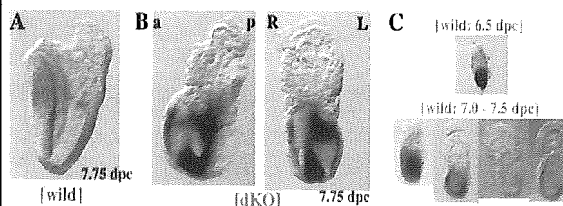


dKO胚で発現が増加している遺伝子群
胎生7.5日
-top ten-

Gene Symbol	Ratio	W Average	(発現部位)
cerberus	23.95	12.4441	?
fibroblast growth factor 5	12.14	14.1618	?
LIM homeobox protein 1	8.669	108.787	nascent mes
eomesodermin homolog (Xenopus laevis)	7.604	51.7372	nascent mes
LIM homeobox protein 1	7.497	59.5642	nascent mes
cerberus 1 homolog (Xenopus laevis)	7.395	77.6818	nascent mes
eomesodermin homolog (Xenopus laevis)	7.073	69.9671	PS, axial parax
Mix1 homeobox-like 1 (Xenopus laevis)	6.992	12.8571	node
forkhead box D3	6.182	15.8104	node
nodal	6.128	23.1582	node
EST	---	---	---

Fgf5はdKO胚の原腸陥入部位で強く発現する



野生型胚では胎生7.5日までに急速に減少し(C)、胎生7.75日ではほとんど認められないが(A)、dKO胚では原腸陥入部位において強い発現が認められた(B)。

モデル遺伝子改変マウス胚を用いた
GeneChip解析の妥当性の検証部分のまとめ(1)

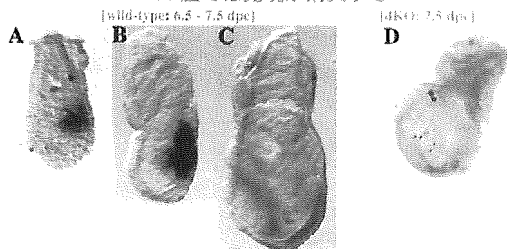
胎生7.75日だけの *Mesp1*, *Mesp2*-dKO型で発現が減少している遺伝子リストは、主として心筋細胞あるいは血管内皮細胞に
関与する遺伝子であり、本解析手法の妥当性が検証できたも
のと考えられた。また、whole mount ISHでも一部検証できた。

→ *Mesp1*, *Mesp2*のシグナルカスケード(マウス心筋前駆細胞分化の分子カスケードの解明)を考えると、*Mesp*遺伝子が発現している胎生6.5日に遡り、解析する必要がある。
→ 胎児1匹を1 サンプルとして用いる2段階増幅法へ

dKO胚で発現が減少している遺伝子群
胎生6.5日
-top ten-

Gene Title	Gene symbol	Ratio(H/W)	W Average
endometrial bleeding associated factor	Ebaf	0.010764	69.477035
mesoderm posterior 1	Mesp1	0.011659	324.9313
protocadherin 8	Pcdh8	0.021345	163.39647
SRY-box containing gene 11	Sox11	0.032422	253.20969
chondroitin sulfate proteoglycan 2	Cspg2	0.043689	78.427565
cadherin 11	Cdh11	0.050969	218.7183
RNA Imprinted and accumulated in nucleus	Rian	0.05762	160.95605
aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	Alch2	0.062035	114.40344
RAS guanyl releasing protein 3	Rasgp3	0.064677	82.367925
solute carrier organic anion transporter family, member 3a1	Sico3a1	0.065206	69.61169

Ebaf1 (=Lefty2) は *Mesp1* と似た発現パターンを示し
dKO胚では発現が消失する



野生型胚では胎生7.5日までに急速に減少し、胎生7.75日ではほとんど認められないが(A-C)、dKO胚では消失している(D)。

dKO胚で発現が増加している遺伝子群
胎生6.5日
-top ten-

Gene Title	Gene symbol	Ratio(H/W)	W Average
major urinary protein 1	Mup1	8.603808	109.1139
major urinary protein 1	Mup1	7.740673	85.3866
albumin 1	Alb1	7.409829	153.0409
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 3K	Serpina3k	6.903922	81.85769
carbonic anhydrase 3	Car3	5.971794	68.78895
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 1a	Serpina1a	5.817544	203.0076
fatty acid binding protein 1, liver	Fabp1	4.002253	193.7971
mitochondrial glutathione S-transferase 1	Mgst1	3.744073	99.44638
RNA Imprinted and accumulated in nucleus	Rian	3.16434	209.5045
apolipoprotein C-III	Apoc3	3.015088	80.90281

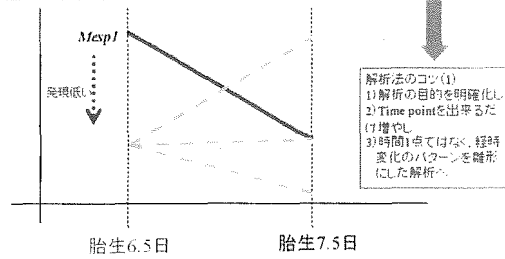
モデル遺伝子改変マウス胚を用いた
GeneChip解析の妥当性の検証部分のまとめ②

Mesp1が発現している胎生6.5日までのMesp1, Mesp2-dKO型で、発現が減少している遺伝子リストでは、
陽性対照であるMesp1やEbf1がリストアップされるなど妥当な点もあるが、別の陽性対照であるMesp2がリストアップされていないなど、問題点も懸念された。他方、whole mount ISHとの対応は一致していた。

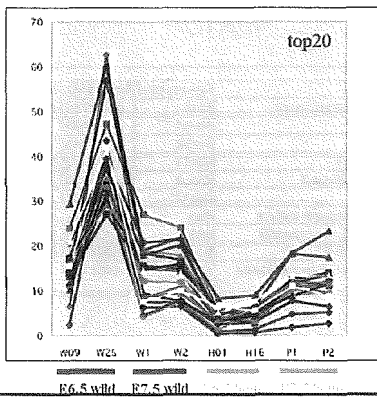
→ 解析技術自体は妥当だが遺伝子リストを抽出する解析法に問題がある可能性
→ ある時点での遺伝子発現の比の評価でなく経時的な発現パターン解析へ
= [Mesp1と同様な発現パターンを抽出]

遺伝子発現比による遺伝子リストアップを、
時間1点でおこなうことの危険性(留意点)

野生型胚とdKO型胚における比較で、胎生6.5日において、ある遺伝子Xの発現が減少していたとしても、胎生7.5日における発現が不明であるため、意味付けが曖昧となる。



$r > 0.8$, WE6 > 20, 比 > 0.2, E6.5比昇順



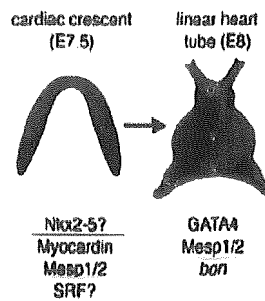
方法

2. 化学物質非投与野生型胚・全胚における、発生に関わる
遺伝子発現の経時変化の解析
[マウス胎生6.25-9.75日](TIME POINT: 12点)

GeneChip一枚あたりに必要なマウス胎生6.25-9.75日胚(全胚)の匹数の算出

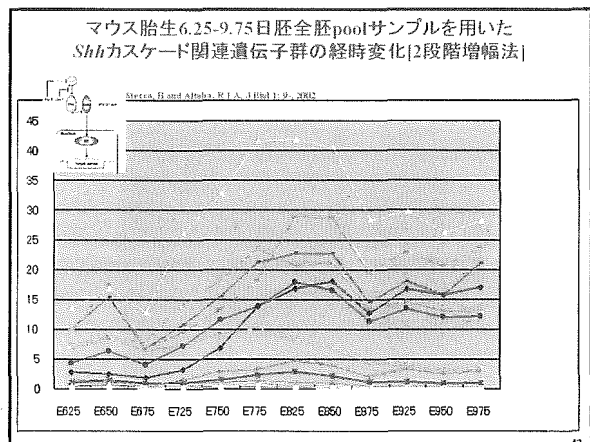
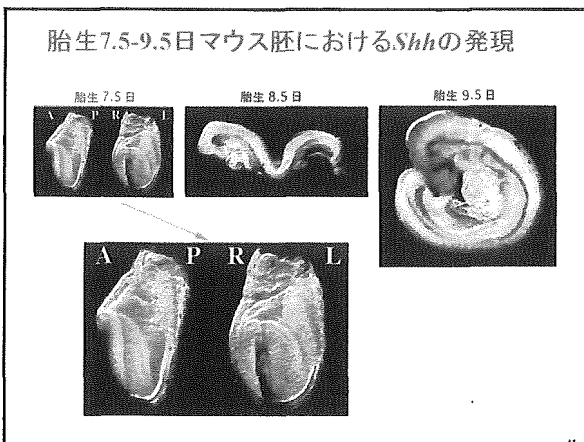
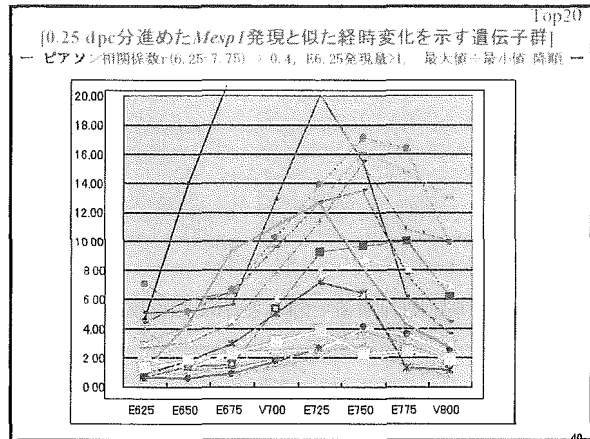
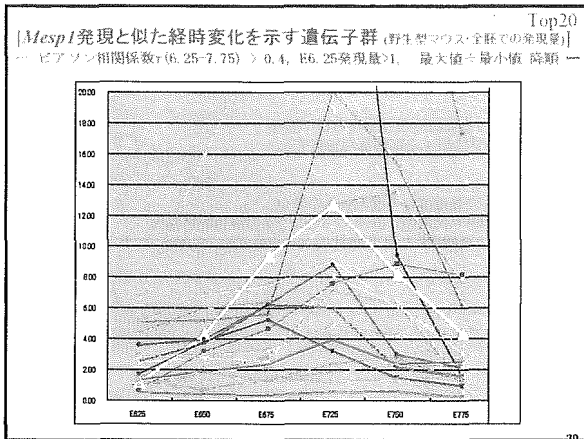
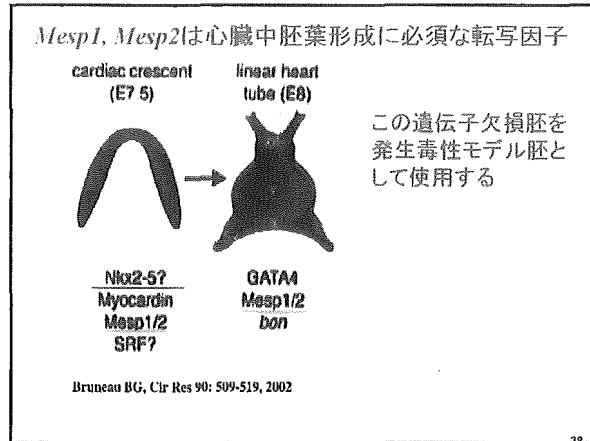
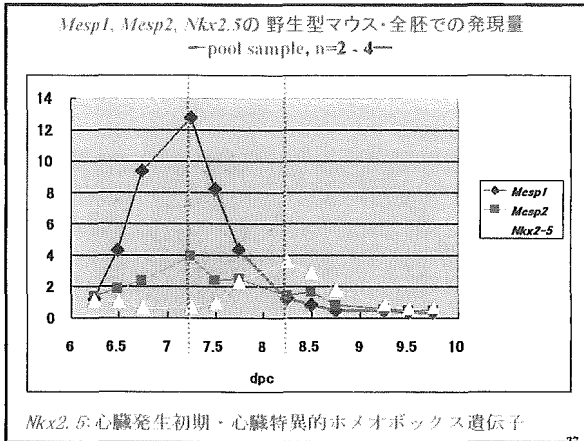
Day	Hygromycin DNA量 (ng) / embryo [mean ± SD, n=4 pools, total 70-77 embryos] / Per 100,000 cells total 30 embryos	Hybrid RNA量 (ng) / embryo [mean ± SD, n=4 pools, total 10-17 embryos] / Per 10,000 cells total 30 embryos	GeneChip RNA量 (ng) / embryo [mean ± SD, n=4 pools, total 10-17 embryos] / Per 100,000 cells
6.25	20.02 ± 4.0	19.11 ± 7.7	267
6.50	33.4 ± 4.2	44.81 ± 22.2	112
6.75	41.4 ± 5.3	30.0 ± 15.0	167
7.25	109.4 ± 39.6	119.8 ± 51.7	82
7.50	201.0 ± 18.4	212.5 ± 68.0	24
7.75	358.6 ± 286.0	551.0 ± 335.0	3
8.25	768.5 ± 18.9	831.9 ± 206.6	6
8.50	1,483.0 ± 722.9	2,039.5 ± 539.4	3
8.75	2,472.8 ± 664.5	1,916.6 ± 325.5	1
9.25	3,875.3 ± 1,080.5	3,278.9 ± 2,186.8	1 (0.5)
9.50	15,952.1 ± 3,089.0	12,676.0 ± 3,229.1	1 (0.4)
9.75	20,315.1 ± 1,845.2	14,954.2 ± 3,523.3	1 (0.3)

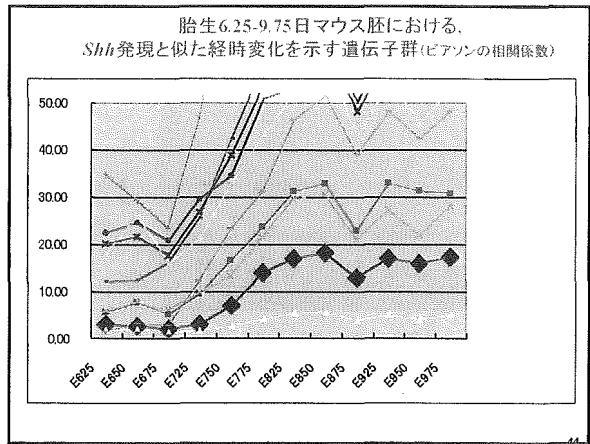
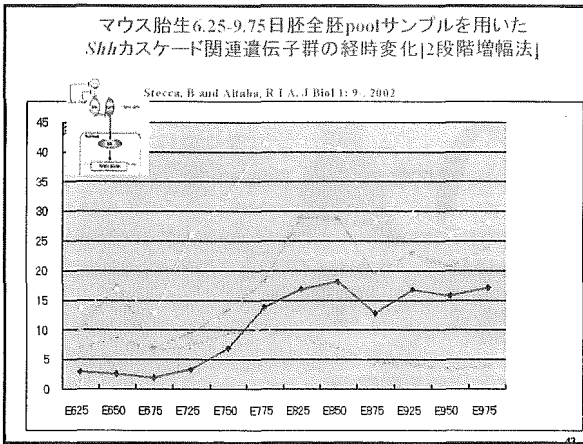
Mesp1, Mesp2は心臓中胚葉形成に必須な転写因子



この遺伝子欠損胚を発生毒性モデル胚として使用する

Bruneau BG, Ctr Res 90: 509-519, 2002





方法

3. モデル発生毒性物質を妊娠マウスに投与した際の、胎児
に対する本手法の適用と解析

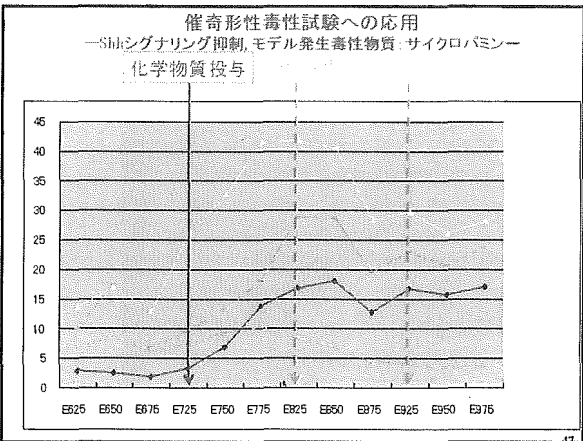
—サイクロパミンの特徴—

*ユリ科植物由来 催奇形性 ベラトルムアルカロイド

・神経管発生における細胞間相互作用などに関与するShhシグナリングに対する阻害作用を有する。

・ユリ科植物を食べた妊娠羊から産まれた小羊が、単眼症を示した(1950年代米国)。Shhシグナリングとの関連性を含め、その原因物質として究明された化学物質(Cooperら, 1998; Incardonaら, 1999)

⇒ 標的分子が定まっていることから、解析上、興味深い知見が得られるものと期待される



催奇形性毒性試験への応用
—Shhシグナリング抑制、モデル発生毒性物質: サイクロパミン—

- 動物 妊娠 C57BL/6CrSlcマウス(日本エスエルシー)
- 投与物質 サイクロパミン(Cyclopamine) (LC laboratories社)
- 投与濃度 0, 50 mg/KgBW 投与群[10 ml/kgBW], 溶媒: 0.5% GMC (メノウ鉢を使用して懸濁)
- 投与経路 経口投与
- 1群: 3-5匹
- RNA用1サンプル = 1腹分の胎児のプール(胎生8.25)

胎生7.25日 胎生8.25日 胎生17.25日

単回経口投与 (投与群: 0, 50 mg/kgBW) 常生切腹 (例: 常検査常検中)

マウスにおけるサイクロパミンを用いた催奇形性実験の報告は、
妊娠動物がかなり死亡する投与用量(180 mg/kgBW)を用いたもののみ
一しかも、明らかな奇形は認められていない。

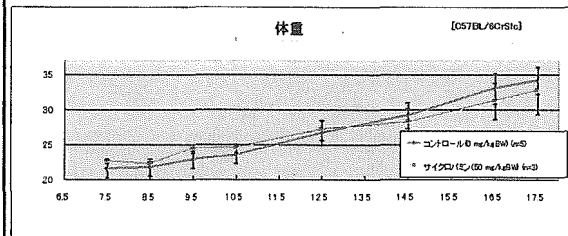
TABLE II. EFFECT OF JERVINE AND CYCLOPAMINE ON MICE.

Group and gestation period	Individual daily dose (mg)	Dose (mg/kg)	No. of dams	Ratio of affected to normal offspring	No. of normal offspring	No. of affected offspring	No. of resorptions in litters	No. of total resorptions w/aborting litters	No. of total deaths in dams	No. of malformations
Cycloamine:										
7	5*	180	3	0/1	10	0	0	0	2	—
6-7	10*	160	1	0	0	0	0	0	3	—
6-8	10*	160	4	0/2	26	0	0	0	2	—
7-9	10	160	7	0/1	12	0	0	0	6	—
7	5	180	6	0/2	23	0	0	0	4	—
7	10*	160	4	1/2	25	1	0	0	2	1-B
8	5	180	6	1/1	11	1	0	1	4	1-B
9	5	180	11	2/7	73	2	0	0	4	2-B
Controls:										
nongavaged			14	0/14	148	1	1	0	0	1-B
H ₂ O-gavaged			13	0/13	127	0	2	0	0	—

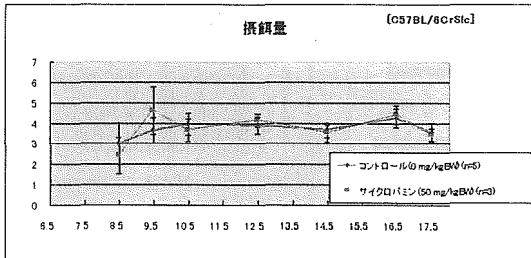
* H = ectocephalic.
* Sample and buffer.

Keller, H.F., Teratogenic effects of cycloamine and jervine in rats, mice and hamsters. *Proc Soc Exp Biol Med.* 14, 303-306, 1975.

モデル発生毒性物質:サイクロパミン
一胎生7.25日単回経口投与一胎生17.25日で帝王切開



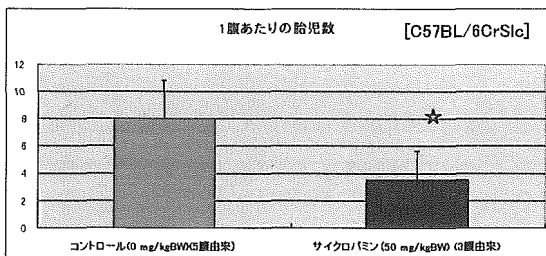
モデル発生毒性物質:サイクロパミン
一胎生7.25日単回経口投与一胎生17.25日で帝王切開



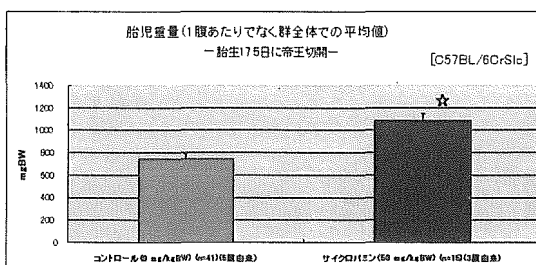
モデル発生毒性物質:サイクロパミン
一胎生7.25日単回経口投与一胎生17.25日で帝王切開

群	妊娠動物番号	胎児数	胎盤遺残数
対照群	22	10	0
コーンオイル	23	9	0
0 mg/kgBW	32	8	0
	33	8	1
	34	6	0
	平均値	8	0
	S.D.	2.8	0
投与群	121	2	1
Cycloamine	131	8	1
50 mg/kgBW	132	5	3
	平均値	3.5	2
	S.D.	2.1	1.4

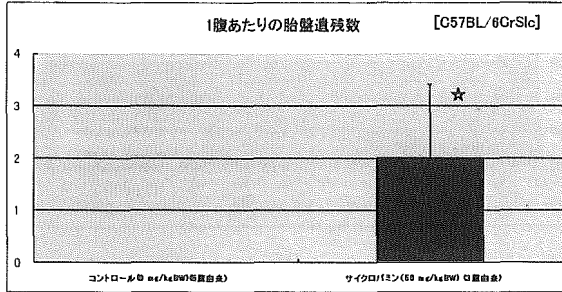
モデル発生毒性物質:サイクロパミン
一胎生7.25日単回経口投与一胎生17.25日で帝王切開



モデル発生毒性物質:サイクロパミン
一胎生7.25日単回経口投与一胎生17.25日で帝王切開



モデル発生毒性物質:サイクロパミン
一胎生7.25日単回経口投与一胎生17.25日で帝王切開一



まとめ

一催奇形性物質を投与したマウス胚を用いた遺伝子発現解析の技術基盤一

- モデル遺伝子改変マウス胚を用いた、本手法の技術的妥当性の検証**
→ モデル胚を特徴づける遺伝子群がリストアップされ、またISHの結果と基本的にはよく対応しており妥当性の検証はできたものと考えられた。むしろ正確な解析法を適用する必要性。
- 化学物質非投与野生型胚・全胚における、発生に関わる遺伝子発現の経時変化の解析**
【マウス胎生6.25-9.75日】(TIME POINT:12点)
→ *Shh*や*Mesp1*を雛形に試みは基本的には成功。
- モデル発生毒性物質を妊娠マウスに投与した際の、胎児に対する本手法の適用と解析**
→ サイクロパミン投与実験進行中 遺伝子発現解析中。

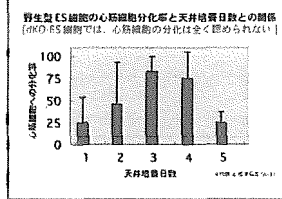
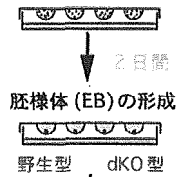
Future Plan

- さらに催奇形性毒性試験への応用を標榜し、種差に焦点をあて、実際にサリドマイドを妊娠動物に投与し、遺伝子発現解析ならびに催奇形性の有無との対応を検討する。
- マウス胚発生の *in vitro* モデル系であるES細胞の分化系への応用も検討中

応用II: *Mesp1*, *Mesp2*の標的遺伝子の探査

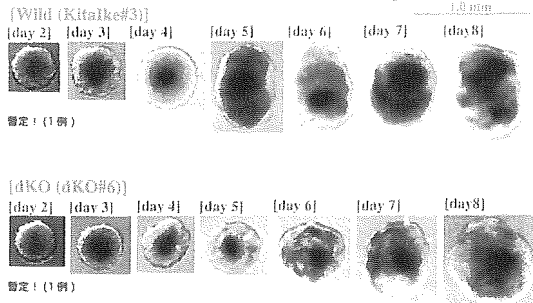
ES細胞の分化系:胚葉体(EB)の天井培養による形成と浮遊培養

ES(野生型 / dKO型)の天井培養



Boheler KR et al., Circ Res 91: 189-201, 2002

EB [wild (Kitalke#3)] & dKO (dKO#6)] Suspension Culture



※したがって、RNA回収のためにpoolする数を、[day2]はplate7枚分(計168EBs)、[day3]はplate3枚分(計72EBs)、[day4-8]はplate2枚分(計48EBs)とした。(※5ug total RNA必要)

造血毒性の発現メカニズム研究

分担研究者 井上 達 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター長

研究要旨

造血系における生体の異物応答に関する普遍性のある指標を得るために、主として酸化ストレス物質を取り上げて、トキシコゲノミクス手法の演繹的利用モデルの確立を目標として研究をおこなった。本年度は、外来異物として、引き続きベンゼン暴露の造血器系への影響をみることを念頭におきつつ、標的としてチオレドキシン(Trx)遺伝子改変動物を用いた酸化ストレス消去系に注目して遺伝子発現解析をおこなった。Trx のヘミアリルノックアウトマウスでは、野生型マウスに比べて特異的な遺伝子の高い発現が見出され、それらの遺伝子の一部はTrx 過剰発現マウスでその発現強度が大きく低下しており、Trx 依存性の酸化ストレス関連遺伝子と考えられた。これに基づいて関連したいくつかの要因解析を試みた。

A. 研究目的

本研究は、外来異物と造血系細胞との相互作用を末梢血から骨髄に至る反応の統一的理解に資するため、関連した細胞生物学的背景実験と比較しつつ、分子レベル毎の発現遺伝子のプロファイルを明らかにすることを計画し、さしあたり未熟細胞についてのそれを目指している。これによって、バイオストレスマーカー遺伝子群の抽出の展望を明らかにする。

B. 研究方法

造血系細胞と外来異物との相互作用のうち、代表的な分子標的として酸化ストレス反応に注目しつつ以下の実験を進めた。モデル実験と

して、ヒトに対する白血病原性をもち、試験管内試験では酸化ストレス誘導物質としても知られるベンゼンを用い、これまでの細胞生物学的蓄積データに対応するマイクロアレイデータの採取を Incyte (Mouse GEM 1) 並びに Affymetrix (Murine Genome U74Av2/M430_2) の系を用いて試行した。細胞生物学的蓄積データとして、プリンストン大学のレミシュカ博士のグループが近年造血幹細胞の分画から得た cDNA ライブラリーの発現プロファイリングや、最近になって各方面から報告されている胚幹細胞や神経幹細胞特異的とされる遺伝子発現プロファイリングデータベースについても新たな視点にたって比較検討の対象とすることとした。昨年までの

研究に引き続き、野生型(Wt)、p53 遺伝子変異動物に加えて、酸化ストレス消去系としてのチオレドキシシン(Trx)遺伝子の、ヘミアリルノックアウト(KO)及び同遺伝子過剰発現(Tg)系とそれぞれの同腹の対照 Wt マウスを解析に用いた。尚、本年度の研究ではベンゼン暴露の体制が整わなかったため、暴露データについては先送りとする事とした。

(倫理面への配慮)

本研究では、野生型並びに人為的に遺伝子改変を施した動物を使用することによって、酸化ストレスに対する生体影響を的確かつ他では得られない方法を駆使することで研究の目的を達成することを計画した。従ってここで用いられる実験動物の取り扱いについては、世界保健機関で動物を用いる生物医学研究のための国際指針を設け、これらに配慮するに至った動物愛護の問題に端を発して、動物の福祉の観点から必要な、動物の不安や苦痛の排除もしくは低減など、格段の配慮に努めることを要請されるに至った世界的背景に鑑みて、これを当申請者グループの研究にも全面的に取り入れて研究を推進することが求められている。こうした視点は、かねてより厚生労働省の努力を傾けている課題でもあり、その構成研究機関としての国立医薬品食品衛生研究所としての責任の上からも、各研究者にその理解と遵守を求めていくことが重要と考え、必要な小委員会の設置と定められた動物実験指針に基づいた研究遂行の趣旨説明などを実施し、もって動物実験に関する倫理面への配慮に努める方針である。尚、本研究には、①ヒトの遺伝子解析研究、②相手方の同意・協力や社会的コンセンサスを必要とする研究課題又

はアンケート調査等を行う研究課題、③生命倫理・安全対策に関して留意すべき研究、を含まない。

C. 研究結果

【要約】造血器における発現を、造血幹細胞分画の特異性およびその変化として把握すべく既存のデータの分析と、新規データ採取のための技術的対応を検討し、その基盤を整備した。p53-KO 動物を対象とする結果の解析とともに、Trx 遺伝子改変動物における定常状態での検討を進め、その将来のベンゼン暴露等にむけた実験条件の設定を終了した。

造血器系における生体異物応答機構の解析を支援する基盤研究として以下の3点にそって必要な検討を行い、所期の成果をみた。

これまでの研究では、造血器系が造血幹細胞や前駆細胞から末梢血液中に見られる分化型血球にいたるまで、単一の細胞群ではなく、分化序列に沿った多様な細胞分画によって構成されているなかで、その生体異物応答反応の本質的要素が造血幹細胞特異的遺伝子発現プロファイリングにあることに焦点をあてた研究を進めてきた。これに基づいてレミシュカからの抽出したcDNA ライブラリーを用いた発現データとの比較の観点からこれまでの結果を整理した (Hirabayashi Y, 2005/ Hirabayashi Y & Inoue T
In: Handbook of Toxicogenomics,

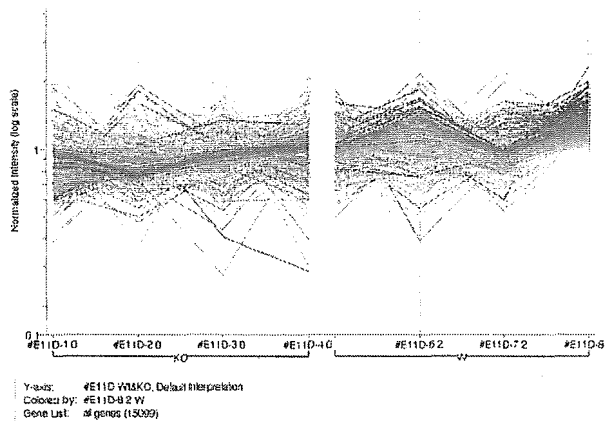


図1 : p53-KO マウス (左) と Wt マウス (右) の定常状態における遺伝子発現プロファイリング

2005)。また、造血幹細胞分画の既存技術による簡便な採取に関する技術的検討も進め、基本的な目標を達成した (造血幹細胞特異的に発現する Connexin32 の発現に着目して、その所期の成果を得た。発表準備中)。

本年は造血系細胞と外来異物との相互作用の検討に当たって、主として受け手の実験動物サイドの条件を変え、それらの結果の解析法を検討し (酸化的) ストレス応答性の特徴を明らかにする方策を試みた。

1. p53 遺伝子欠失とストレス応答

p53 遺伝子は、抗ストレス作用の一環として、cell cycle regulation、ストレス応答などで様々な役割を果たしていることが知られている

(Yoon BI et al., 2003)。定常状態におけるその背景遺伝子の状態を丁寧に観察する意義は高く、これまで十分なデータは見られない (p53-ヘテロ KO マウスを用いた実験が行われているが、p63 などの相補遺伝子の存在とあいまって、p53-ヘテロ KO マウスでは、p53 遺伝子機能を十分に把握できない)。DNA chip やマイクロアレイによる解析では、data processing の過程での実験精

度の向上もさることながら、近年多くのプラットフォームにおけるそうした手技の安定化に伴って浮かび上がってきた点は、個々の動物のエピジェネティックな遺伝子発現の意味のある個体差、stochastic variance にある (これらの stochastic variance は特定の実験条件下では収束することがわかっているの、生物学的に意味のないバラツキを意味するものではない)。

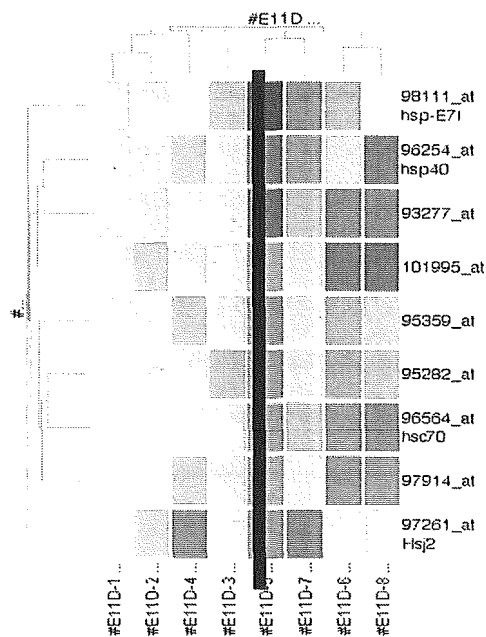
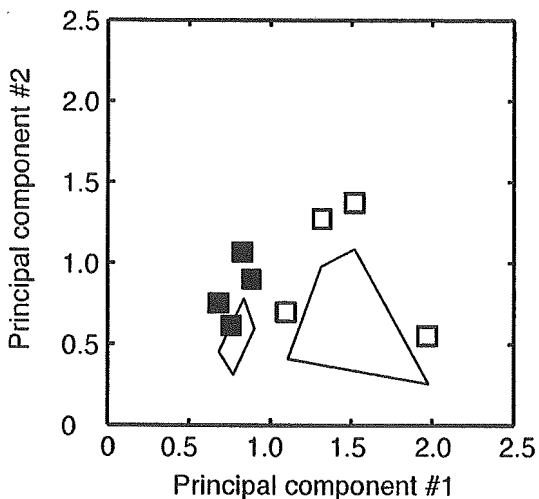


図2 : p53-KO (左 4 検体) と Wt (右 4 検体) の定常状態におけるストレス関連 24 遺伝子による tree 解析

p53-KO マウスと Wt マウスの定常状態における遺伝子発現プロファイリングを non-selective に4匹の個体ずつ全てに対して同一遺伝子を線図として図1の様に表現すると、右の Wt マウスで、比較的高発現の数百に及ぶ遺伝子群が左の p53-KO マウスではほぼ逆転し、発現が低下していることが観察される。それらの背景となる主たる遺伝子を抽出してヒートマップを描かせると、ストレス関連の 24 遺伝子につい

てみた図2ではその Wt マウスにおける高発現遺伝子が heat shock protein(hsp)105kDa、heat shock transcription factor 1、hsp40、hsp60、酸化ストレス誘導性蛋白 mRNA などを含むのに対して、p53-KO マウスでこれらが低反応性であることがわかる。これが何からのストレスを与えたときにも p53-KO マウスが無応答性で、細胞周期関連遺伝子の変動を惹起しないことの背景とも考えられるが、細胞周期関連遺伝子 23 個に注目すると、事実、Wt と p53-KO とでは、前者で cdc 関連遺伝子 (cdc2a、cdc42、cdc2 like 1、cdc25a など) が up-regulate しているのに対して、p53-KO では cdc7 like 1 の発現増加も認められるものの、多くの cdc 関連遺伝子は発現が低下していることがわかる。以上のような傾向は、外来性刺激応答性遺伝子 203 個について抽出した dendrogram でも両群の応答性の違いが示唆され



ている。

図3：p53-KO (■) と Wt (□) の定常状態におけるストレス関連 24 遺伝子による要因解析

尚、先に見たストレス応答性遺伝子を基礎とした要因解析を図示すると、その第一要素と

第二要素の二次元展開における分布は図3のようになり、両者を切り分ける要素が SPSS のような電算解析によって可能なことが示唆される。

2. Trx 遺伝子量に応じた遺伝子発現の相互解析

Trx 遺伝子改変動物の解析で困難な問題点は、Trx が生体必須分子 (ホモ欠失は胎生期、着床前致死) であることにより、Wt との遺伝子発現機能の分離が充分には表現されない点にある。しかしながら、Trx-KO、Wt、Trx-Tg の3段階の遺伝型を比較することによって、このものの定常状態における酸化ストレス応答の特異性が浮かび上がってきている。図4の線図は、最左翼に Trx-ヘテロ-KO、最右翼に Trx-Tg、中間にはそれぞれの同腹の Wt を配置し、それらにおける global な遺伝子発現を比較して示している。ここでの遺伝子発現の対比はたやすく把握されず、主として Trx-KO での高発現遺伝子群が最右翼の Trx-Tg 群でいずれの個体でもおおむね発現低下を示すこと、Wt でも発現低下に傾く多数の遺伝子が認められること、などが観察される程度にとどまる。

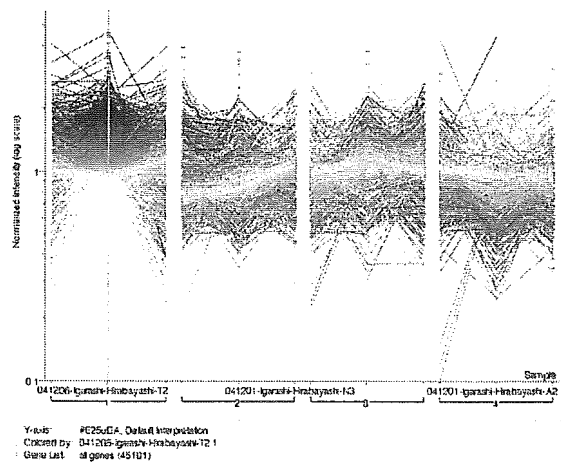
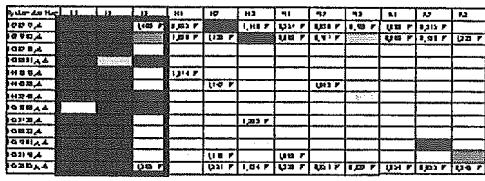
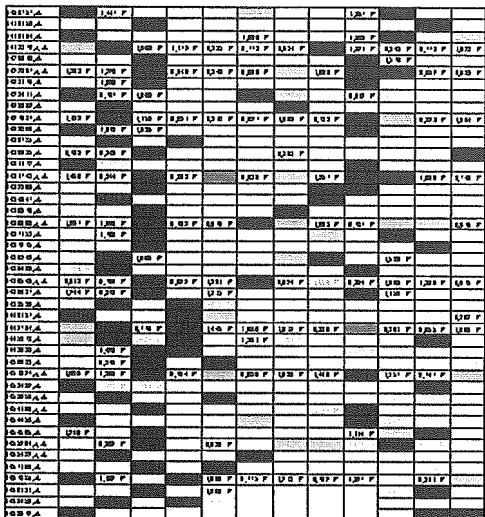


図4：Trx-KO(左：第1カラム)、Trx-Tg(右：第4カラム)及びそれぞれのWt(中央：第2、第3カラム)マウスの遺伝子発現プロファイリング

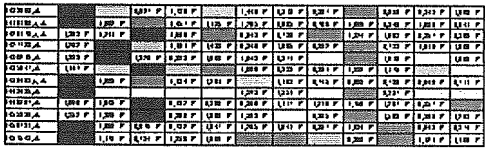
I



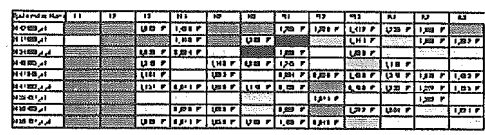
II



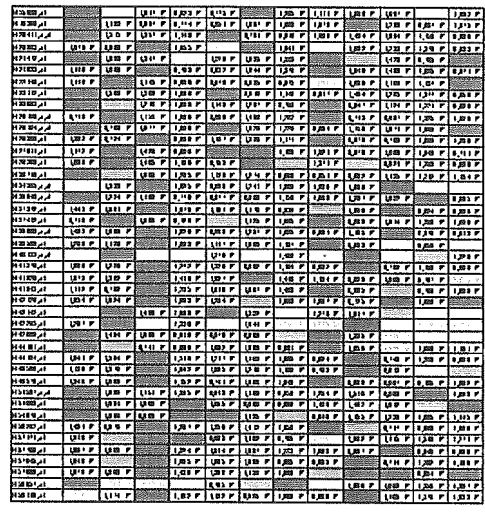
III



IV



V



VI

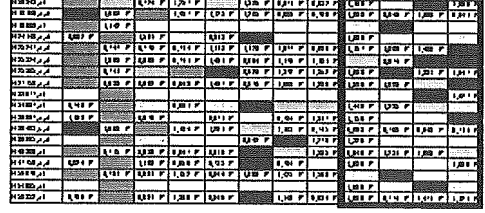


図5 : Trx-KO (左端 3 カラム : T1~T3)、Trx-Tg (右端 3 カラム : A1~A3) 及びそれぞれの Wt マウス (中央 6 カラム : N1~N3 及び W1~W3) の各個体における発現強度によるヒートマップ。Trx-KO マウスでの Top100 (左 : I~III) 及び Bottom100 (右 IV~VI) の遺伝子について、KO 間での重複 (I、IV)、KO と他の遺伝型マウスとの重複 (II、V) 及び逆転 (III、VI) 遺伝子を示す。

TOP100	common name	GenBank Accession #	description
1420272_at	Samhd1	AV340322	AV340322 RIKEN full-length enriched, adult male olfactory bulb Mus musculus cDNA clone 6430514F15 3' similar to U15635 Mus musculus IFN-gamma induced (Mg11) mRNA, mRNA sequence.
1427263_at	Xist	L04961	inactive X-specific transcript
1430218_at	4933424M12 Rik	AK016899	Adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4933424M12 product:unknown EST, full insert sequence
1438661_a_at	Arf2	AV023312	ADP-ribosylation factor 2
1441373_at		BB026958	Adult male pituitary gland cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:5330435L21 product:unknown EST, full insert sequence
1444828_at		BB040139	13 days embryo male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6030447G09 product:unknown EST, full insert sequence

1449248_at	Clcn2	NM_009900	chloride channel 2
1451866_a_at	Hgf	AF042856	hepatocyte growth factor
1452738_at	Stoml1	AK007508	stomatin-like 1
1456839_at		BM229188	7 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A730054F13 product:unknown EST, full insert sequence
1457981_x_at	2810418N01Rik	AV350371	AV350371 RIKEN full-length enriched, adult male cerebellum Mus musculus cDNA clone 6530427K16 3', mRNA sequence.
1459170_at		BG071113	Transcribed sequences
1459885_s_at	D13Ert d332e	AA190297	cytochrome c oxidase, subunit VIIc

図6：図5のIに含まれる13遺伝子の内訳

以上をより個々の遺伝子レベルで把握するために、各群各個体における Top100 及び Bottom100 の発現遺伝子を抽出し、さらに Top101~300、Bottom101~300、及びその残りの中間発現遺伝子群にわけて、Trx-KO マウスを基軸に解析を行った (図5)。図5は左のIとIIは重複して Top100 入りしている遺伝子をまとめた。まずIは、最左翼 (T1~T3=Trx-KO マウス) における Top100 遺伝子のうち、T1~T3 相互に2個体以上で重複した遺伝子13遺伝子を示す。これらの遺伝子で、他の群、Wt (N1~N3 及び W1~W3) や Trx-Tg (A1~A3) でも個々に Top100 に入っている場合には赤、次の Top300 までをピンク、Bottom100 を青、次の Bottom300 までを水色とし、中間のカラムは無色としている。次に、中段II群遺伝子44個は、N1~N3のいずれかの個体で Top100 に入っている遺伝子であり、かつ、他の群で Top100 入りが見られるという重複遺伝子群である。一方、最下段III群の12遺伝子は、発現レベルの逆転の見られる遺伝子である。即ち、N1~N3のいずれかの個体で Top100 に

入っている遺伝子が、他のいずれかのマウスで Bottom100 入りしているものをまとめた。尚、先のI群でT1~T3の中で重複がみられた Top100 遺伝子13遺伝子の中には ADP-ribosylation factor 2 や、cytochrome c oxidase の subunit などが含まれ、これらの Trx-ヘテロ-KO 動物では定常状態においてもストレスの亢進があることを示唆している (図6)。図5に戻って、右の表は Trx-KO 群で Bottom100 遺伝子が重複した9遺伝子 (IV) 及び他の群との重複、43 遺伝子 (V) が左図と同様に示してある。この表で右下のVI群の Trx-Tg 群 (A1~A3) には、多数の Top100 への逆転遺伝子があり、これらの遺伝子は主として Trx 依存性の遺伝子群で、ヘミアリル KO 群では十分な機能を発揮し得なかったものと考えられる。こうした発現遺伝子の逆転頻度は KO 群間では 0.67%であったものに対して、Wt 群では 1.17%、Tg 群では 3.67%で、過剰発現群に対してそれぞれ有意である (図7)。

	Trx-KO	Wt	Trx-Tg
のべ遺伝	2/300 (0.67%)	7/600 (1.17%)	11/300 (3.67%)

子数 (比率)			
P値(対Tg)	0.0412	0.0464	

図7：図5のVIでのBottom100からTop100への逆転率

3. Trx 遺伝子量に応じたマウス個体群毎の要因解析

図8は Trx を中心にした文献上の関連遺伝子における Trx 遺伝子量別の関連遺伝子の各個体での発現を個別に示している (例示は Trx-KO 群)。Trx のシグナルネットワークは、ここに例示されている実態よりも遙かに複雑かつ dynamic で特定の責任遺伝子群をプロファイリングの形できりわけることが困難である (これは前述の通り、KO 動物も Tg 動物

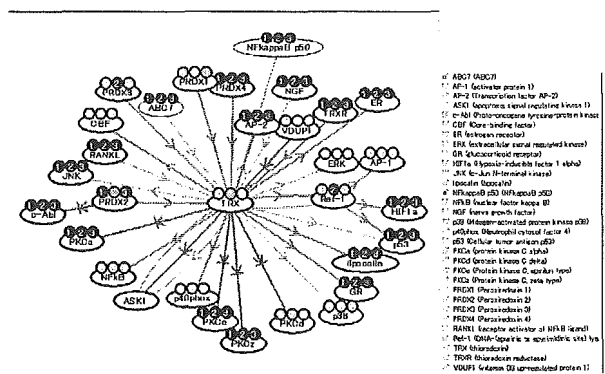


図8：KeyMolnet®による遺伝子発現解析：Trx-KO マウス3匹のそれぞれの遺伝子発現強度を当該遺伝子名の上部の小さな円の着色によって示している。

もヘミアリル動物を使わざるを得ないという点も関連している)。こうした遺伝子解析結果の統計処理には、生物学的蓋然性に則した種々の方法が用いられるが、通常次元の方向性を持たない多要因解析にあつては、dendrogram の様なベクトルで一本化してしまう方法では結果の解釈がつかないことが少なくない。そこで AutoClass や PCA などの試みが種々行われるが、

そのようにしてデータの捨象なしに (歪みは避けられない) global な発現をそのまま解析すると 1/3 に達する第一主要因で Trx-KO マウスと Wt マウスが切り分けられ、Wt と Trx-Tg も 16.9% の第二主要因で、分離要因を抽出することができた (図版省略)。

D. 考察

DNA chip やマイクロアレイ解析による遺伝子発現の解析は、遺伝子機能の決定論的な情報のみならず、遺伝子発現の可塑性によって展開される確率論的なエピジェネティックな要因が主要情報となる (井上 達, 2005)。事実、当研究者らのこれまでの自然発生腫瘍と放射線誘発腫瘍における遺伝子発現の比較などでは、以上を示唆する顕著な結果が認められている (未発表データ)。今回充分な誤差の混入を恐れず、個体別の解析をした結果得られた p53 欠失動物や各種の遺伝子量群の Trx マウスでの機能は、個体別の stochastic variance を示しつつ、かつ遺伝子型の各動物群の特徴を浮上させ、これらを統計的に合算することによって引き起こされる多様な生物学的蓋然性が相殺消去される可能性を示した。今回の解析では、定常状態の動物のみの解析にとどまったが、引き続き暴露動物における解析もすすめ、以上の視点からみた解析の理論化を進めたい。

E. 結論

造血系における生体の異物応答に関する普遍性のある指標を得るために、主として酸化的ストレス物質を取り上げて、トキシコゲノミクス

手法の演繹的利用モデルの確立を目的として研究をすすめた。

F. 健康危険情報

該当しない

G. 研究発表

1. 論文発表

原著

- Yoon BI, Kaneko T, Hirabayashi Y, Imazawa T, Nishikawa A, Kodama Y, Kanno J, Yodoi J, Han JH, Hirose M, Inoue T: Electron microscopical evidence of the protective function of thioredoxin (Trx/ADF) transgene against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced cellular toxicity in the liver and brain. *J Toxicol Pathol* 18:41-46, 2005.
- Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Kanno J and Inoue T: Mechanism of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: current review with implication of microarray analyses. *Toxicol Pathol* 32 Suppl 2: 12-6, 2004.
- Yoon, B.I., G.X. Li, K. Kitada, Y. Kawasaki, K. Igarashi, Y. Kodama, T. Inoue, K. Kobayashi, J. Kanno, D.Y. Kim, T. Inoue and Y. Hirabayashi (2003). Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. *Environ Health Perspect* 111: 1411-20.

著書・総説など

- 井上 達 (2005) 第4章健康医学「環境ストレス応答と生体ホメオスタシス」: 淀井淳司/松尾禎之編 別冊医学のあゆみ「レドックス-ストレス防御の医学」医薬出版(株)、東京、194-199
- 井上 達 (2005) 環境生体応答ー Toxicogenomics 「はじめに」医学のあゆみ 213(4): 221.
- Hirabayashi Y and Inoue T (2005) Toxicogenomics Applied to

Hematotoxicology In: Borlak J (ed), Handbook of Toxicogenomics, pp583-608. Weinheim: Wiley-VCH.

- Inoue T (2003) Introduction: Toxicogenomics - a New Paradigm of Toxicology. In: T. Inoue and W. D. Pennie (eds.), Toxicogenomics, pp. 3-11. Tokyo: Springer-Verlag Tokyo.
 - Hirabayashi Y, Yoon BI, Kawasaki Y, Li GX, Kanno J, and Inoue T (2003) On the Mechanistic Differences of Benzene-induced Leukemogenesis between Wild type and p53 Knockout Mice. In: K. Tanaka, T. Takabatake, K. Fujikawa, T. Matsumoto, and F. Sato (eds.), Molecular Mechanisms for Radiation-induced Cellular Response and Cancer Development, pp. 110-116. Aomori: Inst for Environmental Sciences.
- ### 2. 学会発表
- Inoue T: "Continuing Education Courses" Toxicogenomics-A new paradigm of toxicology. International conference on Toxicology, Environmental and Occupational Health (ICTEOH)-2005. (2005.11.14) [Lucknow, India, CEC01-01 p1-11, 2005]
 - 井上 達, 松下智哉 五十嵐勝秀, 菅野 純, 平林 容子: ワークショップ 1-4 「発がん過程」DNA マイクロアレイによる放射線照射後の遺伝子発現プロファイル解析. 第 64 回日本癌学会総会 (2005.9.16) [札幌、日本癌学会総会記事 p544; 2005]
 - Inoue T: Toxicogenomics strategies and current discoveries. 9th ICEM satellite meeting on Toxicogenomics (2005.8.30) [Kauai Beach Resort, Hawaii]
 - Inoue T: Nutrigenomics: Toxicogenomics and risk assessment applied to food safety. The mini-symposium of the National Center for Risk Analysis (2005.7.11) [Seoul, Korea, Meeting abstract p21-34; 2005]
 - Inoue T: The Use of Toxicogenomics data in risk assessment- Potential applications of Toxicogenomics in risk assessment-. The 5th Princess Chulabhorn International Science Congress (2004.8.22)[Bangkok, Thailand, 2004]
 - Inoue T: Toxicogenomics as a tool of predictive toxicology. 10th International Congress of Toxicology. (2004.7.13)

[Tampere, Finland, Toxicology and Applied Pharmacology 197 (3): 265, 2004]

- Inoue T: Symposium 5. Pharmaco- & Toxicogenomics Symposium: S5-3. Strategy of predictive Toxicogenomics a reverse toxicogenomics. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology The 61st Annual Meeting 2004 (2004.5.27) [Seoul, Korea, Meeting abstract p100; 2004]

H. 知的財産所有権の取得状況

1. 特許取得：
該当しない
2. 実用新案登録
該当しない
3. その他（データベース等）
該当しない

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

ストレスシグナルに関わる毒性発現メカニズムに関する研究

分担研究者 漆谷徹郎 同志社女子大学薬学部・教授

研究要旨

本研究は酸化ストレス応答の鍵となる分子である ASK1 欠損マウスを用いて、酸化ストレスシグナルを解析しようとするものである。GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析により、Mouse embryonic fibroblast において ASK1 欠損マウスと野生型マウスの間に発現の差のある遺伝子群が抽出された。また、MPTP による実験的 Parkinson 病モデルの機序解明の系として、培養細胞が使用可能である可能性が見いだされた。

A. 研究目的

本研究の目的は、細胞のストレス応答に関係する細胞内情報伝達系を解析することにある。このため、ストレス応答の鍵となる遺伝子を欠損したマウスの遺伝子発現応答を正常マウスのそれと比較することによって、当該遺伝子の下流のシグナルを一気に解明しようとするものである。

本研究で注目している分子 ASK1 は、各種のストレスやサイトカインのシグナルを受けてこれを生存側かアポトーシス側に振り分ける鍵となるキナーゼである。細胞がストレスを受けたとき、ある程度まではこれを解消して生き延びようとする機構を働かせるが、ある程度以上の障害を受けると、アポトーシスの形で積極的に死を選ぶ、という防御機構が生体には備わっている。毒性物質や病態によって生じる細胞死の機構解明には、最も重要な分子の一つといえよう (Fig. 1)。現在、ASK1 のノックアウトマウスが作成されており、この分野の研究が進んでいる。このマウスは、通常に誕生・成熟し、生殖能力にも殆ど問題がなく、正

常な状態では ASK1 は殆ど重要な働きをしていないことが分かる。言い換えれば、正常な発生・分化に伴うアポトーシスには、この酵素活性は寄与していないか、他の分子で代替されるといえる。しかしポリグルタミン病モデルマウスや SOD 変異による ALS モデルマウスの神経変性が、ASK1 欠損によって軽減されることである。従って、少なくとも ER ストレスによる神経変性疾患の発症には ASK1 が重要な役割を果たしていることが想像できる。

更に、種々の実験から、ASK1 がチオレドキシンをセンサーとして酸化ストレス応答を受容し、以後のストレス応答を制御していることが明らかとなっている。近年の研究から、種々の物質の毒性発現機序が、酸化ストレスに関係していることが分かってきており、毒性パスウェイとして最も重要なものの一つと考えられるに至っている。この鍵分子のあるなしの状態、それ以降の応答を比較できれば、毒性シグナルの解明に大きく寄与することが期待される。

昨年度までに、以下のような成果が得ら

れている。

1. 肝臓および脳における遺伝子発現には野生型とASK1ノックアウトマウス間で大きな差は見られず、生体にストレス負荷がかかっていない状態では、ASK1の関与は小さいと考えられた。

2. MPTP投与による実験的Parkinsonismに対しASK1ノックアウトマウスは野生型に比べ、抵抗性である傾向を示したが、例数が不足しており、追加実験が必要であった。

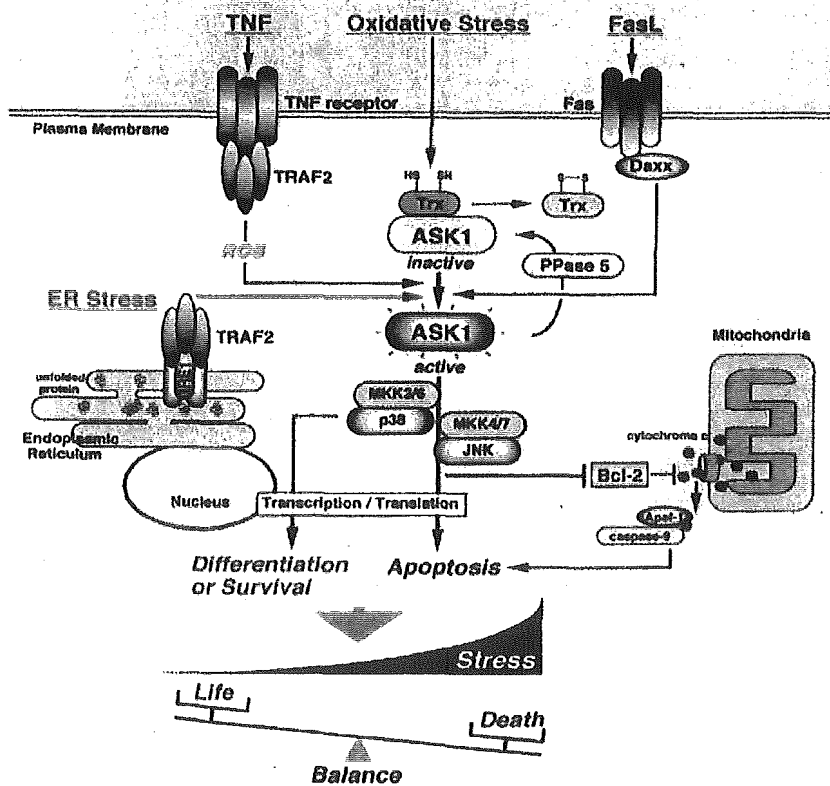
3. 肝臓、脳の両組織において、MPTPにより発現の変化する遺伝子が多数抽出できた。また、野生型とASK1ノックアウトマウスの一方のみで選択的に変化が認められる遺伝子がそれぞれ幾つか抽出できた。

従って、今年度は上記2を中心とする予定であった。しかしながら、今年度より分担研究者は現在の所属に異動したため、動

物も新しい施設に移動させる必要があった。遺伝子改変動物の移動には法律上の制約があり、その対応のため、移動が完了したのが2005年の秋であった。その時点から交配を開始し、ヘテロマウスを取得したのが2005年末であり、そのマウスを交配して得られたノックアウトマウスが実験に使用できるのは2006年3月以降である。従って、現報告書の時点では、まだその結果が出ていない。

前年度までの、in vivoの暴露実験から得られたトランスクリプトーム解析では、種々の要因から、解析が困難であることが予想された。この点を打開するため、培養細胞の使用を検討することとした。培養細胞は、個体としての性質の多くを欠如しているという欠点を持つが、以下のような多くの重要な利点を持っている。

Fig. 1



1. 特に毒性影響を解析するとき、個体でみられる、他臓器や生体内環境から受ける間接的な影響を排除でき、試験物質そのものの作用を観察できる。

2. 前項に関連して、個体では全身影響が強すぎて達成できないような高濃度の試験物質も適用できる。

3. 特定の遺伝子の除去や導入は、個体レベルでは多くの費用と時間がかかり、毒性カスケードの検証のためにこの戦略を使用するのは事実上不可能であるが、培養細胞を用いれば、可能である。

4. 遺伝子改変動物は、成熟動物を用いると、それまでに遺伝子改変結果を補償する効果が長期に渡って作動するため、解析が困難な場合がある。培養細胞では、遺伝子改変の瞬時の効果が観察可能である。

以上のことから、前年度までの成果をより効率的に発展させるため、培養細胞の系を立ち上げることとした。

B. 研究方法

動物と遺伝子解析

ASK1 ノックアウトマウスは、東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室一條秀憲教授より供与された。前年度までにこのマウスを実験動物中央研究所においてSPF化し、国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター動物施設に導入し、B57BL/6 ヘテロ体として維持繁殖させていた。本年度、分担研究者の異動に伴い、このヘテロ体を同志社女子大学薬学部動物施設に移送し、維持繁殖を再開した。

研究協力者である東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学研究室において、昨年度、野生型およびASK1 ノックアウトマウスから、3T3 protocolに従ってmouse embryonic fibroblast (MEF)が樹立された。この細胞の譲受を受け、今回の実験に使用した。

また、マウス一次培養肝細胞の予備検討を行った。ネブタール麻酔下、門脈より0.1 mM EGTAを含む2価イオン不含ハンス液を2 ml/minで10分還流後、collagenase (WAKO 034-10533) 0.5 mg/ml, Trypsin

Inhibitor (Sigma T-2011) 50 ug/mlで10分還流し、肝臓を消化した。50 x gで3回洗浄した肝実質細胞を10% FCS 含HepatoZYME-SFM (Invitrogen)培地に懸濁し、 10^6 /wellとしてコラーゲンコート6wellプレートに撒いた。2~3時間後、非付着細胞を除き、24時間後に実験に供した。

被験物質として、MPTPを暴露させた細胞からmRNAを調製し、Affymetrix社GeneChip(Mouse Genome 430 2.0)により遺伝子発現を網羅的に解析した。このとき、SpikeによるmRNA絶対量化システムを用いて定量化を行った。

また、細胞のアポトーシス判定には、Apoptag Fluorescein Direct *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Chemicon International)を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究に用いた動物は同志社女子大学動物実験委員会の承認を得ている(2005年9月6日, Y05 004)。使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用で苦痛の少ない方法を用いるといった、本学の実験動物取り扱い倫理規定に従った対応を行っている。

C. 研究結果

1. マウスの繁殖

ASK1 ノックアウトマウスを恒常的に維持・使用するため、実験動物中央研究所において人工授精・帝王切開によりマウスをSPF化し、国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター動物施設に導入した。今年度分担研究者の異動に伴い、ヘテロ体を新設された同志社女子大学薬学部動物実験施設に移送した。遺伝子改変動物の移送は法律に従った手続きが求められているため、諸委員会の設立、諸規定の整備等に時間を要し、移送が完了したのは2005年8月末であった。この後、野生型と掛け合わせて誕生したヘテロ体の掛け合わせによって、野生型、及びASK1 ノックアウトマウスを得た。現在、実験に用いる10週

令に至るのを待っている段階である。

2. マウス一次培養肝細胞

まず、マウスの一次培養細胞が個体レベルでのMPTP障害のモデルになりうるかどうかを検討した。B57BL/6 マウスからコラーゲナーゼ消化により肝細胞を単離し、培養した。コラーゲンコートウェルに接着した細胞に対し、MPTP 0.3 -1 mMを添加して24 時間後、細胞を Apoptag Fluorescein Direct *In Situ* Apoptosis Detection Kit によって染色した。Fig. 2 に代表例を示す。核染色 (Propidium Iodide) は赤く示され、アポトーシスを生じた細胞の核は緑で染色される。図は2重染色像であるため、アポトーシスを生じた細胞は黄色を呈する。左の溶媒対照では赤色の核が多くみられるが、右のMPTP 1 mM では、ほぼすべての細胞が黄色を呈しており、明らかにアポトーシスが誘導されている。

以上から、MPTP は黒質の神経細胞だけでなく、肝細胞にも直接毒性作用を及ぼすこと、また、神経細胞で示されているような、アポトーシスの誘導が、肝細胞でも生ずることが示され、*in vitro* モデルとして有用であることが示唆された。後述の、MEF を用いた実験も参考にして、マウスが成熟したら、この系でノックアウトマウスと野生型マウスの比較を行いたい。

3. MEF に対する MPTP の細胞障害の検定

一般に、一次培養細胞は単離の影響が大きく、実験内での比較はまだしも、実験間の比較が困難である。実験間の比較のためには、クローン化した細胞が望ましい。そこで次に、野生型及びASK1 ノックアウトマウスから樹立した mouse embryonic fibroblast (MEF) を用い、これがモデルとして使用可能かどうかを検討した。もしこれが可能であれば、将来的に、*in vitro* の遺伝子操作が可能となり、利用価値が非常に高いことが期待された。

野生型及びASK1 ノックアウトマウスのMEF に対して0.1-1 mM のMPTP を投与し、染色を行った。投与6時間では、いかなる

濃度においても変化は認められなかったが、24時間の時点では、少なくとも野生型マウスのMEF は、明らかなアポトーシス像を示した。Fig.3は0.3 mMの場合であるが、右上の野生型(WT)の細胞の多くにおいてDNA が断片化していることが示されている。また、興味深いことに、ASK1 ノックアウトマウスのMEF は野生型に比べ、アポトーシス抵抗性である傾向を示した (Fig.3, 下)。これは、過酸化水素など、酸化ストレスによるアポトーシスで認められている現象であり、このことからASK1 の酸化ストレスカスケードにおける役割が提唱されているのであるが、今回の結果から、MPTP の細胞傷害も、神経細胞特異的というより、細胞普遍的な酸化ストレス障害の系が関与しており、そこにASK1 が重要な役割を果たしていることが示唆された。

4. 上記の結果、MPTP の細胞障害性に関する毒性カスケードを解析する目的で、MPTP 投与後の遺伝子発現変化をGeneChip により網羅的に解析した。解析は、野生型及びASK1 ノックアウトマウスのMEF に対し、MPTP 0.3mM 投与後6および24時間の時点で、N=2で行った。

Pecellome 手法によるGeneChip 解析を行ったため、それぞれの遺伝子に関して、異なる動物(野生型とノックアウト動物)の間でも絶対量の比較が可能である。ラフな見積りによれば細胞当たり1コピーのmRNA は絶対量として約15であるが、8測定点(野生型とノックアウト動物それぞれ対照群と処理群、2時点)のうち少なくとも1測定点で絶対量50を越える値を示した遺伝子を抽出した。これは約14300プローブセットであった。この遺伝子群を用いて、Hierarchical Clustering を行ったところ、まず6時間、24時間の時点で大別され、それぞれの時点で野生型とノックアウト動物が大別された (Fig.4)。すなわち、遺伝子発現は培養時間依存性に大きく変化し、それぞれの時点においてはMPTP の影響より遺伝子改変の影響の方が大きいことが

推定される。

次に、いずれかの時点で遺伝子改変あるいは MPTP 投与の有無で 1.5 倍以上発現量の差を示した遺伝子を抽出したところ、約 4300 プローブセットが得られた。この遺伝子群を用いて K-means clustering を行って 10 個のクラスターに分けた (Fig. 5, 右)。大きな変動パターンを示したクラスター 1 と 7 に属するプローブセットを用いて Hierarchical Clustering を行ったのが Fig. 5 左である。この場合は、野生型とノックアウト動物がまず大別され、次に時点で大別された。この操作によって、遺伝子改変で大きく変動する遺伝子は抽出されたが、時間依存的変化を上回るような MPTP の作用を表す遺伝子はほとんど無いことを示唆している。

そこで次に、各時点・遺伝子型のいずれかにおいて、MPTP により 1.5 倍以上の変化を示したプローブセットを抽出し、これらの Gene Ontology 解析を行った。各カテゴリーに属するプローブセット数が 2 未満のものを排除し、ヒットプローブ数/カテゴリー総プローブ数、の値と、ヒットプローブのカイ 2 乗値を掛け合わせた値でソートし、上位のカテゴリーを Table 1 - 3 に示した。

Table 1 は、野生型、ノックアウト両者で共通に変動したプローブセットを示し、左は 1.5 倍以上上昇、右は 1/1.5 倍以下に減少したプローブセットを示す。類似カテゴリーのプローブセットを着色してあるが、最も特徴的なのは、両者に於いて各種の脂質代謝関連遺伝子が動いていたことである (黄色)。また、上昇遺伝子として陰イオンチャネル関連 (緑)、低下遺伝子として JNK 関連 (赤) が目に付き、アポトーシスに陰イオンチャネルや JNK が重要な役割をしていることから注目されるが、プローブセットに重複が多く、重要性は不明である。

Table 2 は野生型のみ (左) あるいはノックアウトのみ (右) で 1.5 倍以上上昇したプローブセットを示す。類似カテゴリー

の着色から明らかなように、両者で全く異なるカテゴリーの遺伝子が増動している。野生型では、細胞分化・器官形成関連遺伝子 (赤) と、トランスポーター (黄) が主であり、ノックアウトでは生殖細胞間連遺伝子 (青) とアポトーシス関連 (茶) が注目される。

Table 3 は野生型のみ (左) あるいはノックアウトのみ (右) で 1/1.5 倍以下に減少したプローブセットを示す。この表においても両者で全く異なるカテゴリーの遺伝子が増動している。野生型では、システイン代謝関連遺伝子 (黄) と T 細胞関連遺伝子 (青) が目立つが、25 プローブセットが重複してカウントされているだけであり、結論的には、野生型のみで特異的に MPTP により発現低下する遺伝子は、あったとしてもカテゴリー的に集中することはないと考えられる。一方、ノックアウト特異的に低下するものとして、細胞分化関連 (茶)、環状ヌクレオチド関連 (赤)、組織適合性抗原 (緑) などが注目された。

次に、遺伝子改変や MPTP 投与により特徴的な変動を示した個々の遺伝子に注目してみると、幾つか興味深い点が見いだされた。

まず、ASK1 (MAPKKK5) および関連遺伝子の発現をみってみる。前回報告したように、ノックアウトマウスにおいても ASK1 遺伝子は蛋白質には翻訳されないが mRNA として一部が発現し、GeneChip 解析によって検出される。Fig. 6 左上に示すように、ASK1 ノックアウトマウス由来の MEF は、野生型に比べて ASK1 が非常に高発現しており、かつ MPTP 処理によって更に増大していた。これは、ASK1 欠如を感知した MEF が恐らく恒常性維持のため ASK1 を増大させるシグナルを発信していると考えられる。また、MPTP 処理による増大も、ASK1 由来シグナルの欠損を補償する機構が作動した結果であるかもしれない。Fig. 6 右上は ASK1 の直接の下流で、JNK を活性化する MAPKK の MAPKK7 であるが、この場合は MPTP 投与により両細胞で顕著な上昇がみられた。勿論、ASK1 カスケードは基本的にはリン酸化で制御され