

ヒト結腸由来培養細胞におけるミネラルの相互作用 —ヘムオキシゲナーゼの誘導に及ぼす影響—

中 西 由季子, 小 林 千 晶, 小関(山岡)佐貴代, 安 本 教 傳

京都大学食糧科学研究所*^{注1}

Heme oxygenase-1 Induction by Exposure to Various Metal Ions: Studies on Interactions of Minerals by Using a Human Intestinal Cell Culture System

Yukiko Nakanishi, Chiaki Kobayashi, Sakiyo Yamaoka-Koseki and Kyoden Yasumoto

Research Institute for Food Science, Kyoto University

Cells respond to metabolic perturbations by inducing specific stress proteins. Exposure of mammalian cells to oxidative stress induces heme oxygenase, the rate-limiting enzyme in heme degradation. The induction of heme oxygenase-1 has been hypothesized to represent a cellular antioxidant defense mechanism. The objectives of this study were to characterize the interaction of minerals in human intestinal epithelial cells (Caco-2 cell line) and to explain the mechanism of heme oxygenase-1 induction by oxidative stress. The induction levels of heme oxygenase-1 depended on chemical forms of iron (hemin > Fe (II) > Fe (III) NTA) in Caco-2. As opposed to hemin, Cu (II) is a weak inducer of heme oxygenase-1. Induction levels of heme oxygenase-1 when Cu (II) coexisted with hemin in the medium was same as when hemin only existed. Although both hemin and arsenate are strong inducers of heme oxygenase-1, the induction level of heme oxygenase-1 when arsenate coexisted with hemin was lower than when hemin or arsenate solely existed. These coexistences of minerals required a lot of time to induce a maximum level of heme oxygenase-1. Although it did not reveal whether generation of hydrogen peroxide by exposure to various minerals in Caco-2 cells initiated to induce heme oxygenase-1, it was demonstrated that hydrogen peroxide remarkably induced heme oxygenase-1. These results suggest dietary minerals affected the mechanism of heme oxygenase-1 induction in intestinal epithelial cells.

ヘムオキシゲナーゼ (HO) は、ヘムを開裂分解し、ビリルビンを生成する代謝経路における律速酵素である¹⁾。最近、ビリルビンが抗酸化性物質であることが明らかにされ²⁾、HO は生体内酸化防御機

^{注1}* 〒611 京都府宇治市五ヶ庄

構の一員として認識されるようになった。また、32kD のストレスタンパク質 (HSP32) が HO と同一の物質であり、誘導型の HO-1 と構成型の HO-2 という 2 種類のアイソザイムが存在することが明らかになった³⁾。このような背景から、酸化ストレスの分子機構を解析するための指標として HO が注目されている。本研究は、ヒト結腸由来癌化細胞 (Human Colon Adenocarcinoma cell line ; Caco-2 細胞) を用いて、ミネラル共存下における HO の誘導を調べ、腸管吸収時のミネラルの相互作用ならびに HO-1 の誘導機構を明らかにすることを目的とした。

実 験 方 法

1. 細胞培養

Caco-2 細胞は、10% 牛胎児血清、10mg/l 非必須アミノ酸、50,000U/l ペニシリン、50mg/l ストレプトマイシンを含む DMEM (Dulbecco's minimal essential medium, 大日本製薬) を用い、37℃、5% CO₂ インキュベーター内にて培養した。微柔毛が形成され小腸用の吸収機能を発現している14日間培養した細胞を実験に供した⁴⁾。

2. 細胞毒性の測定

最終濃度が 0 から 800 μ M となるように各種金属イオン (ヘミン、塩化第二鉄、硫化第一鉄、亜硫酸ナトリウム、硫酸第二銅、塩化コバルト) を添加した無血清培地 (Williams' Medium E, 大日本製薬) で、細胞を12時間培養した。ヘミンは、DMSO (最終濃度0.2%) に懸濁し、無血清培地に添加した。塩化第二鉄は、ニトリロトリ酢酸ナトリウム (NTA) との複合体 (1:2) を用いた。金属添加培地を除去し、リン酸緩衝液 (pH7.4) で洗浄後、高水溶性ホルマザンを測定する Cell Counting Kit (同仁化学研究所製) により生細胞数を測定した。細胞毒性は、生細胞率で評価し、金属イオン無添加培地における生細胞数を100とした割合で表した。

3. HO-1 量の測定

最終濃度として 25 μ M の各種金属イオンを添加した培地で、細胞を3, 6, 9, 12, 15, 18時間培養した。可溶化した細胞を遠心分離して得た上清をウェスタンブロットティング用の試料とした。Protein Assay Kit (Bio-Rad 社製) を用いてタンパク定量後、Laemmli らの方法に準じて13.5%のポリアクリルアミドゲルを用いた1次元 SDS ポリアクリルアミド電気泳動によりタンパク質を分離した⁵⁾。抗ラット HO-1 ウサギポリクローナル抗体を1次抗体として反応させ、ペルオキシダーゼ発色法により HO-1 を検出・定量した。

4. 過酸化水素生成量の測定

過酸化水素生成量は、スコボレチン蛍光法により測定した。25 μ M の各金属イオンを添加した無血清培地で1, 3, 6, 9, 12時間培養した。培地 (A) のみを回収し、分光蛍光光度計 (日立製作所製) により、励起波長 350nm、発光波長 460nm における蛍光を測定した。細胞を含まずに培養した培地をブランク (B) とした。

$$\text{過酸化水素生成量 } (\mu\text{mol/mg}) = (A-B)/B \times 22.5 \times 0.2 (\mu\text{mol}) / \text{タンパク質量 (mg)}$$

結 果・考 察

金属イオン添加後に50%以上が生細胞として存在しうる $25\mu\text{M}$ を添加濃度として以下の実験を行った。化学形態の異なる鉄イオンは、腸管からの吸収率が異なることが知られている。有機鉄としてヘミンを、無機鉄として硫化第一鉄と塩化第二鉄を用いて、HO-1の誘導量を測定した。金属無添加の場合には、HO-1は全く検出されなかったが、鉄イオンの添加によりHO-1が誘導された。ヘミン添加による誘導量は無機鉄イオン添加の場合の3倍以上であり、HO-1の誘導量は、ヘミン>硫化第一鉄>塩化第二鉄であった (Fig. 1)。化学形態によってHO-1誘導の様相が異なることが明らかになった。次に、HO-1の誘導が著しいヘミンと他のミネラルのヘムオキシゲナーゼ誘導に関する相互作用を調べた。共存させるミネラルは、肝細胞などで著明なHO-1誘導が報告されている亜硫酸ナトリウムとほとんどHO-1が誘導されない塩化第二銅を用いた。亜硫酸ナトリウムおよび塩化第二銅添加によるHO-1誘導量は、それぞれ、ヘミン添加によるHO-1誘導量の約1.5倍および1/8倍であった (Fig. 2)。ヘミンと亜硫酸ナトリウムを共存させると、ヘミンを単独で添加した場合のHO-1誘導量の約1/3倍に誘導量が抑制された (Fig. 2)。金属イオン添加後のHO-1誘導量を経時的に測定したところ、金属イオンを

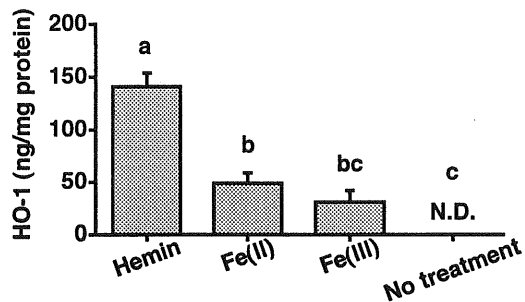


Fig. 1 Effects of incubation with irons of several forms on the expression of hemoxygenase-1 in Caco-2 cells. Values are mean $\pm$ SEM for triplicate experiments. N.D. means not detectable. The values not sharing the same superscript are significantly different at $P < 0.05$.

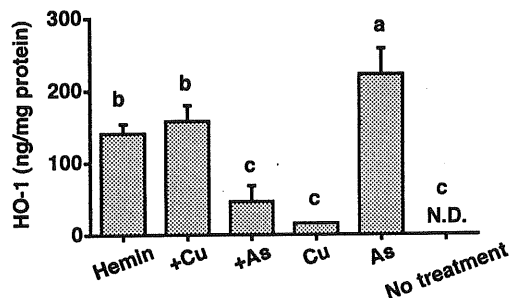


Fig. 2 Effects of incubation with metal ions on the expression of hemoxygenase-1 in Caco-2 cells. Values are mean $\pm$ SEM for triplicate experiments. N.D. means not detectable. The values not sharing the same superscript are significantly different at $P < 0.05$.

それぞれ単独で添加した場合には、金属イオンの種類に関係なく12時間後に HO-1 誘導量が最大に達した。一方、ヘミンと他の金属イオンを共存させた場合には、15時間後に HO-1 誘導量は最大に達した (Fig. 3)。これらの結果から、食事などによって様々な金属イオンが共存した場合、腸管細胞におけるヘムオキシゲナーゼ誘導に関して何らかの相互作用が存在することが示唆された。

一方、ラットに塩化コバルトを腹腔内投与すると、肝臓ではヘムオキシゲナーゼの活性が上昇する以前に過酸化水素の生成量が増加するという報告がある⁶⁾。活性酸素の生成がヘムオキシゲナーゼ誘導のシグナルである可能性が考えられたので、細胞に過酸化水素を負荷した場合、HO は誘導されるか否かを調べた。過酸化水素は、金属イオンに比べて細胞毒性が高かったため、0~100 μM の過酸化水素を含む培地で30分間培養した後、無添加の培地で12時間培養したところ、過酸化水素負荷によって HO-1 が誘導された (Fig. 4)。細胞毒性の低い 25 μM の過酸化水素添加が最も HO-1 誘導量が高く、濃度が増加するに従って、HO-1 誘導量が低下した。金属イオン添加による HO 誘導は、過酸化水素などの活性

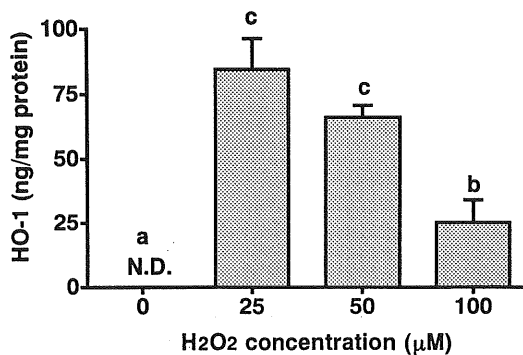


Fig. 3 Effects of metal ions added to medium on the induction of hemeoxygenase-1 in Caco-2 cells.

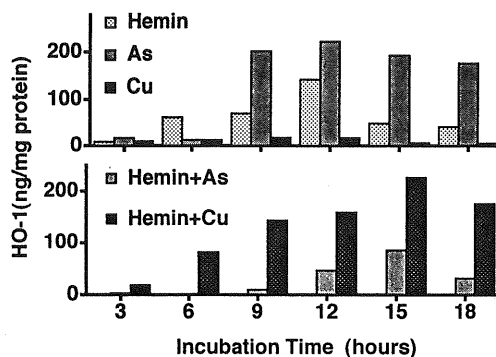


Fig. 4 Effects of incubation with hydrogen peroxide on the expression of hemeoxygenase-1 in Caco-2 cells. Values are mean $\pm$ SEM for triplicate experiments. N.D. means not detectable. The values not sharing the same superscript are significantly different at $P < 0.05$.

酸素の生成がシグナルとなっていることが推察された。そこで、金属イオン添加後に細胞外に遊離する過酸化水素生成量を経時的に測定したが、金属イオンの種類による差はなかった。金属イオン添加後の細胞内活性酸素の生成量を測定し、酸化ストレスに対するHO誘導機構における活性酸素の役割を明確にする必要がある。

引用文献

- 1) Raimo Tenhunen, Hervey S. Marver and Rudi Schmid (1968) *Biochemistry* **61** : 748
- 2) Roland Stocker, Yorihiro Yamamoto, Antony F. McDonagh, Alexander N. Glazer and Bruce N. Ames (1987) *Science* **235** : 1043
- 3) Ingrid Cruse and Mahin D. Mains (1988) *J.B.C.* **263** : 3348
- 4) Pierre H. Vachon and Jean-Francois Beaulieu (1992) *Gastroenterology* **103** : 414
- 5) U. K. Laemmli (1970) *Nature* **227** : 680
- 6) Susana F. Lesuy, maria L. Tomaro (1994) *Biochem. Biophys. Acta* **1223** : 9