

学 位 論 文 要 旨

氏 名

中村 康宏



論 文 題 目

「カドミウムの母仔間移行に関する
メタロチオネインと金属トランスポーターの役割」

指 導 教 授 承 認 印

木田之喜



カドミウムの母仔間移行に関する

メタロチオネインと金属トランスポーターの役割

中村 康宏

研究の背景

カドミウム (Cd) は、産業現場や環境汚染による急性、慢性暴露で、腎機能障害や骨軟化症・骨粗しょう症などを引き起こす毒性の強い重金属の一つとして知られている。また、Cd のような汚染重金属が生体内に侵入した時に、その金属の体内分布や蓄積濃度を修飾し、その毒性を軽減する因子として、金属結合タンパク質のメタロチオネイン (MT) の存在が知られている。この MT は、必須元素である亜鉛 (Zn) や銅 (Cu) 等とも結合し恒常性維持に関わることが報告されている。

一方、Cd の低濃度慢性暴露における母体から胎児への Cd 移行について、MT の役割は不明であり、Cd の生殖毒性との関連は重要な課題である。また、近年、必須元素の Zn、Cu、鉄 (Fe) を細胞内外に移送する金属トランスポーターの存在が報告されているが、これら金属トランスポーターと MT による、生殖臓器での金属元素の移送に対する修飾作用についても、その役割は不明な点が多い。

目的

本研究では、実験動物モデルにより Cd の母仔間移行に関する MT 及び金属トランスポーターの役割を解明する目的で実験を行った。

実験方法

実験動物：

Wistar 系雌ラットに Cd (CdCl₂ 水溶液) を 0 (対照群)、1、2 及び 5 mgCd/kg の濃度で、週 6 日間、定量的に経口投与した。Cd 投与後 3 週目 (9 から 10 週齢の時期) に 1 対 1 で雄ラットと交配させ、膣栓落下日を妊娠 0 日として、妊娠 19 日目に麻酔下心採血により安楽死させ、子宮、胎盤、胎仔等の生殖組織を摘出した。また、出産実験では、出産後 28 日間の哺乳期間中も Cd 投与を行い、仔ラットは出生後 1 日齢と 28 日齢で屠殺して、肝臓及び腎臓を摘出した。

金属測定：

子宮及び胎盤では、Cd、Zn 及び Cu 並びに、可溶性画分中の Cd、MT 結合型 Cd (MT-Cd) 及び非 MT 結合型 Cd (nonMT-Cd) の濃度を測定した。生後 1 日齢と 28 日齢の仔ラットは、肝臓及び腎臓中の Cd 濃度を測定した。尚、各金属濃度は原子吸光光度計で測定した。

遺伝子発現量の測定：

MT 及び各金属トランスポーターの遺伝子発現量を、リアルタイム PCR 法で定量した。尚、内部標準にはアクチン β を用いた。

胎盤の免疫組織学的染色：

母ラットの胎盤中における MT の局在は、1 次抗体に抗 MT ウサギポリクローナル抗体を使用して、Histofine SAB-PO キット (Nichirei Co.) により検出した。

結果

Cd、Cu 及び Zn 濃度 を測定した結果、母ラットの子宮中及び胎盤中で、Cd の蓄積量は Cd 投与量に依存した有意な増加がみられたのに対し、Cu 濃度は減少傾向にあった。また、Zn 濃度は変化がなく一定であった。

Cd の蓄積形態を調べたところ、母ラットの子宮中及び胎盤中に蓄積した Cd は、MT に結合された MT-Cd の形態に比べ、その多くが nonMT-Cd の形態であった。

生後 28 日齢の仔ラットでは、Cd は肝臓中よりも腎臓中に多く蓄積していたのに対し、生後 1 日齢の仔ラットでは、Cd は腎臓中よりも肝臓中に多く蓄積していた。さらに、5 mg 投与群の母ラットの胎盤では、合胞性栄養細胞等の萎縮がみられた。

Fe、Zn を細胞質内に取り込む金属トランスポーター DMT1 及び ZIP14 の遺伝子発現量は、胎盤中で Cd 投与量に依存した増加傾向がみられた。一方で、細胞質から細胞内小器官内へ Zn を移送する ZnT2 の遺伝子発現量についても、胎盤中において Cd 投与量に依存した増加傾向がみられた。その他の金属トランスポーター ZIP8、ZnT1、ZnT4 及び ATP7A は、Cd 投与量に依存した変化はみられなかった。

胎盤中の金属トランスポーターの遺伝子発現量は、子宮中と比較して Cd 投与に応じた変化が顕著であった。

総括

本研究では、生後 1 日齢の仔ラットの Cd の生体内分布の結果や、胎盤の組織染色の結果から、MT は、Cd を胎盤で保持し胎仔への Cd の移行に関して抑制的に機能しており、わずかながら胎盤から胎仔へ移行する Cd は、nonMT-Cd の形態であると考えられた。また、金属トランスポーターのうち、胎盤中では、DMT1、ZIP14 及び ZnT2 の各遺伝子の発現量が、Cd 投与量に依存して増加することを認め、Cd の母仔間移行に関与する可能性を示唆する結果を得た。

今後の課題

MT や金属トランスポーターの役割をより明確するためには、今回行った遺伝子発現レベルの実験に加え、タンパク質レベルでの実験が必要となる。また、胎盤において網羅的に遺伝子発現量を観察し、Cd 移送に関与すると考えられる遺伝子発現をスクリーニングし、メカニズムの詳細を検討する必要があると考えられた。