

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11782

研究課題名(和文) セレン輸送タンパク質の血管内皮細胞シグナル伝達における機能

研究課題名(英文) The function of selenium transport proteins in endothelial cell signal transduction.

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)：微量必須元素セレンは、肝臓で合成されるセレンタンパク質P(SELENOP)と細胞膜上の低密度リポタンパク質受容体の一つであるアポリポプロテインE受容体2(ApoER2)によるエンドサイトーシスを介して輸送される。ApoER2は細胞外シグナルをそのリン酸化によって細胞内に伝達する機能も持つ。SELENOPはApoER2のリガンド結合部位ではなくプロペラドメインに結合することから、シグナル伝達を変化させることが考えられ、血管内皮細胞内の遺伝子発現を変化させることを見出した。またニューロンにおけるドパミン代謝を調節することが観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セレンタンパク質Pはセレンを輸送する血中糖たんぱく質であることが知られているが、その受容体であるApoER2への結合部位が他の受容体結合たんぱく質と異なることから、ApoER2が持つシグナル伝達機能を調節することが考えられた。ApoER2は血管内皮細胞に発現しており、セレンタンパク質Pを作用させると、細胞増殖にかかわるWntカテニン経路にかかわる遺伝子が変動した。またニューロンのドパミン代謝回転を変化させた。これらはセレンを持たないセレンタンパク質P変異体でも同様の変化が起こったことから、セレンタンパク質Pの構造がApoER2のシグナル伝達に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Selenium, an essential trace element, is transported via endocytosis mediated by selenium-binding protein P, synthesized in the liver, and apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2), one of the low-density lipoprotein receptors on the cell membrane. ApoER2 has the ability to transmit extracellular signals into the cell through its phosphorylation. SELENOP, on the other hand, binds to the propeller domain of ApoER2 rather than its ligand-binding site, suggesting that it may alter signal transduction and regulate gene expression in vascular endothelial cells. It has also been observed to regulate dopamine metabolism in neurons.

研究分野：分子栄養学

キーワード：セレン 血管内皮細胞 微量必須元素 シグナル伝達

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り、生体の恒常性維持に重要な機能を持つ。一方で2型糖尿病を悪化させることが報告されている。これにはセレノプロテイン P (SELENOP) がグルコースと摂取セレンに比例して過剰に産生することが一因となることが報告されている。糖尿病は神経障害、網膜症、腎症、冠動脈疾患、脳血管障害、末梢動脈疾患を引き起こすことから血管障害病ともいわれる。本研究の目的は、LDL 受容体ファミリーに属するアポリポプロテイン E 受容体 2 (ApoER2) が介するシグナル伝達に着目し、SELENOP による血管障害の分子メカニズムを明らかにすることである。具体的には、ApoER2 のシグナル伝達経路を SELENOP が調節する分子メカニズムを明らかにする。

2. 研究の目的

セレンは哺乳類の微量必須元素であり、植物由来のセレノメチオニンや動物由来のセレノシステイン、無機セレン源を含む食物が消化吸収され体内で利用される。セレンの所用量は一日あたり 20 マイクログラムといわれ、その 20 倍量を超える過剰量のセレンを摂取し続けると、嘔吐・下痢・腹痛・手の痺れ・異常月経出血・脱毛や爪の変形・腎障害・神経障害・心筋梗塞といった症状が出るため、生体内での利用も調節されている。ヒトでは甲状腺ホルモン活性化酵素やグルタチオンペルオキシダーゼ、チオレドキシシンレダクターゼや小胞体でたんぱく質の品質管理にかかわる酵素など 25 種のタンパク質にセレンが利用されており、セレン欠乏では神経の発達や精子形成が阻害される。またセレンは主にこれら酸化還元にかかわる酵素の活性中心に位置しており、恒常性維持に関わっている。役目を終えたセレンを含むたんぱく質は分解されセレノシステインというアミノ酸になるが、セレノシステインリアーゼによってセレンとアラニンに分解され取り出されたセレンは再度セレンタンパク質のセレンに再利用される。また一部のセレノシステインを含むペプチド鎖は LDL 受容体ファミリーに属する megalin によって腎臓で再吸収を受けることから、微量なセレンを生体内で再利用する仕組みが備わっているため、比較的欠乏症が出にくい必須微量元素である。長期的にセレン欠乏食を摂取した場合に生じるセレン欠乏症はセレンを摂取することで回復することが知られている。ヒトでは主に肝臓で生合成され分子内に最大 10 個のセレンを持つ SELENOP が、血液を介してセレンを必要とする臓器への輸送を担っている。哺乳類の組織への配分は SELENOP の受容体を介してセレンが能動的に受け渡しされることで制御されている。SELENOP は、apoER2 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。細胞内に取り込まれた LDL 受容体に結合したリガンドを含む小胞内はプロトンポンプによって酸性になる。この酸性条件では LDL 受容体のリガンド結合部位とプロペラ部位が結合しやすくなり、受容体に結合していたリガンドが外れ、リガンドが分解される一方で受容体は再度細胞膜上に移動し再利用される。このようにプロペラ部位はリガンドの結合と乖離を調節するが、SELENOP は ApoER2 のプロペラ部位に結合することから、ApoER2 の機能を変化させることが考えられた。ApoER2 にはリガンドのエンドサイトーシスの他に、リガンドとの結合を細胞内に伝え、細胞内ドメインのリン酸化やシグナル伝達たんぱく質の活性調節を行うことが知られている。神経では LDL 受容体ファミリーに属する ApoER2 と VLDLR が協調し、リーリンたんぱく質の刺激を細胞内の DAB1 たんぱく質のリン酸化として伝えることで胎生期における神経細胞の伸長、成体期の記憶形成、シナプス可塑性を制御している。そこで本研究では SELENOP とその受容体である ApoER2 との相互作用によるシグナル伝達について生理的解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

ApoER2 と SELENOP の結合に重要な部位を特定するとともに、脳の SELENOP が海馬の ApoER2 を刺激し、ドパミンを調節する機構について分子的な解析を行った。部位特異的にアミノ酸を変異させ、セレノシステイン残基をシステイン残基にした SELENOP 変異体を培養細胞や脳切片とインキュベートし、受容体への刺激について解析を行った。

- (1) SELENOP を特異的に認識するラットの抗体を使用し、マウスの血清から SELENOP たんぱく質を精製した。またマウスの SELENOP をコードする遺伝子を V5 タグを N 末端もしくは C 末端に連結しクローニングしたものを使用し、部位特異的変異によってセレノシステインをシステインに変異させたプラスミドを作製した。このプラスミドを HEK293T 細胞に導入し、細胞上清に SELENOP たんぱく質を発現させた。これら分泌たんぱく質を V5 タグ抗体で精製した。
- (2) マウスの ApoER2 たんぱく質をコードする遺伝子の C 末端側に GFP たんぱく質をコードする遺伝子を連結したプラスミドを作製し、部位特異的変異によってプロペラ部位のアミノ酸を変化させたたんぱく質を HEK293T 細胞膜上に発現させた。LDLR たんぱく質をコードする遺伝子についても同様の手法で HEK293T 細胞膜上に発現させ、SELENOP の結合解析に使用した。
- (3) マウスの血管内皮細胞由来の TKD2 細胞に ApoER2 が発現することをリアルタイム PCR で確認し、SELENOP が取り込まれセレンタンパク質の mRNA の発現を解析した。
- (4) ウェスタンブロット法によって、AKT pS473 抗体と eNOS pS1177 抗体で各リン酸化量を解析した。

- (5) TKD2 細胞に SELENOP を短時間暴露し、細胞内のシグナル伝達にかかわる遺伝子群の変動をプライマーアレイを用いたリアルタイム PCR によって解析した。
- (6) マウスの脳切片上でドパミンの定量を行う高速スキャンサイクリックボルタンメトリー (fast-scan cyclic voltammetry, FSCV) を行い、SELENOP たんぱく質とのインキュベーションによるドパミンの代謝回転の変化を解析した。

4. 研究成果

精製した SELENOP を用いて、TKD2 細胞のシグナル伝達にかかわる遺伝子群のうち、カテニン経路の遺伝子群が変動することを明らかにした。また SELENOP を 1 分、5 分、10 分の暴露によって、AKT のリン酸化が生じることを確認し、8 時間後に消失することを確認した。この短時間の暴露では SELENOP のセレンが細胞内で分解、代謝を受けセレンタンパク質として利用されたために生じる酵素の機能によるものではなく、細胞表面の受容体との結合が引き起こしたものと考えられた。そこで、たんぱく質合成を停止させるシクロヘキシミドで処理した細胞で同様の解析を行い、AKT のリン酸化が生じることを確認した。この結果は SELENOP が細胞内シグナルにかかわることを示唆していると考えられた。

中脳辺縁系のドパミンの放出は覚せい剤の乱用を引き起こし、特に依存性の高いアンフェタミンの窒素をメチル基に置換したメタンフェタミンはニューロン末端を変性させる。メタンフェタミンはドパミン輸送体 (dopamine transporter, DAT) のドパミン輸送による再取り込みを阻害し、シナプス間隙のドパミン濃度を上昇させる。また小胞型モノアミン輸送体 2 (vesicular monoamine transporter 2, VMAT-2) VMAT-2 の機能を妨害し、ドパミンの小胞への濃縮を抑制する。こうしてシナプス細胞内のドパミン濃度は上昇し、DAT を逆流させる。過剰なドパミンはモノアミン酸化酵素による分解や自動酸化により ROS を生成する他、フリーラジカルであるドパミンセミキノンやドパミン 0-キノンになり、タンパク質のシステイン残基への反応によりタンパク質の凝集など細胞毒性を引き起こす。そこでドパミンの代謝回転とメタンフェタミンによる毒性にセレンがどのような分子形態で作用しているのか解析した。SELENOP が分解されセレンがセレンタンパク質に変換されることでセレンによる神経細胞の保護が生じるのか、それとも SELENOP タンパク質自体に脳のドパミン代謝を調節する機能があるのかということについて検証した。マウス脳の海馬を含む生切片に人工的な脳脊髄液で灌流し、高速スキャンサイクリックボルタンメトリー (fast-scan cyclic voltammetry, FSCV) を用いてドパミンの放出と取り込みを測定した。FSCV は、炭素電極と電極で生切片を挟み、炭素電極側から電位を繰り返し掃引することでドパミンを酸化還元し電流値を測定した。電流値は細胞外のドパミンの濃度勾配に換算した。ドパミンの放出を誘導するために、脳切片に電極を置き、10 回連続的に電流が流れる向きを交互に変えて刺激を与えた。電気刺激で誘発されたドパミン放出量の測定には、0.1 秒ごとに電位をかけ、電位に対する電流の変化を測定し、ドパミンの酸化と酸化電位を示すピーク電流変化でサイクリックボルタモグラムを作製した。人工脳脊髄液中にメタンフェタミンなど添加しながらニューロンから放出されたドパミンを測定した。セレンを輸送する SELENOP がドパミンの放出に関わるかどうかを調べるため、SELENOP の遺伝子が破壊されたマウス (SELENOP-KO) と野生型のマウスの脳切片のドパミン放出について測定したところ、SELENOP-KO では顕著にドパミン放出量が低下していた。また野生型に比べて SELENOP-KO ではメタンフェタミンによって細胞外のドパミン放出量が上昇していた。さらに SELENOP-KO ではドパミンの再取り込みも低下していた。

SELENOP-KO マウスでは、野生型に比べ VMAT-2 のタンパク質発現量が腹側中脳で 182%、腹側線条体で 211% と上昇しており、ドパミン D2 受容体 (D2R) のタンパク質量も腹側線条体で 157% と上昇していた。どちらの部位も L-ドパを合成するチロシン水酸化酵素のタンパク質発現量が上昇傾向にあった。またシナプス間隙からシナプスへドパミンの再取り込みを行う DAT の発現量に対して、シナプス内でドパミンをシナプス小胞に取り込む VMAT-2 の発現量 (VMAT-2/DAT) を比べることでドパミン小胞の生成に変化があるか調べた。野生型に比べ SELENOP-KO では腹側中では上昇傾向、腹側線条体で約 150% と顕著に上昇していた。このためメタンフェタミンによって、小胞からのドパミンの放出量が増えたのではないかと考えられた。電気刺激の直前に SELENOP-KO の脳切片に精製した SELENOP タンパク質を含む灌流液を作用させると、メタンフェタミンによるドパミン回転が野生型のレベルへと回復した。この現象はセレノシステイン残基をシステイン残基へと変異させセレンを含有しない SELENOP-Cys でも観察された。一方で飲み水にセレンを過剰量与えた SELENOP-KO マウスの脳切片ではドパミン代謝回転は回復しなかった。これは SELENOP タンパク質のセレンが脳の細胞に取り込まれ元素として利用されたからではなく、SELENOP のタンパク質自体がドパミン回転に作用していることを示唆している。

SELENOP の受容体の一つである ApoER2 は SELENOP の C 末端側のドメインのアミノ酸配列に結合する。そこでこの結合に必要なアミノ酸配列を破壊した SELENOP を SELENOP-KO マウスの脳切片に作用させたが、メタンフェタミンによるドパミン代謝回転は野生型のように回復しなかった。これはメタンフェタミンのドパミン代謝回転に SELENOP と ApoER2 の結合が必要であることを示唆している。アンフェタミンは D2R の自己抑制を遮蔽し、ドパミン作動性ニューロンの発火を促進する。そこで SELENOP-KO では D2R の発現が上昇した結果、メタンフェタミン刺激によるドパミン濃度が野生型よりも高くなったのかを確認するため、D2R の作動薬クインピロールで D2R の自己抑制を引き起こした。D2R の自己抑制下では、野生型も SELENOP-KO もベースラ

インのドパミン放出が抑制され、メタンフェタミン刺激下でもドパミン濃度の上昇が抑えられた。逆に D2R の拮抗薬であるスルピリドで D2R の自己抑制が阻害されると、野生型も SELENOP-KO もメタンフェタミン刺激によるドパミン濃度の上昇が見られなくなるほど顕著に放出された。このことから SELENOP タンパク質は、D2R の自己抑制を直接促進することで、SELENOP-KO で見られたドパミン濃度の上昇を回復させていることが示唆された。メタンフェタミン暴露によって、シナプス間隙のドパミン濃度が上昇すると、D2R の自己抑制によって、ドパミン小胞の放出が抑制される。この D2R の自己抑制に SELENOP と ApoER2 の結合が重要な役割を担っていることが示唆された。SELENOP と ApoER2 との結合が、メタンフェタミン暴露によって過剰に放出されるドパミン小胞の放出を抑制する D2R の働きを促進することが示唆された。ApoER2 は脳の発達段階で神経の伸長に関わったり、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体 (NMDAR) と相互作用をすることが知られている。シナプス前細胞の軸索末端の脱分極で、カルシウムイオン依存的に NMDAR が活性化することでドパミン放出が促進されるので、SELENOP が結合した ApoER2 によって、ドパミン放出の抑制が調節されていることも示唆された。

5 . 主な発表論文等

原著論文

(1) Daniel J Torres, Jordan T Yorgason, Catherine C Mitchell, Ayaka Hagiwara, Marilou A Andres, Suguru Kurokawa, Scott C Steffensen, Frederick P Bellinger. Selenoprotein P Modulates Methamphetamine Enhancement of Vesicular Dopamine Release in Mouse Nucleus Accumbens Via Dopamine D2 Receptors. *Frontiers of Neuroscience*. 2021 Apr 13;15:631825. doi: 10.3389/fnins.2021.631825. eCollection. (査読あり)

(2) Suguru Kurokawa, Masato Yoneda, Yuji Ogawa, Yasushi Honda, Takaomi Kessoku, Kento Imajo, Satoru Saito, Atsushi Nakajima, Kikuko Hotta. Two differentially methylated region networks in nonalcoholic fatty liver disease, viral hepatitis, and hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol*. 2022 Jun 2;22(1):278. doi: 10.1186/s12876-022-02360-4. (査読あり)

総説

(1) Suguru Kurokawa, Masanori Takehashi. Selenium and Brain Function. *Journal of Analytical Bio-Science*. 2022 Dec 45; 5.

学会発表

- (1) セレノプロテイン P による血管内皮細胞のシグナル伝達調節 日本薬学会第 140 年会 (京都) 2020 年 3 月 27 日
- (2) ApoER2 における SELENOP の結合に重要なアミノ酸残基の同定 日本薬学会第 141 年会 (広島) 2021 年 3 月 28 日

[その他]

ホームページ等

<https://www.matsumoto-u.ac.jp/professors/pid31564.php>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 竹橋 正則

ローマ字氏名 : Masanori Takehashi

所属研究機関名 : 神戸学院大学

部局名 : 栄養学部

職名 : 教授

研究者番号 (8 桁) : 10378862

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : Frederick P. Bellinger

ローマ字氏名 : Frederick P. Bellinger

研究協力者氏名 : Christopher S. Williams

ローマ字氏名 : Christopher S. Williams

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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Torres Daniel J., Yorgason Jordan T., Mitchell Catherine C., Hagiwara Ayaka, Andres Marilou A., Kurokawa Suguru, Steffensen Scott C., Bellinger Frederick P.	4. 巻 15
2. 論文標題 Selenoprotein P Modulates Methamphetamine Enhancement of Vesicular Dopamine Release in Mouse Nucleus Accumbens Via Dopamine D2 Receptors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2021.631825	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 黒川 優	4. 巻 56
2. 論文標題 DNA損傷の修復：酵素の活性中心が新しくできるメカニズムを解明	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 870～870
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14894/faruawpsj.56.9_870	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Jennifer M. Pilat, Rachel E. Brown, Justin Jacobse, Suguru Kurokawa, Yash A.Choksi, Jeremy A. Goettel, Sarah P. Short, and Christopher S. Williams
2. 発表標題 Selenoprotein P (SELENOP) binds LRP5/6 to modulate WNT signaling activity
3. 学会等名 12th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒川 優、竹橋 正則、堀田紀久子
2. 発表標題 セレンタンパク質Pとアポリポタンパク質E受容体2の結合解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 志賀 友美, 竹橋 正則, 堀田 紀久子, 黒川 優
2. 発表標題 Identification of important amino acid residues of ApoER2 for SELENOP binding
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒川 優, 竹橋正則
2. 発表標題 セレノプロテインPによる血管内皮細胞のシグナル伝達調節
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	竹橋 正則 (Masanori Takehashi) (10378862)	大阪大谷大学・薬学部・准教授 (34414)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of Hawaii	Vanderbilt University	