

マウス肝臓におけるメチル水銀の脱メチル化とホルムアルデヒド生成に関する研究

内川, 拓也

<https://doi.org/10.15017/1806963>

出版情報：九州大学, 2016, 博士（薬学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



氏 名	内川 拓也
論 文 名	マウス肝臓におけるメチル水銀の脱メチル化とホルムアルデヒド生成に関する研究
論 文 調 査 委 員	主 査 九州大学大学院薬学府 准教授 石井 祐次 副 査 九州大学大学院薬学府 教 授 田中 嘉孝 副 査 九州大学大学院薬学府 教 授 山田 健一 副 査 九州大学大学院薬学府 准教授 阿部 義人

論文審査の結果の要旨

メチル水銀 (Methylmercury: MeHg) は自然環境中に広く存在し、その過剰摂取により中枢神経障害や胎児発育障害を引き起こす重金属化合物である。これは哺乳類において MeHg は消化管から容易に吸収され、L-cysteine (Cys) 抱合体として中性アミノ酸トランスポーターシステムを介して血液脳関門や胎盤を通過するためであり、ヒトへの MeHg 曝露のほとんどが食物連鎖を通じて生物濃縮された魚介類摂取によるものである。MeHg の体外排出経路としてはグルタチオン代謝産物複合体として糞中や尿中へと体外排泄される他、生体内での無機水銀への変換も考えられる。ヒトにおいては、無機水銀の方が MeHg よりも排泄速度が速いことが知られている。生体内での MeHg の脱メチル化反応には腸内細菌叢によるものと生体組織内における反応がある。陸生哺乳類における組織内での脱メチル化反応では肝臓内での reactive oxygen species (ROS) の関与が示唆されているものの、その反応の詳細については未だ明らかにされていない。一方、薬物の生体内での生物学的な脱メチル化反応として、薬物代謝酵素 cytochrome P450 (P450, CYP) による N-脱メチル化反応が知られており、反応生成物としてホルムアルデヒドが検出される。本研究では、マウス肝臓での MeHg の脱メチル化におけるホルムアルデヒド生成の可能性を検討し、以下の知見を得た。

第一章では、MeHg 曝露マウスの肝臓における無機水銀の生成について調べるため、マウス肝ホモジネートを用いて NASH法をベースとしてホルムアルデヒド生成を指標とした MeHg 脱メチル化反応の *in vitro* 評価系の基礎反応条件について検討を行った。MeHg を基質にした場合の反応時間、基質濃度、酵素源 (タンパク質濃度) など反応条件の構築をし、この反応が NADPH 依存的な酵素化学的反応である可能性を示唆した。さらに P450 標準基質 benzphetamine と MeHg との比較、および CYP 誘導剤処理マウス肝臓ホモジネートを用いた比較検討により、MeHg 添加時のホルムアルデヒド生成が 3-methylcholanthrene (MC) 処理マウス肝臓で高くなる傾向を見出した。

第二章では、構築した *in vitro* 評価系において、MeHg より脱メチル化された無機水銀とホルムアルデヒド生成に高い正の相関が有ることを見出した。しかし、脱メチル化で生成された無機水銀とホルムアルデヒドの生成量に約 500 倍の違いがあり、観察されたホルムアルデヒドのうち、MeHg のメチル基に由来するものはわずかであることが見出された。一方、MeHg の脱メチル化によりホ

ホルムアルデヒド生成が促進されていることから、生成された無機水銀に起因したホルムアルデヒド生成反応である可能性を示した。さらに生成しているホルムアルデヒドの由来は、Met や sarcosine などの *N*-メチル基、*S*-メチル基等を有するメチルドナー化合物である可能性を示し、無機水銀によるホルムアルデヒド生成について新たな知見を見出した。また、このホルムアルデヒド生成には、小胞体 P450 の寄与は小さく、MeHg がミトコンドリアに作用して生成した O_2 が重要であることを示唆した。

第三章では、MeHg 処理マウス肝臓のメタボローム解析を行い、ホルムアルデヒド生成と脱メチル化に関与する代謝反応である choline 代謝および Met cycle の代謝物量を比較した。Choline 代謝経路において *N*-メチル化合物である dimethylglycine、sarcosine の有意な減少、Met cycle における *S*-adenosylmethionine の減少傾向が示唆された。さらに MeHg 処理したマウス初代肝細胞を用いて関連する代謝酵素遺伝子群の mRNA 発現解析を行い、これらの代謝系における mRNA 発現の増加を認めた。これらは、MeHg による O_2 生成を通じたホルムアルデヒド生成促進、その際のメチルドナー化合物の消費に代償的に choline 代謝および Met cycle を活性化する生体応答であると推定された。

本研究の所期には、マウス肝臓での MeHg の脱メチル化反応への P450 の関与とホルムアルデヒドの生成を証明することを目指したが、この反応への小胞体 P450 の寄与はほとんどないと考えられた。MeHg の脱メチル化は主にミトコンドリアで生起すると推定され、MeHg そのもの、あるいはその脱メチル化の際に生成する無機水銀が、細胞内メチルドナーからのホルムアルデヒド生成促進に関与することを初めて示唆した。このホルムアルデヒドは、MeHg のミトコンドリアへの作用に伴って生成する O_2 がメチルドナーと反応して生成すると推定された。一方、MeHg で促進されるホルムアルデヒド生成反応は NADH 依存性ではなく、NADPH 依存性であったことから、 O_2 生成に関与する酵素は、呼吸鎖以外のものである可能性がある。ミトコンドリア局在で MC 誘導性の CYP1B1 のアンカプル反応に由来するか否かは今後検証する必要がある。既に報告されている MeHg によるミトコンドリア superoxide dismutase 阻害と合わせて、この現象の鍵と考えられる。本研究では、MeHg 処理肝臓による *in vitro* でのホルムアルデヒド生成反応を初めて見出した。また、本研究では、実際に MeHg 処理マウス肝臓において、メチルドナーの量が減少することをメタボローム解析により示唆した。また、ホルムアルデヒド生成を伴う代謝経路 (choline 代謝、Met cycle) の酵素群が代償的に発現上昇していることも示した。上述のように、MeHg 処理によるホルムアルデヒド生成促進は、メチルドナーの消費を伴うものである。本研究では、対象を低分子のメチルドナーに限定した。生体内での脱メチル化反応は choline や Met などのアミノ酸代謝だけではない。近年、遺伝子の発現調節における、DNA メチル化やヒストンメチル化によるエピジェネティックな調節が注目されている。MeHg によるホルムアルデヒド生成は、MeHg によるミトコンドリア障害で生成が惹起される O_2 がメチルドナーと反応して引き起こされる化学的イベントと捉えられる。本研究の成果は、MeHg による多面的な毒性発現機構の解明に寄与する可能性がある。これらのことから、申請者は博士（薬学）の学位に値すると認める。