

## 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: 脂質代謝との関連性の検討

研究分担者 石井 祐次 九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野 准教授

#### 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予備的に行った。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。昨年度までの検討において SelenBP1-KO マウスの腎臓では、脂肪酸の $\omega$ および $\omega$ -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することが示唆された。また、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。本年度の検討により、脂質代謝系の酵素の発現を制御する peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (Ppara)の発現レベルの有意な低下が示唆された。これは、先に行ったマイクロアレイの結果を支持した。一方、Ppar- $\beta$  (Pparb)および Ppar- $\gamma$  (Pparg)の発現レベルには影響がなかった。また、昨年度までの検討から 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- $\alpha$  (Rxra)の発現の低下が示唆されている。従って、Ppara および Rxra の発現低下を通じた Cyp4a の低下が示唆された。一方、cyclooxygenase 1 (Cox1), Cox2 および 3 種の lipoxygenase レベルは変動しなかった。これに符合して、ロイコトリエン類の増加が推定された。より精度をあげるために、例数を増やしてメタボロミクス解析を行った結果も、それを支持した。また、抗酸化酵素の発現解析を行ったところ、superoxide dismutase 1 (Sod1)および Sod2 の発現が有意に低下していた。これらのことから、SelenBP1 は酸化ストレス軽減に寄与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ない。

当研究室では、ダイオキシン類の一種、3,3',4,4'-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、リアルタイム RT-PCR により検討を行った際に、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。昨年度までの検討により、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った。さらに、リア

リアルタイム RT-PCR による解析を通じて、脂質代謝関連因子が変動する可能性が示唆された。本年度は、個体数を増やして、メタボロミクスの精度を上げるとともに、引き続き SelenBP1 の脂質代謝への影響に着目してさらなる解析を行った。

## 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:CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (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 モードおよび negative 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 11 匹で行った。

### 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  $\beta$ -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: 1-8)。

## 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 11 匹ずつの腎臓を用いたメタボローム解析を UPLC-TOF/MS を用いて行った。主成分分析を行った結果 (Fig. 1)、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. 2)。そこで、相関係数 0.7 以上、-0.7 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。20-carboxy-leukotriene B<sub>4</sub> および 11-epi-prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  などプロスタグランジンやロイコトリエンの代謝物が増加した。また、パルミチン酸も増加した。こ

これら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。昨年までの検討では、DNA マイクロアレイ解析結果を基にして、変動が示唆された脂質代謝関連因子についてリアルタイム RT-PCR にて発現変動を解析した。データの関連性からここでは、昨年既に報告した結果も併せて提示する。SelenBP1-KO マウスの腎臓では、脂肪酸の $\omega$ および $\omega$ -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: H30 年度報告書参照)。マイクロアレイで変動が示唆されていた脂質代謝系の酵素の発現を制御する peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (Ppara) (18) の発現が、有意に低下することが示唆された。一方、Ppar- $\delta$  (Ppard)(19)および Ppar- $\gamma$  (Pparg) (19)の発現レベルには影響がなかった (Fig. 4)。Ppara への影響は前年度も検討していたが、変化なしとの結果であった。昨年度用いたプライマーでは、isoform間で交差反応することが懸念されたため、それを回避するため、より特異性の高いプライマーをデザインし直した。結果、有意な抑制を認めた。また、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- $\alpha$  (Rxra)(20, 21)の発現も低下していた (Fig. 5: H30 年度報告書参照)。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: H30 年度報告書参照)。本研究では、筆者らの先行研究で、SelenBP2 の mRNA レベルは絶食により著しく低下するのに対して、SelenBP1 のそれは、高く維持されていたことに着眼し、絶食条件下に SelenBP1 は重要な役割を示すと考えて計画を行っている。上述の結果は、絶食条件下のものであるため、非絶食下での検討も行った。非絶食下では、Cyp4a12a,

Cyp4a12b, Ppara, Pparb, Pparg, Rxra, Acox3 のいずれの発現レベルも、SelenBP1-KO による影響は受けなかった (Figs. 6-8)。これらのことから、SelenBP1 が脂質代謝関連遺伝子に及ぼす影響は絶食下において特に重要であることが示唆された。アラキドン酸の代謝酵素である、Cyp4a12a および Cyp4a12b の発現が低下していたが、アラキドン酸は、これ以外に prostaglandin-endoperoxide synthase (cyclooxygenase, Ptgs or Cox)(23)および arachidonate lipoxygenase (Alox)(24)を介してプロスタグランジンおよびロイコトリエン生成にも向かうことが知られている。絶食下でこれらに関する酵素の発現への SelenBP-KO の影響を調べたが、Alox5, Alox12, Alox15, Ptgs1 (Cox1), Ptgs2 (Cox2) のレベルには影響を与えなかった (Figs. 9-10)。次に、SelenBP1 の欠損が活性酸素消去系に及ぼす影響を調べるために、絶食条件下で、Superoxide dismutase 1 (Sod1) および Sod2 について検討したところ、いずれも SelenBP1-KO により有意に発現が低下した (Fig. 11)。

#### 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 (25-27)、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、昨年度の成果は、その

仮説を支持していた。しかし、用いた個体数が少なかったため、メタボロミクスとしては予備的知見に止まった。今年度は、個体数を11匹に増やし、また positive mode および negative mode でメタボロミクスを実施した (Table 1)。結果、やはり、脂質代謝への影響があることを支持した。また、増加の示唆された 20-carboxy-leukotriene B4 および 11-*epi*-prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ など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。

**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、いずれも Ppara により正に調節されていることが知られている。また、SelenBP1-KO により Ppara の発現レベルが低下したことから (Fig. 4)、Cyp4a12a および Cyp4a12b の発現低下には Ppara の発現低下が影響したと推察される。また、Rxra の発現も低下していた (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。昨年度の検討から、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ていた (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 (28)。ペルオキシゾームの $\beta$ 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 Ppara および Rxra の発現低下と符合する。

一方、メタボロミクスからは、プロスタグランジン類およびロイコトリエン類の

増加が示唆されたが、これらの合成系酵素には SelenBP1-KO の影響はほとんど見られなかった (Figs. 10-11)。従って、Cyp4a12a および Cyp4a12b の系が抑制された代償として、プロスタグランジンおよびロイコトリエンが増加したことが示唆された。これらは、炎症との関連からも注視すべきことである。

本研究では、ダイオキシシン誘導性の 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。昨年度行ったマイクロアレイの結果に加え、今年度のメタボロミクスの結果からも、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、Ppara および 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 (29)。また、グルコース代謝に影響することも示唆され (30)、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 (31)。これに符合して、本研究でも、SelenBP1-KO により抗酸化酵素である Sod1 および Sod2 の発現が低下した。Ppara が Sod1 および Sod2 を誘導することが知られており (32)、このことは、本研究で SelenBP1-KO により Ppara の発現が抑制されたことと合致している。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は、まだ十分明らかではないものの、今後は、酸化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) 絶食条件下 SelenBP1-KO により脂質酸化酵素 Cyp4a12a、Cyp4a12b および Acox3 に発現低下が確認された。また、これらの遺伝子の発現に関与する Ppara および Rxra も低下した。3) Alox および Ptgs には影響がなかったが、プロスタグランジン類、ロイコトリエン類の増加が認められた。4) 活性酸素消去系酵素 Sod1 および Sod2 の発現が低下していた。これらのことから、SelenBP1 が脂肪酸酸化を促進的に調節し、炎症に対しては抑制的な役割を担っている可能性が示唆された。

### F. 研究発表

1. 第36回日本薬学会九州支部大会 (長崎、2019年11月16-17日)

### 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) Issemann I, Green S. *Nature*, **347**: 645-650 (1990).
  - 19) Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**: 7355-7359 (1994).
  - 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) Hara S, Kamei D, Sasaki Y, Tanemoto A, Nakatani Y, Murakami M. *Biochimie*, **92**:651-659 (2010).
  - 24) Mashima R, Okuyama T. *Redox Biol*, **6**: 297-310 (2015).
  - 25) Hatsumura M, Ishida T, Ishii Y, Ariyoshi N, Oguri K, Yoshimura H. *Fukuoka Acta Medica*, **86**: 135-143 (1995).
  - 26) Matsusue K, Ishii Y, Ariyoshi N, Oguri K. *Chem Res Toxicol*, **12**: 1158-1165 (1999).
  - 27) Takeda T, Komiya 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).
  - 28) 植田伸夫. *油化学*, **20**: 663-669 (1971)
  - 29) Ansong E, Ying Q, Ekoue DN, Deaton R, Hall AR, Kajdacsy-Balla A, Yang W, Gann PH, Diamond AM. *PLoS One*, **10**: e0127295 (2015).
  - 30) Ying Q, Ansong E, Diamond AM, Lu Z, Yang W, Bie X. *PLoS One*, **10**: e0126285 (2015).
  - 31) Zhao C, Zeng H, Wu RT, Cheng WH. *PLoS One*, **11**: e0158650 (2016).
  - 32) Liu X, Jang SS, An Z, Song H, Kim WD, Yu JR, Park WY. *Radiat Oncol J*, **30**: 88-95 (2012)