学位論文題名

Relationship between Metallothionein and Heavy
Metal Contents in Hepatic Cytosol of Rats

(ラットの肝臓サイトゾール中のメタロチオネイン量と重金属量との関係)

学位論文内容の要旨

メタロチオネインは重金属結合低分子量蛋白質であり、微生物から高等動物に至るまで、ほとんどの生物種に存在する。この蛋白質は高等動物では61、62あるいは68のアミノ酸残基からなり、7原子の亜鉛およびカドミウムと結合している。その分子量は6500~7000である。メタロチオネインの生理的役割としては、現在までに完全に解明されているわけではないが、亜鉛、銅等の生体必須微量元素の恒常性の維持、カドミウム等の有害重金属の解毒などの重要な生理作用に関与していると考えられている。その蛋白質は高等動物では亜鉛、カドミウム、銅等の重金属の投与により、主に肝臓で誘導合成される。

本研究の目的はメタロチオネインが生合成される量は何によって決められるのかを調べるために、肝臓サイトゾール(可溶性画分)中のメタロチオネイン量と重金属投与量との量的関係と肝臓サイトゾール中のメタロチオネイン量と重金属量との量的関係を調べた。

方法を以下に述べる。36匹のラットを各群6匹ずつに分け、各群のラットの腹腔内にラット体重1kg当り0, 5, 10, 20, 40, 60 mgの亜鉛をそれぞれ投与した後、肝臓を摘出した。得られた肝臓の一部を湿式灰化し、その亜鉛量を原子吸光法により定量した。残りの肝臓から、サイトゾールを調製した後、それをセファデックスG-75カラムを用いたゲル濾過法により分画した。各画分の亜鉛量を原子吸光光度計を用いて測定し、溶出量460~550 mlの範囲の低分子量画分の亜鉛量よりメタロチオネイン量を求めた。メタロチオネイン量はメタロチオネイン1分子に対して7原子の亜鉛あるいはカドミウムが結合するものとして求めた。カドミウムの場合は Sabbioni & Marafante の1975年の論文中のカドミウム投与後のラット肝臓、サイトゾールおよびメタロチオネイン中のカドミウム量の変化の表からデータを独自に解析し、その結果も併せ以下に述べることにする。

1) 亜鉛投与後のラットの生存率: ラット体重1kg当り0, 5, 10, 20, 40, 60 mg/kg b.w.の亜鉛を投与した際の各群の生存率はそれぞれ100, 100, 100, 83, 83, 33%であった。死亡したラットの数よりLD₅₀を仮に概算したところ、LD₅₀ = 55 mg/kg b.w.であった。

2) 肝臓中の亜鉛量に対する肝臓サイトゾール中の亜鉛量の占める割合: 亜鉛投与量を変化させた場合、肝臓中の亜鉛量に対する肝臓サイトゾール中の亜鉛量の占める割合は変化せず、常に肝臓中の亜鉛量の約70%はサイトゾール中に存在していた。

3) 亜鉛投与量による肝臓サイトゾール中のメタロチオネイン量の変化: 0~20 mg/kg b.w.の亜鉛の投与量では投与量が増加するとメタロチオネイン量も比例的に増加したが、さらに高濃度の投与量(40~60 mg/kg b.w.)では投与量が増加しても、メタロチオネ

イン量は変化しなかった。

4) 肝臓サイトゾール中のメタロチオネイン量と亜鉛量との関係：0～60 mg/kg b.w.の亜鉛投与量の範囲内で肝臓サイトゾール中のメタロチオネイン量と亜鉛量との間には相関係数0.99で直線関係が成り立った。このことより肝臓サイトゾール中の亜鉛量が増加するとメタロチオネイン量も比例的に増加することがわかった。

5) 肝臓サイトゾール中の亜鉛量とメタロチオネインと結合した亜鉛量との関係：この両者の間の関係より直線式 $Y = 0.62X - 0.10$ {Y；メタロチオネインと結合した重金属量 (mg)、X；肝臓サイトゾール中の重金属量 (mg)} が得られた。この式の係数より肝臓サイトゾール中で増加した亜鉛量の62%がメタロチオネインと結合していることがわかった。

以下の6), 7), 8)は Sabbioni & Marafante の1975年の論文中のカドミウム投与後のラット肝臓、サイトゾールおよびメタロチオネイン中のカドミウム量の変化の表からデータを独自に解析した。

6) カドミウム投与量による肝臓サイトゾール中のメタロチオネイン量の変化：0.03～0.83 mg/ratのカドミウムの投与量では投与量が増加すると肝臓サイトゾール中のメタロチオネイン量が増加したが、さらに高濃度の投与量では投与量が増加しても、メタロチオネイン量はほとんど変化がなく、亜鉛の投与量の増加によるメタロチオネイン量の変化と同様のパターンを示した。

7) 肝臓サイトゾール中のメタロチオネイン量とカドミウム量との関係：0.03～3.33 mg/ratのカドミウム投与量の範囲内でこの両者の間には相関係数1.00で直線関係が成り立った。このことより肝臓サイトゾール中のカドミウム量が増加するとメタロチオネイン量も比例的に増加することがわかった。

8) 肝臓サイトゾール中のカドミウム量とメタロチオネインと結合したカドミウム量との関係：この両者の間の関係より直線式 $Y = 0.93X$ が得られた。この式の係数より肝臓サイトゾール中で増加したカドミウム量の93%がメタロチオネインと結合していることがわかった。

9) カドミウムと亜鉛の場合のゲル濾過パターンの比較：カドミウム投与によりメタロチオネイン画分中のカドミウム濃度が増加し、肝臓サイトゾール中のカドミウムのほとんどがメタロチオネインと結合していた。一方、亜鉛の場合は亜鉛投与によりメタロチオネイン画分中の亜鉛濃度が増加し、それ以外にも高分子量蛋白質画分の亜鉛濃度も増加していることがわかった。

以上のことより、肝臓サイトゾール中のメタロチオネイン量と重金属量との間に直線関係が成り立つことより、肝臓サイトゾール中の重金属量は肝臓サイトゾール中のメタロチオネイン量の指標に成り得ること、さらに肝臓サイトゾール中で増加したカドミウムと亜鉛とでメタロチオネインと結合する割合が異なることを示した。この違いはメタロチオネイン以外の蛋白質と結合しない金属(カドミウム)と生体内で多くの酵素と結合し、存在する金属(亜鉛)との違いを示していると考えられた。

結論として、肝臓サイトゾール中のメタロチオネイン量と亜鉛量の間と肝臓サイトゾール中のメタロチオネイン量とカドミウム量の間とに直線関係がそれぞれ成り立った。これらのことよりメタロチオネインの生合成量は重金属投与量よりも肝臓サイトゾール中の重金属量によって決められるということを明らかにした。

本研究の独創性を以下に示す。メタロチオネインの生合成量は従来、重金属投与量によって決められると考えられてきたが、これらの研究は低濃度の投与量でしか行われて

なく、不完全なものであった。本研究においてさらに高濃度も含めた広い範囲の投与条件で実験を行ったところ、メタロチオネインの生合成量は重金属投与量よりも肝臓サイトゾール中の重金属量によって決められるということ、肝臓サイトゾール中で増加した亜鉛とカドミウムとでメタロチオネインと結合する割合が異なるということ、という2つの新しい知見が得られたことに本研究の特色がある。本研究は生体内におけるメタロチオネインの生合成の研究に貢献することが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 島 豊
副 査 教 授 齋 藤 和 雄 (医学部)
副 査 助 教 授 新 岡 正

学 位 論 文 題 名

Relationship between Metallothionein and Heavy Metal Contents in Hepatic Cytosol of Rats

(ラットの肝臓サイトゾール中のメタロチオネイン量と重金属量との関係)

重金属結合低分子量蛋白質、メタロチオネイン、は高等動物では61、62あるいは68のアミノ酸残基からなり、7原子の亜鉛およびカドミウムと結合している。その分子量は6500～7000である。メタロチオネインの生理的役割としては、現在までに完全に解明されているわけではないが、亜鉛、銅等の生体必須微量元素の恒常性の維持、カドミウム等の有害重金属の解毒等の重要な生理作用に関与していると考えられている。この蛋白質は高等動物では亜鉛、カドミウム、銅等の重金属の投与により、主に肝臓で誘導合成される。本論文ではメタロチオネインが生合成される量は何によって決められるのかを調べることを目的として、肝臓サイトゾール（可溶性画分）中のメタロチオネイン量と重金属投与量との量的関係と肝臓サイトゾール中のメタロチオネイン量と重金属量との量的関係を調べた。

申請者は36匹のラットを各群6匹ずつに分け、各群のラットの腹腔内にラット体重1kg当り0.5、10、20、40、60mgの亜鉛をそれぞれ投与した後、肝臓を摘出した。得られた肝臓の一部を湿式灰化し、その亜鉛量を原子吸光法により定量した。残りの肝臓から、サイトゾールを調製した後、それをセファデックスG-75カラムを用いたゲル濾過法により分画した。各画分の亜鉛量を原子吸光光度計を用いて測定した。カドミウムの場合は、Sabbioni & Marafanteの1975年の論文中的カドミウム投与後のラット肝臓、サイトゾールおよびメタロチオネイン中のカドミウム量の変化の表からデータを独自に解析した。

投与量の増加による肝臓サイトゾール中のメタロチオネイン量の変化は低濃度の投与量では投与量が増加するとメタロチオネイン量も比例的に増加したが、さらに高濃度の投与量では投与量を増加させても、メタロチオネイン量は変化しなかった。肝臓サイトゾール中のメタロチオネイン量と重金属量の間には直線関係が成り立った。このことより肝臓サイトゾール中の重金属量が増加するとメタロチオネイン量も比例的に増加することがわか

った。肝臓サイトゾール中の重金属量とメタロチオネインと結合した重金属量との関係より、亜鉛の場合、直線式 $Y = 0.62X - 0.10$ [Y ; MTと結合した重金属量 (mg)、X ; 肝臓サイトゾール中の重金属量 (mg)] が、カドミウムの場合、 $Y = 0.93X$ が得られた。これらの式の傾きより、肝臓サイトゾール中で増加した亜鉛の62%が、カドミウムの場合、93%がメタロチオネインと結合していることがわかった。カドミウム投与した場合と亜鉛投与した場合のゲル濾過パターンの比較を行ったところ、カドミウム投与によりメタロチオネイン画分中のカドミウム濃度が増加し、肝臓サイトゾール中のカドミウムのほとんどがメタロチオネインと結合していた。一方、亜鉛の場合は亜鉛投与によりメタロチオネイン画分中の亜鉛濃度が増加し、それ以外にも高分子量蛋白質画分の亜鉛濃度も増加していることがわかった。これらの事実より、肝臓サイトゾール中の重金属量は肝臓サイトゾール中のメタロチオネイン量の指標に成り得ること、さらに肝臓サイトゾール中で増加したカドミウムと亜鉛とでメタロチオネインと結合する割合が異なることを示した。以上のように、申請者は肝臓サイトゾール中のメタロチオネイン量と亜鉛量の間、と肝臓サイトゾール中のメタロチオネイン量とカドミウム量の間、に直線関係がそれぞれ成り立つことより、メタロチオネインの生合成量が重金属投与量よりも肝臓サイトゾール中の重金属量によって決められるということを明らかにした。メタロチオネインの生合成量は従来、重金属投与量によって決められると考えられてきたが、これらの研究は低濃度の投与量でしか行われてなく、不完全なものであった。これに対して、本論文では高濃度も含めた広い範囲の投与条件で実験を行い、メタロチオネインの生合成量は重金属投与量よりも肝臓サイトゾール中の重金属量によって決められるということ、さらに肝臓サイトゾール中で増加した亜鉛とカドミウムとでメタロチオネインと結合する割合が異なること、の以上の2つの新しい知見が得られたことに本研究の特色がある。本研究は生体内におけるメタロチオネインの生合成の研究に貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また、研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（環境科学）の学位をうけるのに十分な資格を有するものと判定した。