

機器中性子放射化分析法および PIXE 分析法による 亜鉛欠乏マウス肝細胞成分中の微量元素の定量

矢永誠人、小木貴憲*¹、衣川信之*¹、皆吉龍二*¹、上島淳慈

野口基子*²、菅沼英夫、二ツ川章二*³、世良耕一郎*⁴

静岡大学理学部放射化学研究施設
422-8529 静岡市駿河区大谷 836

*¹ 静岡大学大学院理工学研究科
422-8529 静岡市駿河区大谷 836

*² 静岡大学理学部生物地球環境科学科
422-8529 静岡市駿河区大谷 836

*³ (社)日本アイソトープ協会滝沢研究所
020-0173 岩手郡滝沢村字留が森 348-58

*⁴ 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

生体内には、鉄、亜鉛、マンガン、銅、セレンなど、その含有量は僅かではあるが、生命を維持し、正常な生理機能を果たすためには必要不可欠な元素が存在している。これらの元素は必須微量元素と呼ばれており、その1つである亜鉛は、ヒトの体内において鉄に次いで存在量の多い微量元素であり、種々のタンパク質と結合した亜鉛酵素という形で、様々な生体内の反応に関わっている。この亜鉛が欠乏すると、味覚・嗅覚障害、性機能障害、成長障害、脱毛、皮膚障害、免疫機能低下などの様々な亜鉛欠乏症状が現れてくることが知られている。

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、亜鉛欠乏モデルマウスおよび対照マウスを得、これらマウスの臓器・組織中の微量元素の定量を行い、比較・検討してきた。その結果、成獣マウスの亜鉛濃度に関しては、骨およびすい臓中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。その他の元素として、亜鉛欠乏マウスの全ての臓器および組織中のコバルト濃度が対照群のそれに比べて大

きく上昇していた。骨およびすい臓以外の臓器・組織において、亜鉛欠乏状態にあるにもかかわらず亜鉛濃度の有意な低下が見られなかったことについては、骨からの亜鉛の供給を考えている。しかしながら、特に肝臓については、多くの亜鉛結合タンパク質を含み様々な代謝に関与する臓器であり、コバルト濃度の変化以外の影響を受けていないとは考えにくいことから、本研究では、亜鉛欠乏状態においては亜鉛結合タンパク質がアポタンパク質として存在しているのか、あるいは亜鉛が他の金属元素と置換しているのか、またはタンパク質そのものが消失しているのか、などの構造の変化について検討することとした。この目的のために、遠心分離法により肝細胞をいくつかの細胞成分に分離し、その各画分についての微量元素濃度の分析を行うこととした。なお、まだ研究途中の段階であり、本報では、機器中性子放射化分析による結果のみについて報告することとする。

2 実験

2.1 供試動物

日本クレア(株)より購入した I C R 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3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肝臓を摘出した。摘出した肝臓は、その後の目的に応じて、次の2種類の操作を行った。

- ① 肝細胞の各細胞成分(各画分)中での微量元素濃度の分析を目的とした場合には、生重量を測定した後、HEPES buffer を加えてホモジナイズした。その後、条件を変えて5回の遠心分離を行い(50×g, 7 min、1,000×g, 10 min、9,000×g, 10 min、30,000×g, 30 min、105,000×g, 65 min)、非破壊細胞画分、核画分、ミトコンドリア画分、リソソーム画分、ミクロソーム画分および可溶性画分に分離した。それぞれの画分を凍結乾燥後、秤量した。
- ② SDS-PAGEによる可溶性タンパク質の分離を目的とする試料については、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 機器中性子放射化分析 (I N A A)

摘出した肝臓の各画分、すなわち、非破壊細胞画分、核画分、ミトコンドリア画分、リソソーム画分、ミクロソーム画分および可溶性画分について I N A A を行った。それぞれの各画分について 10~150 mg を精秤した後、ポリエチレン袋に二重に封入したものを照射・分析用試料とした。標準試料には、NIST SRM 1577b Bovine Liver の一定量を同様に二重封入したものをを用いた。熱中性子の照射は、日本原子力研究所 JRR-3 または京都大学原子炉実験所 KUR にて行った。短寿命核種による定量(Na、Mg、Cl、Mn、Cu、Br)では、JRR-3 放射化分析用照射設備 PN-3(熱中性子束 $1.5 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$)あるいは KUR Pn-1 圧気輸送管(熱中性子束 $1.9 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$)にて 10 秒間あるいは 15 秒間の照射を行い、照射後直ちに、あるいは 1~3 時間後に高純度 Ge 半導体検出器を用いて γ 線測定を行った。長寿命核種による定量(Fe、Co、Zn、Se、Rb)では、JRR-3 気送照射設備 PN-1(熱中性子束 $6.0 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$)または KUR 黒鉛設備圧気輸送管 TC-Pn(熱中性子束 $40 \times 10^{11} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$)にて 20 分間または 50~74 時間の熱中性子の照射を行い、照射後、10~60 日間の冷却の後、高純度 Ge 半導体検出器を用いて γ 線測定を行った。

2. 4 SDS-PAGE

亜鉛欠乏マウスおよび対照マウスのそれぞれの肝細胞について、SDS-PAGEによって可溶性画分中に存在するタンパク質を分離し、CBB染色または銀染色を行った。

3 結果および考察

3. 1 I N A Aによるマウス肝細胞成分中の微量元素の定量結果

I N A Aによる亜鉛欠乏マウスおよび対照マウスのそれぞれについての、各肝細胞成分中微量元素の定量結果の一例として、可溶性画分についての分析結果を Fig. 1 に示した。Fig. 1 に見られるように 11 元素について定量を行うことができた。なお、本研究では、試料調製の際に用いる HEPES buffer の pH の調整に sat. KHCO_3 を用いた。これは、常法に従って KNaCO_3 を用いた場合には、中性子照射によって大量の ^{24}Na が生成し、その高エネルギーガンマ線によるコンプトン散乱の影響によって、他の元素の定量が妨害されることが予想されたため、これを避けたためである。したがって、本来であれば I N A A ではカリウムの定量が可能であるが、本研究の場合には上述の理由により定量することはできなかった。

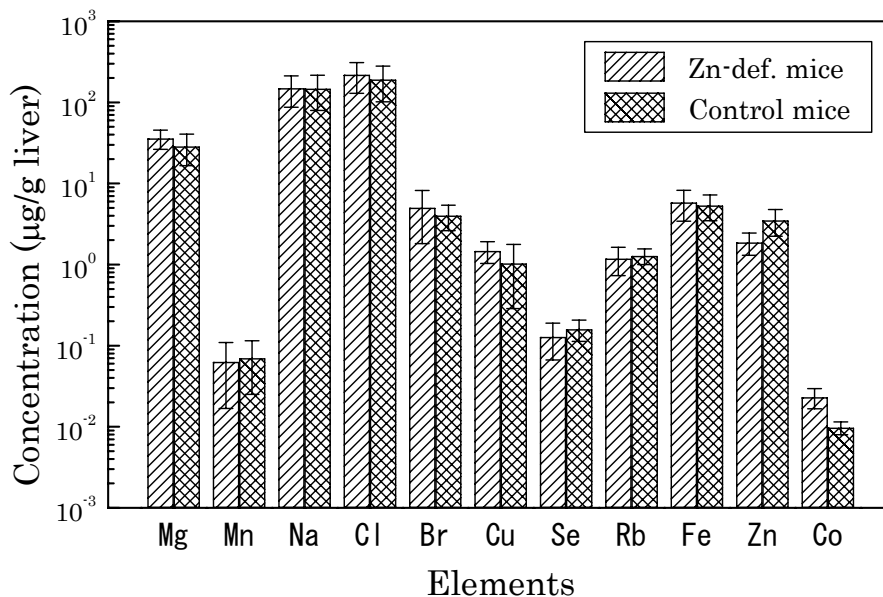


Fig. 1 Elemental concentrations in cytosolic fraction of hepatic cells of zinc deficient and control mice

我々のこれまでのマクロ的分析では（肝臓を細胞分画せずにそのまま分析した場合には）、亜鉛欠乏マウスにおける亜鉛濃度の有意な低下は認めることはできなかった。しかしながら、今回、肝細胞について遠心分離法による細胞分画を行って分析したところ、Fig. 1 に見られるように、可溶性画分では亜鉛欠乏群で亜鉛濃度に有意な低下を認めることができた。亜鉛の肝細胞内での分布を Fig. 2 に示した。Fig. 2 に見られるように、F1 の非破壊細胞を除けば、肝細胞 1 g あたりの含有量に換算した亜鉛濃度は、可溶性画分中で最も多く、次いで核画分中であつた。可溶性画分には、多くのタンパク質や酵素が含まれて

おり、亜鉛はこれらと結合しているものと思われる。本研究においては、食餌中の亜鉛の欠乏によって血漿中亜鉛濃度が低下したとき、肝細胞中の亜鉛結合タンパク質から亜鉛が遊離してしまうのか、亜鉛が他の金属と置換するのか、あるいは、タンパク質そのものが消失するのか、いずれにしろ、肝細胞の可溶性画分中の亜鉛含有量は低下するのではないかと考えていたが、本実験結果はこれらのうちのいずれかの可能性を示すものである。

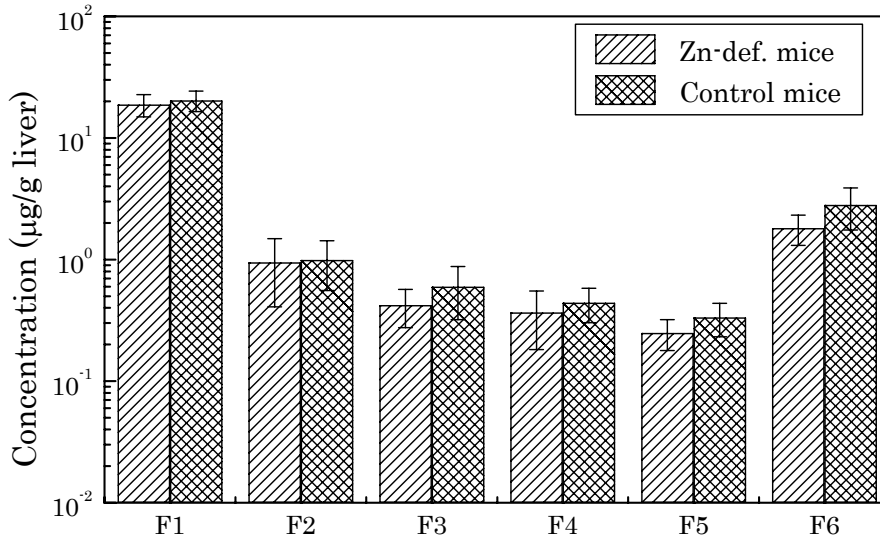


Fig. 2 Zn concentrations in each fraction of livers of zinc deficient and control mice
 1:cellular fragments and heavy particles 2: nuclei 3:mitochondria 4:lysosome 5:microsome 6:cytosol

Fig. 1 に示した可溶性画分についての分析結果で、亜鉛以外の元素で両群間に有意な差を認めることができた元素はコバルトのみであった。このコバルトについては、肝臓の全分析においても亜鉛欠乏群で有意な上昇が認められた元素であったが、細胞分画を行って分析したところ、Fig. 3に見られるように、全ての画分において、亜鉛欠乏群のコバルト濃度が上昇していたが、特に核画分および可溶性画分での濃度の上昇が著しいものであった。生体内におけるコバルトの化学形としては、コバラミン等のビタミン B 群の形で存在するか、あるいは、コバルトイオン（無機体）として何らかのタンパク質と結合していることが考えられる。亜鉛欠乏群の全ての画分でコバルト濃度が高まった原因については次のように考えている。実験室レベルにおいては、亜鉛タンパク質中の亜鉛は容易に遊離し、また、コバルトなどの他の金属と置換する。このことから、食餌中の亜鉛が欠乏した場合には食餌からコバラミンが積極的に取り込まれたり排泄が抑制されたりするというよりは、積極的に亜鉛を取り込むときにコバルトも取り込む、あるいは、亜鉛タンパク質中の亜鉛とコバルトが置換する、ということが起こっていると考えられる。タンパク質に結合している亜鉛とコバルトとの置換を考えたとき、肝細胞の可溶性画分以外ではいずれの画分においても亜鉛濃度に関しては両群の間に有意な差が認められなかったのは、コバルト濃度に比較して亜鉛濃度は約 10^2 倍高いため、亜鉛とコバルトが置換することがあっても亜鉛濃度の低下については検知できなかったためであろう。一方、コバルト濃度に関しては、もともとの存在量が低く、

また、I N A Aにおける検出感度も高いため、その濃度の上昇を容易にとらえることができたものと考えている。

その他の元素の多くは、可溶性画分中での濃度が最も高かったが、鉄はミクロソームで最も高濃度を示していた。これは鉄含有タンパク質であるシトクロム P450 やフェリチンなどに起因していると考えられる。

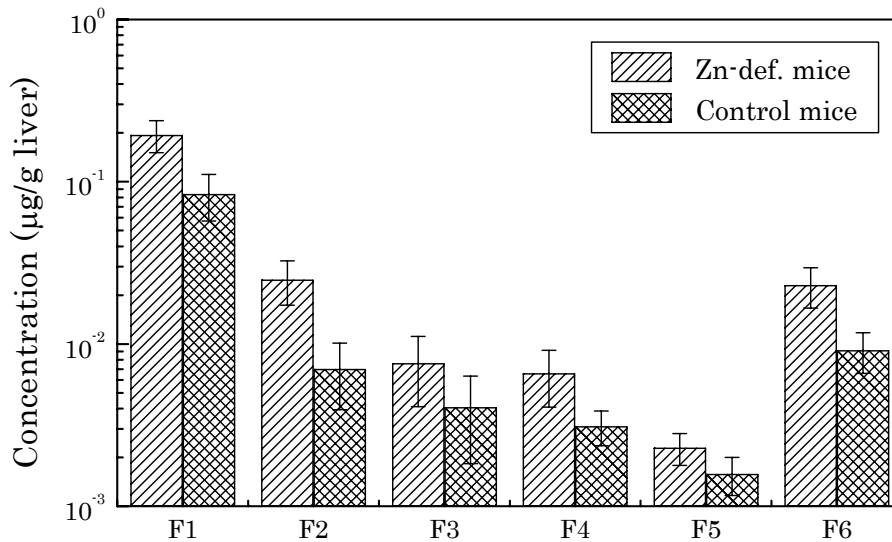
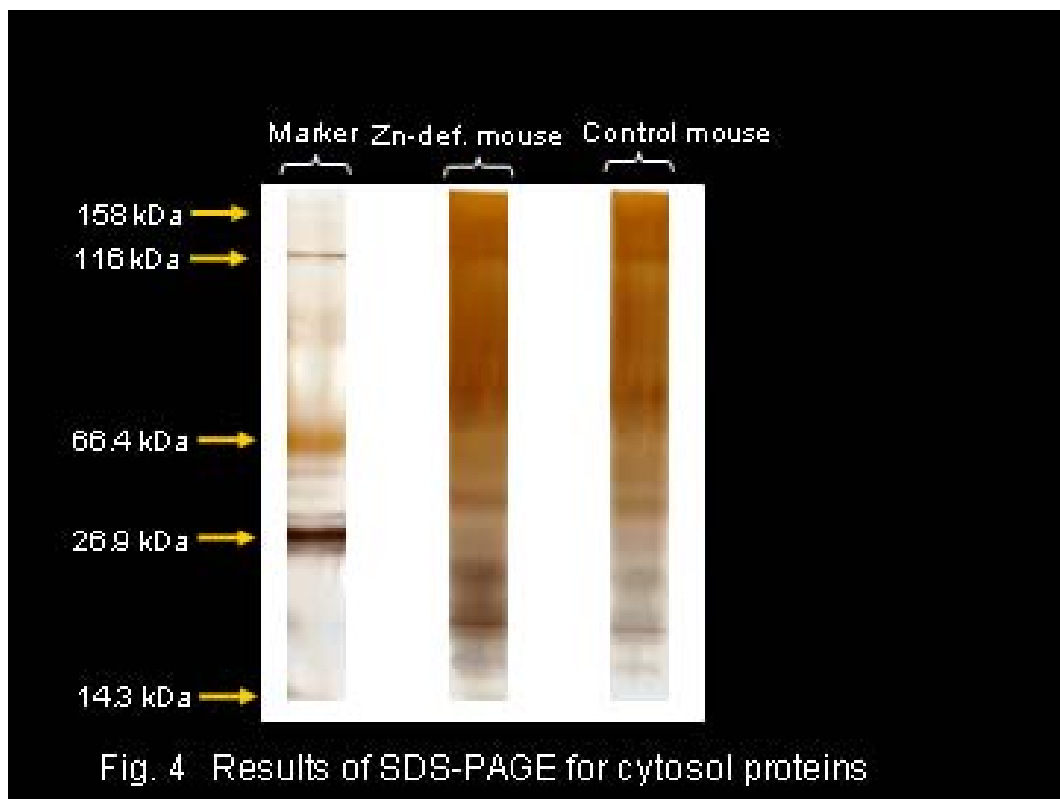


Fig. 3 Co concentrations in each fraction of livers of zinc deficient and control mice
 1:cellular fragments and heavy particles 2: nuclei 3:mitochondria 4:lysosome 5:microsome 6:cytosol

3. 2 SDS-PAGEの結果

亜鉛欠乏マウスおよび対照マウスの肝細胞の可溶性タンパク質について SDS-PAGEを行ったところ、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、各バンドの位置や数あるいはその濃度に関しての比較をした結果は、両群間に有意な差を認めることはできなかった。銀染色を行った結果の一例を Fig. 4 に示した。この両群間に差を認めることができなかったことは、亜鉛欠乏による亜鉛タンパク質（アポタンパク質）の消失や新たなタンパク質の誘導の可能性が低いことを示しているが、SDS-PAGEで分離され、確認される各バンドは、まだ多種類のタンパク質が混在したものであることから、今回のように、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、上述の内容を断定することはできないものと考えている。



今後は、タンパク質の分離方法に改善を加えるとともに、タンパク質量の定量とPIXE分析法を併用することにより、亜鉛欠乏時におけるタンパク質構造の変化、亜鉛欠乏が生体に与える影響のメカニズムを追求していく予定である。