原 著

カドミウム投与により誘導されたウサギ骨髓内の メタロチオネイン様蛋白質について

田 村 幸 彦 大 谷 啓 一

東京医科歯科大学歯学部歯科薬理学教室（主任：大谷啓一教授）

(1995 年 6 月 30 日 受付)

Study on Cadmium-Induced Metallothionein-Like Protein in Bone Marrow of Rabbit

Yukihiko Tamura and Keiichi Ohya

Department of Dental Pharmacology, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University
(Chief : Prof. Keiichi Ohya)

It has been recognized that metallothionein (MT) is a low molecular-weight protein and can be induced by heavy metals in several organs. Most studies on MT focus on the liver and kidney, and little is known about MT in the bone marrow. In the present study, the characterization of the MT-like protein in bone marrow of rabbits was investigated after the injection of CdCl₂. A dose of 8×10^{-5} mol/kg CdCl₂ was injected subcutaneously into Japanese White Rabbits (male, 3.5kg) for five days. Twenty-four hours after the last CdCl₂ injection, the bone marrow, liver and kidney were removed immediately and frozen. The fractions of metal-binding protein were obtained by gel filtration (Sephadex G-75) of cytosol from the tissues of Cd-treated rabbit. They were heat-stable and low molecular-weight (under 10 kDa) proteins. They had high absorption at 250 nm. These observations suggest that the injection of CdCl₂ induced MT-like protein in bone marrow.

I. 緒 言

従来から重金属の一つであるカドミウムは、生体に対して腎臓障害、高血圧症、貧血、生殖細胞への選択的毒性を示すことが知られている¹⁾。特に、富山県神通川流域に発生したイタイイタイ病は、カドミウムが骨組織に障害を起こし骨折を生じるため ache-ache disease という名前で世界的に知られている。吉木らは²⁾カドミウムが腎臓障害を生じる以前に、直接骨に対して為害作用を生じることを報告し、宮原らはカドミウムが骨芽細胞の機能を抑制する作用³⁾と破骨細胞数を増加させる現象⁴⁾を示した。さらに鈴木らは⁵⁾カドミウムが骨芽細胞において cyclooxygenase を介し prostaglandin E₂ 合成系を促進して、骨障害を引き起こすことを明らかにした。骨髓は、骨芽細胞と破骨細胞の前駆細胞に富み、骨形成や骨吸収と密接な関係をもつ組織である。今回われわれは、塩化カドミウムをウサギの背部に皮下注射することにより、骨髓内に重金属の解毒機能を有することが知られている、メタロチオネイン (metallothionein) 様蛋白質の誘導に関する知見を得たの

胞の機能を抑制する作用³⁾と破骨細胞数を増加させる現象⁴⁾を示した。さらに鈴木らは⁵⁾カドミウムが骨芽細胞において cyclooxygenase を介し prostaglandin E₂ 合成系を促進して、骨障害を引き起こすことを明らかにした。骨髓は、骨芽細胞と破骨細胞の前駆細胞に富み、骨形成や骨吸収と密接な関係をもつ組織である。今回われわれは、塩化カドミウムをウサギの背部に皮下注射することにより、骨髓内に重金属の解毒機能を有することが知られている、メタロチオネイン (metallothionein) 様蛋白質の誘導に関する知見を得たの

で、これを報告する。

II. 材料および方法

1. 動物実験

実験動物は平均体重 3.5 kg の雄性日本白色ウサギ（金丸実験動物）6羽を使用した。予備飼育後2群に分け、実験群には CdCl_2 ($8 \times 10^{-5} \text{ mol/kg}$) を1日1回、連続5日間背部皮下注射し、対照群には同容量の 0.9% NaCl を投与した。注射24時間後に pentobarbital 30 mg/kg を静脈内注射後屠殺し、ただちに肝臓、腎臓および脛骨骨髓を摘出し、 -80°C にて測定まで凍結保存した。

2. 試料の調製

それぞれの摘出組織に湿重量の5倍量の 0.25 M sucrose 液 (2 mM dithiothreitol 含有) を加えて希釈し、氷冷下のブレンダー (Polytron-Aggregate, KINEMATICA) にて磨砕した。このホモジネートを $10,000 \times g$, 10 分間遠心し、上清をさらに $100,000 \times g$, 60 分間遠心を行い、細胞可溶性分画を調製した。次にこの試料を 80°C にて5分間熱処理後、 $3,000 \times g$, 10 分間遠心し、この上清を 0.2 M Tris-HCl (pH 7.4) で平衡化された Sephadex G-75 ($2.6 \times 90 \text{ cm}$) に添加し、Oh, S.H. ら⁶⁾の方法により分離した。ゲルろ過の各試料濃度は、bovine plasma gamma globulin をスタンダードとし、Bradford の色素結合法⁷⁾ (Protein Assay Kit, BIO-RAD) により蛋白質量を測定して一定にした。ゲルろ過の分子量マーカーとして albumin (M.W. 66,000), carbonic anhydrase (M.W. 29,000), cytochrome C (M.W. 12,400), aprotinin (M.W. 6,500) を用い、溶出液はろ過流速を 25 ml/hr として、 5 ml ずつフラクションコレクター (REDIRAC 2112, LKB) にて分取した。

3. 試料の分析

分離された各フラクション 5 ml 中のカドミウム濃度は、フレイム原子吸光法で原子吸光分析装置 (model 5100 PC, PERKIN-ELMER) により測定した。254 nm と 280 nm における吸光度を肝臓と骨髓は3倍、腎臓は5倍に 0.2 M Tris-HCl (pH 7.4) で希釈後、分光光度計 (UVIDEC-77,

図1 ゲルろ過クロマトグラフィーのカドミウム濃度分布

A: 肝臓, B: 腎臓, C: 骨髓

1 fraction: 5 ml , column: Sephadex G-75, $2.6 \times 90 \text{ cm}$

矢印はメタロチオネイン様蛋白質のフラクションを示す。

●-●: CdCl_2 投与群, ○-○: 0.9% NaCl 投与群

日本分光工業) にて測定した。

また骨髓内のカドミウムと結合した蛋白質の紫外外部吸収スペクトルを分光光度計 (DU-64 Spectrophotometer, BECKMAN) により測定し albumin (bovine, 3 mg/ml) と比較した。

III. 結 果

図 1 はカドミウム投与後のウサギの肝臓, 腎臓, 骨髓の各ホモジネート液を 80℃ にて 5 分間熱処理後遠心し, この上清をゲルろ過クロマトグラフィーした結果を示す。各組織ともフラクションナンバー 37 から 42 に, カドミウムの主要なピークが認められた。これは分子量マーカーから, 分子量約 10,000 の蛋白質であることが推測される。一方, 対照群の 0.9%NaCl 投与群では, カドミウムのピークは認められなかった。

図 2 はカドミウム投与後のウサギの肝臓, 腎臓, 骨髓の各ホモジネート液のゲルろ過クロマトグラフィー画分の吸光度分布を示す。280 nm では void volume 近くの分子量 66,000 前後のピークと 6,500 以下の低分子領域にピークが認められた。254 nm では 280 nm でのピークにほぼ一致した 2 つのピーク以外に, 図 1 のカドミウムのピークに一致したフラクションナンバー 37 から 42 にもピークが認められた。

6 羽のウサギについて各組織の上清分画をゲルろ過した結果, カドミウム濃度と吸光度に多少の差はあったが, 全体的な分布パターンには, ほとんど差が認められなかった。

カドミウム投与ウサギの骨髓内に誘導されたカドミウム結合蛋白質の紫外外部吸収曲線を調べると, 250 nm 領域付近に肩を示す吸収帯が出現した (図 3)。このようなカドミウム結合蛋白質の吸収曲線は, 280 nm 付近に吸収ピークをもつ albumin の吸収曲線と全く異なっていた。

IV. 考 察

メタロチオネインは 1957 年に Vallee ら⁸⁾により馬の腎皮質から発見されて以来, 肝臓や腎臓を中心に脾臓, 脾臓, 脳など数多くの組織に誘導さ

図 2 カドミウム投与ウサギのゲルろ過クロマトグラフィーの吸光度分布

A: 肝臓, B: 腎臓, C: 骨髓

1 fraction: 5 ml, column: Sephadex G-75, 2.6×90 cm

矢印はメタロチオネイン様蛋白質のフラクションを示す。

●-●: 254 nm, ○-○: 280 nm

図3 紫外外部吸収スペクトル
A: アルブミン, B: 骨髄内メタロチオネイン様蛋白質

れることが報告されている。この蛋白質は、芳香族アミノ酸やヒスチジンを含まず、システインを多量に含む特有なアミノ酸組成をもつ、分子量10,000以下の低分子量金属結合蛋白質である⁹⁾。現在までにこのメタロチオネインは、金属(亜鉛・カドミウム・水銀など)投与やエックス線照射や寒冷などの種々のストレスにより誘導されることが知られている⁶⁾が、特にカドミウムはメタロチオネインの誘導能が高く、メタロチオネインの研究によく利用されている。

一般に生体に投与された多くの金属は肝臓、腎臓、骨などに集まりやすく、この蓄積部位は金属化合物の化学形態、投与経路、動物の種差、投与後の時間経過により変化する。周期律表II b族の重金属であるカドミウムは、主に肝臓と腎臓に蓄積し、骨に対する有害作用が知られており、骨軟化症や骨粗鬆症を生じることが明らかにされている^{2,10,11)}。

本実験でカドミウム注射後誘導された、骨髄内のカドミウム結合蛋白質は、0.9%NaCl投与の対照群には認められず、カドミウムの連続投与により新たに誘導された蛋白質であった。またこの蛋白質は熱安定性の分子量10,000前後の低分子量で、金属に対し結合能を有しており、紫外部の250

nm領域に吸収帯をもつ光学的な特徴を有していた。メタロチオネインは熱安定性の蛋白質であり、分子量も10,000前後で、カドミウムと結合したチオネインは250 nm領域の波長に特有の吸収を示す¹²⁾ことから、これらの蛋白質はメタロチオネイン様蛋白質であると思われる。

メタロチオネインは原始的生物からヒトにいたるまで、広く生物界に存在し、遺伝的に引き継がれてきた細胞内蛋白質である。この生理的機能については、重金属の解毒や生体内の亜鉛などの金属代謝調節(吸収・輸送・貯蔵・恒常性の維持)やフリーラジカル除去(酸素・水酸基ラジカル)などの役割が報告され、多機能蛋白質として生体内で種々の反応に関与していることが知られている⁹⁾。カドミウム投与後、睾丸のようにメタロチオネインの誘導されない組織ではtoxicな作用が強く出ることから、本実験で認められた骨髄内のメタロチオネイン様蛋白質は、カドミウム投与により生じるtoxicな作用を軽減することを目的として誘導されたものと思われる。緒言でも述べたように、カドミウムは破骨細胞数の増加⁴⁾や骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)の石灰化抑制³⁾など骨組織に障害を及ぼす作用を有することが知られており、その作用はカドミウムが直接骨組織に異常を

起こした結果生じると考えられている。今回認められたカドミウム投与後の骨髓内のメタロチオネイン様蛋白質は、このようなカドミウムの骨への作用を緩和するために誘導された可能性も考えられる。しかし、その生理的意義に関しては今後の研究がさらに必要であろう。

1993 年著者は、塩化カドミウム ($4 \times 10^{-5} \text{mol/kg}$) をラットに連続皮下投与すると、切歯歯髓内にメタロチオネイン様蛋白質が誘導されることを報告し¹³⁾、メタロチオネイン様蛋白質が、肝臓、腎臓などの主要組織以外に代謝回転の活発な間葉系組織の歯髓においても誘導されることを示した。歯髓は周囲を硬組織で囲まれ、象牙質の形成に関与することなどから、今回の実験でメタロチオネインの誘導が確認された骨髓と類似する点が多い組織である。骨髓は造血組織の一つであるが、骨芽細胞の前駆細胞と考えられている未分化間葉系細胞 (stromal stem cell) と、破骨細胞の前駆細胞と思われる血液幹細胞 (hematopoietic stem cell) を含むことから、骨形成と骨吸収により行われる骨代謝機能に密接にかかわっていることが知られており、薬物投与により、骨髓内に異所性石灰化組織の誘導現象も報告されている¹⁴⁾。したがって歯髓と骨髓は石灰化組織の形成への関与という点ではほぼ同様の機能を有しており、カドミウム投与により両組織にメタロチオネインが誘導されることは、大変興味深い現象であると思われる。

ところで、現在メタロチオネインのなかで金属がどのように結合しているのかまだ正確に解明されていないが、分光学的な情報からメタロチオネイン中の金属の配位状態が推測されている。それによると、メタロチオネインから金属のはずれた状態のチオネイン自身は、200 nm 以上の波長領域に吸収帯をもたないが、チオネインに亜鉛が配位すると 215 nm 付近に吸収帯が現れる。またカドミウムが配位すると 250 nm 付近に吸収帯が現れ、これらの金属を取り除くとこのショルダーが消えることが知られている¹⁵⁾。カドミウムがチオネインに配位すると 250 nm 付近に吸収帯が現れ

るこの現象は、カドミウムとメルカプチドが結合した結果であると報告されている¹²⁾。本実験では図 3 に示されるように、対照の蛋白質である albumin は、チロシンとトリプトファン存在により 280 nm 領域に紫外部の吸収極大を示したが¹⁶⁾、骨髓内に誘導されたカドミウム結合蛋白質は、280 nm 領域に吸収極大を示さず 250 nm 領域に吸収帯が現れた。したがって骨髓内に誘導されたメタロチオネイン様蛋白質は、芳香族のトリプトファンに欠け、カドミウムがメルカプチドに結合したカドミウムチオネインであることが示唆された。

V. 結 語

ウサギに塩化カドミウム ($8 \times 10^{-5} \text{mol/kg}$) を連続皮下投与することにより、肝臓や腎臓と同様に骨髓内においても、金属結合能をもつ熱安定性のメタロチオネイン様蛋白質が誘導合成されることが示唆された。この蛋白質はカドミウムの骨への作用を軽減する目的で誘導されると思われるが、その生理的意義に関しては今後の検討が必要である。

本論文の要旨の一部は、第 67 回日本薬理学会年会 (京都) にて発表した。

文 献

- 1) Friberg, L., Nordberg, G.F. and Vouk, V.B. : Handbook on the Toxicology of Metals. vol II (Specific Metals) Amsterdam, 1986, Elsevier, 130-175.
- 2) Yoshiki, S., Yanagisawa, T., Kimura, M., Otaki, N., Suzuki, M. and Suda, T. : Bone and kidney lesions in experimental cadmium intoxication. Arch Environ. Health. 30 : 559-562, 1975.
- 3) Miyahara, T., Yamada, H., Takeuchi, M., Kozuka, H., Kato, T. and Sudo, H. : Inhibitory effects of cadmium on *in vitro* calcification of a clonal osteogenic cell, MC3T3-E1. Toxicol. Appl. Pharmacol. 96 : 52-59, 1988.
- 4) Miyahara, T., Takata, M., Miyata, M., Nagai, M., Sugure, A., Kozuka, H. and Kuze, S. : Cadmium stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in mouse bone marrow cell cultures. Bull. Environ. Contam. Toxicol.

- 47 : 283-287, 1991.
- 5) Suzuki, Y., Morita, I., Yamane, Y. and Murota, S. : Cadmium stimulates prostaglandin E₂ production and bone resorption in cultured fetal mouse calvaria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158 : 508-513, 1989.
 - 6) Oh, S. H., Deagen, J. T., Whanger, P. D. and Weswig, P. H. : Biological function of metallothionein. V. Its induction in rats by various stresses. *Amer. J. Physiol.* 234 : E282-E285, 1978.
 - 7) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254, 1976.
 - 8) Margoshes, M. and Vallee, B. L. : A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79 : 4813-4814, 1957.
 - 9) Hamer, D. H. : Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 913-951, 1986.
 - 10) Bawden, J. W. and Hammarström, L. E. : Distribution of cadmium in developing teeth and bone of young rats. *Scand. J. Dent. Res.* 83 : 179-186, 1975.
 - 11) Takashima, M., Moriwaki, S. and Itokawa, Y. : Osteomalacic change induced by long-term administration of cadmium to rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 54 : 223-228, 1980.
 - 12) Cherian, M. G. and Goyer, R. A. : Metallothioneins and their role in the metabolism and toxicity of metals. *Life Sci.* 23 : 1-10, 1978.
 - 13) 田村幸彦, 古田裕昭 : カドミウム投与時のラット歯髄におけるメタロチオネイン様蛋白質の合成誘導. *医学と生物学* 126 : 227-230, 1993.
 - 14) Tamura, Y. : Study on ectopic calcification in bone marrow of rat tibia caused by vinblastine. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.* 33 : 9-22, 1986.
 - 15) 森田昌敏 : 重金属の生理作用 (不破敬一郎, 生体と重金属). 東京, 1989, 講談社サイエンティフィク, 143-197.
 - 16) 萩原秀昭 : 生体成分の定量法 (堀尾武一, 蛋白質・酵素の基礎実験法). 東京, 1988, 南江堂, 409-422.