

PIXE 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

矢永誠人、下山弘高¹、田中宏宗¹、池田裕亮²、秋葉慎一郎²、世良耕一郎³

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

¹ 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

² 静岡大学理学部化学科
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

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、種々の酵素タンパク質として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、性腺機能障害、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。

これまで、我々は、亜鉛欠乏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、特にすい臓については、8週齢の雄マウスを一定期間亜鉛欠乏餌で飼育すると、亜鉛欠乏餌を与えて1週間後には亜鉛濃度は大きく低下し、その後は一定に保たれていた。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の可能性について検討することとした。

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、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。摘出したすい臓の4頭分を1試料として、HEPES Buffer または 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 機器中性子放射化分析(INAA)

2.2 で分離した可溶性画分を凍結乾燥して精秤した後、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 にて行った。短寿命核種による定量(Na、Mg、Cl、Mn、Cu)では、JRR-3 放射化分析用照射設備 PN-3(熱中性子束 $1.5 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$)にて10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 $6.0 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$)にて20分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 PIXE 分析

2.4.1 SDS-PAGE と二次元電気泳動

亜鉛欠乏マウスおよび対照マウスのすい臓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。

また、同様に亜鉛欠乏マウスおよび対照マウスのすい臓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。

2.4.2 ゲルろ過クロマトグラフィーと PIXE 分析

上記と同様の可溶性画分試料について、Sephadex G-100 を担体として用いたゲルろ過クロマトグラフィーにて分離を行い、その各フラクションについての SDS-PAGE も行った。銀染色の後、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バンドを切断した。

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すい臓細胞の可溶性画分における微量元素の分析結果を Fig. 1 に示した。Fig. 1 に見られるように、可溶性画分中の亜鉛濃度は、これまでのすい臓全体での分析結果と同様に亜鉛欠乏群で有意に低下していた。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。

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すい臓細胞の可溶性タンパク質について SDS-PAGE を行い、分離したタンパク質の各バンドの位置や数を比較したところ、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、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、何らかの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。しかしながら、SDS-PAGE で分離され、それぞれの染色法によって確認された各バンドには、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が考えられることから、本結果をもって、タンパク質に変化はないと結論することはできないものと考えている。

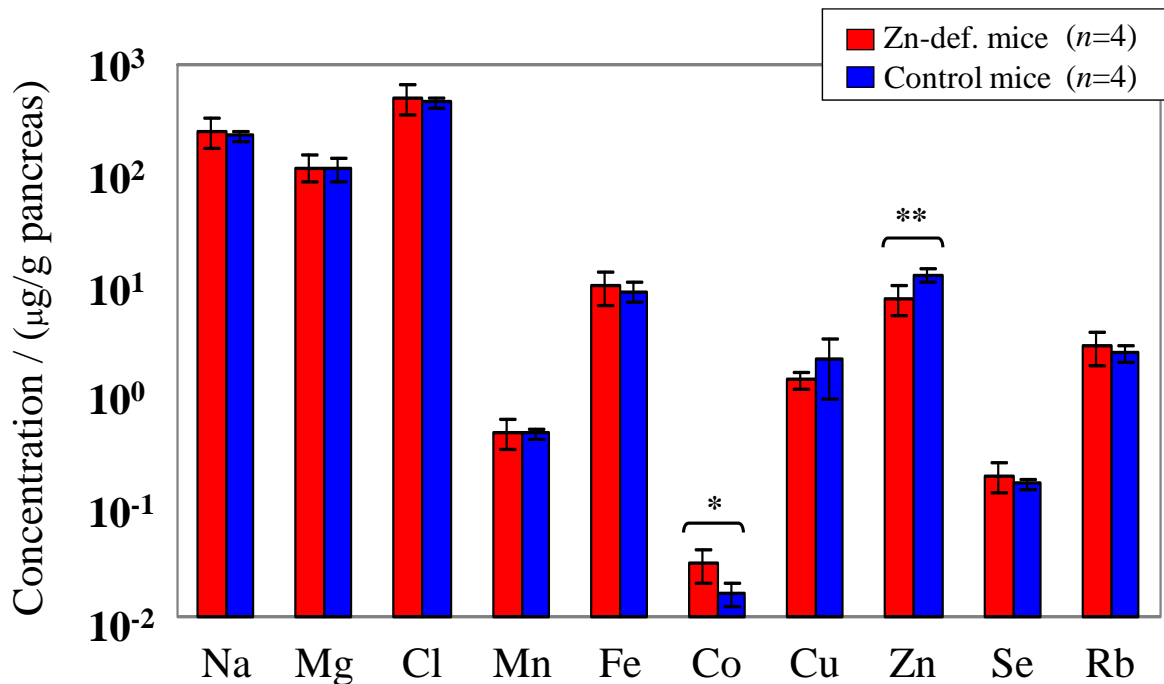


Fig. 1 Concentrations of ten elements in cytosolic fraction of pancreases of Zn-def. mice and control ones. (*: $P < 0.01$, **: $P < 0.05$; t -test)

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

本研究では、すい臓細胞の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る分離も行ったが、INAA による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。

3.4 ゲルろ過クロマトグラフィーによる粗分離後の SDS-PAGE による分離結果

そこで、Sephadex G-100 を担体として用いたゲルろ過クロマトグラフィーを行い、20 フラクションに分離した各フラクションの一部について SDS-PAGE を行った。その結果を Fig. 2 に示した。

Fig. 2 に見られるように、亜鉛欠乏マウス (ZD) では 20 kDa 付近に明らかに発現量の多いタンパク質が存在しているのがわかる。また、Scion Image および Image-J を用いて画像解析を行ったところ、35 kDa 付近には、対照群でその発現量が多いタンパク質バンドが認められた。

3.5 PIXE 分析による可溶性タンパク質中の微量元素の定量

Fig. 2 のゲルで、両群間でタンパク質量に大きな差を認めることができた部分を切り取って PIXE 分析を行った。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仮定して考えることとした。

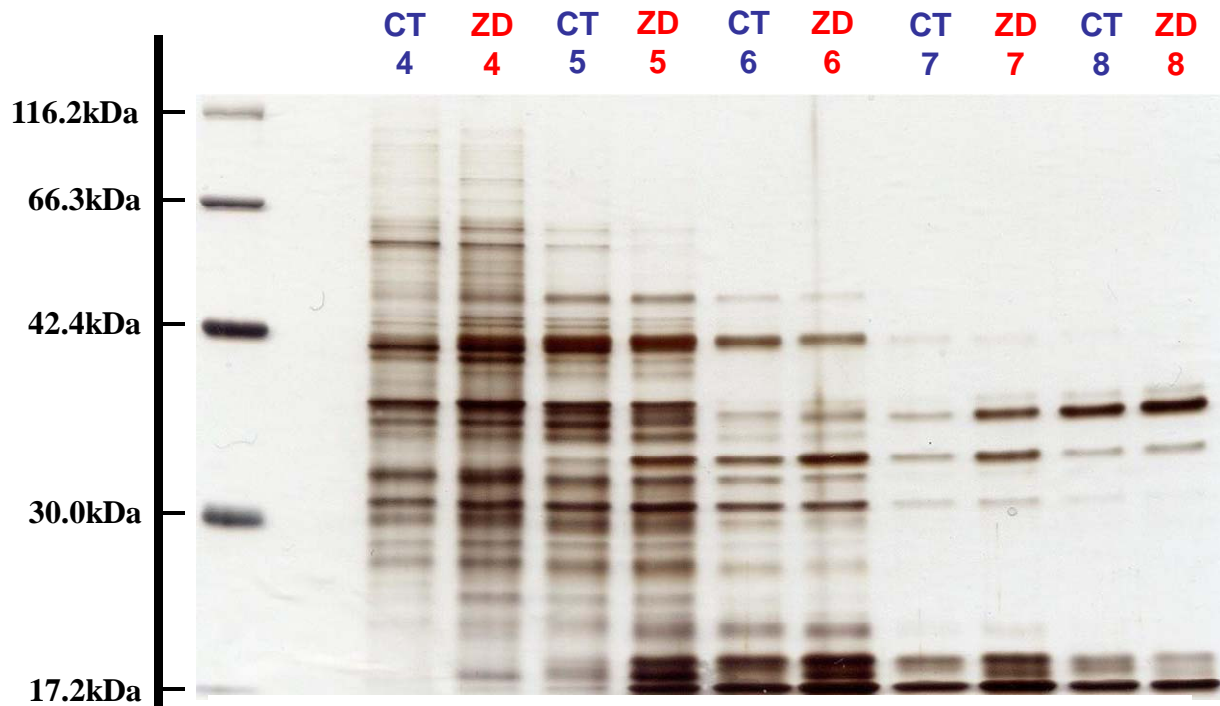


Fig. 2 SDS-PAGE pattern of proteins after gel filtration chromatography for the cytosolic fraction. (fractions No. 4 ~ 8)

その結果、まず、20 kDa 付近のバンドについては、少なくとも 2 種類のタンパク質が近接していることが推定された。すなわち、フラクション No. 6 のバンドについては、亜鉛欠乏群ではその発現量自体は多いものの、亜鉛および鉄の含有割合は対照群に比べて著しく低いものであったのに対し、フラクション No. 7 のバンドについては、亜鉛欠乏マウスではそのタンパク質量も多く、また、鉄の含有割合も高いものであった。また、対照群で多く存在していた 35 kDa 付近のバンドは、銅の含有割合が高いものであった。このことは、約 30 kDa の銅-亜鉛 SOD に何らかの物質が付着している化学形のもので、亜鉛欠乏群では不足するとともに銅が消失していることを示している可能性もあるが、現時点では、明確に説明することは困難である。

Determination of trace elements in organs of Zn-deficient mice by means of PIXE and INAA

Makoto Yanaga, Hirotaka Shimoyama¹, Hirokazu Tanaka¹,
Yusuke Ikeda², Shin-ichiro Akiba² and Kouichiro Sera³

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

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

²Department of Chemistry, Faculty 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) was performed after gel filtration chromatography were performed for cytosolic fraction. After electrophoresis, the gel was cut into protein spots and subjected to PIXE analysis.