

各態水銀化合物の酵母に対する増殖阻害

岡山大学資源生物科学研究所 ○青山 勲、Athanasios Kungolos

1. はじめに

微量有害環境物質による環境汚染は地球的規模にまで拡大し、人類を含むあらゆる生命体の存亡にも関わる問題となる危惧がある。しかし有害化学物質による生態系の汚染や生物に及ぼす毒性の強さや作用機構はまだ十分に明らかにはされていず、生態毒理学的な観点からの研究は緊急の課題となっている。毒性評価を行うために様々な生物がその目的に応じて使い分けられている。本研究は化学物質の毒性のスクリーニングに単細胞生物でありながら、その細胞構造は高等生物と同じ真核生物である酵母を供試生物として利用する試みの一つである。

水銀化合物の中でも有機水銀の毒性が強い事が一般的に知られている。本研究においては、毒性評価の供試生物に酵母を使用する事の可能性を知るために、次の HgSO_4 、 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ 、 HgCl_2 、 CH_3HgOH 、 CH_3HgCl の6種の水銀化合物を用い、酵母の増殖阻害を指標として毒性強度の違いを知るとともに、酵母の野生株(AOY1)と、それと等質的遺伝子を有する水銀耐性株(ONO726)を用いて各態水銀の毒性強度について検討した。

2. 実験材料及び方法

実験に用いた酵母は*Saccharomyces cerevisiae*で、岡山大学薬学部(小野助教授)より分与された。約24時間培養を行った後、初期の細胞密度を 5×10^5 cells/mlとなるように設定した。酵母の培養には微生物全自動増殖解析システムBIOSCREEN C(ラボシステム社製)を用い、培養液はYPD培地で、培養温度を30℃に保ち、波長660 nmの吸光度を15分間隔で連続測定する事によって酵母の増殖曲線を得、増殖速度を解析した。培養時間の初期設定は72時間で始めたが、増殖曲線を見ながら、増殖が平衡に達した時点を見て、適宜実験を中止した。

3. 実験結果及び考察

BIOSCREEN Cを用いて野生株の酵母を培養した結果をFig.1に示す。

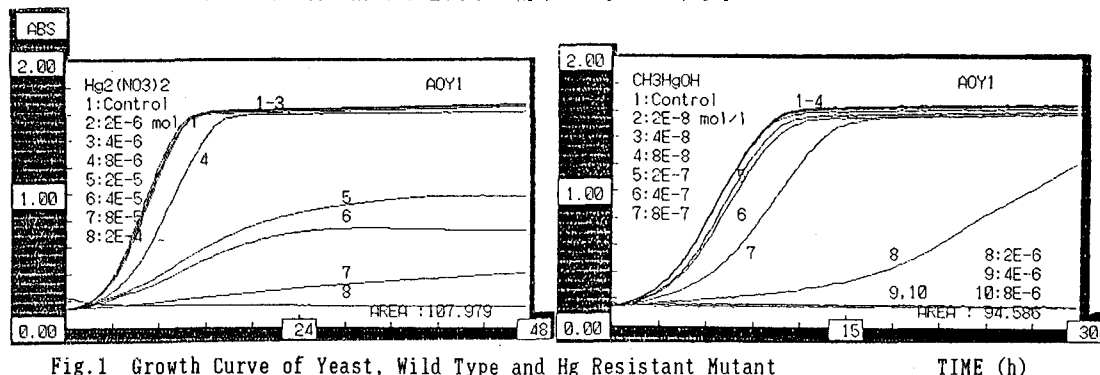


Fig.1 Growth Curve of Yeast, Wild Type and Hg Resistant Mutant

TIME (h)

左の図は硝酸第一水銀、右の図は水酸化メチル水銀の増殖曲線を示している。使用した水銀濃度は前者の方が2桁高い。硝酸第一水銀では $20 \mu\text{mol/l}$ 以上になると、酵母は急速に増殖しなくなり、 $200 \mu\text{mol/l}$ で完全に増殖は停止した。硝酸メチル水銀では、 $4 \mu\text{mol/l}$ で増殖が停止した。これらのデータを解析するため、毒性の強さを評価するのに、最大増殖速度係数(μ)から対照群に対する各実験区の阻害率を求めた。

μ の値は次式から求めた。

$$\mu (1/h) = \ln (Mt1/Mt2) / (t2-t1)$$

ここでMt1、Mt2はそれぞれ時刻t1、t2における酵母の吸光度である。(t2-t1)は1時間をとった。全ての実験の増殖曲線に対して最大増殖速度を算出し、対照群に対する阻害率で表した濃度-影響曲線をFigs.2~3に示す。

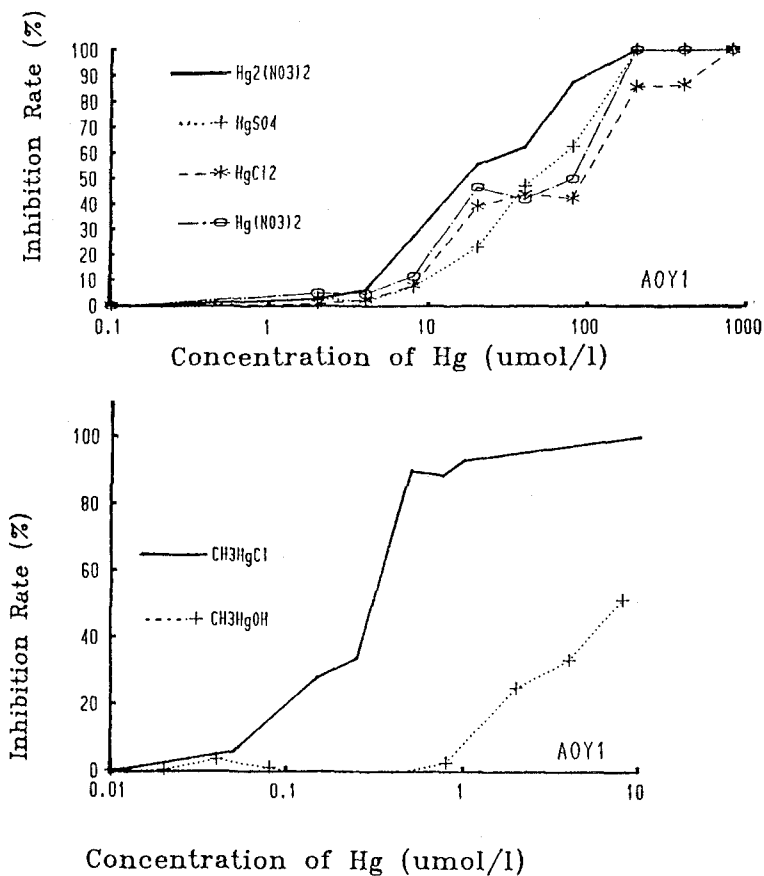


Fig.2 Dose-Effect Curve of Hg for Wild Type of Yeast

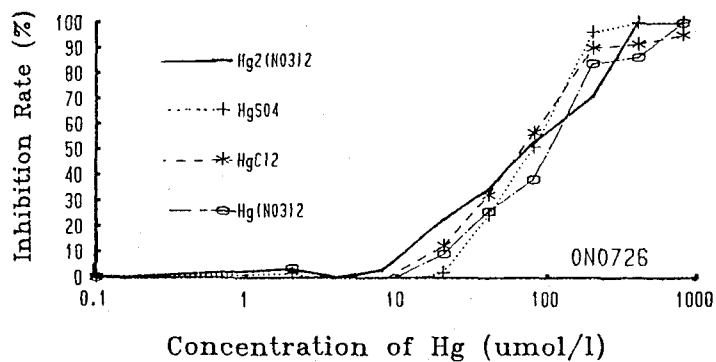


Fig.3(a) Dose-Effect Curve of Hg for Hg Resistant Mutant

Fig.2 は野生株に対する濃度-影響曲線で、(a)は無機水銀、(b)は有機水銀に対するものである。Fig.3 は水銀耐性株に対する同様の濃度-影響曲線を示している。

Table 1 にはこれらの図から求めたEC50値を示した。野生株に対しては、図から求めたEC50値に関してみると、無機水銀については $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ の毒性が最も弱く、次いで HgSO_4 、 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 、 HgCl_2 の順序であったが、 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ と、 HgCl_2 については丁度EC50値に達する前にフラットな濃度-影響曲線になったため明瞭なEC50

が得られなかった。野生株の有機水銀に対する毒性は有機水銀よりはるかに強い事が明瞭に示された。有機水銀に中でも CH_3HgOH より CH_3HgCl の方が20倍以上強かった。水銀耐性株であるON0726についてみると、無機水銀に対する毒性の強さはほとんど変わらず、EC50値は70~100 $\mu\text{mol/l}$ の範囲内で、一般的に野生株より耐性株の方がEC50値高く、水銀耐性株である事が明確に示されている。有機水銀に対しては、野生株の場合と同様に、 CH_3HgOH より CH_3HgCl の方がEC50値が低く、水銀に対する感受性が強い事が示された。これを野生株と比較すると、 CH_3HgCl のEC50値は耐性株の方が2倍近く高かったが、 CH_3HgOH についてはほとんど同じであった。

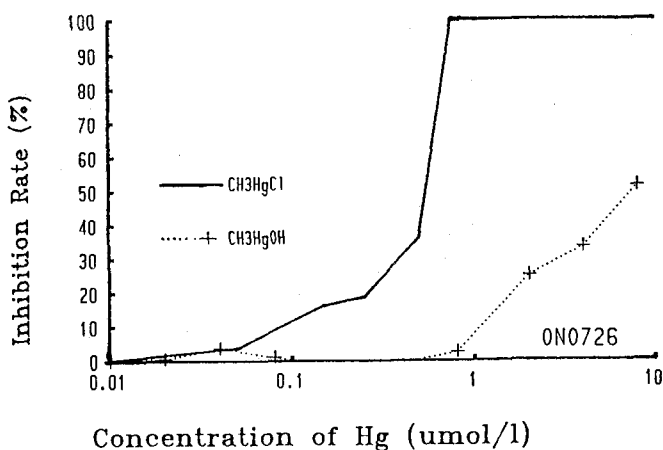


Fig.3(b) Dose-Effect Curve of Hg for Hg Resistant Mutant

Table 1 EC50 values for Hg species ($\mu\text{mol/l}$)

Hg Speceis Strain	$\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$	HgSO_4	$\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$	HgCl_2	CH_3HgOH	CH_3HgCl
AOY1	17	46	80	95	3.0	0.31
ON0726	70	80	100	70	3.0	0.56