

学位論文

セレンの代謝解明に資する反応性代謝物を利用したセレン結合タンパク質の Profiling

堀 恵里子

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科

生命薬科学専攻

2018年3月

略号一覧

CST12	Cystatin-12 precursor
Cys	L-Cysteine
DAN	2,3-Diaminonaphthalene
DRG	Dorsal root ganglion
DTNB	5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
FABP	Fatty acid-binding protein
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione in reduced form
GSSG	Glutathione in oxidized form
GSSeSG	Glutathione selenotrisulfide
Hb	Hemoglobin
L-FABP	Liver fatty acid-binding protein
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry
Mb	Myoglobin
NEM	<i>N</i> -Ethylmaleimide
PenSH	L-Penicillamine
PenSSeSPen	L-Penicillamine selenotrisulfide
PIR	Protein information resource
RSSeSR'	Selenotrisulfide
SA	Selenious acid
SeCys, Sec	L-Selenocysteine
Sel P	Selenoprotein P
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy

目 次

背 景	1
第一章 セレン結合タンパク質探索法の構築	
1-1. 序	7
1-2. 結果および考察	11
1-2-1. PenSSeSPen の合成	11
1-2-2. 肝細胞質溶液と PenSSeSPen の反応性の検討	13
1-2-3. 肝細胞質溶液中セレン結合タンパク質の探索	14
1-2-4. PenSSeSPen と反応性を示した肝細胞質タンパク質の同定	22
1-2-5. マウス L-FABP の PenSSeSPen 反応性の検討	27
1-3. 小括	30
1-4. 実験方法	31
第二章 脳内セレン結合タンパク質の探索	
2-1. 序	36
2-2. 結果および考察	39
2-2-1. 脳細胞質溶液と PenSSeSPen の反応性の検討	39
2-2-2. セレンの結合様式の解析	40
2-2-3. 脳細胞質溶液中セレン結合タンパク質の探索	43
2-2-4. PenSSeSPen と反応性を示した脳細胞質タンパク質の同定	45
2-3. 小括	50
2-4. 実験方法	51

第三章 心臓内セレン結合タンパク質の探索	
3-1. 序	53
3-2. 結果および考察	54
3-2-1. 心臓細胞質溶液と PenSSeSPen の反応性の検討	54
3-2-2. 心臓細胞質溶液中セレン結合タンパク質の探索	55
3-2-3. PenSSeSPen と反応性を示した心臓細胞質タンパク質の同定	62
3-2-4. 生体内における Mb のセレン結合性およびセレン代謝への関与	65
3-3. 小括	68
3-4. 実験方法	69
結 語	73
謝 辞	74
参考文献	75

背景

セレン(selenium, Se)は周期表の16族元素に属し、同族の硫黄やテルルと似た化学的性質を有する。セレンはヒトを含む多くの哺乳類において、生体内のレドックス制御を担う必須の微量栄養素である。1817年にスウェーデンの化学者 Berzelius によって発見されて以来、セレンは毒物とされてきた。Marco Polo が土壤中セレン濃度の高い中央アジアにおける家畜の疾病を東方見聞録に記しており、この疾病はセレンの毒性症状と考えられている [1]。しかし、1957年に Schwarz と Foltz が、無機セレン化合物の投与がビタミンE欠乏によるマウスの肝臓壊死に対して有効であることを報告したことで、セレンの生理機能が注目されるようになった [2]。

セレンの生理機能の多くは、セレンタンパクと呼ばれるセレノシステイン (SeCys) 含有タンパクによるものであり、ヒトでは25種類のセレンタンパクが同定されている [3]。グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) ファミリーは最もよく知られたセレンタンパクで、過酸化水素及び過酸化物 (R-OOH) を無害な水またはアルコール (R-OH) へと還元する酵素である [4]。SeCys を含有する GPx は GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 および GPx6 の5種類が同定されているが、中でも GPx4 はリン脂質ヒドロペルオキシドを直接還元することができる唯一無二の酵素であり、胚発生過程において不可欠である [5-7]。マウスの GPx4 をノックアウトすると全て胚致死になってしまうことから、セレンの必須性が伺える。

セレンが欠乏すると、心筋症や筋力低下などの様々な症状が引き起こされる。セレン欠乏症は土壤中セレン濃度の低い地域で見られ、時には致命的となる。代表的なセレン欠乏症として、中国の Keshan 病や Kashin-Beck 病が知られている。日本国内においても、セレンを含まない経腸栄養剤を使用している場合や静脈栄養実施時にセレン欠乏が生じた例が報告されている [8]。セレン供

給化合物には、亜セレン酸 (H_2SeO_3 , SA) やセレン酸 (H_2SeO_4) などの無機化学種、SeCys やセレノメチオニン (SeMet) などの有機化学種など、様々なセレン種が存在するが、臨床現場ではセレン欠乏症の予防や治療のために、生物学的利用能の高い SA が用いられている。

細胞内に取り込まれた SA は、グルタチオン (GSH) によってグルタチオンセレノトリスルフィド (GSSeSG) へと還元される。続いて、セレナイド (Se^{2-})、セレノリン酸 ($\text{H}_2\text{SePO}_3^-$) を経て SeCys に組み込まれ、最終的にセレンタンパクに挿入されると考えられている (Fig. 1) [9]。SeCys は、終止コドンである UGA によってコードされているため、通常のアミノ酸とは異なる特殊な機構でセレンタンパクに挿入される。近年の技術の進歩によってこの機構の解明は進んでいるが、SA 還元種のうち生体内でその存在が証明されているのはセレノトリスルフィド (RSSeSR') だけであり [10]、SA が SeCys 合成に利用される過程の詳細には不明な点も多い。

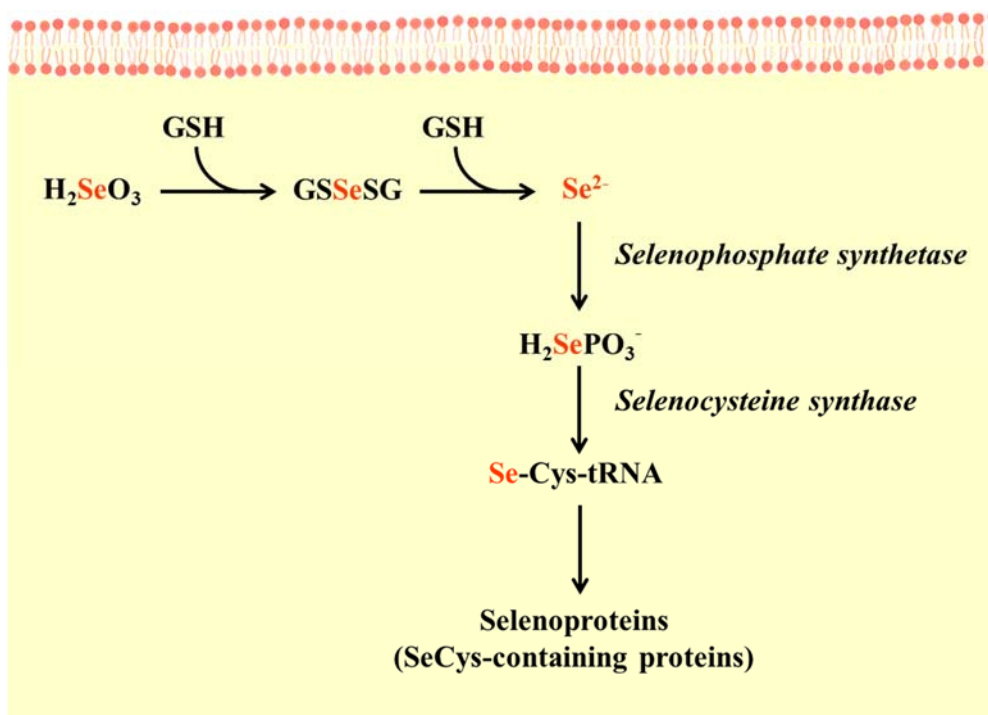


Fig. 1 Intracellular metabolism of selenious acid.

一般に、1) セレンが微量元素であること、2) セレンの還元代謝種が様々な酸化数をとること、3) セレン化合物に対する有効なプローブが無いこと、これらの点がセレンの代謝過程解明のボトルネックであるとされる。セレンの放射性同位体は、極微量のセレンの体内動態を解明する方法として有用である。これまで、放射性 ^{75}Se 標識亜セレン酸とウエスタンブロット法を併用して、セレン種と相互作用する内因性タンパク質（セレン結合タンパク質）が見出されてきた [11-17]。しかし、上記の方法は外因性セレンの追跡には有用であるが、セレンとタンパク質の結合様式や化学形に関する情報を得ることが難しい。

当研究室では、これまでに SA の赤血球内での代謝および赤血球から血漿への放出機構の解明に取り組んできた。血中に入った SA は、赤血球に素早く取り込まれ、GSH による還元を受けて GSSeSG を生じる。GSSeSG はヘモグロビン (Hb) の β サブユニットの遊離チオールとチオール交換した後 [18]、赤血球の細胞質、膜、膜間へと順次輸送され、最終的に赤血球外の血清アルブミン (HSA) へと運搬される [19-21]。さらに、HSA に結合したセレンは肝細胞へ取り込まれる。赤血球におけるセレンの膜輸送は、タンパク質のシステイン (Cys) 残基の遊離チオールと RSSeSR' のチオール交換反応によるものである (Fig. 2) [22]。このことから、 RSSeSR' の形成がセレン輸送において重要であることがわかる。

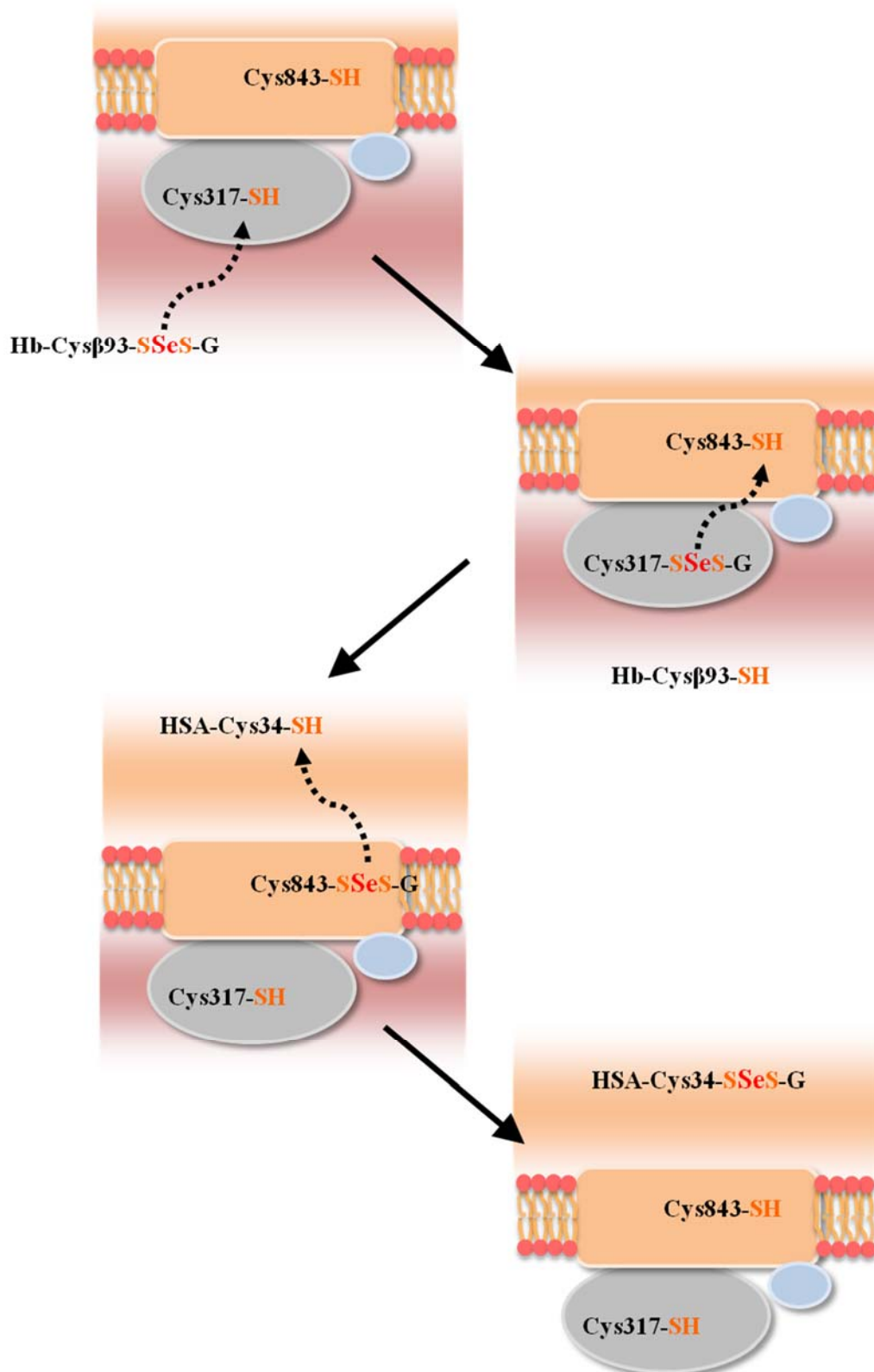


Fig. 2 Selenium export mechanism from red blood cell to plasma via thiol exchange reaction [22].

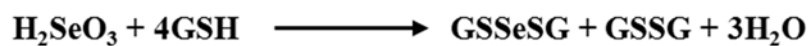
そこで本研究では、RSSeSR'以降のセレン代謝経路解明を目的として、RSSeSR'と反応性を有するタンパク質の解析を行った。まず第一章で RSSeSR'モデル化合物と質量分析法を組み合わせて、SA還元種と反応性を示す肝細胞質タンパク質の探索を行い、セレン結合タンパク質の探索方法を構築した。続いてこの方法を、セレンが重要な機能を果たしていると考えられる臓器のセレン結合タンパク質の探索に応用した。第二章では、臓器特異的な保持機構に関与しうる脳細胞質中セレン結合タンパク質の探索を行った。第三章では、セレン欠乏症との関わりの深い心臓におけるセレン結合タンパク質の探索を行った。

第一章

セレン結合タンパク質探索法の構築

1-1. 序

SA 還元種のうち生体内で同定されているのは RSSeSR' だけであるが、一般に RSSeSR' は生理的条件下において化学的に不安定である。 GSSeSG は GSH と SA の Painter 反応に基づいて生成するが [23]、生理的 pH において速やかに分解されて赤色の元素状セレンを生じてしまう (Fig. 3)。一方、Cys の β 炭素に 2 個のメチル基を導入したペニシラミン (PenSH) と SA の Painter 反応で合成される L-ペニシラミンセレノトリスルフィド (PenSSeSPen , Fig. 4) は、生理的条件下で 24 時間以上分解せず安定に存在する [24, 25]。 PenSSeSPen は Fig. 4 のようなチオール交換によって、様々なタンパク質チオールと反応することができる。そして、このような PenSSeSPen の反応性を利用して RSSeSR' がセレンの膜透過や細胞間輸送などに関与することを当研究室は報告してきた [18-21]。Cys チオールは SeCys セレノールを除いて、生体内で最も強い求核剤である。 RSSeSR' の場合、求核性のチオレート (S^-) は硫黄原子よりも求電子性の高いセレン原子に求核攻撃をすることで、求核置換反応であるチオール交換反応が起こる。

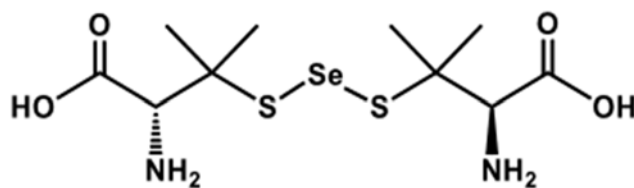


Phosphate buffer
(pH 7.4)

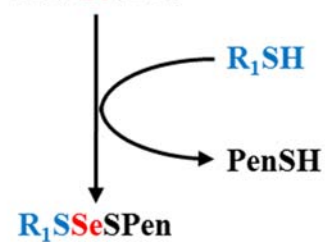
Easily decomposed to
red elemental selenium
(Se⁰)



Fig. 3 Formation of glutathione selenotrisulfide by Painter reaction and its degradation to the red elemental selenium in phosphate buffer (pH 7.4).



PenS**Se**SPen



(R₁-SH, R₂-SH: biogenic thiols)

Fig. 4 Chemical structure of PenSSeSPen and thiol-exchange reaction with biogenic thiols.

肝臓は、腸から吸収したセレンが最初に供給される臓器であり [26]、セレン代謝の中心的な臓器である。吸収されたセレン種は様々な代謝経路を経てセレナイドを生じるとされている。肝臓中で還元されたセレナイドは、体内のセレン量に応じて、GPx1 や Selenoprotein P (SelP) などのセレンタンパク合成に利用されて体内に保持されるか、低分子セレンへ代謝されて排泄されるかが決められると考えられている (Fig. 5) [27, 28]。しかし、セレナイドは非常に化学的反応性が高く、セレンの代謝運命を決めるような重要な化学種であるとは考えにくい。遊離 Cys とのチオール交換反応により $RSSeSR'$ を形成してタンパク質に結合したセレンは、低分子のセレン化合物と比較して安定に存在することから、このようなセレン結合タンパク質がセレン代謝において重要な機能を担っていると考えられる。

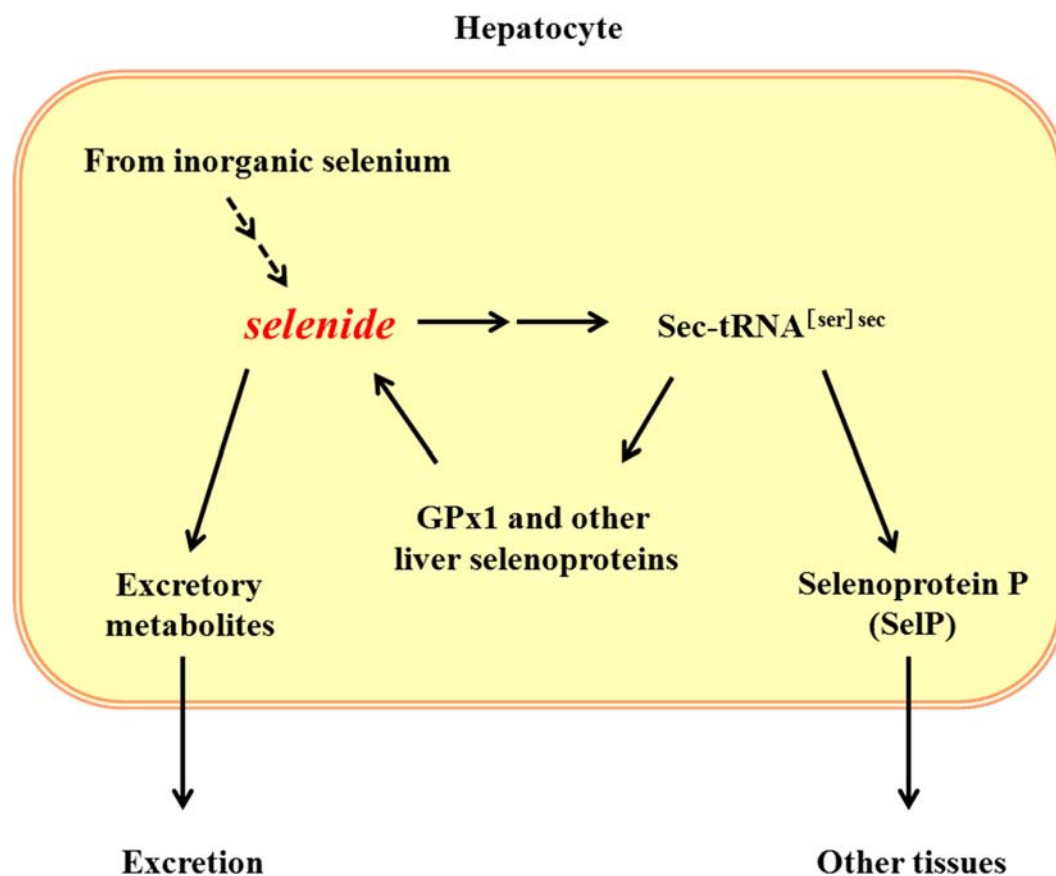


Fig. 5 Selenium metabolism in hepatocytes [27, 28].

そこで第一章では、SA還元種と反応性を示すタンパク質の探索手法の確立を目的として、セレン含量が高くセレン代謝が活発な肝細胞の細胞質溶液を用いてセレン結合タンパク質の網羅的探索を行った。SAの反応性代謝物のモデル化合物としてPenSSeSPenを用い、質量分析法を組み合わせる肝細胞質中のセレン結合タンパク質の同定を行った。

1-2. 結果および考察

1-2-1. PenSSeSPen の合成

PenSSeSPen を既報に従い合成した [24, 25]。セレンには 6 個の安定同位体が存在し (Fig. 6a)、質量分析ではそれを反映した特徴的な同位体ピークが出現する。合成した PenSSeSPen の MALDI-TOF 質量スペクトルにおいても、セレンの同位体ピークが検出され、PenS⁸⁰SeSPen の分子イオンピーク (m/z 376.3) は計算値 (376.2) と一致した (Fig. 6b)。また、PenSSeSPen を逆相高速液体クロマトグラフ分析したところ、保持時間約 9 分にシャープな単一ピークが観察された (Fig. 7)。以上より、目的化合物が合成および精製できていることが確認された。

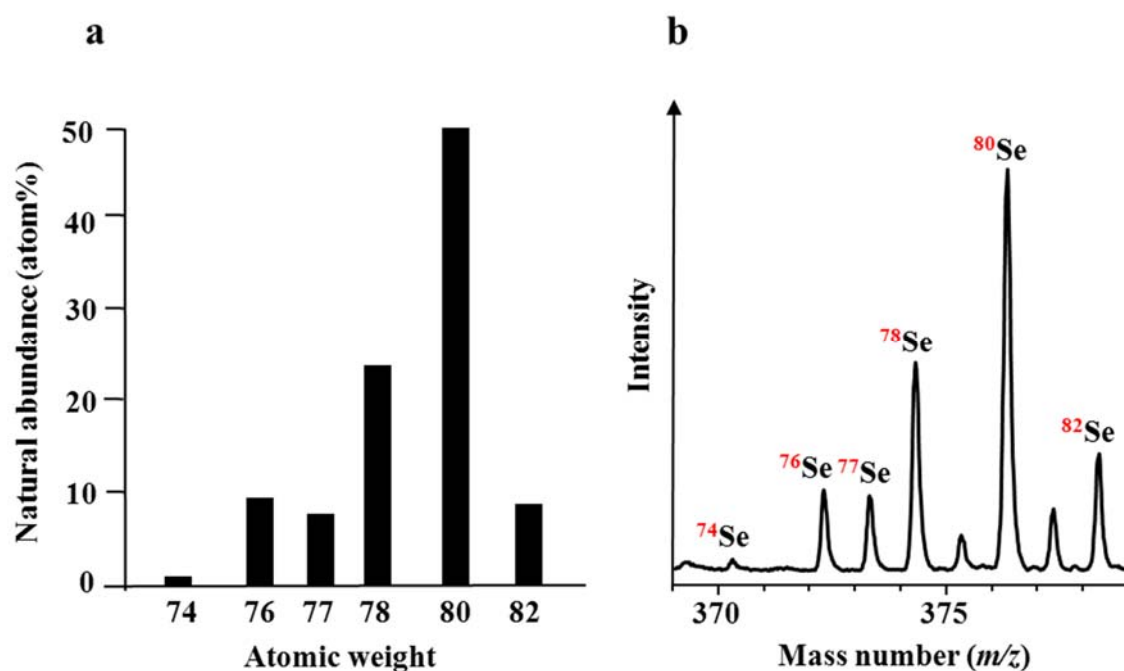


Fig. 6 (a) Natural abundance of selenium stable isotopes. (b) MALDI-TOF mass spectrum of PenSSeSPen. Positive ion mode, calcd for $C_{10}H_{20}N_2O_4S_2^{80}Se$ 376.2, found m/z 376.3.

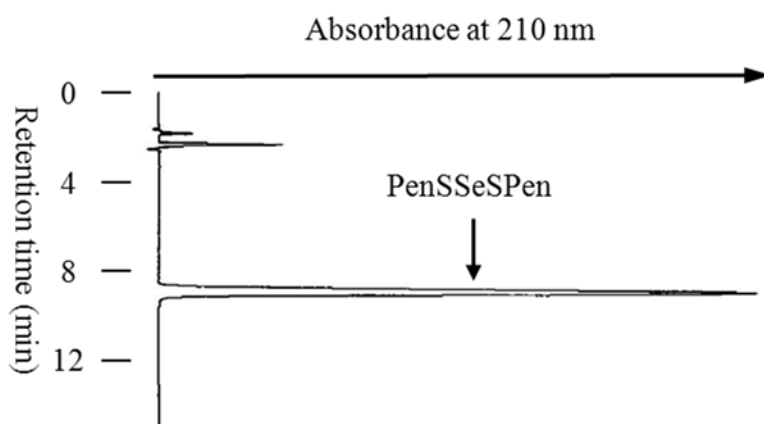


Fig. 7 Reverse-phase liquid chromatographic analysis of PenSSeSPen. Column: COSMOSIL 5C18-AR-II 150 × 4.6 *i.d.*mm (5 μm), Mobile phase: 0.05 M acetate buffer (pH 4)-methanol (9:1 by volume), Flow rate: 1 mL/min, Detection: absorbance at 210 nm, Injection volume: 10 μL.

1-2-2. 肝細胞質溶液と PenSSeSPen の反応性の検討

肝細胞質中タンパク質と RSSeSR'の反応性を検討するため、PenSSeSPen 処理後のラット肝細胞質溶液中のセレン量およびチオール量の測定を行った (Fig. 8)。0.2 – 1.0 mM の PenSSeSPen で 30 分間インキュベート後、各細胞質溶液中のタンパク質量当たりのセレン量は PenSSeSPen 処理濃度の上昇に伴って増加した。一方、タンパク質チオール量はセレン量に対応した減少を示した。以上より、肝細胞質中には RSSeSR' と反応性を有するタンパク質が存在し、PenSSeSPen 由来のセレンがタンパク質チオールに結合していることが示唆された。

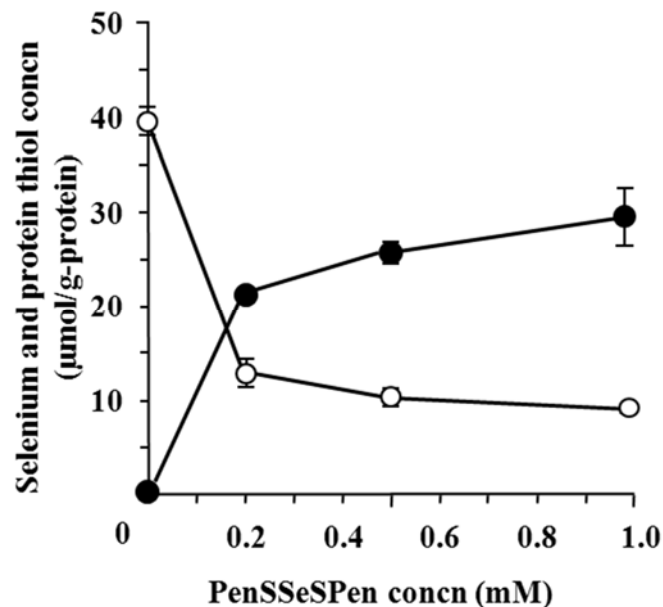


Fig. 8 Selenium and protein thiol concentrations in the rat liver cell lysate after reaction with PenSSeSPen for 30 min at 37 °C. Solid circle: selenium concentration, Open circle: protein thiol concentration. Data are mean and standard error ($n = 4$).

1-2-3. 肝細胞質溶液中セレン結合タンパク質の探索

次に、PenSSeSPen と反応したタンパク質を MALDI-TOF 質量分析により探索した。前節より、タンパク質は遊離チオールを介して PenSSeSPen と反応することが示唆されたため、チオールアルキル化剤 *N*-ethylmaleimide (NEM) を用いて遊離 Cys 含有タンパク質を特定した。遊離チオールは NEM との反応によってアルキル化され、質量数が 125 増加する (Fig. 9a)。NEM 処理前後の肝細胞質溶液の MALDI-TOF 質量スペクトルを比較すると、NEM 処理により質量数が 125 増加した複数のピークが観察された。NEM 処理前後の細胞質溶液中チオール量を測定したところ、NEM 処理により処理前の 5.29% ($n = 5$) と大きく減少した。このことから、肝細胞質溶液中の遊離チオールは NEM によってほとんどアルキル化されることが示された。次に、PenSSeSPen 処理した細胞質溶液の質量スペクトルを未処理のものと比較すると、NEM と反応したいくつかのピークに関して、質量数が 226 増加した新たなピークが見られた。この質量数の増加は、PenSSeSPen の Selenenyl-penicillamine (-SeSPen) 部分に相当し (Fig. 9b)、タンパク質チオールと PenSSeSPen のチオール交換反応の結果生じたと考えられた ($\text{R-Cys-SH} + \text{PenSSeSPen} \rightarrow \text{R-Cys-SSeSPen} + \text{Pen-SH}$)。肝細胞質溶液のマススペクトルについて、上述のような質量数の変化が見られたピークを Table 1 にまとめた。

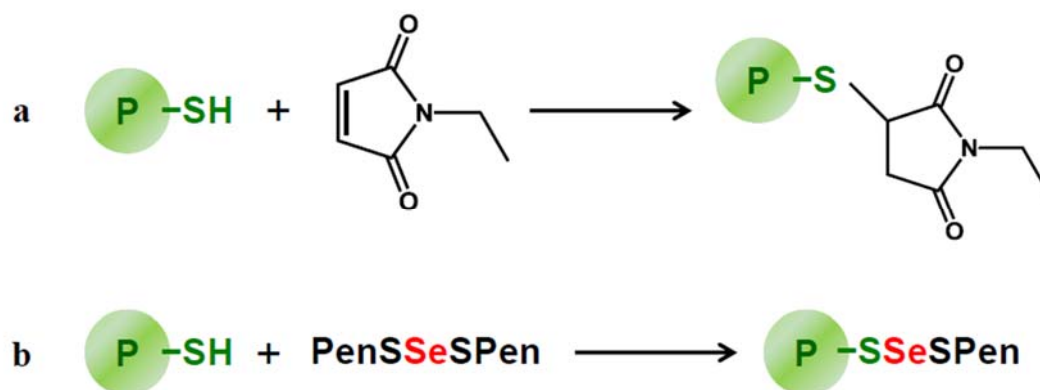


Fig. 9 Reaction of (a) NEM and (b) PenSSeSPen with protein thiol.

Table 1 Observed molecular mass gain in MALDI-TOF mass spectra of the rat liver cell lysate before and after the reaction with NEM and PenSSeSPen.

Original peak in m/z before reaction (a)	Peak in m/z after reaction with NEM (a+125, +250 and +375)	Peak in m/z after reaction with PenSSeSPen (a+226)
3494.8	3619.9	n.d.
4225.1	4350.7	n.d.
7159.7	7287.5	n.d.
7918.6	8044.4	n.d.
11240.0	11368.8	n.d.
11912.1	12038.1	12138.4
12347.7	12473.6, 12598.7, 12723.9	12574.4
11389.1	12516.2, 12641.8, 12766.3	n.d.
14313.0	14436.3	14539.8
15155.3	15282.2, 15407.6	n.d.
15199.1	15325.7, 15450.9	15429.8
15836.5	16088.7	16066.3

n.d.: not detected. NEM and PenSSeSPen concentrations used: 1.0 and 0.2 mM.

Reaction time: 10 and 30 min. Reaction temperature: 37 °C.

肝細胞質には遊離チオールを有する分子種が多数存在し、そのうち PenSSeSPen とも反応したものが複数観察された。これらの中で最もピーク強度の高かった、質量電荷比 (m/z) 14,313 の分子種に着目した。この分子種は NEM 処理によって 125.0、PenSSeSPen 処理によって 226.3 の質量数増加を示した (Fig. 10)。PenSSeSPen と同条件で SA 処理した肝細胞質溶液についても質量分析を行ったところ、 m/z 14,313 のピークに変化は見られなかった。SA 処理後のタンパク量当たりのセレン量を測定すると PenSSeSPen 処理時の 16.6%であり、SA よりも PenSSeSPen の方が反応効率が高いことが示された (Fig. 11)。

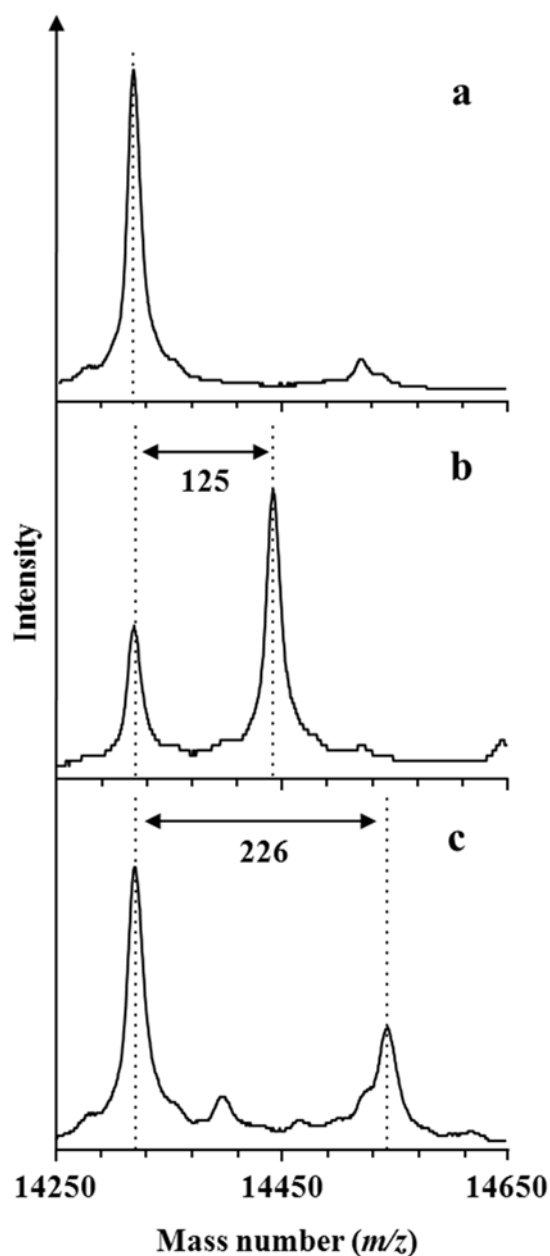


Fig. 10 MALDI-TOF mass analysis of the PenSSeSPen reactivity to m/z 14,313 species in the rat liver cell lysate. (a) Before reaction, (b) after reaction with 1.0 mM NEM for 10 min, (c) after reaction with 0.2 mM PenSSeSPen for 30 min. Reaction temperature: 37 °C. Dotted lines were drawn at m/z 14,313, 14,438 (NEM-adduct) and 14,539 (SeSPen-adduct).

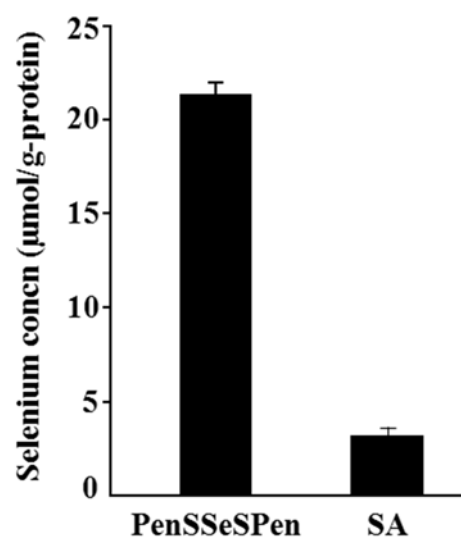


Fig. 11 Selenium concentrations in the liver cell lysate after reaction with selenium species. (a) After reaction with 0.2 mM PenSSeSPen, (b) after reaction with 0.2 mM SA. Reaction time and temperature: 30 min and 37 °C. Data are mean and standard error ($n = 4$).

次に、PenSSeSPen の処理濃度および反応時間を変化させて各肝細胞質溶液を質量分析に供した。異なる PenSSeSPen 濃度で処理した試料の m/z 14,313 のスペクトルを Fig. 12 に示す。PenSSeSPen 濃度の増大に伴って未反応の m/z 14,313 のピークは小さくなり、-SeSPen が付加したピークは増大した。PenSSeSPen との反応時間についても検討を行ったところ、 m/z 14,313 に -SeSPen が付加したピークは、反応時間 1 分においても観察された (Fig. 13b)。これは、Hb の Cys β 93 チオールとの反応に匹敵する速さであった [25]。これらの結果より、 m/z 14,313 は SA 代謝中間体モデルである PenSSeSPen と高い反応性を有し、その反応は濃度依存的であることが示された。

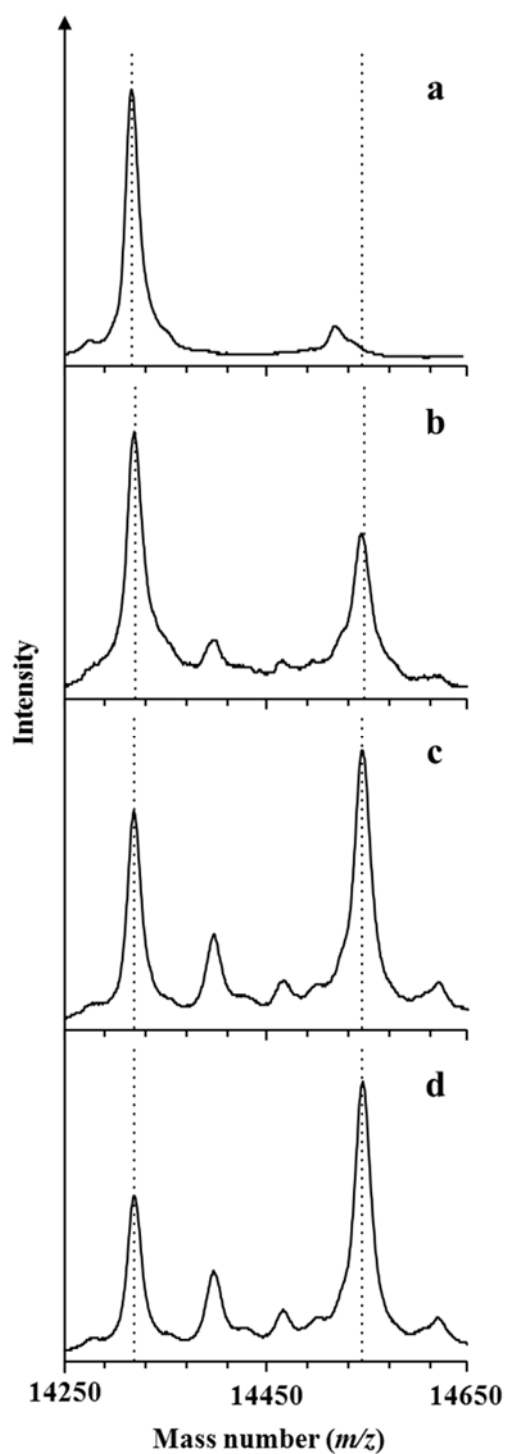


Fig. 12 MALDI-TOF mass spectra of m/z 14,313 species in the rat liver cell lysate treated with PenSSeSPen in varying concentration. (a) Before reaction, after reaction with PenSSeSPen in varying concentration (mM): (b) 0.2, (c) 0.5, (d) 1.0. The rat liver cell lysate was incubated with the indicated PenSSeSPen concentration at 37 °C for 30 min. Dotted lines were drawn at m/z 14,313 and 14,539.

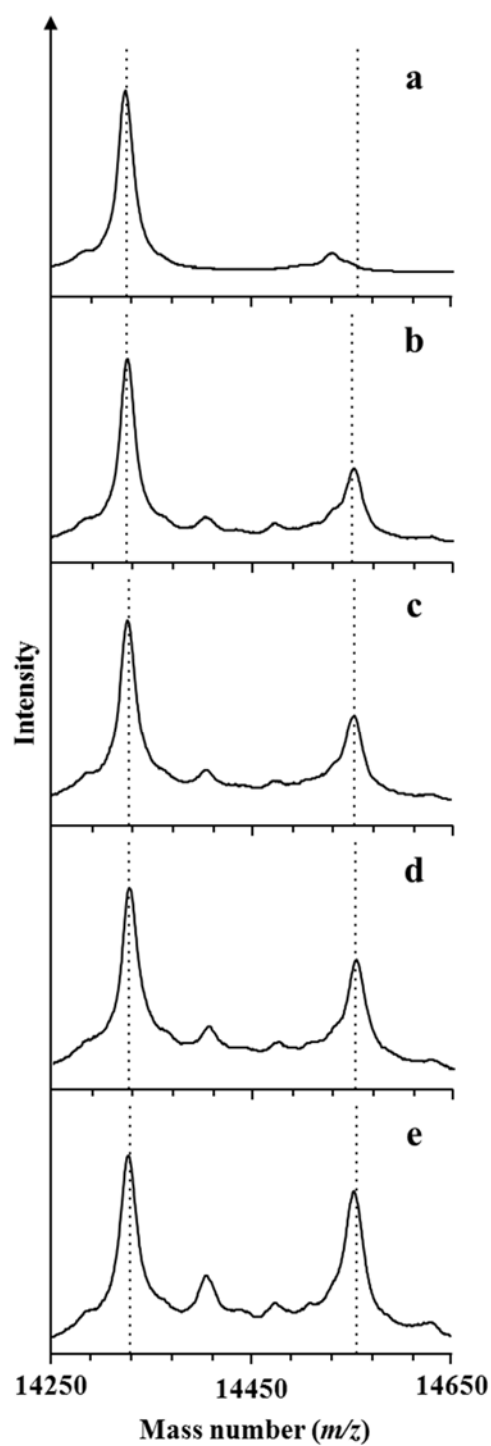


Fig. 13 MALDI-TOF mass spectra of m/z 14,313 species in the rat liver cell lysate treated with PenSSeSPen for varying reaction time. (a) Before reaction, after reaction with PenSSeSPen for (b) 1, (c) 30, (d) 60, (e) 180 min. The rat liver cell lysate were incubated with 0.2 mM PenSSeSPen at 37 °C for the indicated time. Dotted lines were drawn at m/z 14,313 and 14,539.

1-2-4. PenSSeSPen と反応性を示した肝細胞質タンパク質の同定

タンパク質データベース Protein Information Resource (PIR, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pirwww/>) で検索したところ、肝臓型脂肪酸結合タンパク質 (Liver fatty acid-binding protein, L-FABP) が PenSSeSPen と反応した m/z 14,313 の分子の候補として挙げられた。L-FABP は 127 個のアミノ酸から構成され、69 番目に遊離の Cys が 1 つ存在する (Fig. 14)。脂肪酸結合タンパク質 (FABPs) は長鎖脂肪酸の代謝に関与しているタンパク質で、肝臓型 (L-FABP)、心臓型 (H-FABP)、脳型 (B-FABP) などの様々なサブタイプが全身に広く分布する [29]。L-FABP は腎臓にも発現し、尿中 L-FABP は尿細管障害を早期から反映して増加することが報告されており [30]、腎機能マーカーとして臨床応用されている。また、L-FABP はよく保存されたタンパク質であり、ラットやマウス、ウシ、ヒト間での種差が少ないことも知られている [31]。

1		11
Met Asn Phe Ser Gly Lys Tyr Gln Val Gln		Ser Gln Glu Asn Phe Glu Pro Phe Met Lys
21		31
Ala Met Gly Leu Pro Glu Asp Leu Ile Gln		Lys Gly Lys Asp Ile Lys Gly Val Ser Glu
41		51
Ile Val His Glu Gly Lys Lys Val Lys Leu		Thr Ile Thr Tyr Gly Ser Lys Val Ile His
61	69	71
Asn Glu Phe Thr Leu Gly Glu Glu Cys Glu		Leu Glu Thr Met Thr Gly Glu Lys Val Lys
81		91
Ala Val Val Lys Met Glu Gly Asp Asn Lys		Met Val Thr Thr Phe Lys Gly Ile Lys Ser
101		111
Val Thr Glu Phe Asn Gly Asp Thr Ile Thr		Asn Thr Met Thr Leu Gly Asp Ile Val Tyr
121	127	
Lys Arg Val Ser Lys Arg Ile		

Fig. 14 Amino acid sequence of the rat L-FABP.

m/z 14,313 のタンパク質が L-FABP であることを同定するため、酵素トリプシンを用いたフラグメントピーク解析を行うこととした。肝細胞質溶液をトリプシン消化して得られたフラグメントを MALDI-TOF 質量分析し、その分子量をオンラインプログラム Protein prospector を用いて算出した計算値と比較した。Met1-Lys20, Met1-Lys36, Tyr7-Lys31, Lys47-Lys80, Val79-Lys121, Ser100-Arg126 のフラグメントに対して、計算値と良好に一致する分子量ピークが観察された (Fig. 15)。以上より、PenSSeSPen と反応した m/z 14,313 のタンパク質は L-FABP であると同定された。

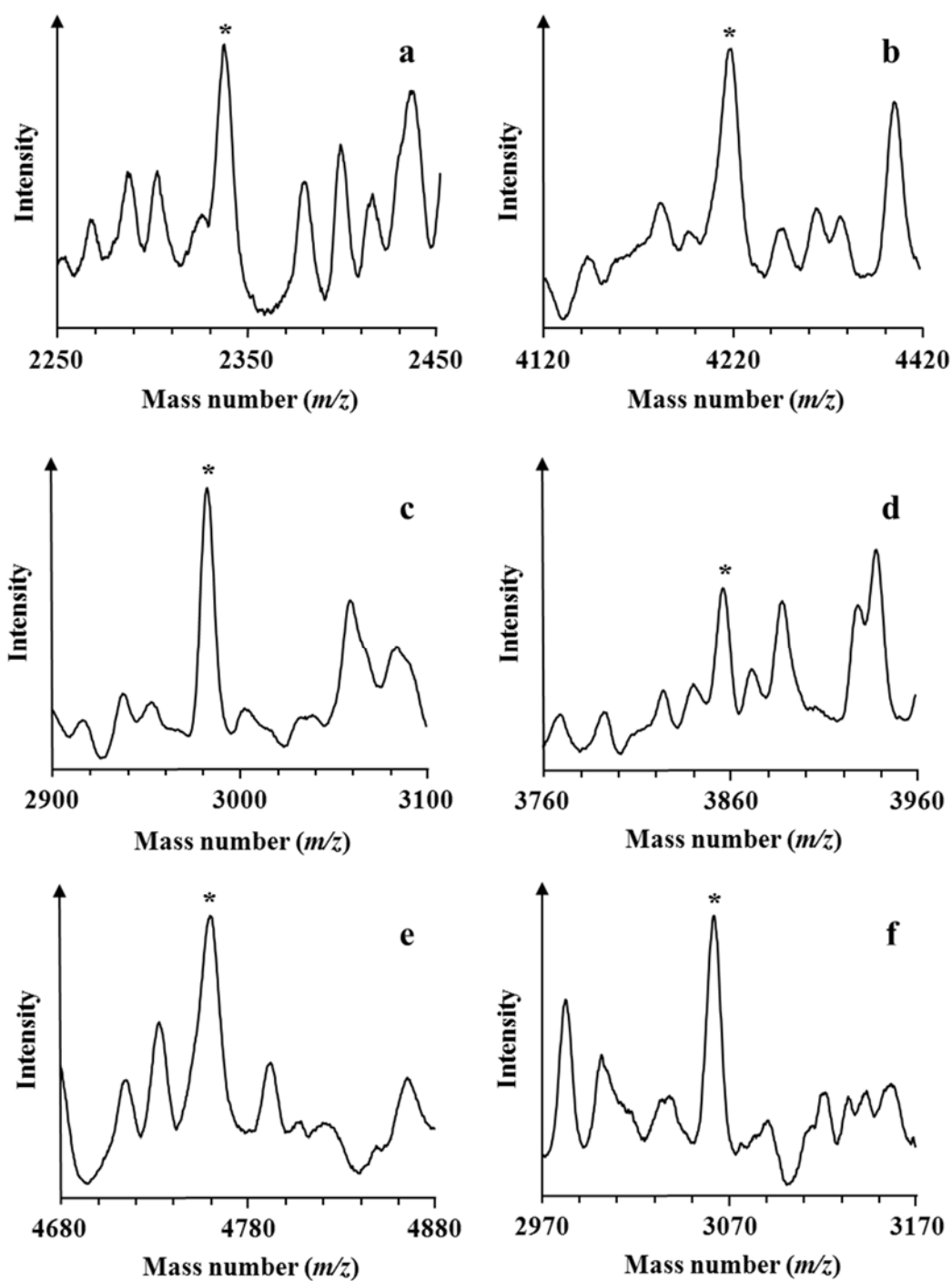


Fig. 15 MALDI-TOF mass spectra of characteristic tryptic fragments from rat L-FABP.

(a) Met1–Lys20 (molecular mass calcd 2351, found 2347.4), (b) Met1–Lys36 (calcd 4220, found 4219.3), (c) Tyr7–Lys31 (calcd 2988, found 2983.2), (d) Lys47–Lys80 (calcd 3857, found 3857.1), (e) Val79–Lys121 (molecular mass calcd 4758, found 4760.0), (f) Ser100–Arg126 (calcd 3063, found 3062.1).

オレイン酸と結合したラットL-FABPのX線結晶構造をFig. 16に示す[32]。図の前面と背面の β シート構造の間に示されているCPKモデルがオレイン酸である。PenSSeSPenと反応したと考えられるL-FABPの遊離Cysは、脂肪酸の結合部位とは異なり、図中の左側面のループ構造の黒丸で示した場所に位置している。これは比較的反応しやすい位置であり、PenSSeSPenと速やかに反応した(Fig. 13b)理由の1つであると考えることができる。

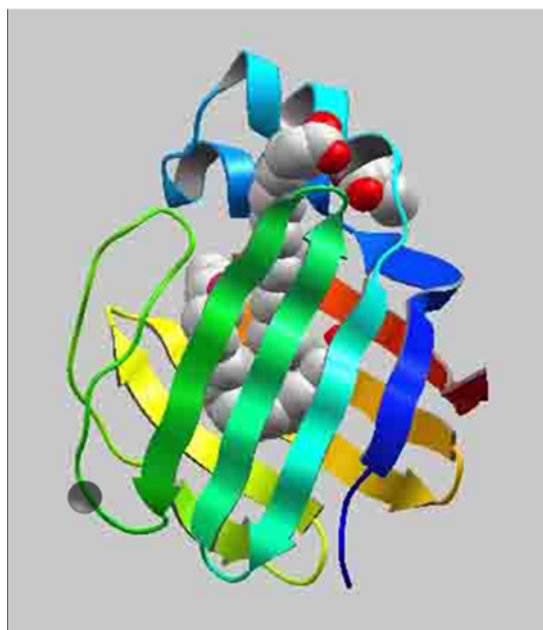


Fig. 16 X-ray crystal structure of the rat L-FABP. Protein Data Bank ID: 1LFO [32].

1-2-5. マウス L-FABP の PenSSeSPen 反応性の検討

^{75}Se 標識した放射性 SA をマウスに腹腔内投与すると、マウス肝臓の 14 kDa のタンパク質に ^{75}Se が結合することが Bansal らによって報告されている [17]。ウエスタンブロット法によって、このタンパク質はマウス L-FABP であると同定された。本研究では、SA 代謝中間体と質量分析法を用いてラット L-FABP がセレン結合タンパク質であることを見出した。そこで、同じ条件でマウス肝細胞質溶液を分析し、*in vivo* でのセレン結合性が示されているマウス L-FABP にも適用できるかを検証した。

ラットと同様の手順でマウス肝細胞質溶液を調製し、NEM または PenSSeSPen 処理した細胞質溶液を MALDI-TOF 質量分析に供した。得られた質量スペクトルを Fig. 17 に示す。 m/z 14,298 のピークについて、ラット L-FABP と同様のピークシフトが見られた。すなわち、NEM 処理によって質量数が 125.4 増加し、PenSSeSPen 処理によって質量数が 226.4 増加した。マウス L-FABP のアミノ酸配列は、ラット L-FABP と相同性が高く (92.5%) [17, 32]、ラットと同じく遊離 Cys が 69 番目に 1 つ存在する (Fig. 18)。したがって、マウス L-FABP も、Cys チオールを介して PenSSeSPen と反応したと推察された。

以上より、マウス L-FABP が RSSeSR' 反応性タンパク質であることが示された。放射性同位体や特異的抗体を用いずとも、SA 代謝中間体と質量分析を組み合わせた方法によりセレン結合タンパク質の探索および同定が簡便に行えることが証明された。また、本法はセレンとタンパク質の結合様式を検討できる点でも有効である。

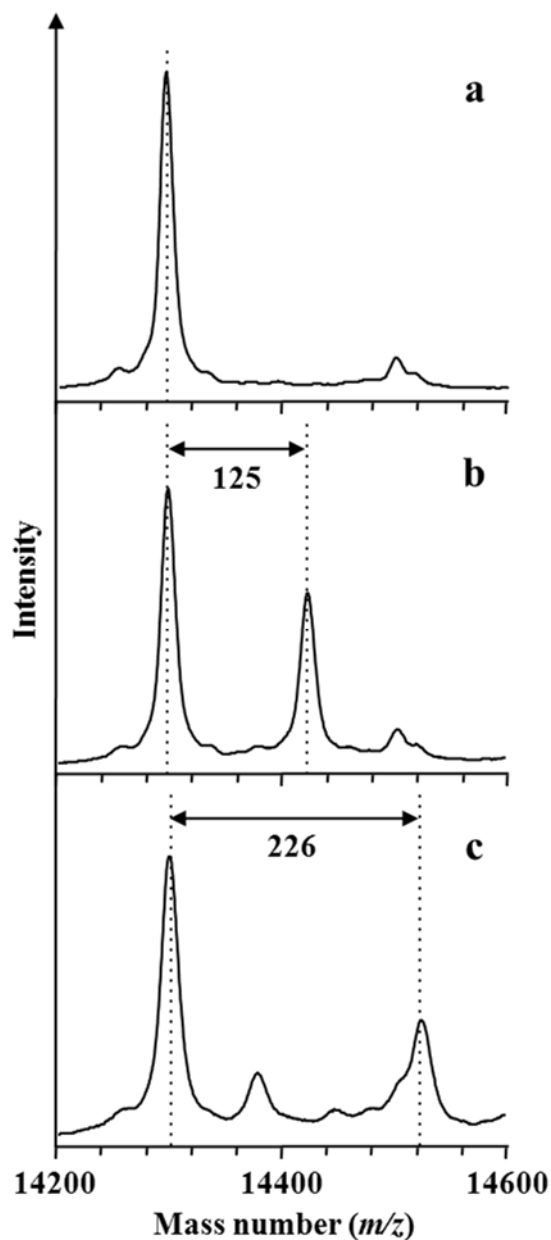


Fig. 17 MALDI-TOF mass analysis of the PenSSeSPen reactivity to mouse L-FABP at m/z 14,298 in the mouse liver cell lysate. (a) Before reaction, (b) after reaction with 1.0 mM NEM for 10 min, (c) after reaction with 0.1 mM PenSSeSPen for 30 min. Reaction temperature: 37 °C. Dotted lines were drawn at m/z 14,298, 14,423 and 14,551. Liver cell lysate was also prepared from a male ICR mouse (3-4 weeks old) by the same procedure described in the Materials and methods section.

1		11
Met Asn Phe Ser Gly Lys Tyr Gln Leu Gln		Ser Gln Glu Asn Phe Glu Pro Phe Met Lys
21		31
Ala Leu Gly Leu Pro Glu Asp Leu Ile Gln		Lys Gly Lys Asp Ile Lys Gly Val Ser Glu
41		51
Ile Val His Glu Gly Lys Lys Ile Lys Leu		Thr Ile Thr Tyr Gly Pro Lys Val Val Arg
61	69	71
Asn Glu Phe Thr Leu Gly Glu Glu Cys Glu		Leu Glu Thr Met Thr Gly Glu Lys Val Lys
81		91
Ala Val Val Lys Leu Glu Gly Asp Asn Lys		Met Val Thr Thr Phe Lys Gly Ile Lys Ser
101		111
Val Thr Glu Leu Asn Gly Asp Thr Ile Thr		Asn Thr Met Thr Leu Gly Asp Ile Val Tyr
121	127	
Lys Arg Val Ser Lys Arg Ile		

Fig. 18 Amino acid sequence of mouse L-FABP.

1-3. 小括

本章では、ラット肝細胞質溶液と SA 代謝中間体のモデル化合物である PenSSeSPen の反応性を検討し、RSSeSR' と反応する細胞質タンパク質の探索法の構築を試みた。PenSSeSPen 処理後の肝細胞質内のタンパク質重量当たりのセレン量およびチオール量の推移より、肝細胞質には PenSSeSPen と反応するタンパク質チオールが存在することが示唆された。PenSSeSPen 処理した細胞質溶液を MALDI-TOF 質量分析に供した結果、 m/z 14,313 のピーク成分に -SeSPen が付加したと考えられるピークが検出された。トリプシン消化フラグメントの解析より、PenSSeSPen と反応したタンパク質はラット L-FABP であることが示唆された。

これまでに、セレンの放射性同位体とウエスタンブロットを併用した方法によって、マウス L-FABP が *in vivo* でセレンと結合性を有するタンパク質であることが報告されている。代謝中間体と質量分析法を組み合わせた本法をマウス肝細胞質溶液にも適用したところ、マウス L-FABP は PenSSeSPen と反応性を有し、RSSeSR' とチオール交換を起こすことが示された。

以上より、本法はセレン結合タンパク質の探索に簡便かつ有効な方法であることが示された。また、タンパク質に結合しているセレンの化学形を考察できる点にも有効性がある。

1-4. 実験方法

1-4-1. PenSSeSPen の合成 [24, 25]

PenSSeSPen は、Milli-Q 水 (> 18 MΩ cm, Millipore 社製 Biocel A10) に溶解させた 1 当量の SA (ナカライテスク社製) と、4 当量の L-ペニシラミン (PenSH、東京化成工業株式会社製) を混合し、スターラーにより室温で 2 時間攪拌後、冷蔵庫で一晩静置して合成した。得られた白色固体を Milli-Q 水で 2 回、特級メタノールで 2 回それぞれ遠心して洗浄した後、室温で減圧乾燥したものを実験に使用した。PenSSeSPen の逆相クロマトグラフ分析には、紫外可視検出器 SPD-10A およびデータ処理装置 C-R8A を装着した液体クロマトグラフ LC-10AT (島津製作所製) を用いた。

1-4-2. ラット肝細胞質溶液の調製

3 週齢雄性 Wistar ラット (体重 ≈ 120 g, 九動株式会社製) をエーテルで屠殺後、肝臓を摘出し、氷冷した 10 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中でホモジナイザー (PT120E, POLYTRON 社製) を用いてホモジナイズした後、プローブ型ソニケーター 250D (BRANSON 社製) で超音波破碎した。得られた懸濁液を、ポリカーボネート製遠心分離用試験管 (38 × 102 mm, Beckman 社製) に移し入れ、超遠心用ローター TYPE45Ti に装着し、超遠心機 L-80 ultracentrifuge (Beckman 社製) で、20000 rpm, 4 °C で 1 時間超遠心処理した。得られた上清を肝細胞質溶液とした。

1-4-3. 肝細胞質溶液の PenSSeSPen 処理

1-4-2 で調製した肝細胞質溶液に最終濃度 1 mM *N*-ethylmaleimide (NEM、ナカライテスク社製) を添加し、37 °C で 10 分間インキュベートし、NEM 処理とした。また、肝細胞質溶液に最終濃度 0.2 mM PenSSeSPen を添加し、37 °C で 30 分間インキュベートし、PenSSeSPen 処理とした。

1-4-4. 肝細胞質溶液の透析

1-4-3 の条件で PenSSeSPen 処理した肝細胞質溶液中の、低分子チオールおよび未反応 PenSSeSPen を除く目的で、透析を行った。試料溶液を分画分子量 6–8 kDa の透析膜 (Spectra/Por, Spectrum 社製) に入れ、試料容量の約 100 倍の 5 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) を外套液として、4 °C で一晩透析した。

1-4-5. セレンの定量 [33]

透析後の試料溶液に硝酸 2 mL を加えてブロックヒータで 140 °C まで徐々に昇温し、140 °C で 30 分間加熱した。室温まで冷却後、過塩素酸 0.5 mL を添加し、175 °C まで徐々に昇温後、白煙が認められてからさらに 1 時間ほど加熱した。室温まで冷却後、Milli-Q 水 2 mL を加えて 170 °C まで徐々に加熱した。室温まで冷却後、さらに Milli-Q 水 2 mL を加え、この操作を再度繰り返した。

湿式分解を終えた試料溶液に、0.1 M 塩酸 13 mL、0.1 M エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 (EDTA) 水溶液 0.5 mL、0.1 M フッ化ナトリウム水溶液 0.5 mL、0.1% 2,3-ジアミノナフタレン (東京化成株式会社製) / 0.1 M 塩酸溶液 10 mL を加え、50 °C の水浴で振とうしながら 20 分間加温した。冷却後、少量の精製水で分液漏斗に洗い込み、シクロヘキサン 10 mL を加えて 5 分間機械振とうし、水層を分離した。シクロヘキサン層を乾燥ろ紙でろ過した後、蛍光分光光度計 FP-6600 (日本分光株式会社製) を使用して、励起波長 375 nm、蛍光波長 520 nm における蛍光強度を測定した。試料溶液中セレン量は、セレン標準液 (原子吸光分析用、関東化学株式会社製) を使用して作成した検量線から算出した。

1-4-6. タンパク質の定量 [34]

肝細胞質溶液中のタンパク質の定量は、Lowry 法により次のように行った。試薬 A 液 (2% Na_2CO_3 , 0.1 M NaOH)、B 液 (1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、C 液 (2% 酒石酸ナトリウム二水和物) を混和 (100 : 1 : 1) して、D 液とした。また、市販のフェノール試薬を Milli-Q 水で 2 倍希釈し、E 液とした。透析後の試料溶液 50 μL に D 液 2 mL を混合し、室温で 10 分間放置した後、E 液 200 μL を加えて室温でさらに 30 分間放置した。紫外可視分光光度計 V-660 (日本分光株式会社製) を使用して、得られた溶液の波長 650 nm における吸光度を測定し、予め作成した検量線から試料溶液中のタンパク量を算出した。検量線は、牛血清アルブミン (脂肪酸フリー、和光純薬工業株式会社製) を使用して作成した。

1-4-7. タンパク質チオール定量 [35]

透析後の試料溶液 500 μL に 1 mM ジチオビスニトロ安息香酸 (DTNB, SIGMA 社製) 溶液を 500 μL 加え、37 °C で 30 分間インキュベートした後、波長 450 nm における吸光度を測定した。還元型グルタチオン (GSH、ナカライテスク社製) を標準として用い、検量線法によって試料中のチオール含量を算出した。

1-4-8. MALDI-TOF 質量分析

MALDI-TOF 質量スペクトルの測定には、Ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonics 社製) を、試料ターゲットには AnchorChip var/384 TF (Bruker Daltonics 社製) を使用した。マトリックスにはシナピン酸 (Fluka 社製) あるいは 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB、東京化成工業株式会社製) を用いた。0.1% トリフルオロ酢酸-アセトニトリル (2:1) 混液にシナピン酸を飽和させ、シナピン酸溶液を調製した。また、DHB 溶液は 20% エタノールに溶かして調製した (10 mg/mL)。シナピン酸溶液または DHB 溶液を、それぞれ 1 当量または 3 当量の試料溶液と混合した後、

少量を試料ターゲット AnchorChip にアプライした。測定用のパラメーターファイルには、LP_3-20 kDa.par または Lowmass_500Da.par を用い、リニアージョイオンモードで測定した。質量電荷比の校正にはインスリン (SIGMA-ALDRICH 社製)、または GSH および酸化型グルタチオン (GSSG、ナカライテスク社製) を使用した。

トリプシン (豚すい臓由来) はナカライテスク社製を用いた。最終濃度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ トリプシンとなるように試料と混合し、37 $^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベートし、トリプシン消化処理とした。トリプシン消化により得られるフラグメントの分子量の計算には、オンラインプログラム Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>) を使用した。

第二章

脳内セレン結合タンパク質の探索

2-1. 序

第一章では、SA の反応性代謝物のモデル化合物 PenSSeSPen と質量分析法を組み合わせた方法が、セレン結合タンパク質の探索に簡便かつ有効な方法であることを示した。第二章ではこの方法を用いて、脳内のセレン結合タンパク質の探索を行った。

脳は、体重のわずか2%程度の重量でありながら、全身が消費する酸素の約20%を占める [36]。このような高い酸素要求性に伴い、脳では高濃度の活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) が生じ、ROS がアルツハイマー病 [37] やパーキンソン病 [38] などの神経変性疾患 [39] の発症や進行に関与すると報告されている。脳内の ROS の消去に GPx は重要であり、GPx の活性変化と神経変性疾患との関連性を指摘する報告もある [40-42]。GPx の中でも GPx4 は脂質過酸化物を直接還元でき、脂質含量の高い脳では特にその重要性は高いと考えられる。

当研究室では以前、雄性マウスをセレン欠乏飼料 (0.004 $\mu\text{gSe/g}$) あるいは栄養量のセレンを混合した飼料 (0.25 $\mu\text{gSe/g}$) で 8 週間飼育した後の臓器中セレン濃度の変化を調べている [43]。セレン欠乏飼料を与えたマウスの肝臓や血液中のセレン濃度は、栄養量のセレンを与えたマウスに比べて顕著な減少を示す一方、脳では大きな変化は見られず、半分程度の減少にとどまった (Fig. 19)。また、このような脳特異的セレン保持挙動に関する検討を行うため、ラット脊髄後根神経節 (Dorsal root ganglion, DRG) 細胞を用いた研究も行っている [44]。DRG 細胞を、SA を添加した培地で培養した後に SA を含まない培地に交換して培養すると、DRG 細胞中のセレン含量は SA 添加時よりは低いものの SA 添加前より高い濃度で推移した (Fig. 20)。また、SA を含まない培地になってからも GPx 活性が増大したことから、DRG 細胞は SA 由来のセレンを細胞内に保持してセレン

タンパク合成に利用していることが明らかとなった。これらの結果は、神経細胞におけるセレンの重要性およびセレン保持機構の存在を強く示唆しており、脳のセレン保持機構との関連性も考えられる。

脳特異的セレンの保持にはセレン結合タンパク質が関与している可能性が考えられることから、本章では、脳内セレン保持機構の解明を目的とした脳内セレン結合タンパク質の探索を行った。

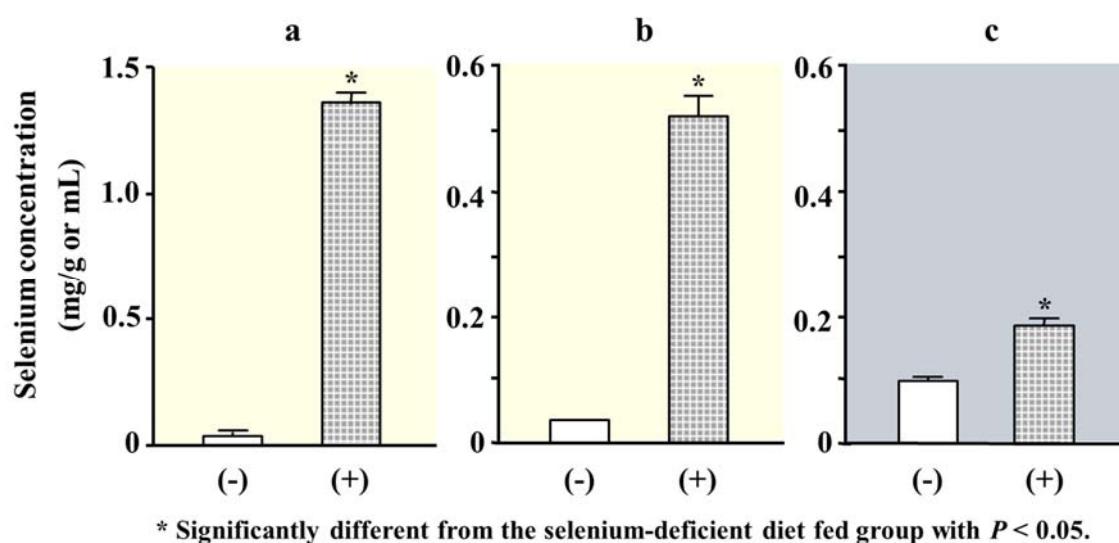


Fig. 19 Dietary selenium status and organ selenium concentrations in 11-week old mouse. (a) Liver, (b) blood, (c) brain. (-): Selenium-deficient diet, (+): selenium-adequate diet.

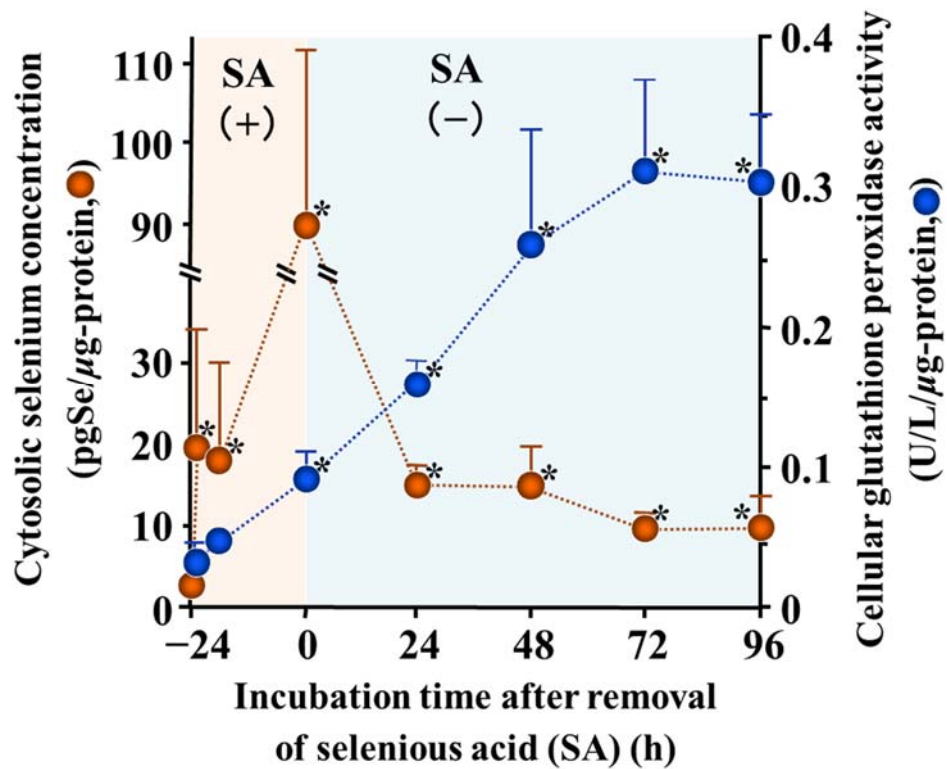


Fig. 20 Changes in selenium concentration and cGPx activity in DRG neurons after removal of SA from the culture media. Incubation conditions: time -24–0 h, 1 μ M SA plus 10% FBS-containing DMEM culture medium; 0-96 h, SA-free 10% FBS-containing DMEM culture medium. Red circle: selenium concentration in the cell, blue circle: cGPx activity. Data express mean and standard error ($n = 4-5$). *Significantly different from the value at time -24 h with $P < 0.05$.

2-2. 結果および考察

2-2-1. 脳細胞質溶液と PenSSeSPen の反応性の検討

PenSSeSPen 処理後のラット脳細胞質溶液中のセレン量およびチオール量の測定を行い (Table 2)、RSSeSR' と脳細胞質中タンパク質の反応性を検討した。肝細胞質溶液の場合と同様に、PenSSeSPen 反応濃度に応じた細胞質溶液中のタンパク量当たりのセレン量の増加およびタンパク質チオール量の減少が見られたことから、PenSSeSPen 由来のセレンが脳細胞質溶液のタンパク質チオールを介して結合することが示された。

Table 2 Changes in selenium and protein thiol concentration in the brain cell lysate after reaction with PenSSeSPen.

PenSSeSPen concn in reaction mixture (mM)	Selenium concn ($\mu\text{mol/g-protein}$)	Protein thiol concn ($\mu\text{mol/g-protein}$)
0	0.025 ± 0.003	24.13 ± 1.506
0.001	0.364 ± 0.035	20.99 ± 2.729
0.01	3.944 ± 0.155	13.05 ± 1.808
0.1	27.80 ± 0.946	4.068 ± 1.332

Reaction time: 30 min, reaction temperature: 37 °C. Values are the mean and standard error ($n = 4$).

2-2-2. セレンの結合様式の解析

脳細胞質溶液を X 線光電子分光法 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) に供し、試料中のセレンと硫黄の酸化状態を調べることで、脳細胞質中のタンパク質に結合するセレンの化学形に関する情報を求めた。XPS は、物質に X 線を照射することで原子軌道の電子が励起され、光電子として原子核外にはじき出される時に生じる光電子のエネルギー (E_K) を測定している。この E_K は元素とその酸化状態に固有であるため、この値から元素の種類と酸化状態を特定することができる。また、照射する X 線のエネルギー ($h\nu$) は一定であり、光電子が物質内に束縛されていた時の結合エネルギー (E_B) を算出することができる ($E_K = h\nu - E_B - \phi$, ϕ : 装置の仕事関数)。

PenSSeSPen 処理前の脳細胞質溶液のスペクトルにおいて、セレン 3p 軌道と硫黄 2p 軌道のピークは 163-166 eV に極大を示した (Fig. 21a)。一方、PenSSeSPen 処理後には、162-166 および 167-172 eV の 2 つのピークが観察された (Fig. 21b)。これらのピークは PenSSeSPen のそれと類似しており (Fig. 21c)、結合エネルギーの値もほぼ一致した (Table 3)。以上より、脳細胞質溶液中タンパク質へ結合したセレンは、RSSeSR' の化学形であると考えられた。すなわち、タンパク質チオールが PenSSeSPen のセレンに求核攻撃を起こし、両者間でチオール交換反応が起こっていることが推察された ($R-Cys-SH + PenSSeSPen \rightarrow R-Cys-SSeSPen + PenSH$)。

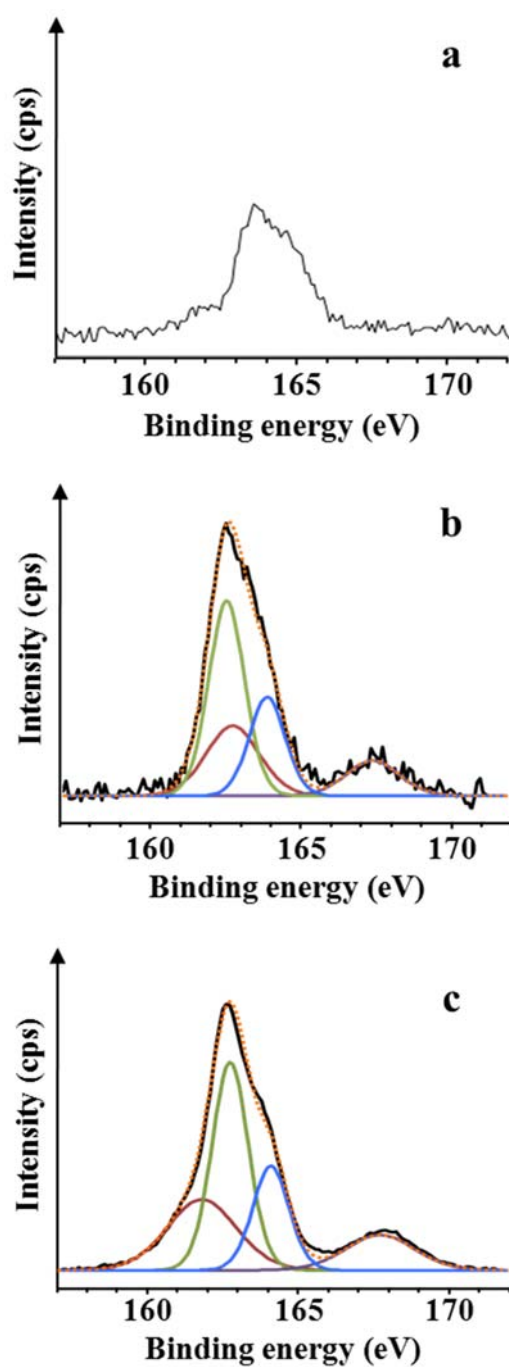


Fig. 21 X-ray photoelectron spectroscopy of selenium 3p and sulfur 2p electrons. (a) Brain cell lysate before reaction with PenSSeSPen, (b) brain cell lysate after reaction with 0.1 mM PenSSeSPen for 30 min, (c) PenSSeSPen. Black line: found, red line: calcd Se 3p_{3/2}, purple line: calcd Se 3p_{1/2}, green line: calcd S 2p_{3/2}, blue line: calcd S 2p_{1/2}, orange dotted line: envelope calcd.

Table 3 X-ray photoelectron spectroscopy binding energy of selenium 3p and sulfur 2p electrons in the brain cell lysate after reaction with PenSSeSPen.

Atom level	Binding energy (eV)	
	Brain cell lysate after reaction	
	with PenSSeSPen	PenSSeSPen
Se 3p _{3/2}	163.60	162.05
Se 3p _{1/2}	168.04	167.61
S 2p _{3/2}	163.13	162.93
S 2p _{1/2}	164.49	164.20

2-2-3. 脳細胞質溶液中セレン結合タンパク質の探索

次に、PenSSeSPen と反応したタンパク質を MALDI-TOF 質量分析により探索した。2-2-1 より、タンパク質は遊離チオールを介して PenSSeSPen と反応することが示唆されたため、第一章と同様に NEM を用いて遊離 Cys 含有タンパク質を特定した。NEM 処理した試料の質量スペクトルにおいて、NEM による修飾を示す質量数 125 の増加を起こしたピークが複数観察された。NEM 処理後のタンパク質チオール量は処理前の $4.38 \pm 2.29\%$ ($n = 4$) と大きく減少し、脳細胞質溶液中の遊離チオールは NEM によってほとんどアルキル化されることが示された。PenSSeSPen 処理した細胞質溶液の質量スペクトルを未処理のものと比較すると、NEM 処理によって特定されたチオール含有ピークの一部について、-SeSPen の付加に相当するピークシフトが観察された。脳細胞質溶液のマスマスペクトルについて、上述のような質量数の変化が見られたピークを Table 4 にまとめた。

Table 4 Observed molecular mass gain in MALDI-TOF mass spectra of the rat brain cell lysate before and after the reaction with NEM and PenSSeSPen.

Original peak in m/z before reaction (a)	Peak in m/z after reaction with NEM (a+125, +250 and +375)	Peak in m/z after reaction with PenSSeSPen (a+226)
4406.6	4532.1	n.d.
4562.6	4688.3	n.d.
7534.9	7660.6, 7786.4	n.d.
7924.5	8050.2	n.d.
11235.7	11361.2, 11487.7	n.d.
11790.9	11917.5, 12042.9	n.d.
12352.9	12476.9, 12602.0, 12727.0	12576.5
15155.5	15282.8	15380.1
15196.5	15322.7, 15447.8	15422.5
15847.0	16098.8	n.d.
17741.7	17867.6, 17991.0	n.d.
17791.2	17914.0, 18040.6	n.d.

n.d.: not detected. NEM and PenSSeSPen concentrations used: 1.0 and 0.2 mM.

Reaction time: 10 and 30 min. Reaction temperature: 37 °C.

2-2-4. PenSSeSPen と反応性を示した脳細胞質タンパク質の同定

PenSSeSPen と反応性を示した 3 つの脳細胞質タンパク質に関して、タンパク質データベース PIR で検索を行った。その結果、 m/z 15,155.5 および m/z 15,196.5 の分子種はそれぞれ、Cystatin-12 precursor (CST12) と Hb の α 鎖であると考えられた。 m/z 12,352.9 については該当するタンパク質がなかった。

m/z 15,155.5 のピークシフトを Fig. 22 に示す。 m/z 15,155.5 の分子種について NEM 処理によって 125.0、PenSSeSPen によって 226.1、それぞれ親ピークに対して質量数が増加したピークが観察された。

CST12 は 128 残基のアミノ酸から成り、Met1-Phe21 はシグナルペプチドである。構造中に有している 5 つの Cys のうち、Cys19 のみが遊離であり、他の Cys 残基は分子内ジスルフィド結合 (Cys82-Cys92, Cys105-Cys125) を形成している (Fig. 23)。PenSSeSPen は、Cys19 の遊離チオールと反応したものと考えられた。 m/z 15,155 のタンパク質が CST12 であることを同定するため、トリプシン消化フラグメントの解析を行った。脳細胞質溶液をトリプシン消化して得られた試料を MALDI-TOF 質量分析し、そのフラグメントの分子量を Protein prospector を用いて算出した計算値と比較した。Met1-Lys22, Ser5-Lys28, Asn29-Lys55, Asn29-Arg58, Thr80-Lys101, Cys105-Thr128 のフラグメントについて、計算値と良好に一致する分子量のピークが観察された (Fig. 24)。以上より、PenSSeSPen と反応した m/z 15,155 のタンパク質は CST12 であると同定された。

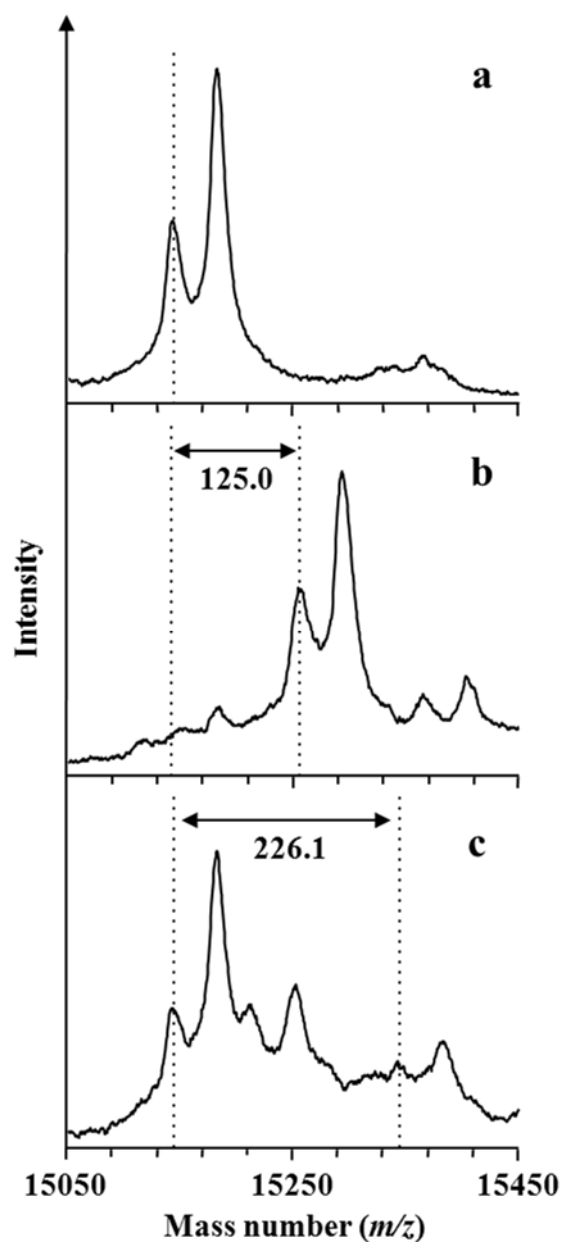


Fig. 22 MALDI-TOF mass analysis of the PenSSeSPen reactivity to m/z 15,155.5 species in the brain cell lysate. (a) before reaction, (b) after reaction with 1.0 mM NEM for 10 min, (c) after reaction with 0.1 mM PenSSeSPen for 30 min. Reaction temperature: 37 °C. Dotted lines were drawn at m/z 15,282.8 (NEM-adduct) and 15,380.1 (SeSPen-adduct).

1	Met Leu Trp Lys Ser Val Lue Pro Val Ala	11	Leu Ile Val Leu Gly Ile His Asp	19	Cys Ser
21	Phe Lys Phe Ile Glu Ile Asp Lys Asn Glu	31	Glu Glu Phe Ala Met Ser Met Glu His Val		
41	Leu Phe His Phe Asn Glu Asn Gln Asn Asp	51	Asp Phe Ala Tyr Lys Phe Leu Arg Val Arg		
61	Arg Ser Leu Arg Lys Lys Tyr Thr Gln Lys	71	Tyr Leu Val Asp Leu Glu Met Gly Arg Thr		
81	Leu Cys Gly Lys Tyr Asp Glu Asp Ile Asp	91	Asn Cys Pro Leu Gln Glu Gly Pro Gly Glu		
101	Lys Lys Val Arg Cys Thr Tyr Ile Val Glu	111	Thr Arg Val Trp Val Thr Glu Phe Thr Ile		
121	Leu Asn Ser Thr Cys Val Gln Thr	128			

Fig. 23 Amino acid sequence of the rat Cystatin-12 precursor. Two intramolecular disulfide bonds between Cys82 and Cys92 and between Cys105 and Cys125. Cys19 has only free thiol.

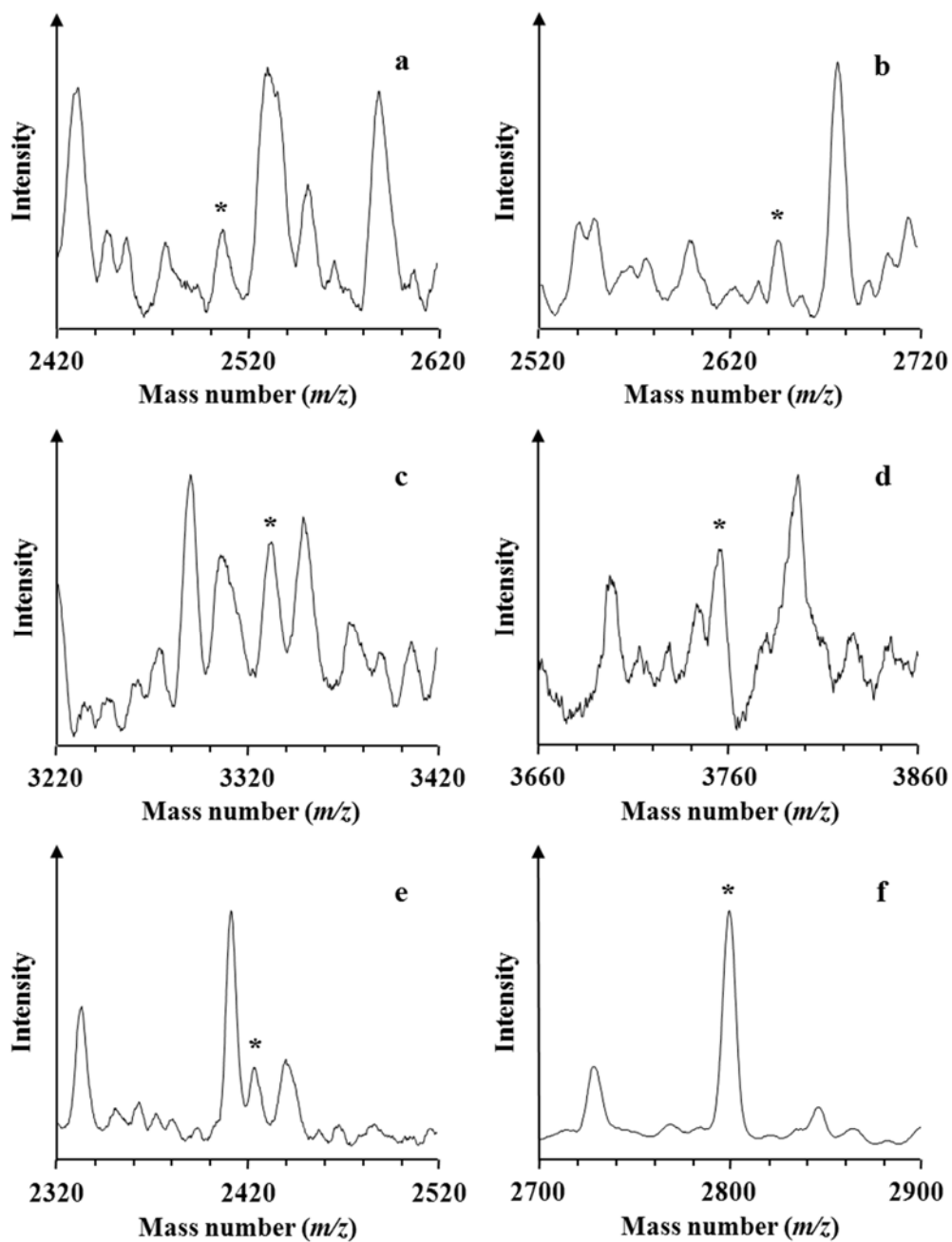


Fig. 24 MALDI-TOF mass spectra of characteristic tryptic fragments from rat CST12. (a): Met1–Lys22 (molecular mass calcd for Met acetyl 2513.1, found 2517.7), (b): Ser5–Lys28 (calcd 2656.5, found 2646.6), (c): Asn29–Lys55 (calcd 3335.4, found 3331.0), (d): Asn29–Arg58 (calcd 3754.1, found 3755.6), (e): Thr80–Lys101 (calcd 2424.1, found 2423.7), (f): Cys105–Thr128 (calcd 2806.4, found 2801.6).

CST12 は、Cys プロテアーゼ(パパイン、カテプシンなど)インヒビターで、Cystatin スーパーファミリーに属している。Cystatin は、中枢神経や他の器官においてタンパク質の代謝回転やポリペプチド産生の制御に関与していると考えられ [45]、腫瘍形成 [46-48] やアルツハイマー病などの神経変性疾患 [49-51] への関与を指摘した報告もある。また、Cystatin C は腎機能マーカーとして臨床応用されている。CST12 とセレン代謝やセレンタンパクとの関連はこれまでに報告されておらず、CST12 がセレンの脳特異的保持に関与しているかどうかは今後検討する必要がある。

2-3. 小括

第二章では、第一章で構築した方法を用いて、ラット脳細胞質溶液におけるセレン結合タンパク質の探索を行った。**PenSSeSPen** はラット脳細胞質溶液のタンパク質チオールを介して反応し、濃度依存的な反応性を示した。**XPS** により脳細胞質タンパク質に結合した **PenSSeSPen** 由来のセレンの化学形を検討した結果、**RSSeSR'** の化学形で結合していることが示された。質量分析により **PenSSeSPen** と反応したタンパク質を探索し、3 つのセレン結合タンパク質を見出した。これらのうち m/z 15,155 のタンパク質は、データベース検索とトリプシン消化フラグメント解析の結果 **CST12** であると同定された。

以上より、**RSSeSR'** のモデル化合物として **PenSSeSPen** を用い、質量分析により **CST12** が脳細胞質中のセレン結合タンパク質であることを見出した。**CST12** は細胞質中のセレン代謝に関与するタンパク質の 1 つであると考えられ、脳における臓器特異的なセレン保持機構と関わりを解明する必要がある。

2-4. 実験方法

2-4-1. ラット脳細胞質溶液の調製

3 週齢雄性 Wistar ラットをエーテルで屠殺後、脳を摘出し、氷冷した 10 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中でホモジナイザーを用いてホモジナイズした後、プローブ型ソニケーター 250D で超音波破碎した。得られた懸濁液を、ポリカーボネート製遠心分離用試験管に移し入れ、超遠心用ローター TYPE45Ti に装着し、超遠心機 L-80 ultracentrifuge で、20000 rpm, 4 °C で 1 時間超遠心処理した。得られた上清を脳細胞質溶液とした。

2-4-2. 脳細胞質溶液の PenSSeSPen 処理

2-4-1 で調製した脳細胞質溶液に最終濃度 1 mM NEM を添加し、37 °C で 10 分間インキュベートし、NEM 処理とした。また、脳細胞質溶液に最終濃度 0.1 mM PenSSeSPen を添加し、37 °C で 30 分間インキュベートし、PenSSeSPen 処理とした。

2-4-3. X 線光電子分光法

試料溶液を凍結乾燥 (VD-800F, TAITEC 社製) し、AXIS-ULTRA (Shimadzu/Kratos 社製) を用いて、セレンの 3p および硫黄の 2p 軌道の光電子スペクトルを測定した。X 線源には、単色化したアルミニウムの $K\alpha$ 線 (0.8339 nm, 1.486 keV) を使用した。測定スペクトルの解析には、XPSPEAK41 Software を用いた。

第三章

心臓内セレン結合タンパク質の探索

3-1. 序

第一章でセレン結合タンパク質の探索法を確立し、第二章ではこの方法を臓器特異的なセレン保持機構を有する脳に適用した。第三章では、セレン欠乏症との関わりの深い心臓への適用を試みた。

セレン欠乏症には、心筋症や筋力低下、骨関節疾患、爪変形など様々な症状が見られる。心筋障害を主症状とする中国の風土病として **Keshan** 病が知られている。**Keshan** 病は、中国の **Keshan** 地方を始めとする土壤中セレン濃度の低い地域に分布し [52, 53]、**SA** の投与によってその症状が改善することから、セレン欠乏との因果関係が報告されている [54]。また、**Keshan** 病患者では、**GPx1** の発現が低下していることも報告されている [55]。心臓は絶えず拍動して全身に血液を送るために、大量のエネルギーを要する。成人の心臓において、**ATP** 供給源の 50-70% は脂肪酸の β 酸化であり [56]、これに伴い **ROS** が産生される。この過酸化物の除去には **GPx** やチオレドキシシンなどのセレンタンパクが関与している [57]。

日本ではあまりセレン欠乏症は見られないが、完全静脈栄養患者で長期間セレン補充を行わない場合などで見られることがある。その際、生物学的利用能の高い **SA** が治療に用いられる。このように、セレン欠乏症との関わりの深い心臓にはセレン運搬や保持などに関与するセレン結合タンパク質が存在するのではないかと考え、心臓細胞質中セレン結合タンパク質の探索を行った。

3-2. 結果および考察

3-2-1. 心臓細胞質溶液と PenSSeSPen の反応性の検討

ラット心臓細胞質溶液と RSSeSR' の反応性を検討するため、PenSSeSPen 処理後の細胞質中セレン濃度およびチオール量を測定した。PenSSeSPen の反応濃度依存的に、タンパク質に結合したセレン量は増大したが、心臓細胞質溶液中のタンパク質チオール濃度 ($20.98 \pm 0.57 \mu\text{mol/g-protein}$, $n = 5$) を超えることはなかった (Table 5)。この結果から、心臓細胞質には RSSeSR' と反応性を示すチオール含有タンパク質が存在することが示唆された。

Table 5 Changes in selenium concentration in the rat heart cell lysate after reaction with PenSSeSPen.

PenSSeSPen concn in reaction mixture (mM)	Selenium concn ($\mu\text{mol/g-protein}$)
0	0.037 ± 0.002
0.01	5.592 ± 1.06
0.05	14.75 ± 1.89
0.1	19.16 ± 2.45
0.2	20.13 ± 0.50

Reaction time: 10 min, reaction temperature: 37 °C. Values are the mean and standard error ($n = 4-6$).

3-2-2. 心臓細胞質溶液中セレン結合タンパク質の探索

次に、PenSSeSPen と反応したタンパク質を MALDI-TOF 質用分析により探索した。前節より、PenSSeSPen と反応するタンパク質は遊離チオールを有すると考えられたため、NEM によりチオール含有ピークを特定した。続いて、PenSSeSPen と反応させて質量数に変化のあるピークを探した。NEM 処理によって質量数が 125、PenSSeSPen 処理によって 226 変化のあったピークの一覧を Table 6 に示す。チオール含有ピークは 12 個検出され、そのうち PenSSeSPen と反応性を示したものは 7 つであった。これらの 7 つのうち、最もピーク強度の高かった m/z 17,026.6 に着目した。この分子種は、NEM 処理によって 125.4、PenSSeSPen によって 226.1 の質量数の増加を示した (Fig. 25)。

Table 6 Observed molecular mass gain in MALDI-TOF mass spectra of the rat heart cell lysate before and after the reaction with NEM and PenSSeSPen.

Original peak in m/z before reaction (a)	Peak in m/z after reaction with NEM (a+125, +250 and +375)	Peak in m/z after reaction with PenSSeSPen (a+226)
3636.6	3762.2	3862.9
4047.3	4171.7	4272.5
4183.4	4308.3	4410.5
11241.2	11366.1	n.d.
12347.9	12473.3, 12597.9, 12722.8	12574.6
14997.7	15122.2	n.d.
15041.7	15167.8	n.d.
15154.4	15406.1, 15529.9	n.d.
15198.4	15324.4, 15449.5, 15574.2	15425.5
15837.9	16088.1	n.d.
17026.6	17152.0	17252.6
17235.8	17361.1	17462.4

n.d.: not detected. NEM and PenSSeSPen concentrations used: 1.0 and 0.05 mM.

Reaction time: 10 min. Reaction temperature: 37 °C.

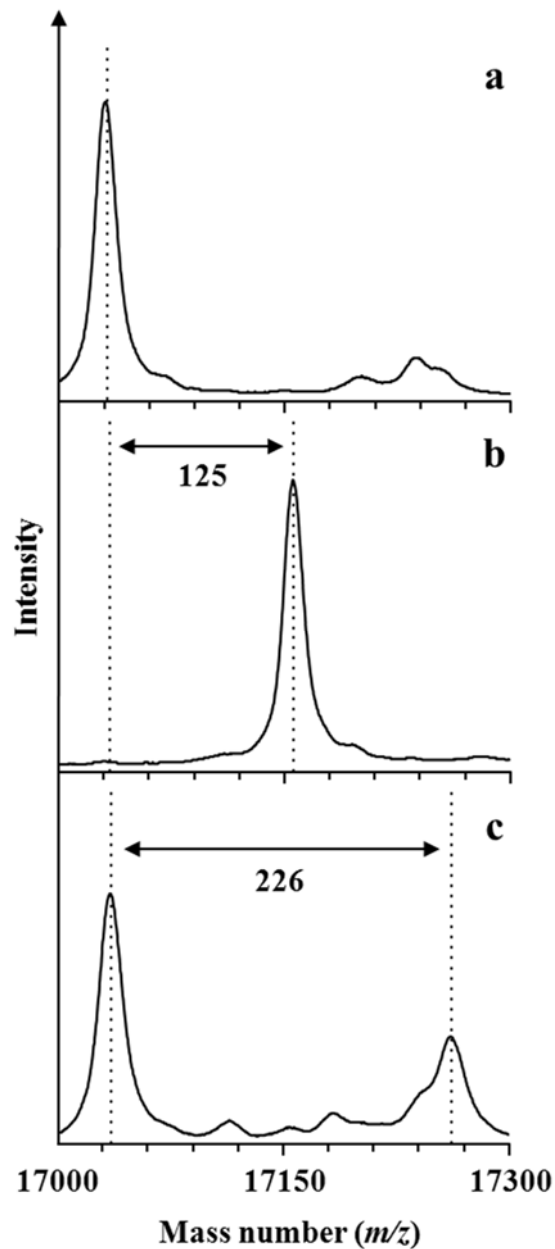


Fig. 25 MALDI-TOF mass analysis of the PenSSeSPen reactivity to m/z 17,026 species in the rat heart cell lysate. (a) Before reaction, (b) after reaction with 1.0 mM NEM for 10 min, (c) after reaction with 0.05 mM PenSSeSPen for 10 min. Reaction temperature: 37 °C. Dotted lines were drawn at m/z 17,026, 17,152 (NEM-adduct) and 17,252 (SeSPen-adduct).

PenSSeSPen と同条件で SA 処理した心臓細胞質溶液についても質量分析を行ったところ、 m/z 17,026 のピークに変化は見られなかった。SA 処理後のタンパク量当たりのセレン量を測定すると PenSSeSPen 処理時の 10.1%であり、SA よりも RSSeSR'の方がタンパク質と効率良く反応することが示唆された (Fig. 26)。SA 処理時間を延長すると、 m/z 17,026 のピークに質量数が 385 増加したピークが観察された (Fig. 27b)。385 は -SeSG (selenenyl glutathione) に相当し、SA が反応溶液中で GSSeSG を形成してタンパク質チオールとチオール交換していると考えられた。試料中の GSH 濃度が低いために反応が進みにくいと見え、SA と GSH を同時に加えてインキュベートした後に質量分析に供した。その結果、SA 単独で処理した場合よりも -SeSG が付加したピークが大きく検出された (Fig. 27c)。以上より、SA は RSSeSR'へ還元されてからタンパク質と反応することが示唆された。

次に、異なる濃度の PenSSeSPen で処理した心臓細胞質溶液を質量分析に供した (Fig. 28)。PenSSeSPen 濃度の増大に伴って未反応の m/z 17,026 のピークは小さくなり、-SeSPen が付加したピークは増大した。このことから、 m/z 17,026 は SA 代謝中間体である RSSeSR'と高い反応性を有し、その反応は濃度依存的であることが示された。

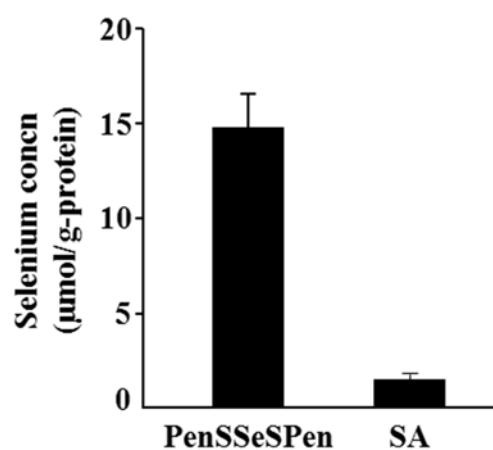


Fig. 26 Selenium concentrations in the heart cell lysate after reaction with selenium species. (a) After reaction with 0.05 mM PenSSeSPen, (b) after reaction with 0.05 mM SA. Reaction time and temperature: 10 min and 37 °C. Data are mean and standard error ($n = 4$).

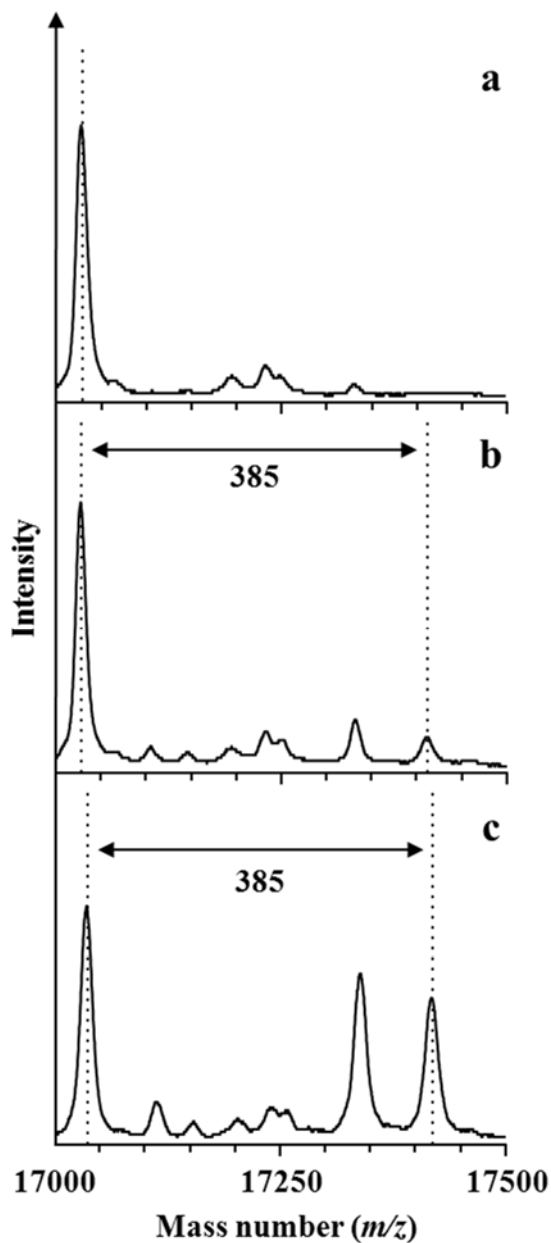


Fig. 27 MALDI-TOF mass analysis of the SA reactivity to m/z 17,026 species in the rat heart cell lysate. (a) Before reaction, (b) after reaction with 0.1 mM SA, (c) after reaction with 0.1 mM SA and 0.05 mM GSH. Reaction time: 3 h, reaction temperature: 37 °C. Dotted lines were drawn at m/z 17,026 and 17,411 (SeSG-adduct).

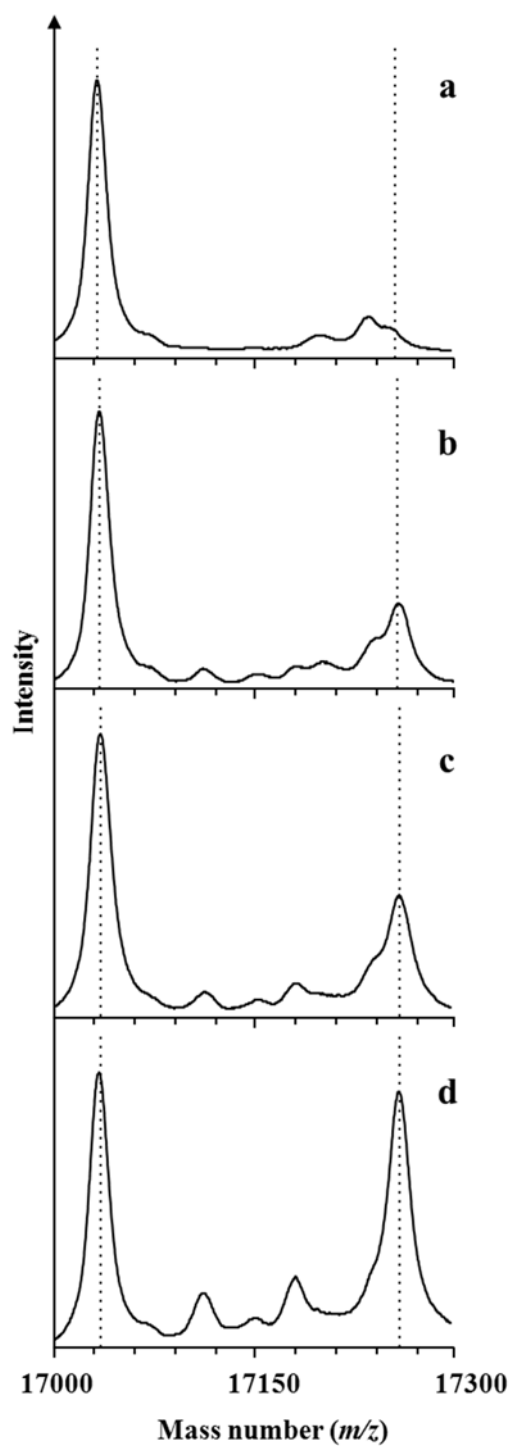


Fig. 28 MALDI-TOF mass spectra of m/z 17,026 species in the rat cell lysate treated with PenSSeSPen in varying concentration. (a) Before reaction, after reaction with PenSSeSPen in varying concentration (mM): (b) 0.01, (c) 0.05, (d) 0.1. The rat heart cell lysate were incubated with the indicated PenSSeSPen concentrations at 37 °C for 10 min. Dotted lines were drawn at m/z 17,026 and 17,252 (SeSPen-adduct).

3-2-3. PenSSeSPen と反応性を示した心臓細胞質タンパク質の同定

PenSSeSPen と反応性を示した m/z 17,026 のタンパク質について、PIR で検索を行った。その結果、ミオグロビン(Mb)が候補として挙げられた。Mb は 153 個のアミノ酸で構成され、その配列中に遊離の Cys 残基を 66 番目に 1 つ有している (Fig. 29)。PenSSeSPen はこの Cys 残基のチオールと反応したものと考えられた。

1		11	
Gly Leu Ser Asp Gly Glu Trp Gln Met Val		Leu Asn Ile Trp Gly Lys Val Glu Gly Asp	
21		31	
Leu Ala Gly His Gly Gln Glu Val Leu Ile		Ser Leu Phe Lys Ala His Pro Glu Thr Leu	
41		51	
Glu Lys Phe Asp Lys Phe Lys Asn Leu Lys		Ser Glu Glu Glu Met Lys Ser Ser Glu Asp	
61	66	71	
Leu Lys Lys His Gly Cys Thr Val Leu Thr		Ala Leu Gly Thr Ile Leu Lys Lys Lys Gly	
81		91	
Gln His Ala Ala Glu Ile Gln Pro Leu Ala		Gln Ser His Ala Thr Lys His Lys Ile Pro	
101		111	
Val Lys Tyr Leu Glu Phe Ile Ser Glu Val		Ile Ile Gln Val Leu Lys Lys Arg Tyr Ser	
121		131	
Gly Asp Phe Gly Ala Asp Ala Gln Gly Ala		Met Ser Lys Ala Leu Glu Leu Phe Arg Asn	
141		151	153
Asp Ile Ala Ala Lys Tyr Lys Glu Leu Gly		Phe Gln Gly	

Fig. 29 Amino acid sequence of the rat Mb.

m/z 17,026 のタンパク質が Mb であることを同定するために、トリプシン消化フラグメントの解析を行った。トリプシン消化には、3-4-4 で示す方法で精製した心臓細胞質溶液を用いた。精製後の試料を電気泳動に供し、17 kDa のタンパク質を精製できていることを確認した (Fig. 30b)。限外ろ過後の試料をトリプシン消化し、質量分析を行った。その結果、Val17-Lys34, Asn48-Lys56, Gly80-Lys96, Tyr103-Lys116, Tyr119-Lys133, Ala146-Gly153 に一致する分子量のフラグメントピークが検出された (Fig. 31)。以上より、PenSSeSPen と反応した m/z 17,026 のタンパク質は、Mb であると同定された。

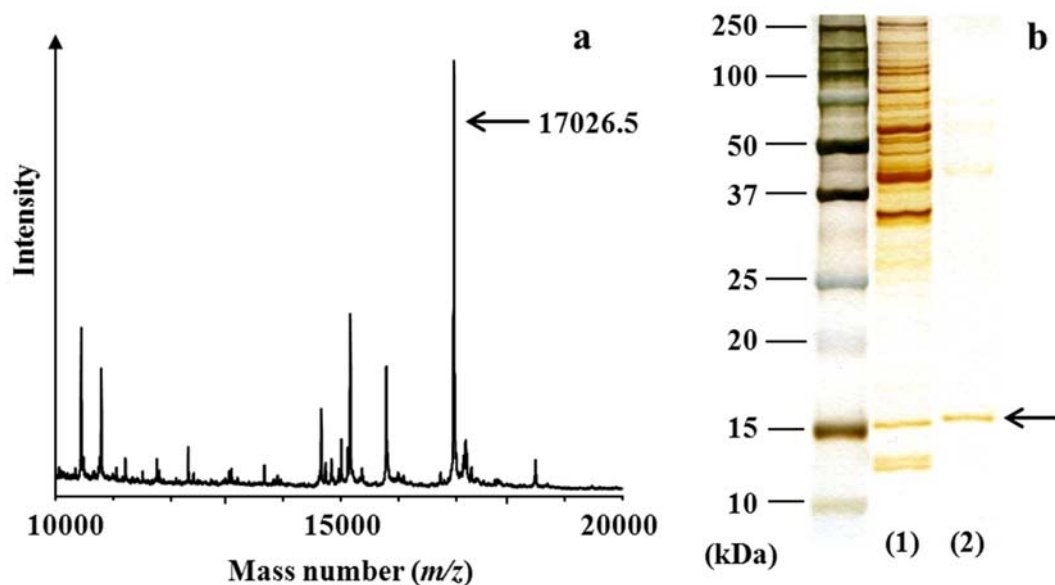


Fig. 30 Purification of 17-kDa protein in the rat heart cell lysate by ultrafiltration. (a): MALDI-TOF mass spectrum of the rat heart cell lysate before ultrafiltration. (b): SDS-PAGE of (1) before and (2) after ultrafiltration. Arrow indicates peak or band of the 17-kDa protein.

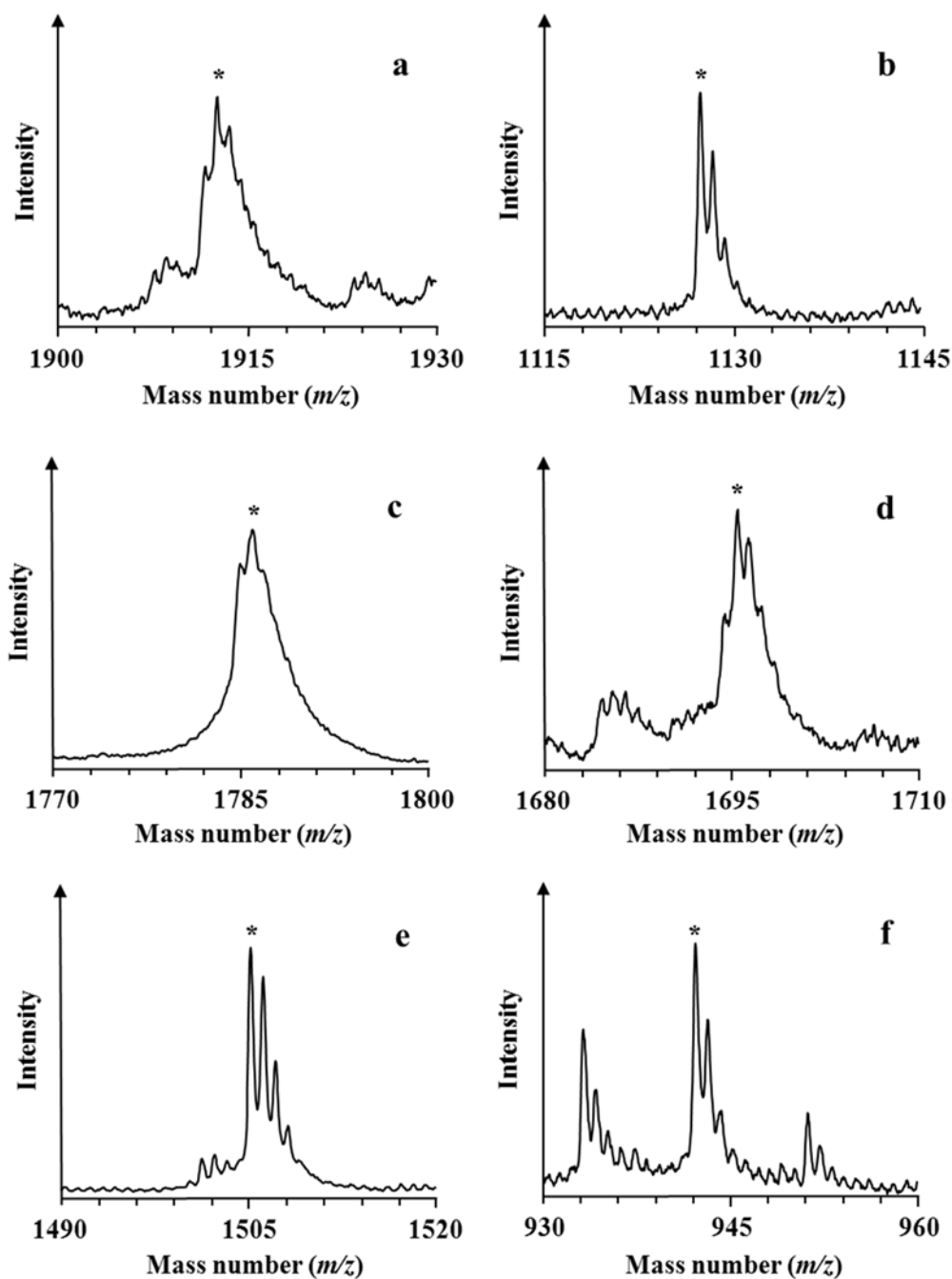


Fig. 31 MALDI-TOF mass spectra of characteristic tryptic fragments from rat Mb. (a) Val17-Lys34 (molecular mass calcd 1913, found 1912.6), (b) Asn48-Lys56 (calcd 1124, found 1127.6), (c) Gly80-Lys96 (calcd 1788, found 1786.1), (d) Tyr103-Lys116 (calcd 1695, found 1695.6), (e) Tyr119-Lys133 (calcd 1505, found 1505.2), (f) Ala146-Gly153 (calcd 942, found 942.4).

3-2-4. 生体内における Mb のセレン結合性およびセレン代謝への関与

3-4-4 で精製した Mb をセレン定量に供し、*in vivo* における Mb のセレン結合性を検証した。その結果、精製した Mb 1 g あたり $6.93 \pm 1.37 \mu\text{g}$ ($n = 4$) のセレンが検出され、Mb が生体内でセレンと結合していることが明らかとなった。しかしながら、Mb-Se 結合体は Mb 全量に対して非常に低い割合 (1 %未満) でしか存在しないため、質量分析では検出されなかった。

心臓のセレン代謝における Mb の機能を検討するため、 $1.5 \mu\text{gSe/kg/day}$ で 1 週間 SA 経口投与を行った。投与後のラットの心臓から Mb を精製してセレン定量を行うと、Mb 1 g あたりのセレン量は $6.13 \pm 0.14 \mu\text{g}$ ($n = 3$) と、SA 非投与時と同程度であった。Mb のセレン量は SA 投与によって変化しなかったが、心臓自体の臓器重量当たりセレン量は SA 投与によって増加していた (Table 7)。SA 投与によって増加した心臓内のセレンがセレンタンパク合成に利用されているかどうかを検討するために、SA 非投与群および投与群の細胞質溶液を用い、過酸化水素 (H_2O_2) および *t*-butyl hydroperoxide (*t*BHP) を基質とした心臓の細胞質 GPx (cGPx) 活性の測定を行った。SA 投与群の心臓 cGPx 活性は、どちらの基質においても SA 非投与群に対して有意な増大を示し、 H_2O_2 で 1.73 倍、*t*BHP で 1.62 倍であった (Fig. 32a)。一方、肝細胞質溶液の cGPx 活性については SA 投与による差は見られなかった (Fig. 32b)。

Table 7 Selenium content in rat organ after administration of SA.

organ	$\mu\text{gSe/g-organ weight}$	
	Non-administered	SA-administered
heart	0.26 ± 0.028	0.51 ± 0.070
muscle	0.15 ± 0.010	0.18 ± 0.0053
brain	0.12 ± 0.0081	0.27 ± 0.0087
liver	0.60 ± 0.069	2.95 ± 0.21
kidney	0.82 ± 0.054	13.1 ± 1.90
plasma	0.30 ± 0.079	0.80 ± 0.057
red blood cell	0.19 ± 0.028	1.53 ± 0.31
whole blood	0.49 ± 0.11	1.73 ± 0.24

Values are the mean and standard error ($n = 4-6$).

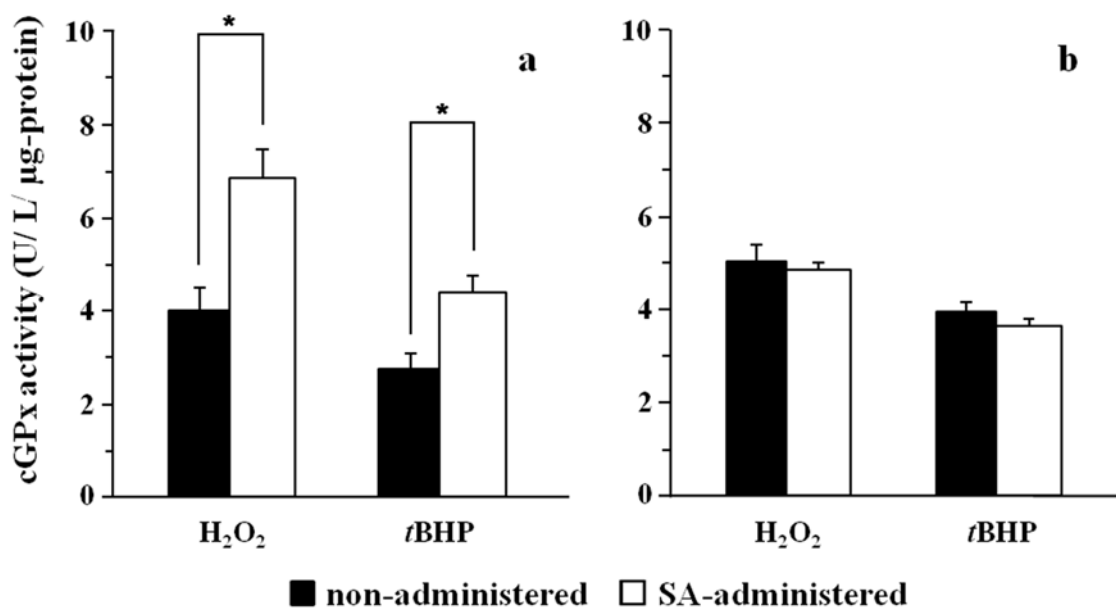


Fig. 32 Changes in cGPx activity for hydrogen peroxide (H_2O_2) and *t*-butyl hydroperoxide (*t*BHP) in the rat (a) heart and (b) liver cell lysate. Data express mean and standard error ($n = 5$). *Significantly different from the non-administered group, $p < 0.05$.

また、心臓細胞質溶液の cGPx 活性の増大がタンパク質量の増加によるものかを確認するため、ウェスタンブロッティングによる心臓細胞質中 GPx1 の定量を行った。GPx1 は多くの細胞の細胞質に存在する GPx のサブタイプである。SA 非投与群の心臓細胞質溶液中の GPx1 量を 1.0 とすると、SA 投与群において 1.73 倍の GPx1 が検出された (Fig. 33a)。これは、cGPx 活性の増大とほぼ一致する結果であった。したがって、cGPx 活性の増大は、タンパク質発現量の増大によるものと考えられた。一方、SA 投与群の肝細胞質溶液における GPx1 量は、SA 非投与群の 0.80 倍であった (Fig. 33b)。cGPx 活性同様、非投与群と変わらない、もしくは微減しているという結果であった。肝臓はセレン代謝の中心的役割を担っている臓器である。肝臓はセレンを素早く取り込み、SeIP として血漿へ分泌し他臓器へのセレン輸送を行ったり、低分子セレンとして体外へ排泄したりしている。今回はセレンが欠乏していない状態で SA 投与を行ったため、肝臓では既に GPx の発現が飽和しており、他臓器へのセレン輸送もしくは低分子セレンへの代謝・排泄の方向へ向かったのではないかと考えられる。

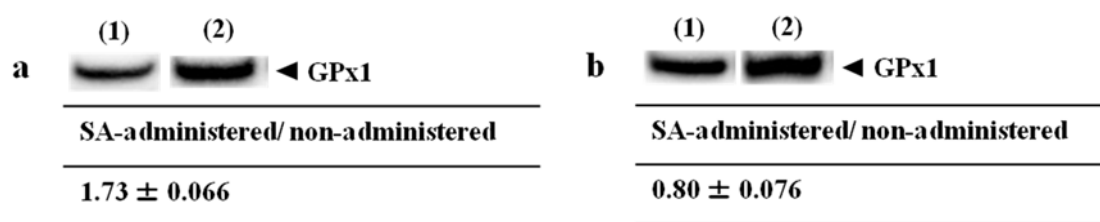


Fig. 33 Changes in GPx1 expression in rat (a) heart and (b) liver cell lysate. Values are the mean and standard error ($n = 4$). Lane (1): non-administered, (2): SA-administered.

これらの結果より、Mb は心臓細胞質中のセレンと一時的に結合し、GPx などのセレンタンパク合成の経路へセレンを供給する中継点のような役割を担っている可能性が示された。

3-3. 小括

第三章では、ラット心臓細胞質溶液と PenSSeSPen の反応性を検討し、心臓内セレン結合タンパク質の探索を行った。PenSSeSPen はラット心臓細胞質溶液中のタンパク質チオールを介して反応した。PenSSeSPen と反応したタンパク質を MALDI-TOF 質量分析により探索した結果、 m/z 17,026 のピーク成分に-SeSPen が付加したと考えられるピークが検出された。トリプシン消化フラグメントの解析より、PenSSeSPen と反応したタンパク質はラット Mb であることが示唆された。細胞質溶液から Mb を精製してセレン定量に供し、生体内の Mb にセレンが結合していることが明らかとなった。次に、ラットに SA 経口投与を行い、セレン代謝における Mb の機能を検証した。SA 投与による Mb へのセレン結合量の増大は見られなかった一方、心臓のセレン量、心臓細胞質の cGPx 活性および GPx1 発現の増大が観察された。したがって、Mb がセレンと一時的に結合し GPx などのセレンタンパク合成の中継点として機能している可能性が示唆された。

3-4. 実験方法

3-4-1. ラット心臓細胞質溶液の調製

3 週齢雄性 Wistar ラットをエーテルで屠殺後、心臓を摘出し、氷冷した 1 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中でホモジナイザーを用いてホモジナイズした後、プローブ型ソニケーター 250D で超音波破碎した。得られた懸濁液を、ポリカーボネート製遠心分離用試験管に移し入れ、超遠心用ローター TYPE45Ti に装着し、超遠心機 L-80 ultracentrifuge で、20000 rpm, 4 °C で 1 時間超遠心処理した。得られた上清を肝細胞質溶液とした。

3-4-2. 心臓細胞質溶液の PenSSeSPen 処理

3-4-1 で調製した心臓細胞質溶液に最終濃度 1 mM NEM を添加し、37 °C で 10 分間インキュベートし、NEM 処理とした。また、心臓細胞質溶液に最終濃度 0.05 mM PenSSeSPen を添加し、37 °C で 10 分間インキュベートし、PenSSeSPen 処理とした。

3-4-3. 心臓細胞質溶液の透析

3-4-2 の条件で PenSSeSPen 処理した心臓細胞質溶液中の、低分子チオールおよび未反応 PenSSeSPen を除く目的で、透析を行った。試料溶液を分画分子量 6–8 kDa の透析膜に入れ、試料量の約 100 倍の容量の 0.5 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) を外套液として、4 °C で一晩透析した。

3-4-4. 心臓細胞質中の Mb 精製

3-4-3 に示した手順で透析を行い、低分子チオールを除いた心臓細胞質溶液を限外ろ過装置 (Amicon® stirred cell, Millipore 社製) にセットし、分画分子量 100 kDa と 30 kDa の膜に順次通すことで Mb (17 kDa) の精製を行った。

3-4-5. Mb 溶液の電気泳動

泳動用緩衝液には、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、100 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane、50 mM トリシン溶液を用いた。1% SDS、20% グリセリン、1 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) 1.0 mL を Milli-Q 水に溶解させ、これを試料処理液とした。3-4-4 で精製した Mb 溶液を試料処理液と 1:1 で混合し、90 °C で1分間の加熱処理を行った。泳動装置 (pageRun AE-6531M, ATTO 社製) に設置した 15% ポリアクリルアミドゲル (e-PAGEL, ATTO 社製) に、試料 20 μ L を添加し、20 mA/1 plate で 75 分間通電した。Bio-Rad Laboratories 製の 10-250 kDa までの 10 本のタンパク質マーカーを含む Precision Plus Protein Standards を分子量の基準として用いた。通電後のゲルは、EzStain Silver (ATTO 社製) を用いて銀染色に供した。

3-4-6. SA 経口投与

0.05 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解させた亜セレン酸を、5 週齢雄性 Wistar ラットの体重 1 kg あたり 1.5 μ gSe となるように、1 日 2 回 1 週間の経口投与を行った。経口投与終了後、ラットを屠殺して臓器を摘出し、3-4-1 に示した方法で細胞質溶液の調製を行った。

3-4-7. 細胞質 GPx 活性測定 [58]

細胞質溶液に、0.05 mM リン酸緩衝液に溶解させたグルタチオンレダクターゼ (0.63 unit, 和光純薬製)、0.63 mM 還元型グルタチオン (ナカライテスク社製)、2.34 mM NADPH (和光純薬製)、基質 [3.14 mM H₂O₂ (ナカライテスク社製) または *t*-butyl hydroperoxide (*t*BHP, Sigma-Aldrich 社製)] を順次加え、速やかに転倒混和した後、波長 340 nm における吸光度を経時的に測定した。以下の (1) 式を用い、試料 1 mL あたりの 1 分間 NADPH の吸光度減少から cGPx 活性の算出を

行った。

$$\text{cGPx activity} = (\Delta A_{\text{SAM}} - \Delta A_{\text{BLK}}) \times 20.6 / \epsilon_{\text{mM}} / c \quad (1)$$

ΔA_{SAM} : 試料溶液の1分間あたりの吸光度減少

ΔA_{BLK} : 緩衝溶液の1分間あたりの吸光度減少

20.6: 希釈倍率

ϵ_{mM} : 1 mM NADPH のモル吸光係数、 $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

c : 試料得溶液中タンパク濃度 (μg)

3-4-8. 細胞質溶液のウェスタンブロッティング

まず、3-4-5 に示した手順で細胞質溶液 ($10 \mu\text{g-protein/lane}$) の電気泳動分離を行った。泳動後、セミドライウェスタンブロッティング装置 AE-8750 および AE-6677 (ATTO 社製) を用いてゲル上のタンパク質を Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (ATTO 社製) に転写した。転写後の膜を TBS-T [25 mM Tris/HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.1v/v% Tween-20] により洗浄した後、TBS-T に溶解させた 1% スキムミルク溶液に浸し、1 時間ゆっくりと振とうさせ、ブロッキングを行った。続いて、TBS-T に溶解させた一次抗体 (Anti-Glutathione peroxidase 1, rabbit-poly, Gene Tex 社製) 溶液を $4 \text{ }^\circ\text{C}$ で一晩反応させた。続いて、HRP 標識二次抗体溶液 (Anti IGG, rabbit, goat poly, HRP, Santa Cruz Biotechnology 社製) を室温で 1 時間反応させた。抗原抗体反応後、検出試薬 (ClarityTM Western ECL Substrate, Bio-rad 社製) を用いて化学発光によりバンドを検出した。バンドの検出には Chemi-Doc Touch (Bio-rad Laboratories 製) を使用し、解析には Image Lab Software ver.5.2.1 (Bio-rad Laboratories 製) を使用した。

3-4-9. 統計処理

統計処理には、PRISM 4 (GraphPad Software 社製) を使用した。亜セレン酸非投与群と投与群間の有意差は、対応のない 2 群間の t 検定によって判定した。 $P < 0.05$ の場合に、有意差があるとした。

結語

本研究では、SAの反応性代謝物であるRSSeSR'以降の代謝解明を目的として、RSSeSR'と反応性を有するタンパク質の解析を行った。

RSSeSR'のモデル化合物としてPenSSeSPenを用い、質量分析法と組み合わせることで肝細胞質中のセレン結合タンパク質としてL-FABPを同定した。さらにこの方法を臓器特異的なセレン保持を示す脳と、セレン欠乏症と関わりの深い心臓にも応用すると、それぞれCST12およびMbがセレン結合タンパク質として見出された。以上より、PenSSeSPenと質量分析を組み合わせた本法が簡便で有効なセレン結合タンパク質の探索方法であることが示され、RSSeSR'の形成が臓器中セレンの代謝や輸送において重要なメカニズムとなっている可能性が示された。

謝辞

本研究を行うにあたり、懇切なる御指導、ご鞭撻を賜りました長崎大学薬学部 衛生化学研究室 中山 守雄 教授、淵上 剛志 准教授、吉田 さくら 助教、並びに崇城大学薬学部 原武 衛 教授に深く感謝申し上げます。

本論文を作成するにあたり、貴重な御助言、御指導を頂きました長崎大学薬学部 黒田 直敬 教授、田中 正一 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究において、貴重な御指導をいただきました 北郷 真史 博士、浦東子 修士、並びに長崎大学薬学部衛生化学研究室の修了生、卒業生、ならびに研究室生の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究および学生生活において、多大なる御支援、御協力をいただきました皆様、支えてくださった皆様に深く感謝と御礼申し上げます。

参考文献

1. Barceloux DG, *Clin Toxicol.*, **37**, 145-172 (1999).
2. Schwarz K, Foltz CM, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3292–3293 (1957).
3. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lonanov AV, Zehtab O, Guigó R, Gladyshev VN, *Science*, **300**, 1439-1443 (2003).
4. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK, *Antioxid. Redox Signaling*, **9**, 775-806 (2007).
5. Imai H, Nakagawa Y, *Free Radic. Biol. Med.*, **34**, 145–169 (2003).
6. Imai H, Hirao F, Sakamoto T, Sekine K, Mizukura Y, Saito M, Kitamoto T, Hayasaka M, Hanaoka K, Nakagawa Y, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**, 278–286 (2003).
7. Yant LJ, Ran Q, Rao L, Remmen HV, Shibatani T, Belter JG, Motta L, Richardson A, Prolla TA, *Free Radic. Biol. Med.*, **34**, 496–502 (2003).
8. Kodama H, Asagiri K, Ida S, Etani Y, Koyama H, Soh H, Tanaka Y, Takayanagi M, Funakoshi M, Yoshida M, *日本臨床栄養学会雑誌*, 1-39 (2016).
9. Weekley CM, Harris HH, *Chem. Soc. Rev.*, **42**, 8870-8894 (2013).
10. Lindemann T, Hintelmann H, *Anal. Chem.*, **74(18)**, 4602-4610 (2002).
11. Ogasawara Y, Lacourciere G, Stadtman TC, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 9494-9498 (2001).
12. Medina D, Morrison DG, *Pathol. Zmmunopathol. Res.*, **7**, 187-199 (1988).
13. Hawkes WC, Wilkerson EC, Tappel AL, *J. Inorg. Biochem.*, **23**, 77-92 (1985).
14. Danielson KG, Medina D, *Cancer Res.*, **46**, 4582-4589 (1986).
15. Yang J-G, Morrison-Plummer J, Burk RF, *J Biol Chem.*, **262**, 13372-13376 (1987).
16. Behne D, Hilmert H, Scheid S, Gessner H, Elger W, *Biochim. Biophys. Acta*, **966**,

- 12-21 (1988).
17. Bansal MP, Cook RG, Danielson KG, Medina D, *J. Biol. Chem.*, **264**, 13780-13784 (1989).
18. Haratake M, Fujimoto K, Hirakawa R, Ono M, Nakayama M, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **13**, 471-479 (2008).
19. Haratake M, Hongoh M, Miyauchi M, Hirakawa R, Ono M, Nakayama M, *Inorg. Chem.*, **47**, 6273-6280 (2008).
20. Haratake M, Hongoh M, Ono M, Nakayama M, *Inorg. Chem.*, **48**, 7805-7811 (2009).
21. Hongoh M, Haratake M, Fuchigami T, Nakayama M, *Dalton Trans.*, **41**, 7340-7349 (2012)
22. 北郷真史, 必須微量栄養素セレンの赤血球膜輸送機構の解明, 平成 23 年度 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科博士論文 : 2012 年 3 月
23. Painter EP, *Chem. Rev.*, **28**, 179-213 (1941).
24. Haratake M, Ono M, Nakayama M, *J. Health Sci.*, **50**, 366-371 (2004).
25. Haratake M, Fujimoto K, Ono M, Nakayama M, *Biochim Biophys. Acta*, **1723**, 215--220 (2005).
26. Kato T, Read R, Rozga J, Burk RF, *Am. J. Physiol.*, **262**, G854-858 (1992).
27. Hill KE, Wu S, Motley AK, Stevenson TD, Winfrey VP, et al. *J. Biol. Chem.* **287**, 40414-40424 (2012).
28. Burk RF, Hill KE, *Annu. Rev. Nutr.*, **35**, 109-134 (2015).
29. Atshavesa BP, Martina GG, Hostetlera HA, McIntosha AL, Kierb AB, Schroedera F, *J. Nutr. Biochem.*, **21**, 1015-1032 (2010).
30. Yokoyama T, Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Hoshino S, Yasuda T, Kimura K, *Am. J. Pathol.*, **174**, 2096-2106 (2009).

31. Bassuk JA, Tschlis PN, Sorof S, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**,7547-7551 (1987).
32. Thompson J, Winter N, Terwey D, Bratt J, Banaszak L, *J. Biol. Chem.*, **272**, 7140--7150 (1997).
33. Watkinson JH, *Anal. Chem.*, **38**, 92-97 (1966).
34. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Paovenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC, *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85 (1985).
35. 日本分析化学会編 分析化学便覧 丸善, (改定四版) 372.
36. Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ, *Cell Metab.*, **14**, 724-738 (2011).
37. Markesbery WR, *Free Radic. Biol. Med.*, **23**, 134-147 (1997).
38. Davies KM, Bohic S, Carmona A, Ortega R, Cottam V, Hare DJ, Finberg JPM, Reyes S, Halliday GM, Mercer JFB, Double KL, *Neurobiol. Aging*, **35**, 858-866 (2014).
39. Federico A, Cardaioli E, Pozzo PD, Formichi P, Gallus GN, Radi E, *J. Neurol. Sci.*, **322**, 254-262 (2012).
40. Chen J, Berry MJ, *J. Neurochem.*, **86**, 1-12 (2003).
41. Schweizera U, Bräuer AU, Köhrleb J, Nitsch R, Savaskan NE, *Brain Res. Rev.*, **45**, 164-178 (2004).
42. Bellinger FP, Raman AV, Reeves MA, Berry MJ, *Biochem. J.*, 2009, **422**, 11-22 (2009).
43. Haratake M, Ono M, Nakayama M, *J. Health Sci.*, **50(4)**, 366-371 (2004).
44. Haratake M, Koga K, Inoue M, Fuchigami T, Nakayama M, *Metallomics*, **3**, 1019-1026 (2011).
45. Ochieng J., Chaudhuri G., *J. Health Care Poor Underserved*, **21(Suppl.)**, 51-70 (2010).
46. Smith KJ, Pacey GE, *Talanta*, **40(12)**, 1961-6 (1993).

47. Kothapalli R, Bailey RD, Kusmartseva I, Mane S, Epling-Burnette PK, Loughran TP, *Int. J Oncol.*, **22(1)**, 33–9(2003).
48. Korolenko TA, Poteryaeva ON, Falameeva OV, Levina OA, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **136(1)**, 46–8 (2003).
49. Huff ME, Balch WE, Kelly JW, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 674–682(2003).
50. Mathews PM, Levy E, *Ageing Research Rev.*, **32**, 38–50 (2016).
51. Hewetson A, Do HQ, Myers C, Muthusubramanian A, Sutton RB, Wylie BJ, Cornwall GA, *Biomolecules.*, **7(3)**, 46 (2017).
52. Tungsheng L, Yetang H, *Chemical & Engineering News*, **81(36)**, (2003).
53. Sun GX , Meharg AA, Li G, Chen Z, Yang L, Chen SC, Zhu YG, *Sci. Rep.*, **6**, 20953 (2016).
54. Keshan Disease Research Group of the Chinese Academy of Medical Sciences, *Chinese Med. J.*, 1979, **92**, 471–476.
55. Pei J, Fu W, Yang L, Zhang Z, Liu Y, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2013, 474203 (2013).
56. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CDL, Jaswal JS, Stanley WC, *Physiol. Rev.*, **90**, 207-258 (2010).
57. Boudina S, Abel ED, *Physiology*, **21**, 250-258 (2005).
58. Flohé L, Günzler WA, *Methods Enzymol.*, **105**, 114-120 (1984).