

CAT アッセイ (二層拡散法) によるグルココルチコイド レセプター機能の検討

笠井 裕, 濃野 勉, 斎藤 泰一

ステロイドホルモン受容体遺伝子の発現は, chloramphenicol acetyl transferase (CAT) を指標にした CAT assay を用いて表すことができる。しかし, 細かい実験条件の違いによりトランスフェクション効率が実験ごとに異なるため, 直接その値を比較するのに問題があった。そこで我々は pSV2CAT 系の発現プラスミドを用いて, シオノギ乳癌細胞とマウス野生型のグルココルチコイド受容体遺伝子の CAT 活性を二層拡散法で測定し, その測定条件の吟味を行った。その際, 各受容体の CAI (CAT activity index) を positive control (pSV2CAT) の CAI の100分比をとったところ, 各測定ごとの変動もなく, 毎回トランスフェクション効率を測定しなくても CAT 活性を比較できることがわかった。

(平成2年10月29日採用)

Comparison of the Gene Expression of a Glucocorticoid Receptor by Diffusion-Based CAT Assay

Yutaka Kasai, Tsutomu Nohno and Taiichi Saito

The function of the steroid hormone receptors has been measured by CAT (chloramphenicol acetyl transferase) assay of a receptor plasmid consisting of a MMTV promoter and a CAT gene. The diffusion-based CAT assay is simpler, less time-consuming and more quantitative than the traditional thin-layer chromatography method. However, the transfection efficacy of this assay is variable for each trial. Therefore, we introduced a CAI [CAT activity index : {dpm(4hr incubation) - dpm (2hr)} / 2 (dpm/hr)] and a relative CAI (RCAI). The function of the mutant glucocorticoid receptor gene (SC-GR II) from Shionogi carcinoma 115 was examined by CAT assay by comparing the CAI of pSV2S-GR II, an expression plasmid of SC-GR II, with that of pSV2Wrec, a full functional expression plasmid of the wild type mouse glucocorticoid receptor. As a positive control, pSV2CAT was cotransfected into COS-1 cells (African green monkey kidney cell line, Japanese Cancer Research Resources Bank). Each receptor's CAI was expressed as RCAI (the percent of the CAI of the positive control, pSV2CAT). RCAI showed constant values in each trial, and can be used as a reliable parameter of CAT activity without measurement of transfection efficacy. (Accepted on October 29, 1990) *Kawasaki Igakkaishi*

16 (3・4): 230-234, 1990

Key Words ① CAT assay ② DNA transfection ③ Shionogi carcinoma
④ Glucocorticoid receptor

はじめに

近年ステロイドホルモンレセプターの cDNA が次々とクローン化され、レセプターの分子構造が解明されつつある。¹⁾ 特にその DNA 結合部は、染色体上のそれぞれに特異的なホルモン応答因子(HRE)を認識して、その転写を活性化すると考えられ、レセプターの機能及びその活性化の機構を知るうえで、興味をもたれるところである。²⁾ 一方、クローニングされたレセプターの cDNA を発現ベクター(プラスミド)に組み込み、培養細胞内で発現させ、その機能を調べる実験が様々な方法で行われている。^{3)~6)} この機能の比較に、レポーターとしての CAT (chloramphenicol acetyl transferase) 活性を測定することが汎用されているが、遺伝子を培養細胞内に導入する方法は、ほんのわずかな実験条件の違いによって大きな数値の変動をもたらす、そのたびごとにトランスフェクション効率を測定し、比較しなければならない。^{7)~9)} したがって、CAT 活性は相対的な比較にとどまり、絶対値として利用することは困難である。今回我々は、シオノギ癌のグルココルチコイド・レセプター(GR)の機能を調べるために、Gormann らの pSV2 CAT 系を用い、¹⁰⁾ これに Neumann らが開発した二層拡散法(diffusion-based CAT assay)を導入して CAT assay を行った。¹¹⁾ しかも CAT 遺伝子の発現プラスミドを陽性コントロールとして、この CAT 活性に対するパーセンテージを出し、GR の CAT 活性の比較を行ったところ、良好な結果を得たので報告する。

材 料

細胞は African green monkey の腎臓由来の細胞株 COS-1 (Japanese Cancer Research Resources Bank細胞バンクから供与)を用いた。マウスの野生型 GR、及びシオノギ癌からクローニングした変異体 GR(SC-GR II)をそれぞれ組み込んだ発現プラスミド(pSV2Wrec,¹²⁾ pSV2S-GR II¹³⁾)を用いて、そのレセプター活性の比較を行った。レポーター・プラスミドとして、GR

のHREを有するMMTVプロモーターとこれによりCAT遺伝子が発現するpMSG-CAT (Pharmacia)を使用した。なお、陽性コントロールとして、pSV2CATを使用した。¹⁰⁾

方 法

1. トランスフェクション

前日に 5×10^5 cells/100 mm dish に調整しておいた COS-1細胞に、pSV2Wrec あるいは pSV2S-GR II 5 μ g、及び pMSG-CAT 20 μ g の計25 μ g の DNA をリン酸カルシウム法(Mammalian Transfection Kit, Stratagene)によってトランスフェクションし、10%FBS加DMEM 10 ml, 35°C, 4%CO₂インキュベーター内で1晩培養した。⁹⁾ 陽性コントロールのpSV2CATも同様に5 μ gをpMSG-CAT 20 μ gとともにトランスフェクションし1晩培養した。これらの細胞を約 2×10^5 cells/30 mm dish に分けて、活性炭処理した10%FBS加DMEM 5 mlで、5%のCO₂インキュベーター内で24時間培養し、dexamethasoneを終濃度 10^{-6} M になるように滴下した。さらに24時間培養し、PBSで2回洗浄後、TEN buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) 1 mlを加え、約10分間氷上に放置した後 rubber scraper にて掻き取り、最終的に 0.25 M Tris-HCl pH 7.8 100 μ l に溶解した。これをエタノール・ドライアイスバスで凍結、融解を3回繰り返した後、15,000 rpm, 5分間遠心した上清を回収し、細胞抽出液として -80°C に保存した。

2. CAT assay

50 μ l の細胞抽出液、0.1 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM chloramphenicol (Sigma), 20 μ M [³H]-acetyl CoA (13.5 Bq/ μ l, NEN), 80 μ M acetyl CoA (Sigma) を混合し、再蒸留水で全量250 μ l とした。あらかじめ、液シン用ミニバイアルに入れておいたシンチレーター (Econofluor : NEN) の中に、この反応液を沈めるように静かに置いた。室温でインキュベートしつつ、ALOKA 3100シンチレーションカウンターを用いて、2時間ごとに室温で2分間測

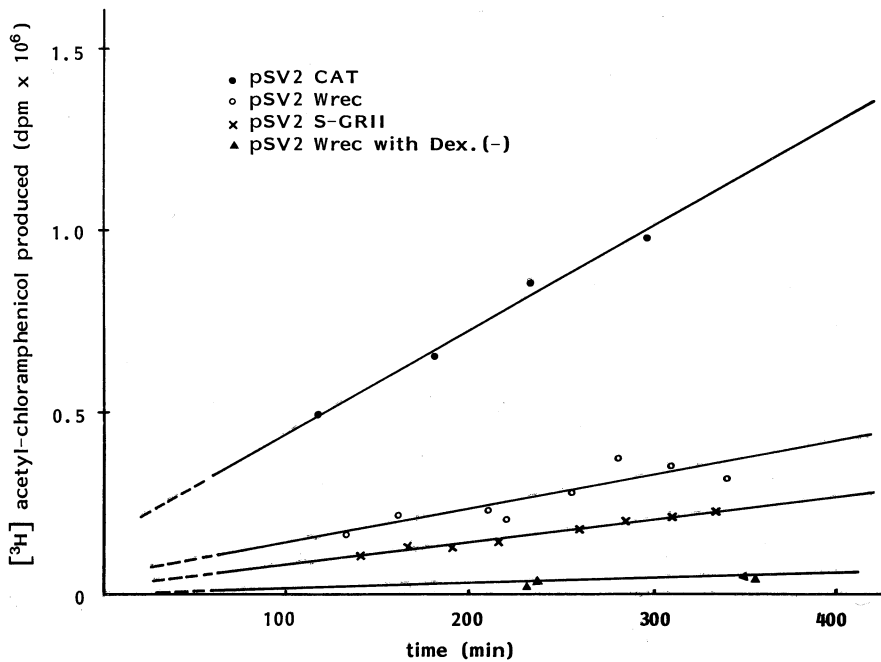


Fig. 1. Kinetics of chloramphenicol acetylation with [³H] acetyl CoA

定した.¹⁴⁾

結果及び考察

二層拡散法は、従来の薄層クロマトグラフィ一法に比し、操作が簡単で、時間も短く、連続的に定量的なデータを得られる点で優れている。¹⁴⁾ pSV2Wrec, pSV2S-GR II, pSV2CAT のそれぞれのプラスミドを、実験条件をそろえて同時にトランスフェクションし、二層拡散法でCAT活性を測定した結果をグラフ (Fig. 1) に示した。2時間と4時間に測定したdpmの差を2で割った値CAI [CAT activity index: {dpm (4 hr) - dpm (2hr)} / 2 (dpm/hr)]¹⁴⁾ は、Figure 1とTable 1に示すように、1回の実験では比較的ばらつきの少ないデータとして示されるが、それぞれ独立した実験間では、細かい条件の差で大きく変化し (Table 1 ①~③)、そのままでは絶対値として比較することができない。これは、培養液のpHや、インキュベーター内のCO₂濃度の微妙な変化により、トランスフェクション

の効率が、大きく変わってくることに起因すると思われる。^{5), 6), 8), 9)} これを是正するには、neomycine耐性のプラスミドとともにトランスフェクションしneomycineを含む培地で選択して、それぞれのトランスフォーメーション効率を求める方法や、⁹⁾ β-Galなどの指標となる遺伝子をもつプラスミドを混合してCAT活性と同時にβ-Gal活性を測定して、⁸⁾ トランスフェクションの効率を調べるなどが必要であるが、このために余分に時間を費やしたり費用もかさむことになり、なかなか簡便に1回の実験を行うことは難しい。そこで、pSV2CATのCAIに対するそれぞれのレセプタープラスミドのCAIのパーセンテージrelative CAI (RCAI)を比較してみると、各実験間のRCAIはt検定にて、有意差を認めなかった。このRCAIを二つのレセプター間で比較することにより、SC-GR IIがマウス野生型GRの約58.5%のCAT活性をもっていることがわかる。これをそのままレセプター活性絶対値として用いることはできないが、そ

Table 1. Comparison of CAT activity indices

Exp. No.	Plasmid	Mean CAI ($\times 10^4$ dpm/hr)	RCAI (%)					RCAI ratio
			1	2	3	4	Mean	S-GR II / Wrec
①	pSV2CAT	17.7						0.62
	pSV2Wrec	6.5	33.9	44.8	36.2	30.9	36.5	
	pSV2S-GR II	4.0	21.0	23.2	23.2	22.4	22.5	
②	pSV2CAT	41.2						0.55
	pSV2Wrec	18.3	46.0	42.8			44.4	
	pSV2S-GR II	10.1	24.8	24.4			24.5	
③	pSV2CAT	11.6						0.58
	pSV2Wrec	5.5	45.8	37.2	58.6	46.2	47.0	
	pSV2S-GR II	3.2	30.2	29.5	27.0	22.7	27.3	

CAI ; CAT activity index = {dpm (4hr) - dpm (2hr)} / 2 (dpm/hr)

RCAI ; relative CAT activity index = CAI of pSV2Wrec or pSV2S-GR II / CAI of pSV2CAT (%)

RCAI ratio ; relative CAT activity index ratio = RCAI of pSV2S-GR II / RCAI of pSV2Wrec

れを比較する場合の一つのパラメーターになり得ると考えられる。CAT assay は、レセプター遺伝子の発現及びその機能を知るために重要な方法であり、新しく発見されたステロイドホルモンレセプターやその変異体のレセプター活性を比較するためにも、欠くことのできない実験

方法になると推測される。¹⁵⁾ 目的の DNA を、細胞内に大量にしかも一定量トランスフェクションする簡便な方法がない現在、CAT 活性を比較検討するうえで、RCAI は比較的使いやすい一つの指標になり得ると考える。

文 献

- 1) Evans, R.M. : The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240 : 889-895, 1988
- 2) Green, S. and Chambon, P. : Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.* 4 : 309-314, 1988
- 3) Mulligan, R.C. and Berg, P. : Expression of bacterial gene in mammalian cells. *Science* 209 : 1422-1427, 1980
- 4) Subramani, S., Mulligan, R. and Berg, P. : Expression of the mouse dihydrofolate reductase complementary deoxyribonucleic acid in simian virus 40 vectors. *Mol. Cell. Biol.* 1 : 854-864, 1981
- 5) 長田嘉穂, 大石道夫 : 細胞への DNA の導入 - 培養哺乳動物細胞への導入を中心として - . *蛋・核・酵* 28 : 1569-1581, 1983
- 6) 金田安史, 内田 驍 : 遺伝子導入をめぐる最近の話題. *生化学* 60 : 1381-1386, 1988
- 7) Sleigh, M.J. : A nonchromatographic assay for expression of the chloramphenicol acetyltransferase gene in eukaryotic cells. *Anal. Biochem.* 156 : 251-256, 1986
- 8) 佐藤建三, 伊藤良次, Agarwal, K., 細川桂一 : XII. 最新のバイオテクノロジー 14) 遺伝子発現の制御(その 2) - 真核生物遺伝子の転写集結と制御 - . *代謝* 25 : 187-198, 1988
- 9) Chen, C. and Okayama, H. : High-efficacy transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* 7 : 2745-2752, 1987

- 10) Gormann, C.M., Moffat, L.F. and Howard, B.H. : Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2 : 1044—1051, 1982
- 11) Neumann, J.R., Morency, C.A. and Russion, K.O. : A novel rapid assay for chloramphenicol acetyltransferase gene expression. *Bio Techniques* 5 : 444—447, 1987
- 12) Danielsen, M., Northrop, J.P. and Ringold, G.M. : The mouse glucocorticoid receptor : Mapping of functional domains by cloning, sequencing and expression of wild-type and mutant receptor proteins. *EMBO J.* 5 : 2513—2522, 1986
- 13) Kasai, Y. : Two naturally-occurring isoforms and their expression of a glucocorticoid receptor gene from an androgen-dependent mouse tumor. *FEBS Lett.* 274 : 99—102, 1990
- 14) 中山敬一, 中内啓光 : 新しい CAT assay —二層拡散法—. *実験医* 7 : 1240—1243, 1989
- 15) Sluyser, M. : Steroid/thyroid receptor-like proteins with oncogenic potential : A review. *Cancer Res.* 50 : 451—458, 1990