

平成 22 年 4 月 2 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20710054

研究課題名 (和文) 内分泌かく乱物質の PDI への結合メカニズムとそれらが及ぼす生理作用の解明

研究課題名 (英文) The binding mechanism of endocrine disruptors to protein disulfide isomerase and its physiological effects.

研究代表者

岡田 和嗣 (OKADA KAZUSHI)

関西学院大学・理工学研究科・博士研究員

研究者番号：40423892

研究成果の概要 (和文)：ビスフェノール A による PDI の SNO 化の可能性を検討した結果、24 時間の曝露によって SNO-PDI の量が増加することが明らかになった。また、ビスフェノール A による PDI の SNO 化は T<sub>3</sub> の存在下でのみ促進されることが明らかとなった。さらに、T<sub>3</sub> は NOS の発現量を誘導することによって NO の産生量を増加させるが、ビスフェノール A は PDI に直接作用することにより、NO の増加に伴い SNO 化を促進することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：We investigated the S-nitrosylation of PDI by bisphenol A in GH3 cells. S-nitrosylated PDI (SNO-PDI) was increased by 24h-treatment of bisphenol A in the presence of T<sub>3</sub>, although not increased by T<sub>3</sub> only.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：内分泌かく乱物質

## 1. 研究開始当初の背景

近年、内分泌かく乱化学物質による脳神経系発達への影響が懸念されている。内分泌かく乱化学物質として知られるビスフェノール A は、マウスの胎仔期、新生仔期における曝露によって、脳の発達や機能に異常をきたし、様々な行動習性に影響を及ぼす事が明らかにされている。しかしながら、その作用機序については不明である。我々は最近、ビスフェノール A をリガンドにしたアフィニティ

ークロマトグラフィーによって、ビスフェノール A の特異的結合タンパク質をラット脳から単離・精製した。そして、アミノ酸配列解析の結果から、本タンパク質がタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) であることを明らかにした。PDI はタンパク質のジスルフィド結合の形成、還元、異性化を行うことが知られており、新生タンパク質の正しいフォールディングに必要な不可欠な酵素であ

る。また、PDI はプロリン水酸化酵素の  $\beta$  サブユニットであるほか、分子シャペロンとしての機能を有しており、「多機能タンパク質」として知られている。さらに、PDI は甲状腺ホルモン ( $T_3$ ) を結合する事から、ホルモンリザーバーとしての機能が示唆されているが、その生理機能は不明である。 $T_3$  は PDI に結合するだけでなく、イソメラーゼ活性を阻害することから、 $T_3$  は細胞内においてイソメラーゼ活性の制御に関わっている可能性が考えられる。ラットおよびヒト由来リコンビナント PDI を用いた検討からは、ビスフェノール A は PDI の  $T_3$  結合を競合的に阻害し、イソメラーゼ活性を抑制する事が分かった。さらに、 $T_3$  依存的に成長ホルモンを産生する GH3 細胞で PDI を過剰発現させると、成長ホルモン産生が抑制される事を明らかにした。またこの抑制は翻訳後修飾の段階で起こることがわかった。一方、最近の報告では、脳神経細胞内で産生された NO によって PDI のニトロシル化がおり、イソメラーゼ活性が阻害された結果、フォールディング異常タンパク質の蓄積により神経変性が引き起こされることが報告されている。さらに、パーキンソン病やアルツハイマー病患者の脳神経細胞では S-ニトロシル化 PDI 量の増加がみられ、*in vivo* における PDI の活性阻害と脳神経系の異常との関連性が示唆されている。その為、ビスフェノール A による PDI への影響がフォールディング異常タンパク質の蓄積をもたらし、脳神経系の発達に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

代表者らはこれまで、内分泌かく乱化学物質としての作用が示唆されている約 20 種類の環境化学物質について検討をおこない、水酸化ポリ塩化ビフェニルやノニルフェノール等も  $T_3$  結合やイソメラーゼ活性を阻害する事を示し、 $T_3$  結合阻害とイソメラーゼ活性阻害には構造-阻害相関があることを報告した。以上の事から、PDI のリガンド結合とイソメラーゼ活性抑制との間には PDI の構造変化など、何らかの相互作用があることが考えられる。しかしながら、 $T_3$  あるいはビスフェノール A の結合部位は明らかにされておらず、またリガンド結合とイソメラーゼ活性の調節機能に関する知見は得られていない。そこで本研究では、PDI におけるリガンドの結合部位の特定を行い、また、結晶構造解析を行う事によって  $T_3$  やビスフェノール A、ハロゲン化ビスフェノール A などのリガンド

存在下での構造変化を検討し、ビスフェノール A をはじめとする内分泌かく乱化学物質による PDI への作用メカニズムを解明することを目的として検討を行った。さらに、内分泌かく乱化学物質による PDI の S-ニトロシル化を検討することによって、環境化学物質が及ぼす脳神経系への影響を明らかにすることを目的として行った。

これまで、ビスフェノール A による内分泌かく乱作用機序に関しては、エストロゲン受容体やアンドロゲン受容体などの性ホルモン受容体に対する作用に研究・論議の焦点が絞られているが、性ホルモン受容体を介した機序と、脳神経系に及ぼす作用との間には大きな隔りがある。本研究では PDI を内分泌かく乱化学物質の標的タンパク質として捉える点が独創的である。近年、ビスフェノール A やポリ塩化ビフェニルなどによる核内甲状腺ホルモン受容体に対する作用が報告されており、甲状腺ホルモン作用を介した作用機序が示されている。PDI は甲状腺ホルモンである  $T_3$  と結合するが、その生理的意義については不明であり、生体内分子が直接 PDI に結合することによって活性が調節される事は知られていない。リガンド結合による PDI の構造変化および活性変化に着目した点が本研究の特色である。本研究では、機能解析と構造解析の両面からアプローチすることにより、内分泌かく乱化学物質の PDI を介して作用する生体への影響を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ビスフェノール A 結合ドメインの同定  
PDI は **a, b, b', a', c** ドメインからなり、チオレドキシシン様ドメインである **a** および **a'** にそれぞれ一カ所ずつの活性部位 (-CGHC-) をもつ。ビスフェノール A および  $T_3$  がいずれのドメインに結合するのかを明らかにするため、表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) により検討を行った。チップに固定化するリガンドに A ビスフェノール A を用い、またアナライトにはラット由来 PDI をヒスチジン融合タンパク質としてドメイン単位で大腸菌内発現させ、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーにより精製を行ったタンパク質を用いた。また、ビスフェノール A はそのままでは固定化に用いることができないため、ビスフェノール A-アミン誘導体 (図 1) を合成し、アミンカップリング方を用いて CM5 センサーチップに固定化した。

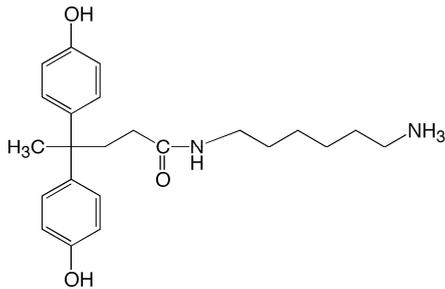


図1 ビスフェノールA—アミン誘導体の化学構造式

#### (2) ビスフェノールAによるPDIのS-ニトロシル化の検討

ラット下垂体由来細胞であるGH3細胞は、 $T_3$ 依存的に成長ホルモン(GH)を産生・分泌する。GH3細胞の培養液中にビスフェノールAを添加し、24時間後に細胞を回収した。S-ニトロシル化PDIの検出は、ビオチンスイッチ法により行った。また、 $T_3$ の影響を検討するため、GH3細胞を甲状腺ホルモン欠乏培地(Td培地)にて48時間培養した後、新しくTd培地に交換し、薬剤の添加を行った。培地中のNO産生量の定量はGriess assay法により行い、NO synthase (NOS) mRNA発現量の定量はRT-PCR法により行った。

#### 4. 研究成果

(1) ビスフェノールA結合ドメインの同定  
ビスフェノールAに対するPDIの各ドメインの結合性をSPR法によって検討したところ、PDI全長、**a**ドメイン、**b'**ドメインにおいて結合性が確認された。

また、**ab**ドメイン、**b'a'c**ドメインをもちいて、イソメラーゼ活性におけるビスフェノールAの阻害性を検討したところ、**ab**ドメイン、**b'a'c**ドメインの両方においてイソメラーゼ活性が見られたものの、ビスフェノールAによる阻害は、**b'a'c**ドメインにおいてのみ見られた。これらの結果は、 $T_3$ においても同様であった。

以上のことから、ビスフェノールAあるいは $T_3$ は**b'**ドメインに結合することによってイソメラーゼ活性に影響を及ぼしていることが明らかとなった。

#### (2) ビスフェノールAによるPDIのS-ニトロシル化の検討

まず、NO供与体であるS-ニトロソシステム(SNOC)をGH3細胞に添加したところ、SNOCの濃度依存的に細胞内のS-ニトロシル化PDI(SNO-PDI)の量が増加していることが確認された。次に、ビスフェノールAをGH3細胞に曝露し、同様にSNO-PDIの検出を行ったところ、ビスフェノールAによってSNO-PDI

の量が増加することが明らかになった。しかしながら、培地中から $T_3$ を除去すると、ビスフェノールAによるSNO-PDIの増加は見られなかった。すなわち、 $T_3$ の存在下でのみ、ビスフェノールAによるPDIのS-ニトロシル化が促進されることが明らかとなった。そこで、 $T_3$ 及びビスフェノールAによるNOSの活性化を検討したところ、 $T_3$ もしくはビスフェノールAの存在下ではNO合成酵素(NOS)mRNAの発現誘導が見られたが、 $T_3$ とビスフェノールAの共曝露によるNOS mRNA発現量の増加はみられなかった。また、NO産生量については、 $T_3$ 存在下においてNOの産生量が増加したが、ビスフェノールA曝露によるNO産生量への影響は見られなかった。このことから、 $T_3$ はGH3細胞においてNOSの発現量を誘導することによってNOの産生量を増加させるが、ビスフェノールAはPDIに直接作用することにより、NOの増加に伴いS-ニトロシル化を促進することが示唆された。一方、幾つかのビスフェノールA誘導体を用いた検討から、PDIのS-ニトロシル化には、少なくとも2つのフェノール基が必要であることが明らかとなった。今後は、ビスフェノールAによるPDIのS-ニトロシル化の分子機構を明らかにすることによって、環境化学物質による脳神経系への作用が明らかになることが期待される。

#### 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5件)

1. Okada K, Hashimoto S, Imaoka S. Biological functions of protein disulfide isomerase as a target of phenolic endocrine-disrupting chemicals. J Health Sci. 2010 56(1):1-13, Review. (査読有り)
2. Komurasaki R, Imaoka S, Tada N, Okada K, Nishiguchi S, Funae Y. LKM-1 sera from autoimmune hepatitis patients recognize ERp57 and carboxylesterase 1 as well as CYP2D6. Drug Metab Pharmacokinet. 2010, 25(1):84-92. (査読有り)
3. Baba K, Okada K, Kinoshita T, Imaoka S. Bisphenol A disrupts Notch signaling by inhibiting gamma-secretase activity and causes eye dysplasia of *Xenopus laevis*. Toxicol Sci. 2009, 108(2):344-355. (査読有り)
4. Okada K, Hashimoto S, Funae Y, Imaoka S. Hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs) interact with protein disulfide isomerase and inhibit its activity. Chem Res Toxicol. 2009, 22(5):899-904. (査読有り)

5. Hashimoto S, Okada K, Imaoka S. Interaction between bisphenol derivatives and protein disulphide isomerase (PDI) and inhibition of PDI functions: requirement of chemical structure for binding to PDI. *J Biochem.* 2008, 144(3):335-342. (査読有り)

[学会発表] (計 10 件)

1. 浦丸直人、岩瀬恵理、佐能正剛、杉原数美、岡田和嗣、今岡進、太田 茂、北村繁幸. プロム化難燃剤の甲状腺ホルモン攪乱活性発現における構造活性相関. 環境ホルモン学会第 12 回研究発表会 (2009 年 12 月 7 日、東京)
2. 岩瀬恵理、佐能正剛、岡田和嗣、今岡進、加藤善久、小島弘幸、浦丸直人、杉原数美、北村繁幸、黒木広明、太田茂. TR, PDI への親和性に対する臭素化難燃剤の構造活性相関. フォーラム 2009 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (2009 年 11 月 6 日、沖縄)
3. 岡田和嗣、橋本翔子、今岡進. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) の S-ニトロシル化による成長ホルモン産生機構および環境化学物質の影響. 第 82 回日本生化学会大会 (2009 年 10 月 22 日、神戸)
4. 佐々木淑絵、橋本翔子、岡田和嗣、今岡進. ビスフェノールA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 22 日、神戸)
5. Okada K, Hashimoto S, Imaoka S. Bisphenol A causes aberrant S-nitrosylation of protein disulfide isomerase in GH3 cells. The 4th international congress on stress responses in biology and medicine. The 4th annual meeting of the biomedical society for stress response (2009 年 10 月 8 日、北海道)
6. Hashimoto S, Okada K, Imaoka S. Inhibition mechanism of PDI functions by bisphenols. The 4th international congress on stress responses in biology and medicine. The 4th annual meeting of the biomedical society for stress response (2009 年 10 月 7 日、北海道)
7. Sasaki Y, Hashimoto S, Okada K, Imaoka S. PDI, ERp57, and ERp72, multifunctional protein disulfide isomerase, reveal different interaction with bisphenol A. The 4th international congress on stress responses in biology and medicine. The 4th annual meeting of the biomedical society for stress response (2009 年 10 月 6 日、北海道)

8. 岡田和嗣、幸田秀紀、今岡進. PDIとカルレティキュリンの相互作用に及ぼすビスフェノールAの影響. 日本トキシコロジー学会第 35 回学術年会 (2008 年 6 月 26 日、東京)
9. 橋本翔子、岡田和嗣、今岡進. プロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) へのビスフェノールA類縁体結合能と酵素活性について. 日本トキシコロジー学会第 35 回学術年会 (2008 年 6 月 26 日、東京)
10. 馬場一信、岡田和嗣、今岡進. フェノール性環境化学物質による発生異常のメカニズム解析. 日本トキシコロジー学会第 35 回学術年会 (2008 年 6 月 26 日、東京)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

岡田 和嗣 (OKADA KAZUSHI)  
関西学院大学・理工学研究科・博士  
研究員  
研究者番号 : 40423892