

カドミウムの細胞輸送における亜鉛輸送体の役割と発現調節

(衛生化学教室) 藤代 瞳

【概要】

我々はカドミウム (Cd) 耐性細胞を活用して、Cd 輸送の解析を行ってきた。まず、メタロチオネイン (MT) 欠損 Cd 耐性細胞を使用した解析により、亜鉛 (Zn) 輸送体である ZIP8 が Cd の取り込みに重要であることを明らかにした。また、MT 欠損 Cd 耐性細胞における ZIP8 の発現抑制の原因は DNA のメチル化によることを明らかにした。一方、MT の発現している細胞から樹立した高濃度 Cd 耐性細胞を用いた解析により、ZIP8 だけでなく、DMT1、電位依存型 Ca channel の $Cacn\alpha_{1C}$ 、 $Cacn\alpha_{1G}$ など複数の輸送体が Cd の輸送に関与していることを明らかにした。また、マンガン (Mn) は Cd と共通の輸送体を介して細胞内に取り込まれている可能性を見出した。今後、これらの複数の金属輸送体とチャネルが、生体内の各組織、各細胞でどのように相互に役割分担しながら Cd や Mn の輸送に関わっているのかを明らかにしていきたい。

【背景と目的】

Cd の生体影響、体内動態について数多くの研究が行われてきたが、いまだに Cd がどのようにして細胞に取り込まれ、また排泄されるのかという基本的なことについても未解明の部分が多く残されている。Cd だけでなく、多くの重金属の毒性と体内動態に影響を及ぼす生体内因子として、MT が知られている。MT は、Cd によって誘導され、Cd に結合し、Cd の毒性を軽減する。これまで数多くの Cd 耐性細胞が樹立されてきたが、そのほとんどにおいて MT 遺伝子の増幅、高発現が観察されている。しかし、MT 以外の Cd 耐性因子についてはよくわかっていなかった。また、多くの薬物輸送体は、その薬物に対する耐性細胞から発見されることが多いが、Cd 耐性細胞は、そのほとんどが MT 高発現細胞であるため、Cd 輸送に関わる因子が変化しているかどうかを調べられていなかった。

そこで、私たちは、MT 以外の Cd 耐性因子、特に Cd 輸送に関わる因子を検索するため、MT ノックアウトマウス由来の細胞を用いて Cd 耐性細胞を樹立し、その性状を解析してきた¹⁻³⁾。MT 欠損 Cd 耐性細胞における Cd の蓄積量は親株細胞の約 10%程度であった¹⁾。この Cd 耐性細胞は、MT に全く依存せず、Cd が蓄積しにくいために Cd 耐性を示した初めての Cd 耐性細胞である。Cd が蓄積しにくい原因として、Cd の取り込み効率、排泄効率を検討したところ、特に Cd の取り込みが強く抑制されていることがわかった¹⁾。また、Cd の取り込みと同時に Mn の取り込みも抑制されていた。しかし、どのような金属輸送体が Cd と Mn の取り込みに関与しているのかについてはほとんどわかっていなかった。そこで、本研究では、カドミウム輸送に関わる遺伝子を同定し、その性状の解析を行った。

【結果と考察】

1. MT 欠損 Cd 耐性細胞における耐性因子の検索

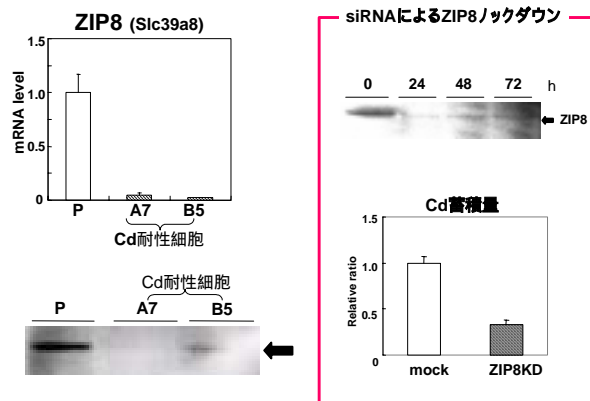
親株細胞と MT 欠損 Cd 耐性細胞の遺伝子発現の差を DNA マイクロアレイにより調べた

結果、Cd 耐性細胞において ZIP14 (slc39a14) の mRNA レベルの顕著な減少が見られた。ZIP14 は ZIP (Zrt-, Irt-related protein) と呼ばれる亜鉛輸送体 family に属し、ZIP family には ZIP1 から ZIP14 まで存在する。そこで全ての ZIP family member の発現の変化を Real time PCR により調べた結果、ZIP14 だけでなく ZIP8 (slc39a8) の発現が Cd 耐性細胞において親株細胞の約 1/30 に低下していた⁴⁾。そこで siRNA を導入し親株の ZIP8 をノックダウンすると Cd 蓄積が明らかに低下した。よって ZIP8 が Cd 耐性に関与する Cd 輸送体候補であることが示唆された⁷⁾。そのころちょうど、米国 Nebert のグループにより、ZIP8 は精巢の血管内皮細胞における Cd の取り込みに関与することが報告された。これまでほとんど注目されていなかった Zn 輸送体が、哺乳動物における Cd の輸送に大きな役割を果たしている可能性が強く示唆された^{5, 6)}。

2. ZIP8 の発現抑制機構の検討

我々が樹立した MT 欠損 Cd 耐性細胞において ZIP8 の mRNA レベルが著しく減少していたが、その原因は解明されておらず、ZIP8 の転写調節機構も分かっていない。そこで、DNA メチル化に注目して ZIP8 をコードする slc39a8 遺伝子の発現制御機構の解析を試みた。ZIP8 の exon 1 を含む領域にメチル化を受けやすい CpG island が存在しているため、ゲノム DNA を *Hpa II* と *Msp I* で処理してメチル化の有無を調べた結果、

Fig.1 MT欠損Cd耐性細胞におけるZIP8の関与



Cd 耐性細胞ではこの領域で DNA のメチル化が起こっているが、親株では起こっていないことを見いだした。さらにメチル化酵素阻害剤 5-aza-deoxycytidine (5-aza-dC) 処理によって Cd 耐性細胞の ZIP8 のメチル化が消失し、低下していた ZIP8 の mRNA レベル、タンパクレベルが回復した。このことを反映し、Cd 耐性細胞を 5-aza-dC 処理すると、Cd の蓄積量が増加し、Cd に対する感受性が高くなった。以上のことから、Cd 耐性細胞において ZIP8 の発現が低下している機構の少なくとも一部に、DNA メチル化というエピジェネティックな制御が関与している可能性を明らかにした⁹⁾。

3. 高濃度 Cd 耐性細胞の樹立と性状解析

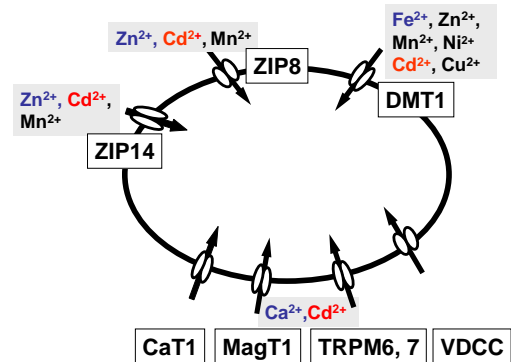
MT 欠損 Cd 耐性細胞において ZIP8 が Cd 輸送に重要な役割を果たすことを明らかにしたが、MT 遺伝子を正常に発現している通常の細胞においてこれらの Zn 輸送体が Cd の細胞輸送に関与しているかどうか、また他の金属輸送体の関与についてはほとんどわかっていない。そこで、MT 遺伝子を発現するマウス胎仔由来細胞 P⁺ から高濃度の Cd に耐性を示す耐性細胞 (A⁺70, B⁺70) を樹立し、様々な金属に対する細胞毒性と金属輸送について解析した。A⁺70, B⁺70 における Cd の LC₅₀ は P⁺ の約 7 倍の約 200 μM であった。MT の発現は A⁺70, B⁺70 において、mRNA レベル及び蛋白レベル共に著しく上昇した。しかし、A⁺70, B⁺70 の細胞内 Cd 蓄積量 (24 時間後)、および、Cd 取り込み速度 (1 時間後) は P⁺ に比べて減少していた。A⁺70, B⁺70 では Cd の取り込みに関与する可能性のある金属輸送

体(トランスポーター)とチャネルの発現を可能な限りすべて調べた。今回樹立した A⁺70, B⁺70 においても ZIP8 の発現が抑制されていたため、やはり ZIP8 は Cd 輸送において重要な役割を果たすと考えられる。また、この高濃度 Cd 耐性細胞は、2 価鉄 (Fe)、および (Cd, Mn を含む) 2 価金属の輸送体である DMT1 および電位依存性 Ca channel のうち Cd 輸送への関与が報告されている Cacnα_{1C}, Cacnα_{1G} の発現が低下していた。DMT1 と Cacnα_{1C}, Cacnα_{1G} は、MT 欠損 Cd 耐性細胞においては変化していなかったが、高濃度 Cd 耐性細胞で発現低下しているため、Fe や Ca の輸送システムは高濃度の Cd に親和性が高い可能性がある。それぞれの輸送体が Cd 輸送にどのような役割を果たしているかは今後の課題である。

4. Cd 耐性細胞における Mn 交叉耐性と Mn 輸送

A⁺70, B⁺70 は、MnCl₂ に対して交叉耐性を示した。Mn²⁺ は MT に結合しないため、Mn 蓄積量を調べた結果、Mn 添加 24 時間後の細胞内 Mn 蓄積濃度は、P⁺ に比べて A⁺70, B⁺70 で約 50% に低下していた。また、Mn 添加 1 時間後の Mn の取り込みは、1 μM 以下では差がみられなかったが、10 μM 以上では P⁺ に比べて A⁺70, B⁺70 で明らかに減少していた。これまで、Mn に親和性を示すことが報告されている輸送体として、DMT1, ZIP8 がある。高濃度 Cd 耐性細胞は Mn に交叉耐性を示していること、この Cd 耐性細胞では DMT1 や ZIP8 の発現が抑制されていることから、DMT1 と ZIP8 が Mn 輸送に関わる可能性が高いのではないかと考えている⁸⁾。MT 欠損 Cd 耐性細胞では低濃度領域で Mn の取込みが抑制され、高濃度 Cd 耐性細胞では高濃度領域で Mn の取込みが抑制されていることから、ZIP8, DMT1 が Mn を輸送する際の親和性がそれぞれの輸送体で異なっている可能性も考えられる。今後、DMT1 と ZIP8 による Mn 輸送の機構についても明らかにしたい。

Fig. 2 カドミウムを輸送する可能性のあるトランスポーターとチャネル



【文献】

- 1) Yanagiya, T; Imura, N; Kondo, Y; Himeno, S. *Life Sci.*, 65: PL177-182 (2000)
- 2) Yanagiya, T; Imura, N; Enomoto, S; Kondo, Y; Himeno, S. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 292: 1080-1086 (2000)
- 3) Himeno, S. *J Inorg Biochem.*, 88: 207-212 (2002)
- 4) Fujishiro, H; Okugaki, S; Nagao, S; Satoh, M; Himeno, S. *J. Health Sci.*, 52: 292-299 (2006)
- 5) Fujishiro, H; Sakurai, T; Himeno, S. *Biomed Res Trace Elements*, 17(4): 349-354 (2006).
- 6) Himeno, S; Fujishiro, H. *Cell Biol. Toxicol.*, 24 (Supple 1): S63-S64 (2008).
- 7) Fujishiro, H; Okugaki, S; Kubota, K; Fujiyama, T; Miyataka, H; Himeno, S. *J. Appl. Toxicol.*, in press (2009).
- 8) Himeno, S; Yanagiya, T; Fujishiro, H. *Biochimie*, in press (2009)
- 9) Fujishiro, H; Okugaki, S; Yasumitsu, S; Enomoto, S; Himeno, S. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, submitted (2009)