

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16351

研究課題名（和文）セレン結合性タンパク質が関与する心臓のセレン代謝経路の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the function of selenium binding protein in selenium metabolic pathway in heart

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者は以前に心臓のセレン(Se)結合性タンパク質としてミオグロビン(Mb)を報告している。本研究により、Mbに結合したSeはチオール交換反応により遊離チオールを含む他のタンパク質へ移行できることが示された。また、培養心筋細胞にはセレノトリスルフィドに由来するSeが取り込まれ、セレンタンパク質合成に利用されたと考えられ、セレノトリスルフィド形成が心臓のSe代謝過程に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セレン欠乏は心臓に重大な影響を与えることが知られているが、心臓のセレン代謝についてはあまり明らかにされていない。また、セレンは種々の疾患との関連が指摘されているが、生体内の存在量が少なくその詳細は不明である。本研究によりセレン代謝過程とミオグロビンおよびセレノトリスルフィドとの関連性が示され、今後のセレン欠乏による心筋障害やセレンと心疾患の関連性の解明に関する研究の一助となる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：Myoglobin was proved to bind selenium through selenotrisulfide bond in rat heart by our previous research. In this research, it was shown that selenium bound to myoglobin was reactive and could be transported to free cysteine thiol of human serum albumin. Additionally, selenium from several selenotrisulfide compounds could be absorbed and utilized for selenoprotein synthesis in cultured myocardial cells. These facts suggested that thiol-exchange reaction with thiol and selenotrisulfide may participate in metabolism and transport of selenium in heart.

研究分野：衛生化学

キーワード：セレン セレノトリスルフィド 心臓

1. 研究開始当初の背景

セレン(Se)は多くの動物にとって必須の元素である。ヒトの生体内の存在量は 10-15 mg と極微量であるが、欠乏により心筋障害を引き起こすことが知られている。生体内セレンの多くはタンパク質に含まれ、生体の恒常性維持において重要な機能を担っている¹。特にセレンを活性中心に有するグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)は、酸素消費に伴って生じる過酸化水素や脂質過酸化物を還元する主要な酵素である。心臓は全身へ血液を送るために常に拍動し、大量のエネルギーを消費しているが、その多くを脂肪酸の酸化により得ており、臓器重量当たりの酸素消費量は脳よりも多い²。その結果活性酸素種(ROS)が多量に生じ、心疾患の発症に関連すると考えられている。セレンは GPx などの抗酸化酵素の活性中心として、心臓の酸化ストレスからの防御に重要であると考えられるが、心臓のセレン代謝過程には不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

研究代表者は、これまでに赤血球の亜セレン酸代謝過程に関する研究から、セレンとチオール(-SH)によって形成されるセレノトリスルフィド(-S-Se-S-, STS)と、グルタチオン(GSH)やタンパク質遊離チオールなどのチオール交換反応($R-S-Se-S-R + R^2-SH \rightarrow R^2-S-Se-S-R + R-SH$)が、セレンの膜透過や輸送に関与することを明らかにしてきた³。さらにラットの心臓由来ミオグロビン(Mb)には 66 番目にシステイン(Cys)残基が存在するが、その遊離チオールがセレノトリスルフィドを介してセレンを結合することも報告している⁴。ミオグロビンとセレンの反応についてはこれまで報告がなく、心臓のセレン代謝に関与している可能性も考えられた。本研究では、心臓におけるセレン代謝にもセレノトリスルフィドの形成やチオール交換反応が関与しているのではないかと考え、心筋細胞のセレンの取り込み機構、およびミオグロビンに結合したセレンの反応性の検討により、心臓のセレン代謝過程を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)セレノトリスルフィド化合物の合成：亜セレン酸と GSH のペインター反応で生じるグルタチオンセレノトリスルフィド(GSSeSG)は亜セレン酸の活性代謝中間体であり、セレン代謝において重要な化合物であると考えられる⁵。一般に GSSeSG のような低分子のセレノトリスルフィドは生理的条件下で活性が高く不安定であるため、研究代表者は GSSeSG のモデル化合物として、生理的条件下でも比較的安定なペニシラミンセレノトリスルフィド(PenSSeSPen)をこれまでのセレン代謝過程の検討に用いてきた³。PenSSeSPen は、1 当量の亜セレン酸と 4 当量の L-ペニシラミン(Pen)を混合し、生じた沈殿を水およびメタノールで洗浄して得た。

(2)ミオグロビンに結合したセレンの反応性の検討：Wistar ラットから心臓を摘出後、氷上でホモジナイズおよび超音波破碎し、心臓細胞質溶解液を調製した。分画分子量 100, 30, 10 kDa の限外ろ過膜により心臓細胞質溶解液を順次ろ過し、10 kDa 膜上に残った試料を粗精製したミオグロビンとして得た。ジチオスレイトール(DTT)で還元後透析し、PenSSeSPen と混合後再度透析してセレノトリスルフィド結合ミオグロビン(Mb-SSeSPen)を調製した (Fig. 1)。



(3)心筋細胞へのセレン取り込み：ラット心筋由来 H9c2 細胞に PenSSeSPen 又は Mb-SSeSPen を添加し、セレノトリスルフィド由来セレンの細胞への取り込みおよび細胞内での利用が見られるか検討した。亜セレン酸は生物学的利用能が高く、臨床でもセレン欠乏症の予防や治療に用いられることから、比較として用いた。種々のセレン化合物を添加して一定時間培養後、細胞質溶解液を調製し、グルタチオンペルオキシダーゼ活性、タンパク質量、セレン量を測定した。H9c2 細胞は本来ミオグロビンを発現していないため、ラットミオグロビンの遺伝子を組み込んだプラスミドをリポフェクション法により導入し、ミオグロビン発現 H9c2 細胞の樹立を試みた。プラスミドを導入した H9c2 細胞を、抗生物質を添加した培地で一定期間培養し、ミオグロビン遺伝子が導入された細胞を選択した。選択された細胞を回収し、ウェスタンブロット法によりミオグロビンの発現を確認した。

4. 研究成果

(1)セレノトリスルフィド結合ミオグロビンの調製：ペニシラミンセレノトリスルフィドおよび Mb-SSeSPen の合成は、質量分析法およびセレン定量により確認した。精製したミオグロビン、および PenSSeSPen と混合後のミオグロビンの質量分析の結果を比較すると、ミオグロビンに

由来するピーク (m/z 17,031) が PenSSeSPen 処理により減少する一方で、-SeSPen の分子量に相当する 226 が増加したピーク (m/z 17,258) が検出され、ミオグロビンの遊離チオールと PenSSeSPen のチオール交換反応により、Mb-SSeSPen が形成されたと考えられた (Fig. 2)。また、同様の検討を ICR マウスを用いて行った結果、マウスミオグロビンに由来すると考えられる m/z 16,938 のピークに -SSeSPen が付加したピークシフト (m/z 17,167) が観察され、マウスミオグロビンもラットミオグロビンと同様にセレノトリスルフィドとの反応性を有していることが推察された。

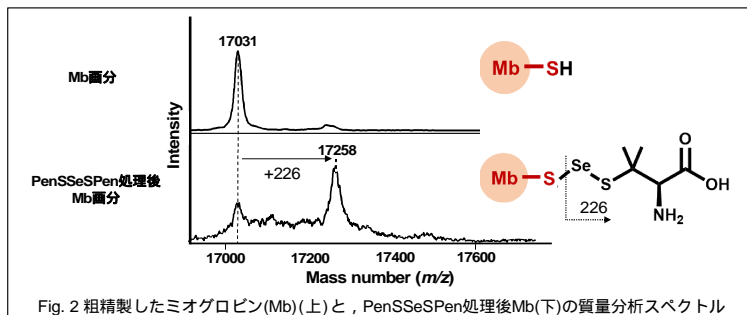


Fig. 2 粗精製したミオグロビン (Mb) (上) と、PenSSeSPen 処理後 Mb (下) の質量分析スペクトル

(2) ミオグロビンに結合したセレンの反応性の検討: 以前の検討から、ラットミオグロビンは生理的条件下でもセレンを結合しているが、亜セレン酸を経口投与してセレン摂取量を増大させた場合、ラット心臓のセレン濃度は増加したのに対し、ミオグロビンに結合するセレン量には変化が見られなかった⁴。このことから、ミオグロビンはセレンを一時的に保持し、セレンタンパク質合成などの経路へ受け渡す役割を担っているのではないかと考えられた。そこで、Mb-SSeSPen と他の遊離チオール含有タンパク質とを反応させ、ミオグロビンに結合したセレンが他のタンパク質チオールへ移行できるか検討した。実際に心臓に存在するタンパク質を用いた検討は困難であることから、本研究ではヒト血清アルブミン (HSA) をモデルタンパク質として用いた。HSA は市販のものを容易に入手可能であり、また通常分子内に 1 個の遊離チオールを有している。血清アルブミンとミオグロビンが実際に生体内で相互作用する可能性は低いと考えられるが、HSA の分子量は約 66 kDa とミオグロビンと大きく異なり、Mb-SSeSPen と反応後に限外ろ過などの手法で分離が可能であるため、モデルタンパク質として適していると考えられた。Mb-SSeSPen と HSA を、セレンと遊離チオールのモル比が 1:1~1:10 となるように混合し 37 °C で 60 分間反応後、分画分子量 50 kDa の限外ろ過膜で分離し、それぞれの画分のセレン量を測定した。その結果、ミオグロビンに結合したセレンは、HSA 由来のチオール量が増大するにつれて減少し、対照的に HSA に結合するセレン量は増大した (Fig. 3)。また、チオールアルキル化剤である *N*-エチルマレイミド (NEM) で HSA を処理すると、HSA の遊離チオール基がアルキル化されセレンと反応できなくなる。この NEM 修飾 HSA と Mb-SSeSPen を反応させると、ミオグロビンから HSA へのセレンの移行が 50% 以上低下した。以上のことから、ミオグロビンに結合したセレンは、他のタンパク質の遊離チオールに移行できることが示された (Fig. 4)。

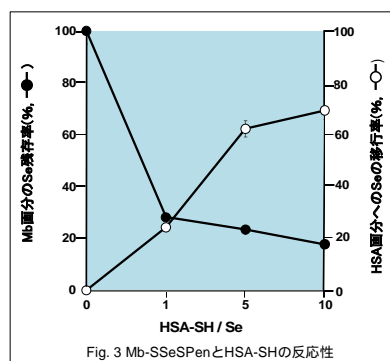


Fig. 3 Mb-SSeSPen と HSA-SH の反応性

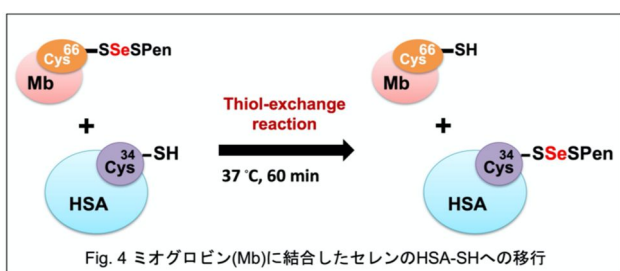


Fig. 4 ミオグロビン (Mb) に結合したセレンの HSA-SH への移行

(3) 培養心筋細胞へのセレン取り込み: 当初は P19 細胞を用いて細胞へのセレン取り込みを検討したが、心筋細胞への分化に時間を要することや、分化後の細胞の扱いが難しいことから、新たにラット心筋由来 H9c2 細胞での検討を行った。H9c2 細胞に亜セレン酸もしくは PenSSeSPen を添加して培養した結果、細胞質 GPx 活性の上昇および細胞内セレン量の増大が観察され、低分子のセレノトリスルフィド由来セレンが心筋細胞内に取り込まれ、セレンタンパク質合成に利用されることがわかった (Fig. 5)。

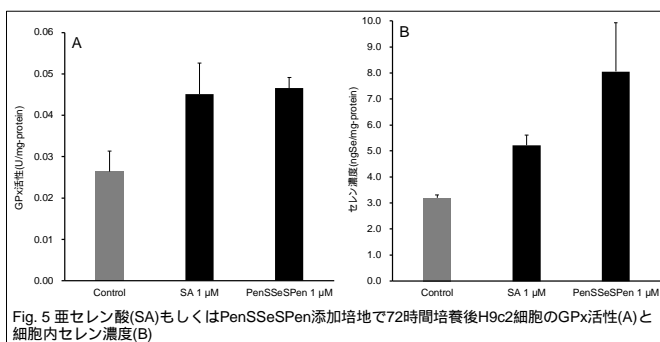


Fig. 5 亜セレン酸 (SA) もしくは PenSSeSPen 添加培地で 72 時間培養後 H9c2 細胞の GPx 活性 (A) と細胞内セレン濃度 (B)

ヒトの血中では HSA の遊離チオールにセレンが結合し、全身を循環していると考えられる。研究代表者はこれまでに HSA の遊離チオールに結合したセレンが、ラットの摘出肝細胞に移行したことを報告している³。したがって、HSA に結合したセレンが心臓に輸送される可能性も予想された。そこで HSA の遊離チオールと PenSSeSPen のチオール交換反応により、セレノトリスルフィド結合 HSA (HSA-SSeSPen) を調製し、これを添加した培地で H9c2 細胞を培養し

た。その結果、亜セレン酸, PenSSeSPen, HSA-SSeSPen のいずれを添加した場合でも, 培養時間の延長とともに細胞質 GPx 活性が上昇する傾向が観察された(Fig. 6)。これらのことから, タンパク質に結合したセレノトリスルフィド由来セレンも細胞内へ取り込まれ, 利用されることが示された。

H9c2 細胞はミオグロビンを発現していないため, ラットミオグロビン遺伝子を導入し, ミオグロビン発現 H9c2 細胞を作成し, セレン代謝におけるミオグロビンの検討を行うこととした。ラットミオグロビン遺伝子を導入後, 抗生物質入り培地で培養した細胞を回収し, 細胞質溶解液のミオグロビンをウェスタンブロッティングにより分析した結果, ミオグロビンの発現が確認された。この細胞に, 亜セレン酸, PenSSeSPen, HSA-SSeSPen を添加して 72 時間培養したところ, 細胞質 GPx 活性の上昇が観察されたが, ミオグロビンを発現していない H9c2 細胞との有意な差は観察されなかった。これは, ミオグロビンが細胞のセレン取り込みや代謝に大きく影響していない可能性も示唆しているが, 導入したミオグロビンの発現量が低くセレン代謝に影響を与えるほどのミオグロビンが細胞に存在していなかった可能性も考えられる。今後さらに効率的な遺伝子導入によりミオグロビン発現量の高い細胞を作成することで, ミオグロビンのセレン代謝に与える影響を詳細に検討できると考えられる。

本研究での検討により, ラットの心臓のミオグロビンに結合したセレンは, 他のタンパク質の遊離チオールに移行できる反応性を有していることが示され, 心筋細胞内でのセレン輸送に関与している可能性が考えられた。また, セレノトリスルフィド化合物由来セレンは, 培養心筋細胞内へ取り込まれ, セレンタンパク質の生合成に利用されることが示された。さらに HSA に結合したセレンが細胞質の GPx 活性上昇に寄与したことから, 心筋細胞外から細胞内へのセレン取り込みにセレノトリスルフィド形成とチオール交換反応が関連している可能性も示唆された。

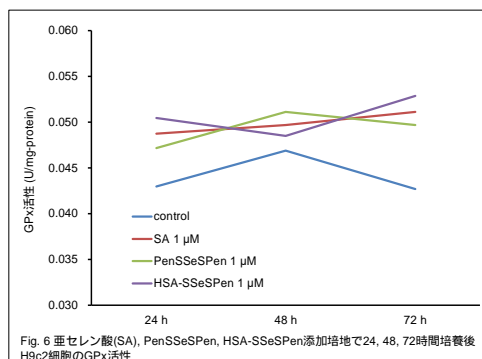


Fig. 6 亜セレン酸(SA), PenSSeSPen, HSA-SSeSPen添加培地で24, 48, 72時間培養後 H9c2細胞のGPx活性

<引用文献>

1. Rayman M., Selenium and human health. *Lancet*, 2012, **379**, 1256-1268
2. Lopaschuk G. D., Ussher J. R., Folmes C. D. L., Jaswal J. S., Stanley W. C., Myocardial fatty acid metabolism in health and disease, *Physiol. Rev.*, 2010, **90**, 207-258
3. Haratake M., Fujimoto K., Hongoh M., Yoshida S., Fuchigami T., Nakayama M., Selenotrisulfide as a metabolic intermediate in biological systems. *ACS Symposium Series*, 2013, **1152**, Biochalcogen Chemistry: The Biological Chemistry of Sulfur, Selenium, and Tellurium, 201-211
4. Hori E., Yoshida S., Fuchigami T., Haratake M., Nakayama M., Cardiac myoglobin participates in the metabolic pathway of selenium in rats. *Metallomics*, 2018, **10**, 614-622
5. Self W. T., Tsai L., Stadtman T. C., Synthesis and characterization of selenotrisulfide derivatives of lipoic acid and lipoamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, **97**, 12481-12486

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshida Sakura, Yamamoto Akinori, Masumoto Hiroshi, Fuchigami Takeshi, Toriba Akira, Haratake Mamoru, Nakayama Morio	4. 巻 26
2. 論文標題 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A participates in the selenium transport into the rat brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 933 ~ 945
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00775-021-01903-6	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13件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Sakura YOSHIDA, Eriko HORI, Sakiko URA, Akinori YAMAMOTO, Hiroshi MASUMOTO, Takeshi FUCHIGAMI, Akira TORIBA, Mamoru HARATAKE, Morio NAKAYAMA
2. 発表標題 A comprehensive study of reactions between a selenious acid-metabolite and protein thiols
3. 学会等名 第30回金属の関与する生体関連反応シンポジウム(SRM2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 さくら
2. 発表標題 必須微量元素セレンの動態分析
3. 学会等名 フォーラム2021 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 さくら, 山本 明典, 増本 博司, 淵上 剛志, 鳥羽 陽, 原武 衛, 中山守雄
2. 発表標題 亜セレン酸代謝に関与するラット脳由来タンパク質の探索
3. 学会等名 フォーラム2021 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒岩 多恵, 吉田 さくら, 堀 恵里子, 淵上 剛志, 鳥羽 陽, 原武 衛, 中山 守雄
2. 発表標題 ミオグロビンが関与する心臓のセレン輸送過程の解明
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒岩 多恵, 吉田 さくら, 堀 恵里子, 淵上 剛志, 鳥羽 陽, 原武 衛, 中山 守雄
2. 発表標題 セレノトリスルフィド結合を介してミオグロビンに結合したセレンの反応性の検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田さくら, 山本 明典, 増本博司, 堀 恵里子, 浦 東子, 淵上剛志, 原武 衛, 中山守雄
2. 発表標題 亜セレン酸還元代謝種と反応するラット脳由来タンパク質の同定
3. 学会等名 フォーラム2020 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田 さくら, 山本 明典, 増本博司, 堀 恵里子, 浦 東子, 淵上剛志, 原武 衛, 中山守雄
2. 発表標題 セレノトリスルフィドと反応するラット脳由来タンパク質の探索
3. 学会等名 生命金属に関する合同年会 (第6回セレン研究会, 第8回メタロミクス研究フォーラム)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田 さくら, 山元 更紗, 丸山 洋子, 淵上 剛志, 鳥羽 陽, 原武 衛, 中山 守雄
2. 発表標題 カツオだし由来セレン含有物質の栄養機能評価
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 吉田 さくら, 森 亮輔, 林 里紗子, 淵上 剛志, 原武 衛, 中山 守雄
2. 発表標題 Investigation of selenium absorption from selenotrisulfide compounds in cultured cells
3. 学会等名 第29回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 さくら, 堀 恵里子, 浦 東子, 淵上 剛志, 原武 衛, 中山 守雄
2. 発表標題 亜セレン還元代謝種を用いたセレン結合性タンパク質の探索
3. 学会等名 第5回日本セレン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 明典, 吉田 さくら, 淵上 剛志, 原武 衛, 中山 守雄
2. 発表標題 必須微量栄養素セレンの脳移行に関与するタンパク質の探索
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 亮輔, 吉田 さくら, 林 里紗子, 淵上 剛志, 原武 衛, 中山 守雄
2. 発表標題 セレノトリスルフィドを介した神経細胞へのセレン輸送機構
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 さくら, 山本 明典, 堀 恵里子, 浦 東子, 淵上 剛志, 原武 衛, 中山 守雄
2. 発表標題 セレン代謝種と反応性を有する脳細胞膜画分由来タンパク質の探索
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
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
研究協力者	森 亮輔 (Mori Ryosuke)	長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科博士前期課程生命薬科学専攻衛生化学研究室・大学院生	
研究協力者	山本 明典 (Yamamoto Akinori)	長崎大学・薬学部薬学科・学部学生	
研究協力者	黒岩 多恵 (Kuroiwa Tae)	長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科博士前期課程生命薬科学専攻衛生化学研究室・大学院生	

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
---------	---------