

Title	Metallothioneinに関する研究
Author(s)	小野, 坂敏見
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/32289
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名・(本籍)	小野坂 敏 見
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 4458 号
学位授与の日付	昭和54年1月12日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	Metallothionein に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 近藤 雅臣
	(副査) 教授 上原喜八郎 教授 青沼 繁 教授 岩田平太郎

論 文 内 容 の 要 旨

カドミウムは人体に対して細尿管性の腎障害や肺気腫をひきおこし、あるいは発ガン性を有する有害な重金属であることは広く知られており、イタイイタイ病もこのカドミウムによるとされている。

このようなカドミウムの毒性発現には生体内の存在状態が関与していると推察されるが、生体内ではカドミウムの大部分はMetallothioneinの型で存在していることが明らかにされている。

Metallothioneinは1960年Kägeらによって単離され、SH基に富む低分子タンパク質のThioneinがカドミウムや水銀などの重金属と結合したものであり、その生合成はカドミウムなどによって誘導されるなどの特徴がある。

カドミウムはイオンの型では多くの酵素の阻害剤であるが、Metallothioneinと結合した型でほとんど阻害作用を示さず、またカドミウムイオンとMetallothioneinに結合したカドミウムでは体内における挙動が大きく異なることが明らかにされている。このことはカドミウムの毒性発現には濃度ばかりでなく、その存在形態が関与していることを強く示唆しており、従って生体内のカドミウム結合成分の面からの研究も必要であると考えられる。

このような観点から、まずMetallothioneinを含む肝臓上清中のカドミウム結合成分について検討した。次にカドミウムの主要な結合成分であるMetallothioneinの基礎的な諸性質について検討した。そして、明らかにした性質に基づいて、金属の耐性現象について検討を加え、また、Metallothioneinの簡易定量法の確立を試みた。

in vitroにおけるカドミウムとラット肝臓、腎臓および小腸粘膜上清成分との結合

生体内のMetallothionein以外のカドミウム結合成分についてはこれまでほとんど報告されてい

いので、まず臓器上清とカドミウムとの結合を試みた。正常ラット肝臓上清のみを SephadexG-75カラムでゲル濾過したがカドミウムは検出できなかった。この肝臓上清とカドミウムを反応させた後ゲル濾過した場合、大部分のカドミウムは高分子画分にあり、Metallothionein画分にはほとんど認められなかった。この結果とは対照的に、カドミウムを前投与した肝臓上清ではMetallothioneinの生合成が誘導されていたため、カドミウム無添加時でもMetallothionein画分にカドミウムが溶出された。そして、カドミウムを添加するとその増加にともなってMetallothionein画分のカドミウム量は約2倍に増加し、高分子画分のカドミウム量はこのころから急増した。腎臓上清はMetallothionein画分のカドミウム量がかなり少ないものの肝臓上清とほぼ同じ傾向を示した。小腸粘膜上清では、カドミウムを経口投与した場合にMetallothionein画分にかドミウムの結合能の増加を認めた。

これらの結果は、正常なラットの臓器上清のMetallothionein量は非常に少なく、故にカドミウムは高分子画分と結合し、一方カドミウムを前投与した場合はMetallothioneinの生合成が誘導され、このときMetallothionein画分は優先的にカドミウムと結合し、高分子画分はMetallothioneinよりも結合能が弱いのでMetallothionein画分に結合しえなかったカドミウムが高分子画分に結合することを示唆している。

家兎肝臓上清成分、とくにMetallothionein画分と金属との結合性について

カドミウムのMetallothionein画分に対する選択的な結合性の原因を明らかにすることを含め、Metallothioneinの基礎的な諸性質を検討した。家兎にカドミウムを前投与してMetallothioneinを含む肝臓上清を調製し、種々の処理を行った後、SephadexG-75カラムでゲル濾過してMetallothionein画分の結合金属を測定した。

この肝臓上清のMetallothionein画分にはカドミウムと亜鉛が結合しており、その結合は熱処理に対して比較的安定であった。キレート剤や酸化剤はMetallothionein画分のカドミウムや亜鉛を脱離させたが、8種の化合物はほとんど影響しなかった。次に肝臓上清と20種類の金属との結合を試みたところ、銅、銀、水銀がMetallothionein画分のカドミウムや亜鉛と置換した。Thioneinは金属の種類によって結合能に差があると考えられるのでMetallothionein画分に対する4種の金属の結合性を比較して、従来の結果とは異なり、銅>カドミウム>水銀>亜鉛である結果を得た。

カドミウムとMetallothioneinに結合している亜鉛との置換について

金属の前投与によって金属による致死率に低下がみられるが、この機序としてMetallothioneinに結合している金属との置換に基づくことが考えられる。そこでMetallothioneinを含む家兎肝臓にカドミウムを添加して反応させ、そのMetallothionein画分の亜鉛量とカドミウム量について検討した。

このとき、添加カドミウムはMetallothionein画分と結合し、その増加モル数はMetallothionein画分の減少したモル数とほぼ一致した。またラット肝臓上清についてもほぼ同様の結果を得た。

これらの結果は先に明らかにした臓器中のMetallothionein画分には結合しているカドミウム以上のカドミウム結合能があるのはMetallothionein画分の亜鉛とカドミウムが置換することに基づくことを、そして金属の耐性現象にはMetallothioneinに結合している金属の種類が関与していることを示唆する。

動物臓器中のMetallothioneinの簡易定量法

Metallothioneinは金属との結合モル比が一定であること、カドミウムを添加することによって容易に結合金属をカドミウムと置換しうること、およびそのものは熱に対して比較的安定であることを明らかにしたので、これらの性質を応用してMetallothioneinの簡易定量法について検討した。

Metallothioneinに結合していない遊離のカドミウムを除去するためにカドミウムにヘモリゼートを加えて加熱したところ、遊離のカドミウムの大部分を沈でんとして除くことができた。そこでMetallothioneinを含む家兎肝臓上清にカドミウムを添加し、この反応液にヘモリゼートを加えて加熱後、その上澄液をゲル濾過すると大部分のカドミウムはMetallothionein画分に溶出されており、その量はMetallothionein中の亜鉛がすべてカドミウムと置換したとして算出した値とほぼ一致した。次に定量範囲について検討したところ、カドミウムとして $0.2\sim 4.0\mu\text{g/ml}$ の広い範囲にわたって良好な直線性を示した。また肝臓、腎臓など10種の臓器について添加回収実験を行い、これらの臓器上清によってほとんど妨害されないことを確かめた。そこで、カドミウムを前投与したラット肝臓および腎臓について従来から行われているゲル濾過後のMetallothionein画分の結合金属量から算出する方法によって得た値と本法によって得た値を比較した結果、両者はほぼ一致し、その相関係数は肝臓では0.98、腎臓では0.95であった。

本法は簡便であり、再現性や回収率も良好であるので、重金属を投与した動物の肝臓や腎臓などのMetallothioneinを定量するのに適した方法であると考えられる。

結 論

- 1) カドミウムは臓器上清においては高分子画分よりもMetallothionein画分と選択的に結合することを明らかにし、Metallothioneinに結合している亜鉛がカドミウムと置換することによって、カドミウムの毒性が防禦されることを示した。
- 2) Thioneinとカドミウムとの結合は熱に対して比較的安定である。Thioneinは金属と一定のモル比で結合するがその結合能には差があり、銅>カドミウム>水銀>亜鉛の順序である。
- 3) 金属を投与した動物臓器中のMetallothioneinの定量法について検討し、カドミウムと反応させたのちヘモリゼートと処理することによって容易に測定できるMetallothioneinの簡易定量法を確立した。

論文の審査結果の要旨

生体内におけるカドミウムとThioneinの結合に関し基礎的検討を行ない、生体内に摂取されたカドミウムは臓器上清においては高分子画分よりもThioneinと選択的に結合することを明らかにし、Thioneinに結合している亜鉛がカドミウムと置換することによってカドミウムの毒性が防禦されることを明らかにした。また、Thioneinと金属との結合能に差があり、銅、カドミウム、水銀、亜鉛の順となることを明らかにした。一方、金属投与時の臓器中Metallothioneinの定量法を確立し、これに

より生体内のMetallothioneinの定量が可能となった。以上の研究は重金属摂取時の生体内防禦作用のひとつとしてのMetallothioneinの存在意義に関し、重要な知見を加えたものとして博士号を授与するに値するものと判定した。