魚類の銅代謝に関する研究—III

コイ肝臓におけるメタロチオネイン様タンパク質の存在^{*1}

山本 義和・石井 知幾・池田 静徳

(1977 年 8 月 11 日受理)

Studies on Copper Metabolism in Fishes—III

Existence of Metallothionein-like Protein in Carp Hepatopancreas

Yoshikazu YAMAMOTO^{*2}, Tomochika ISHII^{*2}, and Shizunori IKEDA^{*2}

The present study was undertaken to determine the appearance of copper-bound metallothionein in the hepatopancreas of carp kept in an 0.1 ppm copper solution for 2 weeks.

The hepatic soluble fractions from control and copper-exposed fish were gel-filtrated on a Sephadex G-75 column, and the following results were obtained. 1) Copper as well as zinc was eluted in two fractions and most of the copper appeared in the second fraction (F-2) in the control. 2) Copper and free SH-group contents in F-2 from copper-exposed fish significantly increased as compared to those from control fish. 3) By incubation of the soluble fraction with *p*-chloromercuribenzoic acid it was shown that copper, zinc and free SH-groups were diminished in F-2 from copper-exposed fish. 4) When the soluble fractions from control and copper-exposed fish were incubated with copper, incorporation of the additive copper into F-2 was much higher in the copper-exposed fish than the control. In addition, the zinc in F-2 was replaced by copper and the free SH-groups in this fraction disappeared. 5) The molecular weight of F-2 was estimated to be about 10,000 by gel-filtration on Sephadex G-75.

These findings indicate that, in carp hepatopancreas, copper induces the synthesis of a copper-binding protein which can be identified as a metallothionein-like protein.

メタロチオネインは、MARGOSHES¹⁾ らによつてウマ腎臓から多量のカドミウムを含むタンパク質として分離されて以来、多くの研究者によつてその性質が調べられ²⁻⁵⁾、カドミウム、水銀、銅および亜鉛などの重金属類と親和性の高い分子量約 10,000 の SH タンパク質であり、重金属摂取によつて肝臓や腎臓に誘導生成されることなどが明らかにされている。この重金属結合性タンパク質は、陸上哺乳動物の他に鳥類⁶⁾ や酵母⁷⁾ にも存在することが知られているが、魚類のメタロチオネインに関する研究はまだほとんどなされていない。著者の知る限りにおいて、環境水から水銀を摂取したウナギの肝臓に水銀-チオネインが誘導生成されたという報告⁸⁾ と、同じく環境水からカドミウムを摂取したキンギョの肝臓および腎臓においてタンパク質の SH 基が増加したという報告⁹⁾ をみるに過ぎない。

著者らは、前報⁹⁾ において、コイ体内に環境水から過

剰にとりこまれた銅は主として肝臓上清画分に存在する比較的低分子量のタンパク質と結合した状態で蓄積されることを見いだした。そこで本報では、コイ肝臓に存在するこの銅結合性タンパク質がメタロチオネインの一種であるかどうかを中心に検討した。

実験方法

供試魚 体重 120 g 前後のコイ *Cyprinus carpio* 5 尾ずつを 250 l 容の水槽 2 個にそれぞれ収容し、対照区および銅負荷区とした。銅負荷区の環境水には銅濃度が 0.1 ppm となるように硫酸銅を添加し、前報⁹⁾ と同一条件下で 2 週間飼育後分析に供した。

Sephadex G-75 ゲル濾過クロマトグラフィー 各区 5 尾分の肝臓に 0.25 M ショ糖溶液 (1 mM Tris-HCl, pH 8.0 を含む) を加えて磨砕し、105,000×g, 60 分間遠心分離して得た上清を、Sephadex G-75 カラム (2.5

^{*1} 本報告の概要は昭和 52 年 4 月 2 日、日本水産学会春季大会において発表した。

^{*2} 京都大学農学部水産学教室 (Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan).

^{*3} 長橋 捷・和田 攻・小野 哲・矢崎和盛・竹尾恵子・山口喜久: 昭和 50 年 4 月 日本衛生学会発表。

×40 cm) を用いてゲル濾過した。溶出液は 0.01 M Tris-HCl (pH 8.0), 流速は 20 ml/h とし, 8.0 ml ずつ分取して各種成分のクロマトグラムを求めた。

銅および亜鉛の定量 日立 208 型原子吸光度計を用いた。肝臓は濃硝酸-濃過塩素酸 (1:2) で湿式分解後定量したが, ゲル濾過溶出画分はそのままを試料とした。

タンパク質および SH 基の定量 タンパク質は BIURET 法, SH 基は 5-5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) を用いる ELLMAN の方法¹⁰⁾ でそれぞれ定量した。なお, SH 基の定量はタンパク質を変性させることなく行つたので, 測定値はタンパク質分子表面の遊離 SH 基のみの含量を示すものである。

分子量の測定 肝臓上清に認められた銅結合性タンパク質 (F-2) の分子量は, ANDREWS らの方法¹¹⁾ により卵アルブミン (分子量 45,000), キモトリプシンノーゲン A (分子量 25,000), チトクローム C (分子量 12,400) およびサルミン (分子量 8,000) を標準タンパク質として, Sephadex G-75 ゲル濾過による溶出位置から求めた。

結果および考察

肝臓の銅および亜鉛含量 銅負荷区のコイ肝臓における銅および亜鉛の含量を対照区と比較し Table 1 に示した。銅負荷によつて肝臓の銅含量は対照区の約 2 倍 ($P<0.01$) に増加した。一方, 対照魚の亜鉛含量は銅含量の約 3.7 倍であつたが, 銅負荷による影響はほとんど認められなかつた。

ここで銅と同時に亜鉛の含量を測定したのは, ウマ肝臓のメタロチオネインに最も多く含まれる重金属は亜鉛

Table 1. Copper and zinc contents in the hepatopancreas of control and copper-exposed carp

Group	Cu content* ¹	Zn content* ¹
	($\mu\text{g/g}$ hepatopancreas)	($\mu\text{g/g}$ hepatopancreas)
Control	18.4 $\pm$ 2.5	69.1 $\pm$ 12.3
Cu-exposed	32.8 $\pm$ 6.1* ²	61.9 $\pm$ 11.9

*¹ Values are expressed as mean $\pm$ S.D. for 5 samples.

*² Significantly higher than the control ($P<0.01$).

であること¹²⁾, およびラットにおけるカドミウム, 亜鉛, 銀あるいは水銀の投与によるメタロチオネインの誘導生成には常に亜鉛が関与していること¹³⁾ が知られているからである。従つて, Sephadex G-75 ゲル濾過クロマトグラフィーによつて, コイ肝臓における銅結合性タンパク質の存在とその性質を調べた以下の実験においても, 同時に亜鉛と結合したタンパク質の溶出パターンを測定し, 両者のクロマトグラフ的性質を比較した。

銅負荷による SH タンパク質 (F-2) の誘導生成 対照区および銅負荷区のコイ肝臓上清を Sephadex G-75 カラムでゲル濾過し, タンパク質および SH 基の溶出パターンを求めた (Fig. 1)。タンパク質は, いずれの区においても, 80 ml, 150 ml および 200 ml の付近で溶出される 3 つのピーク (以下, これらの画分を溶出順に F-1, F-2 および F-3 とする) に分離された。対照区と銅負荷区を比較した場合, タンパク質の溶出パターンにはほとんど差異を認めなかつたが, SH 基の溶出パターンには著しい差異がみられた。すなわち, 銅負荷によつて F-2 の SH 基含量は著しく増大した。これより, 銅

Fig. 1. Sephadex G-75 gel filtration chromatograms of protein and sulfhydryl group in the supernatants from the hepatopancreas of control and copper-exposed carp. Supernatant corresponding to 2.1 g of hepatopancreas was applied to a Sephadex G-75 column (2.5×40 cm) equilibrated with 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 8.0. The material was eluted from the column using the same buffer at a flow rate of 20 ml/h. Fractions of 8.0 ml were collected for analysis.

Fig. 2. Sephadex G-75 gel filtration chromatograms of copper and zinc in the supernatants from the hepatopancreas of control and copper-exposed carp. Conditions of chromatography were the same as described in Fig. 1.

負荷によつて SH 基含量の高いタンパク質 (F-2) が誘導生成されたと考えてよいであろう。なお、BIURET 反応のほとんど認められない 220 ml 付近の溶出位置に検出された高濃度の SH 基は、グルタチオンおよび遊離システインなどの低分子 SH 化合物に基づくものと考えられる。

F-2 の銅および亜鉛に対する結合能 銅および亜鉛の溶出パターンは Fig. 2 に示したとおりである。銅はそのほとんどが F-2 に認められ、銅負荷によつてその銅含量は著しく増大した。一方、対照区の亜鉛は F-2 よりも F-1 に多く存在したが、銅負荷によつて F-2 の亜鉛含

量は F-1 のそれよりも多くなった。これは F-2 の亜鉛に対する親和性が銅負荷によつて上昇したことを示している。以上の結果から、F-2 は銅および亜鉛との結合能を有するタンパク質であり、銅負荷によつて肝臓にとりこまれた銅は、誘導的に生成されるこの SH タンパク質に主として結合することがわかつた。

F-2 と結合した銅および亜鉛の pCMB* による置換 銅負荷したコイの肝臓上清に、終濃度が 3.5×10^{-4} M あるいは 3×10^{-3} M となるように pCMB を添加して 37°C、3 時間放置後、Sephadex G-75 ゲル濾過し、銅、亜鉛および SH 基の溶出パターンを測定した。まず、

Fig. 3. Effect of *p*-chloromercuribenzoic acid treatment on the Sephadex G-75 gel filtration patterns of copper, zinc and sulfhydryl group in the supernatant from copper-exposed carp. *p*-Chloromercuribenzoic acid adjusted to pH 8.0, was added to the supernatant corresponding to 2.1 g of hepatopancreas at a concentration of 3.5×10^{-4} M and 3.0×10^{-3} M. After 3 hours incubation at 37°C, the supernatant was applied to a Sephadex G-75 column. Conditions of chromatography were the same as described in Fig. 1.

* *p*-Chloromercuribenzoic acid

Fig. 4. Effect of copper sulfate treatment on the Sephadex G-75 gel filtration patterns of copper, zinc and sulfhydryl group in the supernatants from control and copper-exposed carp. A copper sulfate solution dissolved in 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, was added to the supernatant corresponding to 2.1 g of hepatopancreas at a concentration of 5 μ g/ml. After 3 hours incubation at 37°C, the supernatant was applied to a Sephadex G-75 column. Conditions of chromatography were the same as described in Fig. 1.

PCMB の濃度が比較的低い場合 (Fig. 3, 左図) には, PCMB 添加前の溶出パターン (Fig. 2, 右図) と比較して明らかなように, 銅の溶出パターンにはほとんど変化がみられなかったが, 亜鉛はその一部が F-2 から遊離し F-1 と F-3 に移動した。また各画分の SH 基含量は明らかに減少した (Fig. 1, 右図と比較)。一方, 高濃度の PCMB を添加した場合 (Fig. 3, 右図) には, SH 基は完全にマスクされ, 銅および亜鉛はいずれも F-2 から遊離して F-3 に移動した。なお, 対照区の肝臓上清に PCMB を添加した場合にも同様の傾向を示した。

これらの結果から, 銅および亜鉛は F-2 の SH 基と結合すること, およびいずれも水銀によって置換されることがわかった。また, 比較的低濃度の PCMB を添加した場合の結果から, F-2 の銅に対する親和性は亜鉛に対するそれよりも強いと考えられる。このことはさらに次の実験で確かめられた。

F-2 と結合した亜鉛の銅による置換 対照区および銅負荷区のコイ肝臓上清に, 銅の終濃度が 5 μ g/ml となるように硫酸銅を添加後, 銅, 亜鉛および SH 基の溶出パターンを測定し (Fig. 4), 銅添加前の溶出パターン (Figs. 1, 2) と比較した。まず, 添加された銅の F-1 と F-2 における取り込みを比較すると, 対照区では F-1 > F-2, 銅負荷区では逆に F-2 > F-1 であつた。一方, 亜鉛は, 銅添加によって F-2 から遊離し F-1 と F-3 に移行した。また, SH 基も銅添加によって F-2 から消失した。これらの実験結果は, 添加された銅がコイに対する

Fig. 5. Determination of molecular weight of F-2 shown in Figs. 1 and 2 by Sephadex G-75 gel filtration. Elution volume of proteins of known molecular weight was plotted as ordinate and molecular weight of proteins as abscissa on logarithmic graph paper. Conditions of chromatography were the same as described in Fig. 1.

銅負荷によって誘導的に生成された F-2 の SH 基と結合し, また SH 基と既に結合していた亜鉛と置換することを示している。従つて, F-2 の重金属に対する親和性は水銀 > 銅 > 亜鉛の順であることがわかった。

F-2 の分子量 分子量既知の標準タンパク質数種を指

標とする Sephadex G-75 ゲル濾過法によつて F-2 の分子量を測定した結果, Fig. 5 に示したとおり, 約 10,000 と推定された。陸上哺乳動物のメタロチオネインの分子量をゲル濾過法により求めた結果も約 10,000 と報告されている^{4,13)}。

以上の実験結果から, コイ肝臓上清に見いだされた銅結合性タンパク質は, 亜鉛ともよく結合する SH タンパク質であること, 銅負荷によつて誘導生成されること, 重金属との結合には SH 基が関与すること, このタンパク質に対する銅の親和性は亜鉛よりも強いが水銀よりも弱いこと, および分子量は約 10,000 であることなどがわかった。これらの性質は, これまでに報告されているメタロチオネインの基本的性質とよく一致するので, コイ肝臓にもメタロチオネインの一種と考えられる重金属結合性タンパク質が銅負荷によつて誘導生成されることが明らかとなつた。しかし, 今後さらに, そのアミノ酸組成などを詳細に調べないと, コイ肝臓に存在するこの重金属結合性タンパク質が陸上哺乳動物のメタロチオネインと全く同じであるかどうかはまだわからない。

本実験における組織銅含量の測定などに小林弘明君の協力を得た。ここに感謝の意を表す。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金によつた。

文 献

- 1) M. MARGOSHES and B. L. VALLE: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4813-4814 (1957).
- 2) J. H. R. KAGI and B. L. VALLE: *J. Biol. Chem.*, **235**, 3460-3465 (1960).
- 3) J. H. R. KAGI and B. L. VALLE: *J. Biol. Chem.*, **236**, 2435-2442 (1961).
- 4) P. PULIDO, J. H. R. KAGI, and B. L. VALLE: *Biochemistry*, **5**, 1768-1777 (1966).
- 5) J. H. R. KAGI, S. R. HIMMELHOCH, P. D. WHANGER, J. L. BETHUNE, and B. L. VALLE: *J. Biol. Chem.*, **249**, 3537-3542 (1974).
- 6) U. WESER, F. DONAY, and H. RUPP: *FEBS Letters*, **32**, 171-174 (1973).
- 7) N. NAIKI and S. YAMAGATA: *Plant and Cell Physiol.*, **17**, 1281-1295 (1976).
- 8) J. M. BOUAUEGNEAU, CH. GERDAY, and A. DIATECHE: *FEBS Letters*, **55**, 173-177 (1975).
- 9) 山本義和・石井知幾・池田静徳: 日水誌, **43**, 1327-1332 (1977).
- 10) G. L. ELLMAN: *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77 (1959).
- 11) P. ANDREWS: *Biochem. J.*, **91**, 222-233 (1964).
- 12) D. R. WINGE, R. PREMAKUMAR, and K. V. RAJAGOPALAN: *Arch. Biochem. Biophys.*, **170**, 242-252 (1975).
- 13) M. KIMURA, N. OTAKI, S. YOSHIKI, M. SUZUKI, N. NORIUCHI, and T. SUDA: *Arch. Biochem. Biophys.*, **165**, 340-348 (1974).