

亜鉛欠乏がラットの脳内亜鉛濃度に与える影響

豊田 淳¹⁾, 白木 琢磨¹⁾, 矢野 史子²⁾, 松井 徹³⁾, 矢野 秀雄³⁾

¹⁾京都大学大学院人間・環境学研究科行動調節機構論, ²⁾近畿大学生物理工学部生物工学科,

³⁾京都大学農学部畜産学科

Effect of Zinc Deficiency on Brain Zinc Concentrations in Rats

Atsushi Toyoda¹⁾, Takuma Shiraki¹⁾, Fumiko Yano²⁾, Tohru Matsui³⁾ and Hideo Yano³⁾

¹⁾*Department of Neuroscience, Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University,*

²⁾*Department of Biotechnological Science, Faculty of Biology-oriented Science and Technology, Kinki University,*

³⁾*Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kyoto University*

There are three separate pools of brain zinc, i. e., free zinc, vesicular zinc, and protein-bound zinc. Each of them has physiological important roles. We suspected that behavioral disorders were induced by some change of brain zinc concentration during zinc deficiency. Twenty-seven male wister-strain rats (four weeks age) were divided into three groups: zinc deficient (ZD), pair fed (PF), and ad libitum (AD). Zinc concentrations in diets were 1mg/kg (ZD) and 30mg/kg (PF, AD). After three weeks of dietary period, the hippocampus, the cerebellum and the striatum were collected, and whole zinc concentrations in these tissues were measured by atomic absorption spectrophotometer.

Moreover, homogenized hippocampus was divided two fractions (>5kDa and <5kDa) by the dialytic filter, and zinc concentrations in these filtrate (<5kDa) were measured in the same way. Zinc deficiency remarkably decreased the body weight gain and feed intake. In addition, plasma zinc concentration was lowered in the zinc deficient rats. Though such obvious conditions occurred in the zinc deficient animals, zinc concentration in brains and ultrafiltrable zinc in the hippocampus were not changed.

亜鉛は生体に必要不可欠な元素のうちのひとつで、様々な生理学的役割を担っており、生体内のあらゆる部位に存在していることが観察されている。これは中枢神経系においても同様で、脳内亜鉛はその存在形態として、遊離型、小胞内含有型、蛋白質結合型があると考えられている。その中でも蛋白質結合型のものが一番多く、亜鉛が結合している蛋白質の多くのものは、分子量30k~400kDaである。また

中枢神経系には含亜鉛神経 (Zinc-containing neuron) が存在しており、例えば海馬苔状線維がこの部類に入る。この含亜鉛神経には小胞内含型の亜鉛が特異的に集積している。これらの小胞内亜鉛は前シナプス終末から活動依存的に後シナプスへ放出されることが分かっており、神経伝達物質であるグルタミン酸などの修飾物質ではないかと考えられている¹⁾。

ところでラットが亜鉛欠乏になると、様々な行動障害を起こすことが知られており^{2,3,4)}、我々はこれらの障害が脳内亜鉛の変化によって引き起こされるのではないかと考えた。そこで、亜鉛欠乏ラットを作成して脳各部 (海馬, 小脳, 線条体) における全亜鉛濃度を測定した。また、亜鉛は蛋白質と親和性が高いので、亜鉛欠乏によって蛋白質結合型亜鉛は影響を受けにくい、遊離型亜鉛は大きく変化する可能性がある。そこで海馬ホモゲネートを分子量 5 kDa の限外ろ過膜によって分別し、得られた透析液の亜鉛濃度も測定した。

実験方法

1) 供試動物及び試験過程

4週齢雄ウイスター系ラット27頭を3区に分け、亜鉛欠乏区 (ZD: Zinc deficient), 制限食区 (PF: Pair fed), 対照区 (AD: Ad libitum) とした。飼料中亜鉛濃度は、AIN-76 mineral mix を用いて調整し、亜鉛欠乏区では 1 mg/kg, 他の区では 30 mg/kg の亜鉛濃度の飼料を与えた。水は超純水を自由に与えた。試験期間を3週間とし、期間中の摂食量、体重を毎日計測した。試験終了時に全てのラットをネブプター麻酔下で殺し、採血後、海馬, 小脳, 線条体をサンプリングした。

2) 全亜鉛の測定

血しょう, 海馬, 小脳, 線条体を硝酸, 過塩素酸による湿式灰化の後、フレイム原子吸光分光光度計 (AA-782, 日本ジャーレルアッシュ(株)) を用いて原子吸光法により分析した。

3) 透析性亜鉛濃度の測定

海馬を 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) とともにテフロンホモゲナイザーによりホモゲナイズし、溶液を遠心分離器で上清と沈殿物に分離した。上清を限外ろ過膜 (Centrisart 1, Sartorius 社製) により分子量 5 kDa で分画し、その透析液に含まれる亜鉛を原子吸光法により分析した。

4) 統計処理

Student の t-test を用いた。

結果及び観察

各区における摂食量及び体重変化は図 1 と 2 にそれぞれ示した。この結果は、以前の報告^{3,4)} を支持するものであった。亜鉛欠乏により摂食量は対照区と比較して急速に低下し、飼料給与開始 2 日目以降にその差は有意 ($p < 0.05$) となった。体重増加は、亜鉛欠乏区及び制限食区が対照区と比較して小さく、測定開始 5 日目以降に有意差が生じた。亜鉛欠乏区と制限食区には、試験終了時まで有意差 ($p > 0.05$) は生じなかった。

血しょう中亜鉛濃度は、亜鉛欠乏区で $0.88 \pm 0.31 \text{ mg/l}$, 制限食区で $1.58 \pm 0.20 \text{ mg/l}$, 対照区で $1.22 \pm$

0.29mg/lであった。正常値は1.0~1.3mg/lと言われているので⁴⁾、我々の作成した亜鉛欠乏区では亜鉛欠乏になっていると言える。しかしながらなぜ制限食区が対照区よりも高い値を示したのかは明らかにはならなかった。

海馬、小脳、線条体の全亜鉛濃度(表3)は、各区間に有意差はなかったが、これは脳が生体の中でも特に優先順位の高い器官であるからであろう。

海馬の透析性亜鉛濃度(表4)は、各区間に有意差は存在しなかった。亜鉛結合蛋白質が、主に分子量30kDa以上であることから¹⁾、海馬透析性亜鉛は、主に遊離型とホモゲナイズによって破壊された小胞のなかの亜鉛が遊離してきたものからなると考えられる。これらの亜鉛は蛋白質結合型のものよりターンオーバーが速いと考えられるが、亜鉛欠乏状態になっても影響を受けない可能性がある。つまりこれは亜鉛が欠乏しているにもかかわらず、脳が積極的に亜鉛を取り込んでいるのではないかと考えられる。脳内全亜鉛における小胞内含型割合は、5-15%程であると考えられている¹⁾。しかし、苔状線維に小胞内含型亜鉛が多量に含まれている海馬の透析性亜鉛濃度が、海馬全亜鉛濃度の1%ほどであるということから、小胞内含型亜鉛も多くものは小胞内で蛋白質などの巨大分子と結合している可能性が示唆された。

しかしながら小胞内に存在している遊離亜鉛が細胞質内蛋白質と結合してしまう可能性もあり、遊離型亜鉛を量的に検討する本方法の妥当性を確認する必要があると考える。

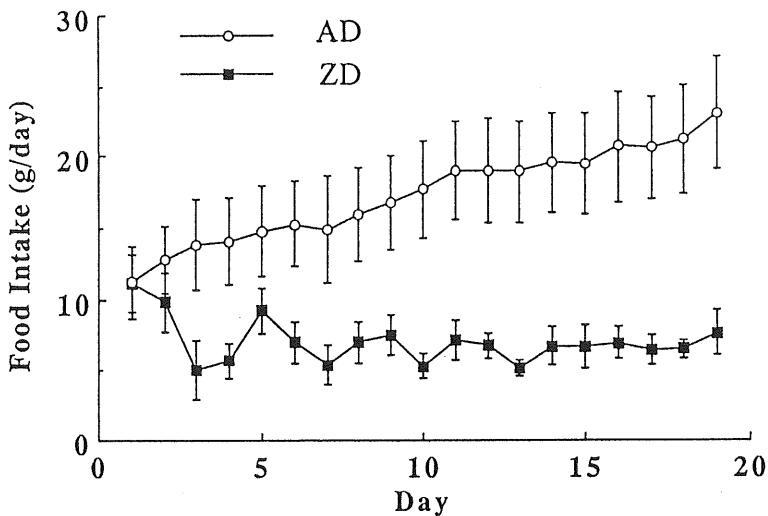


Fig. 1. Effect of Zinc deficiency on Food Intake

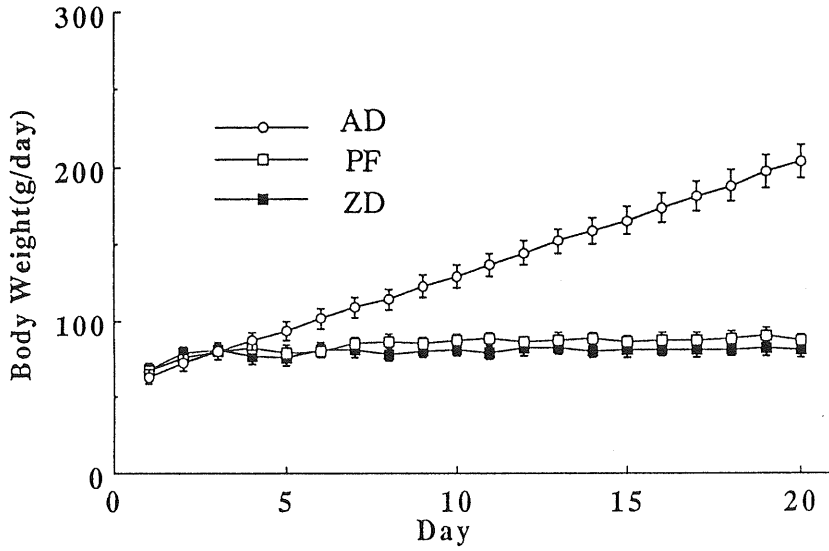


Fig. 2. Effect of Zinc deficiency on Body Weight

Table 1. Whole zinc concentration in rat brain

	Brain region		
	Hippocampus	Cerebellum	Striatum
	Mean ± S. D. (mg/kg, wet weight)		
ZD	12.01 ± 1.76	11.62 ± 2.10	12.35 ± 2.75
PF	13.08 ± 1.67	12.18 ± 2.34	14.48 ± 1.85
AD	12.08 ± 1.53	12.04 ± 1.55	13.44 ± 1.63

Table 2. Ultrafiltrable zinc concentration in rat hippocampus

Hippocampus	
	Mean ± S. D. (mg/kg, wet weight)
ZD	0.154 ± 0.045
PF	0.121 ± 0.016
AD	0.130 ± 0.029

文 献

- 1) Frederickson, C. J. (1989) Int. Rev. Neurobiol. 31, 145-238
- 2) Lokken, P. M., E. S. Halas and H. H. Standstead. (1973) Proc. Soc. Biol. Med. 144, 680-682
- 3) Gordon, P. R and O'Dell, B. L. (1983) J. Nutr. 113, 2339-2345
- 4) Henkin, R. I., ed. "Zinc." (1979) Univ. Park Press, Baltimore, Maryland.