

核内受容体リガンドの網羅的バイオアッセイ

育成研究：JSTイノベーションプラザ大阪 平成20年度採択課題
「核内受容体リガンドの網羅的簡便迅速バイオアッセイ法の開発」

代表研究者：大阪府立大学・理学系研究科・生物科学専攻 教授
八木孝司



■ 研究概要

核内受容体リガンド活性がある物質は、環境中の内分泌攪乱物質とされる一方で、医薬品候補として注目される。本研究では、18種類のヒト核内受容体を発現する遺伝子組換え酵母を樹立し、そのリガンド物質を発色によって簡便に測定できるバイオアッセイ法を確立した。その一部は商品化に至った。

■ 研究内容、研究成果

ヒト細胞より得た核内受容体遺伝子(cDNA)を酵母で発現できるように組換えプラスミドを作製し、酵母染色体中へ組み込んだ。ヘテロダイマー型核内受容体の場合は、パートナーとなるレチノイドX受容体(RXR)のリガンド結合ドメインを欠失させたcDNAを作製し、同時に酵母染色体へ組み込んだ。また、リガンドと結合して転写活性を測定するためのレポーターとしてガラクトシダーゼ、転写を促進させるための転写共役因子(SRC-1)を発現するプラスミドを、それぞれ酵母に導入した。さらに酵母内のリガンド物質の濃度を高めるために細胞壁透過性を高める変異Crp1およびCrp2、薬剤排出を抑えるためにPdr5およびPdr10変異を酵母に導入した。このようにしてヒトの全ステロイドホルモン受容体、全レチノイド受容体、全甲状腺ホルモン受容体、ビタミンD受容体などのリガンドアッセイ酵母を18種類樹立した。これによって、これまでにない核内受容体のリガンドアッセイ系、または既存のバイオアッセイ系より10倍以上高感度なアッセイ系ができた。これらアッセイ系の有用性は、既知のアゴニストまたはアンタゴニスト医薬品や内分泌攪乱物質の濃度応答性および受容体特異性によって確かめた。また環境試料として奈良・大阪を流れる大和川河川水を用い、種々の受容体の未知なるリガンド活性を検出した。これら遺伝的背景が均一な複数のアッセイ酵母を同時に用いることにより、化学物質や環境試料のリガンド活性を網羅的に、かつ高価な装置を用いることなく、低コストで迅速に(2日以内で)測定できるようになった。ダイオキシン受容体とエストロゲン受容体についてはリガンドアッセイキットを商品化した。

■ 今後の展開、将来の展望

重要な約15種類の核内受容体について簡便で低コストで実施できる酵母アッセイ系を構築し、環境や創薬等の用途に応じた種類の酵母を供給できるキットの作製を目指す。インド・東南アジアではダイオキシン類の検出に関してニーズが大きく、環境試料や農作物中からの簡便検出法が望まれている。こうした要望に答えるため、酵母アッセイに用いるための簡便な試料前処理方法についても今後検討したい。ダイオキシンの機器分析は、公定法・簡易測定法を問わず長期間とコストがかかるので、本アッセイは機器分析に供する検体を限定する1次スクリーニングとしての需要に対応できると考えている。一方、国内では天然物からの有用物質探索や環境汚染調査において、複数の核内受容体に対する応答を評価することが求められている。こうしたニーズに対しては、本研究開始前から想定していた網羅的アッセイキットがソリューションになると考えられる。しかし研究実施期間中に、酵母改変による低バックグラウンド・高感度化へと劇的に検出感度が改善した代わりに、個別に培地の至適化が必須となった。ユーザーの利便性を損なわないため、アッセイ用プレート上に培地と酵母をプリセットして提供するなど、新たな提供方法について検討する。



図1. 本技術によって商品化されたダイオキシン分析用およびエストロゲン類分析用酵母レポーターアッセイキット

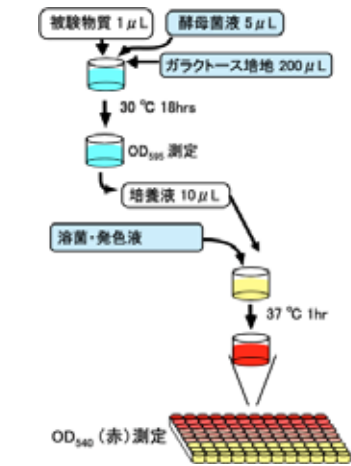


図2. 核内受容体リガンドアッセイ酵母を用いたレポーターアッセイ方法

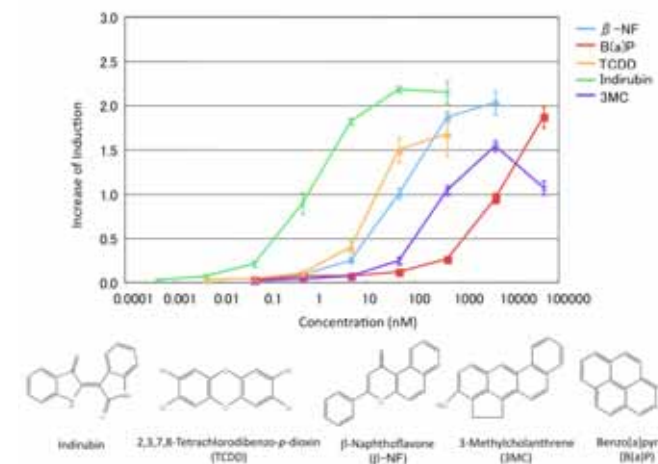


図3. ダイオキシン分析用キットを用いた芳香族炭化水素類のリガンドアッセイ結果

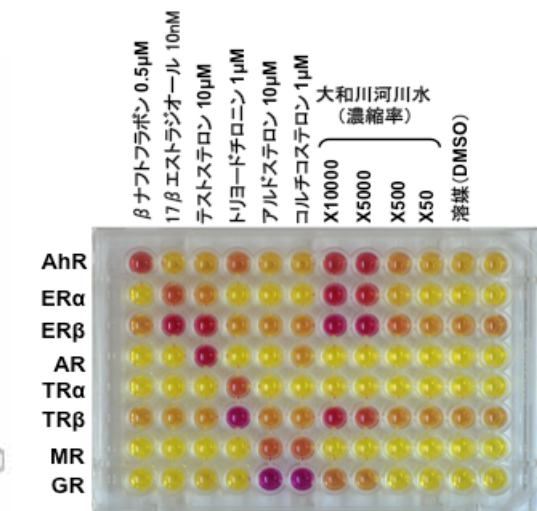


図4. 8種類の核内受容体リガンドアッセイ酵母を用いたレポーターアッセイ

■ 研究体制

- ◆ **代表研究者**
大阪府立大学 理学系研究科・生物科学専攻 教授 八木孝司
- ◆ **研究者**
川西優喜(大阪府立大学)、椎崎一宏(大阪府立大学)、原島小夜子(大阪府立大学)、下原千昌(大阪府立大学)、藤井光代(大阪府立大学)、水山博子(大阪府立大学)、西本幸史(長瀬産業株式会社)、笹野有未(長瀬産業株式会社)
- ◆ **共同研究機関**
長瀬産業株式会社

■ 研究期間

平成21年4月 ~ 平成24年3月