

LEC ラット肝臓中の銅-メタロチオネインと NO の反応

沖田 真由美, 辻 昭博, 櫻井 弘

京都薬大・代謝分析学

Reaction of NO (nitric oxide) and Copper-Metallothionein in the liver of LEC rats

Mayumi Okita, Akihiro Tuji and Hiromu Sakurai

Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University

LEC (Long-Evans Cinnamon) rats develop spontaneous hepatic injury associated with severe jaundice about 4 months after birth. Recently, we obtained evidence which shows an unusual accumulation of copper (Cu) in the liver of LEC rats, followed by finding of the copper-metallothionein (Cu-MT) induction. We suggest the mechanism for the development of the hepatitis in LEC rats in relation to the accumulated copper and induced Cu-MT. On the other hand, nitric oxide ($\cdot\text{NO}$) is known to play a wide variety of physiological role such as control of the blood pressure and immuno-reaction. NO has been shown to react with free SH-groups of proteins yielding nitrosothiols.

In the present study, we examined the age- and organ-dependent changes of NO in LEC rats. Then we studied the reaction of NO and Cu-MT in the liver of LEC rats.

Long-Evans Cinnamon (LEC) ラットは遺伝的に肝臓に銅を異常蓄積し、生後約4カ月より黄疸を発症し、肝ガンにいたる一連の病態を自然発症する特性を持つ実験動物である。そのため、Wilson病をはじめとするヒト肝疾患のモデル動物としての可能性が期待されている。我々はこれまでにLECラットの肝臓に銅が異常蓄積し¹⁾、それにより多量の銅-メタロチオネイン (Cu-MT) が誘導されることを明らかにした。更に、このCu-MTが健常ラットやウサギの肝臓中のMTとは異なり、過酸化水素と反応しやすく、ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) を産生することを見い出しており、これらがLECラットの肝炎発症に深く関与していると考えている^{2)~4)}。一方、一酸化窒素 (NO) は、生体内において血圧のコントロールや免疫反応などの生理的役割を持つことが知られており⁵⁾、ヘモグロビン、グルタチオン、さらにはMTとも結合することが報告されている^{6)~9)}。

今回、LECラットの臓器中のNOレベルとCu-MTとの関係について検討するため、実験を行った。

実験方法

5, 10および15週齢前後の雄, 雌の LEC ラット (Charles River Japan, Inc.) を使用した。肝臓, 腎臓および脳のホモジネート, また採取した血漿について亜硝酸イオン+硝酸イオンの濃度をグリース法を用いて測定した¹⁰⁾。肝臓のホモジネートについては Sephadex G-75 を用いたゲルろ過を行い, フラクションごとに銅, 亜鉛, MT 濃度, および 280nm の吸光度を測定した。銅および亜鉛は, フレームレス原子吸光法で, MT はラジオイムノアッセイ (RIA) 法¹¹⁾ で測定した。更に, MT を含むフラクションを濃縮し, 0.24mM ウサギの MT I, MT II および Cu-MT をそれぞれ 2.4mM 硫酸鉄および 1.9M 亜硝酸ナトリウムと 37°C で 10 分間反応させた後, 77K で ESR を測定した。また, 1~50 μ M ウサギの MT I, MT II, 1~5 μ M Cu-MT および 500 μ M グルタチオンをそれぞれ 10 μ M 亜硝酸ナトリウムと 37°C で 10 分間反応させた後, グリース法で残存する亜硝酸イオンを測定した。

結果と考察

Fig. 1 に示すように, 雄雌の LEC ラットとも, どの臓器においても亜硝酸イオン+硝酸イオンのレベルが週齢依存的に減少する傾向が見られたが, 雌性の方がその割合が高かった。一方, LEC ラットの MT レベルは週齢依存的に増加し, 特に肝臓における増加が顕著であることが知られている²⁾。そこで鉄イオン共存下において肝臓中の MT と NO との反応を ESR で検討した (Fig. 2)。ウサギの MT I, MT II および LEC ラットの Cu-MT の ESR スペクトルはすべて同様の ESR 線形を示し, g 値 2.04 および 2.014 が得られた。

これらと同様の ESR 線形を示す例がすでに鉄-システイン錯体, 鉄-BSA 錯体, フェリチン, フェレドキシンおよびコハク酸デヒドロゲナーゼ¹⁰⁾ などで知られている。これらは NO と反応しニトロシル鉄チオレート錯体を形成と報告されている。これらの g 値 (Table) と今回の ESR 測定より得られた g 値を比較すると, MT のチオール基が NO および鉄イオンと反応し, ニトロシル鉄チオレート錯体を形成していると考えられた。

鉄イオン非存在下で MT と NO を反応させ, 残存している NO をグリース法で測定した結果を Fig. 3 に示した。比較として用いたグルタチオンでは NO の減少はほとんど見られなかったが, 一方, MT では濃度依存的に NO が減少した。さらに, LEC ラットの Cu-MT はウサギの MT I や MT II と比べると, 減少の割合が高いことが分かった。

以上の結果より, LEC ラットの臓器中の NO は, 週齢依存的に減少する傾向が見られ, 週齢依存的に増加する MT が NO と反応し, NO を消去していることが示唆された。すなわち MT が NO と直接反応する可能性を示唆した。

参考文献

- 1) Hiromu Sakurai, Akihito Fukudome, Riichi Tawa, Masahiro Kito, Shigeo Takeshima, Masami Kimura, Noriko Otaki, Katsuya Nakajima, Takuroh Hagino, Kazuya Kawano, Shoji Hirai, Shoji Suzuki (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 1393-1397.

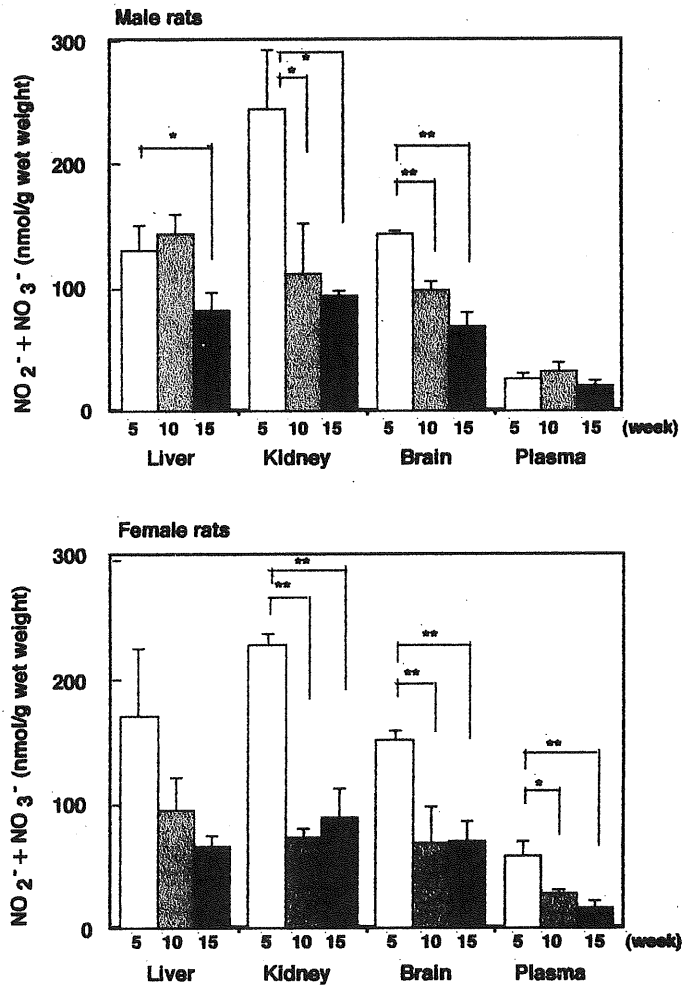


Fig. 1 Age- and organ- dependent changes of NO in terms of $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ in male and female LEC rats

Values are expressed as the mean \pm S.D. for 3 rats.

- 2) Hiromu Sakurai, Hiroko Kamada, Akihito Fukudome, Masahiro Kito, Shigeo Takesima, Masami Kimura, Noriko Otaki, Katsuya Nakajima, Kazuya Kawano, Takuroh Hagino (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 548-552.
- 3) Hiromu Sakurai, Katsuya Nakajima, Hiroko Kamada, Hiromi Sato, Noriko Otaki, Masami Kimura, Kazuya Kawano, Takuroh Hagino (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 893-898.
- 4) Hiromu Sakurai, Hiromi Sato, Akihiko Hatanaka, Takashi Sawada, Kazuya Kawano, Takuroh Hagino, Katsuya Nakajima, (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 313-318.
- 5) 室田誠逸編：NOの基礎と臨床。メディカルレビュー社，東京，1996.
- 6) Lancaster, Jr., J. R., and Hibbs, Jr., J. B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **87**. 1223-1227.

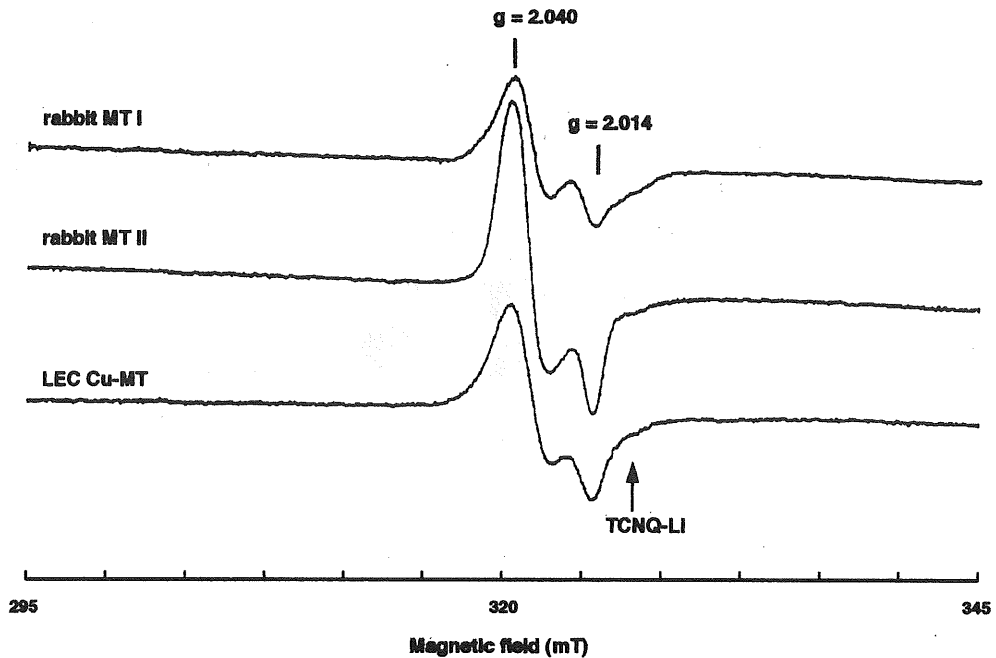


Fig. 2 ESR spectra at 77 K of MT in the presence of FeSO_4 and NaNO_2

Table ESR parameters for $[\text{Fe}(\text{II})(\text{SR})_2(\text{NO})_2]$ complexes

Proteins and iron complexes	Organism	g -values		Reference
Cysteine + Fe (II)		2.041	2.015	(7)
BSA + Fe (II)	bovine serum	2.046	2.015	(7)
Ferritin	horse spleen	2.038	2.011	(7)
Ferredoxin	<i>p. umbilicalis</i>	2.036	2.015	(7)
Succinate dehydrogenase	beef heart mitochondria	2.035	2.010	(10)
MT over-expressed Cell	transformed NIH-3T3 cell	2.040	2.014	(9)
MT I + Fe (II)	rabbit liver	2.040	2.014	This study
MT II + Fe (II)	rabbit liver	2.040	2.014	This study
Cu-MT + Fe (II)	LEC rat liver	2.040	2.014	This study

- 7) Drapier, J.-C., Pellat, C., and Henry, Y. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10162-10167
- 8) Mary Claire Kennedy, Tong Gan, et al, (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 2, 632-635
- 9) Schwarz, M. A., Lazo, J. S., et al (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **92**, 4452-4456
- 10) Hitoshi Habu, Isao Yokoi, Hideaki Kabuto and Akitane Mori, (1994) *Neurochemistry* 1571-1573
- 11) Nakajima, K., Suzuki, K., Otaki, N., and Kimura, M., (1992) *Method. Enzymol.* **205**, 387-395
- 12) Salerno, M. A. et al (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **73**, 833

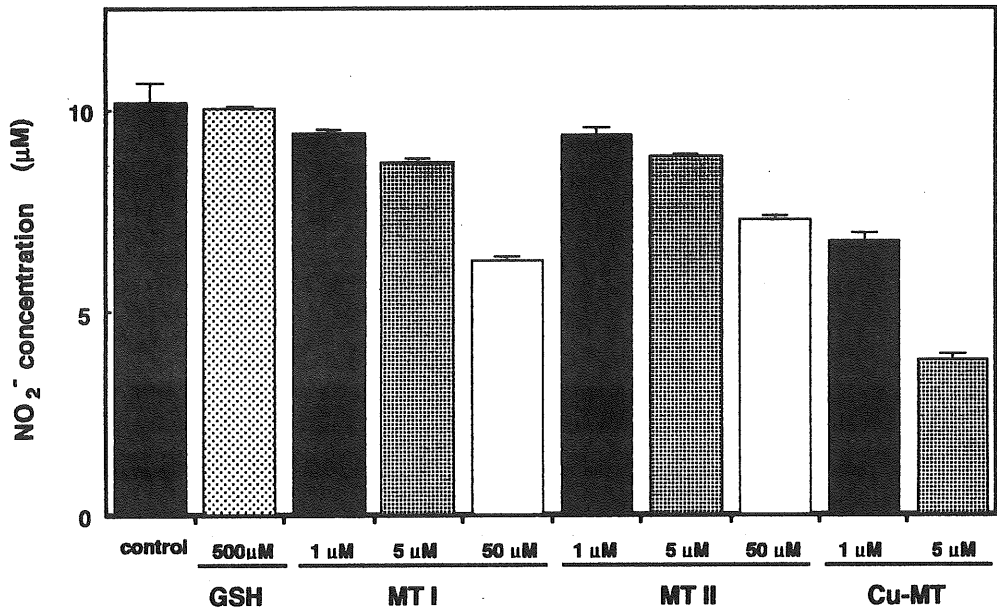


Fig. 3 Scavenging effect of NO by GSH, MT I, MT II and Cu-MT
Values are means \pm S.D. for 3 experiments.