

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	今井岳志
論文題目	Studies on Mammalian Selenite Metabolism (哺乳動物における亜セレン酸代謝に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
必須微量元素セレンはセレノシステイン残基としてグルタチオンペルオキシダーゼなどのセレンタンパク質中に取り込まれ、細胞内で種々の酸化還元反応に関与する。がんやエイズの発症を遅延させるほか、抗炎症作用をもつなど、多くの疾病との関わりが報告されており、セレン代謝に関する詳細な理解が求められている。とりわけ L-セレノシステインを含むタンパク質や亜セレン酸 (H₂SeO₃) は、動物の主なセレン摂取源であるにも関わらず、どのような経路でセレンタンパク質生合成に必要とされるセレニド (Se²⁻) に変換されるのか明らかにされていない。また、これらの化合物の生体内での運搬機構の詳細も明らかにされていない。本研究はラットおよび動物細胞を用いて、これらのセレン化合物のセレニドへの変換機構、および、細胞への取り込みと排出の機構を解析したものである。さらに、従来の方法では検出が困難であったセレノールとセレニドの定量法を開発することにも成功した。これらの成果は以下のように要約される。			
1. 赤血球によるセレン化合物の取り込みと代謝			
食物から摂取されたセレン化合物は血液を介して全身に供給されると考えられるが、種々のセレン化合物がどのような血中成分によって運搬されるのかは明らかにされていない。ラットから採取した血液に種々のセレン化合物を添加し、各血中成分中の経時的なセレン量の変化を測定した。その結果、赤血球が L-セレノシステインを顕著に取り込むことを見いだした。L-セレノシスチン（ジセレニドを形成した酸化型のセレノシステイン）や L-セレノメチオニンの取り込み効率は著しく低かったことから、還元的な条件下でセレノールの存在することが取り込みに重要であることが示唆された。一方、赤血球中にセレノシステインリアーゼが存在することも見いだされた。このことから、赤血球に取り込まれた L-セレノシステインはセレノシステインリアーゼによって分解されるものと考えられた。また、亜セレン酸由来のセレンが血漿中で赤血球に取り込まれたあと直ちに排出されるのに対し、L-セレノシステイン由来のセレンは排出されずに赤血球内に蓄積することが示された。これらの結果から赤血球への取り込み後の経路が L-セレノシステインと亜セレン酸で異なるものと考えられた。			
2. 肝細胞における亜セレン酸代謝			
亜セレン酸は <i>in vitro</i> ではグルタチオン (GSH) やチオレドキシシンレダクターゼ (TrxR) によって還元される。しかし、TrxR のノックダウンがセレンタンパク質生合成に影響をあたえないことから、<i>in vivo</i> では TrxR 以外に亜セレン酸還元を担う分子が存在するものと考えられる。そこで、細胞内の GSH がセレンタンパク質生合成に関与する可能性を、マウス肝がん由来の培養株 Hepa1-6 を用いて検討した。GSH 生合成の阻害剤である DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine を培地中に添加することで細胞内			

GSH を枯渇させ、セレンタンパク質生合成への影響をみた。その結果、細胞内の GSH がほぼ枯渇 (98% 減少) した場合でも、セレンタンパク質生合成量には影響が見られなかった。一方、細胞外へ排出されるセレンの量は顕著な影響を受け、GSH が枯渇した細胞では低分子セレン化合物の排出が有意に抑制されていた。このことは GSH が過剰セレン排出のために機能していることを示唆している。また、これらの結果から、セレンタンパク質生合成に寄与する亜セレン酸還元には、GSH や TrxR に依存しない経路が関与する可能性が考えられた。そこで、TrxR と配列が類似したグルタチオンレダクターゼに注目し、亜セレン酸還元活性を測定した結果、本酵素が亜セレン酸を NADPH 依存的にセレニドに還元することを見いだした。

3. セレノールとセレニドの検出法の開発

生体内のセレノールとセレニドを検出・定量することは、セレン化合物の機能や代謝、分布を理解する上で重要である。しかし、セレンの化学的性質は同族元素の硫黄と類似しており、また、生体内では硫黄に比べて微量しか存在しないため、セレノールおよびセレニドを特異的に検出することは難しい。チオールとセレノールの pKa の違いを利用して、酸性条件下でセレノールを優先的にアルキル化剤によって蛍光修飾する手法が報告されているが、生体内のように過剰なチオールが存在する条件下や中性条件下では用いることができず、生体内セレノールの検出には適用が困難であった。本研究では、GSH の定量試薬として用いられる monochlorobimane (MCB) が、生体内セレノールおよびセレニドの検出・定量試薬として有用であることを見いだした。MCB とチオールが反応すると、クロロメチル基の塩素原子がチオールに置換してスルフィドが生成するが、MCB がセレノールまたはセレニドと反応すると、チオールの場合とは異なり syn-(methyl,methyl)bimane が生成することを見いだした。この蛍光分子は他の bimane 誘導体と比較して極性が低く、酢酸エチルを用いることで迅速かつ選択的に抽出が可能であった。この手法を用いることで、Hepa1-6 培養細胞に亜セレン酸をあたえると細胞内のセレノールおよびセレニドが増加することを定量的に示すことに成功した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

必須微量元素セレンは、セレンタンパク質中のセレノシステイン残基として酸化還元反応に関与するなど、重要な生理機能を担っている。亜セレン酸や L-セレノシステインは動物の主要なセレン摂取源であるが、これらのセレン化合物の代謝経路や運搬機構には不明な点が多い。本論文は、哺乳動物におけるこれらの代謝・運搬機構を解析するとともに、生体内セレンの重要な化学形態であるセレノールおよびセレニドの検出・定量法を開発したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. 血中のセレン化合物の動態を解析し、L-セレノシステインが赤血球に取り込まれることを示すとともに、赤血球からの排出様式が L-セレノシステインと亜セレン酸で異なることを見いだした。また、赤血球内に、L-セレノシステインに作用するセレノシステインリアーゼが存在することも見いだした。食物から摂取されたセレン化合物が全身に運搬される仕組みの一端を明らかにした研究成果として高く評価できる。

2. 従来、GSH が細胞内の亜セレン酸還元を担い、セレンタンパク質生合成に寄与するものと考えられてきたが、本研究において、肝細胞におけるセレンタンパク質生合成に GSH が必須でないことや、細胞からのセレンの排出に GSH が関与することを示した。一方、グルタチオンレダクターゼが亜セレン酸還元を触媒することを明らかにした。亜セレン酸の代謝に関する従来の仮説の見直しを迫る重要な知見を得たものとして、また GSH およびグルタチオンレダクターゼの新しい機能を見いだしたものとして意義深い研究成果である。

3. 生体内セレンの重要な化学形態であるセレノールおよびセレニドを MCB を用いることにより検出・定量する新しい方法を開発した。生体内に微量しか存在しないセレン化合物を高感度・高選択的に分析することを可能にする研究成果であり、今後のセレン研究の発展に寄与するものとして特筆に値する。

以上のように本論文は、哺乳動物細胞におけるセレン化合物の代謝・運搬機構の一端を明らかにするとともに、セレン化合物特異的な新しい検出・定量法を開発したものであり、代謝生化学、酵素化学、分析化学に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成25年2月12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降