

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
分担研究報告書

ダイオキシン類等の有害化学物質による食品汚染実態の把握に関する研究
(2) 食品中のダイオキシン類等の有害化学物質に対する迅速測定法の開発
(2-1) ダイオキシン類に対する高感度レポータージーンアッセイの開発

分担研究者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ダイオキシン類に対する芳香族炭化水素レセプターレポータージーンアッセイの高感度化を目的として、新規ダイオキシン類応答性レポーターベクターのダイオキシン類応答性を解析した。高感度化を狙った新規レポーターベクターとして、ダイオキシン類応答性 DNA 領域(DRE)を4~20個まで連結したルシフェラーゼレポーターベクターの検討を行った。各ベクターを培養細胞株(Hepa1c1c7)に一過性のトランスフェクションを行い、2,3,7,8-TCDD(31.4 pM及び1nM)に対する応答性を検討した。TCDDにより誘導されるルシフェラーゼ活性は、連結したDREの数が増えると増大し、DREを4つしか含まない従来の場合と比較し、最大5倍の活性増強が認められた。また、DREの挿入方向が逆になった場合は、ルシフェラーゼ活性の増強が生じない傾向があった。各TCDD濃度におけるルシフェラーゼ活性倍率(各TCDD濃度における活性/TCDDを含まないブランクの活性)を算出したところ、DREを正方向に20個連結したpGL7.5Fベクターが最も高い倍率を示した。そこで、pGL7.5Fを含むいくつかのベクターについて、TCDD用量反応曲線(3.14~314 pM)を作製した。その結果、ルシフェラーゼ活性はTCDD濃度に依存して誘導され、特にpGL7.5FベクターではDREを4つしか含まない場合と比較すると、いずれの濃度でも高い活性が認められた。しかし、ルシフェラーゼ活性倍率については、いずれの濃度においても大幅な違いは認められなかった。この原因としては、レポーターベクター上の連結したDRE数が増えるに従い、ブランクにおけるルシフェラーゼ活性が上昇したためだと考えられる。今後は、ブランクにおける活性を下げる何らかの工夫が必要になると考えられる。

A.研究目的

我が国では、魚を介したダイオキシン類の摂取量が多いため、市販魚におけるダイオキシン類に対するスクリーニング法が開発できれば、食品衛生上有意義である。魚などの食品を対象にしたダイオキシン類のスクリーニング法としては、培養細胞を用いたレポータージーンアッセイ^{1,2)}や、酵素免疫測定法³⁻⁵⁾が検討されている。しかし、食品ではダイオキシン類の汚染濃度が環境試料と比較し低いことから、スクリーニング法の高感度化が強く望まれてき

た。

レポータージーンアッセイではダイオキシン類の芳香族炭化水素レセプター(AhR)を介した毒性発現機構を利用し、ダイオキシン類を検出する。これらのアッセイでは、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子にしたダイオキシン類応答性ベクターをDNAに組み込んだ培養細胞を使用する。ダイオキシン類は細胞内のAhRに結合した後、ダイオキシン類応答性ベクターのダイオキシン類応答性領域(DRE:dioxin responsive element)に結合しプロモー

ター領域を活性化することで、定量指標となるルシフェラーゼ遺伝子の発現を誘導する。しかし、汎用されているダイオキシン類応答性ベクターは4個のDREしか含んでおらず⁶⁾、微量のダイオキシン類が十分にルシフェラーゼ遺伝子を誘導できない可能性が考えられた。そこで近年になり、高感度化を狙った目的でより多くのDREを連結したダイオキシン類応答性ベクターの開発が行われた⁷⁾。しかし、DRE挿入方向と感度の関係、用量反応曲線等の検討が不十分であった。本研究では、これらの新規ベクターのダイオキシン類応答性について詳細に検討した。

B. 研究方法

1. 試薬

MEM 培地及び牛胎児血清(FBS)はインビトロジェン社より購入した。また、トランスフェクション試薬であるトランスフェクトールはGenechoice社より、細胞溶解液(CCLR)及びルシフェラーゼ定量システム(スタンダードタイプ)はプロメガ社より購入した。BCA プロテインアッセイキットはピアス社製を使用した。2,3,7,8-TCDD は関東化学より購入した。ジメチルスルホキシド(DMSO)はシグマアルドリッチ社製を使用した。

DRE を連結したダイオキシン類レポーターベクターは、マイケル S. デニソン教授(カリフォルニア大学)より供与して頂いた。図1には本レポーターベクターの作製法、表1には使用したレポーターベクターの概要を示した。本ベクターはDREを4つ含む514 bpの塩基配列部分を、1から5個まで連結し導入したものである。各ベクターは、バイオラッド社より購入したプラスミド精製キットにより精製した。

2. 装置

吸光度測定装置は、テカン社製のインフィニットF200を使用した。ルミノメーターはベルト

ールド社製の Centro LB960 を使用した。

3. 一過性トランスフェクション

マウス肝ガン細胞株(Hepa1c1c7)を10%のFBSを含むMEM培地を用いて、CO₂インキュベーター内で培養した。6ウェルプレート(あるいは12ウェルプレート)に播種し、70~85%コンフルエントまで培養した。培養細胞はDNA溶液を加える約2時間前に2%のFBSを含むMEM培地に交換した。各DNA(800~2000 ng/well)を0.1M塩化ナトリウム水溶液で希釈し、トランスフェクトールと混合後、約20分間室温でインキュベートし培養細胞に加えた。24時間培養後、2,3,7,8-TCDD溶液を含む培地(DMSOの最終濃度は0.1%)に交換し、さらに24時間培養した。培養細胞はリン酸緩衝液で2回洗浄し、CCLRを加え、約15分間振とうした。その後、細胞をセルスクレーパーを使用して回収し、マイクロチューブに回収した。遠心操作後(10,000 rpm, 2 min)、上清(20 µl)を96ウェルプレートに移した。ルシフェラーゼ発光量はルシフェラーゼ定量システムにより測定した。

4. タンパク質の定量

BCAプロテインアッセイキットにより定量した。ルシフェラーゼ活性を測定するために調整した細胞溶解液を遠心(10,000 rpm, 2 min)し、上清を精製水で10倍希釈し測定試料とした。測定方法はキットの添付書に従った。

C. 研究結果及び考察

1. DRE数とダイオキシン類応答性の関係

DRE数とダイオキシン類応答性の関係を明らかにするため、連結DREを挿入したレポーターベクターを培養細胞に一過性発現し、2,3,7,8-TCDDに対する応答性を検討した。DREを4から20まで連結したレポーターベクターについては、DREの挿入向き(正方向と逆

方向)と TCDD 応答性についても検討した。また、ネガティブコントロールとして DRE を含まない pGL7.0 ベクター、ポジティブコントロールとしてレポータージーンアッセイで汎用されている pGL6.1 ベクター (DRE を 4 個含む) を使用した。図 2 (a) には TCDD (31.4 pM, 1 nM) を 24 時間暴露させた時の、ルシフェラーゼ活性 (RLU/ μ g protein) を示した。12 個の DRE が挿入されたベクター (pGL7.3F) で最大のルシフェラーゼ活性が認められた。DRE を 4 個含むベクター (pGL7.1F) と比較し、約 5 倍の増強が認められた。また、pGL6.1 と比較すると、約 8 倍の増幅が認められた。全体的に DRE の挿入数が増えるとともに、ルシフェラーゼ活性が上昇する傾向が認められた。なお、DRE が逆方向に挿入された場合では、ルシフェラーゼ活性の大幅な増強は認められなかった。

図 2 (b) には各ベクターのルシフェラーゼ活性倍率 (各 TCDD 濃度における活性/TCDD を含まないブランクの活性) を示した。挿入された DRE 数による、活性倍率の大きな違いは認められなかった。この原因としては、ルシフェラーゼ活性が増大したベクターでは、TCDD を含まないブランクにおけるルシフェラーゼ活性も増大したためだと考えられる。pGL6.1 と比較すると、活性倍率はやや劣る程度であった。

2. TCDD 用量反応曲線

最もルシフェラーゼ活性倍率が高かった pGL7.5F について、TCDD 用量反応曲線を作製した。図 3 (a) には pGL7.5F の他、対照として pGL6.1 及び pGL7.1F の用量反応曲線を示した。全てのベクターで TCDD 濃度依存的にルシフェラーゼ活性の誘導が認められた。特に pGL7.5F ベクターはいずれの TCDD 濃度においても、他のベクターより顕著に高いルシフェラーゼ活性を示した。従って、低濃度におけるルシフェラーゼ活性の検出が容易になると考えられる。

図 3 (b) は各濃度におけるルシフェラーゼ活性倍率を示した。DRE を増やした場合は前述したとおりブランク値が上昇するため、pGL7.1F と pGL7.5F における活性倍率の大きな違いは認められなかった。汎用されている pGL6.1 ベクターと比較すると活性倍率は約半分であり、やや劣る程度であった。

以上の結果から、DRE を多く含むレポーターベクターは、ダイオキシン類に対する応答性が増強し、低濃度でのダイオキシン類検出が容易になる可能性があった。しかし、DRE を増やすにつれブランク値の上昇が生じるため、より高感度なアッセイを構築するためにはブランク値を低下させる必要があると考えられる。今後は、安定細胞株の作製を行うなどして、ブランク値が低いクローンを選択する必要があると考えられる。

D. 結論

- 1) 連結 DRE を正方向に多く導入することで、レポーターベクターの TCDD 応答性が高まった。
- 2) 連結 DRE を多く含むと、ブランク値におけるルシフェラーゼ活性の上昇が生じるため、活性倍率の大幅な上昇は認められなかった。
- 3) 今後は、検討したベクターを使用して安定細胞株を作製し、ブランク値の低いクローンを選択する必要があると考えられる。

E. 参考文献

- 1) 平成 13 年度厚生科学研究費補助金研究報告書「ダイオキシンの汚染実態把握及び摂取低減化に関する研究」(分担報告書 1-2 ダイオキシン類の迅速測定法の開発及び分析の精密化に関する研究)
- 2) Hoogenboom L, Goeyens L, Carbonnelle S, Van Loco J, Beernaert H, Baeyens W, Traag W, Bovee T, Jacobs G, Schoeters G.

The CALUX bioassay: Current status of its application to screening food and feed. Trends Analytical Chem., 25 (2006) 410-420.

3) 平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「ダイオキシンの汚染実態把握及び摂取低減化に関する研究」(分担報告書 3-1 ELISA による市販魚中のコプラナーPCBs 及び総 PCBs のスクリーニング法の開発)

4) 平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「ダイオキシン類による食品汚染実態の把握に関する研究」(分担報告書 3-1 PCB ELISA と Ah イムノアッセイによる市販魚中のダイオキシン類のスクリーニング法)

5) 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「ダイオキシン類による食品汚染実態の把握に関する研究」(分担報告書 3-1 表面プラズモン共鳴センサーを用いた市販魚中のダイオキシン類スクリーニング法)

6) Denison MS, Zhao B, Baston DS, Clark GC, Murata H, Han D. Recombinant cell bioassay systems for the detection and relative quantitation of halogenated dioxins and related chemicals. Talanta, 63, (2004) 1123-1133.

7) 平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「化学物質リスク研究推進事業研究報告書」(外国への日本人研究者派遣事業)109-136

供与していただいたマイケル S.デニソン教授(カリフォルニア大学)に感謝いたします。

F.研究業績

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

【謝辞】

ダイオキシン類応答性レポーターベクターを

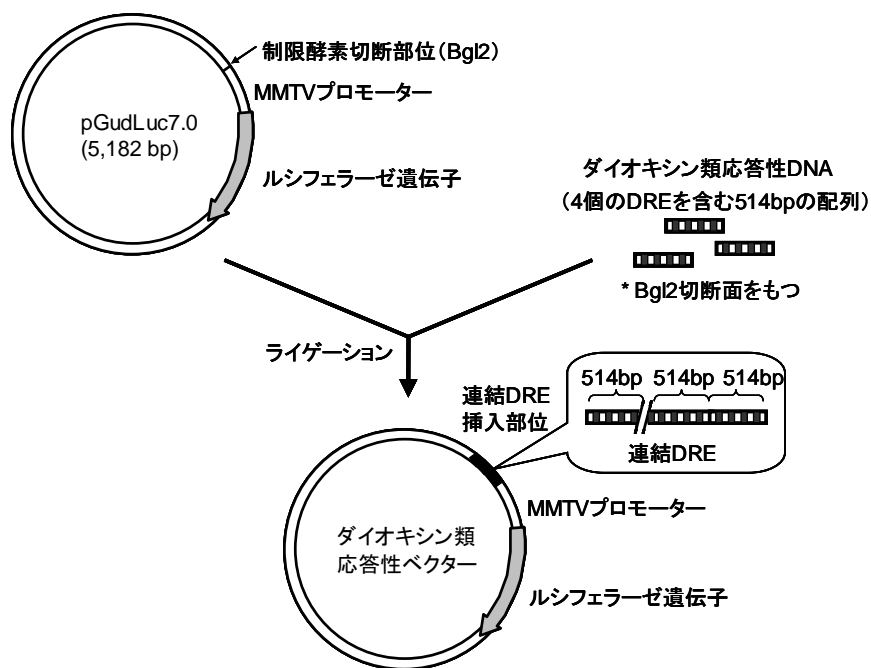


図1 連結DREを含むダイオキシン類応答性ベクターの作製法

表1 使用したダイオキシン類応答性ベクター

DREの数	ベクター名	挿入配列の向き ¹⁾
4	pGL7.1F (1-1)	⇨(正方向)
	pGL7.1R (1-2)	⇨(逆方向)
8	pGL7.2F (10-11)	⇨⇨
	pGL7.2R (1-21)	⇨⇨
12	pGL7.3F (14-8)	⇨⇨⇨
	pGL7.3R (15-12)	⇨⇨⇨
16	pGL7.4F (14-4)	⇨⇨⇨⇨
	pGL7.2R (16-6)	⇨⇨⇨⇨
20	pGL7.5F (3-18)	⇨⇨⇨⇨⇨

1) 1つの挿入配列に4つのDREを含んでいる。

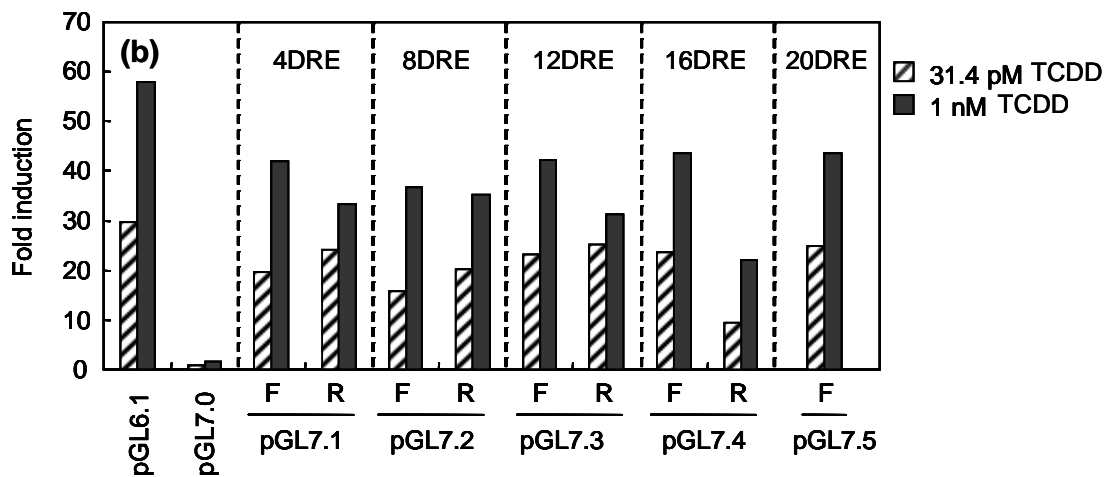
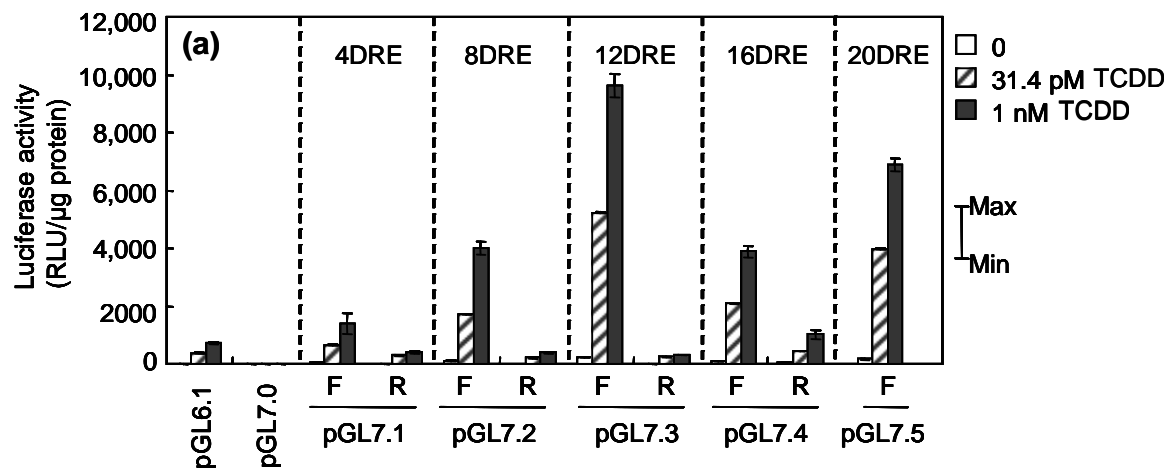


図2 連結DREを含むレポーターベクターのダイオキシン類応答性
 ベクター名のFは正方向に、Rは逆方向に連結したDREを含む
 (a) ルシフェラーゼ活性
 (b) ルシフェラーゼ活性倍率(各濃度における活性/ブランクにおける活性)

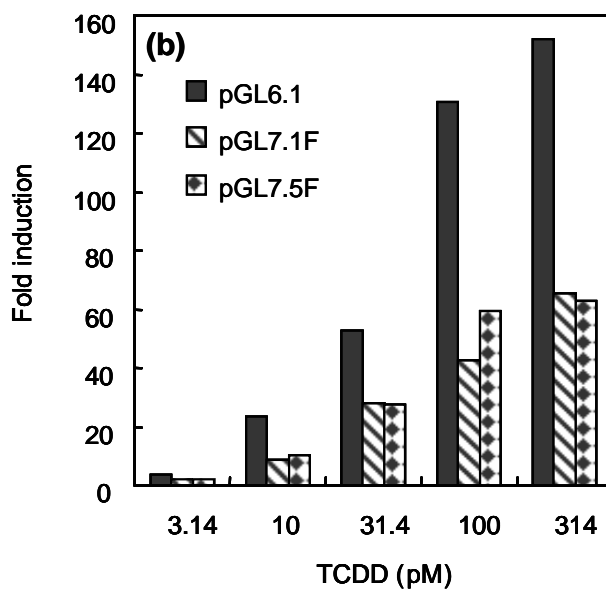
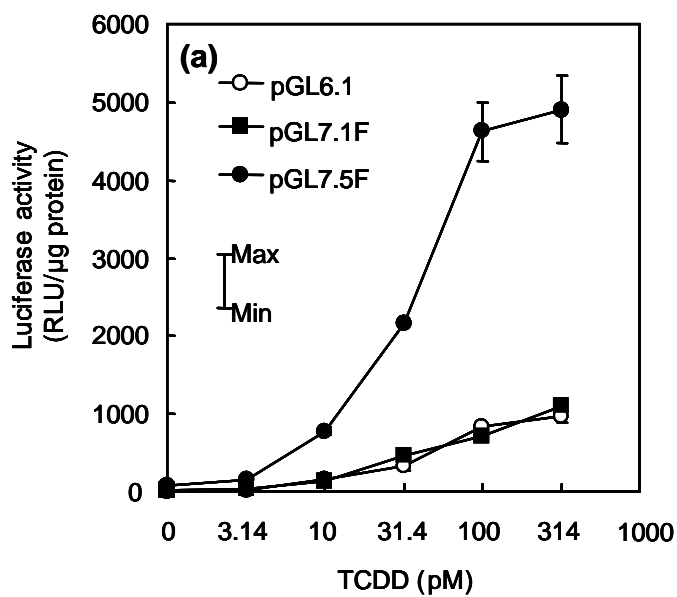


図3 TCDD用量反応曲線

ベクター名のFは正方向に、Rは逆方向に連結したDREを含む

(a) ルシフェラーゼ活性

(b) ルシフェラーゼ活性倍率(各濃度における活性/blankにおける活性)