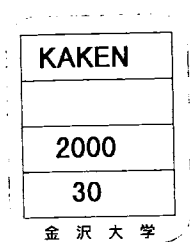


Bioinorganic chemical studies on metal superoxide dismutases and their behavior in brain by the use of multielemental analysis

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-12-08 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Amano, Ryohei メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00049267

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.





多元素同時追跡法による脳内金属SOD酵素 の生物無機化学の研究

(課題番号：10640539)

平成10年度～平成12年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))
研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 **天野 良平**
(金沢大学医学部保健学科)



はじめに

活性酸素種の一つスーパーオキシドアニオンを分解する酵素, SODをからだの中に多くもつ動物ほど長生きすると考えられている。SOD 酵素はその活性部位にCu, Zn, Fe, Mnの金属をもち、金属が機能発現の中心的な役割を果たしている。原子核をプローブとし、脳内の金属SOD酵素の生物無機化学的研究を展開する。

15元素を越えるラジオアイソトープを一つの溶液に含むラジオアイソトープ(RI)・マルチトレーサー法をマウスやラットによる動物実験に適用することにより、第一遷移金属のV, Cr, Mn, Fe, Co, Zn やSeなどの微量元素の動態を同時に知ることができる。これにより脳内微量必須元素の動的な検討が可能になり、脳内におけるspeciationの追跡も可能と考えられる。一方、中性子放射化分析法により脳内の各部位における数種の元素(とくに第一遷移金属のMn, Fe, Co, Zn)の量が高感度に決定することができる。これら両法がもつ特色一多元素を同時に追跡できる特色一を生かし研究を展開する。「マルチトレーサーで脳内の動きを！放射化分析で脳内の量的な分配を！」を探る。質の違うこれらの情報は、「金属SOD酵素の生物無機化学展開」という新たな地平を与えると考ええる。

研究組織

研究代表者	天野 良平(金沢大学・医学部・教授)
研究分担者	鷺山 幸信(金沢大学・医学部・助手)
研究分担者	榎本 秀一(理化学研究所・加速器基盤研究部・前任研究員)

研究経費

平成10年度	1,600	千 円
平成11年度	800	千 円
平成12年度	700	千 円
計	3,100	千 円

研究発表

印刷発表リスト

1. Ryohei Amano, Shigeo Oishi, Masami Ishie, Motoe Kimura, Shuichi Enomoto and Fumitoshi Ambe: Comparative subcellular distribution of radioactive Mn, Fe, Zn and Se tracers in brain and liver - Why, in brain, do most of their proteins exist in mitochondrial and nuclear fraction? .

RIKEN Accelerator Progress Report, vol. 31, p126, 1998

2. Oishi, S., Amano, R., Nishida, M., Yonebayashi, T., Ando A., Enomoto, S., Ambe, F.:

Comparative distribution of the trace elements, Sc, Mn, Fe, Co, Zn, Se, Rb, and Zn in brain and other organs of C57BL/6N mice.

RIKEN Accelerator Progress Report, vol. 31, p127, 1998

3 天野良平:

医療分野で活躍するラジオアイソトープ,

「化学と教育」誌, 平成10年8月, 46(8)巻, pp 482-484, 日本化学会(東京)

4. R. Amano, A. Ando, S. Oishi :

5.07 Instrumental Neutron Activation Analysis of Trace Elements Na, Mg, Cl, K, Mn, Zn, Rb and Br in the brain of young and aged C57BL/6N mice,

KURRI Prog. Rep. 1997. Section I, p 116, issued November 1998

5. Oishi, S., Amano, R., Ando A., Enomoto, S., Ambe, F.:

Simultaneous behavior of Sc, Mn, Fe, Co, Zn, Se, Rb and Zr trace elements in brain and other organs of C57BL/6N mice,

J. Radioanal. Nucl. Chem., vol. 239 (2), pp411-416. 1999

6. R. Amano, S. Oishi, T. Tarouda and S. Enomoto:

Comparative regional uptake behaviors of multitracer in brain of the young and aged C57BL/6N mice.

RIKEN Accelerator Progress Report, vol. 32, p121, 1999

7. R. Amano, A. Ando, S. Oishi, T. Minami :

Instrumental Neutron Activation Analysis of Minor and Trace Elements in Baby, Young and Aged C57BL/6N Mice,

KURRI Prog. Rep. 1998. Section I, p 168, issued November, 1999

8. M. Masumoto, K. Sakamoto, Y. Hirose, H. Haba, K. Hotta and R. Amano:

Photo Activation Analysis of Environmental Samples by KURRI-LINAC (IV),

KURRI Prog. Rep. 1998. Section I, p 148, issued November 1999

9. T. Tarohda, R. Amano, K. Sakamoto, and S. Enomoto:

Biobehaviors of multitracer in the brain and other organs of 1-, 3- and 8-week-old mice.

RIKEN Accelerator Progress Report, vol. 33, p120, 2000

10. Y. Kawamura, R. Amano, and S. Enomoto:

Evaluation of the in vitro stability of radiolabeled DTPA and DOTA and their conjugated.

RIKEN Accelerator Progress Report, vol. 33, p128, 2000

11. R. Amano, K. Washiyama :

Determination of Mn, Zn and Se in brain of baby, young, aged mice by instrumental neutron activation

analysis,

KURRI Prog. Rep. 1999. Section I-6, p 144, issued November 2000

12. M. Masumoto, K. Sakamoto, R. Amano, K. Washiyama, Y. Hirose, H. Yabushita:

Photo Activation Analysis of Environmental Samples by KURRI-LINAC (V),

KURRI Prog. Rep. 1999. Section I-5, p 126, issued November 2000

13. R. Amano, S. Oishi, M. Ishie, M. Kimura :

Brain regional distributions of the minor and trace elements, Na, Mg, Cl, K, Mn, Zn, Rb and Br in young and aged mice,

J. Radioanal. Nucl. Chem., vol. 247 (2), pp. 381- 384, 2001

14. R. Amano, S. Enomoto :

Brain regional uptake of radioactive Sc, Mn, Zn, Se, Rb and Zr tracers into normal mice during aging,

J. Radioanal. Nucl. Chem., vol. 247 (3), pp.507 - 511, 2001

15. T. Tarohda, Y. Yabushita, Y. Kanayama, R. Amano and S. Enomoto:

Biobehaviors of multitracer in brain of 1-, 4-, and 8 day-old normal mice.

RIKEN Accelerator Progress Report, vol. 34, 印刷中, 2001

16. Y. Yabushita, Y. Kanayama, T. Tarohda, K. Washiyama, R. Amano and S. Enomoto:

Brain regional uptake behavior of Sc, Mn, Co, Zn, Se, and Rb in mice fed Mn-deficient and excessive diets.

RIKEN Accelerator Progress Report, vol. 34, 印刷中, 2001

17. Y. Kanayama, Y. Yabushita, T. Tarohda, K. Washiyama, R. Amano and S. Enomoto:

Tissue uptake behavior of Sc, Mn, Co, Zn, Se, and Rb in mice bred under manganese deficient and excessive diet.

RIKEN Accelerator Progress Report, vol. 34, 印刷中, 2001

18. T. Tuji, T. Tarohda, K. Washiyama, R. Amano and S. Enomoto:

Chemical isolation and purification of ^{95m}Tc from distilled waste fraction during multitracer separation of Ag target.

RIKEN Accelerator Progress Report, vol. 34, 印刷中, 2001

口頭発表リスト

1. 天野良平:

脳における微量元素の挙動,

理研シンポジウム「プローブ・トレーサーとしてのRI'98」, 平成10年3月17日, 理化学研究所(和光)

2. Ryohei Amano, Shigeo Oishi, Shuichi Enomoto, and Fumitoshi Ambe:

Aging effects on regional cerebral uptakes and concentrations of some trace elements in normal mice.
2nd International Symposium on Metals and Genetics, Toronto (Canada), 26-29 May 1998

3 天野良平:

(依頼講演)生物マルチトレーサ法と生物放射化分析法の展開,
第42回放射化学討論会, 2A01, 平成10年9月16日-9月18日, 東北大学(仙台)

4. 大石茂雄・天野良平・安東醇・榎本秀一・安部文敏:

マルチトレーサによる脳局所微量元素に関する検討,
第42回放射化学討論会, 1B17, 平成10年9月16日-9月18日, 東北大学(仙台)

5. 大石茂雄・天野良平・安東醇・榎本秀一:

脳局所微小試料の放射化分析 -特に脳内ZnとMnの分布-,
第42回放射化学討論会, 1B18, 平成10年9月16日-9月18日, 東北大学(仙台)

6. Amano, R., Oishi, S., Enomoto, S.:

Regional uptake behaviors of radioactive Rb, Zn, Se, Mn, Sc and Zr tracers in brain of young and aged C57BL/6N mice,
7 - 16 December 1998, On line proceeding of the 5th Internet World Congress on Biomedical Science '98,
<http://www.mcmaster.ca/inabis98/pharmtox/index.html>,

7. 天野良平・榎本秀一:

生体微量元素研究におけるマルチトレーサー法の展開,
理研シンポジウム「生体微量元素 '99」, 平成11年3月19日, 理化学研究所(和光)

8. 廣瀬由紀子・天野良平・羽場宏光・鷲山幸信・坂本浩・榎本和義:

中性子および光量子放射化による週齢の異なるマウス臓器中の無機元素分析(ポスター演示)
理研シンポジウム「生体微量元素 '99」, 平成11年3月19日, 理化学研究所(和光)

9. Ryohei Amano, Yukiko Hirose, Shigeo Oishi, Hiromitsu Haba, Koshin Washiyama, Koh Sakamoto:
Minor and trace elements in rodentians: Comparative NAA and PAA study of various organs of young and aged C57BL/6N mice,

10th International Conference on Modern Trend of Activation Analysis,
Washington (U.S.A.), 19-23 April 1999

10. Takeshi Minami, Y. Sakita, Y. Okazaki, R. Amano:

Correlation of metal penetration into the brain with damage of blood-brain barrier,
10th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals- TEAM-10,
Evian (France.), 2-7 May 1999

11. 廣瀬由紀子・天野良平・鷲山幸信・羽場宏光・坂本浩・榎本和義:

光量子及び中性子放射化法によるマウス臓器中の無機元素の定量(口頭),
第43回放射化学討論会, 1C04, 平成11年10月13-15日, 筑波高エネルギー研究機構(つくば)

12. 太郎田融・天野良平・坂本浩・榎本秀一：
成長期マウスにおけるマルチトレーサの生体内挙動(口頭)。
第43回放射化学討論会, 3A04, 平成11年10月13-15日, 筑波高エネルギー研究機構(つくば)
13. 川村昌寛・尾崎卓郎・榎本秀一・天野良平：
マルチトレーサー法による有機金属錯体の合成および応用研究(ポスター)。
第43回放射化学討論会, 3P41, 平成11年10月13-15日, 筑波高エネルギー研究機構(つくば)
14. 太郎田融、天野良平、榎本秀一：
成長期マウス脳におけるマンガン(Mn)の濃度と挙動、
第11回日本微量元素学会、B214, 平成12年6月29、30日, 愛知県産業貿易館(名古屋)
15. 山本直子、鷲山幸信、高橋美智、辻孝枝、寺田弥生、天野良平、塩川佳伸：
225Ac/213Biジェネレーの作製および213Bi標識モノクロナール抗体の合成法の検討、
第44回放射化学討論会、2A07, 平成12年9月12-14日, 甲南大学(神戸)
16. 藪下裕子、金山洋介、木村知樹、太郎田融、鷲山幸信、天野良平、榎本秀一：
マルチトレーサスクリーニング-必須微量元素の欠乏および過剰下での脳内における元素間相互作用につ
いて-、第44回放射化学討論会、2C05, 平成12年9月12-14日, 甲南大学(神戸)
17. 太郎田融、藪下裕子、天野良平、中西孝、榎本秀一：
成長期マウス脳における微量元素の濃度と取込挙動、
第44回放射化学討論会、2C06, 平成12年9月12-14日, 甲南大学(神戸)
18. Ryohei AMANO, Takae TSUJI, Koshin WASHIYAMA, Tohru TAROHDA and Shuichi ENOMOTO:
Isolation and purification of 95mTc and 96Tc in the distilled waste fraction during chemical separation of
multitracer from Ag target (Poster session). 理研シンポジウム「生体微量元素 2000」, 平成12年12月1
日, 理化学研究所(和光)
19. Yuko YABUSHITA, Yousuke KANAYAMA, Tohru TAROHDA, Koshin WASHIYAMA, Ryohei AMANO,
Shuichi ENOMOTO: Element-element interactions in mouse brain under deficient and excessive state of
an essential trace element (Poster session). 理研シンポジウム「生体微量元素 2000」, 平成12年12月1
日, 理化学研究所(和光)
20. Tohru TAROHDA, Yuko YABUSHITA, Yousuke KANAYAMA, Ryohei AMANO, Shuichi ENOMOTO:
Elemental concentration and tracer uptake behavior of manganese, zinc and selenium in the brain of
normal mice during development (Poster session). 理研シンポジウム「生体微量元素 2000」, 平成12年
12月1日, 理化学研究所(和光)
21. 高宮幸一、赤峰真明、市原貴之、柴田誠一、笠松良崇、豊嶋厚史、篠原厚、天野良平: KURマルチ
トレーサーの製造とその利用 第35回京都大学原子炉実験所学術講演会, 平成13年1月24日~25日, 京
都大学原子炉実験所(熊取)

研究成果

マルチトレーサー実験において、マウス脳内での ^{46}Sc , ^{48}V , ^{54}Mn , ^{58}Co , ^{65}Zn , ^{75}Se , ^{83}Rb , ^{88}Zr , ^{97}Ru , ^{101}Rh の 10 核種 10 元素の挙動が同時に追跡することができた。日齢変化として、1 日齢、4 日齢、8 日齢、21 日齢および 56 日齢のマウス脳を追跡した。全ての核種において、取込率は 1 日齢で最も高く、1 日齢から 56 日齢へと成長と共に取込率が減少していった。1 日齢～8 日齢の幼若期における高取込率は、幼若期特有の高新陳代謝に因るものと考えられる。また、取込率の注射からの経時的変化をみると、6, 12, 24, 48 時間と時間経過と共に取込率が増加していく核種と、一時的に取込率が上昇するが、24, 48 時間と時間が経つにつれ取込率が減少していく核種の 2 種類に別けられていることが分った。取込率が増加していく核種は、 ^{46}Sc , ^{54}Mn , ^{65}Zn , ^{75}Se , ^{83}Rb で、取込み率が減少していく核種は、 ^{48}V , ^{58}Co , ^{88}Zr , ^{97}Ru , ^{101}Rh であった。これは成長過程の脳において Sc, Mn, Zn, Se, Rb の 5 元素が必要不可欠であることを表しているにちがいない。Mn, Zn, Se は必須微量元素であるため当然と考えられる。また、Rb は必須微量元素になる可能性があると言われていることもあるが、K と同様アルカリ金属であり、その物理化学的性質が類似しているため、結合部位を共有し、それが大きく反映していると考えられる。Sc は肝臓への取込挙動が Fe の取込挙動とほぼ一致し、鉄との共通点として、ともに 3 価の陽イオンで存在し、イオン半径 (Fe^{3+} のイオン半径は 0.64\AA , Sc^{3+} のイオン半径は 0.73\AA) が近いこと Sc は Fe の挙動を反映しているのではないかという報告があり¹²⁾、脳の場合も Sc は Fe の挙動を反映しているものと考えられる。ここで経時的取込率が上昇した Mn, Zn, Se と Rb について 1 日齢、4 日齢、8 日齢、21 日齢および 56 日齢を比較する。Fig. 10 にこれら 4 核種の 1 日齢～56 日齢の経時的変化を示す。成長期を通して Rb の取込率が最も高い。これは上記に述べたように、K と物理化学的性質が類似しているため、結合部位を共有するため、取込率が最も高いものと考えられる。Mn, Zn, Se の 3 元素について比較すると、8 日齢までは Mn の取込率が高いが、21 日齢以降は Zn の取込率が上位にきた。幼若期においては Mn の必要性が最も高いと考えられる。また 8 日齢までの取込率が高いのに対して、21 日齢以降の取込率は約 10 分の 1 に減少している。これを脳の成長(重量)と比較してみる。Fig. 11 に正常マウス脳の成長期における重量変化を示す。マウス脳の成長(重量)は、生後から 1 週間で増加し、3 倍以上になっている。成長する時には多く取込み、成長が止まると取込みも落ち着き、脳の機能を維持する為に必要な量だけを取込んでいるのかもしれない。

中性子放射化分析の実験において、Na, K, Mn, Zn, Se の 5 元素が同時定量できた。各元素の年齢による濃度変化を観察した。Na 及び K は成長を通してほぼ一定で、それぞれ 3500～3900ppm, 900～1250ppm と高濃度に存在している。Na 及び K は生体元素として、両者は対になって機能している場合が多く、電解成分として溶解している陽イオン組成の主要成分として存在しているため、存在量も多く、年齢による変化も少ないものと考えられる。必須微量元素である Mn, Zn, Se を比較すると、Zn の濃度が最も高く、このことは Zn が多くの金属酵素の構成成分、免疫、増殖調節因子などの役割を持ち、必須性が強いことを成長期の脳についても証明している。また、この 3 元素について年齢による変化については Zn, Se が成長による変化がほとんどないのに対して、Mn だけは生後ほとんど存在せず、1 日齢から 21 日齢にかけて 0.1ppm から 0.45ppm と 4 倍以上に変化することが分った。そして 21 日以降は他の元素と同じく、ほぼ一定となる。マルチトレーサー法で Mn の取込み率が生後 1 日から 8 日まで高く、21 日以降取込み率が減少したのは、上記の結果より、Mn の濃度が 21 日齢でほぼピークに達したためと考えられる。また各核種の取込みが 21 日齢以降減少することや、Mn の中性子放射化分析の結果から、マウス脳は 21 日齢でほぼ成長

のための代謝は終了し、21日齢以降は維持のための代謝を行なっている可能性が示唆される。

1日齢、4日齢、8日齢マウス脳の⁵⁴Mn、⁶⁵Zn、⁸⁶Rbによるオートラジオグラフィーをを檢討したなかで、Mnオートラジオグラフィーによる成長の変化をみると、1日齢では脳全体に分布し、8日齢は大脳皮質、海馬、視床に多く分布している。21日齢になると大脳皮質への集積はほとんどなくなり、視床、視床下部に集積した。1日齢での脳全体への集積は、血液脳関門(Blood-Brain barrier(BBB))の未形成が考えられる。また8日齢での大脳皮質への集積は、Mnが運動機能や感覚機能に関与し、海馬への集積は、Mnが記憶や学習に関与している可能性を示唆させる。

Znオートラジオグラフィーによる成長の変化をみると、1日齢ではMnと同じように脳全体に集積し、8日齢では大脳皮質、海馬に集積し、特に海馬への集積は著しい。21日齢では大脳皮質への集積はほとんどなく、海馬、視床に多く集積した。1日齢での脳全体への集積はMnと同じくBBBの未形成が考えられる。ほとんどの種で、生まれる前又は生後少しの間にtight junctionが形成されるが¹⁸⁾、マウスの1日齢では、tight junctionは形成されていないものと考えられる。8日齢および21日齢での海馬への著しい集積は、Znが記憶および学習機能に大きく関与していることを示唆させる。

MnやZnの脳内での働きについて考えてみると、Mnはグルタミンシンセターゼ(GS-Mn)として神経伝達物質の輸送、Mn-SODとして活性酸素スーパーオキシドアニオン(O₂⁻)を除去し、ZnはDNAポリメラーゼとしてDNAの合成、CuZn-SODとして活性酸素スーパーオキシドアニオン(O₂⁻)を除去していると考えられる。また、Mn-SOD、CuZn-SODによる活性酸素スーパーオキシドアニオン(O₂⁻)の除去により過酸化水素(H₂O₂)が生成される。この過酸化水素(H₂O₂)の除去にまずカタラーゼが考えられるが、中性子放射化分析の結果から脳内にSeが存在することより、グルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-Px)も考えられる。グルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-Px)が活性酸素スーパーオキシドアニオン(O₂⁻)を除去していると考えれば、MnやZnが集積する大脳皮質や海馬にSeも集積するのではないかと考えられる。

上の成果は、次の発表論文にその詳細を記した。以下に、論文名とページを示す。

1. Simultaneous behavior of Sc, Mn, Fe, Co, Zn, Se, Rb and Zr trace elements in brain and other organs of C57BL/6N mice,9
2. Brain regional distributions of the minor and trace elements, Na, Mg, Cl, K, Mn, Zn, Rb and Br in young and aged mice,23
3. Brain regional uptake of radioactive Sc, Mn, Zn, Se, Rb and Zr tracers into normal mice during aging,39
4. Element-element interrelation in brain under deficient and excessive states of an essential trace element55
5. Elemental concentrations and tracer uptake behavior of manganese, zinc and selenium in brain of normal mice during development65

各論文における個別の成果は、上記論文の本文を参考にしてほしい。

今後、脳内金属SOD酵素の生化学および生理学的研究は益々重要になってくる。その時、本科学研究成果が幾分か参照されることを確信する。