

#### 5-4)メチル水銀および水銀蒸気複合曝露(授乳10日目の仔マウス):

①メチル水銀&水銀蒸気複合曝露群(野生型マウス)/コントロール群(野生型マウス)

②メチル水銀&水銀蒸気複合曝露群(メタロチオネイン-I/II欠損マウス)/コントロール群(メタロチオネイン-I/II欠損マウス)

オリゴDNAチップは30,000遺伝子チップを用いた。また、新生仔脳を群ごとに1検体にプールしてDNAマイクロアレイ解析を行った。

#### マイクロアレイフローチャート

<操作の流れ>

total RNA の抽出

↓

cDNA の作製

↓

CyDye 標識プローブの作製

↓

ハイブリダイゼーション:Lucidea SlidePro (Amersham Biosciences)

↓

画像の取込み:CRBIO™IIe (日立ソフトエンジニアリング)

↓

画像解析:DNASIS Array (日立ソフトエンジニアリング)

#### **【RNA の抽出】**

SV Total RNA Isolation System を用いて RNA を抽出

(Cy3 標識用 RNA = Cy5 標識用 RNA = 約 90  $\mu$ g)

### 【RNA エタノール沈澱】

RNA90  $\mu$ g 相当を含む溶液

↓ + サンプル 1/10 量 3 M 酢酸ナトリウム、2.5 倍量 100% エタノール

-80°C、20 分冷却

↓ 20000 x g (4°C)、60 分遠心

上清を除く

↓ + 1 mL 80% エタノール

↓ 15000 x g (4°C)、10 分遠心

上清を除き、室温乾燥

### 【逆転写反応】

total RNA + DW = 27  $\mu$ L

↓ + 4  $\mu$ L Oligo (dT) 12-18 Primer

70°C、10 分加熱

↓

氷上 5 分

↓ + 12  $\mu$ L 5 × First-Strand Buffer

↓ + 6  $\mu$ L 0.1 M DTT

↓ + 6  $\mu$ L dNTPmix \*

↓ + 1  $\mu$ L 40 U RNase Inhibiter

42°C、2 分加熱

↓ + 4  $\mu$ L Super Script II<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase

42°C、60 - 90 分加熱

↓ +10  $\mu$ L 0.5 M EDTA

↓ +20  $\mu$ L 1 N NaOH

70°C、20 分加熱

↓ +24  $\mu$ L 1 N HCl

cDNA の精製へ

\*dNTPmix

100 mM dATP                      5  $\mu$ L

100 mM dGTP                      5  $\mu$ L

100 mM dCTP                      5  $\mu$ L

100 mM dTTP                      3  $\mu$ L

50 mM Aminoallyl-dUTP      4  $\mu$ L

DW                                      78  $\mu$ L

---

total                                      100  $\mu$ L

### 【cDNA の精製】

調整した cDNA を QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製

(ただし、cDNA の溶出には 130  $\mu$ L の DW を用いた)

### 【cDNA エタノール沈澱】

精製 cDNA を含む溶液

↓ +サンプルの 1/10 量 3 M 酢酸ナトリウム、グリコーゲン (2.5 $\mu$ g/100mL サ  
ンプル溶液)、2.5 倍量 100% エタノール

-80°C, 20 分冷却

↓ 20000 x g (4°C)、60 分遠心

上清を除く

↓ +250 μL 70% エタノール

↓ 15000 x g (4°C)、10 分遠心

上清を除き、室温乾燥

### 【カップリング反応】

cDNA

↓ +9 μL 0.2 M \*Sodium Bicarbonate buffer

↓ +1 μL CyDye

↓ 遮光しながら、40°C, 1 時間加熱

↓ +45 μL DW

マイクロバイオスピカラム P30 により標識された cDNA を精製

↓

Cy3 標識用 cDNA と Cy5 標識用 cDNA をまとめる

↓ +10 μL 5 × Competitor

cDNA エタノール沈澱へ

[\*0.2 M Sodium Bicarbonate buffer]

- (1) NaHCO<sub>3</sub> 1.68 g を 100 mL の H<sub>2</sub>O に溶解する
- (2) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.12 g を 100 mL の H<sub>2</sub>O に溶解する
- (3) 1 に 2 に加えながら pH 9.0 に調整する
- (4) フィルターろ過し (0.22 μm)、適量に分注する (-20°C 保存)。

【cDNA エタノール沈澱 (5、cDNA エタノール沈澱参照)】

【ハイブリダイゼーション】

20 x SSC	50 $\mu$ L
10% SDS	10 $\mu$ L
50 x Denhardt's solution	16 $\mu$ L
Hybridization solution	40 $\mu$ L
DW	62 $\mu$ L
計	178 $\mu$ L (ターゲット溶液)

標識したサンプルにターゲット溶液を加える

↓ サンプル+ターゲット溶液を 95°C で 2 分加熱後、遠心 (4°C) により冷ます

サンプル+ターゲット溶液	178 $\mu$ L
salmon sperm DNA (10 mg/mL)	2 $\mu$ L
formamide	20 $\mu$ L

計 200  $\mu$ L

↓

16 時間ハイブリダイゼーション

↓

洗浄

↓

乾燥

## 6)リアルタイム RT-PCR 法

### 6-1)カドミウム曝露

DNA マイクロアレイ解析によって発現量に変動が認められた遺伝子のうち、Trfr [transferrin receptor]、Itgb4 [integrin beta 4 subunit]、Sema5a [sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (tm) and short cytoplasmic domain]、Sep15 [15-kda selenoprotein]、Akt1s1 [matrix protein (ma), p15 containing protein data source: pfam, source key: pf01140, evidence: iss putative]、Def8 [expressed sequence ai449518]、Hmg20b [high mobility group protein 20 b]、Nfat5 [nuclear factor of activated t-cells 5]および Htr5b [5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5b]の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。

なお、母体ごとにプールした新生仔脳を 1 検体として、母体数 n=4-5 でリアルタイム RT-PCR 解析を行った。

### 6-2)メチル水銀曝露(授乳 10 日目の仔マウス)

DNA マイクロアレイ解析によって発現量に変動が認められた遺伝子のうち、Akt1s1、RPS12 [ribosomal protein s12]、PLP [6.8 kda mitochondrial proteolipid]、RPS20 [ribosomal protein s20]、RPL38 [ribosomal protein L38]、Nme2 [expressed in non-metastatic cells 2, protein (nm23b)]、Cox7b [cytochrome C oxidase subunit VIIb]、Xist [nuclear-localized inactive X-specific transcript]および TIMP4 [tissue inhibitor of metalloproteinase 4]の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。

なお、群ごとにプールした新生仔脳を 1 検体とし、n=1 でリアルタイム RT-PCR 解析を行った。

### リアルタイム RT-PCR フローチャート

RNA 抽出 (1  $\mu$ g)  $\rightarrow$  cDNA  $\rightarrow$

## PCR 反応

SYBR Green Supermix	25	μL	熱変性	95°C 3分
Template cDNA	2	μL	熱変性 95°C 15秒 アニーリング+伸長反応 1分 40 サイクル	
Primer (forward- 250 nM)	2.5	μL		
Primer (reverse- 250 nM)	2.5	μL		
Water	18	μL	↓	
Total volume	50	μL	融解曲線分析	

## 2. 行動影響評価のための胎生期カドミウム経口曝露仔マウスの作製

胎生期および授乳期におけるカドミウム(10 ppm)経口曝露後の仔マウスの行動影響評価の再現性を確認するために、マウスにカドミウム(10 ppm)の妊娠期および授乳 10 日間経口曝露を実施した。

メタロチオネイン-I/II 欠損マウス(コントロール群:23 匹、カドミウム曝露群:40 匹)および野生型マウス(コントロール群:21 匹、カドミウム曝露群:40 匹)をそれぞれ雌雄番いで1日交配し、翌日(妊娠1日目)から10 ppmのカドミウムを含む飲料水を自由に与えた。7匹以上の仔マウスを出産した場合には、出生1日後(授乳1日目)に母マウス1腹につき新生仔が6匹になるように間引きを行った。また、3匹以下の仔マウスを出産した場合は、その後の実験を行わなかった。授乳10日目にカドミウム含有飲料水を蒸留水に交換して飼育した。

仔マウスの行動影響評価を行うため、出生7週後に1腹につき雌雄それぞれ1-2匹の仔マウスを東京大学へ搬送した。

### [結果]

#### 1. カドミウム胎生期曝露

##### 1) マウスの出産割合

メタロチオネイン-I/II 欠損マウス(コントロール群:25 匹、カドミウム曝露群:25 匹)および野生型マウス(コントロール群:23 匹、カドミウム曝露群:23 匹)をそれぞれ雌雄番いで1日交配した結果、4 匹以上の仔マウスを出産したマウスは、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスのコントロール群で 25 匹中 5 匹、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスのカドミウム曝露群で 25 匹中 5 匹、野生型マウスのコントロール群で 23 匹中 5 匹、野生型マウスのカドミウム曝露群で 23 匹中 4 匹であった。

## 2) DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現の解析

野生型マウスとメタロチオネイン-I/II 欠損マウスのコントロール群間において新生仔脳中で変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により解析したところ、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスでは、野生型マウスと比較して約 10,000 遺伝子中 1 種の遺伝子発現が増大し、5 種の発現が減少した (Fig. 1, Table 1)。次に、カドミウム胎生期曝露によって新生仔脳中で変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により解析した。その結果、野生型マウスでは、3 種の遺伝子発現が増大し、1 種の発現が減少した (Fig. 2, Table 2)。メタロチオネイン-I/II 欠損マウスでは、発現が増大した遺伝子は認められず、3 種の遺伝子発現が減少した (Fig. 3, Table 3)。また、野生型マウスとメタロチオネイン-I/II 欠損マウスのカドミウム曝露群間において新生仔脳中で変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により解析したところ、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスでは、野生型マウスと比較して発現が増大した遺伝子は認められず、19 種の遺伝子発現が減少した (Fig. 4, Table 4)。なお、上記 DNA マイクロアレイ解析の結果において、新生仔脳中で 5 倍以上の増減を示した遺伝子は認められなかった (Figs. 1-4)。

## 3)リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現の解析

カドミウムを胎生期曝露した野生型マウスの新生仔脳において、DNA マイクロアレイ解析によって発現量に変動が認められた 4 種の遺伝子 (Trfr, Itgb4, Sema5a, Sep15) の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、新生仔脳中 Trfr の mRNA 量は、カドミウム曝露



によって野生型マウスおよびメタロチオネイン-I/II 欠損マウスともに有意に増加した (Fig. 5)。また、Itgb4、Sema5a および Sep15 の mRNA 量については、両系統のマウスともにカドミウム曝露による有意な変動は認められなかった (Figs. 5 and 6)。

次に、カドミウムを胎生期曝露したメタロチオネイン-I/II 欠損マウスの新生仔脳において、DNA マイクロアレイ解析によって発現量に変動が認められた 3 種の遺伝子のうち Akt1s1 と Def8 の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、両遺伝子の mRNA 量は、野生型マウスおよびメタロチオネイン-I/II 欠損マウスともにカドミウム曝露によって有意な変動は認められなかった (Fig. 7)。

また、野生型マウスとメタロチオネイン-I/II 欠損マウスのカドミウム曝露群間において、DNA マイクロアレイ解析によって新生仔脳で発現量に変動が認められた 19 種の遺伝子のうち Hmg20b、Nfat5 および Htr5b の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、3 遺伝子の mRNA 量は、野生型マウスおよびメタロチオネイン-I/II 欠損マウスともにカドミウム曝露によって有意な変動は認められなかった (Figs. 8 and 9)。しかも、野生型マウスとメタロチオネイン-I/II 欠損マウスのカドミウム曝露群間においても 3 遺伝子の mRNA 量に有意な差は認められなかった (Figs. 8 and 9)。

## 2. メチル水銀曝露(授乳 10 日目の仔マウス)

### 1) DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現の解析

メチル水銀の胎生期曝露によって新生仔脳中で変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により解析したところ、野生型マウスでは、約 10,000 遺伝子中発現が増大した遺伝子は認められず、9 種の遺伝子発現が減少した (Fig. 10, Table 5)。メタロチオネイン-I/II 欠損マウスでは、2 種の遺伝子発現が増大し、発現が減少した遺伝子は認められなかった (Fig. 10, Table 6)。なお、メチル水銀の胎生期曝露によって新生仔脳中で 5 倍以上の増減を示した遺伝子は、両系統のマウス共に認められなかった (Fig. 10)。

## 2)リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現の解析

メチル水銀を胎生期曝露した野生型マウスの新生仔脳において、DNA マイクロアレイ解析によって発現量が減少した遺伝子のうち、Akt1s1、RPS12、PLP、RPS20、RPL38、Nme2 および Cox7b の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、野生型マウスでは、Nme2 を除く 6 遺伝子の mRNA 量がメチル水銀曝露によって減少傾向を示した (Figs. 11-14)。一方、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスでは、RPS12、PLP、RPL38 および Cox7b の 4 遺伝子の mRNA 量がメチル水銀曝露によって増加傾向を示した (Figs. 11-14)。なお、Akt1s1 および Nme2 の mRNA 量は、メチル水銀曝露による差はほとんど認められなかった (Figs. 11 and 13)。

また、メチル水銀を胎生期曝露したメタロチオネイン-I/II 欠損マウスの新生仔脳において、DNA マイクロアレイ解析によって発現量が増大した 2 種の遺伝子 (Xist, TIMP4) の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスでは、両遺伝子の mRNA 量はともにメチル水銀曝露によって増加傾向を示した (Fig. 15)。一方、野生型マウスでは、メチル水銀曝露によって Xist の mRNA 量には変化が認められなかったが、TIMP4 の mRNA 量は増加傾向を示した (Fig. 15)。

## 3. メチル水銀胎生期曝露(授乳 1 年目の仔マウス)

### 1)DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現の解析

メチル水銀の胎生期曝露によって授乳後 1 年目の仔マウス脳中で変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により解析したところ、野生型マウスおよびメタロチオネイン-I/II 欠損マウスともに、約 30,000 遺伝子中発現が増減した遺伝子は認められなかった (Fig. 16)。

## 4. メチル水銀および水銀蒸気複合曝露(授乳 10 日目の仔マウス)

### 1)DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現の解析

メチル水銀-水銀蒸気複合曝露によって新生仔脳中で変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により解析したところ、野生型マウスでは、約 30,000 遺伝子中発現が増大した遺伝子は認められず、1 種の遺伝子発現が減少した (Fig. 17, Table 7)。メタロチオネイン-I/II 欠損マウスでも、発現が増大した遺伝子は認められず、野生型マウスで認められた遺伝子とは異なる 1 種の遺伝子発現が減少した (Fig. 17, Table 8)。なお、メチル水銀-水銀蒸気複合曝露によって新生仔脳中で 5 倍以上の増減を示した遺伝子は、両系統のマウスともに認められなかった (Fig. 17)。

#### 5. 行動影響評価のための胎生期カドミウム経口曝露仔マウスの作製

メタロチオネイン-I/II 欠損マウス(コントロール群:23 匹、カドミウム曝露群:40 匹)および野生型マウス(コントロール群:21 匹、カドミウム曝露群:40 匹)をそれぞれ雌雄番いで1日交配した結果、4 匹以上の仔マウスを出産したマウスは、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスのコントロール群で 23 匹中 6 匹、メタロチオネイン-I/II 欠損マウスのカドミウム曝露群で 40 匹中 6 匹、野生型マウスのコントロール群で 21 匹中 6 匹、野生型マウスのカドミウム曝露群で 40 匹中 8 匹であった。仔マウスの行動影響評価を行うため、出生 7 週後に 1 腹につき雌雄それぞれ 1-2 匹の仔マウスを東京大学へ搬送した。

#### **【考察】**

DNA マイクロアレイ法およびリアルタイム RT-PCR 法の解析により、野生型マウス並びにメタロチオネイン-I/II 欠損マウスともにカドミウムの胎生期曝露によって新生仔脳中で *Trfr* の発現が促進されることが見いだされた。従って、カドミウム胎生期曝露による仔マウスの神経行動毒性に脳内の鉄の動態が関与している可能性が示された。しかしながら、カドミウム胎生期曝露による仔マウスの神経行動毒性と *Trfr* 遺伝子との関係は不明であり、今後、詳細な検討が必要であると思われる。一方、*Ifgb4*、*Sema5a*、*Sep15*、*Akt1s1* および *Def8* については、DNA マイクロアレイ解析ではカドミウム曝露によって発現の変動が認められたものの、リアルタイム RT-PCR 解析では

有意な差は認められなかった。また、カドミウム胎生期曝露によって新生仔脳中で変動した遺伝子について、昨年度実施した DNA マイクロアレイ解析の結果と本年度実施した DNA マイクロアレイ解析の結果を比較したところ、一致した遺伝子は認められず、再現性が得られなかった。ただし、カドミウムを曝露した野生型マウスとメタロチオネイン-I/II 欠損マウスとの比較では、昨年度の結果と本年度の結果で Hmg20b、Nfat5 および Htr5b の 3 遺伝子がともに変動した。しかしながら、リアルタイム RT-PCR 解析では、これら 3 遺伝子の mRNA 発現量には両マウス間で差は認められなかった。このように、DNA マイクロアレイ法は多数の遺伝子の発現変動をスクリーニングする手段としては良いシステムであるが、最終的にはリアルタイム RT-PCR 法やノーザンブロット法による遺伝子発現の確認が必要であると思われる。

メチル水銀を胎生期曝露した野生型マウスの新生仔脳において、Akt1s1、RPS12、PLP、RPS20、RPL38 および Cox7b の発現が抑制され、TIMP4 の発現が促進される傾向が、DNA マイクロアレイ法およびリアルタイム RT-PCR 法の解析により見いだされた。メチル水銀の胎生期曝露による野生型仔マウスの神経行動毒性とこれらの遺伝子発現の変動との関係については、今後、詳細に検討する必要があると思われる。また、メチル水銀を胎生期に曝露した野生型マウスの新生仔脳において、DNA マイクロアレイ解析によって発現量が減少した遺伝子のうち 7 種の遺伝子についてリアルタイム RT-PCR 解析を行ったところ、6 種の遺伝子が DNA マイクロアレイ解析と同様の結果を示した。従って、DNA マイクロアレイ解析とリアルタイム RT-PCR 解析とではほぼ一致した結果が得られた。一方、メチル水銀を胎生期曝露したメタロチオネイン-I/II 欠損マウスの新生仔脳では、RPS12、PLP、RPL38、Cox7b、Xist および TIMP4 の発現が促進される傾向が見いだされた。このように、胎生期メチル水銀曝露による新生仔脳での遺伝子発現において、野生型マウスとメタロチオネイン-I/II 欠損マウスとで正反対の変動を示したが、その理由については今後の課題である。なお、胎生期メチル水銀曝露実験におけるリアルタイム RT-PCR 解析は n=1 であったため、今後、検体数を増やして統計学的な解析を行う必要がある。

また、DNA マイクロアレイ解析において、胎生期のメチル水銀曝露によって新生仔脳中では数

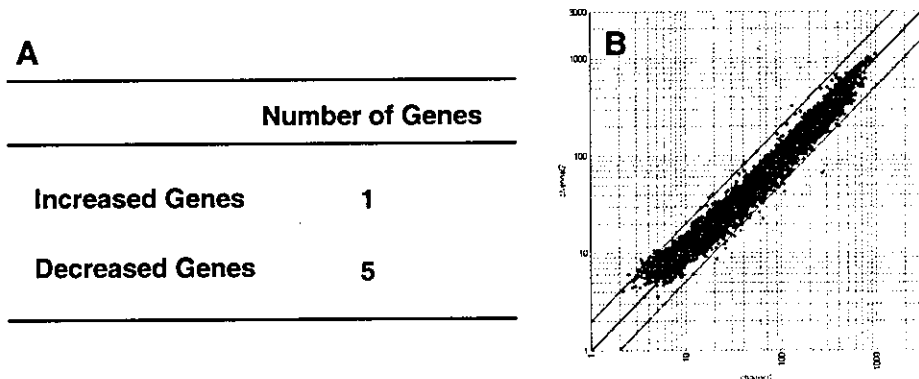
種の遺伝子の発現変動が認められたが、授乳後 1 年目の仔マウス脳中では変動する遺伝子が認められなかった。従って、胎生期のメチル水銀曝露による遺伝子発現の変動は新生仔時期に起こり、1 年後には正常値に回復することが示唆された。さらに、メチル水銀と水銀蒸気の複合曝露によって新生仔脳中で発現が変動した遺伝子は、野生型マウスおよびメタロチオネイン-I/II 欠損マウスともにそれぞれ異なった遺伝子が 1 種ずつであった。しかも、これらの遺伝子は、メチル水銀単独曝露によって発現が変動した遺伝子とは一致しなかった。従って、胎生期のメチル水銀曝露による新生仔脳での遺伝子発現の変動は、水銀蒸気の複合曝露によって修飾される可能性が示された。

#### 【結論】

DNA マイクロアレイ法およびリアルタイム RT-PCR 法の解析により、カドミウムあるいはメチル水銀の胎生期曝露によって新生仔脳で Trfr (カドミウム曝露で変動)あるいは TIMP4 (メチル水銀曝露で変動)の発現がそれぞれ促進されることが明らかとなった。

#### 【研究発表】

- 1) 本田晶子, 長谷川達也, 瀬子義幸, 鈴木純子, 遠山千春, 佐藤雅彦, 永瀬久光. カドミウム曝露による母体および胎仔へのカドミウム蓄積に及ぼすメタロチオネインの影響. フォーラム 2004: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2004 年 10 月 25-26 日, 千葉市).
- 2) 佐藤雅彦, 本田晶子, 吉田 稔, 渡辺知保. 周生期メチル水銀およびカドミウム投与マウス脳における遺伝子発現: マイクロアレイおよび real time RT-PCR による検討. 第 75 回日本衛生学会総会 (2005 年 3 月 27-30 日, 新潟市).
- 3) 本田晶子, 大西沙樹, 長谷川達也, 瀬子義幸, 鈴木純子, 遠山千春, 佐藤雅彦, 永瀬久光. 胎盤中カドミウムの存在状態におよぼすメタロチオネインの関与. 日本薬学会第 125 年会 (2005 年 3 月 29-31 日, 東京).



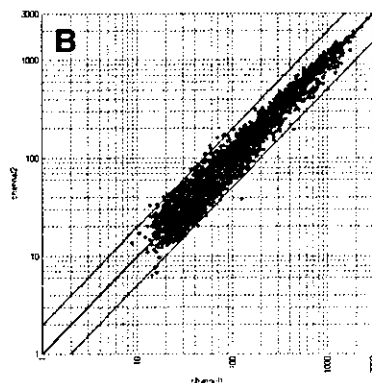
**Fig.1 Gene expression altered by MT-1/1 null mutation in neonatal brain of untreated mice from microarray data**  
**A:** Number of genes altered by MT-1/1 null mutation in untreated mice.  
**B:** Scatter plot of control group (Cy3) of wild-type mice vs control group (Cy5) of MT-1/1 null mice fluorescence intensity signal for each gene.  
**X-axis:** Control group (Cy3) of wild-type mice, **Y-axis:** Control group (Cy5) MT-1/1 null mice.

**Table 1 Altered gene expression from microarray data of control group (Cy3) of wild-type mice vs control group (Cy5) of MT-1/1 null mice hybridization**

Gene Description	Ratio
<b><u>MT-1/1 null (Control) / Wild-type (Control) &gt; 2</u></b>	
Def8 [expressed sequence ai449518]	2.4
<b><u>MT-1/1 null (Control) / Wild-type (Control) &lt; 0.5</u></b>	
unknown (cDNA sequence AF233884)	0.24
hypothetical protein (RIKEN cDNA 1700019B01 gene)	0.39
hypothetical protein (RIKEN cDNA 9130008F23 gene)	0.47
Bax [bcl2-associated x protein]	0.48
Plcb3 [phospholipase c, beta 3]	0.49

**A**

Number of Genes	
Increased Genes	3
Decreased Genes	1

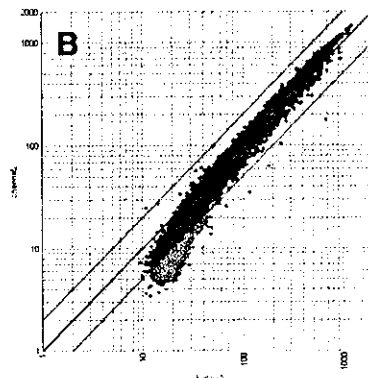


**Fig. 2 Gene expression altered by cadmium exposure in neonatal brain of wild-type mice from microarray data**  
**A :** Number of genes altered by cadmium exposure in wild-type mice.  
**B :** Scatter plot of control group (Cy3) of wild-type mice vs Cd-exposure group (Cy5) of wild-type mice fluorescence intensity signal for each gene.  
**X-axis :** Control group (Cy3) of wild-type mice, **Y-axis :** Cd-exposure group (Cy5) of wild-type mice.

**Table 2 Altered gene expression from microarray data of control group (Cy3) of wild-type mice vs Cd-exposure group (Cy5) of wild-type mice hybridization**

Gene Description	Ratio
<b><u>Wild-type (Cd-exposure) / Wild-type (Control) &gt; 2</u></b>	
Trfr [transferrin receptor]	2.3
Itgb4 [integrin beta 4 subunit]	2.1
Sema5a [sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (tm) and short cytoplasmic domain]	2.1
<b><u>Wild-type (Cd-exposure) / Wild-type (Control) &lt; 0.5</u></b>	
Sep15 [15-kda selenoprotein]	0.49

A	
	Number of Genes
Increased Genes	0
Decreased Genes	3



**Fig. 3** Gene expression altered by cadmium exposure in neonatal brain of MT-I/I null mice from microarray data  
**A** : Number of genes altered by cadmium exposure in MT-I/I null mice.  
**B** : Scatter plot of control group (Cy3) of MT-I/I null mice vs Cd-exposure group (Cy5) of MT-I/I null mice fluorescence intensity signal for each gene.  
 X-axis : Control group (Cy3) of MT-I/I null mice, Y-axis : Cd-exposure group (Cy5) of MT-I/I null mice.

**Table 3** Altered gene expression from microarray data of control group (Cy3) of MT-I/I null mice vs Cd-exposure group (Cy5) of MT-I/I null mice hybridization

Gene Description	Ratio
<u>MT-I/I null (Cd) / MT-I/I null (Control) &gt; 2</u>	
None	
<u>MT-I/I null (Cd) / MT-I/I null (Control) &lt; 0.5</u>	
Mmp24 [matrix metalloproteinase 24]	0.43
Akt1s1 [matrix protein (ma), p15 containing protein data source:pfam, source key:pf01140, evidence:iss putative]	0.26
Def8 [expressed sequence ai449518]	0.34



A	
Number of Genes	
Increased Genes	0
Decreased Genes	19

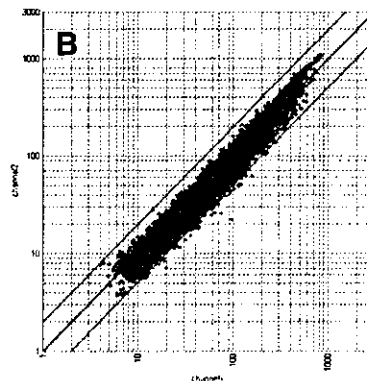


Fig. 4 Gene expression altered by MT-1/1 null mutation in neonatal brain of cadmium-exposed mice from microarray data  
 A : Number of genes altered by MT-1/1 null mutation in cadmium-exposed mice.  
 B : Scatter plot of control group (Cy3) of MT-1/1 null mice vs Cd-exposure group (Cy5) of MT-1/1 null mice fluorescence intensity signal for each gene.

X-axis : Cd-exposure group (Cy3) of wild-type mice, Y-axis : Cd-exposure group (Cy5) of MT-1/1 null mice.

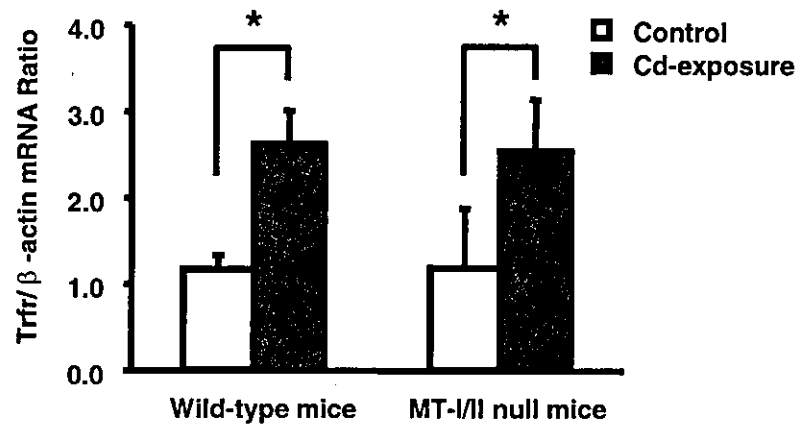
Table 4-1 Altered gene expression from microarray data of Cd-exposure group (Cy3) of wild-type mice vs Cd-exposure group (Cy5) of MT-1/1 null mice hybridization

Gene Description	Ratio
<u>MT-1/1 null (Cd) / Wild-type (Cd) &gt; 2</u>	
None	
<u>MT-1/1 null (Cd) / Wild-type (Cd) &lt; 0.5</u>	
Hmg20b [high mobility group protein 20 b]	0.23
Nfat5 [nuclear factor of activated t-cells 5]	0.39
Zfp346 [zinc finger protein 346]	0.42
hypothetical protein (RIKEN cDNA 1700019B01)	0.42
Ndr2 [n-myc downstream regulated 2]	0.44
related to o-linked glcnac transferase	0.45
hypothetical protein (RIKEN cDNA 4933437N03)	0.45

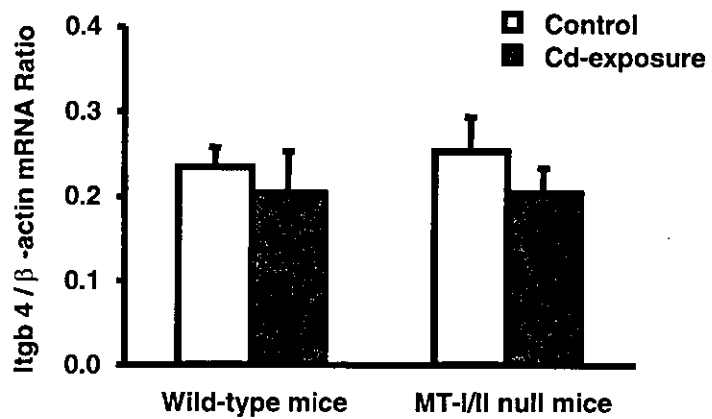
**Table 4-2 Altered gene expression from microarray data of Cd-exposure group (Cy3) of wild-type mice vs Cd-exposure group (Cy5) of MT-1/1 null mice hybridization (Continued)**

<b>Gene Description</b>	<b>Ratio</b>
<b><u>MT-1/1 null (Cd) / Wild-type (Cd) &lt; 0.5</u></b>	
homolog to npd012	0.45
Skat2 [zinc finger protein skat2]	0.46
unclassifiable transcript	0.47
Arhgap6 [rho gtpase activating protein 6]	0.48
riken cdna 2310042n02	0.48
hypothetical protein (RIKEN cDNA C030011J08)	0.49
unclassifiable (RIKEN cDNA 2310007L24 gene)	0.49
Ptgr [prostaglandin f receptor]	0.49
Htr5b [5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5b]	0.49
hypothetical protein (RIKEN cDNA 2700046G09)	0.49
Dctn5 [dynactin 4]	0.50
hypothetical protein (RIKEN cDNA 2310079G19 )	0.50
riken cdna 2310033p09	0.50

## Trfr



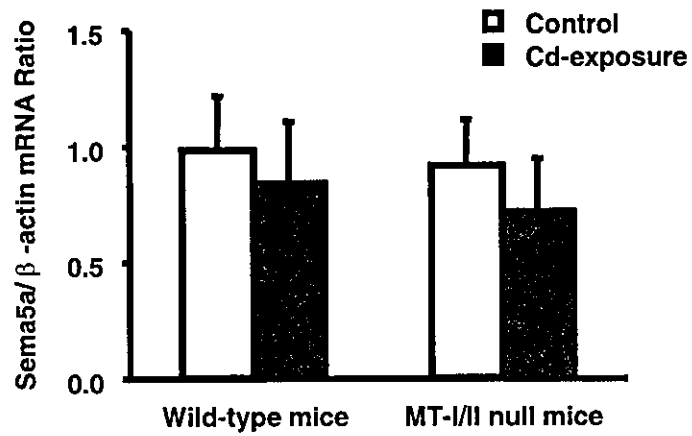
## Itgb4



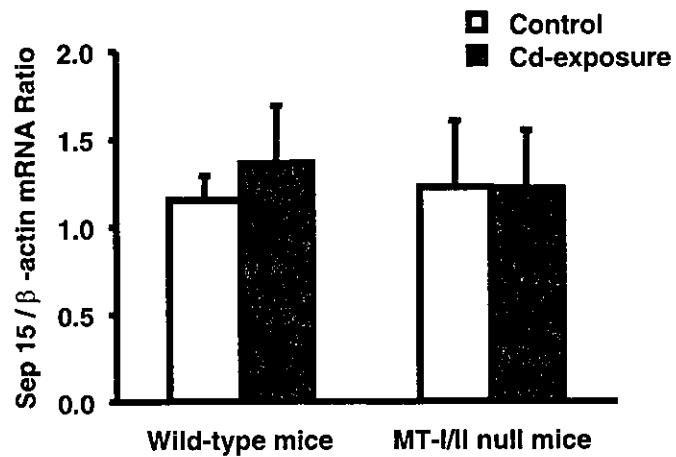
**Fig. 5** Expression of Trfr [transferrin receptor] and Itgb4 [integrin beta 4 subunit] genes in neonatal brain of wild-type mice and MT-1/1 null mice exposed to cadmium during gestation and lactation

Real-time RT-PCR analysis was performed on Trfr and Itgb4 genes. \* P<0.05.

## Sema5a



## Sep15



**Fig. 6** Expression of Sema5a [sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (tm) and short cytoplasmic domain] and Sep15 [15-kda selenoprotein] genes in neonatal brain of wild-type mice and MT-1/1 null mice exposed to cadmium during gestation and lactation

Real-time RT-PCR analysis was performed on Sema5a and Sep15 genes.