

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23248036

研究課題名(和文) セレンレドックス経路の栄養生理学的意義

研究課題名(英文) Nutritional and physiological significance of selenium redox metabolic pathway

研究代表者

山下 倫明 (YAMASHITA, Michiaki)

独立行政法人水産総合研究センター・中央水産研究所・グループ長

研究者番号：80344323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 29,500,000円

研究成果の概要(和文)：セレンは人体における必須の微量元素である。日本人にとって水産物が主要なセレン源である。マグロ類や高次捕食魚、鯨類の血液およびその他組織には、高濃度のセレンネインが含まれていた。セレンネインはセレノキソ基を有するイミダゾール化合物であり、強力な生体抗酸化作用を示すと同時に、細胞増殖を促進した。人体において魚を摂食することによって、セレンネインは、赤血球に高度に蓄積した。セレンネイン特異的なトランスポーターとしてOCTN1が見出された。OCTN1を介してメチル水銀の解毒が促進された。セレンネインの摂取は、過酸化物質や重金属の排出を促進して、がん・生活習慣病予防や抗老化に作用することが推定された。

研究成果の概要(英文)：Selenium is an essential micronutrient for humans, and seafood is one of the major selenium source in Japan. Recent studies showed that the tissues of tuna, other predatory fish, and whales contain high levels of selenoneine. Selenoneine contains an imidazole ring with a unique selenoketone group and has an antioxidant activity in vitro and in vivo. The dietary intake of selenoneine through fish consumption is thought to be important for enhancing selenium redox functions in tissues and cells. In addition, selenoneine accelerated the excretion and demethylation of MeHg through the formation of secretory extracellular lysosomal vesicles via the specific organic cation/carnitine transporter-1 (OCTN1). Dietary intake of selenoneine might decrease the formation of hydroxyl and other radicals and accelerate the excretion of peroxides and heavy metals, and thereby inhibit carcinogenesis, lifestyle chronic diseases, and aging.

研究分野：水産化学

キーワード：セレン 水銀 生体抗酸化 魚類 魚食 水産物 イミダゾール化合物 マグロ類

1. 研究開始当初の背景

魚食は、日本人にとってセレンの主な供給源であり、魚肉に含まれる有機態セレンは栄養学的に必須の微量元素であるにもかかわらず、化学性状が不明であり、機能性成分としても十分利用されていない。最近、申請者らがマグロ類血合筋由来のセレン化合物を同定した結果、新規のセレン化合物セレノネイン (2-selenyl-*N,N,N*-trimethyl-L-histidine, *J.Biol.Chem.* 285, 18134-18138, 2010) を同定した。このセレン化合物が魚食由来のセレンの主要な化学形態であると考えられることから、このセレン化合物を用いて、その生理・生化学的作用機序を解明することによって、セレンの必須元素としての機能性を明らかにすることが可能であると考えた。

そこで、本研究では、セレノネインの特異的なトランスポーターの存在とラジカル消去作用の機序を明らかにすることによって、セレンの微量元素としての必須性と生理的意義を解明する。

2. 研究の目的

水産物から摂取したセレンの栄養学的意義を解明するため、魚肉に含まれる主要な有機態セレンであるセレノネインのレドックス経路における作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

セレノネイン特異的なトランスポーターの作用を解析して、食事由来セレノネインが生体内へ取り込まれて、生体内のレドックス能が向上することを明らかにする。セレンの代謝経路を同定するため、セレノネイン代謝物を化学形態別に分析する。セレン安定同位体・放射性同位体で標識したセレノネインをモデル動物へ投与して、セレノネインを含むセレン代謝経路を解明する。

4. 研究成果

(1) セレノネインの生体抗酸化作用 魚介類の筋肉や臓器の水抽出物を GPC カラムで分離し、溶離したセレン化合物を ICP 質量分析計によって化学形態別に分析する方法が利

用され、セレノネインは、マグロ類以外にもサバ類、ブリ類等の回遊性魚に広く分布することが見出された。マグロ類、カジキ類、サバ類等の回遊魚の血合筋や血液にはとくに、高レベル (5 mg Se/kg 以上) のセレノネインが分布していた。もっともセレノネインを高濃度を含むのは、クロマグロ赤血球であり、セレノネインの含有量は、51.6 mg Se/kg であった。また、ヒトや鯨類の赤血球にもこの化合物が含まれていた。

セレノネインはヘムと結合する性質があるため、セレノネイン含有量の低い組織だと、水溶性画分には抽出されてこなかった。ヘムに結合したセレノネインをメタノールで抽出し、濃縮すると、牛肝臓、ブタ心臓、ニワトリ肝臓など陸上動物に含まれる微量のセレノネインを検出することができた。

セレノネインは、セレノケトン構造を有するイミダゾール化合物である。抗酸化物質としてすでに実用化されているエルゴチオネインと比べて、さらに強いラジカル消去活性を有していた。ラジカル試薬 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) に対するラジカル消去活性 (RS_{50} 値) は 1.9 μ M と、水溶性ビタミン E 誘導体 Trolox® (RS_{50} =880) およびエルゴチオネイン (RS_{50} =1700) と比べて著しく高かった。このことから、セレノネインは食品由来の強力な抗酸化物質であると考えられる。

セレノネインは、生体内でも抗酸化能を示した。セレノネインを培養細胞、赤血球およびブリ活魚に投与すると、速やかに細胞内に取り込まれ、活性酸素種 (ROS) ・過酸化物の生成を抑制し、ヘムのメト化を抑制した (図 1)。セレノネインは赤血球、脾臓、血合筋、心筋などでは、ヘムタンパク質に結合しており、ヘモグロビンおよびミオグロビンに対するメト化を抑制したことから、ヘム鉄の自動酸化抑制に関与することが推定された。セレノネインを臍帯血管内皮由来細胞 (HUVEC) の培地に添加すると細胞増殖を促進した。

ブリ幼魚飼育試験(3週間)

セレノニン添加区では過酸化物質値が低い。
食餌由来のセレノニンは抗酸化力が高い。

control: 市販配合飼料
SeMet: セレノメチオニン添加配合飼料
SeN: セレノニン添加配合飼料

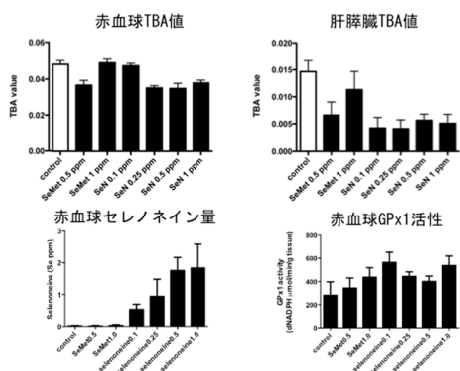


図1 ブリ幼魚へのセレノニンの投与効果

セレノニンの生理作用として、ラジカル生成の防止、捕捉したラジカル・メチル水銀のエクソソームを介する分泌、ヘム鉄の自動酸化防止、チオール基の化学修飾、セレンタンパク質遺伝子の転写・翻訳調節、レドックス状態のシグナル、DNA損傷修復、などが推定され、生体抗酸化と解毒を担うと考えられる。このことから、海洋生物では低酸素や深海環境、飢餓、高水温への適応、陸上動物では低酸素や高地への適応、過酸化物の解毒などへの関与が考えられる。

(2) セレノニンによる遺伝子発現調節
動物培養細胞へのセレノニンの投与によって、グルタチオンペルオキシダーゼ GPx1 および GPx4 の遺伝子発現が誘導された。ヒト細胞での GPx1 遺伝子の転写は、DNA 損傷におけるガン抑制遺伝子 p53 の活性化によって誘導される。セレノニンは p53 を介する GPx1 遺伝子の発現を調節する可能性が考えられる。早老症の一種アタキシア・テランジェクタシア(AT)症のヒト由来細胞では、DNA 損傷修復機構の最上流シグナルを担う ATM キナーゼを遺伝的に欠失しているが、セレノニン投与によって細胞増殖が促進されたことから、セレノニンは ATM キナーゼのリン酸化シグナルを介さない別の経路から細胞周期やアポトーシスを調節し、DNA 損傷修復作用を促進する機序が考えられた。DNA 損傷によってリン酸化され活性化した p53 は、核内に移行して p21 など細胞周期やアポトーシスに関する遺伝子発現を伴うことが知られている。ATM キナーゼの基質である p53 の転

写調節や分子シャペロン CDC48 の分泌や膜輸送、タンパク質分解などがセレノニンによって調節される可能性が考えられる。

ルシフェラーゼアッセイによって、微量なセレノニン濃度(10 pM~10 nM)でゼブラフィッシュ GPx1a 遺伝子の発現が誘導されることから、超微量のセレノニンをバイオアッセイによって検出することが可能になった。今後は、ICP-MS による機器分析と遺伝子発現系を組み合わせた分析が可能である。

魚肉由来のセレンを動物に投与する試験では、魚肉のセレンは肝臓に十分蓄積するが、GPx 活性の誘導レベルは低かったとの報告がある。マウスへのセレノニンの投与試験では、亜セレン酸に比べてセレノニンによる GPx 活性の誘導能は 1/10 程度と低く、また、セレノプロテイン P やチオレドキシシン還元酵素の遺伝子誘導は見られなかった。これらの結果は、亜セレン酸とセレノニンとは、トランスポーターや代謝経路、細胞内の局在性などの生理作用やその機序が大きく異なることを示している。亜セレン酸やセレノメチオニンなどのセレン化合物は、生体内でセレノニンやセレンタンパク質の生合成に利用される可能性が考えられる。

(3) セレノニンの生合成
放射性同位体 ^{75}Se または安定同位体 ^{76}Se を含む亜セレン酸投与によって、ゼブラフィッシュ胚に同位体で標識されたセレノニンが検出され、培養水には検出されなかった。培養した胚を冷メタノールでホモジナイズし、可溶性成分を抽出したのち、C18 逆相カラムおよび Ultrahydrogel-120 カラムを用いて、セレノニン標識化合物を精製した。この標識化合物を培養水に添加し、胚を培養したところ、セレノニンは胚に取り込まれた。また、24 時間培養後、水抽出物を分析した結果、標識されたセレンタンパク質を検出された。以上の結果から、亜セレン酸からのセレノニンの生合成経路の存在が明らかとなった。

(4) セレノニントランスポーターの同定
セレノニンの細胞内膜通過に対する特異的なトランスポーターとして、エルゴチオネントランスポーターの organic cation/carnitine transporter 1 (OCTN1)

が同定された。OCTN1 はエルゴチオネインやカルニチンなどベタイン化合物や、テトラエチルアンモニウムに対して、幅広い特異性を有することが知られている。セレノネインは、エルゴチオネインのセレンアナログであり、同一のヒスチジンベタインの骨格を有している。細胞内取り込みの Km 値は、10 μM であり、文献値と比較するとセレノネインに対する OCTN1 の Km 値が最も低いことから、セレノネインが最適な基質であることが明らかになった。このことから、OCTN1 はセレノネインの生体内の代謝動態に関与することが推定された。

ヒト OCTN1 は、腎臓近位尿細管の刷子縁膜側に高い発現が認められ、薬剤の腎臓からの排泄に重要な因子として知られている。ヒト OCTN1 は、テトラエチルアンモニウムなどの有機カチオン性化合物の輸送だけでなく、カルニチン、エルゴチオネインなどの栄養成分を輸送することも報告された。ヒト OCTN1 の遺伝子多型とリウマチ、慢性大腸炎、クローン病の発症との間に、重要な関連が見いだされた。また、クローン病や慢性大腸炎の原因の一つとしてセレン欠乏との関連性が指摘されている。これらのことから、OCTN1 がセレノネイン特異的なトランスポーターであり、セレン代謝に重要な役割を果たすことを考慮すると、OCTN1 の変異や欠損とともに、魚食によるセレノネインの供給量の低下は、生体抗酸化作用の低下をもたらす可能性が考えられる。OCTN1 変異のあるモデル動物や魚食に関する疫学調査によって、セレン代謝における OCTN1 の必須性が明らかになる必要がある。

(5) ヒトにおけるセレノネインの蓄積 魚類および哺乳類でのセレノネインの蓄積と分布を調べた結果、セレノネインは赤血球に多く含まれ、血漿にはほとんど含まれなかった。ヒトの血液でも、赤血球画分の主要なセレン化合物として、存在していた。鹿児島県離島での住民検診では赤血球の総セレン含量平均値 0.51 $\mu\text{g Se/g}$ 、セレノネイン含量平均値 0.21 $\mu\text{g Se/g}$ であった。また、未同定のセレンタンパク質も赤血球に検出された。

以前の日本人の報告例と比べ赤血球セレン含量は2倍以上高いレベルにあった。魚食の頻度の高い場合に、赤血球セレノネイン含量が高いことから、セレノネインは魚介類中心の食事によって、生体内に取り込まれ、とくに赤血球に濃縮して蓄積すると考えられた。赤血球セレノネイン含量と水銀含量との間に正の相関関係が見られた。セレノネインは赤血球におけるメチル水銀の代謝・蓄積と関係することから、メチル水銀はセレノネインを介して赤血球や他の臓器に輸送される可能性が考えられる。このとき、赤血球のセレン/メチル水銀モル比は、3.5 倍から 81 倍(平均約 42 倍)であった。セレノネイン過剰な生理状態であると考えられ、メチル水銀の解毒効果だけでなく、ガンや糖尿病など生活習慣病の予防効果が期待できる。このような魚肉の摂食条件を動物実験で再現し、赤血球中のセレンおよびメチル水銀含量をモニタリングすることによって、メチル水銀蓄積の標的となる脳神経系や肝臓、心臓、骨格筋におけるメチル水銀の蓄積と毒性、無機化を調査し、魚食由来メチル水銀のリスクを把握することができる。セレノネインの蓄積と生体抗酸化作用の増強効果との関連性を解析することによって、魚食由来のセレノネインが日本人の健康に深く関わっていることを明らかにすることができる。

(6) 魚食由来セレンと生活習慣病予防効果との関係 糖尿病の関連から、過剰なセレンはセレノプロテイン P の産生を促進し、インスリン抵抗性を高めることが報告された。米国の SELECT 研究では、前立腺ガンの発症に対するセレンとビタミン E の効果が調査されたが、セレンサプリメントの摂取によるガンの予防効果は見られず、糖尿病リスクが増大することが示された。セレンの摂取による GPx の活性化は、インスリンレセプターの下流のシグナル伝達で必要となる過酸化水素を阻害するため、インスリンシグナルを低下させ、インスリン抵抗性を増大させると推定される。また、インスリンシグナルを低下させるヘパトカインとしてセレノプロテイン P が産生される。

一方、わが国での糖尿病に関する大規模調査では、小型の魚の摂取は、とくに男性に対して、糖尿病リスクを低下させることが報告された。魚食は、セレノネインの過剰な摂取をもたらして酸化ストレスを軽減し、糖尿病リスクを低下させるのか、また、糖尿病リスクに関わる GPx 活性や血中セレノプロテイン P を誘導するのかどうかを今後検証する必要がある。

セレンはガンに対する予防効果あることが疫学調査で明らかにされている。また、動物実験では、スーパーサプリメントと呼ばれる、欠乏症が生じず、GPx などセレンタンパク質の発現が十分満たされたセレンを必要量以上摂取した過剰な条件で、ガン予防効果が生じることが知られている。これまで、セレン代謝物の中に、発ガン抑制作用がある抗酸化能の強い低分子セレン化合物の存在が示唆されている。セレノネインは、その重要な候補分子であり、単なるセレンの二次代謝物ではなく、抗酸化能をもち、DNA 損傷修復作用を活性化させる可能性と考えられる。

(7) 水産加工残滓からのセレノネインの抽出利用 サバ類やブリ類、マグロ類では、生鮮魚だけでなく、高度に加熱した缶詰やレトルト、しめさばなどの加工品にもセレノセインは検出されたが、サケやサンマではセレノネインはほとんど検出されなかった。このことから、セレノネイン含量の高い水産物は、重要なセレノネインの供給源であり、水産物に含まれる有機セレンを素材として抗酸化能を高めた食品の品質設計や開発が可能になると考えられる。魚食からのセレノネインの摂取によって、OCTN1 を介して細胞・組織内にセレノネインが取り込まれるとともに、亜セレン酸や他のセレン源からもセレノネインは生合成され、細胞内プールとして、蓄積され、セレンタンパク質の生合成やセレンレドックス機能の増強に作用すると考えられる。細胞内のセレノネインは過剰なラジカル類や重金属と複合体を形成して、細胞外・体外へと分泌排出され、解毒されると考えられる。ガンや心臓病、脳神経障害、免疫不全、2型糖尿病、老化などの生活習慣病の予防に

寄与すると考えられる (図1)。

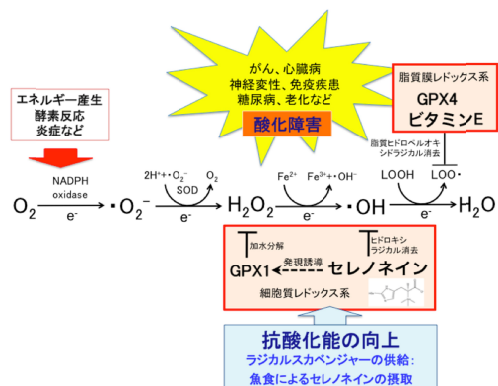


図2 セレノネイン-レドックス作用仮説図

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計10件)

Yabu T, Shiba H, Shibasaki Y, Nakanishi T, Imamura S, Touhata K, Yamashita M. Stress-induced ceramide generation and apoptosis via the phosphorylation and activation of nMase1 by JNK signaling. *Cell Death Differ.* 査読有, DOI: 10.1038/cdd.2014.128 (2014).

Yamashita M, Yamashita Y, Ando T, Wakamiya J, Akiba S. Identification and determination of selenoneine, 2-selenyl-*N,N,N*-trimethyl-L-histidine, as the major organic selenium in blood cells in a fish-eating population on remote Japanese islands. *Biol Trace Elem Res* 査読有, 156, 36-44 (2013).

山下倫明, 今村伸太郎, 藪健史, 石原賢司, 山下由美子. 水産物由来のセレン: セレノネインの栄養生理機能. *Biomed Res Trace Elements*, 査読有, 24(2), 176-184 (2013).

山下由美子, 鈴木珠水, 原竜朗, 今村伸太郎, モハメド A. ホセイン, 藪健史, 東畑顕, 山下倫明. セレン含有抗酸化物質セレノネインの静脈投与によるブリ血合筋のメト化抑制. *日水誌*, 査読有, 79, 863-868 (2013).

Yamashita M, Yamashita Y, Suzuki T, Kani Y, Mizusawa N, Imamura S, Takemoto K, Hara T, Hossain MA, Yabu T, Touhata K. Selenoneine, a novel selenium-containing compound, mediates detoxification mechanisms against methylmercury accumulation and toxicity in zebrafish Embryo, *Mar Biotechnol*, 査読有, 15, 559-570 (2013).

Yamashita Y, Yamashita M, Iida H. Selenium content in seafood in Japan. *Nutrients*, 査読有, 5, 388-395 (2013).

山下由美子, 山下倫明. 高齢化を見据えた食品開発 生活習慣病の予防効果のある食品の開発. *フードケミカル* 査読無 29,

69-74 (2013).

山下倫明, 山下由美子, 今村伸太郎, 水産物の水銀とセレン. 化学と生物, 査読有, 50, 807-817 (2012).

Yamashita Y, Yabu T, Touhata K, Yamashita M, Purification and characterization of glutathione peroxidase 1 in the red muscle of bluefin tuna. *Fish Sci*, 査読有, 78, 407-411 (2012).

Yamashita Y, Amlund H, Suzuki T, Hara T, Hossain Md.A, Yabu T, Touhata K, Yamashita M, Selenoneine, total selenium, and total mercury content in the muscle of fishes. *Fish Sci*, 査読有, 77, 679-686 (2011).

〔学会発表〕(計9件)

山下倫明, 今村伸太郎, 藪健史, 石原賢司, 山下由美子, Biological function of selenium containing imidazole compound, selenoneine, in selenium redox metabolism, 11th International Conference on Zebrafish Development and Genetics, マジソン(米国), 2014年6月
石原賢司, 佐藤洋子, 今村伸太郎, 山下由美子, 山下倫明, マウスにおける食餌セレンのセレン蛋白質遺伝子発現に対する作用, マリンバイオテクノロジー学会, 三重大学(三重県津市), 2014年6月

山下倫明, セレノネインの発見とその生理作用の解析に関する研究, 学会賞受賞講演, マリンバイオテクノロジー学会, 沖縄市町村自治会館(沖縄県沖縄市), 2013年6月

山下倫明, 今村伸太郎, モハメドAホセイン, 藪健史, 東畑顕, 石原賢司, 山下由美子, セレン含有抗酸化物質セレノネインによる低酸素適応機構, 日本生化学会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2013年9月

Yamashita M, Imamura S, Yabu T, Ishihara K, Yamashita Y, Araie H, Shiraiwa Y, Biosynthesis and metabolism of Se-containing imidazole compound, selenoneine, in zebrafish embryo, 10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine, ベルリン(ドイツ), 2013年9月

Yamashita Y, Imamura S, Yabu T, Ishihara K, Yamashita Y, Distribution of selenoneine in animal tissues and seafood, 10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine, ベルリン(ドイツ), 2013年9月

Yamashita M, Imamura S, Yabu T, Touhata K, Ishihara K, Yamashita Y, Se-containing antioxidant selenoneine in tuna blood and its roles in selenium redox metabolism and methylmercury detoxification, International Marine

Biotechnology Conference, ブリスベン(豪州), 2013年11月

山下倫明, 今村伸太郎, モハメドホセイン, アヌアル, 東畑顕, 藪健史, 山下由美子, Strong antioxidant activity of the novel selenium-containing imidazole compound, selenoneine, 米国生化学会, サンディエゴ(米国), 2012年4月

山下倫明, 山下由美子, 鈴木珠水, 今村伸太郎, 原竜朗, モハメドホセイン, 藪健史, 東畑顕, 石原賢司, The strong antioxidant selenoneine in tuna blood and its roles in selenium redox, アジア太平洋マリンバイオテクノロジー国際会議, 高知市文化プラザかるぼーと(高知県高知市), 2012年7月

〔図書〕(計2件)

魚食と健康-メチル水銀の生物影響, 山下倫明・鈴木敏之・横山芳博編. 恒星社厚生閣 160 (2014).

Selenoneine in Marine Organisms, Yamashita M, Yamashita Y. Springer Handbook of Marine Biotechnology, Springer, 1059-1070 (2015).

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 倫明 (YAMASHITA Michiaki)

独立行政法人水産総合研究センター・中央水産研究所・グループ長

研究者番号: 80344323

(2) 研究分担者

山下 由美子 (YAMASHITA Yumiko)

独立行政法人水産総合研究センター・中央水産研究所・主任研究員

研究者番号: 50371852

今村 伸太郎 (IMAMURA Shintaro)

独立行政法人水産総合研究センター・中央水産研究所・主任研究員

研究者番号: 80510007

藪 健史 (YABU Takeshi)

日本大学・生物資源科学部・研究員

研究者番号: 00551756