

抗ストレスサイエンスシンポジウム

カドミウム毒性による細胞ストレスと、 植物由来ペプチドによる毒性の軽減

高木 昌宏

北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科 教授

Oxidative stress has been implicated in a wide variety of disease processes. Oxidative stress is now recognized as accountable for redox regulation involving reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). Living organisms are unavoidably exposed to ROS in an aerobic environment. At the cellular level, oxidant injury elicits a wide spectrum of responses ranging from proliferation to growth arrest, to senescence, to cell death (apoptosis and necrosis). When present at high and/or sustained levels, ROS can cause severe damage to DNA, protein, and lipid. A number of defense system have evolved to combat the accumulation of ROS. These include various non-enzymatic molecules (e.g., glutathione, vitamins A, C, and E) as well as enzymatic scavengers of ROS (e.g., superoxid dismutases (SOD), catalase, and glutathione peroxide). Unfortunately, these defense mechanisms are not always adequate to counteract the production of ROS, resulting in what is termed a state of oxidative stress.

We have revealed that cadmium (Cd) induces oxidative stress including nitric oxide (NO) in human T-lymphoma Jurkat cells. Furthermore, we examined effect of Cd toxicity on neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. P19 cells were derived from a mouse embryo and have been used as a model system for neuronal differentiation in vitro. When P19 cells were cultured in the presence of 10 μ M Cd for 6 hours and then in the serum-free medium for 2 days, the cells were induced to differentiate into neurons. The differentiation of mammalian neurons during development is a highly complex process involving regulation and coordination of signals at multiple steps. It is important to understand basic mechanisms underlying this complex pathway.

Some plants can hyperaccumulate metal ions that are toxic to virtually all other organisms at low dosages. Plants have evolved a suite of mechanisms that control and respond to the uptake and accumulation of both essential and nonessential heavy metals. A plant specific detoxification mechanism was introduced into mammalian cells and zebra fish to enhance their tolerance to the toxicity.

【背景および目的】

重金属であるカドミウムは危険な環境汚染物質であり、イタイイタイ病や腎臓ガンを引き起こす事が知られている反面、カドミウム自体はDNA傷害を引き起こさない事も分かっている。我々はこれまで白血病性T細胞株 Jurkat を用いて、カドミウム毒性は、アポトーシス小体の形成やDNA断片化が不明瞭であることから典型的なアポトーシスを誘導しない点、グルタチオン等の抗酸化物質によって毒性が軽減されることから酸化ストレスである点等を明らかにしてきた。本シンポジウムでは、酸化ストレスとしてのカドミウム毒性が、細胞死や発癌、さらには胚性腫

瘍細胞の分化にどのような影響を与えるか、そしてさらには、植物などに存在する毒性軽減メカニズムについて解析した結果について報告させて頂きたい。

【方法および結果】

・死滅 DNA マイクロアレイ TAKARA Intelli Gene Human Apoptosis CHIP Version 1.1 を用いてカドミウム濃度 30 μ M で 4 時間培養した Jurkat 細胞の遺伝子発現を解析した結果、inducible nitric oxide synthase (iNOS)・proliferating cell nuclear antigen (PCNA)・glutathione S-transferase 等の遺伝子発現上昇が認められた。iNOS 遺伝子発現上昇により発生すると考えられる一酸化窒素 (NO) は、ヌクレアーゼ活性化に関与するカスパーゼ 3 を阻害する。また、NO を介して炎症系のアラキドン酸カスケードが活性化していると考えられ、別途、脂質過酸化物質や活性酸素種を有意に増加させる結果も得られた。PCNA 遺伝子の発現上昇から、細胞周期を調べた結果、カドミウム毒性による G1 期停止が認められ、典型的アポトーシスを起こす UV 照射と同様であった。しかしストレスキナーゼ群 (c-jun , p38) のリン酸化は、UV 照射に比べ数時間遅かった。以上の結果から死滅シグナルは、まず NO を介した炎症系のカスケードを流れ、その後、ストレスキナーゼ群が活性化されアポトーシスの方向にもシグナルは流れるが、NO によりカスパーゼが阻害を受け、ヌクレアーゼの活性化が不十分なためアポトーシス小体や DNA 断片化が不明瞭になると考えられた。

・癌化 NO は、N-ニトロソアミンによる DNA のアルキル化、脱アミノ化等の DNA 傷害を引き起こす。蛍光プローブを用いた観察の結果、カドミウム処理により活性酸素種が生成していることが示された。さらに、NO と活性酸素種との反応により強い変異原であるパーオキシナイトライトができる。つまりカドミウム自体は変異原では無いが、その毒性により発生する NO や活性酸素種、活性窒素種が DNA 傷害を惹起し、細胞を癌化させると考えられた。

・分化 カドミウム毒性に起因する酸化ストレスの分化に対する影響について調べた。分化能を有する胚性腫瘍細胞株 P19 は、レチノイン酸により神経細胞へと分化する。そこで、細胞増殖試験によりカドミウム濃度に対する P19 細胞の相対生存率を算出した。死滅を起こさない範囲で種々のカドミウム濃度を設定し、P19 細胞を適当時間培養した。顕微鏡観察の結果、カドミウム濃度 10 μ M、6 時間処理時に軸索の伸長が認められた。JNK・p38 の活性化を比較したところ、レチノイン酸による分化誘導時と同様 p38 のみの早い活性化が認められた。活性酸素種を細胞内に発生させるメチルビオロゲンを用いて実験した場合、1 μ M、12 時間 (以内) 処理時に軸索伸長が認められた。以上の結果より、軽度の酸化ストレスは細胞分化に対してポジティブに働くと考えられた。分化誘導には、還元剤が用いられることが多いことから考えて、酸化ストレスに応じて細胞内グルタチオン量が増加する等により、一時的に細胞内が還元状態になったために分化誘導のシグナルが流れたのではないかと考察している。

・防御機構 植物や藻類、一部の酵母などは重金属に晒されると、グルタチオン (GSH, -Glu-Cys-Gly) を基質としてファイトケラチン合成酵素 (PCS) によりファイトケラチン (PC, (-Glu-Cys)_n-Gly) を生合成することで無毒化している。現在までに我々は、ヒト白血病性 T 細胞株 (Jurkat 細胞) やゼブラフィッシュ個体に植物 (*Arabidopsis thaliana*) 由来 PCS 遺伝子を導入することでカドミウム耐性を付与させた。