

## 環境アポトジェンを含む環境汚染化学物質の作用動態解析と化学生態学的防除法の開発研究プロジェクト

著者	土戸 哲明, 池内 俊彦, 下家 浩二, 上里 新一, 吉田 宗弘, 福永 健治, 安原 裕紀, 長谷川 喜衛, 岩木 宏明, 老川 典夫, 松村 吉信
雑誌名	技苑
巻	128
ページ	3-8
発行年	2009-03-31
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10112/2364">http://hdl.handle.net/10112/2364</a>

# 環境アポトジェンを含む環境汚染化学物質の作用動態解析と化学生態学的防除法の開発研究プロジェクト

研究代表者：土戸 哲明\*  
研究担当者：池内 俊彦・下家 浩二・上里 新一・吉田 宗弘・  
福永 健治・安原 裕紀・長谷川喜衛・岩木 宏明・  
老川 典夫・松村 吉信

## 1. はじめに

本研究は、環境中に広く存在する環境汚染化学物質を対象とし、とくにヒトを含む生物の細胞にアポトーシスを引き起こして悪影響をもたらす可能性のある物質に注目している。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作動させ、細胞を死滅させる。アポトーシスは、プログラム細胞死とも言われ、生物が本来的に持っている自殺機構であり、生物の発生の過程や恒常性維持に関わっていることが知られている。著者らは、*p*-nonylphenol、bisphenol A、benomylなどが、環境アポトジェンであることを見出している<sup>1)</sup>。さらに、環境アポトジェン分解菌として、*Sphingomonas*属 AO1株を取得している<sup>2)</sup>。

そこで本研究では、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方法による除去法の開発、細胞のアポトーシス防御システムの開発などを通して、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る。

本プロジェクトは、平成20年度からスタートしたもので、研究体制としては、作用機構研究チーム（研究チーム1）、動態研究チーム（研究チーム2）、分解・除去・防御法研究チーム（研究チーム3）の3研究チームから構成する。研究チーム3及び全体の統括を土戸が、研究チーム1の統括を池内が、研究チーム2の統括を吉田が担当する。

以下に本年度における各研究チームで得られた成果を報告する。

## 2. 環境アポトジェンを含む環境汚染化学物質の作用機構に関する研究

### 2-1. 環境アポトジェンのスクリーニングと作用機構

環境省やアメリカ環境保護庁等提起の環境汚染化学物質65~70物質を含む多数の環境汚染化学物質からの可能な環境アポトジェンのスクリーニングの一環として、tributyltin chloride、benzophenone-3、4-octylphenolのアポトーシス誘導作用を調べた。benzophenone-3は高濃度を必要としたが、tributyltin chlorideと4-octylphenolは、以前の3物質と近い又はさらに低い濃度域でアポトーシスを引き起こした。また、tributyltin chlorideは小胞体ストレス誘導型アポトーシスを引き起こすことが示唆された。さらに、分解・除去・防御法研究チーム（研究チーム3）で分解機構の解析を行っている $\gamma$ -resorcyate (2,6-dihydroxybenzoate) についてのチーム間共同研究を行い、アポトーシスを引き起こすとの予備の結果を得ている。

### 2-2. 天然由来生理活性成分および医薬品関連化合物のヒト由来細胞や細菌に及ぼす影響

人々が食品・飲料として利用している天然素材には多くのカテキン類が含まれている。また、医薬品や薬剤等の製造過程で多くの関連化学物質が副生される。著者らは、これらのヒト正常細胞、がん細胞、細菌の生存に対する影響を調べ、その細胞内分子機構を解明する研究を行っているが、本報ではこれまでに得られた結果について紹介する。

緑茶の主成分、(-)-epigallocatechin gallate (EGCG) および (-)-epigallocatechin (EGC) は、ヒト正常繊維芽細胞に影響を与えない濃度で、ヒト大腸がん細胞、乳がん細胞の増殖を有意に抑制した。また、意外なことに、EGCの細胞増殖抑制活性は細胞密度に依存し、低密度状態において、EGCはEGCGと同程度の抑制効果を示した。しかし、細胞が高密度状態になるにつれて、EGCの抑制効果はEGCGと比べて著しく低下した。また、両

\* 化学生命工学部教授 工博

カテキンは主要MAPKを介したアポトーシスを引き起こすことによって、HCT116細胞等の大腸がん細胞の増殖を抑制することが分かった。カテキンは飲用すると95%以上代謝・分解されることが知られているが、今回の研究で、生体では、低血中濃度でも細胞増殖抑制等に影響を与えることが推察された。一方、カテキン誘導体である3-O-octanoyl(-)-epicatechinが、グラム陽性菌に抗菌活性を示し、また、感受性株、耐性株いずれにも抗菌活性を示した。本化合物は、菌の細胞膜を損傷して抗菌活性を発揮していると考えられた。

免疫抑制剤FTY720は、あるがん細胞種に対し強い増殖抑制活性を示すことが知られている。本研究では、FTY720のリン酸化とがん細胞増殖抑制活性との関連性について調べた。FTY720は、乳がん細胞、大腸がん細胞の増殖を強く抑制したが、そのリン酸化体、及び関連物質スフィンゴシン-1-リン酸、cFTY720-Pはこれらの細胞の増殖を抑制しなかった。したがって、FTY720のがん細胞増殖抑制活性は、そのリン酸化に起因しないことが分かった。

大腸がん細胞内では $\beta$ -カテニンのレベルが高まっており、そのTCF複合体ががん増殖に関わる遺伝子発現を活性化し、大腸がんの増殖・増悪を引き起こすことが知られている。我々は、Bis [2-(acylamino)phenyl] disulfidesがこの $\beta$ -カテニン/TCF複合体形成を阻害し、また、ストレス誘導型アポトーシス関連タンパク質JNKを活性化して、大腸がん細胞の増殖を抑制することを見出した。特記すべきことに、本系統化合物はヒト正常繊維芽細胞には事実上毒性を示さなかった。今後、その選択毒性のメカニズムを解明する予定である。

### 3. 環境汚染化学物質の体内動態に関する研究：

#### 高用量3価クロムの生体への影響

重金属類は環境中に存在する代表的な有害化学物質である。とくに6価クロムは、その強い酸化作用によってDNAを損傷し、ヒトを含む動物組織にがんを誘発する。また、6価クロムは細胞にアポトーシスを誘導することも知られている。現在、6価クロムによるアポトーシスには、caspase-3とTGF (transforming growth factor) - $\beta$ が関わるということが明らかにされている。

一方、3価クロムは、クロモデュリンという名称の低分子性クロム化合物 (LMWCr) の形態でインスリン作用の増強に関わっており、必須の微量元素と位置づけられている。糖尿病患者では高用量クロム投与が糖、および脂質代謝を改善するため、1mg/日程度の3価クロム摂取につながるクロムサプリメントが市販されている。しかし、健康人では、このような高用量クロム摂取が健康上の利益をもたらすことはない。むしろ、*in vitro*の

実験で3価クロムに6価クロムと同様の細胞毒性のあることが指摘されていることから、クロムサプリメント摂取による健康障害の発生が懸念されている。

本研究では、高用量3価クロム投与の生体影響を明らかにするため、1~100 $\mu$ g/gのクロムを塩化クロム、またはピコリン酸クロムの形態で投与したラットの組織中クロム濃度と尿中排泄を測定するとともに、肝機能を検討した。

36匹の4週齢Wistar系オスラットを6匹ずつ6群に分け、AIN93G飼料から塩化クロムを除いた低クロム基本飼料に、1、10、または100 $\mu$ g/gのクロムを塩化クロムまたはピコリン酸クロムの形態で添加した飼料を与えて4週間飼育した。飼育期間終了後に血液と臓器 (肝臓、腎臓、小腸、脛骨) を採取し、測定に供した、また、飼育3~4週間目の連続した3日間の尿を採取した。

採取した臓器の一部を10mlの濃硝酸を用いて灰化後、水で一定量にメスアップしたもの、尿を0.1Mの硝酸で適宜希釈後、フィルターで濾過したものを試験溶液とし、これら試験溶液中のクロムについて誘導結合プラズマ質量分析法を用いて定量した。

肝臓の一部はヘマトキシリン・エオジン染色した病理組織標本とし、光学顕微鏡観察に供した。血液試料は血球計算と血清生化学検査に供した。

検討の結果、飼育期間中の体重増加量には群間の差を認めなかった。また、解剖後の臓器重量、および飼育3週間目に採取した尿の容量においても群間に差はなく、クロム投与の影響を認めなかった。さらに、血球計算、血清の総タンパク質、尿素窒素、中性脂肪、総コレステロール、グルコース、鉄濃度、乳酸脱水素酵素活性と $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性値、および総鉄結合能にも群間に差を認めなかった。一方、血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) とアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 活性においては、100 $\mu$ g/gのクロムをピコリン酸クロムとして投与した群が他群に比較して有意に高値を示した。しかし、光学顕微鏡による肝病理組織標本観察においては、血清ASTとALTが高値を示した100 $\mu$ g/gピコリン酸クロム群に異常を認めることはできなかった。

肝臓、腎臓、小腸、脛骨のいずれにおいても、飼料へのクロム添加量に依存してクロム濃度の上昇を認めた。添加クロムの形態の違いの影響は、クロム添加量10 $\mu$ g/gまでは認めなかったが、クロム添加量が100 $\mu$ g/gの場合は、ピコリン酸クロム投与群が塩化クロム投与群よりも有意に高い脛骨クロム濃度を示した。

尿へのクロム排泄量もクロム摂取量に依存して増加した。クロム摂取量に対する尿への排泄率は、クロム添加量10 $\mu$ g/gまでの場合、いずれの群においても15%前後

の値だった。しかし、クロム添加量が100 µg/gの場合は、塩化クロム投与群のクロム尿中排泄量がピコリン酸クロム投与群に比較して明らかに減少し、排泄率も1%未満に低下していた。

血清生化学検査において、100 µg/gのクロムをピコリン酸クロムの形態で与えた群において、ASTとALTの上昇を認めた。光学顕微鏡による肝臓組織の観察で異常は認められなかったが、血清生化学検査の結果はピコリン酸クロムの大量投与が肝機能障害を起こす可能性を示すものといえる。ただし、100 µg/gのクロムを塩化クロムで投与した場合にはASTとALTの上昇が認められないこと、および塩化クロムとピコリン酸クロム投与との間で肝臓クロム濃度に差がないことを考えると、血清ASTとALTの活性上昇はクロムではなく、ピコリン酸によってもたらされた可能性が高い。細胞を用いた実験ではピコリン酸にアポトーシス作用のあることが示されていることから、高水準のピコリン酸は、クロムよりも肝細胞に影響を及ぼす作用が強いのかかもしれない。

クロムの見かけの吸収率と尿中排泄率がいずれも3%未満であるため、クロムの消化管吸収率はきわめて低く、吸収されたクロムの大半は尿へ排泄されると考えられている。吸収された3価クロムは血液中でトランスフェリンに結合し、肝臓へ運搬される。トランスフェリンに結合した3価クロムイオンは容易にLMWCrに移行し、最終的に尿に排泄される。今回の実験では、クロム投与量10 µg/gまでは、投与クロムの形態にかかわらずクロムの尿中排泄率が約1.5%であり、従来の報告と矛盾しない結果を得た。しかし、塩化クロムを用いたクロムの投与量が100 µg/gになると、尿への排泄率は1%未満に低下した。LMWCrには、クロモデュリン作用とともに、過剰のクロムを速やかに尿へ排泄する役割があるといわれていることから、この尿排泄率の低下はクロム排泄機構が飽和したことを意味し、100 µg/gのクロム投与は過剰レベルと判断する。

100 µg/gのクロム投与をピコリン酸クロムで行うと、尿中クロム排泄率は約1.5%に維持され、かつ骨へのクロム蓄積が低下した。ピコリン酸を高水準で投与すると亜鉛の組織濃度が低下することが観察されている。この作用はピコリン酸のキレート作用によるものであり、ピコリン酸には、ペニシラミンのように、生体組織中の金属と結合してこれを排泄する作用を有するといわれている。したがって、100 µg/gのピコリン酸クロム投与による尿中クロム排泄の増加は、ピコリン酸のキレート作用によるものと考えられる。なお、今回観察されたピコリン酸による尿中クロム排泄の増加量は骨のクロム濃度低下量をはるかに上回っている。したがって、筋肉など、今回測定しなかった組織においても、ピコリン酸投与に

よるクロム濃度の低下が生じていた可能性が高い。

塩化クロムとピコリン酸クロムの組織クロム濃度に及ぼす影響を比較した先行研究では、クロム投与水準が等しい場合、ピコリン酸クロム投与が塩化クロム投与よりも組織クロム濃度を上昇させるため、ピコリン酸クロムは塩化クロムよりも高率で吸収されるとしている。今回の結果はこの先行研究と明らかに矛盾している。先行研究では投与期間が36週間であり、今回の4週間よりも著しく長期間となっている。したがって、先行研究との間に生じた矛盾は、投与期間の違いが関連している可能性が考えられる。

以上より、ラットに対する100 µg/gのクロム投与は、塩化クロムで行った場合にはクロム排泄機構を飽和させる可能性のあること、ピコリン酸クロムで行った場合にはピコリン酸による肝機能障害発生や生体内必須金属の排泄促進作用の可能性を否定できないことより、有害な健康影響を及ぼす危険性が高いと結論する。

#### 4. 環境汚染化学物質の分解・除去・防御法に関する研究

##### 4-1. 環境汚染化学物質分解微生物の分離・同定

環境を汚染している化学物質の中で、特にアミノ基、ニトロ基、スルホ基等を持つ芳香族化合物は、染料・殺虫剤・界面活性剤などの化成品の主要な成分であり、生物に対する強い毒性に加え、近年では環境ホルモン作用を有するものも知られている。本研究プロジェクトでは、微生物によるこれらの有害化学物質の分解を酵素・遺伝子レベルで解明し、自然環境下での微生物分解処理への応用を目的としている。

本年度は、環境汚染化学物質として知られているニトロフェノール(2-, 3-及び4-)・ジニトロフェノール(2, 4-, 2, 5-及び2, 6-)・3-ニトロ安息香酸・ベンゼンスルホン酸を選定し、環境中からこれらの有害化学物質を唯一の炭素源あるいは窒素源として利用可能な微生物の探索を行った。

目的とする菌株の分離は、各種基質を唯一の炭素源あるいは窒素源とする分離用培地を用いて、集積培養法により行った。分離菌株の純化は、常法に従って行い、純化の確認できた菌株については-80℃で保存した。

菌株の同定は、16S rRNA遺伝子の5'末端領域約560bpの配列相同性に基いて行った。PCRによる16S rDNAの増幅には、オリゴヌクレオチドプライマー-27f(5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG)及び1492r(5'-TACGGYTA CCTGTACACTT)を用いて行った。PCRのサイクルは、94℃で0.5min(第1サイクルでは3.5min)、55℃で0.5min、72℃で2.0minを30サイクル行った。PCR増幅産物は、アガロースゲル電気泳動法

で確認後ゲルから抽出し、シーケンス反応の鋳型として使用した。分離菌株の16SrDNA相同性配列の検索は、BLASTNプログラムのGenBankデータベースにより行った。

近畿圏の土壌試料200点から、集積培養法により各種有害化学物質を利用して生育可能な菌株の分離を試みた。

#### 1) ニトロフェノール及びジニトロフェノール分解菌の探索

芳香族ニトロ化合物は、1 mM程度の低濃度でも微生物に対して中等度ないし高度な毒性を示すことから、ニトロフェノール類を直接炭素源として菌株を分離することは困難である。そこで、ニトロフェノール類のニトロ基に着目し、ニトロフェノール類を単一窒素源とする分離用培地（炭素源：0.3%コハク酸）を用いて集積培養法により目的とする菌株の探索を行った。その結果、ニトロフェノール分解菌として多数分離した。これらの菌株について16S rDNAの塩基配列に基づいて同定を行ったところ、*Pseudomonas*属・*Burkholderia*属あるいは*Cupriavidus*属に属する菌株であり、グラム陽性細菌は分離されなかった。

分離した菌株中には、3種類のニトロフェノール異性体を利用して生育する菌株や、2, 4-ジニトロフェノールあるいは2, 6-ジニトロフェノールを利用する興味深い菌株も存在することがわかった。

なお、今回の土壌試料からは、2, 5-ジニトロフェノールを利用して生育可能な菌株を分離することはできなかった。

#### 2) 3-ニトロ安息香酸分解菌の探索

2-および4-ニトロ安息香酸分解菌については、既に多数の菌株を環境中から分離しており、現在のこれらの菌株を用いて、代謝経路の解明や分解系遺伝子の解析を進めている。しかしながら、3-ニトロ安息香酸の微生物分解については、*Pseudomonas*属細菌による1報告のみであり、3-ニトロ安息香酸の分解に関する詳細な知見は得られていない。そこで、新たに3-ニトロ安息香酸分解菌を分離するため、3-ニトロ安息香酸(濃度：0.3mM)を唯一の窒素源とした集積培養法により分解菌の探索を行った。その結果、3-ニトロ安息香酸を分解できる菌株を4株分離し、そのうち1株の同定を行ったところ*Cupriavidus*属に属する菌株であった。

#### 3) ベンゼンスルホン酸分解菌の探索

芳香族スルホン酸の微生物分解は、合成洗剤等に使用されているアルキルベンゼンスルホン酸について詳細な研究が行われているが、脱スルホン化機構については殆ど解明されていないのが現状である。細菌による脱スルホン化機構の解明を目的として、本年度はベンゼンスル

ホン酸分解菌の探索を行った。ベンゼンスルホン酸(濃度：10mM)を唯一の炭素源として集積培養を行った結果、ベンゼンスルホン酸を唯一の炭素源として良好な生育を示す菌株が6株分離され、その内5株は*Cupriavidus*属に属する菌株であった。

本年度の成果として、環境汚染化学物質として知られている芳香族ニトロ化合物やベンゼンスルホン酸を分解する菌株を分離した。今後、分離菌を同定したのち、これらの分離菌の中から以後の研究に供する菌株を選択し、培養特性の検討や無細胞抽出液を用いて代謝経路の決定を行う予定である。

#### 4-2. $\gamma$ -レゾルシン酸の代謝経路と酵素的分解

$\gamma$ -レゾルシン酸(2,6-ジヒドロキシ安息香酸)は、医薬品や樹脂などの工業原料として有用であり、現在コルベシュミット反応に基づく化学合成法で製造されている。 $\gamma$ -レゾルシン酸の生産工場の周囲では、 $\gamma$ -レゾルシン酸による土壌汚染などが報告されている。そこで本研究では、環境アポトジェンの可能性がある $\gamma$ -レゾルシン酸を分解する微生物を自然界から探索し、その代謝経路と酵素科学的特性の解明を目的としている。 $\gamma$ -レゾルシン酸を分解する微生物を自然界からスクリーニングし、強い $\gamma$ -レゾルシン酸デカルボキシラーゼ( $\gamma$ -RDC)活性を有する新規微生物を発見し*Rhizobium* sp. MTP-10005と命名した。本菌から $\gamma$ -RDCを精製し、その酵素科学的性質を解明した。原子吸光分析の結果、本酵素はサブユニット1モルあたり1モルの亜鉛原子を含有していることが明らかとなった。ゲノムウォーキングPCR法により $\gamma$ -RDC遺伝子( $\gamma$ -rdc)と $\gamma$ -レゾルシン酸代謝関連酵素遺伝子群(*graD*、*graA*、*graC*、*graB*、*graE*)のクローニングを行った。これらの発現タンパク質を用いて活性を測定した結果、*graD*、*graA*、*graC*、*graB*、*graE*はそれぞれ、フラビンレダクターゼ(レゾルシノールヒドロキシラーゼのレダクターゼコンポーネント)、レゾルシノールヒドロキシラーゼ(レゾルシノールヒドロキシラーゼのオキシゲナーゼコンポーネント)、マレイル酢酸レダクターゼ、ヒドロキシキノール1,2-ジオキシゲナーゼ、機能未知タンパク質をコードしていることが明らかとなった。これらの結果から、*Rhizobium* sp. MTP-10005に $\gamma$ -レゾルシン酸を3-オキソアジピン酸に分解する新規 $\gamma$ -レゾルシン酸分解経路が存在することが明らかとなった。また $\gamma$ -RDCの結晶化とX線結晶構造解析を行い、本酵素の反応機構を明らかにするとともに亜鉛依存型デカルボキシラーゼとして初めて立体構造を解析することに成功した。さらにマレイルアセテートリダクターゼ(EC 1.3.1.32)は、マレイルアセテートの3-オキソアジピン

酸への還元を触媒し、レゾルシノールの好氣的代謝に重要な役割を果たしている。本酵素は、sitting-drop vapor-diffusion法を用いて、硫酸アンモニウムにより293 Kで結晶化に初めて成功した。本酵素の結晶は、monoclinic space group *C*2に属し、unit-cell parameterは、 $a=56.85$ 、 $b=121.13$ 、 $c=94.09$  Å、 $\beta=101.48^\circ$ 、非対称分子中に1つのダイマーを含んでいた。分解能は、1.79 Åであった。

#### 4-3. *Spingomonas bisphenolicum* AO 1株のビスフェノールA分解に関わるチトクロームP450モノオキシゲナーゼ遺伝子の遺伝子機能解析

Bisphenol A (BPA) は、ポリカーボネートやエポキシ樹脂などのプラスチック材料として、世界的に生産量および消費量が増加している化合物である。しかし、最近になって、BPAが内分泌攪乱化学物質であると強く示唆されるようになり、実際に、川や海、土壌などの環境中で広く検出されている。このような現状や環境保護の観点から、BPAを含む環境汚染物質除去システムの構築が望まれている。

これまでに多くのBPA分解菌が単離され、単離菌がBPA除去システムに有効であると考えられている。その一つに著者が単離した*S. bisphenolicum* AO 1株<sup>3)</sup>がある。細菌によるBPA代謝には2経路が報告されているが、BPA分解に関与する酵素群に関する報告は全くない。著者らはAO 1株より、チトクロームP450およびフェレドキシンを精製し、これらを含むチトクロームP450モノオキシゲナーゼ系がBPA分解の初期反応であるBPAの水酸化を触媒することを見いだした<sup>4)</sup>。

そこで本研究では、チトクロームP450モノオキシゲナーゼ遺伝子群のクローンとその塩基配列決定および遺伝情報解析を試みた。また、これらの遺伝子を大腸菌細胞に導入し、P450<sub>bisd</sub>とFd<sub>bisd</sub>の大量発現系の構築ならびにBPA分解能を有する大腸菌の創製を試みた。

本モノオキシゲナーゼの構成成分であるフェレドキシン (Fd<sub>bisd</sub>) およびチトクロームP450 (P450<sub>bisd</sub>) の構造遺伝子である *bisdA* および *bisdB* が約3.7kbの *Hind*III断片にコードされており、二つのトランスポザーゼ遺伝子 (*tnpA1*と*tnpA2*) に挟まれていることが明らかとなった (図1)<sup>5)</sup>。これら構造遺伝子の塩基配列から予想されるアミノ酸配列からFd<sub>bisd</sub> およびP450<sub>bisd</sub>のタンパク質構造解析を行った結果、Fd<sub>bisd</sub>はputidaredoxin-typeの[2Fe-2S]クラスターを持っていることが明らかとなった。また、P450<sub>bisd</sub>は、一般的なチトクロームP450が保持している酸素結合部位やヘム結合部位を持っているものの、これまでに報告されているチトクロームP450のタンパク質の一次構造とは相同性が低く、新しいタイプのチトクロームP450であると予想された。*bisdA*および*bisdB*の片方あるいは両方を大腸菌細胞に導入した結果、*bisdB*組換え体でビスフェノールAの分解活性が確認された。しかし、生産されたほとんどのタンパク質は不溶性の封入体として存在していた。さらに、ビスフェノールA分解能を失った自然突然変異株AO 1L株を取得し、その遺伝子構造を解析した結果、少なくとも*bisdAB*遺伝子の欠失が明らかとなった。この結果は、AO 1株ではP450<sub>bisd</sub>がビスフェノールA分解の初期反応を触媒する唯一の酵素であることを示している。

本研究は、BAP分解の初期反応に関わるチトクロームP450モノオキシゲナーゼ構造遺伝子をクローニングした最初の報告であるが、最終目的である本酵素の大量発現には至っていない。今後、遺伝子発現系の詳細な解析が必要であると考えられる。また、本酵素遺伝子が非常に不安定であることも同時に明らかとなり、AO 1株の工学的利用に向けて本遺伝子の安定化に向けた研究も必要である。今後の研究の進展が期待される。

#### 5. おわりに

本研究プロジェクトは、環境アポトーシスのスクリーニング、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、環境アポトーシス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、人類の健康と福祉に貢献することを目標としている。

環境汚染化学物質として、次世代に影響を及ぼす環境ホルモンの作用とは別に、環境アポトーシスは、暴露されたその世代への影響に注目するものである。広く汚染が進んでいる環境中のどの物質が環境アポトーシスで、どの環境アポトーシスに重点を置くべきか、どの程度の

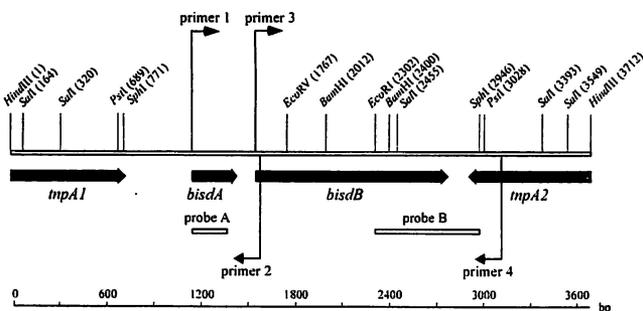


図1. クローニングした*bisdAB*およびその周辺領域の制限酵素地図  
primer 1-4 およびprobe A-Bは本断片のクローニングに用いたPCRプライマーおよびサザンハイブリダイゼーションプローブである。

汚染なのか、どの程度危険なのか、除去法はあるのか、  
防御法はあるのか等が明らかとなれば、人類の未来に次  
第に大きくのしかかりつつある環境汚染に対して新たな  
視点でその対策を提示することが期待できよう。

本研究は、平成21年度に採択された文部科学省私立大  
学戦略的研究基盤形成支援事業によって実施されたもの  
である。

#### 参 考 文 献

- 1) Kusunoki, T. et al.: *p*-Nonylphenol induces endoplasmic  
reticulum stress-mediated apoptosis in neuronally  
differentiated PC12 cells. *Neurosci. Lett.*, **431**, 256-261  
(2008).
- 2) Sasaki, M. et al. : Biodegradation of bisphenol A by cells  
and cell lysate from *Sphingomonas* sp. strain AO1.  
*Biodegradation*, **16**, 449-459 (2005).
- 3) Oshiman, K. et al. *Biodegradation* **18**, 247-255 (2007).
- 4) Sasaki, M et al. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8024-8030  
(2005).
- 5) Sasaki, M. et al. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 1158-1169  
(2008).