

メタロチオネイン (重金属結合低分子量蛋白質) ; 最近の研究動向

小 島 豊

北海道大学大学院地球環境科学研究科環境情報医学講座

我々の健康を支えてくれる微量栄養素の中のひとつのグループとして金属がある。金属の働きとして、まず、生体の重要な反応を触媒している酵素の中に含まれ、多くのものはその活性中心として、酵素反応に直接関与し、一部のものは、酵素蛋白質の構造維持に関係し、その安定に役立っている。例えば、アルコール脱水素酵素に含まれている2原子の亜鉛の内1原子は活性中心にありアルコールがアルデヒドに変わる反応を触媒し、もう1原子の亜鉛はアルコール脱水素酵素蛋白質の立体構造維持に必須だといわれている。

現在知られている酵素の約1/3は金属酵素であるといわれ、例えば、亜鉛を含む酵素は、1985年時点で223あると報告されている¹⁾。これら酵素に含まれている金属の重要性は、その酵素の生体内における生理的意義と同じだと考えられる。

この金属酵素とは異なり、酵素反応に直接関与せず、金属の代謝、すなわち金属の生体内への吸収、体液を介しての輸送、貯蔵、恒常性の維持などに関係している金属結合蛋白質がある。その主なものを表1に示した。カルモデュリンは、最初カルシウム結合蛋白質の名で研究されていたが、カルシウム受容蛋白質として、広くカルシウムイオンによる細胞機能制御に関与している。トランスフェリンとセルロプラスミンは血液中にあり、各々鉄、銅の輸送に、フェリチンは肝臓内において鉄の貯蔵に関係している。微量栄養素である、亜鉛、銅の生体内代謝を考える際に、重要な働きをしているのが、メタロチオネインと呼ばれる蛋白質である。

表1 金属代謝に関係する蛋白質

Ca	カルモデュリン
Fe	トランスフェリン フェリチン
Cu	セルロプラスミン
Zn, Cu, Cd, Hg etc.	メタロチオネイン

I. メタロチオネインとは

メタロチオネイン metallothionein, MT は、その名の示す如く、一口でいえば metal 金属の多い, thio 硫黄即ち硫黄を含むアミノ酸, システインの多い低分子量の ein 蛋白質であるといえることができる。

哺乳類のメタロチオネインの分子量は、ペプチド鎖の分子量約6100に含有金属の原子量が加わり6500から7000位、分子量の低い蛋白質である。この蛋白質は、アミノ酸61, ある種のもは62または68残基よりなり、その内システインの数は20で、その硫黄原子はすべてチオール thiol 基として金属と結合し、IIb 族金属の場合、7 原子の金属と結合している。

このメタロチオネインは、現在アメリカ・ハーバード大学医学部の教授である Vallee 博士によって研究が始められた (表 2)。第 2 次世界大戦前にヨーロッパからアメリカに移った Vallee 教授は、コロンビア大学医学部卒業後、ハーバード大学医学部内科の Thorn 教授のもとで白血病の白血球の亜鉛含有量の研究をはじめたが、当時の医学部での金属分析方法に疑問を持ち、マサチューセッツ工科大学で原子吸光法など新しい分光法を学び、再びハーバードに帰り、カルボキシペプチダーゼが亜鉛酵素であることを見付けた。Vallee 博士にとって非常に残念だったのは、これは世界で第 2 番目に発見された亜鉛酵素で、世界最初の亜鉛酵素, carbonic anhydrase (カルボン酸デヒドラターゼ) は、既に1940年に、Keilin と Mann によって発見されていた。Vallee 教授は、その後ずっと、亜鉛の研究を続け、生体における亜鉛の重要性を常に力説している。

この Vallee 博士が、周期律表を眺めた時、亜鉛のすぐ下にあるカドミウム、即ち同じような原子構造、化学反応性を持つカドミウムに関心を持ち、できれば、今度は世界で最初のカドミウム酵素を発見

表 2 メタロチオネイン研究の歴史

1957 発見	Matgoshes & Vallee	文献 2)
1960 精製 性質 命名	Kägi & Vallee	3), 4)
1964 カドミウムによる誘導	Piscator	5)
1976 蛋白一次構造決定	Kojima, Kagi & Vallee	6)
1978 ストレスによる誘導	Whanger & co-workers	7)
1980 DNA 一次構造	Palmirer & co-workers	8)
1985 蛋白立体構造 (NMR 法)	Wüthlich & co-workers	9)
1985 蛋白立体構造 (X 線回折)	Stout & co-workers	10)
メタロチオネイン国際会議 出版		
1978 第 1 回 於チューリッヒ	"Metallothionein"	11)
1985 第 2 回 於チューリッヒ	"Metallothionein II"	12)
1992 第 3 回 於つくば	"Metallothionein III, Biological Roles and Medical Implications"	13)

したいとの希望を持っても不思議ではないと思われる。文献を調べていた Vallee 博士は1941年太平洋戦争の始まった年でスターリングラード攻防戦の直前ソビエト・ロシアの科学アカデミー会報に掲載された Maliuga の論文¹⁴⁾を、この論文の発表後10年以上もたった1954年頃みつけた。このおくれた理由は第2次世界大戦とロシア語から英語への翻訳がおくれたこと、さらにこの論文がアカデミー会報の岩石鉱物学の部に発表されたためだそうである。チェコスロバキアで発展したポーラログラフィーを使って種々な試料のカドミウム含量を測った Maliuga は、論文の最後のパラグラフで、水銀中毒で死んだ人と心臓病患者の腎臓中にカドミウムが高濃度含まれていたと記載した¹⁴⁾。

1955年 Vallee 博士は、これの追試を分析化学者であった Margoshes に命じた。

彼は正確な分析法を用いて追試した結果、カドミウムが腎臓のしかも皮質に多く存在すること、またウマに一番多く含まれることを見付け、1957年 JACS アメリカ化学会誌に発表した²⁾。分析化学者であった Margoshes が発見の翌年 National Bureau of Standard (国立度量衡局)へ移ったあと、Vallee 博士は、当時スイスのチューリッヒ大学医学部を卒業し、卒業論文実験でカテコールアミンの研究をしたため基礎医学に関心を持ち、アメリカへ留学してきた若い Kagi 博士にこれの続きを命じた。この人が現在チューリッヒ大学生化学教授で、更にこの蛋白質を精製し、物理化学、光学的特性を記載し、化学組成を定めた^{3,4)}。またメタルとチオの多いことからメタロチオネインと命名したのも彼と Vallee 博士である³⁾。

一方、ストックホルムのカロリンスカ研究所の環境衛生に、スウェーデンのカドミウム鉱山の坑夫の職業病を研究していた Friberg 教授がおられ、実験的にカドミウムを注射した動物で、そのカドミウムは赤血球と結びついて血中を運搬され、肝、腎にたまるという説を提唱した。その助教をしていた Piscator 博士が、ウサギにカドミウムを注射すると、カドミウムは腎臓や肝臓に入り蛋白質と結合すること、この蛋白質は肝臓で普段はそう多くなく、カドミウムの注射によって含量が激増するいわゆる誘導 induce されることを明らかにした⁵⁾。

その後約10年間、細々とこの2つのグループのみで研究の続けられた、メタロチオネインも、1968年日本政府によるイタイイタイ病の原因の1つがカドミウムであるとの声明以来研究者の数もふえた。それでも、1978年に開催された第1回メタロチオネイン国際会議では、参加者もそう多くはなかった。この時の、トピックは蛋白一次構造が決定したこと、この蛋白質が自然界に広く分布していること、カドミウム中毒の際のこの蛋白質の役割などであった¹¹⁾。

1985年に第2回メタロチオネイン国際会議が開催されたが、その会でのトピックスは立体構造の決定で、Wüthrich らの二次元 NMR 構造解析と、Stout らの X 線回析による構造解析が、同時に発表された。さらに、メタロチオネインの分子生物学的研究の発展が注目を集めた¹²⁾。

1992年12月に、つくば市で第3回国際会議が、井村、木村、鈴木教授らを中心に開催され、メタロチオネインの生物学的役割と医学的応用を中心にとりあげられた¹³⁾。

本稿は、その会議のトピックのいくつかを取り上げ、我々の教室で行っている研究と併せて、メタロチオネイン研究の最近の動向について報告したい。

II. 化学構造と金属結合

II a. 蛋白一次構造と Conservativity (進化過程での保存性)

メタロチオネインは最初、動物中で一番カドミウム含有量の高かったウマ腎臓より精製され、最初のアミノ酸配列もそれで決められた⁶⁾。表3にウマ・1B型およびヒト・2型のアミノ酸組成を示す。全部で61残基のアミノ酸中約3分の1の20残基はシステインであり、ついでセリン、塩基性アミノ酸即ちリジン、アルギニンが多く、メチオニンが1つ含まれている。トリプトファン、フェニールアラニン、チロジンそれにヒスチジンは全く含まれていない。芳香族アミノ酸を欠いているため、280nmの蛋白特有の吸収ピークは認められない。

ヒト・2型のアミノ酸配列を図1に示す。システイン20残基はペプチド鎖の全体にわたって分布しているが、-Cys-x-Cys-の形が多くその数は7組。この-Cys-x-Cys-の配列は、意外に珍しく、今までアミノ酸配列の決められた蛋白質につき注意深く調べたが殆ど存在していなかった。羊毛や毛髪のケラチンの-Cys-Cys-、フェレドキシンの-Cys-x-y-Cys-と並んでメタロチオネインに特有な配列だということができる^{6,15,16)}。

その後、このウマのアミノ酸配列と殆ど同じメタロチオネインは、ヒトから、カビの一種である *neurospora* まで、数多くみつげられた。さらに、同じ種、同じ臓器中でも、アミノ酸の一部が置換し

表3 メタロチオネインのアミノ酸組成^{6,15,16)}

アミノ酸	1分子中の残基数	
	ウマ・1B型	ヒト-2型
システイン (C, Cys)	20	20
セリン (S, Ser)	8	8
リジン (K, Lys)	7	8
アルギニン (R, Arg)	1	
アラニン (A, Ala)	7	7
グリシン (G, Gly)	5	5
アスパラギン酸 (D, Asp)	2	3
アスパラギン (N, Asn)	1	1
グルタミン酸 (E, Glu)	1	1
グルタミン (Q, Gln)	2	1
スレオニン (T, Thr)	2	1
プロリン (P, Pro)	2	2
バリン (V, Val)	1	3
イソロイシン (I, Ile)	1	
メチオニン (M, Met)	1	1
計	61	61

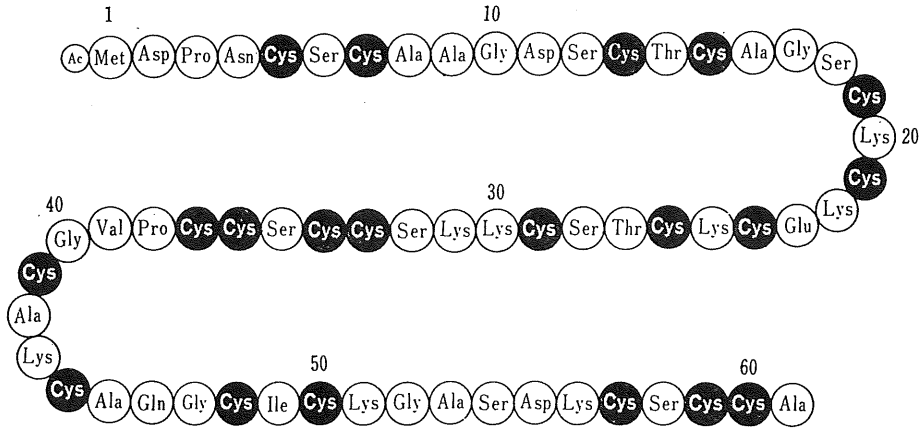


図1 ヒト・メタロチオネイン-2型のアミノ酸配列¹⁶⁾

ているイソ蛋白質が存在する^{15,16)}。これらイソ蛋白質の組成が、分化・発生や成長段階・生理的条件下で異なることは、以前より知られていたが、ヒトのイソ蛋白質6種を分別定量することに成功し¹⁷⁾、臨床検査への応用も考えられている。

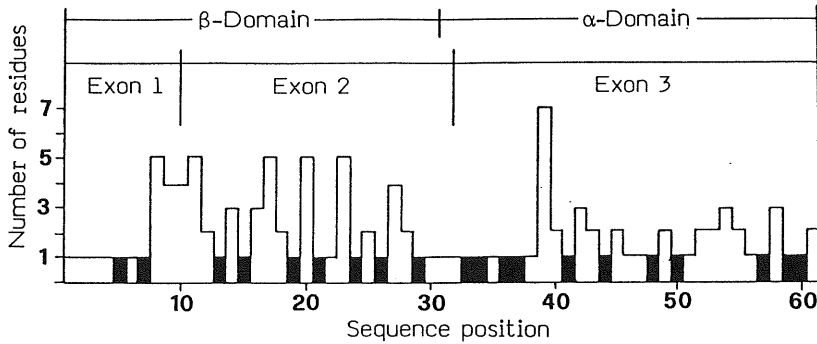
現在 DNA 配列の側からの研究も含め100近くのメタロチオネインの蛋白一次構造がわかっている。表4は、ヒトからカビ *neurospora* のメタロチオネインの主なものの一次構造をくらべたものだが、枠で囲まれたシステイン残基はカビからヒトまでほとんど変わっていない^{16,18)}。どの位変化したか、或いはしなかったかをあらわしたのが図2で金属と結合するシステイン残基はすべて1すなわち1回の置換もなく長い進化の過程で完全に保存されている¹⁶⁾。さらにシステイン残基の近傍に位置するセリン残基、塩基性アミノ酸残基も、進化の過程で殆ど変化を受けず、非常によく保存されている。

最近、-Cys-x-Cys-の構造は所有してはいるがその数が少ない蛋白質がウニ、イーストや他の微生物から精製されアミノ酸配列が決められた。第2回メタロチオネイン国際会議で設置されたメタロチオネイン国際命名委員会では、これらをClass IIメタロチオネインと、哺乳類に多く認められる、-Cys-x-Cys-配列の多い蛋白質を、Class Iメタロチオネインと命名することが提唱された¹⁹⁾ (表5)。さらに最近植物を重金属の入った培地で水耕培養すると、根などにカドミウム結合高分子物質の蓄積することがわかり、この物質が精製され、化学構造が決定された。これがグルタチオンのポリマーの構造を持ち、メタロチオネインの生理的役割、進化論的意義をグルタチオンとの関連において興味を持たれる。このポリペプチドはClass IIIメタロチオネインと命名された。

表4 ストロチオネインの蛋白一次構造の比較^{16),18)}

	1	10	20	30	40	50	60	
Horse	MT-1B	MDP.NQSCVA	GESCTD	AGSCKKQ	QRA.SCK.K.S.C	CSGCPV	GRCA..QGVCKG.....	ASDKC.S.C
	MT-1A	PT	G	T	E	T	T	
	MT-1L54	PT	G	T	E	T	T	
	MT-1R39	PT	G	T	E	T	T	
Human	MT-1a	AT	G	T	E	K	T	L
	MT-1b	TT	G	A	E	K	T	S
	MT-1e	AT	G	A	E	K	T	E
	MT-1f	A	V	S	E	K	T	E
	MT-1g	A	V	S	E	K	T	E
	MT-1h	A	V	S	E	K	T	E
	MT-1i	A	V	S	E	K	T	E
	MT-1k	A	A	V	S	E	K	T
	MT-1l	SP	VG	A	E	K	T	T
	MT-2	A	D	D	E	K	T	T
Monkey	MT-3	PS	G	D	E	G	K	T
	MT-1	AT	V	D	D	E	K	T
	MT-2	ET	D	D	E	K	T	T
Pig	MT	PT	G	S	T	E	K	T
Rabbit	MT-1a	AT	N	S	E	K	T	T
	MT-2a	A	A	D	N	T	A	K
	MT-2b	AT	D	S	N	E	K	T
	MT-2c	ATA	D	S	N	E	K	T
	MT-2d	AT	RD	A	S	E	K	T
	MT-2e	AT	RD	A	S	E	K	T
Mouse	MT-1	ST	G	TS	A	N	K	T
	MT-2	AS	DG	S	A	N	K	T
	MT-3	ET	P	PT	G	SDK	T	N
	MT-4	GE	T	MS	GI	I	GDN	T
Dorphin	MT-II	T	G	I	GDN	T	N	R
Chickin	MT	QD	T	A	D	S	N	E
Trout	MT-A	.E	SK	TG	N	G	SN	A
	MT-B	.E	SK	TG	N	G	SN	A
Crab	MT-1	.PG	P	.ND	K..V	KEGGCK	EG	Q
	MT-2	.PD	P	.ND	K..V	KEGGCK	EG	Q
N. crassa		G	D	G	SG	AS	N	G

注) ウマ・MT-1B と異なるアミノ酸残基のみを記した。



注) ヒト・MT-1a, -1b, -1e, -1f, -1g, -1h, -1i, -1k, -1l, -2, サル・MT-1, -2, ウマ・MT-1A, -1L54, -1R-39, -1B, ウシ・MT-1, -2, ヒツジ・MT-1, イヌ, ウサギ・MT-1a, -2a, -2b, マウス・MT-1, -2, ハムスター・MT-1, -2, ラット・MT-1, -2, のアミノ酸配列を用う。

図2 メタロチオネインのアミノ酸配列の保存性¹⁶⁾

表5 メタロチオネインの分類^{16,18,19)}

Class I Metallothionein

(Cysteine 残基の配列, ウマ・MT-1B と同じ)

		1	20	40	60
Horse	MT-1B	MDP	NCSCVAGESCTCAGSCKCKQCRCASCCKKSCCSCCPVGC	AKCAQGCVCVCKGASD	KCSCCA
Human	MT-2	MDP	NCSCAAGDSCTCAGSCKCKECKCTSCCKKSCCSCCPVGC	AKCAQGCICVCKGASD	KCSCCA
Chicken		MDPQDCTCAAGDS	CSCAGSCKCKNCRCSRCSKSCCSCCPAGC	NNCAKGCVCVCKEPASSKSCCH	
Trout	MTb	MDP	CECSKTGSCNCGSCKCSNCACTSCCKKSCCPCPSD	CSKCSAGCVCVCKCKTC	DTSCCQ
Crab	MT-2	PDP	C C NDKCDCKEKEGCKTGCKCTSCR	CPPCEQCSSGC	KCANKEDCRKTCSKPCSCCP
N. crassa			GDCGCSGASSCNCGSGCSCSNCGSK		

Class II Metallothionein

(Cysteine 残基の配列, ウマ・MT-1B と異なる)

		1	20	40	60
Sea urchin	MTa	MPDVKVCVCCTEGKECACFQDCCVTGECCKDGTCCGIC	TNAACKCANGCKKCGSGCSCTEGNAC		
Yeast		QNEGHECQCQCGSCKNNEQCQKSCSCP	TGCNSDDKPCGKNSSEETKKS	CSCSGK	
Weat germ (E ₆ protein)		GCNDKCGCAVPCPGGTGCRCT	SARSGAAAGEHTTCGCGEHC	GGNPCACGGEGTPSGCAN.....	
Cyanobacterium		TSTTLVKCACBPCLCNVDPSKA	IDRNLGYCCCEACADGHTGGSKG	CGHTGCNC	

Class III Metallothionein

(γ -Glutamyl-cysteinyl)_nglycine

Glutathione : γ -Glutamyl-Cysteimyl-gly

		1	10
S. pombe	(cadystin A)	e	CeCeCG
R. canina	(phytochelatin, PC ₈)	e	CeCeCeCeCeCeCeCeCG
P. vulgaris	(homophytochelatin, h-PC ₇)	e	CeCeCeCeCeCeC- -alanine

II b. 立体構造と金属結合

メタロチオネインの立体構造研究の特徴は、Wüthrich らによる二次元 NMR (核磁気共鳴) 解析^{9,20)} と Stout らによる X 線結晶回折^{10,21)} の両方の研究が競合しあい、その双方から決定されたという点にある。メタロチオネインは、分子量が低いという点、その含有金属であるカドミウムに NMR active なスピンの¹¹³Cd とスピンの⁰の¹¹²Cd がある点で、核磁気共鳴研究にとっては、非常に幸運な材料であった。1980年にイエール大学の Otovos と Armitage は、金属結合部位が2つのクラスター B, A にわかれていることを報告した²²⁾ (図3) が、1984年にスイス、チューリッヒ工科大学の Wüthrich のゲ

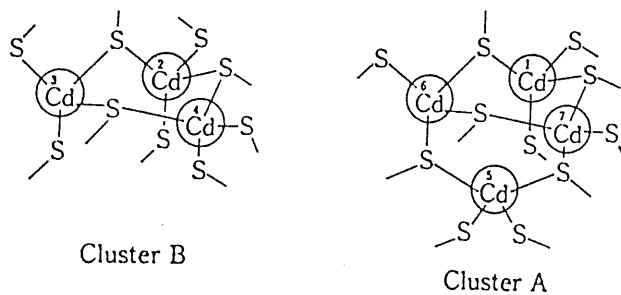


図3 メタロチオネインの金属結合部位の構造：クラスター B, A²²⁾

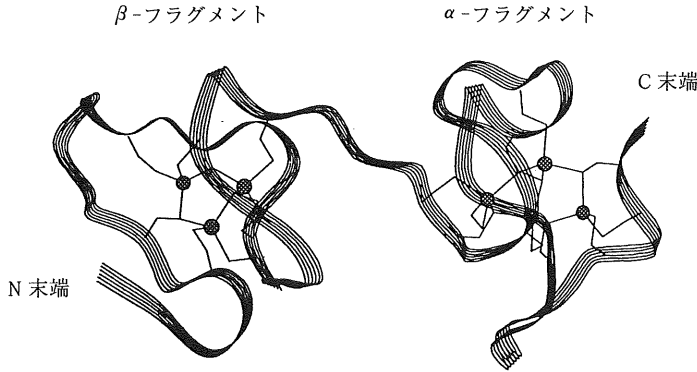


図4 メタロチオネインの立体構造^{9,10,18,20,21}

ループは、2次元核磁気共鳴解析法を用いて溶液中の高次構造を決定した²⁰。チューリッヒ工科大学には、1992年核磁気共鳴による化学構造の解析でノーベル賞を受賞したErnst教授がおられ、その弟子であるWüthrichがメタロチオネインのNMRによる立体構造の決定に着手した。簡単にいうと¹¹³Cdと¹H（プロトン）の核磁気共鳴スペクトルの二次元図形をコンピューターで解析することにより、どのシステイン残基がCdと結合しているかを決め、図4に示した構造を決定した。これは、核磁気共鳴法による世界最初の蛋白の立体構造決定になった。

Otovoらによって示された如く、7原子のⅡb族金属は、tetrahydralの形をとり、金属クラスターBとAを構成している（図3）。これら2つのクラスター、すなわち、3原子のカドミウムを含むクラスターBがアミノ末端側第1～30残基のβ-フラグメントに、4原子のカドミウムを含むクラスターAがカルボキシ末端側第31～61残基のα-フラグメントに存在していることが証明された¹⁶（図4）。一方結晶構造もきめられたが²⁰、核磁気共鳴の結果と同じで、結局メタロチオネインは2つのフラグメントよりなり、その各々に金属クラスターを持つことが確認された。

II c. 遺伝子構造と人工金属蛋白質

1980年にマウス・メタロチオネインのDNA一次構造が発表されて⁸)以来、数多くのDNA構造が決定された^{23,24}。それから推定されたアミノ酸配列は、既に決められていた蛋白質の側から決定されたアミノ酸配列と同じで、特記すべきことはなかったが、遺伝子の上に予想以上のイソ蛋白質の遺伝子の存在することがわかった。例えばヒトの場合、約14の異なった遺伝子が見付かっている²³。それにも増して重要なのは、蛋白質をコードするDNAの5'側すなわち上流側の、プロモーター、エンハンサーと呼ばれる調節領域の研究で、メタロチオネインの生合成の調節が、すなわちメタロチオネインの誘導が、どのような機序で起こるかについての情報が提供された。現在、金属調節部位が2箇所、グルコシルコイド調節部位が1箇所、多くの種において認められている。

さらに、インターフェロン、インターロイキン-Iの誘導に関係する部位も調べられた²³（図5）。

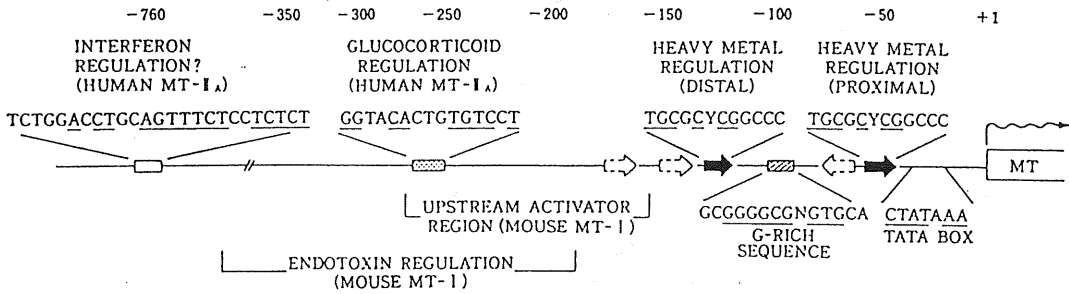


図5 メタロチオネイン遺伝子：プロモーター領域^{23,24)}

このメタロチオネイン調節遺伝子と、他の蛋白質を作る遺伝子を遺伝子工学的手法で繋ぎ、この遺伝子を卵子の中に入れる。生まれてきた動物に金属例えば亜鉛を常に与えると、調節遺伝子の金属調節部位が常に働き、下流にある蛋白質をどんどん作れという命令が出される。下流に、成長ホルモンの遺伝子を繋ぎあわせた遺伝子を持たされた動物に、亜鉛を与えると、成長ホルモンがどんどん合成され続け、その結果生じたのが、体重が約2倍のスーパーマウスと呼ばれる、世界で始めて成功した transgenic の動物であった²⁵⁾。

我々の教室では、メタロチオネインの DNA 構造を参考に、種々な DNA を DNA 合成機で合成し、図6のように大腸菌の DNA 中に組み込み大腸菌で発現させた。この例は α -フラグメントをコードする gene を組み入れた方法を示した。 α -や β -フラグメントは、はじめ、メタロチオネインを蛋白分解酵素によって切断して得られたフラグメントで研究がなされたが、我々は、 α -フラグメントの c-DNA を合成、大腸菌内に組み込み、発現させ、Cd 結合 α -フラグメントを得るのに成功した。すなわち、 α -フラグメントは生合成の際先に合成される β フラグメントの関与なしに生合成され金属結合も正常のものほとんど変わらないことがわかった。現在その金属選択性と立体構造の詳細を調べることにより、なぜクラスター構造をもつ2つのフラグメントより構成されているのかという問題の解明にも役立つのではないかと期待している。

また、金属結合部位であるシステイン残基の一部をアラニンにかえ、これらの人工蛋白質を用いて、金属蛋白質が生合成の過程でどのようにして金属をとりこんでいくのかの研究も行っている。図7は、生合成のはじまる N 末端側の最初のシステイン2残基 (矢印) をアラニンにかえ金属結合にどのような変化を与えるか調べた。ワイシャツの上の2つのボタンの穴をふさがれた場合、どのようにボタンをかけていくのか、あるいはジッパーのようにはじめの部分がこわれると全く動かなくなるかを調べた結果、2つのシステインの置換にもかかわらずメタロチオネインが発現され、カドミウムと結合することができた。これにより、生合成過程での金属の取込み機構やその生理的意義の解明にむけて研究を行っている。

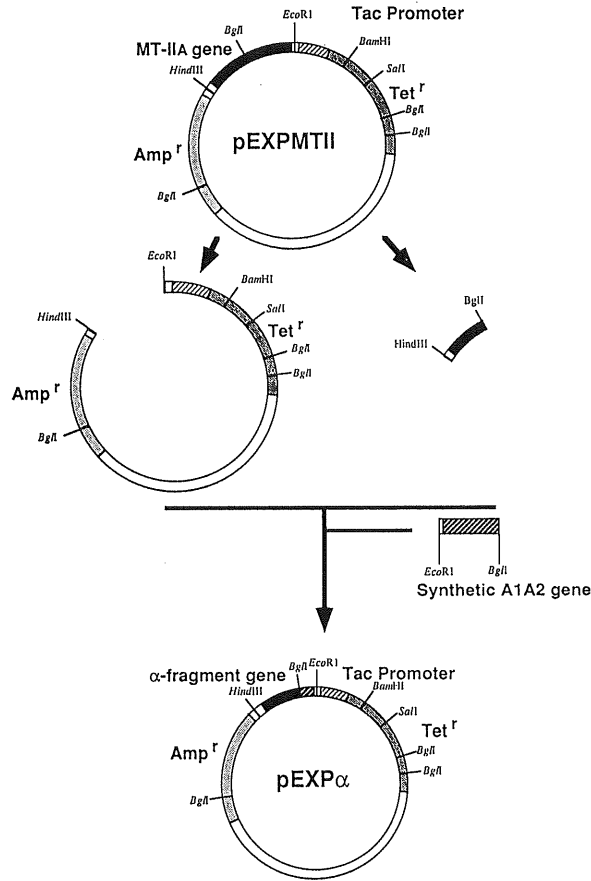
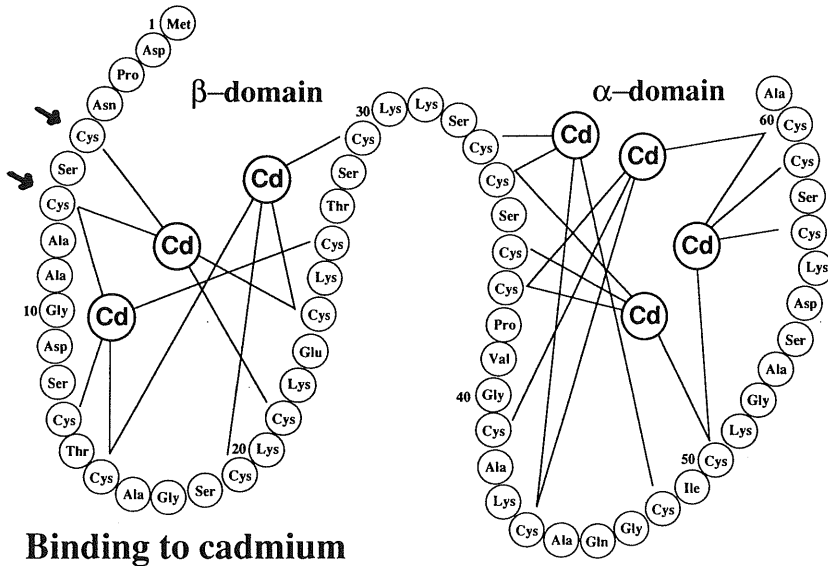


図6 ヒト・メタロチオネイン-2型 α-フラグメントの発現ベクター



Binding to cadmium

図7 部位特異変異法による Cys-5, Cys-7の Ala への置換

Ⅲ. 生理的役割

1960年、メタロチオネインの命名を提唱した論文中で、Kägi & Vallee は、メタロチオネインの金属とシステインを多く含むという化学構造から類推できる生理的機能として表6にあげたごとく、考えられる全てを記載した³⁾。その後30年間にこの中で触媒作用すなわち酵素作用以外は、メタロチオネインの役割として確立されつつある。その詳細についてはいくつかの総説^{15,26)}を参考にさせていただき、ここでは最近の研究について述べたい。

表6 メタロチオネインの機能³⁾

Metallothionein Functions (Kägi & Vallee ³⁾)	
1. Catalysis	触媒(酵素)作用
2. Storage	重金属の貯蔵
3. Detoxification	〃 解毒
4. Transport	〃 輸送
5. Immune Phenomena	免疫現象
6. Homeostatic Mechanisms	重金属の恒常性維持

Ⅲ a. 遺伝性銅代謝異常症と銅メタロチオネイン

北海道大学に実験生物センターという種々の系統の実験動物を、管理・繁殖・飼育しているセンターがある。ここで実験動物の繁殖・飼育を行っておられた、加々美和子さんが多数のラットを飼育されている際に、非近交系LEラットより体の毛の色の変った変異種をみつけられた。変異種は、毛の色が我々が見れば茶色乃至は黄色、加々美さんは、シナモン色と判定され、LEC (Long Evans with cinnamon-like coat color) と名付けられた。比較として、同じLE系から得られたのが、LEA (Long



図8 LECラットの自然史²⁷⁾

Evans with an agouti coat color) ラットで対照として用いられている。

この変異種は、体毛がシナモン色という他に、生後約4ヶ月で肝炎を発症し、肝炎による死をまぬがれたラットは、その後、すべて肝癌を発症することが知られている (図9)²⁷⁾。

勿論このラットは、医学部附属癌研究施設の病理部門の小林博教授の研究室で、研究が続けられた。このラットの研究をしていた李宇博士がある日、肝臓の灌流実験を行ったところ肝臓の色がおかしいことに気づき、金属の蓄積があるのではないかと、我々の研究室に相談された。

そこで我々の教室で肝臓中の金属の定量を行ったところ、肝臓中の銅の濃度が正常の約40倍異常になることがわかった。表7に示したごとく、新生児に高い銅が正常では1ヶ月で低い値になるのに比べ少しは減るが2ヶ月以後どんどん高くなり、4ヶ月以前の肝炎発症前のラットでも高く、正常の100倍近くになっていた^{28,29)}。すなわち、このラットは肝臓中に異常に銅を蓄積することが証明され、一方血清中銅濃度は低いことがわかった。

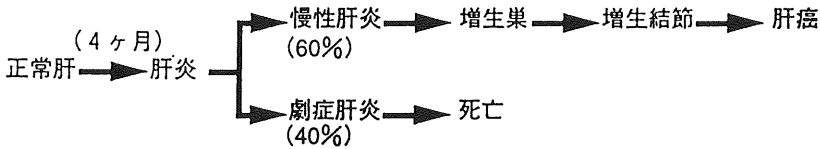


図9 LECラットの自然史²⁷⁾

表7 LECラットの肝臓中銅濃度²⁹⁾

Age	Sex	Copper concentration ($\mu\text{g/g}$ wet weight)	
		LEC	LEA
2 days	Male	148.0 \pm 6.8 ^{a)}	49.5 \pm 1.0
	Female	151.1 \pm 10.4 ^{a)}	48.1 \pm 2.3
1 month	Male	75.7 \pm 7.5 ^{a, d)}	3.1 \pm 0.1
	Female	93.3 \pm 14.2 ^{b, d)}	3.0 \pm 0.1
2 months	Male	170.2 \pm 8.4 ^{a, f)}	3.2 \pm 0.2
	Female	188.7 \pm 7.8 ^{a, f)}	3.3 \pm 0.3
3 months	Male	253.6 \pm 72.0 ^{a)}	3.5 \pm 0.1
	Female	282.9 \pm 51.7 ^{a)}	2.9 \pm 0.1
8 months	Male	213.4 \pm 3.3 ^{a)}	3.4 \pm 0.1
	Female	152.7 \pm 27.4 ^{a)}	3.3 \pm 0.2
29 months	Male	210.1 \pm 34.7	nd

Data are means \pm SE with 3 to 5 rats.

a) $P < 0.001$, b) $P < 0.005$, c) $P < 0.05$ vs. age- and sex-matched LEA rats; d) $P < 0.001$, e) $P < 0.05$ vs. sex-matched 2-day-old LEC rats; f) $P < 0.001$ vs. sex-matched 1-month-old LEC rats by unpaired Student's t test. nd, not determined.

我々の教室をはじめ多くの研究室で、この肝臓中に異常に蓄積された銅がどのような生体成分と結合しているか調べたところ、低分子量蛋白質であるメタロチオネインと結合していることが証明された。特に過剰量の銅のほとんどは、このメタロチオネインと結合した銅であることがわかった。こうなると、有害金属が過剰量あれば、メタロチオネインが誘導され、そのメタロチオネインが有害金属を無毒化するという従来の考え方に反し、メタロチオネインが銅と結合し肝臓に蓄積すると、肝炎・肝癌をひきおこすということになる。現在そのイソ蛋白質組成、結合金属数などについて研究を行っている。

ヒトの遺伝性銅代謝異常症として、表8に示した如く、Wilson病とMenkes病の2つの疾患があるが、その後の研究によりいくつかの疑問点が残されているが、LECラットは、ヒトWilson病のモデル動物として確立されつつある。

このWilson病と並んでヒトのもうひとつの遺伝性代謝異常症にMenkes病がある。この疾患は、腎臓と脾臓にのみ、銅が大量蓄積し、他の臓器、肝臓や脳では、銅欠乏になり、発育、精神障害を引き起こす病気で、現在ヒトの場合、治療法はなく、3歳迄に死亡するという病気で、以前、剖検後の腎臓250mgを名古屋市立大学医学部小児科xx教授からいただき、協同研究を行った。正常児の肝臓に含まれている銅は、この疾患ではほとんどなく、正常児の腎臓には少ない銅が、この疾患では激増していた。正常の肝臓やMenkes病の腎臓に大量蓄積している銅は、やはりメタロチオネインと結合して存在していた。

この病気のモデル動物も、現在浜松医科大学の西村正彦助教授が発見され³⁰⁾、西村先生よりいただいたマウスの腎臓に大量蓄積するのは、銅メタロチオネインであることを証明した。このモデルマウス

表8 遺伝性銅代謝異常症

Wilson病 (Hépatolenticular degeneration, 肝レンズ核変性症)

常染色体劣性遺伝

銅の過剰沈着 (肝, 腎, 脳の基底核, 角膜)

三主徴; 肝硬変

進行性神経症状 (運動失調)

Keyser-Fleischer 角膜炎

治療法; キレート剤による銅の除去, 低銅食

血清銅およびセルロプラスミン低値

銅の胆汁排泄機能障害

Menkes病 (Menkes' kinky hair disease)

伴性劣性遺伝 男児 35000 に1人

銅の体内分布の乱れ (肝, 脳などで欠乏, 腎などに蓄積)

三主徴; 頭髮異常 (硬いちぢれ毛)

重篤で進行性の中樞神経症状 (痙攣発作)

成長障害

治療法; なし 3歳までに死亡

血清銅およびセルロプラスミン低値

の場合、出生後7日と10日に銅を注射すると、生き永らえ子孫をつくることができるが、ヒトの場合にはこの方法は効果がなく、現在この病気の子供を救うことはできない。

Ⅲ b. アルツハイマー病の脳内で激減する神経成長抑制因子 (GIF, Growth Inhibitory Factor) とメタロチオネイン

正常の脳に多量存在する神経成長抑制因子 (GIF, Growth Inhibitory Factor) が、アルツハイマー病の脳で著しく減少していることが、東京都老人総合研究所の内田洋子博士によって報告された³¹⁾。

アルツハイマー病の痴呆は、タウ蛋白質のニューロン内への沈着による NFT (neurofibrillary tangle) や curly fiber の出現と相関するとされ、ニューロンの異常な再生がおこり、これがニューロンを変性させ脱落させると解釈されている。事実、アルツハイマー病患者の脳の抽出液を加えて、ニューロンの培養を行うと、ニューロンの生存や突起形成が著しく促進される。最初は、神経栄養因子活性 (neurotropic activity) が高いと思われたが、実際は成長抑制因子がアルツハイマー病の脳で非常に減少し、それがニューロンの異常な再生を抑制できなくなっていると考えられた。内田博士は、この成長抑制因子 (GIF) を、培養ニューロンを使ったバイオアッセイ系を用いて、世界で初めて精製、単離した³¹⁾。

この神経成長抑制因子 (GIF) はアミノ酸68残基よりなり、アミノ酸配列はメタロチオネインに非常に近い構造をしていた。表9に示すように、61残基のヒト肝臓に存在するメタロチオネイン-2型に、1アミノ酸残基がN末の近くに、6アミノ酸残基がC末の近くに、各々挿入された構造を持ち、アミノ酸残基の相同性は約70%であった。この型のメタロチオネインは、遺伝子の解析から既に、メタロチオネイン-3型と命名され、メタロチオネイン・ファミリーの一員として報告されていたこともわかった¹⁸⁾。

従来のメタロチオネインが主に肝臓や腎臓に存在しているのに対し、GIFは正常な脳に主に存在し、アルツハイマー病の脳では異常に減少していると結論づけられた。正常の脳におけるGIFの機能、役割についての研究の発展が期待される。

		1	10	20	30	40	50	60
Human	MT-2	MDP	NCSCAAGD	SCTCAGSCKCKECKCTSCCKKSCCSCPVGCAKCAQGCICKGASD				KCSCCA
Human	MT-3	MDPETCP	PCPSGGSCTCADSCKCEGCKCTSCCKKSCCSCP	AECEKCAKDCVCKGG	EAAEA	EAEK	CCSQ	
<u>Growth Inhibitory Factor</u>								
GIF		MDPETCP	PCPSGGSCTCADSCKCEGCKCTSCCKKSCCSCP	AECEKCAKDCVCKGG	EAAEA	EAEK	CCSQ	

表9 神経成長抑制因子 (Growth Inhibitory Factor)³¹⁾

III c. 多機能蛋白質

メタロチオネインの生理的意義を、どういう物質または生理的条件でその合成が誘導されるかという点から考察する立場にたつと、現在、メタロチオネインを誘導する因子は、表10に示すごとく、あまりにも数多く見付かりすぎている^{18,32)}。

表10 培養細胞または生体でメタロチオネインを誘導する因子^{16,35)}

金属イオン	抗生物質
Cd, Zn, Cu, Hg, Au, Ag, Co, Ni, Bi	Streptozotocin
ホルモンおよびセカンド、メッセンジャー	Cycloheximide
Glucocorticoids	Mitomycin
Progesterone	細胞毒
Estrogen	Hydrocarbons
Catecholamines	Ethanol
Glucagon	Isopropanol
Angiotensin II	Formaldehyde
Arg-Vasopressin	Fatty acids
Adenosine	Butyrate
cAMP	Chloroform
Diacylglycerol	Carbon tetrachloride
Ca	Bromobenzene
生長因子	Iodoacetate
Serum factors	Urethane
Insulin	Ethionine
IGF-1	Di (2-ethylhexyl) phthalate
EGF	α -Mercapto- β -(2-furyl) acrylate
炎症因子およびサイトカイン	6-Mercaptopurine
Lipopolysaccharide (LPS) s	Diethyldithiocarbamate
Garrageenan	Penicillamine
Dextran	2, 3-Dimercaptopropanol
Endotoxin	2, 3-Dimercaptosuccinate
Interleukin-1	EDTA
Interleukin-6	5-Azacytidine
Interferon- α	Acetaminophen
Interferon- γ	Iodomethacin
Tumor necrosis factor	ストレス誘起条件
腫瘍プロモーターおよびオンコジーン	飢餓
Phorbol esters	感染
ras	炎症
ビタミン	開腹手術
Ascorbic acid	身体的ストレス
Retinoate	X線照射
1 α , 25-Dihydroxyvitamin D ₃	酸素高圧
	紫外線照射

表11 メタロチオネインの生理的役割

重金属	代謝 (吸収, 輸送, 貯蔵, 恒常性維持)
	解毒, 保護作用
生体防御機構	
	免疫現象
	ストレス
	身体的ストレス
	心理的ストレス
	フリー・ラジカルの捕捉
	放射線防護
	酸素毒性防護

特異性を重視する観点から見ると、メタロチオネインの生理的意義が拡大するたびに、その価値を低下しているのも否めない。しかし、例は悪いかもしれないが、アデニン・ヌクレオチドは核酸の構成成分であり、高エネルギーの貯蔵物であり、また少し変化を受けると細胞のセカンド・メッセンジャーになっていることを考えると、ある種の生体成分は、多くの機能を持つともいえるかも知れない。メタロチオネインは、このような多機能蛋白質といえるのではないかと思われる (表11)。

このメタロチオネインに関する研究が、微量栄養素の研究に、少しでも役立てば大変幸いだと考えている。

REFERENCES

- 1) Vallee, B. L. : Implications and inferences of metallothionein structure. in "Metallothionein II" *Experientia*, Suppl. 52 : edited by Kägi, J. H. R. & Kojima, Y., pp. 5-22, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, 1987.
- 2) Margoshes, M. & Vallee, B. L.: A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.*, 79: 4813-4814, 1957.
- 3) Kägi, J. H. R. & Vallee, B. L. : Metallothionein : a cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.*, 235 : 3460-3465, 1960.
- 4) Kägi, J. H. R. & Vallee, B. L.: Metallothionein : a cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex. II. Physicochemical properties. *J. Biol. Chem.*, 236: 2435-2442, 1961.
- 5) Piscator, M. : Om Kadmium i normala människonjur samt redogörelse för isolering av metallothionein ur lever från kadmiumexponerade kaniner (On cadmium in normal human kidneys together with a report on the isolation of metallothionein from livers of cadmium-exposed rabbits). *Nord. Hyg. Tidskr.*, 45 : 76-82, 1964.
- 6) Kojima, Y., Berger, C., Vallee, B. L. & Kägi, J. H. R. : Amino-acid sequence of equine renal metallothionein-1B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73 : 3413-3417, 1976.
- 7) Oh, S. H., Deagen, J. T., Whanger, P. D. & Weswig, P. H. : Biological function of metallothionein. V.

- Its induction in rats by various stresses. *Am. J. Physiol.* 234 : E282-E285, 1987.
- 8) Durnam, D. M., Perrin, F., Gannon, F. & Palmiter, R. D. : Isolation and characterization of the mouse metallothionein-I gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 : 6511-6515, 1980.
 - 9) Wagner, G., Frey, M. H., Neuhaus, D., Wörgötter, W., Braun, W., Vášak, M., Kägi, J. H. R., & Wüthlich, K. : Spatial structure of rabbit liver metallothionein-2 in solution by NMR. in "Metallothionein II" *Experientia*, Suppl. 52 : edited by Kägi, J. H. R. & Kojima, Y., pp. 149-157 Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, 1987.
 - 10) Furey, W. F., Robbins, A. H., Clancy, L. L., Winge, D. R., Wang, B. C. & Stout, C. D. : Crystal structure of Cd, Zn metallothionein. in "Metallothionein II" *Experientia*, Suppl. 52: edited by Kägi, J. H. R. & Kojima, Y., pp. 139-148 Birkhauser Verlag, Basel, Boston, 1987.
 - 11) Kägi, J. H. R. & Nordberg, M. (Editors) : Metallothionein. *Experientia*, Suppl. 34 : Birkhäuser Verlag, Basel, Boston. Stuttgart, 1979.
 - 12) Kägi, J. H. R. & Kojima, Y. (Editors) : Metallothionein II. *Experientia*, Suppl. 52 : Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, 1987.
 - 13) Suzuki, K. T., Imura, N., & Kimura, M. (Editors) : Metallothionein III. Biological Roles and Medical Implications, ALS, *Advances in Life Sciences: Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin.* 1993.
 - 14) Maliuga, D. P. : *Doklady Akad. Nauk, U. S. S. R.* 31, No.2, 145, 1941, Translation RJ-296 of the Associated Technical Services, Inc., POB 271, East Orange, New Jersey, U. S. A.; *Chem. Abstr.* 37. 1, 894, 1943.
 - 15) Nordberg, M. & Kojima, Y. (Editors) : Metallothionein and other low molecular weight metal-binding proteins. in "Metallothionein" *Experientia*, Suppl. 34, edited by Kägi, J. H. R. & Nordberg, M., Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Stuttgart, pp. 41-124, 1979.
 - 16) Kägi, J. H. R. & Kojima, Y. : Chemistry and biochemistry of metallothionein. in "Metallothionein II" *Experientia*, Suppl. 52 : edited by Kägi, J. H. R. & Kojima, Y., pp. 25-61, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, 1987.
 - 17) Hunziker, P. E. & Kägi, J. H. R.: Metallothionein : A multigene protein. in "Essential and toxic trace elements in human health and disease, edited by Prasad, A. S., pp. 349-367, Alan R. Liss, Inc., New York, 1988.
 - 18) Kägi, J. H. R. : Evolution, structure and chemical activity of Class I metallothionein : An overview. in "Metallothionein III, Biological Roles and Medical Implications, ALS, *Advance in Life Sciences: edited by Suzuki, K. T., Imura, N., & Kimura, M.* pp. 29-55, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin. 1993.
 - 19) Fowler, B. A., Hildebrand, C. E., Kojima, Y. & Webb, M. : Nomenclature of metallothionein. in "Metallothionein II" *Experientia*, Suppl. 52: edited by Kägi, J. H. R. & Kojima, Y., pp. 19-22, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, 1987.
 - 20) Frey, M. H., Wagner, G., Vášak, M., Sørensen, O. W., Neuhaus, D., Wörgötter, E., Kägi, J. H. R. Ernst,

- R. R. & Wüthrich, K. : Polypeptide-metal cluster connectivities in metallothionein 2 by novel ^1H - ^{113}Cd heteronuclear two-dimensional NMR experiments. *J. Am. Chem. Soc.*, 107 : 6847-6851, 1985.
- 21) Furey, W. F., Robbins, A. H., Clancy, L. L., Winge, D. R., Wang, B. C. & Stout, C. D.: Crystal structure of Cd, Zn metallothionein. *Science (Wash. DC)*, 231 : 704-710, 1986.
- 22) Otvos, J. D. & Armitage, I. M. : Structure of the metal clusters in rabbit liver metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 : 7094-7098, 1980.
- 23) Palmiter, R. D. : Molecular biology of metallothionein gene expression. in "Metallothionein II" *Experientia*, Suppl. 52 : edited by Kägi, J. H. R. & Kojima, Y., pp. 63-80, Birkhauser Verlag, Basel, Boston, 1987.
- 24) Hamer, D. H. : Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 913-951, 1986.
- 25) Palmiter, R. D., Brinster, R. L., Hammer, R. E., Trumbauer, M. E., Rosenfeld, M. G., Birnberg, N. C. & Evans, R. M. : Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 300 : 611-615, 1982.
- 26) Webb, M. : Toxicological significance of metallothionein. in "Metallothionein II" *Experientia*, Suppl. 52 : edited by Kägi, J. H. R. & Kojima, Y., pp. 109-134, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, 1987.
- 27) 森, 代謝, 270, 1990.
- 28) Li, Y., Togashi, Y., Sato, S., Emoto, T., Kang, J-H., Takeichi, N., Kobayashi, H., Kojima, Y., & Une, Y. : Spontaneous hepatic copper accumulation in Long-Evans cinnamon rats with hereditary hepatitis: a model of wilson's disease. *J. Clin. Invest.* 87,
- 29) Li, Y., Togashi, Y., Sato, S., Emoto, T., Kang, J-H., Takeichi, N., Kobayashi, H., Kojima, Y., Une, Y., & Uchino, J.: Abnormal copper accumulation in non-cancerous and cancerous liver tissues of LEC rats developing hereditary hepatitis and spontaneous hepatoma: *Jpn. J. Cancer Res.* 82, 490-492, 1991.
- 30) 西村正彦:先天性代謝異常症, 動物の疾患モデル, 小児科 MOOK, No33, 150-163, 1984, 金原書店.
- 31) Uchida, Y., Takio, K., Titani, K., Ihara, Y., and Tomonaga, M. : The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein like protein. *Neuron*, 7. 337-347, 1991.
- 32) Bremner, I.: Nutritional and physiological significance of metallothionein. in "Metallothionein II" *Experientia*, Suppl. 52 : edited by Kägi, J. H. R. & Kojima, Y., pp. 81-107, Birkhauser Verlag, Basel, Boston, 1987.