

有機スズ投与による胸腺萎縮とアポトーシス

村山 奈穂, 鈴木 浩史, 荒川 泰昭

(静岡県立大学・食品栄養・公衆衛生*)

Organotin induced thymus atrophy and apoptosis.

Nao MURAYAMA, Hirofumi T. SUZUKI, Yasuaki ARAKAWA

Department of Hygiene & Preventive Medicine,

Faculty of Health Science, The University of Shizuoka

Oral administration of tributyltin chloride (TBTC) is known to cause thymus atrophy and suppression of the T-cell dependent immune responses. To study the mechanism underlying the thymus atrophy, induction of apoptosis was investigated. Oral administration of TBTC (100 mg /kg in NMF diet) enhanced the fragmentation of DNA in the thymus. Activation of DNase was observed along with the fragmentation of DNA. The apparent molecular mass of the DNase was 18 kDa, suggesting the activated DNase was NUC18. Activation of Caspase-3 was observed, indicating the activation of caspase cascade. In addition, FasL levels were increased in response to the administration of TBTC. Taken together, these data show that the induction of apoptosis in the thymus by the administration of TBTC is mediated by the FasL/Fas dependent pathway, which results in the activation of both Caspase cascade and DNase (NUC18).

序

有機スズ化合物は昆虫, 真菌, 細菌, 藻類などに対して有効な生物活性があるため, 殺菌剤, 殺虫剤, 防かび剤, 木材の防腐剤などに幅広く使われてきた。特に, トリブチルスズやトリフェニル錫は藻類や貝類などの付着生物に対する防汚効果に優れており, 船底塗料や漁網防汚材として世界各地で使用されている。その有用性の反面, 有機スズ化合物は世界的規模の海洋汚染を引き起こしており, その毒性や環境への影響が懸念されている。

は乳類に対する有機スズの毒性は実験動物を用いて検討されてきている。ラットへのトリブチルスズの経口投与は, 胸腺の萎縮とそれに伴う免疫抑制を引き起こす¹⁾。胸腺細胞を用いた *in vitro* 実験系では, トリブチルスズはアポトーシスを誘導することが明らかにされている²⁾。本研究では, トリブチルスズ経口投与による胸腺細胞のアポトーシス誘導機構について調べた。

実験方法

1. 動物実験

Wistar系幼若ラット(雄性, 4週齢, 50 g前後)に塩化トリブチルスズ(tributyltin chloride; TBTC)を100 mg/kgで含むNMF固形飼料を連続自由摂取させた。コントロール群には通常のNMF固形飼料を与えた。

2. DNAの断片化の検出

ラットを断頭によりと殺後, 胸腺を摘出した。胸腺に切り込みを入れ, リン酸バッファー内で振とうすることにより

*所在地: 静岡市谷田52-1 (〒422-8526)

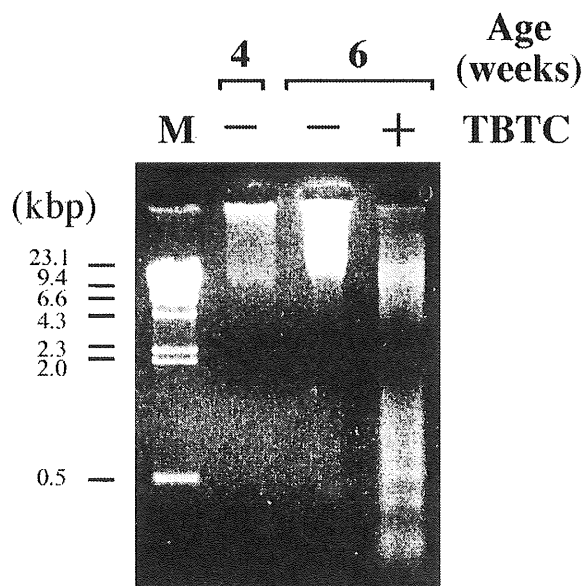


Fig. 1 Oral administration of TBTC induces fragmentation of DNA in the thymus. Rats (wistar-derived, 4 weeks age, male) were fed diet containing TBTC (100 mg/kg) for 2 weeks. Thymic DNA was then isolated by NaI method and developed by 1.5% agarose gel electrophoresis.

浮遊細胞を得た。血球計測板を用いて浮遊細胞の濃度を計測し、約 5×10^5 個の細胞から NaI 法で DNA を抽出した。取得した DNA を 1.5% アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロミドで染色し、UV 照射下で撮影した。

3. TCA 沈殿

細胞懸濁液 1 ml に TCA (trichloroacetic acid) を終濃度 5% で加え、氷上で 10 分放置した。20000 x g で 15 分間遠心し、上清を捨てた。沈殿にアセトン 500 μ l を加え、超音波とボルテックスミキサーで沈殿を再懸濁した。20,000 x g で 15 分間遠心後、上清を捨て、沈殿にジエチルエーテル 500 μ l を加え、超音波とボルテックスミキサーで沈殿を再懸濁した。20,000 x g で 15 分間遠心後、上清を捨て、沈殿を風乾し、全タンパク質のサンプルとした。

4. activity gel 法

TCA 沈殿により、約 10^7 個の胸腺細胞から全タンパク質のサンプルを調製した。ウシ胸腺 DNA を 200 μ g/ml の濃度で含む 12.5% アクリルアミドゲルで電気泳動を行った。泳動後、ゲルを SDS 除去バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM β -メルカプトエタノール) に入れ、50℃で 1 時間放置することにより SDS を除いた。ゲルを 10 mM Tris-HCl (pH 7.8) に移し、4℃で一晩放置し、DNase 活性の再生を行った。ゲルを反応バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 3 mM CaCl_2 , 3 mM MgCl_2 , 1 mM β -メルカプトエタノール) に移し、37℃で数時間反応させた。ゲルを 0.5 μ g/ml エチジウムブロミド溶液で染色後、UV トランスイルミネーターでバンドを検出した。

5. Western blotting

胸腺細胞から調製した全タンパク質のサンプル (10 μ g) を 12.5% アクリルアミドゲルで電気泳動後、抗 FasL 抗体を用いて Western blotting を行った。

6. カスパーゼ活性の測定

カスパーゼ活性の測定は、Caspase-3 Apoptosis Detection Kit (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) を用いて行った。

結果と考察

Wistar 系幼若ラットにトリブチルスズを 100 mg/kg で含む NMF 固形飼料を連続自由摂取させたところ、投与開始か

ら2週間目までに激しい胸腺の萎縮が観察された。培養胸腺細胞を用いた *in vitro* 実験系では、トリブチルスズ暴露はアポトーシスを誘導することが報告されている²⁾。そこで、まず経口投与によるトリブチルスズ暴露によりアポトーシスが誘導されるかについて検討した。アポトーシスの誘導の原因となる情報の多くは細胞膜上の特異的レセプターを介してその死のシグナルを伝達する^{3),4)}。アポトーシスの誘導機構は様々で、情報伝達のカスケードやアポトーシスの決定機構は多種多様であるがアポトーシスの実行過程では、カスパーゼによる特定のタンパク質の限定分解カスケードやDNAの断片化を中心とする共通のプロセスが観察される^{5),6)}。そこで、胸腺重量の変化の激しい2週間目において、胸腺DNAの抽出を行い、DNAの泳動パターンを調べた。その結果、トリブチルスズ投与群に特異的に断片化した胸腺DNAの泳動パターンが観察された (Fig. 1)。DNAのヌクレオソーム単位での切断はアポトーシスを起こした細胞に特徴的な現象である⁶⁾。このことから、トリブチルスズを2週間連続経口投与することにより、胸腺においてアポトーシスが誘導されることが示された。

胸腺DNAの断片化は、アポトーシスに依存したエンドヌクレアーゼの活性化により起こっていると考えられる。トリブチルスズ投与により活性化されるDNaseが存在するかを明らかにするため、アクティビティーゲル法を行った (Fig. 2)。その結果、トリブチルスズ投与群において、約18kDaの位置にDNase活性を示す黒く抜けたバンドが観察された。ラット胸腺で働くDNaseとして、DNase γ (33 kDa)⁷⁾、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ 依存性エンドヌクレアーゼ (22 kDa)⁸⁾、NUC18 (18 kDa)⁹⁾などが知られている。活性化されたDNaseが約18kDaであることから、トリブチルスズ投与により活性化されるDNaseはNUC18であると考えられる。

次にアポトーシス実行過程におけるもうひとつの特徴的なプロセスであるカスパーゼの活性について調べた。カスパーゼ3はアポトーシスの実行因子として中心的役割を果たしていると考えられている¹⁰⁾。そのため、まずトリブチルスズ投与によるカスパーゼ3活性の変化に着目して実験を行った。その結果、トリブチルスズ投与群では、コントロール群

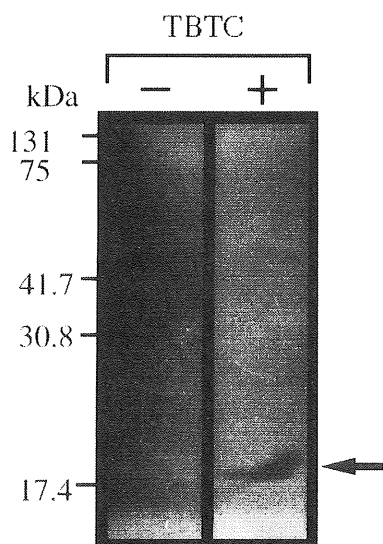


Fig. 2 Oral administration of TBTC induces the activation of endonuclease in the thymus.

Rats were fed NMF food containing TBTC (0 or 100 mg/kg) for 1 week. Total protein from the thymus was collected by TCA precipitation and developed by SDS-PAGE using acrylamide gel containing Calf thymus DNA. The activity of DNase can be observed as a black band generated by the degradation of DNA (indicated by arrow).

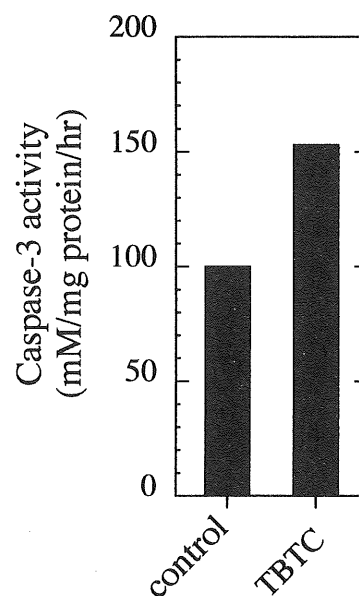


Fig. 3 Oral administration of TBTC activates Caspase-3 in the thymus.

Thymocytes were prepared from the rats fed NMF food containing TBTC (0 or 100 mg/kg) for 2 weeks. Activity of Caspase-3 in the thymocytes was determined by the Caspase-3 apoptosis detection method.

の約1.5倍にカスパーゼ3活性が上昇していた (Fig. 3)。これらの結果から、トリブチルスズ連続経口投与は、胸腺においてアポトーシスの特徴的現象であるDNAの断片化とカスパーゼカスケードの活性化の両方を引き起こすことが示された。

アポトーシス誘導経路は多様であるが、その中でも最もよく研究が進んでいるのは、細胞膜上の特異的レセプターを介した経路である。FasL/Fas系、およびTNF/TNFR系では、カスパーゼ-8を頂点としたカスパーゼ-3の活性化を介するカスパーゼカスケードが報告されている¹⁰⁾。トリブチルスズ投与によるアポトーシスの誘導経路を明らかにするため、FasL/Fasを介した経路について調べることにした。トリブチルスズ投与したラット胸腺タンパク質をSDS-PAGEで分離後、抗FasL抗体でWesternblottingを行った。その結果、投与群では非投与群の約3倍にFasLの発現量が増加していた (Fig. 4)。このことから、トリブチルスズ経口投与による胸腺細胞のアポトーシスはFasL/Fasを介した経路で進行することが示唆された。

今回の実験から、トリブチルスズ投与によりFasL/Fasを介してアポトーシスが誘導され、アポトーシスの実行因子であるカスパーゼ-3およびエンドヌクレアーゼ (NUC18) の活性化が引き起こされることがわかった。実行因子の活性化は、他のカスパーゼの活性化やシトクロームCの遊離などの種々の反応により仲介される。そのため、今後はFas刺激からアポトーシスの実行までを仲介する因子についての詳細を明らかにしていきたい。また、有機スズがどのようにFas刺激を与えるかについてはまだ明らかになっていないため、今後の課題である。

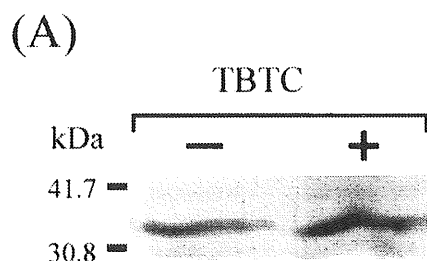


Fig. 4 Oral administration of TBTC enhances the expression of FasL in the thymus.

Rats were fed NMF food containing (+) or not containing (-) TBTC (100 mg/kg) for 2 weeks. Thymus was surgically extracted. Total protein from thymus was then subjected to TCA precipitation. Equal amounts of protein were developed by SDS-PAGE, followed by westernblotting using anti-FasL antibody.

文 献

- 1) Snoeij, N.J., Penninks, A.H., Seinen, W. (1987) *Environ. Res.*, 44 : 335 - 353.
- 2) AW, T.Y., Nicotera, P., Manzo, L., Orrenius, S. (1990) *Arch Biochem Biophys.*, 283 : 46 - 50.
- 3) Yuan, J. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9 : 247 - 251.
- 4) Nagata, S., Golstein, P. (1995) *Science*, 267 : 1449 - 1456.
- 5) Casciola-Rosen, L., Nicholson, D.W., Chong, T., Rowan, K.R., Thornberry, N.A., Miller, D.K., Rosen, A. (1996) *J. Exp. Med.*, 183: 1957 - 1964.
- 6) Wyllie, A. H. (1980) *Nature*, 284 : 555 - 556.
- 7) Gaido, M.L., Cidlowski, J.A. (1991) *J. Biol. Chem.*, 266 : 18580 - 18585.
- 8) Tanuma, S., Shiokawa, D. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 203 : 789 - 797.
- 9) Nikonova, L.V. et al. (1993) *Eur. J. Biochem.*, 215 : 893 - 901.
- 10) Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N.H., Winoto, A. (1998) *Nature*, 392 : 296 - 300.