

必須微量元素セレンの赤血球膜輸送機構の解明

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 北郷 真史

〔目的〕

16 族元素の一つであるセレン(Se)は、多くの高等生物における必須微量元素であり、セレノシステイン(SeCys)の化学形でタンパク質に挿入され、ほぼ全身の臓器や組織に分布している。SeCys が挿入されたセレンタンパク質は、生体内の酸化還元制御などにおいて重要な生理機能を発揮している。生体内のセレンはすべて体外から接種されるが、セレン供給源からセレンタンパク質の生合成に至までのセレン代謝マップの詳細には不明な点が多い。中でも、セレンの生体膜輸送に関する知見は非常に乏しい。有効なセレン供給源の一つである亜セレン酸(SA)は、血中に流入した後、速やかに赤血球に取り込まれ、還元的代謝を受けた後、再び血漿中に放出される。血漿中に放出されたセレンは、血漿アルブミン(HSA)に結合し、肝臓へ運搬された後、セレンタンパク質の生合成に利用されると考えられている。赤血球に取り込まれた SA は、グルタチオンセレノトリスルフィド (G-SSeS-G) に代謝された後、ほぼ全てのセレンがヘモグロビン (Hb) のシステイン (Cys) 残基のチオールに結合していると報告されているが、Hb から血漿へのセレンの膜輸送機構は明らかではない。本研究は、Hb に結合したセレンの赤血球膜輸送機構の解明を目的とした。

〔結果および考察〕

(1)赤血球から血漿へのセレンの放出挙動：37°C において SA 処理した赤血球に血漿を混合すると、赤血球中のセレン量は徐々に減少し、それに対応した時間経過で血漿中のセレン量は増加した。このようなセレンの放出は、予め赤血球をチオール修飾剤で化学修飾すると著しく阻害された。また、4°C および赤血球内 ATP を減少させた条件では完全に抑制された。さらに、血漿に替えて等張緩衝液を使用すると、37°C であっても、セレンは赤血球から全く放出されなかった。しかし、等張緩衝液に HSA を添加すると、セレンは赤血球から放出され、その放出は HSA 中の唯一の遊離チオールである Cys34 を化学修飾することにより抑制された。セレンの放出は、低分子チオールであるペニシラミン(Pen-SH)の添加でも観察された。赤血球から血漿へのセレンの放出には、赤血球膜および赤血球外のチオールが重要であり、また、ATP に依存する輸送過程が含まれていると考えられた。

(2)赤血球細胞質から膜へのセレンの輸送：SA 処理した赤血球の膜を単離した後、膜タンパクを SDS-PAGE により分離し、各バンドのセレン量を測定したところ、スペクトリンと、AE1 のバンドにほとんどのセレンが検出された (Fig. 1)。スペクトリンは膜の裏打ちタンパクであることから少なくともセレンの膜輸送タンパクではない。一方、AE1 は膜貫通タンパクであり、その N 末端細胞質ドメイン (N-CPD) は Hb との結合親和性を有しており、N-CPD に 2 つ (Cys201, Cys317)、膜貫

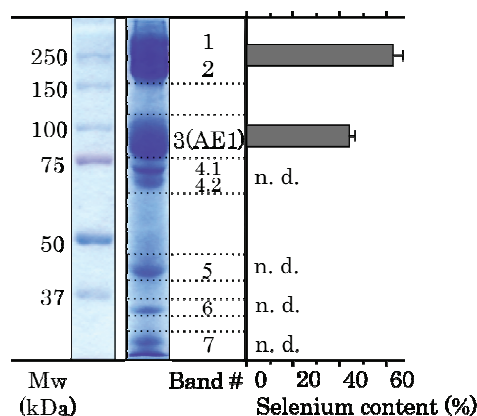


Fig. 1. SDS-PAGE of the RBC membrane and selenium contents.

通ドメイン (MSD) に 2 つ (Cys479, Cys843)、C 末端細胞質ドメイン (C-CPD) に一つ (Cys885) の Cys 残基を有している (Fig. 2)。そこで次に、膜を、N-CPD および MSD、C-CPD、表在性膜タンパクに分画しセレン量を測定したところ、AE1 の何れのドメインにもセレンが検出された。特に、細胞質部分だけでなく、膜間部分にもセレンが結合していたことは、この AE1 へのセレンの運搬がセレン膜輸送機構の一端であることを示唆する結果であった。

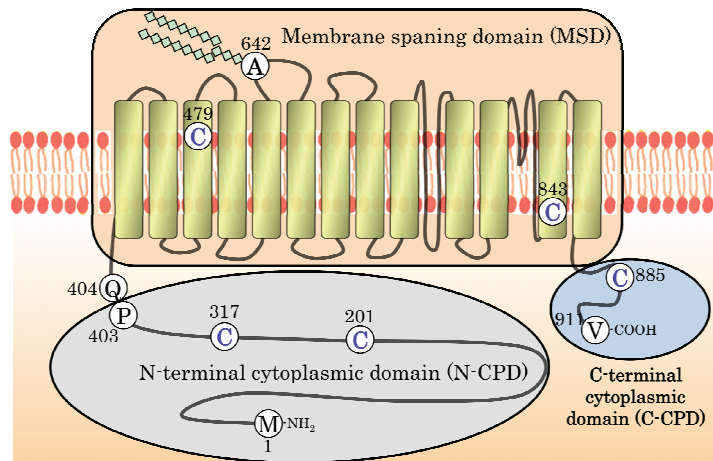


Fig. 2. Locations of cysteine residues in topographical model of AE1

(3)AE1 のアニオン輸送との比較: AE1 はその名が示す通り、アニオン($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$)交換輸送体として知られている。赤血球から血漿へのセレンの放出は、そのアニオン輸送の選択的阻害剤では全く阻害されなかった。さらに、AE1 の 5 つの Cys をすべてアラニンに変異させてもアニオン交換輸送には全く影響しないことが報告されている。一方、血漿へのセレンの放出は、AE1 の Cys 残基のチオール化学修飾により著しい阻害を受ける。したがって、AE1 によるセレンの輸送は、従来のアニオン交換輸送とは異なり、Cys 残基が媒介する機構に基づいていると考えられた。

(4)AE1 に結合したセレンの血漿への輸送挙動: SA 処理後の赤血球から膜を単離し、常法により封着膜小胞を調製した。封着膜小胞を血漿に加えてインキュベートし、AE1 に結合したセレンの血漿への放出挙動を検討した。その結果、AE1 の N-CPD および MSD に結合していたセレンの減少が顕著であり、それは膜から輸送されたセレン量の 75% に相当した (Fig.3)。したがって、セレンは AE1 の N-CPD、MSD を経由して血漿へ輸送されているものと考えられた。また、同様のセレンの放出は 4°C でも観察されたことから、赤血球膜から血漿へのセレンの輸送は、ATP 非依存的に進行するものと考えられた。

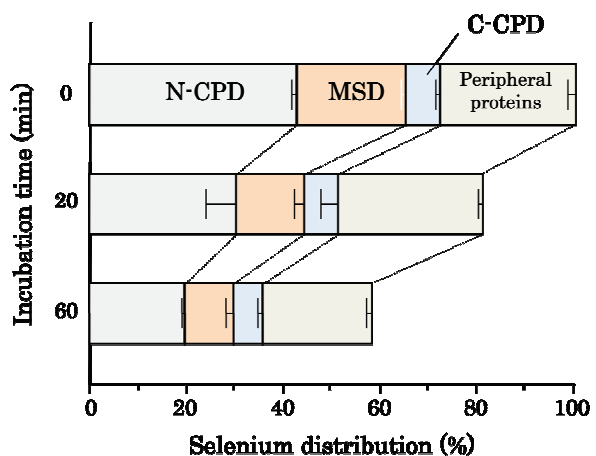


Fig. 3. Selenium transport from resealed membrane to the plasma

(5)Cys 残基に媒介されるセレンの膜輸送機構: 細胞質から膜、血漿へのセレンの一連の輸送には、Cys 残基がセレン結合部位として関与していると考えられることから、MALDI-TOF 質量分析法により Cys に結合したセレンの化学形を検討した。まず、SA 処理後の赤血球内の Hb を分析すると、セレンは Hb の β 鎖の Cys93 にセレネニルグルタチオンとして結合していた (Hb-Cys893-SSeS-G)。AE1 の Cys 含有フラグメントを解析すると、N-CPD の Cys317 にもセレネニルグルタチオンの付加体が検出された。したがって、セレンは Hb-Cys893-SSeS-G と N-CPD の Cys317 とのチオール交換反応により、Hb から N-CPD に運搬されていると考えられた。MSD の Cys

については、その検出には至らなかった。そこで、モデル化合物として Pen-SSeS-Pen を用いて、セレノトリスルフィドと MSD の Cys 残基との反応性を検討した。HSA の Cys34 は Pen-SSeS-Pen に対してチオール交換反応を生じる。また、先の Pen-SH 溶液へのセレンの放出実験において、Pen-SH 溶液中には Pen-SSeS-Pen が検出された。Pen-SSeS-Pen と単離した膜をインキュベートすると、SA 処理時と同様に、N-CPD および MSD へのセレンの結合が観察された。反応前後の混合物中のチオール量は一定であったことから、両者の反応ではセレンの還元は生じていないと考えられた。MALDI-TOF 質量分析より、N-CPD の Cys317 および MSD の Cys843 へのセレネニルペニシラミン(-SeS-Pen)付加体が検出された。さらに、チオールアルキル化剤を用いて N-CPD の Cys 残基だけを化学修飾すると、MSD の Cys 残基はすべて遊離であるにも拘らず、セレンは MSD へは結合しなかった。この結果より、Pen-SSeS-Pen は MSD の Cys 残基と直接反応しておらず、Cys317 とのチオール交換反応により N-CPD に結合し、さらに同様の反応により N-CPD から MSD の Cys 残基へと運搬されるのではないかと考えられた。これらの結果から、赤血球膜から血漿への放出において、セレンはセレノトリスルフィドの化学形でリレー運搬されていくものと考えられた。

[結論]

本研究の結果から、赤血球から血漿へのセレンの放出における膜輸送には、膜貫通タンパク質 AE1 が関与することが明らかとなった。SA として赤血球に取り込まれ Hb に結合したセレンは、Hb と AE1 の N-CPD との結合に基づき N-CPD の Cys317 に運ばれ、さらに MSD の Cys843 に運搬された後、血漿に放出され HSA に結合すると考えられた。このようなセレンの膜輸送は、タンパク質の Cys 残基のチオールが中継ポイントとなり媒介する一連のチオール交換反応（セレノトリスルフィドリレー機構： $R\text{-SSeS-R} + R'\text{-SH} \rightarrow R\text{-SSeS-R}' + R''\text{-SH} \rightarrow R\text{-SSeS-R}''$ ）に基づいていると考えられた(Fig.4)。

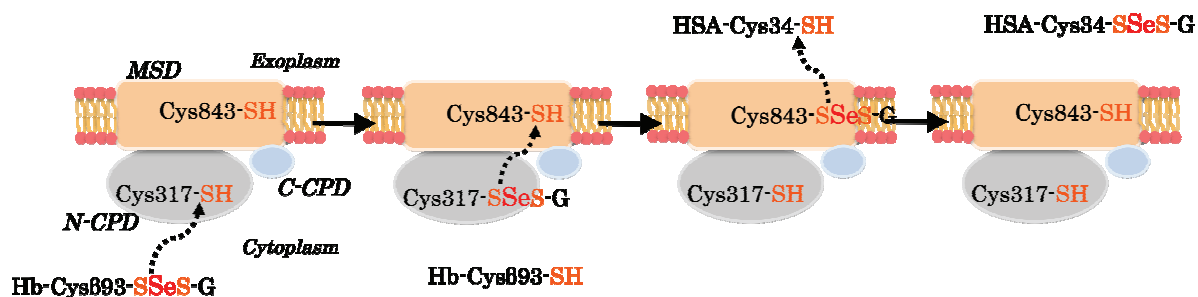


Fig. 4. Proposed selenium transport mechanism via thiol exchange reaction.

[基礎となった学術論文]

1. Haratake, M., Hongoh, M., Miyauchi, M., Hirakawa, R., Ono, M., Nakayama, M. Albumin-mediated Selenium Transfer by a Selenotrisulfide Relay Mechanism. *Inorg. Chem.* **13**, 6273-6280 (2008)
2. Haratake, M., Hongoh, M., Ono, M., Nakayama, M. Thiol-dependent Membrane Transport of Selenium through an Integral Protein of Red Blood Cell Membrane. *Inorg. Chem.* **48**, 7805-7811 (2009)