

제 51차 KIST-KITA 협동공개강좌

진보된 안전성 평가와 환경호르몬 검출기법

2000. 5.

주최 한국과학기술연구원
 한국산업기술진흥협회

Yeast-based steroid hormone receptor
gene transcription assay

류 재천, 김 형태

한국과학기술연구원
독성연구팀

Tel: 958-5070, 5080

Fax: 958-5059

E-mail : 류 재천 ryujc@kist.re.kr

김 형태 hyungtae@kist.re.kr

1. 서론

환경 중에 존재하고 있는 많은 화학물질들은 정상적인 내분비 기능을 저해하여 인간의 건강에 영향을 미치고 있음이 알려져 있다. 스테로이드와 유사한 활성을 지닌 화학물질에 대한 노출에 따라 생식능력의 변형, 불임증, 자궁내막 증 유방암, 및 전립선암 등이 유발되는지의 여부가 관심을 끌고 있다. 스테로이드와 유사한 활성을 갖는 화학물질들에는 coumestrol, genistein 등의 천연물, DDT, methoxychlor, vinclozolin과 같은 살충제와 살진균제 그리고 bisphenol A와 p-nonylphenol 등이 있다. 화학물질들은 주변에 널리 분포되어있기 때문에, 어느 정도의 노출은 피할 수 없는 현실이다. 그러므로, 환경 중에서 이런 화학물질들이 어느 정도 농도의 노출로 인간의 건강을 위협하는지를 결정하는 것이 필요하다.

2. 내분비 기능 저해

스테로이드의 생화학적 활성은 스테로이드 수용체로 알려진 특정 세포 내 단백질에 대한 결합에 의해 매개된다. 세포 내에서 스테로이드가 그 수용체에 결합하는 것은 스테로이드-스테로이드 수용체 복합체가 DNA의 특정한 부위에 결합하도록 하여 수용체에서 구조적인 변화를 야기 시키게 된다. 스테로이드-스테로이드 수용체 복합체가 DNA에 결합한 후에, 이것들은 스테로이드 반응 유전자들의 발현을 변형시키면서 원래 스테로이드가 작용하여 나타내는 유전자 발현에 변형을 일으킨다. 화학물질들이 수용체 매개 과정을 변형시키는 메커니즘은 많이 알려져 있다. 화학물질은 내인성 스테로이드의 합성, 대사, 분배, 및 분해를 변형시킴으로써 특별한 유전자의 위치에서 그것들의 작용 단계를 변형시킬 수 있다. 이와는 다르게, 화학물질은 아마도 수용체 단계들을 변형시키거나 수용체의 기능에 영향을 주는 2차적인 경로를 통한 활동에 의해 조직의 반응들을 변형시킬 수 있다. 마지막으로, 화학물질은 스테로이드의 활동과 비슷한 유사 활동과 스테로이드 활동을 방해하면서 직접적으로 상호작용을 할 것이다. 이와 같이 스테로이드 수용체에 직접적으로 작용하는 화학물질들은 매우 낮은 농도에서 효과를 나타내는 잠재성을 갖는다. 그러므로, 내분비 장애 효과에 관해서 화학물질들을 평가할 때는 그 효과가 수용체 매개되어지는 과정 또는 상호경로를 통해서 나타나는지를 결정하는 것이 필수적이다.

3. 원리

포유류의 스테로이드 수용체는 효모 종의 하나인 *Saccharomyces cerevisiae*가 스테로이드에 의존하는 transcriptional activator로써 기능을 나타낼 수 있다고 알려져 있

다.

Estrogen, androgen, progesterone 수용체 유전자가 들어 있는 plasmid가 들어 recombinant yeast strain에 화학물질을 처리한 후 yeast가 나타나는 β -galactosidase를 측정하여 화학물질과 에스트로젠, 안드로젠, 프로게스테론 수용체와의 상호작용을 나타낼 수 있는 기법이다. 이 기법은 phytoestrogens이나 pharmaceuticals등과 같은 많은 수의 천연적, 합성적 스테로이드와 스테로이드 수용체들과의 상호작용을 통해 내분비 조절 활성화에 원인이 되는 것으로 여겨져 온 상동화된 화학물질들을 평가함으로써 화학물질과 스테로이드 수용체간의 상호작용을 민감하고, 특이적인, 분석을 수행 할 수 있다.

4. 실험방법

(1) Yeast-based estrogen receptor assay

- 1) Human estrogen receptor gene이 들어 있는 yeast stock 125 μ l를 growth medium 50 ml에 접종한 후 28°C shaking incubator에서 24 시간 동안 배양을 한다.
- 2) 양성 대조물질로서 17 β -estradiol을 사용하고, 이는 실험하고자 하는 chemical과 함께 각각 ethanol로 2배 농도로 희석하여 각각 농도별로 96-well optically flat bottom microtitre plate에 10 μ l씩 넣은 후 건조시킨다.
- 3) Assay medium을 다음의 구성에 따라 제조한 후 200 μ l씩 각 well에 넣고 2분간 shaking한다.

Assay medium 구성	
Growth medium	50 ml
24hr incubated yeast medium	0.5~2 ml
Chlorophenol red- β -D-galactopyranoside(CPRG)	0.5 ml

- 4) Low temperature incubator (32°C)에서 24시간 동안 배양한다.
- 5) 배양 중인 plate를 꺼내어 shaking함으로써 자라고 있는 yeast를 잘 섞어준 후 incubator에 넣고 다시 24시간 동안 배양한다.
- 6) 3일간 배양한 후에 microplate reader를 이용하여 540 nm와 620 nm에서 흡광도를 측정한다.

7) 각 파장에서의 흡광도 측정 결과에 의하여 다음 식에 따라 correct value를 계산한다.

$$\text{Corrected value} = \text{chem. abs. (540 nm)} - [\text{chem. abs. (620 nm)} - \text{blank abs. (620 nm)}]$$

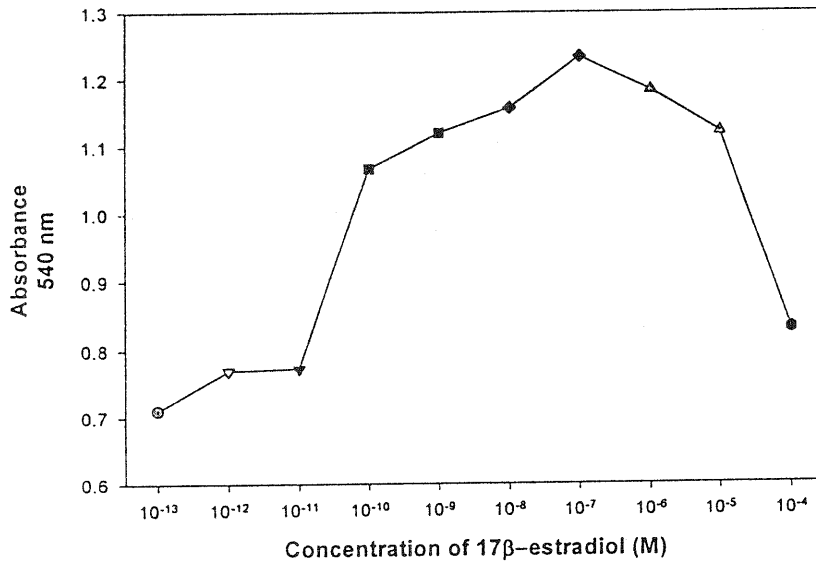


Fig. 1. Yeast assay for estrogen receptor activity

(2) Yeast-Based androgen receptor assay

- 1) Androgen receptor gene이 들어 있는 yeast stock 1 ml을 selective medium 50 ml에 접종 후 30°C shaking incubator (300 rpm)에서, 배양한다.
- 2) Yeast medium의 OD₆₀₀ 값이 1~2 될 때까지 배양한다.
- 3) OD₆₀₀이 0.03이 되도록 yeast medium을 selective medium으로 희석하고 CuSO₄ 50 μM이 되도록 한다.
- 4) Chemical은 최종농도를 yeast medium의 1/1000이 되도록 tube에서 10배씩 희석하여 한 후 30°C shaking incubator에서 overnight 배양을 한다.
- 5) 배양 후 OD₆₀₀이 0.25가 되도록 희석한 후 10배로 희석하여 각 well에 100 μl씩 넣는다.
- 6) Microplate reader로 590 nm에서 흡광도를 측정한다.
- 7) Assay medium을 아래와 같은 조성으로 제조하여 각 well에 100 μl씩 담는다. (단, Assay medium은 제조 후 1시간 내에 사용한다.)

Assay Buffer (11ml)	
o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)	2 mg/ml
SDS	0.1 %
β -mercaptoethanol	50 mM
Oxalyticase	200 U/ml
z- buffer	10.9 ml

- 8) 420 nm에서 20분 동안 매분마다 흡광도를 측정하여 V_{max} 값을 얻는다.
 9) 다음 식에 따라 β -galactosidase activity를 계산한다.

$$\beta\text{-Galactosidase Activity} = V_{max}/OD_{590}$$

Yeast androgen screening of Testosterone

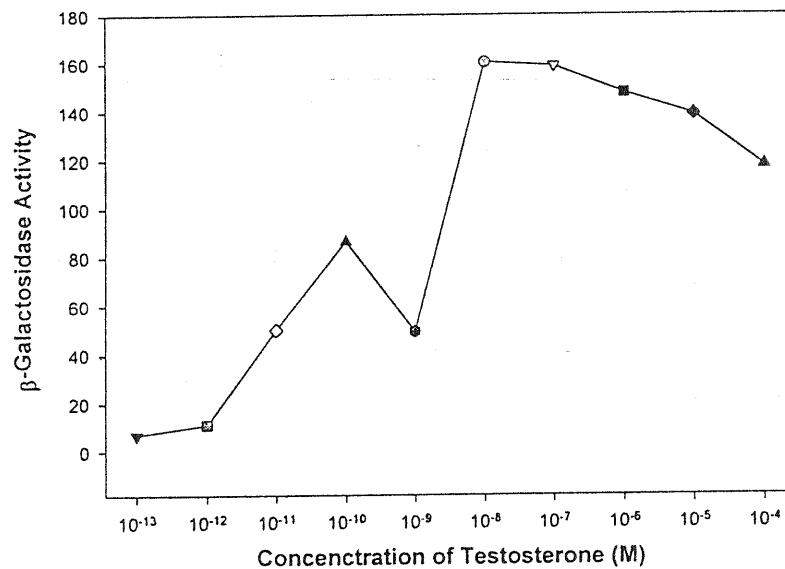


Fig. 2. Yeast assay for androgen receptor activity

(3) Yeast-Based progesterone receptor assay

- 1) Progesterone receptor gene이 들어 있는 yeast stock 1 ml을 selective medium 50 ml에 접종한 후 30°C, shaking incubator(300 rpm)에서 24시간 동안 배양한다.
- 2) Yeast medium의 OD_{600} 이 0.8~1.0 될 때까지 배양 한 후 배양한 yeast

medium에 2배의 100 μ M이 되도록 CuSO_4 를 넣는다.

3) 처리 농도의 2배의 Chemical을 위의 배지로 10배씩 희석한 후 96 well plate 각 well에 50 μ l씩 담는다.

4) 2)에서 준비한 yeast medium을 50 μ l씩 각각의 well에 넣고 잘 혼합한다.

5) Chemical을 처리한 plate는 30°C에서 4시간 동안 배양한다.

6) 배양 후 microplate reader로 500 nm에서 흡광도를 측정한다.

8) Assay medium을 제조하여 각 well에 100 μ l씩 넣는다. (단, Assay medium은 제조 후 1시간 내에 사용한다.)

Assay Buffer (11ml)	
o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)	2 mg/ml
SDS	0.1 %
β -mercaptoethanol	50 mM
Oxalyticase	200 U/ml
z- buffer	10.9 ml

8) 420 nm에서 20분 동안 흡광도를 측정하여 V_{\max} 값을 결정한다.

9) 다음 식에 따라 β -galactosidase activity를 계산한다.

$$\beta\text{-Galactosidase Activity} = V_{\max}/\text{OD}_{590}$$

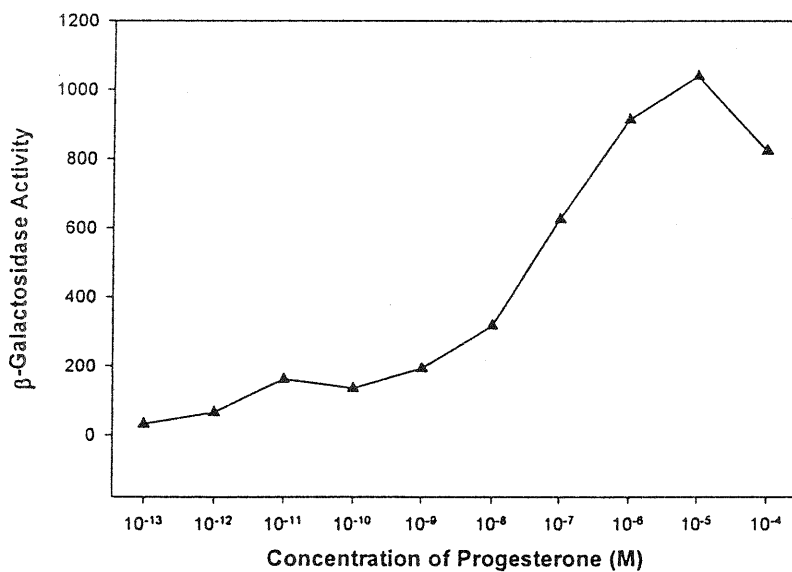


Fig. 3. Yeast assay for progesterone receptor activity

4. 참고 문헌

1. Beresford, N., Routledge, E. J., Harris, C. A., and Sumpter, J. P., Issues arising when interpreting results from an *in vitro* assay for estrogenic activity, 162, 22-33 2000.
2. Gaido, K. W., Leonard, L. S., Lovell, S., Gould, J. C., Babai, D., Portier, C. J., and McDonnell, D. P., Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a Yeast-Based steroid hormone receptor gene transcription assay, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 143, 205-212, 1997.
3. Harris, C. A., Henttu, P., Parker, M. G., and Sumpter, J. P., The estrogenic activity of phthalate esters *In vitro*, *Environ. Health. Perspect.*, 105(8), 802-811, 1997.
4. Routledge, E. J., and Sumpter, J. P. Structural feature of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *J. Biol. Chem.*, 272, 3280-3288, 1997.
5. Routledge, E. J., and Sumpter, J. P., Estrogenic activity of surfactant and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, *Environ. Toxicol. Chem.*, 15(3), 241-248, 1996.
6. Schultz, T. W., Seward, J. R., and Sinks G. D., Estrogenicity of benzophenones evaluated with a recombinant yeast assay: comparison of experimental and rules-based predicted activity, *Environ. Toxicol. Chem.*, 19(2), 301-304, 2000.
7. Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N., and Serrano, F. O., The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogen: An update on estrogenic environmental pollutants, *Environ. Health. Perspect.*, 103-122, 1995.
8. Wright, A. P. H., Carlstedt-Duke, J., and Gustafsson, J. A., Ligand-specific transactivation of gene expression by a derivative of the human glucocorticoid receptor expressed in yeast. *J. Biol. Chem.*, 265, 14763-14769, 1990.
9. Zava, D. T., and McGurie, W. L. Androgen activation through estrogen receptor in a human breast cancer cell line, *Endocrinology*, 103, 624-631, 1978.