

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 李 行錫

人類は多数の化学物質を合成して様々な用途に利用してきた。これらのうち、約数十種の化合物が内分泌攪乱物質として疑われている。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、それら多数の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。

本論文は、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 あるいは hER β) を導入した酵母を用いた内分泌攪乱物質検出系を構築したものである。

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

hER α と β のLBDに含まれる転写活性化領域の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。そこでGAL4 DNA結合領域(DBD)とhER LBD融合タンパク質、またGAL4転写活性領域(AD)とコアクチベーター(AIB1, SRC1, TIF2)融合タンパク質を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中で発現させ、染色体上に組み込んだレポーター遺伝子 (*lacZ*) の発現をモニターするエストロゲン様物質の検出系を構築した。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、hER β LBDと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、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、本検出系は広範なエストロゲン様活性を持つ物質の検出に有効であると言う結果を得ている。

この系を用い、内分泌攪乱物質として知られる γ -HCHが土壌細菌 *Sphingomonas paucimobilis* によって分解される際の間接代謝産物2,5-dichlorohydroquinonとchlorohydroquinoneは γ -HCHより高いエストロゲン様活性を示したが、更にhydroquinoneまで代謝されるとその活性がなくなることを明らかとしている。

さらに、有機スズTBTとTPTにhERアンタゴニストとしてよく知られているOHTとICI182,780よりも強力なアンタゴニスト作用を示唆した。これは有機スズの作用に関わる重要な指摘と言える。

2. hER α 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

hER α 全長には転写制御因子としてA/B領域のAF-1とLBDのAF-2が存在する。そこで、hER

α 全長を GAL4 LBD との融合タンパク質と、GAL4 AD とコアクチベーター-SRC1、また TIF2 との融合タンパク質を酵母で発現させる検出系を構築した。hER α の全長を用いた one-hybrid system と two-hybrid system は、本来 hER がもっている機能を利用した検出系である。すなわち、AF-2 とコアクチベーターの相互作用のみならず、AF-1 と AF-2 との機能的な相互作用や AF-2 以外の領域と基本転写因子群との何らかの相互作用などを用いたものである。1 で構築した hER LBD とコアクチベーター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 オーダまたは 3 オーダ低い濃度で検出できることが明らかとした。この結果から、低濃度の内分泌攪乱物質のホルモン様活性を迅速かつ簡便に評価できる検出系であることを示している。

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

疎水性物質の親和性を持つ酵母 *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な検出系が構築できるものと期待し、レポーター遺伝子としては *lacZ* をチトクローム 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 ERE を 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構築した。本検出系によりエストロゲン様物質を検出することが出来ることを明らかとした。

以上、本論文は内分泌攪乱物質の新規酵母検出系を構築し、その有用性を示したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。