

Title	セレンならびにSH化合物によるメチル水銀解毒機構に関する研究
Author(s)	鬼頭, 寛和
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33505
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	鬼 頭 寛 和
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 5 8 5 0 号
学位授与の日付	昭和 57 年 12 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	セレンならびに SH 化合物によるメチル水銀解毒機構に関する 研究
論文審査委員	(主査) 教授 岩田平太郎 (副査) 教授 近藤 雅臣 教授 鎌田 皎 教授 三浦 喜温

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

1972年、Gantherら¹⁾はマグロ肉にメチル水銀(MM)毒性減弱作用のあることを見出し、その減毒効果がマグロ肉中に含まれる微量元素、セレン、によることを明らかにした。その後、Iwataら²⁾やその他の多くの研究者によって³⁻⁵⁾、セレンが各種実験動物や培養細胞に対するMM毒性を顕著に抑制することを報告している。しかし、今日までセレンがMM毒性を減弱させるメカニズムに関して殆んど解明されていない。セレンによるMMの蛋白への結合性の変化⁶⁾、セレンによるMMの脱メチル化促進作用⁷⁾、セレンの生体膜保護作用⁸⁾などが関与しているとする2~3の仮説が提示されているが、これらはいずれも実験的根拠にとぼしく、いまだに明確な結論は得られていない。

そこで、著者はセレンのMM毒性減弱機作を解明する目的で、セレンとMMの直接的な相互作用に着目し、両元素のin vitroおよびin vivoにおける代謝動態についての詳細な検討を行った。また、SH化合物のMM解毒機構を解明するために、SH化合物のMM排泄促進作用およびその効果に及ぼすセレンの影響についても検討を加えた。

本 論

第1章 MMとセレンのin vitroでの相互作用 —セレンによる蛋白結合型MMのbenzene可溶型水銀への変換機構

体内に侵入したMMは蛋白と強く結合し、通常、生理的なpHではbenzeneなどの有機溶媒によって抽出することが出来ない。しかし、近年、Suminoら⁹⁾は蛋白に結合したMMがseleniteとラットの新鮮な血液や組織homogenateの存在下にMMが蛋白から遊離し、benzeneで抽出される現象を見出

した。著者はこの現象に潜む詳細な分子メカニズムを明らかにする目的で、生体成分中に含まれるこのセレン依存性MM遊離因子（以下、変換因子）を検索することから実験を開始した。

ラット組織から調製した各種可溶性画分(105,000 g上清)をSephadex G-25カラムクロマトグラフィーにより分別し、各フラクションのMM変換活性(bovine serum albuminに結合させたMMを、seleniteの存在下、benzene可溶型水銀に変換する組織内成分の活性)を測定した。その結果、この活性はvoid volumeと低分子SH化合物の溶出位置に2つの分離した成分として溶出された。低分子画分中の活性は、肝および脳ではGSH、腎ではL-cysteineに起因することをDowex 1-XI陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーおよび標品を用いて明らかにした。一方、void volumeに溶出した高分子画分中の変換因子はSephadex G-200カラムクロマトグラフィーにより分別したところ、全フラクションに活性が認められ、蛋白量ならびにSH基量との間にある程度の相関性が認められるようであった。そこで、精製蛋白、bovine pancreatic ribonuclease (RNase)を用いてその機作を検討した。Native RNaseは活性を示さなかったが、還元型RNaseは添加したselenite量に依存した変換活性を示した。この還元型RNaseの活性はそのSH基をN-ethylmaleimideでblockすると消失した。また、GSHやL-cysteineの活性は他のSH化合物によって置換することが可能であったが、これらのdisulfide化合物には全く活性が認められなかった。以上の成績およびSH化合物はseleniteを還元的に代謝するという報告^{10,11)}から、本変換反応の発現には組織内のGSHや蛋白性のSH基が必須であり、また、SH基によるseleniteの還元生成物が本変換反応に関与するものと考えられた。

そこで、GSHによるseleniteの還元生成物、glutathione selenotrisulfide(GS Se SG)およびhydrogen selenide(H₂Se)を合成し、他のセレン化合物と共にMM変換活性を調べた。その結果、selenite, selenate, selenocystineおよびGS Se SGはGSHの存在下でのみ活性を示した。しかしGS Se SGがGSHにより更に還元されて生成するH₂Seは単独で強いMM変換活性を示すことが明らかとなった。以上の成績から、MM変換反応はH₂Seのような活性型のセレンによって惹起されるものと推定された。そして、seleniteなどのセレン化合物はGSHや蛋白のSH基によって活性型のセレンに代謝されたのち活性を示すものと考えられた。

各種条件下に生成したbenzene可溶型水銀の性質を簿層クロマトグラフィー(TLC)およびマススペクトログラフィーにより調べた。Benzene可溶型水銀はTLCでほぼ単一のスポットを呈し、MMとは異なった位置に移動した。そして、その成分は水銀とセレンから成り、それぞれ2:1のモル比を示した。そこでMMとセレンのモル比が2:1および3:1の複合体であるbis(methylmercuric) selenide (BMS), tris(methylmercuric) selenonium nitrate(TMS)などを合成し、benzene可溶型水銀とそれらの性質について比較検討した。その結果、benzene可溶型水銀は主にBMSによって構成され、その中に微量のTMSが混入するものと推定された。

以上の様に、Suminoら⁹⁾の見出したseleniteによる蛋白結合型MMのbenzene可溶型水銀への変換現象は、MMとセレンの複合体の形成に起因することが明らかになった。そして、その機作はseleniteが組織中のGSHや蛋白のSH基の作用により、活性型のセレンに変化し、蛋白に結合したMMと反応

するものと考えられた。

従来、セレンとMMの生体内での直接的な相互作用に関しては多くの否定的な見解が提出されてきた^{4,6)}。しかし、今回の成績はMMとセレンが複合体を形成することを明らかにすると共に、セレンのMM毒性減弱機作の一因が両元素の直接的な相互作用にあることを示唆するものと考えられる。

第2章 MMとセレンの *in vivo* での相互作用 —benzene 可溶型水銀の動態

第1章で示した現象がセレンによるMMの毒性減弱機作の1つの要因となりうるか否かを明らかにする目的でMMとセレンを併用投与したラットの体内にbenzene可溶型水銀が出現するか否かについて検討した。

MM投与ラットにseleniteを投与すると血液や組織中にbenzene可溶型水銀の生成が1時的に認められた。Selenite投与後30分において、血液、肝および腎のbenzene可溶型水銀はピークを示し、それぞれ、総水銀量の30、8および23%を占めた。また、このラット体内に生成したbenzene可溶型水銀は主にBMSであることをTLCにより明らかにした。以上の如く、第1章で示した*in vitro*の系と同様に、*in vivo*においてもBMSが形成されることが明らかとなった。

一方、このBMSの生成時に、MMの体内再分布、即ち、肝および腎の水銀蓄積量の減少ならびに脳への水銀の取り込み増加などの現象が観察された。今日までセレンによるMMの体内再分布現象の機作については殆んど不明であったが、今回の成績から、この現象はBMSの生成に基づくものと考えられた。そして、これはBMSが非イオン性の物質であり、MMに比して脂溶性が高く、脳—血液関門を含む種々の細胞膜を容易に透過できる性質に起因するものと推察された。

BMSはselenite投与後1時的に体内に検出されるのみであり、この複合体が減毒機作に直接、寄与しているとは考え難い。しかし、MMと標的蛋白との結合様式や組織内での存在様式がBMSの生成、移動、分解の過程を介して変化し、その結果、MM毒性が修飾されることは容易に想像できる。

第3章 セレンによるMMの無機化

自然界においてMMは種々の条件下に無機化されることが知られているが^{12,13)}、MMの無機化に関するセレンの関与については賛否両論があり、いまだに結論が得られていない。著者はBMSの生成条件(第1章)とほぼ同一条件下においてMMが無機化されることを見出した。即ち、MMはseleniteとGSHの共存下に徐々に脱メチル化された。この脱メチル化反応はseleniteあるいはGSH単独では起らなかった。また、GSHはL-cysteine, 2-mercaptoethanol, sodium sulfideによって置換えることが可能であった。そこで、GSHによるseleniteの還元生成物(GS Se SG, H₂Se)について、MMの脱メチル化活性を調べた。GS Se SGはGSHの存在下にのみ脱メチル化活性を示すが、H₂Seは単独で強い活性を示した。この様にseleniteとGSHによるMM脱メチル化反応にはH₂Seのような活性型のセレンが関与することが明らかになった。このことから、MMの脱メチル化反応は、恐らく、第1章で示したBMSの生成を経由して進むものと推察された。

MMは哺乳動物の体内で徐々に無機水銀に変化することが知られている^{14,15)}。しかし、その機作に関しては殆んど不明である。著者は上述の脱メチル化反応の生体内での意義を探る目的で、生体内無機化に及ぼすselenite投与の影響をラットを用いて検討した。MM投与ラットにseleniteを投与し、血

液および組織内の無機水銀ならびに総水銀の変動を調べた。その結果、MM投与後2週目からselenite投与群ラットの腎において、MM単独投与群に比し、MM量の有意な減少ならびに無機水銀量の増加が認められた。このようにMMの生体内無機化はセレンによって促進された。以上の成績は、seleniteとGSHによるMMの脱メチル化反応が哺乳動物体内でのMMの無機化に1つの重要な役割を果たしている可能性を示唆するものと考えられた。また、自然界でのセレンとMMの密接な挙動を考慮したとき、今回の成績は自然界でのMM—無機水銀—金属水銀間の水銀のcycleにも係わる興味ある現象と考えられた。

第4章 SH化合物のMM解毒機構

セレンはMMの体外排除を促進しない⁷⁾が、すでに述べた様な機作によってMMを体内で無毒化するものと考えられる。一方、SH化合物の中にはMMの排泄を顕著に促進するものが知られている^{16,17)}。この章において、SH化合物のMM排泄促進作用およびその効果に及ぼすセレンの影響について検討した。

SH化合物の水銀排泄促進作用は水銀化合物によって著明に異なった。2,3-Dimercaptopropanol (BAL)はフェニール水銀や無機水銀の体外排泄を促進するが、MMに対しては効果が認められなかった。BALは水銀の体内分布にも影響を及ぼし、脳への水銀の取り込みを増加させた。一方、2-mercaptopropionylglycine (MPG)はMMに対して著明な排泄促進作用を示した。また、中枢神経系への水銀の取り込みに対し、影響を与えなかった。この様に、MMに対してMPGは優れた排泄促進剤であることを見出した。

次に、MPGのMM排泄促進機作について検討した。MPG処置に対する作用の応答はきわめて早く、MPGの排泄に伴ってMMが尿中に誘導された。このことから、MPGの作用はMM—MPGキレート形成に基づくものと考えられた。しかし、あらかじめin vitroでMM—MPGキレートを調製してマウスに投与してもMMの排泄は促進されなかった。以上の成績から、MM—MPGキレートは生体内では容易に解離するが、大過剰のMPGの存在下においてキレートは比較的安定となり、MPGの排泄に伴ってMMが尿中に誘導されるものと推察された。

SH化合物のMM排泄促進作用に及ぼすセレンの影響について検討した。D-PenicillamineやMPGのようなSH化合物はMMに対して強い排泄促進作用を示した。セレンの併用投与はこれらのSH化合物の作用を抑制した。また、これらのSH化合物は比較的弱いBMS形成能を示した。一方、GSH, L-cysteine, 2-mercaptoethanolのようなSH化合物はMM排泄促進作用を示さず、強いBMS形成能を示した。これらの成績は、MMに対してセレンとSH化合物が互にその結合を競合しあうための結果と推察された。即ち、前者のSH化合物はMMに対してセレンよりも親和性が強いために、水溶性のMM—SH化合物キレートを形成してMMの排泄を促進するが、後者のSH化合物はMM—SH化合物キレートよりもむしろ脂溶性の高いBMSを形成しやすいために排泄促進作用が欠如するものと考えられた。以上の様に、SH化合物のMM排泄促進作用にはMMに対するセレンとSH化合物の競合反応が1つの重要な要素となるものと推察された。

結 論

セレンのMM毒性減弱機作を解明する目的で、MMとセレンの直接的な相互作用を *in vitro* および *in vivo* で検討した。

Selenite の存在下、蛋白に結合したMMを benzene 可溶型水銀に変換するラット組織内因子は GSH および蛋白の SH 基であることを見出した。Selenite はこれらの SH 基により還元的に代謝されて活性型のセレン (H_2Se) となり、蛋白に結合したMMと相互作用するものと推定された。そして、BMS や TMS の様な MM とセレンの複合体が形成されることを明らかにした。

MM と selenite を併用投与したラットの体内にも一時的に benzene 可溶型水銀が出現した。そしてこの benzene 可溶型水銀は主に BMS より構成されることを示した。以上のように、MM とセレンは生体内で直接相互作用することが判明した。一方、selenite の投与はラット体内での MM の再分布を惹起した。そして、この再分布現象は BMS の生成に起因するものと推察された。

MM は GSH と selenite の存在下、経日的に脱メチル化され、無機水銀に変化することが明らかとなった。一方、ラット体内での MM の無機化は selenite の併用投与によって促進された。以上の成績から、selenite と GSH による MM 脱メチル化反応は MM の生体内無機化に 1 つの重要な役割を果しているものと推定された。

次に SH 化合物の MM 排泄促進作用およびその効果に及ぼすセレンの影響について検討した。MM の体外排除に関して、MPG は優れた排泄促進剤であることを見出した。MPG の排泄促進作用はキレート形成に基づくが、キレートは生体内では不安定なものと考えられた。しかし、大過剰の MPG の存在下にキレートは比較的安定となり、MPG の排泄に伴って MM が尿中に誘導されるものと考えられた。また、SH 化合物の MM 排泄促進作用には MM に対する内因性のセレンとの競合反応が 1 つの重要な要素となるものと推察された。

引用文献

- 1) Ganther, H. E., Goudie, C., Sunde, M. L., Kopecky, M. J., Wagner, P., Oh, S. H. and Hoekstra, W. G., *Science*, **175**, 1125 (1972).
- 2) Iwata, H., Okamoto, H. and Ohsawa, Y., *Res. Commun. Chem. Path. Pharmac.*, **5**, 673 (1973).
- 3) Johnson, S. L. and Pond, W. G., *Nutr. Rep. Int.*, **9**, 135 (1973).
- 4) Potter, S. and Matrone, G., *J. Nutr.*, **104**, 637 (1974).
- 5) Stoewsand, G. S., Bache, C. A. and Lisk, D. J., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **11**, 152 (1974).
- 6) Chen, R. W., Whanger, P. D. and Fang, S. C., *Pharmacol. Res. Commun.*, **6**, 571 (1974).
- 7) Stillings, B. R., Lagally, H., Bauersfeld, P. and Soares, J., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **30**, 243 (1974).
- 8) Kasuya, M., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **35**, 11 (1976).
- 9) Sumino, K., Yamamoto, R. and Kitamura, S., *Nature (London)*, **286**, 73 (1977).
- 10) Ganther, H. E., *Biochemistry*, **7**, 2898 (1968).

- 11) Ganther, H. E., *Biochemistry*, **10**, 4089 (1971) .
- 12) Spangler, W. J., Spigarelli, J. L., Rose, J. M. and Miller, H. M., *Science*, **180**, 192 (1973) .
- 13) Beckert, W. F., Moghissi, A. A., Au, F. H. F., Bretthauer, E. W. and McFarlane, J. C., *Nature (London)*, **249**, 674 (1974) .
- 14) Norseth, T. and Brendeford, M., *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1101 (1971) .
- 15) Bakir, F., Damluji, S. F., Amin-Zaki, L., Murtadha, M., Khalida, A., Al-Rawi, N. Y., Tikriti, S., Dhahir, H. I., Clarkson, T. W., Smith, J. C. and Doherty, R. A., *Science*, **181**, 230 (1973) .
- 16) Aposhian, H. V., *Science*, **128**, 93 (1958) .
- 17) Magos, L., *Brit. J. Pharmacol.*, **56**, 479 (1976) .

論文の審査結果の要旨

本論文はセレンのメチル水銀毒性にたいする減弱機構について詳細な検討を行ない、メチル水銀とセレンの複合体形成ならびにメチル水銀の無機化の過程が上記機作に関連していることを明らかにしたもので、薬学博士の称号を授与するに値するものである。