シイタケにおけるカドミウム結合成分

(昭和60年11月19日受理)

大江章夫* 杉谷 哲* 山田不二造*

Cadmium-Binding Components in *Lentinus edodes*

Akio OHE, Akira SUGITANI and Fujizo YAMADA

(Gifu Prefectural Institute of Public Health:
6-3, Noishiki, 4-chome, Gifu, Japan)

The crude supernatant of *Lentinus edodes* (*L. edodes*) was divided into two Cd-binding fractions, that is, Fraction I (Fr-I, MW >10,000) and Fraction II (Fr-II, MW <10,000) by gel filtration on Sephadex G-75. In the previous paper, we suggested that Fr-II contained a peptide with a molecular weight of about 700. In this paper, chemical forms of Cd in Fr-I were investigated. Fr-I was separated into 3 Cd-binding components, Fraction A (Fr-A, MW >450,000), Fraction B (Fr-B, MW ca. 40,000) and Fraction C (Fr-C, MW ca. 9,000) by gel filtration on Sephadex G-150. Then, purification of Fr-A, Fr-B and Fr-C was performed by means of DEAE-cellulose, Sephadex G-150 and Sephadex G-25 column chromatography, respectively. Most of the Cd-containing components in Fr-A were eluted in Fraction A1 (Fr-A1, MW ca. 3,500), those in Fr-B were eluted in Fraction B1 (Fr-B1, MW ca. 3,500) and Fraction B2 (Fr-B2, MW ca. 40,000), and those in Fr-C were eluted in Fraction C1 (Fr-C1, MW ca. 3,500). It was considered that the Cd-binding components, Fr-A1, Fr-B1 and Fr-C1, were identical and were dissociated from parent components to which each was bound as a conjugate or a weakly bonded complex. However, their chemical forms could not be determined. Another Cd-binding component, Fr-B2 was found to be a glycoprotein having high contents of acidic amino acids and saccharides.

(Received November 19, 1985)

Key words: シイタケ *Lentinus edodes*; カドミウム結合成分 cadmium-binding components; 糖タンパク glycoprotein; ゲルろ過クロマトグラフィー gel filtration chromatography

緒 言

ある種の食用キノコにはカドミウム (Cd) の濃縮性があることが報告¹⁾されているが、キノコ中の Cd の化学形については、まだ明らかでない。

我々は前報²⁾で (1) シイタケには Cd の特異的な濃縮性があり、(2) シイタケのホモジネート粗上清液を Sephadex G-75 でゲルろ過すると、Cd は分子量30,000以上の高分子量分画と3,000以下の低分子量分画に溶出し、(3) 低分子量分画の Cd 結合物質は分子量約700のペプチドであろうことを報告した。

今回は高分子量分画の Cd の化学形を検討したので報告する。

試料及び方法

1. 試 料

市販の岐阜県産シイタケ (*Lentinus edodes*) のかさ部を用いた。

2. 試 薬

Cd の原子吸光分析用標準原液は、和光純薬工業(株)製を用いた。分子量マーカーの ferritin, catalase, aldolase, bovine serum albumin, ovalbumin, chymotrypsinogen A, insulin, bacitracin, β -dihydrodiphosphopyridine nucleotide (β -DPNH) は Sigma 社製、ゲルろ過には Pharmacia 社製の Sephadex G-25, G-75 と G-150, イオン交換には生化学工業(株)製の DEAE-セルロースを用いた。他の試薬はすべて特級及び精密分析用を使用した。

* 岐阜県衛生研究所: 岐阜市野一色 4-6-3

3. 装 置

フレイムレス原子吸光分光分析では、本体に日本ジャーレルアッシュ(株)製 AA-8500 型、フレイムレスアトマイザーに同社製 FLA-100 型を用いた。フレイム原子吸光度計は(株)日立製作所製 308 型、分光光度計は(株)日立製作所製 200-20 型を使用した。冷却遠心機は(株)トミー精工製 RS-18GS、真空凍結乾燥機は FRS 社製 2000B 型を使用した。ディスク電気泳動にはミツミ科学産業(株)製 SJ-1060D 型と精密安定電源装置 SJ-1051 型を用いた。アミノ酸分析計は日本電子(株)製 JLC-6AH を使用した。デンストメーターは(株)富士理研社製 FD-AIV 型を用いた。

4. Cd 結合成分の Sephadex G-75 カラムによる分離

前報²⁾の方法によってシイタケ 2,000 g より得た粗上清液 1,240 g を 100 ml ずつ Sephadex G-75 (5×100 cm) カラムでゲルろ過し、分子量約 10,000 を境として高分子量 Cd 溶出分画 (Fr-I) と低分子量 Cd 溶出分画 (Fr-II: 前報で Cd 結合物質は分子量約 700 のポリペプチドと推定された) に大別した。

今回は Fr-I をビスキングチューブに入れ、4° 下、ポリエチレングリコール 20,000 による吸水透析後、さらに凍結乾燥で 10 ml に濃縮し、10 本の Fr-I を得た。

Fr-I 濃縮液を -20° 以下で凍結保存し、用時、解凍し実験に供した。

5. Cd 結合高分子量成分のゲルろ過による精製

Fr-I 濃縮液 10 ml のうち 5 ml を 4° 下、Sephadex G-150 (2.64×100 cm) カラムでゲルろ過し、溶出液を 10 ml ごとに分取した。

各フラクションは、波長 280 nm の吸光度を測定後、それぞれの 10 μ l をフレイムレス原子吸光分析により Cd の測定に使用した。

Cd 溶出分画は Fr-A, Fr-B, Fr-C の 3 分画 (Fig. 1 参照) に分かれた。各々を -20° 以下で凍結保存し、用時、解凍して実験に供した。

分子量マーカーには ferritin (MW 450,000), catalase (MW 240,000), aldolase (MW 158,000), bovine serum (MW 68,000), ovalbumin (MW 45,000) 及び chymotrypsinogen A (MW 25,000) を用いた。

低分子量分画 Fr-C は、さらに Sephadex G-25 カラムを用い、上記と同じゲルろ過条件で精製した。分子量マーカーには、insulin (MW 6,000), bacitracin (MW 1,450), β -DPNH (MW 709) を用いた。各フラクションは同様に波長 280 nm の吸光度と Cd 含量を測定した。

6. DEAE-セルロースカラムによる精製

前項 5 の Cd 溶出分画を 4° 下、pH 8.0 の 0.01 M トリス塩酸緩衝液で平衡化した DEAE-セルロースののせ、同じ緩衝液の塩化ナトリウム濃度 0 M (1 L) から 0.2 M (1 L) まで、続いて 0.2 M (1 L) から 1.0 M (1 L)

までリニアグラジェント法で溶離 (流速: 80 ml/hr) させた。各フラクション中のタンパク質と Cd 溶出パターンをゲルろ過と同法で求め、Fr-A からは Fr-A1 を、Fr-B からは Fr-B1 及び Fr-B2 を、また Fr-C からは Fr-C1 を得た。

次いで、Cd 溶出分画をプールし、その 50 ml ずつを Sephadex G-25 (2.64×100 cm) でゲルろ過 (溶出液: 蒸留-イオン交換精製水、流速: 20 ml/hr) して脱塩した後、凍結乾燥した。

7. ディスク電気泳動

高分子量 Cd 結合物質の成分である Fr-B2 の精製度をポリアクリルアミドゲルを用いたディスク電気泳動法³⁾で調べた。上部緩衝液に BPB を加えてゲル管 1 本あたり 1.5 mA 通電し、leading ion の位置を追跡しながら泳動した。泳動した 6 本のゲルのうち、3 本はクーマシーブリリアントブルー R250 (BDH Chemicals Ltd.) でタンパク染色⁴⁾を行い、他の 3 本は過ヨウ素酸-Schiff 試薬で糖タンパクの染色⁵⁾を行った。

8. Cd 結合物質 Fr-B2 のアミノ酸組成、糖及び灰分の測定

精製した Cd 結合物質 Fr-B2 のアミノ酸分析のために約 5 mg を精秤し、6 N 塩酸で 110°, 22 時間加水分解⁶⁾し、アミノ酸分析に供した。フェノール硫酸法⁷⁾により 490 nm を用いてガラクトースの検量線を作り、これを用いて Fr-B2 中の糖量を測定した。灰分は、試料を白金のつぼに入れ 450° で 12 時間灰化後、デシケーター中で放冷し秤量した。Cd 含量は、上記の灰分に濃塩酸 0.1 ml を入れて水浴上で乾固し、0.1 N 硝酸 5 ml で溶解後、フレイムレス原子吸光分析で測定した。

Fig. 1. Separation pattern of concentrated Fr-I by Sephadex G-150

Column size: 2.64×100 cm; eluate: 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 8.0); flow rate: 20 ml/hr; —: Cd concentration; ---: absorbance at 280 nm

Fig. 2. Elution curve of Fr-A from DEAE-cellulose

Column size; 2.64×45 cm; flow rate; 80 ml/hr; eluate; a linear gradient from 0 to 0.2 M NaCl in 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) followed by a linear gradient from 0.2 to 1.0 M NaCl in the same buffer; —: Cd concentration; ---: absorbance at 280 nm; - - -: NaCl

Fig. 3. Elution curve of Fr-B from DEAE-cellulose

The fractionation was carried out under the same condition as shown in the legend of Fig. 2.

—: Cd concentration; ---: absorbance at 280 nm; - - -: NaCl

Fig. 4. Elution curve of Fr-C from DEAE-cellulose

The fractionation was carried out under the same condition as shown in the legend of Fig. 2.

—: Cd concentration; ---: absorbance at 280 nm; - - -: NaCl

結果及び考察

1. Fr-I 濃縮液の Sephadex G-150 カラムによるゲルろ過

10 本の Fr-I 濃縮液のそれぞれから半量の 5 ml を取り、その各々を Sephadex G-150 カラムによりゲルろ過したときのパターンの一例を Fig. 1 に示した。3 つの Cd 溶出ピークの Fr-A, Fr-B 及び Fr-C の分子量は、それぞれ 450,000 以上、約 40,000 及び約 9,000 に相当した。10 本の Fr-I 濃縮液のそれぞれのゲルろ過パターンを比較すると、Fr-B の Cd ピーク高は、ほぼ一定していたが、Fr-A と Fr-C の Cd ピーク高は変動し、10 回のゲルろ過のうち Cd のピークとして認められなかったことが Fr-A について 2 回、Fr-C については 3 回あった。ただし、Fr-A と Fr-C のピークが同時に認められないということはなかった。

2. Fr-A, Fr-B 及び Fr-C の DEAE-セルロース及び Sephadex カラムによる精製

3 本の Fr-I 濃縮液を Sephadex G-150 カラムにより分画して得た Fr-A, Fr-B 及び Fr-C をそれぞれブールした後、DEAE-セルロースカラムを用い、塩化ナトリウムの濃度グラジエント法で精製し、Cd 溶出パターンと 280 nm での吸収曲線をそれぞれ Fig. 2, Fig. 3 及び Fig. 4 に示した。Fr-A と Fr-C からは、いずれも単一の Cd 溶出ピーク Fr-A1 と Fr-C1 が、Fr-B からは Fr-B1 と Fr-B2 の 2 峰性の Cd 溶出ピークが得られた。

Fr-A1, Fr-B1, Fr-C1 は、まったく同じ位置のフラクションに分画された。そこで、更にこれらの分画をそれぞれ Sephadex G-25 カラムで脱塩精製すると、どの Cd 溶出ピークも void volume より後のフラクションにみられ、これらの分子量は親の分子量よりはるかに小さいことが推定された。そこで、これらの Cd 溶出分画を濃縮し、再び 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を用いて Sephadex G-25 カラム (2.64×100 cm) を通塔すると、Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7 に示す Cd 溶出パターンが得られた。これらのフラクションはいずれも分子量 3,500 に相当した。

前項 1 の Sephadex G-150 カラムによる分離過程において Fr-A, Fr-C の Cd 溶出ピークがときに認められなかったことは、Cd の結合の不安定さを示唆する。しかし、本項の実験結果を加えて考察すると、シイタケ中の高分子量 Cd 結合物質は Fr-A1, Fr-B1, Fr-C1 であって親の Fr-A, Fr-B, Fr-C 成分にそれぞれ抱合もしくは、弱く結合をしていて、Sephadex G-150 では解離されず、その後の DEAE-セルロース処理によりその電荷状態が変化し、解離したものと考えられる。

あるいは、Fr-A1, Fr-B1, Fr-C1 は同一物質であって、少なくともこの高分子量 Cd 結合物質の領域においては、Cd 結合成分の最小ユニットとして Fr-A, Fr-B, Fr-C を構成しているのかも知れない。Cd 含有高分子量

Fig. 5. Separation pattern of concentrated Fr-A1 by Sephadex G-25

Column size: 2.64×100 cm; eluate: 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 8.0); flow rate; 20 ml/hr; —: Cd concentration; ---: absorbance at 280 nm

Fig. 6. Separation pattern of concentrated Fr-B1 by Sephadex G-25

The fractionation was carried out under the same gel filtration condition as shown in the legend of Fig. 5.

—: Cd concentration; ---: absorbance at 280 nm

成分の低分子量化は、高等動物における Cd の生体内移動様式と考えられている“Turn over”類似の機構の一端を物語っているのかも知れない。

いずれにしても、この物質については今回明らかにし得なかったが、今後解明されねばならない興味のある問題であろう。

Fr-B2 を濃縮し、同様の緩衝液を用いて Sephadex

Fig. 7. Separation pattern of concentrated Fr. C1 by Sephadex G-25

The fractionation was carried out under the same gel filtration condition as shown in the legend of Fig. 5.

—: Cd concentration; ---: absorbance at 280 nm

Fig. 8. Separation pattern of concentrated Fr. B2 by Sephadex G-150

The fractionation was carried out under the same gel filtration condition as shown in the legend of Fig. 1.

—: Cd concentration; ---: absorbance at 280 nm

G-150 カラム (2.64×100 cm) を通した Cd 溶出パターンを Fig. 8 に示した。分子量が 40,000 に相当するフラクションに Cd 溶出ピークがみられ、Fig. 1 の Fr-B の分子量と同じであった。この Fr-B2 は、Fr-B の DEAE-セルロース処理により Fr-B1 (MW 3,500) と分離できたこと、及び再度の Sephadex G-150 のゲルろ過によりシャープな Cd 溶出ピークが得られたことから、かなり精製されたものと思われた。

3. Cd 結合物質 Fr-B2 の精製度

Fr-B2 は 280 nm の吸収極大波長を持っていることからタンパク質の存在が推定されたので、ディスクゲル

Fig. 9. Disc gel electrophoresis profile of Fr-B2

The protein and glycoprotein were stained with (A) Coomassie brilliant blue R250 and (B) periodic acid-Schiff's reagent respectively.

Table 1. Amino acid composition of Fr-B2

Amino acid	mol%
Lys	2.4
His	1.2
Arg	1.5
Asp	13.6
Thr	8.3
Ser	9.4
Glu	10.6
Pro	6.0
Gly	8.7
Ala	9.3
Cys	1.8
Val	7.3
Met	ND
Ileu	5.5
Leu	8.5
Tyr	1.7
Phe	4.0

電気泳動により精製度を調べた。またアミノ酸組成を調べるために Fr-B2 を加水分解したとき、その分解液にかっ色の沈殿物が生じたことから糖も含まれていることが推定されたので、タンパク染色と共に糖タンパクの染色を行った。そのディスクゲル電気泳動パターンを Fig. 9 に示した。図はデンシトメーターによる吸収曲線であって、単一のタンパク染色バンドを描いたことから単一の物質であることを示す。またバンドの泳動位置が糖タンパク染色バンドと一致することから Fr-B2 は純

Table 2. Components in Fr-B2

Amino acid	28.1 wt%
Glycose	41.6
Ash content	32.4
(Cd content)	43 µg/g)
Total	102.1

粹に精製された単一の糖タンパクと示唆された。

4. Fr-B2 のアミノ酸組成及び成分

Fr-B2 のアミノ酸組成を Table 1 に示した。塩基性アミノ酸のリジン (Lys), ヒスチジン (His), アルギニン (Arg) が少なく, 酸性アミノ酸であるアスパラギン酸 (Asp), グルタミン酸 (Glu) が比較的多いことがわかった。

また Fr-B2 の成分を Table 2 に示した。アミノ酸は 28.1%, 糖は 41.6%, 灰分は 32.4% であり, 合計は 102.1% であった。従って Fr-B2 は糖含量の高い糖タンパクであると結論できる。

要 約

シイタケの粗上清液を Sephadex G-75 で分画すると Cd 結合成分は, 高分子量分画 Fr-I (MW>10,000) と低分子量分画 Fr-II (MW<10,000) に 2 分された。前報では, Fr-II が分子量約 700 のペプチドであることが示唆されたが, 今回は Fr-I 中の Cd の化学形態を研究した。

Sephadex G-150 によって Fr-I から Fr-A (MW 450,000 以上), Fr-B (MW 約 40,000) と Fr-C (MW 約 9,000) の 3 つの Cd 結合成分が分離された。これら各 3 成分を DEAE-セルロース, Sephadex G-150 と G-25 のカラムクロマトグラフィーによって処理すると, Fr-A 中の Cd は Fr-A1 (MW 約 3,500) に, Fr-B 中の Cd は Fr-B1 (MW 約 3,500) と Fr-B2 (MW 約 40,000) に,

Fr-C 中の Cd は Fr-C1 (MW 約 3,500) に溶出した。

Fr-A1, Fr-B1 及び Fr-C1 の Cd 結合成分は, それぞれ親成分に抱合あるいは弱く結合していたものが DEAE-セルロース処理により解離してきたものと考えられた。いずれも分子量が約 3,500 で溶出位置が同じであることから同一物質である可能性があるが, 今後明らかにしたい。

Fr-B2 の Cd 結合成分は, 糖含量の高い, 酸性アミノ酸に富んだ糖タンパクであることを明らかにした。

なお, 本研究の要旨は, 第44回日本食品衛生学会において報告した。

謝 辞

本研究のアミノ酸分析について種々御便宜をはかっていただいた岐阜県工業技術センター 食品試験研究部 中野 浩部長と大野仁志主任技師に深謝いたします。

文 献

- 1) Alsen, C., Braatz, G., Kruse, H.: Öff. Gesundh. Wesen **39**, 780~789 (1977).
- 2) 大江章夫, 杉谷 哲, 山田不二造: 食衛誌, **22**, 345~350 (1981).
- 3) 永井 裕: 蛋白質・核酸・酵素, **11**, 744~749 (1966).
- 4) 日本生化学会編: 生化学実験講座 第1巻 タンパク質の化学 I, p. 249 (1977), 東京化学同人。
- 5) 電気泳動学会編: 電気泳動実験法 改訂第4版, p. 88~89.
- 6) 阿南功一, 紺野邦夫, 田村善蔵, 公橋通生, 松本重一郎編: 基礎生化学実験法 3 物理化学的測定 [I], p. 241~242 (1975), 丸善。
- 7) 日本生化学会編: 生化学実験講座 第1巻 タンパク質の化学 II, p. 29 (1979), 東京化学同人。