

レポーター遺伝子を用いた細胞内 cAMP 濃度の変動を指標とした生物活性測定法

原理

ルシフェラーゼ遺伝子に cAMP 依存性プロモータを付けたレポーター遺伝子を作製して細胞内に導入し、細胞内 cAMP 濃度の増加によるルシフェラーゼ遺伝子の発現、発現した酵素の活性を利用した化学発光物質の生成とその高感度測定による新規方法を開発した(図1)。

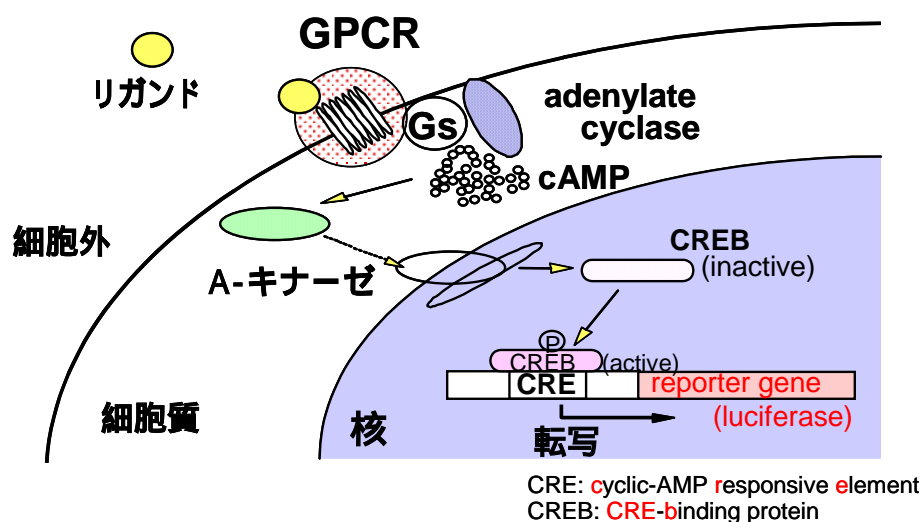


図1.Gs 共役型オーファン受容体リガンドの高感度発現クローニングシステム

方法

レポーター遺伝子アッセイの手順

- HEK293 or CHO cell (1×10^6 cell/10cm dish)
↓ 37°C, CO₂ incubator O/N
- transfection (orphan receptor cDNA + luciferase reporter gene)
↓ 37°C, CO₂ incubator 36hr
- 96-well plateに細胞を 3×10^4 cell/wellでplating
↓ 37°C, CO₂ incubator O/N
- medium 吸引後、100 mlのassay bufferに溶解したsampleを添加
(assay buffer: DMEM/1 μM forskolin/0.1% BSA/10mM HEPES(pH 7.4))
↓ 37°C, CO₂ incubator 3~4hr
- luciferase assay

実例

高感度のルシフェラーゼ・レポーター遺伝子導入法による cAMP 測定法を確立できたので、ラット脳について、cAMP 産生抑制活性を検討した結果、オーファン GPCR (GPR7) に対する新規活性が検出された。ゲル濾過段階における GPR7 発現細胞の cAMP 産生活性を図1に示した。フォルスコリン刺激下、明確な産生抑制作用に見ら

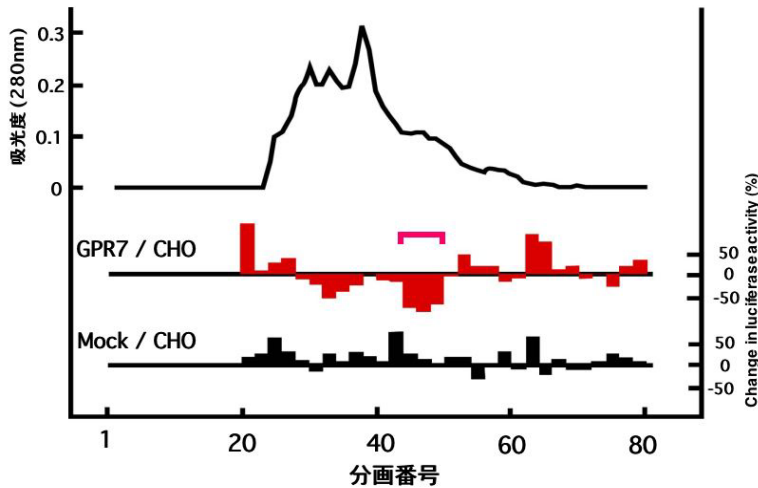
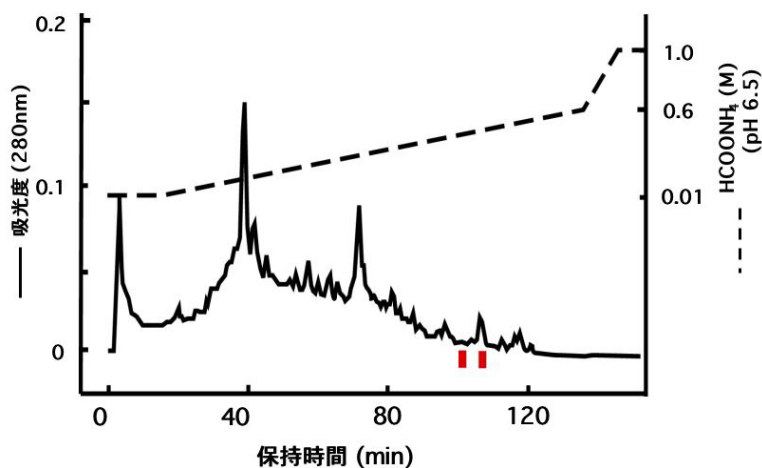


図1.ラット脳由来塩基性ペプチドを対象としたGPR7受容体 (G_i 共役型オーファン受容体) リガンドの検索。

れた画分 46-50 について精製を進めた。イオン交換 HPLC において、極めて強い塩基性ペプチド画分に cAMP 産生抑制活性が観測された (図2)。引き続き精製を試みたが、含量が少なく実験器具への吸着などのため最終精製に至らず、構造決定できなかつた。GPR7 の内在性リガンドは、その後

Neuropeptide W として武田薬品工業により同定され、摂食調節などの生理活性を有することが明らかになっている。



脳塩基性ペプ

ド画分を対象としたGRP7受容体 (G_i 共役型オーファン受容体) リガンドの検索

図1の46-50画分を陽イオン交換HPLCで分離し活性を測定した。赤棒は活性画分を示す。