

金属水銀のカタラーゼによる取り込みに関する研究

第一報

金属水銀のほうれんそうカタラーゼによる酸化について

岡山大学医学部公衆衛生学教室（指導：緒方正名教授）

内 藤 元 久

（昭和55年11月17日受稿）

Key words: 金属水銀

ほうれんそう

カタラーゼ

緒 言

水銀は、昔から計器類製造工場及び医薬品を始めとする化学工業に利用されてきたが、その一方で強い毒作用をもっており、人間などが水銀蒸気を吸入した場合は、肺から吸収され中毒する危険が多い。

このため、わが国でも金属水銀(Hg^0)中毒は、自殺や他殺のほかは、水銀の曝露によっておこる特定の水銀取扱者に発生する職業病的色彩がつよいといわれている¹⁾。

しかしながら、動物ばかりでなく、植物についても水銀を使用する工場の内外で、 Hg^0 が体内に固定される可能性がある。

植物体内に Hg^0 が取り込まれる経路としては、根や葉などから吸収されることが考えられる。

そこで、葉からの吸収起点をあきらかにする方法として、ほうれんそうのカタラーゼを用いて、 Hg^0 の取り込みに関する検討を行った。

生体内における Hg^0 の酸化にカタラーゼが関与していることは、Kudsk による牛肝臓の精製されたカタラーゼによる Hg^0 の取り込みなどの研究²⁾ や Magos, 菅田らの人間の赤血球やラットの Hg^0 の取り込みに対するアミノトリアゾールの影響についての研究³⁾、緒方らのマウスのアカタラセミアの血液や肝などの Hg^0 の取り込みの研究⁴⁾、Magos らの人間の血液などに対する研究⁵⁾、さらに緒方らの人間のアカタラセミアの赤血球に対する Hg^0 の取り込みの研究⁶⁾ な

どにより明らかにされてきた。

しかし、動物以外の生物についてこの種の報告は、ほとんどない。

そこで、本報では動物ばかりではなく、植物においても、その生体内のカタラーゼの関与により Hg^0 が酸化されるかを、ほうれんそうカタラーゼについて、粗抽出液および精製抽出液によって検討した結果について報告する。

実 験 方 法

2-1 実験材料

市販のほうれんそうをよく洗浄後、Galston⁷⁾ のカタラーゼの精製方法に従って粗抽出液を調整した。

すなわち、まず150gのほうれんそうのアセトン粉末20gを作り、これを2倍容のM/15リン酸緩衝液で数回抽出して粗抽出液を得た。

次に、アセトン粉末の0.1M Na_2HPO_4 抽出液について NH_4SO_4 の50%飽和液で塩析を行い、その沈澱物をM/15リン酸緩衝液で抽出して精製抽出液を得た。

2-2 インキュベーション実験

容量15mlのワールブルグフラスコの main chamber に全量を2mlに調整した反応混合物を入れ、side arm に金属水銀0.1mlを、center well に3% H_2O_2 0.1mlを加え密栓した後、80cycles/min. で振とうしながら30℃で3時間インキュベートした。

2-3 水銀量の測定

10N H₂SO₄ 10ml と 3% KMnO₄ 5ml の混合液中に、反応混合物0.1~1.0mlをとり、10% KMnO₄ 2ml を加え、1時間加熱分解し総水銀として還元酸化法によって測定した。

2-4 カタラーゼ活性の測定

カタラーゼ活性は過ホウ素酸法⁸⁾により測定した。活性の単位は、Perborate Unit (P.U.) を用いた。

2-5 タンパク量の測定

タンパク量は、Lowry⁹⁾の方法により測定した。

実験結果

Hg⁰の取り込みは、比取り込み量(タン白当たりの取り込み量)(ngHg/mg. protein)としてあらわした。

(1)粗抽出液による Hg⁰の取り込み

その成績は、表1、図1に示すとおりであった。すなわち、H₂O₂の存在する場合に比べて、存在しない場合は、その取り込みは、19%の減少率を示した。また、2mMKCNを添加した場合は、38%、2mMNaN₃を添加した場合には、86%の減少率を示した。

(2)精製抽出液による Hg⁰の取り込み

その成績は、表1、図2に示すとおりであった。すなわち、H₂O₂の存在する場合に比べて、存在しない場合は、その取り込みは、65%の減少率を示した。また、2mMKCNを添加した場合は、47%、2mMNaN₃を添加した場合には、ほとんど100%の減少率を示した。

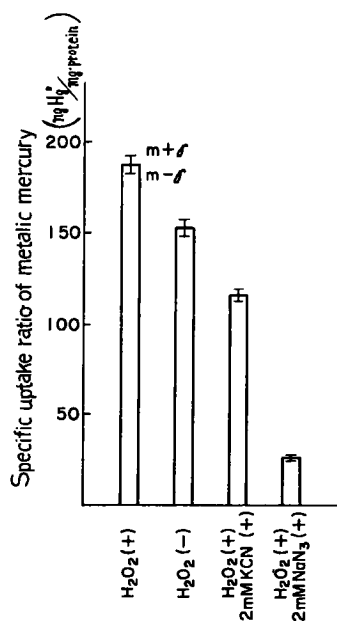


図1 粗抽出液の水銀の取り込み量

総括及び考按

生体内における金属水銀の酸化にカタラーゼが関与していることは、ヒトやマウスなど動物の血液や肝などに関する種々の研究によりすでに明らかになっているが、本報は動物ばかりではなく、植物においてもその生体内のカタラーゼの関与により金属水銀が酸化されることをホウレンソウカタラーゼを用いて明らかにしようと試みたものである。

今回の実験成績では、ホウレンソウカタラーゼの粗抽出液及び精製抽出液が程度の差こそあれ、H₂O₂の存在のもとにHg⁰を取り込んでいるが、これは、Hg⁰の取り込みにカタラーゼの

表1 粗抽出液および精製抽出液の水銀の取り込み

| 試料 | No. | 添加物 | | | 水銀取り込み量 | | カタラーゼ活性 (p.u./g) |
|-------|-----|-------------------------------|--------|---------------------|---------------------|--------|------------------|
| | | H ₂ O ₂ | 2mMKCN | 2mMNaN ₃ | 平均±標準偏差 (ng/mg・タン白) | 比(変動率) | |
| 粗抽出液 | (1) | + | - | - | 188±6 | 0 | 157 |
| | (2) | - | - | - | 153±5 | 0.19 | |
| | (3) | + | + | - | 116±3 | 0.38 | |
| | (4) | + | - | + | 26±1 | 0.86 | |
| 精製抽出液 | (1) | + | - | - | 992±98 | 0 | 1088 |
| | (2) | - | - | - | 351±26 | 0.65 | |
| | (3) | + | + | - | 524±56 | 0.47 | |
| | (4) | + | - | + | N.D | 1 | |

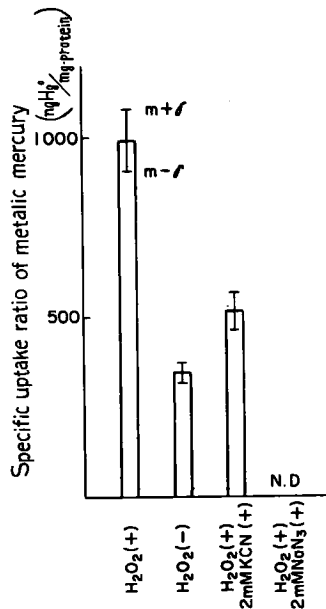


図2 精製抽出液の水銀の取り込み量

酸化が関与していることを示すものである。

また、粗抽出液に比べて、精製抽出液が、H₂O₂の添加しない場合に、とり込み量が少なく、かつ、ヘマチン(Fe³⁺)を活性基に有するカタラーゼの特異的な阻害剤と考えられている KCN 及び一般的な酵素の阻害剤であるが、カタラーゼに強く阻害作用を有する NaN₃による阻害度が強いことは、カタラーゼとその H₂O₂ 分解機構が Hg⁰の取り込みに関与しているものと思われる。

なお、H₂O₂の存在しない場合にも、Hg⁰の

取り込みが行なわれていることは、①粗抽出液及び精製抽出液に H₂O₂を発生する機構が存在する。あるいは②単にカタラーゼのほかに Hg⁰の生体への取り込みに関与する物質が存在するなどの原因が考えられ、今後検討する必要がある。

このように動物ばかりでなく植物カタラーゼによっても金属水銀が酸化されることは、広く生物体内にあるカタラーゼが Hg⁰の酸化に関与していることを裏づけるとともに、自然界に放出された金属水銀がカタラーゼの関与で植物体内などに取り込まれている可能性をも示唆するものであろう。

結 論

Hg⁰の取り込みについて、ホウレンソウカタラーゼを用いて実験を行なったところ以下のとおりであった。

- (1)ホウレンソウより精製したカタラーゼによって、Hg⁰の酸化が行なわれる。また、精製度を上げることにより単位タン白質当たりの Hg⁰の取り込み量は増加する。
- (2)ホウレンソウのカタラーゼ粗抽出液による Hg⁰の取り込みは、カタラーゼの活性阻害剤である KCN によって38%の減少率を、NaN₃によって86%の減少率を示すが、カタラーゼの精製抽出液においては、KCN によって47%の減少率を、NaN₃によっては、ほとんど100%の減少率を示し、また H₂O₂無添加の場合にも粗抽出液で19%、精製抽出液で65%の減少率を示した。

文 献

1. 南部祥一：公害防止の管理と実務(水質編)，日刊工業新聞社，pp. 13—15，1976.
2. Kudsk, N.F.: Biological oxidation of elemental mercury In *Mercury, Mercurials and Mercaptans*, (ed. M.M. Miller and W. Clarkson, Thomas, Springfield, Illinois, 1972.
3. Magos L., Sugata Y. and Clarkson T.W.: Effects of 3-amino-1,2,4-triazole on mercury Uptake by *in Vitro* human blood samples and by whole rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **28**, 387—373, 1974.
4. Ogata M., Ikeda M.: Mercury uptake by acatalasemia mice and their erythrocytes, lung and liver homogenates, *Int. Arch Occup Environ Health* **41**, 81—93, 1978.
5. Magos L., Halbach S., and Clarkson, T.W.: Role of catalase in the oxidation of mercury vapor, *Biochem, Pharmacol.* **27**, 1373—1377, 1978.

- 6 . Ogata, M., Ikeda, M.: and Sugata, Y.: *In vitro* mercury uptake by human acatalasemic erythrocytes, *Arch Environ. Health* **34**, 218—221, 1979.
- 7 . Galston; *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, Vol.2 pp.789—791, 1960.
- 8 . Feinstein, R.N.: Perborate as a substrate in a new assay of catalase. *J. Biol Chem.* **180**, 1197, 1949.
- 9 . Lowry, O.H., Rosebrough, N.T., Tarr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol chem* **193**, 265, 1951.

Uptake of metallic mercury by catalase from spinach (Part I)

Motohisa NAITO

Department of Public Health, Okayama University Medical School, Okayama

(Director : Prof. M. Ogata)

(1) The uptake of metallic mercury by catalase purified from spinach was observed with and without H_2O_2 . Purified catalase solution took metallic mercury up more than crude catalase solution.

(2) In comparison with the mercury uptake from air saturated with mercury vapour, crude spinach extract of catalase with H_2O_2 showed a 38% decrease with H_2O_2 plus KCN, a 86% decrease with H_2O_2 plus NaN_3 , and a 19% decrease without H_2O_2 . Uptake by purified extract with H_2O_2 decreased by 47% with H_2O_2 plus KCN, decreased about 100% with H_2O_2 plus NaN_3 , and 65% without H_2O_2 in comparison with the mercury uptake from air saturated with mercury vapour.