

課題名	5RFc-1201 簡単な試料前処理のみで実施できるダイオキシン土壤汚染バイオアッセイキットの開発
課題代表者名	川西優喜 (大阪府立大学大学院理学系研究科 分子細胞遺伝学研究室 助教)
研究実施期間	平成24～25年度
累計予算額	11,202千円(うち25年度5,457千円) 予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード ダイオキシン、バイオアッセイ、酵母、土壤汚染、簡易検出

研究体制

(1)簡単な試料前処理のみで実施できるダイオキシン土壤汚染バイオアッセイキットの開発(大阪府立大学)

【注意】

本報告書は一般に公開されるため、特許出願および論文公開の関係上、本文および図について一部情報を伏せて執筆しました。

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

現在ダイオキシン類を定量するには、公定法では高分解能ガスクロマトグラフ/質量分析計(HRGC/HRMS)を用いた機器分析法、準公定法として抗体法(ELISA)や動物細胞株を使用した生物検定がある。しかしこれらはいずれも土壤からのダイオキシン類の抽出・精製といった試料前処理過程に約10日を要し、分析終了までに2週間程度必要である。また分析には専門の施設・設備を要し、特にHRGC/HRMSは極めて高額のため分析コスト削減のネックである(図1)。土壤汚染対策法の改正など今般の社会情勢は、今後ますます土壤汚染の調査・対策件数の増大を予想させる。しかしその調査・対策は高額な費用と多くの時間が必要になることが多く、企業にとって無視できない負担である。従って本提案の社会的・経済的意義は大きい。またこの高負担が合理的な土壤汚染リスク管理の大きな制約となっている。そこで本提案の低コストなダイオキシン汚染土壤検出法は、安全・確実な土壤汚染対策に貢献する。これにより土壤汚染による健康リスクを低減できる。



図1 研究の背景と概要

2. 研究開発目的

そこで本提案では低コスト・省時間の分析法として、ダイオキシン汚染を、簡単な試料前処理のみで1日で結果判定できる簡便・迅速・低コストのスクリーニングキットを開発する。

提案者らはすでにダイオキシン受容体ジーンバッテリーを利用したダイオキシン類を検出するレポーター酵母を開発、バイオアッセイキットとして上市(96回分析用、4万8千円)している(図2)。本

が250 [pg-TEQ/g]であることを考えると、十分使い物になる性能といえる。

最後に、公定法による測定データのある実際の汚染土壌を簡易前処理、アッセイした。分析化学会頒布の土壌認証標準物質、すなわち焼却炉ちかくの汚染森林土壌を簡易前処理しアッセイしたところ1gの土壌でも陽性判定できた。酵母アッセイの検量線からTEQを求めたところ、23,000[pg/g]であった。これは公定法で算出した値111[pg/g]の約200倍にあたり、かなり過大に評価することがわかった。これは土壌試料が多種類のダイオキシン異性体を含んでいるため、アッセイ酵母が、TEF・毒性係数の低い異性体にも応答して、過大な評価につながったと考えている。しかし様々なダイオキシン異性体を含む試料を陽性と判定することはむしろ一次スクリーニング法としては望ましいとも考えられ、当初の目的通り機器分析の事前スクリーニングとして有用な方法であると結論する。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

現在ダイオキシン類の汚染は、ソックスレー抽出、硫酸クリーンナップ、多層シリカゲルカラムやアルミナカラムによるクロマトグラフィーを経てGC/MSで定量する公定法で調べられている。専用施設・機器を備えた検査機関への委託分析が主流であり、費用は高額で、分析結果の受領までには相応の日数を要する。

従って、本研究開発による酵母の高感度化は、簡便な前処理方と合わせて高校理科室程度の施設を持つ事業所で安価に簡便に迅速に、土壌のダイオキシン汚染の有無の判定に貢献する。企業は本研究で開発するキットを汚染の一次スクリーニングに用い、陽性判定される土壌試料だけを公定法による分析にまわせばよい。そうすることで、これまで負担していたコストと時間を大幅に削減できる。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

平成24年度環境研究総合推進費募集要項が述べているように、今後ますます土壌汚染対策法、ダイオキシン類特別措置法に基づく汚染調査が増大する。安全確実な土壌汚染対策と健康リスク低減のため、低コストの土壌汚染調査法の開発が求められている。

現在、土壌のダイオキシン類汚染は、HRGC/HRMSを用いた公定法、ELISAや動物細胞株を使用した生物検定による簡易法で調べられている。これらはいずれも専用の施設・分析機器を備えた検査機関(公的機関・民間の分析サービス会社)が実施している。また、試料の前処理には長時間のソックスレー抽出や、硫酸によるクリーンナップ、多層シリカゲルカラムやアルミナカラムによるクロマトグラフィーが必要である。委託費用は高額で、分析結果の受領までには相応の日数を要する。

高校理科室程度の施設を持つ事業所で安価に簡便に迅速に、土壌のダイオキシン汚染の有無を判定できる本課題は特に中小企業にとって福音となる。このバイオアッセイキットは、まさにこの行政ニーズを満たす解決策の決定打である。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

特に記載すべき事項はない

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) ミネラルコルチコイド受容体(MR)発現酵母の高感度化, 原島小夜子, 川西優喜, 八木孝司, 変異機構研究会・第25回夏の学校, 2012年6月30-7月1日, 小牧市
- 2) 男性ホルモン受容体(AR)・黄体ホルモン受容体(PR)の発現酵母の高感度化と有用性の評価, 又野真実, 原島小夜子, 川西優喜, 八木孝司, 変異機構研究会・第25回夏の学校, 2012年6月30-7月1日, 小牧市

- 3) レチノイン酸受容体・レチノイドX受容体発現レポーターアッセイ酵母株の樹立, 芳川智哉, 椎崎一宏, 川西優喜, 八木孝司, 変異機構研究会・第25回夏の学校, 2012年6月30-7月1日, 小牧市
- 4) アフリカツメガエルの甲状腺ホルモン受容体 (TR) α レポーターアッセイ酵母株の樹立, 松井聡子, 原島小夜子, 川西優喜, 八木孝司, 変異機構研究会・第25回夏の学校, 2012年6月30-7月1日, 小牧市
- 5) 酵母レポータージーンアッセイを用いた有機フッ素化合物の核内受容体リガンド活性の評価, 吉田仁, 永吉晴奈, 川西優喜, 原島小夜子, 椎崎一宏, 八木孝司, 松田知成, 高木総吉, 安達史恵, 柿本健作, 山口貴弘, 小西良昌, 第21回環境化学討論会, 松山, 2012年7月
- 6) 酵母レポータージーンアッセイを用いた紫外線吸収剤の核内受容体リガンド活性の評価, 永吉晴奈, 吉田仁, 川西優喜, 原島小夜子, 椎崎一宏, 八木孝司, 松田知成, 高木総吉, 安達史恵, 柿本健作, 山口貴弘, 小西良昌, 第21回環境化学討論会, 松山, 2012年7月
- 7) Detection of environmental pollutants as human receptor agonists in estuarine sediments of Taiwan using various reporter gene assays, Chien-Hsiun Chen, Ton-Cun Liu, Masanobu Kawanishi, Pei-Hsin Chou, SETAC Asia Pacific 2012 Meeting, Kumamoto, Japan, 2012年9月
- 8) Evaluation of estrogenic, androgenic, and antiandrogenic activities in Taiwanese rivers using yeast bioassays and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Tsung-Ya Tsai, Yi-Lin Lia, Masanobu Kawanishi, Pei-Hsin Chou, SETAC Asia Pacific 2012 Meeting, Kumamoto, Japan, 2012年9月
- 9) 性ホルモン受容体発現酵母の高感度化と環境試料のリガンド活性評価, 又野真実, 原島小夜子, 川西優喜, 八木孝司, 第18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, 2012年9月23日-24日, 熊本市
- 10) アフリカツメガエルの甲状腺ホルモン受容体レポーターアッセイ酵母株樹立と有用性評価, 松井聡子, 原島小夜子, 川西優喜, 八木孝司, 第18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, 2012年9月23日-24日, 熊本市
- 11) レポーターアッセイ用ミネラルコルチコイド受容体 (MR) 発現酵母の改良と有用性評価, 原島小夜子, 柿内康司, 川西優喜, 八木孝司, 第18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, 2012年9月23日-24日, 熊本市
- 12) ヒト副腎皮質ホルモン受容体発現酵母によるレポーターアッセイの改良と有用性評価, 原島小夜子, 柿内康司, 川西優喜, 八木孝司, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡, 2012年11月
- 13) アフリカツメガエル甲状腺ホルモン受容体発現レポーターアッセイ酵母株樹立と有用性評価, 松井聡子, 原島小夜子, 川西優喜, 八木孝司, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡, 2012年11月
- 14) ヒト性ホルモン受容体 (ER α/β , PR, AR) 発現酵母の高感度化と有用性の評価, 又野真実, 原島小夜子, 川西優喜, 八木孝司, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡, 2012年11月
- 15) レチノイン酸受容体・レチノイドX受容体発現酵母の樹立と内分泌攪乱物質および河川水のアッセイ, 芳川智哉, 椎崎一宏, 川西優喜, 八木孝司, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡, 2012年11月
- 16) 酵母レポーターアッセイによる府大池の水と底泥の内分泌かく乱活性の検出, 松浦麻衣, 又野真実, 原島小夜子, 川西優喜, 中谷直樹, 八木孝司, 大阪府立大学第8回キャンパスビオトープ研究会, 2013年4月23日, 堺市
- 17) キイロシヨウジョウバエのエクジソン受容体のリガンドを検出するレポーターアッセイ酵母株の樹立, 松浦麻衣, 原島小夜子, 川西優喜, 中川好秋, 八木孝司, 変異機構研究会・第26回夏の学校, 2013年6月22-23日, 尾張一宮市
- 18) 昆虫の脱皮ホルモン受容体リガンドを検出するレポーターアッセイ酵母の樹立, 松浦麻衣, 原島小夜子, 川西優喜, 中川好秋, 八木孝司, 日本農芸化学会関西支部例会第80回講演会, 2013年7月6日, 堺市
- 19) 昆虫脱皮ホルモン受容体発現レポーターアッセイ酵母株の樹立と有用性評価, 松浦麻衣, 原島小夜子, 川西優喜, 中川好秋, 八木孝司, 第19回日本環境毒性学会研究発表会, 2013年9月7-8日, 東京
- 20) カエルの甲状腺ホルモン受容体発現レポーターアッセイ酵母によるリガンド活性物質の検出, 松井聡子, 原島小夜子, 川西優喜, 八木孝司, 第19回日本環境毒性学会研究発表会, 2013年9月7-8日, 東京
- 21) 高感度化レポーターアッセイ酵母を用いたステロイドホルモン受容体リガンド検出システムの有用性評価～各種人工合成化学物質のステロイドホルモン様活性の検出～, 原島小夜子, 又野真実, 柿内康司, 川西優喜, 八木孝司, 第19回日本環境毒性学会研究発表会, 2013年9月7-8日, 東京

- 22) キイロシヨウジョウバエのエクジソン受容体リガンド活性を検出するレポーターアッセイ酵母株の樹立と有用性評価, 松浦麻衣, 原島小夜子, 川西優喜, 中川好秋, 八木 孝司, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013年12月
- 23) カエルの甲状腺ホルモン受容体発現レポーターアッセイ酵母株樹立と有用性評価, 松井聡子, 原島小夜子, 川西優喜, 八木孝司, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013年12月
- 24) 酵母レポーターアッセイ法に基づくステロイドホルモン受容体リガンド検出システムの確立・改良と有用性評価, 原島小夜子, 又野真実, 柿内康司, 川西優喜, 八木孝司, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013年12月

7. 研究者略歴

課題代表者: 川西 優喜

京都大学工学部卒業、博士(工学)、現在、大阪府立大学大学院理学系研究科准教授

研究分担者

なし

5RFc-1201 簡単な試料前処理のみで実施できるダイオキシン土壤汚染バイオアッセイキットの開発

(1) 簡単な試料前処理のみで実施できるダイオキシン土壤汚染バイオアッセイキットの開発

大阪府立大学

大学院理学系研究科 分子細胞遺伝学研究室
研究協力者

川西優喜

原島小夜子、森健太郎

平成24～25年度累計予算額：11,202千円

(うち、平成25年度予算額：5,457千円)

予算額は、間接経費を含む。

特許出願および論文公開の関係上、本文および図について一部情報を伏せて執筆しました。

[要旨]

低コスト・省時間の分析法として、ダイオキシン汚染を、簡単な試料前処理のみで1日で結果判定できる簡便・迅速・低コストのスクリーニングキットを開発した。ダイオキシン受容体AhRを発現するレポーターアッセイ酵母の高感度化および改変プロトコルを用いたアッセイ短時間化を行い、簡易カラムによる前処理と組み合わせることで、迅速・簡便なダイオキシン類検出系を開発した。

野生型アッセイ酵母株に比べ、タンパク質A遺伝子1, 2、タンパク質B遺伝子5, 10を単一、二重、三重に破壊した遺伝子破壊型アッセイ酵母ではリガンドの与える最大活性は2.1～12.6倍に上昇、検出限界濃度は～1/100に向上した。遺伝子破壊型酵母株の中で特に高感度化の見られた2株 YSA172 (タンパク質A1Δ タンパク質B5Δ), YSA222 (タンパク質A1Δ タンパク質A2Δ タンパク質B5Δ)をプロトプラストにし、アッセイプロトコルを改変することで、リガンドの検出限界濃度は1/100に向上した。またアッセイプロトコル改変によりアッセイ時間を40時間から25時間に短縮した。

さらに本アッセイ酵母と、簡易ヘキササン抽出、市販の使い捨てカラムを用いた簡易精製を組み合わせることで、土壤中のダイオキシン類を検出できた。0.061 [ng/g土壤]のTriCDDを検出でき、環境基準1,000 [pg/g土壤]以上のダイオキシン類を検出するには0.061gの土壤で十分であることがわかった。複数のダイオキシン類を含む土壤を用いた場合、毒性当量は過大に評価した。疑陽性率が高いと予想されるものの、土壤汚染の1次スクリーニングの優れたツールとして利用できる。

[キーワード]

ダイオキシン、バイオアッセイ、酵母、土壤汚染

1. はじめに

現在ダイオキシン類を定量するには、公定法では高分解能ガスクロマトグラフ/質量分析計(HRGC/HRMS)を用いた機器分析法、準公定法として抗体法(ELISA)や動物細胞株を使用した生物検定がある。しかしこれらはいずれも土壌からのダイオキシン類の抽出・精製といった試料前処理過程に約10日を要し、分析終了までに2週間程度必要である。また分析には専門の施設・設備を要し、特にHRGC/HRMSは極めて高額のため分析コスト削減のネックである(図(1)-1)。土壌汚染対策法の改正など今般の社会情勢は、今後ますます土壌汚染の調査・対策件数の増大を予想させる。

しかしその調査・対策は高額な費用と多くの時間が必要になることが多く、企業にとって無視できない負担である。従って本提案の社会的・経済的意義は大きい。またこの高負担が合理的な土壌汚染リスク管理の大きな制約となっている。そこで本提案の低コストなダイオキシン汚染土壌検出法は、安全・確実な土壌汚染対策に貢献する。これにより土壌汚染による健康リスクを低減できる。



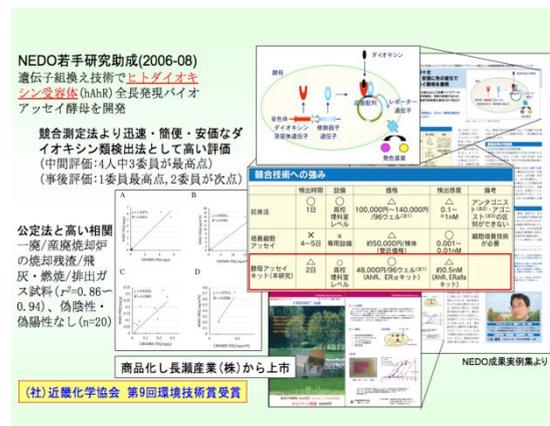
図(1)-1 研究の背景と概要

2. 研究開発目的

そこで本提案では低コスト・省時間の分析法として、ダイオキシン汚染を、簡単な試料前処理のみで1日で結果判定できる簡便・迅速・低コストのスクリーニングキットを開発する。

提案者らはすでにダイオキシン受容体ジーンバッテリーを利用したダイオキシン類を検出するレポーター酵母を開発、バイオアッセイキットとして上市(96回分析用、4万8千円)している(図(1)-2)。本提案では、まず新規に簡便な試料前処理法を開発する。この前処理の簡易化に伴い、抽出度の低下および妨害物質の混入が予想される。これを補償するため酵母の高感度化、すなわち細胞壁破壊(プロトプラスチ化)、細胞膜・壁遺伝子破壊による改変を行う。様々な土壌試料を測定し、ダイオキシン検出1次スクリーニング系として十分な性能を持つか確認する。最後に試料前処理とバイオアッセイを同梱したキットを試作する。

本提案の開発要素の一つは、酵母のプロトプラスチ化・細胞膜・壁遺伝子改変による高感度化である。この改良はダイオキシン検出酵母の他、提案者らがすでに作出している多くの微量汚染物質検出のバイオアッセイ酵母にも施すことができ、科学的・技術的に発展性に富む要素である。



図(1)-2 先行研究で開発したバイオアッセイ酵母

3. 研究開発方法

(1) 遺伝子破壊株の作製

【使用した試薬・培地、実験機器】

試薬類は特に断りがない限り全て研究用、特級を用いた。

Glucose Medium (total volume 1L)

Dropout powder* 1.3 g

Glucose (ナカライテスク株式会社、京都) 20 g

Yeast Nitrogen Base w/o Amino acid and Ammonium Sulfate (Difco, USA) 1.7 g

(NH₄)₂SO₄ (シグマアルドリッチジャパン株式会社、東京) 5.0 g

5M NaOH (ナカライテスク株式会社、京都) 500 μl

D₂O 900 ml

*Dropout powder (標記のない試薬は全てナカライテスク株式会社製)

Adenine (hemisulfate salt) 2.5 g

L-Arginine (HCl) 1.2 g

L-Aspartic acid 6.0 g

L-Glutamic acid (monosodium salt) 6.0 g

L-Histidine 1.2 g

L-Lysine (mono-HCl) 1.8 g

L-Methionine 1.2 g

L-Phenylalanine 3.0 g

L-Serine 22.5 g

L-Threonine 12.0 g

L-Tyrosine 1.8 g

L-Valine 9.0 g

L-Tryptophan (シグマアルドリッチジャパン株式会社、東京) 1.2 g

L-Leucine 3.6 g

Uracil (シグマアルドリッチジャパン株式会社、東京) 1.2 g

必要に応じてL-Tryptophan, L-Leucine, Uracil, L-Phenylalanine, L-Tyrosineを取り除いたものを用いた。Medium類は糖類のみ別に調製し、オートクレーブによる滅菌後、混和した。また、糖類とは別に調製したMedium類をComplete Mediumとした。

作製した選択培地

野生株酵母用

2% Glucose Medium (total volume 1 L)

Complete Medium (Trp-, Ura-) 900 ml

20% Glucose (ナカライテスク株式会社、京都) 100 ml

2% Galactose Medium (total volume 1 L)

Complete Medium (Trp-, Ura-) 900 ml

20% Galactose (ナカライテスク株式会社、京都) 100 ml

遺伝子破壊株酵母用

2% Glucose Medium (total volume 1 L)

Complete Medium (Trp-, Ura-, Phe-, Tyr-) 900 ml

20% Glucose (ナカライテスク株式会社、京都) 100 ml

2% Galactose Medium (total volume 1 L)

Complete Medium (Trp-, Ura-, Phe-, Tyr-) 900 ml

20% Galactose (ナカライテスク株式会社、京都) 100 ml

上記のMediumはすべて糖類のみ別に調整し、オートクレーブにより滅菌後、混和した。

寒天培地

上述のGlucose Mediumに2 % (w/v)になるようAgar (ナカライテスク株式会社、京都)を添加した。

発色基質 (total volume 10ml)

標記のない試薬は全てシグマアルドリッチジャパン株式会社製

Z-Buffer 9 ml**

0.2 M Dithiothreitol (DTT; ナカライテスク株式会社、京都) 100 μ l

20 mg/ml *o*-nitrophenol- β -D-galactopyranoside (ONPG) 500 μ l

10% N-lauroylsarcosine sodium salt 400 μ l

**Z-Buffer (total volume 180 ml)

NaPi Buffer (pH=7.5)*** 40 ml

1 M KCl 2 ml

1 M MgSO₄ 200 μ l

***NaPi Buffer (pH=7.5)

1M Na₂HPO₄·12H₂O

1M NaH₂PO₄·2H₂O

リガンドは β -Naphthoflavone (β -NF; ナカライテスク株式会社、京都)を用いた。

リガンドはDimethyl sulfoxide (DMSO; シグマアルドリッチジャパン株式会社、東京)に溶解した。

Microplate Reader (Model 680; Bio-Rad Laboratories, Inc. USA)

用いたAhR発現酵母

タンパク質A1, タンパク質A2, タンパク質B5, タンパク質B10遺伝子の単一、二重、三重破壊株酵母あるいは野生株酵母 (W303a)を宿主として、AhR-Arnt発現プラスミド (図(1)-3)およびレポータープラスミド (図(1)-4)を酢酸リチウム法にて導入したものをAhR発現酵母とした。AhR発現酵母作製の概略は図(1)-5に示す。また、宿主に用いた遺伝子破壊株酵母の詳細を表(1)-1に示す。レポータープラスミドはC.A. Miller III博士に分与いただいた。

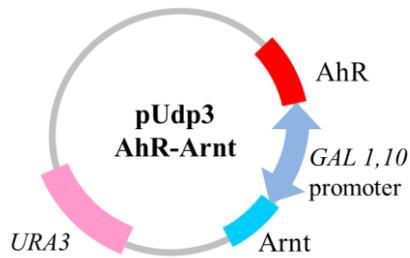


図 (1)-3 AhR-Arnt発現プラスミド

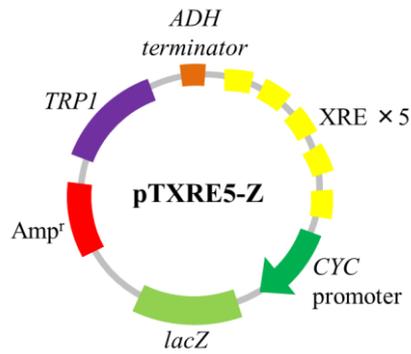


図 (1)-4 レポータープラスミドpTXRE5-Z

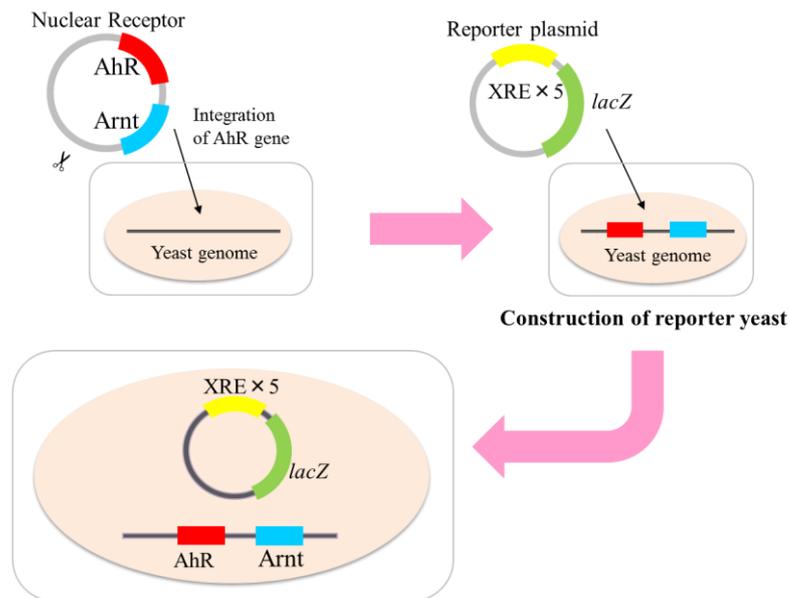


図 (1)-5 AhR-Arnt発現酵母作製の概略図

表 (1)-1 遺伝子破壊株酵母一覧

strain	mutants
YSA162	タンパク質A1Δ
YSA164	タンパク質A2Δ
YSA167	タンパク質B5Δ
YSA347	タンパク質B10Δ
YSA172	タンパク質A1Δ タンパク質B5Δ
YSA195	タンパク質A2Δ タンパク質B5Δ
YSA355	タンパク質A1Δ タンパク質B10Δ
YSA205	タンパク質A1Δ タンパク質A2Δ
YSA354	タンパク質B5Δ タンパク質B10Δ
YSA222	タンパク質A1Δ タンパク質A2Δ タンパク質B5Δ
YSA358	タンパク質A1Δ タンパク質B5Δ タンパク質B10Δ

酵母レポーターアッセイ

グリセロールストックされた、野生株AhR発現酵母を2% Glucose 寒天培地 (Trp-, Ura-)に、遺

伝子破壊株AhR発現酵母を2% Glucose寒天培地 (Trp-, Ura-, Phe-, Tyr-)に線画培養し、30°Cで48時間培養した。プレート上に現れたコロニーのうち良く増殖したものを選択し、野生株AhR発現酵母は2% Glucose Medium (Trp-, Ura-)に、遺伝子破壊株AhR発現酵母は2% Glucose Medium (Trp-, Ura-, Phe-, Tyr-)に植菌し、30°Cで18時間振盪培養した。培養後、1.8% Galactoseと0.2% Glucoseを含む液体培地に、 $OD_{595}=0.1$ になるよう菌液を加えた。

被験剤あるいはリガンドは、DMSOを用いて希釈系列を作製し、96穴プレートの各ウェルに1 μ lずつ加えた。またDMSOのみを入れたウェルも同プレート内に作製し、陰性対照ウェルとした。

上述のGlucose : Galactose = 1 : 9培地に懸濁した酵母を、リガンドを入れた各ウェルに100 μ lずつ加えた。その後、30°Cで22時間培養した。

菌体を十分に攪拌し、各ウェルから酵母リガンド混合液を新たな96穴プレートに10 μ lずつ分注した。そこに発色基質 100 μ lを加えて37°Cでインキュベートし、一定時間後に各ウェルの OD_{405} および OD_{595} をMicroplate Readerにより測定した。測定した各ウェルの吸光度から、 β -galactosidase活性の増加量を以下の式を用いて計算した。

$$\text{increase of induction (活性化量)} = \frac{OD_{405}(\text{ligand})}{OD_{595}(\text{ligand})} - \frac{OD_{405}(\text{DMSO})}{OD_{595}(\text{DMSO})}$$

ここで、 OD_{405} はリガンドにより誘導されたONPGの発色度つまり β -galactosidase活性量、 OD_{595} は酵母菌体数を反映する。この式に従い、 β -galactosidase活性の増加量を算出し、X軸をリガンド濃度、Y軸をincrease of induction (活性化量)としてグラフを作成した。

また、検出限界濃度は次の2通りの方法で求めた。まず実測上の検出限界として、実験で実際に測定したリガンド濃度のうちincrease of inductionが単調増加し始めた時の濃度を実測検出限界濃度とした。一方3 σ 法による検出限界濃度も算出した。3 σ 法では溶媒対照の β -galactosidase活性量の平均値に、その標準偏差の3倍の値を加算した活性量を計算した。そしてその活性量を与えるリガンド濃度を各アッセイの濃度-応答曲線から求め、3 σ 法による検出限界濃度とした。

(2) 遺伝子破壊株AhR発現酵母のプロトプラスト化とプロトコル改変

【使用した試薬・培地、実験機器】

試薬類は特に断りがない限り全て研究用、特級を用いた。

酵母細胞壁溶解酵素

Zymolyase[®]-20T (ナカライテスク株式会社、京都)

浸透圧調整剤

D-sorbitol (ナカライテスク株式会社、京都)

Sodium phosphate (NaPi) buffer (pH7.5)

Na-tartrate (シグマアルドリッチジャパン株式会社、東京)

用いた遺伝子破壊株AhR発現酵母

YSA172 (タンパク質A1A タンパク質B5A)

YSA222 (タンパク質A1A タンパク質A2A タンパク質B5A)

検査用生物顕微鏡 (BX41; オリンパス株式会社、東京)

紫外可視分光光度計 (UVmini-1240; 株式会社島津製作所、京都)

その他の用いた試薬・培地、実験機器は特に標記がない限り3-(1)節に準ずる。

細胞壁溶解酵素Zymolyaseによるプロトプラスト化株の作製

グリセロールストックされた、遺伝子破壊株AhR発現酵母YSA172 (タンパク質A1A タンパク質B5A)を2% Glucose寒天培地 (Trp-, Ura-, Phe-, Tyr-)に線画培養し、30°Cで48時間培養した。プレート上に現れたコロニーのうち増殖の良いものを選択し、2% Glucose Medium(Trp-, Ura-, Phe-, Tyr-)に植菌し、30°Cで18時間振盪培養した。培養後、4000rpmで10分間遠心して集菌した。

次に菌体を滅菌水4mlに懸濁した後、0.067M Sodium phosphate (NaPi) buffer (pH7.5) 5mlおよび0.1mg/ml Zymolyase 1mlを加え、ゆっくり振盪培養しながら、25°Cで2時間反応した。2500rpmで10分間遠心して集菌し、0.067M Sodium phosphate (NaPi) buffer (pH7.5) 3mlに懸濁した。一方で、0.1mg/ml Zymolyaseの代わりに滅菌水を加えた細胞壁非消化酵母も用意した。

これらプロトプラストおよび非プロトプラスト酵母を検査用生物顕微鏡で観察した。

Zymolyaseの至適濃度、至適消化時間

YSA172 (タンパク質A1A タンパク質B5A)およびYSA222 (タンパク質A1A タンパク質A2A タンパク質B5A)を、プロトプラスト化処理した。ここでは、浸透圧調整のため0.5Mになるよう D-sorbitolを加え、0.001 ~ 0.1 mg/mlの範囲でZymolyaseの濃度を変化させ、0~150分間処理した。

その後、各条件下の酵母を5倍希釈し、OD₈₀₀を紫外可視分光光度計により測定した。OD₈₀₀は細胞壁の溶解程度を反映し、完全溶解したときにはOD₈₀₀が60%減少することが知られている⁽¹⁾。

浸透圧の調整に最適な化合物

YSA172 (タンパク質A1A タンパク質B5A)およびYSA222 (タンパク質A1A タンパク質A2A タンパク質B5A)を、後述するリガンド曝露時間短縮によるAhR誘導量減少を補うため、1.0% Galactoseと1.0% Glucoseを含む液体培地で前培養した。次いで至適のZymolyase濃度、反応時間でプロトプラスト化処理した。このときの浸透圧の調整には、0.5M D-sorbitol、0.033M Sodium phosphate (NaPi) bufferまたは0.5M Na-tartrateを用いた⁽¹⁻³⁾。

各酵母プロトプラストを0.9% Galactose、0.1% Glucoseおよび先述の浸透圧調整剤を含む液体培地に、OD₅₉₅=1.0になるよう調整した。本手順ではリガンドの曝露時間が減少し酵母の増殖時間が短縮するため、これまでのアッセイ手順に比べ吸光度測定時の酵母数が減少する。この減少を補うためOD₅₉₅=1.0に調整した。その後、前節に準じリガンド (β-NF) に5時間曝露しアッセイを行った。曝露時間を5時間に短縮したのは、細胞壁再生による非プロトプラストの出現を防ぐためである。

最適浸透圧調整剤の至適濃度

浸透圧調整剤に0.25~1.25Mに変化させたD-sorbitolを用いて、YSA172 (タンパク質A1A タンパク質B5A)およびYSA222 (タンパク質A1A タンパク質A2A タンパク質B5A)を前節に準じプロトプラスト化処理した。D-sorbitolをそのままの濃度に保った培地を用いて前節に準じアッセイを行っ

た。

AhR発現誘導時間がレポーターアッセイに与える影響とプロトプラスト酵母の効果

前節に準じ、プレート上に現れたYSA172 (タンパク質A1A タンパク質B5A)およびYSA222 (タンパク質A1A タンパク質A2A タンパク質B5A)のコロニーのうち増殖の良いものを選択し、1.0%Galactose (Trp-, Ura-, Phe-, Tyr-)と1.0% Glucose (Trp-, Ura-, Phe-, Tyr-)を含む液体培地あるいは、2.0% Glucose (Trp-, Ura-, Phe-, Tyr-)のみを含む液体培地にそれぞれ植菌し、30°Cで18時間振盪培養した。次いで、前節に準じプロトプラストを作製した。その際、非プロトプラスト酵母も用意し、プロトプラスト酵母と比較できるようにした。その後、各酵母株を用いてアッセイを行った

(3) プロトプラスト化のアッセイに与える効果

【使用した試薬・培地、実験機器】

試薬類は特に断りがない限り全て研究用、特級を用いた。

リガンドはBenzo[*a*]pyrene (B[*a*]P; シグマアルドリッチジャパン株式会社、東京)、3-Methylcholanthrene (3-MC; シグマアルドリッチジャパン株式会社、東京)、2,3,7-Trichlorodibenzo-*p*-dioxin (TriCDD; Accu Standard, Inc. USA)、Indirubin (ID)⁽⁴⁾を用いた。リガンドはDMSOに溶解した。

その他の用いた試薬・培地、実験機器等は前節に準ずる。

前節で確立した改変プロトコルおよびプロトプラスト化の至適条件で以下の実験を行った。YSA172 (タンパク質A1A タンパク質B5A)とYSA222 (タンパク質A1A タンパク質A2A タンパク質B5A)およびそれらのプロトプラストを用意した。

(4) 土壌からのAhRリガンドの抽出と精製

【使用した試薬・培地、実験機器】

試薬類は特に断りがない限り全て研究用、特級を用いた。

スペルクリン10% AgNO₃/44%H₂SO₄ Multilayer silica gel column (シグマアルドリッチジャパン株式会社、東京)

スペルクリンCarboxen1000 Carbon reversible tube (シグマアルドリッチジャパン株式会社、東京)

10mlテルモシリンジ (テルモ株式会社、東京)

50mlテルモシリンジ (テルモ株式会社、東京)

ルアーフィッティング (ジョイント; アズワン株式会社、大阪)

Toluene (ナカライテスク株式会社、京都)

Hexan (シグマアルドリッチジャパン株式会社、東京)

赤玉土 (家庭園芸用土; コーナン商事株式会社、大阪)

その他の必要な試薬・培地、実験機器は前節に準ずる。

攪拌抽出

乳棒・乳鉢で粉々にしたそれぞれの赤玉土1gに、酵母アッセイにおいて最大活性値を示す濃度の各リガンド溶液100 μ lあるいは陰性対照としてDMSO 100 μ lを添加し、1時間風乾した。1gの土壌をHexan 5mlに懸濁し、10分間超音波処理した。その後3,000 rpmで10分間遠心して上清を回収した。

カラム抽出

Multilayer silica gel columnとCarbon reversible tube (C1000) をこの順で縦に連結し、Hexan 10mlでカラムを平衡化した。攪拌抽出で回収した上清をMultilayer silica gel columnの上面に注いだ後、さらに5ml/g土壌のHexanを注ぎ滴下した。Multilayer silica gel columnを取り外し、Carbon reversible tube (C1000)を反転し、50ml テルモシリンジをルアーフィッティングを用いて上部に連結した。シリンジにToluene 25mlを注ぎ、ダイオキシン類を溶出した。回収したTolueneをドラフト内で終夜50 $^{\circ}$ Cで乾固した。乾固後、DMSO 100 μ lに再溶解した。

アッセイ

2-2節で確立した改変プロトコルおよびプロトプラスト化の至適条件で以下の実験を行った。YSA172 (タンパク質A1A タンパク質B5A)とYSA222 (タンパク質A1A タンパク質A2A タンパク質B5A)およびそれらのプロトプラストを用意した。これらの株を用いて、土壌から抽出・精製したリガンドと、上記攪拌抽出にて土壌に添加した各種リガンドを用い、アッセイを行った。

ダイオキシン類TriCDDの回収率

ダイオキシン類TriCDDの回収率を算出するために、 10^{-12} ~ 10^{-5} M TriCDD、10 μ M TriCDDをスパイクした赤玉土から抽出精製したTriCDDを10倍希釈したもの、赤玉土から抽出精製したDMSOに対する応答性を同様に確認した。2-2節で確立した改変プロトコルおよびプロトプラスト化の至適条件で行い、YSA172 (タンパク質A1A タンパク質B5A)のプロトプラストを用いて、アッセイを行った。

それぞれのアッセイ結果を用いて、TriCDDの回収率を算出した。また、回収率からどれだけの質量のTriCDDが土壌中に存在すれば検出可能か、さらに環境基準1,000pg/g (1ng/g)以上を検出するにはどれだけの質量の土壌が必要か求めた。

(5) ダイオキシン標準土壌の抽出・精製

【使用した試薬・培地、実験機器】

試薬類は特に断りがない限り全て研究用、特級を用いた。

リガンドは2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD; Accu Standard, Inc. USA)を用いた。リガンドはDMSOに溶解した。

土壌認証標準物質 ダイオキシン類分析用 JSAC 0422 [高濃度]* (社団法人 日本分析化学会、東京)

*ダイオキシン類成分の含有率を認証した土壌標準物質であり、ダイオキシン類を含んだ森林土 (表層から5~10cmの深さの中層のものを採取)である。また、含水率は13%である。仕様書に記載のダイオキシン類の認証値 (成分含有率)を表(1)-2に示す。

表 (1)-2 土壤認証標準物質のダイオキシン類認証値 (成分含有率)

成分名	認証値±不確かさ (pg/g)	所間標準偏差SD (pg/g)	毒性等価係数TEF	毒性当量TEQ (pg/g)
2, 3, 7, 8-TeCDD	4.51±0.62	1.12	1	4.51±0.62
OCDD	1721±148	256	0.0003	0.516±0.044
2, 3, 7, 8-TeCDF	35.2±4.0	7.3	0.1	3.52±0.40
OCDF	221±23	41	0.0003	0.0663±0.0068
3, 4, 4', 5-TeCB	31.4±3.1	5.3	0.0003	9.43±0.92×10 ⁻³
計	-	17.4	-	111.4±9.6

その他の必要な試薬・培地、実験機器は前節に準ずる。

抽出・精製

リガンドやDMSOを土壤にスパイクするという点を除き、前節に準じてダイオキシン標準土壤1g, 5g, 10gを前処理した。

アッセイ

前節で確立した改変プロトコルおよびプロトプラスト化の至適条件で以下の実験を行った。YSA172 (タンパク質A1A タンパク質B5A)とYSA222 (タンパク質A1A タンパク質A2A タンパク質B5A)およびそれらのプロトプラストを用意した。その後、リガンドには先述の前処理によって抽出・精製した化学物質を用い、アッセイを行った。

ダイオキシン類の定量

ダイオキシン類標準土壤から抽出・精製したTCDDを定量するために、10⁻¹²~10⁻⁵M TriCDDおよび10⁻¹²~10⁻⁶M TCDDに対する応答性を同様に確認した。前節で確立した改変プロトコルおよびプロトプラスト化の至適条件で行い、YSA222 (タンパク質A1A タンパク質B5A)のプロトプラストを用いて、アッセイを行った。各土壤から抽出・精製した化学物質のアッセイプレート1ウェル当たりのTriCDD等価濃度を前節に準じ算出した。次いで、10⁻¹²~10⁻⁵M TriCDDおよび10⁻¹²~10⁻⁶M TCDDに対する応答性の結果を用いて、TriCDD等価濃度からTCDD等価濃度を算出した。

また、アッセイプレート1ウェル当たりのTCDD等価濃度から1サンプル当たり、すなわちDMSO溶液100μlに含まれるTCDDの質量を求め、次いでダイオキシン土壤試料1g当たりに含まれるTCDD質量(毒性当量値TEQ)を求めた。計算式は以下の通りである。

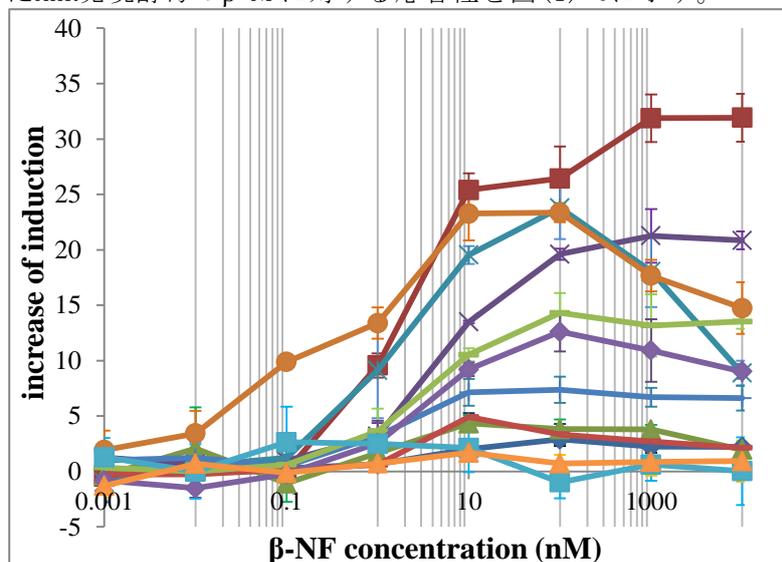
毒性当量TEQ (Pg/g)=

$$\frac{[1 \text{ サンプル当たりのTCDD等価濃度 (M)}] \times [1 \text{ サンプルのDMSO溶液量 (l)}] \times [\text{TCDDの分子量: } 322 \times 10^{12} \text{ (Pg/mol)}]}{[1 \text{ サンプル当たりの土壤試料量 (g)}]}$$

4. 結果及び考察

(1) 遺伝子破壊株の作製と性能

遺伝子を破壊したAhR発現酵母の β -NFに対する応答性を図(1)-6に示す。



図(1)-6 さまざまな遺伝子破壊AhR発現酵母の β -NFに対する応答

YSA205 (タンパク質A1A タンパク質A2A), YSA354 (タンパク質B5A タンパク質B10A)を除く全てのAhR発現酵母で β -NF濃度依存的な活性が確認できた。 β -NFに対する応答の定量的評価を表(1)-3に示す。

野生型酵母株に比べ遺伝子破壊型酵母株では活性化量が高く、2.1~12.6倍上昇した。また、遺伝子破壊により検出限界濃度は $\sim 1/100$ に、 EC_{50} も約 $1/3$ に向上した。

野生型酵母と比べ、細胞壁タンパク質遺伝子タンパク質A1, タンパク質A2および細胞膜タンパク質遺伝子タンパク質B5, タンパク質B10の単一、二重、三重破壊型酵母を宿主に用いることで、AhR発現酵母株の β -NFに対する応答性が上がり、かつ高感度化したと考えられる。他の核内受容体ER α/β (Estrogen receptor α/β), PXR (Pregnane X receptor), TR α/β (Thyroid hormone receptor α/β)等でも同様の結果が得られており^(5,6)、遺伝子破壊株作製は有用であると考えられる。また、遺伝子破壊型酵母株の中でも特にYSA172 (タンパク質A1A タンパク質B5A), YSA222 (タンパク質A1A タンパク質A2A タンパク質B5A)は野生型酵母株に対する β -NFの相対活性値が高く、検出限界濃度、 EC_{50} も低いいため、アッセイ酵母に最適であると考えられる。

YSA205 (タンパク質A1A タンパク質A2A), YSA354 (タンパク質B5A タンパク質B10A)については、 β -NFの相対活性値が低く、検出限界濃度、 EC_{50} も算出できなかった。共通しているのは、同種の遺伝子を二重に破壊していることであるため、それが何等かの原因となっていると考えられる。また、YSA162 (タンパク質A1A)とYSA164 (タンパク質A2A)、YSA167 (タンパク質B5A)とYSA347 (タンパク質B10A)をそれぞれ比較するとYSA162 (タンパク質A1A)、YSA167 (タンパク質B5A)の方が、 β -NFの相対活性値が高く、検出限界濃度、 EC_{50} も低いことから、細胞壁ではタンパク質A1, 細胞膜ではタンパク質B5が主要な役割を果たしていると考えられる。それは、同様にYSA172 (タンパク質A1A タンパク質B5A)とYSA195 (タンパク質A2A タンパク質B5A), YSA355 (タンパク質A1A タンパク質B10A)それぞれの比較からも推察できる。

表 (1)-3 各AhR発現酵母株の β -NFに対する応答指標

酵母株	β -NFに対する応答				EC ₅₀ (nM)
	野生株に対する 相対活性比 (β -NF濃度: 10nM)	検出限界 濃度 (nM)			
		実測	3 σ 法		
W303a (Wt)	1.0	10	0.66	3.8	
YSA172 (タンパク質A1A タン パク質B5A)	12.6	1.0	0.14	1.6	
YSA195 (タンパク質A2A タン パク質B5A)	2.1	1.0	4.8	1.2	
YSA355 (タンパク質A1A タン パク質B10A)	6.7	10	0.30	3.5	
YSA358 (タンパク質A1A タンパク質 B5A タンパク質B10A)	9.7	100	0.16	1.2	
YSA222 (タンパク質A1A タンパク質 A2A タンパク質B5A)	11.5	0.1	0.0061	3.2	
YSA162 (タンパク質A1A)	3.5	1.0	0.19	1.2	
YSA164 (タンパク質A2A)	2.4	1.0	0.52	2.7	
YSA167 (タンパク質B5A)	5.2	1.0	0.17	1.7	
YSA347 (タンパク質B10A)	4.6	1.0	0.42	2.0	
YSA205 (タンパク質A1A タン パク質A2A)	1.1	N. D.	N. D.	N. D.	
YSA354 (タンパク質B5A タン パク質B10A)	0.8	N. D.	N. D.	N. D.	

N. D. は「検出せず」 (Not Detected)を意味し、溶媒対照と差がなかったことを示している。

しかし、この遺伝子破壊株を宿主としたアッセイ酵母の中には溶媒対照でも活性が高いものがあつた (データには示さない)。溶媒対照にも関わらず、活性が見られるのは内在性リガンドが関係していると考えられる。

ヒト体内にはTryptophanからNiacin (ビタミンB3)を生合成するKynurenine経路がある。その経路には中間代謝物としてKyn (Kynurenine)があり、KA (Kynurenic acid)へと代謝される。このKynとKAがAhRへの結合能を示すという報告がある^(7,8)。この代謝経路が酵母内でも存在し、そのために溶媒対照でも活性が見られるのではないかと考えられる。しかし、本研究に用いた遺伝子破壊株酵母用生育培地はTrp-, Ura-, Phe-, Tyr-であり、Tryptophanを含んでいないが、酵母のTryptophan合成能により生産されたと考えられる⁽⁹⁾。

また、Tryptophan自体も芳香族であるので、報告はないが、AhRへの活性能が多少あるのかも知れない。実際、Tryptophanを含む他の芳香族、phenylalanine, tyrosineを生育培地に加えると活性が高くなった (データには示さない)。

(2) 遺伝子破壊酵母株のプロトプラスト作製

検査用生物顕微鏡を用いたプロトプラスト観察結果を図(1)-7に示す。



図(1)-7 プロトプラスト化処理前の酵母（左）と処理後の酵母（右）

プロトプラスト化処理前には出芽中の酵母が多く見られたが、処理後にはあまり見られなかった。また、処理前の酵母は長径約 $5\mu\text{m}$ 楕円形でどの細胞もほぼ同じ大きさであったのに対し、処理後の酵母は真円形をしており、大きさも直径が約 $5\sim 7.5\mu\text{m}$ と様々であった。これら特徴を表(1)-4にまとめた。

表 (1)-4プロトプラスト化処理前後の酵母の特徴

酵母株	出芽中	形状	大きさ
非プロトプラスト酵母	多い	楕円形	一様 ($5\mu\text{m}$)
プロトプラスト酵母	少ない	真円形	多様 ($5\sim 7.5\mu\text{m}$)

Zymolyase消化時間を120分に固定し、Zymolyase濃度を $0\sim 0.1$ (mg/ml)と変化させた時の細胞壁消化度を OD_{800} で評価した結果を図(1)-8に示す。

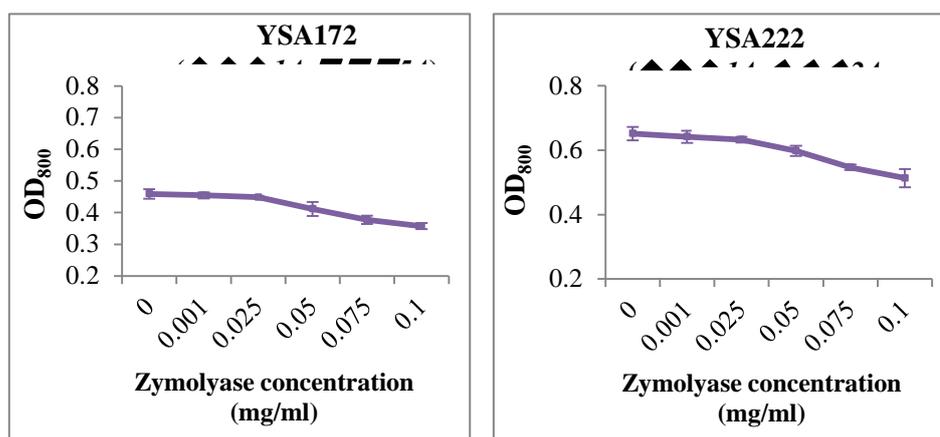
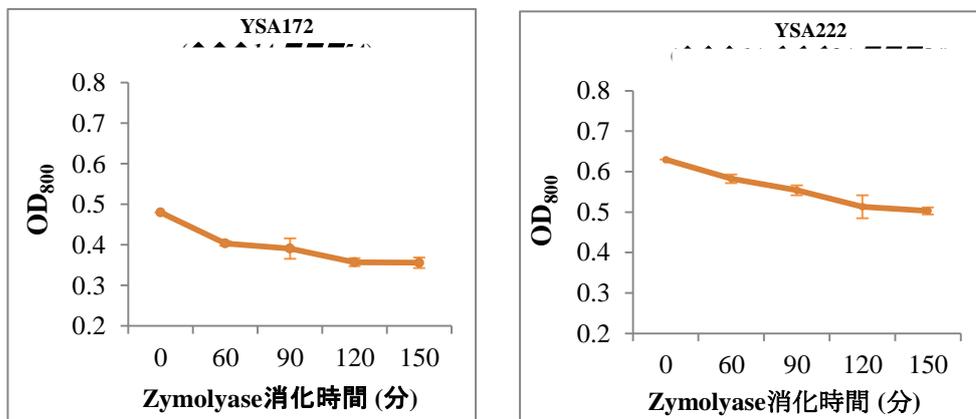


図 (1)-8 Zymolyaseの至適濃度

酵母株の種類に関わらず、 $0\sim 0.025$ mg/mlでは OD_{800} に変化はあまり見られなかったが、 $0.025\sim 0.1$ mg/mlではZymolyase濃度依存的に低下した。

Zymolyase濃度を 0.1mg/ml に固定し、Zymolyase消化時間を $0\sim 150$ 分で変化させた時の結果を図

(1)-9に示す。

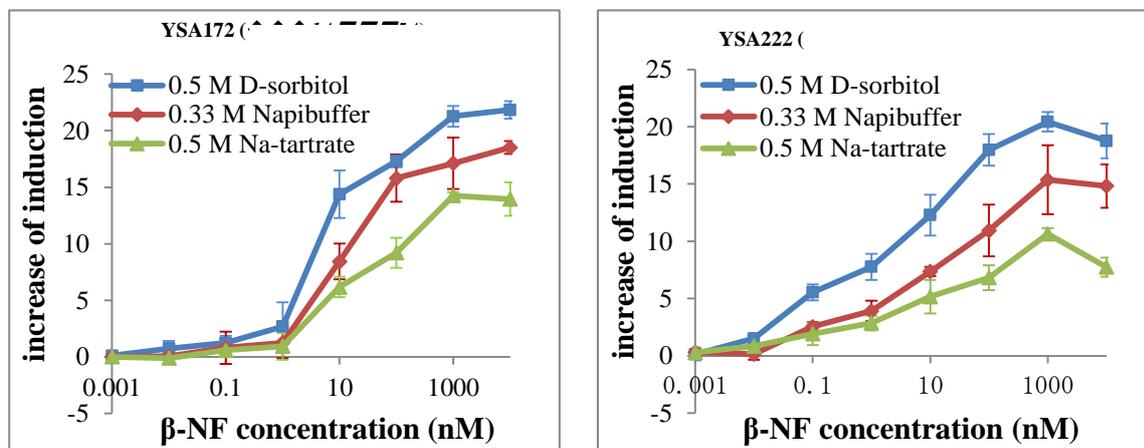


図(1)-9 Zymolyaseの至適反応時間

酵母株の種類に関わらず、0～120分ではOD₈₀₀はZymolyase消化時間依存的に低下していたが、その後30分では変化がなかった。

Zymolyase[®]-20Tのプロトコルに従い、Zymolyase濃度0～0.1 mg/ml、消化時間0～150分で条件検討した結果、Zymolyase濃度は0.1 mg/ml、消化時間は120分が最適となった。

浸透圧調整に最適な化合物検討のためのレポーターアッセイの結果を図(1)-10に示す。



図(1)-10 至適浸透圧調整剤

どちらの酵母株も浸透圧調整剤の種類に関わらず、β-NF濃度依存的な活性が確認できた。

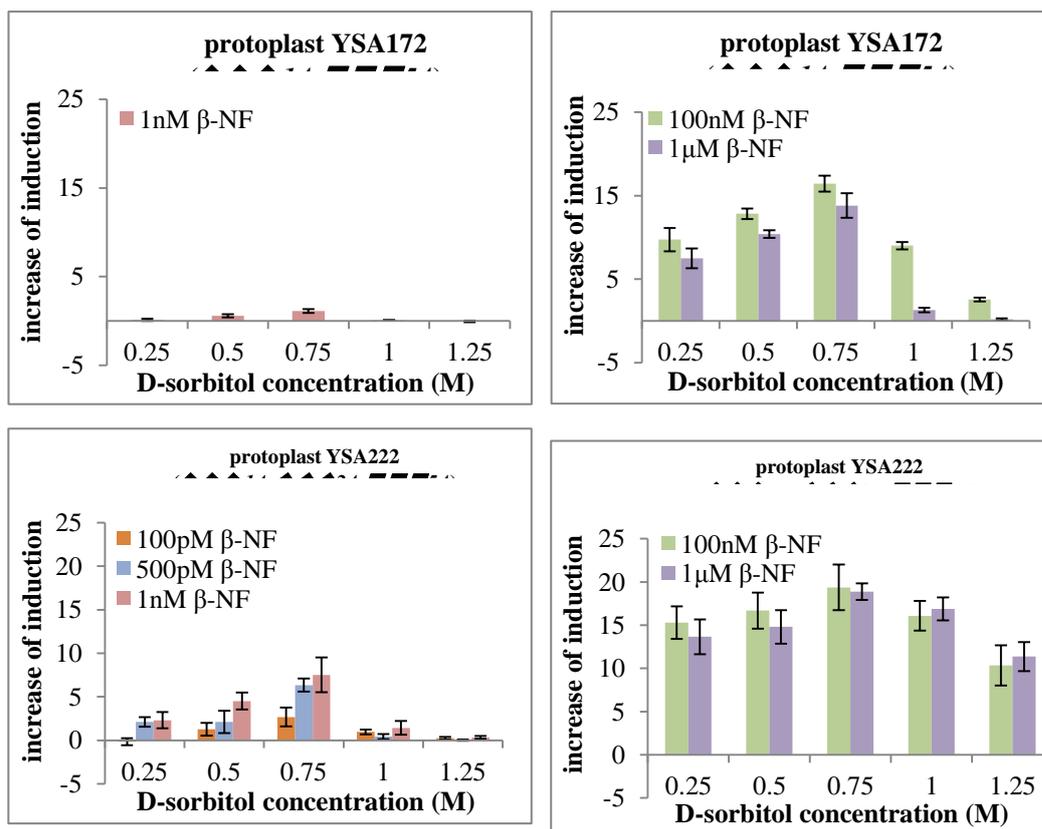
これらの図から算出したβ-NFに対する応答指標を表(1)-5に示す。浸透圧調整にD-sorbitolを用いたとき、どの酵母株でも活性値が高かった。次いでNapi buffer、Na-tartrateの順に高かった。またD-sorbitolを用いたときに、他の調整剤を用いたときに比べ検出限界濃度とEC₅₀が1/2～1/10となり、アッセイ酵母株として最も良い性能を示した。

以上より、浸透圧調整に最適な化合物はD-sorbitolとした。

表 (1)-5 様々な浸透圧調整剤を用いたときのプロトプラスト酵母の応答指標

酵母株と 浸透圧調整剤	β-NFに対する応答性				
	1000nM β-NF における活性 値	検出限界濃度 (nM)		EC ₅₀ (nM)	
		実測上	3σ法		
YSA172 (タンパク質A1A タ ンパク質B5A)	D-sorbitol	21.3	1	1.3	2.4
	NaPi buffer	17.1	10	1.9	8.4
	Na-tartrate	14.3	10	2.5	20.7
YSA222 (タンパク質A1A タ ンパク質A2A タンパ ク質B5A)	D-sorbitol	20.4	0.01	0.75	1.9
	NaPi buffer	15.4	0.1	2.2	12.3
	Na-tartrate	10.6	0.1	2.0	12.4

浸透圧調整剤D-sorbitolの濃度を0.25~1.25 Mに変化させた培地でプロトプラスト化処理とレポーターアッセイを行った結果を図(1)-11に示す。なお、この実験時には酵母が最大活性を示す濃度周辺と検出限界周辺の濃度のβ-NFを用いた。

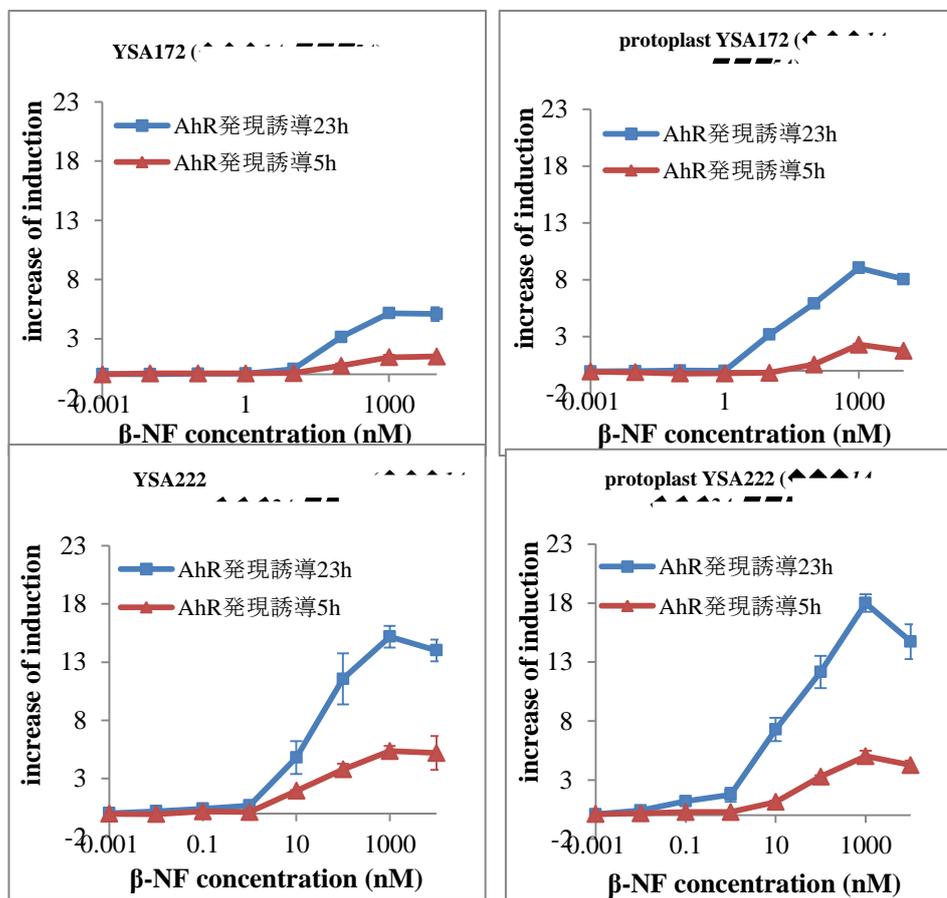


図(1)-11 D-sorbitolの至適濃度検討

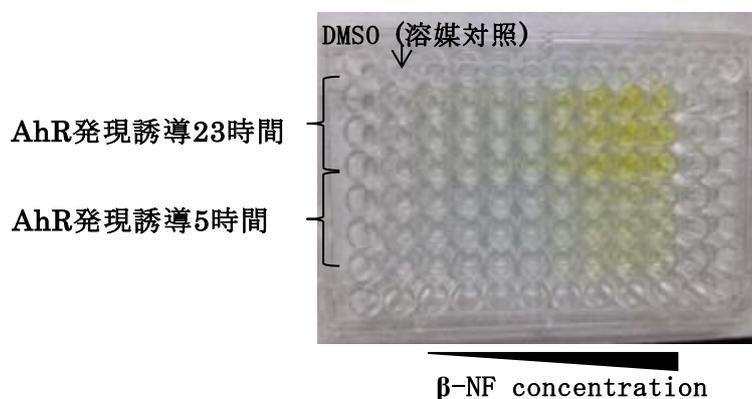
どちらの酵母株も全てのβ-NF濃度において、0.25~0.75 MのD-sorbitolを浸透圧調整剤に用いた時にD-sorbitol濃度依存的に活性値が高くなったが、0.75~1.25 Mでは逆に低くなった。以上

より、浸透圧調整には0.75 MのD-sorbitolが最適とした。

AhR発現誘導時間を変えた時、およびプロトプラスト化がレポーターアッセイにどう影響するか調べた結果を図(1)-12に示す。また、YSA172 (タンパク質A1A タンパク質B5A)株を用いたアッセイの様子を図(1)-13に示す。



図(1)-12 AhR発現誘導時間とAhR活性化量の関係、およびプロトプラスト化の効果



図(1)-13 YSA172 (タンパク質A1A タンパク質B5A) のアッセイプレート

どちらの酵母株もAhR発現誘導時間およびプロトプラスト・非プロトプラスト酵母に関わらず、 β -NF濃度依存的な活性が確認できた。また、どちらの酵母株もプロトプラスト・非プロトプラスト酵母に関わらず、AhR発現誘導23時間の方が、活性値が高かった。これらの結果は肉眼でも確認できた。AhR発現誘導23時間での β -NFに対する応答指標を表(1)-6にまとめた。

表 (1)-6 各酵母株およびそれらのプロトプラストの応答指標
(AhR発現誘導時間：23時間)

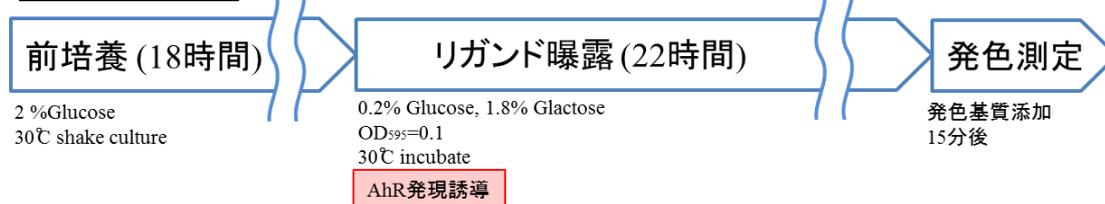
酵母株		β -NFに対する応答性			
		1 μ M β -NF における 活性値	検出限界 濃度 (nM)		EC ₅₀ (nM)
			実測上	3 σ 法	
YSA172 (タンパク質A1A タ ンパク質B5A)	非プロトプラスト	5.2	10	2.1	62
	プロトプラスト	9.1	10	1.1	31
YSA222 (タンパク質A1A タ ンパク質A2A タンパ ク質B5A)	非プロトプラスト	15.2	1	0.31	26
	プロトプラスト	18.0	0.1	0.017	23

非プロトプラストに比べプロトプラスト酵母では活性値が高くなった。また、検出限界濃度とEC₅₀が1/2~1/10に向上し、アッセイ酵母株としての性能が向上した。以上、遺伝子破壊株のAhR発現酵母プロトプラストに最も適した実験条件をまとめると、表(1)-7のようになった。また従来のプロトコルと今回考案した改変プロトコルを図(1)-14で比較した。

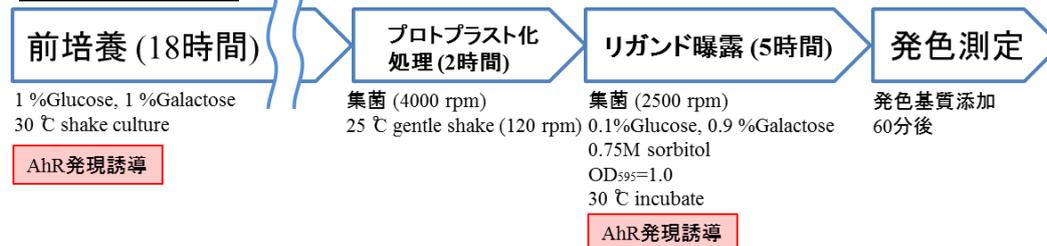
表 (1)-7 遺伝子破壊AhR発現酵母プロトプラストに最適な実験条件

項目	条件
Zymolyase至適濃度	0.1mg/ml
Zymolyase至適反応時間	120min
最適な浸透圧調整剤	D-sorbitol
浸透圧調整剤至適濃度	0.75M
GalactoseによるAhR発現誘導時間	23h

従来プロトコル



改変プロトコル



図(1)-14 従来プロトコルと改変プロトコルのスキーム

アッセイ酵母をプロトプラストにすると様々な変化が見られたが、これはZymolyaseにより β 1,3-glucanが溶解し、細胞壁が破碎された状態になることから始まると考えられる。それにより、形を保てずに真円形になり、増殖も困難となる。また、浸透圧が調整されていないと、細胞内に溶媒が流入して酵母は膨張し、その結果バーストすると考えられる。

Zymolyase濃度が0~0.025 (mg/ml)では変化が見られなかったが、これはZymolyase濃度が低く、反応を示せる濃度に達していなかったためであると考えられる。また、Zymolyase消化時間120~150分の間であまり変化が見られなくなったのは、プロトプラスト形成が可能な酵母の減少によりプロトプラスト形成が進みにくくなったからであると考えられる。

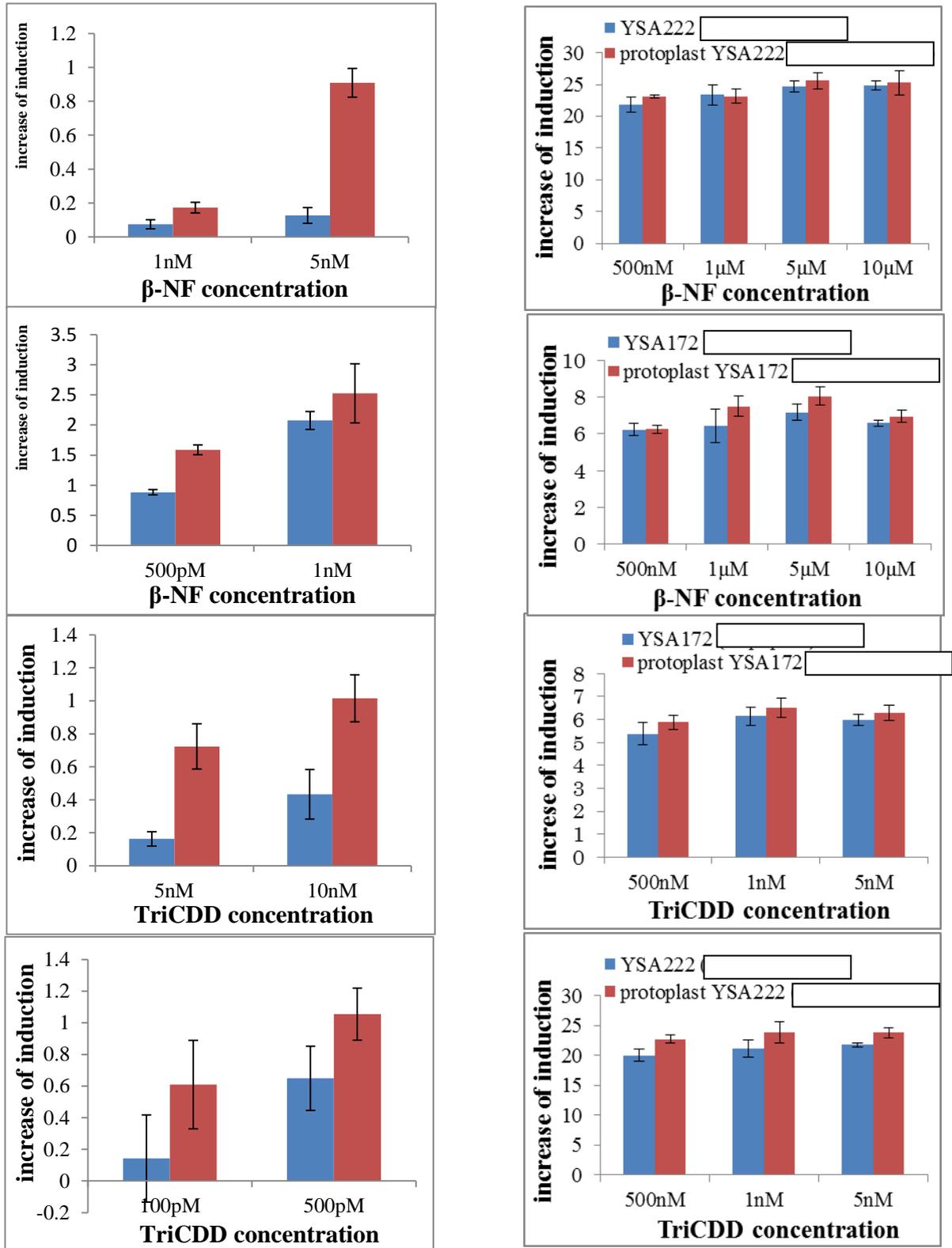
最適な浸透圧調整剤およびその至適濃度を用いることで、酵母のプロトプラスト形成が亢進し、細胞のバーストも抑制する。その結果、リガンドの取り込みが亢進した酵母が増加し、 β -NFが与える活性化量の増加、検出限界濃度・ EC_{50} の向上を促すと考えられる。

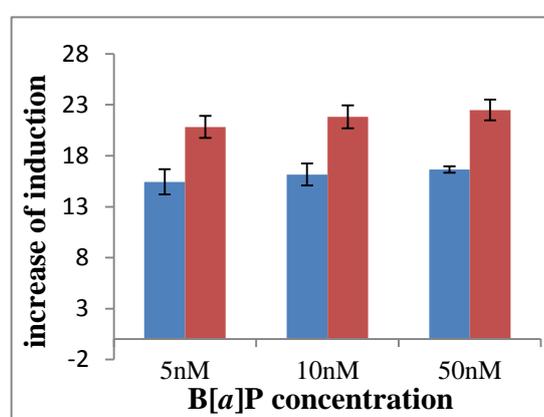
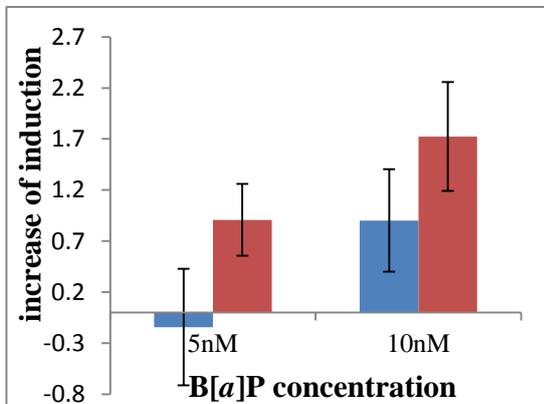
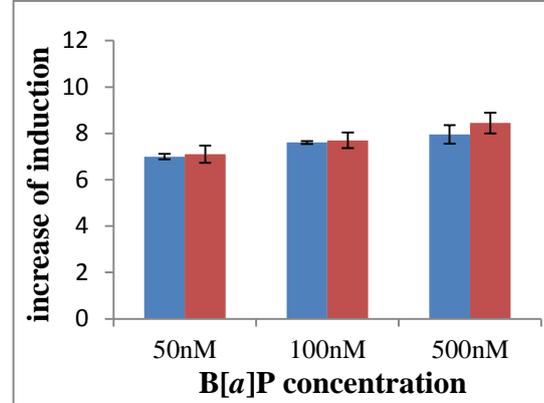
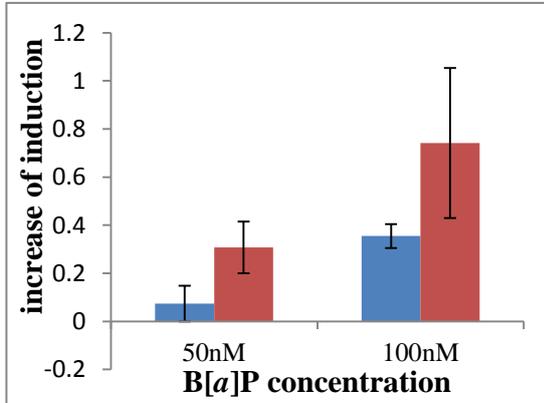
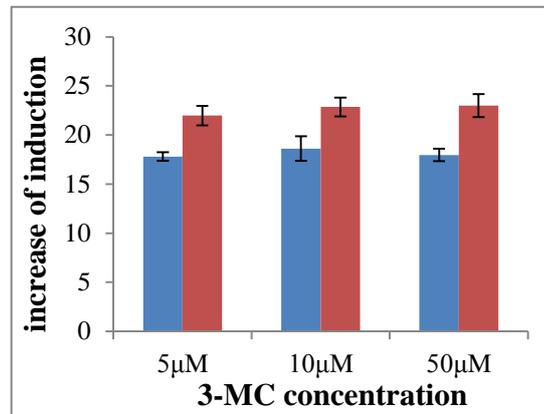
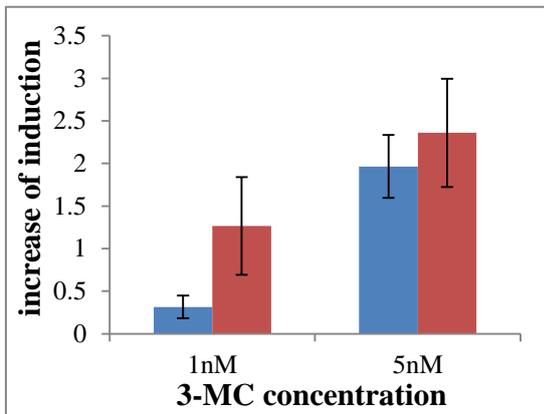
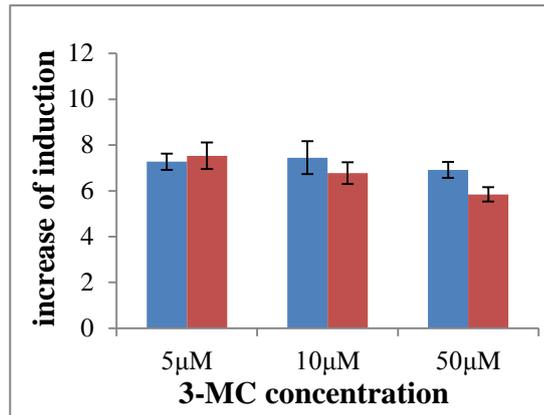
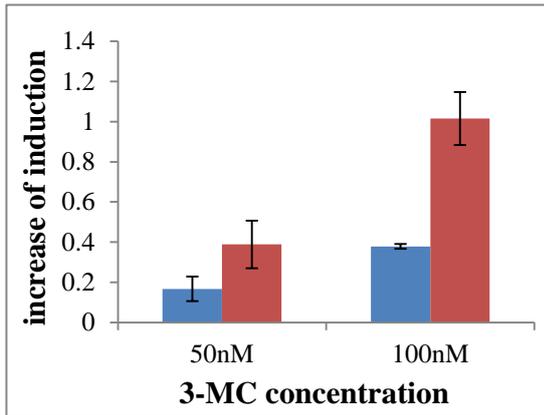
GalactoseによるAhR発現誘導5時間に比べ23時間では β -NFの与える活性化量が高かったのは、前培養でもGalactoseを培地に用いることでAhRの発現が誘導され、より多くの酵母がAhRを発現した状態でアッセイすることにより、リガンド応答性が高くなったということを示唆している。逆に言えば、AhR発現誘導5時間つまり、前培養でGalactoseを培地に用いない場合、AhR発現誘導は不完全であり、23時間以上誘導させた場合でもさらに活性化量上がるのかも知れない。

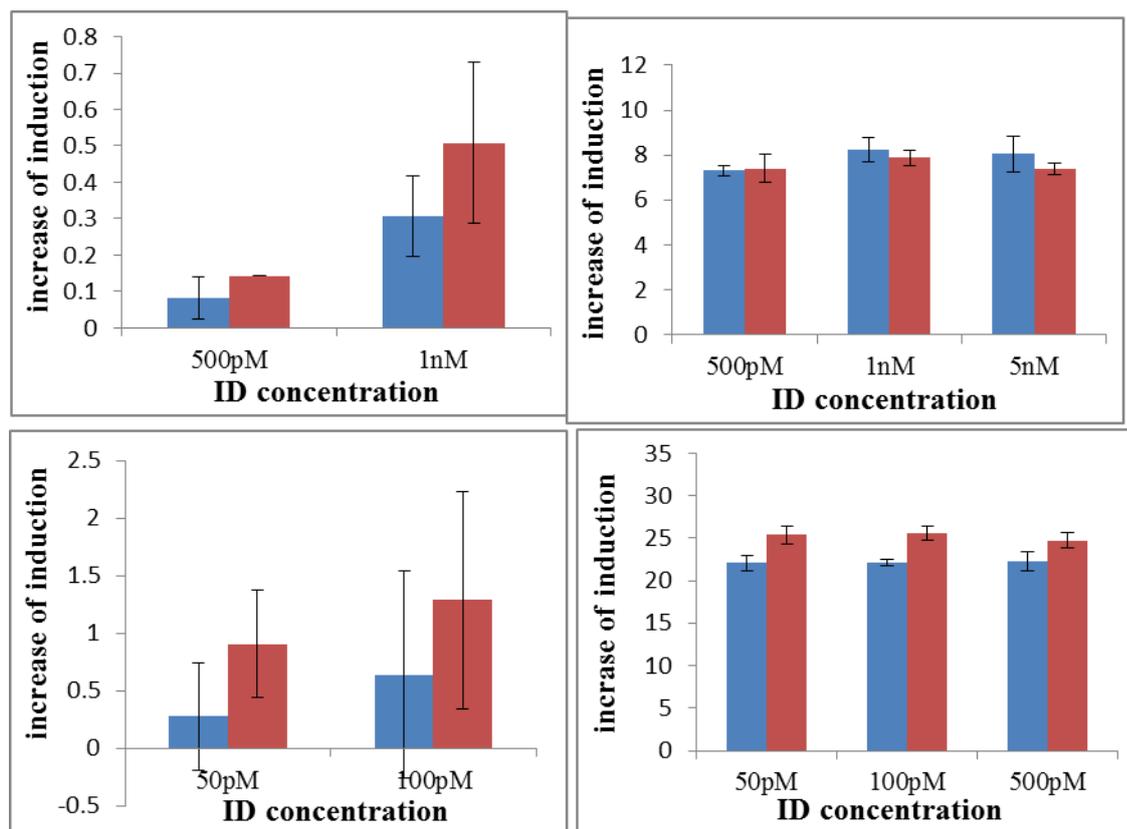
従って、遺伝子破壊型AhR発現酵母株を最適な条件でプロトプラストにし、AhR発現誘導を長時間与えることで、リガンド (β -NF)に対する応答性が上がり、かつ高感度化すると考えられる。

(3) プロトプラスト化のアッセイに与える効果

遺伝子破壊アッセイ酵母のプロトプラスト化がリガンド応答性に与える影響を図(1)-15に示した。特許と論文公開の都合上凡例を伏せて示す。







図(1)-15 各遺伝子破壊アッセイ酵母の応答性 (赤がプロトプラスト、青が対照)

全ての条件でリガンド濃度依存的な活性が確認できた。また概ねどの酵母株でも、非プロトプラストに比べプロトプラスト酵母では活性値が高くなったが、YSA172 (タンパク質*A1A* タンパク質*B5A*)では最大活性を与えるリガンド濃度において非プロトプラスト酵母の方が活性化量の高い場合もあった。

また、各リガンドが与える最大活性化量および検出限界活性化量はそれぞれ一様ではなかった。各酵母株における各リガンドの検出限界濃度を表(1)-8に示した。

表 (1)-8 各酵母株およびそのプロトプラストのリガンド検出限界濃度

酵母株		3 σ 法で求めたリガンドの検出限界濃度 (nM)				
		β -NF	TriCDD	3-MC	B[<i>a</i>]P	ID
YSA172 (タンパク質 <i>A1A</i> タンパク質 <i>B5A</i>)	非プロトプラスト	1.1	1.9	25	15	0.27
	プロトプラスト	0.17	0.11	3.3	11	0.16
YSA222 (タンパク質 <i>A1A</i> タンパク質 <i>A2A</i> タンパク質 <i>B5A</i>)	非プロトプラスト	0.18	1.2	3.6	91	0.23
	プロトプラスト	0.01	0.14	0.93	7.1	0.11

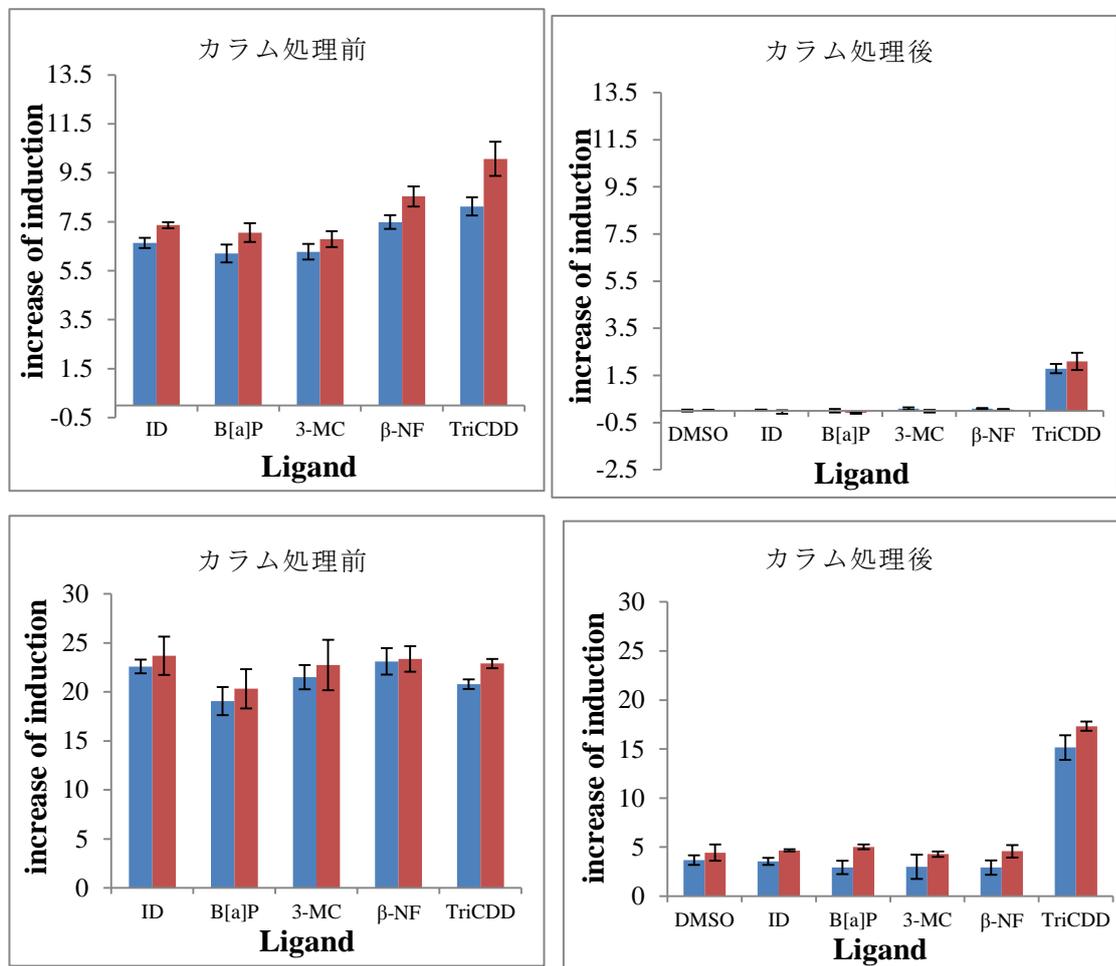
リガンド・酵母株の種類に関わらず、プロトプラスト化することで検出限界濃度が1/2~1/10に向上した。また、各酵母株をプロトプラストにした時のリガンドの検出限界濃度低下率はYSA222 (タンパク質A1A タンパク質A2A タンパク質B5A)の方がやや大きかった。

YSA172 (タンパク質A1A タンパク質B5A)に比べ、YSA222 (タンパク質A1A タンパク質A2A タンパク質B5A)ではプロトプラストにした時の効果が高いことから、YSA222 (タンパク質A1A タンパク質A2A タンパク質B5A)ではプロトプラスト形成率が高いと考えられる。これは、破壊した遺伝子の差であり、YSA222 (タンパク質A1A タンパク質A2A タンパク質B5A)では細胞壁構成成分となる細胞壁タンパク質A1, タンパク質A2を二重破壊しているため、プロトプラスト形成がしやすい状態にあるのかも知れない。その結果、各リガンドに対する応答性が上がり、かつ高感度化すると考えられる。また、各リガンドが与える最大活性化量および検出限界活性化量は酵母株の種類に関わらず、それぞれ一様ではなかったが、これは各リガンドのAhRへの結合能の差であると考えられる。

ここで、AhRタンパク質の立体構造を予測し実証したという報告がある。それによると、AhRを活性化する側鎖の配置は、真中がLeu309, Phe318, Ile319, Leu347, Val357の疎水性残基、末端がThr283, Cys294, Gln317, His320, Gln377の極性残基であり、こうした側鎖と結合できる化学物質がAhRを活性化すると述べられている⁽¹⁰⁾。また、AhRは脂溶性 (疎水性)を認識すると述べられた報告もあり⁽¹¹⁾、よってリガンドはAhR側鎖の疎水性残基との疎水性相互作用により結合すると考えられ、リガンドの疎水性度の違いが結合能の差になると考えられる。一方で、リガンドの分子構造の違いがAhRへの結合能に関係しているという報告もある。それによると、AhRリガンドは全て6.8×13.7Åの長方形に入るとされ⁽¹²⁾、リガンド分子の適切な大きさ・構造がAhRへの結合に必要であると述べられている⁽¹³⁾。つまり、リガンド分子の大きさ・構造の違いが結合能の差になると考えられる。

(4) 土壌からのAhRリガンドの抽出と精製

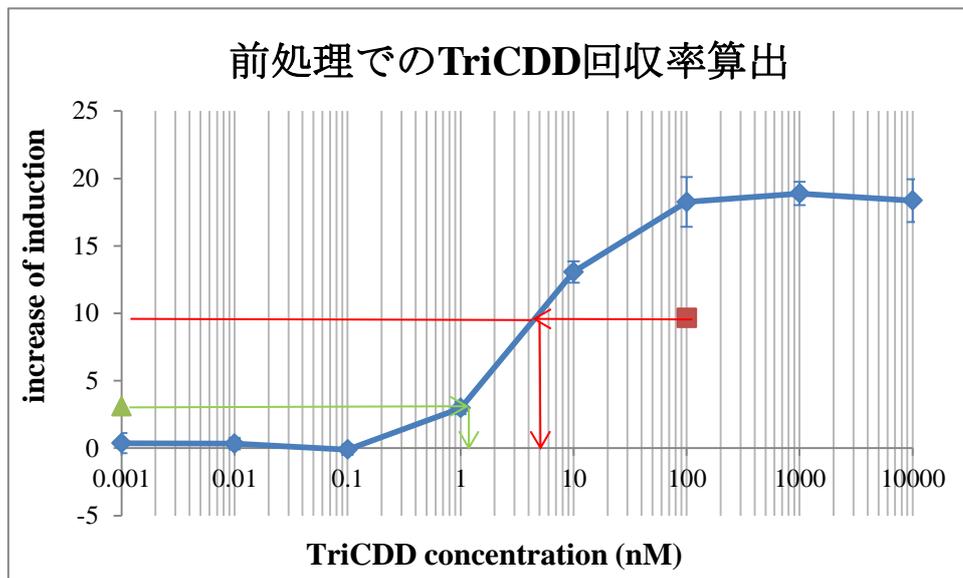
簡易カラム処理前後の各化学物質（リガンド）に対する各酵母株およびそれらのプロトプラストの応答性の結果を図(1)-16に示す。



図(1)-16 カラム処理前後の各化学物質（リガンド）に対する応答性

YSA172（タンパク質A1A タンパク質B5A）とそのプロトプラストは、カラム処理前のリガンドは全て検出したが、カラム処理するとTriCDDのみ検出した。一方、YSA222（タンパク質A1A タンパク質A2A タンパク質B5A）とそのプロトプラストは、TriCDDと比べ活性化量は低いTriCDD以外も検出した。

次いで、 10^{-12} ~ 10^{-5} M TriCDDに対する応答性および土壌からカラム処理後のDMSO、10倍希釈TriCDDに対する応答性とそれを用いたTriCDD回収率算出法を以下に示す。



図(1)-17 TriCDDに対する応答性

- ◆: 10^{-12} ~ 10^{-5} M TriCDD、■: TriCDDスパイク土壌からの抽出・精製物質、
▲: DMSOスパイク土壌からの抽出・精製物質

図(1)-17を用いて前処理によるTriCDDの回収率を算出した。図(1)-17の活性化量について、■はTriCDD + 土壌中の不純物 (AhRリガンド)、▲は土壌中の不純物 (AhRリガンド)を示す。TriCDDの検量線からそれぞれのTriCDD等価濃度を算出し、差をとることで、アッセイプレート1ウェルにおけるTriCDDの濃度 (量)を求めた。その結果、68.6 nM TriCDDをTriCDD添加 (スパイク)土壌から検出したということになる。全て回収した場合は3-1-2節の土壌にスパイクしたTriCDD濃度より100 nMを示すので、簡易前処理法によるTriCDDの実質回収率は68.6 %となった。また、図(1)-17から実測上と3 σ 法による土壌前処理後TriCDDの検出限界濃度を算出し、そこから1ウェルに含まれるTriCDD量を求めた。さらに、1gの土壌から検出するのに必要なTriCDD量を求め、環境基準1,000pg/g (1ng/g)以上を検出するのに必要な土壌量を求めた。その結果を表(1)-9にまとめた。

表 (1)-9 ダイオキシン類検出に必要な土壌量等まとめ

	実測上	3 σ 法
土壌前処理後TriCDDの検出限界濃度 (nM)	10	1.5
アッセイプレート1ウェルあたりに含まれるTriCDD (pg)	286	42
土壌1gから検出するのに必要なTriCDD (pg)	417	61
必要なTriCDD含有土壌 (g)	0.417	0.061

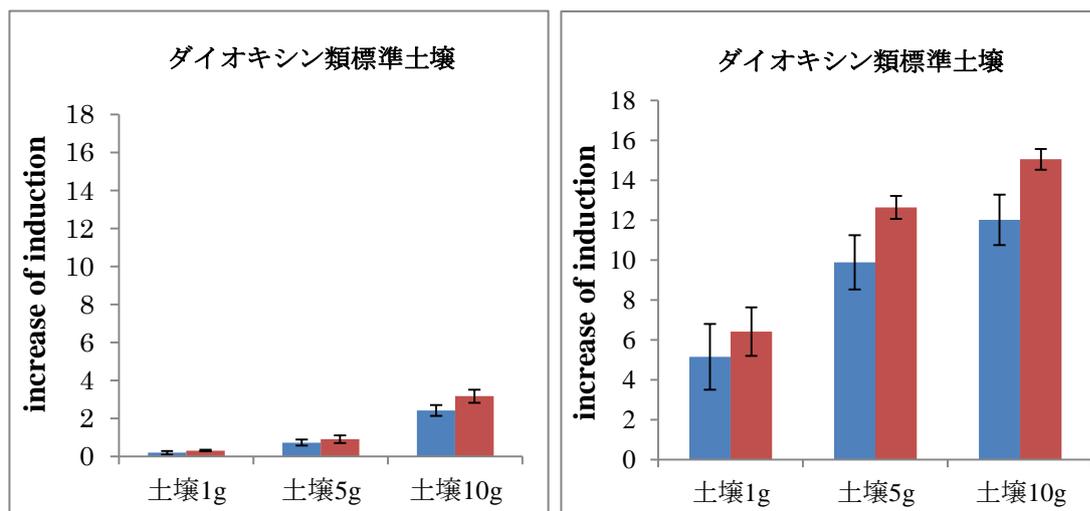
YSA172 (タンパク質A1A タンパク質B5A)とそのプロトプラストは、カラム処理前のAhRリガンドは全て検出し、カラム処理後のAhRリガンドはTriCDDのみ検出したが、これはダイオキシン類であるTriCDDはMultilayer silica gel columnを通り抜けCarbon reversible tubeに吸着したが、そ

れ以外のAhRリガンドは前者のカラム内で除去されたことを示唆している。一方、YSA222（タンパク質A1A タンパク質A2A タンパク質B5A）とそのプロトプラストはTriCDD以外にも検出したが、陰性対照として赤玉土にスパイクしたDMSOでも検出していることから、元々土壌中に含まれる何らかのAhRリガンドがカラム内で除去し切れず、またアッセイ酵母が高感度なために検出してしまっているのではないかと考えられる。しかしながら、68.6nMのTriCDDに対し、赤玉土中の不純物濃度は1 nM程度であったため、無視可能量であると考えられ、赤玉土にはAhRリガンドになるような化学物質はほとんど含まれていないと考えられる。

以上より、簡単な土壌前処理法と酵母レポーターアッセイ法を組み合わせることで、ダイオキシン類TriCDDを特異的に検出することに成功したと言える。また、YSA172（タンパク質A1A タンパク質B5A）に比べ、YSA222（タンパク質A1A タンパク質A2A タンパク質B5A）ではリガンドの与える検出限界、最大活性に対する性能が高いが、前処理したダイオキシンの検出における特異性はYSA172（タンパク質A1A タンパク質B5A）の方が優れていると考えられる。

(5) ダイオキシン標準土壌の抽出・精製

ダイオキシン類標準土壌を前処理法にて抽出・精製した化学物質をリガンドにYSA172とYSA222、およびそれらのプロトプラストでアッセイした結果を図(1)-18に示す。



図(1)-168 ダイオキシンの検出

どちらの酵母株もプロトプラスト・非プロトプラストに関わらず、ダイオキシン類標準土壌量依存的な活性が確認できた。また、酵母株に関わらず、非プロトプラストに比べプロトプラスト酵母では、応答が大きかった。

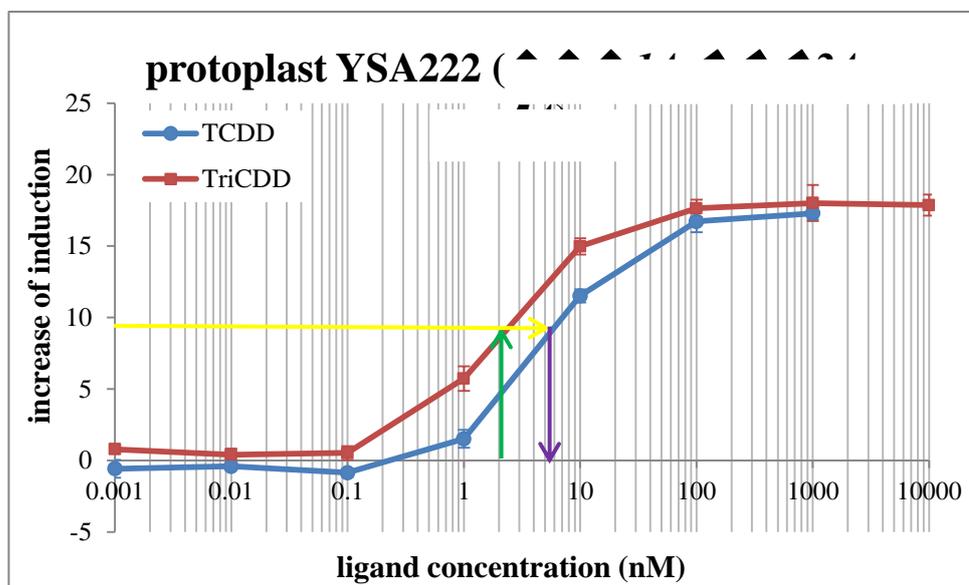
アッセイプレート1ウェルに含まれるリガンドのTriCDD等価濃度の結果を表(1)-10に示す。

表 (1)-10 各アッセイプレート1ウェルに含まれるダイオキシン類のTriCDD等価濃度

ダイオキシン標準土壌量 (g)	TriCDD等価濃度 (nM)
1	2.5
5	8.1
10	25

ダイオキシン類標準土壤量依存的にTriCDD等価濃度が増加しており、そこにはおおそ比例の関係が成り立っていた。

次いで、 10^{-12} ~ 10^{-5} M TriCDD、 10^{-12} ~ 10^{-6} M TCDDに対する応答性および表(1)-10のTriCDD等価濃度からTCDD等価濃度を算出する例を図(1)-19に示す。その結果を表(1)-11に示す。



図(1)-19 TCDD, TriCDDに対する応答性

表(1)-11 各アッセイプレート1ウェルに含まれるダイオキシン類のTCDD等価濃度

ダイオキシン標準土壤量 (g)	TCDD等価濃度 (nM)
1	6.2
5	36
10	78

表(1)-11からわかるように、ダイオキシン類標準土壤量依存的にTCDD等価濃度が増加しており、そこにはおおそ比例の関係が成り立っていた。

ダイオキシン標準土壤に含まれるTCDD毒性当量値 TEQの酵母レポーターアッセイ法による算出値と機器分析法による認証値を表(1)-12で比較した。

表(1)-12 酵母レポーターアッセイ法と機器分析法によるTCDD毒性当量値

酵母レポーターアッセイ法 (pg/g)	機器分析法 (pg/g)
20000	111.4±9.6

TCDD毒性当量値TEQは機器分析法に比べ、酵母レポーターアッセイ法では約200倍という非常に高い値を示した。

ダイオキシン類標準土壤量依存的な活性が見られたが、これはダイオキシン類標準土壤から前処理によりダイオキシン類を抽出・精製し、アッセイにより検出できたことを示唆している。ま

た、非プロトプラス酵母に比べ、プロトプラス酵母では応答が大きいことから、ダイオキシン類土壌からのダイオキシン検出においてもアッセイ酵母のプロトプラス化は有用であると考えられる。

しかし、ダイオキシン類標準土壌中に含まれるTCDD毒性当量値の算出値は認証値に比べ非常に高かった。これは、ダイオキシン各種異性体に対する酵母のAhR活性化係数とWHO基準の毒性等価係数TEFが異なるからであるかも知れない。実際、WHO-TEFが0のTriCDDにおいても酵母レポーターアッセイで活性が現れ、かつWHO-TEFが1のTCDDよりも高い活性が見られた。また、TCDDのWHO-TEQと酵母レポーターアッセイで求めたTEQはほぼ等しいという報告もあるが⁽¹⁴⁾、今回用いた標準土壌とは異なり、含まれるダイオキシン類の種類が少ないためであると考えられる。

多数のダイオキシン類で構成されるダイオキシン類標準土壌では毒性を正確に定量することはできなかったが、検出することはできた。本検出系はヒトに対して毒性が0のダイオキシン類でも検出できると考えられる。そのようなダイオキシン類が土壌に含まれる場合、TCDDなど毒性のあるものも含まれると考えられるため、本検出系は土壌からのダイオキシン類検出の1次スクリーニングとして有用であると考えられる。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

現在ダイオキシン類の汚染は、ソックスレー抽出、硫酸クリーンナップ、多層シリカゲルカラムやアルミナカラムによるクロマトグラフィーを経てGC/MSで定量する公定法で調べられている。専用施設・機器を備えた検査機関への委託分析が主流であり、費用は高額で、分析結果の受領までには相応の日数を要する。

従って、本研究開発による酵母の高感度化は、簡便な前処理方と合わせて高校理科室程度の施設を持つ事業所で安価に簡便に迅速に、土壌のダイオキシン汚染の有無の判定に貢献する。企業は本研究で開発するキットを汚染の一次スクリーニングに用い、陽性判定される土壌試料だけを公定法による分析にまわせばよい。そうすることで、これまで負担していたコストと時間を大幅に削減できる。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

平成24年度環境研究総合推進費募集要項が述べているように、今後ますます土壌汚染対策法、ダイオキシン類特別措置法に基づく汚染調査が増大する。安全確実な土壌汚染対策と健康リスク低減のため、低コストの土壌汚染調査法の開発が求められている。

現在、土壌のダイオキシン類汚染は、HRGC/HRMSを用いた公定法、ELISAや動物細胞株を使用した生物検定による簡易法で調べられている。これらはいずれも専用の施設・分析機器を備えた検査機関(公的機関・民間の分析サービス会社)が実施している。また、試料の前処理には長時間の

ソックスレー抽出や、硫酸によるクリーンアップ、多層シリカゲルカラムやアルミナカラムによるクロマトグラフィーが必要である。委託費用は高額で、分析結果の受領までには相応の日数を要する。

高校理科室程度の施設を持つ事業所で安価に簡便に迅速に、土壌のダイオキシン汚染有無を判定できる本課題は特に中小企業にとって福音となる。このバイオアッセイキットは、まさにこの行政ニーズを満たす解決策の決定打である。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) ミネラルコルチコイド受容体(MR)発現酵母の高感度化, 原島小夜子, 川西優喜, 八木孝司, 変異機構研究会・第25回夏の学校, 2012年6月30-7月1日, 小牧市
- 2) 男性ホルモン受容体 (AR)・黄体ホルモン受容体 (PR)の発現酵母の高感度化と有用性の評価, 又野真実, 原島小夜子, 川西優喜, 八木孝司, 変異機構研究会・第25回夏の学校, 2012年6月30-7月1日, 小牧市
- 3) レチノイン酸受容体・レチノイドX受容体発現レポーターアッセイ酵母株の樹立, 芳川智哉, 椎崎一宏, 川西優喜, 八木孝司, 変異機構研究会・第25回夏の学校, 2012年6月30-7月1日, 小牧市
- 4) アフリカツメガエルの甲状腺ホルモン受容体(TR) α レポーターアッセイ酵母株の樹立, 松井聡子, 原島小夜子, 川西優喜, 八木孝司, 変異機構研究会・第25回夏の学校, 2012年6月30-7月1日, 小牧市
- 5) 酵母レポーター遺伝子アッセイを用いた有機フッ素化合物の核内受容体リガンド活性の評価, 吉田 仁, 永吉晴奈, 川西優喜, 原島 小夜子, 椎崎一宏, 八木孝司, 松田知成, 高木総吉, 安達史恵, 柿本健作, 山口貴弘, 小西良昌, 第21回環境化学討論会, 松山, 2012年7月
- 6) 酵母レポーター遺伝子アッセイを用いた紫外線吸収剤の核内受容体リガンド活性の評価, 永吉晴奈, 吉田仁, 川西優喜, 原島小夜子, 椎崎一宏, 八木孝司, 松田知成, 高木総吉, 安達史恵, 柿本健作, 山口貴弘, 小西良昌, 第21回環境化学討論会, 松山, 2012年7月
- 7) Detection of environmental pollutants as human receptor agonists in estuarine sediments of Taiwan using various reporter gene assays, Chien-Hsiun Chen, Ton-Cun Liu, Masanobu

- Kawanishi, Pei-Hsin Chou, SETAC Asia Pacific 2012 Meeting, Kumamoto, Japan, 2012年9月
- 8) Evaluation of estrogenic, androgenic, and antiandrogenic activities in Taiwanese rivers using yeast bioassays and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Tsung-Ya Tsai, Yi-Lin Lia, Masanobu Kawanishi, Pei-Hsin Chou, SETAC Asia Pacific 2012 Meeting, Kumamoto, Japan, 2012年9月
 - 9) 性ホルモン受容体発現酵母の高感度化と環境試料のリガンド活性評価, 又野真実, 原島小夜子, 川西優喜, 八木孝司, 第18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, 2012年9月23日-24日, 熊本市
 - 10) アフリカツメガエルの甲状腺ホルモン受容体レポーターアッセイ酵母株樹立と有用性評価, 松井聡子, 原島小夜子, 川西優喜, 八木孝司, 第18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, 2012年9月23日-24日, 熊本市
 - 11) レポーターアッセイ用ミネラルコルチコイド受容体(MR)発現酵母の改良と有用性評価, 原島小夜子, 柿内康司, 川西優喜, 八木孝司, 第18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, 2012年9月23日-24日, 熊本市
 - 12) ヒト副腎皮質ホルモン受容体発現酵母によるレポーターアッセイの改良と有用性評価, 原島小夜子, 柿内康司, 川西優喜, 八木孝司, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡, 2012年11月
 - 13) アフリカツメガエル甲状腺ホルモン受容体発現レポーターアッセイ酵母株樹立と有用性評価, 松井聡子, 原島小夜子, 川西優喜, 八木孝司, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡, 2012年11月
 - 14) ヒト性ホルモン受容体($ER\alpha/\beta$, PR, AR)発現酵母の高感度化と有用性の評価, 又野真実, 原島小夜子, 川西優喜, 八木孝司, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡, 2012年11月
 - 15) レチノイン酸受容体・レチノイドX受容体発現酵母の樹立と内分泌攪乱物質および河川水のアッセイ, 芳川智哉, 椎崎一宏, 川西優喜, 八木孝司, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡, 2012年11月
 - 16) 酵母レポーターアッセイによる府大池の水と底泥の内分泌かく乱活性の検出, 松浦麻衣, 又野真実, 原島小夜子, 川西優喜, 中谷直樹, 八木孝司, 大阪府立大学第8回キャンパスビオトープ研究会, 2013年4月23日, 堺市
 - 17) キイロショウジョウバエのエクジソン受容体のリガンドを検出するレポーターアッセイ酵母株の樹立, 松浦麻衣, 原島小夜子, 川西優喜, 中川好秋, 八木孝司, 変異機構研究会・第26回夏の学校, 2013年6月22-23日, 尾張一宮市
 - 18) 昆虫の脱皮ホルモン受容体リガンドを検出するレポーターアッセイ酵母の樹立, 松浦麻衣, 原島小夜子, 川西優喜, 中川好秋, 八木孝司, 日本農芸化学会関西支部例会第80回講演会, 2013年7月6日, 堺市
 - 19) 昆虫脱皮ホルモン受容体発現レポーターアッセイ酵母株の樹立と有用性評価, 松浦麻衣, 原島小夜子, 川西優喜, 中川好秋, 八木孝司, 第19回日本環境毒性学会研究発表会, 2013年9月7-8日, 東京
 - 20) カエルの甲状腺ホルモン受容体発現レポーターアッセイ酵母によるリガンド活性物質の検出, 松井聡子, 原島小夜子, 川西優喜, 八木孝司, 第19回日本環境毒性学会研究発表会, 2013年9月

7-8日, 東京

21) 高感度化レポーターアッセイ酵母を用いたステロイドホルモン受容体リガンド検出システムの有用性評価～各種人工合成化学物質のステロイドホルモン様活性の検出～, 原島小夜子, 又野真実, 柿内康司, 川西優喜, 八木孝司, 第19回日本環境毒性学会研究発表会, 2013年9月7-8日, 東京

22) キイロショウジョウバエのエクジソン受容体リガンド活性を検出するレポーターアッセイ酵母株の樹立と有用性評価, 松浦麻衣, 原島小夜子, 川西優喜, 中川好秋, 八木孝司, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013年12月

23) カエルの甲状腺ホルモン受容体発現レポーターアッセイ酵母株樹立と有用性評価, 松井聡子, 原島小夜子, 川西優喜, 八木孝司, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013年12月

24) 酵母レポーターアッセイ法に基づくステロイドホルモン受容体リガンド検出システムの確立・改良と有用性評価, 原島小夜子, 又野真実, 柿内康司, 川西優喜, 八木孝司, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013年12月

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナー等の開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

1) Koseko S., Miyamoto Y., Hisamatsu M. and Yamada T. (1990) Studies on Cell Fusion of Soy -Sauce Yeast. Part2 Preparation Condition of Protoplast and Electroporation Condition. *Faculty of Bioresources Mie University*. **3**: 79-85

2) Bacon J.S.D., Jones D., and Ottolenghi P. (1969) Cell Wall Residues in Yeast Protoplast Preparations. *Journal of Bacteriology*. **99** (3): 885-887

3) Ohbuchi K, Nishi A, Hamachi M, and Kumagai C (1999) Protoplast Formation in Yeasts by the Lytic Enzyme of *Streptomyces rochei* DB-34 and Their Regeneration. *Seibutsu-kogaku* **77**: 137-146

4) Adachi J, Mori Y, Mastui S, Takigami H, Fujino J, Kitagawa H, Miller CA 3rd, Kato T, Saeki K, Mastuda T (2001) Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J Biol Chem*. **276**: 31475-8

- 5) 山田りな (2012) 高感度な核内受容体アッセイ酵母の作製および環境試料のリガンド活性評価 大阪府立大学大学院 理学系研究科 生物科学専攻 修士論文
- 6) 又野真実 (2013) 性ホルモン受容体発現酵母の高感度化と有用性の評価 大阪府立大学大学院 理学系研究科 生物科学専攻 修士論文
- 7) Christiane A. O., Ulrike M. L., Felix S, Martina O, Isabel T, Saskia T, Theresa S, Leonie J, Dieter S, Michael W, Manfred J, Gilles J. G., Christine L. M., Christian L, Bernhard R, Irina L, Andreas V. D., Wolfgang W and Michael P (2011) An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* **478**: 197-203
- 8) Brett C. D., Iain A. M., Jennifer C. S., Colin A. F., Tejas S. L., Elizabeth M. L., Curtis J. O., and Gary H. P. (2010) Kynurenic Acid Is a Potent Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand that Synergistically Induces Interleukin-6 in the Presence of Inflammatory Signaling. *Toxicological Sciences*. **115** (1): 89-97
- 9) Ian A. Hope and Kevin S (1985) GCN4 Protein, Synthesized In Vitro, Binds HIS3 Regulatory Sequences: Implications for General Control of Amino Acid Biosynthetic Genes in Yeast. *Cell*. **43**: 177-188
- 10) 鈴木愛 (2005) ダイオキシン類の生体影響と外界発生源からの除去プロセスに関する計算化学的検討 東北大学大学院 工学研究科 材料化学専攻 博士論文
- 11) Dension M. S., Health-Pagliuso S (1998) The Ah Receptor: A Regulator of the Biochemical and Toxicological Actions of Structurally Diverse Chemicals. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. **61**: 557-568
- 12) Gillner M, Bergman J, Cambillau C, Fernström B, Gustafsson J. A. (1985) Interactions of indoles with specific binding sites for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat liver. *Mol Pharmacol*. **4**: 357-63.
- 13) Kato T, Matsuda T, Matsui S, Mizutani T, and Saeki K. (2002) Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Methyl Yellow and Related Congeners: Structure - Activity Relationships in Halogenated Derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* **25** (4): 466-471
- 14) Kawanishi M, Ohnishi K, Takigami H and Yagi T. (2013) Simple and rapid yeast reporter bioassay for dioxin screening: evaluation of the dioxin-like compounds in industrial and municipal waste incineration plants. *Environ Sci Pollut Res*. **20**: 2993-3002

Development of a Simple and Rapid Dioxin Bioassay System with Sample Preparation Method

Principal Investigator: Masanobu KAWANISHI

Institution: Osaka Prefecture University

1-2 Gakuen cho, Naka ku, Sakai-city, Osaka 599-8570, JAPAN

Phone: +81-72-254-9830 /Fax: +81-72-254-9938

E-mail: kawanisi@riast.osakafu-u.ac.jp

[Abstract]

Key Words: Dioxins, Bioassay, Yeast, Soil Contamination

The emission of dioxins, consisting of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDD) and dibenzofurans (PCDF), from industrial facilities is of great concern due to their large potential for bioaccumulation and adverse health effects on the human beings. Combustion processes, such as the incineration of waste materials, are a major source of these persistent organic pollutants (POP), and world-wide attention has focused on techniques for controlling and monitoring their emission and contamination. High-resolution gas chromatography-mass spectrometry (HRGC/HRMS) is the standard and conventional method for dioxin measurement. In many countries, including Japan, governmental regulations regarding the analysis of incinerator waste and atmospheric emissions for dioxins require the use of this method.

Although HRGC/HRMS is very accurate and sensitive, the instruments it requires are very expensive, and highly qualified staff and continuous maintenance are required to provide good data; thus, analyses involving this method are very expensive on a per sample basis. Since bioassay systems are relatively simple, easy to handle, and inexpensive, they have been used in various studies of environmental contaminants. A recombinant yeast expressing human AhR and Arnt proteins that was developed by C. A. Miller III are available for detection and measurement of dioxins. The recombinant yeast possesses a *LacZ* (a bacterial β -galactosidase gene) reporter plasmid containing XRE sequences in its promoter region. The level of β -galactosidase activity is therefore correlated with the amount of dioxins in an assay sample.

In this study, we improved performance of the assay strain with genetically-modifying components of cell wall and membrane of the yeast. We also established an assay procedure for protoplasts of these yeasts. Such modifications improved their detection limit with 100 times, and shortened duration of the assay with 40%.

The improved performance of the yeast strains allows to measure less concentrated and less purified samples. And then, we investigated if combination of simple, rapid and primitive procedure of sample preparation with the yeast assay functions in detection of dioxins in contaminated soil. With hexane-extraction using a ultrasonicator and purification using disposal multilayer silicagel and activated charcoal columns, that are available commercially, the yeast detected 0.061 [ng/g soil] of dioxin. Therefore, the improved assay yeast with the simple sample preparation can be an excellent tool for first screening for detection of dioxin-contamination in soil.