

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。これまでのところ、Selenbp1 欠損マウスの腎臓では、DNA マイクロアレイ分析で多くの遺伝子発現の変化が観察されており、特に多くの脂肪代謝関連因子がリアルタイム RT-PCR で確認されている。Selenbp1-KO マウスの腎臓を用いた検討において、脂肪酸代謝を調節する転写調節因子 peroxisome proliferator-activated receptor- α (Ppara)および脂質代謝関連遺伝子 acyl-CoA oxidase 3 (Acox3) 遺伝子、cytochrome P450 (Cyp) 4a12a などの転写レベルの低下が検出されている。一方、マイクロアレイ解析では、脂質代謝関連遺伝子の中に発現レベル増加の可能性が示唆されたものもあった。本年度の検討では、prostaglandin (PG)F2 レベルと脂肪細胞の分化に影響を与える NADPH 依存性酵素であるアルドケトレダクターゼファミリー1 メンバーC3 (Akr1c3) の発現が有意に増加することが示唆された。さらに、血小板活性化因子 (PAF) リン脂質の生合成酵素の一つである lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 (Lpcat 2) が、Selenbp1-KO により、有意に増加することが示唆された。また、細胞内の遊離脂肪酸と結合し、その細胞内輸送を担っていると考えられている脂肪酸結合タンパク質 (fatty acid-binding protein, FABP)Fabp3 と Fabp4 にも転写レベルの増加傾向が認められた。そのほか、胚発生とガンに関連する Wnt シグナル伝達経路 (Wnt signaling pathway) に関与することが知られている糖タンパク質 Dkk2 (Dickkopf homolog 2) の遺伝子の発現は増加傾向が認められた。これらは、前に行ったマイクロアレイの結果を支持した。以前メタボロミクス分析の結果から、変動があった 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。そこで、Selenbp1 欠損が腎臓の形態学的特性へ及ぼす影響について検討した。野生型と比較して、Selenbp1 欠損マウス腎臓には炎症などの明らかな病原性はなかった。また、以前の検討結果で、Selenbp1-KO により retinoid-X-receptor- α (Rxra)発現レベルに影響があったことから、Rxraとヘテロオリゴマーを形成する Ppar 以外の受容体の発現への影響を調べた。さらに、セレンと Selenbp1 タンパク質の結合特性を考え、Selenbp1 の欠損が、他のセレン結合タンパク質の発現に影響するか否かを検討した。Selenbp1 欠損は、マウス腎臓の Ppar 経路を介して脂質代謝を変化させるだけでなく、他のシグナル伝達経路に対しても Selenbp1 欠損が影響を及ぼす可能性がある。

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言い難く、その生理的機能は十分に理解されているとは言い難い。

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

下することを見だした。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 (14)、当研究室では、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て研究を推進してきた。

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 (Ppar α) 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。Ppar α 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 (Rxr α) の発現の低下が示唆されている。従って、Ppar α および Rxr α 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 lipoxigenase 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。また、Sod 活性、過酸化水素生成量が Selenbp1-KO マウス腎臓で低下することを明らかにした。この時、腎臓及び血中のセレン含量については変動がなかった。

一方、マイクロアレイ解析では、脂質代謝関連遺伝子の中に発現レベル増加の可能性が示唆されたものもあったため、本年度は、それらの発現変動を検証した。また、Ppar α 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 Rxr α の発現の低下が示唆されていたため、本研究では、Rxr α とヘテロオリゴマーを形成する、Ppar 以外の受容体の遺伝子発現の調節に変動を及ぼすか否かも検討した。これらの研究を通じて、Selenbp1 は脂肪酸の酸化を促進し、炎症を抑制する役割を果たしていることが示唆されたことから、腎臓組織への形態学的な影響についても検討した。また、Ppar α 以外の他のシグナル伝達経路に対する Selenbp1 欠損の影響についても検討した。最後に、Selenbp1 欠損により、セレン関連のセレノプロテインが影響を受けるかどうかを検討した。

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. 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。

3. Hematoxylin Eosin (HE) 染色

摘出した腎臓は paraformaldehyde (4% in 0.1 M PBS) 中で浸け置き、スクロース処理の後、組織を O.C.T. コンパウンドで包埋し、凍結ブロックとした。完成した凍結ブロックは、クライオスタット (Leica CM3050S) を用いて薄切し、組織切片 (切片厚: 18 μ m) を作製した。作製した切片はスライドガラスに貼り付けて、HE 染色を行った。最後に、切片に Entellan[®] New (rapid mounting medium for microscopy) をのせ、光学顕微鏡を用いて形態観察を行った。(倍率: x100)

4. DNA analysis

有意差を特定するために、Bioconductor、マイクロアレイ分析用線形モデル (limma) パッケージ (16)、および野生型と Selenbp1-KO の有意差の基準を使用してデータを処理した。有意水準は $P < 0.05$ に設定した。マイクロアレイデータセットは、Gene Expression Omnibus (GEO) データベースに提出した (アクセッション番号: GSE169517; www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/、NCBI によってパブリックドメインで提供)。P 値 < 0.05 の選

択、注釈および視覚化は、統合ディスカバリー用データベース (DAVID) (DAVID Bioinformatics Resources 6.8; オンライン <http://david.ncifcrf.gov/>) を使用して行った。

(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

本研究は、ダイオキシン誘導性 Selenbp1 の生理学的役割を解明することを目的とした。これまでの結果から、Selenbp1 欠損は、マウス腎臓の Ppar 経路を介して脂質代謝を変化させることが示されている。Ppar 経路の中で、腎臓における Cyp4a12a、Cyp4a12b、Acox3 などの酸化酵素の発現低下は、絶食条件下での Selenbp1-KO によって確認された。一方、GO 分析を使用した生物学的機能に基づいた解析において (平成30年度および令和元年度報告書)、脂質代謝関連のいくつかの代表的な遺伝子は、Selenbp1 欠損マウス腎臓において増加の可能性が示唆されていた。それら遺伝子の mRNA 発現レベル変動は未だ検証されていなかった。今年度は、この点に着目した。Selenbp1 欠損により、PGF2 レベルと脂肪細胞の分化に影響を与える NADPH 依存性酵素であるアルドケトレダクターゼファミリー1メンバーC3 (Akr1c3) の発現が腎臓で有意に増加することが示唆された (Fig. 1)。さらに、血小板活性化因子 (PAF) リン脂質の生合成酵素の一つである lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 (リゾホスファチジルコリンアシル転移酵素 2: Lpcat2) が、Selenbp1-KO より、有意に増加す

ることが示唆された (Fig. 1)。また、細胞内の遊離脂肪酸と結合し、その細胞内輸送を担っていると考えられている脂肪酸結合タンパク質 (fatty acid-binding protein, FABP) Fabp3 と Fabp4 の mRNA レベルの増加傾向が認められた (Fig. 2)。そのほか、胚発生とガンに関連する Wnt シグナル伝達経路 (Wnt signaling pathway) に関与することが知られている糖タンパク質 Dkk2 (Dickkopf homolog 2) の遺伝子の発現は増加傾向が認められた。Ptges31 (プロスタグランジン E 合成酵素 3) や Ptgis (プロスタグランジン I 合成酵素) を含む遺伝子の発現レベルにも増加傾向が認められた (Fig. 1)。これらは、以前行ったマイクロアレイの結果を支持した。

上記の結果から、Selenbp1 は脂肪酸の酸化を促進し、炎症を抑制する役割を果たしていることが示唆された。次に、Selenbp1 欠損により腎臓の組織病理学的変化があるかどうかを観察した。HE 染色した腎組織切片の顕微鏡写真 (Fig. 3) は、Wild-type と Selenbp1-KO では類似しており、糸球体との適切な間隔の尿細管を備えたネフロン of 正常な配向を示している。

一方、今までの検討から Ppar α 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 Rxr α の発現の低下が示唆されていた。Rxr α は、Ppar だけでなく、Lxr (Liver X receptor)、Pxr (Pregnane X receptor)、Rar (Retinoic acid receptor)、Car (Constitutive androstane receptor) 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 (17, 18)。本研究では、脂質代謝への影響を中心に検討したが、Selenbp1 が Rxr α 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、これらについても検討する必要があると考え検討した。結果、Lxr (nuclear receptor subfamily 1 group H: Nr1h2、Nr1h3)、Pxr (nuclear receptor subfamily 1 group I: Nr1i2、Nr1i3)、Rar 遺

伝子の mRNA レベルは有意な変動が見られなかった (Fig. 4)。従って、Rxr α のパートナーの中では、Ppar α が特異的に Selenbp1-KO により発現低下することが示唆された (令和元年および令和二年度研究報告参照)。

次に、Selenbp1 欠損が、Ppar 経路以外の他のシグナル伝達経路に及ぼす影響についても検討した。以前行った DNA マイクロアレイ解析では、さまざまなシグナル伝達経路に関与する遺伝子や腫瘍の促進または抑制に寄与する遺伝子の発現に Selenbp1 欠損が影響を与える可能性が示唆されていたことから、この点を調べた。Selenbp1 欠損に関連する遺伝子を包括的に調査することは、Selenbp1 の生理的機能を解明することにつながると考えられる。Selenbp1 欠損により変動の大きかった遺伝子の発現に関与する主要な経路 (Fig. 5) には、アジポサイトカイン、ユビキチン (Ubi) 結合、p13k-Akt (ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼおよびプロテインキナーゼ B)、哺乳類ラパマイシン標的 (mTOR)、FoxO (フォークヘッドボックスプロテイン O)、cAMP (環状アデノシン-リン酸)、内因性アポトーシス、古典的補体、およびその他のシグナル伝達経路などが推定された。

また、SelenBP1-KO による腎臓でセレノプロテイン発現量を調べた所、今回調べた範囲では、唯一、チオレドキシシン還元酵素 2 (TrxR2) に低下が認められた (Fig. 7)。その他のセレノプロテインでは野生型動物との間に差は認められなかった (Figs. 6, 7)。

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、今までの報告内容を参照しつつ、本年度の研究を考察する。マウスの腎臓には、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腎臓の

mRNA とタンパク質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 (19-21)、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、腎臓の Selenbp1 欠失に関連する Ppar α 経路を介した脂質メタボロームの顕著な変化を示唆していた成果は、その仮説を支持していた。今回の研究では、対照的に、脂質代謝に関連する他の酵素、細胞内の遊離脂肪酸と結合し、その細胞内輸送を担っていると考えられている Fabp3 と Fabp4 には転写レベルの増加傾向が認められている。そのほか、胚発生とガンに関連する Wnt シグナル伝達経路に関与することが知られている糖タンパク質 Dkk2 の発現に増加傾向が認められた。そして、PGF2 レベルと脂肪細胞の分化に影響を与える Akr1c3 の発現が有意に増加することが示唆された。さらに、PAF 生合成酵素の一つである Lpcat2 は、野生型マウスと比較して、Selenbp1-KO マウスで mRNA 発現が約 2 倍有意に増加することを確認した。近年、脂肪滴 (Lipid droplet, LD) の蓄積は、癌細胞株と腫瘍性組織の数の増加で観察されている (22-25)。脂肪滴に関与する Lpcat2 は、PGE2 などの炎症誘発性脂質メディエーターを産生することによって炎症過程に関与している。Lpcat2 の過剰の発現は炎症反応を増強する。これまでに実施したメタボロミクスの結果にも符合して、プロスタグランジン類の増加が推定された。

令和 2 年度までの研究成果から、アラキドン酸代謝物 prostaglandin J2 および 11-epi-prostaglandin F2 α などの増加が示唆されており、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。これらのことから、Selenbp1 が脂肪酸の酸化を促進

し、炎症を抑制する役割を果たしていることが示唆された。さらに、Selenbp1 欠損により腎臓の組織病理学的変化があるかどうかを観察した。HE 染色した腎組織切片の顕微鏡写真 (Fig. 3) から、Wild-type グループと Selenbp1-KO グループは類似し、いずれも糸球体との適切な間隔の尿細管を備えたネフロン of 正常な配向を示すことから、Selenbp1 の欠損は腎臓に病理的な変化を伴わないと推定された。但し、この実験の精度は将来改善される必要がある。

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。一方、Selenbp1 欠損による変動を受ける遺伝子の調節に関与する主な経路 Ppar α 以外にも、存在すると推定される。DNA マイクロアレイ解析では、野生型および Selenbp1-KO マウスと比較して、発現が変動する 2689 の遺伝子が同定され、そのうち 1464 は増加、1225 が減少した (平成 30 年度報告書)、有意水準 0.05 未満の p 値で、Selenbp1 欠損症に応答する遺伝子プロファイルの変化を、国立アレルギー感染症研究所 (NIAID) の提供する DAVID を使用してさらに分析した。これらの発現変動を示した遺伝子は、遺伝子オントロジー (GO) 分析 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>、関数注釈チャート) を使用して注釈付けを行った。その結果、アジポサイトカイン、Ubi 結合、p13k-Akt、mTOR、FoxO、cAMP、内因性アポトーシス、古典的補体、およびその他のシグナル伝達経路が推定された。今後も関連している経路を調べる必要がある。これら異なるシグナル伝達経路において、さまざまな遺伝子の発現レベルが Selenbp1 欠損によって変化した。これらの遺伝子は、細胞増殖、細胞生存、および代謝プロセスに関与している。他グループの以前の研究から、Selenbp1 が患者の発がんと予後不良に関連する要因であること

が示されている (26-28)。ただし、この基になるメカニズムはよくわかっていない。今後は、他のシグナル伝達経路に対する Selenbp1 欠損の影響についても検討が必要であろう。

Selenbp1 とセレンの結合形態は未だ不明である。近年、最大 100 のセレノプロテインが哺乳類のシステムに存在する可能性があるとしており、これまでに約 25 の同定された哺乳類のセレノプロテインが機能的に特徴付けられている (29)。明確な機能を持つこれらのセレノプロテインには、主に glutathione peroxidase ファミリー (サイトゾル GPx1、胃腸 GPx2、血漿 GPx3、リン脂質ヒドロペルオキシド GPx4)、iodothyronine deiodinase (ID1、ID2、ID3)、thioredoxin reductase (TrxR1、TrxR2、TrxR3) が含まれる。すべてオキシドレダクターゼ機能を持ち、生物において重要な役割を果たす (29)。そこで、Selenbp1 を欠損すると、セレノプロテインが影響を受けるかどうかを検討した。結果、Selenbp1-KO により、TrxR2 mRNA レベルが有意的に減少することがわかった (Fig. 7)。TrxR2 は抗酸化酵素として、酸化還元反応を触媒し、thioredoxin を還元し、細胞シグナル伝達に関与することが示されている (29)。これらの情報と、当研究室におけるこれまでの研究成果、令和 3 年度の成果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。今後は、酸化ストレスの変動状況についても深く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) 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。Selenbp1 欠損により発現変動する遺伝子の調節に関与する経路は、Ppar α 以外にも存在し、細胞増殖、細胞生存、および代謝プロセスに関与する、異なるシグナル伝達経路が影響を受けると推定された。2) Selenbp1-KO より、抗酸化酵素 TrxR2 の

発現レベルが有意に減少した。TrxR2 は酸化還元反応を触媒することから、Selenbp1-KO が TrxR2 の制御を通じて細胞のシグナル伝達に関与することが示唆された。これまでの研究の成果を総合すると、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。

F. 研究発表

1. Song Y, Kurose A, Li R, Takeda T, Onomura Y, Koga T, Mutoh J, Ishida T, Tanaka Y, Ishii Y. Ablation of Selenbp1 Alters Lipid Metabolism via the Ppara Pathway in Mouse Kidney. *Int J Mol Sci*, **22**(10): 5334 (2021). doi: 10.3390/ijms22105334.

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) Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. *Nucleic Acids Res*, **43**: e47 (2015).
- 17) Chambon P. *FASEB J*, **10**: 940-954 (1996)
- 18) Leid M, Kastner P, Chambon P. *Trends Biochem Sci*, **17**: 427-433 (1992).
- 19) Hatsumura M, Ishida T, Ishii Y, Ariyoshi N, Oguri K, Yoshimura H. *Fukuoka Acta Medica*, **86**: 135-143 (1995).
- 20) Matsusue K, Ishii Y, Ariyoshi N, Oguri K. *Chem Res Toxicol*, **12**: 1158-1165 (1999).
- 21) 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).
- 22) Yue S, Li J, Lee SY, Lee HJ, Shao T, Song B, Cheng L, Masterson TA, Liu X, Ratliff TL, Cheng JX. *Cell Metab*, **19**: 393-406 (2014).
- 23) Qiu B, Ackerman D, Sanchez D, Li B, Ochocki JD, Grazioli A, Bobrovnikova-Marjon E, Diehl JA, Keith B, Simon MC. *Cancer Discov*, **5**: 652-667 (2015).
- 24) Qi W, Fitchev PS, Cornwell M, Greeberg J, Cabe M, Weber CR, Roy HK, Crawford SE, Savkovic SD. *J Biol Chem*, **288**: 16274-16281 (2013).
- 25) Bozza PT, Viola JP. Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **82**: 243-250 (2010).
- 26) Chen G, Wang H, Miller CT, Thomas DG, Gharib TG, Misek DE, Giordano TJ, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. *J Pathol*, **202**: 321-329 (2004).
- 27) Li T, Yang W, Li M, Byun DS, Tong C, Nasser S, Zhuang M, Arango D, Mariadason JM, Augenlicht LH. *Mol Nutr Food Res*, **52**: 1289-1299 (2008)
- 28) Schott M, de Jel MM, Engelmann JC, Renner P, Geissler EK, Bosserhoff AK, Kuphal S. *Oncotarget*, **9**:10445-10456 (2018)
- 29) Labunskyy VM, Hatifield D, Gladyshev VN. *Physiol Rev*, **94**: 739-777 (2014)

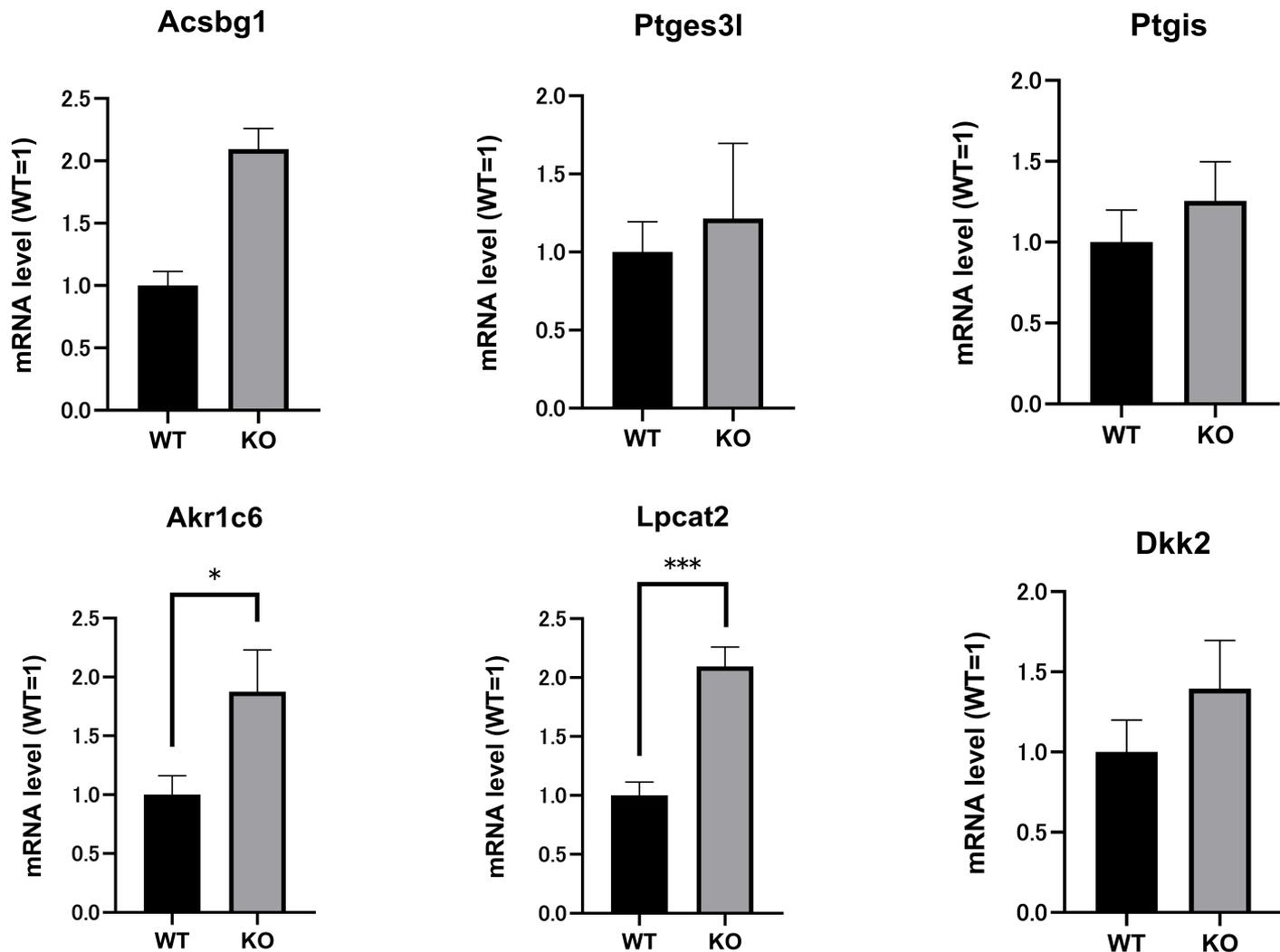


Fig. 1 Effect of Selenbp1 ablation on the renal expression of lipid metabolism-related enzymes (fasting). Abbreviations used: WT, wild-type; KO, Selenbp1-knockout; Acsbg1, acyl-CoA synthetase bubblegum family member 1; Ptges3l, prostaglandin E synthase 3-like; Ptgis, prostaglandin I2 synthase; Dkk2, dickkopf homolog 2; Akrlc6, aldo-keto-reductase family 1 member C6; Lpcat2, lysophosphatidylcholine acyltransferase 2. Significantly different from wild-type (WT): * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

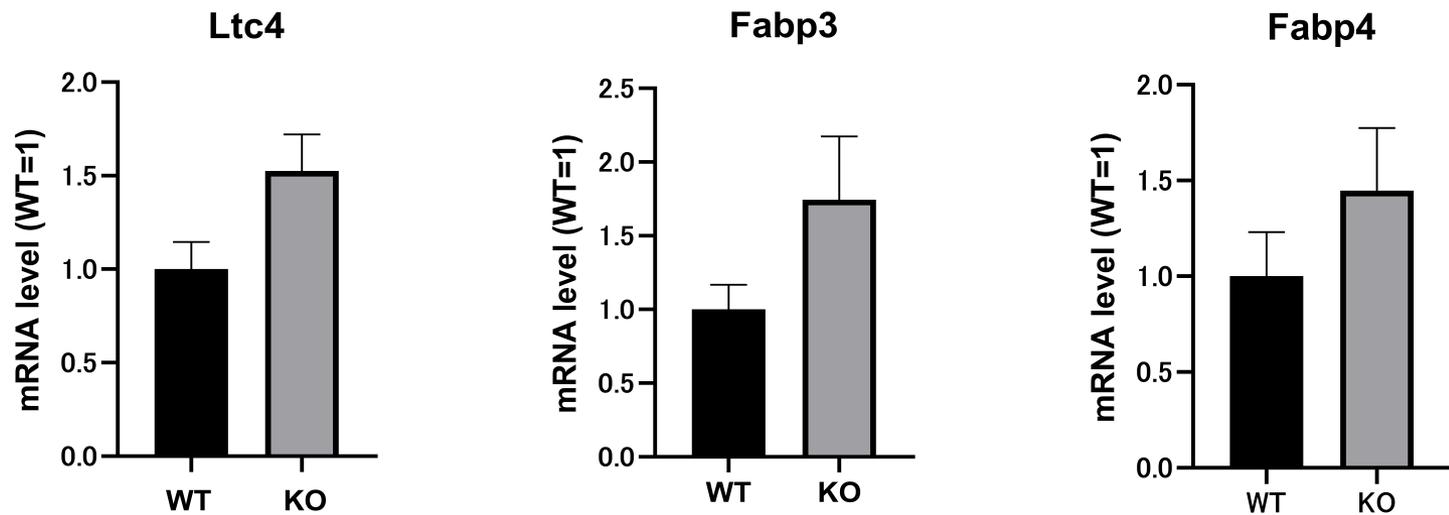


Fig. 2 Effect of *Selenbp1* ablation on the renal expression of lipid metabolism-related enzymes (fasting). Abbreviations used: *Ltc4*, Leukotriene C4; *Fabp*, fatty acid binding protein

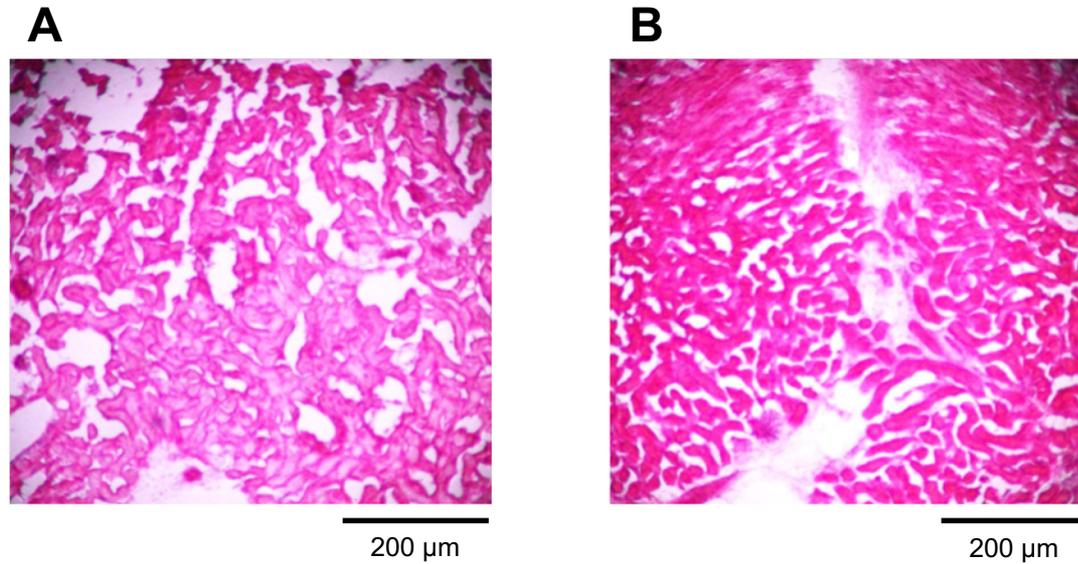


Fig. 3 Hematoxylin-eosin (H-E) staining and no obvious differences in Selenbp1-KO and wild-type mouse. A, kidney of wild-type mouse; B, kidney of Selenbp1-KO mouse (x100). One of the representative data is shown.

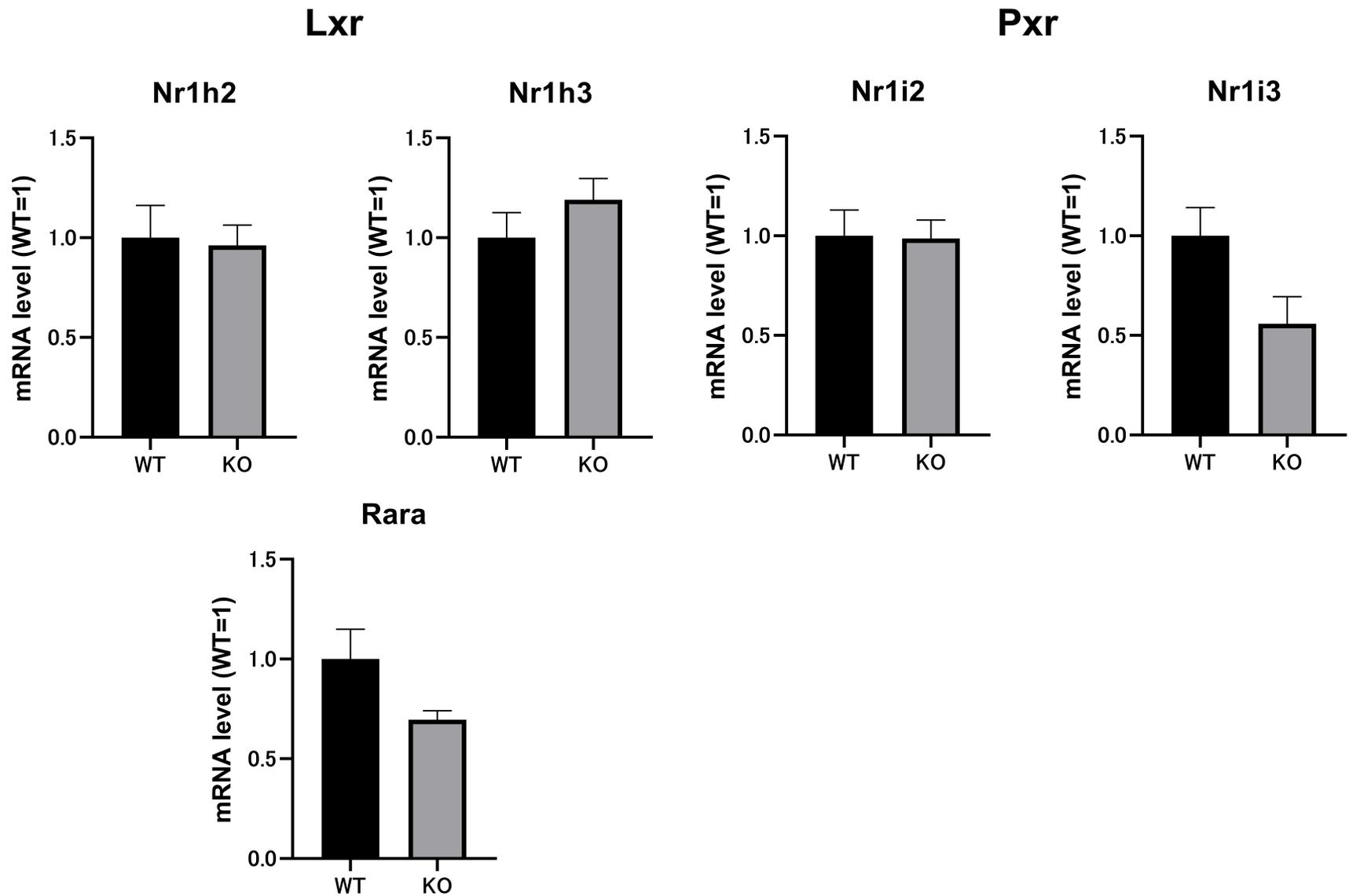


Fig. 4 Effect of Selenbp1 ablation on the renal expression of nuclear receptors (fasting).

Liver X receptor (Lxr)(Nr1h2 and Nr1h3), pregnane X receptor (Pxr)(Nr1i2 and Nr1i3) and retinoic acid receptor- α (Rara) were examined. Abbreviations used: Nr1h, nuclear receptor subfamily 1 group H; Nr1i, nuclear receptor subfamily 1 group I.

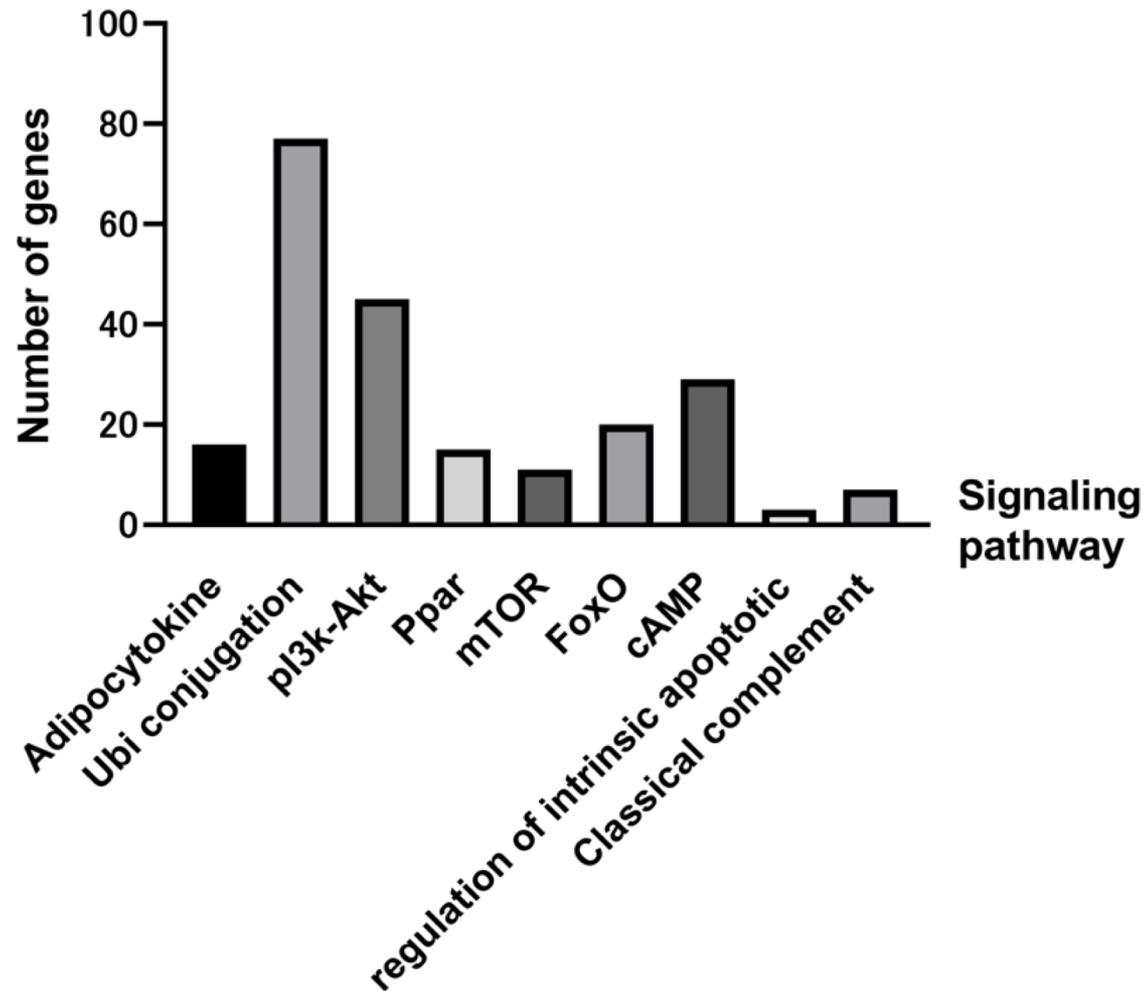


Fig. 5 Number of genes altered by ablation of Selenbp1 and related to different signaling pathways. Different accumulated genes were classified into nine signaling pathway groups by gene ontology (GO) analysis.

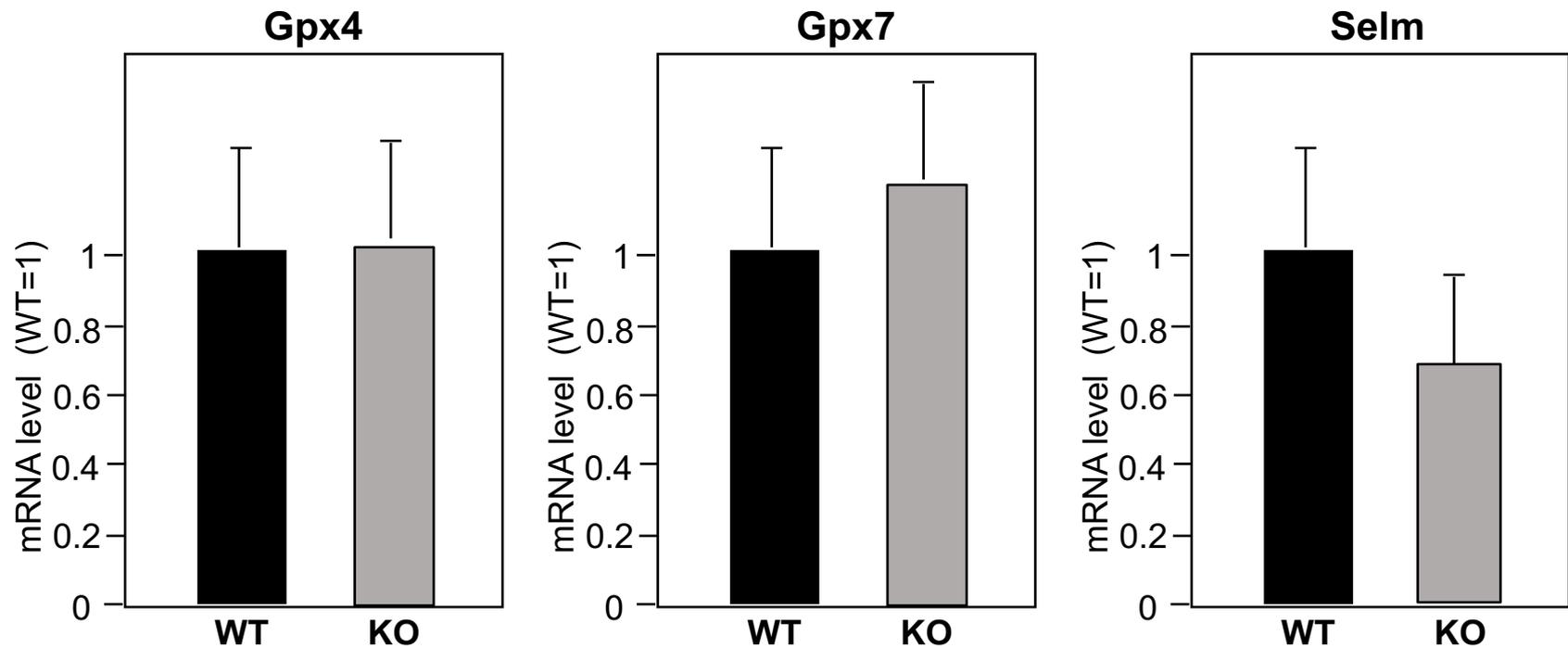


Fig. 6 Effect of Selenbp1 ablation on the renal expression of Selenoproteins mRNA by Quantitative RT-PCR (fasting).

Abbreviations used: Selm, Selenoprotein M; Gpx, glutathione peroxidase

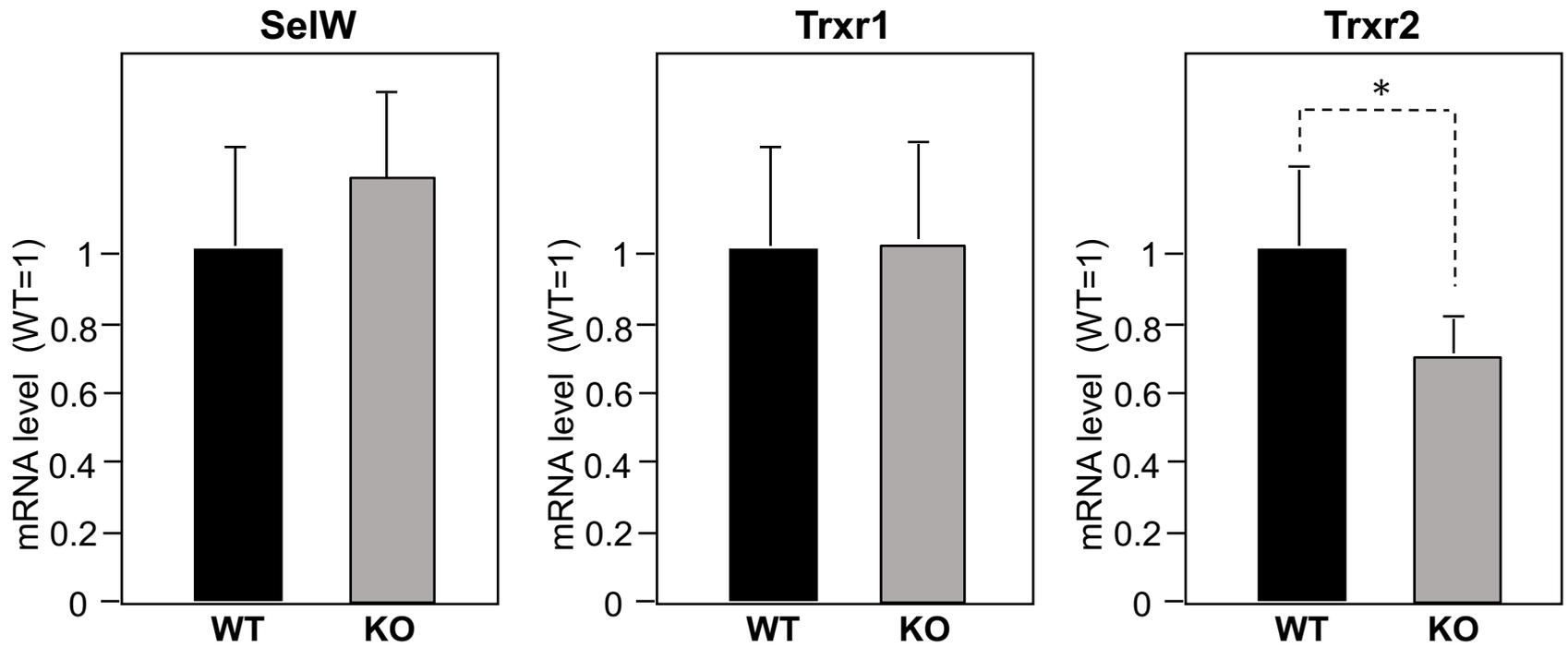


Fig. 7 Effect of Selenbp1 ablation on the renal expression of Selenoproteins mRNA by Quantitative RT-PCR (fasting).

Abbreviations used: SelW, Selenoprotein W; Trxr, thioredoxin reductase.