

タイワンリスの肝臓における Cu 蓄積と細胞内分布

鈴木美成^{1)*}, 渡邊 泉¹⁾, 久野勝治¹⁾, 阿南弥寿美²⁾, 國頭 恭²⁾, 田辺信介²⁾

東京農工大学 農学部¹⁾, 愛媛大学 沿岸環境科学研究センター²⁾

Copper accumulation and hepatic subcellular distributions of trace elements in Formosan squirrel

Yoshinari Suzuki¹⁾, Izumi Watanabe¹⁾, Katuji Kuno¹⁾, Yasumi Anan²⁾, Takashi Kunito²⁾, Shinsuke Tanabe²⁾

¹⁾ Department of Environmental Natural Resource Science, Tokyo University of Agriculture and Technology

²⁾ Center for Marine Environmental Studies, Ehime University

Key words : Formosan squirrel, Copper accumulation, Subcellular distribution, Metallothionein, Wild mammals

Abstract

In order to obtain basic information of trace element distribution in the liver of the Formosan squirrel that accumulates Cu at high level, subcellular and molecular weight distributions in this species were examined.

Mean Cu concentrations in the whole liver of the Formosan squirrel were 610 ± 360 (μ g/g wet wt.). And Cu concentrations in the fraction containing nuclei, mitochondria and lysosome were the largest in the liver of the Formosan squirrel. Mean Cu burden in the fraction containing nuclei, mitochondria and lysosome in the hepatocytes was 73% of the total copper contain in the hepatocytes. On the other hand, the average Cu burden was 3.5% in the microsomes and 23% in the cytosol of the hepatocytes.

The results of the gel filtration showed that most of the Cu in the cytosol was contained in the void volume fraction, the molecular weight of which is larger than that of metallothionein. About only 6.5% of Cu was associated with metallothionein fractions in the liver of the Formosan squirrel. In the metallothionein fraction, Cu was contained while zinc was not detected, suggesting that Cu accumulates beyond the capacity of metallothionein synthesis. These results suggest that the fraction containing nuclei, mitochondria and lysosome contributes the high level of Cu accumulation in the liver of this species.

1 はじめに

必須元素である銅(Cu)は一般に生体内での生理学的要求量に依存し、恒常性維持機能により安定したレベルに保たれる。一方で、野生動物には Cu を特異的に高濃度で蓄積する種が報告されている。なかでも関東地方で捕獲されたタイワンリスの肝臓における Cu 濃度は他の野生 Cu 蓄積

種や肝炎を発症した LEC ラット個体より高レベルであった[1]。LEC ラットなど肝臓に Cu を高濃度で蓄積する種において、細胞中 Cu のほとんどが細胞質のメタロチオネン(MT)に結合して、存在していることが知られている[2-4]。

本報は野生のタイワンリス肝臓における Cu の細胞内分布および肝細胞質における MT との結合を検討することで、本種でみられる高濃度 Cu 蓄積の特徴解析を試みた。

2 試料と方法

2002年4月から5月の間に神奈川県鎌倉市で捕獲されたタイワンリス(*Callosciurus erythraeus*)6 検体の肝臓を供

連絡先：鈴木美成

〒183-8509 東京都府中市 幸町 3-5-8

東京農工大学 農学部 環境毒性学

Tel & Fax : 042-367-5736

e-mail : syoshi@cc.tuat.ac.jp

論文受理日：平成16年2月13日

試した。細胞分画と分子量分画の方法は *Anan et al.* [2] に従い、肝臓組織をホモジナイズ後、遠心分離により核、ミトコンドリア、リソソーム画分、マイクロソーム画分、細胞質画分に細胞分画した。細胞分画で得られたサイトソルは Sephadex G-75 を充填したカラムでゲル濾過分画した。各画分試料と肝臓組織は 80°C で 90 時間乾燥後、硝酸にて湿式灰化し ICP-MS (YOKOGAWA, HP-4500) により Cu と亜鉛 (Zn) 濃度を測定した。

3 結果と考察

分析に供試したタイワンリス肝臓の元素濃度は Cu : 610 ± 360, Zn : 24 ± 5 μg/g WW (湿重量当り) であり、本種の Cu 濃度は肝炎を発症した LEC ラット (242 μg/g WW) [3, 5] や野生の Cu 蓄積種として知られるアオウミガメ (49.9 μg/g WW) [2] やケワダガモ (270 μg/g WW) [6] と較べて高かった。

細胞分画の結果、Cu と Zn はそれぞれ核、ミトコンドリア、リソソーム画分に 73 ± 6.6, 34 ± 5.4% が存在し、マイクロソーム画分には 3.5 ± 0.9, 7.9 ± 0.9%, 細胞質画分には 23 ± 5.8, 58 ± 4.7% が分布していた。Cu は組織中濃度が高くなるにつれて、核、ミトコンドリア、リソソーム画分の濃度および負荷割合が増加した (Fig. 1)。

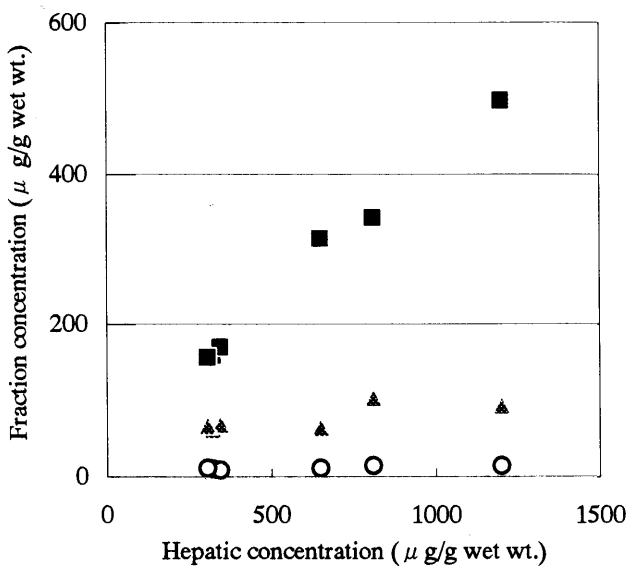


Fig. 1. Relationship between copper concentration in each subcellular fraction and those in whole liver.

■ : Nuclei, mitochondria and microsome, ○ : Microsome
▲ : Cytosol

一方で、細胞質画分の Cu 濃度は組織中 Cu 濃度の上昇とともに増加したが、負荷割合は減少した。

Zn は組織中濃度の上昇に伴い、核、ミトコンドリア、リソソーム画分と細胞質画分の濃度が上昇したが、各画分の負荷割合はほぼ一定であった。分子量分画の結果、Cu は高分子量 (HM) 画分と MT 画分にそれぞれ 1 つピークがみられ、HM 画分のピークは MT 画分のピークよりも優勢であった。Zn は HM 画分で 2 つのピークがみられ、より高分子量のピークのほうが優勢であったが、MT 画分に明確なピークは認められなかった (Fig. 2)。

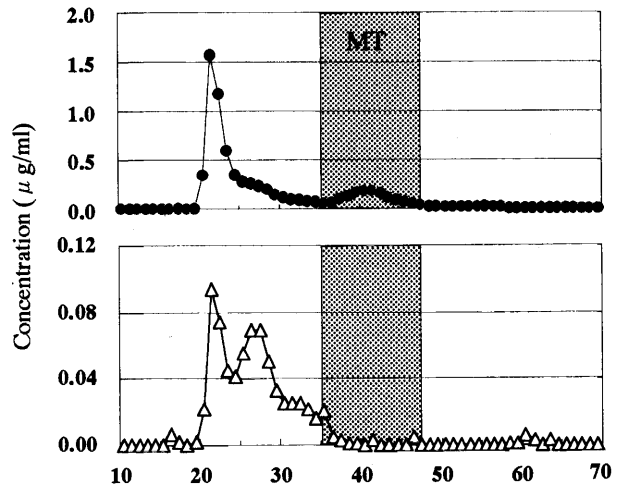


Fig. 2. Sephadex G-75 elution profiles of Cu and Zn in hepatocytosol of Formosan squirrel.

MT 画分に存在している元素のモル濃度の総和から本種の肝臓における MT 濃度を試算したところ約 600 μg/g であり、一般に肝臓における MT 濃度が低いとされているげっ歯目の動物 (2 - 10 μg/g) [7] と比較して高値であった。同様に MT 画分に存在している元素のモル濃度比から、本種の MT に結合している金属は 96% が Cu であった。このことから、MT の誘導、合成に Cu が最も寄与していると推察された。

また、肝組織中 Cu 濃度の上昇に伴い、MT 画分における Cu 濃度はほとんど変わらなかったが、HM 画分における Cu 濃度は上昇する傾向がみられた。加えて本種肝臓における MT 画分中の Cu/Zn のモル比は肝臓中 Cu 濃度との間に正の相関がみられなかったものの、 $[28 \pm 12]/1$ と肝炎を発

症した LEC ラットの Cu/Zn 比(9.6 ± 4.9)/1)よりも高値を示した[8]。MT の合成限界は、肝臓中 Cu 濃度の増加にともない MT に結合していない Cu と MT 中の Zn に対する Cu の割合が増加し、肝臓中の Zn 濃度が減少することで評価できるとされていることから[9]、本種の肝臓中 MT は合成限界まで誘導されている可能性が示唆された。

LEC ラットでは肝臓障害の進行とともに、リソソームへ Cu が蓄積することが報告されている[5]。肝炎の発症した LEC よりも肝臓に Cu を蓄積していた本種の肝臓においては、MT と結合している Cu は全体の $6.5 \pm 3.1\%$ と少なく、肝臓中 Cu のほとんどが核。ミトコンドリア。リソソーム画分に存在していた。このことから本種における Cu の蓄積機構に核。ミトコンドリア。リソソームが寄与していることが示唆された。核。ミトコンドリア。リソソームに蓄積する過程として、まず MT に Cu が結合し MT の合成限界以上の Cu が肝臓に蓄積した場合に核。ミトコンドリア。リソソームへの蓄積が開始される、もしくは Cu との親和性が MT より高いリガンドが核。ミトコンドリア。リソソームに存在し、そのリガンドへの Cu の結合が MT への結合よりも優先的である可能性が考えられた。

また、本種の肝臓において MT 画分における金属の 96% が Cu であることから、Cu のみが結合している Cu-MT の存在が示唆された。Zn を含まず Cu のみを結合する MT は pro-oxidant として働き hydroxyl radicals を発生させることが知られおり、これが肝炎。肝癌の発症機構であることが示唆されている[10]。このことから、台湾リス肝臓中の MT は pro-oxidant として働き、肝臓において hydroxyl radicals を生成している可能性が推察できた。今後は本種における毒性影響の確認を含めた蓄積機構の解明が求められよう。

【引用文献】

1. Suzuki Y, Watanabe I, Kuno K, Kunito T, Tanabe S : Trace elements accumulation in Formosan squirrel. *Proceedings International Symposium on Bio-Trace Elements 2002* : 166-170 (2003).
2. Anan Y, Kunito T, Sakai H and Tanabe S : Subcellular distribution of trace elements in the liver of sea turtles. *Mar. Pollut. Bull.* 45 : 224-229 (2002).
3. Tsujikawa K, Suzuki N, Shimaoka T, Iida T, Kohama Y, Otaki N, Kimura M, Sugiyama T and Mimura T : Abnormal accumulation of copper-metallotionein in the liver and kidney of Long-Evans rats with cinnamon-like coat color (LEC rats). *Biol. Pharm. Bull.* 17(5) : 591-595 (1994).
4. Sugawara N, Sugawara C, Sato M, Katakura M, Takahashi H and Mori M : Copper metabolism in LEC rats aged 30 and 80 days old : Induction of Cu-metallotionein and status of zinc and iron. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 72(3) : 353-362 (1991).
5. Klein, D., Lichtmanegger, J., Heinzmann, U., Müller-Höcker, J., Michaelsen, S. and Summer, K.H. : Association of copper to metallotionein in hepatic lysosomes of Long-Evans cinnamon (LEC) rats during the development of hepatitis. *Eur. J. Clin. Invest.*, 28 : 302-310 (1998).
6. Norheim G : Levels and interactions of heavy metals in sea birds from Svalbard and Antarctic. *Environ. Pollut.* 47 : 83-94 (1987).
7. Henry RB, Liu J, Choudhuri S and Klassen CD : Species variation in hepatic metallotionein. *Toxicol. Lett.* 74 : 23-33 (1994).
8. Sugawara N, Sugawara C, Sato M, Takahashi H and Mori M : Excessive accumulation of hepatic copper in LEC rats aged 80 days without hepatitis and 130 days with hepatitis. *Pharmacol. Toxicol.* 71 : 321-324 (1992).
9. Suzuki KT : Disordered copper metabolism in LEC rats, an animal mode of Wilson disease : Roles of metallotionein. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 89(2) : 221-240 (1995).
10. Suzuki KT, Rui M, Ueda J and Ozawa T : Production of hydroxyl radicals by copper-containing metallotionein : Roles as prooxidant. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 141 : 231-237 (1996).