

LECラット肝メタロチオネインの抗酸化性をめぐって

—Cu(I)-メタロチオネインからの水酸ラジカルの生成—

中村 正雄¹⁾ 中山 憲司²⁾ 宍戸 直美¹⁾弓野 邦夫³⁾ 大山 徹⁴⁾

1) 旭川医科大学医学部化学教室

2) 北海道立衛生研究所生活環境科

3) 北海道大学電子科学研究所超分子分光研究分野

4) 北海道立衛生研究所生物工学室

Evaluation of Cu(I)-metallothioneins from LEC rat liver as antioxidants

Masao Nakamura¹⁾ Kenji Nakayama²⁾ Naomi Shishido¹⁾Kunio Yumino³⁾ Tohru Ohyama⁴⁾

1) Department of Chemistry, Asahikawa Medical College

2) Division of Life Science, Hokkaido Institute of Public Health

3) Biophysics, Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University

4) Division of Biotechnology, Hokkaido Institute of Public Health

要 約

肝炎と肝癌を自然発症するLECラットでは肝臓に遷移金属（鉄、銅）を異常に蓄積することから、遷移金属に由来する酸化的ストレスと発症に関心が寄せられている。そこでLECラット肝に蓄積する1価の銅の結合したメタロチオネイン（Cu(I)-MTs）の抗酸化性とプロオキシダントとしての性質を検討した。

MTsと活性酸素種（ O_2^- , $OH\cdot$ ）との反応速度を算定した。 O_2^- とCu(I)-MTs, GSH, ペニシルアミンとの反応速度定数はそれぞれ 2.3×10^6 , 8.1×10^2 , 9.2×10^3 $M^{-1}s^{-1}$ であった。酸化力の強い水酸ラジカル（ $OH\cdot$ ）との反応速度定数は拡散律速に近い値であった。Cu(I)-MTsと抗酸化物の生理的濃度を考慮してもCu(I)-MTsは良い抗酸化物として作用することが示唆される。一方、Cu(I)-MTsに結合した1価の銅は重金属の添加により遊離し、 O_2^- の生成を経たフェントン反応により水酸ラジカルを生成する。これにより肝臓の局在した部位でpHが低下したり重金属が共存すると、Cu(I)-MTs自身に内在する1価の銅により酸化ストレスが開始する可能性が示唆される。

Abstract

LEC(Long-Evans rats with a cinnamon-like coat color)rats develop spontaneous hepatic injury about 4 months after birth, which is associated with the abnormal accumulation of transition metals such as iron and copper. The relation between the accumulation of transition metals and the disease is a matter of debate. Most copper in the livers is found to be bound to metallothioneins(MTs) in the cytosolic fraction as cuprous form(Cu(I)-MTs). Reactions of oxygen radicals(O_2^- and $OH\cdot$) with various MTs were investigated by optical method and ESR spectroscopy using the ESR spin trap. Since superoxide(O_2^-) and hydroxyl radicals($OH\cdot$) react rapidly with Cu(I)-MTs, Cu(I)-MTs can be considered to be antioxidants. However, heavy metals-induced hydroxyl radical generation by Cu(I)-MTs was observed. The effects of SOD and catalase suggests that addition of metals such as $HgCl_2$ causes the liberation of cuprous ions from MTs followed by a reaction with oxygen, leading to hydroxyl radical formation through a Fenton-type Haber-Weiss reaction. Conditions under which Cu(I)-MTs change to pro-oxidants are suggested.

《Key words》 oxidative stress, metallothioneins, LEC rat, oxygen radicals, Fenton reaction

別刷請求宛先：中村 正雄

〒078 旭川市西神楽4線5号3-11 旭川医科大学医学部化学教室

Reprint Requests to Masao Nakamura, Department of Chemistry, Asahikawa Medical College, Nishikagura 4-5-3-11, Asahikawa 078 Japan

I. 緒言

メタロチオネイン (MTs) は種々の酸化ストレスに対して生成が誘導され¹⁻³⁾、遊離した遷移金属との強い結合能を持つことから最近では生体内での抗酸化物としての役割が注目されるようになった³⁾。LECラット (Long-Evans rats with a cinnamon like coat color) は加齢と共に肝臓などの臓器に、銅 (Cu)、鉄 (Fe) を過剰に蓄積し、肝炎、肝癌を発症し死に至る³⁻⁵⁾。この肝炎発症時にMTsが顕著に発現し、銅は主として1価でMTsに結合している (Cu(I)-MTs)。生体内での酸化障害の発生は遷移金属と還元酸素種 (O_2^- , H_2O_2) とのフェントン反応で酸化力の強い酸素ラジカル (水酸ラジカル) がまず生成し、これによって障害 (生体膜の過酸化、蛋白の修飾、DNAの切断) に連なる一連の反応が開始すると考えられている⁶⁻⁸⁾。従ってLECラットの肝障害にCu(I)-MTsの関与が指摘されているが結論は出ていない^{3,4,9-11)}。MTsの抗酸化性を示す例としては酸素ラジカル (O_2^- , $OH\cdot$) との反応性¹²⁾とSOD様の活性発現の報告¹³⁾があげられる。しかし①Cu(I)-MTsと高濃度の H_2O_2 で水酸ラジカルが生成する⁵⁾、②MTsと有機過酸化物が共存すると生体膜の脂質過酸化反応が促進される¹⁴⁾などMTsの抗酸化性を疑う報告もある。そこでLECラット肝臓から得たMTsを用いて活性酸素消去能と活性酸素生成能を検討した。

II. 方法

Cu(I)-MTsを15週齢LECラット肝からSakuraiらの方法⁵⁾に従って調製した。蛋白質中の金属含量を、フレイム原子吸光光度計Varian Spectr AA-300を用いて定量した。今回用いたCu(I)-MTsは1モルあたり8個の銅と1個の亜鉛を含んでいた。ウシ赤血球SOD、ウシ肝臓カタラーゼ、ウサギ肝Cd,Zn結合型MTs、DMPO(5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide)はSigma社より購入した。

Cu(I)-MTsと O_2^- との反応速度定数を、キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系により O_2^- を生成しシトクロムCの還元を指標とした競争法により求めた。水酸ラジカル ($OH\cdot$) は2価鉄 ($FeCl_2$) と H_2O_2 の反応で生成させた。 $OH\cdot$ と

DMPOの反応速度定数が既知なことから、これにCu(I)-MTsを加え阻害率から競争法により $OH\cdot$ とCu(I)-MTsの速度定数を求めた¹⁵⁾。Cu(I)-MTsによる $K_3Fe(CN)_6$ の還元を、420nmにおける吸収により観察した。分光光度計はShimadzu MPS-2000を使用した。Cu(I)-MTsの酸化をCu(II)のESRスペクトルそのもので、活性酸素種の生成をDMPOをスピントラップ剤としESRで観測した。ESR測定はJEOL JES-TE300 ESR分光計で、100kHz modulationにて行った。全測定を100mMトリス-塩酸緩衝液中 (pH8.6) 室温で行った。

III. 結果

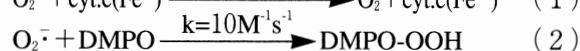
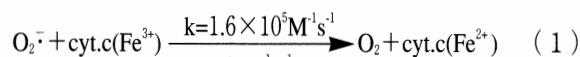
1. MTsの活性酸素 (O_2^- , $OH\cdot$) 消去能

O_2^- とシトクロムC [式 (1)] およびDMPO [式 (2)] との速度定数が既知のことから、これにMTsを加えて阻害率を検討しこの値から O_2^- とMTsの速度定数を算定し表1にまとめた。MTsは

表1 酸素ラジカル (スーパーオキシド、水酸ラジカル) とメタロチオネインおよび抗酸化剤との反応速度定数

Antioxidants	Superoxide ($M^{-1} s^{-1}$)	Hydroxyl radicals ($M^{-1} s^{-1}$)
Metallothioneines		
Cd, Zn-MT (rabbit)	1.2×10^6	$\geq 10^{12}$
Cu ⁺ -MT (LEC rat)	2.3×10^6	$\geq 10^{12}$
Cu ⁺ -MT (mouse)	6.5×10^6	$\geq 10^{12}$
Others		
GSH	8.1×10^2	
Penicillamine	9.2×10^3	
Ascorbate	2.2×10^6	

比較のためLECラット肝Cu(I)-MTsの他に市販のCd,Zn結合型MTs(Cd,Zn-MTs)とマウスに銅を荷重して精製したマウス肝Cu(I)-MTsを用いた。



O_2^- とCd, Zn-MTsおよびLECラット肝Cu(I)-MTsの速度定数はそれぞれ 1.2×10^5 と $2.3 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ であった。 O_2^- とマウス肝Cu(I)-MTsとの速度定数は $6.5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ であり、Cd,Zn結合型よりも1価

の銅が結合したMTsは $O_2\cdot^-$ 消去能が高いことがわかる。また、金属を除いたアポMTsと $O_2\cdot^-$ の速度定数は $8.4 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ であるから、 $O_2\cdot^-$ 消去能は活性中心を形成する金属—チオレートクラスター中のチオール基が中心的役割を果たすことがわかる^{12,13)}。シトクロムCの還元を利用した本測定法ではCu(I)-MTsによるシトクロムCの直接還元が起こり、データの信頼性に欠ける。そこで式(2)を用いたスピントラップ法で $O_2\cdot^-$ とCu(I)-MTsの速度定数を計算した¹⁵⁾。図1Aはキサンチンオキシダーゼ系で生成した $O_2\cdot^-$ がDMPOで捕捉されDMPO-OOH付加化合物のESRスペクトルとして観測されることを示している。この系にあらかじめ $0.6 \mu M$ のCu(I)-MTsを加えるとDMPO-OOHの生成はほぼ50%に抑制され(図1B)、その阻害率から算定された $O_2\cdot^-$ とCu(I)-MTsの速度定数は表1で示される値と良い一致を示した。表はまたシトクロムC法を用いて算定した $O_2\cdot^-$ と還元型グルタチオンおよびペニシラミンの速度定数を示してい



図1 $O_2\cdot^-$ とDMPOの反応で生成する付加化合物(DMPO-OOH)のESRスペクトル(A)とCu(I)-MTsによる阻害効果(B)

キサンチンオキシダーゼ系を用いて $O_2\cdot^-$ は $4 \mu M$ /分で生成している(A)。反応混液は $100 mM$ DMPOと $0.5 mM$ のdiethylenetriamine penta-acetic acidを含んでいる。(B)では系にあらかじめ $0.6 \mu M$ のCu(I)-MTsが存在している。キサンチンオキシダーゼを加えて反応を開始している。ESRの測定条件はpower, $20 mW$; gain, 1×10^3 ; modulation amplitude, $0.1 mT$; microwave frequency, $9.42 GHz$ でスペクトルは反応開始後90秒後に得た。

る。ペニシラミンは銅のキレート剤として銅の輸送を助け肝障害を軽減する他、 $O_2\cdot^-$ の消去にもあたることがわかる。生理的濃度のGSH($1 \sim 10 mM$)とCu(I)-MTs($\cong 10^{-5} M$)を考慮すると、Cu(I)-MTsは肝細胞中で充分抗酸化的に働いていることを示唆する。

図2Aは Fe^{2+} と H_2O_2 の反応で水酸ラジカルが生成しこれがDMPOと付加化合物DMPO-OHを形成し、強度比1:2:2:1のESRスペクトルを与えることを示している。この系にあらかじめ $1.0 \mu M$ Cu(I)-MTsを加えるとDMPO-OHの生成が強く抑制されることを示している(図2B)。結果は水酸ラジカルとMTsの反応は拡散律速に近い速度で進行し¹⁵⁾ [式(4)]、速度定数の差からはMTsの種差や結合している金属の差も区別されず、いずれのMTsも水酸ラジカルを良く消去できることを示している。

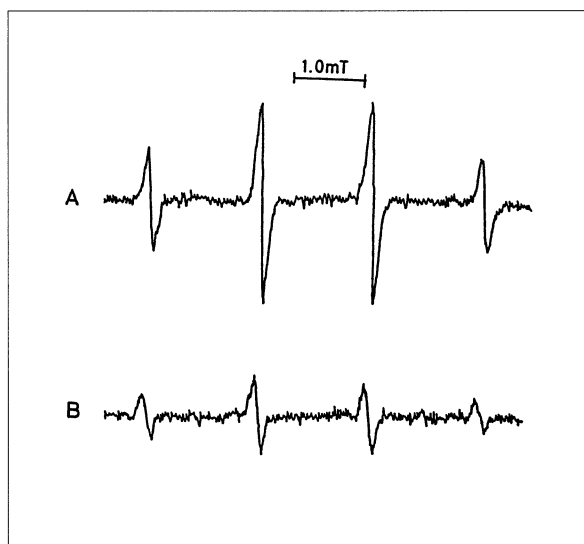
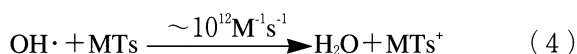


図2 水酸ラジカルとDMPOの付加化合物(DMPO-OH)のESRスペクトル(A)とCu(I)-MTsによる阻害効果(B)

水酸ラジカルは $100 \mu M H_2O_2$ と $50 \mu M FeCl_2$ の反応で生成した。反応混液は $10 mM$ のDMPOを含んでいる(A)。(B)ではあらかじめ $1.0 \mu M$ のCu(I)-MTsが存在している。ESRスペクトルの測定条件はgain, 5×10^2 を除き図1と同じでスペクトルは反応開始後90秒後に得た。

2. MTsの関与したフェントン反応

*in vitro*の実験で、遊離した遷移金属またはその錯体と H_2O_2 を共存させると生体分子（DNAや酵素）の酸化的分解が報告されている^{16,17}。鉄錯体の投与によりラット腎の発癌が確認されている¹⁸。この時の酸化的分解は水酸ラジカルの生成によるか、遷移金属の過酸化型または酸素錯体により触媒されると推論されている。Cu(I)-MTsと高濃度の H_2O_2 との反応で水酸ラジカルの生成がESRで認められている⁵。水酸ラジカルの生成効率はCu(I)-MTsのうちLECラット肝由来のものが他に比べ高い⁵。一般に遷移金属の運搬体では金属イオンは蛋白に緊密に結合し酸化還元反応に関与しにくいことが特徴である。Cu(I)-MTsの1価の銅は強い酸性のpHやSH試薬の添加で遊離し、好気条件で銅は最終的に2価の銅として強いESRシグナルを与える。従って1価の銅の還元当量は分子状酸素に渡ることが予想される。そこでCu(I)-MTsに結合した銅あたり2モルの $HgCl_2$ を加えて、生成する酸素ラジカルをスピントラップ剤（DMPO）との付加化合物としてESRで観測した（図3B）。ESRシグナルはDMPO-OH($A_H=A_N=$

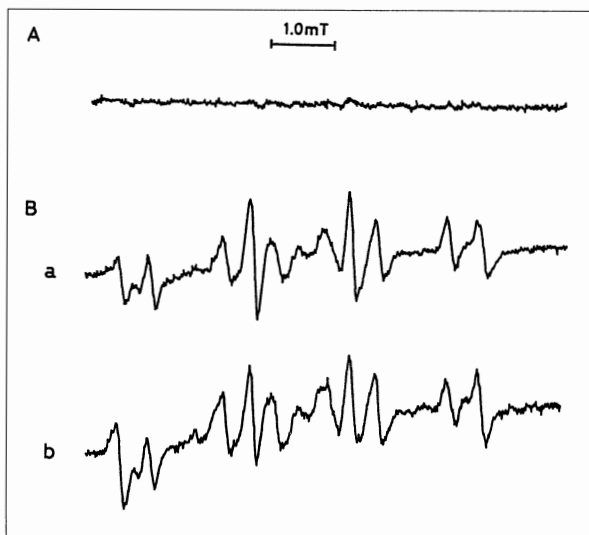
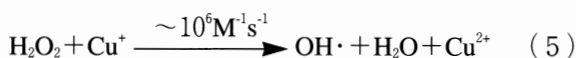


図3 $HgCl_2$ とCu(I)-MTsの反応で生成するESRスペクトル

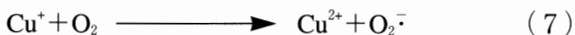
反応混液は88 μ M Cu(I)-MTs, 60mM DMPOを含んでいる (A)。これに1.4mM $HgCl_2$ を加えて反応を開始した。ESRのスペクトルは反応開始後90(a), 180(b)秒後に得た。スペクトルはDMPO-OHと6本線のシグナルの和からなる。ESRの測定条件は図1と同じ。

1.49mT)と6本線のシグナル($A_H=2.25$, $A_N=1.52$ mT)の和で説明され、時間とともにDMPO-OHは弱くなり6本線のシグナルは強くなる(図3Baとb)。DMPO-OHは反応系での水酸ラジカルの生成を示し、また6本線のシグナルは遊離した2価銅によるDMPOとの親電子反応で生成すると説明される¹⁹。

さてこの系でどのように水酸ラジカルの生成が起こるのか。水酸ラジカルの生成は銅に触媒されるフェントン反応と考えられ〔式(5)〕、還元酸素種(O_2^- , H_2O_2)の関与が推定できる。そこでCu(I)-MTsと $HgCl_2$ との反応系にあらかじめSOD



またはカタラーゼを加えその効果を検討した。SODはDMPO-OHのシグナルを増加させカタラーゼを加えるとシグナルは全く認められなくなる。従ってCu(I)-MTsに $HgCl_2$ を加えることによって生成する水酸ラジカルは次の機序で起こると結論できる〔式(6)～(9)〕。SODの効果から式(7)により O_2^- の生成を考えたが、図3から O_2^- の生成に由来するDMPO-OOHのシグナルは認められない。これは共存するアポMTsまたはCu(I)-MTsの持つ O_2^- 消去能力で説明される。もちろんCd,Zn-MTsに $HgCl_2$ を加えても酸素ラジカルの生成は認められない。さてMTsは他の金属との結合が報告されている。 $HgCl_2$ の効果を検討した場合と同様に銅あたり2モルの Ag^+ , Cd^{2+} いずれ



かを系に加えると、 Ag^+ 添加では Hg^{2+} を加えた場合と同じように強い水酸ラジカルの生成、 Cd^{2+} の添加ではESRシグナルは殆ど観測されなかった。これはMTsの金属との親和性が $Hg^{2+} \geq Ag^+ > Cu^{2+} > Cd^{2+}$ の順であることと一致する³。好気条件でCu(I)-MTsに $HgCl_2$ を加えると銅が遊離し強い2価の銅のESRシグナルとして観測される。そこでCu(I)-MTsの溶液に Hg^{2+} , Cd^{2+} , Ag^+ , $K_3Fe(CN)_6$ (赤

血塩)、シトクロムCを加えてESRシグナルを直接観測した(表2)。DMPO-OHシグナルが観測さ

表2 重金属と電子受容体によってLECラット肝Cu(I)-MTから生じるESRシグナル(2価銅および水酸ラジカルシグナル)

Reactants	ESR spectrum of Cu ²⁺	DMPO-OH
Cd ²⁺ ^a	+	ND
Hg ²⁺ ^a	+++	+++
Ag ⁺ ^a	+++	+++
K ₃ Fe(CN) ₆ ^a	+++	ND
Cytochrome c	+	ND

aThe molar ratio of added reactant to bound copper was 2. The affinity of metallothionein with metals is in the order of Ag⁺ ≥ Hg²⁺ > Cu²⁺ > Cd²⁺.

れたHg²⁺またはAg⁺添加の場合は強いCu²⁺のシグナルが観測され、1価の銅が遊離し2価の銅となることが確認できた。赤血塩では2価の銅が観測されるが水酸ラジカルは生成しない。これはシトクロムCと同様、Cu(I)-MTs分子内の1価の銅から電子の受容体(赤血塩、シトクロムC)へ電子が移行し、その結果、銅の酸化数が2価となることを意味する。この時、Cu(I)-MTsから赤血塩へ移る電荷はCu(I)-MTsの銅あたり2を越えており分子内のCu(I)-チオレートクラスターが酸化還元の際には共同的に働くことを示唆しているとみられる¹³⁾。

IV. 考 按

MTsの役割は金属の代謝と細胞内での分布に果たす役割が明らかになっている³⁾。MTsは分子量約6,800の蛋白でチオールに富み(20個/分子)、アミノ酸配列上のシステイン残基の位置は種によって殆ど差はなく良く保存されている。金属の結合したMTsのうちCu(I)-MTsは酸素ラジカルとの反応性が極めて興味深い。パルスラジオリシスで発生したO₂⁻, OH[•]とCu(I)-MTsが反応し分子内にチオールラジカルが生成し、GSHが共存するとこれが分子内のチオールラジカルに対し電子供与体として働き元のCu(I)-MTsへ戻り反応サイクル

を終了する¹³⁾。このようにCu(I)-MTsは有効なSH基が共存するとSOD作用を示すと考えられる。Cu(I)-MTsと酸素ラジカルの反応によって、Cu(I)-MTsは酸化されるが反応中心である銅—チオレートクラスターは酸化的分解に抵抗性があると推定されている¹²⁾。このようにCu(I)-MTsは細胞内での酸素ラジカルの発生についてはGSHと共同することで有効な抗酸化作用を示すと結論される。しかし①細胞が他の酸化的ストレスを受け還元レベルが低下(GSH/GSSG比が低下)する、②細胞のリソゾーム中などでpHが酸性側に傾く、③他の重金属が存在する、などの条件が充足されるとCu(I)-MTsから1価の銅が遊離しそれ自身によりフェントン反応が開始し酸化力に富んだ水酸ラジカルが生成する。このようにCu(I)-MTsは本来抗酸化物として作用するが条件によってプロオキシダントに変化する可能性が指摘される。

文 献

- 1) Kägi JHR : Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins-an overview. Suzuki KJ, Imura N, et al (eds) : Metallothionein III, Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, 1993, pp29-55
- 2) Cherian MG, Chan HM : Biological functions of metallothionein-a review. Suzuki KJ, Imura N, et al (eds) : Metallothionein III, Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, 1993, pp87-109
- 3) Sato M, Bremner I : Oxygen Free Radicals and Metallothionein. Free Radic Biol Med 14 : 325-337, 1993
- 4) Nakayama K, Okabe M, et al : Visualization of Yellowish-Orange Luminescence from Cuprous Metallothioneins in Liver of Long-Evans Cinnamon Rat. Biochim Biophys Acta 1289 : 150-158, 1996
- 5) Sakurai H, Satoh H, et al : Unusual Generation of Hydroxyl Radicals in Hepatic Copper-Metallothionein of LEC (Long-Evans Cinnamon) Rats in the Presence of Hydrogen Peroxide. Biochem Biophys Res Commun 199 : 313-318, 1994
- 6) Halliwell B, Gutteridge JMC : Oxygen Free Radicals and Iron in Relation to Biology and Medicine : Some Problems and Concepts. Arch Biochem Biophys 246 : 501-514,

- 1986
- 7) Nakamura M : Lactoferrin-Mediated Formation of Oxygen Radicals by NADPH-Cytochrome P-450 Reductase System. *J Biochem* 107 : 395-399, 1990
 - 8) Yamazaki I : Hydroxyl Radical Formation in Biological Systems. *Química Nova* 16 : 365-369, 1993
 - 9) Squibb KS, Ridlington JW, et al: Early Cellular Effects of Circulating Cadmium-Thionein on Kidney Proximal Tubules. *Environ Health Perspect* 28 : 287-296, 1979
 - 10) Cain K, Holt D : Studies of Cadmium-Thionein Induced Nephropathy : Time Course of Cadmium-Thionein Uptake and Degradation. *Chem Biol Interact* 43 : 223-227, 1983
 - 11) Dorian C, Gattone II V H, et al : Accumulation and Degradation of the Protein Moiety of Cadmium-Metallothionein (CdMT) in the Mouse Kidney. *Toxicol Appl Pharmacol* 117 : 242-248, 1992
 - 12) Thornalley PJ, Vasák M: Possible Role for Metallothionein in Protection Against Radiation-Induced Oxidative Stress. Kinetics and Mechanism of Its Reaction with Superoxide and Hydroxyl Radicals. *Biochim Biophys Acta* 827 : 36-44, 1985
 - 13) Felix K, Lengfelder E, et al : A Pulse Radiolytic Study on the Reaction of Hydroxyl and Superoxide Radicals with Yeast Cu(I)-Thionein. *Biochim Biophys Acta* 1203 : 104-108, 1993
 - 14) Stephenson GF, Chan HM, et al : Copper-Metallothionein from the Toxic Milk Mutant Mouse Enhances Lipid Peroxidation Initiated by an Organic Hydroperoxide. *Toxicol Appl Pharmacol* 125 : 90-96, 1994
 - 15) Pou S, Hassett DJ, et al : Problems Associated with Spin Trapping Oxygen-Centered Free Radicals in Biological Systems. *Anal Biochem* 177 : 1-6, 1989
 - 16) Yamamoto K, Kawanishi S : Hydroxyl Free Radical Is Not the Main Active Species in Site-Specific DNA Damage Induced by Copper(II)Ion and Hydrogen Peroxide. *J Biol Chem* 264 : 15435-15440, 1989
 - 17) Breen AP, Murphy JA : Reactions of Oxyl Radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 18 : 1033-1077, 1995
 - 18) 粟井通泰 : 鉄ニトリロ三酢酸の活性酸素産生と発癌誘導. 蛋白質・核酸・酵素 33 : 2844-2854, 1988
 - 19) Makino K, Hagiwara T, et al : Cautionary Note for DMPO Spin Trapping in the Presence of Iron Ion. *Biochem Biophys Res Commun* 172 : 1073-1080, 1990