

## レポーター遺伝子アッセイ

### ■概要

レポーター遺伝子アッセイはホルモンなどの生理活性物質の働きを標的遺伝子の活性化を指標として検出する方法であり、本機構では内分泌かく乱物質検出系の開発(経済産業省及び厚生労働省委託研究)の豊富な経験を基に開発した各種核内受容体のレポーター遺伝子アッセイ系による医薬品候補物質の創薬スクリーニングを受託しております。また、各種受容体の一過性レポーター遺伝子アッセイ系の開発と試験を受託しています。さらに、変異型 loxP 配列及びそのアクセプトベクターを保有する細胞(特許出願中)による[レポーター遺伝子アッセイ用安定細胞株の作製](#)も受託しております。

### ■方法

本試験は、試料が受容体へ結合したときに生体内のリガンドと同様のメカニズムで起こる遺伝子の転写活性化能を測定する試験法です。図1に試験の原理を示します。細胞内に受容体活性化作用を持つ試料が取り込まれると、受容体に結合し、その受容体が特定の遺伝子上流に存在する応答配列に結合します。そのことによって、下流に位置している遺伝子の転写が促進されます。本試験では発光タンパク質として有用なホタルルシフェラーゼの遺伝子をレポーター遺伝子として人工的に導入した細胞を使用します。[受容体結合試験](#)では、試料の作用性がアゴニスト活性かアンタゴニスト活性かは判りませんが、本アッセイ法では両者を区別することができます(図2)。得られた曲線から定量的な解析を行い、試料の受容体を介した遺伝子転写作用濃度を算出します。

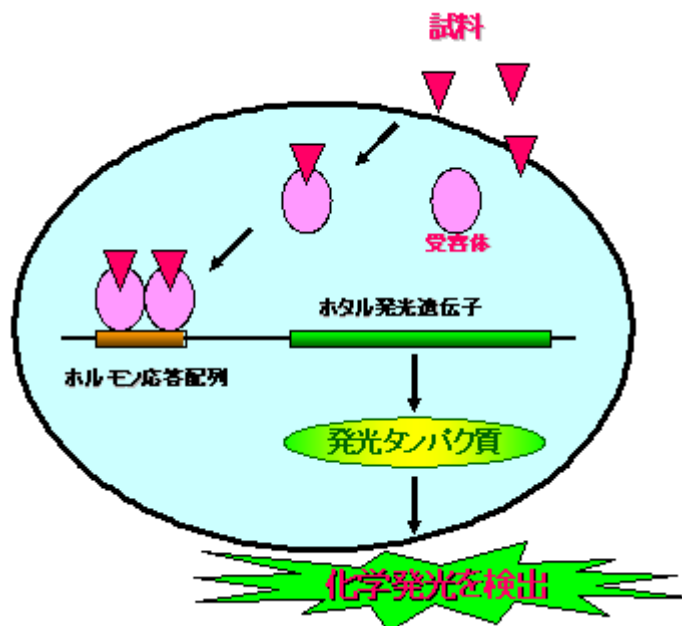


図1. レポーター遺伝子アッセイ原理

## ■受託項目

・核内受容体レポーター遺伝子アッセイ

ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、AR、GR、PR 他

・[レポーター遺伝子アッセイ用安定細胞の作製](#)

## ■実施例

■実施例 1: ヒト ER 受容体(Estrogen Receptor)レポーター遺伝子アッセイ系

### A) アゴニスト活性測定

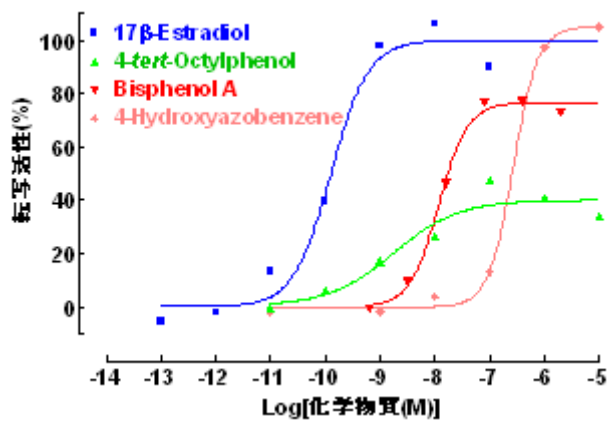


図 2-1. ヒト ER 受容体レポーター遺伝子アッセイ系

アゴニスト活性測定

試料濃度依存的な転写活性化が観察される

## B) アンタゴニスト活性測定(E2 共存下)

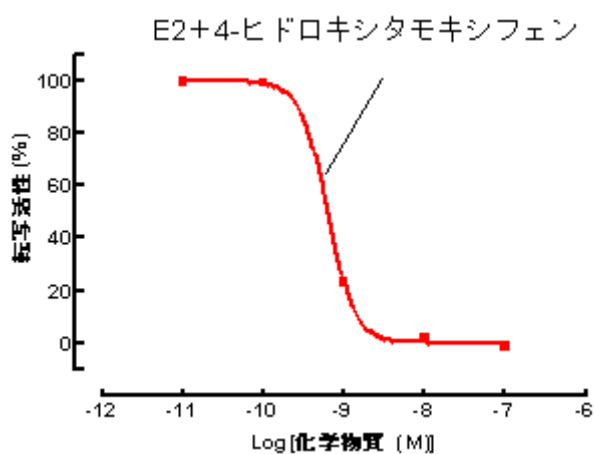


図 2-2. ヒト ER 受容体レポーター遺伝子アッセイ系

アンタゴニスト活性測定(E2 共存下)

4-ヒドロキシタモキシフェンが共存する E2 の転写活性を抑制している

## ■実施例 2: ヒト AR 受容体 (Androgen Receptor)レポーター遺伝子アッセイ系

安定細胞株作製システムを利用して、ヒト AR 遺伝子と応答配列(ARE)+ルシフェラーゼ遺伝子をタンデムにつないだ配列を HeLa 細胞のゲノム上へ挿入しました。作製したヒト AR 受容体レポーター遺伝子アッセイの安定細胞株(Stable AR-Luc)は、細胞の継代を経ても安定した活性を示し、また再現性の良いデータが得られることを確認しています。

## A) アゴニスト活性測定

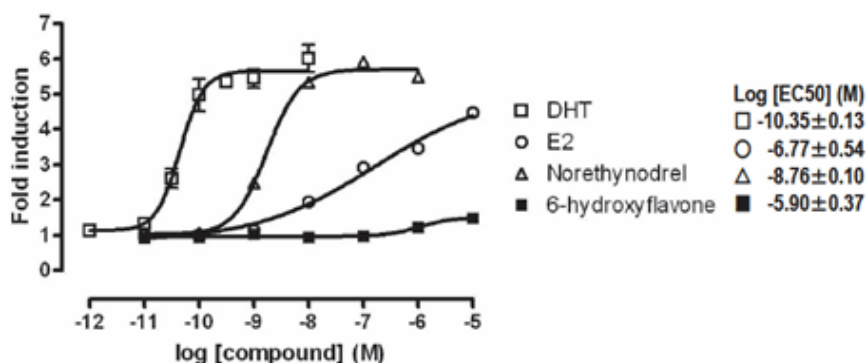


図 3-1. 安定細胞株(Stable AR-Luc)を用いたレポーター遺伝子アッセイ

アゴニスト活性測定

## B) アンタゴニスト活性測定(DHT 共存下)

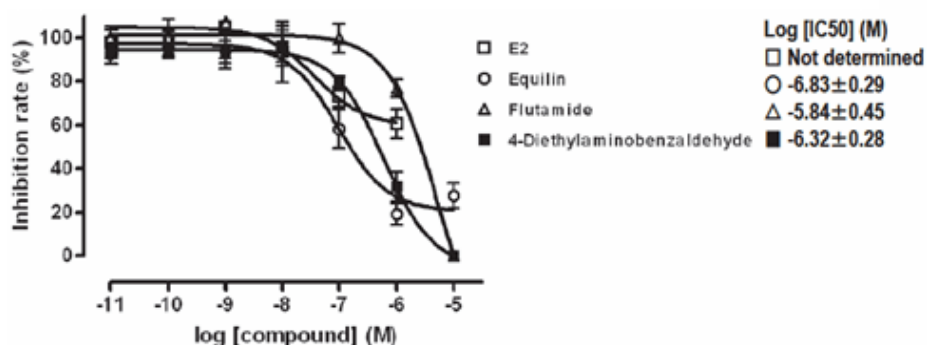


図 3-2. 安定細胞株(Stable AR-Luc)を用いたレポーター遺伝子アッセイ  
アンタゴニスト活性測定 (DHT 共存下)

## ■実施例 3: ヒト GR 受容体(Glucocorticoid Receptor)レポーター遺伝子アッセイ系

安定細胞株作製システムを利用して、ヒト GR 遺伝子と応答配列(GRE)+ルシフェラーゼ遺伝子をタンデムにつないだ配列を HeLa 細胞のゲノム上へ挿入したレポーター遺伝子安定細胞株を作製しました。このヒト GR 受容体レポーター遺伝子アッセイ系の安定細胞株(Stable GR-Luc)は、細胞の継代を経ても安定した活性を示し、また再現性の良いデータが得られることを確認しています。

## A) アゴニスト活性測定(Strong Agonists)

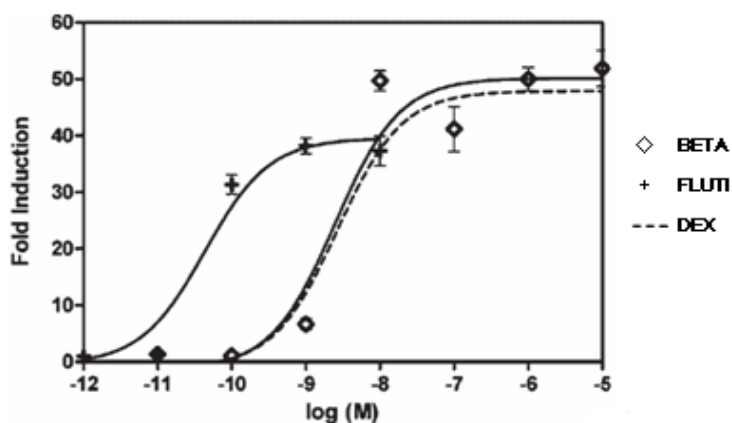


図 4-1. 安定細胞株(Stable GR-Luc)を用いたレポーター遺伝子アッセイ  
アゴニスト活性測定(Strong Agonists)

## B) アゴニスト活性測定(Weak Agonists)

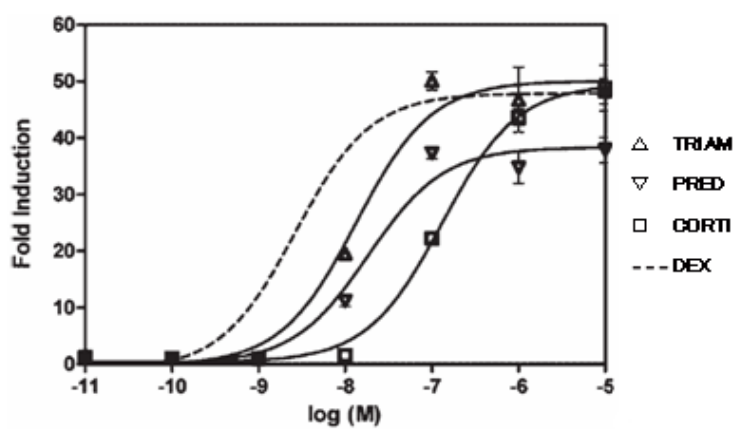


図 4-2. 安定細胞株(Stable GR-Luc)を用いたレポーター遺伝子アッセイ  
アゴニスト活性測定(Weak Agonists)

## C) アンタゴニスト活性測定(DEX 共存下)

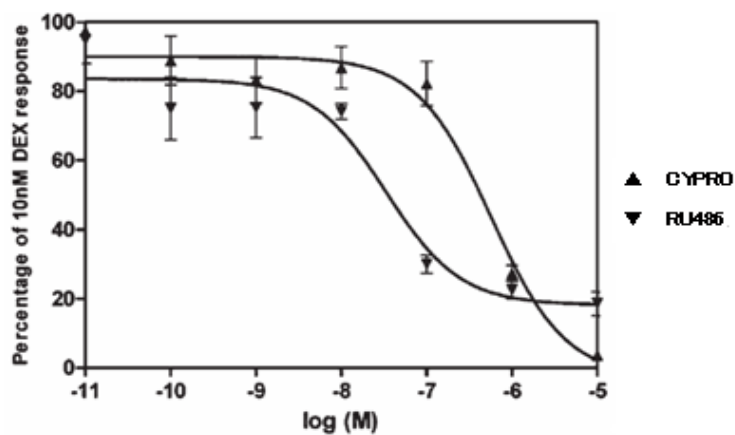


図 4-3. 安定細胞株(Stable GR-Luc)を用いたレポーター遺伝子アッセイ  
アンタゴニスト活性測定(DEX 共存下)

#### ■実施例 4: ヒト PR 受容体 (Progesterone Receptor)レポーター遺伝子アッセイ系

安定細胞株作製システムを利用して、ヒト PR 遺伝子と応答配列(PRE)+ルシフェラーゼ遺伝子をタンデムにつないだ配列を HeLa 細胞のゲノム上へ挿入したレポーター遺伝子安定細胞株を作製しました。このヒト PR 受容体レポーター遺伝子アッセイ系の安定細胞株(Stable PR-Luc)は、細胞の継代を経ても安定した活性を示し、また再現性の良いデータが得られることを確認しています。

##### A) アゴニスト活性測定

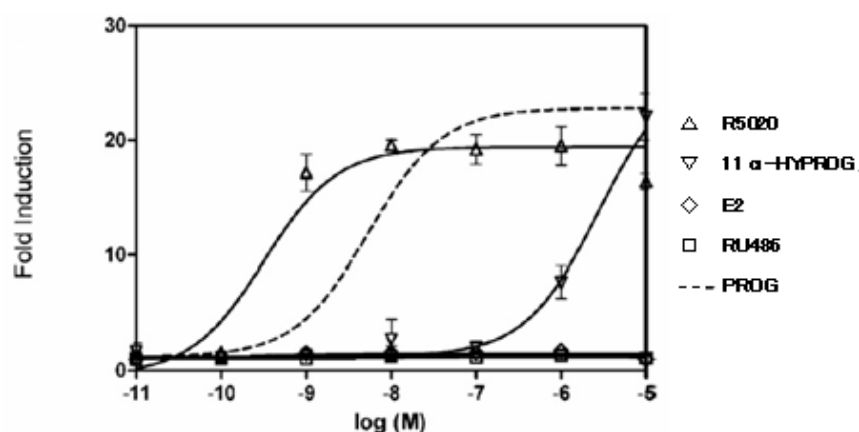


図 5-1. 安定細胞株(Stable PR-Luc)を用いたレポーター遺伝子アッセイ  
アゴニスト活性測定

##### B) アンタゴニスト活性測定(PROG 共存下)

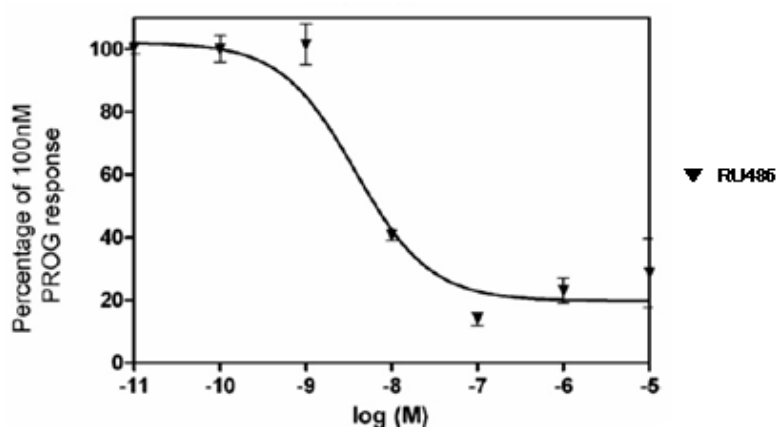


図 5-2. 安定細胞株(Stable PR-Luc)を用いたレポーター遺伝子アッセイ  
アンタゴニスト活性測定(PROG 共存下)

## ■参考文献

Mori T, Saito F, Yoshino T, Takeyama H, Matsunaga T. Reporter gene assay against lipophilic chemicals based on site-specific genomic recombination of a nuclear receptor gene, its response element, and a luciferase reporter gene within a stable HeLa cell line. *Biotechnol Bioeng.* 2008 Apr 15;99(6):1453-61.

Mori T, Murata M, Yoshino T, Nakasono S, Saito F, Takeyama H, Matsunaga T. A stable human progesterone receptor expressing HeLa reporter cell line as a tool in chemical evaluation at the different cell-cycle phases. *Toxicol Lett.* 2009, 25;186(2):123-9.

## ■応用

レポーター遺伝子アッセイは、下記の分野に活用いただけます。

- 医薬品候補物質の創薬スクリーニング
- 化学物質の内分泌かく乱作用等の毒性スクリーニング
- 機能性食品中の機能成分のスクリーニング
- 環境試料等に含まれる内分泌かく乱物質作用等の毒性評価

## ■実績

- これまでに、エストロゲン受容体(ER)、アンドロゲン受容体(AR)を中心に 1,500 物質以上の試験を経済産業省、厚生労働省、環境省からの受託研究及び民間からの受託試験で実施しています。
- 国からの受託研究で得られたデータは、製品評価技術基盤機構のホームページで公開しています。また、これら成果をもとに内分泌かく乱物質の評価法として経済協力機構(OECD)のテストガイドライン化が進められています。

## ■お問い合わせ先

安全性評価技術研究所 研究第一部 TEL 0480 (37) 2601 / FAX 0480 (37) 2521

ホームページからもお問い合わせできます。 <http://www.cerij.or.jp>