

魚類に含まれる有機セレン化合物の構造と機能に関する研究

山 下 由 美 子

目 次

	頁
序 論	1
謝 辞	10
省略記号	11
第一章 有機セレン化合物の同定および生理機能	14
第一節 有機セレン化合物（セレノネイン）の精製および構造決定	16
第二節 セレノネインの生化学的性状	20
第三節 考察	26
第二章 セレノネインの分析法の確立と組織別含量	28
第一節 HPLC-誘導結合プラズマ質量分析によるセレノネインの分析	29
第二節 魚類および鯨類におけるセレノネインの組織別含量	33
第三節 考察	36
第三章 セレノネインのトランスポーターの同定およびメチル水銀の解毒機構の解析	40
第一節 セレノネインに対するトランスポーターの同定	42
第二節 セレノネインによるメチル水銀の解毒機構の解析	46
第三節 考察	52
第四章 グルタチオンペルオキシダーゼの精製および性状解析	56
第一節 グルタチオンペルオキシダーゼの精製	58
第二節 セレノネインによるグルタチオンペルオキシダーゼの発現	61
第三節 考察	66

総括的考察	68
文 献	71
図 表	81

序 論

セレンは人体に対する必須な微量元素である。セレンが不足すると、過酸化物質による酸化障害が生じることが知られている (Combs, 1986; 姫野, 1994; Himeno, 2000)。セレンの欠乏症の一つである心筋症の克山病は、低セレン地域である中国東北部に見られるが、亜セレン酸塩の投与で発症が予防される (Combs, 1986; 姫野, 1994)。また、低セレン地域である中国北部やシベリアの一部の思春期の子供に認められるカシン・ベック症 (地方病性変形性骨軟骨関節症) も、セレン欠乏が原因となっている (Combs, 1986; 姫野, 1994)。完全静脈栄養療養に用いられる高カロリー液にセレンがほとんど含まれないことから、致死性の心筋障害が発生した例が報告されている (Van-Rij *et al.*, 1979)。また、心臓疾患の罹患率と血液中のセレン濃度を比較した疫学調査から低セレン状態が冠動脈疾患と相関することが知られている (姫野, 1994; Salonen, 1982)。フィンランド東部はセレン欠乏による心臓疾患の死亡率が高く、血清中のセレン濃度が 45 $\mu\text{g/L}$ 以下の場合に心臓疾患の発症率が高いことが知られている (姫野, 1994)。さらに、筋肉痛、皮膚の乾燥、肝壊死等がセレン欠乏によって生じることが知られている (Combs, 1986; 姫野, 1994)。ラットや他の哺乳動物にみられる肝壊死、家禽の滲出性体質、ヒツジ、仔ウシなどの白筋症、ブタの食餌性肝炎、原因不明の健康障害が世界各地で知られ、その原因がセレンの摂取不足による欠乏症であることが 1930 年から 1950 年代に確認された (山口, 1994)。

一方で、セレンの過剰摂取は毒性が強く、爪の変形や脱毛、胃腸障害、神経障害、心筋梗塞、急性の呼吸困難、腎不全等を引き起こすことが知られている (Combs, 1986; 姫野, 1994; Wilber, 1980)。セレンは栄養素として食品から摂取される。日本人の 1 日あたりのセレン平均摂取量は 127.3 μg であり、米、小麦、豆などの穀類から 35.7%、魚介類から 32.5%、鶏卵、鶏肉、家畜の肝臓などの肉、卵類から 15.9% を摂取している (鈴木, 1988)。

セレンは、生体内でセレンタンパク質のセレノシステイン残基として存在し、酸化還元酵素の活性中心に位置している。ヒドロペルオキシドや活性酸素種 (ROS) の分解除去を担うグルタチ

オンペルオキシターゼ (GPx) (Awasthi *et al.*, 1975; Bagnyukova *et al.*, 2005; Braddon *et al.*, 1985; Carmagnol *et al.*, 1983; Combs, 2001a; Kai *et al.*, 1995; Kolayi *et al.*, 1997; Mills, 1957, 1958; Nagai *et al.*, 2002; Nakano *et al.*, 1992b; Perez-Campo *et al.*, 1993; Rotruck *et al.*, 1972; Thompson *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 1996) およびチオレドキシシン還元酵素 (Bell *et al.*, 1984), 甲状腺ホルモンの生成に関与するテトラヨードチロニン-5'-脱ヨウ素化酵素 (Arthur *et al.*, 1990; Behne *et al.*, 1990; Berry, 1991), 血漿中セレノプロテイン P (Burk and Hill, 1994; Mustacich and Powis, 2000) 等のセレンタンパク質が知られている。いずれのセレンタンパク質も生体抗酸化作用に重要な役割を担っている。

動物性食品中のセレンの多くは、タンパク質の構成アミノ酸であるセレノシステイン残基として存在することから、その消化・吸収はタンパク質の吸収と同時に行われると考えられており、消化管からの吸収率は 50% 以上であると推定されている (姫野, 1994)。ヒトの体内には体重 1 kg 当たり 250 μg のセレンが存在し、尿中への排泄によって体内での恒常性が保たれている (姫野, 1994)。

穀類中のセレンは主にセレノメチオニンとして存在し、鶏卵、肉類中ではセレノシステインとして存在する (Combs, 1986)。これらの食品中に含まれる有機態セレンの栄養学的な有効性は、ヒトや動物のセレン欠乏症が改善され、血中および肝臓中の GPx の最大活性が得られる亜セレン酸の摂取量を基準として調べられてきた (厚生労働省, 2004)。セレンの食事摂取基準は、推定平均必要量が 25 (20) μg , 推奨量が 30 (25) μg , 上限量が 450 (350) μg に設定されている (数値は成人男性, かつこ内は成人女性) (厚生労働省, 2004)。ただし, 30-49 歳の男性の推定平均必要量は 30 μg , 推奨量は 35 μg である (厚生労働省, 2004)。また, わが国でのセレン上限量は, 脱毛および爪の脆弱化と脱落がみられた中国の湖北省恩施地域の調査より得られた 800 μg Se/日を参考に, 100-450 μg Se/日に設定されている (厚生労働省, 2004; 経済産業省, 2006)。

これらの知見から魚肉に高濃度に含まれる有機態セレンは GPx 等のセレンタンパク質とその分解ペプチド由来であると考えられていた (又平・菊地, 2000)。特に, マグロ類の血合筋や鯨肉

はセレンを最も高濃度に含むことが知られており（有馬・長倉, 1979; 山下, 1994, 1997), クロマトグラフィーにおける各臓器のセレン含量は血液 (15.2 ppm), 腎臓 (8.3 ppm), 脾臓 (7.6 ppm), 表層血合筋 (6.1 ppm), 真層血合筋 (5.9 ppm), 心臓 (4.4 ppm), 肝臓 (4.1 ppm), 鰓 (2.6 ppm), 脳 (1.4 ppm), および普通筋 (0.57 ppm) であった。臓器によっては 4 ppm を超えるセレンが含まれていることから, これらは機能性物質として有機態セレンの供給源として利用可能であると考えられる。しかし, このような各臓器に含まれるセレンの生化学的性状は不明であり, また, 高純度の抽出物を得ることが困難であるため, 有効に利用されていないのが現状である。

肺がん, 大腸がん, 前立腺がん, 直腸がん, 乳がん, 白血病等の発がんのリスクはセレン欠乏によって高まることが報告されており（姫野, 1994 ; 川上, 1986), がんの手術や放射線治療中に 1 日 200 μg の亜セレン酸ナトリウムを補充すると, がん細胞に対する細胞性免疫応答が増強される（Kiremidjian-Schumacher and Roy, 2001）。また, セレンはがん細胞のシグナル伝達系に作用して細胞増殖を抑え, アポトーシスを誘導する効果も報告されている（Ghose, 2001）。そして, 1 日に 100–200 μg の必要量以上のセレン摂取は発がん物質による DNA の変異や酸化障害を抑制し, がんの進展を抑える効果があること, ただし, 上限は 400 μg であってそれ以上の過剰摂取は有害である可能性が指摘されている（El-Bayoumy, 2001）。このようにセレンは発がん抑制やがんの治療や再発予防に有効であると考えられる。

セレンの必要量は GPx 活性化に必要なセレン量であると考えられるが, セレン投与によるがん抑制効果が現われるのは GPx1 の活性化に必要なセレンの投与レベルよりさらに高い条件が必要であることが知られている（Combs, 2001a; Jackson and Combs, 2008）。セレンによる発がんの抑制には, GPx1 などの酵素的な抗酸化作用によるのではなく, セレンの投与レベルが高い条件で生成されるセレン化水素やメチルセレンオールなどのような抗酸化能の高いセレン代謝物が作用すると指摘されている（Jackson and Combs, 2008; Combs et al., 2009）。しかしながら, 生体内からは抗酸化能が高く, がん抑制作用を有する低分子のセレン化合物は同定されていない。

メチル水銀を添加したビンナガ肉の動物投与試験によって, 魚肉中のセレンがメチル水銀に対

する毒性軽減作用を有することが明らかにされた (Friedman et al., 1978; Ganther, 1972; Ganther and Sunde, 1974) が、魚介類の有機態セレンの化学性状には不明な点が多かった。これらの背景から、魚介類に由来する有機態セレンの栄養学的意義、すなわち有機態セレンの化学形態、水産物中の含有量、メチル水銀の解毒機構および生体抗酸化作用を明らかにする必要がある。

以上のような背景の下、本研究は、未解明であった水産物に由来する有機セレン化合物の生化学的性質と生体抗酸化作用を調べた。まず、マグロ類の血液および血合筋から新規有機セレン化合物セレノネインおよび GPx1 を精製し、セレン化合物を化学形態別に同時分析する方法を確立するとともに、セレノネインおよび GPx1 の生化学的性状を明らかにした。次に、セレノネインはマグロ類等魚類に多く含まれ、生体抗酸化作用およびメチル水銀の解毒を担う有機セレン化合物であることを明らかにした。さらに、セレノネインは、強いラジカル消去能、ヘムタンパク質の自動酸化抑制作用および GPx1 の発現誘導能を示したことから、動物細胞でのレドックス応答において中心的な役割を果たす分子であると推定した。成果の概要は以下の通りである。

第一章ではクロマグロ組織中に含まれる有機セレン化合物を単離し、構造と性質を調べた。クロマグロ血液から 50%メタノールで抽出される成分を濃縮乾固したのち、C₁₈逆相シリカゲルカラムおよびゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) カラムによって低分子量の有機セレン化合物を精製した。得られた有機セレン化合物は、高分解能質量分析によって $m/z=553.0562$ の分子イオンピークが観測され、分子式 C₁₈H₂₉N₆O₄Se₂ (計算分子量 [M+H]⁺ = 553.0584) が決定された。また、質量分析法の一つである MS/MS のフラグメントイオンの解析からカルボキシル基、トリメチルアンモニウム基およびイミダゾール基の部分構造を含むことが明らかになった。さらに、核磁気共鳴の ¹H NMR および ¹³C NMR の解析から、この有機セレン化合物ではセレン原子がイミダゾール環の 2 位の炭素原子に結合していることが示された。円偏光二色性 (CD) スペクトルは $\alpha^20_D: +23^\circ$ の光学活性を示した。したがって、この有機セレン化合物の構造を、2-selenyl-N_ω,N_ω,N_α-trimethyl-L-histidine [3-(2-hydro-seleno-1H-imidazol-5-yl)-2-(trimethylammonio) propanoate] の酸化型二量体と決定した。この化合物は、10 mM 還元型グルタチオン (GSH) 存在下、エレ

クトロスペーイオン化-質量分析 (ESI-MS) によって $m/z=278.1$ の分子イオンピークが検出され、生体内濃度の還元条件下で単量体に解離した。この新規の構造を有する有機セレン化合物は、エルゴチオネインのアナログであることから、セレノネインと命名した。

セレノネインは反応性の高いセレノケトン基を有し、*in vivo* および *in vitro* において強い抗酸化作用を示した。セレノネイン還元型の 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) に対するラジカル 50% 消去濃度 (RS_{50} 値) は $1.9 \mu\text{M}$ であり、水溶性ビタミン E 誘導体 TroloxTM ($RS_{50}=880$) およびエルゴチオネイン ($RS_{50}=1700$) と比べて、セレノネインのラジカル消去活性は著しく高かった。

ゼブラフィッシュ胚由来 ZE 細胞 (ZE)、ブリ尾鰭由来 YT 細胞 (YT)、ニジマス生殖腺由来 RTG-2 細胞 (RTG-2)、ヒト臍帯由来血管内皮細胞 (HUVEC) 細胞、ヒトアタキシア症患者皮膚由来 AT-2KY 細胞 (AT)、ヒト皮膚由来 TIG-S3 細胞 (TIG)、およびヒト腎臓由来 HEK293 細胞 (HEK293) の培地にセレノネイン酸化型二量体を添加したところ、これらの細胞に対して細胞増殖促進作用を示した。また、HUVEC 細胞の培地にセレノネイン酸化型二量体を添加したところ、セレノネインは速やかに細胞内に取り込まれ、過酸化水素による酸化ストレスに対して耐性を示した。また、ウサギ赤血球へのセレノネインの投与によって ROS の生成が抑制され、ヘモグロビンのメト化が抑制された。

次に、ブリ活魚に対して、セレノネインを静脈投与して (Se として 12 nmol/kg 、対照区は純水を投与)、血合筋の褐変を抑制する効果を調べた。投与 18 時間後の赤血球セレノネイン含量および血漿 GPx 含量は、セレノネイン投与区で高かった。刺身状の筋肉のスライスを 4°C で一晚保存すると、対照区の血合筋の褐変は進んだが、セレノネイン投与区は赤みが保持され、ROS の生成およびミオグロビンのメト化が抑制された。以上のように、セレノネインは培養細胞および魚類筋肉において、生体抗酸化作用を示すことが見いだされた。

次に第二章では、水産食品中に含まれるセレノネインの定量法を確立し、魚種別および組織別のセレノネイン含量、および総セレン含量を調べた。魚類組織の水抽出物を試料として、GPC

カラムの溶離液をオンラインで誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) に導入して ^{82}Se を検出する測定法によって有機および無機のセレン化合物を定量した。セレノネインは、セレンタンパク質、亜セレン酸、セレノシスチン、セレノメチオニン、トリメチルセレノニウムなどの他のセレン化合物とは異なる保持時間 10.1–10.5 分に検出された。総セレン含量は 2,3-ジアミノナフタレン (DAN) を用いる蛍光法 (Hasunuma *et al.*, 1982; Watkinson, 1966) で測定した。

魚類普通筋中のセレノネインはカジキ類およびマグロ類に多く含まれ、その含有量はメカジキ 2.8 nmol/g, メバチ 2.6 nmol/g, クロマグロ 2.4 nmol/g, ビンナガ 1.7 nmol/g およびキハダ 1.6 nmol/g であった。一方、キンメダイ, マイワシ, アオメエソ, カツオ, マサバ, マアジ, マダイ, ヤマトカマス, マアナゴ, カタクチイワシ, サケ, サンマ, シログチおよびマコガレイ筋肉では 1.4 nmol/g 以下であった。また、鶏肉および牛肉中のセレノネイン含量は低く、検出限界以下であった。さらに、総水銀含量に対する総セレン含量のモル比は、魚種によって大きく異なり、メカジキの 1 からマコガレイの 217 まで、肉食性の強い高次捕食魚で低いことが明らかとなった。

第三章では、セレノネインの細胞内への取り込みを担うトランスポーターとして、エルゴチオネインのトランスポーターとして報告された有機カチオン/カルニチントランスポーター1

(organic cations / carnitine transporter 1, OCTN1) (Gründemann *et al.*, 2005; Tamai *et al.*, 1999) を同定した。アンチセンスのモルフォリノオリゴ (MO) を用いて OCTN1 の発現を抑制したゼブラフィッシュ胚では、胚体へのセレノネインの取り込みが抑制され、逆に、OCTN1 を過剰に発現する HEK293 細胞ではセレノネインの取り込みが促進された。OCTN1 によるセレノネインの取り込みに対する K_m 値は、ゼブラフィッシュ赤血球では 9.5 μM , HEK293 細胞では 13.0 μM であったことから、セレノネインは OCTN1 に対する特異的な基質であることが明らかとなった。

セレノネインが OCTN1 を介してメチル水銀の解毒を促進する作用機構が推定されたことから、ゼブラフィッシュ胚を材料に用いて、その作用を調べた。ゼブラフィッシュ胚へのメチル水銀システイン (MeHgCys) 投与によって、濃度依存的に胚にメチル水銀が蓄積され、発生異常が生じたが、セレノネインを MeHgCys と同時に投与することによって、胚における水銀含量が低下

し、無機水銀が生成され、発生異常が抑制された。さらに、OCTN1の発現抑制によって、ゼブラフィッシュ胚における水銀蓄積が促進された。これらの結果から、メチル水銀のセレンによる解毒は、セレノネインとメチル水銀の複合体がセレノネインの特異的トランスポーターを介して細胞外、体外に排出されて生じることを推定した。

第四章ではクロマグロ血合筋から主要なセレンタンパク質 GPx1 を精製し、酵素学的性状を明らかにした。クロマグロ血合筋から水溶性タンパク質を抽出したのち、ゲルろ過およびイオン交換クロマトグラフィーによって GPx を精製した。精製された GPx の分子量はゲルろ過では 90000、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) -ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) では 22000 であったことから、四量体を形成していることが明らかになった。本酵素は過酸化水素および有機ヒドロペルオキシドを基質として活性を示し、既報の GPx1 と同様に幅広い基質特異性を示した。酵素活性の至適 pH は 7.4 であり、過酸化水素に対する K_m 値は $6.7 \mu\text{M}$ であった。クロマグロからクローニングされた cDNA は、189 および 188 残基のアミノ酸をそれぞれコードする、GPx1a および GPx1b の 2 種類が得られ、いずれもセレノシステイン残基をコードする TGA コドンを含んでいた。アミノ酸配列を演繹し、既報の他生物種のデータ (Akasaka *et al.*, 1989; Chada *et al.*, 1990; Chambers *et al.*, 1986; Djordjevic *et al.*, 2010; Fukuhara and Kageyama, 2005; Hostetler *et al.*, 2006; Novo *et al.*, 2009; Sukenaga *et al.*, 1987; Wu *et al.*, 2010; Zimin *et al.*, 2009) と比較して分子系統樹を構築したところ、クロマグロ GPx1a および GPx1b はそれぞれ、既報のゼブラフィッシュ GPx1a および GPx1b (Kryukov and Gladyshev, 2000) と同じグループを形成した。なお、哺乳類においては GPx1 は一種類しか報告されていない。精製した酵素をカルボキシメチル化した後、トリプシン消化物して得られた活性中心付近のペプチドの質量を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) -ESI-MS によって分析した結果、本酵素は GPx1b であることが明らかになった。ZE 培養細胞、RTG-2 細胞、YT 細胞および HEK293 細胞にセレノネインを投与し、細胞抽出液をウエスタンブロットティングに供したところ、GPx1 の発現が誘導されていることが示された。これらの結果から、セレノネインは GPx1 遺伝子の発現を誘導するとともに、セレンタンパク質の合

成におけるセレン供与体として機能することが推定された。

最後に以上の結果を総括し、今後の研究課題について考察した。

なお、本研究で得られた成果は以下の通り公表済みである。

1. Yamashita, Y. and Yamashita, M. (2010) Identification of a novel selenium-containing compound, selenoneine, as the predominant chemical form of organic selenium in the blood of bluefin tuna. *J. Biol. Chem.*, **285**, 18134-18138.
2. Yamashita, Y., Amlund, H., Suzuki, T., Hara, T., Hossain, M. A., Yabu, T., Touhata, K., and Yamashita, M. (2011) Selenoneine, total selenium, and total mercury content in the muscle of fishes. *Fish. Sci.*, **77**, 679-686.
3. Yamashita, Y., Yabu, T., Touhata, K., and Yamashita, M. (2011) Purification and characterization of glutathione peroxidase 1 in the red muscle of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fish. Sci.*, *in press*.

謝 辞

本研究は、東京大学 渡部終五教授のご指導，ご鞭撻の下におこなわれたもので，ここに深甚なる謝意を表す。

本論文の作成にあたっては，東京大学 吉村悦郎教授，松永茂樹教授，浅川修一教授，および潮秀樹准教授に多くの御助言を頂いた。ここに厚く御礼申し上げます。

本研究の着手にあたり，多大なご指導とご助言を頂いた飯田遥博士に深く謝意を表す。

山下倫明，藪健史，東畑顕，Mohammed Anwar Hossain，原竜朗，鈴木珠水，Heidi Amlund をはじめ，水産総合研究センター中央水産研究所，遠洋水産研究所，東京大学大学院農学生命科学研究科水産化学研究室，青森県水産総合研究センター，太地町漁業協同組合の各位に心から感謝申し上げます。

省略記号

AT: ataxia telangiectasia syndrome patient skin-derived cell line

CD: circular dichroism

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

CMV: cytomegalovirus

DAN: 2,3-diaminonaphthalene

DEPT: distortionless enhancement in polarization transfer

DNA: deoxyribonucleic acid

DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

DTT: dithiothreitol

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

ESI-MS: electrospray ionization-mass spectrometry

GPC: gel permeation chromatography

GPx: glutathione peroxidase

GSH: glutathione (reduced form)

GSSG: glutathione (oxidized form)

HEK293: human embryonic kidney 293 cell line

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HPF: hydroxyphenyl fluorescein

HPLC: high performance liquid chromatography

HUVEC: normal human umbilical vein endothelial cells

hox: homeotic genes

ICP-MS: inductively coupled plasma mass spectrometry

IgG: immunoglobulin G

JNK: c-Jun *N*-terminal kinase

kDa: 10^3 dalton

K_m : Michaelis-Menten's dissociation constant

LC₅₀: median lethal concentration

LD₅₀: median lethal dose

MO: morpholino oligomer

mRNA: messenger ribo nucleic acid

MS: mass spectrometry

MTT: 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)

NMDA: *N*-methyl-D-aspartic acid

NMR: nuclear magnetic resonance

OCTN1: organic cations transporter 1

ORF: open reading frame

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

ROS: reactive oxygen species

RS₅₀: radical scavenging capacity

RTG-2: rainbow trout gonadal fibroblast-like cell

SDS: sodium dodecyl sulfate

SECIS: selenocysteine insertion sequence

SLC: solute carrier

TIG-S3: human skin-derived cell line

V_{\max} : maximum reaction rate

YT: yellowtail tailfin-derived cell line

Tris: *tris*(hydroxymethyl)aminomethane

ZE: zebrafish embryonic cell line

第一章 有機セレン化合物の同定および生理機能

マグロ類の血合肉や鯨肉は食品の中でセレンを最も高濃度に含むことが知られており（有馬・長倉, 1979; 山下, 1994, 1997）、クロマグロの血液や、脾臓、心臓、血合筋などの組織には 4 ppm を超えるセレンが含まれている（山下, 1997）。これらの組織は有機セレンの供給源として利用可能であると考えられるが、魚類の有機態セレンの生化学的性状は不明であり、また、高純度の抽出物を得ることが困難であったため、有効に利用されてこなかった。

近年、セレン欠乏に関わる疾病の予防や治療に、無機態の亜セレン酸およびアミノ酸のセレノメチオニンを含む成分とするサプリメント剤が利用されている（EFSA, 2008; 姫野, 1994）。また、無機態セレンを含む培地中で酵母を培養することによって、セレノメチオニンを高濃度に含むセレン含有酵母が製造され、セレン供給源として食品および配合飼料の原料として利用されている（EFSA, 2008）。また、血合筋からセレン含量が高いタンパク質濃縮物および塩酸加水分解物が試作されている（又平・菊地, 2000）。しかしながら、マグロ類、カジキ類等高次捕食魚の筋肉や内臓には 0.5 ppm を超える比較的高濃度のメチル水銀が含まれるため、これらの組織の分解物や濃縮物にはセレンとともにメチル水銀も含まれる。また魚介類の肝臓はカドミウムの含量も高く、医薬品、食品、飼料等への利用に適さない。そのため、魚介類由来の有機セレン化合物を抽出・精製し、化学的性状を明らかにするとともに、水銀、カドミウム等の有害重金属を除去し、機能性物質として利用するための技術開発が必要である。

生体内および食品中の有機態セレンの分析では、硝酸・過塩素酸混液による湿式加熱分解後、DAN と反応させ、Se (IV) との錯体形成反応により生じる 4,5-ベンゾピアセレノールの蛍光を利用する方法が報告されている（Hasunuma *et al.*, 1982; Watkinson, 1966）。また、HPLC にオンラインで連結した ICP-MS を用いて、環境中の無機態および有機態のセレンの分子種同定を行う分析法も報告されている（Ge *et al.*, 1996）。しかし、魚介類由来の有機セレン化合物は未同定であったことから抽出法や分析法が十分研究されてこなかった。

そこで、第一章では、従来、未解明であった水産物に由来する有機セレン化合物をクロマトグラフィーから精製、単離し、化学構造および生体抗酸化作用に関わる生化学的性質を解析した。

第一節 セレノネインの精製および構造決定

魚介類に由来する有機態セレンは、従来化学的性状が不明であった。そこで、有機セレン化合物の化学構造を決定し、機能性を解明するため、高純度の有機セレン化合物を精製した。魚類組織の中で、クロマグロの各組織には 4 ppm を超えるセレンが含まれ、さらに血液がもっともセレン含量が高い（山下, 1997）ことから、クロマグロの血液を原料に用い、メタノール抽出物をカラムクロマトグラフィーで分離することによって、低分子量の有機セレン化合物を精製し、その化学構造を決定した。

試料および方法

試料

クロマグロ (*T. orientalis*) 血液を採取し、使用まで -80°C で保存した。養殖クロマグロ（平均体重 39 kg）は九州の水産養殖場で得られたものを、天然クロマグロ（平均体重 5.2 kg）は青森県の定置網で捕獲されたものを用いた。

総セレン含量の定量

組織 0.1 g を $200\text{--}220^{\circ}\text{C}$ で 1 ml の硝酸：過塩素酸（1:2, v/v）の混酸中で分解し、DAN を用いた蛍光法（Hasunuma *et al.*, 1982）で測定した。

有機セレン化合物の精製

凍結クロマグロ血液 100 g に 0.1 g のジチオスレイトール（DTT, ナカライテスク, 京都市）を加え、10 倍容量のアセトニトリル（和光純薬工業, 大阪市）中で粉碎した。ホモジェネートを

6000 × g で 10 分間遠心分離し，上清を減圧下ロータリーエバポレーターで濃縮した。アセトニトリル：テトラヒドロフラン（和光純薬工業）（1:1, v/v）混合溶媒を加えた後に，2 層に分離したうちのアセトニトリル層を分離し減圧下ロータリーエバポレーターで濃縮した。この濃縮物に，5 ml の冷純水を加え，0.1%の酢酸で平衡化した Atlantis™ dC₁₈ 300 Å カラム（19×150 mm，日本ウォーターズ，東京）に供し，0–50%直線アセトニトリルグラジエント下，溶出量 40 ml から 50 ml までの画分を回収した。この有機セレン化合物を含む画分を減圧濃縮したのち，Ultrahydrogel™ 120 カラム（7.8×300 mm，日本ウォーターズ，0.1%の酢酸/30%アセトニトリルで平衡化）に供し，溶出量 7.5 ml から 9.0 ml までの有機セレン化合物を含む画分を集めた。さらに，0.1%の酢酸で平衡化した Ultrahydrogel™ 120 カラムを通し，有機セレン化合物を含む 9.0 ml から 13 ml までの画分を集め濃縮した。

紫外・可視吸光分析

紫外・可視吸光スペクトルは紫外・可視分光光度計（DU640，ベックマン・コールター，東京）で測定した。

蛍光スペクトルの分析

蛍光スペクトルは蛍光分光光度計（日立 850 型，日立製作所，東京）で測定した。

旋光度の測定

円偏光二色性（CD）分光光度計（J-720 WI，日本分光，八王子市）で測定した。

ESI-MS 分析

精製したセレン化合物の高分解能 MS 分析は ESI を装着した JMS-700（日本電子，昭島市）を用いた。また，HPLC-ESI-MS は，HPLC（HP1100，横河アナリティカルシステムズ，武蔵野市）

を接続した Quattro II (Micromass UK, Manchester, 英国) を用いた。

NMR スペクトル測定

500 MHz $^1\text{H-NMR}$ および 126.0 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルは日本電子製 ECA500 を用い、重水中で測定した。

結 果

クロマト血液中の有機セレン化合物を、逆相 C_{18} シリカゲルカラムおよび GPC カラムを用いる HPLC によって精製したところ、100 g の血液から 0.2 mg の黄色油状物が得られた。高分解能質量分析の結果、分子式 (Figure 1-1) $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_4\text{Se}_2$ ($[\text{M}+\text{H}^+]=553.0584$) に相当する $m/z=553.0562$ 分子イオンピークが観測された。観測された同位体パターンは、セレンの特徴的な天然存在比によって、セレン原子を 2 個含む分子式から計算された同位体パターンと一致した (Figure 1-1)。高分解能 MS/MS スペクトルにおいて、 $m/z=233.0422$ ($\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_3\text{Se}$)、173.9692 ($\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{Se}$)、および 59.0730 ($\text{C}_3\text{H}_9\text{N}$) に相当するフラグメントイオンピークが観測された。この結果によって、有機セレン化合物がセレン、エチルイミダゾール環、カルボキシル基、およびトリメチルアミノ基を有することが示された (Figure 1-2)。また、この有機セレン化合物を 10 mM DTT または 10 mM グルタチオン存在下で還元し HPLC-ESI-MS 分析したところ、 m/z 553 から m/z 278 に解離したことから (Figure 1-3)、ジセレニル結合を有する酸化型二量体 (Figure 1-4) であることが推定された。単量体の分子式 $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2\text{Se}$ から、この有機セレン化合物は、エルゴチオネイン ($\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$) のイオウがセレンに置換されたセレンアナログであると推定された (Figure 1-5)。

この有機セレン化合物の単量体は抽出およびクロマトグラフィーの精製過程において非常に不安定であった。そこで、セレノキソ・セレノール互変異性化および酸化型二量体 (Figure 1-5)

の生成を促進させるために、セレンケトン型の有機セレン化合物を含むマグロ組織から、アセトニトリル/テトラヒドロフラン混合溶媒を用いて抽出した。酸化型二量体は空气中・常温で比較的安定であり、構造決定のための機器分析および化学的性状の検討に使用した。¹³C-NMR スペクトルは9個の炭素シグナル（うち1個はカルボン酸に帰属された）を示した（Table 1-1）。シグナルの化学シフトから3個のメチル基、1個のメチレン基、3個の芳香族炭素、さらに distortionless enhancement in polarization transfer（DEPT）測定によって1個の sp³メチン基炭素が帰属された。3個の芳香族炭素シグナル（155.8, 120.8 および 115.3）は2位が置換されたイミダゾール基の炭素に帰属された。このことは、¹H-NMR スペクトル（Figure 1-6）における、1個の芳香族水素のシグナル δ 7.00（singlet）と一致し、セレンル基がイミダゾール環（Figure 1-6）内にあることを示し、また、¹H および ¹³C NMR において観測されたシグナルは、エルゴチオネインのシグナル（¹H-NMR（D₂O） δ 6.70, δ 3.83, δ 3.19, δ 3.10；¹³C-NMR（D₂O） δ 173.1（C-1）， δ 158.9（C-5'）， δ 126.7（C-2'）， δ 118.1（C-4'）， δ 79.8（C-2）， δ 54.3（N-CH₃） および δ 25.4（C-3））と類似し、このうちセレンル基に結合した芳香族炭素 C-2'（δ 120.8）はエルゴチオネインのシグナル（δ 126.7, Xu and Yadan, 1995）よりも高磁場側へシフトした（Table 1-1）。以上の結果から、得られた有機セレン化合物はエルゴチオネインのイオウ原子がセレンに置き換えられたセレンアナログであることが確認された。そこで、本有機セレン化合物の化学構造を Figure 1-4 のように決定した。このエルゴチオネインのセレンアナログは、セレンールあるいはセレンケトン構造を有する新規な天然物であったことから、この有機セレン化合物をセレンネインと命名した。

セレンネインは紫外-可視吸光スペクトル（Figure 1-7）において 260 nm に吸収極大を示した。また、蛍光スペクトルにおいて 240, 280 および 337 nm に蛍光極大、405 nm に励起極大を示した。CD スペクトルにおいて比旋光度 α_D²⁰: +23° を示す光学活性体であった。

第二節 セレノネインの生化学的性質

前節において精製，構造決定されたセレノネインは生体濃度の GSH 存在下でセレンール基を有する単量体に解離することが確認された。このことから，セレノネインは抗酸化能を有し，動物細胞のレドックスサイクルにおいて重要な役割を担うと予想された。そこで，本節ではセレノネインの *in vitro* における DPPH ラジカル消去能を調べた。また，セレノネインを HUVEC 細胞，ウサギ赤血球およびブリ活魚に投与し，それぞれ細胞増殖促進作用，ROS 生成抑制作用，血液および血合筋のヘムタンパク質のメト化抑制効果，などの生体抗酸化作用を調べた。

試料および方法

試料

セレノネインはメカジキ (*Xiphias gladius*) 血合筋から第一節の方法に従って精製した。

DPPH ラジカル消去能の測定

セレノネインのラジカル消去能は DPPH (和光純薬工業) を用いて Oki *et al.* (2003) の方法で測定した。比較対照に用いた市販の抗酸化剤として，水溶性ビタミン E 誘導体 TroloxTM

(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid, ロッシュ・ダイアグノティクス, マンハイム, ドイツ) 10 mM 水溶液および L-(+)-エルゴチオネイン (L-(+)-ergothioneine, 3-(2-sulfanylidene-1,3-dihydroimidazol-4-yl)-2-(trimethylazaniumyl)propanoate, シグマ アルドリッチ ジャパン, 東京) 4.36 mM 水溶液を用い，それぞれにつき純水で 2 倍希釈を繰り返して 2-128 倍希釈の検液を用意した。メカジキ肉由来のセレノネイン溶液の希釈液を同様に用意した。検液 10 μ l と DPPH 溶液 [0.35 mM DPPH 1.38mg を 5 ml のエタノールに溶解させ，0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) を

5 ml 添加したもの]100 μ l を 96 穴マイクロテストプレート (BD FalconTM, #1722, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, 米国) 中で混合し, 暗所で室温 30 分間反応させた後, 595 nm の吸光度を測定した。純水を用いた時の吸光度 (吸光度 0.59) と 10m M TroloxTM (吸光度 0.19) を検液とした場合の吸光度をそれぞれ DPPH ラジカル消去率 0%, 100% とし, DPPH ラジカル消去率が 50% となる濃度をそれぞれの物質の RS₅₀ として DPPH ラジカル消去能を表した。

細胞増殖率の測定

ZE 細胞 (中央水産研究所で継代), YT 細胞 (中央水産研究所で継代), および RTG-2 細胞 (ATCC CCL55) は 2% ウシ胎児血清を含む L-15 培地に 30000 細胞/ml に調製した。HUVEC 細胞はヒューマンサイエンス研究資源バンク (泉南市) から分譲を受け, 10% ウシ胎児血清を含む MCDB131 培地で 10000 細胞/ml に調製した。AT-2KY 細胞 (JCRB0316), TIG-S3 細胞 (JCRB0544), および HEK293 細胞 (JCRB9068) はヒューマンサイエンス研究資源バンクから分譲を受け, 10% ウシ胎児血清を含む DMEM 培地でそれぞれ 15000 細胞/ml に調製した。

それぞれの細胞培養液 (2% 血清を含む) 中に, セレン含有化合物を終濃度 0, 5, 10, 25, 50, 100 nM となるように添加し, ZE 細胞は 25°C, YT 細胞は 20°C, RTG-2 細胞は 15°C, HUVEC 細胞, AT-2KY 細胞, TIG-S3 細胞および HEK293 細胞は 37°C, 5% 炭酸ガスの環境下で培養し, 0, 1, 2, 3, 4, および 5 日培養後の細胞をトリパンブルー染色によって細胞数を調べた。

細胞計測

HUVEC 細胞数はミトコンドリア呼吸鎖の活性を MTT 細胞計測キット (ナカライテスク) を用いて調べた。すなわち, HUVEC 細胞を培養後, 培養液に対して 10 分の 1 量の 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 溶液を培養液へ添加して, 5% 炭酸ガスの環境下で, 37°C, 3 時間培養した。培養後, 培養液に対して等量のイソプロパノール (和光純薬工業) を加えて, フォルマザン色素を抽出し, 595 nm の吸光度を測定した。

HUVEC へのセレノネイン酸化型二量体投与による細胞内抗酸化

HUVEC 細胞 (10,000 細胞/ml) を 48 穴のカルチャープレートで 10% 胎児ウシ血清を含む gibco® MCDB131 培地 (Invitrogen, Austin, 米国) で培養した。セレンを添加していない条件を対照として、5 μM の最終濃度になるように培養液へセレノネイン酸化型二量体を添加後、37°C、5% 二酸化炭素の環境下で 1 時間培養した。培養後、25 μM 、50 μM の最終濃度になるように過酸化水素を添加して、37°C、5% 炭酸ガスの環境下で 24 時間培養し、細胞増殖率を MTT 細胞計測キット (ナカライテスク) によって調べた。HUVEC 細胞の性質を維持するために、細胞培養の継代回数を 5 回までとした。

ウサギ赤血球へのセレノネイン酸化型二量体投与試験

ウサギ赤血球はウサギ保存血 (日本バイオテスト研究所, 国分寺市) を生理食塩水で 3 回洗浄 (2000 rpm, 5 分間, 4°C で遠心) して調製した。ウサギ赤血球を 4 倍量の RPMI1640 培地 (gibco®, Invitrogen) に懸濁して 37°C で 1 日間、5% 炭酸ガスの環境下で培養した。セレノネインを添加しない培養条件を対照区として、培地中のセレノネインの濃度が 10, 25 または 50 nM となるように添加して培養した。培養後、赤血球を遠心分離 (2000 \times g, 5 分間, 4°C) によって回収し、PBS で 3 回洗浄し、遠心分離によって赤血球を集めた。

赤血球ヘモグロビンのメト化率測定

赤血球のペレットに 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) を加えて、赤血球を溶血させ、遠心分離 (15,000 \times g, 10 分間, 4°C) 後、上清のヘモグロビン溶液を回収した。ヘモグロビン溶液を 100 倍量の 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) で希釈し、37°C で 3 時間インキュベートした。インキュベートの前後における 405 および 430 nm における吸光度比を測定し、ヘモグロビンのメト化率を算出した。

赤血球中の ROS 量の測定

ROS 量はヒドロキシフェニルフルオロセイン (HPF, 第一化学薬品, 東京) を用いて測定した。上述のヘモグロビン溶液に対して, 1,000 倍量の PBS に希釈した HPF を 100 倍量混合して, 室温で 10 分間反応させたあと, 蛍光強度 (励起波長 490 nm, 蛍光波長 515 nm) を計測し, ROS レベルの指標として用いた。

ブリ活魚

養殖のブリ (*Seriola quinqueradiata*) 活魚 (体重約 4 kg) を 1 週間 15°C で無給餌蓄養したものをを用いた。

ブリ活魚へのセレノネイン酸化型二量体投与

クロマグロ血液から精製したセレノネイン酸化型二量体水溶液をブリの尾静脈に注射し (Se として 12 nmol/kg), 18 時間後に血液および筋肉を採取した。対照区は超純水を注射して同様に組織を採取した。

血合筋ミオグロビンのメト化率の測定

血合筋ミオグロビンのメト化率は尾藤 (1974) の方法で測定した。

セレノネイン含量の測定

血漿, 赤血球, および血合筋のセレノネイン含量, GPx レベルは, 第二章第一節で詳述する GPC カラムを用いる HPLC-ICP-MS によって分析した。

刺身状スライスの色調の観察

氷蔵3日後の筋肉フィレーを刺身状にスライスし、スライス4時間後と24時間後の色調を、Adobe® Photoshop® CS5 (Adobe Systems, San Jose, CA, 米国) を用いて計測し、a*, b*, および L* を数値化した。

結 果

セレノネイン酸化型二量体, Trolox™ およびエルゴチオネインの DPPH ラジカル消去能に対する RS₅₀ 値はそれぞれ 1.9 μM, 880 μM, および 1700 μM であった (Table 1-2)。セレノネインは Trolox™ の 456 分の 1, エルゴチオネインの 907 分の 1 の濃度で同等の DPPH ラジカル消去能を持つ、きわめて強力な抗酸化力を有していた。

ZE 細胞, YT 細胞, RTG-2 細胞, HUVEC 細胞, AT-2KY 細胞, KIG-3S 細胞, および HEK293 細胞の培養液にセレノネインを添加して細胞増殖を調べた結果、いずれにおいても、セレノネインは細胞増殖を促進した。また、最適なセレノネインの濃度は、培養細胞の種類によって異なることが確認された (Figure 1-9)。

HUVEC 細胞の培地にセレノネイン酸化型二量体を添加した結果、セレノネインは細胞内に取り込まれて細胞増殖促進作用 (Figure 1-8) を示すとともに、過酸化水素による酸化ストレス条件に対して耐性を示した (Figure 1-9)。また、ウサギ赤血球へのセレノネインの投与によって ROS の生成が抑制され (Figure 1-10A)、ヘモグロビンのメト化が抑制された (Figure 1-10B)。さらに、ブリ活魚に対してセレノネインを静脈投与して (Se として 12 nmol/kg), 血液および筋肉中のセレノネインおよび ROS 含量, ミオグロビンメト化率を調べた。投与 18 時間後の赤血球セレノネイン含量および血漿 GPx 含量は、セレノネイン投与区で高かった (Figure 1-11 および 1-12)。氷蔵 2 日後血合筋中のセレノネイン含量は血球中のセレノネイン含量と正の相関性を示し

(Figure 1-13A), 血漿中の ROS 含量に対して負の相関性 (Figure 1-13B) を示した。刺身状のス

ライスを4℃で一晩保存したところ、対照区および投与区で血合筋の赤色を表す a*値は低下したが、対照区よりも投与区の方が有意に高く (Figure 14)、外見上も赤色がより強かった (Figure 15)。以上のように、セレノネインは培養細胞、赤血球および活魚において、生体抗酸化作用を示すことが明らかとなった。

第三節 考察

クロマトグラフィーから新規な有機セレン化合物が精製、同定された。高分解能 MS および NMR による構造解析によって、この化合物はエルゴチオネインのイオウがセレンに置換されたセレンアナログの酸化型二量体であることが明らかとなった (Figure 1-4)。エルゴチオネインは麦角 (Tanret, 1909) および血液 (Benedict *et al.*, 1926) から発見されたヒスチジン誘導体であり、セレンでイオウが置換された本有機セレン化合物を「セレノネイン」と命名した。

セレノネインはテトラヒドロフランのような非極性溶媒中では酸化型二量体に変換し、10 mM の GSH または DTT 存在下で単量体に還元された。また、セレノネインは *in vitro* で DPPH ラジカル消去能を示し、HUVEC 細胞への投与によって、過酸化水素による酸化ストレス条件下での細胞増殖能が向上した。さらに、ブリ活魚への投与によって赤血球の ROS 生成およびヘモグロビンのメト化が抑制され、血漿中の ROS 生成および血合筋中のミオグロビンのメト化が抑制された。赤血球と血合筋のセレノネイン含量に正の相関性が認められたことから、血中への投与後、セレノネインは速やかに赤血球に取り込まれ、血液を通して筋肉に輸送されたと考えられる。血球中セレノネイン含量が高い個体で血漿中 ROS 含量が低いことから、セレノネインが生体内で ROS の発生を抑制することが推定された。本研究において、セレノネインの酸化型二量体を培養細胞および魚類への投与試験に用いたが、酸化型二量体は第三章で詳述する OCTN1 トランスポーターによって細胞内に取り込まれ、細胞質で GSH によって単量体に還元されてラジカル消去能を示すことが考えられる。

セレノネインは種々の動物細胞の増殖を顕著に促進する作用を有すること、細胞種毎に増殖促進効果を示すセレノネインの要求量が異なることが明らかとなった (Figure 1-9)。アタキシア症患者皮膚由来 AT-2KY 細胞は DNA 損傷に対して応答する最上流のシグナル因子である ATM キナーゼ遺伝子が欠失しているため、DNA 修復やアポトーシス等の異常によって老化およびがん化が誘発されることが知られている (Motoyama and Naka, 2004)。セレノネインは、この AT-2KY

細胞に対して増殖促進効果を示したことから、セレン含有化合物は DNA 損傷応答を復帰させる生体抗酸化作用を有することが推定された。

以上の結果から、セレノネインは、強いラジカル消去能、ROS の生成抑制、ヘムタンパク質の自動酸化抑制作用を示したことから、動物細胞でのレドックス応答における抗酸化性物質であることが明らかとなった。

「ヤケ肉」の発生は筋肉のタンパク質が変性し、肉質が軟弱化する現象であり、マグロ類、ブリ類、サバ類などの異常肉として水産加工上の問題となっている（小長谷, 1982; 山下, 2009）。ヤケ肉は、セレン含量が低い個体で生じること、溶血を伴うこと、また、オートファジーによる過剰なタンパク質分解が生じることから、セレン欠乏の栄養状態のときに、漁獲時のストレス条件が加わって発生することが推定された（山下, 2009）。クロマグロおよびマサバでは、漁獲後のアポトーシスとオートファジーは血中セレン濃度が低い (<1 mg/kg) 魚で起こりやすいことが報告されている（山下, 2009）。一方、ラットではセレン欠乏は溶血を誘発することが知られている（Rotruck *et al.*, 1972, 1979）。家畜の白筋症はセレン欠乏で発生することから（Hatfield *et al.*, 2006）、ヤケ肉も白筋症と類似した現象であると考えられる。これらのことから、魚類におけるセレン欠乏は、セレノネイン含量の減少によって生体抗酸化作用が低下し、酸化ストレスによる生理的障害が生じることが考えられる。養殖魚や動物へのセレノネインの投与によって、生体抗酸化作用を向上させ、酸化障害を抑制する技術が可能であると考えられる。本研究において、セレノネインの投与によって、ブリ血合筋の褐変の抑制効果が認められたことから、セレノネインはマグロ類およびブリ類など赤身魚の肉質の品質評価の生化学的指標に利用できると考えられる。また、養殖魚へのセレノネインの強化によって品質向上効果が期待できる。

第二章 セレノネインの分析法の確立と組織別含量

第一章ではクロマト組織から新規な有機セレン化合物セレノネインを同定し、その生化学的性状を調べた。この化合物はイミダゾール環の2位にセレノケトンを持つ特異な構造を有し、強力なラジカル消去能を示した。従って、魚食によってセレノネインを摂ることは組織や細胞の抗酸化性を高め、フリーラジカルの毒性を軽減する作用が期待される。

また、セレンの生理的な効果の一つはメチル水銀の毒性軽減であり、血中の水銀：セレンの比が上昇すると水銀リスクが増加すると推定される (Civin-Aralar and Furness 1991; Ganther *et al.*, 1972; Prohaska and Ganther 1977; Raymond and Ralston, 2004; Ralston *et al.*, 2007, 2008; Watanabe *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2008)。このため、メチル水銀の曝露量評価は血中の水銀レベルだけでなく、水銀：セレン比から考慮すべきである (Ralston *et al.*, 2007, 2008; Raymond and Ralston, 2004)。食餌にセレンを必要量以上に強化することによってメチル水銀の毒性は低下する (Civin-Aralar and Furness 1991; Ganther *et al.*, 1972; Prohaska and Ganther 1977; Raymond and Ralston, 2004; Ralston *et al.*, 2007, 2008; Watanabe *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2008)。最近のリスク-ベネフィット解析による食品中の有害化学物質のリスク評価法によると、魚食によるメチル水銀のリスクを把握するためにはメチル水銀曝露量だけでなく、セレンや高度不飽和脂肪酸などの機能性物質の健康増進効果も考慮する必要がある (FAO/WHO, 2011; Mozaffarian, 2009)。

このように、セレノネインは食品に含まれるセレン化合物の中でもっとも強い抗酸化活性を示す有機セレン化合物であると考えられることから、魚介類からのセレノネインの摂取は、セレンの栄養学的な意義は大きいと考えられる。以上の背景から、水産食品に含まれるセレノネインの定量法を確立し、魚種および組織別のセレノネイン含量、総セレン含量、および総水銀含量を日本国内で食される主要な魚種間で比較した。

第一節 HPLC-誘導結合プラズマ質量分析によるセレノネインの分析

第一章で同定したセレノネインの分析方法として、セレノネインを標準物質とした HPLC-ICP-MS により測定する方法を構築した。すなわち、測定対象となる生物組織や食品に含まれるセレンタンパク質、セレノシスチン、セレノメチオニン、およびセレノネイン等の有機態セレンおよび無機態の亜セレン酸等を GPC カラムを用いて分子量によって分離し、オンライン接続した ICP-MS でセレンを検出する分析法を構築した。

試料および方法

試料

養殖クロマグロ（平均体重 39 kg）は九州の水産養殖場で得られたものを、天然クロマグロ（平均体重 5.2 kg）は青森県の定置網で捕獲されたものを用い、血液および他の組織を使用まで -80°C で保存した。ウシ肝臓、ブタ腎臓、ニワトリ筋胃と肝臓、およびスルメイカ（*Todarodes pacificus*, 平均体重 ~ 200 g）は卸売市場で購入した。ティラピア（*Oreochromis niloticus*, 平均体重 405 g）は中央水産研究所で 20°C で5年間、配合飼料によって飼育されたものを用いた。

セレン化合物の標準品の調製

セレノネインの標準品はメカジキ筋肉から精製し（ $1.62\ \mu\text{M Se}$ ）、ウシ赤血球 GPx（SIGMA）は50%グリセリンを含む純水で溶解し（ $2.35\ \mu\text{M Se}$ ）使用まで -80°C で保存した。これらの溶液中のセレン含量は、第一章で述べた蛍光法（Hasunuma *et al.*, 1982）で定量した。

二酸化セレン水溶液（セレン標準溶液 1000 ppm, 和光純薬工業）は使用時に純水で 10^4 倍に希釈した。セレノシスチン（SIGMA）およびセレノメチオニン（東京化成工業）は $0.1\ \text{M HCl}$ で

100 mM に調製して -20°C で保存し、使用時に 1000 倍に希釈した。これらの標準品を 2–20 μl 用いて HPLC-ICP-MS 分析に供した。

ICP-MS

ICP-MS (ELAN DRCII, Perkin Elmer Sciex, Toronto, Canada) 測定は同軸ネブライザー、サイクロン式チャンバー、内径 2 mm のサンプリングチューブ、白金製サンプリングコーンおよびスキマーコーンを用い、アルゴンガス (>99.999%) を導入し、インターフェースを 16°C の冷媒で冷却して計測した。ICP-MS 測定条件 RF 出力: 1500 W, ネブライザーガス流量 (Ar) : 1 l/min, 補助ガス流量 (Ar) : 1.3 l/min, メイクアップガス流量 (Ar) : なし, 反応ガス: なし, 質量数: 82, パルスステージ電圧: 1050, RPq: 0.25。

HPLC-ICP-MS

HPLC ポンプ (Pu712, GL サイエンス, 東京) およびサンプルインジェクター (9725i, Rheodyne) を連結した装置に UltrahydrogelTM 120 (ウォーターズ) を接続し, 0.1% IGEPAL-CA630 (シグマアルドリッチ ジャパン) を含む 0.1 M ギ酸アンモニウム (和光純薬工業) 水溶液を流速 1 ml で流し, カラムからの溶出液を直接 ICP-MS (Perkin Elmer Sciex) に導入し, セレンの天然同位体である ^{82}Se をモニターした。モニター条件: スキャン/読みとり: 1, 読みとり/繰り返し 800, 繰り返し/測定: 1, 1 質量数あたりの滞在時間 0.4 秒。

セレノネインの定量

組織 0.1 g に 5 倍量の冷純水を加え, ホモジナイズした後, $9700 \times g$ で 10 分間遠心分離した上清をメンブランフィルター (シリンジフィルター No.6872-1304, Whatman Japan, 東京) をろ過し, 抽出液を調製した。この抽出液を HPLC 移動相の溶媒で 2–200 倍に希釈し, 20 μl を HPLC-ICP-MS に供した。

クロマグロ筋肉の細胞分画

クロマグロ血合筋および普通筋について、山下（1993）の方法によって細胞質画分（78,000 × g 上清）、ミクロソーム画分（22,500 × g 以上 78,000 × g 以下で沈降するもの）、ミトコンドリア画分（700 × g 以上 8,000 × g 以下で沈降するもの）に分けた。

結 果

魚類組織中のセレノネインの分布を調べるために、GPC カラムを接続した HPLC-ICP-MS で ^{82}Se をモニターする有機態セレンの化学形態別分析法を確立した（Figure 2-1）。GPx、亜セレン酸、セレノシスチン、セレノメチオニンなど、動物組織に分布する有機セレン化合物およびセレノネインを標準品として使用した。セレノネインは GPC カラムのゲルに親和性を有することから、カラムのベッド体積よりも遅い 10.1–10.5 分に溶出した。検出限界は 0.25 nmol Se/g であった。

魚類および動物組織中にはセレノネイン、GPx を含むセレンタンパク質、および未同定のセレン化合物が検出された（Table 2-1）。一方、亜セレン酸、セレノシスチン、セレノメチオニンは本研究で調べた組織からは検出されなかった（Figure. 2-2-2-4）。クロマグロ血合筋には 38 nmol Se/g のセレノネインおよび 0.9 nmol Se/g のセレンタンパク質が含まれ、水溶性セレンの大部分（98%）がセレノネインとして存在していた。クロマグロのその他の組織、脾臓、肝臓、心臓、普通筋、および血液にも同様に 0.45–437 nmol Se/g の高レベルのセレノネインが含まれていた。マサバ血液、ティラピア血液、ブタ腎臓、ニワトリ心臓、筋胃、肝臓、およびスルメイカ肝臓においてもセレノネインおよびセレンタンパク質が検出された。ブタ肝臓には少量のセレンタンパク質が検出されたが、セレノネインは検出されなかった。ティラピア血液においては、セレノ

ネインは赤血球中に含まれ、血清中には認められなかった (Figure 2-3)。以上の結果から、セレノネインは種々の動物組織に分布し、特にクロマグロ組織に高濃度で含まれることが明らかとなり、動物の組織や細胞におけるセレンの主要な化学形態であることが示された。

クロマグロ普通筋および血合筋を細胞分画し、各画分のタンパク質当たりセレノネイン含量を調べた結果、セレノネインは細胞質画分に 1434 pmol Se/mg protein (血合筋) および 527 pmol Se/mg protein (普通筋) 検出された。一方、ミクロソーム画分には 37 pmol Se/mg protein (血合筋) および 26 pmol Se/mg protein (普通筋)、ミトコンドリア画分には 21 pmol Se/mg protein (血合筋) および 25 pmol Se/mg protein (普通筋) 検出され、タンパク質当たりのセレノネイン量は、血合筋の普通筋いずれにおいても細胞質画分が最も多く、他の画分に対し 20-68 倍高かった (Table 2-2)。

第二節 魚類および鯨類におけるセレノネインの組織別含量

クロマグロの血液および各組織中のセレノネイン含量を調べた。また、日本国内で食される主要な魚類について、魚肉中のセレノネイン、総セレン、および総水銀の含量を調べた。

試料および方法

試料

魚類試料のマアナゴ (*Conger myriaster*, 平均体重 187 g), マイワシ (*Sardinops melanostictus*, 平均体重 121 g), カタクチイワシ (*Engraulis japonica*, 平均体重 8.4 g), ヤマトカマス (*Sphyraena japonica*, 平均体重 93 g), サケ (*Oncorhynchus keta*, 平均フィレー半身重量 1430 g), アオメエソ (*Chlorophthalmus albatrossis*, 平均体重 19 g), サンマ (*Cololabis saira*, 平均体重 191 g), キンメダイ (*Beryx splendens*, 平均体重 1.97 kg), マダイ (*Pagrus major*, 平均体重 403 g), シログチ (*Pennahia argentata*, 平均体重 469 g), マアジ (*Trachurus japonicus*, 平均体重 100 g), マサバ (*Scomber japonicus*, 平均体重 427 g), カツオ (*Euthynnus pelamis* 平均体重, 3.39 kg), およびマコガレイ (*Pleuronectes yokohamae*, 平均体重 366 g) は横浜市内卸売市場および小売店から入手し, 分析に供するまで-80°Cで保存した。キハダ (*Thunnus albacares*), ビンナガ (*Thunnus alalunga*), メバチ (*Thunnus obesus*), およびメカジキは重量約 300 g のフィレーとして入手した。クロマグロは第一章の実験と同じ試料を用いた。大型の魚類は背鰭前端部付近の背側の普通筋を採取して分析に用いた。鯨類は, 和歌山県太地町で漁獲されたマダライルカ (*Stenella attenuata*, 平均体長 191 cm) の血液, 肝臓および腎臓を試料として用いた。

総水銀含量の測定

総水銀含量は試料を混酸（硝酸：過塩素酸：硫酸＝2:1:1）で湿式分解した後、冷蒸気原子吸光法による自動分析装置（HG-310, 平沼産業, 日立市）を用いて測定した。硫酸および塩化すず(II)は関東化学（東京）製を用いた。

統計分析

統計分析は Graphpad PRISM™ 5.03（Graphpad Software, La Jolla, CA, 米国）を用いて行った。

結 果

本章第一節で確立したセレンの化学形態別分析法によって魚肉中のセレノネインを定量分析した結果を Table 2-3 および Figure 2-5 に示す。今回調べた魚肉試料中でもっともセレノネイン含量の高かったのはメカジキ (2.8 nmol/g) であった。マグロ類のセレノネイン含量はクロマグロ、メバチ、キハダ、およびビンナガでは 1.6–2.6 nmol/g であり、これらの総セレンに対するセレノネインの存在比は 9–42% であった。その他の魚種では、マイワシ、アオメエソ、キンメダイ、カツオ、マアジ、マダイ、およびヤマトカマスはセレノネイン含量は 0.1–1.4 nmol/g であった。一方、マアナゴ、カタクチイワシ、サケ、サンマ、シログチ、マコガレイ、およびヒラメではセレノネインは検出限界以下 (<0.05 nmol/g) であった。以上の結果から、セレノネインはさまざまな魚類の組織に存在し、特にマグロ類に高レベルで含まれること、さらに、魚類組織の主要な有機態セレンの化学形態はセレノネインであることが示された。

魚肉のセレン：水銀のモル比を計算するために、セレノネイン測定試料と同じ魚肉試料を用いて総水銀含量を分析した (Table 2-3)。キンメダイ、マグロ類、メカジキ、カツオなどの肉食魚類は 0.65–6.32 nmol/g と高レベルの総水銀が含まれ、その他の魚種の総水銀含量は 0.53 nmol/g 以下であった。セレン：水銀のモル比は 1 (メカジキ) から 217 (マコガレイ) であった (Table

2-3)。

マダライルカの組織，肝臓，腎臓，および血液には 0.47–8.62 mg Se/kg (6.0–109 nmol Se/g) のセレノネインが含まれていた (Table 2-4)。特に，赤血球 (2.1 mg Se/kg, 26.5 nmol Se/g) および腎臓 (7.5 mg Se/kg, 109 nmol Se/g) でセレノネイン含量が高く，総セレンの 72–115%がセレノネインとして含まれていた (Figure 2-6)。肝臓中のセレノネイン含量は 1.0 mg Se/kg (12.7 nmol Se/g) であり，総セレン含量の 4%であった (Figure 2-6)。

第三節 考察

GPC カラムを用いることによって、組織および食品の抽出物におけるセレノネインおよび他のセレン化合物を分離し、ICP-MS で ^{82}Se を検出する手法によって、HPLC-ICP-MS を用いるセレンの化学形態別分析法を確立した。セレノネインは、クロマグロの血液、肝臓、脾臓および骨格筋、マサバおよびティラピアの血液、ブタ腎臓、ニワトリの心臓、肝臓、筋胃、スルメイカ肝臓、マダライルカの血液、肝臓、および腎臓などの動物組織に広く分布することが明らかとなった。ヒト血液 (Kobayashi *et al.*, 2002)、ラットの代謝物 (Suzuki *et al.*, 2006)、土壌の抽出物 (Ge *et al.*, 1996) について、セレン化合物を化学形態別に分析し、セレンタンパク質、セレノメチオニン、セレノシュガー等を検出した例が報告されている。本研究では、マグロ類およびマサバの血液には高レベルのセレノネイン 430–437 nmol Se/g (34.0–34.5 mg Se/kg) が含まれていた。

第二節において、魚介類の可食部のセレノネイン含量を明らかにするために、魚類筋肉中のセレノネインレベルを定量した。また、同じ試料の総水銀および総セレン含量を分析した。その結果メカジキ、マグロ類、キンメダイの筋肉中に高レベルのセレノネイン (1.3–2.8 nmol/g) が含まれていた。筋肉中のメチル水銀含量が 0.5 mg Hg/kg を超える (Yamashita *et al.*, 2005) ことが従来知られている高次捕食魚は、妊婦への摂食指導が行われている魚種のリストに掲載されている (厚生労働省, 2009)。これらの魚種の筋肉中のセレンの大部分はセレノネインであった。その他の魚種においてもセレノネインが検出され、マアナゴ、カタクチイワシ、サケ、サンマ、イシモチ、およびマコガレイでは検出限界以下 (<0.05 nmol/g) であった。これらの検出限界以下の魚肉について、メタノール抽出液をエバポレーターで減圧濃縮し、水で再溶解して濃縮試料を調製したところ、HPLC-ICP-MS 分析でセレノネインのピークが確認された (Figure 2-6) ことから、これらの魚肉においても微量ながらセレノネインは分布するものと考えられる。今後、組織抽出物の前処理法を検討して、検出感度を上げ、生体および食品中のセレノネインおよび他のセレン化合物の定量分析を進める必要がある。

また、セレノネインの代謝物として考えられるセレノプロテイン P (Burk and Hill, 1994), GPx (Nagai *et al.*, 1999; Kryukov and Gladyshev, 2000), セレノシュガー (Kobayashi *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2006) 等が動物組織に分布することが報告されている。セレンタンパク質, セレノシュガー, および不溶性セレン化合物やそれらの代謝経路など, 未知のセレン化合物を同定するためのさらなる研究が求められる。セレノネインには強力なラジカル消去能がある (第一章第二節) ことから, セレノネイン自身が生理的および栄養学的なさまざまな過程において, 鍵となる生体酸化作用に関する役割を果たしていると考えられる。本研究では高次捕食性の魚類筋肉およびハクジラ類の組織中に高レベル (>1 nmol/g) のセレノネインが認められ, 特に大型の肉食魚およびハクジラ類の組織に分布することが明らかとなった。これらのことから, セレノネインは肉食性の海洋生物において生物濃縮されて, 血液, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 筋肉などの組織に蓄積し, 筋肉中の ROS 生成およびミオグロビンの自動酸化を抑制すると考えられる。また, セレンはメチル水銀の蓄積および解毒への関与が推定され, これについては第三章で述べる。

本研究において比較的高い総水銀値がキンメダイ (0.78 $\mu\text{g Hg/g}$), 大西洋産クロマグロ (0.42 $\mu\text{g Hg/g}$), 太平洋産クロマグロ (0.59 $\mu\text{g Hg/g}$), メバチ (0.98 $\mu\text{g Hg/g}$), クロカジキ (0.56 $\mu\text{g Hg/g}$), マカジキ (0.51 $\mu\text{g Hg/g}$), およびメカジキ (0.47 $\mu\text{g Hg/g}$) の筋肉で検出された。他の魚種では魚介類の暫定的水銀規制値 (0.4 $\mu\text{g Hg/g}$) (Yamashita *et al.*, 2005) 以下だった。Table 2-3 の結果において, 体重と総水銀値の関係を調べたところ (体重が不明なマグロ類とサケを除く), 総水銀値と体重との間には正の相関があり ($R^2 = 0.2864$, $P = 0.0003$), 総セレン含量も体重と正の相関がみられた ($R^2 = 0.1952$, $P = 0.0038$)。さらに, セレノネイン含量と総水銀含量 ($R^2 = 0.2039$, $P = 0.003$), 総セレン含量と総水銀含量 ($R^2 = 0.4416$, $P < 0.0001$) の間にも正の相関性が認められた。これらのことから, 水銀の代謝および蓄積にセレノネインの代謝経路が関与することが考えられる。

魚類筋肉におけるセレン:水銀のモル比を調べた結果, 分析に用いた 19 魚種におけるセレン:水銀比の平均値は 3.0 であり, 1 (メカジキ) から 217 (マコガレイ) までの幅があった (Table 2-3)。

セレノネインによるメチル水銀の解毒機構に関しては第三章で詳述するが、魚介類から摂取したセレノネインによってメチル水銀の解毒が促進されることが人体においても推定されることから、セレン：水銀比は魚食に伴うメチル水銀の健康リスクを推定する上で重要な評価指標になると考えられる。過去に、メチル水銀と亜セレン酸ナトリウムを餌として投与した動物試験において（0.5 または 50 $\mu\text{mol/kg}$ ）、セレン：水銀のモル比が 0.2 以上になる亜セレン酸の摂取によってメチル水銀の毒性が軽減されることが示された（Ralston *et al.*, 2008; Raymond and Ralston, 2004; Yang *et al.*, 2008）。本研究では魚類筋肉中のセレン：水銀のモル比が 1-217 であったことから、セレン：水銀のモル比の異なる魚肉を材料に用いてメチル水銀の蓄積と解毒に関する生理学および栄養学的効果を比較するによって、魚食によるメチル水銀の健康リスクおよびベネフィットの評価が可能であると考えられる。

セレノネインがニワトリ肝臓およびブタ腎臓で 0.3-0.36 nmol/g 検出された以外では陸上動物の組織では検出限界以下であり、家禽や畜肉の含量は魚肉と比べ明らかに少なかった（Table 2-1）。一方、セレノネインは多くの魚種において普通筋中に 0.4-2.8 nmol/g で顕著に検出された（Table 2-3）。また、ハクジラ類のマダライルカの肝臓、腎臓、および血液には 0.47-8.62 mg Se/kg (6.0-109 nmol Se/g) と高レベルのセレノネインが含まれていた（Table 2-7）。人体へのセレンの栄養学的意義を考えると、セレノネインは大部分が魚食によって摂取され、セレンの様々な生理・栄養的機能における抗酸化応答の役割を果たしていると考えられる（Civin-Aralar and Furness, 1991; Ganther *et al.*, 1972; Kryukov and Gladyshev, 2000; Nagai *et al.*, 1999; Prohaska and Ganther 1977; Ralston *et al.*, 2007, 2008; Ralston and Raymond, 2010; Raymond and Ralston, 2004; Watanabe *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2008）。また、セレノネインは食物からの摂取によって生物濃縮されるだけでなく、ヒスチジン、エルゴチオネインなどのイミダゾール化合物を前駆物質として他のセレン化合物をセレン源として生合成される可能性が考えられる。魚介類中のセレノネイン含量について、天然魚と養殖魚の比較、餌、季節や生理状態による変動、食品の貯蔵および加工中の変化に関するデータを蓄積していくことによって、セレンの栄養学的評価の新しい指標が得られるものと期

待される。

第三章 セレノネインのトランスポーターの同定およびメチル水銀の解毒機構の解析

食餌由来のセレンには、メチル水銀の毒性を軽減する作用が知られている (Clarkson, 1972; Friedman *et al.*, 1978; Ganther *et al.*, 1972; Ganther and Sunde, 1974; Ohi *et al.*, 1976; Potter and Matrone, 1974; Stillings *et al.*, 1974; Stoewsand *et al.*, 1974; Sumino *et al.*, 1977; Suzuki *et al.*, 1991; Watanabe *et al.*, 1999)。Ganther *et al.* (1972) および Ganther and Sunde (1974) は、水銀含量が 20 ppm になるようにメチル水銀を添加したビンナガ缶詰肉をウズラに投与すると、対照試験区と比べて生残率が高いことから、魚肉由来のセレンがメチル水銀の毒性を軽減すると推定した。また、Friedman *et al.* (1978) はメカジキの凍結乾燥肉をラットに与えると、メチル水銀の毒性が軽減されたことを報告した。これらの研究によって、メチル水銀含量を上回るセレンの摂取がメチル水銀の毒性発現を抑制すると考えられてきた。生体内に取り込まれたメチル水銀は容易に細胞膜を通過し、脳に到達することが知られている (Simmons-Willis *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2002)。メチル水銀の細胞内への取り込みの分子機構として、単純な拡散または特異的なトランスポーターを介してシステイン体として運搬されることが知られている (Simmons-Willis *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2002, 2007)。一方、メチル水銀の細胞外への排出と解毒に関与する分子機構は不明であるが、これまでの研究から、魚肉中の主要な有機セレン化合物であるセレノネインに魚肉中のメチル水銀の毒性を軽減する作用があると推定される。

第一章で解析したセレノネインはラジカル消去能を有することから、メチル水銀曝露に対して、ROS の生成を抑制するとともに、メチル水銀との複合体を形成することによって、メチル水銀の解毒を促進する分子機構が考えられる。

セレノネインはエルゴチオネインのチオール基がセレノール基に置換したセレンアナログである (第一章第一節)。従来の研究から、エルゴチオネインに対する特異的なトランスポーターとして、有機カチオン/カルニチントランスポーター [organic cations/carnitine transporter, OCTN1, solute carrier (SLC) family 22, member 4, SLC22A4] が知られている (Gründemann *et al.*, 2005)。こ

のことから、OCTN1は、セレノネインの輸送に対しても作用すると考えられる。OCTN1は哺乳類の細胞、組織に広く分布しており、とくに赤血球に高レベルに発現している (Gründemann *et al.*, 2005; Tamai *et al.*, 1999)。HEK293細胞ではOCTN1の発現は検出限界以下であるが、HEK293細胞へのOCTN1の過剰発現によってエルゴチオネインの取り込みは増大した (Gründemann *et al.*, 2005)。このことから、セレノネインの取り込みもHEK293細胞へのOCTN1の過剰発現によって増大することが考えられる。また、魚類のOCTN1のホモログは*slc22a4*遺伝子であり、ゼブラフィッシュ赤血球や他の組織に発現するとともに、ヘムタンパク質の代謝に関与することが推定される (Weber *et al.*, 2005; Nilson *et al.*, 2009)。すなわち、セレノネインはエルゴチオネインと同様にOCTN1を介して細胞内外に輸送される可能性が考えられた。また、セレノネインとメチル水銀との複合体が細胞内で生成されてメチル水銀が輸送される可能性が考えられた。

無機水銀はクロカジキの筋肉やメチル水銀が曝露された動物の肝臓および腎臓に蓄積している。メチル水銀の無機化は、メチル水銀の解毒に対して重要であると考えられるが、その分子機構は不明である。実験動物に対して、長期間のメチル水銀の曝露によって、無機水銀が生成することが知られている (Ralston *et al.*, 2008)。また、海産ほ乳類の肝臓にはメチル水銀の解毒産物としてセレン化水銀が高濃度に含まれている (Friberg and Mottet, 1989; Itano *et al.*, 1985; Nigro and Leonzio, 1996; Ng *et al.*, 2001; Palmisano *et al.*, 1995; Samson *et al.*, 2001; Skerfving, 1978)。

ゼブラフィッシュは、胚発生の研究分野で利用されるモデル動物であり、メチル水銀の曝露に対する発生や成体組織への影響の解析に利用されている (Gonzalez *et al.*, 2005; Korbas *et al.*, 2008; Samson *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2008)。

本章ではセレノネインに対する特異的なトランスポーターとしてOCTN1の重要性を明らかにするとともに、ゼブラフィッシュ胚を用いて、メチル水銀の蓄積と毒性を評価することが可能となるバイオアッセイ系を確立し、このトランスポーターによるメチル水銀の解毒機構を解析した。

第一節 セレノネインに対するトランスポーターの同定

本節ではOCTN1について、セレノネインの取り込みに関与するトランスポーターであるか否かを調べた。ゼブラフィッシュ胚を研究材料に用い、セレノネインの取り込みを調べるとともに、アンチセンスMOを導入してOCTN1の発現を抑制し、セレノネイン取り込み能に対する影響を調べた。また、OCTN1を過剰発現するHEK293細胞を作製し、セレノネインの細胞内への取り込みに対するOCTN1の関与を調べた。

試料および方法

試料

セレノネイン酸化型二量体は、第一章第一節に記載した精製品を用いた。メチル水銀システインは、「水銀分析マニュアル」（環境省, 2004）に従って、塩化メチル水銀（STREM Chemicals, Newburyport, MA, 米国）およびL-システイン塩酸塩（和光純薬工業）から調製した。

ゼブラフィッシュの飼育と胚の培養

ゼブラフィッシュは明期 14 時間および暗期 10 時間の照光条件下、28.5°C で飼育した（Westerfield, 1995）。1 細胞期の受精卵に対してプラスミド DNA の場合は 0.5 ng, MO は 10 ng をマイクロインジェクション法によって注入した（Westerfield, 1995; Yamashita *et al.*, 2008）。マイクロインジェクションののち、受精卵はハンクス液（Westerfield, 1995）を用いて、6 cm 細胞培養用ディッシュ中 28.5°C で培養した。リソソーム機能の阻害実験のため、バフィロマイシン A1（和光純薬工業）を受精 12 時間後に 5 nM の濃度になるように培養液に添加した。

細胞培養

HEK293 細胞 (ヒューマンサイエンス研究資源細胞バンク) は第一章第二節の方法で培養した。ただし培地には 10% の牛胎仔血清を含む RPMI-1640 培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いた。ヒトサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターに連結したヒト OCTN1 発現ベクター (sc126568; Origene) は, FuGene™ HD トランスフェクション試薬 (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いて HEK293 細胞に導入し, 24 穴カルチャープレート (コーニングインターナショナル, 東京) を用いて培養した。トランスフェクションの 24 時間後にトリプシン液 [(0.05% トリプシン, 0.53 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA, 和光純薬工業)] を用いて細胞を剥離したのち, 遠心分離によって細胞を回収し, PBS で 2 回洗浄した。

ベクターの構築

ORF 全長 1659 bp (Genbank accession No. BC062384) を含むゼブラフィッシュ OCTN1 cDNA (Nilsson *et al.*, 2009; Weber *et al.*, 2005) をセンスプライマー (CTG AAT TCT AAA ATG AGG GAT TAT GAC GA) およびアンチセンスプライマー (TTG GAT CCT TTA TCC AGT AAT AAT TTG AC) を用いて polymerase chain reaction (PCR) で増幅した。反応には, PrimeSTAR™ HS DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ) を用いて, 変性 (98°C, 10 秒間), アニーリング (55°C, 15 秒間) および伸長 (72°C, 90 秒間) の繰り返しを 25 サイクル行った。PCR 産物は pcDNATM 3.1/myc-His(-)A 哺乳類発現ベクター (Invitrogen) の CMV プロモーター下流の EcoR1 および BamH1 部位に挿入した。

モルフォリノオリゴ

ゼブラフィッシュ OCTN1 に対するアンチセンス MO として, antisense-MO1 (CAT TTT AGC CTT CAG TTG CC) および antisense-MO2 (CGT GAT GTC GTC ATA ATC CCT CAT) を合成した

(Gene Tools, Boston, MA, USA) (Nilsson *et al.*, 2009; Weber *et al.*, 2005)。合成した MO をゼブラフィッシュ受精卵 1 細胞期に 10 ng マイクロインジェクションで注入した。対照区用の MO として 5-mis control MO1 (CAA TTA AGG CTA CAC TTG CC) および Standard Control Oligo (control MO: CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A) (Gene Tools) を用いた。

結 果

本章の実験に先立ち、発現ベクター-pzOCTN1 を導入したゼブラフィッシュ胚, および phOCTN1 を導入した HEK293 細胞, またそれぞれのアンチセンス MO を導入したものについて, OCTN1 の発現レベルをウエスタンブロットにより調べた (Figure 3-1)。モックベクターを導入した HEK293 細胞には OCTN1 は検出されなかったのに対し, phOCTN1 を導入した HEK293 細胞には OCTN1 が検出された (Figure 3-1A)。ゼブラフィッシュ胚の対照区 (モックベクターを導入した胚) には少量の OCTN1 が検出され (Figure 3-1B), pzOCTN1 を導入した場合は OCTN1 の発現量が増大した (Figure 3-1B)。また, ゼブラフィッシュ胚にアンチセンス MO を導入した場合, OCTN1 の発現レベルは低下した (Figure 3-1B)。

72 時間胚から取り出した赤血球におけるセレノネインの取り込みを調べた結果, K_m 値は 9.5 μM であった。また, HEK293 細胞で発現したヒト OCTN1 に対して 13.0 μM であった。野生型のゼブラフィッシュ胚におけるセレノネインの取り込みを経時的に調べたところ, セレノネインは投与後 30 分間以内に胚体内に取り込まれた (Figure 3-2A)。セレノネインで処理した胚では HPLC-ICP-MS によって, セレノネインが検出された (Figure 3-2B)。アンチセンス MO を用いるノックダウンの手法を用いて, OCTN1 の発現を特異的に抑制し, 胚へのセレノネインの取り込みを調べた (Figure 3-2)。まず, 5'-mis control MO を導入した対照区の胚では, セレノネイン処理によって, 胚体内のセレン量が増大したが, antisense MO1 を導入した胚では, セレノネイン

で処理してもセレン量は増大しなかった (Figure 3-2C)。

ゼブラフィッシュ胚およびヒト HEK293 細胞にそれぞれ OCTN1 発現ベクターを導入し, OCTN1 を一過的に過剰発現させ, 培養液に添加したセレノネインの取り込みを細胞内のセレン含量として測定した。(Figure 3-3)。OCTN1 を一過的に過剰発現するゼブラフィッシュ胚において, セレン含量はモックベクターを導入した対照区と比べて, 2 倍高かった (Figure 3-3A)。同様に, OCTN1 を一過的に過剰発現する HEK293 細胞では, セレン含量は対照区と比べて, 5.9 倍高かった (Figure 3-3B)。対照区では, セレノネインの添加によって, 約 1.5 倍セレン含量が増加した (Figure 3-3)。

第二節 セレノネインによるメチル水銀の解毒機構の解析

セレノネインの投与によってメチル水銀の蓄積と毒性が軽減されることから、その作用機序を明らかにするため、セレノネインに対する特異的なトランスポーターとして同定された OCTN1 を介するメチル水銀の解毒機構に着目した。すなわち、OCTN1 を発現する HEK293 細胞およびゼブラフィッシュ胚の OCTN1 の発現を抑制するアンチセンス MO を用いて、セレノネインの存在下で OCTN1 を介してメチル水銀が解毒される分子機構を解析した。

試料および方法

ホールマウント免疫組織化学染色

一次抗体として抗 active caspase-3 ポリクローナル抗体 (Promega, Madison, WI, USA) (Yamashita *et al.*, 2008), および二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗体を用いた。BM Purple AP 基質液 (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いて染色した (Yamashita *et al.*, 2008)。ウエスタンブロット染色は、5 倍濃度のサンプル緩衝液 [0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS (和光純薬工業), 10 mM 2-メルカプトエタノール (和光純薬工業), 20% グリセリン (和光純薬工業), 0.05% ブロモフェノールブルー (和光純薬工業), プロテアーゼ阻害剤コンプリートミニ (ロシュ・ダイアグノスティックス)] を培養細胞および胚に対して 1/4 量添加し、100°C で 1 分間加熱したのち、4°C, 10,000 × g で 10 分間遠心分離して抽出液を得た。抽出したタンパク質は、1%ゲルの SDS-PAGE で分離したのち、PVDF 膜 (GE ヘルスケア・ジャパン, 日野市) に転写した。ヒト OCTN1 に対するポリクローナル抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, 米国) から購入した。セイヨウワサビペルオキシダーゼ標識抗体はダコ・ジャパン (東京) から購入した。ECL™ウエスタンブロット試薬キット (GE ヘルスケア・ジャパン) を用いてシグナルを検出し

た。

セレンおよび水銀の測定

総セレンおよび総水銀の測定は、それぞれ第一章第一節および第二章第二節に記載した方法で行った。

ゼブラフィッシュ胚中のセレノネインの測定

ゼブラフィッシュ胚は5個体を合わせて1検体とし、1.5 ml チューブ内で 100 μ l の HPLC 移動相とともにペッスルを用いて細砕し、9,700 \times g で 10 分間遠心分離した。上清を 10 μ l, HPLC-ICP-MS (第二章第一節) に供した。

無機水銀およびメチル水銀の測定

無機水銀およびメチル水銀の測定は Reyes *et al.* (2009) の方法に従って行った、試料を 0.25 M NaCl を含む 5 M HCl を用いて 60°C で 10 分間加熱したのち、アンモニア水で中和した後、無機態水銀およびメチル水銀を C₁₈ 逆相カラム (Inertsil™ Sulfa C18, 150 \times 4.6 mm, ジーエルサイエンス) およびイソクラティック溶離液 [50 mM pyridine (和光純薬工業), 0.5% (w/v) L-システイン塩酸塩 (和光純薬工業), 5% (v/v) メタノール (和光純薬工業), pH 3.0] を用いて水銀化合物を分離し、HPLC-ICP-MS で ²⁰²Hg を測定した。

ROS の測定

ROS は第一章第二節に記載した方法で測定した。胚 1 個に対して HPF 液 (超純水を用いて 1000 倍希釈) 0.5 ml を加え、1.5 ml 遠心チューブ用ペッスル (Treff Lab, Schweiz, Switzerland) を用い

てホモジナイズした。10,000 × *g* で 5 分間遠心したのち、蛍光光度を励起波長 490 nm, 蛍光波長 515 nm で測定した。ROS 含量の単位は、タンパク質 1mg 当たりの蛍光強度で表した。

タンパク質の定量

タンパク質濃度は、Bio-Rad protein assay kit (バイオ・ラッド ラボラトリーズ, 東京) を用いて、牛血清アルブミンを標準物質として測定した。

エキソソームの超遠心分画

ゼブラフィッシュ胚 (受精12時間後) に対して MeHgCys (胚1個あたり水銀として 3 ng) を卵黄嚢に注入した。卵膜をピンセットで除去したのち、ハンクス液で12時間培養した。胚の培養水 (5 ml) を 3,000 × *g* で15分間、4°C で遠心分離して、不溶物を取り除いた後、上清を回収し、150 mM NaCl および 250 mM スクロースを含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に重層して、100,000 × *g* で1時間超遠心分離した。得られた沈殿物を 0.5 ml の 150 mM NaCl および 0.1% tween-20 を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に懸濁し、エキソソーム画分として各種の試験に用いた。カテプシンL活性は、既報の方法 (Yamashita and Konagaya, 1990) に従って、Z-Phe-Arg-MCA (pH 5.6) を基質として測定した。酵素活性は、37°C, 1時間に遊離するアミノメチルクマリン 1 nmol を1単位とした。

結 果

培養水にメチル水銀システインを添加するメチル水銀曝露法

セレノネインのメチル水銀蓄積に対する防御作用を明らかにするため、ゼブラフィッシュ胚を用いるバイオアッセイ法を開発した。MeHgCys を培地に添加してゼブラフィッシュ胚にメチル水銀を投与すると、培地中の MeHgCys 濃度 25–100 ng Hg/ml の範囲で濃度依存的に脳、心臓、膜鱗などの組織に形態形成異常が観察された (Figure 3-4)。MeHgCys 濃度が 100 ng Hg/ml の場合、48 時間胚の眼、心臓および膜鱗に異常が生じた (Figure 3-6, panel d, e) 活性型カスパーゼ-3 に対する抗体染色によって、これらの細胞組織が染色され、カスパーゼ-3 の活性化を伴うアポトーシスが検出された (Figure 3-4)。MeHgCys の曝露によって生じた形態形成異常を計数したところ、メチル水銀の曝露に対して、濃度依存的に異常が生じたが、セレノネインを 1.6 μ M 以上含む培養条件下では、形態形成異常の頻度は減少した。(Figure 3-5)。

セレノネインによるメチル水銀の蓄積抑制

セレノネインが存在しないメチル水銀の曝露条件 (100 ng Hg/ml) では、水銀量は一尾当たり 2.7 ng が蓄積し、セレン含量は対照区と比べて 56% の水準に低下し (Figure 3-6)、組織当たりの水銀含量は約 30 μ g Hg/g に達した (Figure 3-6)。一方、セレノネインを 1.6 μ M 含む培養液の条件では、メチル水銀の蓄積レベルはメチル水銀単独の曝露条件と比べて 40% 程度であり、セレン含量も対照区と同レベルであった (Figure 3-6)。さらに、セレノネインを 3.2 μ M 含む培養液の条件では、胚に蓄積した総水銀含量のうち 61% が無機水銀の形態であった (Figure 3-6)。胚の脳および赤血球の総セレン含量は培養液中の MeHgCys 濃度に応じて低下した (Figure 3-7A)。また、ROS はメチル水銀を曝露した胚で有意に高レベルに発生した (Figure 3-7B)。

培養液から胚へのメチル水銀の蓄積をセレノネインとエルゴチオネインの存在下で比較すると、培養液中の濃度が 0.8 または 1.6 μ M のエルゴチオネインの投与によって、メチル水銀の蓄積は低下しなかった (Figure 3-8)。このことから、メチル水銀の蓄積を抑制する効果は、セレノネインにあるが、エルゴチオネインには見られないことが明らかになった。

低濃度のメチル水銀曝露

ゼブラフィッシュ胚を比較的低濃度のMeHgCysに曝露した場合（10 ng Hg/ml），形態形成異常は認められなかったが，対照区（5'-mis control MO1, control MO）の胚でのセレン含量は減少し，水銀含量も少なかった（Figure 3-9）。一方，OCTN1の発現を抑制した胚（antisense MO1, antisense MO2）では，水銀含量は増大し，セレン含量は減少せず，対照区の胚と同レベルであった（Figure 3-9）。

高濃度のメチル水銀曝露

ゼブラフィッシュ胚に高濃度の MeHgCys を曝露した場合，500 ng Hg/ml では対照区の胚は受精後 72 時間までにすべての胚が死滅し（Figure 3-10A），24 時間胚で形態異常が観察された（Figure 3-11）。一方，1.6 μ M のセレノネイン存在下では，ほとんどの胚が生き残り，無機水銀が蓄積した（Figure 3-10A）。OCTN1 の発現を抑制した胚では，この濃度での MeHgCys の曝露はセレノネインの有無にかかわらず致命的であった（Figure 3-10A）。セレノネイン投与区での生残率は，1 日目で 54% から 87% に増大し，2 日目では 32% から 66% に増大し（Figure 3-10A）（Log-rank Mantel-Cox test; $P < 0.0005$ ），水銀の蓄積レベルは 14.6 ng から 9.6 ng に低下し（Figure 3-10B），MeHgCys の曝露による形態異常も軽減された（Figure 3-11）。

ヒト由来細胞における OCTN1 の発現制御とメチル水銀解毒

このようなセレノネインによるメチル水銀の解毒効果が，ヒト培養細胞でもみられるかどうかを，OCTN1 を過剰発現する HEK293 細胞を用いて調べた（Figure 3-12）。細胞内のセレンレベルは MeHgCys への曝露（25–100 ng Hg/ml）によって減少した（Figure 3-12A）。メチル水銀は OCTN1 の導入の有無にかかわらず，曝露レベルに応じて蓄積した（Figure 3-12B）。セレノネインの存在下では，メチル水銀の蓄積は低下した（Figure 3-12B）。さらに OCTN1 を過剰発現した細胞では，無機水銀が形成されたが モックベクターを導入した対照区の細胞ではこのような効果は見られ

なかった (Figure 3-12B)。

ゼブラフィッシュ胚へのマイクロインジェクションによるメチル水銀曝露

培養液からの MeHgCys の曝露法以外の手法として、MeHgCys を胚の卵黄嚢にマイクロインジェクションによって直接注入した。対照区の胚では、12 時間胚に一個あたり水銀量 3 ng の MeHgCys を注入した後、12 時間培養したところ、胚の水銀含量は 0.7 ng まで低下した (Figure 3-13A)。一方、総水銀含量は OCTN1 を抑制した胚では 2.2 ng 検出された (Figure 3-13A)。OCTN1 を過剰発現する胚では水銀含量はさらに 0.26 ng まで減少した (Figure 3-13A)。また、バフィロマイシン A1 の投与によって水銀は蓄積し、胚中の水銀含量は 2.9 ng 検出された (Figure 3-13A)。

次に、培養液中に分泌された膜顆粒(エクソソーム)を回収し、水銀含量を調べた (Figure 3-13B) 結果、OCTN1 を過剰発現する胚ではエクソソームの水銀レベルが高かった (Figure 3-13B)。また、エクソソームのカテプシン L 活性は対照区と OCTN1 過剰発現胚で高く (Figure 3-13C)、Figure 3-13B におけるエクソソーム中の水銀レベルと類似していた (Figure 3-13C)。さらに、無処理の野生胚は水銀が検出されず、ゼブラフィッシュ胚の卵黄嚢は強力なメチル水銀の排出機能を有することが明らかになった (Figure 3-13A)。

第三節 考察

セレノネインの特異的なトランスポーターとして OCTN1 が同定された。HEK293 細胞およびゼブラフィッシュ 72 時間胚から取り出した赤血球に対してセレノネインの取り込みに関する K_m 値を調べたところ、HEK293 細胞で発現したヒト OCTN1 に対し $13.0 \mu\text{M}$ であり、ゼブラフィッシュ赤血球では $9.5 \mu\text{M}$ であった。エルゴチオネインに対する OCTN1 の K_m 値はヒト OCTN1 に対して $21 \mu\text{M}$ である (Gründemann *et al.*, 2005) ことから、セレノネインは OCTN1 の最適の基質であると考えられた。セレノネインは OCTN1 を介して細胞内に取り込まれ、ROS の発生およびヘムの自動酸化を抑制する作用が推定される (第一章第二節) が、このようなセレノネインの生体抗酸化作用に対して OCTN1 の発現および組織分布は重要であり、セレンによるレドックス状態を決定する主な要因であると考えられる。哺乳類細胞において OCTN1 は有機カチオンの細胞内への取り込みとともに、カチオンの分泌、排出に関与し (Koepsell *et al.*, 2007)、OCTN1 の遺伝子変異はクローン病および潰瘍性大腸炎の原因となることが知られている (Kato *et al.*, 2010; Tamai *et al.*, 1999)。OCTN1 のノックアウトマウスでは組織中のエルゴチオネイン含量が低いことが報告された (Kato *et al.*, 2010)。今回、OCTN1 の重要な生理的機能として、セレノネインの代謝および蓄積に関与することが明らかになったことから、クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性疾病において、セレノネインの欠乏が関与する可能性も考えられる。

さらに、本章第二節では、HEK293 細胞およびゼブラフィッシュ胚を用いるバイオアッセイによって、OCTN1 を介してセレノネインによるメチル水銀の排出および無機化が促進され、生残率が向上することが明らかとなった。これまでの研究では、メチル水銀の細胞内への取り込みはシステインに対するトランスポーター large amino acid transporter (LAT) 1 および LAT2 が担うことが知られている (Simmons-Willis *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2002)。本研究では、メチル水銀の解毒に作用するトランスポーターとして、OCTN1 が同定された。

魚類胚ではセレノネインの存在下で、OCTN1 依存的にメチル水銀曝露による水銀蓄積は軽減されたが、OCTN1 の発現を抑制した胚でも、水銀の蓄積量は 14.6 から 9.6 ng/g に低下し (Figure 3-10B), それに伴って、メチル水銀による形態異常も大幅に軽減された (Figure 3-11)。このことから、OCTN1 以外のトランスポーター、例えば他の SLC ファミリー (Koepsell *et al.*, 2007; Koh *et al.*, 2002) や ATP-binding cassette (ABC) ファミリー (Kruh and Belinsky, 2003; Madejczyk *et al.*, 2007; Maher *et al.*, 2005; Paulusma *et al.*, 1996) のトランスポーターもメチル水銀の排出に寄与していることが考えられる。

ゼブラフィッシュ胚では OCTN1 の過剰発現によって、セレノネインを投与しない条件でもメチル水銀の解毒作用が観察されたが (Figure 3-6B, 3-13), HEK293 細胞では OCTN1 の過剰発現だけでなく、セレノネインの投与も合わせた結果、メチル水銀の蓄積軽減の効果が生じた (Figure 3-12)。このようなゼブラフィッシュ胚と HEK293 細胞とのメチル水銀に対する解毒作用の差違は、ゼブラフィッシュ胚では内在性のセレノネインが存在するため、OCTN1 の過剰発現によって、メチル水銀の解毒作用が促進されたのに対し、HEK293 細胞では OCTN1 の発現レベルが低く、セレノネイン含量も低いことが原因であると推定される。

本研究では、メチル水銀の解毒に対して、OCTN1 トランスポーターが必要であることが確認された。対照区の胚ではメチル水銀の曝露によってセレン含量が低下したが、OCTN1 を欠失した胚では、セレンと水銀は両方とも含量が高く、両方の排出が抑制された (Figure 3-8)。さらに、OCTN1 を過剰発現する胚では、エキソソーム画分の水銀含量が増大するとともに、メチル水銀の無機化が促進された (Figure 13)。このようなエキソソーム画分にはリソソームのバイオマーカーであるカテプシン L 活性が検出された (Figure 3-13)。さらに、リソソームの pH 低下を阻害し、リソソームの活性化を阻害するバフィロマイシン A1 の投与によって、メチル水銀の解毒作用は喪失した (Figure 3-13)。これらの結果から、メチル水銀の排出と無機化には OCTN1 を介するリソソーム系の細胞外分泌系が関係することが明らかとなった。同様のセレノネインによるメチル水銀の無機化作用は、OCTN1 を過剰発現した HEK293 細胞でも認められた (Figure 3-12)。

以上の結果から、メチル水銀の蓄積と無機化は、OCTN1を介して、セレノネインの作用によって促進されることが明らかとなった。セレノネイン-メチル水銀複合体がメチル水銀の解毒作用に関与することが考えられたことから、今後、未同定のセレノネイン-メチル水銀を単離し、その動態を調べることによって、分子レベルでメチル水銀の解毒作用を解明することが可能になると考えられる。

海産哺乳類の肝臓や腎臓には無機態のセレン化水銀が蓄積している (Friberg and Mottet, 1989; Itano *et al.*, 1985; Ng *et al.*, 2001; Nigro and Leonezio, 1996; Skerfring, 1978; Palmisano *et al.*, 1995)。
メチル水銀の無機化がゼブラフィッシュ胚およびOCTN1を発現するHEK293細胞で認められたことから、海産哺乳類の場合と同様のメチル水銀の解毒機構が魚類からヒトまで広く分布することが推定される。海産哺乳類で見られるセレン化水銀はセレンと水銀が等モルで複合体を形成している (Friberg *et al.*, 1989; Itano *et al.*, 1985; Ng *et al.*, 2001; Nigro and Leonezio, 1996; Skerfring, 1978; Palmisano *et al.*, 1995)。メチル水銀に対してセレノネインが結合したのち、無機化することによって、セレン化水銀が生成されたと考えられた。メチル水銀の無機化には大腸菌の場合 (Begley *et al.*, 1986) と同様にメチル水銀の無機化酵素がリソソームで作用して、生じることが予想される。また、メチル水銀の無機化は非酵素的にも生じることが知られている (Ikemoto *et al.*, 2004)。したがって、メチル水銀の無機化に関与する分子機構を酵素的および非酵素的機構の面から特定する必要がある。海産哺乳類の肝臓における無機態の水銀は0価であり、メタロチオネインが関与しないことが報告されている (Palmisano *et al.*, 1995)。無機水銀が0価または+2価であるかを蛍光X線分析などで分析することによってメチル水銀の無機化の分子機構を推定できる可能性が考えられた。

エキソソームの形成には、エンドソーム膜でスフィンゴミエリナーゼの作用によって生じたセラミドが関与することが推定される (Trajkovic *et al.*, 2008; Graner *et al.*, 2009)。セラミドは熱ショックや酸化ストレス条件によって、細胞膜内のスフィンゴリエリンが酵素的に加水分解されて生じる (Hannun, 1996; Mathias *et al.*, 1993; Okazaki *et al.*, 1989; Verheij *et al.*, 1996; Yabu *et al.*, 2008)

ことから、メチル水銀曝露によって生じた ROS 生成による酸化ストレス条件が引き金となって、JNK キナーゼのリン酸化によってスフィンゴミエリナーゼが活性化し (Hannun, 1996; Mathias *et al.*, 1993; Okazaki *et al.*, 1989; Verheij *et al.*, 1996; Yabu *et al.*, 2008), セラミドが生じて、エキソソームが生成されると考えられる。このようなエキソソームを介するメチル水銀の解毒の作用機序を解析する必要がある。

以上の結果から、生体内に取り込まれたメチル水銀はセレノネインと結合して複合体が生成され、OCTN1 を介して、小胞体に取り込まれた後、酵素的な無機化が生じるとともに、分泌顆粒を形成してメチル水銀は細胞外、体外へ排出される解毒経路が推定される (Figure 3-14)。今後、食事からセレノネインまたは他のセレン化合物を摂取することによって、メチル水銀の排出と無機化が促進されることを動物試験およびヒトの健康調査で検証する必要がある。

第四章 グルタチオンペルオキシダーゼの精製および性状解析

GPx (EC1.11.1.9) は GSH の存在下で過酸化水素や脂質ヒドロペルオキシドを還元し、細胞、組織の酸化障害を防止すると考えられる。動物細胞の GPx は複数のアイソザイムが同定されており、細胞内の局在性と基質特異性によって酵素のタイプが分類される。ヒトでは GPx1 から GPx8 までの 8 種類の GPx が同定されており (Hatfield, 2006)、GPx1 は過酸化水素への特異性が高く、GPx の中で細胞質内に最も多く存在するアイソザイムである。GPx1 は、ホモ四量体から構成され、各サブユニットの活性中心に 1 つのセノシステイン残基を有し、GSH はセノシステイン残基を還元するための電子供与体として作用し、下記の反応を触媒することが知られている (O'Brien and Little, 1969)。



セレンは人体に必須な微量栄養素であり、水産物、赤身肉、鶏卵、鶏肉などが食品としての主要な供給源であり (Combs, 2001b)、セレンの多くは、セノシステイン残基として GPx (Awasthi *et al.*, 1975; Braddon *et al.*, 1985; Combs, 2001; Kai *et al.*, 1995; Kolayi *et al.*, 1997; Miwa *et al.*, 1983; Nagai *et al.*, 2002; Nakano *et al.*, 1992b; Perez-Campo *et al.*, 1993; Rotruck *et al.*, 1972; Thompson *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 1996)、チオレドキシンレダクターゼ (Bell *et al.*, 1984)、セノプロテイン P (Burk and Hill, 1994; Mustacich and Powis, 2000) などのセレンを含有する酸化還元酵素に含まれると考えられてきた。

本研究において、マグロ類筋肉中の主要な有機態セレンを分析した結果、低分子のセノネインおよびセノタンパク質である GPx1 が同定された。セノネインはトランスポーターOCTN1 を介して細胞内へ取り込みことを示した。セノネインは、細胞内に取り込まれ、抗酸化作用を示すとともに、セノタンパク質の生合成におけるセレン源として利用され、細胞内のセレンの

代謝に関与すると考えられる。

ラットの研究において、セレン欠乏条件では、GPx1 のタンパク質レベルおよび mRNA レベルでの発現が低下するが、セレンの摂取レベルに応答して、肝臓および赤血球の GPx1 活性は上昇し、飼料中のセレン含量が 0.1 $\mu\text{g/g}$ 以上で、セレン欠乏状態が解消され、GPx1 活性レベルが一定値に達することが知られている (Raines and Sunde, 2011)。このことから、GPx1 活性レベルはセレン欠乏状態を生化学的に評価するためのバイオマーカーとして利用される。

本章では魚類の GPx1 の化学構造と遺伝子発現を明らかにするため、クロマグロ血合筋から GPx1 を精製するとともに、cDNA をクローン化して、GPx1 の基質特異性、アミノ酸配列、組織別の発現等の生化学的性質を調べた。

第一節 グルタチオンペルオキシダーゼの精製

クロマグロ血合筋から GPx1 を精製し、酵素的性状を明らかにした。

試料および方法

試料

クロマグロ（体重約 40 kg）の組織は養殖場で採取し、使用するまでの間 -80°C で保存した。GSH、過酸化水素水、クメンヒドロペルオキシド、および ϵ -ブチルヒドロペルオキシドは和光純薬工業から購入した。ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADPH）およびグルタチオンレダクターゼはオリエンタル酵母（大阪市）から購入した。

分子量の測定

精製した GPx の分子量は Protein Calibration kit（ロッシュ・ダイアグノティクス）を用いてゲルろ過カラムクロマトグラフィーの溶出流量から求めた。

GPx 活性の測定

GPx 活性は、基質の還元反応によって生成した酸化型 GSH を還元型に還元するためにグルタチオンレダクターゼが消費した NADPH 量を測定した。測定のため 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0）0.5 mM EDTA（和光純薬工業）、1 mM アジ化ナトリウム（和光純薬工業）、2.5 mM GSH、0.25 U/ml グルタチオンレダクターゼ（和光純薬工業）および 0.16 mM NADPH を含む反応液を 37°C でインキュベートした。NADPH の蛍光強度（蛍光 460 nm/励起光 360 nm）を蛍光分光光度計（日立 850 型、日立製作所）で測定した。ミカエリス定数 K_m および分子活性 V_{\max} は

過酸化水素, クメンヒドロペルオキシドおよび t -ブチルヒドロペルオキシドを基質として用いて pH 7.0 で測定した。活性値は Prism ver. 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いて Michaelis-Menten の式の双曲線近似によって算出した。タンパク質濃度は第三章第二節に記した方法で測定した。酵素活性は 37°C で一分間に 1 μ mol の NADPH を酸化する活性を 1 unit とした。

マグロ血合筋からの GPx1 の精製

クロマグロの血合筋 (600 g) を細切したのち, 3 倍量の 1 mM EDTA-2Na および 1 mM GSH を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を加え, POLYTRON[®]ホモジナイザー (Kinematica, ルツェルン, スイス) を用いてホモジナイズした。ホモジネートを 7000 \times g で 30 分間遠心分離し上清を得た。上記の緩衝液で平衡化した DEAE-Sephadex A-50 カラム (シグマ アルドリッチ ジャパン, 60 \times 200 mm) を通過させたのち, 溶離液をポリエチレングリコール 20000 (和光純薬工業) で濃縮後, 上記緩衝液に対して透析し, 2 回目の DEAE-Sephadex A-50 カラム (60 \times 300 mm) に通した。カラムを上記緩衝液で洗浄後, GPx1 を NaCl の直線グラジエント (0–0.2 M) で溶出した。GPx1 活性画分を限外ろ過装置 (PM-50 膜を装着した Amicon stirred cell 8050, Millipore, Billerica, MA, USA) で 5ml に濃縮した。試料は, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA-2Na, および 1 mM GSH を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8) で平衡化したゲルろ過 Hiprep Sephacryl S-200 カラム (16 \times 600 mm, ファルマシアファインケミカルズ, ウプサラ, スウェーデン) に通して酵素を溶出した。活性画分を再び限外ろ過によって濃縮し, 1 mM EDTA-2Na および 1 mM GSH を含む 20 mM HEPES 緩衝液 (pH 6.8) に対して透析した後, MonoQ カラム (5 mm \times 20 mm, ファルマシアファインケミカルズ) に導入し, NaCl の直線グラジエント (0–0.5 M) で溶出した。

電気泳動

タンパク質溶液に対して 1/4 量の 5 倍濃度サンプル緩衝液 [(10% SDS, 10 mM 2-メルカプトエタノール, 20% グリセリン, 0.05% ブロモフェノールブルーおよびプロテアーゼインヒビタ

ーカクテル（ロッシュ・ダイアグノティクス）を含む 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8] を加えて、100°C で 1 分間加熱した。タンパク質試料を 12.5% SDS-PAGE ゲルを用いて分離した。

結 果

クロマグロ血合筋の GPx は 5 段階のカラムクロマトグラフィー（DEAE-Sephadex A-50, Sephacryl S-200, および MonoQ イオン交換カラム）によって 565 倍に濃縮され、酵素の収率は 0.8% であった（Figure 4-1, Table 4-1）。SDS-PAGE によって本酵素の均一性が確認され、分子サイズは 22 kDa と推定された（Figure 4-1C）。また、Sephacryl S-200 によるゲルろ過において、本酵素の分子サイズは 90 kDa と測定され、未変性では四量体であることが推定された。

精製した酵素の活性を調べた結果、過酸化水素に対する至適 pH は 7.4 であった。 K_m 値および V_{max} 値は過酸化水素に対してそれぞれ 6.7 μM および 1.25 s^{-1} , クメンヒドロペルオキシドに対し 16.0 μM および 0.38 s^{-1} , *t*-ブチルヒドロペルオキシドに対し 7.0 μM および 0.71 s^{-1} であった。GSH に対する本酵素の K_m 値は 1.51 mM であった。

第二節 セレノネインによるグルタチオンペルオキシダーゼの発現

ゼブラフィッシュで報告された GPx1 は、推定アミノ酸配列の分子系統樹から GPx1a および GPx1b の二種類に分類された (Kryukov and Gladyshev, 2000) が、哺乳類では一種類だけであった (Perez-Campo *et al.*, 1993)。そこで、クロマグロから GPx をクローニングしてその分子種を調べるとともに、セレノネインによる GPx の発現誘導を調べた。

試料および方法

cDNA クローニング

クロマグロ血合筋を TriZol reagent (Invitrogen) に溶解したのち、全 RNA を抽出し、常法 (Maniatis *et al.*, 1993) によりエタノール沈殿によって濃縮した。Poly(A) RNA は oligo(dT)樹脂 (Oligotex; タカラバイオ, 大津市) を用いて精製した。cDNA 二重鎖を oligo(dT)プライマーを用いて合成した後、cDNA ライブラリーを Rapid Amplification of cDNA Ends キット (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) を用いて調製した。GPx1 の cDNA は次のプライマーを用いて増幅した (*gpx-1*, 上流側 5'-TTT TAC GAS CTG TCC GCA AAR CTM YTG TCA GGA GA-3': ゼブラフィッシュ GPx-1a の部分アミノ酸配列領域 FYDLSAKLLSGD; 下流側 5'-TCT TTT ACA TAT TTA TCA RAA WCY CCC CT -3', ゼブラフィッシュ GPx-1a の 3'側非翻訳領域)。PCR で増幅した GPx1cDNA を pGEM-T Easy vector (Promega) にサブクローン化した。塩基配列が異なる 2 種類の GPx1cDNA が得られた。2 種類のクローンのアンチセンス鎖に対して特異的な PCR プライマーを設計して合成した (TunaGpx1A-1a: 5'-CTC TCC AAC GGC CAT GAA GTT TAC TTG ACC-3', TunaGpx1B-1a: 5'-CGG TCG GAC AAC GTT TTG GAT TAG TTT GCC)。これらの PCR プライマーを用いて、GPx1a

および GPx1b の 5'側の cDNA 部分配列を PCR で増幅した。

塩基配列の分析

塩基配列は、DNA シークエンサー (ABI model3100, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) および BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer) を用いて決定した。

質量分析

クロマグロ GPx1 のトリプシン消化物の質量分析は Quattro II (Micromass UK) を用いて ESI-MS によって測定した。Thongboonkerd *et al.* (2002) の方法に従って、精製した酵素の活性中心のセレノール基をカルボキシメチル化した後にトリプシン消化し、得られたペプチド断片の質量を測定した。GPx1a および GPx1b の推定アミノ酸配列に基づいて活性中心付近のトリプシン分解ペプチドを同定した。

ウエスタンブロッティング

既報のニジマス GPx1 (AF281338) およびクロマグロ GPx1 に対して共通のアミノ酸配列 HQENCKNDEI (アミノ酸残基 71-80 に相当) を抗原部位として選定し、その化学合成ペプチドをヘモシアニンに固定化してハプテン抗原としてウサギに免疫した。得られた抗血清からプロテイン G カラム (GE ヘルスケア・ジャパン) を用いて IgG を精製した。ウエスタンブロット用の試料組織は、冷純水でホモジナイズした後、4°C で 10,000 x g で 10 分間遠心分離した。抽出されたタンパク質溶液を前節の SDS-PAGE 法で分離し、PVDF 膜 (GE ヘルスケア・ジャパン) に対してセミドライ型ブロッティング装置 (バイオラッド) を用いて転写した。ECL™ ウエスタンブロッティング検出キット (GE ヘルスケア・ジャパン) および Hybond-ECL フィルム (GE ヘルスケア・ジャパン) を用いて抗 GPx1 抗体に対するシグナルを検出した。

培養細胞へのセレノネイン添加による GPx1 の発現

YT 細胞, ZE 細胞, HUVEC 細胞, および HEK293 細胞はそれぞれ第一章で述べた方法で直径 9 cm のカルチャープレートを用いて培養した。培養液にセレノネインを 100 nM 添加し, 24 時間培養した。回収したそれぞれの細胞について, 前項で述べた方法で, 抗 GPx1 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。

結 果

クロマグロ血合筋 cDNA ライブラリーから GPx1 をコードする cDNA クローンが 2 種類単離された (Figure 4-2)。コード領域にはセレノシステイン残基をコードする TGA コドンが哺乳類の GPx1 およびその他のセレンタンパク質の場合と同様に見いだされた。いずれのクローンもゼブラフィッシュ GPx1a および GPx1b (Kryukov and Gladyshev, 2000) に対してそれぞれ, 高い相同性が認められたことから, 得られた 2 つのクローンをそれぞれクロマグロ由来の GPx1a および GPx1b として同定した。クロマグロ GPx1a の cDNA には 189 個のアミノ酸残基を含むタンパク質 (推定分子量 21728) が ORF にコードされていた。一方, GPx1b の cDNA には 188 個のアミノ酸からなるタンパク質 (推定分子量 21451) が ORF にコードされていた (Figure 4-3)。これら 2 つのアイソザイムにおいて, 前述のように活性中心のセレノシステイン残基をコードする TGA コドンが保存されていた。GPx1a はティラピア GPx1, ゼブラフィッシュ GPx1a (Kryukov and Gladyshev, 2000), ゼブラフィッシュ GPx1b (Kryukov and Gladyshev, 2000), ミナミマグロ GPx1 (Thompson *et al.*, 2010), およびウシ GPx1 (Perez-Campo *et al.*, 1993) に対してそれぞれ 88%, 78%, 73%, 73%, および 70% の相同性を示した。GPx1b はミナミマグロ GPx1 (Thompson *et al.*, 2010) およびゼブラフィッシュ GPx1b (Kryukov and Gladyshev, 2000) とそれぞれ 97% および 76% の相同性を示した。魚類を含む脊椎動物由来の GPx1 の分子系統樹 (Akasaka *et al.*, 1989; Chada *et al.*,

1990; Chambers *et al.*, 1986; Djordjevic *et al.*, 2010; Fukuhara and Kageyama, 2005; Hostetler *et al.*, 2006; Kryukov and Gladyshev, 2000; Novo *et al.*, 2009; Perez-Campoi *et al.*, 1993; Sukenaga *et al.*, 1987; Thompson *et al.*, 2010) から、クロマグロ、ゼブラフィッシュ、およびトラフグを含む魚類の GPx1 は 2 種類の異なるアイソザイム GPx1a および GPx1b に分類された (Figure 4-4)。

精製した酵素をカルボキシメチル化した後トリプシンで消化し、ESI-MS でトリプシン分解物の質量を測定した結果、アミノ酸配列 VVLIVNVASL(cmU)GTTTR の二価イオン ($M+2H$: calculated $m/z=596.785$) に相当する m/z 597.54 にイオンピークが検出された結果から (Figure 4-5), カルボキシメチル化されたセレノシステイン残基を含む GPx1b のペプチド断片であると同定した。この結果から、精製された酵素は 37 番目のセレノシステイン残基を活性中心に持つ GPx1b であることが確認された (Figure 4-3)。また、第四章第一節の SDS-PAGE およびゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分子量測定の結果から、精製された本酵素は単一のサブユニット GPx1b によって構成される四量体であることが示された。クロマグロ、ゼブラフィッシュ、トラフグなどの魚類には 2 種類の異なる GPx1 遺伝子、すなわち GPx1a および GPx1b が存在し、哺乳類 GPx1 は 1 種類のみであった。このことから哺乳類は 1 種類の GPx1 遺伝子を有しているのに対し、魚類は 2 種類の異なる GPx1 を有することが明らかとなった。遺伝子のシンテニー解析の結果、ゼブラフィッシュ GPx1b (染色体 6 番上の *zgp1b*) はヒト GPx1 (ヒト染色体 3 番 p21.31) に対するオーソログの関係にあった。一方、ゼブラフィッシュ GPx1a (ゼブラフィッシュ染色体 11 番上の *zgp1a*) はヒト染色体上に対して遺伝子シンテニーの対応関係が見られなかった。このことから、クロマグロ GPx1a, ゼブラフィッシュ GPx1a, トラフグ GPx1a で構成される魚類由来の GPx1a のクラスターは脊椎動物の進化の過程で祖先型の GPx1 遺伝子の重複によって生じたことが推定された。

セレノシステイン挿入配列 (SECIS) は約 60 塩基からなる mRNA エlement であり、ステムループ構造をとり、翻訳過程で UGA コドンにセレノシステイン残基に対応するように調節している (Kryukov *et al.*, 2003)。このような SECIS は GPx1 クローンの 3'-非コード領域に存在し、

セレンタンパク質が一つあるいはそれ以上のセレノシステイン残基をコードしていることを示している (Figure 4-2)。

魚類 GPx1 に対する特異的ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングによってクロマグロの組織中の GPx1 の発現を調べた (Figure 4-6)。抗体は血合筋中の 22 kDa のタンパク質に交差性を示した (Figure 4-5a, レーン 1)。抗体を精製した GPx1 とプレインキュベーションすることによって、このような染色バンドが消失したことから (Figure 4-6A, レーン 2)、本抗体はクロマグロ GPx1 に特異的に反応することが示された。GPx1 はクロマグロの血合筋, 心臓, 脾臓, および肝臓で検出され, 普通筋には検出されなかった (Figure 4-6B)。

魚類およびヒト由来の培養細胞培地にセレノネイン酸化型二量体を添加することによって, GPx1 および GPx4 の発現が誘導された (Figure 4-7)。

第三節 考察

クロマグロ血合筋から GPx1 を精製した。本酵素は分子量 90000 で 22 kDa の単一サブユニットで構成されていた。本酵素は過酸化水素、クメンヒドロペルオキシド、および *t*-ブチルヒドロペルオキシドに対して活性を示すことから、既報の GPx1 と同様に幅広い基質特異性を持つことが明らかとなった。酵素活性の至適 pH は 7.4 であり、過酸化水素に対する K_m 値および V_{max} 値はそれぞれ 6.7 μM および 1.25 s^{-1} であった。既知の GPx1 の K_m 値は、ヒト肝臓 GPx1 : 83.3 μM (Miwa *et al.*, 1983), ミナミマグロ肝臓 GPx1 : 12.4 μM (Thompson *et al.*, 2006), およびニジマス肝臓 : 10 μM (Bell *et al.*, 1984) であり、これらと比較して、本酵素の K_m 値は低かった。クロマグロ GPx1 の有機ヒドロペルオキシドに対する K_m 値はクメンヒドロペルオキシド 16.0 μM および *t*-ブチルヒドロペルオキシド 7.0 μM であった。これらの値もヒト GPx1 (クメンヒドロペルオキシド 27.8 μM , *t*-ブチルヒドロペルオキシド 33.3 μM) (Miwa *et al.*, 1983), ミナミマグロ GPx1 (クメンヒドロペルオキシド 90 μM , *t*-ブチルヒドロペルオキシド 90 μM) (Thompson *et al.*, 2006), ニジマス GPx1 (クメンヒドロペルオキシド 48 μM , *t*-ブチルヒドロペルオキシド 3000 μM) (Bell *et al.*, 1984) と比較して低かった。これらの広い基質特異性と高い活性から、精製した酵素は GPx1 であると考えられた。

本研究ではアミノ酸配列および生体内における発現を調べるため、GPx1 をコードする cDNA をクローン化した。クロマグロから GPx1 の二種類の異なるタイプの遺伝子、*GPx1a* および *GPx1b* が得られた。本研究でクロマグロ血合筋から精製した GPx1 は推定アミノ酸配列の相同性解析とトリプシン消化物の質量分析によって GPx1b であることが明らかとなった (Figure 4-5)。セレンタンパク質のセレノシステイン残基の取り込みには SECIS が必要であるが、クロマグロ GPx1 の SECIS は、既知の脊椎動物の GPx1 とともによく保存されていた (Figure 4-4)。一方、哺乳類は *GPx1* を 1 コピーのみ有していたのに対し、魚類は 2 種類の異なる *GPx1* を有していた。ゼブラフィッシュゲノムの *hox* クラスターのマッピングによってゼブラフィッシュは哺乳類の染色

体セグメントを2コピー持つことが知られている (Amores *et al.*, 1998)。Postlethwait らはゼブラフィッシュのゲノム構造をヒトと比較して、ヒトとゼブラフィッシュとが分岐してから 4.3 億年の間に、多くの染色体セグメントが重複したことを見いだした (Postlethwait *et al.*, 1998)。ゼブラフィッシュのゲノムには4個の染色体セグメントが存在することから、魚類と哺乳動物の分岐の後に魚類では全ゲノムの重複が生じたことが推定されている (Guindon and Gascuel, 2003)。従って、魚類の進化過程で *GPx1b* グループから *GPx1a* グループが重複して生じた可能性が考えられた。今後は魚類特有の2つの *GPx1* アイソザイムの転写および翻訳がセレンによって誘導される分子機構を解析する必要がある。*GPx1* はクロマグロ血合筋中の主要なセレンタンパク質であり、セレノネインはクロマグロの血合筋中の強力なラジカルスカベンジャーとして働く低分子の有機セレン化合物である (第一章)。培養細胞へのセレノネインの投与によって *GPx1* の発現が誘導された (Figure 4-7)。このことから、*GPx1* の転写または翻訳がセレノネインによって活性化され、セレンタンパク質の生合成においてセレノネインがセレン源として利用される代謝経路が考えられた。また、DNA の損傷による p53 の活性化によって、*GPx1* プロモーターが活性化され、転写が誘導されることが報告されており (Tan *et al.*, 1999)、p53 を介した *GPx1* の発現が増大することによって、生体抗酸化作用を上昇させる作用機序が考えられる。セレノネインおよび *GPx1* は、魚肉中の様々な生理学、栄養上の酸化還元サイクルの重要な因子であると考えられる。

総括的考察

魚食は、日本人にとってセレンの主な供給源であり、セレンは栄養学的に必須の微量元素であるにもかかわらず、その化学的性状が不明であり、機能性成分としても十分利用されてこなかった。本研究において、マグロ類血合筋由来の有機セレン化合物を同定し、新規化合物セレノネイン（エルゴチオネインのセレンアナログ）の化学構造を決定した。セレノネインはマグロ類やカジキ類、サバ類などの魚介類の筋肉に多く含まれたことから、この有機セレン化合物が食事中的セレンの主要な化学形態であると考えられる。この化合物を用いて、その生理・生化学的作用機序を解明することによって、セレンの必須元素としての機能性を明らかにすることが可能である。

このセレン化合物は反応性の高いセレノケトン基を有しており、DPPH ラジカル消去能は、水溶性ビタミン E 誘導体 TroloxTM の約 500 倍高かった。セレノネインは、赤血球、脾臓、血合筋、心筋などに多く含まれ、ヘムタンパク質に結合して、ヘモグロビンおよびミオグロビンのメト化を抑制したことから、ヘム鉄の自動酸化抑制に関与することが推定された。

セレノネインは、細胞膜上にある OCTN1 によって、生体内、細胞内に特異的に取り込まれるとともに、細胞内での生体抗酸化作用、とくにヘム鉄のメト化抑制に関与することが推定される。そこで、セレノネインとヘム鉄との会合および解離の反応メカニズムを 2-オキシまたは 2-チオイミダゾール、ポルフィリン環等の類縁物質を調製して立体構造を解析することにより、セレノネインのヘム鉄に対する抗酸化作用を明らかにできると考えられる。生体内では、セレノネインはグルタチオン/GPx によるレドックス経路で、ラジカルスカベンジャーとして機能すると考えられることから、セレノネインを過剰投与または欠乏した実験動物および動物細胞モデルを用いて、酸化ストレス条件下での生物応答、病態異常を観察し、セレノネインによる酸化抑制の機構を解析することができると考えられる。そのため、マウス、魚類等のモデル動物に対してセレノネインを投与するために必要となる精製標品を大量に製造する技術を確立する必要がある。セレノネインを血合筋、内臓等の水産加工残滓からミリグラムオーダーで抽出し、精製する製造法を開発する必要がある。

マグロ類、鯨類等の海洋生物は、低酸素条件の海洋環境下でも活発にエネルギー産生を行い、低酸素条件下で酸素が解離したヘム鉄の自動酸化を抑制するため、セレノネインによるレドックス制御機構を発達させていると考えられ、セレノネインは低酸素適応能を担う分子であると推定される。

本研究の結果から推定されるセレノネインの代謝モデルを Figure 5-1 に示した。魚由来のセレノネインは OCTN1 を介して魚介類から直接摂取される。また、亜セレン酸など、他のセレン化合物から生合成される経路も考えられる。細胞内に取り込まれたセレノネインはセレノネインプールとしてレドックス応答に寄与すると考えられる。セレノネインは、ROS の消去およびメチル水銀の細胞外への排出に作用するとともに、メチルセレン体およびセレノシュガーとして腎臓から排泄されると推定される。さらに、セレンタンパク質中のセレノシステインは tRNA セリン付加体からセリンのヒドロキシル基がセレノール基に変換されて合成されることから、セレノネインはセレノシステイン-tRNA のセレン源として作用すると推定される。このようにして合成されたセレンタンパク質は、生体内で分解されるが、セレノシステイン β リアーゼの作用によってセレノシステインから遊離したセレン原子からセレノネインが再び合成される経路が考えられる。メチル水銀曝露において細胞内のセレン含量が減少した (Figure 3-7A)。セレノネインとメチル水銀との複合体が OCTN1 を介して排出され、メチル水銀の解毒に利用されたために減少した結果であると推定される。メチル水銀に対する応答を調べたが、カドミウム、銅、亜ヒ酸など、グルタチオンを介して解毒される他の重金属や化学物質もセレノネインを利用して解毒されることが考えられる。フェントン反応のモデルを介して 2 価鉄を触媒としてヒドロキシラジカルが産生され、細胞の酸化障害を引き起こすことが知られている (矢口・遠藤, 2000)。セレノネインによって誘導される GPx1 とともに、セレノネインは、ROS の消去作用を有し、セレン-レドックス機能を向上させることが推定されることから、酸化障害や炎症によって促進されるメタボリック・シンドローム、がん、心臓病、糖尿病等の生活習慣病や細胞老化に対する予防効果をもつと考えられる。

セレン欠乏によって、虚血性心疾患（中国の高地で見られる克山病）、肺がん、前立腺がん、大腸がん、II型糖尿病などのリスクが高まるという現象は、血液および循環器系でのセレノインの生体抗酸化作用の欠如によると予想される。一方、セレンの抗発がん作用は、やや過剰量のセレンによる薬理的な作用によるものであり、メチルセレノール、セレン化水素などの抗酸化性の高いセレン代謝物が候補として考えられてきたが、詳細は明らかではない（Combs, 2001a; 姫野, 1994; Jackson and Combs, 2008）。これらのことから、ラジカル消去能のあるセレノネインが、これら生活習慣病の予防、治療やアンチエイジングに有効な有機セレン化合物の候補であり、セレンの栄養生理学的機能を果たすための化学形態であると考えられる。従来、動物試験や臨床応用に用いられている亜セレン酸、セレノシスチン、セレノメチオニンなどのセレン化合物に対して、セレノネインは細胞毒性が低いと考えられる。マグロやサバの血液中にはセレノネインがセレン当たり 34.0–34.5 ppm 含まれる。今後、セレノネインを機能性物質として利用するにあたり、バイオアベイラビリティおよび毒性の評価を行う必要がある。

また、セレノネインの化学合成法が確立されれば、セレン安定同位体および放射性同位体で標識したセレノネインを化学合成し、培養細胞系および動物への投与試験を行うことによって、生体内でのセレノネインの代謝経路を解析することが可能になると考えられる。セレノネインの強力なラジカル消去活性によって DNA 損傷修復作用が期待できることから、放射線および化学発がんの抑制作用を培養細胞系およびモデル動物を用いて解析する手法が可能であると考えられる。魚類およびヒト細胞で発現するセレンタンパク質遺伝子の転写、翻訳過程におけるセレノネインによる調節メカニズムを解析することにより、セレンによるレドックス経路の活性調節作用が明らかになると期待される。

魚食には心臓病、認知症、うつ、炎症、がん、高血圧、骨形成などに対する健康増進作用が報告されていることから（Mozaffarian and Rimm, 2006）魚食由来の有機セレン化合物であるセレノネインの健康増進作用に対する寄与を疫学調査や動物試験によって解明することができる。

引用文献

- Akasaka, M., Mizoguch, J., Yoshimura, S., Watanabe, K. (1989) Nucleotide sequence of cDNA for rabbit glutathione peroxidase. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 21–36.
- Amores, A., Force, A., Yan, Y.-L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R. K., Langeland, J., Prince, V., and Wang, Y.-L. (1998) Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science*, **282**, 1711–1714.
- 有馬郷司, 長倉克男 (1979) 歯クジラ類の水銀およびセレン含量. 日水誌, **45**, 623–626.
- Arthur, J. R., Nicol, F., and Beckett, G. J. (1990) Hepatic iodothyronine 5'-deiodinase. The role of selenium. *Biochem J.*, **272**, 537–540.
- Awasthi, Y. C., Beutler, E., and Srivastava, S. K. (1975) Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **250**, 5144–5149.
- Bagnyukova, T. V., Storey, K. B., and Lushchak, V. I. (2005) Adaptive response of antioxidant enzymes to catalase inhibition by aminotriazole in goldfish liver and kidney. *Comp. Biochem. Physiol.*, **B142**, 335–341.
- Begley, T. P., Walts, A. E., and Walsh, C. T. (1986) Bacterial organomercurial lyase: overproduction, isolation, and characterization. *Biochemistry*, **25**, 7186–7192.
- Behne, D., Kyriakopoulos, A., Meinhold, H., and Kohrie, J. (1990) Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 1143–1149.
- Bell, J. G., Cowey, C. B., and Youngson, A. (1984) Rainbow trout liver microsomal lipid peroxidation. The effect of purified glutathione peroxidase, glutathione S-transferase and other factors. *Biochim. Biophys. Acta.*, **795**, 91–99.
- Benedict, S. R., Newton, E. B., and Behre, J. A. (1926) A new sulfur-containing compound (thiasine) in the blood. *J. Biol. Chem.* **67**, 267–277.
- Berry, M. L., Banu, L., and Larsen, P. R. (1991) Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature*, **349**, 438–440.
- 尾藤方通 (1974) メトミオグロビンの測定, 水産生物学・食品学実験書 (齋藤恒行, 内山均, 梅本滋, 河端俊治編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.275–280.
- Braddon, S. A., McIlvaine, C. M., and Balthrop, J. E. (1985) Distribution of GSH and GSH cycle enzymes in black sea bass (*Centropristis striata*). *Comp Biochem Physiol.*, **B80**, 213–216
- Burk, R. F. and Hill, K. E. (1994) Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein. *J. Nutr.*, **124**, 1891–1897.
- Carmagnol, F., Sinet, P. M., and Jerome, H. (1983) Selenium-dependent and nonselenium-dependent glutathione peroxidases in human tissue extracts. *Biochim. Biophys. Acta.*, **759**, 49–57.
- Chada, S., Le Beau, M. M., Casey, L., and Newburger, P.E. (1990) Isolation and chromosomal

- localization of the human glutathione peroxidase gene. *Genomics*, **6**, 268–271. PubMed PMID: 2307470.
- Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W., and Harrison, P. R. (1986) The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *EMBO J.*, **5**, 1221–1227.
- Clarkson, T. W. (1972) Recent advances in the toxicology of mercury with emphasis on the alkylmercurials. *Crit. Rev. Toxicol.*, **1**, 203–234.
- Combs, G. F., Jr. (1986) *The Role of Selenium in Nutrition*. Academic Press, New York, NY.
- Combs, G. F., Jr. (2001a) Impact of selenium and cancer-prevention findings on the nutrition-health paradigm. *Nutr. Cancer*, **40**, 6–11.
- Combs, G. F., Jr. (2001b) Selenium in global food systems. *Br. J. Nutr.*, **85**, 517–547.
- Combs, G. F., Jr., Midthune, D. N., Patterson, K. Y., Canfield, W. K., Hill, A. D., Levander, O. A., Taylor, P. R., Moler, J. E., and Patterson B. H. (2009) Effects of selenomethionine supplementation on selenium status and thyroid hormone concentrations in healthy adults. *Am. J. Clin. Nutr.*, **89**, 1808–1814.
- Clavin-Aralar, M. L., Furness, R. W. (1991) Mercury and selenium interaction: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **21**, 348–364.
- Djordjevic, J., Djordjevic, A., Adzic, M., and Radojicic, M. B. (2010) Chronic social isolation compromises the activity of both glutathione peroxidase and catalase in hippocampus of male wistar rats. *Cell Mol Neurobiol.*, **30**, 693–700.
- El-Bayoumy, K. (2001) The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutat. Res.*, **475**, 123–139.
- The European Food Safety Authority (EFSA) (2008) Selenium-enriched yeast as source for selenium added for nutritional purposes in foods for particular nutritional uses and foods (including food supplements) for the general population - Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food. *EFSA J.*, **766**, 1–42.
- FAO/WHO (2011) Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation on the Risks and Benefits of Fish Consumption. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations; Geneva, World Health Organization, 50 pp.
- Friberg, L. and Mottet, N. K. (1989) Accumulation of methylmercury and inorganic mercury in the brain. *Biol. Trace Elem. Res.*, **21**, 201–206.
- Friedman, M. A., Eaton, L. R., and Carter, W. H. (1978) Protective effects of freeze dried swordfish on methylmercury chloride toxicity in rats. *Bull. Environ. Cont. Toxicol.*, **19**, 436–443.
- Fukuhara, R. and Kageyama, T. (2005) Structure, gene expression, and evolution of primate glutathione peroxidases. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **141**, 428–436.

- Ganther, H. E., Goudie, C., Sunde, M., Kopeckey, M., Wagner, S., and Hoekstra, W. (1972) Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna. *Science*, **175**, 1122–1124.
- Ganther, H. E. and Sunde, M. L. (1974) Effect of tuna fish and selenium on the toxicity of methylmercury: a progress report. *J. Food Sci.*, **39**, 1–5.
- Ge, H., Cai, X. J., Tyson, J. F., Uden, P. C., Denoyer, E. R. and Block, E. (1996) Identification of selenium species in selenium-enriched garlic, onion and broccoli using high-performance ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Anal. Commun.*, **33**, 279–281.
- Ghose, A., Fleming, J., and Harrison, P. R. (2001) Selenium and signal transduction: roads to cell death and anti-tumour activity. *Biofactors*, **14**, 127–133.
- Gonzalez, P., Dominique, Y., Massabuau, J. C., Boudou, A., and Bourdineaud, J. P. (2005) Comparative effects of dietary methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle, and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 3972–3980.
- Gründemann, D., Harlfinger, S., Golz, S., Geerts, A., Lazar, A., Berkels, R., Jung, N., Rubbert, A., and Schümig, E. (2005) Discovery of the ergothioneine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 5256–5261.
- Graner, M. W., Alzate, O., Dechkovskaia, A. M., Keene, J. D., Sampson, J. H., Mitchell, D. A., and Bigner, D. D. (2009) Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *FASEB J.*, **23**, 1541–1557.
- Guindon, S. and Gascuel, O. (2003) A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.*, **52**, 696–704.
- Hannun, Y. A. (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*, **274**, 1855–1859.
- Hasunuma, R., Ogawa, T., and Kawanishi, Y. (1982) Fluorometric determination of selenium in nanogram amounts in biological materials using 2,3-diaminonaphthalene. *Anal. Biochem.*, **126**, 242–245.
- Hatfield, D. L., Berry, M. J., and Gladyshev, V. N. (2006) Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health, 2nd Ed., pp.1–419, Springer, New York, NY.
- Himeno, S. and Imura, N. (2000) New aspects of physiological and pharmacological roles of selenium. *J. Health Sci.*, **46**, 1–6.
- 姫野誠一郎 (1994) セレン, ミネラル／微量元素の栄養学 (鈴木継美・和田攻編), 第一出版, 東京, pp.423–445.
- Hostetler, C. E., Michal, J., Robison, M., Ott, T. L., Kincaid, R. L. (2006) Effect of selenium intake and fetal age on mRNA levels of two selenoproteins in porcine fetal and maternal liver. *J Anim Sci.*, **84**, 2382–2390.

- Itano, K., Kawai, S., and Tatsukawa, R. (1985) Properties of mercury and selenium in salt-insoluble fraction of muscles in striped dolphin. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 1129–1131.
- Jackson, M. I., and Combs, G. F. Jr. (2008) Selenium and anticarcinogenesis: underlying mechanisms. *Curr. Opin. Clin. Nutr. and Metab. Care*, **11**, 718–726.
- Kai, N., Tsuda, T., Sakai, T., Murata, H., Hamada, M., Tanoue, Y., and Nagai, T. (1995) Glutathione peroxidase activity in the blood of tunas and marlins. *Fish. Sci.*, **61**, 867–870.
- 環境省 (2004) 水銀分析マニュアル.
- Kato, Y., Kubo, Y., Iwata, D., Kato, S., Sudo, T., Sugiura, T., Kagaya, T., Wakayama, T., Hirayama, A., Sugimoto, M., Sugihara, K., Kaneko, S., Soga, T., Asano, M., Tomita, M., Matsui, T., Wada, M., and Tsuji, A. (2010) Gene knockout and metabolome analysis of carnitine/organic cation transporter OCTN1. *Pharm. Res.*, **27**, 832–840.
- 川上義和 (1986) ビタミンEと呼吸器疾患, *CLINICIAN*, **356**, 63–66.
- 経済産業省 (2006) セレン及びその化合物, 有害性評価書, Ver. 0.4, No.128 (高月峰夫編), 新エネルギー・業技術総合開発機構.
- <http://www.meti.go.jp/committee/materials/downloadfiles/g71205c05j.pdf> (2011/01/14).
- Kiremidjian-Schumacher, L. and Roy, M. (2001) Effect of selenium on the immunocompetence of patients with head and neck cancer and on adoptive immunotherapy of early and established lesions, *Biofactors.*, **14**, 161–168.
- Kobayashi, Y., Ogra, Y., Ishiwata, K., Takayama, H., Aimi, N., and Suzuki, K. T. (2002) Selenosugars are key and urinary metabolites for selenium excretion within the required to low-toxic range. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **39**, 15932–15936.
- Koepsell, H., Lips, K., and Volk, C. (2007) Polyspecific organic cation transporters, structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm. Res.*, **24**, 1227–1250.
- Koh, A. S., Simmons-Willis, T. A., Pritchard, J. B., Grassl, S. M., and Ballatori, N. (2002) Identification of a mechanism by which the methylmercury antidotes N-acetylcysteine and dimercaptopropane sulfonate enhance urinary metal excretion: transport by the renal organic anion transporter-1. *Oat1. Mol. Pharmacol.*, **62**, 921–926.
- Kolayi, S., Arikan, M., Uzunosmanoglu, D., Vanizor, B., Kiran, E., and Sagban, R. (1997) Comparative studies on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in different fish species. *Tr. J. Zool.*, **21**, 171–173.
- 小長谷史郎 (1982) 異常性状の魚肉-ジェリーミートとヤケ肉. 日本食品工業学会誌, **29**, 379–388.
- Korbas, M., Blechinger, S. R., Krone, P. H., Pickering, I. J., and George, G. N. (2008) Localizing organomercury uptake and accumulation in zebrafish larvae at the tissue and cellular level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 12108–12112.
- 厚生労働省 (2004) 日本人の食事摂取基準. <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2004/11/h1122-2.html>

厚生労働省 (2009) 魚介類に含まれる水銀の調査結果.

<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2010/05/s0518-8.html>

Kruh, G. D. and Belinsky, M. G. (2003) The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene*, **22**, 7537–7552.

Kryukov, G. V. and Gladyshev, V. N. (2000) Selenium metabolism in zebrafish: multiplicity of selenoprotein genes and expression of a protein containing 17 selenocysteine residues. *Genes Cells*, **5**, 1049–1060.

Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehtab, O., Guigo, R., and Gladyshev, V. N. (2003) Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, **300**, 1439–1443.

Madejczyk, M. S., Aremu, D. A., Simmons-Willis, T. A., Clarkson, T. W., and Ballatori, N. (2007) Accelerated urinary excretion of methylmercury following administration of its antidote N-acetylcysteine requires mrp2/abcc2, the apical multidrug resistance-associated protein. *J. Pharm. Exp. Therap.*, **322**, 378–384.

Maher, J. M., Slitt, A. L., Cherrington, N. J., Cheng, X., and Klaassen, C. D. (2005) Tissue distribution and hepatic and renal ontogeny of the multidrug resistance-associated protein (Mrp) family in mice. *Drug. Metab. Dispos.*, **33**, 947–955.

又平芳春, 菊地数晃 (2000) 魚肉由来の有機セレンを含有する食品素材, 及び該食品素材を含有する食品. 日本国特許, 特開 2001-231498 号.

Maniatis, T. (1993) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.

Mathias, S., Younes, A., Kan, C.-C., Orlow, I., Joseph, C., and Kolesnick, R. N. (1993) Activation of the sphingomyelin signaling pathway in intact EL4 cells and in a cell-free system by IL-1 beta. *Science*, **259**, 519–522.

Mills, G. C. (1957) Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.*, **229**, 189–197.

Mills, G. C. (1958) The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **234**, 502–506.

Miwa, T., Adachi, T., Ito, Y., and Hirano, K. (1983) Purification and properties of glutathione peroxidase from human liver. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 179–185.

Motoyama, N., Naka, K. (2004) DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr. Opin. Gen. . Dev.*, **14**, 11–16.

Mozaffarian, M. D. and Rimm, E. D. (2006) Fish intake, contaminants, and human health, evaluating the risks and the benefits. *JAMA*, **296**, 1885–1889.

Mozaffarian, M. D. (2009) Fish, mercury, selenium and cardiovascular risk: current evidence and unanswered questions. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **6**, 1894–1916.

- Mustacich, D. and Powis, G. (2000) Thioredoxin reductase. *Biochem. J.*, **346** Pt 1, 1–8.
- Nagai, T., Inada, J., Hamada, M., Kai, N., Tanoue, Y., Kaminishi, Y., Nakagawa, H., Fujiki, K., and Nakao, M. (1999) Distribution of glutathione peroxidase activity in fish. *Fish. Sci.*, **65**, 665–666.
- Nagai, T., Yukimoto, T., and Suzuki, N. (2002) Glutathione peroxidase from the liver of Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus*. *Z. Naturforsch.*, **57c**, 172–176.
- Nakano, T., Sato, M., and Takeuchi, M. (1992) Glutathione peroxidase of fish. *J. Food Sci.*, **57**, 1116–1119.
- Ng, P.-S., Ji, H., Matsumoto, K., Yamazaki, S., Kogure, T., Takagi, T., and Nagasawa, H. (2001) Striped dolphin detoxicates mercury as insoluble Hg (S, Se) in the liver. *Proc. Japan Acad.*, **77**, 178–183.
- Nigro, M. and Leonzio, C. (1996) Intracellular storage mercury and selenium in different marine vertebrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **135**, 137–143.
- Nilsson, R., Schultz, I. J., Pierce, E. L., Soltis, K. A., Naranuntarat, A., Ward, D. M., Baughman, J. M., Paradkar, P. N., Kingsley, P. D., Culotta, V. C., Kaplan, J., Palis, J., Paw, B. H., and Mootha, V. K. (2009) Discovery of genes essential for heme biosynthesis through large-scale gene expression analysis. *Cell Metab.*, **10**, 119–130.
- Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., Cambon, B., Legras, J. L., Wincker, P., Casaregola, S., and Dequin, S. (2009) Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **106**, 16333–16338.
- O'Brien P. J. and Little C. (1969) Intracellular mechanisms for the decomposition of a lipid peroxide. II. Decomposition of a lipid peroxide by subcellular fractions. *Can. J. Biochem.*, **47**, 493–499.
- Ohi, G., Nishigaki, S., Seki, H., Tamura, Y., Mizoguchi, I., Yagyu, H., and Nagashima, K. (1976) Efficacy of selenium in tuna and selenite in modifying methylmercury intoxication. *Environ. Res.*, **12**, 49–58.
- Okazaki, T., Bell, R. M., and Hannun, Y. A. (1989) Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation. *J. Biol. Chem.*, **264**, 19076–19080.
- Oki, T., Osame, M., Matsuda, M., Kobayashi, M., Furuta, S., Nishiba, Y., Kumagai, T., Sato, T., and Suda, I. (2003) Simple and rapid spectrophotometric method for selecting purple-fleshed sweet potato cultivars with a high radical-scavenging activity. *Breed. Sci.*, **53**, 101–107.
- Palmisano, F., Cardellicchio, N., and Zambonin, P. G. (1995) Speciation of mercury in dolphin liver: a two-stage mechanism for the demethylation accumulation process and role of selenium. *Mar. Environ. Res.*, **40**, 109–121.
- Paulusma, C. C., Bosma, P. J., Zaman, G. J., Bakker, C. T., Otter, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Borst, P., and Oude Elferink, R. P. (1996) Congenital jaundice in rats with a mutation in multidrug resistance-associated protein gene. *Science*, **271**, 1126–1128.
- Perez-Campo, R., Lopez-Torres, M., Rojas, C., Cadenas, S., and Barja, G. (1993) A comparative study of

- free radicals in vertebrates—I. antioxidant enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, **B105**, 749–755.
- Postlethwait, J., Yan, Y., Gates, M., Horne, S., Amores, A., Brownlie, A., Donovan, A., Egan, E., Force, A., and Gong, Z., (1998) Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat. Genet.*, **18**, 345–349.
- Potter, S., and Matrone, G. (1974) Effect of selenite on the toxicity of dietary methylmercury and mercuric chloride in the rat. *J. Nutr.*, **104**, 638–647.
- Prohaska, J. R. and Ganther, H. E. (1977) Interactions between selenium and methylmercury in rat brain. *Chem. Biol. Interact.*, **16**, 155–167.
- Raines, A. M. and Sunde, R. A. (2011) Selenium toxicity but not deficient or supernutritional selenium status vastly alters the transcriptome in rodents. *BMC Genomics*, **12**, 26–40.
- Ralston, N. V. C., Blackwell, J. L., and Raymond, L. J. (2007) Importance of molar ratios in selenium-dependent protection against methylmercury toxicity. *Biol. Trace Elem. Res.*, **119**, 255–268.
- Ralston, N. V. C., Ralston, C. R., Blackwell, J. L., and Raymond, L. J. (2008) Dietary and tissue selenium in relation to methylmercury toxicity. *Neurotoxicology*, **29**, 802–811.
- Ralston, N. V. C. and Raymond, L. J. (2010) Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity. *Toxicology*, **278**, 112–123.
- Raymond, L. J. and Ralston, N. V. C. (2004) Mercury: selenium interactions and health implications. *Seychelles Med. Dent. J.*, **7**, 52–56.
- Reyes, L. H., Rahman, G. M. M., and Kingston, H. M. S. (2009) Robust microwave-assisted extraction protocol for determination of total mercury and methylmercury in fish tissues. *Anal. Chim. Acta*, **631**, 121–128.
- Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., and Hoekstra, W. G. (1972) Prevention of oxidative damage to rat erythrocytes by dietary selenium. *J. Nutr.*, **102**, 689–696.
- Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., and Hoekstra, W. G. (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, **179**, 588–590.
- Salonen, J.T., Alfthan, G., Huttunen, J. K., Pikkarainen, J., and Puska, P. (1982) Association between cardiovascular death and myocardial infarction and serum selenium in a watched-pair longitudinal study. *Lancet*, **2**, 175–179.
- Samson, J. C., Goodridge, R., Olobatuyi, F., and Weis, J. S. (2001) Delayed effects of embryonic exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to methylmercury (MeHg). *Aquat. Toxicol.*, **51**, 369–376.
- Simmons-Willis, T. A., Koh, A. S., Clarkson, T. W., and Ballatori, N. (2008) The methylmercury-L-cysteine conjugate is a substrate for the L-type large neutral amino acid transporter. *J. Neurochem.*, **107**, 1083–1090.
- Skerfving, S. (1978) Interaction between selenium and methylmercury. *Environ. Health Perspect.*, **25**,

57–65.

- Stillings, B. R., Lagally, H., Bauerschild, P., and Soares, J. (1974) Effect of cysteine, selenium and fish protein on the toxicity and metabolism of methylmercury in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **30**, 243–254.
- Stoewsand, G. S., Bache, C. A., and Liske, D. J. (1974) Dietary selenium protection of methylmercury intoxication of Japanese quail. *Bull. Environ. Cont. Toxicol.*, **11**, 152–156.
- Sukenaga, Y., Ishida, K., Takeda, T., and Takagi, K. (1987) cDNA sequence coding for human glutathione peroxidase.1. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 71–78.
- Sumino, K., Yamamoto, R., and Kitamura, S. (1977) A role of selenium against methylmercury toxicity. *Nature*, **268**, 73–74.
- Suzuki, K. T., Doi, C., and Suzuki, N. (2006) Metabolism of ⁷⁶Se-methylselenocysteine compared with that of ⁷⁷Se-selenomethionine and ⁸²Se-selenite. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **217**, 185–195.
- Suzuki, T., Imura, N., and Thomas, W. (1991) *Advances in Mercury Toxicology*. Plenum Press, New York, NY.
- 鈴木継美, 今井秀樹, 小林香苗, 本郷哲郎, 柏崎浩, 大塚柳太郎, 鈴木久乃, 石井裕美 (1988) 日本人のセレン摂取量. *日本栄養・食糧学会誌*, **41**, 91–102.
- Tamai, I., Yabuuchi, H., Nezu, J., Sai, Y., Oku, A., Shimane, M., and Tsuji, A. A. (1999) Cloning and characterization of a novel human pH dependent organic cation transporter, OCTN. *FEBS Lett.*, **419**, 107–111.
- Tan, M., Li, S., Swaroop, M., Guan, K., Oberley, L.W., and Sun, Y. (1999) Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 12061-12066.
- Tanret, C. (1909) *J. Pharm. Chim.*, **30**, 145-153.
- Taubert, D., Grimberg, G., Jung, N., Rubbert, A., and Schümig, E. (2005) Functional role of the 503F variant of the organic cation transporter OCTN1 in Crohn's disease. *Gut*, **54**, 1505–1506.
- Thompson, J. L., Thomas, P. M., and Schuller, K. A. (2006) Purification and properties of a glutathione peroxidase from Southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, **B144**, 86–93.
- Thompson, J. L., See, V. H. L., Thomas, P. M., and Schuller, K. A. (2010) Cloning and characterization of two glutathione peroxidase cDNAs from Southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **B156**, 287–297.
- Thongboonkerd, V., Luengpailin, J., Cao, J., Pierce, W. M, Cai, J., Klein, J. B., and Doyle, R. J. (2002) Fluoride exposure attenuates expression of *Streptococcus pyogenes* virulence factors. *J. Biol. Chem.*, **277**, 16599–16605.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., and

- Simons, M. (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, **319**, 1244–1247.
- van Rij, A. M., Tomson, C. D., McKenzie, L. J. M., and Robinson, M. F. (1979) Selenium deficiency in total parenteral nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 2076–2085.
- Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W. D., Grant, S., Birrer, M. J., Szabo, E., Zon, L. I., Kyriakis, J. M., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., and Kolesnick, R. N. (1996) Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature*, **380**, 75–79.
- Watanabe, C., Yoshida, K., Kasanuma, Y., Kun, Y., and Satoh, H. (1999) In utero methylmercury exposure differentially affects the activities of selenoenzymes in the fetal mouse brain. *Environ. Res.*, **80**, 208–214.
- Watanabe, F., Goto, M., Abe, K., and Nakano, Y. (1996) Glutathione peroxidase activity during storage of fish muscle. *J. Food Sci.*, **61**, 734–735.
- Watkinson, J. H. (1966) Fluorometric determination of selenium in biological material with 2,3-diaminonaphthalene. *Anal. Chem.*, **38**, 92–97.
- Weber, D. N., Connaughton, V. P., Dellinger, J. A., Klemer, D., Udvardia, A., and Carvan, M. J. 3rd. (2008) Selenomethionine reduces visual deficits due to developmental methylmercury exposures. *Physiol. Behav.*, **93**, 250–260.
- Weber, G. J., Choe, S. E., Dooley, K. A., Paffett-Lugassy, N. N., Zhou, Y., and Zon, L. I. (2005) Mutant-specific gene programs in the zebrafish. *Blood*, **106**, 521–530.
- Westerfield, M. (1995) *The Zebrafish Book*. University of Oregon Press, Corvallis, OR.
- Wilber, C. G. (1980) Toxicology of selenium: a review. *Clin. Toxicol.*, **17**, 171–230.
- Wu, X., Huang, K., Wei, C., Chen, F., Pan, C. (2010) Regulation of cellular glutathione peroxidase by different forms and concentrations of selenium in primary cultured bovine hepatocytes. *J. Nutr. Biochem.*, **21**, 153–161.
- Xu, J. and Yadan, J. C. (1995) Synthesis of l-(+)-ergothioneine. *J. Org. Chem.*, **60**, 6296–6301.
- Yabu, T., Imamura, S., Yamashita, M., and Okazaki, T. (2008) Identification of Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase 1 as a mediator of heat stress-induced ceramide generation and apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **283**, 29971–29982.
- 矢口直之, 遠藤猛 (2000) SOD と NO およびグルタチオン代謝のクロストークによるレドックス制御, 酸化ストレス・レドックスの生化学 (矢口直之・淀井淳司編), 共立出版, 東京, pp. 1-11.
- 山口賢次 (1994) 微量元素欠乏症とその把握法, ミネラル/微量元素の栄養学 (鈴木継美・和田攻編), 第一出版, 東京, pp.129–130.
- Yamashita, M. and Konagaya, S. (1990) High activities of cathepsins B, D, H, and L in the white muscle of chum salmon in spawning migration. *Comp. Biochem. Physiol.*, **B95**, 149–152.

- Yamashita, M., Mizusawa, N., Hojo, M., and Yabu, T. (2008) Extensive apoptosis and abnormal morphogenesis in pro-caspase-3 transgenic zebrafish during development. *J. Exp. Biol.*, **211**, 1874–1881.
- Yamashita, Y., Omura, Y., and Okazaki, E. (2005) Total mercury and methylmercury levels in commercially important fishes in Japan. *Fish. Sci.*, **71**, 1029–1035.
- 山下倫明 (1993) Studies on cathepsins in the muscle of chum salmon. 中央水産研究所報告., **5**, pp.9-114.
- 山下由美子 (1994) 魚肉中の微量必須元素に関する食品化学的研究, 平成 5 年度水産物利用加工試験研究成績・計画概要集, 水産庁中央水産研究所, pp.10–11.
- 山下由美子 (1997) 魚肉中の微量必須元素に関する食品化学的研究, 平成 8 年度水産物利用加工試験研究成績・計画概要集, 水産庁中央水産研究所, pp.28–29.
- Yang, D. Y., Chen, Y. W., Gunn, J. M., and Belzile, N. (2008) Selenium and mercury in organisms: interactions and mechanisms. *Environ. Rev.*, **16**, 71–92.
- Yin, Z., Jiang, H., Syversen, T., Rocha, J. B., Farina, M., and Aschner, M. (2002) Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury-L-cysteine complex is a substrate for human L-type large neutral amino acid transporter (LAT) 1 and LAT2. *Biochem. J.*, **367**, 239–246.
- Yin, Z., Milatovic, D., Aschner, J. L., Syversen, T., Rocha, J. B., Souza, D. O., Sidoryk, M., Albrecht, J., and Aschner, M. (2007) Methylmercury induces oxidative injury, alterations in permeability and glutamine transport in cultured astrocytes. *Brain Res.*, **1131**, 1–10.
- Zimin, A. V., Delcher, A. L., Florea, L., Kelley, D. R., Schatz, M. C., Puiu, D., Hanrahan, F., Pertea, G., Van Tassel, C. P., Sonstegard, T. S., Marçais, G., Roberts, M., Subramanian, P., Yorke, J. A., Salzberg, S. L. (2009) A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*., *Genome Biol.*, **10**, R42.

Table 1-1. Chemical shifts of selenoneine (oxidized dimer) and L-(+)-ergothioneine* in ¹H NMR and ¹³C NMR spectra in D₂O

selenoneine	L-(+)-ergothioneine*	position
proton		
7.00	6.70	imidazol-4H
3.8	3.83	2H, 2'H
3.16	3.19	CH ₃
3.08	3.10	3H, 3'H
carbon		
170.1	173.1	C1
155.8	158.9	imidazol-5C
120.8	126.7	imidazol-2C
115.3	118.1	imidazol-4C
77.2	79.8	C2
52.2	54.8	N-methyl
23.5	25.4	C3

* Xu and Yadan (1995)

Table 1-2. DPPH radical scavenging activity of selenoneine

product	RS ₅₀ (μM)
Trolox™*	880
L-(+)-ergothioneine	1700
selenoneine	1.9

*Trolox™ is the water-soluble vitamin E-like antioxidant used for control.

Table 2-1. Speciation of water-soluble selenium compounds in the tissues of bluefin tuna and other animals based on LC-ICP-MS analysis. Contents of selenoneine, selenoproteins including GPx and selenoprotein P, and unidentified selenium compounds in the tissues of bluefin tuna, Pacific mackerel, tilapia, chicken, pig, and Japanese common squid are shown. 0.1 g of sample was homogenized with 5 × water, and 20 µl of supernatant was injected to HPLC-ICP-MS after 2–200× dilution with mobile phase (0.1M ammonium formate). Values are the mean ± SD of three individuals.

Species and tissue	Selenoneine nmol Se/g	Selenoproteins ^a nmol Se/g	Unidentified selenium compounds nmol Se/g
Bluefin tuna, farm-raised			
Blood	430 ± 82	24 ± 6.1	ND ^b
Spleen	41 ± 16	14 ± 2.5	4.0 ± 1.5
Hepatopancreas	39 ± 7.5	28 ± 12	2.2 ± 0.6
Heart	15 ± 15	4.8 ± 2.3	1.5 ± 1.0
Dark muscle	190 ± 8.0	4.5 ± 0.5	5.3 ± 1.7
White muscle	2.4 ± 0.3	1.4 ± 0.2	0.5 ± 0.1
Bluefin tuna, wild			
Blood	83 ± 29	28 ± 6.5	ND ^b
Pacific mackerel			
Blood	437 ± 159	56 ± 10	ND ^b
Tilapia			
Blood	0.9 ± 0.6	6.8 ± 3.2	0.55 ± 0.36
Chicken			
Liver	0.3 ± 0.1	6.7 ± 1.0	ND ^b
Heart	ND ^b	2.0 ± 0.4	1.8 ± 0.4
Gizzard	ND ^b	2.7 ± 0.5	ND ^b
Pig			
Liver	ND ^b	8.0 ± 1.2	5.0 ± 1.1
Kidney	0.36 ± 0.1	3.3 ± 1.5	ND ^b
Japanese common squid			
Hepatopancreas	9.3 ± 3.5	5.0 ± 1.1	7.0 ± 1.1

^a Selenoproteins eluted near the void volume of the column were estimated using bovine GPx as the standard.

^b ND, lower than detection limit at 0.25 nmol of Se/g.

Table 2-2. Cellular distribution of selenoneine in the bluefin tuna muscle

	selenoprotein (pmol/mg protein)	selenoneine (pmol/mg protein)	ratio of peak area for unidentified Se-compunds (%)
dark muscle			
cytosolic fraction	861	1434	5
microsomal fraction	248	37	10
mitochondrial fraction	41	21	20
white muscle			
cytosolic fraction	363	527	4
microsomal fraction	17	26	22
mitochondrial fraction	17	25	41

Table 2-3. Contents of selenoneine, total selenium and total mercury in the white muscle of fish

Species	Selenoneine nmol/g	Selenium nmol/g (mg/kg)	Mercury nmol/g (mg/kg)	Molar ratio of Se/Hg
Japanese conger <i>Conger myriaster</i>	ND	2.5 ± 1.1 (0.20)	0.17 ± 0.05 (0.03)	16
Pacific sardine <i>Sardinops melanostictus</i>	1.4 ± 0.6	4.1 ± 0.9 (0.33)	0.10 ± 0.0 (0.02)	42
Japanese anchovy <i>Engraulis japonica</i>	ND	3.1 ± 1.8 (0.25)	0.05 ± 0.03 (0.01)	96
Japanese barracuda <i>Sphyræna japonica</i>	0.1 ± 0.1	1.8 ± 0.2 (0.14)	0.04 ± 0.02 (0.01)	59
Chum salmon <i>Oncorhynchus keta</i>	ND	3.9 ± 0.3 (0.30)	0.09 ± 0.03 (0.02)	49
Greeneye <i>Chlorophthalmus albatrossis</i>	1.4 ± 0.5	5.3 ± 0.6 (0.43)	0.17 ± 0.07 (0.03)	28
Pacific saury <i>Cololabis saira</i>	ND	2.6 ± 0.4 (0.21)	0.30 ± 0.08 (0.06)	9
Alfonsino <i>Beryx splendens</i>	1.3 ± 0.5	18.1 ± 12.5 (1.44)	6.32 ± 2.43 (1.28)	3
Red sea bream <i>Pagrus major</i>	0.4 ± 0.1	3.7 ± 0.3 (0.29)	0.17 ± 0.04 (0.03)	24
White croaker <i>Pennahia argentata</i>	ND	3.6 ± 1.0 (0.28)	0.53 ± 0.32 (0.11)	7
Horse mackerel <i>Trachurus japonicus</i>	0.5 ± 0.2	5.0 ± 1.4 (0.40)	0.15 ± 0.0 (0.03)	34
Pacific mackerel <i>Scomber japonicus</i>	0.6 ± 0.2	3.4 ± 0.6 (0.27)	0.09 ± 0.02 (0.02)	39
Skipjack <i>Euthynnus pelamis</i>	1.0 ± 0.6	6.2 ± 3.4 (0.49)	0.66 ± 0.08 (0.13)	9
Yellowfin tuna <i>Thunnus albacares</i>	1.6 ± 0.5	9.4 ± 3.9 (0.76)	1.92 ± 1.22 (0.39)	10
Albacore <i>Thunnus alalunga</i>	1.7 ± 0.3	19.1 ± 8.3 (1.51)	1.12 ± 0.80 (0.23)	20
Pacific bluefin tuna <i>Thunnus orientalis</i>	2.4 ± 0.3	7.4 ± 1.1 (0.6)	0.84 ± 0.06 (0.17)	9
Bigeye tuna <i>Thunnus obesus</i>	2.6 ± 1.8	14.1 ± 6.6 (1.13)	2.20 ± 0.24 (0.45)	7
Swordfish <i>Xiphias gladius</i>	2.8 ± 0.6	6.6 ± 1.5 (0.53)	5.12 ± 1.54 (1.03)	1
Marbled sole <i>Pleuronectes yokohamae</i>	ND	1.4 ± 0.0 (0.11)	0.01 ± 0.9 (0.002)	217

Each value indicates the mean ± SD of three individuals, except for alfonsino and skipjack where five and four individuals were included.

ND, lower than detection limit at 0.05 nmol of Se/g.

Table 2-4. Total mercury, total selenium, selenoneine, and inorganic mercury levels in the plasma, erythrocyte, liver, and kidney of pantropical spotted dolphin *Stenella attenuata*

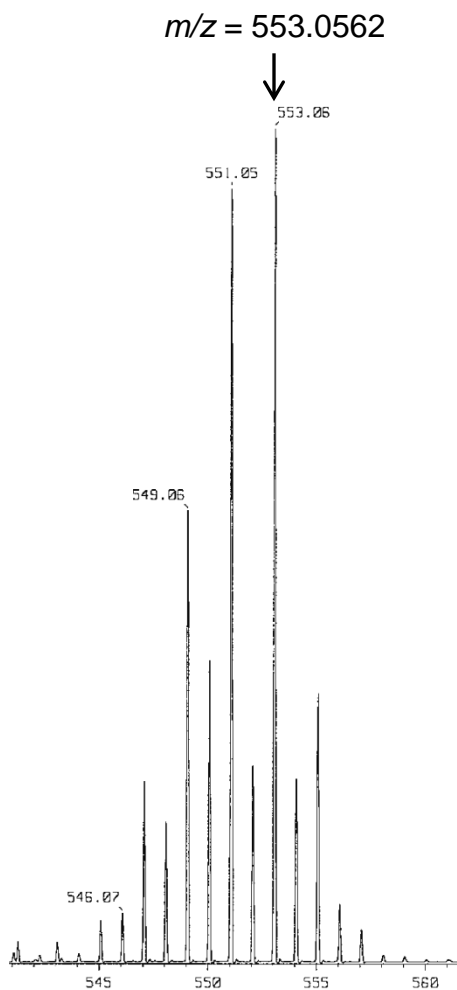
	total Hg mg/kg tissue	total Se mg/kg tissue	selenoneine mg Se/kg tissue
plasma	0.033 ± 0.006	1.06 ± 0.11	0.47 ± 0.22
erythrocyte	0.308 ± 0.185	2.92 ± 0.80	2.09 ± 1.22
liver	62.6 ± 39.4	27.6 ± 21.0	1.00 ± 0.37
kidney	28.4 ± 7.2	7.50 ± 1.24	8.62 ± 2.74

Each value indicates the mean ± SD of nine individuals.

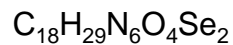
Table 4-1. Purification of GPx from the dark muscle of bluefin tuna

	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
1. crude extract	18700	56.0	0.006	1	100
2. DEAE Sephadex A-50	1266	19.5	0.031	5	35
3. DEAE Sephadex A-50	245	10.5	0.043	7	9
4. Sephacryl S-200	79	5.3	0.067	11	4.7
5. DEAE Sephadex A-50	20	5.3	0.067	44	4.7
6. Sephacryl S-200	2.3	2.2	0.94	156	1.9
7. Mono Q	0.25	0.9	3.39	565	0.8

A: observed ions



B: theoretical ion distribution



m/z = 553.0584

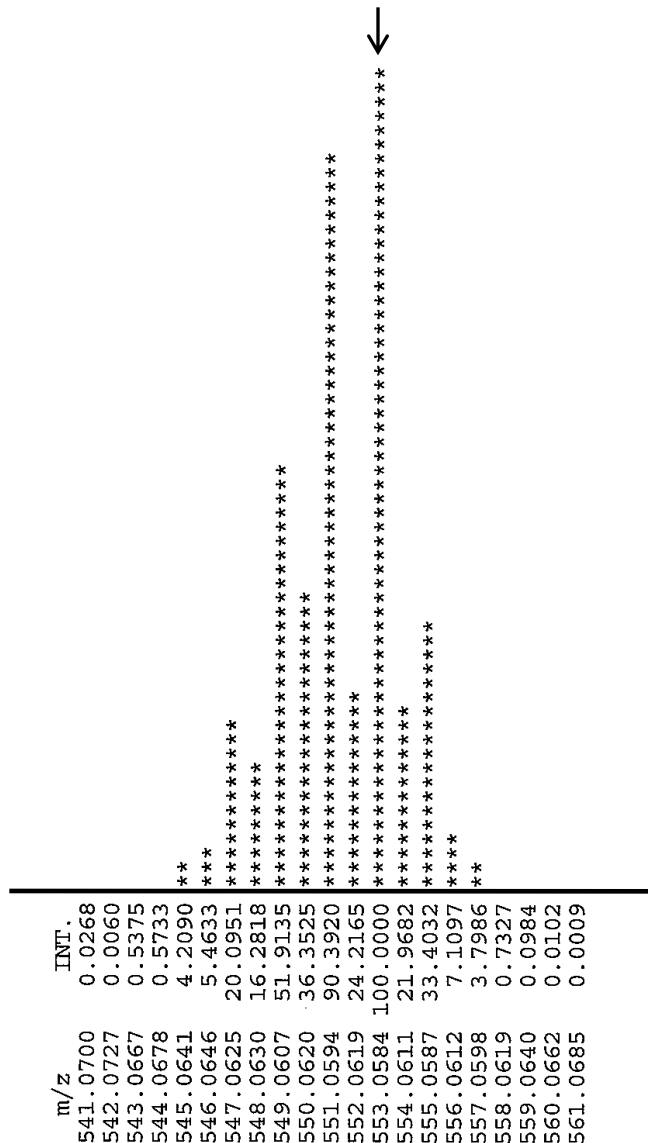


Figure 1-1. High resolution mass spectrometric identification of the selenium compound. The isotopic pattern of the purified compound (A) matched the theoretical isotopic pattern (B) of two selenium atoms calculated from the natural abundance of selenium isotopes.

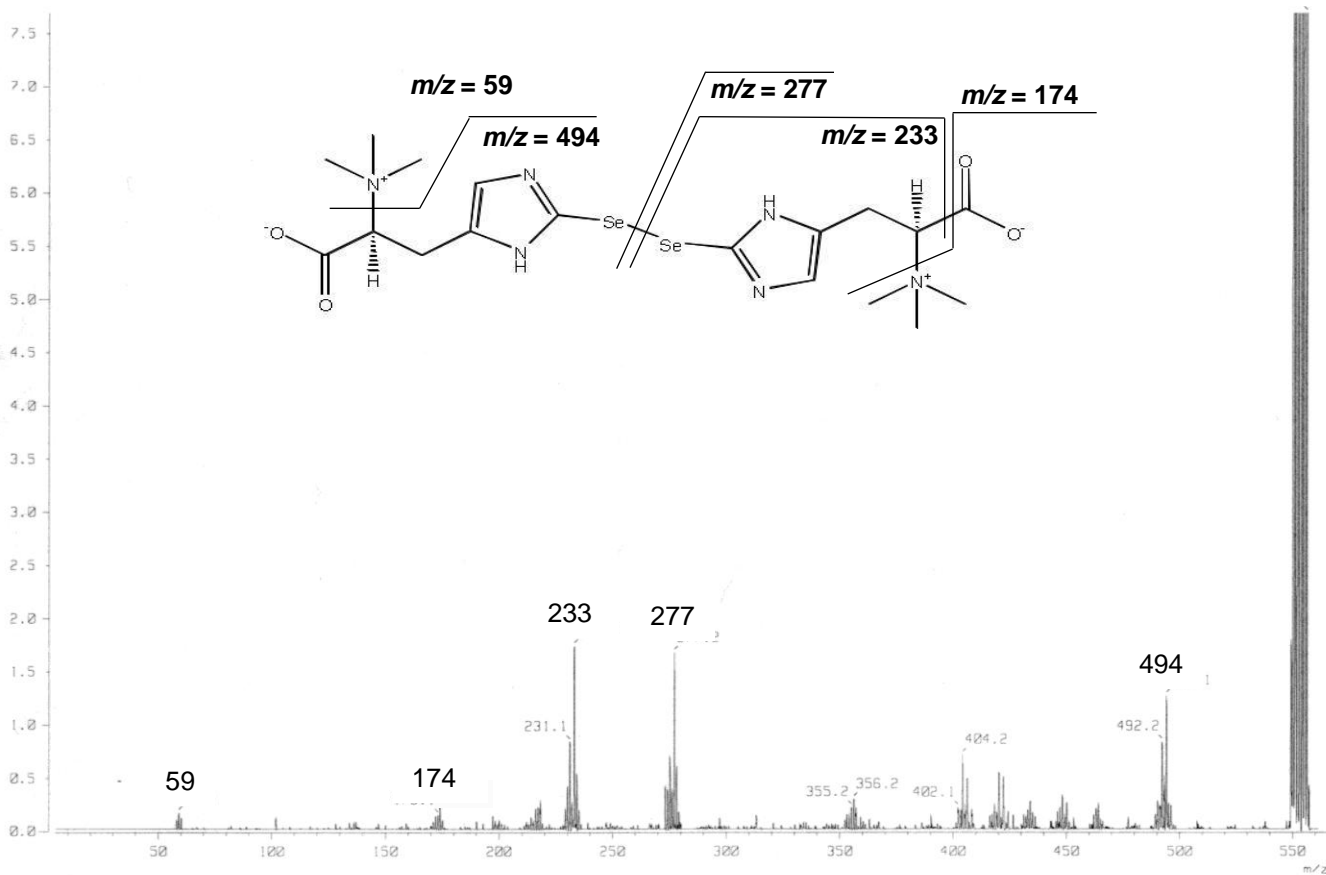


Figure 1-2. High resolution MS/MS analysis of the selenium compound. The daughter ions of m/z 553 were recorded on a JMS-700.

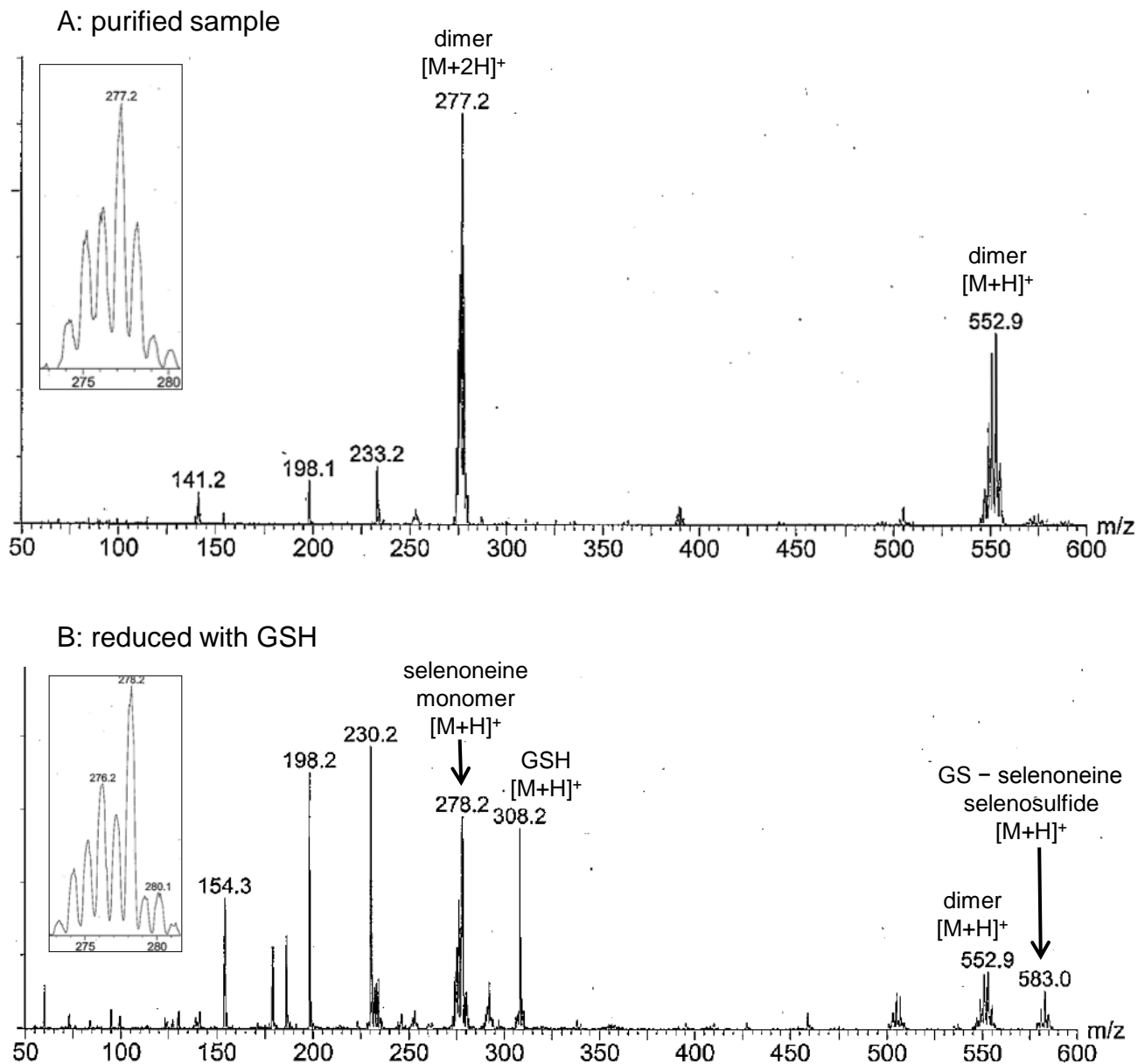


Figure 1-3. MS spectrum of the selenium compound. The MS spectrum of the purified sample (A) of oxidized dimer of selenoneine was recorded on a Quattro II at m/z 552.9. After reduction in the presence of 10 mM glutathione at 25°C for 30 min, the monomer of selenoneine was detected at m/z 278.2 (B). The inserts show the enlarged spectra around the peak at m/z 278.

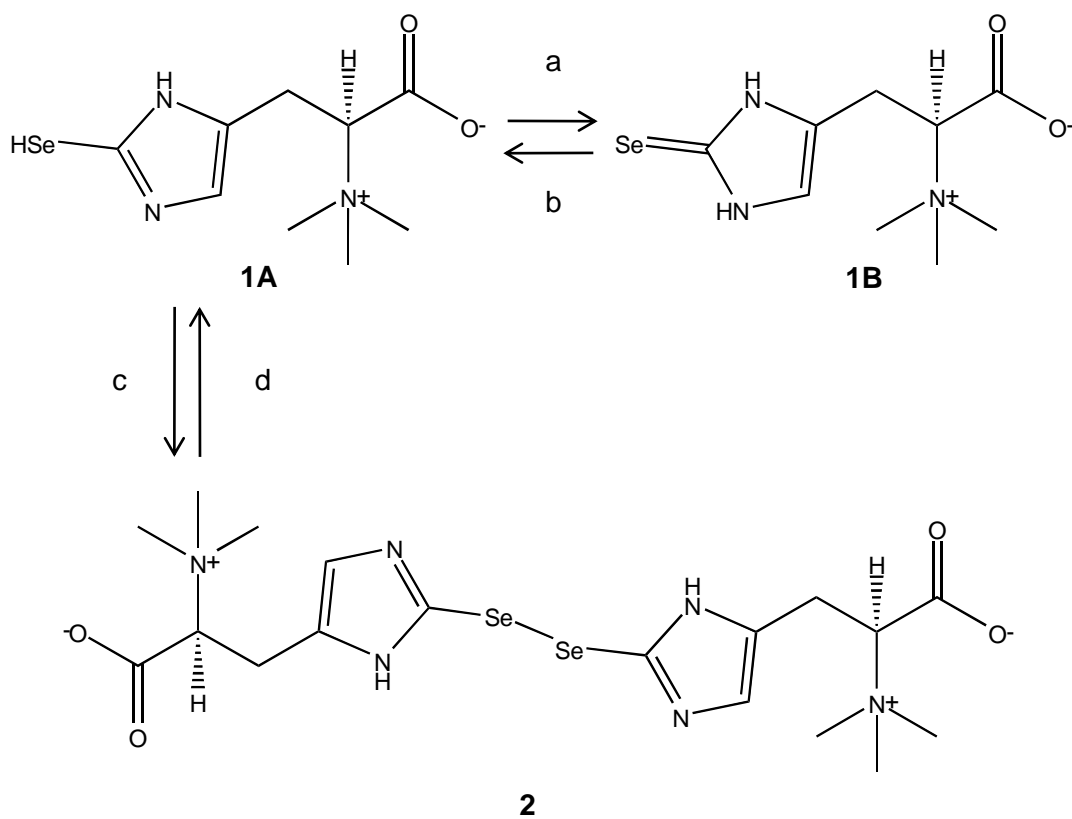
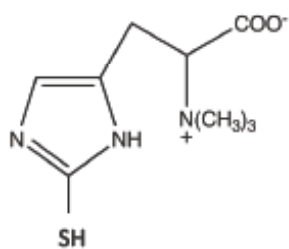


Figure 1-4. The chemical structure of the selenium-containing compound selenoneine (**1A**, **1B**) and its autoxidized dimer (**2**). Reagents and conditions: (a) water, methanol or acetonitrile, 0° C; (b) CH₂Cl₂ or THF, -20° C; (c) CH₂Cl₂, THF, room temperature; (d) water, 10 mM DTT or GSH, room temperature, 30 min.



Ergothioneine

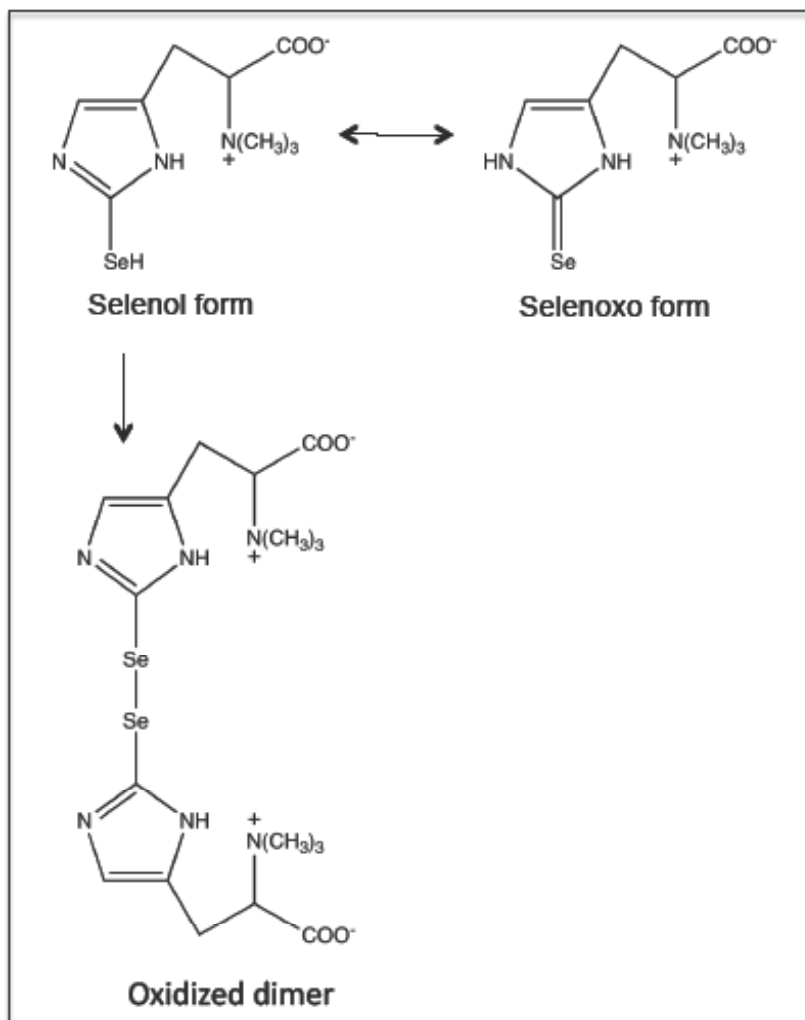


Figure 1-5. Chemical structure of ergothioneine and selenoneine. The monomeric form of the selenium compound was unstable under both cold and room temperature conditions. The extracted material containing the selenoketone of the selenium compound from the tuna tissues with acetonitrile/THF (1:1 in volume) to accelerate selenoketo-selenol tautomerization and formation of the oxidized dimeric form.

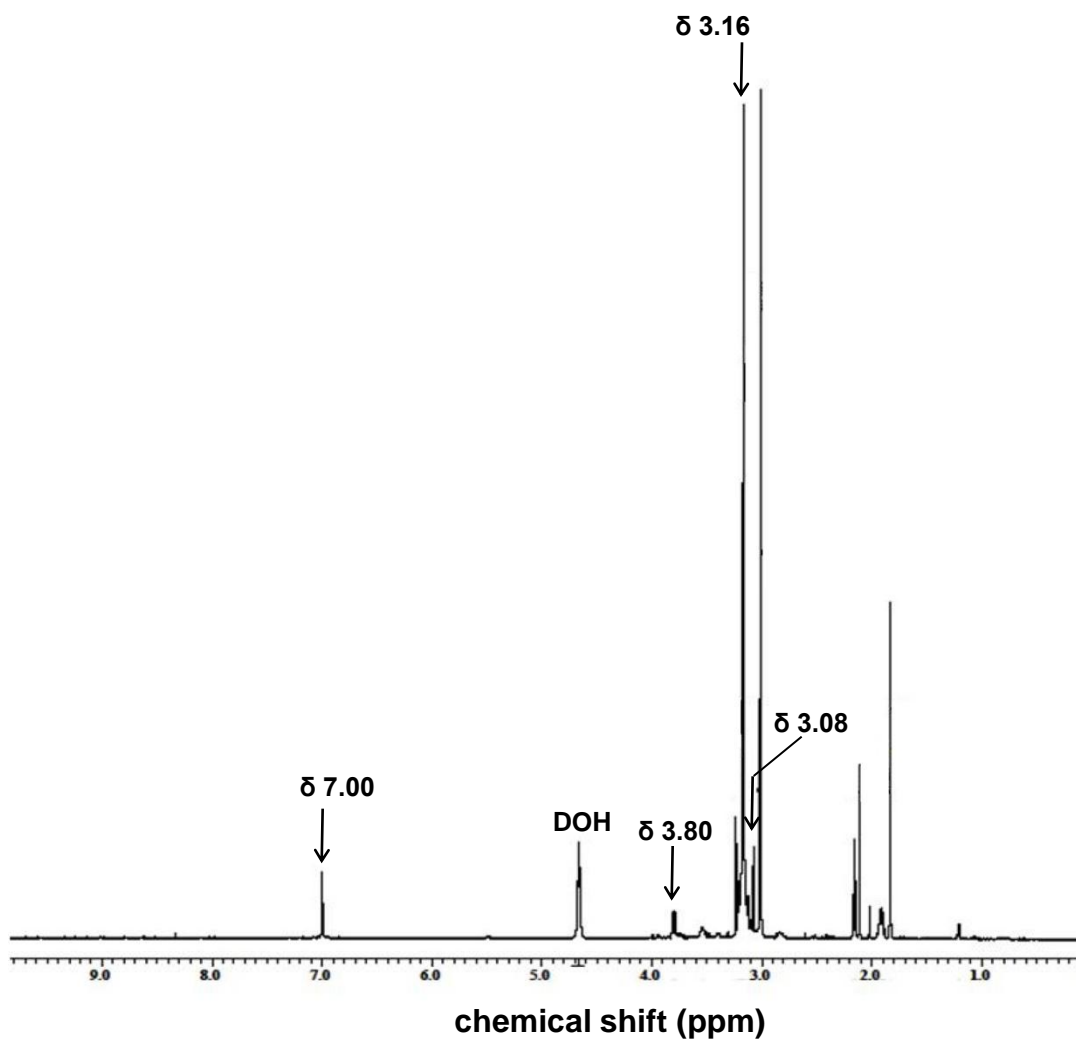
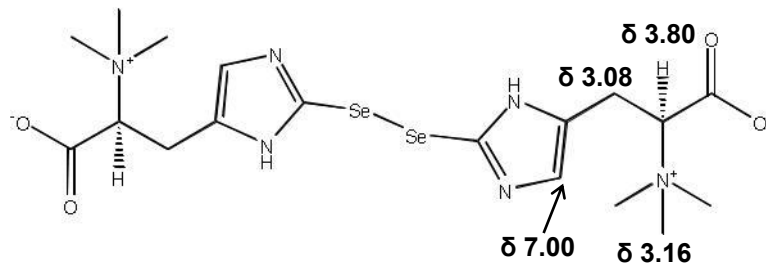


Figure 1-8. ¹H NMR spectrum of the selenium-containing compound. The spectrum of the purified dimer of selenoneine was recorded on a 500 MHz spectrometer (ECA500, JEOL, Tokyo, Japan) in D₂O as the solvent.

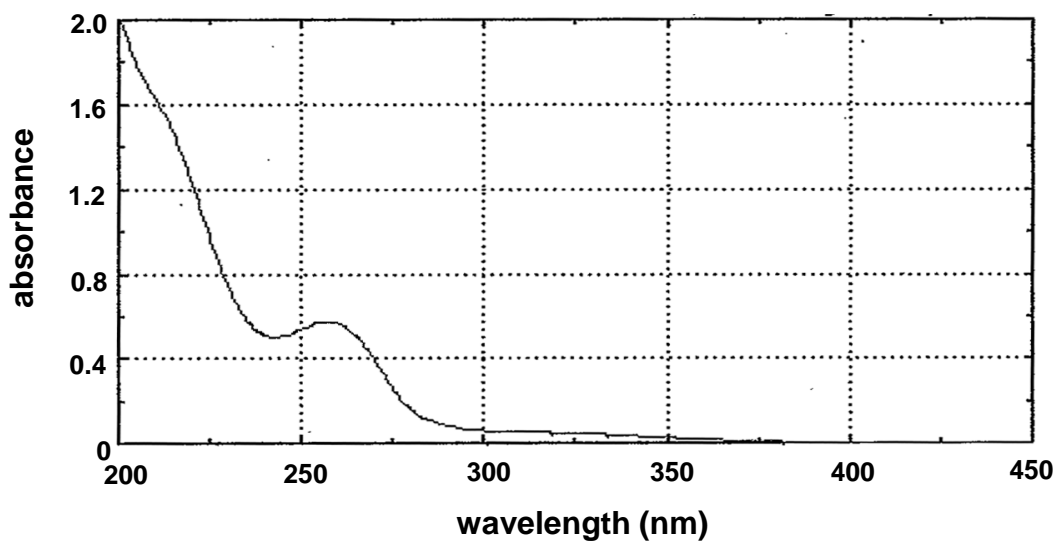


Figure 1-7. UV spectrum of the selenium-containing compound. The spectrum was recorded at the concentration of 1.1 mM of the purified dimer of selenoneine in distilled water.

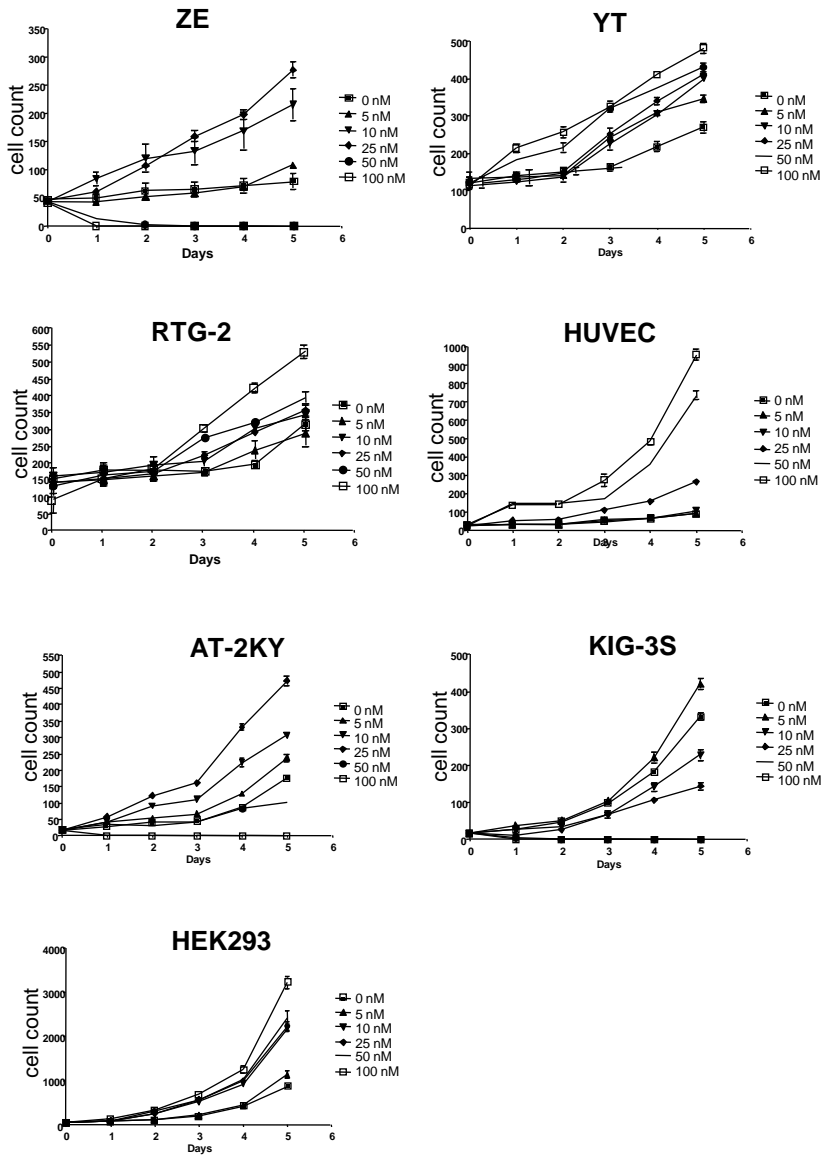


Figure 1-8. Cell proliferation-promoting effect of selenoneine.

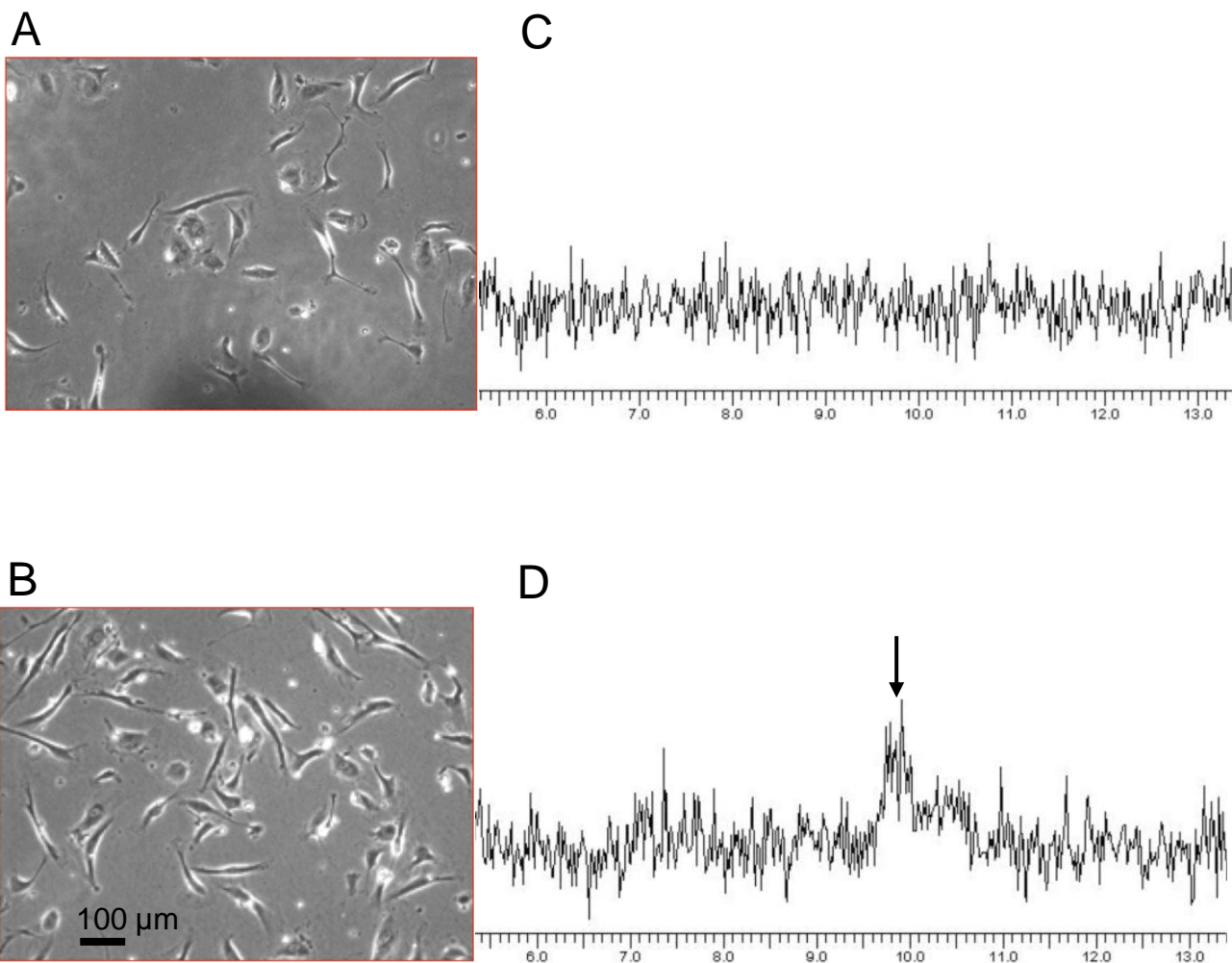


Figure 1-9. Effect of selenoneine on cell growth. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured by supplementation with 10% calf serum in the presence of selenoneine (50 μM , B and D) or its absence in the MCDB131 medium (A and C) at 37°C for 24 h. Cell extracts with distilled water were applied to HPLC-ICP-MS by monitoring ^{82}Se . An arrow shows a peak of selenoneine detected in the cell extract from the HUVEC cells with distilled water at the retention time of 10.5 min (D). Thus, selenoneine was incorporated into the cells and promoted cell growth.

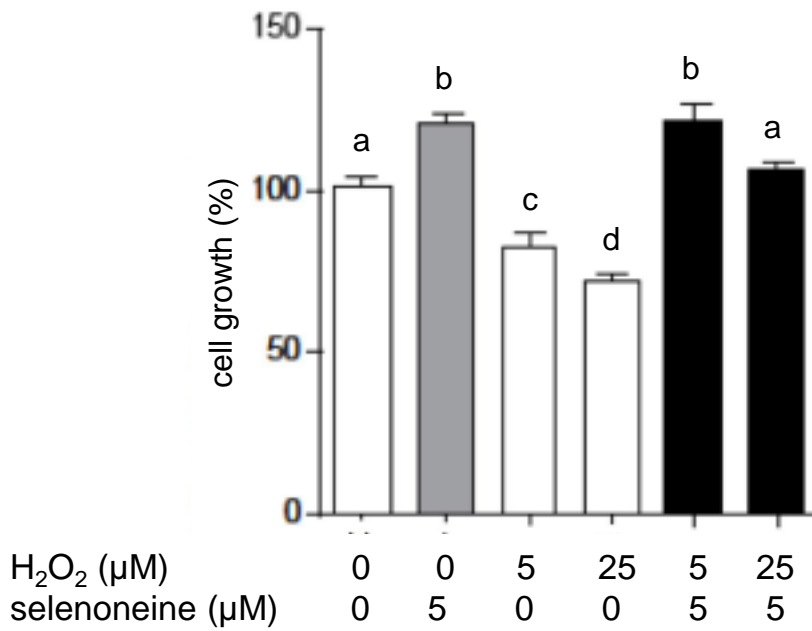


Figure 1-10. Anti-oxidant activity of selenoneine in normal human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). HUVEC were cultured by supplementation with 10% calf serum in the presence of selenoneine (5 μM or 25 μM, closed bars) or its absence (open bars) in the MCDB131 medium containing 5 or 25 μM hydrogen peroxide at 37°C for 24 h. a, b, c, and d indicate statistical significance (ANOVA; P<0.05)

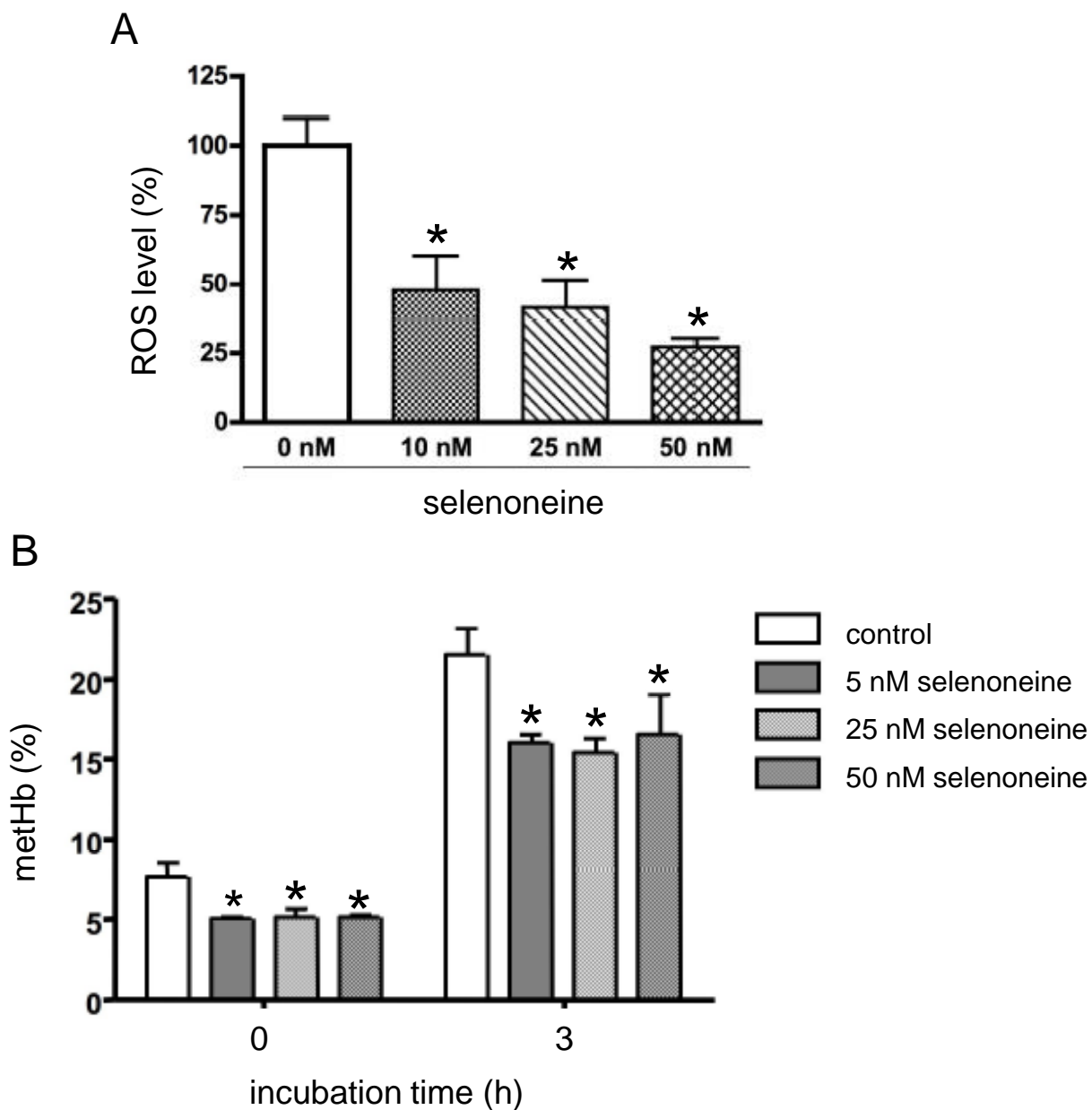


Figure 1-11. Anti-oxidant activity of selenoneine in the rabbit red blood cells. Rabbit erythrocytes were cultured in the presence of selenoneine (5 nM, 25 nM, and 50 nM, gray bars) or its absence (open bars) in RPMI medium at 37°C for 24 h. Selenoneine treatment reduced ROS production (A). Methemoglobin level was also reduced (B). Asterisks indicate statistical significance (ANOVA; $P < 0.05$)

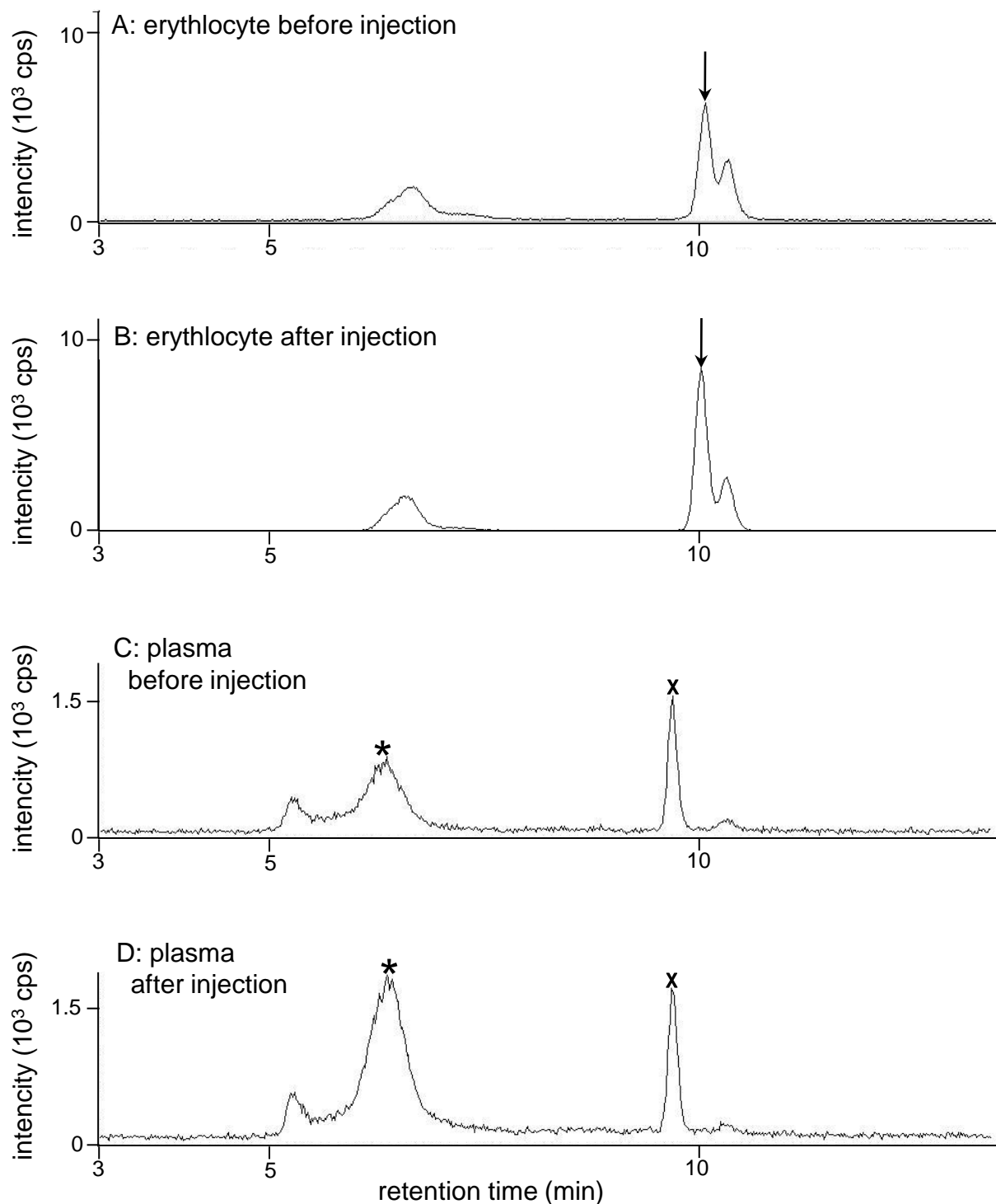


Figure 1-12. Speciation analysis of organic selenium in the yellowtail tissues by LC-ICP-MS. Selenium compounds in erythrocyte (A, B) and plasma (C, D) were analyzed before and after the injection of selenoneine into blood vessel. Arrows show the elution of selenoneine. Asterisks denote a peak of GPx-like selenoprotein. “x” denotes a peak of unidentified selenium compound.

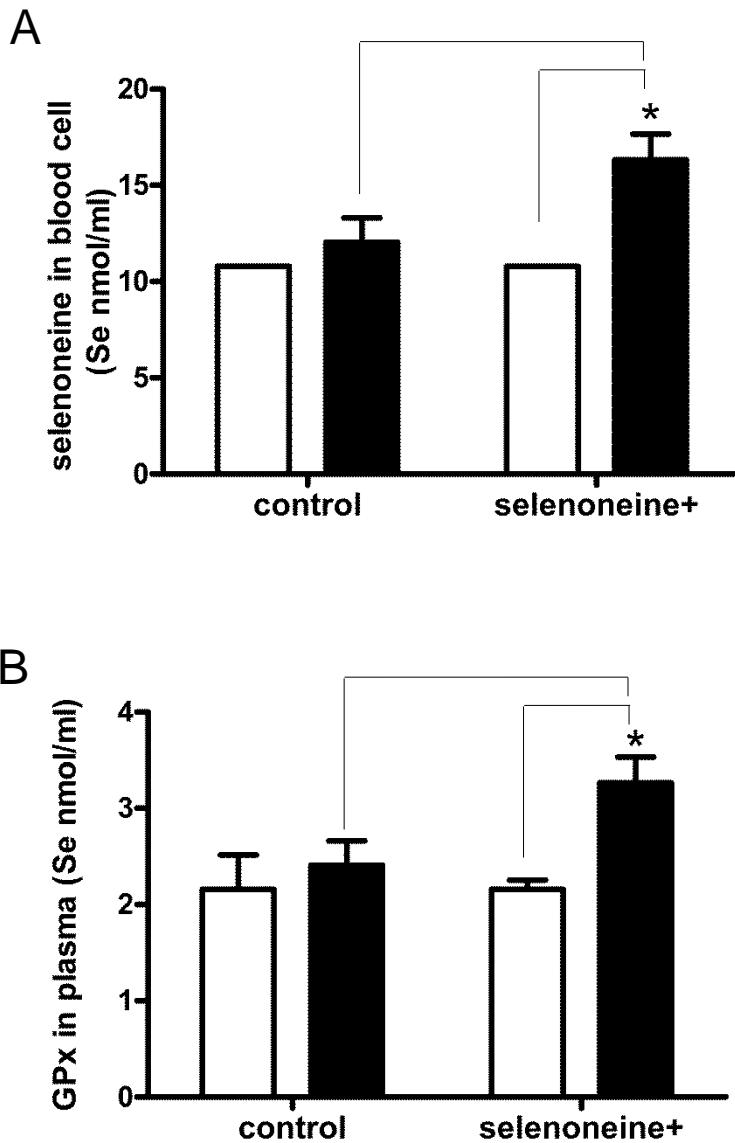


Figure 1-13. Contents of selenium compounds in red blood cells and plasma. Selenoneine levels in erythrocyte (A) and GPx levels in plasma (B) were determined before the selenoneine injection (open bar, n=4) and 18 h after the injection (closed bar, n=4). Asterisks indicate statistical significance (ANOVA, $P < 0.05$).

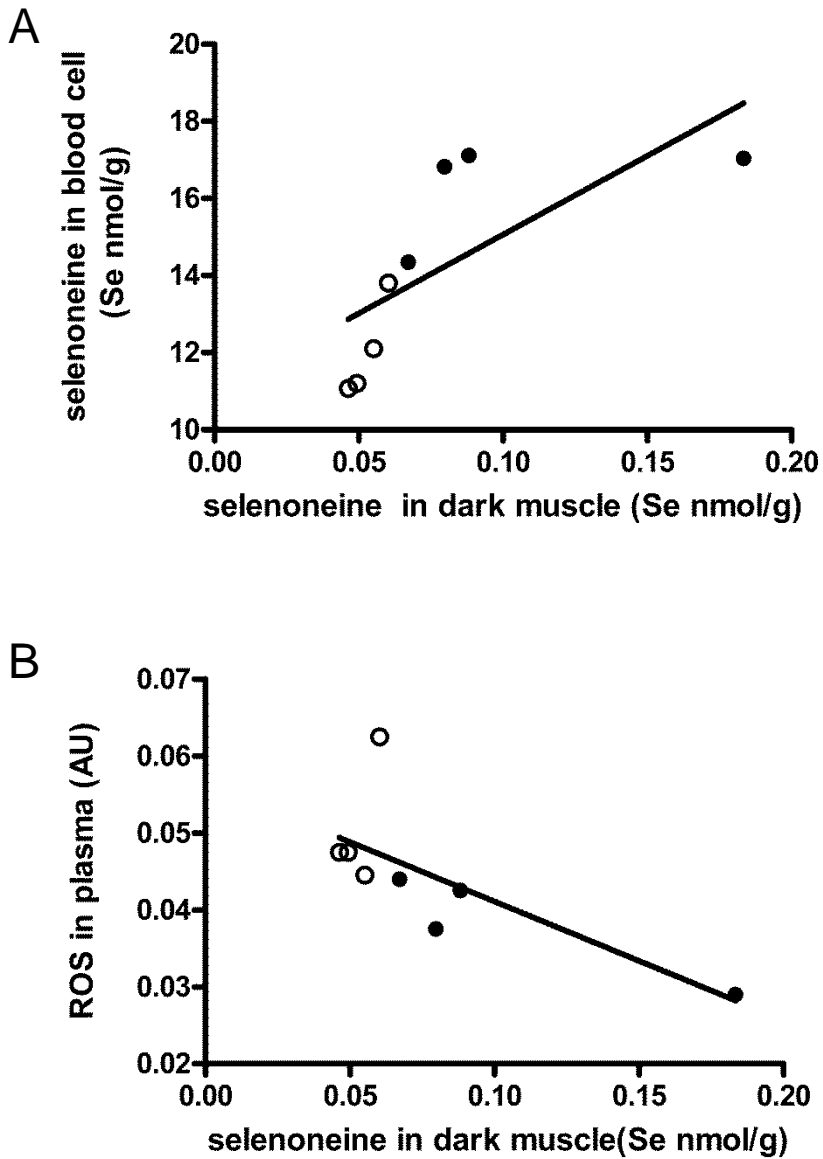


Figure 1-14. Relationship between selenoneine and ROS levels in yellowtail treated with selenoneine. (A) Correlation of selenoneine levels in erythrocyte with those in dark muscle. $R^2=0.529$. (B) Correlation between selenoneine levels and ROS levels in the dark muscle. $R^2=0.503$. Open circle: control fish injected with 1 ml of water (n=4). Closed circle: fish injected with selenoneine at 12 nmol/kg (n=4).

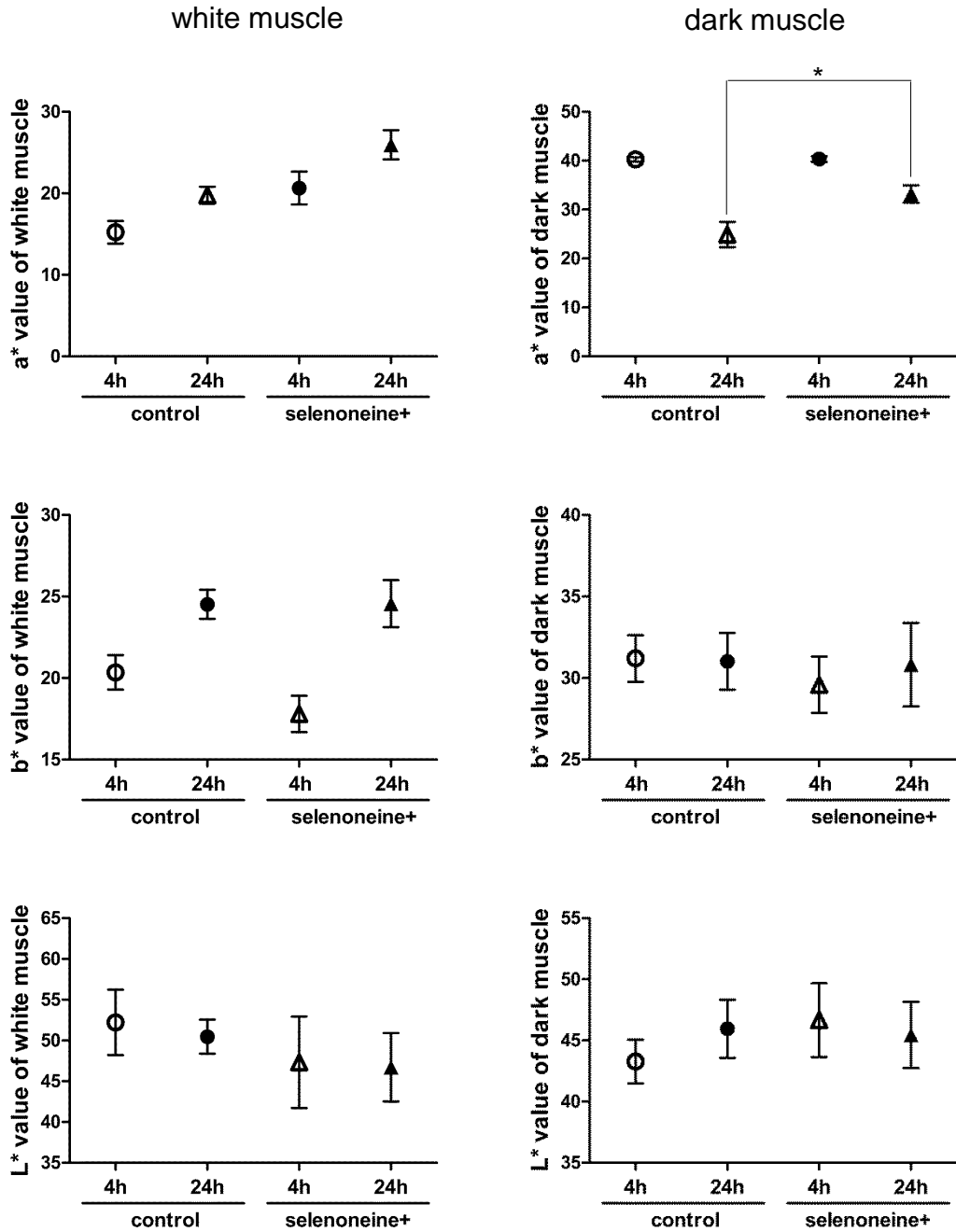


Figure 1-15. Meat color change of sliced meat during cold storage. The sliced meat of yellowtail treated with selenoneine was stored at 4 °C for 24 h. Meat color values (a*, b*, L*) of red muscle and white muscle were measured before and after the cold storage.



control

selenoneine+

Figure 1-16. Appearance of the yellowtail meat. Left pieces indicate the meats of the control fish injected with distilled water. Right pieces indicate the meats of the fish injected with selenoneine (12 nmol/kg of body weight). After killing of fish, the fillets were stored at 4°C for 72 h, and then meat slice was prepared and stored for additional 24 h at 4°C.

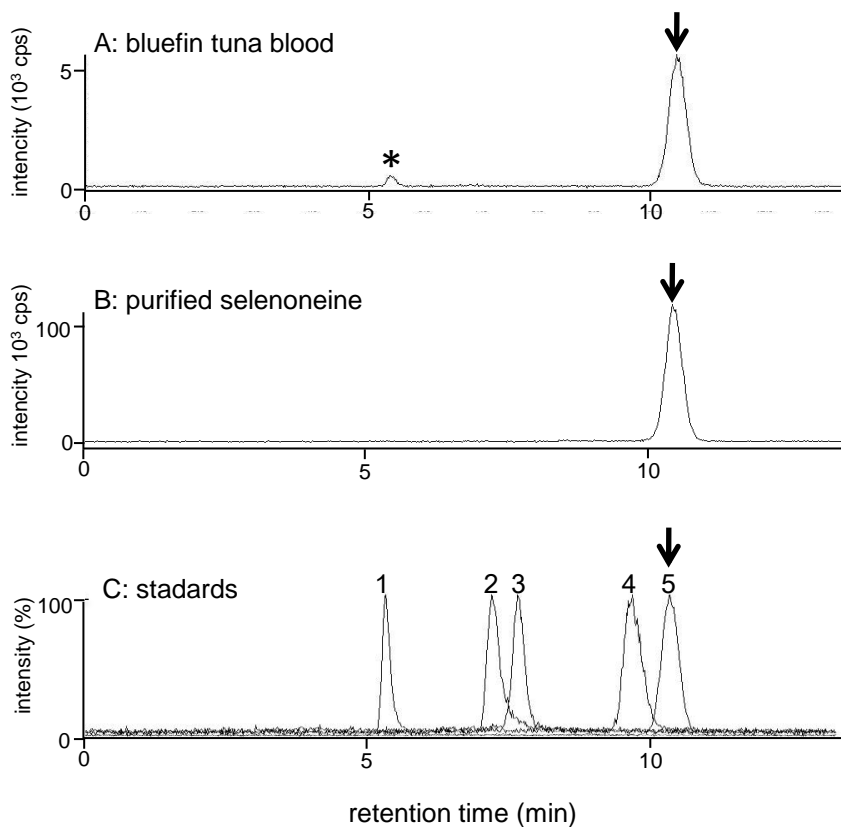


Figure 2-1. Speciation analysis of organic selenium in bluefin tuna by HPLC-ICP-MS. (A) the blood of farm-raised bluefin tuna. (B) purified selenoneine from the tuna blood. (C) standards. 1: bovine erythrocyte GPx, 2: selenite, 3: selenocystine, 4: selenomethionine, and 5: selenoneine. An Ultrahydrogel™ 120 (7.8 × 250 mm) column equilibrated with 100 mM ammonium formate buffer (pH 5.3, flow rate at 1 ml/min) was used. Asterisks indicates selenoproteins including GPx eluted near the void volume of the column. Arrows show the elution of selenoneine.

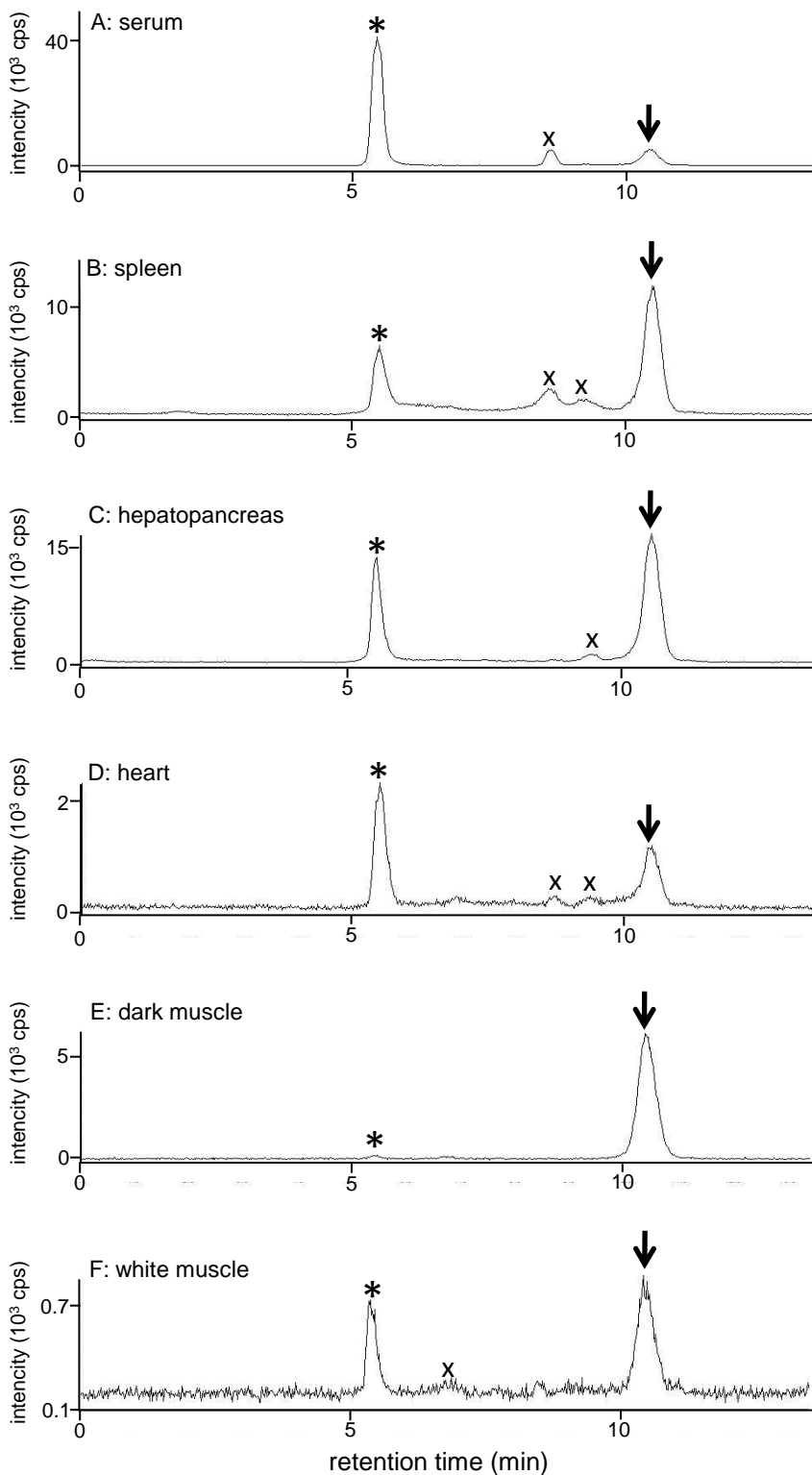


Figure 2-2. Speciation analysis of organic selenium in the various tissues of farm-raised bluefin tuna by HPLC-ICP-MS. A: serum, B: spleen, C: hepatopancreas, D: heart, E: dark muscle, and F: white muscle. Asterisks indicate selenoproteins including GPx eluted near the void volume of the column. Arrows show the elution of selenoneine. “x” denotes a peak of unidentified selenium compound.

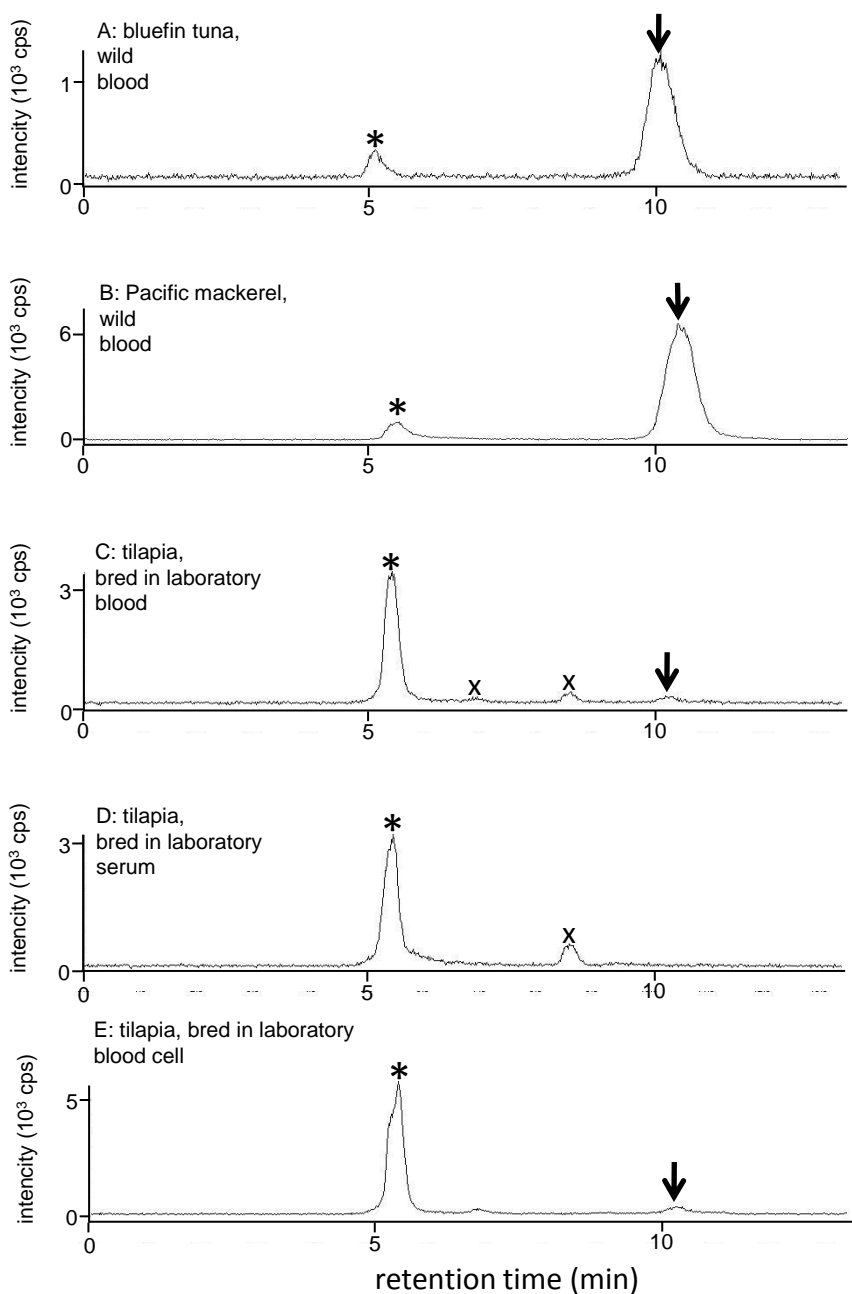


Figure 2-3. Speciation analysis of organic selenium in the blood of fish by HPLC-ICP-MS. The blood of wild bluefin tuna (A), wild Pacific mackerel (B) and laboratory-reared tilapia (C) were examined, and selenoneine was detected in all of blood samples. In the tilapia blood, the serum (D) did not contain selenoneine, whereas the blood cell (E) washed with 50 volume of PBS contained selenoneine. Asterisks indicate selenoproteins including GPx eluted near the void volume of the column. Arrows show the elution of selenoneine. “x” denotes a peak of unidentified selenium compound.

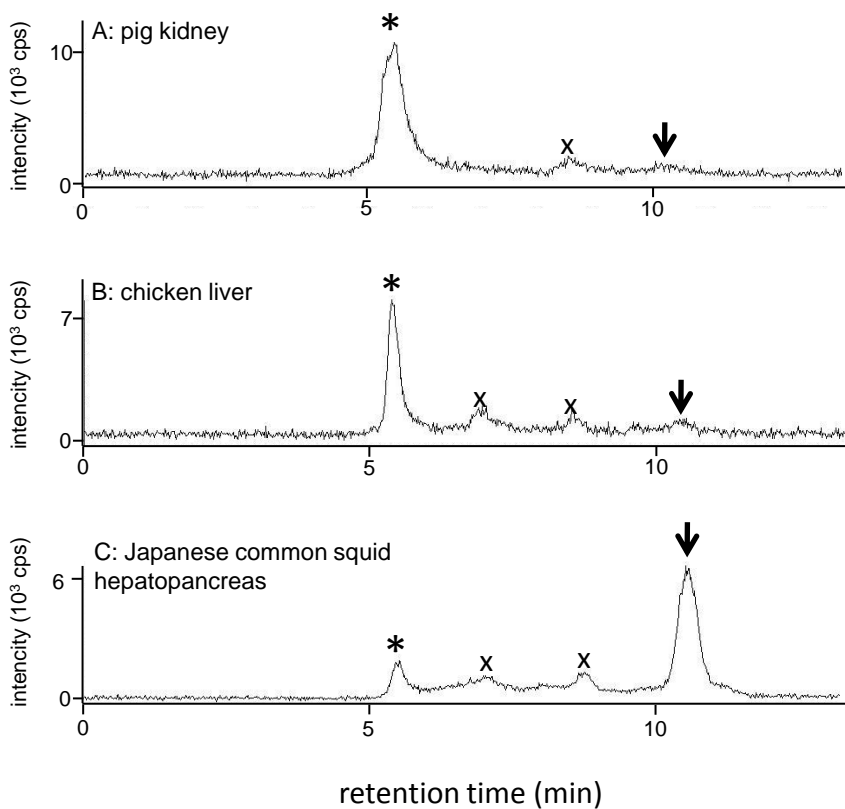


Figure 2-4. Speciation analysis of organic selenium in the animal tissues by HPLC-ICP-MS. Selenoneine was detected in the porcine kidney (A), chicken liver (B) and Japanese common squid hepatopancreas (C). Asterisks indicates selenoproteins including GPx eluted near the void volume of the column. Arrows show the elution of selenoneine. “x” denotes a peak of unidentified selenium compound.

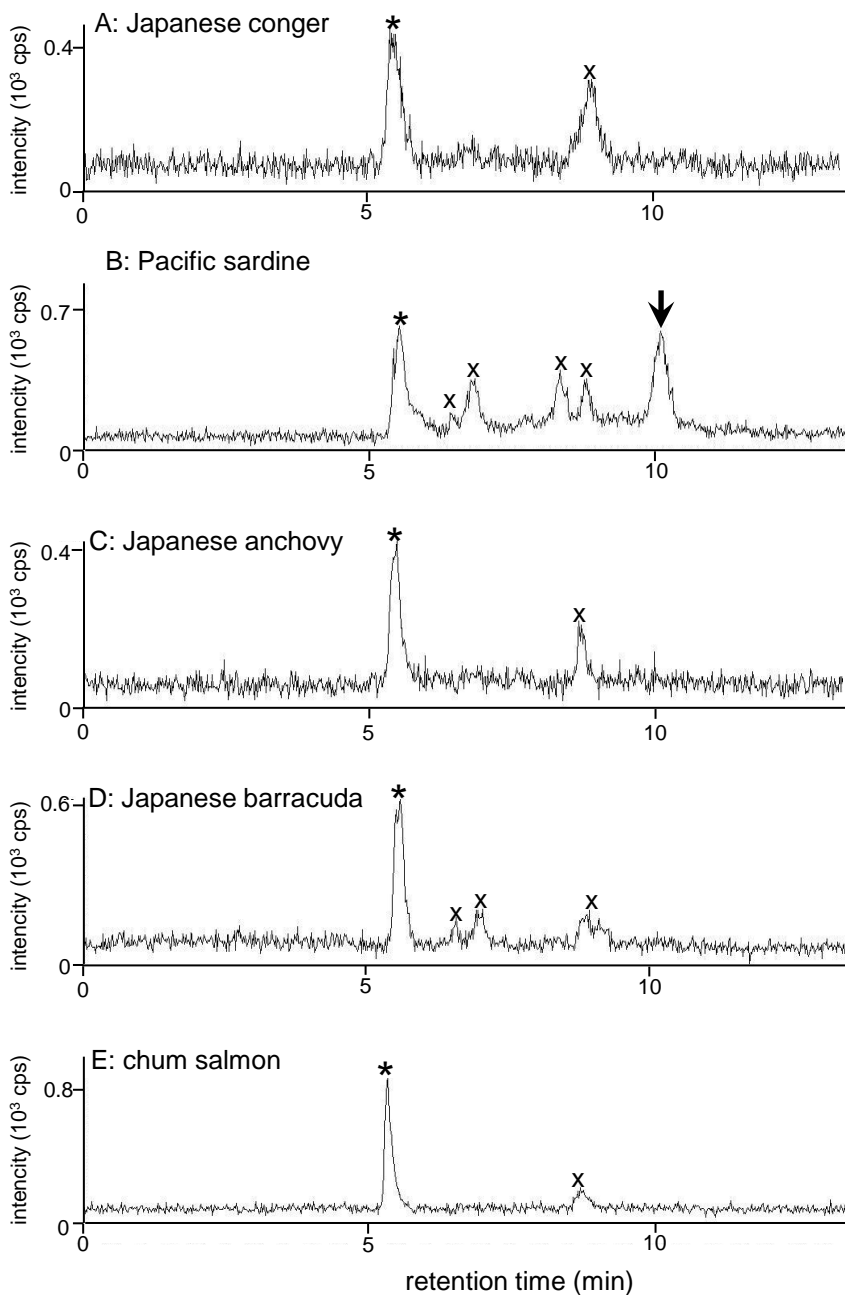


Figure 2-5(1/4) . Speciation analysis of organic selenium in fish white muscle by HPLC-ICP-MS. Water-soluble selenium compounds in fish muscle were speciated though HPLC-ICP-MS analysis. An Ultrahydrogel 120 (7.8 × 250 mm) column equilibrated with 100 mM ammonium formate buffer at pH 5.3 (flow rate at 1 ml/min) was used. Asterisks show selenoproteins including GPx eluted near the void volume of the column. “x” donates elution of unidentified organic selenium. Arrows show elution of selenoneine.

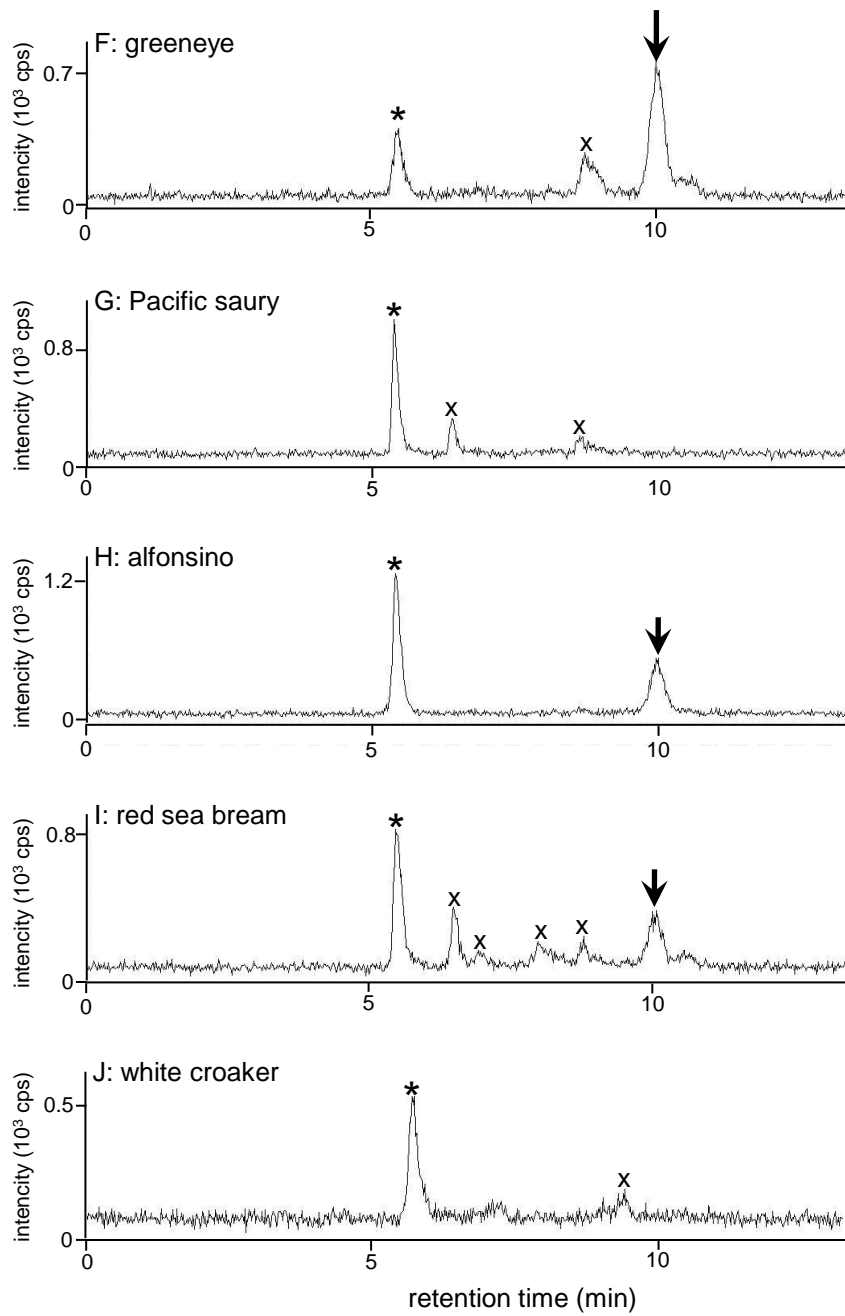


Figure 2-5(2/4) .

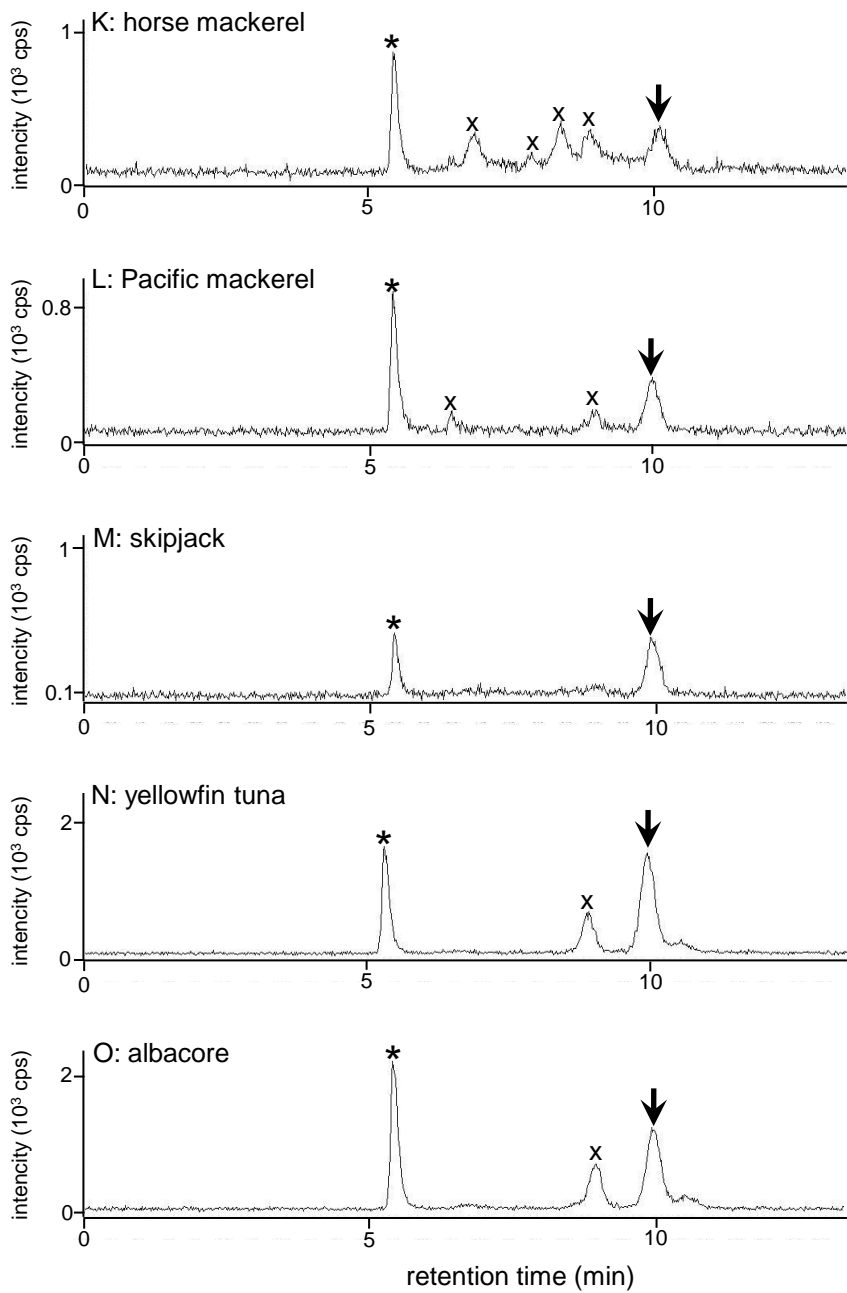


Figure 2-5(3/4) .

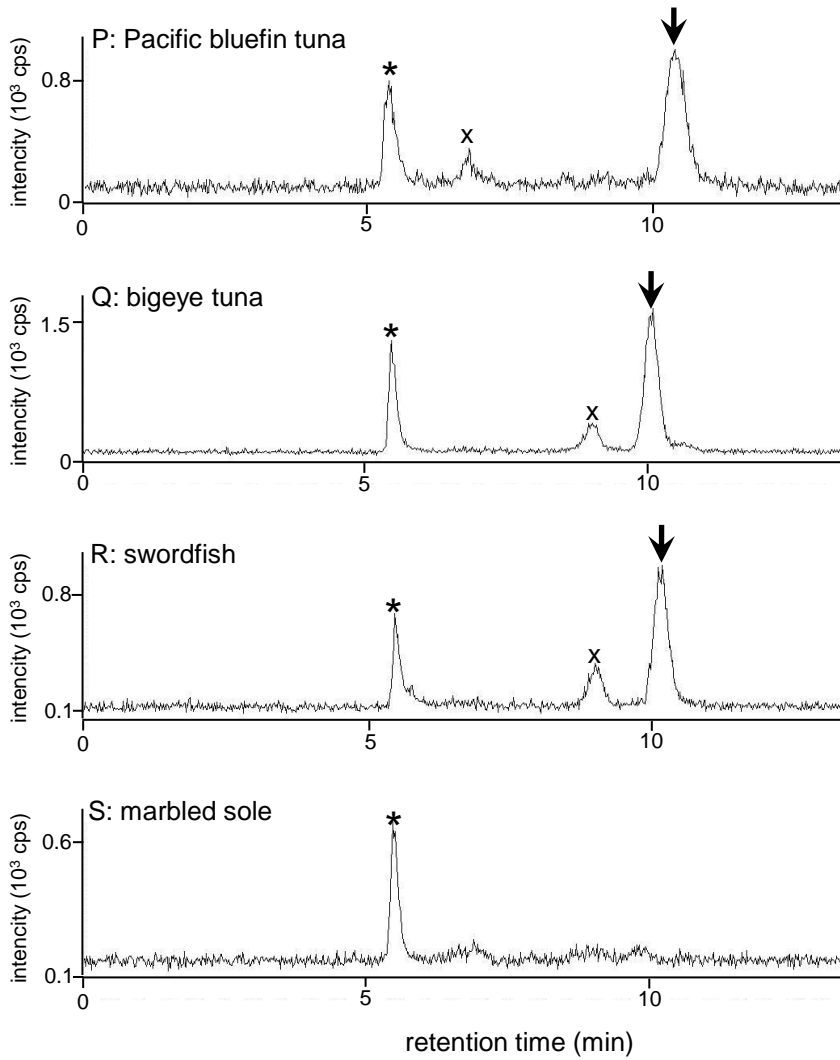


Figure 2-5(4/4) .

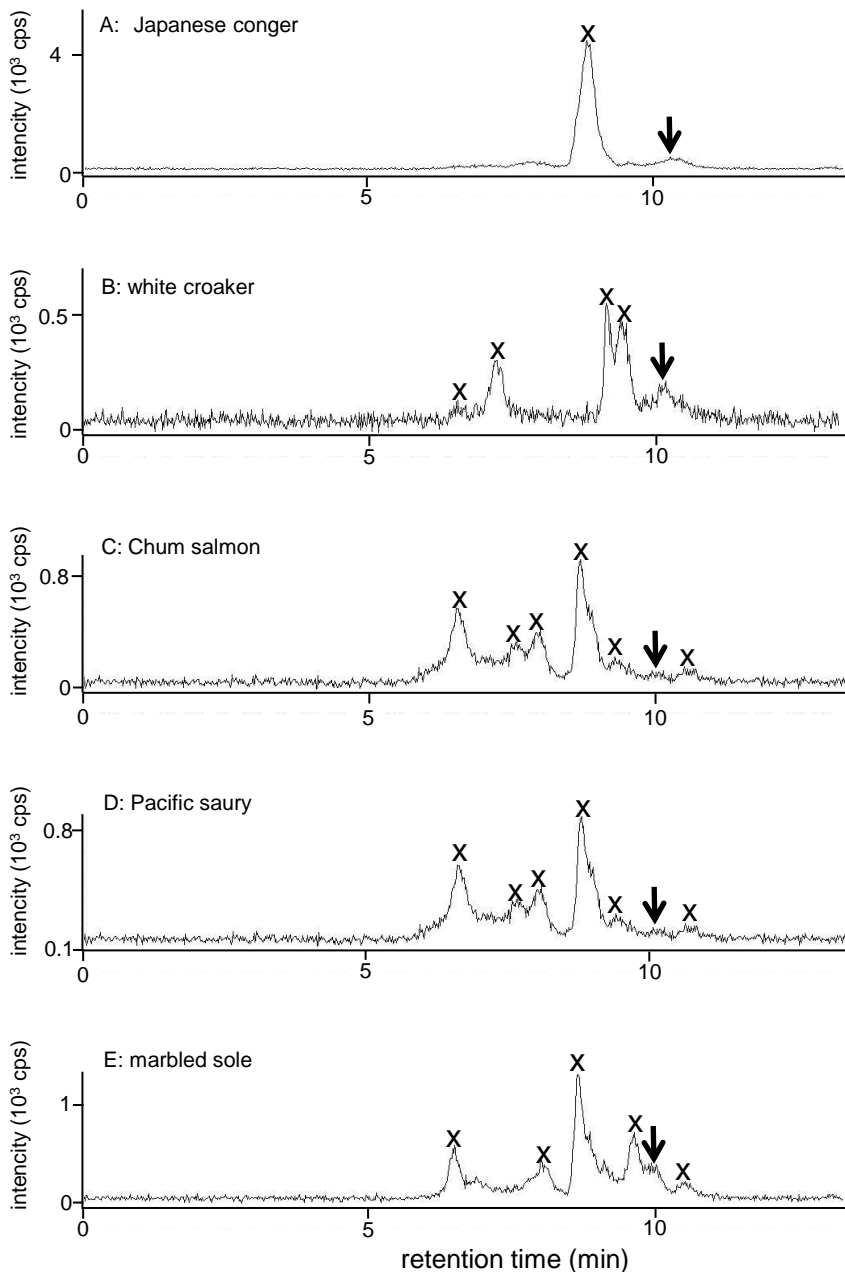


Figure 2-6. Speciation analysis of organic selenium in fish white muscle by HPLC-ICP-MS. Methanol-soluble selenium compounds in fish muscle were speciated through HPLC-ICP-MS analysis. An Ultrahydrogel 120 (7.8×250 mm) column equilibrated with 100 mM ammonium formate buffer at pH 5.3 (flow rate at 1 ml/min) was used. "x" denotes elution of unidentified organic selenium. Arrows show elution of selenoneine.

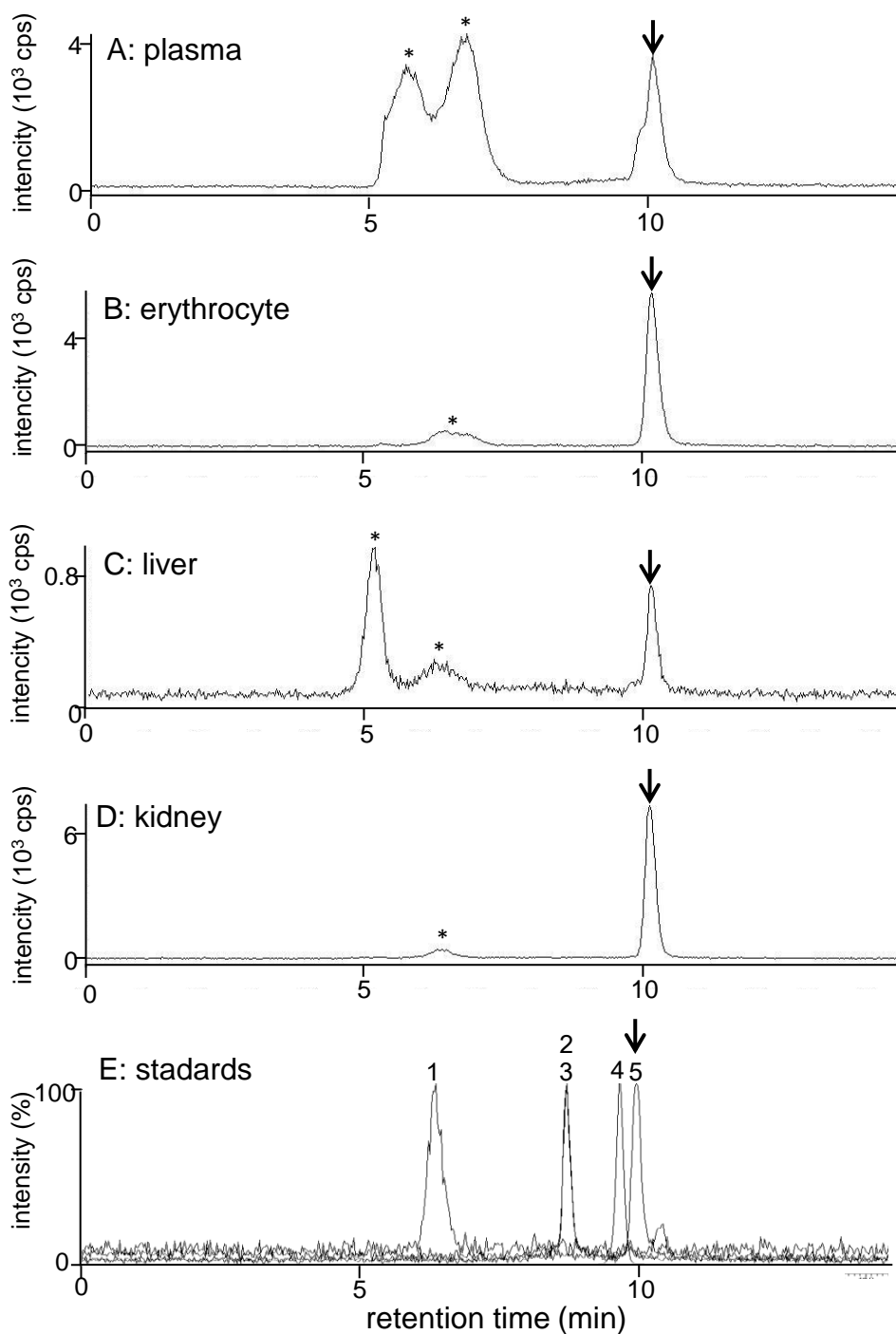


Figure 2-7. Speciation analysis of organic selenium in the plasma (A), erythrocyte (B), liver (C), and kidney (D) of pantropical spotted dolphin *Stenella attenuata* by HPLC-ICP-MS. (E) standards. 1: bovine erythrocyte GPx, 2: selenite, 3: selenocystine, 4: selenomethionine, and 5: selenoneine. Water-soluble selenium compounds in the tissues were separated by HPLC-ICP-MS with an Ultrahydrogel™ 250 (7.8 × 250 mm) column equilibrated with 0.1 M ammonium formate containing 0.1% Igepal CA630 at a flow rate of 1 ml/min. Asterisks indicate selenoproteins including GPx. Arrows indicate elutions of selenoneine.

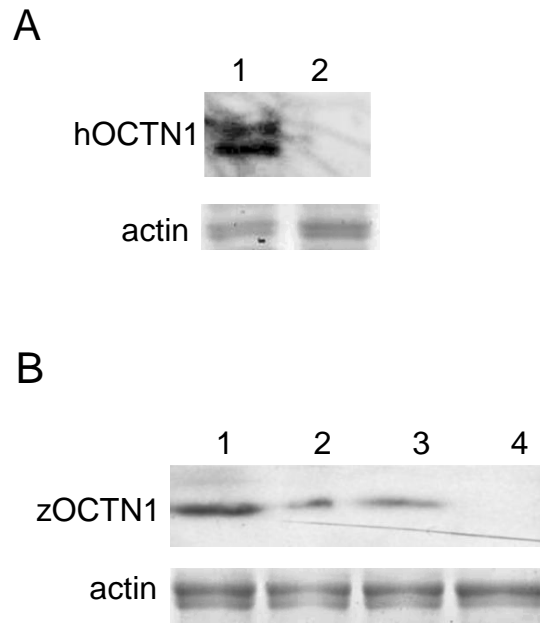


Figure 3-1. Expression of OCTN1 in HEK293 cells and zebrafish embryos. (A) HEK293 cells transfected with phOCTN1 (lane 1) and mock vector (lane 2). (B) Zebrafish embryos microinjected with pzOCTN1 (lane 1), mock vector (lane 2), 5'-mis control MO1 (lane 3) and antisense MO1 (lane 4). OCTN1 proteins were detected by western blotting with anti-OCTN1 antibody. Actin was detected as an internal control by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining.

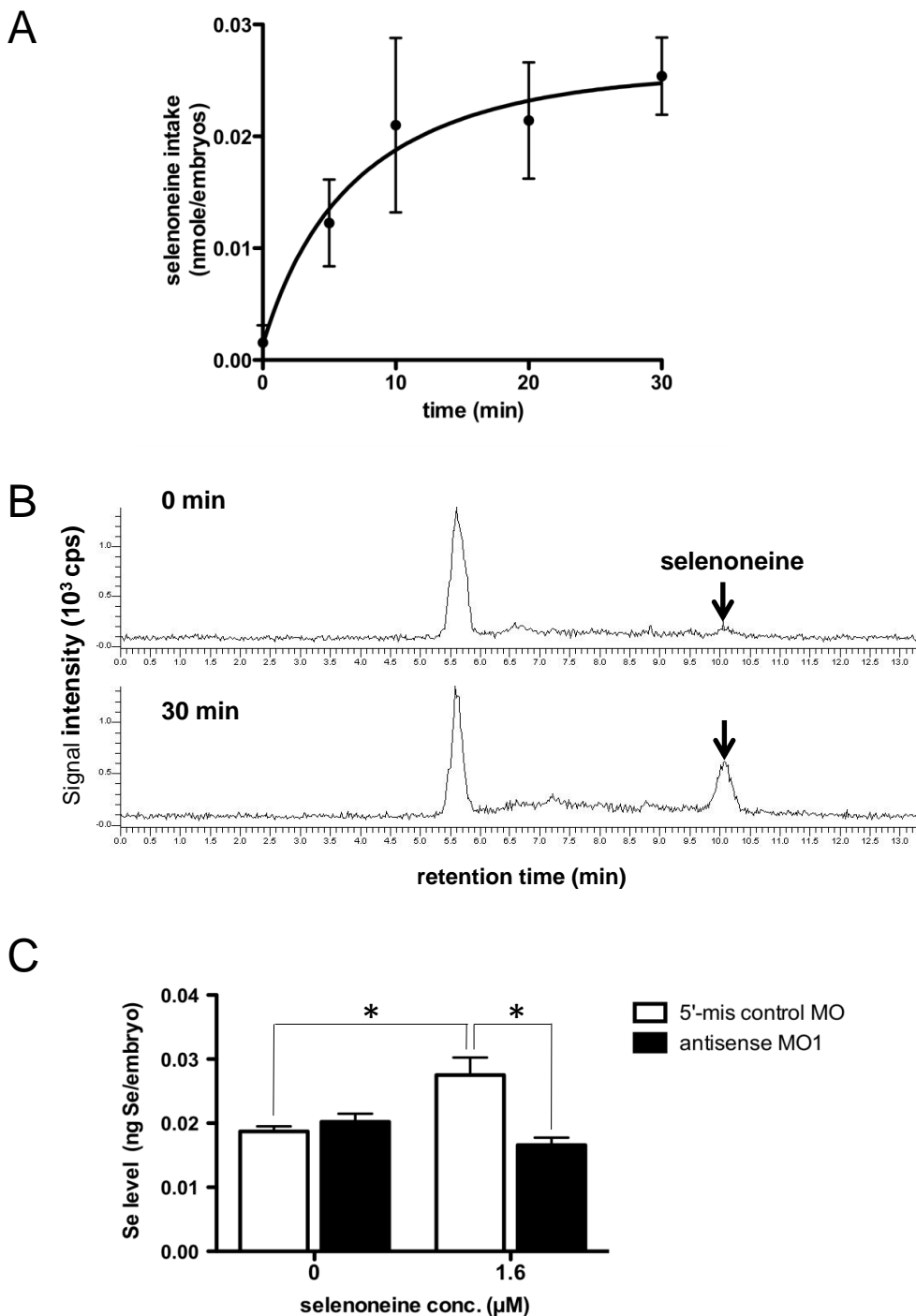


Figure 3-2. Specific incorporation of selenoneine in zebrafish embryos. (A) Incorporation of selenoneine into embryos. Selenoneine levels in 1-day embryos were determined by HPLC-ICP-MS analysis. (B) Chromatograms of selenium speciation analysis. After the treatment of embryos with selenoneine at 1.6 μM for 30 min, a signal of selenoneine at 10.1 min was detected in the embryos by HPLC-ICP-MS analysis. (C) OCTN1-depressed zebrafish embryos microinjected with antisense morpholino oligo. Total selenium levels of 1-day embryos microinjected with 5-mis control MO and antisense MO1 in the presence or absence of selenoneine were compared. Asterisks indicate statistical significance (ANOVA; $P < 0.05$).

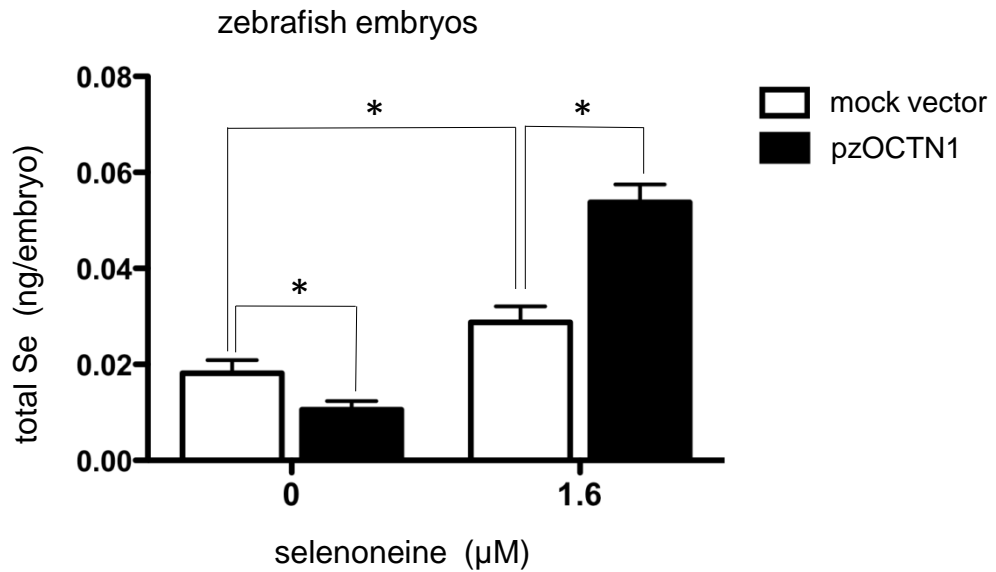
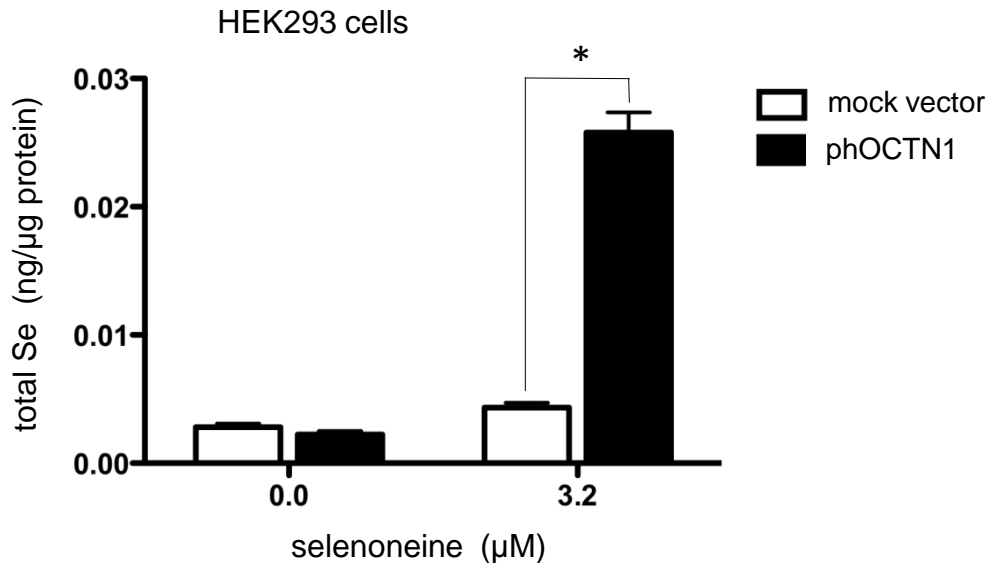
A**B**

Figure 3-3. Specific incorporation of selenoneine through OCTN1. (A) Zebrafish embryos microinjected with mock control or pzOCTN1 expression vector were cultured in Hank's solution in the presence or absence of 1.6 μM selenoneine for 1 h at 24 hour post-fertilization (hpf). (B) HEK293 cells transiently transfected with mock control or phOCTN1 expression vector were cultured for 1 h in the presence or absence of 3.2 μM selenoneine. Each value shown represents the mean of three independent experiments. Error bars represent one standard error. Asterisks indicate statistical significance (ANOVA; $P < 0.05$).

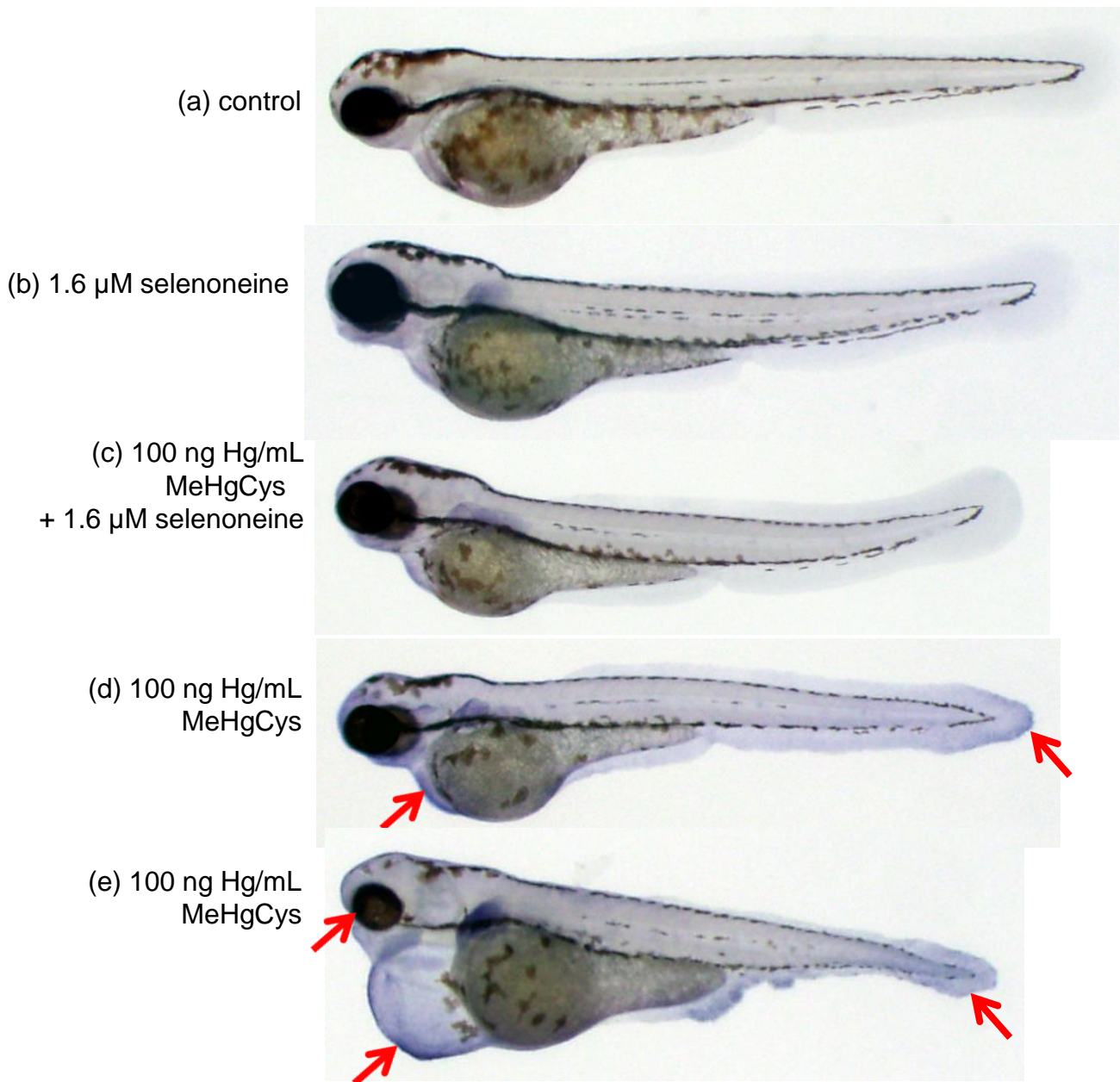


Figure 3-4. Detection of apoptotic cells by whole mount immunostaining with anti-active caspase-3 antibody and BM purple in 2-day-old embryos after MeHgCys exposure. No apparent morphological defect was found in the control embryo (a), the embryo treated only with selenoneine (b), and the embryo treated with both MeHgCys and selenoneine (c), whereas embryos treated only with MeHgCys showed defects in eye, heart cavity, and larval fin and apoptotic cells that were positive for the anti-active caspase-3 antibody, indicated by arrows (d, e).

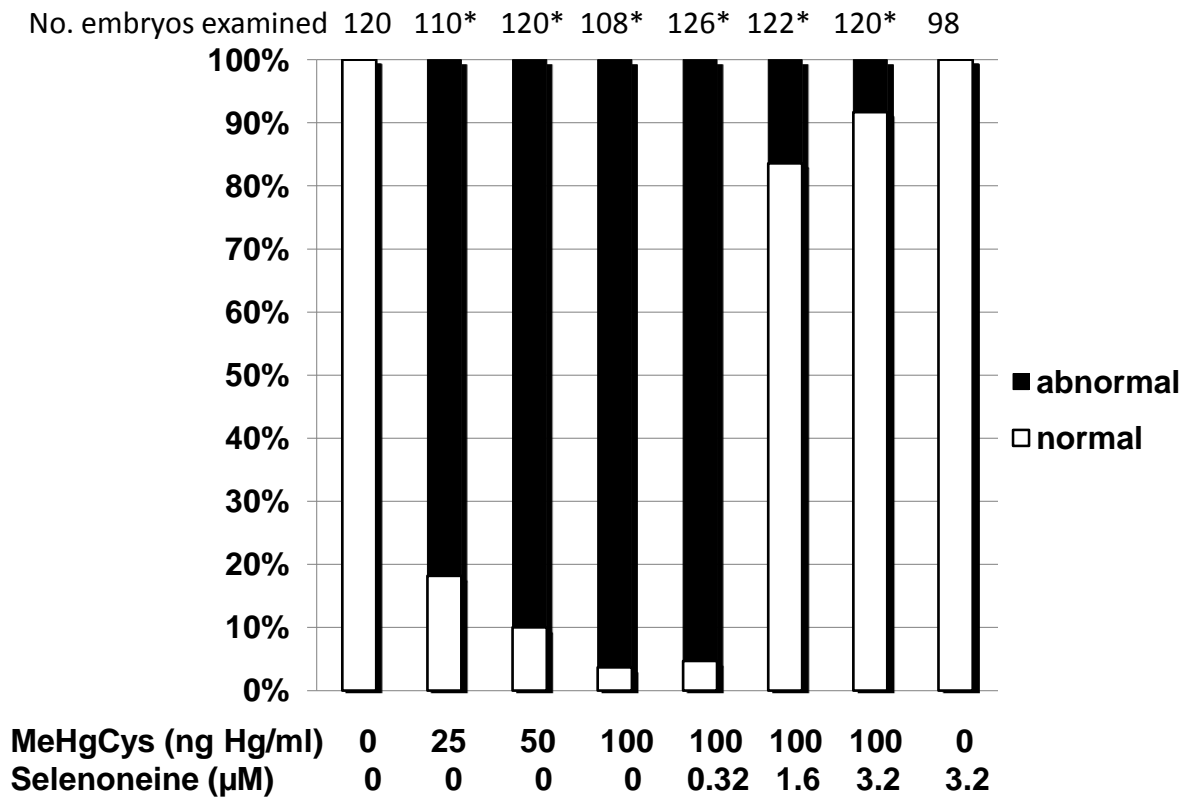


Figure 3-5. The number of embryos showing abnormal defects at 72 hpf was counted after exposure to selenoneine and MeHgCys at the indicated concentrations.

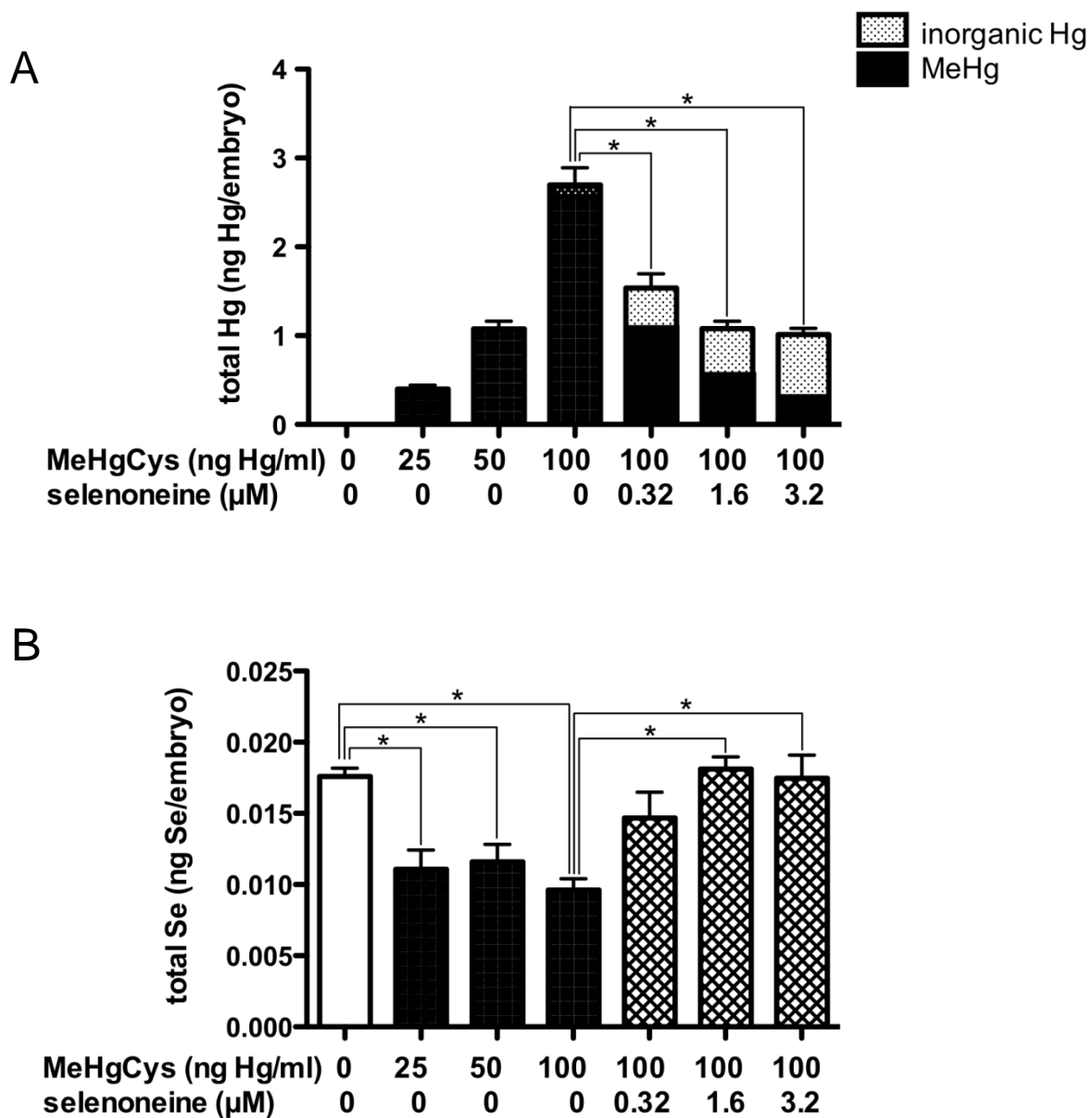
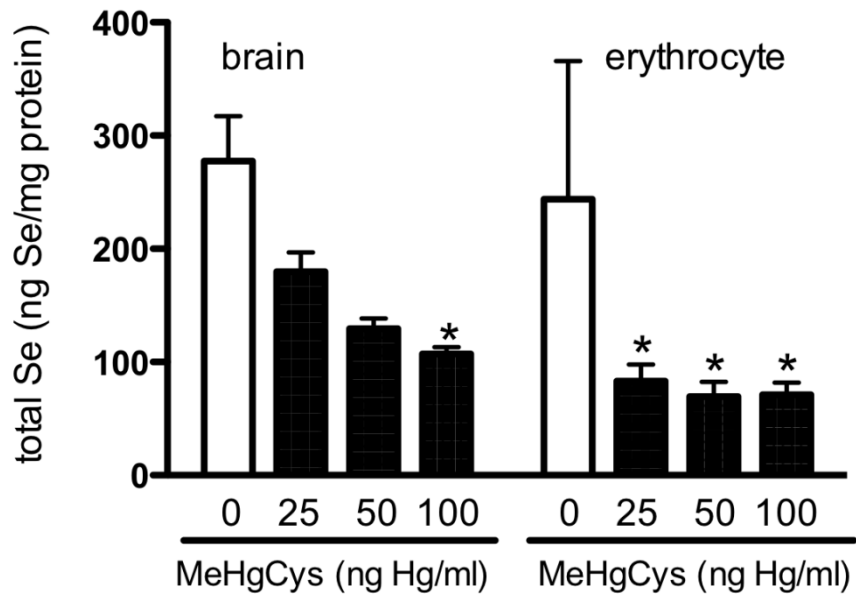


Figure 3-6. Protective effect of selenoneine against MeHg accumulation in zebrafish embryos. The mercury (A) and selenium (B) levels were measured in the embryos upon the MeHgCys exposure at 0–100 ng Hg/mL for 3 days in the presence or absence of selenoneine. After MeHg exposure, MeHg, inorganic mercury, and selenium levels in cellular extracts were determined. Each value is the mean \pm S. E. of 8 individuals. Asterisks denote significant differences (ANOVA; $P < 0.05$).

A: selenium



B: ROS

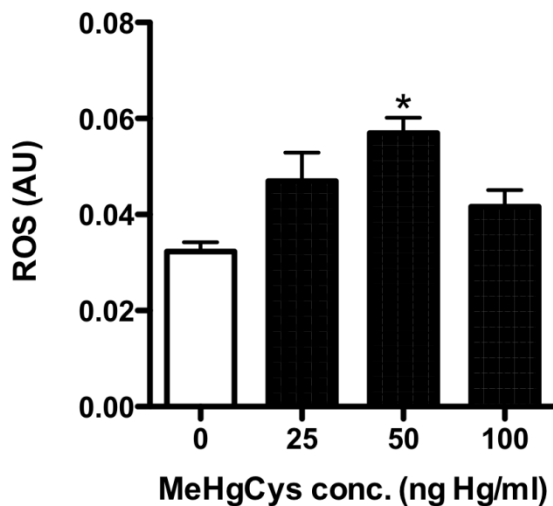


Figure 3-7. Total selenium (A) and reactive oxygen species (ROS) (B) levels in embryos after exposure to MeHgCys at 0, 25, 50 or 100 ng Hg/mL from 12 hpf to 48 hpf. After MeHg water exposure, selenium levels were reduced, whereas ROS levels measured with hydroxyphenyl fluorescein (HPF) were induced. Asterisk indicates statistical significance (ANOVA; $P < 0.05$).

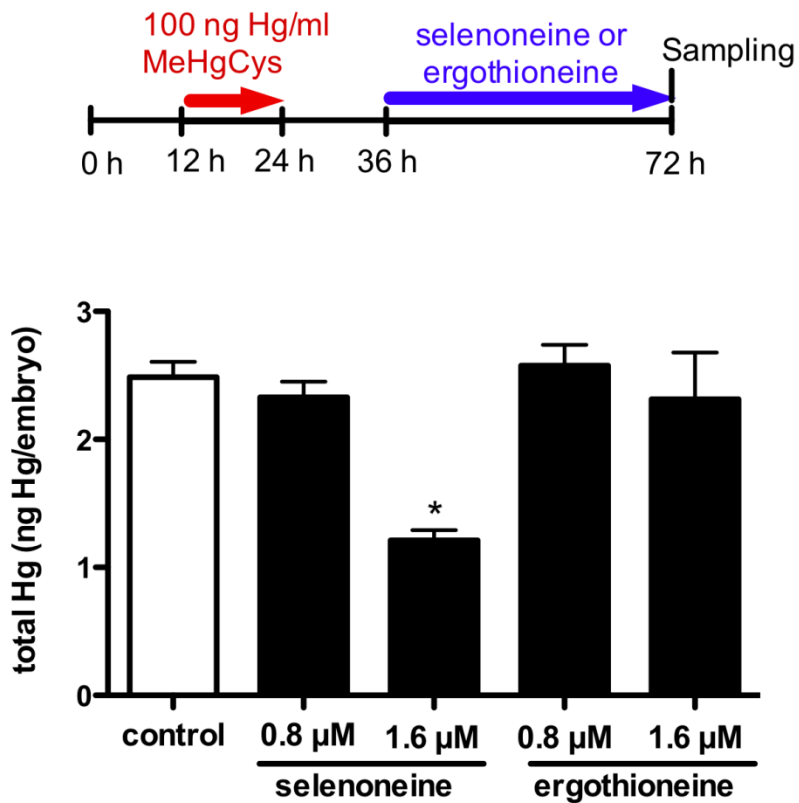
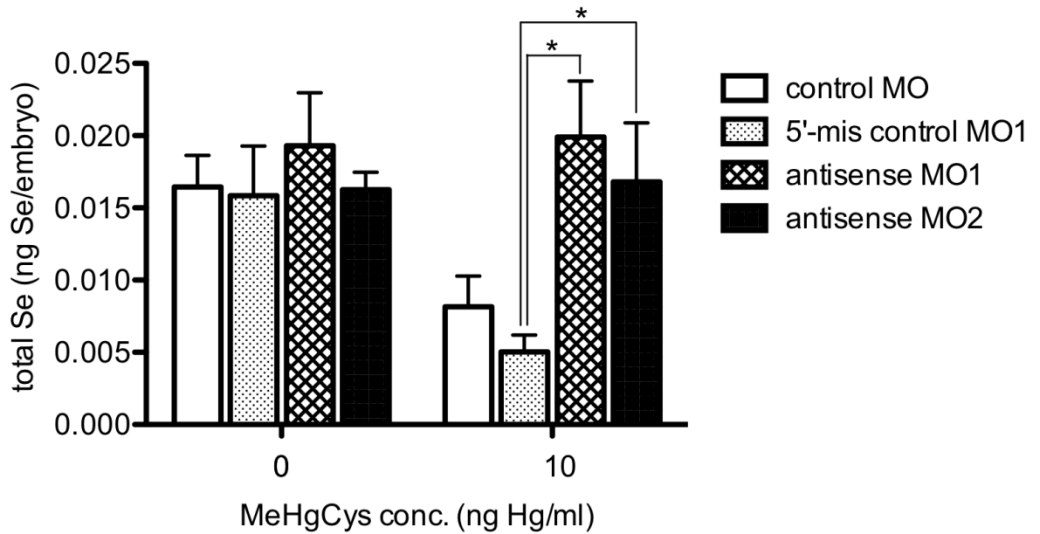


Figure 3-8. Protective effects of selenoneine against MeHg accumulation in zebrafish embryos. After MeHgCys exposure at 100 ng Hg/mL from 12 hpf to 24 hpf, selenoneine or ergothioneine were exposed to the embryos from 36 hpf to 72 hpf, and total mercury levels in the embryos were determined. MeHg accumulation was repressed in the presence of selenoneine, but not in the presence of ergothioneine.

A



B

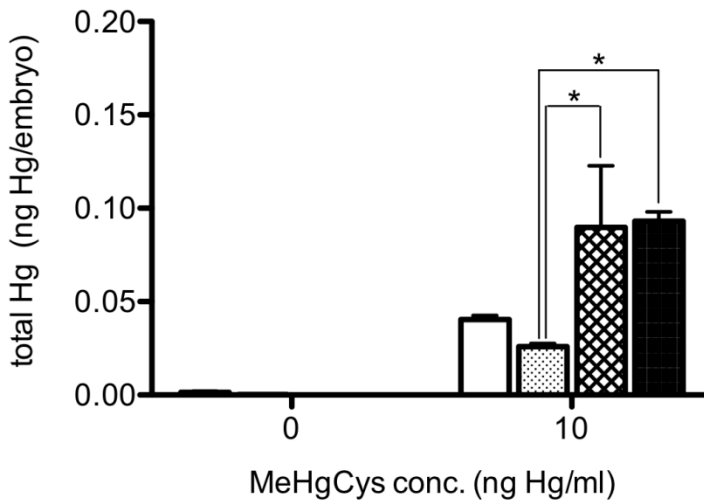


Figure 3-9. Accumulation of mercury and selenium in zebrafish embryos after MeHg exposure. Total mercury (A) and selenium (B) levels in embryos were measured after exposure to MeHgCys at 10 ng Hg/mL from 12 hpf to 72 hpf. After MeHg water exposure, mercury and selenium levels in control embryos (5'-mis control MO1 and control MO) and OCTN1-depressed embryos (antisense MO1 and antisense MO2) were determined. Each value is the mean \pm S. E. of 6 individuals. Asterisks indicate statistical significance from the 5'-mis control MO1 embryos (ANOVA; $P < 0.05$).

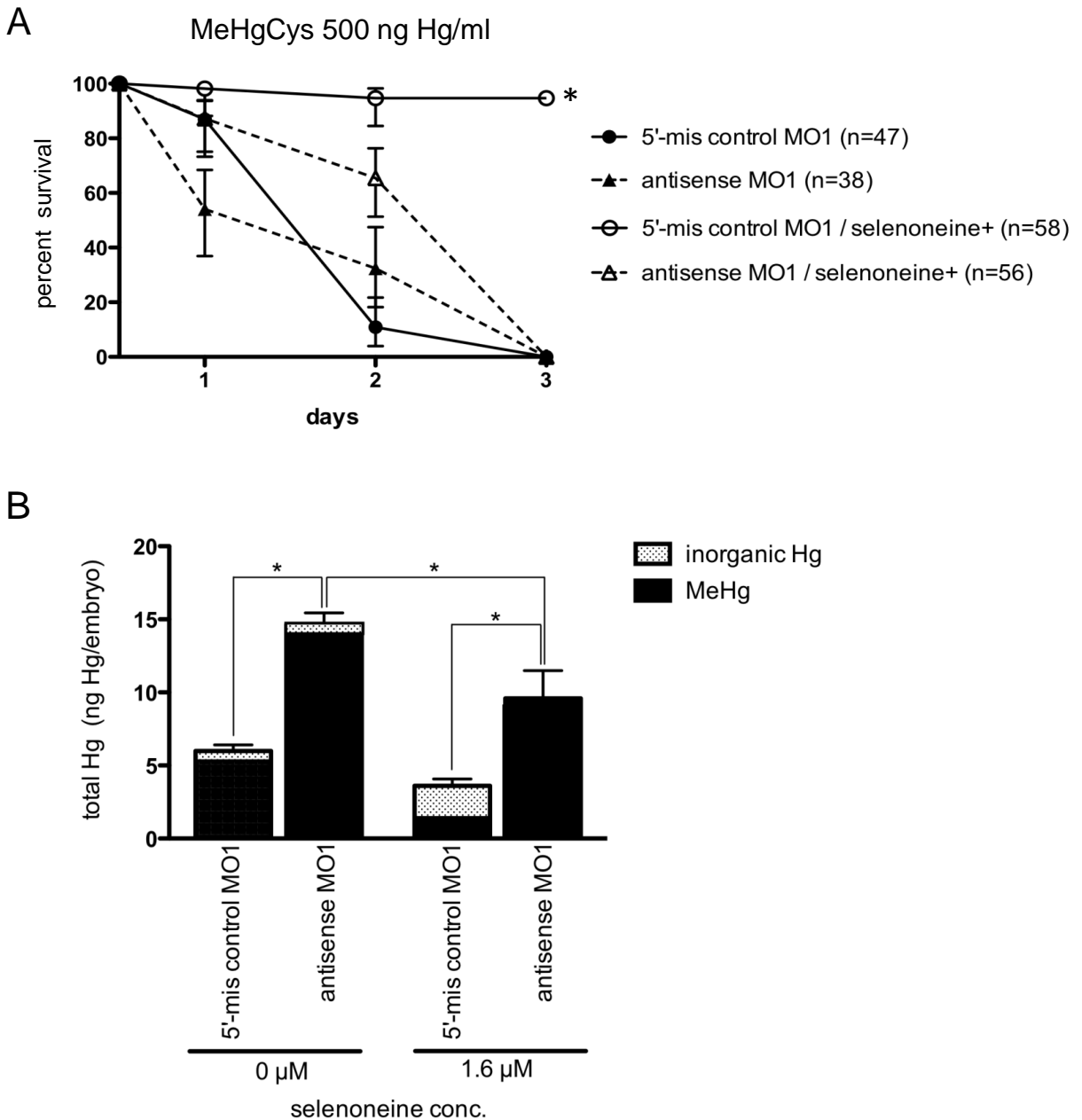


Figure 3-10. Protective effect of selenoneine against lethal MeHg exposure. Zebrafish embryos were exposed to 500 ng Hg/mL MeHgCys in Hank's medium from 12 to 72 hpf and the survival ratios determined daily. (A) Survival ratios of control and antisense MO-injected embryos in the presence of MeHg (500 ng Hg/mL) and selenoneine (0 or 1.6 μ M). Each value is the mean \pm S. E. (n=38–58). Asterisk indicate statistical significance between the 5'-mis control MO1 and antisense MO1 embryos (Log-rank Mantel-Cox test; $P < 0.0001$). (B) Mercury levels in control embryos (5'-mis control MO1) and OCTN1-deficient embryos (antisense MO1) at 24 hpf were compared. Each value is the mean \pm S. E. of 6 individuals. Asterisks indicate statistical significance between the 5'-mis control MO1 and antisense MO1 embryos (ANOVA; $P < 0.05$).

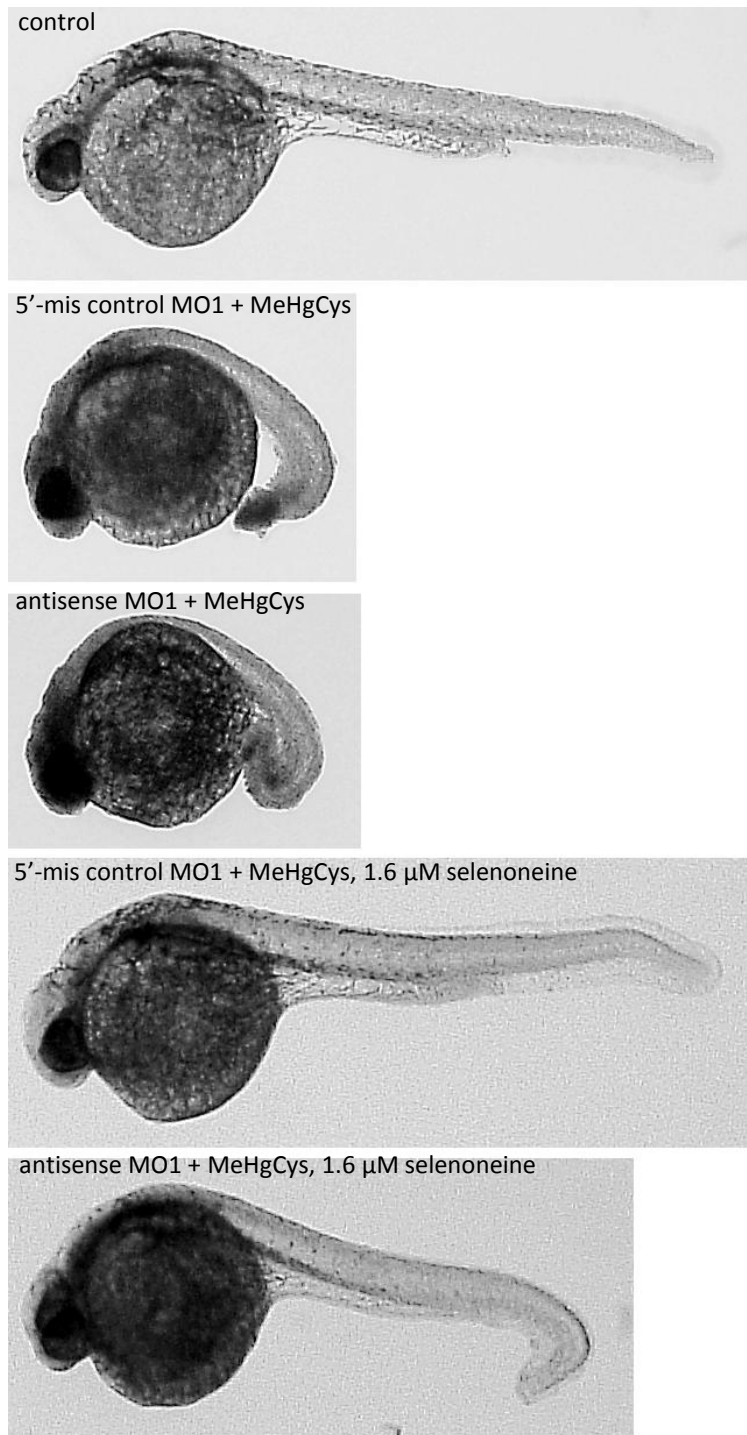
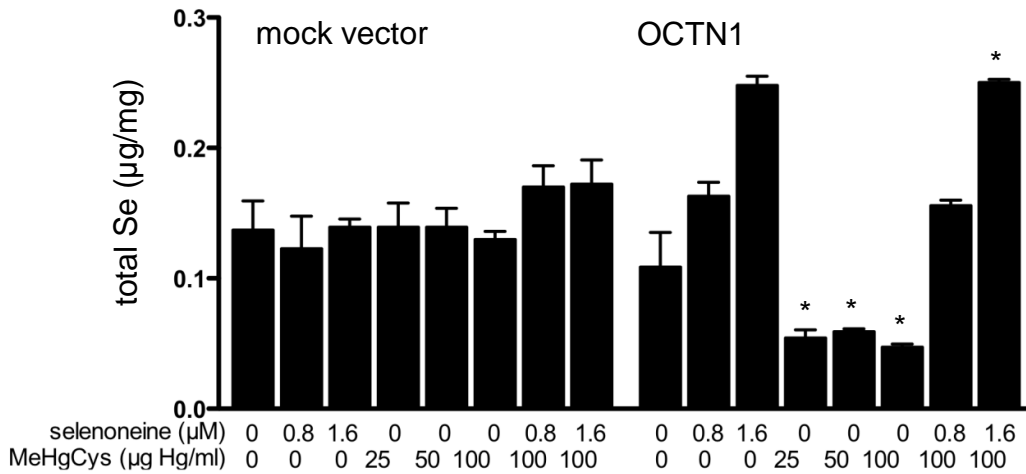


Figure 3-11. Morphological defects in embryos treated with 500 ng Hg/mL MeHgCys in the presence or absence of 1.6 μM selenoneine. MeHg exposure was lethal to OCTN1-deficient (antisense MO1) but not control (5-mis control MO) embryos in the presence of selenoneine, indicating that OCTN1 is essential for protection against MeHg exposure.

A



B

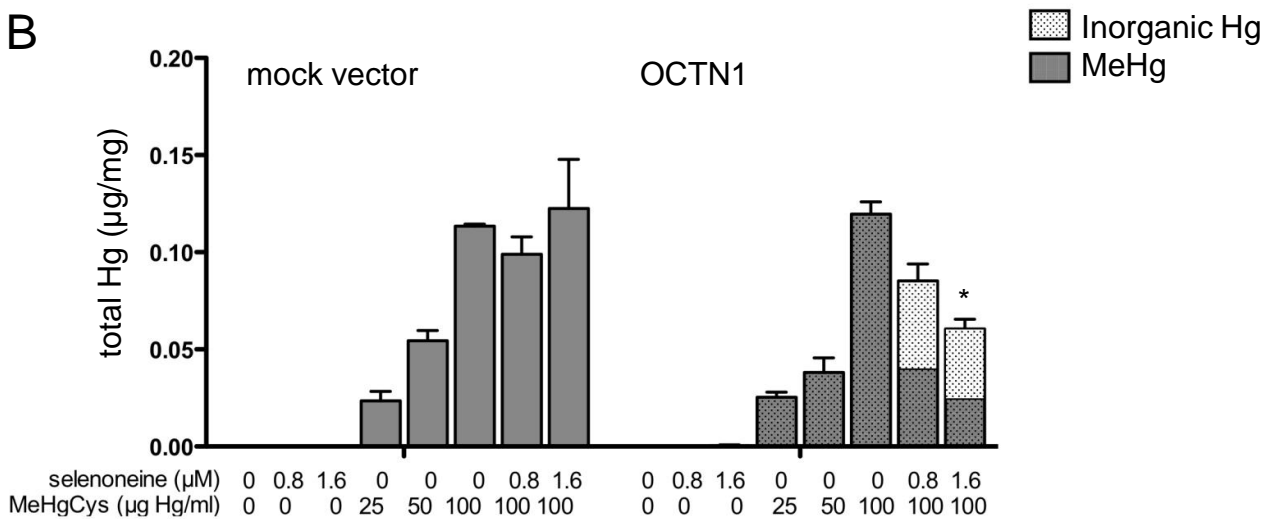
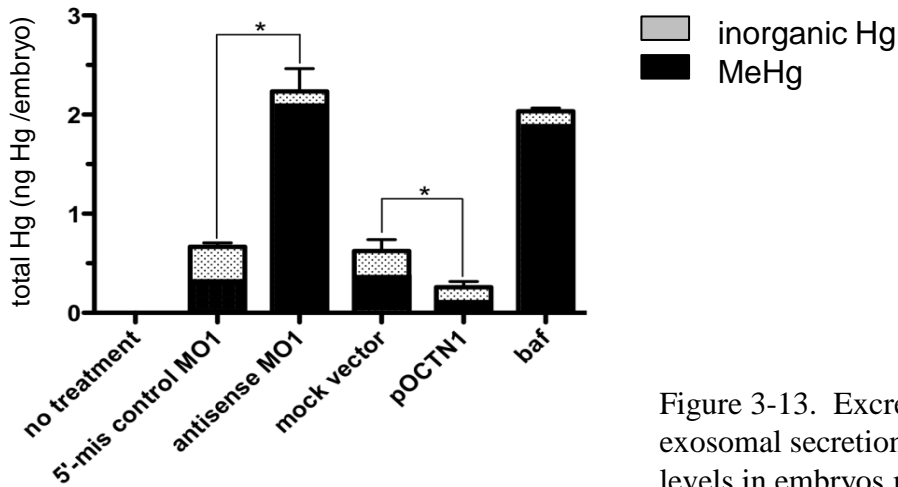
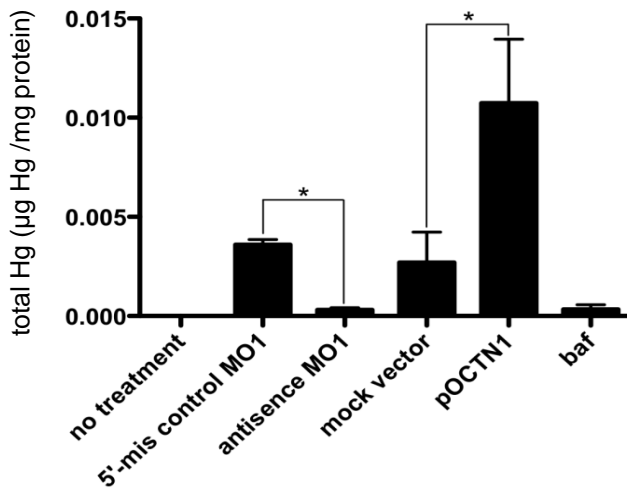


Figure 3-12. Protective effects of selenoneine against MeHg accumulation in HEK293 cells. Mercury (A) and selenium (B) levels were measured in HEK293 cells transiently transfected with human OCTN1 cDNA or mock vector upon MeHgCys exposure at 25–100 ng Hg/mL for 2 h in the presence or absence of selenoneine. After MeHg exposure, MeHg, inorganic mercury, and selenium levels in cellular extracts were determined. Values and bars indicate the mean \pm S. E. of three independent experiments. Asterisks denote a statistical difference between mock control and OCTN1-transfected cells (ANOVA, $P < 0.05$).

A: effect of OCTN1 knockdown and overexpression on mercury excretion



B: mercury levels in the exosomal fraction



C: cathepsin L activity in the exosomal fraction

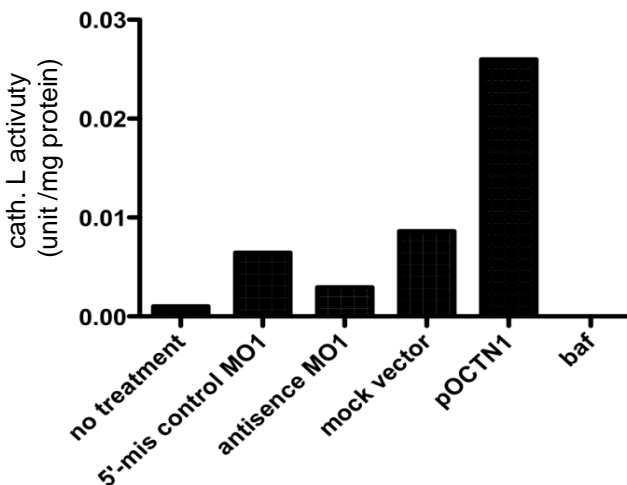


Figure 3-13. Excretion of MeHg by the exosomal secretion pathway. (A) Mercury levels in embryos microinjected with MeHgCys (3 ng Hg/individual embryo) into the yolk sac. Embryos (30 individuals) were cultured for 12 h after MeHgCys microinjection at 12 hpf. MeHg and inorganic Hg contents of embryos were determined. Each value is the mean \pm S. E. (n=6). Asterisks indicate statistical significance (ANOVA; $P < 0.05$). (B) Total mercury content in the exosomal fraction. The secreted exosomal fraction of culture medium was collected by ultracentrifugal fractionation at $100,000 \times g$ for 1 h. Values and bars indicate the mean \pm S. E. of three independent experiments. Asterisks indicate statistical significance (ANOVA; $P < 0.05$). (C) Activity levels of the lysosomal marker enzyme cathepsin L in the exosomal fraction. Values indicate the mean of three independent experiments. OCTN1-knockdown embryos (antisense MO1), control embryos (5'-mis control MO1), mock vector-injected control embryos (mock vector) and pOCTN1-injected embryos (pOCTN1) were examined. To inhibit the lysosomal function, bafilomycin A1 was added to the culture medium at 12 hpf at a concentration of 5 nM (baf).

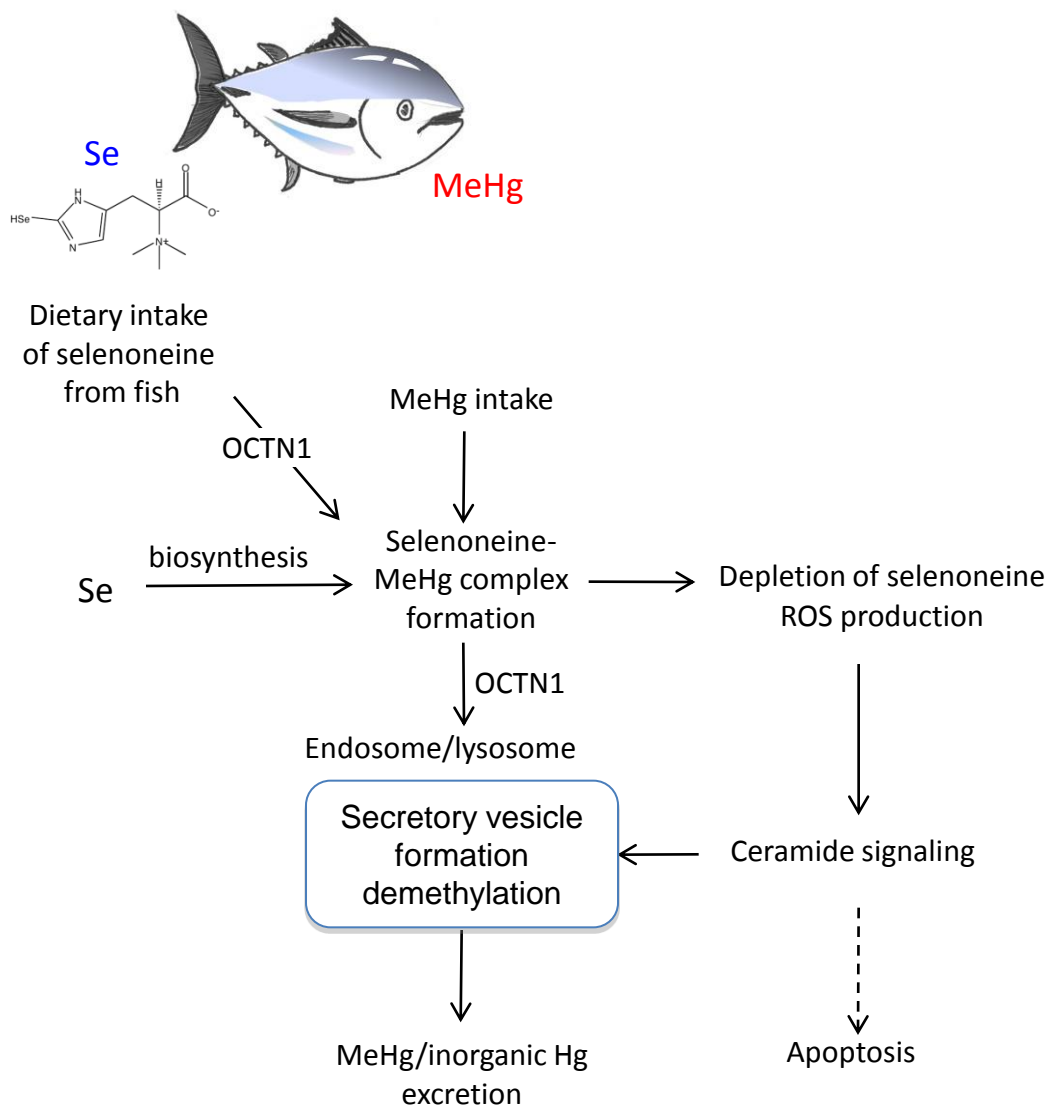


Figure 3-14. Hypothesis on the accumulation and toxicity of MeHg by dietary intake. Selenoneine taken by fish eating and biosynthesis will be reduced under intracellular redox environment. The selenoneine and MeHg complex is formed and incorporated into the endosome through the OCTN1 under the oxidative stress conditions.

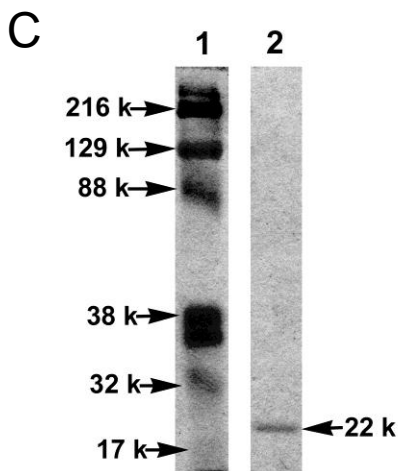
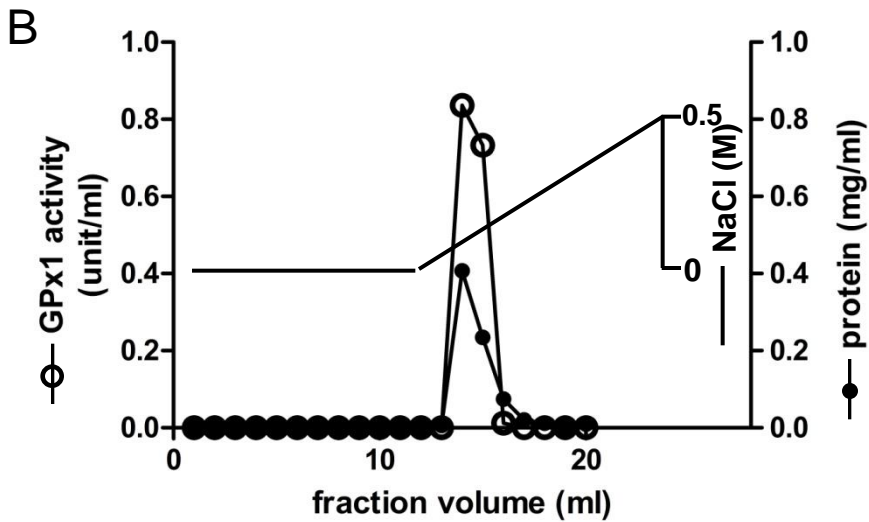
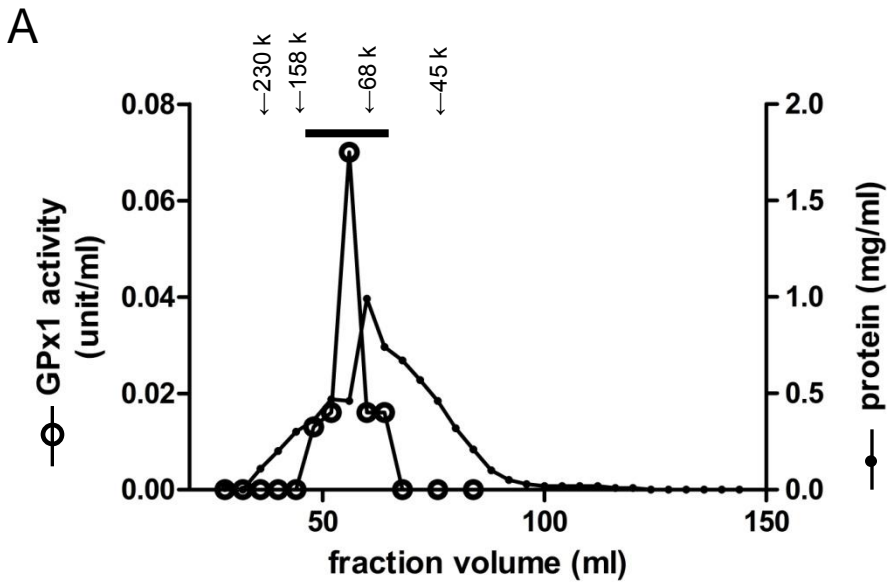


Figure 4-1. Purification of GPx1 from the dark muscle of Pacific bluefin tuna. (A) Sphacryl S-200 chromatography. A bar indicates collected fractions for the further purification step. Elution of marker proteins, such as ferritin (440 kDa), catalase (232 kDa), aldolase (158 kDa), serum albumin (68 kDa), and ovalbumin (45 kDa), are indicated by arrows. (B) monoQ ion exchange chromatography. (C) SDS-PAGE of purified enzyme. The arrow indicates the molecular weight of a 22-kDa protein. SDS-PAGE (12.5% gel) was performed after reducing the sample. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

```

1 TTGAGAAAGGGAAATAGGTGGCACAATA 28
ATGGCTAAAAAATTTACGACTTCGAGGCCAAACTCTTAACGGGAGAAACGTTTGATTTCTCCACACTGCAGGGCAAAGTTGCCTCATT 118
M A K K I Y D F E A K L L T G E T F D F S T L Q G K V V L I

GTGAATGTGGCGTCTCTCTGAGGTACGACCACCAGGGATTACACCCAGATGAACGAGCTCCACGAGCGGTACGCCGGCAAAGGGGCTCGTG 208
V N V A S L U G T T T R D Y T Q M N E L H E R Y A G K G L V

ATTCTGGGAGTGCCTGCAATCAGTTCCGGCCATCAGGAGAACTGCAAGAACGAAGAAATCCTCTTGTCTCTGAAGTATGTCGGTCTCGGA 298
I L G V P C N Q F G H Q E N C K N E E I L L S L K Y V R P G

AACGGCTTTGAGCCAAAGTTTCAGCTCCTGGAGAAAGTGGATGTGAACGGGAAGAATACCCATCCCCTGTTACGTTCCCTGAAGGAAAGT 388
N G F E P K F Q L L E K V D V N G K N T H P L F T F L K E S

CTCCCATCCCCAGTGATGAGCAACACACTTTTTTGAACGACCCAAAGTTGATCATCTGGAGCCCAGTCTGCAGGAACGACGTGGCCTGG 478
L P S P S D E Q H T F L N D P K L I I W S P V C R N D V A W

AACTTTGAGAAGTTCCTAATCGGGTCAGACGGAGTGCCGTTCAAGCGTTACAGCAGGAGGTTCCCTACCAGTGACATCGACGGAGACATC 568
N F E K F L I G S D G V P F K R Y S R R F L T S D I D G D I

CAGAAGCTCCTCAACCAGGCAAATAATCCAAAACGTTGTCGACCGTCATACAGCTTCCACAGCACTACGCCAGTGTGTGTGCGTGTCC 658
Q K L L N Q A N *

ATGAATACTCCTCAGCTTCAGTAGATGGTGTGTGACACTTTTACAACCACCTGTGCTCTCTTGTACTCGATGACTGTGTTCTGTTCTTT 748
TACTAAATGAAGGCATCCTCTGAAACCAAGCTAGTTGTGAGGGGGTATCTGATGAAATGTAAAGGCTTAACGTTTCAGCTCCATTGAG 838
TGCATGTAAAGCACAGCTGTGGTTTGATGTGTTAAGTGGACCA 881

```

Figure 4-2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of Pacific bluefin tuna GPx1. A putative TGA codon encoding a selenocysteine residue is indicated by an underline. Selenocysteine insertion sequence (SECIS) in the 3'-noncoding region is boxed.

bluefin tuna GPx1a	MAVRRFYDLTVKLLSG-ETFSLSALKGKVLLIENVASLU <u>GGTTTRD</u> YT
bluefin tuna GPx1b	MAKKIYDFEAKLLTG-ETDFSTLQGKVLLI <u>VNVASLU</u> GGTTTRD
bovine GPx1	MCAAQRSAAALAAAAPRTVYAFSARPLAGGEPFNLSSLRGGVLLIENVASLU <u>GGTTVRD</u> YT
bluefin tuna GPx1a	QMNELHSRYSDKGLVILGVPCNQFGHQENCKNDEILRSLKYVRPGNGFEPNFQLLEKVDV
bluefin tuna GPx1b	QMNELHERYAGKGLVILGVPCNQFGHQENCKNEEILLSLKYVRPGNGFEPKFQLEKVDV
bovine GPx1	QMNDLQRRLLGPRGLVVLGFPCNQFGHQENAKNEEILNCLKYVRPGGGFEPNFMLFEKCEV
bluefin tuna GPx1a	NGKDAHPLFVYLKERLPSPCDDAMALMNDPKFIWSPVSRNDVSWNFEKFLVSPDGEPYK
bluefin tuna GPx1b	NGKNTHPLFTFLKESLPSPSDEQHTFLNDPKLIWSPVCRNDVAWNFEKFLIGSDGVPFK
bovine GPx1	NGEKAHPLFAFLREVLPTPSDDATALMTDPKFIWSPVCRNDVSWNFEKFLVGPDGVVPR
bluefin tuna GPx1a	RYSRNFLTIDIEADIKELLKRVK
bluefin tuna GPx1b	RYSRRFLTSIDIDGIQKLLNQAN
bovine GPx1	RYSRRFLTIDIEPDIETLLSQGASA

Figure 4-3 Deduced amino acid sequences of Pacific bluefin tuna GPx1a and GPx1b, and bovine GPx1. A putative selenocysteine residue in the active center is boxed.

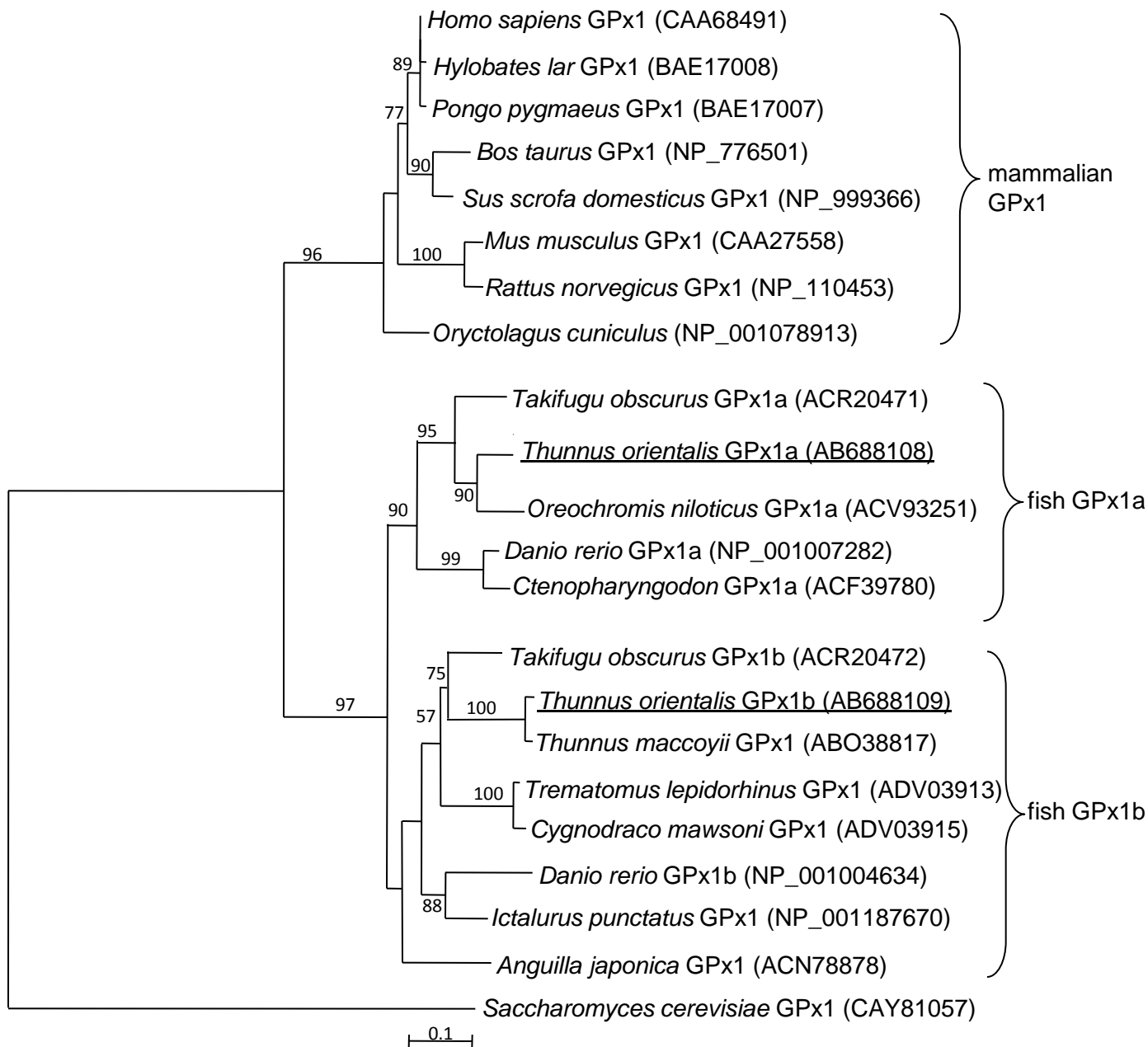


Figure 4-4. Phylogenetic relationships among vertebrate GPx1 enzymes. The tree was constructed with a protein maximum likelihood program, PHYML 3.0 [32]. Bootstrap confidence values for the sequence groupings are indicated in the tree (n=100). The Pacific bluefin tuna GPx1a and GPx1b, identified in this study, are underlined. Sequences database accession numbers in DDBJ/EMBL/GenBank are indicated in parentheses. The scale indicates the evolutionary distance of one amino acid substitution per site.

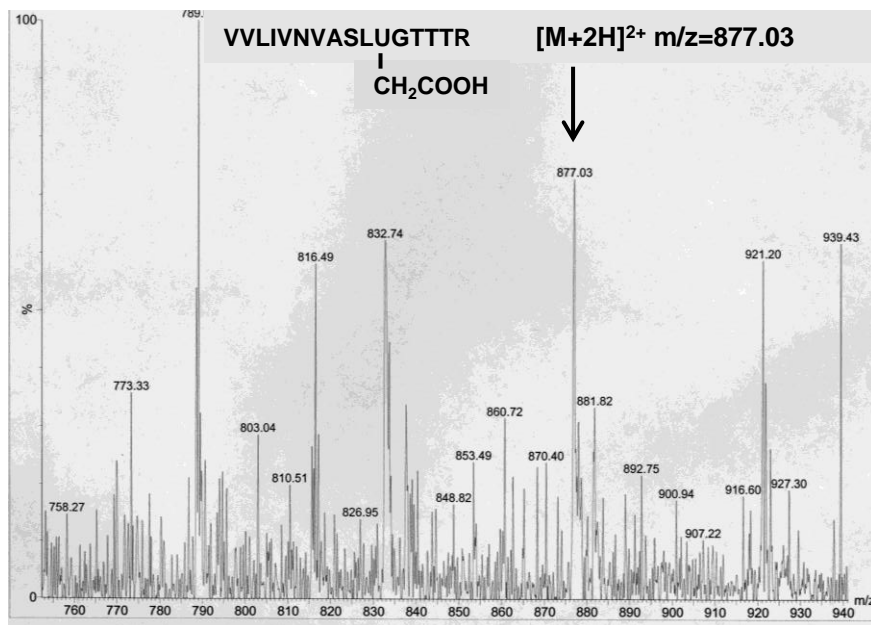


Figure 4-5. Mass spectrum of the trypsin-digests of *Se*-carboxymethylated GPx1 purified from Pacific bluefin tuna dark muscle by HPLC-ESI-MS. An arrow indicates a divalent ion peak of *Se*-carboxymethyl-VVLIVNVASLUGTTTR (calculated $m/z = 876.4439$).

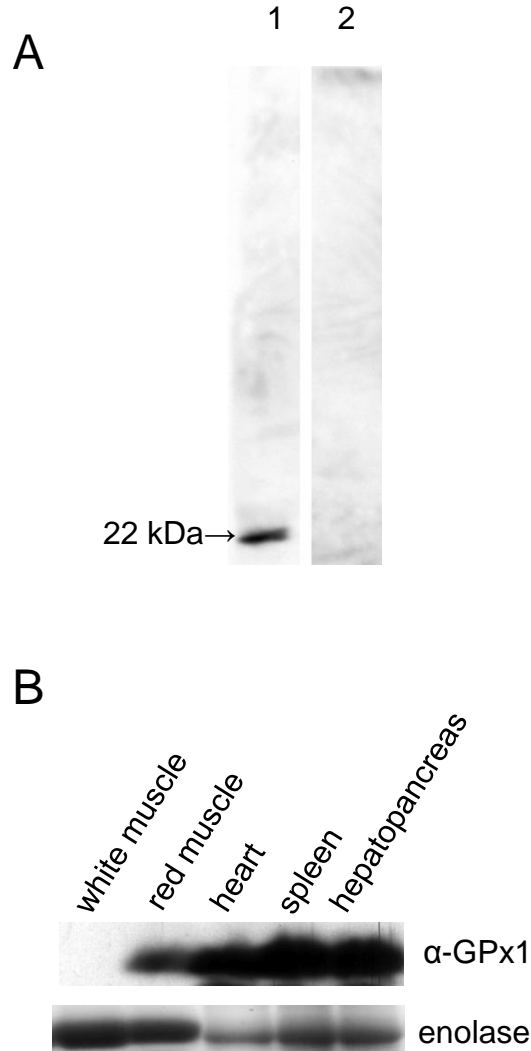


Figure4-6. Expression of GPx1 in various tissues of Pacific bluefin tuna by western blotting. (A) Water soluble proteins (10 μ g/lane) in the red muscle were separated in a 12.5% SDS-PAGE gel. GPx1 expression was detected by western blotting using an anti-GPx1 antibody (lane 1). The arrow indicates a 22 kDa protein. The staining disappeared completely when the antibody (20 ng of IgG) was pre-incubated with the purified tuna GPx1 (0.5 μ g) to remove the cross-reactive antibodies (lane 2). (B) Water soluble proteins (17 μ g/lane) in the white muscle, red muscle, heart, spleen, and hepatopancreas were separated in a 12.5% SDS-PAGE gel. GPx1 was detected by immunostaining with anti-GPx1 antibody, and enolase was detected as an internal control by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining.

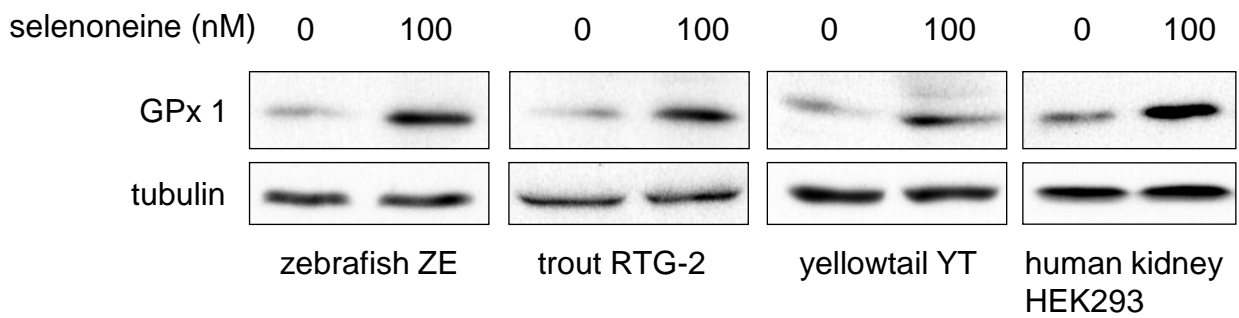


Figure 4-7. Expression of GPx1 in various cells cultured in the presence or absence of selenoneine by western blotting.

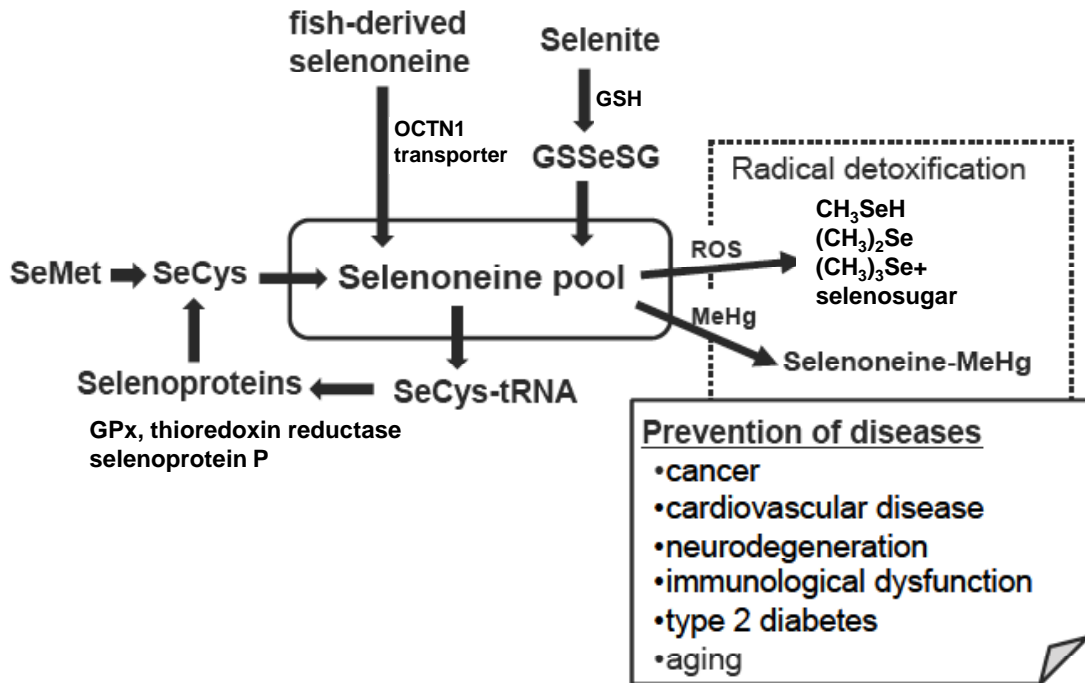


Figure 5-1. Proposed model of the selenium metabolism and radical detoxification.