



Title	X線全身照射による肝,腎のMetallothionein mRNAの増加
Author(s)	林, 英博
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1988, 48(11), p. 1467-1471
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/16678">https://hdl.handle.net/11094/16678</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## X線全身照射による肝、腎の Metallothionein mRNA の増加

岡山大学医学部放射線医学教室

林 英 博

(昭和63年 7月27日受付特別掲載)

(昭和63年 8月26日最終原稿受付)

### Increase of Hepatic and Renal Metallothionein mRNA Level Induced by Whole Body Irradiation

Hidehiro Hayashi

Department of Radiation Medicine, Okayama University Medical School

Research Code No. : 401.3

Key Words : Whole body irradiation, Metallothionein, mRNA,  
Liver, Kidney

Metallothionein (MT) mRNAs were determined in tissues of rat following whole-body X-irradiation. The tissue samples were analyzed for MT-mRNA levels using a human MT-II RNA probe. When compared with control rats, marked elevations in liver and kidney MT mRNA levels and slight elevations in brain and spleen MT mRNA levels were observed in irradiated rats 72 hr after irradiation (20 Gy). However lung, heart, and testis MT mRNA levels did not show an increase 72 hr after irradiation (20 Gy). Time course experiments indicated that hepatic and renal MT mRNA increased significantly compared to control values at 3 or 6 h after high and low dose irradiation (20 Gy and 2 Gy). In rats exposed to high dose irradiation, the hepatic and renal MT mRNA levels decreased obviously at 18 hr, and also showed an increase at 72 hr after irradiation. In rats exposed to low dose irradiation, the hepatic and renal MT mRNA levels decayed to control values by 18 hr after irradiation. These data indicate X-ray treatment produces an in vivo induction of MT mRNA in irradiated rats.

#### 序　論

Metallothionein (MT) は分子量約6,000の金属結合蛋白であり、全アミノ酸の約30%を Cys が占めており、この Cys の SH 基は金属イオンとメルカプチド結合している。MT は当初、Cd を多量に結合した蛋白として分離された。その後、Cd, Zn, Cu, Hg などの重金属を動物に投与すると肝臓や腎臓などに誘導合成されることから、これら重金属の毒性を抑制する解毒蛋白であろうと考えられていた。しかし、その後の研究により、MT の生理的意義は見直されるようになり、MT の機能については、① Cd, Hg など生体にとって有毒である金属を結合することにより毒性を抑える解毒蛋白

白。② Zn を必須とするさまざまの酵素や蛋白に Zn を供給するなど、細胞の増殖、その他のイベントに関与する蛋白。③ 多量の SH 基による radical scavenger 作用、などの可能性が考えられている<sup>1)~4)</sup>。

MT は Cd や Zn などの金属のほかに感染、熱傷、低温暴露、放射線照射、lipopolysaccharide (LPS)、グルココルチコイドなどの生理的、物理的刺激や、ステロイドホルモンにより誘導合成されることが報告されている<sup>4)8)9)</sup>。この中で X 線照射については、この蛋白が多量の Cys や Zn を含むことから照射後の SH 化合物や Zn 代謝との関連から注目され、現在までに全身照射によって肝

臓や腎臓で増加することが報告されている<sup>5)~10)</sup>。しかし、増加の生理的意味やその誘導合成の機序については現在までのところ充分に明らかにされていない。

X線照射によるメタロチオネインの誘導の機序を解明するため mRNA レベルの変化に注目し、実験を行い若干の結果を得たので報告する。

#### 材料と方法

実験動物として Wistar 系雄ラット（150~200 g）を使用した。照射は東芝製深部 X 線治療装置を使用して 2Gy あるいは 20Gy の全身照射を行った（Cu 0.5mm+Al 0.5mm, 0.69Gy/min）。なお照射時に使用したケージに同一時間いれた群を対象群とした。照射後、経時的に断頭によりラットを屠殺し、組織を摘出し直ちにグアニジンイソチオシアネート（GIT, BRL 社, Enzyme grade）溶液中で細切、ポリトロンにより細かく破碎した。この組織の GIT ホモジネートを、22G の注射針を圧をかけて 2 回通すことにより DNA を切断した。この GIT ホモジネートを塩化セシウム（CsCl, BRL 社, Optical grade）溶液の上に重層し 28,000rpm で 21~24 時間遠心した。遠心終了後、GIT 層および DNA を含む CsCl 層の上層を吸引除去し残りの CsCl 層をデカントにより除去した。管壁の溶液をキムワイプで除ぞいた後、0.3 M sodium acetate (pH 6.0) を加えて RNA ベレットをつぶし、2.5 倍容のエタノールを加えて、RNA を沈殿させ、80% エタノールで洗浄後、使用するまで 80% エタノール中、-80°C で保存した。亜鉛投与ラットからの RNA の調製は亜鉛投与（10 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O/kg）から 5 時間後に肝臓を摘出し同様の方法で行った。

RNA の分析はノーザンプロット法<sup>11)</sup>により行った。対照群、照射群の組織からの RNA 15μg あるいは Zn 投与群の肝臓からの RNA 10μg をホルムアルデヒド、ホルムアミド存在での変性条件下でアガロース（1.2%）電気泳動を行い、泳動後ナイロンメンブレンフィルター（NEN 社, Gene Screen Plus）にプロットした。フィルターを風乾後、80°C 2 時間 baking し、ハイブリダイゼーションに使用するまでデシケーター中で保存し

た。

ハイブリダイゼーションは 50% ホルムアミド、6×SSC, 1% SDS, 25μg/ml 変性酵母 RNA 溶液中での 42°C 1~2 時間のプレハイブリダイゼーション後、同溶液中に 1~2 × 10<sup>6</sup> cpm/ml の <sup>32</sup>P 標識 RNA プローブを加えて 42°C 一晩行った。ハイブリダイゼーション後、フィルターを 2×SSC, 1% SDS 溶液中で二回すすぎ、2×SSC, 1% SDS 溶液中で 68°C 10 分で二回、1×SSC, 1% SDS 溶液中で 68°C 30 分で一回、0.1×SSC, 1% SDS 溶液中で 68°C 30 分で一回洗浄した後、2×SSC 溶液ですすぎ、1 μg/ml の RNase A (Sigma 社) を含む 30mM NaCl, 5mM EDTA, 10mM Tris/HCl (pH 7.5) 溶液中で 37°C 15 分の RNase A 処理を行った。RNase A 処理後フィルターをサランラップで包み増感紙（デュポン社、ライトニングプラス）と共に -80°C で 2~4 日のオートラジオグラフィーを行った。

RNA プローブはヒト MT-IIA DNA 断片<sup>12)</sup>を BamHI と Hind III (宝酒造) で処理した pAM19 ベクター（アマシャムジャパン社, Paired promoter SP6/T7 system）のポリリンカー部分に挿入し、挿入 DNA の下流を Bam HI で切断したものを template にして SP6RNA ポリメラーゼ（宝酒造）により作製した。なお、RNA プローブの標識は [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-UTP (アマシャムジャパン社, SP6/T7 grade) を用いて行った。

#### 結果

(1) X 線全身照射によるラット組織の MT mRNA レベルの上昇：X 線全身 20Gy 照射での MT レベルはセファデックス G-75 カラム法での測定では肝臓と腎臓での増加が、しかも照射後 72 時間が最も顕著であることが既に報告されていることから<sup>7)</sup>、20Gy 全身照射 72 時間後のラットの主要組織の MT mRNA レベルの測定を行った。その結果、Fig. 1 に示すように肝臓と腎臓で対照群に比較して顕著な MT-mRNA レベルの上昇が認められた。また、この他の組織では脳、脾臓で僅かではあるがレベルの上昇が認められた。しかし、肺、心臓、では mRNA レベルの上昇は認められなかった (Fig. 1)。また、睾丸では対照群でか

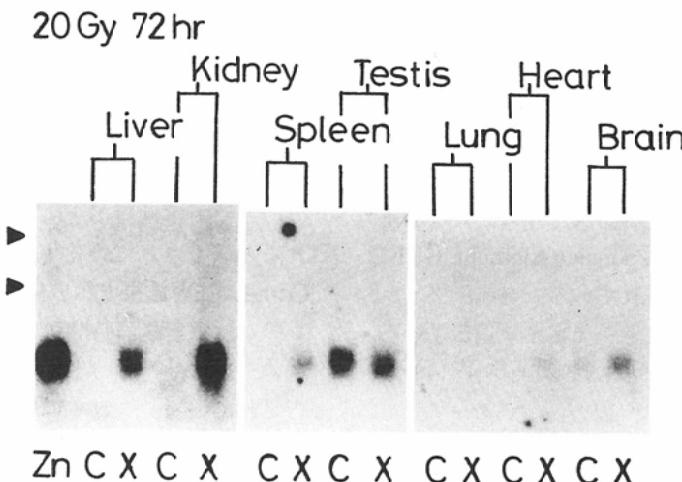


Fig. 1 Induction of MT mRNA in tissues of irradiated rats. Rats were exposed to whole body X-irradiation (20Gy), and tissues were removed 72hr later. Upper and lower arrowheads indicate the positions of 28S and 18S rRNA, respectively. Zn, Zn injected rat liver; C, Control rats; X, irradiated rats.

なり高いMT-mRNAレベルを示していたが照射群では逆にレベルの低下傾向が認められた(Fig. 1).

(2) X線全身照射による肝臓と腎臓のMT mRNAレベルの変動:X線全身照射による肝臓と腎臓のMT mRNAレベルの上昇について、20 Gyと2Gy照射について時間依存性を検討した。20Gy照射では肝臓のMT遺伝子の発現は照射後、3時間で既に認められ、6時間で同程度のレベルを示し、18、48時間で低下傾向が認められ、72時間後に再び増加していた(Fig. 2)。一方、腎臓でも照射後、3時間で既にMT mRNAレベルの上昇が認められ、6時間でさらに増加し、18時間で僅かに減少し、その後48、72時間後に再び、レベルの上昇が認められた(Fig. 2)。

2Gy照射ではCd-hem法での測定で、肝臓のMTレベルは対照群に比較して照射後4日目まで2倍程度の増加が認められる報告されているが<sup>10)</sup>、MT mRNAレベルの変化では照射後、6時間で顕著なmRNAレベルの上昇が認められ、その後、18時間で低下、48時間以後僅かではあるが一定レベルの発現を示していた(Fig. 2)。一方、腎臓でも、同様の傾向が認められた(Fig. 2)。また、2Gyと20Gy照射での肝臓と腎臓での照射後

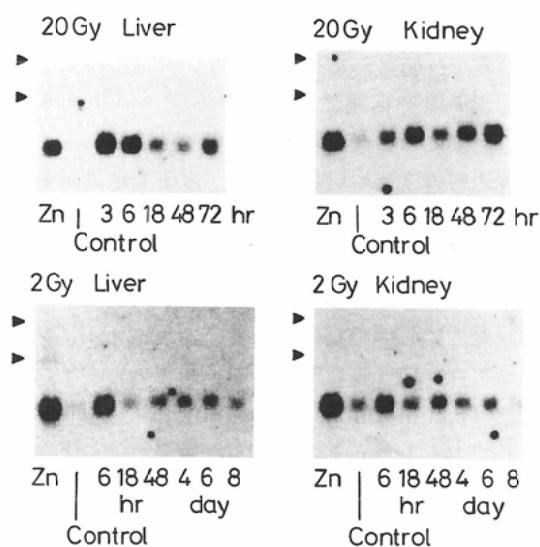


Fig. 2 Time dependence of induction of MT mRNA in the liver and kidney of irradiated rats. Whole body irradiation was administered at a dose of 20Gy and 2Gy.

のmRNAレベルを6時間で比較すると両群に大きな差は認められなかった(Fig. 2)。

### 考 察

メタロチオネインの誘導合成については金属とグルココルチコイドが重要な役割をすると考えら

れており、それぞれ遺伝子レベルでの解析が行われている、特に、マウス MT-I, ヒト MT-II<sub>A</sub>については解析が進んでいる<sup>13)</sup>。これらの構造遺伝子の5'上流領域には金属による発現誘導に必要な塩基配列(Metal Responsive Element, MRE)がグルココルチコイドによる発現誘導に必要な塩基配列(Glucocorticoid Responsive Element, GRE)などの存在が明らかにされている。金属、グルココルチコイド以外にメタロチオネイン遺伝子の転写活性化を起こす因子としてはエンドトキシン<sup>14)</sup>、インターロイキン1<sup>15)</sup>、インターフェロン<sup>16)17)</sup>紫外線<sup>18)</sup>、等も報告されているが不明の点が多い。X線照射によるメタロチオネインの誘導について遺伝子の転写活性化を起こす因子としては、副腎摘出ラットでの肝臓メタロチオネインの増加が正常ラットと差が認められないことやリンパ系組織である胸腺や脾臓の亜鉛量が照射後減少することから亜鉛ではないかという推定されているのみで、明らかにされていない<sup>6)7)10)</sup>。

X線全身照射後に認められるメタロチオネインの増加については肝臓や腎臓で認められることが既に報告されているが<sup>5)~10)</sup>、本研究結果から更に以下の4点を明らかにすることができた。①X線照射によるメタロチオネインmRNAの誘導は肝臓と腎臓以外にも脳と脾臓で僅かであるが認められた。この中で脳におけるメタロチオネインについては、Ebadiら<sup>19)</sup>によるメタロチオネイン様蛋白(metallothionein-like protein)の報告がなされておりそれらとの関連が注目される。②睾丸については照射後レベルの低下が認められた。睾丸のメタロチオネインについては高濃度に存在することが知られており、また、急速に分裂する細胞を有する組織でのメタロチオネインの生理的役割との関連からも注目されている<sup>20)21)</sup>。今回の結果は、細胞の分裂が照射により抑制されたことによる現象ではないかと推定され、メタロチオネインの機能を考える上で興味ある結果と考えられる。③肝臓と腎臓では低線量、高線量いずれの場合にも照射後の3時間あるいは6時間といった早期からmRNAレベルの上昇が認められた。また、6時間の比較では2Gy照射と20Gy照射にmRNA

レベルの増加に著明な差は認められなかった。照射後の肝臓や腎臓中のメタロチオネインレベルについてはセファデックスG-75カラム法による結果では、20Gy照射の場合、肝臓で6時間、腎臓で24時間以後、また線量との関係では、照射72時間後の比較では両臓器とも15Gyから増加が認められると報告されている<sup>7)</sup>。また、松原ら<sup>8)9)</sup>によるCd-hem法の結果では肝臓中のメタロチオネインレベルは照射後24時間では、6.3Gy照射では対照群の3倍に、30Gy照射では4倍に増加すると報告されている。これらの結果と今回の結果は必ずしも全て一致しておらず、今後さらに検討する必要があると思われる。④20Gy照射ではmRNAレベルの変化は二相性を示していた。以上のような結果からX線全身照射によるメタロチオネインの誘導はそのレベルに差はあるものの多くの組織で生じている可能性が、またその誘導についても照射の早期と晚期では誘導の機序が異なる可能性が示唆された。

メタロチオネイン遺伝子の転写活性化を起こす因子が何であるかについては亜鉛が第一に考えられるが、前述した因子の関与やX線そのものの関与についても更に検討する必要があると思われる。

本研究に用いたRNAプローブの作製は岡山大学医学部麻醉蘇生学教室、歯学部口腔生化学教室との共同研究により行われた。

#### 文 献

- 1) Karin M: Metallothioneins: Proteins in search of function. *Cell* 41: 9-10, 1985
- 2) 松原純子: メタロチオネインと生体防御機構, 科学, 56: 86-95, 1986
- 3) Dunn MA, Blalock TL, Cousins RJ: Metallothionein. *Pro Soc Exp Biol med* 185: 107-119, 1987
- 4) Bremner I: Nutritional and physiological significance of metallothionein. (In) Kägi JHR, Kojima Y. ed: Metallothionein II. 81-107, 1987, Birkhauser Verlag, Basel
- 5) Shiraishi N, Aono K, Utsumi K: Increased metallothionein content in rat liver induced by X-irradiation and exposure to high oxygen tension. *Radiat Res* 95: 298-302, 1983
- 6) Yamamoto H: Increase of hepatic metallothionein content induced by whole body irradia-

- tion. *Nippon Acta Radiologica* 46 : 66—71, 1986
- 7) Shiraishi N, Yamamoto H, Takeda Y, et al : Increased metallothionein content in rat liver and kidney following X-irradiation. *Toxicol Appl Pharmacol* 85 : 128—134, 1986
- 8) Matsubara J, Tajima Y, Karasawa M : Promotion of radioresistance by metallothionein induction prior to irradiation. *Environ Res* 43 : 66—74, 1987
- 9) Matsubara J, Tajima Y, Karasawa M : Metallothionein induction as a potent means of radiation protection in mice. *Radiat Res* 111 : 267—275, 1987
- 10) Togami I : A factor of increase of hepatic metallothionein content in normal and adrenalectomized rats induced by whole body irradiation. *Nippon Acta Radiologica* 47 : 69—73, 1987
- 11) Davis LG, Dibner MD, Battey JF : Formaldehyde gel for electrophoretic separation of RNA and Northern blot. (In) Davis LG, Dibner MD, Battey JF ed : *Methods in Molecular Biology*. 143—146, 1986, Elsvier, New York
- 12) Karin M, Richards RI : Human metallothionein genes : Molecular cloning and sequence analysis of the mRNA. *Nucl Acids Res* 10 : 3165—3173, 1982
- 13) Palmiter RD : Molecular biology of metallothionein gene expression. (In) Käji JHR, Kojima Y ed : *Metallothionein II*. 63—80, 1987, Birkhauser Verlag, Basel
- 14) Durnam DM, Hoffman JS, Quaif CJ, et al : Induction of mouse metallothionein-I mRNA by bacterial endotoxin is independent of metals and glucocorticoid hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 1053—1056, 1984
- 15) Karin M, Imbra RJ, Heguy A, et al : Interleukin 1 regulates human metallothionein gene expression. *Mol Cell Biol* 5 : 2866—2869, 1985
- 16) Friedman RL, Manly SP, McMahon M, et al : Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells. *Cell* 38 : 745—755, 1984
- 17) Friedman RL, Stark GR : Interferon-induced transcription of HLA and metallothionein genes containing homologous upstream sequences. *Nature* 314 : 637—639, 1985
- 18) Angeel P, Poting A, Mallick U, et al : Induction of metallothionein and other mRNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts. *Mol Cell Biol* 6 : 1760—1766, 1986
- 19) Ebadi M, Swanson S : Characterization metallothionein-like protein in rat brain. (In) Käji JHR, Kojima Y ed : *Metallothionein II*. 289—291, 1987.
- 20) Brady FO, Webb M : Metabolism of zinc and copper in the neonate. *J Biol Chem* 256 : 3931—3935, 1981
- 21) Brady FO : The physiological function of metallothionein. *Trends Biochem Sci* 7 : 143—145, 1982