

化学物質の遺伝子及び遺伝子発現への影響

植田 康次

Effect of Environmental Chemicals on Genes and the Expression

Koji UEDA

Faculty of Pharmacy, Meijo University, 150 Yagotoyama, Tempaku-ku, Nagoya 468-8503, Japan

(Received August 7, 2009)

Chemicals act on biological molecules and affect their functions. DNA is one of the most important targets, damaging of which could lead to diverse diseases including cancer. The mode of action of chemicals to DNA contains chemical reaction and protein factor-mediated modulation of the function. In this review, these actions are described in view of effects of chemicals on DNA. First, oxidative damage of DNA is described in several cases of chemicals focusing on its mechanisms involving metals such as copper. We have demonstrated: DNA binding of copper ions prior to reduction-oxidation reaction is crucial for the damaging, probably due to the proximal attack of reactive oxygen species; reduction of the bound copper induces a conformational change of DNA strand through rearrangement of copper-coordination geometry; RNA, another nucleic acid, is more liable to oxidative damage than DNA. Impact of RNA damage on oxidative stress-related diseases is discussed. Second, a group of chemicals called endocrine disruptors is described. Phthalate esters are ubiquitous endocrine disruptors of which mechanisms are still elusive. Here, we present our research performed for elucidation of the active metabolite and molecular target. Novel candidates of active metabolite are suggested. Finally, toxicological activity dynamics are described, showing several chemicals exert toxic potential by structural alteration in the environment, metabolism, or both. These imply gene-environment interactions that would underlie various diseases induced by environmental chemicals.

Key words—DNA damage; RNA damage; endocrine disruption; oxidative stress; metal toxicity; gene-environment interaction

1. はじめに

化学物質の中には、私たちの身体に予期しない有害作用を及ぼすものがある。遺伝子すなわち DNA は、こうした化学物質の作用を受け様々な疾患を引き起こす標的分子として重要である。本稿では、DNA への作用を中心に化学物質の生体影響に関するわれわれの研究を紹介しながら、核酸塩基の酸化損傷などの化学的変化及び転写因子を介した遺伝子発現の変動をまとめて「化学物質の遺伝子への影響」として論述する (Fig. 1)。

発がん性化学物質の多くは DNA に結合し付加体を形成するとされているが、金属との相互作用で発生する活性酸素種による損傷作用も無視できない。

これまでに明らかにした酸化的 DNA 損傷性化学物質の事例を基に、それらの分子機構の詳細について考察する。DNA 損傷の影響は、転写・翻訳などの遺伝子発現を含む DNA を起点とした様々な生体反応に及ぶ。われわれは、遺伝子発現の中心分子である‘もう一つの核酸’ RNA にも注目し、その損傷感受性や生体影響について検討している。

内分泌攪乱化学物質と呼ばれる一群の化学物質には、核内受容体への結合を介して遺伝子発現を変動させる作用がある。当初問題とされたのは、生殖系への影響が種の存続に係わるという点であるが、実際の作用点は神経系なども含め多岐にわたる。いずれにしろ、遺伝子発現制御の上流域を占める核内受容体への作用はシステム全体に重篤な影響を及ぼす可能性が危惧されるが、活性発現メカニズムの全貌が明らかになっていない物質も多い。代表的な内分泌攪乱化学物質の 1 つであるフタル酸エステルについて得られた知見を述べる。

名城大学薬学部 (〒468-8503 名古屋市天白区八事山 150)

e-mail: cozy@ccmfs.meijo-u.ac.jp

本総説は、平成 20 年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

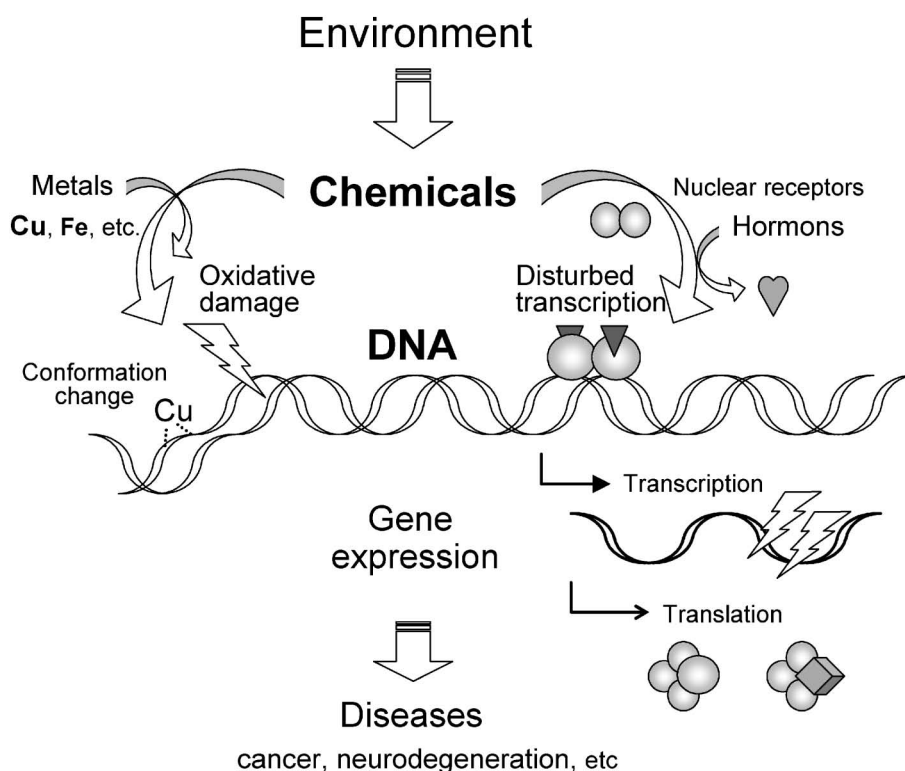


Fig. 1. Effects of Environmental Chemicals on Nucleic Acids and Gene Expression

Two actions toward DNA are indicated; metal-catalyzed oxidative and/or conformational damage and transcription disturbance *via* nuclear receptors. These actions on the structure and function of DNA disrupt regulation of gene expression, leading to various diseases.

化学物質の構造は環境との相互作用によって時々刻々と変わっていく。このとき、構造の変化に伴い新しい活性を獲得することがある。こうした潜在的な活性のうち、特に遺伝子への作用を示す身近な化学物質の事例を示す。

2. 遺伝子の酸化損傷と発現への影響：遺伝子損傷化学物質

発がん性が知られている化学物質の多くは DNA 塩基への結合性を有しており、この付加体修飾塩基が正しく修復されない場合、変異として固定される。一方、塩基の酸化修飾による変異導入も知られている。酸化グアニンは、シトシンだけでなくアデニンとも塩基対を形成できるため、修復・複製の際にチミンへと変異してしまうことがある。¹⁾ これらの酸化的 DNA 損傷は、付加体形成と並ぶ化学発がん作用機序の 1 つになっていると考えられる。ある種の還元性を持つ化学物質は、自動酸化に伴い活性酸素種を発生し塩基の酸化や糖・リン酸鎖の切断を引き起こす。発がん性を示す化学物質のいくらかがこの機序により作用していることを示唆する証拠を得ている。

酸化的 DNA 損傷の分子機構においては、化学物質と金属の間の酸化還元を始めとする相互作用が重要である。遷移金属（還元型）と過酸化水素との反応で発生するヒドロキシルラジカルは非常に強力な DNA 分子のあらゆる部位を攻撃し得る。ところが、銅を過酸化水素と共存させると、連続して配列するグアニンが特異的に酸化損傷される。²⁾ この理由として銅イオンの連続グアニン塩基への親和性の高さが分子軌道計算や特殊な配列の DNA の X 線構造解析により示唆されていたが、生化学的な実験による証明はなかった。^{3,4)} われわれは、生理的条件下における銅イオンの連続グアニン部位選択的な DNA 結合を、制限酵素を用いて実証した。⁵⁾ また、



植田康次

名城大学薬学部衛生化学研究室（小嶋伸夫教授）助教。名古屋大学・饗場弘二研究室（現 鈴鹿医療科学大学）にて、異常な翻訳と mRNA 代謝制御の研究で博士号取得（理学、2002 年）。同年より現所属。基礎生物学から環境衛生化学に視野を広げ、「環境（化学物質）と遺伝子との相互作用」をキーワードにテーマを模索中。

DNA に結合した二価の銅イオンが化学物質との反応で一価に還元される際に DNA 鎖の立体構造が変化することも見い出している。⁵⁾ DNA の塩基間 (あるいは塩基—リン酸基間) 距離が銅錯体の配位構造の転位により変化し、らせん構造全体に歪みが生じたためと考えられる。このような錯体形成による DNA 立体構造の変化は、金属の遺伝毒性の作用様式の 1 つとして重要な役割を果たしていると思われる。

核酸の酸化的あるいは構造的な損傷は、DNA/RNA を起点とする様々な反応に影響すると考えられる。われわれはその一端を *in vitro* 転写・翻訳システムを利用して解明することを試みた。この系では、転写と翻訳の間に損傷反応を挿入することで DNA と RNA を区別しつつ定量的に損傷し、それぞれの遺伝子発現過程 (転写, 翻訳) への影響を個別に評価することができる。これらの実験において、RNA は DNA よりはるかに高い酸化ストレス脆弱性を示し、mRNA 損傷に起因するタンパク質の発現及び活性の低下が観察された。アルツハイマー病やパーキンソン病あるいは統合失調症などの神経疾患には、遺伝的要因に加え無数の環境因子が影響するといわれている。酸化ストレスにより多様なタンパク質が酸化損傷を受けるが、⁶⁾ 疾患との直接的な関連性が明らかな標的タンパク質は特定されていない。^{7,8)} ここで、RNA が酸化ストレス関連疾患の標的分子となっているとは考えられないだろうか? 上記の神経疾患の患者脳内に酸化 RNA が多いという報告や、^{9,10)} 各疾患に特徴的なタンパク質の凝集を伴う異常タンパク質の蓄積が発症に関与するとする現在の主要な病因説は、¹¹⁾ 酸化ストレスが RNA 損傷を介して異常な翻訳を引き起こすというシナリオと矛盾しない。

3. 核内受容体を介した遺伝子発現の攪乱: 内分泌攪乱化学物質

植物由来の化合物群は非常に多様性に富み、各種受容体に作用する物質を探索する際の化合物ライブラリーとして有用である。マメ科植物を始め様々な植物から抽出・構造決定された化合物についてエストロゲン受容体 (ER) などの核内受容体への作用活性をスクリーニングしたところ、陽性対照として用いた 4-ヒドロキシタモキシフェンに匹敵する高い活性を示す化合物が見い出された。^{12,13)} ER への

結合親和性を示す化合物に共通する構造の 1 つはフェノール性の水酸基であるが、ER に結合した化合物がアゴニストとアンタゴニストのどちらの作用を示すかは周辺の構造によって変わってくる。一般に、フェノール性水酸基からやや離れた位置に複数の疎水性基を有するものが高い結合親和性を示すが、その疎水基がプレニル基かゲラニル基かによって活性の有無あるいはアゴニスト・アンタゴニストが変化したことは、ER リガンドのデザインの可塑性と難しさを示している。

プラスチック可塑剤フタル酸エステルは腸管内加水分解によりエステルアルキル基を失いモノエステル体となるが、その際、反応周辺にアルコールが存在するとエステル交換反応が起き得る。これによって生じる非対称アルキル体の一連の組み合わせの誘導体を合成し ER 作用活性について調べたところ、ER 結合には両方のアルキルの炭素数がともに大きい方が高い活性を示したが、転写活性化には片方のアルキルの炭素数が 3 以下である必要があった。¹⁴⁾ この結果は従来の対称アルキル体がジプロピル体で最も高い活性を示すことと符合する。またこの研究は、内分泌攪乱物質を、その構造展開により標的受容体リガンドの構造条件探索に利用できることを示している。

フタル酸エステルの通常の代謝物には ER への親和性がほとんどなく、¹⁵⁾ 一般に直接的な女性ホルモン作用の可能性は否定されている。また、フタル酸エステルは精巣毒性などの抗男性ホルモン作用を示すが、アンドロゲン受容体には作用しない。¹⁶⁾ ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) の制御下にあるコレステロール代謝酵素群の発現に作用してアンドロゲン合成を攪乱すると考えられているが、¹⁷⁾ 精巣毒性の機序の詳細は明らかになっていない。フタル酸エステルの毒性本体はモノエステル体とされているが、¹⁸⁾ 代表的なフタル酸エステルであるフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) 暴露個体の尿中には、モノエステル体 (MEHP) とともにそのアルキル水酸化体が多く検出される。¹⁹⁾ そこで、このアルキル水酸化モノエステル体 (MEHP-OH) の PPAR への作用を、転写活性化因子を結合するようになるかどうかを指標にアゴニスト・アンタゴニスト両面について検討した。²⁰⁾ 従来の研究から PPAR α への作用が予想されたモノエステル体

MEHP には活性がみられなかった。PPAR γ への作用はあったことから、両サブタイプによる制御のクロストークが考えられる。従来の研究が細胞を使っているのに対し、われわれの実験ではリコンビナント・タンパク質を用いた *in vitro* 系を用いている。したがって、MEHP は細胞内でさらに活性化されて PPAR に作用する可能性があり、アルキル水酸化体 MEHP-OH がその活性体ではないかと予想された。しかし、実験の結果、MEHP-OH は PPAR を活性化しなかった。内在性リガンドとされる脂質と PPAR の複合体の構造解析から、末端のカルボニル基が結合に重要と考えられ、²¹⁾ 同様の構造を持つ MEHP-OH 酸化代謝物の活性について今後の検討が待たれる。

4. 環境中・体内における化学物質の活性化

化学物質は、それらの存在する環境の物理的あるいは生化学的な条件により、刻一刻と形を変える。したがって、その毒性の評価には、構造の変化に伴うダイナミックな活性の消長を考慮する必要がある。また、こうした視点からの研究によって、新しい毒性発現機序が明らかになることも期待できる。

プラスチック可塑剤のフタル酸エステルは、大気あるいは水圏に広く拡散しており、²²⁾ 恒常的に太陽光にさらされている。光照射による反応は、体内代謝ではほとんど起きないような構造変化も引き起こすことがあり、フタル酸エステルではベンゼン環の水酸化が起きる。²³⁾ これにより ER への高い結合親和性を獲得し、明確な女性ホルモン様活性を示すようになる。²⁴⁾ フタル酸エステルの女性ホルモン様作用に ER は関与しないとされているが、²⁵⁾ この光環水酸化を考慮すると、生態系への影響のいくらかは ER を介した作用である可能性がある。

紫外線吸収剤ベンゾフェノンは、日焼け止めの主成分として水辺で大量に使用され、水圏の生態系への影響が懸念される。²⁶⁾ 効率よく紫外線を吸収するため光酸化反応を起こしやすく、その結果生成する環水酸化ベンゾフェノンは ER に作用し女性ホルモン様作用を示す。²⁷⁾

界面活性剤の環境微生物分解産物ノニルフェノールは、内分泌攪乱物質として最初に国の指定を受けた。フェノール性水酸基を有し、ER 活性化作用が認められる。この物質も環境中で太陽光にさらされる状況が想定されるため、紫外線照射による活性の

変化について検討したところ、新たな活性として DNA 損傷活性が現れた。²⁸⁾ 2 つめの環水酸化により獲得したカテコール構造が、銅などの金属との酸化還元反応を介して活性酸素種を生成し DNA を損傷する。

保存剤メチルパラベンは、化粧品などに広範に使用されている。紫外線照射により皮膚細胞にアポトーシスを引き起こすことが報告され問題となった。²⁹⁾ われわれは、この現象の最終的な活性種及び活性化メカニズムを明らかにした。³⁰⁾ 皮膚に塗布されたメチルパラベンは、まず太陽光照射により環水酸化を受け、次に皮膚細胞のエステラーゼによりメチルエステルが加水分解されてプロトカテキユ酸となり DNA 損傷活性を発揮する。

エチルベンゼンは、塗料溶剤や燃料添加剤などに汎用されている。動物実験により発がん可能性のある物質に分類されているが、Ames 試験では変異原性を示さない。われわれの研究グループは、太陽光照射により生じる過酸化物質、³¹⁾ あるいは酵素的な環水酸化により生じるパラ又はオルト型のジオール体が DNA 損傷作用を示すことを明らかにした。³²⁾

5. おわりに

生命にとって最重要分子である DNA は、細胞の中心で幾重もの保護・修復機構に守られつつ連綿と次世代に受け継がれる。しかし、その DNA といえども自らを含む細胞・個体が棲む環境から乖離しては存在できない。すなわち、両者の間には「遺伝子—環境 相互作用」がみられる。近代化学が生み出してきた多様な化学物質の中には、生命が進化によって作り上げてきた内因性の因子に紛れて生体内で作動してしまうものもあり、それらの一部は内分泌攪乱物質などと呼ばれている。こうした現象の作用機序の研究は、毒性学的な一知見としてだけでなく、関連する生体システムの生物学的な機能解明にもつながり、普遍的な生命現象の理解に貢献する。遺伝子の変異や遺伝子発現の攪乱が個体に及ぼす影響は、発がんや内分泌攪乱に留まらない。例えば、転写阻害はタンパク質コード領域だけでなくノンコーディング RNA の生成にも作用し、その時空間的な発現ネットワークの制御機能を攪乱することで発生・発達を阻害すると考えられる。また、翻訳阻害は記憶などの高次神経機能に影響する可能性がある。³³⁾ 今回紹介したような化学物質の遺伝子への影

響に関する分子レベルの作用機序の研究が、化学物質を介した遺伝子-環境間相互作用の解明への一助となれば幸いである。

謝辞 本稿の執筆及びその機会を与えられる理由となった支部奨励賞受賞にあたり、名城大学薬学部衛生化学研究室において終始ご指導を賜りました小嶋仲夫教授に深謝いたします。本稿で紹介した研究には、多くの研究室所属学生が携わっています。全員の名前をここに挙げることはできませんが、彼らの貢献なくしてはいずれの成果も得られませんでした。また、いくつかの研究は他研究室と共同で行われました。関係者各位に感謝いたします。

REFERENCES

- Cheng K. C., Cahill D. S., Kasai H., Nishihara S., Loeb L. A., *J. Biol. Chem.*, **267**, 166-172 (1992).
- Midorikawa K., Kawanishi S., *FEBS Lett.*, **495**, 187-190 (2001).
- Kagawa T. F., Geierstanger B. H., Wang A. H.-J., Ho P. S., *J. Biol. Chem.*, **266**, 20175-20184 (1991).
- Sugiyama H., Saito I., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 7063-7068 (1996).
- Ando M., Ueda K., Makino R., Nishino Y., Nishida H., Toda C., Okamoto Y., Kojima N., *J. Health Sci.*, **55**, 319-323 (2009).
- Sayre L. M., Perry G., Smith M. A., *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 172-188 (2008).
- Castegna A., Aksenov M., Thongboonkerd V., Klein J. B., Pierce W. M., Booze R., Markesbery W. R., Butterfield D. A., *J. Neurochem.*, **82**, 1524-1532 (2002).
- Zhang J., Goodlett D. R., *Mol. Neurobiol.*, **29**, 271-288 (2004).
- Nunomura A., Honda K., Takeda A., Hirai K., Zhu X., Smith M. A., Perry G., *J. Biomed. Biotechnol.*, **2006**, 1-6 (2006).
- Nishioka N., Arnold S. E., *Am. J. Geriatr. Psychiatry*, **12**, 167-175 (2004).
- Irvine G. B., El-Agnaf O. M., Shankar G. M., Walsh D. M., *Mol. Med.*, **14**, 451-64 (2008).
- Okamoto Y., Suzuki A., Ueda K., Ito C., Itoigawa M., Furukawa H., Nishihara T., Kojima N., *J. Health Sci.*, **52**, 186-191 (2006).
- Ito C., Itoigawa M., Kumagaya M., Okamoto Y., Ueda K., Nishihara T., Kojima N., Furukawa H., *J. Nat. Prod.*, **96**, 138-141 (2006).
- Kusu R., Toda C., Okamoto Y., Tozuka Y., Ueda K., Kojima N., *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **24**, 311-315 (2007).
- Okamoto Y., Okajima K., Toda C., Ueda K., Hashizume K., Itoh K., Kojima N., *J. Health Sci.*, **50**, 556-560 (2004).
- Takeuchi S., Iida M., Kobayashi S., Jin K., Matsuda T., Kojima H., *Toxicology*, **210**, 223-233 (2005).
- Borch J., Metzдорff S. B., Vinggaard A. M., Brokken L., Dalgaard M., *Toxicology*, **223**, 144-155 (2006).
- Nabae K., Doi Y., Takahashi S., Ichihara T., Toda C., Ueda K., Okamoto Y., Kojima N., Tamano S., Shirai T., *Reprod. Toxicol.*, **22**, 411-417 (2006).
- Barr D. B., Silva M. J., Kato K., Reidy J. A., Malek N. A., Hurtz D., Sadowski M., Needham L. L., Calafat A. M., *Environ. Health Perspect.*, **111**, 1148-1151 (2003).
- Kusu R., Oishi A., Hashizume K., Ueda K., Kojima N., *Toxicol. In Vitro*, **22**, 1534-1538 (2008).
- Xu H. E., Lambert M. H., Montana V. G., Parks D. J., Blanchard S. G., Brown P. J., Sternbach D. D., Lehmann J. M., Wisely G. B., Willson T. M., Kliever S. A., Milburn M. V., *Mol. Cell*, **3**, 397-403 (1999).
- Hashizume K., Nanya J., Toda C., Yasui T., Nagano H., Kojima N., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 209-214 (2002).
- Okamoto Y., Hayashi T., Toda C., Ueda K., Hashizume K., Itoh K., Nishikawa J., Nishihara T., Kojima N., *Chemosphere*, **64**, 1785-1792 (2006).
- Toda C., Okamoto Y., Ueda K., Hashizume K., Itoh K., Kojima N., *Arch. Biochem. Biophys.*, **431**, 16-21 (2004).
- Moore N., *Reprod. Toxicol.*, **14**, 183-192 (2000).
- Pojana G., Bonfa A., Buseti F., Collarin A., Marcomini A., *Environ. Toxicol. Chem.*, **23**, 1874-1880 (2004).
- Hayashi T., Okamoto Y., Ueda K., Kojima N., *Toxicol. Lett.*, **167**, 1-7 (2006).

- 28) Okamoto Y., Hayashi T., Matsunami S., Ueda K., Toda C., Kawanishi S., Kojima N., *J. Health Sci.*, **52**, 91–95 (2006).
- 29) Handa O., Kokura S., Adachi S., Takagi T., Naito Y., Tanigawa T., Yoshida N., Yoshikawa T., *Toxicology*, **227**, 62–72 (2006).
- 30) Okamoto Y., Hayashi T., Matsunami S., Ueda K., Kojima N., *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 1594–1599 (2008).
- 31) Toda C., Uchida T., Midorikawa K., Murata M., Hiraku Y., Okamoto Y., Ueda K., Kojima N., Kawanishi S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**, 638–642 (2003).
- 32) Midorikawa K., Uchida T., Okamoto Y., Toda C., Sakai Y., Ueda K., Hiraku Y., Murata M., Kawanishi S., Kojima N., *Chem. Biol. Interact.*, **150**, 271–281 (2004).
- 33) Alberini C. M., *Neurobiol. Learn. Mem.*, **89**, 234–246 (2008).