

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32624

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659022

研究課題名(和文) オンサイト分析可能な尿中セレン量の新規定量手法の開発

研究課題名(英文) Development of novel on-site analysis of urinary selenometabolites

研究代表者

小椋 康光(Ogra, Yasumitsu)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40292677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：尿中のセレン代謝物がセレン糖であることに着眼し、それを検出するため、レクチンを利用した検出系の構築を試みた。LC-ICP-MSおよび表面プラズモン共鳴装置によりレクチンとセレン糖との相互作用を検討したが、双方の機器で検出できるほどの相互作用は検出されなかった。研究の過程で生体試料中に未知のセレン代謝物の存在が確認できたため、その同定も併せて実施した。当初企図したレクチンによるセレン糖の検出は、予想通りチャレンジングな課題であったが、その過程でセレノシアン酸という新たな代謝物の同定に結び付いた。本研究の成果の一部は、研究代表者が実施した「ひらめき ときめきサイエンス」に取り入れた。

研究成果の概要(英文)：In this project, we intended to establish a novel technique for detection of urinary selenosugar by lectins. Three lectins, i.e., soybean lectin, lectin from Dolichos biflorus and wheat germ agglutinin were used on the basis of their sugar specificities. No interactions between selenosugar and the lectins were detected by an LC-inductively coupled plasma-mass spectrometer and a detector of surface plasmon resonance (Biacore). As expected initially, the aim of this study was very challenging but suitable for a feasibility study. In addition, during the sample preparation, a novel selenium metabolite, selenocyanate, was detected and identified in biological samples.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：セレン ICP-MS セレン糖 表面プラズモン共鳴 スペシエーション 尿

1. 研究開始当初の背景

セレンは動物体内で、グルタチオンペルオキシダーゼやチオレドキシシンレダクターゼなどの活性中心に要求される必須微量元素である。セレンは典型元素と金属元素の両方の物理化学的性質を併有した元素であり、酵素の活性中心では、システインの硫黄原子がセレン原子に置き換わったセレノシステインとして、ペプチド鎖に組み込まれた状態で存在している。このように同族元素の硫黄と類似した生体内挙動を示す一方で、生体により硫黄と厳密に識別されて代謝される経路も知られている。その代表的な例が、排泄経路であるが、永い間セレンがどのような化学形態で体外に排泄されるか明らかになっていなかった。2002年に申請者は、尿中に排泄されるセレンがセレン含有糖(1 β -methylseleno-N-acetyl-D-galactosamine)であることを初めて明らかにした。

セレンは適正所要量の狭い栄養素であり、生体内にプールとして機能するタンパク質が存在しないため、静脈栄養管理中の患者ではセレンの欠乏症が、一方でセレンが上述の抗酸化酵素に含まれることからセレンサプリメントとして服用する健康人にセレンの過剰症が生じることがある。通常の生活では、多くの日本人のセレンの摂取量は適正範囲内にあるが、欠乏症や毒性による症状が致命的になることもあり、正確なセレンの栄養状態を把握する必要性は高い。軽度中毒量から適正所要量以下のセレンを摂取しているヒトでは、生体内のセレンの栄養状態は尿中のセレン量に反映されるため、尿中セレン量の測定が重要な指標となり得るが、セレンの定量には大型の分析機器が必要である。

本研究では、尿中に排泄されるセレン代謝物が糖であることに着目し、セレン糖に特異的に反応するレクチンを探索し、それを利用した簡便で臨床現場でオンサイト分析が可能な検査キットの開発を目指すことを着想した。

2. 研究の目的

上述の通り、生体内のセレンの栄養状態は、セレンが尿中に排泄されることから、尿中のセレン量に反映されている。現在のところ、尿中に排泄される極微量のセレンを定量するためには、大掛かりな分析装置が必要である。申請者のこれまでの成果から、適正所要量以下では、尿中に排泄されるセレンは、セレン含有糖という化学形態であることが示されている。そこで本研究では、レクチンを用いた機器分析に匹敵する高感度なセレン含有糖の分析手法を考案し、セレンの栄養状態を臨床現場等で、簡便にオンサイト分析できるような手段を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) セレン糖に特異的に反応するレクチンの探索

セレン糖に特異的に反応するレクチンは知られていなかったため、商業的に利用可能なレクチンについて、SPRとICP-MSを用いて、レクチンのセレン糖との反応を特異性および定量性という観点からスクリーニングを行うこととした。

まず、セレン糖と同じ糖骨格を有するN-アセチルガラクトサミンに特異性を示すドリコスマメレクチン(DBA)、小麦胚レクチン(WGA)およびダイズレクチン(SBA)を対象に検討を開始した。

SPRを用いた検討ではレクチンを固定化し、セレン糖を含めた各種の糖の溶液を用いて、試験に供するレクチンの特異性を検討した。また反応性を定量化するために、HPLCと結合させたICP-MS(HPLC-ICP-MS)を利用して、遊離セレン糖とレクチン結合セレン糖とを分離検出可能か検討した。

(2) セレン代謝物の同定

実験に供するセレン糖の調製を培養細胞により行おうとしたところ、培養細胞では実験動物とは異なるセレンの代謝物が存在することが確認できた。この構造を同定するため、ICP-MSに加え、四重極型飛行時間型ハイブリッド質量分析計(ESI-Q-TOF-MS)など各種質量分析計を用いた検討を行った。

4. 研究成果

当初の計画に従い、尿中のセレン糖を検出するため、セレン糖が1 β -methylseleno-N-acetyl-D-galactosamineという構造であることから、その構造内の糖骨格に着目し、ダイズレクチン(SBA)、ドリコスマメレクチン(DBA)および小麦胚レクチン(WGA)を利用した検出系の構築を試みた。最初にHPLCと誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)を組み合わせたLC-ICP-MSにより、これらレクチンとセレン糖との相互作用を検討した。しかし、LC-ICP-MSで測定可能な相互作用は検出されなかった。そこで、レクチンを表面プラズモン共鳴装置(SPR)のセンサーチップに固定し、セレン糖やその類縁化合物であるN-アセチルガラクトサミンやN-アセチルグルコサミンとの相互作用を測定した。SBAを固定したセンサーチップを用いたところ、セレン糖にわずかに反応したものの、定量的な検出には至ることができなかった。しかし、レクチンを用いてセレン糖を検出するという評価系の構築には成功したものと考えている。また研究の過程で培養細胞中に未知のセレン代謝物の存在が確認できた。そこでLC-ICP-MSやESI-Q-TOF等

の各種質量分析計を用いての同定も併せて実施したところ、セレノシアン酸という新たなセレン代謝物の同定に成功した。またこれらの研究を実施中の間に、類金属元素を含む新たな代謝物の同定に関する分析方法の改良を行い、応用的な研究を実施することにより、予想以上の成果を得ることができた。これらの結果は当初企図したレクチンによるセレン糖の検出は、予想通りチャレンジングな課題であり、必ずしも想定した結論を得るには至らなかったが挑戦的萌芽研究の成果としては意義のあるものであったと自己評価している。今後可能であれば、より多くのレクチンを本研究で構築した評価系を用いてスクリーニングし、セレン糖の定量的分析に供することが可能なレクチンを探索したい。また、それを用いた簡便なオンサイト分析法開発への挑戦も継続して行きたいと考えている。

本研究の成果の一部は、平成 24 年度と平成 25 年度に研究代表者が実施した JSPS の事業である「ひらめき ときめきサイエンス」に取り入れた。

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 14 件)(* 査読無と記載のないものは査読有)

1. M. Nakamura, T. Ochiai, M. Noji, Y. Ogra, K.T. Suzuki, N. Yoshimoto, M. Yamazaki, K. Saito: An improved tolerance to cadmium by overexpression of two genes for cysteine synthesis in tobacco. *Plant Biotech.* (2014) in press
2. 小椋康光: 哺乳類細胞における銅の恒常性維持の分子機構. *日本衛生学会誌* (2014) **69**, 136-145
3. S. Fujimoto, T. Tsuji, N. Itsumura, Y. Anan, Y. Ogra, T. Kimura, Y. Miyamae, S. Masuda, M. Nagao and T. Kambe: Cooperative functions of ZnT1, metallothionein and ZnT4 in the cytoplasm are required for full activation of TNAP in the early secretory pathway. *PLOS ONE* (2013) **8**, e77445, doi: 10.1371/journal.pone.0077445
4. Y. Anan, M. Yoshida, S. Hasegawa, R. Katai, M. Tokumoto, L. Ouerdane, R. Łobiński and Y. Ogra: Speciation and identification of tellurium-containing metabolites in garlic, *Allium sativum*. *Metallomics* (2013) **5**, 1215-1224, doi: 10.1039/c3mt00108c
5. Y. Anan, Y. Hatakeyama, M. Tokumoto and Y. Ogra: Behavior of selenoproteins in rat serum detected by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Sci.* (2013) **29**, 787-792
6. Y. Ogra, A. Katayama, Y. Ogihara, A.

Yawata and Y. Anan: Analysis of animal and plant selenometabolites in roots of a selenium accumulator, *Brassica rapa var. peruviridis*, by speciation. *Metallomics* (2013) **5**, 429-436, doi: 10.1039/c2mt20187a

7. Y. Anan and Y. Ogra: Toxicological and pharmacological analysis of selenohomolanthionine in mice. *Toxicol. Res.* (2013) **2**, 115-122
8. 小椋康光: スペシエーションによるセレン及びテルルのメタボローム解析. *生化学* (2013) **85**, 519-530
9. 小椋康光, 四方田千佳子: 「誘導結合プラズマ発光分光分析法及び誘導結合プラズマ質量分析法」について. *日本薬局方フォーラム* (2013) **22**, 674-676 (査読無)
10. 小椋康光: ICP-AES と ICP-MS の一般試験法への新規収載. *ファームテックジャーナル* (2012) **28**, 2791-2794 (査読無)
11. Y. Ogra and Y. Anan: Selenometabolomics explored by speciation. *Biol. Pharm. Bull.* (2012) **35**, 1863-1869
12. 小椋康光: スペシエーションを基盤としたメタロミクス研究の展開. *分析化学* (2012) **61**, 513-522
13. Y. Anan, Y. Awaya, Y. Ogihara, M. Yoshida, A. Yawata and Y. Ogra: Comparison in accumulation of lanthanide elements among three *Brassicaceae* plant sprouts. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* (2012) **89**, 133-137, doi: 10.1007/s00128-012-0665-0
14. Y. Anan, A. Ohbo, Y. Tani, Y. Hatakeyama, A. Yawata and Y. Ogra: Distribution and metabolism of selenite and selenomethionine in Japanese quail. *Metallomics* (2012) **4**, 457-462, doi: 10.1039/c2mt20013a

[学会発表](計 50 件)

1. Maki Tokumoto, Natsuko Kutsukake, Erika Yamanishi, Yasumi Anan, Yasumitsu Ogra: Evaluation of arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase activity to tellurite.: The 53rd Annual Meeting of the Society of Toxicology (Arizona, USA), 2014.03
2. 阿南弥寿美, 谷 祐太, 海藤智仁, 加藤祐, 小椋康光: 鳥類における無機水銀の母卵間移行と亜セレン酸の抑制効果: 日本薬学会第 134 回年会 (熊本), 2014.03
3. Yasumitsu Ogra (招待講演): Alternative metabolic pathway of selenium in mammalian cell lines.: The 1st Franco-Japanese Workshop on Metallomics (Pau, France), 2013.07
4. Yasumitsu Ogra (招待講演): Speciation and imaging of bio trace elements.: The 86th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (International

- symposium, Yokohama, Japan), 2013.09
5. Yasumitsu Ogra (招待講演): Identification of novel tellurium metabolites in selenium-accumulating plants.: Xth International Society for Trace Element Research in Humans (Tokyo), 2013.11
 6. 吉田美雪、小椋康光 (依頼講演): セレン蓄積性植物 *Allium sativum* におけるテルル代謝物の解析: 日本薬学会第133回年会 (横浜), 2013.03
 7. 栗屋佑美、阿南弥寿美、徳本真紀、小椋康光: *Allium sativum* による類金属吸収能力の比較: 日本薬学会第133回年会 (横浜), 2013.03
 8. 畠山佳子、徳本真紀、阿南弥寿美、小椋康光: 血清中セレンタンパク質のげっ歯類における種差の解析: 日本薬学会第133回年会 (横浜) 平成25年3月, 2013.03
 9. 手島 彩、徳本真紀、石塚雄大、阿南弥寿美、小椋康光: ラット副腎髄質由来褐色細胞 PC12 の神経細胞分化における銅の作用の解明: 第23回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (東京), 2013.06
 10. 小椋康光、木村桃子、徳本真紀、阿南弥寿美: 培養細胞内における新規セレン代謝物の生成とその機能: 第24回日本微量元素学会学術集会 (大阪), 2013.06
 11. 阿南弥寿美、吉田美雪、長谷川早喜、徳本真紀、小椋康光: セレン蓄積性植物におけるテルル代謝物の同定: 40回日本毒性学会学術年会 (千葉), 2013.06
 12. 阿南弥寿美、林 真理奈、木村桃子、徳本真紀、小椋康光: 亜セレン酸を曝露した HepG2 細胞における新規セレン代謝物の同定: 第40回日本毒性学会学術年会 (千葉), 2013.06
 13. Yasumi Anan, Miyuki Yoshida, Saki Hasegawa, Ryota Katai, Maki Tokumoto, Laurent Ouerdane, Ryszard Łobiński, Yasumitsu Ogra: Identification of tellurium metabolite in the selenium accumulator plant, garlic exposed with tellurate.: 4th International Symposium on Metallomics (Oviedo, Spain), 2013.07
 14. Maki Tokumoto, Natsuko Kutsukake, Yasumi Anan, Yasumitsu Ogra: Evaluation of recombinant human arsenic (+3 oxidative state) methyltransferase for the methylation of tellurite *in vitro*.: 4th International Symposium on Metallomics (Oviedo, Spain), 2013.07
 15. Aya Tejima, Maki Tokumoto, Yudai Ishizuka, Yasumi Anan, Yasumitsu Ogra: Changes in the copper concentration and the expression of copper-regulating genes during the differentiation of pheochromocytoma, PC12, to neural cells.: 4th International Symposium on Metallomics (Oviedo, Spain), 2013.07
 16. Yuta Tani, Tomohito Kaito, Yasumi Anan, Yasumitsu Ogra: Effect of selenium on transfer of mercury to eggs in Japanese quails.: 4th International Symposium on Metallomics (Oviedo, Spain), 2013.07
 17. Momoko Kimura, Yasumi Anan, Marina Hayashi, Maki Tokumoto, Yasumitsu Ogra: Identification of selenium metabolite in cultured cells and elucidation of its biological roles.: 4th International Symposium on Metallomics (Oviedo, Spain), 2013.07
 18. 谷 祐太、阿南弥寿美、海藤智仁、小椋康光: 亜セレン酸を摂取した産卵期ニホンウズラにおける水銀体内分布: 第22回環境化学討論会 (東京), 2013.07
 19. 吉田美雪、阿南弥寿美、長谷川早喜、徳本真紀、小椋康光: セレン蓄積性植物における無機テルル代謝機構の解明: 第22回環境化学討論会 (東京), 2013.07
 20. 荻原友里絵、徳本真紀、阿南弥寿美、小椋康光: セレン蓄積性植物における有機セレン化合物の蓄積及び代謝機構の解析: 第22回環境化学討論会 (東京), 2013.07
 21. 海藤智仁、谷 祐太、阿南弥寿美、小椋康光: 亜セレン酸を摂取したウズラにおける卵へ水銀移行と分布にセレンが及ぼす影響: 第22回環境化学討論会 (東京), 2013.07
 22. 阿南弥寿美、木村桃子、長谷川早喜、徳本真紀、小椋康光: 培養細胞で検出されるセレン代謝物の同定およびその生体内挙動の解析: フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー (福岡), 2013.09
 23. 徳本真紀、手島 彩、畠山直大、阿南弥寿美、小椋康光: 神経細胞分化における銅の蓄積変化: フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー (福岡), 2013.09
 24. 沓掛夏子、徳本真紀、阿南弥寿美、小椋康光: 組換え3価ヒ素メチル化酵素の類金属に対する活性評価: フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー (福岡), 2013.09
 25. 山西絵利加、徳本真紀、阿南弥寿美、小椋康光: 類金属曝露が3価ヒ素メチル化酵素に与える影響: フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー (福岡), 2013.09
 26. Yasumitsu Ogra, Momoko Kimura, Saki Hasegawa, Maki Tokumoto, Yasumi Anan: Identification of selenium metabolite in cultured cells and elucidation of its biological role.: 10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine (Berlin, Germany), 2013.09

27. Yasumi Anan, Yuta Tani, Tomohito Kaito, Yasumitsu Ogra: Distribution and maternal transfer of mercury in Japanese quails ingesting sodium selenite.: 10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine (Berlin, Germany), 2013.09
28. 徳本真紀, 原 友里, 八幡紋子, 鈴木 薫, 小泉信滋, 小椋康光: 重金属依存性転写活性化におけるメタロチオネインの影響: メタルバイオサイエンス研究会 2013 (静岡), 2013.09
29. 徳本真紀, 山西絵利加, 小椋康光: 類金属代謝における3価ヒ素メチル化酵素の役割: メタルバイオサイエンス研究会 2013 (静岡), 2013.09
30. 畠山直大, 徳本真紀, 手島 彩, 阿南弥寿美, 小椋康光: PC12 細胞の神経分化による銅に対する感受性の変化: メタルバイオサイエンス研究会 2013 (静岡), 2013.09
31. 長谷川早喜, 徳本真紀, 阿南弥寿美, 小椋康光: ラットにおける新規セレン代謝物セレノシアネートの生体内挙動の解析: 第57回日本薬学会関東支部大会(東京), 2013.10
32. 小椋康光 (招待講演): スペシエーションを用いた細胞内銅制御機構の解明: 第23回日本微量元素学会(京都), 2012.07
33. Yasumitsu Ogra (招待講演): Speciation of selenium- and tellurium-metabolites in animals and plants.: The 2nd Korea-China Joint Seminar on Selenium in Nutrition, Biochemistry and Cancer (Seoul, Korea), 2012.11
34. Yasumitsu Ogra (招待講演): Recent advances in speciation of metal/metalloid metabolites.: 2012 Singapore/Japan Joint Meeting on Biometals (Singapore), 2012.11
35. 片井涼太, 阿南弥寿美, 徳本真紀, 小椋康光: テルル含有アミノ酸の合成とその生物活性評価: 第22回金属の関与する生体関連反応シンポジウム(金沢), 2012.06
36. Yasumi Anan, Yoshiko Hatakeyama, Maki Tokumoto, Yasumitsu Ogra: Speciation of serum selenoproteins in mammals by HPLC-ICP-MS.: 7th International Franco-Spanish Workshop on Bio-Inorganic Analytical Chemistry (Gijón, Spain), 2012.06
37. 大保 愛, 谷 祐太, 阿南弥寿美, 小椋康光: セレン化合物を投与したウズラにおけるセレンの化学形態分析: 21回環境化学討論会(松山), 2012.07
38. 谷 祐太, 大保 愛, 阿南弥寿美, 小椋康光: セレン化合物を投与したウズラにおけるセレンの体内分布と排泄: 第21回環境化学討論会(松山), 2012.07
39. 阿南弥寿美, 大保 愛, 谷 祐太, 畠山佳子, 八幡紋子, 小椋康光: ウズラにおける無機および有機セレン化合物の蓄積と代謝物の解析: 第39回日本毒性学会学術年会(仙台), 2012.07
40. 片山文音, 荻原友里絵, 八幡紋子, 阿南弥寿美, 小椋康光: アブラナ科植物における有機セレン化合物の代謝機構の解明: 第39回日本毒性学会学術年会(仙台), 2012.07
41. Yasumi Anan, Ai Ohbo, Yuta Tani, Yoshiko Hatakeyama, Ayako Yawata, Yasumitsu Ogra: Distribution and metabolism of inorganic- and organic selenocompounds in Japanese quail.: The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (仙台), 2012.07
42. Ayane Katayama, Yurie Ogihara, Ayako Yawata, Yasumi Anan, Yasumitsu Ogra: Metabolism of organic selenometabolites in brassicaceae family plants.: The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (仙台), 2012.07
43. 大保 愛, 谷 祐太, 阿南弥寿美, 小椋康光: 化学形態分析による鳥類特異的なセレン代謝経路の解析: 第3回メタロミクス研究フォーラム(東京), 2012.08
44. 谷 祐太, 大保 愛, 阿南弥寿美, 小椋康光: ニホンウズラにおけるセレンの体内分布及び排泄の経時変化: 第3回メタロミクス研究フォーラム(東京), 2012.08
45. 林真理奈, 木村桃子, 杉山尚樹, 徳本真紀, 阿南弥寿美, 小椋康光: HepG2細胞における亜セレン酸曝露後のセレンのスペシエーション: 第3回メタロミクス研究フォーラム(東京), 2012.08
46. 片山文音, 荻原友里絵, 徳本真紀, 阿南弥寿美, 小椋康光: セレン蓄積性植物における有機セレン化合物の代謝機構の解明: 第3回メタロミクス研究フォーラム(東京), 2012.08
47. 吉田美雪, 長谷川早喜, 阿南弥寿美, 小椋康光: 亜テルル酸を曝露したニンニクにおけるテルル代謝物の解析: 第3回メタロミクス研究フォーラム(東京), 2012.08
48. 林真理奈, 木村桃子, 杉山尚樹, 徳本真紀, 阿南弥寿美, 小椋康光: HepG2細胞における新規セレン代謝物の各種質量分析法によるスペシエーション: 日本分析化学会第61年会(金沢), 2012.09
49. 阿南弥寿美, 谷 祐太, 海藤智仁, 徳本真紀, 小椋康光: ウズラ卵における必須および毒性元素の分布と化学形態分析: 日本分析化学会第61年会(金沢), 2012.09
50. 阿南弥寿美, 畠山佳子, 徳本真紀, 小椋

康光：齧歯類における血清中セレンタン
パク質の解析：フォーラム 2012 衛生薬
学・環境トキシコロジー（名古屋）、
2012.09

〔図書〕(計3件)

1. 小椋康光(分担執筆):化学形態別分析、
pp. 93-97、毒性の科学、熊谷嘉人、姫野
誠一郎、渡邊知保編、東京大学出版会、
東京(2014)
2. 小椋康光(分担執筆):生物学辞典第5
版、巖佐庸、倉谷滋、斎藤成也、塚
谷雄一編、岩波書店、東京(2013)
3. 小椋康光(分担執筆):食品中の微量元
素、米谷民雄編、日本食品衛生協会、東
京(2013)

〔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

<http://www.shoyaku.ac.jp/labosite/eisei/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小椋 康光(OGRA, Yasumitsu)
昭和薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 40292677

(2) 研究分担者

阿南 弥寿美(ANAN, Yasumi)
昭和薬科大学・薬学部・講師
研究者番号: 40403860

(3) 研究分担者

徳本 真紀(TOKUMOTO, Maki)
昭和薬科大学・薬学部・助教
研究者番号: 90614339