

安定細胞株作製システム

■ 概要

本システムは、変異型 lox 配列と Cre 酵素による組換え反応を利用して、トランスジーンをゲノム上の決まった位置に挿入することで、目的とする安定細胞株を効率良く作製するためのものです(図 1)。このシステムにより、目的遺伝子の強制発現、レポーター遺伝子アッセイなどのバイオアッセイツール、RNAi (RNA interference)法による安定的遺伝子ノックダウンなど、様々な目的の安定細胞株を短期間で効率よく構築することができます。

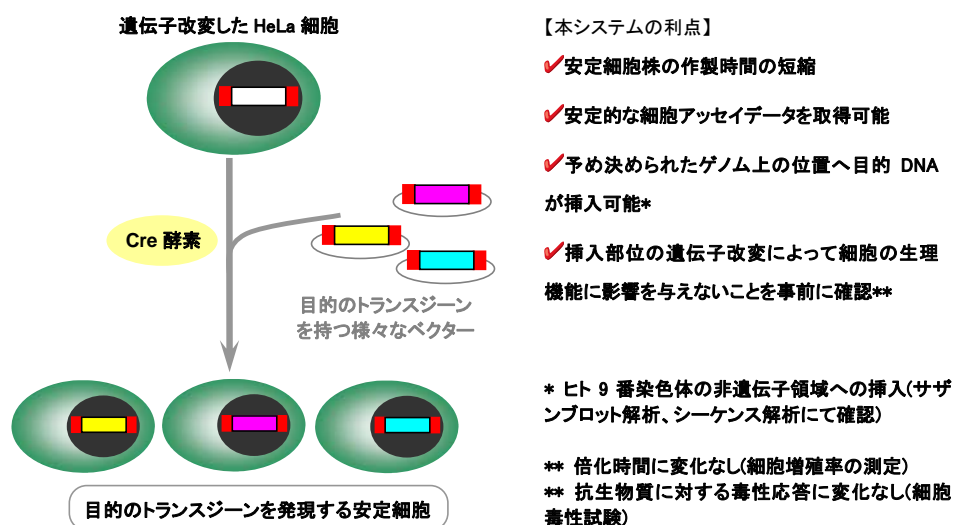
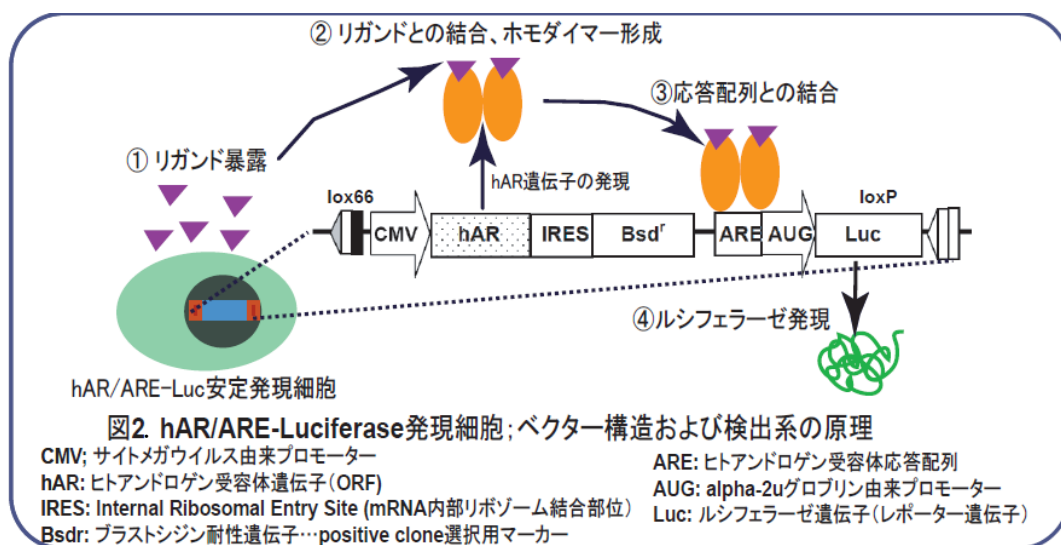


図 1. 安定細胞株作製システムの概要

■実施例 1:レポーター遺伝子アッセイ用の安定細胞株

1) 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。そのベクター構造とレポーター遺伝子アッセイでの検出原理を図 2 に示します。作製した安定細胞株(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(図 3)。



A) アゴニスト活性測定

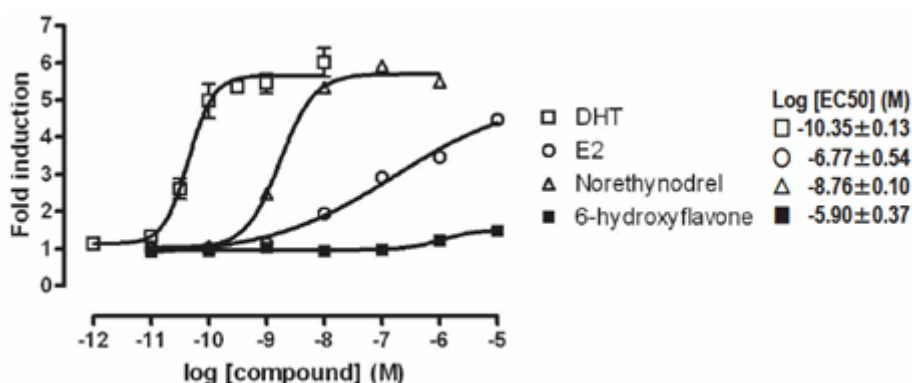


図 3-1. 安定細胞株(Stable AR-Luc)を用いたレポーター遺伝子アッセイ

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)

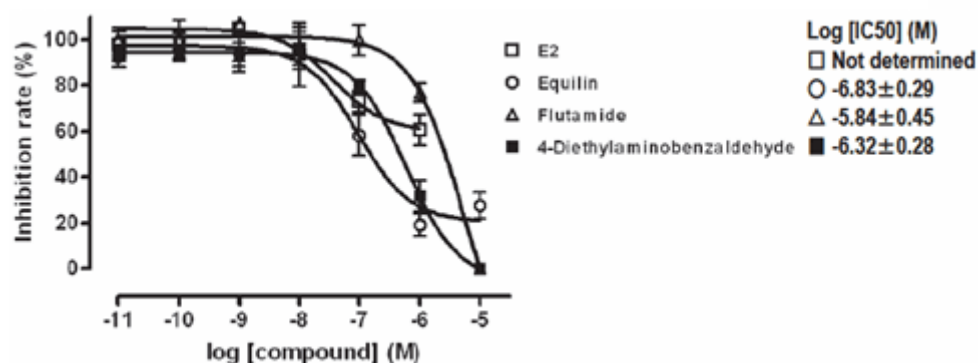


図 3-2. 安定細胞株(Stable AR-Luc)を用いたレポーター遺伝子アッセイ
アンタゴニスト活性測定 (DHT 共存下)

II) 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。ベクター構造とレポーター遺伝子アッセイでの検出原理は図 2 と同様になります。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(図 4)。

A) アゴニスト活性測定(Weak Agonists)

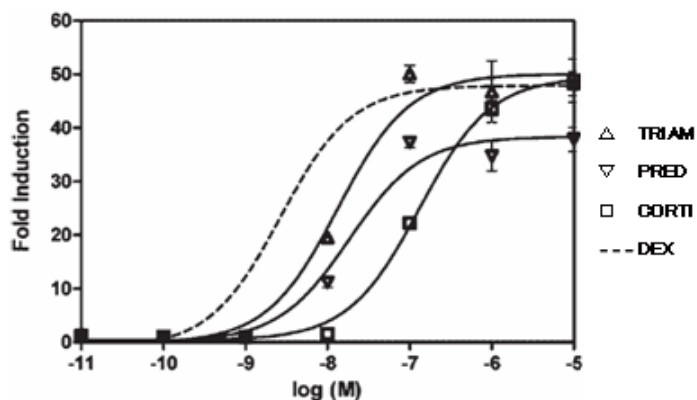


図 4-1. 安定細胞株(Stable GR-Luc)を用いたレポーター遺伝子アッセイ
アゴニスト活性測定(Weak Agonists)

B) アンタゴニスト活性測定(DEX 共存下)

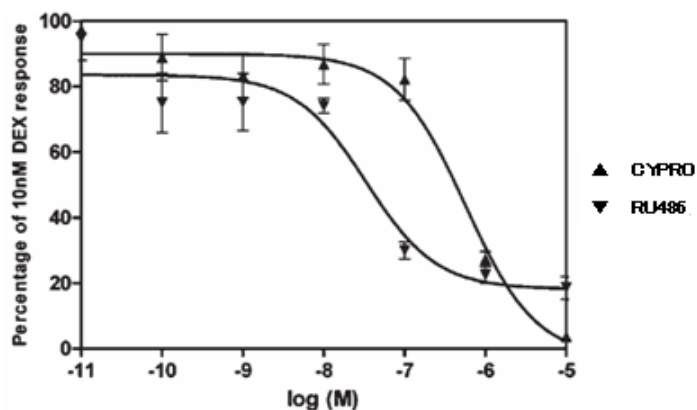


図 4-2. 安定細胞株(Stable GR-Luc)を用いたレポーター遺伝子アッセイ
アンタゴニスト活性測定(DEX 共存下)

III) 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。ベクター構造とレポーター遺伝子アッセイでの検出原理は図 2 と同様になります。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(図 5)。

A) アゴニスト活性測定

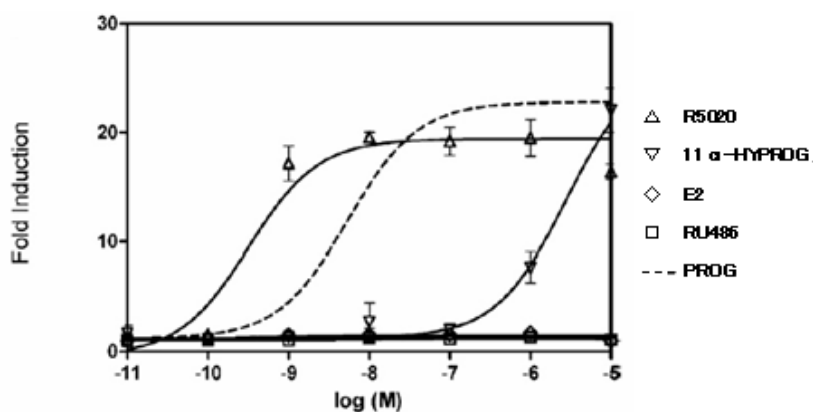


図 5-1. 安定細胞株(Stable PR-Luc)を用いたレポーター遺伝子アッセイ
アゴニスト活性測定

B) アンタゴニスト活性測定 (PROG 共存下)

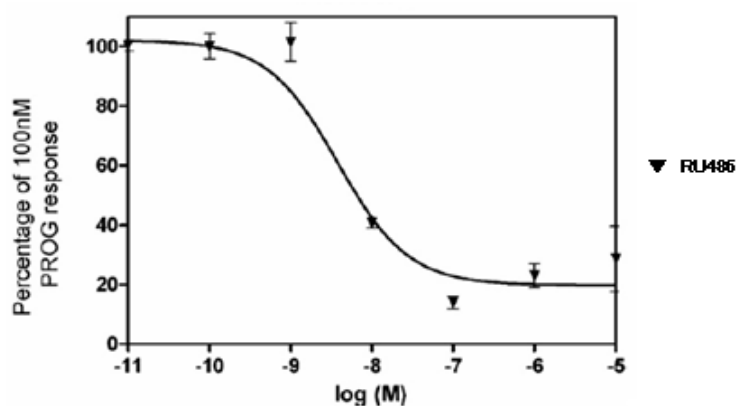


図 5-2. 安定細胞株(Stable PR-Luc)を用いたレポーター遺伝子アッセイ
アンタゴニスト活性測定(PROG 共存下)

■実施例 2: RNAi 安定発現株

安定細胞株作製システムと RNAi 法を組み合わせ、安定に目的遺伝子をノックダウンできる細胞株を構築しました。今回は炎症応答やアポトーシスなどに関与している膜受容体の Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFRI)に対する安定的遺伝子ノックダウン細胞(stable TNFRI-KD)を構築しました(図 6)。この stable TNFRI-KD 細胞は様々な機能解析に用いることができます(図 7、8)。

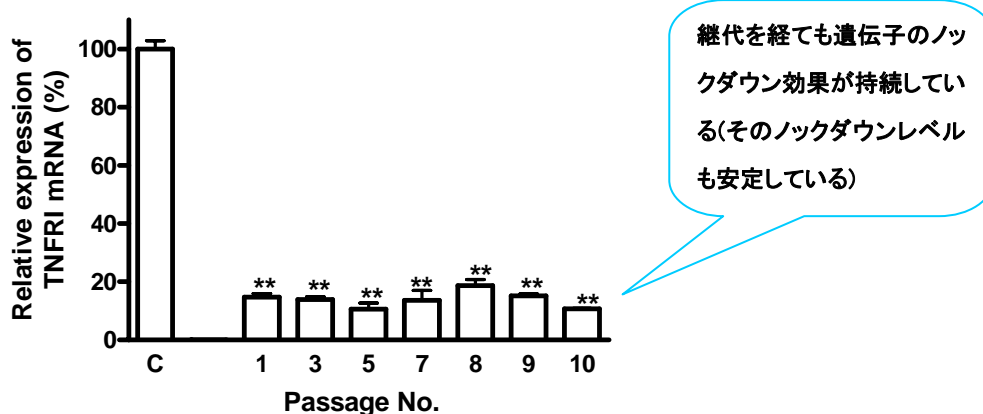


図 6. 継代ごとの TNFRI 遺伝子の発現量(Q-PCR による測定)

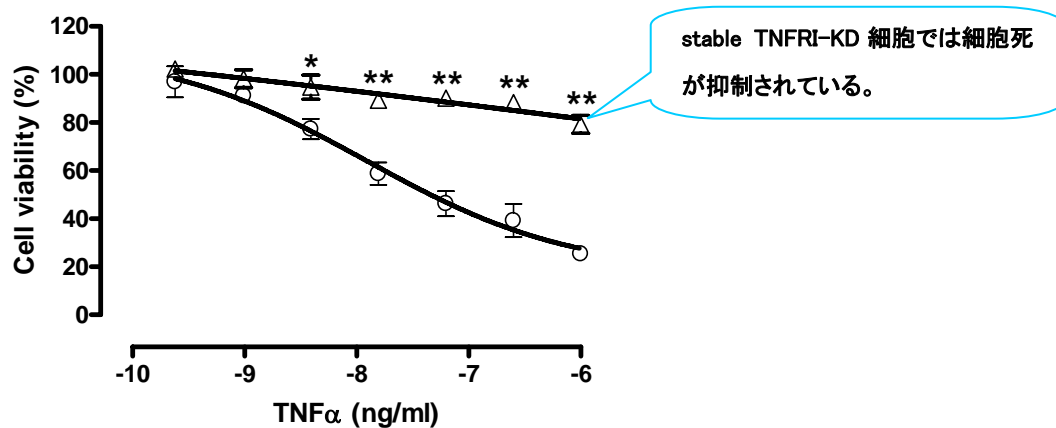


図 7. TNF α 暴露後の細胞生存率(○HeLa 細胞、△stable TNFRI-KD 細胞)

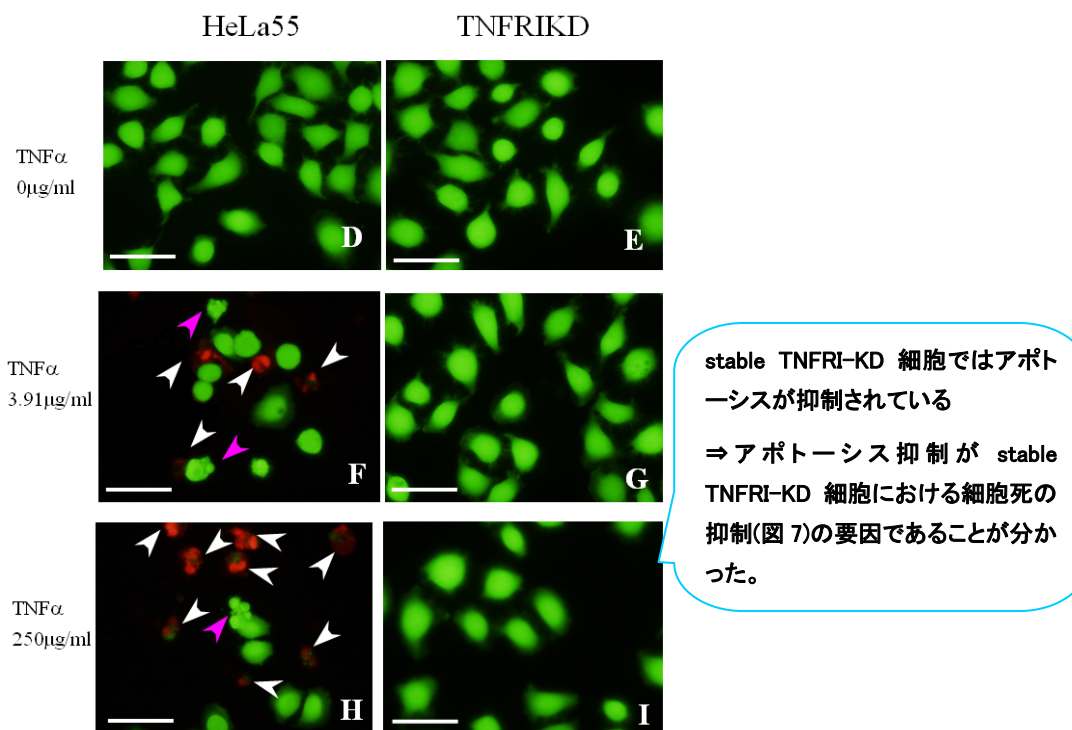


図 8. TNF α 暴露後のアポトーシスの検出

■参考文献

Saito F, Yokota H, Sudo Y, Yakabe Y, Takeyama H, Matsunaga T. Application of RNAi inducible TNFRI knockdown cells to the analysis of TNFalpha-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro*. 2006 Dec;20(8):1343-53.

Saito F, Yokota H, Sudo Y, Yakabe Y, Takeyama H, Matsunaga T. Development and application of a stable HeLa cell line capable of site-specific transgenesis using the Cre-lox system: establishment and application of a stable TNFRI knockdown cell line to cytotoxicity assay. *Toxicol In Vitro*. 2008 Jun;22(4):1077-87.

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.

■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>