

ヒト羊膜由来細胞株でのストレスに対する メタロチオネインの応答

¹⁾産業医科大学医学部産婦人科学教室

²⁾産業医科大学医学部生化学教室

安部 哲哉¹⁾²⁾ 柏村 正道¹⁾

Different Response of Metallothionein Gene Expression to Various Stresses in Human Amniotic Cell Line

Tetsuya ABE¹⁾²⁾ and Masamichi KASHIMURA¹⁾

¹⁾Department of Obstetrics and Gynecology,

University of Occupational and Environmental Health, Fukuoka

²⁾Department of Biochemistry, University of Occupational and Environmental Health, Fukuoka

概要 妊娠時、メタロチオネインは胎盤と卵膜で合成され、胎盤では胎児への必須金属の輸送やカドミウムなどの有害な重金属から胎内環境を防御する機構に関わっている。今回、卵膜でのメタロチオネインの機能を明らかにするために、ヒトの羊膜由来細胞株(WISH)を用いて種々のストレスに対するメタロチオネインの誘導の差異およびその誘導に細胞内グルタチオン(GSH)濃度が及ぼす影響について解析した。Metallothionein-II(MT-II)mRNAは、CdCl₂(0.5~15μM)の濃度依存的に誘導され、CdCl₂ 15μM添加では6時間後に20倍以上の増加を示した。MT-II mRNAの誘導は、酸化ストレスである過酸化水素の投与(0.5~2mM)によっても認められたが、CdCl₂の場合と比較するとその誘導はわずかで、過酸化水素0.5mM処理により9時間後に2.5倍程度の増加であった。温熱ストレス(42°C, 30分)に対しては、70kDaの熱ショック蛋白質(HSP70)のmRNAは強く誘導されたが、MT-II mRNAは誘導されなかった。Diethyl maleate処理による細胞内GSH減少は、CdCl₂によるMT-II mRNAの誘導にほとんど影響を及ぼさなかったが、N-acetyl-L-cysteine処理により細胞内GSHを増加させると、CdCl₂によるMT-II mRNAの誘導は有意に抑制された。今回の研究により、WISH細胞で金属や酸化ストレスによりメタロチオネインが誘導されることが示された。一方、温熱ストレスに対してはメタロチオネインはほとんど応答しないことが明らかにされた。また、羊膜細胞において、細胞内GSHレベルがカドミウムによるメタロチオネイン遺伝子の発現制御に関与していることが示唆された。

Abstract The constitutive expression of metallothionein (MT) gene has been shown in human placenta and fetal membranes. The MT in the placenta plays an important role in the transfer of essential metals as well as in limiting transfer of cytotoxic heavy metals such as cadmium but the function of MT in the fetal membranes remains unknown. In the present study we found a different response of MT mRNA to various stresses and the effect of the intracellular glutathione (GSH) on the stress-induced MT gene expression in a cultured cell line of human amniotic cell line (WISH). The mRNA level of MT-II, a major isoform of MT genes, increased in a concentration-dependent manner when WISH cells were incubated with CdCl₂ at various concentrations (0.5–15μM) for 6 h. The mRNA level of MT-II was increased more than 20-fold in WISH cells exposed to 15μM CdCl₂ for 6 h. Although the treatment of WISH cells with hydrogen peroxide (0.5–2mM), which generates reactive oxygen species, also increased the expression of MT-II gene, the level of MT-II mRNA showed only a 2.5-fold increase in the cells exposed to 0.5mM hydrogen peroxide for 9 h. Heat shock treatment of WISH cells at 42°C for 30 min, which increased the gene expression of heat shock protein 70 (HSP70), did not cause an increase in MT-II gene expression. When WISH cells had been treated with diethyl maleate which depletes intracellular GSH, the induction of MT-II mRNA by

CdCl₂ was not affected. On the other hand treatment of cells with *N*-acetyl-L-cysteine, which increases intracellular GSH, suppressed the induction of MT-II mRNA in cells exposed to CdCl₂. We suggest that metallothionein was involved in protecting against heavy metals and oxidative stresses in a human amniotic cell line, but it did not have any effect in protecting against heart stress. Furthermore, the intracellular GSH level may regulate the gene expression of metallothionein in cells exposed to cadmium.

Key words: Metallothionein • Cadmium • Human amniotic cell line • Glutathione

緒 言

メタロチオネインは、分子量約7kDaの低分子量の蛋白質で、1957年 Margoshes and Vallee¹⁾によって metal-binding protein として馬の腎臓から見出された。この蛋白質は、61個のアミノ酸から構成されており、構造上の特徴としてそのうちの20個を-S-S-(ジスルフィド)結合をもたないシステインが占め、金属(Ag>Hg>Cu>Cd>Zn>Co)に対して高い親和性を有している。生体内においてメタロチオネインは、銅や亜鉛などの必須金属の恒常性維持や、水銀やカドミウムなどの有害な重金属の解毒などに機能している。また、パラコートなどによる酸化ストレスによって誘導されることから²⁾、活性酸素のラジカルスカベンジャーとしても機能すると考えられている。メタロチオネインは、現在までに四つのアイソフォーム(MT-I, -II, -III, -IV)がわかっており、重金属や酸化ストレスからの生体の防御にはMT-IとMT-IIが関与している³⁾。生体では肝臓が主な産生臓器であるが、妊娠時には胎盤と卵膜においてもメタロチオネインの合成が行われている⁴⁾。これまでの報告により、胎盤におけるメタロチオネインが胎児への必須金属の輸送や、重金属からの胎児の保護などに関与している⁵⁾ことはわかっているが、卵膜におけるメタロチオネインの機能についてはほとんど報告されていない。そこで今回われわれは、ヒト羊膜由来細胞株を用いて、3種類の異なるストレス(金属、酸化ストレス、および温熱ストレス)を負荷し、羊膜細胞におけるメタロチオネインのmRNAの誘導の強さを比較することにより、羊膜でのメタロチオネインの機能について検討した。

実験方法

1. 培養細胞と材料

ヒト羊膜由来細胞株(WISH)は、American Type Culture Collection(ATCC)から得た。細胞は、10% fetal calf serumと2mM glutamineを含むMEM培養液を用いて37°C(95% air, 5% CO₂)で培養した。*N*-Acetyl-L-cysteine(NAC)とdiethyl maleate(DEM)は、Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)より、CdCl₂と過酸化水素は、Wako Pure Chemical Industries Ltd.(Tokyo)より購入した。

2. RNA抽出とNorthern blot analysis

Total RNAは、guanidine thiocyanateを用いて、WISH細胞から抽出した⁶⁾。1%のagarose gelで各レーン20μgのtotal RNAを電気泳動し、nylon membraneにblottingをした。Membraneをprehybridizationの後、nick-translation法で³²PをラベルしたcDNAを用いてhybridizationを行った。cDNAとして、metallothionein-II(MT-IIA)(human) *Hind*III fragment(3.0kb)⁷⁾とHsp70(human) *Bam*HI-*Eco*RI fragment(0.8 kb)⁸⁾を用いた。各mRNAの発現レベルは、methylene blueで染色した28S RNAのdensityを計測して補正した。

3. グルタチオン(GSH)濃度測定法

細胞内のGSH濃度は、o-phthalaldehyde(OPT)を用いた蛍光測定法⁹⁾によって測定した。

4. 細胞生存率の算定

96-well plateにWISH細胞を1well当たり2×10³個ずつsplitして、24時間後に濃度を調整したCdCl₂(1~1,000μM)を添加し、5時間培養する。PBSで洗浄した後、fresh mediumで37°C、24時間の培養を加え、MTS assay kit(CellTiter 96 AQ Assay: Promega Co., Madison, MI)により

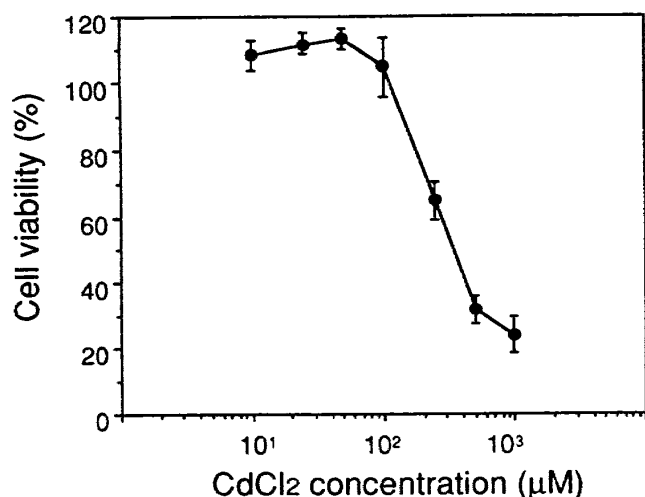


図1 CdCl₂投与による WISH 細胞の生存率. CdCl₂ 投与 5 時間後, fresh medium に交換して 24 時間後に MTS assay 法により測定した (n=3, mean ± SD).

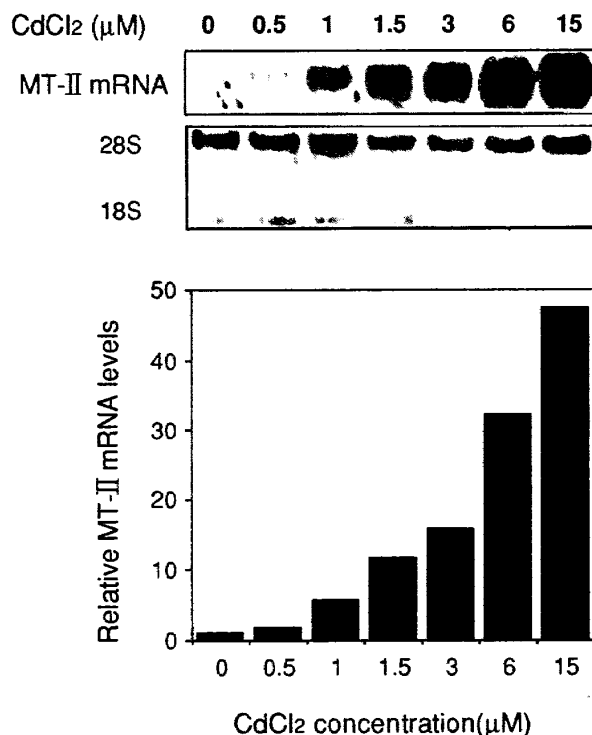
細胞生存率を算出した。

実験成績

ストレスとして, 金属ストレス, 酸化ストレスおよび温熱ストレスを WISH 細胞に負荷した. 金属ストレスとして CdCl₂ (1~1,000 μM) を 5 時間培養液に添加し, PBS で細胞を洗浄の後, 24 時間培養を加え, MTS assay 法により細胞生存率を検討した(図 1). CdCl₂ の濃度 100 μM 以内, 5 時間の曝露では WISH 細胞に顕著な細胞毒性は認められなかった. 次に, 0.5~15 μM の濃度の CdCl₂ を 6 時間添加後, metallothionein-II (MT-II) mRNA の誘導を Northern blot analysis で検討した(図 2). CdCl₂ による MT-II mRNA の誘導は, 濃度依存的に増加を示した(図 2A). 15 μM CdCl₂ 添加による MT-II mRNA の誘導を経時的に検討すると, CdCl₂ 投与 6 時間後にピークに達し, control に比べて 20 倍以上の増加を示した. その後も 10 倍程度の誘導の継続を認めた(図 2B).

酸化ストレスとして, 過酸化水素 (0.5~2 mM) を WISH 細胞の培養液に 4 時間添加して, 過酸化水素濃度の変化による MT-II mRNA の誘導を検討した(図 3). 過酸化水素 1.0 mM 添加のときに最も強い誘導を示したが, control に比べてわずか 1.5 倍程度の誘導増加であった(図 3A). さらに, 過酸化水素 0.5 mM 投与後の MT-II mRNA の

A



B

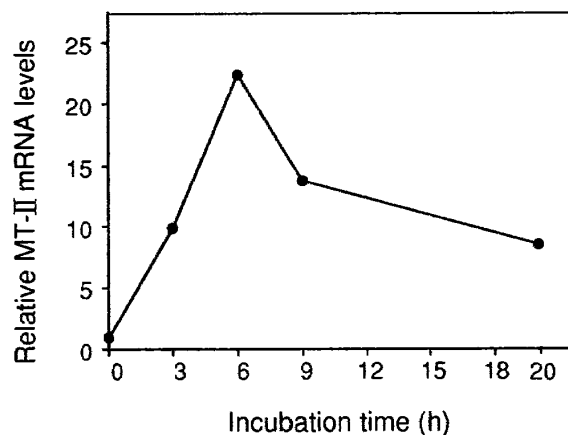


図2 CdCl₂による MT-II mRNA 誘導の解析

A: CdCl₂ (0.5~15 μM, 6 時間) の濃度変化による MT-II mRNA 誘導. B: CdCl₂ (15 μM) による MT-II mRNA の経時的変化.

A, B ともに実験は 2 回ずつ行い, そのうち代表的な結果を示している。

時間的变化を調べてみると, 9 時間後に最も強い誘導を示し, 約 2.5 倍に達した(図 3B).

メタロチオネインの温熱ストレスに対する応答を検討するために, 42°C の water bath に 30 分間, WISH 細胞を含む plate を浸け, 37°C の CO₂ イン

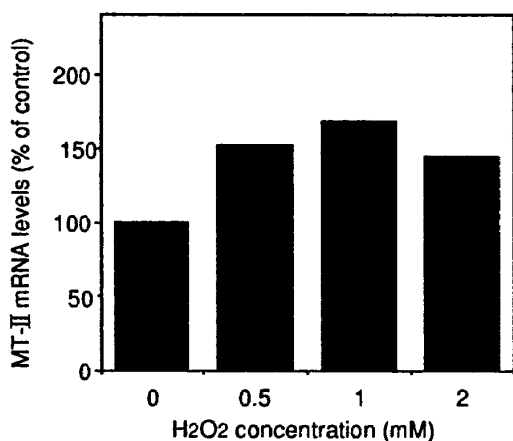
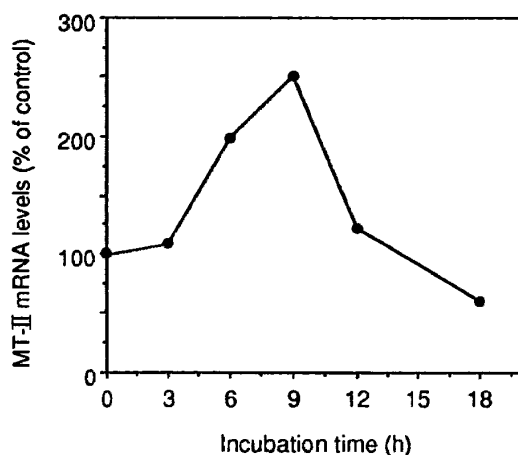
A**B**

図3 過酸化水素による MT-II mRNA 誘導の解析

A: 過酸化水素(0.5~2mM, 4時間)の濃度変化による MT-II mRNA 誘導. B: 過酸化水素(0.5mM)による MT-II mRNA の経時的変化.

A, B ともに実験は2回ずつ行い, そのうち代表的な結果を示している.

キュベータで2時間培養の後に RNA を抽出した(図4). 温熱ストレスに対して誘導される70kDaの熱ショック蛋白質(HSP70)は, WISH 細胞においてもその遺伝子発現を認めた. しかし, MT-II mRNA は, 今回設定した温熱ストレスでは誘導の増強を認めなかった.

一般に, 金属ストレスに対してメタロチオネインと共に細胞内グルタチオン(GSH)が金属毒性の解毒に非常に重要な機能を果たしている. そこでカドミウム負荷の際, WISH 細胞内の GSH 濃度が MT-II mRNA の誘導に及ぼす影響について検討した. WISH 細胞内の GSH を減少させるた

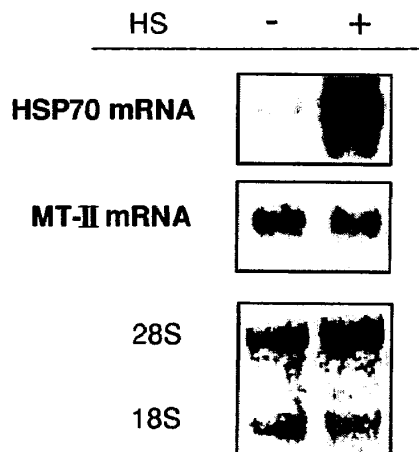


図4 温熱ストレスによる MT-II と HSP70 mRNA の誘導の解析.

温熱ストレス(42°C, 30分)処理後, 37°Cで2時間のインキュベーションを行った.

めに diethyl maleate(DEM)を用いた. DEM 0.2 mM を WISH 細胞の培養液に添加すると4時間後には, 細胞内 GSH 濃度は約5分の1に減少した(図5A). そこで, WISH 細胞の培養液に DEM 0.2mM を添加し, 30分後にさらに CdCl₂を濃度を変えて添加した. 6時間のインキュベーションを行い, 各 CdCl₂濃度における MT-II mRNA 誘導の程度を比較検討した. CdCl₂単独処理したグループと DEM 処理後 CdCl₂処理したグループにおける MT-II mRNA の誘導には大きな相違は認められなかった(図5B). ただし CdCl₂を15μM 添加した場合, DEM 処理した細胞に MT-II mRNA の若干の誘導増加を認めた.

次に, 細胞内 GSH 濃度を増加させた場合の CdCl₂による MT-II mRNA の誘導の変化を検討した. また, 細胞内 GSH 増加がその他のストレスによる MT-II mRNA の誘導に及ぼす影響についても検討した(図6). 細胞内 GSH を増加させるために, *N*-acetyl-L-cysteine(NAC)30mM を WISH 細胞の培養液に2時間添加した. NACにより WISH 細胞内の GSH は約3.1倍に増加した. NAC 30mM を培養液に添加して2時間後に, 種々のストレスを WISH 細胞に与えた. CdCl₂ 50 μM の3時間処理によって約8倍にまで増加した. MT-II mRNA は, NACの前処理により著明にその誘導が抑制された(図6, レーン7と8). 過酸化水素(1mM, 2時間)を添加した細胞におい

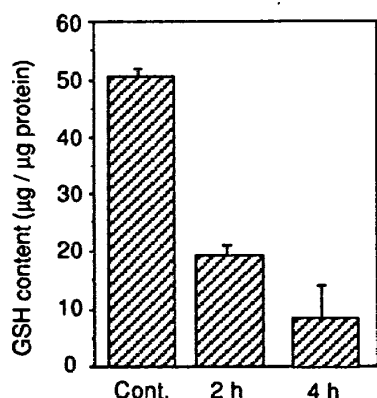
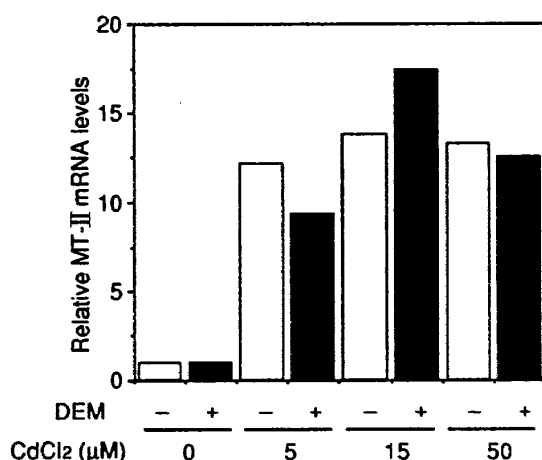
A**B**

図5 MT-II mRNA の誘導に及ぼす細胞内 GSH 減少の効果

A: Diethyl maleate (DEM) 0.2mM 添加後の細胞内 GSH の濃度変化 (n=3, mean±SD). B: DEM 0.2mM 添加30分後に CdCl₂ (5~50μM, 6 時間) を処理して MT-II mRNA の誘導を解析した. 実験は 2 回行い, そのうち代表的な結果を示している.

でも, NAC による MT-II mRNA の抑制効果はわずかながら認められた. しかし温熱ストレス (42°C, 30分) に対して NAC の前処理は, ほとんど影響を示さなかった.

考 察

メタロチオネインは妊娠時に胎盤において産生され, 母体から胎児への銅や亜鉛などの必須金属の輸送やカドミウムなどの有害な重金属からの胎内環境の防御などに機能している⁵⁾. 卵膜においても胎盤同様にメタロチオネインの産生が行われているが⁴⁾, その機能についてはほとんど報告されていない.

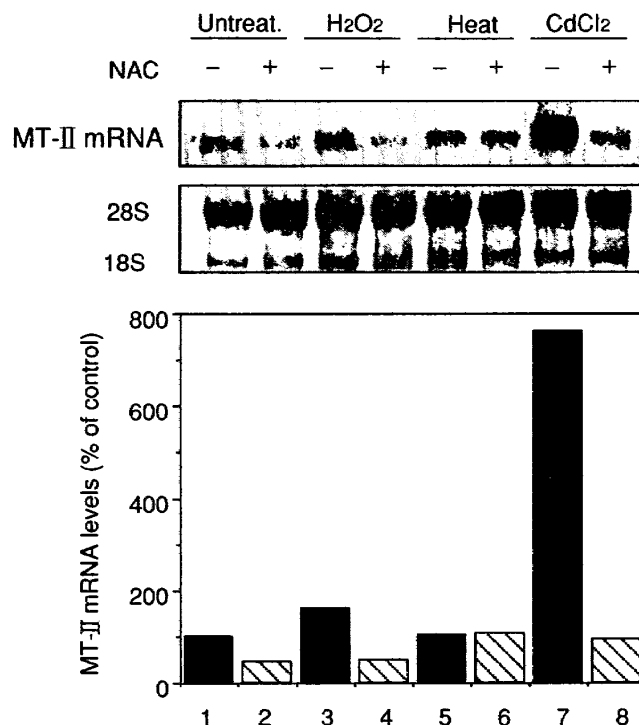


図6 異なるストレスによる MT-II mRNA 誘導に及ぼす NAC の効果. *N*-Acetyl-L-cysteine (NAC) 30 mM 添加2時間後にそれぞれのストレスを与えた. 過酸化水素 (1mM, 2 時間); 熱処理 (42°C, 30分後, 37°C, 2 時間); CdCl₂ (50μM, 3 時間).

われわれは, 卵膜におけるメタロチオネインの発現機構についてヒト羊膜由来細胞株 (WISH) を用いて検討した.

金属ストレスを初めとする三つの異なるストレスを羊膜由来細胞に与えた結果, MT-II mRNA はカドミウムに対して最も強い誘導を示した. 酸化ストレスである過酸化水素に対しても MT-II は応答を示し誘導されたが, カドミウムと比べると非常にわずかな誘導であった. メタロチオネイン遺伝子上流にはいくつかの metal responsive elements (MREs) が存在している¹⁰⁾. 亜鉛やカドミウムなどによるメタロチオネイン遺伝子の転写の誘導は, これらの金属によって活性化された metal transcriptional factor-1 (MTF-1) がこの MRE に結合することにより制御されている¹¹⁾. 一方, 酸化ストレスなどによるメタロチオネイン遺伝子の転写活性の制御機構は, あまり解明されていない. メタロチオネイン遺伝子上流には antioxidant responsive element (ARE:

GTGACNNNGC)が含まれており¹²⁾,酸化ストレスにより活性化された Fos/Jun などの転写因子が AP-1 binding site の塩基配列(TGACTCA)を一部含む ARE に結合して,メタロチオネイン遺伝子の転写が行われると考えられている¹³⁾.本研究におけるカドミウムと過酸化水素に対する MT-II mRNA の誘導の強さの違いには,これらの転写の機序の違いが関与している可能性がある.

今回の成績では, HSP70 mRNA を誘導する温熱ストレスに対して MT-II mRNA はほとんど誘導されなかった. HSP70は,シャペロン機能の特性¹⁴⁾からストレスにより生じた細胞内の変性蛋白質の修復等に関与している. HSP70は,温熱ストレス以外に金属や酸化ストレスによっても誘導される.その機序は細胞質内に存在する転写因子 heat shock factor(HSF)がストレスにより活性化され,三量体形成の後核に移行して, HSP70遺伝子上流域に存在する heat shock responsive element(HSE)に結合して転写が活性化される¹⁵⁾¹⁶⁾.しかし,ヒトのメタロチオネイン遺伝子には, HSE は存在せず,さらに温熱ストレスにより MTF-1が活性化されないことなどから,本研究で示したように,温熱ストレスに対して MT-II mRNA は誘導されない可能性が高い.

グルタチオン(GSH)は,細胞内でカドミウムによる傷害に対して first defense として重要な働きをしている¹⁷⁾.今回の研究で,カドミウムによる MT-II mRNA の誘導は, NAC による細胞内 GSH の補充により抑制された.しかし,カドミウムによる MT-II mRNA の誘導は,細胞内 GSH の減少では増強されないことが判明した.われわれは以前,同じ WISH 細胞を用いてカドミウムによる HSP70 mRNA の誘導と GSH の関係について報告した¹⁸⁾.すなわち,カドミウム投与により誘導された HSP70 mRNA は,細胞内 GSH の減少によりその誘導が増強され,細胞内 GSH の補充により抑制されることを示した.メタロチオネインと HSP70は,細胞内でカドミウムに対して誘導される代表的な蛋白質で,ともに細胞を防御するために機能している.しかし,その誘導の機序

は完全に異なっており,メタロチオネインが MRE を介して誘導されるのに対して HSP70は HSE を介して誘導が行われる.また,メタロチオネインは HSP70に比べて微量のカドミウムに対して強い応答を示す¹⁹⁾.さらに機能としても,メタロチオネインが金属の解毒を主とするのに対して, HSP70は金属によって生じた細胞傷害の修復を行う²⁰⁾.このような差異があるにもかかわらず今回の結果より,カドミウム曝露の際に羊膜細胞において細胞内 GSH が, HSP70遺伝子発現の調節だけでなく,メタロチオネインの遺伝子発現の抑制にも関与していることが明らかにされた.

われわれは本研究で,羊膜細胞における異なる三つのストレスに対するメタロチオネインの応答の違いを明らかにした.すなわち,メタロチオネインは羊膜において金属ストレス,酸化ストレスの順に応答を示し,温熱ストレスに対して全く応答を示さなかった.このことより,妊娠時に外因性の金属や酸化ストレスの曝露に対して,羊膜細胞内でメタロチオネインが誘導・産生され,自己細胞の防御とともに胎内環境の保護に関与している可能性が示唆された.さらに,羊膜細胞において細胞内 GSH 濃度が,カドミウムによるメタロチオネイン遺伝子発現の制御に関与していることが示された.

稿を終えるに際し,御指導をいただいた産業医科大学・医学部生化学教室東 監教授に感謝いたします.

文 献

1. Margoshes M, Vallee BL. A cadmium binding protein from equine kidney cortex. J Am Chem Soc 1957; 79: 4813—4814
2. Bauman JW, Madhu C, McKim JM, Liu Y, Klaassen CD. Induction of hepatic metallothionein by paraquat. Toxicol Appl Pharmacol 1992; 117: 233—241
3. Liu J, Liu Y, Michalska AE, Choo KH, Klaassen CD. Metallothionein plays less of a protective role in cadmium-metallothionein-induced nephrotoxicity than in cadmium chloride-induced hepatotoxicity. J Pharmacol Exp Ther 1996; 276: 1216—1223
4. Waalkes MP, Poisner AM, Wood GW, Klaassen CD. Metallothionein-like proteins in human placenta and fetal membranes. Toxicol Appl Pharmacol 1984; 74: 179—184

5. Goyer RA, Haust MD, Cherian MG. Cellular localization of metallothionein in human term placenta. *Placenta* 1992 ; 13 : 349—355
6. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979 ; 18 : 5294—5299
7. Karin M, Cathala G, Nguyen HM. Expression and regulation of a human metallothionein gene carried on an autonomously replicating shuttle vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983 ; 80 : 4040—4044
8. Kao HT, Nevins JR. Transcriptional activation and subsequent control of the human heat shock gene during adenovirus infection. *Mol Cell Biol* 1983 ; 3 : 2058—2065
9. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976 ; 74 : 214—226
10. Karin M, Haslinger A, Holtgreve H, Richards RI, Krauter P, Westphal HM, Beato M. Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA gene. *Nature* 1984 ; 308 : 513—519
11. Radtke F, Heuchel R, Georgiev O, Hergersberg M, Gariglio M, Dembic Z, Schaffner W. Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter. *EMBO J* 1993 ; 12 : 1355—1362
12. Dalton T, Palmiter RD, Andrews GK. Transcriptional induction of the mouse metallothionein-I gene in hydrogen peroxide-treated Hepa cells involves a composite major late transcription factor/antioxidant response element and metal response promoter elements. *Nucleic Acids Res* 1994 ; 22 : 5016—5023
13. Friling RS, Bergelson S, Daniel V. Two adjacent AP-1-like binding sites form the electrophile-responsive element of the murine glutathione S-transferase Ya subunit gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 668—672
14. Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature* 1992 ; 355 : 33—45
15. Sorger PK. Heat shock factor and the heat shock response. *Cell* 1991 ; 65 : 363—366
16. Pelham HR. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp 70 heat-shock gene. *Cell* 1982 ; 30 : 517—528
17. Singhal RK, Anderson ME, Meister A. Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. *FASEB J* 1987 ; 1 : 220—223
18. Abe T, Konishi T, Katoh T, Hirano H, Matsukuma K, Kashimura M, Higashi K. Induction of heat shock 70 mRNA by cadmium is mediated by glutathione suppressive and non-suppressive triggers. *Biochim Biophys Acta* 1994 ; 1201 : 29—36
19. Abe T, Yamamura K, Gotoh S, Kashimura M, Higashi K. Concentration-dependent differential effects on N-acetyl-L-cysteine on the expression of HSP70 and metallothionein genes induced by cadmium in human amniotic cells. *Biochim Biophys Acta* 1998 ; in press
20. Hatayama T, Tsukimi Y, Watatsuki T, Kitamura T, Imahara H. Differential induction of 70,000-Da heat shock protein and metallothionein in HeLa cells by copper. *J Biochem* 1991 ; 110 : 726—731

(No. 7937 平10・2・9 受付)