

グルタチオンと微量金属の結合能 —水銀分析への応用—

島山 英子, 目黒 熙

(東北福祉大・食品衛生研)

Determination of Heavy Metal Ions Using Glutathion (GSH) Fixation

Eiko Hatakeyama, Hiroshi Meguro

Laboratory of Food Hygiene, Tohoku Fukushi University

A new method was developed to determine heavy metal ions taking advantage of the selective ion fixations. The principle is to measure the decrease of GSH by the fixation. GSH were measured by NAM fluorometry in the concentration range between 10^{-9} ~ 10^{-12} mol/ml. The decrease of the fluorescence was proportional to the metal ion concentrations. The selectivities of the ions were controlled by EDTA, Cl^- , pH and ion strength. Hg^+ , Hg^{2+} and CH_3Hg were selectively determined. The other ions were completely masked by the EDTA solution.

還元型グルタチオン (GSH) は細胞内外の酸化還元状態を制御するとともに、各種の親電子化合物の毒性から生体高分子や細胞を保護する役割を果たす。

金属と GSH の相互作用について生化学や生理学の分野において研究がなされ、GSH 代謝輸送と金属の体内動向について平山らにより報じられている¹⁾。

各種金属は GSH と異なる反応性を有し、このことが生体内での GSH との関係を大きく左右しているものと考えられる。GSH と種々の金属の結合部位は GSH のカルボキシル基、アミノ基、SH 基、ペプチド結合などであるが²⁾、無機水銀やメチル水銀は SH 基が主であり、結合定数は他の金属と比較し数倍大きいとされる³⁾。

一方、微量金属の形態や状態の違いは生体に対し異なった影響を及ぼすことが明らかにされており⁴⁾、金属の形態分析、状態分析の方法論の確立が必要となる。しかし、現在多用されている手法には特殊な装置や高度な分析技術を要する点から、迅速かつ正確な形態分析、状態分析の手法の開発が期待されている。

本研究においては、高感度での検出が期待できる蛍光法により、生体内で GSH と高い親和性をもつ金属のみを選択的に、かつ簡易で迅速な手法により定量することを目的とし、その条件を検討した。

実験方法

試薬：無機金属イオンとして、 Hg^{+} , Li^{+} , Ag^{+} , Pb^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} および Al^{3+} は関東化学製の特級試薬を用いた。メチル水銀は和光純薬工業製の特級を用いた。SH 蛍光試薬 N-(9-アクリジニル) マレイミド (略称 NAM : Fig. 1) は関東化学製を、GSH はシグマ社の生化学用を用いた。他の試薬はすべて関東化学製の特級試薬であった。

装置：蛍光光度計は日立 204A (スリット幅10nm, 光源：キセノンランプ, 分析用セル：10×10×44mm の石英セル) を用いた。

NAM 法：試薬調製ならびに反応は既報⁵⁻⁷⁾ に準じて行った。

金属イオンと GSH の結合能の検討：Fig. 2 に示したとおり、金属イオンと GSH の結合前の GSH 定量値 ($n + \alpha$) と結合後の GSH 量 (α) を NAM 法によって求め、その差から GSH と結合した金属イオン量を求めた。エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) の SH 基保護作用についても同時に検討を行った。

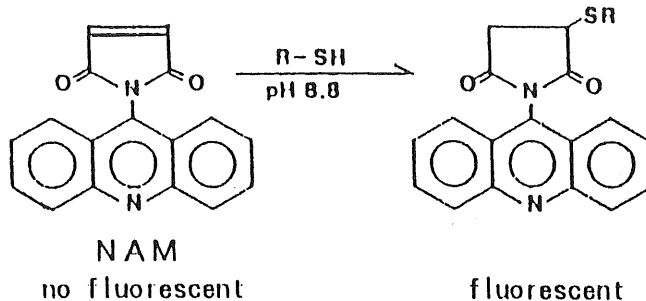


Fig. 1 Reaction Mechanism of Thiols with NAM

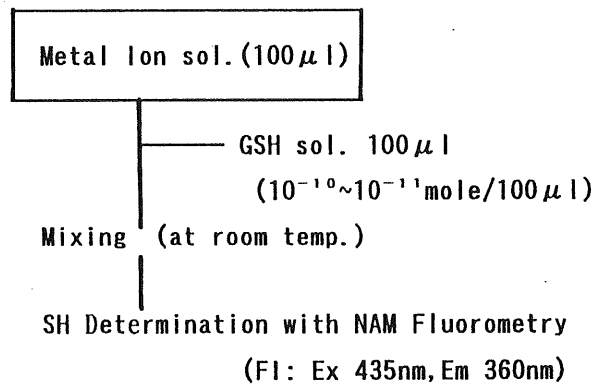
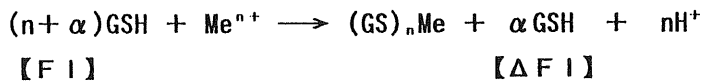


Fig. 2 Analytical Procedure of Metal using GSH-binding

GSHの金属結合能に及ぼす諸因子の検討：GSHと金属イオンとの結合能に及ぼす結合反応時のpH、反応時間、反応温度、およびイオン強度の影響について検討を行った。

Hg⁺、Hg²⁺ およびメチル水銀とGSHの結合特性に関する検討：各種水銀溶液とGSHの反応が1：1当量比で進む反応条件を調べ、水銀化合物の分別定量が可能か否かを検討した。

結果と考察

NAM法によるGSHの定量において、10⁸~10⁻¹²mol/mlの範囲で良好な検量線が得られた。

金属イオンとGSHの結合能について検討した結果、1価、2価の水銀イオンおよび銅イオンとGSHには顕著な結合性が認められた (Table 1)。しかし、0.02M EDTA存在下では銅イオンはGSHと結合せず、EDTAのSH基に対する保護作用が確認された。水銀イオンではこの保護作用はほとんど認められず、GSHとの強い結合能が確認された。

GSHと金属の結合能に及ぼすpHの影響を検討した結果、EDTA存在下では反応時のpHは結合能に影響を及ぼさないことが分かった。

水銀溶液の諸条件下での結合特性について検討した。

ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 中では無機水銀イオンとの結合能が顕著に増加し、SH基の検出がほとんど認められなくなった。さらに、0.02M EDTA存在下、塩素イオンを多量に共存させると2価の水銀イオンのみが著しく結合能を増し、1価のものと分別する際の特徴が得られた。

また、EDTA存在下、酢酸緩衝液 (pH 4.5) を用いると、メチル水銀との結合能の顕著な増加がみられ、無機水銀イオンとの分別が可能であることが分かった。

水銀溶液の場合は、結合能の大小にかかわらず、反応後10秒から30秒でSH基と結合した。

Table 1. Binding Capacity of Metal with GSH
Recovery of GSH (%)

Metal	in DW	in 0.02 MEDTA sol.
GSH only	100	100
Hg ⁺	77.9	77.0
Li ⁺	100	98.2
Ag ⁺	100	100
Pb ²⁺	100	99.1
Ba ²⁺	100	97.8
Fe ²⁺	98.2	97.3
Mn ²⁺	99.6	98.2
Cd ²⁺	100	96.5
Zn ²⁺	99.6	98.7
Cu ²⁺	0.00	98.7
Mg ²⁺	96.9	98.2
Hg ²⁺	36.3	35.8
Fe ³⁺	98.7	96.9
Al ³⁺	99.8	98.7

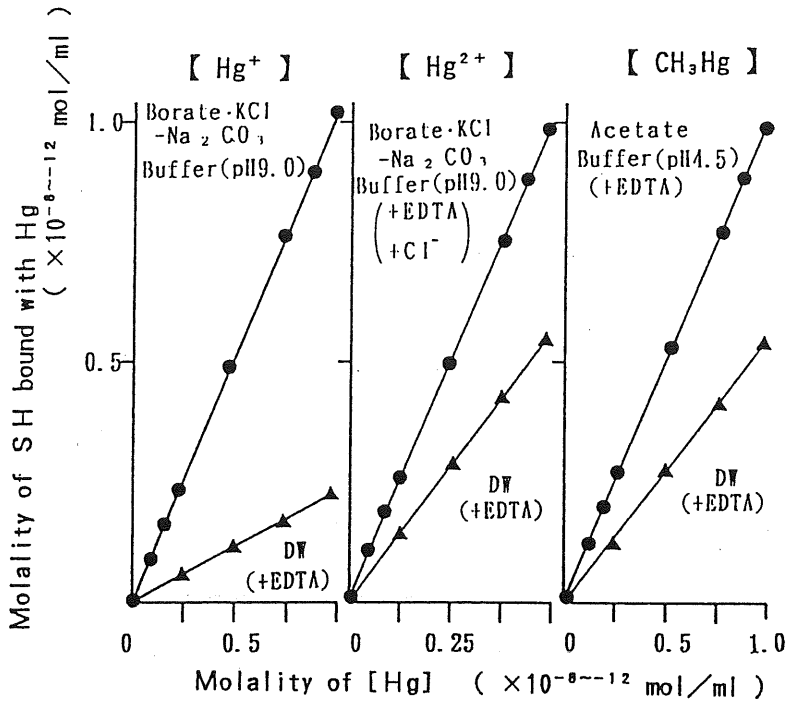


Fig. 3 Determination of Hg with NAM-Method

各種反応溶液を適切に選択することにより，1価，2価，およびメチル水銀の分別定量が可能となり， $10^{-8} \sim 10^{-12}$ mol/ml の範囲で測定が可能であった (Fig. 3)。

以上をまとめると次のようになる。

1. 金属イオンと結合する GSH 量を NAM 法により定量し，各種金属イオンの GSH との結合量を調べた結果，蒸留水中では，銅イオン，1価の水銀イオン，および2価の水銀イオンに顕著な結合能が認められた。
2. EDTA による SH 基の顕著な保護作用が銅イオンの場合に確認されたが，水銀イオンの場合は EDTA とのキレート結合より優先的に GSH と反応することが確認された。
3. 水銀化合物の GSH の結合能は，反応溶液の pH やイオン強度に依存し，反応溶液の種類による反応特異性が認められた。
4. 各種水銀化合物と GSH の結合特性を生かし，1 : 1 当量比で反応する条件を設定することにより，水銀化合物の分別定量が可能であった。この測定限界は 10^{-12} mol/ml レベルであった。

文 献

- 1) 平山紀美子，安武 章，井上正康 (1988) 蛋白質核酸酵素 33 : 1487
- 2) Christie, N. T. and Costa, M. (1984) *Biol. Trace Element Res.* 6 : 139
- 3) Fuhr, B. J. and Rabenstein, D. L. (1973) *J. Amer. Chem. Soc.* 95 : 6944

- 4) Mertz, W. (1981) *Science* 213 : 1332
- 5) 畠山英子, 松本憲一, 越智猛夫, 鈴木建夫, 目黒 熙 (1983) 農化 57 : 1135
- 6) Hatakeyama, E., Matsumoto, N., Ochi, T., Suzuki, T. and Meguro, H. (1989) *Anal. Sci.* 5 : 657
- 7) Hatakeyama, E., Matsumoto, N., Ochi, T., Suzuki, T. and Meguro, H. (1990) *Proceedings of ITAS '90*
p261