

## 亜鉛欠乏マウスすい臓細胞中の微量元素の定量

矢永誠人、下山弘高<sup>1</sup>、寺島美智子<sup>1</sup>、山本 督

村松 航<sup>1</sup>、菅沼英夫、世良耕一郎<sup>2</sup>

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

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>岩手医科大学サイクロトロンセンター  
020-0173 岩手郡滝沢村滝沢字留が森 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、様々な生体内の反応に関わっている。そのため、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。特に、すい臓においては、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脅威ある結果が得られていた。このことは、すい臓中には、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にも亜鉛を保持する亜鉛結合物質が存在することを示すものと考えている。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。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、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PIXE分析

### 2. 3. 1 SDS-PAGE

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。

### 2. 3. 2 二次元電気泳動とPIXE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、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。亜鉛欠乏群及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。銀染色を行った結果の一例をFig. 1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そのものの消失や新たなタンパク質が誘導され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、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. 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

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. 2に示した。二次元電気泳動を行うことで、すい臓細胞の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。

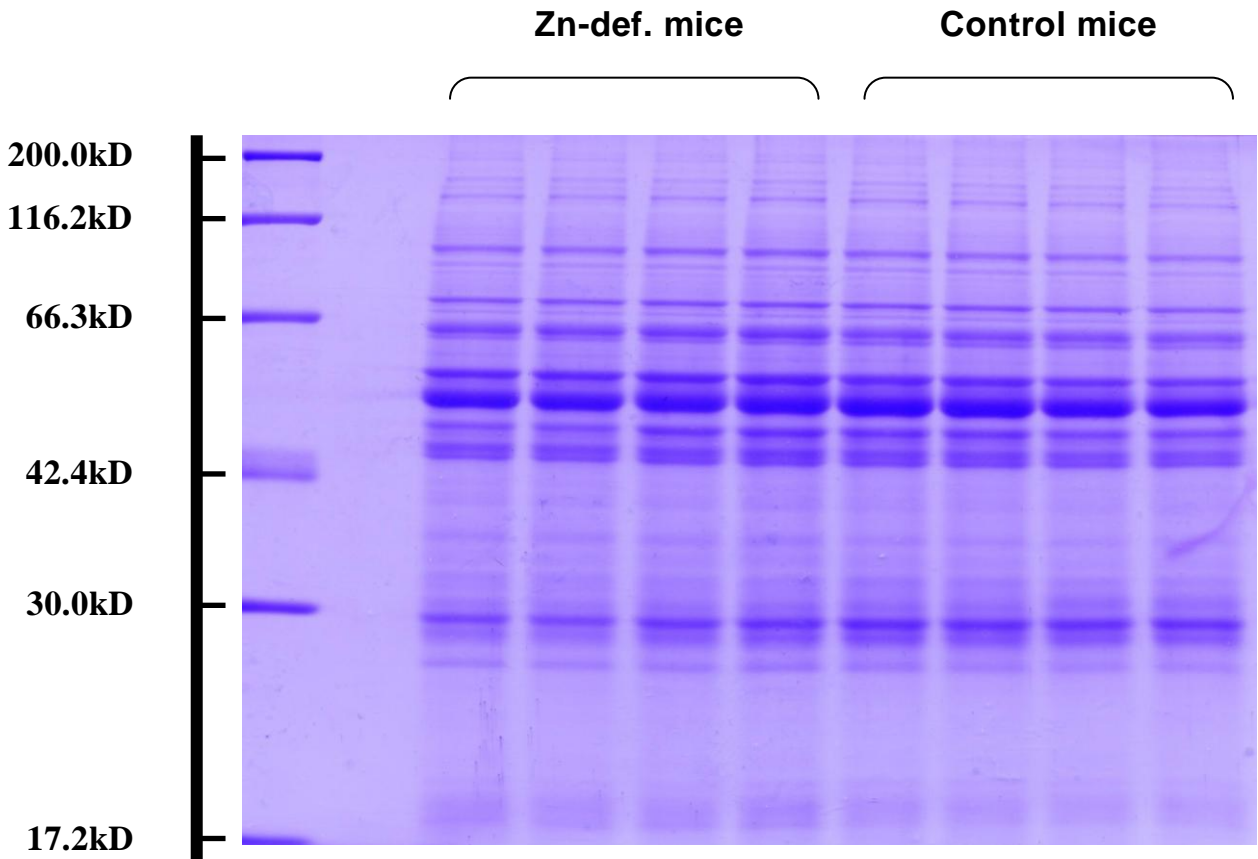


Fig. 1 Typical SDS-PAGE pattern of proteins after BCC staining for the cytosolic fraction

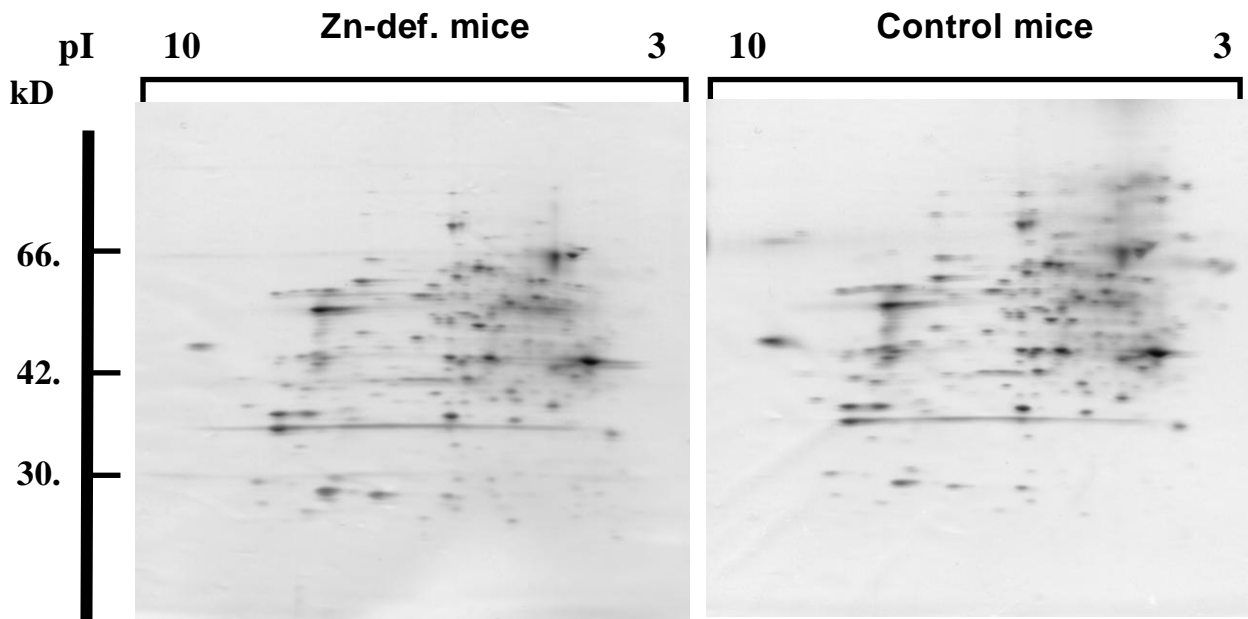


Fig. 2 Two-dimensional electrophoretic analysis of cytosolic proteins.

Fig. 2 に示したように、二次元電気泳動法により可溶性タンパク質を分離したところ、亜鉛欠乏群の高分子量のタンパク質が消失しているようなデータも得られた。しかしながら、マウス 4 頭分を 1 試料とした実験を繰り返したところ、必ず、このような一部のタンパク質の消失という結果が得られることはなく、今後、さらに検討していく予定である。

また、一部のタンパク質スポットのゲルを切り出して PIXE 分析を行った。無標準定量法により、Zn、Fe および Ag などの定量を行うことができた。当初は、亜鉛欠乏状態における金属タンパク質の変化を見るため、タンパク質量当たりの金属濃度の指標として、Ag 濃度に対する Zn 濃度の変化で検討することとした。しかしながら、タンパク質が存在しない部分のゲルからも Ag が検出されたため、Ag を指標とすることは困難であることがわかった。現在、他の指標を用いることを検討している。

## **Determination of trace elements in pancreases of Zn-deficient mice**

Makoto Yanaga, Hirotaka Shimoyama<sup>1</sup>, Michiko Terashima<sup>1</sup>, Susumu Yamamoto  
Wataru Muramatsu<sup>1</sup>, Hideo Suganuma and Kouichiro Sera<sup>2</sup>

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

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

<sup>2</sup>Cyclotron Research Center, Iwate Medical University  
348-58 Tomegamori, Takizawa 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 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.