

令和元年5月29日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18921

研究課題名(和文) 必須微量元素セレンの脳への移行および脳特異的保持メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation into the selenium transport and specific retention mechanism in brain

研究代表者

吉田 さくら (YOSHIDA, Sakura)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・助教

研究者番号：40736419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：抗酸化酵素の活性中心となるセレン(Se)は、血流量が多く酸素消費が活発である脳において特に重要な機能を担っているが、脳内のSe代謝については不明な点も多い。本研究においてSeの活性代謝中間体であるセレノトリスルフィド(STS)化合物を利用してSe代謝過程の解明を試みた。神経細胞へ低分子および高分子のSTS化合物を添加した結果、いずれの化合物由来のSeも細胞へ取り込まれ、Se含有酵素の生合成に利用されることが示され、神経細胞へのSe輸送においてもSTSとタンパク質チオールとのチオール交換反応が寄与している可能性が示唆された。また、新たなSe結合性タンパク質として、ミオグロビンを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セレンは主に抗酸化因子として生体内で重要な機能を担っている。特に脂質含量が高く、かつ酸素消費が活発な脳においてその機能は重要であり、実際にセレン含有酵素グルタチオンペルオキシターゼ(GPx)活性の低下とアルツハイマー病などの神経変性疾患との関連性が指摘されている。本研究で得られた成果は、セレノトリスルフィドが神経細胞へのセレン輸送に寄与すること、またセレン結合タンパク質としての機能をミオグロビンが有していることを示しており、生体内のセレン代謝を明らかにするための重要な情報である。また、これらの知見は、今後脳内セレンの欠乏と神経変性疾患との関連を明らかにする上でも有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Selenium is one of the essential trace elements in various organisms and acts as antioxidative defense in biological systems. In this research, selenotrisulfide (STS), which is the active metabolic form of selenium, was utilized to investigate transport and metabolic pathway of selenium in neuron. After incubation of cultured neuronal cells with low or high molecular mass STS compounds, cellular selenium concentration and activity of selenium-containing protein increased in a selenium concentration dependent manner. These results suggested that thiol exchange reaction between STS and thiol-protein was involved in the selenium transport in neuronal cells. And we also tried to find selenium-binding protein using STS compound and mass spectrometric analysis. Myoglobin was determined as novel selenium binding thiol protein.

研究分野：衛生化学

キーワード：セレン 代謝 脳

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

### 1. 研究開始当初の背景

必須微量元素セレン(Se)は生体内の抗酸化因子として重要であり、全て食事から摂取され全身に分布する。脳は脂質含量が高く、酸素消費も活発であることから、多量の活性酸素種が生成しやすい環境である。したがって、脳内のセレンは酸化ストレスに対する防御システムの一部を担う極めて重要な役割を果たしていると推察される。実際に、アルツハイマー病(AD)患者の脳内セレン濃度およびセレン含有酵素グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)活性が健常者のそれよりも低下していることなど、神経変性疾患と脳内セレンの関連が報告されている。著者も、ADの主要な原因とされるアミロイド(A $\beta$ )を脳内に蓄積するADモデルマウスに、セレン欠乏飼料を与えたところ、脳内A $\beta$ の蓄積が通常飼料給餌群の2倍以上に増加したことを報告している[Haratake, *Metallomics*, **5**, 479-483 (2013)]。しかし、セレンの輸送および代謝機構については不明な点が多く残されている。

### 2. 研究の目的

セレン欠乏時においても脳のセレンは減少しにくいことが知られている[Haratake, *J. Health Sci.*, **50**, 366-371 (2004), Burk, *J. Nutr.*, **137**, 690-693 (2007)]。食餌由来セレンが欠乏すると、肝臓などの臓器中セレン濃度が著しく低下するのに対し、脳内セレンの減少は比較的小さく、このこと

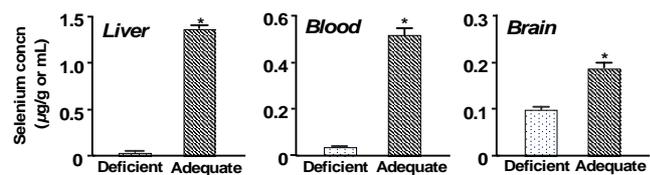
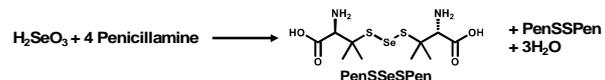


Fig. 1. Dietary selenium status and organ selenium concentrations in mice after 5-week feeding of selenium deficient or adequate diet. \* Different from the Se-deficient diet fed group,  $P < 0.05$ .

からも脳におけるセレンの重要性が明らかである(Fig. 1)。しかしこのような脳内でのセレンの保持メカニズムなどは明らかにされていない。最近、分子内に多数のセレノシステイン(SeCys)残基を含むセレノプロテイン P(SeIP)が、脳へのセレン輸送に関与していることが報告された[Burk, *FASEB J.*, **28**, 3579-3588 (2014)]。SeIPが脳へのセレン輸送において重要であると推察されるが、SeIP欠損マウスはセレン欠乏時に重篤な神経障害を引き起こす一方で、SeIP欠損マウスに十分量のセレンを与えれば、このような障害は観察されない。このことはSeIPによる経路以外にも脳へのセレン運搬メカニズムが存在することを示唆している[Hiil, *J. Biol. Chem.* **278**, 13640-13646 (2003)]。著者らはセレン欠乏時の補給剤として用いられる亜セレン酸の代謝経路の研究を行ってきたが、最近肝細胞質におけるセレン結合タンパク質として肝臓型脂肪酸結合タンパク質(LFABP)を同定した[Hori, *J. Biol. Inorg. Chem.* **20**, 781-789 (2015)]。脳においてもこのようなセレンと特異的に結合するタンパク質が存在し、SeIPとは異なる脳へのセレンの輸送やセレンの保持に関与しているのではないかと推察した。本研究では、セレンの脳への運搬、保持等のメカニズムを明らかにするため、セレンの運搬に寄与すると考えられるセレン結合性タンパク質の探索、および神経細胞におけるセレン利用能の評価を行った。

### 3. 研究の方法

(1)ペニシラミンセレノトリスルフィド(PenSSeSPen)の合成: 亜セレン酸の代謝中間体としては、これまでにグルタチオンセレノトリスルフィド(GSSeSG)が検出されており、セレン代謝の中心となる化合物であると考えられる。しかし、GSSeSGは生理的条件下で非常に不安定であり、容易に赤色の元素状セレンに分解してしまう。そこで、本研究では生理的条件下でも安定であるPenSSeSPenを活性代謝中間体のモデルとして用いた。PenSSeSPenは亜セレン酸とペニシラミン(Pen)を1:4のmol比で混合して合成した(Scheme 1)。



Scheme 1. Synthesis of penicillamine selenotrisulfide

(2)セレン結合性タンパクの検出・同定: 亜セレン酸の活性代謝中間体モデル化合物であるPenSSeSPenを、ラットの脳ホモジネート、もしくは分離した脳の膜画分と混合し、反応させた。得られた試料をMALDI-TOF質量分析法に供し、未処理の試料との分子量の差からセレン結合性タンパク質を探索した。

(3)神経細胞におけるセレン利用能の評価: 脳の神経細胞モデルとして、ラット脊髄後根神経節(DRG)細胞を培養し、亜セレン酸の活性代謝中間体モデルであるPenSSeSPenを添加し、セレン含有タンパク質生合成への利用能を調べた。また、PenSSeSPenとヒト血清アルブミン(HSA)とのチオール交換反応によりSTS含有アルブミン(HSA-SSeSPen)を合成し(Scheme 2)、同様に神経細胞における利用能を調べた。さらに、これらSTS化合物を蛍光色素で標識し、細胞に添加したSTS化合物の動態を経時的に観察した。



Scheme 2. Synthesis of selenotrisulfide containing HSA

### 4. 研究成果

(1)セレン結合性タンパク質の探索: 著者らはこれまでも、PenSSeSPenと質量分析を組み合わせたことにより、セレン結合性タンパク質の探索を行ってきた。PenSSeSPenは遊離チオール基(-SH)を有するタンパク質と、チオール交換により反応することから、PenSSeSPenと反応させた

後の質量スペクトルを未処理のものと比較することで、STSと反応性を有するタンパク質を見つけることができる。ラットの肝臓細胞質溶液とチオールアルキル化剤である*N*-ethylmaleimide(NEM)を反応させ、得られたMALDI-TOF質量スペクトルを未処理のものと比較すると、-SHを有するタンパク質はNEMと反応し、質量電荷比が125増加する。同様に、PenSSeSPenと肝臓細胞質溶液との混合物を質量分析し、NEMと反応したピークのうち、-Se-S-Penの質量に相当する質量数226が増加したピークを、セレン結合性タンパク質として探索した(Fig. 2)。

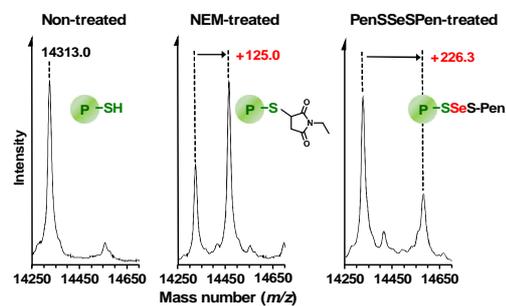


Fig. 2. Detection of selenium binding protein in rat liver cell lysate using PenSSeSPen by MALDI-TOF mass spectrometry

その結果、肝臓型脂肪酸結合タンパク質を同定した[Hori, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **20**, 781-789 (2015)]。この手法によりラット脳細胞質溶液を分析した結果、Cystatin-12 precursor(CST12)をセレン結合性タンパク質として同定することができた[Yoshida, *Chem. Pharm. Bull.*, **64**, 52-58 (2016)]。これらのタンパク質がセレンを結合する生理的意義については報告されていない。さらに、CST12以外のセレン結合性タンパク質を探索するため、限外ろ過により脳細胞質溶液を分画し、画分ごとにPenSSeSPenとの反応性を検討した。-SH含有タンパク質のうち、いくつかはCST12以外にもPenSSeSPenと反応性を示すピークが検出されたが、脳細胞質溶液中チオール濃度は肝臓と比べると低く、また脂質などの夾雑物も多いために、相対的に量が少ないと予想されるセレン結合性タンパク質を検出するためには、試料調製方法や質量分析の条件等を検討する必要があると考えられた。一方、脳のセレン結合性タンパク質探索の手がかりを得るため、脳と同様にセレンが重要な機能を果たしている心臓のセレン結合タンパク質を探索した結果、ミオグロビン(Mb)が同定された(Fig. 3)。

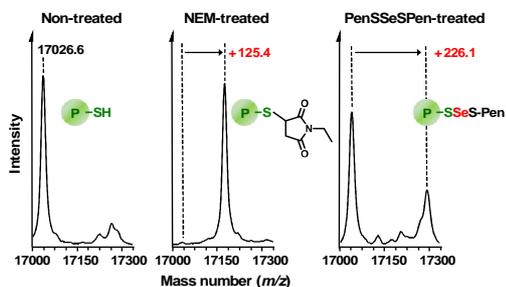


Fig. 3. Detection of selenium binding protein in rat heart cell lysate using PenSSeSPen by MALDI-TOF mass spectrometry

3)[Hori, *Metallomics*, **10**, 614-622 (2018)]。ラット心臓細胞質溶液からMbを限外ろ過等により精製し、セレン定量に供した結果、6.9  $\mu\text{g/g}$ -proteinのセレンが検出され、セレン結合性を有することが確認された。また、亜セレン酸を投与したラットの心臓中セレン濃度やGPx活性は上昇したのに対し、Mbに結合するセレン量はほとんど変化しなかったことから、Mbへのセレンの結合はセレンを保持するためよりも、さらに他のタンパク質などに移動するための通過点であると推察された。Mbは筋肉で酸素の保持や輸送に関与するタンパク質であるが、セレンとの結合性については知られておらず、Mbの新たな機能としてSe代謝との関連性が示唆された。また、セレンが神経細胞へ輸送されるためには、細胞膜を透過する必要があることから、細胞膜にもセレン結合性タンパク質が存在するのではないかと推察し、ラット脳細胞質溶液から膜画分を分離した後、PenSSeSPen処理と質量分析によりセレン結合性タンパク質を探索した。その結果、分子量17000程度の膜画分由来チオール含有タンパク質が、セレン結合性を示し、またその反応はセレンの濃度依存的であることがわかった。

(2)神経細胞のSTS化合物利用能の検討：STSが神経細胞のセレン輸送に関与している可能性を検討するため、亜セレン酸の代謝中間体モデル化合物であるPenSSeSPenの神経細胞による利用能を評価した。脳の神経細胞を培養する場合は、実験動物の胎児の脳を利用する必要があるが、ラット脊髄後根神経節(Dorsal Root Ganglion; DRG)細胞は、成体ラットから比較的容易に得ることができ、脳の神経細胞と同様の性質を示すことが知られている。そこで、本研究ではラットDRG細胞を利用してSTS化合物の利用能を、代表的セレン化合物である亜セレン酸(SA)およびセレノメチオニン(SeMet)のそれと比較検討した。

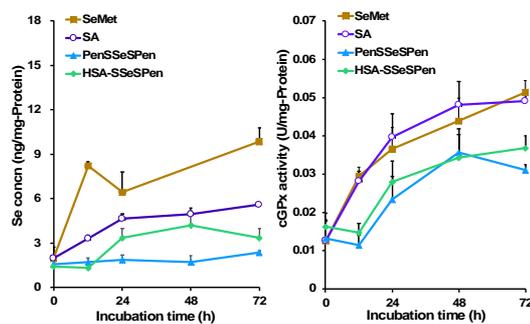


Fig. 4. Selenium concentration (left) and GPx activity (right) in DRG cells incubated with selenium compounds

PenSSeSPen添加培地でDRG細胞を培養した結果、細胞内セレン濃度の上昇およびGPx活性の上昇が観察され、STS化合物由来セレンが神経細胞に取り込まれ、セレンタンパク質合成に利用されることが示された(Fig. 4)。さらに、高分子のSTS化合物であるHSA-SSeSPenを添加した培地でDRG細胞を培養した結果、PenSSeSPen添加時と同様の結果が得られた。タンパク質のHSAは細胞へ取り込まれないと考えられることから、HSA-SSeSPen中のセレンのみがチオール交換反応を介して神経細胞へ取り込まれたのではないかと推察され、神経細胞へのセレン輸送においてもSTSとタンパク質チオールとのチオール交換反応が寄与していることが示唆された。また、DRG細胞をSTS添加培地で一定時間培養後、セレン化合物を添加していない通常の培地に戻して培養すると、細胞内セレン濃度およびGPx活性は、一定の上昇程度に維持され、神経細胞にセレンを保持する機能があるのではないかと考えられ

た。STS化合物の利用が、神経細胞に特徴的であるかどうかを調べるため、肝臓由来の細胞とSTS化合物の利用能を比較した。ヒト肝がん由来HepG2細胞を、DRG細胞と同様にPenSSeSPenもしくはHSA-SSeSPen添加培地で培養した結果、DRG細胞の場合と同様に、細胞内セレン濃度の上昇およびGPx活性の上昇が観察された(Fig. 5)。このことは、STS化合物が脳以外の臓器においてもセレン輸送や代謝の鍵となる化学形である可能性を示唆する結果であると考えられる。

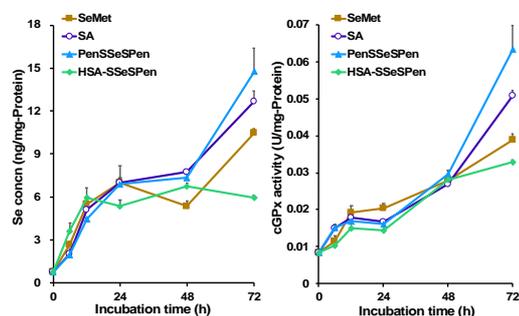


Fig. 5. Selenium concentration (left) and GPx activity (right) in HepG2 cells incubated with selenium compounds

(3)STS化合物の動態解析：STS由来セレンの細胞への取り込み挙動を調べるため、低分子および高分子STS化合物の蛍光標識体を合成した。初めフルオレスキャミンやフルオレセインによるPenSSeSPenの標識を試みたが、標識後化合物の分子量が非常に大きくなり、STS化合物の動態に影響を与えると予想されたため、7-chloro-4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl)による蛍光標識を行なった(Fig. 6)。合成した標識化合物をHPLCで精製後、LC-MSにより生成を確認した。また、ローダミンレッドおよびフルオレセインによりHSAを標識し、蛍光標識HSA-SSeSPenを合成した。それぞれの蛍光標識体は細胞培養条件下で70%以上安定に存在することを確認し、STS化合物の動態解析に用いることができた。NBD標識PenSSeSPen添加培地での培養後、NBD由来の蛍光は、細胞内に観察されたが、蛍光標識HSA-SSeSPen由来の蛍光は観察されなかった。このことから、HSAに結合したセレンのみがチオール交換により細胞に取り込まれたことが示唆された。

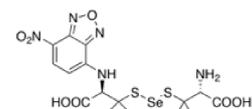


Fig. 6. NBD標識PenSSeSPen

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

- Hori E., Yoshida S., Fuchigami T., Haratake M., Nakayama M., Cardiac myoglobin participates in the metabolic pathway of selenium in rats, *Metallomics*, 査読有, **10**, 2018, 614-622, DOI: 10.1039/c8mt00011e
- Yoshida S., Iwataka M., Fuchigami T., Haratake M., Nakayama M., *In vitro* assessment of bioavailability of selenium from a processed Japanese anchovy, Niboshi. *Food Chemistry*, 査読有, **269**, 2018, 436-441, DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.07.033
- Iwataka M., Yoshida S., Koga K., Fuchigami T., Haratake M., Nakayama M., Separation of selenium species in Japanese littleneck clam 'Asari' (*Ruditapes philippinarum*) and *in vitro* assessment of their bioavailability. *BPB Reports*, 査読有, **1**, 2018, 40-46

### 〔学会発表〕(計 10 件)

- 吉田 さくら, 岩高 美帆, 古賀 香織, 淵上 剛志, 原武 衛, 中山 守雄, 貝類由来セレンの培養細胞による保持挙動の検討, 日本薬学会第 139 年会, 2019
- 森 亮輔, 林 里紗子, 吉田 さくら, 淵上 剛志, 原武 衛, 中山 守雄, チオール基を介した細胞へのセレン取り込み, 日本薬学会第 139 年会, 2019
- 吉田 さくら, 岩高 美帆, 淵上 剛志, 原武 衛, 中山 守雄, 煮干カタクチイワシ中セレンの分析および培養細胞による利用効率の評価, 第 6 回メタロミクス研究フォーラム, 2018
- Sakura Yoshida, Eriko Hori, Sakiko Ura, Takeshi Fuchigami, Mamoru Haratake, Morio Nakayama, A comprehensive analysis of selenium-binding proteins using its reactive metabolic intermediate, The 7th International Selenium Conference, 2018
- Miho Iwataka, Sakura Yoshida, Takeshi Fuchigami, Mamoru Haratake, Morio Nakayama, Separation and bioavailability of selenium in Asari shellfish, The 7th International Selenium Conference, 2018
- Ryosuke Mori, Risako Hayashi, Sakura Yoshida, Takeshi Fuchigami, Mamoru Haratake, Morio Nakayama, A selenium transport function of selenotrisulfide into neuronal cells, The 7th International Selenium Conference, 2018
- 森 亮輔, 林 里紗子, 吉田 さくら, 原武 衛, 淵上 剛志, 中山 守雄, セレノトリスルフィド由来セレンの神経細胞への吸収および保持特性の検討, フォーラム 2018 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2018
- 岩高 美帆, 吉田 さくら, 淵上 剛志, 原武 衛, 中山 守雄, アサリ由来セレン含有物質の

in vitro 栄養機能評価, フォーラム 2018 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2018  
上原 渉, 吉田 さくら, 淵上 剛志, 原武 衛, 中山 守雄, 膜適合性セレネニルスルフィド  
誘導体を使ったナノベシクル型グルタチオンペルオキシダーゼ疑似体の創製, 第 4 回日本セ  
レン研究会, 2018  
吉田 さくら, 丸山 洋子, 岩高 美帆, 淵上 剛志, 原武 衛, 中山 守雄, カツオ節由来セレ  
ンの分析, 第 4 回日本セレン研究会, 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 堀 恵里子

ローマ字氏名: HORI, Eriko

研究協力者氏名: 岩高 美帆

ローマ字氏名: IWATAKA, Miho

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。