

# Characterization of Selenium Species in the Niboshi Extract (煮干だし中セレン含有物質の分離分析)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 吉田 さくら

## [目的]

セレン(Se)はヒトを含む多くの高等生物にとって必須であり、生体内の酸化還元制御において重要な役割を担っている。セレンはすべて食物から摂取され、肉類、魚介類、卵類、穀類などに多く含まれている。これまでに、日本ではセレン欠乏症は報告されていない。日本人は魚介類の摂取量が多いことから、摂取するセレンの半分以上を魚介類から得ている。魚介類由来セレンの生体利用効率は、植物などのそれと比較して低いとされてきたが、最近では魚介類由来セレンが有効に生体利用されるという報告もなされている。煮干カタクチイワシは、比較的高濃度のセレンを含有し、だしの材料などとして日常的に用いられる食材であることから、日本人にとって良好なセレン供給源であると考えられる。以前に行なわれた動物実験においても、煮干由来セレンは、セレン欠乏飼料を与えたマウスの肝臓中セレン濃度および、セレン含有酵素グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)活性を上昇させるのに、亜セレン酸と同等、またはそれ以上の効果を示した。また、煮干だしを与えた場合も、亜セレン酸と同等の改善効果があった。したがって、煮干および煮干だしには生体利用効率の高いセレン含有物質が含まれていると考えられる。食品由来セレンの生体利用効率は、セレンの化学形に依存するため、様々な食品中セレンの分析が行われてきた。これまでに、セレン酵母などのセレン強化食品からいくつかのセレン化合物が同定されてきたが、通常の商品中セレン濃度は非常に低いため、その化学形はほとんど知られておらず、特に魚介類中セレン化合物に関する報告は少ない。本研究では、煮干だしに含まれるセレン含有物質について調べるため、煮干だしを種々の方法により分析した。また、培養細胞を用いて、粗精製した煮干だし由来セレンの利用効率を調べた。

## [結果および考察]

### (1) 煮干だし中セレン含有物質の分析

煮干および凍結乾燥した生のカタクチイワシ中セレン含量はそれぞれ  $1.21 \pm 0.03$  および  $1.14 \pm 0.02 \mu\text{gSe/g}$  であり、加工過程におけるセレンの損失はほとんどないと考えられた。また、煮干およびカタクチイワシを頭、内蔵、身の部位に分けてセレン含量を測定したところ、内蔵に最も高濃度のセレンが検出された。煮干だしを種々の方法により作製したところ、だし中セレン濃度は  $3.795\text{--}7.215 \text{ ng/ml/g-Niboshi}$  であり、煮干中セレンの 6-12%が抽出された。一方、だしからは無機のセレンは検出されなかった。また、だしにはセレン以外にナトリウム、カリウムなどの無機塩やアミノ酸、タンパクなども抽出されていた。

限外ろ過により煮干だし中セレン含有物質の分子量を調べた結果、分子量 5-30 kDa のタンパク性セレン含有物質が含まれていることが分かった。また、煮干だし中セレンの大部分は分画分子量 5 kDa のフィルタを透過したことから、煮干だし中セレンの

多くはアミノ酸やペプチドなどを含む有機低分子であると推察された。

次にイオン交換体の中性塩分解能を利用して、煮干だし中セレン含有物質をそのイオンの性質に基づいて分離した。始めに OH 形にした強塩基性陰イオン交換体 Q Sepharose [P-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·OH] に煮干だしを負荷し、Milli-Q 水を通液した。この条件では、陰イオン性物質だけではなく、中性条件では解離しにくい両イオン性物質もカラムに保持される。カラムに保持されずに溶出したセレンは負荷量の 8.6%であったことから、91.4%のセレンがカラムに保持された。さらに、Q Sepharose カラムに保持されなかった画分を凍結乾燥後、H 形にした強酸性陽イオン交換体 SP Sepharose (P-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>·H<sup>+</sup>) に負荷し、Milli-Q 水を通液した。カラムに保持されなかった画分からは、総負荷量の 2.7%のセレンが検出され、これらは、陰イオン交換体、陽イオン交換体、どちらのカラムにも保持されない、非イオン性のセレン含有物質であると考えられた。次に、Q Sepharose カラムに保持された成分を溶離させるために、カラムに 0.1 M HCl を通液した。ここで溶離したセレンは負荷量の 55.9%であり、約 40%のセレンは Q Sepharose カラムに保持されたままであったが、アミノ酸およびタンパクは、塩酸の通液により 80%以上がカラムから回収された (Table 1)。したがって、カラムに残ったセレン種の多くは、アミノ酸やタンパクなどの両イオン性物質とは異なる有機セレン含有物質であると考えられた。また、SP Sepharose カラムに 0.1 M NaOH を通液して、カラムに保持された成分を溶離させると、負荷したセレンはほぼ全て溶離し、総負荷量の 2.8%が検出された。これらのセレン含有物質は、陽イオン性物質であると推察された。

Table 1. Selenium, Amino Acid and Protein Contents in Fractions Separated by Ion-exchange Chromatography

Fraction	Content (%)		
	Selenium	Amino acid	Protein
Not retained on Q Sepharose column	8.6 ± 0.2	5.4 ± 0.5	4.7 ± 0.1
Retained on neither Q nor SP Sepharose column	2.7 ± 0.1	3.8 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Eluted from Q Sepharose column with 0.1 M HCl	55.9 ± 2.0	83.1 ± 0.6	96.4 ± 1.5
Eluted from SP Sepharose column with 0.1 M NaOH	2.8 ± 0.3	3.5 ± 0.0	0.1 ± 0.0
Total recovery	61.5	90.4	96.5

イオン交換クロマトグラフィの結果、煮干だし中セレン含有物質の多くは陰イオン性もしくは両イオン性であると考えられたため、次にイオン対形成試薬を用いてこれらのイオン性セレン含有物質を有機溶媒に抽出することを試みた。イオン対形成試薬として tetra-*n*-butylammonium bromide (TBA) および hexadecyltrimethylammonium chloride (HTAC) を用い、煮干だしと混合後、クロロホルムで抽出した。さらにクロロホルム層に含まれるイオン対形成試薬を除くため、塩化カリウム水溶液で再度抽出し、水層を凍結乾燥した。得られた抽出物を FAB および MALDI-TOF 質量分析した結果、*m/z* 298 および 577 に、<sup>80</sup>Se の分子イオンピークが検出された (Figure 1)。これらのピークは分子内に 1 個のセレン原子を有していると推察された。

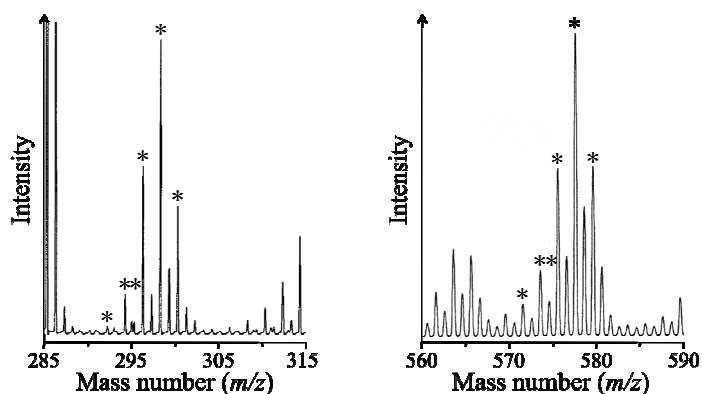


Figure 1. Mass Spectra of Selenium Species Extracted with HTAC from the Niboshi Extract. Asterisks indicate peaks containing naturally occurring stable isotopes of selenium.

## (2) 煮干だし由来セレンの培養細胞による利用能評価

ラットから抽出した脊髄後根神経節 (DRG) 細胞および HeLa 細胞を、亜セレン酸、セレノメチオニン (SeMet) またはエタノールで抽出した煮干だしを添加した培地で一定期間培養後、細胞質の GPx 活性を測定した。その結果、煮干だし由来セレンを添加した細胞では、SeMet を添加した細胞と比較して GPx 活性が有意に上昇し、亜セレン酸と同等の効果を示した (Figure 2)。したがって、煮干だし中セレン含有物質は、これらの細胞に取り込まれ、セレンタンパクの合成に利用されたと考えられた。これらのことから、煮干だしには亜セレン酸と同程度の高い生体利用効率を示す有機セレン化合物が含まれている可能性が示唆された。

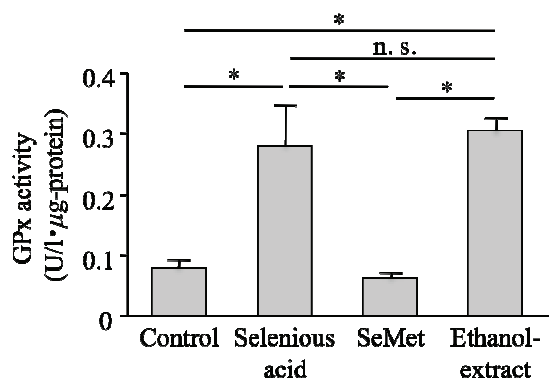


Figure 2. GPx Activity of 4nt from each other with  $P < 0.05$ . n. s., Not significantly different from each other

以上より、煮干だし中の主要なセレン含有物質は分子量 5,000 以下の有機陰イオン性または両イオン性物質であり、その中には質量分析により  $m/z$  298 または 577 に検出されたセレン含有物質も含まれると考えられる。また、煮干だし中セレン含有物質は、培養細胞においても GPx 活性を上昇させるのに亜セレン酸と同等の効果を有することが示された。

### [基礎となった学術論文]

1. Yoshida S., Haratake M., Fuchigami T., Nakayama M. Characterization of Selenium Species in Extract from Niboshi (a Processed Japanese Anchovy). *Chem. Pharm. Bull.*, in press.