

分子生物学的手法によるヒト型エストロゲン受容体異種細胞発現系に関する研究

分担研究者 中澤 憲一 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部第2室室長

研究要旨

ヒト型エストロゲン受容体に対する各種化学物質の影響を評価する系の開発を目的とし、この受容体を分子生物学的手法により異種細胞に発現させる方法について検討した。アフリカツメガエル卵母細胞を発現系とし、この細胞におけるヒト型エストロゲン受容体発現に適したベクターの作製、および発現を確認するためのレポーター遺伝子種の比較検討を行なった。

A. 研究目的

ヒト型エストロゲン受容体に対する各種化学物質の影響を評価する系の開発を目的とし、この受容体を分子生物学的手法により異種細胞に発現させる方法について検討する。3年計画の初年度である本年度は、ヒト型エストロゲン受容体発現のための条件検索を行なった。

B. 研究方法

ヒト型エストロゲン受容体を発現させる細胞としては、大きく、扱いやすく、安価であるアフリカツメガエル卵母細胞を用いた。

ヒト型エストロゲン受容体cDNAは哺乳動物発現型プラスミドに組み込み、大腸菌を用いて増幅させた。これを鋳型としてRNAをin vitro転写により合成した。エストロゲン受容体の発現を確認するためのレポーターとしては、細胞外ATPのイオン・チャネル形成型受容体であるP2X2受容体を用いた。具体的には、P2X2受容体のcDNAをエストロゲン受容体結合配列の下流に組み込んだプラスミドを作製した。これとは別に、P2X2受容体、ニコチン様アセチルコリン受容体あるいはセロトニン5-HT3受容体のcDNAを哺乳動物発現型プラスミドに組み込み、陽性対照とした。

アフリカツメガエルより卵母細胞を摘出し、コラゲナーゼ処理により卵母細胞を除去した。第IV、V期の卵母細胞を実体顕微鏡下で選別しこれにプラスミドあるいは転写したRNAを注入した。18℃で2-5日間の培養後、電気生理学的手法により受容体の発現の有無を確認した。

(倫理面への配慮)

1回に作製する卵母細胞標本の数は通常20個以上であり、また、同一のアフリカツメガエルより5回程度の卵母細胞の摘出が可能である。よって、1匹のアフリカツメガエルより多数(100以上)の標本作製でき、使用する動物の数を大幅に制限できる。動物を死亡させる際には当研究所の実験動物倫理委員会の規定に従い、与える苦痛が最小限となる方法を用いた。

C. 研究結果

P2X2受容体のcDNAを哺乳動物発現型プラスミドに組み込んで卵母細胞に注入した場合、細胞外ATPの卵母細胞の適用により内向き電流が惹起され、受容体が発現していることが確認された。ニコチン様アセチルコリン受容体、5-HT3受容体についても哺乳動物発現型プラスミドからの発現が認められた。P2X2受容体のcDNAをSV40プロモーター・ベクターに組み込み、さらにエストロゲン受容体結合部位(ERE)をSV40プロモーターの直前に組み込んだプラスミドを作製した。これをエストロゲン受容体のRNAまたはcDNAとともに卵母細胞に注入した場合、エストラジオールの有無に関わらずATP誘発電流が観察された。

D. 考察

P2X2受容体、ニコチン様アセチルコリン受容体、5-HT3受容体はいずれも哺乳動物発現型プラスミドからの発現が認められた。このことから、これらの受容体遺伝子はアフリカツメガエル卵母細胞においてエストロゲン受容体発現のレポーターとして利用可能であることが確認された。SV40プロモーターとEREを組み込んだベクターではP2X2受容体がエストラジオールの有無に関わらず発現した。このことは、SV40プロモーターが単独で転写活性化を行なうことを意味している。今後は、他のベクターとEREを組み合わせるにより、エストロゲン受容体によるオン/オフが可能となる条件を検索する予定である。

E. 結論

本年度の研究により、アフリカツメガエル卵母細胞におけるエストロゲン受容体発現のレポーターに利用可能な受容体遺伝子種が明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) K. Nakazawa, Y. Ohno, "Block by 5-hydroxytryptamine and apomorphine of recombinant human neuronal nicotinic

receptors", *European Journal of Pharmacology*, Vol. 374, pp. 293-299 (1999)

2. 学会発表

- 1) 中澤憲一，大野泰雄，“P2X2受容体に存在する隣接したグリシン残基の受容体チャネル機能における役割”
第72回日本薬理学会年会 (1999)

G. 知的所有権の取得状況

なし