

受容体を介して反応するが、この結果は、他の化合物による反応がレチノイン酸受容体を介していない可能性を示唆している。図 13 には、化合物の投与により発現量の変化した遺伝子を発現変化の大きい遺伝子からリストアップした。ここでは、ICI により発現変化をするものを中心に示し、ICI 以外の RA、DES、Carbaryl、Permethrin の化合物により発現変化をする遺伝子を併記した。また、各化合物における遺伝子発現のクラスタリング解析を行ったところ、ICI と Carbaryl は、類似した発現パターンを示すことが明らかとなり、DES および RA のパターンとは異なることが示された(図 14)。

プロテオーム解析

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 16、図 17)、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 15)。この原因として、使用した核抽出液の精度が悪く、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ツの変動するスポットが見いだされた(図 18)。また、逆に分化を促進することがレポータージーンアッセイで明らかとなった Carbaryl でもいくつかの変動するスポットが見いだされた(図 19)。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ヒ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ツの上昇するスポット4種(図 19)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 20、図 21) 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。

まとめ

本研究課題においては、依然内因性リガンド未知のオーファン受容体である ERR β の生理作用部位として確認された胎盤由来細胞である Rcho-1 細胞を用いて、未知の生理活性物質ならびに新規受容体の単離を試みるべく、スクリーニングシステムのためのレポータージーンアッセイ系 (P450_{scc}-Luc) を確立した。このシステムは迅速に化合物の作用をスクリーニングできることが確認された。また、使用した活性を持つ化合物 (RA, DES, ICI, Carbaryl) を用いて、遺伝子発現プロファイルならびに核内でコンテンツの変動するタンパクのプロテオーム解析を実施した。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実施したところ、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ツを増加させたのか、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。新規受容体の分離には今後さらにアッセイ系の改変が必要であると思われる。

D. 結論

本研究では、エストロゲン受容体 (ER α , ER β) 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 (P450scc-Luc) 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することが可能であることがわかった。

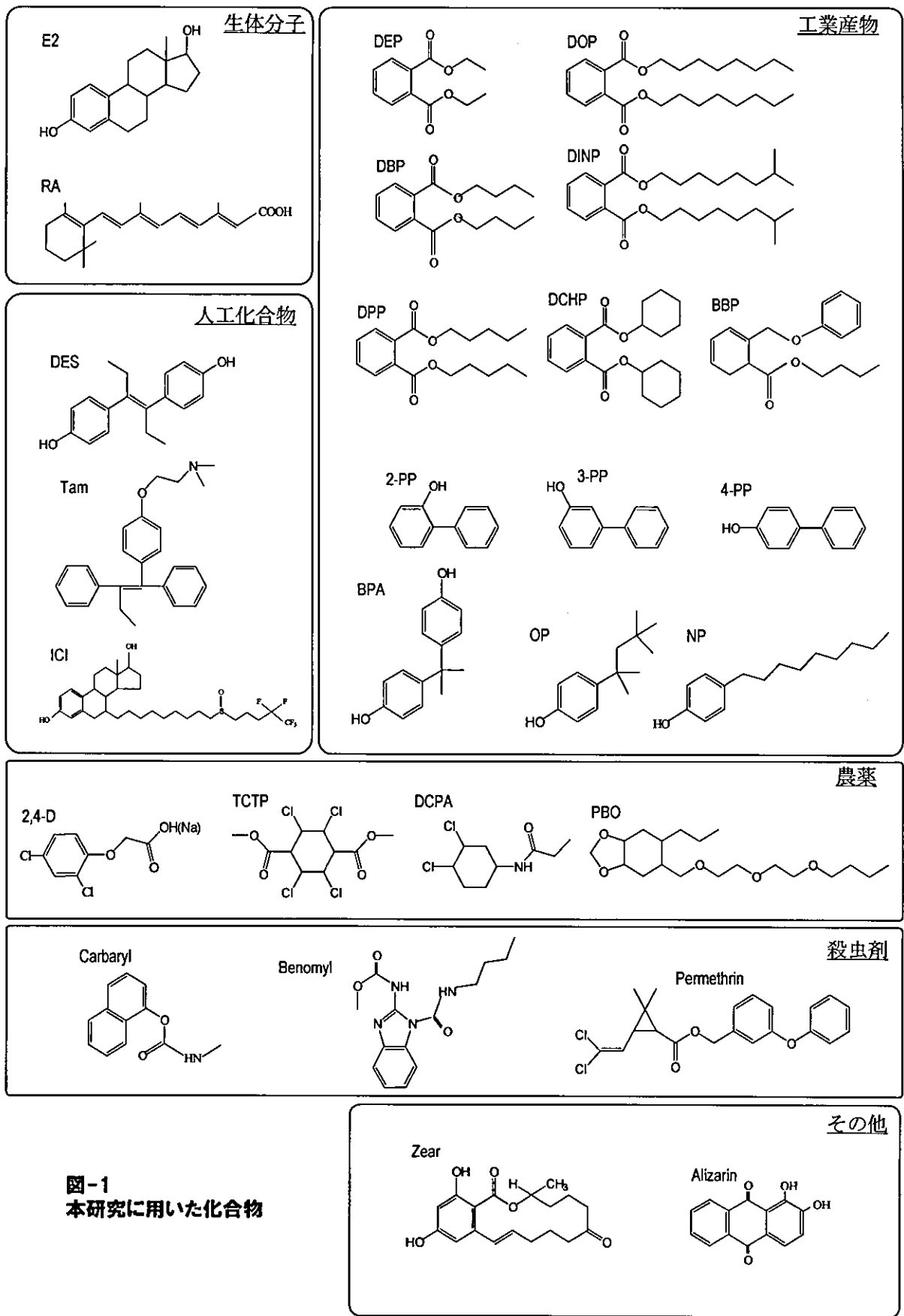
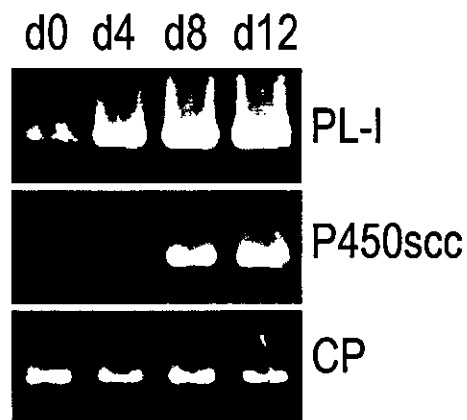


図-1
本研究に用いた化合物

A)



B)



C)

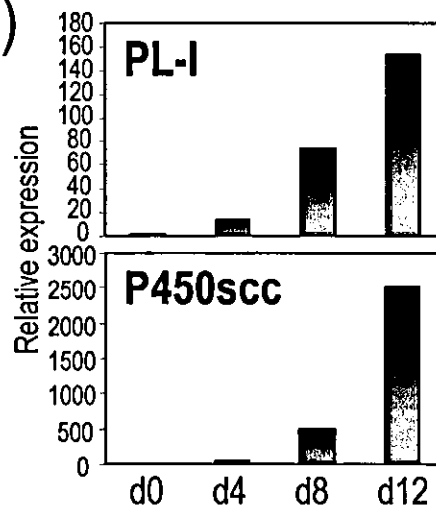


図-2

Rcho-1細胞の分化誘導。A)Rcho-1細胞は、細胞を密に培養することによって未分化細胞(d0)から巨核を有する分化細胞(d8)に誘導される。B)PL-IとP450sccは、Rcho-1細胞の分化とともに発現量が上昇する分化マーカーである。RT-PCR法により、d0からd12にかけて、それぞれの遺伝子の発現変化を調べた。C)PL-IおよびP450sccの発現変化をリアルタイムPCR(Light cycler)により調べた。

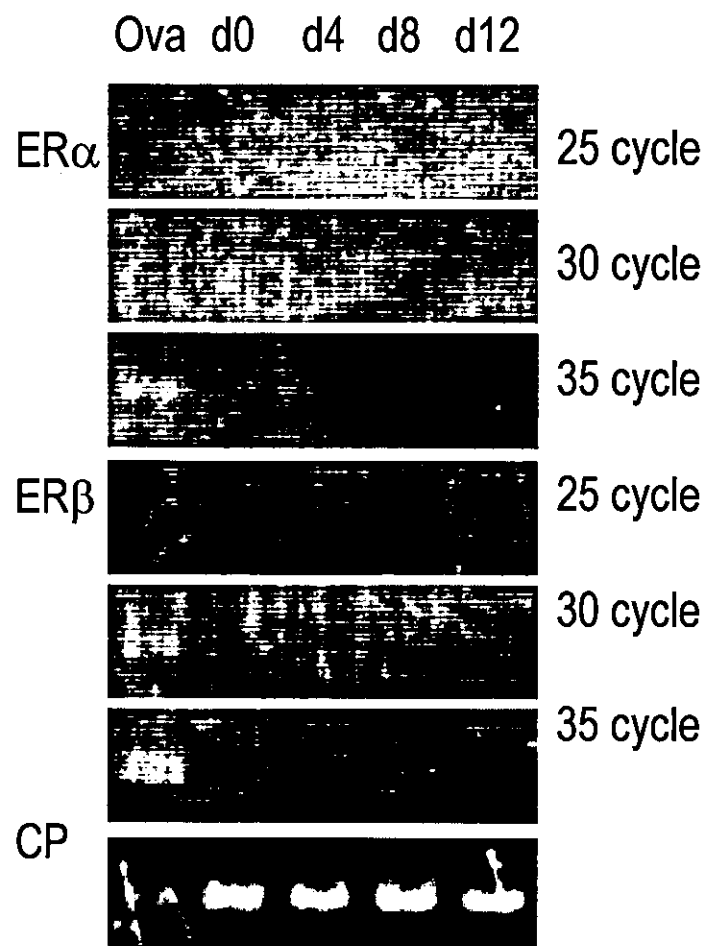


図-3
 Rcho-1細胞にはER mRNAが発現していない。ER α およびER β のmRNA発現をRT-PCR法により調べた。ポジティブコントロールとして、ラットの卵巣(Ova)を用いた。ER α およびER β のmRNA発現は、Ovaにおいて認められるが、d0からd12までのRcho-1細胞には発現は認められない。

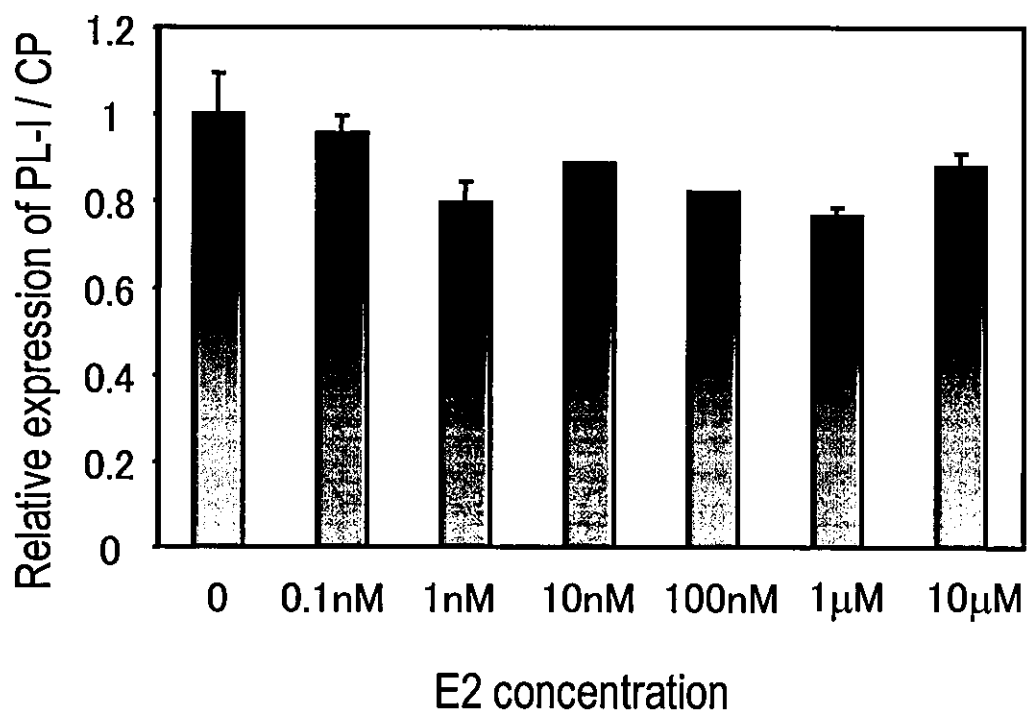


図-4
Rcho-1細胞はE2に対して分化の影響を受けない。未分化Rcho-1細胞に0.1 nMから10 mMまでのE2を6日間曝露し、分化に対する影響をPL-I mRNAを指標にRT-PCR法により調べた。PL-I mRNAの発現量はサイクロフィリン(CP)のmRNA量で補正した。

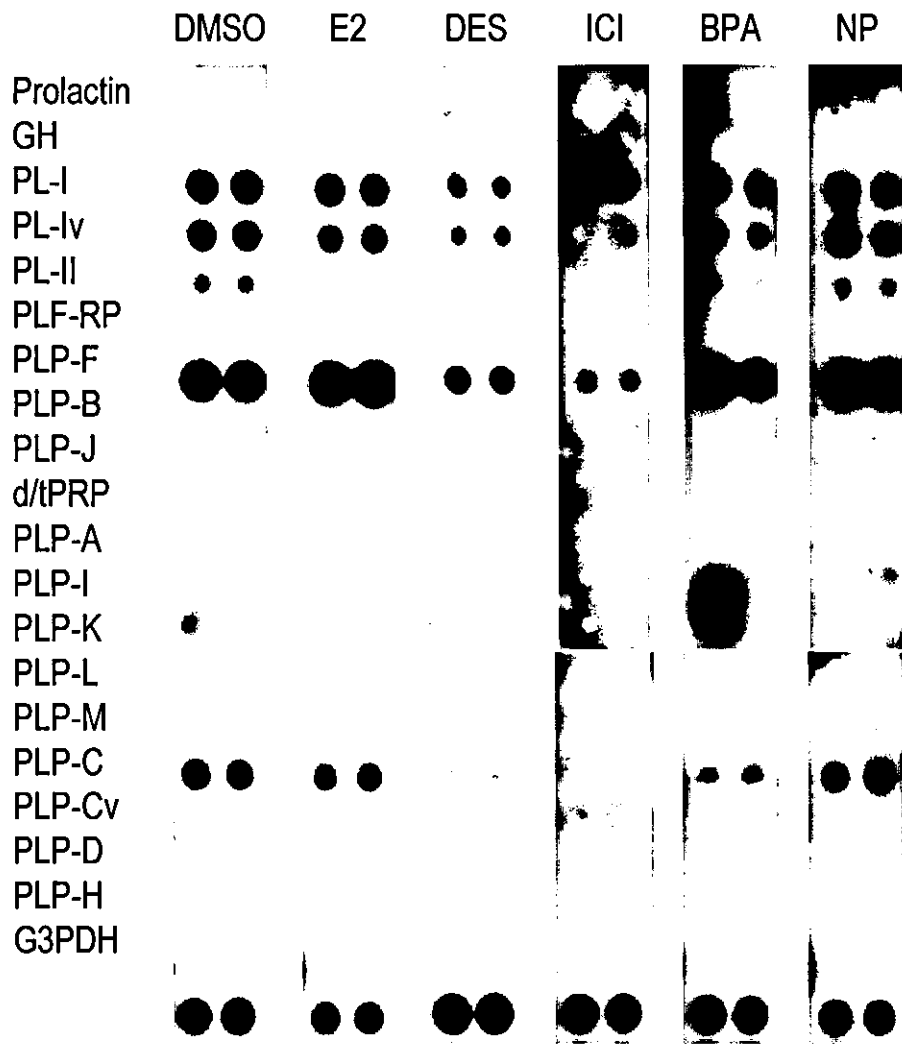


図-5

Rcho-1細胞にE2様の活性を持つとされる化合物を曝露し、プロラクチンファミリー遺伝子の発現変化をミニアレイ法により調べた。Rcho-1細胞にそれぞれの化合物を4日間曝露し、RNAを回収した。それぞれ5 µgのRNAを32p dCTPの存在下で逆転写反応させ、プローブを作成し、ハイブリダイゼーションに供した。感光は24h行なった。

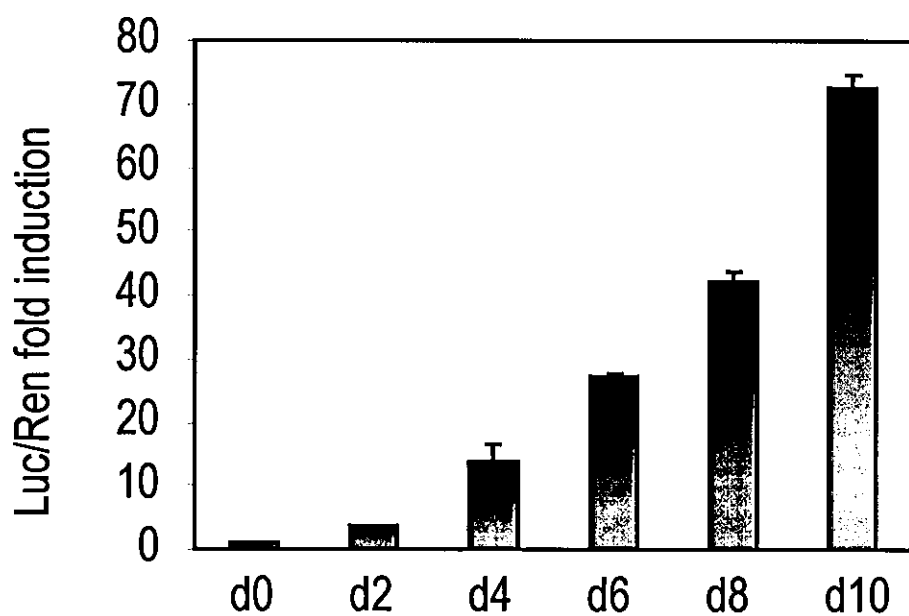


図-6
P450sccプロモーターを用いたリポーター遺伝子は、Rcho-1細胞の分化を測定するのに有効である。Rcho-1細胞のd0にpGL3-P450sccとpRLをトランスフェクトした。d0、d2、d4、d6、d8、d10で細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定し、レニラの値で補正を行った。エラーバーは独立に行なわれた3検体のSE値を示す。

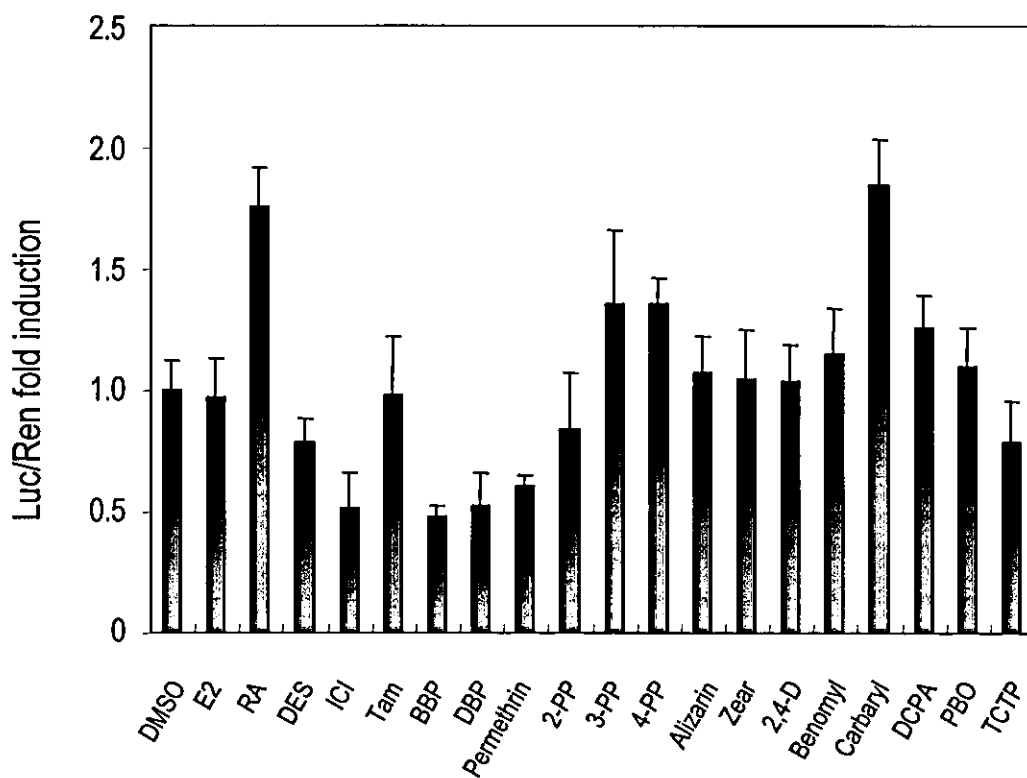


図-7

P450sccプロモーターのリポーター遺伝子アッセイを用い様々な化合物のRcho-1細胞の分化に対する影響を調べた。Rcho-1細胞のd0にpGL3-P450sccとpRLをトランスフェクトし、各化合物を曝露させ、d6にサンプルを回収した。ルシフェラーゼ活性を測定し、レニラの値で補正を行なった。エラーバーは独立に行なわれた3検体のSE値を示す。

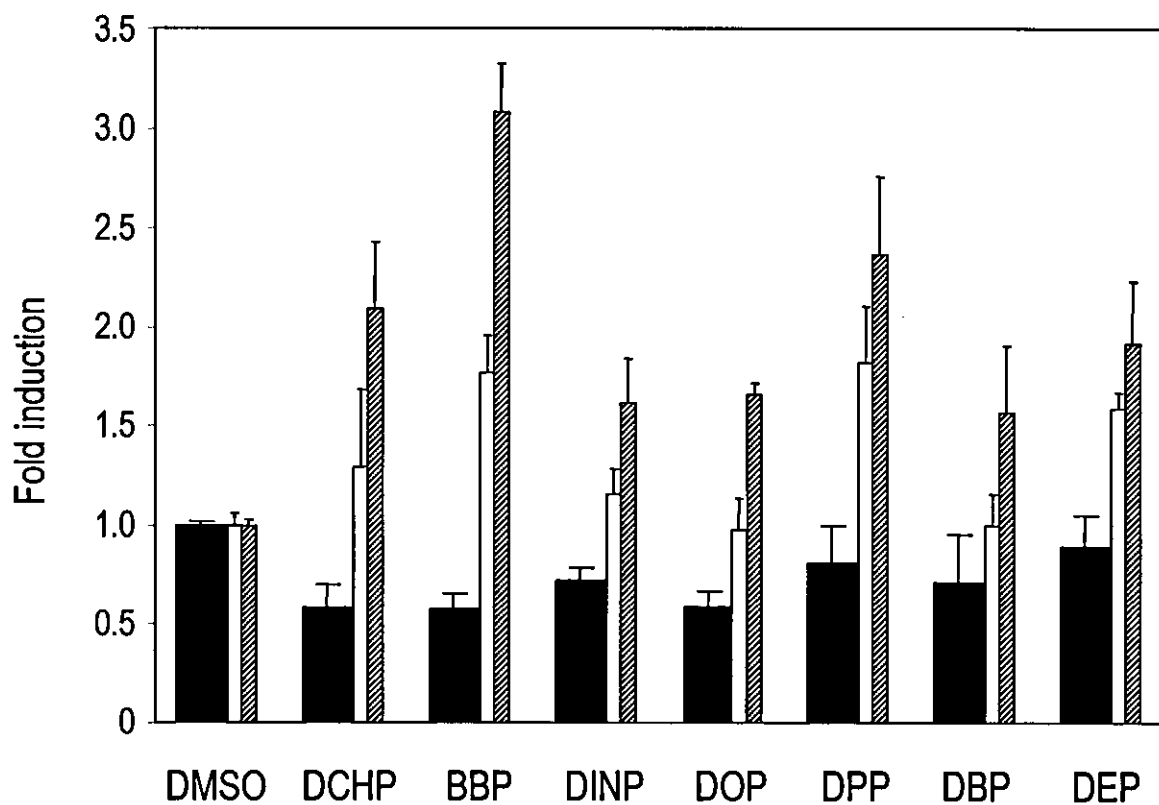


図-8
 フタル酸類の影響をP450sccプロモーターを用いたリポーター遺伝子アッセイで検討した。Rcho-1細胞のd0にpGL3-P450sccとpRLをトランスフェクトし、d6にサンプルを回収した。黒バーはルシフェラーゼ活性値/レニラ活性値を、白バーはルシフェラーゼ活性値を、斜線バーはレニラ活性値をあらわす。エラーバーは独立に行なわれた3検体のSE値を示す。

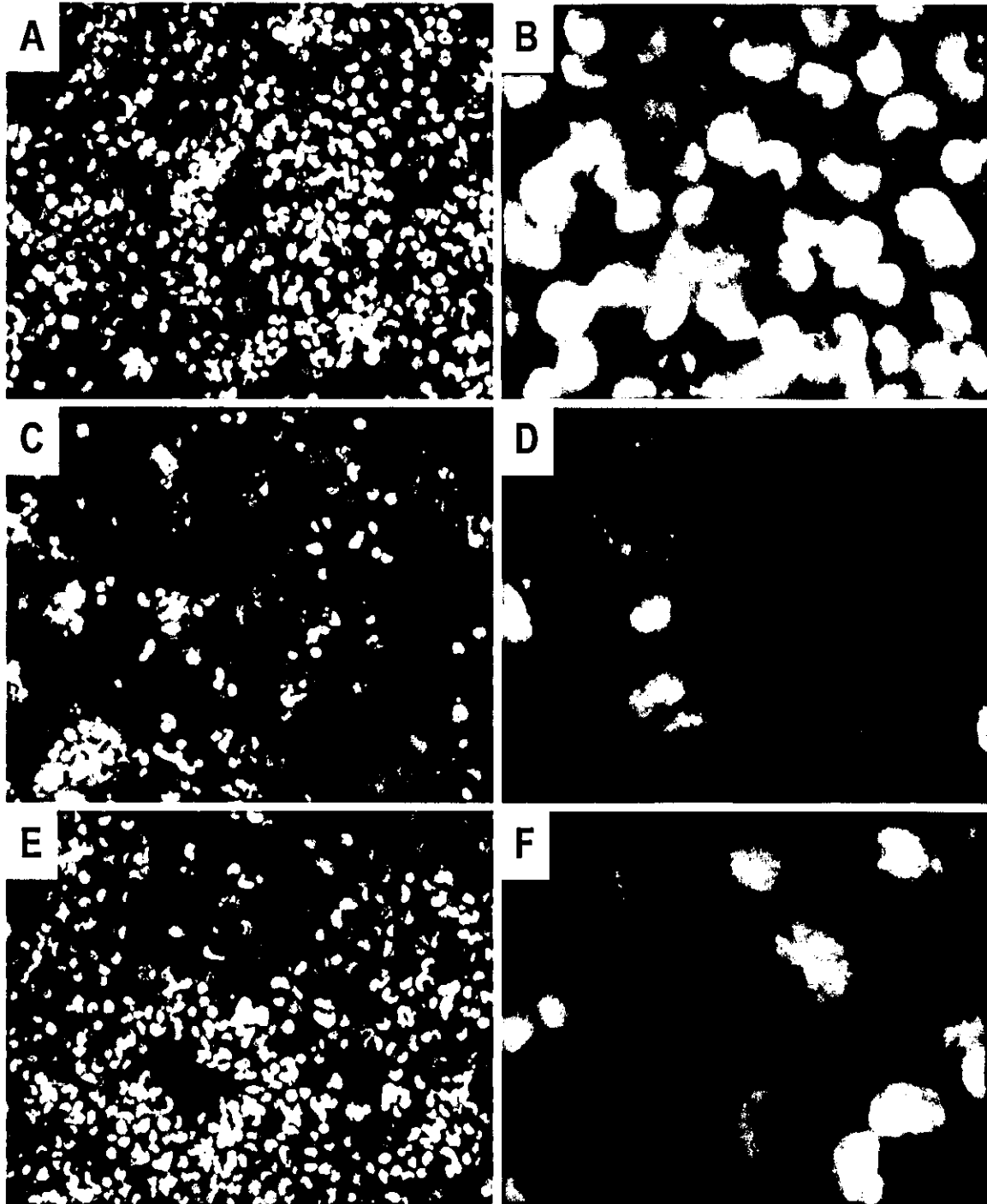


図-9
 DMSO(A, B)、RA(C, D)、およびICI(E, F)をRcho-1細胞に曝露し、分化に与える影響を核染色により検討した。d0からd6まで曝露し、d6に 10^{-7} mol/LのHoechst33342を含んだ培地で1hインキュベートし、核の蛍光観察をおこなった。倍率 100x (A, C, E)、400x(B, D, F)

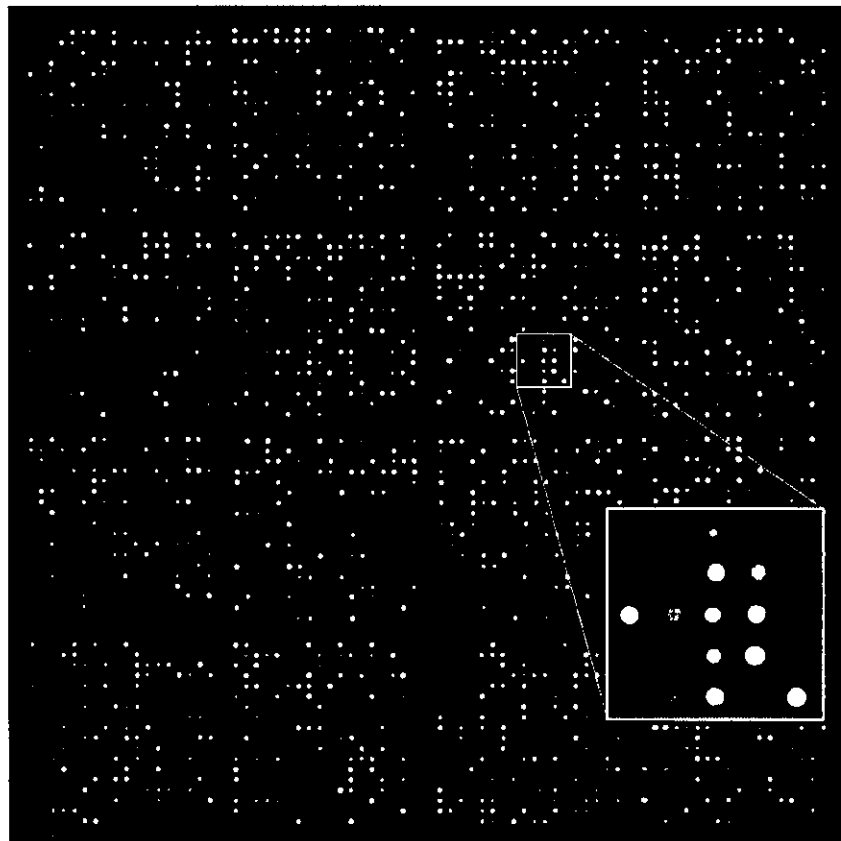


図-10
アレイチップ画像。対照群のRNAはCy5(赤色)で、化合物曝露群のRNAはCy3(緑色)で標識を行った。ここでは、RAの例を示す。また一部のエリアを拡大した。スポットの色が、赤、黄色、緑で標識されており、それぞれ遺伝子の発現が、減少、無変化、増加していることがわかる。

Spot location	A	B	C	D	E	Gene name
1- 5- 1	●	●	●	●	●	Actin, gamma 2, smooth muscle, enteric
1- 9- 4	●	●	●	●	●	Rattus norvegicus C4 complement protein mRNA,
2- 3- 4	●	●	●	●	●	Rattus norvegicus DAD-1 gene
3-17- 1	●	●	●	●	●	Catalase
5- 5- 1	●	●	●	●	●	Rat mRNA for CRP2 (cysteine-rich protein 2), complete cds
5-14- 5	●	●	●	●	●	Rat low molecular weight fatty acid binding protein mRNA, complete cds
5-17- 6	●	●	●	●	●	Rat mRNA for 140-kD NCAM polypeptide
6-10- 6	●	●	●	●	●	ATPase, Na+K+ transporting, alpha 1 polypeptide
6-14- 5	●	●	●	●	●	Rattus norvegicus purine specific Na+ nucleoside cotransporter (SPNT) mRNA, complete cds
7- 5- 4	●	●	●	●	●	R.norvegicus mRNA for C-CAM2a isoform
7-13- 4	●	●	●	●	●	Dynamin 2
8-10- 4	●	●	●	●	●	Peroxisomal membrane protein 1
8-11- 1	●	●	●	●	●	Rattus norvegicus vascular endothelial growth factor mRNA, partial cds
8-15- 2	●	●	●	●	●	Rat testis-specific farnesyl pyrophosphate synthetase mRNA, complete cds
9- 1- 2	●	●	●	●	●	Rat alpha-tropomyosin 2 mRNA, complete cds
10-10- 5	●	●	●	●	●	Rattus norvegicus frizzled related protein frpAP mRNA, complete cds
10-17- 2	●	●	●	●	●	R.norvegicus 3.2.3 antigen protein mRNA, complete cds
13- 6- 5	●	●	●	●	●	Rat nucleoside diphosphate kinase mRNA, complete cds
14- 1- 3	●	●	●	●	●	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase
14- 1- 5	●	●	●	●	●	Phospholipase C (BETA4)
16- 2- 1	●	●	●	●	●	Rat thymosin beta-4 mRNA, complete cds
16- 4- 4	●	●	●	●	●	Annexin 1 (p35) (Lipocortin 1)

A: RA, B: DES, C: ICI, D: Carbaryl, E: Permethrin

図-11

各種化合物の曝露により発現変化のあった代表的な遺伝子およびアレイチップ画像。スポットの色が赤は遺伝子の発現が増加していること、緑色は減少していること、黄色は変化がないことを意味している。

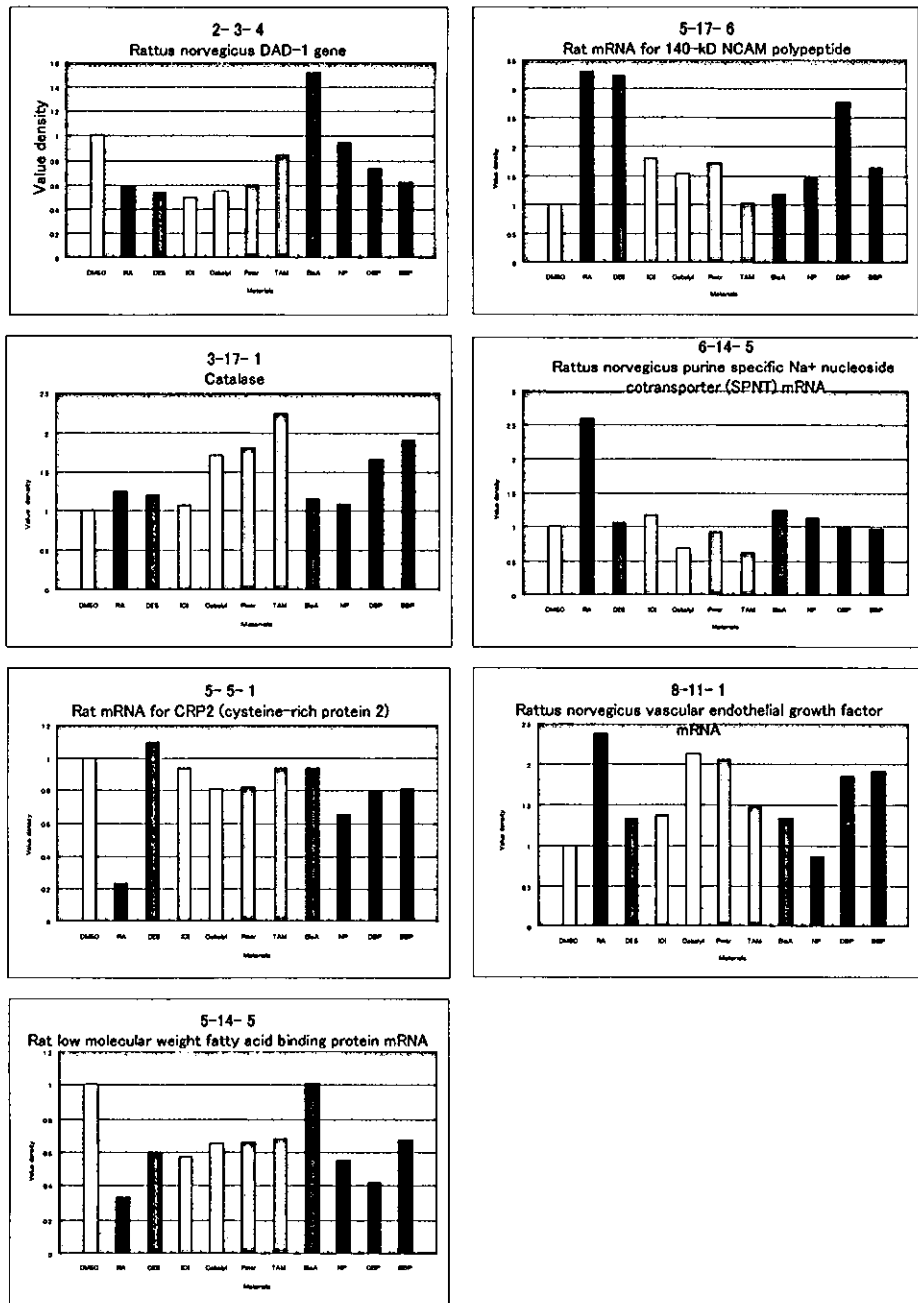


図-12
 各種化合物(RA、DES、ICI、Carbaryl、Permethrin、TAM、BisA、NP、DBP、BBP)の曝露により発現変化のあった代表的な遺伝子について、半定量RT-PCR解析を行った。Rcho-1細胞の分化開始時から化合物を6日間曝露し、mRNAを回収した。アガロース電気泳動後、画像を取り込みデンストメーターでバンドの相対濃度を測定しグラフ化した。

Accession	Row	Name	ID	RA	DES	ICI	Carb	Per
AA875458	4	2 Benzodiazepin receptor (ne sphere)	3.481885	4.802753	5.483024	4.685363	4.009533	
AA858888	16	9 Rattus norvegicus mRNA for class I beta-	3.806355	4.898985	5.321049	4.244003	3.248013	
AA818212	8	4 ESTs, Weakly similar to Smilarity to B	3.639742	4.430943	4.720166	4.178113	3.547265	
AA825325	10	5 3 Rat mRNA for ribosomal protein S10	3.428709	4.655303	4.701555	4.528095	3.662517	
AA875349	2	7 2 Rattus norvegicus mRNA for DPM2, complex	3.024394	3.781887	4.308027	4.125406	3.450847	
AA859496	1	4 2 Rat GTP cyclohydrolase I mRNA, complete	3.480154	3.404211	4.188665	4.557062	3.917493	
AA896982	7	11 4 Rattus norvegicus syntaxin 5 mRNA, compl	3.096239	3.258054	4.054213	3.464196	2.94838	
AA890822	2	5 2 Rat mRNA for ribosomal protein L5	3.445905	3.673741	3.982429	4.430104	3.739032	
AA818910	12	9 ESTs	2.337417	3.273977	3.894382	3.717038	3.182931	
AA818640	10	9 1 ESTs, Highly similar to 40S RIBOSOMAL PR	2.91223	3.709162	3.575013	3.585136	3.111501	
AA801179	10	1 13 EST	2.531991	3.388993	3.384406	3.029257	2.931186	
AA072634	10	11 8 Rattus norvegicus cytokeratin-18 mRNA, p	2.004517	2.715535	3.348148	3.059378	2.671125	
AA818715	7	9 10 ESTs	4.802324	3.331489	3.319859	2.14814	2.819746	
AA070100	3	1 6 Rnorvegicus mRNA for histone H3.3	1.772981	2.287221	3.300215	2.989532	2.692034	
AA818347	8	12 1 Rat PYPB2 mRNA for pyrimidine binding pr	2.154803	1.779949	3.249324	2.430963	2.342838	
AA823964	5	18 2 aflatoxin B1 aldehyde reductase	4.282221	2.728158	3.19849	2.781428	2.480429	
AA145709	16	1 8 EST	2.719682	2.843528	3.157887	3.290015	3.02257	
AA986947	5	10 4 Parathyroid-like peptide	2.817547	3.000375	3.116986	2.965123	2.524692	
AA819658	6	10 8 ESTs	2.889854	3.369778	3.08909	2.851845	2.783689	
AA875068	6	2 2 Rat mRNA for polyubiquitin (four repetit	2.581872	2.818403	2.990559	2.752211	2.418541	
AA819632	4	16 8 EST	1.945119	2.38392	2.893248	2.494907	2.05408	
AA814884	15	8 Heme oxygenase	3.482987	2.739481	2.759021	3.834532	1.802708	
AA889304	12	13 12 ESTs	3.50397	2.978844	2.946331	1.854385	1.807824	
AA859305	16	1 2 Rattus norvegicus tropomyosin non-muscle	3.277742	3.010431	2.92832	2.094897	2.824646	
AA818819	16	4 9 EST	3.117871	2.468952	2.862827	2.895469	2.384993	
AA875541	11	7 12 ESTs, Weakly similar to (define not av	2.052547	2.505559	2.877034	2.820749	2.301447	
AA824495	14	16 16 ESTs	3.126134	2.124818	2.851011	2.399005	2.139135	
AA899909	4	14 13 EST	1.899881	1.482383	2.804248	2.253689	1.877032	
AA818747	12	6 1 Rattus norvegicus ovalbumin upstream pro	2.143826	2.225221	2.9038	2.801933	1.808272	
AA875847	14	5 12 EST	2.589733	2.29697	2.71002	2.60217	2.380072	
AA824882	3	6 3 Rnorvegicus (Sprague Dawley) ribosomal	1.584814	2.299176	2.834795	2.292469	1.844341	
AA859664	15	13 1 Rattus norvegicus mRNA for thiol-specific	2.184325	2.063982	2.822004	2.053843	1.784787	
AA859756	2	2 2 Rnorvegicus (Sprague Dawley) ribosomal	1.85555	2.445579	2.591915	2.758964	1.93843	
AA145606	14	8 6 Rnorvegicus mRNA for coupling factor B	2.515131	2.387268	2.564513	2.728492	2.163512	
AA817787	1	5 1 Actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	2.117121	2.164869	2.568978	2.243972	1.956269	
AA808635	10	5 Nepril	4.100068	3.516258	2.54981	1.889506	1.742419	
AA859078	9	10 12 ESTs	2.934027	1.725987	2.548098	1.591535	1.386938	
AA899788	11	2 2 Rnorvegicus insulin-like growth factor	2.06143	2.094961	2.541739	2.915228	2.32183	
AA900195	11	4 7 ESTs, Highly similar to MEK binding part	3.007323	2.065529	2.533673	1.78258	1.843504	
AA955252	2	2 18 ESTs	2.858251	2.688882	2.532808	2.047314	2.047119	
AA148173	15	5 8 Rat mitochondrial ATP synthase beta subu	1.754592	2.090469	2.511231	2.47885	2.245418	
AA875068	14	10 5 Rattus norvegicus interferon inducible p	1.904378	2.600478	2.508429	2.690863	2.32331	
AA908601	7	6 13 EST	2.824775	2.095275	2.508771	2.015928	2.003834	
AA823844	4	4 15 ESTs	2.821489	2.724289	2.548098	1.591535	1.386938	
AA828300	3	9 18 EST	1.356681	1.649408	2.485215	1.81757	1.559237	
AA819818	3	8 1 Rat mRNA for phosphoinositide-specific p	1.528443	2.210966	2.474339	2.018738	1.344414	
AA955237	3	18 18 ESTs	2.561872	2.784103	2.457961	2.051637	2.063794	
AA875550	9	9 12 ESTs, Highly similar to ADENYL CYCLASE	2.544952	2.523838	2.422319	2.920881	2.263122	
AA859125	1	8 4 Rattus norvegicus C4 complement protein	1.194132	2.006869	2.419789	1.759794	1.754905	
AA819472	7	16 1 Rat ferritin light chain subunit, mRNA	1.587955	2.069805	2.498932	1.984889	1.724358	
AA899243	6	1 4 Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-m	1.845369	1.845782	2.349833	1.1413372	1.090821	
AA823968	12	14 14 EST	1.815849	1.842565	2.368795	2.382375	2.145808	
AA818709	12	7 1 Rnorvegicus mRNA for ribosomal protein	1.708875	2.129978	2.363085	2.471247	1.999555	
AA823884	6	13 2 Rattus norvegicus Tolone4 mRNA	2.246149	2.280031	2.360012	2.046155	1.988443	
AA857534	16	3 3 Rattus norvegicus brain-enriched guanyla	3.328285	2.311649	2.356654	1.989551	1.81812	
AA859035	16	3 8 ESTs, Weakly similar to (define not av	2.343269	2.009811	2.358412	2.824	2.245425	
AA815314	12	11 11 ESTs	2.068828	2.094501	2.352122	2.082748	2.035785	
AA808604	7	2 13 EST	1.515181	2.229572	2.348373	2.410372	1.990821	
AA859182	11	1 2 Rat testis-specific farnesyl pyrophospha	1.703941	1.961423	2.34777	2.154754	1.753032	
AA137940	8	11 11 EST	0.870322	0.881962	2.342891	0.843032	1.024937	
AA899087	12	9 12 EST	2.408811	1.89236	2.321092	1.315314	1.522506	
AA955423	11	9 3 Rattus norvegicus Sprague-Dawley lipid-b	0.753745	1.248548	2.313963	1.794244	1.85328	
AA828336	1	1 5 Rnorvegicus mRNA for (S)-2-hydroxy acid	1.599878	2.368318	2.274112	2.059307	1.821824	
AA874997	12	2 2 Rat mRNA for ribosomal protein S8	2.140872	2.324723	2.286043	2.544387	2.181179	
AA823968	7	3 3 Delta 7-aminolevulinic acid dehydratase	1.85302	1.729753	2.257281	1.807352	1.738769	
AA899243	15	1 12 ESTs	2.216013	2.355689	2.259321	1.808651	2.07108	
AA899309	9	10 12 ESTs	2.712155	2.138428	2.250119	2.186552	2.083271	
AA899771	3	4 13 ESTs	1.727351	1.358483	2.244281	1.636125	1.409188	
AA899136	1	15 12 ESTs	0.95937	0.853305	2.24159	1.011568	1.080384	
AA901168	12	9 2 Rattus norvegicus transcription factor (2.166669	2.37073	2.236789	2.104709	2.28437	
AA859846	8	5 2 Rat gene encoding cytoplasmic beta-actin	1.730548	2.280489	2.230062	1.835599	1.580447	
AA823859	9	1 8 Rat insulinoma rig mRNA, encoding a puta	1.514724	2.111288	2.220235	2.088881	1.84855	
AA899699	10	13 ESTs	2.148858	2.348999	2.150118	2.552018	1.98918	
AA825155	16	8 18 ESTs, Moderately similar to JTV-1 PROTEI	1.518889	1.727809	2.21089	1.978401	2.020459	
AA819707	1	5 8 ESTs	0.806414	0.521085	2.207851	0.959278	0.742867	
AA859498	3	3 2 Cathepsin L	3.495116	2.398825	2.20518	1.439779	1.492369	
AA900391	15	7 11 ESTs	1.506837	1.799532	2.20334	2.671873	2.363386	
AA899219	10	13 1 ESTs, Highly similar to TUBULIN BETA CHA	2.139252	2.612678	2.196938	1.874819	1.710588	
AA819078	9	16 7 ESTs	0.724424	1.184845	2.198328	1.711872	1.735204	
AA817918	14	17 18 ESTs	1.838329	2.233399	2.18815	2.182155	1.781325	
AA875660	16	8 12 ESTs	2.215631	2.338124	2.188221	2.118996	1.887844	
AA875312	14	9 11 ESTs	1.890964	2.239959	2.166606	2.187565	2.008394	
AA958793	8	15 3 Early growth response 1	1.820836	1.542828	2.164602	1.632181	1.438703	
AA964578	5	5 4 Rnorvegicus mRNA for calbactin I heavy	2.254045	2.785249	1.824401	2.522887	2.3303	
AA859083	10	2 1 Rattus norvegicus Sprague Dawley protein	1.838896	2.123724	2.156881	2.129089	1.778879	
AA899180	3	18 12 ESTs	1.464539	1.303325	2.155015	2.01311	1.44896	
AA901378	5	15 14 ESTs	2.278458	1.939525	2.145732	1.831863	1.801146	
AA818768	13	6 10 ESTs	2.151747	1.851187	2.137472	2.188469	1.888982	
AA859699	2	3 2 Rat lung beta-galactoside-binding lectin	3.009302	3.231745	2.137108	1.940133	1.470082	
AA997842	16	7 4 Rat mRNA for MRC OX-45 surface antigen	1.54758	1.395809	2.136018	1.82377	1.82975	
AA899808	15	11 2 Lysosomal associated membrane protein I	0.487339	0.388271	2.122624	0.355668	0.424667	
AA899331	12	18 12 ESTs	2.382268	1.896096	2.122318	1.835291	1.878204	
AA965127	3	9 4 Organic cation transporter	1.800139	2.061221	2.11501	2.283695	1.842778	
AA819719	1	7 1 Beasitin (Ox47 antigen or CE-9) (EMMPRN	1.419728	1.832319	2.109819	2.417653	2.08472	
AA828327	2	18 12 ESTs	4.047128	3.059488	2.096587	1.244135	1.555791	
AA899376	1	9 2 Rattus norvegicus mRNA for 41-kDa phosph	1.499188	2.145824	2.06774	2.393588	2.100524	
AA818228	7	6 1 Rat mRNA for cytochrome c oxidase subuni	1.931927	2.132403	2.062807	1.689288	1.997824	
AA925031	10	17 17 EST	1.608973	1.8583	2.042974	2.08309	1.582545	
AA070618	4	8 8 Rat ras-related protein mRNA, clone NTRA	2.002701	1.444605	2.030902	1.416282	1.550385	
AA824589	4	12 18 ESTs	1.418748	1.347997	2.026714	1.285858	1.758334	
AA818488	10	1 1 Rattus norvegicus cyclophilin B mRNA, co	2.864897	2.008455	2.024504	1.491806	1.487888	
AA825703	11	15 18 ESTs, Highly similar to Wdr1 protein [J	1.583543	1.787823	2.002853	1.888135	1.731009	
AA899578	12	7 13 ESTs	2.487721	1.791281	2.000297	1.344947	1.265032	
AA901095	8	10 14 EST	1.861783	1.823409	2.000285	2.128889	1.962816	

図-13 RA, DES, ICI, Carbaryl, Permethrinの曝露により発現変化のあった遺伝子のリスト。ここでは、ICIの曝露により2倍以上に発現量が変化した遺伝子をリストし、他の化合物での発現変化との比較表示を行った。

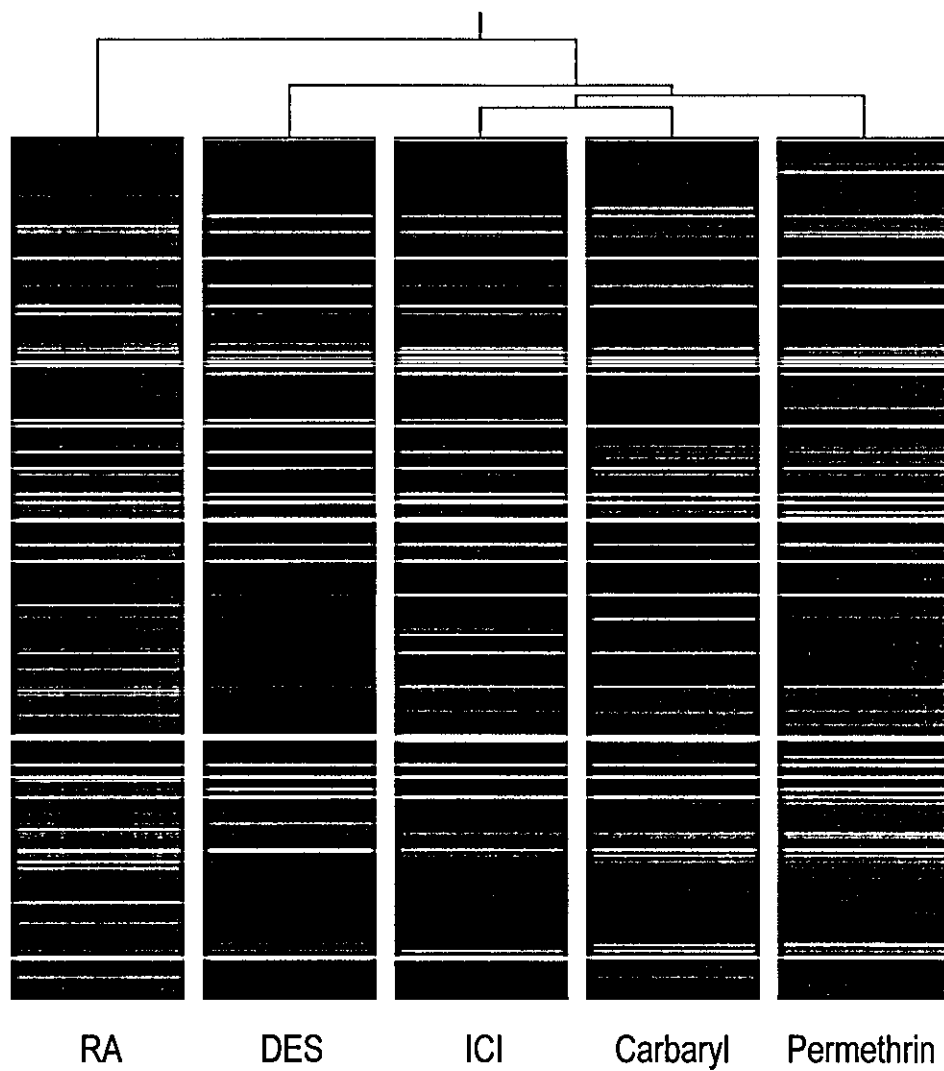


図-14
 各種化合物に曝露した検体のDNAチップ解析のクラスタリング解析。ICIとCarbarylが最も類似した遺伝子発現変化のパターンを示し、次にPermethrin、そしてDESの順に類似性を示した。

DMSO

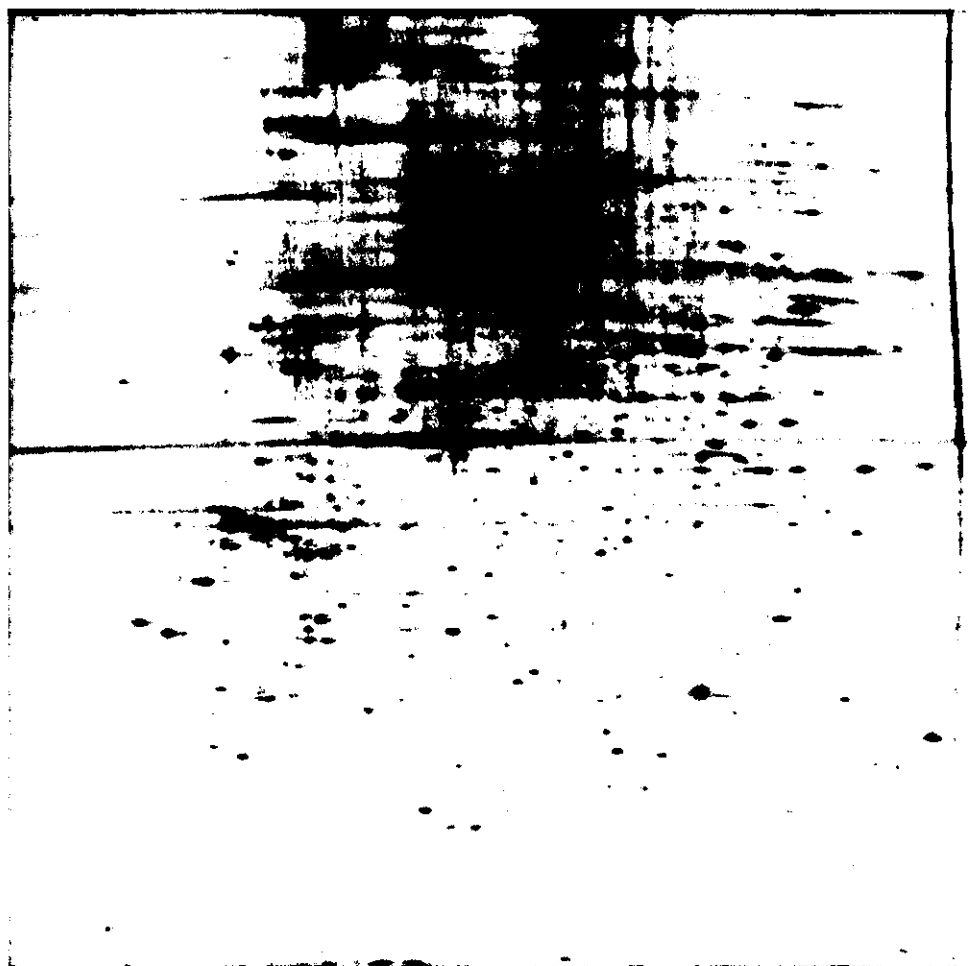


図-15
Rcho-1 細胞核抽出液の2次元電気泳動像(DMSO処理:対照群)。Rcho-1細胞をDMSOを含む培養液で培養し、その核抽出液を展開、銀染色した。

Retinoic acid

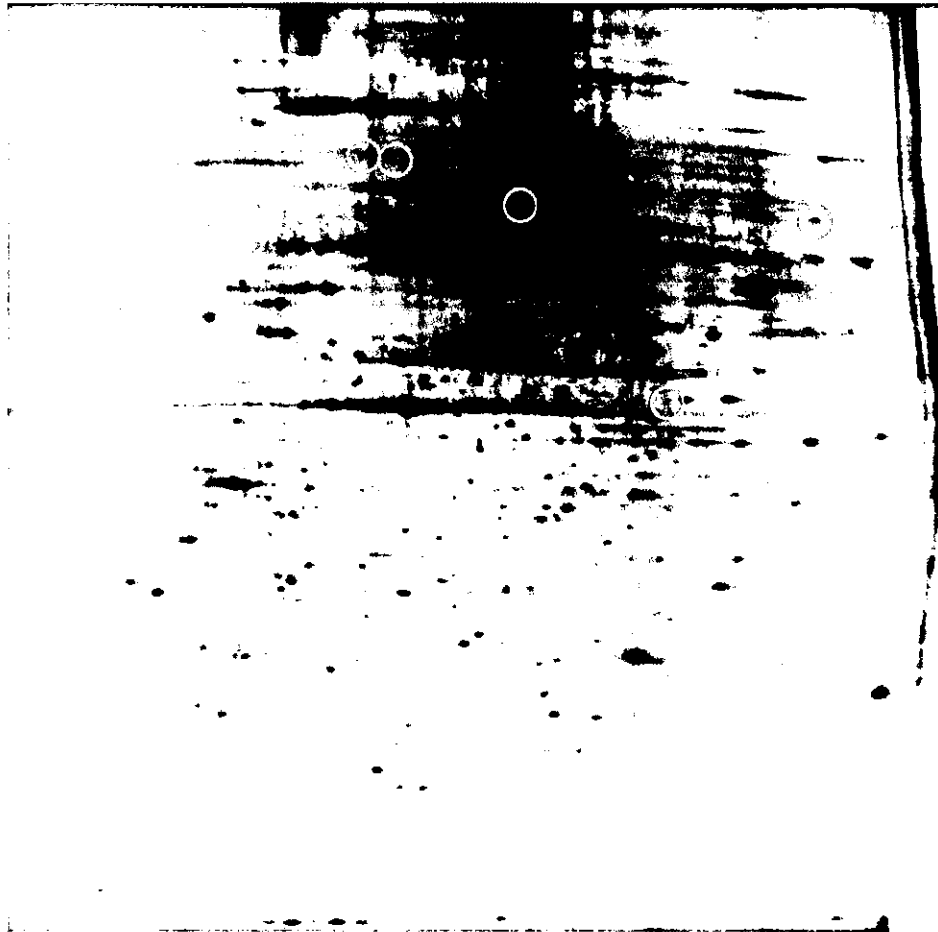


図-16

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。