

第1回メタロミクス研究フォーラム  
講演要旨集

平成20年11月28日（金）・29日（土）

昭和女子大学



# 第1回メタロミクス研究フォーラム

## 講演要旨集

会 期：平成20年11月28日（金）・29日（土）  
会 場：昭和女子大学  
〒154-8533 東京都世田谷区太子堂1-7  
第1会場 学園本部館3F 大会議室  
第2会場 学園本部館3F 中会議室

事務局・連絡先  
第1回メタロミクス研究フォーラム事務局  
〒650-0047 神戸市中央区港島南町6-7-3  
独立行政法人理化学研究所 神戸研究所  
分子イメージング科学研究センター  
メタロミクスイメージング研究ユニット 榎本秀一

# 目 次

第一回メタロミクス研究フォーラムの開催にあたってのご挨拶	1
第1回メタロミクス研究フォーラムご案内	2
交通案内図	3
会場案内図	4
座長一覧表	5
11月28日(金) スケジュール	6
11月29日(土) スケジュール	7
参加者へのお願い・講演者と座長へのご案内とお願い	8
講演プログラム	
11月28日(金)	11
11月29日(土)	15
講演要旨	
シンポジウム	19
口頭発表(一般)	63
鈴木和夫先生追悼講演会	91
公開市民講座	93
第1回メタロミクス研究フォーラム委員一覧	97



## 第一回メタロミクス研究フォーラムの開催にあたってのご挨拶

晩秋の候 先生方におかれましては御健勝にてご研究、ご診療、ご教育に御活躍のことと拝察申し上げます。

さて、このたび、2008年11月28、29日の両日、第1回メタロミクス研究フォーラムを東京都世田谷区の昭和女子大学にて開催させていただき運びとなりました。本フォーラムを主催するにあたり一言ご挨拶申し上げたく存じます。

本フォーラムは、名古屋大学名誉教授原口紘丞先生の提唱されたメタロミクスという新しいオミクスを名に冠して研究交流の場とさせていただきました。これは、昨年2007年11月に原口先生のご主催されましたInternational Symposium on Metallomics 2007(名古屋)を起源といたします。このISM2007は国内外の関連研究者の活発な議論が行われ、大盛会であったことが、まだ記憶に新しいところでございます。本フォーラムは、これを受けた形で国内におきましても、定期的な研究交流の場として企画したものであり、この主旨を日本微量元素学会の荒川泰昭理事長をはじめとする諸先生方にご説明させていただき、全面的なバックアップをご快諾いただき、おかげさまで、無事、本日より第1回メタロミクス研究フォーラムを開催させていただきこととなりました。関係者の先生方には、この場をお借りいたしまして、心より感謝申し上げる次第でございます。

今回のフォーラムは、昭和女子大学大学院特任教授、東北大学名誉教授 木村修一先生のご高配により、会場として交通の利便性の良い、この昭和女子大学を会場とさせていただきました。また、フォーラムでは、微量元素をキーワードとした各方面で御活躍の著名な臨床家、研究者の先生方のシンポジウムを始め、一般講演など50余りの講演を企画させていただいております。さらにメタロミクスの概念の普及と微量元素研究の重要性をアピールするため、11月29日には市民公開講座も企画いたしました。併せまして、メタロミクス研究の先達でもあり、日本の生体微量元素研究の代表的研究者でもあられた千葉大学大学院薬学研究院名誉教授 鈴木和夫先生の急逝に鑑み、鈴木和夫先生の追悼記念講演会も企画させていただいております。

昨今のオミックス研究の潮流にメタロミクスも積極的に参画していくためにも、この研究フォーラムが、メタロミクス研究に従事されております先生方の活発なご交流の場として発展してまいります事を祈念させていただき、快晴に恵まれて、美しい青空の下で、活発な発表と討論を期待させていただきたく思っております。末筆ながら、これから師走を控え、あわただしさと寒さが日々ましてくる時期でございます。先生方におかれましては、ご自愛をお願いさせていただき、益々のご発展を祈念させていただきたく存じます。

平成20年11月27日

第1回メタロミクス研究フォーラム代表世話人

榎 本 秀 一

(独) 理化学研究所神戸研究所分子イメージング科学研究センター  
メタロミクスイメージング研究ユニット研究ユニットリーダー  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
医薬品機能分析学分野教授

## 第1回メタロミクス研究フォーラムご案内

会 期：平成20年11月28日（金）・29日（土）

会 場：昭和女子大学

〒154-8533 東京都世田谷区太子堂1-7

第1会場 学園本部館3F 大会議室

第2会場 学園本部館3F 中会議室

主 催：日本微量元素学会

共 催：日本薬学会、日本化学会

協 賛：日本分析化学会、日本栄養・食糧学会、プラズマ分光分析研究会、日本鉄バイオサイエンス学会、日本分子イメージング学会、日本核医学会、メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会

事務局：第1回メタロミクス研究フォーラム事務局

〒650-0047 神戸市中央区港島南町6-7-3

独立行政法人理化学研究所 神戸研究所

分子イメージング科学研究センター

メタロミクスイメージング研究ユニット 榎本秀一

参加費：

	事前	当日	懇親会
一般 *	5000 円	6000 円	5000 円
学生 **	3000 円	4000 円	3000 円
非会員	6000 円	7000 円	6000 円

\* 一般：主催、共催、協賛の学会員

\*\* 学生：短期大学、大学、大学院の在学生（聴講生は含まず）

実行委員会：

11月28日（金）12:10~13:10 第2会場（学園本部館3階 中会議室）

懇親会：

11月28日（金）18:30~20:30 カフェテリア“ソフィア”（大学一号館地下）にて行います。ぜひご参加下さい。

受付にて11月28日（金）の午前中までお申し込みを承ります。懇親会参加費は、一般5,000円、学生3,000円、非会員6,000円です。

# 交通案内図



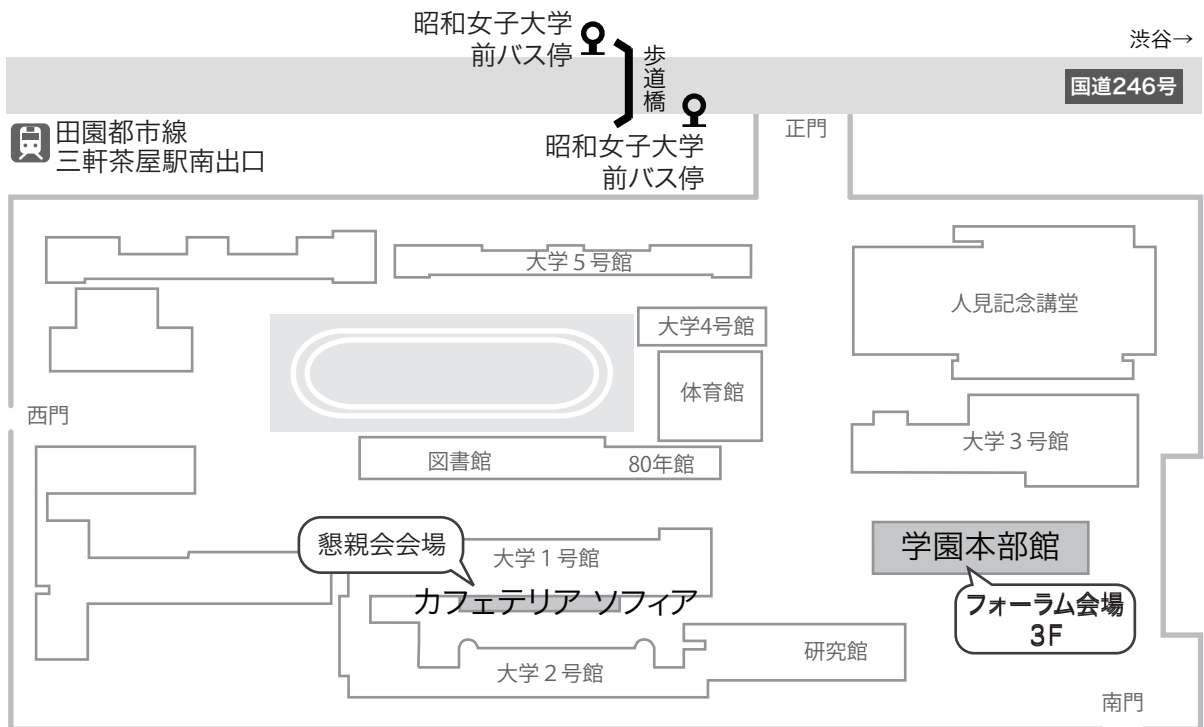
会場: 東京都世田谷区太子堂17 昭和女子大学 学園本部館3F(フォーラム会場)  
 カフェテリアソフィア(懇親会会場)

地下鉄: 東急田園都市線(半蔵門線直通)「三軒茶屋」駅下車 徒歩7分

バス①: 渋谷駅から上町・等々力・田園調布・弦巻営業所・二子玉川・高津営業所・成城学園・祖師谷大蔵・狛江・調布方面行きを利用し、「昭和女子大」下車

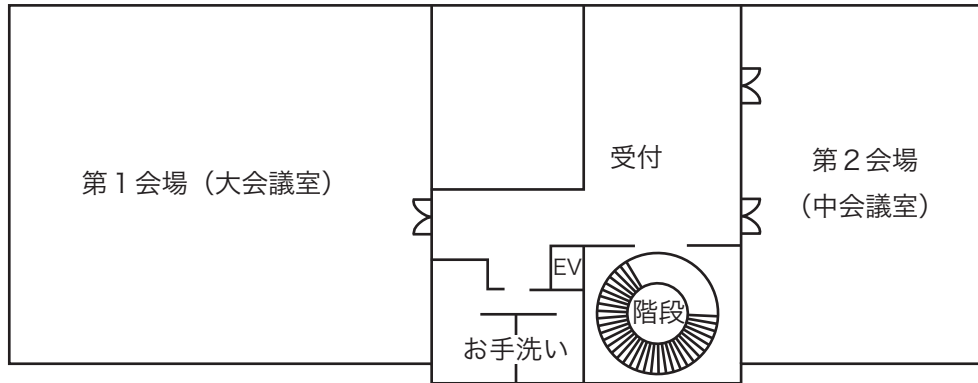
バス②: 目黒駅・祐天寺駅から三軒茶屋行きを利用し、「三軒茶屋」下車

バス③: 下北沢駅から駒沢陸橋行きを利用し、「三軒茶屋」下車



# 会場案内図

学園本部館 3階



## 座長一覧表

### 11月28日(金) 第1会場(大会議室)

シンポジウム1 S1-1~2 (9:10-9:50) 池田 稔 (日本大学 医学部 耳鼻咽喉・頭頸部外科)  
S1-3~5 (9:50-10:50) 児玉浩子 (帝京大学 医学部 小児科)  
S1-6 (10:50-11:10) 池田 稔 (日本大学 医学部 耳鼻咽喉・頭頸部外科)  
S1-7~9 (11:10-12:10) 木村修一 (昭和女子大学大学院 生活機構研究科)

シンポジウム2 S2-1~2 (13:10-13:50) 小椋康光 (千葉大学大学院 薬学研究院)  
S2-3~4 (13:50-14:30) 中西 剛 (岐阜薬科大学 衛生学研究室)

シンポジウム3 S3-1~2 (15:30-16:10) 姫野誠一郎 (徳島文理大学 薬学部)  
S3-3~4 (16:10-16:50) 武田厚司 (静岡県立大学 薬学部)

### 11月28日(金) 第2会場(中会議室)

口頭発表1(一般) O1-1~3 (13:10-13:55) 金山洋介 (独立行政法人理化学研究所 神戸研究所)  
O1-4~5 (13:55-14:25) 小谷 明 (金沢大学 医薬保健研究域 薬学系)

口頭発表2(一般) O2-1~3 (14:35-15:20) 安井裕之 (京都薬科大学 代謝分析学分野)

口頭発表3(一般) O3-1~3 (15:30-16:15) 米田誠治 (鈴鹿医療科学大学 薬学部)  
O3-4~6 (16:15-17:00) 稲垣和三 (独立行政法人 産業技術総合研究所)

### 11月29日(土) 第1会場(大会議室)

シンポジウム4 S4-1~3 (9:00-10:00) 榎本秀一 (岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科、  
独立行政法人理化学研究所 神戸研究所)  
S4-4~6 (10:00-11:00) 梅村知也 (名古屋大学 エコトピア科学研究所)  
S4-7~9 (11:00-12:00) 桜井 弘 (鈴鹿医療科学大学 薬学部)

### 11月29日(土) 第2会場(中会議室)

口頭発表4(一般) O4-1~4 (9:00-10:00) 中西由季子 (昭和女子大学大学院 生活機構研究科)

シンポジウム5 S5-1~4 (10:00-11:20) 川原正博 (九州保健福祉大学 薬学部)  
S5-5 (11:20-11:40) 廣村 信 (独立行政法人理化学研究所 神戸研究所)

口頭発表5(一般) O5-1~3 (11:40-12:25) 廣村 信 (独立行政法人理化学研究所 神戸研究所)

第1回メタロミクス研究フォーラムスケジュール(第1日目)

11月28日(金)

	第1会場 (大会議室)	第2会場 (中会議室)
9:00		
9:10	開会の辞	
	【シンポジウム1】 臨床現場と栄養学からの メタロミクス研究展開 S1-1~9	
10:00		
11:00		
12:00	[池田 稔、児玉浩子、木村修一] 9:10-12:10	
13:00	昼食	実行委員会 12:10-13:10
	【シンポジウム2】 トキシコメタロミクスの展開 S2-1~4	【口頭発表1(一般)】 核医学・錯体化学・分析化学からの メタロミクス研究へのアプローチ(I) O1-1~5
14:00	[小椋康光・中西 剛] 13:10-14:30	[金山洋介、小谷 明] 13:10-14:25
		休憩
15:00		【口頭発表2(一般)】 金属輸送からのメタロミクス研究 O2-1~3 [安井裕之] 14:35-15:20
	【シンポジウム3】 金属輸送とその機能(I) S3-1~4	休憩
16:00	[姫野誠一郎・武田厚司] 15:30-16:50	【口頭発表3(一般)】 核医学・錯体化学・分析化学からの メタロミクス研究へのアプローチ(II) O3-1~6
17:00		[米田誠治、稲垣和三] 15:30-17:00
18:00	鈴木和夫先生追悼講演会 17:00-18:05	
18:30		
	懇親会(カフェテリア「ソフィア」)18:30~20:30	

[ ]内は座長

# 第1回メタロミクス研究フォーラムスケジュール(第2日目)

11月29日(土)

	第1会場 (大会議室)	第2会場 (中会議室)
9:00	<b>【シンポジウム4】</b> 先端分析化学・金属錯体化学から メタロミクスへ S4-1~9  [榎本秀一、梅村知也、桜井 弘]	<b>【口頭発表4(一般)】</b> 臨床現場と栄養学からの メタロミクス研究展開 O4-1~4 [中西由季子] 9:00-10:00
10:00		<b>【シンポジウム5】</b> 金属輸送とその機能(II) S5-1~5
11:00		[川原正博・廣村 信] 10:00-11:40
12:00		<b>【口頭発表5(一般)】</b> トキシコメタロミクスの展開 O5-1~3 [廣村信] 11:40-12:25
13:00	昼食	
14:00	市民公開講座 「健康の維持とミネラル」  14:00-16:15	
15:00		
16:00		
17:00		
18:00		

[ ]内は座長

## 参加者へのお願い

1. 受付  
昭和女子大学学園本部館 3 階ホワイエにて各日とも 8 : 30 より行います。
2. 会場内では、ネームプレートをご着用ください。
3. ご昼食の用意はございませんので、各自でお願いいたします。

## 講演者と座長へのお願い

### ○講演者の皆様へ

1. 発表時間は、シンポジウム 20 分（講演時間：15 分、質疑応答：5 分）、口頭発表（一般）15 分（講演 12 分、質疑応答：3 分）です。
2. ベルは、シンポジウム：13 分（予鈴）、15 分（発表終了）、20 分（質疑応答終了）、口頭発表（一般）：10 分（予鈴）、12 分（発表終了）、15 分（質疑応答終了）に鳴ります。
3. 講演はパソコン（PC）を用いた液晶プロジェクタ 1 台による発表とします。操作は講演台上のキーボードとマウスで行っていただきます。レーザーポインタもご用意しております。
4. 発表データについて
  - ・ 今回ご用意しておりますコンピュータの OS とアプリケーションは以下の通りです。  
**OS／アプリケーション** Windows Vista／PowerPoint 2007  
MacintoshOSX／PowerPoint 2008, Keynote'08
  - ・ フォントにおける不具合を避けるために、OS 標準フォントをお使いください。
  - ・ データファイル名は「演題番号」「氏名」の順で付けてください。  
例) O3-10 和光一郎
  - ・ 動画や音声ファイルの使用はご自身の責任を持って行ってください。
  - ・ お預かりしたデータは、一時的に PC 受付のサーバーや会場内のパソコンにコピー致しますが、学会終了後に責任を持ってデータを破棄させていただきます。



- ・ ウイルスに感染したメディアをお持ちになる事例が増えております。最新のウイルス駆除ソフトを使用し、事前に忘れずにチェックを行ってください。
5. データの受付は、3階ホワイエのPC受付にて行います。ご自身の発表の1時間前（朝1番のセッションについては30分前）までにはPC受付にて受付を終え、10分前までに会場内の次演者席にお着き下さい。第一日目の講演の受付は8時30分から、第二日目の講演の受付は第一日目の午後及び第二日目の8時30分から開始いたします。なお、28日の朝は、28日午前のご発表者の受付を優先させていただきますので（混雑時）、予めご了承ください
- ・ PC受付でのご発表のデータの修正は出来ませんのでご了承下さい。
  - ・ 総合受付にて参加登録をお済ませでない場合、PC受付はできません。
  - ・ PC受付時間 11月28日（金）8：30～17:00  
11月29日（土）8：30～12:00
6. 原則として発表データは**USBフラッシュメモリー**または**CD-R**（CD-RWは不可）に、発表に使用するファイルのみを記録してお持ちください。（念のため、なるべく2種類以上のメディアにコピーして持参下さい。）
7. 個人PCをご利用頂くことも可能です。その場合には、各会場内のPC技師席へ**講演15分前**にご持参いただき、プロジェクタへの接続動作確認を行い、スムーズなPC接続切り替えにご協力下さいますようお願い申し上げます。また、発表データに動画がある場合やデータ容量が**500MB**を超える場合には、ご自身のPCのお持ち込みをお勧めします。ご自身のPCを持ち込む予定の先生は、事前に事務局までお知らせ下さい。また、パソコンをご持参の場合でも、バックアップとしてメディア（USBメモリースティック、CD-R）をご持参ください。また、パソコンのACアダプターも必ずご持参ください。液晶プロジェクタへの接続端子はミニD-Sub15ピン（外形16 mm x 7 mm）ですので、この規格に合致するものをご用意ください。
8. 発表データのプリントアウトが必要な方は、各自でご準備の上、ご持参ください。

### ○座長の先生方へ

1. 進行時間の厳守をお願いいたします。
2. 討議にてコメントをお願いいたします。
3. 次座長は、指定された席に着いてお待ち下さい。



プログラム

# 第1回メタロミクス研究フォーラムプログラム

11月28日(金)

9:00-9:10 第1会場(大会議室)

開会の辞 榎本秀一(岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科、独立行政法人理化学研究所 神戸研究所)

9:10-12:10 第1会場(大会議室)

シンポジウム1 臨床現場と栄養学からのメタロミクス研究展開

座長 池田 稔(日本大学 医学部 耳鼻咽喉・頭頸部外科)

児玉浩子(帝京大学 医学部 小児科)

木村修一(昭和女子大学大学院 生活機構研究科)

S1-1 「Wilson病と銅代謝」

○児玉浩子、藤沢千恵、志賀勝秋、加賀文彩(帝京大学医学部小児科)

S1-2 「高齢入院患者における血清Cuおよび血清Zn値と病態との関係」

齊藤 昇(宮崎医療センター病院 内科・生活習慣病センター)

S1-3 「亜鉛欠乏と味覚障害」

○池田 稔、生井明浩、平井良治、小野田恵子(日本大学 医学部 耳鼻咽喉・頭頸部外科) 高尾恭一(日本大学 医学部 生理学分野)

S1-4 「メタボリックシンドロームとマグネシウムの密接な関係」

横田邦信(東京慈恵会医科大学 糖尿病・代謝・内分泌内科)

S1-5 「臨床における亜鉛の役割」

小野静一(篠ノ井総合病院 リウマチ膠原病科)

S1-6 「神経変性症における微量金属の役割」

宮嶋裕明(浜松医科大学第一内科)

S1-7 「日本人のモリブデン栄養状態」

吉田宗弘(関西大学化学生命工学部生命・生物工学科食品工学研究室)

S1-8 「栄養素代謝におけるマグネシウムの重要性」

○上原万里子<sup>1</sup>、根元智子<sup>1,2</sup>、松本一朗<sup>2</sup>、岡田晋司<sup>2</sup>、荒井綜一<sup>3</sup>、阿部啓子<sup>2</sup>、鈴木和春<sup>1</sup>(<sup>1</sup>東京農業大学・応用生物科学部・栄養科学科、<sup>2</sup>東京大学大学院・農学生命研究科・応用生命化学専攻、<sup>3</sup>東京農業大学・総合研究所)

S1-9 「アジア開発途上国における貧血改善のための食品栄養強化プログラム」

中西由季子(昭和女子大学大学院 生活機構研究科 ヤマザキパン寄附講座 加齢制御栄養学研究室)

13:10-14:30 第1会場(大会議室)

シンポジウム2 トキシコメタロミクスの展開

座長 小椋康光(千葉大学大学院 薬学研究院)

中西 剛(岐阜薬科大学 衛生学研究室)

S2-1 「環境化学物質トリブチルスズによるグルタミン酸が関与する神経細胞死」

古武弥一郎(広島大学大学院医歯薬学総合研究科)

- S2-2 「核内受容体を介した重金属毒性」  
中西 剛（岐阜薬科大学 衛生学研究室、大阪大学大学院薬学研究科）
- S2-3 「親電子性金属類に対する生体防御系を担う転写因子 Nrf2」  
○角 大悟、外山喬士、熊谷嘉人（筑波大学大学院人間総合科学研究科生命システム医学専攻）
- S2-4 「メチル水銀毒性発現に関わる遺伝子群の siRNA ライブラリーを用いた検索」  
黄 基旭（東北大学 大学院薬学研究科）

### 15:30-16:50 第1会場（大会議室）

#### シンポジウム3 金属輸送とその機能（I）

座長 姫野誠一郎（徳島文理大学 薬学部）

武田厚司（静岡県立大学 薬学部）

- S3-1 「海馬シナプス可塑性における亜鉛の役割」  
武田厚司（静岡県立大学 薬学部医薬生命化学分野、グローバル COE）
- S3-2 「腸管での亜鉛吸収の分子メカニズム」  
○神戸大朋<sup>1)</sup>、Glen K. Andrews<sup>2)</sup>（<sup>1)</sup> 京都大学大学院生命科学研究科 <sup>2)</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Kansas Medical Center）
- S3-3 「アミロイド形成タンパクの高次構造変化と神経毒性に及ぼす金属の影響」  
川原正博（九州保健福祉大学 薬学部 分析学講座）
- S3-4 「肥満・糖尿病状態における生体微量金属元素の代謝吸収過程のイメージング化」  
廣村 信（理化学研究所神戸研究所 分子イメージング科学研究センター メタロミクスイメージング研究ユニット）

### 13:10-14:25 第2会場（中会議室）

#### 口頭発表1（一般）核医学・錯体化学・分析化学からのメタロミクス研究へのアプローチ（I）

座長 金山洋介（独立行政法人理化学研究所 神戸研究所）

小谷 明（金沢大学 医薬保健研究域 薬学系）

- O1-1 「損傷坐骨神経の回復過程における下腿筋群でのタリウムの挙動」  
○田島麻衣、稲岡プレイアデス千春、鷲山幸信、立野勝彦、天野良平（金沢大・医・保）
- O1-2 「N末アミノ酸を置換した <sup>111</sup>In-DOTA 結合 octreotide 誘導体の腎放射能集積に関する検討」  
○北村陽二<sup>1)</sup>、秋澤宏行<sup>2)</sup>、八木美知枝<sup>1)</sup>、清水隆也<sup>1)</sup>、中島 聡<sup>1)</sup>、秋吉佑美<sup>1)</sup>、御船正樹<sup>1)</sup>、斎藤 寛<sup>1)</sup>、荒野 泰<sup>3)</sup>、榎本秀一<sup>1)</sup>、<sup>4)</sup>、佐治英郎<sup>5)</sup>（<sup>1)</sup> 岡大院薬、<sup>2)</sup> 北医療大薬、<sup>3)</sup> 千葉大院薬、<sup>4)</sup> 理研メタロミクスイメージング研、<sup>5)</sup> 京大院薬）
- O1-3 「光合成器官葉緑体の持つ水の光分解機能に対する金属イオンの添加効果」  
○天尾 豊、大橋亜美（大分大学工学部）
- O1-4 「メチル水銀によるソルビトール脱水素酵素の阻害機構」  
○外山喬士<sup>a)</sup>、角大悟<sup>a)</sup>、新開泰弘<sup>b)</sup>、鍛冶利幸<sup>b)</sup>、熊谷嘉人<sup>a)</sup>（<sup>a)</sup> 筑波大学大学院人間総合科学研究科、<sup>b)</sup> 北陸大学薬学部）
- O1-5 「ラット胆汁中ヒ素代謝物におけるグルタチオンと過酸化水素の役割」  
○小林弥生<sup>a)</sup>、平野靖史郎<sup>b)</sup>（独立行政法人国立環境研究所 <sup>a)</sup> 環境健康研究領域、<sup>b)</sup> 環境リスク研究センター）

**14:35-15:20 第2会場 (中会議室)**

**口頭発表2 (一般) 金属輸送からのメタロミクス研究**

座長 安井裕之 (京都薬科大学 代謝分析学分野)

- O2-1 「マンガン脳症とトランスフェリン」  
○阿部啓太、西田雄三 (山形大学理学部 物質生命化学科)
- O2-2 「ラット培養脊髄後根神経節細胞へのセレン取り込み挙動の検討」  
○古賀健太郎、井上美佳、原武 衛、中山守雄 (長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 衛生化学研究室)
- O2-3 「メタロチオネイン及び銅シャペロン Atox1 二重欠損細胞における銅の挙動と銅制御因子の変動の解析」  
○宮山貴光、小椋康光 (千葉大学大学院 薬学研究院)

**15:30-17:00 第2会場 (中会議室)**

**口頭発表3 (一般) 核医学・錯体化学・分析化学からのメタロミクス研究へのアプローチ (II)**

座長 米田誠治 (鈴鹿医療科学大学 薬学部)  
稲垣和三 (独立行政法人 産業技術総合研究所)

- O3-1 「第一遷移系列金属イオン及び金属錯体を用いた腓リパーゼの阻害効果」  
○吉川 豊、栗山芳樹、金岡千明、安井裕之 (京都薬科大学・代謝分析学分野)
- O3-2 「第一遷移系列金属イオン及び金属錯体による脂質過酸化反応の抑制効果」  
○安井裕之、寺嶋典子、中尾好絵、吉川 豊 (京都薬科大学・代謝分析学分野)
- O3-3 「ソフト金属キレート分析法を用いたファイトケラチン合成酵素の活性測定」  
○吉富雄洋、調 知朗、吉村悦郎 (東京大学大学院農学生命科学研究科 分析化学研究室)
- O3-4 「吸入曝露したサマリウムの体内分布と経時変化—マウスを用いた作業曝露モデル実験」  
○篠原厚子<sup>1,2</sup>、熊坂利夫<sup>2</sup>、千葉百子<sup>2,3</sup> (<sup>1</sup> 清泉女子大学人文科学研究科 <sup>2</sup> 順天堂大学医学部 <sup>3</sup> 国際医療福祉大学薬学部)
- O3-5 「海棲生物のセレノメタボローム解析」  
○阿南弥寿美<sup>1</sup>、鈴木紀行<sup>1</sup>、田辺信介<sup>2</sup>、鈴木和夫<sup>1</sup>、小椋康光<sup>1</sup> (<sup>1</sup> 千葉大学大学院薬学研究院、<sup>2</sup> 愛媛大学沿岸環境科学研究センター)
- O3-6 「マイクロ蛍光 X 線イメージングと XAFS 解析による重金属耐性植物ヘビノネゴザにおけるカドミウムの分布と化学形態」  
○三尾咲紀子、柏原輝彦、保倉明子、中井 泉、後藤文之\*、北島信之\*\*、阿部知子\*\*\* (東理大理、\*電中研、\*\*(株)フジタ、\*\*\*理研)

**17:00-18:05 第1会場 (大会議室)**

**鈴木和夫先生追悼講演会**

1. 開会の辞  
桜井 弘 (鈴鹿医療科学大学 薬学部 教授)
2. 黙祷
3. 「鈴木和夫先生のご業績の紹介」  
小椋康光 (千葉大学大学院 薬学研究院 准教授)
4. 「メタロミクス研究の将来展望：鈴木和夫先生の業績に学ぶ」  
原口紘丞 (名古屋大学 名誉教授、放送大学 客員教授)

5. ご親族の挨拶

鈴木蓉子様

6. 閉会の辞

榎本秀一（岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 教授、独立行政法人理化学研究所 神戸研究所 研究ユニットリーダー）

**18:30-20:30 カフェテリア「ソフィア」**

**懇親会**

11月29日(土)

9:00-12:00 第1会場(大会議室)

シンポジウム4 先端分析化学・金属錯体化学からメタロミクスへ

座長 榎本秀一(岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科、独立行政法人理化学研究所 神戸研究所)  
梅村知也(名古屋大学 エコトピア科学研究所)  
桜井 弘(鈴鹿医療科学大学 薬学部)

- S4-1 「オミックス研究に資するプラズマ分光分析用高効率微量試料導入インターフェースの設計開発」  
○稲垣和三、藤井紳一郎、高津章子、朱彦北、鎗田 孝、千葉光一(産業技術総合研究所 計測標準研究部門)
- S4-2 「メタロミクス研究を支援するアクティブポリマーモノリスの開発と応用」  
○梅村知也、小林博治、高崎裕加、原口紘丞(名古屋大学 エコトピア科学研究所 ナノマテリアル科学研究部門)
- S4-3 「微量化スペシエーションによる金属結合タンパク質の分析」  
小椋康光(千葉大学大学院薬学研究院)
- S4-4 「ファイトレメディエーション用重金属蓄積植物に蓄積したCdとAsの放射光蛍光X線イメージング」  
中井 泉(東理大 理)
- S4-5 「新しい微量元素分析技術(ECRIS-MS)による生体内金属元素探査への応用」  
木寺正憲(独立行政法人理化学研究所 仁科加速器研究センター 加速器技術開発グループ イオン源開発チーム)
- S4-6 「半導体コンプトンカメラによる複数分子同時イメージングとメタロミクス研究」  
金山洋介(理化学研究所 分子イメージング科学研究センター メタロミクスイメージング研究ユニット)
- S4-7 「カチオン性制癌白金錯体のDNAとの相互作用様式」  
○米田誠治<sup>1,3,5</sup>、Nicholas P Farrell<sup>2</sup>、Loren D Williams<sup>3</sup>、小谷 明<sup>4</sup>、千熊正彦<sup>5</sup>  
(<sup>1</sup> 鈴鹿医療大薬、<sup>2</sup> ヴァージニア連邦大、<sup>3</sup> ジョージア工科大、<sup>4</sup> 金沢大院薬、<sup>5</sup> 大阪薬大薬)
- S4-8 「シスプラチン耐性がん効く白金(II)錯体」  
○小谷 明<sup>1</sup>、高山 浩<sup>2</sup>、佐藤卓史<sup>3</sup>、千熊正彦<sup>3</sup>(金沢大学医薬保健研究域薬学系<sup>1</sup>、名古屋大学理学研究科<sup>2</sup>、大阪薬科大学<sup>3</sup>)
- S4-9 「4-アルキルアミノ-1-ヒドロキシ-2(1*H*)-ピリミジノン-バナジル錯体の合成とそれらのアポトーシス誘導活性」  
○加藤明良、山口美香、松村有里子(成蹊大学 理工学部 物質生命理工学科)

9:00-10:00 第2会場(中会議室)

口頭発表4(一般) 臨床現場と栄養学からのメタロミクス研究展開

座長 中西由季子(昭和女子大学大学院 生活機構研究科)

- O4-1 「Wilson病の亜鉛薬療法」  
○清水教一、藤原順子、山口之利、青木継稔(東邦大学医学部小児科学第二講座)



- O4-2 「潜在的な亜鉛欠乏がラットの食塩嗜好調節系に及ぼす影響」  
○後藤知子、白川 仁、古川勇次、駒井三千夫（東北大学大学院 農学研究科 生物産業創成科学専攻 栄養学分野）
- O4-3 「食餌中亜鉛シグナルがラットの摂食調節に及ぼす影響」  
○駒井三千夫<sup>1</sup>、竹本雅美<sup>1</sup>、川中子誠<sup>1</sup>、大日向耕作<sup>2</sup>、浅川明弘<sup>3</sup>、後藤知子<sup>1</sup>、白川仁<sup>1</sup>（東北大・院農・栄養<sup>1</sup>、京大・院農・食品生物<sup>2</sup>、神戸大・院医・応用分子<sup>3</sup>）
- O4-4 「異なる投与方法による放射性 Tl<sup>+</sup>のマウス体内代謝挙動の比較検討」  
○鷺山幸信、高橋亮次、長岡三樹矢、高坂祐輝、小田雄一、天野良平（金沢大学 医薬保健研究域 保健学系、金沢大学 医学部 保健学科 放射線技術科学専攻）

#### 10:00-11:40 第2会場（中会議室）

##### シンポジウム5 金属輸送とその機能（II）

座長 川原正博（九州保健福祉大学 薬学部）  
廣村 信（独立行政法人理化学研究所 神戸研究所）

- S5-1 「神経変性疾患と金属イオン」  
○福永浩司、山本由似、塩田倫史（東北大学大学院薬学研究科・薬理学分野、東北大学 21 世紀 COE プログラム「CRESCENDO」）
- S5-2 「カドミウムの毒性と動態におけるさまざまな金属輸送体の役割」  
○姫野誠一郎<sup>1</sup>、藤代 瞳<sup>1</sup>、榎本秀一<sup>2</sup>（<sup>1</sup> 徳島文理大学薬学部・衛生化学、<sup>2</sup> 理化学研究所）
- S5-3 「細胞内セレン運搬の生化学的解析」  
○三原久明、江崎信芳（京都大学化学研究所 環境物質化学研究系 分子微生物科学）
- S5-4 「薬剤耐性における金属輸送の役割」  
○鈴木俊宏、兎川忠靖、櫻庭 均（明治薬科大学 分析化学教室）
- S5-5 「ヒ素の毒性発現における生体分子との相互作用」  
鈴木紀行（千葉大院薬）

#### 11:40-12:25 第2会場（中会議室）

##### 口頭発表5（一般） トキシコメタロミクスの展開

座長 廣村 信（独立行政法人理化学研究所 神戸研究所）

- O5-1 「Serum amyloid A の発現に対するカドミウムとコバルトの影響」  
○松本可南子、淵上美由紀、藤代 瞳、姫野誠一郎（徳島文理大学 薬学部 衛生化学研究室）
- O5-2 「転写因子 MTF-1 を介したマウスメタロチオネイン-I 遺伝子発現にともなうクロマチン構造変化」  
○奥村文香<sup>1</sup>、木村朋紀<sup>1</sup>、伊藤徳夫<sup>2</sup>、曾根知道<sup>1</sup>、磯部正和<sup>1</sup>（<sup>1</sup> 摂南大学 薬学部 毒性学研究室、<sup>2</sup> 大阪大学大学院 薬学研究科 毒性学分野）
- O5-3 「6 価クロムは亜鉛依存的 MTF-1-p300 複合体形成を阻害することでマウスメタロチオネイン-I 遺伝子の転写を抑制する」  
○木村朋紀<sup>1</sup>、Yong Li<sup>2</sup>、奥村文香<sup>1</sup>、伊藤徳夫<sup>3</sup>、中西 剛<sup>4</sup>、曾根知道<sup>1</sup>、磯部正和<sup>1</sup>、Glen K. Andrews<sup>2</sup>（<sup>1</sup> 摂南大学 薬学部 毒性学研究室、<sup>2</sup> カンザス大学メディカルセンター 分子生物学研究室、<sup>3</sup> 大阪大学大学院 薬学研究科 毒性学分野、<sup>4</sup> 岐阜薬科大学 衛生学研究室）

14:00-16:15 第1会場(大会議室)

市民公開講座 「健康の維持とミネラル」

司会 榎本秀一(岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科、独立行政法人理化学研究所 神戸研究所)

1. 「生命と金属の世界—メタロミクスへの道」  
原口紘丞(名古屋大学 名誉教授、放送大学 客員教授)
2. 「金属なしでは生きられない」  
桜井 弘(鈴鹿医療科学大学 薬学部 教授)
3. 「アンチエージング(加齢制御)とミネラル」  
木村修一(昭和女子大学大学院 特任教授、東北大学 名誉教授)
4. パネル討論



# シンポジウム要旨

## Wilson 病と銅代謝

○児玉浩子、藤沢千恵、志賀勝秋、加賀文彩  
帝京大学医学部小児科

先天性銅代謝異常症である Wilson 病は銅輸送 ATPase (ATP7B) の遺伝子異常症で、ATP7B が機能しないため、様々な臓器に銅が蓄積する疾患である。ここでは今後の臨床的課題を考えたい。

遺伝・発症頻度：常染色体劣性遺伝で、発症頻度は約 3.5 万人に 1 人、保因者は 100-120 人に 1 人と、比較的発症頻度が高い。染色体 13.3 に位置する銅輸送 ATPase (ATP7B) の遺伝子異常であることが 1993 年に明らかになった。患者の遺伝子変異は非常に多彩で、今まで 300 以上の変異が報告されているが、日本人を含むアジア人では Arg778Leu が多く、欧米人では His1069Gln が多い。

病態：正常肝での銅の分泌経路は胆汁と血液への分泌である。正常肝細胞では、銅は ATP7B によりサイトソルからゴルジ体に輸送され、アポセルロプラスミンと結合して、ホロセルロプラスミンとなり血液中に分泌される。胆汁への分泌は、COMMD1 と ATP7B の相互作用による (図 1)。したがって ATP7B が機能しない Wilson 病では、肝臓から胆汁への分泌と血液への分泌の両方が障害され、肝臓に銅が著明に蓄積する。肝臓に蓄積した銅はセルロプラスミンと結合しないでフリー銅として血液中にオーバーフローし、それが脳、腎など全身の臓器への銅蓄積の原因であると考えられている。

症状・所見：肝障害、神経障害、関節炎、血尿など初発症状は様々である。そのため診断が遅れる例がしばしばある。多くの症例では血清銅・セルロプラスミンは低下しているが、まれに正常値を示す本症患者も見られる。肝臓には著明に銅が蓄積し、尿中銅排泄も増加している。

治療・予後：早期からキレート薬または亜鉛内服で治療を行うと予後良好とされている。発症前に診断された患者も治療を行う。神経型では治療によっても神経症状があまり改善しない例がある。劇症型肝不全で発症した場合は肝移植が有効である。長期生存患者で肝細胞癌の発症が報告されている (表 1)

今後の課題：①診断がしばしば遅れて、症状が進行する例がある、②神経型では初期治療時に神経症状の悪化が見られる、③怠薬し、予後不良になる患者がいる、④肝細胞癌を発症する患者が増えているなどが今後の課題と考えられる。

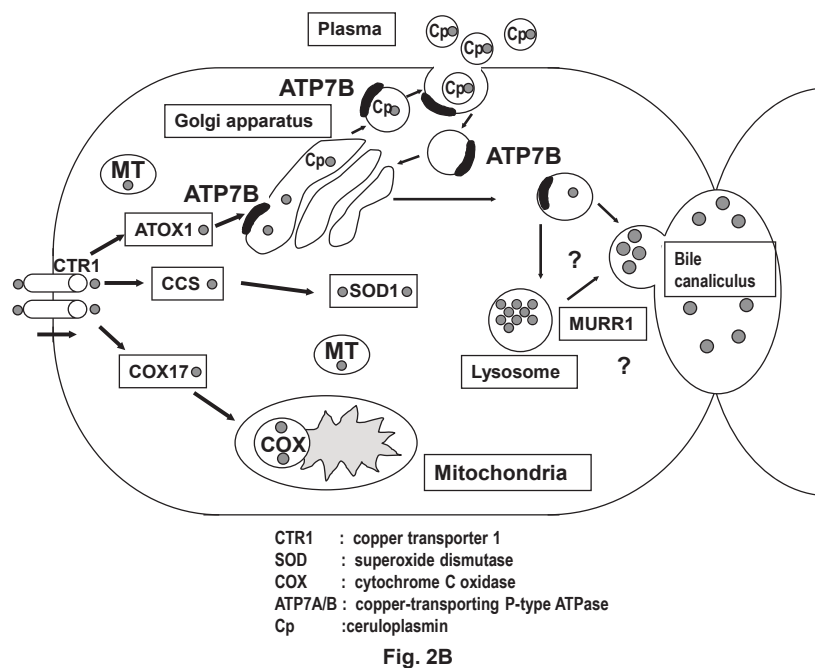


Fig.1 Copper metabolism in the normal hepatocytes

**Table1 The comparison of HCC between WD and non-WD patients (patients in Liver cancer study in Japan).**

	WD Patients	Patients in LCS-J
<b>N</b>	<b>25</b>	<b>67,514</b>
<b>Sex ratio (male/female)</b>	<b>4.0:1</b>	<b>2.9:1</b>
<b>Mean age at diagnosis of HCC (year)</b>		
<b>Male*</b>	<b>39.4±14.6</b>	<b>63.9±1.4</b>
<b>Female</b>	<b>48.3±19.3</b>	<b>67.3±1.4</b>
<b>Virus infection</b>		
<b>HBV infection</b>	<b>8.3%</b>	<b>15.0-16.8%</b>
<b>HCV antibody</b>	<b>0.0</b>	<b>69.6-76.0%</b>
<b>Alpha-fetoprotein</b>		
<b>Normal range</b>	<b>9.0%</b>	<b>33.1-37.5%</b>
<b>Singhtly-extremely higher</b>	<b>91.0%</b>	<b>31.6% - 62.4%</b>
<b>Pathological examination</b>		
<b>Liver cirrhosis</b>	<b>100%</b>	<b>71.0-85.0%</b>
<b>Well differentiated</b>	<b>57.1%</b>	<b>29.5%</b>
<b>Moderately differentiated</b>	<b>28.6%</b>	<b>58.5%</b>
<b>Poorly differentiated</b>	<b>14.3%</b>	<b>10.7%</b>

## 高齢入院患者における血清Cuおよび血清Zn値と病態との関係

○齊藤 昇

宮崎医療センター病院 内科・生活習慣病センター

### 【目的】

銅 (Cu) は銅酵素として細胞呼吸, 鉄酸化, 抗酸化, 神経伝達物質の生合成, 結合組織形成などに関与する。Cu含量の少ない経腸栄養流動食 (以下 流動食) が汎用されていた8年位前には低Cu血症例が多かった。そこで、高齢入院患者につき低Cu血症の発生, 改善, 臨床症状, 予後などを調べた。血清亜鉛 (Zn) の軽度低値も多く、その一因に血清アルブミンの低値が関係するか調べた。

### 【方法】

高齢入院患者 300 例の男女例が対象で、45 - 100 歳におよぶ。病院食経口摂取例 (経口食例) と流動食例であった。これら症例につき早朝空腹時に採血・採尿し、Cuを比色法、Znを原子吸光度法、セルロプラスミン (Cp) をネフェロメトリー法で測定した。尿のCuとZnは尿クレアチニン (Cr) で補正した。経口食のCuとZn含量は5訂食品成分表から計算された。

### 【結果および考察】

経口食例では低Cu血症は非常に稀であった。他方、流動食例ではCu含量の少ない流動食を汎用していた約8年前には低Cu血症が多発した。Cu含量1000kcal当り0.1mgと少ない流動食を約6ヶ月使用すると、男女とも血清Cuは正常値から低値となった。この低Cu血症例にCuを0.6mg含む流動食を4.4ヶ月使用すると血清Cuは正常値となった。血清Cu (正常は70 - 132  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) が20  $\mu\text{g}/\text{dl}$  以下と極端に低くなると、白血球数・好中球数が減少し、Hbも減少した。低Cu血症で重症貧血の45歳女性例に骨髓生検が行われ、好中球と赤血球の前駆細胞の成熟障害が観察された。1000kcal当り、0.8mgのCuを含む流動食 (L8旭化成ファーマ) を20ヶ月使用し、血清Cuは正常値を維持していた。(男性で、0.96mg/日、女性で 0.8mg/日) L8を用いて低Cu血症を改善した4ヶ月迄の経過 (6例) で、リンパ球数は増加傾向、T細胞とB細胞は減少傾向であったが有意でなかった。

BoS等は Cu摂取量を1日0.99mgと1.44mgおよび2.08mgとを比較すると血清Cuも増加し、hs-CRPと血漿 nitorotyrosine が増加し、抗酸化状態は低下すると報告している<sup>1)</sup>。これらから血清Cuは低過ぎても、高過ぎても好ましくないことになる。Cuの anti-oxidant と pro-oxidant の両面が推定される。

血清Znは経口食例および流動食例で正常下限と軽度低値が多かった。

1000kcal当り12mgのZnを含むL8の使用でも血清Znは不変に近かった。Znは血中でアルブミン (Alb) と結合する割合が高く、血清Znと血清Albとの間に正相関がみられる。加齢により血清Znと血清Albは低値となり、血清Cuは不変で、Cu/Znは高くなった。高齢入院患者の長管骨骨折12例で、血清Mg、血清ZnとHbが減少していた。高齢患者が食欲不振で入院した場合、血清Znの低値例もみられる。

### 【参考文献】

- 1) BoS et al (2008) J Nutr 138, 305 - 310.

## 亜鉛欠乏と味覚障害

○池田 稔、生井明浩、平井良治、小野田恵子  
日本大学 医学部 耳鼻咽喉・頭頸部外科  
高尾恭一  
日本大学 医学部 生理学分野

## I. 味覚障害と亜鉛

味覚障害は末梢および中枢の味覚伝導路に対する直接的な障害によるものから、他疾患により二次的に生じてくるものまで種々のものがあり、その病態は多様である。これまでその発症に関与する因子として検討がすすめられてきたのは、主に必須微量元素のひとつである亜鉛との関連性である。

味覚障害発症における亜鉛の関与と、味覚障害に対する亜鉛補充治療の効果について述べる。

## 1. 亜鉛欠乏ラットにおける味覚障害

亜鉛欠乏ラットでは味覚障害が生じる。それらの動物では軟口蓋の味覚乳頭が減少し、形態的にも乳頭の扁平化、味孔内に観察される味細胞先端の microvilli の消失などが観察されている。また、味細胞先端の microvilli の減少・断裂、electron dense substance の消失、dark granule の減少、味細胞の空胞化などがみられている。動物で観察されたこのようは変化は、ヒトの亜鉛欠乏性味覚障害例においてもみられる。

また、正常ラットの味細胞は約 250 時間という短い期間で上皮細胞から次々に新生・交代を繰り返し、味覚の受容器としての機能を維持している。しかし亜鉛欠乏ラットでは、この turnover time が延長し、味覚障害発現の一つの原因であると推測される。

## 2. ヒトにおける亜鉛欠乏性味覚障害

ヒトの亜鉛欠乏症で味覚障害が発現することは、すでに 40 年前に報告されている。味覚障害例における低亜鉛血症は、全身疾患に伴った味覚障害の例や薬剤服用を原因とした味覚障害例にも多くみられ、味覚障害の多くの場面で、その原因として関与している可能性が推測されている。

## II. 味覚障害に対する亜鉛治療の効果

味覚障害の治療法はその原因により異なるが、味覚障害の発現機序に亜鉛欠乏が関与していると思われる場合には亜鉛剤の投与が行われる。亜鉛治療が特に有効なのは、亜鉛欠乏性味覚障害と特発性味覚障害である。

## 1. 治療に用いられる亜鉛剤

一般製剤として処方可能な唯一の亜鉛を含有した薬剤が、消化性潰瘍薬であるポラプレジンクである。ポラプレジンク 75mg に亜鉛としては約 17mg が含有されている。通常 1 日 150mg の服用が行われるため、亜鉛として 1 日約 34mg が投与される。以前よく使用されていた硫酸亜鉛に比べてポラプレジンクは市販薬であり、臨床で使用されている。

## 2. 亜鉛剤による味覚障害の治療効果

味覚障害に対する治療法で、その効果について二重盲検法を含む十分な検討が行われてきたのは、亜鉛内服治療である。



1970 に Henkin らが金属キレートによると思われる薬剤性味覚障害に対し、亜鉛内服治療が有効であったことを報告した。さらに Henkin らは 1976 年に味覚障害に対する亜鉛治療の有用性に関する二重盲検を行った。この検討で用いられた対象症例は、亜鉛欠乏とは必ずしも関係しない多様な原因からなる症例群であり、亜鉛治療による有効性は認められなかった。しかしその後の腎不全症例や放射線照射による味覚障害例においておこなわれた亜鉛治療に対する二重盲検法での検討では、その有用性が指摘されてきた。

味覚障害に対する亜鉛剤の有効性に関する二重盲検は本邦でも行われている。亜鉛剤にはグルコン酸亜鉛およびピコリン酸亜鉛が用いられている。検討は亜鉛欠乏性味覚障害および特発性味覚障害を対象として行われており、亜鉛剤内服治療が有意に有効であることが報告されている。

ポラプレジンクによる亜鉛治療の全体的な有効率は 69%であり、薬剤性、特発性、全身疾患性、亜鉛欠乏性の味覚障害での有効率は、66%から 71%であった。また、ポラプレジンクによる治療の有効率は、65 歳以上の症例でも 73%であり、亜鉛剤による治療効果は、高齢者に対しても変わらないものと思われる。

最近味覚障害に対するポラプレジンクの有用性について、prospective な control study が行われ、その有用性が示されている。

#### IV. 結語

味覚障害の病態について亜鉛欠乏との関係を中心に述べた。亜鉛内服治療は味覚障害に有用な治療法である。特に亜鉛欠乏性味覚障害と特発性味覚障害はその良い適応である。高齢者においても治療の有効性が認められている。

#### SUMMARY

味覚障害の原因は多様である。頻度が高いのは亜鉛欠乏や他疾患に対する服用薬剤によるものなど、二次的な障害である。これまで味覚障害の発症機序に関与する因子として十分な検討がすすめられてきたのは、必須微量元素のひとつである亜鉛である。本稿では様々な味覚障害の病態について、主に亜鉛との関連性を中心に述べた。また、味覚障害に対する亜鉛補充治療の有効性について述べた。

Key words: 味覚障害, 亜鉛, 亜鉛欠乏, 治療, 亜鉛補充,

## メタボリックシンドロームとマグネシウムの密接な関係

○ 横田邦信

東京慈恵会医科大学 糖尿病・代謝・内分泌内科

マグネシウム（以下 Mg）は細胞内ではカリウム（K）に次いで多く、細胞外では4番目に多く存在する2価の陽イオンである。Mgは約350種類に及ぶ酵素活性・維持に不可欠な主要・必須ミネラル（7種類）のひとつである。特に、ブドウ糖代謝におけるATP（アデノシン三リン酸）産生過程で重要な役割を担うと共に、細胞内外のミネラルバランスを制御（細胞内へのカルシウム（Ca）イオンの流入制御）も担うことから、“天然のCa拮抗薬”との異名があるが、これまでCaの陰に隠れ、“忘れられたミネラル”とも言われてきた長い歴史がある。Mgはヒト成人の体内には約25g存在する。骨組織に50%以上が存在し、軟部組織（主に筋肉）にも多く存在するが、細胞外液には約1%弱しか存在しない。Mgは多くの物質代謝に関与するほか、筋収縮・弛緩、神経興奮伝達、核酸合成、ホルモン分泌、酸化ストレス等においても重要な働きを担い極めて多彩な生理作用を有する。

本講演では、メタボリックシンドロームとMgの関係、特に、Mgと疾患の歴史的背景からMg摂取不足の現状、問題と対策提言について述べる。

Mgと疾患との関連は、岡山大学小林純名誉教授が日本各地の水の酸度を疫学的に研究されたことに端を発する。小林教授の報告に世界中が注目し、以後、多くの疫学的研究がなされ、循環器疾患（特に冠状動脈疾患）の発症にはCaよりMgが深く関わるということが明らかにされた。さらには、Mg摂取不足が高血圧・2型糖尿病発症、インスリン抵抗性発現、メタボリックシンドローム等にも密接に関わることは、WHO（2006年）の最終報告にも明記されたところである。今日では、Mgは“抗ストレス”、“抗アンチエイジング”、“抗メタボ”ミネラルとも称され、これこそが、Mgが健康・長寿に必須なミネラルといわれる所以である。

メタボリックシンドロームは高コレステロール血症(高LDL-c血症)とは独立して動脈硬化になり易い(ハイリスクな)病態であり、ひとつのキープレイヤーが存在することによって複合型の病態が起こるひとつの疾患単位と定義されている。そしてこのキープレイヤーとは“インスリン抵抗性”であるが、わが国でのメタボリックシンドロームの定義は、腹部肥満(内臓脂肪蓄積型)を基盤にしたインスリン抵抗性が上流に存在し、それぞれの危険因子の程度が軽度であっても、糖代謝異常、脂質代謝異常、高血圧を複数合併し、動脈硬化性疾患を起し易くなる病態としている。

肥満における大型化した脂肪細胞からは多彩な生理活性物質であるアディポサイトカインの分泌異常が見られる。肥大化した細胞からは抗動脈硬化作用を示すアディポネクチンの分泌は減少し、TNF- $\alpha$ 、FFA、PAI-1、レジスチンなどの分泌は逆に亢進し、これらがインスリン抵抗性を惹起する。

一方、Mg 不足はインスリンの受容体への親和性を減弱させ、同時にチロシンキナーゼ活性を低下させ、特異的受容体の自己リン酸化障害を介してインスリン抵抗性を惹起することも明らかにされた。また、Mg 不足はLPL（リポ蛋白リパーゼ）およびLCAT（レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ）活性を低下させ、その結果、高中性脂肪血症（高TG血症）、低HDL-c血症を引き起こす。さらに、MgはCaチャンネルブロッカー（L&N型）であることから、その不足は血管平滑筋細胞を収縮させる方向に作用すると共に交感神経活性が亢進し血圧上昇をもたらす。以上のように、肥満とMg不足に基づくインスリン抵抗性はさらに耐糖能異常を来らし、ここにメタボリックシンドロームの構成要因が出揃う。こうした機序に加え、Mg不足は直接アディポネクチンの分泌を減少せしめ、一方、CaとMgの摂取アンバランス（Ca/Mg摂取比率の増大）を介して動脈硬化を進展させる可能性もある。

実際、疫学研究でも、若年からMg摂取量が多いとメタボリックシンドロームの発症リスクが31%減少する（Ka He ; Circulation 2006）等の報告が次々と発表されている。

ところで、戦後の食生活の特徴は、'65-'70年に掛けてMgの豊富な全粒穀物（大麦・雑穀等）の摂取量が激減したこと、また、それ以降の脂肪分（主に飽和脂肪酸）の過剰摂取と、緑黄色野菜や海産物などの摂取量が半減した、いわゆる”半欧米化”である。そしてこの穀物摂取量（食事性Mg摂取量）が激減した時期と2型糖尿病の有病率が増加し始めた時期が一致することから、2型糖尿病の発症要因のひとつが慢性的Mg摂取不足である可能性がある（Mg仮説：横田）。

MgはCaと並んで食事摂取基準（旧栄養所要量）を満たしてない主要ミネラルのひとつであるが、Mgは現代人には明らかに不足（男性30-49歳で約120mg/日以上）状態にある。しかも過剰な脂肪分摂取はMgと鹸化反応を起こし、また過剰な塩分摂取は尿中Mg排泄を促進するため、さらにMg不足に拍車が掛かることになる。

このように慢性的Mg摂取不足がメタボリックシンドロームの大きな発症要因に、さらには2型糖尿病のひとつの発症要因にもなっていることが明らかであることから、国がこの現状を認知して、早急に国民への啓蒙と食生活の見直しを実践し、また、食育を重要視する政策を講ずることが急務であり、このことがメタボリックシンドローム/2型糖尿病の発症を未然に防ぐことに繋がると考える。今後、更なる基礎的・臨床的研究の成果も期待されて止まない。

## 臨床における亜鉛の役割

○小野 静一

篠ノ井総合病院 リウマチ膠原病科

関節リウマチは関節痛や関節腫脹の他にもさまざまな自覚症状が発現し、患者の QOL を著しく損ねる要因となっている。また関節機能再建手術後に縫合不全を起こしたり、遅発感染を起こしたりするため治療に難渋することがある。演者も手術後、皮膚の皮薄化が進行し多数の皮下出血を発症、最終的に感染症で死亡した症例を経験しています。関節リウマチ治療における QOL の悪化をいかに改善、予防するかは重要な課題です。

一方、関節リウマチ患者では血清亜鉛値の低下が認められている。亜鉛は創傷治癒、皮膚の安定化、ホルモンの活性化、精神・神経の安定化、免疫能の維持、活性酸素の消去などに深く関与していることから、関節リウマチ患者の QOL 改善にも亜鉛補充が必要であると考え亜鉛含有胃潰瘍治療薬ポラプレジンクを用いて検討を行った。なお長野県では、ポラプレジンクは「亜鉛欠乏症」にて保険適応が認められている。

血清亜鉛値  $70 \mu\text{g/dL}$  未満の関節リウマチ患者にポラプレジンクを6ヶ月間投与し、かつ従来からの関節リウマチ治療薬に変更のなかった81例について血清亜鉛値の変動、自覚症状の改善の有無、DAS28 について調査した。その結果、血清亜鉛値増加症例は64例(79.0%)であり、これらの症例ではCRPの有意な改善およびDAS28の改善が認められた。自覚症状については精神不安定および味覚異常の改善がみられた。また関節痛、関節腫脹、疲労感、肌荒れ、口内炎などの自覚症状については血清亜鉛値不変症例(17例)も同様に改善していた。しかし、血清亜鉛値低値にもかかわらずポラプレジンクが投与できなかった症例19例の自覚症状の改善は全く認められずまたDAS28の改善もなかった。

以上の結果から関節リウマチ患者に対して亜鉛補充は、QOLの改善につながることを示唆された。

## 参考文献

- 1) Ono S, Kawate K, Suzuki S, Urano F aka, Matsui T (2008) J. Jpn. Pharmacol. Ther. 36. 899-907.
- 2) Sato S et al (2005) J. Joint Surg. 24. 44-50.



## 神経変性症における微量金属の役割

○宮嶋裕明

浜松医科大学第一内科

微量金属は種々の重要な蛋白質、酵素の構成要素で、生命維持に必須である。一方、銅や鉄などは活性酸素やフリーラジカルの産生を強力に触媒するので、アポトーシス反応、細胞膜の破壊、蛋白質の凝集などを促進する。したがって、生体内の金属は欠乏あるいは過剰にならないように厳密に調整されている。しかし、その分子機構、なかでも中枢神経系での金属代謝はほとんど解明されていなかった。

私どもが脳内に鉄沈着を来す神経変性症 aceruloplasminemia を報告した頃より、神経系の金属代謝が注目されるようになり、最近ではアルツハイマー病、パーキンソン病、プリオン病などでも微量金属の関与が報告されている。

## 1. 脳内の鉄動態

血液中のトランスフェリン鉄は脳血管内皮のトランスフェリン受容体を介して血液脳関門を通過し、脳脊髄液の吸収から循環系に戻っている。しかし脳の鉄必要量は血液からの供給量よりも多く、脳内では鉄サイクルを形成して鉄を再利用していると考えられる。このため、体内の鉄欠乏あるいは鉄過剰の影響は脳内に及ぶことは少なく、代表的な鉄過剰症である遺伝性ヘモクロマトーシスでも体内への過剰な鉄蓄積はあるものの脳への異常鉄沈着は認められない。遺伝性の鉄代謝異常症である aceruloplasminemia<sup>1)</sup>や neuroferritinopathy<sup>2)</sup>は、脳内の鉄サイクルの概念を支持し、脳内の鉄ホメオスターシスが崩れると神経変性症を生じる可能性を示唆した。

## 2. 金属が介在した蛋白質の凝集が病態に関与する神経変性症

アルツハイマー病を特徴づける病理学的所見は、神経細胞外に沈着するアミロイドβ蛋白質(Aβ)を主要構成成分とする老人斑、神経細胞内に蓄積するリン酸化したタウ蛋白質を主要構成成分とする神経原線維変化、および選択的な神経細胞脱落である。なかでもAβの沈着は最も早期に生じる変化で、それに続いて神経原線維変化が形成され、その頃から神経細胞が減少し、海馬や皮質連合野の神経ネットワークが崩壊して、徐々に認知症としての臨床症状が顕在化する。しかし近年、凝集・沈着したAβよりも可溶性のAβが数個から数十個重合したオリゴマーによるシナプス変性が神経細胞の脱落においてより重要であることが注目されている。このオリゴマーAβの形成には鉄、銅、亜鉛などの微量金属の存在が重要であることが分かった<sup>3)</sup>。

このように生理的に発現した蛋白質が重合してアミロイド線維を形成し、病態の形成に関与するのはアルツハイマー病だけではなく、「コンフォメーション病」の範疇でとらえられる多くの神経変性症が挙げられる。これらの疾患では蛋白質の重合に微量金属が作用しており、パーキンソン病のαシヌクレイン<sup>4)</sup>、プリオン病などでも観察されている。

## 【参考文献】

1. Miyajima H, et al: Neuropathol (2003) 23: 345-350.
2. Curtis AR, et al: Nat Genet (2001) 28: 350-354.
3. Haass C, et al: Nat Rev Mol Cell Biol (2007) 8: 101-112.
4. Uversky VN: J Neurochem (2007) 103: 17-37

## 日本人のモリブデン栄養状態

○吉田宗弘

関西大学化学生命工学部生命・生物工学科食品工学研究室

モリブデン (Mo) は、栄養上必須の微量元素として位置付けられている。しかし、ヒトの Mo 欠乏は、高カロリー輸液の長期投与による一例のみであり、食事性のものは知られていない。わが国の食事摂取基準では、成人の Mo の推奨量を 20~25  $\mu\text{g}$ 、上限値を 230~320  $\mu\text{g}$  としている。ここでは、日本人の Mo 栄養の現状について、われわれが得ている結果を紹介する。

1. 食品中の Mo 含有量と日本人の Mo 摂取量の推定<sup>1)</sup>

種々の食品の Mo 濃度を ICPMS を用いて測定した。穀物と豆類は概ね 0.5~2.0  $\mu\text{g}/\text{g}$  の Mo を含むが、動物性食品は Mo を低濃度 (0.1  $\mu\text{g}/\text{g}$  未満) にしか含有していなかった。測定結果と食品群別摂取量より、日本人の平均的な Mo 摂取量が、欧米よりもやや多く、食事摂取基準の上限値に近い 225  $\mu\text{g}/\text{日}$  であり、コメと大豆が主要な供給源であることを示した。

2. 日本人の母乳 Mo 濃度<sup>2,3)</sup>

全国各地より収集した母乳 70 例について Mo 濃度を測定した。その平均値±標準偏差、範囲、中央値、幾何平均値は、 $4.5 \pm 4.6$ 、0.8~34.7、2.9、3.4  $\text{ng}/\text{ml}$  だった。これとは別に収集した母乳 79 例について同様に測定したところ、平均値±標準偏差、範囲、中央値、幾何平均値は、 $5.4 \pm 5.3$ 、 $< 0.1 \sim 25.9$ 、3.2、3.6  $\text{ng}/\text{ml}$  だった。2つの測定調査の中央値の平均値 (3.0  $\text{ng}/\text{ml}$ ) と日本人女性の平均泌乳量 (780 ml) から、日本人乳児 (0~5 ヶ月児) の Mo 摂取目安量は 2.3  $\mu\text{g}/\text{d}$  と算定できる。

3. 日本人の血清 Mo 濃度<sup>4)</sup>

成人男女 70 名について、血清 Mo 濃度を測定した。その平均値±標準偏差、範囲、中央値、幾何平均値は、 $1.21 \pm 1.34$ 、 $< 0.1 \sim 9.11$ 、0.90、0.81  $\text{ng}/\text{ml}$  であり、2  $\text{ng}/\text{ml}$  をこえる者は 6 名 (8.6%) に過ぎなかった。軽度の肝機能低下者において、血清 Mo 濃度が高い傾向を認めた。肝機能低下者を除いた 55 名の幾何平均値と幾何標準偏差をもとに、日本人の血清 Mo の参照範囲を 0.10~4.73  $\text{ng}/\text{ml}$  と見積もった。

以上の日本人の母乳、および血清 Mo 濃度は、欧米の報告よりもやや高いものであり、日本人の高 Mo 摂取量に対応したものと考えられる。

4. 成人日本人女性を対象にした Mo 出納試験<sup>5)</sup>

成人日本人女性を対象にして Mo 出納試験を 4 回実施した。試験における Mo 摂取量の範囲は 145~318  $\mu\text{g}/\text{g}$  であり、日本人の Mo 摂取の範囲をほぼカバーできていた。この摂取量の範囲では、Mo 出納は平衡状態を維持していること、および食事 Mo の吸収率が 90%以上であり、吸収 Mo の 90%以上が速やかに尿に排泄されることが明らかとなった。

【引用文献】

- 1) Hattori H, Ashida A, Itô C, Yoshida M. *J Nutr Sci Vitaminol* 2004; 50: 404-9.
- 2) 吉田宗弘、伊藤智恵、服部浩之、土田 博、米久保明得. 微量栄養素研究 2004; 21, 59-64.
- 3) Yoshida M, Takada A, Hirose J, Endô M, Fukuwatari T, Shibata K. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008; 72: 2247-50.
- 4) Yoshida M, Ôta S, Fukunaga K, Nishiyama T. *J Trace Elem Med Biol* 2006; 20: 19-23.
- 5) Yoshida M, Hattori H, Ôta S, Yoshihara K, Kodama N, Yoshitake Y, Nishimuta M. *J Trace Elem Med Biol* 2006; 20: 245-52.

## 栄養素代謝におけるマグネシウムの重要性

○上原万里子,<sup>1</sup> 根元智子,<sup>1,2</sup> 松本一朗,<sup>2</sup> 岡田晋司,<sup>2</sup> 荒井綜一,<sup>3</sup> 阿部啓子,<sup>2</sup> 鈴木和春<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京農業大学・応用生物科学部・栄養科学科, <sup>2</sup>東京大学大学院・農学生命研究科・

応用生命化学専攻, <sup>3</sup>東京農業大学・総合研究所

【目的】生命維持に関わるマグネシウム(Mg)の重要性は古くから知られており、Mg欠乏により引き起こされる生理・生化学的変動については数多くの報告がなされてきたが<sup>1-3)</sup>、栄養素代謝全般に与える影響についての包括的な理解は不十分である。そこで本講演では、Mg欠乏ラットを用い、栄養素代謝の中心をなす肝臓を試料として行ったDNAマイクロアレイ解析による遺伝子発現の変動結果と既知のMg欠乏による生理・生化学値の変化との関係について得られた知見を概説する。

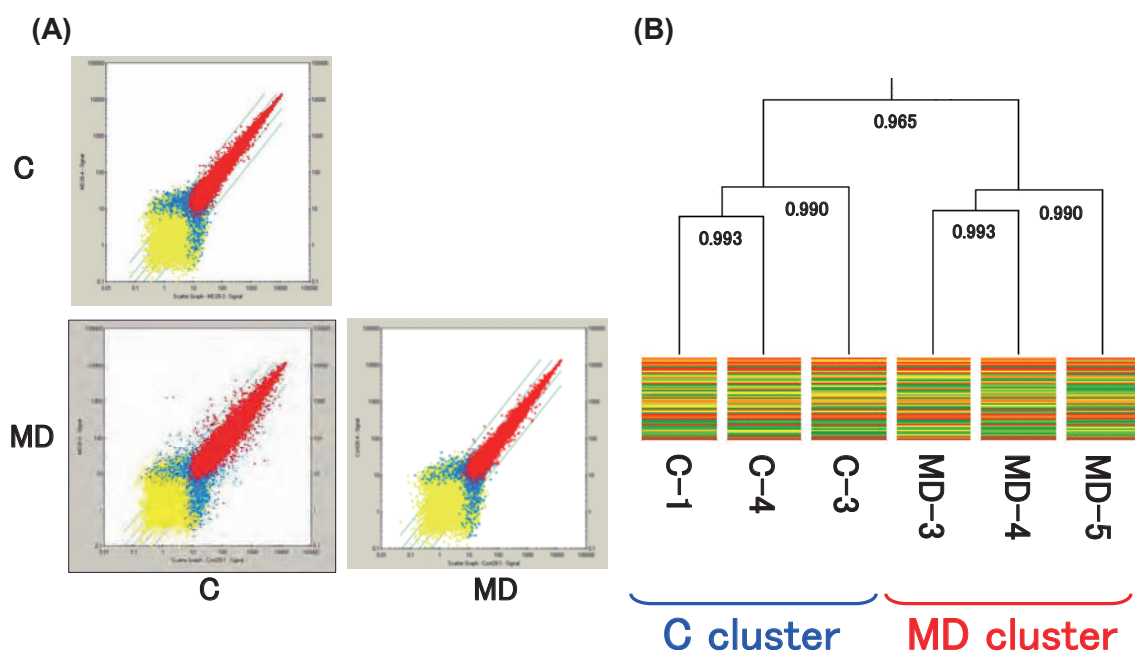
【実験方法】被験動物として4週齢 Wistar 系雄ラットを用い、AIN-93G 飼料組成より酸化 Mg を除いた Mg 欠乏食を投与し、28 日間の飼育観察を行った。対照として正常 Mg 投与群を設け、摂食量の低い Mg 欠乏食投与群の摂食量に合わせた制限給餌を行った。両群より体重の揃った各3個体の肝臓から RNA を抽出後、精製し、cDNA、cRNA を合成し、プローブ数 31099 の GeneChip Rat Genome Array 230 2.0 にハイブリダイゼーションさせた。その後、Stain、Scan を行い、Genechip Operating Software (GCOS) を用いて単解析（蛍光シグナルの数値化）と散布図の作成および Pearson の相関係数を求め、クラスター解析を行った(Fig. 1)。

【結果および考察】最終的に GCOS で得られたデータを基に GeneSpring にて統計解析を行ったところ、Mg 欠乏ラットの肝臓では多くの遺伝子発現が変化することが示された。また倍数変化が2倍以上の有意な変化を示す遺伝子は734プローブと、Mg 欠乏食投与によって発現が大きく変化する遺伝子も多く、Mg 欠乏が肝臓の遺伝子発現に大きく影響していることが示唆された。Mg 欠乏食投与により発現変化を示した遺伝子には糖質代謝、脂質代謝、タンパク質/アミノ酸代謝、ビタミン代謝、核酸代謝、生体異物代謝、免疫応答、輸送、細胞増殖および転写調節因子などの様々な機能に関与するものが含まれており、特に栄養素の代謝については生理・生化学的指標の変化と結び付けられるような遺伝子の発現変化、また生化学データでは捉えることが出来ない変化など、Mg 欠乏食投与による栄養素代謝への影響を理解する上で重要な知見が得られた(Table 1)。

### 【参考文献】

- 1) Nemoto T, Matsuzaki H, Uehara M, Suzuki K (2006) *Magnes. Res.* **19**, 19-27.
- 2) Uehara M et al.(2001) *Advances in magnesium research: nutrition and health*, 291-296, John Libbey & Company Ltd., France.





**Fig. 1 Scatter Plotting (A), and Pearson's Correlation Coefficient Analysis and Cluster Analysis (B)**

Greater or lesser extents of gene expression differences were observed between the control (C) group and the Mg deficient (MD) group.

**Table 1. Significant Classification of Up- and Down-Regulated Genes Found in Dietary Magnesium Deficiency**

Metabolism-based classification	Numbers			Functions-based classification	Numbers		
	Up	Down	Total		Up	Down	Total
Proteins	28	23	51	Transcription	16	27	43
Carbohydrates	5	10	15	Immune Response	18*	9	27
Lipids	19**	18	37**	Nerve system	10	11	21
Amino Acids	3	6	9	Circadian Rhythm	1	5	6
Vitamins	3	2	5	Transport	25	31	56
Cofactors	2	7	9	Cell Proliferation	11	8	19
DNA	3	3	6	Cell Death	13	5	18
Nucleotide	3	2	5	Cell Cycle	12	5	17
Active Oxygens	2	3	5	Cell Growth	5	4	9
Xenobiotic detoxication	1	4	5	Cell Division	6*	2	8
				Cell Homeostasis	4	3	7

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  in Fisher's exact test

## アジア開発途上国における貧血改善のための食品栄養強化プログラム

○中西由季子

昭和女子大学大学院 生活機構研究科

ヤマザキパン寄附講座 加齢制御栄養学研究室

鉄欠乏症は、ビタミンA、ヨードと並んで世界の三大微量栄養素欠乏症として知られており、特に発展途上国では顕著である。鉄欠乏症をはじめ微量栄養素欠乏症の大部分は予防できるものであるが、世界の35億人以上の健康や生産性に及ぼす影響は重大な脅威となっている。女性や子供は生殖や成長のために栄養的な要求量が増加するので、鉄欠乏性貧血や他の栄養素欠乏症になりやすい傾向がある。特に子供の発育や知能の発達を妨げ、母子の健康にも深刻な悪影響を及ぼし、死亡率増加の原因ともなる。更に、この欠乏症は、成人後も労働力の低下や人材の育成を妨げるなど、社会全体の生産性の低下を招き、貧困を助長させる。発展途上国における鉄欠乏性貧血症（IDA）は、幼児期、思春期の男女および妊娠可能期の女性に頻発する栄養障害であり、食物からの鉄供給量不足や食事鉄の難吸収性がその主な要因である。

特定非営利活動法人国際生命科学研究機構（ILSI Japan）では、鉄欠乏性貧血症を撲滅するためのProject IDEA（Iron Deficiency Elimination Action）に参加し、アジアの発展途上国において、それぞれの地域の食生活パターンに合わせて、市販されている主食や調味料に有効な鉄化合物を添加し、毎日の食事を通して欠乏している栄養素を補給することにより、鉄欠乏性貧血症を予防する活動を1998年以来続けている。中国では醤油、ベトナムでは魚醤、フィリピンでは米に鉄を強化するプログラムを展開している。アジア開発途上国における貧血改善のための食品栄養強化プログラムを成功裏に推し進めるためには、強化する食品の選定、強化剤の選定、保存・安定性試験、官能試験、カウンターパートナーの選定、Efficacy Study、Effectiveness Study、モニタリングシステム、マーケットシェア、教育啓発プログラムなど多くのポイントに注意をしなければならない。各項目について、ベトナム、カンボジアでの経験を交えて紹介する。

## 【参考文献】

- 1) 五十嵐香織、中村寛子、中西由季子、中台忠信、岡安誠、蛭沼利江子、榎本秀一、木村修一（2004）*日本栄養・食糧学会誌* **57**, 89-97
- 2) Thuy PV, Berger J, Nakanishi Y, Nga TT, Lam NT, Mai TT, Lynch S, Khan NC(2005) *J Nutr*, **135**, 2596-2601
- 3) Longfils P, Monchy D, Weinheimer H, Chavasit V, Nakanishi Y and Schumann K(2008) *Asia Pac J Clin Nutr* **17**, 250-257

# S2-1

## 環境化学物質トリブチルスズによるグルタミン酸が関与する神経細胞死

○古武弥一郎

広島大学大学院医歯薬学総合研究科

【目的】環境汚染化学物質として認知されているトリブチルスズ (TBT) に代表される有機スズ化合物は、常在する生体内濃度と毒性を惹起する濃度が非常に近く、無処置哺乳動物の生体内からも数～数百 nM の濃度で検出される。脂溶性が高く脳にも移行しやすいことからその神経毒性が報告されている。そこで我々は、大脳皮質培養神経細胞を用いて TBT により惹起されるグルタミン酸の関与する神経細胞死メカニズムを検討した。

【実験方法】胎生 18 日齢のラットより大脳皮質細胞を調製し、培養 10 日目に 500 nM TBT (脳に常在する濃度よりやや高い) 添加 24 時間後に起こる細胞死と、培養 2 日目から 20 nM TBT (脳に常在する濃度とほぼ同じ) を 10 日間添加し続けた後に起こる分子レベルの変化について各種解析を行った。細胞死はトリパンプルー法により評価した。各種タンパク質の変動は Western ブロットにより、mRNA の変動は SYBR Green を用いた定量 PCR 法により検討を行った。

【結果および考察】500 nM TBT は時間依存的に細胞間隙グルタミン酸濃度を上昇させ、グルタミン酸受容体アンタゴニストは TBT による惹起される神経細胞死を軽減した。<sup>1)</sup> 次に、500 nM TBT により速やかに ATP が減少することから、細胞死メディエーターとして ATP 減少により活性化される AMP-activated protein kinase (AMPK) を想定した。AMPK は TBT による ATP 減少に伴って活性化され、AMPK の阻害剤である Compound C により細胞間隙グルタミン酸濃度上昇および細胞死が抑制された。これらの結果より、500 nM TBT は AMPK 活性化を介してグルタミン酸を放出させ、その結果神経細胞死が惹起されることが示唆される。<sup>2)</sup> 次に、20 nM TBT 長期添加により起こるグルタミン酸受容体の発現変動を調べたところ、AMPA 受容体の GluR2 発現が、mRNA、タンパクともに減少していた。GluR2 は AMPA 受容体のカルシウム透過性決定因子であり、GluR2 発現減少によりカルシウム透過性が亢進すると考えられる。そこで、長期添加の後に単独では殆ど細胞死を惹起しない 50  $\mu$ M グルタミン酸を添加すると、TBT 長期添加群でカルシウム流入の増大および細胞死が認められた。これらの結果より、脳に常在する濃度付近の TBT が神経細胞を脆弱にしている可能性が示唆される。

### 【参考文献】

- 1) Nakatsu Y, Kotake Y, Komasa K, Hakozaki H, Taguchi R, Kume T, Akaike A, Ohta S (2006) *Toxicol. Sci.* **89**, 235-242.
- 2) Nakatsu Y, Kotake Y, Hino A, Ohta S (2008) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **230**, 358-363.

## 核内受容体を介した重金属毒性

○中西 剛

岐阜薬科大学 衛生学研究室

大阪大学大学院薬学研究科

重金属は生物に対し強い毒性を示すものが多いが、一般的にこのような低分子化合物の毒性は作用点が多岐に渡っており、分子レベルでの毒性発現機構の解明は困難であることが多い。近年の内分泌攪乱物質問題で話題となった tributyltin (TBT) や triphenyltin (TPT) などの有機スズ化合物は、一部の貝類の雌において雄の性徴発達を示すインポセックスと呼ばれる特徴的な生殖毒性を誘導するが、その作用機構はアロマターゼなどのアンドロゲン代謝酵素を阻害すると考えられていた。一方で我々は、ヒトの発生段階におけるこれらの化学物質の影響を検討するために、ヒト胎盤の内分泌機能に着目した検討を行ってきた。ヒト絨毛細胞株の内分泌機能に対する有機スズ化合物の影響について検討したところ、TBT と TPT はヒト絨毛性ゴナドトロピン産生やアロマターゼ活性を上昇させ、またその上昇は mRNA の発現上昇を伴うものであった<sup>1,2</sup>。本結果は、これまでに貝類で予想されていた結果とは全く異なっていた。そこで我々は、有機スズ化合物の作用機構についてさらに詳細な検討を行った。その結果、TBT および TPT は核内受容体である retinoid X receptor (RXR) と peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  のアゴニストとしての作用を有することを見出した<sup>3,4</sup>。TBT や TPT の各核内受容体に対する結合能や転写活性化能は、RXR については内因性リガンドである 9-cis レチノイン酸と比較して 1/5 程度であり、PPAR $\gamma$ については、既知のリガンドであるロジグリタゾンと同等以上であった。またヒト胎盤における有機スズ化合物のアロマターゼ発現上昇作用や貝類のインポセックスは、RXR を介したものであることも明らかとなった<sup>5,6</sup>。以上の結果から、有機スズ化合物の生物攪乱作用は、これらの核内受容体を介して誘発される可能性が高いと考えられた。

## 【参考文献】

- 1) Nakanishi T et al., (2002) *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 2830-2837.
- 2) Nakanishi T et al., (2006) *Biochem Pharmacol* **71**, 1349-1357.
- 3) Nakanishi T et al., (2005) *Mol Endocrinol* **19**, 2502-2516.
- 4) Kanayama T et al., (2005) *Mol Pharmacol* **67**, 766-774.
- 5) Castro LF et al., (2007) *Aquat Toxicol*, **85**, 57-66.
- 6) Nishikawa J et al., (2004) *Environ Sci Technol*, **38**, 6721-6726.

## 親電子性金属類に対する生体防御系を担う転写因子 Nrf2

○角大悟、外山喬士、熊谷嘉人

筑波大学大学院人間総合科学研究科生命システム医学専攻

求核置換基と共有結合能をもつ親電子性物質は、DNA やタンパク質のような生体内高分子と容易に結合する。親電子性物質との結合により DNA は損傷し、またタンパク質は親電子性物質との結合により構造や活性に影響を受けることが明らかとなっている。我々を取り巻く環境中には様々な環境化学物質が氾濫しているが、そのなかでも親電子性を帯びた環境化学物質の生体への影響が懸念されている。一方、親電子性物質の侵入に対し高等生物は高度な排泄機能を獲得しており、グルタチオン抱合、グルクロン酸抱合のような第2相薬物代謝酵素群がその役割を果たしている。近年、異物に対する応答因子として、転写因子 Nrf2 システムが同定された。Nrf2 は通常 Keap1 によって負に制御されているが、親電子性物質の曝露によって Keap1 の反応性チオール基が修飾を受けると Nrf2 は Keap1 から遊離し、核内に移行する。移行した Nrf2 はプロモーター上の Anti-oxidant/Electrophile Response Element (ARE/EpRE) に結合することで、第2相薬物代謝酵素群の発現を上昇させる。本酵素群の触媒により異物を排泄に適した誘導体に変化させ、同時に発現が上昇した排泄トランスポーターを介し、異物の細胞外への移行を促進する。

メチル水銀 (MeHg) は食事とくに魚介類を通してヒトに蓄積し、中枢神経障害を引き起こすことからその健康影響が懸念されている親電子性物質である。そこで我々は MeHg を親電子性金属類のモデル化合物として、1) MeHg の曝露に対し Keap1 がセンサータンパク質となることで Nrf2 が活性化される、2) Nrf2 の活性化に伴い細胞外への排泄を促進することで MeHg による毒性発現を軽減するのではないかと予想した。その結果、リコンビナントタンパク質およびヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) を用いた検討から、Keap1 と MeHg が結合することが明らかとなった。MeHg を細胞に曝露すると Nrf2 の転写活性が促進され、それに伴い下流遺伝子群の発現が亢進した。さらに Nrf2 および Keap1 遺伝子発現の人為的制御により、Nrf2 が MeHg の排泄を積極的に促し、毒性発現を軽減していることが明らかとなった。

## 【参考文献】

- 1) Toyama T, Sumi D, Shinkai Y, Yasutake A, Taguchi K, Tong KI, Yamamoto M, Kumagai Y. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **363**, 645-650.



### メチル水銀毒性発現に関わる遺伝子群の siRNA ライブラリーを用いた検索 黄 基旭

東北大学 大学院薬学研究科

メチル水銀は水俣病の原因物質として知られ、重篤な中枢神経障害を引き起こすが、その毒性発現機構およびそれに対する防御機構はほとんど解明されていない。近年、短い二本鎖 RNA (siRNA) が相補的な塩基配列を持つ mRNA を特異的に分解する RNA 干渉法が見出され、注目を浴びている。

そこで我々は、2 種の siRNA ライブラリーを用いて、メチル水銀毒性発現に関わる細胞内因子の検索を行っている。1 つ目の siRNA ライブラリーはレンチウイルスベクターに約 5 万のヒト遺伝子産物に対する siRNA がそれぞれ挿入されており、1 遺伝子産物に対して 3~5 種の siRNA コンストラクトを有するものである。また、siRNA 配列が GeneChip® probe 配列と対応することから、GeneChip®の利用で siRNA 配列の同定が簡単にできる利点がある。一方、もう 1 つの siRNA ライブラリーは約 2 万のヒト遺伝子産物に対する合成 siRNA がそれぞれ 2 種類ずつプールされているものである。このライブラリーは個々の siRNA による検討より、ノックダウンおよびスクリーニング効率の上昇が期待されるものの、各 siRNA 導入による off-target 効果を検証する必要がある。

今回は、両 siRNA ライブラリーを用いた検索法の構築、および新たに同定されたメチル水銀感受性決定因子について報告する。

## 海馬シナプス可塑性における亜鉛の役割

○武田厚司

静岡県立大学 薬学部医薬生命化学分野

グローバル COE

【目的】海馬は学習・記憶と関係し、海馬が損傷されると経験が記憶として残らない、重度な前行性健忘症となる。記憶は大脳皮質の連合野に保存され、これらの領域と海馬のネットワークが記憶に関係する。記憶の分子基盤と考えられているシナプス可塑性（長期増強（LTP）などのシナプス伝達効率の変化）は海馬で盛んに研究されている。海馬細胞内では、亜鉛は大部分蛋白質に結合し、その機能調節に関与する。一方、グルタミン酸作動性の歯状回顆粒細胞由来苔状線維では、すべての終末から亜鉛イオンが放出され、CA1 錐体細胞とシナプスを形成するシャーファー側枝/連合線維でも約 45%の終末から亜鉛イオンが放出され、グルタミン酸を介した興奮性神経伝達の調節因子として働く。これまで亜鉛イオンがカルシウムチャネルを介して細胞内外でカルシウムイオンとダイナミックにクロストークし、グルタミン酸放出に対するネガティブフィードバックファクターとして働くことを報告してきた。グルタミン酸放出はシナプス可塑性と密接に関係することから、今回、海馬機能を理解するために、LTP に対する亜鉛の役割を検討した。

【成果】ラットから海馬スライスを作製し、人工脳脊髄液で灌流下、歯状回顆粒細胞にテタヌス刺激（100 Hz, 1 s）を与えて苔状線維-CA3 錐体細胞間での LTP を誘導したところ、苔状線維 LTP が記録された。次に、1-30  $\mu\text{M}$  塩化亜鉛を含む人工脳脊髄液灌流下で苔状線維 LTP を誘導したところ、5-30  $\mu\text{M}$  塩化亜鉛存在下で苔状線維 LTP は減弱した。また、LTP 誘導直後からの亜鉛灌流（5-30  $\mu\text{M}$ ）によっても苔状線維 LTP は減弱した。亜鉛は苔状線維 LTP の発現ならびに維持を抑制的に調節することが示唆された。

一方、CA3 錐体細胞由来のシャーファー側枝にテタヌス刺激を与えてシャーファー側枝-CA1 錐体細胞での LTP を誘導したところ、5  $\mu\text{M}$  塩化亜鉛存在下で CA1 LTP は逆に増強された。

以上より、LTP に対する亜鉛の作用は CA3（苔状線維シナプス）と CA1（シャーファー側枝シナプス）で異なることがはじめて明らかとなった。このような領域に依存した亜鉛の作用が記憶の記銘（符号化）、保持、想起の過程においていかなる意味を持つか個体レベルで明らかにする必要がある。

【参考文献】Takeda A et al. (2008) Attenuation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by low micromolar concentrations of zinc. *J. Neurosci. Res. In press.*

## 腸管での亜鉛吸収の分子メカニズム

○神戸大朋<sup>1)</sup>、Glen K. Andrews<sup>2)</sup>

1) 京都大学大学院生命科学研究科

2) Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Kansas Medical Center

【目的】 近年、タンパク質の構成因子としてのみならず、活性調節因子やシグナル因子としても機能する“亜鉛”に注目が集まっている。亜鉛は、小腸上皮細胞から、特異的な輸送担体を介して吸収されるが、先日、亜鉛トランスポーターZIP4 (SLC39A4) が、この輸送担体に当たることが明らかにされた<sup>1,2)</sup>。Zip4 は、遺伝性の亜鉛欠乏症・腸性肢端皮膚炎 (*Acrodermatitis enteropathica*) の原因遺伝子である。ZIP4 は、消化管特異的に発現し、小腸上皮細胞アピカル膜上に局在することで、消化管腔から食品由来の亜鉛を取り込む。その発現は、亜鉛濃度に応じて、RNA レベル、タンパク質レベルのどちらにおいてもドラマチックな制御を受けている<sup>3,4)</sup>。マウス小腸上皮細胞において、ZIP4 は、亜鉛欠乏に応じてアピカル膜上に蓄積されるが、一方、亜鉛十分時には、エンドサイトーシスの後、速やかな分解を受ける<sup>5)</sup>。この亜鉛応答性の制御は、HEK293 等の汎用される培養細胞に強制発現させた ZIP4 でも再現されるが、*in vivo*の結果とは、ZIP4 の分子サイズに大きな差異が認められることが知られていた (小腸上皮細胞; 主に 37kDa、HEK293 細胞; 全長の分子サイズである 75kDa)<sup>6)</sup>。この ZIP4 の分子サイズの差異は、小腸上皮細胞特異的な未知の新たな制御機構の存在を示唆する。生体内の亜鉛ホメオスタシスの制御に必須の役割を果たす ZIP4 の新たな制御機構を明らかにすること目的に解析を行った。

【実験方法】 細胞株の培養・極性細胞を用いたカップ培養は、定法にて行った。亜鉛欠乏血清は、Chelex-100 resin を用いて血清中の亜鉛を吸着除去することで作成し、これを用いて亜鉛欠乏培地を作成した。強制発現させた ZIP4 のN末には FLAG タグを、C末には HA タグを融合させた。タグ標識 ZIP4、並びに、変異体 ZIP4 発現プラスミドは、2 step PCR 法を用いて構築した。プラスミド DNA の細胞株への導入には、リポフェクタミン 2000 を用い、安定発現株の選別には Puromycin を使用した。内在性の ZIP4 の検出には、抗 ZIP4 抗体を、ZIP4 を導入した培養株における ZIP4 の検出には、抗 FLAG、あるいは、抗 HA 抗体を用いた。細胞表面タンパク質のビオチン化標識には、Sulfo-NHS-SS-Biotinsit 試薬を使用した。Northern blot によるメタロチオネイン mRNA の検出は、文献 2) の方法に従った。



【結果および考察】 強制発現させた ZIP4 が、小腸上皮細胞に発現する ZIP4 と同じ分子サイズ (37kDa) を示す細胞株のスクリーニングを行ったところ、ヒト小腸上皮モデル細胞である CaCO2 とイヌ腎上皮細胞である MDCK が、全長サイズの 75kDa に加え、37kDa の ZIP4 を発現することを見出した。この 37kDa ZIP4 の発現量は、亜鉛欠乏時に上昇し、また、タイトジャンクションの形成によってさらに増加した。HEK293 細胞においては、37kDa の ZIP4 が認められなかったことから、ZIP4 は、小腸上皮細胞等の極性細胞において、特異的に、亜鉛欠乏依存的に 75kDa から 37kDa にプロセッシングされることが判明した。さらに、CaCO2、MDCK 細胞においては、プロセッシングを受けた ZIP4 (37kDa ZIP4) が、全長のものに比べ優先的にアピカル膜上に局在し、この局在は、亜鉛欠乏時に促進されることを見出した。メタロチオネインの発現誘導を指標にして、プロセッシングを受けた ZIP4 の亜鉛取り込み活性について検討したところ、プロセッシングを受けた ZIP4 もアピカル膜側からの亜鉛取り込みに機能していることが判明した。様々な ZIP4 変異体を用いて、ZIP4 のプロセッシング部位について検討したところ、ZIP4 は、ヒト・マウス間で高度に保存された第一膜貫通領域直前の細胞外領域付近でプロセッシングを受けていることが示唆された。以上の解析から、亜鉛欠乏時に小腸上皮に蓄積する 37kDa の ZIP4 は、亜鉛欠乏に応じて発現誘導された後、プロセッシングを受けた ZIP4 であり、このプロセッシングされた ZIP4 は、消化管腔からの亜鉛取り込みに機能していることが強く示唆された。本結果は、ZIP4 の新たな活性制御機構として注目される。

#### 【参考文献】

- 1) Wang, K., B. Zhou, Y. M. Kuo, J. Zemansky, and J. Gitschier (2002) *Am.J.Hum.Genet.*, 71, 66-73
- 2) Küry, S., Dréno, B., Bézieau, S., Giraudet, S., Kharfi, M., Kamoun, R., and Moisan JP. (2002) *Nat Genet.*, 31(3), 239-240.
- 3) Kambe T, Geiser J, Lahner B, Salt D. E and Andrews G. K (2008) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 294, R1474-1481
- 4) Kambe T, Weaver B. P and Andrews G. K (2008) *Genesis*, 46, 214-228
- 5) Mao, X., B. E. Kim, F. Wang, D. J. Eide, and M. J. Petris (2007) *J.Biol.Chem.*, 282, 6992-7000
- 6) Weaver B. P, Dufner-Beattie J, Kambe T and Andrews G. K (2007) *Biol. Chem.*, 388, 1301-1312

## アミロイド形成蛋白の高次構造変化と神経毒性に及ぼす金属の影響

○ 川原正博

九州保健福祉大学 薬学部 分析学講座

近年、蛋白質の高次構造(conformation)変化が疾患の発症に繋がるという、いわゆる‘conformational disease (コンフォメーション病)’という概念が注目を集めている。これらの疾患の共通点としては、疾患の原因と疑われる蛋白が何らかの要因によりその conformation を変化させ、 $\beta$ シート構造からなるアミロイド細繊維構造を取り異常蓄積することと、これらの疾患関連蛋白(あるいはその断片ペプチド)が細胞毒性を持つことが挙げられる。これらの疾患には、アルツハイマー病、プリオン病、パーキンソン病(Lewy小体型認知症)、CAGリピート病等の神経難病も含まれる。アルツハイマー病では、老人斑の主要構成成分である $\beta$ アミロイド蛋白(A $\beta$ P)が、monomerでは毒性を持たず、oligomerになると神経細胞死を引き起こす。A $\beta$ P自身は健常人の脳内にも存在していることを考えると、多量体化を促進あるいは抑制する因子が発症に重要な役割を果たすことが考えられる。そこで、演者等は、微量元素がA $\beta$ Pの多量体化に及ぼす影響について、immunoblotting、免疫染色などの方法により検討した。その結果、A $\beta$ Pの多量体化は、アルミニウム(Al)、亜鉛(Zn)、銅(Cu)、鉄(Fe)などの微量金属によって促進され、中でもAlはZnなどと比較しても顕著に多量体化を引き起こすことが明らかになった。Alによって形成されたA $\beta$ P多量体は、SDSに難溶であり、培養神経細胞に投与すると分解されることなく蓄積し続けるが、Alキレーター(desferrioxamine)によって溶解した。これらの結果はアルツハイマー病の危険因子としての環境中のAlの役割を示唆するものである。また、牛海綿状脳症(BSE)、クロイツフェルト・ヤコブ病などのプリオン病では、脳内に存在する正常プリオン蛋白(PrP)が、伝染などの要因によってconformationが変化して異常化した蛋白が増殖し発症に至ると考えられている。PrPはCu、Zn結合部位を持つことから金属ホメオスタシスに影響する可能性も示唆されているが、演者等はPrPの断片ペプチド(PrP106-126)の培養海馬神経細胞に対する神経毒性がCuやZnによって抑制されることも明らかにしている。Lewy小体型認知症では $\alpha$ シヌクレインの蓄積が発症に重要な役割を果たすことが明らかになっているが、Cu、Feなどの金属が $\alpha$ シヌクレインの多量体化を促進することも報告されている。これらの疾患関連蛋白はいずれも細胞膜上でCa<sup>2+</sup>透過性のporeを形成することにより細胞死を引き起こすことも明らかになっている。これらの結果から、微量元素による疾患関連蛋白のconformation変化が神経難病の発症に関与する可能性が考えられ、新たな治療法開発につながると考えられる。

## 【参考文献】

1. Kawahara M. : Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases, *J. Alzheimer Disease*, 8:171-182 (2005).
2. 川原正博 : アミロイド蛋白質の多量体化と pore 形成による神経細胞死, *臨床病理*, vol.56, No.2, 130-136 (2008).

## 肥満・糖尿病状態における生体微量元素の 代謝吸収過程のイメージング化

廣村 信

理化学研究所神戸研究所 分子イメージング科学研究センター  
メタロミクスイメージング研究ユニット

### 【目的】

昨今、世界中で急増する肥満・糖尿病において、生体微量元素の恒常性破綻が示唆されている。しかし、これら疾患状態における生体微量元素を同時に解析した代謝吸収過程は未だ検討されていない。当研究室では、生体微量元素の動態を検討するため、マルチトレーサー法の開発<sup>1</sup>、および複数分子同時イメージング装置<sup>2,3</sup>の開発を行ってきた。これらの技術は一個体において同時に複数の生体微量元素の分布や代謝過程などの情報が得られるものである。特に、複数分子同時イメージング装置は、RI 元素を使った生体微量元素の複数同時イメージングが可能であることから、代謝疾患等多くの病態における生体内微量元素の動態を画像化により評価できる利点を持っている。今回、これらの技術を利用し、肥満・糖尿病モデルマウスの生体微量元素の代謝吸収過程のイメージング化を試みた。

### 【実験方法】

#### ＜モデルマウスの作製＞

肥満・糖尿病モデルマウスは、C57B/6J（雄：7週令）に高脂肪食（HFD32:日本クレア）を20週間与えた。なお、コントロールマウスは通常食（MF:日本クレア）を同様に20週間与えた。飼育期間中、体重測定、血糖値の測定を、また20週目において糖負荷試験を行うことで肥満・糖尿病発症の評価を行った。

#### ＜肥満・糖尿病マウスのイメージング＞

それぞれ1 MBqの<sup>65</sup>ZnCl<sub>2</sub>、<sup>54</sup>MnCl<sub>2</sub>、<sup>85</sup>SrCl<sub>2</sub>の3種RI元素を生理食塩水に溶解し、RI投与液とした。イソフルラン麻酔下（1.5%イソフルラン）、肥満・糖尿病モデルマウスの尾静脈からRI溶液を注射後、複数分子同時イメージング装置にて12時間撮像を行った。またコントロールマウスについても同様に撮像を行った。

### 【結果および考察】

肥満・糖尿病モデルマウスの<sup>65</sup>Zn、<sup>54</sup>Mnおよび<sup>85</sup>Srの3核種同時イメージングに成功した。肥満・糖尿病モデルマウスおよびコントロールマウスにおいて、肝臓周辺に高い<sup>65</sup>Znおよび<sup>54</sup>Mnの集積性が見られた。特に肥満・糖尿病モデルマウスでは、肝臓組織の脂

肪肝による肥大が認められたことから、モデルマウスの肝臓周辺での  $^{65}\text{Zn}$ 、 $^{54}\text{Mn}$  のイメージング画像は、この肥大化を示していると考えられた。さらに、モデルマウスでの  $^{65}\text{Zn}$  および  $^{54}\text{Mn}$  の分布に差がみられたことにより、肝臓組織内、もしくは近隣組織での  $^{65}\text{Zn}$  および  $^{54}\text{Mn}$  の取り込み機構に違いがあることが示唆された。

【参考文献】

- 1) Enomoto S. *Biomed. Res. Trace Elements* (2005) **16**, 233-240.
- 2) Motomura S, Enomoto S, Haba H, Igarashi K, Gono Y, Yano Y. (2007) *IEEE Trans. Nucl. Sci.* **54**, 710-717.
- 3) Motomura S, Kanayama Y, Haba H, Watanabe Y, Enomoto S. (2008) *J. Anal. At. Spectrom.* **23**, 1089-1092.

## オミックス研究に資するプラズマ分光分析用高効率微量試料導入 インターフェースの設計開発

○稲垣和三、藤井紳一郎、高津章子、朱彦北、鎗田孝、千葉光一  
産業技術総合研究所 計測標準研究部門

【はじめに】誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)は、微量金属元素の高感度分析が可能であるのと同時に、リン、硫黄、ハロゲン等の非金属元素に関しても高い検出能力を有していることから、それらを含む生体分子等の分析法としても近年注目を集めている。特に、キャピラリーLC やキャピラリー電気泳動 (CE) といったマイクロ・ナノ分離技術と ICP-MS を結合した複合分析システムは、微量元素の化学形態別分析のみならず、分子構造内のリンや硫黄を標識とすることで核酸関連試料及びタンパク質等を高感度定量分析へも応用されており、メタロミクスを含むオミックス関連研究分野全般における極めて有用なツールと成りつつある。このような複合分析システムを効果的に構築するためには、マイクロ・ナノ分離部と ICP-MS を効果的に結合するための結合部、即ち試料導入インターフェースが不可欠だが、既存インターフェース（主に微量試料導入ネブライザーと低容量チャンバーの組み合わせによるドレインレス導入系）は、壁面衝突ロス等によるプラズマへの試料導入効率低下の抑制、信号強度の安定化、ネブライザーの頑健性の改善等、多くの改善すべき課題を有しており、特に ICP-MS 側のシステムパフォーマンスを最大限に引き出せていないのが現状である。そこで演者らは、これらの技術課題を克服し、マイクロ・ナノ分離技術、ICPMS 両者のパフォーマンスを最大限に生かした複合分析システムを構築するための新規高効率微量試料導入インターフェースの設計開発に着手した。

### 【新規インターフェースの設計開発】

本開発では、(i) ネブライザー噴霧効率の向上、壁面衝突防止等によるプラズマへの高効率試料導入の実現、(ii) フレキシブルかつメンテナンスが容易な構造を有する汎用性の高い構造設計を念頭に検討を進めた。その結果、開発されたのが図 1 写真に示すインターフェース<sup>1)</sup>である。本インターフェースは、(1) - 高圧駆動三重管同軸ネブライザー、(2) シーツガス導入型-低容量石英シリンダーチャン

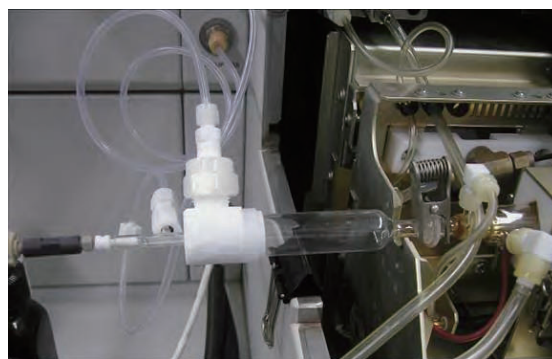


Fig.1 Photographic image of the developed interface mounted on ICP-MS



バーで構成されており、CE を接続する際には、電気回路を確保し、かつ電気浸透流を安定に導入するためのユニットを別途接続する構造とした。本インターフェースの性能を評価したところ、既存インターフェースに比べ一桁以上高い検出感度が得られ、信号強度の短期及び長期安定性も優れていた。また、今回設計開発したインターフェースは、ネブライザー駆動に比較的高圧を必要とするものの、ネブライザー内キャピラリーの目詰り及び破損等が生じた場合でも交換が安価かつ容易であり、用途に応じてキャピラリー内径を変更できることから、既存インターフェースに比べ汎用性にも優れている。

#### 【本開発インターフェースの応用例】

開発したインターフェースの応用例として、(1) CE-ICP-MS によるヌクレオチド 4 種(化合物濃度 1 mg/kg、試料量 12 nL) の測定結果、(2) キャピラリー LC-ICP-MS によるひ素化合物 8 種(化合物濃度 20 µg/kg、試料量 50 nL) の測定結果を図 2 及び 3 にそれぞれ示す。両測定とも良好な結果が得られ、ヌクレオチド測定に関しては、既報より 2 桁以上高い検出感度が得られ、一方、ひ素化合物測定では、汎用 LC-ICP-MS (試料量 50 µL) と比べ、ほぼ同等の検出感度が得られている。

#### 【おわりに】

今回設計開発したインターフェースは、現在、更なる高効率試料導入を目指し、フォーカススプレーネブライザー、高効率導入チャンバー等の開発により、さらなる試料導入効率の向上及び製品化を進めており、オミックス関連研究分野における有用なツールとして応用発展させたいと考えている。

#### 【参考文献】

- 1) 特願 2008-053998 「三重管構造を有するネブライザーとそれを用いた分析システム」

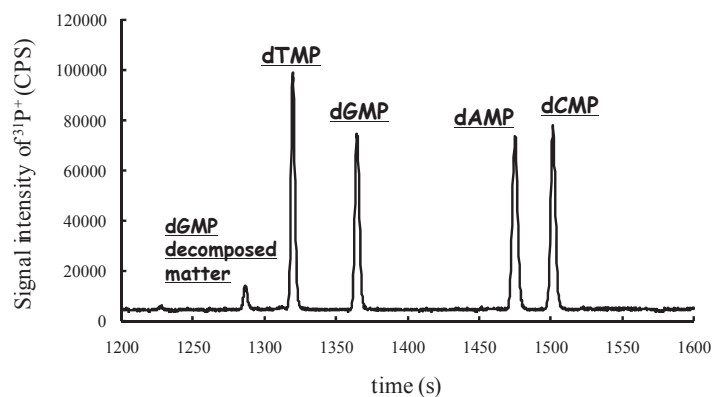


Fig.2 Electroferogram of four nucleotides obtained by CE-ICPMS

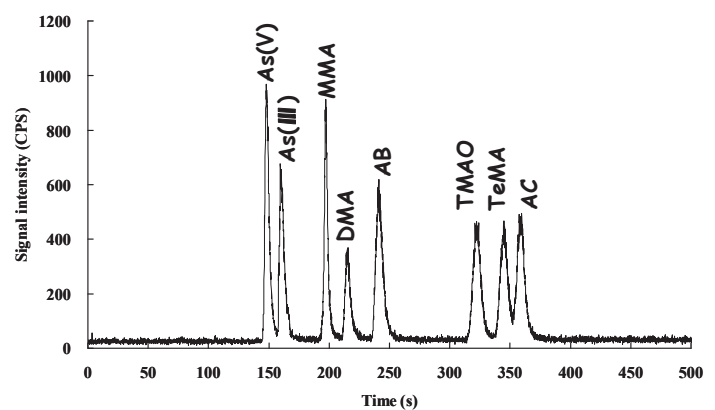


Fig.3 Chromatogram of eight arsenic compounds obtained by capillary LC-ICPMS

## メタロミクス研究を支援するアクティブポリマーモノリスの開発と応用

○梅村知也、小林博治、高崎裕加、原口紘丞

名古屋大学エコトピア科学研究所 ナノマテリアル科学研究部門

【緒言】ヒトゲノム配列の解読が完了した現在、生命科学の次のターゲットは、生命活動の実際の担い手であるタンパク質に移りつつある。生体内に存在するタンパク質の約3分の1は金属が結合しており、その中には金属と結合することで初めて機能を発現するものも少なくない。これまでに実に様々な金属酵素の存在が明らかになっているが、生体内には未知なる金属酵素がまだ多く存在していると考えられている。そのような金属酵素、金属タンパク質の探索には、(1) HPLC や PAGE によるタンパク質相互の分離、(2) ICP-MS による金属元素の高感度定量、(3) ESI-MS や MALDI-MS 等の Molecular-MS による生体分子の同定、という3つの行程が必要となる。また、これらの分析機器にかける前の抽出・濃縮・精製等の前処理も極めて重要であり分析の成否を握っている。これまで、HPLC と ICP-MS を結合した複合装置がメタロミクス研究に、また、HPLC と ESI-MS あるいは MALDI-MS からなる装置がプロテオミクス研究に利用されてきたが、これら3つの装置を融合・併用した総合的な解析システムの開発は進展しておらず、未知の金属タンパク質を探索するレベルには到底達していない。また、mg 以下の微量の試料で分析する技術の開発も遅れており、今後想定される細胞や組織など希少試料への対応も十分ではない。さらに、“オミックス”研究では多数のサンプルを解析・比較することにより、はじめてその意義が解明されるため、分析のハイスループット化（オンライン化、自動化、効率アップ）への対策も極めて重要といえよう。このような現状の下、演者らは、1) 極微量の試料での分析、2) 複雑な混合試料の迅速分析、3) 分析装置の併用による高度情報の収集と解析、を目的として、モノリスカラム技術を基盤とする次世代の総合化学計測システムの開発に取り組んできた。本講演では、モノリス\*と呼ばれる多孔材料を用いたタンパク質の超高速分離と完全二次元分離に関する成果を中心に最新のデータを紹介したい。

\* モノリス：三次元的に連通した空孔を有する多孔材料。従来の粒子充填タイプの担体と比較して、流体透過性が高く、また、物質移動が対流により促進されるので、通常の数倍から数十倍の速度で送液でき、超高速分離、高効率反応が可能となる。

【固定相の設計と試作 —カラムバリエーションの充実—】最善の分離を行うためには、目的に合致した固定相を自在に設計・試作する技術が必要となる。演者らはこれまで、*in situ* 重合法と呼ばれるモノリスカラム技術の開拓に取り組んできた。この *in situ* 重合法は、細管内にモノマー溶液を満たし、その中で重合反応を行わせることにより、カラ

ム管内で分離媒体を直接合成する方法である。様々な機能性モノマーを任意の比率で混合して重合する、あるいは、反応性の高いエポキシ基を持つモノリス担体を作製しておいてから機能性分子を化学修飾することにより、自在に固定相をテーラーメイドできる。現在までに、逆相モノリス、イオン交換モノリス、キレート抽出モノリス、トリプシンを固定したマイクロリアクターモノリス等の開発に成功している。

【完全二次元 HPLC システムの試作と評価】複雑な生体試料の分析では多次元分離が不可欠である。一次元目のクロマトグラムのピーク幅に相当する時間内に、二次元目の分離を行うことができれば、二次元電気泳動のような二次元分離を“ジャストインタイム”に、しかもオンラインで実行できる。これを実現させるために、2つの HPLC 装置を十方切換えバルブを介して接続し、十方切換えバルブにフラクショナルループを2つ取り付けた二次元 HPLC システムを試作した。2つのフラクショナルループに一次元目のカラムからの溶出液を交互に溜め、バルブの切換え毎に二次元目の分離を開始し、次の切換え前までに分離とカラムのコンディショニングが完了するようにプログラムを設定した。現在、一次元目に陽イオン交換モノリスカラムを、二次元目に逆相モノリスカラムをセットし、タンパク質の完全二次元分離を目指して最適条件を模索している。

【HPLC/ICP-MS/ESI-MS 複合分析システムの構築】オミックス研究を推進するためには、複数の分析機器を併用して、より高度な情報を引き出していくことが重要となる。手始めに、モノリスカラムを用いた HPLC と2つの質量分析装置 (ICP-MS と ESI-MS) を結合させた複合分析システムを試作した。これらの3つの分析機器の最適使用条件は相反する要求が多いため、その折り合いをつけることが研究のポイントとなる。本研究では、質量分析装置の感度を維持し、かつ装置にかかる負担をできる限り低減させるために、カラムサイズや固定相の精密設計、揮発性の塩を用いたイオン交換分離条件の探索、また、逆相分離に不可欠な有機溶媒を安定して ICP-MS に導入できるマイクロネブライザーの開発に取り組んだ。このようなシステム全体の調和を図ることにより、カラムからの溶出液を ICP-MS と ESI-MS の両装置に安定して導入できるようになった。本複合システムでは、元素情報と分子情報を同時に得られるため、金属酵素、金属タンパク質、また、リン酸化タンパク質の探索が期待される。

#### 【参考文献】

- 1) 梅村知也, 小島徳久, 植木悠二 (2008) *分析化学*, **57**, 517-529.
- 2) Hasegawa T, Wakita Y, Zhu Y, Matsuura H, Haraguchi H, Umemura T (2007) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80**, 503-506.
- 3) Umemura T, Ueki Y, Tsunoda K, Katakai A, Tamada M, Haraguchi H (2006) *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 566-571.



## 微量化スペシエーションによる金属結合タンパク質の分析

○小椋康光

千葉大学大学院薬学研究院

生体中の金属含有成分から構成されるメタロームの解析には、生体金属含有成分を化学形態別に分析する手法すなわちスペシエーション (speciation) が利用されている。従来のは乳類から得られる試料を対象としたスペシエーションは、血漿、尿あるいは組織の可溶性画分など比較的 massive なものを対象試料とし、mL~数十  $\mu$ L の試料量を要求したため、金属元素の検出手段である ICP-MS の測定限界を考えると、得られる試料量の少ない培養細胞由来の試料は、分析に用いることができなかった。しかし、ゲノムやプロテオームの解析はもとより、メタボロームの一分野であるグライコームやリポドームの解析においても、培養細胞系の利用や遺伝工学的手法の利用は欠くことができない。培養細胞由来の微量な金属含有成分を分析するためには、capillary HPLC カラムの開発や ICP-MS とのインターフェース部の改良が必要であった。そこで我々は、nL (ナノリッター) レベルの微量試料を対象としたスペシエーション、すなわち“ナノスペシエーション”に必要な装置の構築を行い、遺伝子改変細胞中のメタローム解析を目指した。我々の開発した手法により、RNA 干渉法によりアイソフォーム特異的にノックダウンした培養細胞中の重金属結合タンパク質であるメタロチオネインの2つのアイソフォームの分離分析が可能であることを示した。すなわち本手法では、試料要求量が 100 nL であり、2,000 個の培養細胞で分析が可能である。また capillary HPLC-ICP-MS よりも汎用性の高い手法として、試料要求量が 1-5  $\mu$ L で分析が可能な narrow bore HPLC-ICP-MS による分析系も構築し、細胞内の銅代謝における銅制御因子のクロストーク機構の解明にも利用している。これらの手法を用いることにより、分子生物学的手法とスペシエーションが融合した分析を行い、メタローム解析に新たなアプローチを提供したいと考えている。

## 【参考文献】

- 1) T. Miyayama, Y. Ogra\*, Y. Osima and K.T. Suzuki: Narrow bore HPLC-ICP-MS for speciation of copper in mutant mouse neonates bearing a defect in Cu metabolism. *Anal. Bioanal. Chem.* (2008) **390**, 1799-1804
- 2) T. Miyayama, Y. Ogra\* and K.T. Suzuki: Separation of metallothionein isoforms extracted from isoform-specific knockdown cells on two-dimensional micro high-performance liquid chromatography hyphenated with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* (2007) **22**, 179-182
- 3) Y. Ogra\* and K.T. Suzuki: Speciation of selenocompounds by capillary HPLC coupled with ICP-MS using multi-mode gel filtration columns. *J. Anal. At. Spectrom.* (2005) **20**, 35-39

## ファイトレメディエーション用重金属蓄積植物に蓄積した Cd と As の放射光蛍光 X 線イメージング

中井 泉

東理大 理

[はじめに] 原口紘丞先生は新学問領域「メタロミクス」で 10 の研究目標を提唱しておられるが、その第一、第二の目標として、1)生物(生体)試料中の金属元素の濃度と分布の測定—生物細胞 1 個の全元素分析；2)生体中微量元素の化学形態別分析をあげられている<sup>1)</sup>。この 2 つの分析を可能にするのが放射光蛍光 X 線分析である。実験室系の X 線源に比べて 100 万倍以上高輝度な放射光を用いれば、試料に照射した時発生する蛍光 X 線強度は著しく増大し、高感度分析が可能になる。さらに、放射光は平行光で発散が少ないことから全反射ミラー等を用いて集光することで 1  $\mu\text{m}$  のビームを励起光としてルーチン的に利用できる。特に、SPring-8 では数十 nm のマイクロビームも利用可能になりつつあり、生物細胞 1 個のオルガネラレベルの非破壊蛍光 X 線(XRF)分析が可能である。さらに、X 線吸収(XAFS)スペクトルを蛍光法で測定することで、マイクロビームを組み合わせれば細胞レベルの生体中微量元素の化学形態分析が非破壊で行える。そこで我々は、ファイトレメディエーション用重金属蓄積植物に蓄積したヒ素やカドミウムなどの重金属の分布と化学形態を放射光蛍光 X 線分析で明らかにし、その蓄積機構を解明する研究<sup>2-5)</sup>を続けている。本講演では、その成果の紹介を通して、メタロミクス研究における放射光蛍光 X 線分析の有用性を明らかにする。

[実験方法]マイクロビーム蛍光 X 線 ( $\mu$ -XRF) 分析は、放射光施設 SPring-8 の BL37XU と PF の BL-4A を用いて実施した。化学形態分析は、これらの実験ステーションの他に、バルク試料については、PF BL-12C と 9A を利用して行っている。試料は、カドミウム蓄積植物はハクサンハタザオ、ヒ素蓄積植物はモエジマシダ等について、重金属を投与して分析に用いた。

[結果と考察] ヒ素汚染土壌で栽培したモエジマシダの葉を試料とし、 $\mu$ -XRF イメージングを行った。その結果、カリウムやカルシウムが葉の辺縁部にある胞子嚢に分布しているのに対し、ヒ素は胞子嚢にはほとんど存在せず、胞子嚢の基部に特に高濃度で蓄積していることがわかった。また水耕栽培で生育したモエジマシダにヒ素水溶液を投与し、葉の組織におけるヒ素の分布の経時変化を観察したところ、投与して 30 分後に胞子嚢の基部でヒ素が検出され、ヒ素の分布の経時変化を可視化することに成功した。ヒ素を投与してわずか 30 分後にすでに葉の辺縁部の組織においてヒ素が検出されたことから、ヒ素は根からの蒸散流を経由して比較的早く移動していることがわかった。

カドミウムを含む培養液で栽培したハクサンハタザオの葉を試料とし、約 1  $\mu\text{m}$  角の

マイクロビームを使った  $\mu$ -XRF イメージングを行った。一般に蛍光 X 線で Cd を分析する際には、Cd の L 線 ( $L\alpha$  3.1 keV,  $L\beta_1$  3.3 keV) が用いられているが、植物試料の場合には、必須元素で多量に含まれているカリウムの  $K\alpha$  線 (3.3 keV) の妨害により、L 線を使った微量の Cd の分析は困難である。そこで、X 線のエネルギーは Cd の K 線が効率よく励起できる 37 keV とした。

その結果、カドミウムは葉の表面にある毛状突起細胞（トライコーム）において高濃度に蓄積されていることがわかった（図 1）。1 細胞からなるトライコームの中でも特に分岐下部において蓄積しており、この蓄積部位には亜鉛と正の相関が見られたことから、カドミウムの蓄積機構には同族元素である亜鉛との関連が示唆された。

さらにカドミウムの K 吸収端の  $\mu$ -XANES 測定により、トライコーム細胞内に蓄積されたカドミウムの化学形態を調べたところ、酸素あるいは窒素と結合した化学種であることがわかった。このように高エネルギー放射光 X 線マイクロビームを利用することで、細胞内におけるカドミウムの分布と化学形態を初めて明らかにすることに成功した。従来、植物内におけるカドミウムの無毒化機構として、カドミウムはシステインやファイトケラチンなどのチオール基と結合した化学種で存在するといわれていたが、カドミウムの高集積能を有するハクサンハタザオのトライコームにおいては、このような化学種ではなく酸素あるいは窒素と結合した化学種であるという知見は非常に興味深い。

#### 【参考文献】

- 1) 原口紘丞, 新学問領域「メタロミクス」の創成 <http://www2.arkw.co.jp/sousei/en/008.html>
- 2) A. Hokura, R. Onuma, Y. Terada, N. Kitajima, T. Abe, H. Saito, S. Yoshida, I. Nakai, *J. Anal. At. Spectrom.*, **21**, 321-328 (2006).
- 3) A. Hokura, R. Onuma, N. Kitajima, Y. Terada, H. Saito, T. Abe, S. Yoshida, and I. Nakai, *Chemistry Letters*, **35(11)**, 1246-1247(2006),
- 4) N. Kitajima, T. Kashiwabara, N. Fukuda, S. Endo, A. Hokura, Y. Terada, and I. Nakai, *Chemistry Letters*, **37(1)**, 32-33 (2008).
- 5) N. Fukuda, A. Hokura, N. Kitajima, Y. Terada, H. Saito, T. Abe and I. Nakai, *J. Anal. At. Spectrom.*, **23**, 1068-1075 (2008).

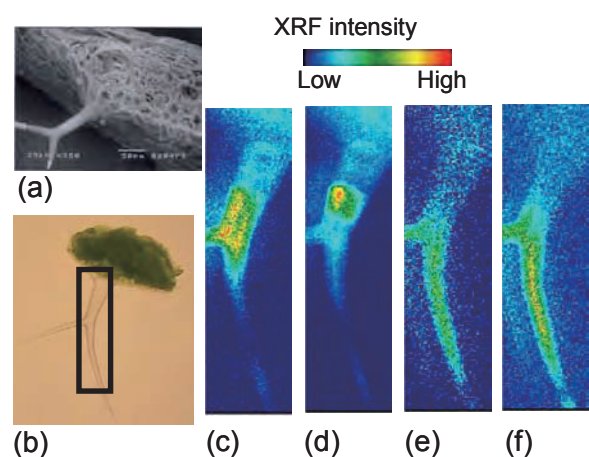


Figure 1. (a) SEM image, (b) photograph of trichome, and  $\mu$ -XRF imaging of (c) Cd, (d) Zn, (e) Sr, (f) Ca.

# S4-5

## 新しい微量元素分析技術（ECRIS-MS）による生体内金属元素探査への応用

木寺 正憲

独立行政法人理化学研究所 仁科加速器研究センター

加速器技術開発グループ イオン源開発チーム

### 【目的】

当研究室では現在、多元素を同時にかつ高感度に分析する新しいタイプの微量元素分析装置<sup>1)</sup>を開発している。この新しい微量元素分析装置を生体微量金属元素の機能解明における定量分析として用いるためにはいくつかの課題がある。本装置の一番の特徴はイオン化部において ECR (Electron Cyclotron Resonance) イオン源を用いていることである。この ECR イオン源を用いた試料のイオン化法においては、ガス、金属（酸化物）などの気体および固体試料が一般的な試料形態であるが、液体試料を使用したイオン化はほとんど行われていない。一方で、生体内金属元素探査においては、試料形態が液体である場合が多く、また試料の取り扱いの利便性や必要性からイオン化において液体試料を利用できることは必要条件といえる。そこで当研究室ではこれまで蓄積した ECR イオン源技術の経験を生かし、液体試料導入装置の開発を行った。

### 【実験方法】

イオン化を行う部屋（プラズマチャンバー）はイオン化停止時で  $10^{-6}$ Pa 以上の高真空であることが条件であり、イオン化を行うには、プラズマを生成し、このチャンバー内に  $10^{-5}$ ~ $10^{-4}$ Pa の範囲で導入量のコントロールを行う必要がある。液体試料を極微量のミストとして噴霧する場合は大気圧中が一般的であり、この圧力差を解消するためにスキマーコーンを有する差動排気チャンバーを製作した。液体試料の噴霧には ESI プローブを用いる。ESI プローブは本来の使用法として噴霧するプローブ先端に高電圧をかけ、イオン化、および引き出しを行うが、今回は高電圧を印加せずに液体の極微量噴霧機として用いる。スキマーより差圧によって引かれた分子は差動排気部を経た後、スローリークバルブによって流量をコントロールされながら高真空なプラズマチャンバーへと導入される。

### 【結果および考察】

液体試料導入装置（差動排気装置）は 10 月末に完成し 11 月より精力的に実験、開発を行う。本研究会にて最初の結果をご報告する予定である。

### 【参考文献】

- 1) Kidera M, Takahashi K, Enomoto S, Mitsubori Y, Goto A, and Yano Y, (2007) Eur. J. Mass. Spectrom. 13(4), 239-248



## 半導体コンプトンカメラによる複数分子同時イメージングとメタロミクス 研究

金山洋介

理化学研究所 分子イメージング科学研究センター

メタロミクスイメージング研究ユニット

複数の生体内分子を同時に追跡し、その分布や代謝過程などの情報を得られる分子イメージング技術の実現が、基礎・臨床医学や分子生物学の領域にブレイクスルーをもたらすことが期待される。我々はこの実現のため、半導体検出器を用いたコンプトンカメラ方式の複数分子イメージング装置 GREI (Gamma-Ray Emission Imaging) の開発を行っている<sup>1,2)</sup>。GREIは核医学分野で用いられる SPECT、PET と同様に $\gamma$ 線放出核種の分布を画像化する装置であるが、検出器に Ge 半導体を用いることでエネルギー分解能に優れており、イメージング可能な $\gamma$ 線エネルギー領域は 200-2000keV と幅広い。またコンプトンカメラ方式では機械的コリメータが不要なため SPECT の様な感度の低下がなく、さらに一方向からの静止撮像で 3 次元の画像再構成が可能である。これらの特徴から、複数の分子にそれぞれ異なるエネルギーの $\gamma$ 線放出核種を標識して用いることで、GREI は各分子を容易に識別して同時イメージングを可能にする。

これまでに GREI を用いて、 $^{55}\text{ZnCl}_2$ 、 $^{85}\text{SrCl}_2$ 、iodinated ( $^{131}\text{I}$ ) methylnorcholestenol 同時イメージング、Mg 欠乏マウスを用いたマルチトレーサー ( $^{24}\text{Na}$ 、 $^{28}\text{Mg}$ 、 $^{43}\text{K}$ ) イメージング、担癌マウスを用いた  $^{18}\text{F}$ -FDG、 $^{54}\text{MnCl}_2$ 、 $^{65}\text{ZnCl}_2$  同時イメージングなどの *in vivo* イメージングに成功してきた。現段階において小動物を用いた研究用ツールとしての複数分子同時イメージングはほぼ実現したと言える。GREI 装置は、いまだ臨床用の実用化のためには様々な要素技術の開発・改善を要するが、基礎研究ツールとしての複数分子同時イメージングは既に成功したと言える。GREI は、これまでイメージングが困難であった様々な生体微量元素についても、そのダイナミクスを捉えられる唯一のモダリティであり、メタロミクス研究においても有用なツールとなり得る。

### 参考文献

- 1) Motomura S, Enomoto S, Haba H, Igarashi K, Gono Y, and Yano Y (2007) *IEEE Trans. Nucl. Sci.* **54**, 710-717.
- 2) Motomura S, Kanayama Y, Haba H, Watanabe Y, and Enomoto S (2008) *J. Anal. At. Spectrom.* **23**, 1089-1092.

## カチオン性制癌白金錯体のDNA との相互作用様式

○米田誠治,<sup>1-3,5</sup> Nicholas P Farrell,<sup>2</sup> Loren D Williams,<sup>3</sup> 小谷 明,<sup>4</sup> 千熊正彦<sup>5</sup><sup>1</sup> 鈴鹿医療大薬, <sup>2</sup> ヴァージニア連邦大, <sup>3</sup> ジョージア工科大, <sup>4</sup> 金沢大院薬, <sup>5</sup> 大阪薬大薬

【目的】 シスプラチンに代表される白金制癌剤の薬理効果は、白金と DNA との共有結合性付加物の形成に起因すると考えられている。その一方で、ポリアミンまたはアズレートで架橋されたカチオン性白金(II)複核錯体が、顕著な癌細胞増殖抑制活性を発揮することが知られている<sup>1-3</sup>。電氣的に中性分子であるシスプラチンとは異なり、これらのカチオン性白金(II)複核錯体は、DNA と静電的な非共有結合性付加物を形成した上で、最終的に共有結合性付加物を形成すると考えられる。我々はこの非共有結合性の相互作用も、カチオン性白金(II)複核錯体の制癌機構に深く関与していると推定し、その相互作用様式について X 線結晶解析を用いて検討を行った。

【実験方法】 ポリアミンまたはアズレートで架橋された一連のカチオン性白金(II)複核錯体と自己相補型二重らせん DNA [d(CGCGAATTCGCG)]<sub>2</sub> (DDD) をモル混合比 1:1 で共結晶化を行い、X 線結晶解析を用いてその構造を明らかにした。

【結果および考察】 X 線結晶構造において、ポリアミン架橋錯体は、そのアミン配位子が DNA のリン酸と水素結合を形成することによって、リン酸バックボーンに選択的に結合している<sup>4</sup>。一方、アズレート架橋錯体は、主にファンデルワールス接触によって DNA のマイナーグループに結合している。白金制癌剤と DNA の共有結合性の相互作用は制癌作用を発揮するには重要であるが、これによって起こる体内への重金属の蓄積は、重篤な副作用の原因であると考えられている。したがって、カチオン性白金(II)複核錯体と DNA の非共有結合性の相互作用が、その制癌効果の主因であると仮定すると、生体高分子との可逆的な相互作用に主眼を置いた制癌剤の分子設計は、副作用がより軽度な制癌剤を開発する上で有効な指針であると考えられる。

## 【参考文献】

- <sup>1</sup> C. Manzotti, G. Pratesi, E. Menta, R. Di Domenico, E. Cavalletti, H. H. Fiebig, L. R. Kelland, N. Farrell, D. Polizzi, R. Supino, G. Pezzoni, and F. Zunino, *Clin Cancer Res*, 2000, 6, 2626.
- <sup>2</sup> S. Komeda, M. Lutz, A. L. Spek, M. Chikuma, and J. Reedijk, *Inorg Chem*, 2000, 39, 4230.
- <sup>3</sup> S. Komeda, M. Lutz, A. L. Spek, Y. Yamanaka, T. Sato, M. Chikuma, and J. Reedijk, *J Am Chem Soc*, 2002, 124, 4738.
- <sup>4</sup> S. Komeda, T. Moulaei, K. K. Woods, M. Chikuma, N. P. Farrell, and L. D. Williams, *J Am Chem Soc*, 2006, 128, 16092.

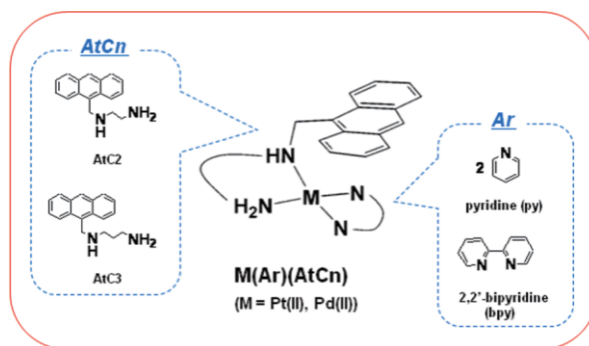
## シスプラチン耐性がんに効く白金 (II) 錯体

○小谷 明<sup>1</sup>、高山 浩<sup>2</sup>、佐藤卓史<sup>3</sup>、千熊正彦<sup>3</sup>金沢大学医薬保健研究域薬学系<sup>1</sup>、名古屋大学理学研究科<sup>2</sup>、大阪薬科大学<sup>3</sup>

【目的】シスプラチンに代表される白金抗がん剤は、広範囲のがんに効くが、耐性ができやすく、新しい白金抗がん剤の開発が望まれている。シスプラチン耐性がんにも有効とされて出現したオキサリプラチンも耐性ができやすく、問題解決に至っていない。白金耐性は銅の輸送経路を活性化して白金の体外輸送が起こると推定されているが、対する有効な対策は見出されていない。我々は、シスプラチンのグアニン配位結合とは異なる作用機構（化学反応性）がひとつの解と考え、核酸とは反応しない4N型 Pt(II)錯体を種々検討した。

【実験方法】Pt(II)錯体合成  $K_2PtCl_4$  から Pt-A-X<sub>2</sub> (A: 2N イミン, 1N イミン x 2, X: Cl, I) を経て, Pt-A-L (L: 2N ligand) を合成した。得た結晶のX線構造解析を行った。

アッセイ ヒト培養細胞を用いて増殖効果抑制濃度 IC<sub>50</sub> から評価した。



【結果・考察】活性が見られた基本構造 Pt 二座を芳香族イミン(Ar), 残る二座を側鎖に芳香環を持つジアミン(AtCn) の場合に活性が見られた。

構造—活性相関 1. 側鎖芳香環が大きいほど, 2. AtCn は5員環 (AtC2) より6員環 (AtC3) が, 3. Ar は単座 (pyridine) より二座配位子 (bpy) が, 高い活性を示した。

化学特性 L 側鎖芳香環と A 配位芳香環の間で芳香環スタッキングが, X線構造解析, H-1 NMR の高磁場シフトから示された。スタッキングの強さは活性と相関を示した。

シスプラチン耐性がんへの効果 Pt(bpy)(AtC3) の IC<sub>50</sub> は L1210 : 9μM, シスプラチン耐性 L1210 : 10μM とほぼ同じと, シスプラチン耐性がんにも効いた。さらに, Pt の Pd 版も同様に 10μM を示し, 作用機構がシスプラチンとは異なり, 非共有性結合であることを示していた。すなわち, シスプラチン耐性がんにも効く白金錯体は配位結合に依らない作用機構を持つ。

抗がん標的 Pt(A)(L) と DNA との相互作用を検討した。L の5員環 (AtC2) と6員環 (AtC3) の差は, CD には差が見られたが, H-1 NMR では差は認められなかった。一方, M(A)(L) (M : Pt, Pd) はプロテアソーム阻害活性を示し, その IC<sub>50</sub> と増殖阻害 IC<sub>50</sub> とは比例関係を示した。

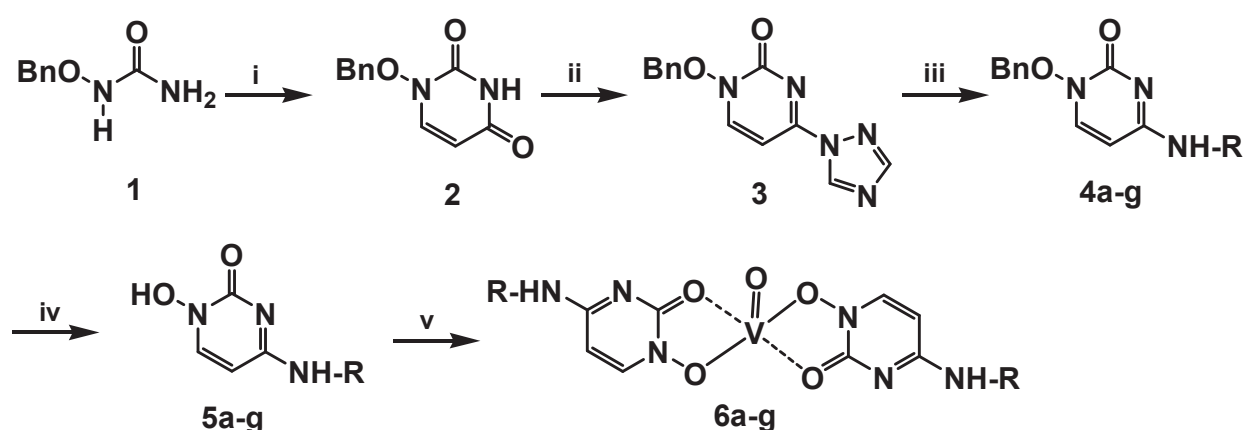
【結論】 シスプラチン耐性がんにも効く Pt 錯体の開発方針を確立した。

## 4-アルキルアミノ-1-ヒドロキシ-2(1*H*)-ピリミジノン-バナジル錯体の合成とそれらのアポトーシス誘導活性

○加藤 明良・山口 美香・松村 有里子  
成蹊大学 理工学部 物質生命理工学科

【目的】アポトーシスとは、生体が形成・維持される過程で不必要に細胞を遺伝子プログラムに従って生理的に除去するものであり、プログラム細胞死とも呼ばれる。癌の発症には、細胞増殖の亢進だけでなくアポトーシスの抑制が重要な役割を果たしている。従って、アポトーシスを癌細胞のみに特異的に誘発できるような物質は、有力な癌治療薬になり得る。当研究室ではこれまで、数多くのアジン系複素環化合物の合成とそれらの化学療法剤への応用について精力的に研究を行ってきた。<sup>1,2)</sup> 今回、4-アルキルアミノ-1-ヒドロキシ-2(1*H*)-ピリミジノン類のバナジル錯体を合成しそれらのアポトーシス誘導活性を調べた結果、興味深い結果が得られたので報告する。

【実験方法】N-ベンジルオキシ尿素 1 に 3,3-ジメトキシプロパン酸メチルエステルを縮合させウラシル 2 とした後、トリアゾールで処理し 4-トリアゾリルピリミジノン 3 を得た。3 に様々な鎖長のアルキルアミンを反応させ 4 とした後、接触還元により脱ベンジル化を行い二座配位子 5a-g を得た。5a-g と VOSO<sub>4</sub> をモル比 2:1 で混合し溶液の pH を 8 程度に調整し、室温で一晩攪拌することによりバナジル錯体 6a-g を得た。(Scheme 1) 6a-g のアポトーシス誘導活性は、ヒト組織球性腫瘍細胞 U937 を用いて評価した。



i: (MeO)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me; ii: triazol, POCl<sub>3</sub>, Et<sub>3</sub>N; iii: R-NH<sub>2</sub>; iv: H<sub>2</sub>/10% Pd-C; v: VOSO<sub>4</sub>

R=CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>; a: n=1, b: n=3, c: n=5, d: n=7, e: n=9, f: n=11, g: n=13

Scheme 1 Synthesis of vanadyl complexes with 4-alkylamino-1-hydroxy-2(1*H*)-pyrimidinones



0.8 x 10<sup>5</sup> cells/mL の細胞懸濁液にサンプルの DMSO 溶液を添加し、48 時間インキュベート後、それぞれの細胞生存率とともに U937 細胞の増殖を 50%抑制する濃度 IC<sub>50</sub> 値も算出した。比較対照物質としては、アポトーシス誘導活性が報告されているお茶成分のエピガロカテキンガレート (EGCG)、無機塩として 4 価バナジウムの VOSO<sub>4</sub> と 5 価バナジウムの Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> を用いた。

【結果および考察】今回合成したバナジル錯体のうち、鎖長の長い **6d-g** は U937 細胞に対して高い腫瘍細胞増殖阻害能を示すことがわかった。また、これらの錯体は濃度依存的に増殖を阻害したことから、それらの IC<sub>50</sub> 値を算出した。(Table 1) その結果、IC<sub>50</sub> 値は数 nM レベルと無機塩である VOSO<sub>4</sub> よりも数倍高い活性を示した。また、同じバナジウム無機塩で比較した場合、その活性は、5 価よりも 4 価の方が高いことがわかった。最後に、アガロースゲル電気泳動を行った結果、EGCG とバナジル錯体を添加したものには DNA のラダーが観測されことから、細胞死がアポトーシス由来であることが示唆された。(Fig. 1)

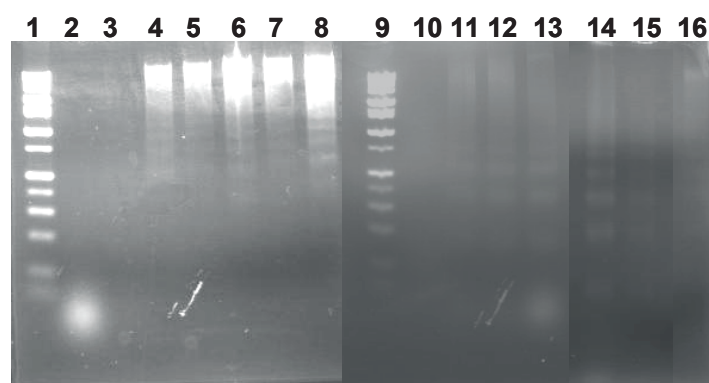
**Table 1** IC<sub>50</sub> values and partition coefficients of vanadyl complexes

Compound	IC <sub>50</sub> (nM)	Pow
EGCG	1000	-
VOSO <sub>4</sub>	11.2 ± 1.14	-
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	335 ± 8.72 <sup>#</sup>	-
<b>6a</b>	480 ± 16 <sup>#</sup>	-
<b>6b</b>	400 ± 31 <sup>#</sup>	*
<b>6c</b>	689 ± 7.9 <sup>#</sup>	0.20
<b>6d</b>	3.40 ± 0.42 <sup>##</sup>	8.55
<b>6e</b>	1.19 ± 0.65 <sup>##</sup> <sup>\$</sup>	**
<b>6f</b>	1.46 ± 0.08 <sup>##</sup>	**
<b>6g</b>	2.54 ± 0.19 <sup>##</sup>	**

\*highly soluble in water, \*\* highly soluble in octanol.

<sup>#</sup>Significance  $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs. VOSO<sub>4</sub>,

<sup>\$</sup> $P < 0.01$  vs. **6d**.



**Fig. 1** DNA fragmentation induced in U937 cells by synthetic vanadyl complexes. 1: DNA maker, 2: control, 3: DMSO, 4: EGCG, 5: **6a**, 6: **6b**, 7: **6c**, 8: **6d**, 9: DNA maker, 10: control, 11: VOSO<sub>4</sub>, 12: Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 13: **6d**, 14: **6e**, 15: **6f**, 16: **6g** DNA fragmentation was analyzed by agarose gel electrophoresis and visualized with ethidium bromide staining under UV light

### 【参考文献】

- 1) Sakurai H., Katoh A., Yoshikawa Y. (2007) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **79**, 1645-1664.
- 2) Yamaguchi M., Saito R., Utsumi K., Ochiai A., Kawashima N., Tokuoka Y., Katoh A. (2007) *Heterocycles* **71**, 1503-1508.

## 神経変性疾患と金属イオン

○ 福永浩司、山本由似、塩田倫史

東北大学大学院薬学研究科・薬理学分野、東北大学 21 世紀 COE プログラム  
「CRESCENDO」

機能性生体内金属イオンである亜鉛と銅イオンはグルタミン神経興奮時にニューロンから放出されシナプス伝達の可塑的变化に関与している。一方、脳虚血やアルツハイマー病の神経変性疾患においてはこれらの金属イオンはラジカル発生やアミロイドベータ蛋白質凝集に関わっている。そのために神経変性疾患治療においては金属キレート剤の投与も試みられているが、これらの金属は酵素活性発現に必須の働きを担っておりキレート剤の有効性については異論がある。

近年、桜井らはバナジウムや亜鉛の金属錯体に血糖降下作用を見だし、糖尿病治療薬としての金属イオンの有用性を確立した(1)。私達は生体内微量金属イオンであるバナジウムの無機化合物及び有機錯体が虚血後の神経細胞死を抑制することを見いだした(2)。バナジウム化合物はチロシンホスファターゼを阻害することにより、インスリン受容体チロシンキナーゼを活性化し、血糖降下作用を有することは知られている。虚血性神経細胞死に対する神経保護作用にもバナジウム化合物のインスリン様活性が関わっていると考えられる。

成熟哺乳動物での神経幹細胞の発現は脳室下帯 (SVZ) と海馬顆粒細下層 (SGZ) に限られている。FGF-2 と EGF を脳虚血後 2-3 日に脳室内に持続注入すると 28 日後に海馬 CA1 領域の錐体細胞が正常の 40% までに回復する。神経幹細胞の増殖には FGF-2 と EGF は必須であることから、CA1 錐体細胞の回復には新生ニューロンも部分的に関わっていると考えられる。しかし、蛋白質である FGF-2/EGF を脳室内投与することはヒトでは臨床応用は不可能であり、末梢投与で神経幹細胞の機能的神経細胞への分化を促進する低分子化合物の開発が望まれている。

私達は齧歯類の脳虚血モデルを用いて、末梢投与したバナジル錯体が SVZ と SGZ での神経前駆細胞の生存と成熟神経細胞への分化を促進することを発見した(3)。特に、4 価バナジル錯体である bis(1-oxy-2-pyridinethiolato) oxovanadium (IV) [VO(OPT)] は海馬歯状回 SGZ において顆粒細胞層に移動する神経前駆細胞の数を顕著に上昇させ、この効果は虚血後の認知機能改善効果と良く相関した (3)。Akt は HIF-1 $\alpha$  を介して VEGF やエリスロポエチンを誘導して、血管新生に関与する他に、グリコーゲン合成酵素キナーゼ(GSK-3 $\beta$ ) の活性を抑制して、神経新生を促進する。ERK は cAMP 反応エレメント結合蛋白質 (CREB) を活性化して神経新生に重要な Bcl-2 や BDNF の発現を促進すると考えられる (4)。

神経変性疾患において生体金属イオンは障害性と保護作用の両面性を有している。今回、生体内微量金属であるバナジウムの錯体が神経保護と神経新生促進効果を有することが

齧歯類の脳虚血モデルで明らかとなった。今後、ヒトにおいて有効な神経再生治療薬のシズ化合物として開発したい。

**【参考文献】**

- 1) 桜井 弘 (2008) YAKUGAKU ZASSHI 128, 317-322
- 2) Shioda N, Ishigami T, Han F, Moriguchi S, Shibuya M, Iwabuchi Y, Fukunaga K (2007) Neuroscience 148, 221-229
- 3) Shioda N, Han F, Morioka M, Fukunaga K (2008) Neuroscience 155, 876-887
- 4) 福永浩司、塩田倫史、森岡基浩、韓 峰 (2008) 日薬理誌 131, 341-346

## カドミウムの毒性と動態におけるさまざまな金属輸送体の役割

○姫野誠一郎<sup>1</sup>、藤代 瞳<sup>1</sup>、榎本秀一<sup>2</sup><sup>1</sup>徳島文理大学薬学部・衛生化学、<sup>2</sup>理化学研究所

## 【目的】

カドミウム (Cd) の動態と毒性発現機構を明らかにする上で、細胞への Cd の取り込み、及び排泄を調節する輸送システムを明らかにすることは必須である。我々は、メタロチオネイン (MT) 欠損細胞から Cd 耐性細胞を樹立することにより、Cd の蓄積が低下しているために Cd 耐性を示す細胞を初めて樹立し、その性状を解析した。その結果、亜鉛 (Zn) 輸送体の一つである ZIP8 の発現が低下していることを見いだした。そこで、MT を発現している細胞から Cd 耐性細胞を樹立した場合でも、これらの金属輸送体の発現が変化するかどうかを検討した。

## 【実験方法】

マウス胎仔由来不死化細胞 (P<sup>+</sup>) から培地中に 70 $\mu$ M の Cd<sup>2+</sup> を添加しても増殖を続ける A<sup>+</sup>70、B<sup>+</sup>70 の 2 種類の Cd 耐性細胞株を樹立した。金属の取り込み効率は、放射標識した Cd<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> を用いて計測した。MT レベルは Hg-binding 法で計測した。

## 【結果および考察】

A<sup>+</sup>70、B<sup>+</sup>70 細胞の MT mRNA、MT 蛋白質レベルは明らかに上昇していた。しかし、Cd<sup>2+</sup> の取り込み速度と蓄積量は A<sup>+</sup>70、B<sup>+</sup>70 細胞で低下していた。従って、MT 発現細胞においても、Cd<sup>2+</sup> の輸送システムの変化が Cd 耐性獲得に関与していることが明らかになった。A<sup>+</sup>70、B<sup>+</sup>70 細胞における金属輸送体、および Ca チャネルの発現を調べたところ、P<sup>+</sup> に比べて、ZIP8 の発現が約 50% に低下し、L-type Ca チャネル (Cacn $\alpha_{1c}$ ) の発現が顕著に低下していた。そこで、様々な金属、および Ca チャネル阻害剤を Cd<sup>2+</sup> と同時に P<sup>+</sup> 細胞に添加したところ、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、および nifedipine によって Cd の取り込みが阻害された。一方、様々な金属に対する交叉耐性を調べたところ、A<sup>+</sup>70、B<sup>+</sup>70 細胞は、MT に結合する Cd<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Hg<sup>2+</sup> のみならず MT に結合しない Mn<sup>2+</sup> にも耐性を示し、Mn<sup>2+</sup> の取り込み、蓄積量も低下していた。これらの結果から、MT を発現する Cd 耐性細胞においても、Cd<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> に親和性を持つ輸送体の発現変化が Cd<sup>2+</sup> 輸送に関与していることが明らかになった。また、ZIP8 のみならず Ca チャネルも Cd<sup>2+</sup> 輸送に関与している可能性が示された。小腸では Fe<sup>2+</sup> 輸送体の DMT1 や Ca<sup>2+</sup> 輸送体の CaT1 が Cd の取り込みに関与していることが知られている。従って、哺乳動物においては、Fe<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup> などの複数の金属の輸送システムが Cd<sup>2+</sup> 輸送に関与しており、組織、細胞によってどの輸送システムが利用されるかが異なっているものと考えられる。

## 細胞内セレン運搬の生化学的解析

○三原久明、江崎信芳

化学研究所 環境物質化学研究系

分子微生物科学

必須微量元素セレンはタンパク質のポリペプチド鎖中にセレノシステイン残基の形で取り込まれ、セレントタンパク質として種々の生理活性を発揮する。セレントタンパク質の生合成において効率的なセレン供源となり得るものとしては、含セレンアミノ酸であるセレノメチオニンやセレノシステインおよびこれらを含むタンパク質、あるいは無機セレンである亜セレン酸などが知られる。しかし、このようなセレン源の吸収、代謝の分子レベルでの詳細や細胞内の動態は明らかではない。セレントタンパク質生合成の鍵化合物であるセレノリン酸は、セレノリン酸シンテターゼ (SPS) により Fig. 1 に示す反応で合成されるが、生体中の遊離セレニド濃度は極めて低いため、本酵素に基質を効率的に運搬するシステムが存在すると考えられている。セレノシステインリアーゼ (SCL) は遊離の L-セレノシステインを特異的に分解し、ペルセレニド (-S-SeH) の形で酵素上にセレンを保持することから、SPS へのセレン運搬タンパク質として機能することが示唆されている。我々は、SCL のセレン特異的基質認識機構を X 線結晶構造解析により明らかにすると共に、SCL が SPS と相互作用することを免疫沈降法により見出した。SPS を含む複数のタンパク質と tRNA<sup>Sec</sup> (セレノシステイン用の tRNA) が超複合体を形成することが示唆されていることから<sup>1)</sup>、SCL はこの超複合体との相互作用を介した効率的なセレン運搬システムに含まれる可能性が考えられる。また、亜セレン酸はグルタチオンにより還元されてセレントタンパク質生合成経路へと導かれるものと一般には考えられているが、チオレドキシソレダクターゼが亜セレン酸を直接的に還元する能力があることなどから、亜セレン酸の還元には複数の経路が関与する可能性がある。我々は最近、少なくとも大腸菌においては、亜セレン酸をセレン源としたセレントタンパク質の合成がチオレドキシソシステムに依存することを見出しており<sup>2)</sup>、哺乳動物における亜セレン酸の還元系と SPS への運搬についてはさらなる解析が必要であると考えられる。



Fig. 1. Reaction catalyzed by selenophosphate synthetase

## 【参考文献】

- 1) Small-Howard A *et al.* (2006) *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2337-2346.
- 2) Takahata M *et al.* (2008) *J. Biochem.* **143**, 467-473.



## 薬剤耐性における金属輸送の役割

○鈴木俊宏、兎川忠靖、櫻庭均  
明治薬科大学 分析化学教室

シスプラチンは白金 (Pt) を中心に持つ金属錯体医薬品で、分子標的治療薬など新薬が開発されてきている現在でも尚、広く癌化学療法に用いられる極めて優れた抗がん剤である。その耐性を克服することは併用化学療法を行う癌化学療法上とても重要であり、その耐性研究が盛んに行われてきた。

シスプラチンが金属医薬品であることから、メタロチオネインやグルタチオンによる解毒あるいは薬効から標的である DNA 修復を介した機構も多く報告されている。しかし演者らは、耐性細胞を用いた検討から、シスプラチンの細胞内濃度が耐性に大きく関与すると考え、輸送機構に着目し研究を行ってきた。取り込みに関してはエンドサイトーシスや銅輸送体の関与などいくつかの説があるが、ある種のシスプラチン耐性細胞はヒ素に対して交叉耐性を示すこと。さらにその蓄積量についても相関があることなどから、ヒ素輸送機構が関与していることを明らかにした。細胞内挙動に関してはシスプラチンが錯体であるゆえに形態を変えて動くことから、その機構解明を困難にしていると思われるが、HPLC による測定法の開発により、未変化体の解析を可能とした。また、排出に関してはシスプラチン耐性肺がん細胞株から ABC トランスポーターの一つである MRP5 をクローニングし、その他のファミリーも含めて GSH との複合体生成、排出、すなわち GS-X ポンプによる排出の可能性を検討した。本講では演者らの知見を含めてシスプラチンを中心とした抗がん剤耐性と輸送、特に金属輸送との関わりについて述べたいと思う。

## ヒ素の毒性発現における生体分子との相互作用

O鈴木紀行

千葉大院薬

【目的】ヒ素は古典的な毒物あり、現在も井水からの摂取による汚染が問題となっている一方で、急性前骨髄球性白血病に対し著効を示すことからその治療薬として注目を集めている元素である。

ヒ素に曝露されることによって、癌や糖尿病といった様々な疾病が発生する。そういったヒ素毒性の根底には、ヒ素と生体分子との相互作用があり、その相互作用が生体分子の正常な働きを損なうことがヒ素の毒性の本質であると考えられる。そこで我々は、ターゲットとなりうる様々な生体分子とヒ素化合物との相互作用を、特にヒ素の化学形態に注目して解析し、その毒性発現機構の検討を行った。

ヒ素は主に無機ヒ素として生体に摂取され体内でメチル化代謝を受ける。今回我々は、それらの代謝物の中で毒性の高い三価の無機ヒ素である arsenite ( $iAs^{III}$ )、メチル化体である monomethylarsonous acid ( $MMA^{III}$ )、dimethylarsinous acid ( $DMA^{III}$ ) に特に注目し、ヒ素の化学形態による個体内、さらには細胞内の局在性の違いについて検討した。そしてそれに基づいて細胞内小器官およびその構成成分となる生体分子へのヒ素化合物の作用を検討し、各ヒ素化合物ごとにその毒性発現の詳細な分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【実験方法】個体内のヒ素化合物の分布について：6週齢雄性 Wistar rat にヒ素化合物を尾静脈内投与し各臓器を採取し、HPLC-ICP-MSにより各臓器中に分布したヒ素化合物のスペシエーションを行った。

細胞内のヒ素化合物の分布について：ラット肝細胞由来 RLC-16 cells にヒ素化合物を曝露し、細胞を収穫・破碎し調製した細胞懸濁液から遠心分離により核・ミトコンドリア・ミクロソーム・サイトゾル画分を得、各画分に含まれるヒ素化合物のスペシエーションを行った。

ミトコンドリアに関する検討：Wistar rat 肝組織より得たミトコンドリア画分を用い、ミトコンドリアにヒ素を曝露した際のアポトーシスシグナルの活性化をミトコンドリアの膨潤を指標として検討した。また、このミトコンドリア画分を用いてサブミトコンドリアパーティクルを作成し、エネルギー産生に関わる電子伝達系へのヒ素化合物曝露の影響と、その際の活性酸素種産生に関する検討を行った。

活性酸素種および  $Ca^{2+}$  イメージング RLC-16cells に活性酸素蛍光プローブ CM-DCFHDA またはミトコンドリア局在性の  $Ca^{2+}$  蛍光プローブである Rhod-2 AM を処理し、各ヒ

素化合物を曝露し共焦点蛍光顕微鏡にて生細胞イメージングを行った。

【結果および考察】 Wistar rat に投与された無機ヒ素は、主に肝臓でメチル化代謝を受ける。その代謝物であるメチル化ヒ素は、元の無機ヒ素とは細胞内コンパートメントへの分布の傾向が異なり、それぞれの毒性発現機構に影響を与えていると考えられる。そこで、ヒ素の毒性発現と各細胞内小器官の関連を検討することとした。まず、様々な毒物の細胞毒性発現に大きな役割を果たすミトコンドリアに関して検討を行った。その結果、 $\text{MMA}^{\text{III}}$ ・ $\text{DMA}^{\text{III}}$ をミトコンドリアに曝露することにより、細胞内レベルの $\text{Ca}^{2+}$ 濃度においてもミトコンドリアの膨潤が観察され、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存的な mitochondrial permeability transition (MPT) pore の開口を強く促進していることが明らかとなった。そこで細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 動態を明らかにするために $\text{Ca}^{2+}$ 蛍光イメージングを行った。その結果、 $\text{DMA}^{\text{III}}$ を曝露することによりミトコンドリア内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が大きく上昇したことから、 $\text{DMA}^{\text{III}}$ はミトコンドリアの $\text{Ca}^{2+}$ トランスポーターに作用しその動態に影響を与えていることが示唆された。 $\text{MMA}^{\text{III}}$ については $\text{Ca}^{2+}$ 動態には影響を示さなかったが、 $\text{MMA}^{\text{III}}$ 曝露細胞においてCM-DCFH由来の蛍光がミトコンドリアに強く局在していたことから、 $\text{MMA}^{\text{III}}$ に関してはミトコンドリアにおいて活性酸素種の産生を介して膨潤を誘導していると考えられる。サブミトコンドリアパーティクルを用い電子伝達系へのヒ素化合物の作用を検討した結果  $\text{MMA}^{\text{III}}$  でのみ電子伝達の阻害が起きたことも、この仮説を支持している。また、CM-DCFH DA による生細胞イメージングを行った際、 $\text{DMA}^{\text{III}}$ を曝露した際には小胞体由来と思われる活性酸素種の産生が確認されたため、各ヒ素化合物の小胞体への作用をここで検討することとした。その結果、ヒ素曝露により小胞体ストレスマーカーの一つである CHOP の発現量が上昇した。この CHOP 発現の上昇は  $\text{DMA}^{\text{III}}$  により顕著であったことから、 $\text{DMA}^{\text{III}}$  は小胞体ストレスを介した毒性を発現する傾向が強いと考えられる。以上より、生体内で生成するヒ素代謝物はもとの無機ヒ素とはその毒性発現機構が異なり、それがヒ素曝露により起こる循環器疾患・糖尿病・癌といった疾病の病態に深く関連していると考えられる。

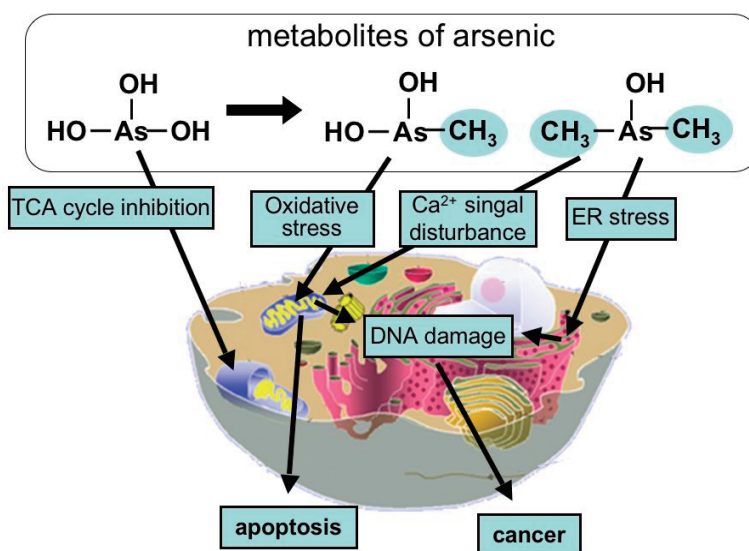


Figure 1. Arsenic metabolites and their respective targets for toxic mechanisms.



# 口頭発表（一般）要旨

# O1-1

## 損傷坐骨神経の回復過程における下腿筋群でのタリウムの挙動

○田島麻衣、稲岡プレイアデス千春、鷲山幸信、立野勝彦、天野良平  
金沢大・医・保

【目的】筋萎縮は重要な問題であり，その進行や回復過程を非侵襲的にモニターできる方法が望まれる．また，筋の回復の評価に使用できる指標が得られれば筋萎縮などの研究に有用となる可能性がある．

$^{201}\text{TlCl}$  は臨床で心筋のイメージングに使用されている放射性医薬品であるが，本研究室では心筋以外の活動している骨格筋群にもその生理活性を反映して集積，滞留するという考えから，廃用性筋萎縮などの研究における筋の血流量の評価に用いてきた．

タリウムの心筋への取込は1価の陽イオン( $\text{Tl}^+$ )の形で行われ，カリウムイオン( $\text{K}^+$ )と同様の動態をとる．静注された  $\text{Tl}^+$  は血流量に依存して分配され，細胞膜の Na-K ポンプにより能動的に細胞内に取り込まれる．能動輸送により細胞内に取り込まれた  $\text{Tl}^+$  は  $\text{K}^+$  と同様にカリウムチャンネルから細胞外へ移動する．これにより細胞膜を介した  $\text{K}^+$  の移動を通して，細胞の活動性を見ることができる．

本研究では RI を利用した筋回復のモニタリングの可能性について検討することを目的とし，一方の坐骨神経を損傷させたラットについて下腿筋重量， $^{201}\text{Tl}$  取込率の経時的変化を観察した．

【実験方法】本実験には日本チャールズ・リバー社より購入した7週齢の Wistar 系雄ラット ( $240 \pm 4.28$  g) を使用した．はじめにネンブタール麻酔下で右側坐骨神経を大腿骨長の中間の位置で圧迫し坐骨神経損傷ラットを作成した．圧迫はピンセットを使用して坐骨神経が半分つぶれる程度の力で2方向より15秒間ずつ行った．このラットを一定期間飼育し，解剖の1時間前に放射能濃度  $1 \text{ MBq/g}$  の  $^{201}\text{TlCl}$  溶液  $100 \text{ mg}$  を尾静脈より投与した．損傷後の飼育期間は2日間，1週間，2週間，3週間，5週間とし，それぞれに3匹のラットを使用した．エーテル麻酔による屠殺ののち解剖を行い，ヒラメ筋，腓腹筋(外側頭)，長趾伸筋，前脛骨筋，心臓，肝臓，血液を摘出した．各組織の湿重量秤量後，NaI(Tl)シンチレーションカウンタで放射能強度を測定し，単位重量あたりの  $^{201}\text{Tl}$  取込率 [% ID /g] を算出した．

【結果および考察】摘出した筋試料の重量と  $^{201}\text{Tl}$  取込率 [% ID /g] の結果を表1，表2，図1，図2に示す．

損傷側，健常側の筋重量を比較すると，健常側はラットの成長のため飼育期間の経過に伴い増加した．損傷側の筋には1週間から減少が見られ，2~3週間後にピークをとったのち徐々に健常側の値に近づいた．両側の差はヒラメ筋が最も大きかった．

$^{201}\text{Tl}$  取込率は，健常側には実験の期間中に大きな変化は見られなかった．損傷側の長趾伸筋と前脛骨筋は1週間後に健常側の2~3倍の値をとった．この増加分は徐々に

減少してゆき、5週間後には健常側と同程度になった。損傷側のヒラメ筋と腓腹筋は2日後から大きく減少し、ヒラメ筋は徐々に回復した。腓腹筋は1週間後以降に健常側と同程度の値をとった。坐骨神経損傷の影響を受けた下腿筋が健常側と同程度の値をとるのは、 $^{201}\text{Tl}$  取込率が3~5週間、筋重量が5週間以降となり、血流量の回復は筋重量の回復より先に起こると考えられた。また、ヒラメ筋、腓腹筋の $^{201}\text{Tl}$  取込率は全期間で健常側の筋と同じか、やや多い程度にとどまっており、神経損傷の影響を受けた筋が回復する過程にとくに大きな血流は必要ないのではないかと考えた。

長趾伸筋と前脛骨筋は足関節の背屈に、ヒラメ筋と腓腹筋は足関節の底屈に使用されるが、飼育期間中はラットが損傷のために足関節を自由に動かさず、健常時に背屈位となる姿勢で底屈位をとる様子が何度か見られていた。底屈位はヒラメ筋と腓腹筋が短縮した状態になるため、損傷からまもなくヒラメ筋と腓腹筋の $^{201}\text{Tl}$  取込率が大きく減少したのは、底屈位を長時間とりヒラメ筋と腓腹筋の短縮が持続されることがあったためではないかと考えた。一方、損傷側の長趾伸筋と前脛骨筋の $^{201}\text{Tl}$  取込率には1週間後より大きな増加が見られたが、ヒラメ筋と腓腹筋が適切に使用されない姿勢のために長趾伸筋と前脛骨筋に負担がかかり、血流量が増加したのではないかと予想した。また $^{201}\text{Tl}$  取込率の減少はとくにヒラメ筋で目立っていたが、この筋は抗重力筋でありバランスをとることが必要な姿勢に重要な働きをもつことから、神経の損傷により健常時の姿勢をとることができずヒラメ筋を適正に使用できなくなっていたためと考えられた。

#### 【参考文献】

- 1) 西村恒彦, 西村重敬, EMBに基づいた誰でもわかる心臓核医学, 株式会社メジカルセンス, 2002, p10.

N末アミノ酸を置換した<sup>111</sup>In-DOTA結合octreotide誘導体の腎放射能集積に関する検討

○北村陽二<sup>1</sup>、秋澤宏行<sup>2</sup>、八木美知枝<sup>1</sup>、清水隆也<sup>1</sup>、中島 聡<sup>1</sup>、秋吉佑美<sup>1</sup>

御船正樹<sup>1</sup>、斎藤 寛<sup>1</sup>、荒野 泰<sup>3</sup>、榎本秀一<sup>1, 4</sup>、佐治英郎<sup>5</sup>

<sup>1</sup>岡大院薬、<sup>2</sup>北医療大薬、<sup>3</sup>千葉大院薬、<sup>4</sup>理研メタロミクスイメージング研、<sup>5</sup>京大院薬

【目的】 キレーターであるDTPAやDOTAが結合したoctreotide誘導体と、<sup>111</sup>Inや<sup>90</sup>Yなどの3価の放射性金属との錯体は、腫瘍診断薬や内用放射線腫瘍治療薬剤として、有用性が認められている。しかし、これらの錯体は、正常な腎臓にも放射能が集積・滞留することが問題となっている。これまでに、<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe-octreotideのN末アミノ酸への負電荷の導入が、この腎放射能集積の低減に有効であることを報告してきた。そこで、本研究では、腎放射能集積の低減を目的として、キレート部位がDOTAの場合について、負電荷の導入が腎放射能集積に及ぼす影響を検討した。

【実験方法】 DOT A-octreotide誘導体をFmoc固相合成法で合成し、<sup>111</sup>Inを用いて標識し、<sup>111</sup>In-DOTA-D-Phe-octreotide (D-Phe体) と、そのN末D-PheをD-Asp 1個及び2個に置換した<sup>111</sup>In-DOTA-D-Asp-octreotide (D-Asp体) と<sup>111</sup>In-DOTA-D-Asp-D-Asp-octreotide (D-Asp-D-Asp体) を調製した。得られた化合物の物理化学的性質やマウス体内放射能分布などを検討した。

【結果および考察】 *n*-octanol/buffer 分配比により脂溶性について検討した結果、化合物間で比較すると、D-Phe体>D-Asp体>D-Asp-D-Asp体の順に脂溶性が低かったが、いずれの化合物の脂溶性も非常に低かった。電気泳動により化合物の電氣的性質を調べた結果、陽極側への移動度はD-Phe体<D-Asp体<D-Asp-D-Asp体の順に大きく、導入したD-Aspの数に対応して負電荷が付与され、化合物全体の電氣的性質に反映されていることが分かった。マウスに投与すると、いずれの場合も放射能は速やかに血液中から消失し、大部分が尿中に排泄された。また、いずれの化合物も、*in vitro* 血漿中で少なくとも3時間安定であったことから、いずれも未変化体として各臓器へ集積すると考えられた。問題の腎放射能集積については、投与1時間後以降においては、D-Asp体、及びD-Asp-D-Asp体ともに、D-Phe体と比較し低い値を示す傾向が認められ、特にD-Asp-D-Asp体の腎集積は有意に低かった。以上の結果は、octreotide誘導体においては、キレート部位がDOTAの場合でも、DTPAの場合と同様に、負電荷の導入が腎放射能集積の低減に有効である可能性を示している。

本研究で得られた知見は、腎放射能集積を低減したペプチド放射性医薬品の開発の一つの有益な情報を与えるものと考えられる。

# O1-3

## 光合成器官葉緑体の持つ水の光分解機能に対する金属イオンの添加効果

○天尾 豊, 大橋亜美

大分大学工学部

【目的】高等植物は、葉緑体中で進行する光合成反応を利用して巧みに太陽エネルギーを生命活動源として利用している。葉緑体中では、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)を生成する還元反応系である光化学系 I (PSI)と、水を酸化して酸素を発生する光化学系 II (PSII)の2つ反応系が連結した酸化還元反応系である。光化学系 I で生成した NADPH を触媒と接触させることで水素を獲得することができれば、太陽光を有効利用し、水を酸素と水素とに光分解することが達成できる。しかしながら、これらの機能を利用した人工光合成系を基盤とした水の光分解の構築は、十分に進んでおらず、中でも酸素発生反応の研究は進んでいないのが現状である。光化学系 II における酸素発生部位は、4つのマンガンイオンと1つのカルシウムイオンが配位したカルシウム・マンガン (Ca-4Mn) クラスタで構成されており、水の光酸化反応の重要な触媒部位である。そこで本研究では、光化学系 II を利用した効率的な水の光酸化反応系を構築するための基礎研究として、ホウレン草から抽出した葉緑体成分であるグラナ部位、電子受容体として2,6-ジクロロインドフェノール (DCIP) を用いた水の光酸化反応に対するマンガンイオンの添加効果について調べた。

【実験方法】グラナの調製は以下の方法を用いた。ホウレン草と緩衝液をミキサーにいれ、磨砕した。得られた磨砕液をろ過し、そのろ液を 10000G で 10 分間遠心分離した。上澄を捨て、沈殿したグラナ成分を緩衝液で懸濁し、界面活性剤 D-β-オクチルグルコシドと混在してグラナ調製液とし、冷凍庫内で保存した。調製したグラナ溶液、2,6-ジクロロインドフェノール (DCIP)、1,1-ジメチル尿素 (DCMU)、酢酸マンガン (II) あるいは (III) をそれぞれ反応管に入れ、リン酸塩緩衝液 (pH8.0) で調製した。この溶液を十分脱気し、気相をアルゴン置換した後、30℃恒温水槽内に反応管を固定し、赤色光照射により反応を開始した。60 分毎に溶液の吸収スペクトルを測定し、DCIP の光還元反応を、クラーク型溶存酸素系システムを用いて水の分解に伴って発生した酸素量を追跡した。

### 【結果および考察】

グラナを用いた DCIP の光還元反応に対する2価及び3価のマンガンイオンの添加効果について検討した。最初に2価のマンガンイオンの添加効果について調べた結果、マンガンイオン 0.04 mM を添加したときに、最も DCIP の光還元反応が進行し、その時の DCIP 還元率は 19.3%であった。マンガンイオン 0.04 mM 以上を添加すると反応速度が減少することも分かった。次に3価のマンガンイオンの添加効果について調べた結果、マンガンイオン 0.08 mM を添加した際に、最も DCIP の光還元反応が進行し、その時の DCIP 還元率は 19.5%であった。また2価のマンガンイオンの添加効果と同様に、マンガンイオン 0.08 mM 以上を添加すると反応速度が減少することも分かった。



## メチル水銀によるソルビトール脱水素酵素の阻害機構

○外山喬士<sup>a</sup>、角大悟<sup>a</sup>、新開泰弘<sup>b</sup>、鍛冶利幸<sup>b</sup>、熊谷嘉人<sup>a</sup><sup>a</sup>筑波大学大学院人間総合科学研究科、<sup>b</sup>北陸大学薬学部

【目的】 生体内には微量ながら生命現象に不可欠な金属元素が存在する。なかでも亜鉛 (Zn) は、タンパク質中のグルタミン酸やヒスチジン、システインと好んで配位することが知られており、酵素活性や高次構造の維持・安定化に関与する。一方、環境中に普遍的に存在するメチル水銀 (MeHg) は、システインの SH 基と高い親和性を有している。そのため、MeHg は Zn 結合性タンパク質の SH 基を修飾することで、Zn の遊離を促進すると予想される。そこで我々は、ラット肝の粗精製画分から MeHg により容易に不溶化するタンパク質を同定し、その中でも Zn 結合性タンパク質に注目して、MeHg による機能変化を検討した。

【実験方法】 MeHg 結合タンパク質の同定：ラット肝臓の CM-52 画分に MeHg を添加後、不溶化するタンパク質を遠心分離により回収した。残渣をグルタチオンで可溶化し、アシル水銀カラムに結合したタンパク質を二次元電気泳動により分離した。スポットをリジルエンドペプチダーゼ消化後、MALDI-TOF/MS によるペプチドマスマッピングを行った。MeHg の結合：ビオチン標識マレイミドを MeHg と競合的に用いたウエスタンブロット法、及び MALDI-TOF/MS により検討した。MeHg の修飾部位：トリプシン消化後、MALDI-TOF/MS により検討した。Zn 含有量：ICP-MS により測定した。

【結果および考察】 1) MeHg の結合により容易に不溶化する Zn 結合性タンパク質として、ソルビトール脱水素酵素 (SDH) が同定された。2) 作成したリコンビナント SDH の酵素活性は低濃度の MeHg によって阻害され ( $IC_{50}=0.77 \mu M$ )、 $4 \mu M$  の MeHg によって完全に失活した。このような MeHg による活性低下に伴い、本タンパク質の不溶化が見られた。3) MALDI-TOF/MS 解析の結果、MeHg は SDH 活性に必要である Zn の配位子の、Cys44 と共有結合することが示された。4) ICP-MS の結果から、SDH と MeHg の結合による Zn 含有量の低下が明らかとなった。5) Cys44 を Ser に変異させた SDH では、Zn の含有量が低下し、酵素活性が見られなくなった。

以上のことから、MeHg は SDH 中の Cys44 と結合し、Zn を遊離することで活性を阻害する機構が示された。SDH は生体においてソルビトールの蓄積を抑制しており、細胞の浸透圧調整に重要である。ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) を用いた検討から、細胞内でも SDH と MeHg の結合が認められており、MeHg は SDH 活性低下に起因した浸透圧ストレスを誘起する可能性が示唆された。これに関しては現在検討中である。



## ラット胆汁中ヒ素代謝物におけるグルタチオンと過酸化水素の役割

○小林弥生<sup>a</sup>、平野靖史郎<sup>b</sup>独立行政法人国立環境研究所 <sup>a</sup>環境健康研究領域、<sup>b</sup>環境リスク研究センター

【目的】生体内に取り込まれた無機ヒ素化合物は、還元およびメチル化という代謝過程を経て体外に排泄される。以前、メチル化はヒ素の解毒機構として知られていたが、最近になって代謝過程において生成する3価メチルヒ素化合物 ( $[\text{CH}_3\text{As}(\text{OH})_2]$ ; MMA<sup>III</sup> および  $[(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{OH})]$ ; DMA<sup>III</sup>) の毒性が3価無機ヒ素化合物 ( $[\text{As}(\text{OH})_3]$ ; iAs<sup>III</sup>) よりも高いことから、毒性発現機構と認識されるようになってくるなど、ヒ素の代謝および解毒機構については未だ明らかになっていない点が多い。ヒ素を投与したラットの胆汁中にはヒ素-グルタチオン (As-GSH) 抱合体 ( $[\text{As}(\text{GS})_3]$ ; ATG および  $[\text{CH}_3\text{As}(\text{GS})_2]$ ; MADG) が排泄される。我々は以前、胆汁中の As-GSH 抱合体の安定性を検討した際に、As-GSH 抱合体は、iAs<sup>III</sup> および MMA<sup>III</sup> に加水分解され、MMA<sup>III</sup> はさらに5価 ( $[\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2]$ ; MMA<sup>V</sup>) へと酸化されること、また GSH は濃度依存的に As-GSH 抱合体の分解を抑制することを明らかにした<sup>1)</sup>。さらに、胆汁中における3価ヒ素化合物の酸化がヒ素化合物の解毒に直接関与していると考え、無機ヒ素化合物を投与したラットの胆汁中の過酸化水素の測定を行うと共に、As-GSH 抱合体の安定性に関する過酸化水素と GSH の役割について報告した<sup>2)</sup>。ここでは、これまでに得られた上記結果についてまとめると共に、胆汁中におけるヒ素代謝物の安定性について新たに得られた知見を報告する。

【実験方法】8週齢の雄性 SD ラットに麻酔下で胆管カニューレーションを施した。コントロール群には生理食塩水を、ヒ素投与群は亜ヒ酸ナトリウムを 0.2 (低用量群) または 2.0 mg As/kg b.w. (高用量群) の用量で尾静脈投与した後、30分間胆汁を採取した。胆汁は50倍に希釈し過酸化水素の測定に用いた。過酸化水素の測定は hydrogen peroxide/peroxidase detection kit (Cell Technology, Inc, CA, USA) を用いた。また、胆汁中での As-GSH 抱合体の安定性を明らかにするために、無処理、熱処理、カタラーゼ処理および透析をした胆汁中に、合成した ATG および MADG を添加し 37°C で10分間加温し、ヒ素の化学形態を調べた。総ヒ素濃度は誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) により、胆汁中のヒ素および硫黄の化学形態別分析には陰イオン交換カラムを装着した高速液体クロマトグラム (HPLC) -プラズマ発光分析 (ICP-AES) 法にて測定した。胆汁中の As-GSH 抱合体の安定性は HPLC-ICP-MS 法の測定結果から評価した。

【結果および考察】胆汁中の過酸化水素濃度を測定したところ、低用量群においては対

照群とほとんど差がみられなかったが、高用量群では対照群の 12.6 倍 (約 300  $\mu\text{M}$ ) の過酸化水素が検出された。胆汁中の過酸化脂質の濃度は、対照群と比較しヒ素投与においてわずかに低下したものの、有意な差はみられなかった。投与後 30 分間に得られた胆汁中へのヒ素の排泄は低用量群で投与量の 9.6%、高用量群においては 20%となった。HPLC-ICP-AES の結果から、低用量群の胆汁において ATG は検出されず、胆汁中のヒ素の約 71%が MADG であり、高用量群では ATG が約 90%、MADG が約 8%となった。胆汁中の GSH 濃度は、低用量群においては対照群と有意な差がみられなかったが、高用量群では対照群と比較し 4.5 倍 (約 10 mM) の GSH が胆汁中に排泄されていることが分かった。

次に、対照群の胆汁 (無処理) と熱処理、カタラーゼ処理および透析を行った後の胆汁を用いて、胆汁中における As-GSH 抱合体の安定性を調べた。ATG は無処理の胆汁中で不安定であり、 $\text{iAs}^{\text{III}}$  へと加水分解されていた。一方、MADG は  $\text{MMA}^{\text{III}}$  へ加水分解され、さらに  $\text{MMA}^{\text{V}}$  へと酸化されていた。熱処理をした胆汁においても無処理の胆汁と同様の結果が得られ、 $\text{MMA}^{\text{V}}$  の割合は無処理の胆汁よりも多かった。この時の胆汁中の過酸化水素濃度も無処理の胆汁と比較し、熱処理をした胆汁の方が高かった。胆汁中の過酸化水素の濃度はカタラーゼ処理および透析処理により低下し、それに伴ってヒ素化合物の酸化も抑制された。また、GSH の添加により As-GSH 抱合体は安定化し、3 価ヒ素化合物への加水分解が抑制された。

以上の結果から、ヒ素を投与したラット胆汁中に排泄された ATG あるいは MADG は、過酸化水素により毒性のより低い 5 価へと酸化されるとともに、同時に排泄される高濃度 GSH により As-GSH 抱合体が安定化されることにより、毒性の高い  $\text{iAs}^{\text{III}}$  や  $\text{MMA}^{\text{III}}$  への変化が抑制されているものと考えられる。

#### 【参考文献】

- 1) Kobayashi, Y., Cui, X., Hirano, S. (2005) *Toxicology* 211, 115–123.
- 2) Kobayashi, Y., Hirano, S. (2008) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232, 33–40.

## マンガン脳症とトランスフェリン

○阿部 啓太、西田 雄三

山形大学理学部 物質生命化学科

### 【目的】

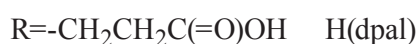
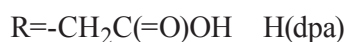
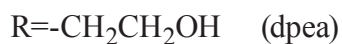
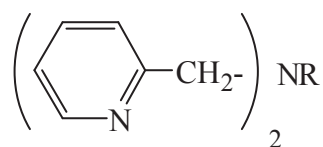
最近、マンガン脳症 (manganism) が脳疾患として非常に注目されている。症状としてはパーキンソン氏病と似ており、そのためパーキンソン氏病と誤診されている可能性が高く、今後はその数が飛躍的に増大すると危惧されている。脳に過剰のマンガンイオンが蓄積することが原因であるが、その過剰蓄積の機構は全く解かっていない。マンガンイオンは鉄イオンと同様に我々生体にとって必要な金属イオンであるが、通常の食生活では脳に過剰に蓄積することはない。この機構を解明しなければ、今後マンガン脳症患者の飛躍的増大を阻止できない。

マンガンイオンの脳への輸送機構の解明が最大の問題であるが、これがさっぱり解かっていない。われわれは最近、鉄 (III) イオンの輸送体であるトランスフェリンがいくつかのマンガン (III) キレート中のマンガンイオンを容易に取り込むことを見出した。これは重要な発見であり、今回、この体内でのマンガン (III) 錯体の生成機構・トランスフェリンへの取り込みの機構を明らかにする目的で研究を行った。

### 【実験方法】

アポトランスフェリンは一般的に鉄 (III) イオンに高い親和性を示す。アポトランスフェリンと二核構造を持つ鉄 (III)-(ida) 錯体との反応で、鉄錯体の鉄イオンがアポトランスフェリンに移行することを、吸収スペクトル・ESR 法から明らかにしてきたが、新しくキャピラリー電気泳動法 (CE) でこの鉄イオンの移行反応を瞬時に検出できることを見出した。このキャピラリー電気泳動法 (CE) を今回の研究においても使用した。

マンガンイオンとトランスフェリンとの相互作用研究では、これまでは 2 価の塩化マンガン溶液が使用されてきた。しかし、生体中のマンガンイオンはこのような単純な化合物とは異なるので、生体反応を検討する上では全く意味がない。そこで、今回の研究では、生体中で可能性のある化合物という観点から、下に示した配位子のマンガン錯体を取り扱った。この中で、H(dpa) 配位子の場合はマンガン (II) 錯体に加えて、二核マンガン (III/IV) 錯体も単離されているので、マンガンイオンの酸化状態とアポトランスフェリンとの反応性の違いを見ることができ、H(dpea) 配位子では、マンガン錯体としては 2 価のものが単離できるが、その水溶液は、放置すると色が変わるので、マンガン (III) イオンに酸化されていることは明らかなである。このようなマンガン錯体溶液とアポトランスフェリンとの相互作用を検討した。



### 【結果及び考察】

今回の結果で注目すべきは、酸化された Mn(III)-(dpea) 錯体溶液にアポトランスフェリンを加えると、オキソ架橋二核 Mn(III)/(IV) 錯体に特有の 16 線の ESR シグナルが観測できることである (Figure 1 参照)。

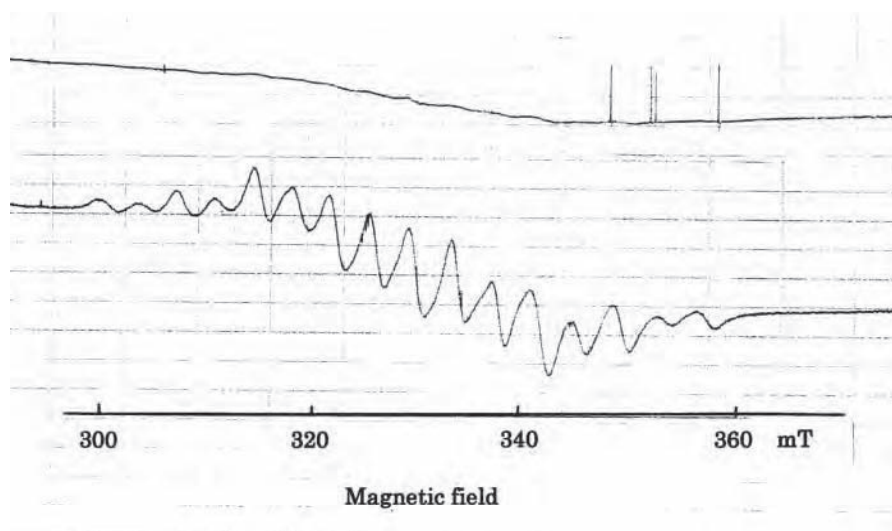


Figure 1. ESR spectra of the solutions (X-band, 295 K). Upper, Mn(III)-dpea solution; Lower, Apo-transferrin was added to the above solution.

二核マンガン (III) 錯体がアポトランスフェリンと相互作用し、Mn(III)/Mn(IV) 種が形成してから、マンガンイオンが移動していることが、他の錯体の結果からも示唆された。

### 【参考文献】

Nishida, The Chemical Times, 2008, No.2, 15-22.

Abe, et al. Z. Naturforsch., 63c, 154 (2008).

### ラット培養脊髄後根神経節細胞へのセレン取り込み挙動の検討

○古賀 健太郎、井上 美佳、原武 衛、中山 守雄

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 衛生化学研究室

【目的】セレン(Se)は、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)などのセレンタンパク質に挿入され、生体内レドックス制御の一翼を担っている必須微量元素である。Se 含量の異なる飼料をマウスなどの実験動物に与えると、肝臓や血液中などの Se 濃度は飼料の Se 含量に対応して変化するが、脳内のそれはほとんど変化しない。したがって、Se 化合物の脳への吸収とそれに続く代謝過程は、末梢の組織や臓器のそれらとは異なるのではないかと考えられた。本研究では、Se に対する脳の特異な挙動についての情報を得ることを目的として、培養脊髄後根神経節(Dorsal Root Ganglion、DRG)細胞を使って、神経細胞への Se の取り込み挙動を検討した。

【実験方法】DRG 細胞の単離と培養：3-4 週齢雄性 Wistar ラットをエーテルで屠殺後、脊椎骨を摘出した。脊椎骨を Hank's 溶液に入れ、氷浴で冷やしながら実体顕微鏡下で DRG を摘出し、周囲の結合組織を除去した後、コラゲナーゼとトリプシンで順次処理し細胞を分散させ、5% CO<sub>2</sub> 条件下、10%FBS 含有 DMEM 培地で培養した。細胞質 GPx 活性の測定：低張緩衝液で溶解した DRG 細胞を遠心処理した後、得られた上清にグルタチオン(GSH)と GSH リダクターゼを加え、過酸化水素を基質として、波長 340 nm における NADPH の吸光度の減少から算出した。Se の定量：試料を硝酸-過塩素酸混液で湿式分解した後、2,3-ジアミノナフタレン法で測定した。

【結果および考察】無機の亜セレン酸(SA)を添加した培地で DRG 細胞を培養し、細胞内 Se 濃度および細胞質 GPx 活性を測定した。SA を 1  $\mu$ M の濃度で添加した培地で 6 時間培養した後、DRG 細胞内 Se 濃度を測定すると、SA 無添加で培養した細胞のそれよりも増大したが、細胞質 GPx 活性の上昇は観察されなかった。同じ SA 添加培地で 24 時間培養すると、細胞内 Se 濃度だけではなく、細胞質 GPx 活性も増大した。さらに、培地中の SA 濃度を 1  $\mu$ M から 10  $\mu$ M に増大して 24 時間培養すると、細胞内 Se 濃度は培地中 SA 濃度に対応して上昇した。しかし、細胞質 GPx 活性にはそのような変化は認められず、何れの SA 濃度の場合もほぼ同様の活性値を示した。他方、有機 Se 化合物であるペニシラミンセレントリスルフィド(PenSSeSPen)を使って DRG 細胞内への Se の取り込み挙動を検討した。PenSSeSPen を培地に添加して 24 時間培養すると、SA の場合と同様に、細胞内 Se 濃度および細胞質 GPx 活性は増大した。以上の結果から、培地に添加したこれらの Se 化合物は、何れも DRG 細胞内に取り込まれ、GPx の生合成にも利用されているものと考えられた。



## メタロチオネイン及び銅シャペロン Atox1 二重欠損細胞における銅の挙動と銅制御因子変動の解析

○宮山貴光、小椋康光

千葉大学大学院 薬学研究院

【目的】近年、細胞内の銅濃度を制御するシャペロンやトランスポーターの存在が明らかとなり、個々の性質については解明されつつあるが、これら銅の制御に関わる因子が細胞内でどのように協働しているかは明らかになっていない。本研究では、細胞内で大きな銅結合能力を有するメタロチオネイン (MT) を欠損した細胞を用い、銅排泄に関わる銅シャペロンである Atox1 を RNA 干渉法によりノックダウンしたときの細胞内の銅の挙動や銅関連遺伝子の応答を解析することにより、銅の制御に関わる各因子間のクロストーク機構を明らかにすることを目的とした。

【実験方法】MT 野生型および MT 欠損細胞に Atox1 siRNA を導入した。ノックダウン細胞中の銅の定量は、微量試料測定用に改良した microflow nebulizer を装着した ICP-MS により行い、細胞内の銅分布の解析は、narrow bore HPLC-ICP-MS による micro speciation (1, 2)と銅特異的蛍光プローブである CS1 を用いた元素イメージングにより行った(3)。また real time RT-PCR 法と Western blotting 法により銅制御因子の発現解析を行い、銅の細胞内流入を担うトランスポーター Ctr1 の細胞内局在を免疫染色法により解析した。

【結果および考察】細胞内の銅濃度は、Atox1 ノックダウンにより上昇し、上昇した銅は CS1 による検出から、小胞内に集積していた。この小胞は、最近相次いで報告されている細胞内の銅プールである後期エンドソームとライソゾームではないかと想定された(4,5)。Ctr1 は、mRNA 量とタンパク質量の両方が上昇し、SOD1 への銅のシャペロンである Ccs はタンパク質量が増加した。これらの発現変動は、細胞内の銅の欠乏に応答する反応であることから、MT 欠損細胞に Atox1 の機能を抑制すると、細胞内の銅濃度は上昇するものの、細胞はむしろ銅欠乏状態になっていると考えられた。従って MT が存在しないときには、細胞内の小胞が銅を隔絶することにより、銅の毒性をマスクするが、同時に必須元素としての銅の利用能まで低下させていると考えられた。すなわち、MT は過剰の銅を解毒すると共に、必須元素としての銅の利用を効率よく行うことを担っているという新たな MT の機能を想定した。

### 【参考文献】

- 1) Miyayama T., Ogra Y. and Suzuki K.T. (2007) *J Anal At Spectrom* **22**, 179–182.
- 2) Miyayama T., Ogra Y., Osima Y. and Suzuki K.T. (2008) *Anal Bioanal Chem* **390**, 1799-1803.
- 3) Miller E.W., Zeng L., Domaille D.W. and Chang C.J. (2006) *Nat Protoc* **1**, 824-827.
- 4) Lee, J., Petris, M.J. and Thiele, D.J. (2002) *J Biol Chem* **277**, 40253-40259.
- 5) Klomp, A.E., Tops, B.B., Van Denberg, I.E., Berger, R. and Klomp, L.W. (2002) *Biochem J* **364**, 497–505.



## 第一遷移系列金属イオン及び金属錯体を用いた腓リパーゼの阻害効果

○吉川 豊・栗山芳樹・金岡千明・安井裕之

京都薬科大学・代謝分析学分野

【緒言】近年、生活習慣病である高血圧や高脂質血症、糖尿病といった病気が問題になっており、メタボ健診（特定健康検査・特定保健指導）が始まるなど国民の健康に対する意識はますます高まってきている。その中でも肥満は、多くの疾患の引き金となる。わが国では、BMIが25以上の肥満者は現在2,300万人であり、特に、30歳以上の男性や、50歳以上の女性はその約30%が肥満であると報告されている。<sup>1)</sup> 食事から摂取された脂質は十二指腸で胆汁酸と胆汁中のレシチンにより乳化された後、膵液中に含まれる腓リパーゼの働きにより、トリアシルグリセロールが2-モノアシルグリセロールと脂肪酸に分解され、小腸細胞から吸収される。そこで、この腓リパーゼの働きを阻害し、脂肪吸収を抑制することにより、抗肥満効果を発揮する物質の探索を目的として、第一遷移系列金属イオンおよびそのピコリン酸錯体を用いて、腓リパーゼ阻害効果を検討した。

【実験方法】①本研究で用いた金属錯体は、文献既知の方法で合成し使用した。<sup>2)</sup> ②腓リパーゼ阻害効果の測定は、中井らの方法を改良して行った。<sup>3)</sup> 0.1 M 4-Methylumbelliferyl oleateのDMSO溶液20  $\mu$ Lを13 mM Tris-HCl緩衝液により1000倍希釈し、Assay Plateに25  $\mu$ L添加した。その後、試料溶液25  $\mu$ Lを加え混和後、腓リパーゼ25  $\mu$ L (10 unit) を加え、よく混和後、25°Cで30分間反応させた。クエン酸緩衝液 (pH 4.2) 100  $\mu$ L加え混和後、SPECTRAFLUOR PLUSを用いて励起波長360 nm、蛍光波長465 nmで腓リパーゼにより遊離した4-Methylumbelliferylを定量した。被験試料の阻害活性は、対照（蒸留水）の活性に対して50%阻害を与える試料量をIC<sub>50</sub>値として求めた。

【結果・考察】Fe(II)、Co(II)、Ni(II)、Cu(II)、Zn(II)イオンの腓リパーゼ阻害効果は、金属イオンの種類によって異なり、実験結果より求められたIC<sub>50</sub>値で阻害活性を比較するとFe(II) > Zn(II) > Cu(II) > Ni(II)  $\approx$  Co(II)の順に低くなった。強い阻害効果を示したFe(II)、Zn(II)およびCu(II)イオンに関しては、ピコリン酸錯体を用いて同様に検討したところ、腓リパーゼ阻害活性は、金属イオンと比較して低下した。以上の結果より金属の種類によって腓リパーゼ阻害効果に違いがあることが分かり、配位子の選択により活性を調節できることが分かった。

【参考文献】<sup>1)</sup>小谷光, 加来活平, メタボリックシンドロームとインスリン抵抗性, 日本臨床, **63**, 1485-1491 (2005). <sup>2)</sup>Y. Yoshikawa, E. Ueda, K. Kawabe, H. Miyake, T. Takino, H. Sakurai, Y. Kojima, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **7**, 68-73 (2002). <sup>3)</sup>中井正晃, 福井祐子, 浅見純生, 橋本文雄, リパーゼ阻害剤, 特開 2006-16367.

## 第一遷移系列金属イオン及び金属錯体による脂質過酸化反応の抑制効果

○安井裕之・寺嶋典子・中尾好絵・吉川 豊

京都薬科大学・代謝分析学分野

【緒言】近年、生体内で産生されるフリーラジカルや活性酸素種の作用が注目されている。通常、生体内では活性酸素種が適度に存在し、病原菌等の侵入に対する生体防御の役割を担っている。しかし、何らかの要因でこれらが過剰に産生されると、細胞内成分が必要以上に酸化され、障害が引き起こされる可能性が生じる。一方、このような障害から生体を保護するものとして、種々の抗酸化剤の有効性が知られている。本研究は、フリーラジカルおよび活性酸素種による生体障害の例として、脂質過酸化に着目した。これを阻害して、生体保護効果を発揮する物質の探索を目的として、第一遷移系列金属イオン<sup>1,2)</sup> およびその錯体を用いて、肝ミクロソーム脂質過酸化抑制効果を検討した。

【実験方法】①タンパク質濃度を 10 mg/mL に調製したラット肝ミクロソーム 200  $\mu$ L に、金属イオンもしくは金属錯体の溶液 100  $\mu$ L、250 mM AAPH 溶液 80  $\mu$ L を加え、100 mM Tris-HCl 緩衝液で全量を 1000  $\mu$ L とし混和した後、37°C で 60 分間反応させた。その後、0.8% (w/v) BHT 100  $\mu$ L を加え、AAPH 誘導による脂質過酸化反応を停止した。③停止後の試料溶液 400  $\mu$ L に、8.1% SDS 100  $\mu$ L、酢酸緩衝液 750  $\mu$ L、0.8% TBA 750  $\mu$ L を順次加え、沸騰水浴中で 20 分間加熱した。④加熱後、氷中で冷却した試料溶液に、超純水 0.5 mL、ブタノール・ピリジン混液 2.0 mL を加えて攪拌後、3000 rpm で 5 分間遠心分離を行った。上清を採取し、TBARS に由来する 540 nm の吸光度を測定した。被験試料の阻害活性は、対照の活性に対して 50% 阻害を与える試料濃度を IC<sub>50</sub> 値として求めた。

【結果・考察】VO(II)、Cr(III)、Mn(II)、Mn(III)、Fe(II)、Fe(III)、Co(II)、Co(III)、Ni(II)、Cu(II)、Zn(II)イオンの脂質過酸化に対する効果は、金属イオンの種類によって異なった。Mn(II)、Mn(III)、Co(II)、Cu(II)において抑制効果が見られ、IC<sub>50</sub> 値で活性を比較すると Mn(II) > Co(II) > Cu(II) > Mn(III)の順に低くなった。そこで、Mn(III)、Co(II)、および Cu(II)イオンに関して、アセチルアセトン錯体を用いて同様に検討したところ、抑制活性は金属イオンと比較して有意に上昇した。一方、VO(II)、Fe(II)、Fe(III)において促進効果が見られ、その効果は VO(II)  $\approx$  Fe(II) > Fe(III)の順であった。また、Cr(III)、Co(III)、Ni(II)、Zn(II)は、脂質過酸化反応に影響しなかった。以上の結果より金属の種類によって脂質過酸化抑制効果に違いがあることが分かり、金属の酸化還元電位や 3d 軌道の電子配置と関係することが示唆された。また、錯体化により抑制活性を強められることが分かった。

【参考文献】<sup>1)</sup> B. J. Day, I. B. Haberle, and J. D. Crapo, *Free Rad. Biol. Med.*, **26**, 730-736 (1999). <sup>2)</sup> V. Duzguner and S. Kaya, *Free Rad. Biol. Med.*, **42**, 1481-1486 (2007).

## ソフト金属キレート分析法を用いたファイトケラチン合成酵素の活性測定

○吉富雄洋、調知朗、吉村悦郎

東京大学大学院農学生命科学研究科分析化学研究室

【目的】高等植物や藻類などでは、重金属の投与によりファイトケラチン(PC<sub>n</sub>)といわれる物質を誘導合成する。PC<sub>n</sub> (Fig. 1) は、 $\gamma$ -(Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly (n $\geq$ 2) で示される非タンパク性のペプチドで、その中のチオール基が重金属（特にCd(II)、Cu(I)などのソフト金属イオン）と結合を形成することでその解毒を図っていると考えられる。この合成は、グルタチオン (GSH:  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) を基質として、



のペプチド転移反応でPC<sub>2</sub>が生成される。さらに、 $\gamma$ -Glu-Cys基がPC<sub>2</sub>に転移するとPC<sub>3</sub>となり、同様のペプチド転移反応で順次重合度の高いPC<sub>n</sub>が合成される。この合成は、PC合成酵素で触媒されるが、そこでは重金属による活性化が必要である。多くの重金属がこの活性化を行うため、その機構に注目が集まっているが、現在までその活性化機構は明確になっていない。

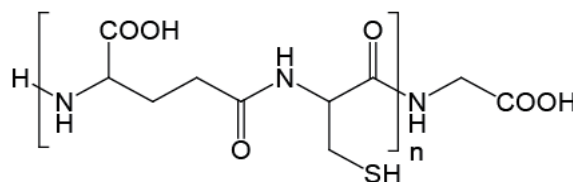


Fig. 1 Structure of phytochelatins

筆者らは、この機構を研究するための PC 分析の高感度化を図り、モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の PC 合成酵素 (AtPCS1) の活性測定に応用し、Cd による活性化機構を推定した。

## 【実験方法】

PC<sub>n</sub>の分離はODSカラムを用いたHPLCで行った。検出は、蛍光性試薬bathocuproine disulfonate (BCS) の蛍光が、BCS-Cu(I) との形成で消光するが、ここにPCが存在するとPCとBCSの競合反応の結果、BCSの蛍光が回復する現象を利用している。すなわち、HPLCのポストカラム溶液としてBCS-Cu(I) 溶液を用いるもので、これにより従来法よりも3桁の高感度化が達成できた<sup>1)</sup>。

AtPCS1 遺伝子は理研バイオリソースセンターからそのcDNAの供与を受け、polymerase chain reaction (PCR)法で増幅した。その後、N末端側に6個のヒスチジンを持つ組み替えタンパク質 (rAtPCS) として大腸菌*E. coli* BL21 株で発現させた。大腸菌を培養の後、超音波で破碎し、Ni-sepharoseアフィニティカラム(His-trap<sup>TM</sup>)を用いてタンパク標品を得た。酵素反応は、1mM 2-mercaptoethanol、10mM (GSH) を含む 200mM HEPES/NaOH (pH7.7) 溶液 (100  $\mu$ l) にCdSO<sub>4</sub>とrAtPCS1を加えて、30  $^{\circ}$ Cで行った。反応開始後 20 min に 1% trifluoroacetic acid 溶液 250  $\mu$ l を加えて反応を停止し、HPLCで分析した。

## 【結果】

本実験で得られた結果は、以下の二つにまとめられる。

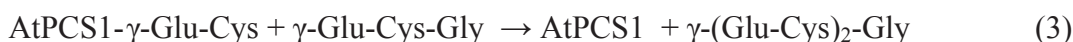
- 1) PC 分析法に新規の分析法を用いることで、酵素反応で必要とされる酵素量を 10 分の 1 以下に減少することができた。
- 2) AtPCS1 の酵素反応では PC<sub>2</sub>、PC<sub>3</sub>、PC<sub>4</sub>の他に、GSHの加水分解産物γ-Glu-Cysも、生成していた。この生成はCd添加時だけに生じており、濃度は反応時間に対して直線的に増加していた。

## 【考察】

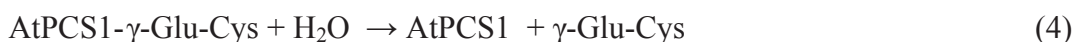
PC 合成酵素による PC の合成は、



の反応で、AtPCS1 がγ-Glu-Cys 基でアシル化されて進行する。AtPCS1 ではこの酵素分子の Cys56 のチオール基がアシル化部位と同定されている。また、このアシル化には重金属の存在を必要としていない。アシル化した酵素は、次に



の反応で GSH (あるいは PC) へのγ-Glu-Cys 基を転移させ、PC 合成を行っている。この反応に金属の存在が必要となっているが、同時にγ-Glu-Cys が生成することは、副反応として



の反応が生じていることを示している。また、γ-Glu-Cys の濃度が直線的に増加していることは、アシル化酵素が常に一定量作られ、これがある割合で分解を受けることを物語っている

反応 (4)が、金属イオンの存在に依存していることを考えると、活性部位の構造として Fig. 2 のモデルが提案される。すなわち、Cd<sup>2+</sup>は、AtPCS1 のアシル化部位の近傍に結合し、アシル化したカルボニル基の電子を引き寄せ、カルボニル炭素を正に帯電させて活性化しているものと推定される。

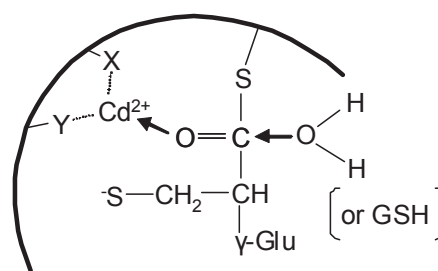


Fig. 2 Tentative model for the active site of AtPCS1

## 【参考文献】

- 1) Dequenching of the Cu(I)-ba thocuproinedisulfonate complexes for HPLC determination of phytochelatins. T. Shirabe, K. Ito, E. Yoshimura, *Anal. Chem.* in press.



## 吸入曝露したサマリウムの体内分布と経時変化—マウスを用いた 作業曝露モデル実験

○篠原厚子<sup>1,2</sup>、熊坂利夫<sup>2</sup>、千葉百子<sup>2,3</sup>

1 清泉女子大学人文科学研究所 2 順天堂大学医学部 3 国際医療福祉大学薬学部

【目的】希土類元素は共通した電子配置をもつ 17 元素の総称で、永久磁石、水素吸蔵合金、MRI 用造影剤などの様々な製品に用いられており、その使用量は機能性材料の開発に伴い増加しているが、生体影響に関する報告は少ない。希土類元素のひとつであるサマリウム(Sm)には自然放射性核種を含む 7 種の同位体が存在しており、希土類磁石の原料として使用されている。製品の製造過程において、原料取扱い工程や、合金の粉体の成形工程で作業者が吸入曝露する可能性が考えられる。本研究では、作業曝露モデル実験としてマウスを用いた Sm 酸化物の吸入実験を行い、投与化合物の肺への蓄積と他の臓器への移行を経時的に観察して、Sm の体内挙動を検討した。

【実験方法】ICR 系雄性マウス (5W 齢、SPF) に、吸入曝露装置を用いて平均粒子径 5  $\mu\text{m}$  のサマリウム酸化物  $\text{Sm}_2\text{O}_3$  を濃度 15  $\text{mg}/\text{m}^3$  で曝露した。労働条件を考慮し、5 日間/週、1 日 7 時間で、1 または 4 週間吸入させた。対照群は曝露化合物なしで同じ時間に別の同型チャンバーに入れた。曝露終了翌日および 4 週間後に各群の 7 匹を解剖し、血液および各種臓器を採取した。肺は、2 匹ずつ病理検査用、または電顕用にホルマリン固定、またはグルタルアルデヒド固定した。電子顕微鏡およびエネルギー分散型 X 線分析は日本電子 (株) で実施した。肺、肝、腎、脾、大腿骨の一部を、硝酸を用いて湿式分解し Sm 濃度を ICP-MS で測定した。

【結果および考察】曝露終了翌日の肺重量は、1 週間曝露では対照群と比して差が認められなかったが、4 週間曝露では重量が増加した。肺に明らかな炎症性変化は認められなかったが、4 週曝露では肺に吸入粒子の沈着が認められた。曝露終了翌日の肺の Sm 濃度は、1 週間曝露で約 50  $\mu\text{g}/\text{g}$ 、4 週間曝露で約 120  $\mu\text{g}/\text{g}$  であり、曝露期間に対応した。曝露中止後 4 週間経過すると、濃度はそれぞれ約 1/5、1/2 弱にまで減少した。これより吸入された  $\text{Sm}_2\text{O}_3$  粒子は肺に取り込まれ、時間経過と共に一部消失することが分かった。肝、腎、脾、精巣にも Sm が検出されたが濃度は 1  $\mu\text{g}/\text{g}$  未満と低かった。各臓器における濃度は曝露期間に対応し、肝 > 腎、脾 > 精巣であり、4 週間経過すると減少した。骨にも曝露期間に依存して Sm が取り込まれたが、他の臓器と異なり曝露終了後 4 週間経過すると濃度が増加したことから、他臓器から血流を介して Sm の一部が骨に移行すると考えられ、骨は希土類元素の蓄積組織と考えられた。

[結論]吸入された Sm 酸化物粒子は肺に沈着し、一部は経時的に排泄または再分布する。

本研究の一部は科研費特定領域研究 (領域番号 440) の助成を受けて実施した

## 海棲生物のセレンメタボローム解析

○阿南弥寿美<sup>1</sup>、鈴木紀行<sup>1</sup>、田辺信介<sup>2</sup>、鈴木和夫<sup>1</sup>、小椋康光<sup>1</sup>

1 千葉大学大学院薬学研究院

2 愛媛大学沿岸環境科学研究センター

【目的】セレン (Se) は様々な化学形態で環境中や生物体内に存在し、ヒトや実験動物における生体内での挙動や代謝経路はその化学形態に依存する。また、Se は水銀 (Hg) の毒性軽減効果を有することが明らかにされている。食物連鎖を通して Hg を高蓄積している海棲高等動物では Se も同時に高蓄積する事が多く報告されており、これは Se と Hg が等モルで複合体を形成することで Hg を不活性化する解毒機序と考えられている。しかしながら、ヒトや実験動物と比べ、野生生物における Se の代謝機構に関する情報は少ない。そこで本研究では、海棲生物の肝臓に存在するセレンメタボロームを解析した。

【方法】世界各地で採取した生物試料を冷凍保存している愛媛大学生物環境試料バンク (es-Bank) より、海棲哺乳類2種 (キタオットセイ、イシイルカ)、ウミガメ類2種 (アオウミガメ、タイマイ) の肝臓、およびウミガメ類の餌生物である海草3種と海綿1種の提供を受けた。また、千葉市内で魚類2種 (マアジ、カツオ) を購入し、肝臓と胃内容物を採取した。各試料は硝酸-マイクロ波加熱分解した後、SeをICP-MSで、HgをCV-AASで定量した。肝臓はホモジナイズ後、遠心分離し、肝上清を調製した。肝上清の一部は熱処理により除タンパクし、熱安定画分とした。海草および海綿は乾燥、粉碎の後、milli Q水で振盪抽出し、可溶性画分を得た。各画分中のセレンメタボロームをHPLC-ICP-MSを用い解析した。

【結果および考察】各生物種の肝臓中SeおよびHg濃度を分析した結果、海棲哺乳類ではHgとSe濃度の間に正の相関関係がみられ、そのモル濃度比は約1:1であったが、ウミガメ類と魚類では、Hg濃度が十分に低いにもかかわらず、Hgを蓄積した海棲哺乳類に匹敵する濃度のSeを蓄積していた (Fig. 1)。とくにウミガメ類の1種であるタイマイでSeの高蓄積がみとめられた ( $33 \pm 11 \mu\text{g Se/g wet weight}$ )。ウミガメ類と魚類の肝臓では

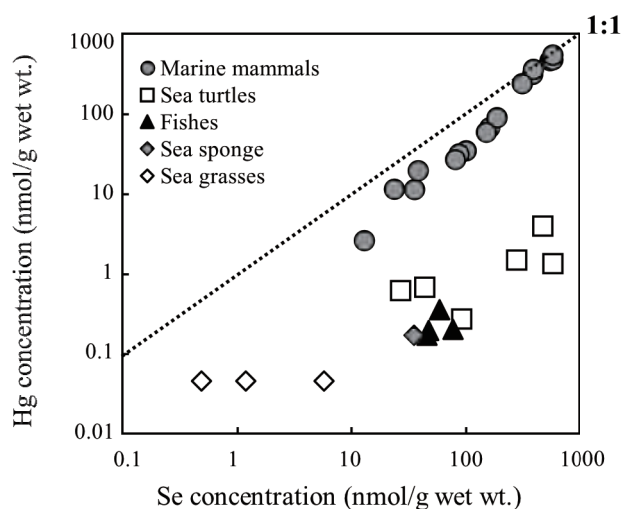
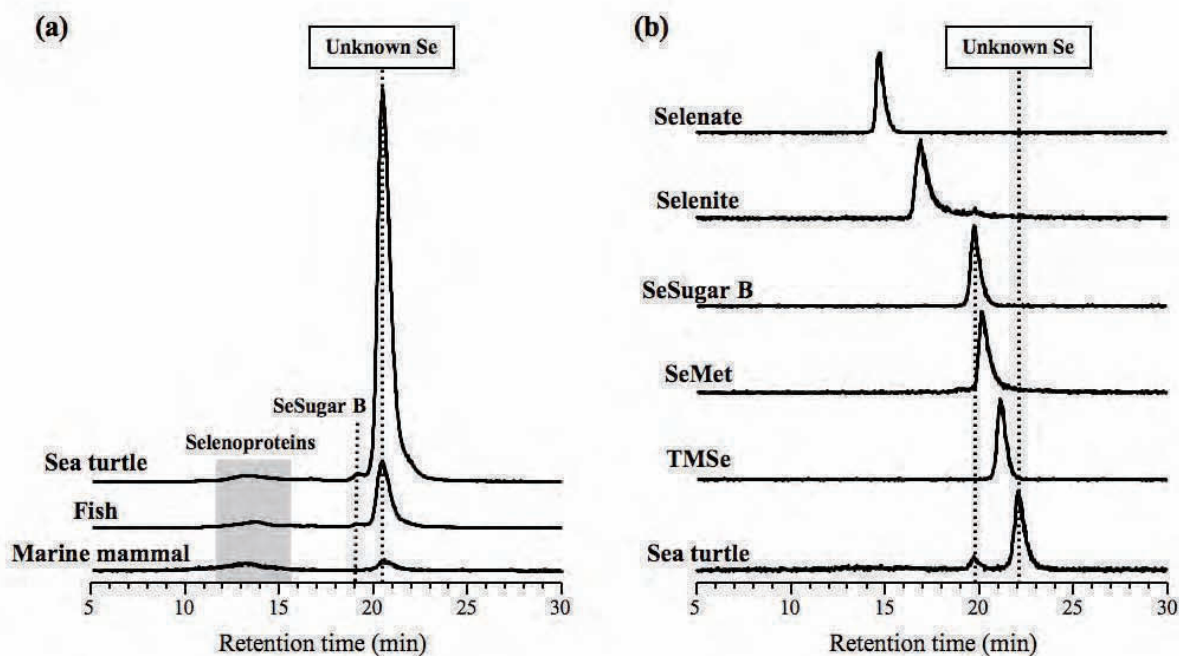


Fig. 1. Relationship between Se and Hg concentrations in livers of marine organisms.



肝臓中Seの大部分は上清に分布しており、SeがHgと共に不溶性画分に蓄積する海棲哺乳類とは異なった。従って、ウミガメ類や魚類と海棲哺乳類等とは異なるSe蓄積/代謝機構を有しており、ウミガメ類および魚類肝臓に存在するSeのHg解毒への関与は小さいことが示唆された。

HPLC-ICP-MSにより上清中のセレノメタボロームを解析したところ、全ての種でセレンタンパク質と数種類の低分子Se化合物が確認された (Fig. 2a)。低分子Se化合物の1つはヒトや齧歯類の主要な尿中代謝物であるセレン糖 (1 $\beta$ -methylseleno-N-acetyl-d-galactosamine) であることが確認されたが、ウミガメ類や魚類肝臓の上清で最も多量に存在したSe化合物は既存のSe化合物の溶出位置と一致せず、未知Se化合物であると推察された (Fig. 2b)。さらに、タイマイの主要な餌生物である海綿の可溶性画分および、カツオの胃内容物からも同様の未知Se化合物が検出され、これらの海棲生物が食物連鎖を介して未知Se化合物を生物濃縮していることが示唆された。



**Fig. 2. Elution profiles of Se in hepatic cytosol of marine organisms.** (a) A 200  $\mu$ L aliquot of hepatic cytosol of sea turtle (hawksbill turtle), fish (Japanese jack mackerel) or marine mammal (northern fur seal) was applied to a GS 520 HQ column and eluted with 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, at a flow rate of 0.6 mL  $\text{min}^{-1}$ . (b) A 20  $\mu$ L aliquot of various authentic Se standards or heat-stable fraction of hepatic cytosol of sea turtle was applied to a GS 320 HQ column and eluted with 50 mM ammonium acetate, pH 6.5, at a flow rate of 0.6 mL  $\text{min}^{-1}$ . SeSugar B; selenosugar B (1 $\beta$ -methylseleno-N-acetyl-d-galactosamine), SeMet; selenomethionin, TMSe; trimethylselenonium ion.

マイクロ蛍光 X 線イメージングと XAFS 解析による重金属耐性植物  
ヘビノネゴザにおけるカドミウムの分布と化学形態

○三尾咲紀子、柏原輝彦、保倉明子、中井 泉、後藤文之\*、北島信之\*\*、阿部知子\*\*\*  
(東理大理、\*電中研、\*\*(株)フジタ、\*\*\*理研)

【目的】ある種の植物は重金属を大量に吸収・蓄積できる。このような植物を重金属汚染土壌で栽培して、土壌を浄化する技術をファイトレメディエーションという。シダ植物ヘビノネゴザは有害重金属の一つである Cd に対する耐性が高いことから、この技術への応用が期待されている植物である。ヘビノネゴザのカドミウム耐性メカニズムを明らかにすることにより、よりカドミウム蓄積能の高い植物を作出でき、効率的に土壌浄化を行うことができる可能性を秘めている。そこで本研究では、非破壊でカドミウムの高感度分析が可能な高エネルギー放射光蛍光 X 線分析を応用して、ヘビノネゴザ体内における Cd の分布を細胞レベルで明らかにし、さらに XAFS 解析により各部位における Cd の化学形態について考察することで、ヘビノネゴザにおける Cd の吸収・蓄積能に関する知見を得ることを目的とした。

【実験方法】試料には、足尾銅山周辺で採取し、カドミウム添加土壌(400 mg kg<sup>-1</sup>)で 2～12 週間栽培したヘビノネゴザ胞子体を用いた。特に胞子着生前後の羽片に着目した。マイクロビーム蛍光 X 線分析は SPring-8 BL37XU にて行った。30 keV に単色化した X 線を K-B ミラーにより 1 ミクロン程度に集光し試料に照射した。検出器には Si(Li)-SSD を用いた。湿らしたキムワイプと共に試料をマイラー膜に封入することで乾燥を防ぎ、測定は常温で行った。次にヘビノネゴザ胞子体を羽片、葉柄、根の各器官に分け凍結乾燥した後、粉碎し錠剤化したものについてカドミウムの化学状態分析を行った。Cd K 吸収端 XAFS 測定は KEK PF-AR NW10A にて行った。さらに、ICP-AES により各器官(羽片、葉柄、根)におけるカドミウム蓄積量を定量した。

【結果および考察】カドミウム汚染土壌で栽培したヘビノネゴザのカドミウム蓄積量は、葉 200 ppm、葉柄 55 ppm、根 370 ppm であり、根に次いで羽片に多く蓄積されていることが分かった。胞子着生羽片におけるカドミウムの分布を調べた結果、主脈と胞子囊付近にカドミウムが蓄積していることが明らかとなった。また、胞子囊の形成に伴い胞子囊へのカドミウムの蓄積が観察された。次に、各器官(羽片、葉柄、根)におけるカドミウムの化学形態を調べた結果、根においてカドミウムの多くは有機酸のもつ酸素原子と結合あるいは水和したイオンの状態で存在しているのに対し、羽片ではカドミウムの多くがファイトケラチンなどチオール基をもつ化合物の硫黄原子と結合している可能性が示された。このことはヘビノネゴザが羽片の葉肉細胞においてキレーター物質を合成し、カドミウムの無毒化をはかっている可能性を示唆している。本研究により、カドミウム汚染土壌で生育したヘビノネゴザ胞子体において、根から取り込まれたカドミウムは最終的に胞子まで移行して蓄積されること、また、根から羽片へかけてカドミウムの化学形態が変化することがはじめて明らかとなった。

## Wilson 病の亜鉛薬療法

○清水教一，藤原順子，山口之利，青木継稔  
東邦大学医学部小児科学第二講座

【緒言】Wilson 病は常染色体劣性遺伝形式をとる先天性銅代謝異常症の代表的疾患である。肝臓からの銅の排泄障害を病態し，肝臓をはじめ，中枢神経や角膜など種々の臓器に銅が過剰に蓄積し，様々な臨床症状を呈する。本症は無治療にて放置されれば，肝不全にて死亡，あるいは神経障害にて心身ともに荒廃する予後不良な疾患である。しかし，本症は治療可能な数少ない先天代謝異常症のひとつでもある。今まで，本邦での主な Wilson 病の治療薬は D-ペニシラミンと塩酸トリエンチンであった。一方，欧米においては亜鉛製剤（酢酸亜鉛あるいは硫酸亜鉛）が広く用いられている<sup>1)2)</sup>。そして，2008 年 4 月より本邦においても酢酸亜鉛製剤が認可され販売させるようになった。本研究にて筆者らは，酢酸亜鉛製剤の治療効果と，本薬剤使用時の銅ならびに亜鉛代謝に関する検討を行った。

【対象および方法】対象は，当科にて治療を行っている Wilson 病症例 10 例である。そのうち 7 例は，酢酸亜鉛薬の長期投与試験に参加していた<sup>3)</sup>。年齢は，22 歳から 55 歳である。これらの症例に，酢酸亜鉛を 150mg/day 分 3 にて投与を行なった。治療効果の指標として，臨床症状・所見のほかに肝酵素を中心とする血液生化学肝機能検査を，銅ならびに亜鉛代謝の検討のため，血清銅，セルロプラスミンおよび亜鉛，尿中銅と亜鉛を測定した。なお，本研究では長期投与症例においても，酢酸亜鉛製剤市販後の経過と成績を検討した。

【結果】治療効果の主要評価項目である ALT，AST および  $\gamma$ -GTP の推移には有意な増悪は認めなかった。また，キレート薬治療にて十分な改善が見られなかった肝酵素上昇が，亜鉛薬にて正常値まで改善した症例が認められた。血清セルロプラスミン値，血清銅値には有意な変動はみられなかった。1 回尿による尿中銅排泄量の測定（対クレアチニン比）においては，1 例を除き  $0.1 \mu\text{g}/\text{mg creatinine}$  以下であった。

【考察】今回の検討にて，酢酸亜鉛は Wilson 病症例の肝機能障害を改善させ，安定に推移させ得ると考えられた。また，銅の吸収と排泄の収支バランスを検討する目的にて尿中銅排泄量測定を行なった。1 回尿における尿中銅排泄量（対クレアチニン比）は 24 時間尿中銅排泄量と同様に，銅収支の管理指標として用いることができ，酢酸亜鉛治療中は，尿中銅排泄量を  $0.1 \mu\text{g}/\text{mg creatinine}$  以下に維持することが良いと考えられている<sup>3)</sup>。今回の検討においてもほとんどの症例にて尿中銅排泄量は  $0.1 \mu\text{g}/\text{mg creatinine}$  を下回っていた。酢酸亜鉛薬は，Wilson 病治療に有用な薬剤であると考えられた。

## 【文献】

1. Brewer GJ. Minireview; Recognition, diagnosis, and management of Wilson's disease. Proc Soc Exp Biol Med. 223: 39-46, 2000

2. Brewer GJ. Wilson Disease. Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th Edition. p2313-2315, 2005
3. 清水教一ほか：本邦における Wilson 病に対する酢酸亜鉛製剤（NPC-02）の有効性と安全性に関する検討. 日本先天代謝異常学会雑誌 24: 71-80, 2008



## 潜在的な亜鉛欠乏がラットの食塩嗜好調節系に及ぼす影響

○後藤知子、白川仁、古川勇次、駒井三千夫

東北大学大学院 農学研究科

生物産業創成科学専攻 栄養学分野

【目的】亜鉛は、生体内の代謝に関与する種々の酵素やタンパク質の構成成分として、生体内の反応を触媒し調節する必須微量元素である。亜鉛が欠乏すると、食欲不振、成長遅延、皮膚炎、脱毛、免疫能低下、生殖機能低下、味覚障害などが引き起こされることが知られている。我々のラットを用いた検討では、亜鉛欠乏食飼育4日目（潜在的な亜鉛欠乏）から食塩嗜好が急激に上昇すること、この現象は末梢での塩味受容能低下によるものではないことを明らかにした<sup>1)</sup>。そこで、潜在的な亜鉛欠乏がラットの食塩嗜好調節系に及ぼす影響を明らかにするため、亜鉛欠乏初期ラットにおいて、尿中ナトリウム・カリウム排泄量、収縮期血圧、ヘマトクリット値、血漿中ミネラル濃度を測定した。また、血漿ナトリウム濃度の上昇を鋭敏に感知して分泌され、食塩摂取の低下、尿中ナトリウム排泄量の増加を引き起こす、下垂体後葉ホルモンのオキシトシンに注目して検討した。

【実験方法】実験動物は、SD (Sprague-Dawley)系雄ラット4週齢を用いた。実験群は、亜鉛欠乏食（亜鉛含量2.2 mg/kg diet; Zn-Def）群、低亜鉛食（同4.1 mg/kg diet; Low-Zn）群、ペアフェド対照（Pair-fed）群（Zn-Def群が前日に食下した量と同量の亜鉛添加食（同33.7 mg/kg diet）を与えた）の3群とした。[実験1] 実験食飼育4日目に24時間尿を採取後、尿中ナトリウム・カリウム濃度を原子吸光光度計にて測定し、体重100gあたりの尿中ナトリウム・カリウム排泄量を算出した。[実験2] 実験食飼育4日目の収縮期血圧を、非観血式血圧計を用いて測定した。[実験3] 実験食飼育4日目に採血し、直ちに遠心分離後、ヘマトクリット値を測定した。血漿中ナトリウム・カリウム・カルシウム・マグネシウム・鉄・銅・亜鉛濃度は、原子吸光光度計にて測定した。[実験4] 実験食飼育0, 1, 2, 3, 4, 7日目の血漿オキシトシン濃度をELISA法にて測定した。

【結果および考察】[実験1] 実験食飼育4日目における体重100gあたりの尿中ナトリウム排泄量は、Zn-Def群でPair-fed群に比べて有意に低値を示した。したがって、亜鉛欠乏初期（潜在的な亜鉛欠乏）の食塩嗜好上昇は、腎臓でのナトリウム再吸収不全に伴う尿中ナトリウム排泄過多によるものではないことが考えられた。一方、体重100gあたりの尿中カリウム排泄量は、3群間で同程度であり、潜在的な亜鉛欠乏の影響は認められなかった。[実験2] 実験食飼育4日目における収縮期血圧は3群間で同程度であり、潜在的な亜鉛欠乏は、SD系ラットの収縮期血圧に影響を及ぼさないことが示唆された。なおSD系ラットは、脳卒中易発性高血圧自然発症ラット(SHR-SP)とは異なり収縮期血圧が低いことから、今後はSHR-SPを用いた比較も必要であると考えられる。[実験3] 実験食飼育4日目のヘマトクリット値は3群間で同程度であり、潜在的な亜鉛欠乏の影響は認められなかった。実験食飼育4日目の血漿亜鉛濃度は、Zn-Def群でPair-fed群に比べて有意に低値を示した。しかし、血漿中ナトリウム・カリウム・カルシウム・マグネシウム・鉄・銅濃度は3群間で同程度であり、潜在的な亜鉛欠乏の影響は認められなかった。[実験4] 血漿オキシトシン濃度は、実験食飼育3, 4, 7日目において、Pair-fed群に比べてZn-Def群で有意な低値を示した。したがって、潜在的な亜鉛欠乏ラットで認められた食塩嗜好上昇の一因として、中枢でのオキシトシン分泌の低下が関与している可能性が示唆された。

## 【参考文献】

- 1) Goto, T., Komai, M., Suzuki, H. and Furukawa, Y: Long-term zinc deficiency decreases taste sensitivity in rats. *J. Nutrition* **131**, 305-310, 2001s

## 食餌中亜鉛がラットの摂食調節に及ぼす影響

○駒井三千夫<sup>1</sup>、竹本雅美<sup>1</sup>、川中子誠<sup>1</sup>、大日向耕作<sup>2</sup>、浅川明弘<sup>3</sup>、後藤知子<sup>1</sup>、白川仁<sup>1</sup>  
 東北大・院農・栄養<sup>1</sup>、京大・院農・食品生物<sup>2</sup>、神戸大・院医・応用分子<sup>3</sup>

【目的】亜鉛は種々の酵素や Zinc-finger など機能性タンパク質の構成成分などとして多様な生理作用を触媒、調節する必須微量元素である。ラットに亜鉛欠乏食を与えると、成長遅延、味覚異常、免疫能低下などさまざまな症状が観察されるが、そのなかでも最初に観察されるのは食欲低下である。この発現機構は未だ明らかになっていないが、これまでに我々は、3 日間の亜鉛欠乏食飼育により摂食量が低下するとともに、食欲調節に重要な視床下部摂食調節ペプチドの mRNA 発現量が変動することを見出した。さらに本研究では、亜鉛欠乏食給餌ラットにおける亜鉛投与による摂食量回復の作用機構に着目し、食欲調節における経口亜鉛シグナルの役割について解明することを目的とした。

【実験方法】(1) 亜鉛投与の摂食量および摂食調節ペプチドに及ぼす影響：SD系雄性ラットに亜鉛欠乏飼料(亜鉛：0.7 mg/kg diet)を3日間与えた後、暗期の1時間前に生理食塩水、ZnSO<sub>4</sub> (3 mg/kg BW)溶液を経口あるいは腹腔内に投与した。暗期開始時にラットに亜鉛欠乏飼料を給餌し、摂食量を経時的(20分、1、2、3時間後)に測定した。

(2) 迷走神経切除の影響：麻酔下でラットを開腹し、迷走神経を切除する手術を施した(Vagotomy群)。一方、同様に麻酔下で開腹し、迷走神経を切除しなかった群を設けた(Sham群)。術後3日間の回復期間を経た後、亜鉛欠乏飼料を3日間与え、亜鉛溶液を投与、経時的に摂食量を測定した。

(3) 摂食促進ペプチドアンタゴニストの影響：亜鉛欠乏飼料で3日間飼育した後、亜鉛溶液を投与する30分前に、NPY Y<sub>1</sub>受容体アンタゴニスト(6 nmol/rat)を脳室内投与、あるいはorexin OX<sub>1</sub>受容体アンタゴニスト(10 mg/kg BW)を腹腔内投与し、摂食量を測定した。なお、Y<sub>1</sub>アンタゴニストは、麻酔下で第3脳室にガイドカニューレを挿入し、3日間の回復期間を経過した後に、脳室内投与した。

【結果および考察】 その結果、亜鉛経口投与の1時間後より摂食量の有意な増加が認められたが、腹腔内投与では全く認められなかった。さらに、迷走神経の関与について証明するために、迷走神経切除ラットを用いて検討したところ、迷走神経切除ラットでは亜鉛投与による摂食量の増加が認められなくなった。したがって、亜鉛の経口投与により、消化管からの摂食促進シグナルが食欲調節中枢に伝達されているものと考えられた。また、オレキシンアンタゴニストまたはNPY Y<sub>1</sub>アンタゴニストの処理によって、亜鉛投与による摂食促進作用がブロックされた。よって、亜鉛欠乏食給餌ラットにおける摂食量の回復過程には、腸管からの亜鉛吸収、迷走神経による情報伝達、視床下部摂食促進系(NPY、オレキシンなど)の活性化が関与しているものと考えられる。

## 【参考文献】

1) Goto, T., Komai, M., Suzuki, H., and Furukawa, Y.: (2008) *J. Nutr.*, **131**, 305-310.



異なる投与方法による放射性  $Tl^{+}$  のマウス体内代謝挙動の比較検討

○鷺山幸信、高橋亮次、長岡三樹矢、高坂祐輝、小田雄一、天野良平

金沢大学 医薬保健研究域 保健学系

金沢大学 医学部 保健学科 放射線技術科学専攻

【目的】体内の  $K^{+}$  イオンはそのほとんどが細胞内に存在しており、 $Na^{+}, K^{+}$ -ATPase に関与するほか、糖・蛋白質代謝、神経・筋肉の興奮性などに生理的な作用がみられている。 $Tl$  の一価の陽イオンは、そのイオン半径が  $K$  と類似しているため、生体内では  $K^{+}$  と類似の挙動を示す。したがって血液中に取り込まれた  $Tl^{+}$  イオンの濃度が高い場合、 $K^{+}$  と競合し細胞内で置換されることにより  $K^{+}$  の果たす様々な生理作用に影響を及ぼす。よって、 $Tl^{+}$  は毒性元素としての側面が強いが、トレーサー量の  $Tl^{+}$  では、体に重篤な影響を及ぼすことがないため、核医学領域では機能診断用薬剤として用いられている。我々はこれまでに  $Tl^{+}$  が鼻腔から脳組織である嗅球へ移行することを見出してきた。この結果を基に新しい薬物投与方法としての嗅覚輸送に着目し、外傷性嗅覚障害に対する客観的診断法になりうると考え、動物を用いたガンマカメラ、SPECT/CT による非侵襲的診断の検討を行ってきた。現在は健常人による SPECT/CT による評価を行っている。本研究では臨床応用のための基礎的情報を取得することを目的として、鼻腔内から移行する  $Tl^{+}$  のマウス体内動態を実験的に検討した。

【実験方法】実験では市販の  $^{201}TlCl$  生理食塩水溶液(74MBq/mL)を、7 週齢 ICR 系雄マウスに尾静脈(IV 投与)または右鼻の鼻腔内(IN 投与)にそれぞれ投与(最大 1.2 MBq/匹)した。投与後、5, 30 分, 1, 3, 6, 12 時間, 1, 3.5 日, 1, 2 週間で解剖し、脳、脳以外の頭部、食道、胃、肺、心臓、肝臓、すい臓、脾臓、小腸、大腸、精巣、膀胱、血液、脂肪、筋肉、骨を摘出した。脳組織は左右に分けたのちさらに、嗅球、その他の脳組織(計 4 部位)とした。摘出組織は重量測定後に  $\gamma$  線スペクトロメトリーを行い、組織に対する取込量(%dose/tissue)あるいは単位重量あたりの取込率(%dose/g)を求めた。

【結果および考察】嗅球以外の脳組織では IV 投与、IN 投与どちらでも大きな差は見られなかったが、IN 投与では嗅球への選択的取込みが確認された。その他の体組織に着目すると、主要な排泄経路である腎臓、小腸、大腸では IV 投与の方が早期に高い取込みを見せているが、その他のほとんどの摘出組織で投与方法の違いによる取込みの差は見られなかった。特に血液では  $Tl^{+}$  投与後 30 分で投与方法の違いによる取込みの差が見られなくなった。以上の結果から、異なる投与方法においても  $Tl^{+}$  は、投与方法によらず一定量の  $Tl$  が投与 1 日で排出されると考えられる。また、この結果は  $Tl^{+}$  を用いた外傷性嗅覚診断法での全身被ばく線量を軽減させる可能性を示している。

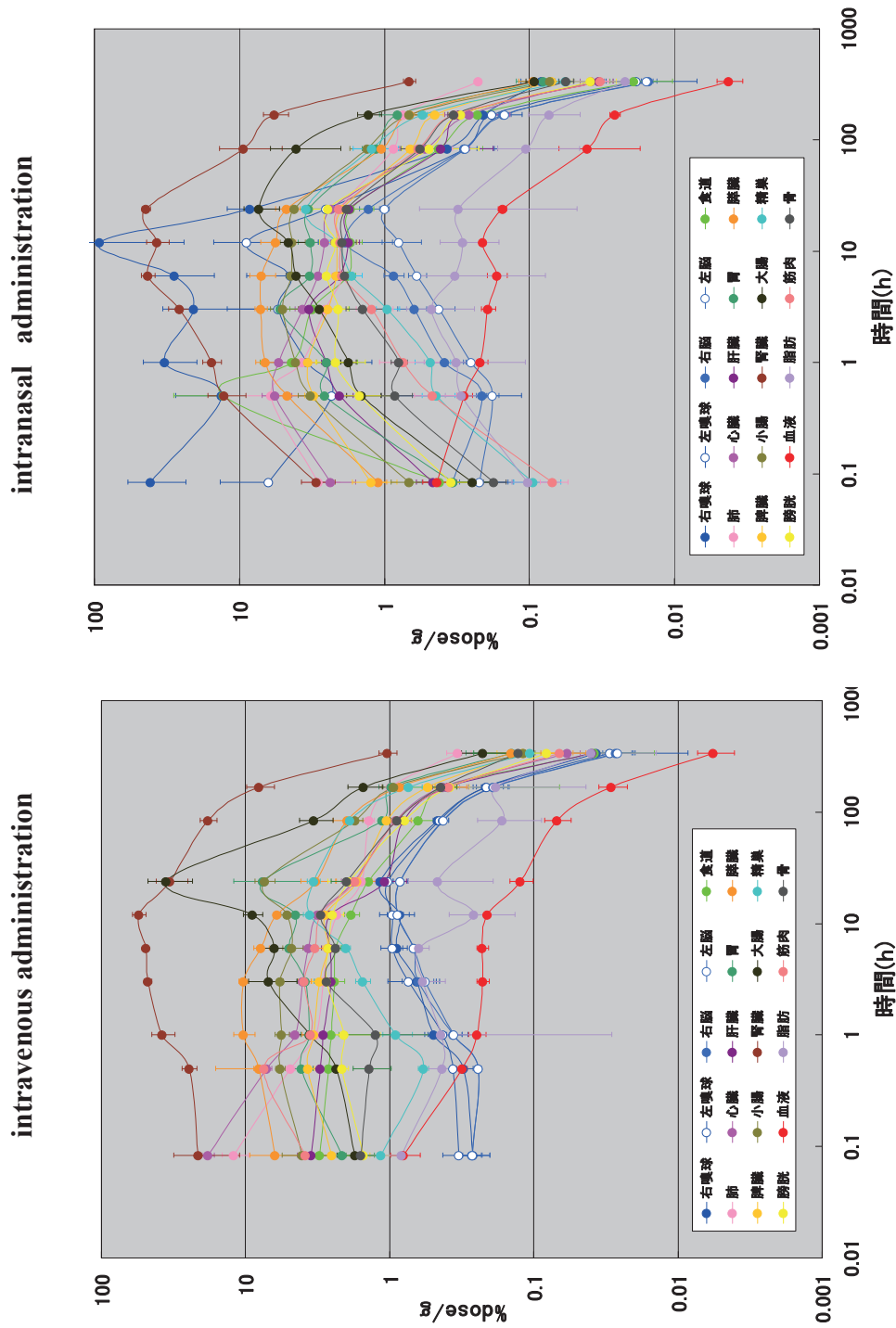


Fig. 1 The biodistribution of  $^{201}\text{Tl}^+$  in mice by intravenous administration and intranasal administration

【参考文献】

- 1) Kanayama Y, Enomoto S, Irie T, Amano R (2005) *Nucl. Med. Biol.* **32**(5), 505-12.
- 2) Kinoshita Y, Shiga H, Washiyama K, Ogawa D, Amano R, Ito M, Tsukatani T, Furukawa M, Miwa T (2008) *Chemical Senses* **33**(1), 73-8.
- 3) Shiga H, Kinoshita Y, Washiyama K, Ogawa D, Amano R, Hirota K, Tsukatani T, Furukawa M, Miwa T (2008) *Chemical Senses* **33**(7), 633-7.

## Serum amyloid A の発現に対するカドミウムとコバルトの影響

○松本可南子、淵上美由紀、藤代瞳、姫野誠一郎

徳島文理大学 薬学部 衛生化学研究室

【目的】 Serum amyloid A (SAA) は急性期タンパクの一つであり、肝臓で合成され、肝障害によって上昇することが知られている。SAA は炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-6 によって誘導されることが報告されている。当研究室ではマウスを用いて、塩化カドミウム ( $\text{CdCl}_2$ ) 投与による肝障害を塩化コバルト ( $\text{CoCl}_2$ ) 同時投与が抑制すること、また、 $\text{CoCl}_2$  同時投与が  $\text{CdCl}_2$  投与によって誘導される SAA の発現を完全に抑制することを明らかにしている。 $\text{CdCl}_2$ 、 $\text{CoCl}_2$  は TNF- $\alpha$  を産生しないが、 $\text{CoCl}_2$  投与により血漿中 IL-6 濃度は顕著に上昇していた。そこで、本研究では IL-6 から SAA 発現に至るシグナル伝達系に注目して  $\text{CoCl}_2$  投与による SAA 発現に対する影響を検討した。

【実験方法】 ICR 系雄マウス 6 週齢に  $\text{CdCl}_2$  (30  $\mu\text{mol/kg}$ ) と  $\text{CoCl}_2$  (300  $\mu\text{mol/kg}$ ) を単独、または同時に皮下投与した後、経時的に解剖し、肝臓を摘出した。摘出した肝臓をホモジナイズし、STAT3、リン酸化 STAT3 (p-STAT3) 及び I $\kappa$ B- $\alpha$  の変化をウエスタンブロット法により比較した。また肝臓の核抽出サンプルで NF- $\kappa$ B の活性化を p50 のウエスタンブロット、及び EMSA により比較した。

【結果および考察】 SAA 遺伝子のプロモーター領域には C/EBP $\beta$  と NF- $\kappa$ B 結合領域がある。NF- $\kappa$ B の活性化がなければ SAA の転写活性化が起きないという報告があるため、まず核内の NF- $\kappa$ B (p50) レベルを検討した。投与後、0, 0.5, 1, 3, 6, 8, 24 hr において核内の p50 タンパク発現量、及び細胞質の I $\kappa$ B- $\alpha$  レベルにあまり変化が見られなかった。しかし、NF- $\kappa$ B の EMSA の結果より、 $\text{CdCl}_2$ 、 $\text{CoCl}_2$ 、 $\text{CdCl}_2$ + $\text{CoCl}_2$  投与群いずれも NF- $\kappa$ B はわずかながら活性化されている事が確認された。そこで SAA 遺伝子上に結合領域はないが、NF- $\kappa$ B を介して SAA の転写活性を増強するとの報告がある STAT3 の活性化について検討した。 $\text{CdCl}_2$  投与によって p-STAT レベルが増加したが、 $\text{CoCl}_2$  単独及び  $\text{CdCl}_2$ + $\text{CoCl}_2$  同時投与群では IL-6 の発現が高いにも関わらず、p-STAT3 がほとんど検出されなかった。いずれの投与群においても STAT3 そのもののレベルは変化しなかった。以上より  $\text{CoCl}_2$  は IL-6 から SAA 発現までのシグナル伝達において、NF- $\kappa$ B の活性化には影響を与えないものの、STAT3 のリン酸化を阻害することより、SAA の転写を抑制している可能性が示唆された。 $\text{CoCl}_2$  が STAT3 のリン酸化に関与する JAK の活性化を阻害しているのか、あるいは STAT3 の脱リン酸化を促進しているのかについて、今後さらに検討する必要がある。

### 転写因子MTF-1を介したマウスメタロチオネイン-I 遺伝子発現にともなう クロマチン構造変化

○奥村文香<sup>1</sup>, 木村朋紀<sup>1</sup>, 伊藤徳夫<sup>2</sup>, 曾根知道<sup>1</sup>, 磯部正和<sup>1</sup>

1 摂南大学 薬学部 毒性学研究室

2 大阪大学大学院 薬学研究科 毒性学分野

**【目的】**重金属結合性タンパク質のメタロチオネイン (MT) は、亜鉛や銅などの恒常性維持や、カドミウムや水銀などの毒性軽減作用を有していることが知られている。MT は亜鉛、カドミウムなどの重金属により誘導されるが、この誘導には重金属応答性転写因子 metal response element-binding transcription factor-1 (MTF-1) が必須であることが MTF-1 ノックアウト細胞を用いた検討により明らかにされている。しかし、MTF-1 による MT の転写活性化機構の詳細はいまだ明らかにされていない。我々はマウス MT-I 遺伝子の転写活性化にともなうクロマチンの修飾および構造変化に着目し、以下の解析を行った。

**【実験方法】**解析には野生型および MTF-1 ノックアウトマウス由来線維芽細胞 (MTF-KO) を用いた。また、MTF-KO 細胞に Flag タグ付 MTF-1 を安定発現した MTFflag 細胞も用いた。MT-I mRNA 量は TaqMan プローブ法を用いたリアルタイム PCR 法により評価した。MTF および RNA polymerase II (pol II) の MT-I プロモーター領域へのリクルートは、抗 Flag 抗体、抗 MTF-1 抗体、および抗 pol II 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により調べた。クロマチンの修飾および構造変化は、抗 K4 メチル化ヒストン H3 (H3-MeK4) 抗体、抗アセチル化ヒストン H3(H3-AcK9) 抗体および抗ヒストン H3 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により解析した。MT-I プロモーターのクロマチン構造は、マイクロコッカルヌクレアーゼ感受性から推定した。マイクロコッカルヌクレアーゼ感受性はヌクレアーゼ消化後、未消化 DNA 量をリアルタイム PCR 法により定量することで調べた。

**【結果および考察】**野生型細胞において MT-I プロモーター領域への亜鉛依存性的かつ MTF-1 依存性的な pol II のリクルートが観察された。一般に H3-MeK4 および H3-AcK9 量は pol II リクルートおよび mRNA 鎖伸長時に増加することが知られているが、MT-I プロモーター領域では減少していた。また、亜鉛依存性的なヒストン H3 の減少が認められた。亜鉛処理によるマイクロコッカルヌクレアーゼ感受性の増加も観察された。しかし、これら亜鉛依存性的な変化は MTF-KO 細胞では認められなかった。一方、インターロイキン -6 による MT 誘導は MTF-1 を介さないことで知られているが、この場合、MTF-1 の有無に関わらずヒストン H3 の顕著な減少は認められなかった。これらの結果より、マウス MT-I プロモーター領域では、亜鉛依存性的な転写活性化にともない、MTF-1 を介してヌクレオソーム・コア粒子が除かれていると考えられる。

## O5-3

### 6価クロムは亜鉛依存的 MTF-1-p300 複合体形成を阻害することでマウスメ タロチオネイン-I 遺伝子の転写を抑制する

○木村朋紀<sup>1</sup>、Yong Li<sup>2</sup>、奥村文香<sup>1</sup>、伊藤徳夫<sup>3</sup>、中西剛<sup>4</sup>、曾根知道<sup>1</sup>、磯部正和<sup>1</sup>、  
Glen K. Andrews<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 摂南大学 薬学部 毒性学研究室、<sup>2</sup> カンザス大学メディカルセンター 分子生物学研  
究室、<sup>3</sup> 大阪大学大学院 薬学研究科 毒性学分野、<sup>4</sup> 岐阜薬科大学 衛生学研究室

【目的】重金属結合タンパク質、メタロチオネイン(MT)は、亜鉛・カドミウムなどの重  
金属により誘導されるが、発がん性を有する 6 価クロムは MT 誘導を阻害することが知  
られている。MT および MT 誘導に必須の転写因子、metal response element-binding  
transcription factor-1 (MTF-1)が、発がんに対して抑制的な作用を有することをいくつかの  
研究グループが示しており、6 価クロムによる発がんの一部は、MT 発現の抑制による  
ものであることが予想される。最近、我々 (木村、Li、Andrews)は、MTF-1 が亜鉛依  
存的に転写共役因子 p300 と複合体を形成し、この複合体形成が MT 誘導において重要な  
役割を果たしていることを明らかにした。<sup>1)</sup> この知見をもとに、6 価クロムによる MT  
誘導阻害機構について検討を行った。

【実験方法】マウス胚性線維芽細胞および MTF-1 欠損線維芽細胞に Flag タグ付 MTF-1  
を安定発現した MTFflag 細胞を用いて検討を行った。MT-I mRNA は TaqMan®プローブ  
を用いたリアルタイム PCR 法により定量した。MT-I プロモーターの転写活性はルシフ  
ェラーゼアッセイにより評価した。MTF-1 および RNA polymerase II (pol II)の MT-I プロ  
モーターへのリクルートはクロマチン免疫沈降法により検出した。また、MTF-1-p300  
複合体形成への 6 価クロムの影響は免疫沈降法により調べた。

【結果および考察】6 価クロムは MTF-1 の MT-I プロモーターへのリクルートにはほと  
んど影響せず、p300 との複合体形成を強力に阻害した。6 価クロムは pol II の MT プロ  
モーターへのリクルートも抑制した。これらの結果より、6 価クロムは MTF-1-p300 複  
合体形成を阻害することによって、pol II リクルートなどを抑制し、MT-I 遺伝子の転写  
を抑制していると考えられる。<sup>2)</sup>

#### 【参考文献】

- 1) Li Y, Kimura T, Huyek RW, Laity JH, Andrews GK (2008) Mol. Cell. Biol. **28**, 4275-4284.
- 2) Kimura T, Li Y, Okumura F, Itoh N, Nakanishi T, Sone T, Isobe M, Andrews GK (2008)  
*Biochem. J.* **415**, 477-482.

# 鈴木和夫先生追悼公演会





リンネは生活の糧を臨床医で得、*science for science* として植物学の研究を楽しんだ。その頃と比べると今は研究をすることにより生活の糧を得ることが可能になっている。あるいはもっと積極的に職業人としての研究者がますます必要となっている。しかし、この研究は企業や行政の *mission-oriented research* が主である。一方で、*science for science* を望む人は多い。プロローグで書いたように、*science for science* の研究で生活の糧を得、ハンディキャップなしで世界の仲間とつきあえたら楽しいだろうかと望んでこの世界に入った。

はじめに目指していた方向とは少し違った分野であったが、希望していた研究生活を充実させてすごせたことに感謝している。そのときどきの研究環境への適応は必要であったが、それは当然であり、むしろ日常の生活の中のひとこまとして楽しむことができた。しかし、これまでの科学に対する考え方を修正しなければならない事態が地球規模の環境の変化という、人類の存亡をかけた問題として現実化しつつある。この人類の生存をかけた *project* を *science for science* として、あるいはもっと積極的に *mission-oriented research* として研究に興味を持ってくれる人たちが増えることを望んでいる。

＜鈴木和夫教授退任記念誌・最終講義録エピローグより＞

鈴木和夫先生のご生前の活躍は、世界に知られるところです。アメリカ化学会が発行する *Chemical Research in Toxicology* 誌に鈴木和夫先生の追悼記事が掲載されました。記事の全文は、千葉大学大学院薬学研究院衛生化学研究室の *web site* からダウンロード可能です。是非ご一読下さい。

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/eisei/indexj.html>



**市民公開講座要旨**  
**「健康の維持とミネラル」**

# 生命と金属の世界ーメタロミクスへの道

名古屋大学名誉教授

原口 紘丞

## 1. 地球システムの全元素化学と拡張元素普存説

地球上の物質には、%オーダーから、ppm(百万分の一)、ppb(10億分の一)、ppt(一兆分の一)、ないしはそれ以下の超微量成分(元素)が存在する。ゆえに、物質中の10桁~15桁の濃度範囲を測定できる分析法を用いて、地球上の物質の全元素分析を行って、地球上の物質循環や動態を研究するのが「地球システムの全元素化学」である。その研究から、地球上の岩石、鉱物、海水の全元素分析を行い(元素普存説)、さらにヒトを含む生物中にもすべての元素が存在するとする考えを、演者は「拡張元素普存説」として提唱している。

## 2. 細胞小宇宙説

「拡張元素普存説」の研究を進めるうちに、「生物細胞1個にもすべて元素が存在する」と考え、「細胞小宇宙説」を提唱した。細胞小宇宙説の実証研究では、イクラ(サケの卵細胞)を用いて実験を行い、現在までに放射性元素(人体に危険)と希ガス元素(揮発性が大きい)を除く78元素の存在を証明している。このような細胞小宇宙説から言えることは、生物細胞も宇宙、そして地球の一部であることである。

## 3. 新学問領域「メタロミクス (metallomics)」の提唱

私達の身体、そして細胞中にはすべての元素が存在するならば、次に目指すことは、金属の生体機能の解明である。そこで、金属の生体機能の解明を主題とする生体金属総合科学として、提唱したのが、「メタロミクス(metallomics)」である(2004年)。メタロミクスは科学の世界ではまだ誕生したばかりの新生児である。しかし、図1の生物システムの単純化モデルに示すように、メタロミクスは今後ゲノミクス、プロテオミクスと相補的な役割を担う生命科学の新学問領域として発展することが期待され、世界的にも注目されつつある。

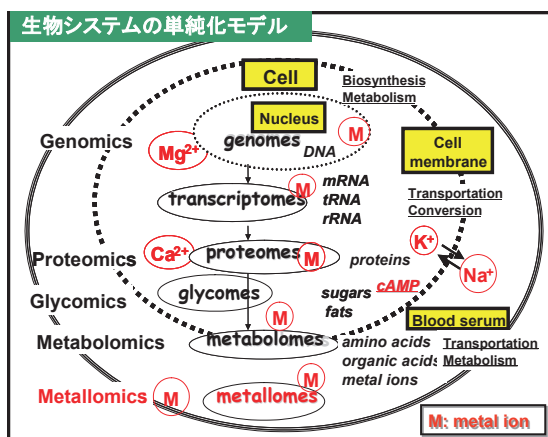


図1. 生物システムの単純化モデル

図で、外側の線は生体または組織全体を、そして内側の点線は細胞膜を示す。両者の間には、血液が流れていると考える。

- Genomics : ゲノミクス (遺伝子科学)
- Proteomics : プロテオミクス (タンパク質科学)
- Metallomics : メタロミクス (生体金属科学)
- Metabolomics : メタボロミクス (代謝科学)
- Glycomics : グライコミクス (糖鎖科学)

参考書:原口紘丞:「生命と金属の世界」、放送大学教育振興会 (2004).

## 金属なしでは生きられない

桜井 弘

鈴鹿医療科学大学・薬学部

人類は「石器時代」に金を発見しました。そして、紀元前 4000 年ころに青銅器を作ることに成功し「青銅器時代」を、紀元前 3000 年ころには西南アジアで製鉄法を考案し「鉄器時代」を迎えました。この銅や鉄の利用により、人類の文明は大きな進歩をとげ、新しい産業がおこりました。その後、電気を発明し、これを用いて軽金属のアルミニウムを作りました。航空機、自動車、家庭電気製品などに使われるようになり、文明は高度に飛躍しました。「アルミニウム時代」と言えるかもしれません。人類は、さらに周期表の原子番号 57-71 の元素類(ランタニド系元素とよばれる)を用いて、原子力電池、プラズマや液晶テレビ、高性能オーディオスピーカー、携帯電話、光ディスクなどを発明しました。これらなくしては私たちの生活は成り立たなくなりました。現代は、「ランタニド時代」とよんでもよいと思われます。このように物質的に見ると、私たちは日々「金属なしでは生きられない」と言えるでしょう。

一方、私たちの体を見てみましょう。言うまでもなく、私たちの体はすべて約 60 種類の元素類からできています。地球が生まれてまもなくすると、海の中で原始生命が誕生しました。気の遠くなるような永い時間を経て、哺乳動物が進化して人間が生まれました。私たちの体を作っている元素類には、酸素、炭素、水素、窒素、カルシウムそしてリンに続いてイオウ、カリウム、ナトリウム、塩素、マグネシウムがあります。これらをすべて合わせますと、体重の約 99.5%を占めてしまいます。しかし、私たちの体は、これらの元素類だけでは、とても生きることができません。海水に溶けている鉄、亜鉛、マンガン、銅、モリブデン、コバルトなどの金属元素が必要だったのです。これらの元素類は、タンパク質や酵素などと結合して、生命の進化にとって必要な新しい生理作用を次々に生み出しました。貧血にならないためには鉄だけでなくコバルトや亜鉛が欠かせないとか、成長にはカルシウムや亜鉛が必要と言われるのはこのためです。これらの元素類を毎日食事から摂らなければ、私たちは生きていけないのです。

さらに面白いことに、私たちが病気になった時に、金属を含んだ薬を摂る事があります。たとえば、がんの治療には白金を、関節リウマチには金を、胃潰瘍にはアルミニウムや亜鉛を含む薬が用いられています。私たちが健康に生きていくうえには、やはり「金属なしでは生きられない」のです。

私は、日々の暮らしの中で「金属なしでは生きられない」という例をいくつか紹介しながら、“金属がどうして大切なのか？”をほんの少しの間考えていただく機会を提供したいと思います。

[参考]

1. 桜井 弘: 金属なしでは生きられない—活性酸素をコントロールする—、岩波書店
2. 桜井 弘: 金属は人体になぜ必要か、講談社
3. 桜井 弘編: 元素 111 の新知識、講談社



## アンチエイジング(加齢制御)とミネラル

木村 修一

昭和女子大学大学院 加齢制御栄養学研究室

今アメリカに行ってみると、多くのアメリカ人がセレン(セレンウム)のサプリメントを摂っているという現象に驚く。日本では考えられない現象である。セレン摂取とガン死亡率の相関を示すようなグラフがアメリカの栄養学の参考書に掲載されているせいではないかと筆者は考えている。つまり一つのマップにはアメリカの地域別における農産物や家畜飼料作物中のセレン含量を濃淡で表しており、低いほうを濃く表現している。そしてもう一つのマップにはアメリカ人のガンによる死亡率の地域差を濃淡で示してあり、死亡率の高い方を濃く表現している。このマップを較べてみると、二つのマップの濃淡の分布が類似していることが分かる。つまりセレン含量の低い地域ほど、ガンによる死亡率が高いことを示唆しているのである。アメリカ人がセレンのタブレットを飲む気持ちが理解できよう。実験的にもセレン投与がガンの発生を抑制するという成績がでてきているからである。セレンがさらに注目されるようになったのは、中国の地方病で若くして動脈硬化を起こす病気(克山病)の原因がその地域の土壤中セレン含量が低いことによることが分かったからである。このように、微量元素の摂取量の違いがガンや生活習慣病の発症と関連して人の寿命に深く関わることが分かってきた。

このようなミネラルの摂取状態が病気の発症に関与し、ひいてはエイジング(加齢)を修飾するという研究成果が数多く報告されている。

ここでは、こうしたミネラルのエイジングの及ぼす影響について述べることにする。われわれが生きていく上で、どうしても食物から摂取しなければならないミネラルはたくさんある。これらを必須ミネラルと呼んでおり、このなかにはナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、クロム、マンガン、鉄、銅、コバルト、亜鉛、セレン、モリブデン、などがある。一方人間が摂取すると毒性を示す水銀やカドミウムのようなミネラルもあり、これらを摂取すれば寿命を縮めることになる。アンチエイジング、つまりどうしたら長生きできるか？ について、ミネラルの摂取の面から述べてみたい。

私たちの研究室でも微量元素についての栄養生理学的研究を進めている。その一つがマグネシウムである。私たちはこの研究でマグネシウム欠乏のラットを作成しなければならないが、困ったことに突然死が非常に多いのである。人間の場合も、心臓の機能不全で死亡した人の心臓では、マグネシウム含量が他の原因で死亡したヒトのものに較べて、低いことが報告されており、エイジングに過程におけるマグネシウムの生理的意義について強い興味を抱いている。亜鉛やヨウ素など他の微量元素についても解説することにした。





## メタロミクス研究フォーラム実行委員会

(7月17日順)

- 実行委員 荒川泰昭 (静岡県立大学)  
荒野 泰 (千葉大学大学院 薬学研究院)  
池川雅哉 (京都府立医科大学 ゲノム医科学)  
稲垣和三 ((独) 産業技術総合研究所 計測標準研究部門 環境標準研究室)  
上原万里子 (東京農業大学 応用生物科学部 栄養科学科)  
梅村知也 (名古屋大学 エコトピア科学研究所)  
江崎信芳 (京都大学化学研究所 環境物質化学研究系)  
榎本秀一 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科、(独) 理化学研究所神戸研究所 分子イメージング科学研究センター メタロミクスイメージング研究ユニット)  
太田清久 (三重大学 工学部)  
大谷 肇 (名古屋工業大学大学院 工学研究科)  
小椋康光 (千葉大学大学院 薬学研究院)  
小谷 明 (金沢大学大学院 自然科学研究科 薬学系)  
鍛冶利幸 (北陸大学 薬学部 環境健康学教室)  
加藤明良 (成蹊大学 理工学部 物質生命理工学科)  
川原正博 (九州保健福祉大学 薬学部)  
木寺正憲 ((独) 理化学研究所 仁科加速器研究センター 加速器部門 加速器技術開発グループ イオン源開発チーム)  
木村修一 (昭和女子大学大学院 生活機構研究科)  
木村美恵子 (タケダライフサイエンスリサーチセンター)  
古武弥一郎 (広島大学大学院 医歯薬学総合研究科)  
児玉浩子 (帝京大学 医学部 小児科)  
小林憲正 (横浜国立大学大学院 工学研究院)  
駒井三千夫 (東北大学大学院 農学研究科・栄養学)  
米田誠治 (鈴鹿医療科学大学 薬学部 機器分析学教室)  
桜井 弘 (鈴鹿医療科学大学 薬学部)  
佐治英郎 (京都大学大学院 薬学研究科)  
篠原厚子 (清泉女子大学 人文科学研究所)  
角 大梧 (筑波大学大学院 人間総合科学研究科 生命システム医学専攻)  
田尾博明 ((独) 産業技術総合研究所 環境管理技術研究部門)  
高橋和也 ((独) 理化学研究所 仁科加速器研究センター 加速器応用研究グループ RI 製造応用チーム)  
竹内豊英 (岐阜大学 工学部 応用化学科)  
武田厚司 (静岡県立大学 薬学部)  
竹中千里 (名古屋大学大学院 生命農学研究科)

千熊正彦 (大阪薬科大学 薬学部 生体分析化学研究室)  
 千葉光一 ((独) 産業技術総合研究所)  
 千葉百子 (国際医療福祉大学 薬学部)  
 角田欣一 (群馬大学大学院 工学研究科 応用化学・生物化学専攻)  
 兔川忠晴 (明治薬科大学 分析化学教室)  
 中井 泉 (東京理科大学 理学部)  
 中西 剛 (岐阜薬科大学 衛生学研究室)  
 中西由季子 (昭和女子大学大学院 生活機構研究科 ヤマザキパン寄  
 付講座 加齢制御栄養学研究室)  
 中山守雄 (長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科)  
 西牟田守 ((独) 国立健康・栄養研究所)  
 馬場嘉信 (名古屋大学大学院 工学研究科 化学・生物工学専攻)  
 原口紘丞 ((社) 国際環境研究協会、名古屋大学)  
 姫野誠一郎 (徳島文理大学 薬学部)  
 平田岳史 (東京工業大学大学院 理工学研究科 地球惑星科学専攻)  
 廣村 信 ((独) 理化学研究所神戸研究所 分子イメージング科学研  
 究センター メタロミクスイメージング研究ユニット)  
 黄 基旭 (東北大学大学院 薬学研究科)  
 藤森英治 (環境省環境調査研修所)  
 古田直紀 (中央大学 理工学部 応用化学科)  
 三原久明 (京都大学化学研究所)  
 本仲純子 (徳島大学大学院 ソシオテクノサイエンス研究部)  
 本水昌二 (岡山大学大学院 自然科学研究科)  
 安井裕之 (京都薬科大学 代謝分析学分野)  
 柳澤裕之 (東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座)  
 山本千夏 (北陸大学 薬学部)  
 吉田宗弘 (関西大学 化学生命工学部)  
 吉村悦郎 (東京大学大学院 農学生命科学研究科)  
 渡辺 正 (東京大学 生産技術研究所)  
 渡辺知保 (東京大学 医学系 人類生態学)

## 第1回メタロミクス研究フォーラム事務局

佐藤愉記子 ((独) 理化学研究所)  
 廣村菜緒子 ((独) 理化学研究所)  
 齋藤大地 ((独) 理化学研究所)  
 廣村 信 ((独) 理化学研究所)



第1回メタロミクス研究フォーラム事務局  
〒650-0047 神戸市中央区港島南町 6-7-3  
独立行政法人理化学研究所 神戸研究所  
分子イメージング科学研究センター  
メタロミクスイメージング研究ユニット  
TEL: 086-251-7951 FAX: 086-251-7953