〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
24 (5) 241-245 (1978)

有害性金属の生体膜生合成に及ぼす影響
—カドミウムのホスホリパーゼ A₂ 活性に及ぼす影響について¹⁾—

及川智正,^{2a)} 和久敬蔵,^{2b)} 中澤泰男^{2c)}

科学警察研究所,^{2a)} 帝京大学薬学部,^{2b)}

東京医科歯科大学難治疾患研究所^{2c)}

Effects of Poisonous Metals on the Biosynthesis of Biological Membranes
—Inhibitory Effect of Cadmium on the Phospholipase A₂ Activity of Snake
Venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*¹⁾—

TOMOMASA OIKAWA,^{2a)} KEIZO WAKU^{2b)}

and YASUO NAKAZAWA^{2c)}

National Research Institute of Police Science,^{2a)} Faculty of
Pharmaceutical Science, Teikyo University,^{2b)} and Medical
Research Institute, Tokyo Medical and Dental University^{2c)}

(Received May 11, 1978)

Kinetic studies on the inhibition of phospholipase A₂ (from *Agkistrodon halys blomhoffii*) activity with cadmium ion demonstrated that cadmium ion inhibits the enzymic activity competitively with respect to calcium ion and phosphatidylcholine. The K_m value was $6.3 \times 10^{-3} M$ for phosphatidylcholine and the K_i value of cadmium ion was $1.4 \times 10^{-4} M$, while, for the calcium ion, the K_m value was $2.8 \times 10^{-4} M$ and K_i value of cadmium ion was $1.4 \times 10^{-4} M$.

Cadmium-metallothionein isolated from the liver of cadmium-injected mouse did not show any effect on the phospholipase A₂ activity and this fact suggests the protective effect of metallothionein against toxic effect of cadmium on lipid metabolism in living cells.

Keywords—phospholipase A₂; phosphatidylcholine; calcium chloride; cadmium chloride; metallothionein

緒 言

環境汚染に関連してカドミウムに関する毒性研究が進められ、西住³⁾は慢性カドミウム中毒ラットの腎臓について、ミトコンドリアの膨脹、変形、増大と滑面小胞体、空胞の増大を電子顕微鏡的に観察し、Stoweら⁴⁾は慢性カドミウム中毒家兎、水平ら⁵⁾は急性カドミウム中毒マウスの肝細胞について電子顕微鏡的に観察を行い、グリコーゲンの消失、粗面小胞体の拡張、滑面小胞体の

増大、コラーゲンの沈着を認め、さらに Golgi 装置の変化、空胞の生成を認めている。

このようにカドミウムは各種臓器組織にとり込まれ、組織及び生体膜の変化に影響を与えるとする研究例が見られるが、著者らはそれらの変化を生化学的に追究することを目的として、生体膜のリン脂質代謝に及ぼす影響を検討した。生体膜のリン脂質は環境条件の変動に応じて、構成脂肪酸を加水分解により遊離し、さらに他の脂

1) 日本薬学会第96年年会で発表、名古屋、1976年4月。

2) Location: a) 6, Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo (東京都千代田区三番町6); b) Sagamiko-cho, Tsukui-gun, Kanagawa (神奈川県津久井郡相模湖町); c) 3-10, 2-chome, Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo (東京都千代田区神田駿河台2-3-10)。

3) M. Nishizumi, Arch. Environ. Health, **24**, 215 (1972).

4) H.D. Stowe, M. Wilson, R.A. Goyer, Arch. Pathol., **94**, 389 (1972).

5) V. Mizuhira, H. Kimura, Proc. 31th Ann Meeting EMSA, New Orleans, 1973, p. 402.

肪酸と結合することにより、物理化学的性質を異にする別種の分子種に変化することが知られているが、^{6,7)} 今回はその分解系、合成系の酵素反応のうち、分解系について実験を試みた。酵素系としてはマムン毒ホスホリパーゼ A₂ (以下 PL ase A₂) を用い、その卵黄ホスファチジルコリン (PC) を基質とした時の酵素活性に及ぼすカドミウムの影響について研究した。カドミウムが PL ase A₂ に対して阻害作用を示すことは、すでに河内ら⁸⁾ により報告されているが、本研究ではその阻害形式について検討した結果を報告する。また、生体のカドミウムに対する防御作用としてメタロチオネインの生成が知られているが、⁹⁻¹¹⁾ カドミウムイオンがメタロチオネインと結合した際、これが PL ase A₂ 作用に対して、どのような反応を示すかについても合わせて研究を行った。

実験の部

1. 試薬類 1) メタロチオネイン——マウスに塩化カドミウムを皮下注射して誘導したものを肝臓より分離精製したもので、東京医科歯科大学難治疾患研究所の角尾 肇 博士より分与されたものを用いた。分子量は約 6000 で 1 モル中に SH 基 20 ケを有し、アミノ酸結合順序もすでに決定され、¹²⁾ 1 モル中 4 ケのカドミウム原子と 2 ケの亜鉛原子を含んでいる。

2) 脱イオン水——三田村理研製 Automatic Demineralizer を用いて、水道水をステンレス製蒸留装置で蒸留したのち、さらにイオン交換樹脂カラムに通して脱イオン水とし、調製後直ちに用いた。

3) マムン毒 PL ase A₂——滋賀、福井両県産のマムン毒 (*Agkistrodon halys blomhoffii*) を、河内らの方法⁸⁾ に従い、DEAE セルロースカラムを用いて分離精製したホスホリパーゼ A-II を用いた。Disk 電気泳動で単一のバンドを示しており、反応に用いる際は Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解 (20 µg/ml) した。

4) その他の試薬及び装置——クロロホルムは試薬 1 級品を蒸留したものを用い、その他の溶媒、試薬類は特別に記載したものを除いて、総て市販の試薬特級品を用いた。ガラス器具は、総て Pyrex あるいは岩城ガラス

No. 7740 製品を用いた。マグネチックスターラーの攪拌子はガラス被覆のものを用いた。

2. PC の分離精製 1) PC のカラムクロマトグラフィー——新鮮卵黄から Folch 法¹³⁾ に従い、脂質を抽出し、ケイ酸 (Mallinckrodt 社製 AR 100 mesh) 200 g に Hyflo Super-Cel (Johns-manville 社製) 100 g を混合したカラムを用い、クロロホルム-メタノール混合溶媒で溶出した。PC のみを含む溶出分画を集め、2% butylhydroxytoluene ベンゼン溶液 2 滴を加えて、減圧下に濃縮して PC 保存溶液として冷蔵庫内に保存した。

2) PC の脱カルシウム処理——PC 保存溶液より PC として 144 mg 相当量を取り約 45° で溶媒を減圧留去後、 1×10^{-2} M EDTA (pH 7.0) 15 ml を加え、マグネチックスターラーで激しく攪拌してエマルジョンとし、セルロース透析膜 (Visking 社製 27/32) に入れ、室温で脱イオン水に対して透析を行った。1 日数回外液を交換し 2 週間透析を続けた。透析終了後、内容液を約 45° で減圧下に濃縮乾固し、残留物に 2% Triton X-100 10 ml, Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.5) 15 ml を加え、マグネチックスターラーで攪拌混合してエマルジョンとした。PC 中のリン含有量を PC 重量の 1/25 として、Rouser 法¹⁴⁾ によるリン測定値より、PC に換算した。このエマルジョン液の PC 含有量は 5.76 mg/ml であった。なお、PC の分子量を 780 として以下の実験を行った。

3. カルシウムの定量 PC 及び主要試薬類に由来するカルシウム混入を確かめるため、原子吸光分析法を行った。装置は日立 308 型原子吸光分光光度計を用い、水冷予混合式バーナー (アセチレン-空気) により吸光度の測定を行った。光源は Westinghouse 社製 hollow cathode lamp WL-36017 (Ne) を用いた。

4. PL ase A₂ の活性測定 1) インキュベーション——精製 PC エマルジョン 3.0 ml に 1×10^{-3} M 塩化カルシウム 1.2 ml を加え、マグネチックスターラーで軽く攪拌しながら 25° の水浴中で 5 分間ブレインキューベートする。ついで PL ase A₂ 溶液 0.6 ml を加え、一定時間後にインキュベート液 0.8 ml 宛を取り、ヒドロキシル

- 6) W.E.M. Lands, *J. Biol. Chem.*, **235**, 2233 (1960).
- 7) H. Okuyama, W.E.M. Lands, *J. Biol. Chem.*, **247**, 1414 (1972).
- 8) S. Kawauchi, S. Iwanaga, *Biochim. Biophys. Acta*, **236**, 142 (1971).
- 9) M. Margoshes, B.L. Vallee, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4813 (1957).
- 10) J.H.R. Kägi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3460 (1960).
- 11) J.H.R. Kägi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **236**, 2435 (1961).
- 12) I-Yih Huang, A. Yoshida, H. Tsunoo, H. Nakajima, *J. Biol. Chem.*, **252**, 8217 (1977).
- 13) J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane Stanley, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957).
- 14) G. Rouser, A.N. Siakotos, S. Fleischer, *Lipids*, **1**, 85 (1966).
- 15) B. Shapiro, *Biochem. J.*, **53**, 663 (1953).

アミン試液 (2M 塩酸ヒドロキシルアミン 0.5 ml, 3.5M 水酸化ナトリウム 0.5 ml, エタノール 2.5 ml の混液. 用時調製) 3.5 ml 中に速やかに加え, 以下つぎの酵素活性測定法に従い, PC のエステル結合の減少率を測定した.

2) 酵素活性測定法——Shapiro 法¹⁵⁾ を一部改良し, インキュベート後の PC のエステル結合の減少率を測定して酵素活性とした.

ヒドロキシルアミン試液 3.5 ml に, 上記のようにインキュベートした酵素反応液 0.8 ml を加えて室温に 20 分間放置する. ついで 3.3M 塩酸 0.6 ml, 0.37M 塩化第二鉄 (0.1M 塩酸) 0.5 ml を加えてヒドロキサム酸を発色させる. インキュベート液の代りに Tris 緩衝液 0.6 ml に水 0.2 ml を加えた液を用いて, 同様に操作した液を対照として 520 nm における吸光度を測定した.

3) カドミウム共存による影響——前記のインキュベーションの際, 添加する 1×10^{-3} M 塩化カルシウム 1.2 ml の代りに, 1×10^{-3} M, 塩化カルシウムに, それぞれ 5×10^{-4} M, 1×10^{-3} M, 1.5×10^{-3} M の塩化カドミウムを併せ含む溶液 1.2 ml を用いて活性検定を行った. メタロチオネインの阻害効果の観察には, メタロチオネインを Tris-塩酸緩衝液に溶かし, 塩化カドミウムの代りに分子内カドミウム濃度が $1.25\text{--}3.75 \times 10^{-4}$ M になるようメタロチオネインを添加した.

結 果

卵黄 PC に対して EDTA-セルロース透析膜を用いて脱カルシウム処理を試みたが, ケイ酸カラムを用いて分離したもの (保存溶液), 脱カルシウム処理したものそれぞれについて, 蒸発乾固した残留物を硝酸・過塩素酸混液で壊機したものについて, また Triton X-100 及び Tris 塩基は, それらの 40 mg/ml 水溶液についてカルシウムの定量を行った. 保存溶液の PC では $1.04 \mu\text{g}/\text{mg}$, 脱カルシウム処理したものでは $0.22 \mu\text{g}/\text{mg}$ のカルシウムが測定された. Triton X-100, Tris 塩基ではカルシウムは trace 量しか検出されなかった.

ケイ酸カラムより分離したままの PC では, 本実験のインキュベーション条件で, 特に塩化カルシウムを添加しない場合の PL ase A_2 活性は $0.14 \mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g protein}$ であったが, 脱カルシウム処理した PC においては同様に塩化カルシウムを添加しない場合には約 1/4 の $0.032 \mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g protein}$ に低下した.

この脱カルシウム処理した PC についてカルシウム濃度を変化させながら, PL ase A_2 による加水分解速度を

Fig. 1. Rate of Hydrolysis of Egg Phosphatidylcholine by Phospholipase A_2

The incubation mixture contained 0.5 ml of egg phosphatidylcholine emulsion (phosphatidylcholine 2.88 mg, 2% Triton X-100 0.2 ml, Tris-HCl buffer (pH 7.5) 0.3 ml), CaCl_2 solution as indicated, $2 \mu\text{g}$ of enzyme, and water, in a total volume of 0.8 ml. The ester value was determined colorimetrically by Shapiro's method,¹⁵⁾ and the hydrolysis percent was calculated from the decreased ester values.

—○—: CaCl_2 3.75×10^{-4} M,
 —●—: CaCl_2 2.5×10^{-4} M,
 ...○...: CaCl_2 1.25×10^{-4} M,
 ...●...: no CaCl_2 .

測定した結果を Fig. 1 に示した.

カルシウム濃度の増加に比例して加水分解速度が増大し, 2.5×10^{-4} M ではほぼ一定となり, インキュベーションタイムも 2.5 分まで直線的に分解速度が上昇することが認められた. 従って, 以後の実験ではカルシウムは 2.5×10^{-4} M, 脱カルシウム処理した PC は $3.69 \mu\text{mol}$ を用い, インキュベーションタイムも 2.5 分で行った.

Fig. 2 に示したように, 塩化カドミウムを添加すると, カドミウム濃度の増加に比例的に酵素活性が阻害され, カルシウムと等濃度添加した場合は, ほぼ 50% の阻害が見られた. また, メタロチオネインをそのカドミウム含量に応じて, 塩化カドミウムに対応する量を添加したが, この場合は酵素活性に対する阻害作用はほとんど認められなかった.

また, PC 濃度を変化させた際の加水分解速度を測定し, Lineweaver-Burk¹⁶⁾ に従いプロットし, Fig. 3 に示されるように $K_m = 6.3 \times 10^{-3}$ M が求められた.

塩化カドミウム添加による阻害は拮抗的阻害で, 酵素の活性中心に作用するものと考えられ $K_i = 1.4 \times 10^{-4}$ M が求められた.

同じくカルシウム濃度を変化させた際の加水分解速度

16) H. Lineweaver, D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1934).

Fig. 2. Inhibitory Effect of CdCl_2 and Cd-metallothionein on Phospholipase A_2 Activity

The incubation mixture contained 0.5 ml of egg phosphatidylcholine emulsion (phosphatidylcholine 2.88 mg, 2% Triton X-100 0.2 ml, Tris-HCl buffer (pH 7.5) 0.3 ml), $2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ CaCl_2 , varying concentration of CdCl_2 or Cd-metallothionein as indicated, 2 μg of enzyme, and water, in a total volume of 0.8 ml. The Cd-metallothionein contained 4g-atoms of Cd/6000 molecular weight. Incubation was performed for 2.5 min at 25° . The decrease of ester value was determined as reported in Fig. 1 and expressed as inhibition percent.

—○—: Cd-metallothionein,
—●—: CdCl_2 .

を測定し、Lineweaver-Burk に従い、プロットして Fig. 4 が得られ、 $K_m = 2.8 \times 10^{-4} \text{ M}$ が求められた。

塩化カドミウムによる阻害は拮抗的阻害で、カドミウムが酵素の活性中心で、カルシウムと置き換えることを示し、 $K_i = 1.4 \times 10^{-4} \text{ M}$ が求められ、基質 PC 濃度を変化させた場合の K_i 値と一致した値を示した。

考 察

生体中の PL ase A_2 活性については、種々の組織内においてその存在が認められている。一般に脾臓において高い PL ase A_2 活性が認められ、Van Den Bosch ら¹⁷⁾ は、馬、ラットの脾臓ホモジネート中に熱に安定性の PL ase A_2 活性を認めている。De Haas ら¹⁸⁾ は豚脾臓 PL ase A の硫安分画、クロマトグラフによる精製を試み、純粋なタンパクとして分離し、至適 pH 7.9—8.4, カルシウム 6 mM が至適濃度であると報告している。

ラット肝臓においてもミトコンドリアから PL ase A_2 活性、ミクロゾームから PL ase A_1 活性が認められ、そ

Fig. 3. Lineweaver-Burk Plot of the Inhibition of CdCl_2 on Phospholipase A_2 Activity

The incubation mixture contained 0.5 ml of egg phosphatidylcholine emulsion (varying concentration of phosphatidylcholine as indicated, 2% Triton X-100 0.2 ml, Tris-HCl buffer (pH 7.5) 0.3 ml), $2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ CaCl_2 , $2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ CdCl_2 , 2 μg of enzyme, and water, in a total volume of 0.8 ml. The decrease of ester value of phosphatidylcholine was determined after incubation at 2.5 min at 25° .

—○—: no CdCl_2 ,
—●—: with CdCl_2 .

Fig. 4. Lineweaver-Burk Plot of the Inhibition of CdCl_2 on Phospholipase A_2 Activity

The incubation mixture contained 0.5 ml of egg phosphatidylcholine emulsion (phosphatidylcholine 2.88 mg, 2% Triton X-100 0.2 ml, Tris-HCl buffer (pH 7.5) 0.3 ml), $2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ CdCl_2 , varying concentration of CaCl_2 as indicated, 2 μg of enzyme, and water, in a total volume of 0.8 ml. The decrease of ester value of phosphatidylcholine was determined after incubation at 2.5 min at 25° .

—○—: no CdCl_2 ,
—●—: with CdCl_2 .

- 17) H. Van Den Bosch, N.M. Postema, G.H. De Haas, L.L.M. Van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta*, **98**, 657 (1965).
- 18) G.H. DeHaas, N.M. Postema, W. Nieuwenhuizen, L.L.M. Van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta*, **159**, 103 (1968).

れぞれ至適 pH は 7.4—9.5 とアルカリ性に傾き、活性発現にはカルシウム 2—10 mM を必要とすることが認められ、¹⁹⁻²³⁾ Waite, Sisson²³⁾ はミトコンドリア PL ase A₂ を、アセトン-アンモニア及び 硫安沈殿による分画法で部分精製し、その活性発現にはカルシウムを要求して 2 mM で至適濃度となり、至適 pH は 9.5 を示すことを報告している。また、モルモット脳²⁴⁾ からも PL ase A₂ 活性が見出され、同じくカルシウムを要求し、6 μ M を至適濃度としている。このような PL ase A₂ の諸性質は、マムシ毒 PL ase A-II と、カルシウム要求性、至適 pH、熱安定性、硫安分画法に対する性質等において類似性がある。

リン脂質は生体膜を構成する主要成分の一つであり、酵素活性の発現、種々の生体内物質の膜透過性に重要な役割を有していることが知られている。リン脂質は広く臓器に分布している PL ase により脂肪酸が加水分解され、さらに acyltransferase の作用によって別種の脂肪酸と結合することによって、リン脂質の脂肪酸を環境条件の変動に応じて変化させると考えられており、生体膜の流動性、透過性等を脂肪酸の変化により調節し、生体機能の維持に関与していると考えられている。

一般に生体中にカドミウムが摂取された場合には、生体はメタロチオネインを生成して、カドミウムに結合させ、無毒化するものと考えられ、このタンパクと結合したカドミウムと無機カドミウムとの毒性比較実験²⁵⁾ においても、メタロチオネインの大きな毒性軽減の効果が認められている。

安藤ら²⁶⁾ はラットに ¹⁰⁹CdCl₂ を経口投与し、2 時間後、肝臓では約 40% のカドミウムがメタロチオネインと結合していない型で存在することを示している。また、Cherian, Shaikh²⁷⁾ により、カドミウム-メタロチオネインをラットに静注し、3 時間後にも腎臓の上清のカドミウムの 15% がメタロチオネインと結合していない状態

で存在することが示され、木村²⁸⁾ は、また、長期間飲料水中にカドミウムを混入して投与したラットの肝臓では、メタロチオネインと結合していないカドミウムが 10 % 程度存在することを示唆しており、生体においてメタロチオネインの生成にもかかわらず、カドミウムに対する減毒作用は必ずしも完全でないことが考えられる。

本実験の結果から、生体中のカドミウムは、メタロチオネインと結合した状態では、PL ase A₂ に影響を与えないが、カドミウムがメタロチオネインと結合していない場合は、PL ase A₂ 活性発現に要求されるカルシウムに対して、カドミウムが拮抗的に働き、PL ase A₂ に強い阻害作用をもたらすことが示唆された。

従って、実際にカドミウムが生体内に存在した場合、以上、述べた実験結果を考え合わせると、リン脂質代謝に変動を与えることが推測される。

結 論

卵黄 PC からカルシウムを除去するため、EDTA-セルロース膜による透析処理を行い、目的を達した。

PL ase A₂ 活性に及ぼすカドミウムの阻害作用は拮抗的で、基質濃度を変化させた際は $K_m = 6.3 \times 10^{-3}$ M, $K_i = 1.4 \times 10^{-4}$ M, 同じカルシウム濃度を変化させた場合、カドミウムの阻害作用は拮抗的で $K_m = 2.8 \times 10^{-4}$ M, $K_i = 1.4 \times 10^{-4}$ M であった。また、カドミウムをメタロチオネインと結合した形で添加すると、PL ase A₂ 活性はほとんど阻害が認められなかった。

以上の結果から、生体内においてもカルシウムによるリン脂質代謝調節機構が、カドミウムにより影響を受ける可能性があると考えられ、また、メタロチオネインがその解毒機構として有用であることを示している。

謝辞 貴重なメタロチオネインを御供与戴いた東京医科歯科大学難治疾患研究所 角尾 肇博士に、心から謝意を表します。

- 19) G. L. Scherphof, M. Waite, L. L. M. Van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta*, **125**, 406 (1966).
- 20) M. Waite, L. L. M. Van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta*, **137**, 498 (1967).
- 21) M. Waite, P. Sisson, *Biochemistry*, **10**, 2377 (1971).
- 22) J. Nachbaur, A. Colbeau, P. M. Vignais, *Biochim. Biophys. Acta*, **274**, 426 (1972).
- 23) J. D. Newkirk, M. Waite, *Biochim. Biophys. Acta*, **298**, 562 (1973).
- 24) R. J. Gullis, C. E. Rowe, *Biochem. J.*, **148**, 197 (1975).
- 25) G. F. Nordberg, *Environ. Physiol.*, **1**, 171 (1971).
- 26) 安藤正典, 佐谷戸安好, 外村正治, 衛生化学, **22**, 24 (1976).
- 27) M. G. Cherian, Z. A. Shaikh, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 863 (1975).
- 28) 木村正己 (産業医学総合研究所: 川崎市) 私信。