鉛によるラット肝亜鉛メタロチオネインの誘導¹⁾

有蘭幸司, 伊藤俊彦, 山口正広, 有吉敏彦

長崎大学薬学部

Induction of Zinc Metallothionein in the Liver of Rats by Lead

KOJI ARIZONO, TOSHIHIKO ITO

MASAHIRO YAMAGUCHI and TOSHIHIKO ARIYOSHI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki

University, 1-14, Bunkyo-cho, Nagasaki-shi,

Nagasaki, 852, Japan

(Received November 2, 1981)

At 18 h after the single injection of lead acetate (100 mg/kg) in male Wistar rats, zinc content in the low molecular-weight protein fraction (zinc binding protein, Zn-BP) in the hepatic 105000 *g* soluble fraction markedly increased, whereas lead was detected only in the high molecular-weight protein fraction by using Sephadex G-75 gel filtration.

The properties of this Zn-BP were investigated and the following results were obtained.

1) Molecular weight was estimated about 10000 daltons. 2) Zinc in Zn-BP was substituted with cadmium. 3) UV spectrum of Zn-BP showed similar spectrum to metallothionein. 4) The formation of Zn-BP induced by lead was almost inhibited by the pretreatment with actinomycin D. 5) Zn-BP was heat-stable, when treated at 80°C for 1 min.

These findings suggest that Zn-BP is thought to be zinc metallothionein (Zn-MT) and consequently lead has an inductive potency to Zn-MT in the liver of rats.

Keywords—lead ; zinc ; cadmium ; metallothionein ; rat liver ; 105000 *g* soluble fraction ; Sephadex G-75 ; actinomycin D ; heat stability

緒 言

メタロチオネイン (MT) は、カドミウム (Cd) と亜鉛 (Zn) の結合蛋白質としてウマの腎皮質から単離された蛋白質²⁾であるが、現在では高等動物のみならず微生物においてもその存在が知られ³⁾、また脊椎動物においては、種々の臓器が MT を生成することも明らかになった。⁴⁾ 一方、MT は Cd, Zn, 銅 (Cu), 水銀 (Hg) を始めとする種々の金属の処置によって誘導されることが確認された。⁵⁾ しかし、鉛 (Pb) の処置ではラット肝において低分子量蛋白質は生じないとの報告^{5a), 6)}もあるが、一方では MT 様蛋白質を誘導するとの報告⁷⁾もあり、充分明らかにはされていない。著者ら⁸⁾は先に酢酸鉛投与ラットの肝臓 105000 *g* 上清画分において、Pb は主に高分子量部分のみに存在することを報告した。しかし、この際、低分子量部分において Zn 含量の増加が認

められたので、今回この Zn 含量の増加と MT との相互関係を明らかにしようと試み、二、三の実験を行った結果興味ある知見が得られたので報告する。

実 験 方 法

1) 動物 実験前 1 週間あらかじめ固型飼料 (クレア CE-2) と水で飼育した、体重 200 g 前後の Wistar 系雄性ラットを使用した。

2) 試薬 酢酸鉛 (特級)、塩化カドミウム (特級)、塩化亜鉛 (特級) は和光純薬工業社製、アクチノマイシン D (AcD) は P-L Biochemicals 社製、チトクローム c、キモトリプシン及び牛血清アルブミンは Sigma 社製、Sephadex G-75 は Pharmacia Fine Chemical 社製を使用した。

3) 投与液の調製 酢酸鉛 ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、塩化カドミウム ($\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$) 及び塩化亜鉛 (ZnCl_2)

は、それぞれ 100 mg/2 ml, 3 mg/2 ml 及び 3 mg/2 ml の濃度になるように精製水で溶解し、また AcD は 0.8 mg/2 ml の濃度になるように、精製水で溶かし投与液を調製した。

4) 置換実験用 Cd 溶液の調製 反応混合液中の Cd の最終濃度が 40 $\mu\text{g}/5\text{ ml}$ となるように、塩化カドミウムを精製水で溶かして調製した。

5) 投与方法並びに実験 1 群には 3 匹のラットを用い、a) 対照群、b) Pb 投与群、c) Cd 投与群、d) Zn 投与群、e) AcD+Pb 投与群に分け、a) には生理食塩水を 2 mg/kg, b), c), d) には調製した酢酸鉛 ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) 溶液、塩化カドミウム (CdCl_2) 溶液、及び塩化亜鉛 (ZnCl_2) 溶液をそれぞれ 2 ml/kg, e) は Pb ($\text{CH}_3\text{COO})_2$ 溶液投与 4 時間前に、AcD 溶液を 2 mg/kg 1 回腹腔内投与し、各実験群の動物は金属投与 18 時間後に屠殺し、以下の実験に供した。

a) 屠殺後肝臓を *in situ* で冷 0.9 % NaCl で灌流したのち、4 倍量の 0.25 M 蔗糖溶液でホモジナイズし、既報⁹⁾に従って 105000 g 上清画分を得た。

b) *In Vitro* におけるカドミウムと上清画分との結合実験：a) で得られた各上清液 8.3 ml に 4) で調製した CdCl_2 溶液 100 μl を加え、37°C, 30 分間インキュベーションを行った。インキュベーション終了後、反応液の 5 ml をあらかじめ 0.001 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.6) で調製した Sephadex G-75 カラム (1.9 $\times$ 90 cm) に添加し、同一緩衝液を用い 20 ml/h の流速でゲル濾過した。溶出液は 5 ml ずつ分取し、Pb, Cd, Zn 含量を直接日立 208 型原子吸光光度計で測定した。なお、ゲル濾

過蛋白質画分の分子量標準品としてチトクローム c (分子量 12400), キモトリプシン (分子量 25000), 牛血清アルブミン (分子量 68000) を使用した。

c) 紫外外部吸収スペクトルは、対照に 0.001 M Tris-HCl (pH 8.6) を用い、島津マルチパーパス自記分光光度計 (MPS-5000) で波長 240—300 nm を測定した。

d) 熱安定性についての実験は a) で得られた上清画分の 5 ml を、80°C, 1 分間インキュベーションを行い、反応終了後、遠心 (26000 g , 10 分間) して得られた上清を Sephadex G-75 カラムを用い、b) と同じ条件でゲル濾過を行った。

実験結果

1) 酢酸鉛投与におけるゲル濾過パターン

Pb ($\text{CH}_3\text{COO})_2$ 溶液を 1 回腹腔内に投与し、肝 105000 g 上清画分を Sephadex G-75 でゲル濾過を行った結果、Fig. 1 (b) に示すように分子量約 10000 付近に対照群 a) には認められない Zn の第三のピーク (以下 Zn 結合蛋白質, Zn-BP と略す) が観察された。しかも大部分の Pb は高分子量部分に認められ、Zn-BP 部分には存在しなかった。

2) *In Vitro* での Cd 添加実験

実験方法 5) の a) で得られた 105000 g 上清の 5 ml に Cd を 40 μg 添加し、37°C, 30 分間インキュベーションした後、ゲル濾過を行った結果を Fig. 2 に示す。対照群 a) では Zn-BP 部分に上清 5 ml あたり 3.1 μg の Cd が認められたが、大部分の Cd は高分子量部分に存在した。しかし、Pb 投与群 b) では上清 5 ml あたり 9.6 μg の Cd (添加 Cd の 24 %) が Zn-BP 部分に存在した。一

Fig. 1. Gel Filtration of Rat Liver Supernatant Fraction on a Sephadex G-75 Column

Animals were sacrificed 18 h after the injection of Pb ($\text{CH}_3\text{COO})_2$.

The supernatant was applied to a Sephadex G-75 column (1.9 $\times$ 90 cm), and eluted with 0.001 M Tris-HCl, pH 8.6, at a flow rate of 20 ml/h and 5 ml fractions were collected.

The arrows indicate the position of cytochrome c eluted.

— : Zn, : Pb.

a) Control. b) Pb-treated.

Fig. 2. Gel Filtration Chromatogram of Rat Liver Supernatant Fraction incubated with Cadmium *in vitro* on a Sephadex G-75 Column

Animals were sacrificed 18 h after the injection of Pb (CH_3COO)₂.

Control and lead-treated liver supernatants were incubated with Cd (40 μg) at 37°C for 30 min, respectively.

After incubation, the supernatant was applied to a Sephadex G-75 column (1.9×90 cm), and eluted with 0.001 M Tris-HCl, pH 8.6, at a flow rate of 20 ml/h and 5 ml fractions were collected.

The arrows indicate the position of cytochrome c eluted.

— : Zn, : Pb, -.- : Cd.

a) Control. b) Pb-treated.

TABLE I. Zinc Contents and Their Percentage in Metal-Treated Rat Liver Supernatant Fraction

	Zinc content						
	$\mu\text{g}/5 \text{ ml}$ of supernatant fraction				(%) of each fraction		
	Total	I	II	III	I	II	III
Control	32.5	18.5	11.9	2.1	56.9	36.6	6.5
CdCl_2	56.1	31.4	4.2	20.5	56.0	7.4	36.6
ZnCl_2	47.0	21.0	9.9	16.1	44.6	21.1	34.3
$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	49.6	21.4	9.2	19.0	43.1	18.6	38.3

Molecular weight : I > 70000 (Fraction No. 20–28), II $\approx$ 30000 (Fraction No. 29–34), III $\approx$ 10000 (Fraction No. 35–40).

Animals were sacrificed 18 h after the single intraperitoneal injection of each metal, CdCl_2 (3 mg/kg), ZnCl_2 (3 mg/kg) and $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (100 mg/kg), respectively.

Liver supernatants were prepared according to the procedure described in Method.

方, Pb 投与群における Zn-BP 部分の Zn は, Cd の添加によって Fig. 1 b) の Zn-BP 部分に比べ, 著しく減少していることから, Zn と Cd との置換が行なわれたことが示唆された. この置換された Zn 量は 9.6 μg を示し, Fig. 1 b) に対する Fig. 2 b) の高分子量部分及び分子量 30000 部分の Zn の増加量と一致したことから, Cd によって置換された Zn は高分子量部分へ移行したことが認められた.

3) 金属投与後の Zn 含量

対照群及び Pb, Cd, Zn 各投与群の 105000 g 上清 5 ml のゲル濾過パターンを, フラクシオン番号 20 から 28 の高分子量蛋白質部分 [I], フラクシオン番号 29 から 34 の分子量約 30000 部分 [II], 及び フラクシオン番号

35 から 40 の Zn-BP 部分 [III] に分け, それぞれに含まれる Zn 量を測定した結果を Table I に示した. Pb 投与では明らかに, [III] の Zn 含量の増加が認められ, 低分子量の Zn-BP の誘導が生じていることが示唆された. この増加した Zn 量は上清 5 ml 中に含まれる Zn 量の 38.3% を占め, Cd 投与によって生じた [III] の Zn 量の増加にほぼ匹敵した.

4) AcD による阻害実験

AcD 0.8 mg/kg を Pb 投与 4 時間前に投与すると, Fig. 3 に示すように分子量 30000 部分の Zn ピークはやや鈍いが, Zn-BP 部分の Zn ピークは Fig. 1 と異なって認められなかった. この事実は Pb による Zn-BP 部分の誘導が, AcD の前投与によってほぼ阻害されたこと

Fig. 3. Sephadex G-75 Chromatogram of Lead-treated Rat Liver Supernatant Fraction after Pretreatment with Actinomycin D

Animals were pretreated with actinomycin D (0.8 mg/kg) 4 h prior to the administration of $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, and sacrificed 18 h after the injection of $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. The supernatant was applied to a Sephadex G-75 column (1.9 × 90 cm), and eluted with 0.001 M Tris-HCl, pH 8.6, at a flow rate of 20 ml/h and 5 ml fractions were collected.

The arrow indicates the position of cytochrome c eluted.

—: Zn,: Pb.

を示唆する。

5) 紫外吸収スペクトル

Fig. 4 に示すように、Pb 投与による Zn-BP 部分のスペクトルは、既に認められている肝-MT¹⁰⁾ とよく似たスペクトルを示し、また 25 nmol の Zn を含有する 3 ml の Zn-BP に、90 nmol の Cd を添加すると 250 nm 付近の吸収増大が認められた。

6) 熱安定性についての実験

Pb 投与後得られた 105000 g 上清画分の 5 ml を、80°C 1 分間インキュベーションを行ったのち遠心し、沈殿を除きその上清を Sephadex G-75 でゲル濾過を行い、熱処理を行わなかった 105000 g 上清画分と比較したところ、熱処理したものは高分子量部分の Zn 含量が、熱処理を行わなかったものの 18.0 % を示し、一方、Zn-BP 部分では 93.2 % の Zn が残存していることが確かめられた。すなわち Zn-BP 部分の金属量の減少は著しく少なく耐熱性であることが示唆された。

考 察

MT が誘導されることについては、これまで Cd, Zn, Cu, Hg 等の重金属の処置^{4,5)}の他にストレスの影響¹¹⁻¹³⁾なども知られている。しかし、現在まで Pb が MT を誘導するか否かについては確証がない。Eaton ら¹⁴⁾は ²⁰³Hg を用いて MT の定量法を開発し、この定量法を応用して、Pb は MT を誘導するのではないかと示唆している。今回著者らが行った実験では、Pb は Zn のみを

Fig. 4. UV Absorption Spectra of Zn-BP

I: Pb induced Zn-BP fraction.

II: I (25 nmol Zn/3 ml Zn-BP fraction)+Cd(90 nmol).

含有する低分子量蛋白質 (Zn-BP) を誘導することが認められ、この Zn-BP の性質は、1) 標準蛋白質のゲル濾過パターンから分子量はほぼ 10000 であること、2) Cd を *in vitro* で添加することによって、置換された Zn と置換した Cd のモル比を Fig. 1 から計算すると Cd : Zn がほぼ 1 : 1.35 となること、3) MT 類似の吸収スペクトルを示すこと、4) AcD 処置で Pb による Zn-BP の誘導がほぼ阻止されること、すなわち、Cd-MT と同じく transcription レベルで制御⁴⁾されているらしいことが示され、また、5) 熱に安定であることなどが明らかとなった。以上の結果はこの Zn-BP が、Zn-MT であることを強く支持するものと考えられる。Suzuki と Yoshikawa⁷⁾ は $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ をラットに処置すると、ゲル濾過パターンで Cd 処置後に生じる Cd-MT とほぼ同位置に Zn のピークが生ずることを見出し、Pb が MT 様蛋白質を誘導すると報告しているが、詳細な生化学的性状は得られなかったため、Zn-MT と確認していない。この際 MT 様蛋白質中の Zn は、高分子量部分の Zn 量のほぼ 1/3 量と試算できるが、本実験で得られた Table I の結果との間に差が認められる。これは投与した Pb の化学形、投与量、及び屠殺までの時間等実験条件の差によるものと考えられる。

Winge ら¹⁰⁾ は投与金属と生じる MT 中に含まれる金属との関係において、Cd は [Cd, Zn] を、Cu は [Cu, Zn] を、Hg は [(Hg), Zn] を、Zn は [Zn] をという関係があることを明らかにしているが、本実験の結果から Pb は [Zn] という関係を持つことが示唆される。Table

I に示した如く Pb 投与時に増加する 105000 g 上清画分の[Zn 量は, [III] の Zn-Bp すなわち Zn-MT 部分に増加した Zn 量とほぼ一致しており, 金属投与は Zn 代謝に影響を及ぼすという志野木¹⁵⁾らの報告ともよく一致する。

MT の誘導機構については, 詳細は不明であるが, Zn が MT の誘導物質としての役割を果たしているのでは

ないかという仮説¹⁶⁾もあり, 今回の結果とあわせ考えると興味深い。しかし, 単に Pb のような重金属の投与が, 一種のストレス¹¹⁻¹³⁾として働いて, Zn-MT の誘導に関連するのかもしれない, 現在 Pb 誘導 Zn 含有蛋白質の性状とその誘導機構について, さらに詳細に検討している。

引用文献および注

- 1) 要旨の一部は第54回日本生化学大会で発表, 仙台, 1981年9月.
- 2) J.H.R. Kägi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3460 (1960).
- 3) K. Lerch, *Nature* (London), **284**, 368 (1980).
- 4) M. Webb, The metallothioneins In: "The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium." ed. by M. Webb, Elsevier/North-Holland Amsterdam, p. 195. (1979).
- 5) a) J.K. Piotrowski, B. Trojanowska, A. Sapota, *Arch. Toxicol.*, **32**, 351 (1974); b) D.R. Winge, R. Premakumar, R.D. Wiley, K.V. Rajagopalan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **170**, 253 (1975); c) R.M. Turkall, J.R. Bianchine, A.P. Leber, *Fed. Proc.*, **36**, 356 (1977); d) M.G. Cherian, R.A. Goyer, *Life Sci.*, **23**, 1 (1978).
- 6) M. Webb, *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 2751 (1972).
- 7) Y. Suzuki, H. Yoshikawa, *Ind. Health*, **14**, 25 (1976).
- 8) 有蘭幸司, 大石弘子, 有吉敏彦, 日本薬学会第101年会, 熊本, 1981年4月要旨集, p. 104.
- 9) T. Ariyoshi, E. Takabatake, H. Remmer, *Life Sci.*, **9**, Part II, 361 (1970).
- 10) D.R. Winge, R. Premakumar, K.V. Rajagopalan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **170**, 242 (1975).
- 11) I. Bremner, N.T. Davies, *Biochem. J.*, **149**, 733 (1975).
- 12) S.H. Oh, J.T. Deagen, P.D. Whager, P.H. Weswig, *Am. J. Physiol.*, **234**, E282 (1978).
- 13) P.Z. Sobocinski, W.J. Canterbury, Jr., C.A. Mapes, R.E. Dinterman, *Am. J. Physiol.*, **234**, E399 (1978).
- 14) D.L. Eaton, N.H. Stacey, King-Lit Wong, C.D. Klaassen, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **55**, 393 (1980).
- 15) 志野木正樹, 中澤三由紀, 福田佳代子, 森 五彦, 薬誌, **101**, 515 (1981).
- 16) F.A. Day, B.J. Coles, F.O. Brady, *Bioinorg. Chem.*, **8**, 93 (1978).