

# 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 25 年度博士課程進学

氏名 陳 嘉上

指導教員名 鈴木 道生

## 論文題目

コメに含まれるカドミウム結合物質の探索と動物におけるカドミウム吸収への影響に関する研究

### 背景

生物の特徴として、周囲の自然環境に適応することで生存することが挙げられる。自然環境の中には高温、低温、強酸、高塩、乾燥などの厳しいストレスが存在するが、生物は進化の過程でこれらに対して様々な防御機構を獲得してきたと考えられる。元素は生命現象を維持するために必要な元素（必須元素）と、必ずしも必要ではない元素（非必須元素）に大別される。必須元素に分類されている元素は炭素(C)、水素(H)、窒素(N)、酸素(O)、リン(P)、硫黄(S)といった、脂質、糖、タンパク質、核酸等の生体有機分子を構成する基本的な元素と、浸透圧調節に使われるナトリウム(Na)やカリウム(K)、骨格の維持に必要なカルシウム(Ca)、様々な有機分子に配位して重要な働きを担うコバルト(Co)、銅(Cu)、鉄(Fe)、マグネシウム(Mg)、マンガン(Mn)、モリブデン(Mo)、亜鉛(Zn)といった金属元素などである。必須元素に含まれるもの以外に 80 種近い金属元素が地球上に存在している。その中には水銀(Hg)、カドミウム(Cd)、クロム(Cr)、鉛(Pb)のような重金属と称される比重 4.0～5.0 以上の元素も含まれている。重金属は工業分野で使われているものが多く、現代では人類の生活には欠かせない元素となっているが、生体に対しては毒性を示す。環境中の重金属は食物連鎖の過程で濃縮されていき、高等植物では

特に生体内濃度が高い。

重金属の中でも Cd は昔から工業製品に使われているが、多くの生物種にとって有害である。Cd はヒトを含む多くの生物種に長時間蓄積する特性があり、曝露されると長期間にわたり慢性的な毒性に曝される危険性がある。Cd と Zn は周期表中の同族元素に属する。しかし Zn が生命活動に多彩な機能を発揮する必須元素であるのに対し、Cd は多くの生物に対する毒性のみが知られている。HSAB 則に基づくと、Cd イオンは軟らかい金属イオンに分類され、軟らかい塩基と高い親和性を持つ。それゆえ、本来 Zn イオンが結合すべき生体分子中の軟らかい塩基に結合し、活性を失わせることが Cd 毒性機構の一つであると考えられている。様々な無機物が植物の養分として根部より吸収されるが、養分だけではなく土壌中に存在する汚染物も同時に吸収される。その原因は植物の根部にある必須金属イオン(Fe, Ca, Zn イオンなど)のトランスポーターが、目的金属だけではなく Cd をも輸送してしまうためであると考えられている。土壌汚染により問題となるのは、我々の主食であるコメに蓄積された Cd が、摂食により人体に吸収、蓄積されることである。健康被害を防ぎ、よりリスクの少ない農業を可能とするためには、コメへの Cd の蓄積形態、生体への吸収動態を理解することが必要である。しかしながら、コメ中の Cd が実際にどのような状態でどのタンパク質と結合しているのかという化学形態については不明点が多く、具体的な Cd 結合分子についても未だ同定されていない。

## 本論文の構成

本研究では、新規および既存の手法によりコメ中に存在する Cd 結合物質の探索を行うことで、Cd 結合物質を単離・同定し、その性質と機能を植物実験、動物実験、細胞実験、放射線実験など様々な手法で解析を行った。第 1 章では背景、Cd 汚染の現状について概説した。第 2 章では Cd 汚染米の準備に関して記述した。第 3 章ではマウスを用いた実験により、Cd 汚染米と Cd-GSH 錯体の経口摂取時において、コメ中の Cd が単なる無機 Cd と比較してより多量に体内に取り込まれる傾向にあることを明らかにした。第 4 章では、新規に開発した Cd 検出法を用いてコメ中に存在する Cd 結合物質の探索・同定を試みた。新規検出法以外にも既存手法としてアフィニティークロマトグラフィー、HPLC-ICP/MS なども併用した。第 5 章では、第 4 章で同定した Cd 結合物質—SSA1 - 2S albumin seed storage family protein を大腸菌により大量発現し、Cd の放射線同位体を用いて、該当タンパク質の Cd 結合力を解析した。さらに、大量発現したタンパク質を Caco-2 細胞の単層膜透過性実験に供し、該当タンパク質の Cd 結合の有無による透過性の変化を観察した。また、SSA1 - 2S albumin seed storage family protein を生産しないコシヒカリ変異株 GbN-1 と野生型コシヒカリを同時に Cd ストレス環境中で栽培し、両コメ中の Cd 蓄積量を比較した。

## Cd 汚染米の摂取によるマウス臓器内の Cd 蓄積量の評価

Cd が Cd 結合物質と錯体を形成することで、消化・吸収・体内蓄積にどのように影響

するかを解明するため、Cd-GSH 錯体と、Cd 汚染米中に含まれた Cd 結合物質と Cd が結合することで生成された錯体が、マウス体内の Cd 動態に与える影響を解析した。GSH の実験においては、各投与量に分けて比較すると、Cd 低濃度飼料を 1 週間投与した場合、マウス肝臓、腎臓両方ともに Cd-GSH 錯体飼料を与えた群の Cd 濃度が高かった。Cd 汚染米での実験の結果は、Cd 汚染米を摂取したマウスの臓器中 Cd 濃度が、無機 Cd を添加したマウスの臓器濃度より著しく高かった。これは Cd 汚染米の中に、Cd と結合している特定の成分が存在し、該当成分と一緒に摂食することでマウスがより Cd を吸収しやすくなることを示唆していた。

#### Cd 結合物質の検出と同定

新規に開発した TPPS 法や、HPLC-ICP/MS によるコメ中 Cd 結合物質の探索を行った。市販米サンプルを用いた Cd 結合阻害アフィニティークロマトグラフィーをと上記の分析手法を組み合わせることにより、コメ中の Cd 結合物質である SSA1-2S albumin seed storage family protein の同定に成功した。動物ではアルブミンは血液中に大量に存在しているため、血液中の重金属と結合して重金属を解毒、輸送する役割も担っている。アルブミンは植物の種子や果実中に存在し、一般的に貯蔵タンパク質の一つとしても有名であるが、Cd と結合することによる人体の消化・吸収量はどのように変化するかを解明することが次の課題と考えられた。

#### SSA1-2S アルブミンの性質解析

SSA1-2S アルブミンについて詳細な解析を行った。Cd ストレス環境で栽培したコシヒカリ野生株と変異株(SSA1-2S アルブミンのノックアウト)のコメ中 Cd 累積量変化を測定した結果から、コメ中 Cd の累積量は、SSA1-2S アルブミン欠損により 11~38%程度低減することが分かった。次に、SSA1-2S アルブミンを大腸菌により組み換え発現させ、SDS-PAGE と PVDF 膜への転写を行い、<sup>109</sup>Cd との結合を放射線イメージアナライザーにより測定したところ、強いシグナルが観察された。この結果より、組み換え SSA1-2S アルブミンは Cd に強い結合能を持つことが示唆された。さらに、Caco-2 細胞を用いた単層膜の透過試験を行い、組み換え SSA1-2S アルブミンと結合した Cd の細胞への取り込み量の評価を試みた。細胞が形成した単層膜を用いて小腸中の Cd 吸収状況を模倣し、透過試験を行った。透過終了後、管腔膜側と基底膜側の Cd 含量を ICP-AES により測定した。組み換え SSA1-2S アルブミンを添加したサンプルでは、未添加のサンプルより基底膜 Cd 含量と透過率が有意差をもって 2 倍以上上昇する現象が観察された。

#### 総括および総合考察

マウス実験において、Cd 汚染米を摂食したマウスの臓器中 Cd 吸収量は、無機 Cd を摂食したマウスより高かった現象に関しては、先行研究で行われた動物実験やボランティアによる人体実験からも同様の結果が得られている。Cd が生体の循環システムに入る時点で、もう既に何かの Cd 結合物質と錯体を生成している状態であった場合には、

腎臓中の Cd 濃度は該当 Cd 結合物質の結合力の強さによって変化すると考えられる。本研究では、マウス実験、Cd の放射線同位体  $^{109}\text{Cd}$  を用いた実験でコメ中の Cd 結合物質の結合力を確認した。加えて、ヒト結腸ガン細胞株の透過実験により、Cd 吸収率に与える Cd 結合物質の影響を検証した。その結果、Cd は SSA1-2S アルブミンと結合することで、人体に取り込まれ易いようになっていることが示唆された。Cd とそれに配位した Cd 結合物質が消化される際、Cd 水和錯体は胃の中の塩酸により Cd のクロロ錯体になる。Cd と塩素の生成定数は大きく、Cd クロロ錯体はトランスポーターに Cd を引き渡し難いことから、トランスポーターでの取り込み量が少なくなると考えられる。一方で、タンパク質のような高分子の結合物質が配位している Cd は、胃での消化後もクロロ錯体にならないが、消化され低分子になるにつれてエントロピー的に不利になり、またその生成定数が大きくないために、小腸ではトランスポーターに受け渡してしまうと考えられる。Cd がタンパク質との結合によって人体への吸収率が上がる現象は、牛乳中の Ca とカゼインの結合に類似している。今後も SSA1-2S アルブミンの働きを詳しく解明していく必要がある。

#### 原著論文

Chia-Shang Chen, Shinya Ogawa, Yuki Imura, Michio Suzuki, Etsuro Yoshimura

“Post-column detection of cadmium chelators by high-performance liquid chromatography using 5,10,15,20-tetraphenyl-21H,23H-porphinetetrasulfonic acid”

Journal of Chromatography B, *in Press*