

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目： 若手研究（スタートアップ）
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19890212
 研究課題名（和文） D-セレノメチオニンの生体内動態に関する研究
 研究課題名（英文） Pharmacokinetic studies of D-selenomethionine
 研究代表者
 松川 岳久（TAKEHISA MATSUKAWA）
 順天堂大学 医学部 助教
 研究者番号： 60453586

研究成果の概要：必須元素セレンを含むアミノ酸である L-セレノメチオニンは、メチル水銀の神経毒性を効果的に弱める作用があることが示唆されている。アミノ酸であるセレノメチオニンは、立体配置により D 型 L 型の 2 種類が存在する。D 型のセレノメチオニンは L 型に比べて安全かつ有効にメチル水銀の毒性を減弱すると考えられる。しかし、D-セレノメチオニンの生体内動態についての知見はほとんどない。本研究では生体における D-セレノメチオニンの安全性・有用性を明らかにすることを目的として、D-セレノメチオニンの体内動態、特に L-セレノメチオニンへの変換を明らかにするための分析手法を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,130,000	0	1,130,000
2008 年度	1,140,000	342,000	1,482,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,270,000	342,000	2,612,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：セレン、セレノメチオニン、D-アミノ酸、ガスクロマトグラフィー質量分析計、

1. 研究開始当初の背景

環境中の水銀は、微生物によりメチル水銀 (MeHg) となり、食物連鎖により魚介類に蓄積することが知られている。魚介類の摂取量が多い我が国では、通常の食事からも比較的多くの MeHg が摂取されており生体への影響に関心が寄せられている。平成 17 年に厚生労働省から「妊婦への魚介類の摂食と水銀に関する注意事項」が公表されたことは記

憶に新しい。

MeHg は摂取されると、脳・肝臓・腎臓に蓄積し、主に脳および神経系に対して強い毒性を発現する。MeHg の毒性発現を抑制させる物質について旧来から多くの検討がなされているが、最近、セレノメチオニン (SeMet) の投与が MeHg の毒性を減ずる可能性が示唆された。SeMet は必須微量元素であるセレン (Se) を含むアミノ酸のひとつである。Se

は欠乏量と中毒量との幅、至適濃度が非常に狭いことが知られている。MeHgの毒性発現を抑制するためにSeMetを投与すると、Se中毒が誘発される可能性が考えられる。

SeMetのような α -アミノ酸は、グリシンを除き α -炭素の立体配置に関して2種の光学異性体(D型、L型)が存在する。一般に、生体においてD-アミノ酸は腸管吸収されたのちD-アミノ酸酸化酵素[E.C. 1.4.3.3]により、その一部が体内でL-アミノ酸へ変換される。D-アミノ酸酸化酵素は、ヒトやラットでは脳・肝臓・腎臓に存在し、マウスでは腎臓にのみ存在する。L-SeMetの光学異性体であるD-SeMetも、他のD-アミノ酸と同様にD-アミノ酸酸化酵素により対応する α -ケト酸を経てL-SeMetとなると考えられる。D-アミノ酸酸化酵素の分布が、MeHgの蓄積する脳・肝臓・腎臓に重なることから、MeHgの毒性発現を抑制するためD-SeMetを投与すればL-SeMetをこれらの標的臓器に集中して供給できると考えられる。

2. 研究の目的

D-SeMetの生体内動態についての知見はほとんどないため、本研究では生体におけるD-SeMetの安全性・有用性を明らかにすることを目的として、D-SeMetの体内動態について、特にL-SeMetへの変換、Se元素のタンパクへの取り込みに着目し薬物速度論的に解析する。

3. 研究の方法

D-SeMetのin vivoにおける挙動を追跡する手段として安定同位体(SI)トレーサー法を用いる。SIトレーサー法では、検出に質量分析計(MS)を用いることで、同一化学構造をもつ標識体と内因性の非標識体を区別して測定できる。本研究においては ^{82}Se と ^3H にて多重標識したD-SeMetを合成し投与すること

で、L-SeMetへの変換とSe元素のタンパクへの取り込みを内因性のSe化合物と区別して追跡できる。

Seのような微量元素を含む物質の代謝を追跡するには、高感度の測定が必要なため、検出法として誘導結合プラズマをイオン源とする質量分析(ICP-MS)を用いる。本研究ではICP-MSを利用すると同時に、ガスクロマトグラフィー質量分析法(GC-MS)を主要な測定法として併用する。すなわち、投与したSI標識D-SeMetならびにその代謝により生じたL-SeMet、内因性のL-SeMetの測定には、アミノ酸のような低分子有機化合物の分離分析に適しているGC-MSを用いる。また、D-SeMet標識化合物中 ^{82}Se は最終的にタンパク質に取り込まれることが予想されるため、高分子化合物中に取り込まれた微量金属元素を測定するのに適しているICP-MSを用いる。さらに、D-SeMetとL-SeMetは物理化学的性質が殆ど変わらないため、そのままではGCによる分離分析は困難である。本研究では、SeMetを揮発性のあるジアステレオマー誘導化することで短時間で高感度な分離分析法を開発する。以上の手法を用いることで、D-SeMetの生体内動態を明らかにし、MeHgの毒性発現を抑制できる可能性やSe中毒の可能性を論じるに十分なデータを得ることができる。具体的には以下の4つの検討を行う。

①GC-MSによるD-SeMet、L-SeMetの分別定量法の開発をする。

②D-SeMetの安定同位体(SI)標識化合物の合成をする

③血漿中のD-SeMetおよびL-SeMetの精製法の検討

④D-SeMet投与実験

4. 研究成果

D-セレノメチオニン (D-SeMet) の生体内動態を評価するための基礎的検討として、D-およびL-SeMet をガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS) により分別定量する方法を検討した。

DL-SeMet のカルボキシル基を 10% HCl/CH₃OH によりメチルエステル化後、アミノ基を光学活性な (+) α -methoxy- α -trifluoro-methyl-phenylacetyl chloride ((+)MTPA-Cl) によりアシル化し、ジアステレオマーアミド誘導体とすることにより、GC-MS で測定した。また、安定同位体標識した DL-[²H₃, ⁸²Se]SeMet をホモセリンラク톤から 2 ステップで合成し、内部標準物質として用いた。D-SeMet および L-SeMet の誘導体を、初期温度 120°C、昇温 40°C/分、最終温度 250°C の GC 条件で分析したところ、D 体と L 体は分析時間 7 分以内で良好に分離した ($R_s > 3.0$)。L-SeMet のみを誘導体化して GC-MS で測定したところ、単一のピークが認められたことから、誘導化時にラセミ化が起きないことが明らかとなった。非標識体である DL-SeMet ならびに標識体である DL-[²H₃, ⁸²Se]SeMet の誘導体を化学イオン化法 (反応ガス: isobutane) により質量分析すると、それぞれ $[M+H]^+$ が基準ピークとして検出された。非標識体では m/z 424 から 430 にかけて主に Se 同位体由来する同位体分子イオンが観察されたのに対し、⁸²Se を導入した標識体では同位体分子イオンが認められなかった。また標識体では ²H を 3 原子導入したことで非標識体に比べて 5 mass unit 高質量となり標識体と非標識体との相互貢献を考慮する必要がないことから、D-およびL-SeMet を精度良く定量できることが期待できる。さらに、 $[M+H]^+$ をモニタリングイオンとして選択イオンモニタリング (SIM) 分析を行ったところ良好な感度を得られ、本

法が D-SeMet の生体内動態を評価するのに有用な方法であることが示唆された。

つぎに、トレーサーとなる光学活性な SeMet の安定同位体標識体の合成を行った。DL-[²H₃, ⁸²Se]SeMet と同様に、D-もしくはL-ホモセリンを出発原料とし α -アミノ- γ -ブロモブチル酸を経る二段階反応により、光学活性な D-[²H₃, ⁸²Se]SeMet と L-[²H₃, ⁸²Se]SeMet を合成した。上記の DL-SeMet の分別定量法を用いて、これらの光学純度を測定したところ、D-、L-[²H₃, ⁸²Se]SeMet とともに 99.8% e. e. 以上であった。これらの標識体は D-SeMet の生体内動態を明らかにするためのトレーサーとして有用であることが示唆された。

最後に、生体成分中の DL-SeMet をガスクロマトグラフィー質量分析計で測定するための前処理法について検討を行った。陽イオン交換固相抽出カートリッジである BondElut SCX を用い、溶出液に塩酸/メタノールを用いることで、SeMet を 80% 以上の回収率で効率よく抽出・精製することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

松川岳久, 長谷川弘, 小林淳, 篠原佳彦, 篠原厚子, 千葉百子, 市田公美, 稲葉裕. GC-MS-SIM による D-および L-セレノメチオニンの分別定量法の開発

日本衛生学雑誌, 63(2): 482, 2008.

[学会発表] (計 2 件)

Matsukawa T, Kobayashi J, Shinohara A, Chiba M, Inaba Y. Simultaneous Determination of the Enantiomers of Selenomethionine by Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry. International Symposium on Metallomics 2007. Nagoya.

松川岳久. GC-MS-SIM による D-および L-セレノメチオニンの分別定量法の開発, 2008. 京都.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松川 岳久 (TAKEHISA MATSUKAWA)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号: **60453586**

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者