

Menkes 症モデルマウス (Macular mouse) の銅代謝

岡山大学医学部放射線医学教室 (指導: 青野 要教授)

近 藤 信 太 郎

(昭和62年10月20日受稿)

Key words : macular mouse, Menkes kinky hair syndrome,
copper, Metallothionein

序 論

Menkes kinky hair disease (Menkes 病) は、乳児早期の男児に発症し、特有の毛髪異常、けいれん、筋緊張異常あるいは進行性中枢神経症状などの症状を有し、生化学的には低セロプラスミン血、低銅血を特長とし、放置すれば3歳ころまでに出血あるいは感染などの合併症にて死亡してしまう予後不良な疾患であり、Menkes ら¹⁾によって1962年最初に報告されている。Daskas ら²⁾は銅不足に陥った動物の血管の弾性繊維の変化や毛の異常に注目し、ケンメス症患者の銅含量を調べ、低銅血、低セロプラスミン血を発見した。さらに放射銅の経口投与後の⁶⁴Cu の血中濃度が低いことから、腸管における銅吸収障害を証明した³⁾。また、銅の非経口投与によっても病気の進行を止めることができないことから、単なる吸収障害だけでなく輸送障害の存在することも推定した⁴⁾。

マウスの X 染色体上の突然変異 mottled は、ヘテロ接合体の雌がモザイクな毛色を呈することから名づけられた。mottled 遺伝子座には複数の対立遺伝子 (multiple alleles) が知られているが、雌ヘテロは外見上マダラ状の毛色を呈するだけなのに対して、雄のヘミ接合体は生前致死から出生してくるものまであって、その表現はいろいろである^{5)~9)}。Hunt⁹⁾は mottled シリーズの C57BL 系由来の brindled マウス (Mo^{br}/y) を用いて銅欠乏状態にあることを明らかにし、ヒトのメンケス症候群と同じ遺伝的な銅輸送異常が原因であることを示した。

我国においても C3H_f 系の中に自然突然変異により生じ、体の縞模様から macular と名づけられたマウスが1973年 Nishimura によって報告されている¹⁰⁾。この macular マウス (以下 M1 マウス) も brindled マウスと同じように、ヒゲの捻れ、色素不足、発育障害、中枢神経症状等を示すことが明らかにされている¹¹⁾¹²⁾。ただ、brindled と異なるのはヒトでの重要な初発症状であるけいれんが M1 マウスには出現するのに対して brindled ではしないとされている点である¹¹⁾¹²⁾。

brindled マウスの銅代謝については詳細な研究がなされており、肝臓や脳等の多くの組織での銅の欠乏や腎臓、小腸での銅の蓄積、これらの銅の蓄積に Metallothionein (以下 MT) の誘導合成が関係していること等が明らかにされている^{13)~23)}。また、胎児での銅欠乏には胎盤での銅の蓄積や輸送低下が関与していることも報告されている¹⁵⁾²¹⁾。一方、M1 マウスの銅代謝については7日令、14日令マウスや成獣の腎臓での銅の蓄積や肝臓、脳での銅欠乏といった事や放射性同位元素⁶⁴Cu を使った腸管の銅の輸送障害が Nishimura¹¹⁾によって明らかにされているだけで、その詳細には不明の点が多い。本論文においては M1 マウスの銅治療前後での組織銅量の変化と肝臓、腎臓での MT の変動について研究した結果について報告する。

方 法

実験に使用した M1 マウスは共同研究者である高知医科大学の田口博士が浜松医科大学の西村博士より譲渡されたものを岡山大学医学部放射

線医学教室内の動物飼育室で繁殖飼育したものである。飼育条件はコンベンショナルな環境下で室温22~25℃, 明暗12時間サイクルであり, 飼料としては固形(オリエンタル酵母, MF), あるいは粉末(日本クレア, CE-2)を使用し, 飲料水としては水道水を使用した。実験に使用したマウスとしてはM1マウスとしてhemizygote (M1/y), homozygote (M1/M1), heterozygote (M1/+), そしてnormal(+/y, +/+)である。なお, homozygote と hemizygote は銅治療を施さなければ16日令までに100%死亡することから, Nishimura¹¹⁾の方法に従って生後7日令でCuCl₂溶液の皮下注射を行った(50μg/一匹)。

肝臓と腎臓のMTの測定はSephadex G-75でのカラムクロマトグラフィーによりおこなった。7~9日令では25~30匹, 8~9週令では8~10匹から調製した腎臓あるいは肝臓に, 0.15M KCl, 0.5mM DTT, 20mM Tris/HCl (pH7.4)を加えてホモジネート(20% w/v)を調製した。細胞可溶性分画を得るため10万g, 1時間の遠心を行った。この可溶性分画(1g湿重量から得られた量)をSephadex G-75(Pharmacia-LKB Biotechnology)のカラム(2.5×90cm)に乗せて, 50mM Tris/HCl (pH8.4)で溶出させた(5℃, 20ml/hr)。フラクションコレクター(Pharmacia-LKB Biotechnology)で6mlづつ集めて, この溶液中の銅, 亜鉛量を原子吸光度計で測定した(Model AA-640-12, 島津製作所)。カラムのキャリブレーションはFerritin (MW480,000), Bovine serum albumin (66,000), Superoxide dismutase (32,000), Cytochrome c (12,000), Metallothionein II (6,500) (Sigma Chemical Co. LTD.)を用いて行った。MTに結合した銅, 亜鉛量はMT分画に含まれる総すべての銅, あるいは亜鉛量を湿重量あたりの量として表わした(μgCuあるいはμgZn/g wet weight)。血清の銅, 亜鉛量は10~15匹から集めた血清を希釈して, 原子吸光度計で測定し, mlあたりの量として表わした(μgCuあるいはμgZn/ml)。組織の銅, 亜鉛量は7~10匹のマウスから分離した組織を同一試料として硝酸で分解後, 希釈して原子吸光度計で測定し, 湿重量あたりの量として表わした

(μgCuあるいはμgZn/g wet weight)。

MT分画への³⁵Sの取り込みをみるため, ³⁵S-cystine (36mCi/mmol, Amersham Corp.)の10μCiをマウスの腹腔内に投与し, 24時間後に腎臓を摘出した。8~10匹から摘出した腎臓に0.15MKCl, 0.5mM DTT, 20mM Tris/HCl (pH7.4)を加えてホモジネート(20% w/v)を調製し, 10万g, 1時間の遠心を行い細胞可溶性分画を得た。この可溶性分画(1g湿重量から得られた量)をSephadex G-75(2.5×60cm)に乗せて, 10mM Tris/HCl (pH8.4)で溶出し, 3mlづつ集めた。この各分画中の³⁵Sの放射能を液体シンチレーションカウンター(Liquid Scintillation Spectrometer, Model 700, Packard Instruments)で測定した。

結 果

正常, M17日令マウス組織の銅, 亜鉛量:M1マウスは大きく二つのグループに分けることができる。ひとつはhemizygote (M1/y)とhomozygote (M1/M1)であり, もうひとつは, heterozygote (M1/+)である。前者は銅投与の治療を施さない限り16日令程度までに死亡することが知られている¹¹⁾¹²⁾。

正常, M1マウスの7日令での腎臓, 小腸, 肝臓, 脳, 脾臓, 血清と全身の銅, 亜鉛量の測定を行った。M1の腎臓の銅量はhemizygote+homozygote群(以下mutant)共に正常群(3.73±0.74μg/g wet weight)に比較して多量の蓄積が認められた(mutant群: 8.41±1.23μg/g wet weight, heterozygote群: 11.60±2.04μg/g wet weight) (Fig. 1-A)。同じような銅の蓄積は小腸でも認められ, mutant群(17.34±2.58μg/g wet weight)で正常群(2.88±0.17μg/g wet weight)の約6倍, heterozygote群(10.83μg/g ±4.78wet weight)で約4倍の値を示していた(Fig. 1-B)。しかも, 小腸での銅の蓄積は, 腎臓での銅の蓄積がheterozygote群の方がmutant群より多かったのに比べて, 逆にmutant群の方が高くなっていた。

胎児, 新生児期において肝臓の銅量が高いことは良く知られている²⁴⁾²⁵⁾, 本研究の結果でも,

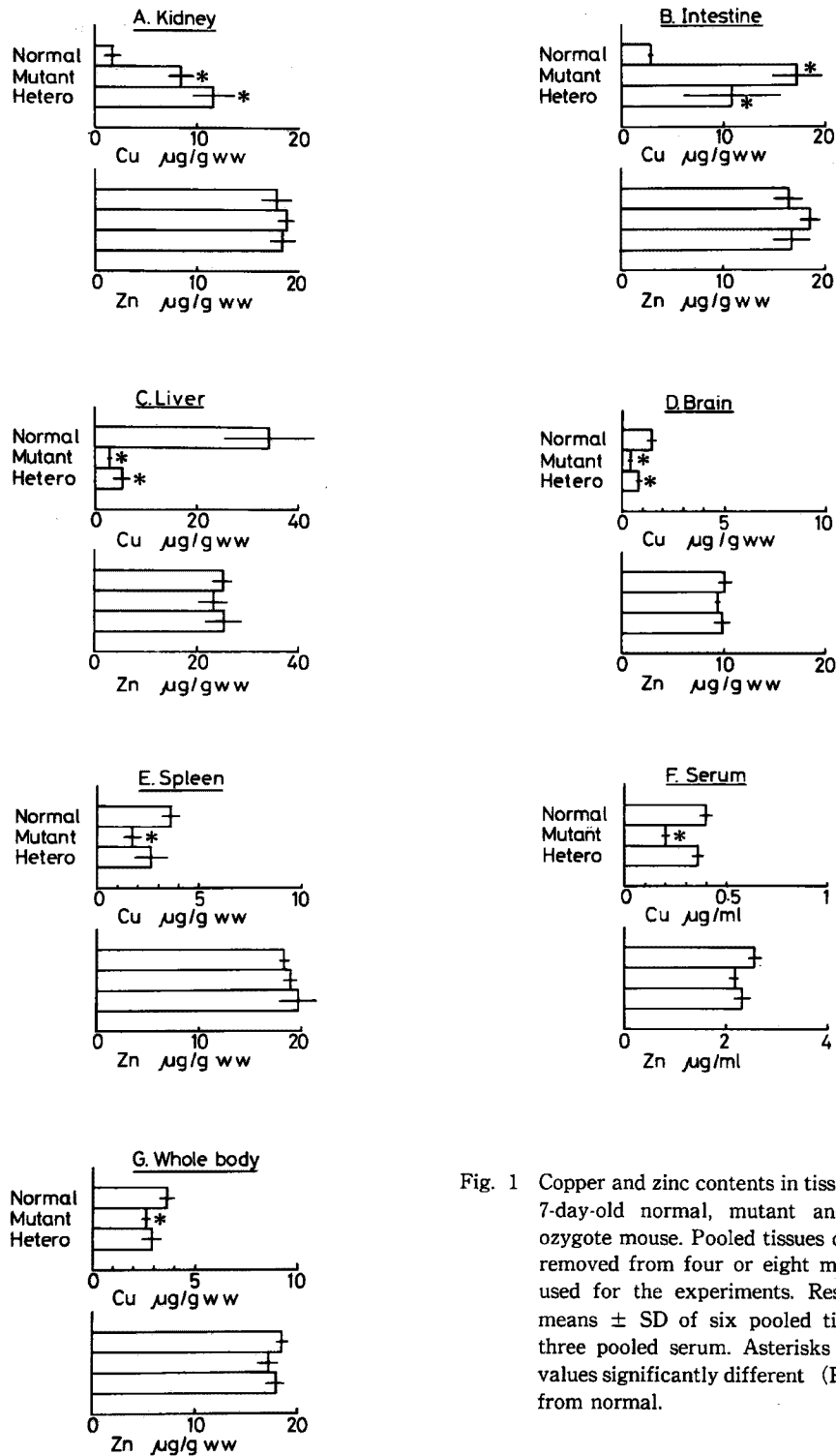


Fig. 1 Copper and zinc contents in tissues from 7-day-old normal, mutant and heterozygote mouse. Pooled tissues or serum removed from four or eight mice were used for the experiments. Results are means $\pm$ SD of six pooled tissues or three pooled serum. Asterisks indicate values significantly different ($P < 0.01$) from normal.

正常群の肝臓の銅量は $34.07 \pm 9.09 \mu\text{g}$ wet weight と高い値を示していた。しかし、これに対して M1 マウスでは両群ともに顕著に低い値を示し、しかも mutant 群($2.95 \pm 0.59 \mu\text{g/g}$ wet weight) は heterozygote 群($5.35 \pm 1.77 \mu\text{g/g}$ wet weight) より更に低い値となっていた (Fig. 1-C)。このような組織銅量の低下は肝臓だけではなく脳、脾臓でも認められ、肝臓の場合と同じように mutant 群は heterozygote 群より更に低い値を示していた (Fig. 1-D, E)。血清銅量は mutant 群が正常群の約半分の値を示していたが ($0.40 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ normal; $0.20 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ mutant), heterozygote では大きな変化は認められなかった ($0.36 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ heterozygote) (Fig. 1-F)。また、銅量について全身で測定した結果では、M1 マウスの両群ともに正常群に比較して、やや低値を示すもののそれほど低下していなかった (Fig. 1-G)。このように銅量の変化に対して、M1 マウスの組織の亜鉛量は正常マウスに比較して変化していなかった。以上のような結果から、M1 マウスでは正常マウスに比較して生体内での銅の分布が著しく変化していることが示唆された。

正常、M1 マウスの 1, 7, 19 日令での腎臓、肝臓、脳の銅、亜鉛量の変動：正常、M1 マウス (mutant 群) の腎臓、肝臓、脳の銅、亜鉛量が新生児期の間にどのように変動するか検討した。

正常マウスの腎臓では、1 日令 $5.37 \pm 2.69 \mu\text{g/g}$ wet weight, 7 日令 $3.95 \pm 0.56 \mu\text{g/g}$ wet weight, 14 日令 $4.25 \pm 0.55 \mu\text{g/g}$ wet weight と大きな変動は認められなかった。一方、mutant では、1 日令 $5.32 \pm 1.58 \mu\text{g/g}$ wet weight, 7 日令 $8.05 \pm 0.96 \mu\text{g/g}$ wet weight, 14 日令 $16.15 \pm 5.26 \mu\text{g/g}$ wet weight と 7, 14 日令で 1 日令に比較して腎臓への銅の蓄積が認められた。この mutant の腎臓の銅量を正常マウスと比較した場合、1 日令では差は認められなかったが、7 日令では約 2 倍の、14 日令では約 4 倍の値となっていた (Fig. 2-A)。一方、腎臓の亜鉛量には正常、mutant ともに大きな変動は認められなかった (Fig. 2-A)。これらの結果から M1 マウスへの銅の蓄積は 7 日令程度から顕著に成ると考えられた。

正常マウスの肝臓の銅量は、1 日令 $31.51 \pm 4.05 \mu\text{g/g}$ wet weight, 7 日令 $31.59 \pm 7.55 \mu\text{g/g}$ wet weight, 14 日令 $12.34 \pm 1.71 \mu\text{g/g}$ wet weight と 1, 7 日令に比較して 14 日令で減少していた。一方、mutant の肝臓では、1 日令 $2.02 \pm 0.38 \mu\text{g/g}$

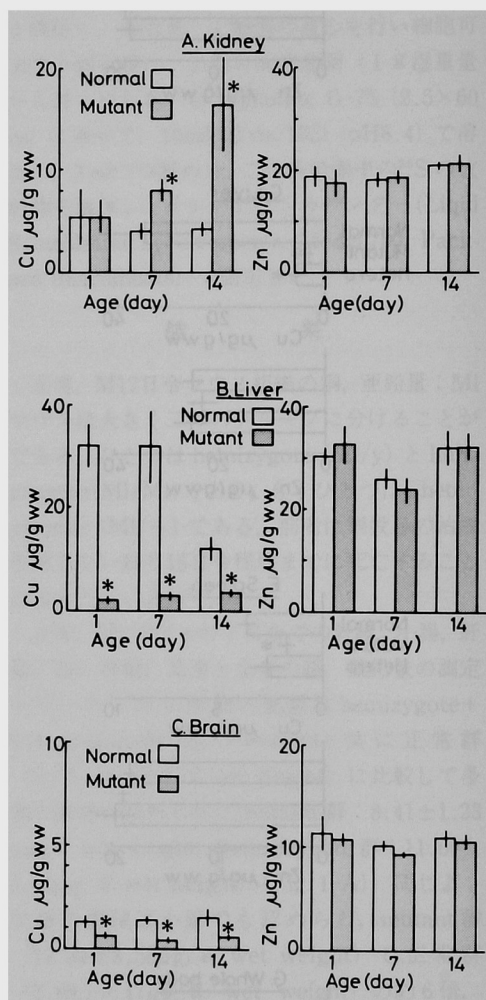


Fig. 2 Comparison of renal, hepatic and brain copper and zinc contents in mutant and normal mice at different stages of development. Pooled tissues removed from 5-10 mice were used for the experiments. Results are means $\pm$ SD of five pooled tissues. Asterisks indicate values significantly different ($p < 0.01$) from normal.

g wet weight, 7日令 $3.00 \pm 0.64 \mu\text{g/g}$ wet weight, 14日令 $3.56 \pm 0.27 \mu\text{g/g}$ wet weight と1日令から14日令まで大きな変動は認められなかった。この mutant の肝臓の銅量を正常マウスと比較した場合, 1, 7日令では約1/10, 14日令では1/4と顕著に低い値を示していた (Fig. 2-B)。一方, 肝臓の亜鉛量は, 銅量と異なり正常, mutant とともに大きく変動していなかった (Fig. 2-B)。これらの結果から M1 マウスの肝臓の銅の欠乏はかなり早い発生段階から生じていることが示唆された。

正常マウスの脳の銅量は, 1日令 $1.30 \pm 0.37 \mu\text{g/g}$ wet weight, 7日令 $1.38 \pm 0.24 \mu\text{g/g}$ wet weight, 14日令 $1.52 \pm 0.83 \mu\text{g/g}$ wet weight と14日令までに大きな変動は認められなかった。一方, mutant の場合, 1日令 $0.58 \pm 0.09 \mu\text{g/g}$ wet weight, 7日令 $0.38 \pm 0.06 \mu\text{g/g}$ wet weight, 14日令 $0.56 \pm 0.11 \mu\text{g/g}$ wet weight と正常マウスと同様に大きな変動は認め

られなかった。しかし, その値は各日令とも正常マウスの1/2程度であった (Fig. 2-C)。一方, 脳の亜鉛量は正常マウスと M1 マウスの間に差は認められなかった (Fig. 2-C)。これらの結果から mutant の脳の銅の欠乏は肝臓と同じように発生段階の早い時期から生じている事が示唆された。

銅投与による M1 マウスの延命と組織銅量の変動: 前述したように M1 マウスは大きく二つのグループに分けることができ, hemizygote と homozygote は銅投与しなければ16日令程度までに

Table 1 Survival after treatment of mutants at 7 days.

Treatment	Injected	Survived	Survival (%)
Untreated	7	0	0
Treated	25	17	68

The number of mice injected is followed by the number of mice that survived the injection to reach 60 days of age.

Table 2 Copper concentrations of tissue 1, 7 and 56 days after treatment.

Tissue	Group	Time after injection (days)		
		1	7	56
Kidney	Treated normal	$6.47 \pm 1.49^{**}$	2.97 ± 0.63	—
	Untreated normal	3.35 ± 0.55	3.80 ± 0.34	4.84 ± 0.37
	Treated mutant	$35.94 \pm 10.24^{**}$	$35.29 \pm 2.30^*$	19.87 ± 3.00
	Untreated mutant	8.59 ± 1.43	12.07 ± 0.69	—
Liver	Treated normal	$83.21 \pm 3.74^*$	$54.16 \pm 18.93^{**}$	—
	Untreated normal	37.34 ± 9.55	13.61 ± 3.93	4.61 ± 0.28
	Treated mutant	$26.07 \pm 3.10^*$	$4.83 \pm 0.33^*$	3.80 ± 0.20
	Untreated mutant	2.92 ± 0.70	3.71 ± 0.39	—
Brain	Treated normal	$1.95 \pm 0.18^{**}$	$2.77 \pm 0.41^*$	—
	Untreated normal	1.44 ± 0.24	1.59 ± 0.20	1.70 ± 0.14
	Treated mutant	$1.18 \pm 0.35^{**}$	$0.90 \pm 0.12^{**}$	1.65 ± 0.20
	Untreated mutant	0.38 ± 0.06	0.65 ± 0.12	—

All mice were treated with copper at 7 days. Tissue copper concentrations are expressed as $\mu\text{g/g}$ wet weight. Results are means $\pm$ SD (n=4). * and ** signify significance at 1% and 5% probability levels respectively for treated/untreated comparisons.

100% 死亡することが知られている¹¹⁾¹²⁾. Nishimura¹¹⁾の方法に従って銅投与を行い, 60 日令での生存率の比較を行った. 50 μ g の銅投与を行ったグループの生存率は68%, 投与しなかったグループの生存率は0%であった (Table 1).

銅投与後, 1, 7, 56日後の正常, mutant マウスの腎臓, 肝臓, 脳の銅, 亜鉛量の測定を行った (Table 2, Table 3). 正常マウスでは銅投与群の腎臓の銅量は, 1日後で非投与群に比較して約2倍の値を示し, 湿重量あたり約3 μ g の銅の蓄積が認められた. 7日後では非投与群と同じ程度になっていた. 一方, mutant マウスでは非投与群に比較して, 1日後で約28 μ g, 7日後で23 μ g の銅の蓄積が認められた. この値は正常マウスの腎臓での銅投与による銅の蓄積量の8~9倍になっていた.

正常マウスの肝臓では, 銅投与1日後, 非投与群に比較して湿重量あたり46 μ g の銅の蓄積が

認められたが, 投与7日後では41 μ g の蓄積が認められた. 一方, mutant の肝臓では, 銅投与1日後, 非投与群に比較して湿重量あたり23 μ g の銅の蓄積が認められた. この値は正常マウスでの蓄積量の1/2であった. また, 7日後では非投与群と同じレベルまで戻っていた. 正常マウスの脳では, 銅投与1, 7日後, 湿重量あたり0.4 μ g の銅の蓄積が一方, mutant の脳では, 1日後0.7 μ g, 7日後1.1 μ g と両グループ共にわずかではあるが銅の蓄積が認められた. 以上の結果から, M1 マウスでは投与された銅の肝臓や腎臓内での動態は正常マウスに比較してかなり異なっていると推定された.

銅投与後の腎臓, 肝臓, 脳の亜鉛量については腎臓と脳では顕著な変動は認められなかったが, 肝臓では正常, mutant とともに投与1日後, 非投与群に比較して, 正常群で湿重量あたり20 μ g, M1 マウスで14 μ g の亜鉛の蓄積が認められた. しかし, 7日後には非投与群のレベルに戻

Table 3 Zinc concentrations of tissues 1, 7 and 56 days after treatment.

Tissue	Group	Time after injection (days)		
		1	7	56
Kindney	Treated normal	20.62 $\pm$ 1.09**	25.82 $\pm$ 2.58	—
	Untreated normal	18.56 $\pm$ 1.27	22.11 $\pm$ 0.72	23.14 $\pm$ 0.97
	Treated mutant	21.67 $\pm$ 1.10**	26.70 $\pm$ 3.80	26.82 $\pm$ 1.08
	Untreated mutant	18.51 $\pm$ 1.32	21.68 $\pm$ 0.21	—
Liver	Treated normal	43.23 $\pm$ 3.86*	29.47 $\pm$ 1.54	—
	Untreated normal	24.06 $\pm$ 0.82	28.47 $\pm$ 2.03	29.63 $\pm$ 1.17
	Treated mutant	38.28 $\pm$ 3.40*	28.30 $\pm$ 1.91**	33.36 $\pm$ 4.36
	Untreated mutant	24.37 $\pm$ 2.84	32.20 $\pm$ 1.60	—
Brain	Treated normal	8.43 $\pm$ 0.55*	14.49 $\pm$ 0.53*	—
	Untreated normal	9.93 $\pm$ 0.32	12.02 $\pm$ 0.76	15.82 $\pm$ 0.81
	Treated mutant	8.59 $\pm$ 0.15*	12.27 $\pm$ 0.41*	16.32 $\pm$ 0.49
	Untreated mutant	9.39 $\pm$ 0.32	10.72 $\pm$ 0.43	—

All mice were treated with copper at 7 days. Tissue zinc concentrations are expressed as μ g/g wet weight. Results are means $\pm$ SD (n=4). * and ** signify significance at 1% and 5% probability levels respectively for treated/untreated comparisons.

っていた (Table 3). この亜鉛の蓄積は銅投与による肝臓での MT の誘導によるものと推定された。

正常, M1 マウスの腎臓と肝臓の MT:MT については生体内での亜鉛, 銅代謝に関係していると考えられており²⁶⁾²⁷⁾, またメンケス症候群のモデルマウスである brindled で詳細な報告がされていることから¹⁹⁾²⁰⁾²²⁾²³⁾, M1 マウスの腎臓と肝臓についてその測定を行った。7~8 日令の正常マウスの腎臓の MT-Cu レベルは $1.55 \pm 0.35 \mu\text{g/g wet weight}$, MT-Zn レベルは $0.83 \pm 0.37 \mu\text{g/g wet weight}$ と低い値を示していたが, M1

マウスの MT-Cu レベルは mutant 群では $5.17 \pm 1.45 \mu\text{g/g wet weight}$, heterozygote 群では $6.14 \pm 0.96 \mu\text{g wet weight}$ と正常群に比較して有意に高値を示していた。しかし, MT-Zn レベルには差は認められなかった。またこの時, mutant や heterozygote の可溶性分画の銅量の内, 60~70% が MT-Cu として占められていた (Table 4)。

7~8 日令の正常マウスの肝臓の MT-Cu レベルは $8.34 \pm 0.86 \mu\text{g/g wet weight}$ と高値を示していたが, MT-Zn は $0.54 \pm 0.28 \mu\text{g/g wet weight}$ と極めて低い値であった。一方, M1 マウ

Table 4 Cytosol Cu and Zn, and MT-Cu-Zn content of kidney and liver from 7-8 day mice.

Tissue	Group	Cytosol		Metallothionein	
		Cu($\mu\text{g Cu/g}$) ^a	Zn($\mu\text{g Zn/g}$) ^a	Cu($\mu\text{g Cu/g}$) ^a	Zn($\mu\text{g Zn/g}$) ^a
Kidney	Normal	2.42 ± 0.86	10.01 ± 1.83	1.55 ± 0.35	0.83 ± 0.37
	Mutnat	$8.33 \pm 2.79^{**}$	14.07 ± 2.64	$5.17 \pm 1.45^{**}$	1.72 ± 0.52
	Heterozygote	$8.74 \pm 1.23^*$	10.52 ± 1.49	$6.14 \pm 0.96^{**}$	0.87 ± 0.46
Liver	Normal	12.39 ± 1.12	18.52 ± 1.98	8.34 ± 0.86	0.54 ± 0.28
	Mutant	$2.48 \pm 0.57^*$	20.97 ± 2.95	$0.25 \pm 0.22^*$	$3.10 \pm 1.02^{**}$
	Heterozygote	$2.82 \pm 0.59^*$	20.56 ± 0.90	$1.46 \pm 0.51^*$	$3.24 \pm 0.45^*$

Mutant were not treated with copper at 7 days. ^aCopper and zinc concentrations are expressed as $\mu\text{g/g wet weight}$. Results are means $\pm$ SD (n=3). * and ** signify significance at 1% and 5% probability levels respectively for macular/normal comparisons.

Table 5 Cytosol Cu and Zn, and MT-Cu-Zn content of kidney and liver from 8-9 week mice.

Tissue	Group	Cytosol		Metallothionein	
		Cu($\mu\text{g Cu/g}$) ^a	Zn($\mu\text{g Zn/g}$) ^a	Cu($\mu\text{g Cu/g}$) ^a	Zn($\mu\text{g Zn/g}$) ^a
Kidney	Normal	1.27 ± 0.04	19.12 ± 4.02	0.16 ± 0.28	0.35 ± 0.30
	Mutant	$8.92 \pm 0.28^*$	11.43 ± 0.17	$6.06 \pm 0.67^*$	$1.61 \pm 0.12^{**}$
	Heterozygote	$19.25 \pm 2.74^*$	12.38 ± 0.63	$15.62 \pm 1.01^*$	$2.23 \pm 0.22^*$
Liver	Normal	3.41 ± 0.13	24.95 ± 1.41	0.19 ± 0.17	0.10 ± 0.17
	Mutant	2.63 ± 0.37	22.05 ± 2.92	0.36 ± 0.32	1.30 ± 1.39
	Heterozygote	3.52 ± 0.69	$21.42 \pm 0.33^{**}$	0.62 ± 0.47	0.45 ± 0.29

Mutants were treated with copper at 7 days. ^aCopper and zinc concentrations are expressed as $\mu\text{g/g wet weight}$. Results are means $\pm$ SD (n=3). * and ** signify significance at 1% and 5% probability levels respectively for macular/normal comparisons.

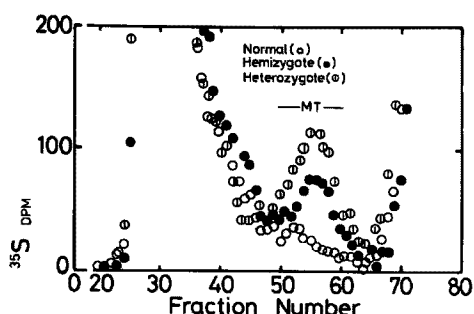


Fig. 3 Gel filtration chromatography of renal cytosol of hemizygote, heterozygote and normal mice.

スの MT-Cu レベルは mutant 群が $0.25 \pm 0.22 \mu\text{g/g}$ wet weight, heterozygote 群が $1.46 \pm 0.51 \mu\text{g/g}$ wet weight と極めて低い値であった。この時、MT-Zn レベルは両群共に正常群より高値を示していた (Table 4)。

8～9 週令の正常マウスの腎臓の MT-Cu, MT-Zn レベルは 7～8 日令と同じように低い値を示していた。一方、MI マウスの mutant 群では MT-Cu レベルは $6.06 \pm 0.67 \mu\text{g/g}$ wet weight と 7～8 日令と比較して変化していなかったが、heterozygote 群では $15.62 \pm 1.01 \mu\text{g/g}$ wet weight と約 2.5 倍に増加していた。しかし、肝臓の MT-Cu, MT-Zn レベルは 3 群ともに低値を示していた (Table 5)。これらの結果から、腎臓に蓄積した銅の大部分は MT に結合した形で存在していると考えられた。

MT の合成の程度を検討するため ^{35}S の MT 分画への取り込みを測定した。8～9 週令正常マウスの腎臓では取り込みはほとんど認められないが、MI マウスの腎臓では、hemizygote 群 heterozygote 群ともに正常群より高い取り込みを示していた (Fig. 3)。しかも、その取り込みも heterozygote 群の方が hemizygote 群より多く、MT-Cu レベルの傾向と一致していた (Table 5)。これらの結果から MI マウスの腎臓では MT の誘導合成が起きている事が示唆された。

考 察

MI マウスは 1973 年に Nishimura によって報告されたマウスで Menkes 症のモデル動物とし

ての有用性が明らかにされつつあり、中枢神経の障害の発生病理研究や銅代謝の研究がなされている¹¹⁾¹²⁾。銅代謝の異常についての報告は Nishimura¹¹⁾によって、されており銅治療を施していない 7, 14 日令マウスの肝臓や脳での銅量が低いことや、7, 14 日令や成獣での腎臓の銅の蓄積を報告している。また、 ^{64}Cu の取り込みから腸管の銅の輸送障害についての報告も行っている。本研究での報告で更に以下の点が明らかになった。

- ① 7 日令での比較では腎臓や小腸以外での組織 (肝臓, 脳, 脾臓, 血清) の銅量は低値を示していた。しかも、全身の銅量には顕著な差は認められないことから、生体内で銅が局在していると推定された。また、亜鉛量には顕著な変化は認められなかった。
- ② 腎臓での銅の蓄積は 7 日令では顕著であったが、1 日令では正常に比較して有意の差は認められなかった。
- ③ 肝臓や脳での銅の低値は 1 日令でも認められた。
- ④ 銅投与後の肝臓、腎臓、銅量の変化は正常に比較して異なっていた。
- ⑤ 腎臓に蓄積した銅の大部分は MT に結合して存在していた。また、亜鉛の結合は僅かであった。肝臓では MT レベルが正常群に比較して顕著に低値を示していた。

Menkes disease のモデル動物としては現在までのところ MI マウスを含めると 9 種類の報告があるが^{5)~9)}、この中でも brindled, blothy については詳細な研究がされている。これらの報告と MI マウスでの本実験結果を比較すると、腎臓や小腸での銅の蓄積と腎 MT の増加、肝臓、脳、脾臓、血清等での銅の欠乏と多くの類似点が認められた。しかし、腎臓での銅の蓄積については brindled では胎児や 1 日令の段階から認められると報告されているのに対して¹⁵⁾、MI マウスの今回の結果では 1 日令では有意の差は認められず、7 日令で差が認められていた。また、brindled の報告では胎盤でも銅の蓄積が認められるとされていたが¹⁵⁾、結果には示さないが MI マウスでは蓄積は認められなかった。このような違いが、系統の違いによるのか、あるいは他の原因なの

か更に詳細な研究が望まれる。

Menkes disease や mottled (brindled, blothy) そして macular マウスでの basic defect は依然不明のままであるが、腎臓や小腸での銅の蓄積や肝臓での銅の欠乏については研究が進められている。特に銅の蓄積については、Menkes disease の患者や mottled マウスからの fibroblast や lymphoblast を用いて多くの研究がなされており、銅の蓄積と MT の誘導との関係が明らかにされつつある。これらの Menkes cells は正常の細胞に比較して 3~10 倍の銅を細胞内に蓄積すること^{28)~30)}、そして、この蓄積した銅の大部分は MT に結合した形で存在することが知られている^{31)~36)}。これらの MT の形で存在する過剰の銅の蓄積を説明するために、いくつかの仮説が考えられている。これらの仮説は大別すると二つに分けることができる。ひとつは銅代謝が変化して、細胞内に銅が蓄積し、その結果 MT の誘導合成が起きるという考えで^{37)~39)}、もうひとつは MT の合成の制御が変化して、MT の誘導合成が生じ、結果として細胞内に銅が蓄積するという考え方である^{40)~41)}。また、in vivo での腎臓での銅の蓄積について Packman ら³⁹⁾は興味ある報告をしている。それによると、細胞内(組織)の銅レベルが有意に上昇した段階でも MT の mRNA レベルが変化していないことを示し、in vivo での腎臓への銅の蓄積も、Menkes cells と同じように銅代謝の変化が生じ、その結果腎臓の細胞内への銅の蓄積が起り、MT が誘導されるのではないかと推定している。また、銅の蓄積について Sone ら³⁸⁾は銅の蓄積には細胞内に存在する MT 以外の銅結合蛋白 (Copper binding protein) が深く関係していると推定している。この蛋白は細胞内の各 organella へ銅を輸送する働きをしておりこの蛋白の機能あるいは発現が変化したために、細胞内での銅の輸送が低下し、銅を要求する蛋白への(酵素等)供給が充分でなくなる一方、細胞内での銅の濃度は高くなるため、結果として MT の誘導が生じ

ているのではないかと推定している。

Menkes disease でのもう一つの特徴である肝臓での銅の欠乏についての解明は⁶⁴Cu を用いて、in vivo やあるいは分離肝細胞を用いて研究がされている。brindled マウスの分離肝細胞は正常肝細胞に比較して取り込みのパラメーターである K_m や V_{max} には大きな違いは認められないが、⁶⁴Cu の蓄積量に減少が認められるとしている⁴²⁾。また、in vivo の研究では⁶⁴Cu の細胞への取り込みは正常であるが、非常に速く消失することが報告されている¹⁷⁾。

以上 Menkes disease での銅代謝異常を説明するためにいくつかの仮説が提出されているが、銅の蓄積と欠乏という相反する現象を十分に説明することはできておらず今後、Menkes cells や MI マウスを含めた Menkes disease のモデルマウスでの詳細な研究が望まれる。

結 語

- ① Menkes 症モデルマウスである Macular マウスの腎臓や小腸では正常群に比較して銅の蓄積が認められたが、他の組織(肝臓、脳、脾、血清)では顕著に低い値を示していた。
- ② 腎臓での銅の蓄積は正常群に比較して 1 日令では差は認められなかったが、7 日令では顕著であった。肝臓と脳での銅の欠乏は 1 日令から認められた。
- ③ 銅投与後の肝臓と腎臓での銅量の変化は正常群に比較して異なっていた。
- ④ 腎臓に蓄積した銅の大部分は MT に結合して存在していた。

謝 辞

稿を終わるに当たり御懇切なる御指導頂いた放射線医学教室の青野要教授、白石則之助手並びに教室の各位に謝意を表します。また、機器の使用につき御配慮下さいました、麻酔蘇生学教室小坂二度見教授、並びに教室の各位に謝意を表します。

文 献

1. Menkes JH, Alter M, Steigleder GK, Weakley DR and Sung JH: A sex-linked recessive disorder

- with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebellar degeneration. *Pediatrics* (1962) 29, 764—779.
2. Danks DM, Stevens BJ, Campbell PE, Gillespie JM, Walker-Smith J, Blomfield J, and Turner B : Menkes' kinky-hair syndrome. *Lancet* (1972) 1, 1100—1103.
 3. Danks DM, Cartwright E, Stevens BJ and Towneley RRW : Menkes' kinky hair disease : Further definition of the defect in copper transport. *Science* (1973) 179, 1140—1142.
 4. Danks DM, Campbell PE, Stevens BJ, Meyne V and Cartwright E : Menkes' kinky hair syndrome : An inherited defect in copper absorption with widespread effects. *Pediatrics* (1972) 50, 188—201.
 5. Fraser AS, Sobey S and Spicer CC : Mottled, a sex-modified lethal in the house mouse. *J Genetics* (1953) 51, 217—221.
 6. Phillips RJS : Dappled, a new allele at the Mottled locus in the house mouse. *Genet Res* (1961) 2, 290—295.
 7. Russell LB and Saylor GL : Induction of paternal sex chromosome losses by irradiation of mouse spermatozoa. *Genetics* (1962) 47, 7—10.
 8. Cattanaach BM, Pollard CE and Perez JN : Controlling elements in the mouse X-chromosome : I. Interaction with the X-linked genes. *Genet Res* (1969) 14, 223—235.
 9. Hunt DM : Primary defect in copper transport underlies mottled mutants in the mouse. *Nature* (1974) 249, 852—854.
 10. Nishimura M : A new mutant mouse, macular (Ml) . *Exp Anim (Tokyo)* (1975) 24, 185.
 11. Nishimura M : Menkes' kinky hair syndrome mutant mouse (macular mouse) ; in *Experimental Animal Models of Intractable Disease*, Kyogoku ed, Soft Science, Inc. Tokyo (1984) pp 158—168.
 12. Yamano T, Shimada M, Kawasaki H, Onaga A and Nishimura M : Clinico-pathological study on macular mutant mouse. *Acta Neuropathol (Berl)* (1987) 72, 256—260.
 13. Danks DM : Copper transport and utilization in Menkes' syndrome and in mottled mice. *Inorg Perspect Biol Med* (1977) 1, 73—100.
 14. Evans GW and Reis BL : Impaired copper homeostasis in neonatal male and adult female brindled (Mo^{br}) mice. *J Nutr* (1978) 108, 554—560.
 15. Camakaris J, Mann JR and Danks DM : Copper metabolism in mottled mouse mutants : Copper concentration in tissue during development. *Biochem J* (1979) 180, 597—604.
 16. Mann JR, Camakaris J, Danks DM and Walliczek EG : Copper metabolism in mottled mouse mutants : Copper therapy of brindled (Mo^{br}) mice. *Biochem J* (1979) 180, 605—612.
 17. Mann JR, Camakaris J and Danks DM : Copper metabolism in mottled mouse mutants : Distribution of ⁶⁴Cu in brindled (Mo^{br}) mice. *Biochem J* (1979) 180, 613—619.
 18. Prins HW and Van den Hamer CJA : Primary biochemical defect in copper metabolism in mice with a recessive X-linked mutation analogous to Menkes' disease in man. *J Inorg Biochem* (1979) 10, 19—27.
 19. Hunt DM and Port AE : Trace element binding in the copper deficient mottled mutants in the mouse. *Life Sci* (1979) 24, 1453—1466.
 20. Port AE and Hunt DM : A study of the copper-binding proteins in liver and kidney tissue of neonatal normal and mottled mutant mice. *Biochem J* (1979) 183, 721—730.
 21. Mann JR, Camakaris J and Danks DM : Copper metabolism in mottled mouse mutants : Defective placental transfer of ⁶⁴Cu to foetal brindled (Mo^{br}) mice. *Biochem J* (1980) 186, 629—631.
 22. Prins HW and Van den Hamer CJA : Abnormal copper-thionein synthesis and impaired copper

- utilization in mutated brindled mice : Model for Menkes' disease. *J Nutr* (1980) 110, 151—157.
23. Prohaska JR : Comparison of copper metabolism between brindled mice and dietary copper-deficient mice using ^{67}Cu . *J Nutr* (1983) 113, 1212—1220.
24. Mason R, Bakka A, Samarawickrama GP and Webb M : Metabolism of zinc and copper in the neonate : Accumulation and function of (Zn, Cu) -metallothionein in the liver of the newborn rat. *Br J Nutr* (1981) 45, 375—389.
25. Bakka A and Webb M : Metabolism of zinc and copper in the neonate : Changes in the concentrations and contents of thionein-bound Zn and Cu with age in the livers of the newborn of various mammalian species. *Biochem Pharmacol* (1981) 30, 721—725.
26. Cousins RJ : Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc : Special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev* (1985) 65, 238—309.
27. Bremner I : Involvement of metallothionein in the hepatic metabolism of copper. *J Nutr* (1987) 117, 19—29.
28. Goka TJ, Stevenson RE, Hefferan PM and Howell RR : Menkes disease : A biochemical abnormality in cultured human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* (1976) 73, 604—606.
29. Camakaris J, Danks DM, Ackland L, Cartwright E, Borger P and Cotton RGH : Altered copper metabolism in cultured cells from human Menkes' syndrome and mottled mouse mutants. *Biochem Genet* (1980) 18, 117—131.
30. Chan W-Y, Granica AD and Rennert OM : Cell culture studies of Menkes kinky hair disease. *Clin Chim Acta* (1978) 88, 495—507.
31. Beratis NG, Price P, LaBadie G and Hirschhorn K : ^{64}Cu metabolism in Menkes and normal cultured skin fibroblasts. *Pediatr Res* (1978) 12, 699—702.
32. Onishi T, Inubushi H, Tokugawa S, Muramatsu M, Nishikawa K, Suzuki Y and Miyao M : Abnormal copper metabolism in Menkes cultured fibroblasts. *Eur J Pediatr* (1980) 134, 205—210.
33. LaBadie GU, Beratis NG, Price PM and Hirschhorn K : Studies of the copper-binding proteins in Menkes and normal cultured skin fibroblast lysates. *J Cell Physiol* (1981) 106, 173—178.
34. LaBadie GU, Hirschhorn K, Katz S and Beratis NG : Increased copper metallothionein in Menkes cultured skin fibroblasts. *Pediatr Res* (1981) 15, 257—261.
35. Bonewitz RF and Howell RR : Synthesis of a metallothionein-like protein in cultured human skin fibroblasts : Relation to abnormal copper distribution in Menkes' disease. *J Cell Physiol* (1981) 106, 339—348.
36. Riordan JR and Jolicœur-Paquet L : Metallothionein accumulation may account for intracellular copper retention in Menkes' disease. *J Biol Chem* (1982) 257, 4639—4645.
37. Packman S, Chin P and O'Toole C : Copper utilization in cultured skin fibroblasts of the mottled mouse, an animal model for Menkes' kinky hair syndrome. *J Inher Metab Dis* (1984) 7, 168—170.
38. Sone T, Yamaoka K, Minami Y and Tsunoo H : Induction of metallothionein synthesis in Menkes' and normal lymphoblastoid cells is controlled by the level of intracellular copper. *J Biol Chem* (1978) 262, 5878—5885.
39. Packman S, Palmiter RD, Karin M and O'Toole C : Metallothionein messenger RNA regulation in the mottled mouse and Menkes kinky hair syndrome. *J Clin Invest* (1987) 79, 1338—1342.
40. Schmidt CJ, Hamer DH, and McBride OW : Chromosomal location of human metallothionein genes : Implications for Menkes' disease. *Science* (1984) 224, 1104—1106.
41. Leone A, Pavlakakis N and Hamer DH : Menkes' disease : Abnormal metallothionein gene regulation

- in response to copper. *Cell* (1985) 40, 301—309.
42. Darwish HM, Hoke JE and Ettinger MJ : Kinetics of Cu (II) transport and accumulation by hepatocytes from copper-deficient mice and the brindled mouse model of Menkes disease. *J Biol Chem* (1983) 258, 13621—13626.

**Copper metabolism in the macular mutant mouse as
an animal model of Menkes kinky hair disease**

Shintaroh KONDOH

**Department of Radiation Medicine, Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan**

(Director : Prof. K.Aono)

The copper, zinc and metallothionein contents were measured in various tissues of mutant (hemizygous and homozygous) macular, heterozygous macular and normal mice. The copper contents in the kidney and small intestine of 7-day-old mutants and heterozygotes were much higher than in normal mice, whereas the copper contents in the other tissues (liver, brain spleen and serum) were low. Renal copper contents of 1-day-old mutants were not different from contents of normal mice, whereas those of 7-, and 14-day-old mutants were significantly elevated. Hepatic and brain copper contents were extremely low at all stages compared to normals. Copper therapy was applied to 7-day-old mutant mice. One day after injection, hepatic copper contents in mutants increased slightly compared to the normal controls, whereas renal copper contents increased greatly. Seven days after injection, hepatic copper contents in mutants decreased greatly compared to the normal control, whereas the increase in renal copper contents remained. One and 7 days after injection, brain copper contents in mutants and normal mice increased slightly compared to untreated mice. The renal MT-Cu contents in 7- and 8-day-old mutants and heterozygotes were significantly greater than that of normal mice. The marked elevation in renal MT-Cu contents was also observed in 8- and 9-week-old mutants and heterozygotes. In contrast to the kidney, hepatic MT-Cu contents in 7- and 8-day-old mutants and heterozygotes were much lower than in normal mice. In contrast to copper, no significant differences in zinc levels in any tissue were evident.