

亜鉛欠乏がラット肝薬物代謝酵素に及ぼす影響

庭田 英明, 丸山 香, 高田 史子, 飯塚 幸澄, 伊藤 邦郎, 田中 頼久*

Effects of zinc deficiency on rat liver drug-metabolizing enzymes

Hideaki NIWATA, Kaori MARUYAMA, Fumiko TAKADA, Yukisumi IIZUKA, Kunio ITOH,
and Yori-hisa TANAKA *

(Received November 22, 2005)

Zinc is an essential trace element that plays many important biological roles in the body. In clinical cases and experimental animals, zinc deficiency results in several unfavorable features including growth retardation, hypogonadism, rough skin, and general lethargy. Regarding drug-metabolizing enzymes, there have only been reports that zinc deficiency reduced the content of mRNA and protein of male-specific CYP3A2, CYP3A18 and CYP2C11, and increased the mRNA levels of female-specific CYP2C12 and CYP3A9. We investigated the effects of zinc deficiency on alcohol dehydrogenase (ADH), hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) and cytochrome P450s in rats. Cytosolic ADH1 activity was lower in male rats than in female rats. The lower ADH1 activity in male rats was increased to the level of that in female rats by zinc deficiency. Microsomal 20 β -HSD activity was detected at a high rate in male rats but was under the limit of quantification (LOQ) in female rats. The high 20 β -HSD activity in male rats was decreased to below the LOQ by zinc deficiency. 7-Ethoxycoumarin O-deethylase activity was inhibited by chloramphenicol in female zinc deficiency rats, but not in female control rats and male rats, indicating the induction of CYP2B1 by zinc deficiency in female rats. The mechanisms of changes in enzyme activity in male rats will be discussed based on the impaired testosterone-hypothalamus-pituitary axis originated from hypogonadism caused by zinc deficiency. The mechanisms of CYP2B1 induction in female rats are still unknown.

Key words — zinc deficiency; ADH; HSD; P450; testosterone; sex differences

緒言

Znは、生体内において炭酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素 (ADH)、カルボキシペプチダーゼ、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼなどをはじめとする80種類以上の金属酵素の必須構成成分であり、炭水化物、脂質、タンパク質、核酸などの代謝に密接に関連し、生体の成長、発育そして正常機能の維持にとって不可欠な微量必須元素である。さらに、ジンクフィンガーとして遺伝子の発現や調節に関わり、免疫機能

の維持や抗酸化作用なども有する¹⁻⁶⁾。また、げっ歯類の研究では、Znは四塩化炭素⁷⁾、プロモベンゼン⁸⁾、アセトアミノフェン⁹⁾、ピロリジンアルカロイド類¹⁰⁾などの様々な薬物や生体異物によって引き起こされた肝毒性に対し保護作用を示すと報告されている²⁾。最近では、Znが舌の味蕾にある味覚細胞の新陳代謝に深く関わっていることや脳の発達や機能維持にも不可欠であることが明らかにされている¹¹⁾。また、ストレスが増大すると血中Zn濃度が減少し、逆にCu濃度が増加するというZnとストレスの間の

興味深い関係が見い出されている¹¹⁾。

Zn欠乏症は微量必須元素欠乏症の中で最も頻度が高く、ヒトにおいては1960年代に栄養性のZn欠乏症(発育不全, 小人症, 性腺機能低下)が明らかになり, ついで味覚・嗅覚減退, 食欲不振, 脱毛, 先天性の皮膚障害(腸管肢端皮膚炎), 創傷の治癒の遅延が示された¹²⁾。現在では, 高カロリー輸液の基本液の中に微量必須元素が含まれていないため, 長期間にわたる高カロリー輸液療法などの医療によっても同様の欠乏症が起こることが問題になっている¹²⁾。また, 免疫不全(リンパ系特にT細胞系機能の低下, 細胞免疫不全, 易感染症), 催奇形成, 神経症状(情緒不安定, うつ)などとの関連も知られている^{2,3,5,12)}。さらに, 最近では, 利尿剤, 降圧剤, 抗癌剤, 抗リウマチ剤および抗パーキンソン病剤などの薬剤が持つZnキレート作用により, 生体内のZnが過剰に排泄されることによって起こる薬剤性味覚障害に加え, 無理なダイエットやファーストフードなどに偏りがちな食生活の変化によるZnの摂取不足によって起こる味覚障害者が増加してきている¹²⁾。

このように, Znは生体内において種々の生理作用に重要な働きを担っているにもかかわらず, 薬物代謝酵素への影響についての報告は多くない。雄ラットにおいてZn欠乏になると, 雄特異的なCYP3A2, 3A18あるいは2C11のmRNA量およびタンパク質量が減少し, 雌特異的なCYP2C12や3A9のmRNA量が増加するといったラットの性特異的なシトクロムP450への影響が知られているにすぎない²⁾。そこで, 本研究では雌雄Wistar系ラットを用い, Zn欠乏がADH, ヒドロキシステロイド脱水素酵素(hydroxysteroid dehydrogenase, HSD)およびシトクロムP450などの種々薬物代謝酵素に及ぼす影響について検討した。

実験材料および方法

試薬類

ジエチルピロカーボネート(DEPC), エタノール, ペンタノール, ニトロブルーテトラゾリ

ウムクロリド, フェナジンメトスルファート, プロゲステロン, グルコース-6-リン酸一ナトリウム, グルコース-6-リン酸脱水素酵素(酵母製)は和光純薬工業株式会社から, 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)は株式会社同仁化学研究所から, エチジウムブロマイド, トリゾル試薬, アガロース, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)用SuperScript First-Strand Synthesis Systemはインビトロジェン株式会社から, Loading Bufferは株式会社ニッポンジーンから, β -nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD⁺)はオリエンタル酵母工業(株)から, TaKaRa Ex Taqは宝酒造株式会社から, ピラゾール, 7-エトキシマリリンはシグマアルドリッチジャパン株式会社から, λ DNA-Hind IIIマーカーはNew England Biolabs Inc.から, PhastGel Dry IEF, 等電点電気泳動用Pharmalyte 3~10はアマシャムバイオサイエンスから, 20 α -ヒドロキシプロゲステロン, 20 β -ヒドロキシプロゲステロンはSIGMA社から, 17-メチルテストステロン, 塩化マグネシウム6水和物, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺), reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), アミノピリン, アニリン塩酸塩, *p*-ニトロアニソールはナカライテスク株式会社から, 4,6-pregnadien-6,17-dimethyl-3,20-dionはSTERALOID INC.から, 抗ラットNADPH P450 reductase抗血清は第一化学薬品株式会社から購入した。その他の試薬及び溶媒は市販特級品のものを使用した。

Zn欠乏ラットの作製

離乳後4週齢の雌雄Wistar系ラット(日本エスエルシー)に, 卵白粉末20%, デキストロース63.7%, コーンオイル10%, セルロースパウダー2%, ミネラル混合3.13%, ビタミン混合1.17%を組成原料としたZn欠乏食(Zn含量: 1.5mg/kg未満)または, 固形飼料(CE-2, 日本クレア)を5週間与え, Zn欠乏および対照ラットを作製した。また, 日内変動を考慮して温度23 \pm 1 $^{\circ}$ C, 湿度55 \pm 5%, 照度サイクル12時間(明期: 7:00~19:00)の環境にて飼育し,

水は自由に与えた。実験に際しては16~18時間絶食を行った。

血清、肝サイトソール及びミクロソーム画分の調製

ラットを断頭屠殺後、直ちに血液を採取するとともに、開腹し氷冷生理食塩液で肝臓を灌流し摘出した。重量測定後、細切して4倍量の0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)-0.1mM EDTAを加え、ポッター型テフロンホモジナイザーでホモジナイズした。得られたホモジネートを $9,000 \times g$ で20分間遠心分離後、さらにその上清を $105,000 \times g$ で60分間遠心分離し、得られた上清をサイトソール画分とした。一方、沈渣を再び上記緩衝液に懸濁後、 $105,000 \times g$ で20分間遠心分離することによりミクロソーム画分を得た。肝サイトソール及びミクロソーム画分中のタンパク質濃度はProtein Quantification Kit-Rapid (株式会社同仁化学研究所)を用いて測定した。血液は氷冷下でしばらく放置した後、 $3,000 \times g$ で20分間遠心分離を行い血清を得た。

血清中Zn、テストステロンおよびエストラジオール濃度の測定

血清中Zn濃度は、Zn-テストワコー(和光純薬工業株式会社)を用い、同社のプロトコールに従って測定した。血清中テストステロンおよびエストラジオール濃度は、DELFLIAテストステロンおよびエストラジオール測定キット(パーキンエルマーライフサイエンスジャパン株式会社)を用い、キット添付のプロトコールに従って測定した。

total RNAの抽出

ラット肝total RNAはトリゾル試薬(インビトロジェン株式会社)を用い、添付のプロトコールに従い調製した。得られたtotal RNAの純度の確認は OD_{260}/OD_{280} 比を自記分光光度計(DU-650, Beckman)を用いて測定し、比が1.7~1.8の試料を実験に用いた。

RNAの電気泳動

1.3%アガロースゲルは、アガロース0.78gに

精製水43.3ml, $10 \times$ MOPS buffer 6mlを加えて高圧蒸気滅菌(121℃, 20分)し, 12.3Mホルムアルデヒド10.7mlを加え調製した。泳動用緩衝液($1 \times$ MOPS buffer)は, 高圧蒸気滅菌(121℃, 20分)したものをを用いた。泳動用試料は, 約 $20 \mu\text{g}$ のRNA, ホルムアルデヒド $3.5 \mu\text{l}$, ホルムアミド $10 \mu\text{l}$ に, 全量が $20 \mu\text{l}$ になるようにDEPC処理水を加え, 60℃, 15分間加温し続いて, 氷中に5分間放置後, $10 \times$ Loading Buffer $2 \mu\text{l}$, エチジウムブロマイド $0.5 \mu\text{l}$ を加え調製した。RNAの電気泳動は, 電気泳動装置にMupid-21ミニゲル泳動槽(コスモ・バイオ株式会社)を用い泳動した。泳動後はUV照射により18S及び28S rRNAの検出を行い, 28S rRNAのバンドが18S rRNAのバンドと比較し2倍程度濃く見える試料を実験に用いた。

等電点電気泳動

等電点電気泳動用のゲル(pH3~10)は, PhastGel Cassette(アマシャムバイオサイエンス)でPhastGel Dry IEFを挟み込み, PhastGel Cassette内を再膨潤液(等電点電気泳動用Pharmalyte 3~10:水=1:15)で満たし, 2時間放置し調製した。等電点電気泳動はPhastSystem全自動電気泳動装置(アマシャムバイオサイエンス), 上記で作製したゲルおよびタンパク質量約 $52 \mu\text{g}$ のサイトソールを用いて行い, タンパク質はCoomassie Tablets, PhastGel Blue R-350(アマシャムバイオサイエンス)を用いて染色した。pIマーカーとしては, アミログルコシダーゼ(3.5), メチルレッド(3.75), 大豆トリプシンインヒビター(4.55), β -ラクトグロブリンA(5.2), ウシカルボニックアンヒドラーゼB(5.85), ヒトカルボニックアンヒドラーゼB(6.55), ウマミオグロビン-酸性側バンド(6.85), ウマミオグロビン-塩基性側バンド(7.35), レンチルレクチン-酸性側バンド(8.15), レンチルレクチン-中間バンド(8.45), レンチルレクチン-塩基性側バンド(8.65)およびトリプシノーゲン(9.3)を含むpI Calibration Kit 3~10(アマシャムバイオサイエンス)を用いた。これらを指標に等電点を確認した。

cDNAの作製

RT-PCR用 SuperScript First-Strand Synthesis System (インビトロジェン株式会社) を用い, 同社のプロトコールに従って cDNA を作製した.

ADH1 および β -Actin の PCR

ADH1 については, forward プライマーを 5'-TCTGCCGCTCAGATGATCACGC-3', reverse プライマーを 5'-TCGAGAAGCCACAGCCGATGAG-3' と設計した¹³⁾. β -Actin については, forward プライマーを 5'-TATGGAGAAGATTTGGCACC-3', reverse プライマーを 5'-CCACCAATCCACACAGAGTA-3' と設計した^{2,14)}. これらプライマーの作製は, シグマジェノシスジャパン株式会社に委託した.

サーマルサイクラーに TaKaRa PCR Thermal Cycler MP (宝酒造株式会社) を用い, cDNA, 0.5 μ M forward および reverse プライマー, dNTP Mixture, 10 \times Ex Taq Buffer, 滅菌蒸留水, TaKaRa Ex Taq polymerase を加え, 全量を 50 μ l となるように調製し, 以下の条件で PCR を行った. ADH1 は, 最初に 94 $^{\circ}$ C で 2 分間熱変性を行った後, 94 $^{\circ}$ C で 30 秒間, 73 $^{\circ}$ C で 30 秒間, 72 $^{\circ}$ C で 30 秒間を 25 又は 27 サイクル行い, 最後に 72 $^{\circ}$ C で 2 分間伸長反応を行った. β -Actin は, 最初に 94 $^{\circ}$ C で 2 分間熱変性を行った後, 94 $^{\circ}$ C で 30 秒間, 61 $^{\circ}$ C で 30 秒間, 72 $^{\circ}$ C で 30 秒間を 25 又は 27 サイクル行い, 最後に 72 $^{\circ}$ C で 2 分間伸長反応を行った.

PCR産物の電気泳動

PCR産物の電気泳動は, 1 \times TAE buffer を泳動用緩衝液とし, 0.8% のアガロースゲルで電気泳動した. 泳動後は UV 照射により PCR 産物の確認を行った. 分子量マーカーは, λ DNA-HindIII マーカーを用いた.

ADH 活性の測定

30 mM グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH10), 1 mM NAD⁺ およびサイトソールを 37 $^{\circ}$ C で 2 分間プレインキュベーション後, エタノール (最終濃度: 0.05 ~ 2.5 mM) を加えて反応を開

始した. 自記分光光度計 (DU-650, Beckman) を用い, 25 $^{\circ}$ C で 340 nm における吸光度の増加を測定した. なお, サイトソールの代わりに, 30 mM グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH10) を添加したものを対照とした.

ADHの活性染色

等電点電気泳動後, ゲルを Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色せずに直ちに, 活性染色液 (50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.6), 0.24 M エタノール, 0.6 mM NAD⁺, 0.24 mM ニトロブルーテトラゾリウムクロリド, 0.065 mM フェナジンメトスルファート) に浸し, 暗所で 46 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させた. 反応終了後, ゲルを取り出し精製水で洗浄し, バンドを確認した.

20 α -HSDの活性測定

0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4)-0.1 mM EDTA, プロゲステロン (最終濃度: 10 ~ 300 μ M) および 0.25 mM NADH からなる反応液にサイトソールあるいはミクロソームを加え, 全量を 1.0 ml となるように調製した. 反応は NADH を加えて開始し, 好氣的条件下にて 37 $^{\circ}$ C, 10 分間インキュベーションした後, 1 N HCl を 250 μ l 加えることにより反応を停止させ, さらに, 内標準物質として 12 μ g/ml の濃度の 17-メチルテストステロンメタノール溶液 50 μ l 及びジクロロメタン 3 ml を加えた. これを 10 分間振とうし, 3,000 \times g で 5 分間遠心分離した. 続いて, 上層 (水層) を除き, ジクロロメタン層 2 ml を分取した. 得られたジクロロメタン層を窒素気流下蒸発乾固し, 残渣をアセトニトリル 200 μ l に溶解したものを HPLC 分析試料とした.

20 β -HSDの活性測定

20 α -HSD の活性測定と同様に行った. ただし, NADH の代わりに NADPH 生成系 (0.25 mM NADP⁺, 6.25 mM グルコース-6-リン酸一ナトリウム, 0.25 unit/ml グルコース-6-リン酸脱水素酵素, 6.25 mM 塩化マグネシウム) を, 内標準物質として 84 μ g/ml の濃度の 4,6-pregnadien-6,17-dimethyl-3,20-dione を用いた.

アミノピリン*N*-脱メチル化酵素活性の測定

0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)-0.1mM EDTA, アミノピリン(最終濃度: 0.05~2.5mM) およびNADPH生成系からなる反応液にマイクロソーム懸濁液を加え, 全量を1.0mlとなるように調製した. 反応はNADPH生成系を加えて開始し, 好氣的条件下にて37℃, 30分間インキュベーションした後, 20%トリクロロ酢酸(以下TCAとする)を1ml加えることにより反応を停止させた. その後, 3,000×*g*で10分間遠心分離を行い, 得られた上清1mlにNash試薬を2ml加え, 再び37℃, 30分間インキュベーションした後, 412nmにおける吸光度を測定した.

アニリン*p*-水酸化酵素活性の測定

基質をアニリン塩酸塩(最終濃度: 4~200μM), 反応時間を40分, 20%TCA 0.5mlを反応停止剤とする以外は, アミノピリン*N*-脱メチル化酵素活性の測定と同じ条件で操作し, 得られた上清1mlに10%炭酸ナトリウムを0.5ml, 2%フェノール/0.2M水酸化ナトリウム溶液を1ml加え, 再び37℃, 30分間インキュベーションした後, 630nmにおける吸光度を測定した.

p-ニトロアニソール*O*-脱メチル化酵素活性の測定

基質を*p*-ニトロアニソール(最終濃度: 4~200μM)に変更した以外は, アミノピリン*N*-脱メチル化酵素活性の測定と同じ条件で操作し, 得られた上清1.5mlに15%炭酸ナトリウムを1.5ml加え, 410nmにおける吸光度を測定した.

7-エトキシマリン*O*-脱エチル化酵素活性の測定

基質を7-エトキシマリン(最終濃度: 0.05~1.5mM)および反応時間を10分に変更した以外は, アミノピリン*N*-脱メチル化酵素活性の測定と同じ条件で操作し, 得られた上清0.5mlに0.5Mナトリウム/カリウムリン酸緩衝液(pH7.4)を2.5ml加え, 分光蛍光光度計(RF-1500, 島津製作所)を用い, 励起波長380nm, 蛍光波長460nmにおける蛍光強度を測定した.

7-エトキシマリン*O*-脱エチル化酵素活性に対する各種CYP阻害剤の影響

0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)-0.1mM EDTA, 阻害剤(クロラムフェニコール又は*p*-ニトロアニソール(共に最終濃度: 25~500μM))およびNADPH生成系からなる反応液にマイクロソーム懸濁液を加え, 好氣的条件下にて37℃, 5分間プレインキュベーション後, 7-エトキシマリン(最終濃度: 150μM)を加えることで反応を開始した. その後の操作は7-エトキシマリン*O*-脱エチル化酵素活性の測定で述べた方法に従った. なお, 対照には各種CYP阻害剤を溶解させた溶液(阻害剤は含まれていない)を加え, 同様の操作を行った.

HPLCによるプロゲステロン代謝物の定量

プロゲステロン代謝物のHPLC分析には, ポンプLC-10ADVP(島津製作所)に, カラム恒温槽U-620VP#30(スガイケミー(株)), 検出器SPD-10AVP(島津製作所)およびデータ解析処理装置(C-R5A, 島津製作所)を接続した高速液体クロマトグラフ装置を用いた. カラムはCAPCELL PAK C18 UG120(250×3.0mm, I.D., 5μm, 資生堂)を用い, 移動相として水, アセトニトリル, メタノールをそれぞれ35:32.5:32.5の割合で混合した溶液を0.3ml/minの流速で流し, 検出は254nmの紫外吸収で行った. なお, カラム温度を37℃に設定し, 上記試料を20μl注入した. 代謝物はクロマトグラム上の得られたピーク面積より算出し, 定量した.

速度論的解析および統計処理

各酵素活性の K_m 及び V_{max} 値は, Hanes-Woolfの式にあてはめ, 最小二乗法により求めた. 実験結果は平均値±標準誤差で示した. 統計学的有意差は分散分析処理後, Student's *t*-testにより行い, $p < 0.05$ を有意差として示した.

結 果

1. Zn欠乏ラットの作製

Zn欠乏食で飼育したラット血清中のZn含量

(Fig.1), テストステロンおよびエストラジオール濃度 (Fig.2) を測定した. Zn欠乏食によりラット血清中Zn濃度は対照群に比べ, 雄で約60%, 雌でも約40%と著しく低下した. また, 雄ラッ

ト血清中テストステロン濃度は, Zn欠乏食により検出限界(0.09ng/mL)以下に低下した. しかし, 雌ラットの血清中エストラジオール濃度についてはZn欠乏食による変動は認められなかった.

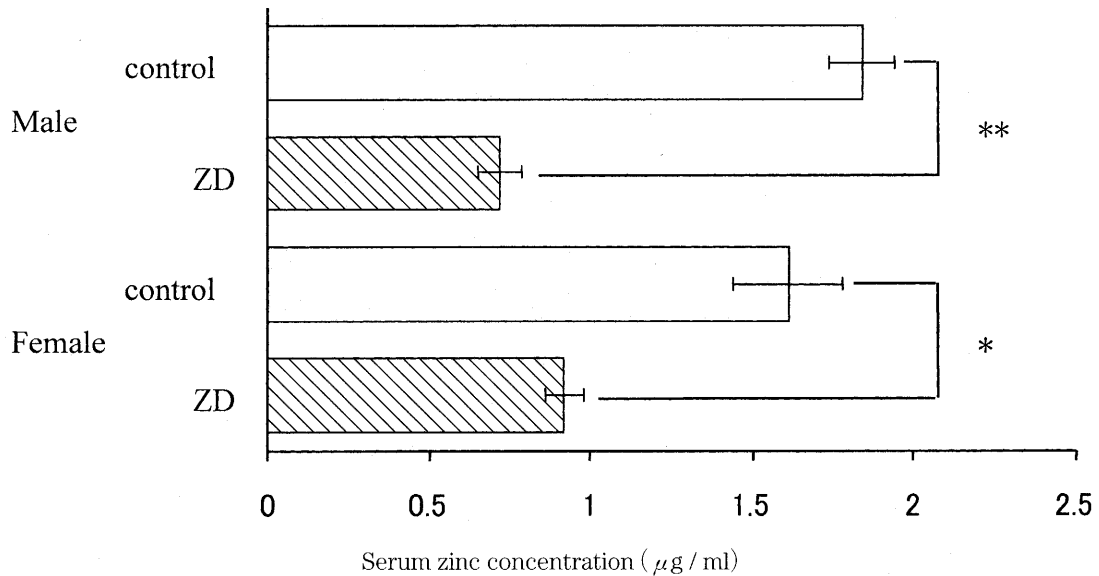


Fig. 1. Effect of zinc deficiency (ZD) on serum zinc concentration

Results are the mean \pm S.E. for four individual rats in each group.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ compared with either male or female control group.

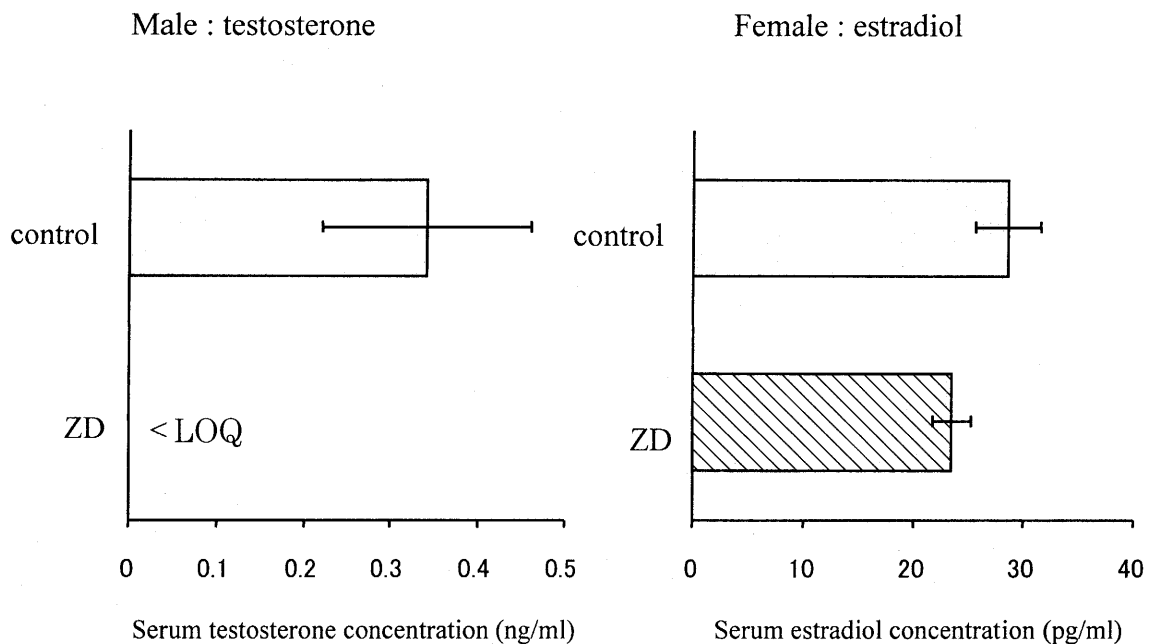


Fig. 2. Effect of zinc deficiency (ZD) on serum testosterone and estradiol concentration

Results are the mean \pm S.E. for four ~ six individual rats in each group.

LOQ : the limit of quantification.

2. アルコール脱水素酵素活性 (ADH)

補酵素にNAD⁺および基質にエタノールを用い、ラット肝サイトソールのADH活性を測定し、キネティックパラメータを算出した (Table 1). K_m 値は各群ともに0.12~0.17mMで、有意な差は見られなかった。しかし、雄ラットにおける V_{max} 値は、Zn欠乏群 ($8.02 \pm 0.58 \text{ nmol/min/mg protein}$) が対照群 ($3.38 \pm 0.50 \text{ nmol/min/mg protein}$) より約2.4倍高い値を示し、それに伴い V_{max}/K_m 値も約3.5倍に増大した。Zn欠乏により増大した雄ラットの V_{max} 値は、雌性ラット対照

群の V_{max} 値とほぼ同等であった。それに対し、雌ラットではZn欠乏によるADH活性の変動は認められなかった。なお、ADH活性を対照群の雌雄で比較すると、雌が雄の約1.8倍高い V_{max} 値を示し、有意な性差が観察された。この結果は従来の報告^{15,16)} と一致するものであった。

3. アルコール脱水素酵素活性染色

ラット肝にはADH1とADH2が存在することが報告されている。そこで、どのアイソザイムがZn欠乏による影響を受けるのかを調べるため

Table 1. Kinetic parameters for liver cytosolic alcohol dehydrogenase of control and zinc deficiency rats

Sex	Control /ZD	K_m (mM)	V_{max} (nmol/min/mg protein)	V_{max}/K_m (mL/min/mg protein)
Male	Control	0.17 ± 0.01	3.38 ± 0.50	20.12 ± 2.15
	ZD	0.12 ± 0.02	$8.02 \pm 0.58^*$	$71.01 \pm 12.7^*$
Female	Control	0.15 ± 0.01	$6.07 \pm 0.53^*$	$41.61 \pm 4.80^*$
	ZD	0.15 ± 0.01	$7.15 \pm 0.93^*$	$47.41 \pm 8.10^*$

Results are the mean \pm S.E. for four individual rats in each group.

* $P < 0.05$ compared with control male.

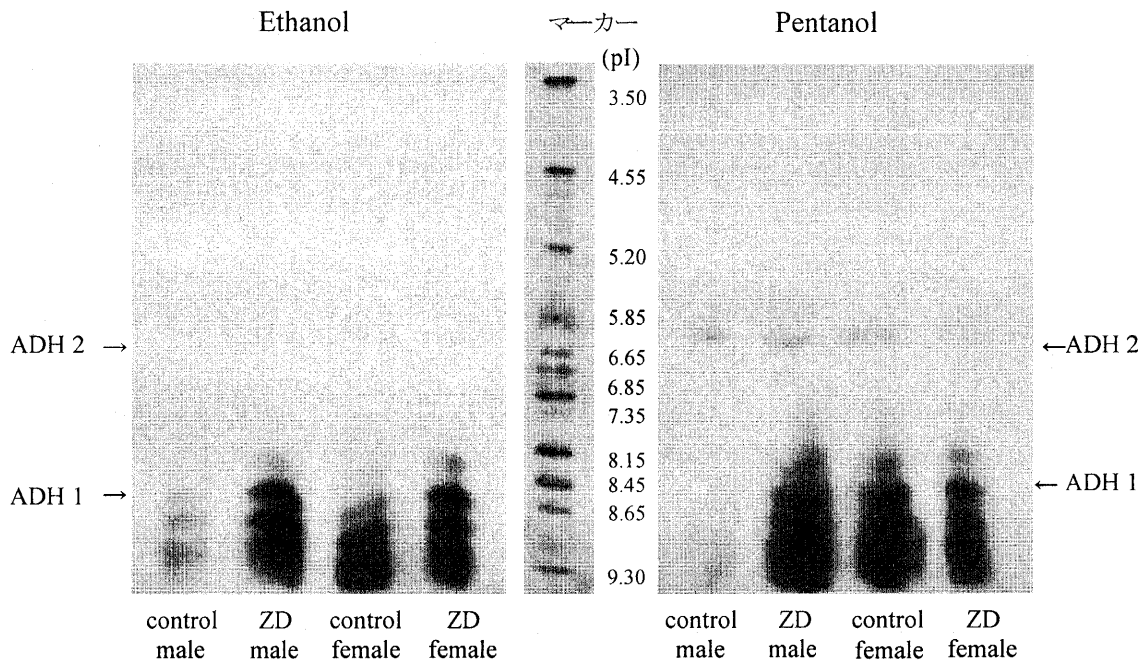


Fig. 3. Activity staining of liver alcohol dehydrogenase (ADH) in control and zinc deficiency (ZD) rats

に, ADH1 (pI8.25~8.4) と ADH2 (pI5.95~6.3) を等電点電気泳動で分離し, エタノールおよびペンタノールを基質に用い活性染色を行った (Fig.3). その結果, ADH1 のバンドはエタノールおよびペンタノールのいずれを基質にしたときも pH8.4 近傍に明瞭に検出され, 雄ラットにおいて Zn 欠乏によるタンパク質量の増大が確認された. 一方, pH6 付近の ADH2 については, 基質がエタノールするときバンドは検出されなかったが, ペンタノールを用いると薄いながらも検出された. しかし, 雌雄ラットとも対照群と Zn 欠乏群の ADH2 発現量に明確な差は認められなかった.

4. アルコール脱水素酵素 ADH1 遺伝子の RT-PCR

β -Actin を基準遺伝子とし, 各ラット群の肝 RNA 量が同じになるように調製したときの ADH1 mRNA の RT-PCR の結果を Fig.4 に示す. 雄ラットにおいて, 対照群に比べ Zn 欠乏群の

mRNA 発現量の明白な増大が観察された.

5. 20-Hydroxysteroid dehydrogenase (20-HSD) 活性の変動

プロゲステロンを基質に用い, ラット肝サイトソールの 20 α -HSD 活性およびミクロソームの 20 α -並びに 20 β -HSD 活性を測定し算出したキネティックパラメータを Table 2 にまとめた. なお, 20 α -HSD および 20 β -HSD 活性測定の補酵素には, それぞれ NADH および NADPH を使用した.

Zn 欠乏によるサイトソールおよびミクロソームの 20 α -HSD 活性の変動は, 雌雄共にほとんど認められなかった. 一方, 20 β -HSD については, 雄性対照群ラットで認められた高い活性が, Zn 欠乏により検出限界以下に激減した. また, 20 β -HSD 活性には既知報告^{27,28)} 通り著しい性差が認められ, 雌性ラットでは検出限界以下であった.

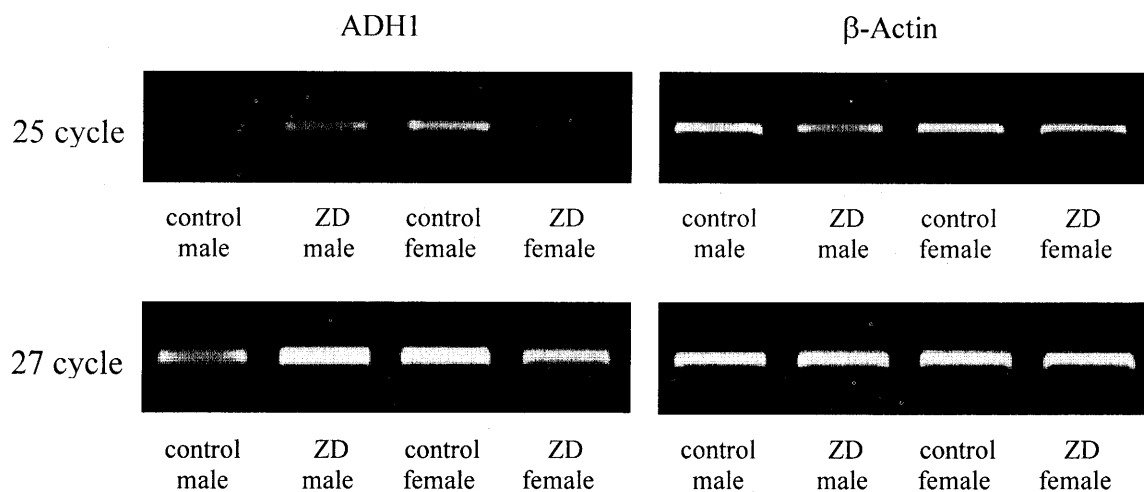


Fig. 4. RT-PCR analysis of liver alcohol dehydrogenase 1 (ADH1) mRNA levels in control and zinc deficiency (ZD) rats

6. シトクロムP450活性

対照群およびZn欠乏ラット群肝ミクロソーム中の主なシトクロムP450分子種の活性を、典型

的な基質としてアミノピリン, アニリン, *p*-ニトロアニソールおよび7-エトキシクマリンを用い測定した (Table 3).

Table 2. Kinetic parameters for liver cytosolic and microsomal hydroxysteroid dehydrogenases of control and zinc deficiency rats

Enzymes	Sex	Control /ZD	K_m (mM)	V_{max} (nmol/min/mg protein)	V_{max}/K_m (mL/min/mg protein)
20 α -HSD (Cytosol)	Male	Control	41.29 \pm 3.47	32.26 \pm 4.58	0.77 \pm 0.08
		ZD	47.79 \pm 3.84	54.46 \pm 8.28	1.20 \pm 0.27
	Female	Control	40.99 \pm 3.90	22.48 \pm 0.92	0.56 \pm 0.04
		ZD	48.22 \pm 2.77	37.18 \pm 4.32	0.77 \pm 0.08
20 α -HSD (Microsomes)	Male	Control	2.68 \pm 0.34	54.81 \pm 5.99	21.80 \pm 4.21
		ZD	2.69 \pm 0.70	70.93 \pm 5.38	32.95 \pm 8.99
	Female	Control	4.29 \pm 0.64	72.85 \pm 6.07	17.50 \pm 1.50
		ZD	1.21 \pm 0.12	68.81 \pm 10.08	60.28 \pm 13.08*
20 β -HSD (Microsomes)	Male	Control	39.94 \pm 2.55	1.69 \pm 0.12	42.24 \pm 0.08
		ZD	N.D.	N.D.	
	Female	Control	N.D.	N.D.	
		ZD	N.D.	N.D.	

Results are the mean \pm S.E. for four individual rats in each group.

*P < 0.05 compared with control female.

N.D. : not detected.

Table 3. Kinetic parameters for several kinds of liver microsomal cytochrome P450 activity of control and zinc deficiency rats

Enzymes	Control /ZD	K_m (mM)	V_{max} (nmol/min/mg protein)	V_{max}/K_m (mL/min/mg protein)
Aminopyrine <i>N</i> -demethylase				
Male	Control	0.40 \pm 0.04	5.92 \pm 0.33	14.95 \pm 0.84
	ZD	0.56 \pm 0.03	5.18 \pm 0.40	9.28 \pm 0.78
Female	Control	0.80 \pm 0.12	3.22 \pm 0.29***	4.40 \pm 0.92
	ZD	0.80 \pm 0.12	3.73 \pm 0.26	4.76 \pm 0.54
Aniline <i>p</i> -hydroxylase				
Male	Control	12.71 \pm 0.71	0.74 \pm 0.07	58.30 \pm 5.98
	ZD	15.18 \pm 2.62	1.13 \pm 0.22	73.54 \pm 1.98
Female	Control	11.77 \pm 0.90	0.78 \pm 0.06	65.71 \pm 2.45
	ZD	16.35 \pm 2.07	1.36 \pm 0.17	83.73 \pm 4.99*
<i>p</i> -Nitroanisole <i>O</i> -demethylase				
Male	Control	9.58 \pm 0.61	1.21 \pm 0.13	117.85 \pm 12.47
	ZD	10.85 \pm 1.26	1.56 \pm 0.19	146.32 \pm 11.71
Female	Control	9.37 \pm 0.58	1.35 \pm 0.11	144.90 \pm 11.15
	ZD	13.34 \pm 2.45	2.06 \pm 0.26	160.02 \pm 10.67
7-Ethoxycoumarin <i>O</i> -deethylase				
Male	Control	0.25 \pm 0.04	3.29 \pm 0.88	15.97 \pm 5.86
	ZD	0.21 \pm 0.02	3.10 \pm 0.71	14.76 \pm 2.29
Female	Control	0.16 \pm 0.03	1.21 \pm 0.14	8.33 \pm 1.93
	ZD	0.17 \pm 0.02	2.66 \pm 0.09**	15.59 \pm 1.55

Results are the mean \pm S.E. for four individual rats in each group.

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005 compared with male control group.

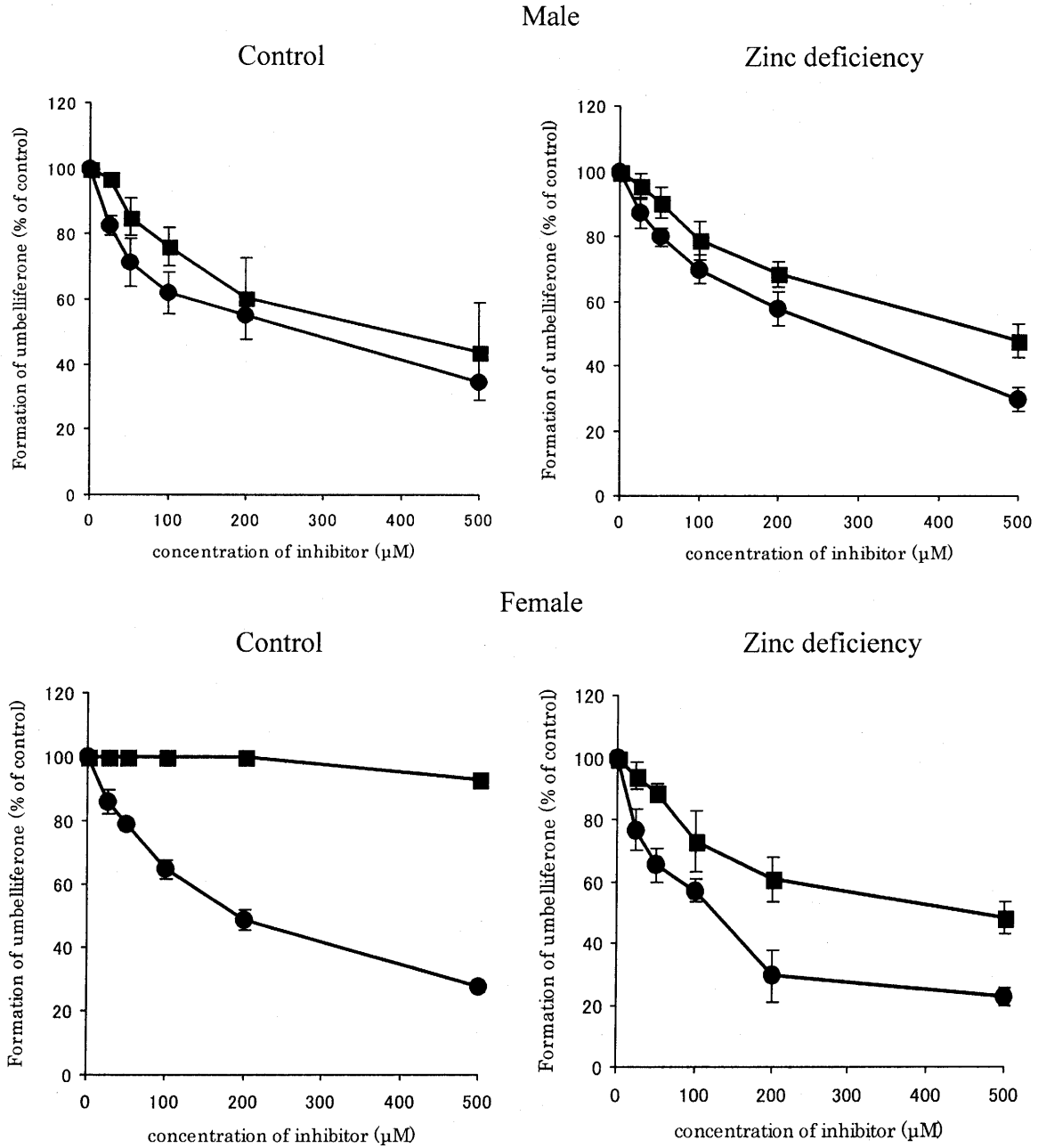


Fig. 4. Inhibition of 7-ethoxycoumarin *O*-deethylase activities in liver microsomes of control and zinc deficiency rats by *p*-nitroanisole and chloramphenicol. Results are the mean \pm S.E. for four individual rats in each group.

—●— *p*-nitroanisole —■— chloramphenicol

アミノピリン*N*-脱メチル化酵素活性については、雄が雌の約2倍高い V_{max} 値を示し従来の報告通りの性差が観察されたが、Zn欠乏の影響は雄ラットにおいて活性低下の傾向が見られるに過ぎなかった。アニリン*p*-水酸化酵素活性および*p*-ニトロアニソール*O*-脱メチル化酵素活性には、性差もZn欠乏による活性の変動も全く認められなかった。

一方、7-エトキシマリン*O*-脱エチル化酵素活性については、Zn欠乏による活性の変動は雄ラットでは認められなかったが、雌ラットで約2倍の V_{max} 値の増大が観察された (Table 3)。本酵素活性には、CYP1A1およびCYP2Bの関与が報告されているので、それぞれに選択的な阻害剤の影響を検討した (Fig.5)。CYP1A1の阻害剤の*p*-ニトロアニソール並びにCYP2Bの阻害剤のクロラムフェニコールにより、対照群およびZn欠乏群いずれも雄ラットの活性は60~80%阻害された。このことから、雄ラット肝ミクロソームによる7-エトキシマリン*O*-脱エチル化反応にはCYP1A1とCYP2Bの両分子種が関与していることが示唆された。一方、雌ラットにおいては、対照群の活性は*p*-ニトロアニソールで60%程度阻害されたが、クロラムフェニコールではほとんど阻害されなかった。これに対し、Zn欠乏群では両阻害剤により60~80%の阻害が見られた。この結果から、雌ラットではZn欠乏によりCYP2Bが誘導されることが示唆された。

考 察

Znは微量必須元素の一つであり、生体内において種々の生理作用に重要な役割を担っているが、薬物代謝酵素への関与については必ずしも十分に明らかにされているとは言えない。そこで、本研究では雌雄Wistar系ラットを用い、Zn欠乏がADH、HSDおよびシトクロムP450などの種々薬物代謝酵素に及ぼす影響について検討した。なお、Zn欠乏によりラット血清中Zn含量が著しく低下するとともに、外見的所見は明らかに成長障害や皮膚障害を呈した。また、Zn欠乏により雄ラットの血清中テストステロン濃

度は検出限界以下に低下するのに対して、雌ラットのエストラジオール濃度はほとんど変動せず、Zn欠乏が精巣に影響を与えることが示された。精巣においては元来Zn含量が高く、機能維持に深く関わっている。その中のZn濃度が低下することにより機能障害が生じテストステロンの産生あるいは分泌の低下が起こり、血清中テストステロン濃度が著しく減少したものと考えられる。

ADH活性には、雌が雄より高いという性差が報告^{15,16)}されており、本研究でも確認された。この性差は、Zn欠乏により雄ラットのADH活性が雌ラットのレベルまで増大することにより消失した。ラット肝にはADH1およびADH2が存在し、それらは等電点電気泳動で分離される¹⁷⁾。雄ラットのADH1タンパク質発現量およびmRNA発現量がZn欠乏により増加することが、それぞれ等電点電気泳動後の活性染色並びにRT-PCRによる遺伝子解析で明らかになった。テストステロンは脳下垂体からの成長ホルモンの分泌パターンをパルス型にすることにより肝臓におけるADHの発現を抑制的に制御していることが、雌の方が雄より活性が高いという性差の原因とされている¹⁶⁾。雄ラット血清中のテストステロン濃度はZn欠乏により検出限界以下に低下するが、このテストステロン濃度の低下がADH1タンパク質発現の抑制を外し、ADH活性が雌レベルまで増大したものと推定される。ADHはZn含有酵素であるが、Zn欠乏により補欠分子族に異常が生じADHの活性が上昇したのではなく、Zn欠乏によるテストステロンの産生あるいは分泌の低下が雄ラットのADH活性をあたかも雌性化したものと言える。

ステロイドの酸化、還元を触媒するHSDには、 3α -HSD、 11β -HSD、 17β -HSD、 20β -HSD、 20α -HSDなどが知られている。11 β -HSDおよび17 β -HSDはN末端に補酵素結合部位を、中心部に活性部位を有するアミノ酸残基が250~300個の短鎖アルコール脱水素酵素スーパーファミリー (SDR) に、 3α -HSDおよび 20α -HSDはC末端に補酵素結合部位を、N末端に活性部位を有するアミノ酸残基が約320個のアルドーケト還

元酵素スーパーファミリー(AKR)に属する¹⁸⁻²⁵⁾. 一方, 20β -HSDはSDRスーパーファミリーの中のカルボニル還元酵素と非常に類似した構造と機能を有しており, 異物カルボニル還元酵素としての役割が考えられている. 20β -HSD活性は主に肝臓や腎臓のミクロソーム画分に局在し, 補酵素としてNADPHを要求する^{21,26-29)}. 肝臓の 20β -HSD活性の発現は, 視床下部-脳下垂体を介するテストステロン依存性の成長ホルモンパルス型分泌パターンにより調節されている²⁷⁾. それに対して, 腎臓の 20β -HSDの活性発現はテストステロンにより直接制御を受けるとされている²⁹⁾.

本研究で, サイトソールおよびミクロソームの 20α -HSD活性はZn欠乏の影響をほとんど受けないことが示された. 一方, ミクロソームの 20β -HSD活性には雄ラットのみを検出されるという著しい性差が存在し, この雄ラットの活性はZn欠乏により検出限界以下に激しく低下した. これは, Zn欠乏による精巣の障害のためテストステロン-視床下部-脳下垂体axis系が機能しなくなり, テストステロンにより誘導的に制御されている本酵素が発現しなくなったことによるものと推察された. このように, 同じミクロソームに存在する 20α -HSDと 20β -HSDのZn欠乏による影響の受け方に違いがあることは, それら酵素の生理的役割との関連から興味を持たれる.

Zn欠乏がシトクロムP450活性に及ぼす影響を検討したところ, 限られた基質ではあるが, 雌ラットにおいてCYP2Bが誘導されることが示唆された. その他のCYP分子種の活性に有意な変動は認められなかった. CYP2Bはフェノバルビタール(PB)によって誘導される酵素として昔からよく知られている. 最近, PBによるCYP2B1の誘導がWistar-Kyoto系ラットの雄では起こるが雌では起こらないのに対して, Fisher 344系ラットでは雌雄共に起こり, CYP2B1の誘導に系統差や性差が複雑に絡んでいることが報告された³⁰⁻³⁴⁾. この原因として, PBによるCYP2Bの誘導に関与するオーファン核内受容体のCAR (constitutive androstane receptor: 常在性アン

ドロスタン受容体)の応答の違いが考えられている³⁰⁾. CYP2B1と異なり, CYP2B2の誘導にはこのような系統差や性差は存在しない³¹⁾. このようなことから, 雌ラット肝においてZn欠乏により誘導されるCYP分子種はCYP2B1と推定された. 今のところその誘導機構は不明であるが, Zn欠乏で雌ラット血清中エストラジオールの濃度は影響を受けないことから, CYP2B1の誘導に少なくともエストラジオールの関与はないものと考えられる.

以上, Zn欠乏が肝薬物代謝酵素に及ぼす影響を検討した結果, テストステロンにより抑制的に制御されているADH活性が著しく増大する一方, 誘導的に制御されている 20β -HSD活性が著しく低下した. これはZn欠乏による精巣の障害がテストステロン-脳下垂体-視床下部 axisに異常を来したことによるとものと推察された. 雌ラットにおけるZn欠乏によるCYP2B1誘導機構については不明で現在種々検討中である.

REFERENCES

- 1) 桜井弘, 田中久, “生物無機化学”, 75-79 (1969).
- 2) Xu Z., Kawai M., Bandiera S. M., Chang T. K. H., *Biochem. Pharmacol.*, **62**, 1283-1291 (2001).
- 3) Hambidge K. M., Casey C. E., Krebs N. F., Zinc. In: Mertz W., Underwood E. J., editors., *Trace elements in human and animal nutrition.*, Academic Press, Orlando, p.1-138 (1986).
- 4) Bray T. M., Bettger W. J., *Free. Radic. Biol. Med.*, **8**, 281-291 (1990).
- 5) Hambidge M., *J. Nutr.*, **130**, Suppl.5, 1344S-1349S (2000).
- 6) Powell S. R., *J. Nutr.*, **130**, Suppl.5, 1447S-1454S (2000).
- 7) Cagen S. Z., Klassen C. D., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **51**, 107-116 (1979).
- 8) McMillan D. A., Schnell R. C., *Fundam. Appl. Toxicol.*, **5**, 297-304 (1985).
- 9) Chengelis C. P., Dodd D. C., Means J. R., Kotsonis F. N., *Fundam. Appl. Toxicol.*, **6**, 278-284 (1986).

- 10) Miranda C. L., Henderson M. C., Reed R. L., Schmitz J. A., Buhler D. R., *J. Toxicol. Environ. Health.*, **9**, 359 – 366 (1982).
- 11) 富田寛：亜鉛と味覚障害，唾液分泌障害. 医薬ジャーナル, **33**, 3025 – 3032. (1997).
- 12) 桜井弘, 田中英彦, “生体微量元素”, 196 – 202 (1994)
- 13) Estonius M., Danielsson O., Karlsson C., Persson H., Jornvall H., Hoog J. O., *Eur. J. Biochem.*, **215**, 497 – 503 (1993).
- 14) Mahnke A., Strotkamp D., Roos P. H., Hanstein W. G., Chabot G. G., Nef P., *Arch. Biochem. Biophys.*, **337**, 62 – 68 (1997).
- 15) Harada S., Tachiyashiki K., Imaizumi K., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **44**, 625 – 639 (1998).
- 16) Simon F. R., Fortune J., Iwahashi M., Sutherland E., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **283**, G646-G655 (2002).
- 17) Julia P., Farres J., Pares X., *Eur. J. Biochem*, **162**, 179 – 189 (1987).
- 18) Maser E., Oppermann U. C., *Eur. J. Biochem*, **249**, 365 – 369 (1997).
- 19) Monder C., White P. C., *Vitam. Horm.*, **47**, 187 – 271 (1993).
- 20) Sang G. W., Lorenzo B., Reidenberg M. M., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **39**, 169 – 176 (1991).
- 21) Perrin C. W., Tomoatsu M., Anil K. A., *Steroid*, **60**, 65 – 68 (1995).
- 22) Maser E., *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 421 – 440 (1995).
- 23) Jörnvall H., Persson B., Krook M., Atrian S., González-Duarte R., Jeffery J., Ghosh D., *Biochemistry*, **34**, 6003 – 6013 (1995).
- 24) Jez J. M., Flynn T. G., Penning T. M., *Biochem. Pharmacol.*, **54**, 639 – 647 (1997).
- 25) Zhang Y., Dufort I., Rheault P., Luu-The V., *J. Mol. Endocrinol.*, **25**, 221 – 228 (2000).
- 26) Takada H., Uchida A., Kamizono R., Otagiri M., Imamura Y., *Life Sci.*, **67**, 2075 – 2082 (2000).
- 27) Imamura Y., Uchida A., Takada H., Otagiri M., Tsuchiya K., *YAKUGAKU ZASSHI*, **121**, 85 – 91 (2001).
- 27) Imamura Y., Uchida A., Takada H., Otagiri M., Tsuchiya K., *YAKUGAKU ZASSHI*, **121**, 85 – 91 (2001).
- 28) Takada H., Otagiri M., Imamura Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **287**, 504 – 507 (1998).
- 29) Imamura Y., Takada H., Kamizono R., Otagiri M., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **78**, 373 – 378 (2001).
- 30) Yoshinari K., Sueyoshi T., Moore R., Negishi M., *Mol. Pharmacol.*, **59**, 278 – 284 (2001).
- 31) Chang T. K. H., Anderson M. D., Bandiera S. M., Bellward G. D., *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 994 – 1000 (1997).
- 32) Murayama N., Shimada M., Yamazoe Y., Kato R., *Mol. Pharmacol.*, **39**, 811 – 817 (1991).
- 33) Shapiro B. H., Pampori N. A., Lapenson D. P., Waxman D. J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **312**, 234 – 239 (1994).
- 34) Larsen M. C., Brake P. B., Parmar D., Jefcoate C. R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **315**, 24 – 34 (1994).