

平成21年 6月 5日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790113
 研究課題名（和文）生体におけるメチル水銀の脱メチル化機構及びその生物学的意義に関する研究
 研究課題名（英文）Study on the mechanism and role of methylmercury demethylation *in vivo*
 研究代表者
 永野 匡昭（NAGANO MASAOKI）
 国立水俣病総合研究センター・基礎研究部・主任研究員
 研究者番号：10393464

研究成果の概要：

ヒトにおけるメチル水銀（MeHg）の無機水銀への変換（生体内変換）の有無及びそのメカニズムを明らかにするため、ヒト培養細胞を用いて検討を行った。その結果、神経由来の細胞株（SK-N-SH）及びその支持細胞（U373MG）においても、MeHgの生体内変換が起こることを確認した。また、組織におけるMeHgの脱メチル化は肝臓で最も高く、その反応は活性酸素種のうちO₂が関与している可能性が考えられた。次に、MeHgの生体内変換に関与する腸内細菌を特定するため、ラット腸内容物から調製した菌懸濁液を用いてMeHgの脱メチル化部位を検討した。その結果、ラット腸におけるMeHgの生体内変換部位は小腸中部から下の部位で行われていることが明らかとなった。さらに、フラクトオリゴ糖を投与したラットの実験から、MeHgの生体内変換にはビフィズス菌が関与していることが示唆された。以上の結果から、腸内細菌によるMeHgの生体内変換は、MeHgの排泄促進機構であると推察された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1,000,000	0	1,000,000
平成20年度	900,000	0	900,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	0	1,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：環境、毒性、メチル水銀

1. 研究開始当初の背景

水俣病の原因物質である、メチル水銀（MeHg）は生体内で脱メチル化され、無機水銀へと変換（生体内変換）されることが知られている。これまでの研究から、生体内には少なくとも2つの生体内変換過程が存在すると考えられる。1つは腸内細菌が関与する反応であり、もう1つは組織自身が関与する反応である。研究代表者は、MeHg曝露した動物の組織中無機水銀濃度が腎臓で最も高く、次

いで肝臓、脳の間であり、MeHgの生体内変換は組織によって大きく異なる結果を観察している。このように、MeHgの生体内変換については、現象そのものは確認されているものの、そのメカニズムは十分に解明されていない。また、MeHgの生体内変換の組織特異性やその生物学的意義役割については明らかとなっていない。

2. 研究の目的

(1) ヒト培養細胞株を用いて、ヒトにおける MeHg の生体内変換の有無とそのメカニズムを解明する。

(2) 動物実験により、MeHg の生体内変換の生物学的意義・役割について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト培養細胞を用いた MeHg の脱メチル化反応機構の解明

〔研究対象〕腎臓中無機水銀は、肝臓などの他の臓器で変換されたものが移行した結果を示唆している報告がある。したがって、ヒト培養細胞株として、代謝を司る肝臓（正常肝細胞、Chang Liver）、MeHg の標的である神経由来の神経芽細胞腫（SK-N-SH）及び神経の支持細胞由来のアストロサイトーマ

（U373MG）を用いた。

〔実験方法〕各種細胞に対する MeHg の毒性については、WST-8 アッセイ及び LDH 活性により測定した。MeHg 曝露後の細胞内総水銀濃度は加熱気化法による冷原子吸光度計で測定した。無機水銀検体は、6N 塩酸酸性下でトルエン抽出を繰り返し調製した。MeHg の脱メチル化に対する活性酸素の生成剤または捕捉剤の影響については、各種薬剤を 30 分間前処理し、MeHg を 24 時間曝露した。

(2) 腸内細菌を介した MeHg の排泄に関する検討

MeHg の脱メチル化部位を特定するため、Wistar 系雌性ラットから腸を摘出後、部位ごとに切除し、菌懸濁液を調製した。小腸については 3 等分にした。この菌懸濁液に MeHg（Hg 濃度として 2 ppm）を添加し、嫌気培養した。48 時間後、培地中の総水銀濃度及び無機水銀濃度を測定した。次に、MeHg の脱メチル化に関与する腸内細菌を推測するため、菌株が明記されているはっ酵乳等を用いて、上記と同様に MeHg の脱メチル化の有無を検討した。さらに、Wistar 系雌性ラットにフラクトオリゴ糖（FOS, 0.4 g/kg 体重）を 8 週間経口投与した。FOS 投与 7 週間後から MeHg を 5 日間同日投与（0.5 µg/ラット）した。糞中総水銀排泄量を MeHg 投与開始から 1 週間測定し、組織（血液、脳、肝臓及び腎臓）中総水銀濃度も測定した。また FOS 投与期間中、糞中嫌気性菌及びビフィズス菌数及び総水銀濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト培養細胞を用いた MeHg の脱メチル化反応機構の解明

ヒト組織における MeHg の脱メチル化の有無及びそのメカニズムについて検討するため、MeHg の曝露濃度は MeHg 毒性に対して最も感受性が高い SK-N-SH の毒性試験の結果に基づいて、1 µM（最終濃度）で行った。

1-1) MeHg の細胞内蓄積量と無機水銀生成量

MeHg の細胞への蓄積は曝露 24 時間後にはプラトーに達し、MeHg は神経由来の SK-N-SH 細胞に最も蓄積しやすいことが明らかとなった（Fig. 1）。細胞内無機水銀量は時間とともに増加し、ヒト組織においても MeHg の脱メチル化が行われていることが示唆された（Fig. 2）。

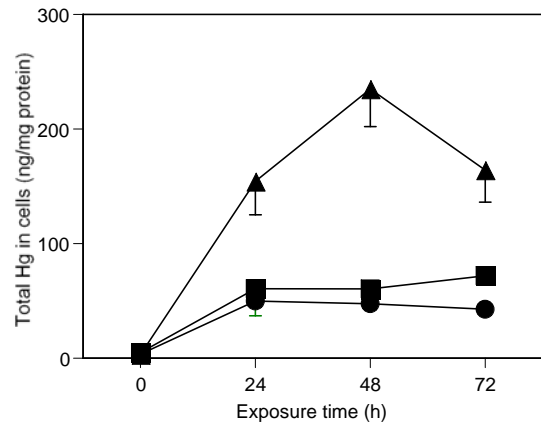


Fig. 1. Hg accumulation in three cell lines after MeHg exposure.

▲, SK-N-SH; ■, C. Liver; ●, U373MG

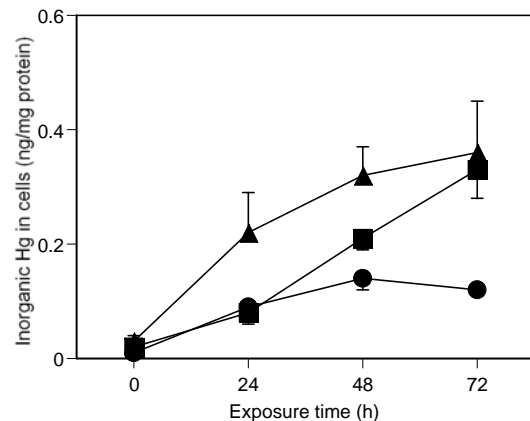


Fig. 2. Degradation of MeHg in three cell lines after MeHg exposure.

▲, SK-N-SH; ■, C. Liver; ●, U373MG

また、このときの MeHg の脱メチル化率は肝臓由来の C. Liver において最も高く、MeHg の脱メチル化は組織によって異なることを確認した。（Fig. 3）。

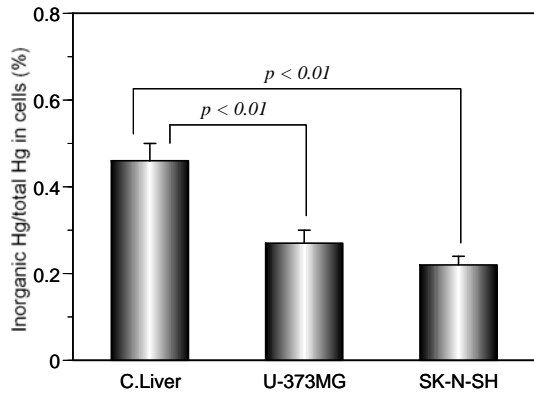


Fig. 3. Degradation of MeHg in three cell lines 72 h after MeHg exposure.

1-2) MeHgの脱メチル化におけるメカニズム
 ラット肝臓に着目した *in vivo* 及びスライス実験において、MeHgの脱メチル化はヒドロキシラジカル ($\text{OH}\cdot$) ではなく、ミトコンドリア内膜で生成されたスーパーオキシドアニオン ($\text{O}_2^{\cdot-}$) が関与していることが報告されている。そこで、MeHgの脱メチル化における O_2 生成剤 (パラコート、PQ、 $100\ \mu\text{M}$) の修飾効果を検討したところ、MeHgの脱メチル化はいずれの細胞においても促進された (Fig. 4)。また、MeHgの脱メチル化における $\text{OH}\cdot$ 生成剤 (鉄イオン、 $10\ \mu\text{M}$) 及び $\text{OH}\cdot$ 捕捉剤 (マンニトール、 500 または $1000\ \mu\text{M}$) の影響についても検討を行ったが、MeHgの脱メチル化への $\text{OH}\cdot$ の関与はいずれの細胞においても認められなかった (data not shown)。

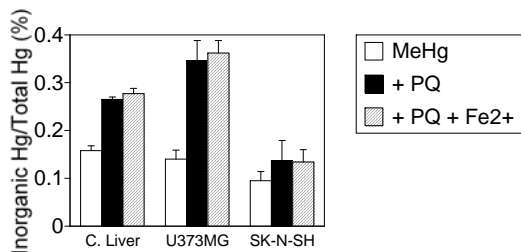
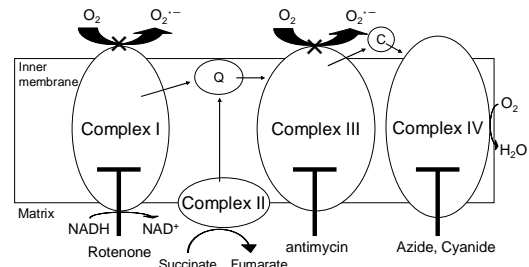


Fig. 4 Effects of PQ and ferrous ion on inorganic Hg formation

細胞内における $\text{O}_2^{\cdot-}$ の産生場所はミトコンドリアとペルオキシソームが主であり、特にミトコンドリアが重要である。ミトコンドリアの産生部位は内膜における電子伝達系であり (Scheme 1.)、そのほとんどは複合体 I と III から生じている。



Scheme 1. The electron transfer system and production of superoxide anion in mitochondria

そこで、複合体 I または複合体 III の単独阻害 (ロテノンまたはアンチマイシン)、両複合体の阻害における MeHg の脱メチル化について検討した。複合体の単独阻害では、Chang Liver における MeHg の脱メチル化に変化は認められなかったが、両複合体の阻害では低下傾向を観察した (data not shown)。一方、U373MG においては、変化は観察されなかった。さらに、ラットの報告において MeHg の脱メチル化を最も阻害した複合体 IV の阻害剤 (アジ化ナトリウム、 $5\text{-}500\ \mu\text{M}$) を用いて検討したが、いずれの細胞においても阻害効果は認められなかった (data not shown)。

1-3) 小括

本実験で使用したヒト由来の細胞株のうち、MeHg は神経由来の細胞株に蓄積しやすいことが明らかとなり、またヒト脳においても MeHg の脱メチル化が起こっていることが示唆された。さらに、組織における MeHg の脱メチル化は肝臓で最も高く、その反応は O_2 が関与している可能性が考えられた。

(2) 腸内細菌を介した MeHg の排泄に関する検討

ラットの糞やヒトの便から単離した菌株のうち、大腸菌、乳酸菌、ビフィズス菌及びバクテロイデスにおいて、MeHg の脱メチル化活性が最も高いことが報告されている。

2-1) MeHg の生体内変換に関与する腸内細菌のスクリーニング

ヒトの腸内細菌叢の最優勢種はビフィズス菌であり、最優勢種ではないものの、ラットにも存在する。そこで、MeHg の生体内変換に関与する腸内細菌を特定するため、ラット腸における MeHg の脱メチル化活性について検討した (Hg の最終濃度は $2\ \text{ppm}$)。その結果、小腸の中部及び下部、盲腸の 3 つの部位において活性が高いことが明らかとなった (Fig. 5)。

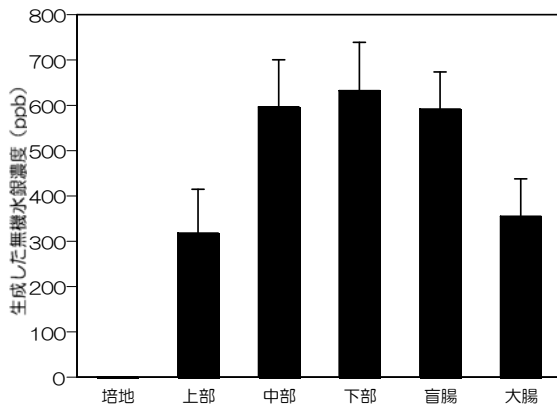


Fig. 5. Demethylation of MeHg by intestinal contents in vitro.

2-2) 乳酸菌飲料およびはっ酵乳における MeHg の脱メチル化

動物実験を始めるにあたり、菌株が明記されている乳酸菌飲料等（6商品）を用いて、MeHgの脱メチル化活性について *in vitro* 実験を行った（Hgの最終濃度は2 ppm）。その結果、商品によって差があるものの、ビフィズス菌や一部の乳酸菌が MeHg を無機水銀へと変換することを観察し、そのうちある種のビフィズス菌に最も高い活性を観察した。

2-3) ラットにおける MeHg の糞中排泄に対する FOS の効果

通常の飼育飼料には、魚由来の水銀が微量含まれている。そこで、飼料中総水銀濃度、飼料の摂取量及び糞中総水銀濃度を経時的に測定し、糞中への水銀の排泄率を算出した。また、FOS投与期間中の糞中総嫌気性菌及びビフィズス菌数を経時的に測定した。その結果、水銀の糞中排泄率は FOS 投与 4.4 週間後から増加傾向が観察されたが、6.4 週間後には対照群と変わらなかった (Fig. 6)。一方、糞中ビフィズス菌の占有率は、FOS 投与 5 週間後に増加傾向が見られたが、7 週間後には対照群と変わらなかった (data not shown)。このときの水銀の糞中排泄率と糞中ビフィズス菌の占有率との間に相関性が認められた (Fig. 7)。しかしながら、FOS 投与 7 週間後に MeHg を 5 日間同日投与した時の糞中への水銀の排泄率及び組織中総水銀濃度に有意な変化は認められなかった (data not shown)。

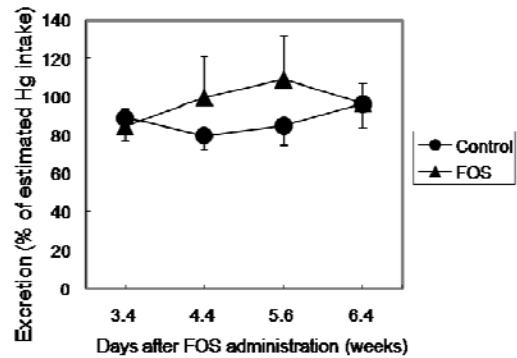


Fig. 6. Mercury excretion in the feces of rat after FOS administration.

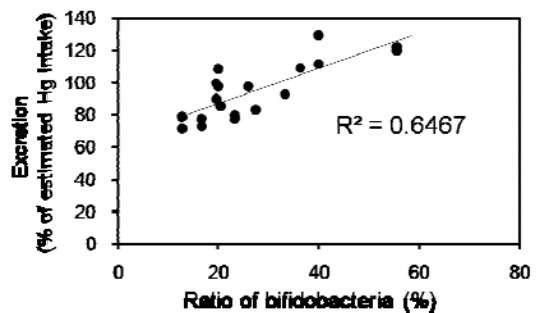


Fig. 7. Correlation between mercury excretion and ratio of bifidobacteria in the feces of rat.

2-4) 小活

本実験から、ラット腸における MeHg の生体内変換部位は小腸中部から下の部位で行われていることが明らかとなった。また MeHg の生体内変換には、ビフィズス菌が関与していることが示唆された。以上の結果から、腸内細菌による MeHg の生体内変換は、MeHg の排泄促進機構であると推察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

- ① 永野匡昭、安武 章、三浦郷子、ヒト培養細胞を用いたメチル水銀の生体内変換とそのメカニズムの検討、第34回日本トキシコロジー学会学術年会、2007年6月、東京。
- ② Masaaki Nagano, Akira Yasutake and Kyoko Miura, Mechanism of methylmercury biotransformation in human cell lines, 47th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2008年3月、Seattle, USA.
- ③ Masaaki Nagano and Akira Yasutake,

Mechanism of methylmercury biotransformation in human cell lines, 9th International Conference on Mercury as a Global Pollutant, 2009年6月発表確定, Guiyang, China .

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永野 匡昭 (NAGANO MASA AKI)

研究者番号: 10393464

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。

