

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 10 年度博士課程入学
氏 名 李 行錫
指導教官 太田 明德

論文題目

酵母を用いた内分泌攪乱活性を有する化学物質の検出系の構築とその応用に関する研究

内分泌攪乱物質は、生体内のホルモンの作用に影響を与え、内分泌系を攪乱する外因性の化学物質である。その作用機構としては、ホルモン受容体の結合部位を占領することにより生体内ホルモンを模倣するような作用を持つこと、ホルモンとの競合によりその作用を妨害すること、ホルモンの合成あるいは代謝酵素の作用を阻害してその濃度を変化させることなどが挙げられる。このような結果として、特に性ホルモンによる調節系を乱してヒトや野生生物の生殖に悪影響が引き起こされることが社会的な関心を集め、広範な化学物質のモニタリングが計画されている。

人類は 1500 万種にもものぼる化学物質を合成し、あるいは分離・同定してきた。そして現在約 10 万種程度の化学物質が商業的に利用されている。これらの化学物質のうち、これまでに有機塩素化合物、工業化学成品、農薬類、重金属及び有機金属、有機臭素化合物、植物エストロゲン及び合成エストロゲン等を含む約数十種の化合物が内分泌攪乱物質として考えられ、あるいは疑われている。しかしながら、他の大部分の化合物については、それらが内分泌攪乱作用を持つのかどうかということについて十分な知見が得られていないのが現状である。従って、それら化学物質の内分泌攪乱作用を評価するための迅速かつ簡便な検出系の確立は極めて重要である。

そこで本研究においては、核内ホルモン受容体の特徴であるリガンド依存的な標的遺伝子の転写活性化機構を利用したエストロゲン様化合物の検出法として、ヒトエストロゲン受容体 (hER α , hER β) を導入した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と *Yarrowia lipolytica* を用いた内分泌攪乱物質検出系の構築を試みた。

1. hER リガンド結合領域 (LBD) とコアクチベーター (転写共役因子) を用いた酵母 two-hybrid system による内分泌攪乱物質の検出系の構築

hER α と hER β のリガンド結合領域に含まれる転写活性化領域 AF-2 を介して転写を強く活性化するためには ER と基本転写装置を仲介するコアクチベーターが必要であることが知られている。そこで GAL4 DNA 結合領域 (DBD) -hER LBD 融合タンパク質と GAL4 転写活性領域 (TAD) -コアクチベーター (AIB1, SRC1, TIF2) 融合タンパク質を酵母 *S. cerevisiae* 中で発現させ、染色体上に組み込んだ reporter gene (*lacZ*) の発現をモニターすることによりヒト ER α と ER β の ligand 依存的な転写活性化を測定するエストロゲン様物質に特異的な検出系を構築した。天然ホルモン (17 β -estradiol (E₂)) を酵母の培養液に添加し、種々の コアクチベーターを同時に発現させた場合の転写活性化能の違いについて検討した結果、hER α LBD においては TIF2>SRC1>AIB1 の順に、hER β LBD に関しては SRC1>TIF2>AIB1 の順に高い転写活性化能が認められた。その中でも特に、hER β LBD-SRC1 の組み合わせにおいて最も高い転写活性化が見られた。そこで、hER β LBD と SRC1 の系を用いて種々の天然エストロゲン、合成エストロゲン、有機塩素化合物、工業用化合物および農薬類などの物質に対するエストロゲン様活性化について検討したところ、本検出系により広範なエストロゲン様活性を持つ物質を迅速かつ簡便に検出することができることが明らかとなった。また、本検出系により、既存の rat ER α を用いた酵母 two-hybrid system で判定できなかったいくつかの内分泌攪乱物質や、環境省が発表した内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質のリスク (SPEED '98) に含まれない物質がエストロゲン様活性を持つ可能性を示した。

2. hER β LBD-SRC1 の組み合わせを用いた γ -HCH とその中間代謝産物に対するエストロゲン様活性の測定

内分泌攪乱物質による環境汚染を除去する為の方法として微生物によるそれらの物質の分解は有力と考えられる。しかしながら、微生物分解系を構築するにあたって、環境汚染物質の微生物分解物のエストロゲン様活性について評価する必要がある。内分泌攪乱物質として知られる γ -HCH は土壌細菌 *Sphingomonas paucimobilis* によって分解される。 γ -HCH は *linA*、*linB*、*linC* と *linD* などの遺伝子産物によって 2,5-dichlorohydroquinon (2,5-DCHQ)、chlorohydroquinone (CHQ) と hydroquinone (HQ) の順に変換される⁽¹⁾。これらの中間代謝産物のエストロゲン様活性を hER β LBD-SRC1 の組み合わせを用いた系で測定した。 γ -HCH の中間代謝産物である 2,5-DCHQ と CHQ は γ -HCH より高いエストロゲン様活性を示したが、更に HQ まで代謝されるとエストロゲン様活性を殆ど示さないことが明らかとなった。この結果から γ -HCH による汚染の解決策として上記微生物による分解が有力な方法であることが確認された。

3. hERβ LBD-SRC1 の組み合わせを用いた新たなアンタゴニストの検出

先に述べたように、内分泌攪乱物質にはホルモンとの競合によりその作用を妨害する、いわゆるアンタゴニストとしての作用をもつものも含まれる。この場合、それらの物質は受容体のホルモン結合部位に拮抗的に結合するが本来のホルモンとは異なるコンフォメーション変化を引き起こし、受容体の活性化は行わないと考えられる。そこで本検出系により内分泌攪乱物質のアンタゴニストとしての活性が検出できるか検討した。hERβ LBD-SRC1 を導入した酵母を天然ホルモンである E₂ に加えエストロゲン受容体のアンタゴニストとしてよく知られている 4-hydroxytamoxifen (OHT) や ICI 182,780 を含む培地で培養したところ E₂ による転写促進活性が阻害された。このことから本系によりアンタゴニストとしての活性を持つ化合物が検出できることが明らかとなった。

更に種々の化合物について同様に検討を行ったところ、これまでアンタゴニストとしては知られていなかった有機スズ TBT-OH と TPT-Cl が、アンタゴニストとしてよく知られている OHT や ICI182,780 よりも強力なアンタゴニストとしての作用を持っていることが明らかとなった。

4. hERα 全長とコアクチベーターを用いた内分泌攪乱物質の検出系の構築

核内レセプタータンパク質が転写制御因子として転写を促進する場合には、複数の領域が関与している。転写促進に関わる領域は、リガンド依存的に転写を促進するリガンド領域 (E 領域の AF-2) のほかにも、N 末端側に位置する A/B 領域にも転写を促進する能力が存在することが知られている (AF-1)。そこで、hERα 全長とコアクチベーターとの相互作用を用いた内分泌攪乱物質の検出系の構築を試みた。

hERα を、GAL4 TAD-コアクチベーター (SRC1、TIF2) と共に酵母 *S. cerevisiae* に導入し、染色体上に組み込んだレポーター遺伝子 (*lacZ*) の発現を測定するというエストロゲン様物質検出系を構築した。1 で構築した hERβ-SRC1 の組み合わせを用いた系と比較した場合、天然ホルモンおよび種々の内分泌攪乱物質を 1 オーダーまたは 2 オーダー低い濃度で検出できることが明らかとなった。この結果から、本検出系は低濃度の内分泌攪乱物質のホルモン様活性を感度良く評価できる検出系であることが明らかとなった。

5. *n*-アルカン資化性酵母 *Y. lipolytica* を用いた内分泌攪乱物質の検出系の構築

アルカン資化性酵母である *Y. lipolytica* は、通常酵母の生育を阻害する疎水性物質に耐性であり、また疎水性化学物質の高い取り込み能を持つ酵母である。そこで *Y. lipolytica* を宿主として用いることで内分泌攪乱物質の高感度検出系が構築できるものと期待された。まず、レポーター遺伝子としては *lacZ* を飯田⁽²⁾らにより単離された

チトクローム P450 ALK1 遺伝子のコアプロモーターに連結し、さらにその上流に EREs (estrogen response element sequence) を1コピーあるいは2コピー連結して *Y. lipolytica* の染色体上の *URA3* 領域に組み込んだものを用いた。また、hER α は *Y. lipolytica* の翻訳伸長因子 EF-1 α をコードする *TEF1* 遺伝子のプロモーターに連結して *Y. lipolytica* に導入し用いた。種々の内分泌攪乱物質のエストロゲン様活性化について検討したところ、レポーター遺伝子の発現レベルは先の *S. cerevisiae* の系より低いが、本検出系により広範なエストロゲン様物質を検出することができることが明らかとなった。

6. まとめ

本研究で構築した検出系により広範な内分泌攪乱物質を検出することができ、その有用性が明らかとなった。

hERには二つのサブタイプ (hER α と hER β) が存在する。ER β の生理的機能については、ER α との類似性を有する一方で、相違点も多く、その原因として発現部位の差に加え、アミノ酸構造の差によるものが考えられる。hER α と hER β は同様の ligand E₂ に対する高い結合能を有するが、各種エストロゲン様物質に対する特異性は必ずしも同一でないことが本研究により明らかとなった。従って、内分泌攪乱物質の検出系を構築する際に ER α だけではなく、ER β の利用を考慮しなければならないと考えられる。本研究で構築したヒトの ER β を用いた検出系は内分泌攪乱活性を有する化合物のモニタリングに大いに有用なものとなると期待される。

1. Miyauchi, K., Suh, S. K., Nagata, Y., and Takagi, M. (1998) Cloning and sequencing of a 2,5-dichlorohydroquinone reductive dehalogenase gene whose product is involved in degradation of γ -hexachlorocyclohexane by *Sphingomonas paucimobilis*. *J. Bacteriol.* **180**, 1354-1359
2. Iida, T., Ohta, A. and Takagi, M. (1998) Cloning and characterization of an *n*-alkane-inducible cytochrome P450 gene essential for *n*-decane assimilation by *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **14**, 1387-1397