薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
101 (6) 515-520 (1981)

中性子放射化分析による生体中微量元素の研究 (第 4 報¹⁾) 正常ラットおよび
カドミウム投与ラット肝臓可溶性蛋白の結合金属元素について

志野木正樹,* 中澤三由紀, 福田佳代子, 森 五彦
神戸女子薬科大学

The Study of Trace Elements in Organisms by Neutron Activation
Analysis. IV.¹⁾ The Binding Metal Elements in Cytosol
Proteins of Normal and Cd injected Rat Liver

MASAKI SHINOGI,* MIYUKI NAKAZAWA, KAYOKO FUKUDA and ITSUHIKO MORI

Kobe Women's College of Pharmacy Motoyamakitamachi,
Higashinada-ku, Kobe

(Received November 22, 1980)

Cytosol proteins of rat liver were divided into four fractions by gel filtration on Sephadex G-75 column. Neutron activation analysis was carried out to determine 7 elements (Mn, Cu, Cd, Fe, Co, Zn and Se) in each protein. Fe, Mn and Se were mainly combined with large molecular weight proteins, while Cd, Cu and Zn with low molecular weight proteins. It was recognized that Zn quantity in low molecular weight fraction was increased significantly by Cd injection. The behavior of Zn in the fraction was examined by use of ⁶⁵Zn tracer. Although Zn-thionein was not produced after administration of small amount (0.2 mg) of Zn, it was observed by the injection of 1 mg of Zn. The effect of Cd on Zn elution profile was studied. Cd-thionein was induced by Cd injection, and then Zn content in metallothionein fraction increased. From a result of distribution of Zn among organs, it could be presumed that the increase of Zn was based on renal Zn. Further, metallothionein previously produced by Cd injection was combined with about 28% of Zn incorporated into the liver.

Keywords—neutron activation analysis; metallothionein; cytosol protein of rat liver; gel filtration; zinc; cadmium

生体試料の中性子放射化分析 (NAA) については数多くの報告がなされているが、従来の分析者はほとんど生化学的な手段を併用していなかったため、その貴重なデータが十分活用されていない。生体における金属元素は、その大部分が生体成分 (アミノ酸、ペプチド、蛋白質、核酸および脂肪酸) と結合して存在し、その結果生体に種々の作用を及ぼすことから、生体中の微量元素を研究する上で、上記の生体成分の分離、精製など生化学的な手段を応用し、金属元素はどのような生体成分と反応 (結合) するかという知識を得る必要がある。Behne ら²⁾ は蛋白の分離法と NAA の組合せについて述べており、Girardi と Sabbioni ら³⁾ は意欲的に金属生化学の方面に NAA を応用して、人血中の鉄輸送系とバナジウムの関係について論じている。一方、このような生体成分の分離、精製の結果得られる試料は少量の場合が多く、多元素を同時に分析するには感度のすぐれている NAA が最も適している方法であるといえる。

著者らは、前報¹⁾ においてラット各臓器および肝臓の細胞分画中の微量元素の分布について報告した。その結果、ほとんどの金属元素は肝臓に最も多く含有されており、さらにその細胞分画中、可溶性画分に肝臓全体の 70—80% が含有されていることが判明したので、次にその肝臓可溶性画分中の金属元素の蛋白との結合について、ゲルろ過法による分画を行ない各分画中の蛋白に結合している金属元素を NAA によって定量し検討した。また、カドミウムを投与すると、正常ラットに比べ肝臓中の各種元素濃度が高くなることも判明している⁴⁾ ので、カドミウム投与ラットについても同様に検討した。とくに亜鉛の挙動については興味深い結果を示したので、⁶⁵Zn をトレーサーとして用いて Cd 投与が Zn の臓器分布におよぼす影響などを詳細に検討した。

実 験 の 部

ラット肝臓可溶性蛋白の分離および分子量の測定 体重約 200 g の Wistar 系雄ラット 6 匹を 3 匹ずつ無投与群および Cd 投与群に分けた。Cd 投与群には塩化カドミウムの生理食塩水溶液 (0.1 mg Cd/ml) を 1 ml/体重 200 g ずつ隔日に 6 回背部皮下投与した。すべてのラットは放血死させ、肝臓を 0.25 M ショ糖溶液で還流した後摘出し、その 3 倍量のショ糖溶液を加えて、テフロン-テフロン製ホモジナイザーでホモジナイズし、このホモジネートを 4° , $105000 \times g$ で 60 分間超遠心分離した上清を可溶性区分とした。その可溶性区分を Sephadex G-75 カラム (3×90 cm) を用いて 0.01 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で溶出しゲルろ過を行ない 4 画分を分取した。各画分を限外ろ過 (ミリポア PSAC フィルター使用) により脱塩、精製した後凍結乾燥したものを可溶性蛋白として、その分子量測定用に、また中性子放射化分析用に使用した。

上記の方法により分取した蛋白の分子量を測定するために、SDS ポリアクリルアミドディスク ゲル電気泳動法⁵⁾を使用した。13% ポリアクリルアミドゲル上に試料溶液 10 μ l を重層し、5 mA/1本の電流を通じマーカー (BPB) が約 10 cm 泳動したとき終了した。蛋白をアミドブラック 10 B で染色し、マーカーとの相対移動度を求め、検量線より各蛋白の分子量を求めた。検量線作製の標準蛋白としては、分子量 14400 の α -lactalbumin から 94000 の phosphorylase B まで 6 種類の分子量の異なる蛋白を含んだ Pharmacia Electrophoresis Calibration Kit (LMW)⁶⁾ に分子量 3500 の glucagon を加えて使用した。

中性子照射および γ 線スペクトロメトリー ゲルろ過により調製した蛋白試料を 85° , 4 時間乾燥させ、清浄なポリエチレン製袋に 2 重に封入し、標準試料 (NBS の SRM-1577 Bovine Liver) と共に京大原子炉の圧気輸送管 No. 1 (熱中性子束 $1.9 \times 10^{13} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$) において 1 時間照射した。照射試料は 10—20 mg 使用した。照射終了後、非破壊法で Ge(Li) 検出器を用いて、3—5 時間後に 300 秒測定し ^{56}Mn と ^{64}Cu を、2—3 日冷却後に 1000 秒測定し ^{115}Cd ($^{115\text{m}}\text{In}$) を定量した。さらに 20—30 日冷却後に 10000 秒測定し、 ^{59}Fe , ^{60}Co , ^{65}Zn , ^{75}Se を定量した。

^{65}Zn トレーサー実験 ^{65}Zn (ZnCl_2) トレーサーを使用し、100 $\mu\text{Ci}/2 \text{ mg Zn/ml}$ の濃度になるように Zn (NO_3)₂ を生理食塩水に溶解した。最初に Zn 投与量の違いによる Zn のゲルろ過プロフィールの変化を検討するためにこの溶液 0.1 ml および 0.5 ml を股静脈より投与し 48 時間後に放血死させ肝臓を摘出し前記と同様の操作を行ない Sephadex G-75 によるゲルろ過後、各分画中の ^{65}Zn の activity を NaI(Tl) ウェル型シンチレーションカウンタで測定した。

次に Cd による Zn のゲルろ過プロフィールにおよぼす影響を検討するために、上記 Zn 溶液 0.1 ml を静注し 24 時間後に Cd 溶液 (0.1 mg Cd/ml) 1 ml を背部皮下投与してさらに 24 時間後に放血死させたもの、および逆に Cd を先に皮下投与し、24 時間後に Zn を静注しそののち 24 時間後に放血死させた肝臓の可溶性画分のゲルろ過を行ない、各フラクションの activity を測定した。さらに Zn の体内分布におよぼす Cd の影響を検討するために、上記 Zn 溶液を 0.1 ml 静注後 24 時間および 48 時間後に、また Zn を静注後 24 時間後に Cd (0.1 mg) を皮下注して 1, 3, 5, および 24 時間後に、逆に Cd を投与後 24 時間後に Zn を投与したもの、すべて動脈採血によって放血死させ、胸腺、肺、心、肝、腎、副腎、脾、膵、睪丸を摘出し、血液とともに ^{65}Zn の activity を測定した。

結 果 お よ び 考 察

ラット肝臓可溶性蛋白の分離およびその分子量について

Fig. 1 に、正常ラットおよび Cd 投与ラット肝臓可溶性画分のゲルろ過クロマトグラフィーについて、それぞれ 280 nm および 254 nm の吸収を示す。高分子画分より、tube number 11—15 を第 I 画分、16, 17 を第 II 画分、19, 20 を第 III 画分、22—26 を第 IV 画分とした。また、 $^{115\text{m}}\text{Cd}$ 溶液 (40 $\mu\text{Ci}/0.1 \text{ mg Cd/ml}$) 0.25 ml を尾静脈より投与したゲルろ過クロマトグラフィーの結果、第 IV 画分のみピークが認められたことから、この第 IV 画分をメタロチオネイン (MT) 画分とした。

ゲルろ過によって得られた 4 画分中の蛋白の分子量を測定した結果を Table I に示す。

第 I 画分は 10 万以上のものも含まれているが約 4—8.5 万、第 II 画分は 2.7—3.9 万、第 III 画分は 1.6—2.5 万、第 IV 画分は 1.5 万が最も濃いバンドを示し、その他にわずかに 1.18 万および 0.776 万の 3 本が確認された。ラット肝臓 MT の分子量はすでに報告されているが Bremner ら⁷⁾ は 12000、Winge ら⁸⁾ は 10200 ± 400 と算出しており少し差が認められるが、今回の結果はいずれの値よりも少し高い値を示した。

ラット肝臓可溶性蛋白中の元素濃度について

正常ラットおよび Cd 投与ラットの肝臓可溶性蛋白について放射化分析を行なった結果を検出された 7 元素についてその濃度 ($\mu\text{g/g}$) を Table II に示し, Fig. 2 に正常ラットと Cd 投与ラットを比較した.

検出した 7 元素について Fe, Mn, Se の 3 元素は高分子蛋白に, Cd, Cu, Zn の 3 元素は低分子蛋白に多く結合している.

特に第 IV (MT) 画分に注目すれば, 正常ラットにおいては Cd よりも Zn, Cu が多量に含有されているが, Cd 投与により Cd は正常の約 1200 倍に, Zn は約 19 倍に増加し, Cu はほとんど変化しなかった. さらに Cd 投与による影響を検討してみると, Co, Cu, Fe, Mn は Cd 投与の影響は認められなかったが, Se については Cd 投与によって第 IV 画分で検出限界以下となった. このことは, Cd が大量に結合することによって Se との間に拮抗関係が生じ Se が置換されたことも考えられるが, そのことに関する文献もなく, Se の絶対量が変化しなかったとしても, Cd-thionein の生成や, Cd, Zn が大量に結合したことによる γ 線スペクトルの測定における Se の検出限界の上昇などによるも

Fig. 1. Gel-Filtration Chromatography of Cd-injected Rat Liver Cytosol on Sephadex G-75 Column (90×3.0 cm)

TABLE I. Molecular Weight of Rat Liver Cytosol Proteins determined by SDS Polyacrylamide Disk-gel Electrophoresis

I	II	III	IV
$>10^5$	$3.91 \pm 0.04 \times 10^4$	$2.55 \pm 0.07 \times 10^4$	$1.51 \pm 0.03 \times 10^4 (**)$
$8.55 \pm 0.07 \times 10^4$	$3.58 \pm 0.18 (**)$	$2.41 \pm 0.02 (**)$	$1.18 \pm 0.13 (*)$
7.31 ± 0.20	3.47 ± 0.05	1.82 ± 0.02	0.776 ± 0.073
6.40 ± 0.15	3.21 ± 0.06	1.65 ± 0.05	
$5.69 \pm 0.11 (*)$	$3.02 \pm 0.04 (*)$		
$4.63 \pm 0.25 (**)$	2.87 ± 0.08		
4.25 ± 0.00	2.72 ± 0.04		
4.06 ± 0.04			

The Roman numerals indicate the protein fractions of gel-filtration chromatography of rat liver cytosol on Sephadex G-75 column.

(*) mark indicates the concentration of electrophoretic image.

(**) is the most concentrated band.

TABLE II. Elemental Concentrations in Cytosol Protein Fractions of Normal and Cd Injected Rat Liver ($\mu\text{g/g}$)

Element	Normal				Cadmium injection			
	N-I	N-II	N-III	N-IV	Cd-I	Cd-II	Cd-III	Cd-IV
Cd	2.6 ± 0.5	ND	7.8 ± 1.8	10.2 ± 4.5	7.7 ± 3.0	4.1 ± 1.5	11.5 ± 6.4	12900 ± 1200
Co	0.140 ± 0.046	0.151 ± 0.015	0.47 ± 0.09	0.20 ± 0.03	0.27 ± 0.17	ND	0.66 ± 0.42	0.40 ± 0.08
Cu	23 ± 3	78 ± 24	148 ± 38	230 ± 100	13.6 ± 2.5	86 ± 37	137 ± 47	210 ± 40
Fe	310 ± 70	290 ± 110	ND	ND	350 ± 90	350 ± 90	ND	ND
Mn	8.0 ± 1.4	2.8 ± 0.5	2.2 ± 0.6	1.22 ± 0.29	8.5 ± 0.3	3.2 ± 0.9	1.63 ± 0.72	1.21 ± 0.47
Se	7.4 ± 0.9	1.95 ± 1.21	1.97 ± 0.67	3.8 ± 1.6	7.7 ± 0.7	1.15 ± 0.27	2.5 ± 1.4	ND
Zn	199 ± 2	190 ± 20	1060 ± 10	490 ± 160	170 ± 15	230 ± 10	540 ± 270	9200 ± 500

ND: Not detected.

Fig. 2. Elemental Concentrations in Cytosol Protein Fractions of Normal (□) and Cd injected (▨) Rat Liver

The Height of the Columns and Vertical Lines represent Mean Values and Standard Deviations, respectively.

のとも考えられる。最も Cd 投与による影響を受けるのは Zn で、Fig. 2 からわかるように、正常ラットにおいて第 III 画分の方が第 IV 画分より高濃度であったが、Cd 投与により第 III 画分が減少し、それ以上正常ラットの約 19 倍に第 IV 画分が増加している。

以上の結果から、Cd を投与すればラット肝臓に取込まれた Cd によって MT が生成され、肝臓に取込まれた Cd の約 70% がその MT に結合し、必須金属である Zn の代謝に影響を与えていることが明白となった。Cd-thionein の生成により Zn の代謝に影響を受けることは、最近では一般的な知見となっており、Sugawara⁹⁾ や Winge ら¹⁰⁾ によっても報告されているが、さらに、Zn の体内分布の関点から ⁶⁵Zn トレーサーを使用して Cd 投与による影響を検討した。

Fig. 3. Effect of Administration Quantity of Zinc on ⁶⁵Zn Distribution in Rat Liver Cytosol Fractions at 48hr after Intravenous Injection of 0.1 ml (●-●) and 0.5 ml (○-○) ⁶⁵Zn (NO₃)₂ Solution (100 μCi/2 mg/ml), and ⁶⁵Zn Distribution (△-△) after Addition of ⁶⁵Zn (NO₃)₂ *in Vitro* into the Cytosol Fraction from Normal Rat Liver

Zn 投与量によるゲルろ過プロフィールの変化

Zn の投与量を 0.2 mg および 1 mg としたときのゲルろ過プロフィールを Fig. 3 に示す。なお、Fig. 3 には、254 nm の吸収と、無投与ラットの肝臓可溶性画分に ⁶⁵Zn を加えてゲルろ過したときのプロフィールも同時に示した。

まず、*in vitro* で Zn を加えると、ほとんど第 I 画分に結合するが、*in vivo* で Zn を投与すると第 III 画分の蛋白にも結合していることから、*in vivo* と *in vitro* では結合の様子が異なることが容易に想像できる。次に、少量 (0.2 mg) の Zn を投与した場合、第 IV (MT) 画分にはほとんど結合されない。このことは、Fig. 2 の正常ラットの Zn 含有量は第 III 画分に最も多いという結果と一致している。すなわち、正常ラットにおいては MT はきわめてわずかし

Fig. 4. Effect of Cadmium Treatment (0.1 mg Cd, subcutaneously) on ^{65}Zn Distribution in Rat Liver Cytosol Fractions after Intravenous Injection of 0.1 ml $^{65}\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ Solution (100 $\mu\text{Ci}/2\text{mg/ml}$)

○—○ ^{65}Zn ————— 48 hr ————— Removal of liver
 ●—● ^{65}Zn ————— 24 hr ————— Cd ————— 24 hr ————— Removal of liver
 △—△ Cd ————— 24 hr ————— ^{65}Zn ————— 24 hr ————— Removal of liver

か存在していないため Zn の結合が少ないものと推定できる。一方、先の 5 倍量 (1 mg) の Zn を投与した場合、第 IV 画分に最大のピークが現われた。このことは、投与された Zn により MT すなわち Zn-thionein が生成されたものと考えられる。以上のことと、MT が金属によって誘導生成されることを考慮すれば、MT の生成にはある種のしきい値が存在する可能性が考えられる。今後さらに量的な検討を行なう必要がある。また、この方法によって他の金属 (MT の生成が実証されていない元素) の MT 生成能を検討することも可能である。

Cd による Zn のゲルろ過プロフィールにおよぼす影響

Zn-thionein の生成がみられていない 0.2 mg Zn (10 μCi ^{65}Zn) を投与し 48 時間後に、また 24 時間後に Cd を投与しそれから 24 時間後に、さらに Cd を先に投与し Zn をあとから投与した場合の 3 種類のゲルろ過プロフィールを Fig. 4 に示す。

Zn のみの場合は第 IV 画分にはピークが認められないが、Cd を投与すれば第 IV 画分にピークが現われた。第 I 画分および第 III 画分のピークが減少していることから、高分子蛋白に結合していた Zn が Cd によって生成された MT に結合されたと考えられる。しかし、第 I, III 画分の減少よりも第 IV 画分の増加の割合の方が大きい。一方、先に Cd を投与し MT を生成させてから Zn を投与した場合、あとから Cd を投与したものよりも第 IV 画分中の Zn 量は多くなっており、第 I, 第 III 画分はさらに減少している。このことから生体内に MT が存在しておれば、生体内に入った金属はその MT と結合しやすいといえる。特に Zn など必須金属の代謝にこの MT が関与していることは興味深い。

以上より、Cd 投与により第 IV (MT) 画分に Zn が多量に結合されることが判明したが、その根拠を確認するために Zn の体内分布を検討した。

Zn の体内分布におよぼす Cd の影響

^{65}Zn トレーサーを投与し、各臓器に分布させておき、24 時間後に Cd を投与して、1, 3, 5, 24 時間後の体内分布を測定した。また別に Zn のみを投与後 24 時間および 48 時間に体内分布を測定した。胸腺、肺、心、肝、腎、

Fig. 5. Effect of Cadmium Treatment (0.1 mg Cd, subcutaneously) on ^{65}Zn Distribution in Each Organ (Liver, Kidney, Testes and Blood)

Cadmium administrated at 24 hr after intravenous injection of 0.1 ml $^{65}\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ solution (100 $\mu\text{Ci}/2\text{mg/ml}$). Broken lines indicate ^{65}Zn distribution in each organ on nontreatment.

●—●: Liver, ○—○: Blood,
 △—△: Kidney, □—□: Testes.

副腎、脾、膵、睾丸および血液について検討したが、胸腺、肺、心、副腎、脾、膵の各臓器は Cd 投与による影響は認められなかった。また、Zn のみを投与したとき、投与後 24 時間と 48 時間において、肝、腎、睾丸および血液に存在する ^{65}Zn 量 (投与量に対する割合) にはほとんど差異が認められなかったことから、これら 4 臓器における ^{65}Zn の分布割合の変化は生体内における Zn の移動によるものと考えられる。Fig. 5 には、Cd 投与による影響が認められる肝、腎、睾丸、血液についてそれらの割合を経時変化として示した。

ある一定の割合で体内に分布した Zn は、Cd を投与することによってまず血中濃度が上昇し、逆に腎臓の割合が低下している。血中に現われた Zn は肝臓に取込まれ、しだいに血中濃度は低下する。5 時間後から 24 時間後まで肝臓はわずかに増加し、腎臓は逆に減少する。しかし、その変化の様子は Zn のみ投与した場合と同じ割合になっており、5 時間で Cd の影響はなくなっている。血中濃度は Cd 投与により一旦上昇し、以後減少するが 24 時間後には通常の濃度にもどる。このことは、別に ^{65}Zn 溶液 ($100\ \mu\text{Ci}/2\ \text{mg Zn/ml}$) $0.5\ \text{ml}$ 静注し 24 時間後に Cd 溶液 ($0.1\ \text{mg/ml}$) $1\ \text{ml}$ を皮下投与し、1, 3, 5, 8, 24 時間後にそれぞれ尾静脈より $50\ \mu\text{l}$ ずつ採血し、 ^{65}Zn の activity を測定した結果ともよく一致していた。また、睾丸については、Cd 投与後 5 時間までは Cd を投与しない場合と同じ割合であるが、24 時間になると Cd 投与の方が低くなっている。

また、Cd を先に投与して MT を生成させておいてから Zn を投与した場合、肝臓の割合が増加し、腎臓、血中濃度は減少した。

以上を総括すれば、Cd を投与しない場合は肝臓に取込まれた Zn の 1.7% のみが MT に結合したにすぎないが、Cd を投与することによって 18.6% に増加した。この MT に結合した Zn は肝臓可溶性区分の他の画分からの寄与の他に腎臓中の Zn が関与していることが判明した。また、先に Cd を投与しておけば、肝臓に取込まれた Zn の 27.7% が MT に結合しており、Cd-thionein の Zn 代謝におよぼす影響の大きさを示している。

本論文はラット肝臓可溶性蛋白と金属元素との結合について検討を行なったが、その中でも特異な蛋白である MT に着目し、その金属元素との結合について、さらに今後検討を加えたい。

引用文献および注

- 1) 第 3 報: M. Shinogi, K. Fukuda, M. Nakazawa, I. Mori, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 2094 (1980).
- 2) D. Behne, P. Brätter, G. Gawlik, U. Rösick, W. Schmelzer, *Proc. Intern. Symp. on Nuclear Activation Techniques in the Life Sciences*, IAEA, Vienna, 1978, p. 117.
- 3) a) F. Girardi, E. Marafante, R. Pietra, E. Sabbioni, A. Marchesini, *J. Radioanal. Chem.*, **37**, 427 (1977).
b) E. Sabbioni, E. Marafante, R. Pietra, L. Goltz, F. Girardi, *Proc. Intern. Symp. on Nuclear Activation Techniques in the Life Sciences*, IAEA, Vienna, 1978, p. 179.
- 4) M. Shinogi, K. Fukuda, M. Nakazawa and I. Mori, *Radioisotopes*, **29**, 368 (1980).
- 5) 高木俊夫, 三宅 淳, “新実験化学講座 20 巻, 生物化学 (I),” 日本化学会編, 丸善, 東京, 1978, pp. 118—130.
- 6) Pharmacia Fine Chemicals 社製.
- 7) I. Bremner, N. T. Davies, *Biochem. J.*, **149**, 733 (1975).
- 8) D. R. Winge, R. Premakumar, K. V. Rajagopalan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **170**, 242 (1975).
- 9) N. Sugahara, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **42**, 377 (1977).
- 10) D. R. Winge, R. Premakumar, K. V. Rajagopalan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **188**, 466 (1978).