エンドトキシンによるラット肝内 iso-メタロチオネインの誘導

長井昭宏・高橋 徹・多賀直行・日高秀邦・
原田圭子・板野義太郎・平川方久*

rapid communication

Induction of hepatic metallothioneins determined at isopro-
tein level in endotoxin-treated rats

In order to clarify the induction of hepatic metallothioneins (MTs) as an acute phase reactant by endotoxin (lipopolysaccharide; LPS) shock further, induction of MT-I and MT-II by LPS was determined by high-performance liquid chromatography coupled with atomic absorption spectrophotometry. Rats were injected with LPS (5 mg/kg) and the hepatic concentrations of Zn-MT-I and Zn-MT-II were determined at 0, 3, 6, 12, 18, and 24 hours after the injection. Time-course experiments showed that MT-II predominantly accumulated in comparison to MT-I. The MT-II increased rapidly at 6 hours after the injection, reached the maximum at 18 hours and then decreased gradually. All of these values were significantly different from those values of MT-I. These results suggest that MT-II may play some role in acute phase response during endotoxin shock.

Akihiro Nagai・Toru Takahashi・Naoyuki Taga・

Hidekuni Hidaka・Keiko Harada・

Yoshitaro Itano・Masahisa Hirakawa*

key words: endotoxin, iso-metalllothioneins, zinc

metallothionein(MT)は、分子量約 6,100 の蛋白質で、約61個のアミノ酸残基のうち20個がシステインであり、芳香族アミノ酸やヒスチジンを含まないという特異なアミノ酸組成を有している¹⁾。また、重金属に高い親和性を示し、亜鉛チオネイン(Zn-thionein)としては、通常 1 分子中に 7 個の亜鉛原子を含んでいる¹⁾。また、ラットでは少なくとも MT-I, MT-II の 2 種の isoforms(iso-MTs)が存在する¹⁾。重金属やグルココルチコイドは、MT の primary inducer である¹⁾。一方, *in vivo* では、エンドトキシン(lipopolysaccharide, LPS)投与、熱傷、放射線照射などのストレスによっても肝内に MT が合成される^{1,2)}。

MT の生理学的役割としては、従来より、重金

属の解毒、必須微量元素の代謝が報告されてきたが¹⁾、1985年、free radical scavenger 作用を有することが報告されている³⁾。

筆者らは、MT が生体防御に果たす役割に注目し、LPS 投与時の急性期反応としての肝臓における iso-MTs の誘導を、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)と原子吸光分光光度計(AAS)を組み合わせた Klaassen ら⁴⁾の方法を用いて測定し検討したので報告する。

方 法

Wistar 系雄性ラット(7 週齢)に LPS(E. coli 0127:B8, Difco Lab.) 5 mg/kg 体重を腹腔内投与した。投与 0, 3, 6, 12, 18, 24 時間後に断頭し、肝臓を摘出、窒素ガスで充填した 1 mM dithiothreitol を含む 10 mM Tris HCl pH 7.4 を、2 倍容加えて破砕し、12,000×g にて30分間遠心分離し、上清をさらに、100,000×g にて60分間遠心分離し、細胞質可溶性画分を得た。これを 100°C 1 分間熱処理し、15,000×g, 3 分間遠心分離したのち上清を濾過して試料とした。試料 200 μ l を anion-exchange column(DEAE-5PW, 75×7.5 mm; 東ソー)を組み込んだ HPLC 装置に添加し、移動相 A: 10 mM Tris HCl pH 7.4, B: 200 mM Tris HCl pH 7.4, 直線勾配 0~100 % B/12 min, 流速 1 ml/min で溶出した。溶出液の亜鉛濃度を HPLC に直接連結した AAS にて測定し、MT ピークの亜鉛量を肝湿重量当りに換算し、Zn-thionein isoroforms を定量した。

これとは別に、ラットに亜鉛を投与し、肝細胞質可溶性画分を Sephadex G-75, DEAE Sephadex A-25 を用いて、MT-I および MT-II を精製し、標準品として用いた。

結 果

LPS 投与ラット肝の、MT-I, MT-II のピークの保持時間は、6.3分、9.8分であり、標準品の iso-MTs の保持時間と一致していた(図 1)。MT-I は、経時的に増加傾向を示し、12~18 時間後に低いプラトーに達した。MT-II は、3 時間後より増加傾向がみられ、6 時間から 24 時間まで有意に増加した。18 時間では 0 時間の約 25 倍に達し、24 時間でやや減少した。全経過を通じて、MT-II が MT-I にくらべて常に量的に優位な iso-MT

* Department of Anesthesiology and Resuscitology,
Okayama University Medical School 岡山大学医学
部麻酔・蘇生学教室

であった(図2)。

考 察

人や動物における血清亜鉛は、正常ときわめて一定に保たれているが、感染症では急激に減少する。Sobocinski ら²⁾は、ラット腹腔に細菌を投与すると、血清亜鉛の低下、肝内亜鉛の増加がみられ、このとき肝内に Zn-thionein が誘導されることを報告した。筆者らもラットに LPS を投与し、同様の結果を得ている⁵⁾。

今回、LPS による MT 誘導をさらに明らかにするために、iso-MTs の誘導について経時的な検討を行った。LPS を投与したラットの MT-II は、MT-I に対して経過中のあらゆる時間において圧倒的に優位な iso-MT であった。

Klaassen ら⁶⁾は、ラットに亜鉛を投与し、本法を用いて MT-isoform の誘導について検討した。その結果、亜鉛投与の場合は LPS 投与ほどではないが、MT-II が比較的優位に誘導されることを報告し、MT-II の半減期が MT-I よりながいことをその主な原因としている。したがって、MT-I は MT-II よりも速く turn over する蛋白であり、MT-II は MT-I にくらべてより安定な isoform であると思われる。

一方、今回の実験で筆者らは、Zn-thionein を定量した。Winge ら⁷⁾は、MT-II が MT-I にくらべて亜鉛により親和性が高いことを報告している。

また、Klaassen ら⁸⁾はデキサメサゾン投与ラットの肝内 MT-isoform 誘導についても検討し、全経過を通じて MT-II が MT-I に対して圧倒的に優位な iso-MT であることを報告している。さらに、肝切除後には、肝内に MT-II が優位に誘導されることが報告されている⁹⁾。

LPS 投与のようなストレス下では、副腎皮質よりグルコルチコイドの分泌が増加するので、血中に増加したグルコルチコイドが MT 誘導に係わっていると考えられる。さらに LPS 投与では、LPS 刺激マクロファージなどから遊離したインターロイキンなどのサイトカインも MT 誘導に係わっていると考えられる¹⁰⁾。

今回、LPS 投与によって MT-II が MT-I にくらべて圧倒的に優位に誘導された理由は明らかではない。しかし、MT-II がより安定な isoform

図1 Chromatographic properties of MTs as determined by HPLC-AAS

図2 Time course for induction of hepatic iso-MTs following LPS administration

であること、MT-II が亜鉛に親和性が高いこと以外に、LPS 投与という侵襲によって血中に増加するグルコルチコイドやサイトカインのような物質が、MT-II の誘導、安定化に寄与している可能性も考えられる。一方、MT-I と MT-II の作用の差異については、いまだ不明である。しかし、今回の結果より LPS 投与による急性期反応においては、MT-II がなんらかの役割を果た

していると思われる。

本稿の要旨は、第11回日本炎症学会(於東京)において報告した。

文 献

- 1) Hamer, D.H.: Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 913-951, 1986.
- 2) Sobocinski, P.Z., Canterbury, W.J., Mapes, C.A., Dinterman, R.E.: Involvement of hepatic metallothionein in hypozincemia associated with bacterial infection. *Am. J. Physiol.* 1234: E339-E406, 1978.
- 3) Thornalley, P.J., Vasak, M.: Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress; Kinetic and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta* 827: 36-44, 1985.
- 4) Lehman, L.D., Klaassen, C.D.: Separation and quantitation of metallothionein by high-performance liquid chromatography coupled with atomic absorption spectrophotometry. *Anal. Biochem.* 153: 305-314, 1986.
- 5) Abe, S., Matsumi, M., Tsukioki, M., Mizukawa, S., Takahashi, T., Iijima, Y., Itano, Y., Kosaka, F.: Metallothionein and zinc metabolism in endotoxin shock rats. *Metallothionein-II*. (ed. Kagi, J.H.R., Kojima, Y.), Birkhauser Verlag, Basel, 1987, p587-594.
- 6) Lehman-McKeeman, L.D., Andrews, G.K., Klaassen, C.D.: Mechanism of regulation of rat hepatic metallothionein-I and metallothionein-II levels following administration of zinc. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 92: 1-9, 1988.
- 7) Winge, D.R., Miklossy, K.A.: Differences in the polymorphic forms of metallothionein. *Arch. Biochem. Biophys.* 214: 80-88, 1982.
- 8) Lehman-McKeeman, L.D., Andrews, G.K., Klaassen, C.D.: Induction of hepatic metallothioneins determined at isoprotein and messenger RNA levels in glucocorticoid-treated rats. *Biochem. J.* 249: 429-433, 1988.
- 9) Cain, K., Griffiths, B.L.: A comparison of iso-metallothionein synthesis in rat liver after partial hepatectomy and parental zinc injection. *Biochem. J.* 217: 85-92, 1984.
- 10) Karin, M., Imbra, R.J., Heguy, A., Wong, G.: Interleukin 1 regulates human metallothionein gene expression. *Mol. Cell Biol.* 5: 2866-2869, 1985.

*

*

*