

生体内微量元素解析と機能説明

小 椋 康 光

1 はじめに

肝炎や心筋梗塞を発症した時にアラニンアミノ基転移酵素 (ALT) や乳酸脱水素酵素 (LDH) の血中濃度が上昇するが、この時に「血中の (これらの酵素に由来する) 炭素や窒素が何マイクログラム増えた」と評価しても意味がない。当たり前のことであるが、単に濃度の増減ではなく、目的とする分子に特異的な方法で検出し、解析することにより生物学的な意義を把握することができる。生体微量元素は、その存在量が微量であるがゆえに存在量の測定に目が行きがちであるが、常量元素と同じように特異的に検出し、機能に着目した解析が必要である。では、生体微量元素を特異的に検出するとはどのようなことであろうか。生体にとって必須であれ、非必須であれ、生体微量元素はなんらかの生体成分と相互作用し、その機能を発揮する。相互作用する相手としては、実際の生理機能を担うタンパク質をはじめ、核酸、ペプチド、糖鎖、脂質などの成分があり、またビタミン B₁₂ やセレン含有アミノ酸のように、生体微量元素を含む錯化合物や共有結合性の低分子化合物として機能することもある。従って、生体微量元素を特異的に検出するということは、ある元素がどのような生体成分と相互作用し (定性的)、どのくらい存在しているのか (定量的) を把握することに他ならない。このように生体微量元素の生体内での分子形態にまで着目し、解析する方法を化学形態分析 (スペシエーション) とよび、生体微量元素の機能解析に欠かせない分析法の一つとなっている。なお本項では、生体微量元素という語は、単に元素そのものを指すだけでなく、元素を含む生体分子全体を指すこととする。

一方、生体や細胞では臓器や細胞内小器官がそれぞれ固有の機能を果たし、それらが統合されることにより、生体や細胞としての機能を発揮している。従って、生体や細胞内の位置情報 (定性的) とその存在量 (定量的) を把握する、いわゆるイメージングも生体微量元素の特異的な手法として、その生物学的な意義を把握するために利用されている。

本稿では、生体微量元素の化学形態分析を中心に、その応用例や問題点などを紹介したい。

2 化学形態分析を構成するハイフネーテッドテクニック

生体微量元素分野における化学形態分析とは、生体内、細胞内あるいは生体に由来する試料中に存在する元素を、化学形態別に分離し、元素特異的に検出することにより、それらを化学種毎に定量すること、またその分析法とされる¹⁾²⁾。すなわち、対象とする試料中に様々な化学形態として存在している目的の元素を、様々な原理に基づく分離手法で分離し、元素を特異的に検出するという分析法がとられる。従って、微量元素含有生体成分の分離と元素の特異的な検出という二つの分析法を結合した複合化技術 (ハイフネーテッドテクニック、hyphenated technique) が用いられる。一方、X線吸収微細構造 (XAFS) によっても上述の分析を果すことができるため、XAFS を用いた生体微量元素の化学形態分析も可能である³⁾。ただし本稿では、より汎用性の高いと考えられるハイフネーテッドテクニックについて述べる。

生体微量元素の化学形態分析を実施するためのハイフネーテッドテクニックにはいくつかの組み合わせが可能である。一般に、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、ガスクロマトグラフィー (GC)、キャピラリー電気泳動 (CE) あるいはフィールドフローフラクショネーション (FFF) などが分離法として用いられ、原子吸光光度法 (AAS)、誘導結合プラズマ発光分光法 (ICP-AES) あるいは誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) などが検出法として利用されている。金属結合タンパク質や金属含有代謝物の多くは可溶性であること、またサイズ排除、イオン交換あるいは逆相といった分離モードに多様性があることから、生体微量元素の化学形態分析における分離法としては HPLC が選択されることが多い。もちろん、アルキルセレニドのような揮発性の高い代謝物を測定する時は GC が、会合した巨大タンパク質分子やナノ粒子の分離には FFF が、金属元素と生体成分との相互作用が弱い場合などは固定相を持たない CE が用いられるなど、生体試料の物理化学的な性質に基づき最適な分離法が選択可能である^{4)~6)}。一方、検出法としては、高感度であることや同位体の利用が可能であることから、ICP-MS が最も汎用される機器となっている。従って、装置構成の汎用性という観点

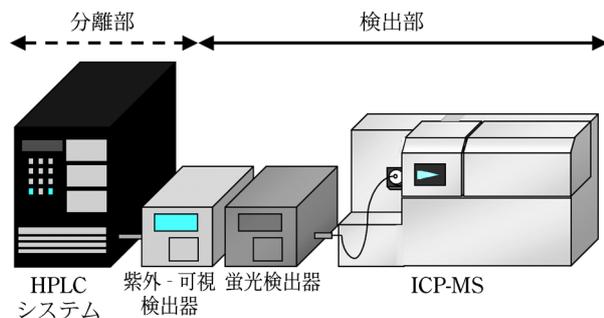


図1 LC-ICP-MSの装置構成図(一例)

から考えれば、生体微量元素の化学形態分析は、LC-ICP-MSで実施されているというのが一般的である。つまりこれは、HPLCの検出器としてICP-MSを用いるということであり、エレクトロスプレーなどをイオン化源(ESI)としたいわゆるLC-MSと装置構成としては同様である。ICP-MSは破壊分析であるが、最後の検出器として使用すれば、図1に示したような、一般的なHPLCの検出器である紫外・可視検出器や蛍光検出器などと併用が可能である。最近では、ICP-MSの装置の改良により、リンや硫黄などの生体常量元素も感度良く測定できるようになってきたため、生体試料中のこれら元素の化学形態分析も報告されている^{7)~9)}。

3 生体微量元素の化学形態分析例 —先天性銅代謝異常症モデルマウスにおける臓器内銅の分布の解析¹⁰⁾—

メンケス病(Menkes disease)は、先天性の銅欠乏症として知られる疾患であり、その病因は、銅輸送性のトランスポーターの欠損であることが知られている^{11)~13)}。経口的に摂取した銅は、消化管粘膜細胞に吸収されるものの、消化管の細胞から血流中へ銅を輸送するトランスポーターを欠損しているため、生体必須微量元素である銅が全身へ分布できず、銅の欠乏症状を呈する。銅は、神経伝達物質の生合成、色素生合成さらにコラーゲンの生合成に関与する酵素に要求されるため、銅の欠乏はこれら酵素の機能不全を引き起こし、メンケス病患者は様々な臨床症状を呈することになる。メンケス病の病因遺伝子と同一の機能を果たす遺伝子を欠損したメンケス病のモデルマウスとして、いくつかの系統のマウスが存在しており、そのうちの一つにblotchyマウスとよばれる系統がある¹⁴⁾。

図2は、blotchyマウスおよび野生(対照型)マウスの小腸(a)と肝臓(b)からそれぞれ可溶性画分を調製し、その中に含まれる銅の化学形態分析を行った結果である。HPLCのカラムは銅結合タンパク質を分離するため、ゲル濾過のカラムを用い、銅とタンパク質との結合が乖離しないように中性付近のpHの溶離液で溶出した。溶離液は、直接ICP-MSへ導入し、 m/z 65で

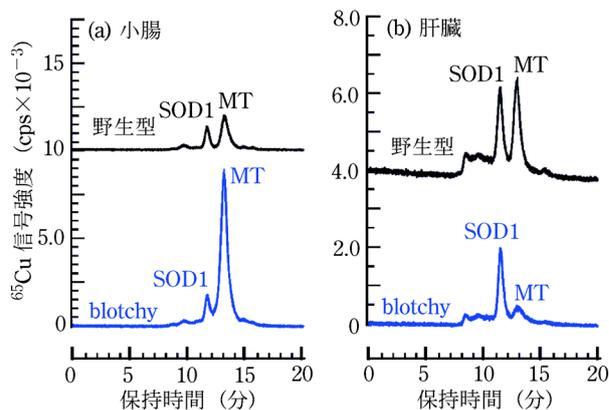


図2 LC-ICP-MSにより取得した野生型マウスおよびblotchyマウス小腸および肝臓可溶性画分中の銅の分布

銅をモニターした。なお、一般的にはICP-MSにより銅を測定する場合は、天然存在比の多い m/z 63(69.1%)で測定することが推奨されているが、生体試料中の銅を測定する場合は、 m/z 63では生体試料中に多量に含まれるナトリウムとプラズマ源のアルゴンとの分子イオン干渉($^{23}\text{Na}^{40}\text{Ar}^+$)を受けるため、天然存在比が少なくても m/z 65(30.9%)を利用する。小腸でも肝臓でも可溶性画分中には、銅、亜鉛-スーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)とメタロチオネイン(MT)に結合した状態で、主に銅は存在している。blotchyマウスの小腸では、小腸の細胞から血流中へ銅を排泄できないことから、銅が小腸へ蓄積するが、過量に蓄積した銅はMTと結合した状態で存在している。銅は必須元素であるが、重金属としての毒性も有しているため、過量の銅は重金属解毒タンパク質として知られるMTに結合した状態で無毒化されていると考えられる。一方、小腸内で銅が過剰になってもSOD1へ供給されている銅の量はblotchyマウスでも野生型マウスと差が無いことがわかる。

肝臓では小腸と異なり、欠乏を呈しているが、欠乏状態であってもMTに結合している銅がまず減少しており、SOD1への銅の供給が優先的に行われていることがわかる。すなわち、小腸と肝臓では、過剰と欠乏という相反する銅の栄養状態を示しているものの、いずれの状態であっても細胞傷害性の高い活性酸素種を消去するために必要なSOD1へ優先的に銅を供給していると考えられる。このことは、単に臓器内の銅の濃度を測定しただけでは把握できないため、化学形態分析の利点を示す好例である。

4 LC-ICP-MSの問題点とその克服

生体に存在するイオン以外の金属含有成分は、主に二つの存在形態をとる。一つは遷移金属がタンパク質や核酸などの生体成分にリガンドとして結合して存在する形態である。もう一つはセレンやヒ素などの半金属では、

半金属自身が共有結合性の化合物を形成することができるため、有機金属代謝物として存在する形態である。生体内のセレンやヒ素を含む代謝物のうち、既に構造が判明しており、標準物質が利用可能な化合物については、LC-ICP-MSにより、クロマトグラム上の挙動から有機金属代謝物の同定が可能である。しかし、元素特異的な検出手法であるICP-MSを用いた化学形態分析では、標準物質が用意されていない未知の代謝物を同定することはできない。

未知の半金属含有代謝物の同定を行うには、ESIや大気圧イオン化法（APCI）などICP-MSのイオン化法と比べて、よりマイルドなイオン化法を採用している質量分析法が必要であり、これらの機器はICP-MS同様にHPLCとの結合も確立されており、LC-ICP-MSからの移行が可能である。ただし、一般的にはESIでは逆相のカラムを用いることが多いため、溶離液に有機溶媒を含むが、ICPでは有機溶媒の導入は不得手である。そこで、分離性能を落とさず、両質量分析法に適用可能な分離条件を構築すれば、両質量分析法間の移行はより容易である。生体微量元素の分析に関しては、ICP-MSのほうがESI-MSに比べて感度が良いため¹⁵⁾、ESI-MSを定量目的で使用することは一般的ではない。つまり、生体微量元素研究の分野でのESI-MSの利用は、ICP-MSでは行えない未知化合物の同定にもつばら用いられるため、検出器はタンデム型のMS-MSやQ-TOFあるいはイオントラップ型などが用いられる。

ESI-MS-MSを用いた有機金属代謝物の分析例の中では、セレン含有代謝物の同定が多く報告されている¹⁶⁾¹⁷⁾。これはセレンが、動物にとって必須元素であること、ある種のセレン化合物には抗腫瘍活性が認められること、活性酸素を除去する酵素に要求されることから栄養補助食品としての利用の可能性があることなど、興味ある薬理活性や生理作用があるため、未知のセレン化合物の同定を行うことは多くの波及効果を生むことが期待できるためである。例えば、植物においてはセレンの必須性は必ずしも認められていないが、セレンを効果的に代謝し、蓄積することが可能な植物種が存在する。これらの植物は、生物にとって毒性の高い無機のセレン化合物（亜セレン酸やセレン酸）を毒性の比較的低い有機セレン化合物に代謝可能であることから、セレンサプリメントの原料やセレン汚染土壌の浄化（ファイトレメディエーション）に応用される可能性を持っている。また分析化学的な見地から未知のセレン含有代謝物の同定を考えると、セレンは特異的な同位体の存在比（⁷⁴Se, 0.89 %；⁷⁶Se, 9.36 %；⁷⁷Se, 7.63 %；⁷⁸Se, 23.8 %；⁸⁰Se, 49.6 %；⁸²Se, 8.73 %）を有しており、質量分析法による未知化合物の同定にはこの存在比のパターンが非常に有用な情報として役立つことも分析対象としての魅力の一つである。それに対して、同様に有機金属代謝物に代

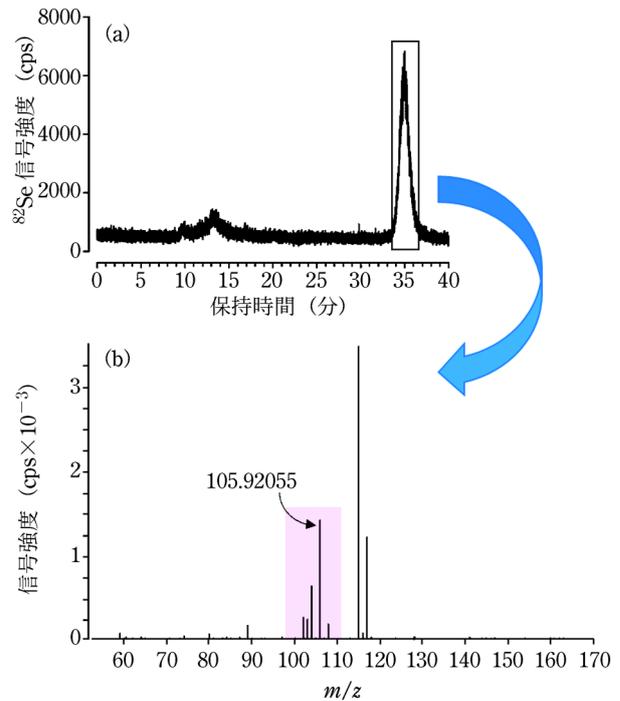


図3 LC-ICP-MSおよびESI-Q-TOF-MSによるヒト肝がん由来細胞株（HepG2）内の未知のセレン代謝物の検出と同定

謝されるヒ素は安定同位体が一種類しか存在しないため、未知化合物の同定はセレンほど容易ではない。以下に、最近著者らが見いだした新規セレン代謝物の同定例を示す¹⁸⁾。

ヒト肝がん由来細胞株（HepG2）に、細胞毒性が出ない量の亜セレン酸を曝露したところ、これまで報告されているセレノアミノ酸やセレノ糖などのセレン代謝物とは保持時間の異なるセレン代謝物が検出された（図3a）。このセレン代謝物が何であるかを、試料の濃縮および部分精製を行いESI-MSでも検出可能な濃度に調製した後、測定したところ、 m/z 106に⁸⁰Seを含む分子が陰イオンモードで検出された。この質量数ではMS-MS分析を行うには小さすぎると判断されたため、TOF-MSにより精密質量を測定し（図3b）、元素組成を調べたところ、⁸⁰Se¹²C¹⁴N⁻の理論値（105.91959）と非常に近い値が得られた。SeCN⁻すなわちセレノシアン酸塩（selenocyanate）は市販されているため、これを標品としてスパイクし、LC-ICP-MSで確認したところ、未知のセレン代謝物のピークと一致したため、未知のセレン代謝物はセレノシアン酸であると結論した。セレンと同族の硫黄の場合は、シアン化物イオン（CN⁻）とチオ硫酸イオン（S₂O₃²⁻）とがロダナーゼという酵素の作用により、SCN⁻を形成する。しかしセレンの場合は、ロダナーゼはもとより酵素の存在なしで、細胞内で亜セレン酸から還元的に生成したセレニドとシアン化物イオンとが直接反応していることも明らかとなった。つまり細胞内で非酵素的に反応可能な、反応性

の高いシアン化物が生成しており、これがセレニドと反応したものと考えられたため、この反応性の高い内在性のシアン化物を活性シアン分子種 (reactive cyanogen species, RCNS) と称することを提唱した。さらなる検討により、亜セレン酸イオン、シアン化物イオン、セレノシアン酸イオンの細胞毒性は、亜セレン酸イオン>シアン化物イオン>セレノシアン酸イオンの順であることから、毒性の高い者同士が反応し、毒性の低い物質へと代謝されたと考えることができる。まさに“毒をもって毒を制す”ということが細胞内で起きているといえる。また亜セレン酸イオンとセレノシアン酸イオンは、セレンの栄養源としては等価であることから、セレノシアン酸イオンは、細胞内のセレンのプールとして機能していると想定できる。しかし今のところ、このRCNSの供給源はどこか？ 合成の機構は？ という問いに対して、明確な答えが得られているわけではない。引き続き検討していくことが必要である。

5 おわりに

生体微量元素分野の研究においては、分析機器や分析技術の向上が新しい生物学的知見の集積へと繋がることが多い。本稿では触れていないが、レーザーアブレーションとICP-MSとの組み合わせによる元素イメージングなど、さらなる研究の進展を期待させる分析法が、生体微量元素研究に利用されている。化学形態分析では得られない情報が、イメージングでは得られることから今後のさらなる分析機器や分析技術の向上が望まれる。

文 献

- 1) R. Łobiński : *Fresenius J. Anal. Chem.*, **369**, 113 (2001).
- 2) J. Szpunar, R. Łobiński, A. Prange : *Appl. Spectrosc.*, **57**, 102A (2003).
- 3) E. Nakazawa, T. Ikemoto, A. Hokura, Y. Terada, T. Kunito, S. Tanabe, I. Nakai : *Metallomics : Integrated Biometal Science*, **3**, 719 (2011).

- 4) M. Bueno, F. Pannier : *Talanta*, **78**, 759 (2009).
- 5) B. Meermann : *Anal. Bioanal. Chem.*, **407**, 2665 (2015).
- 6) M. Menendez-Miranda, J. R. Encinar, J. M. Costa-Fernandez, A. Sanz-Medel : *J. Chromatogr. A*, **1422**, 247 (2015).
- 7) S. Diez Fernandez, N. Sugishama, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel : *Anal. Chem.*, **84**, 5851 (2012).
- 8) E. Maes, K. Tirez, G. Baggerman, D. Valkenburg, L. Schoofs, J. R. Encinar, I. Mertens : *Mass Spectrom. Rev.*, **35**, 350 (2016).
- 9) Y. Suzuki, A. Nobusawa, N. Furuta : *Anal. Sci.*, **30**, 551 (2014).
- 10) T. Miyayama, Y. Ogra, Y. Osima, K. T. Suzuki : *Anal. Bioanal. Chem.*, **390**, 1799 (2008).
- 11) J. Chelly, Z. Tümer, T. Tønnesen, A. Petterson, Y. Ishikawa-Brush, N. Tommerup, N. Horn, A. P. Monaco : *Nat. Genet.*, **3**, 14 (1993).
- 12) J. F. Mercer, J. Livingston, B. Hall, J. A. Paynter, C. Begy, S. Chandrasekharappa, P. Lockhart, A. Grimes, M. Bhawe, D. Siemieniak, T. W. Glover : *Nat. Genet.*, **3**, 20 (1993).
- 13) C. Vulpe, B. Levinson, S. Whitney, S. Packman, J. Gitschier : *Nat. Genet.*, **3**, 7 (1993).
- 14) B. Levinson, C. Vulpe, B. Elder, C. Martin, F. Verley, S. Packman, J. Gitschier : *Nat. Genet.*, **6**, 369 (1994).
- 15) Y. Anan, G. Nakajima, Y. Ogra : *Anal. Sci.*, **31**, 561 (2015).
- 16) Y. Ogra, K. Ishiwata, H. Takayama, N. Aimi, K. T. Suzuki : *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **767**, 301 (2002).
- 17) H. Preud'homme, J. Far, S. Gil-Casal, R. Lobinski : *Metallomics : Integrated Biometal Science*, **4**, 422 (2012).
- 18) Y. Anan, M. Kimura, M. Hayashi, R. Koike, Y. Ogra : *Chem. Res. Toxicol.*, **28**, 1803 (2015).



小椋康光 (Yasumitsu OGRA)

千葉大学大学院薬学研究院 (〒260-8675 千葉市中央区亥鼻 1-8-1)。千葉大学大学院薬学研究院博士後期課程修了。博士 (薬学)。《現在のテーマ》生体微量元素の分析法の開発と生理作用及び毒作用の解明への応用。《主な著書と出版社名》“衛生試験法・注解” (金原出版)。《趣味》苺栽培
E-mail : ogra@chiba-u.jp