

必須微量元素セレンをはかる：セレノールの可視化計測

前田 初男*

1. セレンは毒？

19世紀初頭、スウェーデンの硫酸プラントでの話である[1]。ある時から原料である硫化鉄鉱を全く異なる産地のものに変えた。しばらくして、プラント労働者の中に、様々な症状を訴えるものが現れた。当然、新たに使用し始めた硫化鉄鉱が、これらの症状の原因だと考えられた。そして、問題の硫化鉄鉱から原因物質として、1817年 J.J. Berzelius により新元素が発見された。周期表では、この元素は第VI族の酸素、イオウ、テルル等と同族である。その当時、既に発見されていたテルル (tellurium：地球“tellus”を意味する) の真上に位置することから、Berzelius はこの新元素を月の女神“Selene”に因んでセレン (selenium) と名付けた。セレンの『毒』としての歴史の始まりである。人類史上、セレンの毒性についての最初の記述は Marco Polo によるものだとされる。彼は、1295年ベニスから中国へ旅行した際、ある地域の牧草を食べた馬の蹄に脱爪等の障害を観察している。様々な家畜において同様な障害(アルカリ病と呼ばれる)が20世紀以降次々に報告された。それらの障害が牧草中に高濃度で含まれているセレンに由来することが1934年に科学的に証明された。その結果、セレンの『毒』元素としての地位が確立された。

一方、セレンの『くすり』としての機能は20世紀も後半に入ってから注目されるようになった。1957年ビタミンE欠乏による肝細胞壊死が

セレン摂取により抑制されることが明らかになった[2]。セレン摂取は克山病 (Keshan disease) の治療にも有効である[3]。克山病とは1935年中国黒龍江省の克山で発見されたセレンの欠乏に起因する流行性の心筋障害で、この疾患により過去数千人が死亡していると推定されている。1973年 J.T. Rotruck によりセレンが glutathione peroxidase の構成成分であることが示された[4]。この発見を契機にセレン研究がより活発に行なわれるようになった。その結果、セレンの機能としては、心筋症だけでなく脳細胞障害[5]、ガン[6]、エイズ[1, 6]等の様々な疾患に対する抑制効果や老化に対する予防効果[1, 6]がこれまでに見出されている。ところが、ヒト体内にはセレンは十数 mg しか存在しない。セレンは、過剰摂取では毒性を示すものの、実は必須微量元素であったのである。

2. セレンの生体内化学種

食品には無機セレン (SeO_3^{2-} , SeO_4^{2-} 等) と有機セレン [selenomethionine (SeMet), S-methylcysteine 等] が含まれる。食事により取り込まれたセレン化合物の代謝および変換反応[6, 7] を模式的に表したのが図1である。体内に取り込まれたセレン化合物は、複雑な反応系によりセレン化水素 (H_2Se) に分解される。一方、穀物中の主要なセレン化合物である SeMet には、methionine (Met) と間違えてタンパクに取り込まれる経路および他のセレン

*大阪大学大学院薬学研究科助教授

化合物と同様に H_2Se に分解される経路の二つが存在する。 H_2Se はそれ自身または更に代謝された後体外に排泄される。 H_2Se には、セレンリン酸 ($H_2SePO_3^-$) に変換される経路も存在する。この経路により発生する $H_2SePO_3^-$ は一般的なタンパクの場合とは異なる非常に特殊な遺伝子発現系に活用される。その結果、遺伝子産物として selenocysteine (Sec) を組み込んだセレンプロテイン (SeP) が合成される [8]。尚、SeP 合成過程には、Sec 自身ではなく、SeP 発現系に特異的な tRNA である seryl-tRNA^{[Ser]Sec} から生合成される Sec-tRNA^{[Ser]Sec} が利用される。

このような代謝・変換経路の結果としてセレン化合物の主要な生体内化学種は、SeMet を組み込んだタンパク (SeP とは区別される) と SeP である。前者はランダムに発現されるため、特殊な機能は担っていないと考えられている。つまり、生体において重要な機能を担うセレン化合物の本体は SeP である。事実、これまで

に同定された約25種の SeP の多くが酸化ストレスに対する生体防御機構に深く関わっていることが明らかにされている [5, 7, 8]。しかし、詳細な機能や意義が不明な SeP も多い。SeP の発現は、食品由来のセレン化合物から生成する H_2Se 量だけでなく、複雑かつ特殊な遺伝子発現系に関与する様々な因子に依存する。また、SeP は未知の反応経路により、脱セレン化 (その Sec 残基を alanine 残基へ変換) される場合もある。これらのことから、一般的なタンパクでは成立する [mRNA 発現量] = [タンパク発現量] = [タンパク機能発現量] の関係が SeP には当てはめることができない。この事実が、他のタンパクの場合に比べて、SeP の機能解析をより難しくしている。

3. 既存の SeP 分析法

他のタンパクと同様に SeP も抗体を用いる immuno assay により分析できる [9]。しかし、抗体を作成するためには必ず単離した SeP が必要である (未知の SeP の分析はできない) こと、SeP とその脱セレン化体 (alanine 変異体) を識別することが困難であること、等の問題がある。SeP である glutathione peroxidase (GPx), thioredoxin reductase (TrxR) (ほ乳類由来) 等は、enzyme assay により酵素活性を評価することにより分析できる [10]。enzyme assay は酵素機能を持つタンパクにのみ有効であり、酵素でない SeP には適用できない。

SeP が示す抗酸化機能のキープレイヤーは Sec 残基中のセレンール (-SeH) 基である。つまり、真の SeP 機能レベルは、その Sec またはセレン含量に等価である。Sec 含量の測定は、SeP の消化分解により生成する Sec を HPLC 等の分離分析法により行うことができ

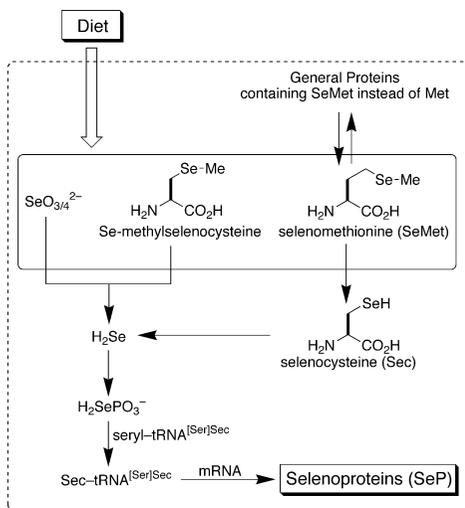


図 1. 摂取されたセレン化合物の生体内代謝・変換反応

る[11]. この手法の問題点は、分解反応の前後における Sec 量が同一であることを如何に担保するかにある. セレン含量は原子吸光法により計測できる. 分解反応を必要とせず、機能の根源であるセレンを直接計測できる手法であるため、原子吸光法は SeP 解析に不可欠な基盤分析法として汎用されている[10]. しかし、原子吸光法には感度の面で問題があり、SeP 分析を行うには比較的大量のタンパクを必要とする.

これらの既存の分析法は、SeP 科学の発展に大きく貢献して来た. しかし、今後、遺伝子解析から35種以上の存在が推定されている SeP の科学を更に展開し、心筋障害、脳細胞障害などの成人病の病因・病態ならびに老化と SeP との関係をもより明確に解明する必要がある. そのためには、既存の手法とは異なる計測原理に基づく新しい分析法の開発が重要だと考えられ

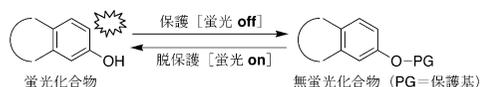


図 2. 新規蛍光プローブ設計戦略

る. 著者らは、SeP の機能を担う Sec 中のセレンノールに着目し、それに対する特異的蛍光プローブの設計開発を試みた.

4. 保護・脱保護化学に基づく蛍光プローブ設計戦略

著者らは、保護・脱保護化学に基づく蛍光プローブ設計戦略を以下の事実ならびに仮説から立てた: フェノール性水酸基を持つ蛍光色素は、そのフェノール性水酸基のある種の保護基で保護すると無蛍光になる; 無蛍光になった保護化合物の脱保護反応 (本の蛍光色素への変換反応) が、あるターゲット分子に特異的な化学反応によってのみ起こるならば、その保護化合物はターゲット分子に対するプローブとして機能する (図 2).

この戦略を検証するため、蛍光色素として fluorescein (1) 類を、保護基として benzenesulfonyl (BES) 基を選択し、様々な benzenesulfonyl fluorescein (3) 類についてプローブ特性を評価した (図 3). その結果、既に合成法が確立されている 1 および BES

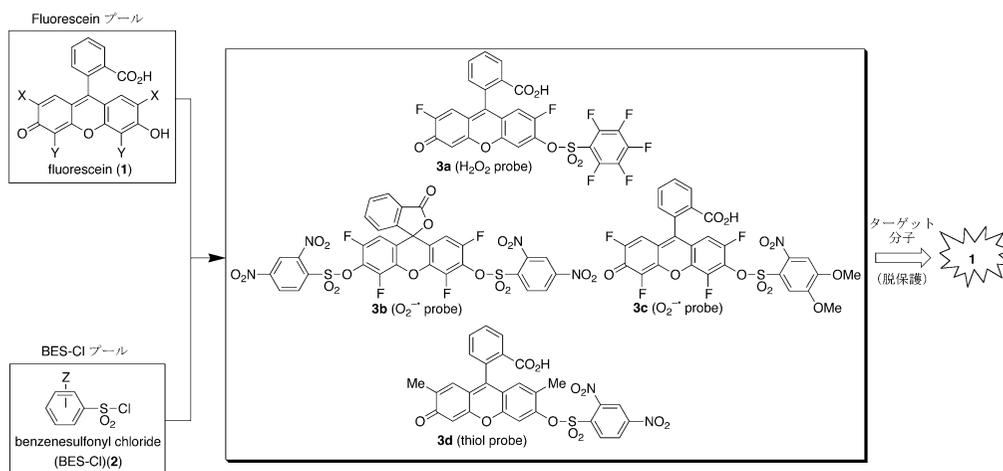


図 3. 保護・脱保護化学に基づく設計戦略により既に開発した蛍光プローブ

chloride (2) の化合物プールから、ターゲット分子の化学的特性を最大限に活用できる組み合わせを適宜選択することにより、様々な新規蛍光プローブを開発することができた。すなわち、図3に示すように、過酸化水素プローブ 3a[12]、スーパーオキシドプローブ 3b[13] および 3c ならびにチオールプローブ 3d[14] の開発に成功した。その結果、著者らの立てたプローブ設計戦略が合理的であるだけでなく、一般的戦略として活用できることを示せた。

5. セレノール蛍光プローブの開発

セレノールはチオールより強力な求核剤として作用する。また、セレノールの pK_a は、チオールの pK_a に比べて小さい。例えば、Sec のセレノール基の pK_a が5.2であるのに対し、cysteine (Cys) のチオール基の pK_a は8.3である[15]。このような両者の化学特性の差を活用すると、セレノールとチオールを識別分析できると考えられる。測定媒体の pK_a を、チオー

ル (-SH) が求核剤として作用できない [チオレイト (-S⁻) に解離することができない] 弱酸性領域に設定すれば、セレノールのみが求核剤として機能する。セレノールだけに観察される求核性を利用すれば、Cys や glutathione (GSH) 等のチオール存在下においても Sec を特異的に検出できる。この考えは、当然、既存のチオール蛍光プローブが弱酸性条件下においてセレノールプローブとして機能する可能性を期待させる。しかし、答えは否であった[16]。これまでに開発されているチオールプローブはマレイミド型、アリールハライド型およびアルキルハライド型プローブに大別できる[17]。マレイミド型およびアリールハライド型プローブは一般にチオールに対する反応性が高く、アルキルハライド型プローブの反応性は比較的低い。著者らの開発したチオールプローブ 3d とチオールとの反応の速度定数[15] から判断すると、3d のチオールに対する反応性は、反応性の高いマレイミド型およびアリールハライド型プロ

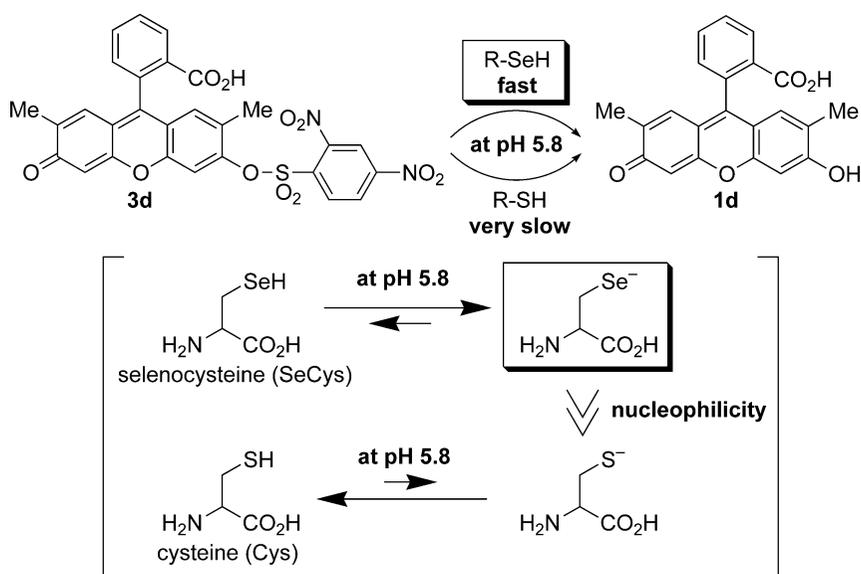


図4. pH5.8で機能するセレノール蛍光プローブ 3d とその検出原理

ブと低反応性のアルキルハライド型プローブの間に位置する。この適度な反応性は、3d が弱酸性条件下においてセレノールプローブとして機能することを許容すると期待された。

そこで、その可能性について詳細に検討したところ、3d は pH5.8 において世界で最初のセレノール蛍光プローブとして機能することを見出した (図4) [18]。pH5.8, 0.1M リン酸緩衝液中 37°C で 3d と Sec, チオール系還元剤である dithiothreitol (DTT) または Cys との反応の速度定数を見積もったところ、各々 7.4×10^2 , 0.7 または $0.4 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった。この速度定数の違いは 3d が Sec, DTT または Cys に対して示す蛍光応答に顕著に反映されていた: 200 pmol の Sec, DTT または Cys について 3d と 37°C で 10 分間培養した時に観察された応答の相対比は 269 : 1.3 : 1.0 であった。つまり、チオール存在下 3d は 200 倍以上の選択性で Sec に対して蛍光応答を与えた。その結果、selenocystine (Sec の酸化型) から DTT との反応により発生する Sec も、共存する DTT に全く妨害されることなく 3d により高感度に検出できた。96 穴マイクロプレートを用いた Sec アッセイの検出限界および定量範囲は、各々 0.8 pmol および 1 ~ 1000 pmol であった。尚、3d の脱保護反応により生成する 1d が pH5.8 で示す蛍光応答は、pH7.4 の時の強度の 10% 程度であったが、Sec の高感度分析に十分な強度であった。

6. SeP の Sec 残基計測

上述したように SeP の機能発現レベルの最も合目的な評価は、Sec 含量 (残基数) すなわちセレノール量の計測により行える。そこで、3d を用いて SeP の Sec 残基数計測法の確立を試みた。SeP としては市販されている GPx

(from bovine erythrocytes) [19] と TrxR (from rat liver) [20, 21] を用いた。前者はホモテトラマー、後者はホモダイマーであり、理論上 GPx および TrxR は 1 分子当たり各々 4 および 2 分子の Sec を含む。変性をしない、または、5 M 尿素を用いて変性した GPx または TrxR に対して 3d は全く蛍光応答を示さなかった。しかし、4 M グアニジンにより変性した場合、3d はこれらの SeP に対して良好な応答を与えた。しかし、4 M という高濃度でグアニジンが存在する時、3d のチオール共存下における Sec に対する選択性は 20 倍程度まで抑制された。そこで、グアニジン濃度の Sec 特異性に対する影響を詳細に検討した。その結果、0.4 M 以下の濃度のグアニジン共存下では 100 倍以上の選択性で 3d が Sec に対して蛍光応答を示すことを見出した。

この知見に基づき、図5に示すようなプロトコルにより GPx (20.7, 82.8 および 207.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と TrxR (62.8, 157.1 および 314.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) について Sec 含量を決定した。表1に得られた結果を示す。どちらの SeP の場合も DTT 共存下における測定により理論値と良く一致する Sec 測定値が得られた [18]。DTT を用いない場合は、DTT 共存下に比べて、10

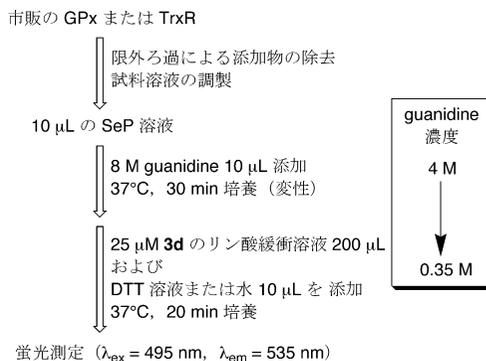


図5. SeP 中の Sec 含量決定法のプロトコル

%程度低い Sec 測定値が得られた。これは、還元剤 DTT が存在しない場合、SeP 中の Sec が部分的に酸化を受けたためだと理解できる。24.5pmol (207.1 μ g/mL, 10 μ L) GPx は、理論上490pmol の Cys 残基および98pmol の Sec 残基を持つ。本アッセイにおいて、この理論値より多い1000pmol の Cys は、わずか1.7pmol の Sec に相当する蛍光応答を与えたのみで、本アッセイ法の Sec 選択性は588倍にも達することが示された。つまり、本アッセイでは SeP 中の Cys 残基の影響は殆ど無視できることが明らかになった。これらの結果から、3d をセレノール蛍光プローブとして用いるアッセイが SeP の簡便かつ高特異的な Sec 残基数決定法として活用できることが明らかになった。

表 1. セレノール蛍光プローブ 3d を用いて決定した SeP 中のサブユニット当たりの Sec 含量 (平均値 \pm 標準偏差)

SeP	DTT	Sec content/subunit
GPx	added	1.03 \pm 0.14
GPx	—	0.91 \pm 0.11
TrxR	added	1.09 \pm 0.19
TrxR	—	1.02 \pm 0.30

7. まとめ

高齢化社会における人々の Quality of Life (QOL) 向上指向が益々高まっている。この社会現象は、ポリフェノール類等を含有する酸化機能食品だけでなく、セレン化合物を主成分とする機能性食品への関心を異常に高めている。一方、生体における必須微量元素としてのセレンの機能・役割は、上述したように未だ不明な点が多い。また、土壌、河川、海等におけるセレン化合物の分布も農林水産科学だけでなく環境科学の観点からも興味が持たれる。つまり、セレン化合物の分析は、ヒトだけでなく様々

な生物における取り込みから体内動態・排泄ならびに生物を取り巻く環境をターゲットに行なうべきであろう。著者らは有機セレン化合物の計測という観点から、今後これらの領域におけるセレン科学の発展に貢献していきたいと考えている。

引用文献：

- [1] K. El-Bayoumy, R. Sinha, *Mutat. Res.*, **551**, 181-197 (2004).
- [2] K. Schwarz, C. Foltz, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3292-3293 (1957).
- [3] H. Tapiero, D.M. Townsend, K.D. Tew, *Biomed. Pharmacother.*, **57**, 134-144 (2003).
- [4] J.T. Rotruch, A.L. Pope, H.E. Ganther, A.B. Swanson, D.G. Hafeman, W.G. Hoekstra, *Science*, **179**, 588-600 (1973).
- [5] U. Schweizer, A.U. Bräuer, J. Köhrle, R. Nitsch, N. R. Savaskan, *Brain Res. Rev.*, **45**, 164-178 (2004).
- [6] P. Brenneisen, H. Steinbrenner, H. Sies, *Mol. Aspects Med.*, **26**, 256-267 (2005).
- [7] L. Schomburg, U. Schweizer, J. Köhrle, *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 1988-1995 (2004).
- [8] D.M. Driscoll, P.R. Copeland, *Annu. Rev. Nutr.*, **23**, 17-40 (2003).
- [9] 例えば、A. Söderberg, B. Sahaf, A. Holmgren, A. Rosén, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **249**, 86-89 (1998); A. Andoh, M. Hirashima, H. Maeda, K. Hata, O. Inatomi, T. Tsujikawa, M. Sasaki, K. Takahashi, Y. Fujiyama,

- Nutr.*, **21**, 574–579 (2005).
- [10] 例えば, V.N. Gladyshev, K.-T. Jeang, T.C. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6146–6151 (1996); L. Zhong, E.S.J. Arnér, J. Ljung, R. Åslund, A. Holmgren, *J. Biol. Chem.*, **273**, 8581–8591 (1998).
- [11] 例えば, B. Iscioglu, E. Henden, *Anal. Chim. Acta*, **505**, 101–106 (2005); J.L. Gómez-Ariza, M.A. Caro de la Torre, G.E. Morales, *Anal. Chim. Acta*, **524**, 305–314 (2004); J. Zheng, Y. Shibata, N. Furuta, *Talanta*, **59**, 27–36 (2003); J.R. Encinar, D. Schaumlöffel, Y. Ogra, R. Lobinski, *Anal. Chem.*, **76**, 6635–6642 (2004).
- [12] H. Maeda, Y. Fukuyasu, S. Yoshida, M. Fukuda, K. Saeki, H. Matsuno, Y. Yamauchi, K. Yoshida, K. Hirata, K. Miyamoto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 2389–2391 (2004).
- [13] H. Maeda, K. Yamamoto, Y. Nomura, I. Kohno, L. Hafsi, N. Ueda, S. Yoshida, M. Fukuda, Y. Fukuyasu, Y. Yamauchi, N. Itoh, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 68–69 (2005).
- [14] H. Maeda, H. Matsuno, M. Ushida, K. Katayama, K. Saeki, N. Itoh, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 2922–2925 (2005).
- [15] C. Jacob, G.I. Giles, N.M. Giles, H. Sies, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 4742–4758 (2003).
- [16] W.C. Hawkes, M.A. Kutnink, *J. Chromatogr.*, **576**, 263–270 (1992).
- [17] R.P. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 9th ed., Molecular Probes, Eugene, 2002, pp. 79–98.
- [18] H. Maeda, K. Katayama, H. Matsuno, T. Uno, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 1810–1813 (2006).
- [19] J.R. Arthur, *Cell. Mol. Life Sci.*, **57**, 1825–1835 (2000).
- [20] D. Mustacich, G. Powis, *Biochem. J.*, **346**, 1–8 (2000).
- [21] S.-R. Lee, J.-R. Kim, K.-S. Kwon, H.W. Yoon, R.L. Levine, A. Ginsburg, S.G. Rhee, *J. Biol. Chem.*, **274**, 4722–4734 (1999).