

Title	Metallothioneinと金属元素の結合に関する研究
Author(s)	志野木, 正樹
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33518
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	志野木正樹
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 5775 号
学位授与の日付	昭和 57 年 7 月 29 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 と金属元素の結合に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 近藤 雅臣 (副査) 教授 岩田平太郎 教授 青沼 繁 教授 三浦 喜温

論文内容の要旨

緒論

Metallothionein(MT)は、1957年¹⁾にウマの腎皮質から発見されて以来、数多くの研究がなされ、すでにいろいろな観点から総説²⁾も書かれている。MTは種々の動植物中より発見されているが、一般に生体中に存在する量は極めて少なく、ある種の金属(Cd, Zn, Cu, Hgなど)によって生体内で誘導生成される特異な蛋白質である。またMTの組成アミノ酸にはシステインが多く含有されており、上記金属が多量に結合しているなど、生体における金属元素の研究という立場から興味ある生体成分の1つである。

MTは、すでにそのアミノ酸構成など物理化学的な性質についてはほぼ解明されているが、その生物学的な役割についてはまだ不明な点が多い。従来、MTは主としてCdとの関連(Cdに対する毒性防御)³⁾について研究されてきたが、MT中にはCd以外に必須金属であるZn, Cuが共存金属として存在することから、これら必須金属の代謝とか生体内バランスの維持とMTとの関連⁴⁾が注目されている。最近では、その本来の生物学的な役割として、必須金属であるZnやCuの代謝を制御している^{2-e)}とさえいわれている。いずれにしても、MTは金属との係りにおいて生物学的な役割を演じていることは確かである。よって、MTと金属元素の結合について検討することにより、MTの生物学的な解明を試みた。また、MTを誘導生成するCd, Hg, ZnのMT生成能力を検討するため、MTを生成させる金属量について、その閾値を算出した。

なお、MT中の金属分析のための方法として、感度、定量性、再現性の良さに加え、非破壊分析および多元素を同時に分析することができる、原子炉による熱中性子放射化分析法を使用した。

本 論

第一章 中性子放射化分析法による微量元素の分析

本研究において使用した生体試料（ラット各臓器および肝臓MT）中の金属分析法および各試料中の微量元素分析結果について述べる。

第一節 原子炉による熱中性子放射化分析法の検討

第一項 機器的非破壊法

高分解能を有するGe(Li)半導体検出器の出現により、中性子照射後いかなる化学分離も行うことなく微量元素の定量が可能となった。本研究においても主としてこの方法を使用した。

試料を数mg～数10mg精秤し、清浄なポリエチレン製袋に2重に封入して、標準試料と共に、京大原子炉の圧気輸送管No.1（熱中性子束 $1.9 \times 10^{13} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ ）において60分間照射した。照射終了後、4096チャンネル波高分析器を装備したGe(Li)検出器(FWHM=2.0keV)を用いて、3～5時間後に300秒測定し、 ^{56}Mn 、 ^{64}Cu を、2～3日後に1000秒測定し ^{24}Na 、 ^{42}K 、 ^{76}As 、 ^{82}Br 、 ^{115}Cd を定量した。さらに20～30日冷却後に10000秒測定し、 ^{46}Sc 、 ^{51}Cr 、 ^{59}Fe 、 ^{60}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{75}Se 、 ^{86}Rb を定量した。

第二項 APDC抽出法を用いる化学分離法

生体試料中には多量のNa, P, Brが存在するため、非破壊法ではこれらの元素によって妨害され検出されない元素がある。これらの3元素を除去する目的で中性子照射後の試料についてAPDC抽出法を使用し、ラット肝臓中の微量元素の分析を行い、非破壊法では検出できなかったCd, Cu, Moを定量した。

第三項 標準試料としてのSRMの使用

放射化分析法では、多元素を同時に定量するため、微量レベルの標準試料を多数調製する必要がある。そのための労力や誤差を除くためMorrisonら⁵⁾はSRM(standard reference material)の使用を推奨している。本研究においては、生体試料を対象としているので、NBSのbovine liverおよびorchard leavesを標準試料として使用することを検討した。その結果、SRMを標準試料として用いることは可能であり、特に揮発性元素（ハロゲン元素, Hg)に対して有効であることがわかった。

第二節 ラット各臓器中の微量元素の分布

本論文においては、ラットを対象動物として使用した。まず、正常なラットの各臓器における微量元素の分布を検討した。その結果をTable Iに示す。

各臓器によって元素含有濃度は異なるが、辜丸に多くの元素が高濃度に存在した。しかし、臓器全体の総含有量を比較すると、最も大きな臓器である肝臓にすべての元素が最も多く存在した。

第三節 ラット肝臓中の微量元素

第一項 正常およびカドミウム投与ラット肝臓中の微量元素

ラット肝臓中の、非破壊法では検出されないTable I以外の元素を定量するため、中性子放射化後APDC抽出法を用いる化学分離を行い、Cd, Cu, Moを定量した。Table IIにその結果を非破壊法と比較して示した。

Table I Elemental Concentrations in Rat Organs in ppm (Dried Tissue)

Element	Brain (311)	Heart (164)	Lung (202)	Thymus (107)	Liver (2970)	Spleen (114)	Kidney (429)	Adrenals (9.7)	Testes (341)	Muscle (-)	Blood (-)
As	ND	ND	1.39 ± 0.21	ND	1.58 ± 0.36	3.1 ± 0.3	ND	ND	ND	ND	19.4 ± 2.8
Bz	32 ± 3	44 ± 6	100 ± 6	5.6 ± 1.7	41 ± 4	72 ± 3	67 ± 4	35 ± 1	162 ± 22	25 ± 2	165 ± 16
Co	0.042 ± 0.018	0.172 ± 0.028	0.081 ± 0.020	ND	0.36 ± 0.12	0.109 ± 0.033	0.84 ± 0.12	0.54 ± 0.39	0.037 ± 0.007	0.036 ± 0.026	0.032 ± 0.024
Cr	ND	ND	ND	ND	ND	0.42 ± 0.18	ND	ND	ND	0.27 ± 0.10	ND
Cs	0.0159 ± 0.0051	0.037 ± 0.005	0.028 ± 0.010	0.051 ± 0.031	0.036 ± 0.018	0.046 ± 0.007	0.056 ± 0.014	0.089 ± 0.020	0.088 ± 0.020	0.077 ± 0.013	ND
Fe	63 ± 9	240 ± 30	310 ± 30	65 ± 30	260 ± 40	770 ± 20	192 ± 23	240 ± 60	116 ± 9	58 ± 4	2100 ± 100
K*	1.43 ± 0.09	1.09 ± 0.20	1.10 ± 0.18	2.1 ± 0.2	1.08 ± 0.03	1.86 ± 0.14	0.93 ± 0.09	1.11 ± 0.33	2.3 ± 0.4	1.52 ± 0.10	0.86 ± 0.23
Mn	ND	0.117 ± 0.025	ND	1.04 ± 0.20	6.3 ± 1.5	0.097 ± 0.033	2.32 ± 0.03	13.3 ± 3.9	ND	0.37 ± 0.15	ND
Na	4500 ± 200	3500 ± 200	4300 ± 300	2700 ± 400	1780 ± 170	2300 ± 308	4100 ± 200	2000 ± 100	7400 ± 500	1640 ± 40	8800 ± 500
Rb	17.0 ± 3.3	27 ± 1	30 ± 1	44 ± 3	31 ± 13	43 ± 1	32 ± 3	21 ± 7	67 ± 9	33 ± 2	15.0 ± 2.4
Se	ND	0.00128 ± 0.00064	ND	ND	ND	ND	0.00140 ± 0.00094	0.0096 ± 0.0035	ND	0.0057 ± 0.0039	ND
Sq	0.63 ± 0.27	1.73 ± 0.32	1.65 ± 0.08	1.35 ± 0.21	2.8 ± 0.6	2.2 ± 0.9	4.4 ± 0.3	3.58 ± 0.04	5.5 ± 0.1	0.66 ± 0.13	2.3 ± 0.1
Zn	64 ± 13	72 ± 2	97 ± 9	88 ± 15	88 ± 15	96 ± 12	83 ± 4	61 ± 10	157 ± 3	49 ± 3	22 ± 3

*: %, ND: not detected, (): mean tissue weights of three rats (mg).

Table II Analysis of normal and Cd injected rat livers

Element	Nuclide of determination	Half life	F ⁷⁵⁷ energy (keV)	Normal (ppm)		Cd injection (ppm)	Cd inj. Normal
				This study	Nondestructive		
Cd	^{115m} In(¹¹⁵ Cd)	4.48 h (53.4 h)	335	0.048 ± 0.012	ND	85 ± 11	1170 ± 500
Co	⁶⁰ Co	5.26 y	1173	0.125 ± 0.011	0.36 ± 0.12	0.194 ± 0.025	1.55 ± 0.24
Cu	⁶⁴ Cu	12.8 h	1346	12.3 ± 0.2	ND	17.8 ± 0.7	1.45 ± 0.06
Fe	⁵⁷ Fe	45.6 d	1099	230 ± 20	260 ± 40	320 ± 50	1.39 ± 0.25
Mn	⁵⁴ Mn	2.58 h	847	6.7 ± 0.2	6.3 ± 1.5	6.88 ± 0.04	1.03 ± 0.03
Mo	^{99m} Tc(⁹⁹ Mo)	6.05 h (66.0 h)	140	1.47 ± 0.13	ND	1.60 ± 0.08	1.09 ± 0.11
Se	⁷⁵ Se	120.4 d	265	2.0 ± 0.5	2.6 ± 0.6	4.1 ± 1.7	2.1 ± 1.0
Zn	⁶⁵ Zn	245 d	1116	85 ± 5	88 ± 15	191 ± 8	2.3 ± 0.2

ND: Not detected.

Cdを投与することによってCd以外に肝臓中のZnとCuの濃度が増加した。このことは、Cdによって肝臓中にMTが生成したことを示唆している。

第二項 正常ラット肝臓細胞分画中の元素分布

各臓器中、最も高含量に各元素を含有する肝臓について、Duveら⁶⁾の方法により5つの細胞分画に分け、各分画中の元素含量を求めた。Table IIIに結果を示す。

Table III Elemental Concentrations in Cell Fractions of Rat Liver in ppm

Element	Nuclear Fr.	Mitochondrial Fr.	Lysosomal Fr.	Micromosomal Fr.	Cytosol Fr.
As	1.26 ± 0.38 (0.43)	0.16 ± 0.06 (0.064)	0.21 ± 0.12 (0.0169)	0.46 ± 0.28 (0.26)	0.129 (1.81)
Bz	0.62 ± 0.09 (0.21)	0.79 ± 0.47 (0.113)	0.47 ± 0.25 (0.037)	1.47 ± 0.32 (0.79)	3.9 ± 1.2 (55)
Co	0.131 ± 0.019 (0.045)	0.40 ± 0.03 (0.057)	0.189 ± 0.046 (0.0150)	0.058 ± 0.022 (0.037)	0.029 (0.41)
Cr	ND	0.32 (0.45)	0.50 ± 0.32 (0.039)	ND	ND
Fe	128 ± 44 (44)	83 ± 16 (13.3)	140 ± 20 (11.1)	100 ± 12 (54)	22 ± 9 (310)
K	1430 ± 510 (490)	2100 ± 400 (290)	530 ± 160 (42)	1350 ± 100 (730)	1710 ± 160 (2400)
Mn	9.8 ± 3.2 (3.3)	28 ± 2 (3.7)	2.6 ± 1.6 (0.30)	3.2 ± 0.9 (1.74)	0.20 ± 0.05 (2.8)
Na	77 ± 23 (26)	42 ± 20 (6.0)	88 ± 19 (7.0)	210 ± 30 (111)	280 ± 60 (3900)
Nb	3.6 ± 1.6 (1.22)	10.7 ± 2.8 (1.48)	4.1 (0.32)	6.1 ± 2.8 (3.3)	10.0 ± 2.9 (139)
Se	1.23 ± 0.07 (0.43)	1.95 ± 0.89 (0.28)	0.32 ± 0.12 (0.026)	1.33 ± 0.38 (0.72)	0.23 ± 0.04 (3.2)
Zn	41 ± 12 (14.0)	17.7 ± 7.7 (2.5)	17.6 ± 12.9 (1.40)	41 ± 9 (22)	12.3 ± 2.4 (172)

ND: not detected, (): total element (μg).

この分画法によると、Mn以外の元素はすべて可溶性画分に最も多く分布していることがわかった。

第四節 正常およびカドミウム投与ラット肝臓可溶性蛋白質中の微量元素

第一項 ラット肝臓可溶性蛋白質の分離およびその分子量

生体中の微量元素は、その大部分が蛋白質などの生体成分と結合して存在していると考えられるので、ラット肝臓可溶性画分中の金属元素の蛋白質との結合について検討するため、ゲルろ過法による分画を行った。また、各画分中の蛋白質の分子量を電気泳動法により求めた。

正常および0.1mgのCdを隔日に6回皮下投与したラットの肝臓を摘出し、その3倍量の0.25Mショ糖溶液でホモジナイズした後、4℃、105,000gで60分間超遠心分離し、上清(可溶性画分)を分取した。その可溶性画分をSephadex G-75カラム(3×90cm)を用いて0.01M Tris-HCl緩衝液(pH8.0)で溶出し、ゲルろ過を行った。Fig. 1に示す4画分を分取し、各画分を限外ろ過(ミリポアPSACフィルター使用)により脱塩後、凍結乾燥し可溶性蛋白質とした。

¹¹⁵Cdを投与した肝臓可溶性画分のゲルろ過クロマトグラフィーの結果、第IV画分にはのみピークが認められたことから、この画分をMT画分とした。

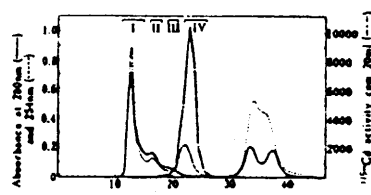


Fig. 1 Gel-Filtration Chromatography of Cd-injected Rat Liver Cytosol on Sephadex G-75, Column (90 × 3.0 cm)

Table IV Molecular Weight of Rat Liver Cytosol Proteins determined by SDS Polyacrylamide Disk-gel Electrophoresis

I	II	III	IV
>10 ⁶	3.91 ± 0.04 × 10 ⁶	2.55 ± 0.07 × 10 ⁶	1.51 ± 0.03 × 10 ⁶ (**)
8.55 ± 0.07 × 10 ⁶	3.58 ± 0.18(**)	2.41 ± 0.02(**)	1.18 ± 0.13(*)
7.31 ± 0.20	3.47 ± 0.05	1.82 ± 0.02	0.776 ± 0.073
6.40 ± 0.15	3.21 ± 0.06	1.65 ± 0.05	
5.69 ± 0.11(*)	3.02 ± 0.04(*)		
4.63 ± 0.25(**)	2.87 ± 0.08		
4.25 ± 0.00	2.72 ± 0.04		
4.06 ± 0.04			

The Roman numerals indicate the protein fractions of gel-filtration chromatography of rat liver cytosol on Sephadex G-75 column.
 (*) mark indicates the concentration of electrophoretic image.
 (**) is the most pronounced band.

各画分中の蛋白質の分子量を測定するために、SDSポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動⁷⁾を行った。Table IVにその結果を示す。第一画分は約4~8.5万、第II画分は2.7~3.9万、第III画分は1.6~2.5万、第IV画分は1.5万が最も濃いバンドを示した。

第二項 可溶性蛋白質のゲルろ過における各画分中の微量元素濃度

正常ラットおよびCd投与ラット肝臓可溶性蛋白質について放射化分析を行った結果をTable Vに示す。

検出された7元素のうち、Fe、Mn、Seは高分子量蛋白質に、Cd、Cu、Znの3元素は低分子量蛋白質に多く結合していた。Cd投与により、第IV画分の金属結合が影響を受け、特にZnは第III画分が減少し、第IV画分は正常時の結合量の約19倍に増加した。

Table V Elemental Concentrations in Cytosol Protein Fractions of Normal and Cd Injected Rat Liver ($\mu\text{g/g}$)

Element	Normal				Cadmium injection			
	N-I	N-II	N-III	N-IV	Cd-I	Cd-II	Cd-III	Cd-IV
Cd	2.6 ± 0.5	ND	7.8 ± 1.8	10.2 ± 4.5	7.7 ± 3.0	4.1 ± 1.5	11.5 ± 6.4	12900 ± 1200
Co	0.140 ± 0.046	0.151 ± 0.015	0.47 ± 0.09	0.20 ± 0.03	0.27 ± 0.17	ND	0.66 ± 0.42	0.40 ± 0.08
Cu	23 ± 3	78 ± 24	148 ± 38	230 ± 100	13.6 ± 2.5	86 ± 37	137 ± 47	210 ± 40
Fe	310 ± 70	290 ± 110	ND	ND	350 ± 90	350 ± 90	ND	ND
Mn	8.0 ± 1.4	2.8 ± 0.5	2.3 ± 0.6	1.22 ± 0.29	8.5 ± 0.3	3.2 ± 0.9	1.63 ± 0.72	1.21 ± 0.47
Se	7.4 ± 0.9	1.95 ± 1.21	1.97 ± 0.67	3.8 ± 1.4	7.7 ± 0.7	1.15 ± 0.27	2.5 ± 1.4	ND
Zn	199 ± 2	190 ± 20	1060 ± 10	490 ± 180	170 ± 15	230 ± 10	540 ± 770	9200 ± 500

ND: Not detected.

第五節 種々の金属を投与したラット肝臓Metallothionein画分中の結合金属元素

Cd投与により金属結合に最も大きな影響を受けるMT画分について、Cd以外の金属を投与した時の金属結合を検討するため、必須金属であるZn, Cu, Coおよび有害元素であるHg, Seの各0.1mgを単独に、また2元素同時に、隔日に6回皮下投与し、肝臓のMT画分を分取し、その金属含有量を求めた。その結果をTable VI, VIIに示す。

Table VI Elemental concentrations in the metallothionein fraction from liver of rats injected each element ($\mu\text{g/g}$)

Detected element	Injected elements						Non-treatment
	Cd	Co	Cu	Hg	Se	Zn	
Cd	12900 ± 1200	ND*	72 ± 7	10.3	2.8	20 ± 7	10.2 ± 4.5
Co	0.40 ± 0.08	1.48	0.21 ± 0.07	0.52 ± 0.09	ND*	0.44 ± 0.10	0.20 ± 0.03
Cu	210 ± 40	250 ± 180	250 ± 40	185 ± 134	92 ± 41	435 ± 7	220 ± 100
Mn	1.21 ± 0.47	5.8 ± 2.9	1.55 ± 0.24	3.5 ± 0.9	3.5 ± 2.8	1.97 ± 0.69	1.22 ± 0.29
Se	ND*	2.4	2.4 ± 0.9	3.3 ± 1.2	5.8 ± 1.5	3.2 ± 1.4	3.8 ± 1.6
Zn	9300 ± 500	414 ± 8	395 ± 7	330 ± 110	520 ± 240	580 ± 20	490 ± 160

* ND: Not detected

Table VII Elemental concentrations in the metallothionein fraction from liver of rats treated simultaneously with 2 or 6 kinds of elements ($\mu\text{g/g}$)

Detected element	Injected elements						All*
	Cd-Co	Cd-Cu	Cd-Se	Cd-Zn	Zn-Co	Hg-Se	
Cd	12800 ± 1200	13400	5900 ± 900	11500 ± 400	2111	26 ± 10	5800 ± 800
Co	1.61 ± 0.43	3.1 ± 0.9	0.70 ± 0.35	0.52 ± 0.28	1.44 ± 0.89	0.24 ± 0.11	1.43 ± 0.66
Cu	560 ± 170	250	360 ± 60	280	273 ± 3	74 ± 5	360 ± 80
Mn	2.9 ± 0.8	3.4 ± 2.8	3.8 ± 0.3	1.95 ± 0.54	4.3 ± 2.5	2.5 ± 1.1	1.88 ± 0.70
Se	ND**	ND**	19.4 ± 10.1	4.2 ± 1.2	5.0 ± 1.7	5.8 ± 0.1	7.0 ± 0.5
Zn	7800 ± 440	7900	4700 ± 2100	7400 ± 600	640 ± 190	770 ± 280	5100 ± 600

* All: Contain same amounts of Cd, Co, Cu, Hg, Se and Zn ** ND: Not detected

これらの結果から、もしもMTが存在しているならば進入したCoとSeはそのMTに結合されること、さらに、Seの存在は、MTへのCdおよびCuの結合を減少させ、また、Cd-MTの生成をも減少させることがわかった。

第二章 亜鉛の体内分布におよぼすカドミウムの影響

Cd投与によって大きな影響を受けるZnの挙動について、 ^{65}Zn トレーサーを使用して検討した。

第一節 亜鉛の投与量によるゲルろ過プロフィールの変化

少量(0.2mg)のZnを投与した場合、投与したZnは高分子量蛋白質に結合しMT画分にはほとんど

結合されないが、1 mg Znを投与すればMT画分に最大の結合が認められた。

第二節 亜鉛のゲルろ過プロフィールにおよぼすカドミウムの影響

Fig. 2 に示すように、0.2 mgのZnのみを投与した場合はMT画分にほとんどピークが認められないが、Cdを投与することによってMT画分にピークが出現し、第Ⅲ画分のピークが減少した。一方、先にCdを投与しMTを生成させてからZnを投与した場合、あとからCdを投与した時よりもMT画分中のZn量は多くなり、第Ⅰ、第Ⅲ画分は減少した。このことから、生体内にMTが存在しておれば、生体内に進入したZnは、そのMTに結合されやすいことがわかった。このZnのゲルろ過プロフィールの変化から、高分子量蛋白質に結合していたZnがCdによって生成されたMTに移行したと考えられるが、第Ⅰ、第Ⅲ画分の減少よりもMT画分の増加の方が大きいと、他の臓器からのZnの移動が考えられた。

第三節 亜鉛の体内分布におよぼすカドミウムの影響

^{65}Zn トレーサーを投与し各臓器中に ^{65}Zn を分布させておき、24時間後にCd(0.1mg)を投与して、1, 3, 5, 24時間後の ^{65}Zn の体内分布(胸腺, 肺, 心, 肝, 腎, 副腎, 脾, 膵, 睾丸および血液)を測定した。胸腺, 肺, 心, 副腎, 脾, 膵の各臓器についてはCdによる影響は認められなかった。また、Znのみを投与したとき、投与後24時間と48時間において肝, 腎, 睾丸, 血液に存在する ^{65}Zn 量(投与量に対する割合)はほとんど差異が認められなかった。したがって、これら4臓器における ^{65}Zn の分布割合の変化は、生体内におけるZnの移動によるものと考えられる。Fig. 3はCd投与後の肝, 腎, 睾丸, 血液における ^{65}Zn 分布の経時変化を示している。

ある一定の割合で体内に分布したZnは、Cdを投与することによって、血中濃度が上昇し、逆に腎臓における割合が低下した。また、血中に現われたZnは肝臓に取込まれ、しだいに血中濃度は低下した。Cd投与後5時間でその影響はなくなり、血中濃度は24時間後には通常の濃度に回復した。一方、睾丸については、Cd投与後5時間までは影響ないが、24時間になるとZn濃度は低下した。

以上のことから、Cdを投与しない場合は肝臓に取込まれたZnの1.7%のみがMTに結合したにすぎないが、Cdを投与した場合は、18.6%にも増加した。この増加したZnは、肝臓可溶性画分の高分子量蛋白質からの寄与の他に、腎臓中のZnも関与していることが判明した。

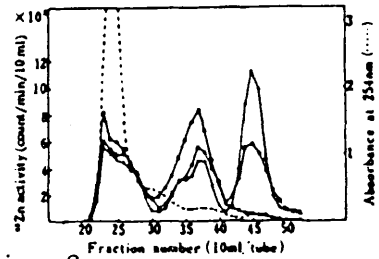


Fig. 2 Effect of Cadmium Treatment (0.1 mg Cd, subcutaneously) on ^{65}Zn Distribution in Rat Liver Cytosol Fractions after Intravenous Injection of 0.1 ml $^{65}\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ Solution (100 $\mu\text{Ci}/2\text{mg/ml}$)

○—○ ^{65}Zn 48 hr — Removal of liver
●—● ^{65}Zn 24 hr Cd 24 hr — Removal of liver
△—△ Cd 24 hr ^{65}Zn 24 hr — Removal of liver

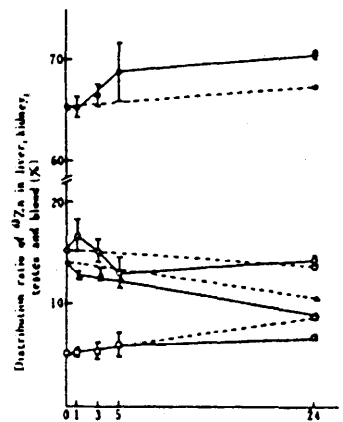


Fig. 3 Hours after cadmium injection Effect of Cadmium Treatment (0.1 mg Cd, subcutaneously) on ^{65}Zn Distribution in Each Organ (Liver, Kidney, Testes and Blood)

●—● Liver, ○—○ Blood,
△—△ Kidney, □—□ Testes.

第三章 ラット肝臓中のMetallothionein生成における誘導金属量

MTはある種の金属によって生体内で誘導生成される蛋白質であることはよく知られている。MT生成にある種の金属が必要であるという事実は、MTの誘導において誘導金属の量にある種の閾値が存在することを示唆している。そこで、MTを誘導するCd, Hg, Zn, および誘導しないSeの4元素をそれぞれの元素のRIと共に種々の量をラットに投与し、肝臓中の可溶性蛋白質に結合している金属量をradiotracer法で求め、その結果から、Cd, Hg, ZnによるMT生成における閾値を算出した。

第一節 肝臓、可溶性画分およびMetallothionein画分への投与金属の分布

Table VIII The Distribution of Metals in Liver, and Its Cytosol and MT-fraction of Rats Intravenously Injected Various Amounts of Each Metal

Metal	Dose / rat	% of dose			Cytosol Liver	MT-Fr. Cytosol	MT-Fr. Liver
		Liver	Cytosol	MT-Fr.			
Hg	0.0063 mg	6.19 %	1.68 %	0.503 %	27.2 %	29.9 %	8.13 %
	0.010	4.97	1.49	0.330	30.0	22.1	6.63
	0.050	4.60	1.59	0.516	34.5	32.5	11.2
	0.072	5.38	2.01	0.207	37.4	40.2	15.0
	0.10	8.84	3.98	3.11	45.0	78.1	35.1
	0.30	20.9	10.9	7.77	52.1	71.3	37.1
	0.50	14.9	8.44	6.90	56.7	81.8	46.4
0.70	13.8	8.27	6.70	60.0	81.0	48.6	
Cd	0.0148 mg	59.9 %	44.5 %	38.1 %	74.4 %	85.6 %	63.7 %
	0.133	61.1	42.5	38.1	69.5	80.4	55.9
	0.0133 μg	62.3	42.4	34.3	68.0	80.9	55.0
	0.10	65.5	47.2	48.2	72.1	102	73.5
	0.017 mg	63.3	46.5	41.9	73.5	90.0	66.2
	0.10	52.7	39.3	37.2	74.6	94.7	70.6
	0.70	34.1	26.4	23.9	77.3	90.4	69.9
Zn	0.03 mg	9.33 %	4.91 %	0.132 %	52.6 %	2.69 %	1.43 %
	0.10	7.41	4.64	0.144	62.6	3.10	1.94
	0.20	8.48	4.80	0.288	56.6	6.00	3.40
	0.30	5.97	3.34	0.380	56.0	11.4	6.38
	0.70	5.64	3.14	0.500	55.6	15.9	8.84
	1.00	7.18	3.69	1.24	50.8	32.6	17.1
	1.50	6.27	4.03	1.80	64.4	44.6	28.7
Se	0.02 mg	7.18 %	2.97 %	0.103 %	41.3 %	3.46 %	1.43 %
	0.05	6.46	2.68	0.143	40.3	5.31	2.14
	0.10	5.18	1.95	0.110	37.6	5.66	2.13
	0.30	3.04	1.18	0.086	38.8	7.30	2.83
	0.70	2.42	0.78	0.052	32.3	6.65	2.15

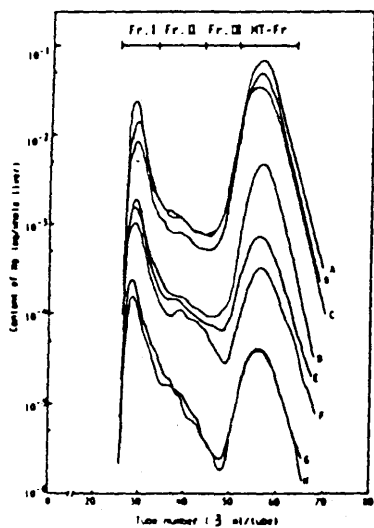
Table VIIIは各金属を種々の量投与した時の肝臓およびその可溶性画分ならびにMT画分中の金属量の投与量に対する割合(%)と、各画分中の金属含有量の割合を示す。

肝臓に取込まれたHgは、可溶性画分に、さらにそのMT画分に蓄積した。肝臓に取込まれたCdの約70%は可溶性画分に分布し、そのほとんどのCd(80%以上)はMT画分に分布した。投与量の6~9%のZnが肝臓に取込まれ、その50~64%が可溶性画分に分布した。肝臓に取込まれたSeの約2%がMT画分に分布した。

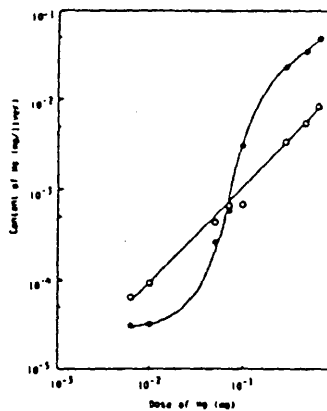
第二節 可溶性蛋白質のゲルろ過における各画分中の金属含有量と投与金属量の関係

Fig. 4~7のa)には、Hg, Cd, Zn, Seの種々の量を投与したときのゲルろ過プロフィールを各金属含有量で示し、b)には、各画分中の金属含有量と投与量の関係を示した。

Znは全画分に結合したが、Seは第I, 第III画分とMT画分に、HgおよびCdは第I画分とMT画分に結合した。Cd以外は、投与量が少ない時はMT画分よりも他の高分子量蛋白質画分への結合量が多い。Cdは投与量にかかわらずMT画分への結合量が多く、MTに対する結合の強さを表わしている。またHg, Znは投与量が増加すると共にMT画分への結合量が増加したが、Seは常にその結合量は最も少なかった。

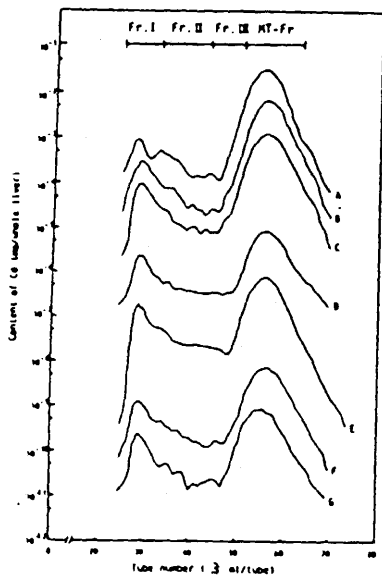


a) Elution profiles of Hg in rat liver cytosol by Sephadex G-75 gel filtration
 Dose of Hg A: 0.70 mg B: 0.50 mg C: 0.30 mg
 D: 0.10 mg E: 72 μ g F: 50 μ g
 G: 10 μ g H: 6.3 μ g.

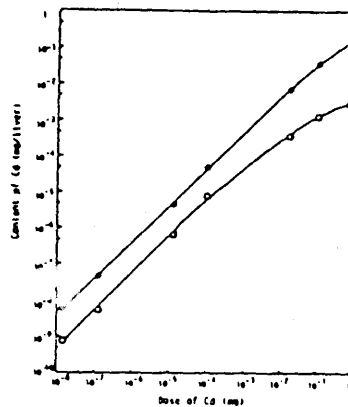


b) Content of Hg in fraction I (—○—) and metallothionein fraction (—●—) on gel filtration of rat liver cytosol.

Fig. 4

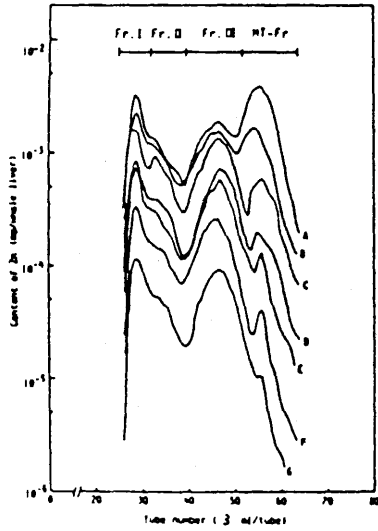


a) Elution profiles of Cd in rat liver cytosol by Sephadex G-75 gel filtration
 Dose of Cd A: 0.70 mg B: 0.10 mg C: 0.017 mg
 D: 0.10 μ g E: 13.3 ng F: 0.133 ng
 G: 14.8 μ g.

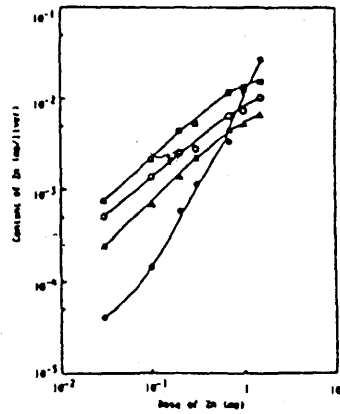


b) Content of Cd in fraction I (—○—) and metallothionein fraction (—●—) on gel filtration of rat liver cytosol.

Fig. 5

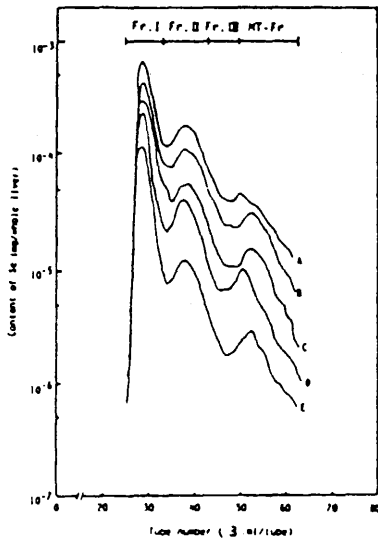


a) Elution profiles of Zn in rat liver cytosol by Sephadex G-75 gel filtration
 Dose of Zn A: 1.50 mg B: 1.00 mg C: 0.70 mg
 D: 0.30 mg E: 0.20 mg F: 0.10 mg
 G: 0.03 mg.

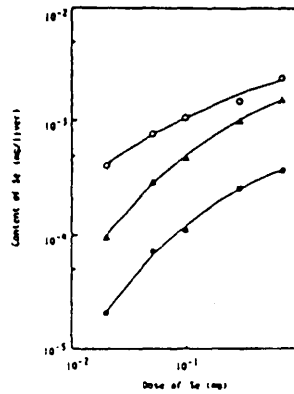


b) Contents of Zn in fraction I (—○—), fraction II (—△—), fraction III (—□—) and metallothionein fraction (—●—) on gel filtration of rat liver cytosol.

Fig. 6



a) Elution profiles of Se in rat liver cytosol by Sephadex G-75 gel filtration
 Dose of Se A: 0.70 mg B: 0.30 mg C: 0.10 mg
 D: 0.05 mg E: 0.02 mg.



b) Contents of Se in fraction I (—○—), fraction II (—△—) and metallothionein fraction (—●—) on gel filtration of rat liver cytosol.

Fig. 7

第三節 Metallothionein 生成における誘導金属量

投与された各金属はすべて第I画分およびMT画分に結合した。第I画分への結合は投与量の増加と共にほぼ直線的に増加した。また、第I画分中の蛋白質は投与した金属によって生成されないという事実から、第I画分に対するMT画分中の金属含有比を求め、その比が増大する点をMT生成点とした。Fig. 8に各金属を種々の量投与した時の第I画分に対するMT画分中の金属含有比を示した。

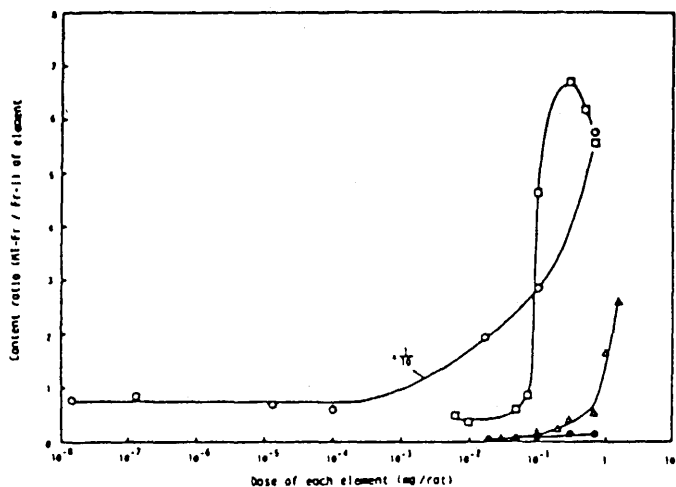


Fig. 8 Content Ratio of Elements in Metallothionein Fraction to Fraction I on Sephadex G-75
Gel Filtration of Liver Cytosol of Rats Injected Various Dose of Each Metal
Cd —○—, Hg —□—, Se —△—, Zn —△—
Content ratio of Cd is expressed in 1/10 scale.

Fig. 8の曲線から求めた各金属のMT生成の閾値(投与量)を、Cd0.3 μ g, Hg 40 μ g, Zn100 μ gと推定した。

SeはMT生成能力を持たないため、上昇点は存在しなかった。またこれらの量を投与した時に肝臓に蓄積された濃度で閾値を表わせば、Cdは0.264nmol, Hgは1.26nmol, Znは15.1nmol/g 肝臓となった。これらの値は、体重約200gのラットを使用した時の結果であって、動物の種類やその体重が異なれば当然これらの値も変化するものと考えられるが、いずれにしてもMT生成能力は各金属によって異なり、その順位はCd>Hg>Znの順であると推察できる。さらに、肝臓におけるMT生成は、MTを誘導生成する能力を有する金属が肝臓中にある一定量蓄積された後に開始されるものと推定できる。

第四章 カドミウム投与量とラット肝臓Metallothionein中の結合金属濃度

MTのアミノ酸組成はすでに解明されており、そのシステイン残基の数から1分子あたりに結合する金属原子数は推定され、6~9個といわれている²⁻⁹⁾しかし、本研究における実験において、Cd投与量の違いにより、MT中のCd濃度が異なることを発見した。この点を明らかにするため、Cd投与量とMT中の結合金属濃度について検討した。

第一節 一回投与時の変化

ラットに、Cdを0.1, 0.3, 0.6, 1.2mg皮下投与し、24時間後に放血死させ、常法により肝臓可溶性画分を分取し、Sephadex G-75によるゲルろ過を2回(3×90cmと1.8×95cmカラム)行い、MT画分

を分取した。限外ろ過で脱塩後、凍結乾燥により得られたMT中の金属を放射化分析により定量した。Table IX にその結果を示す。

Table IX Metal Concentrations in Hepatic Metallothionein Fractions of Rats Injected with Various Amounts of Cd ($\mu\text{g/g}$ Protein) (Single Subcutaneous Injection)

Detected element	Amount of injected Cd (mg/rat)					Not treated
	0.1 ^{a)}	0.3 ^{a)}	0.6 ^{a)}	0.6 ^{b)}	1.2 ^{a)}	
Cd	3400 (0.5)	8100 (1.1)	17600 (2.3)	17000 (1.6)	31000 (4.1)	10.2 (<0.1)
Cu	230 (<0.1)	240 (<0.1)	173 (<0.1)	230 (<0.1)	193 (<0.1)	230 (<0.1)
Zn	400 (<0.1)	4100 (0.9)	6700 (1.5)	5800 (1.3)	6100 (1.4)	490 (0.1)
(Cd+Cu+Zn)	(0.5)	(2.0)	(3.8)	(2.9)	(5.5)	(0.1)

() $\mu\text{g atom/mol}$ MT (M.W. 15000)
 a) Sacrificed 2h after injection.
 b) Sacrificed 10d after injection.

MT中のCd濃度は、投与量と共にほぼ直線的に増加したが、Znは0.1mg Cd投与ではbasal MTと変わらないが、0.3mg Cd投与で急激な増加を示したことから、MT中にCdがある濃度になった後、Znが結合されると考えられた。Cu濃度はほとんど変化しなかった。全結合金属濃度は、Cd投与量と共に増加した。一方、MTのturnoverによって、Cd濃度は減少し、Zn、Cu濃度は増加した。

第二節 多数回投与時の変化

0.1mgのCdを1, 3, 6, 12回連日皮下投与し、最終投与24時間後に放血死させ、一回投与時と同様に処理した。その結果をTable X に示す。

Cd投与量の増加と共にMT中の金属濃度は、一回投与時と同様に増加した。また、全投与量が同じ時は、その金属濃度もほぼ等しかった。わずかな違いは、多数回投与時のturnoverによるものと思う。

第三節 カドミウム投与量と各結合金属含有比

Fig. 9にCdの投与量と、そのMT中のCd, Zn, Cu含有比を示す。

basal MTはZn濃度が高い(67%)けれど、Cd投与により生成したMTの金属含有比はその投与量によって異なる。0.1mg Cd投与によりCd比の高い(75%)MTが生成するが0.3mg投与ではその比は減少し、0.3mg以上の投与で再び増加した。Znの含有比はCdの変化と逆の変化を示した。Cd/Zn比の変化はCd含有比の変化と同様になり、これはZn濃度の変化に基づくものと考えられる。

また、turnoverによりCdは減少し、Znが増加するためCd/Zn比は減少した。全結合金属濃度も減少した。

Table X Metal Concentrations in Hepatic Metallothionein Fractions of Rats injected with Cd ($\mu\text{g/g}$ Protein)

Detected element	The number of injections			
	1	3	6	12
Cd	3400 (0.5)	10400 (1.4)	18000 (2.4)	28000 (3.7)
Cu	230 (<0.1)	230 (<0.1)	290 (<0.1)	270 (<0.1)
Zn	400 (<0.1)	5000 (1.2)	6900 (1.6)	8900 (2.0)
(Cd+Cu+Zn)	(0.5)	(2.6)	(4.0)	(5.7)

() $\mu\text{g atom/mol}$ MT (M.W. 15000)
 0.1 mg Cd single injection (a.c.)

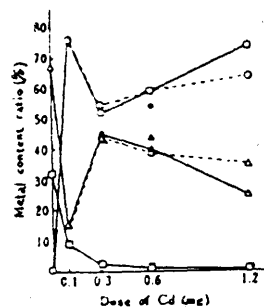


Fig. 9 Bound Metal Content Ratio in the MT induced by Various Amounts of Injected Cd

Each metal content ratio was calculated with respect to the total content of three metals (Cd, Cu and Zn).
 (○) Cd, (□) Cu, (△) Zn
 ---: Rats were injected subcutaneously with 0.1, 0.3, 0.6 or 1.2 mg Cd and sacrificed 2h after injection. (Single injection)
 —: Rats were injected subcutaneously with 0.1 mg Cd 1, 3 or 12 times on successive days and sacrificed 2h after final injection. (Plural injection)
 The ○, □ and △ series show Cd, Cu and Zn content ratios, respectively, of the hepatic MT induced in rats by 0.1 mg Cd injection. The rats were sacrificed 10d after injection.

第五章 in Vitro および in Vivo におけるラット肝臓 Metallothionein とカドミウム、銅、亜鉛の結合

MT中の金属量は、その誘導金属の投与量によって異なることが判明したので、in vitro でMTに金属を反応させ、その金属結合能を検討した。また、in vivo でのMTと金属の結合についても検討した。

第一節 in Vitro における Metallothionein と金属元素との結合

ラットにCd, Cu, Znの各0.1mgを隔日に6回皮下投与し生成させた肝臓MTを分離精製した。各MTをEDTAで処理し、MT中の金属を除去したものの1mgに対し、各2.5μmolのCd, Cu, Znを反応させた。各試料中の金属濃度をTable XIに示す。

Table XI Metal Concentration and Replacement of Metals in Each Protein of Metallothionein Fractions (μg/g protein)

Detected element	Cd injection			Cu injection			Zn injection			Not treated a)
	MT	t-MT	t-MT + (Cd, Cu, Zn) b)	MT	t-MT	t-MT + (Cd, Cu, Zn) b)	MT	t-MT	t-MT + (Cd, Cu, Zn) b)	MT
Cd	12300 (1.6)	137 (<0.1)	1580 (0.2)	19.4 (<0.1)	ND	480 (<0.1)	22 (<0.1)	ND	810 (0.1)	10.2 (<0.1)
Cu	185 (<0.1)	ND	17900 (4.2)	260 (<0.1)	ND	19600 (4.6)	430 (0.1)	300 (<0.1)	19300 (4.6)	230 (<0.1)
Zn	9100 (2.1)	1220 (0.3)	18200 (4.2)	400 (<0.1)	400 (<0.1)	15400 (3.5)	600 (0.1)	230 (<0.1)	17300 (4.0)	490 (0.1)
(Cd+Cu+Zn)	(3.7)	(0.3)	(8.6)	(<0.3)	(<0.1)	(8.5)	(0.2)	(<0.2)	(8.7)	(0.1)

ND : Not detected

MT : Protein of metallothionein fractions by Sephadex G-75 gel filtration

t-MT : Thionein of MT treated with EDTA

{ } : μg atom / mol MT (M.W. 15,000)

a) : Previous data, Yakugaku Zasshi, 101, 515 (1981).

b) : Mixture solution of Cd, Cu and Zn contained same amounts (2.5μmol/mg t-MT)

各MTともその金属結合力はCu ≥ Zn > Cdの順となり、これは2価の遷移金属の錯塩形成における安定度定数の順²⁻⁸⁾と一致している。最初のMT中の金属量はその誘導金属によって異なっていたが、EDTAで処理したあと、過剰の金属と反応させることによってほぼ一定の結合数(8~9g原子/mol MT)となった。これらの金属からMT中のシステイン残基数を求めると各MTとも約20となり、従来から知られている結果²⁻⁸⁾と一致した。このことから、MTの誘導金属が異なってもその1molあたり8~9g原子の金属を結合し得ることが判明した。

一方、EDTAで処理しないCd-MTと各金属を反応させた結果、従来の報告⁸⁾と同様、Cd-MT中のCdとZnはCuによって置換され、CdとZnは相互に置換した。

第二節 in Vivo における Cd-Metallothionein と金属元素との結合

あらかじめ0.1mg Cdを隔日に6回皮下投与し、Cd-MTを生成させておいて、その最終投与24時間後にCd, Cu, Znの各10μmolを再投与したときのMTへの金属結合を検討した。その結果をTable XIIに示す。

in vivoにおいては、in vitroでのようなMT中の金属置換という現象は見られず、金属を再投与することにより、MT中の全結合金属量は増加し、その増加分は再投与した金属の増加分に一致していたことから、進入した金属は、すでに存在しているMTにトラップされるものと考えられる。このこ

Table XII In Vivo Incorporation of Each Metal into Rat Liver Cd-thionein ($\mu\text{g/g}$ protein)

Detected element	Injected element (subcutaneous administration)				
	Cd^{a}	$\text{Cd}^{\text{a}}+\text{Cu}^{\text{b}}$	$\text{Cd}^{\text{a}}+\text{Cu}^{\text{b}}$	$\text{Cd}^{\text{a}}+\text{Zn}^{\text{b}}$	$\text{Cd}^{\text{a}}+(\text{Cd},\text{Cu},\text{Zn})^{\text{b}}$
Cd	12900 \pm 1200 (1.7 \pm 0.2)	30700 \pm 400 (4.1 \pm 0.1)	14200 \pm 2100 (1.9 \pm 0.3)	12100 \pm 3800 (1.6 \pm 0.5)	27000 \pm 6000 (3.6 \pm 0.8)
Cu	210 \pm 40 (<0.1)	ND	2900 \pm 500 (0.7 \pm 0.1)	370 \pm 80 (0.1 \pm 0.0)	2870 \pm 20 (0.7 \pm 0.0)
Zn	9200 \pm 500 (2.1 \pm 0.1)	8500 \pm 1100 (2.0 \pm 0.3)	8000 \pm 1300 (1.8 \pm 0.3)	12800 \pm 800 (2.9 \pm 0.2)	6700 \pm 1000 (2.0 \pm 0.2)
(Cd+Cu+Zn)	(3.8 \pm 0.2)	(6.1 \pm 0.3)	(4.4 \pm 0.4)	(4.6 \pm 0.5)	(6.3 \pm 0.8)

means and standard deviations for each element were calculated from 3 determinations
ND : Not detected

() : μg atom / mol MT (M.W. : 15,000)

a) : injected with 0.1mg Cd as CdCl_2 solution (1 ml) six times on alternate days

b) : injected with 10 μmol each of Cd, Cu and Zn as CdCl_2 , CuCl_2 and $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ solution (1 ml), respectively, 24 hours after the sixth injection of Cd^{a} .

とは、MTの生成は金属が細胞に到達してから約2時間後に急速に進む^{2-e)}ということからも推察される。

総括

以上の実験結果からMTの生物学的な役割について考察すると、MTは1molあたり8~9g原子の金属を結合する能力を有しているが、生体内に存在するMTの金属結合量はすべてそれ以下である。すなわち、さらに金属を結合する能力を有しており、そのようなMTが存在しているところにCuやZnのようなMTとの結合力の強い金属が進入した時には、そのMTにトラップされ、その代謝に大きな影響をおよぼす結果となる。また、MTの役割として最もよく知られているCdの毒性防御に関しても、少量のCdで前処理することにより、生体内にさらに金属を結合する能力を有するCd-MTが生成されあらたに多量のCdが進入してきてもそのMTにトラップされ、その毒性を抑えるものと推定できる。

また、MT本来の生物学的な役割としては、1)正常な生体中にはわずかしかが存在しない。2)有害金属のCdやHgのMT生成能力は、必須金属のZnやCuのMT生成能力よりも大きい。3)逆に、MTとの結合力はCu, Znの方が強い。などを考慮すれば、有害金属の毒性を防御することであり、その結果として、Zn Cuの必須金属の代謝に大きな影響をおよぼすものと結論できる。

結論

- 1) ラット各臓器中、肝臓にすべての元素が最も多く存在し、さらにその細胞分画中、可溶性画分にMn以外の元素が最も多く分布することがわかった。
- 2) ラット肝臓可溶性画分中、Fe, Mn, Seは高分子量蛋白質に、Cd, Cu, Znの3元素は低分子量蛋白質に多く結合しCdを投与することによって特にMT画分に結合するZn量が著しく増加すること、およびCoとSeはMTに結合されること、またSeの存在は、MTへのCdおよびCuの結合を減少させ、Cd-MTの生成をも減少させることがわかった。
- 3) Cd投与により、肝臓MTへのZnの結合量は増加し、この増加したZnは、可溶性画分中の高分子量蛋白質からの移行の他に、腎臓からのZnの移行による結果であることがわかった。

- 4) Cd, Hg, Znのラット肝臓中におけるMT生成のための閾値として、体重約200gのラットにCdを0.3 μ g, Hgを40 μ g, Znを100 μ g投与した時、すなわち、肝臓中の濃度でCdは0.264nmol, Hgは1.26nmol, Znは15.1nmol/g肝臓という値を得た。また、MT生成能力は、Cd>Hg>Znの順で、これらの金属がある一定の量蓄積されたのち、MT生成が開始されることがわかった。
- 5) MT中の金属濃度(g原子/mol MT)は投与したCd量によってほぼ一定の値をとるが、投与量が増加すると共に増加すること、およびその結合金属比が異なることがわかった。またturn overの結果Cd含有比が低下し、Zn含有比が増加し、全結合金属濃度は減少することもわかった。
- 6) MTはその誘導金属が異なっても、1molあたり8~9g原子の金属を結合し得ること、およびその結合力はCu \geq Zn \gg Cdの順であることがわかった。また、MTが存在しているところに進入したZnやCuはそのMTにトラップされることがわかった。

引用文献

- 1) M. Margoshes and B. L. Vallee, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4831 (1957).
- 2) a) 不破敬一郎, *科学*, **41**, 569 (1971). b) 木村正己, *医学のあゆみ*, **83**, 1 (1972). c) 代謝, **12**, 205 (1975). d) *ファルマシア*, **13**, 210 (1977). e) *化学の領域*, 増刊**126**, 47 (1980). f) *鈴木和夫衛生化学*, **26**, 205 (1980). g) *医学のあゆみ*, **116**, 611 (1981).
- 3) a) Y. Suzuki and H. Yoshikawa, *Ind. Health*, **12**, 141 (1974). b) W. Webb and R. D. Verschoyle, *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 673 (1976). c) A. P. Leber and T. S. Miya, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **37**, 403 (1976).
- 4) M. G. Cherian and R. A. Goyer, *Life Sci.*, **23**, 1 (1978).
- 5) R. A. Nadkarni and G. H. Morrison, *J. Radioanal. Chem.*, **43**, 347 (1978).
- 6) C. de Duve, R. Wattiaux and P. Buadhuim, *Adv. Enzymol.*, **24**, 291 (1962).
- 7) 高木俊夫, 三宅 淳, “新実験化学講座20巻, 生物化学(I),” 日本化学会編, 丸善, 東京, 1978, pp118-130.
- 8) J. H. R. Kägi and B. L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **236**, 2435 (1961).

論文の審査結果の要旨

Metallothioneinの生物学的役割について、中性子放射化分析による重金属分析を用いて検討し、正常な生体中には本蛋白質はわずかしかが存在しないこと、有害金属のカドミウムや水銀のMetallothionein生成能は、生体に正常存在する亜鉛や銅よりも高いが、逆に結合能は銅や亜鉛の方が大きいことなどを明らかにした。このことから、有害金属の毒性を防御することがMetallothioneinの役割であり、その結果として亜鉛や銅などの必須金属の代謝に大きな影響を及ぼすことになるものと結論した。これらの知見は生体微量金属の動態に関し、新しい知見を加えるとともにMetallothioneinの存在意義についても示唆を与えるものであり薬学博士の学位を授与するに値するものと判定した。