

亜鉛欠乏マウスすい臓および精巣細胞中の微量元素の定量

矢永誠人¹、下山弘高²、田中宏宗¹、村松 航²、世良耕一郎³

¹ 静岡大学理学部放射科学研究施設
422-8529 静岡市駿河区大谷 836

² 静岡大学大学院理学研究科化学専攻
422-8529 静岡市駿河区大谷 836

³ 岩手医科大学サイクロトロンセンター
020-0173 岩手郡滝沢村字留が森 348-58

1 はじめに

近年、生体微量元素の機能や微量元素欠乏による健康障害については、学問分野のみならず一般社会においても広く関心もたれているようである。そのことは、どこのコンビニエンスストアに行っても、亜鉛や鉄などのミネラルを強化した栄養補助食品が多数販売されていることを見ても明らかである。微量元素欠乏症の中でも亜鉛欠乏は、その頻度が高く最も懸念されている。しかしながら、現在のところ、臨床検査データによる亜鉛欠乏の診断は困難とされ、亜鉛投与により諸症状が改善されれば、欠乏症と診断されているのが実情のようである。また、発症にいたった原因が食生活である場合においても、亜鉛投与を行っただけでは完全には症状を改善させることができないこと理由は解明されていない。

これまで、我々は、亜鉛欠乏餌および対照餌を用いてマウスを飼育することにより亜鉛欠乏マウスを得て、それらマウスの臓器・組織中の微量元素の定量を行い、対照マウスのそれと比較・検討してきた。その結果、成獣マウス（8週齢から一定期間亜鉛欠乏餌を与えたもの）の亜鉛濃度に関しては、骨、すい臓、および精巣においては対照マウスに比べて有意な低下が認められたが、他の臓器・組織については両群の間に有意な差は認められなかった。また、分析した全ての臓器・組織中のコバルト濃度は対照マウスに比べて有意に増加していた。

亜鉛欠乏マウスで亜鉛濃度の低下が認められた臓器の中で、すい臓については、亜鉛欠乏餌を与えて1週間後には、その亜鉛濃度は大きく低下し、その後は一定に保たれるという興味ある結果が得られている。このことは、すい臓中の亜鉛結合タンパク質などの亜鉛結合物質については、大きく2グループに分類できる可能性があることを示している。すなわち、亜鉛が欠乏したときに直ちに亜鉛が遊離するタンパク質などの亜鉛結合物質と亜鉛が欠乏したときでも亜鉛を保持する亜鉛結合物質の2グループに分けることができるのではないかと考えている。そこで本研究では、亜鉛欠乏初期におけるすい臓中の亜鉛結合タンパク質からの亜鉛の遊離や、他の金属元素と置換、もしくはタンパク質そのものの消失など、亜鉛の欠乏から起こるタンパク質構造の変化について検討することとした。また、亜鉛欠乏時にわずかではあるが亜鉛濃度が低下するとともに、亜鉛欠乏症の一つの症状である生殖腺機能の低下に関連する精巣についても、同様に検討することとした。なお、本課題は実験途中であり、PIXE分析の結果を

示すまでに至っていない。

2 実験

2.1 供試動物

日本クレア(株)より購入した ICR 系マウス(オス、7 週齢)を通常餌(日本クレア実験動物用飼料、CE-2)による 1 週間の予備飼育を行い、その後 2 群に分け、同社より購入した亜鉛欠乏餌および超純水、または対照餌および超純水を与え、それぞれ 1 週間の飼育を行った。なお、予備飼育を含めた飼育期間中は、各ケージの中にステンレス製ネットを二重に敷き、いずれの場合も飼料および水以外の敷き藁あるいは排泄物等を摂取できない条件とした。

2.2 分析試料

上記の各マウスからエーテル麻酔下ですい臓を摘出した。摘出したすい臓または精巣の 4 頭分を 1 試料として、Tris-HCl Buffer を用いてホモジナイズし、1 回の遠心操作 (105,000×g、65 min) にて可溶性画分を分離した。

2.3 電気泳動法と P I X E 分析

2.3.1 SDS-PAGE

亜鉛欠乏マウスおよび対照マウスのすい臓または精巣細胞から分離した可溶性画分に含まれるタンパク質濃度を定量し、Tris-HCl buffer を用いて適宜希釈することにより、各レーンに滴下するタンパク質濃度をそろえた後、SDS-PAGE によってタンパク質を分離し、CBB 染色または銀染色を行った。

2.3.2 二次元電気泳動と P I X E 分析

2.3.1 と同様に亜鉛欠乏マウスおよび対照マウスのすい臓または精巣細胞の可溶性画分中のタンパク質量を両群間でそろえた後、二次元電気泳動によりタンパク質を分離し、CBB 染色または銀染色を行った。

PIXE 分析を行う試料は、二次元電気泳動後、銀染色を行った。その後、何点かのスポット位置でゲルを切断し、十分に乾燥させた後、サンプルホルダー上のバックリング膜 (ポリプロピレンシート) に添付して PIXE 分析のターゲットとした。ここで、バックリング膜への試料の貼り付けにはアルコールで希釈したコロジオン溶液 (コロジオン : エタノール = 1 : 5) を用いた。亜鉛欠乏群および対照群のそれぞれの同じ位置にあるスポットのゲルを切断した。

3 結果および考察

3.1 SDS-PAGEによる可溶性タンパク質の分離結果

亜鉛欠乏マウスおよび対照マウスのすい臓細胞および精巣細胞の可溶性タンパク質について SDS-PAGE を行い、亜鉛欠乏によるタンパク質の消失等の可能性について検討を行った。その結果、分離したタンパク質の各バンドの位置や数を比較した場合、CBB 染色および銀染色のどちらの染色法を採用した場合においても、両群間にはっきりとした差を認めることはできなかった。このことは、亜鉛が欠乏したことによって亜鉛タンパク質そのものが消失したり、新たなタンパク質が誘導されたりする可能性が低いことを示している。しかし、SDS-PAGE で分離され、確認された各バンドには、なお多種類のタンパク質が混在して含まれるものであることから、今回の実験のように、単に可溶性タンパク質全量について分離した結果からは、上述の内容を正しい結論として断定することはできないものと考えている。

3. 2 二次元電気泳動法による可溶性タンパク質の分離結果

すい臓細胞および精巣細胞のそれぞれについて遠心分離法により分離した可溶性画分中に含まれるタンパク質について二次元電気泳動法により分離を行った。

すい臓については、亜鉛濃度の分析結果ではその濃度が大きく低下していたにもかかわらず、タンパク質スポットの消失のようなタンパク質そのものが消失するという結果は得られなかった。また、新たなスポットが認められることもなかった。このことは、亜鉛欠乏時には、すい臓中の亜鉛タンパク質のうち、元素分析での亜鉛濃度の低下に関連するタンパク質については、亜鉛のみが遊離したアポタンパク質として存在しているか、あるいは、他の金属、例えばコバルトが亜鉛と置き換わった置換体として存在している可能性が高いことを意味しているものと思われる。興味ある事実として、多くの亜鉛タンパク質の亜鉛をコバルトと置き換えた置換体は、活性が低下することなく、むしろ増加するものもある。このことからコバルト置換体の存在の可能性は高いと思われるが、その一方で、体内の亜鉛とコバルトの濃度を考慮すると、コバルトの濃度は亜鉛の約 100 分の 1 であり、亜鉛濃度の低下分がすべてコバルトで置換されて補われているとは考えにくい。これらのことから、現時点では、アポタンパク質と置換体の両者が混在しているものと考えている。

精巣細胞の可溶性画分中のタンパク質を二次元電気泳動により分離したところ、亜鉛欠乏群で消失するスポットがある一方で、対照群には認められないスポットも存在した。これらの事実は、精巣中での精原細胞からの精子の形成・成熟までの一連の働きと関連しているものと思われるが、この点については、今後検討していきたい。

3. 3 PIXE分析による可溶性タンパク質中の微量元素の定量

電気泳動法による可溶性タンパク質分離後に切断したゲルについての PIXE 分析を行い、タンパク質中の微量元素濃度の分析を行うことを試みた。ここで、分析結果は、電気泳動ゲルの銀染色の際、タンパク質に結合する銀イオンの量が、そのタンパク質の量に比例すると仮定し、それぞれの元素量を銀の量で規格化することで、タンパク質量との比として算出できるものと考えていた。しかしながら、例えば、SDS-PAGE で試料をフローさせるレーンからかけ離れた位置のゲルにおいても銀が検出されたことから、銀の量をもってタンパク質量とすることは困難であることがわかった。この点も含め、タンパク質と結合した金属量の定量法に関して、さらに検討していきたい。

Determination of trace elements in pancreases and testes of Zn-deficient mice

Makoto Yanaga¹, Hirotaka Shimoyama², Hirokazu Tanaka¹,
Wataru Muramatsu² and Kouichiro Sera³

¹Radioscience Research Laboratory, Faculty of Science, Shizuoka University
836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka 422-8529, Japan

²Graduate School of Science, Shizuoka University
836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka 422-8529, Japan

³Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

Abstract

Eight-week-old male mice of ICR strain were divided into two groups; one was fed with zinc deficient diet (<1 µg/g Zn), the other with control diet (30 µg/g Zn). After 1 week of treatment periods, their pancreases and testes were removed. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and two-dimensional electrophoresis (2-DE) were performed for cytosolic fraction. After electrophoresis, the gel was cut into protein spots and subjected to PIXE analysis.