

アポトーシスを引き起こす環境汚染化学物質 ：環境アポトジェン

池 内 俊 彦* 下 家 浩 二**

Apoptosis inducing chemicals in the environment

Toshihiko IKEUCHI, Koji SHIMOKE

1. はじめに

現代の生命科学のキーワードは、タンパク質と遺伝子です。タンパク質は生命現象の直接の担い手であり、遺伝子（その本体はDNA）はそのタンパク質の設計図になっています。タンパク質といいましても、ヒトでは約3－4万種類あります。多種類のタンパク質が多様な生命現象にかかわっています。一方、遺伝子には、タンパク質を作るための設計図が書き込まれています。従いまして、ヒトの遺伝子は、約3－4万種類あります。

タンパク質は、ネックレスの様な物質です（図1）。ネックレスといいましても、首から外した状態の、両端（りょうはし）があるものです。ネックレスの玉にあたるのがアミノ酸で、アミノ酸は20種類あります。1個の玉に20種類の可能性があり、玉が40個以上1000個位までつながったネックレスですので、タンパク質が多種類あるわけです。しかし、1種類のタンパク質は、それぞれ固有のアミノ酸の並びと働きを持っています。それは、遺伝子に指令されているからです。

図2は、インスリンと呼ばれるタンパク質（それはホルモンとして働いています）のアミノ酸の並び方を示しています。これは、2本のネックレスから成っています。ネックレスの橋渡しであるS-S結合で結ばれています。このタンパク質は、血糖値を下げるとい

う大切な働きを持っています。そして、糖尿病の治療にも使われています。一方で、インスリン遺伝子がありますが、インスリン遺伝子が、インスリンのアミノ酸の並び方を指令しています。インスリン遺伝子を含めまして、遺伝子は、どこにあるのでしょうか。

図3は、細胞の図です。細胞膜に囲まれて細胞質があり、細胞の中心部に核があります。タンパク質は細胞のいたる所にありますが、遺伝子は核の中にあるま

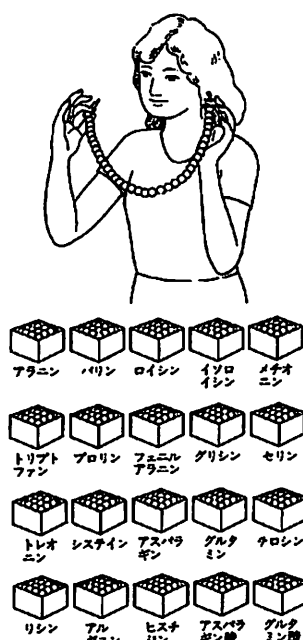


図1 タンパク質はネックレスの様な物質
池内俊彦著「タンパク質の生命科学 ポスト・ゲノム時代の主役」中公新書、中央公論新社、2001年より

原稿受付 平成20年8月7日

*化学生命工学部 生命・生物工学科 教授

**化学生命工学部 生命・生物工学科 准教授

す。遺伝子の本体であります DNA（デオキシリボ核酸）の構造を見てみましょう（図4）。遺伝子もまた、ネックレスの様な物質です。こちらのネックレスの玉は、ヌクレオチドといいます。違う部分は塩基という部分でして、この塩基が4種類あります。この4種類の玉の並びがタンパク質の設計図になっています。

遺伝子ネックレスの玉の並び方（これを遺伝情報といいます）が、タンパク質ネックレスの玉の並び方を指令しています。図5は、その仕組みを分かりやすく

示したものです。遺伝子ネックレスの玉3個の並び方が、タンパク質ネックレスの玉の種類を指令しています。この過程は、細胞の中で起こっていますが、それをまとめたのが、図6です。核の中で、DNAの遺伝情報が mRNA（メッセンジャー RNA）の遺伝情報に写されます（これを転写といいます）。この mRNA が細胞質に出て行き、そこでリボソームと呼ばれるるまの様な形の装置によって、mRNA の遺伝情報が3個1組で読まれて、アミノ酸が決められ、そのアミ

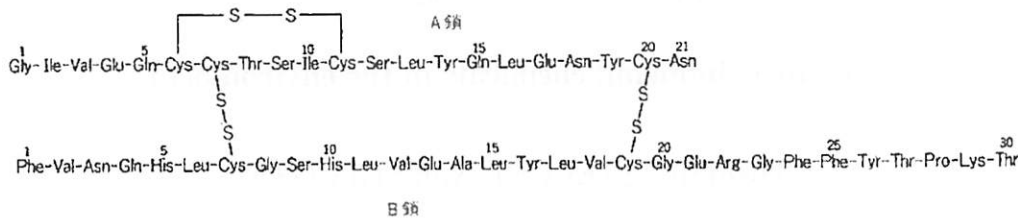


図2 インスリンのアミノ酸配列

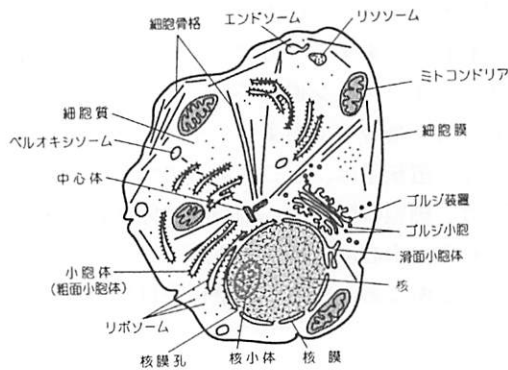


図3 細胞の構造

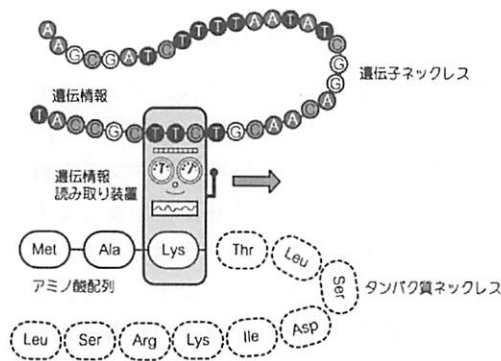


図5 遺伝子はタンパク質の設計図

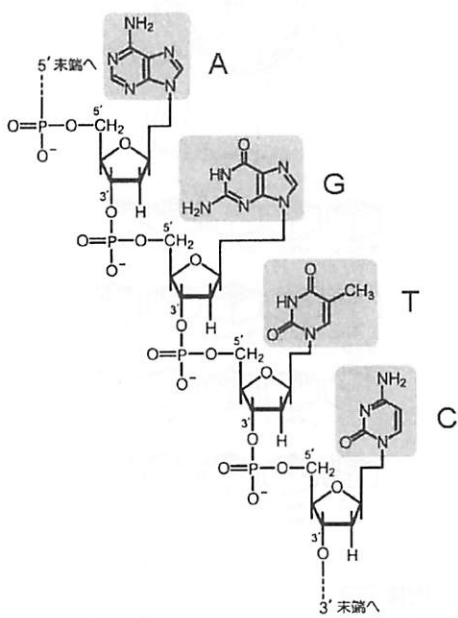


図4 遺伝子（DNA）もネックレスの様な物質

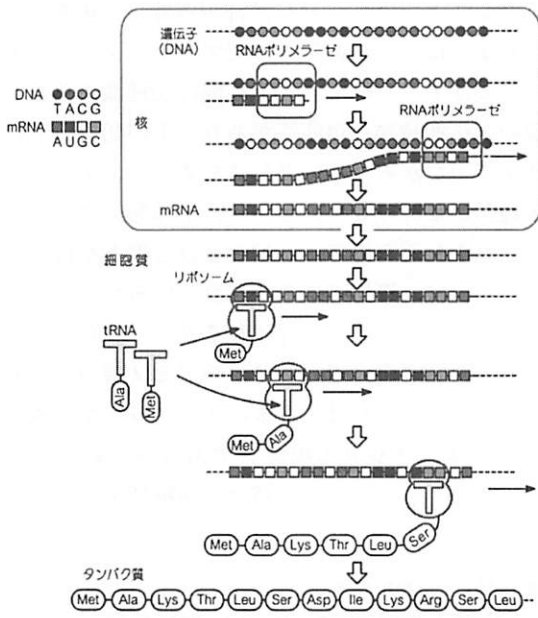


図6 転写と翻訳

ノ酸がつながってタンパク質ができます（これを翻訳またはタンパク質合成といいます）。

2. 小胞体ストレスとアポトーシスについて

細胞の図（図3）に戻りますが、細胞質に小胞体という細胞小器官があります。この小胞体には、滑面小胞体と粗面小胞体の2種類があります。粗面は表面がざらざらの意味ですが、このざらざらは、リボソームが付いているからです。この小胞体に付いているリボソームでは、分泌タンパク質や膜タンパク質の合成が行われています。図7は、その仕組みを示したものです。合成されたタンパク質は、小胞体内（内腔）に入り、そこで、タンパク質の品質管理が行われます。タンパク質の品質管理では、正しく折り畳むことや翻訳後修飾という飾りを付ける作業が行われます。

さて、遺伝的変異タンパク質、薬剤、ウイルス、虚血、還元状態、重金属等により、小胞体内に折り畳み不良タンパク質（unfolded protein）が蓄積しますと、小胞体ストレスが起こります¹⁾。細胞に対して小胞体ストレスが負荷されますと、正常な細胞では、このストレスを回避するため、(unfolded protein response (UPR) および endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD) とよばれる小胞体特異的な) ストレス応答機構が働きます。このストレス応答機構でも回避できない程に過度な小胞体ストレスが負荷されますと、アポトーシスが引き起こされます。これを小胞体ストレス型アポトーシスと呼んでいます。

図8は、その応答機構を示していますが、折り畳み不良タンパク質の蓄積で小胞体ストレスがかかります。それによって、それら折り畳み不良タンパク質を正しく折り畳むシャペロン分子である GRP78 の発現誘導（つまり、このタンパク質の合成促進）が起こります。また、小胞体膜上にて活性化されたカスパーゼ-12 (caspase-12) を介して、アポトーシスが引き起こされます。

アポトーシスとは、生物が元々持っている細胞自殺機構（プログラム細胞死ともいう）であり、生物の発生過程や恒常性の維持に必須な細胞自殺機構であります。その機構で中心的な役割を果たしているのが、カスパーゼ (caspase) と呼ばれる一群のタンパク質分解酵素です。アポトーシスには、通常型アポトーシスと小胞体ストレス型アポトーシスの2種類がありますが、後者には、カスパーゼ-12 がかわっています。

小胞体に過度なストレスが負荷されますと、カスパーゼ-12 が活性化され、その後カスパーゼ連鎖反応が進み、アポトーシスが起こります。アポトーシスの最終段階で、核の凝集が起こります（図9）。

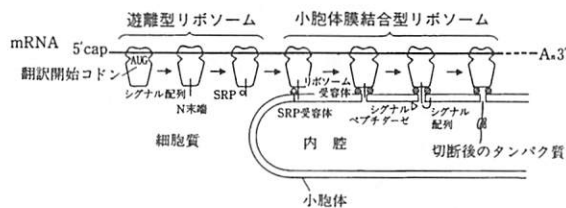


図7 小胞体膜結合型リボソームによるタンパク質の合成

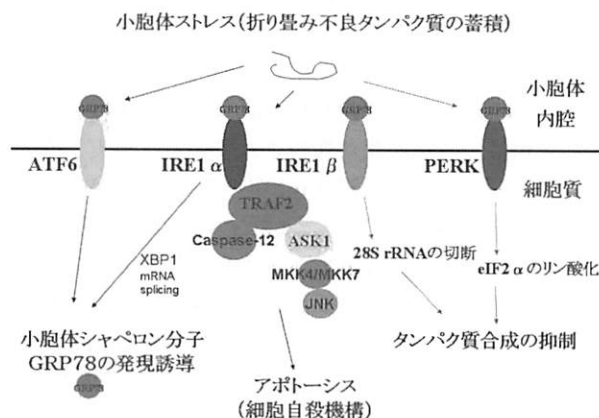


図8 小胞体ストレスに対する応答機構

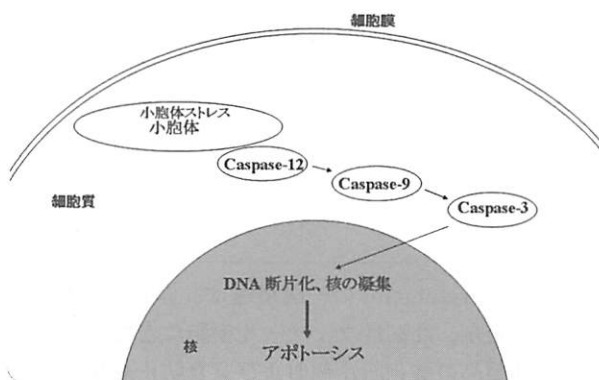


図9 小胞体ストレス型アポトーシスの機構

3. 環境アポトーゼン

現在まで環境汚染で問題とされています環境ホルモン（内分泌攪乱物質）は、その名の通り、性ホルモン攪乱作用を介した生殖細胞に対する影響で注目されてきた経緯があります²⁾。表1にあります様に、生殖細胞に対する影響の報告がたくさんあります³⁻¹⁷⁾。図10は、環境ホルモンの構造式です。表2は、これらの環境ホルモンの用途、生産量をまとめたものです。

しかし、我々は、これらの環境ホルモンには、もう1つの作用があります、アポトーシスを誘導する作用があることを見出しました¹⁸⁾。環境中に広く存在する

表1 環境ホルモンの性ホルモン攪乱作用を介した生殖細胞に対する影響

- ・ マウスなどを対象とした初期研究においては、精子数の減少、不妊症、精巣の下降不全や発育不全などの生殖器異常が報告されている。
- ・ 野生生物への影響としては、米国フロリダのワニやいくつかの海洋無脊椎動物などに対して、環境中の化学物質が生殖機能に障害性の影響を与えているとの報告がなされている。例えば、中央フロリダのアポプカ湖におけるワニのペニスの矮小化、卵の孵化率の低下などと湖水中の化学物質の流出の関連が指摘されている。
- ・ 米国五大湖のセグロカモメの性比の変化は、環境中の DDT などのエストロゲン様物質が原因となっているとの仮説もある。
- ・ 我が国では、巻き貝のイボニシやレイシガイで、雌に対する雄の性徴（インボセックス）が出現しており、船底防汚塗料として用いられていたトリブチルスズ（TBT）の暴露により、インボセックスが誘導されたとの報告がある。
- ・ 子宮がん、子宮内膜症、乳がん、精子数の減少、前立腺がん、精巣がん、尿道下裂などのエストロゲン作用によるがん化が報告されている。事実、成人男女25人の血液中のビスフェノールAの濃度を調べたところ、女性では血清1 ml 中の濃度が平均0.64ng だったのに対し、男性ではその2倍以上にあたる平均1.49 ng と高濃度であり、女性でも、月経障害などを引き起こしている患者（16人）では平均1.04ng と、平均女性よりも高濃度であることが報告されている。
- ・ 内分泌系のみならず、脳・神経系、免疫系などの高次系にも影響をおよぼす可能性が指摘されている。例えば、脳・神経系におよぼす影響が懸念されている事例で、広く知られているのが、米国五大湖で捕れたサケなどを食べた女性から生まれた子供たちの調査である。五大湖周辺では DDT などの農薬類、PCB 類、ダイオキシン類をはじめ多くの化学物質による汚染が進み、それらが食物連鎖を通じ、サケなどの魚類の脂肪に蓄積している。これらの魚を食べた女性の血中や母乳中の PCB 類濃度は魚を食べない女性に比べて高濃度であり、これらの血中 PCB 量が高い母親から生まれた子供の4歳のときの体重は正常より軽く、行動テストでの点数が低かった。胎児期と幼児期における神経発達が PCB によってどのように阻害されるかは科学的に不明な点が多いが、PCB が甲状腺ホルモンの攪乱作用により、影響を与えることを裏付ける証拠が見いだされている。

表2 環境ホルモンの用途、生産量

- ・ p-Nonylphenol の一次用途は、界面活性剤（アニオンおよび非イオン界面活性剤）、エチルセルロースの安定剤、油性フェノール樹脂などで、二次用途は、洗剤、油性ワニス、ゴム助剤および加硫促進剤、石油製品の酸化防止剤および腐食防止剤などである。1995年の生産量は20,000 t（推定）であった。
- ・ Bisphenol A は、ポリカーボネート樹脂、エポキシ樹脂の原料である。1996年の生産量は250,143 t、輸入量は45,536 t であった。
- ・ Benomyl は、カーバメイト系殺菌剤（ウドンコ病、ソウカ病に適用）、防カビ剤、抗ダニ剤、抗寄生虫剤で、1971年に農薬登録された。1994年の生産量は305 t（水和剤）で、輸入量は352 t（製剤）であった。
- ・ Styrene, monomer は、重合させることにより、polymer（樹脂）製造に用いられている。1995年の生産量は2,939,111 t であった。
- ・ Benzo(a)pyrene は、非意図的に生成される化学物質で、コールタール処理、石油精製、コークス製造、灯油処理、発電などの製造過程からの発生に加え、たばこや燃料の燃焼など人間生活からも発生することが知られている。
- ・ Fenvalerate は、1983年に農薬登録された合成ピレスロイド系殺虫剤（野菜のアブラムシ、アオムシ、ヨトウムシに適用）である。1994年度の農薬生産量は、原体172 t、輸入原体105kL、製剤71 t であった。
- ・ Bis(2-ethylhexyl)phtalete は、プラスチック可塑剤であり、塩化ビニル樹脂に適し、シート、レザー、電線被覆剤、農ビ、ペーストなどに使用される。1995年の生産量は297,681 t、輸出15,080 t、輸入3,437 t であった。

環境汚染化学物質の内、ヒトを含む生物の細胞にアポトーシスを引き起こし悪影響をもたらす可能性のある物質を、我々は環境アポトジェンと命名しました。図11のグラフの縦軸は生存細胞数でありまして、*p*-nonylphenol、bisphenol A、benomyl によって、用量依存的にアポトーシス（細胞死）が引き起こされます。つまり、*p*-nonylphenol、bisphenol A、benomyl は環境アポトジェンであります。一方、styrene monomer、benzo (a) pyrene、fenvalerate、DOP は、環境アポトジェンではありません（図12）。

p-nonylphenol、bisphenol A、benomyl は、アポトーシスの指標であります核の凝集を引き起こします（図13）。また、*p*-nonylphenol により、カスパーゼ-12の活性化、シャペロン分子 GRP78 の発現誘導（合成促進）が見られます（図14）。bisphenol A、benomyl も同様です。従いまして、*p*-nonylphenol、bisphenol A、benomyl は、小胞体ストレス型アポトーシスを引き起こす環境アポトジェンです。*p*-nonylphenol、bisphenol A、benomyl は環境アポトジェンであります。styrene monomer、benzo(a)pyrene、fenvalerate、bis (2-ethylhexyl) phtalate (DOP) はそうではありません（図10）。図15は、環境アポトジェンの作用機構をまとめたものです。

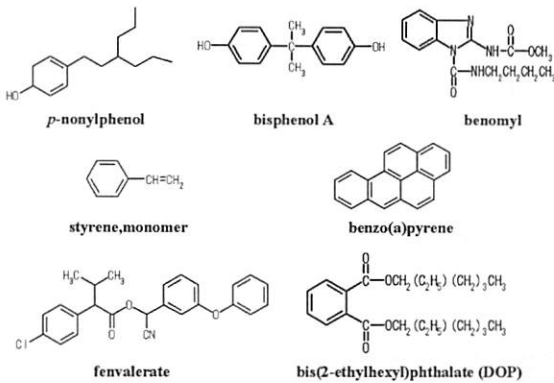


図10 環境ホルモン（内分泌攪乱物質）の構造式
p-nonylphenol、bisphenol A、benomyl は、環境アポトジェンです。

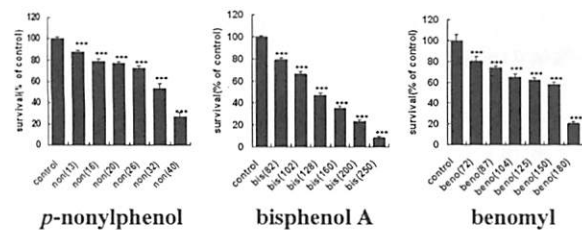


図11 各種環境ホルモンによるアポトーシス（その1）

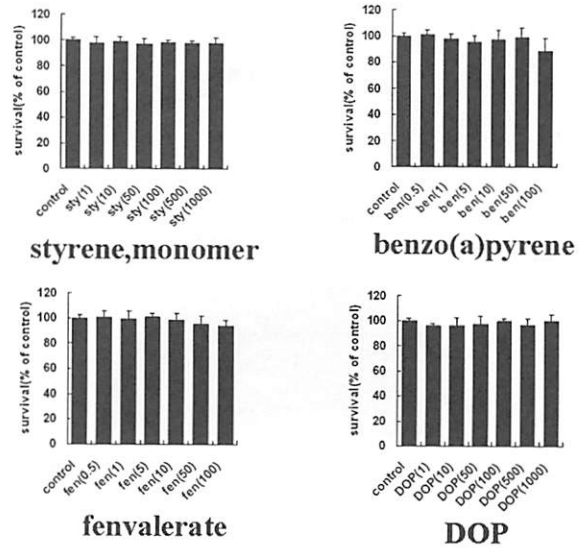


図12 各種環境ホルモンによるアポトーシス（その2）

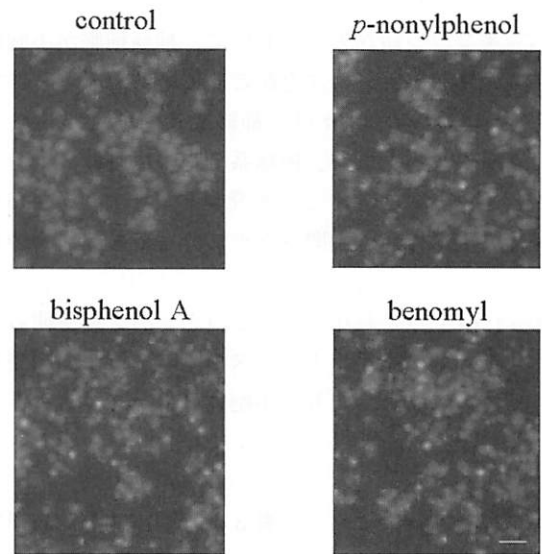


図13 Hoechst33258染色での核の凝集像

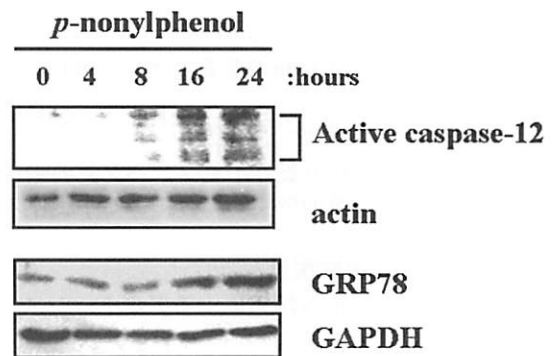


図14 *p*-nonylphenol による小胞体ストレス型アポトーシス

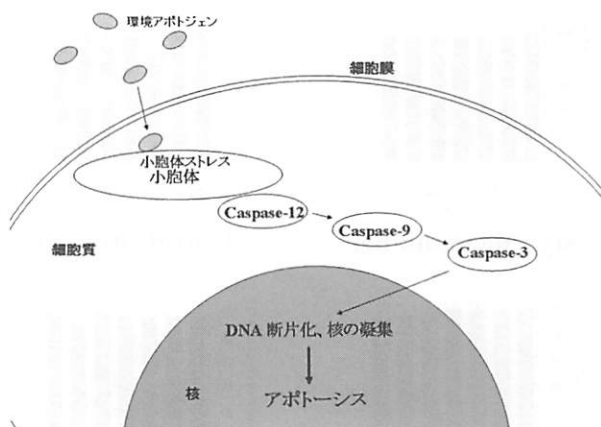


図15 環境アポトーゼンによる小胞体ストレス型アポトーシスの機構

4. 神経変性疾患とのかかわり

近年では、様々な神経変性疾患（アルツハイマー病やパーキンソン病など）において、神経細胞が小胞体ストレス型アポトーシスを起こしていると考えられています¹⁹⁾（表3）。我々は、神経成長因子（NGF）と呼ばれるタンパク質が、神経系細胞の小胞体ストレス型アポトーシスを防ぐことを発見しました²⁰⁾（図16）。神経成長因子は、細胞間シグナル分子である局所仲介物質（local mediator）の仲間の成長因子（growth factor）の1つであります。このタンパク質を使った小胞体ストレス型アポトーシスの予防療法の開発を目指しています。つまり、小胞体ストレス型アポト

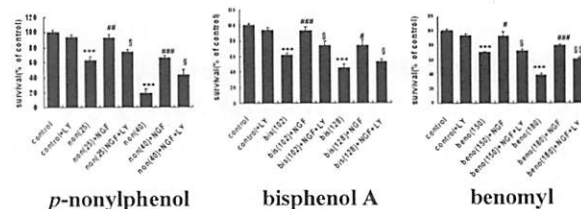


図16 NGFによる小胞体ストレス型アポトーシスの防御

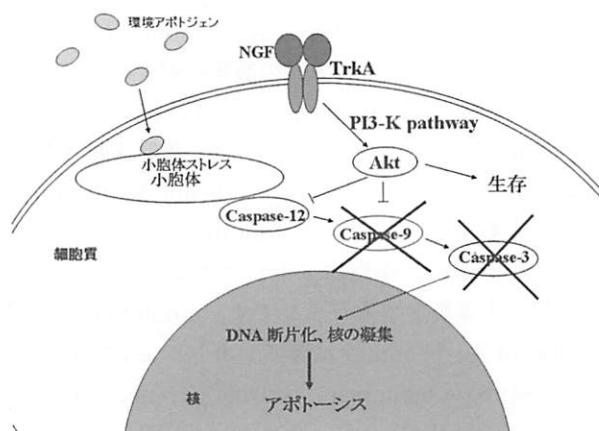


図17 NGFによる小胞体ストレス型アポトーシスの防御機構

シスの予防治療法開発の手がかりを得たと考えています。図17は、神経成長因子の作用機構をまとめたものです。

表3 小胞体ストレス型アポトーシスと病理との関わり例

アルツハイマー病

Aβの産生に関わるPresenilin-1(PS-1)の変異体による小胞体ストレス応答機構の阻害とAβの産生亢進

パーキンソン病

Parkinの基質であるPael receptorの小胞体内腔での蓄積

ポリグルタミン病

折り畳み不良タンパク質の輸送タンパク質であるp97/VCPとポリグルタミン凝集塊の特異的結合による小胞体ストレス応答機構の破綻

虚血性疾患

血流障害によるアポトーシス（神経疾患、心疾患）

I型糖尿病

ランゲルハンス島β細胞が、何らかの原因によって小胞体ストレスを受け変性、脱落

5. おわりに

我々は、環境中に広く存在する環境汚染化学物質の内、ヒトを含む生物の細胞にアポトーシスを引き起こし悪影響をもたらす可能性のある物質：環境アポトジェンに注目しています。これら環境アポトジェンは、細胞に小胞体ストレスと呼ばれる負荷を与え、その結果、細胞のアポトーシスと呼ばれる自殺機構を働かせ、細胞を死滅させます。我々は、*p*-nonylphenol、bisphenol A、benomyl 等が、環境アポトジェンであることを見いだしました。現在、本学科において、微生物による環境アポトジェン分解を解析している研究室や環境中の微量分析や体内動態解析を行っている研究室等と共同で、大型プロジェクトを立案しています。そこでは、環境アポトジェンのスクリーニング、細胞に対する作用機構、飲料水や食品中あるいは土壌や河川の微量質量分析による環境内動態、体内の代謝産物や分解産物の同定による動物や植物体内動態、微生物や植物による分解法および化学的除去による除去法の開発、細胞のアポトーシス防御機構の開発等を通して、環境アポトジェンを含む環境汚染化学物質を総合的に研究し、それにより環境保全の方策を探ると同時に、人類の福祉に貢献することを目的としています。

本研究の一部は、著者の1人の池内俊彦が、平成20年度関西大学重点領域研究助成金において研究費を受けたものの成果として公表するものです。ここに謝意を表します。

参考文献

- 1) R.J. Kaufman, Orchestrating the unfolded protein response in health and disease, *J. Clin. Invest.* 110 (2002) 1389-1398.
- 2) R. Sharpe, N. Skakkebaek, Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341 (1993) 1392-1395.
- 3) A.R. Woodward et al., Low clutch viability of American alligators on Lake Apopka, Fla. *Sci.* 56 (1993) 52-63.
- 4) D.M. Fry et al., Sex ratio skew and breeding patterns of gulls: demographic and toxicological considerations, *Stud. Avian Biol.* 10 (1987) 26-43.
- 5) T. Horiguchi et al., Imposed sex and organotin compounds in *Thais clavigera* and *T. bronni* in Japan, *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 74 (1994) 651-669.
- 6) L. Bernstein et al., *Cancer epidemiology and prevention*. Second edition. pp.463-464, Oxford University Press, Oxford, 1996
- 7) A. Mayani et al., Dioxin concentrations in women with endometriosis, *Human Reprod.* 12 (1997) 373-375.
- 8) L. Bernstein et al., *Cancer epidemiology and prevention*. Second edition. pp.465-470, Oxford University Press, Oxford, 1996
- 9) B. Fisher et al., Tamoxifen for prevention of breast cancer: Report of the national surgical adjuvant breast and bowel project P-1 study, *J. Natl. Cancer Inst.* 90 (1998) 1371-1388.
- 10) C. Nagata et al., Decreased serum estradiol concentration associated with high dietary intake of soy products in premenopausal Japanese women, *Nutrition and Cancer*. 29(3) (1997) 228-233.
- 11) R. Sharpe et al., Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*, 341 (1993) 1392-1395.
- 12) E. Carlsen et al., Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years, *B. M. J.*, 305 (1992) 609-613.
- 13) K. van Waelegheem et al., Deterioration of sperm quality in young Belgian men during recent decades, *Human Reprod.* 9 (1994) 73.
- 14) S. Irvine et al., Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years, *B. M. J.*, 312 (1996) 467-471.
- 15) J. Ginsburg et al., Residence in the London area and sperm density., *Lancet* 343 (1994) 230.
- 16) D. Schottenfeld et al., *Cancer epidemiology and prevention*. Second edition. pp.1207-1219, Oxford University Press, Oxford, 1996
- 17) J.L. Jacobson, S.W. Jacobson, Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero, *New Engl. J. Med.*, 335 (1996) 783-789.
- 18) T. Kusunoki et al., *p*-Nonylphenol induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in neuronally differentiated PC12 cells, *Neurosci. Lett.* 431 (2008) 256-261.
- 19) R.V. Rao, D.E. Bredesen, Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegen-

- eration, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 16 (2004) 653-662.
- 20) K. Shimoke et al., Nerve growth factor attenuates endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis via suppression of caspase-12 activity, *J. Biochem.* 135 (2004) 439-446.