

厚生労働科学研究費補助金
萌芽的先端医療技術推進研究事業

組換え胎盤培養細胞を用いた新規作用を有する化合物の
スクリーニングシステムの構築および核内受容体の同定

(H14-トキシコ-013)

平成 16 (2004) 年度 総括研究報告書

主任研究者 大迫 誠一郎

(独立行政法人国立環境研究所環境健康研究領域 主任研究員)

平成 17 (2005) 年 3 月 31 日

研究課題名 : 組換え胎盤培養細胞を用いた新規作用を有する化合物のスクリーニングシステムの構築および核内受容体の同定

研究費の名称 : 厚生労働科学研究費補助金

研究事業名 : 萌芽的先端医療技術推進研究事業

国庫補助金精算所要額 : 4,500,000 円

研究期間 : 平成 14 (2002) 年度～平成 16 (2004) 年度

主任研究者名 : 大迫 誠一郎

分担研究者名 :

目次

I. 総括研究報告書

A. 研究目的	-----	5
B. 研究方法	-----	8
C. 研究結果と考察	-----	10
D. 結論	-----	12
図	-----	13
E. 参考文献	-----	20
F. 健康危機情報	-----	21
G. 研究発表	-----	21
H. 知的所有権の取得状況	-----	22

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

総括研究報告書

組換え胎盤培養細胞を用いた新規作用を有する化合物のスクリーニング
システムの構築および核内受容体の同定

主任研究者 大迫 誠一郎 独立行政法人国立環境研究所 主任研究員

研究要旨

本研究では、ラット胎盤由来の Rcho-1 細胞を用い、分化に影響をおよぼす化合物ならびに新規核内受容体を明らかにすることを目的とする。初年度の解析から、先ず Rcho-1 細胞はエストロジェン (E2) に対して不応性かつ E2 受容体 (ER) が発現していないことを明らかにした。さらに、P450 側鎖切断 (P450sc) 酵素のプロモーターを用いたリポーター遺伝子アッセイを利用して、27 種の化合物について分化に及ぼす影響を検討した。その結果、とくにレチノイン酸 (RA)、Diethylstilbestrol (DES)、ICI182,780 (ICI)、Carbaryl, フタル酸類や Permethrin が Rcho-1 細胞の分化に影響を与えることを見出した。

本年度では、RA、DES、ICI、Carbaryl、化合物によって特異的な細胞内分布を呈するタンパク質の同定を 2 次元電気泳動法と LC-ESI-MS/MS 解析を用いることで行った。RA、DES、ICI、Carbaryl とともに核内でコンテンツの変動するスポットが数種発見できたが、特異的に発現または消失するものは見いだせなかった。分化促進に関連すると考えられる核内因子の分離を行うため、最も分化促進効果のあった Carbaryl の処理サンプルからコンテンツの上昇したタンパクの同定を行ったところ、Nuclear RNA helicase ファミリーなどが検出された。

A. 研究目的

近年、医薬品候補化合物などは膨大な数にのぼり、これらのほとんどはエストロゲン受容体 (ER) やアンドロゲン受容体 (AR)、甲状腺ホルモン受容体 (TR) 等のいわゆる核内受容体との相互作用が考えられている。特にエストロゲン (E2) 様あるいは抗 E2 様の作用を有すると考えられている医薬品化合物は、避妊や乳癌治療等を含め多岐にわたり応用性が考えられている。これら E2 様の化合物の有害性を見分けるために、ER を介したリポーター遺伝子アッセイシステム等を用いて、簡便に安全性が評価されている。

しかし、これらの化合物は ER を介して作用を発揮するだけではないことが近年の研究から示唆されている。Diethylstilbestrol (DES) は、従来 ER とのみ相互作用すると考えられていたが、リガンドが不明な核内受容体 (オーファン受容体) である Estrogen receptor-related orphan receptor beta (ERR β) に結合し、胎盤の幹細胞である Trophoblast stem (TS) 細胞の分化を変調させることが

明らかにされた (Tremblay *et al.*, 2001)。かつて流産防止薬として使用された DES は、実際は流産を増加させ、胎児への悪影響を誘起することが判明し使用中止となった経緯をもつ。この流産増加の原因がオーファン受容体を活性化したためと考えられている。このことから ER と相互作用すると考えられている化合物も、従来の ER との作用を検討するだけでは不十分であり、新たな核内受容体との相互作用を想定する必要性が示された。今日、オーファン受容体の研究は、新たな薬剤を発見する可能性があることから、創薬研究の一角をなしている。また、E2 様の作用を有すると考えられている化合物の安全基準を定める上でも、既知の受容体を対象とするだけでなく、オーファン受容体を含めた反応系を考慮に入れた解析が必要と思われる。

本研究では、Rcho-1 細胞を用いて、このような新規核内受容体の同定を介した作用メカニズムの解明を目指す。Rcho-1 細胞はラット胎盤の迷路部から樹立された細胞株である (Faria *et al.*, 1991)。分化能を有しており未分化細胞から巨核を有する巨細胞に

分化を誘導することができる。ラットの胎盤から分泌されるプロラクチンファミリーは Rcho-1 細胞においても分化依存的に発現が誘導されることが知られている (Hamlin *et al.*, 1994)。その発現様式が胎盤の各妊娠ステージのそれと類似していることから、*in vivo* の性質を反映している細胞株として知られている。DES が ERR の結合により分化に影響を与えることが明らかにされた細胞は、TS 細胞である。TS 細胞は胎盤細胞の全能細胞である (Tanaka *et al.*, 1998)。TS 細胞も同様に培養条件下で巨核細胞に分化し、分化依存的にプロラクチンファミリーを分泌する。このことから Rcho-1 細胞は全能性を有さないものの TS 細胞とほぼ同じ遺伝子サブセットを有していると考えられる。胎盤細胞が生理活性物質の宝庫ともいえる一面を有していること、また TS 細胞を用いて ERR の存在が発見された実績を有すること、また TS 細胞よりも取り扱いが簡便である利点から、Rcho-1 細胞は、新規核内受容体を探索するには最良の細胞株であると考えられる。本研究では Rcho-1 細胞を用いて、細胞の分化を指標に影響のある化合

物を選別していくという独特のスクリーニングシステムを用いる。

本研究では、先ず ER が発現していない胎盤の培養細胞 (Rcho-1) を用いて、様々な化合物をその作用様式により細分類化できるスクリーニングシステムの構築を行う。第一年次において、ルシフェラーゼ (Luc) を利用し細胞の分化を簡易に検出できる組換え Rcho-1 細胞の構築を行い、一度に多くの化合物を対照とし、分化に影響を与える化合物の選定を行う。第二年次では、選定された化合物において DNA マイクロアレイ法を用いて特異的に誘導される遺伝子を明らかにする。遺伝子の発現変化のパターンをもとに、どの化合物が類似したメカニズムを介して作用しているのかを明らかにする。第三年次では、化合物に結合した核内受容体の多くは細胞内分布を変化させるという性質に着目して研究を行う。Rcho-1 細胞の核タンパクを二次元電気泳動法により分離し、化合物によって特異的な細胞内分布を呈するタンパク質の同定を行う。当初の計画では、第三年次にはアフィニティークロマトグラフィー法や共鳴プラズモン

相互作用解析を用いて新規核内受容体の同定を行う予定であったが、研究方法の変更の理由は、本研究の主旨にのっとりかつ確実にデータを得られる研究の展開を行うためである。

初年度の平成 14 年度には、Rcho-1 細胞の分化に影響を与える化合物の選定を行った。先ず組換え Rcho-1 細胞を樹立する目的で、ゲノミックウォーカー(クローンテック社)を用いて P450scc のプロモーター配列をクローニングし、それぞれ GFP のベクターである pEGFP(クローンテック社)および Luc のベクターである pGL3(プロメガ社)に組み込んだ。これらの組換えプラスミドを Rcho-1 に形質導入し、Rcho-1 の分化の測定に可能かどうかを検討した。その結果、P450scc が組み込まれた pGL3(P450scc-Luc)が、Rcho-1 細胞の分化を鋭敏に捉えられることが明らかとなった。次に Rcho-1 細胞には ER が発現していないことを明らかにした。まず RT-PCR 法により Rcho-1 細胞には ER が発現していないことを確認した。次に P450scc-Luc を Rcho-1 細胞に形質導入し、そこから様々な化合物を 6 日間曝露し続け

た後、プロモーターの活性を測定した。DMSO 溶媒液に比べ、10 nM のエストラジオール(E2)では影響は見られず、不応答性であることを確認した。Rcho-1 細胞はレチノイン酸 (RA) によって分化が誘導されることが知られているが、P450scc プロモーター活性を用いて分化の促進を調べると、RA によって約 2 倍上昇していることが確認された。同様に、この系を用いて様々な化合物の影響を調べた。人工の化合物として、ジェチルスチルベストロール (DES)、タモキシフェン (Tam)、ICI182,780 (ICI) を、工業過程で生産される化合物として、フタル酸類である DEP、DBP、DPP、DOP、DINP、DCHP、BBP を、フェニルフェノール類である 2-PP、3-PP、4-PP を、また E2 様の作用を有すると考えられているビスフェノール A (BPA)、オクチルフェノール (OP)、ノニルフェノール(NP)を、農薬として 2,4-D、TCTP、DCPA、PBO を、殺虫剤として Carbaryl、Benomyl、Permethrin を用いた。その結果、DES、ICI、Carbaryl、フタル酸類や Permethrin が Rcho-1 細胞の分化に影響を与えることが明らかとなった。

本年度（平成 16 年度）は、化合物の中でも、RA、DES、ICI、Carbaryl を用い、プロテオミクス解析により核内で変動するタンパクの同定を行う。RA は、レチノイン酸受容体を介して、Rcho-1 細胞の分化を誘導することが明らかとなっている。また DES は、ERR 受容体を介することが明らかとなっている。プロテオミクス手法を通して核内コンテンツの変動するタンパクを解析することにより、新規受容体タンパクの候補同定を試みた。

B. 研究方法

Rcho-1 細胞の培養

Rcho-1 細胞の培養は、基本的に以前の報告（Faria et al., 1991; Ishimura et al., 2001）に従った。20% heat-inactivated fetal bovine serum（FBS）を含む NCTC-135（Sigma Chemical, St. Louis, MO）、pH7.2（50 μ M 2-mercaptoethanol、1 mM sodium pyruvate、100U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin）で、95% air-5% CO₂、37°Cの湿気条件下で

培養した。細胞は 2 日に 1 度継代し、100 mm のディッシュ（Nunc Brand Products, Roskilde, Denmark）で、10 ml のメディアウム、10⁴/100 mm の細胞密度条件で維持した。分化を誘導する際には、10⁶/100 mm（Nunc ディッシュ）または 1 x から 3.5 x 10⁴/10 mm（Falcon 24 ウェルプレート）の細胞密度になるようにまき、この日を分化後 0 日目（d0）と定めた。

化合物の曝露

本研究で用いた化合物は、RA, Retinoic acid; DES, Diethylstilbestrol; ICI, ICI182,780; Carbaryl である。それぞれの化合物は、DMSO に 20 mM になるように融解し、それを 2000 倍希釈になるように培地に添加し最終濃度が 10 μ M になるようにして 7 日間曝露した。

核抽出液の調整

各細胞の核内タンパク分画は NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents（PIERCE, Woburn, MA）を用いて精製した。下記の操作は、すべて氷上でおこなった。

まず、回収した細胞を 500 x g で 3 分間遠心し、上清を取り除いた後 500 µl の Cytoplasmic Extraction Reagent I を添加した。さらに 27.5 µl の Cytoplasmic Extraction Reagent II を添加・混和し、16,000 x g で遠心した。直ちに上清を取り除き、250 µl の Nuclear Extraction Reagent を添加、40 分間放置した。サンプルを 16,000 x g で遠心し、その上清を 2D/E の試料とした。

2次元電気泳動

各化合物 (DMSO、RA、ICI、Carbaryl) を曝露した Rcho-1 細胞の核内タンパク質 80 µg を 9.9 M 尿素 (和光純薬工業、大阪、日本)、4 % Triton X-100、2.2 % ampholytes (pH3-11) (Genomic Solutions, Inc., Ann Arbor, MI) および 100 mM DTT を含む溶液に溶解し、全てのサンプルは同時に泳動展開をおこなった。まず、9.5 M 尿素、2 % Triton X-100、4.1 % アクリルアミドおよび 5 mM ampholytes を含む溶液に 10 % APS を加えて重合反応させた 1次元ゲル(長さ:260 mm、直径:1.2 mm) に各サンプルを 35 µl ずつ装填した。2D/E システム (Genomic Solutions

Inc.) を使い、室温、1000V で 17 時間、さらに 2000V で 30 分間泳動をおこなった。1次元終了後、ゲルを取り出し 3 ml の平衡化バッファー (0.3 M Tris-HCl (pH 6.8)、3.0% SDS、50 mM DTT、0.01%プロモフェノールブルー) 中に 2 分間静置した。各 1D サンプルを 11%の SDS/ポリアクリルアミドゲル (220 x 220 x 1 mm) に装填し、20°C、500V で 3 時間半泳動を行った。2次元電気泳動終了後、ゲルは 40%メタノールおよび 10%酢酸を含む溶液にて固定し、タンパク質のスポットは銀染色キット (和光純薬工業、大阪) を用いて検出した。

タンパクの同定

2次元電気泳動によりコンテンツの変動したスポットタンパクの同定を行うため、Electrospray ionization (ESI) 法による MS/MS 解析を行った。上記 2次元電気泳動で処理したサンプルと同一のものを、同様に 2次元電気泳動で展開し、グルタルアルデヒド非処理による銀染色を施した。得られた標的スポットをくり抜き、トリプシン処理した。このサンプルを LC-nanoESI-MS/MS

解析に供し、検索エンジン Mascot (Matrix Science 社製) による MS/MS イオンサーチでデータベース検索を行いタンパクの同定を行った。

C. 研究結果と考察

Rcho-1 細胞は、培養日数が進むに従って細胞のサイズが拡張し、巨核を有する巨細胞に分化する。初年度の解析で、リアルタイム PCR 法により胎盤性ラクトジェン-I (PL-I) および P450scc の発現量の増加倍率を測定したところ、PL-I は培養 0 日目に比べ培養 12 日目では約 160 倍に、P450scc は約 2500 倍に発現量が増加した。従って、P450scc を分化マーカーのプロモーターとして利用することとした。次にエストロゲン様活性あるいはエストロゲンアンタゴニスト様活性をもつとされる複数の化合物 (27 種) を使用し、P450scc のプロモーターを利用したルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。そのうち、DES, ICI, BBP, DBP, Permethrin は Rcho-1 の分化を抑制する

ことが、レポーターアッセイならびにミニアレイ解析で明らかとなった。また、RA, 3-PP, 4-PP, Carbaryl は分化を促進する傾向があった。

今年度はこの上記影響のあった DES, ICI, RA, Carbaryl 曝露サンプルの核抽出液を調整し、2次元電気泳動により DMSO 処理サンプルとの比較から核内で特異的に変動するタンパクのスポット解析を行った。その結果、陽性対象として使用した RA ならびに DES でコンテンツの変動するスポットは複数見いだされたが (図 2、図 3)、対照群 (DMSO) と比較して明らかに特異的に発現または消失するスポットは見いだされなかった (図 1)。この原因として、使用した核抽出液の精度が依然サイトゾルのコンタミネーションを含んでいることが考えられた。この点を改良するためには、Rcho-1 細胞からの核抽出液回収に関して独自のプロトコルを確立する必要があると思われる。

一方、ICI はエストロゲンのピュアアンタゴニストであり、ER の発現していない Rcho-1 細胞では何らの反応性も示さないこ

とが期待されたが、初年度のレポータージーンアッセイの結果、分化を抑制する作用があることがわかった。この ICI 処理による核抽出液のスポット解析では、RA や DES に比べ数多くのコンテントの変動するスポットが見いだされた (図 4)。

また、逆に分化を促進することが明らかとなった Carbaryl でもいくつかの変動するスポットが見いだされた (図 5)。Carbaryl はヒト乳腺ガン細胞でエストロゲン作用を抑制することが知られている (Klotz *et al.*, 1997)。Rcho-1 細胞で分化の促進効果が見られたことは、この化合物の ER 以外の標的が存在することを示唆している。また、Carbaryl は薬物代謝酵素第 1 相酵素のシトクローム P450 1A1 (CYP1A1) の誘導を促進することが知られている (Denison *et al.*, 1998)。CYP1A1 の誘導は転写因子であるアリールハイドロカーボン受容体 (AhR) との相互作用をトリガーに生じるが、Carbaryl の標的分子はこのような核内受容体である可能性が高い。そこで、Carbaryl 処理による核内コンテントの上昇するスポット 4 種 (図 5) を LC-ESI-MS/MS 解析した。その

結果、Nuclear RNA helicase ファミリーの内まだ機能の明らかでない Nuclear RNA helicase, DECD variant of DEAD box family (Benbank accession#: BC086328) (図 6、図 7) ならびに Neuronal differentiation related gene (Benbank accession #: NM_139333) が核内分布を示す遺伝子として同定された。他の 2 種は Tubulin ファミリー (Tubulin alpha 1) であった。このチューブリンのコンタミネーションは、metaphase の Rcho-1 の分裂装置由来と考えられる。

ラットの Nuclear RNA helicase, DECD variant of DEAD box family は Strausberg らにより報告された NIH の哺乳類ゲノムコレクション (MGC) における完全長 cDNA サンプル内で報告された機能未知のタンパクである (Strausberg *et al.*, 2002)。Nuclear RNA helicase は、転写後調節のみならず転写自体にも作用を持つ核内分子としてその多機能性が論じられている (Bleoo *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002)。今回我々が発見した Rcho-1 細胞における Carbaryl によるこのタンパクの変動は細胞の分化においてこのタンパクが何らかの作用を持つことを意味し

ているかもしれない。Neuronal differentiation related gene に関しては何ら機能が報告されていない。

今回、我々は Rcho-1 細胞の分化を促進する化合物として Carbaryl を用いたプロテオーム解析を行ったが、解析したスポット数に限界があり、期待された核内移行性のオーファン受容体あるいは AhR 等は見いだされなかった。しかし、検出された機能未知の 2 種のタンパクはともに細胞の分化や転写に何らかの機能を持つことが予想されるタンパクで今後のその相互作用分子を Two-hybrid 法などにより解析することが重要と考えられる。

D. 結論

本研究では、エストロゲン受容体を発現していない胎盤巨細胞の幹細胞である Rcho-1 細胞を用いた新規作用を有する化合物のスクリーニングシステムの構築を行った。構築したレポーター遺伝子アッセイ系により、Rcho-1 細胞の分化を抑制あるいは

促進する作用のある化合物をスクリーニングできた。特にその作用部位が不明である Carbaryl を用いて、分化促進に関連すると考えられる核内因子の同定をプロテオームにより解析したところ、Nuclear RNA helicase ファミリーなどが検出された。Carbaryl は最も分化促進効果をもつ化合物であったが、この化合物暴露により Nuclear RNA helicase ファミリーがなぜ核内コンテントを増加させたのか、Two-hybrid 法などによるスクリーニングで共役因子を同定する必要がある。

DMSO

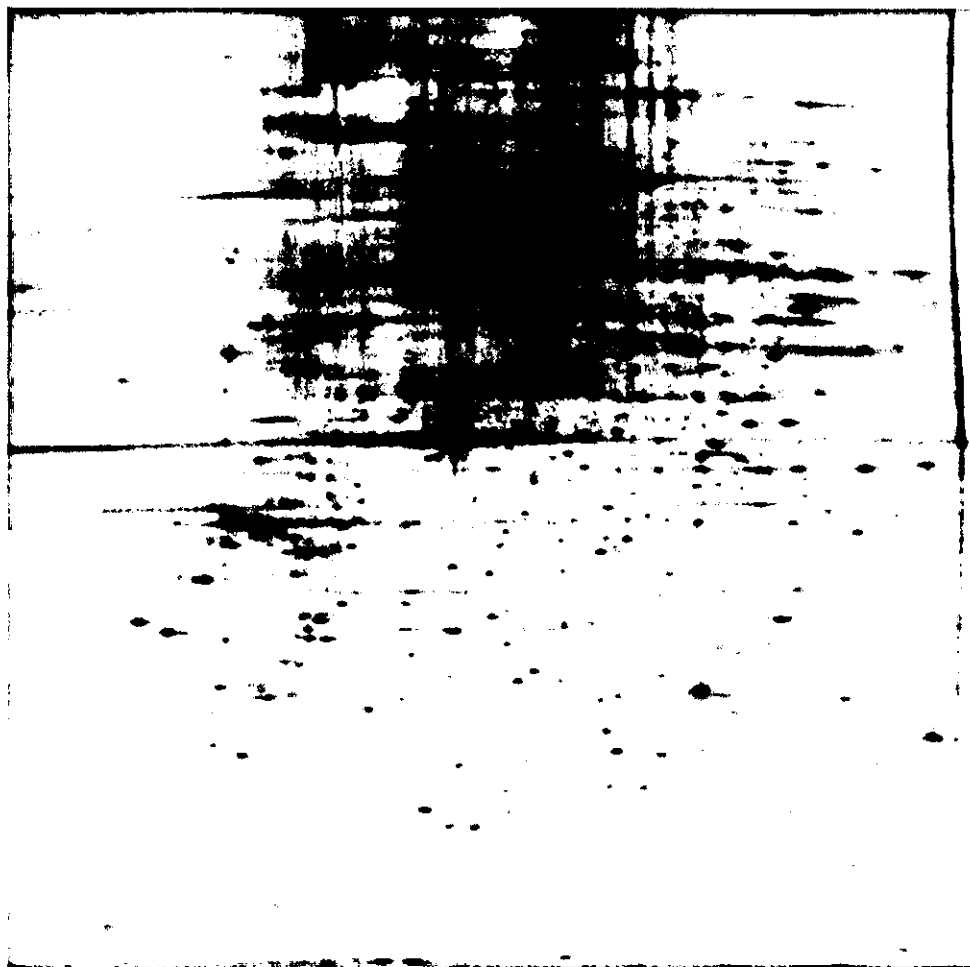


図1

Rcho-1 細胞核抽出液の2次元電気泳動像(DMSO処理:対照群)。Rcho-1細胞をDMSOを含む培養液で培養し、その核抽出液を展開、銀染色した。

Retinoic acid

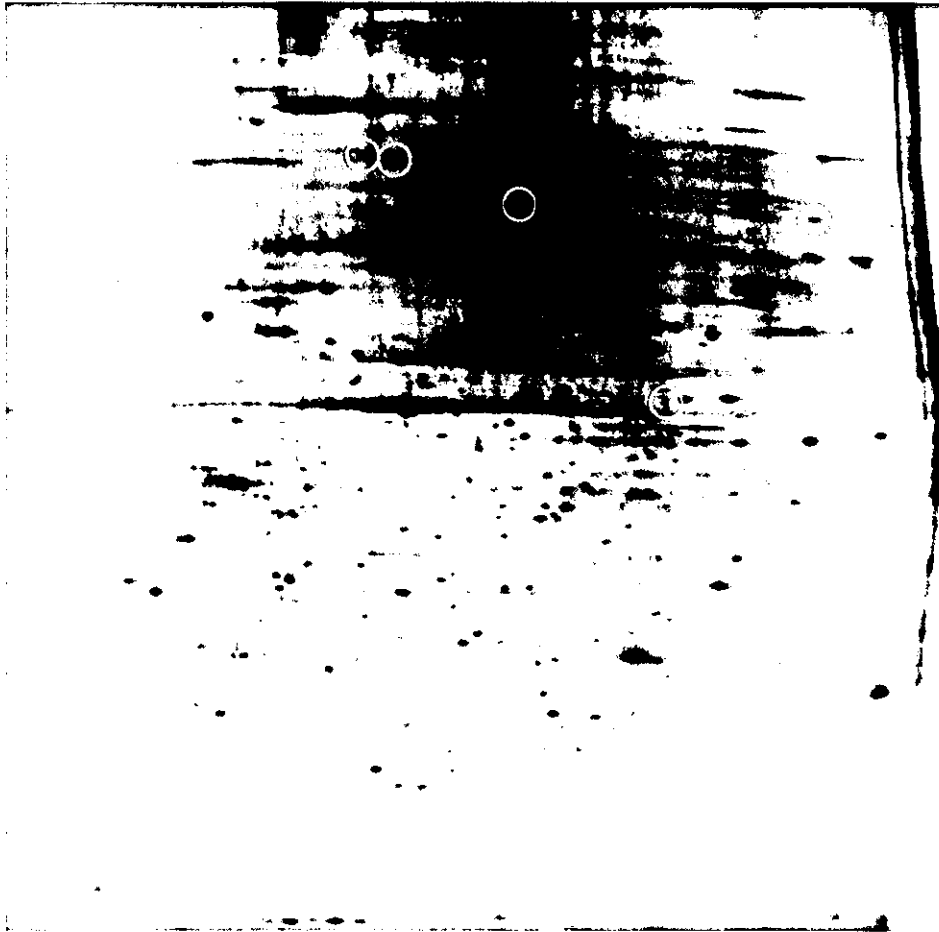


図2

Rcho-1細胞核抽出液の2次元電気泳動像(RA処理)。Rcho-1細胞をRetinoic acidを含む培養液で培養し、その核抽出液を展開、銀染色した。赤○は対照群に比べて有意にコンテンツの上昇したスポットを示す。

Diethylstilbestrol

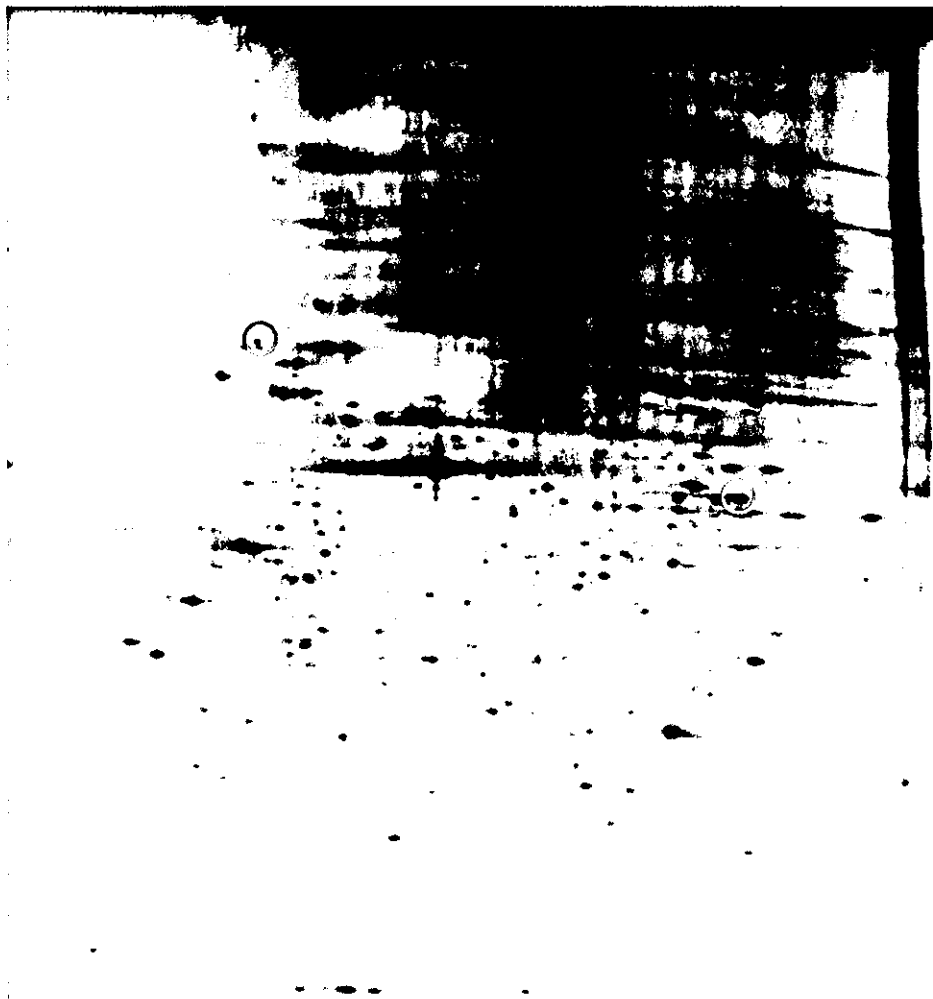


図3

Rcho-1 細胞核抽出液の2次元電気泳動像 (DES処理)。Rcho-1細胞をDESを含む培養液で培養し、その核抽出液を展開、銀染色した。赤○は対照群に比べて有意にコンテンツの上昇したスポットを示す。

ICI182780

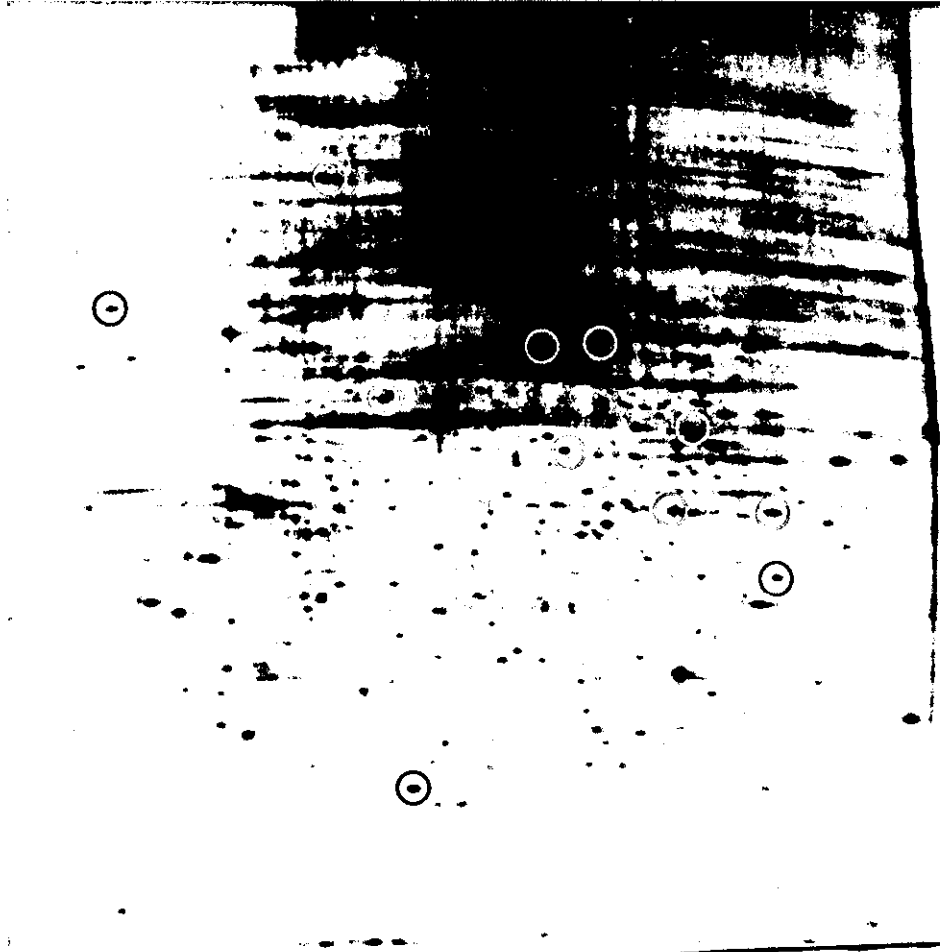


図4

Rcho-1 細胞核抽出液の2次元電気泳動像(ICI処理)。Rcho-1細胞をICIを含む培養液で培養し、その核抽出液を展開、銀染色した。赤○は対照群に比べて有意にコンテンツの上昇したスポットを示す。

Carbaryl

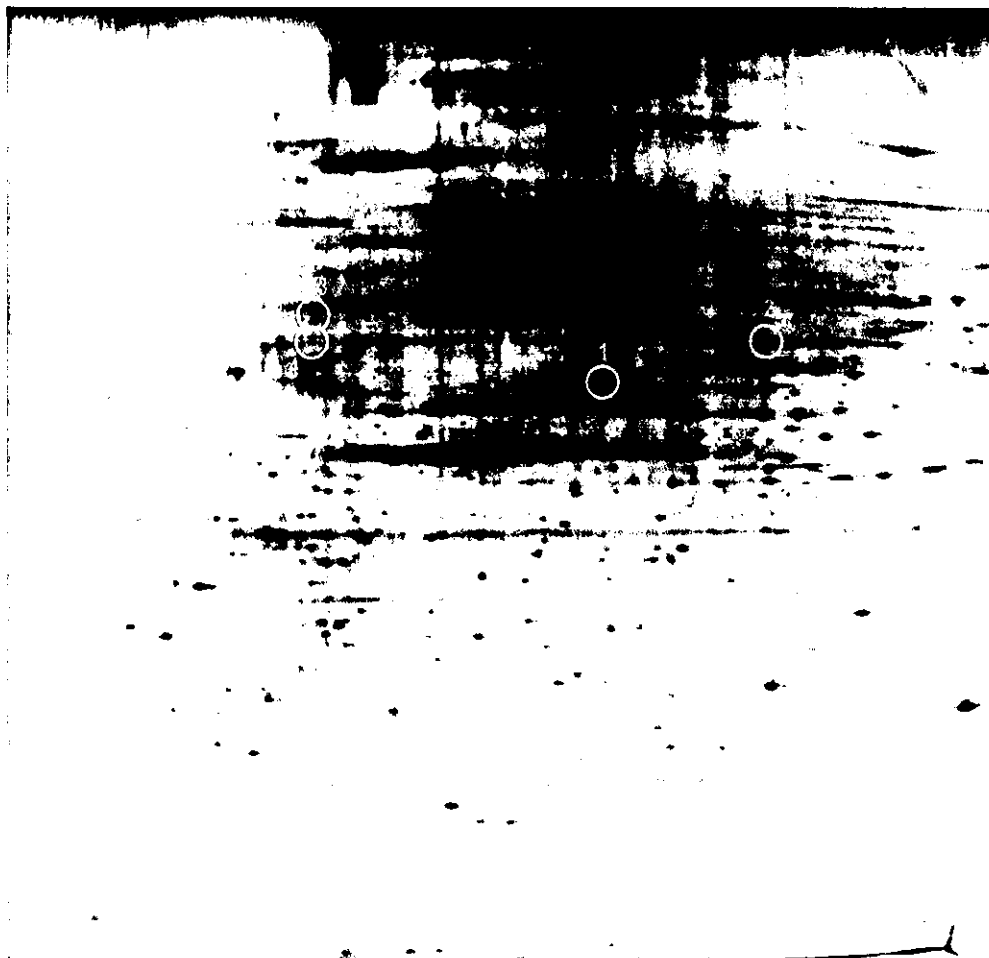
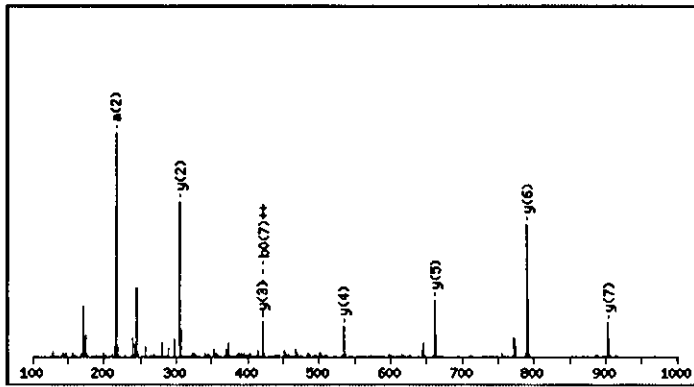


図5

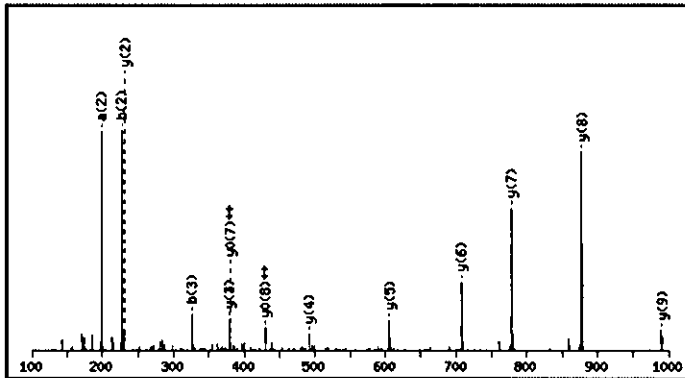
Rcho-1 細胞核抽出液の2次元電気泳動像 (Carbaryl処理)。Rcho-1細胞を Carbarylを含む培養液で培養し、その核抽出液を展開、銀染色した。赤○は対照群に比べて有意にコンテンツの上昇したスポットを示す。プロテオミクス解析に供したスポットの番号を付加した。

A



#	a	a ⁺⁺	b	b ⁺⁺	b ⁺	b ⁺⁺⁺	b ⁰	b ⁰⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y ⁺	y ⁺⁺⁺	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#
1	104.05	52.53	132.05	66.53					M							8
2	217.14	109.07	245.13	123.07					L	904.46	452.73	887.43	444.22	886.45	443.73	7
3	346.18	173.59	374.17	187.59			356.16	178.59	E	791.37	396.19	774.35	387.68	773.36	387.18	6
4	474.24	237.62	502.23	251.62	485.21	243.11	484.22	242.62	Q	662.33	331.67	645.30	323.16	644.32	322.66	5
5	587.32	294.17	615.32	308.16	598.29	299.65	597.31	299.16	L	534.27	267.64	517.24	259.13	516.26	258.63	4
6	702.35	351.68	730.34	365.68	713.32	357.16	712.33	356.67	D	421.19	211.10	404.16	202.58	403.18	202.09	3
7	833.39	417.20	861.39	431.20	844.36	422.68	843.37	422.19	M	306.16	153.58	289.13	145.07			2
8									R	175.12	88.06	158.09	79.55			1

B



#	a	a ⁺⁺	b	b ⁺⁺	b ⁺	b ⁺⁺⁺	b ⁰	b ⁰⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y ⁺	y ⁺⁺⁺	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#
1	86.10	43.55	114.09	57.55					I							10
2	199.18	100.09	227.18	114.09					L	990.57	495.79	973.55	487.28	972.56	486.79	9
3	298.25	149.63	326.24	163.63					V	877.49	439.25	860.46	430.74	859.48	430.24	8
4	369.29	185.15	397.28	199.14					A	778.42	389.71	761.39	381.20	760.41	380.71	7
5	470.33	235.67	498.33	249.67			480.32	240.66	T	707.38	354.20	690.36	345.68	689.37	345.19	6
6	584.38	292.69	612.37	306.69	595.35	298.18	594.36	297.68	N	606.34	303.67	589.31	295.16			5
7	697.46	349.23	725.46	363.23	708.43	354.72	707.45	354.23	L	492.29	246.65	475.27	238.14			4
8	844.53	422.77	872.52	436.77	855.50	428.25	854.51	427.76	F	379.21	190.11	362.18	181.60			3
9	901.55	451.28	929.55	465.28	912.52	456.76	911.54	456.27	G	232.14	116.57	215.11	108.06			2
10									R	175.12	88.06	158.09	79.55			1

図6

Rcho-1 細胞核抽出液 (Carbaryl処理) に見られたスポット1のLC-MS/MS解析結果 (ペプチドビュー)。Q-TOF解析によるペプチド断片2種のMS/MSスペクトルとイオンスコア (a, b, yシリーズ)、ならびに決定されたアミノ酸配列を示した。

Protein View

Match to: **gi|55562871**; Score: 307

Nuclear RNA helicase, DECD variant of DEAD box family [Rattus norvegicus]

Found in search of \\Qug\spro2.PRO\OutputESI\p105030902.pk1

Nominal mass (M_r): 49078; Calculated pI value: 5.46

NCBI BLAST search of **gi|55562871** against nr

Unformatted sequence string for pasting into other applications

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:

gi|55926219 (no taxonomy information for this entry)

Variable modifications: Acetyl (N-term), Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: 16%

Matched peptides shown in Bold Red

1 MAEQVVENEL LDYDEDEEPO VPQESTPAPP KKDVKGSYVS IHSSGFRDFL
51 LKPELLRAIV DCGFEHPSEV QHECIPOAIL GMDVLCQAKS GMGKTAVFVL
101 ATLQIEPIN GQSVILVMCH TRELAFQISK EYERFSKYMP SVKVSVFFGG
151 LSIKKDEDVL KKNCPHVVVG TPGRILALVR SRSLNLRNVK HFVLDECDKM
201 LEQLDMRRDV QEIFRLPHE KQCMMSATL SKEIRPVCRK FMQDPMEVFV
251 DDEIKLTLHG LCQYYVKLKD SEKNRKLFDL LDVLEFNQVV IFVKSQRCM
301 ALAQLLVEQN FPAIAHRGM AQEERLSRYQ QFKDFQRRIL VATNLFGRGM
351 DIERVNIVFN YDMPEDSDTY LHRVARAGRF GTKGLAVTFV SDENDAKILN
401 DWQDRFEVNV AELPEEIDIS TYIEQSR

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
48 - 57	622.35	1242.69	1242.73	-0.05	0	DPELLKPELLR (Ions score 30)
123 - 130	468.25	934.48	934.51	-0.03	0	ELAFQISK (Ions score 34)
200 - 207	518.23	1034.45	1034.49	-0.04	0	MLEQLDMR (Ions score 54)
209 - 215	453.72	905.42	905.46	-0.04	0	DVQEIFR (Ions score 32)
256 - 267	488.25	1461.73	1461.80	-0.07	0	LTLHGLCOYYVK (Ions score 46)
339 - 348	552.31	1102.60	1102.65	-0.05	0	ILVATNLFGR (Ions score 67)
384 - 397	733.34	1464.67	1464.71	-0.04	0	GLAVTFVSDENDAK (Ions score 43)

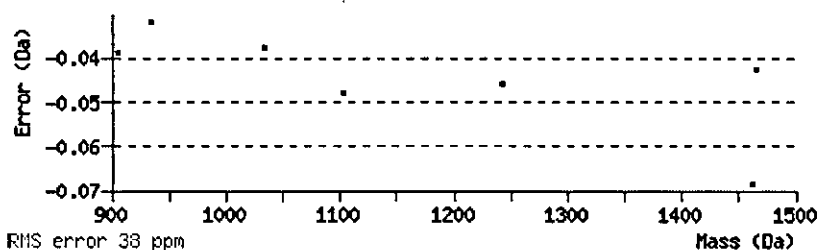


図7

Rcho-1 細胞核抽出液 (Carbaryl処理)に見られた誘導性スポット1のnanoLC-MS/MS解析のMascot検索結果(タンパクビュー)。最大スコアを示したタンパクとして Nuclear RNA helicaseファミリーがラットデータベースにより検索された。分子量、等電点ともに2次元電気泳動スポット情報と一致していた。得られたペプチド断片シーケンスが赤で示されている。

E. 参考文献

1. Tremblay, G. B., Kunath, T., Bergeron, D., Lapointe, L., Champigny, C., Bader, J. A., Rossant, J., and Giguere, V. Diethylstilbestrol regulates trophoblast stem cell differentiation as a ligand of orphan nuclear receptor ERR beta. *Genes Dev* 15, 833-838, (2001).
2. Faria, T. N., and Soares, M. J. Trophoblast cell differentiation: establishment, characterization, and modulation of a rat trophoblast cell line expressing members of the placental prolactin family. *Endocrinology* 129, 2895-2906, (1991).
3. Hamlin, G. P., Lu, X. J., Roby, K. F., and Soares, M. J. Recapitulation of the pathway for trophoblast giant cell differentiation in vitro: stage-specific expression of members of the prolactin gene family. *Endocrinology* 134, 2390-2396, (1994).
4. Tanaka, S., Kunath, T., Hadjantonakis, A. K., Nagy, A., and Rossant, J. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 282, 2072-2075, (1998).
5. Ishimura, R., Yoshida, K., Kimura, H., Dohmae, N., Takio, K., Ogawa, T., Tanaka, S., and Shiota, K. Stage-specific modification of G protein beta subunits in rat placenta. *Mol Cell Endocrinol* 174, 77-89, (2001).
6. Klotz DM, Arnold SF, McLachlan JA. Inhibition of 17 beta-estradiol and progesterone activity in human breast and endometrial cancer cells by carbamate insecticides. *Life Sci* 60, 1467-1475, (1997).
7. Denison MS, Phelan D, Winter GM, Ziccardi MH. Carbaryl, a carbamate insecticide, is a ligand for the hepatic Ah (dioxin) receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 152, 406-414, (1998).
8. Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF,