

## 分泌型 $\alpha$ -ガラクトシダーゼを用いたエストロゲン活性測定法

東京都立衛生研究所 狩野文雄、上原真一、鈴木孝人  
 明星大学理工学部 藤巻靖人、上田豊甫

外因性の環境ホルモンをスクリーニングする酵母 Two-Hybrid 法は、化学物質と酵母との反応、遠心処理、zymolase 溶解など複雑な手順を要する。蛋白間相互作用をより迅速かつ感度よく検出するため GAL4 活性化に応答して MEL1 遺伝子を発現する Y190 (Clonotech) を用いて分泌型  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性を短時間に測定する方法を検討した。ラット estrogen receptor と coactivator 組換え酵母 (大阪大学大学院薬学研究科の西川株) を 30°C、6 時間回転培養して、2 倍量の SD で酵母を 2 倍濃縮した。DMSO で 10 倍希釈した  $\beta$ -Estradiol に S9mix を 5 倍量で添加し、3 時間 37°C 処理した後、SD で 10 倍希釈したものを培養酵母と容量比 5 : 3 で混和してマイクロチューブ内で 30°C、18 時間回転培養した。同じくフィルタープレート内で 1.8 時間静置培養したものについて試験した。96 ウェル・フィルター・プレート (Eppendorf EVENT 4160 cell plate) に 100  $\mu$ l ずつ移して吸引ろ過し、基質として  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ用に、X- $\alpha$ -Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-Galactoside)、MU- $\alpha$ -Gal (4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-Galactoside)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ用に、C P R G (Chlorophenolred- $\beta$ -D-Galactoside) をそれぞれに添加後、経時的に X- $\alpha$ -Gal (665nm)、CPRG (570nm)、MU- $\alpha$ -Gal (Ex : 350nm、Em : 450nm) を測定した。また失活 S9mix 添加条件で回転培養法と静置培養法の試験を行い、それぞれのエストロゲン活性を比較した。以上の結果、MU- $\alpha$ -GAL、X- $\alpha$ -GAL の S9mix 添加と失活 S9mix 添加および無添加条件とも  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性を示し、S9mix 添加の方が高い活性を示した。また回転培養の方が静置培養よりも高い活性を示した。本法は  $\beta$ -ガラクトシダーゼと比較して、より低い濃度でのエストロゲン活性を検出できること、酵母に対する細胞毒性によるアーティファクトがないこと、遠心処理に代るフィルターろ過による迅速測定が可能であることなど、ハイスループット・アッセイに適していることがわかった。

### Measurement of Estrogenic Activity used by Secreted $\alpha$ -Galactosidase Assay

Fumio Kano, Shinichi Uehara, Takahito Suzuki,\* : Yasuhito Fujimaki,\* : Toyotosi

Ueda (Tokyo Res. Lab. Public Health,\* : Meisei University)

To determine the estrogenic activity by endocrine disrupting chemicals, we examined  $\alpha$ -galactosidase assay which is Secreted into culture medium. Yeast MEL1 genes are activated by GAL4 binding domains with endocrine disrupting chemicals. In  $\beta$ -Estradiol with S9mix, MU- $\alpha$ -Gal and X- $\alpha$ -Gal Showed  $\alpha$ -galactosidase activity. MU- $\alpha$ -Gal showed high activity than X- $\alpha$ -Gal, And  $\beta$ -Estradiol with S9mix showed high activity than without S9mix. Because of high sensitivity and low background and ease of manipulation this method is useful for high-throughput screening assay.