

The Study on Physiological Effects of Endocrine Disruptor Bisphenol A on Circadian Locomotor Activity Rhythm in the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*

松尾, 文香

<https://hdl.handle.net/2324/1654657>

出版情報：九州大学, 2015, 博士（理学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



氏 名 : 松尾 文香

論 文 名 : The Study on Physiological Effects of Endocrine Disruptor Bisphenol A on Circadian Locomotor Activity Rhythm in the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*
(ショウジョウバエ歩行活動の概日リズムにおける内分泌攪乱物質・ビスフェノールAの生理学的影響に関する研究)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

現代社会の日常的な生活において我々は、携帯電話、パソコン、CD、食器など多種多様なプラスチック製品を使い、その恩恵に浴している。これらの原料・ポリカーボネート樹脂はビスフェノールA (BPA) を原料として製造されている。BPA はポリカーボネート樹脂から漏出すると、皮膚や口を通して我々の体内に侵入する。実はこうした漏出 BPA が胎児、乳幼児、子供の脳神経系や生殖腺系において、特に発達段階で悪影響を及ぼすことが懸念されている。さらに、マウスやラットに BPA を投与した研究から、卵子や精子数の減少などの生殖線系への影響や、行動異常や多動性症状などの行動への影響、また乳がん、前立腺がんやアルツハイマー病を引き起こすことが示されている。このような BPA の作用については、細胞の核内受容体を介したメカニズムや、遺伝子の活性化状態を決定する DNA メチル化が原因と考えられているが、現在まで、BPA の悪影響における分子レベルでのメカニズム解明には未だ至っていない。

BPA は動物の生殖腺系のみならず、脳神経系にも悪影響をもたらす。特に、脳神経系における概日リズム形成への悪影響は多動性症状に直接に関係していると考えられる。概日リズムは、脳内の分子時計機構であり、約 24 時間周期で変動する。これに BPA が作用し、概日リズムを乱す可能性から、BPA 暴露の概日リズムへの影響解析が強く求められている。そこで、ヒトのモデル生物としてショウジョウバエを取り上げ、歩行活動の概日リズムへの BPA 暴露の影響を詳細に解析することにした。ショウジョウバエは容易に飼育し、また、約 2 週間で一世代を継代でき、しかも、ゲノム解析が完了しており生化学的な実験に適している。本博士論文では、以下のような章立てに従って、研究の経緯および結果を記述した。

第一章では、ビスフェノールA (BPA) の生体への悪影響と生体内での作用メカニズムの究明に関する知見についてまとめ、本研究で取組むショウジョウバエにおける概日リズム形成の分子機構、及び BPA の作用機構解明の意義などを含めて、研究背景について論述した。

第二章では、まずショウジョウバエに BPA を含むエサを与えて継代するという実験系を確立し、ショウジョウバエ専用の歩行活動リズム観察装置により BPA 食餌ハエの歩行活動を記録、解析した。その結果、BPA 食餌ハエでは、BPA を与えていない野生型のハエに比べて活動量が増加し、概日リズムが無くなるなど活動異常のハエが現れることが判明した。さらに活動量の高いハエ同士を選択的に交配させる選択的交配継代法により、野生型に比べて活動量が約 3 倍に増加した“多動

性症状”のハエを作出することに成功した。さらに、活動リズムの詳細な分別解析を実施し、二峰性活動リズムを保持した多動性症状バエと、恒暗条件で恒常的に多動性となる多動性症状バエに分類して選択的交配継代することに成功した。後者はさらに、「明期多動性症状ハエ」「明期暗期多動性症状ハエ」「暗期多動性症状ハエ」に分別することに成功した。一方で、BPA 食餌により活動量が低下した“低活動性症状”ハエの抽出にも成就した。このような BPA 食餌により引き起こされた活動の概日リズム異常は、活動リズムを司る分子時計機構、つまり時計遺伝子に BPA が影響を及ぼしたためであると考え、一連の時計遺伝子について構造異常がないか？ 調べた。*period* 遺伝子、及びそのタンパク質・PERIOD は概日リズム形成の最も主要な役割を担っているが、PERIOD タンパク質のもつ Thr-Gly リピート領域において、野生型ハエではそのリピート数が 20 回と 23 回の 2 種類のアイソフォームが存在し、BPA 食餌した多動性症状のいずれの種類のハエにも 20 回リピートのみが、低活動性症状ハエには 23 回リピートのみが存在することが初めて明らかとなった。このことは、BPA 食餌、及び選択的交配継代により 20 回リピートをもつ多動性症状ハエ、及び 23 回リピートをもつ低活動性症状ハエがそれぞれに抽出されたと考えられた。このように、時計遺伝子 *period* の Thr-Gly リピート領域における構造差違とショウジョウバエの歩行活動との関与を明らかにした。Thr-Gly リピート構造の機能的な役割については未解明であるが、このように時計タンパク質構造と機能の相関が究明されたことは初めてのことである。

第三章では、BPA 食餌による時計遺伝子への影響をさらに詳細に調べるため、塩基配列と遺伝子の発現量に着目して解析し、野生型ハエと多動性症状ハエで比較した。その結果、中枢神経で発振された概日リズムを他の細胞に伝達する神経ペプチドの一種である pigment-dispersing factor (PDF) の mRNA において、3' UTR の長さが異なる 2 種のアイソフォームを同定した。*pdf* mRNA の全発現量、及びアイソフォーム毎の発現量を解析したところ、BPA 食餌多動性ハエでは 3' UTR が短いアイソフォームの発現量が減少したことにより *pdf* mRNA 全体量が減少しており、さらに免疫組織学的解析すると、PDF ペプチドが特定の神経系から消失し、発現が大きく減少することが判明した。これは、多動性症状に *pdf* mRNA 遺伝子、PDF ペプチドが直接的に関与していること実証するものであり、BPA の低用量効果の分子機構の一端が初めて解明された。さらに、*pdf* mRNA には 9 カ所もの一塩基多型 (SNP) が存在し、各 SNP での塩基変異率が野生型ハエと多動性症状ハエ、そして低活動性ハエで異なっていることが判明した。この変異率に差違が存在する事実より、microRNA による転写後発現調節の存在が考えられた。*pdf* mRNA に結合する可能性のある既知の microRNA が存在することから、microRNA による発現調節や転写機構における発現調節などを詳細に検討する必要性が明らかとなった。

第四章では、BPA 食餌による遺伝子 DNA 転写機構への影響を調べるために、転写因子である核内受容体とその DNA メチル化に着目し、解析した。以前の研究で、ヒト核内受容体の一種であるエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) に BPA が非常に強く結合することが分かっていることから、ERR γ のショウジョウバエホモログである ERR を取り上げた。しかし、BPA は ERR には結合せず、ERR の転写活性は BPA 暴露により変化しないことが分かった。一方、ショウジョウバエの培養細胞を用い、BPA を暴露したところ DNA メチル化量が増加することが判明し、BPA は DNA メチル化機構を介して遺伝子発現を攪乱している可能性が判明した。

本研究において、BPA 食餌によりショウジョウバエが多動性症状、あるいは僅少ながら低活動性症状を示すという全く新規な事象を発見し、さらに時計遺伝子に関する網羅的なスプライシング、塩基配列、発現量の解析から、これら歩行活動の異常性症状の原因と考えられる遺伝子異常を明らかにすることに初めて成就した。