

研究要旨：

血管作動性腸管ペプチド遺伝子のプロモーターにより転写されるベータガラクトシダーゼ遺伝子をラット副腎髄質由来の細胞に導入し、安定した形質転換細胞株 PCVG を得た。この細胞を用いると、cAMP、TPA、変動磁場などの生物学的影響を簡便に検出できた。また、核受容体型転写因子 NOR-1 の遺伝子プロモーターも、様々な刺激に反応して転写を促進することがわかり、化学物質の生物作用の検出に利用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

哺乳動物の培養細胞を用いて、いわゆる内分泌かく乱化学物質の生物学的活性を検出する系を考案する。特に、膜受容体を介し、細胞内キナーゼ類を活性化するシグナル伝達系をかく乱する物質の、簡便で感度の良い検出系をつくることを目的とする。

B. 研究方法

ホルモン等の刺激により転写誘導ないし抑制を受ける遺伝子のプロモーター領域にレポーター遺伝子をつなぎ、これを培養細胞に導入し、安定した形質転換細胞を作製する。この細胞を各種化学物質で刺激し、導入遺伝子の発現をレポーター遺伝子産物の酵素活性測定により検出する。本年度は、ラット副腎髄質由来の神経内分泌細胞 PC12 に、血管作動性腸管ペプチド (vasoactive intestinal peptide, VIP) 遺伝子のプロモーター領域により転写されるベータ・ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) を導入した安定形質転換細胞 PC12-VG 細胞を用いて、種々の刺激に対する遺伝子発現の変化を検討した。

VIP 遺伝子は PC12 細胞などの神経内分泌

細胞に局限して発現するため、他の種類の細胞における化学物質の影響をみるのには不適であることが予測される。VIP とは異なり、ほとんど全ての細胞で発現し、かつ、ホルモン等により発現誘導が見られる遺伝子のプロモーターを用い、様々な細胞において発現の変化が検出できる系を作製する。また、内分泌かく乱化学物質およびその候補物質による刺激実験を行い、検出系の特性を検討する。

C. 研究結果および考察

内因性 adenylate cyclase を活性化するアルカロイド forskolin で PC12-VG 細胞を刺激すると、約 6 時間後にベータ・ガラクトシダーゼ活性が頂値に達し、その後低下する。これまでの検討では、細胞を 6 時間刺激後、ONPG を基質とする 1 時間の測定で、forskolin の最小濃度 100 nM (40 ng/ml) により有意に酵素活性が上昇した。また本来 PC12 細胞に内在する pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) 受容体を介して、PACAP、VIP、Glucagon 等による cAMP 上昇が検出でき、VIP の最小濃度 30 nM により有意な酵素活性の上昇がみ

られた。この PC12-VG 細胞に、さらに性腺刺激ホルモン受容体を強制発現させた細胞では、ヒト胎盤性ゴナドトロピンによる cAMP 上昇が検出できた。また、protein kinase C を活性化させる 12-O-tetradecanoylphorbol-13- acetate (TPA) を、一定濃度の forskolin の存在下で加えると、TPA の用量に依存的にベータ・ガラクトシダーゼ活性が上昇する。この方法によると、最小濃度 10 nM (6 ng/ml) の TPA により有意な酵素活性の上昇を認めることができた。

一方、ヒト神経芽細胞腫の培養株 NB-OK-1 を用いた細胞分化誘導作用の検出系により、放線菌が産生するアルカロイド staurosporine が神経突起形成作用を有することが明らかにされた。この検出系では神経突起崩出に数日を要し、その定量も困難であるが、PC12-VG 細胞を用いて staurosporine の作用をみると、数時間の刺激でその効果を定量的に検出することができた。staurosporine によって細胞内 cAMP の上昇は起こらないため、この場合の PC12-VG 細胞の staurosporine に対する反応機序は不明である。

PC12-VG 細胞は培養液の pH の変化などに対しても敏感に反応するため、注意深い対照試験が必要であるが、作用機序不明の生理活性物質の検出にも利用できると思われる。この細胞はすでに低周波変動磁場の生物作用の研究にも応用され、低周波磁場が培養細胞に生物反応を誘発することを証明できた。このように、PC12-VG 細胞は細胞内 cAMP の上昇のみならず、作用機構不詳の生物学的活性をもつ物質や物理的刺激の影響を検出することが明らかになった。

最近我々は核受容体型の構造を有する転写

因子 neuron-derived orphan receptor (NOR-1) を同定し、その遺伝子の転写活性を検討した。この遺伝子は PC12 細胞を含め多くの細胞で発現しており、cyclic AMP、TPA、神経栄養因子、インスリン等の種々の細胞内情報伝達系を介するシグナルにより急速に発現が誘導される。また、チャイニーズハムスター卵巣由来の培養細胞 (CHO 細胞) において極低周波変動磁場の NOR-1 遺伝子発現に与える影響について調べたところ、50 ヘルツ・400 ミリテスラーの変動磁場が NOR-1 遺伝子発現を一過性に誘導することが明らかになった。また、この NOR-1 遺伝子は乳癌細胞 MCF-7 細胞においてはレチノイン酸によっても発現が誘導された。

#### D. 結論

血管作動性腸管ペプチド遺伝子のプロモーターにより転写されるベータガラクトシダーゼ遺伝子をラット副腎髄質由来の細胞に導入した形質転換細胞株 PCVG を用いて、cAMP、TPA、変動磁場などの生物学的影響を簡便に検出できた。また、核受容体型転写因子 NOR-1 の遺伝子プロモーターも、様々な刺激に反応して転写を促進することがわかり、化学物質の生物作用の検出に利用できる可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ohkura N, Hosono T, Maruyama K, Tsukada T and Yamaguchi K. An isoform of Nurr1 functions as a negative inhibitor of the NGFI-B family signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1444, 69-79, 1999.

Ohkura N, Ito M, Tsukada T, Sasaki K, Yamaguchi K and Miki K. Alternative splicing generates isoforms of human neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) mRNA. Gene 211: 79-85, 1998

Miyakoshi J, Tsukada T, Tachiiri S, Bandoh S, Yamaguchi K and Takebe H. Enhanced NOR-1 gene expression by exposure of Chinese hamster cells to high-density 50 Hz magnetic fields. Mol Cell Biochem 181: 191-195, 1998

## 2 学会発表

Regulation of expression of NOR-1, one of the Nur77/NGFI-B family members. Naganari Ohkura, Tetsuji Hosono, Kouji Maruyama, Toshihiko Tsukada, and Ken Yamaguchi. (Growth Factor Division, National Cancer Center Research Institute, Tokyo) 1998 年 3 月 31 日 Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology Incline Village, Nevada, USA.

NGFI-B family における isoform の役割

大倉永也、塚田俊彦、丸山宏二、細野哲司、山口 建 (国立がんセンター研究所細胞増殖因子研究部) 1998 年 9 月 30 日 第 57 回日本癌学会総会 (横浜)

乳がん細胞 MCF-7 における NOR-1 及び Nurr1 標的遺伝子の探索、丸山宏二、長崎光一、塚田俊彦、細野哲司、大倉永也、佐々木一樹、山口 建 (国立がんセンター研究所細胞増殖因子研究部) 1998 年 9 月 30 日 第 57 回日本癌学会総会 (横浜)

乳がん細胞 MCF-7 における NGFI-B subfamily 遺伝子の dexamethasone による発現調節、細野哲司、塚田俊彦、丸山宏二、大倉永也、佐々木一樹、山口 建 (国立がんセンター研究所細胞増殖因子研究部) 1998 年 9 月 30 日 第 57 回日本癌学会総会 (横浜)