

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658108

研究課題名(和文)イカ肝に含まれるカドミウム結合物質の構造解析とそのカドミウム集積への利用

研究課題名(英文)Structural analysis of cadmium-binding substance(s) in squid liver and their application to cadmium accumulation

研究代表者

吉村 悦郎 (Yoshimura, Etsuro)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：10130303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：スルメイカ肝臓およびその抽出上清のXAFSスペクトルの測定から、スルメイカ肝臓中のCd結合性物質は、肝臓、上清のどちらも主にS原子ではなくO原子がCdと配位していることが判明した。また、肝臓の部位によってX線の吸収スペクトルに変化はなく、肝臓中にCd結合性物質が一様に存在していることが示唆された。

スルメイカ肝の抽出上清を、各種クロマトグラフィーで分離した。また、Cd高濃度画分を電気泳動によって分離を行った。また、二次元電気泳動の結果5つのスポットが検出された。これらのスポットのアミノ酸配列の解析から、これらが新規タンパク質であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：XAFS spectrum of liver of squid indicated that cadmium binds to a substance through its O-atom. The spectra were unchanged when X-ray was irradiated any other spots, indicating that the substance distributed evenly over the liver specimen. The similar spectrum was also evident when soluble fraction of the extract of squid liver.

The supernatant of squid liver was subject to isolate the Cd-binding substance by several kinds of chromatography. The fraction containing higher levels of Cd was applied to SDS-PAGE and 5 spots were detected. Amino acid sequencing of the protein in the spots indicated that the substances are novel proteins.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：カドミウム イカ カドミウム結合物質

1. 研究開始当初の背景

日本では古くから様々な魚介類を食用として用いてきた。その中でもスルメイカ *Todarodes pacificus* は日本人が最も多く消費する魚介類の1つで、日本人の食文化において欠かすことのできない生物である。また、スルメイカは成長が早く1年で寿命を終えることや、摂餌能力の高さなどから海洋生態系において非常に重要な位置を占めている。スルメイカは、短期間で多量の食餌を摂取することなどから肝臓に強い毒性をもつカドミウム (Cd) が多量に蓄積することが知られている。そのため食品加工業者にとって Cd を多量に含むスルメイカの肝臓の廃棄は、非常に重要な問題となっている。一般に、生物は Cd をはじめとする毒性の強い重金属を、メタロチオネイン (MT) やファイトケラチン (PC) のようなシステインを多く含む物質とキレートさせることで無毒化していると考えられている。しかし、Cd を高濃度に蓄積するスルメイカが、Cd とどのような物質をキレートさせることで Cd を無毒化しているのかは不明であった。

2. 研究の目的

スルメイカの肝臓には、Cd と強力な結合を形成する物質が存在することが予想された。本研究ではこの物質の構造を明らかにするとともに環境中の Cd を集積する技術の基礎を考案することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) XAFS (X-ray Absorption Fine Structure) 分析によるスルメイカ肝臓中における Cd 化学形態の解明

XAFS 法は、試料に X 線を照射し、各元素の K、L、M 殻などの電子が叩き出される際の X 線吸収スペクトルから、対象原子の原子価や電子構造、周辺原子の種類や数を明らかにする方法である。

均一化した肝臓、肝臓抽出液上清、肝臓抽出液沈殿の XAFS 解析の結果を図 1 に示す。横軸が X 線の強度をとり、X 線吸収スペクトルを示し、系列は図に示した通りである。サンプルは全て約 26710 keV に吸収端を持っていた。吸収端付近の XANES に注目すると、Cd が S 原子と結合している CdS と Cd-DTT 錯体は、吸収端直後の吸収スペクトルに変化が無い。一方で、Cd が O 原子と結合している Cd-EDTA、酢酸 Cd、CdO は吸収端直後の吸収スペクトルに変化が見られた。測定したサンプルはすべて吸収端直後に変化が確認できた。

肝臓の部位ごとの XAFS 解析の結果を図 2 に示す。軸、系列は図に示した通りである。部位ごとの吸収スペクトルを比較しても大きな変化は見られなかった。

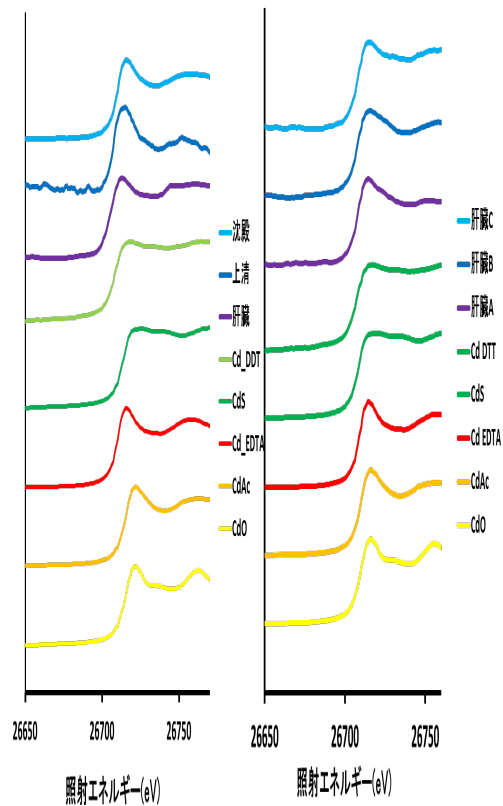


図 1 (左図) 肝臓、上清、沈殿の XAFS
図 2 (右図) 肝臓部位による XAFS

分析の結果、スルメイカ肝臓中の Cd 結合性物質は、肝臓、上清のどちらも主に S 原子ではなく O 原子が Cd と配位していることが判明した。また、肝臓の部位によって X 線の吸収スペクトルに変化はなく、肝臓中に同一の Cd 結合性物質が一様に存在していることが示唆された。

(2) スルメイカの Cd 結合物質の単離

(a) FPLC による分離

抽出操作後の上清を、FPLC を用いた各種クロマトグラフィーで分離し、Cd 濃度を指標として精製を行った。画分の Cd、Cu、Zn 濃度測定には ICP-OES を用いた。また、分子量キャリブレーションを行い、おおよその分子質量の把握も行った。Cd

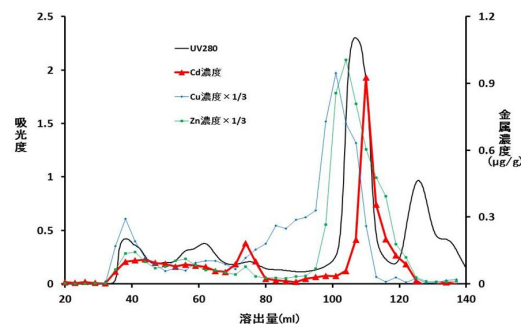


図 3 肝臓抽出液上清の SEC による分離分析

(b) HPLC-ICP/MS による分離

抽出操作後の上清と、(a)で得られた画分 A を HPLC-ICP/MS を用いたサイズ排除クロマトグラフィーによって分離した。また、(a)と同様に Cd 高濃度画分は分取後、二次元電気泳動を行った。

分析の結果、上清では Cd 濃度のピークを 3 つ検出したが(図 4)、画分 A ではそのピークのうち 1 つだけが検出され(図 5)、この画分を分取した(画分 B)。画分 A にも Cu のピークが見られた。画分 B で二次元電気泳動すると、画分 A と同様の 5 つのスポットが検出された。

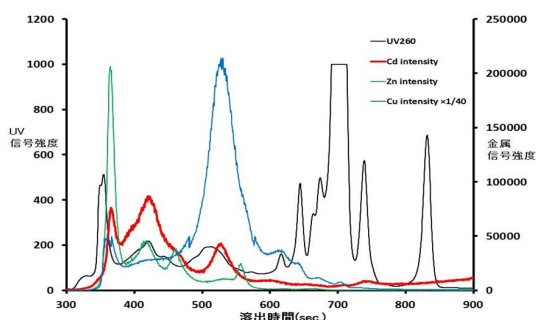


図 4 肝臓抽出液上清の HPLC-ICP-MS による分析

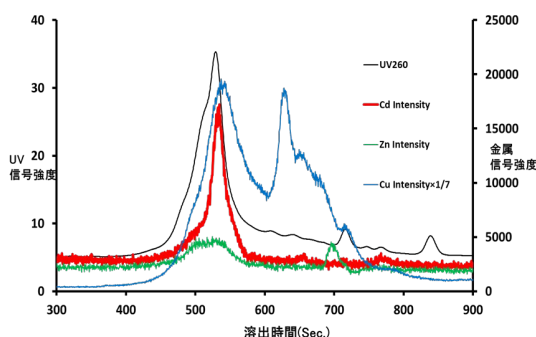


図 5 画分 A の HPLC-ICP-MS による分析

(3) Cd 結合タンパク質の同定

二次元電気泳動で確認したスポット(図 6)を、プロテインシーケンサでアミノ酸配列の解析を行った。得られたアミノ酸配列はデータベースに登録がなく、新規タンパク質であると考えられる。そこで、解析したアミノ酸配列から degenerate プライマーを設計し、degenerate PCR を行った。現在増幅が確認できた DNA 断片について、塩基配列を解析し、タンパク質の同定を進めている。

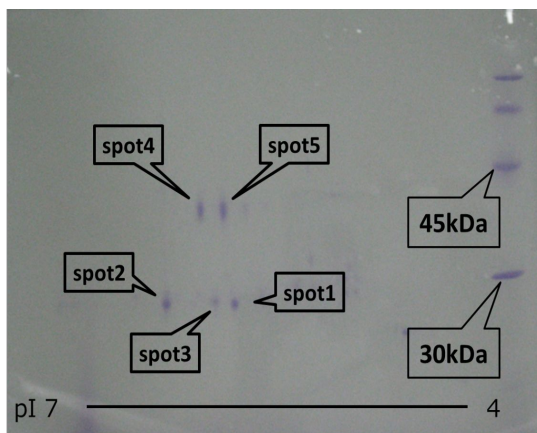


図 6 画分 A の二次元電気泳動

4. 研究成果

生体内で Cd と結合する MT や PC のような物質は Cd に S 原子が配位している。しかし、本研究で行った XAFS 解析によりスルメイカ肝臓中に存在する Cd 結合性物質は S 原子ではなく O 原子と配位している物質であり、MT とは性質の異なる物質であることが示唆された。また、肝臓と上清でスペクトルに違いが無かったため、上清の Cd 結合物質は肝臓のものと同様であることが示唆された。

HPLC-ICP/MS の結果から、本研究の精製操作によりスルメイカの肝臓中の Cd 結合物質の 1 つが精製できた。画分 A、B には Cd だけでなく Cu も検出されたため、これらの画分のタンパク質は、Cd と Cu どちらにも結合する物質である可能性が示唆された。

二次元電気泳動後のスポットをプロテインシーケンサでアミノ酸配列を解析した。得られたアミノ酸配列は NCBI タンパク質データベースに登録がなく、本研究で分離したタンパク質が新規タンパク質である可能性が示唆された。Cd 結合タンパク質同定のために、得られたアミノ酸配列から遺伝的な手法で同定を試みたが同定には至らなかった。

本研究で、スルメイカ肝臓中の Cd 結合物質は MT とは性質の異なる新規タンパク質である可能性が示唆された。今後タンパク質の同定、機能解析を行うことで、生物の Cd の無毒化に関する新しい知見が得られることが期待される。また、このタンパク質は Cd 除去技術の開発などに貢献できると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

瀬川俊、井村祐己、吉村悦郎、スルメイカ肝臓に存在するカドミウム結合性タンパク質

の分離分析、日本分析化学討論会、2013年5月18日～19日(函館)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村悦郎 (YOSHIMURA, Etsuro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：10130303

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：