

令和 2 年 4 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19387

研究課題名(和文)新奇活性シアン種の産生の機構とその毒性学的意義の解明

研究課題名(英文) Mechanism underlying the generation of reactive cyanogen species

研究代表者

小椋 康光 (OGRA, Yasumitsu)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：40292677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、主に以下の2点の成果を上げることができた。一つ目は、内在性のシアン化物イオンすなわち、活性シアンとセレンが反応し生成したセレノシアン酸の検出方法として、既報のポストカラム法を用いた蛍光検出法と誘導結合プラズマ質量分析法とを比較した。その結果、蛍光検出法の方が検出感度において優れているという結論に達した。二つ目は、これまでの研究では、内在性のシアンの生成はミエロペルオキシダーゼが特異的に存在する好中球でのみ産生されると考えられていたが、多くの細胞種で産生が可能であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体にとって毒性の高い物質として認識されていたシアン化合物が、生体内において生合成されていることを示唆してきたが、本研究により、間違いなく反応性の高いシアン化合物すなわち活性シアンが細胞内で普遍的に生合成されていることを明らかにすることができた。すなわち、生体は毒性の高いシアン化合物をわざわざ生合成をし、生体に曝露されたさらに毒性の強い化学物質の解毒に利用しているという機構の一端が解明できた。本研究で得られた結果は、毒性学のパラダイムシフトに繋がる大きな成果であると認識している。すべからく成果を論文としてまとめ、その後ニュースリリースを行いたい。

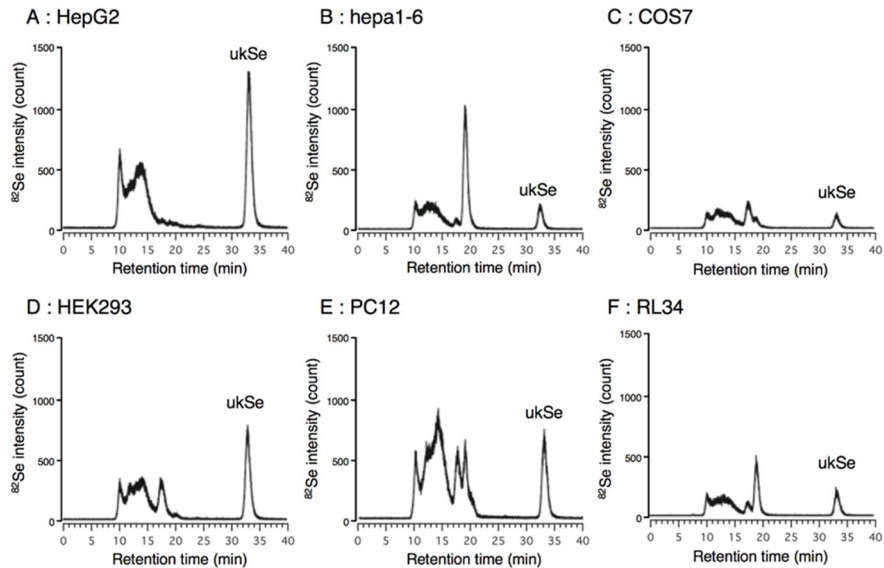
研究成果の概要(英文)：When human hepatoma HepG2 cells were exposed to sodium selenite, an unknown selenium metabolite was detected in the cytosolic fraction by HPLC coupled with an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS). The unknown selenium metabolite was identified as selenocyanate by electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (ESI-Q/TOF-MS). Because exogenous cyanide increased the amount of selenocyanate in the mixture, selenocyanate seemed to be formed by the reaction between selenide reduced from selenite and endogenous cyanide. Endogenous cyanide was called reactive cyanogen species due to its high reactivity. Although LC-ICP-MS was more robust against a sample matrix in the detection of selenocyanate, HPLC-fluorescence detection with the post-column reaction was superior to LC-ICP-MS in the detection limit. Endogenous cyanide was detected in all cell types we evaluated. The pretreatment of glycine or hydrogen peroxide increased the amount of endogenous cyanide.

研究分野：毒性学

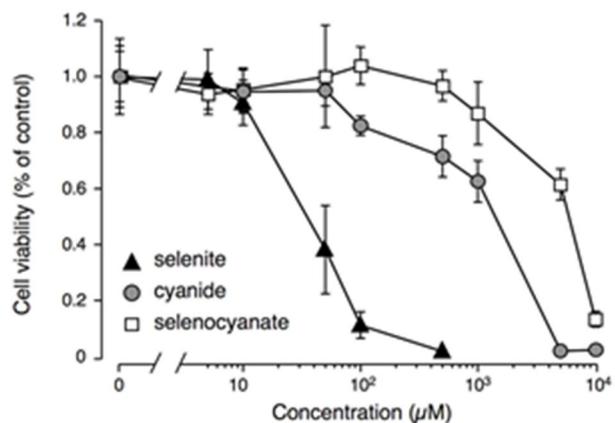
キーワード：シアン化物イオン 活性シアン セレン ICP-MS グリシン

1. 研究開始当初の背景

代表者はこれまで生体微量元素のうち、特に必須微量栄養素であるセレンの代謝研究を行ってきた。その過程で、栄養量を上回る過剰なセレンが細胞内に取り込まれた場合、未知のセレン代謝物に変換される



ことを見出した。上図は、きっかけとなった LC-ICP-MS の溶出図 (LC で細胞成分を分離し、ICP-MS でセレンを検出) である (上図中に示した ukSe と表記したピークが未知代謝物)。この代謝物は、その後の質量分析等による solid な同定により、セレノシアン酸 (SeCN^-) であることを明らかにした (*Chem. Res. Toxicol.* (2015) **28**, 1803–1814)。さらにセレノシアン酸の生成過程を調べていくと、内在性のシアンが細胞内で生成し、非酵素的にセレンと反応していることを強く示唆する結果を得た。このことから代表者は、この反応性の高い内在性のシアンを活性シアン種 (reactive cyanogen species, RCNS) と名付けた。しかし、その時点では名付けるに留まっており、どのような分子基盤に基づいて生成しているのか、その生物学的特に毒性学的意義は何なのかについては、これから明らかにしていかなければいけない課題であった。つまり、セレンの研究に端を発し、毒性学的に興味ある RCNS に行きついた。細胞にとって毒性の高い物質であるシアンが、細胞内で *de novo* 合成され、別の毒性化合物の解毒に参与しているという魅力あるストーリーに挑みたくなり、挑戦的研究として応募したという経緯であった。



2. 研究の目的

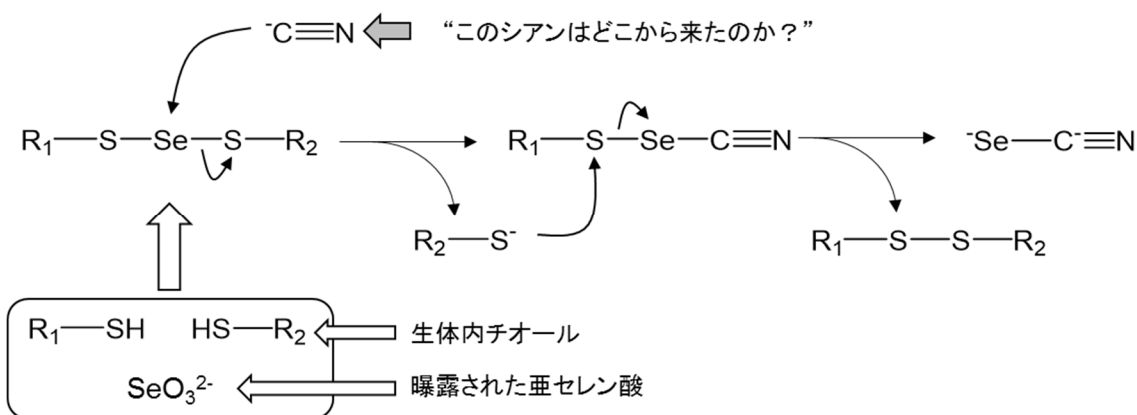
(1) 内在性シアンの測定法の確立

先行研究を調べてみると、特にほ乳動物細胞内での内在性のシアンの機能は、ほとんど明らかになっていないのが現状であることがわかった。その理由の一つが、細胞内の微量のシアンを定量的に測定できないという分析化学的な問題に起因していることに気づいた。代表者は、逆に高感度なセレンの分析の過程からセレノシアン酸ひいては内

在性のシアン存在に気づいた経緯があり、そもそも細胞内の高感度のシアン分析が可能であった。本研究では、さらに改良を加えた分析方法を構築するところから研究を開始した。

(2) ほ乳類細胞内におけるシアン生成の分子機構の解明

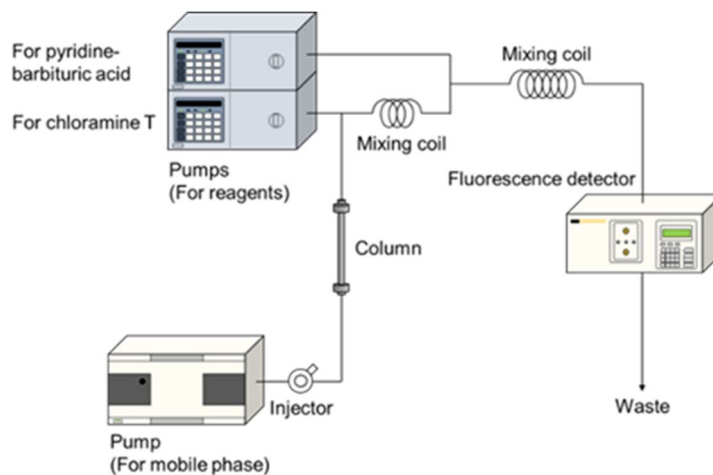
内在性のシアン化物イオン (= 活性シアン) の生成については、特定の細胞種で起こることが報告されている。しかし、これまでの研究成果から、内在性のシアン化物イオンは特定の細胞に限らず、多くの細胞種で普遍的に産生されることが示されている。そこで、内在性のシアン化物イオンの生合成機構を明らかにすることを第二の目的とした。



3. 研究の方法

(1) 内在性シアンの測定法の確立

我々が確立している誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) を利用し、シアンをセレノシアン酸あるいはチオシアン酸へと誘導体化する方法を開発した (LC-ICP-MS、右図)。また、既報のシアン化物イオンを蛍光誘導体化するポストカラム法 (LC-PC-FD) とこの LC-ICP-MS との比較を行った。



(2) ほ乳類細胞内におけるシアン生成の分子機構の解明

内在性のシアン生成に関わる基質の量や精製に関わる酵素の活性を制御することにより、シアン生成の分子機構を明らかにした。具体的には、グリシンや過酸化物の曝露は内在性シアンの生成量を増加させ、ある種のペルオキシダーゼの阻害剤は内在性シアンの生成量を低下させることが想定できることから、これらの物質を利用することにより、酵素反応の機構を解析した。

4. 研究成果

LC-PC-FD ではシアン化物イオン、チオシアン酸イオン及びセレノシアン酸イオンを、LC-ICP-MS ではチオシアン酸イオンとセレノシアン酸イオンを分別定量することが可能であった。しかし、検出限界として規定できる感度については、LC-ICP-MS よ

りも LC-PC-FD の方が優れていた。一方、試料の前処理の観点では、前処理のいらない LC-ICP-MS の方に利点があると言えた。検出できる分子種や検出感度といった利点を考慮すると、培養細胞レベルの試料量において、内在性のシアン化物イオンを検出することを考えると、LC-ICP-MS を利用するよりも LC-PC-FD を利用する方が適切であるという結論を得た。

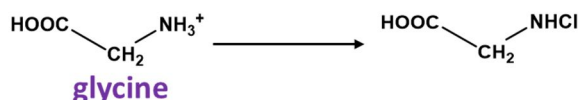
ヒト肺胞基底上皮線癌細胞 A549、ヒト肝がん細胞 HepG2、ヒト胎児腎細胞 HEK293 及びラット副腎髄質褐色腫 PC-12 について、内在性のシアン化物イオン濃度を調べたところ、PC-12 が最も存在量が多かった。

各細胞の培地に 5 mM のグリシンを添加したところ、各細胞種において内在性シアン化物イオンの生成量は 5.0 - 25 倍に上昇した。しかし、同濃度のアラニンも添加しても内在性シアン化物イオンの生成量は上昇しなかった。すなわち、内在性のシアン化物イオンの生成には、グリシンがかかわっていることを強く示唆している。

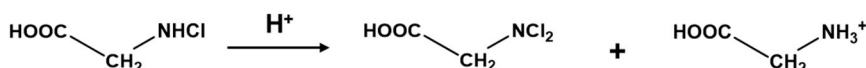
各細胞の培地に 100 μ M の過酸化水素を添加したところ、各細胞種において内在性シアン化物イオンの生成量は 3.8 - 16 倍に上昇した。このことは内在性のシアン化物イオンの産生に酸化的ストレスが関与していることを示唆している。

以上のことから、内在性のシアン化物イオンは、細胞種に関わらず、グリシンを原料として、酸化ストレス下ではより効率的に産生されることが明らかとなった。既報では、下図のような 3 段階の反応により内在性のシアン化物イオンが生成することが知られている。しかし、好中球特異的なミエロパーオキシダーゼによる機構では他の細胞種でも生成し得る内在性のシアン化物イオンの生成機構を説明し得ないことから、引き続き、ミエロパーオキシダーゼに代わる酵素系の存在を明らかにしていくことが必要である。

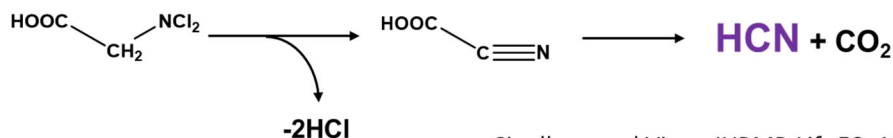
(A) *N*-chlorination by myeloperoxidase



(B) acidic dismutation of *N*-chloroglycine



(C) Decomposition to nitrile and cyanide



Cipollone and Visca, *IUBMB Life* **59**, 187-189, 2007

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Roldan Nicole, Pizarro Danitza, Frezard Frederic, Bravo Manuel, Verdugo Marcelo, Suzuki Noriyuki, Ogra Yasumitsu, Quiroz Waldo	4. 巻 34
2. 論文標題 Analytical methodology for the simultaneous determination of NMG-Sb(v), iSb(v), and iSb(iii) species by anion exchange liquid chromatography in Glucantime? and its biological application in Wistar rat urine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Analytical Atomic Spectrometry	6. 最初と最後の頁 203 ~ 213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8JA00273H	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 該当する
1. 著者名 Hu Zhenying, Shiokawa Ayako, Suzuki Noriyuki, Xiong Hua, Ogra Yasumitsu	4. 巻 245
2. 論文標題 Evaluation of chemical species and bioaccessibility of selenium in dietary supplements	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Food Research and Technology	6. 最初と最後の頁 225 ~ 232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00217-018-3155-8	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 該当する
1. 著者名 Ogra Yasumitsu, Shimizu Maya, Takahashi Kazuaki, Anan Yasumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Biotransformation of organic selenium compounds in budding yeast, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Metallomics	6. 最初と最後の頁 1257 ~ 1263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8MT00176F	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 該当する
1. 著者名 Takahashi Kazuaki, Suzuki Noriyuki, Ogra Yasumitsu	4. 巻 49
2. 論文標題 Effect of administration route and dose on metabolism of nine bioselenocompounds	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Trace Elements in Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 113 ~ 118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtemb.2018.05.007	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 -

1. 著者名 Kobayashi Hironori、Suzuki Noriyuki、Ogra Yasumitsu	4. 巻 5
2. 論文標題 Mutagenicity comparison of nine bioselenocompounds in three Salmonella typhimurium strains	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Toxicology Reports	6. 最初と最後の頁 220 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxrep.2018.01.005	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Y. Ogra
2. 発表標題 Methylation of selenium -Molecular mechanisms for Se excretion-
3. 学会等名 Workshop on Metals in Life Process (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Ogra
2. 発表標題 Tellurium metabolome in plants and animals.
3. 学会等名 The 8th International Congress of Asian Society of Toxicology (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小椋康光
2. 発表標題 生体におけるセレンの新たな代謝機構 新たな活性分子種の関与 -
3. 学会等名 第6回メタロミクス研究フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小椋康光
2. 発表標題 ICP-MSの生体試料への応用
3. 学会等名 第9回日本質量分析学会中部談話会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小椋康光
2. 発表標題 臨床に結び付くセレンの代謝機構
3. 学会等名 第41回日本栄養アセスメント研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Y. Ogra	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 522
3. 書名 Selenium Molecular and Integrative Toxicology, B	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>千葉大学大学院薬学研究院 予防薬学研究室 OGRA LAB http://www.p.chiba-u.jp/lab/yobou/index.html 千葉大学大学院薬学研究院 予防薬学研究室 https://www.facebook.com/ogralab/</p>

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