

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340053

研究課題名(和文) 環境化学物質によるPDI活性阻害を介した甲状腺ホルモンかく乱作用メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanism behind the disruption of Thyroid hormone receptor (THR) activity via PDI by BPA

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らはBPAがPDIと結合し、その活性を阻害することを明らかにした。本研究ではBP A, PDIが様々な生理作用、特に甲状腺ホルモン受容体(THR)をはじめとして核内因子に及ぼす影響を検討した。まず、PDIファミリータンパク質においてPDI以外にもPDI以上に強くBPAと結合するものがあることを明らかにした。さらに、BPAはGH3細胞において低濃度ではT3依存的な成長ホルモン(GH)の分泌を抑制したが、高濃度では促進した。また、BPAがNOを発生することを明らかにした。PC12細胞においても同様にNOを発生させ、NGF依存性の神経突起伸長抑制とPDIのニトロシル化促進を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：An endocrine disrupting chemical, bisphenol A (BPA) binds to protein disulfide isomerase (PDI) and inhibits its isomerase activity. In this study, we found the new BPA-binding PDI family proteins. ERp29 revealed 3 times higher affinity than PDI toward BPA. Furthermore, effects of BPA on growth hormone (GH) release via Thyroid hormone receptor (THR) in GH3 cells. BPA in high concentration induced but low concentration of BPA inhibited the GH expression of GH3 cells. BPA induced nitric oxide in GH3 and PC12 cells and nitrosylation of PDI. NOC7 which is an NO-provider inhibited PDI activity and neurite outgrowth in PC12 cells.

研究分野：環境応答制御学

キーワード：GH3細胞 PC12細胞 プロテイン・スルフィド・イソメラーゼ ビスフェノールA HIF-1α 甲状腺ホルモン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

ビスフェノールA (BPA) はエストロゲン様の作用を持ち、内分泌かく乱物質としての危険性が報告されてきたが、脳神経系への影響が新たに発見された。研究代表者らはラット脳から BPA の結合因子として protein disulfide isomerase (PDI) を明らかにし、さらに BPA が PDI の活性を阻害することを見出した。一方、ラット脳下垂体由来細胞である GH3 の甲状腺ホルモン( $T_3$ )依存性の成長ホルモン(GH)分泌が、PDI 過剰発現においてもノックダウンにおいても低下することを明らかにした。

## 2. 研究の目的

環境化学物質のいくつかは甲状腺ホルモン受容体(THR)のようなホルモン受容体と結合し、受容体の作用を乱すいわゆる内分泌かく乱作用を持つ。ビスフェノールA (BPA) は環境中に比較的高濃度に存在し、日本では今のところ厳しい使用規制はかかっているが、ヨーロッパにおいては使用規制している国もある。BPA はエストロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体と結合し、その作用をかく乱していると考えられる。研究代表者らは BPA の結合因子として PDI を明らかにした。PDI は20種類ほどのファミリータンパク質が存在している。本研究では BPA の生体への影響を PDI との相互作用という観点から検討した。

## 3. 研究の方法

PDI, ERp57, ERp72, ERp46, ERp29 およびこれらのドメイン変異体 cDNA は研究代表者らがすでに論文に報告している方法で単離した。PC12 細胞の神経突起伸長は ImageJ を用いて定量した。GH3 からの成長ホルモン(GH)の分泌は市販の抗体で検出した。HIF-1alpha をはじめとして PDI ファミリータンパク質の検出は研究代表者らが作成した抗体を用いて行った。BPA 及び BPA 類縁体は市販のものを購入して使用した。

## 4. 研究成果

### (1) BPA と結合する PDI ファミリータンパク質の探索と結合様式の検討

PDI ファミリータンパク質には20種類存在することが報告されている。20種類のうち PDI をはじめとして ERp57, ERp72, ERp46, ERp29 について検討した。このうち ERp29 は PDI より強く  $1/3$  の  $K_D$  値で BPA と結合した。PDI については a, b, b', a', c ドメインのうち、a と b' ドメインに結合することをドメイン変異体を用いることで明らかにし、報告しているが ERp29 について同様の検討をしたが、このタンパク質はサイズが小さいこともあり、特定の結合部位がなく、BPA との結合には全体の三次構造が関わっている可能性が示唆された(図1)。一方 BPA 側の構造の検討においては、BPA, BPF, diphenyl propane,

cumylphenol (図2)を用いた。その結果、Erp29 の結合にはフェノールの構造が必要であることが示された。

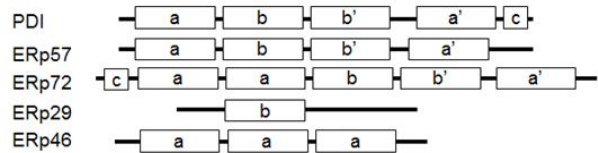


図1 PDIファミリータンパク質のドメイン構造

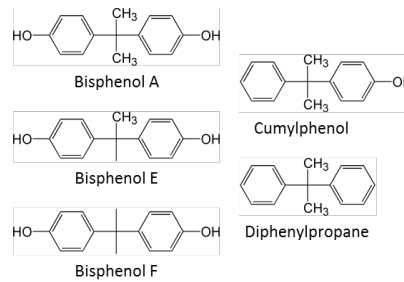


図2 BPA及びその類縁体の化学構造

### (2) PDI による低酸素応答因子 HIF の発現調節

PDI を GH3 細胞に過剰発現すると GH3 細胞において  $T_3$  依存性の成長ホルモン(GH)分泌が低下することが明らかになっており、研究代表者はこの現象が PDI による還元因子 Ref-1 の酸化によることを明らかにし報告している。本研究においては Ref-1 の還元によって活性化されることが報告されている HIF-1alpha の発現が PDI ファミリータンパク質の過剰発現によってどのように変化するのかを明らかにした。すでに BPA が HIF-1alpha のタンパク質量を低下させることは明らかにし報告している。PDI, ERp57, ERp29 の過剰発現を検討したところ、PDI の過剰発現においてのみ HIF-1alpha タンパク質量低下が見られた。甲状腺ホルモン受容体の活性についても PDI 過剰発現で顕著な低下が見られたが、HIF-1alpha についても同じ傾向であった。さらにこれらタンパク質と HIF-1alpha の相互作用を免疫沈降法によって調べたところ、PDI のみの相互作用が見られた。HIF-1alpha のシステインのチオール基の酸化還元状態を PEG-maleimide 法で調べたが HIF-1alpha の分子量が大きいせいかな十分な分子量変化が検出できなかったため、現在それぞれのドメインを発現させて、酸化還元状態を検出中である。

### (3) BPA による GH3 細胞への影響検討

先に述べたように GH3 細胞は甲状腺ホルモン( $T_3$ )によって THR 経由で GH の発現を誘導する。GH3 細胞に  $10 \mu\text{M}$  BPA を添加すると GH の発現を阻害するが、 $20 \mu\text{M}$  以上の濃度で添加すると GH の発現が誘導された。PDI の過剰発現によって  $T_3$  依存性の GH 誘導が抑制され

ることは先に述べたように報告されているが、研究代表者はPDIのノックダウンによってもGHの誘導が抑制されることを明らかにしている。一方、BPAのGH3細胞への投与によってNOの増加が見られるとともに、PDIのニトロシル化が誘導され、エストロゲン受容体のアンタゴニスト投与でニトロシル化が抑制された。さらに、PDIはエストロゲンと結合することも明らかとなった。

#### (4) BPAによる神経様細胞PC12への影響検討

PC12細胞はNGF添加によって神経突起を形成するので、それに対するBPAの影響を検討した。BPAは濃度依存的に神経突起伸長を阻害した(図3)。一方、BPAから中央のメチル基

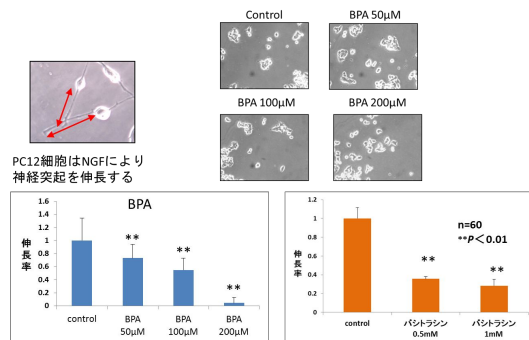


図3 細胞の神経突起伸長にBPA及びバシトラシンが及ぼす影響

が水素に置換したBPFでは突起伸長阻害が低下した。BPA投与によってPC12細胞においてGH3細胞と同様に一酸化窒素(NO)によるPDIのシステインのチオール基のニトロシル化及びイソメラーゼ活性の低下が検出された。さらにNO供与体NOC7、PDI阻害剤、バシトラシン投与によってもPC12細胞の神経突起伸長の阻害が見られた。これらはPDIの活性がPC12細胞の神経突起形成に関わっている可能性を示す結果である。そこで、PC12細胞にwild PDI (PDIWT)とイソメラーゼ活性部位

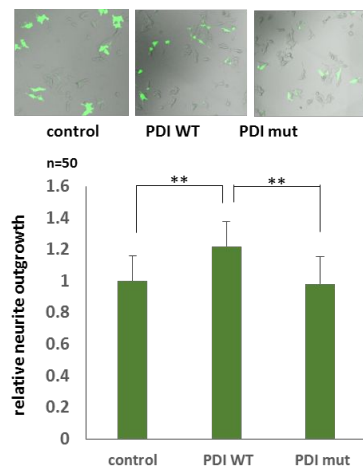


図4 PC12細胞の神経突起伸長におけるPDI過剰発現の影響

に変異を入れたPDI mutを過剰発現して突起伸長を検討した。PDIWTでは神経突起伸長が促進したが、PDI mutの過剰発現では突起伸長には影響がなかった(図4)。

#### (5) まとめ

本研究では、甲状腺ホルモン受容体依存性にGHを発現するラット脳下垂体由来細胞GH3、低酸素下でHIF-1αを発現するヒト肝がん細胞Hep3B、神経成長因子(NGF)依存性に神経突起を形成するラット副腎髄質由来褐色腫細胞PC12の3つのモデル系を用いて、BPA及びPDIが核内因子に及ぼす影響を明らかにした。BPAは高濃度においては、上記いずれの応答も阻害した。低濃度ではGH3によるGHの分泌を促進した。GHは神経発達において重要とされる。これまでBPAはエストロゲン受容体に結合するが、その親和性が低いと考えられてきたが親和性の高いエストロゲン受容体ERRγが報告された。一方で、研究代表者は本研究においてBPAの親和性がPDIより高いERp29などのPDIファミリータンパク質を見出した。一方、BPAはGH3細胞にNOを発生させ、それがPDI活性を阻害した。BPAによるNOの発生はエストロゲン受容体アンタゴニストにより阻害された。研究代表者は脳神経変性疾患でPDIの発現量が低下することを明らかにしている。一方で脳変性疾患ではPDIの活性部位がニトロシル化されていることが明らかにされた。そこで神経様細胞PC12細胞の神経突起形成に対するPDI過剰発現の影響を調べた。wild PDIの過剰発現では促進効果があったが、活性部位に変異を入れたPDI mutでは影響がなかった。PDIのニトロシル化やバシトラシンによる活性阻害でも神経突起伸長が抑制されていた。このことは神経の突起伸長にPDIが重要な働きをしていることを示している。BPAはNGF非存在下においても低濃度でPC12の神経突起伸長を誘起するという報告があり、親和性の異なる複数の因子に結合している可能性がある。本研究ではPDIの核内因子に対する作用にはそのイソメラーゼ活性部位が重要であることを証明しているが、BPAによる活性阻害が影響していることを突き止めることができなかった。本研究とは別件の研究で、BPAが結合するPDIファミリータンパク質の働きがBPAとの結合によって阻害されている可能性を見出しており、今後さらなる検討が必要と考えている。

#### 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9件)

1. Oguro A., Oida S., and Imaoka S. Down-regulation of EPHX2 gene transcription by Sp1 under high-glucose conditions. *Biochem J.* 15, 289-291, 2015. (査読あり)

2. Oguro A., Kobayashi Y., Imaoka S. Protein factors and chemical compounds regulating hypoxic or oxidative stress responses. *Personalized Medicine Universe*, 4, 27-31, 2015. (査読あり)
3. Purba, E. R., Leuhery E. A., Oguro A., Imaoka S., The metabolism of lysophosphatidic acids by allelic variants of human soluble epoxide hydrolase. *Drug Metabol. Pharmacokinet.* 30, 75-81, 2015. (査読あり)
4. Okumura M., Kadokura H., Hashimoto S., Yutani K., Kanemura S., Hikima T., Hidaka Y., Ito L., Shiba K., Masui S., Imai D., Imaoka S., Yamaguchi H. and Inaba K. Inhibition of the functional interplay between ER oxidoreductin-1a (Ero1a) and protein disulfide isomerase (PDI) by the endocrine disruptor bisphenol A. *J. Biol. Chem.* 289, 27004-27018, 2014. (査読あり)
5. Purba, E. R., Oguro A., Imaoka S., Isolation and characterization of *Xenopus* soluble epoxide hydrolase. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipid*, 1841, 954-962, 2014. (査読あり)
6. Miyake Y., Hashimoto S., Sasaki Y., Kudo T., Oguro A., and Imaoka S. Endoplasmic reticulum protein (ERp) 29 binds as strongly as protein disulfide isomerase (PDI) to Bisphenol A. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 501-506, 2014. (査読あり)
7. Oguro A., Koyama C., Xu J., Imaoka S. A cellular stress response (CSR) that interacts with NADPH-P450 reductase (NPR) is a new regulator of hypoxic response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 445, 43-47, 2014. (査読あり)
8. Baba K., Muraguchi T., Imaoka S. Role of the hypoxia response pathway in lens formation during embryonic development of *Xenopus laevis*. *FEBS Open Bio*, 3, 490-495, 2013. (査読あり)
9. Baba K., Morimoto H., and Imaoka S. Seven in absentia homolog 2 (Siah2) protein is a regulator of NF-E2-related Factor 2 (Nrf2). *J. Biol. Chem.* 288, 18393-18405, 2013. (査読あり)

[学会発表](計 22 件)

1. 大黒亜美、今岡進、「高グルコース条件下における可溶性エポキシド加水分解酵素(sEH)の転写制御機構の解明」第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本

生化学会大会 合同大会 BMB2015 (神戸国際会議場、兵庫県・神戸市) 2015 年 12 月 3-4 日

2. 小林之乃、新銀健太、大黒亜美、今岡進、「BPA やその類縁体が HIF-1alpha の量を減少させるメカニズム」第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 BMB2015 (神戸国際会議場、兵庫県・神戸市) 2015 年 12 月 2 日
3. 八木英里奈、福原美穂子、大黒亜美、今岡進、「Bisphenol A (BPA) 及びその類縁体がラット副腎髄質由来褐色細胞腫 (PC12 細胞) の神経突起伸長に及ぼす影響と構造-活性相関の検討」第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 BMB2015 (神戸国際会議場、兵庫県・神戸市) 2015 年 12 月 2 日
4. 金尚燃、大黒亜美、今岡進、「酸化ストレスにおけるアクアポリンの役割」第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 BMB2015 (神戸国際会議場、兵庫県・神戸市) 2015 年 12 月 2 日
5. 山中秀剛、箕浦洋介、小林之乃、大黒亜美、今岡進、「酸素濃度変化におけるストレス応答の検討」第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 BMB2015 (神戸国際会議場、兵庫県・神戸市) 2015 年 12 月 2 日
6. 大黒亜美、今岡進、「低酸素-酸化ストレス応答のクロストーク因子の機能解析」第 13 回がんハイポキシア研究会(国立遺伝学研究所、静岡県・三島市) 2015 年 6 月 5 日
7. Yagi E, Fukuhara M, Oguro A, and Imaoka S. The neurite outgrowth of PC12 cells treated with Bisphenol A (BPA) and its derivatives. The 20th International Congress of Personalized Medicine (Iino Hall & Conference Center, 東京都・千代田区) May 24, 2015.
8. 大黒亜美、小山千佳、箕浦洋介、今岡進、「低酸素感受性因子 HIF-1alpha 及び酸化ストレス応答因子 Nrf2 の安定化に関わるタンパク質因子の機能解析」第 37 回日本分子生物学会年会(パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市)(ワークショップ) 2014 年 11 月 26 日
9. 小林之乃、大黒亜美、今岡進、「低酸素感受性因子 HIF-1alpha の酸化還元による活性制御機構の検討」第 87 回日本生化学会大会(国立京都国際会館、京都府・京都市) 2014 年 10 月 16-17 日
10. 大黒亜美、今岡進、「低酸素感受性因子 (HIF-1alpha) 及び酸化ストレス応答因子 Nrf2 の発現量に影響を与える化学物質、及びそのメカニズムの検討」第 87 回日本生化学会大会(国立京都国際会館、

- 京都府・京都市) 2014年10月16-17日
11. 八木英里奈、大黒亜美、今岡進、「PDIファミリータンパク質のジチオール酸化活性とBisphenol A (BPA)との結合と活性阻害の検討」第87回日本生化学会大会(国立京都国際会館、京都府・京都市) 2014年10月17日
  12. Oguro A, Kobayashi Y, Koyama C, Baba K, and Imaoka S. The protein factors contributing to hypoxic response and search of inhibitors for these factors. The 18th International Congress of Personalized Medicine (Sapporo Convention Center, 北海道・札幌市) June 14, 2014.
  13. 大黒亜美、種田祥子、今岡進、「転写因子 Sp1、Ap2、NF- $\kappa$ Bにより調節される可溶性エポキシド加水分解酵素(sEH)の低酸素下における発現低下メカニズムの解明」第11回がんとハイポキシア研究会(東北大学、宮城県・仙台市) 2013年12月13日
  14. 小林之乃、大黒亜美、今岡進、「Protein disulfide isomerase (PDI)によるRef-1を介した低酸素誘導因子 HIF-1の活性制御機構の解明」第11回がんとハイポキシア研究会(東北大学、宮城県・仙台市) 2013年12月13日
  15. 小山千佳、大黒亜美、今岡進、「NADPH-cytochrome P450 reductase(NPR)の低酸素応答に関わる機構の解明」第11回がんとハイポキシア研究会(東北大学、宮城県・仙台市) 2013年12月13日
  16. 大黒亜美、今岡進、「酸化ストレスによる可溶性エポキシド加水分解酵素(sEH)の転写抑制はSP1とAP2の競合反応によって制御される」第86回日本生化学会大会(パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市) 2013年9月11日
  17. 小山千佳、大黒亜美、今岡進、「低酸素応答におけるNPRの機能解析と新規相互作用因子の探索」第86回日本生化学会大会(パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市) 2013年9月11日
  18. 小林之乃、大黒亜美、今岡進、「低酸素誘導因子 HIF-1のProtein disulfide isomerase(PDI)による活性制御機構の解明」第86回日本生化学会大会(パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市) 2013年9月11日
  19. 三宅由香、橋本翔子、今岡進、「Endoplasmic reticulum protein 29kDa(ERp29)のビスフェノールA結合機構の検討」第86回日本生化学会大会(パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市) 2013年9月11日
  20. Oida S, Oguro A, and Imaoka S. Cross-talk of signalings between NF- $\kappa$ B and AhR or HIF-1. The XIII

International Congress of Toxicology, Seoul(Korea), July 1, 2013.

21. Oguro A, and Imaoka S. Down-regulation of soluble epoxide hydrolase by SP1 under oxidative stress condition. The XIII International Congress of Toxicology, Seoul(Korea), July 1, 2013.
22. 大黒亜美、今岡進、「NADPH-P450 reductase(fp2)の低酸素応答における機能解明」P450とUGT/SULT勉強会(コテージヒムカ フェニックスシーガイアリゾート内、宮城県・宮崎市) 2013年6月2日

〔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)研究協力者

大黒 亜美 (OGURO AMI)

関西学院大学・理工学部・助教(2015年度より、2013年度、2014年度博士研究員)

研究者番号：20634497