

P-056 無機亜鉛および亜鉛錯体を活用した血管内皮細胞メタロチオネイン誘導の特性解析

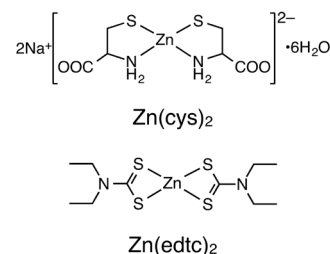
○藤江 智也^{1,2}, 中 寛史³, 瀬川 雪乃¹, 上原 茜¹, 中村 武浩¹, 木村 朋紀⁴, 吉田 映子¹, 内山 真伸⁵, 山本 千夏², 鍛冶 利幸¹

(¹東京理大・薬, ²東邦大・薬, ³名大物産七, ⁴摂南大・理工, ⁵東大院・薬)

【目的】メタロチオネイン(MT)は構成アミノ酸残基の約1/3がシステインであり, その全てがチオール基として存在する金属結合タンパク質である。MTはその特徴的な構造から, 活性酸素や有害重金属の毒性を軽減するだけでなく, 亜鉛の恒常性の維持にも寄与する多機能な防御タンパク質である。MTの誘導には, 亜鉛が結合して活性化される転写因子MTF-1がMT遺伝子の重金属応答配列MREにリクルートされることが不可欠である。血管の内腔を一層に覆う内皮細胞は, 血液凝固線溶系の調節を通じて血管病変の防御に寄与している。最近, 有機-無機ハイブリッド分子を活用することによって, 内皮細胞MTの誘導にMTF-1だけでなく, AREにリクルートされるNrf2も関与し, 誘導機構がアイソフォーム単位で異なることを示した¹⁾。したがって, 内皮細胞のMT誘導機構を解明することは血管病変の理解に重要である。亜鉛は代表的なMT誘導因子であるが, 内皮細胞を無機亜鉛で処理してもMTは誘導されないことが示唆されている²⁾。本研究では, 無機亜鉛による内皮細胞のMT関連応答を確認するとともに, MTF-1-MRE経路を活性化する亜鉛錯体を活用し, 内皮細胞MT誘導の特性を解析した。

【方法】培養ウシ大動脈内皮細胞を硫酸亜鉛, 亜鉛錯体Zn(cys)₂, Zn(edtc)₂で処理し, MT-1/2タンパク質発現をウエスタンブロット法で, MTアイソフォーム(MT-1A, MT-1E, およびMT-2A) mRNA発現をreal-time RT-PCR法でそれぞれ解析した。プロモーター活性はDual luciferase assayにて測定した。

【結果および考察】内皮細胞を硫酸亜鉛で処理したとき, MT-1/2タンパク質およびMT mRNA発現の上昇は認められなかった。このとき, MREの活性化もAREの活性化も認められなかった。このことから, 内皮細胞においては, 無機亜鉛がMTF-1-MRE経路およびNrf2-ARE経路を活性化することができず, そのためMTを誘導しないことが分かった。マウス胚線維芽細胞においてMTF-1選択的に亜鉛を供給する亜鉛錯体Zn(cys)₂で処理したところ, MREが活性化されたにも関わらず, MT-1/2タンパク質および3つのMTアイソフォームmRNAの発現上昇は認められなかった。これに対し, Zn(edtc)₂は, AREは活性化されなかったがMREは活性化され, MT-1/2タンパク質とすべてのMTアイソフォームmRNAの発現上昇が認められた。以上の結果は, 内皮細胞のMT誘導は, MTF-1-MRE経路の活性化が必要であるが, それだけでは不十分であることを示している。Zn(edtc)₂は内皮細胞MT誘導機構の解析に有用な分子プローブであることが示された。



Characterization of metallothionein induction in vascular endothelial cells using inorganic zinc and zinc complexes

○Tomoya Fujie^{1,2}, Hiroshi Naka³, Yukino Segawa¹, Akane Uehara¹, Takehiro Nakamura¹, Tomoki Kimura⁴, Eiko Yoshida¹, Masanobu Uchiyama⁵, Chika Yamamoto², Toshiyuki Kaji¹ (¹Fac. Pharm. Sci., Tokyo Univ. Sci., ²Fac. Pharm. Sci., Toho Univ., ³Res. Center Mater. Sci., Nagoya Univ., ⁴Fac. Sci. Eng. Setsunan Univ., ⁵Grad. Sch. Pharm. Sci., Univ. Tokyo)

In the present study, the following results were obtained: (1) inorganic zinc does not activate the MTF-1-MRE and Nrf2-ARE pathways involved in the induction of MT-1/2; (2) Zn(cys)₂ activates the MTF-1-MRE pathway without activating the Nrf2-ARE pathway activity but does not induce MT-1/2; and (3) Zn(edtc)₂ activates the MTF-1-MRE pathway without activating the Nrf2-ARE pathway activity and induced MT-1/2 in vascular endothelial cells.