

## クロムのカルシニューリン活性に対する影響

秋山 珠璃, 田中 佑季, 田中 進  
 (高崎健康福祉大学大学院健康福祉学研究科食品栄養学専攻\*)  
 (受付 2019年8月29日, 受理 2019年10月8日)

## Effect of chromium on calcineurin phosphatase activity

Shuri AKIYAMA, Yuki TANAKA, Susumu TANAKA  
 Takasaki University of Health and Welfare, Graduate School of Health and Welfare

## Summary

Chromium is one of the transition elements and it exists in numerous oxidation states. Trivalent chromium (Cr [III]) and hexavalent chromium (Cr [VI]) have been reported to play roles in human health. Industrially produced Cr (VI) is carcinogenic and toxic based on its strong oxidizing power. Conversely, Cr (III) is present in food and the environment, and is an essential trace element for mammals that participates in carbohydrate metabolism. Cr (III) reportedly enhances and maintains the tyrosine kinase activity of insulin receptors via chromium-containing oligopeptides (also known as chromodulin).

Calcineurin (CN) is a calcium ion ( $\text{Ca}^{2+}$ )/calmodulin (CaM)-dependent protein phosphatase and is also known as serine/threonine phosphatase. In a previous study, we confirmed that trivalent lanthanum (La [III]), one of the rare earth elements, inhibits the phosphatase activity of nickel ion ( $\text{Ni}^{2+}$ )-stimulated CN from the bovine brain and the phosphatase activity of recombinant human CN (rhCN) from *Escherichia coli*. Kinetic analysis has revealed that such inhibition is a mixed type inhibition. In the present study, we examined the effect of rhCN on phosphatase activity using Cr (III) and Cr (VI). We have observed Cr (III) inhibited rhCN, while Cr (VI) did not. Using Lineweaver–Burk plot analyses, we demonstrated that Cr (III) inhibited phosphatase activity non-competitively.

遷移元素の一つであるクロムは様々な価数をとるが、一般的な形態は0 (単体), +3 価 (三価クロム), +6 価 (六価クロム) であると言われている。六価クロムは、主として工業的に製造されるのに対して、自然界に存在するクロムの多くは三価クロムであると考えられている。六価クロムは強い酸化力をもつことから、毒性が強く、国際がん研究機関 (IARC) の評価では「ヒトに対して発がん性がある」というグループ1 に分類されている<sup>1)</sup>。実際には、六価クロム暴露部位の細胞は壊死を起こすことが報告されており、また慢性暴露によって肺がんや胃がんの発症率が高まるとされている<sup>2,3)</sup>。一方、三価クロムは食品に含まれ、ヒトの糖代謝改善に影響を与えるとされることから、クロムは必須微量元素の一つに数えられている。三価クロムを投与した動物組織からは三価クロムを結合させたクロモデュリンと呼ばれるオリゴペプチドが存在することが確認され、これがインスリン刺激によって活性化されるインスリン受容体のチロシンキナーゼ活性の維持と増強に関与することが示されている<sup>4-6)</sup>。しかしながら、最近ではク

ロムの糖代謝改善作用は薬理作用であり、かならずしも必須の栄養素ではないという報告もある<sup>7)</sup>。

一方、カルシニューリン (CN) は、カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) / カルモジュリン (CaM) 依存性のタンパク質脱リン酸化酵素であり、セリン / トレオニンホスファターゼの活性をもっている。免疫系において CN は細胞性免疫に関与する酵素であることから、免疫抑制剤の標的酵素であることが知られている。先行研究において、我々は希土類元素の一つである三価のランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) に着目し、細胞性免疫に対する影響について基礎的検討を行う目的で CN 活性に対する検討を試みた。その結果、 $\text{La}^{3+}$  はニッケルイオン ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 刺激したウシ脳由来の CN (bCN) およびリコンビナントヒト CN (rhCN) 活性を阻害することを見出し、この阻害はキネティクス解析により混合阻害であることを報告してきた<sup>8,9)</sup>。従って、 $\text{La}^{3+}$  は、細胞性免疫系に影響を与える可能性があると考えられる。本研究では、ランタンと同じ三価のクロムとさらに六価クロムを用い、これらの元素がヒトの細胞性免疫に与える影響や

\*所在地：群馬県高崎市中大類町37-1 (〒370-0033)

免疫抑制剤としての可能性を探るため、ヒト酵素である rhCN を使用してホスファターゼ活性に対する影響について検討したので報告する。

## 実験方法

### 1. 試薬

塩化クロム ( $\text{CrCl}_3$ )、クロム酸カリウム ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ )、二クロム酸カリウム ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) は富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) から、硫酸クロム ( $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ ) は関東化学株式会社 (東京) から購入した。リコンビナントヒトカルシニューリン (rhCN) 測定のためのホスファターゼアッセイキットは Enzo Life Sciences International, Inc. (Plymouth Meeting, PA) から購入した。

### 2. rhCN 活性の測定

CN 活性はホスファターゼアッセイキットのプロトコルに従って、前報<sup>9,10</sup> の通り測定を行った。次に示すような酵素反応溶液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mM DTT, 0.025% NP-40) を調製し、それぞれ 8 U/ $\mu\text{L}$  の rhCN<sup>11</sup>) と 0.25  $\mu\text{M}$  CaM を添加したものを標準酵素反応液とした。これに任意の濃度の  $\text{CrCl}_3$ ,  $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ ,  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  をそれぞれ加え、基質として 150  $\mu\text{M}$  の R II リン酸化ペプチド (Asp-Leu-Asp-Val-Pro-Ile-Pro-Gly-Arg-Phe-Asp-Arg-Arg-Val-*p*Ser-Val-Ala-Ala-Glu)<sup>12,13</sup>) を加え、30°C, 60 分間、酵素反応を行った。60 分後、この溶液の 2 倍量のマラカイトグリーンを添加し、酵素反応の結果、生成したリン酸を波長 620 nm の吸光度 ( $A_{620}$ ) を測定することにより、CN の酵素活性を求めた<sup>14,15</sup>)。なお、酵素活性は  $A_{620}$  とリン酸濃度との検量線を使用することにより求めた。

### 3. キネティクス解析

rhCN のホスファターゼ活性に対する三価クロムの阻害形式を明らかとするために行った逆数プロット解析は、標準酵素反応液に終濃度で  $\text{CrCl}_3$  なし (0  $\mu\text{M}$ ) あるいは 30  $\mu\text{M}$  をそれぞれ添加して一定濃度で固定し、さらに、基質である R II リン酸化ペプチドを任意の濃度でそれぞれ添加して 30°C, 60 分間反応させた。それぞれの反応速度と基質濃度の逆数をプロットし、阻害形式を求めた。

三価クロムの rhCN に対する阻害定数  $K_i$  を求めるために行った Dixon プロット解析は、R II リン酸化ペプチドの濃度をそれぞれ 75  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$  に固定し、標準酵素反応液に任意の濃度の  $\text{CrCl}_3$  をそれぞれ加え、30°C, 60 分間反応させた。 $\text{CrCl}_3$  の濃度と反応速度の逆数をプロットし、 $K_i$  を求めた。

### 4. 統計解析

得られた結果は平均値  $\pm$  標準偏差で表し、Dunnett's test で解析した。50% 阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) は、GraphPad

Prism5 (GraphPad Software, San Diego) を用いて非線形回帰による分析で求めた。有意水準は  $p < 0.05$  または  $p < 0.01$  とした。

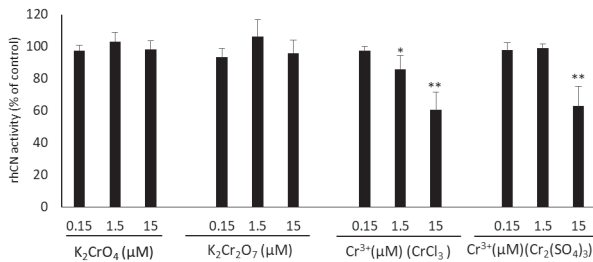
## 結果と考察

カルシニューリン (CN) はホスホプロテインホスファターゼの一種で、PP2B とも言われており、酵母から高等動物までの生物の全ての細胞に存在する酵素であるが、特に高等動物では細胞性免疫に関わる細胞内情報伝達系において重要な役割を果たしていることが知られている。T 細胞において細胞性免疫に関与するインターロイキン-2 (IL-2) mRNA の発現は、転写調節因子の一つである Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (NFATc1) により制御されているが、CN はリン酸化 NFATc1 を脱リン酸化することにより活性化型に変化させ、IL-2 mRNA の発現を高めることにより細胞性免疫を上昇させる<sup>16</sup>)。臓器移植などの際に臨床で使用される免疫抑制剤 FK506 やシクロスポリンは細胞内でイムノフィリンと結合し、このタンパク質複合体が CN を阻害することから、CN は免疫抑制剤の標的酵素となっている<sup>17</sup>)。細胞内の CN は、カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) やカルモジュリン (CaM) およびその他の因子によって活性が調節されていると思われるが、*in vitro* では、ニッケルイオン ( $\text{Ni}^{2+}$ ) やマンガンイオン ( $\text{Mn}^{2+}$ ) のような二価重金属で活性化 (刺激) されることが明らかとなっている<sup>18-20</sup>)。近年、我々は *in vitro* において亜鉛イオン ( $\text{Zn}^{2+}$ ) が  $\text{Ni}^{2+}$  との競合により CN 活性を阻害すること<sup>21</sup>)、また  $\text{Mn}^{2+}$  が  $\text{Ni}^{2+}$  刺激した CN 活性を不競合的に阻害することを明らかとし<sup>22</sup>)、更にバナジウム (オルトバナジウム酸、メタバナジウム酸、バナジル) が  $\text{Ni}^{2+}$  刺激した CN 活性を二相性に阻害することをウシ脳由来の CN (bCN) を使用して報告してきた<sup>23,24</sup>)。また bCN とリコンビナントヒト CN (rhCN) のホスファターゼ活性が希土類元素の一つであるランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ ) で阻害されることを見出し、キネティクス解析によりその阻害形式が混合阻害であることを明らかとしてきた<sup>8,9</sup>)。本研究では  $\text{La}^{3+}$  と同じ三価クロム (塩化クロム ( $\text{CrCl}_3$ )、硫酸クロム  $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ ) に着目するとともに、さらに六価クロム (クロム酸カリウム ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ )、二クロム酸カリウム ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )) を用いて rhCN のホスファターゼ活性に対する影響について検討を行った。

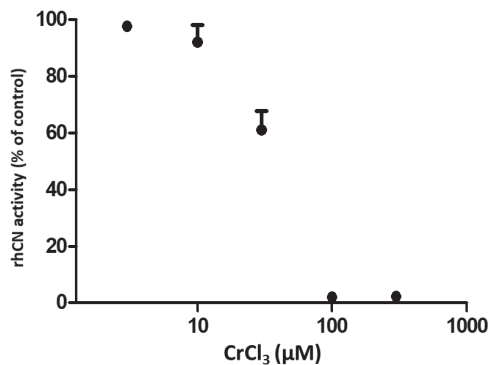
Fig. 1 に示すように六価クロムとして使用した  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  では 0.15  $\mu\text{M}$ , 1.5  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$  の濃度において rhCN 活性に影響を与えなかったが、三価クロムとして使用した  $\text{CrCl}_3$  では、コントロールと比較して 1.5  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$  の濃度で有意に CN 活性の阻害を認めた。 $\text{CrCl}_3$  の CN 活性に対する阻害が  $\text{Cr}^{3+}$  によるものか確認するために、硫酸クロム  $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$  を使用して同様な検討を試みたところ、Fig. 1 に示すように  $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$  においても 15  $\mu\text{M}$  で

CN 活性の有意な低下を認め、従って、 $\text{Cr}^{3+}$  は rhCN を阻害することが示唆された。さらに  $\text{CrCl}_3$  の濃度を変えて rhCN のホスファターゼ活性に対する影響を検討したところ、CN 活性の阻害を認め、50% 阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) は約  $32.6 \mu\text{M}$  であった (Fig. 2)。次に  $\text{Cr}^{3+}$  の CN 活性阻害のメカニズムを明らかとするために、キネティクス解析を行い検討を試みた。 $\text{CrCl}_3$  なし ( $0 \mu\text{M}$ )、あるいは  $30 \mu\text{M}$  でそれぞれ一定の濃度に固定し、基質として使用した R II リン酸化ペプチドの濃度を変えて CN 活性を測定した。Fig. 3 に示すように基質と反応速度について二重逆数プロットを作成し、 $\text{Cr}^{3+}$  の rhCN に対する阻害形式を検討したところ、 $\text{CrCl}_3$  なし ( $0 \mu\text{M}$ ) とあり ( $30 \mu\text{M}$ ) のそれぞれの直線はグラフの x 軸で交叉し、この結果、 $\text{Cr}^{3+}$  は非競合阻害により rhCN 活性を阻害することが示された。次に  $\text{CrCl}_3$  の rhCN に対する阻害定数  $K_i$  を求めるために、R II リン酸化ペプチドの濃度をそれぞれ  $75 \mu\text{M}$ 、 $150 \mu\text{M}$  に固定し、 $\text{CrCl}_3$  の濃度を変えて CN 活性を測定することにより Dixon プロット解析を行った (Fig. 4)。それぞれの直線は x 軸で交叉し、この結果からも  $\text{Cr}^{3+}$  は非競合阻害により rhCN 活性を阻害することが示された。また、 $K_i$  は、約  $18.0 \mu\text{M}$  であった。

本研究により三価クロムは、 $\text{La}^{3+}$  同様に rhCN のホス

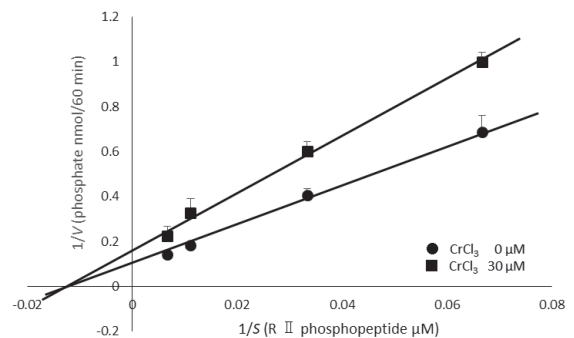


**Fig. 1** Effects of potassium chromate ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ), potassium dichromate ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), chromium chloride ( $\text{CrCl}_3$ ), and chromium sulfate ( $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ ) on the activity of recombinant human calcineurin (rhCN) from *Escherichia coli*. rhCN activity inhibition increased with increased  $\text{CrCl}_3$  and  $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$  concentrations. Values are presented as mean  $\pm$  standard deviation. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. control.

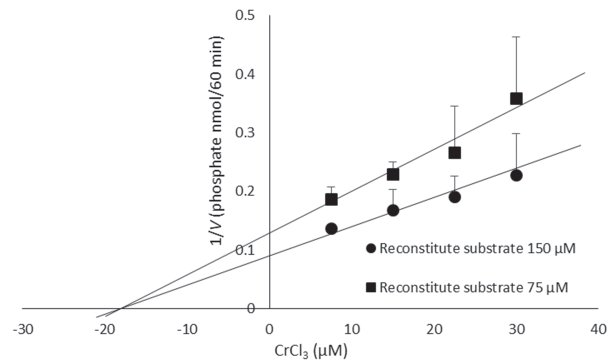


**Fig. 2** Inhibition of phosphatase activity of recombinant human calcineurin (rhCN) by  $\text{CrCl}_3$ .  $\text{IC}_{50}$  values were calculated using GraphPad Prism5. Values are presented as mean  $\pm$  standard deviation.

ファターゼ活性を阻害することが明らかとなった。しかしながら rhCN に対する  $\text{IC}_{50}$  は  $\text{La}^{3+}$  で約  $8.8 \mu\text{M}$ <sup>9)</sup>、 $\text{Cr}^{3+}$  で約  $32.6 \mu\text{M}$  であった。またキネティクス解析から求めた阻害形式も  $\text{La}^{3+}$  が混合阻害<sup>9)</sup> に対して、 $\text{Cr}^{3+}$  は非競合阻害であり (Fig. 3, Fig. 4), 阻害形式が異なることが示された。 $K_i$  については、 $\text{La}^{3+}$  は rhCN に対して混合阻害を示すことから、rhCN に対する  $K_i$  が約  $7.0 \mu\text{M}$ 、rhCN-基質 (R II リン酸化ペプチド) 複合体に対する  $K_i$  が約  $10.2 \mu\text{M}$  であることが示されている<sup>9)</sup>。本検討で  $\text{Cr}^{3+}$  の rhCN に対する  $K_i$  は約  $18.0 \mu\text{M}$  であり、 $\text{La}^{3+}$  と比較して高い値が得られた。同じ 3 価のイオンでありながら、 $\text{Cr}^{3+}$  と  $\text{La}^{3+}$  で阻害形式や  $K_i$  が異なる理由や三価クロムが rhCN を阻害するのに対して六価クロムでは阻害を認めないことに関しては、CN への結合性や結合部位がそれぞれ異なるためと考えられるが、詳細な検討が必要であると思われる。ヒト T 細胞用株 Jurkat 細胞を用いた先行研究<sup>8)</sup> において、我々は  $\text{La}^{3+}$  が転写調節因子 NFATc1 を介してコンカナバリン A (ConA) 誘導性の IL-2 mRNA 発現および IL-2 タンパク質の産生を抑制することを見出している。今後は、三価クロムが細胞性免疫に影響を与える可能性について細胞レベルで検討を行っていきたいと考える。



**Fig. 3** Double-reciprocal Lineweaver-Burk plot.  $1/V$  (phosphate nmol/60 min) increased linearly with increased  $1/S$  (R II phosphopeptide  $\mu\text{M}$ ), and was the highest at  $30 \mu\text{M}$   $\text{CrCl}_3$  and the lowest at  $0 \mu\text{M}$   $\text{CrCl}_3$ . Values are presented as mean  $\pm$  standard deviation.



**Fig. 4** Dixon plot. The line indicates the inhibitor concentration ( $\text{CrCl}_3$ ) vs.  $1/V$  (phosphate nmol/60 min). The inhibition constant  $K_i$  was calculated from the intersection of two straight lines on the x-intercept. Values are presented as mean  $\pm$  standard deviation.

## 参考文献

- 1) Chen QY, Murphy A, Sun H, Costa M (2019) Molecular and epigenetic mechanisms of Cr (VI)-induced carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 377: 114636. DOI: 10.1016/j.taap.2019.114636.
- 2) 吉田宗弘 (2018) 臨床医として知っておきたいミネラルの知識 クロム. *成人病と生活習慣病* 6: 644-647.
- 3) Smith AH, Steinmaus CM (2009) Health effects of arsenic and chromium in drinking water: Recent human findings. *Ann Rev Public Health* 30: 107-122.
- 4) Yamamoto A, Ono T, Wada O (1987) Isolation of a biologically active low-molecular-mass chromium compound from rabbit liver. *Eur J Biochem* 165: 627-31.
- 5) Davis CM, Vincent JB (1997) Chromium oligopeptide activates insulin receptor tyrosine kinase activity. *Biochemistry* 36: 4382-4385.
- 6) Vincent JB (2004) Recent advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium. *Proc Nutr Soc* 63: 41-47.
- 7) Vincent JB (2017) New Evidence against Chromium as an Essential Trace Element. *J Nutr* 147(12): 2212-2219. DOI: 10.3945/jn.117.255901.
- 8) 秋山琉璃, 井上咲季, 中島徹, 田中進 (2017) ランタンイオンの細胞性免疫に対する影響の基礎的検討. *微量栄養素研究* 34: 52-58.
- 9) 秋山琉璃, 田中佑季, 田中進 (2018) 希土類元素のカルシニューリン活性に対する影響. *微量栄養素研究* 35: 78-82.
- 10) 田中進, 田中佑季, 伊藤昇, 保坂公平 (2011) リコンビナントヒトカルシニューリン活性に対する金属イオンの効果. *医学と生物学* 155 (8): 483-488.
- 11) Mondragon A, Griffith EC, Sun L, Xiong F, Armstrong C, Liu JO (1997) Overexpression and purification of human calcineurin *a* from *Escherichia coli* and assessment of catalytic functions of residues surrounding the binuclear metal center. *Biochemistry* 36: 4934-4942.
- 12) Enz A, Shapiro G, Chappuis A, Dattler A (1994) Nonradioactive assay for protein phosphatase 2B (calcineurin) activity using a partial sequence of the subunit of cAMP-dependent protein kinase as substrate. *Anal Biochem* 216: 147-153.
- 13) Donella-Deana A, Krinks MH, Ruzzene M, Klee C, Pinna LA (1994) Dephosphorylation of phosphopeptides by calcineurin (protein phosphatase 2B). *Eur J Biochem* 219: 109-117.
- 14) Martin B, Pallen CJ, Wang JH, Graves DJ (1985) Use of fluorinated tyrosine phosphates to probe the substrate specificity of the low molecular weight phosphatase activity of calcineurin. *J Biol Chem* 260: 14932-14937.
- 15) Harder KW, Owen P, Wong LK, Aebersold R, Clark-Lewis I, Jirik FR (1994) Characterization and kinetic analysis of the intracellular domain of human protein tyrosine phosphatase beta (HPTP beta) using synthetic phosphopeptides. *Biochem J* 298: 395-401.
- 16) Crabtree GR (1999) Generic signals and specific outcomes: signaling through  $Ca^{2+}$ , calcineurin, and NF-AT. *Cell* 96: 611-614.
- 17) Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL (1991) Calcineurin is a common target of cyclosporine A and FKBP-PK506 complexes. *Cell* 66: 807-815.
- 18) Li HC, Chan WW (1984) Activation of brain calcineurin towards proteins containing Thr(P) and Ser(P) by  $Ca^{2+}$ , calmodulin,  $Mg^{2+}$  and transition metal ions. *Eur J Biochem* 144: 447-452.
- 19) Pallen CJ, Wang JH (1984) Regulation of calcineurin by metal ions. *J Biol Chem* 259: 6134-6141.
- 20) Pallen CJ, Wang JH (1986) Stoichiometry and dynamic interactions of metal ion activators with calcineurin phosphatase. *J Biol Chem* 261: 16115-16120.
- 21) Takahashi K, Akaishi E, Abe Y, Ishikawa R, Tanaka S, Hosaka K, Kubohara Y (2003) Zinc inhibits calcineurin activity in vitro by competing with nickel. *Biochem Biophys Res Commun* 307: 64-68.
- 22) 田中佑季, 大塚恵美子, 保坂公平, 田中進 (2009) マンガンはニッケル刺激したカルシニューリン活性を不競合的に阻害する. *微量栄養素研究* 26: 70-73.
- 23) 田中進, 大塚恵美子, 高橋克典, 増田泰紀, 本間千裕, 宮澤紀子, 保坂公平 (2008) ニッケル刺激したカルシニューリン活性に対するバナジウムの効果. *医学と生物学* 152 (3): 88-93.
- 24) 田中佑季, 大塚恵美子, 保坂公平, 田中進 (2008) ニッケル刺激したカルシニューリン活性におけるバナジウム阻害のキネティック解析. *微量栄養素研究* 25: 122-124.