重金属とメタロチオネイン

鈴木 和 夫*

Heavy Metals and Metallothionein.

Kazuo T. SUZUKI*

Metallothionein is named for its characteristic structure, a low molecular weight metal-binding protein (61 amino acid residues) rich in cysteinyl residues (20 residues) and heavy metals (7 metals for zinc and cadmium). Heavy metals which can induce and can be bound to metallothionein are restricted to seven heavy metals (zinc, copper, cadmium, silver, mercury, gold, and bismuth). Namely, heavy metals with higher affinity than zinc can be bound *in vivo* to metallothionein. Other heavy metals such as nickel, manganese, chromium, and so on can also induce metallothionein but can not be bound to metallothionein and the induced metallothionein contains only zinc or zinc and a small amount of copper. A great diversity of stresses other than heavy metals such as starvation, operation, administrations of alkylating agents and inflammatory drugs also induces metallothionein. Glucocorticohormone which may be related to the stresses also induces metallothionein and high concentrations of metallothionein are observed in the livers of foetus and neonatus. Biological functions of metallothionein have been postulated to be a protective protein from harmful heavy metals and a regulating protein for the homeostasis of zinc and copper.

1. はじめに

メタロチオネイン (MT) は metallo-thio-nein のように、それぞれ金属、いおうおよびタンパクを意味する単語から合成された名前である^{1,2)}。一般的にタンパクは何らかの生理作用をもっており、その生理活性に基づいた定義付けと命名がなされている場合が多い。このような一般的なタンパクとは違って MT にはこれまで酵素作用やホルモン作用のようないかなる生理活性も見い出されていない。そこで MT はその命名からもわかるようにその構造的特徴すなわち金属とチオール基に富んだ低分子量タンパクという意味で名付けられた。したがって MT はどのようなタンパクをさすかという定義付けは従来のタンパクほど明確でない。たとえば、どのような金属をどの程度含んでおり、どの程度の分子量のものを MT と呼ぶかという点に関する合意ができていないとは現在でも言いがたい面がある。

MT の定義はこのように構造的な特徴からなされて

おり、タンパクとしての構造も従来から知られているものとは異なり際だった特徴を有している。すなわち哺乳類から単離され、アミノ酸の一次構造まで明らかにされた MT は、いずれも 61 ケのアミノ酸からなり、その内の 20 ケまでをシステインが占めている。これらシステインのチオール基はいずれも金属に配位しており、メルカプチド結合を形成している。さらに哺乳類から単離された MT は芳香族アミノ酸を全く含んでいないという特徴もある。このような構造的特徴は化合物としての MT に対する興味をひくものである。

MT の生物学的機能が明らかでないことはすでに述べた。しかしこれまでにいくつかの仮説が出されている。最も古くから出され、かつ支持されている MT の生物学的役割は、有害重金属から生体を防御するために誘導されるタンパクであるという仮説である。これは初めて単離された MT がウマの腎皮質に由来するカドミウム (Cd) と亜鉛 (Zn) を結合するタンパクであり、細胞内で MT に結合している Cd は毒性を示さないこと、さらに Cd などの重金属の投与によって誘導されるという事実から出された^{1,2)}。重金属の解毒ないし毒性の中和に関与するタンパクというこの考え方は、MT の生物学的役割の内では最も広く支持されている。

* 国立公害研究所 ()

* National Institute for Environmental Studies ()

MTの生物学的役割として次に注目されているものは、Znと銅(Cu)の生体内のバランスを保つために誘導されるタンパクであるとする説である。この説は最初に単離されたMTがCdと共に多量のZnを含んでいたことから注目されていた^{1,2)}。後になってZnの投与によりZnだけを含むMTが誘導されることが確認されるにおよび、Cdとの関連による中毒学的観点からばかりでなく、より広い観点から注目されることになった。Cdは生体にとって有害な金属であるため、MTに関しても初めの内は中毒学的な見地からのアプローチをする研究者に限られがちであった。しかし生体にとって必須な金属であるZnやCuの生体内における代謝に関与するタンパクである可能性が出てくると栄養や生理をはじめとする基礎的な学問分野の研究者の注目もあびることになり、MTに関心をもつ研究者の数を飛躍的に増加させることになった。

このように注目をあびているMTについて金属タンパクとしての構造的な特徴と生理学的役割に関する最近の知見を含めて紹介したい。なおMTに関する総説や成書も多いので、あわせて参照していただければ幸いである³⁻¹⁵⁾。

2. メタロチオネインの構造的特徴

2.1. メタロチオネインのアミノ酸配列 すでに述べたようにMTはその構造的な特徴から命名されたが、MTの定義としては次のようなものがあげられている。これらはいずれも哺乳類に由来するMTの特徴から出された定義である。i) 金属含量が高い、ii) メルカプト基(システイン残基)が多い、iii) 低分子量である、iv) 芳香族アミノ酸を含まない、v) 熱に安定である。これらの特徴に関して具体的な数字、たとえば金属含量は何%以上であるとか、システイン残基は構成アミノ酸の何%以上であるといったような数字まで含めて定義されているわけではない。

哺乳類由来のMTでアミノ酸の一次配列まで明らかにされているMTは全て61ケのアミノ酸鎖からなり、その内の20ケのアミノ酸をシステインが占めている。さらにこの20ケのシステイン(●)は図1に示すような配列位置をとっており、これまで明らかにされた哺乳類由来のMTでは、全てその位置が同じである。哺乳類由来のMTは構成アミノ酸組成の一部が異なる2種類のイソタンパク(イソメタロチオネイン)の混合物であり、それらは等電点の違いを利用して分離することができる。この2種類のイソメタロチオネインのシステイン配列も同じである。すなわち哺乳類のMTはイソメタロチオネインまで含め

Fig. 1. Mode of distribution of cysteinyl residues in mammalian metallothioneins.

Primary amino acid sequences of mammalian metallothionein have been shown to have highly homologous and conservative distribution of 20 cysteinyl residues out of the 61 constitutive amino acids as indicated by black circles. All of the mammalian metallothioneins starts from *N*-acetylated methionine at the N terminal position and ends in alanine at the C terminal position. Zinc and cadmium can be bound to metallothionein up to seven atoms/molecule in total and copper up to 10 atoms/molecule, which results in the ratios of 1:3 and 1:2 for metal to thiol groups respectively.

て全て、61ケのアミノ酸で構成されており、そのうち20ケを占めるシステインは配列位置も含めて全て同じであると現在では推定されている。またMTは肝、腎、脾、膵、腸管をはじめほとんどの臓器で合成される。臓器によって合成されるMTに違いがあるかどうかまで検討されているものは肝、腎のMTなどわずかではあるが、同一動物で合成されるMTは結合する金属の違いはあってもタンパク部分は同じであると考えられている。

これまでアミノ酸配列まで明らかにされているMTは哺乳類由来のものが大部分である。哺乳類以外の生物から単離され、そのアミノ酸配列まで明らかにされたものに、アカパンカビのMTがある¹⁶⁾。このMTは20ケのアミノ酸からなる小さなMTである。20ケの内7ケを占めるシステインの配列は哺乳類のMTのシステイン配列の一部に一致することが認められている。このように哺乳類に比べはるかに下等なアカパンカビのMTが哺乳類のMTに類似した構造的な特徴を有しているのに反し、無脊椎動物の一部、たとえば軟体動物のカイ類に由来するMTと考えられているCd結合タンパクなどではシステイン含量が低く、そのアミノ酸組成も哺乳類とはかなり異なっていることが報告されている。

MTまたはMTと考えられている金属結合タンパクはシステイン含量の高いことで特徴付けられると共に、そのシステイン残基のチオール基は必ず金属に配位している。金属とチオール基の結合であるメルカプチド結合に関与していないチオール基は存在しない。

2.2. メタロチオネイン中の重金属 これまで金属を含んでいない MT, すなわちアポタンパクだけの MT またはチオネインの存在は知られていない。生物体より単離された MT は必ず金属を結合している。その金属としては次に示す 6 または 7 種類の重金属に限られている。Zn, Cu, Cd, 水銀 (Hg), 銀 (Ag), 金 (Au) の 6 種の重金属である。ビスマス (Bi) も生体内で結合しうることが報告されており¹⁷⁾, この Bi まで含めると 7 種類となる。これらの重金属は外殻電子が d^{10} 構造をとっていると考えられているが, 全ての金属について証明されているわけではない。

MT はこのように金属としては 7 種の重金属と生体内で結合しうるが, その内の 2 種類, Zn と Cu は 生体に必須な金属である。これら 7 種の重金属は, それらを投与することによって MT を誘導しうると共に, MT に結合しうる金属である。MT を誘導しうることと, MT に結合しうることとは同じでないため, わざわざこのような表現をとった。すなわち MT に生体内で結合しうる金属は MT を誘導しうるが, MT を誘導しうる金属が全て MT に結合しうるわけではない。それでは MT を誘導しうるが, MT に結合しえない金属を投与した時にはどのような MT がえられるであろうか。このときえられる MT は金属としては Zn のみを含む Zn-MT また

は Zn-チオネインと呼ばれる MT である¹⁸⁾。

生体に必須な重金属であり, ヒトなどでは鉄 (Fe) に次いで含量の高い Zn は, MT にとって非常に重要な金属である。生体中で MT に結合しうる金属として, 7 種の重金属をあげたが, これらの内で MT に対する親和性は Zn が最も低い。言いかえれば, Zn よりも MT に対する親和性の高い金属のみが, 生体内で MT に結合しうる。Zn よりも MT に対する親和性の低い重金属は, MT を誘導しえても MT には結合しえない。MT を誘導しえても, MT に結合しえないコバルト (Co) やニッケル (Ni) も, MT 中の金属を酸性の条件などではずしたチオネインには結合しうる^{19,20)}。したがって Co-チオネインや Ni-チオネインも人工的には合成しうるが, 生体内では合成されない。

MT を誘導しうると共に, MT に結合しうる 7 種の重金属を投与した時にはどのような MT が得られるであろうか。この場合には MT は誘導に用いた金属と共に必ず Zn を含んでおり, 時には Cu も含んでいる。すなわち Zn を投与すれば Zn-MT, Cu を投与すれば Cu と Zn を含む Cu, Zn-MT, Cd を投与すれば Cd, Zn-MT や Cd, Cu, Zn-MT といった具合に誘導に用いた金属と共に, MT 中の共存金属として Zn そして時には Cu をも含んだ MT が得られる。これらをまとめると表 1 のようになる。

Table 1 MT-inducing factors and metals in the induced MT.

MT-inducing factors	Metals in induced MT
Heavy metals	
i) metals able to induce MT and able to be bound to MT Zn, Cu, Cd, Hg, Ag, Au, Bi	inducer metal + Zn or inducer metal + Zn + Cu
ii) metals able to induce MT but unable to be bound to MT Ni, Mn, Pb, Cr, In, Sn,	Zn or Zn + (Cu)
Stresses	
Starvation, environmental changes, operation, administrations of alkylating agents or inflammatory drugs	Zn or Zn + (Cu)
Hormone	
natural and synthetic glucocorticohormones	Zn or Zn + (Cu)
Unidentified factors	
livers of foetus and neonatus, livers and kidneys of certain adult animals	Zn or Cu + Zn

2.3. メタロチオネインと金属の結合 MTは20ケのシステインを含んでおり、そのチオール基が金属に配位してメルカプチド結合を形成していることについてはすでに述べた。CdとZnはMT 1分子あたり7ケ結合するとされており、一般的にはMT中の金属とチオール基の比率は1:3である。厳密にはその値は7:20である。Cd²⁺とZn²⁺は外殻電子構造がd¹⁰であるためテトラヘドラルな構造、すなわち金属あたり4ケのリガンドが配位した構造をとると推定されているため、金属と配位子の比率は7:28でなければならない。¹¹³Cd NMRの結果から4ケのリガンドは全てチオール基であると推定され、図2に示すようなアダマンタン構造をとりクラスターを形成していると推定されている²⁰⁾。

Fig. 2 Postulated co-ordination structures for rabbit liver cadmium-metallothionein²¹⁾.

Seven metals in metallothionein were divided into two classes according to the postulated structures. Four-metal (A) and three-metal (B) clusters were presented from the ¹¹³Cd-¹¹³Cd spin coupling information contained in the cadmium-metallothionein-I spectrum.

哺乳類のMTが61ケのアミノ酸と7ケの重金属より構成されていることは、その分子量が約7,000であることを示している。しかしMTの分離用カラムとして最も一般的に用いられているセファデックス G-75 でゲルろ過を行うと、MTは分子量10,000~14,000に相当する位置に溶出されてくる。ゲルろ過法による分子量測定は標準タンパクと目的とするタンパクが類似した、一般的には球状の構造をとっていると仮定している。MTが実際の分子量よりも大きめに算定されることは、MTが球状構造をとっていないことを示している。¹H NMRによる結果なども2重鎖構造をとっている部分が少ないことを示している。これはCdやZnを含むMTがアダマンタン構造をとりクラスターを形成しているとする仮説とは必ずしも一致しないように思われる。

MTに対する金属の親和性はZnが最も低いことについては述べたが、MT中の金属として最も一般的なCd、ZnとCuの間ではZn<Cd<Cuの順である。したがってCdはMT中のZnと容易に置換しうる。またCuはZnおよびCdと容易に置換しうる。Znを含む金属酵素である炭酸脱水素酵素やスーパーオキシドディスムターゼ中のZnは、CdやCuを添加しただけでは置換されない。MT中のZnがCdで、またZnとCdがCuで容易に置換されることはMTに特徴的な性質でもある。

CdやZnはMT 1分子当たり7ケ結合し、過剰のCdやZnを加えてもそれ以上は結合しえない。一方CuはCdやZnの約1.5倍結合しうる。すなわちCuとチオールの比率は1:2となる。ZnやCdを1価のCuで置換するとこのように約1.5倍のCuがMTに入りうる。しかし2価のCuで置換するとチオール基との間でまず酸化還元が起こり、2価のCuは1価のCuに還元された後にMT中に入る。このときMTのチオール基は酸化されてジスルフィド結合をつくる。そのため2価のCuで置換した場合にはZnやCdと等量のCuしかMTに入りえない。MTの分子内酸化を伴う2価のCuによる置換は、同時にMTの性質をも変化させる²²⁾。Cuを含むMTはCdやZnのみを含むMTに比べると酸化されやすく、取り扱いにくいMTであることが認められている。これは恐らくMTの酸化とそれに伴ったMTの化学的性質の変化によるものと思われる。

MTに結合しうる他の金属Hg、Ag、AuおよびBiに関する研究は少なく、MT中のそれら金属の結合状態などはあまりわかっていない。一方チオネインとCoやNiからCo-チオネインやNi-チオネインなどを人工的に合成し、その性質を調べようとする試みもなされている^{19,20)}。

人工的に1分子中に種々の重金属を有するMTを合成できることは述べた。また動物に重金属を投与したとき誘導合成されるMTが、生体中の内在性重金属であるZnおよび時にはCuをも含んでいることについても述べた。生体中に誘導されるMT中の重金属の種類と比率は、投与金属の種類、投与量、臓器の違い、動物種の違いなどによって変化する。したがってそれらは一定のものではない。それではMT中の重金属の種類と比率はどのような生物学的な意味を持っているのであろうか。ラットにCdを連続投与すると、肝に誘導蓄積されるCd量が増加するにつれて合成されるMT中のCd/Zn比が高くなる^{23,24)}。また腎に誘導されるMTはCu含量の高いCd、Cu、Zn-MTからCd、Zn-MTとなり、肝と同じようにCd/Zn比の高いMTとなる²⁵⁾。これらのことから内在性金属の占める割合が減少するのは恐らく臓器の

MT 合成能に関連していると推定される。すなわち MT 合成能にゆとりがなくなると Cd/Zn 比の高い MT が合成されるため、MT 中の内在性金属の量はその臓器の MT 合成能を知るためのめやすになりうると思われる²⁴⁾。

3. メタロチオネインの生体内挙動

3.1. メタロチオネインの誘導 MT を誘導し、MT に結合しうる金属として Zn, Cu, Cd, Hg, Ag, Au と Bi の 7 種の重金属が存在することを述べた。これら以外の重金属、たとえば Ni, クロム (Cr), マンガン (Mn) なども MT を誘導できるが、Zn よりも MT に対する親和性が低い生体内では MT に結合できない重金属である¹⁸⁾。

重金属の投与以外にも MT を誘導しうる条件が多数存在することが最近次々に明らかにされた。このとき誘導される MT は Zn のみまたは時には少量の Cu を含む MT で主として肝に誘導される。このような Zn-MT が誘導される条件は広い意味でストレスと呼ぶことができるかもしれない。重金属の投与以外の条件で MT が誘導されることが最初に見出されたのは絶食による肝 Zn-MT の誘導である²⁰⁾。その後環境温度の変化²⁷⁾、細菌感染²⁸⁾、手術^{29,30)}、アルキル化剤の投与³¹⁾、炎症性薬物の投与^{32,33)} など広範囲のストレスにより MT が誘導されることが明らかになった。

ストレスは副腎皮質ホルモンに影響を与えることはよく知られているが、グルココルチコホルモンも Zn-MT を誘導しうるということが明らかにされた³⁴⁻³⁶⁾。ホルモンによる MT の誘導実験は主として培養細胞を用いたものが多いが、Zn による MT の誘導機構が違うことが明らかにされている³⁷⁾。ストレスによる MT の誘導にグルココルチコホルモンが関与している可能性は高いが、ホルモンの投与だけでは説明しきれない部分があり、詳細はその機構に関する研究の結果を待たねばならない。

現段階では以上に述べたように大きく分けると表 1 に示すように 3 種類の MT 誘導機構がある可能性がある。しかしたとえば重金属による MT の誘導機構の内でも、最もよく研究されている Zn と Cd に関する誘導機構に違いがあるかどうかといったことも明らかにされていない段階である。したがって表 1 に示した MT の誘導に関して共通の因子があるのかどうか明らかにされておらず MT の生物学的な役割を明らかにするうえで障害になっている。

どのような刺激によって誘導される場合であっても、MT の合成には DNA から mRNA への転写を伴っている。この MT mRNA への転写ならびにリボソーム上の

翻訳によるチオネイン合成はそれぞれアクチノマイシン D とシクロヘキシミドによって阻害されることが明らかにされている。MT 合成を誘導させた臓器などから poly (A) MT mRNA を取り出し、無細胞系で MT を合成することも可能になっている³⁸⁻⁴⁰⁾。したがって MT の誘導合成機構に関しては MT mRNA への転写を誘起するまでの機構が現在のところ解明されていないことになる。

3.2. メタロチオネインの分解 Cd の生物学的半減期は極めて長く、蓄積性金属として知られている。また生体臓器中に存在する Cd はほとんど MT に結合している。これらの事実から MT の生物学的半減期も極めて長いと考えられがちである。実際には MT のアポタンパクであるチオネイン部分は絶えず分解再合成が繰り返されており、MT 中の金属は再合成されたチオネインに次々に受け渡されている。このようにして Cd の生物学的半減期と MT のタンパクとしての半減期とは異なっている。

MT には生体に必須な Zn と Cu だけを MT 中の重金属として含むものと、Cd など生体に必須でない金属と Zn や Cu を同時に含むものとに分けることができる。Zn のみまたは Zn と Cu のみからなる MT の半減期は Cd を含む MT と比べるとはるかに短い。Zn や Cu で報告された Zn-MT や Cu, Zn-MT は金属もタンパク部分も臓器から速やかに消失する^{41,42)}。金属もアポタンパクもその半減期は 1 日以下である。ところが Cd を含む MT のアポタンパク部分の半減期は数日であり、Cd/Zn 比の高い MT ほど半減期は長い⁴³⁾。このように MT のアポタンパク部分の半減期は結合している金属の種類により異なっている。

MT は重金属、広範囲のストレスおよびホルモンにより誘導されることが明らかにされた。このように外部からの刺激によって MT を誘導しなくても、ある状態の動物には MT 濃度が極めて高いことが明らかにされた。胎児や新生児の肝には Zn-MT の濃度が高く、生後速やかにその濃度が下がってゆくことが最近次々に指摘されるようになった⁴⁴⁻⁴⁹⁾。動物の種類と臓器の違いにより MT の濃度に違いがあるが、このような MT が生理的に何らかの重要な役割をになっていることは間違いないと思われる。このような外部の刺激によらず存在する MT の濃度は長期間保たれ、外部からの刺激によって誘導される MT とはその誘導と分解ないしは代謝の機構が異なるように思えるが、それらに関する研究はまだなされていない。

3.3. 重金属の生体内移動とメタロチオネイン Cd はその投与方法や投与する Cd の化学形態などにより、その

生体内分布は異なるが、最終的には腎に蓄積する。腎中の Cd のほとんどが MT に結合していることはもちろんであるが、肝や他の臓器中の Cd もほとんど MT に結合している。これら臓器中の MT はすでに述べたようにそのタンパク部分はたえず分解され、再合成されていると推定される。このように各臓器に分布している Cd がどのような機構で最終的に腎に運ばれ、さらに腎から尿に排泄されるのかまだ明らかではない。しかし Cd の体内移動に MT が関与しているのではないかとする考え方は、MT が発見された時からなされていた。MT の生物学的役割の 1 つとして、重金属の生体内運搬タンパクであるとする仮説がそれである。

重金属の運搬タンパクとしての MT の役割を明らかにしようとした最も代表的な研究は、単離した MT を再投与し、その生体内分布をみようとする実験である⁵⁰⁾。無機塩の Cd を腹腔内や皮下に投与すると、70%前後が肝に分布し、腎には 10% 以下である。投与量が多くなれば肝への分布が減り、肝と比べた相対的な腎への分布は増加する。また投与後の時間によってもこの分布が変化することはすでに述べた。ところが MT に結合した Cd を同じく非経口的に投与すると、肝への分布よりも腎への分布が多くなる。この場合も投与量によって分布は変わってくる。投与量が少ない時は圧倒的に腎への分布比率が高く、投与量を増やすにつれて尿中への排泄が増加する。一方無機 Cd を一回投与した時、尿中に排泄される量は無視しうる。これらの結果は無機 Cd と MT 結合した Cd では臓器間分布が全く異なっていることを示している。

吸収された Cd の主たる排泄経路は尿である。一方吸収されなかった Cd は糞から排泄される。また無機 Cd を 1 回投与した時、胆汁排泄により糞中への排泄がみられるが、MT の合成が誘導されている 2 回目以後の投与では胆汁排泄による糞への排泄はほとんどみられなくなる⁵¹⁾。このようなことも考慮に入れると、生体に吸収され MT に捕捉された Cd は尿から排泄されるようになることを示唆している。事実 MT 結合した Cd を投与した場合に尿中に排泄される Cd は MT に結合している⁵²⁾。

外から与えた MT でなく、肝に存在する MT の移動についても実験的に研究されている。無機 Cd を投与し、肝に Cd を MT として蓄積させた後、肝障害をおこさせて Cd (MT) の移動がおこるかどうかが調べた実験がそれである。肝毒物としてアフラトキシン⁵³⁾や四塩化炭素⁵⁴⁾を投与すると、肝から腎および尿への Cd (MT) の移動がおこることが確かめられた。このときの MT は肝障

害により、肝細胞から逸脱したものが血流によって移動したと推定される。このような実験的肝障害による MT の移動は、肝細胞の壊死などにより消極的な意味で血流に出された結果の移動である。健康な状態の肝からの MT (Cd) の移動が、通常の肝細胞の新陳代謝に伴う消極的な機構によるものか、または肝細胞から MT (Cd) を送り出す積極的な機構によるものか明らかでない。これは腎から尿への排泄機構についても言えることである。

MT が血液に入るまでの機構はこのようにまだ明らかではない。血液中に入った Cd の挙動についてはどうか。無機 Cd と MT 結合した Cd ではなぜ臓器間分布が異なってくるのであろうか。この点に関しては血液、特に血清中のタンパクとの金属の結合状態が金属の臓器間分布に影響を与えているようである。Cd イオンは血清中では主として高分子量のタンパクに結合し、無機塩や低分子量物質、たとえばアミノ酸などの錯体として存在することは少ないようである。このように血清中の高分子量タンパクに結合した Cd は主として肝に運ばれる。一方 MT に結合している Cd はその安定度数が高いため、血清中の高分子量タンパクへは結合せず、MT に結合した状態で血液中を循環するようである。MT は分子量が小さいため、糸球体でろ過され、尿細管で再吸収されると考えられている。

血中における Cd 錯体の安定度定数と分子量の違いにより Cd の臓器間分布が変わってくる⁵⁵⁾。すなわち血清タンパクよりも安定度定数が小さな錯体の Cd は血清タンパクに結合し、肝に運ばれる。一方血清タンパクよりも安定度定数の高い錯体中の Cd は錯体に結合した状態で血液に存在し、それらの内低分子量の錯体は糸球体でろ過される。ろ過された錯体の内、MT 程度の分子量のものは尿細管で再吸収されるが、それよりも小さな錯体はそのまま尿中に排泄されると推定される。血液中の Cd の存在状態と腎におけるろ過再吸収の機構はここに述べたような簡単なものではないと思われるが、なぜ MT が選択的に腎尿細管で再吸収されるか、またなぜ腎に蓄積する Cd が尿細管に多いかという事実を説明しうる。さらに Cd の体内移動には MT が関与していることを強く示唆する。

重金属の内でも Cd の体内移動にはこのように MT が関与している可能性が極めて高い。しかし Zn や Cu の体内移動にも MT が関与しているかどうかという点についてはまだわかっていない。Zn を投与すると肝と腎に Zn-MT が誘導されるが、この Zn-MT の半減期は 10 数時間と短く、肝、腎から同時に消失する⁴¹⁾。したがって肝から消失した Zn-MT が腎に移動している可能性は低

いと思われる。Fe やカルシウム (Ca) にはそれぞれ運搬タンパクが認められているが、Zn やCuの運搬タンパクがMTであるかどうかこれから明らかにされる問題であらう。

4. メタロチオネインの分離分析

4.1. メタロチオネインの分離法 MTは主として細胞の可溶性分画に存在するタンパクである。これはMTの翻訳には膜に結合したポリソームでなく、遊離のポリソームが関与しているという事実とも一致する^{56,57)}。このように可溶性分画で合成され、可溶性分画に存在するMTを分離するための第一段階は対象とする臓器をホモジェナイズし、遠心分離によって可溶性分画を調製することである。得られた上澄中に存在するMTを分離する次の段階は、分子篩によるゲルろ過が一般的である。ゲルろ過の充填剤としては、MTの分子量が約7,000であるため、セファデックス G-75 やバイオゲル P-10 などが用いられる。このようなカラムを用いるとMTはカラムの排除容量の約2倍 ($V_0/V_e=2$) のところで溶出される。このようにして得られたMTはイソメタロチオネインの混合物であるため、イオン交換カラムを用いて各イソメタロチオネインに分離される。ゲルろ過とイオン交換カラムの組み合わせ法による分離がこれまで最も一般的に用いられてきた分離方法である。ゲルろ過の一般例を図3に示す⁵⁸⁾。

ゲルろ過とイオン交換カラムによるMTの分離法は必要とされるサンプル量が多く、時間がかかり、かつ再現性にも欠けるという欠点がある。通常のゲルろ過用カラムの充填剤は機械的な力に弱いが、近年高速液体クロマトグラフ (HPLC) 用に機械的な力にも耐えるゲル浸透カラム (GPC) が開発されるようになった。ゲルろ過の充填剤は親水性官能基を有するポリマーで作られている。親水性官能基としてはヒドロキシル基やアミノ基が一般的であり、セファデックスは前者、バイオゲルは後者の官能基を有するポリマーで作られている。HPLC用のGPCカラムについても原理的には同じである。

金属タンパクは一般的には酸性条件下で金属結合が不安定になるため、弱塩基性条件下で分離操作が行われる。充填剤の親水性官能基は中性付近では解離していないが、弱塩基性条件下ではヒドロキシル基の一部はヒドロキシアニオンに解離する。そのためカラムはゲルろ過の性質と共に弱陽イオン交換カラムとしての性質も示すようになる。図3で見かけ上単一ピークに見えるMTも等電点の異なる2種のイソメタロチオネインに分離している。MT分画の内、早く溶出している分画にはMT-IIが多く、

Fig. 3 Separation of rat liver metallothionein on a Sephadex G-75 column⁵⁸⁾.

Livers of rats obtained after seven injections of cadmium (3.3 mg of Cd in total) were homogenized in 4 volumes of 0.1 M Tris/HCl buffer (pH 7.4, 0.25 M glucose, bubbled with N_2 gas) and the homogenate was centrifuged at 170,000 g for 60 min. The supernatant fraction (8 ml) was applied to a Sephadex G-75 column (2.6×90 cm) and 5-ml fractions were collected. —, Cd; —, Zn; ·····, Cu; —·—, absorbance at 254 nm; —·—, absorbance at 280 nm. The arrow indicates the metallothionein fraction.

遅く溶出している分画にはMT-Iが多い。すなわちカラムの理論段数が高ければゲルろ過カラムでもMTを各イソメタロチオネインに分離できることを示している⁵⁹⁾。HPLC用のGPCカラムは高理論段数化されているため、MTを一度に各イソメタロチオネインにまで分離することができる。図4にその例を示す。図4に示したクロマ

Fig. 4 Separation of rat liver metallothionein on an SW 3000 column by HPLC-AAS⁵⁹⁾.

Liver supernatant was prepared as indicated in the legend to Fig. 3 from rats injected with Cd at a dose of 3.0 mg/kg body weight, four times a week for three weeks. A 0.1 ml portion of the supernatant was applied to an SW 3000 column (Toyo Soda Co. Ltd., 7.5 × 600 mm with a precolumn of 7.5 × 100 mm) and the column was eluted with 50 mM Tris/HCl buffer (pH 8.0, 0.1 %, Na₂S₂O₃) at a flow rate of 1 ml/min. The eluate of the column was directly introduced into a flame atomic absorption spectrophotometer (HPLC-AAS). Cadmium peaks are assigned as follows; 11.2 min (void volume of the column), 18.6 min (MT dimers), 20.2 min (MT-II), 21.2 min (MT-I), 23.3 and 24.9 min (Cd-binding proteins related to MT with shorter amino acid length).

トグラムでは、カラムの溶出液を直接原子吸光分光器(AAS)に導き、金属濃度を連続的に測定している。

HPLCの検出器として、AASを用いたHPLC-AAS法は従来のゲルろ過-イオン交換カラムに比べ、サンプルの少量化と分析時間の短縮化、さらに再現性の良さといった点でははるかに秀れている^{57, 58)}。

4.2. メタロチオネインの検出 MTは酵素作用などの生理活性を示さない。また最近抗原抗体反応を利用したラジオイムノアッセイ(RIA)法が実用化されつつあるとはいえ、抗血清を作製しにくいなどの問題点もある⁵⁹⁻⁶²⁾。そのためMTの検出にはこのようなバイオアッセイ法よりも、MTをカラムなどで分離し定量する方法がとられてきた。MTは芳香族アミノ酸を含んでいないため、タンパクの簡易検出法として用いる280 nmの吸収は用いえない。Cdを含むMTは250 nm付近にメルカプチド結合に由来する吸収を示すため、この吸収が利用されることもある。しかし最も一般的なMTの検出手段はMT中の金属をAASで定量する方法である。AASのサンプルは液状である必要がある。そのためディスクや平板ゲルを用いた分離検出法は純度のチェックなどに用いられるが、定量などの目的には用いられていない。このような理由からMTの分離法として、対象とする臓器をホモジェニイズ、遠心して上澄を得、その上澄をゲルろ過-(イオン交換)カラムにかけ、溶出液中の金属を定量する方法が最も一般的に用いられてきた。

金属の定量によるMTの定量法には、MT中の金属の種類が通常は複数であることと、チオール基が酸化されジスルフィド結合を形成すると結合できる金属数が減少するという欠点がある。前者に関してはより親和性の高い金属でMT中の金属を置換定量する方法が考案され、CdやHgが置換金属として用いられている^{64, 65)}。しかし完全に置換しきれない金属、特にCuを置換できないなどの問題がある。MTの酸化と金属の結合量に関してこれまではほとんど注意も払われていない。

MTのアポタンパクであるチオネインを定量する方法としてRIAが最も有力である。しかしMT中の結合金属の種類や分子内酸化による立体構造の違いとRIAによる検出能の関連など未解決な点も多い。RIA法はMTをカラム法のような分離操作なしで測定できることおよび微量のMTを検出定量できることなどから、尿や血液中のMTの定量など疫学分野で特に注目されている。

5. おわりに

MTのタンパクとしての性質はこれまで知られているものとは著しく異なっており、生物学的役割として仮定されているものも多数ある。MTに関心をもち、研究対

象としている研究者の数が增えるにつれ、それらのレポートを理解するために広範囲の専門知識が必要とされるようになってきた。無機化学、生化学、分析学、毒物学、生理学などなどあまりにも広い分野にわたっている。今回紹介した内容はその一部にすぎない。成書や総説さらに原報を参照していただければ幸いである。

本総説は国立公害研究所において久保田憲太郎環境生理部長をはじめとする多くの研究員との共同研究および議論に負うところが多い。ここに謝意を表する。

(昭和56年7月18日受理)

文 献

- 1) J. H. R. Kägi, B. L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3460 (1960)
- 2) J. H. R. Kägi, B. L. Vallee, *ibid.*, **236**, 2435 (1961)
- 3) 木村正己, *ファルマシア*, **13**, 210 (1977)
- 4) K. Kojima, J. H. R. Kägi, *Trends Biochem. Soc.*, **3**, 90 (1978)
- 5) M. G. Cherian, R. A. Goyer, *Life Sci.*, **23**, 1 (1978)
- 6) 鈴木和夫, *化学の領域*, **33**, 185 (1979)
- 7) J. H. R. Kägi, M. Nordberg ed., "*Metallothionein*" (1979) Birkhäuser Verlag
- 8) M. Webb ed., "*The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium*" (1979) Elsevier/North-Holland and Biochemical Press
- 9) 木村正己, *現代化学*, **108**, 40 (1980)
- 10) 井村伸正, 中尾 真, 鈴木継美編, "中毒学における生化学的アプローチ—重金属を中心として—" p. 64 (木村正己), p. 82 (須田立雄, 木村正己, 吉木周作), p. 96 (鈴木康友), p. 110 (鈴木和夫, 山村 充, 竹中参二) (1980) 篠原出版
- 11) 木村正己, *蛋白質・核酸・酵素*, **25**, 738 (1980)
- 12) 木村正己, "環境汚染物質と毒性, 無機物質編" (山根靖弘, 高島英伍, 内山 充編) *化学の領域増刊* **126**号, p. 47 (1980)
- 13) 鈴木和夫, *衛生化学*, **26**, 205 (1980)
- 14) 鈴木和夫, *医学のあゆみ*, **116**, 611 (1981)
- 15) 鈴木和夫, "バイオメディカル クロマトグラフィ II" (原 昭二, 中島暉躬, 広部雅昭編), *化学の領域 増刊* **133**号, p. 79 (1981)
- 16) K. Lerch, *Nature*, **234**, 368 (1980)
- 17) J. A. Szymanska, A. J. Zelazowski, *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 2913 (1980)
- 18) Y. Suzuki and H. Yoshikawa, *Ind. Health*, **14**, 25 (1976)
- 19) M. Vasak, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 3953 (1980)
- 20) M. Vasak, 2nd International Metallothionein Meeting, Aberdeen (April 1981)
- 21) J. D. Otvos and I. M. Armitage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7094 (1980)
- 22) K. T. Suzuki, M. Yamamura, T. Maitani, *J. Liq. Chromatogr.*, **3**, 1385 (1980)
- 23) M. Sato, Y. Nagai, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **54**, 90 (1980)
- 24) K. T. Suzuki, M. Yamamura, Y. K. Yamada, F. Shimizu, *Toxicol. Lett.*, **8**, 105 (1981)
- 25) K. T. Suzuki, M. Yamamura, Y. K. Yamada, F. Shimizu, *ibid.*, **7**, 137 (1980)
- 26) I. Bremner, N. T. Davies, *Biochem. J.*, **149**, 733 (1975)
- 27) S. H. Oh, J. T. Deagen, P. D. Whanger, P. H. Weswig, *Am. J. Physiol.*, **234**, E 282-E 285 (1978)
- 28) P. Z. Sobocinski, W. J. Canterbury Jr., C. A. Mapes, *ibid.*, **234**, E 399-E 406 (1978)
- 29) H. Ohtake, M. Koga, *Biochem. J.*, **183**, 683 (1979)
- 30) F. O. Brady, *Life Sci.*, **28**, 1647 (1981)
- 31) F. N. Kotsolis, C. D. Klaassen, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **51**, 19 (1979)
- 32) K. T. Suzuki, M. Yamamura, *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 2260 (1980)
- 33) T. Maitani, K. T. Suzuki, *ibid.*, **31**, 0000 (1981)
- 34) K. R. Etzel, S. G. Shapiro, R. J. Cousins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 1120 (1979)
- 35) M. Karin, H. R. Hershman, *Science*, **204**, 176 (1979)
- 36) M. Karin, H. R. Hershman, D. Weinstein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 1052 (1980)
- 37) M. Karin, H. R. Herschman, *Eur. J. Biochem.*, **113**, 267 (1981)
- 38) K. S. Squibb, R. J. Cousins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**, 806 (1977)
- 39) S. G. Shapiro, K. S. Squibb, L. A. Markowitz, R. J. Cousins, *Biochem. J.*, **175**, 833 (1978)
- 40) R. D. Anderson, U. Weser, *ibid.*, **175**, 841 (1978)
- 41) K. T. Suzuki, M. Yamamura, *Toxicol. Lett.*, **6**, 59 (1980)
- 42) K. T. Suzuki, M. Yamamura, *ibid.*, **6**, 301 (1980)
- 43) K. Cain, D. E. Holt, *Chem.-Biol. Interactions*, **28**, 91 (1979)
- 44) J. U. Bell, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **48**, 139 (1979)
- 45) J. U. Bell, *ibid.*, **50**, 101 (1979)
- 46) K.-L. Wong, C. D. Klaassen, *J. Biol. Chem.*, **254**, 12399 (1979)
- 47) K. T. Suzuki, M. Yamamura, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **10**, 251 (1981)
- 48) A. Bakka, M. Webb, *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 721 (1981)
- 49) I. Bremner, R. B. Williams, B. W. Young, *J.*

- Inorg. Biochem.*, **14**, 135 (1981)
- 50) K. Tanaka, K. Sueda, S. Onosaka, K. Okahara, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **33**, 258 (1975)
- 51) M. G. Cherian, *J. Toxicol. Environ. Health.*, **2**, 955 (1977)
- 52) K. T. Suzuki, T. Maitani, S. Takenaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 647 (1979)
- 53) K. Cain, B. Griffiths, *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 1852 (1980)
- 54) K. Tanaka, K. Sueda, F. Hashida, S. Onosaka, *Eisei Kagaku*, **25**, 251 (1979)
- 55) K. T. Suzuki, M. Yamamura, *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 3643 (1979)
- 56) M. G. Cherian, S. Yu, C. M. Redman, *Can. J. Biochem.*, **59**, 301 (1981)
- 57) S. G. Shapiro, R. J. Cousins, *Biochem. J.*, **190**, 755 (1980)
- 58) K. T. Suzuki, *Anal. Biochem.*, **102**, 31 (1980)
- 59) K. T. Suzuki, T. Motomura, Y. Tsuchiya, and M. Yamamura, *ibid.*, **107**, 75 (1980)
- 60) R. J. Vander Mallie, J. S. Garvey, *Immunochem.*, **15**, 857 (1978)
- 61) C. Tohyama, Z. A. Shaikh, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 907 (1978)
- 62) R. J. Vander Mallie, J. S. Garvey, *J. Biol. Chem.*, **254**, 8416 (1979)
- 63) C. C. Chang, R. J. Vander Mallie, J. S. Garvey, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **55**, 94 (1980)
- 64) F. N. Kotsonis, C. D. Klaassen, *ibid.*, **42**, 583 (1977)
- 65) J. K. Piotrowski, W. Bolanowski, A. Sapota, *Acta Biochim. Pol.*, **20**, 207 (1973)

『有機合成化学協会誌』合本用ファイル

「有機合成化学協会誌」合本ファイル1部に1カ年分(12冊)がとじられるようになっています。

合本ファイル 1部500円 (送料実費下表参照) の上、前金にてお申込み下さい。

小包料金表

地帯別	地帯別都道府県名	1～4部 1kgまで	5～9部 2kgまで	10～14部 3kgまで	15～19部 4kgまで
第1地帯	東京都23区内	400円	460円	520円	580円
	東京都下, 山形, 宮城, 福島, 栃木, 茨城, 群馬, 埼玉, 千葉, 神奈川, 新潟, 長野, 山梨, 静岡, 富山, 石川, 岐阜, 愛知, 滋賀, 三重	500円	580円	660円	740円
第2地帯	青森, 岩手, 秋田, 福井, 京都, 奈良, 兵庫, 大阪, 和歌山, 鳥取, 島根, 岡山, 広島, 四国4県	650円	730円	810円	890円
第3地帯	北海道, 山口, 九州7県, 沖縄	800円	880円	960円	1,040円