

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

中枢神経系に影響を与える内分泌かく乱化学物質の
順位付けとヒトでのリスク予測と回避法の研究

平成14-16年度 総合研究報告書

主任研究者 船江 良彦

平成17(2005)年 3月

目 次

I. 総合研究報告書

中枢神経系に影響を与える内分泌かく乱化学物質の
評価法の開発とその順位付け
船江良彦

中枢神経系に影響を与える内分泌かく乱化学物質の
評価法の開発とその順位付け

- | | | | |
|----|---|-------|----|
| 1. | PDI に対する影響 | | 1 |
| 2. | PC12 細胞でのドパミン分泌に対する影響 | | 12 |
| 3. | 微小管結合蛋白質 (MAP2) および G 蛋白質
連関型受容体に及ぼす影響 | | 18 |
| 4. | アフリカツメガエルおよびヒト肝癌細胞を
用いる方法 | | 28 |

BPA の中枢神経系への作用機序

- | | | | |
|----|-----------------------------------|-------|----|
| 1. | BPA の脳神経系形成に及ぼす影響 | | 36 |
| 2. | BPA が胎仔の脳発達に与える影響 | | 38 |
| 3. | BPA の胎児・幼児期曝露による
中枢神経系腫瘍発生への影響 | | 42 |

ヒトでのリスク予測と回避法 45

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 47

III. 研究成果の刊行物・別刷 48

中枢神経系に影響を与える内分泌かく乱化学物質の 評価法の開発とその順位付け

1. PDI に対する影響

研究要旨

我々はこれまでにビスフェノール A (BPA) を胎児期・授乳期に暴露されたマウスにおいて、脳内のドパミン動態に変動が生じる事を見いだしている。BPA はドパミンの減少を引き起こす事で中枢神経系に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた事から、ラット脳より BPA 結合タンパク質の単離・精製を試みた。BPA-Sepharose アフィニティークロマトグラフィーによって精製したタンパク質が protein disulfide isomerase (PDI) である事が明らかとなった。PDI は *in vitro* においてタンパク質のジスルフィド結合の異性化を行うイソメラーゼ活性を持つだけでなく、甲状腺ホルモン結合タンパク質としても知られている。リコンビナント PDI を用いて内分泌かく乱化学物質 (EDCs) の作用を検討したところ、BPA が T_3 の結合を拮抗的に阻害した。また、BPA 以外にも *p*-ノニルフェノール、*p*-オクチルフェノール、2,4-ジクロロフェノール、ペンタクロロフェノール、テトラブロモ BPA、テトラクロロ BPA といった、フェノール基含有化合物が T_3 の結合を阻害した。したがってこれらの化学物質は PDI を介して甲状腺ホルモンの働きを模倣する事により、内分泌かく乱作用を示す事が示唆された。さらに、BPA、*p*-ノニルフェノール、*p*-オクチルフェノールがイソメラーゼ活性を阻害する事が明らかとなった。PDI の甲状腺ホルモン結合と、イソメラーゼ活性への影響を指標に環境化学物質を評価する事によって、脳神経系発達に影響を及ぼす可能性のある化学物質を選定する事が可能になると考えられる。

A. 研究目的

これまでに EDCs の生殖器系・免疫系への影響に関しては膨大な数の報告があり、その分子メカニズムも明らかになりつつある。しかし、近年問題視されている学習障害や知能指数の低下、また注意欠陥多動性症候群 (ADHD) との関連性が指摘されている

にも関わらず、その作用機序などに関しては不明のままである。我々はこれまでに BPA を胎児期・授乳期に暴露されたマウスにおいて、脳内のドパミン動態に変動が生じる事を見いだしている。脳におけるドパミンは、運動・感情・情動発現・脳報酬系に関与している神経伝達物質である。

ラット脳より BPA 結合タンパク質精製したところ、それは PDI と同定された。PDI はタンパク質のジスルフィド結合の異性化を行うイソメラーゼ活性を持つだけでなく、甲状腺ホルモン結合タンパク質としても知られている。したがって BPA による中枢神経系の作用は甲状腺ホルモンをかく乱することによって起ると考えられた。

また、PDI はタンパク質のチオール-ジスルフィド交換反応を触媒することによってタンパク質の酸化、還元、異性化をおこなう酵素であり、還元型タンパク質、変性型タンパク質のリフォールディングを行うイソメラーゼ活性を有している。また、このイソメラーゼ活性は T_3 の存在下で抑制される事が報告されている。胎児期・新生児期は複雑な神経ネットワークが形成される時期であり、脳内では様々なタンパク質が盛んに合成されている。この様な時期に、環境化学物質によって PDI を介したイソメラーゼ活性が影響を受けると、タンパク質の合成に異常が生じ、結果的に脳神経系発達に悪影響が及ぶ危険性が考えられる。

そこで本研究では、PDI のイソメラーゼ活性に及ぼす化学物質の影響について検討を行い、脳神経系発達に影響を及ぼす可能性のある可能性のある化学物質の選定を行う事を目的とした。

B. 研究方法

1. 被検物質

本研究で用いた被検物質は、内分泌

かく乱化学物質としての作用が疑われている以下の 22 種類である。BPA、*p*-オクチルフェノール、*p*-ノニルフェノール、2,4-ジクロロフェノール、ペンタクロロフェノール、テトラプロモ BPA、テトラクロロ BPA、トリブチルスズ、トリフェニルスズ、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジエチルヘキシル、フタル酸ジヘキシル、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジプロピル、アジピン酸ジエチルヘキシル、アミトロール、ベンゾフェノン、4-ニトロトルエン、オクタクロロスチレン

2. BPA 結合タンパク質の精製

(1) BPA 結合実験

BPA の放射性同位体 ($[^3H]$ -BPA) とタンパク質標品を 150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.0) 中で 4°C にて 2 時間インキュベーションした。反応後の Bound/Free 分離は、遠沈法か濾過法、もしくは PEG 沈澱法により行った。

(2) ラット脳 P2 画分の調製

以下の操作は全て 4°C にて行った。ラット脳をバッファー A (0.32 M スクロース / 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.05% のプロテアーゼインヒビターカクテル (SIGMA 社) を含む) で 2 回洗浄した後、湿重量に対して 9 倍量のバッファー A を加え、テフロン-ガラスホモジナイザーにてホモジナイズ (900-1,000 rpm, 10 ストローク) した。ホモジネートを遠心分離 (1,500×g, 20

分)して得られた上澄を S1 画分とした。S1 画分を遠心分離 (17,000×g, 15 分)して得られた沈澱をバッファー A にて懸濁し、P2 画分とした。P2 画分をさらに遠心分離 (17,000×g, 15 分)して得られた沈澱を P2' 画分(粗シナプトゾーム画分)とした。P2' 画分は実験に使用するまで-80 °Cにて保存した。

(3)BPA 結合タンパク質の精製

可溶化：

250 mg タンパク質量 P2' 画分 (10 mg / mL) に終濃度 0.5 %となるようにスクロースモノラウレートを加え、スターラーを用いて 60 分間、穏やかに攪拌した。遠心分離 (100,000×g, 60 分)して得られた上澄を可溶化画分とした。

陰イオン交換カラムクロマトグラフィー：

可溶化画分を Whatman DE52 カラム (25 mL, 2.5×5 cm) に供した。0.1 M、0.2 M、0.5 M の NaCl によりタンパク質を溶出し、BPA との結合活性の高い画分を採取した。

BPA-Sepharose 樹脂の作製：

BPA のメチル基を置換した BPA 誘導体 (図 1) の合成は、神戸天然物化学株式会社に依頼した。BPA を CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia 社) とカップリング反応により結合させ、BPA-Sepharose アフィニティー樹脂を作製した。

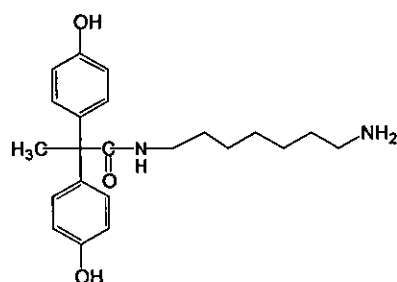


図 1：BPA 誘導体の構造

BPA アフィニティークロマトグラフィー：

陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにおいて BPA との結合活性の高かった画分を限外濾過にて濃縮した。濃縮したサンプルを BPA-Sepharose カラム (湿容積 2.0 mL) と混合し、ローテータを用いて 2 時間穏やかに攪拌した。スラリーゲルをカラム (ポリブレップエンブティーカラム, Bio-Rad 社) に移し、8 mL の洗浄バッファー (バッファー A + 0.15 M NaCl) で洗浄した。5 mL の溶出バッファー (2 mM BPA を含むバッファー A + 0.15 M NaCl) を加え、スラリーゲルを 1 時間、穏やかに攪拌した。スラリーをカラムに移し、溶出液を採取した後、さらに 5 mL の溶出バッファーにて溶出した。

3 . PDI 遺伝子のクローニングと His-tag 融合発現

(1) ラット PDI

ラットより脳を摘出し、ISOGEN (QIAGEN) を用いて mRNA を調製した。RT-PCR 法により cDNA を調製し、ラット肝臓 PDI の塩基配列をもとに設計したプライマーを、二つの組み合わせを用いて PCR を行い、遺伝子の増幅を行った。

組み合わせA (全長PDI上流部)

sense : 5' -GGG GGG ATC CTC CGA CAT
GCT GAG CCG TGC-3'

antisense : 5' -AGC GAT GAC GAT ATT
CTC AT-3'

組み合わせB (全長PDI下流部)

sense : 5' -ACC TGA TGA GCC AGG AAC
TG-3'

antisense : 5' -CCC TCG AGA GAT CTG
GCT TCT GCA CTA C-3'

組み合わせAで増幅されたPCR産物をEcoR I と BamH I により制限酵素消化し、pBluescript KS+ (TOYOBO社)に組み込んだ。このプラスミドをコンピテント細胞(DH5 α COMPITENT high, TOYOBO社)に導入し、形質転換させた。アンピシリンを含むLB寒天培地で培養し、コロニーの出現を確認した。アルカリ法によりプラスミドを調製し、EcoR I と Xho I により制限酵素消化した。これに組み合わせBで増幅されたPCR産物をEcoR I と Xho I により制限酵素消化したのち組み込んだ。このプラスミドをコンピテント細胞に導入し、形質転換させた。アンピシリンを含むLB寒天培地上で培養し、コロニーの出現を確認した。アルカリ法によりプラスミドを調製し、Sac I と Kpn I により制限酵素消化した。PDI全長を含むDNA断片をpQE-80L(QIAGEN社)に組み込んだ。このプラスミドをコンピテント細胞に導入し、形質転換させた。アンピシリンを含むLB寒天培地上で培養し、コロニーの出現を確認した。

アルカリ法によりプラスミドを調製し、PDIの全長が含まれている事を確認した。

(2)ヒト PDI

Human fetal brain cDNA (STRATAGENE社)を鋳型にし、プライマー (センス鎖 : 5' -GGG GGA ATT CAT CCG TGT CCG ACA TGC T-3' , アンチセンス鎖 : 5' -GGG GGT CGA CCG GTC TGG CTT TGC GTA TTA-3') を用いてPCRを行い、PDIの増幅を行った。

増幅されたPCR産物をEcoR I と Sal I により制限酵素消化し、pBluescript KS- (TOYOBO社)に組み込んだ。このプラスミドをコンピテント細胞(DH5 α COMPITENT high)に導入し、形質転換させた。アンピシリンを含むLB寒天培地で培養し、コロニーを単離した。アルカリ法によりプラスミドを調製し、Sac I と Kpn I により制限酵素消化した。PDI全長を含むDNA断片をpQE-81L(QIAGEN社)に組み込んだ。このプラスミドをコンピテント細胞に導入し、形質転換させた。アンピシリンを含むLB寒天培地上で培養し、コロニーを単離した。アルカリ法によりプラスミドを調製し、全長PDIをもつクローンを単離した。

(3)His-tag融合PDI (rPDI、hPDI) の精製

上記の方法によって得られたクローンのグリセロールストックより2 \times YT 培地に植菌し、一晚培養した。10 mL の培養液を 500 mL の培養液に植菌し、OD₆₀₀=0.6 に達するまで振盪培養を

行った。培養液に IPTG を 1.0 mg/mL となるように加え、さらに 4 時間、振盪培養を行った。遠心分離により細胞を回収し、PBS に再懸濁した後、遠心分離により洗浄菌体を得た。50 mL の溶菌バッファー (6 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM イミダゾール, 0.5 % プロテアーゼインヒビターカクテル, 1 mg/mL リゾチーム, pH 8.0) で懸濁し、氷上に 30 分間おいた。氷中にて 5 分間の超音波処理を行った後、スクロースモノラウレートを 0.5% となるように加え、スターラーを用いて 4 °C にて 60 分間、穏やかに攪拌した。遠心分離 (50000×g, 30min, 4 °C) により得られた上澄を可溶化画分とし、Ni-NTA agarose カラム (1.0 mL, QIAGEN 社) に供した。5 mL の洗浄液 (溶菌バッファー + 0.1 % スクロースモノラウレート + 0.5 % プロテアーゼインヒビターカクテル + 10 mM イミダゾール) でカラムを洗浄した後、イミダゾールによるステップワイズにて溶出した。それぞれの画分を SDS-PAGE 分析に供し、必要な画分を集めて 50 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 8.0) に対して透析を行った。得られた最終画分を His-tag 融合 PDI 精製標品とした。

(4) ラット核内 T₃ レセプター (TRs) の調製

TRs は Tagami T らの方法に従って調製した NT₃R を用いた。ラットより肝臓を摘出し、5 mM MgCl₂ を含む 0.25 M スクロース (SM) 中でホモジナイズし、700×g にて 10 分間の遠心分離を行った。沈殿を 5 mM MgCl₂ を含む 2.5 M ス

クロースで懸濁した後、スクロース濃度を 2.2 M に調整した。80,000×g にて 45 分間の遠心分離を行って得られた沈殿を 0.5 M Triton X-100 を含む SM で 1 回洗浄し、さらに SM で 2 回洗浄した。沈殿を 0.4 M KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT を含む 50 mM Tris-glycine (pH 8.5) に懸濁し、60 分間攪拌した。117,000×g にて 30 分間の遠心分離を行い、得られた上澄を NT₃R とし、使用するまで -80 °C にて保存した。

4. 結合阻害試験

(1) PDI

被検物質の存在下で、100 nM [¹²⁵I]-T₃ と PDI (0.1 mg/mL タンパク質量) 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。反応後の反応液に等量の 12% PEG 6,000, 150 mM NaCl, 0.2M ZnCl₂ を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) を加えて攪拌した後、遠心分離 (14,500 rpm, 5 分, 4 °C) を行った。上澄をアスピレーターにより除去した後、沈殿に 1.5 mL の洗浄バッファー (6% PEG 6,000, 150 mM NaCl, 0.1M ZnCl₂ を含む 50 mM Tris-HCl, pH 7.0) で 2 回洗浄した。沈殿に含まれる放射活性を γ カウンターにより測定した。T₃ の非特異的結合量を測定するために、過剰量 (30 μM) 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。

(2) TRs

被検物質の存在下で、1.0 nM [¹²⁵I]-T₃ と NT₃R (0.5 mg/mL タンパク質量) とを 5 mM DTT, 150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中で 0°C にて 30 分間インキュベーションした。反応後の反応液に 1/2.5 量の 10 % AG X8 (Bio-Rad 社), 5 mM DTT, 150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) を加えて 4°C にて 5 分間攪拌した後、遠心分離 (5,000 rpm, 5 分, 4 °C) を行い、上澄に含まれる放射活性を γ カウンターにより測定し、[¹²⁵I]-T₃ の結合量を算出した。また、T₃ の非特異的結合量を測定するために、過剰量 (10 μM) の T₃ を加えた系を用意した。

(3) データ解析

T₃ の結合 B / B₀ (%) は次式により求めた。

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

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

得られたデータは、GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc.) により解析を行い、IC₅₀ 値を算出した。

5. イソメラーゼ活性の測定

PDI のイソメラーゼ活性測定は、Lyles らの方法に従って行った。すなわち、PDI によるリフォールディングによって還元型・変性型 RNase が未変性型 RNase に再活性化された時の cCMP 水酸化活性を分光光学的に測定する方法により行った。RNase の還元・変性は、RNase (10 mg/mL) を変

性緩衝液 (140 mM DTT, 2 mM EDTA, 6 M グアニジン塩酸塩を含む 100 mM Tris-HCl, pH 8.0) 中で室温にて一昼夜、反応させる事によって行った。変性緩衝液は Bio-Gel P6 spin column を用いて 0.1% 酢酸に置換し、使用するまで -20°C にて保存した。還元型・変性型 RNase の濃度は、280 nm にて吸光度を測定し、分子吸光度係数 9300 cm⁻¹M⁻¹ を用いて算出した。4.5 mM cCMP、1 mM グルタチオン、0.2 mM 酸化型グルタチオン、2 mM EDTA、100 mM Tris-HCl (pH 8.0) を含む反応液に 0.1 mg/mL rPDI を加え、25°C にて 3 分間プレインキュベーションを行った後、反応液に 8・M となるように還元型・変性型 PDI を加える事により反応を開始した。296 nm における吸光度の経時的変化を 30 分間測定した。一分間あたりの吸光度変化を算出し、化学物質を加えない時の値を 0% として、各種化学物質存在下での活性阻害率を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究における実験動物を用いた実験は、大阪市立大学大学院医学研究科動物実験委員会において審査・承認された実験計画に基づき、動物倫理・動物愛護に配慮した動物実験指針従い施行した。臓器摘出の際には苦痛を伴わない断頭法により行った。

C. 研究結果

1. BPA 結合実験

ラット脳 P2 画分に対する [³H]-BPA

の結合は、過剰量の BPA (1 mM) を加えたときの値を非特異的結合とし、特異的結合は、全結合から非特異的結合を差し引いた値で算出した。その結果、ラット脳 P2 画分には BPA が特異的に結合する部位が存在する事が明らかになった。

2. BPA 結合タンパク質の精製

Whatman DE52 カラムを用いて NaCl によって 0.1 M, 0.2 M, 0.5 M とステップワイズにて溶出した結果、0.2 M NaCl で溶出した画分においてタンパク質あたりの BPA の結合活性の最も高い値が得られた。この画分をさらに BPA アフィニティークラムクロマトグラフィに供した。

BPA-Sepharose アフィニティークロマトグラフィによって本タンパク質を SDS-PAGE 上で単一にまで精製した。さらにこのタンパク質のアミノ酸の N-末端配列の分析を行った結果、33 残基の配列

(DALEEDNVLVLKKSNAEALAAHNYLLVEFYA) が得られた。BLAST によりホモロジー検索を行った結果、PDI と 100% の相同性を示した。

rPDI に対する [³H]-BPA の結合性は、過剰量の BPA (1 mM) を加えたときの値を非特異的結合とし、特異的結合は、全結合から非特異的結合を差し引いた値で算出した。その結果、rPDI には BPA が特異的に結合する部位が存在する事が明らかになった。また、PDI は甲状腺ホルモン結合タンパク質 (T₃ 結合タンパク質) と知られている事から、標準リガンドとして [¹²⁵I]-T₃ に対する

競合的結合阻害実験を行ったところ、BPA は T₃ の約 1/20 の強さで [¹²⁵I]-T₃ の結合を阻害した。

3. PDI に対する甲状腺ホルモンの競合的結合阻害

EDCs としての作用が疑われている 22 種類の化学物質について検討を行ったところ、明らかな [¹²⁵I]-T₃ の結合阻害が見られたのは T₃ (0.5 μM)、BPA (17.3 μM)、p-オクチルフェノール (2.9 μM)、p-ノニルフェノール (5.3 μM)、2,4-ジクロロフェノール (37.4 μM)、ペントクロロフェノール (22.3 μM)、テトラプロモ BPA (1.1 μM)、テトラクロロ BPA (0.2 μM) であった。それ以外の被検物質による阻害は見られなかった。

PDI に対して T₃ の結合を阻害する化合物はいずれもフェノール基を有するものであった。そこで、構造活性相関を明らかにするべく、BPA 誘導体 (図 2) を用いて、競合的結合実験を行った。

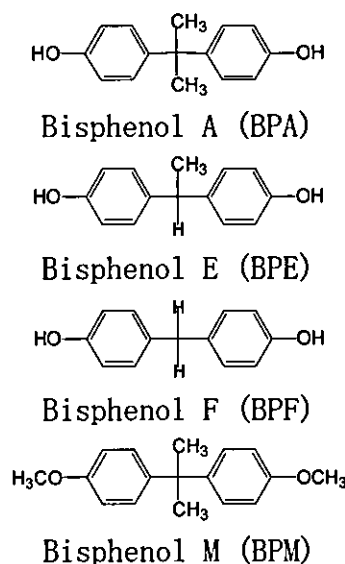


図 2 : BPA 誘導体

その結果、BPA のメチル基を置換した誘導体 (BPE, BPF) では阻害活性は BPA と大きな差は見られなかったが、水酸基をメトキシ基に置換した BPM では大きく低下した (図 3)。

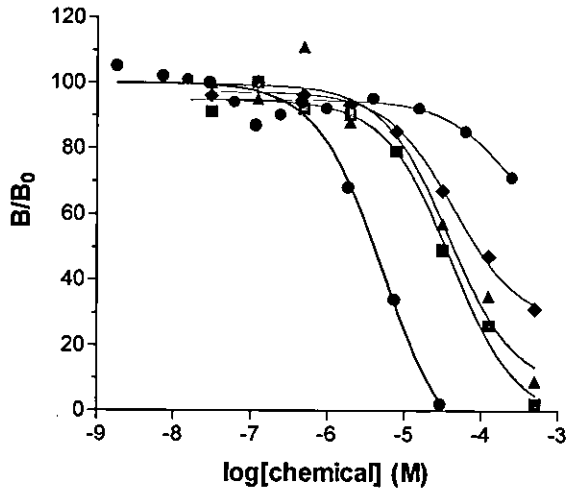


図 3: BPA 誘導体による PDI に対する T_3 の競合的結合阻害
 ●; T_3 , ■; BPA, ▲; BPE, ◆; BPF,
 ○; BPM

4. TRs に対する T_3 の競合的結合阻害試験

PDI に対する T_3 の結合阻害活性が見られた 7 種の化学物質について、これまでポリ塩化ビフェニル (PCBs) などの標的タンパク質として数多く報告のある TRs に対する結合阻害活性を調べた。その結果、ペンタクロロフェノール, BPA, テトラブロモ BPA, テトラクロロビスフェノールに弱い阻害活性が見られた (図 4)。このうち最も強い阻害活性を示したのはテトラブロモ BPA とテトラクロロ BPA で、 T_3 と

比較すると 1/1000 程の作用であった。

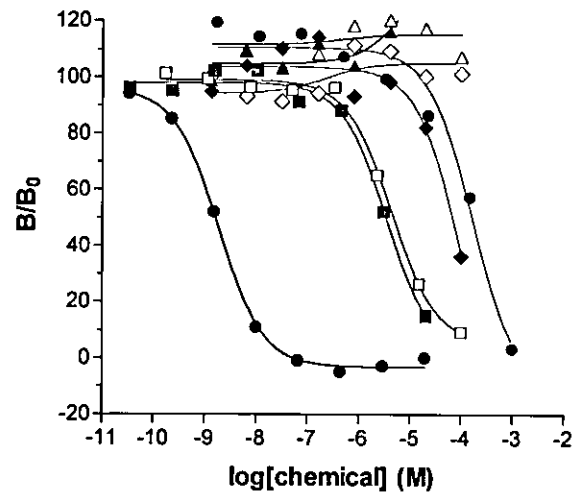


図 4.: ラット核内 TRs に対する各種化合物による T_3 の結合阻害

- ; T_3 ,
- ; BPA,
- ; tetrabromobisphenol A,
- ; tetrachlorobisphenol A,
- ▲; *p*-octylphenol,
- △; *p*-nonylphenol,
- ◆; 2,4-dichlorophenol,
- ◇; pentachlorophenol

5. EDCs によるイソメラーゼ活性への影響

被検物質 100 μ M の存在下で、イソメラーゼ活性を測定した。結果は下図に示した (図 5-A)。その結果、BPA (20% 阻害)、*p*-オクチルフェノール (40% 阻害)、*p*-ノニルフェノール (20% 阻害) において、阻害効果が見られた。2,4-ジクロロフェノール、ペンタクロロフェノール、テトラブロモ BPA、テトラ

クロロ BPA は、PDI に対する結合性を示すものの、イソメラーゼ活性には影響しなかった。また、その他の被検物質による阻害性はみられなかった。

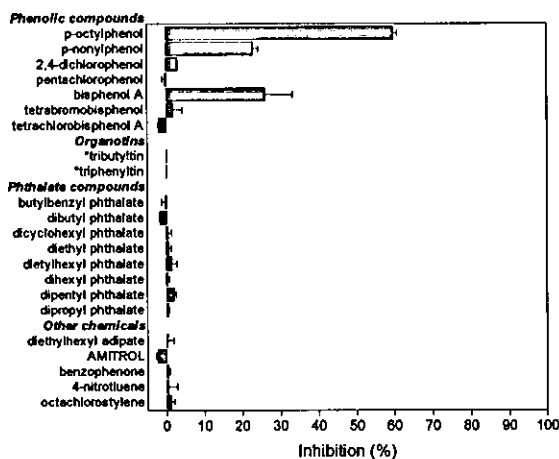


図 5-A : PDI のイソメラーゼ活性に及ぼす化学物質の影響

6. イソメラーゼ活性の阻害

前試験において、イソメラーゼ活性の阻害効果が見られた BPA、p-オクチルフェノール、p-ノニルフェノールについて、阻害効果の濃度依存性を 10^{-7} ~ 10^{-3} M の範囲で検討した。その結果、いずれの化学物質も濃度依存的な阻害活性を示し、用量-反応曲線はシグモイド曲線を描いた (図 5-B)。この時の阻害活性 (IC_{50} 値) は、BPA: $113.8 \mu\text{M}$ 、p-オクチルフェノール: $62.3 \mu\text{M}$ 、p-ノニルフェノール: $42.1 \mu\text{M}$ であった。一方、イソメラーゼ活性の抑制作用が知られている T_3 の IC_{50} 値は $3.6 \mu\text{M}$ であった。このことから、これらの化学物質の影響は、 T_3 と同様の作用を示し、数十分の一程度の阻害強度であることが分かった。

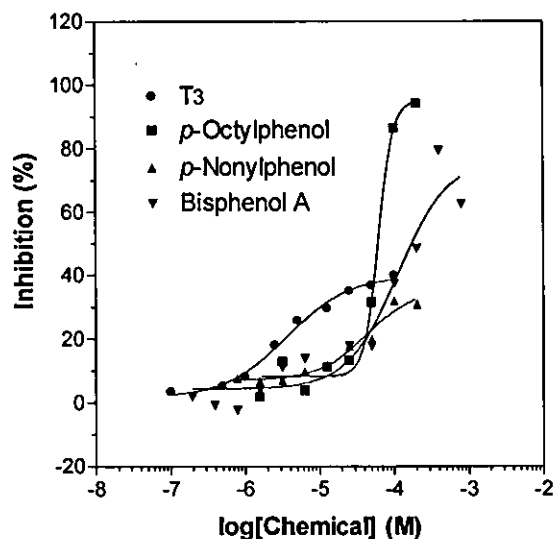


図 5-B : イソメラーゼ活性阻害

D. 考察

ラット脳における BPA の結合タンパク質の探索を行った結果、P2 画分に、BPA が特異的に結合するタンパク質の存在が明らかになった。本タンパク質を精製し、アミノ酸の N 末端配列の分析を行った結果、N-末端の 33 残基は PDI と 100% の相同性を示した。PDI は多機能タンパク質として知られており、イソメラーゼ活性を有する他、ヨードチロニン 5' -脱ヨード酵素、プロリル 4-水酸化酵素の β サブユニットとしての機能を有する事が知られている。その他、特に注目すべきは、本タンパク質が甲状腺ホルモン結合タンパク質として、甲状腺ホルモンである T_3 の結合能をも有している事である。我々はこの点に着目し、 T_3 との競合結合実験を行った。その結果、BPA は T_3 の結合の結合を阻害する事が明らかとなり、BPA は生体

内において T_3 の作用を模倣・阻害する可能性が示唆された。さらに、EDCsとしての作用が疑われている化学物質について同様の試験を行った結果、 T_3 の結合を阻害した化合物は5種類であり、それらはいずれもフェノール基を有する化学物質であった。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攪乱す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。

これらの化学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おり、ペンタクロロフェノールについては血清中の下垂体ホルモン・甲状腺ホルモンの低下、肺・肝臓重量の増加、胸腺重量減少、肝薬物代謝酵素活性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。また、テトラブロモBPA、テトラクロロBPAの内分泌攪乱作用に関する報告はほとんどなく、また毒性も低い事からこれまであまり注目されなかった物質である。しかし両物質は環境モニタリング調査の結果から、土壌・河川底質中に検出されており、環境汚染物質の一つとされている。また職業暴露の可能性もあることから、ヒトの体内に蓄積された結果の危険性

は十分考えられる。

その他の化学物質の甲状腺ホルモン攪乱作用に関するこれまでの研究は、血中濃度の増加・低下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、EDCs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。

さらにフェノール基をもつ化合物のみが T_3 結合阻害活性を示した事は、このような特定の化学物質が甲状腺ホルモンの攪乱作用を示す危険性をその構造的性質から予測できるため、リスク評価を行う上でも非常に有用な結果であると考えられる。

フェノール基含有化合物がPDIの甲状腺ホルモン結合を阻害する事が明らかになったため、これまでPCBなどの標的タンパク質として知られているTRsに対する作用を検討した。その結果、TRsに対して T_3 の結合を阻害する化学物質はPDIの結果とは一致しておらず、p-オクチルフェノールや、p-ニルフェノール、2,4-ジクロロフェノールは、PDIに対してのみ T_3 結合阻害活性が見られ、TRsに対する作用は認められなかった。

これまでTRsが化学物質による甲状腺ホルモン作用を攪乱する作用点として考えられており、TRsを標的にしたgenomicなスクリーニングが行われてきたが、今後、PDIを標的にしたnon-genomicなスクリーニング法により、甲状腺ホルモン作用攪乱による中枢神経系への影響を考慮に入れる事も必要であると考えられる。

PDI のイソメラーゼ活性に及ぼす化学物質の影響を検討する事によって、BPA、p-オクチルフェノール、p-ニルフェノールがイソメラーゼ活性を抑制する事が明らかとなった。PDI は *in vitro* においてタンパク質の酸化、還元、異性化などのチオール - ジスルフィド交換反応を触媒するため、生体内における新生タンパク質の正常な立体構造形成に必要不可欠であると考えられている。また、また、このイソメラーゼ活性は *in vitro* において T_3 の存在下で抑制される事や、ラット下垂体由来細胞である GH3 細胞において、PDI の発現抑制が T_3 の存在下で誘導される事が報告されており、PDI によるタンパク質のフォールディングを甲状腺ホルモンが制御していると考えられる。PDI のイソメラーゼ活性を阻害した化学物質は、フェノール基含有化合物のなかでも、側鎖にハロゲン基を持たないものだけに限定された。この結果は化学物質の構造活性相関を明らかに示しており、今後、PDI を介したタンパク質のフォールディングに影響を及ぼす化学物質を、その構造から予測する事も可能である。甲状腺ホルモンは軸索形成、神経突起の伸長、細胞遊走、ミエリン形成など正常な脳神経発達に重要な役割を果たしている。特に胎児期・新生児期は複雑な神経ネットワークが形成される時期であり、脳内では様々なタンパ

ク質が盛んに合成されている。このような時期に環境化学物質によって PDI を介したイソメラーゼ活性が影響を受けると、タンパク質の合成に異常が生じ、結果的に脳神経系の発達異常があらわれる危険性が考えられる。その為、本研究で用いたスクリーニング法は、脳神経系発達に影響を及ぼす危険性のある環境化学物質の評価を行う上で、非常に重要であると考えられる。

E. 結論

環境化学物質の作用タンパク質として、今回我々は PDI の存在を見いだした。PDI はタンパク質のイソメラーゼ活性を有するだけでなく、甲状腺ホルモン結合タンパク質としての機能を有しているが、甲状腺ホルモンの結合を阻害する化学物質をスクリーニングする事により、甲状腺ホルモン作用に影響を与え、その結果、脳神経系発達に悪影響を及ぼす化学物質を選別する事が可能であると考えられる。また、PDI のイソメラーゼ活性へ作用する化学物質をスクリーニングする事により、タンパク質合成の異常を経て結果的に脳神経系発達に影響を及ぼす可能性のある物質をリストアップする事が可能になると考えられる。

2. PC12 細胞でのドパミン分泌に対する影響

研究要旨

胎児期にビスフェノール A (BPA) により曝露された仔マウスの脳内ドパミン量は、非曝露群と比較して減少していること、また脳内チロシン水酸化酵素 (TH) は上昇していることを明らかにした。そこで我々は、ラット副腎腫瘍由来の PC12 (pheochromocytoma) 細胞を用いた実験を行った結果、BPA 曝露によりドパミン放出が見られることを確認した。ドパミン放出機構を検討したところ、この反応は G 蛋白および N 型カルシウムチャンネルを介するものであった。そこで我々は、PC12 細胞を用い、ドパミン分泌を指標に、内分泌かく乱化学物質の中樞神経系への影響を評価する方法を開発した。その結果、BPA と同等にノニルフェノールやペンタクロロフェノールが強いドパミン分泌作用を示した。また、PC12 細胞を BPA 曝露すると、ナノモルレベルで TH の上昇が検出された。この TH 発現上昇を指標にした評価法は、高感度の評価法として有用であると考えられた。

A. 研究目的

我々は、BPA を胎児期および授乳期に曝露された仔マウスに行動異常がみられ、脳内のドパミンが低下していることを発見した。生体内でのカテコラミンのかく乱は神経伝達や循環動態に影響を及ぼす可能性があり、BPA 曝露による急性的な有害作用が示唆された。

中樞神経系への内分泌かく乱化学物質の影響を評価する方法として、妊娠マウスに投与する方法は、動物愛護の面からも、また実験に関する時間、費用の点からも、多くの内分泌かく乱化学物質をスクリーニングする方法としては適切な方法ではない。

一方、最近、BPA の膜受容体、膜チャンネルを介する作用が報告されている。核内

受容体を介する長期的な genomic action に対して、膜受容体、膜チャンネルを介する短期的な作用は non-genomic action として位置づけられている。本研究では、神経系での non-genomic action、つまり急性的な作用を調べるために PC12 細胞に BPA および作用を調べたい内分泌かく乱化学物質を曝露させ、PC12 細胞からのドパミン分泌作用を指標に評価法を開発した。

また、BPA 曝露により、仔マウスの TH の増昇が観察されたが、この反応は、ドパミン低下より、低濃度の BPA 曝露で検出できたので、PC12 細胞を用い、TH 上昇を指標により高感度な簡易な評価法の開発を行った。

また BPA による non-genomic なドパミン

遊離および TH 上昇の機構も検討した。

B. 研究方法

(1) PC12 細胞での暴露実験

1.5~2.0×10⁶個のPC12細胞をプレートに蒔き、10%ウマ血清および5%ウシ血清を含むRPMI1650培地で一晚培養した。培地からBuffer A, pH7.4 (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 6 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 10 mM Glucose) に交換し、それぞれの被検体を添加した。30分間培養後、Buffer A を取り除きPBSで2回洗浄した細胞をPBS回収した。回収された細胞を超音波破碎し、遠心分離をおこなった。このときの上清に含まれるドパミン量を細胞内ドパミン量として定量した。

(2) ドパミン定量

定量にはHPLCを用い、ECDで検出した。このとき、内部標準物質としてデオキシエピネフリンを用いることにより、また遠心後の沈渣を用いて蛋白定量することにより補正した。

(3) 評価を行った内分泌かく乱化学物質

評価をおこなったのは、以下に示す21種類の化学物質である。トリブチルスズ、4-オクチルフェノール、ノニルフェノール、フタル酸-n-ブチル、オクタクロロステレン、ベンゾフェノン、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸-2-エチルヘキシル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジエチル、アジピン酸-2-エチルヘキシル、トリフェニルスズ、ペンタクロロフェノール、アミトロール、2,4-ジクロロフェノール、4-ニトロトルエン、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジヘキシル、フタル

酸ジプロピル、BPA、ビスフェノールA代謝物(4-メチル-2,4-ビス(p-ヒドロキシフェニル)ペンタ-1-エン; MBP)。

(4) ドパミン分泌機構

50 μM BPA 曝露 30 分前にあらかじめ、選択的 L-, N-, P/Q 型カルシウムチャンネル拮抗薬 (20 μM diltiazem, 1 μM ω-conotoxin GVIA, 1 μM ω-agatoxin IVA)、G-蛋白阻害剤 (0.5~3 mM GDP βs)、cyclic AMP 阻害剤 (0.25~1 mM Rp-cAMPS)、PKA 阻害剤 (10 μM H7, 100 μM H89) 及びリアノジン受容体阻害剤 (10 μM ryanodine) をそれぞれ添加し、各々の場合の BPA 添加によるドパミン放出の変化を調べた。

PC12 細胞を用いて、リアノジン受容体の mRNA の発現を RT-PCR 法で調べた。PC12 細胞から RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて相補的な DNA を合成した。この RNA-DNA 鎖を鋳型として、1~3 型リアノジン受容体特異的なプライマー組およびプローブを用いて PCR で増幅し、増幅した特異的 DNA フラグメントから元の mRNA の発現を調べた。

(5) TH の定量と増加機構

TH の mRNA は RT-PCR 法で測定した。PKC 阻害剤である H7 (10 μM)、Ro 32-0432 (100 nM) を添加し、BPA の作用機序を調べた。

C. 研究結果

(1) ドパミン分泌作用

これまで内分泌ホルモンかく乱作用を有することがすでに知られている 20 被検体による PC12 細胞内ドパミン量の変

化について検討した。100 μ M BPAは約30%細胞内ドパミンを細胞外へ放出し、細胞内ドパミン量を約70%に低下させた。BPAの効果と比較することにより3つのグループに分けることができ、図6に示した。まず第1のグループは、BPAよりもさらに強い効果を示す化学物質でトリブチルスズ、トリフェニルスズ、ノニルフェノール、ペンタクロロフェノールの4種類が含まれる。これら化合物の濃度50 μ Mでは、細胞内ドパミン量が50%以下であった。しかし、トリブチルスズおよびトリフェニルスズ添加時には、PC12細胞を剥がれるなど細胞毒性が見られた。このことから、これらの化学物質による細胞内ドパミンの減少はドパミン放出ではなく、単に細胞死による可能性が考えられる。第2のグループは、BPAとほぼ同程度の効果を示した2種類の化合物が含まれる。4-オクチルフェノールとオクタクロロスチレンであり、共に濃度100 μ Mで細胞内ドパミン量が約70~80%であった。第3のグループは、細胞内ドパミン量をほとんど減少しないかもしくは全く影響しない13種類の化学物質であった。BPAは生体内で速やかに代謝され排泄されるが、このBPAの代謝過程で生じるMBPには強力なエストロゲン作用があることが報告されている。我々は、このMBPにおいてもBPAと同様細胞内ドパミンに影響を及ぼすかどうか検討した。その結果、濃度10 μ Mで細胞内ドパミン量が20%にまで減少し、強いドパミン分泌作用を示した。

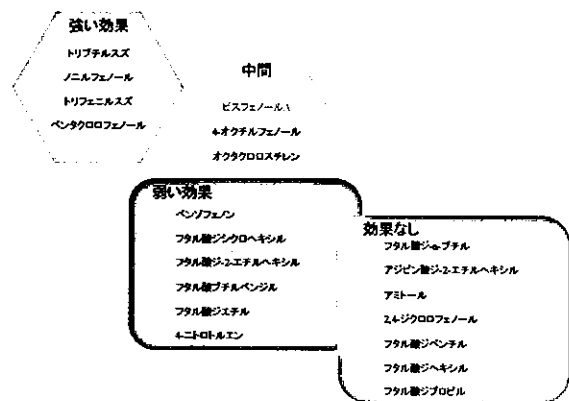


図6：ドパミン分泌作用を有する化学物質

(2) ドパミン分泌機構

カルシウムチャネルの関与：

あらかじめ選択的L-, N, P/Q型カルシウムチャネル拮抗薬 (20 μ M diltiazem, 1 μ M ω -conotoxin GVIA, 1 μ M ω -angatoxin IVA) をそれぞれ添加し、その30分後に50 μ M BPAを曝露した。N型カルシウムチャネル拮抗薬添加の場合のみ、有意にBPAによる細胞内のドパミン減少が阻害された。以上からBPAによるドパミン放出にはN型カルシウムチャネルが関与していることがわかった。

膜受容体の関与：

G-蛋白阻害剤 (0.5~3mM GDP β s) を添加し、その30分後に50 μ M BPAを曝露した。G-蛋白阻害剤の濃度依存性にBPAによる細胞内のドパミン減少が阻害された。以上からBPAによるドパミン放出にはG蛋白結合膜受容体が関与していることがわかった。

cyclic AMP/PKA 経路の関与：

cyclic AMP 阻害剤 (0.25 ~ 1 mM Rp-cAMPS) 阻害剤 (10 μ M H7, 100 μ M H89) を各々添加し、その 30 分後に 50 μ M BPA を曝露した。

cyclic AMP 阻害剤、PKA 阻害剤共に BPA による細胞内ドパミン減少を阻害した。以上から BPA によるドパミン放出には cyclic AMP/PKA 経路が関与していることがわかった。

リアノジン受容体の関与：

リアノジン受容体阻害剤 (10 μ M ryanodine) を添加し、その 30 分後に 50 μ M BPA を曝露した。リアノジン受容体阻害剤は BPA 添加による細胞内のドパミン減少を阻害した。また RT-PCR 法によりリアノジン受容体の存在が確認された。以上から BPA によるドパミン放出にはリアノジン受容体が関与していることがわかった。

(3) BPA 曝露による TH 上昇

BPA 各 1 nM、10 nM、100 nM を PC12 細胞に 1 時間曝露したところ、濃度依存性に TH の mRNA が増加した (図 7)。

また、100 nM の BPA を各 0.5、1、3、6、12 時間曝露したところ、曝露 6 時間まで時間依存性に TH の mRNA の増加を認めた (図 8)。

BPA による TH の mRNA の増加は PKC 阻害剤である H7 (10 μ M)、Ro 32-0432 (100 nM) で阻害された。

BPA 各 1 nM、10 nM、100 nM を PC12 細胞に 12 時間曝露したところ、濃度依存性に細胞内のドパミン量の増加を認めた (図 9)。

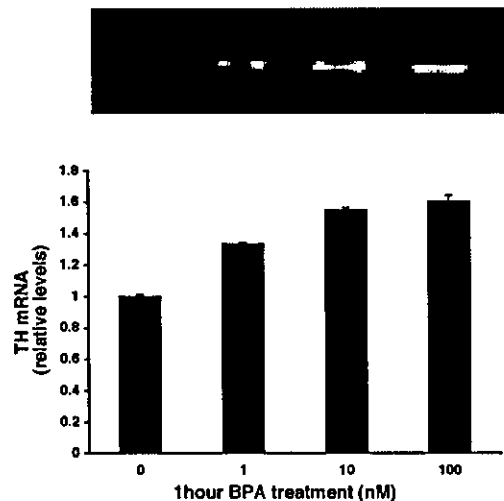


図 7：TH 発現に及ぼす BPA 濃度の影響

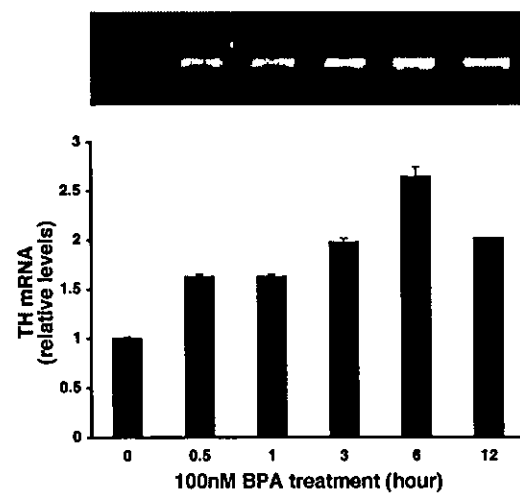


図 8：TH 発現に及ぼす BPA 曝露時間の影響

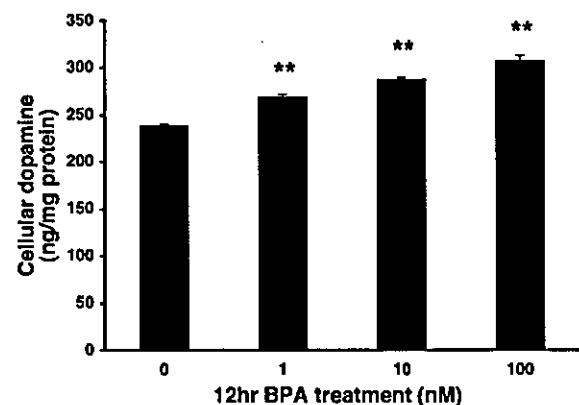


図 9：PC12 細胞内ドパミンに及ぼす BPA 濃度の影響

また、100 nM の BPA を各 1、12、24 時間曝露すると、時間依存性に細胞内ドパミン量の増加を認めた (図 10)。

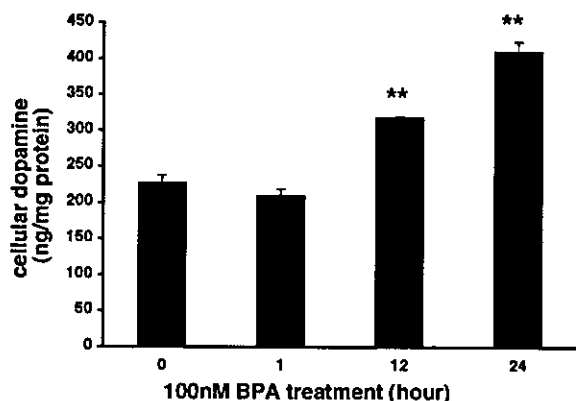


図 10 : PC12 細胞内ドパミンに及ぼす BPA 時間の影響

D. 考察

今回用いた化学物質は、低濃度で内分泌系のメッセージ伝達のかく乱を介して生殖器の異常や内分泌、免疫、神経系に影響を与えるなど、ホルモンかく乱作用を有することが報告されている。これらは環境調査や多くの実験動物を用いた暴露評価により得られた知見であり、ヒトへの暴露評価および種々の健康影響評価ができる研究を系統的に行う必要がある。とりわけ神経系への影響は脳の発達過程を変化させ正常な脳機能を乱すことから、その同定することと作用機序の解明が急がれている。そのため、脳神経系に及ぼす影響を評価する確かな方法が必要であると考える。我々は、PC12 細胞の細胞内ドパミン量の変化を指標として、21 種類のホルモンかく乱物質について検討した。BPA は PC12 細胞内ドパミン量を 30% 減少させたが、これ以上の作用を有する

2 種類の化学物質 (ノニルフェノール、ペンタクロロフェノール) が存在し、また同様の効力をもつ化学物質 (4-オクタフルフェノール、オクタクロロスチレン) を加えると BPA 以外に 4 種類の化学物質が見つかった。これらの化合物はフェノールもしくはクロロベンゼンの基本骨格を有しており、現在その他の化学物質においても構造活性相関が考えられるかどうかについてビスフェノール誘導体を用いて検討している。

さらに、強力なエストロゲン作用を有する BPA 代謝物である MBP に細胞内ドパミン量減少効果が存在したことから、脳発達の未成熟な胎児期において BPA の代謝体が脳内ドパミンに影響を及ぼす可能性が考えられる。

今回の研究で、25~150 μ M の BPA を PC12 細胞に曝露すると、BPA の濃度依存性に PC12 細胞からドパミン放出が起こることがわかった。また、その機序に G 蛋白結合膜受容体、cyclic AMP/PKA 経路、N 型カルシウムチャネル、リアノジン受容体がそれぞれ関連していることがわかった。各経路を整理し図 11 に示した。

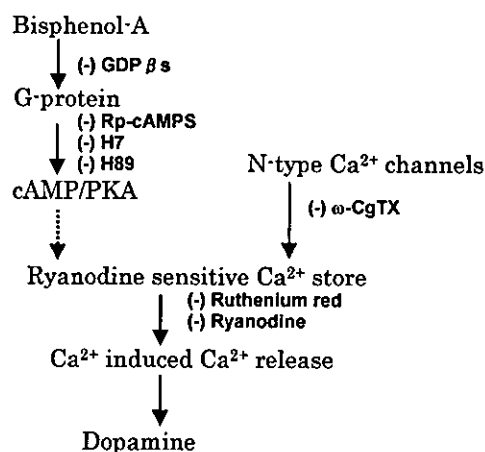


図 11 : ドパミン分泌機構

その経路は、まず BPA が G 蛋白結合膜受容体に結合することによって cyclic AMP/PKA 経路が活性化され、つぎに PKA により N 型カルシウムチャネルおよびリアノジン受容体がリン酸化されることが考えられる。N 型カルシウムチャネルからカルシウムが流入すると、PKA によりリン酸化されたリアノジン感受性カルシウム小胞から calcium induced calcium release が起こりドパミンが放出されるものと思われる。

BPA は β -エストラジオールと類似構造を持ち、エストロゲン核内受容体を介して有害作用を及ぼすことが報告されている。膜受容体、膜チャネルを介する作用として、 17β -エストラジオールでは、PKA とは無関係に、L, N 型カルシウムチャネル及び P2X 受容体に作用しカテコラミン放出を起こすことが報告されている。一方、今回の研究で BPA は、PKA を介してドパミン放出を起こすことが確認された。BPA は膜受容体・膜チャネルを介する反応では β -エストラジオールとは異なる様式を示すようである。

低濃度の BPA を PC12 細胞に曝露すると、濃度依存性および時間依存性に TH および細胞内ドパミンの増加が生じることから、低濃度の BPA により神経系が攪乱される可能性が示唆された。したがって TH 上昇を測定する EDCs の評価法はかなり高感度な方法であることを示している。曝露 0.5 時間後に TH の有意な増加を認めることから (図 8)、BPA が non-genomic に作用していることが考えられる。BPA による TH の mRNA の増加は PKC 阻害剤である H7 ($10\mu\text{M}$)、Ro 32-0432 (100nM) で阻害されたことから、PKC の経路が関

わっていると考えられるが、BPA の first attack point は現時点ではわかっていない。我々はこれまでに BPA が PDI (protein disulfide isomerase) に結合することを報告し、種々の内分泌攪乱物質のスクリーニングに PDI が有用であることを研究してきたが、TH の増加についても今後 PDI との関連性を調べていく必要があると考えられる。

E. 結論

PC12 細胞にて EDCs 曝露により細胞内ドパミンが細胞外へ分泌し、細胞内ドパミンが低下することを見出した。また PC12 細胞に BPA を曝露すると、ドパミン合成酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) の発現が上昇することを見出した。これら PC12 細胞を用い、二つのドパミンおよび TH の変化を測定する方法は EDCs の中枢神経系への影響を評価するための有効な方法と考えられる。

3. 微小管結合蛋白質 (MAP2) および G 蛋白質連関型受容体に及ぼす影響

研究要旨

内分泌かく乱化学物質の中枢神経系への新規作用分子標的として、樹状突起伸展を制御する微小管結合蛋白質：MAP2、Gq 蛋白質連関型細胞膜受容体、2つの分子を基盤とした以下の評価系を構築した。①MAP2 評価系：微小管重合測定-海馬神経細胞樹状突起伸展測定-学習試験、②受容体モデル評価系：肥満細胞脱顆粒応答測定-細胞内カルシウム濃度測定-疼痛過敏応答測定・血管透過性亢進測定である。これらの評価系を用いて様々な化学物質について評価を行ったところ、多くの化学物質が標的分子の内在性作用分子である神経ステロイドの作用を模倣、もしくは変調することを明らかとした。本作用は試験管-細胞-個体レベルで相関したことから、本研究において構築したノンジェノミック測定系が化学物質の安全性の再評価に有効であることを示している。

A. 研究目的

現在の生活環境に存在する様々な化学物質が生体内の内分泌系をかく乱し、ヒトに有害な作用を及ぼす可能性が問題視されている。従来からステロイドホルモンへのかく乱作用として核内受容体を介するジェノミック作用がよく検討されている。一方で最近その存在が認識されだしたステロイドホルモンのノンジェノミック作用に対するかく乱性については、殆ど解明されていない。本研究ではノンジェノミック作用の新規標的である微小管蛋白質：MAP2、G 蛋白質連関型細胞膜受容体、2つの標的分子に対する直接作用と脳で合成される内在性作用分子である神経ステロイドの機能変調を基に化学物質の評価を行った。最終的に様々な化学物質の効果を量的・質的に順位付けし、安全性に対して再評価する測定系の開発を目的と

している。

B. 研究方法

I. 微小管結合蛋白質：MAP2

1. マウス MAP2 及び微小管蛋白質精製

温度変化を利用した微小管蛋白質の重合-脱重合反応を繰り返した後、超遠心によりマウス脳細胞質画分より微小管蛋白質を調整した。チューブリンはホスホセルロースカラムを用いて精製し、続いて MAP1 を熱変性により除去し、MAP2 と tau 蛋白質はハイドロキシアパタイトカラムを用いて分離精製した。精製蛋白質は SDS-PAGE により確認した。

2. MAP2 依存的微小管重合測定

微小管が形成されると反応液の濁度が上昇し、その濁度は形成微小管量に比例するので定量的測定が可能と