

4. ビスフェノール A 結合蛋白質の分子生物学的検討と中枢神経系への作用機序の解明に関する研究

研究者 船江良彦（大阪市立大学大学院医学研究科 教授）

研究要旨

これまでの我々の研究結果から、ビスフェノール A (BPA) は、妊娠ラットに投与することで出生仔の脳でドパミンの減少を引き起こし、中枢神経系に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。さらに、ラット脳シナプトソーム画分に BPA の結合活性を見いだした。そこで、脳神経細胞に BPA 結合タンパク質が存在すると考え、この BPA 結合タンパク質の単離・精製を試みた。その結果得られた BPA 結合タンパク質の N 末端アミノ酸配列分析を行ったところ、このタンパク質が protein disulfide isomerase (PDI) と同一性を示す事が明らかとなった。PDI は甲状腺ホルモン(T3)結合タンパク質としても知られている。大腸菌で大量発現させたヒスチジンタグ融合ラットおよびヒト PDI を用いて T3 競合的結合実験を行ったところ、BPA は甲状腺ホルモンの結合を阻害する事が明らかとなった。ヒトにおいては母親の甲状腺ホルモンの低下が、胎児の知能低下を引き起こすことが知られていることから、PDI を介した神経発達に注目して内分泌かく乱化学物質の影響をさらに検討すべく研究を進めた。まず、平成 12-13 年度にリストアップされた「優先してリスク評価に取り組む物質」のうちの 7 種類 [ビスフェノール A (BPA), *p*-ノニルフェノール(NP), トリブチルスズ(TBT), ベンゾフェノン(BP), ジブチルフタレート(DBP), ペンタクロロフェノール(PCP), アミトロール(AMI)] を用いて、1) PDI への結合実験(T3 結合阻害) 2) T3 応答性増殖細胞 GH3 増殖作用実験 3) アフリカツメガエル発生過程における影響 の 3 種類のスクリーニング系を用いて評価を行った。まず、PDI への T3 結合阻害実験では BPA, NP, PCP が顕著な阻害活性を示した。2 番目の GH3 を用いた実験では、BPA, NP が細胞増殖促進性を示した。次に 3 番目のアフリカツメガエルを用いた検討を行った。アフリカツメガエルの発生過程は容易に観察でき、またほぼ哺乳動物と共通の発生過程をとることからよく利用される。まず、アフリカツメガエルの PDI cDNA を単離して、それを大腸菌に発現させ T3 や BPA との結合を検討したところ、ヒトやラット PDI とほぼ同じ性質を示した。続いて各発生段階（受精卵、胞胚期、原腸胚期、神経胚期、尾芽胚期、幼生期）について、RNA レベル、タンパク質レベルでの PDI の発現量を検討した。PDI は原腸胚期で発現し神経胚期で低下し、尾芽胚期で再び上昇した。受精卵に 7 種類の化合物を添加して、最も PDI の発現量が高く影響が出ると考えられる原腸胚期から神経胚期にかけての表現形を観察したところ、BPA, NP で胚にアポトーシスが観察された。

研究協力者名

今岡進（関西学院大学理工学部 教授）

廣井豊子（大阪市立大学大学院医学研究科 講師）

長田真優子（大阪市立大学大学院医学研究科 助手）

吉田徳之（大阪市立大学大学院医学研究科 助手）

岡田和嗣（大阪市立大学大学院医学研究科 大学院生）

A. 研究目的

BPAはポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料であるほか、歯科用シーラント剤として用いられており、容易に経口的に摂取される化合物である。またBPAは、エストロゲン様活性を有しており、内分泌かく乱化学物質（EDCs）の一つとして注目されている化合物である。一方、脳におけるモノアミンは、運動・感情・情動発現・脳報酬系に参与している。さらに、躁鬱病や感情障害・行動障害といった多くの精神疾患、さらには近年問題となっている注意欠陥・多動性症候群（ADHD）や学習障害（LD）の発症に参与しているとの報告もある。我々はラットを用いた先行研究により、母親に暴露されたBPAが生まれてきた仔のドーパミン濃度を低下させ、中枢神経系へ影響を及ぼす事を明らかにした。しかし、EDCsの中枢神経系への影響は、不明な点が多く、分子生物学的なメカニズムが明らかにされていない。ところで、平成12-13年度にリストアップされた優先してリスク評価に取り組む物質は、内分泌かく乱作用を持つと断定されたものではなく、優先的に調査研究を行う対象として取り上げられたもので、生殖器系や免疫系への影響を指標とした評価法がほとんどであり、近年問題視されるようになった「中枢神経系への影響」をエンドポイントとした評価法は全くと言っていいほど行われていない。それには、EDCsの作用点が捕らえられていないからであると考えられる。当該研究では、ラット脳においてBPAが結合するタンパク質（レセプター様タンパク質）の存在を見だし、さらにこのBPA結合因子の単離・精製を試みた。そしてこの研究の結果、BPA結合タンパク質の実体が明らかになった。このタンパク質は甲状腺ホルモンであるT3の結合タンパク質であった。BPAは甲状腺ホルモンであるT3の結合を阻害する事によりその働きを模倣・阻害している可能性が示唆された。本研究ではH12-13年度にリストアップされた、優先してリスク評価に取り組む物質の7種の化合物について、T3かく乱作用に重点を置いた3段階のスクリーニング法（大腸菌発現タンパク質を用いたin vitroでの結合実験、T3応答性増殖培養細胞を用いた実験、アフリカツメガエルを用いたin vivoでのスクリーニング法）を考案し、評価を行った。

B. 研究方法

1. PDIに対する甲状腺ホルモンの競合的結合阻害試験

(1) BPA結合実験

BPAの結合活性は、BPAの放射性同位体（ ^3H -Bisphenol A）とタンパク質標品を150 mM NaClを含む50 mM Tris-HCl, pH 7.0中で4℃にて2時間インキュベーションした後、遠沈法あるいはPEG沈澱法によりBound/Free分離を行い、沈澱に含まれる放射活性を測定する事により求めた。

【遠沈法】反応後の反応液を遠心分離（14,500 rpm, 5 min, 4℃）した後、上澄をアスピレーターにより除去した。沈澱を1.0 mLの洗浄バッファー（150 mM NaClを含む50 mM Tris-HCl, pH 7.0）で2回、洗浄した。

【PEG 沈澱法】反応後の反応液に等量の 50mM Tris-HCl, pH 7.0 (12% PEG 6,000, 150 mM NaCl, 0.2M ZnCl₂を含む) を加えて攪拌した後、遠心分離 (14,500 rpm, 5 min, 4 °C) を行った。上澄をアスピレーターにより除去した後、1.5 mL の洗浄バッファー (6% PEG 6,000, 150 mM NaCl, 0.1M ZnCl₂を含む 50mM Tris-HCl, pH 7.0) で 2 回洗浄した。

(2) 競合的結合阻害実験

T3 の結合活性は、試験物質の存在下で、T3 の放射性同位体 ([¹²⁵I]-3,5,3'-triiodothyronine, 1.0 nM) と His-tag 融合 PDI (0.1 mg/mL protein) とを 150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 中で 3 時間、4°C にてインキュベーションした後、PEG 沈澱法により Bound/Free 分離を行い、沈澱に含まれる放射活性を測定する事により求めた。T3 の非特異的結合量を測定するために、過剰量 (30µM) の T3 を加えた系を用意した。また試験物質を溶解するためのエタノール濃度は、事前に試験を行い、T3 の結合に影響を与えない濃度を検討した結果、終濃度 4 % とした。

T3 の結合率 B / B_0 (%) は下式により求めた。

$$B / B_0 (\%) = (TB - NB) / (T_0B - NB) \times 100$$

TB : 試験物質存在下での T3 の結合量

T₀B : 試験物質非存在下での T3 の結合量

NB : 非特異的結合量

2. GH3 細胞の増殖に及ぼす影響

(1) 細胞培養

GH3 細胞はヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手した。細胞は 15 % ウマ血清, 2.5 % ウシ胎仔血清, 50 units / mL ペニシリン, 50 units / mL ストレプトマイシンを含む Ham's F-10 培地で、5 % CO₂, 湿度 95 %, 37 °C にて培養した。

(2) 甲状腺ホルモン欠乏血清の作製

AG 1-X8 樹脂 (Bio-Rad) を蒸留水で 3 回洗浄した後、血清に 50mg 樹脂 / mL 血清となるように加え、ローテータを用いて 5 時間、室温にて穏やかに混合した。1,000 x g にて 10 分間の遠心分離を行った後、上澄に新しい AG 1-X8 樹脂を 50mg 樹脂 / mL 血清となるように加え、ローテータを用いて 18 時間、室温にて穏やかに混合した。1,000 x g にて 10 分間の遠心分離を行って得られた上澄をさらに 30,000 x g にて 20 分間遠心分離して微粒子を除去したものを甲状腺ホルモン欠乏血清とし、使用するまで -80 °C にて保存した。T3 の含量を DELFIA Triiodothyronine Reagents (Perkin Elmer) を用いた EIA 法により測定したところ、処理後の T3 含量は検出限界濃度以下 (< 0.2 ng / mL) であった。

(3) GH3 細胞増殖試験 (Wst-1 法)

GH3 細胞を 1×10^4 cells / well となるように 24 ウェルマルチプレートに播種した。培養には通常の培養液 (T_n 培地)、および甲状腺ホルモンを除去した血清を用いて作製した培地 (T_a 培地) を用いた。24 時間後、各ウェルに被検物質を添加し、7 日間培養した。培養液を除去し、各ウェルに 0.25 mM Wst-1, 0.01 mM 1-methoxy PMS, 1mM HEPES (pH 7.4) を含む T_a 培地を 200 μ L ずつ添加し、5 % CO₂, 湿度 95 %, 37 °C にて 4 時間インキュベーションした。培地を回収し、690 nm を対照にして 450 nm の吸収を測定して細胞増殖度を算出した。

3. アフリカツメガエル胚を用いた試験法

(1) 産卵のためのホルモン誘導と人工授精

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の成体雌に胎盤性性腺刺激ホルモン 200 units を背中に皮下注射し、保温器により 18 °C 7-13 h, 24 °C 6 h で飼育した後、産卵させた。雄の腹部から摘出した精巣を一部切り取り、0.1×MBS (pH7.5, 100 μ M KCl, 240 μ M NaHCO₃, 1mM HEPES, 82 μ M MgSO₄, 33 μ M Ca(NO₃), 40 μ M CaCl₂) で懸濁した後、産卵させた未受精卵に懸濁液をかけて人工授精させた。

(2) 胚の試験化合物処理法

人工授精後、室温で 15~20 分飼育して表層回転が起きるのを確認し、0.1×MBS で浸した後 14 °C の保温器へと移した。受精後 45 分経過したら胚を 1% チオグリコール酸ナトリウム溶液で除ゼリーし、0.1×MBS で希釈した Bisphenol A などの試験化合物溶液 (1・10・25・50 μ M) 中で 24 °C の保温器で表現型に変化が現れるか観察した。

(3) Xenopus PDI の単離と大腸菌での発現

ISOGEN を用いて *Xenopus* 尾芽胚(st.35)10 胚から total RNA を抽出し、RT-PCR によりその cDNA を単離した。この cDNA をテンプレートにして xPDI cDNA 全長(1518bp)を前半(909bp)及び後半(756bp)をそれぞれ増幅し、pBluescript II に全長を組み込んだ。pBluescript II に組み込んだ xPDI 全長を、5'-*Sac* I ,3'-*Kpn* I で制限酵素処理し、同様の制限酵素で処理した pQE80 ベクターに組み替えた。xPDI 全長 cDNA をインサートとする pQE80 プラスミドを導入した大腸菌を一晩培養した。培養液 5ml を 100ml の 2×YT medium に植菌し、37°C で振盪培養した。OD₆₀₀=0.6 になった時点で 100mM IPTG 1ml を添加し、さらに 4 時間振盪培養した。遠心分離により菌体を回収し、1×PBS(-)で洗浄した。回収した菌体を Lysis buffer 20ml に懸濁し、超音波破碎した。そこへ 10% Sucrose monolaurate 0.4ml を加え、4°C で 1 時間攪拌し可溶化させた。50,000×g、4°C で 30 分間超遠心分離し、可溶化画分を調製した。これを Ni-NTA カラムに供し、イミダゾールで溶出して精製アフリカツメガエル PDI を得た。

(4) *Xenopus* の発生過程における PDI mRNA およびタンパク質の発現解析

発生段階にある *Xenopus* 胚 10 胚から total RNA を単離し逆転写の後、PCR によって PDI mRNA の発現を検討した。また胚発生段階にある *Xenopus* 胚 60 胚の質量を測定し、5 倍量の Homogenize buffer を加え Homogenize し、10,000×g, 4°C, 30 分遠心分離した。上清を 100,000×g, 4°C, 60 分遠心分離し、得られた沈殿物を Microsomes 分画とし、50µl の PBS(-)(×1) に溶解し懸濁した。タンパク質量を測定した後 40µl 分を SDS-PAGE に供し、作成したラット PDI 抗血清を用いて Western blot を行った。

C. 実験結果

1. PDI に対する甲状腺ホルモンの競合的結合阻害試験

今回使用した化合物はポジティブコントロールとしての甲状腺ホルモン 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T3) そして BPA、*p*-ノニルフェノール、トリブチルスズ、ベンゾフェノン、ジブチルフタレート、ペンタクロロフェノール、アミトロールの 7 種類であった。これらを用いた競合的結合阻害実験を行った結果を図 1 に示した。T3 に対する結合阻害がみられた化合物は、BPA の他、*p*-ノニルフェノール、ペンタクロロフェノールであった。これらの化合物はいずれもフェノール構造を持ち、構造的に T3 と類似しており、PDI 上の T3 と共通の部分に結合することが推測された。フェノール構造を有しない他の化合物は、PDI と T3 結合部位を介した相互作用は見られなかった。

2. T3 応答性増殖細胞 GH3 に増殖促進効果試験

T3 に依存して増殖する細胞であるラット下垂体由来 GH3 細胞を用い、7 種類の化合物について増殖促進効果を検討した。結果を図 2 に示した。なお、GH3 細胞は、PDI を多量に発現していることを Western blotting で確認している。また、PDI をノックダウンすると細胞の増殖能は顕著に低下し、PDI がこの細胞の増殖に関わっている可能性を明らかにしている。この試験系において、BPA およびノニルフェノールが GH3 の増殖促進効果を示した。その効果は T3 の濃度と比較すると 1/10000 程度であった。BPA や *p*-ノニルフェノールとともに PDI に結合したペンタクロロフェノールは GH3 細胞に対しては効果を示さなかった。

3. アフリカツメガエル PDI の単離と性質

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の発生過程を利用して、化学物質の影響評価をするためにまず、アフリカツメガエルの PDI(xPDI) cDNA をクローニングした。ラット PDI とのアミノ酸配列における相同性は 78.3% であった。さらに、我々の作製したラット PDI に対する抗体は xPDI も認識した。続いて xPDI を大腸菌に発現させ精製した。これを用いてラット PDI と同じように BPA による T3 との結合阻害実験を行った (図 3)。その結果 xPDI はラット PDI と BPA の結合に関してはほぼ同じであることが明らかとなった。

4. アフリカツメガエル PDI の発生過程における発現

RT-PCR および Western blotting によって xPDI の mRNA およびタンパク質発現を受精

卵、胞胚期、原腸胚期、神経胚期、尾芽胚期、幼生期について調べた（図 4）。受精卵、胞胚期には発現が見られなかったが、原腸胚期になり、mRNA タンパク質両方において PDI の発現が見られた。この発現は、神経胚期で一度低下したが、尾芽胚期で再び上昇した。幼生期では消失した。

5. アフリカツメガエル初期発生過程における影響

ビスフェノールA(BPA), *p*-ノニルフェノール(NP), トリブチルスズ(TBT), ベンゾフェノン(BP), ジブチルフタレート(DBP), ペンタクロロフェノール(PCP), アミトロール(AMI)についてそれぞれ 10 μ M, 25 μ M をアフリカツメガエル受精卵に添加して、PDI が誘導されてくる原腸胚付近での発生変化を調べた。トリブチルスズおよびペンタクロロフェノールに関しては、細胞毒性が強く 25 μ M では胚が完全に死亡した。BPA, ノニルフェノールについては 10 μ M の濃度ではほとんど影響が見られなかったが、25 μ M において動物極側にアポトーシスが観察された。さらに原腸陥入に遅れが観察された。他の化合物については 25 μ M の濃度においても、ほとんど変化は見られなかった。

D. 考察

平成 12-13 年度にリストアップされた「優先してリスク評価に取り組む物質」のうちの 7 種類 [ビスフェノールA(BPA), *p*-ノニルフェノール, トリブチルスズ, ベンゾフェノン, ジブチルフタレート, ペンタクロロフェノール, アミトロール] を用いて、1) PDI への結合実験 (T3 結合阻害) 2) T3 応答性増殖細胞 GH3 増殖作用実験 3) アフリカツメガエル発生過程における影響 の 3 種類のスクリーニング系を用いて評価を行った。今回試験した化合物のうち、PDI における T3 の結合を阻害した化合物は BPA, *p*-ノニルフェノール, ペンタクロロフェノールであった。これらの化合物は化学構造上の特徴を有しており、何れもフェノール基を有するものであった。今回用いた方法では、試験物質のアゴニスト / アンタゴニスト作用の識別を行う事はできないが、甲状腺ホルモンの作用をかく乱する可能性のある化合物のスクリーニング法としては有用なものである事が明らかとなった。これらの物質の生体への影響に関しては、精巣・精巣上体・前立腺・精囊・凝固腺・子宮重量の減少、精子産生の減少、精子形態の異常、胎児数・新生児数の減少、化骨遅延、早期死胚数の増加などが報告されている。ペンタクロロフェノールは血清中の甲状腺ホルモン濃度を低下させるとの報告があるが、PDI との相互作用を示した報告はない。

これまでに BPA の作用機序としては、核内エストロゲンレセプターを介したエストロゲン様作用による、生殖器系への影響が数多く報告されているが、PDI にはエストロゲンも結合することから、これらの影響が PDI を介した作用である可能性も考えられる。また他の物質の甲状腺ホルモンかく乱作用に関する研究は、circulate hormone の濃度を指標にしているが、外因性化合物の細胞内での作用に視点を置く事は、内分泌攪乱化学物質と疑われる化合物の新たな作用機構を明らかにする目的で非常に重要であると考えられる。BPA, *p*-ノニルフェノール, ペンタクロロフェノールが PDI に対する T3 の結合阻害活性を有する事が明らかになったことから、これらの化学物質は T3 依存的な作用に影響を及ぼしている事が示唆

された。そこでさらに第 2 の実験系である GH3 細胞の T3 依存的な細胞増殖及ぼす影響について検討した。GH3 細胞には PDI が顕著に発現していることを明らかにしている。PDI が GH3 の T3 依存性増殖に関わっている可能性は十分に考えられる。試験した化合物の中で GH3 増殖促進性を示したのは、BPA, *p*-ノニルフェノールで PDI における T3 結合阻害と共通していた。また、PDI に対して T3 の結合阻害活性が見られたが、細胞増殖には影響しない化学物質として、ペンタクロロフェノールが挙げられた、これらの化学物質は他の T3 作用に影響を及ぼしている可能性が考えられる。しかし、GH3 細胞はエストロゲンによる増殖作用も知られており、PDI ノックダウン細胞を用いるなど、これらの化合物の影響が PDI を介しているかどうか詳細に検討する必要がある。

第 3 の試験系として発生過程での *in vivo* での影響においても、BPA と *p*-ノニルフェノールがアフリカツメガエル胚に対して顕著な影響を及ぼした。原腸胚期においてこれらの化合物によって動物極側にアポトーシスが誘導された。アフリカツメガエル PDI については今回当該研究で初めてクローニングし、その性質がラットやヒトとほぼ同じであることを明らかにした。さらに発生過程では、原腸胚において顕著な発現が見られた。カエルにおいては T3 がオタマジャクシのシッポのアポトーシス誘導に必要な因子である。今回のこれらの化合物による胚へのアポトーシス誘導が T3 様の作用を介したものであるかどうかはわからないが、PDI がこれらの現象に関わっている可能性が示唆された。しかし、PDI の発生過程における役割は十分明らかでなく、従って今回明らかにしたこれらの化合物の初期発生過程における影響が PDI を介したものであるかどうか、今後証明する必要がある。

E. 結論

EDCs の中枢神経系への影響は、行動異常・発達障害などとの関連性が示唆されているにもかかわらず作用メカニズムに関しては不明な点が多い。脳シナプトゾーム画分に存在する BPA 結合タンパク質である PDI は甲状腺ホルモン結合タンパク質としても知られており、本研究により BPA は甲状腺ホルモンの結合を阻害する事が明らかとなった。さらに、1) PDI への結合実験(T3 結合阻害) 2) T3 応答性増殖細胞 GH3 増殖作用実験 3) アフリカツメガエル発生過程における影響 の 3 種類のスクリーニング系を確立して、いくつかの化合物についてスクリーニングを行った結果、BPA と *p*-ノニルフェノールが PDI を介した発達障害に影響を与える可能性のある化合物として挙げてきた。しかし、これらの詳細なメカニズムは明らかでなく、PDI の機能解析とあわせて、PDI を介したこれらの化合物の作用のメカニズムを解明していく必要があると考えられる。