

D. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

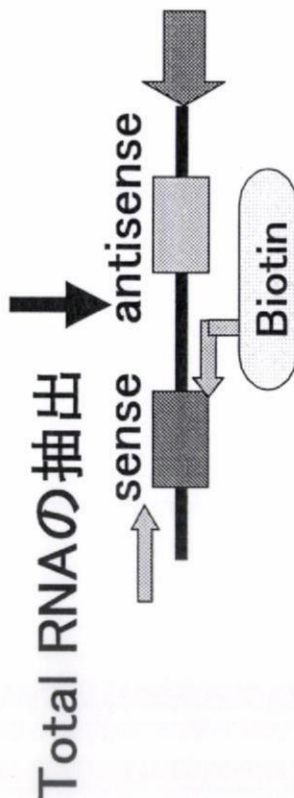
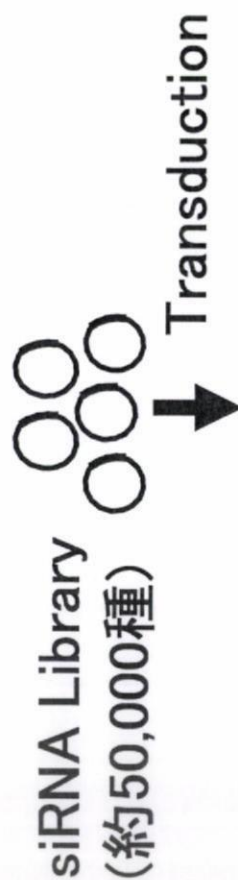
飛田真由美、黄基旭、永沼章：siRNA
ライブラリーを用いたメチル水銀感

受性決定因子の検索．第46回日本薬
学会東北支部大会，2007

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

スクリーニング方法



siRNA塩基配列の増幅

メチル水銀処理した細胞の
シグナル強度



コントロール細胞群のシグナル強度

DNAマイクロアレイ解析

Affymetrix社の
GeneChipへ
ハイブリダイズ

Figure 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検索方法

5×10^6 cellsとなるようにsiRNA導入細胞を21枚の10 cm plateに播いた後、24 時間後に塩化メチル水銀(0.3, 6 μ M 各7枚ずつ)で処理した。48 時間処理した後、塩化メチル水銀を含まない通常の培地に戻し回復培養を行った後、各メチル水銀濃度ごとに生存細胞を回収して総mRNAを抽出し、総RNA中のsiRNA配列のsenseを特異的に認識するprimerを用いて増幅したPCR産物をGene Chipにハイブリダイズさせ、DNAマイクロアレイ解析を行った。

DNAマイクロアレイの結果

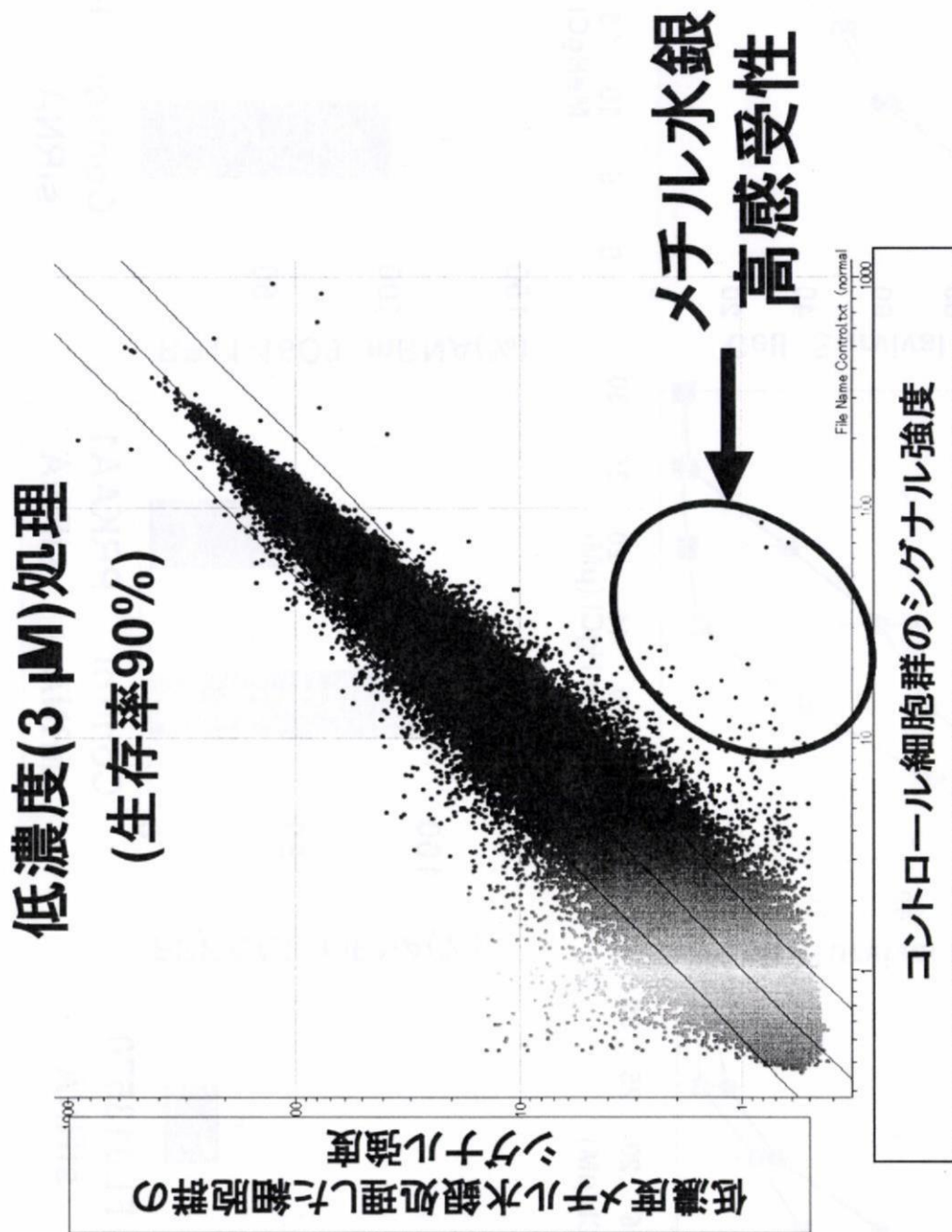
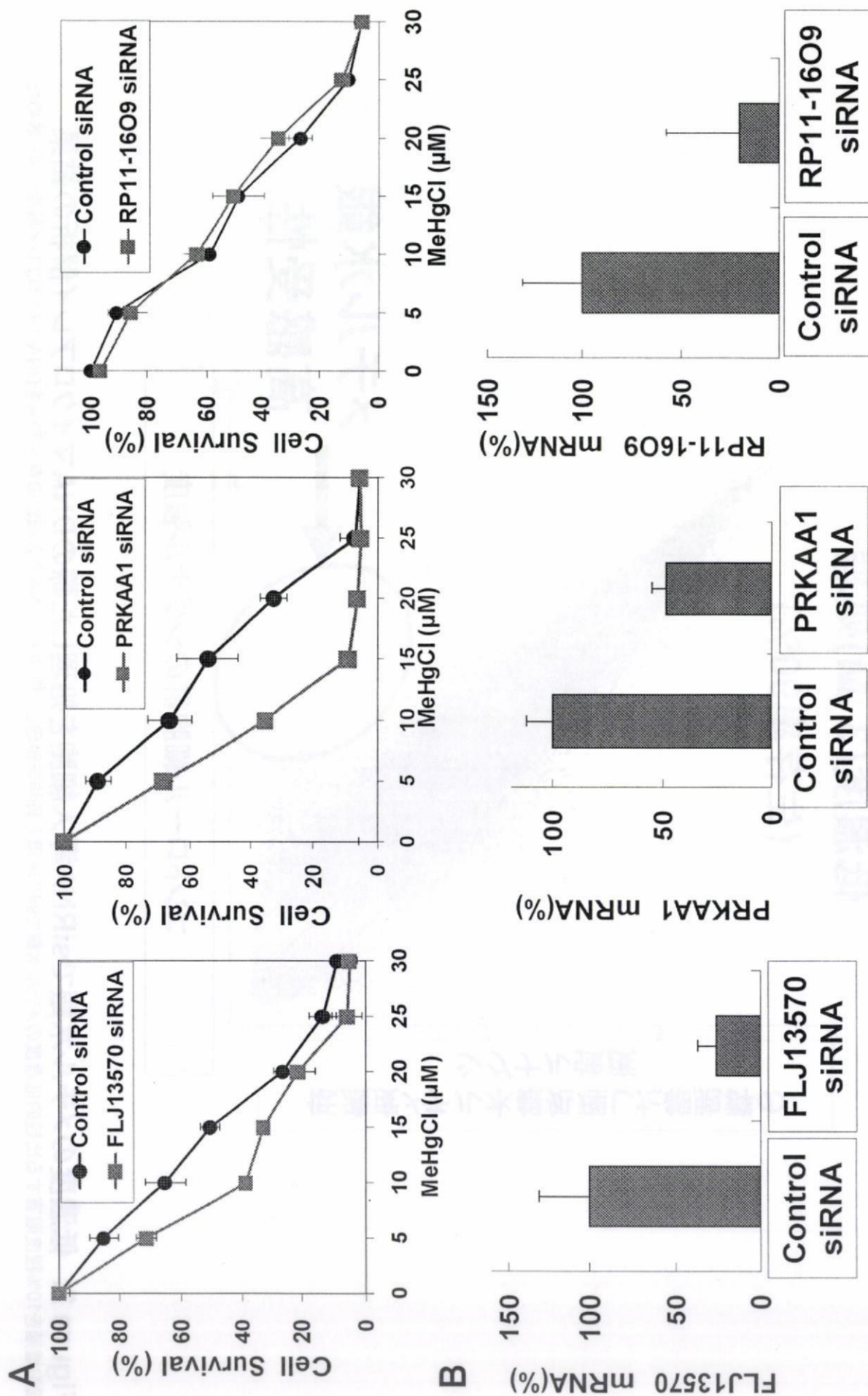


Figure 2. 低濃度のメチル水銀でsiRNA導入細胞を処理した際のDNAマイクロアレイ解析の結果
細胞増殖を10%程度阻害する比較的低濃度のメチル水銀でsiRNA導入細胞を処理した際の各siRNA導入細胞の存在割合をDNAマイクロアレイ解析により求めた。



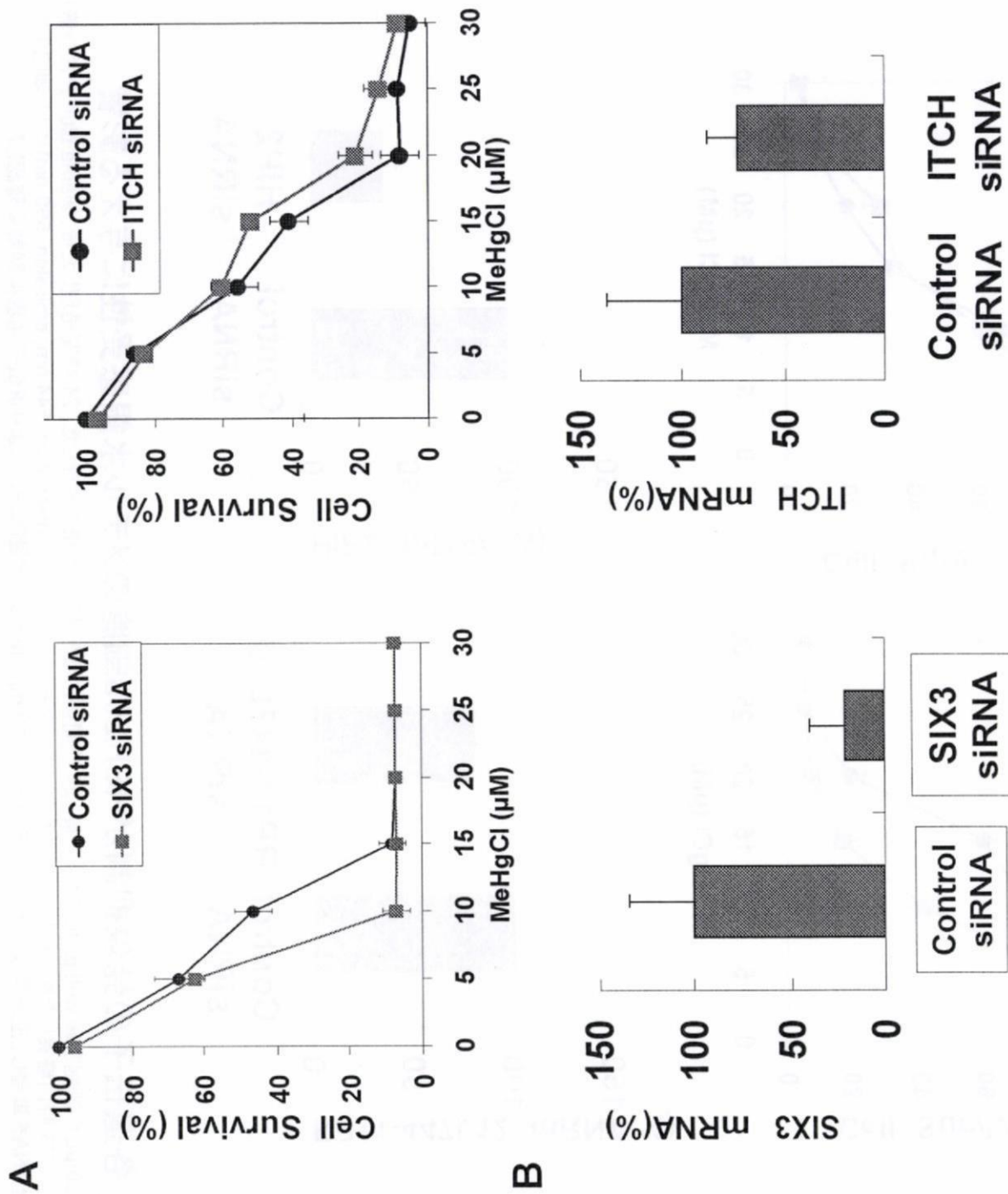
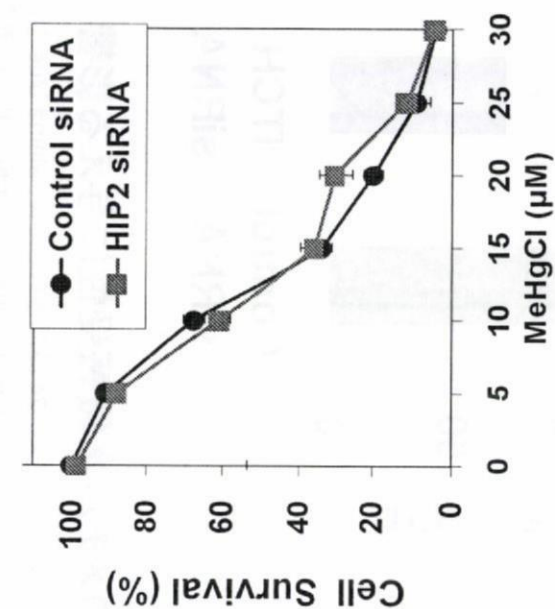


Figure 3-2. 各遺伝子の発現抑制がHEK293細胞のメチル水銀感受性に与える影響

- A) 2×10^4 cells/90 μ L の細胞を96 well plateにまいた後、24 時間後に塩化メチル水銀で処理した。24 時間処理した後、alama blue を含む培地に交換し、37 $^{\circ}$ C、5 % CO_2 存在下で3 時間培養した後、蛍光マイクロプレートリーダーによる蛍光測定(excitation, 544 nm; emission, 590 nm)により細胞生存率を求めた。
- B) 各細胞から全RNAを単離し、逆転写反応を行い、そのcDNAをtemplateとした定量PCR法により遺伝子発現抑制効果を確認した。

A



B

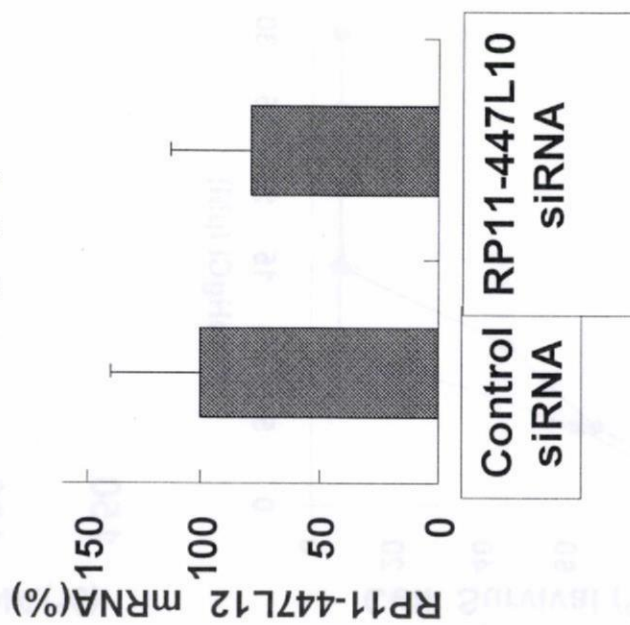


Figure 3-3. 各遺伝子の発現抑制がHEK293細胞のメチル水銀感受性に与える影響

A) 2×10^4 cells/90 μ L の細胞を96 well plateにまいた後、24 時間後に塩化メチル水銀で処理した。24 時間処理した後、alama blue を含む培地に交換し、37 $^{\circ}$ C、5 % CO_2 存在下で3 時間培養した後、蛍光マイクロプレートリーダーによる蛍光測定(excitation, 544 nm; emission, 590 nm)により細胞生存率を求めた。
 B) 各細胞から全RNAを単離し、逆転写反応を行い、そのcDNAをtemplateとした定量PCR法により遺伝子発現抑制効果を確認した。

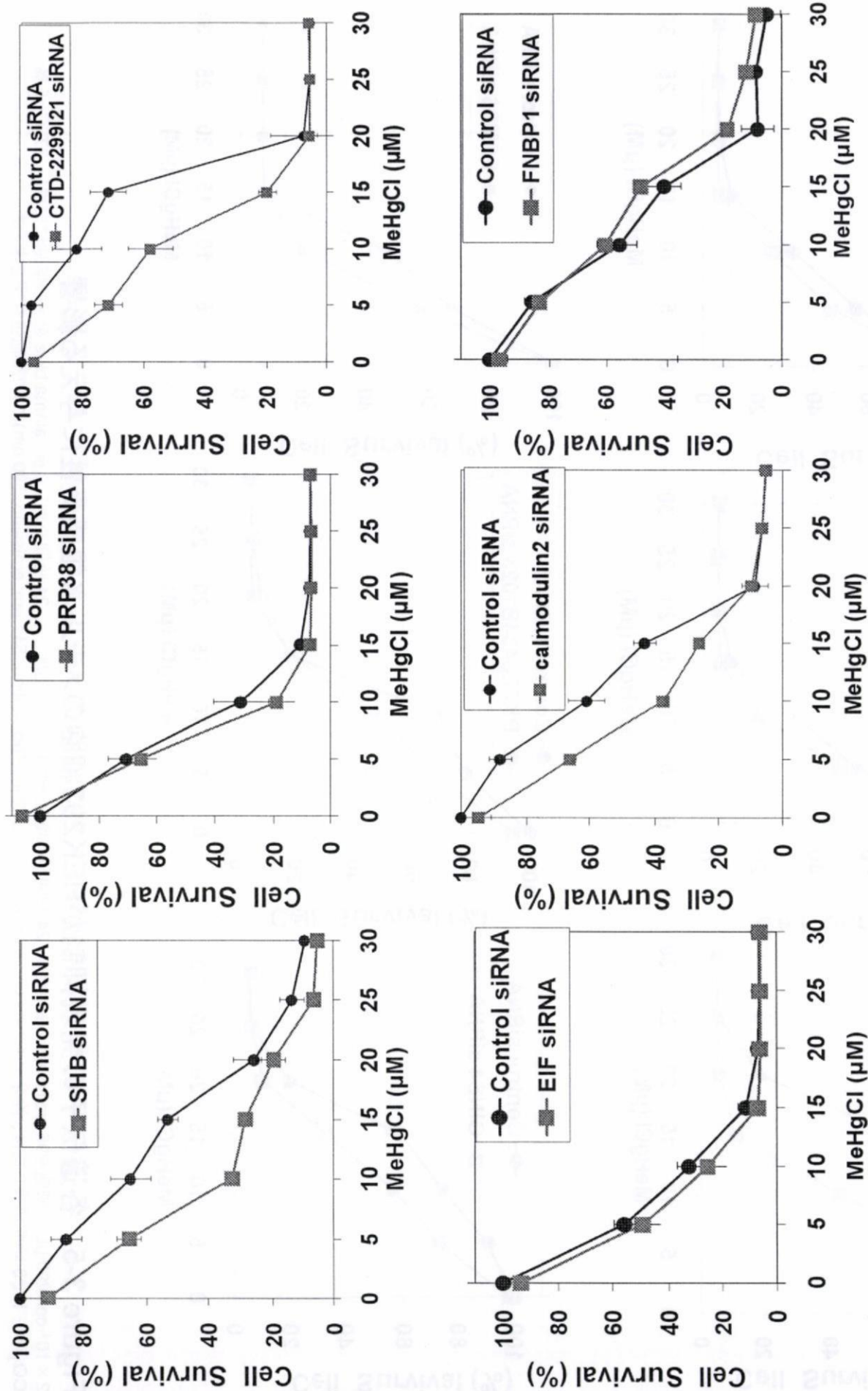


Figure 3-4. 各遺伝子の発現抑制がHEK293細胞のメチル水銀感受性に与える影響

2×10^4 cells/90 μ L の細胞を96 well plate にまいた後、24 時間後に塩化メチル水銀で処理した。24 時間処理した後、alams blue を含む培地に交換し、37 $^{\circ}$ C、5 % CO_2 存在下で3 時間培養した後、蛍光マイクロプレートリーダーによる蛍光測定(excitation, 544 nm; emission, 590 nm)により細胞生存率を求めた。

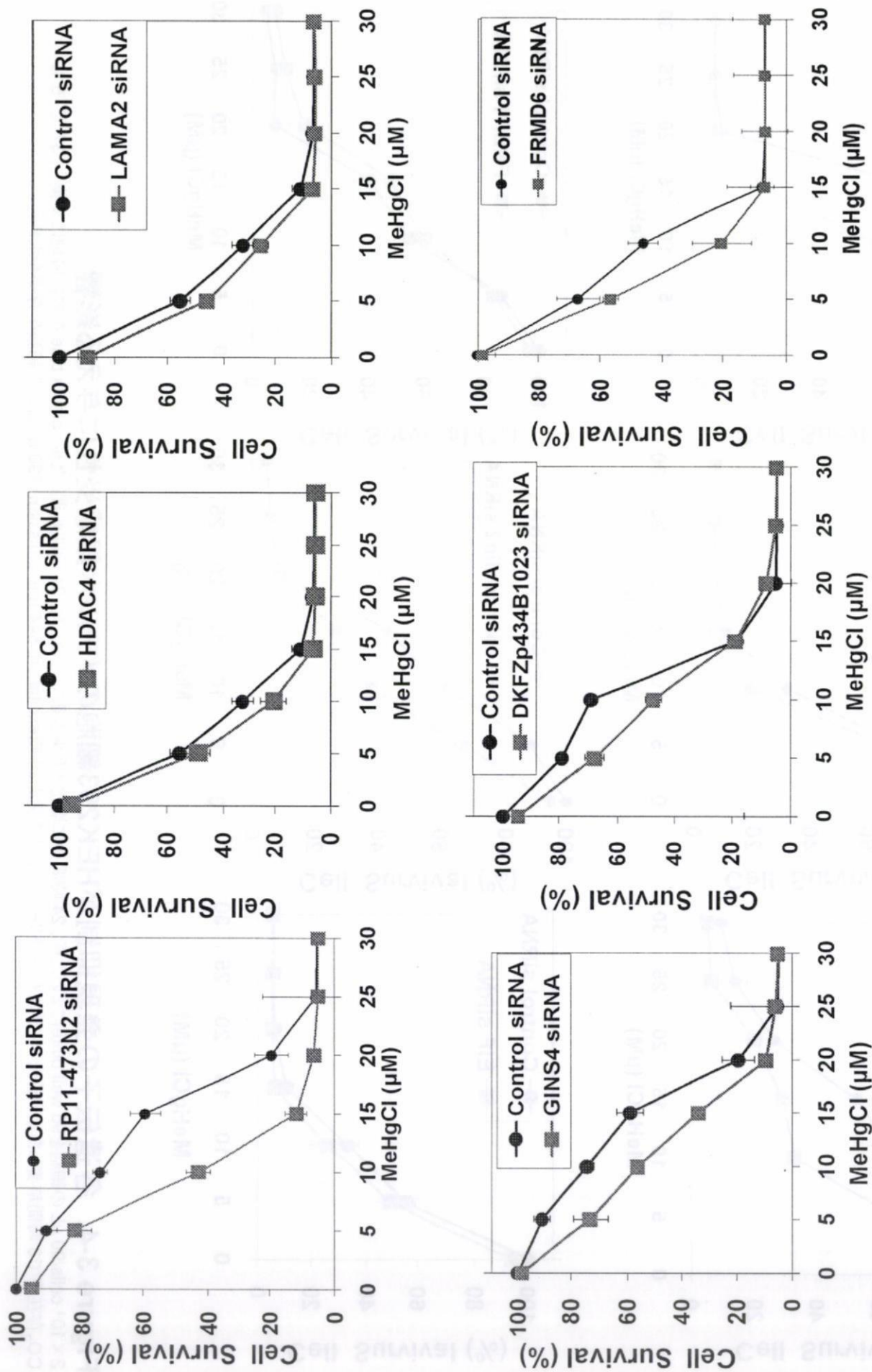


Figure 3-5. 各遺伝子の発現抑制がHEK293細胞のメチル水銀感受性に与える影響

2 × 10⁴ cells/90 μL の細胞を96 well plate の細胞にまいた後、24 時間後に塩化メチル水銀で処理した。24 時間処理した後、alams blue を含む培地に交換し、37 °C、5 % CO₂存在下で3 時間培養した後、蛍光マイクロプレートリーダーによる蛍光測定(excitation, 544 nm; emission, 590 nm)により細胞生存率を求めた。

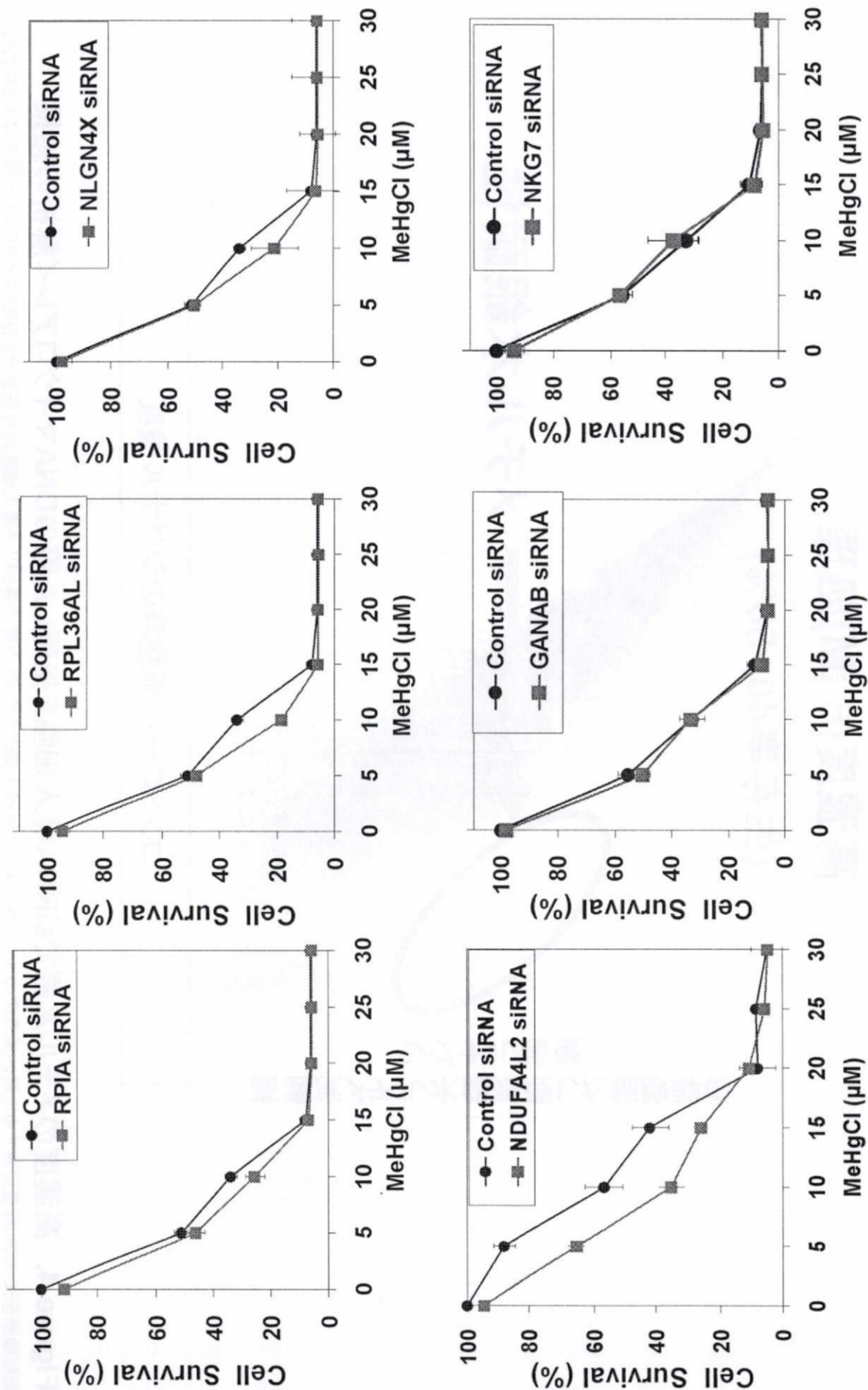


Figure.3-6 各遺伝子の発現抑制がHEK293細胞のメチル水銀感受性に与える影響

2 × 10⁴ cells/90 μL の細胞を96 well plate にまいた後、24 時間後に塩化メチル水銀で処理した。24 時間処理した後、alama blue を含む培地に交換し、37 °C、5 % CO₂ 存在下で3 時間培養した後、蛍光マイクロプレートリーダーによる蛍光測定(excitation, 544 nm; emission, 590 nm)により細胞生存率を求めた。

DNAマイクロアレイの結果

高濃度(6 μ M)処理

(生存率40~50%)

高濃度メチル水銀処理した細胞群の
シグナル強度

メチル水銀耐性

コントロール細胞群のシグナル強度

File Name: Control.txt (normal)

Figure 4. 高濃度のメチル水銀でsiRNA導入細胞を処理した際のDNAマイクロアレイ解析の結果

細胞増殖を50~60%程度阻害する比較的高濃度のメチル水銀でsiRNA導入細胞を処理した際の各siRNA導入細胞の存在割合をDNAマイクロアレイ解析により求めた。

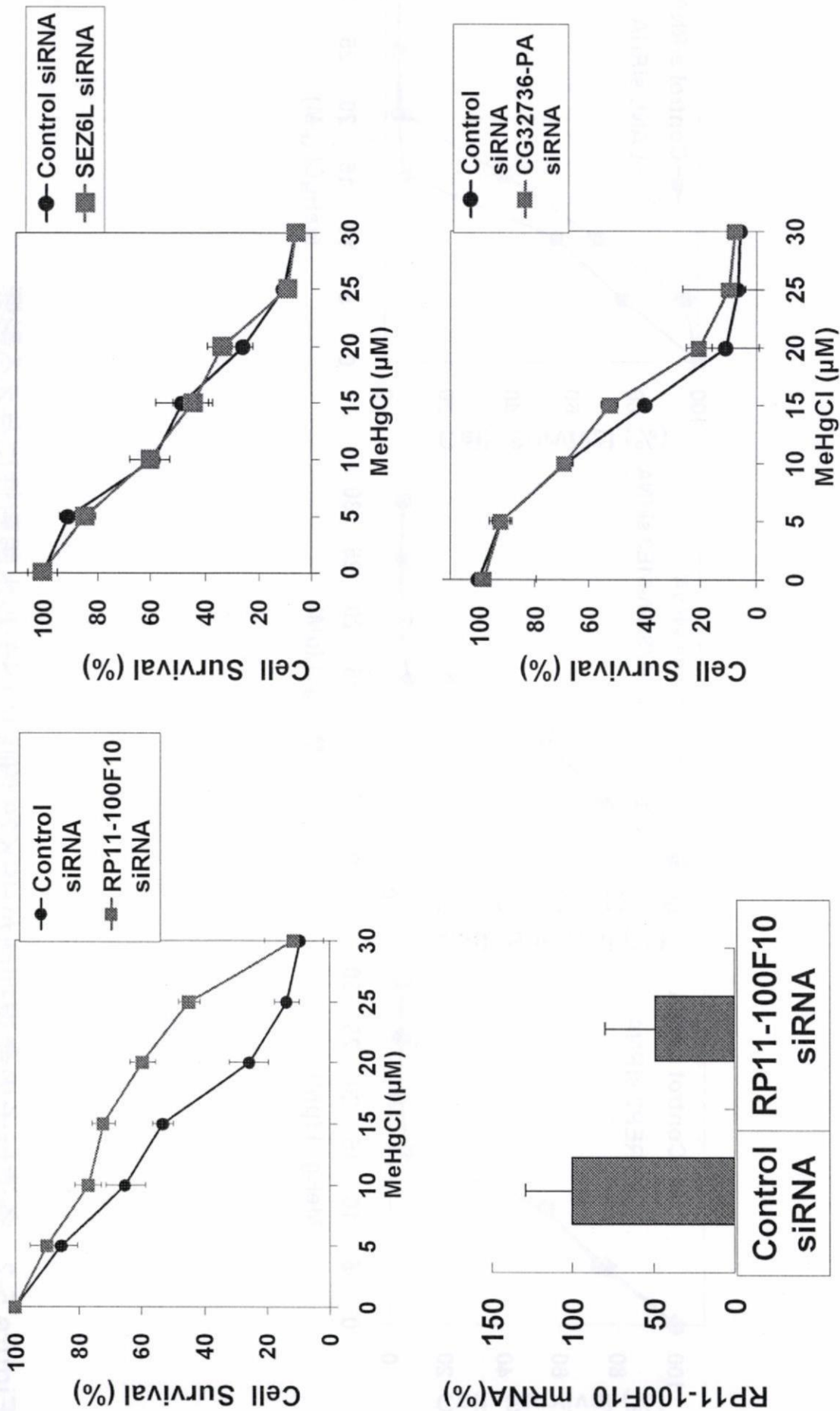


Figure 5-1. 各遺伝子の発現抑制がHEK293細胞のメチル水銀耐性に与える影響

2 × 10⁴ cells/90 μL の細胞を96 well plateにまいた後、24 時間後に塩化メチル水銀で処理した。24 時間処理した後、alams blue を含む培地に交換し、37 °C、5 % CO₂存在下で3 時間培養した後、蛍光マイクロプレートリーダーによる蛍光測定(excitation, 544 nm; emission, 590 nm)により細胞生存率を求めた。また、それらの細胞から全RNAを単離し、逆転写反応を行い、そのcDNAをtemplateとした定量PCR法により遺伝子発現抑制効果を確認した。

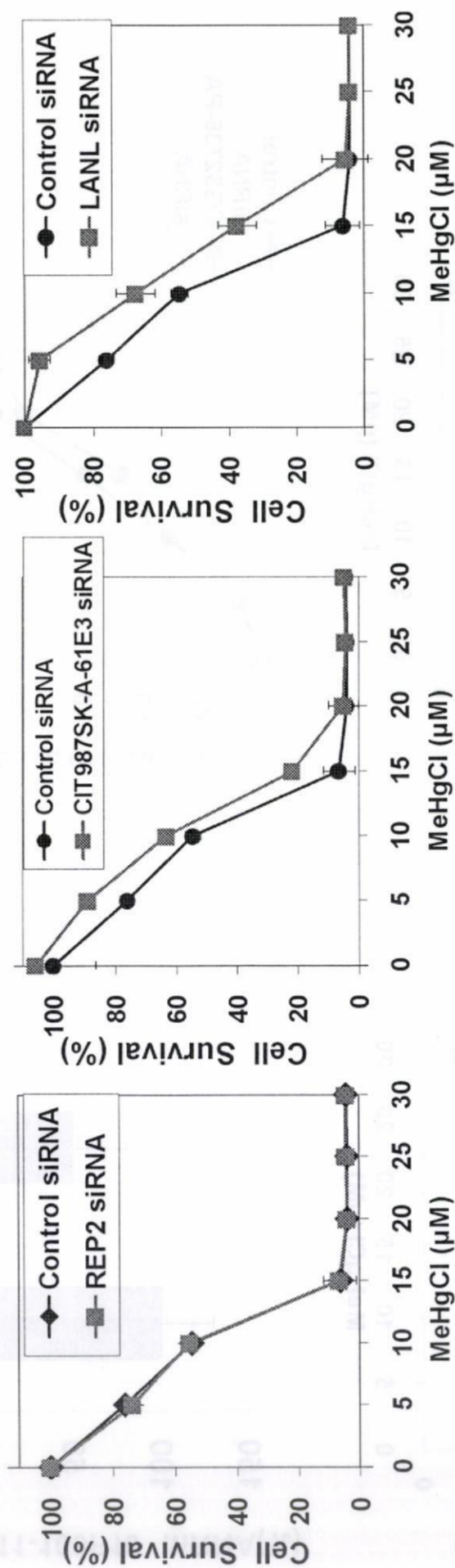


Figure 5-2. 各遺伝子の発現抑制がHEK293細胞のメチル水銀耐性に与える影響

各遺伝子のsiRNAを導入した細胞についてFig.2と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。また、それらの細胞から全RNAを単離し、逆転写反応を行い、そのcDNAをtemplateとした定量PCR法により遺伝子発現抑制効果を確認した。

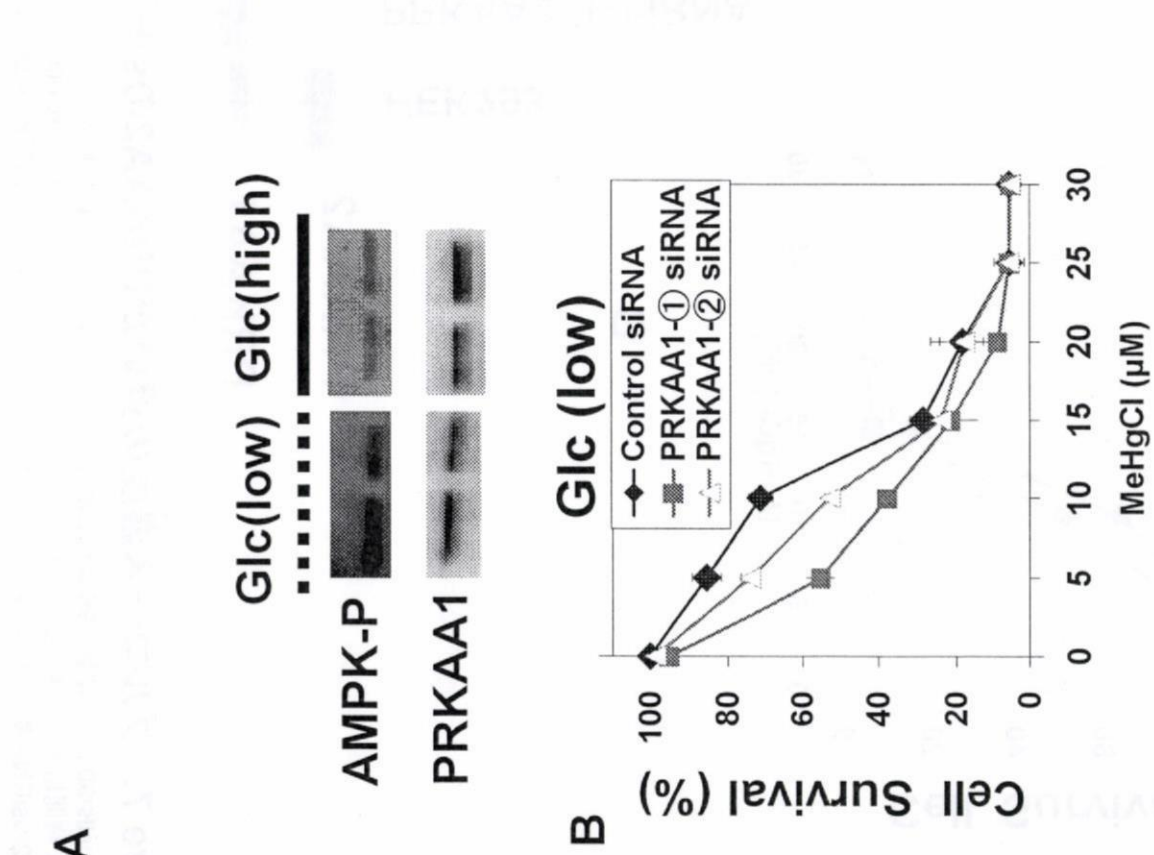
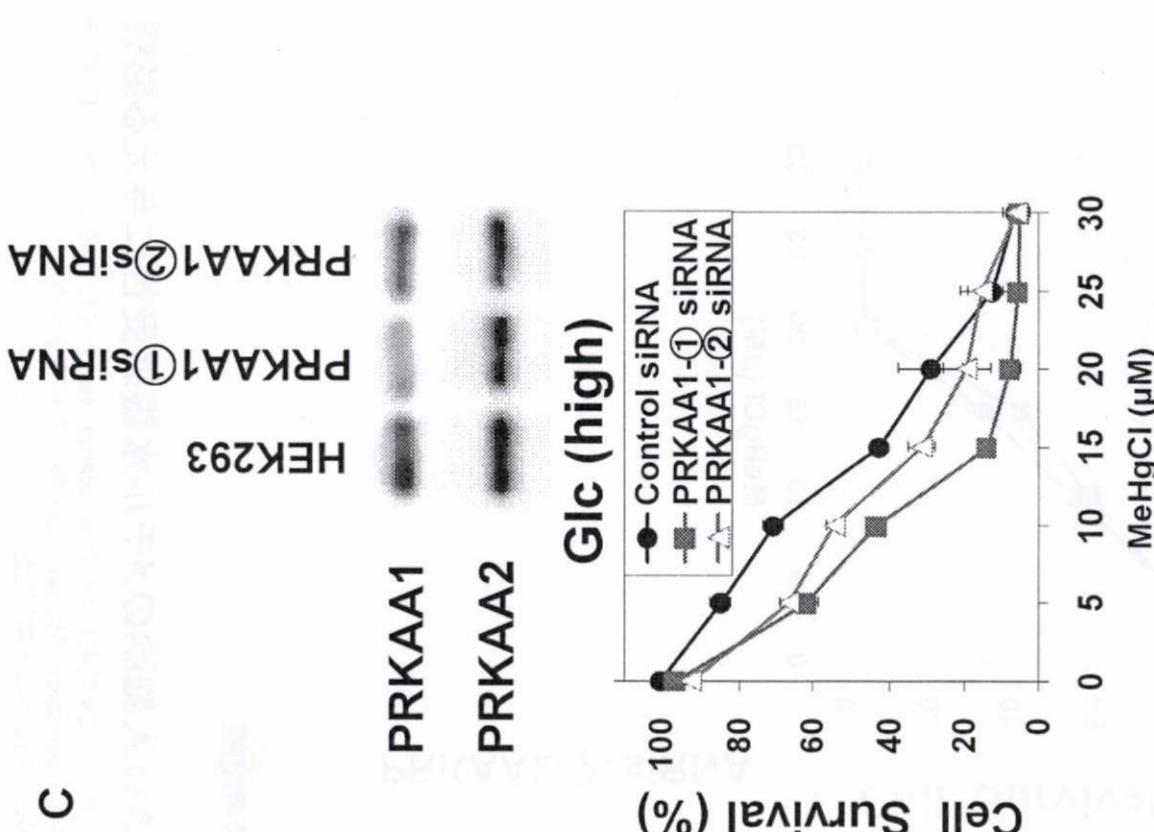


Figure 6. グルコース濃度の違いがPRKAA1のsiRNA導入細胞のメチル水銀感受性に与える影響

A. 1×10^6 cells となるように各濃度 (5.5, 25 mM) のグルコースを含む培地で培養した HEK293 細胞を 6 well plate に播いた後、24 時間後に蛋白質を抽出した。その後、immunoblotting によりリン酸化 AMPK および PRKAA1 レベルを検討した。

B. 2×10^4 cells/90 μ L の細胞を 96 well plate にまいた後、24 時間後に塩化メチル水銀で処理した。24 時間処理した後、alama blue を含む培地に交換し、37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ 存在下で 3 時間培養した後、蛍光マイクロプレートリーダーによる蛍光測定 (excitation, 544 nm; emission, 590 nm) により細胞生存率を求めた。

C. PRKAA1 の siRNA 導入細胞の発現抑制効果を immunoblotting により PRKAA1 および PRKAA2 レベルを検討した。

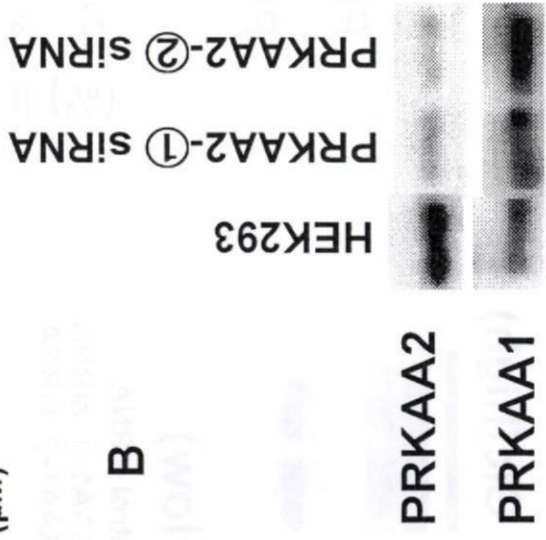
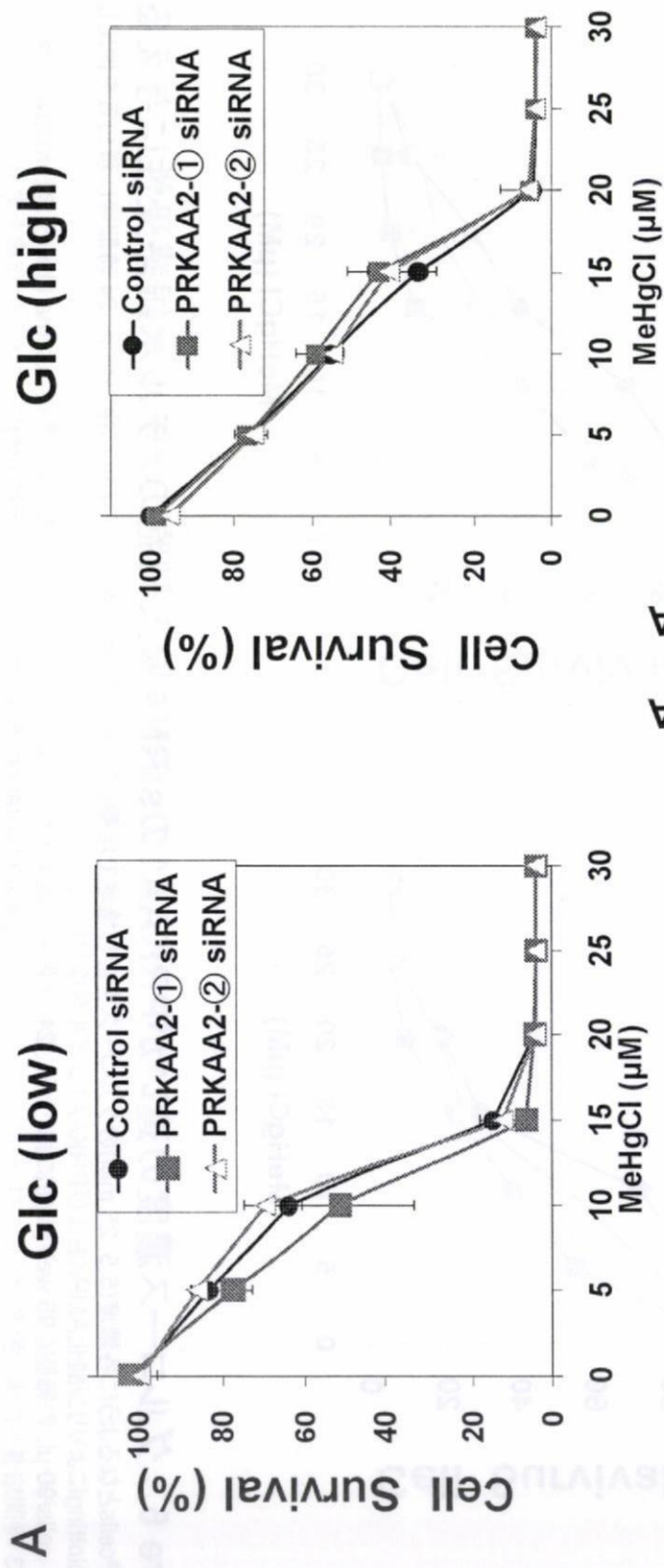


Figure 7. グルコース濃度の違いがPRKAA2のsiRNA導入細胞のメチル水銀感受性に与える影響

A. 2×10^4 cells/90 μ L の細胞を96 well plateにまいた後、24 時間後に塩化メチル水銀で処理した。24 時間処理した後、alama blue を含む培地に交換し、37 $^{\circ}$ C、5 %CO₂ 存在下で3 時間培養した後、蛍光マイクロプレートリーダーによる蛍光測定(excitation, 544 nm; emission, 590 nm)により細胞生存率を求めた。
 B. PRKAA2のsiRNA導入細胞の発現抑制効果をimmunoblottingにより PRKAA2およびPRKAA1レベルを検討した。

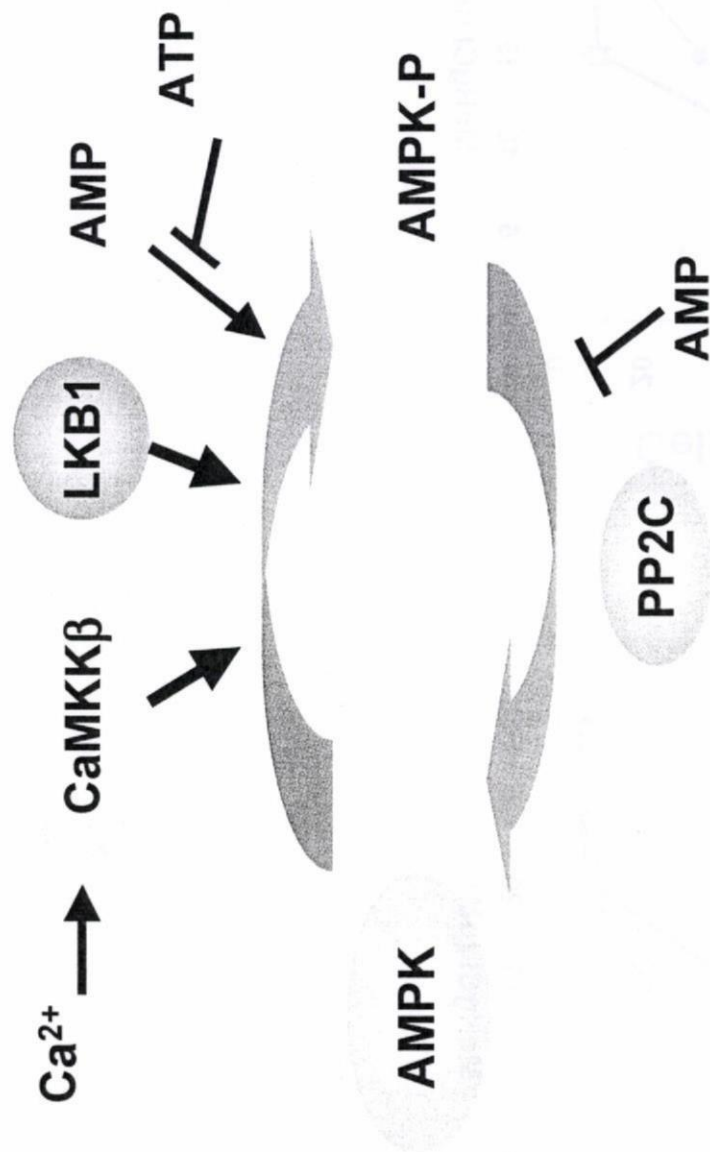


Figure8. AMPK活性化 / 不活性化に関わる制御因子との関連図

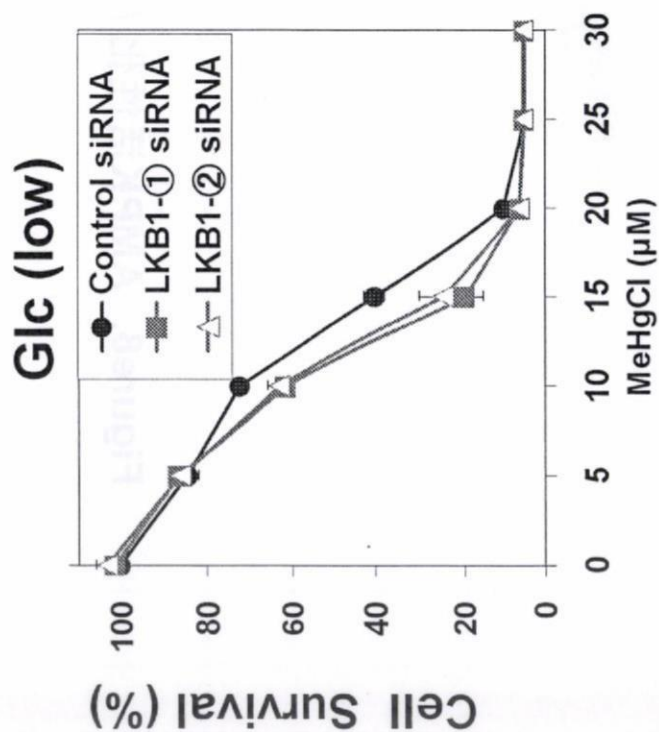
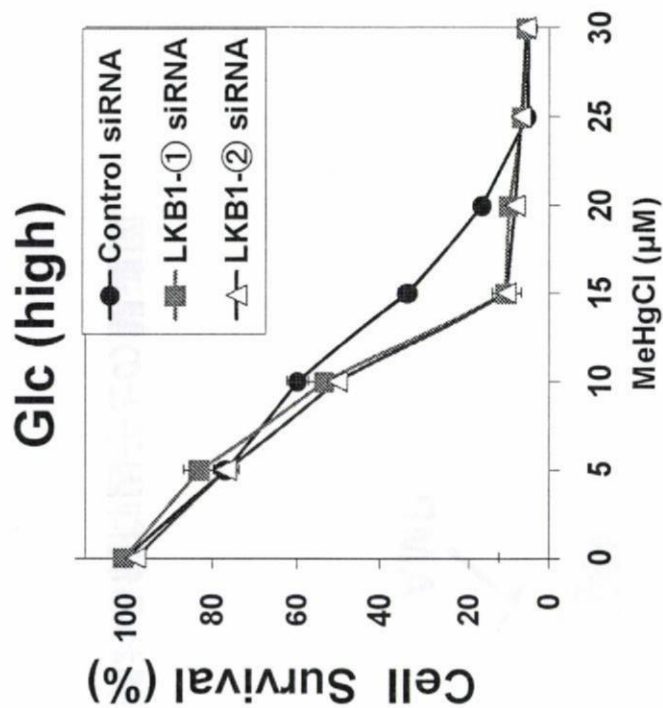
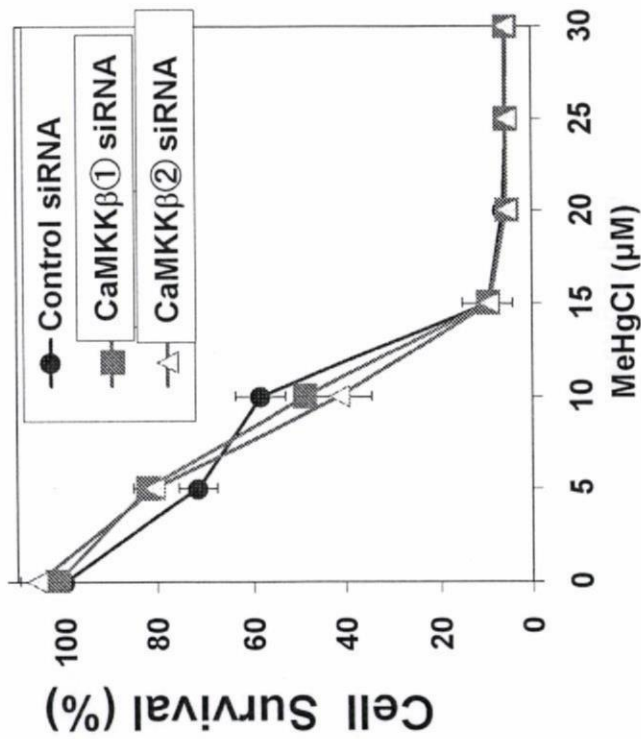


Figure 9-1. AMPKに関わる遺伝子(LKB1)の発現抑制が細胞のメチル水銀感受性に与える影響

2×10^4 cells/90 μL の細胞を96 well plateにまいた後、24時間後に塩化メチル水銀で処理した。24時間処理した後、alabma blueを含む培地に交換し、 37°C 、5% CO_2 存在下で3時間培養した後、蛍光マイクロプレートリーダーによる蛍光測定(excitation, 544 nm; emission, 590 nm)により細胞生存率を求めた。

Glc (low)



Glc (high)

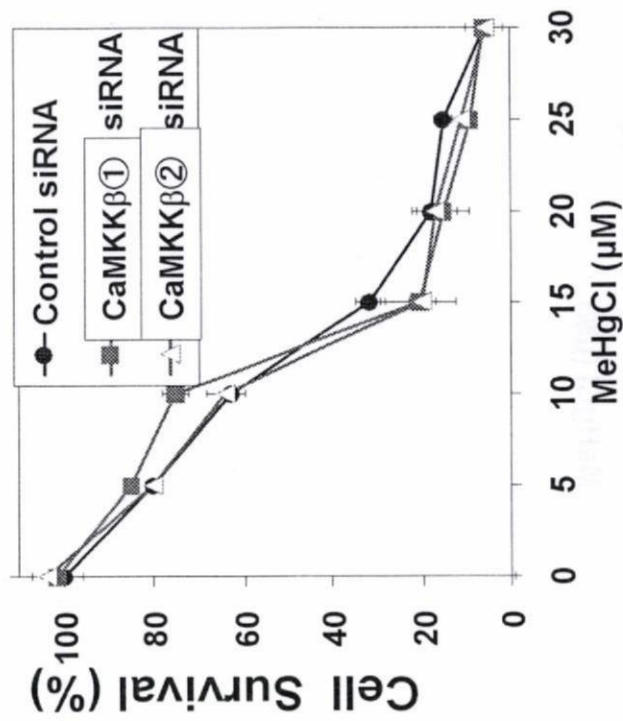


Figure 9-2. AMPKに関わる遺伝子(CaMKKβ)の発現抑制が細胞のメチル水銀感受性に与える影響

2×10^4 cells/90 μ L の細胞を96 well plateにまいた後、24 時間後に塩化メチル水銀で処理した。24 時間処理した後、alams blue を含む培地に交換し、37 $^{\circ}$ C、5 % CO_2 存在下で3 時間培養した後、蛍光マイクロプレートリーダーによる蛍光測定(excitation, 544 nm; emission, 590 nm)により細胞生存率を求めた。

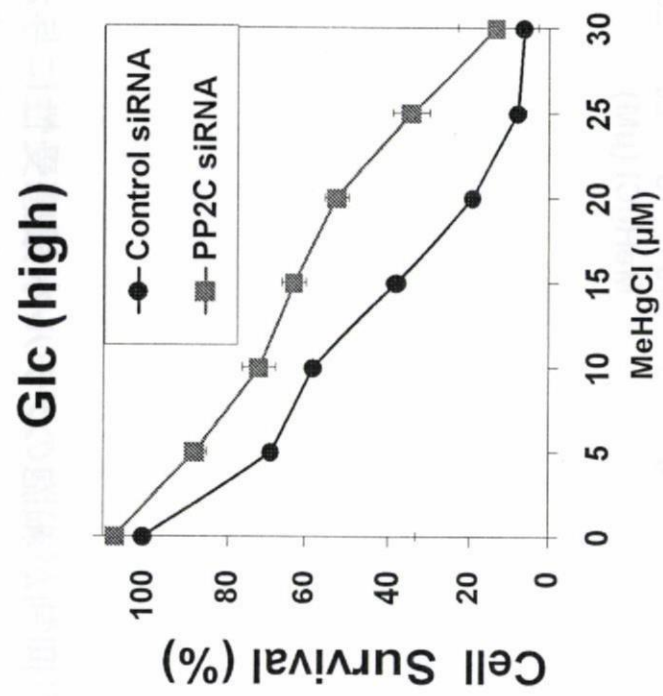
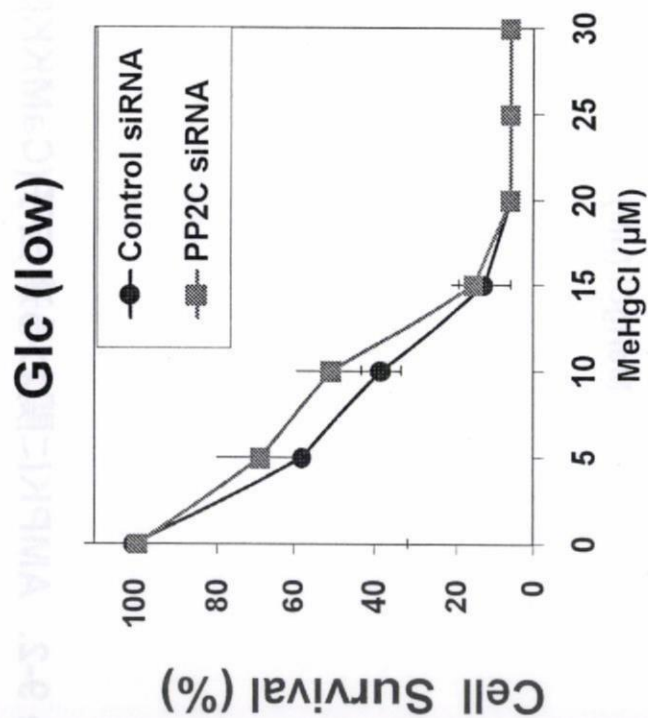


Figure 9-3. AMPKに関わる遺伝子(PP2C)の発現抑制が細胞のメチル水銀感受性に与える影響

2×10^4 cells/96 well plate の細胞を96 well plate にまいた後、24 時間後に塩化メチル水銀で処理した。24 時間処理した後、alams blue を含む培地に交換し、 37°C 、5% CO_2 存在下で3 時間培養した後、蛍光マイクロプレートリーダーによる蛍光測定(excitation, 544 nm; emission, 590 nm)により細胞生存率を求めた。

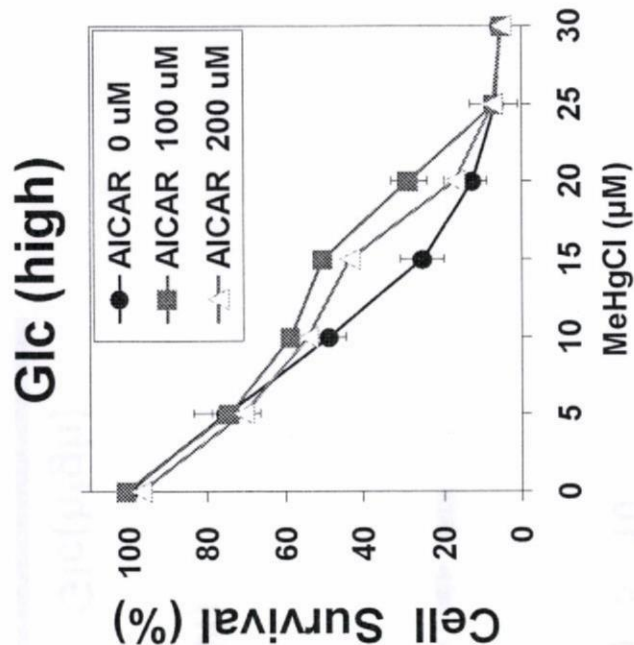
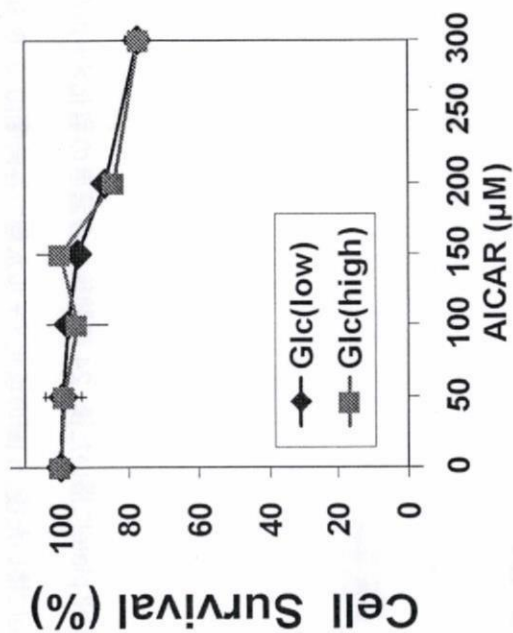


Figure 10. AICAR(AMPK活性化剤)がメチル水銀感受性に与える影響

A. 1×10^6 cells となるように各濃度(5.5, 25 mM)のグルコースを含む培地で培養した HEK293 細胞を 6 well plate に播いた後、各濃度(0, 12.5, 25, 50, 100, 1000 μ M)の AICAR で 1 時間処理し、蛋白質を抽出した後、immunoblotting によりリン酸化 AMPK および PRKAA1 レベルを検討した。
 B. 2×10^4 cells/90 μ L の細胞を 96 well plate にまいた後、24 時間後に AICAR で 24 時間処理し、aloma blue を含む培地に交換し、 37°C 、5% CO_2 存在下で 3 時間培養した後、蛍光マイクロプレートリーダーによる蛍光測定(excitation, 544 nm; emission, 590 nm)により細胞生存率を求めた。
 C. 2×10^4 cells/90 μ L の細胞を 96 well plate にまいた後、24 時間後に塩化メチル水銀で 24 時間処理した後、上記 B. と同様の操作にて細胞生存率を求めた。

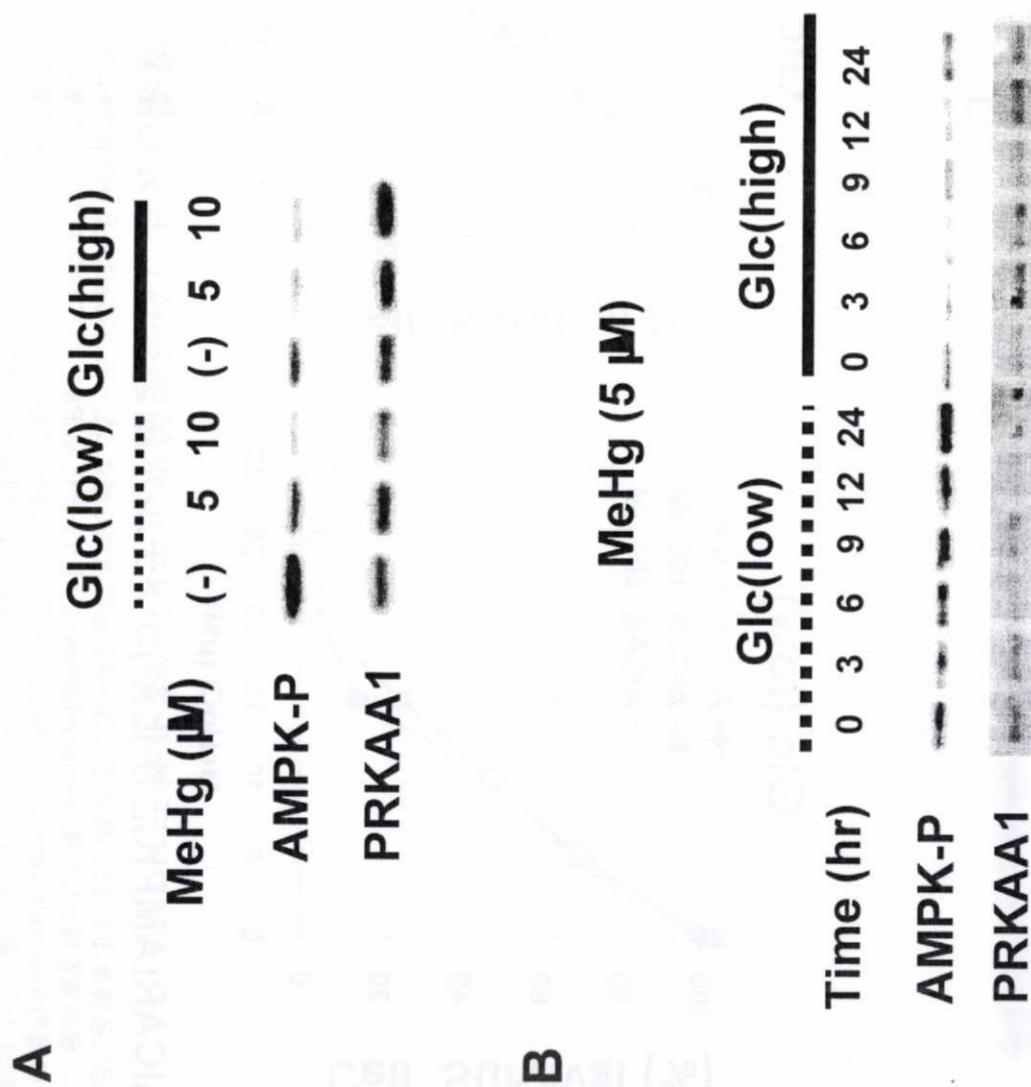


Figure 11. メチル水銀がAMPKのリン酸化に与える影響

A. 1×10^6 cells/1.8 mL となるように各濃度 (5.5, 25 mM) のグルコースを含む培地で培養した HEK293 細胞を 6 well plate に播いた後、24 時間後に各濃度の塩化メチル水銀 (0, 5, 10 μM) で 3 時間処理し、Immunoblotting によりリン酸化 AMPK および PRKAA1 レベルを検討した。

B. 1×10^6 cells となるように各濃度 (5.5, 25 mM) のグルコースを含む培地で培養した HEK293 細胞を 6 well plate に播いた後、5 μM の塩化メチル水銀で各時間 (0, 3, 6, 9, 12, 24) 処理し、蛋白質を抽出した後、Immunoblotting によりリン酸化 AMPK および PRKAA1 レベルを検討した。