

甲状腺ホルモン応答配列を組換えたレポータープラスミドを用いた 遺伝子活性試験システムについて

Gene Activation Assay System Using Reporter Plasmid
with Thyroid Hormone Responsive Element

久保亜希子 加藤 芳伸 澤田 幸治

Akiko KUBO, Yoshinobu KATOH and Yukiharu SAWADA

RXR/TR reporter plasmid for gene activation assay was produced using recombinant DNA techniques. Thyroid hormone responsive element nucleotide sequences (AGGTTC ttcAGGTTC) was inserted into a reporter plasmid (pGL3 vector). After transfection of RXR/TR reporter plasmid into HepG2 cells, the activities of luciferin-luciferase were determined on various concentrations of thyroid hormone (T3). This reporter plasmid gene activation assay was highly sensitive to allow the detection of T3 effects in HepG2 cell, detecting the effect of 10^{-8} to 10^{-1} M thyroid hormone. Further experiments using the RXR/TR reporter plasmid gene activation assay system will be conducted in order to detect of thyroid hormone like-compounds in environmental pollutants.

Key words : T3 thyroid hormone (T3 甲状腺ホルモン) ; thyroid hormone responsive element DNA (甲状腺ホルモン応答配列) ; reporter plasmid (レポータープラスミド) ; gene activation assay system (遺伝子活性試験システム)

緒 言

近年, DDT, PCB, 各種農薬やプラスチック成形剤そしてそれらの分解物が難分解性のため長期間大気, 水, 土壌に留まり環境汚染を引き起こすばかりでなく, 食物連鎖を通して広範囲の生物の汚染をも引き起こしていることが明らかにされた。しかも, これらの化学物質の中には内分泌攪乱化学物質と呼ばれるものがあり, 微量であたかもホルモンのように生体に作用して本来の体内のホルモン作用を攪乱し, 生物の生存と生殖に障害を与える可能性がでてきた^{1,2)}。

内分泌攪乱化学物質のヒトへの影響として, 精子数の減少に伴う生殖機能低下に関与するとされている性ホルモン作用が挙げられるが, 現在大きな問題となっているのは悪性腫瘍等に関係する甲状腺ホルモン作用である³⁾。甲状腺ホルモンは, ATP 合成, 脂質の合成や代謝, 糖質の代謝促進等多岐にわたって生体の活動に対し不可欠な働きをしている⁴⁾。さらに, 哺乳類では, 胎生期における正常な脳・神経系や骨格筋の分化・成長においても甲状腺ホルモンが不可欠である⁴⁾。この甲状腺ホルモンと同じ様な働きをする化学物質を検出する方法として, 甲状腺腫発生抑制試験やオタマジャクシを用いた変態促進法, 動物個体における甲状腺ホルモンそのものや甲状腺刺激ホルモンの血中濃度

の変化を測定する代謝率法がある⁵⁾。しかし, これらの手法は, 煩雑で, 分析に多大な時間と労力を必要とする。このことから, 化学物質の甲状腺ホルモン作用を迅速, 簡便にスクリーニングする試験法が求められている。

甲状腺ホルモンは, 細胞内で当該ホルモンのレセプターと結合し, ホルモン/レセプター複合体を形成する。このホルモン/レセプター複合体は核内の DNA のホルモン応答配列領域に結合し, 遺伝情報の発現を調節する^{4,6)}。われわれは, このホルモン作用機序の特徴を活用し, 甲状腺ホルモン作用を簡便に測定する遺伝子活性試験システムの開発を試みた。今回, 甲状腺ホルモン応答配列を組換えたレポータープラスミドの作成と, このレポータープラスミドを用いた遺伝子活性試験システムについて報告する。

方 法

1. 試 薬

fUGENE™ 6 Transfection Reagent は Roche Diagnostics 社製, バクトートリプトンとバクトー酵母抽出物は Difco 社製を使用した。また, HepG2 細胞は, 大日本製薬(株)製を使用した。Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) と牛胎児血清 (FBS) は GIBCO BRL 社製を使用した。さらに, QIAGEN Tip-500 キットは QIAGEN 社製, Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready

Reaction Kit は Applied-Biosystems 製を, Dual-Luciferase Assay System, pGL3 promoter ベクター及びシーケンス用 RV4 プライマーは Promega 社製を用いた. 制限酵素 *Bam*HI, *Sal*I そして DNA Ligation Kit は, TaKaRa 社製を使用した. その他の試薬は和光純薬(株)製の特級試薬を使用した.

2. HepG2 細胞の調製

HepG2 細胞は, 25 mL のコーニング培養フラスコを用いて血清と抗生物質を含んだ DMEM 培地中で, 37°C で 72 時間培養した. 培地更新後, さらに 72 時間培養した HepG2 細胞を遠心分離により集め, 保存用培地に懸濁して液体窒素中で保存した.

3. アニーリング

まず, 合成オリゴヌクレオチドを用いて甲状腺ホルモン応答配列を持つ 2 本鎖ヌクレオチドフラグメント (HRE フラグメント) を作成した. 標的ホルモン応答配列に相当する S-オリゴヌクレオチド (5'-TCGTCGGATCCTCA CCAGGTCATTTTCAGGTCAGCTTTGTCTGACTGGC-3') (0.8 μ g/ μ L) と A-オリゴヌクレオチド (5'-GCCAGTCG ACAAAGCTGACCTGAAATGACCTGGTGAGGATCC GACGA-3') (0.8 μ g/ μ L) をそれぞれ 12.5 μ L ずつエッペンドルフチューブに採り, アニーリング緩衝液 5 μ L, 全量が 50 μ L になるように滅菌蒸留水を加えて混合後, 90°C で 15 分間インキュベートした. 反応液の温度を 90°C から室温 (32~30°C) まで 3 時間かけて下げた. 反応終了後, TE 緩衝液 50 μ L を加え, クロロホルム/フェノール 100 μ L で処理した. アニーリングにより新たに合成された 2 本鎖ヌクレオチドフラグメントは 100% エタノール 300 μ L を加えて沈殿させた. 4°C, 14,000 rpm, 15 分間の遠心により集めた沈殿を 70% エタノールで洗浄した後, 減圧乾燥した. この HRE フラグメントは TE 緩衝液 20 μ L に溶かし, 制限酵素 *Bam*HI と *Sal*I で処理した後, pLG3 Promoter ベクター (pLG3) とのライゲーションに用いた.

4. ライゲーション

制限酵素 *Bam*HI と *Sal*I で処理した HRE フラグメントはフェノール/クロロホルム処理及びエタノール処理した後, 0.05 μ g/ μ L の濃度になるように TE 緩衝液に溶かした. ライゲーションは, 以下の反応組成で行った. すなわち, 制限酵素 *Bam*HI と *Sal*I で処理した pLG3 (0.02 μ g/ μ L) 2.5 μ L と HRE フラグメント (0.05 μ g/ μ L) 2 μ L, 100 mM MgCl₂ 0.5 μ L, 1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6) 1 μ L, 再蒸留水 4 μ L をマイクロチューブに採り, ソリューション I を 10 μ L 添加して混合した後, 16°C, 3 時間反応させ pLG3 に HRE フラグメントを組換えた.

5. トランスフォーメーション

コンピテント細胞は大腸菌 JM109 を使用し, 塩化カルシウム法に従って調製した. プラスミド DNA が 0.01 ng/ μ L となるように調製したライゲーション溶液 5 μ L を 15 μ L のファルコンチューブに取り, これにコンピテント JM109 細胞液 100 μ L を加え, 42°C, 1 分間ヒートショックを行っ

た. 氷冷後, LB 培地 1 mL を加え, 37°C で 1 時間培養した. 培養液は全量を 2% X-gal, 15 μ M IPTG を含んでいるアンピシリン (100 μ g/mL) 含有 LB 寒天培地プレート上に塗布し, 37°C で一夜培養した.

6. レポータープラスミドの調製

白色コロニーを滅菌楊枝を用いて, アンピシリン (100 μ g/mL) 含有 LB 液体培地 250 mL に移し, 37°C, 一夜振とう培養した. 遠心分離により回収した菌体から QIAGEN Tip-500 キットを用いてプラスミド DNA を精製した. 溶出液にイソプロパノールを加え沈殿させたプラスミド DNA を 70% エタノール 15 mL で洗浄し, 室温にて 5 分間乾燥後, 滅菌蒸留水 500 μ L に溶かした.

7. レポータープラスミド DNA の塩基配列の決定

RXR/TR レポータープラスミド DNA の塩基配列は Big Dye Cycle Sequencing Kit と RV4 プライマー (5'-GACGATAGTCATGCCCGCG-3') を用いて, 95°C/15 秒, 50°C/5 秒, 60°C/4 分の 25 サイクルの条件でサイクルシーケンシング反応を行ない, ABI PRISM 377 シーケンサ (Applied Biosystems 製) により解析して決定した.

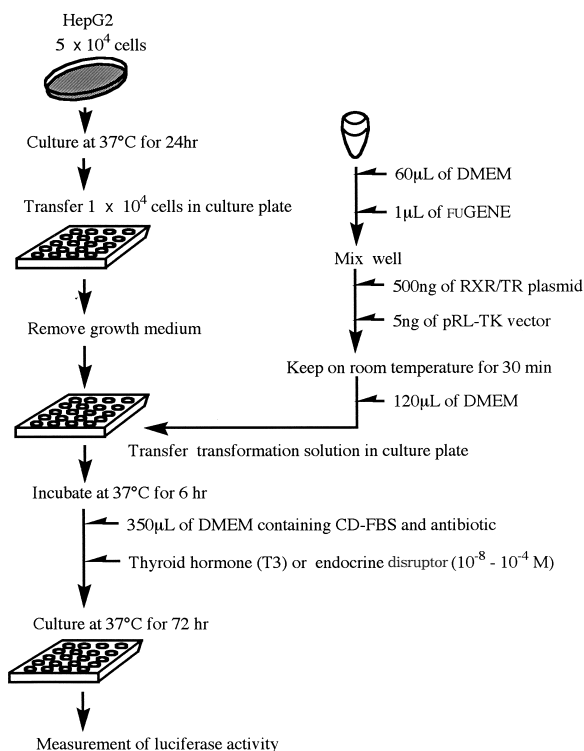


Fig. 1 Scheme of Activation Assay System Using HepG2 Cells Transfected with Reporter Plasmid Carrying Thyroid Hormone Responsive Element (RXR/TR)

8. 遺伝子活性試験

遺伝子活性試験の概要は Fig. 1 に示した。ポリスチレンチューブに DMEM 無血清培地 60 μ L と FUGENE 1 μ L を採り、さらにレポータープラスミド DNA 1 μ L と対照となる pRL-TK プラスミド 0.01 μ L を加えて混合した。このリポフェクション溶液は室温にて 30 分間処理した後、DMEM 無血清培地 100 μ L を加えて、 1×10^5 個の HepG2 細胞が培養されているプレートに添加し、37°C で 4 時間処理した。さらに、培養プレートに血清と抗生物質を含んだ DMEM 培地 1 mL を加えて、37°C で培養を行った。24 時間後、新しい血清と抗生物質を含んだ DMEM 培地または甲状腺ホルモン (T3: トリヨードチロニン)、血清、抗生物質を含んだ DMEM 培地に換えて、48 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

9. ルシフェラーゼ活性測定法

レポーター遺伝子を用いた転写活性の測定には、個々の細胞の状態やトランスフェクション効率などの条件の違いが結果に影響を与えることから、甲状腺ホルモン応答配列

領域を組み込んだプラスミドと対照プラスミドを一緒にトランスフェクトして、対照プラスミドから得られた測定値を内部対照にして甲状腺ホルモン応答配列領域を組み込んだプラスミドのルシフェラーゼ活性測定値を補正した。

ルシフェラーゼ活性は Dual-Luciferase Assay System を用いて測定した⁸⁾。細胞培養プレートから培地を除去した後、プレートに 5 mL の PBS 溶液を加え HepG2 細胞を洗浄した。この操作をさらに 2 回繰り返した後、 $1 \times$ Passive Lysis Buffer 100 μ L を加え、室温で 30 分間処理して細胞抽出液をマイクロチューブに移した。この細胞抽出液 20 μ L をあらかじめ 100 μ L の Luciferase Assay Reagent II を入れておいた Rohnsen チューブに添加してピペッティングにより混合した。チューブは、ルミノメーター (ミニルーマット LB 9506) にセットして、最初にレポータープラスミド由来のルシフェラーゼ活性を測定した。続いて、100 μ L の $1 \times$ Stop and Glo Reagent を加え混和後、pRL-TK プラスミド由来のルシフェラーゼ活性を測定した。

結 果

Fig. 2 には、甲状腺ホルモン応答配列を組換えた RXR/TR-レポータープラスミドを *Bam*HI と *Sal*I で処理し、2% アガロースゲル電気泳動により確認した結果を示した。この結果よりレポータープラスミドには、45 マーのオリゴヌクレオチドフラグメントが導入されていることが認められた。

さらに、目標どおりにレポータープラスミドが作成されているか否かを明らかにするために、レポータープラスミド R-鎖の塩基配列を決定した。RXR/TR-レポータープラスミドに挿入された甲状腺ホルモン応答塩基配列は 5'-TGACCTGAAATGACCT-3' である。Fig. 3 に示した RXR/TR-レポータープラスミドの *Bam*HI と *Sal*I 認識部位の間には、5'-TGACCTGAAATGACCT-3' の RAR/TR 型の標的ホルモン応答塩基配列が導入されていることが認



Fig. 2 Agarose Gel Electrophoresis of Reporter Plasmid with Thyroid Hormone Responsive Element (RXR/TR) Digested by *Bam*HI and *Sal*I

M: 100bp size maker, 1: RXR/TR-reporter plasmid digested by *Bam*HI and *Sal*I, 2: pGL3 vector

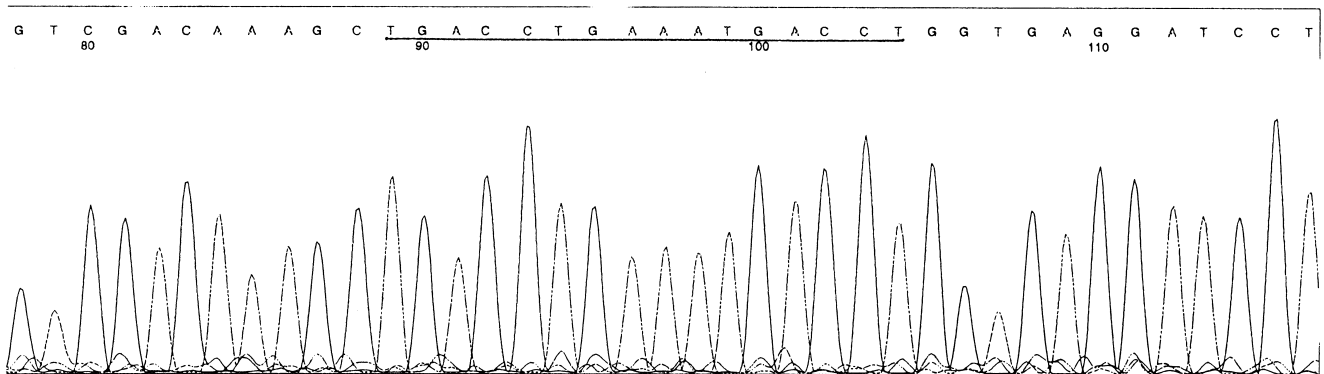


Fig. 3 Partial Nucleotide Sequence of Reporter Plasmid DNA with Thyroid Hormone Responsive Element (RXR/TR)

Nucleotide sequence was determined by the dye terminator cycle sequencing method with ABI-PRISM 377 sequencer (Applied Biosystems). RXR/TR nucleotide sequence is underlined.

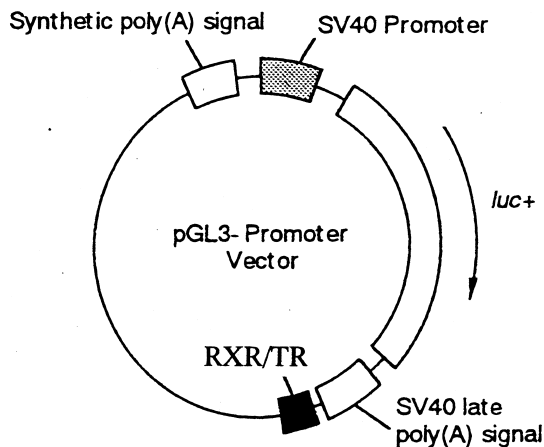


Fig. 4 Reporter Plasmid with Thyroid Hormone Responsive Element (RXR/TR)

められた。シーケンシングの結果は、一連の組換え操作によって Fig. 4 の様な pLG3 ベクターに RXR/TR-標的ホルモン応答配列が挿入されたレポータープラスミドであることを示していた。

次に、レポータープラスミドの RXR/TR-塩基配列 (5'-TGACCTGAAATGACCT-3') が甲状腺ホルモンに反応して、下流域に組み込まれているルシフェラーゼ遺伝子を活性化するか調べた。Fig. 5 には、RXR/TR-レポータープラスミドと対照プラスミド (pRL-TK) を用いた遺伝子活性試験の結果を示した。培地に10%血清のみを添加した時のルシフェラーゼ活性測定値を1.0とした場合、10%血清と 10^{-6} M 甲状腺ホルモン (T3) の添加により比活性値は1.9倍に上昇した。また、 10^{-8} M T3 処理においてもルシフェラーゼの比活性が1.7倍上昇することが認められた。なお、T3 添加試験を3回繰り返し行ったところ 10^{-4} M T3 処理において比活性値が1.31~1.40、 10^{-6} M T3 では、1.89~1.94 の値を示した (Table 1)。3回ともほぼ同じ試験結果を得ることができた。このことから、RXR/TR-レポータープラスミドを導入した培養細胞を用いた遺伝子活性システムにより甲状腺ホルモン様作用を 10^{-4} ~ 10^{-8} M の濃度範囲で測定できることが確認された。

考 察

われわれは化学物質の甲状腺ホルモン作用を検出するための標的ホルモン応答配列として AGGTCAttcAGGTCA 配列を pGL3 ベクターのルシフェラーゼ酵素遺伝子の下流に組換えた RXR/TR-レポータープラスミドを作成した。細胞内では、甲状腺ホルモンはその受容体と複合体を形成して、DNA の甲状腺ホルモン応答配列に結合する。甲状腺ホルモン受容体が結合する応答配列は、8~22塩基程度の短い配列で、PuGGTCA を基準とする6塩基配列 (ハーフサイト) が2回繰り返した構造をとっている⁸⁾。特に、AGGTCAnAGGTCA のような順向き繰り返

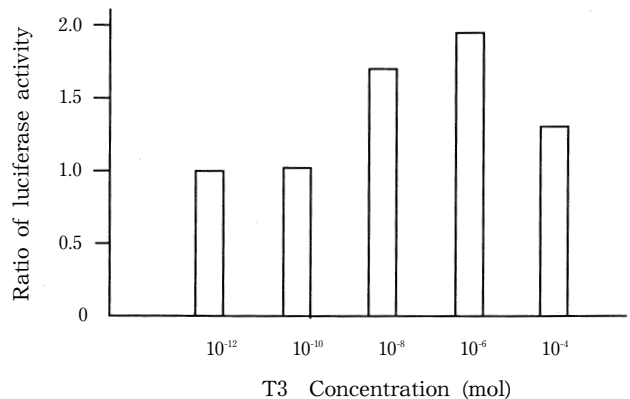


Fig. 5 Effects of Thyroid Hormone (T3) on the Gene Activation in HepG2 Cells Transfected with Reporter Plasmid DNA Carrying Thyroid Hormone Responsive Element (RXR/TR)

Dual-luciferase assay system (Promega) was used to quantify both firefly and renilla luciferase activities within the same sample prepared from HepG2 cells transfected with RXR/TR-reporter plasmid and pRL-TK vector. The firefly luciferase activity was measured first by adding Luciferase Assay Reagent. After quantifying the firefly luciferase, renilla luciferase reaction was initiated by simultaneously adding Stop and Go Reagent to the same tube.

Table 1 Gene Activation Assay Using HepG2 Cells Transfected with RXR/TR-Reporter Plasmid

RXR/TR-reporter plasmid (ng)	pRL-TK (ng)	T3 (mol)	Ratio of luciferase activity		
			1	2	3
500	5	—	1.00	1.00	1.00
500	5	10^{-4}	1.31	1.40	1.33
500	5	10^{-6}	1.89	1.91	1.94

Ratio of luciferase activity was calculated by dividing the activity value of firefly luciferase with that of renilla luciferase quantitated within each sample prepared from HepG2 cells transfected with RXR/TR-reporter plasmid and pRL-TK vector.

し応答配列は最も強力なホルモン応答配列で、ハーフサイト間の塩基数 [1 to 5 ルール] に従い 9-cis-レチノイン酸受容体/甲状腺ホルモン受容体やビタミン D 3 受容体/甲状腺ホルモン受容体のヘテロ 2 量体で結合し、下流または上流の遺伝子発現を調節している⁸⁻¹¹⁾。さらに、甲状腺ホルモンの影響を強く受ける遺伝子は、例外なく AGGTCA (n)₄ AGGTCA で示されるホルモン応答配列により発現調節されていることが報告されている^{10,12-15)}。これらのことから、今回使用した AGGTCAttcAGGTCA 配列は、甲状腺ホ

ルモン応答配列として最も優れたものの一つと考えられる。

RXR/TR を組換えたレポータープラスミドを用いた遺伝子活性試験は、ルシフェラーゼの酵素活性をホルモン作用の指標とすることにより化学物質の甲状腺ホルモン作用の有無を判定することができる¹¹⁾。T3 を使用した実験で、RXR/TR を組換えたレポータープラスミドを用いた遺伝子活性試験は、 10^{-4} ~ 10^{-8} モルの T3 濃度でホルモン作用を検出できることが認められた。環境中での内分泌攪乱化学物質のほとんどがナノグラムからピコグラムのオーダーで検出されることから、 10^{-8} M までホルモン作用を検知できる RXR/TR を組換えた遺伝子活性試験は、化学物質の甲状腺ホルモン様作用の潜在活性を検出するためのスクリーニング法として十分活用できるものと思われる。

今回の遺伝子活性試験には、レポータープラスミドを導入する宿主細胞としてヒト肝臓由来の培養細胞である HepG2 が用いられている。RXR/TR を組換えたレポータープラスミドを用いた遺伝子活性試験システムでは、宿主細胞を種々選択することができるので、肝臓由来培養細胞に換えてヒト神経細胞など宿主細胞を選択することにより、ヒト臓器に特異的な影響を及ぼす甲状腺ホルモン様化学物質の評価を行うことも可能であろう。

これまで、内分泌攪乱作用のなかで性ホルモン作用に比べて甲状腺ホルモン作用にはあまり注意が払われてこなかった。先に記したように甲状腺ホルモンは、生物の生存や生殖に関与する多くの遺伝子発現の調節に関与している。今後、ヒトに対する内分泌攪乱作用が懸念されている有機スズ化合物、DDT、PCB、ダイオキシン類について RXR/TR を組換えたレポータープラスミドを用いた遺伝子活性試験システムを用いて検討を加えていく必要がある。

結 語

DNA 組換え技術を用いて、甲状腺ホルモン応答配列 (AGGTCAAttcAGGTCA) を pGL3 ベクターに組換え、RXR/TR-レポータープラスミドを作成した。このレポータープラスミドをヒト肝由来培養細胞 HepG2 に導入して遺伝子活性試験を行なった。試験結果から、RXR/TR を組

換えたレポータープラスミドを用いた遺伝子活性試験システムは、甲状腺ホルモン作用を 10^{-4} ~ 10^{-8} M の濃度で検出できることが確認された。RXR/TR-レポータープラスミド遺伝子活性試験システムは、環境汚染化学物質の甲状腺ホルモン様作用の潜在活性を検出するためのスクリーニング法として十分活用可能と考える。

終わりに臨み、本研究は平成11~13年度北海道立衛生研究所・遺伝子工学導入特別研究費により実施されたことを付記する。

文 献

- 1) Dodds EC, Lawson W : Proc. Roy. Soc. B., **125**, 222 (1938)
- 2) IEH, IEH Assessment on Environment Oestrogens : Consequences to Human Health and Wild Life, Institute for Environment and Health, 1995
- 3) Carlsen E, Qweenman A, Keiching N, Skakkeback NE : Br. Med. J., **305**, 609 (1992)
- 4) 日本比較内分泌学会編：甲状腺ホルモン，学会出版センター，東京，1998
- 5) 白須泰彦，吐山豊秋：新毒性試験法—方法と評価，リアライズ社，東京，1985，p.183
- 6) 武森重樹：ステロイドホルモン，共立出版，東京，1998
- 7) 東京大学医科学研究所制癌研究部編：新細胞工学実験プロトコール，秀潤社，東京，1993
- 8) Chin WW : Thyroid Today, **15**, 1 (1992)
- 9) Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM, Sigler PB : Nature, **375**, 203 (1995)
- 10) Umezono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM : Cell, **65**, 1255 (1991)
- 11) Perlmann T, Rangarajan PN, Umezono K : Genes Dev., **7**, 1411 (1993)
- 12) Kurokawa R, Yu VC, Naar A, Kyakumoto S, Han Z, Silverman S, Rosenfeld MG, Glass CK : Genes Dev., **7**, 1423 (1993)
- 13) Zechel C, Shen X-Q, Chambon P, Gronemeyer H : EMBO J., **13**, 1425 (1994)
- 14) Schrader M : J. Biol. Chem., **269**, 6444 (1994)
- 15) Katz RW, Koenig RJ : J. Biol. Chem., **269**, 18915 (1994)