

氏 名(本 籍)	<sup>しんやしき</sup> 新屋敷 <sup>まさる</sup> 勝 (東 京 都)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 1,741 号
学位授与年月日	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	医 学 研 究 科
学 位 論 文 題 目	<b>Selective inhibition of the mouse brain Mn-SOD by methylmercury</b> (メチル水銀によるマウス脳 Mn-SOD の選択的阻害)
主 査	筑波大学教授 医学博士 村 上 正 孝
副 査	筑波大学教授 医学博士 草 刈 潤
副 査	筑波大学教授 理学博士 坂 内 四 郎
副 査	筑波大学教授 医学博士 三 澤 章 吾
副 査	筑波大学助教授 医学博士 山 下 衛

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

水銀を動物に暴露すると組織中脂質過酸化の上昇や抗酸化酵素系の低下が生じることから、本金属毒性のひとつとして“酸化ストレスの惹起”が提唱されている。しかし、従来の毒性学的研究は金属暴露時に観察される酸化ストレス指標の定量が中心で、分子レベルでの検討は未解決のまま残されてきた。そこで本研究では、メチル水銀によるスーパーオキシドジムターゼ分子種 (Cu, Zn-SOD および Mn-SOD) の変動を詳細に検討するため、インビボでの発現変動ならびに精製酵素を用いたインビトロでの直接的な阻害効果について検討した。

### (対象と方法)

ICR 系雄性マウス (7-8 週齢) に 10mg/kg の塩化メチル水銀 (MMC) を一回投与して、一定時間後に脳を採取し、総水銀濃度 (還元気化無炎原子吸光法) の変動ならびに SOD 分子種について活性 (アセチル化チトクロム c 法), mRNA 量 (ノーザンブロッティング) および酵素蛋白質量 (ウエスタンブロッティング) の変動を経時的に調べた。さらに各 SOD アイソザイムを精製して、これらを試験管内で MMC と反応させた後 1) 活性の変動, 2) 水銀の結合ならびに 3) 高次構造の変化を検討した。それぞれ、チトクロム c 法, 等電点電気泳動と放射光蛍光 X 線分析法を組み合わせた方法 (IEF-AGE & SR-XRF 法, 参考論文 2) および HPLC を用いた分子ふるいカラムにより分析を行った。なお, Cu, Zn-SOD の精製は我々の開発した ASME extraction により行った (参考論文 1)。

### (結果)

マウスに塩化メチル水銀 (MMC) を投与すると, ①脳内総水銀濃度は投与 2 日後に最大となり, 5 日後までその濃度が維持された。②酸化ストレスのマーカーである脳内 SH 基は, 二相性の減少傾向を示した。③そのような条件下で, Cu, Zn-SOD 活性は殆ど変動しないのに対し, Mn-SOD の活性は MMC 投与後 5 日目に対照群の約 60% まで減少した。④このような Mn-SOD の活性低下を反映する mRNA および酵素蛋白質量の変動は観察されなかった。⑤インビトロで各 SOD 分子種と MMC とを反応させると, Cu, Zn-SOD と比較して Mn-SOD の方が著しく阻害され, インビボでの結果をよく反映した。⑥その阻害効果はグルタチオンを前処置した場合やジメチル水銀では殆ど観察されなかった。⑦ IEF-AGE&SR-XRF 法により MMC は Mn-SOD のみに結合することが明

らかとなった。⑧さらに、分子ふるいカラムで分析した結果、MMC による Mn-SOD の酵素活性の低下は、その天然型分子の減少とよく一致していた。

#### (考察)

これまで重金属による SOD 活性の変動については報告されてきたが、今回の結果から MMC 投与により Mn-SOD 活性が選択的に低下することが初めて明らかとなった。その阻害は Mn-SOD の mRNA 発現および蛋白質合成の過程に起因するものではなく、MMC と Mn-SOD との結合の結果生じる、おそらく高次構造の変化に伴う天然型分子の減少によることが示された。酵素タンパクと MMC の結合様式については、SH 基が重要な役割を演じていることが予想された。したがって、分子種特異的な MMC の活性阻害には、Cu, Zn-SOD および Mn-SOD 間の水銀に対する反応性の高い遊離 SH 基の数の違いが関係するものと思われる。

脳は脂質やカテコールアミンのような酸化され易い物質に富むことから、酸化的ストレスに対して感受性の高い臓器である。一般に生体は、酸化ストレスを惹起するような異物が侵入した場合は、それに対する防御系を誘導することで応答することが考えられている。しかし MMC の場合は SOD 分子種の誘導は認められず、むしろ酵素活性の減少が確認された。それ故、酸素消費の主要な部位であるミトコンドリアに局在する Mn-SOD の活性低下が MMC によって引き起こされる酸化ストレスの主要因かもしれない。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

メチル水銀による Cu, Zn-SOD および Mn-SOD への作用を検討するため、メチル水銀投与によるインビボでの両酵素の発現変動とインビトロでの両酵素の精製酵素へのメチル水銀の阻害効果について検討している。分析方法には、ルーティンの方法とともに筆者らの開発した① Cu, Zn-SOD の精製法、②等電点電気泳動と放射光蛍光 X 線分析法を組み合わせた水銀化合物の分析法を意欲的に使用している。その結果、脳内総水銀濃度が一定に保持されている（投与後 2～5 日）条件下で、Cu, Zn-SOD は変動が認められないのに対し、Mn-SOD の活性は 60% まで減少した、その原因を探る。Mn-SOD の mRNA および酵素蛋白量の変動は認められなかったことから、Mn-SOD 活性の低下はメチル水銀の直接的な作用によることが示唆された。事実、精製酵素を用いたインビトロの実験でメチル水銀は Mn-SOD を著しく阻害し、分析により、メチル水銀が Mn-SOD と直接結合していることが明らかになった。その結合形態についても筆者は考察を試みている。メチル水銀の脳内毒性発現のメカニズムを、酵素分子レベルで詳細に検討した点で、重金属中毒学の進歩に寄与する、ユニークな論文と評価される。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。