

LECラット肝臓におけるMT-1およびMT-2の経日的変化

中村 俊輔, 河田 卓三, 桜井 弘
(京都薬科大学・代謝分析学教室*)

Age-dependent changes of MT-1 and MT-2 concentrations in the liver cytosol of LEC rats

Shunsuke NAKAMURA, Takumi KAWATA and Hiromu SAKURAI
*Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry,
Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto 607-8417, Japan*

Summary

We determined the concentrations of metallothionein-1 (MT-1) and MT-2 in the liver cytosol of Long-Evans Cinnamon (LEC) rats, an animal model of Wilson disease, which develop hepatic disorders spontaneously, by using capillary zone electrophoresis (CZE) with polyacrylamid-coated capillary. In addition, by comparing the values of MT by ELISA (total concentrations of MT-1 and MT-2), we confirmed that each concentration of MT-1 and MT-2 can be determined by CZE. Total MTs in the liver cytosol of LEC rats increased age-dependently with accumulation of Cu. MT-1/MT-2 ratio decreased age-dependently (1.73, 1.38 and 0.76), indicating that MT-2 was induced more than MT-1 with development of hepatic disorders.

ヒト肝細胞癌患者の肝臓において、銅濃度が上昇していることが報告されている¹⁻³⁾。肝炎を自然発症するLECラットは、肝臓に銅が蓄積しており、この銅の蓄積によりメタロチオネイン (MT) が誘導されると考えられている⁴⁻⁶⁾。MTは亜鉛やカドミウムなどの金属のほか、化学的および物理的ストレスなどによっても発現が誘導され、様々な機能を有していることが報告されているが⁷⁾、MT分子種の各々の機能については詳しく述べられていない。本研究は、LECラットの肝炎発症に伴うMT分子種および金属の変動を調べることにより、肝炎発症の機序およびMT分子種の機能解明に有益な情報が得られると考え、LECラット肝臓中のMT、銅および亜鉛濃度の経日的な変動と、キャピラリー電気泳動 (CZE) によるMT分子種濃度の変動について検討したので、報告する。

【実験方法】

5, 10および15週齢のLECラットの肝臓を採取し、実験時まで-80℃で保存した。氷水中にてスクロース溶液 (0.25 M) でホモジネートし、超遠心分離法 (4℃, 105,000 g) によってサイトゾール画分を調製した。そのサイトゾール中の総MT濃度を加熱処理後にELISA法で定量した。また、湿式灰化後に銅および亜鉛濃度をICP-MSを用いて定量した。さらに、CZEでMT-1およびMT-2を分離・定量するため、ポリアクリルアミドをコーティングしたキャピラリーを用いた⁷⁾。標準のMT-1およびMT-2にもとづく濃度およびピーク面積から作成した検量線を用いて、加熱処理した肝臓サイトゾール中のMT-1およびMT-2を定量した。

*所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

【結果および考察】

LECラットの肝臓サイトゾール中の銅濃度は、週齢に依存して顕著に上昇した。また、亜鉛濃度も上昇した (Table 1)。

ポリアクリルアミドをコーティングしたキャピラリーを用いて、標準MT-1およびMT-2のピークを分離した。続いて、加熱処理したLECラットの肝臓サイトゾールを泳動したところ、標準品と同じ時間 (MT-2は4.3分、MT-1は6.1分) にピークが観察された (Fig. 1)。

Table 1 Concentrations of Cu and Zn in the liver cytosol of LEC rats at the age of 5, 10 and 15 weeks

	Cu	Zn
LEC (5)	44.6 ± 4.74	19.1 ± 1.29
LEC (10)	78.9 ± 12.2*	27.3 ± 3.37**
LEC (15)	173 ± 21.6***	32.8 ± 4.41**

(Unit: $\mu\text{g/g}$ wet liver)

Data represent the means ± SDs (n=3-5)

Significant differences at *p<0.01 vs. 5-week old (Cu), **p<0.05 vs. 5-week old (Zn) and ***p<0.05 vs. 10-week old (Cu)

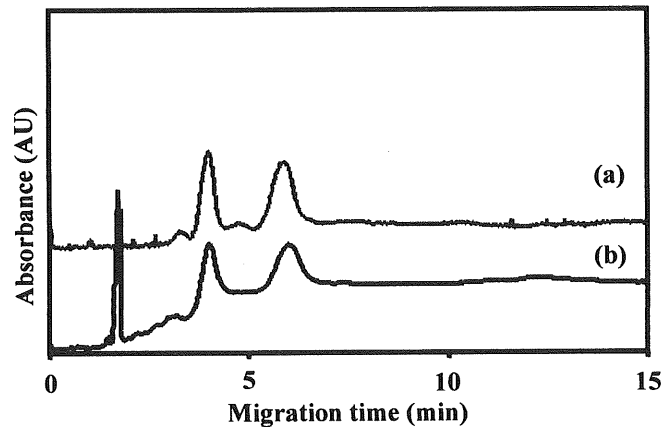


Fig. 1 Electropherograms for (a) MT-1 std. and MT-2 std., and (b) the liver cytosol of LEC rat at the age of 15 weeks

標準MT-1およびMT-2のピーク面積と濃度から検量線を作成し、サイトゾール中のMT-1およびMT-2を定量した。さらにELISAにより総MTを定量したところ、MT-1およびMT-2の和と一致し、CZEはMT分子種の定量に有効であることが示された (Table 2)。銅の蓄積により、総MT濃度は週齢とともに上昇した。しかし、MT-1/MT-2比をみても、減少傾向を示した。つまり、MT-1とMT-2の量的関係が週齢とともに逆転していることが分かった (Fig. 2)。

Table 2 Concentrations of MTs in the liver cytosol of LEC rats at the age of 5, 10 and 15 weeks as determined by CZE and ELISA

	MT-1	MT-2	MT-1+MT-2	ELISA
LEC (5)	645 ± 84*	372 ± 61	1016 ± 133	1093 ± 181
LEC (10)	1216 ± 83**.#	884 ± 263##	2101 ± 193#	2185 ± 104#
LEC (15)	3138 ± 695##	4132 ± 800##	7270 ± 1472##	7598 ± 1458##

(Unit: $\mu\text{g/g}$ wet liver)

Data represent the means ± SDs (n=3-5)

Significant differences at *p<0.001 vs. MT-2 (5-week old), **p<0.05 vs. MT-2 (10-week old), #p<0.001 vs. 5-week old (MT-1, MT-1+MT-2 and ELISA) and ##p<0.05 vs. 5-week old (MT-2) and vs. 10-week old (MT-1, MT-2, MT-1+MT-2 and ELISA)

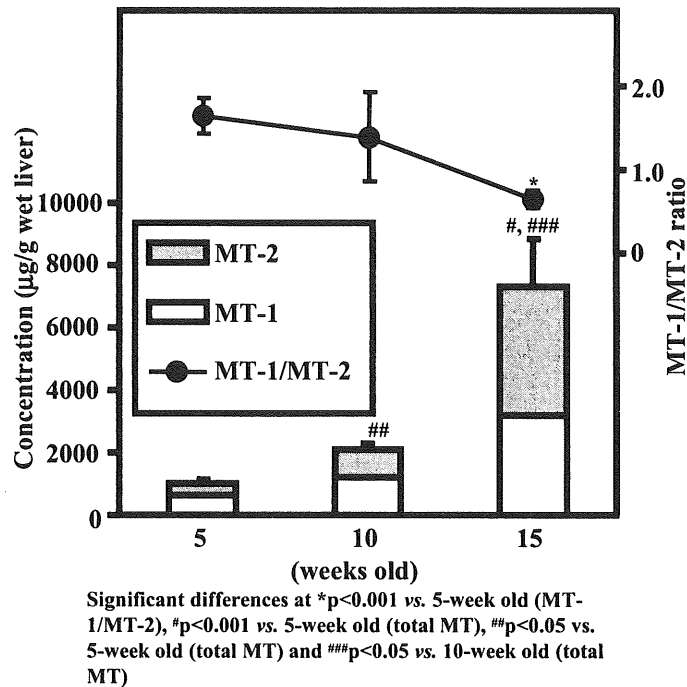


Fig. 2 Age-dependent change of MT-1/MT-2 ratio in the liver cytosol of LEC rats

銅は必須微量元素の一つであり、生体内の酵素などの構成成分として利用されている。しかし、ウィルソン病やメンケス病のように、銅が過剰もしくは不足すると重篤な症状を示す。本実験で用いたウィルソン病のモデル動物のLECラットはすでに報告されているように、肝臓中には銅が蓄積し、MTの誘導が観察されている。今回、さらに新知見を得るために、CZE法を用いてMT分子種の定量を試みた。週齢の増加に伴ってMT-1よりもMT-2の方が多く誘導されており、一連の肝疾患を示すLECラットの病態経過にMT-1/MT-2比の変動が大きく関与していると推定した。

CZE法は、動物の肝臓中のMT分子種の分析に極めて有効な手段であると結論した。

【参考文献】

- 1) M. Ebara, H. Fukuda, R. Hatano, H. Saisho, Y. Nagato, K. Suzuki, K. Nakajima, M. Yukawa, F. Kondo, A. Nakayama, H. Sakurai (2000) Relationship between copper, zinc and metallothionein in hepatocellular carcinoma and its surrounding liver parenchyma. *J. Hepatol.* 33: 415 - 422.
- 2) A. Nakayama, R. Tawa, N. Masuyama, M. Ebara, H. Fukuda, K. Suzuki, K. Nakajima, H. Sakurai (2002) Chemical forms of metallothionein and cellular oxidative stress in human hepatocellular carcinoma: A comparative study with the hepatitis of LEC rat. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 15: 31 - 45.
- 3) A. Nakayama, H. Fukuda, M. Ebara, H. Hamasaki, K. Nakajima, H. Sakurai (2002) A new diagnostic method for chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma based on serum metallothionein, copper, and zinc levels, *Biol. Pharm. Bull.* 25: 426 - 431.
- 4) H. Sakurai, A. Fukudome, R. Tawa, M. Kito, S. Takeshima, M. Kimura, N. Otaki, K. Nakajima, T. Hagino, K. Kawano, S. Hirai and S. Suzuki (1992) Unusual accumulation of copper related to induction of metallothionein in the liver of LEC rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 1393 - 1397.
- 5) H. Sakurai, H. Kamada, A. Fukudome, M. Kito, S. Takeshima, M. Kimura, N. Otaki, K. Nakajima, K. Kawano, T. Hagino (1992) Copper-metallothionein induction in the liver of LEC rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 548 - 552.

- 6) H. Sakurai, K. Nakjima, H. Kamada, H. Satoh, N. Otaki, M. Kimura, K. Kawano, T. Hagino (1993) Copper-metallothionein distribution in the liver of Long-Evans Cinnamon rats: Studies of immunohistochemical staining, metal determination, gel-filtration and electron spin resonance spectroscopy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192: 893-898.
- 7) T. Minami, K. Kubo, S. Ichida (2002) Determination of metallothionein-1/metallothionein-2 ratio in the mouse liver and pancreas by capillary zone electrophoresis using a polyacrylamide-coated capillary at natural pH, *J. Chromatogr. B* 779: 211-219.