衛生化学
THE JOURNAL OF
HYGIENIC CHEMISTRY
17 (5) 353-356 (1971)

メチルコバラミン (ビタミン B₁₂ アナログ) による無機水銀の化学的メチル化反応¹⁾

井村伸正, 助川英治, 彭 秀光, 長尾 清

金 鍾潤, 管 孝男, 浮田忠之進

東京大学薬学部²⁾

Chemical Methylation of Inorganic Mercury with Methylcobalamin, a Vitamin B₁₂ Analog¹⁾

NOBUMASA IMURA, EIJI SUKEGAWA, SHOE-KUNG PAN,

KIYOSHI NAGAO, JONG-YOON KIM,

TAKAO KWAN and TYUNOSIN UKITA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo²⁾

(Received May 17, 1971)

Chemical methylation of inorganic mercurial compounds with methylcobalamin, a vitamin B₁₂ analog, was examined. Quantitative determination of methylated mercury by gas chromatography and analysis of the products by thin-layer chromatography revealed that the methylation proceeded at a markedly high rate by simply mixing methylcobalamin with inorganic mercury, and the reaction gave dimethylmercury as the initial and methylmercury as the final products.

Comparative experiments using several other metal halides under the same condition indicated that mercuric chloride is a unique acceptor of the methyl moiety from methylcobalamin among these metal halides tested.

緒 言

水銀農薬や工場排棄物による生活環境の水銀による汚染が大きな社会問題となり, 特にわが国においては再度にわたるアルキル水銀化合物による集団中毒事件が発生したこと, また一般環境の水銀汚染が異常に高いことが農薬としての有機水銀化合物の過剰使用によることが指摘されその使用が禁止されたことなどにより, 河川, 港湾等への特にメチル及びエチル水銀の排出に強い関心が寄せられるようになった。しかし, 無機水銀の公害原因物質としての危険性については, いまだそれ程深刻な受取り方がされていない。最近, 自然界における無機水銀の有機化に関する知見が報告されるにおよんで無機水銀

の自然界への放出もまた水銀公害防止の見地からきわめて重要な問題となって来た。

Jensen と Jernelöv はある種の微生物により無機水銀がメチル化されることを報告し,³⁾ さらに最近養魚池の底質及び死魚のホモジェネートに水銀をメチル化する能力のあることを発見した。⁴⁾ 一方 Wood 等は純粋に単離されたメタン産生菌, MOH, の菌体抽出液を用いることにより, メチルコバラミンの存在下に無機水銀からメチル水銀が生成すること, また, 還元的条件下においては, この系から菌体抽出液を除いても化学的に水銀のメチル化反応が起こることを定性的に確認し報告している。⁵⁾ 我々はこの生物体内でのメチル基供与物質の一つ

1) N. Imura, E. Sukegawa, S. K. Pan, K. Nagao, J. Y. Kim, T. Kwan, and T. Ukita, *Science*, **172** 1248 (1971).

2) Location: *Hongo 7-chome, Bunkyo-ku, Tokyo* (東京都文京区本郷7丁目).

3) S. Jensen, A. Jernelöv, *Nordforsk Biocidinforation* **10**, 4 (1967).

4) S. Jensen, A. Jernelöv, *Nature*, **223**, 753 (1969).

5) J. M. Wood, F. Scott Kennedy, G. C. Rosen, *Nature*, **220**, 173 (1968).

であるメチルコバラミンの関与する水銀の化学的メチル化反応に関して定量的検討を加えた。その結果、メチルコバラミンと無機水銀とを中性の水溶液中ただ単に共存させることにより注目すべき速度で水銀のメチル化が進行すること、また、この反応にはなんら還元的条件を必要としないことを見出した。さらに、反応成績体の分析結果からこのメチル化反応の機構について考察を加えここにその知見を報告する。

実験材料及び方法

材料 標準品として用いた塩化メチル水銀及びジメチル水銀は、それぞれ近藤の方法⁶⁾及びMarvel等の方法⁷⁾に従って合成した。塩化エチル水銀は、市販品(和光純薬製)を使用した。S-アデノシルメチオニンはJamiesonの方法⁸⁾により、また、メチルコバラミンはWeissbach等の方法⁹⁾により合成したものを用了。

方法 (a) ガスクロマトグラフィー——装置は島津ガスクロマトグラフ GC-4AIE の電子捕獲型検出器付のものを使用し、カラムは25%ポリジエチレングリコールサクシネートでコートしたクロモソルブ WAWHMS (60-80メッシュ)を装填した0.4×100 cmのガラスカラムを用いた。カラム温度160°C、インジェクションポート温度185-190°C、検出器温度200°Cの条件でキャリアガスとしては窒素ガス(80 ml/min)を使用した。

(b) 薄層クロマトグラフィー——シリカゲルプレート(0.25 mm, 5×20 cm)を使用した。溶媒としては、(1)石油エーテル-エーテル(70:30)、(2)*n*-ヘキサン-アセトン(85:15)、(3)クロロホルム-*n*-ヘキサン(90:10)を用いた。

(c) 反応及び成績体の分析——2 μ mole のメチルコバラミンを1 μ mole, 2 μ mole, 又は10 μ mole の昇汞とそれぞれ暗所で0.2 M リン酸緩衝液(pH 7.0)中37°Cで放置することにより反応させたのち、反応液をベンゼン200 μ lで抽出し、ベンゼン層の60 μ lを薄層クロマトグラフィーにかけ反応成績体を分析した。水銀化合物のスポットは0.05%のジチゾン-クロロホルム溶液を噴霧することにより検出した。

(d) メチル化反応の速度——0.1 μ mole のメチルコバラミンを0.05 μ mole, 0.1 μ mole, 又は0.5 μ mole の昇汞と、それぞれ上記反応及び成績体の分析の場合と同様

な条件で反応させた後、反応液に1 mlの濃塩酸を加えて90 min 室温で振盪して反応成績体のうち、ジメチル水銀を完全に塩化メチル水銀に変換する。ついで反応液を1 mlのベンゼンで抽出し、0.1 mlのベンゼン層をとってこれを1 mlのベンゼン(内部標準物質として3.3 μ g/mlの塩化エチル水銀を含む)で希釈し、希釈液の1 μ lをガスクロマトグラフィーにかけて塩化メチル水銀を定量した。

結果及び考察

メチル及びプロピルコバラミンをZn末とNH₄Clの存在下、還元的条件で無機水銀と反応させることにより対応するアルキル水銀が生成することはWood等により定性的に認められている。⁵⁾我々は、このような水銀の化学的なアルキル化反応の速度を定量的に調べる目的でWood等の用いたZn-NH₄Clをはじめ、種々の緩和な還元的条件、例えばNaBH₄, SnCl₂-HCl, またはSnCl₂-AcOH存在下でのメチルコバラミンと昇汞の反応を試みたが、このような条件下の反応液からは生成したメチル水銀を定量的に抽出、回収することが困難であった。ところが興味あることにリン酸緩衝液(pH 7.0)中において、なんら還元系が存在しない場合でもメチルコバラミンによる水銀の化学的メチル化は注目すべき速度で進行すること、かつ、この場合には反応生成物の抽出、回収がきわめて容易で、反応の定量的解析に適していることが明らかとなった。まず我々は、反応成績体を分析する目的でメチルコバラミンを昇汞と種々の量比でpH 7.0のリン酸緩衝液中暗所で37°Cで反応させ、反応液をベンゼンで抽出し、抽出液について三種類の溶媒系を用いた薄層クロマトグラフィーによる分析を行なったところ、反応成績体としてジメチル水銀(DMM)及び塩化メチル水銀(MMC)が検出、同定された。溶媒(1)を使用し経時的に反応成績体を分析した結果をTable Iに示す。

この結果、メチルコバラミンに対し、等モル以下の昇汞を用いた場合、反応初期の生成物として、まずDMMが生成し、時間の経過と共にMMCの生成量が増大することが明らかとなり、ここに用いた条件下ではChart 1.に示されるような形式で反応が進行することが推定される。^{10,11)}

次に電子捕獲型検出器(ECD)を備えたガスクロマト

- 6) 近藤孝子, 薬学雑誌, **84**, 137 (1964).
- 7) C.S. Marvel, V.L. Gould, *J. Am. Chem. Soc.*, **49**, 153 (1922).
- 8) G.A. Jamieson, "Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry," Vol. 1, ed. by W.W. Zorbach and R.S. Tipson, John Wiley and Sons, Inc., 1968, p. 215.
- 9) H. Weissbach, A. Peterkofsky, H. Dickerman, *J. Biol. Chem.*, **238**, 3318 (1963).
- 10) H. Gilman, "Organic Chemistry—An Advanced Treatise," Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y., 1937, p. 462.
- 11) M.D. Rausch, J.R. van Wazer, *Inorg. Chem.*, **3**, 761 (1964).

TABLE 1. Thin-Layer Chromatography^{a)} of the Reaction Mixture Containing Methylcobalamin and Varying Amounts of HgCl₂

Molar ratio (HgCl ₂ /CH ₃ -[Co])	Reaction time					
	30 min.		5 hr.		24 hr.	
	D ^{b)}	M ^{c)}	D	M	D	M
0.5	+	-	+	-	+	-
1	+	±	+	++	±	++
5	+	++	±	++	-	++

a) silica gel thin-layer plate with ether-petr. ether (30:70)

b) D: dimethylmercury (*R_f* 0.58)

c) M: methylmercuric chloride (*R_f* 0.25)

Extent of coloration of mercury dithizonate is expressed by ++ (strong), + (positive), ± (faint), and - (not detectable).

Chart 1.

グラフィーを用いてメチル化反応の速度を調べた。上記反応成績体の分析結果から、この反応に際しては DMM 及び MMC が生成することが明らかとなったが、このうち DMM はきわめて揮発性が高く、その定量的取扱いが困難であること、また ECD を用いたガスクロマトグラフィーによる微量定量分析では注入した微量の DMM はカラム中で分解されて MMC と同じ保持時間を与えることが知られている¹²⁾ので、本実験においては生成した DMM を反応液を塩酸処理¹³⁾することにより、定量的に MMC に変換したのち、ベンゼン抽出を行ないベンゼン抽出液について MMC の量をガスクロマトグラフィーにより定量した。

Fig. 1 に示されるように反応はきわめてすみやかに進行し、無機水銀は約5時間後には、ほとんど定量的にメチル化されることが判明した。一方、この反応でメチルコバラミンがメチル基を遊離して、アココバラミンに変化することを利用し、アココバラミンに特有の 352mμ の吸収の増加を測定することにより、メチル基を遊離したメチルコバラミン量を定量した結果、5時間の反応で

Fig. 1. Formation of Methylated Mercury from Mercuric Chloride in the Presence of Methylcobalamin^{a)}

a) Methylcobalamin (0.1 μmole) was treated with 0.05 (—□—), 0.1 (—○—), and 0.5 μmole (—●—) of mercuric chloride at 37°C in 1 ml of 0.2M potassium phosphate buffer (pH 7.0) in the dark. (See the text)

メチルコバラミンはほぼ定量的にメチル基を遊離していることが明らかとなり、Fig. 1 の結果と合わせて考えると、遊離したメチル基は、すべて水銀のメチル化反応に利用されたと考えることが出来る。また、昇汞が存在しない場合には、この条件でメチルコバラミンは全く安定であり、48時間後にもアココバラミンへの変換はみられないことから、この反応系でのメチルコバラミンからのメチル基の脱離には昇汞の存在が不可欠であることがわかった。昇汞の代りに、他の金属の塩化物、例えば PbCl₂, SnCl₂, CdCl₂, CoCl₂ 等を用いてメチルコバラミンと反応を試みたが、これら金属のメチル化物の生成は見られず、また、メチルコバラミンからのメチル基の遊離も認められなかった。一方、生体内での他のメチル基供与物質である S-アデノシルメチオニンをメチルコバラミンの場合と同様な条件で昇汞と反応させたがメチル水銀の生成は観察されなかった。以上の結果からメチルコバラミンと水銀との反応はきわめて特異的であると考えられ、¹⁴⁾ その反応機構を更に詳細に検討することは

12) 西 末雄, 堀本能之, *Japan Analyst*, **17**, 75 (1968).

13) R. E. Dessy, G. F. Reynolds, J. Y. Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 2683 (1959).

14) 我々はメチルコバラミンと同様に CH₃-Co 結合を持つコバルト錯体で、より簡単な構造を有するメチルコパロキシムを昇汞と同様な条件で反応させたところ、メチルコバラミンの場合に比べてやや速度は遅いがメチル水銀が生成することを定性、定量的に確認することが出来た。(J. Y. Kim, N. Imura, T. Ukita, T. Kwan, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **44**, 300 (1971)).

非常に興味あることと思われる。

ビタミン B₁₂ 類縁化合物の一つであるメチルコバラミンは、微生物体内のみならず、哺乳動物の組織、すなわち、仔牛肝臓や血漿にも存在することが知られ、¹⁵⁾ 自然界に広く分布していると考えられる。特に河川の底質や廃水処理に用いられるメタン醗酵槽の汚泥等にごくふつうに存在するメタン産生菌は、メタン生合成の中間体と

してメチルコバラミンを多量に含有することが予想される。^{16,17)} 強い毒性を有するメチル水銀が無機水銀とメチルコバラミンとが単に共存することにより、きわめて容易に生成されることを示した本実験の結果を考える時、無機水銀化合物の自然界への放出は、アルキル水銀化合物の場合と同様に、強く規制されるべきであると云えよう。

15) K. Lindstrand, *Nature*, **204**, 188 (1964).

16) B.A. Blaylock, T.C. Stadtman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **17**, 475 (1964).

17) B.A. Blaylock, T.C. Stadtman, *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**, 138 (1966).