

Fig. 5-2 dsRNA 導入細胞のカドミウムに対する感受性

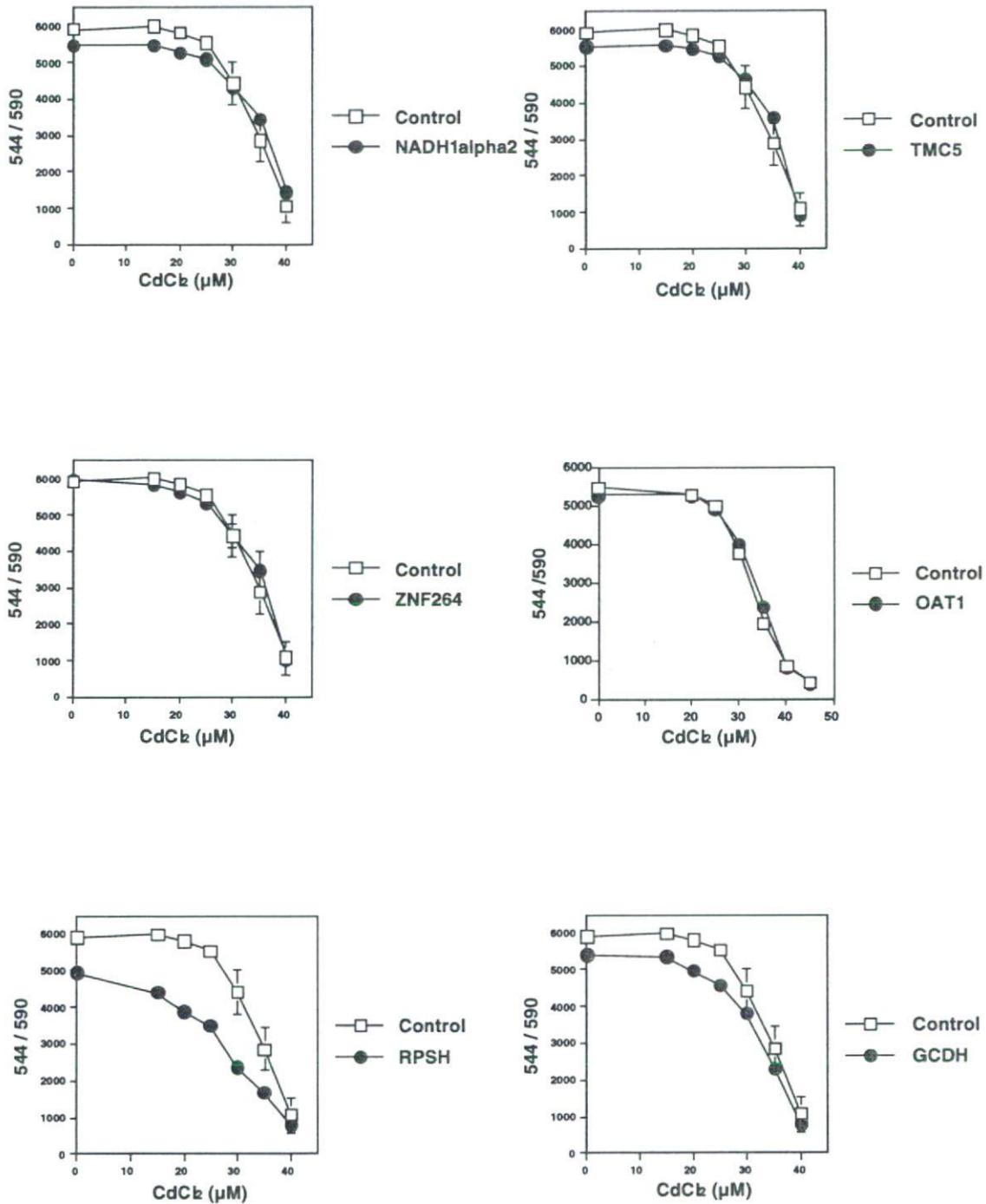


Fig. 5-3 dsRNA 導入細胞のカドミウムに対する感受性

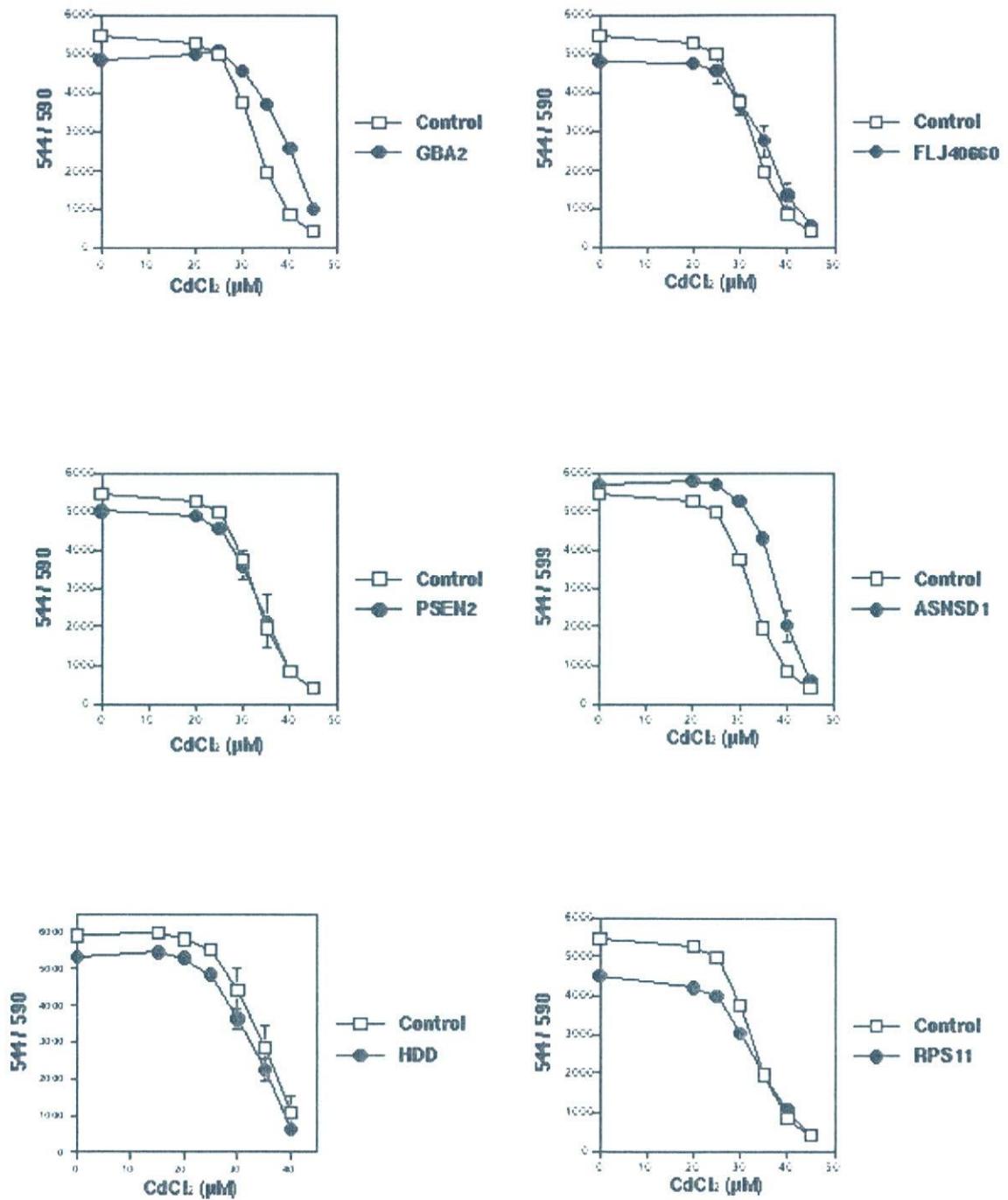


Fig. 5-4 dsRNA 導入細胞のカドミウムに対する感受性

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（2）

分担研究者 黄 基旭 東北大学大学院薬学研究科助手
（協力研究者 高橋 勉 日本食品衛生協会リサーチレジデント）

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を検索するために、50K siRNA ライブラリー導入 HEK293 細胞を用いたところ、化学物質処理とは関係なくシグナル強度が変動する遺伝子が多く存在することが明らかとなった。そこで、非特異的なシグナル強度の変動を排除するために、新たな siRNA ライブラリー導入する方法を検討したところ、従来の導入方法より約 5 倍程度導入効率を高めることに成功した。さらに、従来のスクリーニング方法では 1 回でかかる費用は 400 万円と高額であったが、その費用をより低額で実施可能なシステムを構築することに成功した。今後、本システムによって、種々の化学物質に対する感受性に影響を与えるヒト遺伝子群をより網羅的、かつ、確実に同定できることが期待される。

A. 研究目的

siRNA ライブラリー50K（ヒト遺伝子の約 50,000 種）ウイルスの感染効率が他の細胞に比べ高い 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およびカドミウム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、化学物質処理とは関係なくそのシグナル強度が変動する遺伝子が多く見られたことから、化学物質感受性に関わるヒト

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。また、本スクリーニング法は1回のスクリーニングでかかる費用が約 400 万円と高額であることから、より低費用でスクリーニングが実施可能な実験系の構築を試みた。

B. 研究方法

1. レンチウイルス作製法の検討

293FT 細胞を 5×10^6 cells / 10 cm シャーレになるように播き、D-MEM (10%FCS)、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養した。培地を D-MEM (3% FCS) に交換後、レンチウイルスのパッケージングに必要なプラスミド群および GFP 発現レンチベクター pSIH-H1-copGFP (System Bioscience) を表 1 に示す量比で Lipofectamine 2000™ (Invitrogen) を用いて 293FT 細胞に導入し、37°C、5 % CO₂ 存在下で 12 時間培養した。その後、新しい D-MEM (10%FCS) 培地に交換し、48 時間後に回収した上清を Millex-HV 0.45 μm PVDF filters で濾過したものを GFP 発現ベクターウイルス溶液とした。

2. レンチウイルス感染法を用いた HEK293 細胞への遺伝子導入の検討

(方法 A) 2×10^6 個の HEK293 細胞を 10 cm シャーレに播き、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養し、培地を除去した後、1.で得られたウイルス溶液 1 mL 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溶液を細胞全体に行き渡らせるという操作を 10 分おきに 1 時間行った。次に polybrene を含む D-MEM (10%FCS) を 4 mL 加え (polybrene 濃度: 6 μg/mL)、37°C、5 % CO₂ 存在

下で 24 時間培養した。その後、新しい D-MEM (3% FCS) に交換後、37°C、5 % CO₂ 存在下で 24 時間培養し、蛍光顕微鏡で GFP 導入細胞を観察した。

(方法 B) 4×10^6 個の HEK293 細胞を 1.で得られたウイルス溶液 1 mL に懸濁し、10 分おきに転倒混和をしながら 37°C、5% CO₂ で 1 時間インキュベートした。次に polybrene を含む D-MEM (10%FCS) を 4 mL 加え (polybrene 濃度: 6 μg/mL)、37°C、5 % CO₂ 存在下で 24 時間培養した。その後、新しい D-MEM (3% FCS) に交換後、37°C、5 % CO₂ 存在下で 24 時間培養し、蛍光顕微鏡で GFP 導入細胞を観察した。

3. siRNA ライブラリー発現ベクター (ウイルス) の作製

293FT 細胞を 5×10^6 cells / 10 cm シャーレになるように 100 枚播き、D-MEM (10%FCS)、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養した。培地を D-MEM (3% FCS) に交換後、レンチウイルスのパッケージングに必要な 2 種のプラスミド DNA (pFIV-34N : 8 μg, pVSV-G : 2 μg) および siRNA ライブラリー発現ベクター pSIF-H1-Puro-siRNA library (Human 50K) (System Bioscience) を Lipofectamine 2000™ を用いて 293FT 細胞に導入し、37°C、5 %

CO₂存在下で 12 時間培養した。その後、新しい D-MEM (10%FCS) 培地に交換した後、12 時間ごとに培養上清の回収および新しい培地の添加を行い、72 時間後まで培養した。回収した培養上清を Millex-HV 0.45 μm PVDF filters で濾過したものを siRNA ライブラリーウイルス溶液とした。

4. レンチウイルス感染法を用いた siRNA ライブラリーの HEK293 細胞への導入

4 x10⁶ 個の HEK293 細胞を 3. で得られたレンチウイルス溶液 1 mL に懸濁し、10 分おきに転倒混和をしながら 37°C、5% CO₂ で 1 時間インキュベートした。次に polybrene を含む D-MEM (10%FCS) を 4 mL 加え (polybrene 濃度: 6 μg/mL)、37°C、5 % CO₂ 存在下で 24 時間培養した。その後、新しい D-MEM (3% FCS) に交換後、37°C、5 % CO₂ 存在下で 72 時間培養した。

5. 種々の化学物質で処理した HEK293 細胞から総 RNA の抽出

4 で得られた siRNA ライブラリー導入細胞を dish より剥がし、5x10⁶ cells/10 cm dish になるよう control (12 枚)、メチル水銀処理群 (12 枚)、カドミウム処理群 (12 枚) および亜ヒ酸処理群 (12 枚) を播き直し、37°C、

5% CO₂ 存在下で 24 時間培養後、塩化メチル水銀 (final 15 μM、生存率 20% 以下)、塩化カドミウム (final 100 μM、生存率 20%以下)、亜ヒ酸 (final 5 μM、生存率 20%以下) を添加して 60 時間培養した。培養終了後、各 dish の培地を取り除き、3 枚の dish を 1 群とし、各細胞を 1.5 mL tube にまとめた。その後、TRIzol (Invitrogen) 1 ml を加え、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。

6. 種々の化学物質で処理した HEK293 細胞から genomic DNA の抽出

5 で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 分間遠心分離した後、中間層および有機層に 0.3 mL エタノールを加えて inversion し、室温で 3 分間放置し、2,000 xg で 5 分間遠心分離し、回収した沈殿物は 10%エタノールを含

む 0.1 M sodium citrate で 30 分間リンスを 2 回行った。その後、12,000 xg で 10 分間遠心分離し、沈殿した genomic DNA 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。

7. 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。

8. 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。

9. 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 DNA (10 µg) を用いて hybridization master mixture (control oligonucleotide B2、

eukaryotic hybridization controls、herring sperm DNA、BSA、hybridization buffer、DMSO) と混合した液 250 μ l を調整し、99°C 5 分、45°C 5 分間処理した後、12,000 \times g で 5 分間遠心分離した。得られた上層液を Affymetrix Human Genome U133 plus 2 に注入し、hybridization oven で 45°C、16 時間インキュベートした。Hybridization 終了後、Fluidics Station 450 を用いて洗浄および染色を行い、chip scanning は GeneChip Scanner 3000 で行った。なお、データ解析は Genespring software version 7.0 (Silicon Genetics) を用いた。

(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。

C. 結果・考察

1. siRNA ライブラリーウイルスのパッケージングおよび HEK293 細胞への導入方法の検討

レンチウイルスのパッケージングに用いるプラスミドの量比は、推奨されている pFIV-34N : pVSV-G (1:1) に比べて、pFIV-34N : pVSV-G (4:1) にすることで大幅に改善された。また、

レンチウイルスのパッケージングに用いるプラスミド (pFIV-34N, pVSV-G) を塩化セシウム法によって精製することにより、パッケージング効率は上昇した (Table 1)。なお、レンチウイルスを用いた標的細胞 (HEK293 細胞) への感染は、標的細胞をシャーレに接着させた状態でウイルスと接触させる方法 (A) より、標的細胞を浮遊させた状態でウイルスと接着させる方法 (B) の方が、感染効率が高かった (Fig. 1)。

また、上記で確立されたウイルス感染方法を用いて、HEK293 細胞への siRNA ライブラリー導入効率を検討した。まず、従来方法または今回改善された方法を用いて siRNA ライブラリーが導入された HEK293 細胞から、genomic DNA を抽出した後、PCR 方法を用いて導入効率を確認した。siRNA ライブラリーが導入された細胞は染色体に siRNA 発現ベクター由来の WPRE (Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) 配列を有することから、その配列を特異的に増幅させるプライマーを用いた PCR により、細胞への導入効率が定量的に確認することが可能である。なお、すでに感染効率が確認された細胞の genomic DNA を standard とし、housekeeping 遺伝子である PGK (Phosphoglycerate

kinase) を内部標準 control として用いた。その結果、従来の感染方法で siRNA ライブラリーを導入させた細胞の MOI は 0.2 ~ 0.3 程度であったのに対し、今回改善された感染方法によって siRNA ライブラリーを導入させた細胞ではほぼ MOI =1 の感染効率を示した (Fig. 2)。したがって、今回の siRNA ライブラリーウイルスのパッケージングおよび感染方法の改良によって、従来の方法に比べて約 5 倍以上の siRNA ライブラリーを HEK293 細胞に導入することに成功した。さらに、従来のスクリーニング方法では 1 つの化学物質に対して 2×10^7 ifu の siRNA ライブラリーウイルス (200 万円) を用いたが、今回の検討によって、市販される siRNA ライブラリーウイルス (System BioScience 社) より感染効率が高く、かつ、大量 (2×10^9 ifu) に作製することに成功した。今後、今回の作製した siRNA ライブラリーウイルスを用いて、種々の化学物質に対する感受性に影響を与えるヒト遺伝子群をより網羅的に検索することが期待される。

2. 発現抑制によって種々の化学物質の感受性に影響を与える因子の検索

これまでに、50K siRNA ライブラリー導入 HEK293 細胞を用いた化学物質 (メチル水銀およびカドミウム) の

感受性に影響を与えるヒト遺伝子群の検索を行い、それらの感受性に影響を与える因子を多数同定することに成功している。しかし、これまでのスクリーニング方法では化学物質処理とは関係なく、サンプル毎にシグナル強度が変動する遺伝子が多く存在した。そこで今回は、上記の 2 で作製した siRNA ライブラリーを用い、メチル水銀、カドミウムおよび亜ヒ酸に対する感受性に影響を与えるヒト遺伝子群の検索を行った。なお、今回のスクリーニングでは対照群および各々の化学物質処理群ともにそれぞれ 3 サンプルについて解析を行い、すべてのサンプルについて共通して変動する遺伝子を化学物質に対する感受性に影響を与える因子の候補として同定することで、化学物質処理とは関係なくシグナル強度が変動する遺伝子の排除を試みた。なお、化学物質非処理群の各遺伝子のシグナル強度は 3 つのサンプルから得られた各遺伝子に対するシグナル強度をそれぞれ平均した値で示した。まず、化学物質非処理群の各遺伝子のシグナル強度に対し、各々の化学物質で処理した 3 つのサンプルから得られた各遺伝子のシグナル強度についてそれぞれ scatter plot した。その結果、siRNA ライブラリーを導入させた細胞をメチル水銀で処理した場合は、シグナル強度が 1/2 以下に低

下した遺伝子が7種 (Fig. 3-1)、シグナル強度が2倍以上に上昇した遺伝子が13種 (Fig. 3-2) 同定された。カドミウム処理の場合はシグナル強度が1/2以下に低下した遺伝子が18種 (Fig. 4-1)、シグナル強度が2倍以上に上昇した遺伝子が13種 (Fig. 4-2) 同定された。また、亜ヒ酸処理の場合はシグナル強度が1/2以下に低下した遺伝子が13種 (Fig. 5-1)、シグナル強度が2倍以上に上昇した遺伝子が18種 (Fig. 5-2) 同定することに成功した。今回同定された遺伝子は化学物質処理とは関係なくシグナル強度が変動する可能性が低く、ほとんどの因子がそれぞれの化学物質に対する感受性決定に重要な役割を果たすものと思われる。

る。現在、これら因子に対する siRNA をそれぞれ導入させた細胞について各々の化学物質に対する感受性を再検討している。

D. 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。

Table 1 レンチウイルス感染法を用いた HEK293 細胞への GFP 遺伝子の導入

| パッケージングプラスミド | | プラスミド精製法 | ウイルス感染法 | 導入効率 (%) |
|----------------------------|-----------------|------------------------|---------|----------|
| pACK Packaging Plasmid Mix | 10 µg | System Bioscience から購入 | 方法 A | 90% |
| pFIV-34N : pVSV-G | 5 µg : 5 µg | アルカリ抽出法 (Qiagen) | 方法 A | 10% |
| pFIV-34N : pVSV-G | 6.6 µg : 3.3 µg | アルカリ抽出法 (Qiagen) | 方法 A | 20% |
| pFIV-34N : pVSV-G | 8 µg : 2 µg | アルカリ抽出法 (Qiagen) | 方法 A | 60% |
| pFIV-34N : pVSV-G | 8 µg : 2 µg | 塩化セシウム法 | 方法 A | 90% |
| pFIV-34N : pVSV-G | 8 µg : 2 µg | 塩化セシウム法 | 方法 B | 95% |

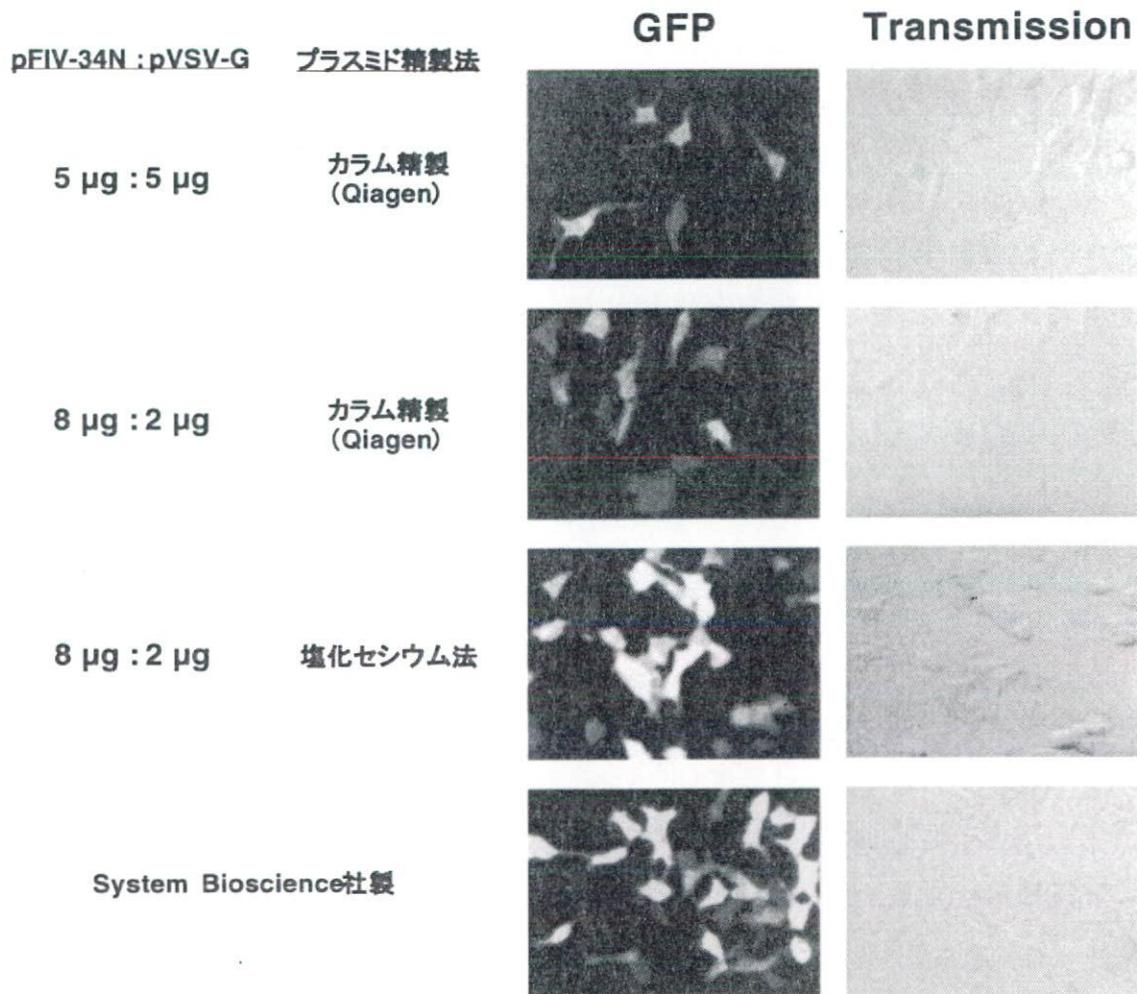
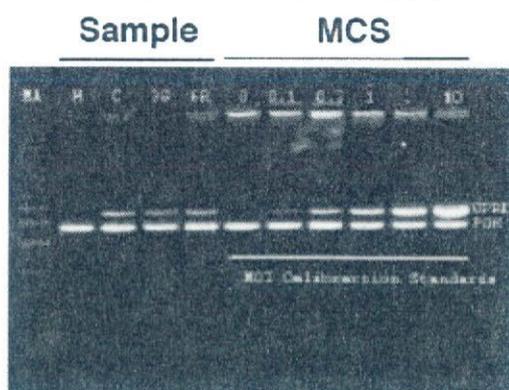


Fig. 1 レンチウイルス感染法を用いた HEK293 細胞への GFP 遺伝子の導入

a. 従来の導入法による感染効率



MCS : MOI calibration standards

MA : Marker

M : Mock

C : Control

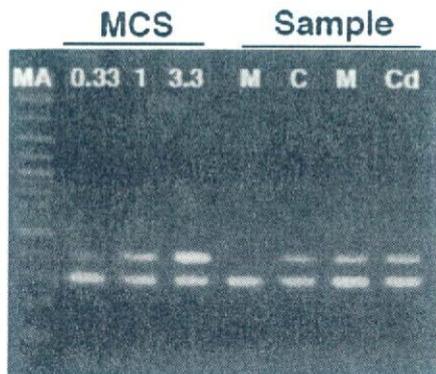
3S : Methylmercury 3 μ M

6R : Methylmercury 6 μ M

WPRE : Woodchuck hepatitis virus
posttranscriptional regulatory element
(lentivector-specific region)

PGK : Phosphoglycerate kinase
(Housekeeping gene)

b. 今回の導入法による感染効率



M : Mock

C : Control

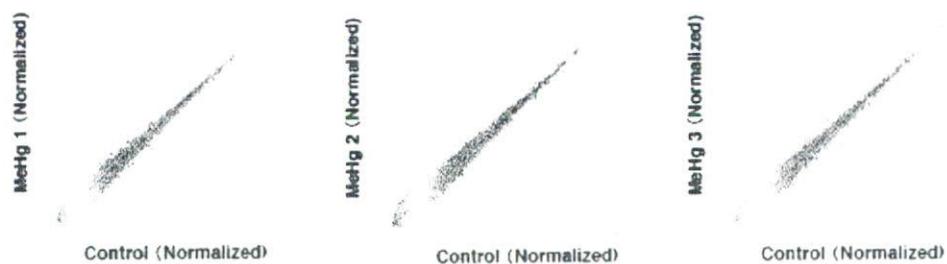
M : Methylmercury

Cd : Cadmium

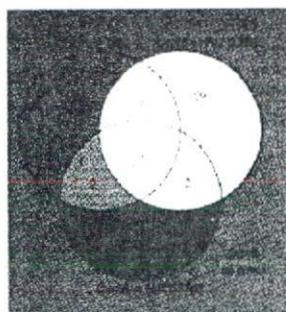
← WPRE
← PGK

Fig. 2 HEK293 細胞への siRNA ライブラリーの導入効率

Screening of genes that involved in methylmercury toxicity using siRNA librarise - 1



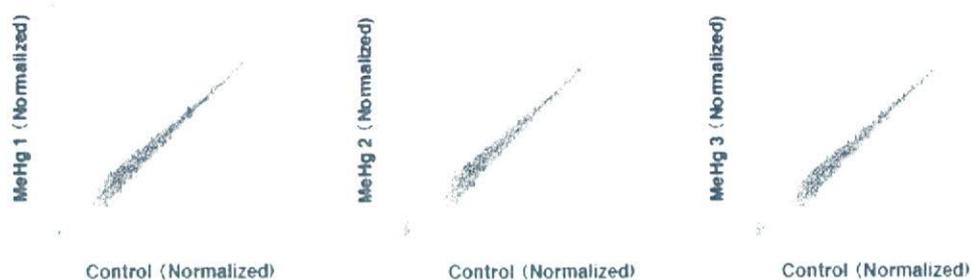
Select genes within lines (fold < 1/2)



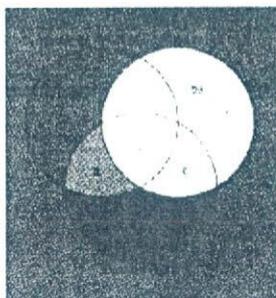
| Common name | Genbank No. | Description |
|---------------|-------------|---|
| LOC286207 | AK094948 | hypothetical protein LOC286207 |
| IMAGE:2662086 | AW182934 | cDNA clone IMAGE:2662086. |
| TN-R | Y13359 | Homo sapiens mRNA for tenascin-R, 5' UTR. |
| FLJ39479 | AL633150 | cDNA FLJ39479 fis, clone PROST2013627 |
| FLJ38525 | AI733348 | cDNA FLJ38525 fis, clone HCHON2000851 |
| FLJ39739 | AK097058 | FLJ39739 protein |
| MGC15523 | BC020925 | hypothetical protein MGC15523 |

Fig. 3-1 メチル水銀で処理した細胞の scatter plot analysis およびその感受性に影響を与える因子 (1)

Screening of genes that involved in methylmercury toxicity using siRNA librarise - 2



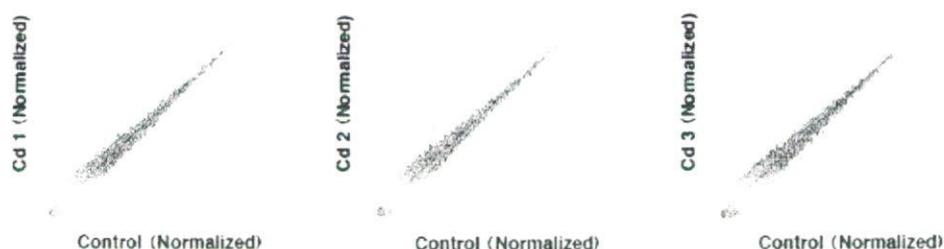
Select genes within lines (fold > 2)



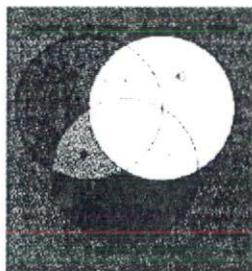
| Common name | Genbank No. | Description |
|---------------|-------------|--|
| CANP | AA960844 | cancer-associated nucleoprotein |
| IMAGE:298797 | BC007558 | cDNA clone MGC:15483 IMAGE:2987974, complete cds |
| CDH23 | AL122081 | cadherin related 23 |
| RP1-296K21 | Z83821 | clone RP1-296K21 on chromosome Xq13, complete sequence. |
| LOC389132 | BC039495 | Similar to double homeobox protein (LOC389132), mRNA |
| LOC38990 | BC017239 | Similar to Serine/threonine protein kinase PRKX |
| PDCD6 | BC020552 | programmed cell death 6 |
| CACNA1A | NM_023035 | calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit |
| AFG3L2 | AA905788 | AFG3 ATPase family gene 3-like 2 (yeast) |
| CSMD1 | AB067477 | CUB and Sushi multiple domains 1 |
| AP1S3 | AF393369 | adaptor-related protein complex 1, sigma 3 subunit |
| IMAGE:2072754 | A1440386 | cDNA clone IMAGE.2072754 |
| IMAGE:3084624 | BF511336 | cDNA clone IMAGE.3084624 |

Fig. 3-2 メチル水銀で処理した細胞の scatter plot analysis およびその感受性に影響を与える因子 (2)

Screening of genes that involved in cadmium toxicity using siRNA librarise - 1



Select genes within lines (fold < 1/2)



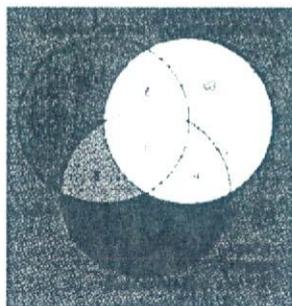
| Common name | GenBank No. | Description |
|---------------|-------------|--|
| NY-BR-46 | AF308291 | serologically defined breast cancer antigen NY-BR-46 |
| DKFZp761D1624 | BQ636703 | MRNA; cDNA DKFZp761D1624 |
| ACSL4 | W95007 | acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 |
| FOXP2 | AF493430 | forkhead box P2 |
| FLJ10357 | R42449 | hypothetical protein FLJ10357 |
| CDC34 | AI199095 | cell division cycle 34 |
| FAF1 | AW140098 | Fas (TNFRSF6) associated factor 1 |
| HT014 | AI867781 | HT014 |
| DKFZp761P2319 | AL833240 | MRNA; cDNA DKFZp761P2319 |
| CACNB2 | AL162054 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761J1323 |
| LOC286207 | AK094948 | hypothetical protein LOC286207 |
| PLXNA4 | AB046770 | plexin A4 |
| | CA430188 | cDNA clone UI-H-FL1-bfw-c-18-0-UI 3', mRNA sequence. |
| IMAGE:2662086 | AW182934 | cDNA clone IMAGE:2662086 |
| IMAGE:5296106 | BC042986 | CDNA clone IMAGE:5296106, partial cds |
| GRIK2 | AJ301610 | glutamate receptor, ionotropic, kainate 2 |
| FLJ42457 | AA527515 | cDNA FLJ42457 fis, clone BRACE2018700 |
| ZDHHC11 | AF267859 | Homo sapiens GL013 mRNA, complete cds. |

Fig. 4-1 カドミウムで処理した細胞の scatter plot analysis およびその感受性に影響を与える因子 (1)

Screening of genes that involved in cadmium toxicity using siRNA librarise - 3



Select genes within lines (fold > 2)



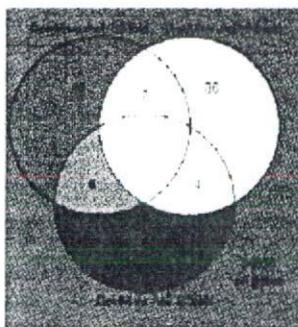
| Common name | GenBank No. | Description |
|---------------|-------------|--|
| LOC389132 | BC039495 | Similar to double homeobox protein (LOC389132), mRNA |
| DKFZp761J1919 | AL833238 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761J1919 |
| UGCGL2 | BC032302 | UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 2 |
| PDCD6 | BC020552 | programmed cell death 6 |
| CS0DC021YJ19 | AL527334 | cDNA clone CS0DC021YJ19 3-PRIME, mRNA sequence. |
| TTY6 | AF332237 | Similar to Transcript Y 6 protein (LOC389923), mRNA |
| 6M1-16 | AJ459849 | Homo sapiens mRNA for olfactory receptor (6M1-16 gene) |
| KCNIP2 | AF367019 | Kv channel interacting protein 2 |
| IMAGE:4837159 | BC036316 | Clone IMAGE:4837159, mRNA |
| CANP | AA960844 | cancer-associated nucleoprotein |
| FLJ90128 | A1452799 | cDNA FLJ90128 fis, clone HEMBB1000276. |
| FLJ36116 | AK093435 | LOC388666 (LOC388666), mRNA |
| TGAP18 | AJ012498 | mRNA activated in tumor suppression, clone TSAP18. |

Fig. 4-2 カドミウムで処理した細胞の scatter plot analysis およびその感受性に影響を与える因子 (2)

Screening of genes that involved in arsenite toxicity using siRNA librarise - 1



Select genes within lines (fold < 1/2)



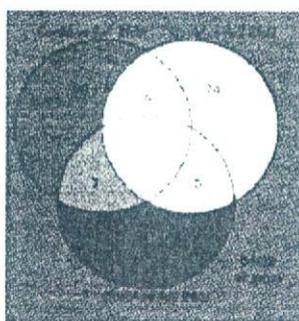
| Common name | GenBank No. | Description |
|---------------|-------------|--|
| ZNF599 | BC033354 | zinc finger protein 599 |
| AD24 | AF086377 | AD24 protein |
| | BC007806 | |
| CACNA1A | NM_023035 | calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit |
| NY-BR-46 | AF308291 | serologically defined breast cancer antigen NY-BR-46 |
| LOC389132 | BC039495 | Similar to double homeobox protein (LOC389132) |
| CANP | AA960844 | cancer-associated nucleoprotein |
| GRIK2 | AJ301610 | glutamate receptor, ionotropic, kainate 2 |
| IMAGE:2662086 | AW182934 | cDNA clone IMAGE: 2662086 |
| LOC286207 | AK094948 | hypothetical protein LOC286207 |
| LOC148137 | NM_144692 | hypothetical protein BC017947 |
| C9orf10 | AU116818 | chromosome 9 open reading frame 10 |
| FLJ42457 | AA527515 | cDNA FLJ42457 fis, clone BRACE2018700 |

Fig. 5-1 亜ヒ酸で処理した細胞の scatter plot analysis およびその感受性に影響を与える因子 (1)

Screening of genes that involved in arsenite toxicity using siRNA librarise - 3



Select genes within lines (fold > 2)



| Common name | GenBank No. | Description |
|---------------|-------------|--|
| LA16c-390E6 | AL031600 | LA16c-390E6 on chromosome 16, complete sequence. |
| ATP2A2 | AA805753 | ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2 |
| SMPD2 | AI739480 | sphingomyelin phosphodiesterase 2, neutral membrane |
| SECTM1 | BF939675 | secreted and transmembrane 1 |
| FLJ32871 | NM_144674 | hypothetical protein FLJ32871 |
| | BM676963 | cDNA clone UI-E-EO1-aib-g-06-0-UI 3', mRNA sequence. |
| FLJ22347 | NM_022830 | hypothetical protein FLJ22347 |
| RP1-296K21 | Z83821 | clone RP1-296K21 on chromosome Xq13 |
| | U82303 | novel ORF; Homo sapiens unknown protein mRNA |
| CACNB2 | AL162054 | cDNA DKFZp761J1323 |
| IMAGE:5744875 | BC039537 | cDNA clone IMAGE:5744875, partial cds |
| KCNIP2 | AF367019 | Kv channel interacting protein 2 |
| HTBABA11 | AV723666 | AV723666 HTB Homo sapiens cDNA clone HTBABA11 |
| FLJ11951 | BU683708 | cDNA FLJ11951 fis, clone HEMBB1000827 |
| IMAGE:5297130 | BC043275 | cDNA clone IMAGE:5297130, partial cds |
| MYO1D | BC030602 | myosin ID |
| PDCD6 | BC020552 | programmed cell death 6 |
| SNAP29 | NM_004782 | synaptosomal-associated protein, 29kDa |

Fig. 5-2 亜ヒ酸で処理した細胞の scatter plot analysis およびその感受性に影響を与える因子 (2)

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

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

分担研究者 永沼 章 東北大学大学院薬学研究科教授
（協力研究者 高橋 勉 日本食品衛生協会リサーチレジデント）

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亜ヒ酸を対象化学物質として検討した。cDNA ライブラリー導入細胞を親株において顕著な生育抑制が観察される亜ヒ酸濃度で培養し、生き残った細胞から genomic DNA を回収し、ゲノム中に挿入されている cDNA 配列を調べた。その結果、細胞内小胞輸送に関わる Rab ファミリーの活性抑制因子である GDP dissociation inhibitor 2 (GDI2) (全長 1338 bp) の C 末端領域 (1243-1319 bp) が挿入されていることが明らかとなった。また、全長 GDI2 を高発現する細胞は、コントロールの細胞に比べて高い亜ヒ酸感受性を示した。したがって、GDI2 は亜ヒ酸毒性を増強する因子であり、GDI2 の C 末端領域の過剰発現は内因性の GDI2 の機能を阻害するため、細胞に亜ヒ酸耐性を与えている可能性が考えられる。

本実験系は、ヒ素のみならず様々な環境化学物質に対する感受性に影響を与える細胞内因子のスクリーニングに応用することが可能であり、化学物質感受性決定機構の解明研究に大きな発展をもたらすものと期待される。

A. 研究目的

ヒ素 (As : Arsenic) は、環境汚染物質として古くから毒性が知られており、特にインド・バングラディッシュ周辺の西ベンガル地域における地下ヒ素汚染問題は未曾有の重金属汚染である。原因は、両国でここ 40 年来推進されてきた地下水くみ上げによ

る灌漑政策で、地下水の過剰使用によって地中のヒ素が滲み出したことである。これらの地域でヒ素に汚染された地下水を飲用している人口は 4400 万人にも及ぶ。バングラディッシュではヒ素に汚染された地下水が原因で、毎年最大 12 万 5 千症例の皮膚がんが発生し、3000 人が亡くなっている。

ヒ素は、原子量 33 の元素であり、半金属に分類される。環境中には、ヒ素 5 価やヒ素 3 価の形で存在し、有機ヒ素の形態はほとんど存在しない。農薬やシロアリ駆除剤、半導体の材料などに使用され、近年では白血病の治療薬として注目されているという一面も持つ。また、1998 年に和歌山県和歌山市で発生した毒入りカレー事件でヒ素の毒性が社会的に注目されたことは記憶に新しい。

ヒ素は、人体に入ると、生体内でメチル化を受け、ジメチルアンシン酸などとして尿中に排泄される。ヒ素のメチル化はヒ素の毒性を大幅に軽減させるため、一種の解毒機構だと考えられる。ヒ素は、大量摂取による急性毒性として、消化管の粘膜障害からの嘔吐、下痢、脱水によるショック症状、神経症などを、長期連続摂取による慢性毒性としては、皮膚の黒色素沈着、脱着角化等の皮膚障害や、皮膚がん、肺がん、肝がんなどを引き起こすことが知られている。

細胞レベルにおいてヒ素は、活性酸素種を産生すること、MAP kinase を含むシグナル伝達系を活性化すること、細胞の分化異常やアポトーシスを引き起こすことが報告されている。また、ヒ素において誘導されるアポトーシスは Bcl-2 により制御されるミトコンドリア経路を介して起こることが知

られている。しかし、細胞内においてヒ素が毒性を発現する機構は不明な点が多い。

本研究ではヒ素の毒性発現機構の解明を目的として、Flp-In system を用いてヒト骨髄由来 cDNA ライブラリーをゲノムの特定の部位に導入したヒト胎児腎由来培養細胞 (Flp-In-293 cell) を作製し、過剰発現によって亜ヒ酸耐性を与える細胞内因子の検索を行った(Figs. 1 and 2 参照)。

B. 実験方法

1. ヒト骨髄由来 cDNA ライブラリーからのプラスミドの抽出

ヒト骨髄由来 cDNA ライブラリーが導入された大腸菌 (Electro MAX™ DH12S™) 2.5×10^9 cells を 100 mL Terrific Broth (containing 100 μ g/mL ampicillin) 中に混和し、30°C で 16 時間振盪培養した。cDNA ライブラリーはプラスミド pCMV · SPORT6 (Invitrogen) に組み込まれている。cDNA ライブラリーを含むプラスミドをアルカリ法で回収した。その一部を制限酵素 *EcoRI*、*HindIII* で切断後、電気泳動を行って cDNA 由来と考えられるスメア状のバンドを確認した。また、アルカリ法で抽出したプラスミドは、Plasmid Miniprep Kit (Sigma) を用いてさらに精製した。