

PIXE分析法および機器中性子放射化分析法による 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、大山拓也*¹、衣川信之*¹、皆吉龍二

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 静岡市大谷 836

*¹ 静岡大学大学院理工学研究科
422-8529 静岡市大谷 836

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

*³ (社)日本アイソトープ協会仁科記念サイクロロンセンター
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

必須微量元素の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、成長障害、脱毛、皮膚障害、性腺機能低下、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・組織中の微量元素濃度の定量を行い、比較・検討してきた。その結果、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、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分析を行うことにより、食餌中の亜鉛欠乏がマウス肝臓中の亜鉛および他の微量元素濃度の変化を調べ、金属結合タンパク質の挙動に与える影響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、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)

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INAAを行った。それぞれの各画分について10~150 mgを精秤し、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25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とPIXE分析

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。その後、各バンド位置およびその近傍のゲルを切断し、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コロジオンを用い、照射

中の試料の脱落を防ぐために試料を別のポリプロピレンシートでカバーして照射を行った。

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、I N A Aではカリウムの定量が可能であるが、本研究で用いる試料調製の際に HEPES buffer の pH の調整に sat. KHCO_3 を用いたため、カリウムの定量はできなかった。

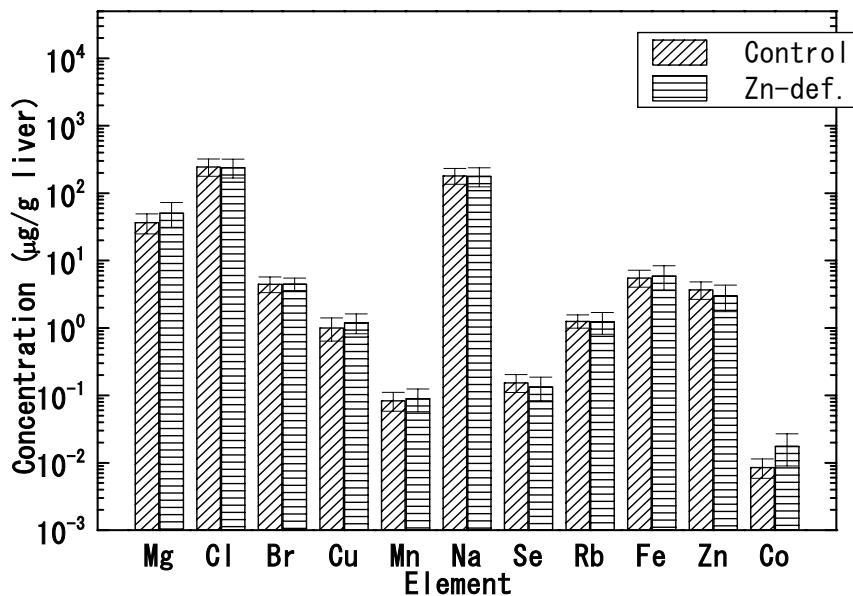


Fig. 1 Elemental concentrations in cytosol fraction of hepatic cells of zinc deficient and control mice

これら 11 の元素のうち、亜鉛およびコバルトの 2 元素について、肝細胞内での分布を Fig. 2 および 3 に示した。Fig. 2 に見られるように、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、食餌中の亜鉛が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、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、可溶性画分全体の分析の結果では、対照群との間に有意な差を認めることはできなかった。

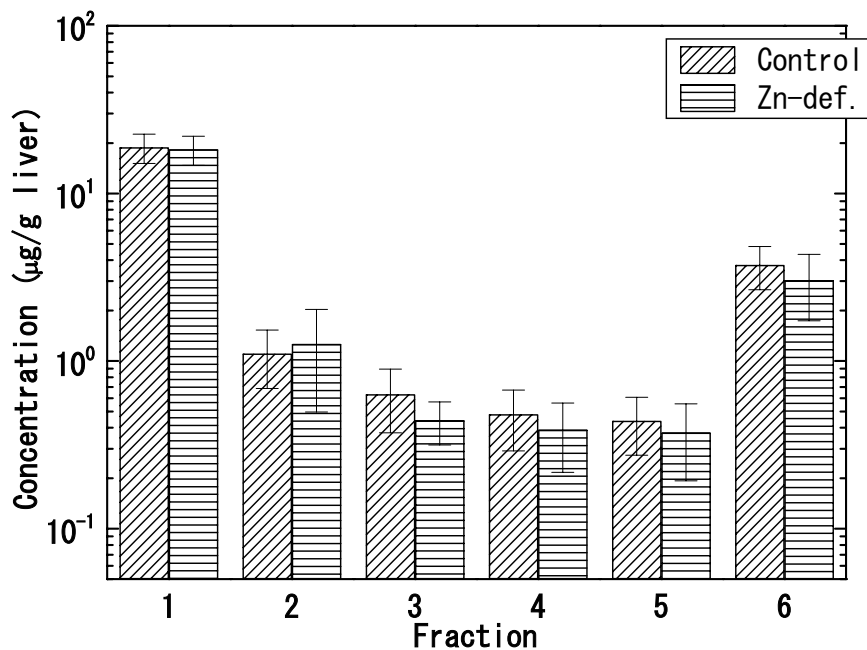


Fig. 2 Zn concentrations in each fraction of livers of zinc deficient and control mice
 1:cellular fragments and heavy particles 2: nuclei 3:mitochondria
 4:lysosome 5:microsome 6:cytosol

コバルトについては、Fig. 3に見られるように、各画分および可溶性画分での濃度が高かった。また、全ての画分において、亜鉛欠乏群のコバルト濃度が有意に上昇していた。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。

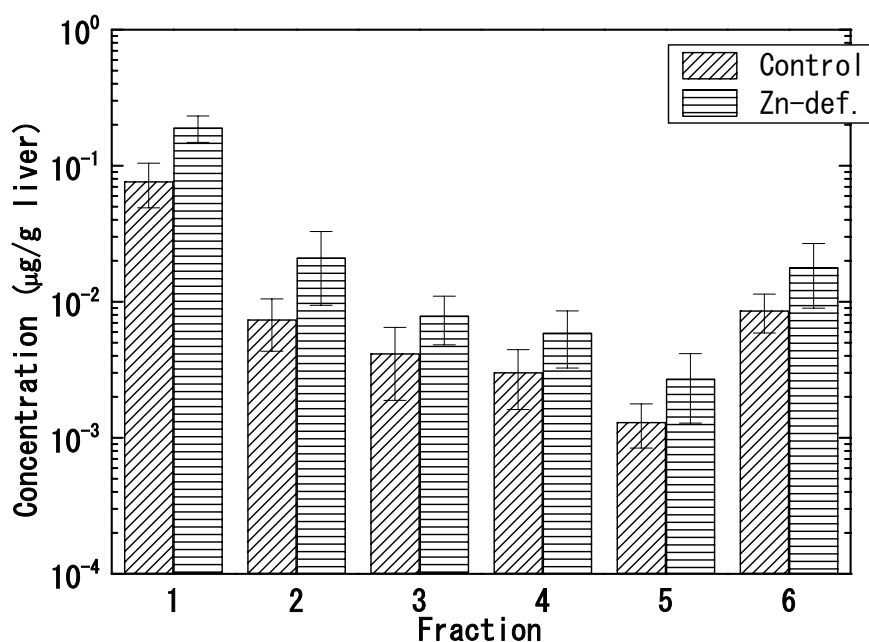


Fig. 3 Co concentrations in each fraction of livers of zinc deficient and control mice
 1:cellular fragments and heavy particles 2:nuclei 3:mitochondria
 4:lysosome 5:microsome 6:cytosol

3. 2 SDS-PAGEおよびPIXE分析の結果

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する比較をした結果は、両群間に有意な差を認めることはできなかった。このことは、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、この、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、このサンプルについての次に示すPIXE分析の結果からわかるように、上述の内容は断定できないものと考えている。

Fig. 4 に、銀染色を行ったものについてPIXE分析を行った結果を示す。各バンド中の微量元素の量はごく僅かであること、また、乾燥したと思われるアクリルアミドゲルであっても高真空中では、切り取ったゲル試料の内部から水分が気化して膨張するためコロジオンや試料をカバーするポリプロピレンフィルムを用いたため、自己吸収が大きく、銀以外の元素では亜鉛についてのみ、定量が可能なカウント数を得ることができた。試料である乾燥ゲルによる自己吸収を考えない場合、無標準定量法により、乾燥ゲル単位重量当たりの亜鉛濃度を求めることは可能であり、実際、暫定値としてその値を求めたが、Fig. 4 での縦軸は任意単位としてある。これは、上述した理由の他、銀濃度は定量性は低いもののタンパク質の相対的な濃度関係は示すであろうとの仮定から、銀濃度で亜鉛濃度を規格化して示したものである。このようにまとめてみると、各バンド中の亜鉛濃度は両群間で異

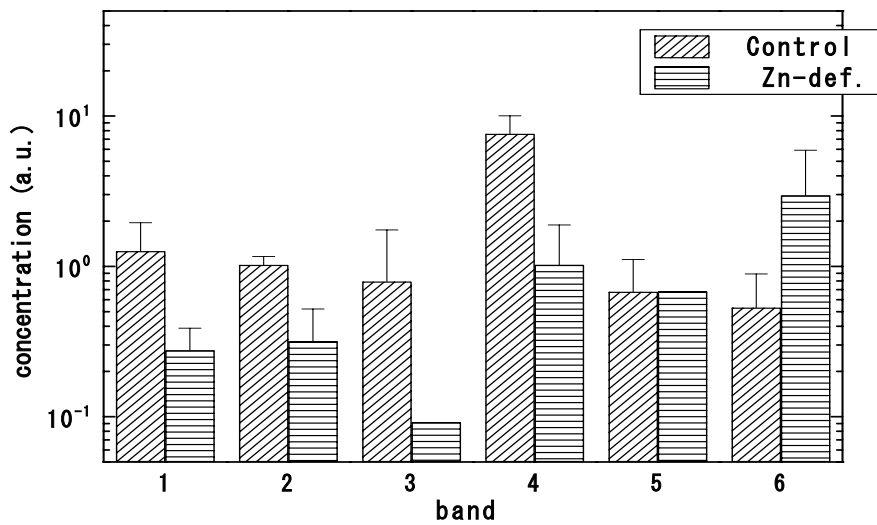


Fig. 4 Relative zinc concentration in each band after SDS-PAGE for cytosol of hepatic cells of zinc deficient and control mice

なっていることがわかった。亜鉛欠乏群では、低分子量側のバンドー1～4の亜鉛濃度は低下していた。このことは、これらのバンド中の亜鉛が遊離しているか他の金属と置換していることを示している。一方、高分子量のバンドー6の亜鉛濃度は増加していた。すなわち、亜鉛欠乏時において、高分子量の亜鉛タンパク質が誘導されることを示していた。

これらのことは、亜鉛欠乏症と関連することは事実であろうが、これに関しては、今後さらに検討していく予定である。