

川久保 敦 論文内容の要旨

Zinc as an Essential Trace Element in the Acceleration of Matrix Vesicles-Mediated Mineral Deposition

(必須微量元素亜鉛の基質小胞性石灰化促進効果)

Atsushi Kawakubo, Tsunenori Matsunaga, Hidetaka Ishizaki,
Shizuka Yamada, and Yoshihiko Hayashi

MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE in press, 2011

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：林 善彦 教授)

緒 言

生物の硬組織には多くの微量元素が含まれている。特に、Zn は食事で摂取できる必須微量元素であり、コラーゲン合成や骨の石灰化に必要であることが知られている。Zn は、骨芽細胞性の骨形成に対する促進効果と破骨細胞性の骨吸収に対する抑制効果を持つことが明らかにされている。さらに in vitro において、Zn はタンパク合成を促進することができる。ALP は、硬組織形成と石灰化における重要な役割の産物として、骨芽細胞から、特に骨形成段階にある細胞から産生される。基質小胞には高い ALP 活性があることが明らかにされた。基質小胞の機能に対する Zn の効果は未だ結論がない。

本研究では、骨芽細胞の ALP 活性に対する、また基質小胞性石灰化の初期段階における、Zn の効果を調査した。

対象と方法

教室保存の骨芽細胞株 (NOS-1) を使用した。様々な濃度の ZnSO_4 を添加した培地を用いて NOS-1 の培養を行い、培養 1, 3, 5 日目でアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を計測し、最適な ZnSO_4 濃度を求めた。次に、100ml の培養皿に、 1×10^6 個の細胞を播種、培養 (血清添加 α -MEM を作製) し、60~70% コンフルエントの時点で培養細胞をコラゲナーゼ (20mg/5mL ハンクス液) で処理し、18200rpm, 20 分の超遠心操作を行い、細胞画分を分離したのち、その上清を回収し 50000rpm, 10 分間の超遠心操作によって、基質小胞を分離した。ハンクス液で洗浄ののち、同様の超遠心操作を行い、基質小胞を回収した。その後、血清無添加、5mM Na- β グリセロリン酸添加の α -MEM (ZnSO_4 添加群、無添加群) を分離した基質小胞へ加え、炭酸ガス培養器にて培養した (5% CO_2 , 37°C、湿度 100%)。培養 1, 3, 5 日後、超遠心を行ったのちパラホルムアルデヒド・グルタルアルデヒドで前固定、エタノール脱水・ブタノール置換後、凍結乾燥を行った。石灰化物 (沈殿物) を KEK PF の放射光 (BL-4A) を用いて蛍光 X 線分析を行い、Zn, Ca の定性・定量を行った。また、電子顕微鏡を用いて微細構造の SEM 観察を行い、EDX を用いて Ca/P の mol 比率を求めた。

結 果

Zn 濃度を 1×10^{-6} M から 1×10^{-3} M まで変化させ、その中で ALP 活性の高かった 1×10^{-5} M を至適濃度とした。また石灰化物の蛍光X線定性・定量分析において、Zn 添加群が無添加群に比べて、3 日目、5 日目で Ca 相対値平均の上昇が見られた。走査型電子顕微鏡を用いた観察において、1 日目では添加群、非添加群の差は明らかではなく 3 日目においてともに球状構造物が見られた。5 日目になるとそれぞれ 3 日目の構造と比して大きく、添加群においては板状の構造物も認められた。EDX における石灰化物の Ca/P mol 比率に関して、Zn 添加群が有意に大きく、5 日目では 1.6 に近似していた。

考 察

ALP はリン酸塩エステルを加水分解しリン酸濃度を上昇させ外部マトリックスの石灰化を促進する(Anderson, 2003)。ALP は同じく Zn 金属酵素であり Zn を 2 分子含む。本研究の XRF データにおいて、培養 5 日目における Ca と P 濃度に関して増強していることを実証した。

アネキシンも含めて、基質小胞には、Ca 結合タンパク質が多く含まれる(Anderson, 1995)。アネキシンは細胞膜の Ca チャネルの役割も果たす(Anderson, 1995)。本研究のデータは基質小胞内への Ca 流入が起こることを明示し、Zn が存在することでこの Ca 流入を速めることができると示した。

NOS-1 細胞から分離した基質小胞のサイズは直径 $0.05\text{--}0.2\ \mu\text{m}$ であった (Yamada et al., 2003)。よって、SEM で観察された $1\text{--}2\ \mu\text{m}$ の球形の構造物は基質小胞の集合体であるといえる。

本研究では Zn 処理を施したグループではすべての期間でコントロールグループより高い Ca/P mol 比率であったことを示した。理論的なウィットロカイトの mol 比率が 1.5 であり、本研究のデータは培養 3 日後のミネラル沈着がウィットロカイトからハイドロキシアパタイトに近いカルシウムリン酸塩までの変化を示し、そして Zn が同じくこの変換を速めることを示している。Zn 貯蔵タンパク(Kaji et al., 1988)や Zn トランスポーター (ZnT-1.2.4) を含めた細胞内外の Zn の挙動を通じて、Zn は骨芽細胞性石灰化における重要な役割を果たすかもしれない(Nagata and Lonnerdal, 2010)。

結論として、適切な Zn の濃度において、培養 5、7 日後の骨芽細胞の ALP 活性を増加させた。本研究における XRF と EDX データから、培養 1～5 日における Zn 添加によるミネラル沈着の増加は、ALP とカルシウム結合タンパク質の活性によって調節されている可能性が示唆された。