

魚類のメタロチオネイン定量法の検討  
——Sephacryl S-200 HR によるゲルろ過法——

山 本 義 和  
伊 達 かおる

## Summary

### Quantitative Analysis of Metallothionein in Fish —Gel-filtration analysis with a Sephacryl S-200HR—

Yoshikazu Yamamoto

Kaoru Date

This paper deals with an analytical method for fish metallothionein which detects the metals bound to the protein after separation by gel chromatography with a Sephacryl S-200HR column.

Suitable conditions for the separation of several proteins of known molecular weights were examined, and it was found that the concentrations of buffer or salt in the eluting solution are recommended to be higher in order to obtain good correlation between molecular weights and elution volume of proteins. Metallothionein from the liver and kidney of rainbow trout intraperitoneally injected with cadmium was separated as distinct protein peak by elution with 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 0.1 M NaCl. The gel-filtration with a Sephacryl S-200HR column was shown to possess several advantages over the Sephadex G-75 method for the separation of metallothionein.

## 緒 言

メタロチオネイン (MT と略記) は Cd, Hg などの有害性重金属や制癌剤の毒性緩和などの生体防御作用に関与している低分子量のタンパク質である。さらに、このタンパク質は放射線障害の軽減や細胞膜の過酸化抑制など、細胞の解毒にも関与していることが報告されている<sup>1,2,3)</sup>。また、MT は Cu や Zn など生体内必須金属の代謝調節因子としても注目されている。

著者らは魚介類における重金属類の毒性緩和における MT の生化学的機能について研究を行ってきた<sup>4,5,6)</sup>。MT の生化学的役割解明には、生体内での MT 量の変動を明らかにする必要がある。今まで著者らが用いてきた MT の定量法は組織の可溶性画分を Sephadex G-75 でゲルろ過した重金属の溶出パターンに基づくものであった。しかし、この方法ではクロマトグラフィーに長時間を要するため、多数の試料を短時間に分析することが不可能であり、このことが研究の一つの障害となっていた。そこで、液体クロマトグラフィーによる魚介類の MT 定量法について、より迅速でかつ簡易な操作方法を検討した。本報では、高流速でのゲルろ過クロマトグラフィーが可能な担体として最近開発された Sephacryl S-200 HR を使用してゲルろ過条件の検討と Sephadex G-75 および Superose 12 との実用面での優劣について比較をおこなった。

## 試料および実験方法

### 供試魚

滋賀県醒ヶ井養鱒場より入手したニジマス発眼卵を神戸女学院大学内の水生生物飼育室でふ化させて、市販配合飼料で養成した体重 200 g 前後の個体を供試魚とした。

### 試 薬

分子量キット (bovine thyroglobulin MW 670,000, bovine  $\gamma$ -globulin MW 158,000, chicken ovalbumin MW 44,000, horse myoglobin MW 17,000, vitamin B<sub>12</sub> MW 1,350) は BIO-RAD 社製のもを、MT 標品は馬の腎臓から調製された SIGMA 社製のもを用いた。その他はすべて通常使用する研究用試薬を使用した。

### ゲルろ過担体およびクロマトグラフィー装置

今回ゲルろ過担体として用いたのは Sephacryl S-200 HR, Sephadex G-75 および Superose 12 である。これらはいずれも Pharmacia LKB Biotechnology 社の製品であり、Superose 12 の場合は Superose 12 HR 10 / 30 プレパックカラムを用いて同社の高速液体クロマトグラフィーシステムを利用した。Sephacryl S-200 HR と Sephadex G-75 の場合は通常のクロマトグラフィー装置を使用した。

### Sephacryl S-200 HR カラムのゲルろ過条件の検討

展開溶媒について検討するために分子量キットを Sephacryl S-200 HR カラム (1.6 × 27 cm) を用いてゲルろ過した。展開溶媒として Tris-HCl 緩衝液, pH 8.0 の濃度を 0.02 M, 0.04 M, 0.10 M, 0.20 M とした場合および 0.01 M Tris-HCl 緩衝液に NaCl を 0.1 M あるいは 0.5 M 添加した場合について実験をおこなった。流速は 60 ml/h とし, E<sub>280</sub> のクロマトグラムから実験結果を判定した。

次に bovine serum albumin と cytochrome c をマーカーとして上記のカラムで展開溶媒としては 0.10 M Tris-HCl 緩衝液, pH 8.0 を用いて, 流速を 15 ml/h, 30 ml/h, 60 ml/h とし E<sub>280</sub> のクロマトグラムよりゲルろ過パターンにおよぼす流速の影響を調べた。

### Cd を投与したニジマスの腎臓および肝臓可溶性画分のゲルろ過クロマトグラフィー

MS 222 (meta aminobenzoic acid ethylester methanesulfonate) で麻酔したニジマスに体重の 0.5% 量の 75 ppm Cd 溶液 ( $\text{CdCl}_2 \cdot 2 \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$  を 0.9% NaCl に溶解) を腹腔内注射し, 20 時間後に各個体から腎臓および肝臓を摘出した。腎臓には 5 倍容, 肝臓には 4 倍容の 1 mm Tris-HCl 緩衝液, pH 8.0 を含む 0.25 M sucrose を加えて調製したホモジネートを遠心分離 (105,000 × g, 60 min) して得た上清を可溶性画分とした。得られた可溶性画分を少量ずつ凍結保存して融解後, Sephacryl S-200 HR カラム (1.6 × 67 cm), Sephadex G-75 カラム (1.6 × 67 cm), Superose 12 カラム (1.0 × 30 cm) を用いてゲルろ過した。流速は Sephacryl S-200 HR カラムでは 60 ml/h, Sephadex G-75 カラムでは 17 ml/h, Superose 12 カラムでは 30 ml/h とし Cd, Cu, Zn の溶出パターンを日立 170-30 型原子吸光分析機で求めた。

### Cu および Zn を投与したニジマス肝臓可溶性画分のゲルろ過クロマトグラフィー

ニジマスに体重の 0.5% 量の 200 ppm Cu 溶液 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  を 0.9% NaCl に溶解) あるいは 400 ppm Zn 溶液 ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  を 0.9% NaCl に溶解) を腹腔内投与して 23 時間後に肝臓を摘出して, 前記の方法に従って可溶性画分を得て, Sephacryl S-200 HR カラム (1.6 × 69 cm) を用いてゲルろ過をおこなった。なお, コントロールは重金属を投与していないニジマスとした。

## 結 果

### ゲルろ過パターンにおよぼす展開溶媒の影響

Sephacryl S-200 HR カラムを用いて 5 種類の分子量既知物質の溶出パターンにおよぼす展開溶媒の影響を Fig. 1 に示した。Tris-HCl 緩衝液, pH 8.0 の濃度を 0.02, 0.04, 0.10, 0.20 M と変えた場合, 0.02 M ではこれらの物質は 2 つのピークにしか分離されなかったが, モル濃度が上昇するに従って分離能が向上し, 0.20 M では 5 種類の分子量マーカーの明瞭なピークが得られた。

また, NaCl を添加して展開溶媒のイオン強度を高めた場合にも分離能が良くなる傾向が認

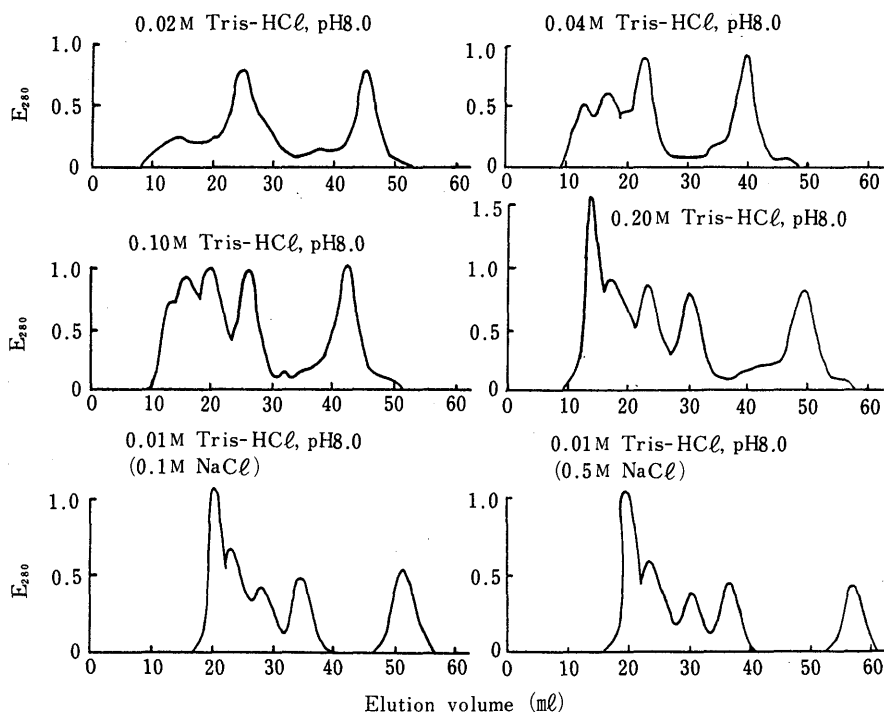


Fig. 1 Effect of eluants on the Sephacryl S-200HR gel-filtration patterns of thyroglobulin,  $\gamma$ -globulin, ovalbumin, myoglobin and vitamin B<sub>12</sub>. These samples were applied to a Sephacryl S-200HR column (1.6×27cm) equilibrated with eluants indicated in the figure. Each fraction of 1.0ml was collected at a flow rate of 60 ml/h.

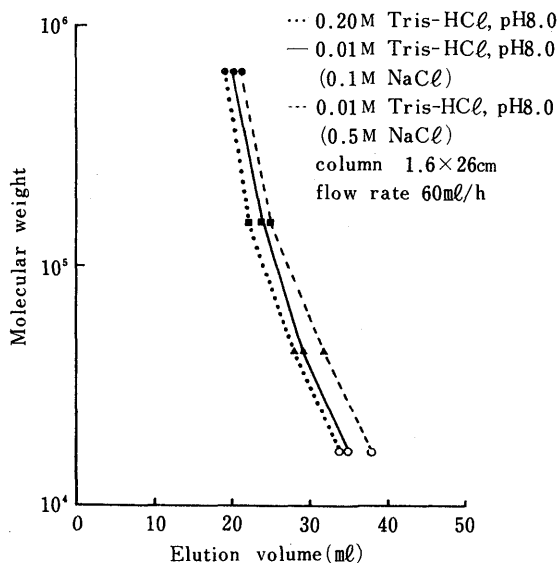


Fig. 2 Relation between molecular weights and elution volume of proteins of known molecular weight by Sephacryl S-200HR gel-filtration. Elution volume of proteins was plotted as abscissa and molecular weight of proteins as ordinate on logarithmic graph paper. ● thyroglobulin, ■  $\gamma$ -globulin, ▲ ovalbumin, ○ myoglobin

められた。しかし、0.1 M と 0.5 M の添加での差異はなかった。Fig. 2 には良好な分離結果が得られた展開溶媒での 4 種類のタンパク質の分子量と溶出位置との関係を示した。展開溶媒の種類によってタンパク質の溶出位置が若干異なるが、タンパク質の分子量とその溶出位置の間には比例関係が認められた。

#### ゲルろ過パターンにおよぼす流速の影響

Sephacryl S-200 HR カラムにおいて展開溶媒に用いた 0.1 M Tris-HCl 緩衝液、pH 8.0 の流速を 15, 30, 60 ml/h と変化させた場合における bovine serum albumin と cytochrome c の溶出パターンを Fig. 3 に示した。各物質の溶出位置、分離能は流速をかなり高めても差異が認められなかった。

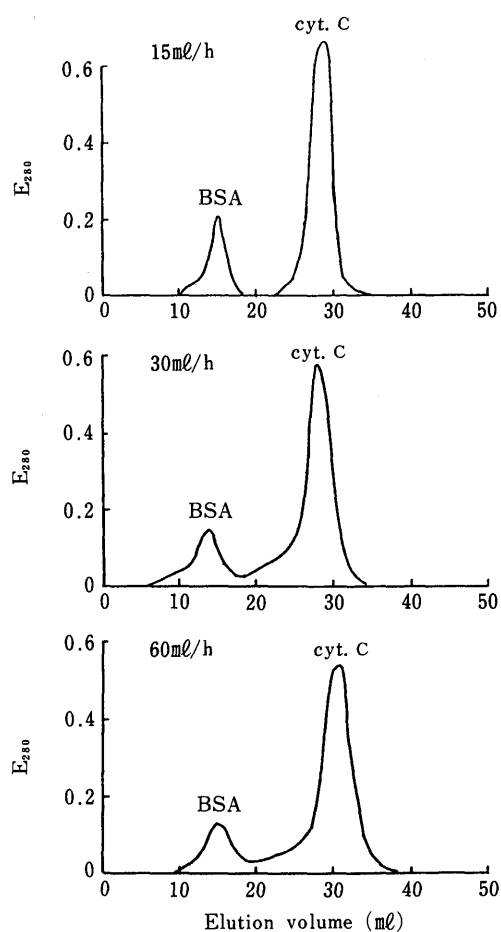


Fig. 3 Effect of flow rate on the Sephacryl S-200HR gel-filtration patterns of bovine serum albumin and cytochrome c. Each sample was applied to a Sephacryl S-200HR column (1.6×27cm) equilibrated with 0.1M Tris-HCl, pH8.0.

### Cdを投与したニジマスの腎臓可溶性画分のゲルろ過パターン

Cdを腹腔内投与してMTを誘導合成させたニジマスの腎臓可溶性画分をSephacryl S-200 HR カラムを用いて、展開溶媒の種類をかえてゲルろ過し、Cd, Zn, Cuの溶出パターンを求め、さらに同条件下においてMT標品をゲルろ過して $E_{254}$ の溶出パターンからその溶出位置を調べた (Fig. 4)。Cdはどの展開溶媒においても溶出液量 25 ml 付近の高分子画分に少量、35～40 ml 付近の画分にかなり多量溶出した。矢印で示したMT標品の溶出位置はCdの溶出位置と一致したことから、後半のCdピークはMTを含む画分 (MTFと略記) と考えられる。MTFの溶出位置は展開溶媒に0.01 M Tris-HCl 緩衝液、pH 8.0を用いたときに少し前方

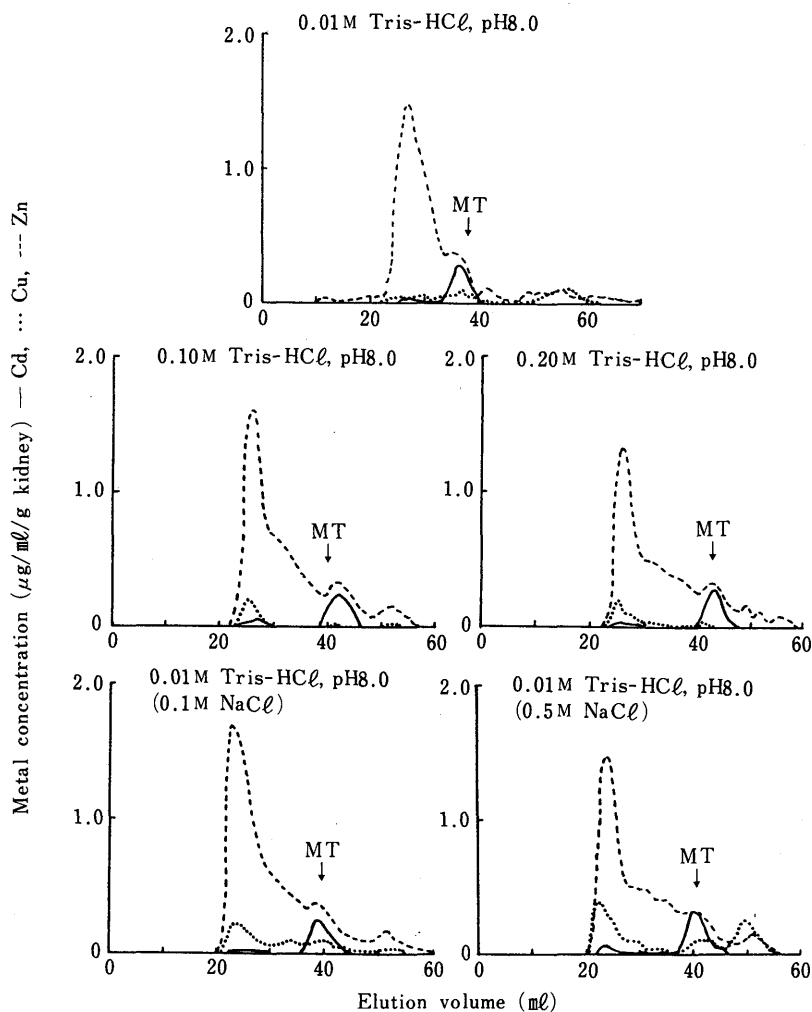


Fig. 4 Comparison of gel-filtration patterns of Cd, Zn and Cu in the soluble fraction from kidney of rainbow trout intraperitoneally injected with Cd (0.375mg/kg BW). Soluble fraction from kidney was applied to a Sephacryl S-200HR column (1.6×67cm) equilibrated with eluants indicated in the figure, at a flow rate of 60ml/h.

に移動するが、展開溶媒のイオン強度を高めた場合にはほぼ同位置であった。Zn は 25 ml 付近に非常に大きなピーク、30～40 ml 付近にショルダー、MTF に小さなピークがあり、MTF よりも低分子の画分にも少量の Zn が認められた。展開溶媒に 0.01 M Tris-HCl 緩衝液、pH 8.0 を用いたときには、MTF の Zn は Cd と同様に少し前方へ移動し、30～40 ml のショルダーが他の展開溶媒の場合に比べて不明瞭であった。Cu の溶出パターンは展開溶媒の影響を大きくうけ、0.01 M Tris-HCl 緩衝液、pH 8.0 では明らかなピークが認められず、NaCl を添加した場合にははっきりとしたピークが得られた。なお、試薬の Trishydroxy methyl aminomethane には Cu と Zn が、NaCl には Cu, Zn, Cd が不純物としてかなり含まれていたため、これらの試薬濃度が高くなるとクロマトグラムのベースラインを補正する必要があった。

### Sephacryl S-200 HR, Sephadex G-75, Superose 12 の比較

Sephacryl S-200 HR のゲルろ過パターンを Sephadex G-75 および Superose 12 と比較するために、Cd を投与して MT を誘導合成させたニジマスの肝臓可溶性画分をそれぞれのカラムでゲルろ過した (Fig. 5)。Sephacryl S-200 HR と Sephadex G-75 はカラムサイズが等しいので Cd, Cu, Zn の溶出パターンを直接比較できる。Cu と Zn の溶出が始まるのは Sephacryl S-200 HR では 50 ml, Sephadex G-75 では 30 ml であったので、カラムの void volume は Sephacryl S-200 HR の方が Sephadex G-75 よりもかなり大きい。また、

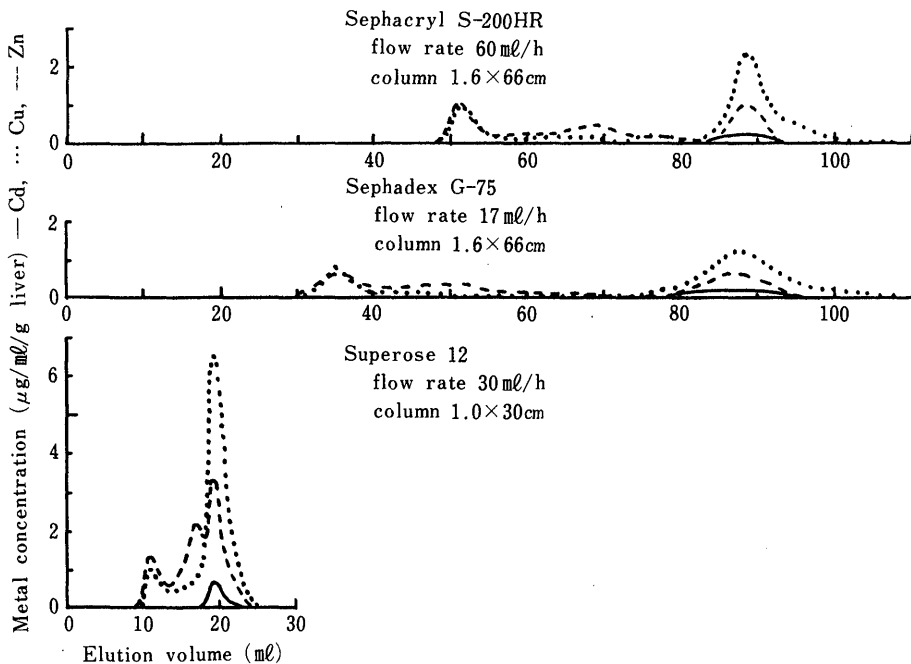


Fig. 5 Comparison of gel-filtration patterns of Cd, Cu and Zn in the soluble fraction from liver of rainbow trout intraperitoneally injected with Cd (0.375mg/kg BW). The column was equilibrated with 0.01M Tris-HCl, pH8.0, containing 0.1M NaCl.



この2つのカラムではMTFが90 ml付近の同位置に溶出し、Cd, Cu, ZnのピークはSephacryl S-200 HRの方が明瞭であった。Superose 12はカラムサイズが小さいので他のカラムと直接比較し難いが、CdはMTFに1つ、Cuは高分子画分とMTFに、Znは3つのピークに分離されて他のカラムと同様であったが、各々のピークは他のカラムよりも明らかであった。

#### Cu および Zn を投与したニジマスの肝臓可溶性画分のゲルろ過パターン

ニジマスに前もってCuあるいはZnを腹腔内投与して、これらの元素によるMTの誘導の程度を肝臓可溶性画分を試料としてSephacryl S-200 HRカラムを用いて調べた (Fig. 6)。

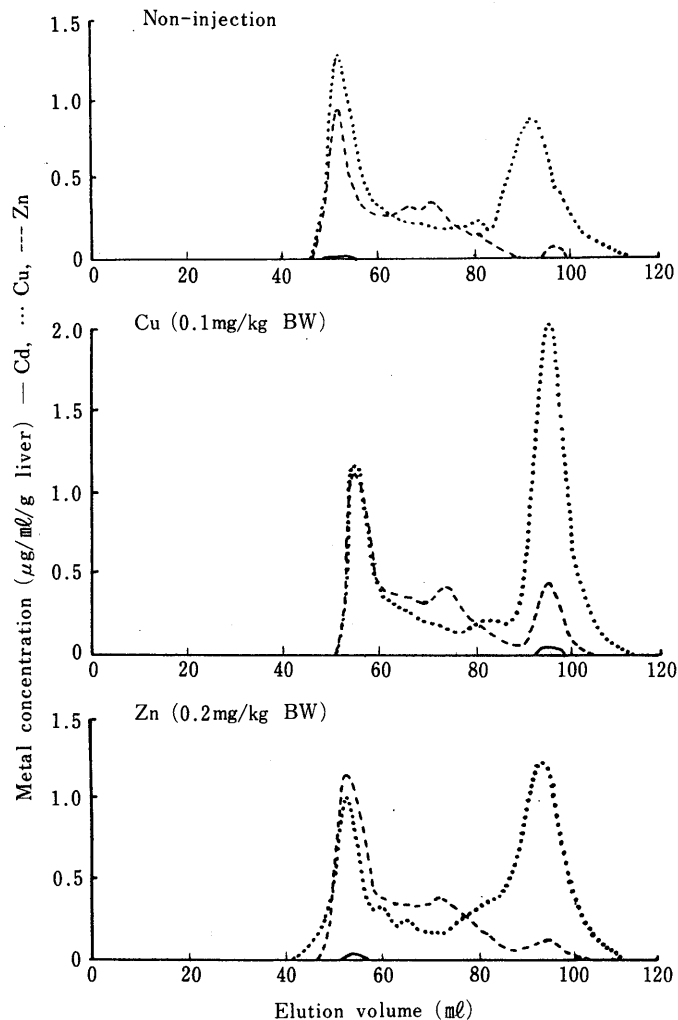


Fig. 6 Sephacryl S-200HR gel-filtration patterns of Cd, Cu and Zn in the soluble fraction from liver of rainbow trout intraperitoneally injected with Cu or Zn. Soluble fraction from liver was applied to a Sephacryl S-200HR column (1.6×69cm) equilibrated with 0.1M Tris-HCl, pH8.0, at a flow rate of 60ml/h.

また、Table 1 には MTF の Cd, Cu, Zn の含有量を示した。重金属を前投与していないニジマスでの Cd, Cu および Zn のゲルろ過パターンと対比すると、Cu を投与したニジマスでは MTF の Cu 含有量が増加するとともに Zn 含有量にも顕著な増加が認められた。また、MTF に Cd が少量検出された。このことは、Cu の投与によって MT がかなり誘導合成されることを示している。一方、Zn を投与したニジマスでは Cu および Zn のゲルろ過パターンはコントロールのニジマスと大差なく、MTF で Cd もほとんど検出されなかった。さらに Table 1 に示した MTF の Cd, Cu, Zn のグラム原子数の合計量から判断しても、今回の実験条件下では Zn による MT の誘導合成はわずかししか認められないと考えられる。

Table 1 Cadmium, copper and zinc distribution in the metallothionein fraction from liver\* obtained by gel-filtration with Sephacryl S-200HR

Group	Metal	Metallothionein fraction ( $\times 10^{-3}$ $\mu\text{g}$ -atoms/g liver)
Control	Cd	trace
	Cu	58.3
	Zn	2.1
	Cd+Cu+Zn	60.4
Cu-injected	Cd	0.9
	Cu	114.2
	Zn	20.0
	Cd+Cu+Zn	135.1
Zn-injected	Cd	N.D.
	Cu	88.2
	Zn	7.2
	Cd+Cu+Zn	95.4

\*Pooled sample from 3fish

## 考 察

MT の定量法は各種検討されている<sup>7)</sup>。この物質の定量法は MT が金属結合タンパク質であり、酵素活性を示さないという特徴から MT と結合している金属量を測定する間接法と、タンパク質量を測定する直接法の 2 つに大別される。

金属測定法のひとつはゲルろ過クロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーにより分離された MT の金属量を、原子吸光法や発光分析法などで測定する方法である。もう一方はまず、MT と親和性の高い Cd, Cu, Hg, Ag などの金属を添加して、MT をこれらの金属で飽和置換させ、次いで MT と結合していない過剰の金属を血色素などで捕捉して除去した後、MT の金属量を測定する方法である<sup>8,9)</sup>。

タンパク質測定法には脊椎動物の MT では 61 のアミノ酸残基中 20 残基がシステイン (Cys) である特徴を利用し、Cys の SH 基を定量する方法とタンパク質としての免疫原性を利用し

て、産生抗体をラジオイムノアッセイやエンザイムイムノアッセイで定量する方法がある。

MTの定量にゲルろ過クロマトグラフィーを用いる利点として、MTに含まれる複数の金属の種類、量を知るための金属定量が可能であり、また、タンパク質はpH、金属イオン、コファクター、イオン強度などの影響を受けやすいがゲルろ過法ではこれらの因子による影響が比較的少なく穏やかな条件下で分画できるなどの点が挙げられる。

今回MTの定量にゲルろ過担体としての有効性を検討したSephacryl S-200 HRはアリルデキストランとN,N'-メチレンビスアクリルアミドを共有結合で架橋した親水性の担体であり、従来のSephacrylより高流速、高分離能が得られるよう、粒子径が小さく、架橋度が強固になったものである。Sephacryl S-200 HRはビーズ構造をとり、カルボキシル基を少量含むため荷電の状態により吸着現象を示す。そのため展開溶媒のイオン強度やpHの調節が必要となる。本研究の結果では展開溶媒のTris-HCl緩衝液、pH 8.0のモル濃度を変化させたり、NaClを添加してイオン強度を変えた場合、イオン強度が上昇するに従い分子量が異なるタンパク質の分離能が良くなる傾向を認めた (Fig. 1)。これはゲルの組成として含まれるカルボキシル基の影響が、イオン強度を増すことにより抑制されたと考えられる。Sephacryl S-200 HRの分子量分画範囲は約5,000~250,000といわれており、MTの分子量はアミノ酸組成からは約6,000であるがゲルろ過法では約10,000と求められる。Sephacryl S-200 HRで展開溶媒のイオン強度を高めた場合には、タンパク質の分子量とその溶出位置には比例関係が認められた (Fig. 2)。

また、展開溶媒の流速という面から分画速度を比較すると、Sephacryl S-200 HRではゲル粒子が強固なため60 ml/hの高流速でも分離能に影響はなかった (Fig. 3)。

さらにCdを前投与してMTを誘導合成させたニジマスの腎臓可溶性画分をSephacryl S-200 HRカラムを用いてゲルろ過した結果、展開溶媒のイオン強度が高い条件下ではMTの良好な分離が得られた (Fig. 4)。

Sephacryl S-200 HRカラムに用いる展開溶媒については次の点も考慮する必要がある。すなわち、ニジマスの腎臓可溶性画分のようにCu含有量の低い試料では、試薬中に存在するCuが影響をおよぼす可能性がある。そこで展開溶媒のイオン強度を高めるには、Tris-HCl緩衝液のモル濃度を上げるよりNaClを添加してイオン強度を上げるほうが好ましいと思われ、実用上は0.01 M Tris-HCl緩衝液、pH 8.0に0.1 M NaClを添加するのが良いと考えられる。

次にニジマスの肝臓可溶性画分を試料として、Sephacryl S-200 HRのゲルろ過パターンをSephadex G-75およびSuperose 12と比較した結果、Cd、Cu、Znのゲルろ過パターンはSephacryl S-200 HRの方がSephadex G-75よりもピークが明瞭であった (Fig. 5)。また、ニジマスにCuを前投与してMTの誘導合成についてSephacryl S-200 HRを用いて調べた場合にも良好な結果が得られた (Fig. 6)。

これらの実験結果に基づいてSephacryl S-200 HRとSephadex G-75およびSuperose 12との実用面での優劣を考察すると次のようになる。まず、分離能については各々の担体の性質を考慮し、展開溶媒のイオン強度やpH、流速、カラムサイズ、試料添加量などの最適条件を

設定すればどのカラムでも良い結果が得られる。しかし Sephadex G-75 は他の2つのカラムよりも若干分離能が劣るようである。また、展開溶媒の流速から分画速度を比較すると、従来 Sephadex G-75 でおこなっていた速度を1とすると Sephacryl S-200 HR は約4倍、Superose 12 では約2倍の速度が得られる。サンプルボリュームという面では、Superose 12 は  $\mu\text{l}$  単位であるため少量の溶出液しか得られないので、溶出液の分析という面では不利である。一方、Sephacryl S-200 HR と Sephadex G-75 では必要性に応じてカラムサイズを選択できる利点がある。

実験操作をおこなううえで分離能の良否は最も重要な点であるが、取り扱い操作の容易性も見逃がすわけにはいかない。Superose 12 はプレパックカラムでゲルの充填が不要である。試料の添付もシリンジで注入するだけであり非常に簡単である。Sephacryl S-200 HR はゲルが膨潤状態で市販され、脱気が不要なため直接カラムへ充填できる。また、ゲル粒子も Sephadex G-75 より強固なため試料添付時のゲル表面の乱れが少なく Sephadex G-75 より取り扱い操作が容易である。

装置の面では Superose 12 は高速液体クロマトグラフィー用なので、装置が大型で経費がかかるという難点がある。一方、Sephacryl S-200 HR は Sephadex G-75 と互換性があり従来使用していた装置がそのまま利用できる利点がある。

本研究の結果、MT の定量には Sephadex G-75 が広く利用されてきたが、Sephacryl S-200 HR を使用しても Sephadex G-75 と比べ損色はみられなかった。むしろ、Sephacryl S-200 HR の方が分離能、迅速性、取り扱い操作など優れた面も多く、今後魚介類の MT 定量に Sephacryl S-200 HR を積極的に利用したいと考えている。

## 謝 辞

本研究は日本私学振興財団学術研究振興資金および神戸女学院大学研究助成金によって行ったものである。記して感謝の意を表す。

## 参考文献

- 1) 松原純子：科学，56，86—95 (1986).
- 2) 森田昌敏：代謝，20，615—623 (1983).
- 3) 鈴木和夫：トキシコロジーフォーラム，10，338—347 (1987).
- 4) 山本義和，石井知幾，池田静徳：日水誌，44，149—153 (1978).
- 5) 山本義和，井上雅代：日水誌，51，1733—1735 (1985).
- 6) 山本義和，伊達かおる：日水誌，53，833—839 (1987).
- 7) 佐藤政男，長井 靖：トキシコロジーフォーラム，10，348—357 (1987).
- 8) 小野坂敏見，田中慶一，土井雅子，岡原國男：衛生化学，24，128—131 (1978).
- 9) D. L. Eaton, B. F. Toal: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 66, 134—142 (1982).

(原稿受理 1989年4月18日)