

分担研究報告書

ダイオキシン誘導性セレン結合性タンパク質 1 (SelenBP1)の腎臓における役割: SelenBP1欠損マウスでの検討

研究分担者	石井 祐次	九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野	准教授
研究協力者	李 任時	九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野	助教
	田中 嘉孝	九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野	教授
	藤本 景子	九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野	助教

研究要旨

当教室ではこれまでに、ダイオキシンが肝臓のセレン結合性タンパク質 1 (SelenBP1)を誘導することを明らかにしてきた。また、SelenBP1 の遺伝子欠損マウスを作成して、ダイオキシン毒性発現、あるいは毒性軽減への寄与について検討を行って来たが、SelenBP1 と相同性の高いもう一つの分子種 SelenBP2 が発現しているため、その誘導の意義について理解することが難しかった。SelenBP2 の発現は腎臓において低いことが報告されているため、ダイオキシン誘導性 SelenBP1 の腎臓における役割を明らかにすることを目的として、ダイオキシン非投与条件下で、野生型の C57BL マウスと SelenBP1 欠損マウスの腎臓を用いたメタボロミクス解析を行った。その結果、脂質代謝関連因子の変動が確認され、SelenBP1 の脂質代謝への寄与が推定された。次に、DNA マイクロアレイ解析を行った。多数の遺伝子に発現変動が認められたが、その中で、変動が示唆された脂質代謝関連因子に着目し、更に、リアルタイム RT-PCR にて発現変動を解析した。SelenBP1-KO マウスの腎臓では、脂肪酸の ω および ω -1 水酸化に関与することが知られている cytochrome P450 4a (Cyp4a)サブファミリーのうち、Cyp4a12a および Cyp4a12b の発現が有意に低下した。ペルオキシゾームでの分岐脂肪酸の不飽和化を触媒する acyl-CoA oxidase3 (Acox3)の発現も有意に低下した。マイクロアレイでは変動が示唆されていたものの、脂質代謝系の酵素の発現を制御する peroxisome proliferator-activated receptor- α (Ppara)および Ppar- γ coactivator-1 β (Ppargc-1b)の発現レベルには影響がなかった。しかし、Ppara とヘテロオリゴマーを形成して遺伝子発現を促進させる retinoid-X-receptor- α (Rxra)の発現は低下していた。また、carnitine palmitoyltransferase 1a (Cpt1a)や Cyp2e1 についても検討したが、発現変動は確認されなかった。以上の結果から、1) メタボロミクス解析より、TCDD 誘導性の SelenBP1 は、脂質代謝に関連した機能を有する可能性が示唆された。2) マイクロアレイ解析の結果もこれを支持し、脂質酸化酵素に発現低下が確認されたこと、これらの遺伝子の発現に関与する Rxra も低下したことから、SelenBP1 が脂質代謝を促進的に調節している可能性が示唆された。

A. 研究目的

A. 研究目的

セレン結合性タンパク質 (SelenBP1) は、肝臓、腎臓、性腺などに多く発現するサイトゾルタンパク質の一つである (1)。

SelenBP1 は、生体内においてセレンとの結合能を有し、セレンの生理的役割に関わるものと推定されている。これまでに、抗酸化的作用 (2)、増殖抑制作用 (3)、ゴルジ層板間のタンパク質構成因子 (4) 等の

機能が報告されているものの、これらは、いずれも決定的とはいえず、その生理的機能は十分に理解されているとはいえず。

当研究室では、ダイオキシン類の一種、3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl、および多環芳香族炭化水素、3-methylcholanthrene のラットへの曝露により肝臓における SelenBP1 タンパク質および mRNA 発現が顕著に誘導することをすでに報告している (5-7)。ダイオキシン類は、免疫抑制、肝障害、発がんプロモーション作用等、生体に対して非常に多彩な毒性を引き起こすが (8)、その大部分の毒性発現に関与すると考えられているのが芳香族炭化水素受容体 (AhR) である (9)。ダイオキシン類は、細胞内においてサイトゾルに局在している AhR に結合することで核内へと移行し、AhR nuclear translocator とヘテロダイマーを形成する。この複合体が様々な遺伝子上流に存在するコンセンサス配列、xenobiotic responsive element (XRE) に結合することで、cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) に代表される遺伝子発現を変動させることが知られている (10)。ダイオキシン類により変動する遺伝子は実に数百種類にもものぼるが、どの遺伝子変動がどの毒性発現に重要であるのかなど詳細に関しては未だ十分には明らかになっていない。

当研究室では、これまでにラットにおいて見出されている SelenBP1 遺伝子の誘導に注目し、ダイオキシンによる毒性との関連性を検証することを目指して研究を行って来た。マウスにおいては SelenBP1 とアミノ酸配列で約 97% の相同性を示す SelenBP2 (アセトアミノフェン結合性タンパク質) が存在することが知られているが、これは異なる遺伝子産物であり臓器分布等も多少異なる (11)。SelenBP2 は、アセトアミノフェン代謝物との結合を介して肝障害発現に関わると推定されてい

るが (12)、SelenBP1 同様に肝臓に多く発現していること、および、その相同性の高さから SelenBP1 との機能的な関連性も示唆されている。当研究室では、ダイオキシンによる SelenBP1 の誘導機構を解析するため、ダイオキシン類に対して親和性の異なる AhR を有する二系統のマウス (C57BL/6J マウス: 高親和性 AhR、および DBA/2J マウス: 低親和性 AhR) を用いて比較検討することにより、SelenBP1 の誘導に対する AhR 依存性が検証されるとともに、SelenBP1 ノックアウト (KO) マウスを作製し、その表現型の解析を行った (13)。これらの結果から、SelenBP1 には、卵巣におけるガンへの防御的な役割がある可能性が示された。また、SelenBP1 と SelenBP2 は、ダイオキシンによる誘導性に差があることが分かったが、SelenBP1-KO マウスの肝臓においては、依然として SelenBP2 が発現しており、SelenBP1-KO によるダイオキシン毒性の悪化や軽減作用を見出すことは出来ず、その誘導の意義について理解することが難しかった。

最近、当研究室では、絶食により肝臓及び腎臓において、SelenBP1 発現は影響を受けないが、SelenBP2 発現が著しく低下することを見出した (未発表データ)。SelenBP2 の発現は腎臓において低いことが報告されているため (14)、本研究では、ダイオキシン誘導性 SelenBP1 の腎臓における役割を明らかにすることを目的とした。ダイオキシンにより変動する他の因子を排除して検討するために、ダイオキシン非投与条件下で絶食を行い、野生型の C57BL マウスと SelenBP1 欠損マウスの腎臓を用いたメタボロミクス解析を行った。また、マイクロアレイ解析も行い、脂質代謝関連因子の変動について解析を行った。

B. 研究方法

1. 動物実験

SelenBP1-KO マウスは、先行研究において作製したものをを用いた (13)。このマウスにおいては、SelenBP1 遺伝子の第 2 エクソンをネオマイシン耐性遺伝子カセットと置換することによって KO マウスを作製している。マウスの genotyping は、離乳後のマウスの尾よりゲノム DNA を抽出し、置換したネオマイシン耐性遺伝子、および SelenBP1 遺伝子を含むプライマーを用いて PCR を行い、アガロース電気泳動によるバンド検出にて行った。解析には、雌雄のホモ KO マウスの交配により得たホモ KO 雄マウスを用いた。また、日本クレアより、野生型 C57BL/6J を 7 週齢にて購入し、KO マウスと同一条件で一週間馴化させたのち、20 時間の絶食後に腎臓を摘出し解析に供した。

2. メタボローム解析

既報 (15) に準じて、採取した組織を MeOH:CH₃CN:H₂O (2:2:1, v/v) で抽出して、下記の構成からなる Waters 社製 UPLC-TOF/MS を用いてメタボローム解析を行った。ACQUITY UPLC system (Waters Corporation, Milford, MA, USA) -electrospray ionization (ESI) 検出器を装着した Waters LCT Premier™ Mass Spectrometer (Waters Corp., Manchester, UK)(positive モード)を使用し、カラムには ACQUITY UPLC BEH-C18 column (50 mm 4.6 mm i.d., 1.7 mm; Waters Corporation, Milford, MA, USA)を用いた。C57BL/6J 及び SelenBP1-KO それぞれの 8 週齢雄マウス 6 匹で行った。

3. DNA マイクロアレイ解析

マウスの腎臓組織はただちに RNeasy RNA stabilization Reagent (QIAGEN) 浸漬させ、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。抽出後の RNA 溶液は、1/10 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) および 2.5 倍量の 99.5% エタノー

ルを加えて混和し、氷上に 1 時間放置した。4°C, 1500 rpm にて 10 分間遠心分離し、上清を除去した後、70% エタノールを加えて、4°C, 1,500 rpm にて 10 分間遠心分離を行った。得られたペレットを total RNA として滅菌水で溶解し、NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて濃度を測定した。その後、Experion (BioRad Laboratories) による total RNA の電気泳動を行い、28s および 18s リボソーム RNA のバンド強度比ならびに RNA quality indicator (RQI) 値をもとに RNA の品質チェックを行った。なお、判定基準は 28s/18s \geq 1.5 および RQI \geq 9.5 とした。

マイクロアレイ解析は、セルイノベータ社にて受託解析を行った。

全てのデータは、Bioconductor ソフトウェアの pre-process Core パッケージを用いて標識化を行った後、Linear Models for Microarray Analysis (limma) による有意差検定を行った。C57BL/6J 及び SelenBP1-KO それぞれの 8 週齢雄マウス 3 匹ずつを用い、有意水準 p<0.05 とし、有意な変動を示した遺伝子を抽出してヒートマップを作成した。

4. リアルタイム RT-PCR 法

組織より total RNA を抽出したのち、PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (タカラバイオ社) を用いて cDNA を合成した (16)。これを鋳型とし、Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies 社) を用いて目的タンパク質の mRNA 発現変動を解析した。解析は、ターゲット mRNA の threshold cycle (Ct) 値を β -actin mRNA の Ct 値で補正した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、「九州大学動物実験規則」第 12 条第 4 号に基づき、動物実験委員会による実験計画の承認のもとに、動物の苦痛を可能な限り軽減して

実施した。動物実験承認番号：A30-103。遺伝子組換え実験は、「九州大学遺伝子組換え実験安全管理規則」第10条第2項の規定に基づき、委員会の承認を得て行った(承認番号: 25-103)。

C. 研究結果

ダイオキシン非投与条件下で、8週齢の野生型のC57BLマウスとSelenBP1欠損マウスを20時間絶食させ、各群6匹ずつの腎臓を用いたメタボロミクス解析をUPLC-TOF/MSを用いて行った。主成分分析を行った結果(Fig. 1A)、SelenBP1-KOにより野生型とは腎臓のメタボロームに明確な違いがあると考えられた。メタボロームの違いは、S-plotによっても見て取れる(Fig. 1B)。そこで、相関係数0.8以上、-0.8以下のものを有意な変動があるものと考えた。これらの中から、脂質代謝に関連する成分をTable 1に示す。Leukotriene F4、5-hydroxyeicosatetraenoate (5-HETE)、ceramide phosphate や7-dehydrodesmosterolなどの脂質代謝関連因子の変動が確認され、SelenBP1の脂質代謝への寄与が推定された。次に、DNAマイクロアレイ解析を行った。その時のヒートマップを示す(Fig. 2)。2689遺伝子の発現変動(1464遺伝子に増加、1225遺伝子に減少)が認められた。多数の遺伝子に発現変動が認められたが、その中で、変動が示唆された脂質代謝関連因子をTable 2に示す。これらに着目し、更に、リアルタイムRT-PCRにて発現変動を解析した。SelenBP1-KOマウスの腎臓では、脂肪酸の ω および ω -1水酸化に関与することが知られているcytochrome P450 4a (Cyp4a)サブファミリー(17)のうち、Cyp4a12aおよびCyp4a12bの発現が有意に低下した(Fig. 3)。マイクロアレイでは変動が示唆されていたものの、脂質代謝系の酵素の発現を制御するperoxisome proliferator-activated receptor- α (Ppara) (18)およびPpar- γ coactivator-1 β (Ppargc-1b)(19)

の発現レベルには影響がなかった(Fig. 4)。しかし、Pparaとヘテロオリゴマーを形成して遺伝子発現を促進させるretinoid-X-receptor- α (Rxra)(20, 21)の発現は低下していた(Fig. 5)。ペルオキシゾームでの分岐脂肪酸の不飽和化を触媒するacyl-CoA oxidase3 (Acox3)(22)の発現も有意に低下した(Fig. 5)。また、carnitine palmitoyltransferase 1a (Cpt1a)やCyp2e1についても検討したが、発現変動は確認されなかった(Fig. 6)。

D. 考察

本研究では、ダイオキシン誘導性SelenBP1の本来の役割を明らかにすることを目的とし、まず、腎臓のメタボローム解析を行った。腎臓には、もう一つの分子種SelenBP2の発現は低く(14)、当研究室の先行研究で絶食によってそのmRNAレベルが著しく低下することが示唆されていることから、ダイオキシンを投与しない条件下で8週齢の雄SelenBP1-KOマウスと対照のC57BL/6Jマウスに20時間絶食を行ってから比較検討した。ダイオキシン類の毒性の一つとして、脂質代謝異常が知られていることから(23-25)、ダイオキシンにより著しく誘導されるSelenBP1が脂質代謝に関連したタンパク質である可能性は十分考えられる。メタボロミクスの結果は、それを支持し、leukotriene F4、5-HETE、ceramide phosphate や7-dehydrodesmosterolなどの増加を認め、脂質の構成成分であるグリセリンの低下も示唆された(Table 1)。また、増加の示唆されたleukotriene F4や5-HETEはアラキドン酸代謝物であり、脂肪酸代謝が影響を受け炎症性物質が生成する可能性も示された。

また、DNAマイクロアレイ解析の結果、多くの変動が見られたため(Fig. 2)、メタボロミクスの結果を踏まえて、まず、脂質代謝に関連する因子に着目した(Table 2)。

SelenBP1-KO マウスの腎臓では、Cyp4a12a および Cyp4a12b の発現が低下していた (Fig. 3)。これらの酵素は、アラキドン酸の代謝に関わると、いずれも ω および ω -1 水酸化により、20-HETE および 19-HETE を生成することが知られている (17)。一方、メタボロミクスでも増加が示唆された 5-HETE は、5-lipoxygenase により生成するものである (26)。これは、さらに酸化されて炎症の原因物質にもなり得るため、SelenBP1 に、炎症を抑える働きがある可能性を示しているのかもしれない。メタボロミクスでの結果は定性的なものであるため、5-HETE、19-HETE、20-HETE など、各々の HETE また、アラキドン酸代謝物を定量する必要がある。また、Ppara および Ppargc-1b の発現レベルには影響がなかった (Fig. 4)が、Rxra の発現は低下していた (Fig. 5)。Rxra は、Ppar だけでなく、Lxr、Pxr、Rar、Car など多くの核内受容体とヘテロオリゴマーを形成し、転写調節に関与している (20, 21)。本研究では、脂質代謝への影響を中心に検討したが、SelenBP1 が Rxra の発現レベルにも影響するのであれば、これら Ppar 以外の受容体に関わる遺伝子発現の調節にも変動を及ぼす可能性があり、これらについても今後検討する必要がある。ペルオキシゾームの酵素でメチル分岐を持つ pristanoyl-CoA の不飽和化を触媒する Acox3 (22) の発現も有意に低下した (Fig. 5)。分岐脂肪酸は、Val、Leu、Ile のような分岐アミノ酸に由来すると考えられる (27)。ペルオキシゾームの β 酸化に関連する酵素は、Ppara の制御下にあるものが多いため、この結果は Rxra の発現低下と符合する。本研究のマイクロアレイでの解析結果から抽出したものには、有意な変動を示さないものも多かった。本研究では有意水準を $P < 0.05$ としたが、変動自体は大きいものばかりではなかった。そのため、リアルタイム RT-PCR により検証することが重要と考えられた。

本研究では、ダイオキシン誘導性の SelenBP1 の元々の役割を明らかにするために、ダイオキシンを処理しない条件下、また、相同性の高い分子種 SelenBP2 の影響がほとんどない条件下で検討を行った。メタボロミクスとマイクロアレイの結果から、SelenBP1 は、その欠損が致命的な影響を及ぼすことはないものの、少なくとも脂質代謝に関係する可能性が示唆された。欠損により脂肪酸の代謝抑制による代謝スイッチングを生じて炎症性の代謝物を増加させる可能性も示唆された。SelenBP1 と脂質代謝の接点は、本研究を基に考えると、Rxra 発現への影響によるものと推定される。最近の他グループが作製した SelenBP1-KO マウスを用いた研究により、前立腺がんに対して SelenBP1 が抑制的に働くことが示唆されている (28)。また、グルコース代謝に影響することも示唆され (29)、HeLa 細胞では、SelenBP1 欠損により酸化的ストレスが亢進することも報告されている (30)。本研究の成果とこれらの情報を総合すると、SelenBP1 のダイオキシンによる誘導は、その毒性発現に寄与するとは考えにくく、この点は、当研究室の先行研究の結果 (13) を支持する。今後、SelenBP1 欠損がどのような機構で Rxra 発現を低下させたのかを明らかにすべく、本研究の条件下での酸化的ストレスの変動状況についても検討を行うことが必要であろう。

E. 結論

以上の結果から、1) メタボロミクス解析より、TCDD 誘導性の SelenBP1 は、脂質代謝に関連した機能を有する可能性が示唆された。2) マイクロアレイ解析の結果もこれを支持し、脂質酸化酵素 Cyp4a12a、Cyp4a12b および Acox3 に発現低下が確認されたこと、これらの遺伝子の発現に関与する Rxra も低下したことから、SelenBP1 が脂肪酸酸化を促進的に調節している可

能性が示唆された。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

H. 参考文献

- 1) Bansal MP, Oborn CJ, Danielson KG, Medina D. *Carcinogenesis*, **10**: 541-546 (1989).
- 2) Jamba L, Nehru B, Bansal MP. *Mol Cell Biochem*, **177**: 169-175 (1997).
- 3) Pohl NM, Tong C, Fang W, Bi X, Li T, Yang W. *PLoS One*, **4**: e7774 (2009).
- 4) Porat A, Sagiv Y, Elazar Z. *J Biol Chem*, **275**: 14457-14465 (2000).
- 5) Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N, Oguri K. *Chemosphere*, **32**: 509-515 (1996).
- 6) Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N, Oguri K. *Toxicol Lett*, **87**: 1-9 (1996).
- 7) Ishida T, Ishii Y, Tasaki K, Ariyoshi N, Oguri K. *Fukuoka Acta Medica*, **88**: 135-143 (1997).
- 8) Poland A, Knutson JC. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, **26**: 371-399 (1982).
- 9) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. *Toxicol Appl Pharmacol*, **140**: 173-179 (1996).
- 10) Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. *Biochim Biophys Acta*, **1619**: 263-268 (2003).
- 11) Bartolone JB, Sparks K, Cohen SD, Khairallah EA. *Biochem Pharmacol*, **36**: 1193-1196 (1987).
- 12) Pumford NR, Martin BM, Hinson JA. *Biochem Biophys Res Commun*, **182**: 1348-1355 (1992).
- 13) Tsujimoto S, Ishida T, Takeda T, Ishii Y, Onomura Y, Tsukimori K, Takechi S, Yamaguchi T, Uchi H, Suzuki SO, Yamamoto M, Himeno M, Furue M, Yamada H. *Biochim Biophys Acta*, **1830**: 3616-3624 (2013).
- 14) Lanfear J, Fleming J, Walker M, Harrison P. *Carcinogenesis*, **14**: 335-340 (1993).
- 15) Ivanisevic J, Zhu ZJ, Plate L, Tautenhahn R, Chen S, O'Brien PJ, Johnson CH, Marletta MA, Patti GJ, Siuzdak G. *Anal Chem*, **85**: 6876-6884 (2013).
- 16) Matsumoto Y, Ishida T, Takeda T, Koga T, Fujii M, Ishii Y, Fujimura Y, Miura D, Wariishi H, Yamada H. *J Toxicol Sci*, **35**: 365-373 (2010).
- 17) Muller DN, Schmidt C, Barbosa-Sicard E, Wellner M, Gross V, Hercule H, Markovic M, Honeck H, Luft FC, Schunck WH. *Biochem J*, **403**: 109-118 (2007).
- 18) Abbott BD. *Reprod Toxicol*, **27**: 246-257 (2009).
- 19) Piccinin E, Peres C, Bellafante E, Ducheix S, Pinto C, Villani G, Moschetta A. *Hepatology*, **67**: 884-898 (2018).
- 20) Chambon P. *FASEB J*, **10**: 940-954 (1996).
- 21) Leid M, Kastner P, Chambon P. *Trends Biochem Sci*, **17**: 427-433 (1992).
- 22) Westin MA, Hunt MC, Alexson SE. *J Biol Chem*, **282**: 26707-26716 (2007).
- 23) Hatsumura M, Ishida T, Ishii Y, Ariyoshi N, Oguri K, Yoshimura H. *Fukuoka Acta Medica*, **86**: 135-143 (1995).
- 24) Matsusue K, Ishii Y, Ariyoshi N, Oguri K. *Chem Res Toxicol*, **12**: 1158-1165 (1999).
- 25) Takeda T, Komiyama Y, Koga T, Ishida T, Ishii Y, Kikuta Y, Nakaya M, Kurose H, Yokomizo T, Shimizu T, Uchi H, Furue M, Yamada H. *J Biol Chem*, **292**: 10586-10599 (2017).
- 26) Powell WS, Rokach J. *Biochim Biophys Acta*, **1851**: 340-355 (2015).
- 27) 植田伸夫. *油化学*, **20**: 663-669 (1971)
- 28) Ansong E, Ying Q, Ekoue DN, Deaton R,

- Hall AR, Kajdacsy-Balla A, Yang W, Gann PH, Diamond AM. *PLoS One*, **10**: e0127295 (2015).
- 29) Ying Q, Ansong E, Diamond AM, Lu Z, Yang W, Bie X. *PLoS One*, **10**: e0126285 (2015).
- 30) Zhao C, Zeng H, Wu RT, Cheng WH. *PLoS One*, **11**: e0158650 (2016).