

Role of Metallothionein in Food Toxicology

Monica Nordberg Ph. D
Associate professor
Institute of Environmental Medicine
Karolinska Institutet
SE- 171 77 Stockholm
Phone: +46 8 52487400
Fax: +46 8 314124
E-mail: monica.nordberg@ki.se

(内閣府食品安全委員会仮訳)

食品毒性学から見たメタロチオネインの作用

(Role of Metallothionein in Food Toxicology)

モニカ・ノルドバーグ、理学博士

(Monica Nordberg Ph. D)

カロリンスカ研究所環境医学研究部門助教授

(Associate professor, Institute of Environmental Medicine, Karolinska
Institutet)

SE- 171 77 Stockholm

電話番号: +46 8 52487400

ファックス: +46 8 314124

電子メール: monica.nordberg@ki.se

Toxicity of metals depends on

- Bioavailability, species and exposure conditions.
- Essential metals important for life might cause adverse health effects if
- Exposure is excessive.
- Chemical species or exposure route is not the physiological one.
- Toxicity and uptake of metals from food varies with nutritional factors as iron status, intake of protein, calcium and zinc.
- The mechanism for toxicity of several metals involves metallothionein.
- Human exposure to metals takes place via food stuff in which metal binding proteins such as metallothionein occur.

金属毒性を左右する要因

- バイオアベイラビリティ(生物学的利用能)、種、曝露条件。
- 生命にとって重要な必須金属であっても、以下のような場合、健康に悪影響を生じうる：
- 過度に曝露したとき。
- 化学種もしくは曝露ルートが生理学的なものでないとき。
- 食品由来の金属の毒性および吸収は、鉄状態、タンパクの摂取、カルシウム、亜鉛などの栄養因子によって変化する。
- 金属の毒性のメカニズムには、メタロチオネインが関与しているものもある。
- 人間の金属への曝露は、メタロチオネインなど金属結合タンパクが生じている食物を経由して起こる。

Metals and Food

- Many metals and their species are present in food and can thus have an influence on human health.
- Limited data available for Cadmium, Zinc, Copper, Mercury in relation to Metallothionein.
- Cadmium binding proteins of different molecular weight in e.g. rice, oysters, liver and kidney.

金属と食品

- 多くの金属および金属種が食品中に存在しているため、人の健康に影響を与える。
- カドミウム、亜鉛、銅、水銀と、メタロチオネインとの関係についてのデータは限られている。
- カドミウム結合タンパクの分子量は、例えば米、カキ、肝臓、腎臓など、その存在場所によって異なっている。

Metallothionein (MT)

- Metallothioneins (MTs) are low molecular weight, cysteine-rich metal-binding proteins found in a wide variety of organisms including bacteria, fungi and all eukaryotic plant and animal species.
- Metallothionein is often related to toxicokinetics and biochemistry of essential and non-essential metals such as zinc, cadmium, mercury and copper. In vivo binding to other metals/metalloids such as selenium and bismuth is not yet understood. Although it is mainly an intracellular protein, MT has been detected in small amounts in blood and urine.

メタロチオネイン (MT)

- メタロチオネイン(MT)は、低分子量の、システインに富む金属結合タンパクで、バクテリア、菌類、全ての真核植物、動物種など、種々の生物に広範に見られる。
- メタロチオネインは、亜鉛、カドミウム、水銀、銅などの必須金属、非必須金属の毒性や生化学と関連づけられることが多い。生体内における、セレン、ビスマスといった他の金属／半金属との結合については、まだ理解が進んでいない。メタロチオネインは、主に細胞内に見られるタンパクであるが、血中、尿中からも少量検出されている。

Characteristics of metallothionein

- Molecular weight around 6000-7000
- 61 aminoacids (62-68)
- 20 cysteine (30%), N-acetylmethionine, C-alanine, no aromatics, no histidine
- Unique aminoacid sequence
- Tertiary structure/metal clusters
- Metal content; Zn, Cd, Hg, Cu; 5-10% w/w
- Absorption at nm 225 (Zn), 250 (Cd) 300 (Hg) 275 (Cu)

メタロチオネインの特性

- 分子量はおよそ6000-7000
- 61個のアミノ酸 (62-68個)
- 20個のシステイン(30%)、N-アセチルメチオニン、C-アラニンよりなり、芳香族アミノ酸やヒスチジンは含んでいない
- 独自のアミノ酸配列
- 三次構造／金属クラスター
- 金属含有量；亜鉛、カドミウム、水銀、銅；5-10% w/w
- 225 nm(亜鉛)、250nm (カドミウム)、300nm (水銀)、275nm (銅)で吸収

Characteristics of metallothionein cont

- No disulfide bonds
- Heat stability
- Cytoplasmic localisation
- Isoforms
- Localisation on chromosome
- Induced synthesis by Cd, Zn

メタロチオネインの特性、続き

- ジスルフィド結合なし
- 熱的安定性
- 細胞室内局在
- イソ型(イソフォーム)
- 染色体に局在
- カドミウム、亜鉛によって誘導合成

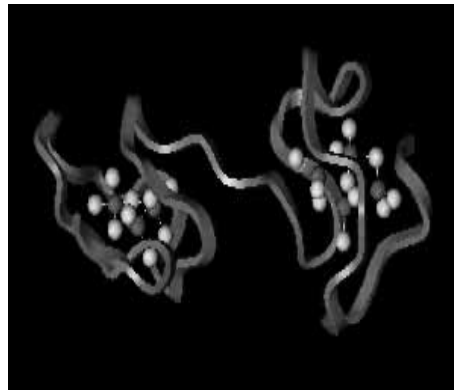
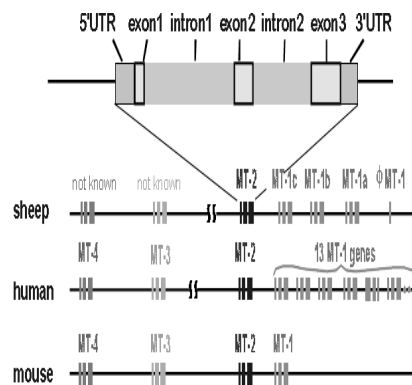
Metallothionein and DNA

- MT-I, - II, - III, - IV,
- Age; fetus, newborn, adult, aged
- Gender aspects men-women
- MT higher in liver women than in men and
- Increased Cd in blood & increased MT women
- Iron deficiency increases MT-I in bone marrow, MT in liver unchanged, in kidney decreased
- Iron status-MT-Cd
- Genetic polymorphism - several genes for MT on same chromosome coding specific MT-function?

メタロチオネインとDNA

- MT-I, - II, - III, - IV,
- 年齢;胎児、新生児、成人、老人
- 性的側面 男性-女性
- 男性よりも女性の肝臓内にMTが多い
- 血中カドミウムの増加 & MT増加 女性
- 鉄欠乏によって骨髄のMT-I増加、肝中のMTは変化なし、腎中では減少
- 鉄状態-メタロチオネイン-カドミウム
- 遺伝的多形-同一染色体上にあるいくつかのMT遺伝子が特定のMTの機能をコーディング?

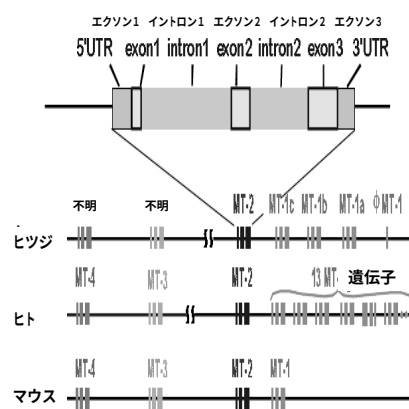
Metallothionein



Monica Nordberg, Food Safety Commission in Japan

March 06 15

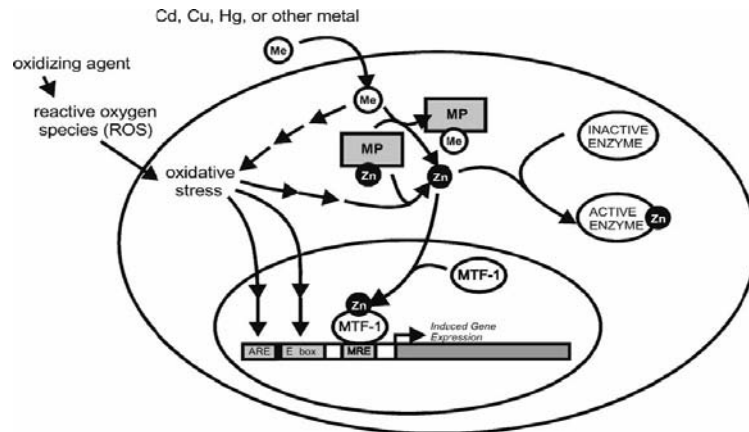
メタロチオネイン



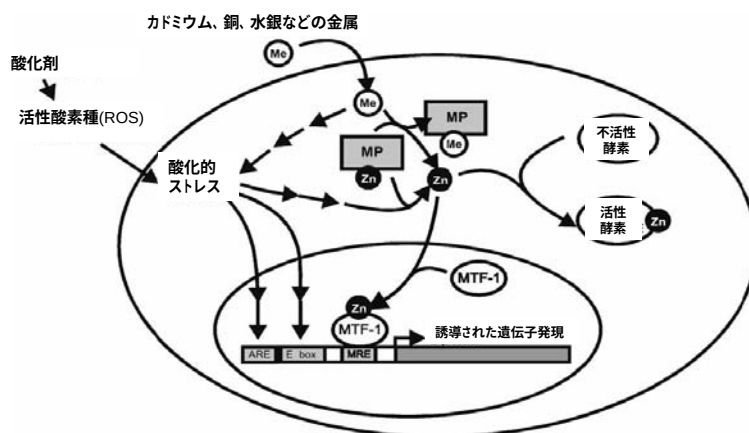
Monica Nordberg, Food Safety Commission in Japan

March 06 16

Model induction MT gene expression (F. Haq et al. / Mutation Research 533 (2003) 211–226)



メタロチオネイン遺伝子発現の誘導モデル (F. Haq et al. / Mutation Research 533 (2003) 211–226)



Metallothionein has several functions in the biological system

- Transport of metals e. g. Cd, Cu, Zn
- Detoxification of metals e. g. Cd, Zn, Hg
- Protection from metal toxicity; non-MT-bound metal versus MT-bound metal
- Free radical scavenger
- Storage of metals
- Metabolism of essential metals
- Functions related to the immune response
- Genotoxicity and carcinogenicity

生体系においてメタロチオネインが有する いくつかの機能

- 金属の輸送 カドミウム、銅、亜鉛など
- 金属の解毒 カドミウム、亜鉛、水銀など
- 金属毒性に対する防御; 非メタロチオネイン結合型金属とメタロチオネイン結合型金属
- フリーラジカル捕捉剤
- 金属の貯蔵
- 必須金属の代謝
- 免疫反応(応答)に関する機能
- 遺伝毒性および発癌性

Metabolism and kinetics of metals-general concepts and relationship to metallothionein

- Intake: Cd and MT important
- Absorption: Cd and Cu
- Distribution and Accumulation: Cd, Hg, Cu
- Metabolism and kinetics
- Biological half-time
- Excretion: Cd, Hg(?)

金属の代謝および動態－ 一般概念およびメタロチオネインとの関係

- 摂取: カドミウム、メタロチオネインが重要
- 吸収: カドミウム、銅
- 分布・蓄積: カドミウム、水銀、銅
- 代謝および動態
- 生物学的半減期
- 排泄: カドミウム、水銀(?)

Metallothionein and Disease

✱Cadmium: Kidney: proteinuria, calciuria, Itai-Itai disease

✱Copper :

✱liver: Wilson's, Indian liver cirrhosis,

✱Placenta: Menke's,

✱GIF

✱brain Alzheimer's disease

メタロチオネインと疾病

✱カドミウム: 腎臓: タンパク尿、カルシウム尿、イタイイタイ病

✱銅:

✱肝臓: ウィルソン病、インディアン肝硬変、

✱胎盤: メンケス病

✱GIF

✱脳 アルツハイマー病

Cadmium in food

- | | |
|----------|---------------|
| ▪ Beef | ▪ MT |
| ▪ Liver | ▪ MT |
| ▪ Kidney | ▪ MT |
| ▪ Crab | ▪ ? |
| ▪ Oyster | ▪ MT and CdBP |
| ▪ Rice | ▪ CdBP |
| ▪ Water | ▪ ? |
| ▪ Fish | ▪ ? |
| ▪ Bread | ▪ ? |

食品中のカドミウム

- | | |
|------|-------------|
| ▪ 牛肉 | ▪ MT |
| ▪ 肝臓 | ▪ MT |
| ▪ 腎臓 | ▪ MT |
| ▪ カニ | ▪ ? |
| ▪ カキ | ▪ MTおよびCdBP |
| ▪ 米 | ▪ CdBP |
| ▪ 水 | ▪ ? |
| ▪ 魚 | ▪ ? |
| ▪ パン | ▪ ? |

Structural properties of CdBP (Petering and Fowler, 1986 EHP 65, 217-

Table 4. Structural properties of CdBP.*

	Molecular weight	Metal and sulphhydryl information	Other
Mammalian Cd-Mt	10K ^b	(Cd + Zn)/SH = 3 (30% SH)	pI ~ 4
Pseudomonas p.	3-7K	(Cd + Zn + Cu)/SH = 1-2	
Yeast ^c	1.3.6K	Cd/SH 2-3	
Neurospora ^c	2K	Cd/SH 3(2)	
Mushroom (Cd-mycophosphatin)	12K	no SH, 13 Cd/mole	$\lambda_{max} \sim 260$ nm
Rice ^c	7K		
Mussel ^d			
Cd	10(20)K	12-26% SH	No aromatics
Hg		8 Cd + 1 Zn/mole	
Whelk	8K	3 SH	
Oyster	10K		pI 5.9 (4.4)
Oyster	10.24K	low % SH	
Alga	10K	Cd/SH ~ 1 (7)	
Bacteria ^c	10K	18% SH, 3 metals/mole	pI ~ 4.3
Lobster	> 10K		
Crab - Cu	10K		Does not bind to DEAE cellulose
Crab ^b	10K	SK (>30%)	
Drosophila ^c			
Larval	5-6K		Sequence homology Res 1-40
Adult	2-3K		
Carp ^c	10K		
Rainbow ^c	12K		
	12K (Mt and novel CdBP)		

* Binding proteins for other metals (Cu,Hg) are specifically noted.

^b 10K = 10,000 dalton.

^c Possible simple relationship to Mt.

^d Clear evidence of Mt of mammalian type.

CdBPの構造特性 (Petering and Fowler, 1986 EHP 65, 217-224.

Table 4. Structural properties of CdBP.*

	Molecular weight	Metal and sulphhydryl information	Other
Mammalian Cd-Mt	10K ^b	(Cd + Zn)/SH = 3 (30% SH)	pI ~ 4
Pseudomonas p.	3-7K	(Cd + Zn + Cu)/SH = 1-2	
Yeast ^c	1.3.6K	Cd/SH 2-3	
Neurospora ^c	2K	Cd/SH 3(2)	
Mushroom (Cd-mycophosphatin)	12K	no SH, 13 Cd/mole	$\lambda_{max} \sim 260$ nm
Rice ^c	7K		
Mussel ^d			
Cd	10(20)K	12-26% SH	No aromatics
Hg		8 Cd + 1 Zn/mole	
Whelk	8K	3 SH	
Oyster	10K		pI 5.9 (4.4)
Oyster	10.24K	low % SH	
Alga	10K	Cd/SH ~ 1 (7)	
Bacteria ^c	10K	18% SH, 3 metals/mole	pI ~ 4.3
Lobster	> 10K		
Crab - Cu	10K		Does not bind to DEAE cellulose
Crab ^b	10K	SK (>30%)	
Drosophila ^c			
Larval	5-6K		Sequence homology Res 1-40
Adult	2-3K		
Carp ^c	10K		
Rainbow ^c	12K		
	12K (Mt and novel CdBP)		

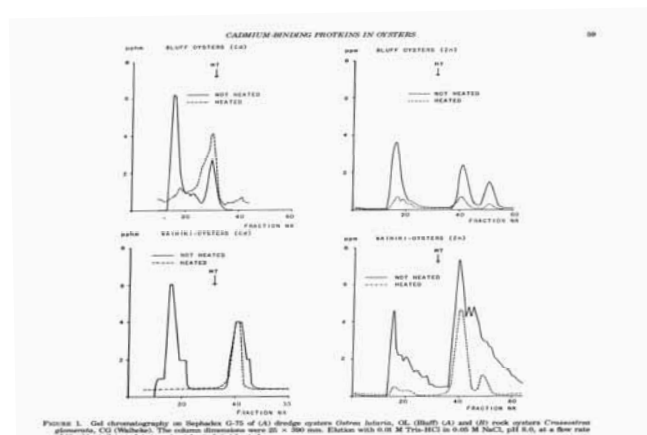
* Binding proteins for other metals (Cu,Hg) are specifically noted.

^b 10K = 10,000 dalton.

^c Possible simple relationship to Mt.

^d Clear evidence of Mt of mammalian type.

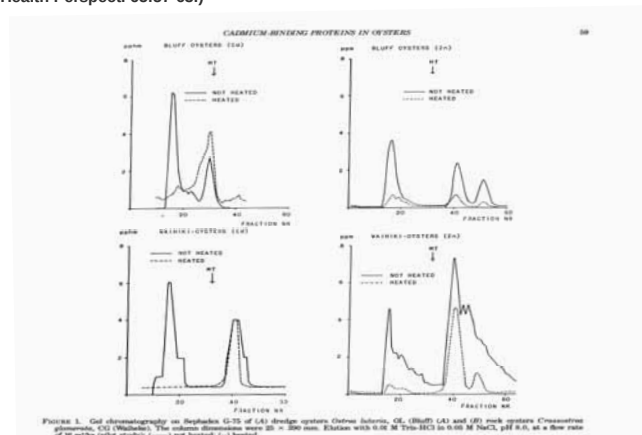
CdBP in oysters (Nordberg M, Nuottaniemi I, Cherian MG, Nordberg GF, Kjellström T, Garvey JS. (1986) Characterization studies on the cadmium-binding proteins from two species of New Zealand oysters. Environ. Health Perspect. 65:57-63.)



Monica Nordberg, Food Safety Commission in Japan

March 06 29

カキに含まれるCdBP (Nordberg M, Nuottaniemi I, Cherian MG, Nordberg GF, Kjellström T, Garvey JS. (1986) ニュージーランド産カキ2種に見られるカドミウム結合タンパクの特性研究 (Characterization studies on the cadmium-binding proteins from two species of New Zealand oysters) Environ. Health Perspect. 65:57-63.)



Monica Nordberg, Food Safety Commission in Japan

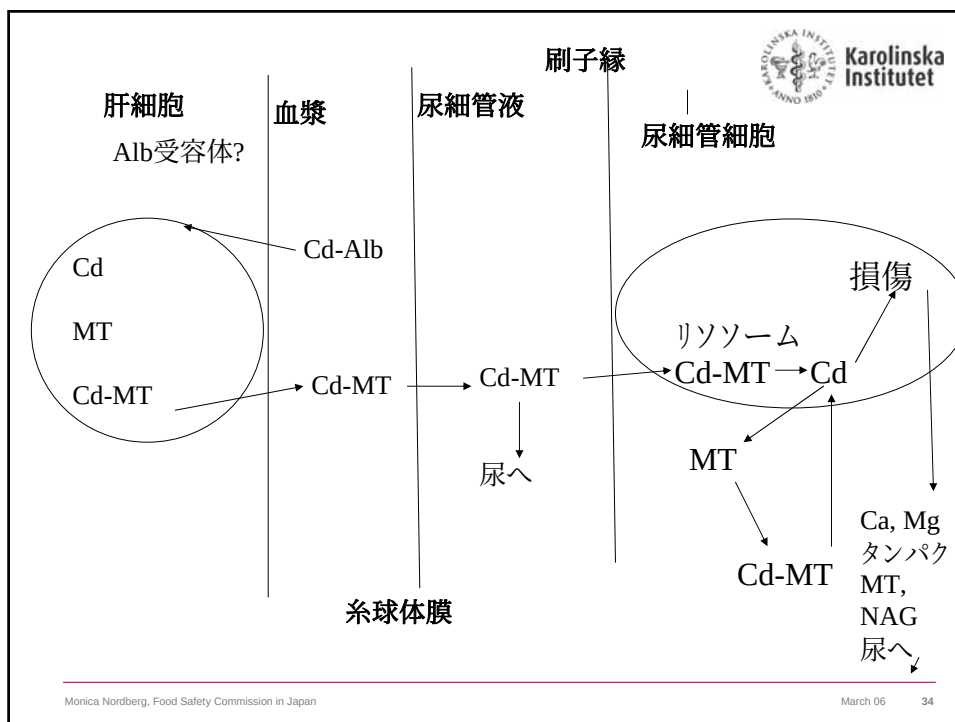
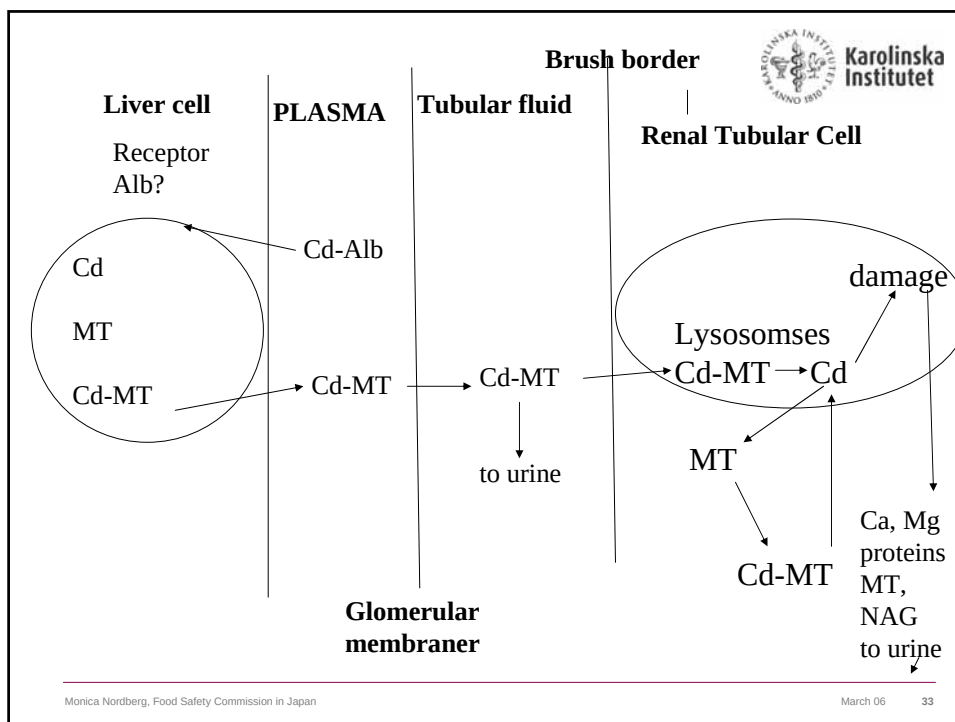
March 06 30

Role of Metallothionein in Chronic Cadmium Exposure

- Cadmium, Zinc, Copper, in relation to Metallothionein

慢性カドミウム曝露におけるメタロチオネインの役割

- カドミウム、亜鉛、銅 メタロチオネインとの関連において



Protective mechanisms

- ♦ Metal binding proteins
- ♦ Localization in the cell
- ♦ Metallothionein in cytoplasm
- ♦ Detoxification
- ♦ Change of pH in lysosomes
- ♦ MT-bound Cadmium
- ♦ Zinc status
- ♦ Iron status
- ♦ Protein intake

防御のメカニズム

- ♦ 金属結合タンパク
- ♦ 細胞内での局在性
- ♦ 細胞質内のメタロチオネイン
- ♦ 解毒
- ♦ リソソームでのpHの変化
- ♦ MT結合カドミウム
- ♦ 亜鉛状態
- ♦ 鉄状態
- ♦ タンパク摂取

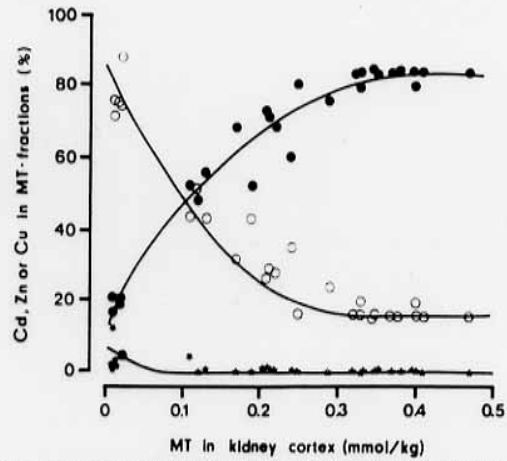


FIG 2. The relative concentrations (%) of cadmium, zinc, and copper in MT- fractions in relation to the total MT-concentration (groups 1 and 2). (●) Cd; (○) Zn; (*) Cu.

Monica Nordberg, Food Safety Commission in Japan

March 06 37

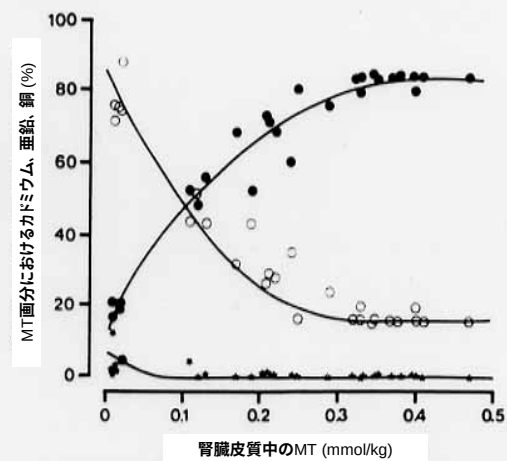


図2. MT画分におけるカドミウム、亜鉛、銅の総MT濃度(グループ1および2)に対する相対濃度 (●) Cd; (○) Zn; (*) Cu.

Monica Nordberg, Food Safety Commission in Japan

March 06 38

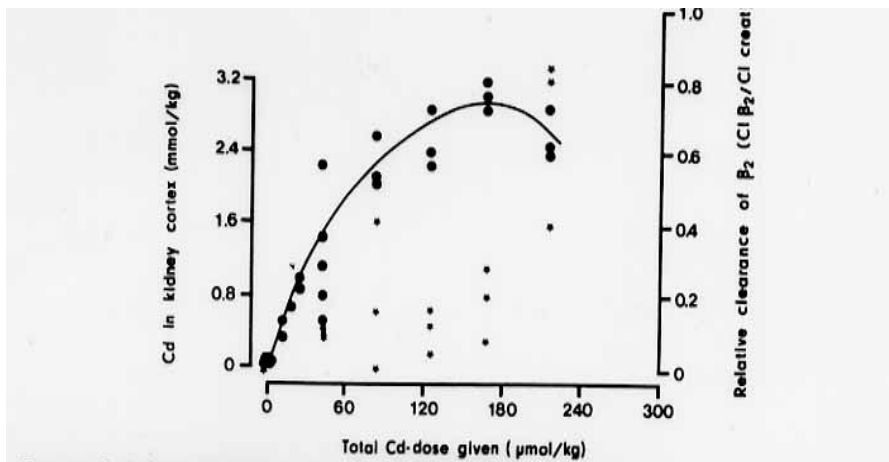


FIG. 1. Cadmium in kidney cortex (wet weight) (groups 1 and 2) and the relative clearance of β_2 -microglobulin ($Cl\beta_2/Cl\text{ creat } (\%)$) (group 2 only) in relation to the total cadmium dose administered (sc). (●) Cadmium concentration in kidney cortex; (*) relative clearance of β_2 -microglobulin.

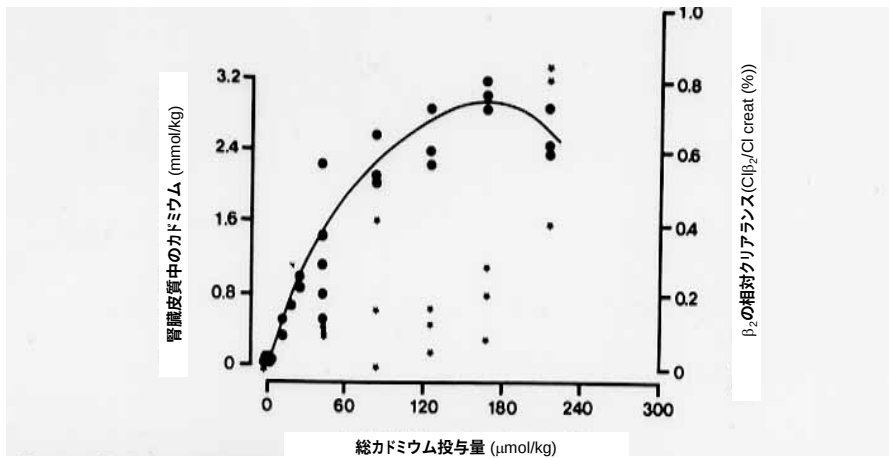


図1. 腎臓皮質中のカドミウム(湿重量)(グループ1および2)と、総カドミウム投与量に対する β_2 -マイクログロブリンの相対クリアランス($Cl\beta_2/Cl\text{ creat } (\%)$)(グループ2のみ)。(●)腎臓皮質中のカドミウム濃度; (*) β_2 -マイクログロブリンの相対クリアランス

Developments in the application of molecular “omics” i.e genomics, proteomics, and metabolomics will lead to new biomarkers.

Example:

Metallothionein can be used to evaluate early effects of cadmium and its species in risk and exposure assessment

ゲノミクス、プロテオミクス、メタボロミクスなど、
“・・・オミクス”分子科学の応用の発展によって
新たなバイオマーカーが発見されるであろう。

例:

メタロチオネインは、リスク・曝露評価において、
カドミウムおよびカドミウム化合物による初期段階の影響を
評価するために用いることができる

Needs for Evaluation of Potential Health Effects:

Biological Monitoring Exposure and Effects Biomarkers

Blood: plasma MT

Urine: MT and others

Feces

Hair

Biomarker in urine

健康への潜在的影響に関する評価の必要性:

生物学的モニタリング 曝露および影響の指標となるバイオマーカー

血液: 血漿MT

尿: MTほか

糞便

髪

尿中のバイオマーカー

Methods for quantification of MT - early methods

- After isolation and in crude tissue fractions:
- Freeze-drying Nordberg et al 1972
- Biuret method Nordberg et al 1972
- Calculation aminoacid analyses Kägi; Nordberg
- In Vitro binding Hg Piotrowski et al 1973
- In Vitro binding Cd Onosaka and Cherian 1981
- RIA VanderMallie and Garvey 1978
- ELISA Garvey 1984

メタロチオネインの定量方法 - かつての方法

- 分離後、粗組織画分内において:
- 凍結乾燥(フリーズドライ)法 Nordberg et al 1972
- ビウレット法 Nordberg et al 1972
- アミノ酸分析より算出 Kägi; Nordberg
- 試験管内水銀結合 Piotrowski et al 1973
- 試験管内カドミウム結合 Onosaka and Cherian 1981
- ラジオイムノアッセイ(RIA) VanderMallie and Garvey 1978
- ELISA(酵素免疫吸着測定法) Garvey 1984

Methods for quantification of MT

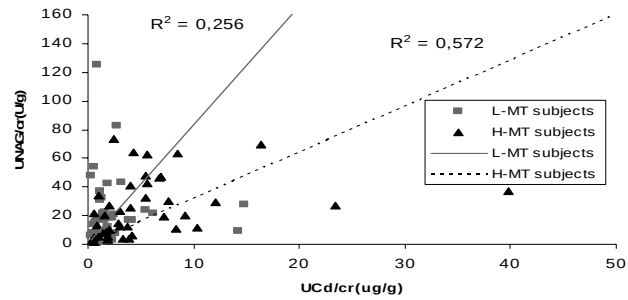
- Peripheral lymphocytes
- Plasma or serum
- Urine
- MTmRNA RT-PCR
- ELISA or RIA
- ELISA or RIA

メタロチオネインの定量方法

- 末梢リンパ球
- 血漿または血清
- 尿
- MTmRNA RT-PCR
- ELISAまたはRIA
- ELISAまたはRIA

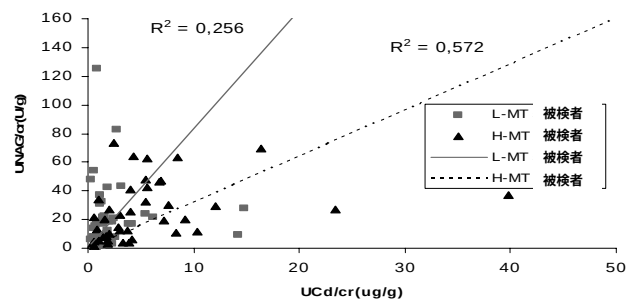
Metallothionein gene expression in peripheral lymphocytes from Cd

exposed workers (Lu J, Jin T, Nordberg G and Nordberg M (2001) Metallothionein gene expression in peripheral lymphocytes from cadmium exposed workers Cell Stress and Chaperones 6(2), 97-104.)



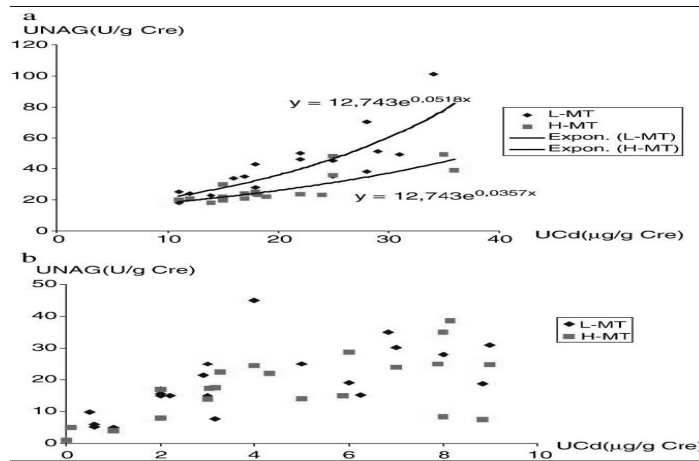
カドミウム曝露した労働者の末梢リンパ球におけるメタロチオネイン遺伝子の発現

(Lu J, Jin T, Nordberg G and Nordberg M (2001), カドミウム曝露した労働者の末梢リンパ球におけるメタロチオネイン遺伝子の発現 (Metallothionein gene expression in peripheral lymphocytes from cadmium exposed workers), Cell Stress and Chaperones 6(2), 97-104.)



Metallothionein Gene Expression in Peripheral Lymphocytes and Renal Dysfunction in a Population Environmentally Exposed to Cadmium

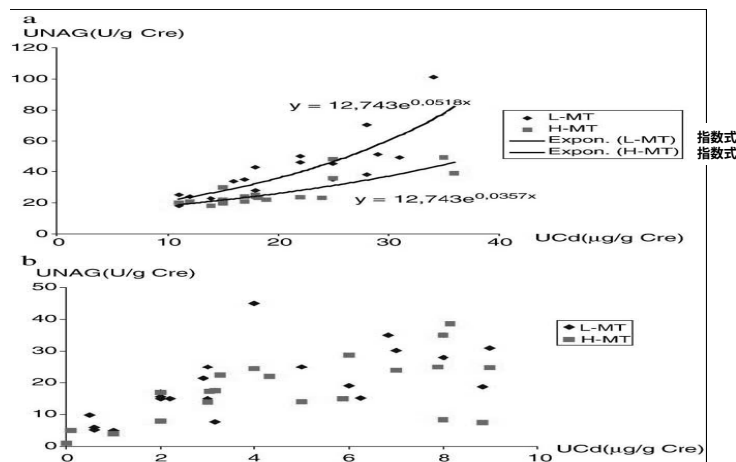
(Lu J., Jin T., Nordberg GF., Nordberg M (2005) The application of metallothionein (MT) gene expression in peripheral blood lymphocytes (PBLs) as a biomarker of cadmium exposure Toxicological and Applied Pharmacology 206 (2) ,150-156)



Monica Nordberg, Food Safety Commission in Japan

March 06 51

カドミウムへの環境曝露を受けた集団における末梢リンパ球でのメタロチオネイン遺伝子の発現と腎機能障害 (Lu J., Jin T., Nordberg GF., Nordberg M (2005). 末梢血リンパ球におけるメタロチオネイン遺伝子発現のカドミウム曝露バイオマーカーへの応用(The application of metallothionein (MT) gene expression in peripheral blood lymphocytes (PBLs) as a biomarker of cadmium exposure), Toxicological and Applied Pharmacology 206 (2) ,150-156)



Monica Nordberg, Food Safety Commission in Japan

March 06 52

Figure from Chen L., Jin T., Huang B., Chang X., Lei L., Nordberg GF., Nordberg M. (2005) Plasma metallothionein antibody and cadmium induced renal dysfunction in an occupational population in China TOXSCI in press

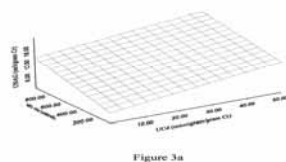


Figure 3a

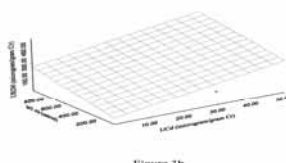


Figure 3b

図、出典:Chen L., Jin T., Huang B., Chang X., Lei L., Nordberg GF., Nordberg M. (2005)、中国での職業集団における血漿メタロチオネイン抗体とカドミウム誘導型腎機能障害(Plasma metallothionein antibody and cadmium induced renal dysfunction in an occupational population in China)、TOXSCI、近刊

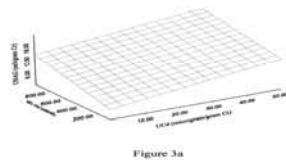


Figure 3a

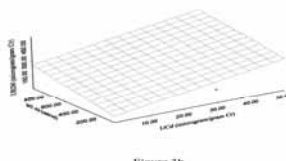


Figure 3b

Future trends

Metal toxicology is confronted with new challenges to meet requirements from advanced technologies in search for biomonitoring methods for new materials and processes.

Metals speciation and omic's technologies including assessment of metallothionein and other metal binding proteins are important tools for adequate human health risk assessment.

将来の動向

**金属毒性学は、新物質やプロセスの
生物学的モニタリング方法を求める先進技術からの
要求に応える、
という新たな課題に直面している。**

**メタロチオネインをはじめとする
金属結合タンパクの評価など、
金属スペシエーション(種同定)や“オミクス”テクノロジーは、
人の健康に関するリスク評価を十分に行う上で
重要なツールである。**