亜鉛投与ラットの膵臓メタロチオネインの精製

小野坂敏見, 三隅一彦, 梅本佳弘, 加藤智康

関 庚善, 福原千佳子, 田中慶一

神戸学院大学栄養学部

Purification of Pancreatic Metallothionein of Zinc-injected Rat

SATOMI ONOSAKA, KAZUHIKO MISUMI, YOSHIHIRO UMEMOTO,

TOSHIYASU KATO, KYONG-SON MIN,

CHIKAKO FUKUHARA and KEIICHI TANAKA

Faculty of Nutrition, Kobe-Gakuin University

Igawadani-cho, Tarumi-ku, Kobe

(Received July 24, 1982)

When a solution of zinc sulfate was injected to rat subcutaneously at a dose of 20 mg Zn/kg, the concentration of metallothionein in the pancreas reached the maximum value 36 h after the administration and then decreased with an apparent half-life of 30.9 h.

Therefore, Zn-thionein-I and -II were purified by use of gel filtration on Sephadex G-75 and DEAE-cellulose chromatography, from the pancreas of rat given with ten times of subcutaneous injection of a solution of Zinc sulfate at a dose of 20 mg/kg every 24 h. These samples were found to be homogeneous by disc electrophoresis. The results of their absorption spectra and amino acid analyses have the characteristics of Zn-thioneins.

From these results the synthesis of Zn-thioneins which resembles metallothionein in the liver was shown to be induced in the organs by the administration of Zn.

Keywords—zinc; pancreas; induction; metallothionein; zinc-thionein-I; zinc-thionein-II

緒 言

Metallothionein (以下 MT と略す) は Cd や Hg によって肝臓や腎臓で, その生合成が誘導されることはよく知られており, 重金属の毒性防禦の観点から多くの報告がなされている.^{1,2)} Zn によっても結合金属が Zn である MT の 1 種 Zn-thionein が誘導されることが見出されている.³⁾ Zn-thionein については Zn が生体にとって必須金属であるので, むしろ栄養学的な面での研究が進められてきた.⁴⁾ 最近 Zn を経口摂取したニワトリやウシの膵臓には肝臓や腎臓よりも高濃度に Zn-thionein が存在すると報告されている.^{5,6)} 著者ら⁷⁾ も Zn 投与ラットで同様の結果を得るとともに, Zn 欠乏食で飼育したラットに Cd を投与しても膵臓では MT が誘導されないことから, 膵臓は Zn の代謝に密接な関係を有していると推論された。

そこで, Zn を投与したラット臓器中の MT 濃度を定

量するとともに, 膵臓から Zn のみを結合金属とする Zn-thionein-I および -II を精製したので報告する。

実 験 方 法

1. 投与方法の影響 ウィスター系雄性ラット (体重 300—470 g) に経口および皮下投与の場合は硫酸亜鉛溶液を Zn として 20 mg Zn/ml/kg の用量で, 腹腔内注射の場合では 20 mg Zn/ml/kg の用量に耐え得ないので 7.5 mg Zn/ml/kg の用量で, いずれも 24 時間毎に 7 回投与して最終投与 24 時間後に肝臓および膵臓を摘出した。肝臓は各ラット毎に, 膵臓はプールしたものに 5 倍量の 0.25 M ショ糖溶液を加えてホモジナイズし, その 105000 × g 上清 3.5 ml を 1.4 × 47 cm の Sephadex G-75 カラムにかけ, 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で溶出し, 4.0 ml ずつ分取した。MT 量は MT 画分の Zn 量から算出した。

2. MT 量の経時変化 27 匹のウィスター系雄性ラ

ット (体重170—220 g) を1群3匹として9群にわけ、20 mg Zn/ml/kg の用量で硫酸亜鉛溶液を皮下注射し、0, 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72時間後に肝臓、腎臓、小腸 および 脾臓を摘出した。これらの臓器に5倍量の0.25 M ショ糖溶液を加えてホモジナイズし、105000×*g* 上清を得て、これを試料として先に報告したCd 飽和・ヘモリゼート処理法⁸⁾に準じてMT を定量した。

すなわち、臓器上清 0.5 ml に 30 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 1.9 ml, Cd 溶液 (10 ppm) 1.0 ml を加えた。この反応液にラットのヘモリゼート 0.2 ml を加え、1分間沸騰水浴中で加熱し、3000 rpm で5分間遠心分離して上清を得るヘモリゼート処理を3回繰り返したのち、その上清中のCd 量からMT 量を算出した。このとき、MT のタンパク部分であるthionein の分子量は6050, thionein 1モルあたり6モルの金属が結合すると仮定した。^{1,9)}

3. 脾臓 MT の精製 MT の精製にあたっては熱処理や有機溶媒による分画などのタンパク質の変性が予想される方法をやめ、最も緩和な方法で行った。すなわち、投与方法の影響や経時変化の結果を考慮して、20 mg Zn/ml/kg の用量で硫酸亜鉛溶液を24時間毎にウィスター系雌性ラット (体重300—470 g) に10回皮下注射した。最終投与24時間後に摘出した脾臓をプールし、その11.0 g に5倍量の0.25 M ショ糖溶液を加えてホモジナイズし、そのホモジネートを105000×*g* で1時間超遠心分離して上清を得た。これをSephadex G-75 カラムでゲル濾過し、そのMT 画分に3倍量の蒸留水を加えたのち、DEAE セルロースイオン交換クロマトグラフィーを行ってZn-thionein-I および -II 画分を得、各々凍結乾燥した。これに1.0 ml の30 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を加えて溶解し、2回目のSephadex G-75 カラムによるゲル濾過とDEAE セルロースイオン交換クロマトグラフィーを行い、Zn-thionein-I および -II を精製した。

1回目のSephadex G-75 によるゲル濾過は6.2×43.5 cm のカラムを用い、10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で溶出し、15.0 ml ずつ分取した。2回目は1.8×46 cm のカラムを用い、30 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で溶出し、4.0 ml ずつ分取した。DEAE セルロースイオン交換クロマトグラフィーは1.5×3.5 cm のカラムを用いて、10 mM から250 mM のTris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) のリニアグラジェントで溶出し、4.0 ml ずつ分取した。

4. ディスク電気泳動 14 µg のZn-thionein-I または18 µg のZn-thionein-II を用いて、7.5%のポリア

クリルアミドゲルでディスク電気泳動を行った。¹⁰⁾ 泳動終了後、Coomassie Brilliant Blue R-250 を用いて染色した。

5. 吸収スペクトル Zn-thionein-I は26.4 µg/ml, Zn-thionein-II は50.2 µg/ml に30 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で調製して、日立200—10型分光光度計で吸収スペクトルを測定した。また、Zn-thionein-I には3.40 µg Cd/ml, Zn-thionein-II には5.4 µg Cd/ml になるようにCd 溶液を添加して、その吸収スペクトルも測定した。

6. アミノ酸分析 2.7 mg のZn-thionein-I または3.0 mg のZn-thionein-II に塩酸を加えて減圧下で封管し、110°C で24時間加水分解後、柳本LC-8A型高速アミノ酸分析装置を用いて測定した。¹¹⁾ ただし、システイン量は過ギ酸を加えて氷冷下で4時間反応させてシステイン酸とし、110°C で18時間塩酸加水分解した後、アラニン量と比較して算出した。¹¹⁾

7. 金属の結合性 34.4 µg のZn-thionein-I またはZn-thionein-II を含む250 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に1000 ppm のHgCl₂ 溶液615 µl およびCuCl₂ 溶液200 µl を添加し、250 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を加えて全量1.0 ml とし、10分間放置後Sephadex G-25 カラムでゲル濾過した。1.0×26 cm のカラムを用い、250 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で溶出して2.0 ml ずつ分取し、Zn-thionein を含むvoid volume に溶出される画分のピークの試験管の金属量を比較した。同様に、1000 ppm のCuCl₂ 溶液200 µl とCdCl₂ 溶液342 µl を添加した場合、および1000 ppm のCd Cl₂ 溶液6.9 µl とZnCl₂ 溶液405 µl を添加した場合についても検討した。

8. 金属の測定 Zn, Cd およびCu は日立208型原子吸光度計を用いて直接噴霧法で、Hg は平沼Hg-1型水銀濃度計を用いて還元気化法で測定した。

結 果

1. 投与方法の影響

投与方法を変えて肝臓および脾臓中のMT 濃度を測定した (Table I)。

経口投与では肝臓および脾臓のMT 量は微量であった。一方、皮下注射では肝臓で1.10 mg/g, 脾臓で5.26 mg/g と高濃度の蓄積が見られた。腹腔内注射でも肝臓より脾臓の方が高い値を示した。

2. 経時変化の影響

Zn を1回皮下注射して4種の臓器中のMT の経時変化を検討した (Fig. 1)。

脾臓では投与3時間後にすでに有意に増加し (*p* <

TABLE I. Accumulation of Metallothionein by Different Routes

Route	Metallothionein (mg/g tissue)	
	Liver	Pancreas
Control	trace	nd ^{c)}
PO	0.06±0.02 ^{a)}	0.04 ^{d)}
SC	1.10±0.32 ^{a)}	5.26 ^{d)}
IP	1.43 ^{b)}	3.65 ^{e)}

a) Mean ± S.D. of 4 rats.

b) Mean of 2 rats.

c) Not detected.

d) Pooled sample of 4 rats.

e) Pooled sample of 2 rats.

PO: Peroral administration.

SC: Subcutaneous injection.

IP: Intraperitoneal injection.

Fig. 1. Time Course of Metallothionein Level in Tissues of Zn-injected Rat

—▼—: Pancreas. —○—: Liver.
—□—: Kidney. —△—: Small intestine.

0.01), 36 時間後に最大に達したのち, 見かけ上の半減期 30.9 時間で減少したが, 72 時間後でも 0 時間の 10 倍以上の値を示した. 肝臓では 18 時間後にピークに達し, 見かけ上の半減期は 26.9 時間, 腎臓では 24 時間後にピークに達し, 65.5 時間の見かけ上の半減期で減少した. また, 投与 3 時間以後はどの時点でも膵臓中の MT 濃度が他の 3 種の臓器中よりも高かった.

3. 膵臓 MT の精製

Zn 投与の場合, 高濃度の MT が膵臓に蓄積することを見出したので, 膵臓 MT の精製を試みた.

1 回目の Sephadex G-75 ゲル濾過によって (Fig. 2) 試験管番号 54—73 の MT 画分に 3 μg/ml 以上の高濃度

Fig. 2. Sephadex G-75 Gel Filtration of Supernatant of Pancreatic Homogenate of Zn-injected Rats

Fig. 3. DEAE Cellulose Chromatography of the Pancreatic Metallothionein Fraction from Gel Filtration

Fig. 4. Second Sephadex G-75 Gel Filtration of Pancreatic Metallothionein-I from DEAE Cellulose Chromatography

の Zn が溶出された. この画分に Cd および Cu は検出されず, 誘導された MT が Zn-thionein であることを確かめた. MT 画分の 1 回目の DEAE セルロースイオン交換クロマトグラフィー (Fig. 3) では試験管番号 5

Fig. 5. Rechromatography of Pancreatic Metallothionein-I from Second Gel Filtration on DEAE Cellulose

Fig. 7. Absorption Spectrum of Purified Pancreatic Metallothionein-I

Fig. 6. Polyacrylamide Disc Gel Electrophoresis of Purified Pancreatic Metallothionein. Zn-thionein-I (left) and Zn-thionein-II (right).

—9の Zn-thionein-I と 10—13 の Zn-thionein-II 画分の 2つの亜種の Zn-thionein に分離された。Zn-thionein-I 画分の 2回目の Sephadex G-75 ゲル濾過によって (Fig. 4) 試験管番号 19—21 に高濃度の Zn が溶出されたのでこの画分を集め、再度 DEAE セルロースイオン交換クロマトグラフィー (Fig. 5) を行い、Zn 濃度の高い試験管番号 7—10 を集めて 4.4 mg の精製 Zn-thionein-I を得た。Zn-thionein-II 画分についても同様にして 2回目の Sephadex G-75 カラムによるゲル濾過と DEAE セルロースイオン交換クロマトグラフィーを行って、10.9 mg の精製 Zn-thionein-II を得た。

TABLE II. Amino Acid Composition of Rat Pancreatic Metallothionein

	MT-I ^{a)}	MT-II ^{b)}
Asx	4.32 (4)	4.95 (5)
Thr	1.10 (1)	2.12 (2)
Ser	8.45 (8)	5.95 (6)
Glx	1.00 (1)	2.39 (2)
Pro	1.67 (2)	4.36 (4)
Gly	7.73 (8)	4.48 (4)
Ala	3.00 (3)	5.74 (6)
1/2 Cys ^{c)}	17.49 (17)	19.70 (20)
Vat	2.03 (2)	1.67 (2)
Met	1.08 (1)	1.33 (1)
Ile		1.00 (1)
Leu		0.05 (0)
Lys	9.98 (10)	6.61 (7)

a) Calculated on the basis of one residue of glutamine (or glutamic acid)/mol MT.

b) Calculated on the basis of one residue of isoleucine/mol MT.

c) Measured as cysteic acid.

Numbers in parentheses are the nearest integral numbers.

4. ディスク電気泳動

精製した標品が均一であることを確認するためにディスク電気泳動を行った (Fig. 6)。

Zn-thionein-I は移動度 0.43 の位置に、Zn-thionein-II は 0.58 の位置にいずれも単一のパンドとして認められた。この移動度は Cd を投与したラット肝臓 Cd-thionein-I または -II にほぼ一致していた。

5. 吸収スペクトル

MT は結合金属によって特徴のある吸収スペクトルを示すので、¹²⁾ この点について検討した (Fig. 7)。

Zn-thionein-I については、通常のタンパク質に見られる芳香族アミノ酸による 280 nm に極大吸収のない、

TABLE III. Competitive Binding of Zinc, Cadmium, Copper and Mercury to Pancreatic Metallothionein

Added metal				MT-I				MT-II			
Zn	Cd (nmol)	Cu	Hg	Zn	Cd (nmol)	Cu	Hg	Zn	Cd (nmol)	Cu	Hg
6200	62			3.7	15.3			4.3	13.2		
	3100	3100		0	0.7	15.0		0	0.7	16.0	
		3100	3100	0		0	25.3	0		0	15.5

Zn-thionein に特有の吸収スペクトルを示した. Cd を添加した場合は Zn と Cd が置換して Cd-thionein-I に変わるので, Cd とシステイン残基の結合による 250 nm 付近のショルダーが現われた. これらの結果は, 精製したものが Zn-thionein-I であることを示している. また Zn-thionein-II についても Zn-thionein-I と同様の吸収スペクトルを示した. なお Cd-thionein-I では $UV_{\lambda_{\text{shoulder}}^{\text{H}_2\text{O}(\text{pH } 8.0)}} \text{ nm } (\epsilon) : 250 (81000)$, Cd-thionein-II では $UV_{\lambda_{\text{shoulder}}^{\text{H}_2\text{O}(\text{pH } 8.0)}} \text{ nm } (\epsilon) : 250 (59700)$ であった.

6. アミノ酸分析

MT のアミノ酸組成はシステイン含量が高く, 芳香族アミノ酸を含まないことに特徴がある.¹²⁾ そこで Zn-thionein-I および -II のアミノ酸分析を行った (Table II).

Thionein 1.0 モルあたり Zn-thionein-I の場合はグルタミン酸を 1.0 モル, Zn-thionein-II の場合はイソロイシンを 1.0 モル含んでいるとして計算すると, Zn-thionein-I では 17 モルの, -II では 20 モルのシステイン残基を含むことになり, これは構成全アミノ酸の約 1/3 に相当する. 対照的に, 芳香族アミノ酸は見出せなかった.

以上の結果は精製した標品が Zn-thionein であることを明確に示しており, アミノ酸組成から最小分子量を計算すると thionein-I としては約 5600, -II としては約 6000 となった.

7. 金属との結合性

著者ら¹⁸⁾は先に MT を Cd で誘導した家兎肝臓上清を用いて MT の金属との結合性を比較したが, その場合, 肝臓上清中の MT 以外の成分の影響が推測される. そこで, 精製した Zn-thionein-I および -II を用いて金属の結合性を比較した (Table III).

精製した Zn-thionein を用いた場合は, I, II 型ともに Hg が Cu より強く, Cu が Cd より, Cd が Zn より強固に結合した. 従って, MT の金属との結合性は, $\text{Hg} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Zn}$ であると結論した. なお, Zn-thionein-I と -II では, その金属との結合性に著明な相違は

見出せなかった.

考 察

正常の成熟動物臓器中の MT は微量であるので, その結合金属は明らかではない. しかし, 胎児肝臓では高濃度の Zn-thionein が認められていること¹⁴⁾を考えると, その結合金属は生体にとって常成分である Zn であると推論される. それ故, Cd, (Zn)-thionein と同様に Zn-thionein についての研究も重要であると考えられる.

本研究では Zn-thionein を精製するに先だって Zn を投与し, 臓器中の MT 濃度を測定した. この結果, 皮下注射した場合の脾臓で最も高濃度で MT が蓄積することを認めた. 故に脾臓は Zn-thionein の精製に適した材料である. また, 経時変化の検討では脾臓の場合, ピークに達するまでの時間が肝臓より遅かった. Zn を経口投与したニワトリの Zn-thionein の半減期については脾臓, 肝臓および腎臓についてそれぞれ 2.3, 1.5 および 0.9 日と報告されており,⁹⁾ 本実験で得た 1.3, 1.1 および 2.7 日とは少し差が見られた. この原因は種差, 投与方法あるいは投与量の相違によると推定される.

脾臓 Zn-thionein の回収率は $105000 \times g$ 上清中の Zn-thionein 量を 100 % とすると Zn-thionein-I として 11.4 %, Zn-thionein-II として 28.4 % であり, 合計 39.8 % と良好であった. ディスク電気泳動, 吸収スペクトルおよびアミノ酸分析によって精製した標品が Zn-thionein であることを確認した. これらの検討では, これまでに報告されている MT との明確な相違は見出せなかった. このことは脾臓の Zn-thionein は肝臓の Cd-, Zn-thionein とよく似ていることを示唆している.

著者ら¹²⁾は先に MT を含む家兎肝臓上清を用いて MT と金属との結合性は $\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Hg} > \text{Zn}$ であると報告した. 精製 Zn-thionein を用いた検討では $\text{Hg} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Zn}$ であるとの異なった結果を得, ラット腎臓 Cd-, Zn-thionein による報告¹⁵⁾を支持した. 臓器中の MT の結合金属を Hg で飽和するには 350 μg 必要である¹⁶⁾のに対し, Cd では 10 μg で十分であった点⁸⁾を考慮す

ると、この相違の原因は臓器上清成分の共存下でも Cu や Cd は MT と選択的に結合することによって考えられる。

脾臓 Zn-thionein の生理的意義は明らかではないが、脾臓には Zn を含んでいるインシュリンが存在するので、今後 Zn-thionein とインシュリンや糖代謝との関連

についても検討したいと考えている。

謝辞 アミノ酸分析に御協力を賜った神戸学院大学栄養学部草野毅徳教授、池田清和講師に深く感謝致します。

引用文献および注

- 1) J.H.R. Kägi, M. Nordberg (eds.), "Metallothionein," *Experientia Supplementum* 34, Birkhauser Verlag, Basel, 1979.
- 2) E.C. Foulkes (ed.), "Biological Roles of Metallothionein," Elsevier North-Holland, New York, 1982.
- 3) M. Webb, *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 2751 (1972).
- 4) M.P. Richards, R.J. Cousins, *J. Nutr.*, **106**, 1591 (1976).
- 5) S.H. Oh, N. Nakae, J.T. Deagen, P.D. Whanger, G.H. Arscott, *J. Nutr.*, **109**, 1720 (1979).
- 6) P.D. Whanger, S.H. Oh, J.T. Deagen, *J. Nutr.*, **111**, 1207 (1981).
- 7) S. Onosaka, M.G. Cherian, *Toxicology*, **23**, 11 (1982).
- 8) 小野坂敏見, 田中慶一, 土井雅子, 岡原國男, 衛生化学, **24**, 128 (1978).
- 9) MT は 1 モルあたり 6—7 モルの金属を結合しているとされているが、ここでは前報 (引用文献 7) にしたがって 6 モルと仮定した。
- 10) 青木幸一郎, 中埜栄三, 大井優一, "電気泳動実験法," 第 5 版, 廣川, 東京, 1970, pp. 132—151.
- 11) 高橋礼子, "生化学実験講座 1, タンパク質の化学 II," 第 1 版, 日本生化学会編, 東京化学同人, 東京, 1976.
- 12) J.H.R. Kägi, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **236**, 2435 (1961).
- 13) 小野坂敏見, 田中慶一, 末田香里, 岡原國男, 衛生化学, **22**, 206 (1976).
- 14) I. Bremner, R.B. Williams, B.W. Young, *Br. J. Nutr.*, **38**, 87 (1977).
- 15) D. Holt, L. Magos, M. Webb, *Chem.-Biol. Interact.*, **32**, 125 (1980).
- 16) J.K. Piotrowski, W. Bolanowska, A. Sapota, *Acta Biochim. Polon.*, **20**, 270 (1973).