

# Human Estrogen Receptor Ligand Binding Domain (hER LBD)과 Co-activator로 구성된 효모 Two-Hybrid System을 이용한 내분비계장애물질 검출계의 구축

이행석<sup>1,2</sup> · 조은민<sup>1</sup> · 류재천<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>일본 동경대학교 응용생명공학과

<sup>2</sup>한국과학기술연구원, 생체대사연구센터 독성학 연구실

## Construction of the Detection System of Endocrine Disrupters using Yeast Two-Hybrid System with Human Estrogen Receptor Ligand Binding Domain and Co-activators

Haeng-Seog Lee<sup>1,2</sup>, Eun-Min Cho<sup>1</sup> and Jae-Chun Ryu<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, The University of Tokyo

<sup>2</sup>Korea Institute of Science and Technology, Toxicology Laboratory

(Received July 25, 2002 / Accepted August 20, 2002)

**ABSTRACT:** Endocrine disruptors (EDs) are the chemicals that affect endocrine systems through activation or inhibition of steroid hormone response. It is necessary to have a good system to evaluate rapidly and accurately endocrine-disrupting activities of suspected chemicals and their degradation products. The key targets of EDs are nuclear hormone receptors, which bind to steroid hormones and regulate their gene transcription. We constructed a co-expression system of Gal4p DNA binding domain (DBD)- ligand binding domain of human estrogen receptor  $\alpha$  or  $\beta$ , and Gal4p transactivation domain (TAD)-co-activator AIB-1, SRC-1 or TIF-2 in *Saccharomyces cerevisiae* with a chromosome-integrated *lacZ* reporter gene under the control of *CYC1* promoter and Gal4p binding site (GAL4 upstream activating sequence, *GAL4<sub>UAS</sub>*). Expression of this reporter gene was dependent on the presence of estrogen or EDs in the culture medium. We found that the two-hybrid system with combination of the hER $\beta$  LBD and co-activator SRC-1 was most effective in the xenoestrogen-dependent induction of reporter activity. The extent of transcriptional activation by those chemicals correlated with their estrogenic activities measured by other assay systems, indicating that this assay system is efficient and reliable for measuring estrogenic activity. The data in this research demonstrated that the yeast detection system using steroid hormone receptor and co-activator is a useful tool for identifying chemicals that interact with steroid receptors.

**Keywords:** Endocrine disrupters, Yeast two-hybrid system, GAL4 DBD, GAL4 TAD, hER $\alpha$  LBD, hER $\beta$  LBD, co-activator AIB-1, SRC-1, TIF-2

### 서 론

내분비계장애물질(Endocrine Disruptors, EDs)은 생체내의 호르몬작용에 영향을 주고, 내분비계를 장애하는 외인성 화학물질이며, 그 영향의 end point가 종래의 독성과 같은 개체의 죽음으로써 끝나는 것이 아니고, 종의 멸종이라는 점으로부터, 인간에 대해서 뿐만 아니라 야생생물에 대한 영향을 고려하지 않으면 안된다.

EDs의 target이 되고 있는 estrogen receptor (ER)는 핵내 수용체(nuclear receptors)의 superfamily의 일원이며, 6개(A-F)의 domain 구조를 가지고 있다. E domain은 estrogen binding domain, C domain은 DNA binding domain이며, 전사 활성화 인자(transcription activating factor, AF)의 기능을 하는 AF-1 (A/B domain)와 AF-2 (E/F domain)등으로 특정되어 있다(Mangelsdorf, *et al.*, 1995; Tsai, *et al.*, 1994). ER은 2개의 subtype (ER $\alpha$ 와 ER $\beta$ )가 존재한다(Kuiper, *et al.*, 1996). 인간의 ER $\alpha$ 와 ER $\beta$ 의 amino acid 구조를 비교해보면, ER $\beta$ 에서는 A/B

\*To whom correspondence should be addressed

domain이 짧고, amino acid level에서 C domain에서는 96%, E domain에서는 50%, A/B domain에서는 30%의 affinity을 나타내고 있다. ER $\beta$ 는 ER $\alpha$ 와 같이 target gene의 promoter 상류에 있는 estrogen response element sequences (EREs)에 결합해서 그 전사를 활성화하는 점에서는 동일하지만(Tremblay, *et al.*, 1997; Pace, *et al.*, 1997), ER이 발현하고 있는 조직, ligand (hormone등)에 대한 기질특이성, affinity, recruit하는 co-activator의 종류에 대해서는 서로 다르다고 보고되고 있다(Pettersson, *et al.*, 2001).

호르몬이 receptor에 결합하면 receptor의 입체구조가 변화하며 이 변화를 식별하여 정보를 기본전사장치에 전달하는 co-factor라고 불리는 단백질 인자가 계속해서 발견되어 왔으며, 전사를 활성화하는 인자이기 때문에 co-activator라고 불리고 있다. 이들 단백질은 ligand 의존적으로 receptor와 상호작용하고, 그 signal을 기본 전사장치에 전달하고 있다고 생각된다. 현재 이 co-activator로써 동정된 것은, 분자량 약 160 kDa의 기능이 제법 유사한 SRC-1 (Steroid Receptor Co-activator-1), TIF-2 (Transcriptional Intermediate Factor-2), AIB-1 (Amplified In Breast cancer-1)의 family protein이 알려져 있다(Anzick, *et al.*, 1997; Voegel, *et al.*, 1996). SRC1 family protein인 SRC-1, TIF-2, AIB-1은 서로 높은 상동성을 가지고 있다. AIB-1와 SRC-1은 33%, TIF-2와 AIB-1은 45%, SRC-1와 TIF-2은 59%의 amino acid level에서 동일성을 가지고 있다. nuclear receptor와 상호작용는 LXXLL motif (L=leucine, X=any amino acid)가 AIB1와 TIF2에는 3개, SRC1에는 4개가 포함되어 있으며, ligand 의존하에서 nuclear receptor의 E domain (AF-2)과 co-activator의 LXXLL이 직접 상호작용한다고 사려 되고있다.

인류는 1,500만 종류에 달하는 화학물질을 합성 혹은 분리·동정 해왔다. 그리고 현재 약 10만 종류 정도의 화학물질이 상업적으로 이용되고 있다. 이들 화학물질 중에 유기염소화합물, 공업용화합물, 농약류, 유기취소(bromine)화합물, 중금속 및 유기금속, 식물 및 합성에스트로젠 등을 포함한 수십 종의 화합물이 EDs라고 생각되고, 혹은 의심되고 있다. 그렇지만, 대부분의 다른 화합물에 대해서는 그것들이 내분비계장애작용을 가지고 있는지에 대해서는 충분한 결론이 얻어지지 않고 있어 이들 화학물질의 내분비계장애작용을 평가하기 위해서 신속 또는 간편한 검출계의 확립은 매우 중요하다.

본 연구의 목적으로는, nuclear receptor의 특징인 ligand 의존적인 표적유전자의 전사활성화 기구를 이용하여 estrogenic chemical (EDs)의 검출법을 구축하기 위해, 인간 유래의 estrogen receptor (hER $\alpha$ ,  $\beta$ )의 ligand binding domain

(LBD)와 GAL4 DNA binding domain (GAL4 DBD)와의 융합단백질, 그리고 GAL4 transcriptional activation domain (GAL4 TAD)와 각종 co-activators(AIB-1, SRC-1, TIF-2)와의 융합단백질을 염색체상에 reporter gene (UAS<sub>GAL4</sub>-TATA-lacZ)을 integration 시킨 효모 *Saccharomyces cerevisiae*에서 발현시켜 EDs 검출제인 two-hybrid system을 구축했고, 각종 화학물질의 estrogenic activity의 측정을 실시 하였으며, 동시에 각종 EDs 검출system을 이용해서 내분비계장애 활성을 가지는 물질에 대한 평가법(REC10 and RIE)을 새롭게 실시 하였다.

## 실험재료 및 방법

Plasmids and Yeast Strain (Lee *et al.*, 2002)

pGAL4 DBD-hER $\alpha$  LBD 및 pGAL4 DBD-hER $\beta$  LBD

pGAL4 DBD-hER $\alpha$  LBD는, GAL4의 DNA 결합 영역(GAL4 DNA Binding Domain, GAL4 DBD)와 target protein와의 융합 단백질 제작용인 plasmid pGBT9 (clontech)를 제한효소 *Eco*R1와 *Sal*I site에서 절단하고, 이것에 hER $\alpha$  LBD cDNA의 *Eco*R1와 *Sal*I 단편(amino acids 311-595)을 삽입시켰다. 또, pGAL4 DBD-hER $\beta$  LBD는 plasmid pGBT9을 제한효소 *Bam*H1와 *Sal*I site에서 소화시키고, hER $\beta$  LBD cDNA의 *Bam*H1와 *Sal*I 단편(amino acids 213-477)을 삽입시켰다.

pGAL4 TAD-AIB-1, pGAL4 TAD-SRC-1와 pGAL4 TAD-TIF-2

이들은 GAL4의 전사 활성화 영역(GAL4 Transcriptional Activation Domain, GAL4 TAD)와 여러 가지 단백질과의 융합단백질 제작용 plasmid pGAD10 (clontech)의 제한효소 *Eco*R1 부위에 AIB1 cDNA *Eco*R1 단편(amino acids 180-819), SRC-1a cDNA *Eco*R1 단편(amino acids 231-1094), TIF2 cDNA *Eco*R1 단편(amino acids 670-1750)을 각각 삽입시켰다.

*S. cerevisiae* YRG-2 (*MATa ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, GAL80-538, LYS:: UASGALI-TATA<sub>GALI</sub>-HIS3, URA3:: UASGAL4 17mers(X3)-TATACYC1-lacZ*)(Stratagene)를 host로 사용했으며 electroporation에 의해 형질전환 되었다(형질전환체).

## Chemicals

본 실험에 사용된 화학물질 목록을 Table 1에 나타냈으며, 이들 물질 전부는 유기용매 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹여 사용했다.

**Table 1.** Compounds used to determined the estrogenic activity by a yeast two-hybrid system

Category	Substances	SPEED '98 <sup>1</sup>	Category	Substances	SPEED '98 <sup>1</sup>
Natural products and related	17 $\beta$ -estradiol (E <sub>2</sub> )		Industrial chemicals		
	Estrone (E <sub>1</sub> )		PCBs, PAH <sup>2</sup> , and related	TeCBP	0
	Testosterone			<i>p</i> -CBP	0
	Coumestrol			$\alpha$ -Naphthol	X
	Genistein			$\beta$ -Naphthol	X
Synthetic hormone	DES		Naphalene	X	
Pesticides and related	2,4-D	0	Phenols	Indole	X
	2,4,5-T	0		Phenanthrene	X
	<i>p,p'</i> -DDT	0		BPA	0
	<i>p,p'</i> -DDE	0		4- <i>n</i> -NP	0
	<i>p,p'</i> -DDD	0		4-NP	0
				4-NP	0
				4-OP	0
		4- <i>tert</i> -OP	0		

<sup>1</sup>SPEED '98, Strategic Programs on Environmental Endocrine Disruptors '98 in Japan environment agency. O, chemicals selected from SPEED '98 list; X, chemicals excepted from SPEED'98 list.

<sup>2</sup>PC3, PolyChloroBiphenyl; PAH, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.

#### Growth of Yeast and $\beta$ -Galactosidase Assay

1) 효모 형질전환체는 SD선택배지 2 ml에서 30°C, 24 h 전배양한다.

2) 이 전배양액을 9.7 ml의 SD배지에 2% 식균한다. 이것에 estrogenic activity을 측정하고 싶은 화합물의 용액을 100  $\mu$ l 첨가한다. 이 때, positive control로써는 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>), negative control로써는 DMSO를 첨가한 것도 동시에 배양했다. 30°C에서 11 h 진동배양(300 rpm)했다.

3) 집균후, 균체를 냉각수에 세정하고, 1 ml의 Z-buffer (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 35 mM  $\beta$ -mercaptoethanol)에 현탁하고, glass beads를 첨가한다.

4) 1 min 동안 vortex한 후, 1 min 이상 냉각시킨다. 이 cycle을 3회 이상 실시하여 균체를 파괴시킨다.

5) 원심분리로부터 glass beads와 비파괴 균체를 분리하고, 그 상등액을 효소액으로 했다.

효소액 농도의 정량에는 Bio-Rad Protein Assay 시약을 사용하여 595 nm의 흡광도값을 측정하며, BSA (Bovine Serum Albumin)를 standard (Z-buffer에 의해 0.2-0.9 mg/ml가 되도록 용해)로 해서 만든 검량선으로부터 정량했다. Report gene *lacZ* 유전자가 발현하여 효소  $\beta$ -galactosidase를 생성한다. 이때  $\beta$ -galactosidase는 기질인 ONPG (*o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside dissolved in Z-buffer)를 분해해서 황색의 ONP (*o*-nitrophenol)를 생성한다. 이 ONP를 정량 함으로써  $\beta$ -galactosidase의 활성을 측정하는 원리이다.

6) 효소액 200  $\mu$ l을 Z-buffer로 희석하여 500  $\mu$ l로 만들고,

Z-buffer에 4 mg/ml의 농도인 ONPG용액을 100  $\mu$ l 가하고, 30°C에서 보온한다.

7) 적당한 시간(반응액이 옅은 노란색으로 변하는 시점)에서 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 250  $\mu$ l 첨가하여 반응을 멈추고, 반응시간(min)을 기록한다. 420 nm의 흡광도값을 측정한다.

흡광도 측정조건에 의한 ONP의 mol 흡광계수를 21300 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>로 하고, 1 unit을 1 min 동안 1 $\times$ 10<sup>-3</sup> mol ONP를 생산하는 효소량이라고 정의하고, 그리고 모든 실험은 최저 3회 이상 반복 실험하고, 측정치로부터 표준편차를 구했으며, 재현성을 확인했다. 단백질 1 mg에 해당하는 unit수를 이하의 식을 이용해서 계산했다.

$\beta$ -galactosidase activity (unit/mg protein)=

$$\frac{A_{420} \times 10^{-6} \times \text{반응액량 (0.85 ml)}}{21300 \times \text{반응시간 (min)} \times \text{사용 효소량 (0.2 ml)} \times \text{단백질농도 (mg/ml)}}$$

## 결과 및 고찰

### Ligand-Dependent Interaction between hER LBD and Co-activator in Yeast

얻어진 각 형질전환체를 ligand인 E<sub>2</sub>를 1 $\times$ 10<sup>-11</sup>-1 $\times$ 10<sup>-4</sup> M의 농도가 포함된 SD배지에서 배양하고, 세포추출액을 조제하여  $\beta$ -galactosidase의 활성을 측정했다. 우선 GAL4 DBD와 hER LBD와의 융합 단백질만을 도입한 one-hybrid system에서는 Fig. 1의 A와 B의 No co-activator에서 나타낸 것처럼, 효모에서 E<sub>2</sub>의 농도에 관계없이 유용한

$\beta$ -galactosidase활성은 나타나지 않았다. 그러나, 2종류의 hER (hER $\alpha$  LBD와 hER $\beta$  LBD)와 3종류의 co-activators (AIB-1, SRC-1과 TIF-2)에 의한 two-hybrid system을 동시에 발현시킨 효모에서는 Fig. 1A와 1B에 나타난 것처럼, E<sub>2</sub> 의존적으로 reporter 유전자, lacZ의 전사가 활성화 되어  $\beta$ -galactosidase 활성이 검출되었다. 각종의 co-activators에 의한 전사 활성화 능력의 차이에 대해서 검토한 결과, hER $\beta$  LBD에 대해서는 E<sub>2</sub> 10<sup>-7</sup> M 이상의 농도에서는 TIF-2 > SRC-1 > AIB-1의 순서로 높은 전사 활성화가 나타났다. 그렇지만, 10<sup>-8</sup> M 및 10<sup>-9</sup> M의 낮은 농도에서는 hER $\alpha$  LBD와 SRC-1이 높은 활성을 나타냈다. 한편, hER $\beta$  LBD에 대해서는, E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M의 농도에서는 SRC-1 > TIF-2 > AIB-1의 순서로 높은 전사활성이 확인 되었으며, 이들 중에서도 hER $\beta$  LBD와 SRC-1에 의해서 구성된 two-hybrid system이 가장 높은 전사 활성을 나타냈다(Lee

et al., 2002).

Two-hybrid system에서는, hER은 ligand와 결합해서 구조변화가 일어나고, 전사를 활성화 시키는 인자 co-activator와 상호작용해서, 그 signal이 기본전사장치에 전달되고, reporter 유전자의 전사가 활성화 된다고 사려된다(Fig. 2). One-hybrid system과 비교하면, two-hybrid system은 co-activator을 도입함으로써, 포유동물세포와 효모의 사이에 있는 전사기구의 차이를 극복해서, 보다 포유류에 가까운 조건에서 각종 화학물질에 대한 내분비계장에 활성을 가진 화합물을 분석할 수 있다고 사려된다. 본 논문에서는 가장 높은  $\beta$ -galactosidase활성을 나타낸 hER $\beta$  LBD와 SRC-1에 의한 각종 화학물질에 대한 내분비계장에 활성 결과를 중심으로 기술했으며, 다른 system에 대해서는 내분비계장에 활성의 평가에 대해서만 기술했다.

Evaluation of Estrogenic Activities of Various Compounds using Different Two-Hybrid Systems

다음으로 24종류의 화학물질에 대해서, hER $\alpha$  LBD와 SRC-1 및 TIF-2, hER $\beta$  LBD와 SRC-1의 복합체를 이용한 효모 two-hybrid system을 이용해서 내분비계장에 활성을 측정하고, 그 평가를 실시했다. 평가법으로써는, 각 system에서 E<sub>2</sub>를 ligand로 이용한 경우에 얻어진  $\beta$ -galactosidase활성의 최고치의 10% (hER $\alpha$  LBD+SRC-1, 2.14; hER $\alpha$  LBD+TIF-2, 2.77; hER $\beta$  LBD+SRC-1, 7.33 unit/mg protein)를 기준으로 하고, 그 활성치가 10%를 넘는 화합물은

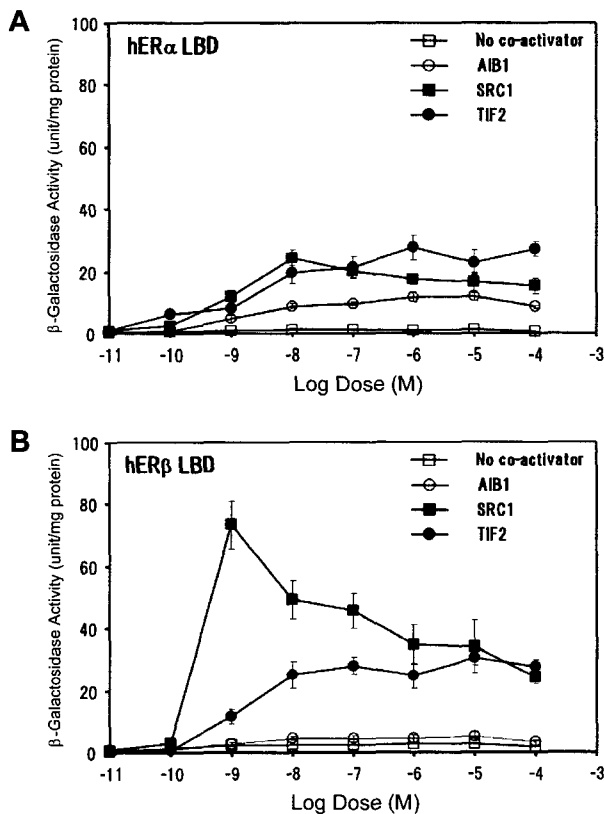


Fig. 1. Effects of co-activator on ligand-dependent activation of hER LBDs in yeast. *S. cerevisiae* strain YRG-2 was transformed with pGBT9 that contained inserts of ER LBDs (A, hER $\alpha$  LBD; B, hER $\beta$  LBD) and with pGAD10 that contained inserts of co-activators (AIB-1, SRC-1, TIF-2). Transformants were incubated in the presence of the indicated concentrations of E<sub>2</sub>, and  $\beta$ -galactosidase activities were measured as described in MATERIALS AND METHODS.

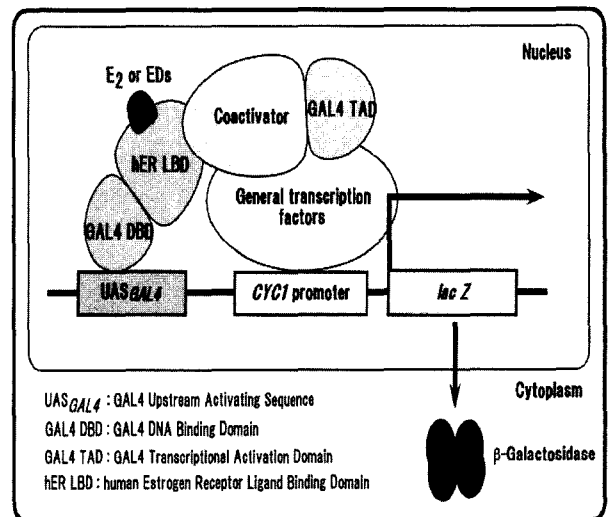


Fig. 2. Outline and principle of the yeast two-hybrid system for estrogenic activity. The test yeast can express  $\beta$ -galactosidase in response to estrogenic compounds through the ligand-dependent interaction between estrogen receptor and co-activator.

positive, 그 이하의 활성을 나타낸 화합물은 negative로 평가했다. 단, 이 평가치는, 어디까지나 알기 쉽게 하기 위한 것이지, 꼭 이 평가에서 negative로 평가된 화합물이 EDs가 아니다 라고는 말 할 수는 없다. 각 화합물에 대해서는 여러 범위의 농도에서 검토를 실시했으며, E<sub>2</sub>를 이용한 경우에 얻어진 β-galactosidase활성의 10%의 활성을 부여하는 각 화합물의 농도를 REC10 (10% Relative effective concentration)이라 했다(Nishihara, *et al.*, 2000). 게다가, 각 화합물의 REC10값을 E<sub>2</sub>의 REC10값으로 나누고, 그 값의 역수를 취한 뒤 %로 표시한 것을 상대유도효율, RIE (Relative Inductive Efficiency)라고 했다(Coldham, *et al.*, 1997; Gaido, *et al.*, 1997; Nishihara, *et al.*, 2000). 이들의 평가치를 Table 2에 나타냈다.

**Application of the Yeast Two-Hybrid Detection System with hERβ LBD and SRC-1 to Endocrine Disruptors**

**Natural and Synthetic Steroids (Fig. 3)**

여성 호르몬 E<sub>2</sub>를 ligand로 한 경우 10<sup>-9</sup>M의 농도에서 다른 two-hybrid system 보다 높은 β-galactosidase활성을 얻었다. 합성 호르몬인 DES (Diethylstilbestrol)도 다른

system보다 1 order 낮은 10<sup>-10</sup>M에서 내분비계장애 활성이 검출되었다. 또 남성호르몬인 testosterone은 다른 system에서는 reporter gene의 전사 활성화는 나타나지 않았지만, 본 system에 의해서는 10<sup>-5</sup>M에서 높은 활성을 나타냈다. 그리고 estrone, 식물호르몬(phytoestrogen)인 coumestrol와 genistein은 각각 10<sup>-7</sup>M, 10<sup>-6</sup>M, 10<sup>-4</sup>M에서 높은 내분비계장애 활성을 나타냈다. 또한, estrone, testosterone, coumestrol, genistein, DES의 REC10에 대한 RIE의 값은 각각 23.8, 0.005, 0.31, 0.063, 253이며, E<sub>2</sub>보다 4.2, 20,000, 322, 1,587배 약한 estrogenic activity을 나타냈지만, DES의 경우 2.53배 강한 활성을 나타냈다.

**Pesticide Chemicals (Fig. 4)**

제초제인 2,4-D와 2,4,5-T는 본 검출계에 의해서 10<sup>-4</sup>M 와 10<sup>-5</sup>M에서 높은 내분비계장애작용의 활성을 나타냈다. 살충제인 p,p'-DDT는 10<sup>-4</sup>M에서 다른 농약물질보다 높은 β-galactosidase활성을 나타냈지만, 그 대사물인 p,p'-DDE와 p,p'-DDD에 대해서는 활성이 거의 나타나지 않았다. p,p'-DDT는 여성 유방암세포(MCF-7)를 이용해서 ER에 대한 E<sub>2</sub>와의 결합작용을 조사한 실험으로부터 내분비계장애 활성을 가진 것(vom Saal *et al.*, 1995), 또한 SD rat의 전립선조직을 이용한 계에서 testosterone의 AR와의 결합을 방해하

**Table 2.** Evaluation of estrogenic activities of various compounds using different two-hybrid systems

Substance	hERα LBD and SRC1		hERα LBD and TIF2		hERβ LBD and SRC1	
	REC10(M)	RIE	REC10(M)	RIE	REC10(M)	RIE
17β-Estradiol	1.75×10 <sup>-10</sup>	100	2.13×10 <sup>-10</sup>	100	1.14×10 <sup>-9</sup>	100
Estron	1.60×10 <sup>-8</sup>	1.10	1.58×10 <sup>-8</sup>	1.35	4.20×10 <sup>-9</sup>	27.1
Testosteron	N		N		2.12×10 <sup>-5</sup>	0.005
Coumestrol	4.56×10 <sup>-6</sup>	0.004	2.54×10 <sup>-6</sup>	0.0084	3.25×10 <sup>-7</sup>	0.35
Genistein	1.33×10 <sup>-4</sup>	0.00013	1.81×10 <sup>-4</sup>	0.00012	1.59×10 <sup>-6</sup>	0.072
DES	3.24×10 <sup>-9</sup>	5.40	1.45×10 <sup>-9</sup>	14.7	3.95×10 <sup>-10</sup>	288.6
p,p'-DDT			1.03×10 <sup>-4</sup>	0.0002	1.95×10 <sup>-5</sup>	0.0059
p,p'-DDD					N	
p,p'-DDE					N	
2,4-D	2.09×10 <sup>-4</sup>	0.0001			1.35×10 <sup>-4</sup>	0.0008
2,4,5-T	N				2.92×10 <sup>-6</sup>	0.039
TeCBP			N		1.23×10 <sup>-4</sup>	0.0009
BPA	1.47×10 <sup>-4</sup>	0.00012	2.12×10 <sup>-4</sup>	0.0001	2.75×10 <sup>-5</sup>	0.004
p-CBP					N	
α-Naphthol					1.36×10 <sup>-4</sup>	0.0008
β-Naphthol					4.33×10 <sup>-5</sup>	0.0026
Indole					3.92×10 <sup>-5</sup>	0.0029
Naphthalene					N	
Phenanthrene					N	
4-n-NP					1.96×10 <sup>-6</sup>	0.058
4-NP	5.60×10 <sup>-6</sup>	0.003	4.08×10 <sup>-6</sup>	0.005	1.86×10 <sup>-6</sup>	0.061
4-HP					1.02×10 <sup>-6</sup>	0.112
4-OP					3.00×10 <sup>-6</sup>	0.038
4-tert-OP	1.80×10 <sup>-6</sup>	0.01	2.41×10 <sup>-6</sup>	0.009	3.35×10 <sup>-7</sup>	0.34

REC10 (10% Relative Effective Concentration). The concentration which gives 10% of the highest activity of E<sub>2</sub>; RIE (Relative Inductive Efficiency), reciprocal REC10 ratio, E<sub>2</sub> has an RIE of 100; N, Negative.

는 antagonist의 작용을 가진 것으로 보고되었다(Kelce *et al.*, 1995). 또, *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDE와 *p,p'*-DDD는 rat의 전립선을 이용한 AR결합에 대한 장해효과(IC<sub>50</sub>)에 의해서 antagonist의 작용을 가지고 있다고 보고되었다(Kelce *et al.*, 1995). 따라서, *p,p'*-DDT는 ER에 대해서 estrogen (agonist) 작용을, AR에 대해서는 antiandrogen 작용을 가지고 있고, 그리고, *p,p'*-DDE와 *p,p'*-DDD는 AR에 대해서

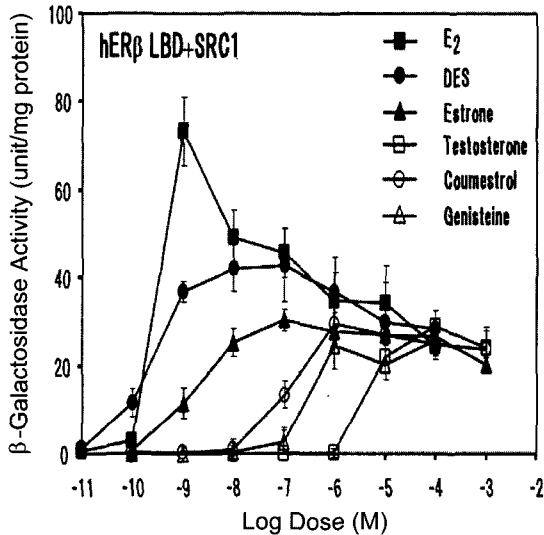


Fig. 3. Dose-response curves for steroid hormones, DES, and phytoestrogens as determined by the two-hybrid systems. *S. cerevisiae* strain YRG-2 with plasmids pGAL4 DBD hERβ LBD and pGAL4 TAD-SRC1 was incubated in the presence of the indicated concentrations of estrogenic compounds.

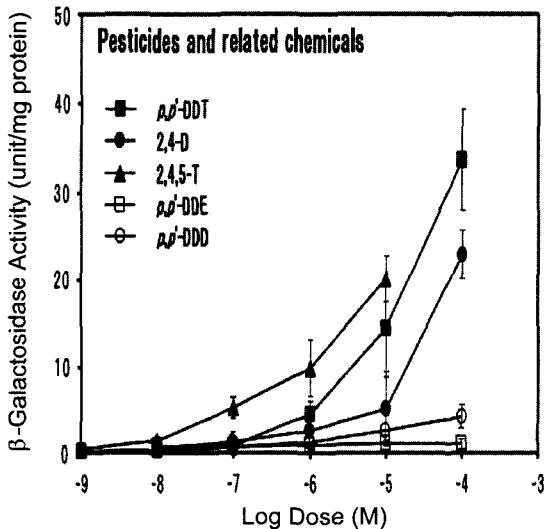


Fig. 4. Dose-response curves for pesticide and related chemicals as determined by the yeast two-hybrid system with hERβ LBD and co-activator SRC-1.

antiandrogen와 같은 활성을 가지고 있다. Rat 숫놈에 2,4-D가 첨가된 사료를 투여한 결과, 정소(고환)의 중량 저하에 대한 보고, mouse의 임신 6~14일 사이에 2,4-D와 2,4,5-T을 2대1로 혼합한 것을 투여한 결과, 생아 수 감소, 기형태아의 증가 등이 보고 되고 있다(Charles *et al.*, 1996). *p,p'*-DDT, 2,4-D, 2,4,5-T의 REC10에 대한 RIE는 각각 0.001, 0.005, 0.034이고, E<sub>2</sub> 보다 더 100,000, 20,000, 13,300, 2,940배 약한 estrogenic activity을 나타냈다.

Alkylphenol Chemicals (Fig. 5)

측정된 alkylphenol 화합물 전부는 높은 내분비계장애작용의 활성을 나타냈으며, 특히, 4-*tert*-OP (4-*tert*-Octylphenol)은 10<sup>-6</sup>M에서 높은 활성을 나타냈다. 4-HP (4-Heptylphenol)은 10<sup>-9</sup>M의 낮은 농도에서 β-galactosidase 활성이 검출되었다. Alkylphenol 화합물을 ligand로 한 경우의 β-galactosidase활성값의 크기는 4-*tert*-OP > 4-HP > 4-NP > 4-*n*-NP > 4-OP의 순서로 나타났다. 한편, 효모를 이용한 검출법에서는 alkyl기의 위치(para > meta > ortho)와 분기형(tertiary > secondary = normal)에 따라 높은 내분비 계장애 활성을 나타낸다고 보고 되고있다(White *et al.*, 1994). 이들 alkylphenol 화합물의 RIE 값은 각각 0.3, 0.098, 0.014, 0.051, 0.033이며, E<sub>2</sub>보다 333, 1,020, 1,852, 3,030 배 약한 활성을 나타냈고, β-galactosidase활성치와 잘 일치하고 있다.

Industrial Chemicals (Fig. 6)

BPA (Bisphenol A)는 10<sup>-5</sup>M~10<sup>-3</sup>M에서 높은 활성을 나타내고 있다. 염소화합물(phenyl류)에 대해서는, poly-

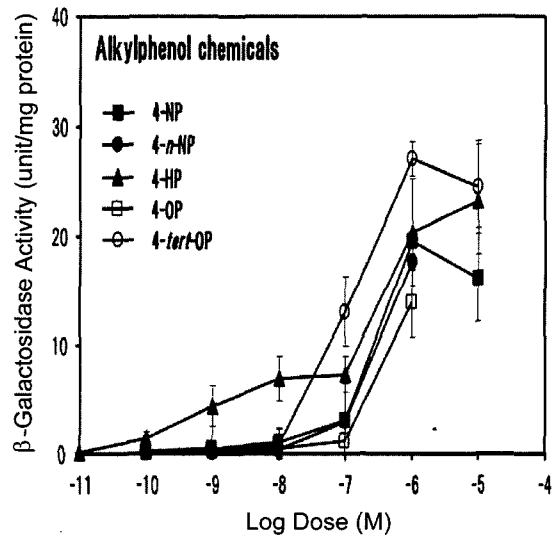


Fig. 5. Dose-response curves for alkylphenol chemicals as determined by the yeast two-hybrid system with hERβ LBD and co-activator SRC-1.

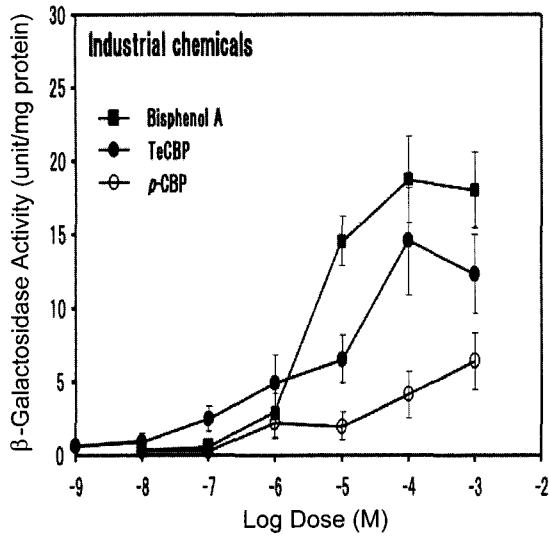


Fig. 6. Dose-response curves for industrial chemicals as determined by the yeast two-hybrid system with hER $\beta$  LBD and co-activator SRC-1.

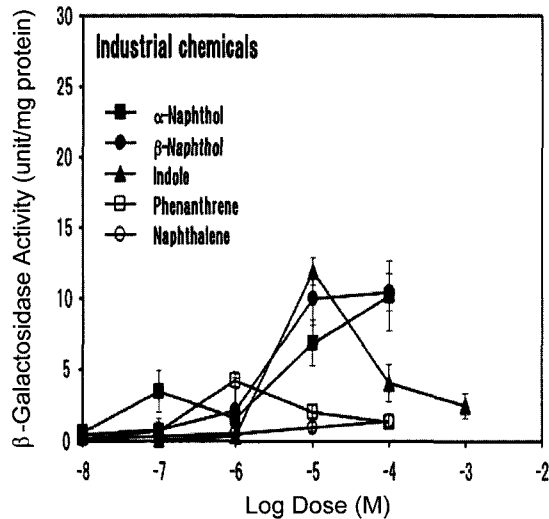


Fig. 7. Dose-response curves for polycyclic aromatic hydrocarbons as determined by the yeast two-hybrid system with hER $\beta$  LBD and co-activator SRC-1.

chlorobiphenyl인 TeCBP (2,2',3,4'-tetra chlorobiphenyl)는 본 system에서 내분비계장애 활성을 나타냈지만, p-chlorobiphenyl의 경우, 매우 약한 활성을 나타냈다. 그러나, TeCBP와 같이 염소이온이 4개 달려있는 TeCHQ (tetra-chlorohydroquinone)에 대해서는 estrogenic activity가 거의 나타나지 않은 것으로(data not shown), 벤젠고리에 달려있는 염소이온의 수에 의해서 내분비계장애 활성이 달라지는 것은 아니고, 기질 특이성에 의해 활성이 달라진다고 생각된다.

다. TeCBP와 BPA의 RIE는 0.008, 0.004이며, E<sub>2</sub>보다 12,500, 25,000배 약한 활성을 나타냈다.

**Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Fig. 7)**

염료중간체인  $\alpha$ -naphthol,  $\beta$ -naphthol은 10<sup>-4</sup>M에서 높은 내분비계장애 활성을 나타냈고, 향료의 원료인 indole은 10<sup>-5</sup>M에서 높은 내분비계장애 활성을 나타냈으며, 이들은 일본 환경성이 발표한 SPEED '98 (Japan Environment Agency, 1998)에 표시된 EDs로써 의심되는 화학물질의 list에 포함되지 않는 물질로써, 본 system에 의해서 이들 물질이 내분비계장애와 같은 활성이 검출된 것은 상당히 흥미 있는 사실이다. 의약품 합성에 사용되는 phenanthrene은 10<sup>-6</sup>M에서 낮은 활성을 나타냈고, 염료 중간체인 naphthalene은 거의 활성을 나타내지 않았다.  $\alpha$ -naphthol,  $\beta$ -naphthol, indole의 REC10에 대한 RIE는 0.0074, 0.00023, 0.0026이고, E<sub>2</sub>보다 135,140, 434,800, 38,460배 약한 활성을 나타냈다.

내분비계장애작용의 활성을 나타낸 모든 화학물질에 대해, reporter 유전자의 발현을 유도하기 위해서 필요한 농도는 다르지만, 이것들의 상대적인 내분비계장애작용의 활성의 크기는 다른 검출방법에 의해 조사된 내분비계장애작용의 활성의 크기와 비교적 잘 일치하고 있다. 많은 화학물질은 천연호르몬에 비해서 약한 내분비계장애작용의 활성을 가지고 있다. 효모 배양액에 첨가하는 이들 화학물질의 농도를 높이면  $\beta$ -galactosidase활성은 상승하지만, 일단 peak에 도달한 후, 다시 그 이상의 농도의 화학물질을 첨가하면 역으로 활성이 감소된다. 이것은 고농도의 세포독성 및 antagonist와 같은 작용 등의 원인이 된다고 사료된다. 따라서, 어느 화학물질에 대한 내분비계장애작용을 조사할 경우, 단계적으로 농도를 바꾸면서 조사할 필요가 있다.

본 연구에서는 구축된 검출계는, 광범위한 내분비계장애 작용을 가진 물질을 검출할 수 있으며, 유용성있는 검출계라고 사료된다. 구축한 system 중에서 hER $\beta$ LBD와 SRC-1을 이용한 system은 다른 two-hybrid system보다 저농도의 화학물질의 농도에서 보다 높은 내분비계장애작용의 활성을 얻을 수 있었다. 뿐만 아니라, hER $\alpha$ 와 hER $\beta$ 는 같은 ligand E<sub>2</sub>에 대해서 높은 결합성을 가지고 있지만, 각종 estrogenic activity에 대한 특이성은 꼭 일치하지 않는다는 것이 본 연구로부터 밝혀졌다. 따라서, EDs 검출 system을 구축할 시 ER $\alpha$ 뿐만 아니라, ER $\beta$ 의 이용을 고려할 필요가 있다고 사료된다.

**참고문헌**

Charles, J.M., et al. (1996) Comparative subchronic studies on

- 2,4-D, amine, and ester in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* **33**, 161-165.
- Gasiewicz, T.A., *et al.* (1997) Dioxins and the Ah receptor: probes to uncover processes in neuroendocrine development. *Neuro, Toxicol.* **18**, 393-414.
- Japan Environment Agency, "Strategic Programs on Environment Endocrine Disruptors '98", Japan Environment Agency, Tokyo, 1998 (<http://www.elc.or.jp>)
- Kelce, W.R., *et al.* (1995) Persistent DDT metabolite *p,p*-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* **375**, 581-585.
- Kuiper, G.G., *et al.* (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5925-5930.
- Kuiper, G.G., *et al.* (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology* **138**, 863-870.
- Lee, H-S., *et al.*, (2002) Empolyment of the human estrogen receptor  $\beta$  ligand-binding domain and co-activator SRC1 nuclear receptor-binding domain for the construction of a yeast two-hybrid detection system for endocrine disrupters. *J. Biochem.* **131**, 399-405.
- Mangelsdorf, D.J., *et al.* (1995) The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* **83**, 835-839.
- Nishihara, T., *et al.* (2000) Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *J. Health Science* **46**, 282-298.
- Pace, P., *et al.* (1997) Human estrogen receptor  $\beta$ ? binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **272**, 25832-25838.
- Pettersson, K., *et al.* (2001) Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *J. Annu. Rev. Physiol.* **63**, 165-192.
- Tsai, M.J., *et al.* (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 451-486.
- Tremblay, G.B., *et al.* (1997) Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor  $\beta$ . *Mol. Endocrinol.* **11**, 353-365.
- Voegel, J.J., *et al.* (1996) TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand- dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* **15**, 3667-3675.
- Vom Saal, F.S., *et al.* (1995) Estrogenic pesticides: Binding relative to estradiol in MCF-7 cells and effects of exposure during fetal life on subsequent territorial behavior in male mice. *Toxicol. Lett.* **77**, 343-350.
- White, R., *et al.* (1994) Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* **135**, 175-182.