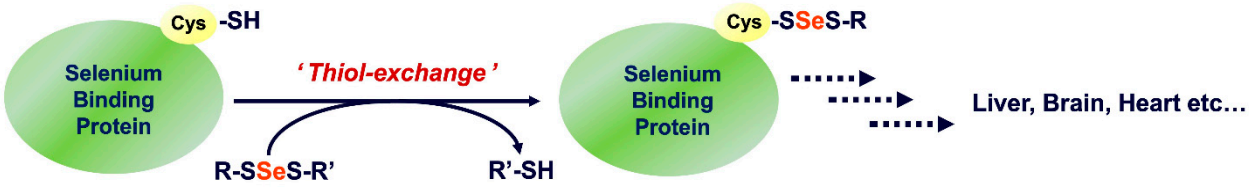
126　細胞内セレン結合性タンパク質の機能解析	吉田　さくら

【目的】必須微量栄養素セレン（Se）は、抗酸化酵素の活性中心に存在するなど、生体内で重要な機能を果たしている。しかし、生体内でのセレンの輸送や代謝過程には不明な点も多く残されている。著者らは、これまでにタンパク質の遊離チオール基と、亜セレン酸の代謝中間体であるセレノトリスルフィドのチオール交換反応が、血中でのセレンの輸送に関与していることを報告している。さらに、ラットの複数の臓器から、肝臓型脂肪酸結合タンパク質（L-FABP）や、ミオグロビン（Mb）、peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A（PPIase A）などの複数のセレン結合性タンパク質を検出してきた。本研究では、セレンの代謝や輸送過程を明らかにするため、これらのセレン結合性タンパク質がセレン輸送などに関与する可能性を検討した。

【方法】3〜5 週齢雄性 Wistar ラットから摘出した脊髄後根神経節（DRG）細胞およびヒト肝臓がん由来 HepG2 細胞へ種々のセレン化合物を添加して一定時間培養後、細胞質のセレン含有酵素グルタチオンペルオキシダーゼ（GPx）活性の測定、細胞内セレンの定量、細胞内セレン結合性タンパク質の発現量を調べた。また、購入もしくはラット臓器から得られたセレンと反応性を有するチオール基を含むタンパク質と、セレン化合物を反応させ、セレンを結合したタンパク質を調製し、細胞への添加および他のセレン結合性タンパク質との反応により、セレン結合性タンパク質に結合したセレンの反応性を検討した。

【結果】ラット DRG 細胞および HepG2 細胞に種々のセレン化合物を添加して培養した結果、細胞内セレン濃度が上昇し、セレン含有酵素 GPx の活性が上昇した。特に、タンパク質に結合させたセレンも、亜セレン酸などの低分子セレン化合物と同様に細胞に取り込まれ、セレン含有酵素の生合成に利用されたと考えられた。しかし、細胞内のセレン結合性タンパク質である、PPIase A や L-FABP の細胞内の発現には大きな変動は見られなかった。一方、著者らがこれまでに検出したセレン結合性タンパク質に、セレノトリスルフィドを介して結合したセレンは、他のセレン結合性タンパク質へ移行できることが示された。以上のことから、これらのセレン結合性タンパク質が、セレンの輸送に関与している可能性が示された。

セレン結合性タンパク質とチオール交換反応



126. 細胞内セレン結合性タンパク質の機能解析

吉田　さくら

長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 衛生化学分野

Key words : セレン，セレン結合タンパク質，セレノトリスルフィド

緒　言

生体内に存在するセレン（Se）は 10～15 mg と極微量であるが、抗酸化酵素グルタチオンペルオキシダーゼなどの活性中心に存在し、生体の恒常性維持に必須の元素である。セレンの欠乏は様々な疾患の原因となることがあり、中国の土壌中セレン濃度が低い地域の風土病である克山病はセレン欠乏が関与する心筋障害であることが報告されている。日本では、通常の食事でセレン欠乏症が生じた例はないものの、セレンを含まない輸液による長期の中心静脈栄養などの施行中の患者で、心電図異常や心不全などを生じた例が知られている。また、セレンは感染症やがん、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患との関連も報告されている［1］。このように、生体内セレンの重要性は明らかであるが、その輸送や代謝経路については未解明な部分も多く残されている。本研究では、セレンと反応性を示すタンパク質が、生体内のセレン代謝に関与する可能性を検討した。セレンは、システインの硫黄原子がセレンに置換したセレノシステイン（SeCys）としてタンパク質に含まれてその機能を発揮するが、ヒトでは 25 種類の SeCys 含有タンパク質（セレンタンパク質）が存在する。近年、Burk 等により血漿中の主要なセレンタンパク質である selenoprotein P（SelP）が脳などへのセレン輸送に関与することが報告された［2］。SelP の欠損はマウスに重篤な神経障害を引き起こすが、この症状は十分量のセレンが含まれた餌を与えることで回避することができた。このことから、SelP が関与するセレン輸送とは別のセレン輸送機構が存在することが示唆された。著者らは、これまでに赤血球からの亜セレン酸放出過程の研究により、亜セレン酸とチオール化合物が反応して形成されるセレノトリスルフィド（STS）と、タンパク質遊離チオール（-SH）との交換反応が、亜セレン酸の赤血球からの放出や、肝細胞への取り込みに関与していることを明らかにしてきた［3］。さらに、STS とタンパク質遊離チオールとの反応を利用し、ラットの肝臓、脳、心臓からセレンと反応性を有するタンパク質を複数検出している［4～7］。これらのタンパク質のセレンとの反応性についてはほとんど報告されていないことから、セレン代謝との関連性を検討した。

方　法

1. ペニシラミンセレノトリスルフィド（penicillamine selenotrisulfide : PenSSeSPen）およびセレノトリスルフィド（selenotrisulfide : STS）結合タンパク質の調製

PenSSeSPen は、L-ペニシラミン（penicillamine : Pen）と亜セレン酸を 4 : 1 のモル比で混合し、生じた沈殿を水およびメタノールで洗浄して得た。調製した PenSSeSPen と、還元したチオール含有タンパク質を混合し、透析により未反応の PenSSeSPen を除去後、凍結乾燥して STS 結合タンパク質を得た。

2. 細胞培養

3～5 週齢雄性 Wistar ラットをイソフルランにより安楽死させ、脊椎を採取後、氷上で脊髄後根神経節（DRG）を摘出した。摘出した神経節を刻み、コラゲナーゼおよびトリプシンで処理し、10%ウシ胎児血清（FBS）含有 Dulbecco's modified Eagle Medium（DMEM）中で培養した。実験には、培養開始後 1 週間から 10 日経過したものを使用した。ヒト肝臓がん由来 HepG2 細胞は 10% FBS 含有 DMEM 中で培養した。亜セレン酸、セレノメチオニン（SeMet）、PenSSeSPen および STS 結合タンパク質を培地に添加して一定期間培養後、トリプシンにより細胞を剥離して回収し、

超音波破砕により細胞質溶解液を調製した。得られた細胞質溶解液のセレン含有酵素グルタチオンペルオキシダーゼ（GPx）活性測定は、NADPH の吸光度の減少により測定した。また、細胞質中セレン濃度は、セレン特異的試薬である 2、3-ジアミノナフタレンを用いた蛍光光度法により測定した。

3. セレン結合性タンパク質の分離精製

ラットから摘出した肝臓、脳、心臓をそれぞれ氷上でホモジナイズ後、超音波処理し、20,000 rpm で超遠心して得られた上清を細胞質溶解液とした。また、これら臓器の細胞質溶解液を分画分子量 100、30、10 kDa の限外ろ過膜にて順次ろ過し、セレン結合性タンパク質を含む画分を得た。セレン結合性タンパク質の検出は、MALDI TOF 質量分析法および western blotting 法により行った。

4. セレン結合性タンパク質の反応性の検討

ラットの脳および肝臓の細胞質溶解液を限外ろ過に供し、分画分子量 10 kDa の膜上に得られた画分と、PenSSeSPen を混合して STS セレン結合性タンパク質含有画分を調製した。これらの画分と、還元したヒト血清アルブミン（HSA）を反応させ、さらに分画分子量 50 kDa の限外ろ過膜により、セレン結合性タンパク質（50 kDa＞）と HSA（50 kDa＜）を分離した。セレン結合性タンパク質と HSA が含まれるそれぞれの画分のセレン定量により、タンパク質に結合したセレンが他の遊離チオール含有タンパク質へ移行するか検討した。

結果および考察

1. 培養細胞へのセレン添加およびセレン結合性タンパク質の分析

亜セレン酸（H_2SeO_3）は、セレン欠乏症の予防や治療に用いられるが、遊離チオールとの反応によりセレノトリスルフィド（Selenotrisulfide : STS）を生じる。さらに STS は低分子やタンパク質の遊離 Cys 残基などとチオール交換反応を起こす（図 1）。HSA やヘモグロビン（Hb）はそれぞれ遊離チオールを有し、STS とチオール交換反応を起こしてセレンを結合することが示されていた。そこで、還元した HSA および Hb をそれぞれ PenSSeSPen と反応させて STS 結合 HSA（HSA-SSeSPen）および STS 結合 Hb [Hb-（SSeSPen）$_2$]を調製し、HepG2 細胞および DRG 細胞に添加後、6～24 時間培養した。その結果臨床でセレンの補給に用いられる SeMet や亜セレン酸と同様に細胞内セレン濃度と GPx 活性が上昇し、タンパク質に結合したセレンが、細胞内へ移行することが確認された（図 2、3）。また HepG2 細胞および DRG 細胞には、これまでに著者等がセレン結合性タンパク質として報告した肝臓型脂肪酸結合タンパク質（L-FABP）と、peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A（PPIase A）がそれぞれ発現していることを確認していた。そこで、セレン添加による細胞内セレン濃度や GPx 活性と、これらのセレン結合性タンパク質発現との関連性を検討したが、セレン添加による有意な発現変化は見られなかった。これらのタンパク質は、細胞内に豊富に存在し、脂肪酸代謝や細胞内のタンパク質輸送などに関与することから、その極一部がセレンと反応していると予想された。そこで、これらのタンパク質の siRNA による発現抑制がセレン代謝に与える影響を検討した。しかし、siRNA による発現抑制は観察されたものの、細胞内セレン濃度や GPx 活性測定に十分な量の細胞を得ることができなかったため、セレン代謝への影響を調べるためには、さらに効率的な発現抑制か、過剰発現細胞を用いるなどの検討が必要であると考えられた。

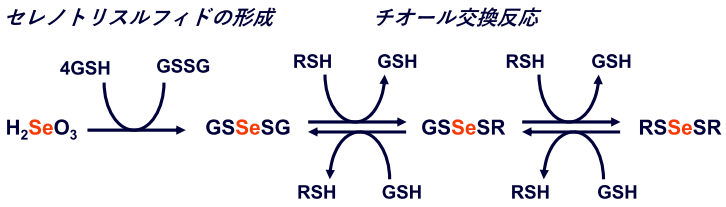


図 1. セレノトリスルフィド（STS）の形成（左）と STS のチオール交換反応（右）
亜セレン酸（H_2SeO_3）は 4 当量のチオール（この図では GSH）と反応し、セレノトリスルフィド（S-Se-S、STS）を形成する。さらに、STS はタンパク質の遊離チオール（R-SH）などとチオール交換反応を起こす。

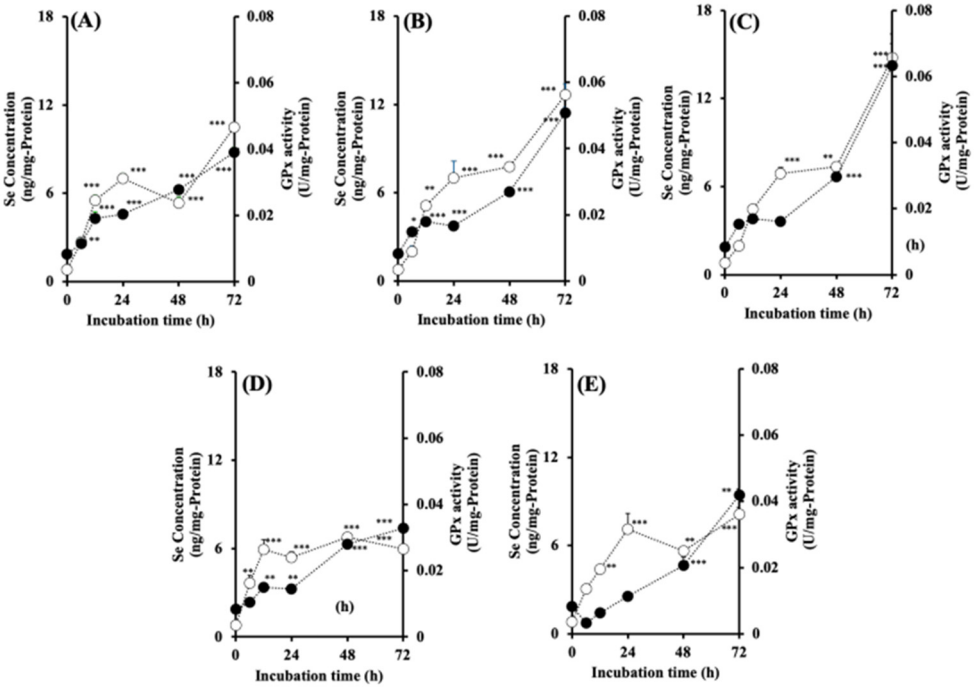


図 2. セレン添加後 HepG2 細胞の細胞内セレン濃度および細胞質 GPx 活性

1μM の（A）セレノメチオニン、（B）亜セレン酸、（C）PenSSeSPen、（D）HSA-SSeSPen、（E）Hb-（SSeSPen）$_2$添加 HepG2 細胞。Data express mean ± SD (n=3). *, ** and *** were significantly different from the value at time 0 h with $P < 0.05$, < 0.01 and < 0.001 (ANOVA with a Tukey test).

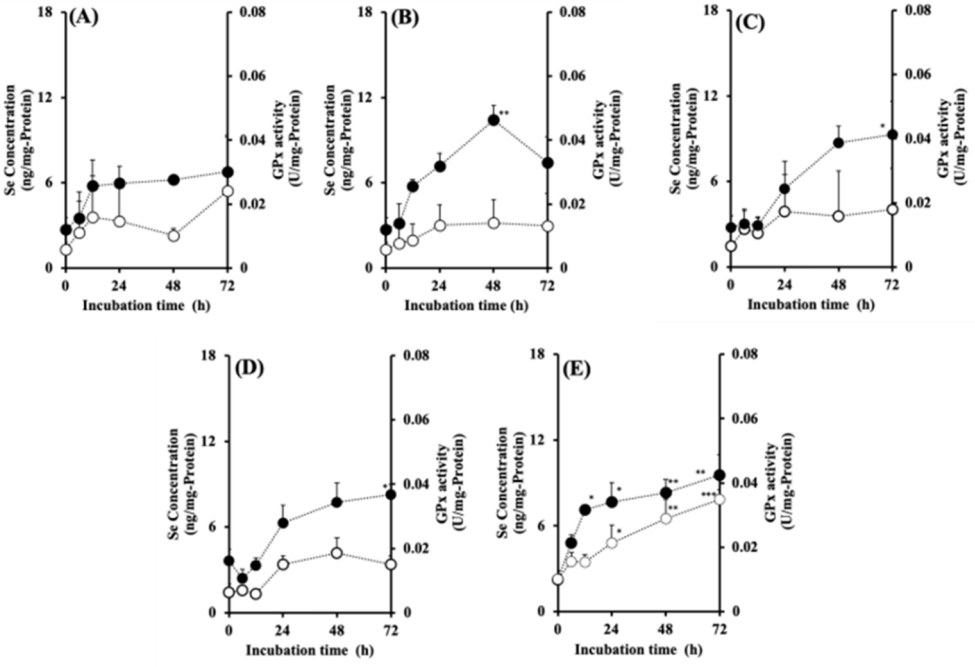


図 3. セレン添加後 DRG 細胞の細胞内セレン濃度および細胞質 GPx 活性

1μM の（A）セレノメチオニン、（B）亜セレン酸、（C）PenSSeSPen、（D）HSA-SSeSPen（E）Hb-（SSeSPen）$_2$添加 HepG2 細胞。Data express mean ± SD (n=3). *, ** and *** were significantly different from the value at time 0 h with $P < 0.05$, < 0.01 and < 0.001 (ANOVA with a Tukey test).

2. セレン結合性タンパク質に結合したセレンの反応性

次に、一度セレン結合性タンパク質に結合した他の遊離チオール含有タンパク質へ移行するかを、モデルタンパク質として HSA を用いて検討した。ラットの肝臓および脳の細胞質溶解液から作製した L-FABP と PPIase A を含有する画分を、PenSSeSPen と反応させて STS 結合タンパク質を調製した。それらを還元した HSA と反応させ、限外ろ過で分離した HSA に結合したセレンを定量した結果、HSA の遊離チオール濃度の上昇に伴ってセレンが移行することが確認された。上記の結果より、細胞内セレン結合性タンパク質は、細胞へのセレン取り込みよりも、細胞内でのセレンの保持や輸送に関与する可能性が考えられた。今後はこれまでに検出したセレン結合性タンパク質のリコンビナントタンパク質を用い、さらに詳細に反応性を検討する予定である。

共同研究者・謝辞

本研究は、当研究室卒業生の森亮輔修士、黒岩多恵学士との共同研究により実施した。

文　献

1) Rayman M. Selenium and Human Health. The Lancet. 2012 Mar 31; 379(9822): 1256−1268. Epub 2012 Feb 29. PMID: 22381456 DOI: 10.1016/S0140-6736(11)61452-9

2) Hill KE, Zhou J, McMahan WJ, Motley AK, Atkins JF, Gesteland RF, Burk RF. Deletion of Selenoprotein P Alters Distribution of Selenium in the Mouse. The Journal of Biological Chemistry. 2003 Apr 18; 278(16): 13640−13646. Epub 2003 Feb 6. PMID: 12574155 DOI: 10.1074/jbc.M300755200

3) Haratake M, Fujimoto K, Hongoh M, Yoshida S, Fuchigami T, Nakayama M. Selenotrisulfide as a metabolic intermediate in biological systems (2013) In: Bayse CA, Brumaghim JL (ed) Biochalcogen Chemistry: Biological Chemistry of Sulfur, Selenium, and Tellurium, American Chemical Society

4) Hori E, Yoshida S, Haratake M, Ura S, Fuchigami T, Nakayama M. An effective method for profiling the selenium-binding proteins using its reactive metabolic intermediate. Journal of biological inorganic chemistry, 2015 Jul; 20(5): 781−789. Epub 2015 Apr 21. PMID: 25896271 DOI: 10.1007/s00775-015-1265-3

5) Yoshida S, Hori E, Ura S, Haratake M, Fuchigami T, Nakayama M. A Comprehensive Analysis of Selenium-Binding Proteins in the Brain Using Its Reactive Metabolite .Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 2016; 64(1): 52−58. PMID: 26726744 DOI: 10.1248/cpb.c15-00689

6) Hori E, Yoshida S, Fuchigami T, Haratake M, Nakayama M. Cardiac myoglobin participates in the metabolic pathway of selenium in rats. Metallomics. 2018 Apr 25; 10(4) 614−622. PMID: 29578234 DOI: 10.1039/c8mt00011e

7) Yoshida S., Yamamoto A., Masumoto H., Fuchigami T., Toriba A., Haratake M., Nakayama M., Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase A participates in the selenium transport into the rat brain. Journal of biological inorganic chemistry, 2021 Dec; 26(8): 933-945. Epub 2021 Sep 22. PMID: 34550449 DOI: 10.1007/s00775-021-01903-6.