

## 金属ストレス応答を指標とした腸管上皮細胞におけるミネラルの相互作用

宇野 千枝子・中西 由季子・小関(山岡)佐貴代・安本 教傳  
京都大学食糧科学研究所

### Studies on Interaction of Minerals in Intestinal Epithelial Cells by Using The Metal Stress Response as An Marker

Chieko UNO, Yukiko NAKANISHI, Sakiyo KOSEKI (YAMAOKA), Kyoden YASUMOTO  
*Research Institute for Food Science Kyoto University*

#### Summary

Hemeoxygenase, the rate-limiting enzyme in the heme-degradative pathway, is induced by addition of several metal ions. Hemeoxygenase is considered to function in the cellular defense mechanism against oxidative stress. We studied the induction of hemeoxygenase in intestinal epithelial cells (Caco-2 cell line) exposed to various types of minerals and the possible role of this enzyme in preventing the oxidative damage.

The level of induced hemeoxygenase was found to depend on the species of minerals used (NaAsO<sub>2</sub>, hemin, and CuCl<sub>2</sub>). Both NaAsO<sub>2</sub> and hemin strongly induced hemeoxygenase, but CuCl<sub>2</sub> did not. Coexistence of NaAsO<sub>2</sub> and hemin furthered the induction of hemeoxygenase as compared with that observed when the compound was added separately. However, the simultaneous addition of CuCl<sub>2</sub> suppressed the hemeoxygenase induced in the presence of either NaAsO<sub>2</sub> or hemin. Furthermore, in any case, the oxidized proteins accumulated gradually as the induction of hemeoxygenase was reduced.

These results indicate that minerals directly affected the induction of hemeoxygenase and suggest the possibility that dietary minerals may regulate the induction of hemeoxygenase and the generation of oxidized protein in intestinal cells.

鉄や銅などのミネラルは、生体機能を調節するために必須な微量成分である。しかし、これらのミネラルが細胞内に過剰に蓄積すると、反応性の高い活性酸素が増加し、細胞や器官に酸化障害をもたらすと予想される。

吸収の場である腸管上皮細胞では、ミネラルなどを吸収すると同時に活性酸素が発生しやすく、酸化障害に対する巧みな防御機構が存在すると考えられる。

一方、ヘムの代謝の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼ (HO)<sup>1)</sup> は、代謝産物として抗酸化物質であるビリルビンを生成する<sup>2)</sup>。また、HOには誘導型のHO-1と構成型のHO-2の、2種類のアイソザイムが存在し<sup>3)</sup>、HO-1はストレスタンパク質32 (HSP32)とも呼ばれている。通常のHO-1量は極めてわずかであり、重金属の添加などにより発現が誘導されることから、酸化ストレスの指標になると考えられている。

本研究では、ヒト結腸由来癌化培養細胞 Caco-2 を用いて、金属イオン添加によるHO-1の誘導及び酸化損傷度を、経時的に追跡することにより、ミネラル間の相互作用について明らかにすることを目的とした。

## 実験方法

### 1 細胞培養

Caco-2細胞の培養には、10%牛胎児血清、4 mM/l L-グルタミン、50000 U/l ペニシリン、50 mg/l ストレプトマイシンを含むDMEM (Dulbecco's Modified EAGLE MEDIUM, 日本製薬)を用い、37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。コンフルエントになった後7日間さらに培養して、実験に供した。

### 2 金属イオンの添加

各金属イオンは無血清のWilliam's Medium E (大日本製薬)に溶解させた。最終濃度は、毒性の最も強い亜硫酸ナトリウムに対して細胞の生存率が50%となる25 μMに調整した。各金属イオンを細胞に添加し、6~24時間インキュベートした後、培地を除去・洗浄し、0.1% TritonX-100により細胞を可溶化した。金属イオンは、ヘミン、塩化第二銅をそれぞれ単独に、亜硫酸ナトリウムと塩化第二銅、ヘミンと塩化第二銅、亜硫酸ナトリウムとヘミンをそれぞれ同時に添加した。

### 3 HO-1量の測定

可溶化した細胞を遠心分離した上清を試料とし、Protein Assay Kit (Bio-Rad社製)を用いてタンパク質量を測定した。総タンパク質50 μgをSDS-PAGEにより分離した後、PVDF膜に転写した。抗HO-1抗体(フナコシ)を1次抗体、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG(フナコシ)を2次抗体として用いて、PVDF膜上のHO-1を検出し、スキャナーでコンピューターの画像に取り込み、NIH Imageを用いて定量した。

### 4 酸化タンパク質量の測定

HO-1量の測定と同様の試料を用いて、ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH)法<sup>4)</sup>により酸化タンパク質量を測定した。0.7~1.0mgのタンパク質を含む試料に最終濃度10%トリクロロ酢酸により得た沈殿に、0.2% DNPHを添加し、室温で1時間保持した後、最終濃度10%トリクロロ酢酸を加え沈殿を回収した。EtOH:EtOAc=1:1で沈殿を3回洗浄した後に、6M塩酸グアニジンで溶解し、遠心分離した。この上清を、370nmで吸光度を測定し、酸化されたタンパク質に取り込まれたDNPH量を分子吸光計数21.0により算出した。

結 果

(1) 単独金属添加による HO-1 および酸化タンパク質レベルの変動

亜硫酸ナトリウム、ヘミンを添加した場合には HO-1 は速やかに誘導され、最大値を示した時間はそれぞれ12時間及び9時間後であり、その量は、亜硫酸ナトリウムはヘミンの約3倍であった (Fig. 1)。いずれの金属も HO-1 量は、最大値を示した後に減少し、その後に酸化損傷度の指標と仮定される酸化タンパク質量が増加した。酸化タンパク質量は、亜硫酸ナトリウム添加後18時間で最大値を示し、その後減少した (Fig. 2)。ヘミン添加によって生成した酸化タンパク質の最大量は、亜硫酸ナトリウム添加の場合の1/3であった。一方、塩化第二銅を添加した場合には、HO-1 の誘導ならびに酸化タンパク質量の変動は認められなかった。すなわち、金属イオン種によって HO-1 の誘導の変動が異なることが明らかとなった。

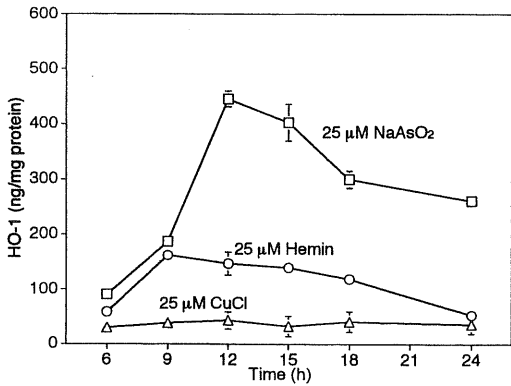


Fig. 1. HO-1 in Caco-2 on Treatment with Hemin, NaAsO<sub>2</sub> or CuCl<sub>2</sub>

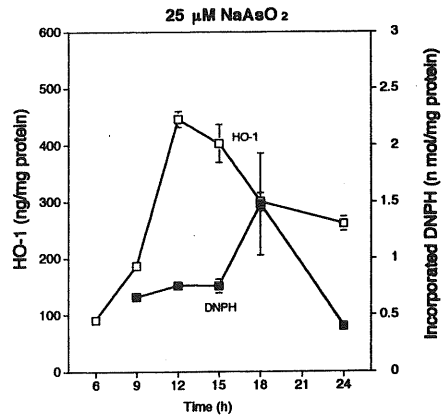


Fig. 2. HO-1 and Oxidized Protein in Caco-2 on Treatment with NaAsO

(2) 混合金属添加による HO-1 および酸化タンパク質レベルの変動

亜硫酸ナトリウムと塩化第二銅を同時に添加した場合、亜硫酸ナトリウムを単独で添加した時と比較すると、HO-1 の最大誘導量を示したのは同じ9時間後であった。しかし、その誘導量は、塩化第二銅を同時に添加することによって約半分を抑えられ、その後の誘導も抑制された。

ヘミンと塩化第二銅を同時に添加した場合も、ヘミンを単独で添加した時と比較すると、HO-1 の最大誘導量を示したのは同じ9時間後であったが、塩化第二銅を同時に添加すると12時間以降においてHO-1 の誘導が抑制された (Fig. 3)。酸化タンパク質量については、亜硫酸ナトリウム、ヘミンを単独で添加した場合よりも塩化第二銅を混合添加した場合の方がその量は少なかった。しかし、HO-1 量が減少した後に酸化タンパク質量が増加するという変動のパターンは、単独添加の場合と同様であった。

これらのことから、銅イオンがヘミンや亜硫酸ナトリウムによる HO-1 の誘導を抑制する作用があると示唆された。

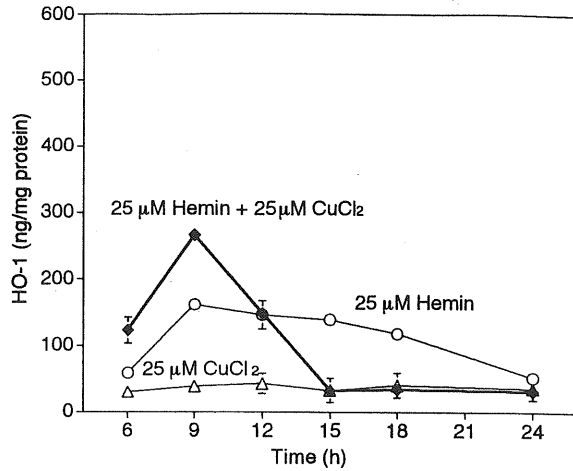


Fig. 3. HO-1 in Caco-2 on Treatment with Hemin, CuCl<sub>2</sub> or Hemin + CuCl<sub>2</sub>

次に単独添加によっても HO-1 を誘導する亜砒酸ナトリウム及びヘミンを同時に添加した時の変化を調べた。亜砒酸ナトリウム単独添加の場合と比較すると、HO-1 の最大誘導量を与える時間が12時間後から9時間後へと早まり、HO-1 の誘導量は有意に高かった (Fig. 4)。酸化タンパク質量も、それぞれ単独で添加した場合よりも混合添加した方がより早い時期に最大値を示し、その量も多かった。しかし、HO-1 と酸化タンパク質の経時的な変動パターンは、これまでと同様であった。

このことから、亜砒酸ナトリウムとヘミンの間には HO-1 の誘導に関して相互作用があることが示唆された。

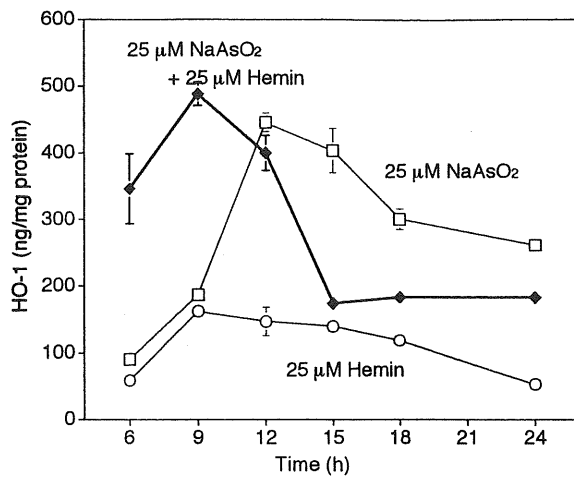


Fig. 4. HO-1 in Caco-2 on Treatment with NaAsO<sub>2</sub>, Hemin or NaAsO<sub>2</sub> + Hemin

## 考 察

金属種によってHO-1および酸化タンパク質の経時的变化に差異があることが明らかになった。亜硫酸ナトリウムとヘミンに塩化第二銅を同時に添加することにより、HO-1の誘導量と酸化タンパク質レベルの上昇を抑制されることが明らかとなった。また、亜硫酸ナトリウムとヘミンを混合添加すると、それぞれ単独に添加した場合に比べて、HO-1誘導量と酸化タンパク質量が高くなることが示された。これらの結果は、HO-1誘導と酸化タンパク質の生成に対して、これらの金属が何らかの相互作用をしていることを示唆している。しかし、以上の結果から、HO-1誘導が最大に達した後に酸化タンパク質の生成量が最大に達するという経時的变化のパターンは、添加する金属イオン種を変えても同様であり、HO-1の誘導と酸化タンパク質の生成には何らかの関連があることが示唆された。この関連について2通りの仮説が考えられる。

仮説1は、HO-1誘導量が最大に達した後に、その量が減少するが、この減少に伴って酸化タンパク質量が増加するのは、HO-1が誘導されることによって酸化タンパク質の生成つまり酸化的損傷が抑えられている、即ち、HO-1の抗酸化性の減少に伴って酸化タンパク質量で示される酸化的損傷が増加すると考えられる。このHO-1の抗酸化性は、HO-1の代謝産物である抗酸化物質ビリルビン、もしくは、鉄イオンがフェントン反応によって活性酸素を生成するため、この鉄イオンをトラップするフェリチンの作用<sup>5)</sup>によるものと予想される。

仮説2は、金属添加によって誘導されたHO-1が更に酸化タンパク質を誘導するということである。これは、HO-1の抗酸化機能を否定するものであるが、酸化タンパク質が細胞の酸化損傷度の指標であることが明確でないことから、上記の可能性も否定できない。

今回明らかになった金属種また金属の混合添加によってHO-1誘導ならびに酸化タンパク質レベルの経時的变化が異なる原因を更に明らかにすることによって、HO-1の細胞内での機能やHO-1と酸化タンパク質の関連を解明できるものと期待できる。

## 引用文献

- 1) R. Tenhunen, H. S. Marver & R. Schmid (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 61 : 748-755.
- 2) R. Stocker, Y. Yamamoto, A. F. MacDonagh, A. N. Glazer & B. N. Ames (1987) *Science* 235 : 1043-1046.
- 3) Ingrid Cruse and Mahin D. Mains (1988) *J. Biol. Chem.* 263 : 3348-3353.
- 4) C. N. Oliver, B. W. Ahn, E. J. Moerman, S. Goldstein & E. R. Stadtman (1987) *J. Biol. Chem.* 262 : 5488-5491.
- 5) Glenn F. Vile and Rex M. Tyrrell (1993) *J. Biol. Chem.* 268 ; 14678-14681.