

A. 研究目的

前章において、肝毒性化合物の投与による特異的な遺伝子の発現変動と、毒性発現時間に依存した主要な遺伝子発現変動パターンが検出された。本章では、これらの遺伝子発現変動パターンが投与量を変化させた場合にも保持されるか、また、前章で見出された遺伝子が投与量を変化させた場合にはどのような変化を示すかを検討した。前章で生化学検査値が最も顕著に上昇した TA について投与量を変化させて投与し、経時的に採材を行い、RNA を抽出して DNA マイクロアレイによって網羅的に遺伝子発現変動の解析を行った。

B. 研究方法

B-1. 実験材料および試薬

CodeLink™ bioarray、CodeLink™ Expression Assay Expression Kit, Manual Prep および ストレプトアビジン-Cy5 は GE Healthcare アマシャムバイオサイエンス(Buckinghamshire, UK) より購入した。QIAquick PCR Purification Kit および RNeasy Mini Kit はキアゲン (Hilden, Germany) より購入した。NEN Blocking Reagent と Biotin 標識 11-UTP はパーキンエルマーライフサイエンス (Boston, MA) より入手した。

B-2. ラットへの投与

400 mg/kg 体重 (high dose)、150 mg/kg 体重 (medium dose) および 50 mg/kg 体重

(low dose) の TA を生理食塩水に溶解して投与した。投与後 6、12、24、36 および 48 時間に肝臓を採取した。対照群には生理食塩水を 2 mL/kg 体重で投与し、48 時間後に肝臓を採取した。各群 4 匹で検討を行った。

B-3. DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現変動解析

DNA マイクロアレイによる遺伝子発現変動解析に用いる cRNA は、GE healthcare アマシャムバイオサイエンスの CodeLink™ Bioarray Perfect System を用い、同社のプロトコールに従って合成した。試薬類は CodeLink™ Expression Assay Expression Kit, Manual Prep に含まれるものをそのまま使用した。cRNA 合成は以下に述べる手順にて行った。

使用する Total RNA 全てについて、10 mM Tris-HCl (pH 7.6) における 260 nm と 280 nm の吸光度を測定し、260 nm/280 nm の吸光度比が 1.8 以上であることを確認し、クオリティーチェックとした。RNA 2 µg を使用し、対照となるバクテリア RNA 0.2 pg および T7 Oligo dT プライマーを加え、最終 12 µL として 70°C で 10 分間反応させ、プライマーのアニールングを行った。次に逆転写バッファー、dNTP mix、RNase インヒビターおよび逆転写酵素を加え、最終 20 µL として 42°C で 2 時間反応させることによって、逆転写反応を行った。反応液の全量にさらに二本鎖合成反応用バッファー、dNTP mix、RNase H

および DNA polymerase mix を加え、最終 100 μ L として 16°C で 2 時間反応させ、cDNA の二本鎖化反応を行った。その反応液を QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製し、真空乾燥機により濃縮した。濃縮液の量を 9.5 μ L にそろえ、T7 反応バッファー、T7 ATP、T7 GTP、T7 CTP、T7 UTP および Biotin 標識 11-UTP を混合したものに濃縮液を 9.5 μ L および T7 Enzyme mix を加え、最終 40 μ L として 37°C で 14 時間、転写反応を行った。転写反応により合成された Biotin 標識 cRNA を RNeasy Mini Kit を用いて精製し、再び 260 nm における吸光度を測定し、cRNA の定量を行い、同時に上述の 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) におけるクオリティーチェックを行った。

合成した cRNA 10 μ g を用い、最終 20 μ L にした後、5 μ L の断片化反応用バッファーを加え、94°C で 20 分間断片化処理した後、5 分間氷上で急冷した。断片化した試料に 2 種類のハイブリダイゼーションバッファーを加え、最終 260 μ L とした後、90°C で 5 分間 cRNA の熱変性を行い、5 分間氷上で急冷した。熱変性させた試料を 250 μ L 採取し、急冷後 30 分以内にアレイスライドに注入し、CodeLink INNOVA 4080 シェイカー (GE Healthcare アマシャムバイオサイエンス) を用いて 37°C 300 rpm で 18 時間旋回振とうし、ハイブリダイゼーションを行った。

アレイスライドからチャンパーをは

がし、46°C の 0.75 x TNT バッファー中で正確に 1 時間インキュベーションした。これ以後の操作は室温が 23°C の条件で行った。続いて TNB バッファーで 500 倍に希釈したストレプトアビジン-Cy5 溶液と 30 分間反応させ、染色を行った。これ以後の操作は全て遮光した状態で行った。染色後に TNT バッファーで 5 分間の洗浄を 4 回繰り返し行った。最後に、0.05% Tween 20 溶液で 30 秒間洗浄を行い、日立製作所の 05PR-22 遠心器を用いて 644 g (2,000 rpm)、3 分間遠心を行い、スライドについた水滴を除去した。乾燥後のスライドはスキャン分析まで遮光して保存した。

アレイスライドのスキャンは、Agilent G2565BA マイクロアレイスキャナを用いて行った。スキャンした画像の数値化および補正は GE Healthcare アマシャムバイオサイエンスの CodeLink Expression Analysis ソフトウェアを使用した。

B-4. 血清の生化学検査

採取した血清は、エスアールエルに依頼し、AST、ALT、LDH およびビリルビン値の 4 項目を測定した。

B-5. DNA マイクロアレイによって得られたデータの解析

データの総合的な補正として GeneSpring に含まれる median normalization を適用した。さらに flag がたっている遺伝子を除外し、present (蛍

光強度が十分に得られており、スポットの形状に不良がないもの)と判断されたもののみを解析に使用した。Flag がたつものとして、CodeLink™ マイクロアレイに付随するアレイスライド製作工程の不良スポット、蛍光強度が低いスポット、蛍光検出の段階でスポット不良なものが挙げられる。その結果、本章で使用したアレイスライド CodeLink™ UniSet Rat I (GE Healthcare アマシャムバイオサイエンス) に搭載された9,936遺伝子のうち、7,986 遺伝子が全ての投与群において present であり、本章の検討で使用することができた。遺伝子発現の誘導および抑制の評価は、2 倍以上または 1/2 以下の変動を基準とした。また、階層クラスタリングおよび QT クラスタリングにおいて、相関値は Standard correlation を使用した。

C. 実験結果

C-1. 各 TA 用量投与群における血清試料の生化学検査

TA の各投与量における AST、ALT、LDH について投与後 6、12、24、36、48 時間の各 4 試料の平均値に標準誤差を付した結果を以下に示した (Fig. 1)。AST は TA 投与後 24 時間以後においては本章で検討したどの投与量においても活性値の有意な上昇が認められ、24 時間が最も高値を示した。ALT は AST と非常によく似た変化を示した。LDH 値でも 24 時間において high と medium dose では活性値の

上昇が認められたが、low dose においては認められなかった。また、LDH は試料採取時の溶血の影響を受けたものがあり、その試料の値を除外してあるため、有意差検定を行うことができなかった。また、間接ビリルビン値は全投与群において変化せず、直接ビリルビン値は対照群を含むほとんどの試料で 0 mg/dL であったが、high の 24 時間においてのみ 0.3 mg/dL まで増加した (data not shown)。

C-2. TA 投与後 24 時間において発現が変動した遺伝子の分類

C-1 において、TA 投与後 24 時間においていずれの投与量においても肝障害の発現が認められた。以下に TA 投与後 24 時間において全ての投与量において変動が認められた遺伝子のうち、アノテーションが明確であったものをその機能で分類したものを示す (Table 1)。

本章における検討では、全ての投与量で 24 時間において誘導された遺伝子は 315 種類で、抑制された遺伝子の 479 種類を下回った。また、6、12、36、48 時間において誘導された遺伝子の数はそれぞれ 70、284、242、208 種類であり抑制されたものはそれぞれ 53、369、257、163 種類であり、24 時間において最も多く遺伝子が変動していた。24 時間で変動した遺伝子のうち、EST など機能が明確でないものを除いてカテゴリー別に分類すると誘導が 72 種類、抑制が 160 種類と分類された。その中でも多く誘導されたの

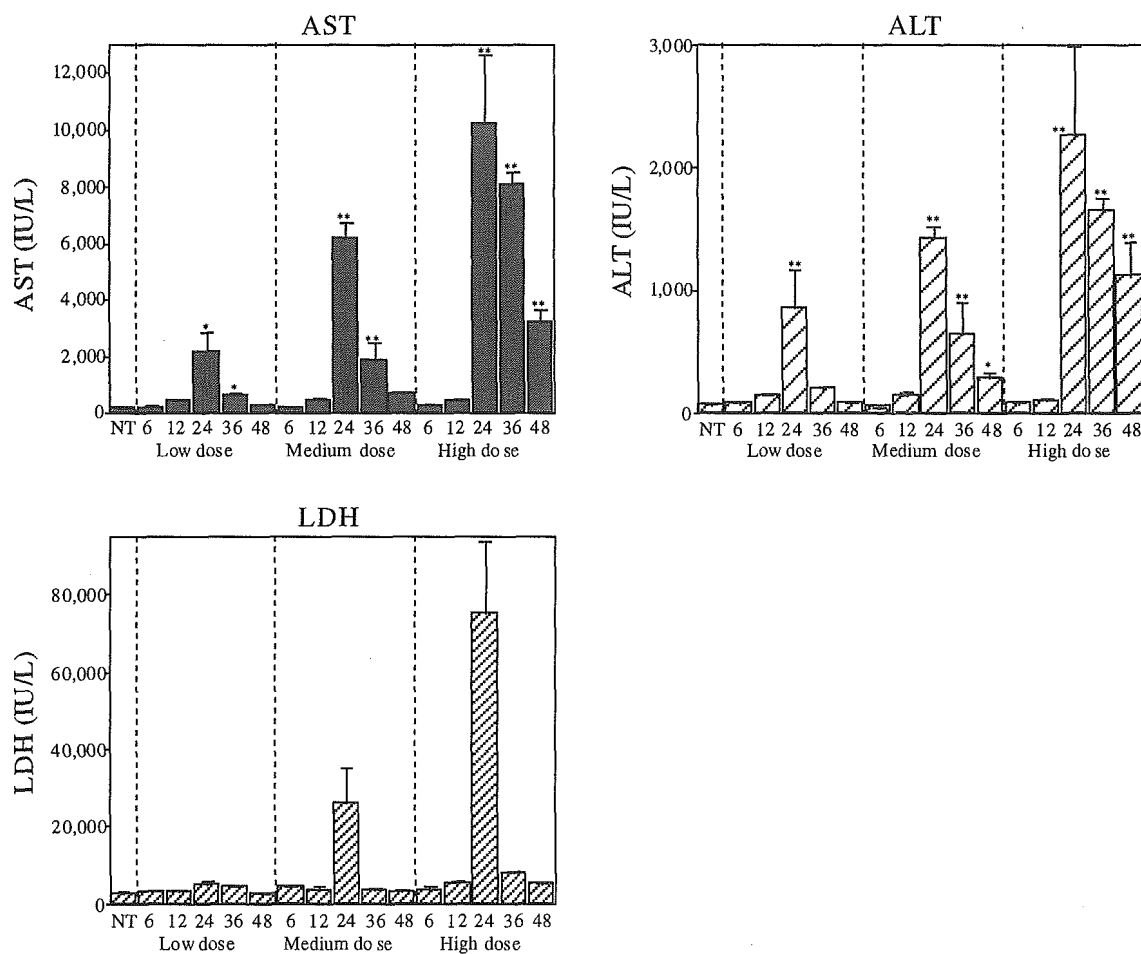


Fig. 1. Changes of AST, ALT and LDH in TA-administered rat serum.

Data are expressed as mean \pm SE from four rats. Significantly different from NT group

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). NT; non-treated.

は nucleic acid binding の遺伝子であり、抑制されたのは enzyme, structural protein, transport の遺伝子であった。

C-3. 階層クラスタリングによる遺伝子変動パターンの解析

それぞれの投与群で各時間における遺伝子変動パターンを分類するために、投与群別の階層クラスタリングを行った結果を以下に示す(Fig. 2A)。いずれの投与

量においても毒性発現時間である 24 時間を境に大きく二つに分かれた。さらに、24 時間以後の階層においても 24 時間と 36、48 時間の二つに分けられた。また、毒性発現前後で分かれた二階層間の距離は、その投与量依存的に遠ざかっていく傾向が見られた。さらに、全ての投与群についてまとめて階層クラスタリングを行った結果を以下に示す (Fig. 2B)。先ほどと同様に毒性が発現する前である 12

Table 1. Classification of genes those expression were significantly changed in all TA-administered groups.

Category	Total	Present	Up (%)	Down (%)
Apoptosis regulator	33	25	4 (16.0)	0 (0)
Cancer	51	28	3 (10.7)	0 (0)
Cell cycle regulator	25	19	2 (10.5)	1 (5.3)
Chaperone	33	19	1 (5.3)	2 (10.5)
Enzyme	852	657	24 (3.7)	100 (15.2)
Immunity protein	42	31	0 (0)	2 (6.5)
Microtubular protein	16	8	0 (0)	1 (12.5)
Nucleic acid binding	175	126	12 (9.5)	6 (4.8)
Other groups	102	71	2 (2.8)	1 (1.4)
RNA	2	1	0 (0)	0 (0)
Signal transducer	201	124	7 (5.6)	9 (7.3)
Storage	3	2	0 (0)	0 (0)
Structural protein	181	116	7 (6.0)	12 (10.3)
Transport	313	208	10 (4.8)	26 (12.5)
Total	2,029	1,435	72 (5.0)	160 (11.1)

Total: Gene numbers on this array

Present: Gene numbers of enough spot density

12 時間以前の early phase と毒性が発現した 24 時間以後の late phase の大きく二つに分けられた。また、全ての投与量の 24 時間群でそれぞれが同等な階層が形成された。Early phase ではそれぞれの遺伝子群は投与時間依存的に階層を形成するが、late phase では投与量依存的に階層を形成した。

C-4. 時間別 QT クラスタリングによる遺伝子発現変動プロファイルの解析

投与時間毎の主要な遺伝子発現変動プロファイルを検出するために、前章で用いた QT クラスタリングを各時間に分けて行った。QT クラスタリングに用いた条件は、遺伝子数が 1,000 以上で、6、12、24、36 および 48 時間における相関係数

の値はそれぞれ 0.82、0.92、0.91、0.88 および 0.86 とした。この値はクラスターが誘導型と抑制型の 2 種類が検出される最大の値である。誘導型のククラスターには、6、12、24、36 および 48 時間においてそれぞれの遺伝子数が 1,028、1,010、1,003、1,008 および 1,000 であり、抑制型のクラスターには、6、12、24、36 および 48 時間においてそれぞれ 1,903、1,724、1,546、1,533 および 1,513 の遺伝子が含まれていた。それらのクラスターに含まれる遺伝子の相対的発現変動量の平均値とメディアン値について以下に示す (Fig. 3)。

誘導型のクラスターでは平均値とメディアン値において値の大きさに少し差があるものの、誘導型、抑制型どちらのク

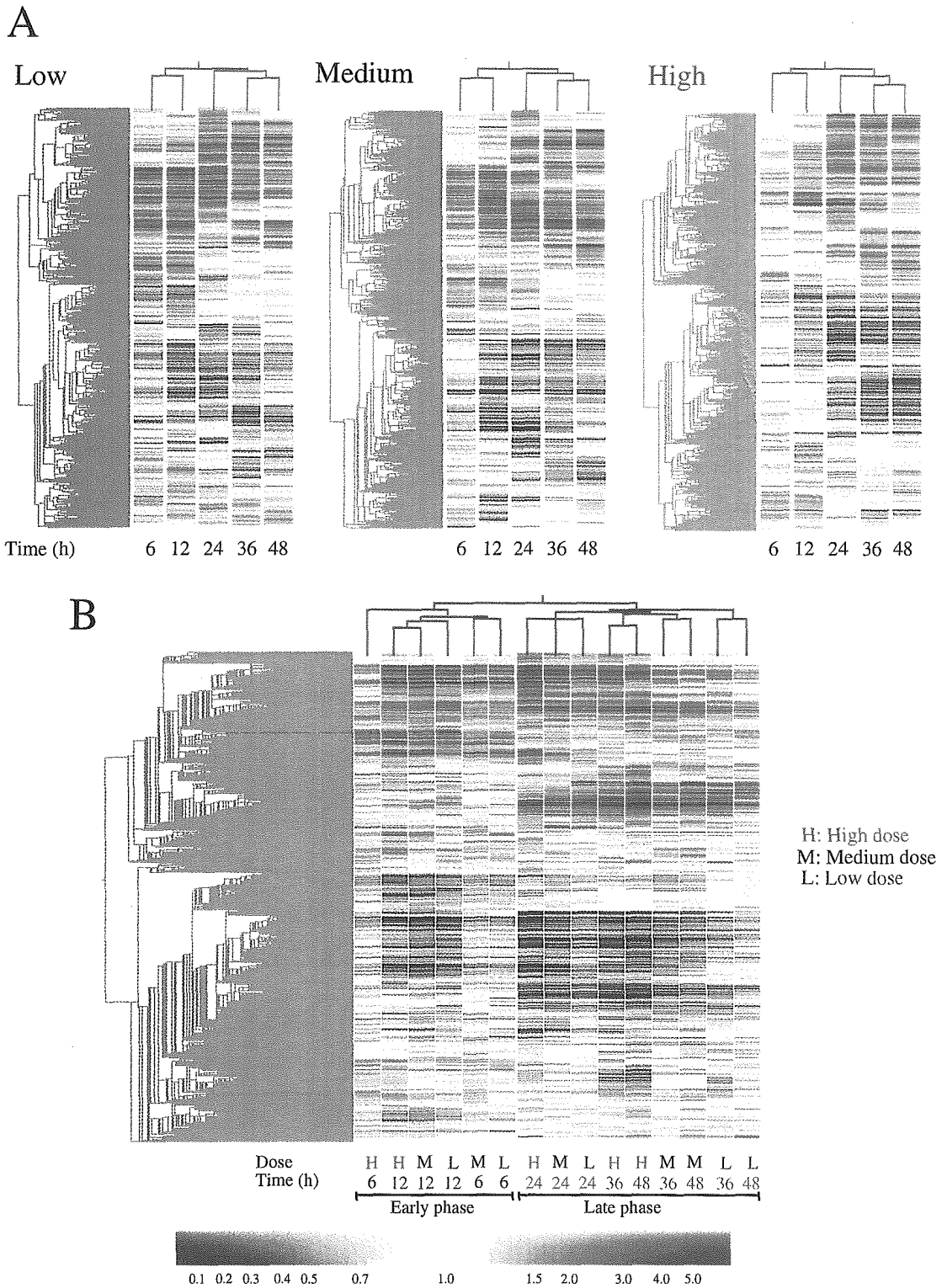


Fig. 2. Hierarchical clustering analyses of hepatic gene expression profiles. There are 7,978 present genes. Data are expressed in a color-coded matrix. Red and blue colors in matrix indicate the expression levels of above and below the median respectively. Dendrograms of each group (above the matrix) and genes (left of the matrix) represent the overall similarities in gene expression profiles. Hierarchical clustering of each dosage (A) and of all TA-administered samples (B).
H: high dose (400 mg/kg), M: medium dose (150 mg/kg), L: low dose (50 mg/kg)

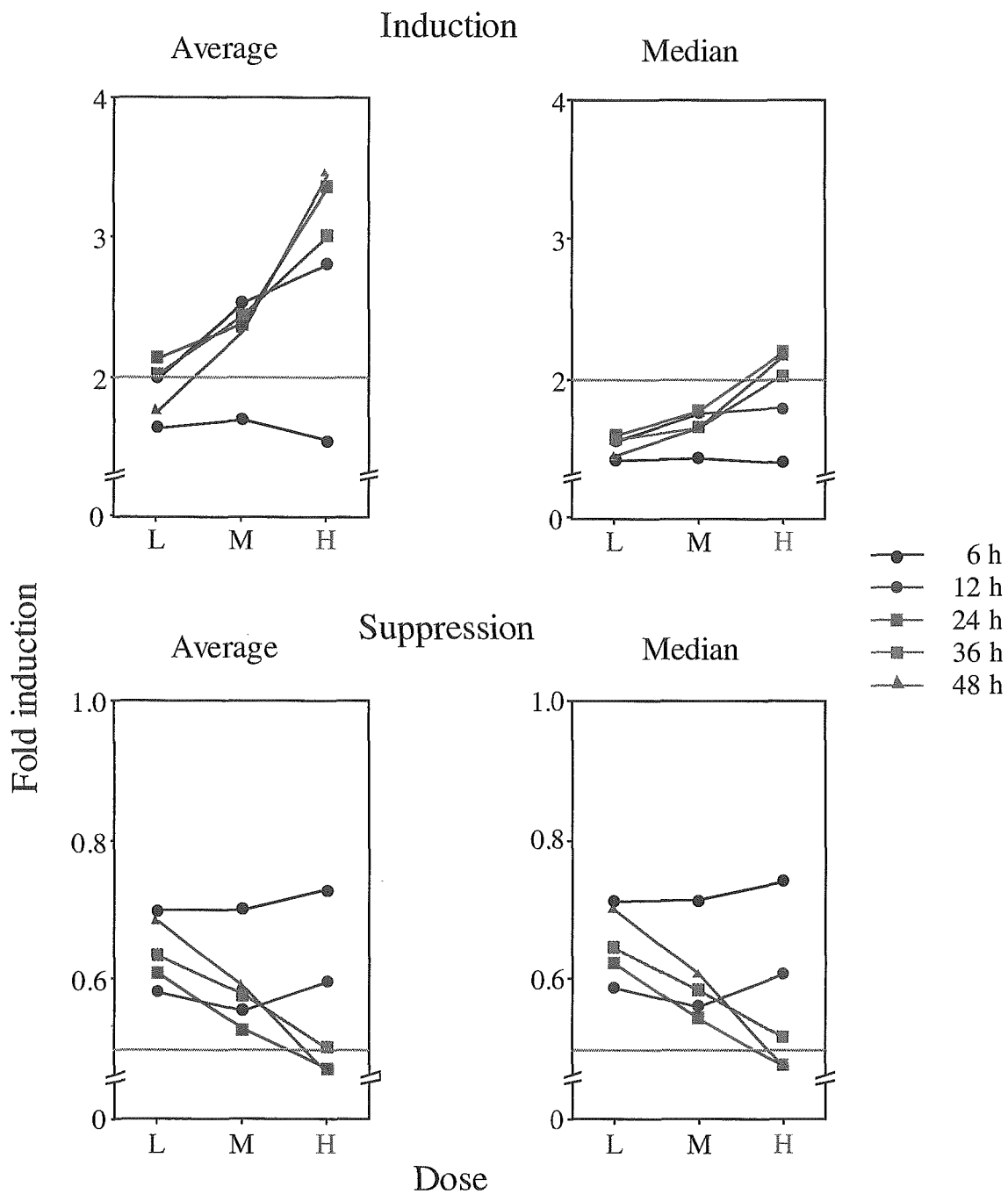


Fig. 3. QT clustering analysis based on the dose of TA.

Analysis settings are described in Result. In this analysis, 6, 12, 24, 36, and 48 hours after administration were evaluated. Data are expressed as average or median value of these clusters. Minimal correlation values selected in this analysis were as follows; 6 h: 0.82, 12 h: 0.92, 24 h: 0.91, 36 h: 0.88 48 h: 0.86.

ラスターにおいても、平均値とメディアン値の傾向に違いは認められなかった。また、毒性が発現していない 12 時間以前では、検出された遺伝子変動プロファイルは low、medium、high の各投与量で差は認められないが、毒性が発現した 24 時間以後では、誘導型、抑制型どちらのクラスターにおいても投与量依存的にその誘導または抑制の変動値は大きくなっていった。

C-5. 投与量別 QT クラスタリングによる遺伝子発現変動プロファイルの解析

投与量毎の主要な遺伝子発現変動プロファイルを検出するために、QT クラスタリングを各投与量で行った。QT クラスタリングに用いた条件は、遺伝子数が 1,000 以上で、low、medium および high dose における相関係数の値はそれぞれ 0.47、0.58 および 0.68 とした。この値は先ほどと同様に誘導型と抑制型の 2 種類のクラスターが検出される最大の値である。誘導型のクラスターには、low、medium および high dose においてそれぞれ 1,021、1,003 および 1,000 遺伝子が含まれ、抑制型のクラスターには、low、medium および high dose においてそれぞれ 2,129、2,050 および 1,606 遺伝子が含まれていた。さらに、相関値を引き上げて一つのクラスターのみ検出される条件とした場合、抑制型のクラスターが検出された。そのクラスターには、low、medium および high dose においてそれぞれ 1,016、1,002 およ

び 1,016 遺伝子が含まれていた。検出された全てのクラスターそれぞれに含まれる遺伝子の相対的発現変動量の平均値と、そのメディアン値について以下に示す (Fig. 4)。

誘導型、抑制型どちらのクラスターにおいても、平均値、メディアン値が同様の傾向を示した。さらに、ほぼ全てのクラスターにおいて投与量とは関係なく毒性が発現した 24 時間をピークとする発現変動プロファイルを示した。さらに、その発現変動プロファイルは投与量依存的に変動値の幅が大きくなり、さらにその相関係数も投与量依存的に増加する傾向が認められた。相関係数を高めた場合でもそれらの傾向に変化はなく、さらに変動値の幅が大きくなる傾向が認められたが、相関係数の投与量依存性は認められなくなった。

C-6. 肝毒性発現関連遺伝子の検討

前章において見出された肝毒性化合物に共通して変動した遺伝子のうち、本章で使用したアレイスライドに搭載されていたものについて検索を行った。その結果誘導型で 9 種類、抑制型で 7 種類の遺伝子が搭載されていた。それらの遺伝子群の名称 (Table 2) とその発現変動を投与量毎にまとめたものについて以下に示す (Fig. 5)。

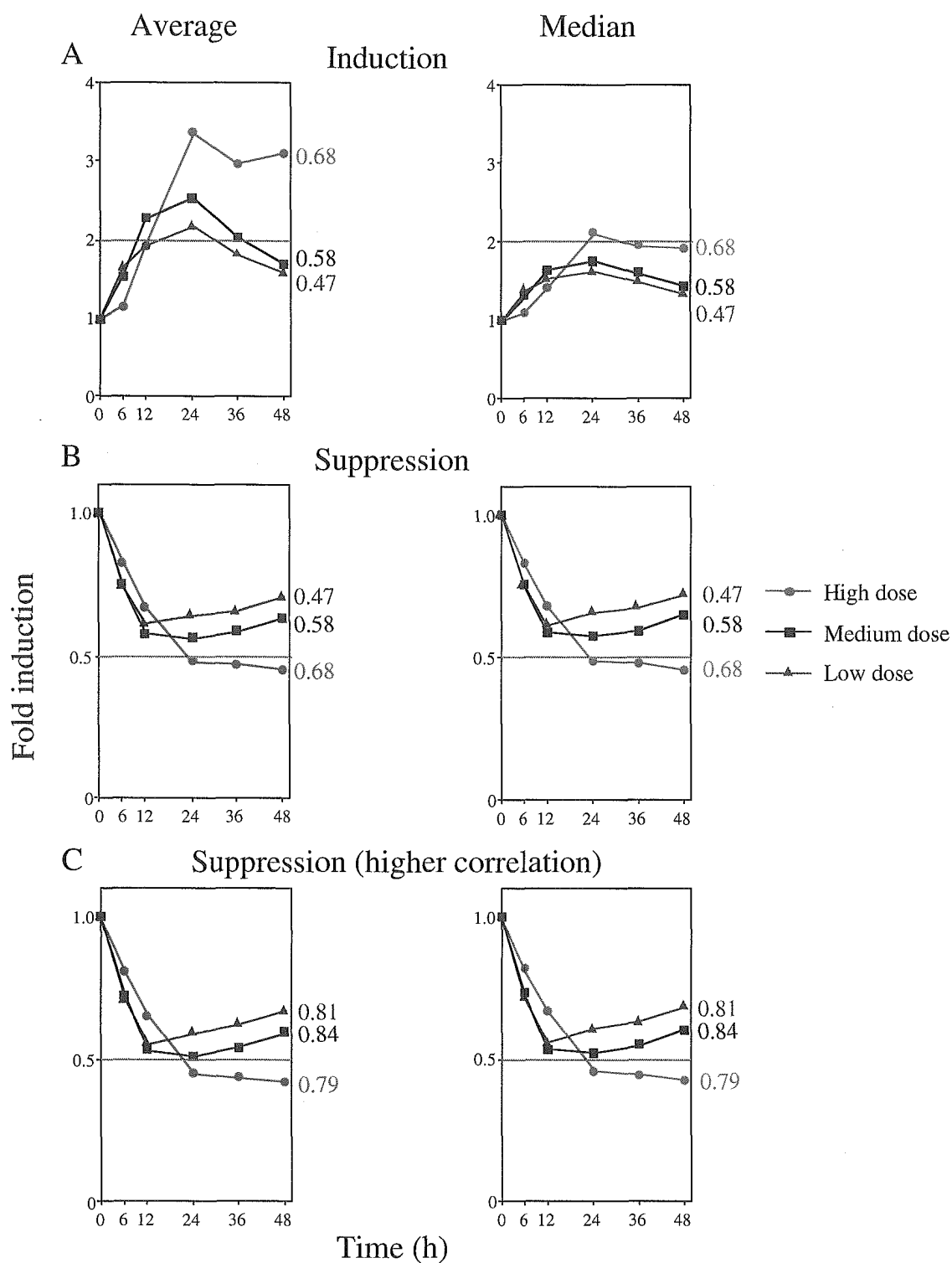


Fig. 4. QT clustering analysis based on the time after TA-administration. Analysis settings are described in Result. In this analysis, 6, 12, 24, 36, and 48 hours after administration were evaluated. Correlation values used in this analysis were as follows; low-limited correlation; H: 0.68, M: 0.58, L: 0.47 (A) and (B), high-limited correlation; H: 0.79, M: 0.84, L: 0.81 (C). Data are expressed as average or median value of these clusters.

Table 2. Genes appeared both in CodeLink UniSet Rat I and 20 candidate genes in the previous chapter.

Symbol	Genbank ID	UniGene ID	Description
Up regulated genes			
Casp3	NM_012922	Rn.10562	RATTUS NORVEGICUS CASPASE 3, APOPTOSIS RELATED CYSTEINE PROTEASE (ICE-LIKE CYSTEINE PROTEASE) (CASP3), MRNA
Ccng1	NM_012923	Rn.5834	RATTUS NORVEGICUS CYCLIN G1 (CCNG1), MRNA
Cxcl10	U22520	Rn.10584	RATTUS NORVEGICUS INTERFERON INDUCIBLE PROTEIN 10 (IP-10) MRNA, COMPLETE CDS
Dia4	NM_017000	Rn.11234	RATTUS NORVEGICUS DIAPHORASE (NADH/NADPH) (DIA4), MRNA
Gadd45a	NM_024127	Rn.10250	RATTUS NORVEGICUS DNA-DAMAGE-INDUCIBLE TRANSCRIPT 1 (GADD45A), MRNA
Hmox1	NM_012580	Rn.3160	RATTUS NORVEGICUS HEME OXYGENASE (HMOX1), MRNA
Lyz	NM_012771	Rn.2283	RATTUS NORVEGICUS LYSOZYME (LYZ), MRNA
Tdag	NM_017180	Rn.40778	RATTUS NORVEGICUS T-CELL DEATH ASSOCIATED GENE (TDAG), MRNA
Txnrd1	NM_031614	Rn.9474	RATTUS NORVEGICUS THIOREDOXIN REDUCTASE 1 (TXNRD1), MRNA
Down regulated genes			
Avpr1a	Z11690	Rn.32282	RATTUS NORVEGICUS MRNA FOR V1A ARGININE VASOPRESSIN RECEPTOR
Hadhsc	NM_057186	Rn.17172	RATTUS NORVEGICUS HYDROXYLACYL-COENZYME A DEHYDROGENASE, SHORT CHAIN (HADHSC), MRNA
Nme3	NM_053507	Rn.8785	RATTUS NORVEGICUS EXPRESSED IN NON-METASTATIC CELLS 3, PROTEIN (NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE KINASE) (NME3), MRNA
Rb1	D25233	Rn.55115	RATTUS NORVEGICUS MRNA FOR RETINOBLASTOMA PROTEIN, PARTIAL SEQUENCE
Ste	NM_012883	Rn.32104	RATTUS NORVEGICUS ESTROGEN SULFOTRANSFERASE (STE), MRNA
Sult1a2	NM_031732	Rn.9937	RATTUS NORVEGICUS SULFOTRANSFERASE FAMILY 1A, PHENOL-PREFERRING, MEMBER 2 (SULT1A2), MRNA
Tgfb1i4	NM_013043	Rn.3545	RATTUS NORVEGICUS TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA STIMULATED CLONE 22 (TGFB1I4), MRN

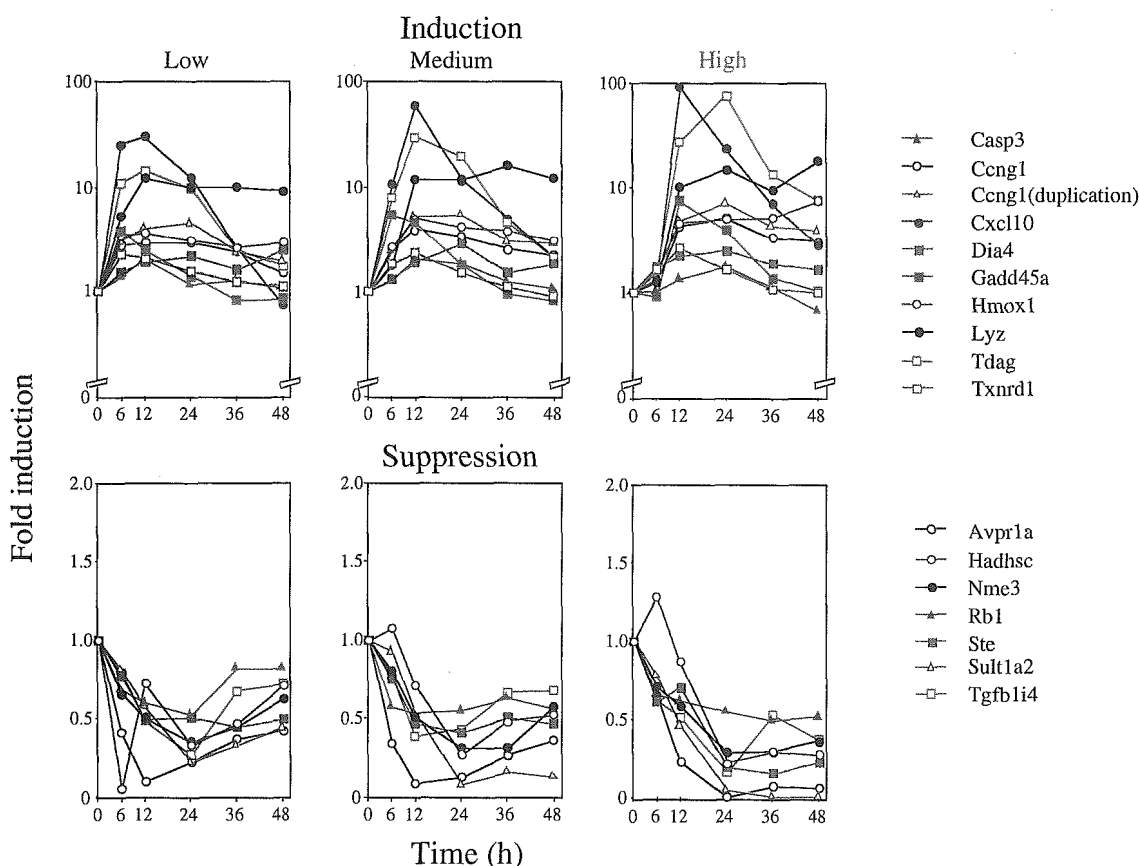


Fig. 5. Expression profiles of the selected genes. Data are from pooled RNA of four rats. Vertical axis of induction is ruled by logarithm. The induction group consists of 9 genes and the suppression group consists of 7 genes. Gene names, accession numbers and symbols are listed in Table 2.

本章で検討に使用した CodeLink™ UniSet Rat I と前章で検討した Rat Drug Response Chip に共通して搭載されていた遺伝子 (誘導 9 種類、抑制 7 種類) 全てにおいて前章で見出された発現変動と同様の傾向を示した。さらに、これらの遺伝子はその投与量と関係なく、非常に似た変動値を示した。

D. 考察

前章では、TA を含む 5 種類の肝毒性化合物における遺伝子発現変動を検討した。その結果、肝毒性マーカーとなりうる遺伝子と解析方法が見出された。本章では、前章の手法が肝毒性化合物の投与量を変化させた場合にも有効であるかを検討するために、3 種類の TA 投与量で遺伝子発現変動解析を行った。投与量の設定に際しては、過去の報告を参考に決定した (Zaragoza et al., 2000; Zimmerman, 1999)。

肝障害の発現とその程度を確認するために、前章での検討の結果、応答性の優れていた AST、ALT、LDH について測定を行った。AST、ALT、LDH いずれも 24 時間においてその活性が最大であった。この結果は前章における検討結果と一致しており、前章と同様に毒性が発現していることが確認できた。しかしながら、low dose は参考文献によると単回投与による肝毒性は発現しないとされており (Zimmerman, 1999)、本章においても無毒性用量となることを期待して検討した投

与量であった。LDH の活性上昇は認められなかったものの、AST、ALT は活性の有意な上昇が認められた。原因は分からないが、無毒性用量での検討は本研究において重要であるので、今後の検討課題の一つである。

遺伝子の機能別での発現変動の特徴を検討するために、本章で使用したマイクロアレイに搭載された遺伝子の機能によるカテゴリー分けを行った。TA 投与後 24 時間において全ての投与量において変動した遺伝子をカテゴリーに分類したところ、多くの遺伝子が変動したカテゴリーはいくつかあるものの、カテゴリーごとで搭載されている遺伝子数が大きく異なるため、有用な結果を得ることができなかった。

現在までに TA 投与による遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイによって網羅的に検討した報告がなされている (Bulera et al., 2001)。この報告において、5 から 6 週齢の Wistar 系雄性ラットに 500 mg/kg 体重の TA を投与後 24 時間において、搭載された 1,600 遺伝子中 133 遺伝子が 2 倍以上誘導され、163 遺伝子が 50% 以上抑制されていた。本章の検討で使用したマイクロアレイに搭載されている 9,936 遺伝子のうち、先の報告で誘導された遺伝子は 49 種類 (39.5%)、抑制された遺伝子は 68 種類 (41.7%) が搭載されていた。誘導された 49 種類のうち、本章では 39 種類 (79.6%) の遺伝子が 2 倍以上誘導されており、抑制された 68

種類のうち 64 種類 (94.1%) が 50%以上抑制されていた。その中でも、特に TA を活性中間体に代謝する FMO1 は 10%以下にまで抑制されていた。最終的に、共通で搭載されていた顕著な変動を示した 127 遺伝子のうち 103 種類 (88.0%) が Bulera らの報告と一致していた。このことは、過去の報告と照らし合わせても、今回の実験手法や解析が確実に行われていることを示すものである。

本章では、各投与群と全投与群とをまとめて階層クラスタリングを行った。各投与群で行った場合、毒性発現時間と規定した 24 時間の前後で大きく二つに分かれた。また、全投与群における解析結果では、毒性発現前である 12 時間以前では時間依存的に階層が形成され、毒性発現時間の 24 時間では各投与量が一つの階層を形成した。それ以降の時間では投与量依存的にそれぞれ小さな階層を形成した。TA を用いて投与量、投与時間を同時に検討した報告はこれまでに 1 報存在している。低用量 (40 mg/kg 体重) の 3、6、18 時間と高用量 (500 mg/kg 体重) の 8、24 時間が検討されており、早い時間すなわち低用量の 3、6、時間と高用量の 8 時間の階層と遅い時間すなわち低用量の 18 時間と高用量の 24 時間で階層が形成されており (Bulera et al., 2001)、本章の結果とほぼ一致していた。このことも今回の検討における結果の確実性を証明している。これらの結果に加えて、今回の検討によって明らかになった新しい知

見として、毒性が発現する以前では個々の遺伝子発現変動における傾向は投与量において差異がなく、その処置時間依存的に発現変動が起こり、毒性発現直後の 24 時間では投与量毎で非常に似通った発現変動を示し、毒性発現後の時間においては投与量、すなわち毒性の程度に従ってそれぞれの遺伝子発現変動の傾向が分岐していくことが示された。さらに、投与量毎で行ったクラスタリングでも投与量に依存せず同様の傾向を示した。加えて、毒性発現直後の階層と発現後 12 時間以上経過後の階層の距離は投与量に依存して近づいていった。このことは高用量の処置による毒性の残存度を反映していると考えられる。

さらに詳細に時間毎の遺伝子発現変動について検討するために、前章で使用した QT クラスタリングによって時間毎の主要な遺伝子発現の傾向について検討した。その結果、毒性が発現する以前では投与量に依存しないで、遺伝子発現変動の幅に差がないパターン、すなわちグラフが投与量依存的に変動せず傾きがないパターンが得られた。一方、毒性が発現してからは遺伝子発現変動の幅が投与量依存的に変化する、すなわちグラフが投与量依存的に傾くパターンが得られた。このことから毒性発現前では遺伝子発現変動量は投与量に関係なく同等のレベルで変化しているが、毒性発現後には投与量依存的に遺伝子発現量の変動の幅が大きくなり、毒性発現のピーク時間を超え

でもその傾向は維持されることが示された。また、この結果は本章における階層クラスタリング解析によって見出された、毒性発現前には投与量依存的に階層を形成し、毒性発現後には投与量依存的な階層を形成する結果と一致するものであった。

前章での QT クラスタリングによる主要な遺伝子発現パターンの検出が投与量を変化させても適用できることを確認するために、投与量毎の主要な遺伝子発現変動を QT クラスタリングで前章と同様の手法で検討した。その結果、投与量に関係なく、主要な発現パターンとして、血清検査値の推移を反映した遺伝子発現変動パターン、すなわち投与後 24 時間をピークとするパターンが検出された。また、検出された誘導、抑制それぞれの遺伝子発現変動パターンもその投与量依存的に誘導または抑制の程度が大きくなった。このことから、投与量に関係なく主要な遺伝子発現変動パターンは血清検査値の変動を反映することが示され、ともすれば血清検査値の測定では検出されない無毒性用量においても遺伝子発現変動パターンは鋭敏に反応可能性が示唆された。この点から無毒性用量における確認は本章における重要な検討課題の一つである。

前章で TA を含む 5 肝毒性化合物について Rat Drug Response Chip によって検討した際にマーカーの可能性があるとされた誘導、抑制それぞれ 10 遺伝子に対

して、今回の CodeLink™ マイクロアレイに搭載されているものについて遺伝子発現変動の確認を行った。その結果、両方のマイクロアレイに搭載されていた遺伝子の CodeLink™ マイクロアレイにおける遺伝子発現変動プロファイルは、前章の Rat Drug Response Chip における結果と誘導、抑制ともに高い相関を示した。また、それらの特異的に誘導あるいは抑制された個々の遺伝子においてもその投与量や誘導、抑制のパターンに関係なくよく似たレベルでの発現変動プロファイルを示した。このことから本研究で見出された遺伝子は投与量に依存せずに、毒物に対し低用量でも高用量の場合と同様に敏感に反応する遺伝子であることが示された。このことから、これら遺伝子は毒性マーカーとして有用である可能性が示唆された。

本章で行ったような、投与量と時間を同時に検討した報告は、APAP や BB においてなされている。APAP では 5 週齢の Fischer 系雄性ラットを使用した 50、150、1500 mg/kg 体重での 6、24、48 時間における検討 (Heinloth et al., 2004) で、BB では本検討と同程度の体重の Wister 系雄性ラットを使用した 0.5、2.0、5.0 mmol/kg 体重での 6、24、48 時間における検討 (Heijne et al., 2004) である。しかし、どちらの報告も DNA マイクロアレイによって変動した遺伝子をシグナルカスケードにまとめるに留まっており、遺伝子発現変動の法則性についての検討はなされ

ていないため、本章で得られた結果と比較検討を行うことはできない。

E. 結論

QT クラスタリングによる毒性評価は、複数の化合物において、投与量を問わず遺伝子発現変動パターンを検出することによって、血清検査値よりも優れた毒性予測ができる可能性が示唆された。この方法を応用して、新薬開発における候補化合物の毒性発現の可能性評価も期待されるが、無毒性量での検討など、いくつかの検討課題が残っている。また、複数の遺伝子が投与量、投与化合物に関係なく毒性発現時間依存的に変動しており、これらの遺伝子が毒性マーカーとして使用できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Minami K, Maniratanachote R, Katoh M, Nakajima M, and Yokoi T. (2006) Simultaneous measurement of gene expression for hepatotoxicity in thioacetamide-administered rats by DNA microarrays. *Mutation Research*, **603**: 64-73.

G. 知的財産権の出願・登録 なし

H. 参考文献

Bulera SJ, Eddy SM, Ferguson E, Jatkoe TA, Reindel JF, Bleavins MR and De La Iglesia FA (2001) RNA expression in the early characterization of hepatotoxicants in Wistar rats by high-density DNA microarrays. *Hepatology* **33**: 1239-1258.

Heinloth AN, Irwin RD, Boorman GA, Nettesheim P, Fannin RD, Sieber SO, Snell ML, Tucker CJ, Li L, Travlos GS, Vansant G, Blackshear PE, Tennant RW, Cunningham ML and Paules RS (2004) Gene expression profiling of rat livers reveals indicators of potential adverse effects. *Toxicol Sci* **80**: 193-202.

Zaragoza A, Andres D, Sarrion D and Cascales M (2000) Potentiation of thioacetamide hepatotoxicity by phenobarbital pretreatment in rats. Inducibility of FAD monooxygenase system and age effect. *Chem Biol Interact* **124**: 87-101.

Zimmerman, HJ. (1999) HEPATOTOXICITY –The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver-second edition. pp229-274, Lippincott Williams & Wilkins A Wolters Kluwer Company. Philadelphia.

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	巻号	ページ	出版年
Rawiwan Maniratanachote, Keichi Minami, Miki Katoh, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi:	Chaperone proteins involved in troglitazone-induced toxicity in human hepatoma cells.	Toxicological Sciences	83	293-302	2005
Yusuke Hara, Miki Nakajima, Ken-Ichi Miyamoto, and Tsuyoshi Yokoi	Inhibitory effects of psychotropic drugs on mexiletine metabolism in human liver microsomes: prediction of in vivo drug interactions.	Xenobiotica	35	549-560	2005
Keiichi Minami, Toshiro Saito, Masatoshi Narahara, Hiroyuki Tomita, Hirokazu Kato, Miki Katoh, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi	Relationship between hepatic gene expression profiles and hepatotoxicity in five typical hepatotoxicant-administered rats .	Toxicological Sciences	87	296-305	2005
Rawiwan Maniratanachote, Ayaka Shibata, Shuichi Kaneko, Takanobu Wakasugi, Takeshi Sawazaki, Kanefusa Katoh, Shogo Tokudome, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi	Identivication of autoantibody to aldolase B in sera from patients with troglitazone-induced liver dysfunction.	Toxicology	216	15-23	2005
Keiichi Minami, Rawiwan Maniratanachote, Miki Katoh, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi	Simultaneous measurement of gene expression for hepatotoxicity in thioacetamide-administered rats by DNA macroarrays.	Mutation Research	603	64-73	2006

Chaperone Proteins Involved in Troglitazone-Induced Toxicity in Human Hepatoma Cell Lines

Rawiwan Maniratanachote, Keiichi Minami, Miki Katoh, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi¹

Drug Metabolism and Toxicology, Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa 920-1192, Japan

Received August 3, 2004; accepted October 25, 2004

Troglitazone (TRO), an effective thiazolidinedione antidiabetic agent, was reported to produce idiosyncratic hepatotoxic effects in some individuals. In contrast, rosiglitazone (RSG), in the same group of agents, has no significant toxic effects and now is widely used. In this study, human hepatoma (HepG2) cell lines were exposed to various doses of TRO as well as RSG (0, 25, 50, and 75 μM) for 48 h. Cell lysates were separated by two-dimensional electrophoresis, and the gels were stained with coomassie brilliant blue to compare the spot profiles. The greatest protein expression at a MW of 75 kDa and isoelectric point of 5 was specifically increased with TRO treatments of 50 and 75 μM . The spot was identified as a mixture of immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP) and, to a lesser extent, protein disulfide isomerase-related protein (PDIrp). Immunoblot analyses showed that the BiP protein was dose-dependently increased by TRO treatment and, to a lower degree, by RSG. These effects were also correlated with the high induction of BiP mRNA by TRO (50 and 75 μM) and the lower induction by RSG. However, both treatments showed no significant effects on PDIrp expression. The toxic effects of TRO in relation to the overexpression of BiP were also demonstrated in HLE cells, another human hepatoma cell line. In HLE cells, the inhibition of BiP expression by small interference RNA rendered cells more susceptible to the toxic effects of TRO. These results suggest that the overexpression of BiP is a defense mechanism of the endoplasmic reticulum in response to TRO-induced toxicity.

Key Words: troglitazone; BiP; chaperone protein; hepatotoxicity; thiazolidinedione.

Troglitazone (TRO) is one of the thiazolidinedione (TZD) oral antidiabetic agents launched in 1997. This drug has been demonstrated to improve hyperglycemia, hyperinsulinemia, and hypertriglyceridemia, as well as to ameliorate the insulin sensitivity of the target tissues (Fujiwara *et al.*, 1988; Nolan *et al.*, 1994). Based on its pharmacological advantages and the apparent absence of severe toxic effects, TRO was thought likely to become a promising treatment for type II diabetes mellitus in patients with insulin resistance. However, in the early clinical trials, 1.9% of the patients who received TRO experienced an

elevation of serum alanine aminotransferase of more than three times the normal upper limit (Watkins and Whitcomb, 1998). During the following few years of utilization, TRO has been reported to produce idiosyncratic hepatotoxic effects in some individuals (Gitlin *et al.*, 1998; Neuschwander-Tetri *et al.*, 1998; Shibuya *et al.*, 1998). Because of the seriousness of the cases, TRO was considered for withdrawal from the market in 2000. The mechanism by which TRO induced toxicity is still not completely understood. Severe hepatotoxic effects have not been observed in any kind of conventional animal models including monkey, which has a similar metabolic profile to human (Rothwell *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 1999).

The antidiabetic effects of TZDs occur via the activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), and the potency correlates to their receptor-binding activities (Lehmann *et al.*, 1995). There is a less clear association between hepatotoxicity and rosiglitazone (RSG), another TZD agent (Freid *et al.*, 2000; Isley and Oki, 2000; Lebovitz *et al.*, 2002). Since hepatotoxicity is unique to TRO, it is unlikely to be related to a PPAR γ class effect.

Even though TRO toxicity has not been observed in *in vivo* experimental animal studies, a number of *in vitro* experiments revealed evidence that TRO can cause apoptotic cell death in various hepatic cell types (Bae and Song, 2003; Tirmenstein *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2001). The degree of lethality also depends on the concentration of the agent and the duration of exposure. Tirmenstein *et al.* (2002) reported that TRO induces mitochondria permeability transition and decreases in the cellular ATP concentration prior to cell death. Regarding the signaling pathway of apoptosis, Bae and Song (2003) reported that TRO but not RSG activates both c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) and p38 kinase and causes an increase in proapoptotic proteins such as Bad and Bax, release of cytochrome c, and cleavage of Bid, together with a decrease in antiapoptotic protein, Bcl-2.

In addition to the known mechanisms of apoptotic cell death caused by TRO, we attempted to investigate the involvement of proteins whose up- or down-regulation correlated with the TRO-induced toxic effects. Using a proteomic analysis strategy, we analyzed a protein spot on a gel separated by two-dimensional

¹ To whom correspondence should be addressed. Fax: +81-76-234-4407, E-mail: TYOKOI@kenroku.kanazawa-u.ac.jp.

electrophoresis (2-DE) at an approximate MW of 75 kDa and isoelectric point of 5 that increased greatly in correlation with the concentration-dependent exposure to TRO. The spot was identified as a mixture of two chaperones, immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP or Grp78) and, to a lesser extent, protein disulfide isomerase-related protein (PDIrp or ERp72). These findings suggest that TRO targets the endoplasmic reticulum (ER) and causes the overexpression of BiP, a prominent chaperone, in response to cytotoxicity. A possible association of BiP in TRO-induced cytotoxicity is also discussed.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture condition and treated agents. Human hepatoma cell lines HepG2 and HLE were obtained from the Riken Gene Bank (Tsukuba, Japan, <http://www.rtc.riken.go.jp>) and the Japanese Collection of Research Biosources (Tokyo, Japan, http://cellbank.nih.go.jp/cellbank_e.html), respectively. The cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) containing 10% fetal bovine serum (FBS, BioWhittaker, Walkersville, MD), 3% glutamine, and 8% sodium bicarbonate at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. TRO and RSG were kindly provided by Sankyo (Tokyo, Japan). The treated agents were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Wako, Osaka, Japan), in which the final concentration did not exceed 0.1%. In all treatment conditions, the cells were grown in medium containing 5% FBS.

Cytotoxicity assay. To assess the cytotoxicity, a crystal violet assay and an ATP-based luminescent assay were used. Crystal violet assay was used according to Nakagawa *et al.* (1996) for determining the concentration- and time-dependent toxicity in HepG2 cells. Briefly, a suspension of HepG2 cells (1×10^5 cells/well) in the presence of TZDs or 0.1% DMSO was seeded onto 12-well plates. At the end of treatment, adherent cells were washed three times with phosphate buffered saline (PBS), fixed with 3.7% formaldehyde, and stained with 0.2% crystal violet. The absorbance at 620 nm was measured after extracting the cells with 2% sodium dodecyl sulfate (SDS). Percent cell viabilities were calculated by comparing them to the absorbance of 0.1% DMSO-treated cells.

Cell viabilities based on the quantity of the ATP produced by metabolically active cells were assessed with a CellTiter-Glo Luminescent assay kit (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's protocol. In the concentration-dependent study, a suspension of HepG2 cells (3×10^3 cells/well) in the presence of TZDs or 0.1% DMSO was seeded onto a 96-well plate. At the end of treatment, CellTiter-Glo reagent was added at an equal volume to the cell culture medium present in each well. The generated luminescent signal was monitored on a Wallac 1420 multilabel counter (PerkinElmer, Wellesley, MA).

Preparing cell lysates. HepG2 cells were treated with various doses of TRO or RSG. At the end of the 48-h treatment period, the cells were harvested by treatment with 0.05% trypsin plus 0.02% EDTA. The cells were washed with PBS and lysed with 100–200 μ l of lysis solution (8 M urea, 4% CHAPS, 2% Pharmalyte 3-10) containing protease inhibitors (1 mM DTT, 0.5 mM APMSF, 2 μ g/ml aprotinin, 2 μ g/ml pepstatin, and 2 μ g/ml leupeptin). The cell suspension was centrifuged at 12,000 rpm for 1 h to remove cell debris. The supernatant was collected, and the protein concentration was measured using a Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The cell lysates were stored at –80°C until the time of analysis.

2-Dimensional electrophoresis (2-DE). The devices and chemicals used in 2-DE were purchased from Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK. For the first dimension, 500 μ g of protein of the cell lysates was mixed with Destreak Rehydration Solution containing immobilized pH gradient (IPG) buffer of pH 4–7 and applied onto IPG gel strips. The samples were rehydrated at 20°C for 14 h and subsequently separated at 17,500 V-h using an Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System. The second dimensional electrophoresis was run

on 10% acrylamide gel at 10°C for 4 h. The separated proteins on 2-DE were visualized by coomassie brilliant blue (CBB) staining.

Protein identification. The amino acid sequence analyses from the CBB-stained two-dimensional (2-D) gels were performed at Hitachi Science Systems, Ltd., Japan. The protein spot of interest was excised from the CBB-stained gel of the sample treatment with 75 μ M TRO. After in-gel digestion with trypsin, the peptides were reduced and carbamidomethylated. The peptide mass mapping was performed on an ESI-TRAP and analyzed by LC/MS/MS. The matched peptides were searched using MASCOT (<http://www.matrixscience.co.uk>) based on the NCBI database.

Western blot analysis. The HepG2 cell lysates (50 μ g for BiP, and 25 μ g proteins for PDIrp and PDI proteins) were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA). The specific proteins were detected by mouse anti-KDEL monoclonal antibody (SPA-827, Stressgen, San Diego, CA) for BiP, rabbit anti-ERp72 polyclonal antibody (SPA-720, Stressgen) for PDIrp, and rabbit anti-PDI polyclonal antibody (SPA-890, Stressgen) for PDI proteins at dilutions of 1:200, 1:2000, and 1:2000, respectively. The protein bands were developed by biotinylated second antibody-peroxidase reaction. The quantitative analysis of protein expression was performed using a densitometer GS-700 (Bio-Rad Laboratories).

Reverse transcription and real-time PCR. Human hepatoma cells were treated with or without TZDs. At the end of the incubation periods, the cells were washed with PBS, and the total RNA was prepared using Isogen[®] (Nippon Gene, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription (RT) reactions were carried out by incubating 2 μ g of total RNA with random primer (Takara, Tokyo, Japan) and Moloney-Murine Leukemia Virus Reverse transcriptase (M-MLV-RT) RNaseH Minus (Toyobo, Tokyo, Japan) at 37°C for 1 h. Subsequently, the steady state of the mRNA levels was quantified by fluorescence-based real-time PCR. Oligonucleotide sense and antisense primers of human-BiP (5'-TGCTTGATG-TATGTCCCCTTA-3' and 5'-CCTGTCTTCAGCTGTCAC-3') and PDIrp (5'-AATACCAGGATGCCGCTAAC-3' and 5'-GCAAAGGTGTACTCAGG-GAA-3') as well as GAPDH (5'-CCAGGCTGCTTTAACTC-3' and 5'-GCTCCCCCTGCAAATGA-3') were used. The reaction mixture for real-time PCR containing 1 μ l of RT product, Ex Taq R-PCR Version (Takara, Japan), SYBR[®] Green I (Molecular Probes, Eugene, OR), and the specific sense and antisense primers were subjected to a Smart Cycler[®] System (Cepheid, Sunnyvale, CA). After a holding step at 95°C for 30 s, the thermal cycling was repeated for 45 cycles of 94°C for 4 s and 64°C for 20 s, followed by melting from 60°C to 95°C at 0.2°C/s. The standard curve for the relative quantification was created by serially diluted GAPDH concentrations plotted against the threshold cycle number from the real-time PCR reaction. The BiP and PDIrp expressions were evaluated, and the relative values were normalized with the GAPDH values from the same DNA samples.

siRNA generation. Small interference RNA (siRNA) for BiP (Accession AF188611) and human lamin A (Accession X03444) mRNA target sequences were created and checked by the species-appropriate genome database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) to avoid target sequences homologous to other known coding sequences. The sense and antisense primers for BiP were 5'-CAACTGTTACAATCAAGGTC-3' and 5'-CTGTATCCTCTTAC-CAGTT-3', and for lamin A were 5'-AAAGCGCGCAATACCAAGAA-3' and 5'-CCTCACTGTAGATGTTCTTC-3', designed with the T7 RNA polymerase promoter sequences (CTAATACGACTCACTATAGGGAGG) at the 5'-end of each primer. The target genes were amplified by PCR and purified by ethanol precipitation. dsRNAs were generated using a T7 RiboMAX[™] Express Large Scale RNA Production System Kit (Promega) according to the manufacturer's protocol. The dsRNAs were then diced into 20–23 bp of siRNAs by incubating them with recombinant dicer enzyme (GTS, San Diego, CA) for 18 h. The obtained siRNAs were further subjected to two purification steps, removal of the salts with a Sephadex G25 column (Amersham Biosciences) and the undigested dsRNA by centrifugation with a Microcon YM-100 (Millipore). The purified siRNA duplexes were stored at –80°C until analysis.

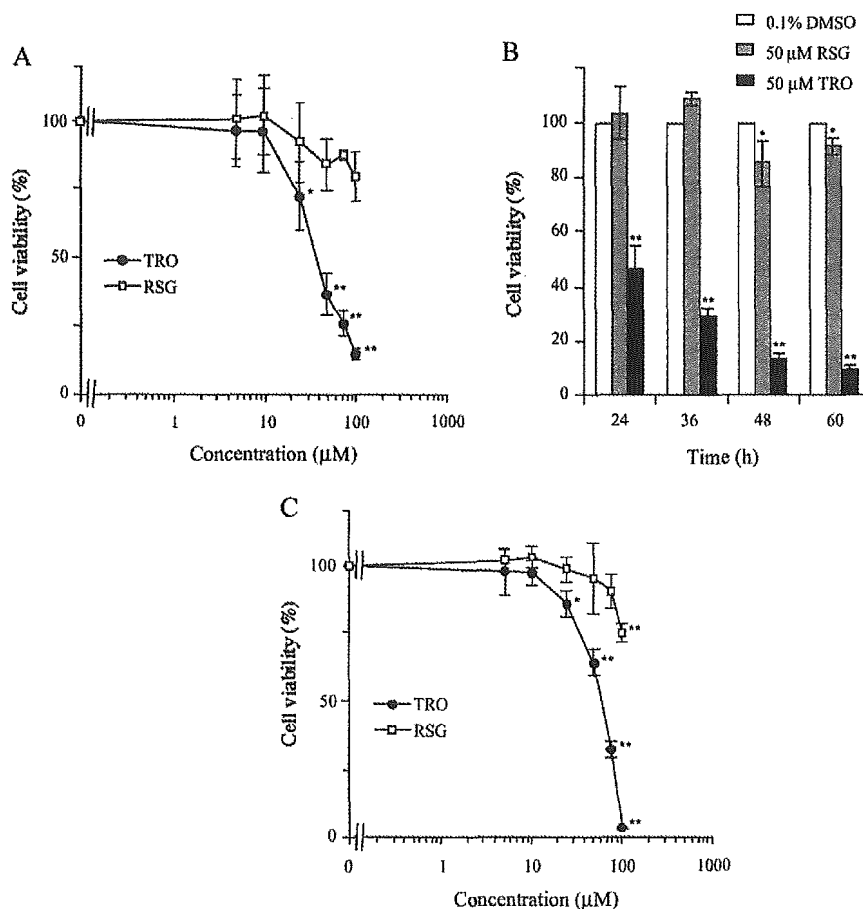


FIG. 1. TZDs cytotoxicity in HepG2 cells. (A) HepG2 cells were incubated with 0.1% DMSO (control) or the indicated concentration of TRO or RSG for 48 h. (B) HepG2 cells were incubated with 0.1% DMSO (control) or 50 µM TZDs for the indicated time. Cell viabilities were assessed by crystal violet assay. (C) HepG2 cells were incubated with 0.1% DMSO (control) or the indicated concentration of TRO or RSG for 48 h. Cell viabilities were measured by ATP-based luminescent assay. The results represent the mean \pm SD of at least three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control.

Transfection of siRNA. In order to knockdown target genes at the transcriptional level, siRNA was transfected into the cells. Because of the difficulty to transfect siRNA into HepG2 cells, HLE cells, another human hepatoma cell line that demonstrates similar BiP expression profiles to HepG2 cells (data not shown), were used in this experiment. Briefly, HLE cells were seeded onto 6-well plates (8×10^4 cells/well) or 96-well plates (3×10^3 cells/well) and incubated for 24 h before transfection. At approximately 30–50% confluency, the cells were transfected with siRNA using Oligofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) for 24 h. The cells were treated with TZDs or DMSO at the concentrations indicated for 24 h before analysis.

Statistical analysis. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post hoc test using InStat version 2.0 software; $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Troglitazone-Induced HepG2 Cell Toxicity

To investigate the toxic effects of TRO, crystal violet assay was used to determine the concentration- and time-dependent

cytotoxicity. ATP-based luminescent assay was used for the sensitive detection of a small amount of viable cells. In the concentration-dependent experiment, HepG2 cells were exposed to various concentrations of TRO of 0 (0.1% DMSO), 5, 10, 25, 50, 75, and 100 µM as well as the same concentrations of RSG as negative controls. After 48 h of treatment, ≥ 25 µM TRO significantly reduced the cell viability with an approximate IC_{50} of 40 µM, whereas RSG showed no significant toxic effects (Fig. 1A). TRO also showed a time-dependent cytotoxicity in HepG2 cells from 24 h to 60 h of exposure ($p < 0.01$) compared to the DMSO treatment (Fig. 1B). The concentration-dependent cytotoxicity of TRO (Fig. 1A) was comparable to the reduction of ATP produced by viable metabolically active cells as detected by the ATP-based luminescent assay (Fig. 1C).

Proteomic Analysis for Troglitazone-Induced Hepatotoxicity

The different toxic effects of TRO and RSG were investigated by proteomic analysis to determine the differences in the protein

expression profiles. HepG2 cells were treated with or without various doses of TRO or RSG for 48 h. Cell lysates were prepared and subjected to 2-DE analysis. The gels were then stained with CBB. A number of spots were up- and down-regulated by the treatments. We focused on the spot showing a large amount of protein expression, which showed dose-dependent and TRO-specific changes, at an approximate MW of 75 kDa and isoelectric point of 5. The expression was increased by treatment with 50 and 75 μ M of TRO (Fig. 2A). At the same position, RSG-treated cells demonstrated no difference compared to the DMSO-treated control (Fig. 2B). The spot was excised, subjected to amino acid sequence analysis and identified as a mixture of immunoglobulin binding protein (BiP) (Fig. 3A) and, to a lesser extent, protein disulfide isomerase-related protein (PDIrp or ERp72) (Fig. 3B). Notably, BiP was prominent in this finding, as indicated by the higher total score (1341) compared to PDIrp (294), and these proteins had MWs and calculated isoelectric point values near the position that appeared on the 2-D gels.

Changes of Chaperone Proteins and mRNAs by TZDs Exposure

HepG2 cells were incubated in the presence of various concentrations of TRO or RSG or 0.1% DMSO (control) for 48 h. The cell lysates were confirmed for the expressions of BiP and PDIrp proteins by Western blot analyses with specific

antibodies. In Figure 4A, BiP protein detected by anti-KDEL antibody was markedly increased in intensity by increasing the TRO concentration and was about 5-fold at 100 μ M. The same phenomenon was also demonstrated with RSG treatment but with a relatively smaller increase, even at 100 μ M (about 2.5-fold). The expression of PDIrp as detected by anti-ERp72 antibody showed no significant difference among the treatments (Fig. 4B). We also investigated the expression of PDI protein and there was no significant difference (Fig. 4C). To further investigate the control of BiP and PDIrp expressions at the transcription level, the mRNAs were determined by real-time PCR. Comparing the results from the Western blot analyses, BiP mRNA expression by TRO treatment was also dose-dependently induced, with the highest level at 75 μ M (about 11-fold) (Fig. 5A). However, at 100 μ M of TRO, BiP mRNA was comparable to the control because of cell toxicity. RSG-treated cells showed a small tendency to increase, with significance at the higher doses of 75 and 100 μ M (Fig. 5A). Although PDIrp protein was equally expressed in the presence of all treatments, mRNA expression in response to TRO and RSG treatment showed the induction at the doses of 75 and 100 μ M (Fig. 5B).

Inhibition of BiP Expression by siRNA

All the above results demonstrated the obvious effects of TRO compared to RSG on BiP overexpression. To clarify these

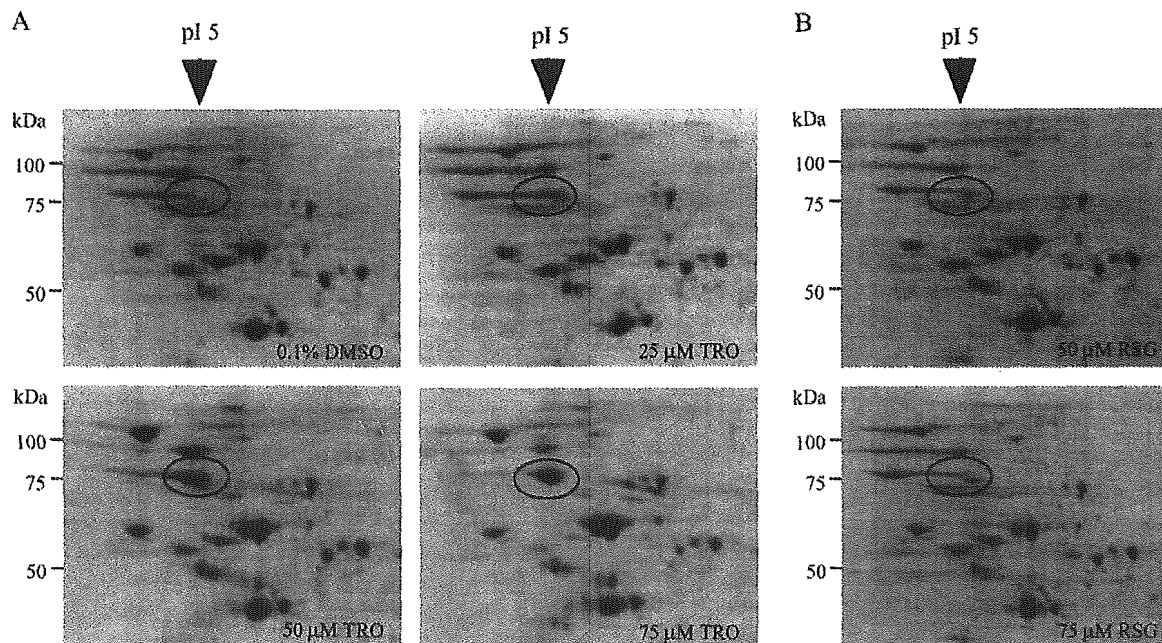


FIG. 2. Protein expression profiles of 2-D gels from CBB staining. HepG2 cells were incubated with 0.1% DMSO (control) or the indicated concentration of TRO or RSG for 48 h. The cell lysates were separated by 2-DE and stained with CBB. The oval frames mark the proteins of interest, which were increased in a concentration-dependent manner by TRO treatment.

A BiP

g|6470150; Total score: 1341
BiP protein [Homo sapiens]
Nominal mass (Mr): 71002
Calculated pI: 5.23

1 MBEDKKEDVG TVVGI DLGTT YSCVGVFKNG **RVELIANDQG** **NRITPSYVAF**
51 **TPEGRRLIGD** **AAKNOLTSNP** **ENYVFDARL** IGRTWNPFSV QODIKFLPFK
101 VVERKTKPFI QVDIGGGQTK **FPAPBEISAM** **VLTKMKETA** **AYLGKKVTHA**
151 **VVTVPAYFND** **AQRQATKDG** TTAGLNVMRY **INRPTAAATA** **YGLDKREBEG**
201 NILVFDLGGG TFDVSLLTID NGVFEVATN GDTHLGGEDF DQRVMHFID
251 LYKKTGKDV RLDNRAVQKL RREVEKAKRA LSSQHQARIE LYKKTGKDV
301 SETL**TRAKFE** **ELNMDLFRST** MKPVQK**VLIED** **SDLKKSDIDE** **IYLVGGSTRI**
351 PKIQQLV**KFE** **FNQKEPSRGI** NPDEAVAYGA AVQAGVLSGD QDTGDLVLLD
401 VCPLTLGL**ET** VGGVMTKLIP RNTVVPTK**ES** **QIFSTASDNO** **PTVTKVYEG**
451 **RRPLTKDNHL** LGTFDLTGIP PAPRGVQIE VTFEIDVNGI LRVT**EDKGT**
501 GNR**KKITITN** **DQNRITPEEI** **ERMVNDARL** **AREDKLKER** **IDTRNELRSE**
551 **AYGLEKNIQD** **KBKLGCKLSS** **EDKETMRKAV** **BEKIEWLESH** **QDADIBDFKA**
601 **KKKELEIVQ** **PIISKLYGSA** GPPTGEBEDT AELHHHHHH

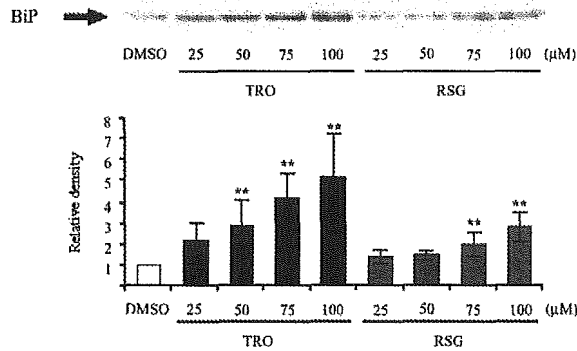
B PDIrp

g|4758304; Total score: 294
Protein disulfide isomerase related protein
(calcium-binding protein, intestinal-related) [Homo sapiens]
Nominal mass (Mr): 73229
Calculated pI: 4.96

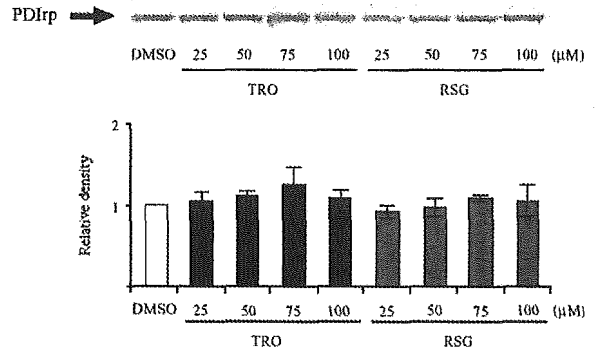
1 MRPRKAFLL LLLGLVQLLA VAGAEGPDED SSNRENAIED EEEEEHDDDD
51 EEEDDLEVKE ENGLVLVINDA NFDNFVADKD TVLLEFYAPW CGHCKQFAPE
101 YEKIANIL**KD** **KDPPIPVAKI** **DATSASVLAS** **RFDVSGYPTI** **KILKKGQAVD**
151 YEGSRTQBERI VAKVREVSQP DWTTPPPRVTL VLTKENFDEV VNDADIIIVE
201 FYAPWCGHCK KLAPRYEKAA KELSRSRPPPI PLAKV**DATAR** **TDLAKRFDVS**
251 **GYPTLKIFRK** **QRPYDYNRER** EKYGIVDYMI EQSGPPSKEI LTLQVQEFLL
301 KGDVDVITIG VFKGESDPAY QYQDAANLN REDYKPHHTF STEIAKFLKV
351 SQGQLVVMQP EKFPQSKYEP SHMMDVQGST QDSAIDFVL KYALPLVGHHR
401 KVNDAKRYT RRPLVVVYYS VDPSPDYRAA TQFWRSKVLE VAKDPPPEYTF
451 AIADBEDYAG EVKDLGLSRS GEPVNAAILD ESGKFFAMPF EEPDSDTLRE
501 FVTAFKKGKL KPVTKSQPVF KNNKGPVKV VGTKFD5IVM DPKKDLVIEF
551 YAPWCGHCKQ **LEPVYNSLAK** KYKGGKGLVI AKMDATANDV PSDRYKVEGF
601 PTIYFAPSGD KKNPVKFEGG DRDLEHLSKF IREHATKLER TKRELL

FIG. 3. Amino acid sequences analyzed from the 2-D gel spot. The protein spot of interest was excised from the CBB stained gel of the sample treated with 75 μM TRO and subjected to amino acid sequence analyses as described in Materials and Methods. The 'Bold Underlined' sequences denote peptides which matched with both BiP (A) and PDIrp (B).

A Anti-KDEL



B Anti-ERp72



C Anti-PDI

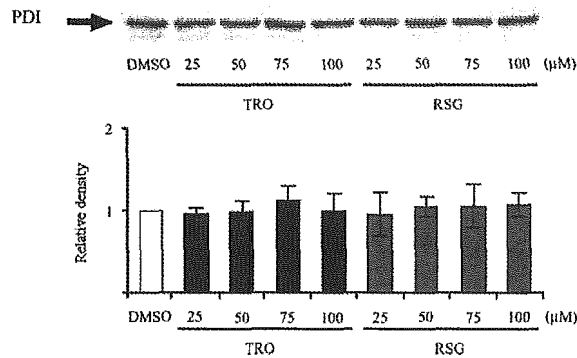


FIG. 4. Western blot analyses. HepG2 cells were incubated with 0.1% DMSO (control) or the indicated concentrations of TRO or RSG for 48 h. The cell lysates were subjected to Western blot analysis with mouse anti-KDEL (A), rabbit anti-ERp72 (B), and rabbit anti-PDI (C) antibodies for BiP, PDIrp, and PDI proteins, respectively. Two additional studies yielded equivalent results. The expressions of BiP, PDIrp, and PDI proteins were measured using a densitometer. The data represent the mean ± SD of three independent experiments. **p < 0.01 compared with the control.