

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780297

研究課題名(和文) フッ素による肝毒性発現メカニズムへの細胞内輸送阻害の関与

研究課題名(英文) Inhibition of intracellular transport involved in fluoride-induced hepatotoxicity.

研究代表者

中川 博史 (NAKAGAWA, HIROSHI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・助教

研究者番号：60336807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円、(間接経費) 450,000円

研究成果の概要(和文)：フッ素中毒による肝毒性に見られる、肝細胞内脂肪滞留のメカニズム解明を試みた。小胞体内で産生された脂質が、細胞内小胞輸送システムの阻害により、細胞内滞留した結果ではないかと考えた。脂質代謝との関連が示唆されながら、輸送に関する作用が不明であったCD36、ApoB、CIDE-B、Vamp-7、FABP-1各タンパクの挙動を調べた結果、CIDE-Bがタンパク輸送小胞形成時に、細胞質から小胞体膜上に移動し、また、輸送小胞形成阻害時に、その移動が阻害されたことから、タンパク輸送小胞コートタンパクと同様の挙動を示すことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Fluoride hepatotoxicity reveals lipid retention in hepatocyte. We assumed that a disruption of intra-cellular lipid vesicle transport retained the lipid in endoplasmic reticulum. We examined the role of lipid metabolism relating proteins CD36, ApoB, CIDE-B, Vamp-7, FABP-1 in intra-cellular vesicle traffic systems. CIDE-B was recruited from cytosol to endoplasmic reticulum membrane with the formation of protein transport vesicle. On the other hand, inhibition of protein transport vesicle formation blocked CIDE-B recruitment from cytosol to endoplasmic reticulum membrane. These results indicate lipid metabolism relating protein CIDE-B recruited from cytosol to endoplasmic reticulum membrane like a coat protein of protein transport vesicles.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：トキシコロジー 細胞シグナリング 脂肪代謝 細胞内小胞輸送

## 1. 研究開始当初の背景

アメリカの一部、または欧州の一部の国で行われている、虫歯予防を目的とした水道水へのフッ化物添加は、疫学的な有効性と安全性への懸念との狭間で絶えず議論が戦わされてきた。議論の紛糾の原因の1つとして、フッ化物の毒性に関する知見が不完全であることが挙げられる。現在日本においては安全性への懸念からフッ化物の水道水への添加は一切行われていないが、安全性についての議論の根拠となるべき毒性学的知見には、毒性発現メカニズム等まだまだ補強すべき点がある。

フッ素による具体的な毒性が日本において見られたものとしては、1970年代に兵庫県宝塚市域において見られた斑状歯がある。これはフッ化物汚染土壌由来の水道水に起因するもので、当該地域住民に斑状に変色した歯が認められたものである。これは、水道水のフッ化物汚染によりエナメル質分泌細胞内での輸送阻害が起きたことによる歯のエナメル質形成不全が原因とされている。代表者が属する研究グループでは、フッ素による斑状歯発現メカニズムを解明する過程で、体内で形成されるフッ化アルミ錯イオンが三量体 G タンパク活性化物質として働くことにより、細胞内タンパク小胞輸送機構に変調を与えることを明らかにしてきた。代表者らはこの細胞内タンパク輸送制御機構へのフッ素の影響を解析した所、細胞内タンパク小胞輸送経路の内、Endoplasmic Reticulum(ER)からの輸送小胞出芽の段階においても小胞出芽の抑制が起こされていること、そして、ER-Golgi 間の輸送阻害がアポトーシス様の自殺的細胞死を惹起することによる細胞毒性を起こしていることを明らかとした。

## 2. 研究の目的

フッ化物中毒症例において肝組織内への脂肪滴貯留を伴う肝毒性が見られることから、脂質代謝機構への毒性が予想されているが詳細は不明なままである。本研究課題では細胞内脂質代謝メカニズム、特に細胞内脂質輸送機構へのフッ素の影響を明らかにすることにより、フッ素による肝毒性発現機構の解明を目的とする。細胞内での脂質の輸送はER から Golgi 装置へと prechylomicron transport vesicles (PCTV)等の脂質輸送小胞により行われることにより始まる。脂肪滴の貯留からは細胞内脂質輸送阻害が疑われるが、脂質輸送の制御機構はタンパク輸送小胞以上に不明な点が多い。

COPIIcoat タンパク輸送小胞と PCTV は全くサイズ・構造等が異なり別のものであると考えられてきたが、PCTV のコートタンパクとして Sar1 等の COPIIcoat タンパク群が含まれていることが報告されている。これらの知見は、PCTV 輸送制御機構と COPIIcoat 小胞輸送の制御機構が少なからぬ分子コン

ポーネントを共有していることを示唆しているものと考えられる。そこで、本研究課題では細胞内脂質輸送機構への三量体 G タンパクの影響を調べ、脂質輸送制御機構へのフッ化物の作用機序を明らかにし、フッ素の肝毒性発現メカニズムの解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ER 膜への PCTV コートタンパクの移動に対する ER 膜局在三量体 G タンパク活性化の影響

ラット肝細胞質分画と ER 膜画分を三量体 G タンパク活性化物質存在下または非存在下にてインキュベート後、15%ショ糖溶液を用いた不連続ショ糖密度勾配遠心を用いることにより ER 膜画分のみを再度分離し、ウエスタンプロットを行い、各種 PCTV コート候補タンパクの ER 膜への結合量を評価する系を作出した。三量体 G タンパク活性化物質としてはフッ化アルミ錯イオンまたは mastoparan7 を用いる。この評価系を用いて三量体 G タンパク活性化物質であるフッ化アルミニウム錯イオンや mastoparan7 を処置することにより、PCTVcoat タンパクの ER 膜への移動過程において三量体 G タンパクがどのように関与するかを評価した。PCTV の候補タンパクとして脂質代謝に関連があると報告されているものの、細胞内小胞輸送における役割が不明なタンパクである CD36、APOB、CIDE-B、Vamp-7、FABP-1 を選んだ。

(2) 出芽した PCTV の数量とコートタンパク結合量への ER 膜局在三量体 G タンパク活性化の影響

ラット肝細胞質分画と ER 膜画分を三量体 G タンパク活性化物質存在下または非存在下にてインキュベート後、連続ショ糖密度勾配遠心(0.1-1.15M)により PCTV 画分を単離し、PCTV 量の定量を試みた。また、この PCTV 分画を用いたウエスタンプロットにて各 PCTV コートタンパクの結合量への三量体 G タンパク活性化の影響を確認した。

(3) PCTV の Golgi 膜への融合に対する三量体 G タンパクの影響

ラット肝細胞質分画と ER 膜画分を正常状態にてインキュベートさせ PCTV 出芽を起こした後、15%ショ糖溶液を用いた不連続ショ糖密度勾配遠心(20,000×G)を用いることにより出芽した PCTV を含む細胞質画分である遠心上清を再回収する。そして、得られた PCTV を含む細胞質画分と Golgi 膜画分を三量体 G タンパク活性化物質存在下または非存在下にてインキュベートし、0.8 M~1.4 M ショ糖溶液を用いた不連続段階ショ糖密度勾配遠心を用いることにより Golgi 膜画分のみを分離・回収しウエスタンプロットを行い、各種 PCTV コートタンパクの Golgi 膜への結合量の変化を評価した。

(4) ラットを用いた *in vivo* におけるフッ素投与時の肝細胞像の電子顕微鏡観察による評価

フッ素投与ラットを作成し肝組織を採材後、オスミウム染色を行い肝細胞内の小胞像について透過型電子顕微鏡観察を行った。様々な濃度のフッ素投与による PCTV 輸送抑制と COPII 小胞輸送抑制の発現強度を比較し、タンパク輸送抑制と脂質輸送抑制の二つの発現機構の差異を検討した。また、発現強度の違いだけでなく、投与後様々な時間でサンプリングした試料を用いた観察を行い、タンパク輸送抑制と脂質輸送抑制それぞれの発現速度の差異を比較検討した。

#### 4. 研究成果

代表者が作成した NRK 細胞ミクロソーム画分とラット肝細胞質画分からなる *in vitro* 再構成系を用いた実験にて、タンパク輸送小胞である COPII コート小胞のコート形成過程をモニタリングした結果、Sar1 タンパクや Sec23 タンパク等のコートタンパク群のミクロソーム膜への移動を、三量体 G タンパク活性化が抑制することを明らかにすることが出来、その抑制機構に関して、既知の H89 感受性キナーゼ系との差異を示した (Nakagawa et al. Mol Cell Biochem. 2012)。一方で脂質輸送小胞について COPII コート小胞と構造上の差異が少なく、コート形成過程に関してはほぼ同様の機構を取ることが明らかとなって来た。そして、COPII 小胞および PCTV 小胞コート形成に必要な Sar1 と第 2 段階に細胞質に移動してくる Sec23 の移動が異なる kinase によって支配されていることを学会にて発表した (第 154 回日本獣医学会 2012)。

次に COPII 小胞コート形成過程の解析モデルを用い、PCTV 小胞輸送に関与が疑われている候補タンパクが ER 膜での輸送小胞形成に関与しているかどうかを検討した。候補タンパクとして脂質代謝に関連があると報告されているものの、細胞内小胞輸送における役割が不明なタンパクである CD36、APOB、CIDE-B、Vamp-7、FABP-1 を選び、ER 膜への輸送小胞コート様の移動が見られるかについて検討を行った。その結果輸送小胞形成刺激時に CIDE-B が細胞質より ER 膜上へ移動し、Mastoparan7 処置によりその移動が阻害されるという結果が得られた。以上の結果より、CIDE-B が輸送小胞のコート様の挙動を示すことがわかった (図 1) (第 156 回日本獣医学会 2013、および学術雑誌投稿中)。よって、フッ素による ER 膜局在三量体 G タンパク活性化により、ER 膜上におけるタンパク輸送小胞形成だけでなく、脂質輸送小胞形成もともに抑制され、細胞内脂質小胞輸送が阻害された結果、肝細胞内に脂質滞留が引き起こされるという仮説を証明する一助になると考えられる。

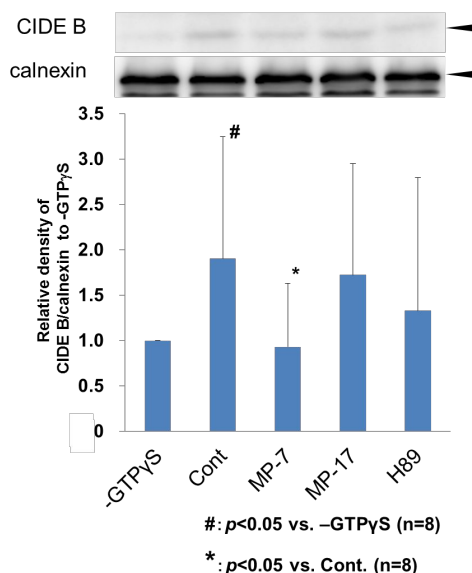


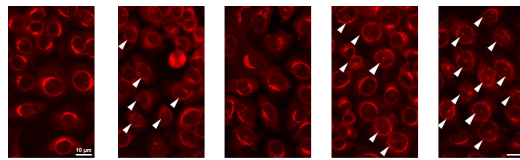
図 1. 脂質代謝関連タンパク CIDE-B は輸送小胞形成過程において小胞コート様の挙動を示す

細胞質から ER 膜への移動を評価するミクロソーム結合実験において、輸送小胞コートタンパクは ER 膜へ移動し、膜結合量が増加する。図はウエスタンブロットによる ER 膜結合 CIDE-B タンパク量を定量化しグラフ化したものである。三量体 G タンパク活性化物質である mastoparan-7 (MP-7) 処置により CIDE-B タンパクの細胞質から ER 膜への移動が阻害された。三量体 G タンパク活性化能を持たないネガティブアナログである mastoparan-17 (MP-17) 処置ではその作用は見られなかった。

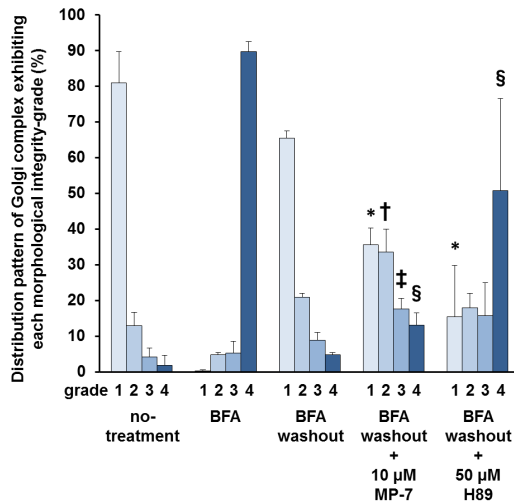
また ER からの小胞輸送阻害由来の細胞障害発現調節機構の解析を行った結果、小胞輸送抑制制御機構と細胞生存応答と細胞死実行機構との間に関連があることを見出した (Matsumoto et al., Bio. Open, 2013)。CIDE-B は脂質代謝関連タンパクとしての機能だけでなく、細胞死の進行の制御に関しても重要な働きがあることが知られており、今回得られた結果から、今後更なる研究の展開が期待できると考えられる。

Golgi 装置への脂質輸送小胞の到達を評価する実験系については、脂質の検出感度の問題があり、複数の検出法を試みたが、検出感度の問題を解決できず、一定の所見を得ることが出来なかった。

CIDE-B の輸送への関与を証明するために、ノックダウン細胞における脂質輸送の低下を検出しようと実験を行う過程にて、Golgi 装置の形態学的な検出を利用した新たな細胞内輸送評価系の作出に成功した (図 2)。学会にて発表を行っており (第 40 回日本毒性学会 2013)、学術雑誌に投稿中である。



no-treatment 10 µg/ml BFA BFA washout BFA washout + 10 µM MP-7 BFA washout + 50 µM H89  
 矢頭は不完全な形態のGolgi装置を示す  
 BFA: Brefeldin A  
 MP-7: mastoparan-7



\*、†、‡、§ はBFA washout群の同gradeに対しての比較を示す。  
 $p < 0.05$  (n=3)

図 2. Golgi の形態評価を用いた、細胞内小胞輸送評価系

培養細胞への Brefeldin A (BFA) 処置により *cis*-Golgi 装置は断片化し拡散しその大部分は ER と癒合する。この効果は可逆的であり、Brefeldin A の洗浄除去後、ER-Golgi 間小胞輸送に依存的に Golgi 装置が再構築される。再構築の遅延は小胞輸送の抑制を反映する。*cis*-Golgi の崩壊の程度を分類・数値化することにより Golgi 装置再構築を評価できる。図では mastoparan-7 (MP-7) 刺激による三量体 G タンパク活性化により Golgi 装置の再構築が遅延していることがわかる。

ラットを用いた *in vivo* での実験については、試料作成中途までは至ったものの、電子顕微鏡観察の実施にまでは、研究期間内に到達することが不可能であったため、所見を得ることが出来なかった。

#### 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2件)

Matsumoto H, Miyazaki S, Matsuyama S, Takeda M, Kawano M, Nakagawa H, Nishimura K, Matsuo S.

Selection of autophagy or apoptosis in cells exposed to ER-stress depends on ATF4 expression pattern with or without CHOP expression.

Bio Open, 査読有、Vol. 2, No. 10, 2013、

1084-1090、

DOI: 10.1242/bio.20135033.

Nakagawa H, Ishizaki M, Miyazaki S, Abe T, Nishimura K, Komori M, Matsuo S.

Sar1 translocation onto the ER membrane for vesicle budding has different pathways for promotion and suppression of ER-to-Golgi transport mediated through H89-sensitive kinase and ER-resident G protein.

Mol Cell Biochem, 査読有、Vol. 366、

No. 1-2, 2012, 175-180、

DOI: 10.1007/s11010-012-1295-x

[学会発表](計13件)

中川博史、小森雅之、西村和彦、松尾三郎、細胞内脂質輸送小胞形成に関するタンパクの検討について、第156回日本獣医学会、2013年9月20日、岐阜大学大竹潤、中川博史、西村和彦、松尾三郎、COP11 小胞輸送におけるコートタンパク移動調節への casein kinase II の関与、第156回日本獣医学会、2013年9月20日、岐阜大学

平岡真弘、西村和彦、中川博史、松尾三郎、HepG2 細胞におけるエリスロポエチン産生への乳酸の影響、第156回日本獣医学会、2013年9月20日、岐阜大学

中川博史、石崎雅和、石田勝政、西村和彦、松尾三郎、シスゴルジマーカーを用いた細胞内タンパク小胞輸送評価系の検討、第40回日本毒性学会学術年会、2013年6月18日、幕張メッセ国際会議場千葉

松本弘輝、岩崎登、中川博史、西村和彦、松尾三郎、ER-stress で導かれる2つの防御反応 (autophagy と apoptosis) の選択は ATF4 発現に加えての CHOP 発現の有無で調節される、第40回日本毒性学会学術年会、2013年6月19日、幕張メッセ国際会議場千葉

西村和彦、勝山英明、平岡真弘、中川博史、松尾三郎、HepG2 細胞におけるエリスロポエチン産生に対するエタノール添加の影響、第40回日本毒性学会学術年会、2013年6月19日、幕張メッセ国際会議場千葉

西村和彦、勝山英明、中川博史、松尾三郎、HepG2 細胞におけるエリスロポエチン産生に対するソルビトール添加の影響、第155回日本獣医学会、2013年3月30日、東京大学

Nishimura K, Tokita M, Katuyama H, Nakagawa H, Matsuo S、Effect of oxidative stress of iron on erythropoietin production in HepG2 cell、The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX-VI)、2012年7月20日、Sendai International Center

西村和彦、常田将宏、勝山英明、中川博史、松尾三郎、エリスロポエチン産生に及ぼす鉄の2つの効果、第39回日本毒理学学会学術年会、2012年7月17日、仙台国際センター

中川博史、小森雅之、西村和彦、松尾三郎、rER-Golgi間輸送小胞形成過程におけるH89感受性kinaseの作用部位について、第154回日本獣医学会、2012年9月16日、岩手大学

石田勝政、中川博史、西村和彦、松尾三郎、COPII小胞輸送におけるホスホリパーゼD活性の関与、第154回日本獣医学会、2012年9月16日、岩手大学

松本弘輝、松尾三郎、西村和彦、中川博史、ER(小胞体)ストレスが導くautophagyとUPR発現調節機構の差異、第154回日本獣医学会、2012年9月16日、岩手大学

勝山英明、西村和彦、中川博史、松尾三郎、ソルビトールが有するエリスロポエチン産生促進効果、第154回日本獣医学会、2012年9月16日、岩手大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/toxi/tox.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中川 博史 (NAKAGAWA, Hiroshi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号：60336807