

※ 下線のある遺伝子は、欠損により致死となる。**太字**は、欠損により亜ヒ酸感受性になる遺伝子。細字は、欠損により亜ヒ酸感受性に影響がない遺伝子。

Fig. 6-1 ストレスに応答して細胞骨格の制御を行う

シグナル伝達経路中の因子と亜ヒ酸感受性への影響

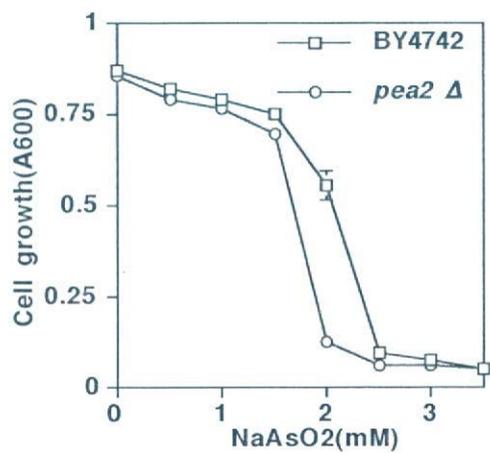
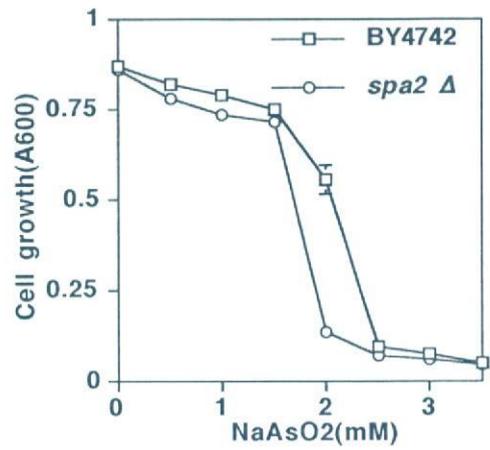
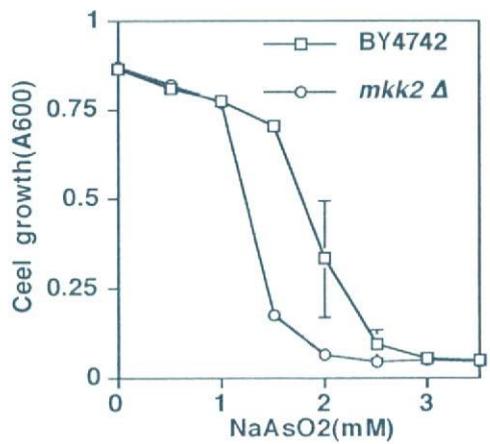
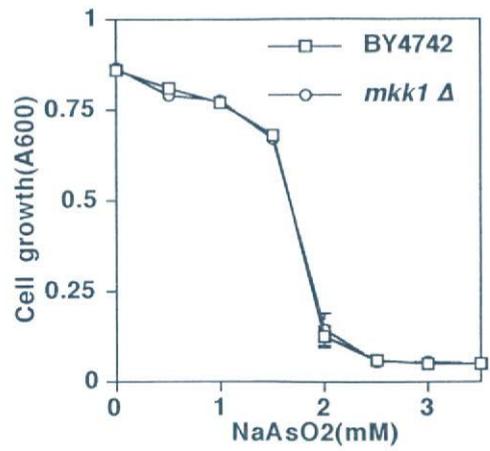
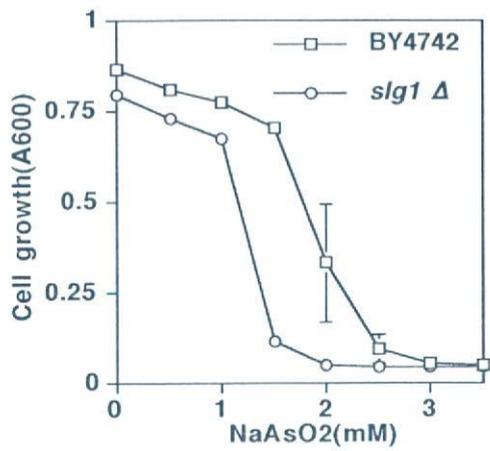


Fig. 6-2 ストレスに応答して細胞骨格の制御を行うシグナル伝達経路中の因子と亜ヒ酸感受性への影響

Table. 3-1 細胞骨格に関する遺伝子がコードする蛋白の機能

遺伝子	機能
<i>YKE2</i>	Prefoldin subunit 6, component of the Gim protein complex that promotes formation of functional alpha- and gamma-tubulin, and actin
<i>ABP1</i>	Actin-binding protein of the cortical actin cytoskeleton, important for activation of the Arp2/3 complex that plays a key role actin in cytoskeleton organization
<i>VRP1</i>	Involved in cytoskeletal organization and cellular growth; Proline-rich protein verprolin
<i>MYO3</i>	One of two type I myosins; localizes to actin cortical patches; deletion of MYO3 has little effect on growth, but myo3 myo5 double deletion causes severe defects in growth and actin cytoskeleton organization
<i>MYO5</i>	One of two type I myosins; contains proline-rich tail homology 2 (TH2) and SH3 domains; MYO5 deletion has little effect on growth, but myo3 myo5 double deletion causes severe defects in growth and actin cytoskeleton organization
<i>SLA1</i>	Protein involved in assembly of cortical actin cytoskeleton, has three SH3 domains
<i>END3</i>	Protein required for endocytosis and cytoskeletal organization
<i>ARK1</i>	Serine/threonine protein kinase associated with cortical actin cytoskeleton
<i>CAP1</i>	Actin-capping protein, alpha subunit
<i>CAP2</i>	Actin-capping protein, beta subunit
<i>SLG1</i>	Plasma membrane protein required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response during vegetative growth

Table. 3-2 細胞骨格に関する遺伝子がコードする蛋白の機能

遺伝子	機能
<i>MKK1</i>	Serine/threonine protein kinase of the MAP kinase kinase (MEK) family involved in cell wall integrity (low-osmolarity) pathway
<i>MKK2</i>	MAP kinase kinase (MEK) serine/threonine protein kinase, involved in cell wall integrity (low-osmolarity) pathway
<i>SPA2</i>	Protein involved in cell polarity and cell fusion during mating, required for stimulation of the low affinity Ca ²⁺ influx system (LACS) that is activated during the pheromone response and is required for cell-cell fusion
<i>PEA2</i>	Protein involved in oriented growth toward mating partner, required for stimulation of the low affinity Ca ²⁺ influx system (LACS) that is activated in response to mating pheromone and is required for cell-cell fusion

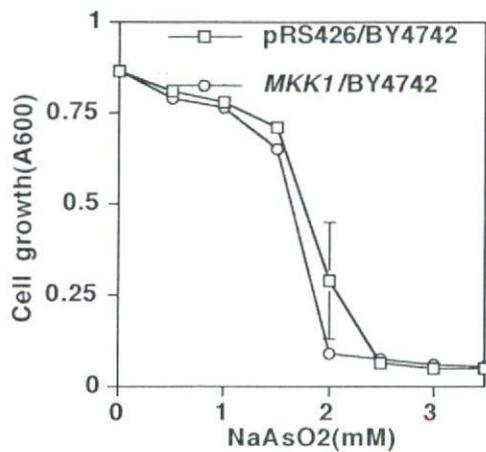
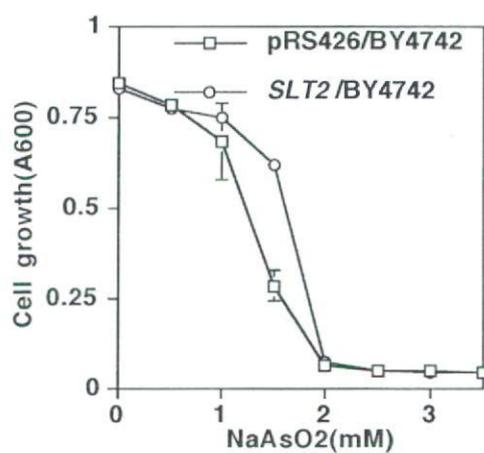
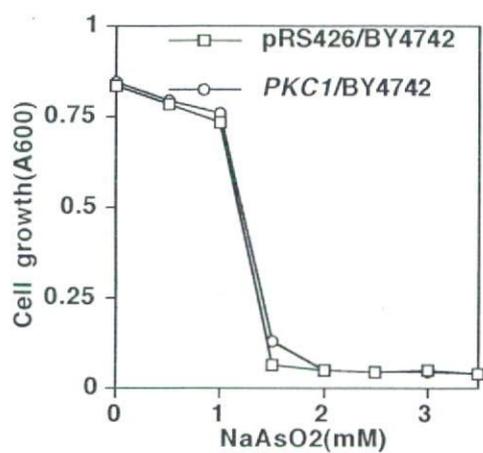


Fig. 7-1 高発現による亜ヒ酸感受性への影響

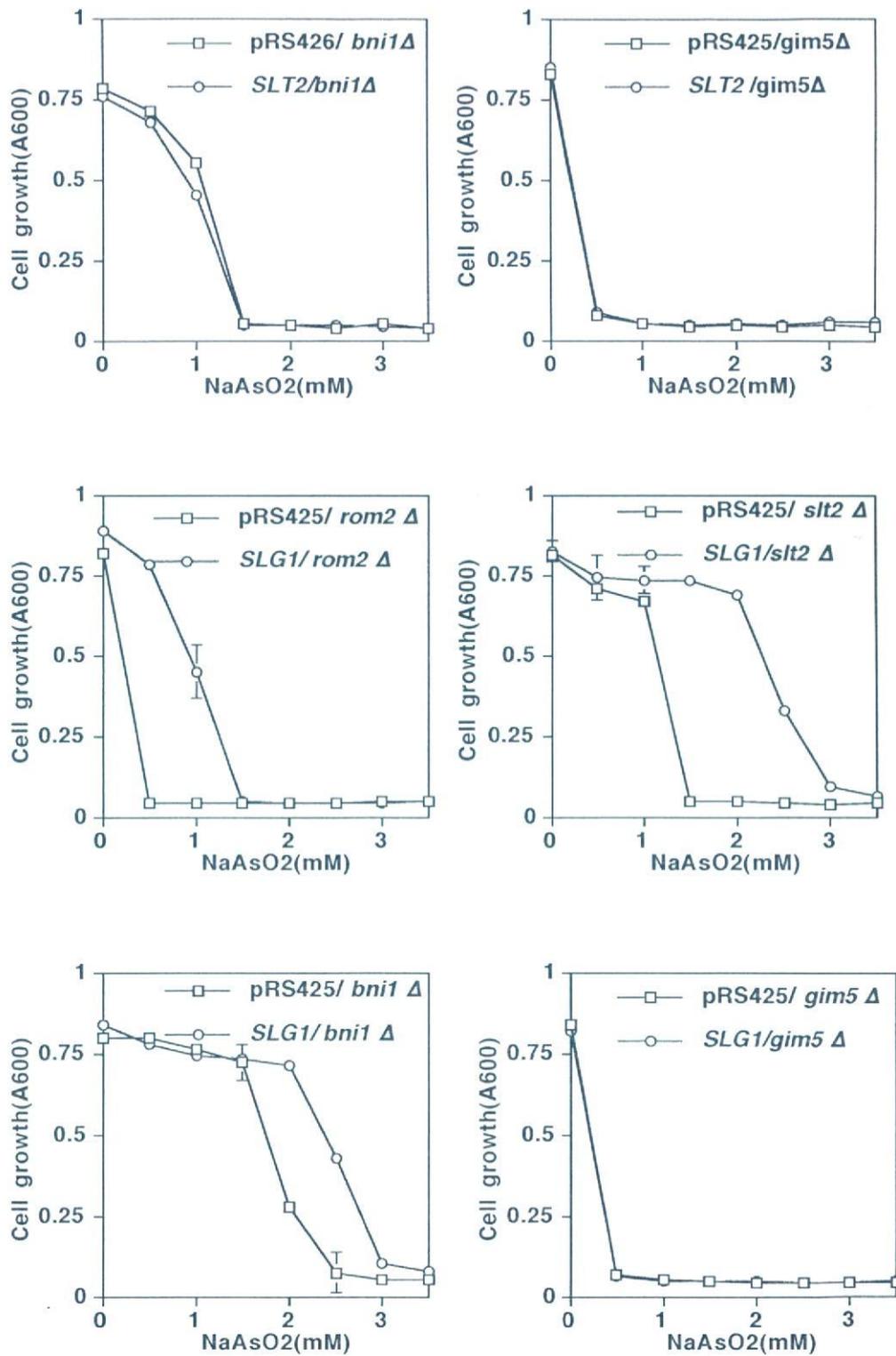


Fig. 7-2 高発現による亜ヒ酸感受性への影響

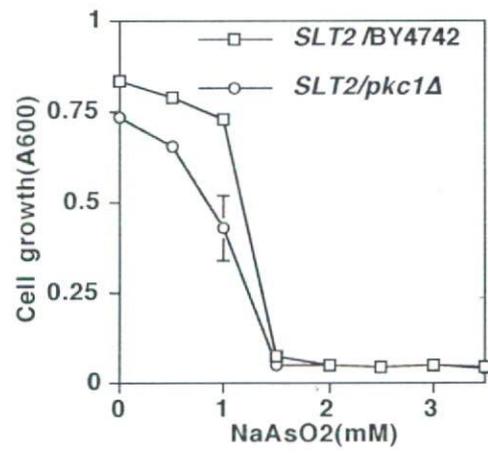


Fig. 7-3 高発現による亜ヒ酸感受性への影響

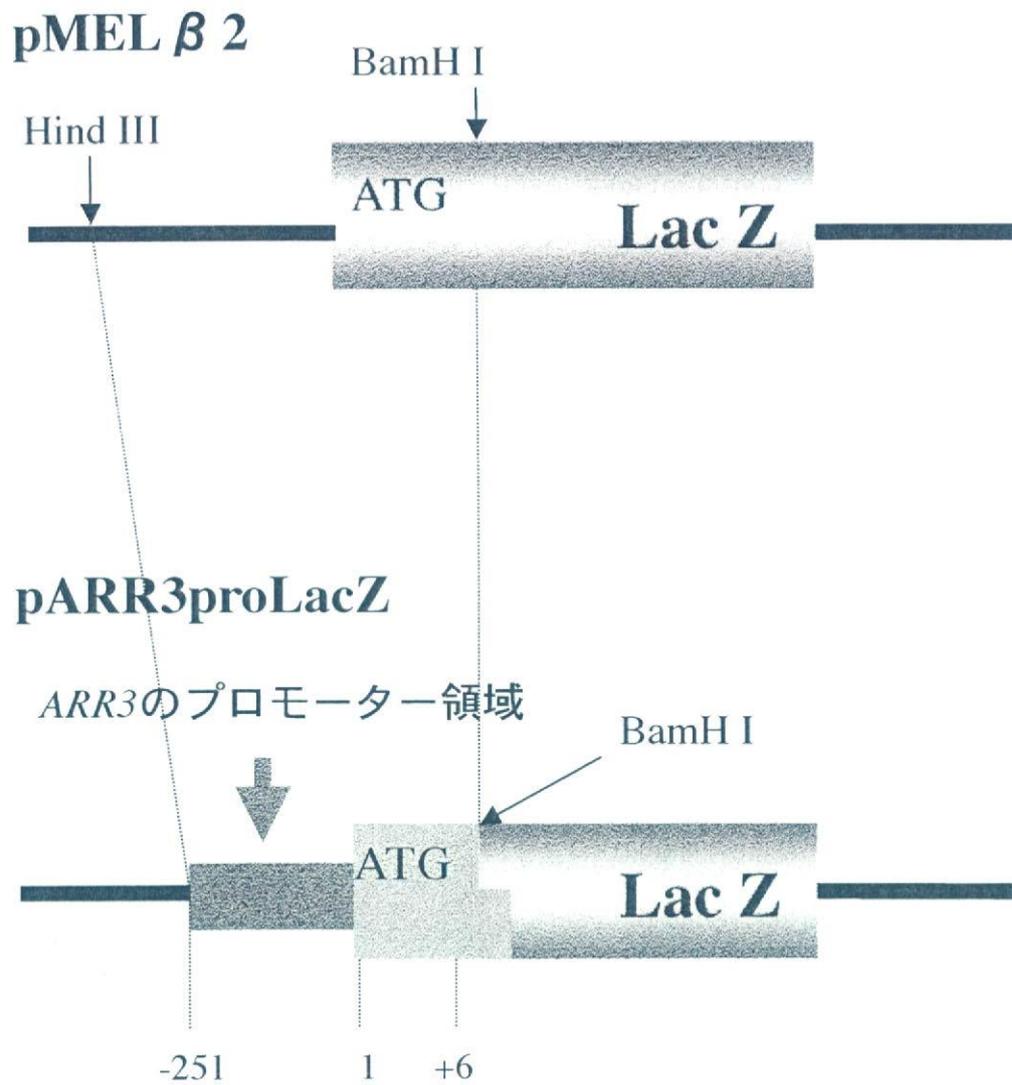


Fig. 8 *ARR3* のプロモーター領域を *Lac Z* 遺伝子に

連結したプラスミド

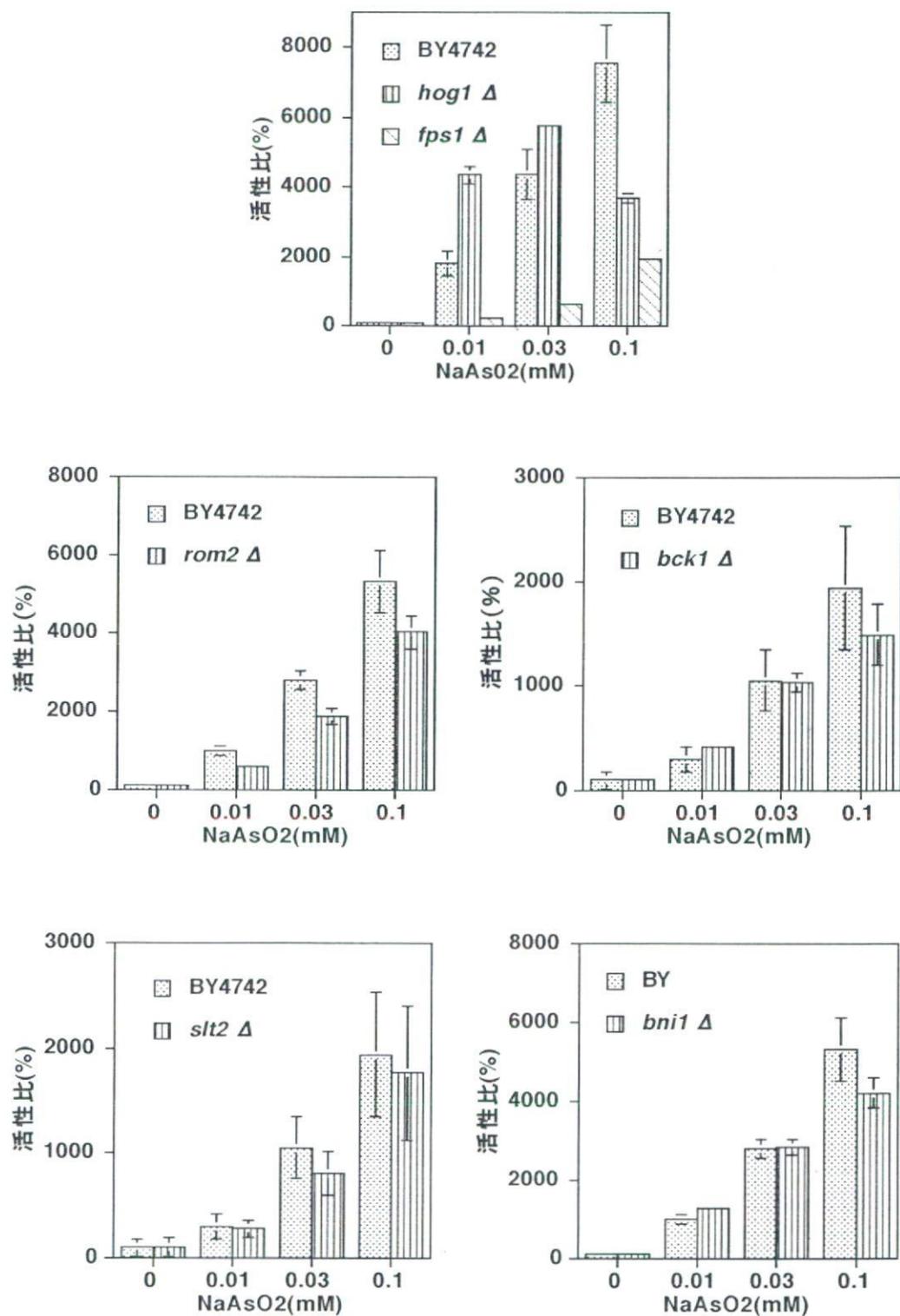


Fig. 9 亜ヒ酸処理による *ARR3* の転写活性比の変化

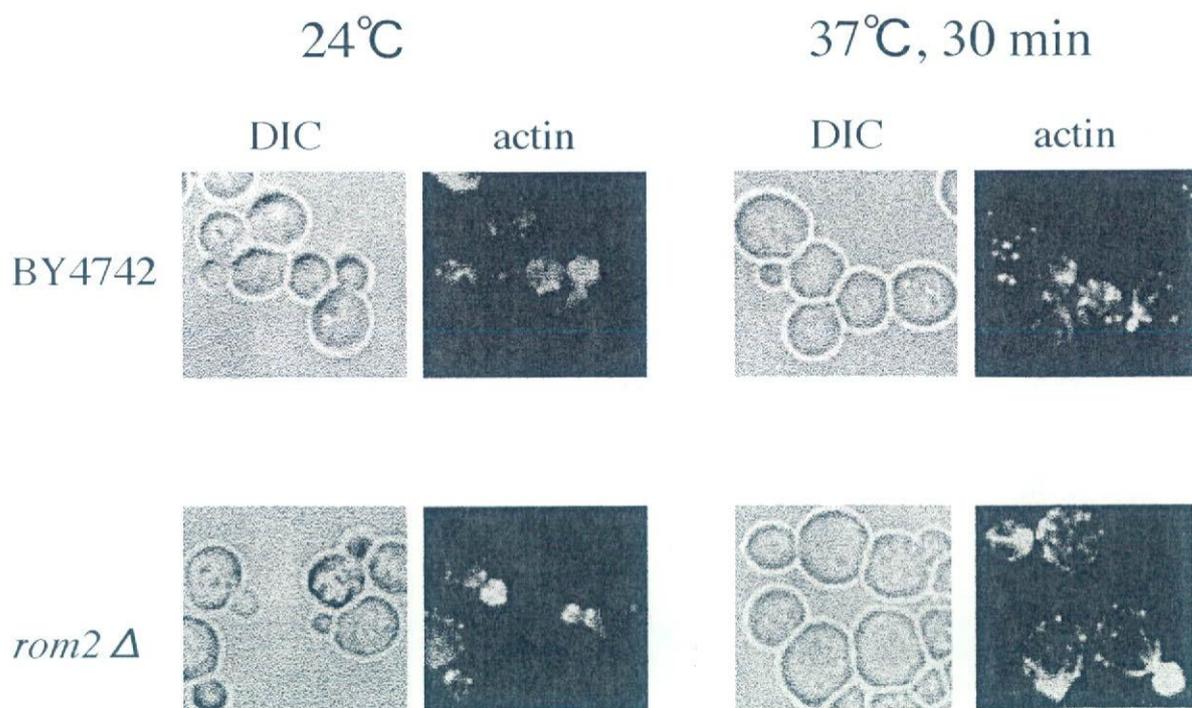


Fig.10 ヒートショックによるアクチンの分布の変化

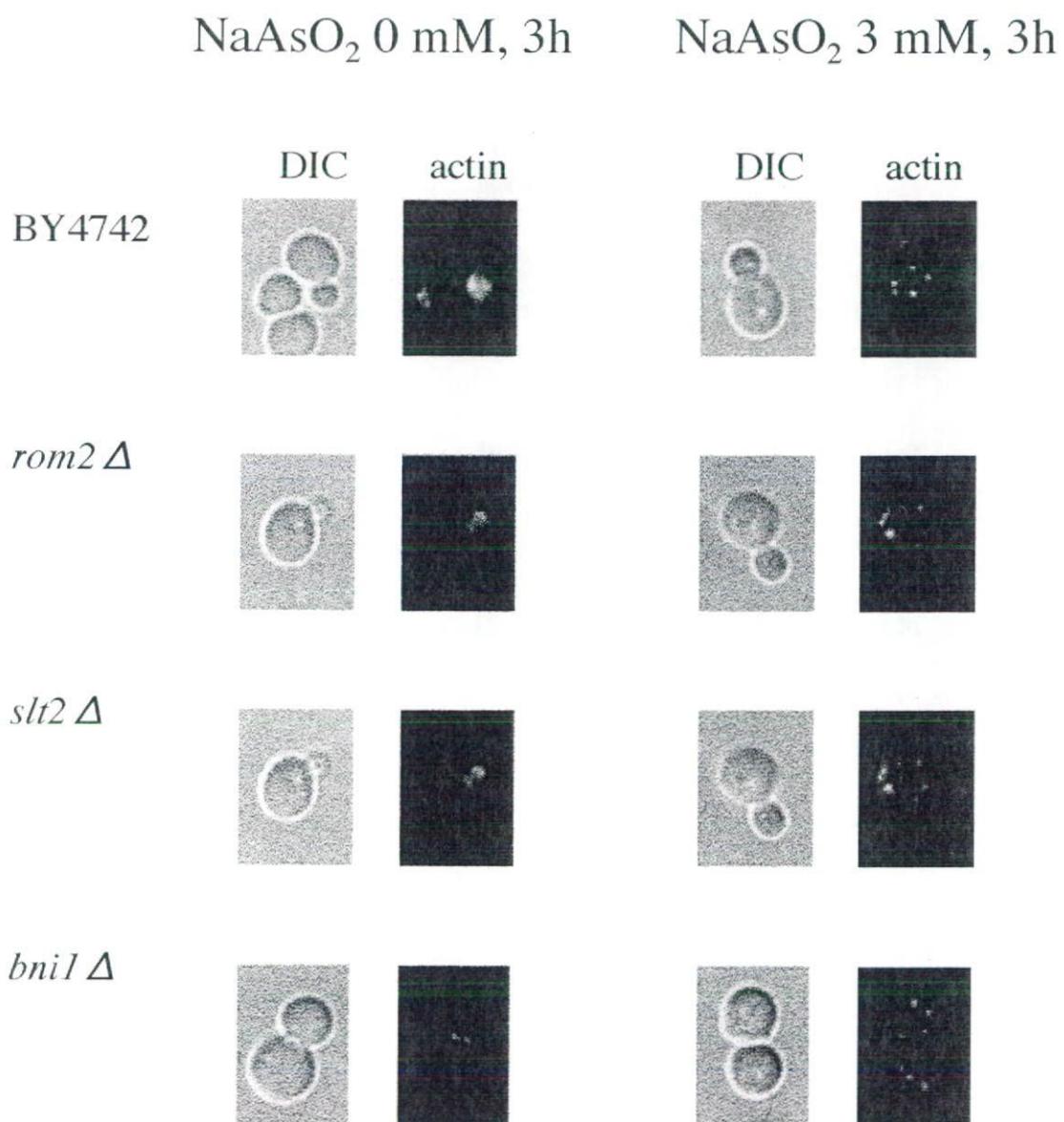


Fig. 11 亜ヒ酸処理によるアクチンの分布の変化

平成18年度

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

HEK239 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 $3 \mu\text{M}$, $6 \mu\text{M}$ または塩化カドミウム $20 \mu\text{M}$ 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、 $12,000 \text{ xg}$ 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、 $12,000 \text{ xg}$ 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 $5 \mu\text{g}$ に cDNA synthesis primer ($10 \mu\text{M}$)を $1 \mu\text{l}$ 、脱イオン水を加え、全量を $16 \mu\text{l}$ 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 $2 \mu\text{l}$, DTT (100 mM) $1 \mu\text{l}$, dNTP mix ($10 \mu\text{M}$) $1 \mu\text{l}$ を加え、全量を $20 \mu\text{l}$ にした。そこへ $1 \mu\text{l}$ 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  
agCTTCCTGTCAGActtgcttctctataagt  
tattgtgTTTTTG
```

PRKAA1 reverse :

```
AATTCAAAAAtcacaataacttataagaga  
agcaaagTCTGACAGGAAGctttacttctc  
cataagttatcgtgaCG
```

SHB forward :

```
GATCCGcagaggagatgccgagagcctgct  
gtgtCTTCCTGTCAGAACgcagcaggttct  
cggcgtctctctgTTTTTG
```

SHB reverse :

AATTCAAAAAcagaggagacgccgagaa
cctgctgcgtTCTGACAGGAAGacgcagc
aggttctcggcgtctcctctgCG

FLJ13570 forward :

GATCCGctttgctttgtattgacgactggataC
TTCCTGTCAGAtatctaagttgtcaatgcaa
agcaaagTTTTTG

FLJ13570 reverse :

AATTCAAAAActttgctttgacgacttagata
TCTGACAGGAAGtatctaagttgtcaatgcaa
gcaaagCG

PAPLN forward :

GATCCGctttctactttgatcttctgcaaatCTC
TTCCTGTCAGAAgattttagaagggttaa
gtggaaagTTTTTG

PAPLN reverse :

AATTCAAAAActtccactttaaccttctacaa
aTCTTCTGACAGGAAGagattttagaa
ggtaaagtggaagCG

TRUB1 forward :

GATCCGgttgcgcagtagcttgaggtagctatC
TTCCTGTCAGAAtaggtgccttaagactat
gtgaacaaTTTTTG

TRUB1 reverse :

AATTCAAAAAttgttcacatagcttaaggca
cctatTCTGACAGGAAGataggtgccttaa
gactatgtgaacaaCG

RP1-268 forward :

GATCCGcattgttggcttgggtcttctCT
TCCTGTCAGAAgataagaccaagatca
acaacagtgTTTTTG

RP1-268 reverse :

AATTCAAAAcactgttggatcttgggtctta
tctTCTGACAGGAAGagataagaccaag
atcaacaacagtgCG

RP11-100 forward :

GATCCGatggtgacgtgagcttgcattatc
CTTCCTGTCAGAGAAatacatgcaggct
caggtaccaTTTTTG

RP11-100 reverse :

AATTCAAAAAtggtaacctgagcctgcat
gttattcTCTGACAGGAAGgaataacatgc
aggctcaggtaccatCG

FLJ34643 forward :

GATCCGgtttgggagtatatgtgaagagtgag
gCTTCCTGTCAGAcctcgccttccacatga
ttccaaacTTTTTG

FLJ34643 reverse :

AATTCAAAAgtttgggaatacatgtgaaga
gagagTCTGACAGGAAGcctcgccttca
catgtattccaaacCG

RP11-67 forward :

GATCCGttgctgcagtagagacgggtggtctg
aCTTCCTGTCAGAtcaggaccaccgtcttt
gctgtagcaaTTTTTG

RP11-67 reverse :

AATTCAAAAAttgctacagcaaagacggtg

gtcctgaTCTGACAGGAAgtcaggaccac
cgtcttgctgtagcaaCG

HEL308 forward :

GATCCGtaagggcaggattaattcctctcgtggCT
TCCTGTCAGAccatgagagggattaattctgcct
ttaTTTTTG

HEL308 reverse :

AATTCAAAAtaaaggcagaattaatccctctcat
ggTCTGACAGGAAgccatgagagggattaatt
ctgccttaCG

AL137312 forward :

GATCCGgagctcaggaattgagaccggctct
ggCTTCCTGTCAGAccagactggctcga
attcctgggctcTTTTTG

AL137312 reverse :

AATTCAAAAgagcccaggaattcgagaccagt
ctggTCTGACAGGAAgcccagaccggctctcaa
attcctgagctcCG

GPR124 forward :

GATCCGttcctgtctccgtgaggtcagagga
aCTTCCTGTCAGAttcctctggccttacgga
ggcaaggaaTTTTTG

GPR124 reverse :

AATTCAAAAAttccttgctccgtaaggccag
aggaaTCTGACAGGAAgttctctggcctt
acggaggcaaggaaCG

SEZ6L forward :

GATCCGggagcagggactcccgtctggatgt
ctCTTCCTGTCAGAAgacgtccagatgg

gagtcctgtttcTTTTTG

SEZ6L reverse :

AATTCAAAAgaaacagggactcccatctg
gacgtctTCTGACAGGAAgagacgtccag
atgggagtcctgtttcCG

ADBRK2 forward :

GATCCGtggtactttgtactgggtgtacggcaCT
TCCTGTCAGAtgtctacagcccagtgcaaagt
atcaTTTTTG

ADBRK2 reverse :

AATTCAAAAtgatactttgcactgggctgtacga
caTCTGACAGGAAgtgtctacagcccagtgca
aaagtatcaCG

RECQL5 forward :

GATCCGggtacgtgggagtgatcagcagaaa
CTTCCTGTCAGAttctgtctggcccactcccat
gtgccTTTTTG

RECQL5 reverse :

AATTCAAAAggcacatgggagtgaggaccagc
agaaaTCTGACAGGAAgttctgtctggcccac
tcccatgtgccCG

PAPLN forward :

GATCCgatctcttaggacttctgattccttggctCTTC
CTGTCAGAAatcaaggaattagaagtcctgagag
aTTTTTTG

PAPLN reverse :

AATTCAAAAAtctctcaggacttctaattccttgat
TCTGACAGGAAgatcaaggaattagaagtcct
gagagatCG

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

UUCCGAUAUG
 RP11-498D10
 GGAUUCGGUAUGAUCUG
 CGAUUUCAGG
 4826992
 UGGCACUCCAGAGUUGU
 UCGUCCCUCC
 CIT987SK
 UAAUGGUAACCUGAGCC

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
 GINSsub4
 GAGAGAUUGCUCACAG
 AAGCACAGAG
 DKFZp434
 GUAAGCCACUGAUUAU
 UCCACAUAAU
 FRMD6
 GCAACAUUGCCUUAUCA
 CGCUAGGUUC
 SIX3
 ACCAUACACACAUAACAAG
 UCCACACAC
 RP11-447L10
 UGAGAGGGUGUGGUUCU

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
LRRTM4
GUGCAAAGACUGACUAC
UAAGGCCUUG
FLJ40660
GUGGCAAUAGUAAACUGA
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

し、siRNA 発現プラスミド 2 μg を添加し、1200 V, 20 m/s, 2 回の条件で導入した。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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の puromycin で処理することにより確認した。

9. メチル水銀またはカドミウムによる毒性試験

2 $\times 10^4$ cells/90 ml/well となるように HEK293 細胞を 96 well plate に播いた後、24 時間後に各濃度(0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 μM)の塩化メチル水銀または各濃度(0, 20, 25, 30, 35, 40, 45 μM)の塩化カドミウムで処理した。処理 24 時間後に、塩化メチル水銀または塩化カドミウムを含む培地から 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,590 nm)。

10. 総 RNA の単離

5 $\times 10^6$ cells の細胞に Isogen 1 ml (Nippon gene, Japan) を加えて懸濁した後、0.2 ml chloroform を加え、激しく攪拌した後、12,000 g 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 g 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、TE に溶解し RNA 溶液を得た。

11. 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 μM), 5 \times M-MLV buffer (2 μl)となるように反応液を調整し、42 $^{\circ}\text{C}$ で 15 min 逆転写反応を行った。反応後、酵素を失活させるため、95 $^{\circ}\text{C}$ で 2 min 加熱した。

12. 定量 PCR

cDNA 2 μl (20 ng)に対し、SYBR Permixon Ex Taq 10 μl , forward primer 4 μM , reverse primer 4 μM , MiliQ 7.2 μl となるように反応液を調整し、定量 PCR 法を行った。用いたプライマー、PCR 反応条件は以下に示した。定量 PCR 法は iCycler iQ detection System で行い、経時的に蛍光の変化の検出を行った。mRNA 量は内標準対照遺伝子として一般的に発現量が一定であると考えられている hGAPDH mRNA を用いて標準化した。

(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。