

課題番号：1905

メチル水銀の脱メチル化機構における 食品中の水銀／セレンの バイोजェニックナノ粒子形成

千葉大学大学院薬学研究院
小椋康光（主任研究者）
国立医薬品食品衛生研究所
鈴木美成（分担研究者）



CHIBA
UNIVERSITY

令和3年度食品健康影響評価技術研究成果発表会 2022.03.02



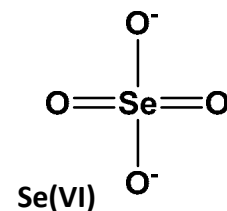
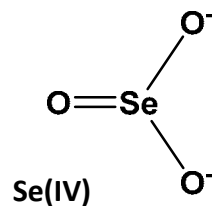
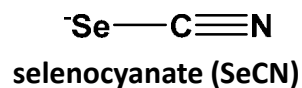
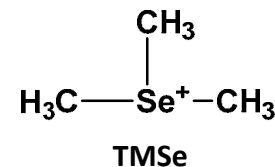
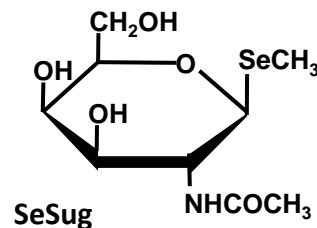
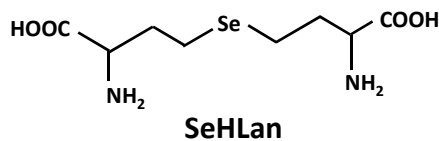
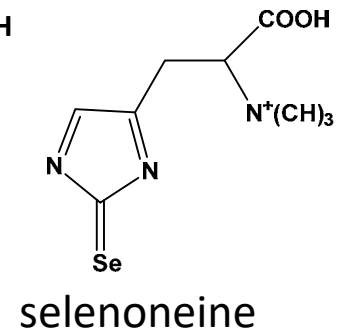
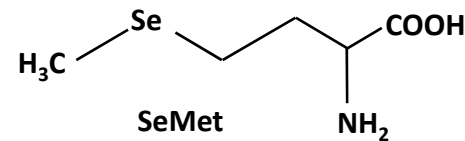
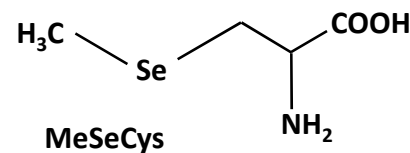
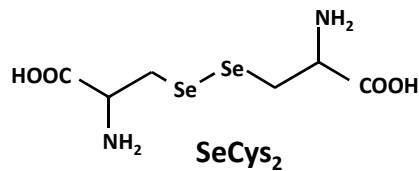
はじめに：用語の説明

水銀

- ユニークな物理的及び化学的な性質を有し、産業上の有用性が高い。人為的・非人為的起源の水銀が環境中に存在している。
- 炭素と直接結合できる（有機金属結合を形成できる）ため、様々な化学形態が存在する。天然には、無機水銀化合物、有機水銀化合物（メチル水銀など）及び金属水銀として主に存在する。
- 毒性などの生体影響は、その化学形態に依存している。
- 日本人の水銀摂取の80%以上が魚介類由来となっている。
- 平均的な日本人の水銀摂取量は健康への影響が懸念されるようなレベルではない。

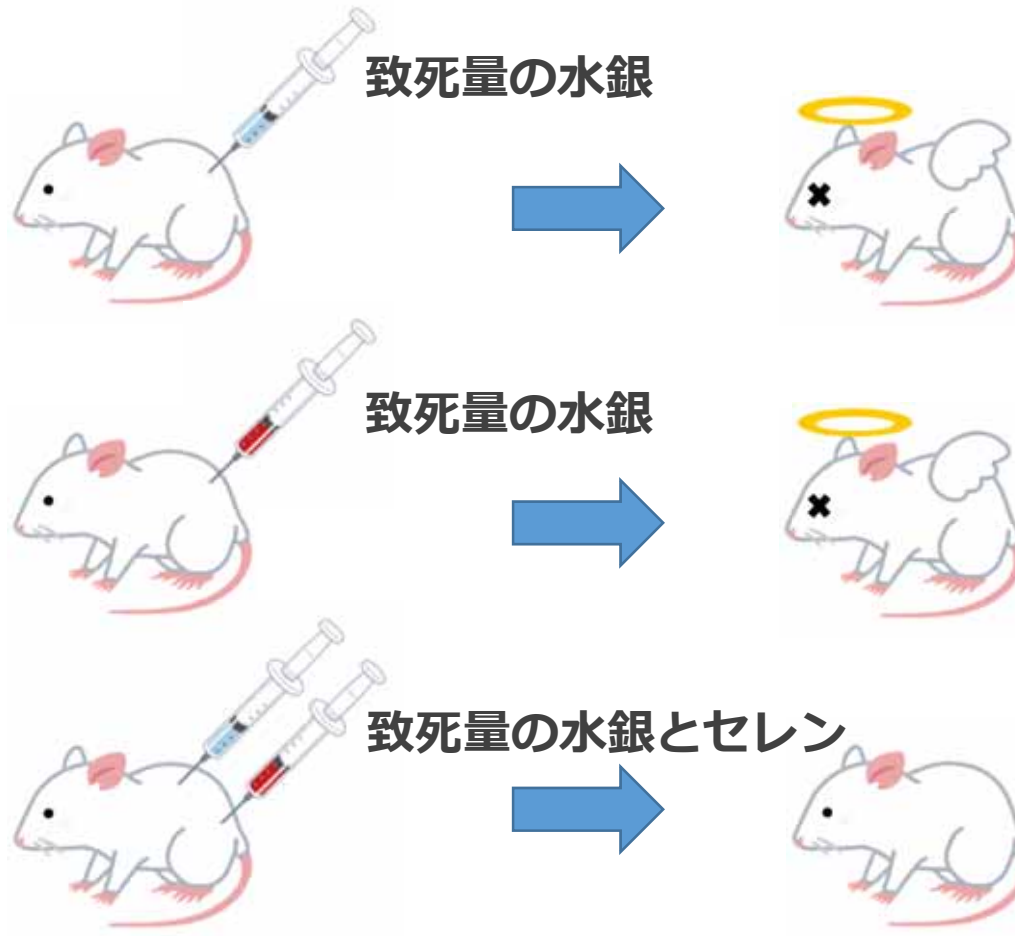
セレン

- 周期表上で酸素、硫黄の下に位置する元素
- 動物にとって健康の維持に必要な必須ミネラルの一つであるが、極めて毒性も高い。
- ヒトでは25種類のセレンタンパク質が知られている。
- 天然には、様々な化学形態のセレンが存在する。
- 海棲生物はセレン含量が高い。



セレン

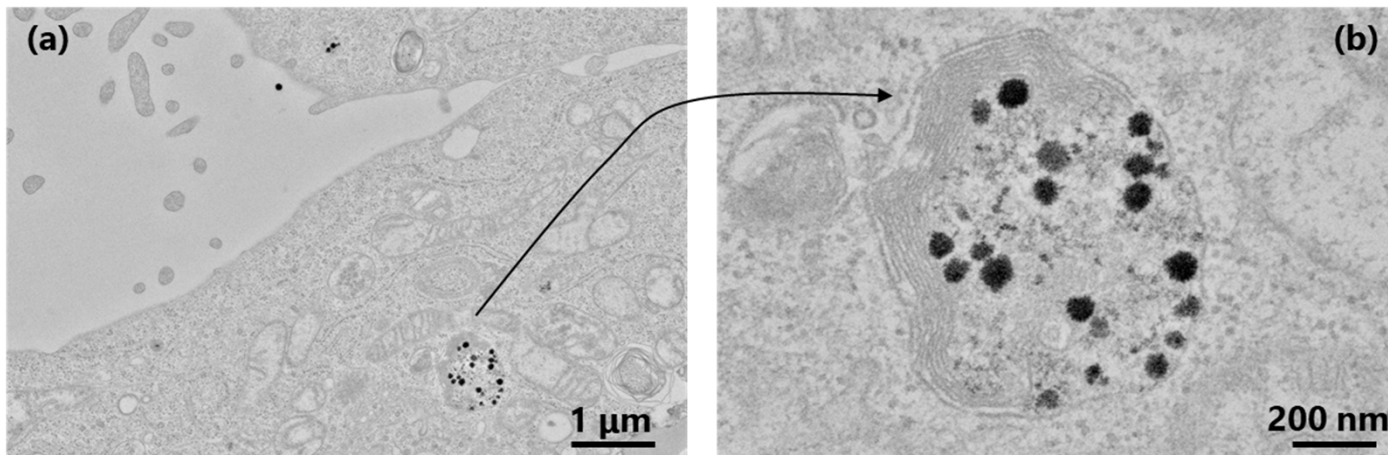
➤ セレンは、生体内で水銀に対して拮抗作用を有する。



この時、生体では何が
起こっているのか

バイオジェニックナノ粒子

- 生体内で生成するナノサイズの粒子
- 水銀及びセレンの拮抗作用は、水銀／セレンバイオジェニックナノ粒子の形成による。
- 水銀／セレンバイオジェニックナノ粒子の形成は、被食者にとっては解毒
- **被食者で形成された水銀／セレンバイオジェニックナノ粒子は捕食者にどのような影響を与えるか？**



塩化第二水銀及び亜セレン酸ナトリウムをHepG2細胞に同時曝露した後の透過型電子顕微鏡像

本研究の主な成果

- I. 魚の中の水銀／セレンのバイオジェニックナノ粒子の検出
方法の確立とリスク評価

- II. 水銀／セレンのナノ粒子の体内動態

- III. メチル水銀の脱メチル化の機構

I . 魚の中の水銀／セレンのバイオジェニックナノ粒子の 検出方法の確立とリスク評価

➤ 海棲哺乳類はHgを高濃度に蓄積するものの、毒性影響がない
Hg濃度高い個体ではMeHgの割合が減少
Hg:Seモル比が1 : 1に近づくことから、SeによるHg解毒機構

➤ 近年のX線分析の結果

HgとSeの局在が一致し、マイクロメートルサイズの粒子を形成
X線吸収微細構造分析より、HgがHgSeと鉍物化した状態で存在

➤ 近年のX線分析と単一粒子(sp)-ICP-MSを用いた結果

粒子径がナノメートルサイズからマイクロメートルサイズまで成長
したものが、pilot whaleの肝臓及び脳中で検出

➤ 魚介類でもMeHgの割合が低い個体が報告

脱メチル化されたHgが、HgSe-NPsとして存在する可能性

食品中にHgSe-NPsが存在するのか？

- NPの大きさや数濃度は？
- 食品からの曝露量はどの程度か？
- HgSe-NPは毒性があるのか？

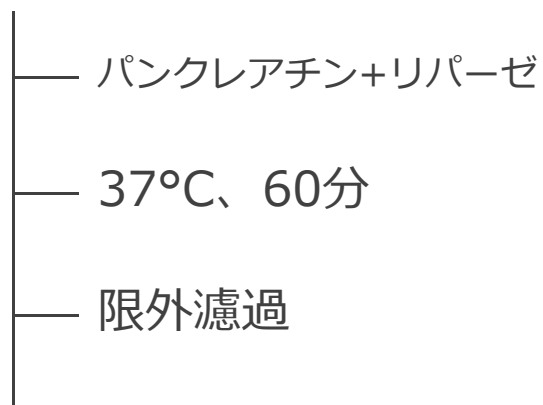
方法

まぐろ・かじき: 44試料
さけ・ます: 10試料
あじ・いわし類: 4試料
たい・かれい類: 2試料
いか・たこ類: 11試料
えび・かに類: 3試料
貝類: 3試料
その他の生魚: 13試料

HgSe-BgNPsの分析

前処理法

試料



ルーティン分析

総水銀: 加熱気化原子吸光光度法
メチル水銀: TMAH抽出後、LC-ICP-MS法
セレン: マイクロ波分解後、ICP-MS法

sp-ICP-MS法 (高時間分解型ICP-MS)

- ✓ HgSe-NPsの粒子質量濃度 (Hgとして)
- ✓ 粒子数濃度
- ✓ 単一粒子質量 (Hgとして)
を測定した。

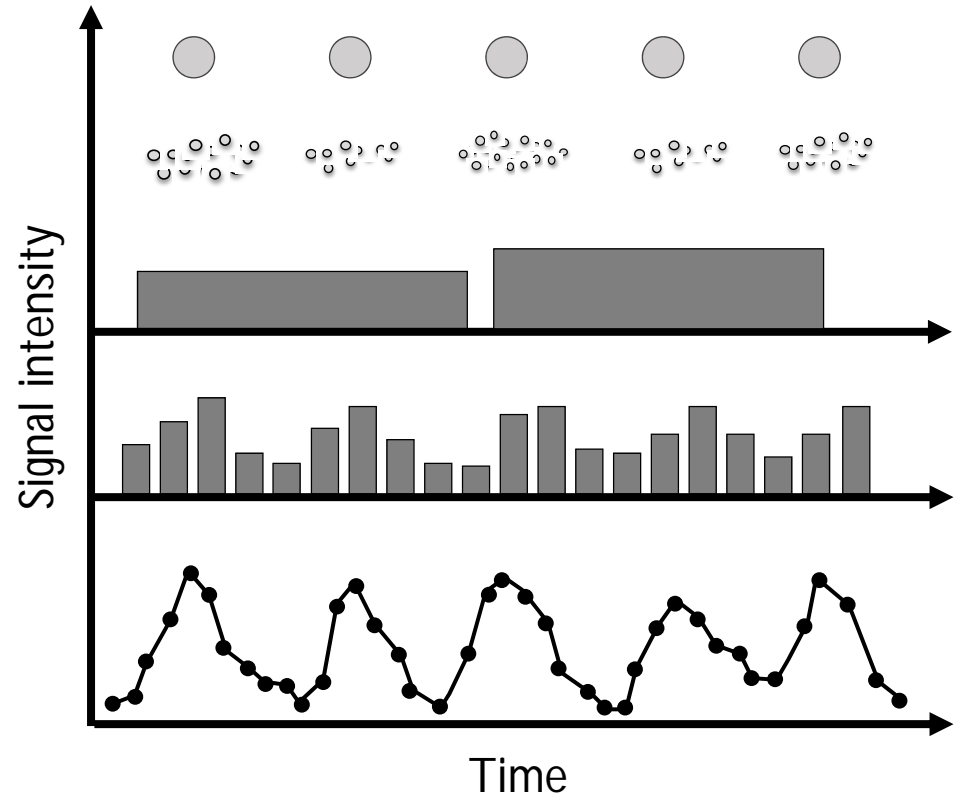
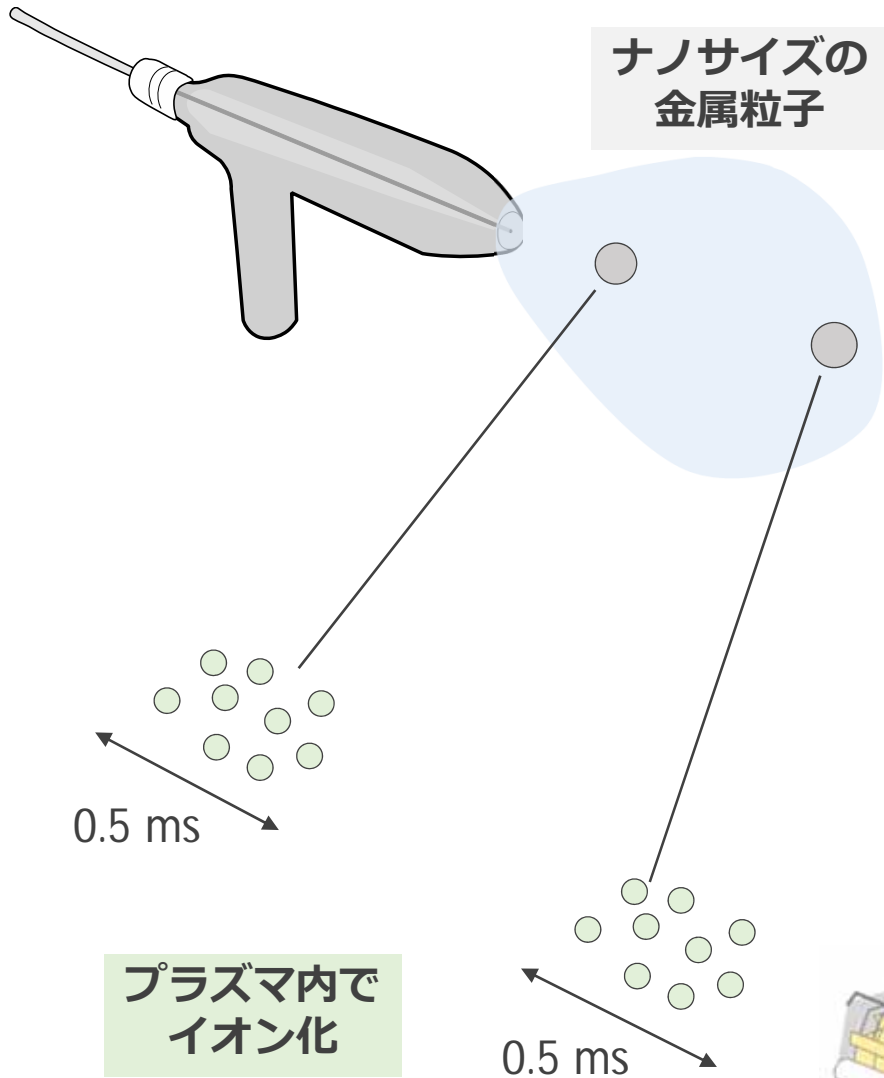
* sp-ICP-MSでの試料輸送効率、粒径60 nmの銀ナノ粒子を用いて測定ごとに算出した値を用いた。

Hg測定可能



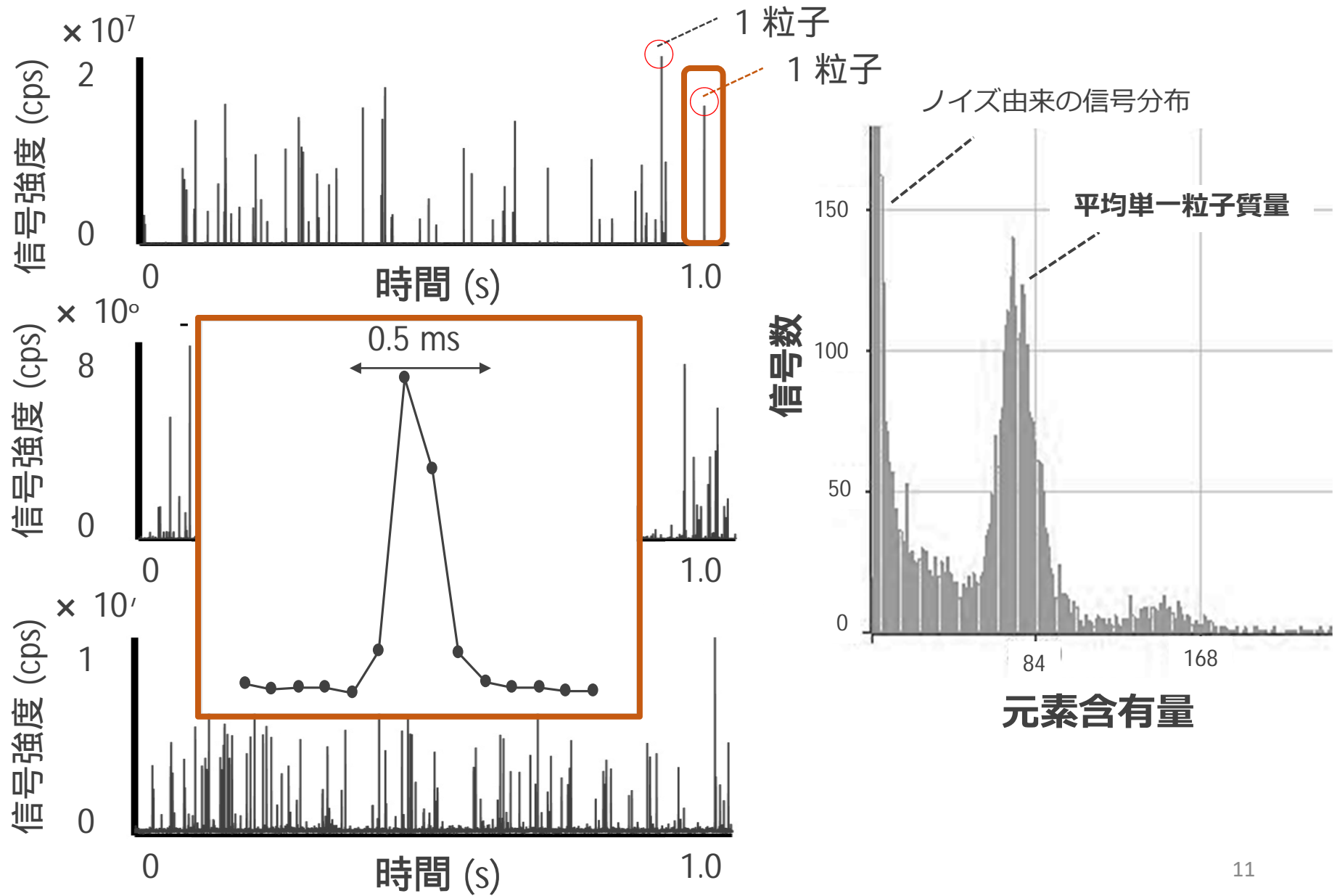
Se測定困難

高時間分解型ICP-MSとは

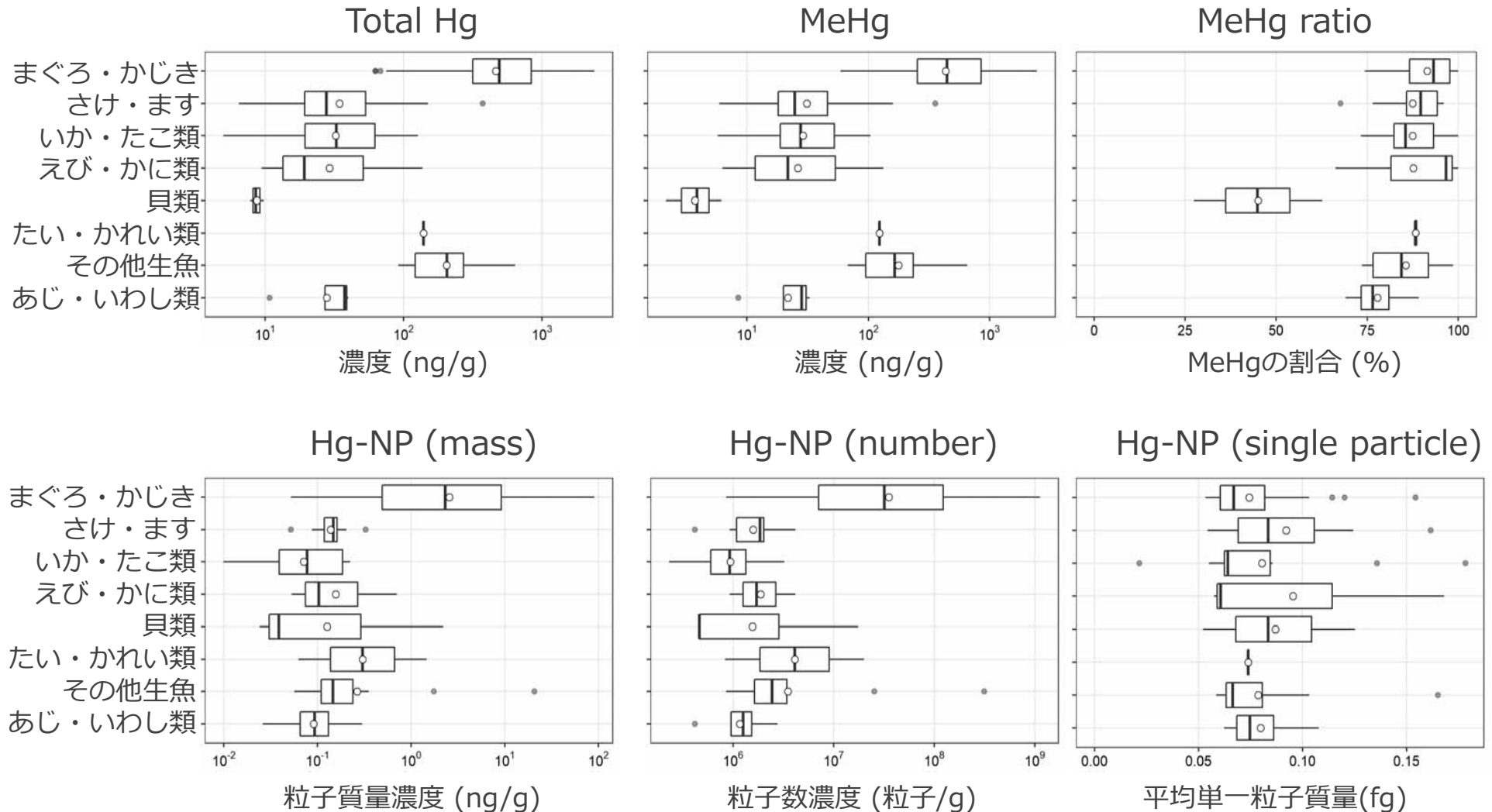


信号の積分時間
従来型 : 100 ms
高時間分解型 : 0.1 ms

高時間分解型ICP-MSによる1粒子金属分析のデータ解析の概念図



総Hg, MeHg, Hg-NPsの魚種間比較



総水銀濃度・メチル水銀濃度の高い魚種で、Hg-NPの質量濃度・数濃度ともに高い傾向にあった。(まぐろ・かじきは、12.0 ng/gおよび 1.78×10^8 particle/g)
 単一粒子の平均質量には魚種間の相違はほとんどなかった。(0.079 ± 0.028 fg)
 Hg-NPの生成は、広い魚種に共通したメカニズムであると示唆された。

生魚からのT-Hg, MeHg, Hg-NP曝露量の推定

	喫食量* (g/day)	濃度 (ng/g)			曝露量 (µg/person/day)		
		T-Hg	MeHg	Hg-NP	T-Hg	MeHg	Hg-NP
あじ, いわし類	7.5	31.8	24.5	0.13	0.24	0.18	0.001
さけ, ます	5.4	73.5	70.0	0.15	0.40	0.38	0.001
たい, かれい類	4.5	140	124	0.76	0.63	0.56	0.003
まぐろ, かじき類	3.8	656	631	12.0	2.5	2.4	0.046
その他の生魚	6.8	241	220	1.87	1.6	1.5	0.013
貝類	2.8	8.75	4.05	0.76	0.02	0.01	0.002
いか, たこ類	3.0	45.0	37.6	0.11	0.13	0.11	0.000 ₃
えび, かに類	3.5	55.4	53.6	0.29	0.19	0.19	0.001
総和	-	-	-	-	5.8	5.3	0.067

* 2019年の国民健康栄養調査の平均値

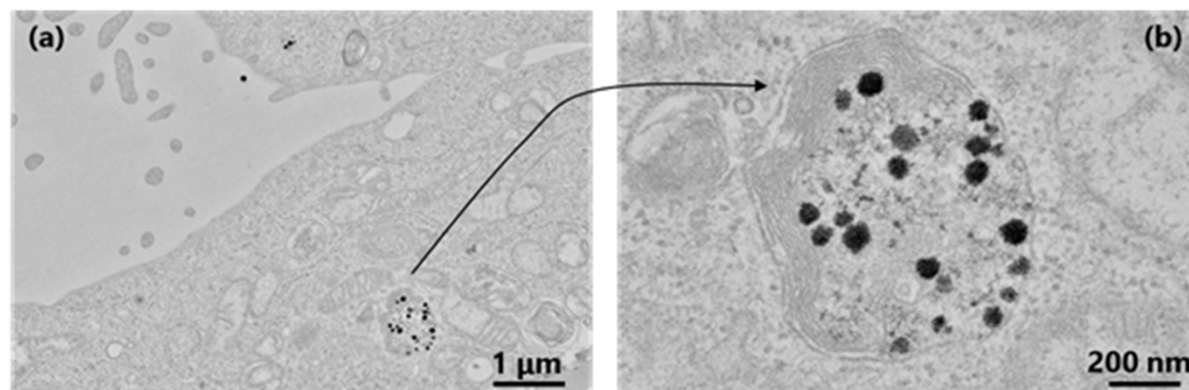
国衛研で行っているトータルダイエットスタディーの結果 [T-Hg: 5.67 (2019), 6.05 (2020); MeHg: 4.62 (2019), 4.29 (2020)]と同程度のT-Hg, MeHgの曝露量と推定された。

リスク評価

総水銀 :	5.8 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$
メチル水銀 :	5.3 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$
Hg-NPs :	0.067 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$
	9.6×10^8 粒子/人/日
	総水銀の1.2%相当
	メチル水銀の1.3%相当

平均粒子質量 : 0.079 ± 0.028 fg

* 現在のsp-ICP-MSでは0.043 fg以下の粒子は測定できない



培養細胞中で亜セレン酸ナトリウム及び塩化第二水銀からHgSe-NPsを生成させた後の透過型電子顕微鏡 (TEM) 写真

粒子径が10 nm以下の1次粒子がリソソーム内で100 nm程度の2次粒子を形成している。

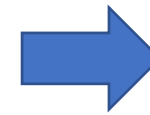
II. 水銀／セレンのナノ粒子の体内動態

実験

投与試料 : HgSe-NPs,
selenite or/and MeHg
投与量 : 10 μg Se/day
25 μg Hg/day
投与期間 : 二日間



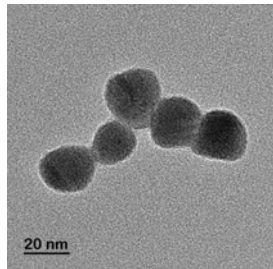
セレン欠乏ラット



サンプル回収 :
血清、臓器、尿、
糞便



解析

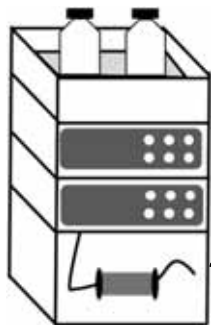
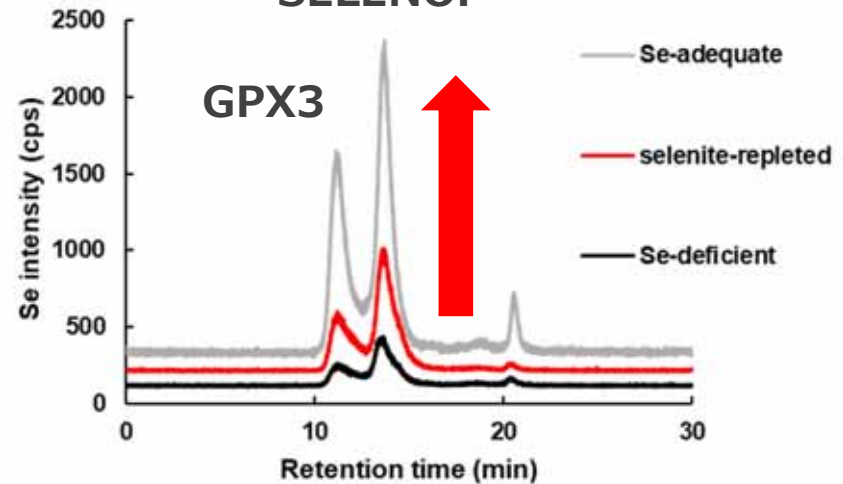


Nanoparticle size (\varnothing): 23 ± 2 nm

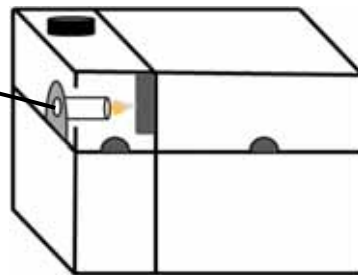
Hg/Se molar ratio: 1.04 ± 0.03

セレンタンパク質の検出

SELENOP



HPLC

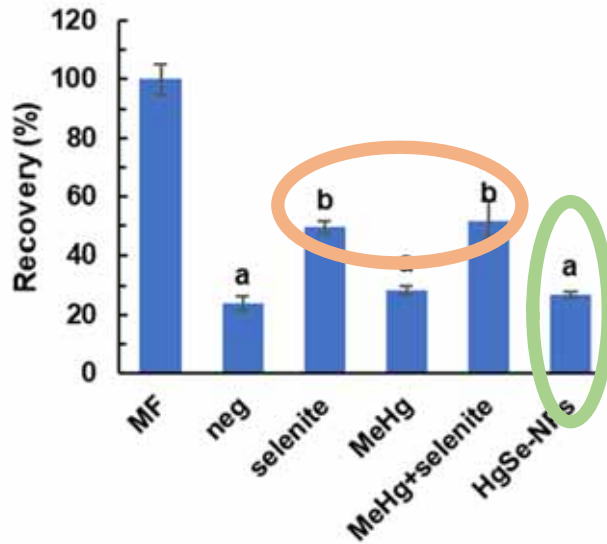


ICP-MS

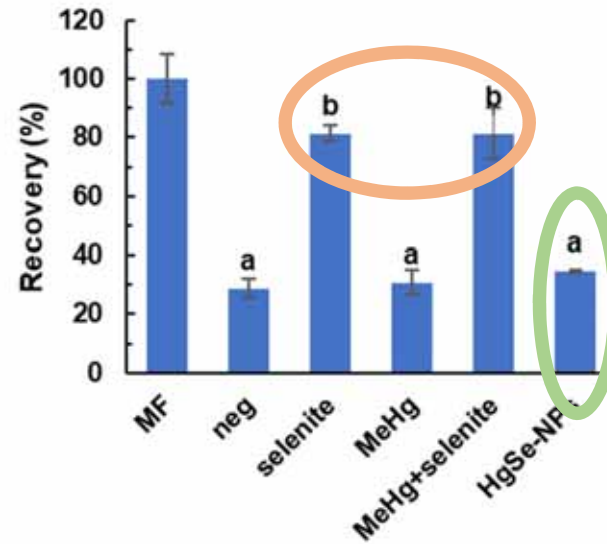
セレン欠乏状態からの回復評価

血清セレンタンパク質への取り込み

(a) GPX3



(b) SELENOP

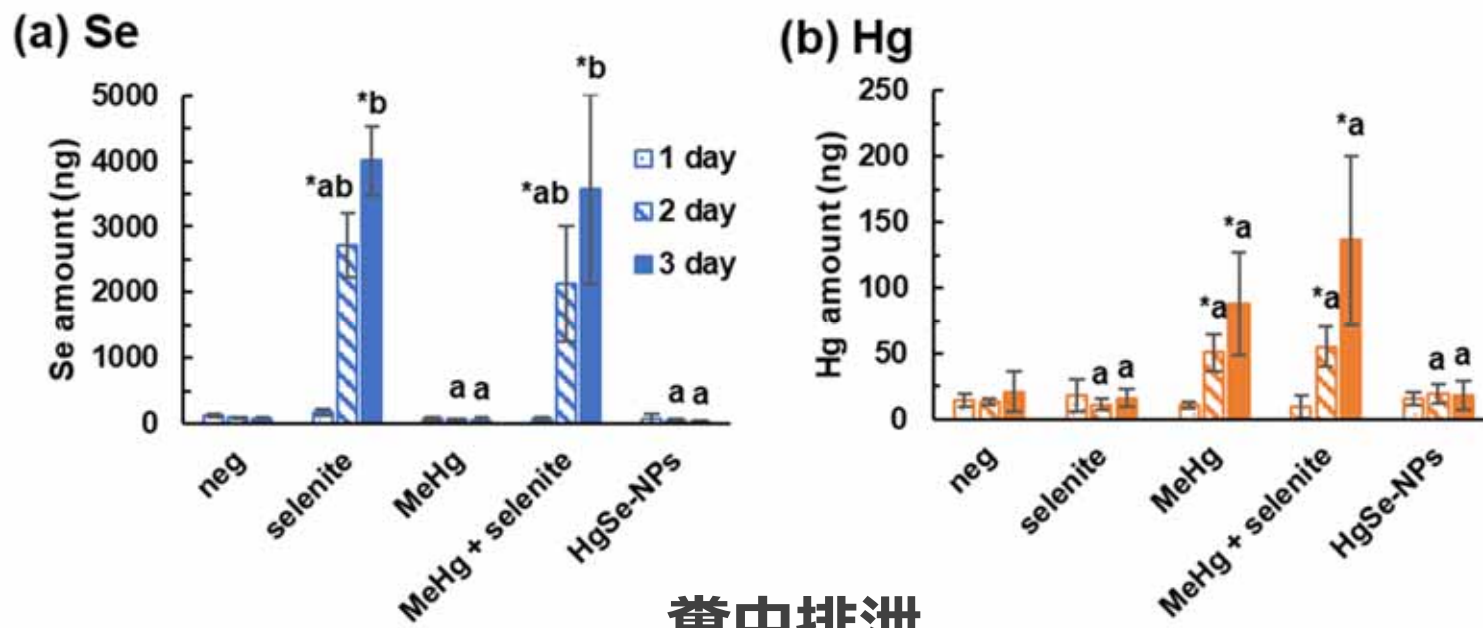


水銀の同時投与はセレンの栄養的価値に影響なし

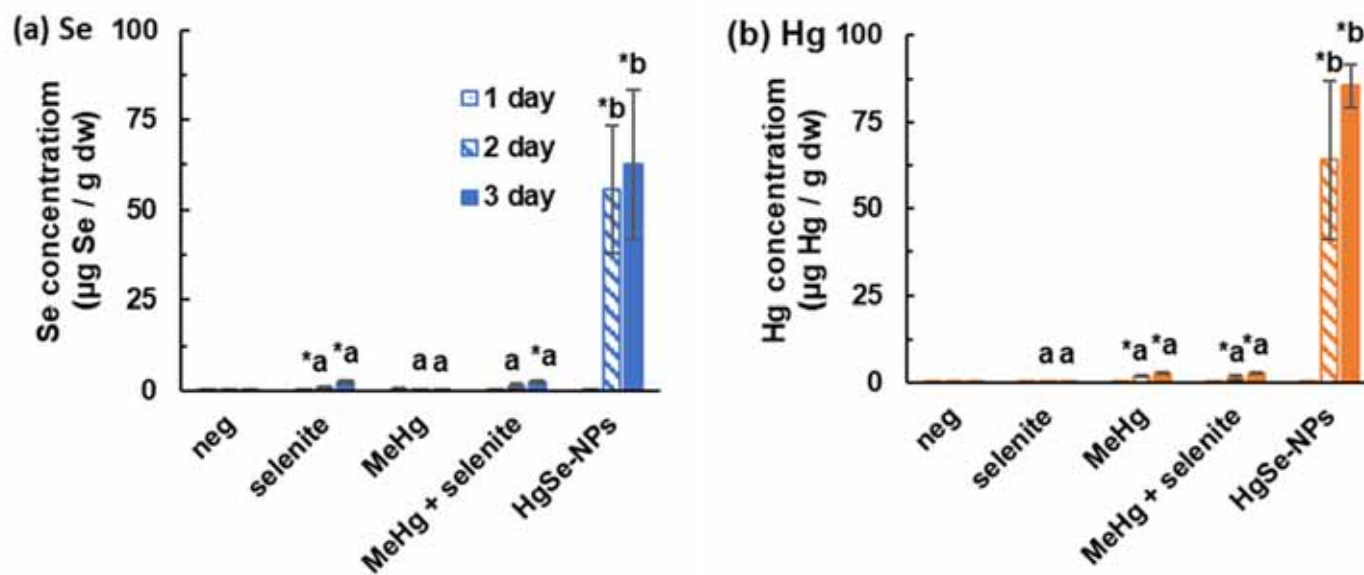
HgSe-NPsはセレン源として利用されない

HgSe-NPsは分解せず、セレン (=水銀) を放出しない

尿中排泄



糞中排泄



HgSe-NPsは、ほとんど吸収されず、糞中へ排泄された。

小括

- 平均粒子径20 nm程度の化学合成した水銀／セレンナノ粒子を経口投与した時、それらのナノ粒子が体内に吸収されることはほとんど観察されなかった。
- 被食者で形成された水銀／セレンバイオジェニックナノ粒子についても、捕食者に影響を与えることを示唆するデータは得られなかった。

Ⅲ. メチル水銀の脱メチル化の機構

➤ バイオインフォマティクス (BLAST)によるバクテリアのメチル水銀脱メチル化酵素MerB相同遺伝子の検索

➡ ほ乳類でMerBに相当する遺伝子は見つからなかった。

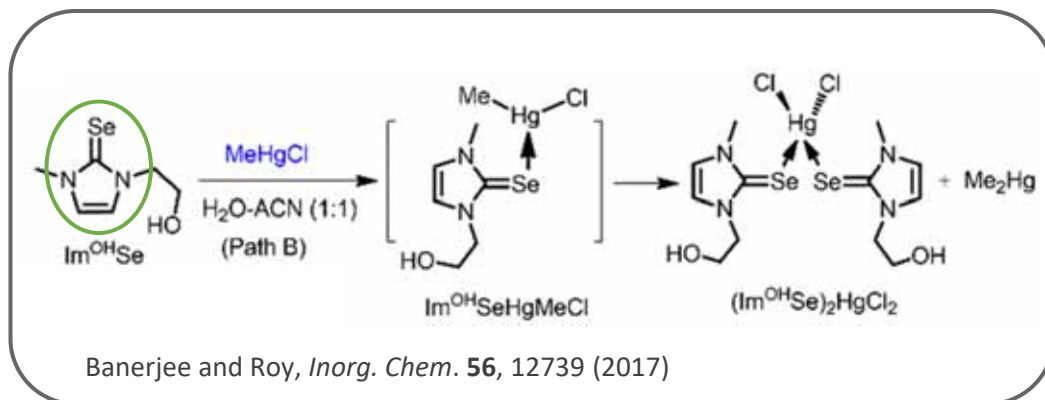
➤ 実験動物の臓器ホモジネートからのメチル水銀脱メチル化酵素の精製

➡ そもそも、*in vitro*における反応効率が数%程度しかない。

Hirayama and Yasutake, J. Health Sci. **45**, 24 (1999)
Uchikawa et al., J. Toxicol. Sci. **41**, 479 (2016)

イミダゾールセロン骨格を持つセレン化合物がメチル水銀の脱メチル化を引き起こすことが報告されている。

Palmer and Parkin, J. Am. Chem. Soc. **137**, 4503 (2015)
Banerjee and Roy, Inorg. Chem. **56**, 12739 (2017)



セレノネイン

イミダゾールセロン骨格を持つ天然アミノ酸

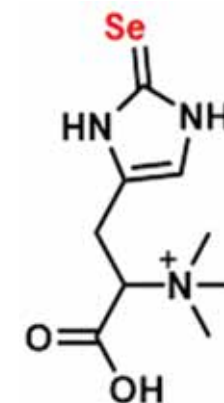
海棲生物に多く蓄積

(血中、筋肉、肝臓など)

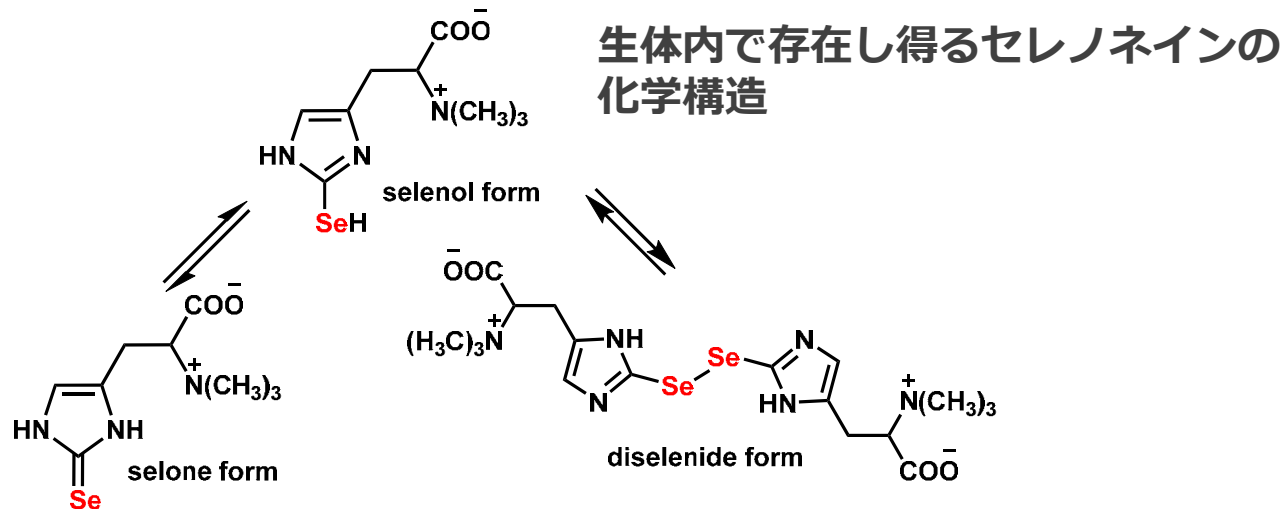


Yamashita and Yamashita, J. Biol. Chem. **285**, 18134 (2010)

Anan et al., J. Anal. At. Spectrom. **26**, 80 (2011)



selenoneine

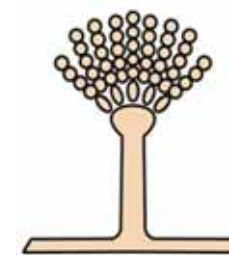


セレノネインがメチル水銀の脱メチル化に寄与するのか？

セレノネインの化学合成は成功していない。

(報告はあるが、ラセミ体となる。)

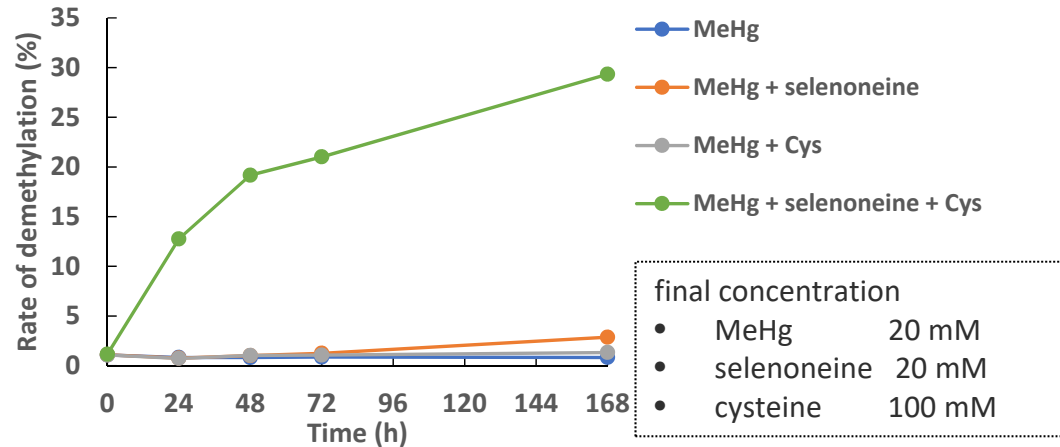
→遺伝子改変麹菌から抽出したセレノネインを使用



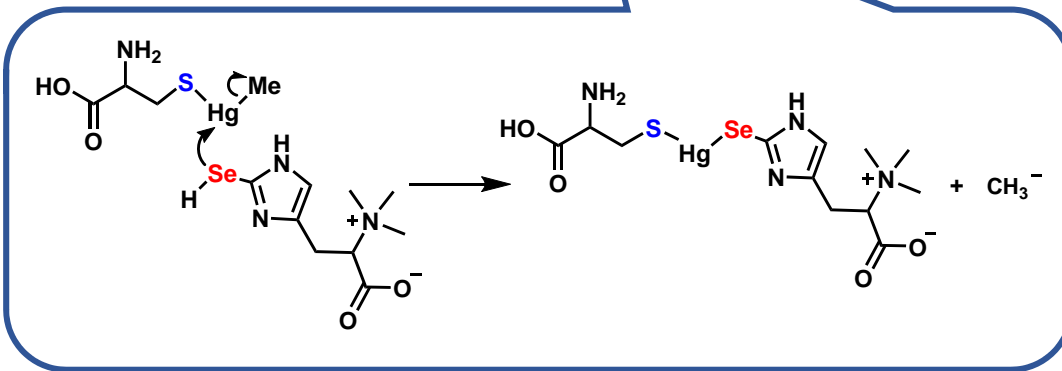
遺伝子改変麹菌
(*Aspergillus sojae*)

MeHgとセレノネインの反応 (*in vitro*)

MeHgの脱メチル化割合の経時変化

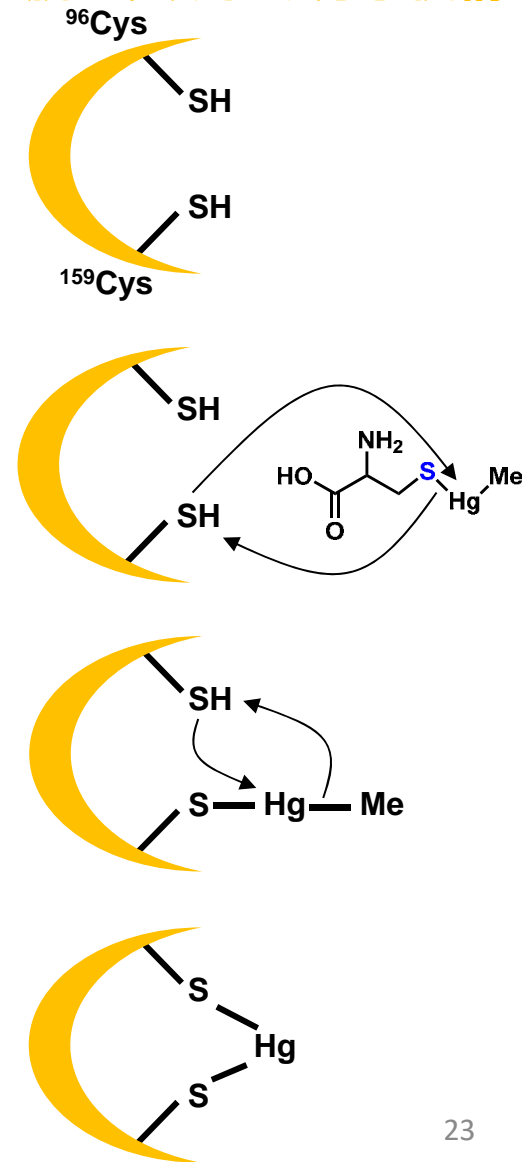


効率的に脱メチル化が進行



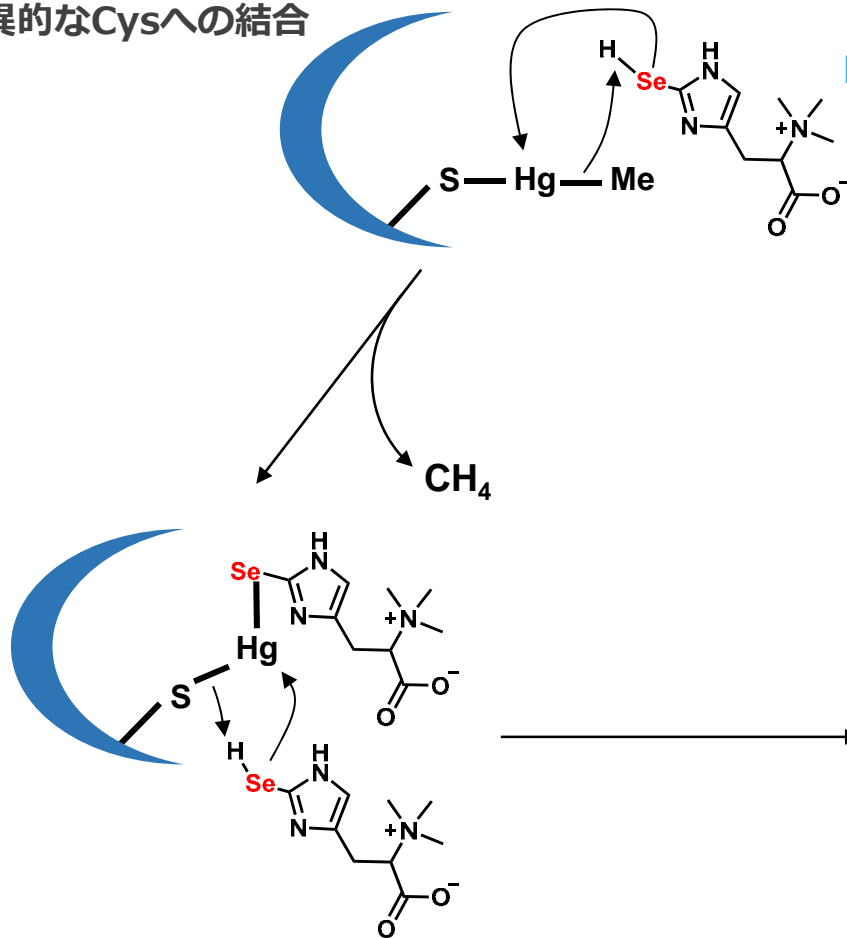
予想されるセレノネインによるMeHgの脱メチル化機構

MerBによるMeHgの脱メチル化の分子機構



想定されるセレノネインによるMeHgの脱メチル化の分子機構

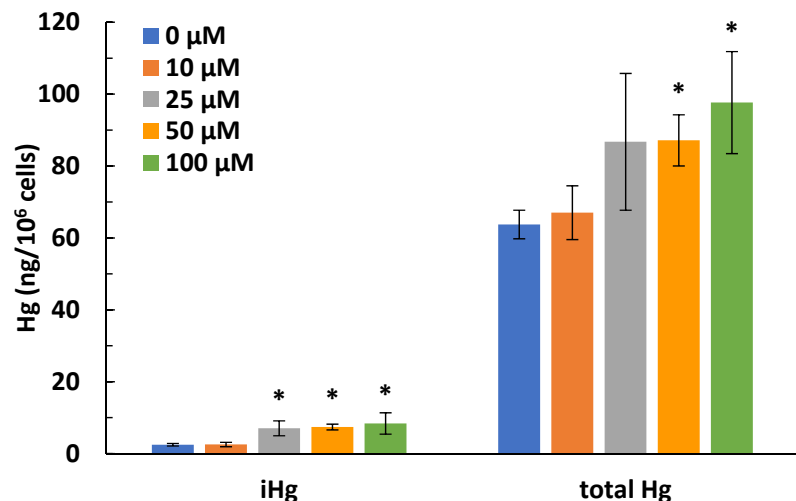
- A. メチル水銀脱アルキル化酵素
あるいは
- B. 非特異的なCysへの結合



A. 脱メチル化のための特異的なMeHg結合タンパク質（酵素）があるのか。
→セレノネインは補因子として機能

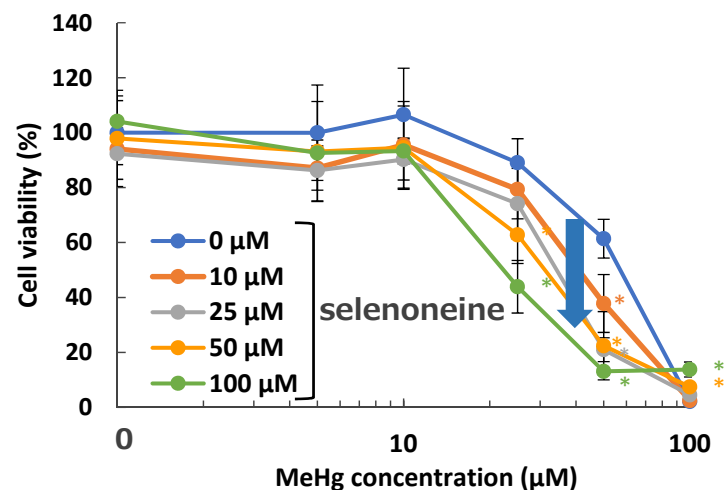
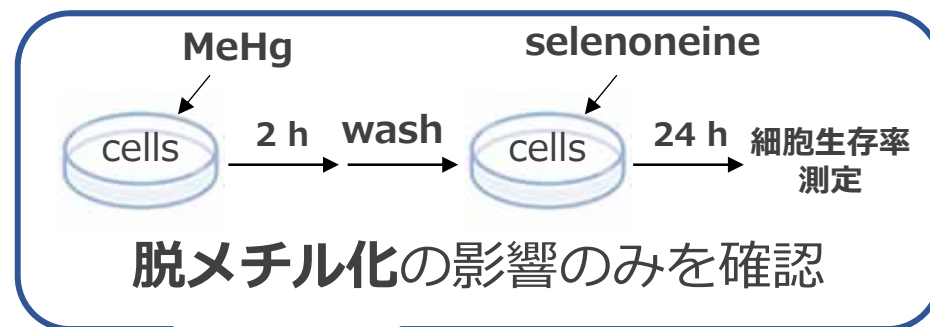
B. セレノネインの反応性の高さのみで反応が進行するのか。

細胞内水銀形態分析



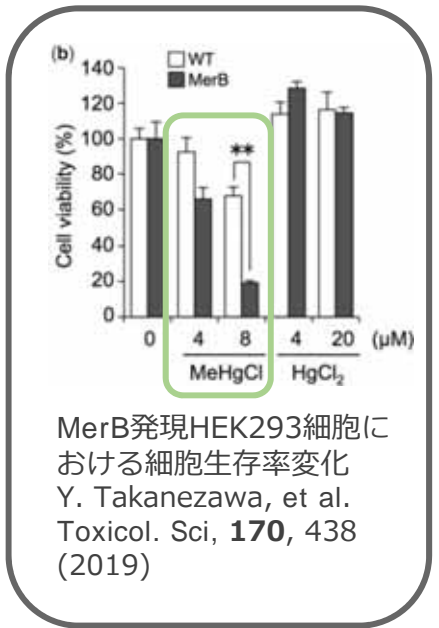
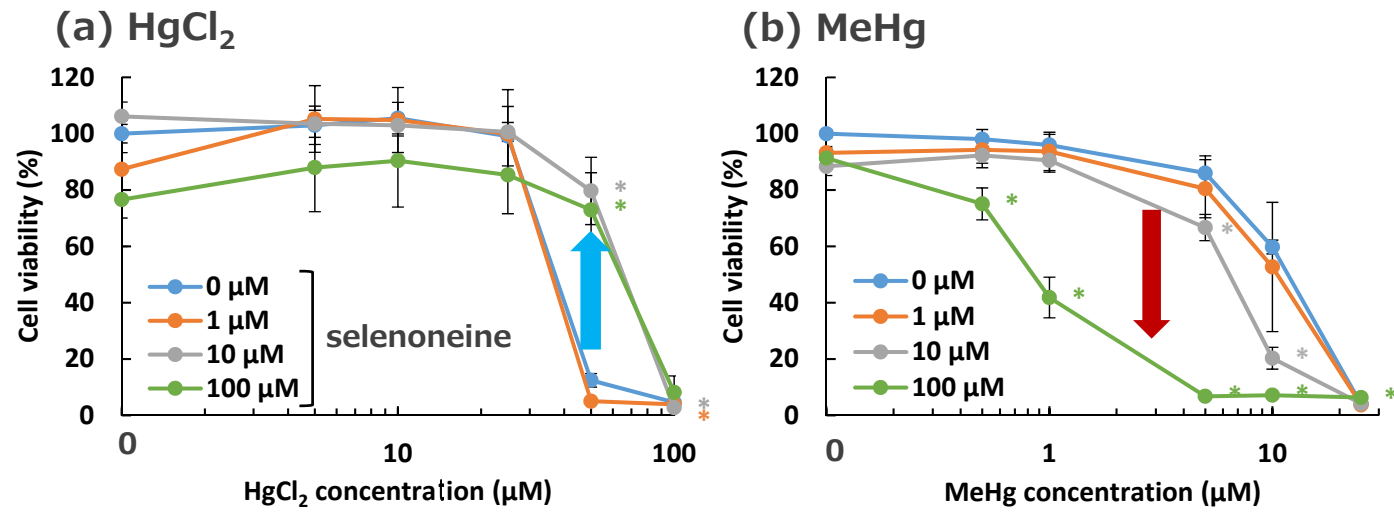
セレノネインとメチル水銀 (5 μM) 共曝露後の細胞内水銀量 (*p<0.05, vs 0 μM セレノネイン)

- 細胞内iHg量の増加
→ 細胞内で脱メチル化促進
- 細胞内総Hg量の増加
→ HgSe-BgNPsの生成が促進？



MeHgによる細胞毒性に与えるセレノネインの影響

無機水銀及びMeHgの細胞毒性に与えるセレノネイン影響



MerB発現HEK293細胞における細胞生存率変化
Y. Takanezawa, et al.
Toxicol. Sci, **170**, 438 (2019)

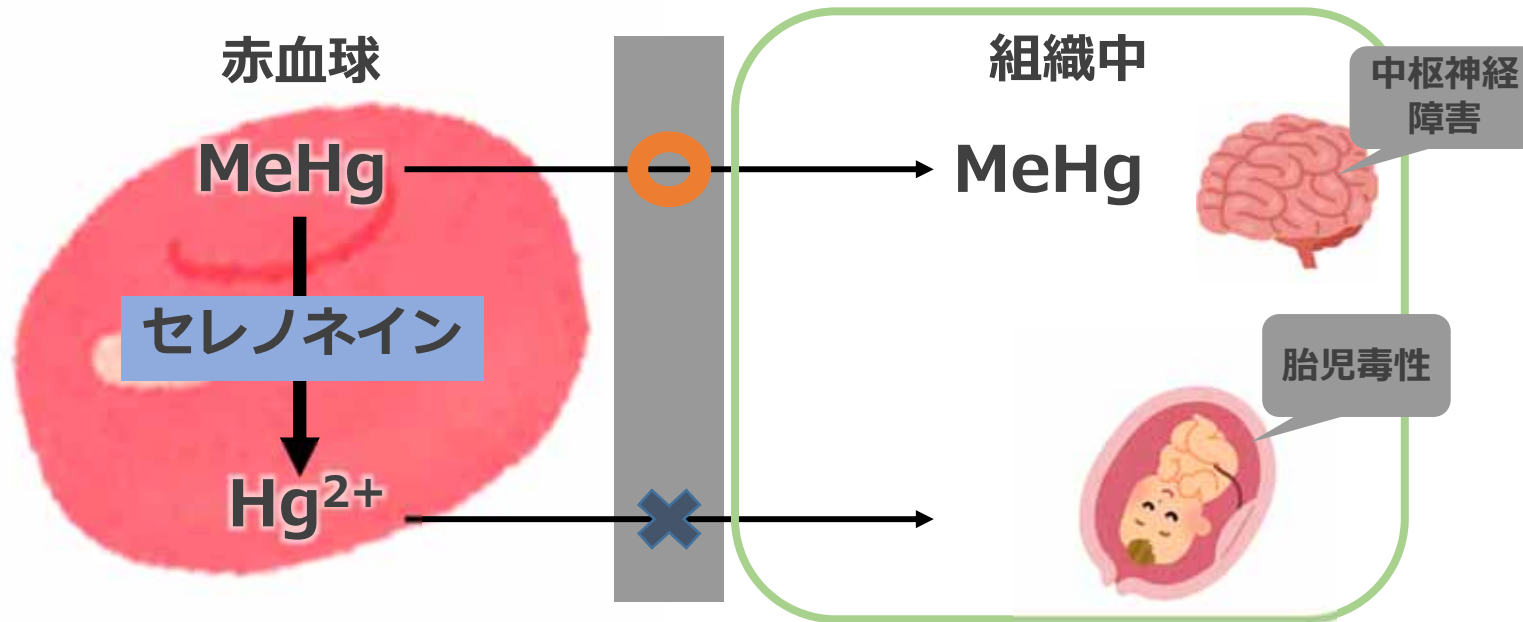
水銀化合物の細胞毒性

- **HgCl₂共曝露**
細胞生存率**上昇** ➔ セレノネインの**抗酸化作用**で
HgCl₂による**酸化ストレス抑制**
- **MeHg共曝露**
細胞生存率**低下** ➔ **MeHgの脱メチル化は細胞毒性を
上昇させる？**

MerBを発現させても、細胞毒性は上がる。

- **毒性**
Hg²⁺ > MeHg
- **組織移行性**
Hg²⁺ < MeHg

小括：in vivoにおけるMeHgとセレノネインの相互作用



クロマグロ赤血球中の
セレノネイン濃度
50 mg Se/kg

血液中でセレノネインによる脱メチル化

組織移行性の低下

個体レベルで水銀毒性軽減の可能性

まとめ

- 魚介類中に存在するHgSe-BgNPsは、その存在量や経口摂取後の体内動態から考えて、直ちにリスクとなり得ることはないと想定された。
- メチル水銀の脱メチル化には、海棲生物に多く存在するセレノネインが関与していることが示唆された。
- 脱メチル化の過程が、HgSe-BgNPsの生成には必要であることから、セレノネインの摂取とメチル水銀の摂取の関係を今後さらに検討していくことが必要であると考えられた。