

図4 新生児期にDESを投与したSD系ラットの生存曲線

不明である。

雄では、いずれの時期の交配においても、DES投与の影響は認められなかった。また、26週齢および52週齢では、ともに精子数および生殖器重量にDES投与の影響を示唆する変化も認められなかった。新生児期のDES投与では、雄動物の生殖能力への影響^{12,13)}が報告されているが、いずれも高用量(0.1 mg/pup/day以上)での報告であり、今回用いた5 µg/kgまでのDESは、新生児期投与で雄の生殖機能に影響を及ぼさないと考えられる。しかしながら、Vom Saalら¹⁴⁾は、胎生期に0.02 µg/kgのDESを投与したマウスで前立腺重量の増加を報告していることから、同程度の投与量を用いて胎生期曝露を追試することが必要であろう。

54週齢の雌では、下垂体および副腎重量が用量に依存して増加し、血中プロラクチンとLH濃度の上昇が確認された。剖検時に乳汁貯留も観察さ

れていることから、高プロラクチン血症が疑われる。一方、5 µg/kg投与群では甲状腺重量の増加が認められたが、血中T₃およびT₄濃度に変化はなかった。卵巣重量は、0.5 µg/kg以上の投与群で低下したが、hCG投与による誘起排卵がすべての投与群で確認されたことから、新生児期のDES投与は、卵巣機能には直接影響を及ぼさず、下垂体からの刺激の低下、すなわち視床下部-下垂体系の内分泌攪乱作用に起因したものと推定される。

結論

低用量DESは雌の性成熟を早めるだけでなく、雌の老化過程における性周期、受胎率、交尾率あるいは産児数に影響を与える可能性が示唆された。また、それらの変化は視床下部-下垂体系の内分泌攪乱作用に起因したものと推定され、卵巣機能への直接的な影響ではないと考えられた。本研究から、内分泌攪乱性を確定する上で一生涯試

験は有効であることが示されたが、雄の生殖機能異常を検出することは出来なかった。

謝辞

この研究は、平成17年および18年度厚生労働省厚生労働科学研究費の補助事業（H16-化学一般-001）により実施した。本研究の試験計画は、国立医薬品食品衛生研究所毒性部菅野純部長の指導によるものである。研究の実施にあたり、排卵検査では代田真理子、血液学検査および精子検査では関剛幸、血中ホルモン濃度測定では古谷真美の諸氏の協力を得、また病理解剖では病理学研究室、動物飼育管理では動物飼育管理室に負うところが大きい。さらに東京農工大学田谷一善教授にも血中ホルモン濃度測定に関し、ご協力を賜った。

文献

- 1) 渡辺千朗, 代田真理子, 長尾哲二: SD系雌ラットの性周期の加齢性変化に関する研究. 秦野研究所年報 17: 37-40 (1994)
- 2) 厚生労働省 医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室: 内分泌かく乱化学物質ホームページ. <http://www.nihs.go.jp/edc/torikumi/scheme.htm>
- 3) Watanabe, C., Kuwagata, M., Yoshimura, S., Azegami, J., Kojima, K., Ono, H., Nagao, T.: An improved technique for repeated gavage administration to rat neonates. *Congenit. Anom.* 43: 177-179 (2003)
- 4) 和田和義: AGD測定および包皮分離観察ならびにそれらの問題点. 秦野研究所年報 25: 109-114 (2002)
- 5) Sato, M., Ohta, R., Kojima, K., Shiota, M., Koibuchi, H., Asai, S., Watanabe, G., Taya, K.: A comparative study of puberty, and plasma gonadotropin and testicular hormone levels in two inbred strains of Hatano rats. *J. Reprod. Dev.* 48: 111-119 (2002)
- 6) Sawaki, M., Noda, S., Muroi, T., Mitoma, H., Takakura, S., Sakamoto, S., Yamasaki, K.: *In utero* through lactational exposure to ethinyl estradiol induces cleft phallus and delayed ovarian dysfunction in the offspring. *Toxicol. Sci.* 75: 402-411 (2003)
- 7) Howdeshell, K. L., Hotchkiss, A. K., Thayer, K. A., Vandenberg, J. G., vom Saal, F. S.: Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 401: 763-764 (1999)
- 8) Yoshimura, S., Yamaguchi, H., Konno, K., Ohsawa, N., Noguchi, S., Chisaka, A.: Observation of preputial separation is a useful tool for evaluating endocrine active chemicals. *J. Toxicol. Pathol.* 18: 141-157 (2005)
- 9) Franczak, A., Nynca, A., Valdez, K. E., Mizinga, K. M., Petroff, B. K.: Effects of acute and chronic exposure to the aryl hydrocarbon receptor agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on the transition to reproductive senescence in female Sprague-Dawley rats. *Biol. Reprod.* 74: 125-130 (2006)
- 10) Rubin, B. S., Murray, M. K., Damassa, D. A., King, J. C., Soto, A. M.: Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ. Health Perspect.* 109: 675-680 (2001).
- 11) vom Saal, F. S., Moyer, C. L.: Prenatal effects on reproductive capacity during aging in female mice. *Biol. Reprod.* 32: 1116-1126 (1985)
- 12) Atanassova, N., Mckinnell, C., Walker, M., Turner, K. J., Fisher, J. S., Morley, M., Millar, M. R., Groome, N. P., Sharpe, R. M.: Permanent effects of neonatal estrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, Sertoli cell number, and the efficiency of spermatogenesis in adulthood. *Endocrinology* 140: 5364-5373 (1999)
- 13) Warita, K., Sugawara, T., Yue, Z. P., Tsukahara, S., Mutoh, K., Hasegawa, Y., Kitagawa, H., Mori, C., Hoshi, N.: Progression of the dose-related effects of estrogenic endocrine disruptors, an important factor in declining fertility, differs between the hypothalamo-pituitary axis and reproductive organs of male mice. *J. Vet. Med. Sci.* 68: 1257-1267 (2006)
- 14) vom Saal, F. S., Timms, B. G., Montano, M., Palanza, P., Thayer, K. A., Nagel, S. C., Dhar, M. D., Ganjam, V. K., Parmigiani, S., Welshons, W. V.: Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 2056-2061 (1997)

特集 環境化学物質の作用メカニズムを解き明かす

トキシコゲノミクスの新展開

Percellome プロジェクトによる 2,3,7,8-TCDD - 2,3,7,8-TCDF 比較

An Attempt for Adding a New Dimension to Toxicogenomics Research : 2,3,7,8-TCDD-2,3,7,8-TCDF Comparison Trial in The Percellome Project

菅野 純 相崎健一 五十嵐勝秀 北嶋聡 中津則之 児玉幸夫 高木篤也

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Satoshi Kitajima, Noriyuki Nakatsu, Yukio Kodama, Atsuya Takagi

Percellome トキシコゲノミクスはマイクロアレイという数万遺伝子の発現レベルを一気に測定するハイスループット技術を利用し、全遺伝子のカスケード解明を最終目標としつつ、従来に比べてより早く安くかつ正確な毒性評価系の確立を目指すものである。筆者らはこのような次世代の毒性評価・予測技術を開発するために、細胞1個当たりの mRNA コピー数を測定する Percellome 法を開発した。今までに 90 以上の化学物質についての網羅的遺伝子発現情報を得て、なお追加中である。本稿では環境化学物質の一例としてダイオキシンの分子毒性に関わる知見を紹介する。

key words

Percellome Project, 遺伝子発現カスケード, 分子毒性学

① 菅野 純 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 毒性部 E-mail : kanno@nihs.go.jp

1985年東京医科歯科大学大学院医学研究科博士課程修了。人体病理学、実験病理学専攻。国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長を経て、2002年より同部長。内分泌攪乱関連などの分子毒性学研究、Percellome トキシコゲノミクスプロジェクトなどを厚生労働所掌業務の一環として有機的に推進。

相崎健一、五十嵐勝秀、北嶋聡、中津則之*、児玉幸夫、高木篤也 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 毒性部

*現(独)医薬基盤研究所 基盤的研究部

はじめに

毒性学は生体 (Biosphere) と外来性物質 (Chemosphere) との相互作用を研究する分野であり、目的は“ヒトの安全”である。日常遭遇する化学物質 (生活化学物質、環境化学物質、医薬品や食品を含む) が摂取された際の安全性を担保するため (毒性評価) に、人体実験が困難な場合、身代わりとしての実験動物の毒性所見をヒトに外挿することが行われてきた。これは両者が基本的に同等の生体反応を示すという前提に基づいている。そして、酵素、膜、DNA など比較的全体的かつ基本的な標的が主な検討対象となってきた。現在の分子毒性学は、生体反応メカニズムに踏み込み、受容体、転写因子などとの選択的結合によるシグナル伝達障害などの標的特異性の高いものや、エピジェネティックな遅発影響なども直接的な対象とするようになり、基礎分子生物学と直結する時代に入っている。古い話ではあるもののいまだに分子機構の解明が完結していないサリドマイドの催奇形性問題、あるいは、最近の健常人ボランティアに対するバイオ医薬品 (治療薬) の微量投与がその全員を集中治療室送りにした事件は、種差問題の解決を含む分子毒性評価法の確立の重要性と、その現状を示していると考えられる。

I. トキシコゲノミクス

分子毒性メカニズム解析のためのツールの1つに mRNA を対象とするトキシコゲノミクスがあり、見落としのない網羅性が要求される毒性学では全遺伝子のカスケード解明がそ

の最終目標となる。これにより従来に比べて早く安く正確な毒性評価を目指すことができる。そして、種差・個体差、一生涯の反応性を修飾する胎生期・周産期影響、あるいは複合作用などを包括的に扱う際には、生命科学の各分野との緊密な連携が必須となる。また、従来の毒性学に対してのトキシコゲノミクスは、例えとしては光学顕微鏡に対しての電子顕微鏡のような立場にあると考えられる。電子顕微鏡が広く用いられるようになるには、教科書や図譜が必要であったように、トキシコゲノミクスの実用化にはある程度の量のデータの蓄積と解析のための基礎研究 (関連分野との連携を含む) が必要である。そこで、筆者らは、情報の互換性を確保するために細胞1個当たりの mRNA 発現コピー数を得る Percellome 手法を開発した。これを基盤としたプロジェクトを展開中であり、今までに 90 以上の化合物についてのデータを蓄積し、その解析ツールを開発している。

II. Percellome 法

原理は単純で、サンプルの細胞数を測る代わりに DNA 濃度を精密に計測し、それをもとに外部標準 mRNA (スパイク RNA) を細胞1個当たり決まった分子数だけそのサンプルに添加し、そして RNA 抽出・測定に移る。スパイク RNA の測定値を基準に、サンプルの各 RNA の測定値を細胞1個当たりのコピー数に換算する^{1)~3)}。これにより、実験操作、試薬やマイクロアレイのロット差などによる系統誤差を相殺するという本来の目的が果されるほか、測定過程における各種の異常が高感度に検出されることから、品質管理精

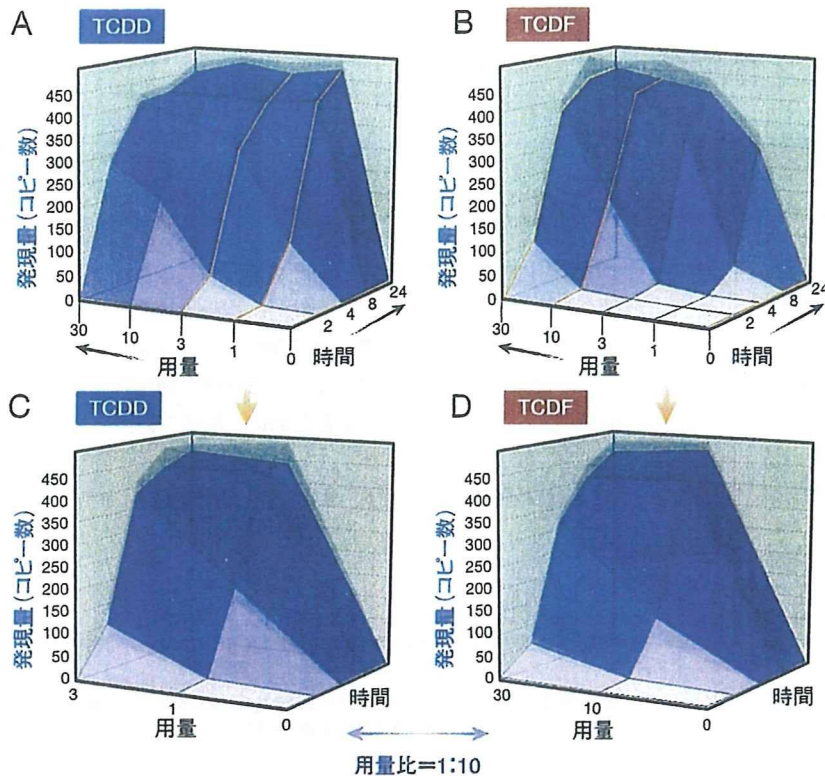


図1. TCDDとTCDFのPerccellomeデータ：
TEF 依存遺伝子の抽出法 (1)

TCDDおよびTCDFの単回経口投与をC57BL/6雄マウスに行った。用量は両実験とも0 (溶媒対照), 1, 3, 10, および30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ とし、投与後2, 4, 8, および24時間後に肝を採取しマイクロアレイ解析を行った (両動物実験は1カ月を隔てて、国立医薬品食品衛生研究所、環境保全型動物実験施設内にて厳重管理の下に実施された)。代表例として cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp1a1; Affymetrix probe ID 1422217_a_at) を示す。

A: TCDDによるCyp1a1の発現変動のSurface (反応曲面) 表示。

B: TCDFによるCyp1a1の発現変動のSurface表示。

丁度、用量について10倍ずれた反応を示している。C: TCDDの3, 1, 0から作製したSurfaceとD: TCDFの30, 10, 0から作製したSurfaceが形状および発現値ともにほぼ完全に一致している。このような遺伝子をTEF依存性とした。

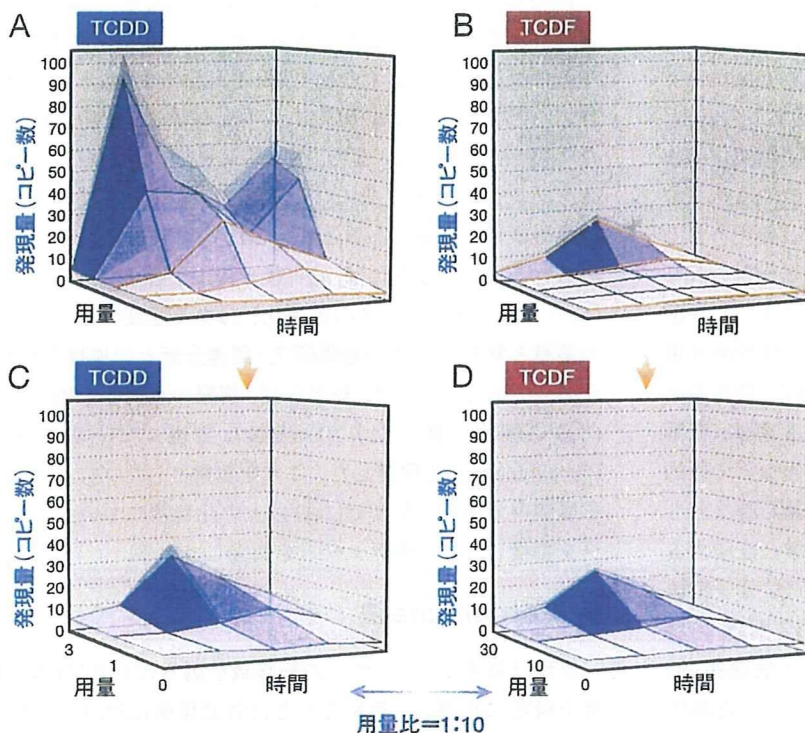


図2. TCDDとTCDFのPerccellomeデータ：
TEF 依存遺伝子の抽出法 (2)

TEFに従うもう1つの例としてTCDD-inducible poly (ADP-ribose) polymerase (Tiparp; 1452160_at) を示す。A, B, C, Dは図1と同様の表示。AとBを比較すると一見違った反応をしているようだが、CとDを比較するとTEF依存性であることがわかる。

度の向上が図られている。例えば、高密度マイクロアレイで問題となるプローブの飽和によるダイナミックレンジの狭小化の検証・回避に役立っている。新世代Affymetrix GeneChipにおいて高発現遺伝子プローブが容易に飽和し高用量域で定量性を失う現象は、一般的なデータ標準化手法

では検出困難であり、Perccellome法を用いて初めて直接的に感知することができる。現在、筆者らはサンプルRNA量をメーカー推奨プロトコルの半量にすることなどにより効率的にこれを回避している。

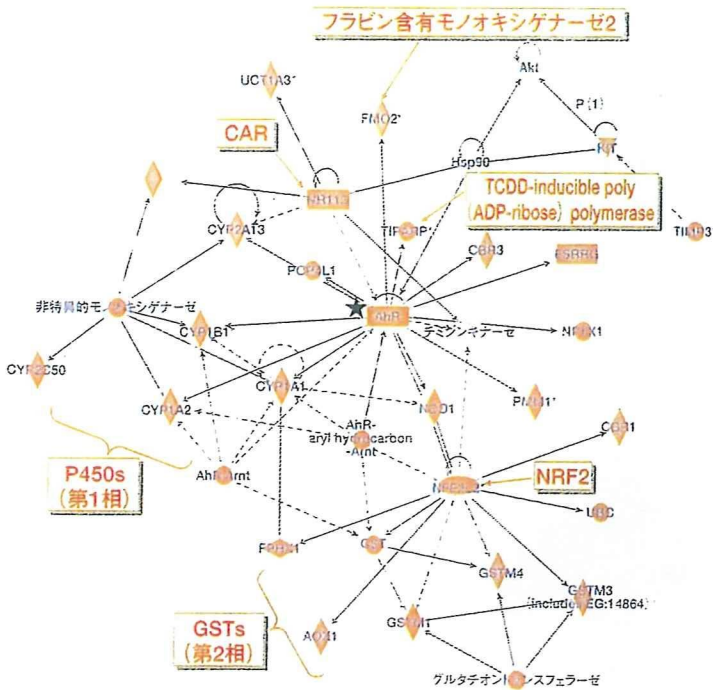


図3. TEF 依存遺伝子の描く Pathway

図1, 2の方法で抽出された TEF 依存遺伝子約140を Ingenuity Pathways Analysis 5.5 (Ingenuity Systems, Inc.)に投入し, 得られる Pathway の代表的なものを示す。AhR (★)を中心に NRF2を含む転写因子群を介して, 第1相および第2相の代謝酵素を含む AhR 依存的な遺伝子を認める。
 赤色; 計算に投入した TEF 依存遺伝子のうち, この Pathway に含まれるもの。
 灰色; Pathway のメンバーとしてソフトウェアが拾ったもの。

III. Percellome Project

マウス肝を中心とした約90化合物(毒性的情報の豊富なもの)の単回暴露による初期応答遺伝子データベースを構築するとともに, シックハウス症候群^{注1}を考慮した低用量域での吸入トキシコゲノミクス, 発生毒性についての胎児トキシコゲノミクス, また *in situ* ハイブリダイゼーションによる局在確認系を立ち上げた。現在, これらに加えて反復暴露による慢性毒性, および多臓器間の関連性を検討する研究を展開中である。データの一部はホームページ (<http://toxicomics.nih.gov/db/>) にて公開中であり, 今後, 内容を拡充する予定である。

ここで, プロジェクトにより明らかとなった一般的な注意点について簡単に触れる。それは, 再現性の高いデータを得るためには実験管理を厳重にする必要があるという点である。マウス肝で有意に発現する12,000(いずれかの時点で3コピー/細胞以上)の遺伝子のうち, 概日変動を示す遺

伝子が3,600以上あり, 最大で数十倍以上の発現差が見られる。この変動が実験の邪魔をしないようにするためには, 動物飼育施設の明暗サイクルを2週間以上一定に保ちマウスの概日リズムを安定化し, そのうえで, マウスに検体を投与する時刻, およびサンプルを採取する時刻を±30分以内に限定する必要がある。概日リズムは肺, 腎, 脳, 心, 胸腺などにも明瞭に存在するので, 同様の注意が必要である。培養細胞実験においても細胞密度, 培地交換, シャーレのインキュベーター内の位置, 倒立顕微鏡での観察の影響(操作による培地攪拌による刺激), 多孔プレートでは辺縁と中央の違いなどが, 遺伝子発現データに大きく影響することを観察している。

IV. Percellome を活かしたデータ解析

Percellome 法の絶対量データの特徴は, 原点 (zero) から表示可能なコピー数という“名数”である点にある。基底発現量がわかる, データの四則演算が可能であり, 例えば処置群から溶媒対照群の値を引くことで概日リズムや溶媒による影響を容易に取り除くことができる, などの利点が多い。これらは発現比を用いた解析では問題となる操作であるが, Percellome 法であれば自然な処理が可能である。さらに, この性質を利用し, 用量と時間が発現変動を規定するとの前提に基づき, 用量・時間・発現値を三次元直行座標に置いた1つの三次元グラフに反応曲面 (Surface と呼称) として可視化して, 直感的なデータの把握を実現している。1つの化合物について GeneChip のプローブセット数に対応する約45,000枚の Surface が描出される。この中から生物学的に有意であると考えられるパターンを含む特徴的な発現パターンを効率的に自動的に抽出する RSort (Surface の凹凸の特徴を解析し, その明瞭さの順にソートする) アルゴリズムを考案, 活用している。また, 別途に独自開発した教師無しクラスタリングアルゴリズム (MADIC⁴⁾などを活用して, 発現パターンが類似しているものを網羅的にクラスタ化している。2枚の Surface の形の類似性を数値化するアルゴリズム (tmf) も開発済みであり, 注目すべき遺伝子の発現パターンを鑄型として同様の発現誘導パターンを呈する遺伝子を自動抽出できるようになっている⁵⁾。

V. TCDD と TCDF の Percellome 比較による TEF 依存遺伝子および非依存遺伝子の解析アプローチ

ここでは解析例として, TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) と TCDF (2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran) の遺伝子発現応答データを比較し TEF (toxicity equivalence

注1 住宅の高気密化や化学物質を放散する建材・内装材の使用などにより, 新築・改築後の住宅やビルにおいて, 化学物質による室内空気汚染などにより, 居住者に生じる様々な健康障害の総称。

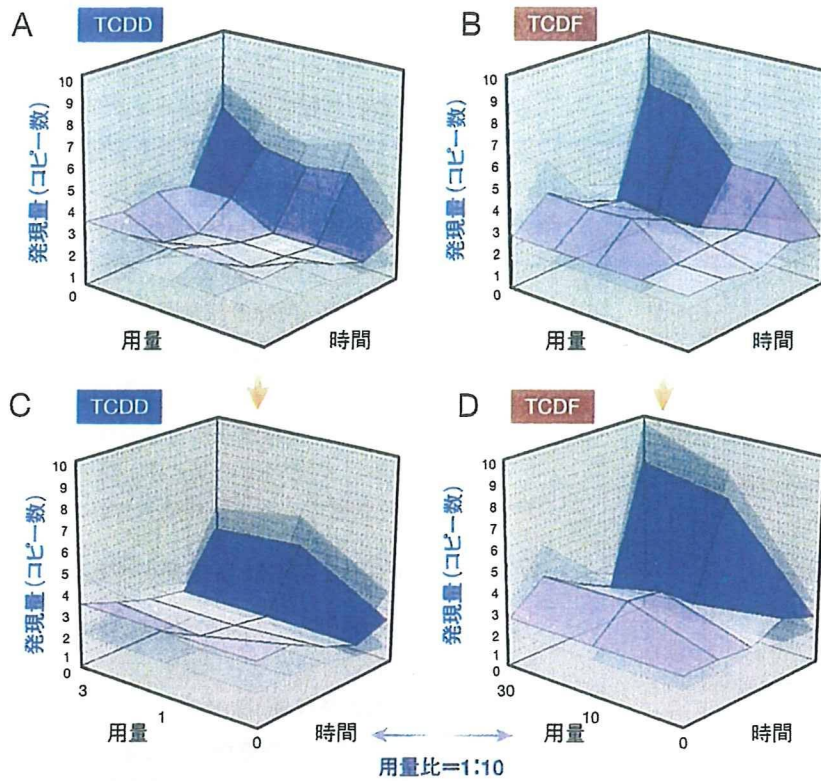


図4. TEF非依存遺伝子

TEFに従わない遺伝子の一例として, Hectd2 (HECT domain containing 2, 1433944_at)のSurfaceを示す. A, B, C, Dは図1と同様の表示. 2時間目の応答の違いのほか, 24時間目の応答がTCDF > TCCDDである.

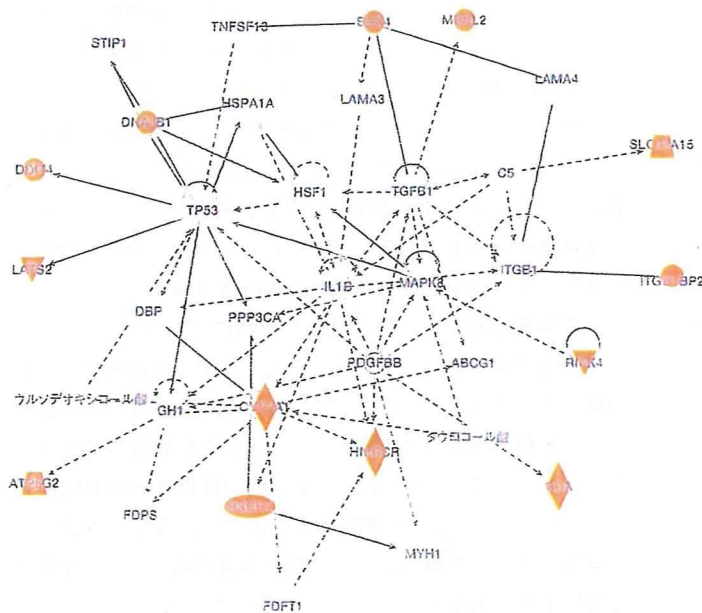


図5: TEF非依存遺伝子の描くPathway

図1の方法を利用し抽出されたTEF非依存遺伝子約20をIngenuity Pathways Analysis 5.5 (Ingenuity Systems, Inc.)に投入し, 得られるPathwayの代表的なものを示す. AhRは含まれず, p53, TGF-β, MAPK8などが見られる. 赤色;計算に投入したTEF非依存遺伝子のうち, このPathwayに含まれるもの. 灰色;Pathwayのメンバーとしてソフトウェアが拾ったもの.

factor)⁶⁾に従う遺伝子と従わない遺伝子を検討した事例を紹介する.

ダイオキシン類, すなわちダイオキシン, ジベンゾフラン, およびコプラナーPCBは, そのいずれにもベンゼン環に結合する塩素の数の違う異性体や同族体が多数あり, 個々はそれぞれダイオキシンとしての生物活性の強さ, 例えば*in vitro*実験系でCyplalの発現を誘導する能力に違いがある. 他方, 環境中では, これらダイオキシン類の同族体などを様々な比率で含む混合物として検出されることから, その生物影響の総体強度を推定するために, 個々の同族体の活性を合計して評価が行われている. その際の強度の単位にTEFが用いられる. TEFは最も活性が強い2,3,7,8-TCDDを1とし, 2,3,7,8-TCDFは0.1, 1,2,3,7,8-pentachlorodibenzofuranは0.05, などとして表す. なお, TEFの値は, ほぼ, AhR結合能に比例していることが経験的に知られている.

ダイオキシン毒性は, 受容体原性毒性の典型であり, その説明には“AhRノックアウトマウスがダイオキシン投与に対し事実上無反応”であることが用いられる. すなわち, このノックアウトマウスでは, 体中に広がったTCDDはそこにある酵素や膜などの生体分子に対して何の影響も与えないということを示している. 野生型のマウスがTCDDで死ぬのはAhRが存在するからであり, 言い換えれば, AhRからの異常なシグナルによるという

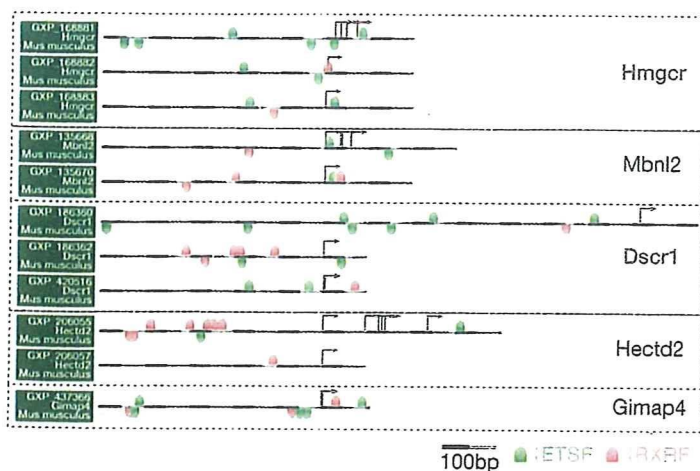


図6: TEF非依存遺伝子の *in silico* プロモーター解析

TEF非依存遺伝子約20のうち、TCDF優位の5遺伝子を絞り込み、Genomatix Software GmbHの提供する *in silico* プロモーター解析の結果を示す。5つの遺伝子に共通して、ETSファミリーとRXRファミリーの転写因子の結合配列を認めた。Hmgcr; 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, Mbnl2; muscleblind-like 2, Dscr1; Down syndrome critical region homolog 1 (human), Hectd2; HECT domain containing 2, Gimap4; GTPase, IMAP family member 4.

ことになる。この際の毒性も概してTEFに従うことが知られており、TCDDの1に対してTCDFの10が同等の影響を及ぼす。しかし、リガンド分子個々の作用には受容体毒性学上、興味があるところであり、培養細胞に対する影響を検討した際にこの値が逆転する場合があることを見いだしたことから、TCDF特有の作用がある可能性をマウス肝において遺伝子発現レベルで検討することとした。

TCDDとTCDFについて、以下のような同一プロトコールを用いての実験を行った。12週齢雄C57BL/6マウスの1群3匹、20群を用意し、0, 1, 3, 10, および30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で単回強制経口投与後、2, 4, 8, および24時間後に肝を採取し、Affymetrix GeneChip, MOE430 2.0によりPercellome遺伝子発現データを得た。2時間目の反応を見やすくするために、仮想0時間に2時間溶媒対照群の値を流用し、用量軸5点、時間軸5点から成る5×5の三次元Surfaceを作製した。さらに、TCDD = 1, TCDF = 0.1というTEF値に従った反応を示す遺伝子を抽出するために、TCDDの0, 1, 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群から成る3×5のSurfaceとTCDFの0, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群から成る3×5のSurfaceを用意した。そして、この3×5のSurface同士について、上述のtmfアルゴリズムにより類似度を計算し、類似性の十分に高い遺伝子のリストを得た。次にコピー数が同等であるか、反応が投与依存的変動として生物学的蓋然性があるかを3×5および5×5のSurfaceにより確認し、TEFに忠実に従うTEF依存遺伝子(図1, 2)を約140、従わないTEF非依存遺伝子を約20得た。TEFに従うと判定

された遺伝子群を、Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, Inc.)により既知情報と照合するとAhRの下流の第1相代謝酵素やNrf2下流の第2相代謝酵素を中心に、AhRを中心としたPathwayの構成要員であることが示され(図3)、上述したTEFについて現在想定されている分子背景に合致するものであった。従わない遺伝子についても、5×5のSurface同士を比較し、TCDDとTCDFで反応のパターンが異なるもの、および類似していてもTEF値の10倍差を説明できないもの、すなわち、TCDFが同等あるいはより強い反応を示すものを抽出した(図4)。TEF非依存遺伝子群は既知情報との照合で予想どおりAhRを含まないPathwayを描き出した(図5)。*In silico*プロモーター解析ソフトウェア(Genomatix Software GmbH)に甘い条件で遺伝子リストを投入した結果、すべてに共通するものとして多数のエレメント、例えば、E2F, EKL, ETS, HES, NR2, RXR, SP1, TBPなどのファミリーが見いだされたが、AhR結合配列は抽出されなかった。さらに、非依存遺伝子のうちTCDF優位の5遺伝子を絞り込みパスウェイ解析を行った結果、TNFを中心とし、ESR1やABCA1を含むネットワークが描かれ、*in silico*プロモーター解析では5遺伝子に共通するものとしてETSファミリーとRXRファミリーの結合部位が選択された(図6)。ETSはERK/MAPKシグナル系の下流に位置し、その1つであるETS2の強制発現系の実験などからp53系を介する胸腺系のアポトーシス、あるいはダウン症候群との関連性などが指摘される。これらの既知情報ベースの解析結果は限られた共通の公開情報源を基にしているため、概して同じリストに収束する。しかし、得られたリストのうち、この検索に投入しなかった遺伝子(図5中の灰色)について、再度Surfaceを吟味すると選定基準ぎりぎりでは排除されていた遺伝子が見つかる。ここでは、図5中のTgfb1 (transforming growth factor beta 1), Hspala (heat shock protein 1A), およびFddt1 (farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1)が該当する。このような既知情報と実際のデータとの往復が、データ解釈の向上と今後の検証実験の計画立案に役立つものと見込まれる。

おわりに

このTCDDとTCDFの実験結果の比較によるダイオキシン類化合物の生体影響に関わる分子メカニズム解析はまだまだ途上にあり、追加としてAhRノックアウトマウスを用いた投与実験やChIP(クロマチン免疫沈降)解析などによる確認作業が考えられる。ここでは、Percellome Projectの投与実験の組み合わせと、それらに対するPercellome法の利点を生かした網羅的な解析が、環境化学物質をはじめとする外来性化学

物質 (Xenobiotics) の生体影響に関する分子生物学的メカニズム解明研究のユニークな糸口を提供する手段としても利用可能であることを示すことができたと考える。誌面の都合上; 他に譲るが, ヒトに対する催奇形性があり使用禁止となっていたが, 癌や難治性炎症性疾患の治療薬として再登場したサリドマイドについて, 成獣雄マウスの肺に及ぼす影響と経胎盤的にマウス胎仔に及ぼす影響とを Percellome 解析により対比すると, 間葉系成分に対する共通の抑制シグナルの存在が示唆される事例を見いだした。異なったプロトコルで異なった組織に対して行われた実験の間でも, このように共通のメカニズムを抽出しうる可能性を見ており, 今後の複合的展開に大きな期待を抱いているところである。今後, 本法の利点を生かした解析をさらに進めるとともに, データ・

解析ツールの公開Webサイトの充実, および, 実験のみならずデータ解析・データマイニングについての共同研究を含めた展開を加速させていきたい。

謝辞 本Percellome Projectの遂行にあたっては, 当毒性部の全メンバー, 特に松田菜恵, 辻 昌貴, 森田紘一, 今井あや子, 安東朋子, 安部麻紀, 森山紀子, 近藤優子, 青柳千百合, 相原妃佐子, 渡辺 忍の各氏の卓越した働きに深謝する。三次元Surface可視化およびそれを用いた解析ツール群のアルゴリズム開発は共筆者の相崎健一主任研究官による。データベース関連, MADIC実装などのIT開発はNTTコムウェア, 日本NCR (日本テラデータ) との共同研究に負うところ大である。本研究は厚生労働科学研究費補助金H13-生活-012, H13-生活-013, H14-トキシコ-001, H15-化学-002, H18-化学-一般-001などによる。

— 文献 —

- 1) Kanno J, et al: BMC Genomics (2006) 7: 64
- 2) 菅野 純ら: 細胞工学 (2004) 23: 685-693
- 3) 菅野 純ら: 細胞工学 (2007) 26: 71-77

- 4) Matsumoto S, et al: Genome Informatics (2005) 16: 183-194
- 5) 相崎健一ら: 細胞 (ニュー・サイエンス社), 印刷中
- 6) Van den Berg M, et al: Toxicol Sci (2006) 93: 223-241

Special Review

Percellome Project による毒性トランスクリプトミクスの新しい試み

Percellome Project as a New Approach to Toxicology Transcriptomics

菅野 純 北嶋 聡 相崎 健一 五十嵐 勝秀 中津 則之 高木 篤也 小川 幸男 児玉 幸夫

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsuya Takagi, Yukio Ogawa, Yukio Kodama

身の回りの物質の毒性(有害性)を予測し、その被害を未然に防ぐのが毒性学の役割である。この精度向上を目指したトキシコゲノミクス研究を実施する際に、マイクロアレイなどから細胞1個当たりのmRNAコピー数を得るPercellome法を開発した。90化合物のマウス肝初期応答データを採取し終え、新たな対象(反復投与、胎児毒性、吸入毒性、多臓器連携)を加えたPercellome Projectを展開している。

key words

トキシコゲノミクス, 分子毒性学, 遺伝子発現カスケード, 標準化, Percellome 法, 3次元多層(Millefeuille) データ

1 菅野 純 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 毒性部 E-mail: kanno@nihs.go.jp

1985年東京医科歯科大学大学院医学研究科博士課程修了。人体病理学、実験病理学専攻。国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長を経て、2002年より同部長。内分泌かく乱関連などの分子毒性学研究、トキシコゲノミクスプロジェクトなどを厚生労働所学業務との有機的連携のもとに推進。

北嶋 聡, 相崎 健一, 五十嵐 勝秀, 中津 則之, 高木 篤也, 小川 幸男, 児玉 幸夫 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 毒性部

はじめに

医薬品、食品、化粧品、生活関連用品など、身の回りの物質が我々の身体に取り込まれた際に生じる可能性のある毒性(有害性)を予測し、それらの使用に際しての被害を未然に防ぐのが毒性学の役割である^{注1}(図1)。具体的には、人々の安全を確保するために使用法(用途)や使用量(残留量)を制限したり、場合によっては禁止したりするための科学的根拠を提供するが、その際、人の身代わりとして実験動物を用いる場合が多い。このような毒性学の精度向上の一環として、従来からの毒性研究(毒性症候学、毒性病理学、など)に加えてのトキシコゲノミクス(Toxicogenomics)研究が進められている。

トキシコゲノミクスでは、物質が生体に及ぼす影響をトランスクリプトームとして観測・解析する。その際、①分子毒性学を構築し種差や個体差の問題、複合暴露の問題などを解決するためには、遺伝子発現カスケードの全容解明を目指す必要がある、②形態学的に変化が現れた段階のトランスクリプトームは、遺伝子発現カスケードの最終段階に過ぎない、③形態変化の現れないごく初期段階を含む遺伝子発現カスケードを描出するためにはまとまった量のデータの蓄積が必須である、との観点から、筆者らは、マイクロアレイや定量PCRから細胞1個当たりのmRNAコピー数を得るPercellome手法と、そのデータ解析のための3次元多

層(Millefeuille)システムを開発・実用化した。遺伝子発現量が共通の尺度、すなわち“コピー数/細胞”で表現されることから、検体間、実験間、マイクロアレイのバージョン間、異なったプラットフォーム間、などのデータ比較が直接的に行えるようになり、数年かけて蓄積したデータの有機的活用が可能となった。現在、90種類の化学物質によるマウス肝の初期応答データを採取し終えたところである。新たな対象(反復投与、胎児毒性、吸入毒性、多臓器連携)を加えたPercellome Projectの概要を紹介する。

I. Percellome法:細胞1個当たりのmRNA絶対量を得る方法

原理は単純である。サンプルの細胞数を計測し、外部標準mRNA(スパイクRNA)を細胞1個当たり決まった分子数だけそのサンプルに添加し、そしてRNA抽出、測定に移る。サンプルのRNAの測定値を、スパイクRNAの値を基準に、細胞1個当たりのコピー数に換算する。実際には細胞数を直接計測するのが困難なことが多いため、その代替指標として細胞核内のゲノムDNA量を用いる^{1), 2)}。定量性・直線性の検証にはLBM標準サンプル(肝[L]と脳[B])を100:0, 75:25, 50:50, 25:75および0:100に混合した5サンプルから成るセット)を用いる。なお、スパイクRNAは、5種類の枯草菌遺伝子のmRNAを濃度公比3で混合したカクテル(dose-graded spike cocktail; GSC)として用意した。高精度を要求されるDNA定量法は手作業プロトコルおよび自動ロボット(PerkinElmer JANUS)のプロトコルを準備

注1 環境への配慮も含まれる。



図1. 毒性学の対象

毒性学は、身の回りの物質が引き起こす障害を予測し、その発生を未然に防ぐことを目的としている。トキシコゲノミクス (毒性ゲノミクス) は、最先端の網羅的遺伝子発現解析技術を用いて、従来の毒性学の予測の精度を著しく向上、迅速化させることで、国民の健康安全の確保にさらに貢献することを目指している。

中である。カクテルとも共同研究ベースで供給可能である (連絡先: kanno@nihs.go.jp)。また、ERCC (The External RNA Control Consortium) と連絡をとるとともに、国際的標準化への関与を深めるため平成18年度厚労科研費「医薬品などの有効性・安全性評価に資する遺伝子発現解析の国際的標準化に関わる研究 (H18-特別-指定-023)」を立ち上げた。現在、この他にシックハウス症候群を考慮した低用量域での吸入毒性トキシコゲノミクス、1匹のマウスから多臓器を採取しそれらの連携状況をトランスクリプトームから解析する多臓器トキシコゲノミクスを開始し、特徴的な遺伝子について組織内の発現分布を *in situ* ハイブリダイゼーションで確認する作業を並行している。また、下記の3次元データをweb公開するサーバを整備し、一部の化合物から3次元多層 (Millefeuille) データを順次閲覧可能とした (<http://toxicomics.nihs.go.jp/db/>)。

II. 3次元多層 (Millefeuille) データシステム: 生物系研究者に優しいデータ可視化と解析

医薬品を含む毒性既知の90化合物について単回経口投与後のトランスクリプトームデータを取得して、初期応答遺伝子カスケードを解析するための基盤データベースを構築した。現在、第二段階として反復暴露データ集積を開始し

た。データは、用量軸、時間軸、および遺伝子発現軸から成る3次元表示により、遺伝子発現の用量および時間に依存した変化を1枚の曲面として表すことで可視的に変化を判別しやすいように配慮した (図2)。これにより、コンピュータが選び出した遺伝子クラスターの中身を確認する際、特に、mRNAの合成分解のスピードなどの知見から生物学的にありえないパターン (用量軸の方向にも時間軸の方向にもジグザグな変化など) を排除する際に威力を発揮している。

1つの実験から排出されるGeneChip約50枚のデータを一括処理する能力を持ったPercellome自動換算・データ品質管理 (QC) に関わるソフトウェアに加えて、3次元多層 (Millefeuille) データに最適化した、発現パターン類似性による候補遺伝子検索、およびそれを発展させた教師無しクラスタリング³⁾を中心とした解析システム (MF System, MFシリーズ, 開発: 相崎 健一) を独自に実用化し、開発継続中である (図3)。これらにより、データQCはその日のうちに、基本的な発現情報検索から全遺伝子の教師無しクラスタリングまでを3日間で完遂できるものとなっている。

この基本解析を用いて、発現パターンによって分類された候補遺伝子リストが多数生成される。一部の幸運な例ではただちに新規と思われる毒性関連反応を見いだすことができた。またそうでない場合のための1つの補強手段とし

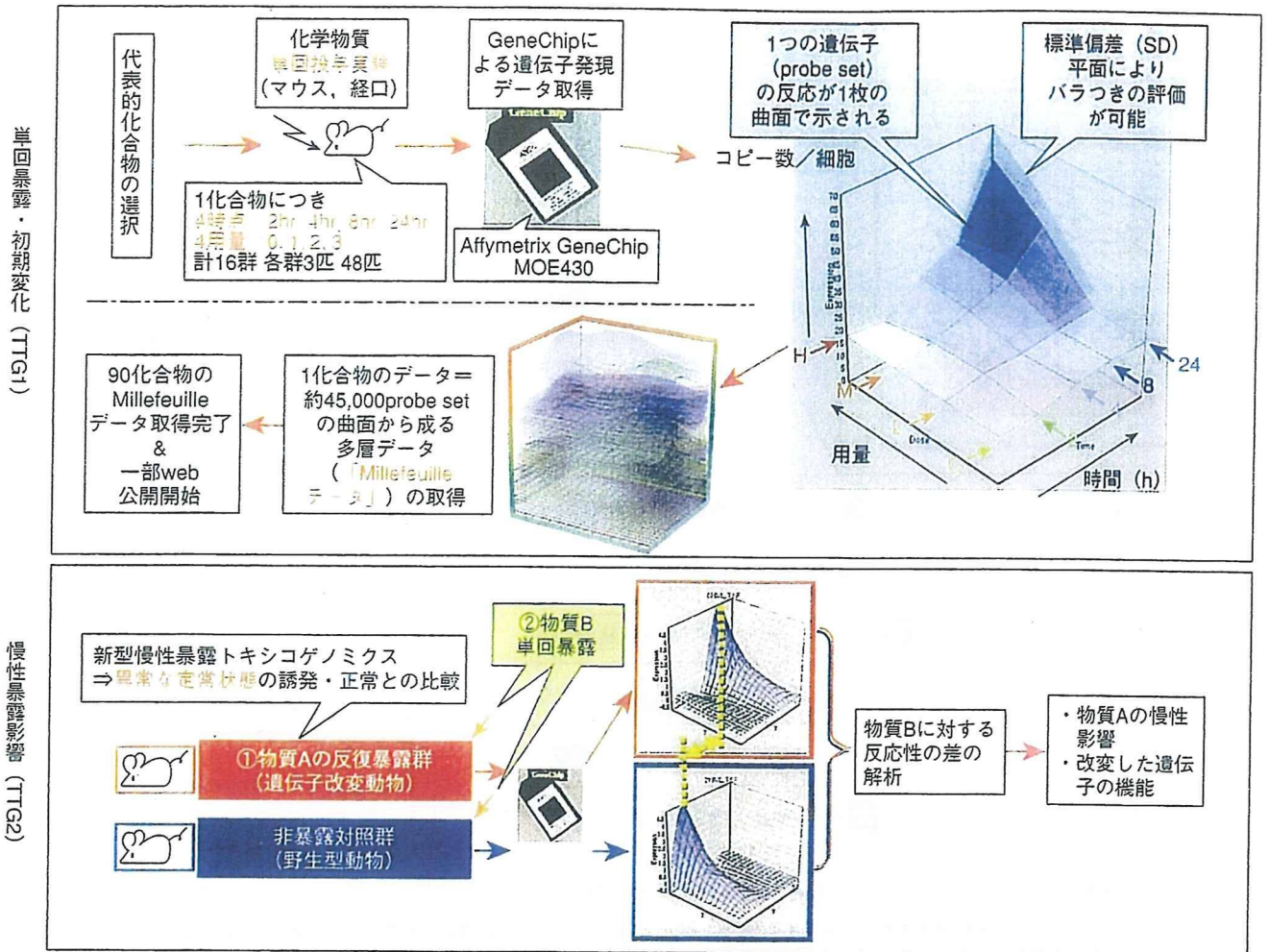


図2. Percellome 法と3次元表示による多層 (Millefeuille) データシステムを用いたプロジェクトの根幹部分の概要
 単回投与による遺伝子発現初期変化データを90化合物について取得 (上段)。現在、反復投与の影響を検討中 (下段)。H; 高用量 (high)、M; 中用量 (medium)、L; 低用量 (low)、C; コントロール (control)。

て、Gene Ontology などの既存知識を利用して候補遺伝子リストの理解を支援するソフトウェア (MF GoPlot) を用意した。このツールは一種の化合物クラスタリングとしても利用することができる。

さらに候補遺伝子リストを基に複数化合物間比較を行い、複数条件下においても同期して発現する遺伝子群を自動抽出するシステムも開発済みである。本システムで得られた同期遺伝子群はシグナルカスケードの構成単位である可能性があり、データベース化しつつ、その解析を進めている (5TB規模のデータベース部分および、大量計算アルゴリズム実装は (株) NTT コムウェアおよび (株) 日本NCR/Teradata との共同開発による)。

Ⅲ. Percellome 手法のリアルタイム PCR を含む他のプラットフォームへの適用

Percellome 手法は、GSC の受け入れ条件を整えることに

より、様々なプラットフォームに適用可能である。その1つとして最も定量性が高いとされるリアルタイム PCR (ABI PRISM 7900 HT・96 ウェルプレート) への適用例を示す。現行の RT-PCR 絶対定量法では、遺伝子ごとに検量線が必要であり、多数のサンプルについて多数の遺伝子を検討するには不向きである。Percellome RT-PCR では、マイクロアレイと同様の原理を用いる。すなわち、サンプル破碎液に、その細胞数に比例する量のスパイクカクテル (GSC) を添加し、それらの Ct 値を PCR プレートごとの検量線とすることにより、測定したい遺伝子の Ct 値を細胞 1 個当たりの mRNA コピー数に換算する。これにより、GAPDH や Actin などのハウスキーピング遺伝子が変動してしまう際の問題、例えば、少数の遺伝子を検討する際に Global normalization 法を適用し難い問題などが解決される。共通サンプルを測定しデータを比較することにより、Affymetrix GeneChip の Percellome 結果と 9 割程度の整合性が確認され、

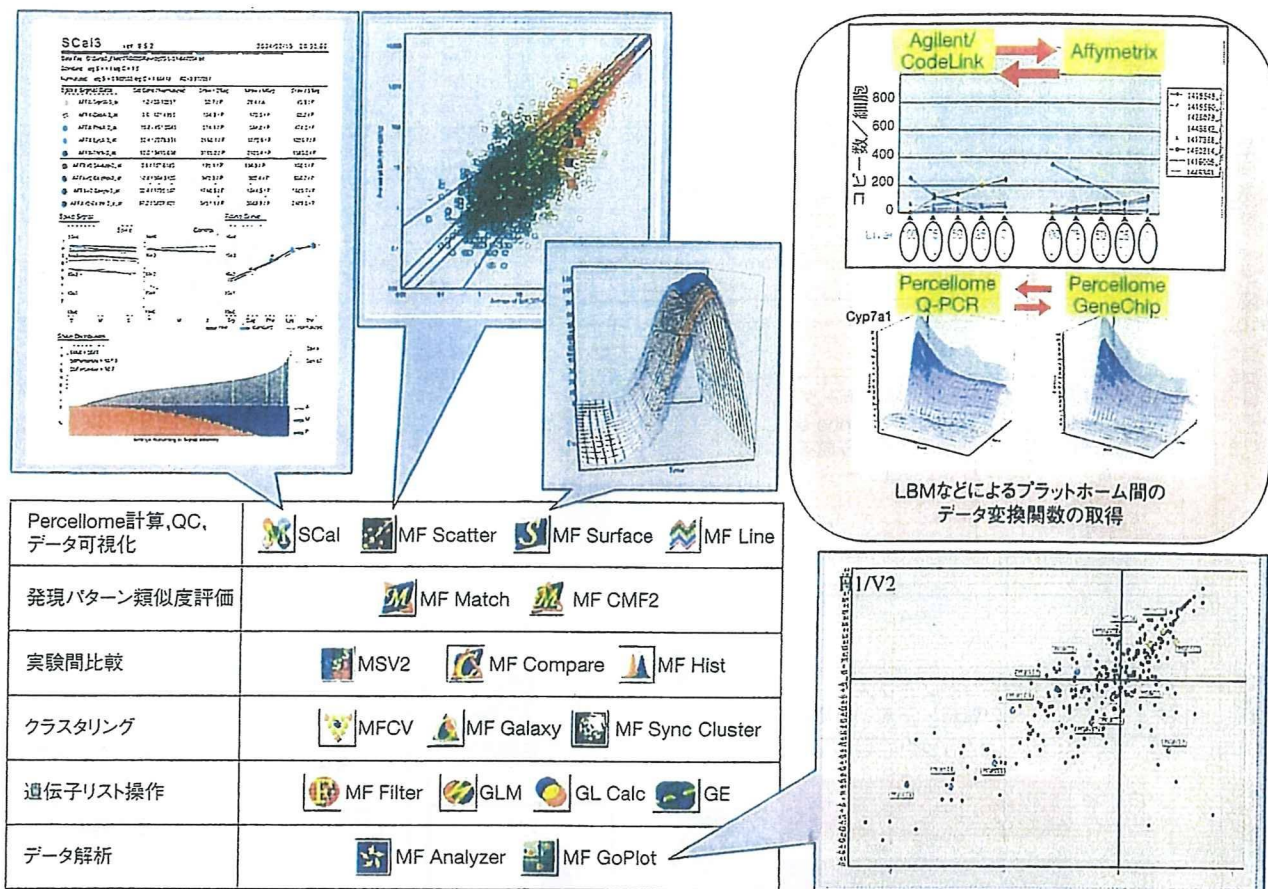


図3. 3次元多層 (Millefeuille) データの解析などに用いる独自開発プログラム群

品質管理とともにPercellome計算を自動的に実施するSCal, Plotソフトウェア, 3次元曲面の描画ソフト (MF Surface), など. 右上はプラットフォーム間のデータ変換情報の得方を示す. LBMを用いる方法 (上段) と, 実際の実験サンプルを用いる方法 (下段) がある. いずれも, 一度, 両方のプラットフォームでそれらのサンプルを測定する必要がある.

GeneChipとPercellome RT-PCRとの間でのコピー数の換算式がいくつかの遺伝子について得られている. この他に, Agilent社製の単色マイクロアレイとCodeLinkアレイにGSCを測定可能なカスタムアレイを用意し終え, LBMサンプルのデータなどをもとに, これらとの間の換算式も得つつある (図3右上).

Percellome法は, Affymetrixの新しいエクソンアレイの定量性・直線性の検討にも適応可能である. Affymetrix社のHuman Exon 1.0 ST Arrayと従来型の発現アレイHuman Genome U133 plus 2について, 性質の異なるヒト癌細胞株2株から調製したLBM様標準サンプル (100:0, 75:25, 50:50, 25:75および0:100混合5サンプル) による比較を行い, 両アレイ間の相関性の高いprobe setを多数検出することができた. また, 既知のエクソンに対して設計されたprobe setでは発現が見られ, イントロンに対して設計されたprobe setでは発現が見られない, あるいは, 既知のsplicing variantに対応したprobe setの発現が検出された,

などの基本性能が確認された. しかし, Percellome法を適用して未知のsplicing variantの検出力を向上させるためには, 現状では各エクソン間の定量性に問題があることが示唆された. 定量値を算出する補正アルゴリズムの開発など, 何らかの対策が必要であることが考えられ, 現在, Affymetrix社に確認を行っている.

IV. 核内受容体原性毒性のPercellomeトキシコゲノミクス解析

受容体原性毒性とは, 化学物質が受容体 (リガンド依存的転写因子を含む) に選択的に結合してシグナルをかく乱し, その結果生じる有害性を指す. 代表例としてはダイオキシンが挙げられる. AhR (Arylhydrocarbon receptor) ノックアウトマウスでは, ダイオキシンを大量に投与しても毒性がほとんど観察されない. すなわち, 野生型マウスがダイオキシンで死ぬメカニズムには, AhRが必須であり, AhRからの異常なシグナルがマウスを死に至らせていることに

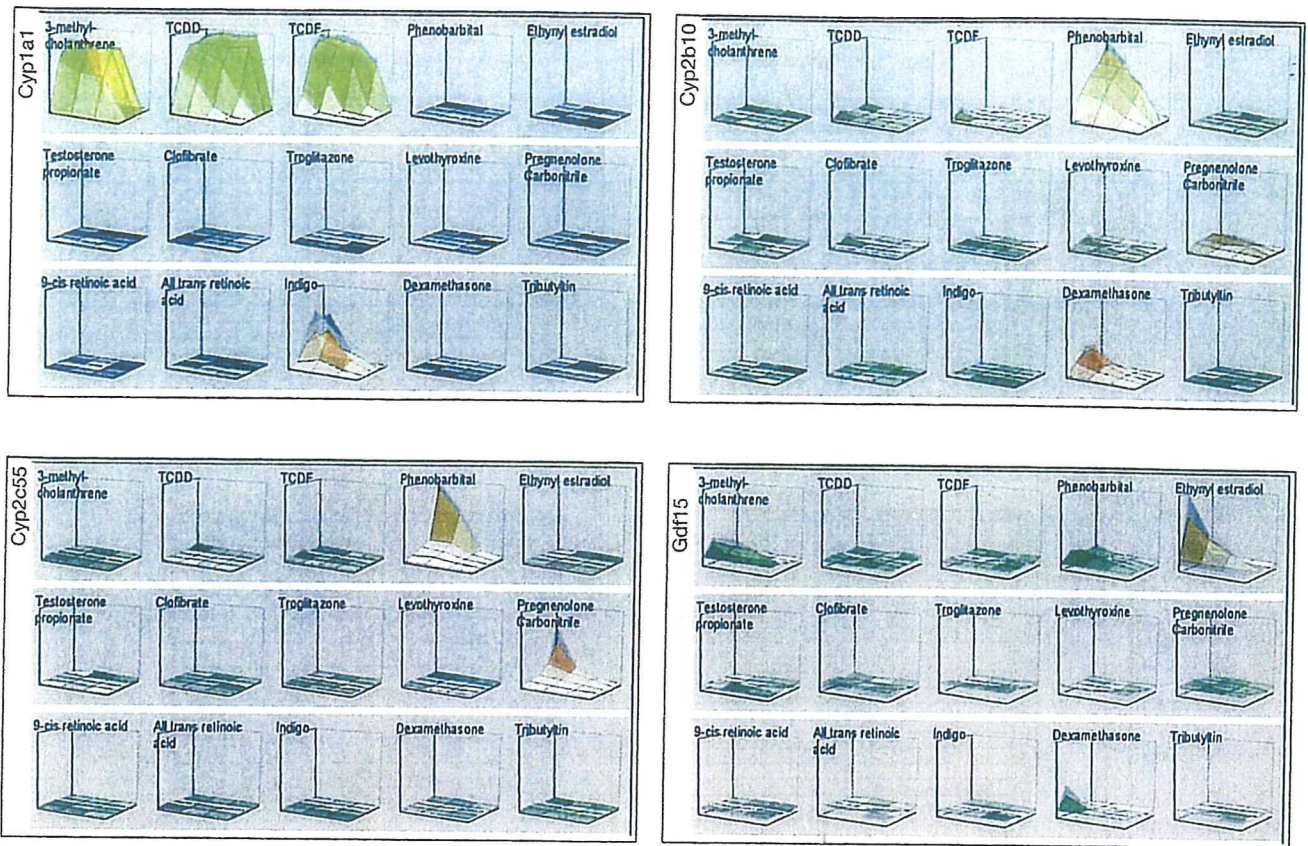


図4. 化合物間の発現比較

15種類の核内受容体リガンド化合物 (各3次元グラフ内に表示) によるCyp1a1 (左上), Cyp2c55 (左下), Cyp2b10 (右上) および, Gdf15 (右下) の遺伝子発現を3次元表示したもの. 各軸は, 図2のとおり. 縦軸のスケールは遺伝子ごとに共通. リガンドに選択的な遺伝子の発現が確認される.

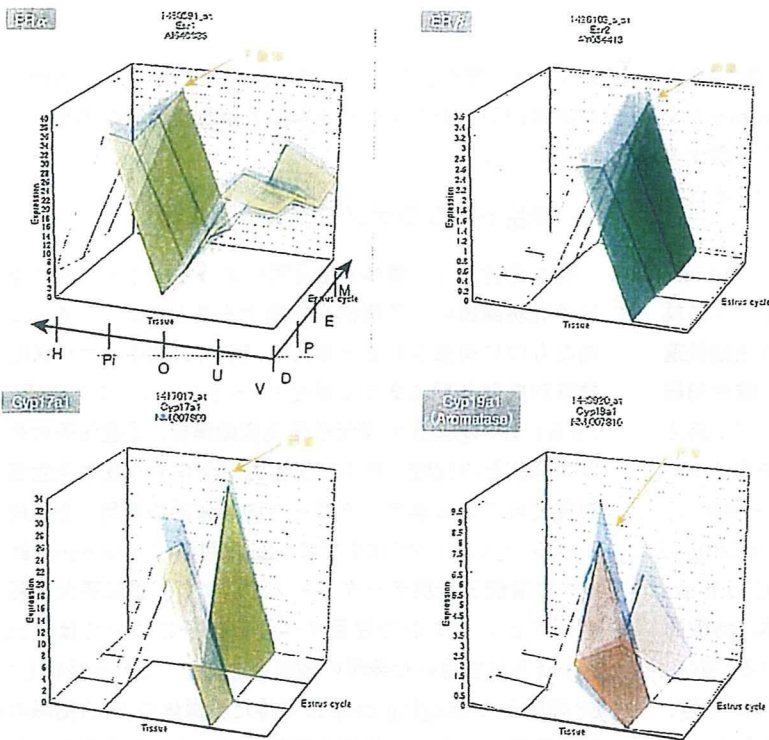


図5. 臓器間の発現比較

マウスの性周期 (Diestrus, Proestrus, Estrus, Metestrus の4日間で1周期) ごとの視床下部 (H), 下垂体 (Pi), 卵巢 (O), 子宮 (U) および膣 (V) における, ER α , ER β , Cyp17a1 (steroid-17 α -hydroxylase), およびCyp19a1 (Aromatase) の遺伝子発現変動を3次元表示したもの. 後二者の酵素は卵巢において周期性を持って発現している.

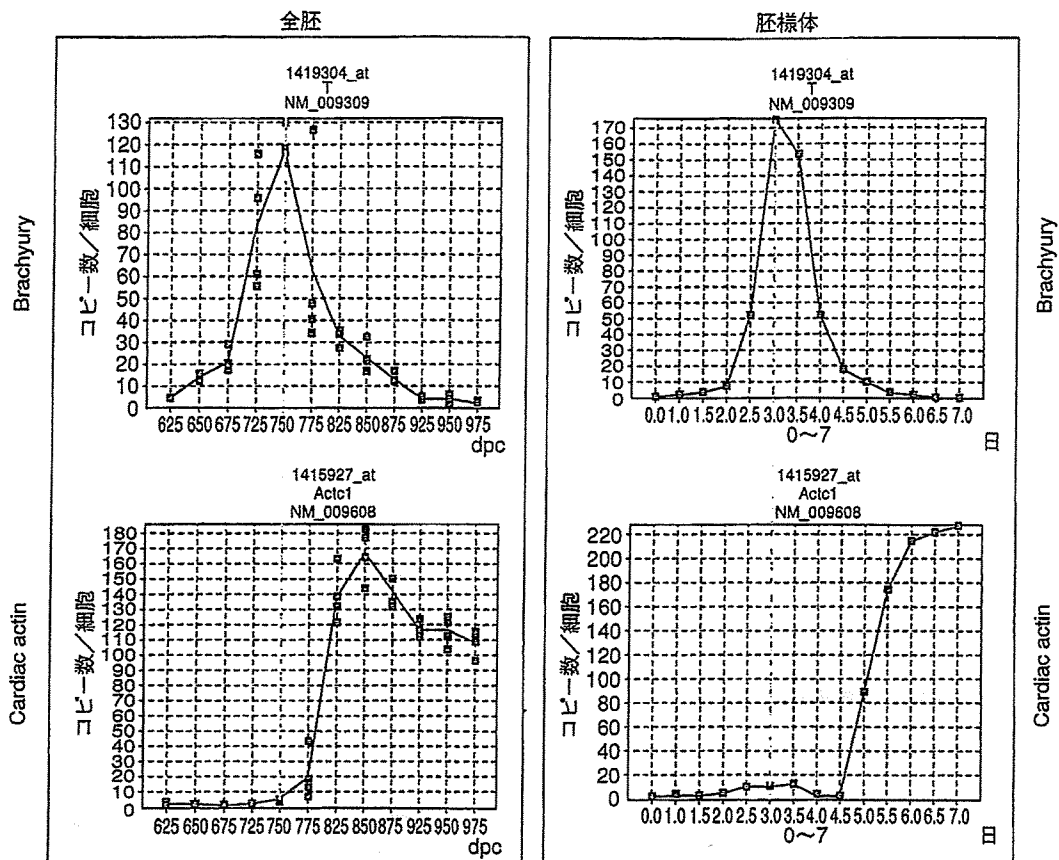


図6. マウス胎児（全胚）と胚様体の発現比較

マウス全胚の胎生6.25日～9.75日までの遺伝子発現と、胚様体の1日～7日目までの遺伝子変動の網羅的データベースから、初期中胚葉分化マーカーであるBrachyury遺伝子と、Cardiac actin遺伝子の経時変化を示す。

なる。エストロゲン活性化学物質による有害影響（内分泌かく乱化学物質問題）も同様にER (estrogen receptor) を介する受容体原性毒性と考えられ、胎生期にERを発現する組織が、低用量シグナルかく乱影響の重要標的であると考えられている。

ここでは、受容体原性毒性研究の基盤として、Perclonome手法を適用して、①核内受容体作動性物質によるマウス雄肝臓の遺伝子発現変動、②性周期に伴うマウス雌生殖器遺伝子発現変動、③生後の発達過程におけるマウス雌生殖器遺伝子発現変動、の3種類のデータベースを構築した。例えば、①では10種類の核内受容体に作用する典型物質について、単回経口投与後、2, 4, 8, 24時間目の変動を解析し、Ethinyl-estradiolがCyp15, TCDDがCyp1a1, 9-cis Retinoic AcidがCyp26a1, DexamethasoneがCyp2b10, ClofibrateがCyp4a14, PCNがCyp2c55など、各々の受容体に特徴的な遺伝子発現を誘導するところがとらえられている(図4)。②の性周期データベースは視床下部、下垂体、卵巣、子宮、膣を対象としており、性周期との関連が網羅的にとらえら

れている(図5)。これらのデータベースは、今後、各種の候補物質が引き起こす変化を詳細に解析する際の基準として利用される。

V. 発生トキシコゲノミクスへの応用

発生毒性学は、個体発生過程におけるダイナミックな遺伝子発現調節の分子機構を把握することにより、さらに正確なものに補強されると考える。現在、C57BL/6マウス胚の器官形成初期にあたる胎生6.5～9.5日（プラグ確認日：0.5日）の、①全胚の遺伝子発現変動解析、②遺伝子欠失マウス全胚との比較、および③標的が明らかな既知発生毒性物質投与による本データベースの具体的な適用、を実施している。①についてはすでに0.25日間隔（Time point 計12点）の遺伝子発現データベースを得て、②遺伝子欠失胚のデータといくつかの注目すべき遺伝子についてはwhole mount ISHを用いた発現の検証を加えた。これと並行して、ES細胞からhanging drop法で得た胚様体の0.5日間隔の遺伝子発現データとの比較を実施している。個体発生に関与

する遺伝子群の多くは経時的に激しく変化しており、既知発現毒性物質投与実験については標的遺伝子シグナルカスケードを解析中である (図6)。

おわりに

ノーザンブロットでは実験サンプルにだけバンドが見られ、対照サンプルには遺伝子発現がないという結果を得ても、細胞1個当たりで定量してみると、対照が10コピーに対して実験サンプルが20コピーである場合がある。“無”が“有”になったのではなく、“10”が“20”になったのである。

さて、筆者らの属する毒性学でも、医学の分野でも、疾患概念や毒性概念が整理され、患者や実験動物を診断する際には、まず、そのどれに当てはまるかを検討する。すなわち、どの“典型”に近い症例であるかを検討することから始まることが多い。

しかし、最近の医学・生物学には多因子疾患・多因子形質発現制御の概念が導入され、今から何年かの後には、“21世紀初頭までは、患者の遺伝子多型を調べずして治療を行っていた時代”として、“血液型を調べずに輸血していた時代”と並び称されるようになる可能性がある。このような多因子概念が定着すると、その多くは、“有(100%)”“無(0%)”の組み合わせではなく、“70%”“50%”“90%”といった半端な数の組み合わせであることが考えられる。すなわち、今までの離散値的な“典型”例を基準とするアプローチから、

連続値的な病態“スペクトラム”を直接扱うアプローチに変革していく可能性が考えられる。その際の網羅的データの解析とその蓄積の必要性を考えると、遺伝子発現データの定量化・標準化という問題は、今まで以上に重みを増すと考えられる。生命現象の網羅的解析にはトランスクリプトームだけでは不十分であることは自明であるが、この定量性を確保することは、これから実現されるであろう網羅的プロテオミクスなどの基盤としても重要ではないかと考える。

マイクロアレイなどから得られるトランスクリプトーム情報が、今後の医薬品審査や化学物質の安全性評価の際に必須なものとなる時代がすぐそこまで来ていることを念頭に、筆者らはPercellome法をさらに展開し、Percellome Projectデータベースを可能な限り高精度に保ちつつ毒性学的内容を充実させるべく最大限の活動を継続して行く所存であるが、この技術、あるいは研究内容が毒性学以外の研究分野にもお役に立つことができれば幸甚である。

謝辞 本システムの開発とプロジェクトの遂行に当たっては、当毒性部の全メンバー、特に松田菜恵、辻昌貴、森田敏一、今井あや子、安東朋子、安部麻紀、森山紀子、近藤優子、青柳千百合、相原妃佐子、渡辺忍の各氏の卓越した働きに深謝する。本研究は厚生労働科学研究費補助金H13-生活-012, H13-生活-013, H14-トキシコ-001, H15-化学-002, H18-化学-一般-001などによる。

文献

- 1) Kanno J, et al: BMC Genomics (2006) 7: 64
- 2) 菅野 純ら: 細胞工学 (2004) 23: 685-693
- 3) Matsumoto S, et al: Genome Informatics (2005) 16: 183-194

Identification of Rat Prostatic Secreted Proteins Using Mass Spectrometric Analysis and Androgen-Dependent mRNA Expression

NARIAKI FUJIMOTO,* TOMOHARU SUZUKI,† SHIGERU OHTA,† AND SHIGEYUKI KITAMURA‡

*From the *Department of Developmental Biology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine (RIRBM), Hiroshima University, Hiroshima, Japan; the †Department of Xenobiotic Metabolism and Molecular Toxicology, Institute of Pharmaceutical Sciences, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima, Japan; and the ‡Department of Health Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, Nihon Pharmaceutical University, Saitama, Japan.*

ABSTRACT: Rats have been used to study the function and development of the mammalian prostate. Identification of prostatic secreted proteins is important in order to better understand their physiological function. Previous investigations have showed that prostatein, cysteine-related protein 1, and kallikrein S3 are in the ventral prostate (VP), whereas the proteins probasin, prostate secretory peptide 94, transglutaminase 4, and carbonic anhydrase II are produced in the lateral prostate, dorsal prostate (DP), and anterior prostate. They are also useful markers when looking at androgen dependency as well as prostate-specific expression. Although some of the rat prostatic proteins have been investigated well, the overall protein expression profile of the prostate has not been examined. In the present study, the secretions from the rat prostate were subjected to 2-dimensional gel electrophoresis followed by mass spectrometric analysis. In addition to the previously

known proteins, proteome analysis revealed several new secreted proteins, including spermine-binding protein and a protein similar to immunoglobulin-binding protein. In addition, epididymal secreted protein 1 and peroxiredoxin 6 were found in the DP, while glucose-regulated protein 78 was identified in all lobes of the prostate. Castration of the animals led to a decrease in the mRNAs of all of these secreted proteins. While the mRNAs of prostatic proteins became almost completely absent in the VP, the reductions in the other lobes were limited. A novel view of rat prostate secretion from our results should contribute to an understanding of the biological functions of the prostate gland.

Key words: Rat prostate, secretion, proteome analysis, lobe-specific, androgen regulation.

J Androl 2009;30:669–678

In order to study prostate morphology, development, and pathology, as well as androgen-regulated gene expression, rat models have been widely used (Cunha et al, 1987). The rodent prostate consists of the ventral prostate (VP), lateral prostate (LP), dorsal prostate (DP), and anterior prostate (AP, or coagulating gland). The main physiological function of the prostate gland is to produce and secrete prostatic proteins. These proteins have been studied in rats as well as humans, especially to understand the androgen-dependent regulation of expression and to identify possible markers of prostate

cancer (Spence et al, 1989; Donjacour et al, 1990; Heyns, 1990; MacDonald et al, 1996; Vercaeren et al, 1996; Imasato et al, 2001). The major human prostatic secreted proteins are prostate-specific antigen (PSA), prostate secretory peptide 94 (PSP94), and prostatic acid phosphatase (PAP) (Lee et al, 1986). In rats, the composition of prostatic proteins has been shown to be very different, because it is believed that only PSP94 is in common with humans, and the production of each protein varies among the lobes (Fernelund et al, 1996; Xuan et al, 1999). Recently we identified major prostatic secretory proteins in mice (Fujimoto et al, 2006) and found that they were not similar to previously known rat prostatic secretions. Considering the morphological and functional similarities of the prostate gland in 2 species, these discrepancies were puzzling. In the present study, then, the secretions from rat prostatic lobes were subjected to 2-dimensional gel electrophoresis, followed by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometric analysis, to determine the major prostatic secretory proteins in rats with a view to comparing their profiles with those in mice and humans. Additionally, a

Supported in part by a Grant-in-Aid (H19-kagaku-Ippan-003) from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan and a Grant-in-Aid (17510046) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

Correspondence to: Dr Nariaki Fujimoto, Department of Developmental Biology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan (e-mail: nfjm@hiroshima-u.ac.jp).

Received for publication March 27, 2008; accepted for publication June 1, 2009.

DOI: 10.2164/jandrol.108.005553

quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) method was employed to examine the androgen dependence of the transcriptional regulation of the secretory proteins.

Materials and Methods

Animals

Animal experiments were approved by the Animal Experiment Committee of Hiroshima University (document B05-4) and conducted in accordance with "A Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of Hiroshima University." Male F344 rats were purchased from Charles River Japan Co (Kanagawa, Japan) and maintained with free access to a basal diet and tap water. For proteome analysis, three 11-week-old rats were killed under ether anesthesia and their prostates were carefully resected. Each of the prostate lobes was dissected under a microscope. For RNA isolation, the lobes were immediately fixed in RNA Later solution (Ambion Inc, Austin, Texas). For the castration and hormone replacement study, the animals were divided into 5 groups: castrated, castrated and testosterone-injected (1, 4, and 24 hours), and intact, with 5 animals per group. Surgical castration was performed when the animals reached 11 weeks of age, and the animals were then allowed to recover for 1 week. Testosterone propionate (Wako Junyaku KK, Osaka, Japan) was dissolved in vehicle oil, Panacet 810 (Nippon Oils and Fats Co, Ltd, Tokyo, Japan), and the solution was administered IP at 5 mg/kg body weight. The animals were sacrificed under ether anesthesia 1, 4, and 24 hours after testosterone injection, and the prostate lobes were collected for RNA extraction.

Preparation of Secretion Samples

The preparation of secretion samples was performed based on a previously reported method (Donjacour et al, 1990). Each dissected prostate lobe from a 12-week-old rat was rinsed well in saline and placed on a 35-mm culture dish with 100 μ L of saline containing a 1% protease inhibitor mixture (P8340; Sigma, St Louis, Missouri). Each lobe was cut into 4 or 5 pieces, left to stand for 5 minutes, and transferred to a 1.5-mL microcentrifuge tube. After centrifugation at 10 000 \times g for 5 minutes at room temperature, the supernatant was collected as the secretion sample. The incubation time of 5 minutes was chosen because inner cellular contamination (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was confirmed to be low by 5 minutes (Fujimoto et al, 2006). The protein concentration of each sample solution was determined with a Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, California). Because prostatic proteins are known to be glycosylated, the samples were digested with Peptide N-Glycosidase (PNGase) F, which removes all types of N-linked glycosylation, to improve the mass spectrometric identification of proteins. Prior to electrophoresis, each of the samples was incubated with PNGase F (50 U/ μ g protein; New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) at 37°C for 1.5 hours for deglycosidation.

Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis

First-dimensional isoelectric focusing with immobilized pH gradients was performed using Immobiline DryStrip (GE Healthcare Life Sciences Co, Piscataway, New Jersey) and the Ettan IPGphor system (GE Healthcare) according to the manufacturer's protocol. For analytical 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE), 10 μ g of deglycosylated protein was applied to a 7-cm Immobiline DryStrip (pI = 3–11, nonlinear gradient). After rehydration, the strip was isoelectrofocussed (15 kVh). The Immobiline gel was then treated with a sodium dodecyl sulfate (SDS) equilibration buffer (50 mM Tris HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, and 2% SDS) containing 10 mg/mL dithiothreitol for 15 minutes, followed by the same buffer containing 25 mg/mL iodoacetamide. The Immobiline gel was then placed on the second SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) slab gel with 5%–20% gradient (SuperSep precast gel, Wako Jyunyaku) and overlaid with hot agarose solution to connect the 2 gels. The second electrophoresis was run at a constant current of 20 mA. The gel was fixed with 50% methanol and 7% acetic acid, stained overnight in Sypro Ruby (Invitrogen Corp, Carlsbad, California), and destained with 10% methanol and 7% acetic acid. The stained gels were scanned with a Molecular Imager FX Pro (Bio-Rad), with excitation at 532 nm. In the case of preparative 2D-PAGE for mass spectrometric analysis, 60 μ g of total protein was subjected to electrophoresis as described above and then stained with silver nitrate by incubation with 0.2 g/L Na₂S₂O₃ for 1 minute followed by 1 g/L AgNO₃ for 20 minutes on ice, and washed with 20 g/L Na₂CO₃ containing 0.1% HCHO.

Mass Spectrometry

Protein spots were excised from the polyacrylamide gel and the silver nitrate was removed with 15 mM K₃[Fe(CN)₆] and 50 mM Na₂S₂O₃. The gel pieces were incubated in distilled water several times for 1-hour periods, then incubated with CH₃CN for 10 minutes, and dried in a centrifuge-vacuum concentration system. Each gel piece was incubated with a 20- μ L aliquot of 10 μ g/mL trypsin solution (sequence grade, Sigma) for 30 minutes on ice. Excess trypsin solution was removed, and the gel piece was incubated overnight at 35°C. To extract the digested peptides, 10 μ L of a 70% CH₃CN solution containing 0.1% trifluoroacetic acid was added to each gel piece. A 0.5- μ L aliquot of the extract solution was spotted onto a target plate for an UltraFlex mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) along with 0.5 μ L of 10 mg/mL α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (mass spectrometry [MS] grade; Nacalai Tesque Co, Kyoto, Japan). MS was performed using an accelerating voltage of 20 kV, with data acquisition between 1000 and 4000 daltons. Some of the fragment peaks were further analyzed by MS/MS. The MS and MS/MS data were evaluated with Biotoools software (Bruker Daltonics) in combination with a peptide mass fingerprinting analysis system, MASCOT Ver. 2.1 (Matrix Science, London, United Kingdom). The peptide mass fingerprinting was performed with reference to the MSDB and NCBInr databases, with the terminal modifications of the peptides set as fixed carbamidomethyl and flexible oxidation ends. The peptide mass tolerance was set to 0.3%.

Table 1. Quantitative PCR primers for rat genes

Gene	GenBank Accession No.	5' Primer (5'→3')	3' Primer (5'→3')
Prostatein C3	M71245	5'-CAGTGGTTCTGGCTGCAGTATT	5'-CTAGAAAACACTGCTTGAATTGCTTC
Cysteine-rich protein 1	S57980	5'-TGCTCCTACTGGCCATCTTTG	5'-TGTCAGCACTGTGCGTGTTG
Kallikrein S3	M11566	5'-AATCCCAACCCTGGCAAGT	5'-CGCTGAGCAAAGGGTTCATC
Spermine-binding protein	NM_013024	5'-TACGGATCCCGGTCACTAAAA	5'-AACACCAAAGGTGACCACTCG
Transglutaminase 4	RATTRNGLT	5'-GGCAAGAACATCAGCACCAA	5'-TGTCCGAGAGTTGAGCTTGCA
IgG-binding protein-like protein	BC099756	5'-CAGAGGAGTCAGTTCTATTGAAAAC	5'-TTGCATGGGTCTTTGTTGATG
Carbonic anhydrase II	NM_019291	5'-GCTCAAGGAACCCATTACTGTCA	5'-TTTAAAGGACGCCTTGATCTTTCT
Epididymal secretory protein 1	NM_173118	5'-TACTAGCGGCACTCAGTCCCA	5'-CCGGCAGCTTATTCAGGTAGC
78-kDa glucose-regulated protein	NM_013083	5'-ACTGGAATCCCTCCTGCTCC	5'-GTTTTGGTCATTGGTGATGGTG
Peroxiredoxin 6	NM_053576	5'-AGCCTTAAGTCTGCGGGAAC	5'-GCCATTTCCATTTAATGAGCCA
Probasin	NM_019125	5'-CCTCCTGCTCACACTGGATGT	5'-GCGACGGAAGTAGGTCCTCA
PSP94	U65486	5'-GATCACCTGCTGCACCAAAC	5'-TTCCTGGTTCGTCGGTTC
β-actin	X03765	5'-CTGTCCCTGTATGCCTCTGGTC	5'-TGAGGTAGTCCGTCAGGTCCC

Abbreviation: PSP94, prostate secretory peptide 94.

Quantification of mRNAs by Real-Time RT-PCR

Total RNA was prepared from each lobe of the prostate using an RNA isolation kit, NucleoSpin RNA II (Machery-Nagel GmbH & Co KG, Düren, Germany), and 2 µg of the total RNA was reverse transcribed as described previously (Fujimoto et al, 2004). An ABI Prism 7700 (PerkinElmer Life Sciences, Boston, Massachusetts) was employed for quantitative measurement of the cDNA using a QuantiTect Sybr Green PCR kit (Qiagen, Valencia, California). Specific primer sets with a melting temperature of about 59°C were designed for each mRNA (Table 1). Prior to quantitative analysis, PCR products were prepared separately and purified by gel electrophoresis. The DNA sequences were confirmed with a capillary DNA sequencer, ABI 310 (PerkinElmer Life Sciences). The extracted fragments were used as standards for quantification. The PCR conditions were 15 minutes of initial activation followed by 45 cycles of 20 seconds at 94°C, 30 seconds at 58°C, and 40 seconds at 72°C. All mRNA contents were normalized with reference to β-actin mRNA.

Statistical Analysis

Statistical comparisons were made using Student's *t* test.

Results

2D-PAGE and Identified Proteins

Secretory proteins from all of the lobes were treated with PNGase F and subjected to 2D-PAGE analysis. Because of the limitation of the pore size of the immobilized pH gradient gel for isoelectric focusing, proteins with a molecular weight over 100 kDa could not be analyzed in the 2D-PAGE. The gels were stained and the major spots were selected for MS analysis (Figure 1). Two sets of prostate secretions from independent control mice were analyzed and provided identical patterns. The spots were successfully identified,

and the results are summarized in Table 2. Prostatein, cystatin-related protein 1 (CRP1), and kallikrein S3 (KS3) were major proteins, along with spermine-binding protein (SBP) in the VP. Similar proteins were found in the LP, with the exception of the additional secretion of carbonic anhydrase II (CA2). In the DP, a 100-kDa protein, which showed a thin spot because of the pore size limitation of the Immobiline gel, was identified as a predicted protein similar to immunoglobulin-binding protein. Transglutaminase 4 (TGase4), CA2, epididymis-specific protein 1 (ESP1), and peroxiredoxin 6 (PRdx6) were also found. Similar secreted proteins were found in the AP. Contamination by the serum proteins, including albumin, transferrin, and aldose reductase, was unavoidable especially in the DP sample.

Lobe-Specific mRNA Expression of Identified Secreted Proteins

The expression of the identified proteins in the prostate was further confirmed by examining their mRNA levels; the results are summarized in Table 3. The lobe-specific expression of secreted proteins was evident. Prostatein C3, CRP1, and KS3 mRNAs were abundant in the VP and LP. The mRNA expression of SBP was also VP/LP specific. High-level expression of immunoglobulin G-binding protein-like protein (IgGBPLP) and TGase4 mRNA was detected only in the DP and AP. Probasin and PSP94 mRNAs, proteins that were not identified in 2D gel electrophoresis, were specific to the LP/DP. ESP1 and PRdx6 were specific to the DP.

Androgen Dependency of mRNA Expression of Identified Secreted Proteins

The transcriptional regulation of the identified proteins by androgen was examined by comparing mRNA levels

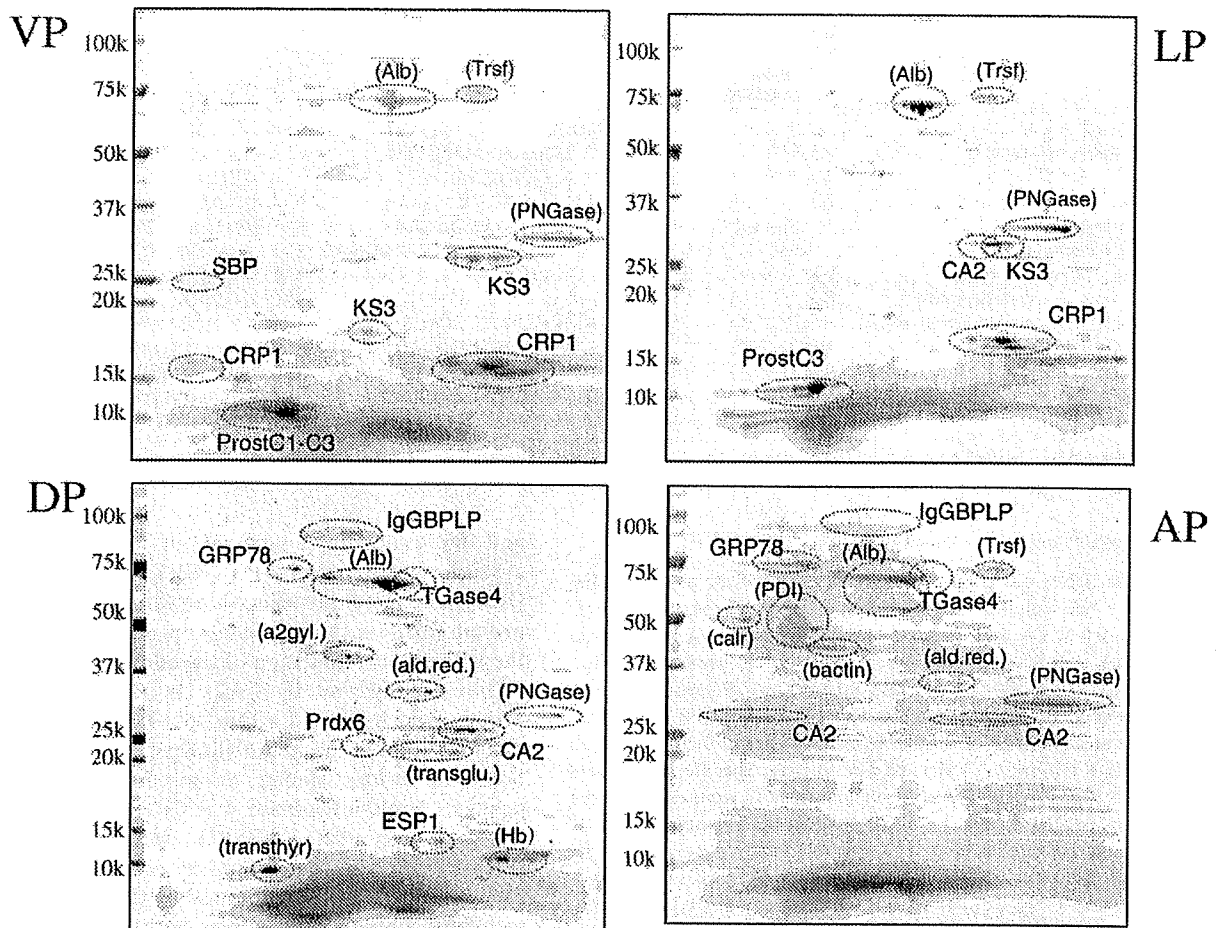


Figure 1. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) analysis of rat prostate secretory proteins. Each sample from the ventral prostate (VP), lateral prostate (LP), dorsal prostate (DP), and anterior prostate (AP) was treated with Peptide N-Glycosidase (PNGase) F and applied to an immobilized pH gradient gel, followed by a second sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The gels were stained with Sypro Ruby. The identified spots are indicated in the figure. Serum albumin (Alb), transferrin (Trsf), and hemoglobin (Hb) were considered to be due to serum contamination.

among the castrated, castrated and testosterone-treated, and intact animals (Figure 2). The mRNA levels were normalized by the β -actin levels, which were not affected by castration or testosterone treatment. The mRNA levels of the identified secreted proteins decreased 1 week after castration, although the extent of the decrease differed among the proteins. Prostatic protein mRNAs in the VP fell to an almost undetectable level after castration, but the probasin in the LP, for instance, fell to only one-third its original level. The mRNA levels increased after a single injection of testosterone, but in different manners. IgGBPLP and PRdx6 mRNAs increased significantly in 1 hour after an injection, whereas the others started to increase afterward. The manner of androgen response is varied among different lobes (Figure 3). In case of CA2, the mRNA was significantly regulated by androgen in the

LP, but unchanged in the DP. TGase4 and IgGBPLP mRNAs reached to above the intact control level in the AP but not in the DP.

Discussion

In the present study, the major secretory proteins of the rat prostate were identified by mass spectrometric analysis after 2D gel electrophoresis. In addition to previously known prostatic proteins, including prosta-tein, CRP1, and KS3 in the VP as well as TGase4 and CA2 in the LP/DP/AP, SBP, IgGBPLP, ESP1, 78-kDa glucose-regulated protein (GRP78), and PRdx6 were found in the prostatic secretions. The mRNAs for these proteins were expressed in a lobe-specific manner and

Table 2. Identified rat prostatic secretory proteins^a

Abbreviation	Protein Name	Accession No.	Observed MW/pl	Theoretical MW/pl	P	Sequence Coverage (%)
PrstC3	prostatein C3	P02780	11/4~5	11/5.5	1.00	34
CRP1	cysteine-rich protein 1	AAA42345	17/8~9	19/9.6	1.00	49
KS3	kallikrein S3	AAH61771	30/7	29/7.8	1.00	40
SBP	spermine-binding protein	NP_037156	25/4	31/3.7	1.00	27
TGase	transglutaminase	NP_073204	75/8	76/7.9	1.00	55
IgBPLP	IgG-binding protein-like protein	AAH99756	100/5~6	216/5.6	1.00	17
CA2	carbonic anhydrase II	NP_062164	30/7~8	29/7.0	1.00	58
ESP1	epididymal secretory protein 1	NP_775141	15/7	17/8.9	1.00	42
GRP78	78-kDa glucose-regulated protein	AAA41277	75/5	71/5.5	1.00	49
PRdx6	peroxiredoxin 6	NP_446028	30/7~8	29/7.1	1.00	29

Abbreviations: MW, molecular weight; pl, isoelectric point.

^a Neither probasin (NP_061998) nor PSP94 (NP_062061) was identified in the 2D gel.

were found to be regulated by androgen. Identifying several new prostatic proteins in rats, our present study put forth a novel view of rat prostatic secretions and reveals some similarities in prostatic secretions of rats and mice.

The identification and characterization of prostatic secretory proteins has drawn interest because these proteins may be good candidates for prostate cancer makers and as gene expression models of androgen-dependent regulation (Spence et al, 1989; Donjacour et al, 1990; Heyns 1990; MacDonald et al, 1996; Vercaeren et al, 1996; Imasato et al, 2001). The major human prostatic secreted proteins are PSA, PSP94, and PAP (Lee et al, 1986). The rodent prostate is morphologically very different from that of the human, and it is believed that PSP94 is the only secretory protein common to both species (Fernlund et al, 1996; Xuan et al, 1999). In addition, previous studies have suggested large differences even between rat and mouse in prostatic secretions, in spite of the morphological similarities (Donjacour et al, 1990). However, there had been very few reports about mouse prostatic secretions; thus, we recently performed an investigation identifying mouse secretions (Fujimoto et al, 2006). Our study showed that the mouse VP secretions are composed of SBP, serine protease inhibitor KT3, PRdx6, GRP78, and "91-kDa protein," whereas the LP/DP and AP secrete IgGBPLP, experimental autoimmune prostatitis antigen protein 2, PRdx6, GRP78, zinc- α 2- glycoprotein, and phospholipase C α . The present data show that SBP, IgGBPLP, PRdx6, GRP78, and PSP94 are all common to the prostatic secretions of rats and mice.

The secretion of the rat VP was reported to contain prostatein (about 50% of the secretion), CRP1 (10%), and kallikreins (Vercaeren et al, 1998). Prostatein consists of components, C1 + C3 and C2 + C3, linked by disulfide bridges (Heyns 1990). The 22-kDa CRP1 was named after its sequence homology with cystatins, a

group of cysteine protease inhibitors (Vercaeren et al, 1996). KS3, one of the tissue kallikreins (serine proteases), is also abundantly expressed in the VP (Clements et al, 1988). SBP is one of the major secretions of the mouse VP and is reported to be under the control of androgen (Mills et al, 1987). Our results indicate that SBP is also secreted and hormonally regulated in the rat VP.

Among the secretions of the LP/DP/AP, probasin (originally named after prostatic basic protein) is structurally related to the lipocalin superfamily, which suggests that this protein is a ligand-carrier protein, although its ligands and function are not presently known (Spence et al, 1989). Its mRNA was expressed greatly in the LP/DP, but it was not found by mass spectrometric analysis in the present study. This may suggest that probasin is mainly localized intracellularly in the nuclei rather than in the secretions. An early study reported that this protein was localized in the lumen and acinar regions of the epithelium (Dodd et al, 1983). Similarly, PSP94 was not identified as a protein spot in our 2D gels, whereas a substantial amount of mRNA was detected. PSP94, also known as β -microseminoprotein, is a nonglycosylated and cysteine-rich protein with 94 amino acids (Fernlund et al, 1996). It was first isolated from human seminal plasma and found to be one of the major prostatic proteins in humans. It is expressed in rat LP/DP (Kwong et al, 2000), as confirmed in the present study, although it is found in both the VP and LP/DP in the case of the mouse. The function of this protein may be immunoglobulin binding to suppress the activation of B cells in the female reproductive tract. This protein may also function as a suppressor of tumor growth and metastasis (Beke et al, 2007). Another "prostatic protein" not found in the 2D gel was seminal vesicle secretion II, whose mRNA was abundantly expressed in the LP in our previous study and others (Kwong et al, 2000; Suzuki et al, 2007).