23 mitochondrial acyl-CoA thioesterase 1	
051P	174	151 P	148	172 P	149	048 P	78	103 P	244	110 P	182	032 P	94	101 A	25	178 P	43	240 P	136	245 P	1125	094 P	600	20 dihydrotransferase 9 (OMP-N1uAcetylserine)omamide a1p	
052P	113	101 P	120	114 P	139	145 P	104	222 P	139	143 P	113	228 P	843	225 P	843	225 P	502	078 P	833	113 P	1740	025 P	1716	18 expressed sequence AT118339	
053P	217	124	318 P	235	151 P	134	053 A	32	028 P	37	133 P	32	052 P	113	033 P	60	029 P	34	191 P	65	112 P	313	030 P	338	15 early growth response 1
054P	80	081 P	43	078 P	49	082 P	25	033 P	17	067 P	34	284 P	284	438 P	139	220 P	45	067 P	64	045 P	303	021 P	236	14 B-cell leukemia/lymphoma 6	
055P	69	051 P	157	263 P	613	233 P	233	145 P	192	146 P	638	077 P	859	033 P	111	028 P	211	089 P	83	135 P	1631	089 P	627	12 serum amyloid A 2	
056P	213	057 P	282	232 P	1338	210 P	339	151 P	253	137 P	282	059 P	584	022 P	637	043 P	563	038 P	87	163 P	2505	077 P	1543	12 serum amyloid A 1	
057P	46	039 P	69	318 P	69	130 P	68	103 P	67	120 P	64	063 P	394	039 P	43	028 P	80	035 P	37	134 P	532	057 P	596	12 serum amyloid A 2	
058P	30	045 P	43	072 P	25	051 A	49	079 P	64	057 P	44	233 P	316	288 P	137	094 P	36	047 P	51	028 P	454	038 P	783	11 Mus musculus, clone IMAGE1007123 mRNA	
059P	116	081 P	37	045 A	23	177 P	22	171 P	49	137 P	45	039 P	20	028 A	18	039 P	23	085 M	28	124 P	202	057 P	297	11 suppressor of cytokine signaling 2	
060P	8	083 P	25	028 P	79	184 P	32	148 P	29	150 P	24	048 P	91	077 P	8	039 P	149	065 P	65	080 P	158	059 P	177	9 expressed sequence A327257	
061P	182	048 P	85	083 P	103	189 P	382	070 P	218	083 P	124	082 P	23	077 P	37	078 P	37	065 P	123	111 P	2248	045 P	1172	8 pleckstrin homology-like domain, family A member 1	
062P	23	025 P	32	028 P	89	183 P	73	128 P	65	114 P	78	035 P	79	048 P	43	102 P	103	040 P	37	037 P	261	082 P	639	8 choline kinase	
063P	115	133 P	100	074 P	81	078 A	159	101 P	94	091 P	81	075 P	70	028 A	29	102 P	183	048 P	67	082 P	676	033 P	465	8 araA (bacterial) insertase transporter, ATP-binding, hor	
064P	44	078 P	77	048 M	82	081 P	81	072 P	67	071 P	63	023 M	34	078 A	39	027 P	43	105 P	69	128 P	833	124 P	582	8 FROEN cDNA 403430323 gene	
065P	16	027 A	19	057 A	2	050 A	4	129 A	8	051 A	4	020 A	1	244 A	72	048 A	13	039 A	5	110 A	11	118 A	28	8 FROEN binding protein 4	
066P	169	089 P	127	064 P	133	042 P	53	075 P	81	082 P	80	085 P	144	046 P	63	083 P	159	042 P	175	082 P	1403	047 P	1394	8 transforming growth factor beta 1 induced transcript 4	
067P	160	020 P	97	048 A	137	083 M	89	084 P	117	070 P	101	026 P	67	037 A	25	129 P	265	083 P	190	089 P	2372	048 P	1423	8 inhibitor of DNA binding 2	
068P	45	048 P	21	082 P	61	110 P	63	083 P	75	085 P	78	048 P	46	028 P	38	083 P	138	085 P	84	083 P	741	057 P	914	8 inhibitor of DNA binding 3	
069P	64	028 A	81	063 A	129	061 A	92	103 P	103	089 P	143	048 A	80	028 A	38	108 P	149	031 P	67	040 P	883	030 P	1545	7 FROEN cDNA 111003047 gene	
070P	31	094 P	85	085 P	37	033 A	111	059 A	10	070 M	99	081 P	35	034 P	23	083 P	31	027 P	23	058 P	359	044 P	382	7 Mus musculus adult male hypothalamus cDNA FROEN	
071P	69	045 P	68	083 P	103	089 P	103	057 P	110	089 P	95	082 P	31	014 P	40	018 P	39	085 P	65	131 P	833	055 P	731	7 FROEN cDNA 482443023 gene	
072P	13	055 A	8	021 A	3	022 A	4	032 A	2	078 A	3	089 A	2	011 A	7	103 A	143	035 A	3	125 P	149	027 A	39	7 FROEN cDNA 251000010 gene	
073P	78	045 P	82	094 P	133	048 P	39	084 P	69	048 P	38	070 P	76	085 P	85	089 P	42	043 P	84	038 P	695	017 P	433	7 dual specificity phosphatase 1	
074P	69	074 P	126	034 P	72	040 P	77	048 P	81	089 P	92	042 P	107	013 A	32	048 P	27	070 P	83	030 P	914	087 P	850	7 FROEN cDNA 1700012918 gene	
075A	78	013 A	10	031 A	83	171 A	81	246 A	33	031 A	81	078 A	8	028 A	8	028 A	89	021 A	15	043 P	281	037 A	80	6 growth arrest and DNA-damage-inducible 45 genes	

※ 発現上昇 発現抑制

表4 アリストロキア酸によりマウス各臓器にて発現の変化した遺伝子数

	Spleen			G.Stomach		Liver		Bladder		F.Stomach		Kidney		
	6hr	6hr	24hr	6hr	24hr	6hr	24hr	6hr	24hr	6hr	24hr	6hr	24hr	48hr
Up	10	15	6	101	6	8	10	13	47	218	26	48		
Down	5	48	8	116	2	15	17	9	67	243	33	107		

図2 チップデータの K-mean 法によるクラスタリング解析結果

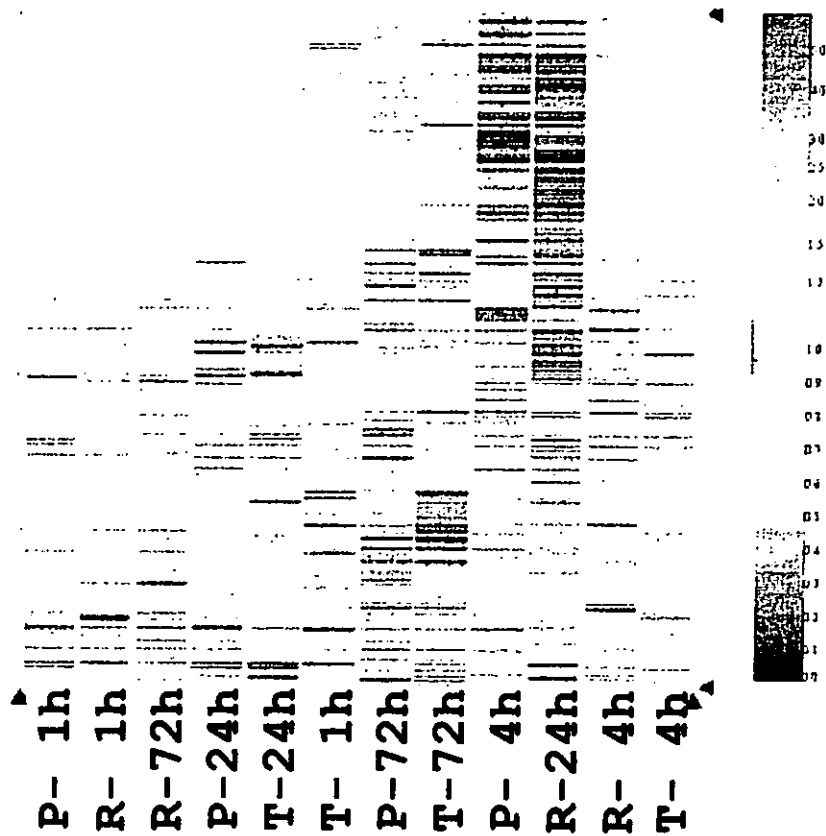


表7 アリストロキア酸にて臓器間で共通性を持って発現低下した遺伝子

Gene Title	Spleen		Glandular Stomach		Liver		Bladder		Fore Stomach		Kidney	
	6hr Ratio	24hr Ratio	6hr Ratio	24hr Ratio	6hr Ratio	24hr Ratio	6hr Ratio	24hr Ratio	6hr Ratio	24hr Ratio	6hr Ratio	24hr Ratio
growth hormone receptor	1.05	M	0.75	P	0.92	P	0.32	P	1.08	P	0.84	P
RAB7, member RAS oncogene family	0.82	P	0.87	P	0.94	P	0.16	A	0.87	P	0.91	P
RKEN cDNA 160003003 gene	0.81	P	1.01	P	0.88	P	0.16	A	1.03	P	0.84	P
RKEN cDNA 130011P19 gene	0.79	P	0.92	P	1.08	P	0.18	A	0.87	P	0.80	P
RKEN cDNA 310002M17 gene	0.90	A	0.76	P	0.74	P	0.24	A	0.97	P	1.36	P
RKEN cDNA 310002K08 gene	0.71	P	0.64	P	0.58	P	0.21	A	1.21	P	0.98	P
RKEN cDNA 061003P07 gene	1.02	P	0.87	P	0.78	P	0.39	M	1.01	P	1.12	P
RKEN cDNA 1110084M08 gene	0.76	P	1.39	P	0.92	P	0.58	P	1.01	P	1.11	P
protein disulfide isomerase-related protein	0.83	P	0.92	P	0.90	P	0.18	A	1.06	P	0.95	P
murine leukemia virus modified polytropic provirus DNA	0.85	P	0.82	P	0.88	P	0.32	P	0.92	M	0.99	P
growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	0.54	A	1.10	P	0.90	P	0.44	P	0.44	P	1.28	P
Raggrin	0.83	A	1.29	P	0.48	A	0.97	A	1.04	A	1.67	A
glucosylglycosyl (N-acetyl) transferase 1, core 2	0.78	P	0.58	A	1.00	A	0.94	A	1.11	A	1.14	P
ARF2 subfamily-related protein 2 homolog (yeast)	0.59	P	0.77	P	1.08	P	0.39	A	1.19	P	1.04	P
Tofa2-related transcriptional repressor 1	1.15	P	0.57	P	0.92	P	0.88	P	0.94	P	0.89	P
LM and SH3 protein 1	0.55	A	0.94	P	0.91	P	0.39	A	0.74	A	0.56	P
four and a half LIM domain 1	1.08	P	1.00	P	1.17	P	1.00	A	0.71	A	1.10	P
solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 7	0.69	A	1.09	M	0.89	M	0.51	A	0.85	M	1.11	P
acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	0.94	A	0.81	P	1.10	P	0.70	P	1.14	P	0.85	P
erythrocyte protein band 4.1	0.73	P	0.78	P	1.29	P	0.63	P	1.01	P	0.87	P
Intracisternal A-particle	0.78	P	0.65	P	0.85	P	0.56	A	0.91	P	0.88	P
Eph receptor B4	0.80	P	0.99	P	1.11	P	0.47	P	1.00	P	1.14	P
RKEN cDNA A030007L17 gene	0.92	P	1.28	P	0.91	P	1.15	P	1.03	P	0.73	P
RKEN cDNA 2810313E07 gene	0.87	P	1.18	P	1.18	P	0.83	A	0.99	P	1.00	P
RKEN cDNA 2310016A09 gene	1.09	P	1.22	P	1.06	P	0.84	P	0.90	P	0.82	P
ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3	1.12	P	0.87	P	0.95	P	1.59	P	0.88	P	0.85	P
protease, serine, 8 (proctasin)	1.05	A	0.78	M	0.89	A	0.70	A	1.59	A	0.92	A
isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	0.82	P	0.81	P	1.03	P	0.52	P	1.15	P	1.03	P
selenium binding protein 1	1.01	A	0.71	P	1.29	M	0.71	P	1.12	P	0.81	P
mevalonate (diphospho) decarboxylase	0.85	A	0.68	A	0.97	A	1.85	A	0.58	A	0.84	A
neridinyl, N-arginine diacyl convertase, NRD convertase 1	0.74	P	0.85	P	0.90	P	0.52	P	1.05	P	0.84	P
nitridase 3-like 3	1.23	P	1.07	P	0.57	P	1.17	A	0.56	A	0.84	A
Ras association (RalGDS/AF-6) domain family B	0.89	P	1.49	P	0.85	P	0.63	P	0.78	P	1.01	P
par-3 (partitioning defective 3) homolog (C. elegans)	0.80	A	2.38	P	0.95	P	2.86	P	0.88	A	0.83	P
RKEN cDNA 311008P09 gene	1.02	P	1.01	P	1.04	P	1.46	P	0.93	P	1.16	P

Gene Title	Spleen		Glandular Stomach		Liver		Bladder		Fore Stomach		Kidney	
	6hr Ratio	24hr Ratio	6hr Ratio	24hr Ratio	6hr Ratio	24hr Ratio	6hr Ratio	24hr Ratio	6hr Ratio	24hr Ratio	6hr Ratio	24hr Ratio
leukemia	0.88	P	1.84	P	0.46	P	1.12	P	0.90	P	0.79	A
LRP--responsive beta2-microglobulin anchor	0.80	P	0.89	P	0.82	P	1.18	P	0.86	A	0.47	P
osteoclast P450, family 2, subfamily 1, sialoprotein 2	1.99	P	0.71	P	0.83	P	0.98	P	0.94	P	0.80	P
ferroxidase (hepatic, non-hepatic)	0.83	P	0.90	P	0.92	P	0.99	P	1.19	P	0.81	P
lysosomal 1,4-alpha-D-glucanase receptor 1	1.32	P	1.38	P	1.03	P	1.12	P	0.73	P	1.09	A
plexin B2	0.92	P	0.82	P	1.10	P	0.41	P	0.80	P	0.87	P
prolyl-4-hydroxylase	0.71	P	0.74	P	0.77	P	0.58	P	1.30	P	0.88	P
protein 2	0.88	P	0.81	P	0.86	P	0.27	A	1.29	P	0.83	P
serotransferrin	0.73	P	1.23	P	1.40	P	0.40	P	1.04	P	1.19	P
histidase	1.28	P	0.84	A	1.09	A	0.98	P	1.04	P	1.10	P
hydroxylase, 6-oxoaldehyde oxidase	1.16	P	1.58	P	0.97	A	1.16	P	1.09	P	0.85	A
protease (serine, macropain) 2B subunit, ATPase 3	0.81	P	1.30	P	1.01	P	0.35	A	0.84	P	1.11	P
F-box and WD-40 domain protein 10	0.86	P	0.85	P	1.16	P	0.37	A	0.94	P	1.10	P
TAP binding protein	0.78	P	1.10	P	1.10	P	0.42	P	1.13	P	1.09	P
RKEN cDNA 1110016P09 gene	0.85	P	0.81	P	1.06	P	0.82	P	1.10	P	1.13	P
phosphotransferase-related protein, beta	1.08	P	0.82	P	0.84	P	0.97	A	0.87	P	1.03	P
stephanocephalus nucleolar domain containing 1	0.86	P	0.81	P	1.08	P	0.42	P	1.13	P	1.09	P
OS19A protein	0.78	P	1.58	P	1.12	P	0.30	A	0.82	P	1.11	P
histone acetylase 2, O region loop 10	0.89	P	1.17	P	1.18	P	0.30	A	0.82	P	1.12	P
RAD23B homolog (S. cerevisiae)	0.74	P	1.07	P	0.72	A	0.88	P	1.02	P	0.97	P
amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	0.88	P	0.81	P	1.06	P	0.42	P	0.83	P	0.73	P
NADH dehydrogenase (ubiquinone) F1b protein 2	0.85	P	0.85	P	0.90	P	0.48	P	1.02	P	1.07	P
zinc finger protein 36	0.84	P	1.13	P	0.71	P	0.41	A	0.89	P	0.89	P
RKEN cDNA 1110030013 gene	0.82	P	0.82	P	1.18	P	0.82	M	0.88	P	1.08	P
phagosome protein, phospholipase 2, neutral	0.80	M	0.82	P	0.87	P	0.48	A	1.04	P	0.89	P
serp--associated migratory protein	0.80	P	1.47	P	1.17	P	0.92	A	0.87	P	0.89	P
RKEN cDNA 111008418 gene	0.81	P	1.29	P	1.19	P	0.40	P	0.87	P	1.04	P
histone acetylase 2, O region loop 1	0.78	P	0.82	P	1.16	P	0.52	P	1.02	P	1.01	P
signal transducer and activator of transcription 8	0.84	P	1.03	P	1.08	P	0.48	A	1.08	P	1.14	P
RKEN cDNA 1110011K10 gene	0.87	P	0.88	P	1.11	P	0.43	A	0.97	P	1.16	P
vesicular transport protein, cytosolic	0.80	P	1.05	P	1.08	P	0.42	P	1.12	P	1.03	P
acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	0.80	M	0.95	P	0.89	P	0.34	P	1.23	P	1.09	P
ATPase, H+ transporting, VO subunit B	0.88	P	0.93	P	1.07	P	0.39	P	1.01	P	1.23	P
ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 1 polypeptide	0.89	P	0.77	P	1.32	P	0.27	A	0.85	P	0.84	P
cholesterol transferase, vesicular transport 2	0.83	P	1.04	P	0.82	P	0.98	P	0.93	P	0.92	P
cell division cycle 25 homolog (S. cerevisiae)	0.80	P	0.83	P	0.88	P	0.40	P	1.09	P	0.82	P
transient sticky-tail protein	0.77	M	1.04	P	1.08	P	0.49	P	0.97	P	1.02	P
stress-induced phosphoprotein 1	1.08	P	1.89	P	0.78	P	0.24	A	1.31	P	1.29	P
sepsin 1	1.04	P	1.17	P	0.98	P	0.27	A	1.01	P	0.83	P
cupper hexamer for superoxide dismutase	0.80	P	0.93	P	1.18	P	0.30	P	1.09	P	1.09	P
protease (serine, macropain) 2B subunit, non-ATPase, 1	0.80	P	1.24	P	1.21	P	0.44	A	1.02	P	1.09	P
cytochrome differentiation related protein	1.00	M	0.78	A	1.06	A	0.80	P	0.87	P	0.87	P
hepatin	1.02	P	0.82	P	1.04	P	0.31	P	1.08	P	1.21	P
DNA segment, Chr 11, Wayne State University 88, expressed	0.82	P	0.86	P	1.08	P	0.40	A	1.00	P	0.84	P
serologically defined breast cancer antigen 94	0.98	P	1.11	P	1.22	P	0.34	P	0.77	P	1.10	P
OD B1 antigen	0.74	P	0.40	P	0.93	P	0.48	P	1.02	P	0.84	P
histone beta 4 binding protein	0.98	P	1.21	P	1.18	P	0.37	M	1.18	P	1.22	P
SHD (D4) Q2-3 gene for shua-1 antigen	0.78	P	0.81	P	1.37	P	0.39	P	0.79	P	1.15	P
DNA segment, Chr 19, PRATO Dal 721, expressed	0.82	P	1.07	P	1.09	P	0.28	P	0.89	P	1.07	P
histone acetylase 2, O region loop 1	0.80	P	0.88	P	1.29	P	0.44	A	1.10	P	1.04	P
Ras activator 1 (rasGRF1)	0.82	P	0.93	P	1.17	P	0.48	M	1.16	P	0.82	P
Ras GTP dissociation inhibitor (RDI) alpha	0.80	P	1.32	P	0.81	P	0.45	M	0.98	P	1.15	P
area (hepatitis) serotype transporter, ATP-binding, homolog 1	0.87	P	0.93	P	0.93	P	0.26	A	0.84	P	1.20	P
inhibitor of DNA synthesis 1	1.12	P	1.12	P	1.14	P	1.31	P	0.82	A	0.89	P
Gna2 (Hsc63) homolog, subfamily B, member 8	0.88	P	1.12	P	0.10	P	0.17	P	1.18	P	0.87	P
growth factor receptor bound protein 2-associated protein 1	0.42	A	0.82	A	0.44	A	0.48	A	0.85	P	0.84	P
heparanase	0.97	P	0.33	P	1.18	P	0.46	A	1.35	P	1.09	P
heparanase-like 2	1.16	M	0.78	P	1.43	P	0.28	P	1.08	P	0.98	P
RKEN cDNA 110002F13 gene	0.40	A	1.08	P	1.23	P	0.22	P	1.11	P	0.87	P
adenylate kinase 3 alpha-like	1.31	P	1.03	P	1.02	P	0.48	A	0.92	P	1.09	P
RKEN cDNA 2800057017 gene	1.12	P	1.12	P	1.08	P	0.38	A	1.12	P	1.09	P
serine protease 2	1.00	P	0.87	P	1.18	P	0.97	P	1.19	P	0.88	P
RKEN cDNA 482248010 gene	0.84	A	1.28	P	0.94	A	0.85	A	0.92	P	0.78	P
LT lymphoblastin (LT3) gene	0.81	M	0.62	P	1.08	P	1.03	P	1.09	P	0.81	P
RKEN cDNA 139001 Q24 gene	0.84	P	0.84	P	1.09	P	1.00	P	0.88	M	1.08	M
cytochrome P450, family 2, subfamily 8, polypeptide 1	1.46	P	0.48	P	0.47	P	1.41	P	1.10	P	0.88	P
Igk chain gene	0.76	P	0.77	A	1.34	P	1.50	A	0.61	A	0.86	P

表 8 用いた遺伝子傷害性物質とその TK6 細胞に対する細胞毒性

Chemical name (Abbreviation)	Conc. (μ g/ml)	Cytotoxicity (RS%)	Mode of action
Paraquat (PQ)	150	66	Active oxygen radical
Ethylmethanesulfonate (EMS)	50	26	Alkylation (ethylation)
N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)	0.005	58	Alkylation (methylation)
Furylfuramide (AF2)	20	16	Unknown (nitro reduction?)
Arabinofuranosylcytosine (AraC)	20	53	Nucleoside analogue
Monocrotaline (MQ)	2000	61	Alkylation (bifunctional)

図 3 発現変化の見られた遺伝子数

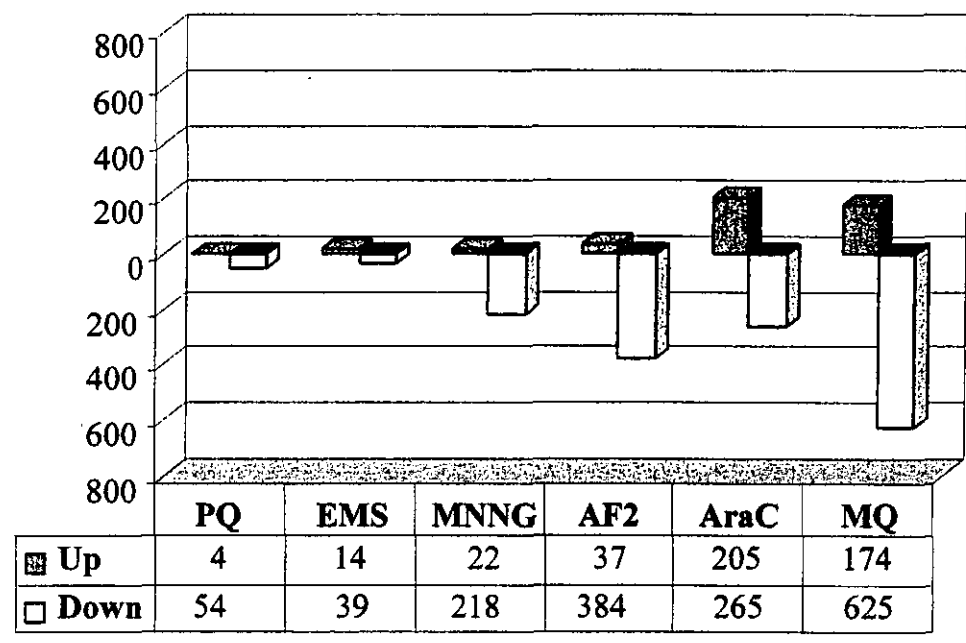


表 9 複数の遺伝子傷害物質により発現の変化した遺伝子リスト

Gene	Control		PQ		EMS		MNNG		AF2		AraC		MQ	
	ratio	cell av diff	ratio	cell av diff	ratio	cell av diff	ratio	cell av diff	ratio	cell av diff	ratio	cell av diff	ratio	cell av diff
Activating transcription factor 3 (ATF3)	1	P 163	0.87	P 158	1.31	P 244	1.34	P 281	4.89	P 687	8.66	P 1079	8.00	P 811
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A)	1	P 442	1.21	P 832	1.44	P 724	1.17	P 829	4.88	P 1728	12.03	P 6348	2.68	P 978
Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A)	1	P 512	1.16	P 588	1.18	P 891	0.88	P 627	8.40	P 1504	6.70	P 4087	2.20	P 1003
pho-1-like 1 (Drosophila)	1	A 5	2.68	A 14	3.38	P 21	2.67	P 17	1.38	A 7	2.87	P 24	2.16	A 11
G-protein coupled receptor 85 (GPR85)	1	A 13	0.33	A 4	3.14	P 46	2.18	P 33	2.78	P 30	1.88	A 30	3.88	P 40
Immunoglobulin kappa constant	1	P 1193	1.87	P 2148	0.79	P 861	1.72	P 2379	2.15	P 2138	0.89	P 1217	1.38	P 1417
Serine/arginine repetitive matrix 1	1	P 489	3.89	P 870	1.30	P 894	1.07	P 1074	1.17	P 473	1.59	P 890	0.88	M 387
Mitogen-activated protein kinase kinase 2 (MAP2K2)	1	P 814	1.02	P 832	1.82	P 1683	1.58	P 1592	1.39	P 978	0.78	P 758	1.88	P 1363
BT4 oncofetal trophoblast glycoprotein (BT4)	1	A 28	0.97	A 27	0.80	A 18	3.64	P 83	1.85	M 45	0.84	A 32	2.91	P 58
ets variant gene 5 (ets-related molecule)	1	P 182	1.64	P 249	1.58	P 288	2.03	P 371	1.68	P 220	1.18	P 214	2.40	P 324
Peripheral benzodiazepine receptor-associated protein 1 (PRAX1)	1	P 70	0.87	P 61	0.83	A 68	0.89	A 75	2.05	P 124	0.74	A 62	6.40	P 275
PUM1, FY1 protein	1	P 128	0.84	P 108	1.22	P 176	0.89	P 138	2.10	P 228	2.47	P 523	1.13	P 127
Prostate differentiation factor	1	A 32	1.20	A 38	0.84	A 30	2.18	A 82	8.28	P 146	88.79	P 2181	0.87	A 28
B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	1	P 727	0.84	P 880	0.89	P 814	0.94	P 821	1.27	P 797	2.17	P 1887	1.89	P 1282
Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	1	P 957	1.22	P 1181	1.14	P 1260	0.78	P 801	1.50	P 1016	1.89	P 2168	2.09	P 1783
Ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain) (ENC1)	1	P 823	1.17	P 808	1.00	P 800	0.40	A 284	1.00	P 480	3.34	P 2085	1.49	P 694
Small inducible cytokine A3 (homologous to mouse Mip-1a)	1	P 1043	1.14	P 1182	0.93	P 1101	0.92	P 1184	0.48	P 418	2.89	P 3148	1.34	P 1239
Phosphodiesterase 4B, cAMP-specific	1	P 98	0.84	P 82	0.82	A 89	0.87	A 79	0.84	A 45	3.88	P 427	0.89	A 8
Inhibitor of DNA binding 3	1	P 480	0.93	P 417	0.85	P 437	0.90	P 830	0.79	M 308	3.14	P 1888	0.39	A 155
Id-2H, inhibitor of DNA binding 2	1	P 202	0.86	P 114	0.83	P 102	0.48	P 117	1.38	P 242	0.70	P 166	3.89	P 645
Hypothetical protein (HSPC111)	1	P 796	0.87	P 893	0.83	P 843	0.78	P 780	0.94	P 844	0.47	P 448	0.41	P 287
ELAM-1 ligand fucosyltransferase (ELFT)	1	P 417	0.81	P 338	0.72	P 345	0.78	P 395	0.38	P 128	0.79	P 391	0.06	A 23
Centromere protein E (312kD) (CENPE)	1	P 280	0.71	P 188	0.77	P 244	0.65	A 220	0.32	P 77	0.34	A 113	1.28	P 310
pinn, desmosome associated protein	1	P 1027	0.86	P 887	1.17	P 1371	0.57	P 704	0.64	P 584	0.89	P 1091	0.41	P 374
putative N6-DNA-methyltransferase (NSAMT1)	1	P 88	0.80	P 82	0.53	A 42	0.18	A 18	0.68	A 39	0.12	A 10	0.11	A 7
KIAA0829 protein, TBP-interacting protein	1	P 829	0.88	P 829	0.94	P 686	0.69	P 370	0.63	P 232	1.03	P 373	0.48	P 285
cDNA	1	P 125	0.78	P 88	0.84	P 120	0.39	A 59	0.42	A 45	0.48	A 72	1.11	P 123
cell division cycle 27	1	P 512	0.86	P 438	0.78	P 487	0.40	P 246	0.48	P 264	0.47	P 386	0.84	P 381
secretory carrier membrane protein 1	1	P 109	0.85	P 131	0.76	P 172	0.27	P 66	0.33	A 57	0.40	P 110	0.52	P 83
U1-snRNP binding protein homolog (70kD) (U1SNRNPBP)	1	P 257	0.89	P 161	0.44	M 130	1.03	A 319	1.01	P 224	0.42	A 129	0.17	A 39
solute carrier family 18 (solute transporter), member 1	1	P 101	0.77	P 77	0.28	A 32	0.86	P 117	0.48	A 42	0.54	A 85	0.43	A 38
Procollagen C-endopeptidase enhancer 2 (PCOLCE2)	1	P 43	0.40	A 17	1.01	P 50	0.70	P 36	0.30	A 11	0.38	A 19	0.84	P 35
Transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)	1	P 39	0.44	A 17	0.53	P 23	0.82	M 38	0.39	A 13	0.28	A 12	0.74	P 23
CDP-diacylglycerol-inositol 3-phosphatidylinositolase (CDIPT)	1	P 1389	0.32	P 428	0.60	P 937	0.34	P 848	0.64	P 517	0.72	P 1173	1.14	P 1881
CUL-2 (cul-2)	1	P 62	0.86	P 41	1.02	P 73	0.38	P 28	0.30	M 18	0.43	P 32	0.51	P 28
Numb (Drosophila) homolog (NUMB)	1	P 71	1.01	P 71	0.88	P 82	0.31	M 26	0.39	M 24	0.39	A 33	0.32	A 10
MAX dimerization protein 5 (MGA)	1	P 123	0.55	P 68	0.67	A 80	0.14	A 21	0.09	A 10	0.08	A 12	0.09	A 20
Solute carrier family 11, member 2 (SLC11A2)	1	P 138	0.37	P 61	0.87	P 135	0.84	M 164	0.61	A 48	0.39	A 84	0.48	A 58
Capillary morphogenesis protein 1	1	P 33	0.42	P 14	0.28	A 11	0.80	P 24	0.42	A 12	0.49	A 20	0.54	A 18
Lymphotxin alpha (TNF superfamily, member 1) (LTA)	1	P 202	0.77	P 186	0.29	A 68	0.38	A 82	0.12	A 22	0.84	P 183	0.21	A 37
Uricarbonate transporter (BT)	1	P 97	0.48	P 48	0.44	P 49	0.37	P 43	0.30	P 26	0.42	P 48	0.88	P 48

図 4 共通性を持って変化した遺伝子を用いたクラスタリング結果

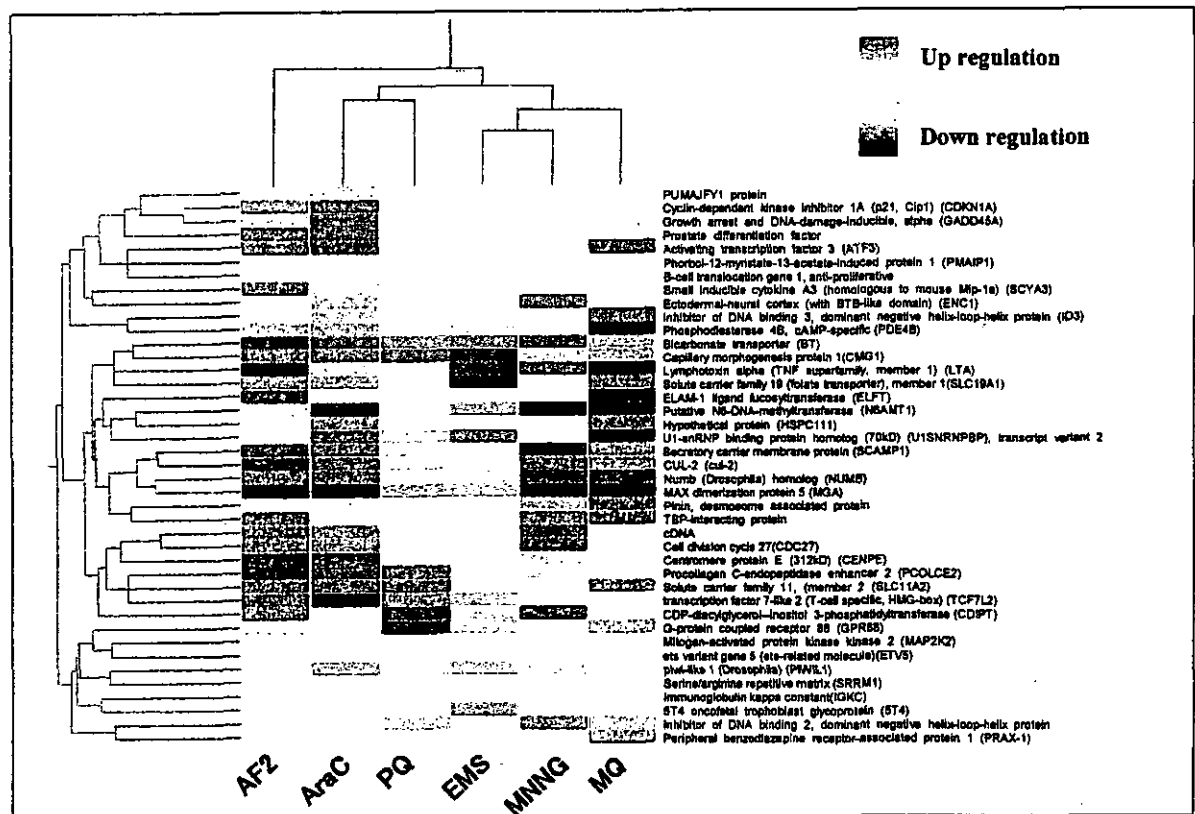


表 10 定量的 RT-PCR による確認のために選んだ遺伝子とその機能

Name of the Gene (Abbreviation)	Function
(Up regulated)	
Activating transcription factor 3 (ATF3)	Transcription factor
Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A)	Apoptosis
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)	Cell cycle regulator
Prostate differentiation factor (PDF)	Cell-cell signaling
(Down regulated)	
Capillary morphogenesis protein (CMP1)	Signal transduction
Cell division cycle (CDC27)	Metaphase/Anaphase transition
Lymphotoxin alpha (LTA)	Signal transduction
Solute carrier family (SLC11A2)	Folate transport

図 5 定量的 RT-PCR と GeneChip データの比較

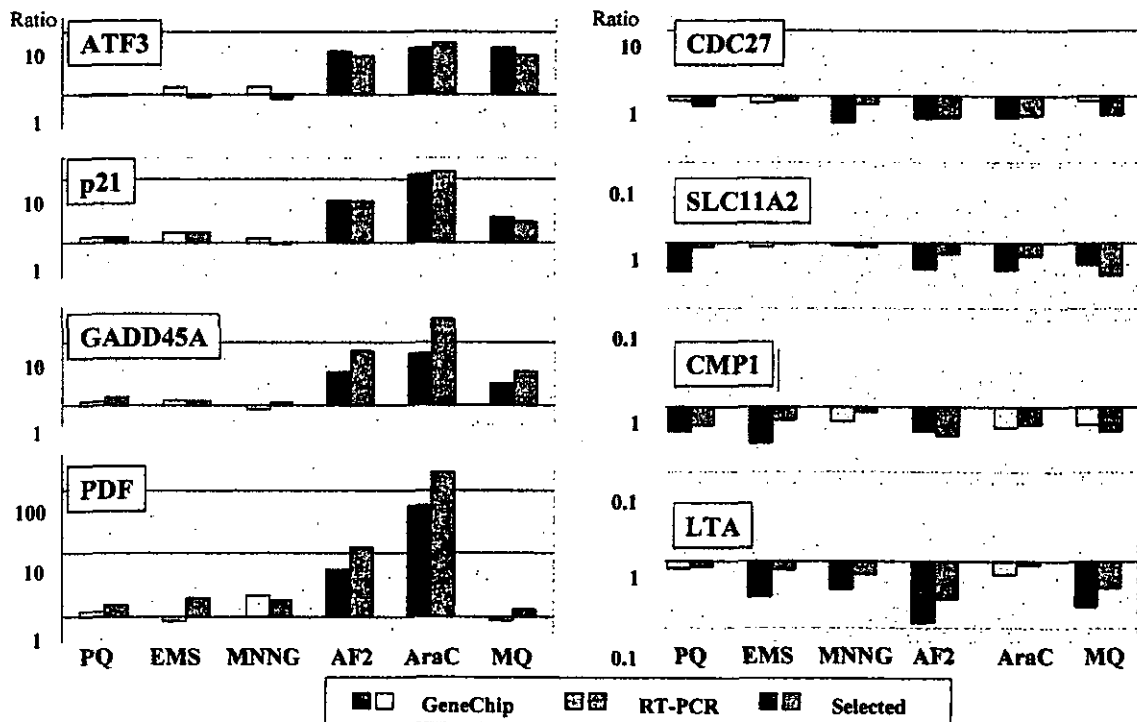


表 1 1 定量的 RT-PCR 解析に用いた遺伝子傷害性物質とその作用機所

Chemical name	Mode of action
Methylmethanesulfonate	Alkylation (methylation)
4-nitroquinoline-1-oxide	Arylation (active oxygen?)
Potassium bromide	Active oxygen
Mitomycin C	DNA cross-linking
Bleomycin	Active oxygen
Chrorambucyl	DNA cross-linking
Colchicin	Spindle poison
ICR 191	Intercalation
Camptotecin	Topoisomerase I inhibitor
Ethylnitrosourea	Alkylation (ethylation)
Etoposide	Topoisomerase II inhibitor
Cis-platin	DNA cross-linking
Dinitropyrine	Arylation