

## 重金属ストレスに対する生体の応答

Response of Living Organisms to Heavy Metal Stresses from the Environment

高 寺 喜久雄\*・渡 辺 正\*

Kikuo TAKATERA and Tadashi WATANABE

生物の特徴のひとつは、外界の環境変化を認識しこれに適応して生存しようとするところにある。生物は、大気中酸素濃度、気温、湿度、光といった環境からのストレスに適応する形で進化をとげてきた。二酸化炭素濃度の上昇、雨の酸性化、オゾン層の破壊を始めとして、生命をとりまく環境はここ数十年、ゆっくりではあるが確実に変化しつつある。はたして生物は十分な防御機能をもっているのだろうか。本稿では環境からの重金属ストレスをとりあげ、重金属に対して生体が獲得してきた防御の仕組みの一端を解説し、当研究室で行っている関連の研究を紹介する。

## 1. は じ め に

かつての重金属汚染はほとんどが鉱山や精錬所、あるいは重金属を扱う工場の周辺のみで発生した。しかし産業構造の変化に伴い、汚染源や汚染経路として、いったん人間の消費生活の中に入ったのちに放出される経路や、石炭・石油など化石エネルギー資源の消費に伴って放出される経路が問題となってきた。重金属汚染は人間の産業活動により今後ますます激化の度を強めると予想され<sup>1)</sup>、生物圏への影響が懸念されている。

生体に取り込まれた金属は、さまざまな化学変化を受けながら、一部は貯蔵（あるいは蓄積）され、残りは排泄されていく。重金属が過剰に侵入すれば生体組織は破壊され死に至るものの、低レベルの侵入に対しては重金属を無毒化しようとする反応が生体内では起こる。たとえば現在、全世界では何億トンもの有害な水銀化合物が合成され生物圏に分散しているが、一部の細菌は水銀を還元気化させる酵素（水銀イオンレダクターゼ）を保有している<sup>2)</sup>。これは細菌がもともと持っていた機能ではなく、水銀ストレス下の環境に適応し耐性を獲得した結果だと解釈される。

細菌に限らず、他の多くの生物も体内に類似の機能をもつ。たとえば亜鉛や銅は多くの酵素反応の進行に欠くことのできない必須微量元素である。しかしこれらの金属も高濃度で生体内に存在すると、酵素の活性サイト周辺を構成するアミノ酸残基と無差別に結合しその働きを阻害してしまう。生体内にはこれら金属濃度を一定に保つため、過剰に取り込まれた金属を解毒する働きがあると推定される。その役割を担っていると考えられている

代表的なタンパクとして、メタロチオネインという化合物がある<sup>3)</sup>。

## 2. メタロチオネイン

メタロチオネイン（metallothionein, MT：金属を含み硫黄含有量の多いタンパクの意）は、ウマの肝臓に存在するカドミウム・亜鉛結合タンパクとして、1950年代の中ば Vallee らによって発見された<sup>4), 5)</sup>。このタンパクにはカドミウムが高濃度に濃縮されていること、カドミウム以外にも亜鉛、銅、水銀などの重金属が含まれること、さまざまな生物種に広く見いだされることなどから、重金属の代謝や解毒に関与しているのではないかと推定されてきた。1970年代後半に入ると植物体内にも同様の働きをする物質が見いだされ<sup>6)</sup>、フィトキレチン（phytochelatins, PC：植物体内にあって金属とキレート結合する物質の意）と命名された。

## 2.1. 特徴

MT は酵素としての機能が特定されておらず、その構造的な特徴に従って同定される。MT は以下のような特徴をもつ。

1. 重金属含有量が高い（1分子あたり4～12個の金属原子を含む）。
2. SH 基をもつアミノ酸であるシステインの含有量が高い（一般にアミノ酸残基総数の22～33%を占める）。
3. 分子量が小さい（一般に10000以下）。
4. 哺乳類のMTと構造的に類似している（システイン残基がほぼ同じ位置にある）。

さらにMTは、構造の類似性にもとづいて3種に分類されている。

\*東京大学生産技術研究所 第4部

Class I : システイン残基の位置がウマの肝臓 MT と酷似しているもの

Class II : システイン残基の位置がウマの肝臓 MT とかなり異なるもの

Class III : DNA の転写生成物ではない, 金属チオレートポリペプチド<sup>7)</sup>

哺乳類の MT は Class I に属し, Class II-MT は酵母, ラン藻などの生物で見つかった。PC は Class III に属し,  $(\gamma \text{ Glu-Cys})_n \text{ Gly}$ ,  $n = 2 \sim 8$  で表される構造をもち, おもに高等植物の体内に発見されている。最近になって植物体内に Class I-MT 様タンパクをコードする遺伝子が発見され<sup>8)</sup>, その機能に注目が集まっている。

## 2.2 構造と機能

哺乳類の MT は 1 分子中に 20 残基のシステイン, 6 ~ 8 残基のリシン, 7 ~ 10 残基のセリンを含み, アミノ末端にモノアセチル化メチオニンが位置しており, 芳香族アミノ酸やヒスチジンを欠くペプチドで, 総計 61 ないし 62 残基のアミノ酸からなる。計 14 種のタンパクまたは DNA 試料の分子レベル比較から導かれた一般的なアミノ酸配列を図 1 (1) に示す<sup>9)</sup>。システイン残基の大部分が Cys-X-Cys あるいは Cys-Cys という形で並んでいる。精製した MT 中の金属量は生物種, 器官, また重金属にさらされた環境に応じて幅広く異なる。

ラットのカドミウム・亜鉛 MT-II について X 線結晶構造解析が行われ, これによって判明した分子構造を図 1 (2), (3) に示す<sup>10)</sup>。金属はすべて 20 個のシステイン

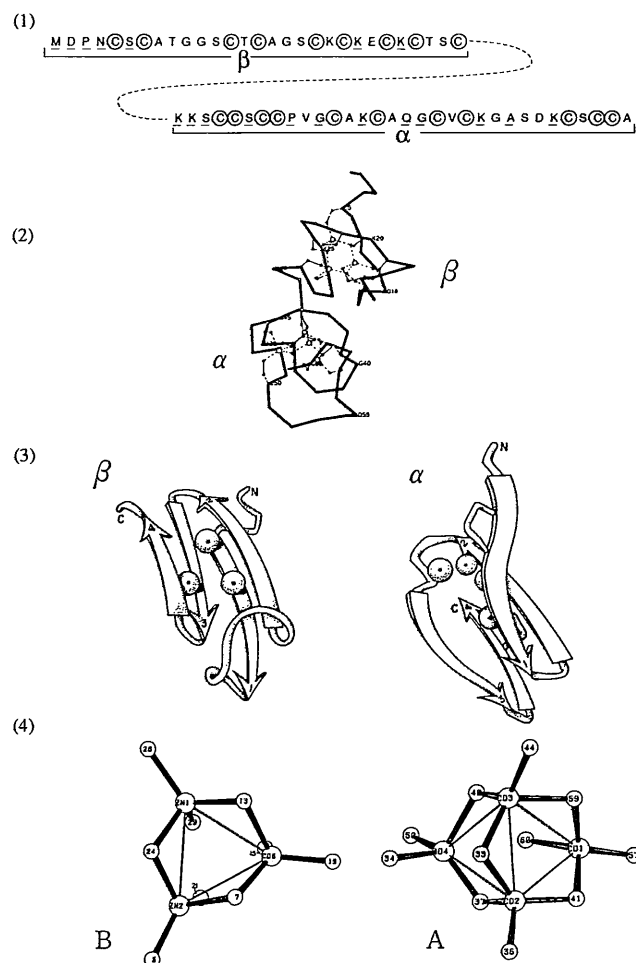


図 1 哺乳動物の MT. (1) 哺乳動物 MT の代表的なアミノ酸配列<sup>9)</sup>. 丸印のシステイン残基および下線をつけた残基は哺乳動物に共通している. (2)~(4) ラットのカドミウム・亜鉛 MT-II の分子構造 (X 線結晶解析による)<sup>10)</sup>. (2) 全体構造. (3)  $\beta$  および  $\alpha$  ドメインの折りたたみパターン. (4) B および A クラスターの配位構造.

残基とのチオレート結合で MT に結合している。MT 中の金属は 2 つの異なる多核クラスターからなる。A クラスターは 11 個のシステインを含み、4 個の亜鉛かカドミウムもしくは 5～6 個の銅原子と結合した、カルボキシ末端側の 31～61 番アミノ酸の  $\alpha$  部分である。B クラスターは 7 個のシステインを含み、4 個の亜鉛かカドミウムもしくは 5～6 個の銅原子と結合した、アミノ末端側の 1～30 番アミノ酸の  $\beta$  部分である。図 1 (4) には 2 つの金属クラスターについて、システイン分子の硫黄原子がどのような配位構造にあるかを示した<sup>10)</sup>。すべての金属は 4 つのシステインチオレート配位子に対して正四面体型に結合している。A クラスターは 3 つの架橋硫黄原子 (1 個の硫黄原子が 2 個の金属に配位している) と 1 つの末端硫黄原子 (1 個の硫黄原子が 1 個の金属に配位している) に結合したカドミウム 2 原子と、2 つずつの架橋および末端硫黄に結合したカドミウム 2 原子を含む。4 個のカドミウム原子は、2 つの重なり合う 6 員環に埋め込まれた歪んだ四面体型 (蝶型) に配置されている。B クラスターは 2 つずつの架橋および末端硫黄原子に結合した亜鉛 2 原子とカドミウム 1 原子を含んでいる。金属イオンはイス型の 6 員環内で正三角形を作っている。

MT はおもに重金属のストレス下で誘導されることから、その役割はもっぱら細胞内に侵入した重金属の解毒だと考えられてきたが、MT がアポ酵素への金属イオンの供給を担っている可能性もあって、MT 分子の金属交換反応が調べられた。その結果、哺乳類の亜鉛-MT は、炭酸脱水素酵素・アルドラーゼ・アルカリフォスファターゼを含むさまざまな亜鉛含有酵素の再活性化を、亜鉛の無機塩とはほぼ同程度の効率で行いうことが明らかとなった<sup>11)</sup>。そのほか近年、MT の放射線に対する防御作用<sup>12)</sup>や抗癌剤に対する毒性軽減作用<sup>13)</sup>が明らかにされ、別の面からも注目を浴びるようになった。これらの生理作用の多くは、金属チオレートクラスターを形成するシステイン残基のチオール基の反応性や、MT の金属に対する高い親和性によって説明できる。

### 2.3. MT の検出・定量

MT の検出・定量法としては、原子吸光分析装置 (AAS) や誘導結合プラズマ発光分析装置 (ICP/AES) により直接金属元素を定量する方法や<sup>14), 15)</sup>、結合した金属を放射性同位体の<sup>109</sup>Cd に置き換え、 $\gamma$ 線シンチレーションカウンターで定量する方法がある<sup>16)</sup>。そのほか電気化学的に検出する方法も報告されているが<sup>17)</sup>、妨害物質の影響を受けやすいため一般的ではない。近年、ICP/AES よりも格段に高感度な誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP/MS) が開発され、これを用いた MT の分析も報告されるようになってきた<sup>18)~20)</sup>。ここでは当研究室で実施している ICP/MS を用いた分析法につ

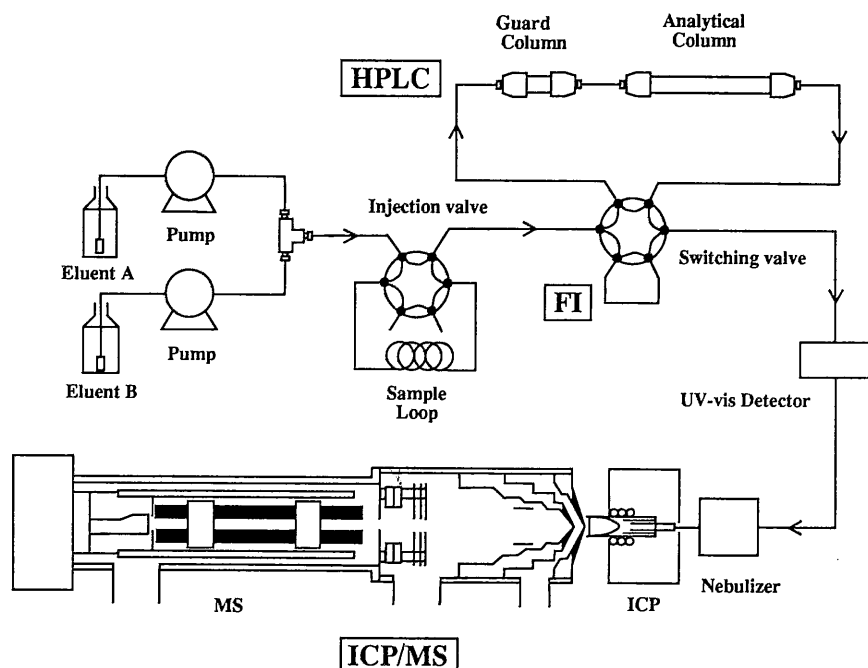
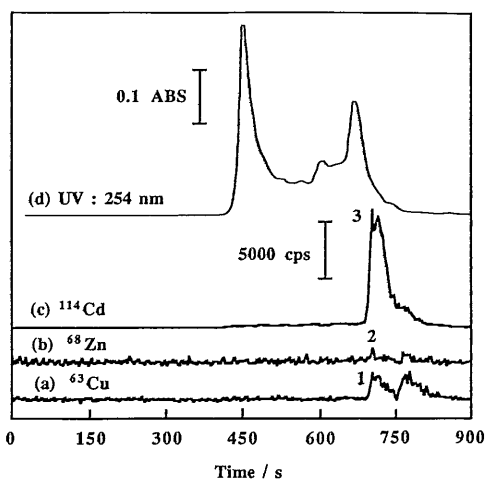
いてやや詳しく紹介する。

ICP/MS は多くの元素 (とりわけ重い元素) で検出限界が ppt ( $10^{-12}$  g/ml) レベルにも達し、ICP/AES よりも 2～3 桁ほど感度が高い<sup>21)</sup>。ICP/MS では、ICP/AES と同様に多元素同時定量ができ、ICP/AES と比べて分光干渉が少なくスペクトルが簡単のため定性が容易である。また質量分析を基礎とするので元素の同位対比が測定でき、濃縮安定同位体を用いた同位体希釈法による定量も可能となる。

ICP/MS 法は試料がプラズマの中に導入された時点でもととの化学形態は失われる。したがってこのままでは化学種についての情報は得られない。そこで、適当な物質分離手段 (とくに高速液体クロマトグラフィー: HPLC) と組み合わせることにより、化学種の同定・定量 (chemical speciation) が可能となる。このようにして構成される HPLC-ICP/MS を生体試料・環境試料中の重金属測定へ応用しようとする試みがここ数年で開始され<sup>22), 23)</sup>、化学種の静的な分布から動的な代謝、病因診断などへの広い応用が期待される<sup>24)</sup>。

装置の構成例を図 2 に示す。HPLC, ICP/MS とともに主として水溶液試料を取り扱うため、これら 2 つの装置を連結するには、HPLC システムの溶出口をそのまま ICP/MS の試料導入口につなぐだけで済む。HPLC の分析カラムとしてサイズ排除型 (ゲル濾過) クロマトグラフィーを用いる。このカラムでは化合物が分子の大きさに従って分離されるため、タンパクを始めとする生体分子の分離によく使用されている。カラムから分離溶出してきた物質を、まず紫外—可視 (UV-vis) 検出器で検出する。検出波長は一般に芳香族アミノ酸の吸収のある 250nm 付近に設定し、タンパクそのものの量をモニターする。溶出液はこののち ICP/MS に導入される。試料はネブライザーで霧 (エアロゾル) になり、キャリアガスに乗ってプラズマの中心部 (約 8000°C) へ入って原子に分解され、大半の元素で 90% 以上が 1 価の陽イオンになる。こうして生じた陽イオンの混合物は小孔を通して低圧の分析部分に引き込まれ、イオンレンズで収束されたのち四重極質量分析装置 (MS) に導かれる。ここでイオンは質量に応じて分離され検出される。

MT は他の多くのタンパク (分子量十万～数万) と比べ分子量が小さいので、適切なカラムの選択により容易に分離できる。例として、カドミウムストレス下で培養した単細胞藻類の一種 *Anacystis nidulans* の体内から分離した水溶性タンパク混合物の HPLC-ICP/MS クロマトグラム ((a)～(c)) を図 3 に示す<sup>20)</sup>。1～3 のピークが MT (分子量約 10000) である。254nm でタンパクそのものの量をモニターした紫外吸光度クロマトグラム (d) から明らかなように、この位置に溶出してくるタンパクはほとんどなく、存在量の少ない MT は紫外—可視検

図2 HPLC-ICP/MSの装置構成<sup>20)</sup>.図3 ラン藻(*Anacystis nidulans* R-2)から抽出した水溶性タンパク混合物のHPLC-ICP/MSクロマトグラム(a~c)とUVクロマトグラム(d)<sup>20)</sup>.

出器では明瞭なピークとしては認められない。1~3のピーク面積から金属含有量を計算し、MT量を間接的に推定できるが、MT中に複数の金属種が含まれる場合や(金属種によって1分子のMT中に含まれる原子の個数が異なる)、部分的あるいは完全に金属が抜けたMT(アボタンパク)が共存する場合には測定誤差が大きくなる。そこで、MT中のシステイン残基数が一定であることに注目し、システイン量を指標としてHPLC-ICP/

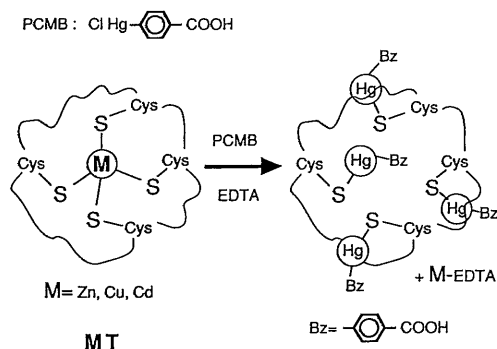


図4 MT中のシステイン残基とPCMBとの反応による水銀メルカプチドの形成。

MSによりMTを定量する手法を開発した<sup>20)</sup>。

先述のようにMT中には約30%の割合でシステインが含まれている。このシステイン残基を、ICP/MSで検出限界の低い、しかも生体内にほとんど存在しない元素を含む化合物で選択的に修飾してやり、HPLC-ICP/MSによって分離・検出する。大部分のタンパクはジスルフィド結合を形成していないシステイン残基を1分子中に数個程度しか含まないので、この手法を用いるとMTが強調されて検出されると予想した。p-塩化水銀安息香酸(PCMB)に代表される有機水銀化合物は、選択的にシステイン残基と反応しメルカプチドを形成することが知られている(図4)。しかも、水銀はICP/MS

の検出下限が $41 \text{ pg/ml}$  ( $41 \times 10^{-12} \text{ g/ml}$ ) と最も低い元素の一つであり、この手法に用いる試薬としては最適である。図3に示した水溶性タンパクをPCMBで修飾し、その後に得られたHPLC-ICP/MSクロマトグラムを図5 (a)~(d)に示す。ピーク7がPCMB修飾MTで、その面積はシステイン残基の量に対応する。PCMBとの反応で遊離した金属イオンは、EDTA錯体になり、MTのピークよりも遅れて検出された。このような方法によってMTの精度の高い定量が可能となった。

#### 2.4. MT 遺伝子

MTは重金属ストレスによって誘導されるが、MT遺伝子の発現がどのように調整されているのかを解明すべく、哺乳類のヒト、サル、マウス、ラットや、菌類の酵母、アカバネカビなどについて、MTをコードする遺伝子の解析が行われた。

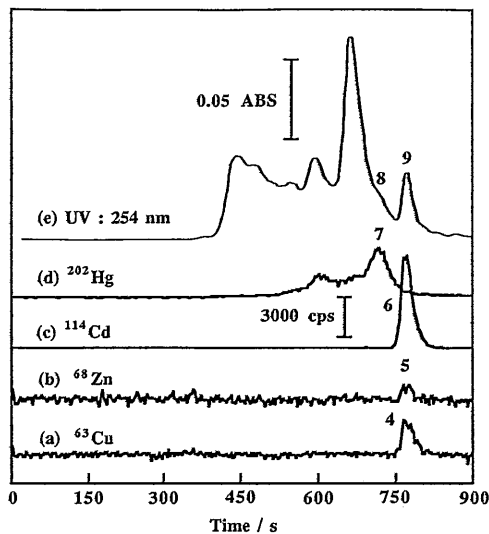


図5 ラン藻から抽出した水溶性タンパク混合物をPCMB処理した後に得られたHPLC-ICP/MSクロマトグラム(a~d)とUVクロマトグラム(e)<sup>20)</sup>。

哺乳類のMT遺伝子のうち、直接タンパクに翻訳される塩基配列は3個の構造配列(エクソン)に分かれており、その間に2個の翻訳されない介在配列(イントロン)が存在する<sup>25)</sup>。DNAのMT遺伝子を発現調節する仕組みを知るには、MT遺伝子の転写されない上流(プロモーター)部分の塩基配列(図6)を解かねばならない。哺乳動物の場合、プロモーター領域における2つの特徴的な12塩基の繰り返し配列(proximalとdistal)がある。カドミウムによる誘導では遺伝子の近位領域(proximal)(中心塩基、マウス:-46, 人:-49)および遠位領域(distal)(中心塩基、マウス:-114, 人:-145)の領域のどちらかがあればタンパク合成が起ることから<sup>26~28)</sup>、カドミウム投与による何らかの特異的なタンパクがこの領域に結合すると考えられている。さらに上流の-236~-268の領域にステロイドホルモンの一つであるグルココルチコイドのリセプタータンパクが結合することがわかっている<sup>28)</sup>。MTが重金属やホルモンといった、まったく異なる化学物質によるストレスで誘導されるのはきわめて興味深い。上流の-25~-35領域にはTATA boxと呼ばれるTATAAという塩基配列が存在する。これは多くの遺伝子上流に見られ、この位置にRNAポリメラーゼが結合して転写を開始する働きをしているといわれる<sup>20)</sup>。

このように、遺伝子上流部分の塩基配列の解析を通じて、遺伝情報発現の仕組みが判明しつつあり、この仕組みを利用して遺伝子工学的応用が考えられている。Palmiterらの得た実験結果によると、マウス遺伝子のプロモーター領域とラットの成長ホルモンをつなぎ合わせた遺伝子を染色体に組み込まれたマウスの場合、亜鉛を投与すると成長ホルモンが体内に効率的に合成され、通常のマウスの約2倍の大きさにまで成長する<sup>30), 31)</sup>。将来的にはこの方法を、遺伝的に欠陥をもつ患者の治療や、家畜や農産物の成長加速などへ応用することが考えられる。

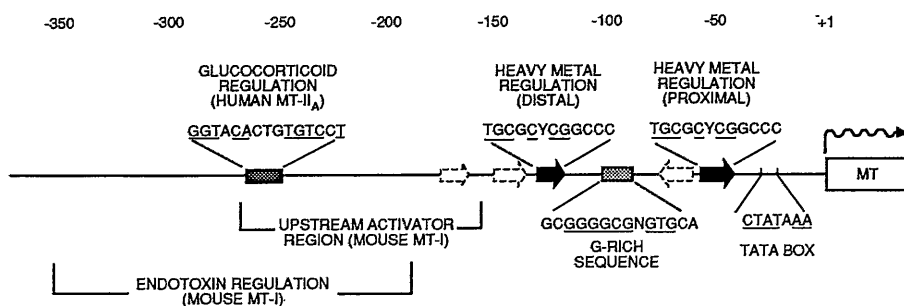


図6 哺乳動物MTの遺伝子転写制御配列<sup>9)</sup>。黒ぬりの矢印は近位(proximal)および遠位(distal)重金属制御因子。下線をつけた塩基は哺乳類の共通していると考えられるもの。白抜き矢印はマウスMT-I遺伝子におけるこの配列の部分的な繰り返し。左側の斜線を引いた箱は人間のMT-II<sub>A</sub>遺伝子におけるグルココルチコイドホルモン制御配列。

## 3. お わ り に

以上, メタロチオネインというタンパクに注目して, 重金属ストレスと生体との関わり的一端を眺めてきた. MT に類する重金属含有タンパク (ポリペプチド) は, 原核生物から哺乳類までほとんどすべての生物に遍在している. 生体内には必須金属を常に一定濃度に保とうとする働き (ホメオスタシス) があり, これは生命を維持していくための本質的な機能のひとつである. 今後, 生体におけるホメオスタシスとメタロチオネイン誘導との関係について明らかにすることが, 生命というものを知るひとつの手掛かりとなるのではないだろうか. そのためにも, さまざまな生物種について生物が進化の過程で獲得してきた重金属ストレスに対する防御機構の遺伝子レベルでの解明が期待される. (1992年7月20日受理)

## 参 考 文 献

- 1) J. O. Nriagu and J. M. Pacyna, *Nature [London]*, **333**, 134 (1988).
- 2) A. O. Summers and S. Silver, *Ann. Rev. Microbiol.*, **32**, 637 (1978).
- 3) (a) "Metallothionein", ed. J. H. R. Kägi and M. Nordberg, Birkhäuser Verlag, Basel, 1979; (b) "Metallothionein II", ed. J. H. R. Kägi and Y. Kojima, Birkhäuser Verlag, Basel, 1987.
- 4) M. Margoshes and B. L. Vallee, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4813 (1957).
- 5) J. H. R. Kägi and B. L. Vallee, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3460 (1960).
- 6) J. L. Jr. Casterline and N. M. Barnett, *Plant Physiol.*, **59**, 124 (Suppl.) (1977).
- 7) B. A. Fowler, C. E. Hildebrand, Y. Kojima and M. Webb, *Experientia Suppl.*, **52**, 19 (1987).
- 8) A. J. de Framond, *FEBS Lett.*, **290**, 103 (1991).
- 9) D. H. Hamer, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 913 (1986).
- 10) W. F. Furey, A. H. Robbins, L. L. Clancy, D. R. Winge, B. C. Wang and C. D. Stout, "Metallothionein II", ed. J. H. R. Kägi and Y. Kojima, p. 139, Birkhäuser Verlag, Basel, 1987.
- 11) A. O. Adam and F. O. Brady, *Biochem. J.*, **187**, 329 (1980).
- 12) 松原純子, *科学*, **56** (2), 86-95 (1986).
- 13) S. L. Kelley, A. Basu, B. A. Teicher, M. P. Hacker and D. H. Hamer, *Science*, **241**, 1813 (1988).
- 14) H. Sunaga, E. Kobayashi, N. Shimojo and K. T. Suzuki, *Anal. Biochem.*, **160**, 160 (1987).
- 15) A. Mazzucotelli, A. Viarengo, L. Canesi, E. Ponzano and P. Rivaro, *Analyst*, **116**, 605 (1991).
- 16) G. Wagner, *Plant Physiol.*, **76**, 797 (1984).
- 17) R. W. Olagson, *Environ. Health Perspect.*, **65**, 71 (1986).
- 18) H. M. Crews, J. R. Dean, L. Ebdon and R. C. Massey, *Analyst*, **114**, 895 (1989).
- 19) A. Z. Mason, S. D. Storms and K. D. Jenkins, *Anal. Biochem.*, **186**, 187 (1990).
- 20) K. Takatera and T. Watanabe, *Anal. Sci.*, **8**, 469 (1992).
- 21) A. R. Date, A. L. Gray, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (Blackie, 1989).
- 22) H. Suyani, J. Creed, T. Davidson and J. Caruso, *J. Chromatogr. Sci.*, **27**, 139 (1989).
- 23) D. Heitkemper, J. Creed, J. Caruso and F. L. Fricke, *J. Anal. At. Spectrom.*, **4**, 179 (1989).
- 24) K. Takatera and T. Watanabe, *Anal. Chem.*, 投稿中 (1992).
- 25) M. Karin and R. I. Richards, *Nature*, **299**, 797 (1982).
- 26) G. Stuart, P. Searle, H. Chen, R. Brister and R. Palmiter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7318 (1984).
- 27) A. Carter, B. Felber, M. J. Walling, M.-F. Jubier, C. Schmidt and D. H. Hamer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7392 (1984).
- 28) M. Karin, A. Haslinger, H. Holtgreve, R. I. Richards, P. Krauter, H. M. Westphal and M. Beato, *Nature*, **308**, 513 (1984).
- 29) R. Breathnach and P. Chambon, *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 349 (1981).
- 30) R. D. Palmiter, R. L. Brinster, R. E. Hammer, M. E. Rosenfield, N. C. Brinberg and R. M. Evans, *Nature*, **300**, 611 (1982).
- 31) R. D. Palmiter, G. Norstedt, R. E. Gelinas, R. E. Hammer and R. L. Brinster, *Science*, **222**, 809 (1983).