

有機錫による嗅球障害と嗅球カルシウム過剰蓄積の機序解析

荒川 泰昭¹⁾, 伊倉 宏一¹⁾, 吉成 章子¹⁾, 平野 裕司¹⁾, 中島 晴信²⁾
大森 佐与子³⁾, 武内 孝之⁴⁾, 中野 幸廣⁴⁾, 和田 攻⁵⁾

¹⁾静岡県立大学・公衆衛生学教室, ²⁾大阪府立公衆衛生研究所

³⁾大妻女子大学, ⁴⁾京都大学・原子炉実験所, ⁵⁾埼玉医科大学

An Excessive Accumulation of Olfactory Calcium and Inhibition of Olfactory Signal Transduction by Organotin Compounds

Yasuaki Arakawa¹⁾, Kōichi Igura¹⁾, Shōko Yoshinari¹⁾, Yūji Hirano¹⁾,
Harunobu Nakashima²⁾, Sayoko Ohmori³⁾, Takayuki Takeuchi⁴⁾, Yukihiro Nakano⁴⁾
and Osamu Wada⁵⁾

¹⁾Department of Hygiene & Preventive Medicine, Faculty of Health Sciences, The University of Shizuoka,

²⁾Osaka Prefectural Institute of Public Health, ³⁾Ohzuma Women University,

⁴⁾Research Reactor Institute, Kyoto University, ⁵⁾Saitama Medical College

Deficiencies and excesses of trace elements induce various kinds of brain lesion. In this study, a tributyltin-induced olfactory lesion (anosmia) was examined by the kinetic analysis of the mechanisms in an excessive accumulation of calcium into the olfactory bulb, an inhibition of olfactory signal transduction and toxic cell death (necrosis or apoptosis).

The trialkyltin-induced excessive increase of calcium in the olfactory bulb was associated with an increase of olfactory PTH. Since the IP_3 level in the olfactory significantly decreased under the tributyltin exposure, which seems to be a consequence of tributyltin-induced inhibition of PI turnover, the excessive increase of olfactory calcium was not due to an influx of Ca^{2+} mediated by a plasma membrane IP_3 -gated Ca^{2+} channel and a release of intracellular Ca^{2+} mediated by IP_3 receptor-channel complex from endoplasmic reticulum. The tributyltin-induced excessive increase of olfactory calcium is perhaps caused by an excessive increase in the formation of cAMP mediated by activation of adenylyl cyclase and an excessive influx of extracellular Ca^{2+} mediated by cAMP-activated channels. Moreover, this rapid and excessive increase in the concentration of intracellular Ca^{2+} seems to inhibit CaM kinase II functions leading to necrosis in vivo or toxic cell death in vitro.

はじめに

最近海洋汚染の代表的な物質として注目されているトリアルキル錫は、強力な中枢神経毒性を有し、脳内微量元素を著しく変動させ、記憶・学習障害ならびに嗅覚障害を併発する。特にトリアルキル錫の一つであるトリブチル錫は、脳組織内暴露に伴い、嗅覚の第一中枢である嗅球にカルシウムを過剰蓄積させる。そしてこのカルシウムの過剰蓄積が嗅球障害すなわち嗅覚情報伝達系や嗅球ニューロンの細胞死を誘発しているものと考えられる。そこで、本研究では、トリブチル錫1回投与による嗅球暴露（一過性暴露）実験を用い、この嗅球におけるカルシウム過剰蓄積の機序を解析した。

実験方法

1. 動物実験

6週齢の雄性 Wistar 系ラットを使用し、コントロール群にはコーンオイルのみを、トリブチル錫暴露群にはコーンオイル溶解のトリブチル錫クロリド (Bu_3SnCl , 2.0mg/kg body weight) をそれぞれ 0.4ml ずつ腹腔内投与し、0, 1, 2, 3, 4 日経過後に断頭し、嗅球を摘出した。

2. IP_3 測定

嗅球 IP_3 抽出画分、 $[\text{}^3\text{H}]$ 標識 1,4,5- IP_3 、 IP_3 レセプター含有膜調整、 IP_3 標品を用いてリガンド結合の競合反応を利用したラジオレセプターアッセイ (RRA) により、嗅球中の 1,4,5- IP_3 を測定した。

3. cAMP 濃度測定

嗅球中の cAMP を 6% トリクロロ酢酸により抽出し、サクシニル化後、 $[\text{}^{125}\text{I}]$ -サクシニル cAMP の抗血清に対する競合反応を行い、抗体に非結合の $[\text{}^{125}\text{I}]$ -サクシニル cAMP チロシンメチルエステルをデキストランコーティングの活性炭で吸着除去し、上清の放射活性を測定した。

4. Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaM キナーゼ II) 活性測定

嗅球より CaM キナーゼ II を抽出し、そのリン酸化活性を基質に Syntide2 を用い、 $[\text{}^{32}\text{P}]$ で標識することにより測定した¹⁾。

結果ならびに考察

嗅覚情報伝達系では、細胞外からの Ca^{2+} 流入経路として主に IP_3 作動性チャンネルおよび cAMP 依存性チャンネルの 2 つのチャンネルの介在が考えられている²⁾。また、細胞内における Ca^{2+} 遊離の機構として小胞体 (ER) からの IP_3 作動性のカルシウム遊離が考えられる (Fig. 1)。本実験では、Fig. 2 に示すように、嗅球中の IP_3 濃度は、トリブチル錫暴露によって著しく減少し、3 日目に最低値を示した。この IP_3 量の著減はトリブチル錫による PI 代謝回転の障害が主因と思われるが、この結果より IP_3 作動性チャンネルの介在は否定された。一方、嗅球中の cAMP の濃度は、嗅球がトリブチル錫で高濃度 (1ppm レベル) に暴露される 1 日目および 2 日目に著しく増大した。この cAMP の著増結果は cAMP 依存性チャンネル介在による細胞外 Ca^{2+} の流入を考えさせる。

しかるに、我々はこれまでにトリブチル錫がベシクルあるいはカチオン様の膜透過によって細胞内に取り込まれ、その疎水性によって核周辺のゴルジ体ならびに小胞体領域に選択的に集積してゴルジ体の

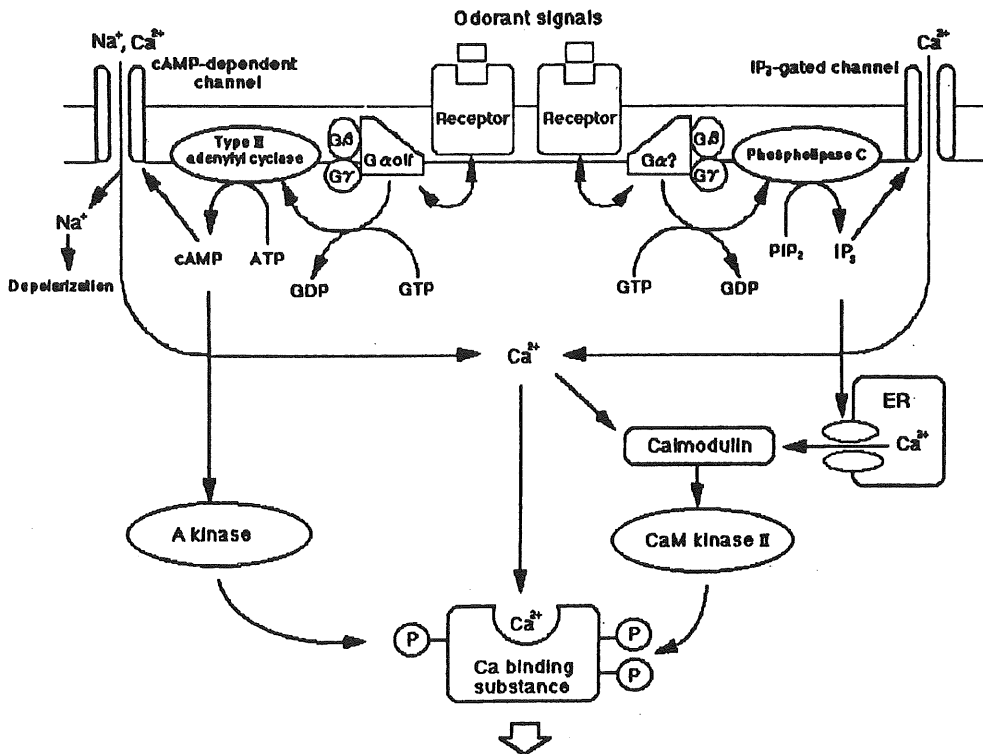


Fig. 1. A scheme of the mechanism proposed for olfactory signal transduction.

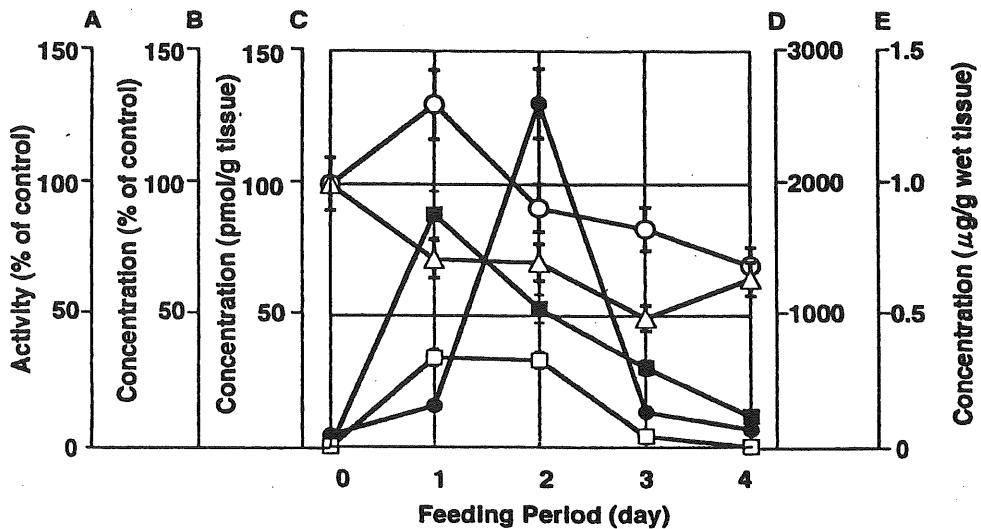


Fig. 2. Changes with the passage of time in the activity of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II ($\circ$ in the A axis), in the concentration of inositol-1,4,5-triphosphate ($\triangle$ in the B axis), cAMP* ($\square$ in the C axis), calcium ($\bullet$ in the D axis), and organotin ($\blacksquare$ in the E axis), in the olfactory of rats which received single i.p. injections of tributyltin chloride (2.0 mg/kg body weight). Vertical bars denote SE of the mean for 5 determinations. *Each cAMP value in the C axis is corrected for the value taken without tributyltin at each feeding period.

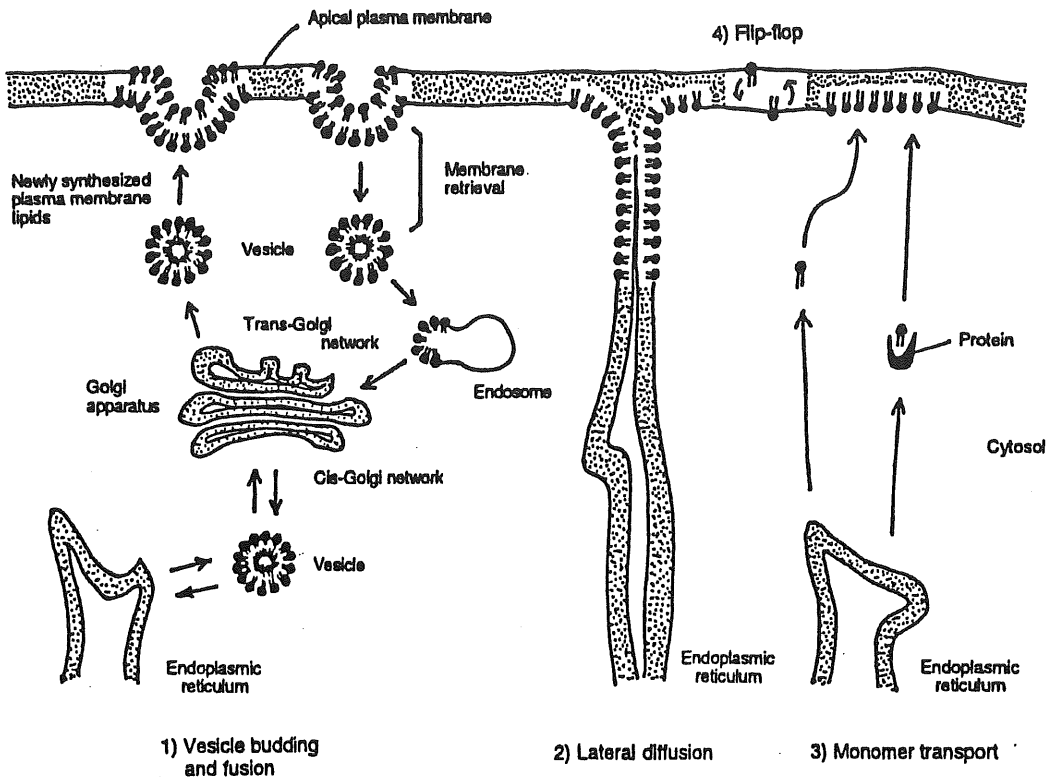


Fig. 3. The proposed intracellular transport of phospholipids.

特異的層状構造や、小胞体の特異的細網構造を破壊し、細胞内リン脂質輸送系を阻害し、PI代謝回転の阻害や小胞体における IP_3 作動性カルシウム動員化の阻害など、最終的にリン脂質代謝系を阻害することを明らかにしてきた (Fig. 3)³⁻⁸⁾。

以上の動的解析結果を総合すると、有機錫による嗅球カルシウムの過剰蓄積の機序として細胞内ではトリブチル錫の小胞体膜破壊あるいは構造変化による IP_3 非作動性のカルシウム遊離も考えられるが、量的観点からこの細胞内カルシウム遊離のみでは説明し得ず、細胞外からの Ca^{2+} 流入が考えられる。すなわち IP_3 作動性チャンネル介在ではなく、cAMP 依存性チャンネル介在の細胞外 Ca^{2+} の流入が考えられる。

また、このとき細胞内カルシウム濃度増大に伴って作動する CaM キナーゼ II 活性の変化をみると、適当な Ca^{2+} 濃度に至る 1 日目に一旦活性の増大がみられたが、カルシウムが過剰蓄積する 2 日目には急激に減少し、以後経時的に失活の度合を深めた。このような過剰 Ca^{2+} による CaM キナーゼ II の作用の異常が細胞死を誘発する要因の一つであると思われる。

参 考 文 献

- 1) Ochiishi, T., et al.: Characterization and autophosphorylation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in the post-synaptic density of the rat forebrain. Brain Res. 610: 97-107, 1992

- 2) Reed, R. R : Signaling Pathways in Odorant Detection. Neuron 8 : 205-209, 1992
- 3) Arakawa, Y. et al. : Chapter 9, Suppression of cell proliferation by certain organotin compounds. In Tin and Malignant Cell Growth, (Zuckerman, J. J., ed.), CRC Press, Florida, U.S.A., 83-106, 1988
- 4) Arakawa, Y. : Chapter 23, Antitumor activity of organotin compounds and inhibition of membrane signal transduction. in Chemistry and Technology of Silicon and Tin. (Kumar Das V. G., Gielen, M., ed.). Oxford University Press, Oxford, U.K., 319-333, 1992
- 5) Arakawa, Y. et al. : Chapter 4, Biological properties of alkyltin compounds. in Metal Ions in Biological Systems, Volume 29, Biological Properties of Metal Alkyl Derivatives. (Sigel, H., ed.), Marcel Dekker. Inc., New York, U.S.A., 101-136, 1993
- 6) Arakawa, Y. : Tin and Immunity, Review. Biomed. Res. Trace Elements Vol.6 No.2, 1-34, 1995
- 7) Arakawa, Y. : Cellular and biochemical aspects of antitumor activity of organotin compounds. In Main Group Elements and Their Compounds. (Kumar Das, V. G.ed.) Narosa Publishing House, New Dehli, India, pp.422-445, 1996
- 8) Arakawa, Y. : Chapter 2. Recent studies on the mode of biological action of the di- and tri-alkyltin compounds. in Chemistry of Tin. (Smith, P. J., ed.), Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, Glasgow, U.K. 1996