

# 動物性ペルオキシダーゼによる金属水銀取り込みと L-dopa によるその抑制作用について

岡山大学医学部公衆衛生学教室（指導：緒方正名教授）

愛 甲 博 美

（昭和57年2月16日受稿）

Key words : Lactoperoxidase, Metallic mercury uptake, L-dopa

## 緒 言

植物性のペルオキシダーゼには西洋ワサビ、チトクロームCなどがよく知られているが、動物性のペルオキシダーゼには白血球中のペルトペルオキシダーゼと乳汁中のラクトペルオキシダーゼが知られているだけである。一方、カタラーゼは動植物界に広く分布し、特に動物体においては赤血球中や肝臓中の microbody に多く存在していることが知られている。このカタラーゼの生理的役割としては生体内で発生する過酸化水素の処理であり、そのペルオキシダーゼ作用により種々のアルコールなどの酸化に役立っていると考えられている。

一般にカタラーゼやペルオキシダーゼは過酸化水素を分解する触媒酵素であり、両者とも過酸化水素を基質とする点で一致している。カタラーゼは過酸化水素を直接水と酸素に分解するのに対し、ペルオキシダーゼは適当な被酸化物を必要とする。このような点に関して、Magosら<sup>1)</sup>はカタラーゼが金属水銀を取り込む能力を有することを示し、また池田ら<sup>2)</sup>は植物性ペルオキシダーゼである西洋ワサビによる水銀取り込みなどを報告しているが、動物性ペルオキシダーゼによる水銀取り込みに関する報告はない。

そこで、著者は動物性ペルオキシダーゼとしてラクトペルオキシダーゼを用い、その金属水銀取り込みと L-dopa [L-β-(3, 4-dihydroxyphenyl) alanine] による抑制作用について検討した。

## 実験材料と実験方法

### 実験材料

今回の実験には下記の試薬を用いた。

ラクトペルオキシダーゼ：シグマ製の76unit/mg protein (from Milk) を用いた。

L-dopa : L-β-(3, 4-dihydroxyphenyl)alanine (和光製, 特級)を用い、必要量を弱酸に溶解し実験に供した。

過酸化水素：30%—H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を希釈して用いた。  
実験方法

ラクトペルオキシダーゼおよび L-dopa はワールブルグガラスコ(容量15ml)のmain chamber に入れ、リン酸塩溶液(M/60, pH=6.8)で全容を3mlとする。side arm には金属水銀を0.1ml, center well には必要に応じて過酸化水素を入れ、37°Cで振盪しながら90分インキュベートした。90分インキュベート後、必要量を採取し、前処理した後、総水銀量を遷元気化法で測定した<sup>3)</sup>。

## 実 験 結 果

動物性ペルオキシダーゼとしてラクトペルオキシダーゼ(以下 Lact. と略す)を用い、その水銀取り込みについて検討した。その結果を Table 1 に示す。Lact. のみの水銀取り込み量は非常に低い値であった。この系に過酸化水素が存在すると、その水銀取り込み量は過酸化水素の存在しない系と比較して約10倍高い値を示した。また、Lact-L-dopa 系の水銀取り込み量は Lact. のみのそれと比較し、幾分増加の傾向を示

Table 1 Mercury uptake in vitro by lactoperoxidase

Lact.* (26μg)	L-dopa** (16.67x10 <sup>-5</sup> M)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.3%)	Mercury uptake (μg/ml)
+	-	-	0.0659±0.0090
+	-	+	0.6421±0.0978
-	+	-	0.0770±0.0014
-	+	+	0.0913±0.0084
+	+	-	0.0992±0.0083
+	+	+	0.1738±0.0242

\* Lactoperoxidase(Sigma Co., 80 units of protein per mg by the pyrogallol method), \*\* L-β-(3,4-dihydroxy-phenyl)alanine(Wako Co.), Buffer solution addition resulted in a final of 3 ml. Incubation time was 90 min.

Table 2 Mercury uptake in vitro by lactoperoxidase on the concentration change of hydrogen peroxide and L-dopa

Lact. (26μg)	L-dopa (M)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)	Mercury uptake (ug/ml)
+	16.67x10 <sup>-5</sup>	30	0.2341±0.0248
+	"	3	0.1937±0.0261
+	"	0.3	0.1738±0.0505
+	"	0.03	0.0905±0.0024
+	"	0.003	0.0754±0.0014
+	"	0.0003	0.0746±0.0037
+	16.67x10 <sup>-3</sup>	0.3	0.0964±0.0017
+	16.67x10 <sup>-4</sup>	"	0.1167±0.0034
+	16.67x10 <sup>-5</sup>	"	0.1738±0.0505
+	16.67x10 <sup>-6</sup>	"	0.2524±0.1815
+	16.67x10 <sup>-7</sup>	"	0.3825±0.2381

Buffer solution addition resulted in a final of 3 ml. Incubation was 90 min.

Table 3 Mercury uptake in vitro by lactoperoxidase on the concentration of hydrogen peroxide

Lact. (26μg)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)	Mercury uptake (μg/ml)
+	30	0.3714±0.0135
+	3	0.8167±0.0572
+	0.3	0.6421±0.0978
+	0.03	0.1905±0.0337
+	0.003	0.1739±0.0101
+	0.0003	0.0976±0.0034
+	-	0.0659±0.0090

Buffer solution addition resulted in a final of 3 ml. Incubation was 90 min.

Table 4 Relationship between the concentration change of lactoperoxidase and mercury uptake

Lact. (μg)	L-dopa (M)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)	Mercury uptake (μg/ml)
260	16.67x10 <sup>-5</sup>	0.3	0.1786±0.0212
26	"	"	0.1738±0.0505
2.6	"	"	0.1452±0.0597
0.26	"	"	0.0738±0.0024
0.026	"	"	0.0730±0.0096

Buffer solution addition resulted in a final of 3 ml. Incubation was 90 min.

した。次に Lact-L-dopa系に過酸化水素が存在する場合、Lact-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系のような水銀取り込み量は認められず、Lact-L-dopa系のそれと比較し約1.8倍増加したひすぎない。

L-dopa のみの水銀取り込み量は0.077μg/mlであるが、この系に過酸化水素が存在すると0.091μg/mlと幾分増加の傾向を示した。さらに、L-dopa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系(0.091μg/ml)とLact-L-dopa系(0.099μg/ml)との水銀取り込み量との和は0.19μg/mlであるのに対してLact-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系それは0.642μg/mlである。すなわち、Lact-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系の水銀取り込み量は前者の系の和より約3倍高い値を示した。

次に、過酸化水素およびL-dopaの濃度変化におけるLact.の水銀取り込み量はL-dopaの濃度によりかなりの差が生じた。その結果をTable 2に示す。Lact.およびL-dopaの濃度を一定とし、過酸化水素の濃度が増加するとともに水銀取り込み量は増加の傾向を示した。一方、Lact.および過酸化水素の濃度を一定とし、L-dopaの濃度変化をみると、L-dopaの濃度が増加するとともに水銀取り込み量は逆に減少の傾向を示した。また、L-dopaの存在しないLact-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系においてはTable 1に示したように非常に高い水銀取り込み量であった。そこで、Lact-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系の水銀取り込みにおよぼす過酸化水素の影響について検討した。その結果をTable 3に示す。その結果、過酸化水素の濃度減少につれて水銀取り込み量は減少の傾向を示した。上記とは逆にL-dopaと過酸化水素の濃度を一定として

Lact. の濃度変化をみると、Lact. の濃度増加とともに水銀取り込み量は幾分増加の傾向を示した。その結果を Table 4 に示す。この傾向は Table 2 に示した過酸化水素の濃度変化における水銀取り込み量とよく似ている。

### 考 察

Lact. は過酸化水素の存在下ではフェノールや芳香族アミンなどを酸化する<sup>4)</sup> 西洋ワサビペルオキシダーゼに酷似している。この傾向は Table 1 の結果において、Lact. が過酸化水素の存在下で金属水銀取り込み量が高いことに基因していると思われる。しかしながら、この系に L-dopa が存在すると、この金属水銀取り込み量が減少した。これはおそらく基質あるいは還元剤として作用する L-dopa による水銀とのペルオキシダーゼ反応の競合抑制によるものと考えられる。このことは動物組織中の tyrosinase<sup>5)</sup> による tyrosine の酸化によって生成される L-dopa として生理学的意義があるかもしれない。Lact. は過酸化水素の存在下で金属水銀を取り込む能力を有するが、L-dopa の存在下で減少することを確かめるために、L-dopa の濃度変化あるいは L-dopa の存在下での過酸化水素の濃度変化を試みた結果、L-dopa の濃度増加により Lact. によ

る金属水銀の取り込み能力が減少した。このことは L-dopa により Lact. の金属水銀取り込み能が抑制されたものと考えられる。また、金属水銀が Lact. の基質となるか否かについては今後定量的な検討が必要と考えられる。

### 結 論

動物性ペルオキシダーゼとして Lact. を用い、金属水銀の取り込みについて検討し、以下の結論を得た。

- (1) 過酸化水素の存在下での Lact. による水銀取り込み量は  $0.64 \mu\text{g/ml}$  であり、過酸化水素なしのそれよりも約 10 倍高い値を示した。
- (2) Lact.- $\text{H}_2\text{O}_2$  系に L-dopa が存在することにより、Lact. による金属水銀取り込み量は減少した。また、L-dopa の濃度増加によりその取り込み量は減少の傾向を示した。
- (3) Lact.- $\text{H}_2\text{O}_2$  系において、Lact. による金属水銀取り込み量は過酸化水素の濃度増加とともに増加した。
- (4) Lact-L-dopa- $\text{H}_2\text{O}_2$  系において、Lact. による金属水銀取り込み量は Lact. の濃度増加とともに増加の傾向を示し、この系における過酸化水素の濃度変化とほぼ同様な値を示した。

### 文 献

1. Magos, L., Halbach, S. and Clarkson, T.W.: Role of catalase in the oxidation of mercury vapor, *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 1373—1377, 1978.
2. 池田己喜子, 熊城一男, 井上豊治, 緒方正名, 石田立夫: 金属水銀の生体内酸化に及ぼす還元型グルタチオンの影響, 岡山県環境保健センター年報, No. 1, 104—108, 1977.
3. 愛甲博美: 金属水銀酸化における鉄化合物と過酸化水素の役割について, 岡山医学会誌, **92**, 1061—1064, 1980.
4. Sumner, J.B. and Somers, C.F.: *Chemistry and Methods of Enzymes*, 3rd ed., Academic Press, New York, 1952.
5. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.: *Methods in Enzymology*, Vol. II, Academic Press, New York, 1955.

**The uptake of metallic mercury by peroxidase in animals and its inhibition by L-dopa.**

**Hiromi AIKOH**

**Department of Public Health, Okayama University Medical School.**

**(Director: Prof. M. Ogata)**

The uptake of metallic mercury by lactoperoxidase was measured. The results are described as follows:

(1) The uptake of metallic mercury by lactoperoxidase in the presence of hydrogen peroxide was 10 times higher than that in the absence of hydrogen peroxide.

(2) The uptake of metallic mercury by lactoperoxidase in the presence of L-dopa in the Lact. -H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system decreased, and decreased further as the concentration of L-dopa increased.

(3) The uptake of metallic mercury by lactoperoxidase in the Lact. -H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system showed a tendency to increase, when the concentration of hydrogen peroxide increased.

(4) The uptake of metallic mercury by lactoperoxidase increased with an increase in the lactoperoxidase concentration when the concentration of L-dopa and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the Lact. -L-dopa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system was constant. This uptake was similar in value to the increase changed by increase in the concentration of hydrogen peroxide.