

Bull. Mukogawa Women's Univ. Nat. Sci., **48**, 75–79(2000)

武庫川女子大紀要 (自然科学)

高リン食摂取ラットの腎におけるシトクローム p450, HSP-70, HO-1, iNOSの発現

岸本三香子, 松浦 寿喜, 市川 富夫
(武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科)

The appearance of the cytochrome p450, HSP-70, HO-1, iNOS in rat kidney fed a high phosphorus diet.

Mikako Kishimoto, Toshiki Mathuura and Tomio Ichikawa

*Department of Food Science and Nutrition,
School of Human Environmental Sciences,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663-8558, Japan*

Five-week-old rats were fed on a diet containing phosphorus either at 0.3% (control diet) or at 1.5% (high P diet) for 21 days. Mitochondrial, microsomal, cytosol fractions were obtained from the kidney by the usual method. Kidney of rat fed on high P diet contained high concentration of calcium, and its function was impaired because of excessive calcium. In this case, many stress defensive proteins like cytochrome p-450, HSP-70, HO-1, iNOS in kidney seem to appear. Then those proteins in those fractions were detected by the western blotting method. Contents of cytochrome p-450, HSP-70 and iNOS in three fractions were almost the same between in control diet rats and high P diet rats. On the other hand, HO-1 was not detected in three fractions of control rats, but it was detected in high P rats. HO-1 may play some defensive roles in environmental condition, that is, the cellular high calcium concentration.

緒言

ラットを用いた実験では、高リン(P)食摂取はカルシウム(Ca)代謝に影響を及ぼし、腎石灰化を起す¹⁻³⁾。腎石灰化は腎へのリン酸カルシウムの沈着であり、腎臓皮髄境界部に発症する⁴⁾。本実験条件においてもCa量は約150倍に達し、Caと同様にマグネシウム(Mg)、Pの著しい蓄積がみられた⁵⁾。細胞において高濃度のCaは細胞毒であり、細胞質内のCa濃度の上昇が持続的に続くと、ミトコンドリア(Mt)へCaが蓄積され、やがて呼吸が抑制されて、ATP産生が低下するといわれる。細胞膜のポンプはATPにより駆動されているため、このことがさらなるCaの上昇を招くが、やがて様々

なCa依存性プロテアーゼが活性化され、細胞死が招来される⁶⁾。我々は腎臓Mt画分中のミネラル量を測定した結果、高P食投与Mtには、標準食投与による腎MtのCaで20倍、Mgで4倍、Pでは10倍量の蓄積が、またミクロソーム(Ms)画分では19、2.5、3.6倍量が蓄積されていることを明らかにした⁷⁾。腎Mt、Ms機能への強い影響が示唆され、高P食摂取による障害に伴う細胞異常と大きく関連する種々のタンパク質の合成誘導が考えられる。本実験では、腎臓の細胞分画により、Mt画分、Ms画分、細胞質液に分け、各無細胞画分のシトクロームp450(p450)、ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)、ヒートショックタンパク-70(HSP-70)、iNOSタンパクの検出をWestern blot法により行い、高P食

摂取時の腎石灰化との関連性を検討した。

実験方法

1. 実験動物および飼育方法

4週令 SD 系雄ラットを日本クレア(株)より購入し、個別ゲージにて、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 7\%$ 、12 時間ごとの明暗サイクル (8:00am~8:00pm, 8:00pm~8:00am) の環境下で飼育した。対照飼料で1週間予備飼育した後、各飼料で3週間飼育した。試験期間中の飼料、およびイオン交換水は自由摂取とした。飼育終了日にネブタール麻酔下のラット腹部大動脈よりヘパリン処理した注射器で採血して脱血後、腎臓を摘出した。臓器は測定に使用するまで -30°C で冷凍保存した。

2. 飼育飼料

実験飼料組成を Table 1. に示す。対照食は Ca:0.5%, P:0.3%, 高 P 食は Ca:0.5%, P:1.5% とした。Mg はともに 0.05% としたが、実測値の平均値は、対照食 0.6, 0.3, 0.03, 高 P 食 0.6, 1.5, 0.03 であった。カゼイン、コーンスターチ、セルロースパウダー、ミネラルミックス、ビタミンミックスはオリエンタル酵母(株)製を用いた。コーン油はナカライテスク(株)製を用い、その他の試薬は和光純薬(株)から購入した。

3. 実験方法

3.1 Mt, Ms, 細胞質液の調製

腎臓 Mt, Ms および細胞質液の調製には、250mM sucrose, 2mM EDTA, 25mM β -

Table 1. Composition of Hi-P diet. (g/100g diet)

	Control	Hi-P
Casein	20.0	20.0
DL-Methionine	0.3	0.3
Corn starch	15.0	15.0
Corn oil	5.0	5.0
Cellulose powder	5.0	5.0
Vitamin mix ¹⁾	0.8	0.8
Choline chloride	0.2	0.2
Mineral mix ²⁾	3.5	3.5
CaCO ₃	1.25	1.25
KH ₂ PO ₄	0.70	5.97
Sucrose	48.3	43.0
Ca(%)	0.5	0.5
P(%)	0.3	1.5
Mg(%)	0.05	0.05

1) According to AIN-76 Vitamin mixture.

2) According to AIN-76 Mineral mixture, without Ca, P sources.

glycerophosphate, 1mM DTT, 1mM orthovanadate, 1% Tween 20, 1mM phenyl methylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin 含む 20mM Hepes 緩衝液 (pH7.5) を用いた。腎を9倍量の緩衝液でホモジナイズ後、600 $\times\text{g}$ で遠心分離し、上清をさらに 8000 $\times\text{g}$ で遠心分離して得られた沈殿を Mt 画分とし、上清を 105000 $\times\text{g}$ で遠心して得られた沈殿を Ms 画分、上清を細胞質液とした。画分調製には、対照、高 P 食投与ラット各 3 匹の腎臓器を用い、分離操作は 4°C で行った。

3.2 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動および Western blot 分析

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動および Western blot は常法⁸⁾により行った。

3.3 p-450 分子種 CYP1A1

各試料(タンパク量 30 μg)を 10% ポリアクリルアミドゲルにより泳動を行った。ゲルをニトロセルロース膜に転写後、3% Skim milk/TBS-0.5T で 4°C で一晩ブロッキングした。ニトロセルロース膜を TBS-T で洗浄後、一次抗体 Anti-Rat CYP1A1 (第一化学薬品) で反応させた。反応後、TBS-T で洗浄後、二次抗体ペルオキシダーゼ標識抗ヤギ Ig-G (MBL) で反応させた。検出には Western blotting detection reagents (Amersham) により、X 線フィルム上に検出した。

3.4 p450 分子種 CYP2B1

p450 分子種 CYP2B1 の検出は、p-450 分子種 CYP1A1 の検出と同様の方法で行った。一次抗体には Anti-Rat CYP2B1 (第一化学薬品) を用いた。

3.5 HO-1

HO-1 の検出は、p-450 分子種 CYP1A1 の検出と同様の方法で行った。ポリアクリルアミドゲルの濃度は 12% とし、一次抗体には Anti-Heme-Oxygenase-1 HO-1 (Stress Gen) を用いた。二次抗体にはペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG (MBL) を用いた。

3.6 iNOS

iNOS の検出は、p-450 分子種 CYP1A1 の検出と同様の方法で行った。ポリアクリルアミドゲルの濃度は 8% とし、一次抗体には Anti-iNOS (ABR) を用いた。二次抗体にはペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG (MBL) を用いた。

3.7 HSP-70

各試料(タンパク量 30 μg)を 10% ポリアクリルアミドゲルにより泳動を行った。ゲルをニトロセル

ローズ膜に転写後, 3%Skim milk/TBS-0.5T 25~30℃で20分間ブロッキングした. ニトロセルローズ膜をTBS-Tで洗浄後, 一次抗体Anti-Rat

HSP-70(UBI)で4℃で一晩反応させた. 反応後, TBS-Tで洗浄後, 二次抗体ペルオキナーゼ標識抗ヤギIgG(MBL)で反応させた. 検出にはWestern blotting detection reagents(Amersham)により, X線フィルム上に検出した.

3.8 その他

タンパク量はLowry法⁹⁾により定量した.

実験結果

Western blot法によるタンパクの検出を行った. p450 CYP1A1は, 標準食, 高P食の両Mt, Msにおいてわずかに発現し, 細胞質液には認められなかった(Fig. 1.). p450 CYP2B1は, 両Mt, Ms, 細胞質液に発現した(Fig. 2.). HSP-70は標準食群, 高P食群両群のMt, 細胞質液において発現し, Msでの発現は極めて低かった(Fig. 3.). HO-

1は高P食群のMt, Ms, 細胞質液においてのみ検出された(Fig. 4.). iNOSは両群において同程度発現し, 両群で差は認められなかった.

考察

生体は酸化ストレス, 低酸素症, 熱ショックなどにより急性期タンパクを産生する. HSP, ヘムオキシゲナーゼ(HO)などは合成中のタンパク質中間体などに結合して変性を防止したり, 介添役的作用を示す“分子シャペロン”としても重要と考えられている. 高P食摂取時の腎石灰化との関連性を検討するため, Western blot法によるこれらのタンパクの検出を行った.

シトクロムp450分子種CYP1A1とCYP2B1は, 無細胞画分の検出場所は異なるものの, 標準食, 高P食において同程度の検出結果となった.

HSP-70は標準食群, 高P食群両群のMt, 細胞質液において発現し, Msでの発現は極めて低い, 同様の検出となった. HSP-70は細胞質ではタンパ

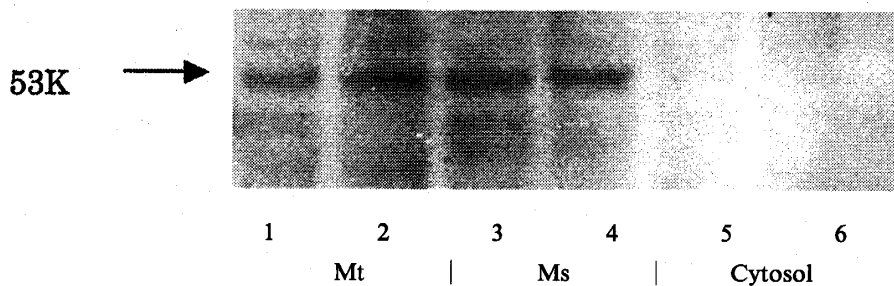


Fig. 1. Western analysis of CYP1A1 protein of kidney in rats fed the 0.3% (control) and 1.5% phosphorus (hi-P) diet. Mitochondria (lane1:control, lane2:hi-P), Microsome (lane3:control, lane4:hi-P), cytosol (lane5:control, lane6:hi-P).

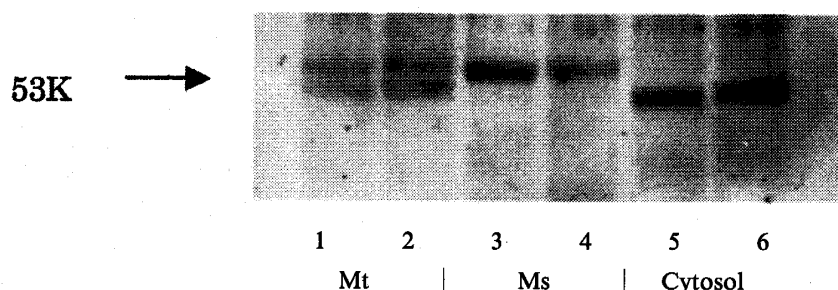


Fig. 2. Western analysis of CYP2B1 protein of kidney in rats fed the 0.3% (control) and 1.5% phosphorus (hi-P) diet. Mitochondria (lane1:control, lane2:hi-P), Microsome (lane3:control, lane4:hi-P), cytosol (lane5:control, lane6:hi-P).

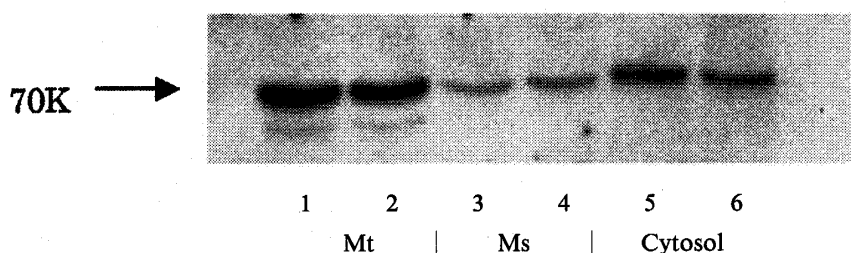


Fig. 3. Western analysis of HSP-70 protein of kidney in rats fed the 0.3% (control) and 1.5% phosphorus (hi-P) diet. Mitochondria (lane1:control, lane2:hi-P), Microsome (lane3:control, lane4:hi-P), cytosol (lane5:control, lane6:hi-P).

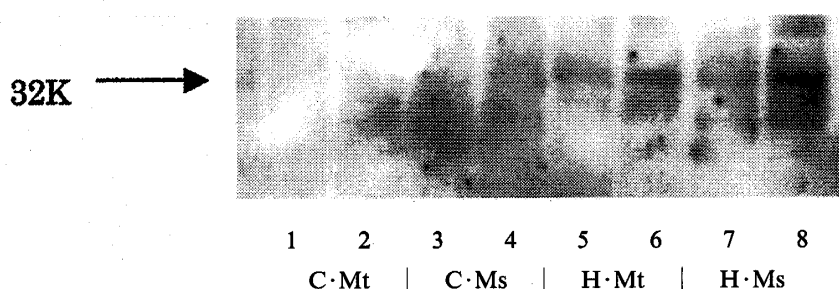


Fig. 4. Western analysis of HO-1 protein of kidney in rats fed the 0.3% (control) and 1.5% phosphorus (hi-P) diet. Mitochondria (lane1, 2:control, lane5, 6:hi-P), Microsome (lane3, 4:control, lane7, 8:hi-P).

ク質の高次構造を適正にし、変性、凝集を防ぐ働きをし、一方 Mt HSP-70 は、前駆体タンパク質を内部に導入し、正常な Mt タンパク質の機能を持たせるために必須の働きをすることが知られている¹⁰⁾。標準食群、高 P 食群両群の Mt において同程度発現したことから、両 Mt において正常に働いているものと考えられ、高 P 食投与による影響はみられないと推察された。

HO-1 は高 P 食群の Mt, Ms, 細胞質液においてのみ検出された。HO には誘導型の HO-1 と構成型 HO-2 が存在するが、HO-1 は、生体内で種々のストレスおよび組織障害などに反応して防衛反応としてタンパク質を発現することでも知られている¹¹⁻¹²⁾。HO の作用により、シトクロム p450、ヘモグロビン等の補欠分子族であるプロトヘムは分解され、一酸化炭素(CO)、鉄と胆汁色素ビリベルジンを生成する¹¹⁾。HO の産物の一つである CO は一酸化窒素(NO)との構造上の類似点から血管拡張物質として作用する¹³⁾ことが見いだされ、ビリベルジンの抗酸化活性による生体防御系としての HO¹⁴⁾、あるいは鉄の再利用系を構成する因子としての HO

という観点もふくめてその機能が見直されつつあるのが現状である。高 P 食群では、高 P 食投与による腎臓 Mt, Ms へのミネラル蓄積がストレスとなり HO-1 が発現したと考えられたが、これら HO 機能との関連は明らかでない。

また、iNOS は両群において同程度発現し、両群で差は認められなかった。NO は、アルギニンを基質とした酵素反応により生体内で生成され、その反応を触媒するのが NO 合成酵素(NOS)である。NO は血管弛緩に限らず、神経系での神経情報伝達や免疫系での広範囲な炎症反応のモジュレーター分子として機能している¹⁵⁾。iNOS は 3 種類ある NO 合成酵素の一つであり、細菌毒素やサイトカインなどにより誘導合成され、細胞質に局在する¹⁶⁾。抗菌活性や抗腫瘍活性などの防御機能を有する^{17,18)}ことも報告されているが、一方、NO は Mt の呼吸酵素、解糖系酵素、あるいは DNA 複製の律速酵素などを阻害すると報告されている¹⁶⁾。本実験では、高 P 食投与による影響は見られなかった。

Western blot 法によるタンパク質の検出を行った結果では、高 P 食投与による腎臓 Mt および Ms に

HO-1が発現したが、これはミネラル蓄積がストレスとなったと考えられた。

要約

体重約90gのSD系雄ラットにPレベル0.3% (標準食)と1.5%(高P食)を自由摂取させ3週間飼育した。解剖時には腎臓器を摘出し、常法により無細胞画分を分離した。各画分のシトクロームP450分子種2種, HSP-70, HO-1, およびiNOSタンパクをwestern blot法により検出し、高P食投与時の腎石灰化と腎機能について検討を試みた。

- 1)シトクロームp450分子種, p450 CYP1A1とp450 CYP2B1では、無細胞画分の検出場所は異なるものの、標準食、高P食において同様の検出結果となった。
- 2)HSP-70においても標準食群、高P食群両群のMt, 細胞質液において発現し、Msでの発現は極めて低い、同様の検出となった。
- 3)HO-1は高P食群のMt, Ms, 細胞質液においてのみ検出された。HO-1は、生体内で種々のストレスおよび組織障害などに反応して防衛反応としてタンパク質を発現することで知られている。高P食群では、高P食投与による腎臓へのミネラル蓄積がストレスとなりHO-1が発現したと考えられた。
- 4)iNOSは両群において同程度発現し、両群で差は認められなかった。

文献

- 1) Hoek, A.C., Lemmens, A.G., Mullink, J.W.M.A. and Beynen, A.C., *J. Nutr.*, **118**, 1210-1216(1988)
- 2) Mars, Y.W.H.M., Lemmens, A.G. and Beynen, A.C., *Nutr. Rep. Int.*, **38**, 249-258(1988)
- 3) Woodard, J.C. and Jee, W.S.S., *J. Nutr.*, **114**, 2331-2338(1984)
- 4) Al-Modhefer, A.K.J., Atherton, J.C., Garland, H.O., Singh, H.J. and Walker, J., *J. Physiol.*, **380**, 405-414(1986)
- 5) 岸本三香子, 倉本周子, 川口真規子, 松浦寿喜, 市川富夫, 武庫川女子大学紀要, **45**, 67-72(1997)
- 6) 宇井理生編, 細胞内シグナル伝達, 現代化学増刊, **34**, 東京化学同人, 東京, 121-127(1998)
- 7) 岸本三香子, 松浦寿喜, 市川富夫, 武庫川女子大学紀要, **46**, 79-85(1998)
- 8) 西方 敬人, バイオ実験イラストレイテッド⑤, 秀潤社, 東京(1997)
- 9) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275(1951)
- 10) 中澤 透, 浅見行一, ミトコンドリア, 東京大学出版会, 東京(1995)
- 11) 藤田博美, 武田和久, 伊原直美, 三谷絹子, 衛生化学, **41**, 14-23(1995)
- 12) 末松誠, 合田巨人, 鈴木恒陽, 若林良之, 石村 巽, 細胞工学, **17**, 2, 224-229(1998)
- 13) Suematsu, M., Kashiwagi, S., Sano, T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205**, 1333-1337(1994)
- 14) Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N., Ames, B.N., *Science*, **235**, 1043(1987)
- 15) Bred, D.S., and Snyder, S.H., *Annual. Rev. Biochem.*, **63**, 175-195(1994)
- 16) 井上正康: 活性酸素とシグナル伝達, 講談社, 東京(1998)
- 17) MacMicking, J.D., *Cell*, **81**, 641-650(1995)
- 18) Wei, X.Q., *Nature*, **375**, 408-411(1995)