

Figure 3 Involvement of members of the Ark/Prk kinase family in the sensitivity of yeast cells to adriamycin. (A) Yeast cells (BY4742) harboring pRS315, pRS315-*AKL1*, pRS315-*ARK1* or pRS315-*PRK1* were grown in SD (-Leu) medium that contained adriamycin. (B) Yeast (BY4742) cells lacking Ark1, Prk1, or AkI1 (*ark1* Δ , *prk1* Δ , and *akI1* Δ , respectively) were grown in SD medium that contained adriamycin. For further details, see the legend to Fig. 1 (B).

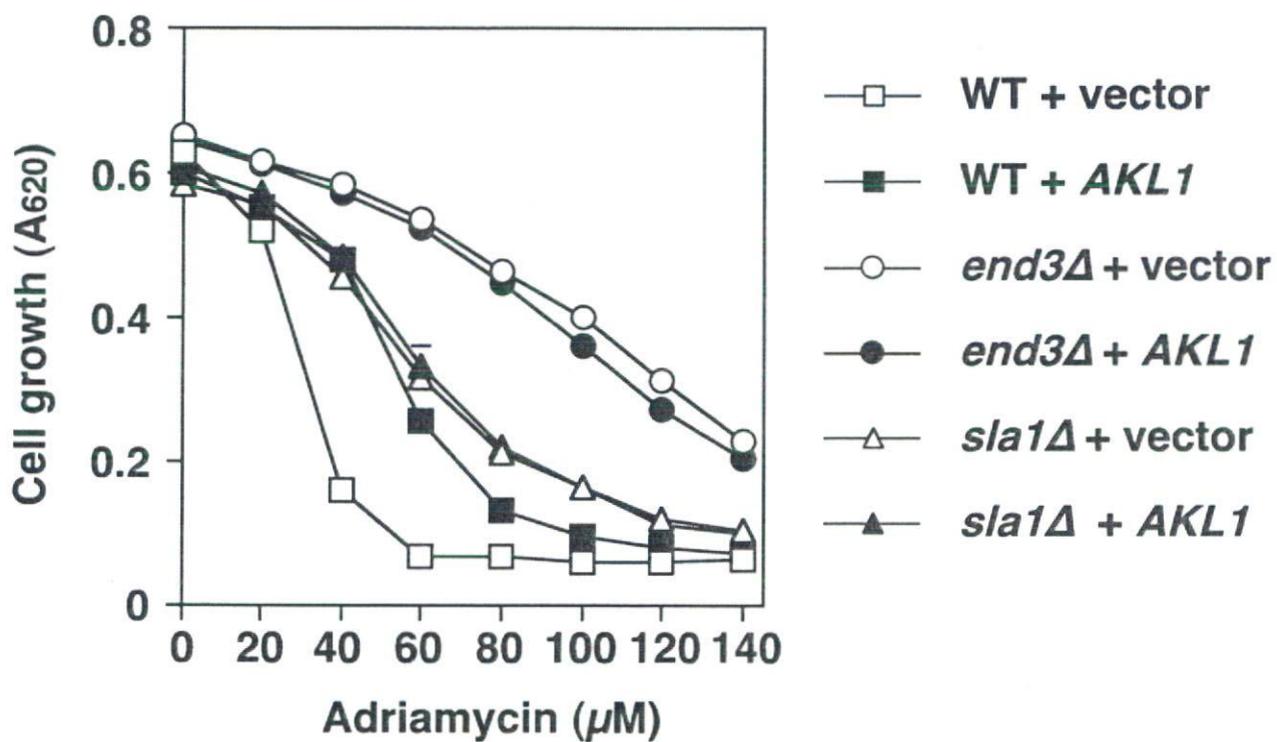


Figure 4 Relationship between Ak11 and the Sla1/End3/Pan1 complex in the acquisition of adriamycin resistance. Yeast strains (BY4742, *sla1Δ*, and *end3Δ*) harboring pRS315 or pRS315-*AKL1* were grown in SD (-Leu) medium that contained adriamycin. After incubation for 24 hr at 30 °C, the absorbance was measured spectrophotometrically at 620 nm. Each point represents the mean value of results from three cultures with S.D. (bar). The absence of a bar indicates that the S.D. falls within the symbol.

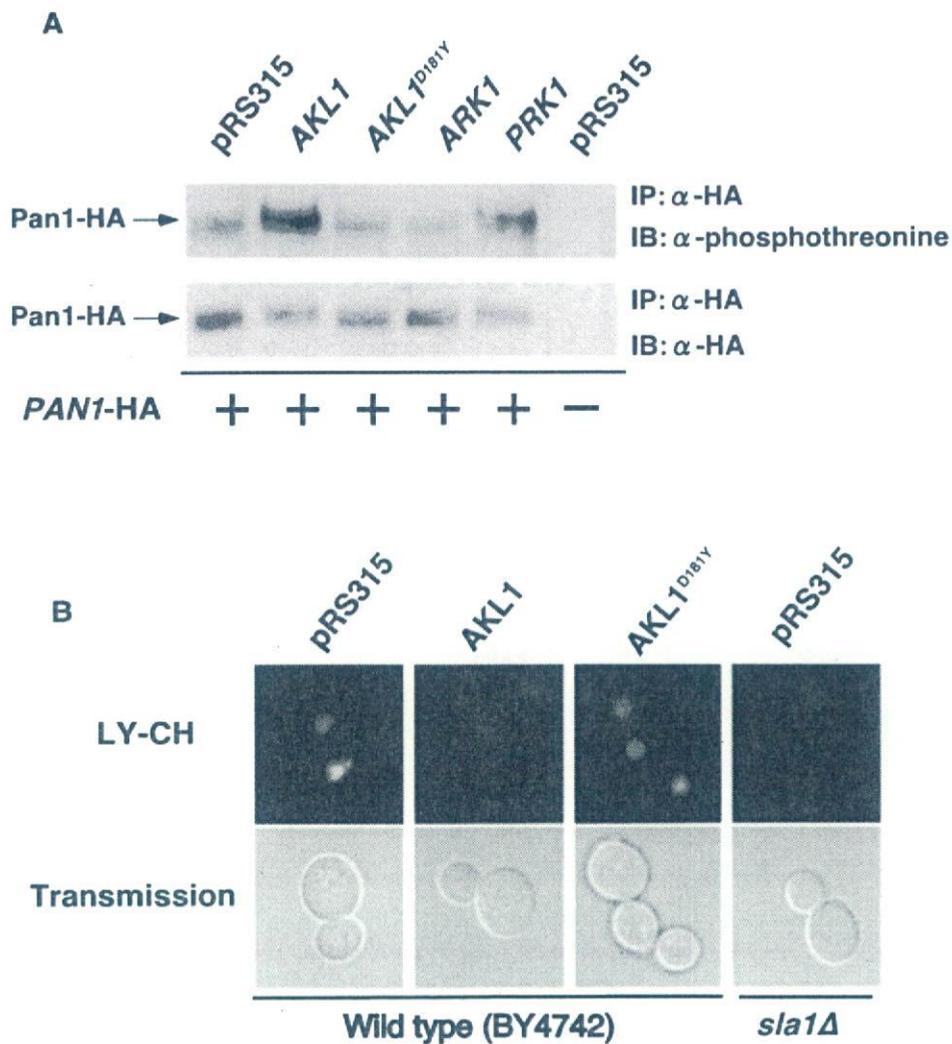


Figure 5 Effects of overexpression of Ak11 on the phosphorylation of Pan1-HA and the endocytic uptake of lucifer yellow. (A) Yeast (BY4742) cells expressing Pan1 tagged with HA at the carboxyl terminus (Pan1-HA) were transformed with pRS315, pRS315-*AKL1*, pRS315-*ARK1*, pRS315-*PRK1* or pRS315-*AKL1^{D181Y}*. Pan1-HA was immunoprecipitated (IP) with anti-HA agarose and immunoblotted with phosphothreonine-specific antibody (α -phosphothreonine; upper panel) or HA-specific antibody (α -HA; lower panel). See text for details. (B) Yeast cells at the logarithmic phase of growth were incubated with lucifer yellow for 2 hr. The localization of lucifer yellow was visualized with fluorescein isothiocyanate (FITC) fluorescence optics. The fluorescent images (LY-CH; upper panel) and the transmission images (lower panel) are shown.

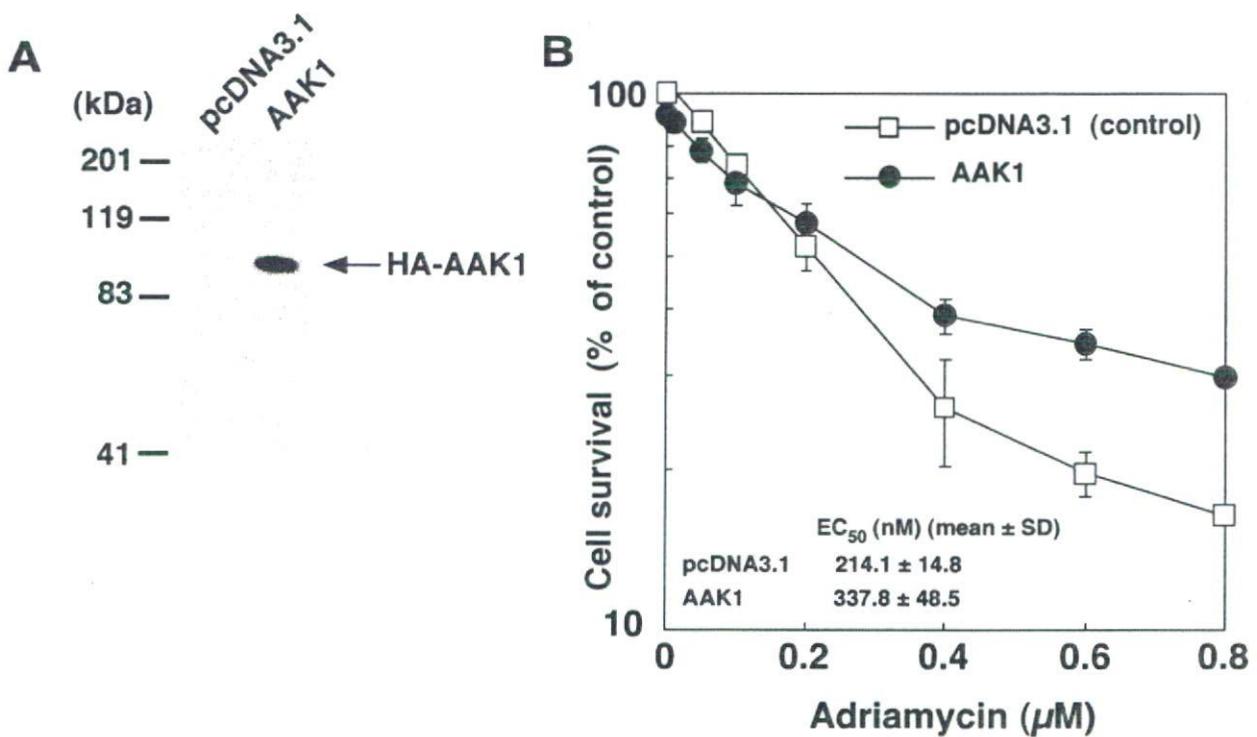


Figure 6 Effects of overexpression of AAK1, a member of the human Ark/Prk kinase family, on the sensitivity of HEK293 cells to adriamycin. (A) Immunoblotting analysis of HA-tagged AAK1. HEK293 cells were transfected with pcDNA3.1-HA-AAK1 or the pcDNA3.1 empty vector. Each lane was loaded with whole-cell extract from the indicated transfectants. (B) Sensitivity of HA-AAK1-expressing HEK293 cells to adriamycin. Transfectants expressing HA-AAK1 were cultured for 3 days in the presence of various concentrations of adriamycin. Each point and bar represents the mean value and SD of results from three cultures. The absence of a bar indicates that the SD falls within the symbol. EC_{50} for cytotoxicity was defined as the effective concentration of adriamycin that caused a 50% reduction in cell viability relative to non-adriamycin-treated controls (which represent 100% viability).

平成19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に対する感受性決定因子の網羅的検索

分担研究者 黄 基旭 東北大学大学院薬学研究科助教
（協力研究者 高橋 勉 東北大学大学院薬学研究科助教）

siRNA ライブラリーを用いてメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子群を検索したところ、発現抑制によって細胞のメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子として23種を新たに同定することに成功した。その中には、発現抑制によって細胞にメチル水銀高感受性を与える遺伝子として10種(CNTNAP2、USP15、SQRDL、GNB4、CXCL14、IL13RA2、STC1、GDF5、CPZ、CFI)、逆に、発現抑制によって細胞にメチル水銀耐性を与える遺伝子として13種(STX5、CCL27、LOC91664、AKR1B1、PSMD2、LONRF1、AKR1CL1、KIAA1833、HEMK1、LOC124446、WISP1、RP3-340N1.3、CLEC1A)が含まれていた。今回得られた遺伝子群がコードする蛋白質はその全てがメチル水銀毒性に関与することがはじめて示されたものであり、メチル水銀の細胞毒性発現機および生体の防御機構の解明に重要な手がかりを提供するものと思われる。本法は従来のスクリーニング法に比べてより確実に目的とする遺伝子群を同定することが可能であり、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が同定されるものと期待される。

A. 研究目的

これまで、我々は siRNA 発現プラスミドのライブラリー（SBI 社）をレンチウイルス感染法によってヒト培養細胞（HEK293 細胞）に導入し、発現抑制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てきた。しかし、メチル水銀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るなど、確実にメチル水銀感受性に影響を与え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、更なる実験系の構築が必要であった。また、SBI 社の siRNA ライブラリーは Affymetrix 社のマイクロアレイのチップの oligonucleotide と同じ塩基配列を siRNA 塩基配列として用いること

から、その siRNA 導入によって標的となる遺伝子の発現が十分に抑制されなかった場合も頻繁に認められた。そこで、より確実に遺伝子の発現を抑制するようにデザインされた Qiagen 社の siRNA ライブラリーを用いて、メチル水銀感受性に影響を与える遺伝子群を網羅的にスクリーニングした。

B. 実験方法

1. 細胞培養

ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞は Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) に 0.06 % L-glutamine、100 U/ml penicillin G sodium、100 µg/ml streptomycin sulfate および 10 % fetal bovine serum を添加した培地を用いて、37 °C、5 % CO₂ 存在下で培養した。

2. siRNA ノックダウン法を用いたメチル水銀感受性に影響を及ぼす遺伝子群の網羅的検索

96 well plate の各 well に 400 nM siRNA 混合溶液 2.5 µL (最終濃度 10 nM) および 3% HiPerFect reagent を含有する OptiMEM 溶液 12.5 µL を添加し、室温で 10 分間インキュベートした後、各 well に 1×10^4 cells/75 µL の HEK293 細胞を播種し、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養した。その後、

10 µL の塩化メチル水銀溶液 (最終濃度 3 µM) を添加し、さらに 48 時間培養した。細胞の生存率は、10% alamar blue を含有する DMEM 培地 70 µL 中で 2~3 時間培養した後、各 well 中の蛍光強度 (excitation; 544 nm, emission; 590 nm) を蛍光プレートリーダーで測定することによって調べた。

3. siRNA 再導入によるメチル水銀感受性の検討

上記 2 と同様に、siRNA を導入した HEK293 細胞を 24 時間培養した後に、各濃度 (最終濃度 0, 1, 2, 3, 4 µM) の塩化メチル水銀を添加した。メチル水銀処理 48 時間後に、塩化メチル水銀を含む培地から 10% alamar blue を含有する DMEM 培地 70 µL に交換し 2~3 時間培養した。その後、各 well 中の蛍光強度 (excitation; 544 nm, emission; 590 nm) を蛍光プレートリーダーで測定することによって調べた。

(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. 発現が抑制されることによって細胞にメチル水銀感受性に与える遺伝子の検索

Qiagen 社の siRNA ライブラリーは、機能がよく知られている遺伝子産物（約 7000 種）を標的とする合成二本鎖 RNA が 96-well plate の各々の well に 2 つずつ入っている。まず、その siRNA 混合溶液（最終濃度 10 nM）をそれぞれ導入した HEK293 細胞を約 50～60%の細胞毒性を示すメチル水銀（3 μM ）で処理し、48 時間後に生存率を調べた。各 siRNA 導入細胞のメチル水銀に対する生存率は、siRNA 導入によるメチル水銀感受性の度合い（メチル水銀処理群の gene siRNA 導入細胞の蛍光強度 / メチル水銀処理群の control siRNA 導入細胞の蛍光強度）を siRNA 導入による細胞増殖抑制率（mock 処理群の gene siRNA 導入細胞の蛍光強度 / mock 処理群の control siRNA 導入細胞の蛍光強度）で割り算することで算出した。すなわち、生存率 1 を基準にその値が 1 以上になるとその細胞はメチル水銀耐性を、逆に、1 以下になるとその細胞は高いメチル水銀感受性を示したことになる。約 7000 種の siRNA 混合溶液をそれぞれ導入した HEK293 細胞のメチル水銀毒性に対する生存率を調べたところ、0.5 以下の生存率を示した siRNA 導入

細胞を 146 種同定することに成功した（データ示さず）。これらの細胞に導入されている siRNA の標的遺伝子は、発現抑制されることによって HEK293 細胞にメチル水銀高感受性を与える遺伝子と考えられる。しかし、導入された siRNA に関係なく、自然耐性や突然変異などによってメチル水銀耐性を獲得した細胞が含まれる可能性も否定できない。そこで、今回同定された 146 種の siRNA の中から、細胞に最も高いメチル水銀感受性を与えた上位 15 種（Table 1）の siRNA 混合溶液をそれぞれ HEK293 細胞に再導入した際の各細胞のメチル水銀に対する感受性を検討した。その結果、15 種のうち 10 種（CNTNAP2、USP15、SQRDL、GNB4、CXCL14、IL13RA2、STC1、GDF5、CPZ、CFI）の siRNA の導入が HEK293 細胞にメチル水銀高感受性を与えることが確認された（Figures 1-1～1-4）。特に、10 種の siRNA 導入細胞の中、USP15、GNB4、GDF5、CXCL14 または IL13RA2 の発現抑制は HEK293 細胞に非常に高いメチル水銀感受性を与えたことから、これら蛋白質が有する機能が示す役割がメチル水銀毒性に何らかの影響を与える可能性が考えられる。

2. 発現が抑制されることによって細胞にメチル水銀耐性に与える遺伝子の検索

上記1と同様に、siRNA導入細胞のメチル水銀毒性に対する生存率を検討したところ、2以下の生存率を示したsiRNA導入細胞を37種同定することに成功した(データ示さず)。そこで、2以上の生存率を細胞に与えたsiRNAの中で特に高い上位15種のsiRNAを選択した(Table 2)。これらsiRNAの標的遺伝子は、発現抑制されることによってHEK293細胞にメチル水銀耐性を与える遺伝子と考えられる。これら15種のsiRNAをそれぞれHEK293細胞に再導入してメチル水銀感受性を検討したところ、15種のうち13種(STX5、CCL27、LOC91664、AKR1B1、PSMD2、LONRF1、AKR1CL1、KIAA1833、HEMK1、LOC124446、WISP1、RP3-340N1.3、CLEC1A)のsiRNAの導入がHEK293細胞にメチル水銀耐性を与えることが確認された(Figures 2-1~2-4)。その中には、aldo-keto reductaseをコードしtestosteroneの合成に関与するAKR1CL1およびAKR1B1が含まれていた。Testosteroneは腎臓へのメチル水銀の取り込みに関与するgamma-glutamyltranspeptidaseの活性が上昇させることが知られており(Tanaka, T. et al, 1992)、aldo-keto reductaseの発現抑制は何らかの形でメチル水銀感受性に関与しているかも知れない。また、リン脂質であるアラキドン酸を細胞膜から解離させる

活性を有するホスホリパーゼA2(PhospholipaseA2, PLA2)をコードするRP3-340N1.3の発現抑制が細胞に強いメチル水銀耐性を与えることが明らかになった。メチル水銀はPLA2の発現を誘導し、細胞膜からのアラキドン酸の遊離を亢進させることで細胞毒性を引き起こすことが知られており(Shanker, G. et al, 2002)、PLA2の発現抑制は細胞膜からのアラキドン酸の遊離を抑制することでメチル水銀耐性獲得に関与している可能性が考えられる。

今回得られた遺伝子群がコードする蛋白質はその全てがメチル水銀毒性に関与することがはじめて示されたものであり、メチル水銀の細胞毒性発現機および生体の防御機構の解明に重要な手がかりを提供するものと思われる。

D. 参考文献

Shanker, G., Mutkus, L. A., Walker, S. J. and Aschner, M. (2002) Methylmercury enhances arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 expression in primary cultures of neonatal astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 106, 1-11.

Tanaka, T., Naganuma, A., Miura, N.
and Imura, N. (1992) Role of
testosterone in
gamma-glutamyltranspeptidase-depe
ndent renal methylmercury uptake in
mice. Toxicol Appl Pharmacol 112,
58-63.

なし。

2. 学会発表

なし。

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

E. 研究発表

1. 論文発表

Gene name	Accession number	Fuction of gene product	Survival rate
MRPL3	NM_007208	mitochondrial ribosomal protein L3	0.112
ACADS	NM_000017	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain	0.115
CNTNAP2	NM_014141	contactin associated protein-like 2	0.235
USP15	NM_006313	ubiquitin specific peptidase 15	0.239
SQRDL	NM_021199	sulfide quinone reductase-like (yeast)	0.253
CXCL14	NM_004887	chemokine (C-X-C motif) ligand 14	0.255
GNB4	NM_021629	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4	0.282
IL13RA2	NM_000640	interleukin 13 receptor, alpha 2	0.284
TXNDC6	NM_178130	thioredoxin domain containing 6	0.290
STC1	NM_003155	stanniocalcin 1	0.292
GDF5	NM_000557	growth differentiation factor 5	0.292
ACADM	NM_000016	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain	0.293
PDE10A	NM_006661	phosphodiesterase 10A	0.298
CFI	NM_000204	complement factor I	0.312
CPZ	NM_001014447	carboxypeptidase Z	0.313

Table 1. 発現抑制によりヒト培養細胞にメチル水銀高感受性を与えると予想される上位 15 種の遺伝子

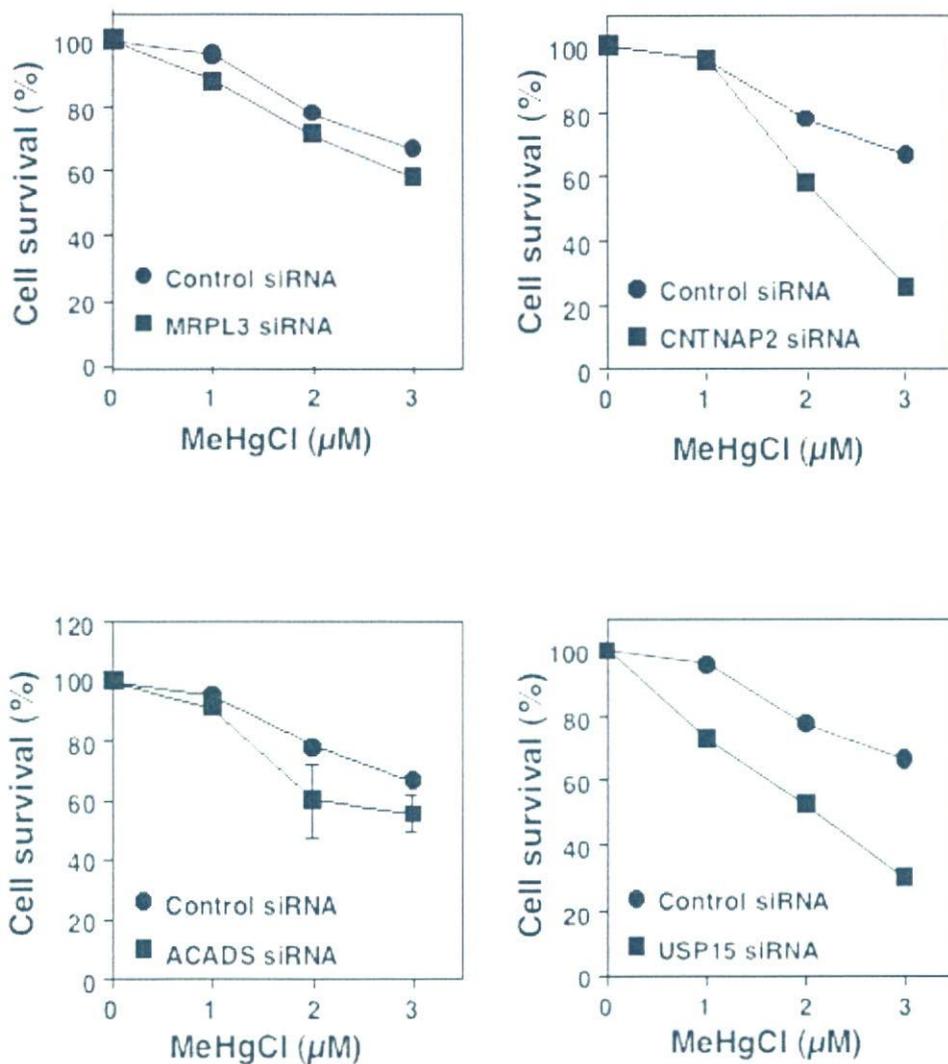


Figure 1-1. 遺伝子発現抑制が HEK293 細胞のメチル水銀感受性に与える影響

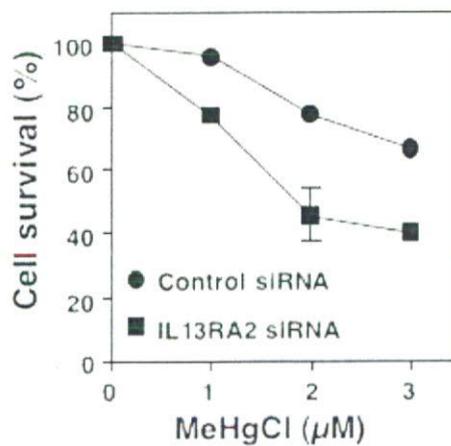
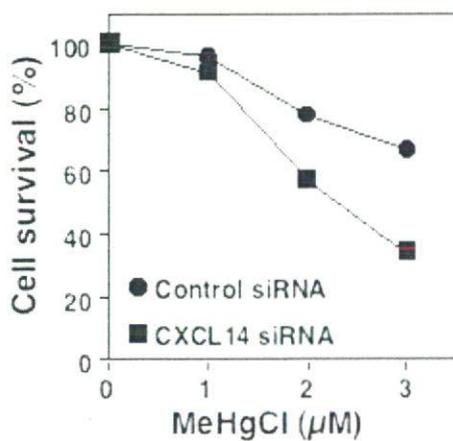
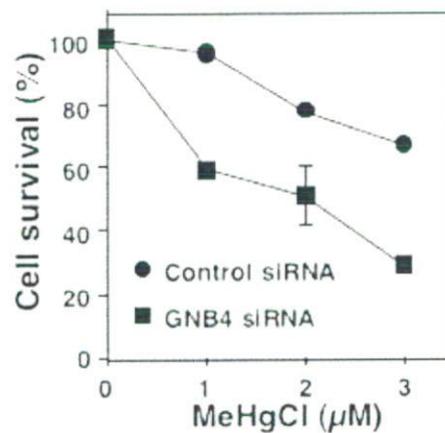
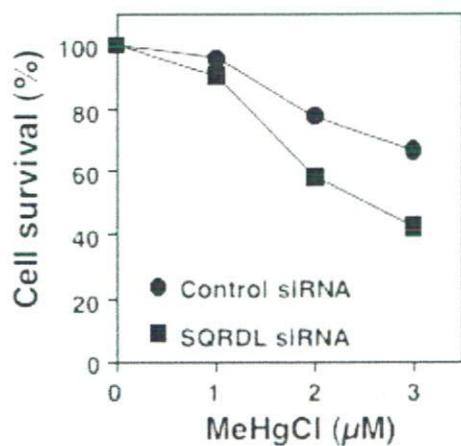


Figure 1-2. 遺伝子発現抑制が HEK293 細胞のメチル水銀感受性に与える影響

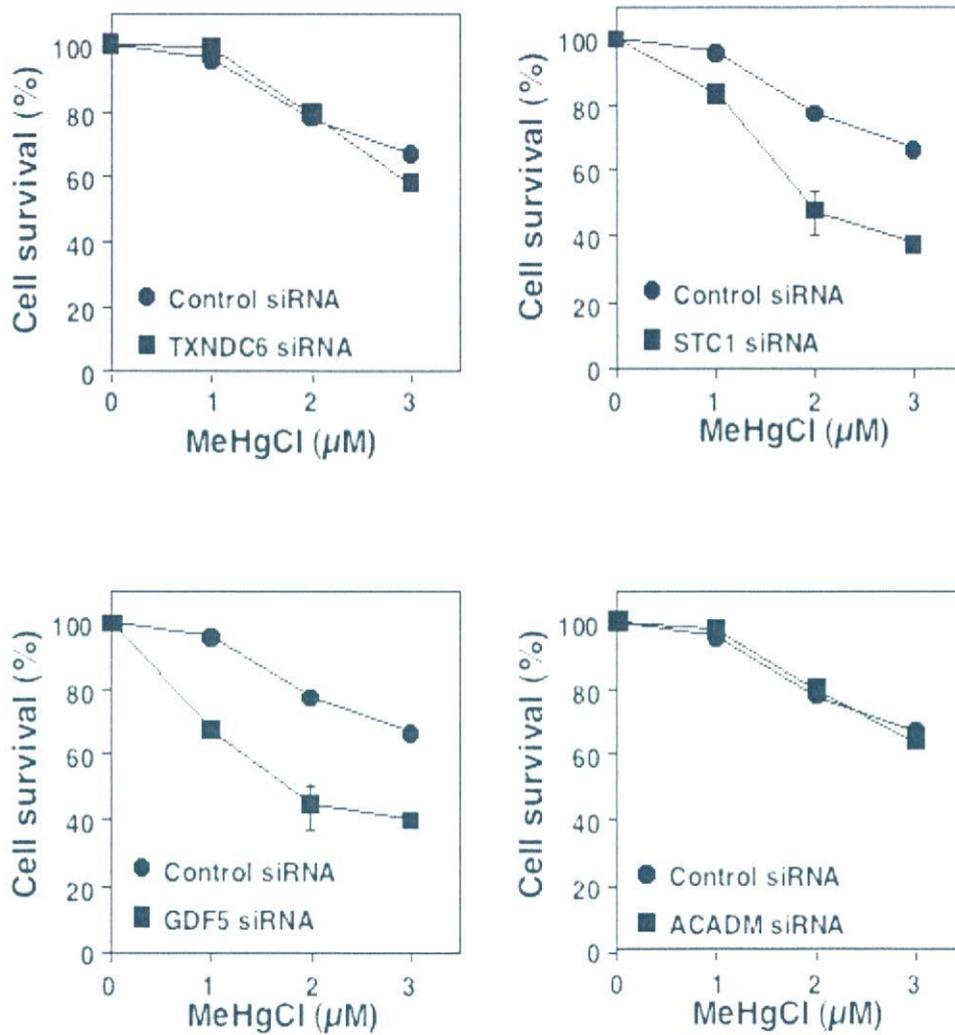


Figure 1-3. 遺伝子発現抑制が HEK293 細胞のメチル水銀感受性に与える影響

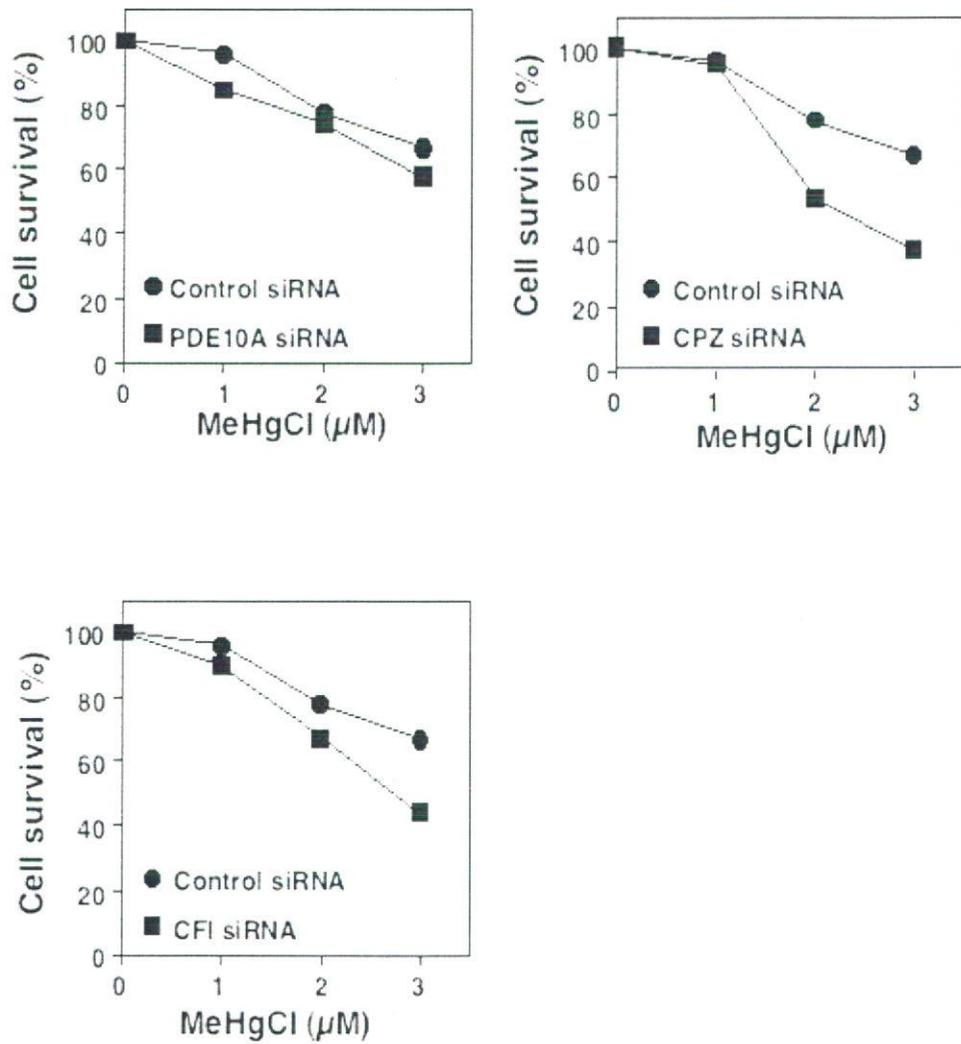


Figure 1-4. 遺伝子発現抑制が HEK293 細胞のメチル水銀感受性に与える影響

Gene name	Accession number	Fuction of gene product	Survival rate
STX5	NM_003164	syntaxin 5	5.112
MKRN1	NM_013446	makorin, ring finger protein, 1	3.392
CCL27	NM_006664	chemokine (C-C motif) ligand 27	2.664
LOC91664	XM_039908	hypothetical protein BC007307	2.586
AKR1B1	NM_001628	aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)	2.537
PSMD2	NM_002808	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2	2.477
LONRF1	NM_152271	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 1	2.378
AKR1CL1	NM_001007536	aldo-keto reductase family 1, member C-like 1	2.377
KIAA1833	XM_927367	hypothetical protein LOC377711	2.344
HEMK1	NM_016173	HemK methyltransferase family member 1	2.337
LOC124446	NM_194280	hypothetical protein BC017488	2.298
WISP1	NM_003882	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	2.290
NEU1	NM_000434	sialidase 1 (lysosomal sialidase)	2.273
CLEC1A	NM_016511	C-type lectin domain family 1, member A	2.212
RP3-340N1.3	XM_372769	phospholipase A2, group IIC	2.208

Table 2. 発現抑制によりヒト培養細胞にメチル水銀耐性を与えると予想される上位 15 種の遺伝子

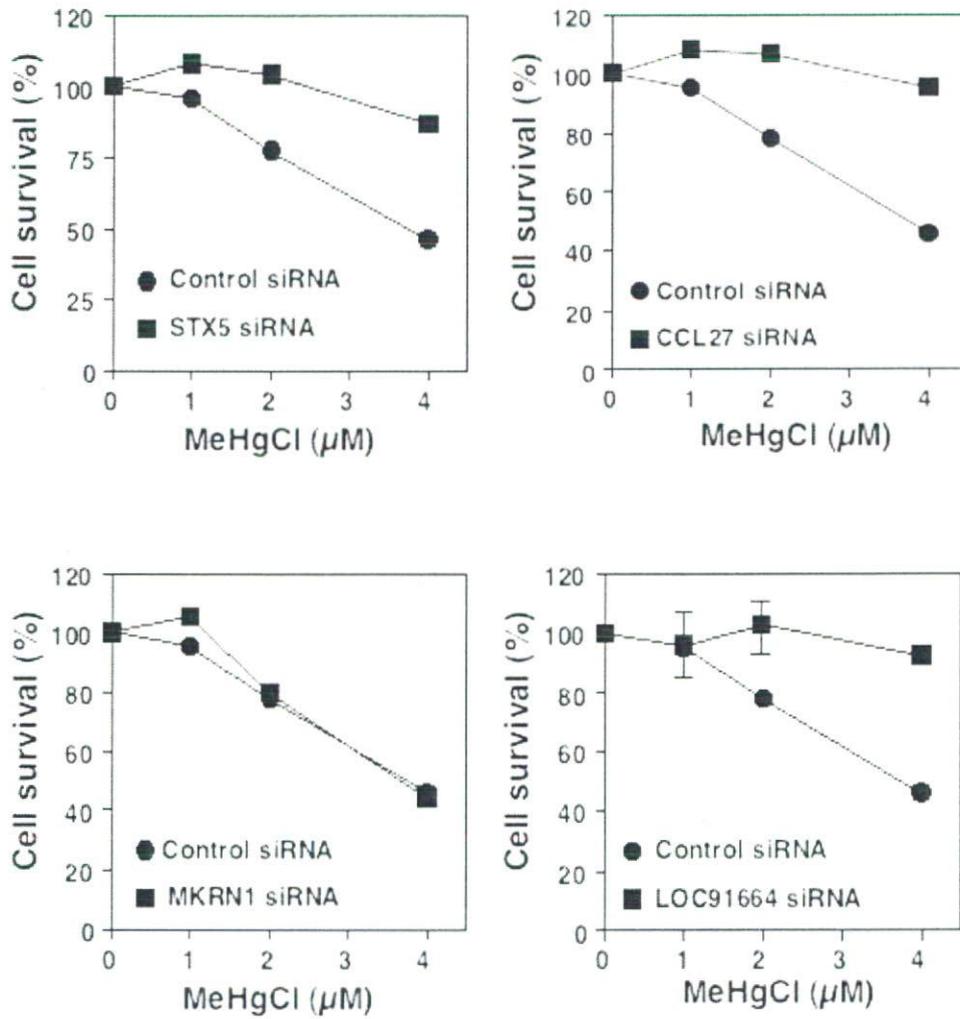


Figure 2-1. 遺伝子発現抑制が HEK293 細胞のメチル水銀感受性に与える影響

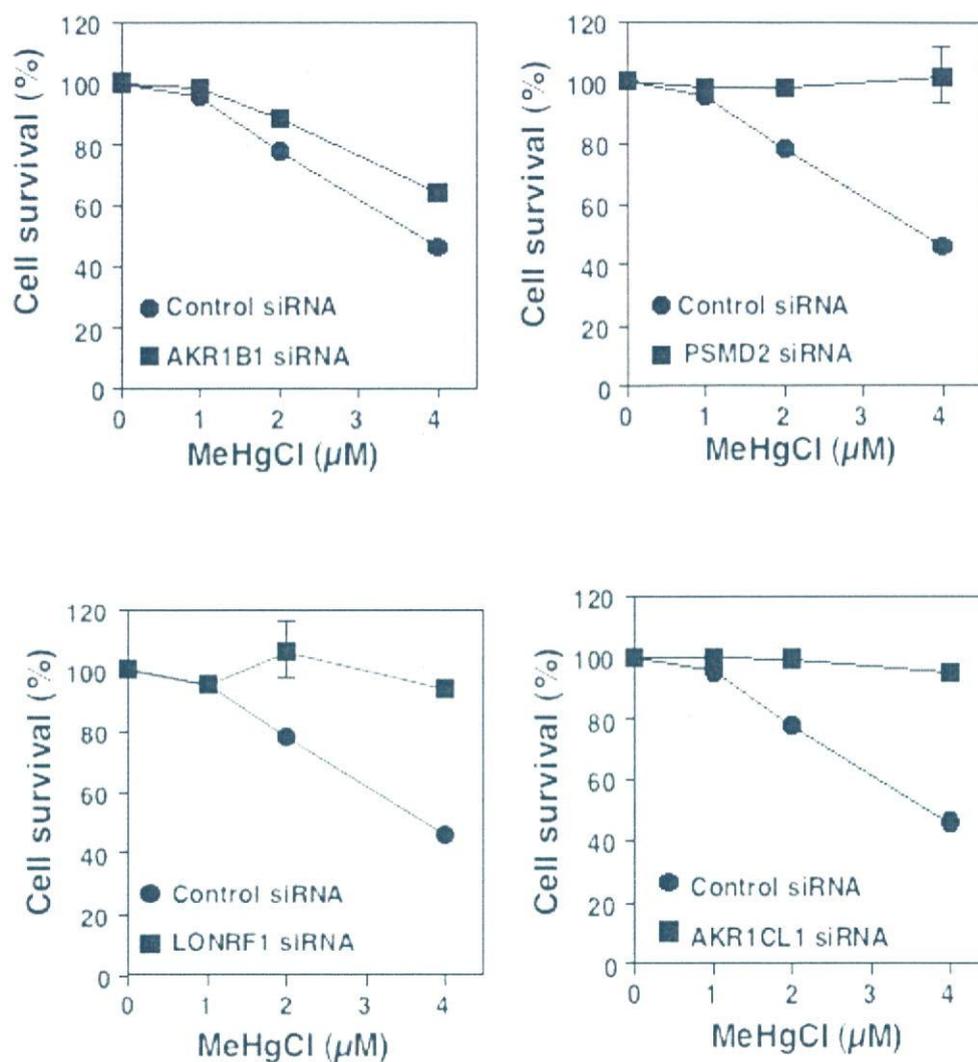


Figure 2-2. 遺伝子発現抑制が HEK293 細胞のメチル水銀感受性に与える影響

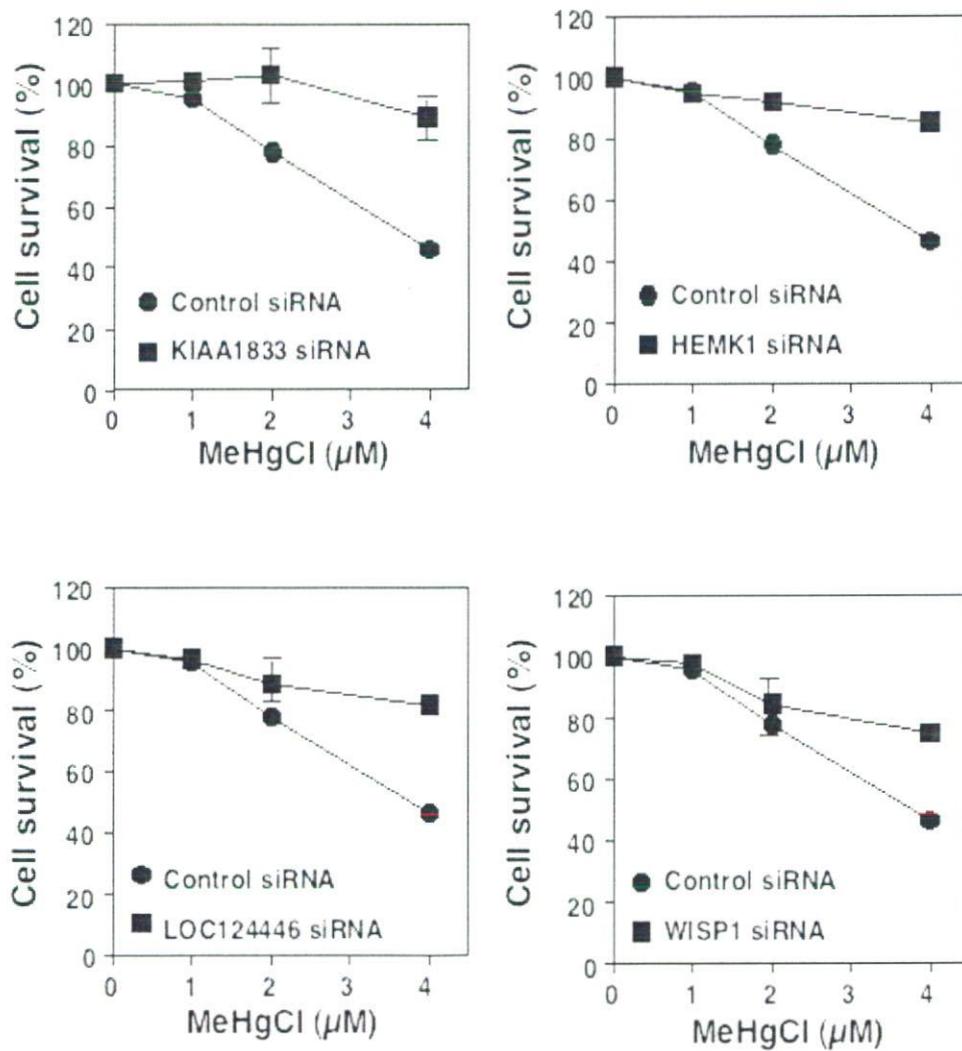


Figure 2-3. 遺伝子発現抑制が HEK293 細胞のメチル水銀感受性に与える影響

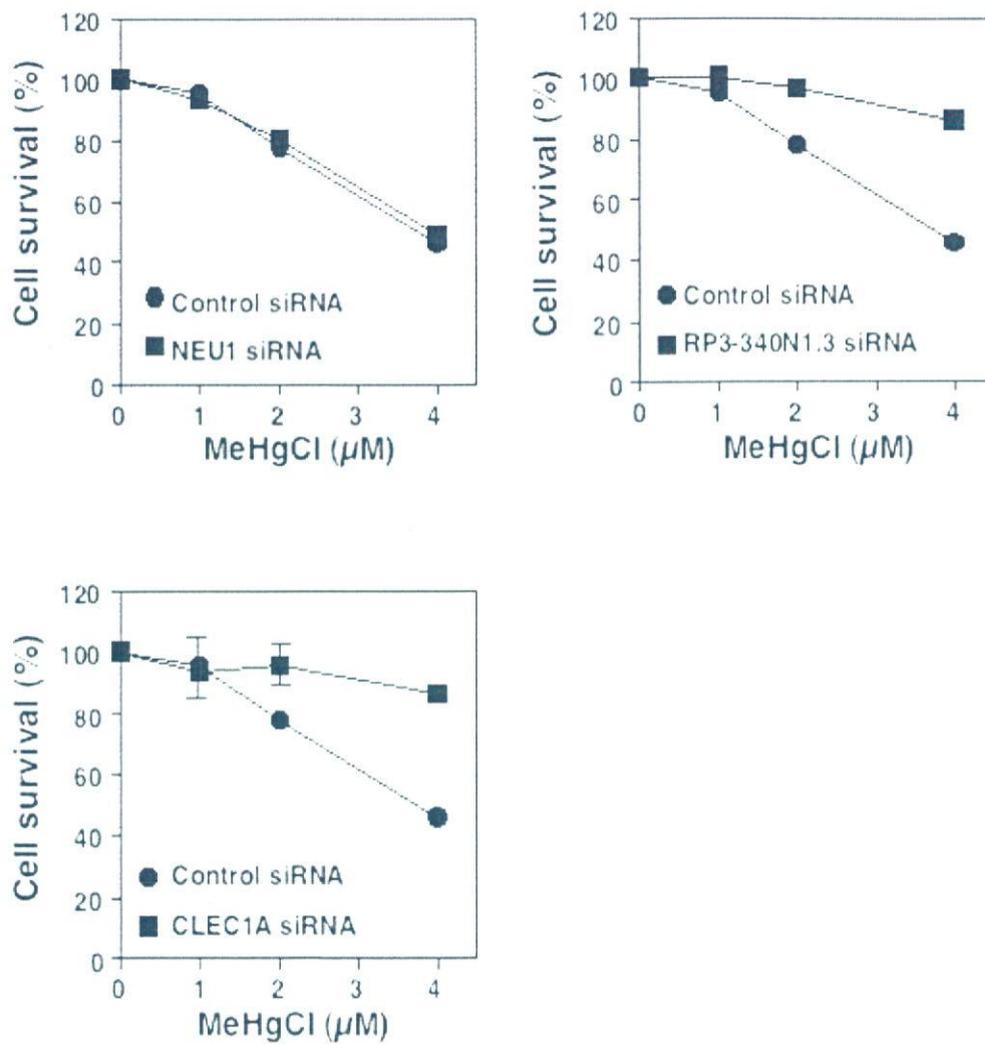


Figure 2-4. 遺伝子発現抑制が HEK293 細胞のメチル水銀感受性に与える影響