

マンガンイオンのラット体内分布と原子価状態

桜井 弘¹⁾, 西田 幹夫²⁾

(徳島大学薬学部,* ¹⁾薬品分析学, ²⁾生化学教室)

Distribution and Valence States of Manganese Ion in Rat

Hiromu SAKURAI¹⁾ and Mikio NISHIDA²⁾

*Department of Analytical Chemistry¹⁾ and Biochemistry²⁾,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokushima*

Although the essential roles of manganese ion (Mn) and requirement of its homeostasis have been studied in various biological systems, little is known about how Mn actually plays physiological roles. Our interests are focused on the determination of the redox passway of Mn through which Mn is transferred to an appropriate location for its function.

We determined the tissue and subcellular distributions of Mn (II), determined by ESR (electron spin resonance), and of total Mn, determined by neutron activation analysis combined with chemical separation, differentiating two species of Mn in rats with and without MnCl₂-treatment.

In controls, total Mn content was high in the thyroid, hypophysis, adrenal, pancreas, liver and kidney, but Mn(II) contents of these tissues were low. In animals treated with MnCl₂, the total Mn content of all tissues increased, but the Mn(II) content remained low. In subcellular distribution, the total Mn content was high in nuclear and mitochondrial fractions of liver and kidney, and in the microsomal and supernatant fractions of the pancreas. The ratio of Mn(II) to total Mn was relatively high in microsomes of the liver and kidney of control rats, and in the nuclear fraction

* 所在地: 徳島市庄町 1-78 (〒770)

of pancreas of Mn-treated rats.

Partially purified liver nuclei and mitochondria were found to contain higher levels of Mn than the crude compartments, indicating that Mn is tightly bound in each cellular compartment.

近年、多くの微量元素が生命の存在にとり必須であることが証明されている。¹⁾ マンガンイオン (Mn) は、1931 年、マウスとラットを用いて哺乳動物における必須性が証明された微量元素である。その後、ヒトにおいて欠乏症や過剰症が観察され、またいくつかの Mn を含む酵素やタンパクが見い出されている。²⁾ しかし、Mn の生理学、生化学あるいは錯体化学的研究は、他の微量元素と比べて、基礎研究は遅れている。その理由は、+7 から -3 まで 11 種類の中広い酸化状態をとりうる Mn は、その生体内存在形も極めて多様であり、あらゆる領域での基礎研究を複雑かつ困難にしているからである。

このような状況を認識して、我々は動物における Mn のもつ生理的および生化学的役割を明らかにすることを目的として、基礎研究を行っている。今回、 MnCl_2 を投与したラット臓器中および肝、腎およびすい臓細胞下画分の総 Mn および Mn (II) を、それぞれ中性子放射化分析法と ESR (電子常磁性共鳴) 法³⁾ により測定し、次の結果を得たので報告する⁴⁾。

- (1) Mn はすい臓、下垂体、副腎、甲状腺などへ選択的に分布する。
- (2) Mn (II) を投与したにもかかわらず、大部分の Mn は Mn (II) 以外の原子価状態へ移行する。
- (3) 対照および Mn (II) 投与ラット臓器中の Mn (II) / 総 Mn 比に大きな変動は見られず、したがって Mn (II) の代謝機構の存在が予想される。
- (4) 肝臓の核やミトコンドリア画分中に見い出される Mn は、これら画分中の成分と強く結合して存在する。

方 法

Wistar 系雄ラットに市販固形飼料 (オリエンタル) と水道水を与えた。Mn は生理食塩水に溶かした $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 14.2 mg/kg 体重を毎日腹腔内注射し、連続 2 週間投与した (1 群 5 匹)。動物は頸動脈切断し脱血致死させ、臓器を剔出した。各臓器は、1.15 % KCl を用いたホモジネートを作成した。肝、腎およびすい臓については、常法にしたがって細胞下画分を調製した。肝臓の粗核画分は、1.15 % KCl, 1mM MgCl_2 を含む 2M sucrose に重層し、遠心法を用いて細胞核を精製した。肝ミトコンドリア画分は、Meyer と Slater の方法

を用い、1.15% KClを含む0.25 M sucrose で遠心法により、succinate dehydrogenase と glucose - 6 - phosphatase 活性を指標にして精製した。各画分を一定量とり、凍結乾燥し、2重のポリエチレンバックに封入し、京都大学原子炉実験所において5000 KW、30分間照射し、総Mn量を求めた。試料の一部は、77 KでJES-ME-3X、X-バンドスペクトロメーターによりMn(II)を定量した。タンパク定量は、Lowry法によった。

結 果 と 考 察

凍結乾燥試料を中性子照射後冷却して、湿式灰化-溶媒抽出法を用いて、Mn-56にもとづく γ 線(846.6 KeV, 半減期2.57時間)を検出し(図1)、対照およびMnCl₂投与ラットの各臓器、細胞下画分および精製画分の総Mnを定量した。また臓器ホモジネートおよび細胞下画分を液体窒素温度(77 K)でESR法により、Mn(II)核($I = 5/2$)にもとづく6本線から成るシグナルを検出し(図2)、最も低磁場側のシグナル高を用いて試料中のESR活性なMn(II)を定量した。

MnCl₂を投与したラットの臓器中の総MnおよびMn(II)量そしてMn(II)/総Mn比を表1に示す。肝臓中の総Mn量を1とすると、対照ラットでは甲状腺には肝臓中の約1.2倍のMnが存在し、他の臓器では肝臓を越えるものがなかった。MnCl₂を2週間投与すると、検討した全臓器中の総Mn量は増大し、肝臓での値を1とすると、すい臓(6.2) > 下垂体(2.9) > 副腎(2.4) > 腎臓(2.1) > 甲状腺(1.7) > 睪丸(1.1)の順となり、これら臓器への選択的なMnの蓄積が観察された。この結果は⁵⁴MnCl₂投与動物の24時間のMn-

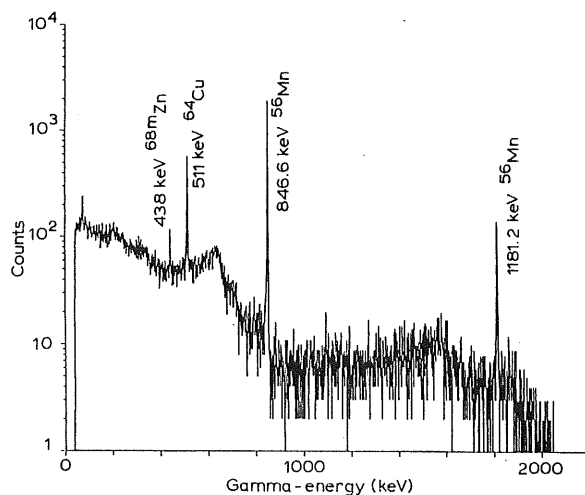


Fig. 1. Gamma-ray spectrogram after chemical separation of the rat liver treated with manganese chloride

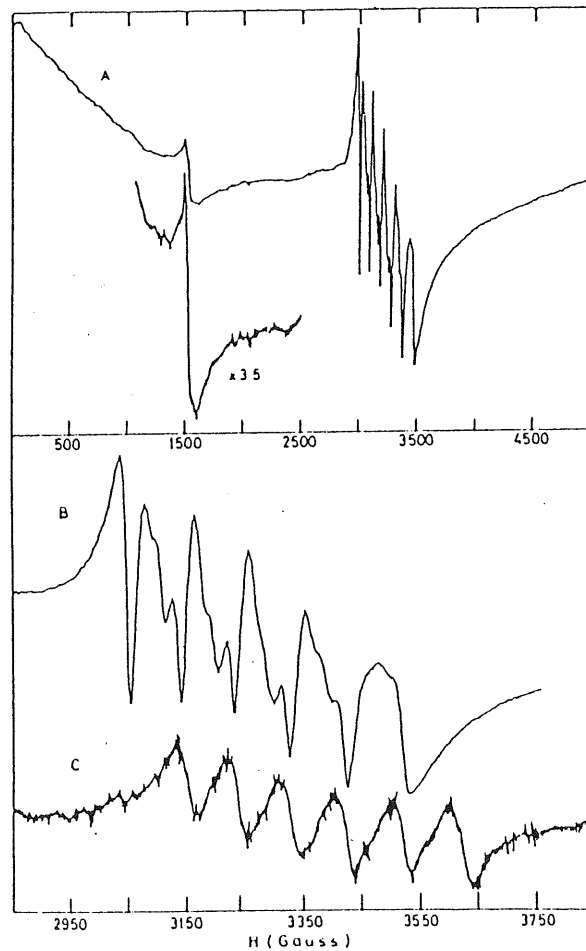


Fig. 2. ESR spectra of thyroid homogenate of rat treated with manganese chloride. A and B: 77K, C: 293K

Table 1. Distribution of total and divalent manganese in various rat tissues

Organ	Control			MnCl ₂ -treated			Percent change of total Mn
	Mn level (nmol/g protein)		Ratio (%) Mn ²⁺ /total Mn	Mn level (nmol/g protein)		Ratio (%) Mn ²⁺ /total Mn	
	Total Mn	Mn ²⁺		Total Mn	Mn ²⁺		
Cerebrum	10.5(0.22)	n.d.	—	70.7(0.77)	1.6	2.3	573
Cerebrum	13.1(0.27)	n.d.	—	38.3(0.42)	2.3	6.0	192
Hypophysis	35.4(0.73)	n.d.	—	265.4(2.89)	1.4	5.3	650
Thyroid	58.6(1.21)	n.d.	—	152.6(1.66)	4.0	2.6	160
Thymus	4.0(0.08)	n.d.	—	27.1(0.30)	0.3	1.1	578
Heart	6.6(0.14)	n.d.	—	32.5(0.35)	2.8	8.6	392
Lung	5.5(0.11)	n.d.	—	13.6(0.15)	n.d.	—	147
Liver	48.3(1.00)	0.6	1.2	91.7(1.00)	3.5	3.8	90
Spleen	4.9(0.10)	n.d.	—	15.8(0.17)	0.7	4.4	222
Pancreas	19.5(0.41)	1.2	6.2	571.9(6.24)	14.6	2.6	2833
Kidney	19.8(0.40)	3.1	15.6	191.8(2.09)	5.3	2.8	869
Adrenal	32.2(0.67)	0.4	1.2	217.4(2.37)	4.4	2.0	575
Testis	6.8(0.14)	0.1	1.5	96.7(1.05)	1.3	1.3	1322

Data are means of two replicate experiments on pooled samples from five rats. Values in parentheses are ratios of the total Mn level in the tissue to that in the liver. n.d., not detected. Percent change in total Mn was calculated by the following equation: [(total Mn in MnCl₂-treated rats) - (total Mn in control rats)] / (total Mn in control rats) × 100.

54 の臓器分布：すい臓（2.0）＞腎臓（1.6）＞肝臓（1.0）とよく対応し、Mn のすい臓や腎臓などへの選択的取り込みが明らかになった。

さらに、対照および MnCl_2 投与ラットと比較すると、すい臓（28.9）＞睪丸（14.2）＞腎臓（9.8）＞下垂体（7.5）＞胸腺（6.8） $\approx$ 副腎（6.8） $\approx$ 小脳（6.7）の順に、Mn の蓄積が見られた。このようにホルモン産生に関連する臓器において Mn が選択的に蓄積される現象は、Mn の生理的機能を考察する上に重要な方向を与えるかもしれないと考えられる。

一方、 MnCl_2 を投与したラットの各臓器の総 Mn 量に対する Mn（II）の割合は、極めて少ない（1～16％）ことが見い出された。Mn（II）は内因性物質により酸化還元反応をうけ、他の原子価状態に移行し、各臓器に取り込まれていることが示唆された。

表 2 は、 MnCl_2 を投与したラットの肝、腎およびすい臓における総 Mn および Mn（II）

Table 2. Distributions of total and divalent manganese in subcellular fractions of rat liver, kidney and pancreas

Subcellular fraction	Liver			Kidney			Pancreas		
	Mn level (nmol/g prot.)		Ratio (%)	Mn level (nmol/g prot.)		Ratio (%)	Mn level (nmol/g prot.)		Ratio (%)
	total Mn	Mn^{2+}		total Mn	Mn^{2+}		total Mn	Mn^{2+}	
Control									
Nuclei	109.3	1.8	1.6	36.3	0.9	2.5	36.7	2.8	7.6
Mitochondria	144.6	2.9	2.0	64.0	1.5	2.3	55.6	6.8	12.2
Microsomes	12.6	3.5	20.7	5.1	0.7	13.7	82.5	12.8	15.5
Supernatant	23.2	0.8	3.4	0.0	n.d.	—	63.5	5.2	8.2
MnCl_2 -treated									
Nuclei	173.2	4.4	2.5	296.1	8.0	2.7	86.0	49.8	57.9
Mitochondria	176.7	5.3	3.0	577.0	13.7	2.4	845.6	57.9	6.8
Microsomes	26.0	2.8	10.8	178.0	8.4	4.7	1918.0	93.7	4.9
Supernatant	55.8	1.0	1.8	120.2	1.7	1.4	1144.2	59.6	5.2

Values are means of two replicate experiments on pooled samples from five rats. Ratio (%) means $(\text{Mn}^{2+}/\text{total Mn}) \times 100$.

Table 3. Total manganese contents of crude and purified nuclear and mitochondrial fractions of rat liver

Fraction		Total Mn content (nmol/g protein)		Percent change of Mn content on purification ^a
		crude fraction (A)	partially purified fraction (B)	
Nuclei	control	36.7	429.8	1071
	MnCl_2 -treated	86.0	880.5	924
Mitochondria	control	44.3	92.5	109
	MnCl_2 -treated	68.4	170.7	150

Values are means for two replicate experiments on pooled samples from four rats.

^a Calculated by the following formula: $[(B)-(A)]/(A) \times 100$.

の細胞内分布を示している。肝および腎では、対照および Mn 投与群共に、総 Mn は、ミトコンドリア>核>ミクロゾーム $\approx$ 上清の順に減少し、Mn の大部分はミトコンドリアと核画分に集中している。すい臓では、ミクロゾーム>上清>ミトコンドリア>核の順に Mn は分布し、肝や腎臓での Mn 分布と著しい相異を示した。

ラット肝臓において、Mn が真に核やミトコンドリア画分に蓄積されているかどうかを明らかにするために、粗および精製画分中の Mn 量を検討した。表 3 に示されるように、核（光学顕微鏡で 95 % 以上の純度を確認）およびミトコンドリア画分では、精製により Mn の存在比が未精製画分に比べて増大し、Mn がこれら画分中に強く結合して存在することが見いだされた。

本研究の成果を基礎に、Mn の核やミトコンドリア中における結合部位と原子価状態を明らかにする研究を展開している⁵⁾

謝 辞

本研究は、京都大学原子炉実験所共同利用研究により行なわれたものである。

文 献

1. HURLEY, L. S. (1981) *Physiol. Rev.* 61:249
2. SCHRAMM, V. L. (1982) *Trends Biochem.* 7:369
3. SAKURAI, H., M. NISHIDA and T. YOSHIMURA (1982) *Inorg. Chim. Acta* 66:117
4. SAKURAI, H., M. NISHIDA, T. YOSHIMURA, J. TAKADA and M. KOYAMA (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 841:208
5. 桜井弘, 西田幹夫, 下村滋, 川田純 (1986) 第 3 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 講演要旨集 p. 50