

## ストレス蛋白質遺伝子のプロモーター活性の可視化と評価

大橋智子,<sup>\*,a,b</sup> 佐藤哲也,<sup>b</sup> 桑田 実,<sup>a</sup> 藤村 庄,<sup>a</sup> 竹谷 茂<sup>b</sup>

## Visualization and Evaluation of the Promoter Activities of Genes for Stress-inducible Proteins in Response to Environmental Pollutants

Tomoko OHASHI,<sup>\*,a,b</sup> Tetsuya SATOH,<sup>b</sup> Minoru KUWATA,<sup>a</sup> Taira FUJIMURA,<sup>a</sup> and Shigeru TAKETANI<sup>b</sup><sup>a</sup>Hyogo Prefectural Institute of Technology, 3-1-12 Yukihiro-cho, Suma-ku, Kobe 654-0037, Japan,and <sup>b</sup>Department of Biotechnology, Kyoto Institute of Technology, Hashigami-cho,

Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

(Received September 19, 2006; Accepted December 27, 2006)

We examined the systematic assay of the reporter gene for the assessment of heavy metals and organic chemical pollutants using the reporter plasmids carrying stress-responsive elements fused to the green fluorescence protein (GFP) gene as follows: *metallothionein (MTIIA)*, *heme oxygenase-1 (HO-1)*, *quinone reductase (ARE)*, and *c-fos* genes. The treatment of COS7 cells in which the *c-fos* gene promoter-, *ARE*-, or *HO-1* enhancer-fused GFP with a low concentration of NaAsO<sub>2</sub> was introduced led to the detection of the fluorescent cells, and an agrichemical paraquat enhanced the fluorescence of *ARE* or *HO-1* enhancer-transfected cells. The cells in which the plasmid carrying the *MT-IIA* gene promoter (the -765 bp upstream from the transcription initiation site) was introduced highly expressed GFP on treatment with CdCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, or CuCl<sub>2</sub>. The plasmid carrying seven metal-responsive elements of the *MT-IIA* gene increased the response of the fluorescence intensity to these heavy metals. These results indicated that the use of the gene promoters and enhancers of the stress-responsive genes fused to GFP contributes to the visualization of pollutant-responsive mammalian cells and can be applied to biomonitoring of environmental pollution.

**Key words**—bioassay; environmental pollution; fluorescent cells; reporter assay

## 序 論

環境汚染物質の中で無機物質には、重金属に属する水銀、カドミウム、クロム及びスズ、亜金属に属するヒ素やセレン、さらにガス状のフッ素、窒素酸化物やオゾンなどがある。無機金属の汚染物質としての特徴は、微量ではあるが栄養にとって不可欠な銅、亜鉛などがある反面、微量でも有害なものも多い。また有益なものであっても、許容濃度を超えると有害作用を示すことがある。一方、農薬等を含む有機汚染物質は、環境下において分解されたり、生体内で代謝されて他物質に変化するので、化合物そのものや代謝分解産物が毒性を持つ場合もあり、それらの作用機序は複雑である。

環境汚染物質が生体内に摂取されると、生体内の

解毒や分解に係わる機構が働く。その機構に寄与する遺伝子が知られており、環境汚染物質によって応答する数多くの遺伝子の中でも、ストレス誘導蛋白質 heme oxygenase-1 (HO-1)、c-fos、quinone reductase (QR) 及び metallothioneinIIA (MTIIA) の機能や発現機構について多くの研究が行われている。

HO-1 はヘムを分解する酵素として知られており、カドミウム、ヒ素、<sup>1)</sup>コバルト、低酸素状態<sup>2)</sup>などで発現誘導され、生体内で生じた Reactive oxygen species (ROS) の消去を通して種々の疾患の予防に働いている。HO-1 遺伝子の活性化にはプロモーター部位の MRE (metal-response element) や MARE (Maf-recognition element) が働くことが知られている。<sup>3)</sup> また、癌遺伝子でもある c-fos も種々のストレスによって誘導されることが知られている。<sup>4-6)</sup>

QR は、キノン化合物の 2 電子を還元することにより、キノンの有害な影響から細胞を保護すると考

<sup>a</sup>兵庫県立工業技術センター、<sup>b</sup>京都工芸繊維大学大学院応用生物学部門

\*e-mail: tomoko@hyogo-kg.go.jp

えられ,<sup>7)</sup> 種々のフェノール性抗酸化剤などで発現誘導されることが知られている。その発現誘導には遺伝子プロモーターの XRE (xenobiotic-response element) や ARE (antioxidant-response element) 部位が関与することが知られている。<sup>8,9)</sup>

金属結合蛋白質メタロチオネインの一遺伝子である MTIIA は、重金属を始めとする多くのストレスに応答するが、それには MTIIA 遺伝子プロモーター配列に存在する MRE を介することが知られている。<sup>10)</sup>

プロモーターやエンハンサーの転写活性を調べる方法としては、chloramphenicol acetyltransferase や luciferase 遺伝子のレポーター解析が用いられている。近年、蛋白質の機能を視覚的に観察する Green fluorescence protein (GFP) などの蛍光蛋白質が用いられるようになった。<sup>11)</sup> 本研究では、ストレス応答遺伝子の 5'プロモーター領域に GFP 遺伝子を結合させてレポーターを作製し、生細胞内における環境汚染物質によるストレス応答遺伝子の発現活性を視覚的に観察して、汚染物質を検出する方法の開発を試みた。

## 材料と方法

**1. 材料** 動物細胞発現ベクターは pEGFP-1 (BD Biosciences Clontech, Fig. 1), pGL2 及び pGL3 (Promega) を用いた。c-fos のプロモーター領域 (-404/+41) を含むプラスミドとしては pGL2-c-FOS を用いた。<sup>12)</sup> HO-1 のエンハンサーを含むプラスミドは、pGL2-HO-1 を用いた。pGL2-HO-1 には、マウス HO-1 遺伝子の 5'側の約 6 kb 上流域に含まれている MARE site (161 bp) と家兎  $\beta$ -グロビン遺伝子の TATA-BOX が組み込まれている。ARE を含むプラスミドとしては、pGL2-ARE を用いた。pGL2-ARE には、ラット QR 遺伝子の 5'上流に含まれている領域 (-434/-404) と家兎  $\beta$ -グロビン遺伝子の TATA-BOX が組み込まれている。pGL2-ARE と pGL2-HO-1 は伊東 健博士 (筑波大学基礎医学系) から供与されたものを用いた。MTIIA プロモーター領域を含むプラスミドとしては、pBS-hMTIIA (柴原茂樹博士 (東北大学医学部) からの供与) の HindIII/BamHI (-764/+76) 処理断片を pGL3 に挿入して作製した。

**2. プラスミドの作製** pHO-1, pGL2-ARE 及

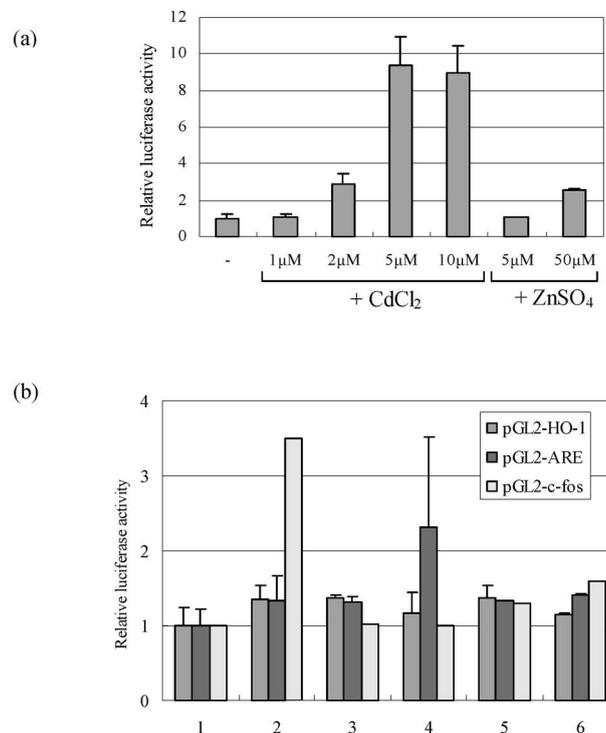


Fig. 1. The Luciferase-reporter Activity of the MTIIA and c-Fos Gene Promoters, and ARE and HO-1 Enhancers

(a): COS7 cells were transfected with pGL2-MTIIA and pRL-CMV. After 24 h, the cells treated with vehicle, CdCl<sub>2</sub> (1, 2, 5, 10 μM) and ZnSO<sub>4</sub> (5, 50 μM). After 16 h, medium was removed from the cells, the cells were lysed, and cell extracts were assayed for the luciferase activity. Luciferase activity was normalized to the *Renilla* luciferase activity. The data are expressed as fold-activation versus the corresponding control value. Data are expressed as the mean ± S.D. of four experiments. (b): COS7 cells were also transfected with pGL2-ARE, pGL2-HO-1, pGL2-c-FOS and pRL-CMV. The cells were treated with vehicle (1), 10 μM NaAsO<sub>2</sub> (2), 100 μM DEM (3), 50 μM paraquat (4), 10 μM menadione (5) and 1 μM CdCl<sub>2</sub> (6). After 16 h, the cells were used for assay of the luciferase activity.

び pGL2-c-FOS に組み込まれているプロモーター領域を鋳型にして、以下のプライマーをそれぞれ使って、PCR 法により DNA を増幅した。pHO-1-EGFP, pARE-EGFP 及び pc-fos-EGFP はそれぞれ DNA 増幅産物を HindIII で処理して、pEGFP-1 に挿入して作製した。

HO-1 forward primer : 5' AAA AGC TTC TTA TGG TAC TGT AA 3'

HO-1 reverse primer : 5' AAG AAT TCA AGC TTA AGC AGC AGC 3'

ARE forward primer : 5' AAA AGC TTA CCG AGC TCT TAC GCG 3'

ARE reverse primer : 5' AAG AAT TCA AGC TTA AGC AGC AGC 3'

c-fos forward primer : 5' AAA AGC TTC CTG CCT CGC CCC T 3'

c-fos reverse primer : 5' AAG AAT TCA AGC  
TTG CGG CTC AGT 3'

pMTIIA-EGFP は, pGL3-hMTIIA の *SacI/Hind*-III 処理断片を pEGFP に挿入して作製した. また, pMRE-EGFP は, pMTIIA-EGFP の MRE 配列を鋳型として, 以下のプライマーで増幅し, *SacII* 処理したのち, pEGFP-1 に挿入して作製した.

MRE forward primer : 5' AAG AGC TCA ACT  
GAC CGC CCG 3'

MRE reverse primer : 5' AAA AGC TTT TTA  
TAG CTA GAA 3'

**3. 培養細胞及びレポーター解析** アフリカミドリザルの腎臓細胞である COS7 細胞 (Japan Cell Bank) は, 抗生物質 (penicillin 100  $\mu$ g/ml, streptomycin 100  $\mu$ g/ml), 10% Fetal Calf Serum 及び L-グルタミン (1.168 mg/ml) を含む Dulbecco's Minimum Essential Medium を用いて, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した.

pGL2-HO-1, pGL2-ARE, pGL2-c-FOS, pGL3-hMTIIA 及び pRL-CMV (Promega Co.) を CellPfect Transfection Kit (Amersham Biosciences) 又は LIPOFECTAMINE PLUS™ Reagent (Invitrogen) を用いて, COS7 細胞に遺伝子導入し, 37°C でインキュベーションした. 24 時間後, 発現誘導物質 (10  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M dimethylmaleate (DEM), 10  $\mu$ M menadione, 50  $\mu$ M paraquat, 1—10  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> 及び 5, 50  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>) を添加した. 16 時間後, 細胞抽出液を回収し, Dual-Luciferase<sup>(R)</sup> Reporter Assay System (Promega) を用いて活性を測定した. 得られた活性は pRL-CMV 由来のウミホタル Luciferase 活性値を用いて補正した.

**4. GFP 蛋白質の発現解析** 遺伝子導入を行った細胞を 24 時間 37°C でインキュベーションしたのち, 誘導物質を添加した. 16 時間後, パラホルムアルデヒドで細胞を固定し, 共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM510) 又は蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX60, BX-FLA) で観察した (励起波長 470—490 nm, 蛍光波長 515—550 nm). また, 蛍光分光光度計による蛍光強度の GFP 蛋白質の定量には, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5/150 mM NaCl/0.1% TritonX-100 を加えて細胞を可溶化した後, 遠心分離を行って, 上清を測定試料として用いた. GFP 発現量は励起光 (488 nm) で蛍光波長 490—

560 nm を用いて定量した. 得られた蛍光強度は pRL-CMV 由来のウミホタル Luciferase 活性値を用いて補正した. さらに, 無添加群と誘導物質添加群間で Dunnett の多重比較検定を行い,  $p < 0.05$  で判定した.

## 結 果

**1. ルシフェラーゼ発現系への環境汚染化合物の影響** 始めに, 用いたルシフェラーゼ発現プラスミドの転写活性の環境汚染物質による影響を調べた. Figure 1(a) に示すように, メタロチオネイン遺伝子上流域を組み込んだ pGL3-hMTIIA を導入した COS7 細胞では, ルシフェラーゼ活性が重金属である CdCl<sub>2</sub> の添加濃度に依存して増加し, 5  $\mu$ M 以上では活性はプラトーに達した. この結果は, hMTIIA プロモーターは低濃度の CdCl<sub>2</sub> に対して強く応答することを示した. また, 同様に ZnSO<sub>4</sub> を添加した細胞については, 転写活性の増加は認められるが, CdCl<sub>2</sub> を添加した場合と比較してその程度は低かった.

pGL2-ARE, pGL2-HO-1 及び pGL2-c-FOS を導入して発現に対する金属や有機化合物の影響を調べた. pGL2-ARE 及び pGL2-HO-1 では, 強力な細胞毒性を示す NaAsO<sub>2</sub> (10  $\mu$ M), 親電子試薬の 1 つである酸化剤の DEM (100  $\mu$ M) 及び活性酸素種を発生させる menadione (10  $\mu$ M) を添加した場合, 転写活性はそれぞれ増加した (Fig. 1(b)). これらの活性の増加は添加した化合物の濃度に依存して増加して, 上に示した濃度でそれぞれ最高値若しくはプラトーに達した. また, pGL2-ARE を導入した細胞では, 農薬の paraquat (50  $\mu$ M) の添加によって比較的強い誘導を示した (2.3 倍). 一方, pGL2-HO-1 では, paraquat (50  $\mu$ M) の効果はほとんど認められなかった (1.1 倍). pGL2-c-FOS では NaAsO<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) 及び CdCl<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) でそれぞれ 3.5 及び 1.8 倍に増加した. したがって, 用いた 3 種類のレポーターは, それぞれの活性化物質に異なった応答をすることが分かった.

**2. GFP 発現システムの作製と発現活性** 先に述べたプロモーター活性化物質を用いて, 蛍光発光細胞の転写応答を調べた. Figure 2 はそれぞれの遺伝子のプロモーター領域を pEGFP-promoterless ベクターに挿入して作製した pMTIIA-EGFP,

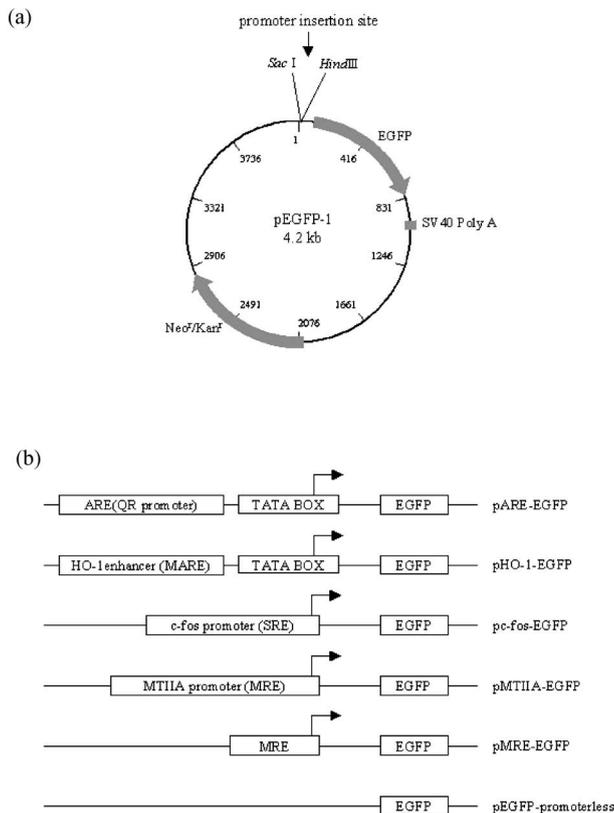


Fig. 2. Structure of the Constructed Plasmids

(a): pMTIIA-EGFP. The PCR-amplified DNA fragments of the MTIIA gene promoter were inserted into the *SacI*/*HindIII* site of pEGFP-1. (b): The profiles of the indicated plasmid.

pMRE-EGFP, pARE-EGFP, pHO-1-EGFP, pc-fos-EGFP の概略図を示す。

作製したプラスミドを用いて、COS7 細胞のトランスフェクションを行って、それぞれの化合物で処理して共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光発光を観察した (Fig. 3)。pc-fos-EGFP を導入した細胞では NaAsO<sub>2</sub> 処理を行った場合に発光する細胞が増加した。また、pARE-EGFP と pHO-1-EGFP をそれぞれ導入した細胞では paraquat 処理すると少数の細胞に発光が認められた。さらに、pARE-EGFP, pHO-1-EGFP 及び pc-fos-EGFP の無処理細胞では、ほとんどの細胞は発光しなかった。EGFP を用いた場合の蛍光発光した細胞数の増減はルシフェラーゼ活性の薬剤による影響の結果と似ていた。

3. MTIIA 遺伝子上流プロモーターの金属応答次にプロモーター活性の強い pMTIIA-EGFP (Fig. 3) に着目して、種々の転写活性化物質に対する EGFP の発現強度を調べた。MTIIA は、発生のす

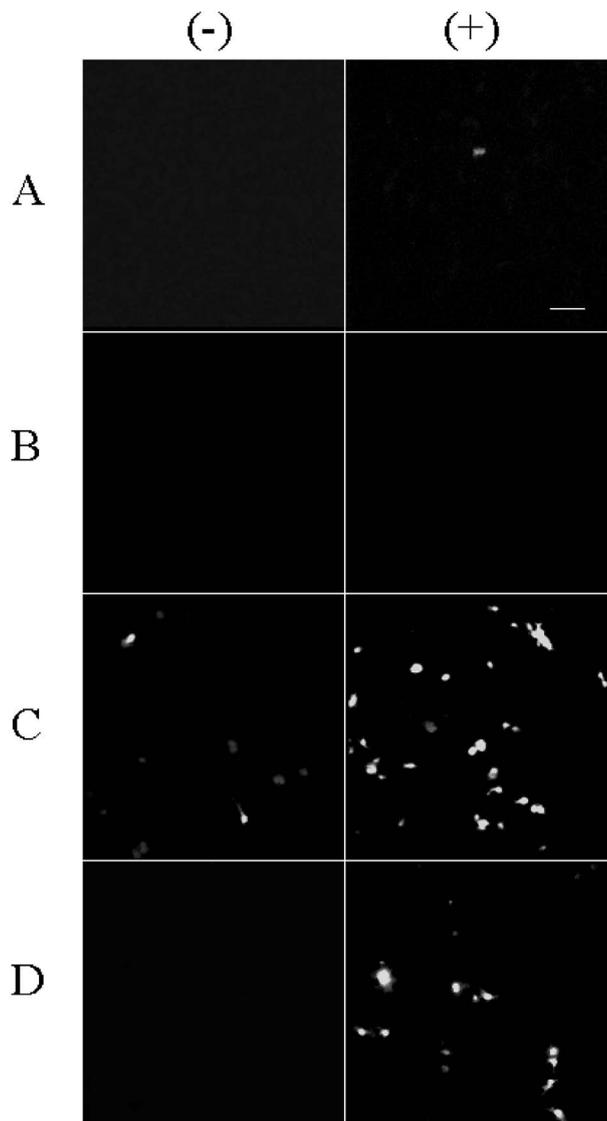


Fig. 3. Fluorescent Images of COS7 Cells Expressing GFP Protein

COS7 cells transfected with the indicated plasmid using calcium-phosphate method. After 24 h-incubation, the cells were untreated (-) or treated with the indicated reagent (+). After 16 h, the cells were fixed and the GFP fluorescence was observed under the confocal-laser scanning microscope at a 100-fold magnification. A: The cells transfected with pARE-EGFP were treated with 50  $\mu$ M paraquat. B: The cells with pHO-1-EGFP were treated with 50  $\mu$ M paraquat. C: The cells with pMTIIA-EGFP were treated 1  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>. D: The cells with pc-fos-EGFP were treated with 10  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub>. Bar: 25  $\mu$ m.

べてのステージ及びすべての組織で発現しており、重金属や酸化的ストレスによっても発現が誘導されることが知られている。MTIIA 遺伝子のプロモーター領域には7個のMREの繰り返し配列があるために、プロモーター活性が強力に増加する。<sup>13)</sup>そこで、CdCl<sub>2</sub>だけでなく、重金属であるZnSO<sub>4</sub>及びCuCl<sub>2</sub>による発現強度を調べた。

Figure 4 は pMTIIA-EGFP を導入した COS7 細

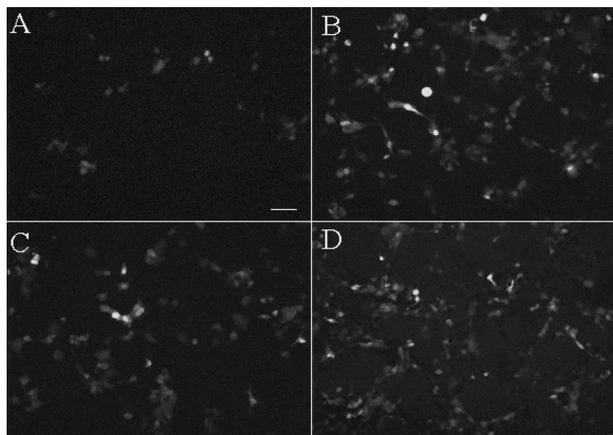


Fig. 4. Fluorescent Images of COS7 Cells Transfected with pMTIIA-EGFP

COS7 cells were transfected with pMTIIA-EGFP using the lipofection method. After 24 h-incubation, the cells were treated with vehicle (A), 1  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> (B), 5  $\mu\text{M}$  CuCl<sub>2</sub> (C) and 5  $\mu\text{M}$  ZnSO<sub>4</sub> (D). After 16 h, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde. The GFP fluorescence was observed under the fluorescence microscope at a 100-fold magnification. Bar: 25  $\mu\text{m}$ .

胞を蛍光顕微鏡で観察した結果を示している。試薬を加えていない無添加の細胞 (A) において数個の発光細胞が観察された。1  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> (B), 5  $\mu\text{M}$  CuCl<sub>2</sub> (C) 及び 5  $\mu\text{M}$  ZnSO<sub>4</sub> (D) をそれぞれ添加した細胞は EGFP の発現が著しく増加した。Figure 5 は同じく pMTIIA-EGFP を導入した COS7 細胞を可溶化し、蛍光分光光度計で蛍光強度を定量した結果を示している。無添加の細胞に比べて CdCl<sub>2</sub> 及び ZnSO<sub>4</sub> を添加した細胞において約 2 倍、CuCl<sub>2</sub> において約 1.5 倍に有意に増加した。これらの結果は、重金属 (少なくともカドミウム、亜鉛及び銅) に応答して細胞内で EGFP が発現していることを示唆した。しかしながら無添加の細胞においても EGFP を発現している細胞が多く、高いバックグラウンド値を示した。さらにそれぞれの金属濃度の増加に対する依存性に乏しく、得られた値の変動が大きかった。

pMTIIA-EGFP の重金属に対する感知機能を高めるために、プラスミドの改良を行った。pMTIIA-EGFP は MTIIA プロモーターの -764 bp を使用したので、プロモーター活性が強く誘導物質の有無による差があまりみられなかったと考えられる。そこで、MTIIA 遺伝子プロモーター (-764/-595) 領域を取り除き、MRE 配列が 7 回繰り返された領域 (-595/+76) のみを残した pGL3-MRE 及び pMRE-EGFP を作製した (Fig. 2)。

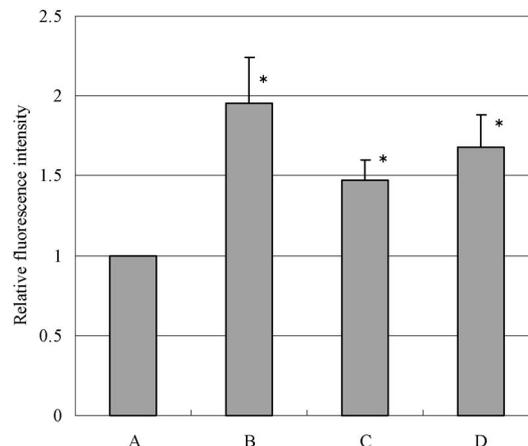


Fig. 5. Fluorescence Intensity of COS7 Cells Transfected with pMTIIA-EGFP

COS7 cells were transfected with pMTIIA-EGFP and pRL-CMV using the lipofection method, and were treated with vehicle (A), 1  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> (B), 5  $\mu\text{M}$  CuCl<sub>2</sub> (C) and 5  $\mu\text{M}$  ZnSO<sub>4</sub> (D). After 16 h, the cells were washed and lysed. Fluorescence intensity at 510 nm of the cell extracts was measured with the fluorescence spectrophotometer, and normalized to the *Renilla* luciferase activity. The data are expressed as fold intensity versus the corresponding control value. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of three experiments. \* $p < 0.05$  versus control value.

まず、COS7 細胞に pGL3-MRE を導入し、24 時間後に CdCl<sub>2</sub> を各濃度 (1–10  $\mu\text{M}$ ) 添加して一晩置いた細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した結果を Fig. 6 に示す。ルシフェラーゼ活性は CdCl<sub>2</sub> 容量に依存して上昇した。pGL3-hMTIIA を導入した細胞のルシフェラーゼ活性 (Fig. 1(a)) と比較すると、全体的に相対的な転写活性は低い値を示した。また、pGL3-hMTIIA を導入した細胞群では、CdCl<sub>2</sub> の添加量 5  $\mu\text{M}$  以降で活性がプラトーに達していたが、pGL3-MRE を導入した細胞群では、10  $\mu\text{M}$  の添加量でも同様の傾向はみられなかった。MTIIA 遺伝子の -390 bp まで削除すると CdCl<sub>2</sub> に対する応答が著しく低下した。これらの結果から、7 個の MRE 配列をプロモーターとすると、転写活性が低くなり、定量的な転写活性を示すことが分かった。

次にレポーター遺伝子を EGFP に変えて、転写活性を測定した。pMTIIA-EGFP と同様に、COS7 細胞に pMRE-EGFP を導入し、誘導物質を添加してから 16 時間後に、蛍光顕微鏡による観察及び蛍光分光光度計により蛍光強度を測定した。

Figure 7 に pMRE-EGFP を導入した COS7 細胞を蛍光顕微鏡で観察した結果を示す。無添加の細胞 (A) での発光が Fig. 4 の場合に比べて減少し、誘

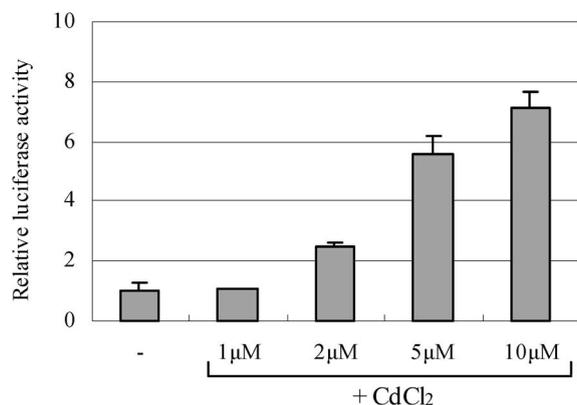


Fig. 6. The Luciferase Activity with pGL3-MRE

COS7 cells were transfected with pGL3-MRE and pRL-CMV. After 24 h, the cells untreated or treated with CdCl<sub>2</sub> (1, 2, 5 and 10 μM). After 16 h, medium was removed from the cells, the cells were lysed, and cell extracts were assayed for the luciferase activity. Luciferase activity was normalized to the *Renilla* luciferase activity. The data are expressed as fold activation versus the corresponding control value. Data are expressed as the mean ± S.D. of three experiments.

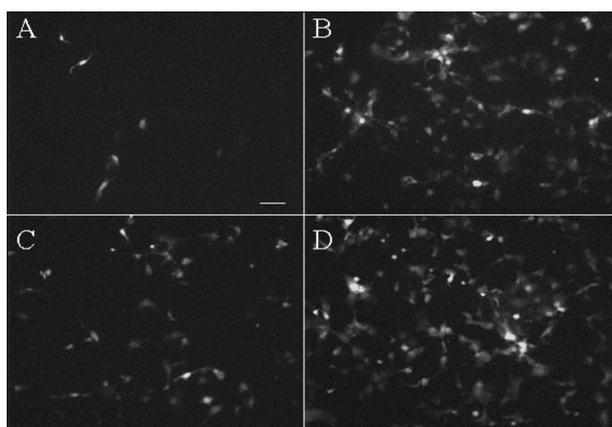


Fig. 7. Fluorescent Images of COS7 Cells Transfected with pMRE-EGFP

COS7 cells were transfected with pMRE-EGFP using the lipofection method. After 24 h, the cells were untreated (A) or treated with 1 μM CdCl<sub>2</sub> (B), 5 μM CuCl<sub>2</sub> (C) and 5 μM ZnSO<sub>4</sub> (D). After 16 h-incubation, the cells were fixed and the GFP fluorescence was observed under the fluorescence microscope at a 100-fold magnification. Bar: 25 μm.

導物質を添加した細胞 (B, C, D) は EGFP を発現している細胞が多く認められた。また、蛍光分光光度計により蛍光強度を調べると (Fig. 8), 無添加の細胞群に較べて, CdCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub> を添加した細胞群において約 3.9 倍, ZnSO<sub>4</sub> 添加時において約 3.6 倍, 蛍光強度は増加した。また, pMTIIA-EGFP のレポーターアッセイ (Fig. 5) と較べて, 無添加の細胞と ZnSO<sub>4</sub> や CuCl<sub>2</sub> を添加した細胞との蛍光強度の割合は増加した。また, 各重金属に対する MRE の応答性に関しては, ZnSO<sub>4</sub> や CuCl<sub>2</sub> では用

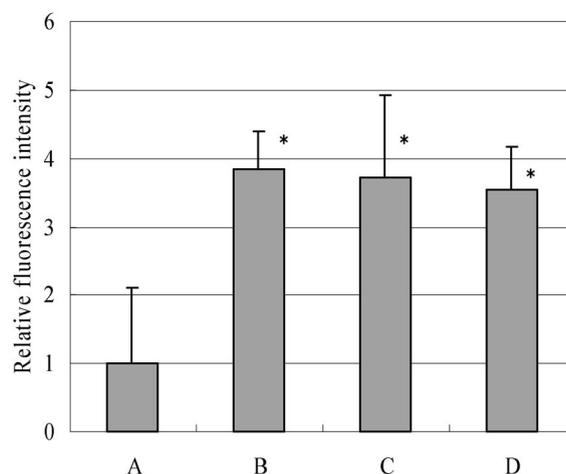


Fig. 8. Fluorescence Intensity of COS7 Cells Transfected with pMRE-EGFP

COS7 cells were transfected with pMRE-EGFP and pRL-CMV, using the lipofection method, and were treated without (A), or with 1 μM CdCl<sub>2</sub> (B), 5 μM CuCl<sub>2</sub> (C) and 5 μM ZnSO<sub>4</sub> (D). After 16 h, the cells were collected, washed and lysed. Fluorescence intensity at 510 nm of the cell extracts was measured with the fluorescence spectrophotometer and normalized to the *Renilla* luciferase activity. The data are expressed as fold intensity versus the corresponding control value. Data are expressed as the mean ± S.D. of three experiments. \**p* < 0.05 versus control value.

いた濃度で最大値を示したが, CdCl<sub>2</sub> に対する応答性は高く, 添加濃度の増加に依存した。これらの結果は, MTIIA のプロモーターの改変の結果, 全体的なプロモーター活性が弱くなり, 重金属に対する転写活性の感度が高くなることを示した。

## 考 察

本研究においては, HO-1, ARE, c-fos, MTIIA 遺伝子のエンハンサーやプロモーター部位を組み込んだレポーター解析を用いて, 重金属や有機化合物に対する細胞のストレス応答を統合的に観察した。その中でも, MRE を含む MTIIA 遺伝子の CdCl<sub>2</sub> に対する高い感受性, c-fos の NaAsO<sub>2</sub>, ARE の paraquat に対するストレス応答を明らかにした。さらに, ヒト MTIIA 遺伝子の MRE 配列を用いて EGFP をレポーター遺伝子とする発光細胞を用いた応答の検出を試みた結果, 環境汚染物質を感知できる細胞として, CdCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub> や CuCl<sub>2</sub> を感知する発光細胞を作製した。

ARE 及び HO-1 のプロモーターを挿入したプラスミドを用いて導入した COS7 細胞では, 誘導物質存在下で発現した EGFP の発光を蛍光顕微鏡下で少数しか観察できなかった。原因としては, プラスミド本来のプロモーター活性が低いことが考えら

れる。一方、蛍光分光光度計による測定では、pHO-1-EGFPを導入したCOS7細胞は、menadione (10  $\mu$ M)の添加により無添加の細胞に比べて約3.1倍の蛍光強度を示した。この結果は、誘導物質によりEGFPの発現が活性化されていることを示しており、プロモーターの活性を高めることができれば、顕微鏡レベルでもEGFPの発現を観察できる可能性がある。マウスHO-1遺伝子のエンハンサーは、本研究で用いたエンハンサー以外の領域でも強いプロモーター活性を示す配列があることが知られており、<sup>14)</sup> ラット及びヒトHO-1遺伝子のエンハンサーも同様に特有な配列が知られている。<sup>15)</sup> 種々のHO-1遺伝子エンハンサーを組み合わせる等のプラスミドの改良を加えることで、強力なプロモーター活性を持つプラスミドを作製できる可能性がある。pARE-EGFPについても、ARE配列を複数回導入する改良を加えることで強力なプロモーター活性を持つプラスミドを作製できる可能性がある。

レポーターとして用いたGFPには、BFP (blue fluorescent protein), RFP (red fluorescent protein), YFP (yellow fluorescent protein) 及びCFP (cyan fluorescent protein)<sup>16-18)</sup>といった変異体が開発されており、同時に使用すれば、1つの細胞内で複数の蛋白質の動態を観察できる。MREは重金属<sup>10)</sup>に、AREはフェノール性抗酸化剤である*t*-BHQ (*t*-butylhydroquinone) や農薬である paraquat など種々の生体外物質によって応答する。<sup>19-21)</sup> またHO-1エンハンサーに存在するStREは、ROSや砒素を含む各種ストレス物質に応答する。<sup>21)</sup> このような性質の異なるプロモーター配列を、それぞれの蛍光タンパク質遺伝子上流に組み込んだプラスミドを用いた安定な発現細胞株を樹立し、様々な発現細胞を混合培養することで、種々の色の蛍光を発光する細胞群が得られる。蛍光波長のスペクトルのパターンを解析することで、汚染物質の特異性が分かり、未知の化合物の同定につながるかもしれない。

環境省は平成16年12月にダイオキシン類対策特別措置法施工規則(平成11年総理府令第67号)の一部を改正し、公定法の一部に生物検定法による測定法を追加した。<sup>22)</sup> 生物検定法の特徴は、化学分析だけでは測定できない微量の化学物質の複合的な影響を評価できること、また、含まれている化学物質の成分が分からない状況においても生物に与える影

響を評価できることにある。今後は益々生物への影響を重要視した生物検定法が増えるものと考えられる。実際には、実用化されている生物検定法は、ダイオキシン類やPCB等の有機化合物対象のものが多く、重金属の生物検定法は、水生生物を使用したアッセイ法<sup>23)</sup>など限られている。本研究では、公定法として採用され認められている培養細胞の実験系を用いて、重金属を検出することができた点で大変意義がある。本研究で得られた成果を複合的な環境汚染物質の検出システムの構築につないでいきたい。

## REFERENCES

- 1) Taketani S., Kohno H., Yoshinaga T., Tokunaga R., *FEBS Lett.*, **245**, 173-176 (1989).
- 2) Gong P., Hu B., Stewart D., Ellerbe M., Figueroa Y. G., Blank V., Beckman B. S., Alam J., *J. Biol. Chem.*, **276**, 27018-27025 (2001).
- 3) Inamdar N. M., Ahn Y. I., Alam J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **221**, 570-576 (1996).
- 4) Rouse J., Cohen P., Trigon S., Morange M., Alonso-Llamazares A., Zamanillo D., Hunt T., Nebreda A. R., *Cell*, **78**, 1027-1037 (1994).
- 5) Ludwig S., Hoffmeyer A., Goebeler M., Kilian K., Hafner H., Neufeld B., Han J., Rapp U. R., *J. Biol. Chem.*, **273**, 1917-1922 (1998).
- 6) Wang Z., Templeton D. M., *J. Biol. Chem.*, **273**, 73-79 (1998).
- 7) Lind C., *Arch. Biochem. Biophys.*, **240**, 226-235 (1985).
- 8) Fujisawa-Sehara A., Yamane M., Fujii-Kuriyama Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 5859-5863 (1988).
- 9) Rushmore T. H., Pickett C. B., *J. Biol. Chem.*, **265**, 14648-14653 (1990).
- 10) Palmiter R. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 8428-8430 (1998).
- 11) Tsien R. Y., *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 509-544 (1998).
- 12) Masuya Y., Kameshita I., Fujisawa H., Kohno H., Hioki K., Tokunaga R., Taketani S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **260**, 289-295 (1999).
- 13) Takeda K., Fujita H., Shibahara S., *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun.*, **207**, 160–167 (1995).
- 14) Alam J., *J. Biol. Chem.*, **269**, 25049–25056 (1994).
- 15) Sato M., Fukushi Y., Ishizawa S., Okinaga S., Muller R. M., Shibahara S., *J. Biol. Chem.*, **264**, 10251–10260 (1989).
- 16) Yang T. T., Sinai P., Green G., Kitts P. A., Chen Y. T., Lybarger L., Chervenak R., Patterson G. H., Piston D. W., Kain S. R., *J. Biol. Chem.*, **273**, 8212–8216 (1998).
- 17) Lybarger L., Dempsey D., Patterson G. H., Piston D. W., Kain S. R., Chervenak R., *Cytometry*, **31**, 147–152 (1998).
- 18) Muldoon R. R., Levy J. P., Kain S. R., Kitts P. A., Link Jr. C. J., *Biotechniques*, **22**, 162–167 (1997).
- 19) De Long M. J., Prochaska H. J., Talalay P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 787–791 (1986).
- 20) Kelner M. J., Bagnell R. D., Montoya M. A., Estes L. A., Forsberg L., Morgenstern R., *J. Biol. Chem.*, **275**, 13000–13006 (2000).
- 21) Ishii T., Itoh K., Takahashi S., Sato H., Yanagawa T., Katoh Y., Bannai S., Yamamoto M., *J. Biol. Chem.*, **275**, 16023–16029 (2000).
- 22) Ministry of the Environment: [http://www.env.go.jp/chemi/dioxin/guide/sim\\_method/](http://www.env.go.jp/chemi/dioxin/guide/sim_method/), 2004.
- 23) Kawabata M., *Kankyojoukagijutu*, **4**, 38–43 (2005).