

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790161

研究課題名（和文）新規セレン化合物ポリセレノジチオールの活性開拓および
セレン代謝ネットワーク解明研究課題名（英文）Pioneering activities of novel selenium compounds polyselenodithiols
leading to elucidation of selenium metabolism network

研究代表者

植田 康次（UEDA KOJI）

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：30351092

研究成果の概要（和文）：セレン（Se）代謝ネットワークの解明を目指しながら、Seの必須性と毒性、あるいは抗がん活性の基盤となるSeの化学および分子メカニズムについて検討した。チオール基（-SH）を含み生体内に豊富に存在するグルタチオンなどの分子が、Seの還元的代謝を促すとともに、未知の新しい反応機序に基づく継続的な酸素ラジカル発生サイクルを形成することを見出した。Se代謝ネットワークの全貌解明は、チオールとの化学によって大きく進展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Selenium (Se) is remained to be elucidated in its metabolism network, through which biological effects of Se such as nutritional essentiality, toxicity, and anti-carcinogenic activity are exerted. We have investigated the basic chemical mechanisms underlying the biological effects of Se. The results indicate that thiols stimulate metabolism of Se and continuous production of oxygen radicals. Se metabolism network will be understood in the chemistry with thiols.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：セレン代謝，チオール，セレノトリスルフィド，活性酸素，抗がん活性

1. 研究開始当初の背景

(1) セレンの有用性と有害性

セレン（Se）の生理作用は、抗酸化作用をはじめ、様々な臓器に対する抗がん作用、生殖および脳機能への影響など多岐にわたる。Seには、生理的な必要量における生体必須元素としての役割とともに、薬理的用量においてがん選択的な細胞障害作用が認められている。しかし、わずかな過量で毒性が現れる有効濃度域の狭いデリケートな栄養成分でもあるため、Seの生理的・薬理的な効果を安

全に引き出すためには、代謝および毒性の基盤となる分子機序についての理解を深める必要がある。Seの有用性と有害性の分岐点を規定する機序の詳細については未解明な部分が多く残されており、その基盤となるSe代謝ネットワークの全貌解明が望まれている。

(2) Seタンパク質とセレノトリスルフィド

生体内においては大部分のSeがタンパク質と結合していると考えられている。遺伝子デコーディング（翻訳）時に活性中心にセレ

ノシステイン (Sec) を導入される「Sec タンパク質」, 遺伝子上の Sec 導入シグナルに依存せず翻訳後に Se を結合する「Se 結合タンパク質」, メチオニンに代わってセレノメチオニン (Sem) を持つ「Sem タンパク質」, Se が非特異的に付着した「Se 含有タンパク質」など多様な形態がある. Sec タンパク質以外の Se タンパク質における Se の存在意義や Se チャージの機序はほとんど分かっていないが, いくつかの研究報告により, チオール (RSH) との反応で生成するセレノトリスルフィド (RSSeSR) の体内 Se 運搬における重要性が示唆された.

(3) Se 代謝とセレノトリスルフィド

有機・無機の様々な化学形で摂取された Se 化合物は, いずれも吸収後にいったん分解されてセレニ化物イオン (セレナイド, Se^{2-}) へと還元された後に各種の Se タンパク質に取り込まれると考えられている. この Se の還元的代謝には生体内チオールであるグルタチオン (GSH) が関与するといわれている. 薬理的な投与形態である亜セレン酸 (H_2SeO_3) は生理的条件下において GSH と非酵素的に反応し, セレノトリスルフィドの一種セレノジグルタチオン (GSSeSG) を生成する. さらに, 細胞内に多量に存在する GSH によりセレニ化水素 (H_2Se) あるいはセレニ化水素イオン (HSe^-) となる. その後, 酸素により元素 Se (Se^0) となる際に, スーパーオキシドアニオンや過酸化水素などの活性酸素種が生成し, 金属の関与により生体損傷性のヒドロキシルラジカルが発生すると考えられていた.

2. 研究の目的

われわれの研究グループが独自に作出した, セレノトリスルフィド発展型化合物である「多核 Se 架橋チオール (RSSe_nSR)」をツールとして用いながら, Se 代謝ネットワークおよび Se 毒性発現機序に関する知見を得ることを目指した.

3. 研究の方法

Se 化合物として亜セレン酸 H_2SeO_3 , セレン酸塩 CaSe を用いた. Se チオール複合体は, 亜セレン酸とグルタチオン GSH との定量的あるいは Se 過剰反応により得たセレノジグルタチオン GSSeSG およびポリセレノジチオール GSSe_nSG を高速液体クロマトグラフィー-HPLC にて分取精製して用いた. 細胞障害性/DNA 損傷性/活性酸素の種類および生成量等への影響について, それぞれ, 生細

胞特異的蛍光試薬, アネキシン V 蛍光染色フローサイトメトリー/電気化学的酸化グラニン検出 HPLC, コメットアッセイ, プラスミド DNA 切断試験/活性酸素消去酵素, 金属キレート剤, ラジカル消去剤等を用いて測定・評価した.

4. 研究成果

Se の代謝およびその過程で生じる毒性について, 当初計画したポリセレノ体に先んじて単一 Se からなるセレノジチオールをモデルに研究を開始した. 研究の結果, チオールは Se とのセレノジチオール形成に加え, Se の還元的代謝, および活性酸素生成においても重要な役割を果たすことを明らかにした. 以下に, 本研究により得られた知見およびそれらの考察と展望を述べる.

(1) セレノジグルタチオンの重要性

Se の第一次代謝中間体であるセレノジグルタチオン (GSSeSG) は, 高い抗がん活性に着目した長年の研究の歴史にもかかわらず, その生理的役割および生体内反応の分子機序が未解明であることが判明した. 酸素ラジカル生成におけるグルタチオンの必須性から, GSSeSG は, Se 代謝にともなう活性酸素生成においても重要な役割を果たしている可能性が示唆される. また, 代謝中間体であるセレノパースルフィド (GSSeH) は, 高い反応性が予想されることから, タンパク質性チオールへの結合などに関する新しい研究の展開が見込まれる.

(2) チオールによる Se の活性制御

GSSeSG を含むチオール Se 架橋体 (セレノジチオールあるいはセレノトリスルフィド) は, 再構成系では DNA を酸化的損傷から保護するものの, 細胞に対しては, 同濃度域において DNA 一本鎖切断とアポトーシス誘導を引き起こした. Se の持つ「必須性と毒性 (あるいは細胞障害性)」という二面性の一端が現れたものと考えられる.

(3) Se による生体内チオールの機能攪乱

Se の細胞障害性には, 生体内に豊富に存在するグルタチオンが主に関与すると考えられるものの, その反応は各種チオールに共通の機序によるものであることを示した. この結果は, 「チオールが Se を活性化した」と同時に「Se がチオールを活性化した」とも解釈することができる. 生体内反応において広範な役割を果たしているチオールの化学を攪乱してしまうことが

Se による障害の本態である可能性が考えられる。

(4) 非フェントン反応による活性酸素生成
亜セレン酸 (SeO_3^{2-}) から GSSeSG やセレナイド (Se^{2-}) を経て元素 Se を生じる経路が提案されているが、ここでの酸素ラジカルの発生が従来いわれている鉄などの遷移金属に依存した、いわゆる「フェントン反応」ではないことを示した。Se による活性酸素生成は毒性学分野で認められた事実であるが、その機序として「非」フェントン反応を想定している研究はなく、代替メカニズムの解明が急がれる。

(5) 元素 Se のリサイクル反応
グルタチオンによる元素 Se の還元による活性酸素生成の反応サイクル形成を示唆する結果を得た。元素 Se は不溶性で生体反応には関与しないとされているが、従来考えられていた Se 代謝の袋小路ではない可能性がある。これに関連する事例として、Se 煙霧への曝露事故等で見られる気管支や肺の炎症は、元素 Se と気道上皮の粘膜中に含まれるグルタチオンとの反応によるものかもしれない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件, 関連文献を含む)

(1) Koji Ueda, Motozumi Ando, Yoshinori Okamoto, Nakao Kojima: Manganese neurotoxicity: Interplay with iron in catecholaminergic oxidative stress. *J. Res. Inst. Meijo Univ.* 12, (2013) in press. <http://www.meijo-u.ac.jp/sougou/sougou/ronbun/index.html>

(2) 植田康次, 鈴木千帆, 山本 京, 岡本誉士典, 小嶋仲夫: セレン代謝中間体セレノジグルタチオンの生理機能: 細胞死誘導および DNA 損傷作用. *日本衛生学雑誌*, 67, 313 (2012). <http://www.nacos.com/jsh/main/journal.html>

(3) Yoshihiko Nishino, Motozumi Ando, Rena Makino, Koji Ueda, Yoshinori Okamoto, and Nakao Kojima: Different mechanisms between copper and iron in catecholamines-mediated oxidative DNA damage and disruption of gene expression in vitro. *Neurotox. Res.*, 20, 84-92 (2011) DOI 10.1007/s12640-010-9226-7.

[学会発表] (計 14 件)

(1) 塩見卓也, 近 祥太朗, 植田康次, 岡本誉士典, 小嶋仲夫: セレン代謝中間体セレノジグルタチオンとチオール化合物との複合反応による酸化ストレスの誘導. 日本薬学会第 133 年会 (横浜) 平成 25 年 3 月 30 日

(2) 植田康次, 近 祥太朗, 塩見卓也, 岡本誉士典, 小嶋仲夫: セレンの細胞障害機構の検討: チオール, セレン化水素, 活性酸素の役割. 第 12 回分子予防環境医学研究会 (つくば) 平成 25 年 2 月 2 日

(3) 近 祥太朗, 鈴木千帆, 山本 京, 植田康次, 岡本誉士典, 小嶋仲夫: セレンによる細胞傷害性: チオール化合物との反応を介する活性酸素生成. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学会 2012 (岐阜) 平成 24 年 11 月 18 日

(4) 植田康次, 鈴木千帆, 山本 京, 岡本誉士典, 小嶋仲夫: セレンの細胞傷害性にはチオールとの反応を介して生成する活性酸素が関与する. 第 3 回メタロミクス研究フォーラム (東京) 平成 24 年 8 月 30 日

(5) Chiho Suzuki, Miyako Yamamoto, Koji Ueda, Yoshinori Okamoto, and Nakao Kojima: Involvement of reactive oxygen species in cytotoxic mechanisms of selenodiglutathione. 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (Sendai, Japan) 平成 24 年 7 月 20 日

(6) 鈴木千帆, 山本 京, 植田康次, 岡本誉士典, 小嶋仲夫: セレン代謝中間体セレノジグルタチオンによる細胞傷害性機構への活性酸素種の関与. 第 39 回日本毒性学会学術年会 (仙台) 平成 24 年 7 月 18 日

(7) 山本 京, 鈴木千帆, 植田康次, 岡本誉士典, 小嶋仲夫: セレノジグルタチオンの酸化的 DNA 損傷に対する生体内チオール化合物の影響. 第 58 回日本薬学会東海支部総会・大会 (静岡) 平成 24 年 7 月 7 日

(8) 鈴木千帆, 山本 京, 植田康次, 岡本誉士典, 小嶋仲夫: Selenium-mediated oxidative DNA damage via selenodiglutathione formation. 第 22 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム SRM2012 (金沢) 平成 24 年 5 月 31 日

(9) 鈴木千帆, 山本 京, 植田康次, 岡本誉士典, 小嶋仲夫: セレン代謝中間体セレノジグルタチオンによる酸化的 DNA 損傷を

伴う細胞傷害作用. 日本薬学会第 132 年会
(札幌) 平成 24 年 3 月 29 日

(10) 植田康次, 鈴木千帆, 山本 京, 岡本
誉士典, 小嶋仲夫: セレン代謝中間体セレ
ノジグルタチオンの生理機能: 細胞死誘導
および DNA 損傷作用. 第 82 回日本衛生学
会学術総会 (京都) 平成 24 年 3 月 25 日

(11) 鈴木千帆, 山本 京, 植田康次, 岡本
誉士典, 小嶋仲夫: 酸化的 DNA 損傷活性
を伴う細胞傷害作用を示すセレン代謝中
間体セレノジグルタチオン. 第 2 回学生フ
ォーラム (名古屋) 平成 24 年 3 月 10 日

(12) 鈴木千帆, 山本 京, 高木麻衣, 戸邊
隆夫, 岡本誉士典, 植田康次, 小嶋仲夫:
細胞内酸化ストレスレベルに対するセレ
ン代謝中間体セレノジグルタチオンの影
響. メタロチオネインおよびメタルバイオ
サイエンス研究会 2011 (名古屋) 平成 23
年 12 月 9 日

(13) 山本 京, 高木麻衣, 戸邊隆夫, 岡本
誉士典, 植田康次, 小嶋仲夫: セレノジグ
ルタチオンによる細胞内酸化ストレスの
揺らぎ. フォーラム 2011 衛生薬学・環境
トキシコロジー (金沢) 平成 23 年 10 月
28 日

(14) 戸邊隆夫, 高木麻衣, 安藤基純, 西田
博之, 伊藤和男, 植田康次, 岡本誉士典,
小嶋仲夫: セレン架橋グルタチオン
GSSeSG による酸化的 DNA 損傷の制御.
第 57 回日本薬学会東海支部総会・大会 (名
古屋) 平成 23 年 7 月 9 日

[その他] 解説記事

(1) 植田康次: 内分泌かく乱物質の見過ごさ
れていた作用点. ファルマシア, 48, 158
(2012).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 康次 (UEDA KOJI)
名城大学・薬学部・助教
研究者番号: 30351092

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究連携者

なし