

学 位 論 文 題 名

Cadmium-induced Cellular Damage and Participation
of Oxidative Stress in *Euglena gracilis*: Comparison of Cellular
Response between Strains Z and SMZ as Photosynthetic
Protophyta and Non-photosynthetic Protozoa Model Organisms.

(*Euglena gracilis* におけるカドミウム惹起細胞障害と活性酸素ストレスの
関与： *E. gracilis* Z を光合成原生生物細胞モデル， *E. gracilis* SMZ を
非光合成原生動物細胞モデルとしたストレス応答の比較)

学位論文内容の要旨

【序章】健全な食品の確保は健康維持の基本であり，それにはまず一次生産物の安全を考えなければならない．近年，地球環境汚染が深刻化し，食糧生産の場の安全と一次生産量の低下による食糧危機が懸念されている．水圏は地球環境汚染のバロメータであり，水圏生物への影響を知ることは，我々の健康を考える上でも意義深い．

数年来，関心が高まっている内分泌攪乱物質（EDC）による障害は，従来の安全基準をはるかに下回る低濃度で現れ，その影響評価系の確立が最優先課題となっている．著者は，従来の実験動物の代替として，より単純で扱いも容易な真核単細胞生物 *Euglena gracilis* の特異な性質に着目し，代表的な環境汚染物質である塩化カドミウム（Cd）の細胞毒性評価を試みた．*E. gracilis* には，葉緑体を持つ Z 株（以下 Z）と，ストレプトマイシン処理によりクロロフィル，RuBisCO を欠損させた SMZ 株（以下 SMZ）があり，光合成株 Z を Protophyta モデル，光合成能を喪失した従属栄養株 SMZ を Protozoa モデルと位置づけ，Cd ストレス負荷に対する細胞応答を比較した．ストレスと生体応答の解析に数十兆個もの細胞からなる高等生物の利用は困難だが，単細胞原生生物は扱いが簡単で解析も比較的容易である．単細胞原生生物で得られた情報が直接高等動植物に帰納できるものではないが，基本反応に類似点が多いことから，モデルとしての *E. gracilis* の有用性評価につながると考えた．

【第一章】Cd 曝露により，Z，SMZ とともに増殖阻害と急性毒性細胞死，細胞の肥

大化および多核化，V 字またはヒトデ状分裂異常の有意な増加を認めた．それらの異常細胞は，従来報告されている ppm (Cd^{2+} 1ppm = 8.9 μM) レベルよりもはるかに低い ppb レベルで高頻度に起き，Cd の EDC としての水圏生物に対する影響が無視できないことがわかった．

【第二章】Cd 惹起細胞障害と活性酸素種 (ROS) の関与について検討した．細胞内 ROS 検出プローブ Dihydrofluorescein diacetate を用いて蛍光強度を調べたところ，両株とも Cd 曝露細胞で control に比べ 2 倍以上強い蛍光が認められた．また，分裂異常細胞で強い蛍光を観察し，Cd 曝露による ROS 発生を確認した．さらに，脂質過酸化レベルを測定したところ，Z では 0.2 ppm Cd で最高値を示した．SMZ でも同様の傾向を認めたが，0.1 ppm でも高い値を示し，極低濃度の Cd 曝露に関しては，Z と異なる結果となった．この相違は，Z の高度不飽和脂肪酸を含むリン脂質含量が SMZ に比べ 1.5~2 倍高いためであると推察した．続いて，comet assay を行ったところ，両株とも 10 ppm Cd の急性曝露で control の 3~4 倍の comet tail が観察され，DNA 鎖断片化を確認した．

【第三章】ROS 検出プローブ Dihydrorhodamine 123 を用いて Flow cytometry (FCM) により ROS 生成を確認した．ROS 発生 Cd 曝露濃度は，Z で 50 μM ，SMZ で 100 μM であり，同じ濃度では Z 株でより高い ROS 生成を確認した．また，DNA 障害惹起器官を調べるために，TUNEL と DAPI による二重染色を行い，Z，SMZ ともに核以外の DNA 断片化を明らかにした．さらに，Z において Cd の標的小器官が葉緑体，ミトコンドリアのどちらかを断定するために光合成に対する影響を調べたところ，Cd 毒性は光合成に関係しないことがわかり，Z でもミトコンドリアが標的器官であることが示唆された．

【第四章】一般に TUNEL の結果は，アポトーシスを反映していることから，*E. gracilis* でもアポトーシス様細胞死が惹起しているか調べた．DiOC₆(3)染色でミトコンドリア膜電位の変化を，Annexin V 染色で細胞死に伴う phosphatidyl serine (PS) の細胞外露出を FCM により解析した．両株ともに膜電位は 10 μM までの Cd 曝露で上昇し，50 μM 以上では下降した．すなわち，50 μM 以上の Cd 曝露でアポトーシス様細胞死が推測された．一方，PS 露出は両株ともに 500 μM 以上の Cd 曝露で明らかに認められた．

【第五章】Cd 曝露に伴うストレスタンパク質の発現をウエスタンブロット法で解析したところ，両株とも 50 μM Cd で Heat-shock protein 70 が最も高く検出された．また，ROS 検出プローブを用いた実験により Cd 曝露で生成する活性酸素は，過酸化

水素由来のヒドロキシルラジカルであると推測されたため、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APx) とグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の活性を調べた。Apx 活性は、両株とも 100 μ M Cd 曝露で最も高く、同濃度で Z は SMZ の 4 倍多く生成されていた。一方、GPx 活性は、Z では 50 μ M, SMZ では 100 μ M Cd 曝露により最高値を示した。光合成能の有無と ROS 生成の質的、量的相違を生じ、それによって両者に異なる傾向が生じたのではないかと推察した。

【第六章】Cd 曝露によるチオール生成量の変化を調べた。グルタチオン生成量は、Cd 曝露 Z で 1.5 倍、SMZ で 2~3 倍増加していた。また、高等動物で重金属曝露によってつくられるメタロチオネインは *Euglena* では合成されないが、Cd 曝露で phytochelatins ([γ Glu-Cys] $_n$ -Gly; $n = 4$) の生成が示唆された。

【第七章】Cd と拮抗する亜鉛 (Zn) の障害発現抑制効果を検討した。1 ppm Cd に 0.5 ~250 ppm の Zn を添加し分裂異常について調べたところ、Z では 63 ppm 添加したときに異常が最も抑制され、SMZ では有意な変化は認められなかった。また、細胞分裂に必須の cyanocobalamin を Zn と同様に添加し、その効果を調べたところ、両株とも若干細胞増殖が促進されたが、分裂異常を抑制する効果は得られなかった。

【総合考察】Cd が惹起した一連の細胞機能障害発現メカニズムの詳細は不明であるが、著者は、その異常がミトコンドリアでの活性酸素制御系の傷害によるものと認識している。本研究結果により、Protophyta と Protozoa との間には、Cd 惹起ストレスによる細胞分裂障害、ROS 発生、DNA 障害の発現とその防御機構の相違が示唆された。この違いは、原生生物にのみ特異的に認められるものではなく、高等動植物とも多くの共通性を有するものと考えられる。ストレスに対し敏感に反応し多様な応答を示す *E. gracilis* は、さまざまなストレスに対する生体応答研究のモデル細胞として大変有用であると著者は考えている。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	鈴 木 鐵 也
副 査	教 授	鈴 木 翼
副 査	教 授	嵯 峨 直 恆
副 査	教 授	宮 下 和 夫
副 査	教 授	都 木 靖 彰
副 査	助教授	工 藤 勲

学 位 論 文 題 名

Cadmium-induced Cellular Damage and Participation of Oxidative Stress in *Euglena gracilis*: Comparison of Cellular Response between Strains Z and SMZ as Photosynthetic Protophyta and Non-photosynthetic Protozoa Model Organisms.

(*Euglena gracilis* におけるカドミウム惹起細胞障害と活性酸素ストレスの
関与： *E. gracilis* Z を光合成原生生物細胞モデル， *E. gracilis* SMZ を
非光合成原生動物細胞モデルとしたストレス応答の比較)

水圏は地球環境汚染のバロメータであり，水圏生物への影響を知ることは，我々の健康を考える上でも意義深い．数年来，関心が高まっている内分泌攪乱物質（EDC）による障害は，従来の安全基準をはるかに下回る低濃度で現れ，その影響評価系の確立が最優先課題となっている．著者は，真核単細胞生物 *Euglena* の特異な性質に着目し，代表的な環境汚染物質である塩化カドミウム（Cd）の細胞毒性評価を試みた．光合成株 *E. gracilis* Z を Protophyta モデル，光合成能を喪失した従属栄養株 *E. gracilis* SMZ を Protozoa モデルし，Cd ストレス負荷による細胞応答を比較している．

従来報告されている ppm レベルよりもはるかに低い Cd 濃度で，Z，SMZ とともに増殖阻害，細胞肥大・多核化，V 字またはヒトデ状分裂異常の増加を認め，Cd の EDC としての影響が無視できないと指摘している．

また，Cd 惹起細胞障害と活性酸素種（ROS）の関与について検討し，ROS 発生 Cd 濃度は，Z で 50 μ M，SMZ で 100 μ M，同じ濃度では Z 株でより高い ROS 生成を明らかにしている．

さらに、comet assay により両株とも Cd 曝露で control の 3~4 倍の comet tail を観察し、DNA 鎖断片化を確認している。また、DNA 障害器官を TUNEL と DAPI による二重染色で検討し、両株とも核以外の DNA 断片化を明らかにした。続いて Z において遅延蛍光を指標に光合成に対する影響を調べ、Cd 毒性は光合成に関係しないこと、Z でもミトコンドリアが標的器官であることを明らかにしている。

一般に TUNEL positive の結果はアポトーシスを反映していることから、ミトコンドリア膜電位の低下、phosphatidyl serine (PS) の細胞外露出を指標にフローサイトメトリーにより検討している。両株ともに膜電位の低下が認められた 50 μ M 以上の Cd 曝露でアポトーシス様細胞死を示唆する結果を得ている。一方、PS 露出は両株ともに 500 μ M 以上の Cd 曝露で確認している。

さらに、ウエスタン解析により両株とも 50 μ M Cd で Heat-shock protein 70 の誘導を確認している。また、活性酸素消去系酵素であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APx)、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) 活性を調べ、APx 活性は両株とも 100 μ M Cd で最も高く、同濃度で Z は SMZ の 4 倍多く生成されること、GPx 活性は、Z で 50 μ M, SMZ で 100 μ M Cd で最高値を示すことを確認している。両株において光合成能の有無と ROS 生成の質的、量的相違を生じたことから異なる傾向が生じたのではないかと考察している。

また、Cd 曝露によりグルタチオン生成量が Z で 1.5 倍、SMZ で 2~3 倍増加することを明らかにした。さらに、phytochelatin ($[\gamma\text{Glu-Cys}]_n\text{-Gly}$; $n = 4$) の生成を示唆する結果を得ている。

最後に、Cd と拮抗する亜鉛 (Zn) の障害発現抑制効果を検討し、Z では 1 ppm Cd に Zn を 63 ppm 添加したときに異常が最も抑制され、SMZ では有意な変化は認められないことを確認している。また、細胞分裂に必須の cyanocobalamin を Zn と同様に添加してその効果を調べ、両株とも若干細胞増殖が促進されたものの分裂異常を抑制する効果がないことを明らかにした。

総合考察において、Cd が惹起した一連の細胞機能障害発現メカニズムの詳細は不明であるが、その異常がミトコンドリアでの活性酸素制御系の傷害によるものと推察している。本研究結果により、Protophyta と Protozoa との間には、Cd 惹起ストレスによる細胞分裂障害、ROS 発生、DNA 障害の発現とその防御機構の相違を示唆し、この違いが原生生物にのみ特異的に認められるものではなく、高等動植物とも多くの共通性を有するものと指摘している。ストレスに対し敏感に反応し多様な応答を示す *E. gracilis* は、さまざまなストレスに対する生体応答研究のモデル細胞としての有用性を指摘して結んでいる。