

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500705

研究課題名(和文) 食餌中の亜鉛不足による生体内金属タンパク質の変化

研究課題名(英文) Effects of zinc deficient diet on changes of metalloproteins in organs and tissues of mice

研究代表者

矢永 誠人 (YANAGA MAKOTO)

静岡大学・理学部・准教授

研究者番号：10246449

研究成果の概要(和文)：亜鉛欠乏餌を与えて1週間飼育したマウスおよびその後1週間亜鉛を与えたマウスの肝臓、すい臓および精巣細胞のサイトゾル画分中の金属タンパク質について金属元素濃度の変化とタンパク質量の変化を調べた。その結果、肝臓においては僅かな変化のみが検知されたが、すい臓や精巣においては亜鉛欠乏の影響を受けやすい複数のタンパク質の存在を明らかにすることができたとともに、精巣中には亜鉛投与によっても回復しないタンパク質が存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Concentrations of trace metal elements and protein levels in cytosol fractions of hepatic cells, pancreas, and testes of mice which were fed with zinc-included diet for a week after one week feeding with Zn-deficient diet were determined. It was revealed in testes that the presence of proteins which were not recovered by administering zinc diet after falling into zinc deficiency.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：核・放射化学、生物無機化学

科研費の分科・細目：生活科学・食と栄養

キーワード：亜鉛欠乏、金属タンパク質、放射化分析

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、生体微量元素の機能については、学問の分野に限らず広く一般社会においても、インスタント食品やスナック菓子に依存しがちな現代の食生活から、微量元素欠乏が懸念されるようになってきた。その中で、亜鉛欠乏はその頻度が高く、最も懸念されているものである。しかしながら、現在のところ、臨床検査データによる亜鉛欠乏の正確な判断は困難とされ、亜鉛を投与することにより諸症状が改善されれば、欠乏症と診断されているのが現状である。また、遺伝的原因によるもの以外、すなわち食生活が原因のような場合

においても、亜鉛投与を行っても完全には症状を改善させることができないことの理由は解明されていない。

(2) 本研究の代表者は、これまで亜鉛欠乏マウスの各臓器・組織について、多元素同時定量法として主として機器中性子放射化分析法を用いて分析を行ってきた。その結果、食餌中の亜鉛が不足すると、肝臓や腎臓などの臓器においては亜鉛そのものよりも他の金属元素濃度が増加するとの知見を得、その理由の一つとして、骨にプールされていた亜鉛が他の臓器や組織に供給される一方で、亜鉛タン

パク質中の亜鉛が他の金属と置換する可能性を考えていた。このことから、亜鉛欠乏という病的状態における種々のタンパク質の性状を解析することは、亜鉛欠乏症の病理を解明することになるのみではなく、亜鉛欠乏症の発症の予防、また、亜鉛欠乏症に対する効果的な治療法の開発につながるものと考え、本研究を行うに至った。

2. 研究の目的

(1) 研究開始当初の背景を踏まえ、食餌中の亜鉛が欠乏しはじめた段階、すなわち亜鉛欠乏症が発症しない程度の初期の亜鉛欠乏状態においてキーとなるタンパク質を検索することを第一の目的とした。

(2) 亜鉛欠乏症と診断された後に、亜鉛投与によってその症状の改善が見られても、完全に回復することができないということは、亜鉛が欠乏したことにより一旦消失するとその再合成が行われにくいタンパク質の存在が示唆される。そのようなタンパク質を検索することを第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 日本クレア(株)より購入したICR系マウス(オス、7週齢)を一般的飼料(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、その後の一定期間、同社に作成を依頼した亜鉛欠乏餌 ($Zn < 1 \mu g/g$) および超純水を用いて飼育したマウスを本研究における供試動物とした。亜鉛を欠乏させる期間は、1週間とした。また、亜鉛欠乏餌に塩基性炭酸亜鉛の形で亜鉛を添加した対照餌 ($Zn: 30 \mu g/g$) および超純水を与えて同じ期間飼育したものを対照マウスとして用いた。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) 一定期間の飼育を行ったマウスからエーテル麻酔下で、肝臓、すい臓および精巣の摘出を行った。摘出したそれぞれの臓器については、その後の分析目的に応じて異なる遠心分離操作を行った。それぞれの臓器の各細胞成分中の微量元素の定量を目的とするときには、飽和炭酸水素カリウム水溶液により pH 7.4 に調整した HEPES バッファーを用いつつ非破壊細胞の他、5 つの細胞成分 (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サイトゾル画分) に分離した。また、サイトゾル画分中のタンパク質を調べることを目的とした際には、Tris-HCl バッファーを用いての1回の遠心操

作によりサイトゾル画分のみを分離した。なお、すい臓および精巣については、4個体分を1試料として分析を行った。また、一部のマウスについては解剖前にエーテル麻酔下で心臓から採血を行い、血清についての生化学的検査を行った。

(3) 各細胞成分中の微量元素の定量は機器中性子放射化分析法によった。各細胞成分を秤量してから凍結乾燥し、再度秤量した後、ポリエチレン袋に二重に封入して照射試料とした。熱中性子照射は日本原子力研究開発機構東海研究開発センター原子力科学研究所の研究炉 JRR-3 において行った。各元素の定量に用いる核種の半減期に応じて、pn-3 での60秒間照射および pn-1 での20分間照射の2種類の照射を行った。短時間照射した試料については照射後5から10分後および60から150分後に、また、長時間照射した試料については14日から40日後に、それぞれ高純度 Ge 半導体検出器を用いてガンマ線測定を行った。

(4) サイトゾル画分中のタンパク質については、Bradford 法によるプロテインアッセイによりタンパク質量の定量を行った後、SDS-PAGE および 2次元電気泳動によるタンパク質の分離を行い、亜鉛欠乏に起因するタンパク質の消失あるいは正常のものとは異なるタンパク質の検索を行った。

(5) サイトゾル画分中のタンパク質については、(4)とは別に、ゲルろ過クロマトグラフィーによるタンパク質の分離もを行い、分離したフラクション中のタンパク質濃度および金属元素濃度を定量し、タンパク質の濃度分布およびタンパク質量に対する金属元素の結合量を調べた。ゲルろ過クロマトグラフィーは、Tris-HCl バッファーで膨潤させた Sephadex G-100 を担体として 65 ml 充填したカラム (1.1 cmφ × 70 cm) を使い、タンパク質濃度 10 mg/ml の試料溶液 400 μl を添加した後、流速 10 ml/h でバッファー送液を自然落下法で行った。90 のフラクションに分離した後、BCA プロテインアッセイ法によるタンパク質の定量を、また、原子吸光法により金属元素の定量を行った。なお、原子吸光分析においては5フラクションの試料を1試料として分析を行った。さらに、別にゲルろ過クロマトグラフィーにより分離したフラクションについて、5フラクションごとに混合したものについて SDS-PAGE によるタンパク質分離も行った。

(6) (4)または(5)で SDS-PAGE または2次元電気泳動を行った後のゲル上のバンドまたはスポットの一部を切り取り、PIXE 分析による金属元素の定量も試みた。PIXE 分析にお

ける陽子照射および特性 X 線の検出は、(社)日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンターのサイクロトロン(NMCC)および Si(Li)半導体検出器を用いて行った。

(7) 亜鉛欠乏餌で 1 週間飼育したマウスに亜鉛投与を行うことにより、1 週間の亜鉛欠乏によって生じた変化が欠乏期間と同じである 1 週間の亜鉛投与で回復するかどうかを調べた。亜鉛投与の方法は、塩基性炭酸亜鉛添加餌である対照餌を与える方法によった。また、その他の分析法は、上述と同様の方法によった。

4. 研究成果

(1) 1 週間の亜鉛欠乏餌での飼育が 8 週齢のマウスに与える影響について検討したところ、対照飼育開始後の 1 週間の時点で、亜鉛欠乏マウスの体重および肝臓やすい臓の湿重量は、僅かではあるが対照マウスのそれらの値よりも有意に低値を示しており、亜鉛欠乏餌による飼育の影響が現れているものと考えられた。しかしながら、その一方で、肝臓やすい臓の重量が体重全体に占める割合を比較してみると両群間に差は認められていなかった。このことは、食餌中の亜鉛が欠乏し、見かけ上は成長障害が認められる場合であっても、少なくとも亜鉛欠乏初期の段階では体と臓器との大きさのバランスがとられていることを示しているものと考えている。

(2) 肝臓について

① 肝臓の各細胞成分についての放射化分析では、10 元素(Na, Mg, Cl, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Se, Rb)の定量を行うことができた。これらの元素のそれぞれについて両群間の比較をしたところ、亜鉛欠乏群のすべての細胞成分中のコバルト濃度が増加していた。以前に行った 3 週間亜鉛欠乏餌で飼育したマウスについての分析では、いくつかの細胞成分で亜鉛濃度の低下が認められていたが、本研究における 1 週間の欠乏実験では、亜鉛濃度の変化は認められなかった。これは、亜鉛欠乏初期においては、食餌からの亜鉛摂取量が減少しても、骨などに備蓄されている亜鉛が肝臓に対して十分に供給されることや、上述したように肝臓の大きさを増加させないことで肝臓中の亜鉛濃度を保っているためと考えている。

② SDS-PAGE または 2 次元電気泳動によりサイトゾル中のタンパク質を分離することで、亜鉛欠乏による既存のタンパク質の消失や平常時には認められないタンパク質の発現の可能性について検討を行った。しかし、いずれの場合においても、亜鉛欠乏群と対照群との間で、タンパク質のバンド、スポットの

数や位置に明瞭な差異を認めることはできなかった。このことから、肝臓においては、亜鉛欠乏による既存のタンパク質の消失や新たなタンパク質の発現の可能性は低いものと考えられる。しかしながら、今回の実験では、分子量が 10 kDa 以下の低分子量タンパク質やごく少量存在するタンパク質については分離あるいは検出を行うことはできなかったため、食餌中の亜鉛が不足してきた段階での、タンパク質の変化の可能性は完全にないと断定することはできないものと考えている。

③ ゲルろ過クロマトグラフィーによりタンパク質を分離し、BCA プロテインアッセイ法および原子吸光分析によりフラクション中のタンパク質および金属元素の分布を調べ、亜鉛欠乏群と対照群とでその結果を比較した。その結果、本研究での分離条件で見える限りにおいては、各フラクション中に含まれるタンパク質濃度に関して両群間に差異を認めることはできず、分子サイズごとの分布に変化はないようであった。また、亜鉛および鉄含有タンパク質はサイトゾル中に広く存在することがわかった。

④ ゲルろ過クロマトグラフィーで分離したフラクション中のタンパク質を SDS-PAGE によりさらに分離した後にバンド解析を行った結果、150 kDa の分子量をもつタンパク質の濃度が亜鉛欠乏群で減少していた。この大きな分子量をもつタンパク質濃度の変化が、食餌中の亜鉛欠乏あるいは血清中の亜鉛濃度の低下とどのような関係にあるかを含め、今後、このタンパク質の同定およびその機能について調べていく。

(3) すい臓について

① すい臓サイトゾル画分中のタンパク質についての SDS-PAGE や 2 次元電気泳動の結果は、肝細胞サイトゾル画分中のタンパク質の場合と同様に、両群間でタンパク質のバンドやスポットに明らかな違いを見ることはできなかった。

② ゲルろ過クロマトグラフィーによりタンパク質を分子サイズ別に分離し、フラクション中のタンパク質および金属元素の分布を調べて両群間での比較したところ、タンパク質の濃度分布に関しては両群間で明瞭な差異は認められなかった。その一方、タンパク質濃度が高いフラクションについて亜鉛濃度の測定を行った結果、亜鉛欠乏群では全体的に亜鉛濃度が低下していたことから、分子量の小さなタンパク質から大きなものまでの広範囲にわたって亜鉛タンパク質中の亜鉛が遊離してアポタンパクとなっている可能性が示唆された。

③ 上記と同様にゲルろ過クロマトグラフィーにより分子サイズ別に分離したサイトゾル画分についてさらに SDS-PAGE による分離を行ったところ、亜鉛欠乏群の低分子量側 20 kDa 付近に、対照群には存在しないタンパク質バンドの存在を明瞭に認めることができた。さらに解析を進めたところ、他にも両群間で発現量が異なる複数のタンパク質の存在が認められた。それらのタンパク質バンドについて PIXE 分析を行った結果、35 kDa 程度の分子量をもつタンパク質が対照群には認められるものの亜鉛欠乏群には存在しないことおよびそのタンパク質には銅が含まれていることがわかった。現在のところ、このタンパク質は銅-亜鉛 SOD に何らかのものが付着した化学形のものではないかと考えている。これらすい臓細胞のサイトゾルで認められた変化と亜鉛欠乏との関係、すい臓の機能との関係にさらに調べていく予定である。

(4) 精巣について

2 週間にわたって亜鉛欠乏餌を与え続けた群（亜鉛欠乏群）、対照餌を与え続けた群（対照群）および 1 週間亜鉛欠乏餌を与えた後に 1 週間対照餌を与えた群（切り替え群）のマウスについて精巣細胞のサイトゾルタンパク質の 2 次元電気泳動を行い、3 群間での比較を行った。その結果、全てのマウスで共通に認められるタンパク質スポット以外について、(ア)対照群のみで認められるものと、(イ)対照群および切り替え群では認められるが亜鉛欠乏群では認められないものに分類することができた。このことは、亜鉛欠乏に陥ると直ちに消失するが亜鉛を投与されると容易に合成されるタンパク質(イ)もあるが、一旦消失すると回復が容易でないタンパク質(ア)が存在することを意味しており、亜鉛欠乏による性腺機能の低下などの亜鉛欠乏症発症のメカニズムの解明のみならず、亜鉛欠乏症の効果的な治療法を開発する際の重要なポイントなるであろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 矢永誠人、下山弘高、田中宏宗、村松 航、世良耕一郎、亜鉛欠乏マウスすい臓および精巣細胞中の微量元素の定量、NMCC 共同利用研究成果報文集 16 (2009 年)、査読無、2010、pp. 130-133
- ② 矢永誠人、下山弘高、寺島美智子、山本 督、村松 航、菅沼英夫、世良耕一郎、亜鉛欠乏マウスすい臓細胞中の微量元素の定量、

NMCC 共同利用研究成果報文集 15 (2008 年)、査読無、2009、pp. 123-127

[学会発表] (計 7 件)

- ① 下山弘高、村松 航、山本 督、川島美智子、田中宏宗、池田裕亮、菅沼英夫、矢永誠人、亜鉛欠乏マウスすい臓細胞中における微量元素の定量とタンパク質の変化、2010 日本放射化学会年会・第 54 回放射化学討論会、平成 22 年 9 月 27 日～28 日、大阪大学銀杏会館 (大阪府)
- ② 田中宏宗、下山弘高、池田裕亮、矢永誠人、亜鉛欠乏初期におけるマウスの精巣中の金属タンパク質の変化、2010 日本放射化学会年会・第 54 回放射化学討論会、平成 22 年 9 月 27 日～28 日、大阪大学銀杏会館 (大阪府)
- ③ 矢永誠人、上島淳慈、川島美智子、山野喜、村松 航、野口基子、菅沼英夫、亜鉛欠乏状態における肝細胞中の可溶性タンパク質の構造変化、平成 22 年原子力機構施設利用一般共同研究成果発表会、平成 22 年 8 月 24 日、テクノ交流館リコッティ (茨城県)
- ④ 矢永誠人、村松 航、下山弘高、山本督、田中 宏宗、菅沼 英夫、世良耕一郎、亜鉛欠乏マウスすい臓および精巣細胞中の微量元素の定量、第 16 回 NMCC 共同利用研究成果発表会、平成 22 年 5 月 14 日、岩手医科大学歯学部 (岩手県)
- ⑤ 下山弘高、村松 航、山本 督、川島美智子、菅沼英夫、矢永誠人、亜鉛欠乏マウスすい臓細胞における微量元素の定量とタンパク質の変化、2009 日本放射化学会年会・第 53 回放射化学討論会、平成 21 年 9 月 28～29 日、日本大学百周年記念館 (東京)
- ⑥ 矢永誠人、山本 督、菅沼英夫、下山弘高、寺島美智子、村松 航、世良耕一郎、亜鉛欠乏マウスすい臓細胞中の微量元素の定量、第 15 回 NMCC 共同利用研究成果発表会、平成 21 年 5 月 15 日、岩手医科大学附属循環器医療センター (岩手県)
- ⑦ 村松 航、上島淳慈、川島美智子、山野 喜、菅沼英夫、野口基子、矢永誠人、亜鉛欠乏初期におけるマウス肝細胞中の微量元素濃度およびタンパク質の変化、2008 日本放射化学会年会・第 52 回放射化学討論会、平成 20 年 9 月 25 日、広島大学広仁会館 (広島県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢永 誠人 (YANAGA MAKOTO)
静岡大学・理学部・准教授
研究者番号：10246449