

新規 Reporter plasmid を用いた男性ホルモン様化学物質検出法の開発

久我直子、武吉正博、山崎寛治、矢可部芳州、高月峰夫
財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所

【目的】内分泌攪乱作用をもつ化学物質の検出法としてレポーター遺伝子アッセイがある。迅速にこれらの物質を検出するためには、より高感度のレポータープラスミドを開発する必要がある。そこで我々は独自に α_{2u} -globulin (AUG) のプロモーターを導入した男性ホルモン様化学物質検出用のレポータープラスミドの開発を試みた。

【方法】ルシフェラーゼ遺伝子の上流に男性ホルモン応答配列 (ARE) 及び AUG のプロモーターを組み込んだレポータープラスミド (ARE-AUG-Luc+) を作製し、ヒト男性ホルモン受容体発現 plasmid (hAR/pcDNA3.1) と共に培養細胞に一過性に導入し、化学物質添加後のルシフェラーゼの転写活性を測定した。

【結果及び考察】従来のレポータープラスミドと比較して、転写活性化倍率を減少させることなくバックグラウンドの発光量を大幅に下げること成功した。組み込む AUG プロモーターの長さは、開始コドンより上流の TATA ボックスを含む-1bp から-195bp の領域をプロモーターとして導入した場合、転写活性化倍率は最も高倍率を示した。さらに、アッセイに使用する培養細胞に関して HeLa と CV1 を比較した場合、CV1 がより感度が高く、コントロールに対する転写活性化倍率は最高で約 300 倍を得ることが可能であった。

本研究で開発した新規レポータープラスミドはバックグラウンドの発光量が極めて低く、また 230 物質の測定結果から男性ホルモンへの選択性も高いことから男性ホルモン様化学物質高速スクリーニングに有効であると思われる。

Development or screening test for androgenic chemicals using new reporter Plasmid

Naoko Kuga, Masahiro Takeyoshi, Kanji Yamasaki, Yoshikuni Yakabe and Mineo Takatsuki

Chemicals Assessment Center, Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan

Reporter gene assay is one of the promising predictive test methods for endocrine modulating activity of chemicals. In this study, we developed a novel high responsive reporter plasmid bearing androgen responsive elements (ARE) and α_{2u} -globulin (AUG) promoter for screening androgenic potential of chemicals. Three copies of ARE consensus and rat AUG promoter containing TATA signal were cloned into the multiple cloning sites of pGL3 basic vector to create a new reporter plasmid, ARE-AUG-Luc+. The reporter plasmid and the hAR/pcDNA3.1 designed for constitutive expression of human AR were transiently transfected into the CV1 cells. The chemical induced transcriptional activation was examined in the concentration range from 10pM to 10t μ M. As the result of examination with 230 chemicals, reporter gene assay system using ARE-AUG Luc+ showed high selectivity, high androgen dependent induction and low background induction of reporter gene product. Consequently, the reporter gene assay using a new reporter plasmid, ARE-AUG-Luc+, may be an effective tool for rapid screening of androgenic chemicals.