

氏名	橋本翔子
学位の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	甲理第141号(文部科学省への報告番号甲第429号)
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	2012年3月16日
学位論文題目	Binding of chemicals to PDI and their effects on the catalytic activity and physiological functions of PDI
論文審査委員	(主査) 教授 矢倉達夫 (副査) 教授 藤原伸介 教授 今岡進 教授 松田祐介

近年ポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料として使用されているビスフェノール A (BPA) が、脳や神経系の機能や発達へ影響することが明らかとなっている。ビスフェノール A の脳への影響を解明する研究の過程で、ラット脳の BPA 結合タンパク質が探索され、小胞体シャペロンタンパク質のひとつであるプロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) が同定された。PDI は新生タンパク質やミスフォールドタンパク質のジチオール・ジスルフィドの相互変換を触媒するジスルフィドイソメラーゼ活性を持つ酵素として知られており、タンパク質の品質管理機構において重要な役割を担っている。ミスフォールドタンパク質の蓄積が起こるとされているアルツハイマー病や、パーキンソン病などの神経変性疾患では、PDI のイソメラーゼ活性の活性中心の s-ニトロシル化が起こっており、その活性が阻害されていることが明らかにされているなど、病態における機能にも関心が持たれている。また、発生において重要なホルモンの一つである甲状腺ホルモン (T3) の結合タンパク質としても PDI は知られており、多彩な役割を持つ酵素として注目されている。

このような背景のもと、筆者は BPA の PDI を介した脳神経系への影響を明らかにするための研究を行った。この研究では主として2つの軸を持って進められた。一つ目は、BPA が PDI に結合することによって PDI の酵素活性にどのような影響を与えるかについての生化学的な解析、二つ目は、ラット脳下垂体腫瘍由来 (GH3) 細胞を用いて、PDI による甲状腺ホルモン応答の制御メカニズムの解明を試みた。

BPA が PDI のイソメラーゼ活性を阻害することはすでに明らかにされているので、本研究ではそれをさらに一歩進めて、BPA による活性阻害の分子メカニズムを解明するための研究を行った。まず、BPA の構造のうちどの官能基が活性阻害に必要であるかを調べ、さらに、PDI における、BPA の結合部位及び BPA による活性阻害に重要なドメインとアミノ酸の同定を行い、活性阻害メカニズムを明らかにした。次いで、T3 は甲状腺ホルモン受容体への結合を介して、遺伝子発現制御をしているホルモンであるが、GH3 細胞において PDI を過剰発現させると、T3 により転写活性化を受ける因子の発現が抑制されることがすでに明らかになっているので、PDI による T3 応答制御メカニズムについて詳細な研究を行った。PDI はジスルフィドイソメラーゼ活性だけでなく、T3 結合活性を持つことが知られているが、どちらの活性が T3 応答抑制に働いているのかを明らかにすることが甲状腺ホルモン受容体の活性制御機構の解明にとって重要であったが、PDI の T3 への結合ではなく、PDI が成長ホルモンの遺伝子活性化を行う転写因子のレッドックス状態を変化させることによって転写因子の活性を抑制することを明らかにした。

論文内容の要旨

本学位論文は、一章二節、二章二節、三章一節で構成されている。

第一章では、BPA または Polybrominated diphenyl ethers (PBDE、ポリ臭化ジフェニルエーテル) の誘導体と PDI の触媒活性に対する効果を検証することによって、PDI の触媒活性を阻害する誘導体の化学構造についての新たな知見を得るための研究の結果の報告である。PDI は、いくつかのドメイン構造から成り立っていることが分かっており、それらが協調して新生タンパク質などの折り畳み（フォールディング）を行う。一節では、異なる場所に水酸基を持つ様々な BPA を用い、RNase A を基質とした PDI 活性への阻害を調べた。また二節では、やはり異なる場所に水酸基を持つ PBDE を用いて同様の実験を行った。その結果、BPA や PBDE はベンゼン環の水酸基を介して PDI と結合し、イソメラーゼ活性を阻害していること、また水酸基は 2' 位より 4' 位に結合している化合物のほうがより阻害活性が強いことを見出した。

第二章では、主として BPA による PDI 活性阻害メカニズムを明らかにするために行った BPA の PDI に対して結合する部分の決定に関する研究の結果、さらに PDI の結晶構造解析と PDI の一部のドメインを含むタンパク質フラグメントと T3 または BPA との複合体の結晶解析の中間結果を報告している。これらの研究の結果、BPA による PDI 活性の阻害は、PDI の b' ドメインを介して起こっていることを見出した。BPA は a と b' ドメインに結合するが、阻害は b' ドメインへの結合によって起こること、またこの結合によって b' ドメインの疎水性領域と X リンカー（a' ドメインと b' ドメインをつなぐ領域）の相互作用を阻害することなどを明らかにした。

第三章では、PDI による GH3 細胞株の T3 への応答の抑制機構を調べた。PDI は T3 と結合するが、このことによって直接応答抑制を行っているのではなく、Ref-1 (Redox factor 1) (転写因子や受容体タンパク質のレドックス状態を変化させることによって機能を制御するタンパク質因子) が還元されて活性化することを抑制する (Ref 1 のレドックス状態の制御) ことによって間接的に T3 受容体 (TR) の転写活性を抑制していることを明らかにした。

論文審査結果の要旨

本論文は、PDI と環境化学物質として知られる化合物との結合特異性や細胞内で特異的に作用する標的タンパク質に対する作用解明に関する研究結果について報告したものである。本論文の新規性とこの研究分野に対する重要な寄与は以下のようにまとめられる。

- (1) BPA や PBDE は環境ホルモン (内分泌攪乱化学物質) の一つとしてその作用メカニズムが注目されているが、本論文では BPA や PBDE が標的タンパク質の一つである PDI と結合するメカニズムや強く結合するこれら化合物の構造的な特徴について明らかにした。さらに BPA による PDI 活性阻害メカニズムについて詳細な解析を行い、BPA が PDI に結合するタンパク質ドメインを同定し、BPA がそのドメインに結合することによる立体構造変化についても検討を試みた。これらの研究により環境ホルモンとして知られる BPA の作用機作の一端が明らかにされ、環境毒物学分野の発展に大きく寄与した。
- (2) PDI は、タンパク質の高次構造 (立体構造) を正しく作るための手助けをする酵素であるが、細胞内でのこの活性の役割は新生タンパク質などの高次構造形成のためだけではなく、特定のタンパク質の転写調節にも働いていることを明らかにした。PDI が過剰発現している細胞で T3 の発現が抑制される機構について詳細な実験を行い、PDI が T3 発現に関与する転写因子 Ref-1 のレドックス状態を変化させることによって、間接的に T3 の発現を変化させていることを初めて明らかにした。PDI は、T3

と結合することがすでに分かっており、これによって T3レスポンスが直接変化すると予想されていたが、本研究によってこれが否定されると同時に PDI が転写因子のレドックス モジューラ (redox modulator) として働いている実例を示したことで PDI 関連研究を大きく進展させた。

以上より、本論文が BPA などの内分泌攪乱物質の作用機作を PDI を中心とした細胞内反応の連鎖として生化学的に解明し、PDI による細胞内酸化還元反応と細胞内ターゲットタンパク質・酵素の活性調節の機構の一端を明らかにしたことは高く評価できる。

本論文の内容の一部は、国際誌である J.Biochemistry に 2 編、Chemical Research in Toxicology に 1 編の論文として掲載済みである。他に Mol.Cell.Endocrinol. と Chem.Res.Toxicol. に 2 編の参考論文がある。残りの部分については投稿中または投稿準備中である。

審査委員会は提出された論文の内容について申請者との面接を行い、詳細な質疑応答を行い、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な高度の研究能力とその基礎となる学識を有していると判断した。

以上、審査委員会は本論文の提出者、橋本翔子氏が博士（理学）の学位を授与されるに足る資格を有するものと認める。