

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 永沼 章

平成19(2007)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化学物質に対する感受性決定因子の網羅的検索 (1)	9
黄 基旭、永沼 章	
2. siRNAライブラリーを用いた化学物質に対する感受性決定因子の網羅的検索 (2)	41
黄 基旭	
3. cDNAライブラリーを用いた化学物質に対する感受性決定因子検索方法の樹立	57
永沼 章	
4. ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強機構の解析	71
黄 基旭	
5. PIGBノックダウンによるメチル水銀耐性獲得機構の解析	103
黄 基旭	
6. Slg1欠損が酵母に与える亜ヒ酸高感受性機構の解析	129
黄 基旭、久下周佐	
7. Ak11の高発現が酵母に与えるアドリアマイシン耐性機構の解析	153
久下周佐	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	167
IV. 研究成果の刊行物・印刷物	169

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、ヒトのほぼ全遺伝子に対応するsiRNAライブラリーを293細胞に導入して、ノックダウンすることによってメチル水銀に対する293細胞の感受性に影響を与える遺伝子群を検索し、PIGBを含むいくつかの遺伝子を同定した。GPIアンカー合成に関わるPIGBはノックダウンによって293細胞をメチル水銀耐性にしたが、機構解析の結果、GPIアンカーの合成の抑制がメチル水銀毒性軽減に関与していることが初めて示唆され、初期のGPIアンカーの形成に関わるセラミドがメチル水銀毒性を増強することも明らかとなった。また、昨年度の検索で同定されたピルビン酸合成に関わる酵素Eno2についても機構解析を引き続き行い、ミトコンドリア電子伝達系に関わる因子の中でRip1が電子伝達系とは別の機構でメチル水銀毒性を増強させることが判明し、さらにメチル水銀がピルビン酸のミトコンドリアへの取り込みを促進させることも明らかとなった。一方、FIP-INシステムを用いて高発現によって亜ヒ酸毒性に影響を与える遺伝子の検索も行い、GDP/GTP交換反応抑制因子であるGDI2が293細胞を亜ヒ酸耐性にする遺伝子として同定された。さらに、酵母を用いた遺伝子スクリーニングも実施し、各種のストレスに応答するPkc1-MAPK 経路に関わる因子の多くが欠損によって酵母を亜ヒ酸高感受性にすることも判明した。Pkc1-MAPK 経路の上流に位置する数種の膜受容体の中でストレス感知を担う膜受容体であるSlg1のみが本機構に関わり、亜ヒ酸処理によってSlg1の蛋白質レベルが顕著に減少すること、および酵母Slg1のヒトホモログであるCD43を高発現させたヒト培養細胞が亜ヒ酸に耐性を示すことも明らかとなった。

分担研究者

久下周佐

(東北大学大学院薬学研究科・助教授)

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による遺伝子ノックダウン法を利用した感受性決定遺伝子スクリーニング法の確立:

平成17年度には、ヒト遺伝子のうち機能の判明している約8,500の遺伝子に対応するsiRNAライブラリーをレンチウイルス感染法を用いてヒト胎児腎由来培養細胞

(HEK293細胞)に導入して各遺伝子をそれぞれノックダウンするという方法で、化学物質感受性に影響を与える遺伝子の基本的なスクリーニング法を確立した。また、平成18年度には更に本法を改良し、ヒトの全遺伝子をほとんど網羅する約50,000の遺伝子をそれぞれノックダウンさせるスクリーニング法を確立した。しかし、本法は1回のスクリーニングにかかる費用が400万円と高額であることが問題となる。そこで、より低費用で実施可能なシステムの構築も行った。

(2) 高発現す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検索法の確立:

遺伝子を安定発現させることが可能なFIP-INシステムを利用してヒトcDNAライブラリーをヒト由来培養細胞中に高発現させ、この細胞群を用いて高発現によって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。本法を用いた検索によって、GDP/GTP交換反応抑制因子であるGDI2がHEK293細胞を亜ヒ酸耐性にする遺伝子として同定された。

(3) 化学物質に対する感受性決定に関わる遺伝子群の検索・同定:

上述のsiRNA法を用いた検索等により、メチル水銀および亜ヒ酸に対するHEK293細胞の感受性に影響を与える遺伝子候補が多数見出された。そのなかで、GPIアンカー合成に関わるPIGBおよびピルビン酸合成に関わるENO2などの遺伝子がノックダウンによってHEK293細胞にメチル水銀耐性を与えることをこれまでに確認しており、残りの遺伝子のノックダウンがメチル水銀および亜ヒ酸感受性に与える影響についても、現在、個々の遺伝子について再確認中である。さらに今後は、カドミウムやパラコートについても検討する予定である。一方、欠損することによって化学物質感受性に影響を与える遺伝子の酵母を用いた効率の良い検索法も確立し、ヒ素に対する感受性に影響を与える遺伝子を142種同定し、それら全ての遺伝子の欠損がそれぞれ間違いなく感受性に影響を与えることを確認した。

(4) 同定された遺伝子群の作用機構解析

(4) - 1. Eno2ノックダウンによるメチル水銀耐性獲得機構の解析:

siRNAライブラリーを用いた検索によって、ピルビン酸合成に関わる酵素Eno2のノックダウンがヒト培養細胞をメチル水銀耐性にすることが判明した。そこで、昨年度に引き続き、メチル水銀毒性とピルビン酸との関係を検討した。本年度はまず、ミトコンドリア中ピルビン酸濃度とメチル水

銀毒性との関係を検討し、培地中にピルビン酸を添加してもミトコンドリア中のピルビン酸レベルは有意な変動を示さないが、メチル水銀処理によってそのレベルが増加することを見出した。メチル水銀がミトコンドリア中でのピルビン酸代謝を抑制することによってミトコンドリア中のピルビン酸レベルを増加させている可能性も考えられたが、ピルビン酸をアセチル CoA に変換する pyruvate dehydrogenase の活性にはメチル水銀はほとんど有意な影響を与えなかった。ミトコンドリアの電子伝達系に関わる様々な因子の欠損がメチル水銀感受性に与える影響を検討したところ、complex III の構成因子の 1 つである Rip1 のみが欠損によって酵母をメチル水銀耐性にした。Rip1 欠損酵母では、野生型酵母で認められるピルビン酸によるメチル水銀毒性増強がほとんど認められないことから、ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強に Rip1 が強く関わっていると考えられる。

(4) - 2. PIGB ノックダウンによるメチル水銀耐性獲得機構の解析：

PIGB (phosphatidylinositol glycan class B) のノックダウンがヒト由来 HEK293 細胞をメチル水銀耐性にすることが判明したことから、PIGB とメチル水銀毒性との関係を検討した。PIGB は、ある種の蛋白質が細胞膜などに結合するために必要な GPI アンカーを小胞体膜上で合成する酵素の一つである。PIGB と同様に GPI アンカーの合成に関わる因子である PIGV の siRNA を導入した細胞を作製したところ、PIGB

siRNA 導入細胞と同様に对照細胞に比べて高いメチル水銀耐性が認められ、GPI アンカーの合成の抑制がメチル水銀毒性軽減に関与していることが初めて示唆された。また、初期の GPI アンカーの形成に関わる ceramide を培地中に添加しても、HEK293 細胞のメチル水銀感受性はほとんど影響を受けなかったが、神経芽細胞腫由来の SH-SY5Y 細胞に添加したところ、細胞毒性を示さない濃度の ceramide 存在下でメチル水銀毒性の増強が認められた。Ceramide の添加は、神経細胞特異的に GPI アンカーの合成を亢進させてメチル水銀毒性を増強する可能性が考えられる。

(4) - 3. Slg1 欠損が酵母に与える亜ヒ酸高感受性機構の解析：

酵母は遺伝子工学的研究を比較的容易に、かつ、確実に行うことができ、遺伝子の多くがヒト遺伝子と共通した機能を有することなどから、ヒトと同じ真核生物のモデルとして生物学的研究に汎用されている。酵母を用いたスクリーニングによって細胞骨格の機能や制御に関与する遺伝子の欠損が酵母を亜ヒ酸高感受性にすることが判明した。酵母には各種のストレスに応答して細胞骨格の制御を行う Pkc1-MAPK 経路が存在するが、この経路に関与する遺伝子の多くも欠損によって酵母を亜ヒ酸高感受性にした。そこで、Pkc1-MAPK 経路の上流に位置する数種の膜受容体について検討したところ、ストレス感知を担う膜受容体である Slg1 の欠損が酵母を亜ヒ酸高感受性にし、逆に高発現は亜ヒ酸耐性にするこ

が判明した。Slg1 の構造中で C 末領域が高発現による亜ヒ酸耐性に必要であり、この領域に結合する下流因子である Rom2 の欠損も酵母を亜ヒ酸高感受性にする事が明らかとなった。また、亜ヒ酸処理によって Sgl1 の蛋白質レベルが顕著に減少することも判明し、この現象が亜ヒ酸毒性の増強に関わることが示唆された。さらに、酵母 Sgl1 のヒトホモログである CD43 を高発現させたヒト培養細胞が亜ヒ酸に耐性を示すことも明らかとなった。

(4) -4. Akl1 の高発現が酵母に与えるアドリアマイシン耐性機構の解析：

17 年度の検討によって、エンドサイトーシスに関わるいくつかの因子の欠損が酵母をアドリアマイシンに対して高感受性にする事が判明した。また、以前の我々の検討において、高発現によって酵母にアドリアマイシン耐性を与える遺伝子として *AKL1* が同定されている。Akl1 はその機能についての報告はほとんどないが、配列上の特徴からエンドサイトーシスなどの制御に関与する Ark/Prk kinase family の一つと考えられている。そこで、Akl1 とアドリアマイシン感受性との関係を検討した。Ark/Prk kinase family (Ark1, Prk1 および Akl1) の中では Akl1 以外に、Prk1 が高発現によって酵母にアドリアマイシン耐性を与えた。Prk1 はエンドサイトーシスに関わる Sla1/Pan1/End3 complex 中の Sla1 および Pan1 をリン酸化して本 complex の解離を促すことが知られている。本研究によって、Akl1 が、Prk1 と同様に、

Sla1/Pan1/End3 complex 中の Pan1 のリン酸化を促進し、細胞のエンドサイトーシス能の低下を引き起こすことが判明した。また、Sla1 または End3 を欠損させた酵母もそれぞれアドリアマイシン耐性を示し、両欠損酵母に Akl1 を高発現させてもアドリアマイシン耐性度の上昇は認められなかった。したがって、Akl1 は Pan1 をリン酸化することによって Sla1/Pan1/End3 complex が関与する細胞のエンドサイトーシス能を低下させることでアドリアマイシン毒性を軽減していると考えられる。また、ヒト Ark/Prk kinase family の一員である AAK1 を高発現させた HEK293 細胞がアドリアマイシン耐性を示すことも判明した。以上の結果からエンドサイトーシスが酵母細胞およびヒト細胞におけるアドリアマイシンの毒性発現に関与していると考えられる。

D. 結論

新しい高効率の感受性決定遺伝子検索法が確立され、これによって多くの化学物質感受性決定遺伝子を同定することに成功した。本知見は、今後の化学物質感受性決定因子に関する研究の発展に大きく寄与す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, A ubiquitin-proteasome

system as a factor that determine the sensitivity to methylmercury, *Yakugaku Zasshi* 2007; 127: 463-468.

Kimura A, Ohashi K, Naganuma A, Cisplatin upregulates *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in iron homeostasis through activation of the iron insufficiency-responsive transcription factor Aft1, *J Cell Physiol* 2007; 210: 378-384.

Takahashi T, Furuchi T, Naganuma A, Endocytic Ark/Prk kinases play a critical role in adriamycin resistance in both yeast and mammalian cells, *Cancer Res* 2006; 66: 11932-11937.

Miura N, Kanayama Y, Nagai W, et al., Characterization of an immortalized hepatic stellate cell line established from metallothionein-null mice, *J Toxicol Sci* 2006; 31: 391-398.

Kita K, Miura N, Yoshida M, et al., Potential effect on cellular response to cadmium of a single-nucleotide A → G polymorphism in the promoter of the human gene for metallothionein IIA, *Hum Genet* 2006; 120: 553-560.

Kimura A, Ohashi K, Yamamoto R, et

al., Cisplatin-induced expression of iron-retaining genes FIT2 and FIT3 in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Toxicol Sci* 2006; 31: 287-290.

Hwang GW, Naganuma A, DNA microarray analysis of transcriptional responses of human neuroblastoma IMR32 cells to methylmercury, *J Toxicol Sci* 2006; 31: 537-538.

Hwang GW, Ishida Y, Naganuma A, Identification of F-box proteins that are involved in resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett* 2006; 580: 6813-6818.

2. 学会発表

高橋 勉、廣瀬健一郎、永沼 章：出芽酵母における脱ユビキチン化酵素とアドリアマイシン毒性との関わり。日本薬学会第127年会, 2007.

李 辰竜、黄 基旭、永沼 章：メチル水銀がミトコンドリア中のピルビン酸レベルに及ぼす影響。日本薬学会第127年会, 2007.

久保田直子、福田隆志、供田 洋、永沼 章、久下周佐：C型肝炎ウイルス粒子形成阻害剤としてのHSP90阻害剤の同定。日本薬学

会第 127 年会, 2007.

久保田直子、久下周佐：C型肝炎ウイルスコア蛋白質の機能阻害物質の探索. 第 54 回 日本ウイルス学会学術集会, 2006.

吉田敦美、久保田直子、久下周佐：HCV コア蛋白質による細胞機能阻害に必要な領域：出芽酵母モデルシステムを用いた解析. 第 54 回 日本ウイルス学会学術集会, 2006.

Hwang GW : A ubiquitin-proteasome system as a determination factor involved in methylmercury toxicity. 2006 Fall Symposium of Korean Society of Toxicology (KSOT) and Korean environmental Mutagen Society (KEMS), 2006.

廣瀬健一郎、高橋 勉、永沼 章：酵母プロテインホスファターゼ Ptc1 欠損によるアドリアマイシン毒性増強機構におけるリボソーム蛋白質 Rpl12a および Rpl12b の関与. フォーラム 2006；衛生薬学・環境トキシコロジー, 2006.

丹羽 貴子、黄 基旭、永沼 章：ヒ素耐性因子 Slg1 の作用機構解析. フォーラム 2006；衛生薬学・環境トキシコロジー, 2006.

李 辰竜、黄 基旭、永沼 章：ミトコンドリア内ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強機構. フォーラム 2006；衛生薬学・環

境トキシコロジー, 2006.

林 達也、黄 基旭、永沼 章：メチル水銀毒性に関わるヒト遺伝子の siRNA ライブラリーを用いた検索とその作用機構. フォーラム 2006；衛生薬学・環境トキシコロジー, 2006.

高橋 勉、永沼 章：Akr/Prk kinases family 高発現によるドキシソルピシン耐性. 第 65 回 日本癌学会学術総会, 2006.

松尾拓洋、黄 基旭、中島晶子、永沼 章；酵母のカドミウム感受性に影響を与える因子の同定. 第 45 回日本薬学会東北支部大会, 2006

李 辰竜、黄 基旭、永沼 章；ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強における Rip1 の役割. 第 45 回日本薬学会東北支部大会, 2006

廣瀬健一郎、高橋 勉、永沼 章：酵母プロテインホスファターゼ Ptc1 欠損によるアドリアマイシン毒性増強機構の解析. 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2006.

丹羽貴子、黄 基旭、大橋一晶、永沼 章：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. 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2006.

黄 基旭、村井康高、永沼 章：出芽酵母 2006.

でのメチル水銀毒性発現におけるエンドソ
ーム内への蛋白質取り込みシステムの役割.
第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会,

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（科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種々の化学物質に対する
感受性決定因子の網羅的検索（1）

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種々の化学物質に対する感受性決定因子の検索を行うために、HEK293 細胞に siRNA ライブラリーを導入し、ノックダウンされることで細胞のメチル水銀およびカドミウム感受性に影響を与える遺伝子群のスクリーニングを行った。その結果、メチル水銀感受性に影響を与える新たな因子として 17 種 (PRKAA1、FLJ13570、SHB、ITCH、RP11-447L10、GINS、IMAGE; 4826992、DKFZp434B1023、Plexin D1、RMRP、SIX3、FRMD6、RP11-473N2、RP11-100、PAPLN、TRUB1、462G18)、また、カドミウム感受性に影響を与える因子として 6 種 (JOSD3、SOCS1、LRRTM4、MGC11102、GBA2 および ASNSD1) を同定することに成功した。しかし、本実験系ではメチル水銀やカドミウム処理とは関係なくそのシグナル強度が変動する遺伝子も多く見られたことから、ヒト全遺伝子のノックダウンによる化学物質に関する感受性の変動を網羅的、かつ、効率的にスクリーニングするためには、更なる実験系の改善が必要である。

A. 研究目的

昨年は siRNA ライブラリー 8.5K (ヒト遺伝子の約 8,500 種) ウイルスの感染効率が他の細胞に比べ高かった HEK293 細胞を用いて、ノックダウンさせ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が、各遺伝子に対するシグナル強度が低く、メチル水銀処

理とは関係なくその強度が変動する遺伝子も見られたことから、ヒト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改善が必要であった。そこで本年度は、ヒト全遺伝子に対する siRNA がプールされている 50K ライブラリー (ヒト遺伝子転写産物の約 50,000 種) を HEK293 細胞へ導入し、メチル水銀およびカド

ミウム感受性に影響を与える因子を網羅的にスクリーニングした。

B. 実験方法

1. HEK293 細胞への siRNA ライブラリーウイルスの導入

HEK293 細胞を 2×10^6 cells となるように 10 cm plate 5 枚に細胞を播き、 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 存在下で 24 時間培養後、ウイルス液を含む 4×10^6 ifu/600 ml D'MEM/3%FBS を plate 5 枚に添加し、ウイルスを細胞全体へ行き渡らす操作を 10 分おき 1 時間行い、polybrene を含む D'MEM/3%FBS 培地 4.4 ml/plate を添加し (6 mg/ml)、 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 存在下で 12 時間培養した。培養後、新しい D'MEM/3 %FBS に交換して 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 存在下で 60 時間培養した。

2. メチル水銀またはカドミウムで処理した HEK293 細胞から総 RNA の抽出

1 で得られた細胞をトリプシンで細胞をはがし、 5×10^6 cells となるように 21 枚の 10 cm plate に播き、 37°C , $5\% \text{CO}_2$ D'MEM/10%FBS 存在下で 24 時間培養し、培地 (D'MEM/10%FBS) を交換した。そして 100 ml ずつ薬物添加 (Control, 塩化メチル水銀 3 μM , 6 μM または塩化カドミウム 20 μM 各

7 枚ずつ) し、 37°C , $5\% \text{CO}_2$ D'MEM/10%FBS 存在下で 48 時間培養後、PBS で洗浄し、TRIzol Reagen 1 ml を加えて各薬物添加の種類ごとに細胞を回収した。得られた細胞混合液に 0.2 ml の chloroform を加え、激しく攪拌した後、12,000 xg で 15 min 遠心した。得られた水層に 0.5 ml isopropanol を加えて静置した後に、12,000 xg で 10 min 遠心した。得られた沈殿を 70 % ethanol によりリンスし、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。

3. cDNA の作製

cDNA の作製は Revers transcription Reagent (Takara, Japan) を用いて行った。まず、2 で調整した RNA 5 μg に cDNA synthesis primer (10 μM) を 1 μl 、脱イオン水を加え、全量を 16 μl に統一し、 72°C で 2 min インキュベート後、 42°C まで下げた。そして 10 \times First-Strand Buffer 2 μl , DTT (100 mM) 1 μl , dNTP mix (10 μM) 1 μl を加え、全量を 20 μl にした。そこへ 1 μl の M-MLV Reverse Transcriptase を加え、 42°C で 1 時間インキュベート後、 72°C で 5 min インキュベートし、常温まで冷ました。

4. チップ解析用のプローブ作製

3 で得られた cDNA 5 μ l と First Round PCR Master Mix 95 μ l (脱イオン水 77 μ l, 10 \times titanium Taq PCR buffer 10 μ l, 50 \times dNTP mix 2 μ l, Forward PCR primer (10 μ M) 2 μ l, Reverse PCR primer (10 μ M) 2 μ l, 50 \times Titanium Taq DNA polymerase (2 μ l) を混合し、First Round PCR を行った。PCR の条件は、94 $^{\circ}$ Cで 2 min 行い、94 $^{\circ}$ Cで 30 sec, 68 $^{\circ}$ Cで 1 min を 1 サイクルとして 20 サイクル行い、68 $^{\circ}$ Cで 3 min のステップ後、15 $^{\circ}$ Cを維持した。得られた PCR 産物 1 μ l と Second Round PCR Master Mix 100 μ l(脱イオン水 66 μ l, 10 \times titanium Taq PCR buffer 10 μ l, 50 \times dNTP mix 2 μ l, Nested Reverse PCR primer (10 μ M)10 μ l, Nested Reverse PCR primer (10 μ M) 10 μ l, 50 \times Titanium Taq DNA polymerase (2 μ l)を混合し、second round PCR を行った。PCR の条件は、94 $^{\circ}$ Cで 30 sec, 50 $^{\circ}$ Cで 2 min, 68 $^{\circ}$ Cで 1 min を 1 サイクル後、94 $^{\circ}$ Cで 30 sec, 68 $^{\circ}$ Cで 1 min を 1 サイクルとして 18 サイクル行い、68 $^{\circ}$ Cで 3 min のステップ後、15 $^{\circ}$ Cを維持した。得られた PCR 産物は QIAGEN's QIAquick PCR Purification 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。

5. ハイブリダイゼーション

Affymetrix GeneChip (U133 puls 2) Array にビオチンでラベルされた siRNA の PCR 産物 15 μ g をハイブリダイスさせた。Affymetrix GeneChip の解析は受託した。

6. siRNA 発現プラスミドの作製

各遺伝子の発現を抑制する siRNA のプライマーを 95 $^{\circ}$ Cで 5 分間アニーリングさせ、室温まで放冷した後、T4 PNK を用いてリン酸化させた。リン酸化させた siRNA を pFIV-H1 に ligation ver 2.1.を用いて導入し、得られたプラスミドを大腸菌にトランスフェクションし、24 時間後に大腸菌からプラスミドを plasmid miniprep kit を用いて回収した。使用したプライマーは以下に示した。

PRKAA1 forward :

```
GATCCGtcacgataacttatgagagaagtaa  
agCTTCCTGTCAGActttgcttcttataagt  
tattgtgaTTTTTG
```

PRKAA1 reverse :

```
AATTCAAAAAtcacaataacttataagaga  
agcaaagTCTGACAGGAAGctttacttctc  
cataagttatcgtgaCG
```

SHB forward :

```
GATCCGcagaggagatgccgagagcctgct  
gtgtCTTCCTGTCAGAaccgacgaggttct  
cggcgtctcctctgTTTTTG
```


SHB reverse :

AATTCAAAAAcagaggagacgccgagaa
cctgctgcgtTCTGACAGGAAGacgcagc
aggtctcggcgctcctctgCG

FLJ13570 forward :

GATCCGccttgcttgattgacgactggataC
TTCCTGTCAGAtatctaagttgcaatgcaa
agcaaagTTTTTG

FLJ13570 reverse :

AATTCAAAAActtgcttgcaacttagata
TCTGACAGGAAGtatctaagttgcaatgcaa
gcaaagCG

PAPLN forward :

GATCCGccttctactttgatctctgcaaatCTC
TTCCTGTCAGAAgattgtagaaggtaaa
gtggaaagTTTTTG

PAPLN reverse :

AATTCAAAAActtccacttaacctctacaa
aTCTTCTGACAGGAAGagattgtagaa
ggtaaagtggaagCG

TRUB1 forward :

GATCCGttgttcgcatagtcttgaggtaacctatC
TTCCTGTCAGAAtaggtgccttaagactat
gtgaacaaTTTTTG

TRUB1 reverse :

AATTCAAAAAttgttcacatagtcttaaggca
cctatTCTGACAGGAAGataggtgccttaa
gactatgtgaacaaCG

RP1-268 forward :

GATCCGcattgttggtcttgggtcttctCT
TCCTGTCAGAAgataagaccaagatca
acaacagtgTTTTTG

RP1-268 reverse :

AATTCAAAAcactgttgatcttgggtctta
tctTCTGACAGGAAGagataagaccaag
atcaacaacagtgCG

RP11-100 forward :

GATCCGatggtgacgtgagcttgcattatc
CTTCCTGTCAGAGAAataacatgcaggct
caggtaccaTTTTTG

RP11-100 reverse :

AATTCAAAAAtggtaacctgagcctgcat
gttattcTCTGACAGGAAGgaataacatgc
aggctcaggtaccatCG

FLJ34643 forward :

GATCCGgtttgggagtatatgtgaagagtgag
gCTTCCTGTCAGAcctcgtcttcacatgta
ttcccaaacTTTTTG

FLJ34643 reverse :

AATTCAAAAAgtttgggaatacatgtgaaga
gcgaggTCTGACAGGAAGcctcgtcttca
catgtattcccaaacCG

RP11-67 forward :

GATCCGttgctgcagtagagacgggtggtctg
aCTTCCTGTCAGAtcaggaccaccgtcttt
gctgtagcaaTTTTTG

RP11-67 reverse :

AATTCAAAAAttgctacagcaaagacggtg

gtcctgaTCTGACAGGAAgtcaggaccac
cgctcttgctgtagcaaCG

HEL308 forward :

GATCCGtaagggcaggattaattcctctcgtggCT
TCCTGTCAGAccatgagagggattaattctgcct
ttaTTTTTG

HEL308 reverse :

AATTCAAAAAaaagggcagaattaatccctctcat
ggTCTGACAGGAAgccatgagagggattaatt
ctgcctttaCG

AL137312 forward :

GATCCGgagctcaggaatttgagaccggctc
ggCTTCCTGTCAGAccagactggctcga
attcctgggctcTTTTTG

AL137312 reverse :

AATTCAAAAAgagcccaggaattcgagaccagt
ctggTCTGACAGGAAgcccagaccggctca
attcctgagctcCG

GPR124 forward :

GATCCGttccttgcctccgtgaggcagagga
aCTTCCTGTCAGAttcctctggccttacgga
ggcaaggaaTTTTTG

GPR124 reverse :

AATTCAAAAAttccttgcctccgtaaggccag
aggaaTCTGACAGGAAgtcctctggcctt
acggaggcaaggaaCG

SEZ6L forward :

GATCCGggagcagggactcccgtctggatgt
ctCTTCCTGTCAGAAgacgtccagatgg

gagtcacctgtttcTTTTTG

SEZ6L reverse :

AATTCAAAAAgaacagggactcccatctg
gacgtctTCTGACAGGAAgagacgtccag
atgggagtcacctgtttcCG

ADBRK2 forward :

GATCCGtggtactttgtactgggtgtacggcaCT
TCCTGTCAGAtgtcgtacagcccagtgcaaagt
atcaTTTTTG

ADBRK2 reverse :

AATTCAAAAAtgatactttgactgggctgtacga
caTCTGACAGGAAgtgtcgtacagcccagtg
aaagtatcaCG

RECQL5 forward :

GATCCGggtacgtgggagtggtatcagcagaaa
CTTCCTGTCAGAttctctgggtcccactccc
gtgccTTTTTG

RECQL5 reverse :

AATTCAAAAAggcacatgggagtggtaccagc
agaaaTCTGACAGGAAgtttctgctggtcccac
tcccatgtgccCG

PAPLN forward :

GATCCgatctcttaggacttctgattccttggctTTC
CTGTCAGAAatcaaggaattagaagtcctgagag
aTTTTTTG

PAPLN reverse :

AATTCAAAAAtctctcaggacttctaattccttgat
TCTGACAGGAAgatcaaggaattagaagtcct
gagagatCG

ZF forward :
GATCCGagttctagctcagacagagagtcca
taCTTCCTGTCAGAtatggactttctgtctgg
gctggaacTTTTTTG
ZF reverse :
AATTCAAAAAgttccagcccagacagaaagtc
cataTCTGACAGGAAgtatggactctctgtctga
gctagaactCG

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。

CTD-2299I21

GGUUCUUACCAGUUGUA

UCACCCUGGG

RP11-473N2

UCCCGUAUAUGAGCUCU

GAGACACAAA

GINSub4

GAGAGAUUGCUCACAG

AAGCACAGAG

DKFZp434

GUAAGCCACUGAUUAU

UCCACAUAAU

FRMD6

GCAACAUUGCCUUAUCA

CGCUAGGUUC

SIX3

ACCAUACACACAUACAAG

UCCACACAC

RP11-447L10

UGAGAGGGUGUGGUUCU

UUCCGAUAUG

RP11-498D10

GGAUUCGGUAUGAUCUG

CGAUUUCAGG

4826992

UGGCACUCCAGAGUUGU

UCGUCCCUC

CIT987SK

UAAUGGUAACCUGAGCC

UGCAUGUUAU

RFP2

UGUGUAGAGUUUGCCAU

AUGUAAUUA

462G18

CCAGCUUGAGCAACAGU

GAGAUUCCAU

ZGPAT

CAGGGCCCGCTTGGCAC

TCTTGCTGGC

OAT1

AUUAACCGGGACUGGGC

UAGAGCCUGG

GCDH

GAAGGUACACAUGACAU

UCACGCCUG

DKFZP566F084

AUAACACUGUGGGUAGG

AGACGGGAUA

ZNF264

CAAAGUCAUGGUUCUCU

GGUGGUUUGU

HPD

AGAACAUUGAUGCCCUG

GAGGAGCUGA
MGC11102
AGGGAACAAUCUGCAUG
AGGUGGAGAC
JOSD3
CAAAGAGGGCUUAUGAG
GCUGUGAAAC
GBA2
CCAGAUGAUGAACCAUG
GCUCCGCGUC
ASNSD1
GCAAUGCAAAGGUAGUU
CUCACUGGAA
TMC5
GUGGAAUACAACCAGAG
GUCUCAUCUC
RPS11
CGCCCUCGAAUGGACAC
AUUACCAGUG
LRRM4
GUGCAAAGACUGACUAC
UAAGGCCUUG
FLJ40660
GUGGCAAUAGUAACUGA
ACCUGCAUCA
PSEN2
CAGCUCUACAUCUGAGG
GACAUGGUGU
SOCS1
CGAAGAGGCAGUCGAAG
CUCUCGCGGC
STCOA
GGAGUACGCUAGACUUG

UCUGACCUAG
RBPSUHL
GAAGGUGGUGCAAUUUC
AGGCCUCUCC

8. siRNA 発現プラスミドの導入

リポフェクション法およびエレクトロポレーション法によって導入した。

①リポフェクション法

HEK293 細胞を 5×10^6 cells/2ml/well になるように 6 well plate に Penicillin/Streptomycin (-) 培地で播き、37°C、5%CO₂ 存在下で 24 時間培養した後、Lipofectamine™2000 (Invitrogen) 5 µl を OPTIMEM 125 µl に滴下し、5 分後に siRNA 発現プラスミド 1 µg 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た。発現プラスミドには puromycin 耐性遺伝子が含まれているため、プラスミドの導入は 2 µg/ml の puromycin で処理することにより確認した。

②エレクトロポレーション法

エレクトロポレーション法は Microporator (Digital Bio Technology, Korea) を用いて行った。HEK293 細胞を 5×10^5 cells/tube になるように 1.5 ml tube にとり、960 g, 2 min で遠心し、上清を取り除いた。そして resuspension buffer R 100 µl で懸濁