

学 位 論 文 題 名

脂肪酸代謝における亜鉛とカドミウムの
拮抗作用に関する研究

学位論文内容の要旨

【目 的】

微量必須元素の1つである亜鉛の生体内での役割は多岐にわたっており、亜鉛酵素の活性発現や転写調節の際に重要な役割を演じている。近年、かたよった食生活やある種の薬物投与などにより亜鉛欠乏症がおきることが指摘されてきた。その症状としては皮膚の角化、脱毛、成長障害、生殖機能低下、創傷治癒遅延、味覚障害などがあげられる。これらの症状と脂肪欠乏症には多くの類似点がみられることなどから、脂肪酸代謝における亜鉛の調節機能が示唆されていたが、その詳細についてはほとんど明らかにされていない。

本研究では脂肪酸代謝における亜鉛の役割の解明を目的とし、亜鉛欠乏、および亜鉛と拮抗作用を持つ重金属カドミウムにより、脂肪酸代謝がどのように変化するかを詳細に検討した。

【結果および考察】

1. 亜鉛欠乏食飼育とカドミウム投与によるラット臓器中脂肪酸組成変化

3週令ラットを亜鉛欠乏食で飼育し、対照として亜鉛欠乏食飼育ラットの食事摂取量と同量の亜鉛添加食（50ppm）を与えたラットを用いた。2週間の飼育によって、心臓、肺、肝臓、腎臓、精巣いずれの臓器においても、16:1、18:1のモノエン酸が有意に減少し、20:4や飽和脂肪酸は増加の傾向がみられた。また、分析した臓器の中では肝、腎の変化が大きかった。

亜鉛含有食で飼育したラットに塩化カドミウム0.01mmol/kgを皮下投与し、48時間後の肝臓を分析すると、亜鉛欠乏の場合と同様に18:1や16:1が減少し、18:0や20:4の増加が観察された。亜鉛欠乏食飼育ラットに同量のカドミウムを投与すると、この変化は一層顕著であった。

亜鉛欠乏および塩化カドミウム投与ラットに尾静脈から¹⁴C-ステアリン酸を投与した。24時間後に肝を摘出して総脂質を抽出後、脂肪酸メチルエステルに変換してHPLCにより各脂肪酸を分離し、オレイン酸への変換率を求めた。投与したステアリン酸は時間経過と共にオレイン酸へ変換された。この割合は亜鉛欠乏及びカドミウム投与ラットで有意に抑制された。この結果は

脂肪酸組成の変化と一致するものであり、モノエン酸を合成する酵素である $\Delta 9$ デサチュラーゼ活性の低下を示唆している。

2. 肝ミクロゾーム中の脂肪酸代謝酵素活性の変化

飽和脂肪酸の9位に2重結合を導入する $\Delta 9$ デサチュラーゼはミクロゾームに存在し、この反応にはチトクロム b_5 、NADH-チトクロム b_5 レダクターゼおよび末端デサチュラーゼの3つが関与する。亜鉛欠乏と塩化カドミウム投与を組み合わせたラットから肝ミクロゾームを調製し、各成分の活性を検討した。その結果、カドミウムの投与によって、上記の3つの成分のうち、末端デサチュラーゼ活性のみが減少した。カドミウム投与によるモノエン酸の減少は、末端デサチュラーゼ活性の低下に起因していることが明かとなった。

リン脂質の2位に脂肪酸を導入する酵素である1-アシルグリセロホスホコリン(1-アシル GPC) アシルトランスフェラーゼの活性が変化することによっても膜リン脂質の脂肪酸組成が変化することが知られている。しかしこの活性は、亜鉛欠乏やカドミウムの投与による影響を受けなかった。

正常ラット肝から調製したミクロゾームの $\Delta 9$ デサチュラーゼ活性に対する *in vitro* でのカドミウムの効果を調べたところ、1 mM の塩化カドミウムを添加すると活性が50%阻害された。また、塩化カドミウムは1-アシル GPC アシルトランスフェラーゼ活性を阻害し、 K_i 値は約 $1.8 \times 10^{-4} M$ と計算された。*in vitro* でこれらの酵素活性を阻害する濃度は、カドミウム投与直後の肝ミクロゾームに存在するカドミウムの量に比べて高い。カドミウムを投与したラットの肝ミクロゾームの $\Delta 9$ デサチュラーゼ活性の低下は、カドミウムイオンによる直接の阻害である可能性も否定はできないが、酵素蛋白の合成能の低下や、安定性の低下などの理由による、酵素量の減少によるものである可能性が強いものと考えられる。

3. 肝臓におけるカドミウムの存在形態と亜鉛代謝への影響

カドミウムは肝細胞に取り込まれるとメタロチオネイン合成を誘導し、これに結合して解毒される。まず、ラットにカドミウムを投与し、肝可溶性画分について Sephadex G-75 でゲル濾過を行い、メタロチオネインと非メタロチオネインに分離した。カドミウム投与直後にはメタロチオネインは合成されていないので、高分子量のリガンドに結合していた。あらかじめ亜鉛を投与してメタロチオネインを誘導しておくと、投与したカドミウムが速やかにトラップされることがわかった。

亜鉛欠乏ラットと亜鉛含有食で飼育したラットに $^{109}CdCl_2$ を投与して、48時間後に、肝臓におけるカドミウムの細胞内分布を比較した。亜鉛欠乏ラットではカドミウムは核、ミトコンドリ

ア, ミクロゾームに多く存在していた。また, サイトゾルでは, メタロチオネイン画分での割合が減少していた。亜鉛欠乏ラットではメタロチオネイン合成が低下しているために, 細胞内でのカドミウムの有効濃度が高まっていることが示唆された。

4. 初代培養肝細胞の脂肪酸代謝に対するカドミウムの影響

ラット肝の初代培養細胞を用いて脂肪酸代謝に対するカドミウムの影響を検討した。McCoy's 5 A培地にインスリン, アプロチニン, デキサメサゾンを追加した無血清培地を用いて培養したところ, 培養1日後から5日目まで細胞中のモノエン酸の増加が観察された。0.5–1 μ Mの塩化カドミウムを追加して培養した細胞ではこの増加が大きく抑えられていた。

次に培養1日後の細胞に [14 C] 18:0を取り込ませ, 2時間および24時間後のオレイン酸への変換率を検討した。カドミウムを1 μ M共存させると, 18:1への変換が強く抑制された。in vivoでカドミウムを投与したときに肝臓で観察された Δ 9デサチュラーゼ活性の低下は, ホルモン分泌などの作用を介した二次的なものではなく, カドミウムの直接作用であることが示唆された。

【まとめ】

1. ラットを亜鉛欠乏にしたり, カドミウムを投与すると Δ 9デサチュラーゼ活性が低下することにより, モノエン酸が減少する。2. 亜鉛欠乏ラットは対照に比べてカドミウム感受性が著しく高く, その理由としてメタロチオネインが十分にカドミウムをトラップできないために, 細胞内でのカドミウムの有効濃度が高まっていることが考えられた。3. カドミウム投与ラット肝における Δ 9デサチュラーゼ活性の低下は, ホルモン作用などを介する二次的なものではなく肝臓への直接作用と考えられる。また, 酵素活性の低下は, 活性の阻害によるものではなく, 酵素量の低下であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 栗 原 堅 三

副 査 助教授 高 橋 和 彦

副 査 助教授 三 宅 教 尚

副 査 助教授 徳 光 幸 子

本論文の申請者は、長年衛生化学の研究に携わってきたが、今回脂肪酸代謝におけるカドミウムの拮抗作用に関する研究で、博士のための学位論文をまとめ申請してきた。

微量必須元素の1つである亜鉛の生体内での役割は多岐にわたっており、亜鉛酵素の活性発現や転写調節の際に重要な役割を演じている。近年、かたよった食生活やある種の薬物投与などにより亜鉛欠乏症がおきることが指摘されてきた。その症状としては皮膚の角化、脱毛、成長障害、生殖機能低下、創傷治癒遅延、味覚障害などがあげられる。これらの症状と脂肪欠乏症には多くの類似点がみられることなどから、脂肪酸代謝における亜鉛の調節機能が示唆されていたが、その詳細についてはほとんど明らかにされていない。本論文は、脂肪酸代謝における亜鉛の役割の解明を目的として行われた。

本論文では、まず亜鉛欠乏食飼育とカドミウム投与によるラット臓器中脂肪酸組成変化を検討している。3週令ラットを亜鉛欠乏食で飼育し、対照として亜鉛欠乏食飼育ラットの食事摂取量と同量の亜鉛添加食(50ppm)を与えたラットを用いた。2週間の飼育によって、心臓、肺、肝臓、腎臓、精巣いずれの臓器においても、16:1、18:1のモノエン酸が有意に減少し、20:4や飽和脂肪酸は増加の傾向がみられた。

亜鉛含有食で飼育したラットに塩化カドミウム0.01mmol/kgを皮下投与し、48時間後の肝臓を分析すると、亜鉛欠乏の場合と同様に18:1や16:1が減少し、18:0や20:4の増加が観察された。亜鉛欠乏食飼育ラットに同量のカドミウムを投与すると、この変化は一層顕著であった。

亜鉛欠乏および塩化カドミウム投与ラットに尾静脈から¹⁴C-ステアリン酸を投与した。投与したステアリン酸は時間経過と共にオレイン酸へ変換された。この割合は亜鉛欠乏及びカドミウム投与ラットで有意に抑制された。この結果は脂肪酸組成の変化と一致するものであり、モノエン酸を合成する酵素である Δ^9 デサチュラーゼ活性の低下を示唆している。

本論文では、次に肝ミクロソーム中の脂肪酸代謝酵素活性の変化を調べている。亜鉛欠乏と塩

化カドミウム投与を組み合わせたラットから肝マイクロゾームを調製し、各成分の活性を検討した。その結果、カドミウムの投与によって、末端デサチュラーゼ活性が減少した。カドミウム投与によるモノエン酸の減少は、末端デサチュラーゼ活性の低下に起因していることが明らかとなった。

正常ラット肝から調製したマイクロゾームの $\Delta 9$ デサチュラーゼ活性に対する *in vitro* でのカドミウムの効果を調べたところ、1 mM の塩化カドミウムを添加すると活性が50%阻害された。肝マイクロゾームの $\Delta 9$ デサチュラーゼ活性の低下は、酵素蛋白質の合成能の低下や、安定性の低下などの理由による酵素量の減少によるものである可能性が強いものと推定している。

本論文では、次に肝臓におけるカドミウムの存在形態と亜鉛代謝への影響を検討している。カドミウム投与直後にはメタロチオネインは合成されていないので、高分子量のリガンドに結合していた。あらかじめ亜鉛を投与してメタロチオネインを誘導しておくと、投与したカドミウムが速やかにトラップされることがわかった。

亜鉛欠乏ラットと亜鉛含有食で飼育したラットに $^{109}\text{CdCl}_2$ を投与して、肝臓におけるカドミウムの細胞内分布を比較した。亜鉛欠乏ラットではカドミウムは核、ミトコンドリア、マイクロゾームに多く存在していた。また、サイトゾルでは、メタロチオネイン画分での割合が減少していた。亜鉛欠乏ラットではメタロチオネイン合成が低下しているために、細胞内でのカドミウムの有効濃度が高まっていることが示唆された。

最後に、本論文では、初代培養肝細胞の脂肪酸代謝に対するカドミウムの影響を検討している。培養1日後から5日目まで細胞中のモノエン酸の増加が観察された。0.5–1 μM の塩化カドミウムを添加して培養した細胞ではこの増加が大きく抑えられていた。次に培養1日後の細胞に $[^{14}\text{C}]$ 18:0を取り込ませ、オレイン酸への変換率を検討した。この結果、*in vivo* でカドミウムを投与したときに肝臓で観察された $\Delta 9$ デサチュラーゼ活性の低下は、ホルモン分泌などの作用を介した二次的なものではなく、カドミウムの直接作用であることが示唆された。

以上のように、本論文は脂肪酸代謝における亜鉛とカドミウムの作用に関し、多くの新しい知見を含んでおり、博士（薬学）の学位を与えるにふさわしいものであると判断した。