

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5284479号  
(P5284479)

(45) 発行日 平成25年9月11日 (2013. 9. 11)

(24) 登録日 平成25年6月7日 (2013. 6. 7)

(51) Int. Cl.	F I
<b>C 1 2 N</b> 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
<b>C 1 2 Q</b> 1/02 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A
<b>C 1 2 N</b> 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 9 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2011-532886 (P2011-532886)	(73) 特許権者	000003078
(86) (22) 出願日	平成21年9月28日 (2009. 9. 28)		株式会社東芝
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/066824		東京都港区芝浦一丁目1番1号
(87) 国際公開番号	W02011/036812	(74) 代理人	100108855
(87) 国際公開日	平成23年3月31日 (2011. 3. 31)		弁理士 蔵田 昌俊
審査請求日	平成23年9月12日 (2011. 9. 12)	(74) 代理人	100159651
			弁理士 高倉 成男
微生物の受託番号	IPOD FERM BP-11165	(74) 代理人	100091351
微生物の受託番号	IPOD FERM BP-11166		弁理士 河野 哲
		(74) 代理人	100088683
			弁理士 中村 誠
		(74) 代理人	100109830
			弁理士 福原 淑弘
		(74) 代理人	100075672
			弁理士 峰 隆司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アリルハイドロカーボンレセプター転写活性化量を測定するための細胞、方法およびアッセイキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

受託番号FERM BP-11165またはFERM BP-11166である細胞。

【請求項 2】

請求項 1 記載の細胞であって、アリルハイドロカーボンレセプターの認識配列と、前記認識配列の下流に機能的に接続されている転写開始に必要な塩基配列とからなる配列番号 1 に示す配列と、前記塩基配列の下流に機能的に接続されているレポーター遺伝子とからなるレポーターコンストラクト、およびアリルハイドロカーボンレセプター遺伝子が染色体に導入され、

且つアリルハイドロカーボンレセプター核トランスロケター遺伝子を発現している神経由来の細胞であるアリルハイドロカーボンレセプター転写活性化量を測定するための細胞。

10

【請求項 3】

内部標準として -ガラクトシダーゼ遺伝子発現用ベクターが前記染色体に更に導入されている請求項 2 に記載の細胞。

【請求項 4】

前記レポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である請求項 3 に記載の細胞。

【請求項 5】

前記神経由来細胞がマウス由来のNeuro2a細胞である請求項 4 に記載の細胞。

【請求項 6】

20

被験物質が有するアリルヒドロカーボンレセプター転写活性化能の評価方法であって、

(1) 請求項1～5の何れか1項に記載の細胞に被験物質を接触させる工程と、  
(2) 被験物質に接触した前記細胞における当該レポーター遺伝子の翻訳産物量又はその量と相関関係を有する指標値を得る工程と、  
(3) 前記工程(2)において得られた翻訳産物量又はその量と相関関係を有する指標値に基づき、前記被験物質のアリルヒドロカーボンレセプター転写活性化能を評価する工程とを具備する方法。

【請求項7】

10

前記工程(1)において、前記細胞と被験物質との接触が20時間以上に亘って維持される請求項6に記載の方法。

【請求項8】

請求項1～5の何れか1項に記載の細胞を具備するアリルヒドロカーボンレセプター転写活性化量を測定するためのアッセイキット。

【請求項9】

請求項6に記載の方法により評価されたアリルヒドロカーボンレセプター転写活性化能に基づき、アリルヒドロカーボンレセプター転写活性化能を有する物質を選抜する工程を具備するアリルヒドロカーボンレセプター転写活性化能を有する物質の選抜または探索方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アリルヒドロカーボンレセプター転写活性化量の測定に関する。

【背景技術】

【0002】

ダイオキシン様物質は、次のように、細胞内でアリルヒドロカーボンレセプター(以下、Ahレセプターと記す)に結合して毒性を惹起する(非特許文献1、2参照)。ダイオキシン様物質がAhレセプターに結合すると、当該レセプターは活性化されて核内に移行する。その後、それは、Ahレセプター核トランスロケーター(Ah receptor nuclear translocator; 以下、Arntと記す。非特許文献3参照)とヘテロ二量体を形成する。当該二量体は染色体上のダイオキシン応答配列(Dioxin responsive element; DRE、またはXenobiotic responsive element; XRE、; 非特許文献4参照)に結合し、当該応答配列の下流にある遺伝子の転写を活性化する。

30

【0003】

非特許文献5は、当該応答配列の下流にAhレセプター活性化能の指標となるレポーター遺伝子を結合し、これを細胞に導入し、当該細胞に被験物質を接触させ培養した際の当該レポーター遺伝子の発現量を測定することにより、被験物質のAhレセプター活性化能を決定する方法を開示する。

【0004】

40

また、Ahレセプターの活性化は、ドーパミン生合成に関与するチロシン水酸化酵素(Tyrosine Hydroxylase、TH)の発現を増加する(非特許文献6参照)。特許文献1は、基質結合性を有する転写因子の制御領域に対する被験物質の活性を測定する方法を開示する。この方法は、ダイオキシン類によって強く誘導され、マウスTH遺伝子に由来する67bpのAhレセプターの認識配列を含むエンハンサー配列と、TH遺伝子由来プロモーター配列とがルシフェラーゼ遺伝子の上流に挿入されたベクターを導入された細胞を用いる方法である。この方法で使用される細胞は、ベクターが一過的に導入された細胞である。

【0005】

このような状況において、より測定時間が短く、また安定に広範囲な検出感度を可能にする方法の開発が望まれている。

50

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0006】

【特許文献1】特開2007-202555号公報

## 【非特許文献】

## 【0007】

【非特許文献1】Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.,22,517-554 (1982)

【非特許文献2】Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.,26,371-399

【非特許文献3】Science,252,954-958 (1991)

【非特許文献4】J.Biol.Chem.,263,17221-17224 (1988)

【非特許文献5】Fund.Appl.Toxicol.,30,194-203 (1996)

【非特許文献6】Akahoshi E et al., Environ Health 7; 5; 24 (2006)

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0008】

本発明は、Ahレセプター転写活性化量を測定するための細胞、方法およびアッセイキット、並びに当該活性を有する物質の選抜または探索方法を提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

本発明は、

1. Ahレセプターの認識配列と、前記認識配列の下流に機能的に接続されている転写開始に必要な塩基配列とからなる配列番号1に記載の配列と前記塩基配列の下流に機能的に接続されているレポーター遺伝子とからなるレポーターコンストラクト、およびAhレセプター遺伝子が染色体に導入され、

且つAhレセプター核トランスロケーター遺伝子を発現している神経由来の細胞であるAhレセプター転写活性化量を測定するための細胞；

2. 被験物質が有するAhレセプター転写活性化能の評価方法であって、

(1) 前記1項に記載の細胞に被験物質を接触させる工程と、

(2) 被験物質に接触した前記細胞における当該レポーター遺伝子の翻訳産物量又はその量と相関関係を有する指標値を得る工程と、

(3) 前記工程(2)において得られた翻訳産物量又はその量と相関関係を有する指標値に基づき、前記被験物質のAhレセプター転写活性化能を評価する工程と

を具備する方法；

3. 前記1項に記載の細胞を具備するAhレセプター転写活性化量を測定するためのアッセイキット；および

4. 前記2項に記載の方法により評価されたAhレセプター転写活性化能に基づき、Ahレセプター転写活性化能を有する物質を選抜する工程を具備するAhレセプター転写活性化能を有する物質の選抜および/または探索方法；

を提供する。

## 【発明の効果】

## 【0010】

本発明により、Ahレセプター転写活性化量を測定するための細胞、方法およびアッセイキット、並びに当該活性を有する物質のスクリーニング方法が提供される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0011】

【図1】Ahレセプター遺伝子を組み込んだ受容体発現用ベクターの構築図である。

【図2】Ahレセプター応答性レポーター遺伝子を含むベクターコンストラクトpTHEn-Luc-Zeocinの構築図である。

【図3】当該形質転換細胞が保持するレセプター応答性レポーターベクターpTHEn-Luc-Zeocinのコピー数を示すサザンハイブリダイゼーションの結果を示す。

10

20

30

40

50

【図4】当該形質転換細胞による2,3,7,8-TCDDの転写活性化能測定の結果を示すグラフである。

【図5】当該形質転換細胞によるPCB126の転写活性化能測定の結果を示すグラフである。

【図6】当該形質転換細胞によるKC400の転写活性化能測定の結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明に従う細胞は、Ahレセプター転写活性化量を測定するために形質転換を行なうことにより作製された形質転換細胞である。

【0013】

当該細胞は、Ahレセプターの認識配列と、前記認識配列の下流に機能的に接続されている転写開始に必要な塩基配列とからなる配列番号1に記載の配列と、前記塩基配列の下流に機能的に接続されているレポーター遺伝子とからなるレポーターコンストラクト、およびAhレセプター遺伝子が染色体に導入され、且つArnt遺伝子を発現している神経由来の細胞である。

【0014】

当該形質転換細胞は、その染色体にAhレセプター遺伝子およびArnt遺伝子が導入されてもよい。また、その染色体にAhレセプター遺伝子が導入され、且つ天然にArnt遺伝子を含んでもよい。配列番号1と前記塩基配列の下流に機能的に接続されているレポーター遺伝子とからなるレポーターコンストラクトおよびAhレセプター遺伝子は、染色体に導入されているため、当該細胞において安定して発現される。それにより従来では不可能であった極低濃度の被験物質、例えば、試料中に0.1 pg/mlの濃度で存在する被験物質(例えば2,3,7,8-TCDD)についても、本発明によれば、そのAhレセプター転写活性化量を測定することが可能となる。

【0015】

当該形質転換細胞を作製するためには、神経細胞に由来する細胞を使用してよい。神経細胞由来の細胞は神経芽細胞腫細胞であってよい。神経芽細胞腫細胞は、いずれの種に由来する細胞であってもよいが、例えば、マウス神経芽細胞腫に由来するNeuro2a細胞などが好ましい。神経芽細胞腫細胞は、株化されている細胞を使用してもよく、神経芽細胞腫から単離されたものを使用してもよい。

【0016】

Ahレセプターの認識配列は、以下に説明するエンハンサーであってよく、基質により活性化された転写因子が結合するゲノム上の特異的な塩基配列である。これは、転写因子との結合によって下流遺伝子の転写を活性化する機能を持つ塩基配列である。Ahレセプター結合エンハンサーとは、ダイオキシンとの結合で活性化されたAhレセプター(即ち、受容体型の転写因子)が結合する塩基配列であり、この結合により下流遺伝子の転写を活性化する機能を持つ塩基配列である。

【0017】

当該細胞の好ましい例は、これらに限定されるものではないが、平成21年8月5日に独行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに国際寄託されたFERM BP-11165およびFERM BP-11166で示される細胞である。

【0018】

当該形質変換細胞とその作製する方法の例を説明する。

【0019】

1. ベクター

当該形質変換細胞を作製するための材料となる細胞に導入されるベクターについて説明する。

【0020】

(A) レポーター発現用ベクター

当該レポーター発現用ベクターは、チロシン水酸化酵素(TH)遺伝子の転写制御領域内の被験物質に応答して下流遺伝子の転写活性を増強するエンハンサー領域と、当該領域の

10

20

30

40

50

下流に機能的に連結されたプロモーターと、その下流に機能的に連結されたレポーター遺伝子とを有するベクターであってよい。

【0021】

(1) エンハンサー領域

当該エンハンサー領域は、Ahレセプター転写活性化能を有する物質に応答して遺伝子の転写活性を増強する。当該エンハンサー領域は、例えば、配列番号2に示すように、配列番号3に示す25bpの配列を含むマウスTH遺伝子の5'上流領域の63bpからなる領域を、6個のタンデム繰返し配列(tandem repeat)として含有されているものであってよい。繰返し配列は、6個のタンデム繰返し配列に限定するものではなく、例えば、正方向(5'

3'方向)のエンハンサー領域を含んでいてもよく、逆方向(3'5'方向)のエンハンサー領域を含んでいてもよい。例えば、繰返し配列は、すべてが正方向(5'3'方向)のエンハンサー領域から構成されてもよく、すべてが逆方向(3'5'方向)のエンハンサー領域から構成されてもよく、正方向(5'3'方向)のエンハンサー領域と逆方向(3'5'方向)のエンハンサー領域の組合せから構成されてもよい。

【0022】

(2) プロモーター

当該形質変換細胞を作製するために必要なベクターは、上述のエンハンサー領域に加えて、その下流に機能的に連結されたプロモーターおよびレポーター遺伝子も含む。

【0023】

「機能的に連結された」とは、連結された領域が、その領域の機能を発揮するように連結されていることを意味する。例えば、プロモーターまたはレポーター遺伝子が「機能的に連結された」とは、ベクター内においてプロモーター活性を発揮し、レポーター遺伝子の発現を増強させるように連結されていることをいう。レポーター遺伝子が「機能的に連結された」とは、本発明のベクター内において、「Ahレセプター転写活性化能を有する被験物質に応答して遺伝子の転写活性を増強する領域」およびプロモーターの作用によって該レポーター遺伝子が発現されるように連結されていることをいう。

【0024】

プロモーターは、配列番号4に記載されたTH遺伝子のコアプロモーターであってもよく、宿主細胞内で機能的なプロモーターであれば、他の何れのプロモーターであってもよい。好ましいプロモーターの例は、哺乳類細胞において活性を有するプロモーターであり、例えば、シミアンウイルス(SV40)の初期プロモーター(配列番号5)もしくはSV40の後期プロモーター(配列番号6)、ヒトヘルペスウイルス1チミジンキナーゼ(TK)プロモーター(配列番号7)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(配列番号8)などである。当業者であれば宿主生物に適した適切なプロモーターを選択できるであろう。

【0025】

(3) レポーター遺伝子

レポーター遺伝子として、当該技術分野において既知の何れのレポーター遺伝子を使用してもよい。レポーター遺伝子は、その産物の活性が簡単に測定でき、測定バックグラウンドの低いものが好ましい。例えば好ましいレポーター遺伝子の例は、ルシフェラーゼ遺伝子、緑色蛍光タンパク質遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子などが挙げられる。レポーター遺伝子の検出には、レポーター遺伝子の種類に応じて発光、蛍光または放射線活性などが利用されてよい。当該レポーター遺伝子は、本発明に従う形質転換された細胞において機能的に存在し、当該細胞がAhレセプターを活性化させる物質と接触した場合に、当該細胞において発現する応答性レポーター遺伝子である。

【0026】

また、当該細胞は、内部標準として $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子発現用ベクターが染色体に導入されてもよい。

【0027】

10

20

30

40

50

#### (4) 他のエレメント

当該ベクターは、上記領域の他に、種々のエレメントを含んでもよい。例えば、適切な微生物内で機能する複製起点および薬剤耐性遺伝子などを組み込んでもよい。また、ベクターを細胞の染色体上に組み込んで安定に保持させるために、ベクター内に哺乳類用の薬剤体制遺伝子を組み込んでもよい。このような哺乳類用の薬剤耐性遺伝子には、例えばゼオシン耐性遺伝子およびG418耐性遺伝子などが含まれる。また、当該ベクターは、マルチクローニングサイトなどの適切な制限酵素部位を有してもよい。

#### 【0028】

当該ベクターは、環状のプラスミドDNA、ウイルスベクターDNAおよび直鎖のDNA断片など任意の形態であってよい。

10

#### 【0029】

##### 2. ベクターの作製方法

当該ベクターは、当業者に既知の何れの方法を使用して作製することができる。例えば以下の通りに作製されてよい。

#### 【0030】

##### (A) レポーター発現用ベクターの作製

##### (1) TH遺伝子の転写制御領域の調製

TH遺伝子の転写制御領域は、その塩基配列が明らかとなっている。それを例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を利用して単離することができる。PCRの鋳型として使用できる核酸には、例えば任意の細胞から抽出したゲノムDNAを使用すればよい。

20

#### 【0031】

##### (2) レポーター発現用ベクターの作製

次いで、上記(1)により得たTH遺伝子の転写制御領域をベクターに組み込む。ベクターの作製は、上記(1)で作製したTH遺伝子の転写制御領域を、レポーター遺伝子が機能する形で連結することにより行なってよい。作製されたレポーター発現用ベクターは、少なくともTH遺伝子の転写制御領域部分の塩基配列をシーケンシングされ、遺伝子に変異が導入されていないことが確認されることが好ましい。

#### 【0032】

当該レポーター発現用ベクターのための材料になるベクターは、市販のものを使用してもよい。例えば、PGV-B2ベクターおよびPGV-P2ベクター(TOYO B-NET社)を使用してもよい。この場合、上記(1)で作製されたTH遺伝子の転写制御領域は、当該市販のベクターに組み込むだけで本発明において使用されるベクターを作製される。

30

#### 【0033】

##### (B) Ahレセプター遺伝子発現用ベクターの作製

##### (1) Ahレセプター遺伝子の調製

Ahレセプター遺伝子を調製する。Ahレセプター遺伝子は、その塩基配列が明らかになっているので、例えばPCRを利用して単離される。PCRの鋳型として使用できる核酸には、例えば任意の細胞から抽出したRNAから合成されたcDNA、または市販のcDNAなどが含まれる。

#### 【0034】

Ahレセプター遺伝子は、いずれの種に由来する遺伝子であってもよい。Ahレセプター遺伝子の例は、例えばラット、ヒトもしくはマウスなどの哺乳類由来、またはゼブラフィッシュもしくはメダカなどの魚類由来、またはニワトリなどの鳥類由来の遺伝子などであってよい。好ましいAhレセプター遺伝子は、哺乳類、特にヒト由来の遺伝子である。Ahレセプター遺伝子は、天然に存在する野生型の遺伝子であってもよく、天然または人工的に変異された遺伝子であってもよい。例えば、変異された遺伝子は、Ahレセプター蛋白質の機能を変化させない限りにおいて、人為的に一部が改変された遺伝子であってよい。変異された遺伝子の例は、例えばAhレセプター遺伝子の1つまたは数個の塩基が、欠失、付加および/または置換された遺伝子を含む。例えば翻訳開始コドン前の塩基配列がコザック配列に変更された遺伝子であってもよい。

40

50

## 【 0 0 3 5 】

## ( 2 ) Ahレセプター発現用ベクターの調製

上記Ahレセプター遺伝子は発現用ベクターに組み込まれる。発現用ベクターとしては、適切な微生物内で機能する複製起点および薬剤耐性遺伝子などを有するプラスミドがあげられる。発現用ベクターには、少なくとも1種類以上の薬剤耐性遺伝子が組み込まれていることが好ましい。例えば、当該発現ベクターの好ましい例は、微生物内での発現用ベクターの維持に必要な薬剤耐性遺伝子およびベクターが導入された細胞の選択に必要な薬剤耐性遺伝子の2種類の薬剤耐性遺伝子をもつ発現用ベクターなどである。薬剤耐性遺伝子の例は、例えばゼオシン耐性遺伝子およびハイグロマイシン耐性遺伝子などである。発現用ベクターとして使用されるプラスミドは、市販のものであってもよい。

10

## 【 0 0 3 6 】

例えば、上記のような特徴を有する発現用ベクターに、上記( 1 )で調整されたAhレセプター遺伝子を発現可能な形態でプロモーターの下流に組み込むことにより、Ahレセプター発現用ベクターを構築してよい。好ましいプロモーターの例は、例えばサイトメガロウイルス( CMV )プロモーター、ラウス肉腫ウイルス( RSV )プロモーター、およびシミアンウイルス( SV40 )の初期あるいは後期プロモーターなどの構成的な発現を指揮するプロモーターである。テトラサイクリン応答性プロモーターなどの誘導性プロモーターが使用されてもよい。プロモーターは、発現用ベクターにあらかじめ組み込まれていてもよく、Ahレセプター遺伝子の挿入後に適切な位置に組み込まれてもよい。

20

## 【 0 0 3 7 】

Ahレセプター遺伝子は、天然に存在する形態で発現するように発現用ベクターに組み込まれてもよく、タグが付加された融合蛋白質として発現するように組み込まれてもよい。このようなタグが付加された蛋白質を使用すると、蛋白質の単離または検出が容易になる。付加されるタグの例は、ヒスチジンタグおよびV5タグなどを含む。

## 【 0 0 3 8 】

構築されたAhレセプター発現用ベクターは、少なくともAhレセプター遺伝子部分についてシーケンシングが行なわれ、遺伝子に変異が導入されていないことを確認することが望ましい。

## 【 0 0 3 9 】

## ( C ) -ガラクトシダーゼ遺伝子発現用ベクター

30

-ガラクトシダーゼ遺伝子発現用ベクターは、インビトロジェン株式会社から販売されているpcDNA4/V5-His/LucZを使用してもよく、それ自身公知の方法により -ガラクトシダーゼ遺伝子発現用ベクターを作製してもよい

## 3 . 発現用核酸の神経芽細胞腫細胞への導入

上記( A )、( B )、( C )に記載された3種類のベクター、即ち、レポーター発現用ベクター、Ahレセプター発現用ベクター、および -ガラクトシダーゼ遺伝子発現用ベクターは神経芽細胞腫細胞に導入される。

## 【 0 0 4 0 】

導入方法の1例は、以下の通りである。例えば細胞を培養容器に播き、10%牛胎児血清を含むダルベッコ・ハムF12等比混合培地( DF1:1 )中でインキュベートする。培養された細胞に上記の3種類のベクターを導入する。細胞へのベクターの導入法としては、例えばリポフェクタミン法、エレクトロポレーション法、DEAE-デキストラン法、リン酸カルシウム法などの当業者に既知のいずれの方法を使用して行うこともできる。例えば、リポフェクタミン2000( インビトロジェン社製 )を使用することもでき、市販のマニュアルに従って、導入するベクターの量、リポフェクタミン2000の量、および細胞数などを予め決定しておくことが好ましい。細胞に導入するベクターは、適当な制限酵素で消化して直鎖状にしてから導入してもよい。

40

## 【 0 0 4 1 】

ベクターが細胞に導入された後、ベクターを含む細胞を約1日インキュベートする。細胞を培養容器から剥がして、新しい培養容器に継代する。継代から1日後に、ベクターに

50

組み込まれた薬剤耐性遺伝子に応じて、適切な薬剤を使用して細胞株のスクリーニングを開始する。スクリーニングのための薬剤濃度は、使用する細胞種に応じて適切な濃度を予備実験によりあらかじめ決定しておく。一般に、80～95%の細胞が死滅する濃度がスクリーニング時の薬剤濃度として適当である。週に1～2回の割合で適切な濃度の薬剤を含む培地に交換しながら、ベクターが導入された細胞株に由来する薬剤耐性コロニーが適当な大きさになるまで培養を続ける。この間に、各ベクターが染色体に組み込まれ、かつ各ベクターを安定に保持する細胞のみが増殖されるため、発現用核酸であるレポーター遺伝子、Ahレセプター遺伝子および $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を含む細胞が得られる。

#### 【0042】

##### 4. 細胞の選択

上記3. で得られた細胞から、以下の(1)～(3)に示す全ての条件を満たす細胞株を選択する。選択の順序は任意であり、どの選択を先に行ってもよい。

#### 【0043】

(1) 上記3で得られた細胞の中から、Ahレセプター発現用ベクターを安定に保持する細胞を選択する。細胞がAhレセプター発現用ベクターを安定に保持することを確認するためには、Ahレセプター遺伝子が細胞のゲノムに組み込まれていることを確認すればよい。例えば、そのような確認は次のように行なえる；サザンハイブリダイゼーションなどそれ自身公知のDNA検出方法；導入されたレセプター発現用ベクター上のAhレセプター遺伝子から転写されたmRNAについてのノーザンハイブリダイゼーションもしくは逆転写PCRなどのそれ自身公知のRNA検出法；または導入されたAhレセプター発現用ベクターから翻訳されたAhレセプター蛋白質についてのAhレセプター蛋白質に特異的な抗体によるウエスタンブロッティングなどのそれ自身公知の蛋白質検出法。タグ配列が付加された形態でAhレセプター蛋白質を発現させれば、タグ配列に特異的な抗体を使用したウエスタンブロッティングなどの方法を用いてもよい。このような確認により、Ahレセプター発現用ベクターを安定に保持する細胞が選択される。

#### 【0044】

(2) 上記3で得られた細胞の中から、Ahレセプターを活性化させる物質、即ち、リガンドに接触した際に、レポーター遺伝子が機能する細胞を選抜する。選抜の指標には、レポーター遺伝子の翻訳産物量又は、その量と相関関係を有する指標値を測定すればよい。具体的には、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いた場合、当該活性化させる物質に接触させた細胞からの細胞抽出物に対して、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを加えると、当該細胞抽出物中のルシフェラーゼ量に比例した強度で発光する。従って、この発光強度をルミノメーター等の測定装置で測定することにより、ルシフェラーゼ量、つまりルシフェラーゼ遺伝子の翻訳産物量を知ることができる。

#### 【0045】

Ahレセプターリガンド添加区における発現量から対照区における発現量を差し引いたときに、リガンドとの接触によるAhレセプターリガンド応答性レポーター遺伝子の発現量の増大量が、対照区における発現量の少なくとも3倍以上、好ましくは5倍以上である細胞を選択すればよい。尚、このようにして選択されたコロニーが単一の形質転換細胞で構成されていない場合には、当該形質転換細胞を希釈して更に培養した後に、単一の形質転換細胞からなるコロニーを選択すればよい。

#### 【0046】

(3) 上記3. で得られた細胞の中から、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現用ベクターを安定に保持する細胞を選択する。細胞が $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子発現用ベクターを安定に保持することを確認するためには、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子が細胞のゲノムに組み込まれていることを確認すればよい。当該確認は例えば次の手段により行ってもよい；例えばサザンハイブリダイゼーションなどのそれ自身公知のDNA検出方法、導入された $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子発現用ベクター上の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子から転写されたmRNAのノーザンハイブリダイゼーションもしくは逆転写PCRなどのそれ自身公知のRNA検出法；または導入された $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子発現用ベクターから翻訳された $\beta$ -ガラクト

10

20

30

40

50



シダーゼのそれ自身公知の蛋白質検出法； -ガラクトシダーゼは酵素活性を有するので、当該タンパク質に特異的な基質と接触させ、基質との反応量について吸光度を指標にして測定してもよい。

#### 【 0 0 4 7 】

##### 5 . 形質転換細胞による被験物質評価方法

上述のようにして得られた本発明形質転換細胞を用いて被検物質のAhレセプター転写活性化能を、次のように評価することが可能である。

#### 【 0 0 4 8 】

##### 工程（ 1 ） 当該形質転換細胞に、被験物質を接触させる工程

本発明形質転換細胞と被験物質との接触は、例えば約24時間以上維持すると、後述するようにレポーター遺伝子の翻訳産物量がほぼ飽和に達する。従って、測定時間のずれ等に起因する測定誤差の発生を抑えることができる。当該測定誤差の発生を抑えるためには、当該細胞と被検物質との接触が約6時間以上または約24時間以上に亘って維持されることが好ましい。

#### 【 0 0 4 9 】

より具体的な態様の1例は次の通りである。当該形質転換細胞を24ウェルプレートに1ウェルあたり約 $8 \times 10^4$ 細胞の濃度で播種し、10%牛胎児血清を含むダルベッコ・ハムF12等比混合培地（DF1:1）を500  $\mu$ L 添加し、5% CO<sub>2</sub> および飽和湿度条件下に37℃で数時間～1日間程度培養する。培養中の当該形質転換細胞を含む培地に、被験物質の溶液を添加する。または、当該形質転換細胞を含む培地を、被験物質を含む培地と交換してもよい。被験物質が溶解される溶媒の例は、ジメチルスルホキシド(DMSO)、エタノール、蒸留水などを含む。当該形質転換細胞に対する溶媒の影響を少なくするためには、培地に添加される被験物質溶液の容量割合は、培地容量の約0.5 % (v / v) ～ 約1% (v / v) 以下にすることが好ましい。被験物質の溶液が水溶液である場合には、例えば、ポアサイズ22  $\mu$ mのフィルターで濾過滅菌した後で、上記培地に添加してもよい。

#### 【 0 0 5 0 】

##### 工程（ 2 ） レポーター遺伝子の翻訳産物量または指標値の測定

上記のように被験物質に接触させた当該形質転換細胞について、レポーター遺伝子の翻訳産物量、又はその量と相関関係を有する指標値を測定する

当該形質転換細胞が発現するAhレセプターが、被験物質(例えば、ダイオキシン様活性物質など)の結合によって活性化された場合、レポーター遺伝子の転写が促進され、当該レポーター遺伝子の翻訳産物であるレポータータンパク質が当該形質転換細胞内に蓄積される。このレポータータンパク質の量又はその量と相関関係を有する指標値を測定することにより、当該形質転換細胞の細胞あたりのレポーター遺伝子の翻訳産物量又はその量に相関関係を有する指標値が測定されてよい。

#### 【 0 0 5 1 】

具体的な態様の1例は次の通りである。レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いた場合、被験物質に接触させた当該形質転換細胞からの細胞抽出物に、ルシフェリンを加え、発光強度を測定すればよい。当該発光は、細胞抽出物中のルシフェラーゼ量に比例して変化する。従って、発光強度をルミノメーター等の測定装置で測定すれば、生じたルシフェラーゼの量、即ち、ルシフェラーゼ遺伝子の翻訳産物量が明らかになる。

#### 【 0 0 5 2 】

##### 工程（ 3 ） 被検物質のAhレセプター転写活性能の評価

前記工程（ 2 ）において得られた翻訳産物量又はその量と相関関係を有する指標値に基づき、被験物質のAhレセプター転写活性化能を評価する。Ahレセプター転写活性化能としては、例えば、Ahレセプターに対するアゴニスト活性、またはAhレセプターに対するアンタゴニスト活性が挙げられる。Ahレセプター転写活性能の評価は、例えば、被験物質に接触させた当該形質転換細胞において測定されたレポーター遺伝子の翻訳産物量又はその量と相関関係を有する指標値と、被験物質には接触させない当該形質転換細胞において測定された翻訳産物量又は指標値（即ち、対照値）とを比較すればよい。

## 【 0 0 5 3 】

被験物質に接触させた当該形質転換細胞におけるレポーター遺伝子の翻訳産物量又はその量と相関関係を有する指標値が、対照の指標値と比べて高い場合には、当該被験物質はAhレセプターに対するアゴニスト活性を有すると評価することができる。

## 【 0 0 5 4 】

例えば、TCDD等のダイオキシン様活性物質と被験物質とを同時に接触させた当該形質転換細胞と、当該ダイオキシン様活性物質は接触させるが、被験物質は接触させない当該形質転換細胞の各々について、上記と同様な方法でレポーター遺伝子の翻訳産物量又はその量に相関関係を有する指標値を測定する。ダイオキシン様活性物質を接触させた当該形質転換細胞におけるレポーター遺伝子の翻訳産物量又はその量に相関関係を有する指標値と比較して、ダイオキシン様活性物質と被験物質とを同時に接触させた当該形質転換細胞におけるレポーター遺伝子の翻訳産物量又はその量に相関関係を有する指標値の方が低い場合、当該被験物質はAhレセプターに対するアンタゴニスト活性を有すると評価することができる。

10

## 【 0 0 5 5 】

上記のように、当該評価方法により評価された被験物質のAhレセプターに対するアゴニスト活性に基づき、当該被験物質のTCDD換算量を求めることもできる。例えば、TCDDを被験物質として濃度を段階的に変えて上記の測定系に添加し、各濃度におけるレポーター遺伝子の翻訳産物量又はその量に相関関係を有する指標値を測定する。次いで、得られた測定値とTCDDの濃度とをプロットして検量線を作成する。得られた検量線に、各種被験物質について測定されたレポーター遺伝子の翻訳産物量又は、その量に相関関係を有する指標値を当て嵌めることにより、当該被験物質のTCDD換算量を求めることができる。求められたTCDD換算量は、GC-MS測定によるダイオキシン類分析法における「毒性等量 (TEQ)」と同様の意味合いをもつ。

20

## 【 0 0 5 6 】

## 6．選抜または探索方法

上述の評価法により評価されたAhレセプター転写活性化能に基づき、Ahレセプター転写活性可能を有する物質を選抜および／または探索することも可能である。

## 【 0 0 5 7 】

そのような選抜および／または探索方法は、上述の5．に記載される通りの評価法を行い、当該方法により評価されたAhレセプター転写活性化能に基づいて、Ahレセプター転写活性化能を有する物質を選抜および／または探索する工程を具備すればよい。例えば、予め任意の閾値を、レポーター遺伝子の翻訳産物量、その量に相関関係を有する指標値、またはそれらの値から求めたTCDD換算量について定めておき、当該閾値よりも高い量若しくは値の場合、または低い量若しくは値の場合に、評価の対象となる物質群から選抜または削除すればよい。このような選抜または探索方法も本発明の範囲に含まれる。

30

## 【 0 0 5 8 】

## 7．アッセイキット

更に、本発明に従うと、上述の被験物質が有するAhレセプター転写活性化能の評価方法、またはAhレセプター転写活性化能を有する物質の選抜または探索方法を行なうためのアッセイキットも提供される。

40

## 【 0 0 5 9 】

当該アッセイキットは、少なくとも本発明に従う形質変換細胞を具備すればよい。また当該アッセイキットは、これに限られるものではないが、上述された本発明に従う形質変換された細胞、当該形質変換細胞を作製するための細胞、目的の遺伝子を細胞に与えるための種々のベクター、培地、当該評価方法を行なうための試薬、検量線を作成するための試薬、細胞抽出用試薬、標準品、トリプシンなどの剥離用酵素、抗生物質、そこにおいて細胞を培養するための培養容器、そこにおいて反応を行なうための反応容器および取扱説明書などからなる群より1以上を選択し、具備してよい。

## 【 0 0 6 0 】

50

例

以下に、例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【 0 0 6 1 】

例 1

Ahレセプター遺伝子の調製

ラット脳からRNeasyキット（キアゲン社製）を使用して全RNAを抽出した。抽出したRNAをオリゴ(dT)プライマーを使用して逆転写した。次いで、これを鋳型に、Pyrobest DNAポリメラーゼを使用して、変性：94 1分、アニーリング：55 1分、伸長：72 4分を1サイクルとする25サイクルのPCR反応を行い、ラットAhレセプター遺伝子のコーディング領域を増幅した。

【 0 0 6 2 】

プライマーには、

フォワードプライマー：5' - CCCAAGCTTACCATGAgCAGCggCgCCAACATCA(配列番号 9)

リバープライマー：5' -CCgCTCgAgAggAATCCgCTgggTgTgATATCAg(配列番号 10)

を使用した。

【 0 0 6 3 】

フォワードプライマーの5'末端にHindIII認識配列を付加し、リバープライマーの5'末端にXhoI認識配列を付加した。さらに、リバープライマーは、Ahレセプター蛋白質がV5エピトープとヒスチジンタグが付加された融合蛋白質として発現するように設計した。

【 0 0 6 4 】

例 2

Ahレセプター遺伝子を組み込んだ受容体発現用ベクターの調製

発現用ベクターには、pcDNA4/V5-His B（インビトロジェン社製）を使用した。このpcDNA4/V5-His Bは、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター配列とV5エピトープ配列との間にマルチクロニングサイト（MCS）が配置されている。MCS内の適当な制限酵素部に所望の遺伝子をコードする配列を組み込むことにより、CMVプロモーターの制御下で目的とする蛋白質を過剰発現させることができる。

【 0 0 6 5 】

また、組み込む遺伝子のコーディング配列の3'末端を適切に変更することにより、V5エピトープとヒスチジンタグを目的蛋白質のC末端に付加することが可能である。まず、この発現用ベクターを例1で増幅したラットAhレセプター遺伝子のコーディング領域を制限酵素HindIIIとXhoIで消化する。同様にHindIIIとXhoIでpcDNA4/V5-His Bを消化した。次いで、pcDNA4/V5-His BとラットAhレセプター遺伝子のコーディング領域を連結することにより、発現用ベクターpcDNA4-rAhRを作製した（図1）。pcDNA4-rAhRを大腸菌TOP10（インビトロジェン社製）に導入して増幅および維持した。

【 0 0 6 6 】

作製したpcDNA4-rAhRにおいて、ラットAhレセプター遺伝子のコーディング領域をシーケンシングして該領域に変異が導入されていないことを確認した。シーケンシングのためのプライマーには、T7プライマーおよびBGHリバープライマーを使用した。

【 0 0 6 7 】

例 3

Ahレセプター応答性レポーター遺伝子を含むレポーターベクターコンストラクトpTHEn-Lucの作製

配列番号3に記載の配列を含むTH遺伝子コーディング領域の5'上流側-175bp ~ -237bpの領域を2回繰り返した1本鎖DNAを合成し、これを鋳型としてPCRで2本鎖DNAを調整した。前記2本鎖DNAに含まれる一方の一本鎖DNAの配列と使用したPCRプライマーの塩基配列を以下に示した。当該一本鎖DNAはテンプレートとしてした。

【 0 0 6 8 】

10

20

30

40

50

一本鎖DNA ( forward ) :

5' -GCCAGCCCCTGTCTTCATGTCTGTCTAGGGCGGAGGGTGATTTCAGAGGCAGTGCCTGCGACAGTGGATGCAG  
TCTTCATGTCTGTCTAGGGCGGAGGGTGATTTCAGAGGCAGTGCCTGCGACAGTGGATGCAATTAGATCTA -3'

( 配列番号11 )

プライマー ( forward ) : 5' - GCCAGCCCCTGTCTTC -3' ( 配列番号12 )

プライマー ( reverse ) : 5' - TAGATCTAATTGCATC -3' ( 配列番号13 )。

【 0 0 6 9 】

PCRで得た2本鎖DNAを、T4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化後にT4 DNAリガーゼで連結し、アガロースゲル電気泳動で連結個数が3つのDNA断片を分離してから、QIA quick  
ゲル抽出キット ( キアゲン ) で精製した。精製したDNA断片は、TCDD応答エンハンサーの6  
回繰り返しからなる。このDNAをルシフェラーゼ発現ベクターであるPGV-P2ベクター ( TOY  
O B-NET社 ) に組み込んだ。まず、PGV-P2上のSV40プロモーターを制限酵素HindIIIとXho  
Iで切り出して、TH遺伝子のコアプロモーター [ 転写開始点 ( 0 bp ) から5' 上流 -100 bp  
までの領域、 ( 配列番号4 ) ] と組み換えたベクター ( PGV-THp ) を作製した。PGV-THpをSma  
Iで切断し、このサイトにTCDD応答エンハンサーの6回繰り返しからなるDNA配列 ( 配列  
番号2 ) を組み込んで、レポーターベクターコンストラクトpTHEn-Lucを作製した。

【 0 0 7 0 】

pTHEn-Luc上のTCDD応答エンハンサー塩基配列、およびTH遺伝子コアプロモーター配列は、  
シーケンシングで確認した。

【 0 0 7 1 】

作製したベクターpTHEn-Lucにゼオシン耐性遺伝子を導入するため、pcDNA4-rAhRベク  
ターを鋳型として、

フォワードプライマー : 5' -CGGAGCGCTCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCG-3' ( 配列番号14 )

リバースプライマー : 5' -GCTCGCGACGGTATACAGACATGATAAGATACAT-3' ( 配列番号15 )

を使用してPCRでゼオシン耐性遺伝子とその発現プロモーターを含む790bpのPCR産物を取  
得した。増幅されたPCR産物はQIAquick PCR Purification kit ( キアゲン社製 ) で精製し  
た。

【 0 0 7 2 】

精製後のPCR産物、およびpTHEn-LucベクターをそれぞれAor51HIで酵素消化した後、PCR  
産物については、QIAquick PCR Purification kit ( キアゲン社 ) で精製した。精製後のP  
CR産物は、BAP ( タカラバイオ社製 ) を用いて脱リン酸化処理を行った。

【 0 0 7 3 】

酵素消化後のpTHEn-Lucベクターはアガロース電気泳動を行い、その分子量を基準にゲ  
ルから切り出し、QIA quick Gel Extraction Kitで精製した。脱リン酸化したPCR産物を  
、得られた1本鎖pTHE-Lucベクターに連結し、ゼオシン耐性能を持つpTHEn-Luc-Zeocinベ  
クターを構築した ( 図2 )。

【 0 0 7 4 】

例 4

Ahレセプター遺伝子発現用ベクターpcDNA4-rAhR、レセプター応答性レポーターベク  
ターpTHEn-Luc-Zeocin、および -ガラクトシダーゼ遺伝子発現用ベクターpcDNA4/V5-His/L  
ucZを導入した神経芽細胞腫由来Neuro2aの作製

Ahレセプター遺伝子発現用ベクターpcDNA4-rAhR、レセプター応答性レポーターベク  
ター、および -ガラクトシダーゼ遺伝子発現用ベクターpcDNA4/V5-His/LucZのNeuro2aへの  
導入には、リポフェクタミン2000 ( インビトロジェン社製 ) を使用した。Neuro2aを24ウ  
ェルプレートにおいて80%コンフルエント (  $8 \times 10^4$  細胞 ) で継代し、10% 牛胎仔血清を含  
むDF1:1培地で一晚培養した。2  $\mu$ l のリポフェクタミン2000を50  $\mu$ l のOpti-MEM培地 ( ギブ  
コ社製 ) と混合し、室温で15分間静置した。その後、0.2  $\mu$ g の例2で作製したレセプター  
遺伝子発現用ベクターpcDNA4-rAhRと0.2  $\mu$ g の -ガラクトシダーゼ遺伝子発現用ベクター  
pcDNA4/V5-His/LucZ、および0.4  $\mu$ g の例3で作製したレポーターベクターpTHEn-Luc-Zeoc  
inを含むOpti-MEM培地50  $\mu$ l とよく混ぜ合わせた。pcDNA4-rAhRとpcDNA4/V5-His/LucZは、

MunIで、消化して直鎖状にした後に使用した。またpTHEn-Luc-ZeocinはNotIで消化して同様に直鎖状にした後に使用した。リポフェクタミン2000と3種の直鎖状遺伝子発現用ベクターの混合液を室温で20分間静置して、24ウェルプレートにおいてあらかじめ培養しておいたNeuro2aに加えて穏やかに混合した。24時間培養した後、Neuro2aを新鮮な10%牛胎仔血清を含むDF1:1培地で1/50希釈して6ウェルプレートに植え継ぎ、さらに培養を続けた。24時間後、ゼオシン（インビトロジェン社製）を250  $\mu$ g/mlの濃度で培地に添加し、pcDNA4-rAhR、pcDNA4/V5-His/LucZ、およびpTHEn-Luc-Zeocinが導入された細胞の選択を開始した。以降は、3～4日ごとに250  $\mu$ g/mlでゼオシンを含む新鮮な培地に交換して培養を続けた。2週間後、クローニングリング（イワキ社製）を使用して、10～12種のゼオシン耐性細胞のコロニーを得た。上記の一連の操作を3回行い、計33種のコロニーを得た。これらの細胞を、受容体発現用核酸pcDNA4-rAhR、pcDNA4/V5-His/LucZ、およびpTHEn-Luc-Zeocinを安定に保持する細胞株として選択した。

10

【0075】

例5

クローン間における、レセプター応答性レポーターベクターpTHEn-Luc-Zeocinのコピー数のサザンハイブリダイゼーション法による比較

[サザンプロットの作製]

例4に記載の作製方法に基づき作製した安定形質転換細胞株のうち2,3,7,8-TCDDに対して低い応答性しか示さないZ3株と、本発明に従う形質転換細胞であるN2a-SY1株(Z12株とも称する)、およびN2a-SY2株(Z7株とも称する)をDF1:1培地で、3～5日間培養を行った後、DNeasy Tissue kit（キアゲン社製）を用いて各々の細胞からゲノムDNAの抽出を行った。得られたゲノムDNA、陽性コントロールとしてレセプター応答性レポーターベクターpTHEn-Luc-Zeocin、および陰性コントロールのゲノムDNAの各々5  $\mu$ gをNco1+Xba1で完全消化させ、100  $\mu$ lスケールで37℃、一晩反応させた。

20

【0076】

10  $\mu$ lの3M酢酸ナトリウム溶液、および750  $\mu$ lのイソプロパノールを加え、制限酵素反応により生成するゲノムDNAの断片を析出させた。70%エタノールで洗浄してドライアップさせた後、析出したDNA断片を12  $\mu$ lのTEに再溶解した。

【0077】

3  $\mu$ lの6 X dyeを加え、遠心機でスピンドウンさせ、0.8%のアガロースゲルに、マーカー（1 kbラダー；New England Biolabs社製）、およびサンプルをアプライして室温、50V、で約2時間電気泳動させた。このとき、陽性コントロールとして1、3、10、30、100コピー数に相当する完全消化したレセプター応答性レポーターベクターpTHEn-Luc-Zeocinも同時にアプライした。

30

【0078】

得られたアガロースゲルをタッパーに移して0.25N 塩酸に浸し、10分間緩やかに震盪させた。塩酸を除去して蒸留水でゲルをリンスしたのち、0.4N水酸化ナトリウムに浸してさらに10分間緩やかに震盪させた。0.4N水酸化ナトリウムを用いたキャピラリー法により、アガロースゲル中に分離されたゲノムDNA断片を、室温で一晩、ナイロンメンブレン（Hybond-XL；アマシャム）にトランスファーさせた。

40

【0079】

ゲノムDNA断片がトランスファーされたナイロンメンブレンを2XSSCに浸して10分間緩やかに震盪させ、その後に風乾させてハイブリダイゼーションに用いるまで室温で保存した。

【0080】

[放射性プローブの作製、ハイブリダイゼーション、洗浄、オートラジオグラフィー]

レセプター応答性レポーターベクターpTHEn-Luc-ZeocinをNco1+Xba1で完全消化させ、サザンハイブリダイゼーションに適したDNAフラグメント(1.7kbp)を精製した。

【0081】

50

DNAラベル化キット(Megaprime DNA Labelling System: アマシャム)を用いて、ランダムプライム法により [ $^{32}\text{P}$ ]dCTP (パーキンエルマー; NEG-513Z) で、25~50 ngのプローブ用DNAフラグメントをラベルした後、セファデックススピンカラム(ProbeQuant G-50 Micro Columns; アマシャム)を用いて [ $^{32}\text{P}$ ]ラベル化されたDNAフラグメントを精製した。

【0082】

放射活性を確認した後、95℃、5分間加熱、および、直後に5分間氷冷させて変性させ、 [ $^{32}\text{P}$ ]ラベル化プローブとした。

【0083】

ゲノムDNA断片がトランスファーされたナイロンメンブレンをハイブリダイゼーションバッファーに入れて、65℃で1時間プレインキュベートした後、100  $\mu\text{L}$ のハイブリダイゼーションバッファーに変性させた [ $^{32}\text{P}$ ]ラベル化プローブを加えて、65℃で4時間インキュベートした。

【0084】

インキュベーション終了後にナイロンメンブレンを取り出し、中塩濃度洗浄(1XSSC, 0.1% SDS, 65℃で約15分間)を行い、サーベイメーターでメンブレンに結合するプローブに由来する放射活性を確認した。十分な放射活性がメンブレンに結合している場合は、さらに低塩濃度洗浄(0.2XSSC, 0.1% SDS, 室温で約5分間)を行った。

【0085】

洗浄したメンブレンをサランラップ(登録商標)でシールし、暗室内でX線フィルム(BioMax MS; Kodak)を重ねてオートラジオグラフィカセットに入れ、4℃で3日間から1週間感光させた後にX線フィルムを感光し [ $^{32}\text{P}$ ]ラベル化プローブとのハイブリダイゼーションによる特異的なシグナル検出を行った。その結果を図3に示す。図3に示される結果は、向かって左から1kbp Ladder、Z3株、Z7株、Z12株、陰性コントロール、1コピーの陽性コントロール、3コピーの陽性コントロール、10コピーの陽性コントロール、30コピーの陽性コントロールおよび100コピーの陽性コントロールについてサザンハイブリダイゼーションを行なった結果である。陰性コントロールではシグナルが観察されず、陽性コントロールについてはコピー数が増えるのに従って強いシグナルが観察された。

【0086】

解析の結果から、低応答性クローンであるZ3株と比較して、本発明形質転換細胞であるN2a-SY1株、およびN2a-SY2株細胞の方が、レセプター応答性レポーターベクターpTHEn-Luc-Zeocinのコピー数を高く保持していることが確認された。

【0087】

N2a-SY1株およびN2a-SY2株細胞を、平成21年8月5日に独行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに国際寄託した。N2a-SY1株およびN2a-SY2株細胞はそれぞれ受託番号FERM BP-11165およびFERM BP-11166で示される細胞である。

【0088】

例6

本発明形質転換細胞による2,3,7,8-TCDDの転写活性化能測定

例4において作製された安定形質転換細胞(N2a-SY1)を24ウェルプレートに80,000細胞/ウェルの割合で播種した後、10%血清含有のDF1:1培地で数時間~一晚培養した。

【0089】

次に上記のように培養された安定形質転換細胞の培地を吸引して除き、0、0.1、1、10、100、1000 pg/mLの濃度で2,3,7,8-TCDDを含有した10%血清含有のDF1:1培地を1mL/ウェルの割合で分注し、細胞の培養を行った。細胞の培養を続け、24時間後に培地を除き、PBS 1mL/ウェルで1回洗浄した後、5倍希釈したピッカジーン培養細胞溶解剤Lu (東洋ビーネット社製)を200  $\mu\text{L}$  / ウェルずつ各ウェルに加えて、室温で10分以上放置することにより溶解させ細胞抽出液を得た。得られた細胞抽出液を冷凍庫で凍結保存し、この冷凍保存プレートを冷凍庫から取り出した後、室温にて融解された細胞抽出液の10  $\mu\text{L}$ を黒色96ウェルプレートに移した。当該プレートにピッカジーン(登録商標)LT210発光基質溶液

を、100  $\mu$ Lずつを各ウェルに分注して、混合した後、Mithras LB940マイクロプレートリーダー（ベルトールド社製）にセットし連続的に発光量を測定した。別途、上記の細胞抽出液の10  $\mu$ Lを透明96ウェルプレートに移した。当該プレートの各ウェルに  $\beta$ -ガラクトシダーゼ基質溶液（ONPG基質液）150  $\mu$ Lずつ添加し、これを室温で5分間インキュベートした後、反応停止液（1mM炭酸ナトリウム水溶液）を50  $\mu$ Lずつ添加した。次に、当該プレートをマイクロプレートリーダーにセットし、各ウェルにおける405 nmの吸光度を測定した。検量線を用いて、吸光度をタンパク質抽出液中の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ（ng）に換算した。その結果を図4に棒グラフとして、表1（表中、<sup>a</sup> 数値はルシフェラーゼの発光値（RLU）を  $\beta$ -ガラクトシダーゼの吸光度で除した補正值、<sup>b</sup> B/Aは活性化倍数（S/N比）を意味する。）に各々の数値を示す。

10

【表1】

表1 本発明形質転換細胞による2,3,7,8-TCDDの転写活性化能測定から得られたルシフェラーゼの発光値（RLU）を $\beta$ -ガラクトシダーゼの吸光度で除した補正值、及びS/N比

	0 (pg/ml)	0.01 (pg/ml)	0.1 (pg/ml)	1 (pg/ml)	10 (pg/ml)	100 (pg/ml)	1000 (pg/ml)
N2a-SY1 (LUC) <sup>a</sup>	1177.3	1187.8	1451.5	1577.6	4029.7	5718.5	6132.5
N2a-SY1 (活性化倍数) <sup>b</sup>	1	1.	1.24	1.34	3.43	4.88	5.22

20

## 【0090】

## 例7

本発明形質転換細胞によるPCB126の転写活性化能測定

例4において作製された安定形質転換細胞（N2a-SY1）を24ウェルプレートに80,000細胞/ウェルの割合で播種した後、10% 血清含有のDF1:1培地で数時間～一晩培養した。

30

## 【0091】

次に上記のように培養された安定形質転換細胞の培地を吸引して除き、0、0.2、2、20、200、2000、20000 pg/mLの濃度でPCB126を含有した10% 血清含有のDF1:1培地を1mL/ウェルの割合で分注し、細胞の培養を行った。細胞の培養を続け、24時間後に培地を除き、PBS 1mL/ウェルで1回洗浄した後、5倍希釈したピッカジーン培養細胞溶解剤Lu（東洋ビーネット社製）を200  $\mu$ L / ウェルずつ各ウェルに加えて、室温で10分以上放置することにより溶解させ細胞抽出液を得た。得られた細胞抽出液を冷凍庫で凍結保存し、この冷凍保存プレートを冷凍庫から取り出した後、室温にて融解された細胞抽出液の10  $\mu$ Lを黒色96ウェルプレートに移した。当該プレートにピッカジーン（登録商標）LT210発光基質溶液を100  $\mu$ Lずつ各ウェルに分注して、混合した後、Mithras LB940マイクロプレートリーダー（ベルトールド社製）にセットし連続的に発光量を測定した。別途、上記の細胞抽出液の10  $\mu$ Lを透明96ウェルプレートに移した。当該プレートの各ウェルに  $\beta$ -ガラクトシダーゼ基質溶液（ONPG基質液）（sigma社製）150  $\mu$ Lずつ添加し、これを室温で5分間インキュベートした後、反応停止液（1mM炭酸ナトリウム水溶液）を50  $\mu$ Lずつ添加した。次に、当該プレートをマイクロプレートリーダーにセットし、各ウェルにおける405 nmの吸光度を測定した。検量線を用いて、吸光度をタンパク質抽出液中の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ（ng）に換算した。その結果を図5に棒グラフとして、表2（表中、<sup>a</sup> 数値はルシフェラーゼの発光値（RLU）を  $\beta$ -ガラクトシダーゼの吸光度で除した補正值、<sup>b</sup> B/Aは活性化倍数（S/N比）を意味する。）に各々の数値を示す。

40

【表 2】

本発明形質転換細胞による PCB126 の転写活性能測定から得られたルシフェラーゼの  
発光値 (RLU)を・ガラクトシダーゼの吸光度で除した補正值、及び S/N 比

	0 (pg/ml)	0.2 (pg/ml)	2 (pg/ml)	20 (pg/ml)	200 (pg/ml)	2000 (pg/ml)	20000 (pg/ml)	200000 (pg/ml)
N2a-SY1 (LUC) <sup>a</sup>	2075.4	1882.6	2388	3991	5685.8	6401.6	6264.8	6268.9
N2a-SY1 (活性化倍数) <sup>b</sup>	1	0.91	1.15	1.92	2.74	3.08	3.02	3.02

10

## 【 0 0 9 2 】

例 8 本発明形質転換細胞による KC400 の転写活性化能測定

例 4 において作製された安定形質転換細胞 (N2a-SY1) を 24 ウェルプレートに 80,000 細胞 /  
ウェルの割合で播種した後、10% 血清含有の DF1:1 培地で数時間～一晚培養した。

20

## 【 0 0 9 3 】

次に上記のように培養された安定形質転換細胞の培地を吸引して除き、1E-04、0.01、0.1、1、10、100、1000、10000 ng/mL の濃度で KC400 を含有した 10% 血清含有の DF1:1 培地を 1mL/ウェルの割合で分注し、細胞の培養を行った。細胞の培養を続け、24 時間後に培地を除き、PBS 1mL/ウェルで 1 回洗浄した後、5 倍希釈したピッカジーン培養細胞溶解剤 Lu (東洋ビーネット社製) を 200  $\mu$ L/ウェルずつ各ウェルに加えて、室温で 10 分以上放置することにより溶解させ細胞抽出液を得た。得られた細胞抽出液を冷凍庫で凍結保存し、この冷凍保存プレートを冷凍庫から取り出した後、室温にて融解された細胞抽出液の 10  $\mu$ L を黒色 96 ウェルプレートに移した。当該プレートにピッカジーン (登録商標) LT210 発光基質溶液を 100  $\mu$ L ずつ各ウェルに分注して、混合した後、Mithras LB940 マイクロプレートリーダー (ベルトールド社製) にセットし連続的に発光量を測定した。別途、上記の細胞抽出液の 10  $\mu$ L を透明 96 ウェルプレートに移した。当該プレートの各ウェルに -ガラクトシダーゼ基質溶液 (ONPG 基質液) (sigma 社製) 150  $\mu$ L ずつ添加し、これを室温で 5 分間インキュベートした後、反応停止液 (1mM 炭酸ナトリウム水溶液) を 50  $\mu$ L ずつ添加した。次に、当該プレートをマイクロプレートリーダーにセットし、各ウェルにおける 405 nm の吸光度を測定した。検量線を用いて、吸光度をタンパク質抽出液中の -ガラクトシダーゼ (ng) に換算した。その結果を図 6 に棒グラフとして、表 3 (表中、<sup>a</sup> 数値はルシフェラーゼの発光値 (RLU) を -ガラクトシダーゼの吸光度で除した補正值、<sup>b</sup> B/A は活性化倍数 (S/N 比) を意味する。) に各々の数値を示す。

30



【表 3】

本発明形質転換細胞による KC400 の転写活性化能測定から得られたルシフェラーゼの発光値 (RLU)を・ガラクトシダーゼの吸光度で除した補正值、及び S/N 比

	1E-04 (pg/ml)	0.01 (pg/ml)	0.1 (pg/ml)	1 (pg/ml)	10 (pg/ml)	100 (pg/ml)	1000 (pg/ml)	10000 (pg/ml)
N2a-SY1 (LUC) <sup>a</sup>	3483.3	3167.3	3425.9	3759.2	5441.9	6844.1	8539.5	8519.9
N2a-SY1 (活性化倍数) <sup>b</sup>	1	0.91	0.98	1.08	1.56	1.96	2.45	2.44

10

【受託番号】

【 0 0 9 4 】

FERM BP-11165

FERM BP-11166

【 0 0 9 5 】

20

0-1	様式 PCT/RO/134 (SAFE) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、右記によって作成された。	
0-1-1		JPO-PAS 0362
0-2	国際出願番号	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	09S0487P

1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	段落番号	0094
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	IPOD (独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6
1-3-3	寄託の日付	2009年 08月 05日 (05.08.2009)
1-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-11165
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
2	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
2-1	段落番号	0094
2-3	寄託の表示	
2-3-1	寄託機関の名称	IPOD (独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
2-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6
2-3-3	寄託の日付	2009年 08月 05日 (05.08.2009)
2-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-11166
2-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

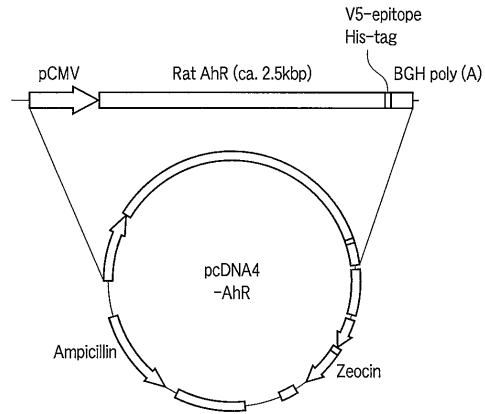
## 受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	
0-4-1	権限のある職員	

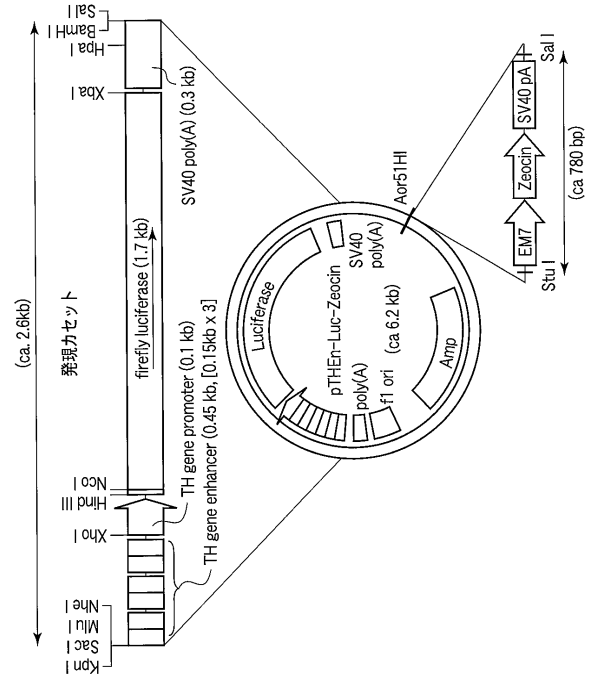
## 国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	
0-5-1	権限のある職員	

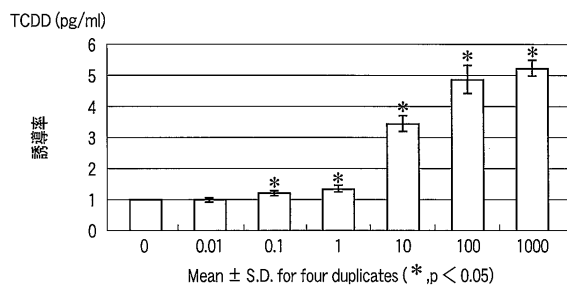
【図 1】



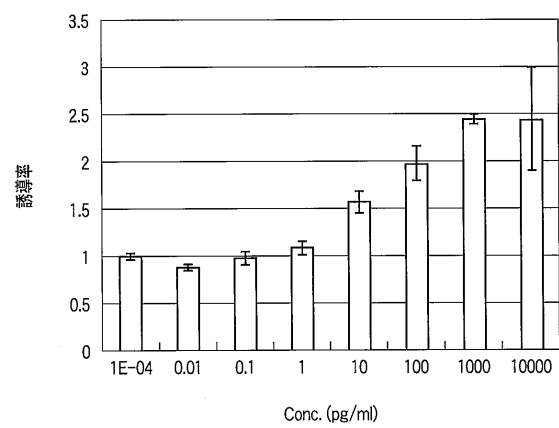
【図 2】



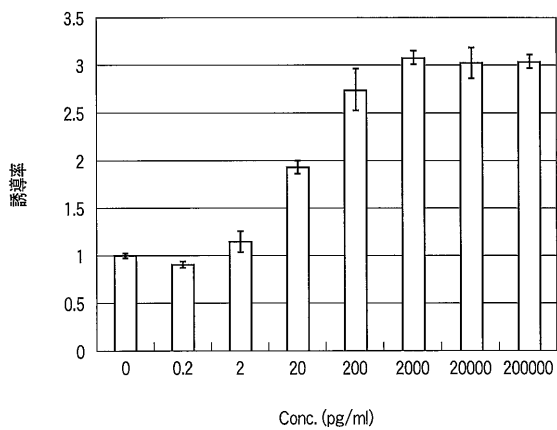
【図 4】



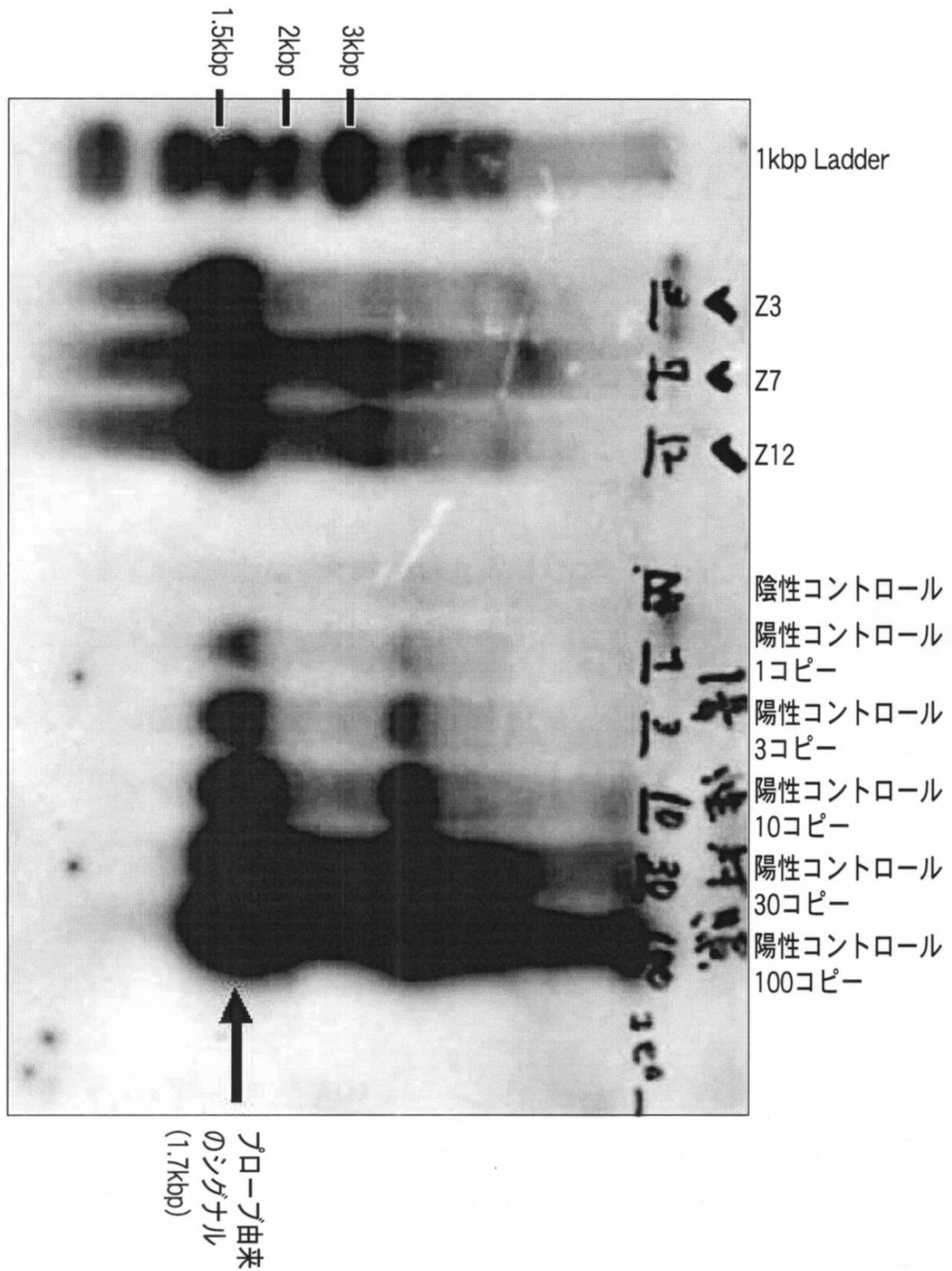
【図 6】



【図 5】



【図 3】



【配列表】

0005284479000001.app

---

 フロントページの続き

- (74)代理人 100095441  
弁理士 白根 俊郎
- (74)代理人 100084618  
弁理士 村松 貞男
- (74)代理人 100103034  
弁理士 野河 信久
- (74)代理人 100119976  
弁理士 幸長 保次郎
- (74)代理人 100153051  
弁理士 河野 直樹
- (74)代理人 100140176  
弁理士 砂川 克
- (74)代理人 100158805  
弁理士 井関 守三
- (74)代理人 100124394  
弁理士 佐藤 立志
- (74)代理人 100112807  
弁理士 岡田 貴志
- (74)代理人 100111073  
弁理士 堀内 美保子
- (74)代理人 100134290  
弁理士 竹内 将訓
- (72)発明者 吉村 斉湖  
日本国東京都港区芝浦一丁目1番1号 株式会社東芝内
- (72)発明者 宇留野 さえ子  
日本国東京都港区芝浦一丁目1番1号 株式会社東芝内
- (72)発明者 赤星 英一  
日本国東京都港区芝浦一丁目1番1号 株式会社東芝内
- (72)発明者 石原 美津子  
日本国東京都港区芝浦一丁目1番1号 株式会社東芝内

審査官 伊藤 良子

- (56)参考文献 特開2007-202555(JP,A)  
特開2008-092911(JP,A)  
特表2004-519243(JP,A)  
特開昭61-081791(JP,A)  
特表2002-523050(JP,A)  
赤星英一 他, 神経由来細胞を用いたレポータージーンアッセイ『THアッセイ』(1), 日本環境化学会第18回環境化学討論会講演要旨集, 2009年 6月 9日, Vol.18th, p.60-1  
菅野美津子 他, バイオアッセイによる環境化学物質の有害性評価技術, 東芝レビュー, 2008年, Vol.63, No.2, p.41-4  
宇留野さえ子 他, 神経由来細胞を用いたレポータージーンアッセイ『THアッセイ』(2), 日本環境化学会第18回環境化学討論会講演要旨集, 2009年 6月 9日, Vol.18th, p.41-4-5  
吉村斉湖 他, ダイオキシン類の神経毒性を検出するTH assayの開発, 第9回環境ホルモン学会研究発表会要旨集, 2006年, Vol.9th, p.121  
吉村斉湖 他, ダイオキシン類の神経毒性を検出するレポーターアッセイ(THアッセイ)の開発

, フォーラム2006: 衛生薬学・環境トキシコロジー 講演要旨集, 2006年, Vol.2006, p.14  
4

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/10

C12Q 1/02

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed