

酵母 Two-Hybrid System における代謝活性化の効果に関する検討

国立医薬品食品衛生研究所 西村哲治、安藤正典

1. はじめに

水環境には、自然由来の有機物、工場、事業所や家庭からの排水中に含まれる化学物質、雨水により流入する大気からの化学物質等、発生源も種類も多岐にわたる化学物質が流入してきている。さらに、これらの化学物質は、水環境中で光や生物により、または種々の処理により分解を受けたり新たな反応生成物に変化することもある。この結果、水環境中には微量ではありながら莫大な種類の化学物質が存在していることになる。これら化学物質の中には、生物に取りこまれた後、内分泌系をかく乱する恐れのあるものも少なくないと考えられ、その実態把握が求められている。水道原水として利用されている河川や湖沼等の水にも、これらの化学物質が含まれている可能性があり、個々の化学物質の内分泌系に及ぼす影響と環境中の実態を把握することが大切である。

本研究では、ビフェニル類を対象に取り上げ、酵母 Two-Hybrid System 法により、エストロゲン受容体との複合体形成の結果生じる遺伝子転写促進活性について検討した。また、化学物質は生物の体内に吸収された後、代謝を受ける結果、作用機構や作用の強弱等に変化を生じる可能性が考えられることから、生理的な状態を反映する試験系として、代謝酵素を含む肝ミクロゾームの共存下における酵母 Two-Hybrid System 法の試験方法について検討を加えた。

2. 材料および装置

ビフェニル（純度 98%；以下同様）、*o*-ヒドロキシビフェニル（99.5%）、*p*-ヒドロキシビフェニル（99%）、2,2'-ジヒドロキシビフェニル（97%）、4,4'-ジヒドロキシビフェニル（97%）、17 β -エストラジオール（97%以上）は和光純薬（株）より入手した。*m*-ヒドロキシビフェニル（90%以上）は関東化学（株）から、グルコース-6-リン酸、還元型ニコチンアミド-アデニンジヌクレオチドリジン酸（NADPH）、還元型ニコチンアミド-アデニンジヌクレオチド（NADH）はオリエンタル酵母（株）から入手した。ラット肝ミクロゾーム画分（S9）は、キッコーマン社より、フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンにより酵素誘導をかけたラット肝臓から調製した S9 を購入して用いた。塩類など特に記載の無いものについては、和光純薬（株）の特級試薬を用いた。

吸光度は、島津製作所製 CS-9300PC を用いて測定した。

3. 実験方法

本実験の酵母試験系（酵母 Two-Hybrid System）は、ヒトエストロゲン α 受

容体のリガンド結合領域と GAL4 遺伝子産物の DNA 結合領域の融合タンパク質、および RNA ポリメラーゼと相互作用をする GAL4 活性化領域と転写活性化共役因子ヒト TIF2 の一部との融合タンパク質を導入した組換え酵母株を用いた¹⁾。

試験には、SD 培地 (6.7g/l Difco yeast nitrogen base without amino acid (Difco 社), 2% グルコース (和光純薬(株)), 30mg/l L-イソロイシン, 15mg/l L-バリン, 20mg/l L-アデニンヘミサルファー塩, 20mg/l L-ヒスチジン塩酸一水和物, 100mg/l L-ロイシン, 30mg/l L-リジン塩酸, 20mg/l L-メチオニン, 50mg/l L-フェニルアラニン, 200mg/l L-スレオニン, 20mg/l L-トリプトファン, 30mg/l L-チロシン, 20mg/l L-ウラシル (以上 SigmaChemical Co.; St. Louis, MO) を含む培地) で、30℃、約 16 時間培養した酵母菌を用いた。200 μ l の新鮮な SD 培地に、酵母培養液を 50 μ l 加え、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した被験物質を 2.5 μ l 加え、30℃、4 時間暴露した。暴露後、150 μ l を分取し、595nm の吸光度を 2 回測定した。残りの菌液を 15,000rpm、5 分間遠心し、上清を除いた。1mg/ml ザイモリエース(生化学工業(株))を含む溶液(60mM リン酸水素二ナトリウム, 40mM リン酸水素一ナトリウム, 10mM 塩化カリウム, 1mM 硫酸マグネシウム)を 200 μ l 加え懸濁した後、30℃、15 分間保温した。40 μ l の 4mg/ml o-ニトロフェニルガラクトピラノシド (ONPG) を加え、さらに 30℃、30 分間保温し、被験物質の添加により誘導された β -ガラクトシダーゼと反応させた。100 μ l の 1M 炭酸ナトリウムを加えて反応停止後、遠心により細胞残さを除き、上清の吸光度 (420nm および 570nm) を測定した。被験物質のエストロゲン様活性は、レポーター遺伝子として導入した β -ガラクトシダーゼ遺伝子から誘導合成された酵素の活性値として測定した。 β -ガラクトシダーゼ活性の算出は以下の式を用いた。

$$\text{Units} = 1000 \times \{[\text{OD}_{415}] - [1.75 \times \text{OD}_{570}]\} \div \{[t] \times [v] \times [\text{OD}_{595}]\}$$

t = 反応時間 (30 分)

v = 反応に用いた細胞溶液の量 (0.1ml)

OD₅₉₅ = 反応開始時の細胞密度 (2 回の測定値の平均)

OD₄₂₀ = 反応終了時の o-ニトロフェノールの吸光度

OD₅₇₀ = 反応停止時の反応液のブランク

OD₅₇₀ = 反応停止時の反応液のブランク

4. 結果および考察

- (1) 化学物質は生物の体内に吸収された後、代謝を受け作用点やその機構の変化、作用の強弱化を示す可能性が考えられることから、生理的な状態を反映する試験系として、代謝酵素を含むラット肝ミクロゾームの共存下における酵母 Two-Hybrid System 法の試験方法について検討を加えた。外部から取りこまれた化学物質は、肝臓、小腸、肺、腎臓

などで代謝を受けるが、主として肝臓の代謝酵素系により代謝を受けている。そこで、ネズミチフス菌を用いる変異原性試験の方法²⁾に準じて、ラット肝ミクロゾーム画分(S9)混合液を作製し、添加したS9の最終濃度の違いによる代謝活性化の効果を調べた。フェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンにより酵素誘導したラットの肝臓から調製したS9には、種々の代謝酵素が含まれている。反応液に最終濃度として4mM 塩化マグネシウム, 16.5mM 塩化カリウム, 2.5mM グルコース-6-リン酸, 2mM NADPH, 2mM NADH および ラット S9 を含む50mM ナトリウム-リン酸緩衝液(pH7.4) 100 μ lを、2倍濃度に調製した酵母培地 100 μ lに加え、酵母菌培養液を50 μ l加えた。S9混合液共存下で、 1×10^{-3} Mのビフェニルを30 $^{\circ}$ C、4時間暴露した後、誘導された β -ガラクトシダーゼの活性を測定した。図1に示すように、最終添加濃度として10%まで濃度に依存して誘導活性が上昇した。10%から15%の間でも酵素活性誘導の上昇が見られたが、添加濃度に比べて濃度依存度の低い誘導活性のみを示したことから、以後の試験でのS9の添加最終濃度は10%とした。

- (2) S9混合液の組成成分の必要性について検討した。全ての成分を含む混合液から検討する一つの成分を除き、酵母菌および 1×10^{-3} Mのビフェニルと共存した状態で、30 $^{\circ}$ C、4時間暴露した場合の誘導に及ぼす影響を検討した(表1)。S9を除くと誘導は全く見られなかった。NADPHまたはNADHを除くことによって、誘導活性は大きく減少した。その他の三種の成分については、16%から45%ほどの減少が見られた。これら三種の成分については、誘導活性に対して大きな影響を及ぼさないかもしれないが、S9混合液の安定性を考慮に入れ、S9混合液の成分として加えることとした。これらの結果から、表2に示した成分をそれぞれの最終添加濃度になるように、2.5倍濃度のS9混合液を調製し、反応系に加えることとした。ただし、ここに示した濃度は、被験化学物質の種類や濃度等の違いによる詳細な比較検討を行っていないため、必ずしも最適濃度を示しているものとは限らず、今後さらに検討を加える必要がある。
- (3) 被験物質の代謝に係る時間について検討した。被験物質の暴露時間4時間は一定に定め、酵母菌に暴露する前にどの程度被験物質にS9混合液を作用させるかについて検討を加えた。図2に示すように、0時間から2.5時間の前処理の時間をかけることにより、前処理の時間に依存して徐々に誘導活性が上昇する傾向が見られた。しかしながら、時間をかける割にはその効果が見られなかった(最高の誘導率で前処理行なわない場合の109.2%)。これらの結果から、以後の試験では、酵母菌と被験物質およびS9混合液を同時に混ぜ、代謝活性化を行わない従来の方法と同様4時間暴露させることとした。
- (4) 図3に示すビフェニル、*o*-ヒドロキシビフェニル、*m*-ヒドロキシビ

フェニル、*p*-ヒドロキシビフェニル、2,2'-ジヒドロキシビフェニル、4,4'-ジヒドロキシビフェニルの 6 種類のビフェニル類に対して、誘導活性を検討した。図 4 に濃度-反応性の関係を示す。暴露は $1 \times 10^{-3} \text{M}$ を最高濃度として 10 倍段階希釈系列で行ない、誘導活性は 3 回の独立した測定値の平均値で示した。

代謝活性化を行なわない場合は、4,4'-ジヒドロキシビフェニル、*p*-ヒドロキシビフェニルの 2 種がそれぞれ $3 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $3 \times 10^{-5} \text{M}$ の濃度で最高誘導活性を示した。 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 17β -エストラジオールの誘導活性に比較して、それぞれ 55.9%、35.9%の誘導活性が認められた。*o*-ヒドロキシビフェニルおよび *m*-ヒドロキシビフェニルは $1 \times 10^{-4} \text{M}$ の濃度でごく僅かの誘導活性が見られた。ビフェニルおよび 2,2'-ジヒドロキシビフェニルについては、今回の検討では有意な誘導活性は認められなかった(表 3)。

昨年度のフェノール類の検討において、酵母 Two-Hybrid System では、フェノールの水酸基の位置に対してパラ位にアルキル基が存在する構造を持つ化学物質の誘導活性が高いことが認められている。本年度の結果からも、同様に水酸基に対してパラ位にベンゼン環が結合した構造を持つ化学物質の誘導活性が高いことが認められた。すなわち、酵母 Two-Hybrid System を用いて検討した結果においては、構造と誘導活性の間に相関関係が存在することが示唆される。これは、(1) フェノールの構造を持ち、水酸基に対してパラ位に別の官能基を持つ構造の化学物質がエストラジオール受容体に結合親和性が高い一般的な性質を表している、(2) 酵母を試験株として用いていることの特異性による、(3) 化学物質の性状に由来する、等の可能性が考えられる。ここで見られた構造と誘導活性の関係の意味するところについては、さらに検討を加えていかなければならない。また、酵母 Two-Hybrid System を用いた場合、親水性物質に比べ脂質親和性の高い物質の誘導活性が高く出る傾向が見られる、フェノール構造を持たない化学物質は誘導活性が出にくい、酵母 Two-Hybrid System で誘導活性が有意に認められない化学物質であっても、別の方法で調べるとエストロゲン受容体との親和性が見られるものもある、などの情報も蓄積しており、構造と誘導活性との関係を含めて、さらに化学物質のエストロゲン様活性についての知見の蓄積を進めていかなければならない。

- (5) 6 種のビフェニル類を前記の条件で、代謝活性化をしながら試験酵母株に暴露した結果、*o*-ヒドロキシビフェニルおよび 2,2'-ジヒドロキシビフェニルを除いて有意な酵素誘導活性が認められた。ビフェニル、および *m*-ヒドロキシビフェニルでは、代謝活性化をしない場合には誘導活性が有意に認められないか、もしくはごくわずかしか誘導活性を示さなかった(表 3)。しかしながら、代謝活性化を行なうことにより、代謝活性化を行なわない場合の $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 17β -エストラジオールの誘

導活性に比較して、それぞれ 33.0%、24.4%の誘導活性が認められるようになった(表 3)。

また、代謝活性化を行わない場合にも強い誘導活性の認められた *p*-ヒドロキシビフェニルおよび 4,4'-ジヒドロキシビフェニルでは、さらに誘導活性が増強された(それぞれ、代謝活性化を行わない場合の約 2 倍ほど)(表 3)。また、17 β -エストラジオールについては、代謝活性化を行なうことにより、誘導活性は認められなくなった。

これらの結果から、ある種の化学物質は、生体内で代謝酵素により代謝を受けることによりエストロゲン受容体への結合親和性が生じたり増強することが考えられる。また、17 β -エストラジオールのようにその活性が消失する化学物質もあることがわかった。

5. おわりに

酵母 Two-Hybrid System を用いて、ビフェニル類 6 種のエストロゲン様酵素誘導活性を検討した。*p*-ヒドロキシビフェニルおよび 4,4'-ジヒドロキシビフェニルでは誘導活性が有意に示されることがわかった。

さらに、生体内に吸収された後の代謝活性化を考慮して、ラット肝臓の代謝酵素を作用させると、誘導活性が見られなかったビフェニルと誘導活性がごくわずかであった *m*-ヒドロキシビフェニルに誘導活性が見られるようになった。代謝活性化を行わない場合にも誘導活性の認められた *p*-ヒドロキシビフェニルおよび 4,4'-ジヒドロキシビフェニルでは、さらに誘導活性が増強された。

これらの結果から、エストロゲン様活性を検討していく上で、生体内の代謝活性化を考慮した試験系を併用していくことも必要であると考えられる。

6. 参考文献

1. Nishikawa, J., Saito, K., Goto, J., Dekeyama, F., Matsuo, M. and Nishihara, T.: New screening method for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154, 76-83 (1999).
2. 労働省化学物質調査課編；安衛法における変異原性試験—テストガイドラインと GLP—、中央労働災害防止協会（平成 3 年 3 月 25 日）