

200501157A

別添1 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質感受性の個人差を決定する遺伝子的
要因の検索とその作用機構解析

(H17-化学-010)

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 永沼 章

平成18(2006)年4月

目次

I. 総括研究報告	
化学物質感受性の個人差を決定する遺伝子的要因の検索とその作用機構解析 ...1	
永沼 章	
II. 分担研究報告	
1. siRNAライブラリーを用いたメチル水銀感受性決定因子の網羅的検索法の樹立 ...9	
黄 基旭、永沼 章	
2. siRNA導入細胞ライブラリーを用いたメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子検索23	
黄 基旭	
3. Eno2 ノックダウンによるメチル水銀耐性獲得機構の解析35	
黄 基旭	
4. IMR-32細胞でのメチル水銀に対する遺伝子発現のプロファイリング39	
黄 基旭	
5. 酵母を用いた化学物質感受性の個人差決定に関わる遺伝子の検索方法の樹立 とその応用67	
久下周佐	
6. ヒ素感受性に影響を与える遺伝子群の検索とその作用機構解析91	
大橋一晶	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表157	
IV. 研究成果の刊行物・印刷物159	

1. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（総括）研究報告書

化学物質感受性の個人差を決定する遺伝子的要因の検索とその作用機構解析

主任研究者 永沼 章 東北大学大学院薬学研究科教授

本研究は、健康影響が懸念されている化学物質や重金属類に対する感受性決定遺伝子を網羅的に検索・同定することを目的としている。本年度はまず、siRNA発現ライブラリーでヒトの各遺伝子をそれぞれノックダウンさせるという方法を用いて、発現量の減少が細胞のメチル水銀感受性に影響を及ぼす遺伝子群を検索する方法を確立した。本法を用いた検討により、メチル水銀感受性に影響を与えるヒト遺伝子を数種類見出すことに成功し、その中の1種であるEno2に関する機構解析により、ピルビン酸がメチル水銀毒性の増強に関与することが判明するなど本法の有用性も確認された。また、酵母を用いた検索法についても検討し、これまでの我々の方法を改良した新しい高効率の感受性決定遺伝子検索法を確立することができた。本法によってヒ素に対する感受性に影響を与える遺伝子も数多く同定された。今後これらの方法を用いることによって、化学物質感受性決定遺伝子が同定されるものと期待される。

分担研究者

久下周佐

（東北大学大学院薬学研究科・助教授）

大橋一品

（東北大学大学院薬学研究科・助手）

黄 基旭

（東北大学大学院薬学研究科・助手）

A. 研究目的

化学物質に対する感受性が遺伝的に高い人々（遺伝的ハイリスクグループ）の存在が示唆されており、これらの人々は比較的

少量の化学物質摂取によって健康に障害が生じると考えられる。原因不明とされている疾病の中に、化学物質が高感受性個体に引き起こした症例が含まれている可能性も否定できない。化学物質に対して遺伝的に高感受性を示す人々の特定は、化学物質による健康被害を最小限に抑えるためにも、また、より正確なリスク評価を行う上でも極めて重要な厚生労働行政課題と考えられる。しかしながら、感受性の個体差に関わる遺伝子が解明されている化学物質はほとんど存在しない。我々はこれまで、哺乳動

物に先駆けて全遺伝子配列が決定された酵母を真核細胞生物のモデルとして用い、無作為かつ網羅的な遺伝子スクリーニング法を種々開発して感受性決定遺伝子の同定に挑んできた。酵母の遺伝子の多くはヒトにも類似のものが存在するため、この方法によっていくつかの新規ヒト感受性決定遺伝子の同定に成功したが、本法では酵母で得られた知見をヒト培養細胞で確認する作業に多くの時間が費やされた。

この問題を解決するために、本研究では、最近急速な発展を遂げたsiRNA法を利用し、欠損することによって培養細胞の化学物質感受性に影響を与えるヒト遺伝子群を検索する方法を新たに開発することを第一の目的とする。この方法は、約22,000といわれているヒト遺伝子の中で機能の分かっている約8,500の遺伝子をsiRNAライブラリーを用いて一つずつノックダウンするという画期的な手法を取り入れたものであり、この検索方法を用いればヒトの遺伝子を直接同定することができるばかりでなく、対象となる化学物質に対する感受性決定遺伝子群のほとんどが一気に同定されるので、その化学物質の毒性の発現程度を調節する細胞内機構の全容解明も夢ではない。本研究では最終的に、siRNAライブラリーを利用した遺伝子ノックダウン法により、代表的な化学物質に対する感受性決定に関与するヒト遺伝子群を網羅的に同定し、それらの作用機構解明をめざす。さらに本研究では、酵母を用いた信頼性の高い機能遺伝子検索

法による感受性決定遺伝子の検索も行う。本研究によって、目的とする遺伝子群が非常に効率良く同定されるものと期待され、得られる成果はこれまで世界中の研究者が集積してきた知見をも凌駕する極めて画期的なものとなり、化学物質に対する遺伝的ハイリスクグループの同定やこれを考慮したリスク評価の実現化、さらには中毒治療法の開発などに大きく貢献することになる。

B. 結果・考察

(1) siRNA ライブラリーを用いたメチル水銀感受性決定因子の網羅的検索法の樹立

siRNA 発現ライブラリーでヒトの各遺伝子をそれぞれノックダウンさせるという方法を用いて、発現量の減少が細胞のメチル水銀感受性に影響を及ぼす遺伝子群を検索する方法を検討した。ヒト培養細胞への siRNA ライブラリーの導入はレンチウイルスベクターを用いた。まず、レンチウイルス感染方法について詳細な検討を行い、導入効率の高いウイルス感染法を確立した。また種々の細胞の中で HEK293 細胞への導入効率が高いことが判明した。そこで、HEK293 細胞に siRNA ライブラリーを導入し、ノックダウンにされることによって細胞のメチル水銀感受性に影響を及ぼす遺伝子群のスクリーニングを行った。ここでは、導入された siRNA の発現量をマイクロアレイ法で解析することによって各 siRNA 導入細胞の生存率を求め、高い発現量を示した siRNA (85 種。これらの導入細胞はメ

チル水銀耐性を示すと予想される)の中からランダムに選んだ10種についてそれぞれの遺伝子を各々dsRNAによってノックダウンさせた際のメチル水銀感受性を確認した。その結果、ノックダウンによってメチル水銀耐性を与える遺伝子3種(UBE4B、ATF3、UTF1)が同定された。ただし、本実験系では導入したsiRNAライブラリーの発現レベルがあまり高くなく、メチル水銀処理とは関係なくそのレベルが変動する遺伝子も認められたことから、全遺伝子を網羅的にスクリーニングするためにはさらに改善が必要であると考えられる。

(2) siRNA 導入細胞ライブラリーを用いたメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子検索

siRNAライブラリーを導入したHEK293細胞群(siRNA導入細胞ライブラリー)を作成した後に、それらの中でメチル水銀耐性を示す細胞を検索したところ、グルタミン酸の代謝に関わるTgm4、Grm6、Oat、及びピルビン酸生成に関わるEno2のノックダウンが細胞にメチル水銀耐性を与えることが判明した。

(3) Eno2 ノックダウンによるメチル水銀耐性獲得機構の解析

ピルビン酸生成に関わるEno2のノックダウンが細胞をメチル水銀耐性にすることから、メチル水銀毒性和ピルビン酸との関係を検討した。その結果、ヒト脳由来細胞であるIMR32のメチル水銀感受性をピルビン酸が顕著に増強させることが判明した。

また、同様の現象が酵母でも認められた。酵母を用いてその機構を検討したところ、ピルビン酸のミトコンドリアへの流入促進がメチル水銀毒性を増強させることが明らかとなった。ミトコンドリア中に蓄積したピルビン酸はアセチルCoAへの変換およびそれに続くTCAサイクルでの代謝を受けることなくメチル水銀毒性を増強することも示唆され、ピルビン酸によるTCAサイクル非依存的なメチル水銀毒性増強機構の存在が考えられる。

(4) IMR-32細胞でのメチル水銀に対する遺伝子発現のプロファイリング

DNAマイクロアレイ法を用いてメチル水銀によって発現量が変動する遺伝子を検索した。その結果、メチル水銀処理により発現量が上昇する遺伝子が74種、また発現量が減少する遺伝子が86種見つかった。その中にはシグナル伝達、腫瘍形成、ストレス応答および神経変性疾患に関わる遺伝子が多く含まれていた。これら遺伝子の高発現またはノックダウンがメチル水銀毒性に与える影響を現在検討中である。

(5) 酵母を用いた化学物質感受性の個人差決定に関わる遺伝子の検索方法の樹立とその応用

我々はこれまで、ヒトと同じ真核生物であり多くの遺伝子がヒトと共通している酵母を用いて化学物質感受性の決定に関与する遺伝子を検索してきた。酵母はヒト細胞よりも効率良く目的とする遺伝子を検索できという利点を有することから、今回、さ

らに簡便で信頼性の高い検索法の樹立を試みた。その結果、欠損によって細胞の化学物質に対する感受性を高める遺伝子と低下させる遺伝子を同時に効率良く検索する方法を樹立することに成功した。本法によって、特に強い細胞毒性を示すモデル毒物として選択したアドリアマイシンに対して耐性を与える遺伝子を 152 種、高感受性を与える遺伝子を 254 種同定することができた。欠損によりアドリアマイシン耐性を示す遺伝子の中には、エンドサイトーシスに関わる因子をコードする遺伝子が多数存在したことから、さらにエンドサイトーシス経路とアドリアマイシン毒性について詳細に検討を行った。同定されたエンドサイトーシス関連遺伝子群は全てが internalization step に関わるものであったが、post-internalization step に関わる遺伝子はアドリアマイシン毒性に関与しないこと、さらに、アドリアマイシンの細胞内への取込みにエンドサイトーシス関連因子群が関与しないことが明らかとなった。本検索法で同定された遺伝子 (エンドサイトーシス関連因子を含む) のほとんどは初めてアドリアマイシン毒性に関わるものが判明したものであることから、この方法は化学物質の感受性遺伝子検索研究に大きな発展をもたらすものと期待される。

(6) ヒ素感受性に影響を与える遺伝子群の検索とその作用機構解析

(5) で確立した方法を用いて、亜ヒ酸感受性に影響を及ぼす遺伝子を検索した。その結果、欠損により亜ヒ酸感耐性を与える

遺伝子 59 種、高感受性を与える遺伝子 83 種が同定された。我々は以前に、酵母を用いてヒ素感受性に影響を与える遺伝子群の検索を行っているが、今回見出された遺伝子の 9 割以上は前回見逃された新規のものであった。その中には、細胞骨格の形成や機能調節に関与する因子群、蛋白質の細胞内輸送に関与する因子群および蛋白質合成に関与する因子群がそれぞれ比較的多数同定された。細胞骨格に関連する因子が多数得られたことから、酵母を亜ヒ酸処理した際のアクチンの挙動を観察したところ、アクチンの斑点状の点在が同様に観察され、ヒ素毒性に対する防御機構としてアクチンの重合など細胞骨格の機能・制御が重要な役割を果たしている可能性が新しく示唆された。

D. 結論

ノックダウンされることによって細胞の化学物質感受性に影響を与える遺伝子の検索法を確立した。本法を用いてメチル水銀感受性に影響を与えるヒト遺伝子を数種類見出すことに成功した。その中の 1 種である Eno2 に関する機構解析により、ピルビン酸がメチル水銀毒性の増強に関与することが判明するなど、本法の有用性も確認された。また、酵母を用いた検索法についても検討し、これまでの我々の方法を改良した新しい高効率の感受性決定遺伝子検索法を確立することができた。本法によってヒ素に対する感受性に影響を与える遺伝子も数多く同定された。今後これらの方法を用い

ることによって、化学物質感受性決定遺伝子が同定されるものと期待される。

E. 健康危険情報
特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hwang GW, Sasaki D, Naganuma A, Overexpression of Rad23 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae* via inhibition of the degradation of ubiquitinated proteins, *Mol Pharmacol* 2005; 68: 1074-1078.

Hwang GW, Furuoya Y, Hiroshima A, et al., Overexpression of Bop3 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae* through interaction with other proteins such as Fkh1, Rts1 and Msn2, *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 378-385.

Takahashi T, Furuchi T, Naganuma A, A novel role for Bsd2 in the resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to adriamycin, *J Cell Physiol* 2005; 202: 100-104.

Okazaki S, Naganuma A, Kuge S, Peroxiredoxin-mediated redox

regulation of the nuclear localization of Yap1, a transcription factor in budding yeast, *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 327-334.

2. 学会発表

黄 基旭：メチル水銀毒性発現に関わる分子メカニズム. 日本薬学会第 126 年会, 2006.

村井康高、黄 基旭、永沼 章：Vps27/Hse1 複合体によるメチル水銀毒性増強に関わる蛋白質の同定. 日本薬学会第 126 年会, 2006.

荻原庸介、黄 基旭、永沼 章：酵母パルミトイルトランスフェラーゼ Akr1 の欠損によるメチル水銀毒性増強機構の解析. 日本薬学会第 126 年会, 2006.

李 辰竜、黄 基旭、石田洋輔、永沼 章：ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強機構の解析. 日本薬学会第 126 年会, 2006.

岡崎祥子、永沼 章、久下周佐：協調した複数のジスルフィド結合形成による酵母 Yap1 転写因子の酸化ストレス応答. 日本薬学会第 126 年会, 2006.

久下周佐：酸化ストレス感知におけるペルオキシレドキシンの役割. 日本薬学会第 126 年会, 2006.

黄 基旭、永沼 章：メチル水銀の細胞毒性に対するユビキチン・プロテアソームシステムの防御作用とその機構. 第 76 回日本衛生学会総会, 2006.

村井康高、黄 基旭、永沼 章：エンドソームへの蛋白質の取り込みに関わる Vps27-Hse1 複合体とその結合蛋白質 Ynr005c のメチル水銀毒性発現における役割. 第 28 回日本分子生物学会年会, 2005.

橘 剛、永沼 章、久下周佐：過酸化水素シグナル感知におけるペルオキシレドキシンの機能解析. 第 28 回日本分子生物学会年会, 2005.

久保田直子、永沼 章、福田隆志、供田 洋、久下周佐：HCV コア蛋白質が示す酵母細胞増殖抑制作用における Hsp90 分子種の関わり. 第 28 回日本分子生物学会年会, 2005.

Shoko Okazaki, Akira Naganuma, Shusuke Kuge : Coordinated thiol-disulfide exchange reactions of Yap1 prevent formation of nonspecific mixed disulfide upon oxidative stress. International Redox Network, 2005.

Masataka Nomoto, Naoko Kubota, Akira Naganuma and Shusuke Kuge :

Dissection of nuclear import activity of importin Kap121 from its growth defect phenotype. International symposium on life of proteins, 2005.

荻原庸介、黄 基旭、永沼 章：メチル水銀毒性増強蛋白質 Whi2 がパルミトイルトランスフェラーゼ Akr1 の機能に与える影響. フォーラム 2005：衛生薬学・環境トキシコロジー, 2005.

村井康高、黄 基旭、永沼 章：エンドソーム上に存在する蛋白質選別輸送システムによるメチル水銀毒性の増強機構：基質認識に関わる Vps27 の関与様式. フォーラム 2005：衛生薬学・環境トキシコロジー, 2005.

稲葉佐知子、大橋一晶、永沼 章：NADPH oxidase によるパラコート毒性の増強. フォーラム 2005：衛生薬学・環境トキシコロジー, 2005.

廣瀬知子、黄 基旭、永沼 章：酵母 F-box 蛋白質 Ufo1 の高発現によるメチル水銀耐性とその機構解析. 第 44 回日本薬学会東北支部大会, 2005.

荻原庸介、黄 基旭、永沼 章：ユビキチン転移酵素 Cdc34 の高発現によるメチル水銀毒性軽減機構：メチル水銀毒性増強蛋白質 Whi2 の役割. 第 44 回日本薬学会東北

支部大会, 2005.

橘 剛、永沼 章、久下周佐：過酸化水素シグナル感知におけるペルオキシレドキシンの機能解析. 第 44 回日本薬学会東北支部大会, 2005.

Yousuke Ogiwara, Gi-Wook Hwang, Akira Naganuma : Functional analysis of proteins that degraded by ubiquitin-proteasome system and involved in enhancement of methylmercury toxicity. 第 78 回日本生化学大会, 2005.

Sachiko Inaba, Kazuaki Ohashi, Akira Naganuma : Enhancement of paraquat toxicity by membrane-associated reductases. 第 78 回日本生化学大会, 2005.

Shushuke Kuge : Redox shift-mediated transduction of oxidative stress by multiple disulfide formation in Yap1

transcription factor. 2nd International Congress Stress Responses in Biology and medicine, 2005.

黄 基旭：メチル水銀に対する感受性決定要因としてのユビキチン・プロテアソームシステム. 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2005.

荻原庸介、黄 基旭、永沼 章：ユビキチン・プロテアソームシステムで分解されるメチル水銀毒性増強蛋白質の検索. 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2005.

村井康高、黄 基旭、永沼 章：メチル水銀が酵母細胞内の物質輸送に与える影響. 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2005.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

II. 分担研究報告

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

siRNA ライブラリーを用いたメチル水銀感受性決定因子の網羅的検索法の樹立

分担研究者 黄 基旭 東北大学大学院薬学研究科助手

永沼 章 東北大学大学院薬学研究科教授

siRNA ライブラリーを用いたメチル水銀感受性を決定する因子の検索を行うために、まず、ヒト培養細胞へのウイルス感染方法などの検討を行い、導入効率が高く維持されるウイルス感染方法を確立した。また、種々の細胞種への pFIV-lacZ レポーターの導入効率を検討したところ、HEK293 細胞への導入効率が高かった。そこで、HEK293 細胞に siRNA ライブラリーを導入し、ノックダウンにされることで細胞のメチル水銀感受性に影響を及ぼす遺伝子群のスクリーニングを行ったところ、3 種の遺伝子（UBE4B、ATF3、UTF1）を同定することに成功した。しかし、本実験系では各遺伝子のレベルが低く、メチル水銀処理とは関係なくそのレベルが変動する遺伝子も見られたことから、全遺伝子を網羅的にスクリーニングするためには更なる実験系の構築が必要である。

A. 研究目的

近年、siRNA を用いた遺伝子ノックダウン法が見出され、ヒト遺伝子の中機能の分かっている約 8,500 種の遺伝子を一つずつノックダウンする画期的な応用例が報告された（Kittler R. et al, 2004）。そこで、メチル水銀毒性の分子メカニズムを解明するために、この最近の報告で用いられた siRNA ライブラリーを利用して、ノックダウンすることによってメチル水銀感受性に影響を与えるヒト遺伝子群を同定する検索系の構築およびス

クリーニングを行う。

B. 研究方法

1. 種々の細胞種へのレンチウイルス導入効率の検討

種々の培養細胞へのパッケージ済み pFIV-lacZ レポーターの導入効率を検討するために、 2×10^6 cells/10 ml になるように 10 センチシャーレに播き、37℃、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養後、培地を除去した後 MOI=1 になるよう 4×10^6 ifu/160 ul ウイルス液を含む D' MEM / 10%FBS 培地を

細胞にかけてシャーレをまんべんなく 10 回程度揺らしてウイルスを細胞全体に行き渡らせるという操作を 10 分おきに 1 時間行い、その後 polybrene を含む D' MEM / 10%FBS 培地を 4.4 ml 加え (polybrene 濃度 : 6 ug/ml)、12 時間培養した後、新しい D' MEM/10% FBS に交換し、36 時間培養した。その後、X-gal staining を行い、感染効率を観察した。

2. HEK293 細胞への siRNA ライブラリーウイルス導入の検討

HEK293 細胞を 2×10^6 cells/10 ml になるように 10 センチシャーレに播き、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養後、培地を除去した後 MOI=1 になるように 4×10^6 ifu/160 ul ウイルス液を含む D' MEM / 10%FBS 培地 600 ul を細胞にかけてシャーレをまんべんなく 10 回程度揺らしてウイルスを細胞全体に行き渡らせるという操作を 10 分おきに 1 時間行い、その後 polybrene を含む D' MEM / 10%FBS 培地を 4.4 ml 加え (polybrene 濃度 : 6 ug/ml)、12 時間培養した。その後、新しい D' MEM/10% FBS に交換し、36 時間培養した後に細胞を剥がし、細胞懸濁液の 1/4 量ずつを新しい 10 センチシャーレ 4 枚にまき直し、48 時間培

養した。

3. メチル水銀で処理した HEK293 細胞から総 RNA の抽出

1 で得られた細胞を剥がし、 2.6×10^5 cells/900 μ l/well になるように 6-well plate に播き、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養後、塩化メチル水銀 (final 4 uM) を含む滅菌水をそれぞれ 100 μ l/well ずつ添加して 24 時間 (生存率約 90%) または 72 時間 (生存率約 40%) 培養した。培養終了後、各 well の培地を取り除き、TRIzol (Invitrogen) 1 ml を加えて細胞を回収した。得られた細胞混合液に 0.2 ml のクロロホルムを加えて激しく攪拌し、室温で 3 分間放置後、12,000 xg で 15 分間遠心分離した。分離した水層 0.5 ml に同量のイソプロパノールを加えて混和後、室温で 10 分間放置し、12,000 xg で 10 分間遠心分離し、沈殿した total RNA 画分を得た。この沈殿を 75% エタノール溶液で洗浄し、乾燥後 molecular grade water に溶解し、260 nm の吸光度値から RNA 濃度を算出した。

4. cDNA の作製

cDNA の作製は Reverse Transcription Reagent (Takara) を用いて行った。まず、上記の方法で調

整した総 RNA 3 μg に oligo dT primer (50 μM) 0.5 μl 、5 x M-MLV (Molony Murine Leukemia Virus) Buffer 2 μl 、dNTP Mixture (各 10 mM) 0.5 μl 、M-MLV RTase (reverse transcriptase) (200 U/ μl) 0.25 μl 、RNase Inhibitor (40 U/ μl) 0.25 μl を加え、滅菌蒸留水で全量を 10 μl にした。この溶液を 42°C で 15 分間インキュベート後、95°C で 2 分間インキュベートした。

5. プローブの作製

上記で得られた cDNA 5 μl と first round PCR master mix 95 μl (10 x Titanium Taq PCR buffer 10 μl , 10 x dNTP mix (10 mM each) 10 μl , 10 μM Fwd PCR primer 2 μl , 10 μM Rev PCR primer 2 μl , 50 x Titanium Taq DNA polymerase 2 μl , D.W. 69 μl) を混合し、first round PCR を行った。なお PCR の条件は 94°C で 30 秒、68°C で 1 分の 2 ステップを 1 サイクルとし、20 サイクル行い、最後に 68°C で 3 分のステップを行った。得られた PCR 産物 1 μl と second round PCR master mix 99 μl (10 x Titanium Taq PCR buffer 10 μl , 10 x dNTP mix (10 mM each) 10 μl , 10 μM

nested fwd PCR primer 10 μl , 10 μM nested rev PCR primer 10 μl , 50 x Titanium Taq DNA polymerase 2 μl , D.W. 57 μl) を混合したサンプルを総 5 本用意し、それぞれ second round PCR を行った。なお PCR の条件は 94°C で 2 分、50°C で 2 分、68°C で 1 分を行った後、94°C で 30 秒、68°C で 1 分の 2 ステップを 1 サイクルとし、18 サイクル行い、最後に 68°C で 3 分のステップを行った。得られた second round PCR 産物は QIAquick gel extraction kit を用いて精製した後、260 nm の吸光度値から DNA 濃度を算出した。

6. ハイブリダイゼーションおよびチップの解析

上記で調整したプローブに 20 x SSC 6.25 μl (最終濃度 5 x SSC) を加え、95°C で 2 分間加熱して変性させた後に、室温で 10 分間放置した。その後、最終濃度が 0.2% になるように SDS を加え、Affymetrix Human Genome Focus 上に溶液をのせ、カバーガラスを被せて湿度の高い状態で 65°C、14 時間インキュベートした。この DNA チップを 2 x SSC-0.1% SDS 溶液に浸し、カバーガラスをはずした。2 x SSC-0.1% SDS 溶液に浸し室温で 20 分間、次いで 0.1% SDS 溶液に浸して室温で 20 分間、0.2 x

SSC-0.1% SDS 溶液にて 45°C、10 分間洗淨した後、0.2 x SSC、0.05 x SSC で軽く洗淨し、100 xg、20 秒間遠心した後に、室温で乾燥した。この DNA チップの解析は受託した。

7. dsRNA の合成

dsRNA は受託で合成した。各遺伝子に対する dsRNA の塩基配列は以下に示した。

ATF3 ;
 GUAUCUCAAGAUUAUUCGAGUG
 GCCAGA
 BAIAP2 ;
 CAGUGGCUACUGGUUAUUGUCU
 CUUCCC
 UTF1 ;
 CCUUGAACCAGCACGUGGAGCA
 GCUGC
 WNT1 ;
 AGAUGCGCCAGGAGUGCAAGU
 GCCACG
 PCDHB3 ;
 GCGGCCAAGCACAGGCUGGUGG
 UGCUG
 GADD34 ;
 CUAAGGCCAGAAAGGUGCGCU
 UCUC
 CALCYON ;
 UGAUCAUGUACAAGGCCAUCU
 GGUACG
 PSMD3 ;

UCUGUCAAGGCCAUGAGGUUU
 CCUCCC
 UBE4B ;
 GCUGCUCUGGUCCUUGUGAUA
 AGCCUC
 CAMK1 ;
 AGAUAAGAAUAUCCACCAGUCG
 GUGAG

8. dsRNA の細胞への導入

5×10⁵ cells/2 ml/well となるように HEK293 細胞を 6 well plate にまいた後、24 時間後に合成した dsRNA (double strands RNA) を Lipofectamine 2000 を用いて導入した。Lipofectamine 2.5 μl を OptiMEM 125 μl に滴下し、5 分後に dsRNA 100 pmol を OptiMEM 125 μl に混合させたものを滴下し、20 分静置した後、培養した細胞に滴下し、24 時間後に毒性試験に用いた。

9. メチル水銀に対する感受性の検討

1×10⁴ cells/90 μl/well となるように細胞を 96 well plate にまいた後、24 時間後に各濃度の塩化メチル水銀で処理した。48 時間後に塩化メチル水銀を含む培地から alamablue 10 μl を含む培地 100 μl に交換し、蛍光プレートリーダーで蛍光を測定した (excitation, 544nm; emission, 590nm)。

(倫理面への配慮)

本研究では動物などは使用せず、生物としてヒト培養細胞のみを用いる。したがって、倫理面での配慮を必要としない。

C. 結果・考察

1. HEK293 細胞への pFIV-lacZ レポーターの導入方法の検討

HEK293 細胞へのパッケージ済み pFIV-lacZ レポーターの導入方法を検討するために、ウイルス感染時に 4×10^6 ifu/160 ul ウイルス液を含む D' MEM / 10%FBS 培地の総量を 500 ul から 5 ml まで検討したところ、総 600 ul のウイルス液を含む D' MEM / 10%FBS 培地で感染する際、導入効率が高かった。また、1 時間のウイルスを感染する際に 10 分おきに 10 回程度揺らしてウイルスを細胞全体に行き渡らせる操作を行うことによって更なる導入効率の上昇が認められた。さらに、ウイルス粒子と細胞膜との結合を上昇させるためにポリブレンの処理濃度を検討したところ、5 ug/ml のポリブレンの処理によってより高い pFIV-lacZ レポーターの導入が認められた。

2. 種々の細胞種への pFIV-lacZ レポーター導入の検討

上記で検討された導入方法によって、種々の細胞種への siRNA ライブラリーウイルス導入効率を検討するために、HEK293 (ヒト胎児腎由来)、IMR-32 (神経腫由来)、HepG2 (肝癌由来)、HeLa (ヒト子宮癌由来) 細胞を用いて、パッケージ済み pFIV-lacZ レポーターの導入効率を検討した。その結果、MOI=1 で感染した場合、種々の細胞 HEK293 細胞ではほとんどの細胞への pFIV-lacZ レポーターの導入が確認されたのに対して、他の細胞では低い導入効率を示した。したがって、遺伝子群のスクリーニングでは HEK293 細胞を用いることにした。

3. ノックダウンされることによって細胞のメチル水銀感受性に影響を及ぼす遺伝子群の検索

siRNA ライブラリーを導入した HEK293 細胞を用いてノックダウンされることによって細胞のメチル水銀感受性に影響を及ぼす遺伝子群のスクリーニングを行った。塩化メチル水銀で処理した細胞より総 RNA を抽出し、得られた総 RNA 中の siRNA を特異的な配列を有するプローブを用いた PCR により増幅させた後にマイクロアレイを行った。その結果、塩化メチル水銀で 72 時間処理した siRNA ライブラリー導入細胞では、8793 種

の遺伝子中 85 種の遺伝子のレベルが対照細胞に比べて高かった (Fig. 1)。一方、塩化メチル水銀で 24 時間処理した siRNA ライブラリー導入細胞では、26 種の遺伝子のレベルが対照細胞に比べて低かった (Fig. 2)。塩化メチル水銀処理によって対照細胞に比べてレベルが変動した遺伝子産物の中にはメチル水銀毒性発現に関与している因子が含まれている可能性が考えられる。しかし、今回のマイクロアレイでは各遺伝子のレベルが低く、塩化メチル水銀処理とは関係なくそのレベルが変動する遺伝子が見られた。今後、細胞への siRNA ライブラリーの導入方法などの検討によって全遺伝子を網羅的にスクリーニングできる方法を確立する必要があると思われる。

4. dsRNA 導入による遺伝子のノックダウンが細胞のメチル水銀感受性に及ぼす影響

1 でメチル水銀処理によって遺伝子のレベルが上昇した 85 種の遺伝子の中から、ランダムに 10 種の遺伝子を選び、それらの遺伝子をそれぞれノックダウンさせる dsRNA (double strands RNA) を細胞に導入し、メチル水銀に対する感受性を検討した。その結果、UBE4B の dsRNA 導入細胞は対照細胞に比べて高いメチル水銀

耐性を示したものの、AFT3 または UTF1 の dsRNA 導入細胞は僅かなメチル水銀耐性を示した。一方、BAIAP2、CALCYON、CAMK1、PSMD3、WNT1、PCDHB3 および GADD34 を導入した細胞は対照細胞と同じもしくは高いメチル水銀感受性を示した。しかし、CALCYON、CAMK1、PSMD3 および GADD34 の dsRNA を導入した細胞は対照細胞に比べて細胞増殖が著しく抑制されたことから、これらの遺伝子のノックダウンによる細胞のメチル水銀感受性への影響は判断できなかった。今回、ノックダウンされることによって細胞に顕著なメチル水銀耐性を与えた UBE4B は ubiquitin ligase の一つである (Mahoney, J. A. et al, 2002)。我々は細胞内での選択的な蛋白質の分解経路である ubiquitin-proteasome system がメチル水銀毒性発現に深く関わっていることを見出していることから、UBE4B が関わる ubiquitin-proteasome system がメチル水銀毒性増強に関与している可能性が考えられる。したがって、UBE4B によって認識され、分解をうける蛋白質の中にはメチル水銀毒性を軽減させる蛋白質が存在し、その蛋白質を同定することによってメチル水銀による毒性発現機構が明らかになるものと思われる。また、ATF3

(Kool, J. et al, 2003 ; Zhang, C. et al, 2001) および UTF1 (Fukushima, A. et al, 1998) は様々なストレス応答に応答する転写因子であり、両転写因子によるメチル水銀に対する応答機構はメチル水銀毒性発現機構の解明において重要な手がかりを提供するものである。本研究はメチル水銀感受性に影響を与えるヒト遺伝子のスクリーニングとしてはじめて行われたものであり、本研究で樹立される遺伝子スクリーニング法は様々な薬毒物感受性に関わる遺伝子スクリーニング法として広く活用されることが期待される。

D. 参考文献

Fukushima, A., Okuda, A., Nishimoto, M., Seki, N., Hori, T. A., and Muramatsu, M. (1998) Characterization of functional domains of an embryonic stem cell coactivator UTF1 which are conserved and essential for potentiation of ATF-2 activity. *J Biol Chem* 273, 25840-25849.

Kittler R., Putz G., Pelletier L., Poser I., Heninger A.K., Drechsel D., Fischer S., Konstantinova I., Habermann B., Grabner H., Yaspo M.L., Himmelbauer H., Korn B.,

Neugebauer K., Pisabarro M.T. and Buchholz F. (2004) An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* 432, 1036-40.

Kool, J., Hamdi, M., Cornelissen-Steijger, P., van der Eb, A. J., Terleth, C., and van Dam, H. (2003) Induction of ATF3 by ionizing radiation is mediated via a signaling pathway that includes ATM, Nibrin1, stress-induced MAPkinases and ATF-2. *Oncogene* 22, 4235-4242.

Mahoney, J. A., Odin, J. A., White, S. M., Shaffer, D., Koff, A., Casciola-Rosen, L., and Rosen, A. (2002) The human homologue of the yeast polyubiquitination factor Ufd2p is cleaved by caspase 6 and granzyme B during apoptosis. *Biochem J* 361, 587-595.

Zhang, C., Kawauchi, J., Adachi, M. T., Hashimoto, Y., Oshiro, S., Aso, T., and Kitajima, S. (2001) Activation of JNK and transcriptional repressor ATF3/LRF1 through the

IRE1/TRAF2 pathway is implicated in human vascular endothelial cell death by homocysteine. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 718-724.

E. 研究発表

1. 論文発表

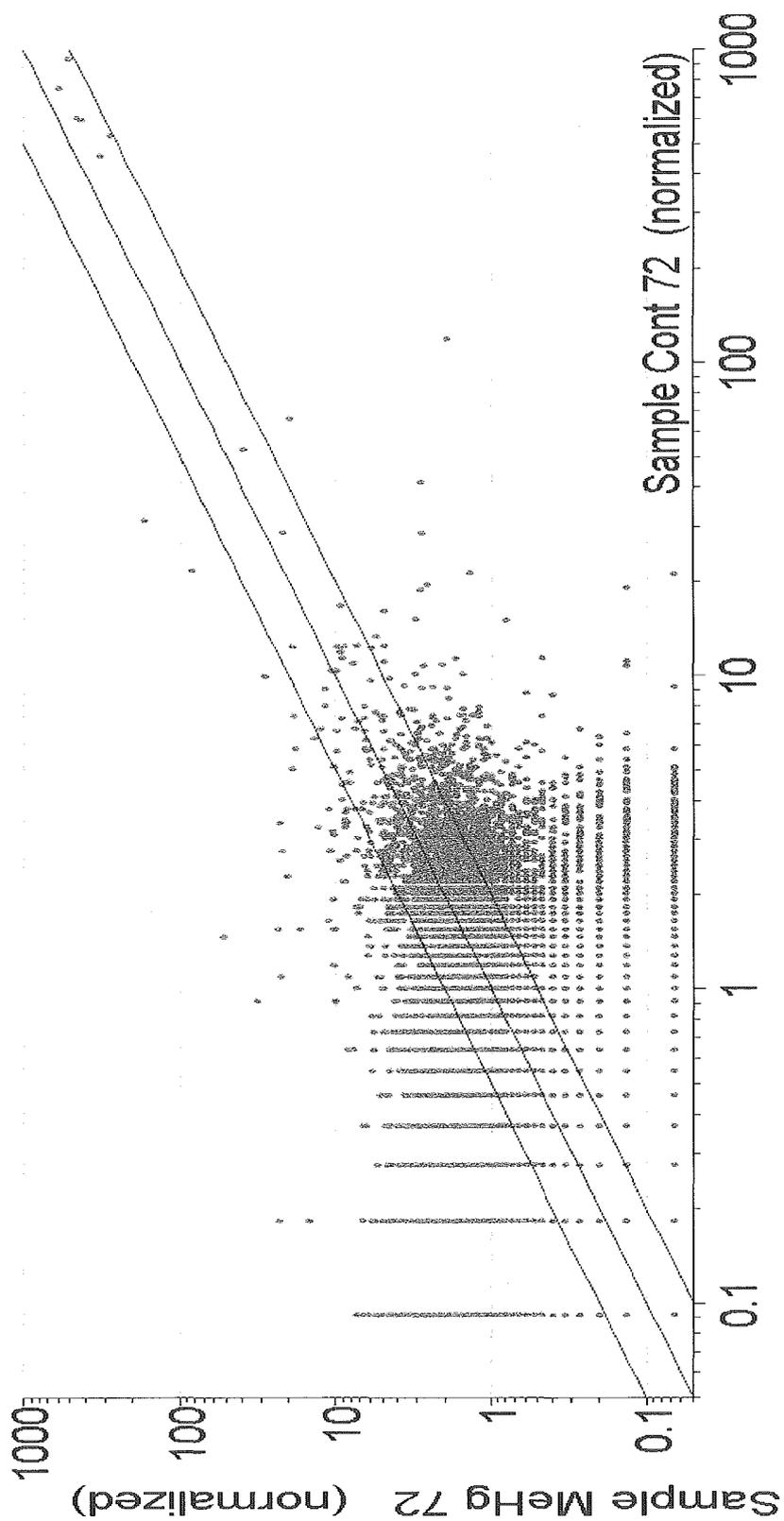
なし。

2. 学会発表

なし。

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



X-axis: Affymetrix Experiment (Default Interpretation) : Sample Cont 72
 Y-axis: Affymetrix Experiment (Default Interpretation) : Sample MeHg 72
 Gene List: all genes (8793)

Fig. 1 72時間メチル水銀処理した細胞の scatter plot analysis