

## P-097

**Further improvement of high through-put fluctuation Ames test (Part X)**

Hajime Sui<sup>1</sup>, Kumiko Kawakami<sup>1</sup>, Saki Negishi<sup>1</sup>, Emi Masubuchi<sup>1</sup>, Keita Sonohara<sup>1</sup>, Masami Yamada<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center,

<sup>2</sup>National Institute of Health Sciences

We have improved a fluctuation Ames test (FAT) using a 384-well microplate, and the improved FAT is more sensitive than the conventional method (Sui *et al.*, Genes and Environ., 31, 47-55, 2009). High correlation (i.e., negative specificity: 100%, sensitivity: 71.4% and concordance: 80.0%) was observed between the results of the improved FAT and the Ames test using 40 National Toxicology Program (NTP) compounds with TA100 and TA98. In the 39th, 41st and 43rd meetings, we reported that the higher sensitivity was observed without S9 mix by using one-tenth of the conventional bacterial cell number. In the present study, we focused on the broth used for the pre-incubation, and evaluated the test condition by using mutagens (B[a]P, CP etc.) to increase the sensitivity of improved FAT with S9 mix. We will report these results in the meeting.

**ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験法の検討 10**

須井哉<sup>1</sup>、川上久美子<sup>1</sup>、根岸沙記<sup>1</sup>、増渕恵美<sup>1</sup>、園原啓太<sup>1</sup>、山田雅巳<sup>2</sup>

<sup>1</sup>一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 遺伝学研究室、

<sup>2</sup>国立医薬品食品衛生研究所

我々は、384 ウェルマイクロプレートを用いる Fluctuation Ames Test (FAT) に改良を加えて、感受性を向上させてきた (改良法 FAT, Sui *et al.*, Genes and Environ., 31, 47-55, 2009)。また、40 種の National Toxicology Program (NTP) 選定化合物を用い、TA100 および TA98 を用いた改良法 FAT と Ames 試験の結果に、高い相関性 (特異性: 100%、感受性: 71.4%、予測性: 80.0%) が認められることを明らかにした。その後、従来の 1/10 量の菌数を用いることにより、S9 mix 非存在下では陽性反応の向上が認められることを JEMS 大会 (39, 41 および 43 回) において報告した。今回、S9 mix 存在下における陽性反応の向上を図るため、ブレインキュベーション時の培養液に着目し、変異原物質 (Benzo[a]pyrene, Cyclophosphamide など) を用いて改良法 FAT の試験条件を検討したので、それらの結果を報告する。

## P-098 (0-11)

**Absolute quantification of DNA repair and DNA damage-response proteins and histone modifications using LC/MS/MS**

Shun Matsuda<sup>1</sup>, Masae Ikura<sup>2</sup>, Kanji Furuya<sup>2</sup>, Tsuyoshi Ikura<sup>2</sup>, Tomonari Matsuda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Center for Environmental Quality Management, Kyoto University, <sup>2</sup>Radiation Biology Center, Kyoto University

Cells have a number of proteins involving DNA repair and DNA damage-response to protect genome from a variety of mutagens. However, knowledge about quantification of these proteins is limited.

Here, we developed a precise absolute quantification method of some DNA repair and DNA damage-response proteins and histone modifications to measure changes in their localization and amounts in response to DNA damage. This method can simultaneously measure absolute amounts of dozens of proteins, and has high throughput performance. This study showed that amounts of these proteins in a cell differ by more than two orders of magnitude. We also revealed dynamic changes in their localization in response to DNA damage. Furthermore, we revealed that levels of the Ser139-phosphorylation and K5-acetylation of histone H2AX are significantly different between cell lines.

In the future, we aim to apply this method to genotoxicity assessment considering tissue diversity and development of a DNA damage mechanism-inferring genotoxicity test.

**LC/MS/MS を用いた DNA 修復・損傷応答タンパク質及びヒストン修飾の絶対定量**

松田俊<sup>1</sup>、井倉正枝<sup>2</sup>、古谷寛治<sup>2</sup>、井倉毅<sup>2</sup>、松田知成<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都大学 工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター、<sup>2</sup>京都大学 放射線生物研究センター

細胞には多種多様な変異原からゲノムを守るために様々な DNA 修復・損傷応答タンパク質が存在するが、これらの定量的な知見はほとんどない。

本研究では、DNA 損傷に応じた各種 DNA 修復・損傷応答タンパク質、ヒストン修飾の局在・量的変化を詳細に捉えるため、各種タンパク質、ヒストン修飾の高精度絶対定量法を開発した。本手法は一度の分析で数十種類のタンパク質を同時に絶対定量でき、サンプルのスループット性も高いという利点がある。本研究により、各 DNA 修復・損傷応答タンパク質の 1 細胞あたりの分子数には 100 倍以上の差があることが明らかになり、各タンパク質の DNA 損傷後のダイナミックな局在変化も詳細に捉えることができた。さらにヒストン H2AX の Ser139 リン酸化と K5 アセチル化レベルは細胞種間で著しく異なることも明らかになり、本手法が細胞種や組織の違いによる DNA 損傷応答の多様性を捉えられる可能性が示唆された。

今後データを集積し、本手法を組織の多様性を加味した遺伝毒性評価や、DNA 損傷メカニズム推定型の遺伝毒性試験の開発に役立てたい。