

環境水中のエストロゲン様物質検出のための酵母 two-hybrid 法の最適化

○中室 克彦、上野 仁、奥野 智史、坂崎 文俊、亀井 孝幸
摂南大学 薬学部

【はじめに】著者らは、環境水中のエストロゲン様物質を酵母 two-hybrid 法を用いて測定したところ、検出されるエストロゲン様活性が予測される活性値よりも低いことを認めた。そのため、環境水中にはエストロゲン様活性の検出を妨害する夾雑物質が存在する可能性が示唆された。そこで今回、環境水中のエストロゲン様活性を定量的に解析することを目的に、酵母 two-hybrid 法によるエストロゲン様活性の検出を妨害する環境水中夾雑物質を確認するとともに、本法の改良について検討を行った。

【実験方法】1) 試料水の濃縮：試料水 10L を HCl により pH3 に調整後、XAD-2 樹脂カラムを用いて吸着処理した。ついで、窒素ガスにより樹脂を乾燥後、酢酸エチルおよびメタノール各 500mL を用いて順次溶出した。これら溶出液は、減圧濃縮乾固後 DMSO 2.0mL に溶解し、XAD-2 樹脂-酢酸エチルおよびメタノール画分として実験に供した。

2) 酵母 two-hybrid 法：GAL4DNA 結合領域 - ホルモン受容体結合領域、GAL4 活性化領域 - Coactivator およびレポーター遺伝子として β -Galactosidase を組み込んだ酵母 Y190 株を SD 培地中で一晚培養した。その一定量に下水の XAD-2 樹脂カラム濃縮試料を一定量加え、5.0 mol/L NaOH 溶液を用いて培養液中の pH を 7.6 に調整した後、30°C、4 時間曝露した。酵母中に産生された β -Galactosidase 活性は *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside を基質として吸光光度法によって測定し、検量線法から 17 β -estradiol(E₂)等量値 (pg)を算出した。また、S9 mix を共存した場合は、試料および phenobarbital と β -naphthoflavone により誘導した S9 mix 5.0 μ L を SD 培地に添加した後、37°C で 30 分間プレインキュベーションした。

【結果および考察】酵母 two-hybrid 法における環境水濃縮試料中の夾雑物質による妨害作用を検討するため、下水の XAD-2 樹脂-濃縮試料に E₂ を共存させた時のエストロゲン様活性を測定した。その結果、XAD-2 樹脂-酢酸エチル画分に E₂ を共存させた時は、E₂ 単独時の約 25%、メタノール画分への E₂ 共存時がその約 65%と低いエストロゲン様活性を示した。このことからいずれの画分にも妨害物質が共存することが認められた。また、フミン酸に E₂ を共存させた時の E₂ のエストロゲン様活性を測定したところ、下水濃縮試料と同様、約 65%の低いエストロゲン様活性を示した。

つぎに、下水濃縮試料の S9 mix 添加時のエストロゲン様活性を測定した結果、代謝活性化によって同活性が顕著に増強することが認められた。しかし、S9 を含まない cofactor のみを共存させた場合でも S9 mix 添加時に匹敵する活性増強が認められた。この活性増強の原因究明の検討から、下水濃縮試料にリン酸緩衝液(pH7.4)を添加するだけで濃度依存的にエストロゲン様活性が増強することが認められた。また、リン酸緩衝液濃度依存的に pH の上昇が認められたため、この活性増強の原因としては培養液 pH の上昇が示唆された。そこで、培養液 pH を pH4.0~9.0 に調整後、下水濃縮試料のエストロゲン様活性を測定したところ、従来法の pH4.0 付近では活性が低いが、pH 値の上昇に伴い活性が増強し pH7.6 付近において活性が最大(pH4.0 の約 10 倍)となることが認められた。そのため、環境水濃縮試料を測定するには培養液の pH を 7.6 に調整することが最適であることが考えられた。さらに、培養時の pH を 7.6 にする方法を用いて下水の酢酸エチル画分では妨害作用がほぼ完全に消失するが、メタノール画分では妨害がやや残ることが認められた。一方、フミン酸の妨害はほぼ完全に消失することが認められた。

以上のことから、下水濃縮試料中には従来の酵母 two-hybrid 法でのエストロゲン様活性の検出を妨害する夾雑物質が共存しており、その原因のひとつはフミン酸であることが明らかとなった。また、環境水中有機物の S9 mix による代謝活性化によるエストロゲン様活性の増強には、培養液中 pH の上昇が強く関与することが示唆された。そのため、酵母 two-hybrid 法を用いて環境水濃縮試料によるエストロゲン様活性をより定量的に測定するには、培養液中 pH を 7.6 に調整することでフミン酸による負の妨害作用がほぼ完全に消失し最適化できることが明らかとなった。

Improvement of yeast two-hybrid system for detection of estrogenic substance in environmental water

Katsuhiko NAKAMURO, Hitoshi UENO, Tomofumi OKUNO, Humitosi SAKAZAKI, Takayuki KAMEI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University, Japan

Improvement of yeast two hybrid system for detecting estrogenicity of waste water was investigated. It was found that waste water contained inhibitors such as humic acid for detecting estrogenicity. Enhancement of estrogenicity of waste water by metabolic activation with S9mix was recognized. This phenomenon was derived from elevation of pH (pH7.6). Adjustment of pH7.6 at cultivation could remove inhibition by humic acid.