様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成　25　年　5　月　29　日現在

機関番号：３４５０４
研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2009～2011
課題番号：２１３１００４５
研究課題名（和文）　フェノール性化学物質の功罪について結合タンパク質因子からの検討
研究課題名（英文）　Biological functions of polyphenols－Search for their binding factors and mechanism in the binding

研究代表者
今岡　進（IMAOKA SUSUMU）
関西学院大学・理工学部・教授
研究者番号：60145795

研究成果の概要（和文）：代表者らはビスフェノールＡ(BPA)やレスベラトロール(RES)が低酸素応答を阻害することを明らかにしている。また BPA は甲状腺ホルモン応答を促進した。一方、代表者らは BPA がプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)と結合することを明らかにしている。本研究においては甲状腺ホルモン受容体の活性が Ref-1 を介して PDI のレドックス制御を受けていることを解明した。Ref-1 は本来低酸素感受性因子 HIF-1α還元活性化因子として発見されたものである。この成果はポリフェノールが PDI の活性阻害を介して、核内因子の活性に影響を与えている可能性を示すものである。

研究成果の概要（英文）：We found that polyphenols such as bisphenol A (BPA) and resveratrol (RES) inhibited the hypoxic response of the cells (Hep3B cells) and that BPA enhanced the T3-response of the cells (GH3 cells).　However, the mechanism of these phenomena was not still understood.　We already found that BPA bounds to protein disulfide isomerase (PDI) and inhibits its activity. In this study, we found that PDI regulated the redox state of T3 receptor via Ref-1 which was originally found as redox factor of HIF-1α, the key regulator of hypoxic response. These findings suggest that PDI regulates the redox states of nucleus factors and poly phenol may affect the activation of nucleus factors by inhibition of PDI.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総　計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：複合新領域
科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学
キーワード：ビスフェノール、レスベラトロール、プロテインジスルフィドイソメラーゼ、甲状腺ホルモン応答、低酸素応答

１．研究開始当初の背景

ビスフェノールやノニルフェノールのようないわゆる内分泌かく乱物質やレスベラトロールに代表される植物性ポリフェノールは、我々のからだに対して様々な影響を及ぼすと考えられる。内分泌かく乱物質は、文字通りホルモン様の作用を持ち、生体に悪影響を与えるが、植物性のポリフェノールは抗

癌作用や抗肥満作用など、有用な作用が報告されている。同じフェノール性の化合物でありながら、このように作用が異なるのは、これらがターゲットとしているタンパク質因子が異なるためであると考えられる。一方、代表者は当時これらのフェノール性化合物のターゲット因子として、(1)コラーゲンのプロリン残基水酸化酵素のβサブユニットやシャペロンとして働いているプロテインジスルフィドイソメラーゼ（PDI）(2)発癌に関わるAh受容体　(3)低酸素応答や血管系形成に関わる低酸素感受性因子（HIF）(4)分化や一次神経系形成に関わる Notch signal を明らかにしている。そこで当該研究では、フェノール性化合物が、これらの因子とどのように相互作用するのか、そのメカニズムを分子レベルで解析することを目的とした。

２．研究の目的

体によくないとされるビスフェノール A（BPA）と体によいとされるレスベラトロール（RES）は代表者の研究では、両化合物とも低酸素応答阻害及び、アフリカツメガエル胚の発生に影響を及ぼす事が示された。一方、BPAは酸化ストレス感受性因子であるNrf2を誘導するが､逆にRESはこの因子を抑制する。代表者らはBPAがPDIに結合してその活性を阻害することを明らかにしているがRESにその作用はない。以上の事実から、本研究では、これらのフェノール化合物およびその誘導体が､どのようにPDIの活性を阻害するのか。さらには PDI,HIF,Nrf2 シグナリングの解析とこれらの化合物がこれらのシグナリングにどのような影響を与えるのかを明らかにし、フェノール性化合物の生体への影響の分子機構を解明することを目的とする。

３．研究の方法

各タンパク質因子のｃDNA の単離と大腸菌での発現精製、抗体の作成と培養細胞での過剰発現

ヒトHIF-1α, Nrf2, Siah2 のｃDNA はヒト肝癌細胞 Hep3B RNA から RT-PCR によって単離した。ラット PDI,Ref-1,TR のｃDNA はラット肝臓またはGH3細胞から RT-PCR で単離した。そして、培養ヒト細胞での過剰発現のために、pcDNA、大腸菌での発現精製のために pQE または pET に導入した。大腸菌による発現は IPTG 誘導により行った。発現したタンパク質は Ni-NTA アガロースで精製した。精製したタンパク質を用いてウサギで抗体を作製した。ヒト培養細胞での過剰発現は G418 で選択を行った。

Biacore による相互作用解析

BPA と PDI やその誘導類似タンパク質の相互作用解析は表面プラズモン解析装置 Biacore を用いて行った。CM5 chip　の表面にBPA誘導体を固定し、アナライトとして PDI または PDI 及びその類似タンパク質を用いた。

RNase を用いたイソメラーゼ活性の測定法

PDI のイソメラーゼ活性は RNase を用いて測定した。まず、RNase を DTT とグアニジン存在化に変性した。変性 RNase と PDI を反応させ、リフォールディングされた RNase の活性を基質である cCMP から CMP への変換で測定した。

４．研究成果

BPA が PDI に結合して、イソメラーゼ活性を阻害することは既に述べた通りであるが、PDI のどの部位に結合し、どのような機構で活性を阻害するのかを検討した。PDI は a,b, b', a', c の５個のドメインからなり、a と a' ドメインに CGHC の配列を持つイソメラーゼ活性中心が存在する。まずこれらを ab, b'a'c, a, b, b', a'c フラグメントに分けて大腸菌で発現精製して BPA との結合性を Biacore で検討した(図１)。その結果、ab, b'a'c, a, b' のフラグメントに BPA 結合性が見られた。このことから結合には a と b' が重要であると考えられた。次に ab, b', a'c, a, b, b', a', abb'a', のフラグメントを発現精製して BPA によるイソメラーゼ活性阻害を調べた(図２)。このう

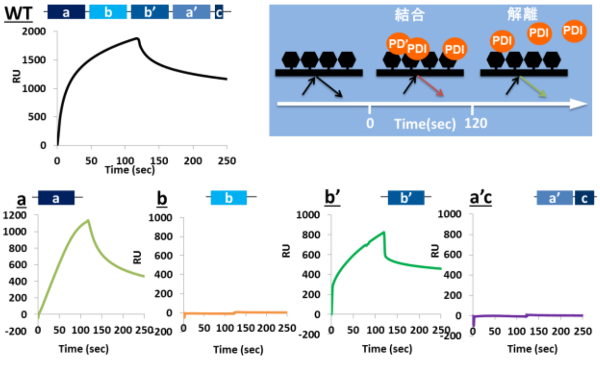

図1. PDIドメインとBPAの相互作用

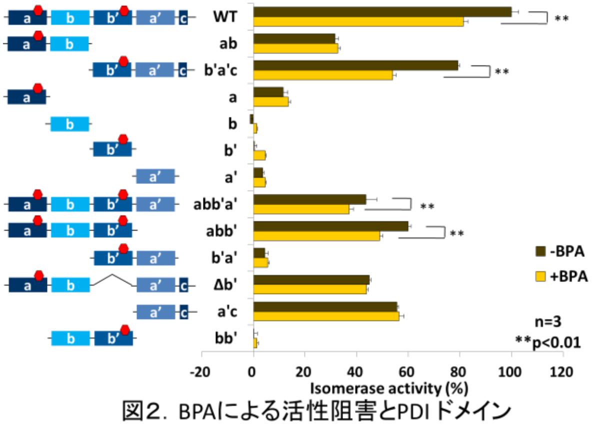

図2. BPAによる活性阻害とPDIドメイン

ち a と a' ドメインを含んでいるものに活性が見られたが、b' ドメインを含むものにのみ、BPA による活性阻害が見られた。このこ

とから、BPA が PDI の b’ドメインに結合することで、そのイソメラーゼ活性を阻害していることが明らかになった。さらに、a と b’の間には可変性領域があり、基質が b’に結合するのを調節しているが、b’に BPA が結合することで、この動きが制限され、基質が b’に結合できなくなり、阻害反応が起こることを解明した。

PDI の新規機能と BPA の甲状腺ホルモンかく乱機構

ラットの脳下垂体由来細胞 GH3 は甲状腺ホルモン T3 に応答して成長ホルモン(GH)を分泌する細胞で、この細胞を利用して甲状腺ホルモン応答機能を解析した。GH3 細胞に T3 を添加すると顕著な GH 分泌が見られたが、同様に BPA を添加しても GH の分泌は見られず、BPA の T3 様の作用は弱いと考えられた。しかし、T3 を添加して GH の分泌が見られる状態で BPA を添加すると GH 分泌の促進が観察された。一方、この細胞に PDI 過剰発現すると T3 による GH 発現は抑制された。PDI は BPA のみならず、T3 と結合することが知られ、代表者らは T3 と BPA の結合部位が同一であることも明らかにしている。ところで、PDI を過剰発現すると T3 応答が低下することは以前から知られ、これは T3 が PDI にトラップされて、甲状腺ホルモン受容体に結合できなくなることによる PDI 甲状腺ホルモンリザーバー説が報告されている。代表者らの本研究によって T3 及び BPA の PDI への結合部位が明らかになったことで、上記のメカニズムを検討した。まず、GH3 細胞に様々な PDI 変異体を発現して、甲状腺ホルモンの応答を GH の発現で調べた。変異体としてはイソメラーゼ活性中心の変異体である C/A Mt,及び BPA が結合するそれぞれのドメイン欠損体Δ a, Δ b’である。その結果、Δ b’では過剰発現すると GH3 細胞の T3 応答に顕著な低下がみられた。一方でΔa, C/A Mt では低下が軽微であった。このことから、これまで、PDI を過剰発現すると甲状腺ホルモン応答が低下する原因は PDI に T3 が結合してその細胞内の濃度が低下するためと考えられてきたが、T3 の結合部位を除去したΔ b’でも過剰発現で T3 応答に影響があることから、上記の説は否定された。一方、PDI のイソメラーゼ活性中心を除去した C/A Mt の過剰発現では影響が軽微であることから、甲状腺ホルモン受容体の活性には PDI のイソメラーゼ活性が必要であることが証明された。

そこで、次に細胞の酸化状態、還元状態がどのように甲状腺ホルモン受容体の活性に影響を及ぼしているかについて検討した。まずチオール基の酸化剤である diamide や過酸化水素を添加して T3 応答を検討したところ、低下がみられ、チオールの酸化は T3 応答を低下させることが明らかになった。それに対して還元剤である DTT の添加は影響を与えなかった。そこで核内因子を酸化還元している因子を検索したところ、Ref-1 の可能性が示唆された。Ref-1 は本来低酸素感受性因子 HIF-1αを還元活性化する因子として見いだされたものである。このことから Ref-1 が甲状腺ホルモン受容体 TR を還元活性化している可能性が示唆された。そこで、まず、GH3 細胞に Ref-1 を過剰発現した。すると、GH3 細胞における T3 応答が増加した。一方で Ref-1 の活性中心である６４番目のシステイン残基をセリン残基に変換した変異体 C64S Ref-1 では全く効果は見られなかった。すなわち Ref-1 による TR の還元が活性化にかかわっていることが示された。

BPA 誘導体による低酸素応答阻害とその化学構造

BPA は内分泌かく乱物質として報告され、エストロゲンや甲状腺ホルモンのかく乱作用が疑われている。動物実験においては妊娠した母マウスに BPA を与えると、生まれてきた仔に多動性などの異常が現れると報告され、BPA の脳への影響が懸念されている。代表者らは BPA の脳への影響を明らかにするために先に述べたように BPA のアフィニティーカラムを作製し、ラット脳から結合因子として PDI を精製した。PDI のイソメラーゼ活性は RNase を用いて簡単に測定することができる。PDI のイソメラーゼ活性は BPA の添加によって阻害された。まず、PDI と BPA との結合において BPA のどの構造が必要なのかを検討した。ジメチル BPA、2,2-ジフェニルプロパン、BPE、 BPF について検討した結果、前者二つすなわちフェノール基を持たないものは、PDI との結合性もなく、また阻害活性も見られなかった。一方、フェノール基をメチルでブロックしても低酸素応答阻害効果は変わらず、PBE や PBF で阻害効果が低下することから、BPA について低酸素応答阻害には BPA の中心部のメチル基の疎水性が重要であるが、PDI との結合にはフェノール基が重要であることが明らかとなった(図 3,4)。

低酸素応答と酸化ストレス応答のクロストーク及びフェノール化合物による阻害の相違

虚血・再灌流は酸化ストレスを引き起こす典型的な例である。虚血すなわち血流が遮断され低酸素状態となり、再灌流によって血流が再開されるとそこで酸化ストレスが引き起こされる。このように生体では低酸素状態と酸化ストレス状態が連続して起こる。すなわち低酸素状態で引き起こされる遺伝子発現の変化が次の酸化ストレス状態を変化させる。そこで、酸化ストレス応答の鍵因子であ

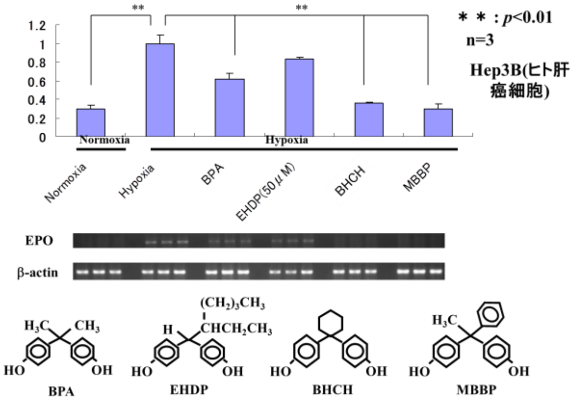

図3．低酸素応答阻害とBPA誘導体の構造

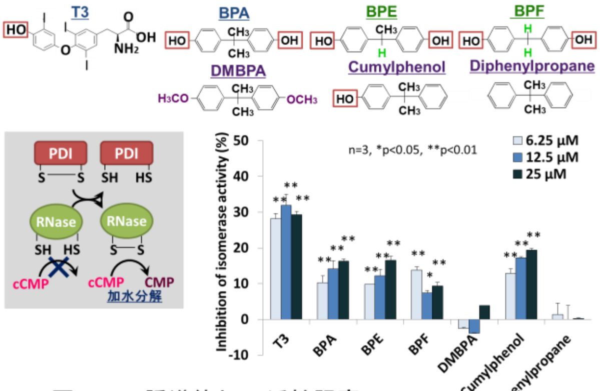

図4．BPA誘導体とPDI活性阻害

るNrf2が低酸素下でどのように変化するのかを調べたところ、低酸素状態で顕著な低下が見られた。そして、さらに検討の結果、この低下の原因がSiah2というユビキチンリガーゼであることが明らかとなった。Nrf2は低酸素下ではリン酸化され、Keap1による分解が阻害されているが、Siah2はリン酸化されたNrf2も分解でき、しかも低酸素によって誘導されることでNrf2の代謝が亢進することが明らかとなった。

生体の酸化ストレス応答にはいくつかのパスが知られているが、活性酸素などラジカルによって活性化される keap1-Nrf2 はその典型的なものでヘムオキシゲナーゼなどの抗酸化因子を誘導する。すなわち、通常の状態では Nrf2 は Keap1 によって補足されユビキチン化されプロテアゾーム系で分解されているが、活性酸素が発生する様な酸化ストレス下において、活性酸素はKeap1の構造を変化させ Nrf2 を解放して、これは様々な抗酸化因子の誘導に関わる。BPAはNrf2の発現を誘導した。これは細胞にBPAを投与するとNOが発生することから、これがKeap1を不活性化するためと考えられる。一方、RESはNrf2の発現量を低下させた。この理由は明らかでないが、おそらくRESの抗酸化作用によるものと考えられる（図５）。

まとめ

本研究によって低酸素応答因子HIF-1のみならず甲状腺ホルモン受容体TRがRef-1によって還元され活性化することが明らかになり、さらにRef-1はPDIによって酸化されることが明らかになった。一方、申請者らはBPAのようなポリフェノールがPDIの活性を阻害することを明らかにしているので、BPAのような物質がPDIを介することで、核内受容体には直接作用しないで、間接的に影響を与えている新たなメカニズムを提唱する（図６）。

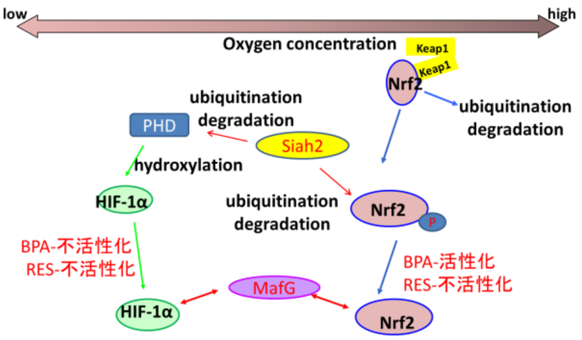

図5．低酸素応答と酸化ストレスのクロストークとポリフェノールによるシグナル阻害

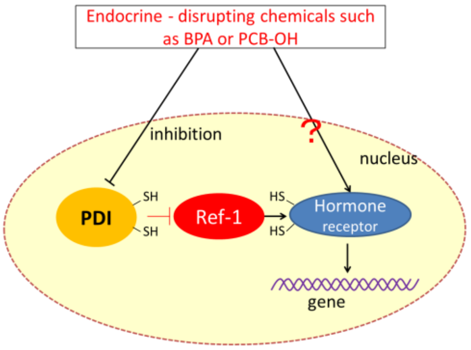

図6．PDIを介した甲状腺ホルモン受容体制御

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　14 件）

1. Hashimoto S, and Imaoka S. Protein disulfide isomerase regulates the thyroid hormone receptor-mediated gene expression via redox factor-1 through thiol reduction-oxidation. *J. Biol. Chem.* 288, 1706－1716, 2013. 査読有り　10.1074/jbc.M112.365239
2. Hashimoto S, Ito L, Okumura M, Shibano T, Nawata M, Kumasaka T, Yamaguchi H, and Imaoka S. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the complex between

triiodothyronine and the bb' fragment of rat protein disulfide isomerase. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 68(Pt 4):476-478,2012. 査読有り 10.1107/S1744309112007439

3. Hashimoto S, Yoshimura H, Okada K, Uramaru N, Sugihara K, Kitamura S, and Imaoka S. Effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and their derivatives on protein disulfide isomerase activity and growth hormone release of GH3 cells. *Chem. Res. Toxicol.* 25(3):656-63,2012. 査読有り 10.1021/tx200374s
4. Hashimoto S, Shiomoto K, Okada K, and Imaoka S. The binding site of bisphenol A to protein disulfide isomerase (PDI). *J. Biochem.* 151, 35-45, 2012. 査読有り 10.1093/jb/mvr122
5. Imaoka S. Chemical stress on protein disulfide isomerases and inhibition of their functions. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 290, 121-166, 2011. 査読有り 10.1016/B978-0-12-386037-8
6. Oguro A, Sakamoto K, Funae Y, and Imaoka S. Overexpression of CYP3A4, but not CYP2D6, promotes hypoxic response and cell growth of Hep3B cells. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 26, 407-415, 2011. 査読有り 10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-017
7. Kinoshita T, Haruta Y, Sakamoto C, and Imaoka S. Antagonistic role of XESR1 and XESR5 in mesoderm formation in Xenopus laevis. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 25-31, 2011. 査読あり 10.1387/ijdb.092990tk
8. Osada-Oka M, Hashiba Y, Akiba S, Imaoka S, and Sato T. Glucose is necessary for stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha under hypoxia: contribution of the pentose phosphate pathway to this stabilization. *FEBS Lett.* 584, 3073-3079, 2010. 査読あり 10.1016/j.febslet.2010.05.046
9. Okada K, Hashimoto S, and Imaoka S. Biological functions of protein disulfide isomerse (PDI) as a target of phenolic endocrine-disrupting chemicals. (Review) *J. Health Sci.* 56(1):1-13, 2010. 査読なし http://jhs.pharm.or.jp/
10. Okada K, Hashimoto S, Funae Y, and Imaoka S. Hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs) interact with protein disulfide isomerase and inhibit its activity. *Chem. Res. Toxicol.* 22(5):899-904, 2009. 査読あり 10.1021/tx800476j

〔学会発表〕(計　40 件)

1. 今岡進、「低酸素応答から酸化ストレス応答まで因子のクロストークについて」第 85 回日本生化学会大会（招待講演）、2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場
2. 今岡進、「プロテインジスルフィドイソメラーゼ（PDI）への環境化学物質の結合とその作用機序について」 第 39 回日本毒性学会学術年会（招待講演）、2012 年 7 月 19 日、仙台国際センター
3. 志波徹朗、橋本翔子、今岡進、「Transmembrane thioredoxin-like protein(TMX)のビスフェノール A 結合性とイソメラーゼ活性の検討」 第 84 回日本生化学会大会、 2011 年 9 月 23 日～2011 年 9 月 24 日、 京都国際会館
4. 馬場一信、石尾一真、森本陽香、今岡進、「低酸素環境における酸化ストレス応答系の不活性化機構」 第 84 回日本生化学会大会、 2011 年 09 月 22 日、 京都国際会館
5. 橋本翔子、佐々木淑絵、工藤智弘、今岡進、「Protein disulfide isomerase による甲状腺ホルモン応答制御メカニズムの解明」 第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 23 日、 京都国際会館
6. Hashimoto S, Shiomoto K, Okada K, Imaoka S, "Structural changes of protein disulfide isomerase by the binding of bisphenol A", ESF-EMBO Symposum: Glutathione and Related Thiols in Living Cells, September 6, 2011, Sant Feliu de Guixols, Spain
7. Imaoka S, Oguro A, Suzuki S, "Contribution of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) to hypoxic response of cells", 52nd International Conference on the Bioscince of Lipids, August 30, 2011, Warsaw, Poland
8. 橋本翔子、岡田和嗣、今岡進、「ビスフェノール A による protein disulfide isomerase 活性阻害メカニズムの解析」 第 33 回日本分子生物学会大会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 10 日、 神戸国際展示場
9. 佐々木淑絵、岡田和嗣、松岡篤、奥村正樹、山口宏、今岡進、「PDI、ERp57、ERp72 に対するビスフェノール A の結合とそれらの生理作用への影響について」 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010年12月7日、神戸国際展示場

10. 工藤智弘、橋本翔子、岡田和嗣、今岡進、「PDI ファミリータンパク質 ERp29 と ERp46 タンパク質化学的性質について」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 10 日、 神戸国際展示場
11. 志波徹郎、橋本翔子、今岡進、「TMX3（PDI ファミリータンパク質）のビスフェノール A 結合性の検討および機能解析」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、 2010 年 12 月 10 日、 神戸国際展示場
12. 新銀健太、渡辺進、大黒亜美、今岡進、「低酸素応答系因子 HIF-1α の新規阻害剤の検討「 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 7 日、 神戸国際展示場
13. 馬場一信、谷山太一、浦丸直人、杉原数美、北村繁幸、今岡進、「水酸化 PBDE による発生毒性の解析」第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会、 2010 年 6 月 17 日、 沖縄コンベンションセンター
14. 工藤智弘、橋本翔子、岡田和嗣、今岡進、「PDI family タンパク質 ERp29 と ERp46 に対するビスフェノールＡの影響について」第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会、2010 年 6 月 17 日、沖縄コンベンションセンター
15. Imaoka S, Hashimoto S, Okada K, Yoshimura M, Watanabe S, Uramaru N, Sugihara K, and Kitamura S, “Required chemical structures for inhibition of protein disulfide isomerase activity and hypoxic response”. Gordon Research Conferences: Thiol-Based Redox Regulation & Signaling, May 10-13, 2010, Lucca (Barga), Italy.
16. Hashimoto S, Okada K, and Imaoka S, “Biological functions of protein disulfide isomerase in growth hormone release from GH3 cells by T3”. Gordon Research Conferences: Thiol-Based Redox Regulation & Signaling, May 10-13, 2010, Lucca (Barga), Italy.
17. 坂元弘一、大黒亜美、矢倉達夫、今岡進、「アラキドン酸エポキシゲナーゼの細胞増殖における役割について」 第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 22 日、 神戸国際展示場
18. 佐々木淑絵、橋本翔子、岡田和嗣、今岡進、 「BPA 結合タンパク質 PDI とその相同タンパク質 ERp57,ERp72 の機能解析」 第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日、 神戸国際展示場
19. 橋本翔子、岡田和嗣、今岡進、 「GH3 細胞における Protein disulfide isomerase による甲状腺ホルモン応答制御機構について」 第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日、神戸国際展示場
20. 岡田和嗣、橋本翔子、今岡進、 「ビスフェノールＡによるタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ（PDI）の S-ニトロシル化および成長ホルモン産生促進機構」第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 23 日、 神戸国際展示場

〔産業財産権〕
○出願状況（計 3 件）
名称：ビスフェノール A 吸着剤及びその利用
発明者：藤原伸介・今岡進
権利者：学校法人関西学院
種類：特許
番号：特願 2013-042324
出願年月日：2013 年 3 月 4 日
国内外の別：国内

名称:ビスフェノール A 誘導体を含有する HIF 阻害剤
発明者：今岡進
権利者：学校法人関西学院
種類：特許
番号：特願 2010-040851
出願年月日：2010 年 2 月 25 日
国内外の別：国内

名称：融合モノオキシゲナーゼ及びそれを用いた酸化物の生産方法
発明者：今岡進
権利者：学校法人関西学院
種類：特許
番号：PCT/JP2010/052558
出願年月日：2010 年 2 月 19 日
国内外の別：国外

〔その他〕
ホームページ等
関西学院大学理工学部今岡研究室
http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~imaoka/

６．研究組織
(1)研究代表者
今岡 進（IMAOKA SUSUMU）
関西学院大学・理工学部・教授
研究者番号：60145795
(2)研究分担者
岡田 和嗣（OKADA KAZUSHI）（H21 のみ）
関西学院大学・理工学研究科・博士研究員
研究者番号：40423892
勝村 成雄（KATSUMURA SHIGEO）
関西学院大学・理工学部・教授
研究者番号：70047364