

A-16

マウス肝臓中細胞内グルタチオンペルオキシダーゼのセレノアミノ酸解析 Selenoamino Acid Analysis of Cellular Glutathione Peroxidase in Mouse Liver

応用化学専攻 山本 貴雄
YAMAMOTO Takao

【緒言】

セレン (Se) は肝臓中に多く存在し、細胞内グルタチオンペルオキシダーゼ (cGPx) をはじめとするセレンタンパク質の活性中心として働き、過酸化物を還元する抗酸化作用を持っている¹⁾。動物の生体内におけるセレンタンパク質の合成メカニズムとしては、摂取した Se がセレナイド (HSe) に還元され、UGA コドンによりセレノシステイン (SeC) としてタンパク質に組み込まれる経路が知られている²⁾。また、酵母においてはセレノメチオニン (SeM) が合成され、タンパク質のアミノ酸配列中の Met とランダムに置き換わりセレンタンパク質が合成される。しかしながら、動物肝臓中セレンタンパク質では上記の経路は知られていない。

本研究では、摂取する Se の化学形態の違いによる生体内でのセレンタンパク質合成経路の違いを解明するため、マウス肝臓中の Se 全量分析、タンパク質の化学形態別分析、cGPx のアミノ酸解析を行った。

【実験】

本実験で使用するマウスは生後 4 週齢のマウスに Se 欠乏食を 4 週間与えた。4 週間後、質量数 82 の Se 同位体を濃縮した ⁸²SeM 及び ⁸²SeO₃²⁻ を静脈注射した。投与後 6h で解剖し、肝臓を摘出した。

Se 全量分析では、マウス肝臓 0.06 g を秤量し、テフロン製容器内で硝酸及び過酸化水素を加え、マイクロ波分解を行った。分解後の溶液を超純水で希釈し、ICPMS で測定した。

マウス肝臓中セレンタンパク質の化学形態別分析は以下の手順で行った。マウス肝臓を 0.5 g 秤量し、臓器の 2 倍量の Tris-HNO₃ (pH7.4)を加えた。

ホモジナイザーを用いて、マウス肝臓を冷却しつつ均質化させた後、超遠心分離用のチューブに移し、105,000 × g, 4°Cの条件で 1 時間超遠心分離を行った。1 時間後、超遠心チューブ内の上澄みを採取し、サイズ排除カラム (SEC) を用いた SEC-ICPMS を用いて水溶性セレンタンパク質の測定を行った。

アミノ酸解析では、化学形態別分析で測定試料としたマウス肝臓中水溶性セレンタンパク質を SEC に通すことで、cGPx のみを分取した。得られた cGPx 溶液をカットオフ値 3000 Da の限界ろ過フィルターを用いて濃縮した。フィルター上に残った溶液をポリプロピレン容器に移し、リパーゼ 10 mg、プロテアーゼ 20 mg を加えた。窒素ガスでバブリングを行い、37°Cの恒温振とう器内で 24 時間酵素分解を行った。分解後の試料を混合イオン対試薬³⁾で希釈し、逆相カラム (RP) を用いた RP-ICPMS を用いて Se アミノ酸を測定した。

【結果及び考察】

1. マウス肝臓中 Se 全量分析

⁸²SeM 及び ⁸²SeO₃²⁻ を投与したマウス肝臓中の外因性 ⁸²Se 濃度はそれぞれ 106 ± 22 及び 66 ± 6 ng g⁻¹であった。

この結果から、⁸²SeM のほうが ⁸²SeO₃²⁻ よりも肝臓中に取り込まれやすい化学形態だといえる。

2. マウス肝臓抽出物中 Se 化学形態別分析

SEC-ICPMS で得られたマウス肝臓抽出物のクロマトグラムを図 1 に示す。保持時間 600-1200 sec の間にピーク (P1) が検出された。⁸²SeM 投与サンプルにおいては保持時間 1200-1400 sec の間に ⁸²Se のみのピーク (P2) が検出された。cGPx 及び SeM 標準試料を用いた標準添加法により、同位体比に変

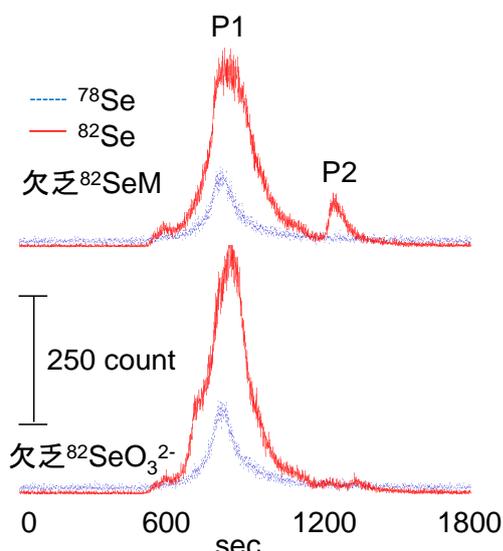


図 1 SEC-ICPMS で得られたマウス肝臓抽出物中の Se のクロマトグラム

動が見られたことから、P1 及び P2 はそれぞれ cGPx 及び SeM であると同定した。cGPx 中の外因性 ^{82}Se 濃度を比較すると、 ^{82}SeM 及び $^{82}\text{SeO}_3^{2-}$ を投与したマウス肝臓中の外因性 ^{82}Se 濃度はそれぞれ 60 ± 10 及び $52 \pm 19 \text{ ng g}^{-1}$ であった。 ^{82}SeM を投与したマウス体内では $^{82}\text{SeO}_3^{2-}$ を投与した場合よりも cGPx 中に外因性 Se が多く取り込まれることが明らかになった。

また、 ^{82}SeM 投与サンプルでは投与された ^{82}SeM が直接肝臓中に入り込む経路が存在することが確認できた。

3. マウス肝臓中 cGPx の Se アミノ酸解析

RP-ICPMS で得られたマウス肝臓 cGPx 中の Se アミノ酸のクロマトグラムを図 2 に示す。図 2 中の保持時間 200-240 sec (P3) 及び 410-460 sec (P4) のピークはセレノシステイン (SeC) の 2 量体であるセレノシスチン (CSeSeC) 及び SeM の標準添加法により、同位体比の変動が見られたことから、P3 及び P4 はそれぞれ CSeSeC 及び SeM であると同定した。 ^{82}SeM 投与のサンプルにおいては外因性 ^{82}Se が SeM の形態で cGPx に取り込まれていることを明らかにした。 ^{82}SeM を投与した際には従来考えられている cGPx の合成経路に加えて、アミノ酸配列中に存在するメチオニン (Met) と SeM がランダムに置き換わる経路が存在することが示唆された。

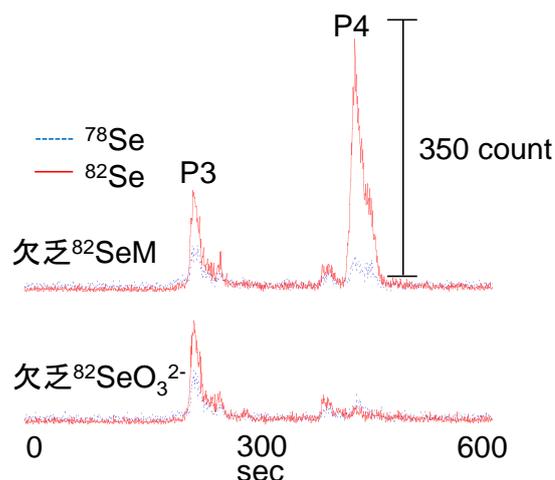


図 2 RP-ICPMS で得られたマウス肝臓 cGPx 中の Se アミノ酸のクロマトグラム

【結論】

標準添加法により cGPx を構成する Se アミノ酸は ^{82}SeM 投与サンプルでは CSeSeC と SeM が検出され、 $^{82}\text{SeO}_3^{2-}$ 投与サンプルでは CSeSeC のみが検出された。従って SeM をマウスに投与した場合には SeM がセレナイドに還元された後に UGA コドンにより SeC としてコードされ、cGPx 中に入る経路に加えて cGPx のアミノ酸配列中の Met と SeM がランダムに置き換わる経路が存在することを明らかにした。

【参考文献】

- 1) Sar, D. G et al. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 896-904.
- 2) Kazuo, T. S. *J. Health Sci.* **2005**, *51*, 107-114.
- 3) Zheng, J. et al. *J. Chromatogr. A* **2000**, *874*, 55-64.

【対外発表リスト】

- 1) 山本 貴雄, 鈴木 美成, 古田 直紀: 第 72 回分析化学討論会, 2012, 鹿児島, 口頭発表.
- 2) N. Furuta, Y. Suzuki, Y. Hashiura, T. Sakai, T. Yamamoto, T. Matsukawa and A. Shinohara: SCIX2012, Kansas City, USA, Oral.
- 3) 小林 慧人, 山本 貴雄, 鈴木 美成, 古田 直紀: 第 73 回分析化学討論会, 2013, 函館, 口頭発表.