

PIXE 分析法およびINAAによる亜鉛欠乏マウス臓器中の微量元素の分析

《二次元電気泳動した可溶性タンパク質中の定量》

上島淳慈¹、皆吉龍二¹、川島美智子¹、菅沼英夫²

野口基子³、二ツ川章二⁴、世良耕一郎⁵、矢永誠人²

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

³ 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

⁴ (社) 日本アイソトープ協会アイソトープ部
〒113-8941 東京都文京区本駒込 2-28-45

⁵ 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

生体微量元素とは、生体内にごく僅かに存在する元素のことを意味し、これらの元素は体内ではそれだけで機能することは少なく、主として酵素タンパク質や代謝機能の触媒として作用する。そのため、生物体内には、生命活動とその維持において必須性の高い元素（必須微量元素）が存在し、鉄、亜鉛、マンガン、銅、セレンなどがこれに含まれる。この中で亜鉛は、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、亜鉛欠乏マウスおよび対照マウスの臓器・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、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。その他の元素として、亜鉛欠乏マウスの分析を行った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。いくつかの臓器において、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。そこで本研究では、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が消失など、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。この目的のために、遠心分離法により分離した肝細胞成分中における微量元素濃度を機器中性子放射化分析により、また、可溶性タンパク質中の微量元素濃度を PIXE 分析により定量した。

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, C E - 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、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、二次元電気泳動法による可溶性タンパク質の分離、および PIXE 分析によるタンパク質中の微量元素濃度の分析を目的とする試料については、Tris-HCl Buffer を用いてホモジナイズした肝細胞から、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)

成分分離した肝細胞の各画分、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、日本原子力研究開発機構 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 10~60 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 $4.0 \times 10^{11} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$)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 電気泳動法と P I X E 分析

2. 4. 1 SDS-PAGEとPIXE分析

タンパク質の検出を目的とし、亜鉛欠乏マウスおよび対照マウスの肝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 を用いてすべてのタンパク質濃度をそろえた。次に 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。

PIXE 分析によるタンパク質中の微量元素定量を目的とした試料については、SDS-PAGE 後、銀染色を行った。その後、約 27~65 kDa のそれぞれ 12 本のバンド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。

2. 4. 2 二次元電気泳動とPIXE分析

2.4.1 と同様に亜鉛欠乏マウスおよび対照マウスのタンパク質濃度をそろえた後、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、CBB 染色を行った際に亜鉛欠乏マウスにおいてタンパク質の減少が示唆されたそれぞれ 2 つのスポット位置〔スポット 1 (67.1 kDa)、スポット 2 (77.6 kDa)〕でゲルを切断し、SDS-PAGE を行った場合と同様に PIXE 分析のターゲットを調製した。なお、亜鉛欠乏マウスについて二次元電気泳動を行ったゲルからは、対照群のスポットと同じ位置でゲルを切断した。

3 結果および考察

3. 1 INAAによるマウス肝細胞成分中の微量元素の定量結果

INAA により定量した亜鉛欠乏マウスおよび対照マウスのそれぞれの肝細胞成分中における微量元素の結果の一例として、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

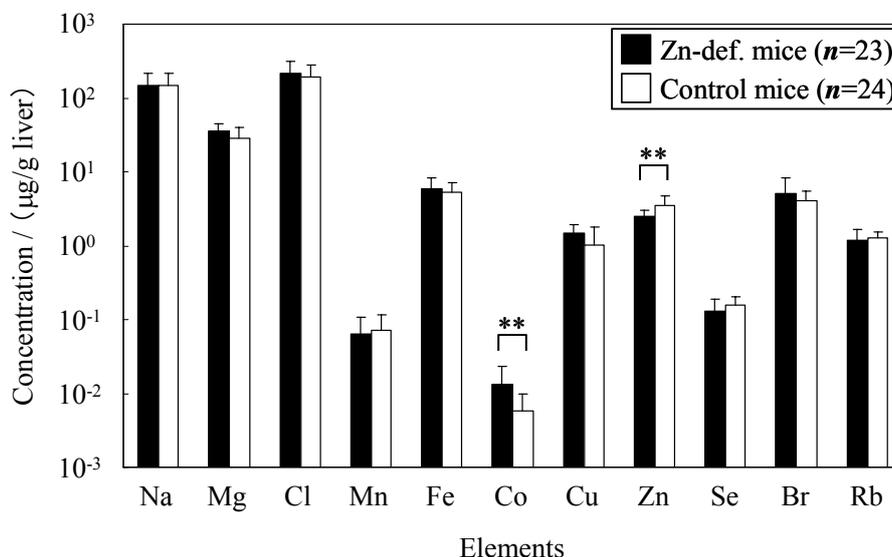


Fig. 1 Concentrations of eleven elements (mean ± SD) in cytosolic fraction of Zn-def. mice and control ones. Asterisks indicate significant difference (* $P < 0.01$; t-test) from control.

素について定量を行うことができた。なお、本実験では、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 NaHCO_3 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INAA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。

亜鉛の肝細胞内での分布を Fig. 2 に示した。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. 2に見られるように、特に可溶性画分において亜鉛欠乏群での亜鉛濃度の有意な低下を認めることができた。また、F1の非破壊細胞を除けば、肝細胞1g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高く、次いで核画分中であつた。細胞内に存在する亜鉛の多くは、タンパク質と結合して存在し、遊離イオンとして存在する量は非常に少ない。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。

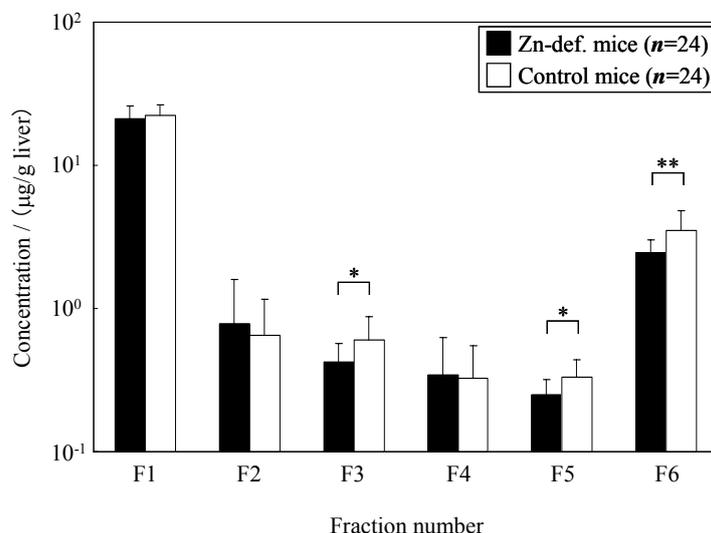


Fig. 2 Concentrations of zinc (mean \pm SD) in cellular fragments and 5 subcellular fractions of Zn-def. mice and control ones; F1-cellular fragments, F2-nuclear, F3-mitochondrial, F4-lysosomal, F5-microsomal and F6-cytosolic fractions. Asterisks indicate significant difference (* P <0.05; ** P <0.01; t-test) from control.

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つた。これは他の画分においても同様の結果となつた。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つたが、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。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つた。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つ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。さらに、いくつかの亜鉛酵素に関しては、亜鉛がコバルトと置換した場合、酵素活性が保たれる、もしくは高くなることが知られている。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大き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、INAA 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。

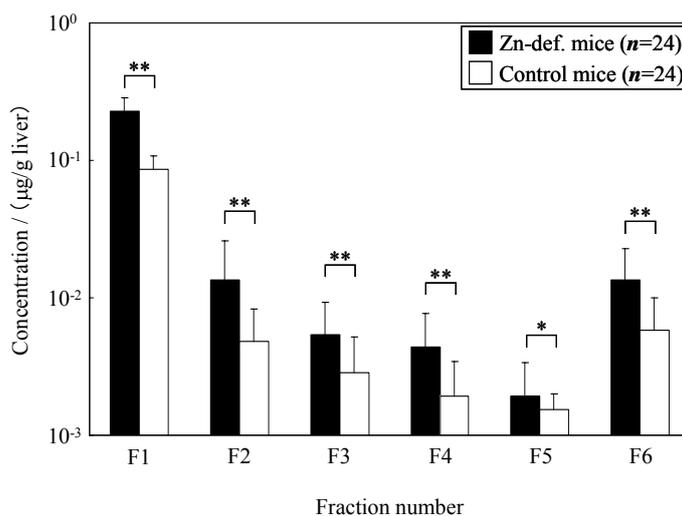


Fig. 3 Concentrations of cobalt (mean \pm SD) in cellular fragments and 5 subcellular fractions of Zn-def. mice and control ones; F1-cellular fragments, F2-nuclear, F3-mitochondrial, F4-lysosomal, F5-microsomal and F6-cytosolic fractions. Asterisks indicate significant difference (* P <0.05; ** P <0.01; t-test) from control.

3. 2 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肝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。しかし、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。

3. 3 二次元電気泳動法による可溶性タンパク質の分離結果

二次元電気泳動法により可溶性タンパク質を分離した結果を Fig. 5 に示した。二次元電気泳動を行うことで肝臓サイトゾルに存在する可溶性タンパク質をスポットとして広く分離することができた。亜鉛欠乏マウスおよび対照マウスのそれぞれのタンパク質スポットを比較した結果、Fig. 5 に矢印で示したタンパク質スポットが亜鉛欠乏状態において消失もしくは明らかに薄くなっていることが認められた。分子量マーカーから算出したこれらのタンパク質の相対分子量は等電点 (pI) の低い方からそれぞれ 67.1 kDa、77.6 kDa であった。これは、他のマウスの肝臓を用いて同様の対照実験を繰り返し行った場合も同様の結果となった。

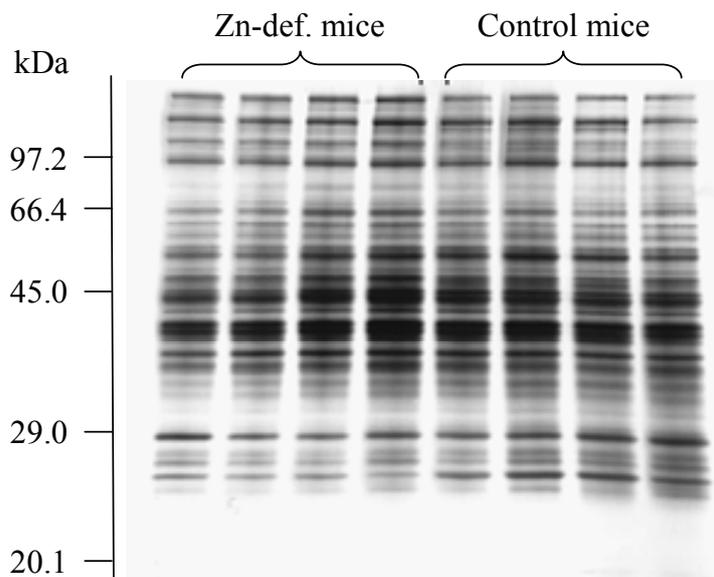


Fig. 4 Typical SDS-PAGE pattern of proteins after silver staining for the cytosolic fraction

この結果から、亜鉛が欠乏することで、あるタンパク質については全量ではないとしても、その一部は消失（減少）することが示唆された。本実験では、この消失の可能性のあるタンパク質の同定を行うことができなかったため、これらのタンパク質が亜鉛結合タンパク質であるかどうかは判断できないが、亜鉛結合タンパク質と仮定した場合、消失の原因として、亜鉛が不足したことによりタンパク質自身の構造を保持することができなくなったことや、肝臓全体としての機能を保つために、他の細胞成分に輸

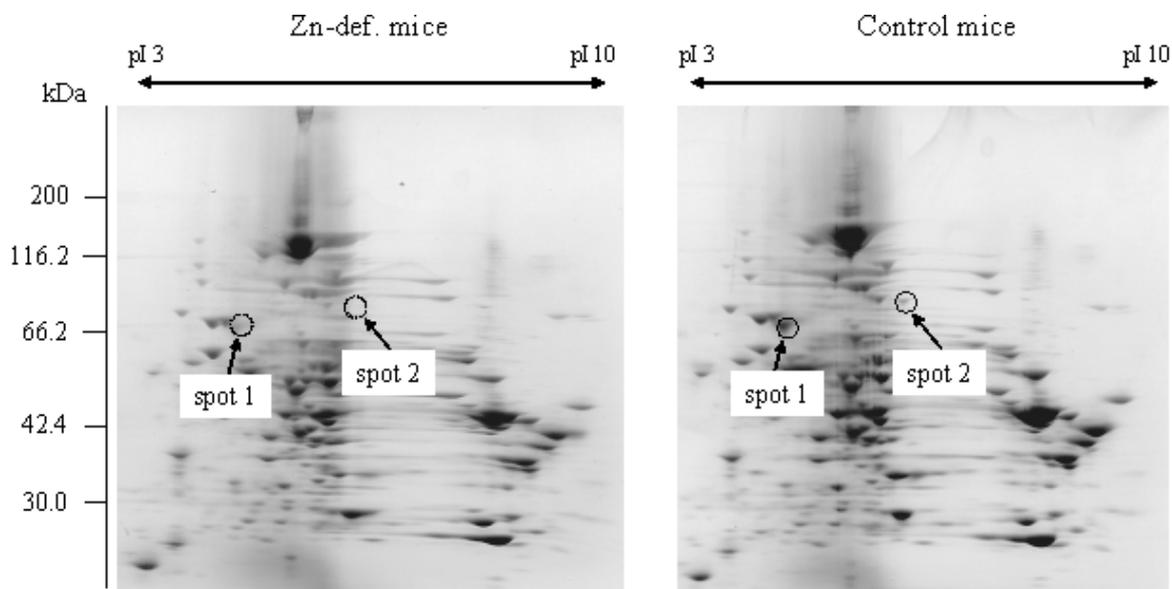


Fig.5 Two-dimensional electrophoretic analysis of cytosolic proteins. The gel was stained with Coomassie blue.

送されたことなどが考えられる。二次元電気泳動による分離で対象としたのが、サイトゾルに含まれる可溶性タンパク質だけであるために、他の細胞成分にタンパク質が輸送されたかどうかを確認すること

はできなかった。また、亜鉛欠乏時に大きく濃度増加するコバルトについては、新たなコバルト結合タンパク質が発現することも考えられたが、亜鉛欠乏群だけに認められるスポットはなかったため、この可能性は低いと考えられた。

3. 4 PIXE分析による可溶性タンパク質中の微量元素の定量結果

本実験では電気泳動法による可溶性タンパク質分離を行い、切断したゲルについて PIXE 分析を行い、タンパク質中の微量元素濃度の分析を行った。SDS-PAGE を行ったものについては、特に 27 ~ 65 kDa の 12 本のタンパク質バンド、二次元電気泳動を行ったものについてはそれぞれ 2 つのスポットを対象として分析を行った。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した。この場合タンパク質が消失するなど、両群間でタンパク質量が変化すると上述の仮定は成り立たないが、3.3 で示した結果より、亜鉛欠乏状態におけるそのような変化は僅かであり、同種のタンパク質が存在する場合、結合する銀イオンの量もタンパク質量に比例すると考えられるため上記の仮定を採用した。その結果の一例として、各バンド中の亜鉛と銀の比を Fig. 6 に示した。この結果より、タンパク質の分子量が、62.5 および 31.0 kDa のゲル中における値 (Zn/Ag) が、亜鉛欠乏群において増加していることが認められた。これは、この分子量のアポタンパク質に、サイトゾルの遊離亜鉛もしくは他のタンパク質に結合していた亜鉛が結合したためにタンパク質量 (Ag 量) は変化せず亜鉛の量が増加したために見られた結果であると考えられる。これに対して、35.8 および 33.1 kDa においては亜鉛欠乏群でその値が減少していた。これは、亜鉛結合タンパク質から、亜鉛が遊離し、アポタンパク質へと変化したため、あるいは他の金属元素が結合したため、亜鉛の量のみが減少したためであると考えられる。

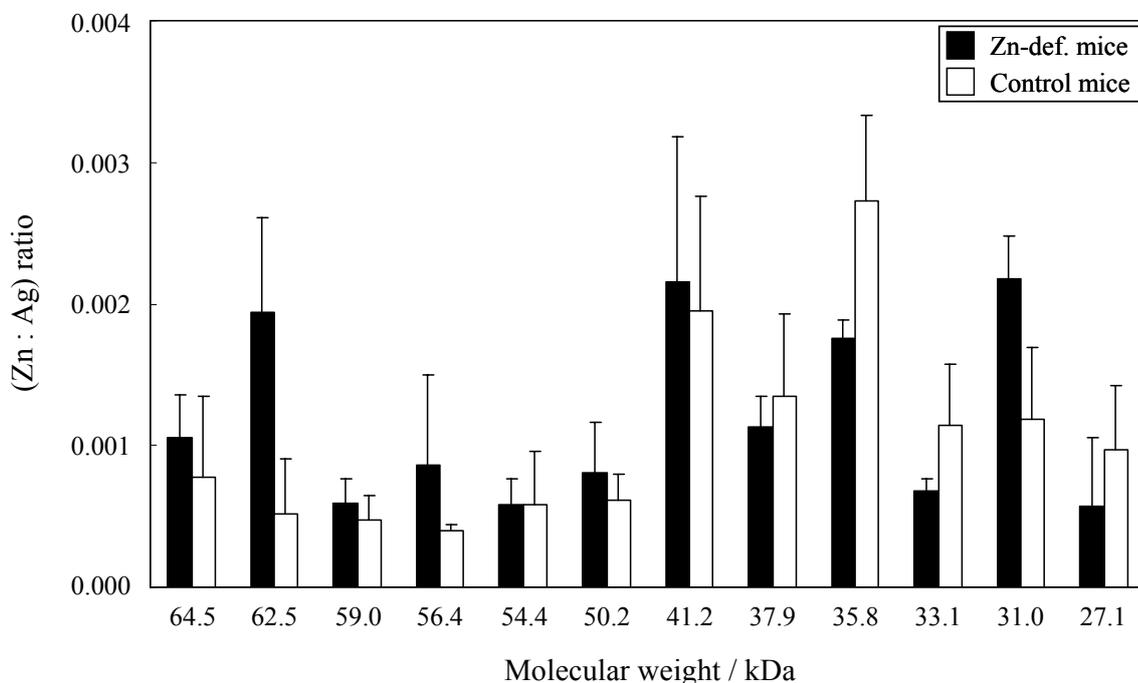


Fig. 6 (Zn:Ag) ratio in each band of zinc deficient mice and control ones.

一方、他の 9 つのバンドでは両群間に有意な濃度差は認められなかった。これは、亜鉛欠乏によってもタンパク質の消失等の変化が起こらない場合を除いて、亜鉛タンパク質の減少や消失、もしくは

新たな亜鉛タンパク質の誘導の可能性を示している。すなわちタンパク質と亜鉛の両方が増加もしくは減少するために亜鉛と銀の比が変わらないためであると考えられる。しかし、3.3より、亜鉛欠乏によるタンパク質の消失や発現の可能性はあるが、その変化量は僅かであると考えられるため、上述のような変化というよりは単に亜鉛の欠乏による変化を受けにくいタンパク質であると考えられる。また、SDS-PAGEで分離したタンパク質の各バンドには多種類のタンパク質が混在している。このことから、もし一部の亜鉛タンパク質から亜鉛が遊離していたとしても、それを亜鉛の濃度変化として容易には捉えることができないことも考えられる。

二次元電気泳動後、PIXE分析を行った結果をFig. 7に示した。両群間の値を比較したところ、銀により規格化した亜鉛量はスポット1では亜鉛欠乏群で大きく低下すること、また、スポット2では両群間に差は認められないことが示された。また、対照群のスポット1を除く3つはほぼ等しい値となった。これらの結果より、スポット1のタンパク質は亜鉛結合タンパク質であり、スポット2は亜鉛の結合していないタンパク質であることが示唆された。そのために、スポット1では、亜鉛欠乏状態においてタンパク質が消失もしくはその一部が減少したために亜鉛の量が減少したと考えられる。また、亜鉛欠乏群において僅かに亜鉛が存在するのは、スポット2の結果から、電気泳動ゲルなどに含まれる不純物レベルでの亜鉛が定量されたためであると考えられる。

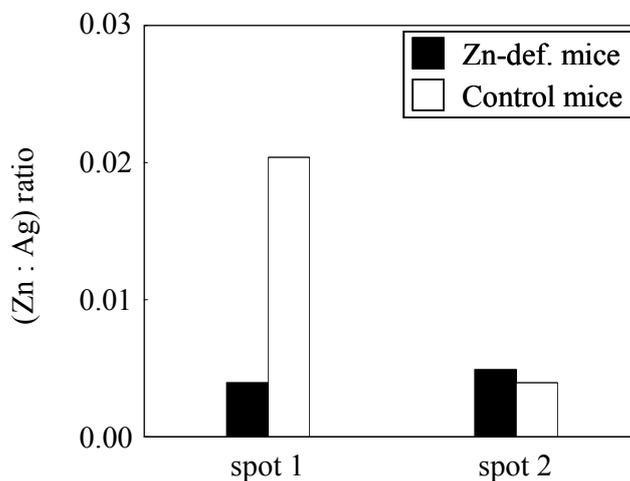


Fig.7 (Zn:Ag) ratio in each spot of zinc deficient mice and control ones.

**Determination of trace elements in organs and tissues of Zn-deficient mice
by instrumental neutron activation and PIXE analyses
~Determination of trace elements in soluble proteins separated by
two-dimensional electrophoresis~**

Junji Kamishima¹, Ryuji Minayoshi¹, Michiko Kawashima¹, Hideo Suganuma²,
Motoko Noguchi³, Syoji Futatsugawa⁴, Kouichiro Sera⁵ and Makoto Yanaga²

¹Graduate School of Science and Engineering, Shizuoka University
836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka 422-8529, Japan

²Radiochemistry Research Laboratory, Faculty of Science, Shizuoka University
836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka 422-8529, Japan

³Department of Biology and Geosciences, Faculty of Science, Shizuoka University
836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka 422-8529, Japan

⁴Radioisotope section, Japan Radioisotope Association
2-28-45 Komagome, Bunkyo, Tokyo 113-8941, Japan

⁵Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa 020-0173, Japan

Abstract

The concentrations of trace elements in hepatic subcellulars and cytosolic protein of zinc deficient mice were determined in order to investigate the behavior and role of zinc and other trace elements.

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 3 weeks of treatment periods, their livers were removed. Two types of experiments were performed. In the first experiment, the liver samples homogenized with HEPES buffer which adjusted to pH 7.4 with KHCO₃ were centrifuged under differential conditions in order to separate into cellular fragments and 5 subcellular fractions, such as nuclear, mitochondrial, lysosomal, microsomal and cytosolic fractions. Each fraction was freeze-dried for instrumental neutron activation analysis (INAA). Concentrations of 11 elements, Na, Mg, Cl, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Se, Br, and Rb, were determined by INAA. In the second experiment, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and two-dimensional electrophoresis (2-DE) were performed for cytosolic fraction of other mice. After electrophoresis, the gel was cut into protein bands and subjected to PIXE analysis.