

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 liver

応用化学専攻 山尾 契

YAMAO Kei

1. 緒言

セレン (Se) は哺乳動物にとって必須微量元素であり、主に抗酸化酵素である細胞内グルタチオンペルオキシダーゼ (cGPx) の活性中心として機能する。また Se は生体内でセレノメチオニン (SeMet) 及びセレノシステイン (SeCys) の2つのセレノアミノ酸の形態で存在し、cGPx のアミノ酸配列中では SeCys の形態で含まれている。先行研究^{1,2}において、Se (IV) または SeMet を投与したマウス肝臓中 cGPx 中の Se 濃度を測定したところ、SeMet 投与の場合、Se (IV) 投与の時と比べ 1.5 倍の Se 濃度が観測された。その結果、マウスに SeMet を投与することで肝臓中の cGPx が多く合成されるように思われたが、cGPx の活性を測定したところ、Se 投与形態間で差は見られなかった。植物体内において、SeMet はタンパク質のアミノ酸配列中のメチオニン (Met) 残基の一部と置き換わり得ることが知られている³。そのため Se 投与形態間における Se 濃度の結果と cGPx 活性測定の結果の差異は、動物体内でも植物と同様に Met 残基から SeMet 残基への置き換わりが発生しているのではないかと考えた。そこで、本研究ではキャピラリー (Cap) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と誘導結合プラズマ質量分析法 (ICPMS) またはエレクトロスプレーイオン化-質量分析法 (ESI-MS/MS) を用いて Se 投与形態別にマウス肝臓中 cGPx の S 及び Se ペプチドを測定することで、アミノ酸配列中の Met 残基から SeMet 残基への置き換わりの機構を解明することを目的とした。

2. 実験

2-1. マウス飼育実験

4 週齢のマウスを購入し、Se 含有飼料 (2.25 µg/day) を 5 週間与え飼育した後、⁸²Se を濃縮した Se (IV) または SeMet をそれぞれ静脈注射した。また対照群には生理食塩水を静脈注射した。注射後、6 時間後に解剖し肝臓を摘出した。

2-2. マウス肝臓中 cGPx の精製

摘出したマウス肝臓に 50 mM Tris HNO₃ (pH 7.4) 緩衝溶液を加えてホモジナイズした。そのホモジネートを超遠心分離機にかけ、上清液をフィルターでろ過した。その後、ろ液をサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 及び陰イオン交換クロマトグラフィー (AEC) を用いて cGPx 画分を分離した。そして cGPx 画分を電気泳動により分離することで、更なる cGPx の精製を行った。

2-3. LA-ICPMS による cGPx バンドの特定

泳動後のゲルからタンパク質を PVDF 膜に転写し、タンパク質バンドを可視化するために染色を行った。次に、Laser Ablation (LA)-ICPMS を用いてバンド中の Se をマッピングし、マウス肝臓中 cGPx のバンド位置を特定した。

2-4. Cap HPLC-ICPMS 及び ESI-MS/MS による S 及び Se ペプチドの分析

Se マッピングによって特定した cGPx バンドを切り出し、トリプシンを用いて酵素分解した。このトリプシン分解から得られたペプチド断片を抽出し、Cap HPLC-ICPMS を用いて S 及び Se を測定した。この際、リアクションガスとして酸素ガス (¹⁶O₂) を導入し、ペプチド中の S 及び Se を ³²S¹⁶O, ⁸⁰Se¹⁶O, ⁸²Se¹⁶O として測定することで、スペクトル干渉を抑制した。また同時に UV 検出器により、ペプチド結合の吸収波長 214 nm 及び芳香族の吸収波長 280 nm の UV 吸収を測定した。また同様に抽出されたペプチド断片を ESI-MS/MS によりアミノ酸解析を行った。

3. 結果及び考察

3-1. LA-ICPMS による cGPx バンドの特定

図 1 に泳動後のゲル及び Se マッピングの結果を示す。ゲル中の左のレーンから順に分子量マーカー、ウシ赤血球由来 cGPx 標品、マウス肝臓中

cGPx のバンドである。図 1 より、分子量 22 kDa 付近に観測されたタンパク質バンドに Se を含んでいることが分かった。また、cGPx 標品も同程度の移動度を示していることから 22 kDa のバンドがマウス肝臓中 cGPx であると特定できた。

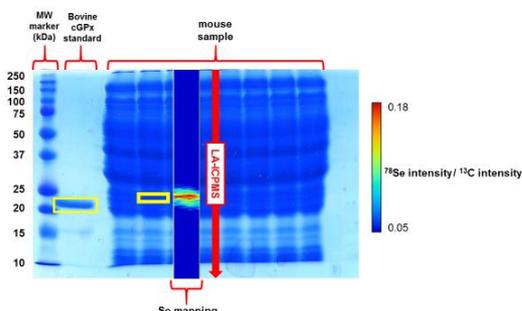


図 1 cGPx の泳動後ゲルと Se マッピング

3-2. Cap HPLC-ICPMS による S 及び Se ペプチドの検出

図 2 に Cap HPLC-ICPMS による SeMet 投与マウス肝臓中 cGPx ペプチドの測定結果を示す。図 2 のクロマトグラムは上から UV 検出器による 214 nm と 280 nm の吸収、ICPMS による $^{32}\text{S}^{16}\text{O}$, $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}$, $^{82}\text{Se}^{16}\text{O}$ である。ペプチドの分離に逆相クロマトグラフィーを用いているため、親水性の大きいペプチドから順に検出されている。

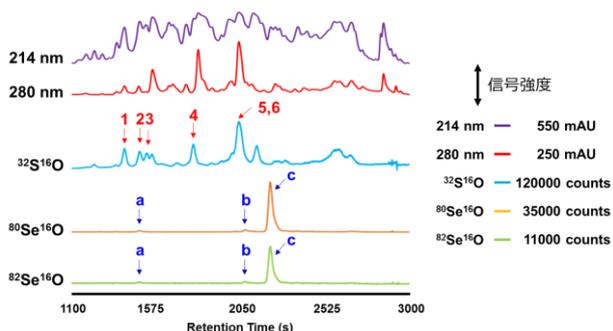


図 2 SeMet 投与マウス肝臓中 cGPx ペプチド

図 2 より $^{32}\text{S}^{16}\text{O}$ のクロマトグラムから S ペプチド由来の S ピーク 6 本を、 $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}$, $^{82}\text{Se}^{16}\text{O}$ のクロマトグラムから Se ペプチド由来の Se ピーク a, b, c を得ることができた。また表 1 に S 及び Se ペプチドを親水性の高いものから順に並べ、図 2 のピークに当てはめたものを示す。さらに ESI-MS/MS の結果より、表 1 に示すアミノ酸配列を有した Se ピーク a, b, c の存在が明らかになった。そのうち Se ピーク a, b は、それぞれ S ピーク 2, 6 と同じ保持時間に溶出した。これは S ピーク 2, 6 のペプチドのアミノ酸配列中にある C (Cys) 残基が U (SeCys) 残基に置き換わることで、Se のピークとして検出されたものであると考えた。また Se ピ

ーク c は cGPx の活性部位である U を含むペプチドと M (Met) 残基が SeMet 残基へ置き換わったペプチドが誤開裂によって繋り疎水性が高く長鎖の Se ペプチドとして遅く溶出されていると考えた。以上のピークは全投与形態間で同様に得られた。次に表 2 に Se ピーク a, b, c の $^{82}\text{Se}/^{80}\text{Se}$ 比を示した。 ^{82}Se を濃縮した Se (IV) 及び SeMet 投与では Se ピーク a, b, c は天然同位体比 0.176 に対して、いずれも高い値を示している。これは、投与した ^{82}Se から SeCys や SeMet が生成したことを示している。また SeMet 投与の Se ピーク c のみ Se (IV) 投与よりも高い $^{82}\text{Se}/^{80}\text{Se}$ 比を示していることから U だけでなく ^{82}Se を濃縮した SeMet をアミノ酸配列中に組み込んでいると考えた。その一方、Se (IV) 投与では Se (IV) から SeMet を生合成しアミノ酸配列中に組み込む可能性は低いと考えた。

表 1 マウス肝臓中 cGPx の S 及び Se ペプチド

Element	Peak No	Peptide	Hydrophobicity	Retention time
S	1	DYTEMNDLQK	-1.77	1380 s
	2	CEVNGEK	-1.16	1460 s
	3	NALPTSPDDPTALMTDPK	-0.78	1530 s
	4	GLVVLGFPCNQFGHQENGK	-0.20	1770 s
	5	MCAAR	0.70	2030 s
	6	YIIWSPVCR	0.73	2030 s
Se	a	UEVNGEK	-1.16	1460 s
	b	YIIWSPVUR	0.73	2030 s
	c	VLLIENVASLUGTTIR DYTE(SeMet)NDLQK	-	2205 s

表 2 Se ピーク a, b, c の投与形態別 $^{82}\text{Se}/^{80}\text{Se}$ 比

	peak a	peak b	peak c
生理食塩水投与	ND	ND	0.179
Se(IV) 投与	0.295	0.282	0.223
SeMet 投与	0.269	0.267	0.236

4. 結論

Se 投与形態に限らずマウス肝臓中 cGPx では C 残基から U 残基への置き換わりが起きており、SeMet 投与でのみ M 残基から SeMet 残基への置き換わりが起きていることが示唆された。

引用文献

- (1) Suzuki, Y. et al. *Metallomics* **2010**, 2, 126–132.
- (2) Suzuki, Y. et al. *Metallomics* **2013**, 5, 445–452.
- (3) Biera, K. et al. *J. Anal. At. Spectrom.* **2008**, 23, 493–499.
- (4) 田代裕規, 中央大学大学院修士論文 (2018).

対外発表

- 1) 山尾契, 池田智洋, 古田直紀: プラズマ分光分析研究会 2019 筑波セミナー, 2019, 東京, ポスター発表.
- 2) 山尾契, 池田智洋, 古田直紀: 日本分析化学会第 68 年会, 2019, 千葉, 口頭発表.