

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: 脂質代謝の制御とストレス応答との関連性の検討

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。肝臓及び腎臓における SelenBP1 及び SelenBP2 の発現に関しては、mRNA レベルで明らかにされているものの、未だタンパク質発現レベルでの検証は十分にはされていない。本研究では、野生型 C57BL/6J と SelenBP1 欠損マウスの肝臓と腎臓をウェスタンブロッティングにより比較することにより検証した。非絶食と 20 時間絶食した 8 週齢の野生型 C57BL/6J 及び SelenBP1 欠損マウスにおいて肝臓及び腎臓 S9 画分をウェスタンブロッティングで調べたところ、野生型の SelenBP は、絶食によって有意に低下した。SelenBP1 欠損マウス肝臓では、絶食の影響を受けなかった。腎臓においては、野生型にある抗 SelenBP1 抗体に認識されるバンドが、SelenBP1 欠損マウスでは存在しないことが明らかになり、このバンドが SelenBP1 であると考えられた。また、このバンドの強度は野生型の腎臓では絶食の影響を受けなかった。SelenBP1 欠損マウスの腎臓では、絶食でも同様にバンドは検出されなかった。これらのことから、肝臓には SelenBP1 だけでなく SelenBP2 が高発現していることがタンパク質レベルで確認された。これらのことから、SelenBP1 タンパク質は絶食時にも必要で、重要な機能をもつタンパク質であると考えられた。肝臓では SelenBP2 タンパク質レベルが高く、ダイオキシンによる SelenBP1 の誘導の意義を理解するのは難しいことが改めて確認された。一方、腎臓では、SelenBP1 のみが機能すると考えられ、かつ、SelenBP1 は絶食条件下でも重要な役割をもつと推定されるため、絶食条件下で得た腎臓を用いることで、SelenBP1 の役割を解明することが期待された。腎ホモジネートの Sod 活性を測定したところ、前年度までの mRNA 検討結果に符合して、Sod 活性は、SelenBP1 欠損マウスで野生型の C57BL/6J に比べて有意に低下していた。過酸化水素は、Sod によってスーパーオキシドアニオンから不均化反応によって生成することが知られているため、腎臓組織中の過酸化水素量を調べたところ、SelenBP1 欠損マウスでは過酸化水素含量が低かった一方で、脂質過酸化の指標であるチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS)量は増加傾向が認められた。腎と血清セレン含量に変動がないことも分かった。これらのことから、SelenBP1 は、酸化ストレス低減作用を有する可能性が浮上した。

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ず。

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。肝臓及び腎臓における SelenBP1 及び SelenBP2 の発現に関しては、mRNA レベルで明らかにされているものの、未だタンパク質発現レベルでは検証されていない。本研究では、野生型 C57BL/6J と SelenBP1 欠損マウスの肝臓と腎臓をウェスタンブロッティングにより比較することにより検証した。

平成30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。令和元年度は、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。平成30年度及び令和元年度の検討において 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。さらに、脂質代謝系の酵素の発現を制御する peroxisome proliferator-activated receptor- α (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- β (Pparb)および Ppar- γ (Pparg)の発現レベルには影響がなかった。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- α (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 lipoygenase 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。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。そこで、本年度は、これらの検討をさらに発展させ Sod 活性、過酸化水素生成量、腎臓及び血中のセレン含量についても検討を行った。

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. SelenBP タンパク質発現

マウス肝臓中の SelenBP 発現量は、イムノブロット法にて解析した。また、loading control として β -actin のタンパク質を同時に ECL 法にて検出した。ChemiDoc XRS Plus (日本バイオラッド)にて撮影し、バンド強度を定量した。また、Cyp2e1 の発現も検討した。

抗体：抗ヒト SelenBP1 抗体は Santa Cruz Biotechnology 社、Rabbit anti-CYP2E1 antibody は Abnova 社、抗 β -actin 抗体は

Biovision 社、Enhanced chemiluminescence (ECL)用の Horseradish Peroxidase 標識二次抗体は GE Healthcare 社、ECL 用の基質 Clarity™ Western ECL Substrate は日本バイオラッドの市販品を購入して使用した。

3. 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 (15)。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。

4. Sod 活性及び過酸化水素量

マウス腎ホモジネートの Sod 活性は、SOD assay kit-WST (Dojindo)を用いて測定した。マウス腎ホモジネートの過酸化水素量は、Pierce™ Quantitative Peroxide assay (Thermo)のキットを用いて測定した。

5. チオバルビツール酸反応性物質 (TBARS)

Ohkawa らの方法 (16)に従って測定した。

6. 腎臓及び血清中セレン含量の測定

いで株式会社 食品・生命科学研究所 (大阪)にて受託測定した。野生型及び SelenBP1-KO 各々3個体の腎臓及び血清を Agilent Technologies ICP-MS 7700x を用いた方法により測定した。組織に対しては、組織を精密天秤で秤量し、テフロン製容器に入れ、硝酸にて湿式分解を行った。内標準物質としてイットリウムを加えて定容したのち、ICP-MS で測定した。血清サンプルの場合は、検体を 0.1 mL 分取し、内標準物質としてイットリウムを加えて界面活性剤入り溶液で定容したのち、同様に ICP-MS で測定した。

(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 及び A20-061。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

非絶食と 20 時間絶食した 8 週齢の野生型 C57BL/6J 及び SelenBP1 欠損マウスにおいて肝臓及び腎臓 S9 画分をウェスタンブロッティングで調べたところ、野生型では SelenBP は、絶食によって有意に低下した (Fig. 1)。SelenBP1 欠損マウス肝臓では、絶食の影響を受けなかった。腎臓においては、野生型にある抗 SelenBP1 抗体に認識されるバンドが、SelenBP1 欠損マウスでは存在しないことが明らかになり、このバンドが SelenBP1 であると考えられた (Fig. 2)。また、このバンドの強度は野生型の腎臓では絶食の影響を受けなかった。SelenBP1 欠損マウスの腎臓では、絶食でも同様にバンドは検出されなかった。これらのことから、肝臓には SelenBP1 だけでなく SelenBP2 が高発現していることがタンパク質レベルで確認された。これらのことから、SelenBP1 タンパク質は絶食時にも必要で、重要な機能をもつタンパク質であると考えられた。

また、エタノール誘導性でアセトアミノフェンやアルコールを酸化的に代謝する酵素である CYP2E1 は (17, 18)、絶食によっても誘導されることが知られている (19)。これは、mRNA レベルの増加を伴わないタンパク質レベルの増加であることが知られている (20)。そこで、適切に絶食が行われ、Cyp2e1 の発現量が増加して

いることを確認すべく、採取した雄マウスのS9分画を、抗CYP2E1抗体を一次抗体としたウェスタンブロッティングにより解析した。Cyp2e1のタンパク質発現量は β -actinで補正して算出した (Fig. 3)。CYP2E1抗体で認識されるバンドは2本あったが、いずれもCyp2e1として総和で量を比較した。その結果、雄性マウスの、SelenBP1(+/+)マウスおよび(-/-)マウスのいずれにおいても、絶食によりCyp2e1の発現量が有意に増加していることが確認された (Fig. 3)。

次に、ダイオキシシン誘導性SelenBP1生理的機能を明らかにする目的で、ダイオキシシン非処理条件下のSelenBP1-KOが腎臓の活性酸素消去系に及ぼす影響を調べた。絶食条件下で、腎臓のSod1およびSod2について検討した。令和元年度の検討から、これらはいずれもSelenBP1-KOによりmRNAレベルで有意に低下することが示唆されていた (Fig. 4)(21,令和元年度報告書より引用)。本年度は、腎臓におけるSod活性について検討したところ、mRNAレベルの変化に符合してSod活性は有意に低下した (Fig. 5A)。Sodは不均化酵素であり、2分子のスーパーオキシドアニオンから過酸化水素と水を生成する。そこで、続いて、腎臓組織中の過酸化水素濃度を測定した所、Sod活性の低下に合致して、SelenBP1-KOマウス腎臓の過酸化水素濃度は有意に低かった (Fig. 5B)。この結果は酸化ストレスの増加作用であるのか否か調べるために、TBARSを調べた所、SelenBP1-KOにおいて有意ではないものの増加傾向が見られた (Fig. 5C)。また、SelenBP1-KOによる腎臓のセレン含量への影響を調べた所、野生型動物との間に差は認められなかった。同様に、血清のセレン含量にも差はなかった。

D. 考察

本研究では、SelenBP1-KO動物におけるSelenBP1及びSelenBP2タンパク質レベルについて初めて解析し、特に絶食が及ぼす影響について明らかにした。腎臓にはSelenBP1のみ発現していること、これには絶食の影響がないことから、20時間の絶食を行うことで、野生型の肝臓SelenBP2はタンパク質レベルでも発現が減少すると考えられた。しかし、SelenBPのタンパク質レベルでの減少は有意であるものの、先行研究で観察されたmRNAの減少量ほどの減少は見られなかった (Fig. 1)。SelenBP1-KOマウス肝臓でみられる、抗SelenBP1抗体を一次抗体とするウェスタンブロッティングで認められるバンドはSelenBP2であると考えられるが、これは絶食により減少せず、SelenBP1欠損時は代償的にSelenBP2はタンパク質レベルで高発現が維持された可能性がある。これには、何らかのタンパク質安定化機構が存在することが想起された。これらのことから、肝臓ではSelenBP2タンパク質レベルが高く、ダイオキシシンによるSelenBP1の誘導の意義を理解するのは難しいことが改めて確認された。一方、腎臓では、SelenBP1のみが機能すると考えられ、かつ、SelenBP1は絶食条件下でも重要な役割をもつと推定されるため、絶食条件下で得た腎臓を用いることで、SelenBP1の役割を解明することが期待された。

本研究では、ダイオキシシン誘導性SelenBP1の本来の役割を明らかにすることを目的とし、平成30年度にまず、腎臓のメタボローム解析を行った。以下、平成30年度と令和元年度の報告内容を参照しつつ、本年度の研究を考察する。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 (22-24)、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、平成 30 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。令和元年度は、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 F2 α 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 (21, 令和元年度報告書参照)。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、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 (21)。また、Rxra の発現も低下していた (21)。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 (25, 26)。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 以外の受容体が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。平成 30 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 (27) の発現も有意に低下していた

(21)。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 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 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 (24)。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。平成 30 年度行ったマイクロアレイの結果に加え、令和元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 (Fig. 4)、

それに符合して Sod 活性も低下した (Fig. 5A)。また、腎臓組織中の過酸化水素は低下し (Fig. 5B)、TBARS は有意ではないものの増加傾向があった (Fig. 5C)。尚、注視すべきは、この過酸化水素濃度は、凍結組織を融解し、ホモジナイズ後、タンパク質を定量して、量を整えてから測定したものである点である。これらのことを総合すると、SelenBP1-KO による過酸化水素の低下は、Sod 活性低下による過酸化水素生成量の低下を反映していると思われる、TBARS が増加傾向であったことより、スーパーオキシドアニオンが増加していることも推定される。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、生理的条件下で SelenBP1 には、酸化ストレス軽減作用があると推定される。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。但し、ダイオキシンによる SelenBP1 誘導は著しいものであり、欠損条件下で観察された現象のみでの考察には制約もあるだろう。SelenBP1 欠損がどのような機構で Ppara 及び Rxra 発現を低下させたのかは、まだ十分明らかではない。今後は、この点と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) タンパク質レベルでの検討により腎臓には SelenBP1 のみが発現し SelenBP2 が発現していないこと、SelenBP1 は絶食により影響受けないことから、絶食条件下の腎臓がダイオキシンによる SelenBP1 の誘導の意義を理解するのに適していることが改めて確認された。2) 活性酸素消去系酵素 Sod1 および Sod2 の発現が低下し、その活性も低下していた。

過酸化水素含量も低下し、TBARS も増加傾向にあった。これらのことから、SelenBP1 は生理的条件下に酸化ストレス軽減作用があると推定される。

F. 研究発表

1. フォーラム 2020:衛生薬学・環境トキシコロジー (名古屋、2020 年 9 月 4 日-5 日、オンライン)

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) 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).
- 16) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi N. *Anal Biochem* **95**: 351-358 (1979).
- 17) Lee SS, Buters JT, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ. *J Biol Chem*, **271**: 12063-12067 (1996).
- 18) Patten CJ, Thomas PE, Guy RL, Lee M, Gonzalez FJ, Guengerich FP Yang CS. *Chem Res Toxicol*, **6**: 511-518 (1993).
- 19) Hong J. Y., Pan J. M., Gonzalez F. J., Gelboin H. V. and Yang C. S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**: 1077-1083 (1987).
- 20) Johansson I., Lindros K. O., Eriksson H. and Ingelman-Sundberg M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**: 31-38 (1990).
- 21) 令和元年度分担研究報告書 (石井祐次)
- 22) Hatsumura M, Ishida T, Ishii Y, Ariyoshi N, Oguri K, Yoshimura H. *Fukuoka Acta Medica*, **86**: 135-143 (1995).
- 23) Matsusue K, Ishii Y, Ariyoshi N, Oguri K. *Chem Res Toxicol*, **12**: 1158-1165 (1999).
- 24) 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).
- 25) Chambon P. *FASEB J*, **10**: 940-954 (1996).
- 26) Leid M, Kastner P, Chambon P. *Trends Biochem Sci*, **17**: 427-433 (1992).
- 27) Westin MA, Hunt MC, Alexson SE. *J Biol Chem*, **282**: 26707-26716 (2007).
- 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)

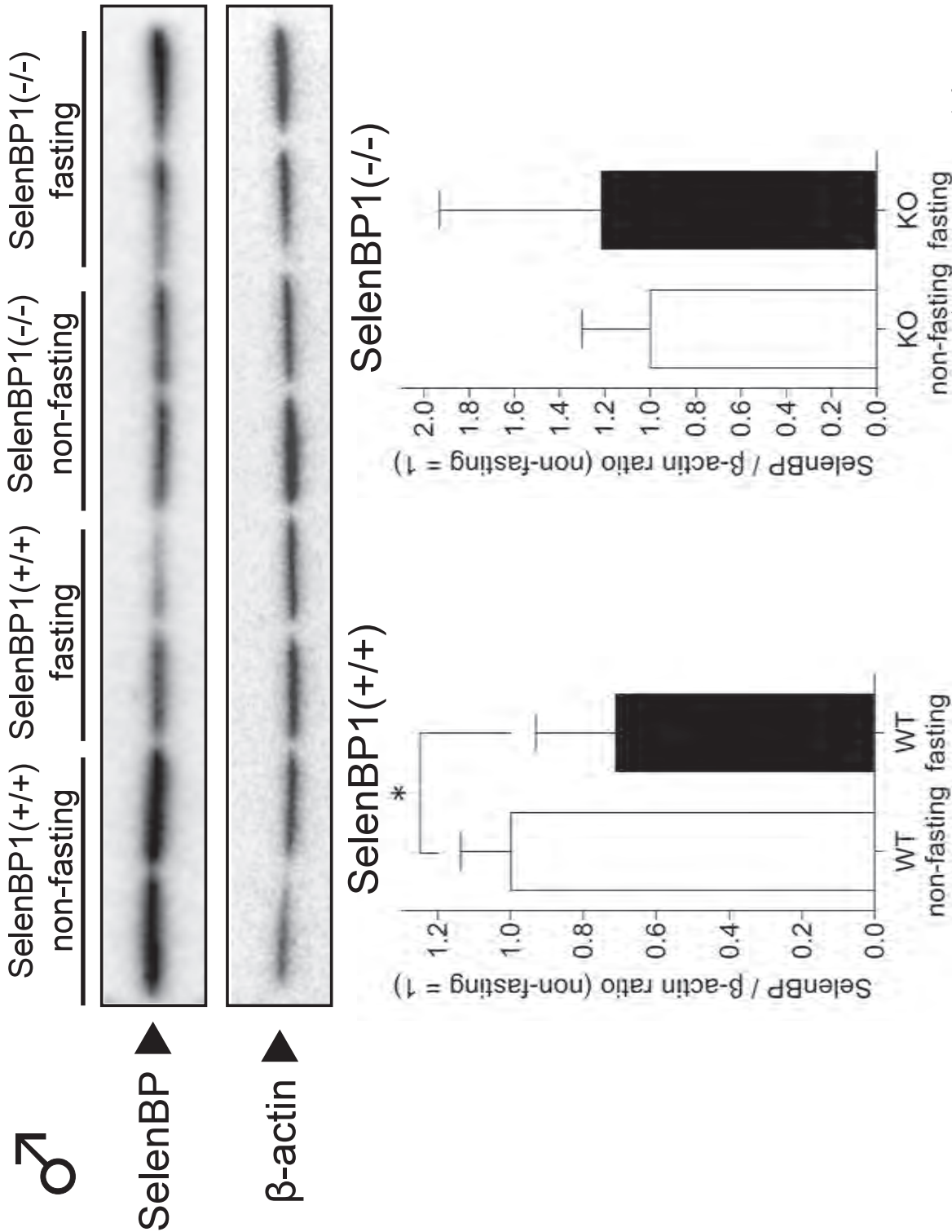


Fig. 1 Western blot analysis of hepatic SelenBP in male SelenBP1(+/+) and (-/-) mice. Livers were removed from 8 weeks-old male SelenBP1(+/+) and (-/-) mice. Individual liver S9-fractions (10 μg protein) prepared from SelenBP1(+/+) and (-/-) mice were subjected to SDS-PAGE (10% separation gel). SelenBP was detected by mouse anti-human SelenBP1 antibody. β-actin was detected by mouse anti-β-actin antibody. Lanes 1-2, SelenBP1(+/+) non-fasting; 3-4, SelenBP1(+/+) fasting; 5-6, SelenBP1(-/-) non-fasting; 7-8, SelenBP1(-/-) fasting. Representative data are shown. Randomly selected two of five samples were subjected. $n=5$, $*p<0.05$.

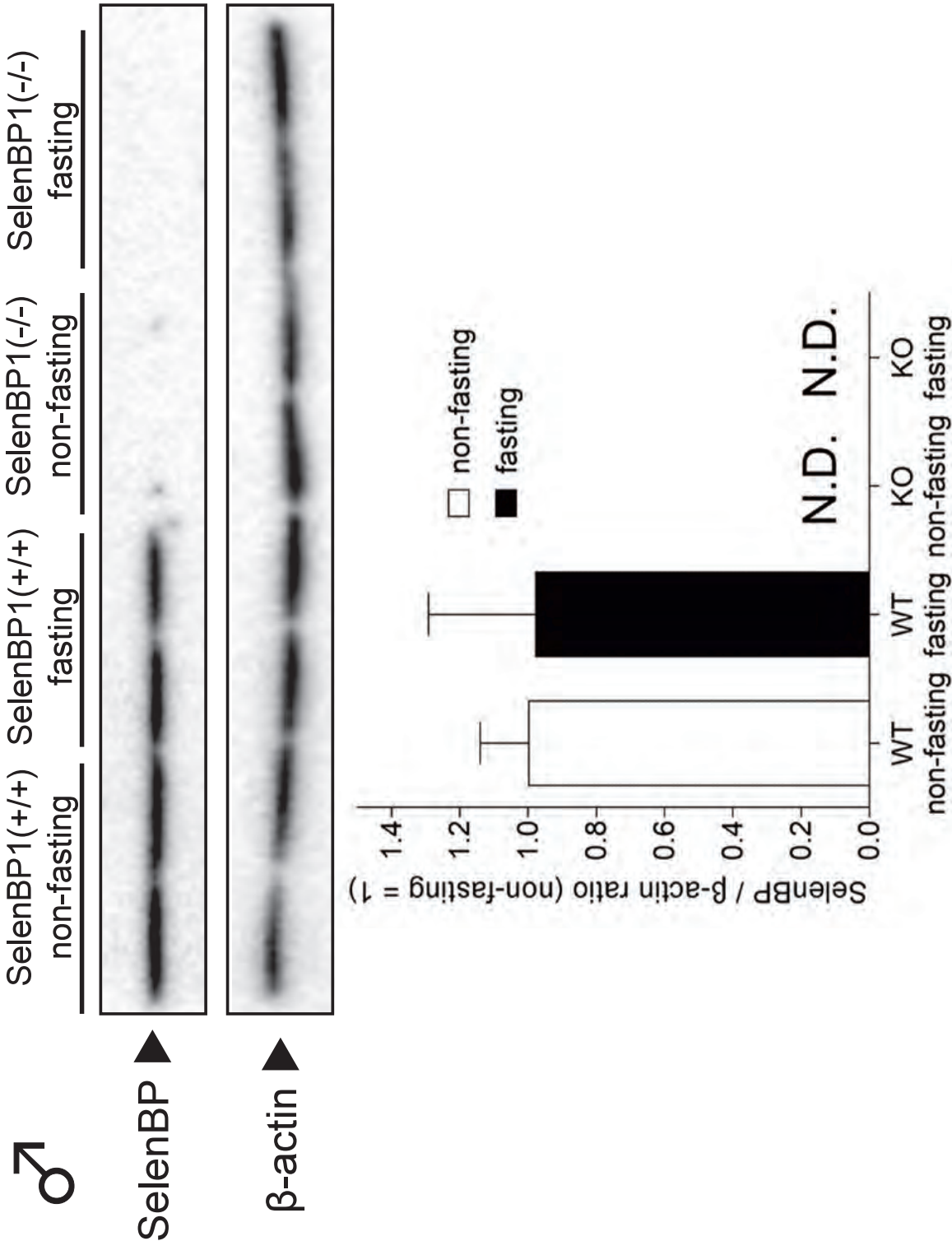


Fig. 2 Western blot analysis of nephric SelenBP in male SelenBP1(+/+) and (-/-) mice. Kidneys were removed from 8 weeks-old male SelenBP1(+/+) and (-/-) mice. Individual kidney S9-fractions (20 µg protein) prepared from SelenBP1(+/+) and (-/-) mice were subjected to SDS-PAGE (10% separation gel). SelenBP was detected by mouse anti-human SelenBP1 antibody. β-actin was detected by mouse anti-β-actin antibody. Lanes 1-2, SelenBP1(+/+) non-fasting; 3-4, SelenBP1(+/+) fasting; 5-6, SelenBP1(-/-) non-fasting; 7-8, SelenBP1(-/-) fasting. Representative data are shown. Randomly selected two of five samples were subjected. *n*=5, N.D., not detectable.

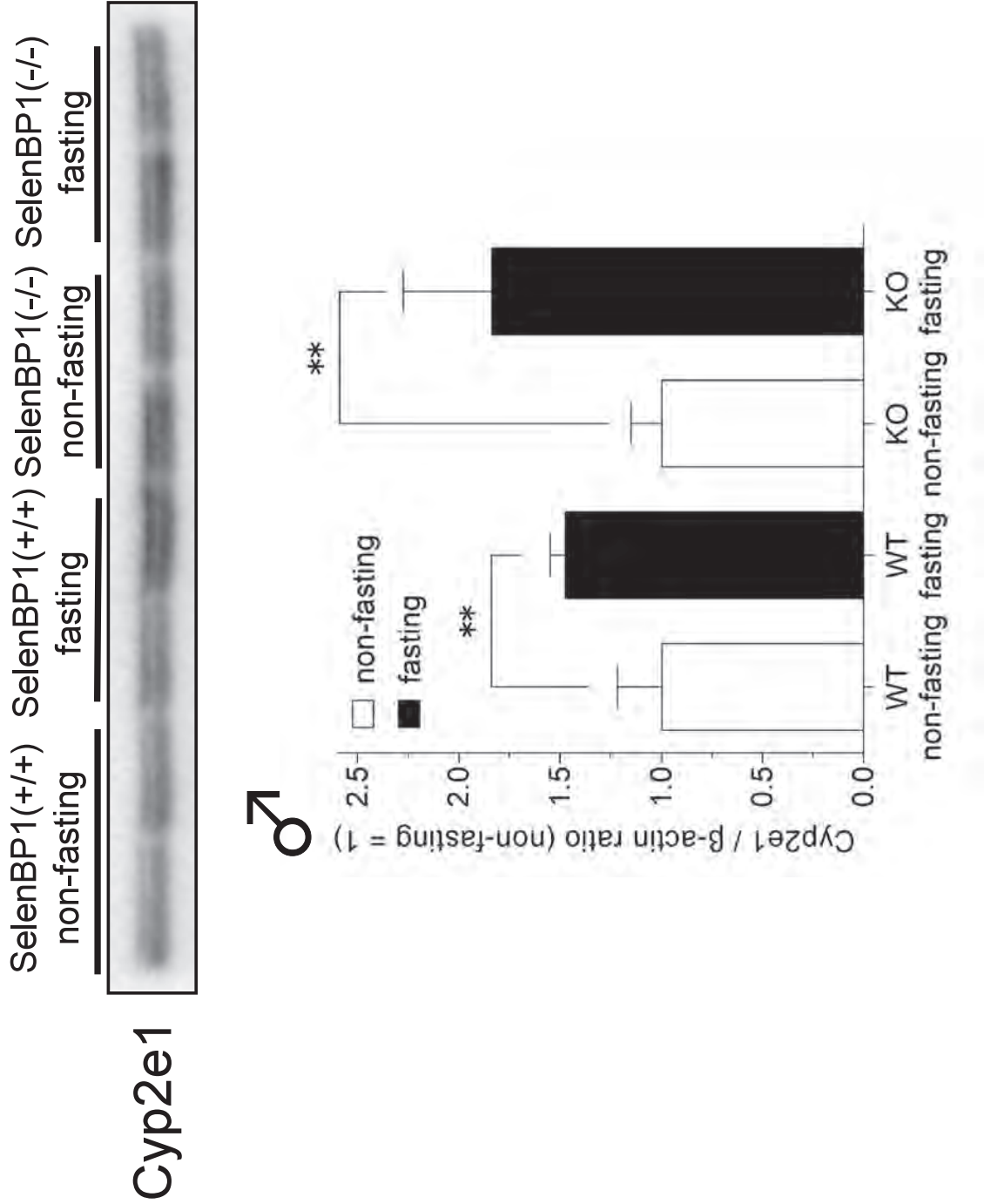


Fig. 3 Western blot analysis of hepatic Cyp2e1 in male mice. Livers were removed from 8 weeks-old male and female mice. Individual liver S9-fractions (10 µg protein) prepared from male and female mice were subjected to SDS-PAGE (10% separation gel). Cyp2e1 was detected by rabbit anti-CYP2E1 antibody. Lanes 1-2, SelenBP1(+/+) non-fasting; 3-4, SelenBP1(+/+) fasting; 5-6, SelenBP1(-/-) non-fasting; 7-8, SelenBP1(-/-) fasting. Representative data are shown. Randomly selected two of five samples were subjected. $n=5$, $**p<0.01$.

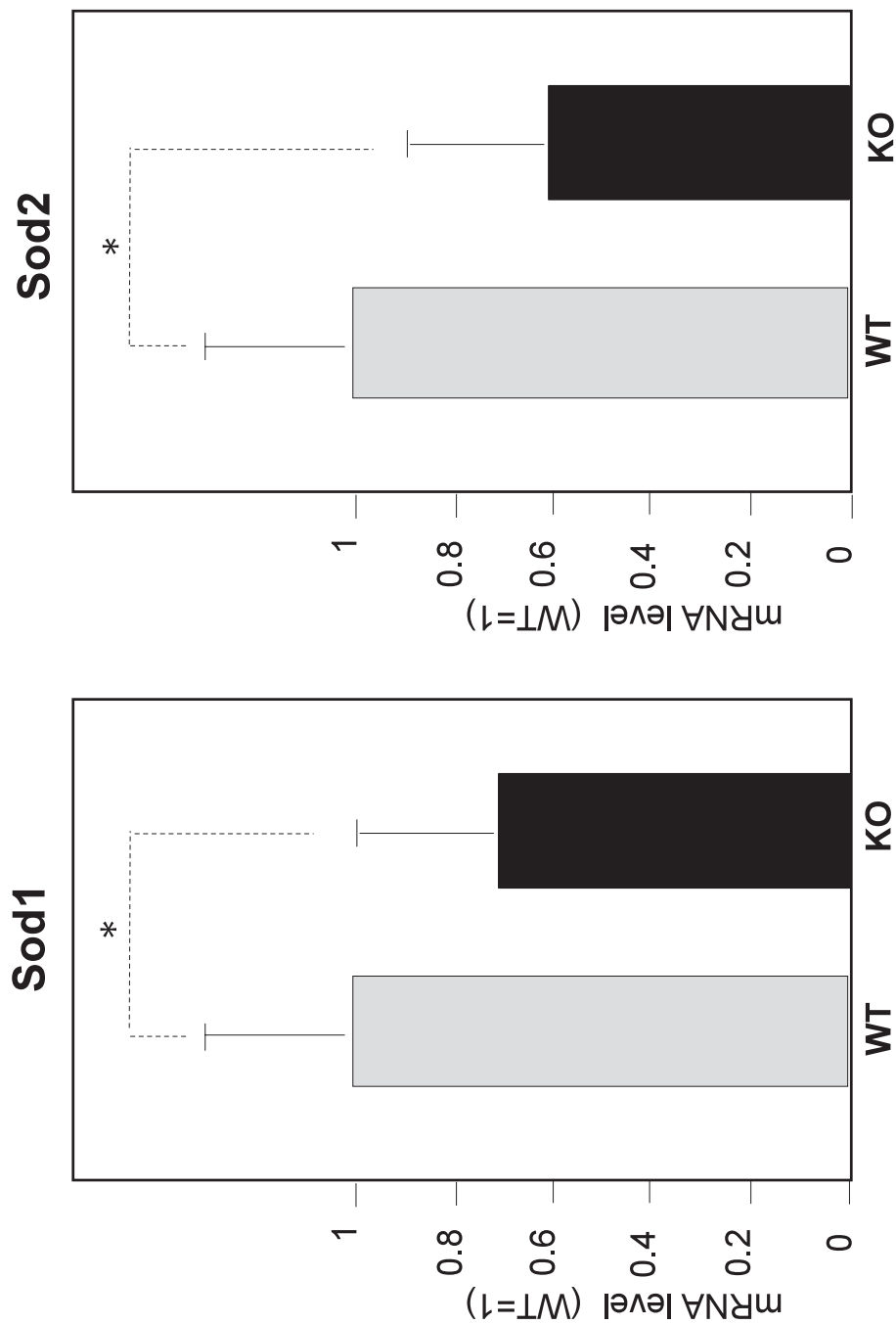


Fig. 4. Effect of SelenBP1 ablation on the renal expression of Sod1 and Sod2 mRNA in 8-week old male mice which treated with 20 hr fasting. Each bar represents the mean $\pm$ S.E.M. of 6 mice. * $p<0.05$. β -actin was used as an internal control.
(令和元年度報告書より引用)

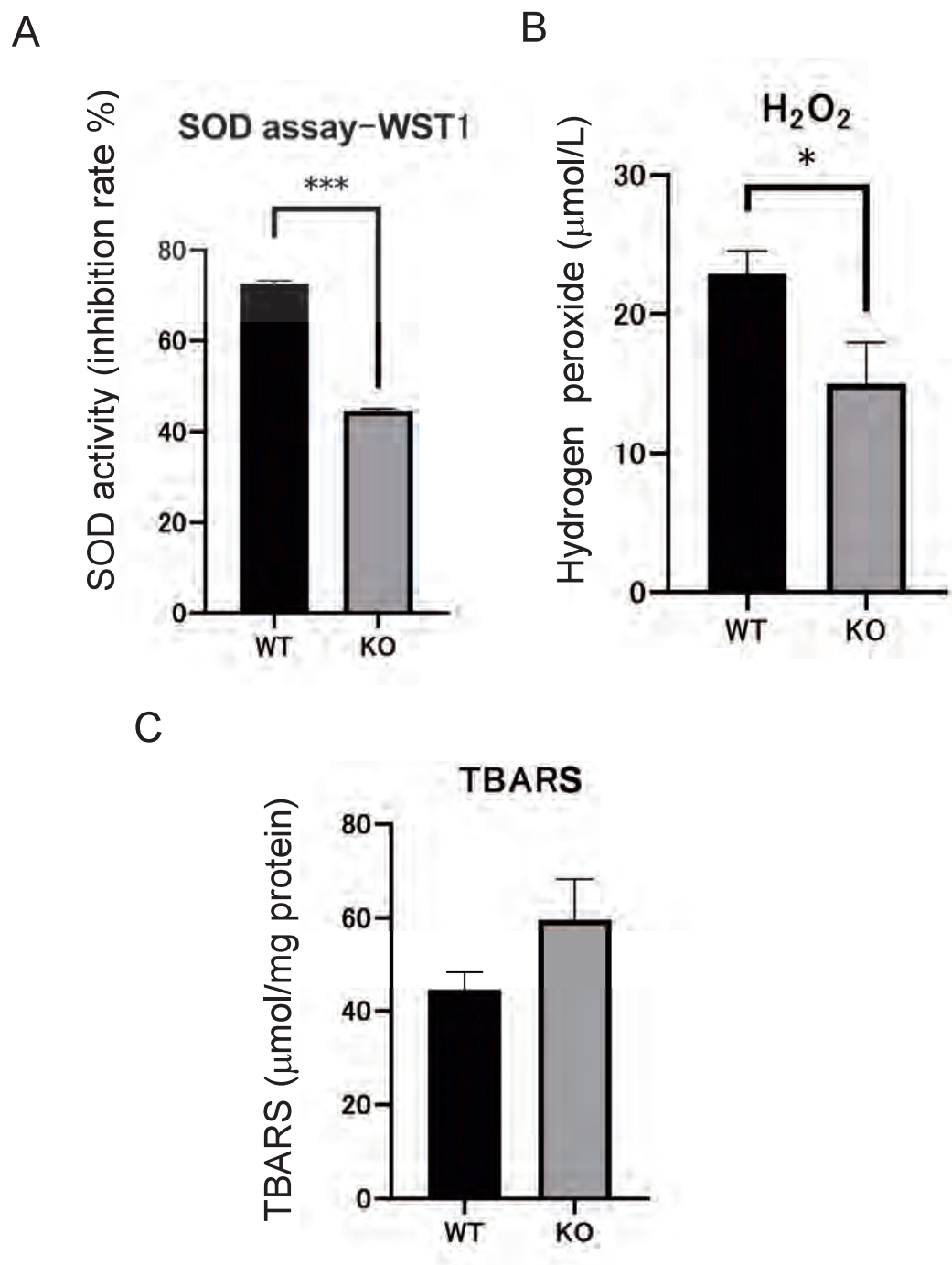


Figure 5. Manifestation and influence in renal redox reaction caused by SelenBP1 deletion.
A、B. Significance change of SOD activity assay and hydrogen peroxide concentration in mice kidney by Quantitative peroxide assay detection. The kidney were collected from 8-week old male mice which treated with 20 hr fasting. Each bar represents the mean $\pm$ S.E.M of 5 mice. * $p<0.05$. **C.** Effect on lipid peroxidation in the kidney of SelenBP1deficient mice as the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) . Each bar represents the mean $\pm$ S.E.M of 10 mice.

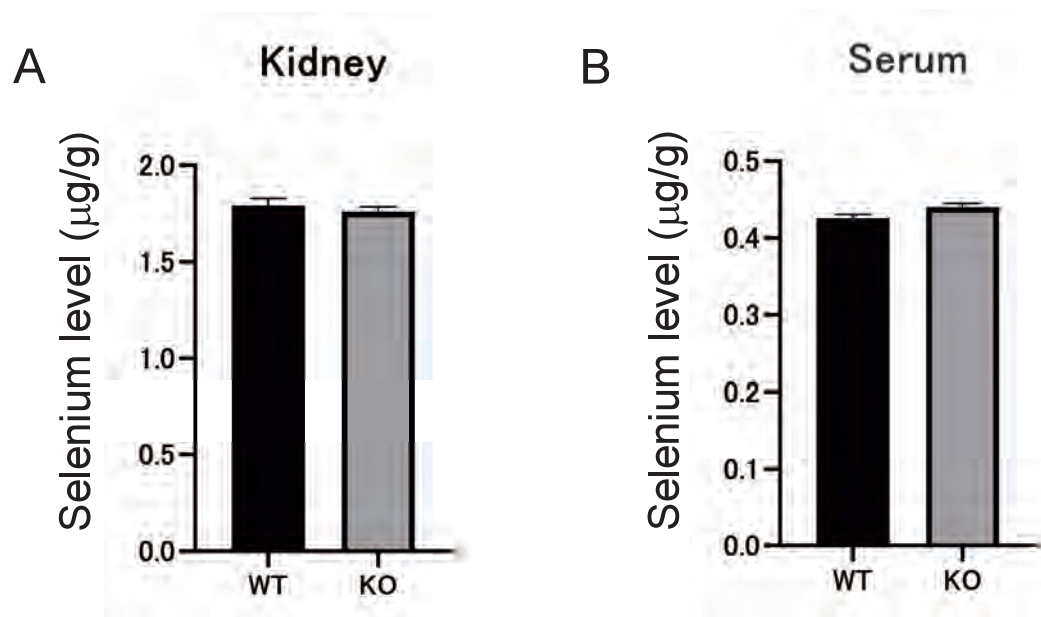


Figure 6. Levels of selenium ($\mu\text{g/g}$) in kidney and serum of Selenbp1-KO and C57BL/6J mice by Agilent Technologies ICP-MS 7700x detection. Each bar represents the mean $\pm$ S.E.M of 3 mice each by 3 times detection. **A:** kidney. **B:** serum.