

Title	Construction of a biosensor <i>Daphnia magna</i> for the detection of environmental estrogens via integration of the human estrogen receptor $\alpha$
Author(s)	Toerner, Kerstin
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/70744">https://doi.org/10.18910/70744</a>
rights	
Note	

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## Abstract of Thesis

Name ( TOERNER Kerstin )	
Title	<p>Construction of a biosensor <i>Daphnia magna</i> for the detection of environmental estrogens via integration of the human estrogen receptor <math>\alpha</math></p> <p>(オオミジンコにヒトのエストロゲン受容体<math>\alpha</math>遺伝子を導入した内分泌攪乱物質検出用バイオセンサーの作製)</p>
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Environmental estrogens have a variety of adverse effects including increased risks for cancer and abnormalities in reproductive tissues. Current screening methods are mostly limited to yeast or mammalian cell assays which lack tissue diversity, and to transgenic fish which employ the respective fishes' own estrogen receptors. Water fleas (<i>daphnia</i>) have a long history in aquatic testing and now lend themselves to applications as biosensor due to recent progress in the development of genome editing tools.</p> <p>To be able to design a functional estrogen biosensor, with ubiquitous but weak expression of hER<math>\alpha</math> and high expression of the reporter once activated, I first needed to develop a method to adjust protein expression in <i>D. magna</i>. I focused on the untranslated regions (UTRs) of <i>D. magna</i> elongation factor 1<math>\alpha</math>-1 (EF1<math>\alpha</math>-1), since this gene's mRNA can be found ubiquitously and at high copy numbers in <i>daphnia</i>. RNAs with different lengths of EF1<math>\alpha</math>-1 3' UTR, 185 nt, 61 nt, and 0 nt or no 3' UTR, lead to respective relative fluorescence increases of <math>12.1 \pm 0.4</math>, <math>14.1 \pm 1.0</math>, and <math>1.1 \pm 0.1</math>. These results suggest we can use different lengths of EF1<math>\alpha</math>-1 3' UTR to modulate translation in <i>D. magna</i>.</p> <p>For an estrogen biosensor in <i>D. magna</i>, I designed two separate plasmids with EF1<math>\alpha</math>-1:ESR1 and ERE:mCherry. hER<math>\alpha</math> (ESR1) is flanked by a full length (522 nt) EF1<math>\alpha</math>-1 3' UTR; mCherry, under the control of a minimal promoter with four estrogen response elements (ERE), is flanked by a truncated EF1<math>\alpha</math>-1 3' UTR (79 nt) made by joining the first 61 nt with the last 18 nt, its poly (A) motif. Using microinjection, I could show that both plasmids are functional in <i>D. magna</i> embryos in an estrogen-dependent manner. I then joined them in opposite directions on a plasmid containing a TALE site. For genomic integration I used the Minos-Red line of <i>D. magna</i> which contains a hemizygous EF1<math>\alpha</math>-1:DsRed2, exhibiting ubiquitous red fluorescence, and previously developed transcription activator-like effector nucleases (TALEN) targeting the DsRed2 ORF. One embryo survived, showing a DsRed2 knock-out phenotype, founding the ES line of <i>D. magna</i>.</p> <p>To test the practicality of the ES line, I conducted a reproduction assay and tested its response to exposure to estradiol (E2), a natural estrogen, and DES, a synthetic estrogen. ES <i>daphnia</i> reproduce slower than Minos-Red <i>daphnia</i>, on average <math>28 \pm 5</math> juveniles per animal after 28 days, versus <math>50 \pm 6</math> juveniles from Minos-Red. Exposure to different concentrations of E2 and DES and a new method to quantify fluorescence in <i>daphnia</i> resulted in detection thresholds of 4 mg/L for E2 and 0.5 mg/L for DES. As it is, sensitivity is too low for practical application, but ES is functional.</p> <p>Taken all together, I developed a method for protein overexpression in <i>D. magna</i>, and implemented different lengths of EF1<math>\alpha</math>-1 3' UTR to modulate translation. Further experiments are needed to investigate if other UTRs behave similarly in <i>daphnia</i>. I then successfully integrated an estrogen biosensor construct into the <i>D. magna</i> genome. The resulting ES line expresses functional hER<math>\alpha</math> and exhibits fluorescence responses to exposure to both natural and synthetic estrogens as tested with E2 and DES. Sensitivity must be improved for practical application, either by changing the exposure regiment or the genetic cassette, e.g. by replacement of mCherry with an even brighter fluorescent protein like tdTomato, or the introduction of human coactivators like SRC-1, SRC-3 and LRP16. Nevertheless, hER<math>\alpha</math> could be shown to be functional in <i>daphnia</i> for the first time, suggesting a huge potential for the use of <i>daphnia</i> to study the interaction of human genes with environmental factors like the effect of EDCs in this study.</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( TOERNER Kerstin )			
論文審査担当者		(職)	氏 名
	主 査	(教授)	渡邊 肇
	副 査	(教授)	福崎 英一郎
	副 査	(教授)	内山 進
	副 査	(教授)	村中 俊哉
	副 査	(教授)	紀ノ岡正博
	副 査	(教授)	大政 健史
	副 査	(教授)	藤山 和仁
	副 査	(教授)	永井 健治
<p><b>論文審査の結果の要旨</b></p> <p>本論文では、環境水をモニタリングするためのツールとして、オオミジンコに対して遺伝子編集を行い、エストロゲン様活性をもつ化学物質に対しての応答を可視化したバイオセンサーを作製している。</p> <p>第一章では、環境水における化学物質影響の問題点を総括すると同時に、特にホルモン様作用を持つ化学物質影響の問題点に焦点をあて、本論文の目的と概要を総括している。</p> <p>第二章では、化学物質影響を可視化するために有用な緑色蛍光タンパク質を対象として、オオミジンコの生体内で安定して発現するために必要な遺伝子構造、特に遺伝子の3'側の非翻訳領域の適正化をはかっている。また同時に個体レベルでの蛍光タンパク質を定量的に計測するための手法の開発も行っている。</p> <p>第三章では、エストロゲン様活性を検出するための遺伝子を設計しオオミジンコに遺伝子を導入している。このために、ヒト由来のエストロゲン受容体<math>\alpha</math>遺伝子とこの受容体の標的配列を有するレポーター遺伝子を、TALEN技術を用いて導入している。レポーター遺伝子としては、赤色蛍光タンパク質の遺伝子を用いている。</p> <p>第四章では、作製したヒトエストロゲン受容体とそのレポーター遺伝子を有するオオミジンコについて、実際に曝露を行いエストロゲン様活性に対する応答性を確認している。その結果、実際に天然のエストロゲンであるエストラジオールや、人工のエストロゲンであるジェチルスチルベストールが水中に存在する場合、この遺伝子編集を行ったオオミジンコは赤色蛍光を発することを確認している。</p> <p>以上のように、本論文は環境水のモニタリングに広く用いられているオオミジンコを、さらに水中のエストロゲン様活性を検出できるように改変したものであり、水環境のモニタリングの効率化と簡便化に対してその意義は大きい。</p> <p>よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。</p>			