

環境汚染物質（重金属など）の生体膜に対する作用

第 2 報

各種有機水銀の生体膜に対する作用，特に K^+ 区画性に対して

長 谷 川 亨（指導 緒方正名教授）

岡山大学医学部公衆衛生学教室

目 的

産業界における水銀及びその化合物による慢性中毒は、肝・腎などの実質臓器障害のみならず、中枢神経の機能に対する障害をもひきおこし、企図振せんなどの症状を示す。また環境汚染による水俣病の原因物質として塩化メチル水銀^①があげられる。この水俣病は特に中枢神経障害や運動機能失調として知られている^②。これら水銀中毒の毒性機序は一般にチオール含有酵素の機能損傷と考えられている^③。一方、生体膜機能に対する各種水銀化合物の害作用をより具体的に解明する事は、水銀化合物の生体に対する作用を検討する上で重要な問題である。

Brierly らは^④ P-Chloro mercuri phenyl sulfonate, P-Chloro mercuri benzoate, の有機水銀化合物が心筋ミトコンドリアの 1 価カチオンのエネルギー依存的とり込みを促進する事を報告し、中尾らは^⑤細胞膜諸酵素—(Na-K-ATPase, adenylyl Cyclase) に対する有機水銀化合物の阻害を報告している。著者は、環境汚染や産業中毒として問題にされているものとして塩化メチル水銀、また過去において農薬として使用され、現在防腐剤として使用されている酢酸フェニル水銀^⑥を用いた。そしてこれら各種有機水銀が生体膜に対する作用—生体膜の K^+ 区画性保持（この機能の変化は膜の微小変化を反映する）に対する作用—は如何なるものかを調べた。また K^+ 区画性に対する作用は酸化的リン酸化反応などの生体膜機能に対し如何なる影響を与えるかを検討してみた。

材料及び方法

① 赤血球及びミトコンドリアの分画

〔赤血球〕 家兎の耳介より採血し、冷生理食塩

水で 2 回、冷 0.15 M 塩化コリン, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) で 2 回, 3000rpm 10 min. で洗浄したものを実験に供した。

〔ミトコンドリア〕 Hogeboom, Schneider の変法^⑦により分画したものを 0.25 M sucrose, 3 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 中に懸濁したものを実験に供した。

② 試薬の調製

各種有機水銀：PhMC（塩化フェニル水銀），Ph-MA（酢酸フェニル水銀），M. M. C.（塩化メチル水銀），PCMB (p-Chloro mercury benzoate) は DMSO (Dimethyl sulfoxide) に溶解し、対照は有機水銀の添加量と同量の DMSO を添加したものを用いた。

③ K^+ 遊出作用

赤血球の場合は反応液 0.15 M Choline Chloride, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 反応温度 37℃ で行ない、ミトコンドリアの場合は反応液が赤血球と同じものと、0.25 M Sucrose, 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) を用い、反応温度は 25℃ で行い、反応容量は両者共に 2.5 ml である。反応液中に遊出する K^+ 量をカリウム電極 (Beckman 社) で測定した。

④ 酸化的リン酸化反応

反応液 0.25 M Sucrose, 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) あるいは 0.15 M KCl, 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) Pi 2.5 mM, Na-succinate 5 mM 存在下のリン酸化基質 ADP 0.3 mM による溶存酸素濃度減少変化を経時変化で測定した。

実験結果

1. 酸化的リン酸化反応に対する作用

各種有機水銀の細胞機能に対する作用を検討する

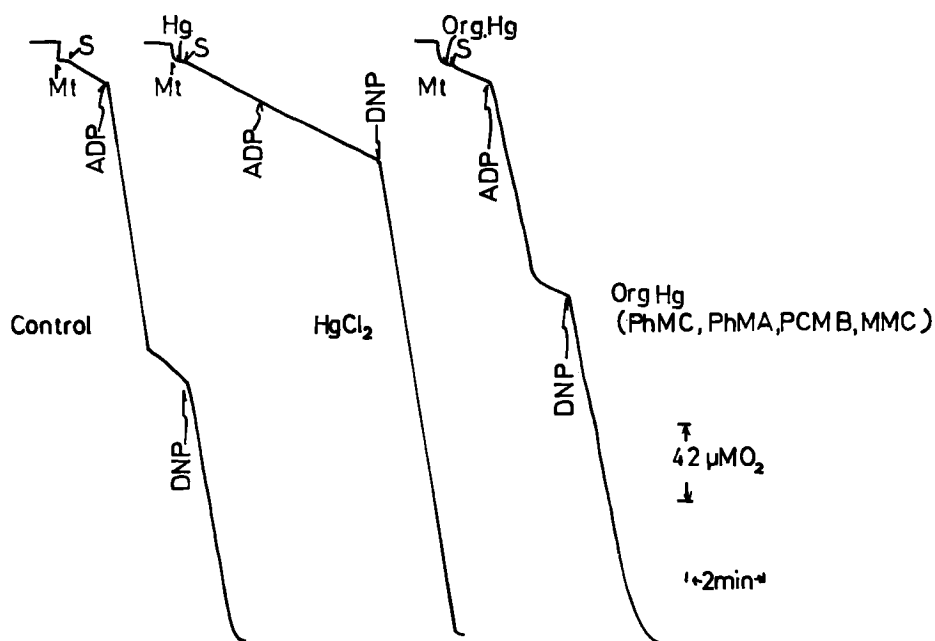


図 1. ラット肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対する作用. 反応系. 0.25M sucrose, 5mM Tris-HCl (pH 7.5) Pi 2.5 mM, Na-succinate 5mM, ADP 0.3 mM, ラット肝ミトコンドリア (1.5 mg protein/ml) HgCl_2 , PhMA, PhMC, MMC, PCMB : 20 μM . 対照は DMSO が添加されてある. 反応容量 3.5 ml. 反応温度 25°C

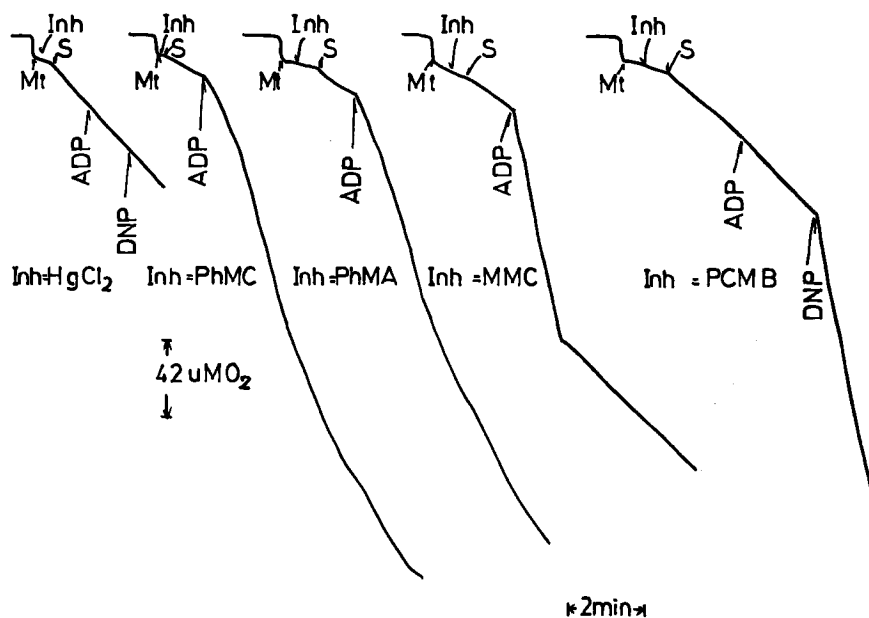


図 2. ラット肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対する作用. 反応系は図 1 と同じ, 但し, 水銀化合物は 50 μM の濃度を示す.

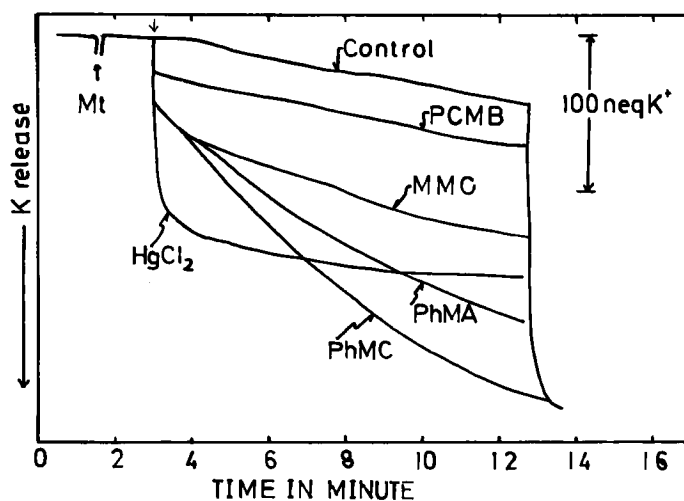


図3. ラット肝ミトコンドリア膜からの K^+ 遊出に対する作用. 反応系, 方法の項で述べてある. 水銀化合物の濃度 $50\mu M$.

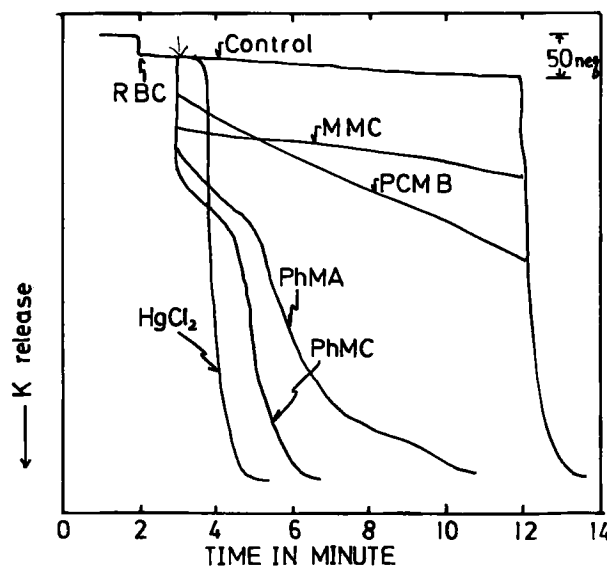


図4. 赤血球からの K^+ 遊出に対する作用. 反応系, 方法の項参照, 水銀化合物の濃度 $100\mu M$.

上で, 膜機能の微小変化を反映する酸化的リン酸化反応に対する作用を検討してみる事は重要な問題であると思われる. 即ち, $0.25 M$ sucrose, 中で酸化的リン酸化反応に対する作用を検討してみたのが〔図1〕, 〔図2〕である. 図1は各種有機水銀濃度は $20\mu M$, 塩化第二水銀を対照として検討を行なった. 明らかに, 塩化第二水銀はADP呼吸阻害を示し, 他の有機水銀はほとんど影響を示さなかった. 図2は濃度を $50\mu M$ に上げた場合に於ける作用を示

してある. 明らかに, 各種有機水銀の作用は異なったものを示す. 塩化第二水銀は呼吸抑制, 有機水銀は塩化フェニル水銀>酢酸フェニル水銀>塩化メチル水銀の順で脱共役作用を示した. またPCMBは $20\mu M$ に於ける塩化第二水銀同様, 特異的にADP呼吸を抑制する作用を示した.

2. K^+ 遊出作用

上記の実験で, 各種有機水銀が酸化的リン酸化反応に対し障害作用を示す事が認められたが, この

作用機序を求める意味で、 K^+ 遊出作用を検討してみた。〔図3〕はミトコンドリアからの K^+ 遊出に対する作用を示したもので濃度 $50\text{ }\mu\text{M}$ に於いて塩化第二水銀>塩化フェニル水銀>酢酸フェニル水銀>塩化メチル水銀の順に K^+ 遊出作用を有する事が認められた。このミトコンドリア膜に対する K^+ 遊出作用は細胞膜に対しても示されるものかどうかを検討する意味で、赤血球膜に対する作用を検討してみたのが、〔図4〕である。明らかに、 $100\text{ }\mu\text{M}$ の濃度に於いて各種有機水銀の K^+ 遊出作用がミトコンドリア膜同様観察された。この K^+ 遊出作用は、この実験から明らかな如く、生体膜一般に対する作用である事が判明した。

3. K^+ 遊出速度と濃度との関係

各種有機水銀が生体膜に対し K^+ 遊出作用を有している事が上記の実験から認められたがこの K^+ 遊出作用と濃度との関係を赤血球を用いて検討を行なったのが〔図5〕である。即ち各種有機水銀の K^+ 遊出最大速度と濃度との関係を検討してみた。〔図5〕から明らかな如く、塩化第二水銀は $10\text{ }\mu\text{M}$ の濃度範囲内で濃度に依存し K^+ 遊出速度が急激に上昇するのに反し、各種有機水銀は各々異なった濃度依存曲線を描く。即ち塩化フェニル水銀、酢酸フェニル水銀は $30\text{ }\mu\text{M}$ 付近から急激な速度上昇を示し、一種の膜の協同現象が認められ、これは膜の脂質の関与を示

唆する。PCMB、MMCは $100\text{ }\mu\text{M}$ までほとんど著明な速度変化を示さず、 K^+ 遊出作用は認められなかった。

考 察

本実験より明らかな如く、各種有機水銀(PhMC, PhMA, MMC, PCMB)は生体膜(赤血球膜とミトコンドリア膜)の K^+ 区画性保持機能に対し阻害をかける作用を有する事が認められた。この生体膜に対する K^+ 遊出作用は、水銀の障害作用を考慮する上で興味ある問題を提示する。

この K^+ 遊出作用の作用機序としては、Brierlyらのp-Chloro mercuri phenyl sulfonate, p-chloro mercuribenzoateの実験報告がある³⁾⁷⁾が、他の有機水銀(PhMC, PhMA, MMC)の系統的研究は報告されていない。中尾らの⁸⁾MMC, PCMBのNa-K-ATPase活性阻害、ミトコンドリアのイオン透過性制御に関与していると考えられているSH基の消失⁹⁾等が報告されている。本実験より明らかな如く、無機水銀と有機水銀(PhMC, PhMA, MMC)とは異なる作用機序を持つ事が示唆される。即ち有機水銀は脂溶性に富み、また本研究より、膜の協同現象を示す事が認められ膜の脂質部分に対する作用が大きいものと思われ、この点は新しい知見である。

本研究において、無機水銀>フェニル水銀>アル

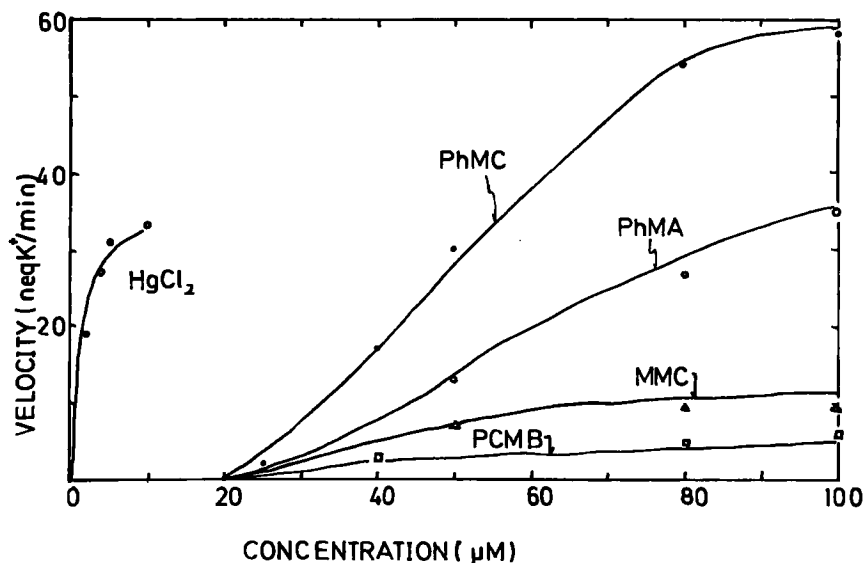


図5. K^+ 遊出速度と濃度の関係。反応系図4と同じ、但し、水銀化合物の濃度を種々に変化させてある。

キル水銀の順で生体膜に対する障害作用(K^+ 遊出作用及び酸化的リン酸化反応に対する脱共役作用)が強い理由として、2価の無機水銀は細胞内ジチオールと結合し、1価の有機水銀はモノチオールと、結合し得る事があげられる。また有機水銀の中では、飽和蒸気濃度の低いものほど K^+ 遊出作用が強い事などから考えると、極性の強い有機水銀程 K^+ 遊出作用及び脱共役作用が強い事が示唆される。

また本研究により、目的の項で述べた如く、かつて農業に使用され現在は防錆剤として使用されている酢酸フェニル水銀や、環境汚染としての塩化メチル水銀は、程度の差あれ、生体膜に作用し、 K^+ 遊出作用を発現しミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に対しは脱共役を示す事が認められた。この事実は、これら有機水銀の毒作用を検討する上で興味ある知見を呈するものと考えられる。

結 論

塩化フェニル水銀、酢酸フェニル水銀、塩化メチル水銀及びp-クロロ安息香酸第二水銀の生体膜に

対する作用をミトコンドリアの酸化的リン酸化反応及び赤血球とミトコンドリア膜の K^+ 遊出に関し検討し以下の如き結果を得た。

1. 酸化的リン酸化反応に対し、塩化フェニル水銀(PhMC)、酢酸フェニル水銀(PhMA)塩化メチル水銀(MMC)は脱共役作用、P-700安息香酸第二水銀(PCMB)は特異的にADP呼吸阻害、塩化第二水銀($HgCl_2$)は呼吸阻害を示した。

2. 赤血球及びミトコンドリア膜に対し

無機水銀($HgCl_2$)>有機水銀(PhMC>PhMA>MMC>PCMB)の順で K^+ 遊出作用を有する事が示された。

3. K^+ 遊出における膜の協同現象から、有機水銀のうちのPhMC、PhMAは K^+ 遊出現象に膜の脂溶性可分が関与していることが示唆された。

本論文を執筆するに当たり、御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜った恩師緒方正名教授に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) 三浦豊彦, 斉藤一, 狩野広之, 藤本武, 多田次編集, 「新労働衛生ハンドブック」労働科学研究所, 東京, pp. 796-802, 1974.
- 2) 忽那将愛編, 「水俣病」熊本大学医学部水俣病研究班, 熊本, pp. 349-401, 1966.
- 3) Knight, V. A., Settlemire, C. T. and Brierly, G. P. Biochem. Biophys. Res. Comm., **33**, 287-293, 1968.
- 4) 原しげ子, 中尾順子, 原諭吉, 中尾貢, J. Toxic. sci., **2**, 102-103, 1977.
- 5) Utsumi, K. Acta Med. Okayama. **17**, 259-271, 1963.
- 6) Goodman, L. S. and Gilman, A. "The Pharmacological Basis of Therapeutics" The Macmillan Company. London, pp. 1048-1049., 1971.
- 7) Brierly, G. P., Knight, V. A. and Settlemire, C. T. J. Biol. chem., **243**, 5035-5043, 1968.
- 8) Brierly, G. P., Scott, K. M. and Jurkowitz, M. J. Biol. Chem., **246**, 2241-2251, 1971.

**The effects of organic mercury compounds on the biomembrane
with specific reference to the K^+ compartment**

Tohoru HASEGAWA

Department of Public Health, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Masana Ogata)

The effects of organic mercury compounds on the biomembrane were studied with specific reference to the K^+ compartment and the following results were obtained.

- 1) PhMC, PhMA, and MMC had effects of decoupling action on the oxidative phosphorylation, and PCMB inhibited the ADP-stimulated respiration, and mercury chloride inhibited the respiration.
- 2) On the red blood cell and mitochondrial membrane, these organic mercury compounds induced the K^+ release in the order of $HgCl_2$ PhMC PhMA MMC PCMB.
- 4) It is suggested that the liophilic nature of organic mercury compounds plays an important role in the reaction of K^+ release.