

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292078

研究課題名(和文) 血漿セレノプロテインPによるセレン運搬機構の解明

研究課題名(英文) Selenium-transport mechanism of selenoprotein P

研究代表者

齋藤 芳郎 (Saito, Yoshiro)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号：70357060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：セレノプロテインP (SeP) は、必須微量元素セレンを含む血漿蛋白質である。SeP は、細胞にセレンを運ぶトランスポーターとしての機能を有する。しかしながら、SePのセレン運搬メカニズムは未だ不明な点が多い。本研究では、骨格筋や膵臓、リンパ球など複数の細胞系でSeP受容体を同定した。さらに、親和性の異なる受容体を発見し、そのセレン運搬機構の違いを明らかにした。以上、SePのセレン運搬機構の分子メカニズムが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Selenoprotein P (SeP) is plasma selenoprotein containing essential trace element selenium. SeP functions as a transporter of selenium, delivering selenium to the cells. However, details of selenium-transport mechanisms of SeP remain unknown. In the present study, we identified SeP receptors in several tissues such as skeletal muscle, pancreas, and lymphocytes. Further, we identified SeP receptors with different affinity for SeP, and found a different molecular pathway to transport selenium of SeP to the cells. Collectively, we revealed selenium-transport mechanisms of SeP.

研究分野：生化学 細胞生物学

キーワード：トランスポーター セレン 受容体

### 1. 研究開始当初の背景

セレノプロテイン P (SeP) は、必須微量元素セレンを含む血漿タンパク質である。SeP は、細胞にセレンを運ぶトランスポーターとしての機能を持つ。SeP は、生体内で酸化ストレス防御に重要な役割を果たしているが、その一方で、SeP が過剰に存在すると糖尿病のリスクが増加する。セレンの栄養学的な重要性や疾患との関係が明らかになってきているが、SeP のセレン運搬メカニズムは未だ不明な点が多かった。

### 2. 研究の目的

本研究では、SeP によるセレン運搬の第一ステップとなる細胞膜表面の SeP 受容体を同定する。次に、SeP に含まれるセレンがどのようにして細胞内のセレン含有タンパク質に取り込まれるか、分子レベルで解明する。以上の研究により、SeP のセレン運搬メカニズムを解明することを目的として行う。

### 3. 研究の方法

SeP の細胞表面への結合および SeP 受容体の同定を行った。<sup>75</sup>Se 標識 SeP を用いて、細胞膜への特異的な結合や親和性を明らかにした。これまでに報告されている LRP8 (ApoER2) やメガリンの発現解析を Real time PCR 法を用いて行った。SeP 受容体の発現が不明な細胞については、SeP-受容体複合体をクロスリンクし、この複合体に反応する抗体を選別した。さらに、免疫学的手法を用いて SeP 受容体を精製し、質量分析法を用いて SeP 受容体を同定した。SeP の細胞内取り込みは、SeP 存在下で培養した細胞を洗浄後、細胞可溶化物を調製し、可溶化物中の SeP 量から見積もった。SeP のセレン運搬作用は、細胞内セレン含有タンパク質であるグルタチオンペルオキシダーゼ 1 (GPx1) の発現量から評価した。標的分子が SeP 受容体として機能するかは、siRNA によるノックダウンにより確認した。本研究では、骨格筋や膵β細胞、Tリンパ球細胞モデルにおける SeP 受容体を解析した。実験に用いた SeP タンパク質は、ヒト血漿から精製して用いた。

### 4. 研究成果

以下、論文報告 (発表論文①) に至った骨格筋における SeP 受容体について得られた結果を主に記す。

#### (1) <sup>75</sup>Se 標識 SeP 解析系の構築

ヒト SeP を発現するヒト肝がん由来 HepG2 細胞に、<sup>75</sup>Se を添加し、三日間培養した。培養後、培養上清を回収し、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーにより

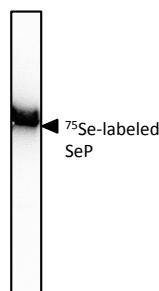


図1 <sup>75</sup>Se標識SePの純度確認

上清中に分泌された <sup>75</sup>Se 標識 SeP を部分精製した。精製した <sup>75</sup>Se 標識 SeP を SDS-PAGE により分離し、オートラジオグラフィーにより単一バンドを示すことを確認した (図1)。<sup>75</sup>Se 標識 SeP のタンパク濃度は、サンドイッチ ELISA 法を用いて決定した。

#### (2) <sup>75</sup>Se 標識 SeP を用いた結合アッセイ系の構築

精製した <sup>75</sup>Se 標識 SeP を対象となる細胞に可変量添加し、4°C で 1 時間反応した。反応後、細胞を洗浄し、細胞を可溶化させた。可溶化物中の <sup>75</sup>Se 量により SeP 結合量を評価した。また、SeP の特異的な結合は、500 倍量の未標識 SeP 存在下における <sup>75</sup>Se 結合量との差から求めた。図2に、骨格筋由来 C2C12 筋細胞における SeP 結合解析の結果を示した。筋分化した C2C12 細胞において、SeP の特異的な結合が観察された。

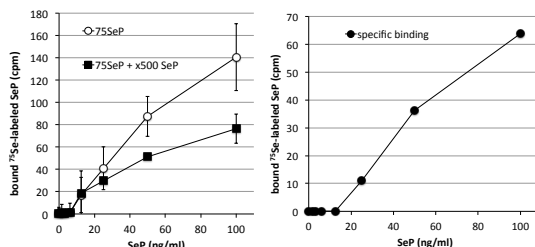


図2 骨格筋由来C2C12筋細胞におけるSePの特異的結合  
筋分化C2C12に可変量の<sup>75</sup>Se標識SePを添加し、4°Cで1時間反応した(左図・<sup>75</sup>SeP)。同条件において、500倍量の未標識SeP存在下でも反応した(左図・<sup>75</sup>SeP+x500 SeP)。両者の差から、SePの特異的な結合を算出した(右図)。

#### (3) SeP 受容体の KO 細胞における SeP 結合解析

骨格筋では、SeP 受容体として報告されている ApoER2 やメガリンの発現量が低かったが、LRP1 の顕著な発現が認められた。そこで、LRP1 に対する siRNA 系を構築し、SeP 結合解析を行った。LRP1 をノックダウンした C2C12 細胞において、SeP の特異的な結合の低下が認められ、LRP1 が SeP 受容体として機能すると考えられた (図3)。

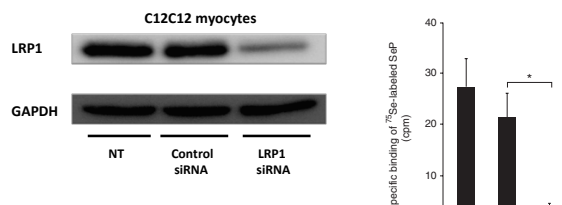


図3 LRP1欠乏細胞におけるSeP結合の低下  
筋分化C2C12にLRP1 siRNAをトランスフェクトし、3日間培養後、細胞可溶化物を調製した。LRP1に対する抗体を用いたWestern blot解析から、LRP1の低下を確認した(左図)。各処理細胞において、SeP結合解析を行い、SePの特異的な結合量を評価した(右図)。

#### (4) SeP 受容体のノックダウンによる SeP の細胞内取り込みおよびセレン運搬の低下

SeP 受容体のノックダウンにより、SeP の細胞内取り込みやセレン運搬が抑制されるか検討した。その結果、LRP1 をノックダウン

した筋分化 C2C12 において、細胞内への SeP 取り込み量および細胞内セレン含有タンパク質レベルの低下が認められた。

ヒト横紋筋由来 RD 細胞では、SeP 受容体候補分子として、LRP8 (ApoER2) および LRP1 の発現が認められた。そこで、両者の受容体が SeP の取り込み寄与するか、各受容体候補分子の siRNA 系を構築し、SeP の細胞内取り込みおよびセレン運搬作用がどのように変化するか解析を行った。RD 細胞における LRP1 siRNA の効果を図 4 に示した。

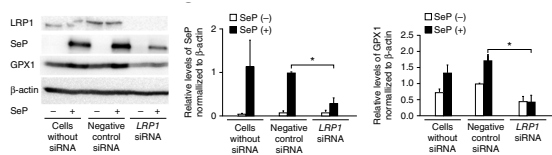


図4 LRP1欠乏細胞におけるSeP取り込みおよびセレン運搬の低下

ヒト横紋筋由来RD細胞にLRP1 siRNAをトランスフェクトし、LRP1欠乏細胞を調製した。各処理細胞において、SePを添加し、24時間培養後、細胞可溶化物を調製した。可溶化物中の各タンパク質量をWestern blotで評価した(左図)。同実験を3回実施し、LRP1結合細胞において、SePの細胞内取り込み(中央図)および細胞内セレン含有蛋白質の指標であるGPx1レベル(右図)の低下を認めた。

図4の結果から RD 細胞に発現している LRP1 が SeP 受容体として作用し、SeP のセレン運搬作用に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。次に、RD 細胞に発現している LRP8 (ApoER2) も機能するか、同じく RD 細胞に対して siRNA を用いて検証した。

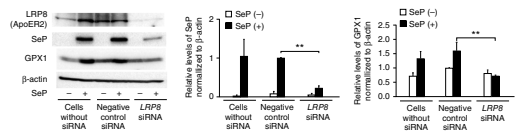


図5 LRP8欠乏細胞におけるSeP取り込みおよびセレン運搬の低下

ヒト横紋筋由来RD細胞にLRP8 siRNAをトランスフェクトし、LRP8欠乏細胞を調製した。各処理細胞において、SePを添加し、24時間培養後、細胞可溶化物を調製した。可溶化物中の各タンパク質量をWestern blotで評価した(左図)。同実験を3回実施し、LRP8結合細胞において、SePの細胞内取り込み(中央図)および細胞内セレン含有蛋白質の指標であるGPx1レベル(右図)の低下を認めた。

図5に LRP8 に対する siRNA の効果について検証した結果を示した。LRP8 の欠乏によっても、SeP の細胞内取り込みが低下し、セレン運搬作用が抑制された。この結果から、LRP1 と LRP8 の両方を発現する RD 細胞において、両方の受容体が、SeP の細胞内取り込みおよびセレン運搬作用に寄与することが明らかとなった。

以上、SeP のセレン運搬に関与する受容体が明らかとなり、SeP の細胞内取り込みおよびセレン運搬の解析系を確立することができた。類似の方法を用いることで、膵β細胞やリンパ球での SeP 受容体が明らかとなった。

#### (5) SeP 中和抗体の作用

SeP 受容体に関する研究から培った SeP の

細胞内取り込みやセレン運搬作用の解析系を応用し、SeP のセレン運搬作用を抑制する中和抗体のスクリーニングを行った。その結果、研究室で作製した SeP に対するモノクローナル抗体の内、AE2 が最も強いセレン運搬抑制作用を持つことが明らかとなった。培養細胞系で認められた AE2 の SeP 中和作用を、*in vivo* でも検証を行った。ヒト SeP 投与 2 時間前に AE2 抗体を投与し、各組織への SeP の取り込み、セレン運搬作用に対する AE2 の効果を検証した。その結果、骨格筋における SeP の取り込みおよびセレン運搬作用の抑制効果が認められた(図6)。この結果から、SeP 中和抗体 AE2 は、*in vivo* においても機能すると考えられた。

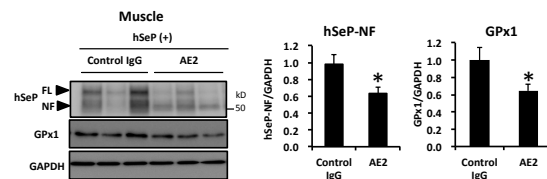


図6 SeP中和抗体AE2の投与によるセレン運搬作用の抑制

C57BL/6Jマウスに、SeP中和抗体AE2を投与後、ヒトSePを投与した。還流後、各組織を摘出した。骨格筋をホモジネートし、調製した可溶化物中の各タンパク質量をWestern blotで評価した(左図)。同実験を複数回実施し、各バンドの定量値から骨格筋におけるSePの取り込み(SeP-NF、中央図)およびGPx1レベル(右図)を評価した。AE2投与群において、SePレベルおよびGPx1レベルの有意な低下が認められた。

これまでに、ヒト SeP の投与により、C57BL/6J マウスのインスリン抵抗性が増加し、耐糖能異常が生じることが明らかとなっている。AE2 が SeP のセレン運搬作用の抑制効果を示したことから、AE2 投与による耐糖能の改善効果について検討した。その結果、図7に示すように、SeP 投与による耐糖能異常(血糖値の増加)が、AE2 抗体投与により有意に低下した。

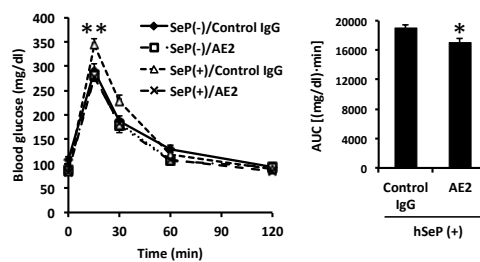


図7 SeP中和抗体AE2の投与による耐糖能異常の改善効果

C57BL/6Jマウスに、SeP中和抗体AE2を投与後、ヒトSePを投与した。投与マウスにおいて、糖負荷試験を行い、各時間において血糖値を測定した。その結果、AE2投与により、SeP投与による耐糖能異常(血糖値の増加)が有意に改善した(左図)。左図から求めたAUC(Area Under the Curve)においても、AE2の有意な効果を認めた(右図)。

以上の結果から、SeP の結合およびセレン運搬作用を抑制する中和抗体 AE2 が、SeP により誘導される耐糖能異常を抑制することが明らかとなった。

#### (6) まとめ

以上の研究から、SeP によるセレン運搬作

用の分子メカニズムが明らかとなり、各細胞における受容体の存在が明らかとなった。また、SeP の細胞内取り込みやセレン運搬作用を評価する系を確立することができた。本研究の発展から、SeP のセレン運搬作用を抑制する中和抗体が同定され、SeP により誘導される耐糖能異常を抑制できることが示された。今後、各臓器における受容体の役割および糖尿病態で増加した SeP による各組織の障害メカニズムが明らかとなり、SeP の基礎研究が医薬品開発や糖尿病予防へと発展することが期待される。

#### 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 9 件)

- ① H Misu, Y Saito (3 番目), N Noguchi (23 番目), 他 21 名 (2017) Deficiency of the hepatokine selenoprotein P increases responsiveness to exercise in mice through upregulation of ROS and AMPK in muscle. *Nature Med*, **23**, 508-516 (査読有り) doi: 10.1038/nm.4295
- ② B Sowrirajan, Y Saito (2 番目), N Noguchi (10 番目), その他 10 名 (2017) Interleukin-27 Enhances the Potential of Reactive Oxygen Species Generation from Monocyte-derived Macrophages and Dendritic cells by Induction of p47<sup>phox</sup>. *Sci Rep*, **7**, 43441 (査読有り) doi:10.1038/srep43441
- ③ Y Saito, N Noguchi (2016) Oxidized Lipoprotein as a Major Vessel Cell Proliferator in Oxidized Human Serum. *PLoS ONE*, **11**, e0160530 (査読有り) doi: 10.1371/journal.pone.0160530
- ④ Y Saito (1 番目), Noriko Noguchi (11 番目), その他 9 名 (2015) Enhancement of lipid peroxidation and its amelioration by vitamin E in a subject with mutations in the *SBP2* gene. *J Lipid Res*, **56**, 2172-2182 (査読有り) doi: 10.1194/jlr.M059105
- ⑤ M Tanaka, Y Saito (2 番目), K Takahashi (11 番目), その他 9 名 (2016) Development of a sol particle homogeneous immunoassay for measuring full-length selenoprotein P in human serum. *J Clin Lab Anal*, **30**, 114-122 (査読有り) doi: 10.1002/jcla.21824
- ⑥ K Ishikura, Y Saito (16 番目), K Takahashi (19 番目), その他 20 名 (2014) Selenoprotein P as a diabetes-associated hepatokine that impairs angiogenesis by inducing VEGF resistance in vascular endothelial cells. *Diabetologia*, **57**, 1968-1976 (査読有り) doi: 10.1007/s00125-014-3306-9
- ⑦ H Takayama, Y Saito (4 番目), その他 13 名 (2014) Metformin Suppresses Expression of the Selenoprotein P gene via an AMPK-FoxO3a Pathway in H4IIEC3 Hepatocytes. *J Biol Chem*, **289**, 335-45 (査読あり) doi: 10.1074/jbc.M113.479386
- ⑧ B A Muzembo, Y Saito (8 番目), K Takahashi (9 番目), その他 7 名 (2013) Serum selenium and selenoprotein P in patients with silicosis. *J Trace Elem Med Biol*, **27**, 40-44 (査読あり) doi: 10.1016/j.jtemb.2012.05.003
- ⑨ Y Saito, N Noguchi (2014) 7-Hydroxycholesterol as a possible biomarker of cellular lipid peroxidation: Difference between cellular and plasma lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Comm*, **446**, 741-744 (査読有り) doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.083

[学会発表] (計 24 件)

- ① 齋藤芳郎「セレノプロテイン P と糖代謝一瞬 B 細胞の機能調節について」第 6 回 Metabolism Scientific Forum、ステーションコンファレンス東京 (東京都・千代田区)、17 December 2016
- ② 堺菜穂子、齋藤芳郎ら Jurkat 細胞の Selenoprotein P 取り込みに関与する ApoER2 の同定 第 39 回日本分子生物学会、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)、2 December 2016
- ③ S Inari, Y Saito et al. Selenoprotein P-neutralizing antibody ameliorates glucose intolerance and insulin resistance, insulin secretion SFRBM's 23th Annual Meeting, San Francisco (USA), 19 November 2016
- ④ Y Saito Increased Selenoprotein P as a Therapeutic Target of Type 2 Diabetes The 6th International Selenium Conference (Se 2016), Guangzhou (China), 21 October 2016
- ⑤ 三田雄一郎、齋藤芳郎ら Selenoprotein P の中和抗体によるインスリン抵抗性及び分泌能の改善 第 69 回日本酸化ストレス学会、仙台国際センター (宮城県・仙台市)、30 August 2016
- ⑥ 中山華穂、齋藤芳郎ら 糖尿病関連タンパク質セレノプロテイン P の中和抗体を用いた新規 2 型糖尿病治療の検討 日本薬学会第 136 年会、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)、29 March 2016
- ⑦ 齋藤芳郎「血漿セレン含有タンパク質セレノプロテイン P を標的としたテーラーメイド型糖尿病治療—診断薬および治療薬の開発」日本薬学会第 136 年会一般シ

- ンポジウム S29-2、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）、28 March、2016
- ⑧ 稲荷尚吾、齋藤芳郎ら 膵β細胞モデル MIN6 は過剰な Selenoprotein P により障害を受ける 第 88 回日本生化学会・第 38 回日本分子生物学会年会 合同年会 (BMB2015)、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)、3 December 2015
- ⑨ 齋藤芳郎 「血漿セレン含有タンパク質セレノプロテイン P のレドックス制御機能—2 型糖尿病の治療標的として」 第 10 回レドックス 170 委員会、慶應義塾大学先端生命科学研究所メタボロームキャンパス レクチャーホール (山形県・鶴岡市)、20 August、2015
- ⑩ 齋藤芳郎ら 血漿セレン含有タンパク質セレノプロテイン P を標的とした 2 型糖尿病の抗体医薬の開発 第 67 回日本ビタミン学会、奈良県新公会堂 (奈良県・奈良市)、5 June 2015
- ⑪ 齋藤芳郎ら *SBP2* 変異によるセレン含有タンパク質欠乏患者におけるコレステロールの酸化—細胞膜と血漿リポタンパク質の酸化反応の違い 第 57 回日本脂質生化学会、一橋大学一橋講堂 (東京都・千代田区)、28 May 2015
- ⑫ 稲荷尚吾、齋藤芳郎ら 血漿セレン含有タンパク質 Selenoprotein P による膵臓β細胞障害のメカニズム解析 第 62 回日本生化学会近畿支部例会、立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県・草津市)、16 May 2015
- ⑬ 齋藤芳郎ら 「セレン含有タンパク質が低下した *SBP2* 変異患者におけるビタミン E の投与および投与中止に伴う変化」 第 26 回ビタミン E 研究会、北里大学白金キャンパス (東京都・港区)、10 January 2015
- ⑭ Y Saito, et al. Enhancement of Oxidative Stress and Its Amelioration by Vitamin E in a Subject with Mutations in the Selenocysteine Insertion Sequence-Binding Protein 2 (*SBP2*) Gene. SFRBM's 21th Annual Meeting, Seattle (USA), 21 November 2014.
- ⑮ 齋藤芳郎 「2 型糖尿病のテーラーメイド治療を目指した抗体医薬の開発」 東大医科研究学友会セミナー、東京大学医科学研究所 (東京都・港区)、5 November 2014
- ⑯ 吉岡佑弥、齋藤芳郎ら セレノプロテイン P は分解経路・非分解経路を介して細胞内へセレンを供給する 第 87 回日本生化学会、京都国際会館 (京都府・京都市)、18 October 2014
- ⑰ 齋藤芳郎 血漿セレノプロテイン P によるセレン代謝制御と 2 型糖尿病 第 25 回日本微量元素学会、岡山大学津島キャンパス (岡山県・岡山市)、3 July 2014
- ⑱ 中山華穂、齋藤芳郎ら インスリン抵抗

- 性バイオマーカー “セレノプロテイン P” の中和抗体の探索および *in vivo* での評価—新規 2 型糖尿病の治療薬創成を目指して 第 134 回日本薬学会、熊本大学薬学部 (熊本県・熊本市)、30 March 2014
- ⑲ Y Mita, Y Saito, et al. The cellular uptake of SeP is inhibited by SeP specific antibodies 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRRI2014), Kyoto (Japan), 23 March 2014
- ⑳ Y Saito, et al. Development of new therapy of type 2 diabetes targeting to the insulin-resistance biomarker, Selenoprotein P 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRRI2014), Kyoto (Japan), 24 March 2014
- 21 Y Saito 7-hydroxycholesterol as a possible biomarker of cellular lipid peroxidation—difference between cellular and plasma lipid peroxidation 3<sup>rd</sup> ENOR Symposium Oxysterols: Markers and Pathways, Swansea (UK), 20 September 2013
- 22 Y Saito, et al. Study of selenium supply mechanism of selenoprotein P using <sup>75</sup>Se and immunological methods 10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine, Berlin (Germany), 16 September 2013
- 23 Y Saito, et al. Development of human selenoprotein P measurement system as a possible biomarker of insulin resistance in type 2 diabetes 10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine, Berlin (Germany), 15 September 2013
- 24 吉岡佑弥、齋藤芳郎ら <sup>75</sup>Se および免疫学的手法を用いたセレノプロテイン P のセレン運搬機構の解析 第 86 回日本生化学会、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)、12 September 2013

[図書] (計 1 件)

- ① 齋藤芳郎 (2016) セレンの生物学—セレノプロテインの機能と疾患 細胞工学 (学研メディカル秀潤社)、35、240-246

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：2 型糖尿病患者の治療薬選択の補助方法、治療薬の効果予測方法及び検査方法  
 発明者：御簾博文、金子周一、竹下有美枝、篁俊成、田中睦、齋藤芳郎  
 権利者：同上  
 種類：特許  
 番号：特許願 2014-184499  
 出願年月日：平成 26 年 9 月 10 日  
 国内外の別：国内

名称：2型糖尿病の治療及び／又は予防薬  
発明者：齋藤芳郎、吉岡佑弥、中山華穂、西藤有希奈、三田雄一郎、野口範子  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特許願 2013-175612  
出願年月日：平成 25 年 8 月 27 日  
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://systemlifescience.wixsite.com/system-life-science>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 芳郎 (SAITO, Yoshiro)  
同志社大学・生命医科学部・准教授  
研究者番号：70357060

### (2) 連携研究者

野口 範子 (NOGUCHI, Noriko)  
同志社大学・生命医科学部・教授  
研究者番号：40198578

高橋 和彦 (TAKAHASHI, Kazuhiko)  
北海道薬科大学・基礎教育系・教授  
研究者番号：10113581