HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	環境水を酵母Two-Hybrid法へ適用するための前処理法に関する研究
Author(s)	平井, 友希子; 竹田, 誠; 大野, 浩一; 亀井, 翼; 眞柄, 泰基
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 11, 155-158
Issue Date	2003-10-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/7069
Type	bulletin (article)
Note	第11回衛生工学シンポジウム（平成15年11月6日（木）-11月7日（金） 北海道大学学術交流会館）. 一般セッション. 3 環境保全・リスク評価. P3-6
File Information	11-3-6_p155-158.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

3－6

環境水を酵母 Two-Hybrid 法へ適用するための前処理法に関する研究

○平井 友希子、竹田 誠、大野 浩一、亀井 翼、眞柄 泰基（北海道大学大学院）

1．背景と目的

生体内ホルモンは、生体の恒常性・生殖・発生に関与するため、生物が正常な生活を維持するために必要なものである。生体内ホルモンは、内分泌細胞によって、必要な時期に必要な量だけ生産・分泌され、標的細胞の活性を調節している。内分泌撹乱化学物質は、この生体内ホルモンの機能を模倣または撹乱し、悪影響を及ぼす化学物質の総称である。その影響として、野生生物においては孵化率の低下や雄の雌性化といった生殖機能の異常、また、ヒトにおいては精子数の減少やガンの誘発等の可能性が指摘されている。しかし、その作用機構については未解明な部分が多いのが現状である。

内分泌撹乱作用の疑いがある化学物質として Bisphenol-A、ダイオキシン類、フタル酸エステル類など約 70 種類がリストアップされている [1]。さらに、人畜由来の天然のホルモンである 17β-Estradiol（以下 E2）は、強いエストロゲン様作用を有し、環境水中で生物への影響を及ぼすと懸念されている。

酵母 Two-Hybrid 法 [2]は、*in vitro* 試験の中でも簡便性・迅速性・経済性に優れており、また、タンパク質間の相互作用を検出することで、より生物のホルモン作用システムに近い機構でホルモン作用を検出可能であることから、内分泌撹乱作用の評価に汎用されている。

しかし、この試験法は本来、化学物質が持つ内分泌撹乱作用を評価するために開発されたものである。環境水の評価を行う場合は、目的物質の回収・濃縮、および測定に影響を与える物質の分離といった前処理が必要となる。これまで、環境水の前処理にはジクロロメタン（以下 DCM）を溶出溶媒とした固相抽出法を用いてきたが [3]、環境水中に共存している物質の影響により定量的な評価が困難であった。共存物質の影響は、試験系の操作にリン酸緩衝溶液を加えること（以下+buffer 系）で軽減可能であったが [4]、このような試験法の改良のみでは、その影響を完全に取り除くことはできなかった。

そこで、本研究では、前処理法の改良により目的物質の回収率の向上および測定に影響を与える物質の分離を可能にし、+buffer 系と合わせて、環境水のエストロゲン様活性が検出可能な手法を提案することを目的とした。

2．研究方法

千歳市内別河川水、北村泥炭水、A・B 各下水処理場二次処理水（以下 A・B 二次処理水）を試料水として用いた。また、E2 の回収率の評価および阻害作用の有無を調べるため、各試料水 3L に 10^{-6}mol/L の E2 を 60μL 添加した試料水を作成した。これは、50000 倍濃縮時に、酵母 Two-Hybrid 法において十分な活性が認められる濃度である。比較対照として、精製水に同様の E2 を添加した試料水も測定した。

濃縮方法

試料水は、ガラス繊維濾紙（GF/B,Whatman 社製）を用いて吸引濾過を行った後、固相抽出法により濃縮した。予め、ヘキサン（以下 Hex）20mL、DCM20mL、メタノール（以下 MeOH）20mL（すべて残留農薬試験用、和光純薬製）、精製水 40mL でコンディショニングした固相カートリッジ Sep Pak C18（Waters 社製）に、Sep Pak コンセントレーター（Waters 社製）を用いて各試料水を 3L 通水した。窒素気流下でカートリッジを十分乾燥させた後、Hex、DCM、MeOH の順に流速 1.0mL/min で各 20mL 溶出した。各溶出液をエバポレーターで減容し、さらに窒素気流下で溶出液を十分乾固させた。それ

を DMSO60μL に再溶解させ（最高濃縮倍率 50000 倍）、段階希釈して測定試料とした。以上の操作手順のフローを図１に示す。

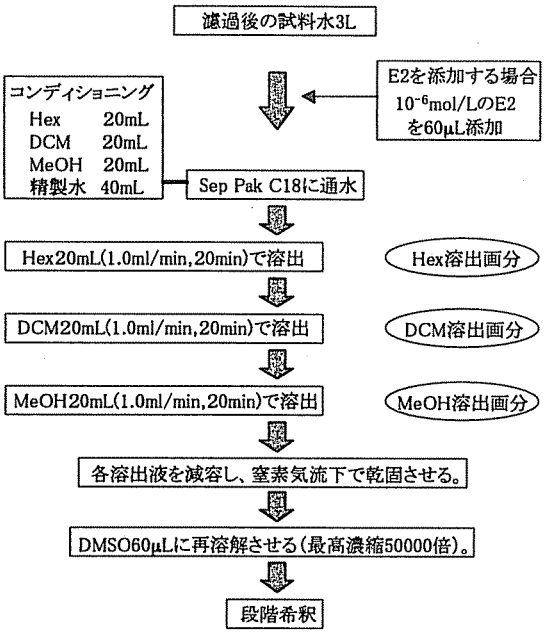

図１　濃縮の操作手順

エストロゲン様活性の測定

エストロゲン様活性の測定は、酵母 Two-Hybrid 法を用いた。本試験法は、ラットのエストロゲンレセプターとコアクチベーターを組み込んだ酵母を用いて、試験物質の受容体結合能および DNA 転写活性能をレポータ遺伝子であるβ-galactosidase 活性により測定する方法である。測定原理を図２に示す。

通常系の場合 SD 培地 200μL に、また+buffer 系の場合 SD 培地 175μL にリン酸緩衝溶液 25μL を加えたものに、それぞれ 16 時間培養させた酵母懸濁液 50μL とサンプル 2.5μL を混合し、30℃で 4 時間培養する。その後、595nm の吸光度(OD_{595})を測定し、遠心分離により上澄みを捨て、Z-buffer 溶液で細胞壁を破壊し、産生されたβ-galactosidase を ONPG 溶液により呈色させる。そして、420nm と 570nm の吸光度(OD_{420}、OD_{570})を測定する。この操作により、以下の式に基づいて活性値を算出した。

$$\text{ｴｽﾄﾛｹﾞﾝ様活性値} = \frac{OD_{420} - 1.75 \times OD_{570}}{t \times v \times OD_{595}} \times 1000$$

t＝30(min)：ONPG による呈色時間

v＝0.05(mL)：酵母懸濁液の量

なお、エストロゲン様活性値は、試験時に陽性対照として測定される E2 の最大活性値を 100%とし、これに対する比活性値(%)に換算して評価を行った。

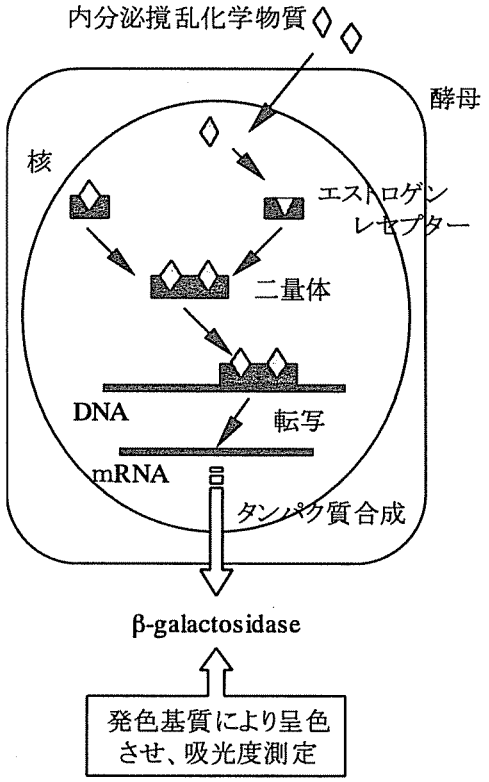

図２　酵母 Two-Hybrid 法の原理

E2 濃度の測定

E2 濃度の測定は、ELISA キット（日本エンバイロケミカルズ(株)製）を用いた。ELISA 法は、抗原とそれに対して生体内で合成される抗体（モノクロナール抗体）が特異的に結合する抗原抗体反応を利用した、酵素免疫測定法の一つである。抗体がマイクロプレート内面に固相化されており、前処理した試料水と抗原に発色用酵素を結合させた抗原酵素複合体（酵素標識抗原）をマイクロプレートに加え、競合反応させる。未反応物を洗浄により除去した後、酵素標識抗原を発色させ、その吸光度を測定することにより E2 濃度を定量する。

3．結果と考察

エストロゲン様活性

これまで、環境水からの目的物質の抽出には、DCM を溶出溶媒として用いてきた。そこで、A 二次処理水と精製水に E2 を添加した試料水における、DCM 溶出でのエストロゲン様活性の測定結果を図 3 に示す。図中の positive control は、添加した E2 から予測されるエストロゲン様活性の計算値である。精製水に E2 を添加したものでは、通常系、+buffer 系ともに positive control に近い活性が認められた。しかし、A 二次処理水の通常系ではほとんど活性が認められず、+buffer 系においても、精製水に E2 を添加したものに比べかなり低い活性値しか示さないことがわかる。両者の比較から、A 二次処理水は共存物質によるエストロゲン様活性の阻害影響が大きいと考えられる。

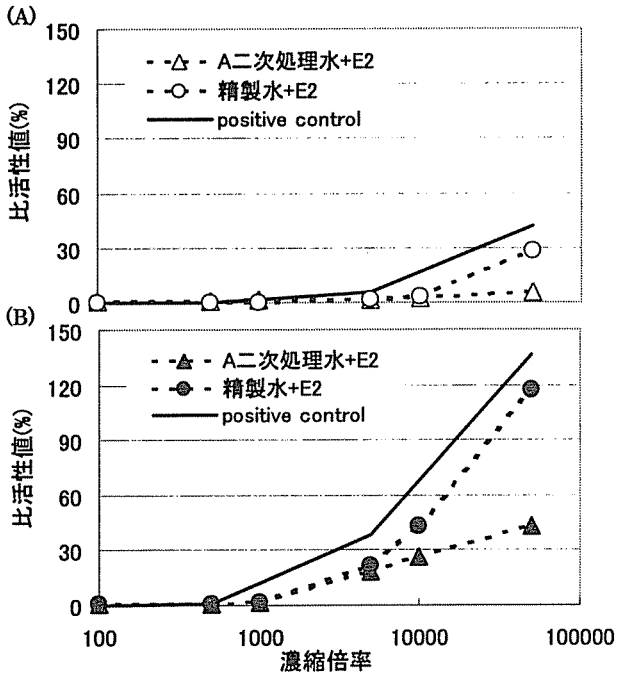

図 3　A 二次処理水および精製水に E2 を添加した試料水のエストロゲン様活性
(A＝通常系、B＝+buffer 系)

各溶出画分における寄与率

3 種の溶出溶媒を用いて溶出を行い、各溶出画分における E2 濃度を測定した。E2 を添加した場合の 3 種の溶媒による総回収率は、精製水 71%、北村泥炭水 77%、A 二次処理水 96%、B 二次処理水 103%であった。

図 4 に、回収された E2 総濃度に対する E2 添加および未添加試料における各画分の寄与率を示す。E2 未添加試料では、北村泥炭水では Hex 画分の回収量が最も多く、A･B 二次処理水では DCM 画分の回収量が最も多かった。一方、E2 添加試料では、全ての試料水において DCM 画分の回収量が最も多かった。また、E2 を添加することにより、DCM 画分の寄与が北村泥炭水では大きくなり、B 二次処理水では小さくなることがわかった。一方、A 二次処理水では各画分の寄与率が変わらないという結果となった。寄与率の変動の要因としては、各試料水に含まれる共存物質の違いによる E2 の溶出への影響が考えられる。また、ELISA 法を用いて E 2 濃度を測定していることから、抗体が類似した別の抗原とも結合反応を示す交差反応の可能性も考えられる。しかし、この結果は 1 回のみの測定結果であり、繰り返し実験を行い、回収率およびその変動を確かめる必要がある。

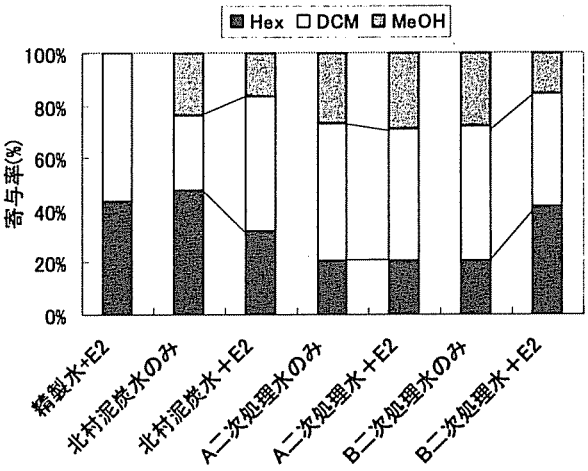

図 4　E2 添加および未添加試料における各画分の寄与率(%)

エストロゲン様活性と測定 E2 濃度の関係

3 種の溶出溶媒を用いた場合の各溶出画分における測定 E2 濃度とエストロゲン様活性の関係について、Hex 画分を図 5 に、DCM 画分を図 6 に示す。MeOH 画分は濃縮試料中に色成分の溶出が見られ、エストロゲン様活性の測定

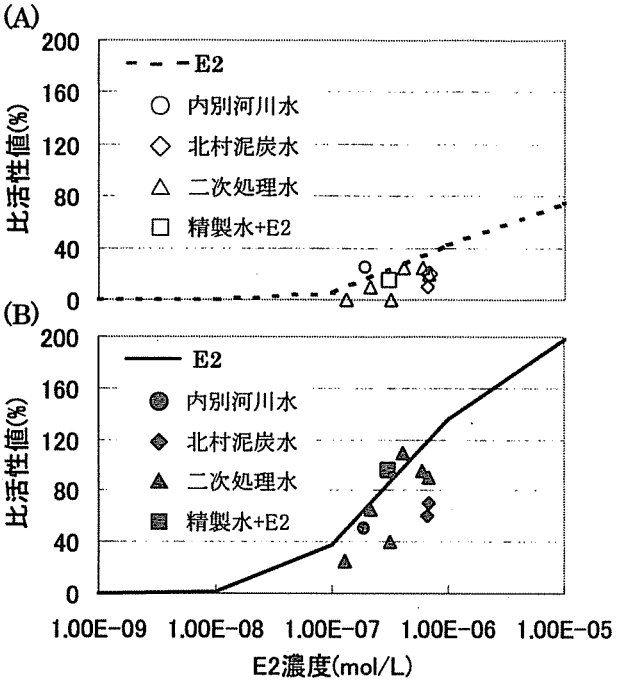

図５　Hex 画分における測定 E2 濃度とエストロゲン様活性の関係（A=通常系、B=+buffer 系）

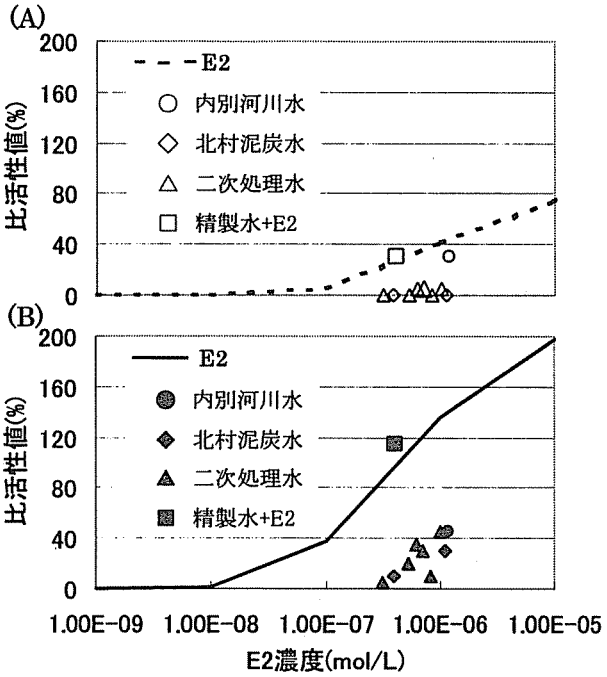

図６　DCM 画分における測定 E2 濃度とエストロゲン様活性の関係（A=通常系、B=+buffer 系）

に対する影響が顕著であったため、測定不能であった。ほとんどの試料水において E2 の回収量が多かった DCM 画分では、精製水に E2 を添加した試料水はほぼ測定 E2 濃度に対応したエストロゲン様活性が見られたが、その他の試料水はエストロゲン様活性が E2 濃度から予想される値より大幅に低くなった（図６）。一方、Hex 画分では、E2 の回収量は DCM 画分に比べて少ないが、回収した測定 E2 濃度から予想される活性値に近い値を示した（図５）。

したがって、従来の濃縮方法である DCM 溶出では、E2 の回収量は多いがエストロゲン様活性を阻害する物質も同時に溶出するため活性が大きく阻害されることが示された。一方、Hex 溶出では DCM 溶出に比べ E2 の回収量は少ないが、阻害物質の溶出は少ないと考えられる。

４．まとめ

目的物質を回収する際、試料水に含まれる共存物質の違いによる影響を受ける可能性が示唆された。また、溶出溶媒の極性の違いにより、目的物質の回収率および測定妨害物質の溶出量が異なることが明らかとなった。以上より、Hex と DCM の混合溶媒やこれら２つの溶媒の中間の極性をもつ溶媒を用いるなど、エストロゲン様物質と測定の妨害物質を分離し、環境水のエストロゲン様物質濃度に対応したエストロゲン様活性の定量的な評価を可能とする前処理法を検討していく必要がある。

５．参考文献

1) 環境庁：外因性内分泌撹乱化学物質問題への環境庁の対応方針について－環境ホルモン戦略計画 SPEED'98－（1998）
2) J, Nishikawa *et al.*：*Toxicology and Applied Pharmacology*, 154,pp.76-83（1998）
3) 鎌田素之：水環境中における内分泌撹乱作用の酵母 Two-Hybrid 法による評価と挙動に関する研究、平成 13 年度北海道大学大学院工学研究科博士論文
4) 河合富貴子ら：第８回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会講演要旨集、pp.32-33（2002）