〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
30 (4) 183-188 (1984)

コイ (*Cyprinus carpio*) のえらと脾臓中のイソメタロチオネイン

鬼頭英明,^a 小瀬洋喜,^a 佐藤孝彦,^a 石川哲也,^b 永瀬久光^a

岐阜薬科大学環境衛生学教室,^a 岐阜女子短期大学^b

Isometallothioneins in Carp (*Cyprinus carpio*) Gills and Spleen

HIDEAKI KITO,^a YOUKI OSE,^a TAKAHIKO SATO,^a

TETSUYA ISHIKAWA,^b and HISAMITSU NAGASE^a

Gifu Pharmaceutical University, Department of Environmental

Hygiene,^a 6-1, Mitahora-higashi 5 chome, Gifu 502,

Japan and Gifu Women's Junior College,^b

Nagarafukumitsu, Gifu 502, Japan

(Received February 20, 1984)

The accumulation of metals in the several organs (hepato-pancreas, kidney, gills and spleen) of carp (*Cyprinus carpio*) was studied by two kinds of cadmium administration methods, namely, exposure to 5 mg Cd/l solution and intraperitoneal (*i.p.*) injection of 2 mg Cd/kg body wt. Cadmium concentrations in the kidneys accumulated by these two administration methods were highest among the organs, those in hepato-pancreas being next to the kidneys. Cadmium accumulation in hepato-pancreas and kidney was higher by the intraperitoneal injection than by the exposure. Zinc concentration was high in the spleen by the intraperitoneal injection, and that of copper was high in hepato-pancreas by the two administration methods. The cytosolic fractions obtained from carp hepato-pancreas, kidney, gills and spleen were further fractionated into high molecular fraction (HMF) and metallothionein (MT) fraction (MTF). The difference of concentrations of cadmium and zinc in the MTF and HMF by the two administration methods was studied. In the case of intraperitoneal injection, the cadmium concentration in the MTF was higher than that of the HMF in all organs. Compared with the control, the zinc concentration decreased in the MTF of hepato-pancreas, but increased in that of gills by both administration methods. The induction of metallothionein in gills and spleen by the injection of cadmium was recognized, and two types of isometallothionein were separated (MT-I, MT-II). The metal composition in gills MT-I and spleen MT-I was mainly cadmium. The molar ratio of cadmium, copper and zinc in gills MT-II was 48:2:1, and that of cadmium and zinc in spleen MT-II was 35.2:1.

Keywords — isometallothionein; carp; *Cyprinus carpio*; gills; spleen; intraperitoneal administration; exposure; cadmium

緒 言

魚におけるメタロチオネイン (以下 MT と略す) については, 1974 年 Copper rock fish¹⁾ で MT 様蛋白質がみいだされたのをはじめとして, ウナギ,²⁾ ヒラメ,³⁾ カツオ,⁴⁾ Staghorn sculpin,⁵⁾ フナ⁶⁾ などの肝臓中で, MT の存在が報告されている。著者らは前報⁷⁾ でコイ肝臓、腎臓、脾臓、えら、消化管における MT の存在

を確認するとともに, 肝臓と腎臓に対する臓器特異性について報告した。⁸⁾

えら MT については, 1975 年 Bouquegneau ら⁹⁾ がウナギの HgCl₂ 曝露により Hg 結合チオネインが増加したことを報告したのを始めとし, 著者らの他に, CdCl₂ 投与したウナギ,²⁾ ギンザケ¹⁰⁾ のえらにおける Cd 結合メタロチオネインの存在についての報告があり,

Reichert¹⁰⁾ は金属排泄との関係を示しているが、えら MT を精製分離したものはない。著者らは本報においてえら MT の分離を行ない 2 種の イソメタロチオネイン の存在を明らかにした。

脾臓 MT は、哺乳動物ではイヌ,¹¹⁾ ラット,¹²⁾ ウサギ¹³⁾ において Cd 結合蛋白質 または MT として、その存在が確認されているが、魚類の脾臓中の MT については著者ら以外に確認したものはない。本報では、脾臓に誘導された MT の分離を進め 2 種のイソメタロチオネインの存在を明らかにした。

実験方法

1. コイ (*Cyprinus carpio*) 体重約 700 g のコイを養魚場より購入し、3 日間、水道水にて馴化した後、実験に供した。

2. Cd 投与法の相違による臓器中の各金属濃度への影響 体重約 700 g のコイ 5 匹を 5 ppm Cd 溶液 (Cd Cl₂ を添加) で 72 時間飼育したのち、直ちに屠殺解剖した。これを曝露群と称する。別に、同様のコイ 5 匹に CdCl₂ を 2 mg Cd/kg body wt. 連続 3 日間腹腔内投与し、最終投与 24 時間後に屠殺解剖した。これを腹腔内投与群と称する。いずれから、肝臓、脾臓、腎臓、えらと脾臓を摘出し、-80℃ のフリーザーにて保存した。

3. MT の分離精製 前報⁸⁾ に準じて行なった。すなわち、コイ 20 匹に CdCl₂ を 2 mg Cd/kg body wt. 連続 3 日間腹腔内投与し、24 時間後に屠殺解剖した。脾臓とえらを摘出し、1.5 倍量の 0.01 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中、4℃ で Potter-Elvehjem 型 homogenizer によりホモゲナイズ後、日立 55P-2 型超高速冷却遠心機で 105000×g, 60 分間、4℃ にて超遠心分離を行なった。得られた上清を可溶性分画とし、これを Sephadex G-75 のカラムで分画し、MT 分画を得た。この分画を

DEAE Sephadex A-25 のカラムに吸着させ、0.01 M から 0.35 M の Tris-HCl 緩衝液、pH 7.4 による直線的濃度勾配により Cd ピークを 2 成分に分離した。得られた 2 成分をそれぞれ分取し、Bio gel P-10 を用いてゲル濾過を行ない精製した。

4. 分析方法

a) 各臓器の金属濃度——臓器約 2 g (湿重量) を精秤し、有害金属分析用の硝酸 40 ml を加えてホットプレート上で分解し、冷却したのち 30% 過酸化水素水 10 ml を添加し、ひきつづき分解を行なった。分解試料につき、Cd, Zn と Cu 量を原子吸光分析装置 (島津 AA-610S 型) により定量した。

b) ゲル濾過とイオン交換クロマトグラフィーによる各フラクションの分析——前報⁷⁾ に準じて行なった。すなわち、蛋白質については 254 nm と 280 nm の吸光度測定を行なった。金属分析は島津 AA-610S 型原子吸光分析装置を用い、直接噴霧方式により Cd, Cu と Zn について実施した。

結果及び考察

1. Cd 投与による各金属の臓器内濃度への影響

曝露群と腹腔内投与群の肝臓、脾臓、腎臓、えら及び脾臓における Cd, Zn と Cu の臓器内濃度を Fig. 1 に示す。

Cd 濃度は両群とも腎臓でもっとも高く、腹腔内投与群では、ついで肝臓に高かったが、曝露群では、他臓器間での差が認められなかった。両群間では、腹腔内投与群に高く、肝臓と腎臓への Cd 蓄積量にかなりの差を認めた。Zn 濃度は、腹腔内投与群では脾臓で高く、肝臓で低い値を示した。曝露群では脾臓での値が腹腔内投与群より低いが、肝臓、腎臓とえらでの Zn 濃度は腹腔内投与群とほぼ同様の値を示した。Cu 濃度は両群の各臓器間では差がみられず、肝臓でもっとも高い

Fig. 1, Distribution of Metals among Organs of Carp Exposed to 5 ppm Cd Solution or Injected Intraperitoneally (i. p.) with CdCl₂ (2 mg Cd/kg body wt.) for 3 d

H, K, S, and G indicate hepato-pancreas, kidney, spleen and gills, respectively. IP and EXP indicate injection and exposure, respectively. Each datum represents the mean±S.E. for five carps. (a) indicates the metal contents in the controls.

TABLE I. Distribution of Cd in Cytosolic Fractions of Several Organs on a Sephadex G-75 Column

		Hepato-pancreas	Kidney	Gills	Spleen
5 ppm Cd exposure	HMF	0.72	7.5	2.8	0.92
	MTF	7.9	5.6	1.8	3.0
Injection by <i>i. p.</i> (2 mg/kg)	HMF	86	5.9	2.5	0.64
	MTF	160	26	11	13

Five carps were exposed to 5 ppm Cd solution or injected intraperitoneally (*i. p.*) with CdCl₂ (2 mg Cd/kg body wt.) for 3 d. Organs of five carps were mixed.

Units: n mol/g wet wt, HMF: high molecular weight fraction, MTF: metallothionein fraction.

TABLE II. Distribution of Zn in Cytosolic Fractions of Several Organs on a Sephadex G-75 Column

		Hepato-pancreas	Kidney	Gills	Spleen
5 ppm Cd exposure	HMF	88	270	140	460
	MTF	13	12	6.7	15
Injection by <i>i. p.</i> (2 mg/kg)	HMF	78	410	76	620
	MTF	3.2	25	8.1	1.0
Control	HMF	83	300	200	360
	MTF	41	14	1.8	0.77

Five carps were exposed to 5 ppm Cd solution or injection intraperitoneally (*i. p.*) with CdCl₂ (2 mg Cd/kg body wt.) for 3 d. Organs of five carps were mixed.

Units: n mol/g wet wt, HMF: high molecular weight fraction, MTF: metallothionein fraction.

値を示した。

2. Cd 投与による Cd と Zn の可溶性分画での分布

曝露群と腹腔内投与群の各臓器可溶性分画中の Cd を, Sephadex G-75 によるゲル濾過で分画し, 高分子物質が溶出する分画を高分子分画 (HMF と略す, Fig. 2 ではフラクションナンバー 49 から 69), MT を含む分画をメタロチオネイン分画 (MTF と略す, Cytochrome C の溶出位置と一致する分画で Fig. 2 ではフラクションナンバー 91 から 111) として, Table I に示す。

養魚場にて捕獲後, 直ちに屠殺して得たコイの各臓器可溶性分画のゲル濾過により Cd は検出されなかった。

各臓器の HMF と MTF 中の Cd 量を比較すると, 腹腔内投与群では各臓器とも Cd 濃度は HMF よりも MTF に高く, とくに肝臓では濃度が 160 n mol/g 湿重量に達していた。腎臓の MTF では 26 n mol/g 湿重量であったが, えらと脾臓の MTF では腎臓の約 1/2 のレベルであった。

これに対し, 曝露群では肝臓と脾臓では MTF の方が高かったが, 腎臓とえらでは HMF の方が高かった。MTF 中の濃度は最も高い肝臓で 7.9 n mol/g 湿重量, 腎臓で 5.6 n mol/g 湿重量であり, えらで最も小さな値を示した。HMF と MTF の合計値では腹腔内投与

群では肝臓に最も高く, ついで腎臓であったが, 曝露群では腎臓に高かった。

曝露群, 腹腔内投与群及び対照群の各臓器可溶性分画中の HMF と MTF における Zn の濃度を Table II に示す。

Zn は対照群では HMF 中に高く, 脾臓, 腎臓, えら及び肝臓の順に低下し, MTF では肝臓に高く, ついで腎臓中に高かった。曝露群では MTF 中濃度は, 脾臓中で約 20 倍, えらで約 4 倍に増加したが, 肝臓と腎臓では減少し, Cd との置換が示唆された。腹腔内投与群では MTF 中濃度は肝臓でかなり減少したが, えらで約 4.5 倍に増加した。

2. MT の分離精製

i) えら えらの可溶性分画の Sephadex G-75 によるゲル濾過パターンを Fig. 2 に示す。

腹腔内投与群 (B) のフラクションナンバー 103 本目あたりに Cd のピークがみとめられ, この分画はほぼ等モルの Zn も含んでいた。対照群 (A) のえら可溶性分画では, この分画に Cd, Zn 及び Cu のピークは認められず, またこの溶出位置は Cytochrome C の溶出位置とほぼ一致することから MT を含む分画と推定された。この分画を集めて MT の分離を行なった。

Fig. 2. Sephadex G-75 (Column Size: 5×80 cm) Gel Filtration Profiles of Gills Cytosolic Fraction from Carp Non-Injected (Upper Panel) and Injected with CdCl_2 (2 mg Cd/kg body wt.) for 3 d (Lower Panel)

The sample volume was 50 ml. The column was eluted with 0.01 M Tris-HCl at pH 7.4. Each fraction was collected 10 ml. Cd —●—, Zn —○—, 254 nm —, 280 nm —·····.

えら MTF の DEAE Sephadex A-25 によるイオン交換クロマトグラフィーのパターンを Fig. 3 に示す。

フラクションナンバー 57 本目付近に Cd 濃度の高いピークがみとめられ、254 nm の吸収が高く、280 nm の吸収が低いことから MT を含む分画と認められた。フラクションナンバー 33 本目付近にも Cd の低いピークがあるが、254 nm, 280 nm の吸収よりの判定が困難なので、両分画をそれぞれ集め、Bio gel P-10 によりゲル濾過を行なった結果を Fig. 4 に示す。

Cd 濃度と 254 nm 吸収の高い分画が一致する単一ピークを、それぞれに分離したが、いずれも MT と認められたので Fig. 3 のフラクションナンバー 33 本目付近のものを MT-I, 57 本目付近のものを MT-II と称した。MT-I には 2.32 n mol の Cd が検出されたが、他の金属は検出限界以下であり、Cd のみを含む Cd-チオネインとして示された。

MT-II には Cd 8.04 n mol, Cu 0.63 n mol, Zn 0.31 n mol が検出されモル比にすると 48:2:1 となった。

Noël-Lambot ら²⁾ は、ウナギを 13 ppm Cd 溶液で 14 日間飼育した結果、Cd は肝臓とえらの可溶性分画に非

Fig. 3. DEAE Sephadex A-25 Chromatography (Column Size: 3×40 cm) of Pooled Metallothionein Fraction from Sephadex G-75 Chromatography of Carp Gills

Initial buffer was 0.01 M Tris-HCl and the concentration was elevated up to 0.35 M Tris-HCl at pH 7.4. Each fraction was collected 10 ml. Cd —●—, Zn —○—, Cu —·—, 254 nm —, 280 nm —·····.

Fig. 4. Bio Gel P-10 (Column Size: 2.6×93 cm) Gel Filtration Profiles of MT-I and MT-II Obtained by DEAE Sephadex A-25 Chromatography

The sample volume was 5 ml. The column was eluted with 0.01 M Tris-HCl at pH 7.4. Each fraction was collected 5 ml. Cd —●—, Zn —○—, Cu —·—, 254 nm —, 280 nm —·····.

Fig. 5. Sephadex G-75 (Column Size: 5×70 cm) Gel Filtration Profiles of Spleen Cytosolic Fraction from Carp Non-Injected (Upper Panel) and Injected with CdCl_2 (2 mg Cd/kg body wt.) for 3 d (Lower Panel)

The sample volume was 50 ml. The column was eluted with 0.01 M Tris-HCl at pH 7.4. Each fraction was collected 10 ml. Cd —●—, Zn —○—, Cu —·—, 254 nm —, 280 nm

常に多く蓄積し、Cdの大部分がMTFに見い出されたと報告している。また、これらのMTFではZnとCuは検出限界以下であり、UVの吸収もとくに認められなかったことから、これらのMTは肝臓MTと異なり、①少量のZn、Cuとしか結合しない、②これらの正常成分でなくCd曝露によりこれらの生合成されると推定している。

著者らは、Cd投与によりこれらの可溶性分画中のMTFにCdのピークを認め、これらのMTFをDEAE Sephadex A-25、Bio gel P-10で精製し、2種のイソメタロチオネインの存在を認めた。これらイソメタロチオネインは254 nmの吸収が高く、280 nmの吸収が低く、MT-IではCu、Znを含まず、MT-IIでもきわめて微量のCuとZnしか含んでいないなど、ウナギのメタロチオネインとの類似点が認められた。

ii) 脾臓 コイ脾臓の可溶性分画のSephadex G-75によるゲル濾過パターンをFig. 5に示す。

Cdはフラクションナンバー87本目付近にのみみとめられ、この分画には等モル程度のZnも含まれていた。対照群(A)のこの分画には、わずかにZnのピークがみとめられたが、CdとCuは検出されなかった。

Fig. 6. DEAE Sephadex A-25 Chromatography (Column Size: 3×40 cm) of Pooled Metallothionein fraction from Sephadex G-75 Chromatography of Carp Spleen

Initial buffer was 0.01 M Tris-HCl and the concentration was elevated up to 0.35 M Tris-HCl at pH 7.4. Each fraction was collected 10 ml. Cd —●—, Zn —○—, 254 nm —, 280 nm

この分画を集め、DEAE Sephadex A-25によるイオン交換クロマトグラフィーを行なった結果をFig. 6に示す。

Cd濃度の高い分画がフラクションナンバー33本目、57本目、69本目あたりの3ヵ所にみとめられた。第2と第3分画からは若干のZnが検出されたが、Cuは検出されなかった。第1と第2の分画は254 nmの吸収が高く、280 nmの吸収が低いことから、MTFと認められるが、第3の分画は280 nmの吸収がかなり高く、MTの性質とは一致しない。これらの分画をBio gel P10によるゲル濾過を行ない精製した。結果をFig. 7に示す。ただし、第3の分画は精製してもMTを得られなかったので略す。

Fig. 6のフラクションナンバー57本目付近の分画はさらに2つの分画にわかれ、Cd量と254 nmの吸収の一致した高いピーク、Cd量が低く254 nmと280 nmの吸収が一致するピークが認められ、MTの特性から前者をMT-IIとした。フラクションナンバー33本目付近の分画では、きわめて量が少ないためCdピークのみの確認となったがMT-Iとした。MT-IではCdは1.61 n mol、Znは検出されず、MT-IIではCdは8.84 n mol、Znは0.15 n molが検出され、モル比で35.2:1、Cuはいずれの場合も検出されなかった。

Amacherら¹¹⁾は、Cd処理動物の心臓血管系で高血圧などがみられることから、造血器官、免疫機構として重要な脾臓におけるCdの蓄積について検討し、カドミウム結合蛋白質の存在を認めた、小野坂¹⁴⁾らは、Cd投与

Fig. 7. Bio Gel P-10 (Column Size: 2.6×93 cm) Gel Filtration Profiles of MT-I and MT-II Obtained by DEAE Sephadex A-25 Chromatography

The sample volume was 5 ml. The column was eluted with 0.01 M Tris-HCl at pH 7.4. Each fraction was collected 5 ml. Cd —●—, Zn —○—, 254 nm —, 280 nm

ラット脾臓中からMTを定量し、その合成能は低いと報告した。鈴木ら¹²⁾は、高速液体クロマトグラフィーにより、Cd投与ラット脾臓から2種のイソMTを分離し、Cu量がきわめて低いことを認め、野見山ら¹³⁾は、Cd投与ウサギ脾臓から2種のイソMTを分離した。著者らは、コイ脾臓のMT誘導能を検討し、対照群のMTF中のZn濃度が脾臓0.77 n mol/g組織、えらで1.8 n mol/g組織であったものが、Cd腹腔内投与により組織1gあたりの脾臓MTFのCd量は13 n molで、えらの11

n molと同程度になったことから、脾臓MT誘導能はえらと類似することを認めた。

ま と め

1. 5 ppm Cd 曝露群と 2 mg CdCl₂/body wt. 腹腔内投与群の肝脾臓、腎臓、えらと脾臓でのCd、ZnとCuの蓄積量を検討し、Cdは腎臓に多く、Znは腹腔内投与群の脾臓に、またCuは肝脾臓に多いことを認めた。

2. 腹腔内投与群の各臓器MTFのCd量はHMFよりも高く、肝脾臓では濃度が160 n mol/g湿重量に達していた。ついで腎臓に高かった。曝露群では、Cd量は肝脾臓と脾臓でMTFの方が高く、腎臓とえらではHMFの方が高かった。MTF中濃度は最も高い肝脾臓で7.9 n mol/g湿重量であり、えらで最も小さな値を示した。Znは対照群ではHMF中に高く、各臓器MTF中Zn濃度は肝脾臓に高く、ついで腎臓に多かった。曝露群では、脾臓とえらで増加し、肝脾臓と腎臓で減少し、Cdとの置換が示唆された。腹腔内投与群において、MTF中Zn濃度は肝脾臓でかなり減少し、えらで増加した。

3. Cd投与のえらと脾臓において、MTFにCdのピークを認め、また対照群のえらでは、この分画にCd、CuとZnのピークを認めず、脾臓においても微量のZnが認められただけであったことから、これらの臓器でのMT誘導と認めた。

4. えら及び脾臓MTの分離精製の結果、それぞれDEAE Sephadex A-25 カラム及び Bio gel P-10 カラムにより2成分のイソMTを認めた。

えらMT-Iと脾臓MT-IはCdのみを含むCd-チオネイン、えらMT-IIではCd:Cu:Znが48:2:1、脾臓MT-IIではCd:Znが35.2:1のモル比で含むCd、Cu、Zn-及びCd、Zn-チオネインであった。

引 用 文 献

- 1) R.W. Olafson, J.A.J. Thompson, *Mar. Biol.*, **28**, 83 (1974).
- 2) F. Noël-Lambot, Ch. Gerday, A. Disteche, *Comp. Biochem. Physiol.*, **61C**, 177 (1978).
- 3) J. Overnell, T.L. Coombs, *Biochem. J.*, **183**, 277 (1979).
- 4) H. Takeda, C. Shimizu, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 717 (1982).
- 5) J.W. Ridlington, D.C. Chapman, D.E. Goeger, P.D. Whanger, *Comp. Biochem. Physiol.*, **70B**, 93 (1981).
- 6) 山村 充, 鈴木和夫, 衛生化学, **29**, 100 (1983).
- 7) H. Kito, T. Tazawa, Y. Ose, T. Sato, T. Ishikawa, *Comp. Biochem. Physiol.*, **73C**, 129 (1982).
- 8) H. Kito, Y. Ose, K. Hayashi, S. Yonezawa, T. Sato, T. Ishikawa, H. Nagase, *Eiseikagaku*, **30**, 119 (1984).
- 9) J.M. Bougueneau, Ch. Gerday, A. Disteche, *FEBS Lett.*, **55**, 173 (1975).
- 10) W.L. Reichert, D.A. Federighi, D.C. Malins, *Comp. Biochem. Physiol.*, **63C**, 224 (1979).
- 11) D.E. Amacher, K.L. Ewing, *Arch. Environ. Health*, **30**, 510 (1975).
- 12) K.T. Suzuki, T. Motomura, Y. Tsuchiya, M. Yamamura, *Anal. Biochem.*, **107**, 75 (1980).
- 13) K. Nomiya, H. Nomiya, "Biological Roles of Metallothionein" 9, ed. by E.C. Foulkes, Elsevier North-Holland, New York, 1981, p. 47.
- 14) S. Onosaka, M.G. Cherian, *Toxicology*, **22**, 91 (1981).