

# X線照射によるラット肝メタロチオネインの誘導

岡山大学医学部附属病院中央放射線部（部長：山本道夫教授）

青 野 要

（昭和56年9月3日受稿）

**Key words :** X線照射, メタロチオネイン  
SOD活性, SDS-PAGE

## 緒 言

近年X線をはじめ、放射性物質の利用は著しく広範囲に及んでいる。即ち、X線診断をはじめ、癌治療や核医学に見られる医学への応用のみならず、放射性同位元素の利用は極めて広く、更に最近では原子力エネルギーの利用と放射線生物作用の研究、特に防護方法に関する研究には多くの努力がみられる。

一般に放射線生物作用として注目されるのは遺伝子への影響であるが、同時にラジカル反応やその酸化作用に伴う生体内SH化合物の酸化も見逃すわけにはいかない。特に放射線生物作用に対する防護物質としては、SH剤の開発として注目される如く<sup>1)</sup>、放射線照射に伴うSH化合物の生体内での動態が注目されている。

生体内でSH基を大量にもつ蛋白としては、重金属をキレートし、システインを大量にもつメタロチオネインがある。メタロチオネインはいろいろな動物の肝や腎より分離され<sup>2),3)</sup>、大よその分子量は10,000~6,000で6~8%の金属を含み、30%のシステインをもつ蛋白質である<sup>4),5)</sup>。しかし現在このメタロチオネインの生理作用は殆んど明らかではなく、一つの可能な作用としてはZn代謝に関係し<sup>6),7)</sup>、また金属の解毒作用が考えられている<sup>8)</sup>。

このメタロチオネインは、一般に正常の肝には極めて少ないが、Zn<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>あるいはHg<sup>2+</sup><sup>6,8)</sup>の投与によって合成が誘導され、Zn<sup>2+</sup>の体内のホメオスタシスの役割を成している可能性が示唆されている<sup>7)</sup>。X線照射は動物体内のSH酸化を誘導する<sup>1)</sup>ことから、これを保護するため

に、メタロチオネインが誘導されるという生体反応も期待される。また最近の研究<sup>9)</sup>では、CCl<sub>4</sub>やストレスによってもこの種の蛋白が誘導されることから、放射線照射動物肝でのメタロチオネインの誘導が予期される。本研究はこの様な見解のもとにラットにX線照射を行い、メタロチオネイン合成が肝において誘導されることを明らかにしたので、その結果について報告する。

## 材 料 と 方 法

### 1. 材料

実験材料には、ウイスター系ラット（体重200~300g）を使用した。

Zn<sup>2+</sup>やCd<sup>2+</sup>投与によるメタロチオネインの誘導は、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10mg/kg体重を3日間、cdCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 0.25mg/kg体重を3日間それぞれ腹腔内に連続投与し、24時間後に肝を摘出して実験に供した。X線照射による誘導は、実験用東芝X線照射装置（Toshiba LMR-15）を用いて1,000レントゲン照射後、2.5.7日目の肝をそれぞれ摘出し実験に供した。

### 2. 肝ホモゲネートの上清分画

肝10gを4℃の0.25M蔗糖—10mM Tris-HCl緩衝液（pH7.4）60ml中でホモゲナイズし、100,000XG、90分間遠心分離を行い上清を得た。この上清液（100mg蛋白）を更にSephadex G75のカラム（φ2.5cm×90cm）にチャージし、50mM Tris-HCl緩衝液（pH 8.4）で溶出、6.8mlずつ分画した。

### 3. 定量

a. Zn<sup>2+</sup>及びcd<sup>2+</sup>量は、島津原子吸光度計

(フレイム分光光度計 AA-630) で測定した。

- b. スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)は, Beauchamp and Fridovich の方法<sup>10)</sup>により, cyt. C の還元量から測定した。
- c. 蛋白量の測定は Lawry 法<sup>11)</sup>によった。
- d. 蛋白の分析は Laemmli<sup>12)</sup>の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)によった。

### 実験結果

#### 1. 正常ラット肝ホモゲネート上清分画の Sephadex G75 分画における $Zn^{2+}$ , SOD の分布。

X線照射に伴うメタロチオネイン蛋白の変動を検索するため, その対照群として, 正常ラット(5匹の平均)肝上清の SOD 活性や, メタロチオネインを示す分子量10,000以下の分画における  $Zn^{2+}$ 量を測定し, その分画のパターンを調べた。

図1はその結果を示す。ここで SOD は  $Zn^{2+}$ を含む酵素として一般に認められる細胞質蛋白である。図に示す如く, Sephadex G75により蛋白はボイドボリュームから後の部分に分子量3万前後の SOD を含む分画と, 少量の分子量

1万以下の部分に分けられる。

SOD 活性は実験を通して比較的一定量認められ,  $Zn^{2+}$ の分布はボイドに多く SOD 分画と1万以下の分画にわずかに認められる。このようなパターンは, 正常ラットではかなり安定したものとして再現性が大きい。

#### 2. $Zn^{2+}$ 投与によりメタロチオネインを誘導されたラット肝上清の SOD, $Zn^{2+}$ の分布

$Zn^{2+}$ 投与はラット肝に強いメタロチオネイン誘導作用のあることはよく知られた事実であり, X線照射により誘導されるメタロチオネインと比較するため,  $Zn^{2+}$ 誘導により示される肝上清分画の SOD 活性及び  $Zn^{2+}$ の分布パターンを求めた。

図2はその実験結果を示す。 $Zn^{2+}$ 投与によるメタロチオネインの誘導は顕著で, 図に示す如く, メタロチオネインの含有する  $Zn^{2+}$ が分子量10,000~6,000に相当する部分に著しい。しかし蛋白量の増加は必ずしも認められず, この分画(Fraction 50~70)にメタロチオネイン以外の蛋白質が大量に存在することを示唆する。また SOD 活性は, 正常ラット肝のそれと殆んど変わらない。

#### 3. X線照射ラット肝上清分画の $Zn^{2+}$ 及び SOD の分布とその変動

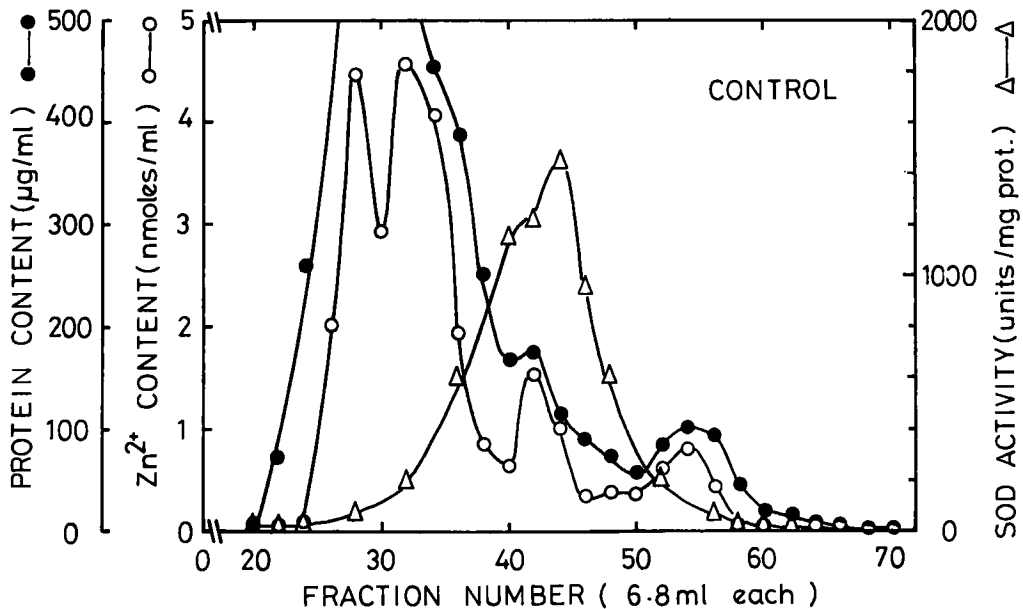


図1. 正常ラット肝上清液のゲル濾過による  $Zn^{2+}$ , 蛋白及び SOD 活性の分布

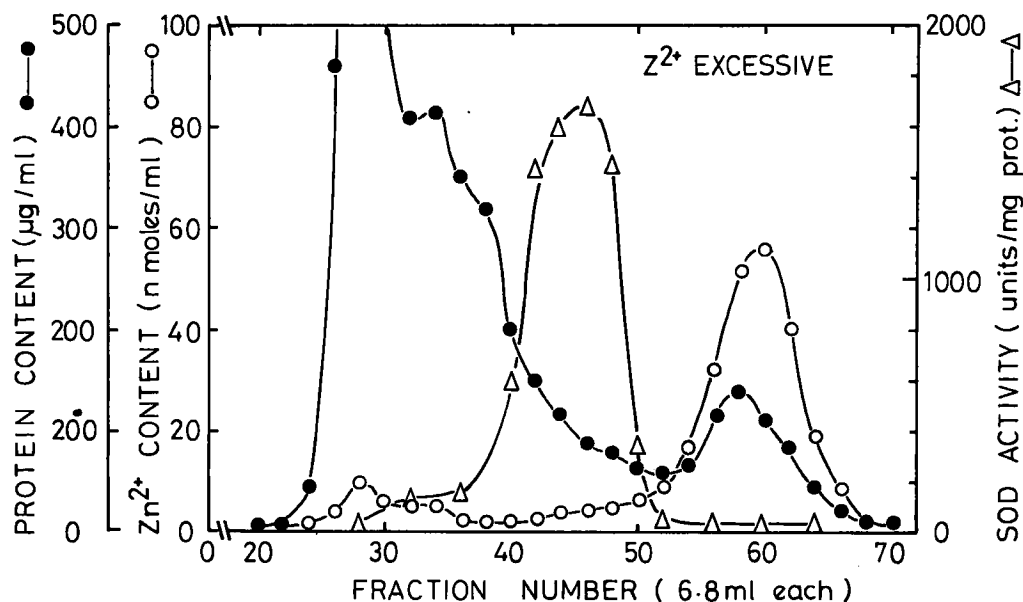


図2.  $Zn^{2+}$ 投与ラット肝上清液のゲル濾過による  $Zn^{2+}$ 、蛋白及びSOD活性の分布

X線1,000レントゲン1回照射後2日目のラット肝上清分画は、 $Zn^{2+}$ 及びSOD活性の分布パターンにおいて、正常ラット肝のそれと比べ殆んど変化がない(図3-A)。しかし照射後5日目では $Zn^{2+}$ 量で示されるメタロチオネイン量はかなり増大し、また、SOD活性も対照のそれと比べ活性の上昇がみられる(図3-B)。このような変化は照射後7日目では更に大きく、メタロチオネイン- $Zn^{2+}$ もSOD活性も著しく増大している(図3-C)。しかしSOD活性の増大の方がはるかに顕著であった。

今、Fraction 50~70の中で、 $Zn^{2+}$ 量が最も大きい分画の試験管7本について全 $Zn^{2+}$ 量及びその分画に含まれる蛋白量を測定し、メタロチオネインと考えられる総 $Zn^{2+}$ 量、総蛋白量、蛋白当りの $Zn^{2+}$ 量をX線照射に伴う経時変化で示すと、図4の如くである。即ち、蛋白量についてはX線照射に伴う増加としてとらえることはできないが、総 $Zn^{2+}$ 量及び蛋白当りの $Zn^{2+}$ は、いずれもX線照射により経時的に増大することが明らかにされた。

#### 4. X線照射ラット肝に誘導されたメタロチオネインの確認

上記の如く、X線照射によりメタロチオネ

ンと考えられる分画がかなり明確に増大することが明らかにされたが、この $Zn^{2+}$ で示されるメタロチオネインを更に確認する目的で次の様な実験を行った。即ち、メタロチオネインは $cd^{2+}$ に対する親和性が極めて高いため、肝上清分画を分離した後その上清に $cdCl_2 \cdot H_2O$ を添加し、4℃で24時間インキュベートを行い、Sephadex G75で分画した結果、図5に示す様なパターンを得た。

図から明らかなように、非照射ラット肝では、 $cd^{2+}$ の分画はメタロチオネインに相当する部分に殆んど認められないが、X線照射後5日目のメタロチオネイン- $Zn^{2+}$ が増加しているラット肝上清では $Cd^{2+}$ の分布が有意に認められこの分画が $Cd^{2+}$ に親和性をもつメタロチオネインであることと、それがX線照射で増大することが確認された。

このことを更に確実にする目的で、14%のアクリルアミドゲルを含むSDS-PAGEによりメタロチオネイン分画相当部分に含まれる蛋白を分析した。その結果、図6に示す如く、 $Cd^{2+}$ で誘導されるラット肝上清メタロチオネイン分画の蛋白と、X線照射ラットや $Zn^{2+}$ 投与ラット肝上清のメタロチオネイン分画に含まれる蛋白

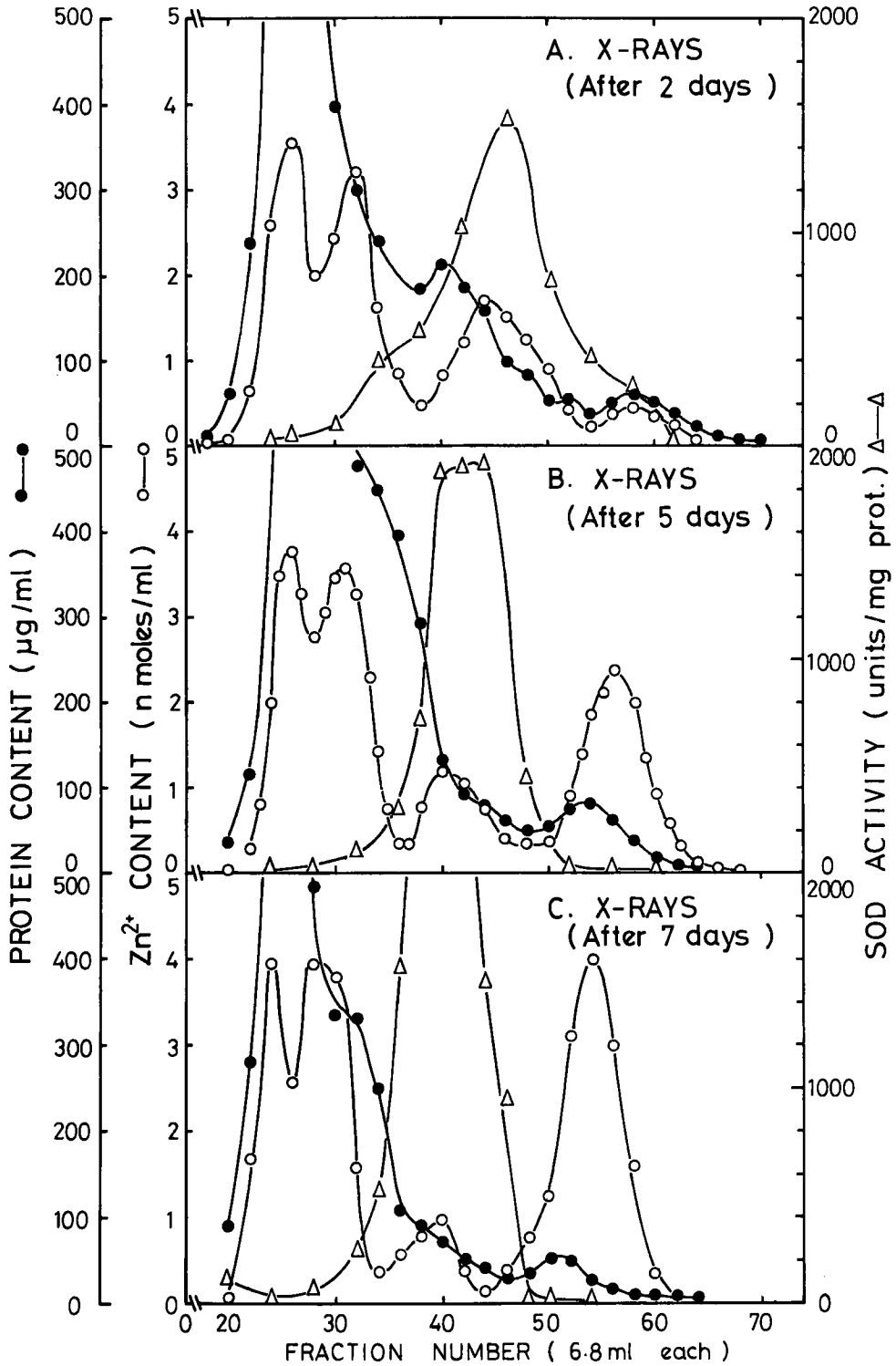


図3. X線照射後のラット肝上清液のゲル濾過による  $Zn^{2+}$ , 蛋白及びSOD活性の分布  
 A: 2日後, B: 5日後, C: 7日後

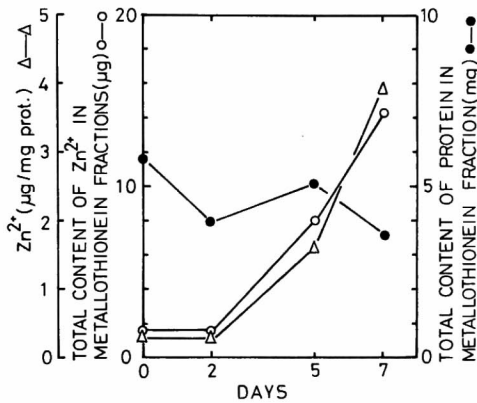


図4. X線照射後のメタロチオネイン分画のZn<sup>2+</sup>及び蛋白量の変化  
図1及び図3よりメタロチオネイン分画と考えられる分画50以後で、Zn<sup>2+</sup>量が最大値を示す分画の前後7分画、計15分画のZn<sup>2+</sup>及び蛋白量を加算した結果を示す。

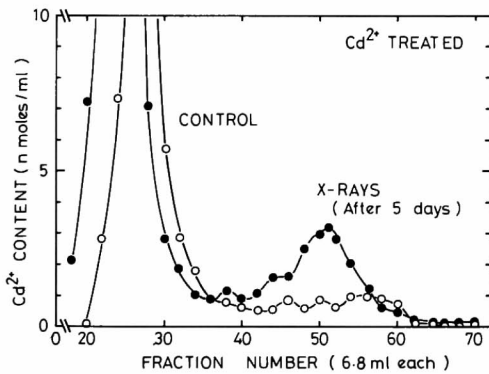
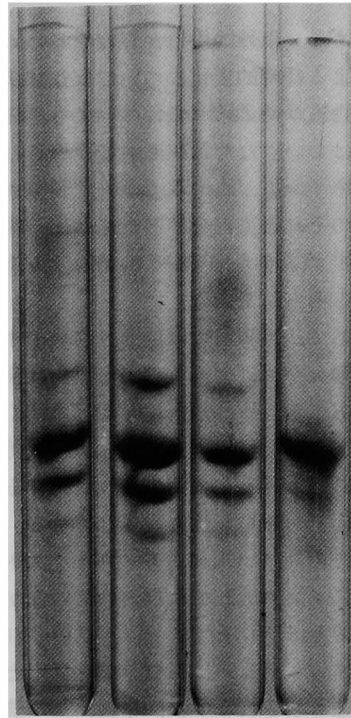


図5. X線照射ラット肝上清液にin vitroでCd<sup>2+</sup>を加えた場合のCd<sup>2+</sup>の分布  
対照及びX線照射5日後のラット肝上清液(100mg蛋白)に0.3mM CdCl<sub>2</sub>・H<sub>2</sub>O, 5mM DTTを加え、TrisによってpHを8.0近くにし、4℃下24時間インキュベートした後ゼル濾過した。

は、ともに全く同一パターンを示す。この中の1で示される蛋白は分子量的にSODに相当し、2, 3はそれぞれ分子量11,000及び9,000に相当し、これがメタロチオネインであると考えられる。なお、ヒストンは分子量11,400のものである。

ORIGIN



FRONT

Cd<sup>2+</sup> X-RAY Zn<sup>2+</sup> HISTONE

図6. Cd<sup>2+</sup>及びZn<sup>2+</sup>投与ならびにX線照射ラット肝メタロチオネイン分画のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターン  
Cd<sup>2+</sup>: Cd<sup>2+</sup>投与ラット肝のメタロチオネイン分画  
X-RAY: X線照射後5日目のラット肝のメタロチオネイン分画  
Zn<sup>2+</sup>: Zn<sup>2+</sup>投与ラット肝のメタロチオネイン分画  
HISTONE: M・W 11,400  
バンド1はSOD, バンド2は分子量11,000, バンド3は分子量9,000程度。

### 考 察

現在、メタロチオネインの生理活性についての十分な説明はなされていないが、上記の実験結果から、X線照射に伴いZn<sup>2+</sup>やCd<sup>2+</sup>投与と同様に、ラット肝細胞内にメタロチオネインが誘導されることはほぼ確実と考えられるデータを得ることができた。ただ定量的研究として、その含有量が精製された蛋白として測定されていたので、正確な値については今後更に精製された蛋白について測定する必要がある。勿論、本実験で示されたメタロチオネイン分画の蛋白量は、実験結果の項でも述べた如く、メタロチ

オネイン以外の蛋白が存在するため、そのX線による経時的変化については意味がなく、また蛋白当りの  $Zn^{2+}$  量についてもその生化学的意味はない。ただX線照射で誘導されたメタロチオネインも、 $Zn^{2+}$ や $Cd^{2+}$  で誘導された他の場合のそれと蛋白分子としては同一物と考えられ  $Zn^{2+}$ のみならず  $Cd^{2+}$  も結合する能力があることも明らかである。

さて、X線照射に伴うメタロチオネイン分画の増大が何によるものであるかは現在なお不明であるが、Weswigら<sup>9)</sup>が示す如く、ストレスによる可能性が大きい。しかし同時に、X線照射に伴うSH化合物の酸化に対する生体の防御反応である可能性も残されている。

この外、 $CCl_4$ によるメタロチオネインの誘導もストレスとして取扱われているが、高酸素圧下でもメタロチオネインが誘導され(未発表データ)、あるいは指質過酸化反応と関係する可能性も残されている。今後、この誘導された蛋白の精製、照射X線の強度依存性、脂質過酸化反応との関係、X線照射の防御作用との関係等々多くの問題が残されているが、これらの問題解決のため更に研究を進めたい。

## 結 論

X線照射により、ラット肝におけるメタロチオネインの誘導に関する研究を行い次の結果を得た。

1. X線照射により、ラット肝細胞において一定時間後にメタロチオネイン蛋白が誘導される。またこれと平行して、SOD活性も増大する傾向がある。
2. 誘導されるメタロチオネイン量は、X線照射後の時間とともに増大する。
3. このメタロチオネインは  $Zn^{2+}$  を含むが、 $Cd^{2+}$ とも結合する能力がある。
4. このメタロチオネインは、SDS-PAGEパターンから11,000と9,000の分子量をもつ二つの蛋白から成り、 $Zn^{2+}$ 誘導のそれと同一の泳動を示す。

## 文 献

1. L. Eldjarn: Sulfhydryl-disulfide protection mechanisms and the isolated of a protection target structure from mammalian cell nuclei. In *Cellular Radiation Biology*, Williams and Wilkins Company, Baltimore, pp 305—325, 1965.
2. I. Bremner and B.W. Young: Isolation of (copper, zinc)-thioneins from pig liver. *Biochem. J.* **155**, 631—635, 1976.
3. P. Pulido, J.H.R. Kägi and B.L. Vallee: Isolation and some properties of human metallothionein. *Biochemistry* **5**, 1768—1777, 1966.
4. R.H.O. Buhler and J.H.R. Kägi: Human hepatic metallothioneins. *FEBS Letters* **39**, 229—234, 1974.
5. J.H.R. Kägi, S.R. Himmelhoch, P.O. Whanger, J.L. Bethune and B.L. Vallee: Equine hepatic and renal metallothioneins. *J. Biol. Chem.* **249**, 3537—3542, 1974.
6. I. Bremner and N.T. Davis: The induction of metallothionein in rat liver by zinc injection and restriction of food intake. *Biochem. J.* **149**, 733, 738, 1975.
7. M.P. Richards and R.J. Cousins: Mammalian zinc homeostasis: Requirement for RNA and metallothionein synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **64**, 1215—1223, 1975.
8. M. Webb: Binding of cadmium ions by rat liver and kidney. *Biochem. Pharmacol.* **21**, 2751—2765, 1972.

9. S.H.OH.J. T. Deagen, P.D. Whanger and P.H. Weswig: Biological function of metallothionein. V. Its induction in rats by various stresses. *Am. J. Physiol.* **234**, 282—285, 1978.
10. C. Beauchamp and I. Fridovich: Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**, 276—287, 1971.
11. A. Bensadoun and D. Weinstein: Assays of protein in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* **70**, 241—250, 1976.
12. U.K. Laemmli: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacferiophage T<sub>4</sub>. *Nature* **227**, 680—685, 1970.

**Induction of metallothionein synthesis in the liver of rats  
by X-ray irradiation**

**Kaname AONO**

**Department of Central Clinical Radiology**

**(Chief Director: Prof. M. Yamamoto);**

**Okayama University Medical School, Okayama, Japan**

Experiments were carried out on the rat liver metallothionein induced by X-ray irradiation. The following results were obtained. 1) The metallothionein content of liver cells increased for a certain time after X-ray irradiation. SOD activity showed an upward trend in accordance with the increasing metallothionein. 2) The increase in metallothionein content induced kept in certain level with the time course after irradiation. 3) This metallothionein contains  $Zn^{2+}$ , and also has the ability to bind  $Cd^{2+}$ . 4) The SDS-PAGE pattern indicated that this metallothionein consists of two subunits having molecular weights of 11,000 and 9,000 respectively. Also this metallothionein showed the same electrophoretic properties as that of  $Zn^{2+}$ -induced metallothionein.