

^{82}Se を濃縮した亜セレン酸またはセレノメチオニンを投与したマウス肝臓中の細胞内グルタチオンペルオキシダーゼのペプチド解析

Peptide analysis of cellular glutathione peroxidase in mouse livers after intravenous injection of ^{82}Se -enriched selenite or selenomethionine

応用化学専攻 田代 裕規

TASHIRO yuuki

1. 緒言

セレン (Se) は哺乳動物にとって重要な役割を果たす必須微量元素の1つである。セレンタンパク質の一つである細胞内グルタチオンペルオキシダーゼ (cGPx) は細胞に損傷を与える過酸化物を還元する抗酸化作用を持つ¹。先行研究では、 ^{82}Se を濃縮したセレノメチオニン ($^{82}\text{SeMet}$) を静脈注射したマウス肝臓中のタンパク質のアミノ酸解析をした結果、Se の代謝経路において、SeMet がタンパク質中のメチオニン (Met) 残基とランダムに置き換わる可能性が示唆された²。この仮説を立証するためには、cGPx 中のどの Met 残基がどの程度 $^{82}\text{SeMet}$ 残基に置き換わったのかを調べる必要がある。そこで本研究では、Capillary (Cap) HPLC-ICPMS 及び Electrospray Ionization (ESI)-MS/MS を用いて、 ^{82}Se を濃縮した亜セレン酸 ($^{82}\text{Se(IV)}$) または $^{82}\text{SeMet}$ を投与したマウス肝臓中 cGPx をトリプシン分解して得られる Se ペプチドの分析を行うことで、cGPx 中 Met と SeMet の置き換わりを調査することを目的とした。

2. 実験

Se 含有量 $0.2 \mu\text{g} / \text{day}$ 以下である飼料を4週間与えた Se 欠乏群マウスを用意した。このマウスに ^{82}Se を濃縮した $^{82}\text{Se(IV)}$ または $^{82}\text{SeMet}$ を投与し、6 時間後にマウスを解剖して肝臓を摘出した。この肝臓を Tris- HNO_3 (pH 7.4) 中でホモジナイズし、超遠心分離を行い、水溶性画分を抽出した。そして Anion Exchange Chromatography (AEX) 及び Size Exclusion Chromatography (SEC) を用いて cGPx を含む画分を分取し、さらに SDS-PAGE を行うことで cGPx を分離した。その後、cGPx を含むバンドを切り取り、トリプシンを用いてゲル内消化を行った。ウシ赤血球中 cGPx 標品についても同

様の処理を行い、トリプシン分解により得られた Se ペプチド中の Se を Cap HPLC-ICPMS により測定した。コリジョン・リアクションガスとして酸素を導入することで、Se を $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}$ 及び $^{82}\text{Se}^{16}\text{O}$ として測定した。また、ESI-MS/MS により Se ペプチドのアミノ酸配列の解析を行った。

3. 結果及び考察

3-1. cGPx の精製

マウス肝臓中 cGPx を AEX 及び SEC を用いて分離し、さらに SDS-PAGE を行った結果を図 1 に示す。

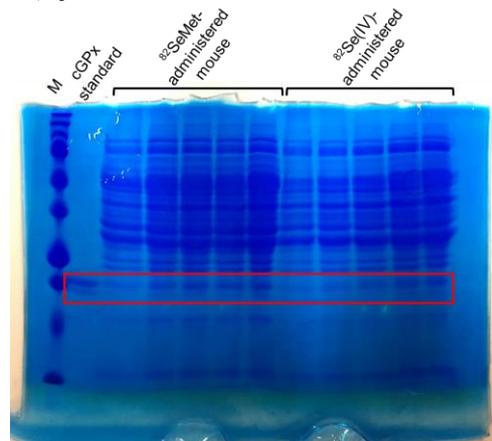


図 1 マウス肝臓ホモジネートの SDS-PAGE

SDS-PAGE により分離されたマウス肝臓中タンパク質の中から、cGPx 標品と同位置に検出されたバンドをマウス肝臓中 cGPx とし、トリプシン分解を行った後、ペプチド解析を行った。

3-2. Cap HPLC-ICPMS によるペプチド解析
Cap HPLC-ICPMS による Se ペプチドの測定結果を図 2 に示す。

図 2 より、 $^{82}\text{Se(IV)}$ または $^{82}\text{SeMet}$ を投与したマウス肝臓中 Se ペプチドにおいて、標品でも検出された Peak 1 に加え、Peak 2, 3 が検出

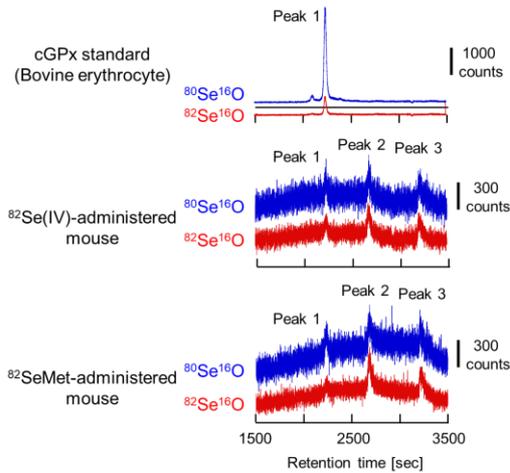


図2 マウス肝臓中 cGPx のペプチド解析

されたことがわかる。既知の cGPx のアミノ酸配列より、標品で検出された Se ペプチドはセレンシステイン (SeCys) として Se を含むペプチドであり、かつ生成するペプチドの中で最も疎水性が高いことが知られているため、Peak 1 の保持時間より後に検出された Peak 2, 3 は誤開裂の Se ペプチドである可能性が考えられる。続いて各ピークの外因性 ⁸²Se の取り込みを確認するため、⁸²Se(外因性) / ⁸⁰Se(内因性) 同位体比を算出した結果を表 1 に示す。

表 1 各クロマトグラムピークの ⁸²Se / ⁸⁰Se 同位体比

	⁸² Se(IV)-administered mice	⁸² SeMet-administered mice
Peak 1	0.58	0.67
Peak 2	0.89	1.96
Peak 3	1.96	1.90

Natural isotope ratio : 0.18

各クロマトグラムピークの ⁸²Se / ⁸⁰Se 同位体比を Se 投与形態別に比較すると、クロマトグラム Peak 1, 3 に関しては有意な差は認められなかったが、クロマトグラム Peak 2 では ⁸²Se(IV) 投与時と比較して、⁸²SeMet 投与時で高い外因性 ⁸²Se の取り込みを示した。

3-3. ESI-MS/MS によるペプチド解析

ESI-MS/MS を用いて Se のペプチド分解物中に含まれるペプチドのアミノ酸配列の解析を行った結果、検出されたペプチドのうち、⁸²Se を含むペプチドを表 2 に示す。

表 2 マウス肝臓中 cGPx ペプチドの ESI-MS/MS 測定

Peptide	Peptide sequence
a	GKVLIIENVASLU(⁸² SeCys)GTTIR
b	GKVLIIENVASLU(⁸² SeCys)GTTIRDYTE(⁸² SeMet)NDLQKR

表 2 に示した Peptide a は既知の cGPx のアミノ酸配列より、理論上 cGPx をトリプシン分解した際に得られる Se ペプチドと一致したため、図 2 中の cGPx 標品でも検出された Peak 1 に含

まれるペプチドであると推定した。次に、Peptide b に注目すると、このペプチドは図 3 に示したように、Peptide a の C 末端のリシン (R) でトリプシン分解が起こらず誤開裂を起こしたペプチドであると考えられる。

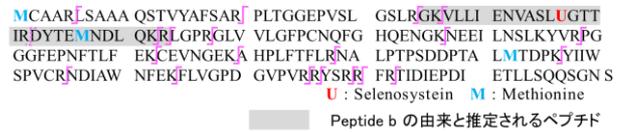


図3 マウス肝臓中 cGPx の 1 量体(22.3kDa)の アミノ酸一次配列

Peptide b のアミノ酸配列に注目すると、本来 Met 残基である箇所が ⁸²SeMet 残基へと置き換わった配列を持つペプチドであることがわかる。この Peptide b は ⁸²SeMet 投与時のみ検出されていることから、⁸²SeMet 投与時で ⁸²Se(IV) よりも外因性 ⁸²Se の取り込み量が多いクロマトグラム Peak 2 に含まれると考えられる。また、図 3 に示した Peptide b の由来と推定されるペプチドにおいて、Met と ⁸²SeMet の置き換わりはないが、SeCys 残基へ ⁸²SeCys 残基として Se が取り込まれているペプチドも同様にクロマトグラム Peak 2 には含まれると考えられる。図 2 のクロマトグラム Peak 3 の由来となるペプチドは、おそらく濃度が低く、ESI-MS/MS の検出下限を下回ったため測定できなかったと考えられ、現在調査中である。

4. 結論

SeMet 投与時においては、投与した SeMet がマウス肝臓中の cGPx 中の Met と置き換わりうるが、Se(IV) 投与時には同様な置き換わりが起こらないことが示唆された。

引用文献

- (1) Yamashita, R. et al. *Biomed Res Trace Elements*. **2013**, *24*, 176–184.
- (2) Suzuki, Y. et al. *Metallomics*. **2013**, *5*, 445–452.

対外発表

- 1) 田代裕規, 西田翔, 古田直紀: 日本分析化学会第 65 年会, 2016, 札幌, 口頭発表
- 2) Yuuki Tashiro, Sho Nishida, Naoki Furuta: Asia-Pacific Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 2017, Matsue, Japan, Poster 他, ポスター発表 1 件 (国内学会)