

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

研究分担者 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を用いて安定発現細胞株の作製を行った。レポーターベクターには高感度化を図るため、ダイオキシン応答配列(DRE:Dioxin Response Element)を多く含むベクターを使用した。レポーター遺伝子にホタルルシフェラーゼを用いたベクターとして pGL7.1(4DRE を含む)、pGL7.3(12DRE を含む)、又は pGL7.5(20DRE を含む)を培養細胞株(Hepalclc7)に遺伝子導入し、2,3,7,8-TCDD に対する応答性を指標に安定発現細胞株のスクリーニングを行った。その結果、DRE を多く含む pGL7.3 あるいは pGL7.5 を遺伝子導入した細胞株では、低濃度の TCDD(10 pM)により誘導されるルシフェラーゼ活性が、pGL7.1 を導入した細胞株と比較し、2 倍以上に上昇した。また、ルシフェラーゼ活性誘導倍率(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、pGL7.3 を遺伝子導入した細胞株が最も高い倍率を示した。さらに、簡便化を図るためレポーター遺伝子に緑色蛍光タンパク質(サンゴ由来の ZsGreen1)を使用したレポーターベクターの作製を行った。pZs7.1(4DRE を含む)、pZs7.3(12DRE を含む)、又は pZs7.5(20DRE を含む)GFP のレポーターベクターを作製し、各ベクターを培養細胞株(H4IIE)に遺伝子導入した。DRE を最も多く含む pZs7.5 を導入した細胞株では、低濃度の TCDD(10 pM)に対する蛍光強度が、pZs7.1 を導入した細胞株と比較し約 4 倍上昇した。また、GFP 誘導倍率についても 3 倍程度高い値が得られた。このように DRE を多く含む新規レポーターベクターを使用した結果、TCDD に対して高い応答性を有するレポータージーンアッセイが開発できた。本レポータージーンアッセイは高感度であるため、食品など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期待できる。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所

石塚 菜穂子

A.研究目的

人が暴露するダイオキシン類の殆ど全ては食品の摂取に由来するため、食品中の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。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、例えば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。

昨年度、我々は DRE を多く含んだルシフェラーゼレポーター (pGL7.1~7.5) の特性を詳細に解析した結果、DRE の数が増えると TCDD 応答性が高まることを確認した⁷⁾。そこで、今年度は本レポーターベクターを使用して安定細胞株の作製を行った。さらに、測定法の簡便化を図るため緑色蛍光タンパク質 (GFP) を使用したレポータージーンアッセイについても検討した。レポーター遺伝子として汎用されているホタルルシフェラーゼは高感度であるが、発光測定に基質を必要とするため測定操作が煩雑になる。これに対し、GFP を利用したレポータージーンアッセイは、測定に基質を必要としないため優れた迅速性を有する。そこで、レポーター遺伝子としてサンゴ由来の GFP である ZsGreen1 を用いたレポーターベクターを開発し、これらを使用して安定発現細胞株の作製を行った。

B. 研究方法

1. 試薬

MEM 培地、牛胎児血清 (FBS)、及びトランスフェクション試薬であるリポフェクタミン 2000 はインビトロジェン社より購入した。RPMI 1640 培地、ペニシリン/ストレプトマイシン混合溶液はナカライテスク株式会社より購入した。また、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。2,3,7,8-TCDD は和光純薬より購入した。G418 及び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。pZsGreen1-1 レポーターベクターはクローンテック社より購入した。

DRE を含むダイオキシン応答性ルシフェラーゼレポーターベクター (pGL7.1、pGL7.3 及び pGL7.5)、Hepa6.1 細胞、及び H4G1.1c2 細胞は、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。pGL7.1、pGL7.3 及び pGL7.5 の概略は表 1 に示した。

2. 装置

ルミノメーターはベルトールド社製の Centro LB960 を使用した。蛍光プレートリーダーはテカン社製のインフィニット F200 を使用した。

3. DRE を多数含むダイオキシン類応答性 GFP ベクターの作製

pGL7.1、pGL7.3 または pGL7.5 より、DRE 領域 (4、12 または 20 個の DRE を含む) とマウス乳房腫瘍ウイルス (MMTV) プロモーター領域を含む DNA 断片 (800~3,000 bp) を 2 種類の制限酵素 (HindIII 及び XhoI) で切り出し、pZsGreen レポーターベクターにサブクローニングした。なお、本レポーターベクターは、最も強い蛍光強度を有する GFP の一つである ZsGreen1 (サンゴ由来) をレポーターとしている。作製した 3 種類のベクター (pZs7.1、pZs7.3 及び pZs7.5) の概略を表 1 に示す。

3. 安定発現細胞株の作製

培養細胞株 (Hepa1c1c7 又は H4IIE) は MEM 培地 (10%FBS 含む) を用いて CO₂ インキュベーター内で培養した (37℃、5%CO₂)。24 ウェルプレートに播種し、約 90%コンフルエントまで培養した。各ルシフェラーゼレポーターベクター (pGL7.1、pGL7.3 あるいは pGL7.5、各 0.6 µg) は pSV2neo (G418 耐性遺伝子を有するベクター、0.2 µg) と混合し、リポフェクタミ

ン2000を使用して、Hepa1c1c7細胞に遺伝子導入した。24時間培養後、100 mm ディッシュ(約10枚)に播種し、さらに24時間培養した。G418(500 µg/ml)を含む培地に交換し、約2週間培養した。この間、3日おきに培地交換を実施した。耐性細胞を選択し、TCDDに対する応答性を指標にスクリーニングした。

各 GFP レポーターベクター(pZs7.1、pZs7.3あるいはpZs7.5、各0.8 µg)については、リポフェクタミン2000を使用して、H4IIE細胞に遺伝子導入した。その後の操作はルシフェラーゼレポーターベクターの場合と同様に行った。

4. ルシフェラーゼアッセイ

Hepa6.1細胞はRMPI1640培地(8%FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン含有)、作製した安定細胞株はMEM培地(10%FBS及び500 µg/ml G418を含む)を用いてCO₂インキュベーター内で培養した(37°C、5%CO₂)。96ウェルプレートに細胞を播種(75,000 個/well)し、約24時間培養後、種々の濃度のTCDD(DMSOの最終濃度は1%)に暴露した(100 µl/well)。一定時間培養後、培地を除きウェルをリン酸緩衝液で2回洗浄した。CCLRを加え(50 µl/well)、プレートミキサーで15分間振とう後、ルシフェラーゼ定量試薬を加え(100 µl/well)、ルミノメーターにより発光強度(RLU)を測定した。

5. GFP アッセイ

H4G1.1c2細胞、又は作製した安定発現細胞はMEM培地(10%FBS及び500 µg/ml G418を含む)を用いてCO₂インキュベーター内で培養した(37°C、5%CO₂)。96ウェルプレートに細胞を播種(150,000 個/well)し、約24時間培養後、種々の濃度のTCDD(DMSOの最終濃度は1%)に暴露した(100 µl/well)。約24時間培養後、蛍光マイクロプレートリーダーにより蛍光強度を(励起波長485 nm、蛍光波長535 nm)測定した。

C.研究結果及び考察

1. ルシフェラーゼレポータージーンアッセイ

pGL7.1、pGL7.3又はpGL7.5を遺伝子導入した安定発現細胞株を樹立し、TCDDに対する応答性を検討した(図1)。

DREを多く含むpGL7.3又はpGL7.5を導入した3-41又は5-46細胞株では、DREが少ないpGL7.1を導入した1-2細胞株と比較し、TCDDにより誘導されるルシフェラーゼ活性が大きく上昇した(図1(a))。DREを最大数(20個)含むpGL7.5を導入した細胞株では最も高いルシフェラーゼ活性を示し、DREを最小数(4個)含むpGL7.1を導入した細胞株と比較すると、10 pM TCDDに対して約4倍高いルシフェラーゼ活性が得られた。また、3-41及び5-46細胞株は汎用されているルシフェラーゼレポータージーンアッセイの安定発現細胞株であるHepa6.1と比較すると、10 pM TCDDに対して100倍以上高いルシフェラーゼ活性が得られた。

次に、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(図1(b))。DERを多く含むベクターを導入した3-41及び5-46細胞株では、1-2細胞株と比較し誘導倍率についても上昇が認められた。最も誘導倍率が高かった3-41細胞株では10 pM TCDDに対して10倍近い上昇が認められた。汎用されている細胞株であるHepa6.1と比較した場合も、10 pM TCDDに対して10倍近い誘導倍率の上昇であった。

今回作製した細胞株は高いルシフェラーゼ活性を示すため、短時間のTCDD暴露で十分なルシフェラーゼ活性の誘導が期待できた。そこで、最も高い誘導倍率を示した3-41細胞株を用いて、TCDD暴露時間の検討を行った(図2)。TCDDにより誘導されるルシフェラーゼ活性(図2(a))及び誘導倍率(図2(b))は24時間まで経時的に上昇した。短時間のTCDD暴露による大幅な誘導倍率の上昇は

認められなかった。

2. GFP レポータージーンアッセイ

pZs7.1、pZs7.3 又は pZs7.5 を遺伝子導入した安定発現細胞株を樹立し、TCDD に対する応答性を検討した(図 3)。DRE を最も多く含む pZs7.5 を導入した 5-36 細胞株は、DRE が少ない pZs7.1 を導入した 1-34 細胞株と比較し、10 pM TCDD に誘導される蛍光強度が約 4 倍上昇した(図 3(a))。また、既存の改良型 GFP (EGFP) をレポーターに使用した H4G1.1c2 細胞株と比較した場合も、10 pM TCDD に対して蛍光強度が約 4 倍に上昇した。なお、5-36 細胞株ではブランク(溶媒対照)の若干の上昇が認められた。また、DRE を 12 個含む pZs7.3 を導入した 3-28 細胞株では、有意な蛍光強度の上昇は認められなかった。pZs7.3 遺伝子導入後の TCDD 応答性細胞の数が極端に少なかったため、遺伝子導入が上手く行われなかった可能性がある。各ベクターの GFP 誘導倍率(各 TCDD 濃度における蛍光強度/TCDD を含まないブランクの蛍光強度)を示した(図 3(b))。その結果、5-36 細胞株は 10 pM TCDD に対して最も高い誘導倍率を示した。

既知の H4G1.1c2 細胞株では 33°C で培養した場合、TCDD により誘導される EGFP が 37°C で培養するよりも有意に上昇することが知られている^{8,9)}。そこで、培養温度が 5-36 細胞株の GFP 誘導に与える影響を検討した(図 4)。しかし、TCDD により誘導される GFP は、5-36 細胞株を 33°C で培養しても、通常の培養温度である 37°C で培養した場合と大差はなく、バックグラウンドが若干、上昇する傾向が認められた(図 4(a))。また、誘導倍率を比較した場合も、5-36 細胞株を 37°C で培養した場合が、最も高い値を示した(図 4(b))。今回使用した ZsGreen1 はサンゴに由来する GFP であり、EGFP(クラゲ由来)とは由来する生物種が異なる。従って、EGFP とは最適な培養温度が異

なると考えられる。

D. 結論

- 1) DRE を多く含むレポーターベクターを遺伝子導入し、TCDD に高応答性を有するレポータージーンアッセイの開発に成功した。
- 2) レポーター遺伝子にルシフェラーゼを使用したアッセイの他、迅速化の向上を目指して GFP を使用したレポータージーンアッセイを開発した。
- 3) 既知のレポータージーンアッセイと比較して高感度であり、食品など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期待できる。

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 19 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」(分担報告書 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)

8) Nagy SR, Sanborn JR, Hammock BD, Denison MS. Development of a green fluorescent protein-based cell bioassay for the rapid and inexpensive detection and characterization of Ah receptor agonists. *Toxicological Sciences*, 65 (2002) 200-210.

9) Zhao B, Baston DS, Denison MS. The application of lowered incubation temperature to enhance CALUX and CAFLUX cell bioassay responses in environmental analysis. *Organohalogen Comp.*, 70 (2008) 1124-1127.

クターを利用したアプローチ. 第 11 回環境ホルモン学会 (2008.12)

2) 堤 智昭、石塚菜穂子、渡邊敬浩、松田りえ子: 緑色蛍光タンパク質を用いたダイオキシン類に対する新規レポータージーンアッセイ. 第 18 回環境化学討論会 (2009.6) 発表予定

【謝辞】

ダイオキシン類応答性レポーターベクター及び細胞株を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

1) Tsutsumi, T., Ishizuka, N., Denison, MS., Watanabe, T., Matsuda, R. A new reporter gene assay for dioxins using green fluorescent protein: increased responsiveness using amplification of the dioxins responsive element, *Organohalogen Compounds* (投稿予定).

2. 学会発表

1) 堤 智昭、石塚菜穂子、松田りえ子、Michael S. Denison: ダイオキシン類に対する高感度 CALUX バイオアッセイの開発 —ダイオキシン類応答性領域を多数含むレポーターベ

表1 本研究で使⽤したダイオキシン類応答性レポーターベクター

ベクター名称	レポーター遺伝子	プロモーター	含まれるDRE数
pGL7.1	ルシフェラーゼ(ホタル)	MMTV	4
pGL7.3	ルシフェラーゼ(ホタル)	MMTV	12
pGL7.5	ルシフェラーゼ(ホタル)	MMTV	20
pZs7.1	GFP(ZsGreen1)	MMTV	4
pZs7.3	GFP(ZsGreen1)	MMTV	12
pZs7.5	GFP(ZsGreen1)	MMTV	20

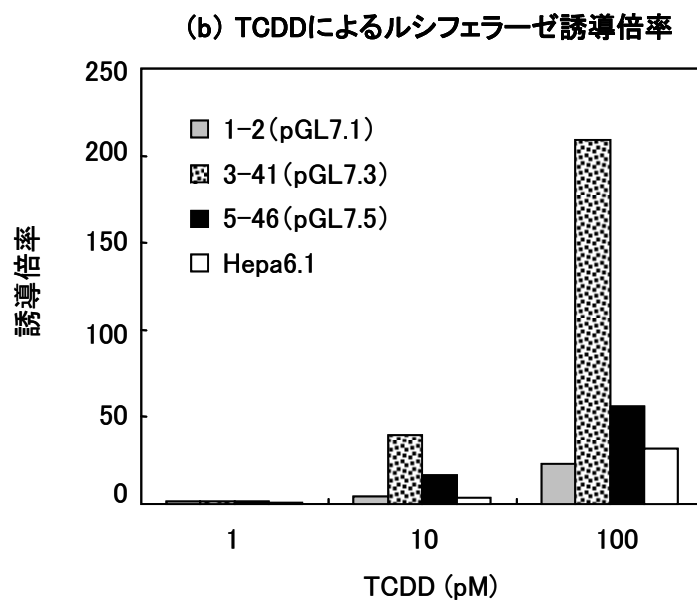
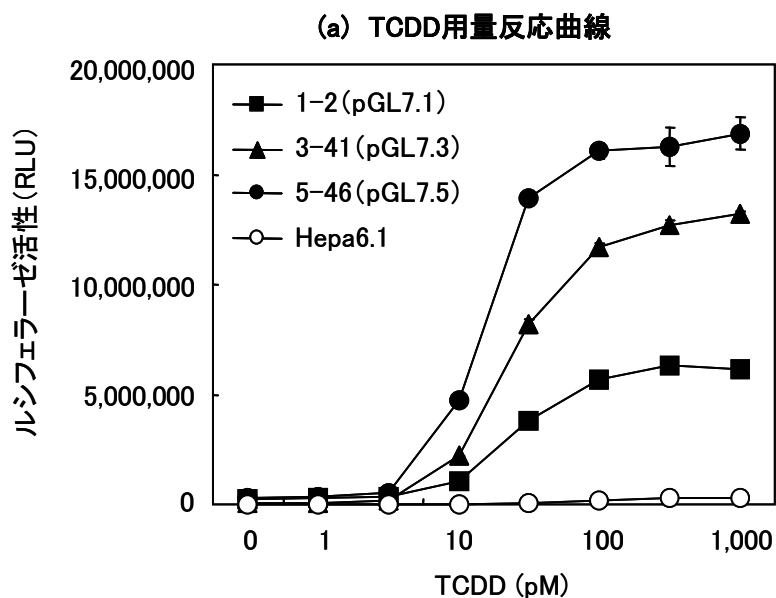


図1 ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにおけるTCDD用量反応曲線(a)とルシフェラーゼ誘導倍率(b)

作製した細胞株(1-2, 3-41及び5-46)とHepa6.1細胞株を種々の濃度のTCDDに37°Cで約24hr暴露させた。(a)各濃度についてトリPLICATEで測定し、平均値及び標準偏差を示した。(b)誘導倍率は、各TCDD溶液における活性を溶媒対照(DMSO)の活性で除し算出した。

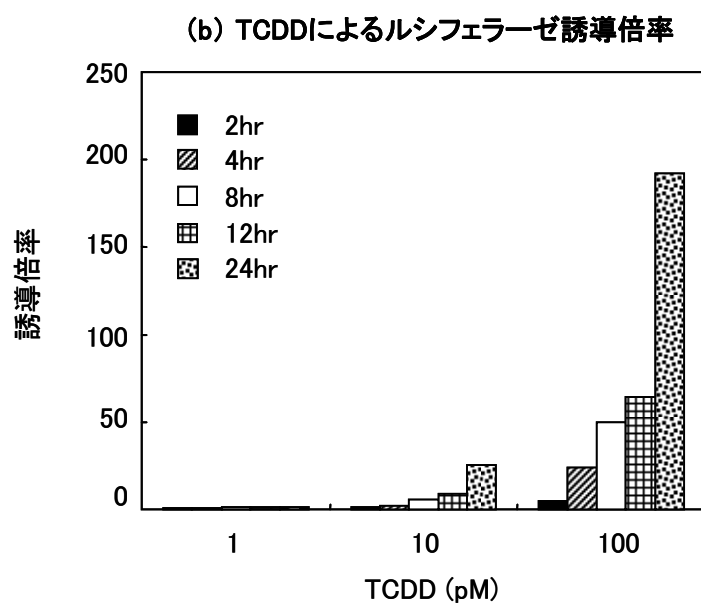
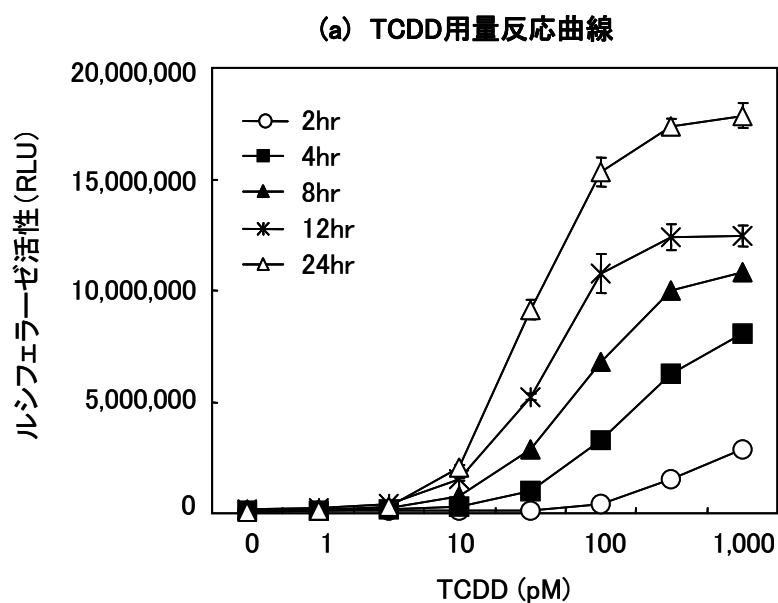


図2 ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ(3-41細胞株)におけるTCDD暴露時間の検討

3-41細胞株を種々の濃度のTCDDに37°Cで2~24hr暴露させた。(a)各濃度についてトリPLICATEで測定し、平均値及び標準偏差を示した。(b)誘導倍率は、各TCDD溶液における活性を溶媒対照(DMSO)の活性で除し算出した。

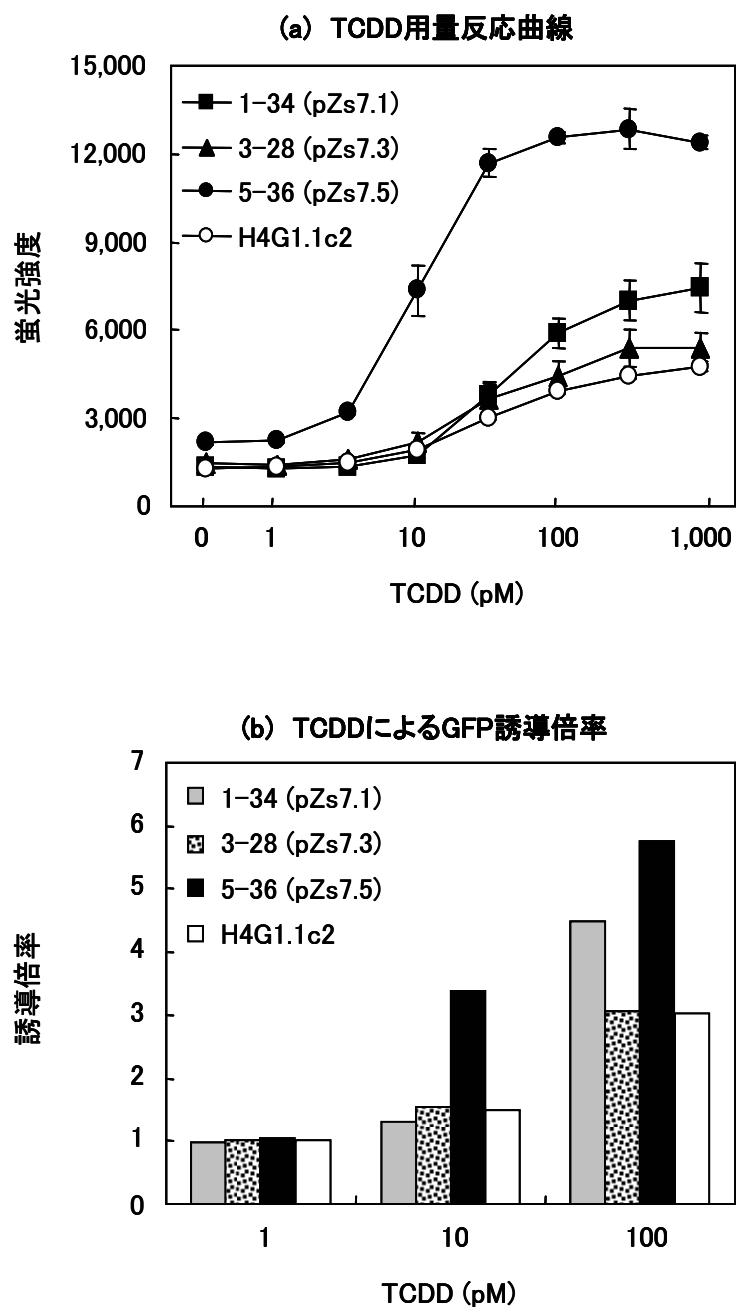


図3 GFPレポーター遺伝子アッセイにおけるTCDD用量反応曲線(a)とGFP誘導倍率(b)

作製した細胞株(1-34, 3-28及び5-36)とH4G1.1c2細胞株を種々の濃度のTCDDに37℃で約24hr暴露させた。(a)各濃度についてトリPLICATEで測定し、平均値及び標準偏差を示した。(b)誘導倍率は、各TCDD溶液における活性を溶媒対照(DMSO)の活性で除し算出した。

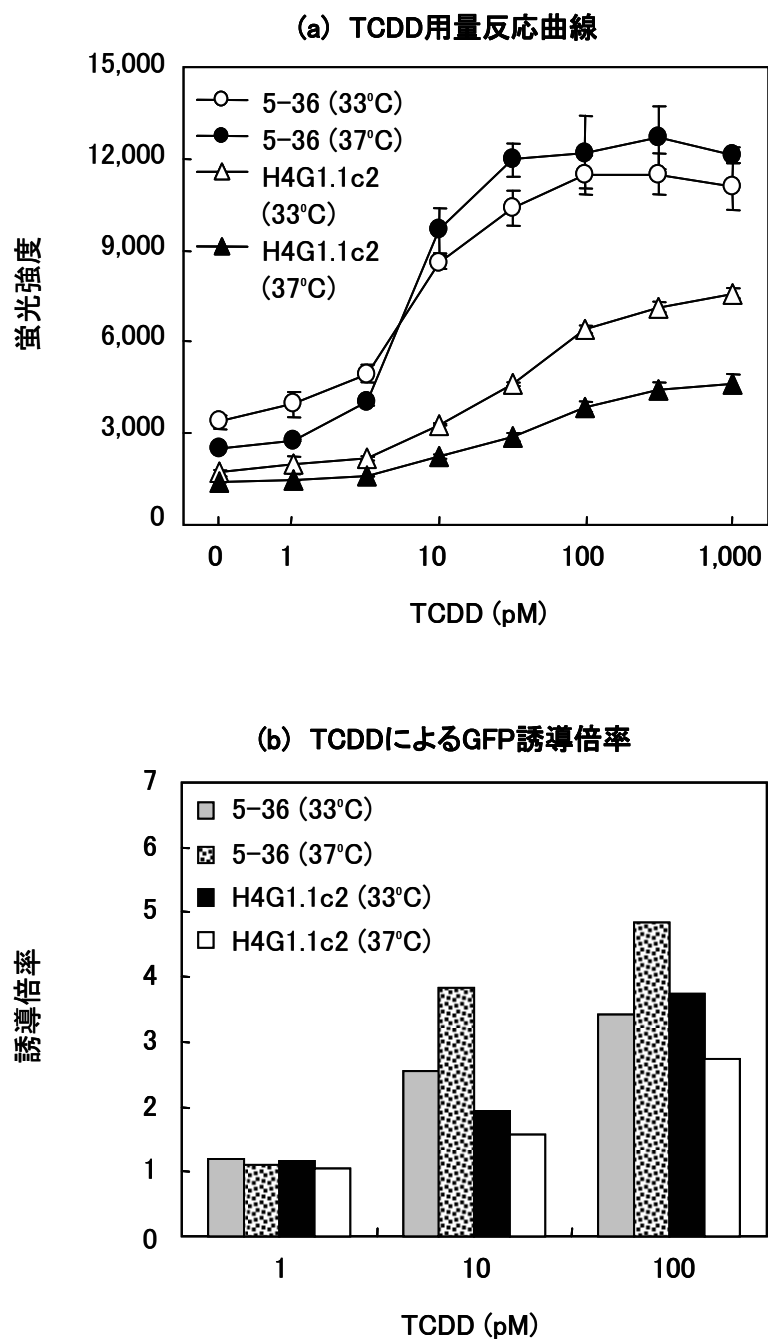


図4 GFPLレポーター遺伝子アッセイにおける培養温度の検討

5-36細胞株とH4G1.1c2細胞株を種々の濃度のTCDDに33°Cあるいは37°Cで約24hr暴露させた。(a)各濃度についてトリPLICATEで測定し、平均値及び標準偏差を示した。(b)誘導倍率は、各TCDD溶液における活性を溶媒対照(DMSO)の活性で除し算出した。