

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790123
 研究課題名（和文）カドミウムの細胞輸送における亜鉛輸送体とカルシウムチャネルのクロストーク
 研究課題名（英文）Cross-talk of zinc transporter and Ca channels in cellular transport of cadmium
 研究代表者
 藤代 瞳（FUJISHIRO HITOMI）
 徳島文理大学・薬学部・助教
 研究者番号：10389192

研究成果の概要（和文）：カドミウム(Cd)は人体に腎臓や骨の疾患を引き起こす環境汚染物質であるが、Cdの細胞への取り込み、細胞からの排泄機構はほとんど明らかになっていない。Cdは必須微量元素ではないため、亜鉛の輸送体やCaチャネルを介して輸送される可能性がある。本研究は、亜鉛の排出輸送体であるZnT-1に注目し、ZnT-1がCdの排泄に関与しているか、またZnT1の発現が高く、Caチャネルの発現が低くなっている細胞を作成し、Cdの輸送が変化しているかどうかを検討した。

研究成果の概要（英文）：Cadmium(Cd) is a heavy metal widely distributed in the environment and causes adverse effects in a variety of organisms including humans. However, the mechanisms of cellular cadmium uptake and excretion have been poorly understood. It has been assumed that cellular Cd uptake is mediated by pathways for other essential elements such as Ca and Zn. The present study examined the involvement of Zn transporter and Ca channel in cellular Cd transport (influx and efflux) by using a cell line in which the expression of Zn transporter and Ca channel was changed.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：中毒学・カドミウム・衛生・生体分子・輸送体・亜鉛・カルシウムチャネル

1. 研究開始当初の背景

これまでの本研究者の報告を含む多くの研究により、細胞へのCd取込みにZn輸送体やカルシウムチャンネルが関与していることがわかってきた。しかし、Cdの細胞外への排泄にZn輸送体が関与しているかどうかはまったくわかっていない。本研究者は、高濃度のCdに耐性を示すCd耐性細胞を樹立し、性状を解析したところ、細胞外へZnを排出する輸送体であるZnT-1の発現量がすべてのクローンに共通して高いことを見出した。しかし、Cd耐性、Cd輸送におけるZnT-1の役割はわかっていない。一方、最近、ZnT-1の発現低下によって、カルシウムチャンネルを介したカチオンの細胞内流入が上昇し、逆にZnT-1の発現上昇でCa流入が低下することが報告された。しかし、このようなZnT-1とCaチャンネルとのクロストークがCd輸送にどのように関与しているか、また、Cd輸送とZnT-1、Cd輸送とCaチャンネルとの関係がそれぞれどうなっているのかについてもわかっていない。

2. 研究の目的

① ZnT-1がZnだけでなくCdを細胞外に排泄する能力があるかどうかについて検討する。
② ZnT-1が高発現しているCd耐性細胞ではZnT-1とLTCCとの相互作用により、Caチャンネルの機能が抑制されており、そのために、高濃度のCd、Mnの流入が抑制されている、という可能性について検討する。

3. 研究の方法

① すでに樹立しているZnT-1が高発現したCd耐性細胞を活用することにより、Znの排泄に関与するZn輸送体がCdの排泄にも関与するかどうかを放射標識したCd、Zn

を活用して明らかにする。また、Cd、Mnの取込み効率が高いRBL-2H3細胞からもCd耐性細胞を新たに樹立して検討する。

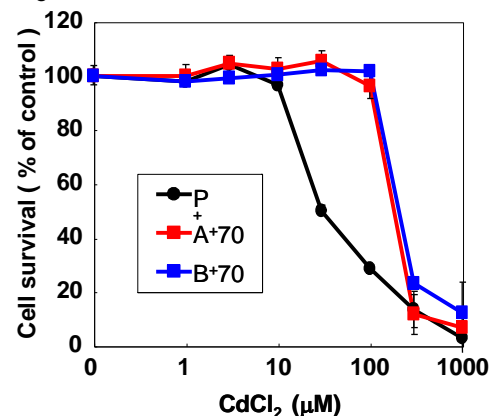
② ZnT-1とCaチャンネルとのクロストークを検討するため、Caプローブを活用して、ZnT-1の発現変化とCaチャンネルの機能を調べる。その際、Caのみならず、Mn、Cd、Znの取り込みの変化についても調べる。

③ Cd耐性細胞のみならず、遺伝子工学的にZnT-1の発現を亢進、あるいは抑制した細胞も活用する。

4. 研究成果

(1) 本研究室で樹立したMT^{+/+}Cd耐性細胞のCdに対するLC₅₀はA⁺70、B⁺70で約200 μM

Fig 1. MT^{+/+}Cd耐性細胞のCdに対する感受性



であり、親株(P⁺)の約7倍の耐性を示した(Fig 1)。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、Cd添加24時間後のA⁺70、B⁺70の細胞内Cd蓄積量はP⁺に比べて減少していた(Fig 2)。Cdの細胞内への取り込み効率は、A⁺70、B⁺70の方が低かった(Fig 3)。A⁺70、B⁺70ではZn輸送体のZIP8、CaチャンネルのCaV1.2の発現が低下していた(Fig 4)。

一方、ZnT1は細胞外にZnを排泄する輸送体であるが、他の2価金属の排泄に関与して

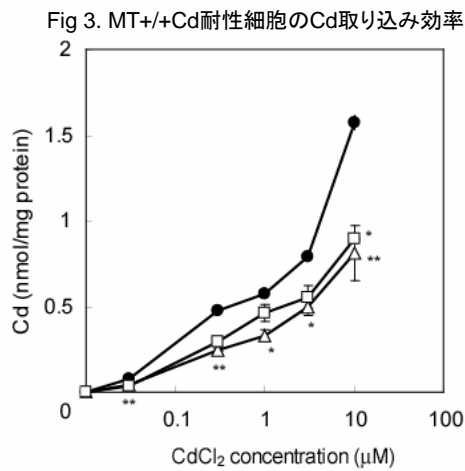
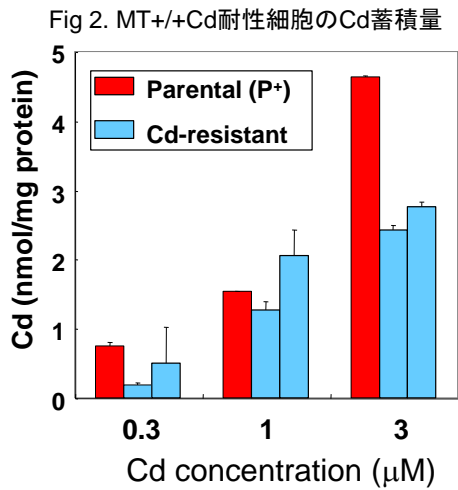
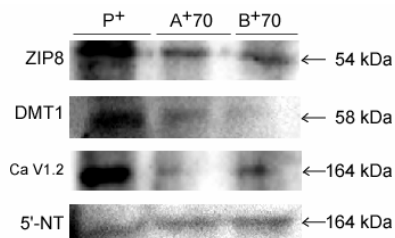


Fig 4. MT+/+Cd耐性細胞における様々な輸送体の発現変化



いるかどうかは不明である。そこでまず、ZnT1 の発現を MT+/+Cd 耐性細胞で調べた。その結果、培地中に Cd が存在すると ZnT1 の mRNA は親株に比べて著しく発現上昇し、タンパクレベルでも ZnT1 の発現が MT+/+Cd 耐性細胞において高くなっていることが明らかになった(Fig 5)。次に、ZnT1 が高発現していた MT+/+Cd 耐性細胞において Cd の排泄を調べた。MT+/+Cd 耐性細胞において培地を

Fig 5. MT+/+Cd耐性細胞におけるZnT1遺伝子の発現量の変化

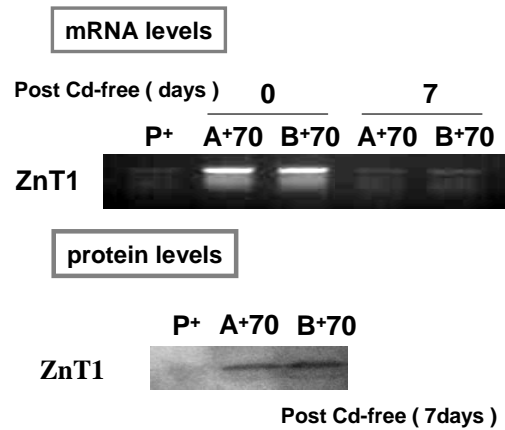
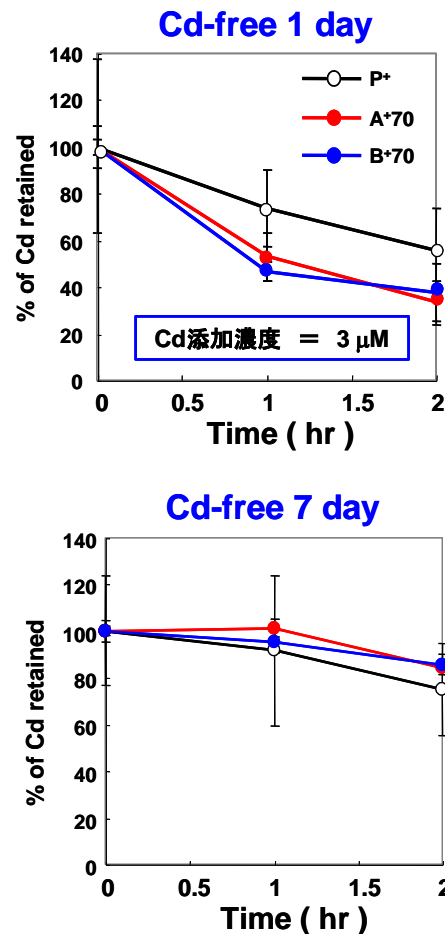


Fig 6. 高濃度Cd耐性細胞におけるCdの排泄効率



Cd-free にして1日後には親株細胞よりも若干亢進したが、7日後にはほとんど差がなくなった(Fig 6)。よって、ZnT1 が Cd の排泄に関与するかどうかはさらに検討が必要である。この結果から ZnT1 が Cd を排泄する可能性があるが、MT+/+Cd 耐性細胞では解析しに

Fig 7. ZnT1過剰発現HEK293細胞のCd排泄効率の変化

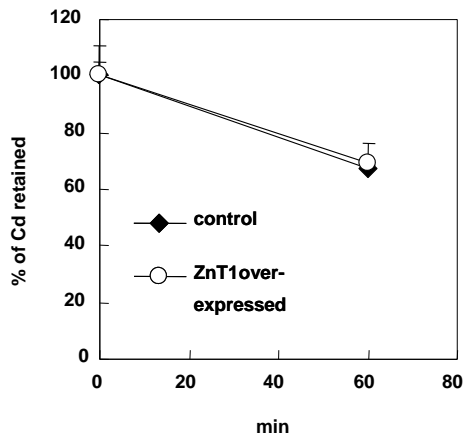


Fig 8. HEK293細胞へのZnT1過剰発現によるCd排泄への影響

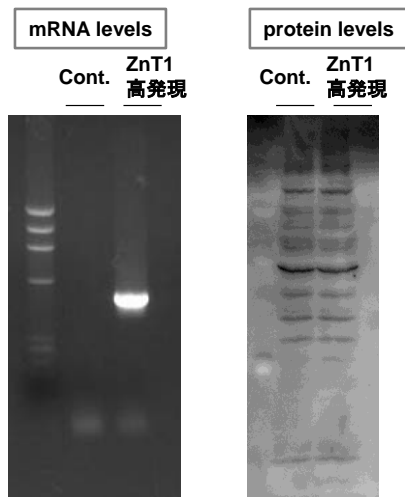
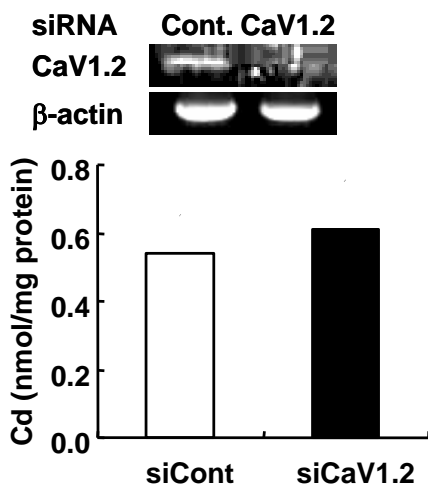


Fig 9. RBL-2H3細胞へのCaV1.2の発現抑制によるCd取り込み効率への影響



くいと考え、Cd 耐性細胞よりも高いレベルで

ZnT1 を高発現細胞している細胞の樹立を目指した。HEK293 細胞に ZnT1 遺伝子を導入し、Cd 排泄に及ぼす影響を検討した結果、ZnT1 を過剰発現しても Cd の排泄は変化していなかった(Fig 7)。しかし、この系で mRNA レベルでは ZnT1 発現上昇を確認できたが、タンパクレベルではその発現上昇が確認できなかった(Fig 8)。

(2) Cd に対して高い感受性を示す RBL-2H3 細胞において Cd の取り込みに関与する可能性のある L-type Ca channel (CaV1.2)の役割を検討した。そこで RBL-2H3 細胞に CaV1.2 siRNA を導入して発現抑制し Cd の取り込み効率を調べたが、Cd の取り込み速度の変化は観察されなかった。このように ZnT1, CaV1.2 が Cd 輸送に関与するかどうか個別に検討を行ったが、ZnT1 と CaV1.2 などの Ca channel が相互に発現を調節しているかどうかまでは明らかにできなかった。しかし、ZnT1 が Cd 輸送に何らかの役割を果たす可能性についてはまだ残されている。今後さらにこれらの役割やクロストークについては検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Fujishiro, H., Okugaki, S., Yasumitsu, S., Enomoto, S., Himeno, S. (2009) Involvement of DNA hypermethylation in down-regulation of the zinc transporter ZIP8 in cadmium-resistant metallothionein-null cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241, 195-201. (査読有り).
2. Fujishiro, H., Okugaki, S., Kubota, K., Fujiyama, T., Miyataka, H., Himeno, S. (2009) The role of zinc transporters in cadmium and manganese transport in mammalian cells. *J. Appl. Toxicol.* 29(5), 367-373. (査読有り).
3. Yu, J., Fujishiro, H., Miyataka, H., Oyama, M.T., Hasegawa, T., Seko, Y., Miura, N., Himeno, S. (2009) Dichotomous effects of

- lead acetate on the expression of metallothionein in the liver and kidney of mice. *Biol. Pharm. Bull.* 32(6), 1037-1042. (査読有り).
4. Himeno, S., Yanagiya, T., Fujishiro, H. (2009) The role of zinc transporters in cadmium and manganese transport in mammalian cells. *Biochimie.* 91(10), 1218-1222. (査読有り).
 5. Himeno, S. and Fujishiro, H. (2008) Role of zinc transporters in cadmium transport in mammalian cells. *Cell Biol. Toxicol.* 24 (Supple 1), S63-S64. (査読有り).
 6. 藤代 瞳, 姫野誠一郎. (2009) 微量元素のトランスポーター. *臨床検査.* 53(2), 713-717.

[学会発表] (計 33 件)

(国内学会 33 件、うち招待講演 4 件)

1. 奥垣里美, 藤代 瞳, ○姫野誠一郎, カドミウム耐性細胞における亜鉛輸送体 ZIP8 の発現低下と DNA メチル化. 第 2 回日本エピジェネティクス研究会年会、2008 年 5 月 9 日、静岡.
2. 藤代 瞳, 奥垣里美, ○姫野誠一郎, カドミウム輸送における亜鉛輸送体 ZIP8 の役割. 第 3 回トランスポーター研究会、2008 年 6 月 7 日、京都.
3. Synergistic activation of peritoneal macrophages by lipopolysaccharide and nickel or cobalt. ○Seiichiro Himeno, Hiroko Hoshizaki, Naoko Orihara, Koichiro Matsuda, Hitomi Fujishiro. 第 18 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2008 年 6 月 5-6 日、名古屋.
4. ○藤代 瞳, 奥垣里美, 姫野誠一郎, 亜鉛輸送体 ZIP8 の発現調節における DNA メチル化の関与. 第 19 回日本微量元素学会、2008 年 7 月 3 日、東京.
5. ○藤代 瞳, 窪田圭祐, 井上大輔, 姫野誠一郎, カドミウムとマンガン細胞毒性・輸送における亜鉛輸送体の役割. 平成 20 年度北陸大学学術フロンティア・第二回コネクティブラボ, 招待講演、2008 年 10 月 14 日、大阪.
6. ○藤代 瞳, カドミウムとマンガンの細胞輸送における亜鉛輸送体の役割. 北陸大学学術フロンティア・サテライトミーティング, 招待講演, 2009 年 2 月 27-28 日、神戸.
7. ○藤代 瞳, 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. 日本薬学会第 129 年会, シンポジウム若手が切り開く, 2009 年 3 月 26 日、京都.
8. Comparison of cytotoxicity and transport and cadmium among rat cell lines. ○Miwako Doi, Hitomi Fujishiro, Seiichiro Himeno, 第 19 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2009 年 6 月 11-12 日、大阪.
9. 亜鉛輸送体 ZIP8 の DNA メチル化による発現低下とカドミウム耐性. 藤代 瞳, 奥垣里美, 安光沙織, ○姫野誠一郎, 第 3 回日本エピジェネティクス研究会年会、2009 年 5 月 22-23 日、東京.
10. ○藤代 瞳, 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. 戦略的研究基盤形成支援事業・第 2 回研究発表会, 招待講演, 2009 年 7 月 4 日、徳島.
11. ○藤代 瞳, 窪田圭祐, 三好亜依, 榎本秀一, 姫野誠一郎, カドミウム耐性細胞におけるマンガン交叉耐性とその機構. 第 20 回微量元素学会, 2009 年 7 月 2 日、東京.
12. マウス腎臓の近位尿細管由来不死化細胞におけるカドミウムの輸送機構. ○三好亜依, 藤代 瞳, 姫野誠一郎, メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2009、2009 年 10 月 16 日、東京.
13. さまざまな組織由来のラット細胞株におけるカドミウムとマンガンの毒性・輸送機構の比較. ○土肥美和子, 藤代 瞳, 角

大悟, 姫野誠一郎, メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2009、2009年10月16日、東京.

14. ラットの細胞におけるマンガン毒性に対する感受性の差とその機構. ○土肥美和子, 藤代瞳, 角大悟, 姫野誠一郎, 第 82 回日本生化学会、2009年10月23日、兵庫.
15. ○藤代瞳、土肥美和子、三好亜依、姫野誠一郎. カドミウムおよびマンガンの細胞内取り込みにおける重炭酸の影響. 北陸大学学術フロンティア・サテライトミーティング, 招待講演, 2010年2月25日、滋賀.

(以下略)

[図書] (計 0)

なし

[産業財産権]

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤代 瞳 (FUJISHIRO HITOMI)

研究者番号 : 10389192

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし