

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32624

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870739

研究課題名(和文)海棲生物に存在するセレン化合物の生体内代謝および環境毒性学的機能の解析

研究課題名(英文)Metabolism and toxicological significances of selenocompound found in marine organisms

研究代表者

阿南 弥寿美 (ANAN, Yasumi)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40403860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：必須微量元素であるセレンは生体内で様々なセレンタンパク質に利用される他、水銀の解毒作用を有する。本研究では海棲生物の主要なセレン化学形態であるセレノネインについて、動物生体内における生物学的利用や代謝、および水銀解毒への関与を検証した。まず *in vitro* アッセイにより、セレノネインと水銀との直接的な反応性は低いことが示唆された。動物実験により、セレノネインは消化管吸収されやすく、肝臓に蓄積されたことから、セレン栄養源として有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Selenium (Se) is an essential micronutrient because it promotes the activity of various selenoenzymes. Se is also known for playing a role in detoxification of mercury. In this study, we focused on metabolism and toxicological significances of selenoneine, a major selenocompound found in marine organisms. *In vitro* assay revealed that selenoneine did not interact with mercury, suggesting that it may not play a role in the detoxification of Hg. To evaluate the bioavailability and metabolism of selenoneine, we administered selenoneine extracted from marine fishes to Wistar rats. Analysis of Se distribution in the rat body showed that selenoneine was absorbed efficiently, and accumulated mainly in the liver. It suggested that selenoneine is useful as nutritional selenium source in animals.

研究分野：環境生物化学

キーワード：セレン 水銀 ICP-MS LC-ICP-MS 化学形態分析

1. 研究開始当初の背景

海洋環境には天然賦存または人間活動に由来する様々な元素が遍在している。海棲生物の重金属蓄積に関する研究は世界各地で実施されており、海洋汚染のモニタリングや、主に魚介類について、ヒトが摂取する場合の安全性に着目した報告が多くなされてきた。重金属の代謝経路や毒性影響を評価するうえで、生体内に存在する金属含有化合物やタンパク質の分離分析、すなわち存在状態の解析は重要な情報をもたらす。近年、分析機器の発達に伴い、金属の総濃度だけではなく、個々の化学形態に着目した影響評価がされている。

セレンは生体必須元素の一つで、セレノシステインの形でグルタチオンペルオキシダーゼなどのセレン酵素の活性中心として機能する。一方、セレンは栄養量と毒性量の値が他の必須微量元素に比べ近く、毒性の強い元素という側面も持つ。また、セレンは水銀の毒性を直接的または間接的に軽減することが知られている。動物実験では、無機水銀と亜セレン酸の同時投与により互いの毒性が軽減されることが報告されている。海洋生態系において、水銀は食物連鎖を通じて生物濃縮するため、生態系の高次に位置する海棲哺乳類や海鳥類の組織では高濃度の水銀が検出されるが、これらの水銀はセレンと等モルで蓄積している。これは、セレンと水銀が生体内でモル比 1 : 1 の複合体を形成することで生理活性を低下させることから、水銀解毒作用の一つと考えられている。

これまでに、ウミガメ類や一部の魚類では水銀解毒に関与しないセレンを高濃度に蓄積することが報告されており、最近の我々の研究により、ウミガメ類に高濃度蓄積するセレンの大部分はセレノネイン (selenoneine, 2-selenyl- $N^{\alpha},N^{\alpha},N^{\alpha}$ -trimethyl-L-histidine) であることが明らかとなった。セレノネインは近年マグロの血中から同定された新規セレン化合物である。しかしながら、哺乳類生体内におけるその生理機能や代謝経路は不明である。

2. 研究の目的

(1) 様々な動物種におけるセレン代謝物のスクリーニング

これまでに主に海産魚類やウミガメ類の主要セレン代謝物として検出されてきたセレノネインについて、他の動物種のスクリーニングを行い、生態系におけるセレン代謝物の蓄積特性を解析する。

(2) 哺乳類生体内におけるセレノネインの代謝経路の解明

実験動物 (ラット) を用いた投与実験を行い、ヒトがセレノネインを摂取した場合の生体利用や代謝機構を評価する。また、ヒトが陸上生態系由来の食物およびサプリメントから摂取する主要なセレン化合物であるセレノメチオニンと比較し、ヒトにとって効率

の良いセレン摂取経路を検証する。

(3) セレノネインの水銀解毒への関与の解析
セレノネインの直接的あるいは間接的な水銀解毒作用の有無について、*in vitro* および *in vivo* 実験により解析する。

以上より、海棲生物で見出されるセレン化合物の生物学的および毒性学的意義について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 様々な動物種におけるセレン代謝物のスクリーニング

① 試料の収集

スーパーマーケットにおいて数種の食用魚類および鳥類 (肝臓) を購入した。また、実験動物として販売されているニホンウズラと、愛媛大学生物環境試料バンクに保存されている数種の海棲哺乳類の肝臓を分析に供した。試料は分析まで -40°C で保管した。

② 化学分析

各動物種の肝臓を湿式灰化し、セレンおよび水銀濃度をそれぞれ誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) と還元気化水銀分析装置 (CV-AAS) で測定した。また、各肝臓から可溶性画分を調製し、マルチモードゲル濾過カラムを用いた LC-ICP-MS によりセレンと水銀のスペシエーション分析を行った。

(2) 哺乳類生体内におけるセレノネインの代謝経路の解明

① セレノネインの調製

(1) の実験にて高濃度のセレノネインを含むことが確認された魚試料からセレノネインを抽出した。

② ラットを用いた動物実験

6 週齢雄性 Wistar ラットにセレン欠乏餌と ^{82}Se -亜セレン酸を含む水を 4 週間与え飼育した。セレンとして栄養量のセレノネインと、比較としてセレノメチオニンを単回または 1 週間連続で経口投与した。それぞれ代謝ケージで飼育し、投与から 24 時間後 (1 週間連続投与の群は最後の投与から 24 時間後) に解剖し、各臓器組織、血液、および 24 時間尿とフンを採取した。

③ 化学分析

投与したセレン化合物の体内分布を明らかにするために、得られた各試料を湿式灰化し、セレン濃度を D_2 リアクションモードの ICP-MS で測定した。測定時には m/z 77 と 82 を検出し、投与した Se 化合物 (セレノネインまたはセレノメチオニン) と、飼育中の飲料水に由来する内在のセレンを定量値および同位体比より算出した。

セレンタンパク質への利用を評価するために、血清を LC-ICP-MS で分析し、血清中のセレンタンパク質である細胞外グルタチオンペルオキシダーゼ (eGPx) とセレノプロテイン P (SeIP) を検出した。

また、セレノネインの生体内代謝経路および代謝効率を評価するために、尿中のセレン

代謝物を LC-ICP-MS で分析した。

(3)セレノネインの水銀解毒への関与の解析

① *In vitro* アッセイ

魚類から抽出したセレノネインを用い、無機水銀と *in vitro* で反応させ、反応液を LC-ICP-MS および四重極飛行時間型質量分析装置 (Q-TOF-MS) で分析した。また、比較として亜セレン酸、セレノシアン酸との反応性についても評価した。

②ニホンウズラを用いた動物実験

通常餌と精製水または亜セレン酸を含む水を与えて約 2 週間飼育した産卵期の雌性 WE 系ニホンウズラに無機水銀を経口投与し、卵および排泄物を 1 週間採取した。1 週間後に解剖し、各臓器組織および血液を採取した。

③化学分析

(1)と同様の手法により、セレンおよび水銀を分析した。

4. 研究成果

(1)様々な動物種におけるセレン代謝物のスクリーニング

食用として市販されている魚類の分析の結果、カツオの内臓やマグロの血合い肉において高濃度のセレノネインが、主要なセレン化合物として検出された。食用の鳥 (鶏) 肝臓のセレン濃度は低く、セレノネインも検出されなかったが、興味深いことに実験動物として利用されているニホンウズラの肝臓において、セレノネインが検出された。ニホンウズラ飼育時に使用した飼料からも微量のセレノネインが検出されたため、鳥類はセレノネインを蓄積しやすい/排泄しにくいことが示唆された。さらに、海洋生態系の高次に位置する海棲哺乳類 (キタオットセイ、イシイルカ) においても肝臓可溶性画分からセレノネインが検出されたことから、餌から摂取されたセレノネインは生体内において蓄積性を示すことが推察された。

(2)哺乳類生体内におけるセレノネインの代謝経路の解明

①実験に用いるラットの内在性セレンの置換の確認

セレンとして栄養量のセレノネインを摂取した時の生体内利用能や代謝を評価するためには、内在性のセレンと投与した化合物由来のセレンを区別して検出する必要がある。そこで、セレン安定同位体の 1 つである ^{82}Se で作成した ^{82}Se -selenite 水とセレン欠乏餌をラットに与え、ラットの内在性セレンを ^{82}Se -rich にすることで、投与したセレン化合物由来のセレンを検出する方法を検討した。上記の条件で 4 週間飼育したラットにおいて、肝臓や腎臓など主要な臓器のセレンは 80% 以上が ^{82}Se に置き換わっていた。投与するセレン化合物由来のセレンを m/z 77 で、内在性のセレンを m/z 82 で検出し、同位体比を用いて補正することで、栄養量レベルのセレンを

摂取しても検出が可能であることが確認された。

②セレノネインの体内分布

魚類から抽出したセレノネイン、または比較としてセレノメチオニンを①のラットに経口投与し、採取した臓器、全血および尿中のセレン濃度を定量した。検出されたセレンの総和から算出したセレノネインの消化管吸収効率は 90% 以上であり、セレノアミノ酸の 1 つであるセレノメチオニンと同様に極めて高いことが示された。また、体内分布においては、セレノメチオニンが腎臓で高濃度を示すのに対し、セレノネインは肝臓に最も集積した。

③セレノネインの生物学的利用と代謝

セレノメチオニンを投与したラットにおいて、セレノメチオニンに由来するセレンの血清中セレンタンパク質への取り込みは、単回投与群 (投与 24 時間後) において確認され、連続投与群ではさらに増加した。一方、セレノネインを投与したラットでは、単回投与群では取り込みがみられず、連続投与群では eGPx、SelP への取り込みが確認されたものの、セレノメチオニン投与群と比べ低いピークであった。

また、尿中セレン代謝物も同様に、セレノメチオニンは速やかにメチル化セレン糖 (1B-methylseleno-N-acetyl-D-galactosamine) やトリメチルセレノニウムに代謝され尿中排泄されたのに対し、セレノネインのこれらの代謝物への代謝および尿中排泄は緩やかであった。

以上より、セレノネインはセレノメチオニンに比べ体内に留まりやすく、セレン貯蔵源として有用であると示唆された。

(3)セレノネインの水銀解毒への関与の解析

① *In vitro* におけるセレノネインと無機水銀の反応性の評価

魚類から抽出したセレノネインと無機水銀を *in vitro* で反応させ、LC-ICP-MS および Q-TOF-MS で分析したところ、いずれの分析結果においてもセレノネインと無機水銀の複合体は検出されなかった。従って、セレノネインは無機水銀との直接的な相互作用による水銀解毒効果を示さないと考えられた。

②ニホンウズラ生体内における水銀との相互作用

(1)の実験において、ニホンウズラは餌に由来するセレノネインを生体内に蓄積する可能性が示されたことから、ニホンウズラ生体内における水銀との相互作用を解析した結果、亜セレン酸と無機水銀の同時投与時に、肝臓可溶性画分に存在するセレノネインが減少した。このことから、生体内においてセレノネインは間接的に水銀解毒に関与している可能性が示唆された。

現在、この作用の詳細は不明であるが、今後、ラットなど哺乳類の実験動物を用いた検証や、減少したセレンの化学形態変化の追跡を行うことにより、セレンの毒性学的意義、特に水銀解毒への関与について明らかにな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3件) 全て査読有り

1. Anan Y, Nakajima G, Ogra Y. Complementary use of LC-ICP-MS and LC-ESI-Q-TOF-MS for selenium speciation. *Anal Sci*, 31, in press, 2015.
2. Anan Y, Ohbo A, Tani Y, Ogra Y. Metabolic pathway of inorganic and organic selenocompounds labeled with stable isotope in Japanese quail. *Anal Bioanal Chem*, 406, 7959-7966, 2014.
doi: 10.1007/s00216-014-8260-3
3. Anan Y, Hatakeyama Y, Tokumoto M, Ogra Y. Chromatographic behavior of selenoproteins in rat serum detected by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Sci*, 29, 787-792, 2013.
<http://doi.org/10.2116/analsci.29.787>

[学会発表] (計10件)

1. 内田茉莉, 北里歩夢, 阿南弥寿美, 小椋康光. 水銀とセレンシアン酸または亜セレン酸を投与したラットにおける水銀とセレンの体内分布. フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー, 平成 26 年 9 月 19 日-20 日, つくば国際会議場, (茨城県つくば市).
2. 碓井聡美, 阿南弥寿美, 小椋康光: 培養細胞におけるセレン化合物による無機水銀の毒性軽減作用の解析. フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー, 平成 26 年 9 月 19 日-20 日, つくば国際会議場, (茨城県つくば市).
3. Anan Y, Tani Y, Kaito T, Ogra Y. Speciation of selenium and mercury in the liver of Japanese quails ingesting sodium selenite and mercury chloride. 14th Workshop on Progress in Trace Metal Speciation for Environmental Analytical Chemistry, 平成 26 年 8 月 31 日-9 月 4 日, アバディーン (英国).
4. 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, 平成 26 年 3 月 27 日-30 日, 熊本市総合体育館 (熊本市).

5. Anan Y, Tani Y, Kaito T, Ogra Y. Distribution and maternal transfer of mercury in Japanese quails ingesting sodium selenite. 10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine, 平成 25 年 9 月 14 日-18 日, ベルリン (ドイツ).

6. 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, 平成 25 年 9 月 13 日-14 日, 九州大学医学部百年講堂 (福岡市東区).

7. 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, 平成 25 年 7 月 31 日-8 月 2 日, 東京農工大学 (東京都府中市).

8. Tani Y, Kaito T, Anan Y, Ogra Y. Effect of selenium on transfer of mercury to eggs in Japanese quails. 4th International Symposium on Metallomics, 平成 25 年 7 月 8 日-11 日, オビエド (スペイン).

9. Kimura M, Anan Y, Marina Hayashi, Maki Tokumoto, Yasumitsu Ogra: Identification of selenium metabolite in cultured cells and elucidation of its biological roles. 4th International Symposium on Metallomics, 平成 25 年 7 月 8 日-11 日, オビエド (スペイン).

10. 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, 平成 25 年 6 月 17 日-19 日, 幕張メッセ国際会議場 (千葉市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし