

令和元年6月25日現在

機関番号：34414

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18708

研究課題名(和文) セレン輸送タンパク質とapoER2の制御による2型糖尿病悪化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of selenium-transport protein and apoER2 signaling in deterioration of type 2 diabetes

研究代表者

黒川 優 (Kurokawa, Suguru)

大阪大谷大学・薬学部・助教

研究者番号：70759761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトではセレンは必須微量元素である。本研究では、セレンを輸送するセレノプロテインP(SELENOP)が、その受容体であるアポリポプロテインE受容体2(apoER2)を介して細胞内シグナル伝達を引き起こす仕組みを解析した。SELENOPの取り込みと遺伝子発現解析を行い、マウス血管内皮細胞において一酸化窒素合成酵素の活性化を調節するシグナル伝達機構にSELENOP、apoER2とエンドサイトーシスを引き起こす因子が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セレンによって生じる様々な疾患は、セレンを持つたんぱく質であるセレントンパク質が原因であると考えられており、セレントンパク質の解析が研究対象になっている。急性毒性を生じないレベルのセレンと糖質の摂取が、セレンを運ぶ機能を持つ血中SELENOPを増加させ、2型糖尿病を悪化させることが報告されている。本研究はこれらセレンによる生理活性とは別に、SELENOPとその受容体であるApoER2のユニークな結合が、シグナル調節を行っていることと位置付け、2型糖尿病の悪化メカニズムを解析した。

研究成果の概要(英文)：In humans, selenium is a trace element nutrient. In this study, a signal transduction pathway triggered by selenoprotein P (SELENOP) which transfers selenium via its receptor apolipoprotein E receptor 2 (apoER2) was analyzed. Regulation of eNOS activity by SELENOP, apoER2 and endocytic accessory factors were analyzed by SELENOP uptake and gene expression analysis in mouse vascular endothelial cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：セレン apoER2 apoE SELENOP

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

セレンは必須微量元素である反面、2型糖尿病を悪化させる。これは血糖値と摂取セレンに比例して過剰に産生するセレノプロテイン P (SELENOP) が原因であるといわれている。本研究は、LDL 受容体ファミリーに属する apoER2 が介するシグナル伝達に着目し、SELENOP による糖取り込み悪化の分子メカニズムを明らかにすることである。ApoE によって活性化された血管内皮細胞の apoER2 が引き起こすシグナル伝達の結果、筋肉での糖の取り込みが促進される。本研究者は SELENOP と apoER2 の結合が、積極的なエンドサイトーシスを引き起こすことを明らかにしている。そこで、活性化 apoER2 のシグナルを SELENOP が阻害する分子機構を明らかにすることで、セレンによる2型糖尿病悪化を解決する方法を見つける。

### 2. 研究の目的

セレンは必須微量元素で、分子内にセレンを持つ SELENOP が、セレンの臓器への輸送を担っている。LDL 受容体ファミリーに属する、apoER2 および megalin が、その受容体となり、SELENOP は細胞内に取り込まれる。ヒトでは甲状腺ホルモンの活性化酵素などの25種のタンパク質にセレンは必要であり、欠乏すると神経の発達や精子形成が阻害される。それよりも、近年では食生活によるセレンや糖の過剰摂取による SELENOP の上昇が2型糖尿病を悪化させるということが問題になってきており、世界人口の8.3% (糖尿病アトラス, 2014) にのぼるこの疾患の悪化メカニズムを明らかにすることが緊急の課題である。

SELENOP は血中グルコースと摂取セレン量で発現量が上昇するため、栄養状態を示すマーカーとなる (Burk, 2009)。Burk のグループでは LDL 受容体ファミリーの apoER2 と megalin が SELENOP の受容体であることを明らかにした。また、apoER2 受容体の apoE 結合ドメインではなく、プロペラドメインに、セレンを多く含有する C 末端ドメインが結合し、クラスリンによるエンドサイトーシスを受けることを報告した。さらに、apoE 結合ドメインを欠損させた apoER2 でも SELENOP の取り込みが起きたことから、プロペラドメインに SELENOP が結合したことが、エンドサイトーシス複合体に伝わっていると考えられた。神経の発達調節において、apoER2 への細胞外マトリックス糖たんぱく質である Reelin の結合がシグナル伝達を引き起こし、樹状突起の伸長や神経細胞移動を促進する機構は最もよく解析されているもののひとつである。そこで、SELENOP の結合が引き金となり、活性化 apoER2 をエンドサイトーシスさせることによって、そのシグナルを調節しているのではないかと考えた。本研究では、apoER2 への SELENOP の結合からエンドサイトーシスが始まる経路を解析する。そして、血管内皮細胞の apoER2 のシグナル伝達による一酸化窒素産生が SELENOP で阻害されることを明らかにする。一酸化窒素には血管を拡張させ、血流を増加させることで筋肉でのインスリン、グルコースの取り込みを促進させるという働きがある。本研究は、血中グルコース濃度に比例して過剰に産生する SELENOP が、この一酸化窒素生成シグナルを阻害することで、2型糖尿病を悪化させるというメカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) SELENOP がマウス血管内皮細胞においてエンドサイトーシスを受ける機構を解析した。さらにエンドサイトーシスに関与する因子によって apoER2 のシグナル伝達が SELENOP の結合によって調節されるかについて解析を行った。マウス血管内皮細胞は、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクからマウス不死化血管内皮細胞を購入した。SELENOP が結合する受容体である ApoER2 と LRP1、そして SELENOP 固定化カラムに結合したタンパク質を質量分析により同定し、エンドサイトーシスに関わる因子を特定することに成功した。SELENOP のエンドサイトーシスに関わると考えられた遺伝子の mRNA の発現量をリアルタイム PCR で定量した。また apoER2、LRP1、エンドサイトーシスに関わる因子の抗体を購入し、それぞれのタンパク質発現量をウエスタンブロット法で確認した。SELENOP のエンドサイトーシスに関わることを調べるために、shRNA を発現するレンチウイルスを調製し、ApoER2、LRP1、エンドサイトーシスに関わる因子の遺伝子発現を抑制したマウス血管内皮細胞を樹立した。マウスの SELENOP をラットモノクローナル抗体を使用してマウス血清から精製した。SELENOP の細胞への取り込み活性を、セレンタンパク質であるグルタチオンペルオキシダーゼ 1、SELENOW、SELENOS の mRNA をリアルタイム PCR で定量した。

(2) apoE3 共存下で SELENOP の apoER2 への結合が、シグナル伝達因子のリン酸化状態、一酸化窒素生成酵素の活性を低下させるか解析した。apoE3 を発現するプラスミドを HEK293T 細胞に導入後、培養液中に分泌させた。apoE3 の抗体を購入し、HEK293T 細胞培養液中の apoE3 をウエスタンブロット法で確認した。マウス血管内皮細胞を無血清培地で培養後、apoE3、SELENOP を添加し、経時的な AKT のリン酸化量の変化をリン酸化 AKT 特異的抗体を用いたウエスタンブロット法で定量した。マウス血管内皮細胞において apoE が引き起こす一酸化窒素生成量は Gries 法では検出限界以下であったため、一酸化窒素合成酵素の発現量をウエスタンブロット法で解析した。

(3) apoER2 を発現するアデノウイルスを調製した。調整したアデノウイルスを C57BL/6 マウスに尾静脈注射し、肝臓で apoER2 を発現させた。

#### 4. 研究成果

(1) マウス血管内皮細胞において SELENOP が apoER2 または LRP1 を介してセレンタンパク質として利用されるかを解析した。pLK0.1 レンチウイルスベクターを利用し shRNA 発現レンチウイルスを調製し、マウス血管内皮細胞に感染後ピューロマイシン耐性の細胞を調製した。リアルタイム PCR で遺伝子発現を定量し、apoER2 と LRP1 の mRNA の発現量が有意に低下できたことを確認した。無血清培地で 48 時間培養後、モノクローナル抗体で精製したマウス SELENOP を添加し、さらに 24 時間後に細胞内のセレンタンパク質の mRNA を測定した。その結果、apoER2 を抑制した細胞においては、セレンタンパク質の mRNA の発現量がコントロールの細胞に比べて有意に低下した。一方で LRP1 をノックダウンした細胞のセレンタンパク質の mRNA の発現量はコントロールの細胞のそれら mRNA の発現量が上昇した。apoER2 の発現量が減少したことによってセレン源である SELENOP の取り込み効率が低下したことはこれまでの報告と一致する結果であった。一方でマウス血管内皮細胞において LRP1 の減少は細胞内のセレンタンパク質の mRNA 発現量を上昇させたことから、SELENOP の取り込みを apoER2 と LRP1 が調節していることが示唆された。セレンタンパク質の mRNA の発現量を指標にして無機セレン源である亜セレン酸の取り込み効率を解析したところ、apoER2 と LRP1 の発現量の減少はコントロールの細胞と比べて変化がみられなかった。これらのことからマウス血管内皮細胞において SELENOP の細胞内への取り込みは apoER2 が機能していることが示唆された。LRP1 が低下したことで細胞内のセレンタンパク質の mRNA の発現量が上昇したことについて血管内皮細胞特有の現象であるのか、セレンタンパク質として発現しているのかを解析している。SELENOP は apoER2 のベータプロペラドメインに結合する。エンドサイトーシスとシグナル伝達を担う apoER2 の機能を SELENOP が調節していると考え、SELENOP に結合するタンパク質群の質量分析を行った。エンドサイトーシスとシグナル伝達に関わる因子が同定されたため、これが SELENOP の取り込みに関与するのか解析した。レンチウイルスを用いて mRNA の発現量を抑制したマウス血管内皮細胞をピューロマイシンで選択した。精製した SELENOP の取り込み効率をセレンタンパク質の mRNA の発現量で評価した。その結果コントロールの細胞に比べてエンドサイトーシスに関わる因子を抑制すると有意に SELENOP の取り込みが抑制された。これらのことからマウス血管内皮細胞では、LRP1 ではなく apoER2 を介してエンドサイトーシスに関わる因子が SELENOP の取り込みに働いていることが示唆された。

(2) apoER2 はリガンドとなる apoE を結合すると活性化し、クラスリン依存的エンドサイトーシス経路を開始する。また活性化した apoER2 は細胞内ドメインに結合する因子を介してシグナル伝達を調節する役割がある。これらのことを踏まえ、SELENOP が apoER2 に結合することでシグナル伝達に変化するのかを解析した。apoE が含まれる培養上清を調製し、マウス血管内皮細胞の AKT のリン酸化が生じるかを解析した。無血清培地で 24 時間培養したマウス血管内皮細胞では AKT のリン酸化が低下していることをウエスタンブロット法で確認した。この細胞に apoE を添加後、経時的に細胞を回収し AKT のリン酸化量を解析した。apoE 添加後 15 分で AKT のリン酸化が見られた。この条件でマウス血清から精製した SELENOP を添加すると AKT のリン酸化が減少した。さらに、SELENOP のセレノシステイン残基をシステイン残基にした SELENOP-Cys を調製し SELENOP の代わりに添加しても同様の結果を得た。一方で無機セレンである亜セレン酸を添加しても AKT のリン酸化の抑制は見られなかった。これらのことから、SELENOP 及び SELENOP-Cys による AKT のリン酸化の抑制は SELENOP のセレンが代謝されて生じたものではないことが示唆された。AKT のリン酸化が SELENOP によって調節されている機構が apoER2 を介して生じるかを調べるために、apoER2 の mRNA の発現量を抑制したマウス血管内皮細胞で AKT のリン酸化の変化を解析した。その結果、コントロール細胞に比べ、apoER2 を抑制した細胞では AKT のリン酸化量が有意ではないが増加傾向であった。apoER2 を抑制した細胞において SELENOP の添加はコントロール細胞にくらべて AKT のリン酸化量が減少の傾向を示した。血管内皮細胞では AKT のリン酸により一酸化窒素を生成する経路が活性化される。そこで SELENOP が一酸化窒素の生成を変化させるか調べるために Gries 法で一酸化窒素の定量を行ったが、一酸化窒素の検出限界以下であった。そこで血管内皮細胞で一酸化窒素の生成を触媒する酵素である eNOS のタンパク質の発現量が SELENOP によって変化するかどうかウエスタンブロット法で解析したところ、SELENOP を添加後 24 時間で eNOS のタンパク質発現量が上昇した。eNOS の発現量の変化については SELENOP-Cys でも観察されたことから、SELENOP に含まれるセレンが代謝されセレンタンパク質が生じることによって eNOS の発現が変化するのではないことが示唆された。eNOS の発現量を精度よく測定するためにセルアナライザーを使用する解析法を確立した。SELENOP が AKT のリン酸化を抑制することと eNOS の発現量を上昇させるまでにかかる時間には違いがみられたことから、マウス血管内皮細胞において SELENOP が直接 apoER2 と apoE の結合によるシグナル伝達を調節している点と、SELENOP によって細胞表面の apoER2 がエンドサイトーシスを受けるために apoE と結合する機会が減少する点に分けて解析を行った。マウス血管内皮細胞において SELENOP によってシグナル伝達が起こると考え、シグナル伝達に関わる因子のスクリーニングをプライマーアレイを用いて SELENOP もしくは SELENOP-Cys の添加後 1 時間と 8 時間に分けてリアルタイム PCR を行った。その結果、シグナル伝達に関わる約 400 遺伝子の mRNA のうち、SELENOP、SELENOP-Cys で 2 倍以上上昇するものと 50% 以下に減少するものを同定した。SELENOP

によってベータカテニンのシグナル伝達経路が顕著に変動したため、ウエスタンブロット法でタンパク質の発現量を測定した。apoER2 は LDL 受容体の一つであるが、ベータカテニン経路は LDL 受容体のうち LRP5/6 が深くかかわっていることが報告されている。apoER2 がベータカテニン経路に関わるという報告は今のところないため、SELENOP が apoER2 を介してベータカテニン経路を刺激しているのかを apoER2 の発現を抑制した細胞で解析している。SELENOP-Cys によっても遺伝子発現が変動するため、SELENOP が代謝されたセレンによるものではなく、シグナル伝達に関わる mRNA の発現量を SELENOP の結合が引き金となっていることが示唆された。

(3) SELENOP は肝臓が主要な発現部位であり、血中を通じて全身に送られる。グルコースが肝臓の SELENOP の発現を誘導することから、高血糖において血中 SELENOP 濃度が高いことが報告されており、SELENOP が 2 型糖尿病などの悪化につながることを報告されている。マウスの尾静脈から注射したアデノウイルスはそのほとんどが肝臓に感染する。そこで肝臓で apoER2 を発現させ血中 SELENOP が低下するか発現系を構築した。全長もしくはリガンド結合部位を欠損した apoER2 をアデノウイルスベクターに組み込み HEK293 細胞でウイルス粒子を調製した。マウスの尾静脈からウイルス粒子を導入し、10 日後に肝臓の apoER2 の発現量を免疫染色法で解析した。弱い apoER2 の発現が観察できたので、SELENOP が集積しているかを免疫染色法で解析した。apoER2 を肝臓に発現させたマウスとコントロールのマウスの血中 SELENOP 量を測定したが、有意な違いが観察できなかったため、今後は肝臓における apoER2 の発現量を増加させることで SELENOP の血中濃度に変化がみられるか検討する。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 1 件 )

Kurokawa S, Tanaka S, Takehashi M Tissue-specific transport mechanism of selenium, Journal of Analytical Bio-Science, 総説, 査読無 39, 217-225, 2016, <http://j-jabs.umin.jp/2016-39.html>

[ その他 ]

ホームページ等

<https://www.osaka-ohtani.ac.jp/department/teacher/pharmacy/kurokasugu.html>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：竹橋 正則

ローマ字氏名：Masanori Takehashi

所属研究機関名：大阪大谷大学

部局名：薬学部

職名：准教授

研究者番号 ( 8 桁 ) : 10378862

研究協力者氏名：W. Hayes McDonald

ローマ字氏名：W. Hayes McDonald

所属研究機関名：Vanderbilt University

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。