

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24年6月15日現在

機関番号：32707

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590671

研究課題名（和文） 化学物質の新規甲状腺ホルモン様作用評価系開発のための基礎的研究

研究課題名（英文） Basic studies for a novel validation system of thyroid hormone-like activities by chemicals

研究代表者

岡部 とし子（OKABE TOSHIKO）

相模女子大学・栄養科学部・教授

研究者番号：20152564

研究成果の概要（和文）：本研究ではヒト培養細胞を用い、受容体と緑色蛍光タンパク質(GFP)との融合タンパク質の分解に伴う蛍光強度の低下を指標として、甲状腺ホルモンが甲状腺ホルモン受容体タンパク質を特異的に分解することを明らかにした。蛍光強度の低下は甲状腺ホルモン濃度に依存し、さらに血液中の甲状腺ホルモン濃度程度でも検出可能であったことから、このバイオアッセイ系は、既存の甲状腺ホルモン受容体および甲状腺ホルモン応答因子を介した転写活性化を用いた系よりも鋭敏な指標となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, it was demonstrated that thyroid hormone caused thyroid hormone receptor degradation specifically using the reduction of fluorescent intensities of thyroid hormone receptor-green fluorescent protein (GFP) fusion protein in cultured cells. The reduction of fluorescent intensities was dependent on the concentration of thyroid hormone in the culture medium and this reduction could be detected even in the presence of serum concentration level of thyroid hormone. From these results, it was suggested that the bioassay system using the reduction of fluorescent intensities might be more sensitive than that using transactivation by thyroid hormone receptor and thyroid hormone response element.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境保健、甲状腺ホルモン、甲状腺ホルモン受容体、緑色蛍光タンパク質、GFP、蛍光強度、甲状腺ホルモン応答配列

1. 研究開始当初の背景

(1) 内分泌攪乱化学物質等種々の化学物質による生体影響に関して、化学物質を高濃度に蓄積した野生動物の結果から、ヒトへの影響が危惧されている。特に、農薬やダイオキシン等化学物質や食品含有成分の中には、実験動物を用いた毒性試験や、培養細胞内や試験

管内での性ホルモン受容体との結合試験の結果、一定濃度以上のある種の化学物質の曝露がエストロゲンやアンドロゲンのような性ホルモン作用を有するものがあり、これらの化学物質が生殖系へ影響する可能性が示唆されている。さらに、最近では従来の試験ではヒトへの影響が重要視されていなかった

た化学物質について、胎児期には感受性が高く低用量で影響するとの報告があり、各国でその使用に関する規制を新たにするなど、化学物質の影響評価について様々な視点からの評価が望まれている。

(2) 甲状腺ホルモンは呼吸やエネルギー産生など生体にとって基礎代謝の維持に必要なホルモンであり、生体内では TSH や TRH によって血中濃度が維持されているが、この恒常性が機能しなくなると様々な病態を示すことが知られている。これまでは被験物質が甲状腺ホルモン系へ影響を及ぼすか否かを検討する際、主にげっ歯類へ投与した後、血中の甲状腺ホルモンレベルの変化や胎児期に投与した場合は代謝酵素の測定や脳の発達状況の観察、一般毒性試験や変異原性・発癌性試験などの結果を総合して評価してきた。また、甲状腺ホルモンのシグナルは細胞内で甲状腺ホルモン受容体に特異的に結合し甲状腺ホルモン応答配列を介して転写活性化を促し受容体下流の遺伝子へ伝達されることから、本研究代表者は、このシグナル伝達系を利用しルシフェラーゼをレポーターとしたバイオアッセイ系を構築し、被験物質の甲状腺ホルモン様作用を評価してきた。被験物質の中には単独では転写活性化を示さないが甲状腺ホルモンによる転写活性化を増強するものがあり、化学物質による甲状腺ホルモン系への影響は甲状腺ホルモン受容体への直接的な影響以外のメカニズムが存在することが予想された。

(3) 甲状腺ホルモン受容体の属する核内ホルモン受容体ファミリーに属するエストロゲン受容体や Ah 受容体はリガンドが結合するとユビキチン・プロテアソームシステムにより受容体タンパク質が分解することが報告されていたが、甲状腺ホルモン受容体タンパク質に関してはリガンド結合による分解や転写活性化との関連に関して不明であった。

2. 研究の目的

(1) 上記1. 研究開始当初の背景(1)で記載したように、内分泌攪乱化学物質等種々の化学物質による生殖系への影響に関して、従来の試験ではその影響が明確でなかった化学物質についても生体影響の可能性が報告され、多くの視点からの評価が望まれている。したがって甲状腺ホルモン系への影響に関してもこれまでより鋭敏な新規のバイオアッセイ系の構築が望まれている。核内ホルモン受容体に関してはリガンド結合により受容体タンパク質がユビキチン・プロテアソーム系を介して特異的に分解されることが報告されていることから、本研究では同じ核内ホルモン受容体に属する甲状腺ホルモン受容体

について甲状腺ホルモンの結合により特異的に分解すること、またリガンド結合による甲状腺ホルモン受容体分解を指標とした新規バイオアッセイ系を構築することを目的とした。受容体タンパク質の分解を容易に検出するために受容体タンパク質に緑色蛍光タンパク質を連結し、受容体・緑色蛍光タンパク融合タンパク質として、緑色蛍光強度を測定することにより受容体タンパク質の分解を定量的に測定する方法を構築することとした。

(2) 上記(1)の新規バイオアッセイ系と甲状腺ホルモン受容体および甲状腺ホルモン応答配列を介した転写活性化を指標とした従来のバイオアッセイ系を比較して、リガンド結合による応答能を比較するとともに、リガンド結合による甲状腺ホルモン受容体分解のメカニズムがユビキチン・プロテアソームシステムを介しているか否かを明らかにすること、さらにリガンド結合時に起こる甲状腺ホルモン受容体の分解と転写活性化の関連を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 甲状腺ホルモン受容体および緑色蛍光タンパクの融合タンパク質の分解を利用したバイオアッセイ

①融合タンパク質の発現

ヒト甲状腺ホルモン受容体 $\alpha 1$ の全長 cDNA の下流に緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードする遺伝子を接続した真核細胞発現プラスミドを作成し、インビトロジェン社製のリポフェクタミンおよびプラス試薬を使用して HEK293 細胞、HeLa 細胞または NIH3T3 細胞へ導入した。導入3時間後にリポフェクタミンおよびプラスミド DNA を取り除き、活性炭およびデキストラン処理したウシ胎児血清を含む培地で3日間培養した。この間、種々の濃度の甲状腺ホルモンまたは化学物質を培地へ添加し影響を検討した。対照として緑色蛍光タンパク質のみを発現させた細胞を使用した。なお、ユビキチン・プロテアソームシステムによるタンパク質分解を阻害するためにプロテアソーム阻害剤 MG132 (Enzo Life Sciences 社製)を使用した。

②ウェスタンブロッティング

上記①で作成した細胞を PBS で洗浄後、界面活性剤を含む細胞破壊液(プロメガ社製)に懸濁した。攪拌・遠心後、上清に含まれるタンパク質を 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて分離し、PVDF 膜(バイオラッド社製)に転写した。1次抗体としてヒト甲状腺ホルモン受容体 $\alpha 1$ タンパク質に特異的なウサギポリクローン抗体(サンタクルズ社製)、パーオキシダーゼ結合の抗ウサギ抗

体(アマシャム社製)を2次抗体として反応させた後、ECL-Plus 試薬(アマシャム社製)を用いて検出した。

③融合タンパク質の細胞内挙動

上記①で作成した細胞について蛍光顕微鏡(オリンパス社製)を用いて融合タンパク質の発現を調べた。

④融合タンパク質の蛍光強度測定

上記①で作成した細胞をPBSで洗浄後、②と同様に界面活性剤を含む細胞破壊液(プロメガ社製)で処理し遠心後の上清を細胞粗抽出液とした。甲状腺ホルモンや化学物質などを添加して培養した細胞由来の粗抽出液について、それらの蛍光強度をフルオロメーター(バイオラッド社製)で測定し、一定タンパク量あたりの蛍光強度を比較した。

(2) 甲状腺ホルモン受容体および甲状腺ホルモン応答配列を用いた転写活性化を指標としたバイオアッセイ

①レポーター遺伝子の導入

上記、研究の方法(1)①で使用したヒト甲状腺ホルモン受容体 $\alpha 1$ の全長cDNAの下流に緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子を接続した真核細胞発現プラスミドと甲状腺ホルモン応答配列を上流に挿入したホタルルシフェラーゼ遺伝子真核細胞発現プラスミドをリポフェクタミンおよびプラス試薬を使用してHEK293細胞へ導入した。導入3時間後にリポフェクタミンおよびプラスミドDNAを取り除き、活性炭およびデキストラン処理したウシ胎児血清を含む培地で3日間培養した。この間、種々の濃度の甲状腺ホルモンまたは化学物質を培地へ添加した。

②ルシフェラーゼ活性の測定

上記①で作成した細胞をPBSで洗浄後、界面活性剤を含む細胞破壊液(プロメガ社製)で破壊し遠心により上清を調製し粗抽出液とした。プロメガ社製のルシフェラーゼ活性基質溶液と粗抽出液を混合後、直ちにルミノメーター(アトー社製)で発光量を測定し、一定タンパク量あたりの発光量を比較した。

4. 研究成果

(1) 甲状腺ホルモン受容体および緑色蛍光タンパクの融合タンパク質の分解を利用したバイオアッセイ系の確立

①使用する細胞株および融合タンパク質の発現方法

前記、3. 研究の方法(1)①に記載した方法によりHEK293細胞、HeLa細胞、NIH3T3細胞へ発現プラスミドを導入し3(1)④の方法で予備的にヒト甲状腺ホルモン受容体に接続した緑色蛍光タンパク質の蛍光強度を測定した結果、HEK293細胞を用いた場合、最も

高い蛍光強度を得ることができた(図省略)。また、ヒト甲状腺ホルモン受容体および緑色蛍光タンパクの融合タンパク質を恒常的に発現する細胞株を単離することを試みたが、細胞株を単離する過程で蛍光強度が減少し、バイオアッセイに使用可能な強度を維持することが困難であった(図省略)。以上の結果から、甲状腺ホルモン受容体および緑色蛍光タンパクの融合タンパク質の発現はHEK293細胞を用いてtransientで行うことにした。

②融合タンパク質発現の確認

前記3. 研究の方法(1)①に記載した方法によりHEK293細胞において甲状腺ホルモン受容体と緑色蛍光タンパクの融合タンパク質をtransientに発現させた後、3(1)②に記載した方法によりウェスタンブロッティングを行い、発現させた甲状腺ホルモン受容体タンパク質の分子量を推定した。図1に示すように、抗甲状腺ホルモン受容体抗体と特異的に反応するタンパク質は、以前作成した甲状腺ホルモン受容体のみを恒常的に発現している細胞の抽出液では分子量55kDa付近に認められたが(レーン3、矢尻で表記)、融合タンパク質を発現させた細胞抽出液を用いた場合は約80kDa付近であり(レーン2、矢印で表記)、甲状腺ホルモン受容体と緑色蛍光タンパクの融合タンパク質と同程度の分子量であることから、甲状腺ホルモン受容体を含む融合タンパク質が発現していると推察された。

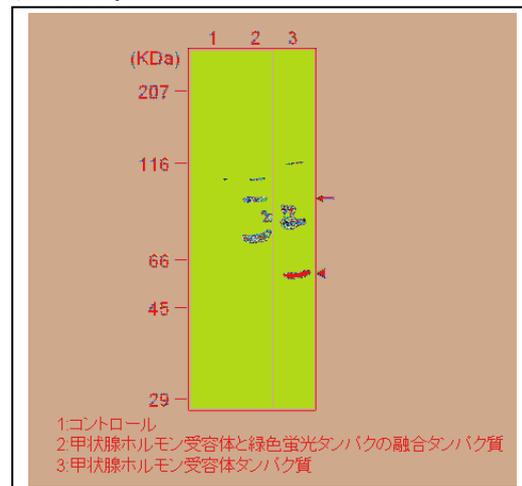


図1. 甲状腺ホルモン受容体と緑色蛍光タンパクの融合タンパク質の細胞内での発現

③甲状腺ホルモンによる融合タンパク質の蛍光強度の変化

HEK293細胞において甲状腺ホルモン受容体及び緑色蛍光タンパクの融合タンパク質を発現させる際、甲状腺ホルモンT3を培地へ添加し蛍光顕微鏡を用いて細胞を観察すると、図2に示すように無添加の場合(-T3

と表記)と比較して蛍光がほとんど消失していた(+T3と表記)。

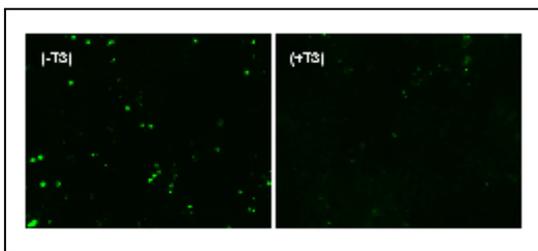


図 2. 甲状腺ホルモン添加による甲状腺ホルモン受容体と緑色蛍光タンパクの融合タンパク質の蛍光の変化

一方、緑色蛍光タンパク質のみを発現した場合は甲状腺ホルモンの添加による蛍光の減少は認められなかった(図3参照)。

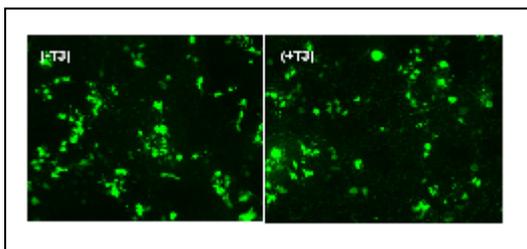


図 3. 甲状腺ホルモン添加による緑色蛍光タンパク質発現への影響

したがって、図2で認められる蛍光強度の減少は甲状腺ホルモン受容体を介して甲状腺ホルモンが作用することにより引き起こされたものと考えられた。

次に甲状腺ホルモン受容体および緑色蛍光タンパクの融合タンパク質を発現する際、種々の濃度の甲状腺ホルモンを培地へ添加し培養後、蛍光強度をフルオロメーターで測定した。その結果、図4に示すように甲状腺ホルモンを最終濃度 0.5ng/ml で培地へ添加した場合、蛍光強度が減少し、添加する甲状腺ホルモン濃度の増加に伴って蛍光強度の減少が観察された。高濃度の甲状腺ホルモンを添加した場合、さらに蛍光強度が減少した(図省略)。

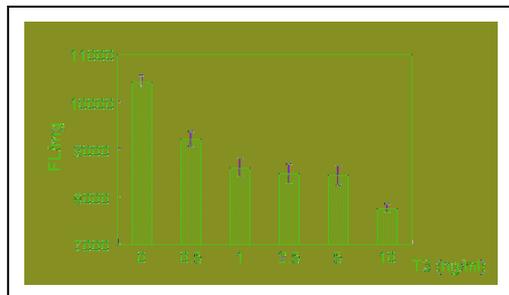


図 4. 甲状腺ホルモン添加による甲状腺ホルモン受容体および緑色蛍光タンパクの融

合タンパク質の蛍光強度の低下

一方、緑色蛍光タンパク質のみを発現させた場合には甲状腺ホルモンの添加による蛍光強度の減少は全く認められなかった(図5参照)。

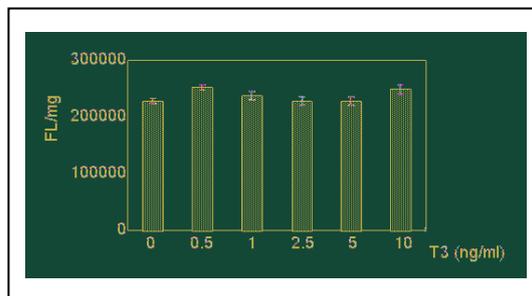


図 5. 甲状腺ホルモン添加による緑色蛍光タンパク質の蛍光強度への影響

以上の結果から、甲状腺ホルモン受容体および緑色蛍光タンパクの融合タンパク質の分解を指標として甲状腺ホルモンによる影響を評価することが可能であることが示唆された。

(2) 甲状腺ホルモン受容体および甲状腺ホルモン応答配列を用いた転写活性化を指標としたバイオアッセイ

これまでに研究代表者はHeLa細胞において甲状腺ホルモン受容体を恒常的に高発現している細胞株であるHeLaTR細胞を用いて、甲状腺ホルモン応答配列を有するルシフェラーゼ発現プラスミドを導入し、種々の化学物質による甲状腺ホルモン様作用を検討してきた。本研究では前記4. 研究成果(1)①に記載した通り、甲状腺ホルモン受容体および緑色蛍光タンパクの融合タンパク質の蛍光強度がHEK293細胞において最も高かったことから、従来の転写活性化を指標としたバイオアッセイにおいてもHEK293細胞を使用し再検討した。

甲状腺ホルモン受容体発現プラスミドと甲状腺ホルモン応答配列を有するルシフェラーゼ発現プラスミドを導入したHEK293細胞へ種々の濃度の甲状腺ホルモンを添加し培養後、抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定した。

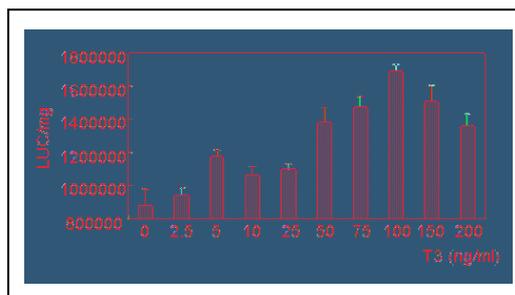


図 6. 甲状腺ホルモン受容体を介した転写活性化

図 6 に示すように甲状腺ホルモン濃度の上昇に伴いルシフェラーゼ活性の増加が認められ、100ng/ml 濃度で最大値を示しその後減少した。しかしながら低濃度の甲状腺ホルモンを添加した場合には有意な転写活性化の上昇は認められなかった。なお、この結果は HeLaTR 細胞を用いた結果とほぼ同様であった(結果省略)。

(3) 甲状腺ホルモン受容体及び緑色蛍光タンパク質の融合タンパク質を利用したバイオアッセイの応用

上記 4. 研究成果(1)で示したように蛍光強度の減少は従来の転写活性化で有意な影響が認められるよりも低濃度の甲状腺ホルモンを培地へ添加することにより観察されたことから、これまで単独での甲状腺ホルモン様作用が明確ではなかった内分泌攪乱化学物質であるビスフェノール A を用いて蛍光強度への影響を検討した。図 7 に示すようにビスフェノール A を添加することにより融合タンパク質の分解に伴う蛍光強度の低下が認められたことから、比較的低濃度のビスフェノール A が甲状腺ホルモンと同様の影響を与える可能性が否定できないと考えられた。

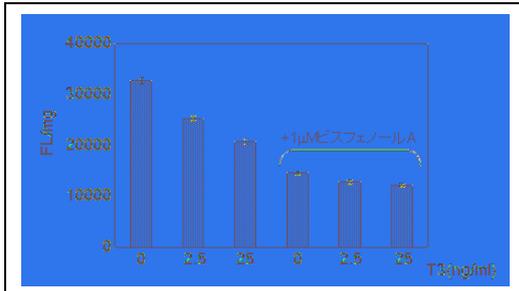


図 7. ビスフェノール A 添加による甲状腺ホルモン受容体および緑色蛍光タンパクの融合タンパク質の分解

さらに、甲状腺ホルモンの添加による融合タンパク質の分解は低濃度のプロテアソーム阻害剤 (MG132) により抑制されるとの予備的な知見を得ていることから(図省略)、他の核内ホルモン受容体の場合と同様に甲状腺ホルモン受容体のリガンドによる分解はユビキチン・プロテアソーム系を介する可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

①岡部とし子、安井奈津美「受容体タンパク質の分解を指標とした甲状腺ホルモン様作用評価系の開発」(第 81 回日本衛生学会総会、2011 年 3 月 26 日開催予定であったが東日本大震災のため中止)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡部 とし子 (OKABE TOSHIKO)
相模女子大学・栄養科学部・教授
研究者番号：20152564

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし