

性との関係. メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2007, 2007

黄 基旭、松尾拓洋、山本玲子、永沼章：酵母の遺伝子欠損株ライブラリーを用いたカドミウム感受性決定因子の検索. メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2007, 2007

高橋 勉、永沼 章：エンドサイトーシス制御に関わる Ark/Prk kinase family のアドリアマイシン耐性獲得機構における役割. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2007.

丹羽貴子、黄 基旭、大橋一晶、永沼章：ストレス感知受容体 Slg1 (CD43) の亜硫酸毒性軽減における役割. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2007.

李 辰竜、黄 基旭、永沼 章：ミトコンドリア内ピルビン酸レベルに及ぼすメチル水銀の影響. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2007.

黄 基旭、佐々木大祐、永沼 章：ユビキチン・プロテアソームシステム関連因子 Rad23 によるメチル水銀毒性軽減作用の分子メカニズム. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2007.

永沼 章：ユビキチン・プロテアソーム

システムが関わるメチル水銀感受性決定機構. 第 78 回日本衛生学会総会, 2008.

宮永直幸、丹羽貴子、高橋 勉、永沼章：酵母の糖代謝因子 Snf1 活性と亜硫酸毒性の関わり. 日本薬学会第 128 年会, 2008.

中島晶子、黄 基旭、村井康高、永沼章：酵母 Ubi4 によるメチル水銀毒性増強機構の解析. 日本薬学会第 128 年会, 2008.

木村幸由、黄 基旭、永沼 章：メチル水銀毒性と脱ユビキチン化酵素群との関わり. 日本薬学会第 128 年会, 2008.

Takahashi T, Naganuma A : Role of endocytic Ark/Prk kinases in adriamycin resistance. 47th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2008.

Hwang GW, Naganuma A : Overexpression of F-box protein, Hrt3 or Ylr224w, confers resistance to methylmercury in yeast cells. 47th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2008

岩井健太、永沼 章、久下周佐：ペルオキシレドキシン Ahp1 による有機過酸化物シグナルの感知と伝達. 第 30 回日本

分子生物学会年会, 2008

G. 知的所有権の取得状況
なし。

II. 資料

平成17年度

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°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 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℃、10 分間洗浄した後、0.2 x SSC、0.05 x SSC で軽く洗浄し、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 ;
 CAGUGGCUACUGGUAUUGUCU
 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

5×10^5 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 μ l を OptiMEM 125 μ l に滴下し、5 分後に dsRNA 100 pmol を OptiMEM 125 μ l 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

1×10^4 cells/90 μ l/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 μ l を含む培地 100 μ l 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 μ l ウイルス液を含む D' MEM / 10%FBS 培地の総量を 500 μ l から 5 ml まで検討したところ、総 600 μ l 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 μ g/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

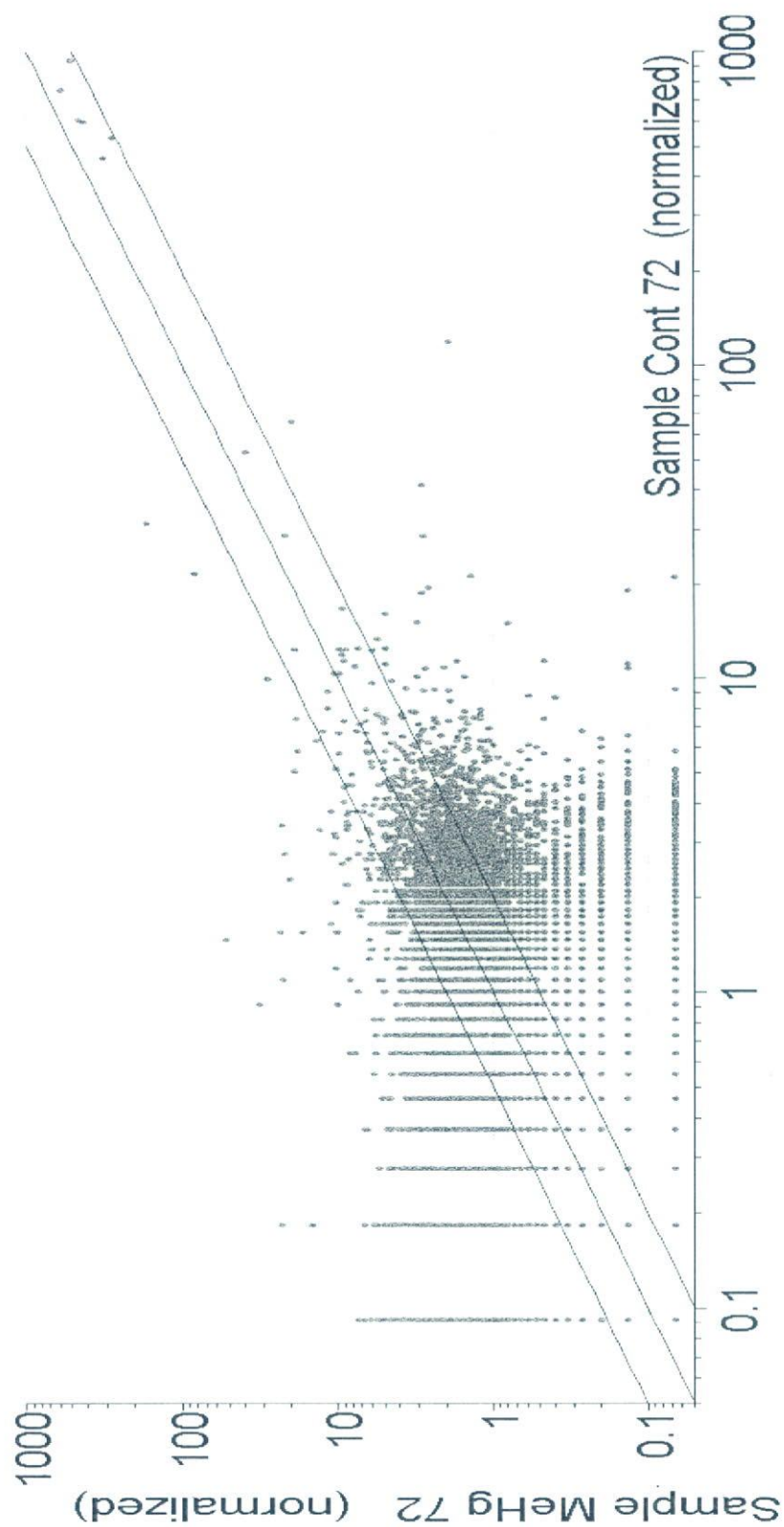
なし。

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

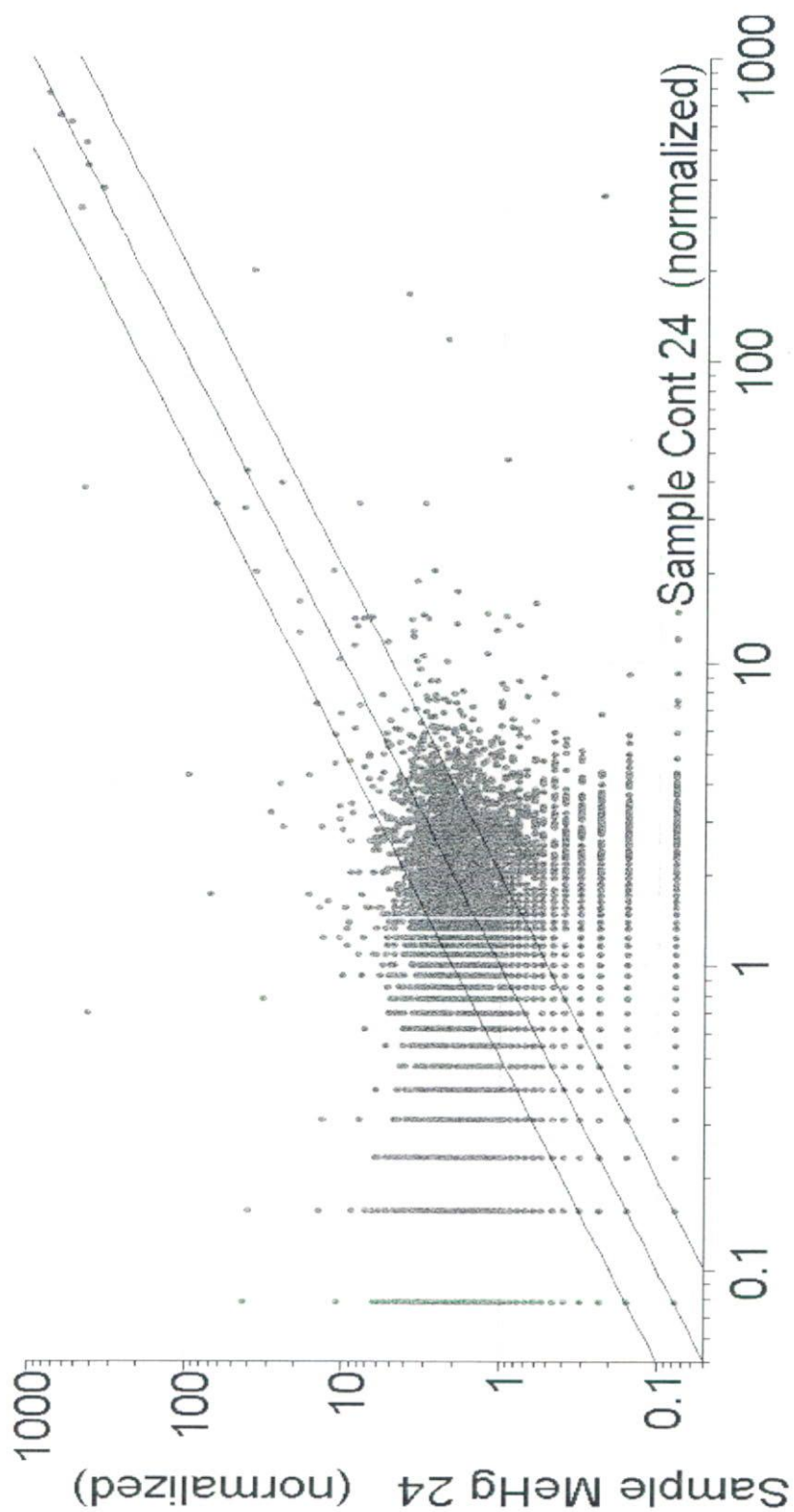


Fig. 2 24時間メチル水銀処理した細胞の scatter plot analysis

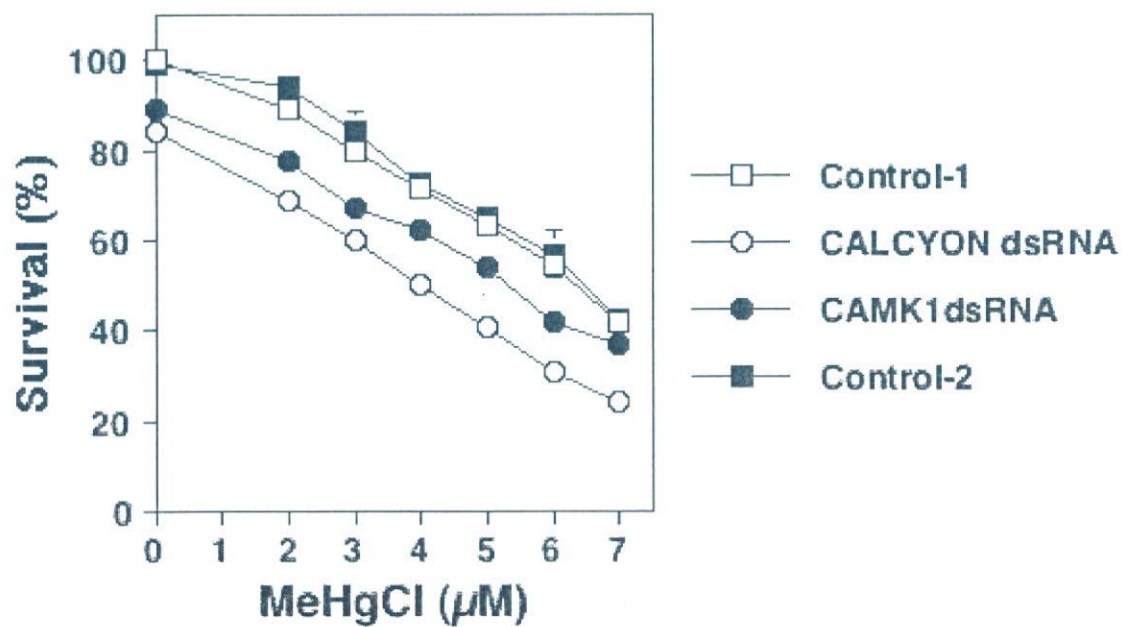
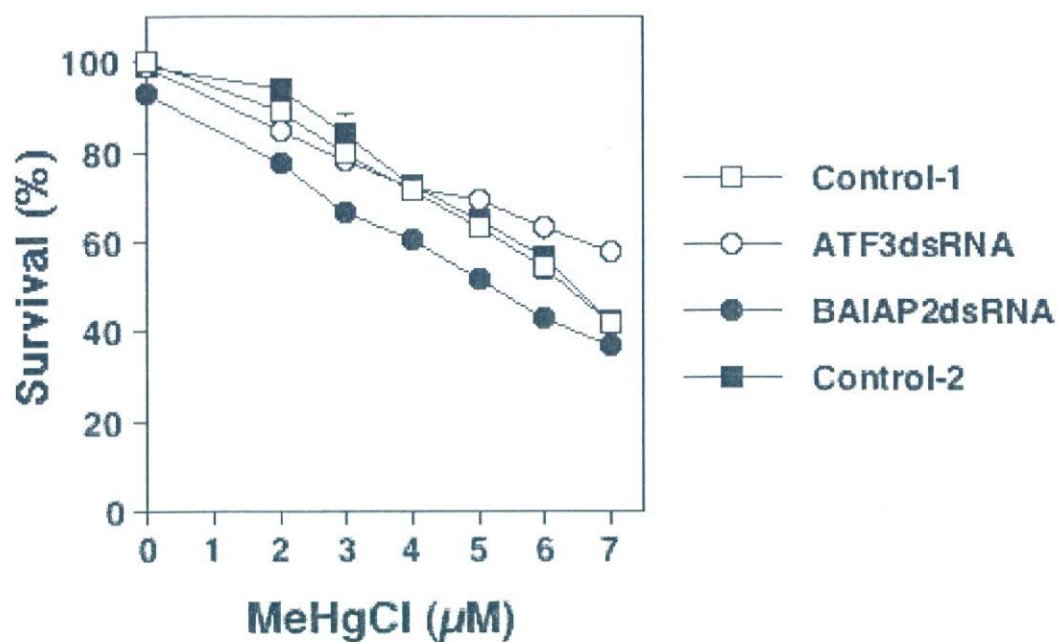


Fig. 3-1 dsRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

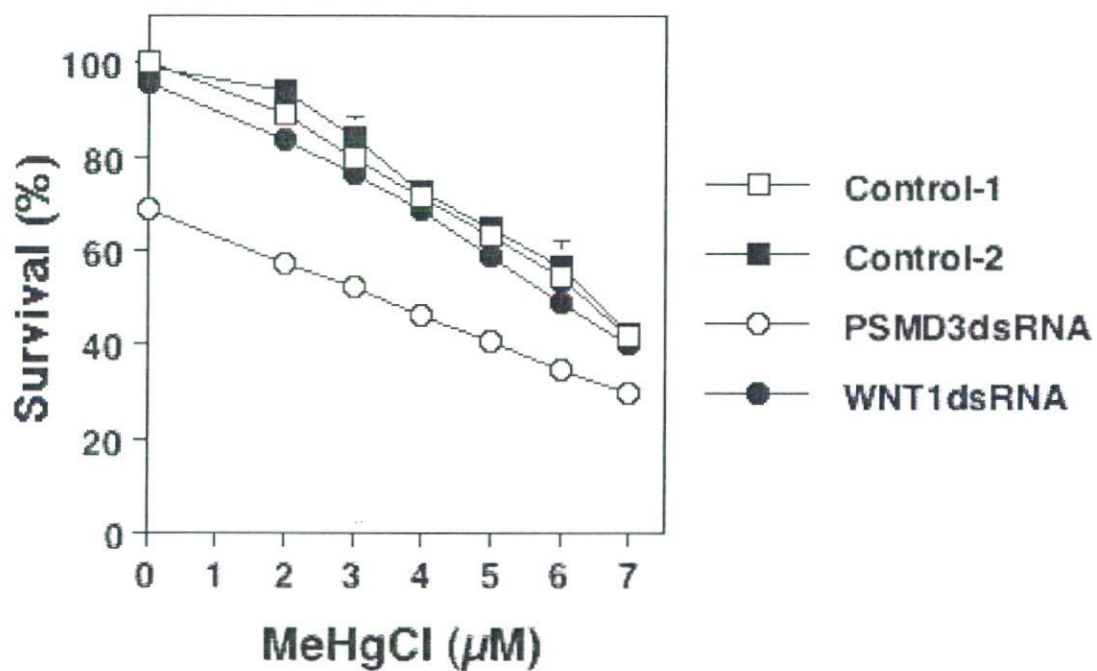
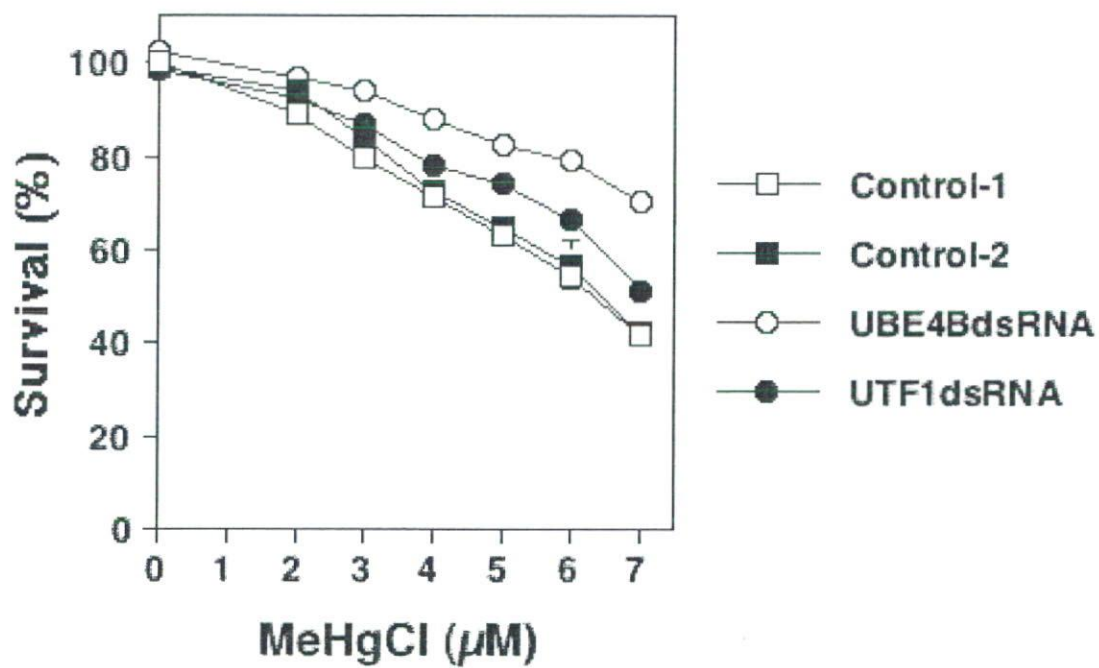


Fig. 3-2 dsRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

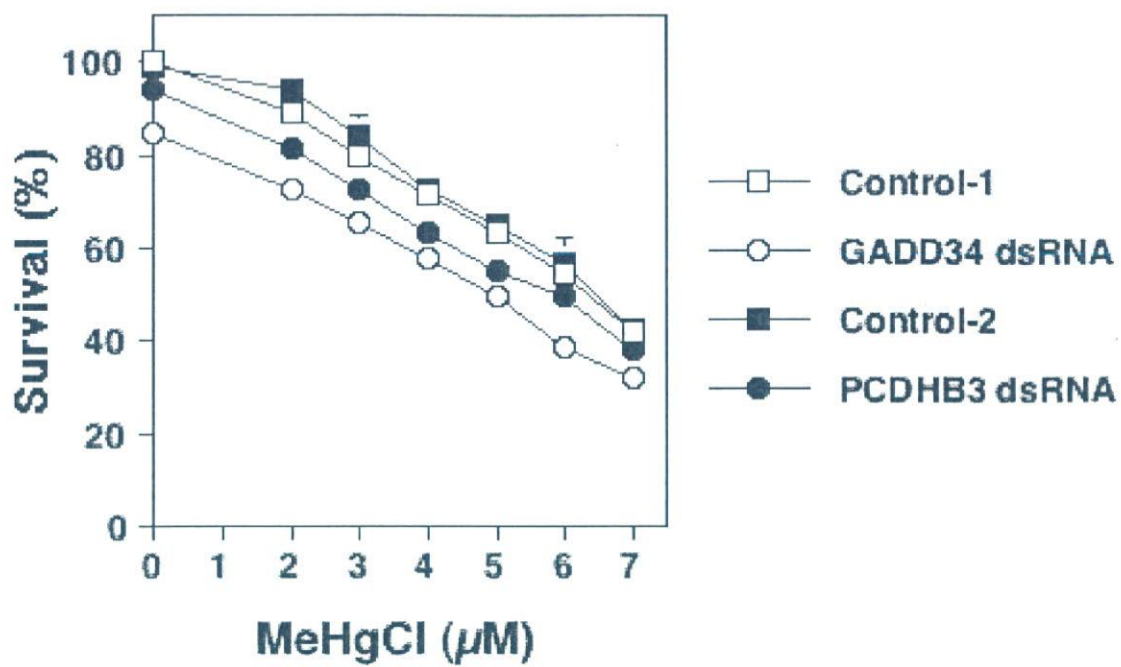


Fig. 3-3 dsRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

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 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

分担研究者 黄 基旭 東北大学大学院薬学研究科助手

メチル水銀による毒性発現機構を解明するために、ノックダウンされることによってヒト培養細胞にメチル水銀耐性を与える遺伝子のスクリーニングを行ったところ、TGM4、OAT、GRM6 および ENO2 遺伝子を同定することに成功した。今回、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の代謝に関わる TGM4、GRM6 および OAT が同定されたことから、メチル水銀毒性発現におけるグルタミン酸の役割は非常に興味深い。一方、我々は出芽酵母を用いた検討によって、ミトコンドリアマトリクスでのピルビン酸の蓄積量の上昇がメチル水銀毒性を増強させることを見出している。今回のスクリーニングによって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たことから、ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強作用はヒト培養細胞でも同様にメチル水銀毒性増強に関わっており、メチル水銀毒性発現におけるピルビン酸の役割を検討することによってメチル水銀による毒性発現の分子メカニズムが明らかになるものと思われる。

A. 研究目的

マイクロアレイ法を応用したメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子のスクリーニング法は全遺伝子を網羅的に検索することは可能であるが、多量の情報の中には非特異的なレベルの変動を示す遺伝子も多く含まれていることから、更なる再確認をとる必要があり、そのためには莫大な費用がかかる。そこで、本研究では既に

siRNA 発現ベクターライブラリーを導入した HEK293 細胞を用いて、ノックダウンすることによってヒト培養細胞にメチル水銀耐性を与えるヒト遺伝子の同定を試みる。

B. 研究方法

1. ヒト培養細胞においてメチル水銀毒性の発現に関わる遺伝子の検索

約 8500 種 of ヒト遺伝子を抑制することができる siRNA 発現ベクターライブラリーを既に導入した HEK293 細胞(ヒト胎児腎臓由来の培養細胞)を用いて、正常細胞が生存出来ない塩化メチル水銀 $7\ \mu\text{M}$ で 96 時間処理した。この条件下で生存可能な細胞をセレクションし、回復培養した後クローン化を行った。また、siRNA 導入細胞を塩化メチル水銀 $18\ \mu\text{M}$ で 48 時間処理し、回復培養を行った後、再度塩化メチル水銀 $18\ \mu\text{M}$ で 48 時間処理し、この条件下でも生存可能な細胞のセレクションを行った。

2. 総 RNA の単離

5×10^6 cell の細胞に Isogen 1 ml を加えて懸濁した後、chloroform 0.2 ml を加え、激しく攪拌した後、12,000 xg で 15 分間遠心した。得られた水層に isopropanol 0.5 ml を加え静置した後、12,000 xg で 10 分間遠心した。得られた沈殿を 70 %エタノールによりリンスし、乾燥後、TE に溶解し総 RNA 溶液とした。

3. 逆転写反応

RNA 500 ng に対し M-MLV RTase (50 U) , RNase (10 U) , oligo DT primer (50 pmol) , dNTP mixture (0.5 mM) , $5 \times$ M-MLV buffer (2 μl) となるように反応溶液

を調製し、 42°C で 15 分間逆転写反応を行った。反応後酵素を失活させるため、 95°C で 2 分間加熱した。

4. 導入 siRNA 配列の確認

得られた cDNA を template とし、siRNA を含む配列を増幅するようなプライマーを用いて PCR 反応によって siRNA を含む配列を増幅し、得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により精製した後、pGEM-T easy vector に Ligation ver 2.1 を用いて導入した。得られたベクターを大腸菌にトランスフェクションし、24 時間後にプラスミドを plasmid miniprep kit を用いて回収し、シーケンス解析を行い、NCBI の BLAST を用いて siRNA の塩基配列を確認した。使用したプライマーは以下に示した。

siRNA	forward	:
	AATGTCTTTGGATTTGGGAATCT	
	TA	
	reverse	:
	AAAAGGGTGGACTGGGATGAGT	
	A	

5. siRNA 発現ベクターの作製

4 で同定された各遺伝子の発現を抑制する siRNA のプライマーを 95°C で 5 分間アニリングさせ、室温まで放冷した後、T4 PNK を用いてリン酸化さ

せた。リン酸化させた二本鎖 siRNA を pFIV-H1 に Ligation ver 2.1 を用いて導入し、得られたベクター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。

CCL2

forward : GATCCGACCAGCGGCAGGTGTC
CCAGAGAAGCTCTTCCTG

TCAGAAGCTTCTTTGGGACACTT
GCTGCTGGTTTTTTG

reverse : AATTCAAAAACCAGCAGCAAGT
GTCCCAAAGAAGCTTCTG

ACAGGAAGAGCTTCTCTGGGACA
CCTGCCGCTGGTCG

ENO2

forward : GATCCGTGGGGAGATGATTGATG
GGATGAATGACTTCCT

GTCAGATCATTCATCCCATTAAT
CATTTCCCATTTTTTG

reverse : AATTCAAAAATGGGGAAATGATT
AATGGGATGAATGATCTGACAG

GAAGTCATTCATCCCATC

AATCATCTCCCCACG

GRM6

forward :

GATCCGTAATTGTGTAGACATGG

AGTAAGCCTCCTTCCTGTCAGA

GAGGCTTATTCCATGTTT

ACACAATTATTTTTG

reverse :

AATTCAAAAATAATTGTGTAAAC

ATGGAATAAGCCTCTCTGACAGG

AAGGAGGCTTACTCCAT

GTCTACACAATTACG

OAT

forward :

GATCCGACTTCAACTGAGTATAG

ATGCCGTTACCTTCCTGTCAGAG

TAATGGCATCTATATTCA

GTTGAAGTTTTTTG

reverse :

AATTCAAAAACCTTCAACTGAAT

ATAGATGCCATTACTCTGACAGG

A

AGGTAACGGCATCTATA

CTCAGTTGAAGTCG

PCK1

forward :

GATCCGAACTAGTAGGTCGTCTT

GCCCGAGATTCTTCCTGT

CAGAAATCTTGGGGCAAGATGACC

TACTAGTTTTTTTTG