

## エストロゲン様物質モニタリング用組換え植物の開発

### Development of a System for Monitoring Estrogenic Activity Using Transgenic *Arabidopsis thaliana*

東條 卓人, 津田 賢一, 和田 朋子, 山崎 健一\*

TAKUTO TOJO, KENICHI TSUDA, TOMOKO S. WADA and KEN-ICHI YAMAZAKI

北海道大学大学院地球環境科学研究科環境分子生物学講座 〒060-0810 札幌市北区北10条西5丁目

\* TEL: 011-706-4522 FAX: 011-706-4522

\* E-mail: ymzk@ees.hokudai.ac.jp

Laboratory of Environmental Molecular Biology, Graduate School of Environmental Earth Science,  
Hokkaido University, Kita 10, Nishi 5, Kita-ku, Sapporo, 060-0810, Japan

(原稿受付 2005年5月25日 / 原稿受理 2005年7月30日)

Numerous physiological processes are regulated by endocrine systems in animals. Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) can affect physiological processes of organisms by binding to hormone receptors. Therefore, it is necessary to develop methods for detecting EDCs and removing them from the environment. We have developed a simple and low-cost reporter-gene assay system for the comprehensive analysis of estrogenic activity using transgenic *Arabidopsis thaliana*. This transgenic plant constantly expresses two effector proteins: a chimeric estrogen receptor and a chimeric nuclear receptor co-activator. Estrogen-dependent interaction between the two effector proteins triggers transcriptional activation of reporter gene,  $\beta$ -glucuronidase (GUS). We have demonstrated this transgenic plant's capability of detecting the existence of  $17\beta$ -estradiol at a concentration of 50 pM (13 pg/ml) in agar medium. This plant can also detect other estrogenic substances, such as diethylstilbestrol, p-n-nonylphenol, bisphenol A, and Genistein.

**Key words:** estrogen receptor, transgenic *Arabidopsis*, endocrine-disrupting chemicals, bioassay, reporter assay

**キーワード:** エストロゲン受容体, 形質転換シロイヌナズナ, 内分泌攪乱化学物質 (環境ホルモン), バイオアッセイ, レポーターアッセイ

## 1. 緒 言

内分泌攪乱化学物質 (環境ホルモン) は, 発生・代謝・生殖などに関与するホルモン受容体への結合などを通して生態系やヒトに悪影響を与えるとされる化学物質である<sup>3)</sup>。その中には自然分解を受けずに長期にわたり環境中に残留する化学物質もあり, 人類をはじめとする種の存続のためにも, 環境中における環境ホルモンの調査技術の開発は早急の課題であると言える。

現在, 環境ホルモンの検出には, 主にガスクロマトグラフィーを用いた方法といった高価な機材を必要とする分析化学的手法が用いられている。しかし分析化学的手法には, 試料中からの環境ホルモンの抽出, 精製操作に用いる有機溶媒自体が環境汚染物質であるということ, また, 測定に手間や高いコストがかかるなどの難点が挙げられる。これらのことから, 低コスト, 低環境負荷で簡便に環境ホルモンの広域調査が行える技術の開発が求められている。

また生物学的な環境ホルモン評価法として, 酵母を用いた方法<sup>8)</sup>, ヒト培養細胞<sup>9)</sup> や魚類を使ったバイオアッセイ法<sup>14)</sup> などが報告されている。これらは生物のホル

モン受容体を用いるため, より生体への影響に近い状態で, そして分析化学的検出方法よりも安価に環境ホルモンの評価をすることが可能である。しかしながら, 培養細胞や酵母は扱う際に無菌操作を必要とし, また, 魚類は凍結保存することができないため使用時以外にも常に育成する手間を要するなどの短所があり, 広く使用されるバイオアッセイ法とはなっていない。

そこで我々は, 環境ホルモン検出に植物の利用を試みた。植物を環境ホルモン検出に用いる利点として, 植物は非常に発達した根組織を持っているため, 環境試料から直接物質を吸収することが期待される。これにより, 物質の抽出操作が省略可能になり, さらに無菌操作を行わなくても育成することができる。また, 今回用いたシロイヌナズナは1個体から約2000粒以上の種子が採れ, 回収した種子は常温・省スペースで保存ができ, 保管のための特別な装置もいらぬという特性も備えている。これらのことから, 植物は非常に簡便に取り扱える環境ホルモン検出ツールとしての応用が可能であると考えられる。

今回我々は, 環境ホルモンの中でも, エストロゲン受容体を持つ組織に作用することで問題視されているエス

トロゲン活性をもつ物質に着目した。エストロゲン活性を持つ化学物質は、農薬や工業的に作られた化学物質などに含まれている<sup>11)</sup> 他、下水処理場からの排水などにも多く含まれていることが知られている。

エストロゲン受容体は核内受容体スーパーファミリーに属しており、エストロゲンとの結合により活性化され、コアクチベーターとの相互作用を通して標的遺伝子の転写を活性化することが知られている<sup>9)</sup>。エストロゲン受容体をはじめとした核内受容体のリガンド結合部位とコアクチベーターとの間のリガンド依存的な相互作用を利用したツーハイブリッド法によるホルモン様物質検出法が、酵母ですでに報告されている<sup>10,12)</sup>。

今回我々は、ツーハイブリッド法を基盤とした遺伝子を組み込んだシロイヌナズナを用いた、簡便で低コストなエストロゲン様物質検出法を紹介する。

## 2. 材料と方法

### 2.1. シロイヌナズナに導入した遺伝子の構築

構築した遺伝子を図 1A に示した。キメラエストロゲン受容体をコードするエフェクター 1 遺伝子はカリフラワーモザイクウィルスの 35S プロモーター (P35S) の下流に、翻訳増幅配列 ( $\Omega$  配列)・SV40 ウィルスの T-抗原の核局在シグナル (NLS)・LexA DNA 結合性ドメイン (LexA DBD)・ヒトエストロゲン受容体  $\alpha$  のリガンド結合ドメイン (hER $\alpha$  LBD) を連結したポリペプチドをコードする遺伝子およびアグロバクテリウムのノパリン合成

酵素遺伝子のターミネーター (TNOS) を連結してある。

キメラコアクチベーターをコードするエフェクター 2 遺伝子は P35S の下流に、 $\Omega$  配列・NLS・ヒト転写コアクチベーターの一部 (hTIF2 NID) (human transcriptional intermediately factor 2 nuclear receptor interaction domain)<sup>13)</sup>・単純ヘルペスウィルス VP16 の転写活性化ドメイン (VP16 AD)<sup>4)</sup> を連結したポリペプチドをコードする遺伝子および TNOS を連結してある。

$\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) (E.C. 3.2.1.31) をコードするレポーター遺伝子は LexA 蛋白質の標的 DNA 配列 (8 回繰り返した配列) に P35S の TATA 配列を連結したキメラプロモーターの下流に、 $\Omega$  配列、GUS をコードする遺伝子の全長および TNOS を連結してある。

作製した各プラスミドを制限酵素処理することで得られたエフェクター 1 断片、エフェクター 2 断片、タバコの Matrix attachment region である S/M II 断片<sup>5)</sup>を、レポータープラスミドに挿入することにより、二つのエフェクター遺伝子と一つのレポーター遺伝子を含むプラスミドを作製した。

### 2.2. シロイヌナズナへの遺伝子導入法

全ての形質転換植物作製においてシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) の Columbia 株を用いた。構築したプラスミドをエレクトロポアレーション法でアグロバクテリウム C58 株に導入後、このアグロバクテリウムを floral dipping method<sup>2)</sup> によりシロイヌナズナに感染させることにより、形質転換を行った。形質

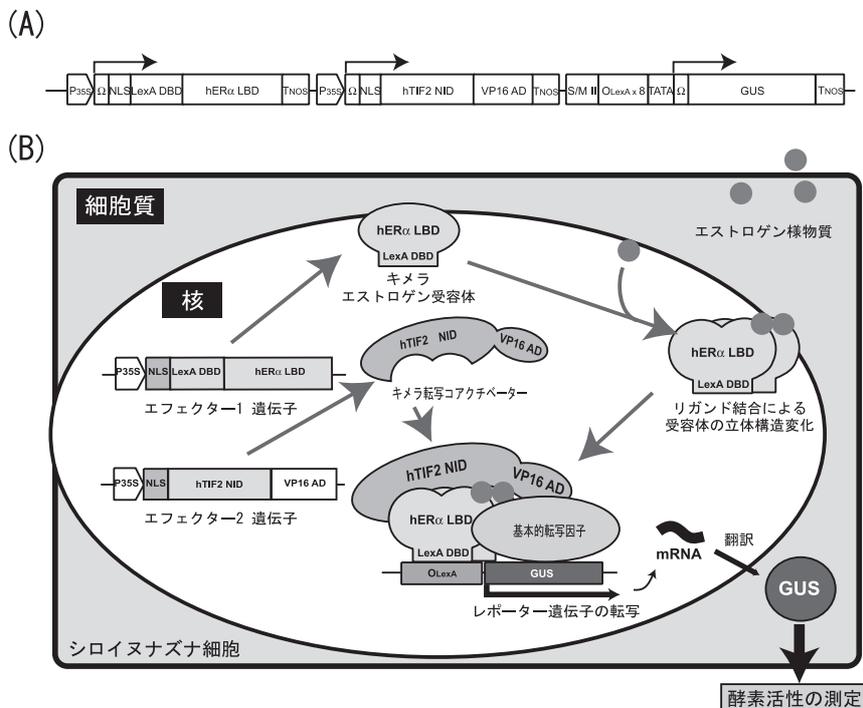


図 1. エストロゲン検出のためにシロイヌナズナに導入した遺伝子構造と、遺伝子導入植物のエストロゲン検出の分子メカニズム。

(A) エストロゲン検出のためにシロイヌナズナに導入した遺伝子構造

各遺伝子の略称は本文中 2.1 に記してある。

(B) エストロゲン検出の分子メカニズム

エストロゲンの hER $\alpha$  LBD への結合により、hTIF2 NID と VP16 AD を含むキメラ転写コアクチベーターとのリガンド依存的な相互作用が起こる。これにより VP16 AD の転写活性化シグナルが植物の転写装置に伝わり、GUS 遺伝子の転写、翻訳が引き起こされる。GUS タンパク質の酵素活性を測定することでエストロゲンを検出することができる。

転換処理をしたシロイヌナズナから得られた種子 (T1 種子) を 1% sucrose, 0.8% 植物用寒天, 50  $\mu\text{g/ml}$  カナマイシン, 100  $\mu\text{g/ml}$  クラフォランを含む MS 寒天培地<sup>9)</sup> に播種し, 導入遺伝子を持つ形質転換植物体の選抜を行った。カナマイシン耐性を持つ T1 個体から得られた T2 種子を用いて, エストロゲン様活性を持つ物質に対する応答性を調べる実験を行い, また, T2 個体から得られた T3 種子を用いて 17 $\beta$ -エストラジオールに対する応答性を調べる実験を行った。

### 2.3. エストロゲンによる形質転換シロイヌナズナにおけるレポーター遺伝子発現誘導法

17 $\beta$ -エストラジオールもしくはエストロゲン様活性を持つ物質を含む MS 寒天培地 (17 $\beta$ -エストラジオールは DMSO に溶解した状態で 10,000 分の 1 量添加した) 上に形質転換シロイヌナズナの種子を播き, 3 日間 4°C 暗所に置いた。その後, 22°C, 明所において, 発芽・一定期間生育させたのち, エストロゲン活性により形質転換シロイヌナズナ内において発現が誘導されたレポーター遺伝子である GUS の活性を GUS 染色法および GUS 活性測定法で調べた (図 2)。

### 2.4. GUS 活性染色法

Jefferson et al. の方法<sup>7)</sup> を参考に, エストロゲンに曝露された形質転換シロイヌナズナの GUS 染色を行った。植物体を染色液 (2 mM 5-ブromo-クロロ-インドリル- $\beta$ -D-グルクロニド (X-Gluc), 50 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.5 mM フェリシアニド, 0.5 mM フェロシアニド) に浸し, 15 分間デシケーターの中で減圧処理を行った。その後, 37°C で 3 時間静置して発色後, 植物体を 70% エタノールに浸して葉緑素を取り除き, 観察を行った。

### 2.5. GUS 活性測定法

Jefferson et al. の方法<sup>7)</sup> に従って, エストロゲンに曝

露された形質転換シロイヌナズナから抽出したタンパク質中の GUS 活性を測定した。2.3 に記してある方法で処理した植物体 20 個体を液体窒素中で凍らせた後, ホモジナイザーを用いてパウダー状にした。そこに抽出バッファー (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.1% N-ラウロイルサルコシナトリウム, 10 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール) を加えて可溶性タンパク質を抽出した。GUS 活性の測定には 4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -D-グルクロニド (4-MUG) を基質として用いた。終濃度 1 mM となるように 4-MUG を加えた抽出バッファーに抽出したタンパク質液を加えて, 37°C で 1 時間反応させた。1 時間後に 0.2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  を加えて酵素反応を停止させた。GUS の触媒作用により 4-MUG から遊離した 4-MU の濃度を蛍光分光光度計 [Fluorescence Spectrophotometer F-4500 (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan)] を用いて測定した (波長 365 nm の光で励起して放出される波長 455 nm の光を測定)。また, Bradford の方法<sup>8)</sup> に従って溶液中のタンパク質濃度を測定し, 蛍光分光光度計での測定で得られた値を溶液に含まれる全タンパク質量によって補正してデータを標準化した。

## 3. 結果と考察

### 3.1. エストロゲン検出の分子メカニズム

シロイヌナズナに導入したエストロゲン検出の分子メカニズムの模式図を図 1 に示した。植物内で強力に下流の遺伝子の転写を起こさせるプロモーターである P35S の作用により, hER $\alpha$  LBD と LexA DBD を含むキメラエストロゲン受容体, および TIF2 NID と VP16 AD を含むキメラ転写コアクチベーターが形質転換シロイヌナズナ個体内で常時過剰に発現している。この 2 つのキメラタンパク質は, SV40 ウィルス由来 T 抗原の核移行シグナルを含んでおり, 常時核内に局在している。エストロゲンがキメラエストロゲン受容体の hER $\alpha$  LBD 部分

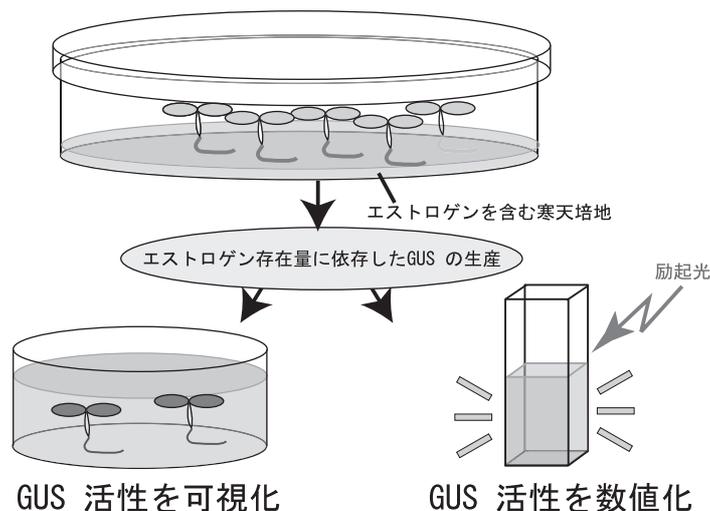


図 2. 形質転換シロイヌナズナのエストロゲンへの曝露方法およびレポーター遺伝子活性の測定法。

エストロゲン活性を持つ物質の入った寒天培地上に形質転換シロイヌナズナの種子をまき, 22°C, 恒明条件下で一定期間育成した。育成したシロイヌナズナ中の GUS の酵素活性を, シロイヌナズナ個体を直接 X-Gluc を含む基質液に浸して染色することで検出, または, シロイヌナズナから抽出した可溶性タンパク質を 4-MUG を含む基質液と混合し, 分光光度計を用いて酵素活性を数値化した。

と結合することにより、hER $\alpha$  LBD の立体構造の変化が起こり、キメラ転写コアクチベーターの TIF2 NID 部分との相互作用が起こる。この相互作用により TIF2 NID に融合した VP16 AD の転写活性化シグナルが植物の転写装置に伝わり、エストロゲン依存的に GUS 遺伝子の転写および翻訳が引き起こされる。形質転換植物における GUS タンパク質の酵素活性を測定することでエストロゲンを検出することができる。

### 3.2. 形質転換シロイヌナズナにおける 17 $\beta$ -エストラジオール依存的な GUS の発現

形質転換シロイヌナズナの 17 $\beta$ -エストラジオールへの応答を調べるために、17 $\beta$ -エストラジオールを含む寒天培地の上に T3 種子を播き、1 週間育成した。それを GUS 染色法 (図 3A) および GUS 活性測定法 (図 3B) を用いて GUS の発現を観察した。染色法において、GUS が基質である X-Gluc を分解して得られるインディゴブルーの青い発色は、50 pM (13 pg/ml) 以上の濃度の 17 $\beta$ -エストラジオールに曝露したときに主根及び根毛で強く見られた (図 3A)。染色は、50 pM では胚軸と根の間の部分に観察され、濃度を上げていくに従って、根全体で観察されるようになった。地上部での GUS の発現が見られないのは、シャーレ内の高湿度条件により蒸

散による根から地上部への吸い上げが抑制されているためであると考えられる。通気性が上がる条件下で形質転換シロイヌナズナを育成した場合、地上部でも維管束に沿って GUS の発現が見られた (データは示していない)。

GUS 活性測定法では Jefferson et al. の方法<sup>7)</sup> に従い、4-MUG を基質として、エストロゲンに曝露された形質転換シロイヌナズナから抽出したタンパク質中の GUS 活性を測定した (図 3B)。染色法と同様 50 pM より活性の上昇が見られ、800 pM で活性の最大値を示した。しかしながら、5 nM よりも高濃度のエストロゲンに曝露した場合、活性の減少が見られた。高濃度の 17 $\beta$ -エストラジオールによるシロイヌナズナの生育阻害は観察されず (データは示していない)、このレポーター遺伝子活性の減少の要因は今後解明すべき課題である。しかしながらスイスにおいて、高度のエストロゲン活性を有するとされる下水処理廃水の濃度でも 400 pM 程度との報告もあり<sup>13)</sup>、1 nM 以上の濃度で活性が低下することは、環境試料の調査においてさほど大きな問題ではないと言われていると同時に、形質転換シロイヌナズナは汚染源の一つである下水処理廃水を測定するのに十分な検出感度を有していると言える。

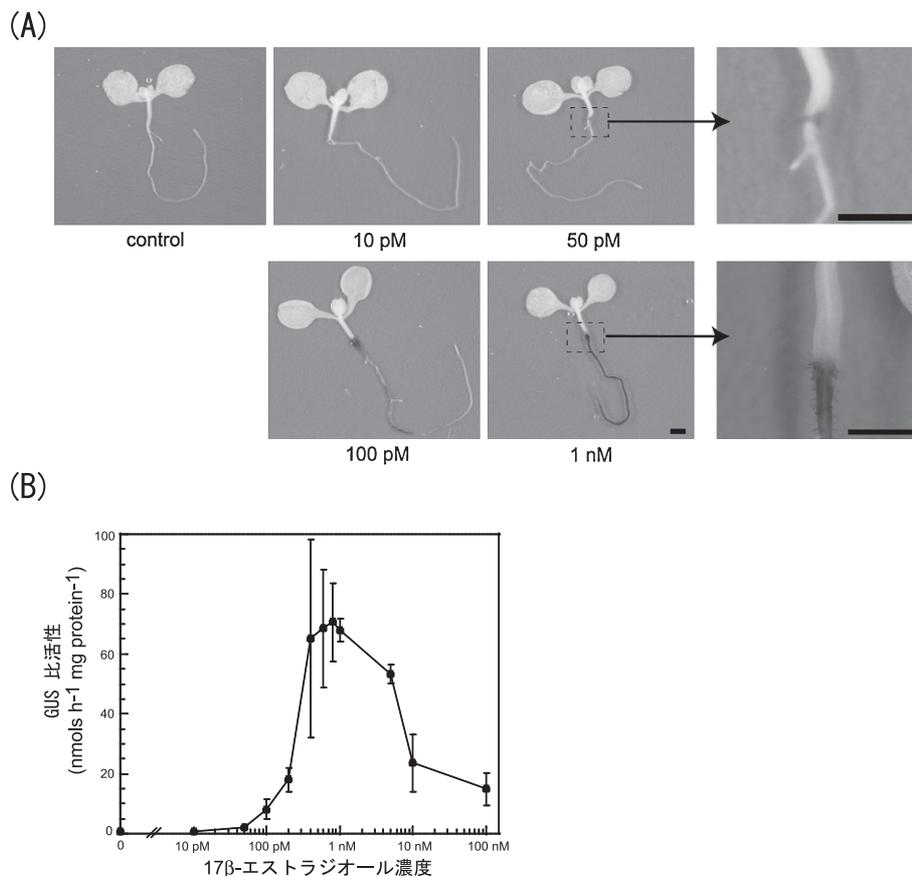


図 3. 17 $\beta$ -estradiol 濃度依存的レポーター遺伝子発現の変化。

(A) 各写真に示した異なる濃度の 17 $\beta$ -エストラジオール存在下で 22°C、明所において 1 週間生育させた 10 個体の実生 (T3) を用いて GUS 染色を行った。写真はそのうちの代表的なものを示す。なお、control は 0.01% DMSO を含む寒天培地で生育させたものである。Bar=1 mm。(B) (A) と同様に生育させた 20 個体の実生 (T3) を用いて、4-MUG を基質として GUS 活性を測定した。蛍光分光光度計を用いて測定した値を全可溶タンパク質量で標準化した。17 $\beta$ -estradiol 濃度をグラフの横軸に示した。また、縦軸は GUS 活性 (nmols 4-MU h<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>) を示す。独立した実験を 3 回行って、誤差を算出した。

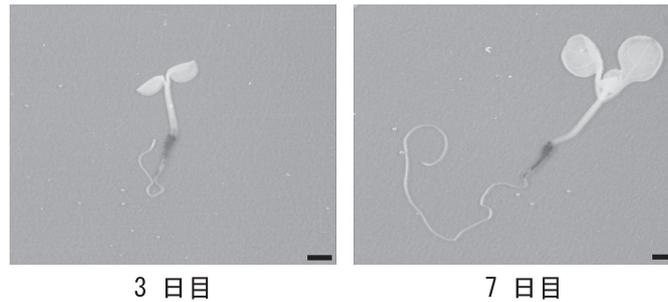


図4. エストロゲン曝露日数に依存したレポーター遺伝子の発現量の変動。  
100 pM の 17β-エストラジオール存在下で、22°C、明所において、3日目もしくは7日間育成した10個体の実生 (T3) を用いて GUS 染色を行った。写真はそのうちの代表的なものを示す。Bars=1 mm

### 3.3. 曝露期間の変化によるレポーター遺伝子の発現の様子

検出の際に必要なとされる期間を調査するため、T3 種子を 100 pM 17β-エストラジオールを含む寒天培地上で一定期間育成し、GUS の活性を染色法で測定した (図4)。その結果、3日目の芽生えの状態ですでに GUS の発現が見られたことから、種子をまいて3日間でエストロゲン活性の検出が行えることが示唆された。

### 3.4. 17β-エストラジオール以外のエストロゲン活性を持つ物質への応答

形質転換シロイヌナズナの 17β-エストラジオール以外のエストロゲン活性を持つ物質への応答を調べるために、T2 種子をジエチルstilbestロール (DES), p-n-ニルフェノール, ビスフェノール A, ゲニステインを含む寒天培地で1週間育成し、GUS 活性測定法により応答を調査した (図5)。DES は 17β-エストラジオールと非常によく似た応答を示した。その他、ゲニステインは 1 nM 以上、ビスフェノール A は 100 nM 以上、p-n-ニルフェノールは 1 μM 以上からそれぞれ活性の上昇が見られた。また、GUS 遺伝子発現のための各々のエストロゲン様物質の至適濃度は、DES 10 nM、ビスフェ

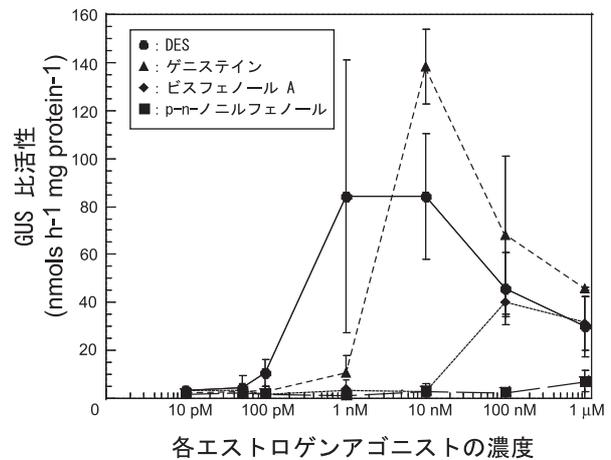


図5. さまざまなエストロゲン様物質に対するレポーター遺伝子の応答性。  
エストロゲン様物質として DES, ゲニステイン, ビスフェノール A, p-n-ニルフェノールを用いた。異なる濃度のエストロゲン様物質存在下で、22°C、明所において、1週間生育させた20個体の実生 (T2) を用いて、GUS 活性を測定した。蛍光分光光度計を用いて測定した値を全可溶タンパク質量で標準化した。縦軸は GUS 活性 (nmols 4-MU h<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>) を示す。独立した実験を3回行って、誤差を算出した。

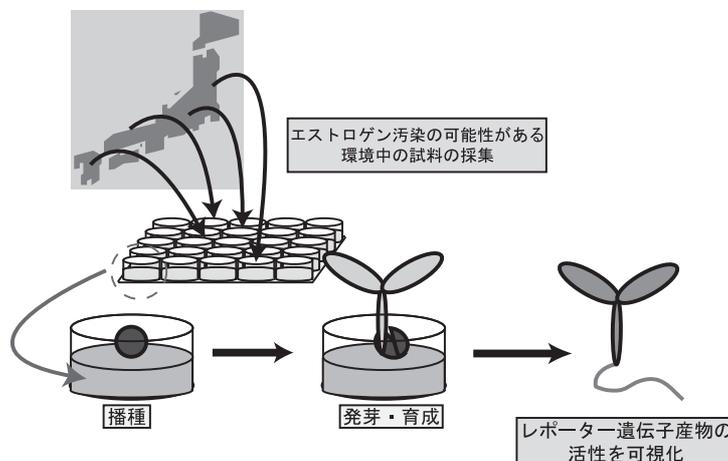


図6. 形質転換植物を用いた広域環境調査の将来像。  
環境試料を採取し、そこに直接形質転換植物の種子をまき育成し、レポーター遺伝子活性を視覚化する。育成に場所もとらず、検出のための特別な装置も必要ないため、簡便に大量のサンプルを同時に評価できることが期待される。

ノール A 100 nM, ゲニステイン 10 nM であった。これらのことから、このシロイヌナズナはエストロゲン活性を持つ多種の化学物質を検出できる能力を有しているといえる。

この研究で作製した形質転換シロイヌナズナは 17 $\beta$ -エストラジオールをはじめとしてエストロゲン活性を持つ化学物質に対して応答を示した。また、今回利用したエストロゲン受容体以外の核内受容体スーパーファミリーにも、コアクチベーターである TIF2 がリガンド依存的に相互作用することが確認されており<sup>10)</sup>、受容体を変更することで多種多様な環境ホルモン検出植物を作製できることが期待できる。

形質転換シロイヌナズナが示した 17 $\beta$ -エストラジオールに対する検出感度 (50 pM 以上) は、現在報告されている酵母や魚類を用いたバイオアッセイ法とほぼ同等の検出感度を有していると言える。しかしながら、他の生物を用いたバイオアッセイ法よりもこの植物を用いたシステムは取り扱いが非常に簡便であり、また低コストで調査を行えることも期待できるため、図 6 に模式的に示したように広域にわたるエストロゲン様物質の存在の調査に利用することが可能であると言えよう。

## 謝 辞

We thank Dr. Kotaro Yamamoto (Hokkaido Univ.), Dr. Atsushi Kato (Hokkaido Univ.), Dr. Kenji Washio (Hokkaido Univ.), and Dr. Yuji Fukuda (AIST) for their valuable discussion. Dr. Yasuo Niwa (University of Shizuoka) kindly donated the 35S-NLS-GFP plasmid. This study was supported in part by the Center of Excellence (COE) program of Japan.

## 文 献

- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Ann. Biochem.* 72: 248–254.
- Clough, S.J., and A.F. Bent. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735–743.
- Colborn, T., D. Dumanoski, and J.P. Myers. 1996. *Our Stolen Future*. Dutton, New York.
- Dalrymple, M.A., D.J. McGeoch, A.J. Davison, and C.M. Preston. 1985. DNA sequence of the herpes simplex virus type 1 gene whose product is responsible for transcriptional activation of immediate early promoters. *Nucleic Acids Res.* 13: 7865–7879.
- Fukuda, Y., and S. Nishikawa. 2003. Matrix attachment regions enhance transcription of a downstream transgene and the accessibility of its promoter region to micrococcal nuclease. *Plant Mol. Biol.* 51: 665–675.
- Gruber, C.J., W. Tschugguel, C. Schneeberger, and J.C. Huber. 2002. Production and actions of estrogens. *New Engl. J. Med.* 346: 340–352.
- Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh, and M.W. Bevan. 1987. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901–3907.
- Mueller, S.O. 2004. Xenoestrogens: mechanisms of action and detection methods. *Anal. Bioanal. Chem.* 378: 582–587.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.
- Nishihara, T., and J. Nishikawa. 2001. Bioassay for endocrine disruptors using yeast two-hybrid system. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 118: 203–210.
- Nishihara, T., J. Nishikawa, T. Kanayama, F. Dakeyama, K. Saito, M. Imagawa, S. Takatori, Y. Kitagawa, S. Hori, and H. Utsumi. 2000. Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *J. Health Sci.* 46: 282–298.
- Nishikawa, J., K. Saito, J. Goto, F. Dakeyama, M. Matsuo, and T. Nishihara. 1999. New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol. Appl. Pharm.* 154: 76–83.
- Rutishauser, B.V., M. Pesonen, B.I. Escher, G.E. Ackermann, H.R. Aerni, M.J. Suter, and R.I. Eggen. 2004. Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three in vitro assays and chemical analysis of steroids. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 857–864.
- Van den Belt, K., R. Verheyen, and H. Witters. 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56: 271–281.
- Voegel, J.J., M.J.S. Heine, C. Zechel, P. Chambon, and H. Gronemeyer. 1996. TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* 15: 3667–3675.