

博士論文(要約)

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

陳 嘉上

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。これらは元素が欠乏した時にある種の欠乏症が現れるかどうかにより決定されてきたが、両方とも過剰存在すると生体に対して有害となる。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八十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。Cdイオンはソフト金属イオンに分類され、ソフトな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ソフトな塩基に結合し、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。

第二章では、まずCd汚染米サンプルの準備について述べた。それから宇都宮大学の深見元弘名誉教授の研究グループから供与して頂いたCd汚染水田で栽培されたイネから収穫した未脱穀コシヒカリを用いて、マウス餌の成分の一部としてマウスに投与した実験を行った。その結果からCd汚染米を餌として投与したマウスの臓器中Cd蓄積量が、単なる餌に無機Cdを添加したマウスの臓器蓄積量より著しく高かった現象を観察された。これは、Cd汚染米の中に、Cdに結合す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を吸収しやすい化学形態に変化させることを示唆している。この結果を踏まえて、既知の生体内Cd結合物質であるグルタチオン(GSH)を用いて、CdがCd結合物質と錯体を形成した状態はCdの生体内吸収にどのような影響を与えるか調べた。その結果、肝臓、腎臓ともGSH-Cd投与群が単なるCd硫酸塩投与群より臓器中のCd蓄積量が増加したと見えたが、有意差を検証した結果、データ全体の半数以上で有意差がないと検定された。これは以前に行った放射線同位体¹⁰⁹Cdを用いた他の研究と一致している。

第三章の前半では、筆者が修士課程で開発したCd結合物質の新規検出法を紹介し、

生体サンプルと米抽出液の測定を試みた。新規検出法を開発する動機として、現行の Cd 結合物質分析では、主に Cd と親和性の高いチオール基を定量する方法が用いられていた。現在汎用されている DTNB(5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid))法と mBBr(mono-bromobimane)法があるが、各自に欠点を持っている。その上、両者とも官能基依存的な方法であり、Cd に対する結合力の定量性評価では対応できない。Cd に対する結合力を高感度に評価できる分析方法として、他の研究で開発された蛍光試薬の BCS(Bathocuproine disulfonate)と一価の銅イオンを利用する BCS 法があるが、ポストカラム液にヘリウムをバブリングするという特殊な実験操作が必要である。また、Cu⁺と Cd²⁺は共にソフト金属に属するため似た性質を有しているが、Cd 結合物質分析法としては Cd²⁺を利用した分析方法の方が理想的だと考えられる。TPPS 法では TPPS の Cd 錯体を使用して、結合物質の有無を検出することから、Cd の特異的結合を解析することができる。TPPS 法の標準サンプルで有用性や検出限界の評価を行った後に、実際に生体サンプル由来の Cd 結合物質の分析を試みた。生体サンプルとしてはまずウマの血漿を選出した。哺乳類に属するウマは主に低分子量チオール化合物であるグルタチオン(GSH)が Cd と結合し、解毒、輸送する働きが担われている。GSH は図 3-④で示したように、還元型の GSH と酸化型の GSSG の二種類存在している。GSSG はチオール基が酸化されてジスルフィド結合を形成しているため、DTNB 法や mBBr 法のようなチオールの官能基依存的な分析方法では検出できない。TPPS 法は Cd 結合力を指標とした分析が可能であるため、GSSG を検出できると期待される。

新規開発した分析手法以外も既存手法の HPLC-ICP/MS による米中 Cd 結合物質の探索を続け、TPPS 法と両方とも SDS-PAGE で 25 kDa 付近に Cd 結合物質と思われたバンドが観察されたが、バンドに含まれるタンパク質濃度の問題で LC-MS/MS を用いた同定まで至らなかった。そこで、SDS-PAGE によって分離されたタンパク質の量を配慮し、使えるコメサンプルの量を増やすために、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起用し、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。

第四章では、第三章までに同定できたコメ中 Cd 結合物質—SSA1-2S アルブミンについて詳細な解析を行った。まず農業生物資源研究所(現 農業・食品産業技術総合研究機構)の遺伝子組換え研究センターから供与して頂いた、SSA1-2S アルブミン生産する遺伝子がノックアウトされたコシヒカリ変異株—GbN-1 の Cd ストレス栽培実験を行った。同じく農業生物資源研究所遺伝子組換え研究センターから供与して頂いた、野生株のコシヒカリも同時に栽培し、収穫したコメの測定結果を比較することで、SSA1-2S アルブミンの有無がコメ中 Cd 累積量への影響を解析することとした。次に、SSA1-2S アルブミンを実験サンプルとしての使用量を確保するため、大腸菌の大量発現システムを構築した。発現した組み換え体 SSA1-2S アルブミンを用いて、Cd の放射線同位体である ¹⁰⁹Cd との結合力を確認した。最後に、第二章のマウスを用いた実験から判明した Cd 汚染米を餌として飼育したマウスの臓器中 Cd 累積量は、無機 Cd 添加コメを投与したマウスより 2 倍近く高くなる現象が SSA1-2S アルブミンに起因するのか確認するため、ヒト

結腸癌由来の Caco-2 細胞を用いた単層膜の透過実験を行い、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行った。

これまで、経口摂取時においてコメ中の Cd が単なる無機 Cd よりも体内に取り込まれやすい現象を、マウス実験から観察された。この興味深い現象を究明するには、まず Cd が自然界から人体、臓器中までの流れを理解する必要がある。Cd は亜鉛の製錬などによる人間の活動により、特定範囲内の土壌に高濃度蓄積するようになる場合がある。これが、すなわち Cd 汚染である。Cd による汚染された土地に農作物を栽培することで、イネのような Cd を高濃度蓄積する植物は根部に存在するトランスポーター経由で植物体内に取り込まれ、クエン酸とファイトケラチンと結合している状態で、導管中に輸送される。導管で根から地上部に運送された Cd は、イネの節で篩管に乗り換え、コメまで運搬される。Cd はコメ中のタンパク質と結合している状態で貯蔵されることが考えられる。他の研究によると、コメ中にある Cd と結合するタンパク質の種類については、アルカリ、酸性溶液に可溶なグルテリンとの報告が多いが、塩可溶性のグロブリン、水溶性のアルブミンである可能性もある。しかしながら、これまで具体的なコメ中の Cd 結合タンパク質については明らかになっていないため、本研究は Cd の結合タンパク質を同定する実験を行った。さらに、Cd 汚染米を摂取した人間では、Cd が小腸上皮細胞刷子縁膜に存在する 2 価金属トランスポーターの DMT1 による細胞内に取り込まれ、血液経路で循環システムに入る。血液中では主に肝臓で誘導合成された MT と結合し、腎臓まで運搬される。腎臓で糸球体にろ過された後、近位尿細管で再吸収の際に Cd が MT より解離することで、腎障害を起こす。マウス実験で Cd 汚染米を摂食するマウスの臓器中 Cd 吸収量は単なる無機 Cd を摂食したマウスより高い現象は、他の研究で行った動物実験、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。それらの結果を踏まえて、Cd が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だった場合には、腎臓の Cd 蓄積量は該当 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}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。それと、人間結腸ガン細胞である Caco-2 細胞が形成した単層膜を用いて、人類小腸中の Cd 吸収状況を模擬し、SSA1-2S アルブミンの存在が小腸の吸収率にどのような影響を出すことを観察した。その結果は、SSA1-2S アルブミンと結合することで、Cd を腸管細胞に取り込まれ易いようになっていることを示唆した。金属イオン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本研究の Cd だけではなく、例えば牛乳中の Ca 吸収がカゼインの有無に大きく影響されていることもよく知られている。今後も SSA1-2S アルブミンの働きをカゼインと同じ程度に詳しく解明したいと思っている。