

学 位 論 文 題 名

ヒト血漿セレン含有蛋白質 Selenoprotein P の 構造と機能に関する研究

学位論文内容の要旨

必須微量元素セレン (Se) は、生体内では Cys の S が Se に置き換わったアミノ酸 selenocysteine (Sec) の形で蛋白質中に存在しており、Sec を含む蛋白質は selenoprotein と総称されている。Sec は翻訳されうる 21 番目のアミノ酸であり、終止コドンの一つ UGA でコードされ、ユニークな翻訳機構によって蛋白質中に取り込まれる。selenoprotein として glutathione peroxidase (GPx), thioredoxin reductase (TR) 等が知られており、Sec はこれらの酵素の活性部位を形成している。Selenoprotein P (P は Plasma の意, SeP) は、血漿中の主要な selenoprotein であり、その最大の特徴は、他の selenoprotein がポリペプチド鎖内に Sec を 1 残基しか含まないのに対し、10 残基の Sec を含む点である。Sec は N 末端側に 1 残基が、C 末端側に 9 残基が局在しており、中央付近に連続した His 残基を含む配列の繰り返しが認められる。1973 年に SeP の存在が見出されて以来、長い間その機能は不明であった。

I. ヒト SeP および SeP フラグメントの精製

ヒト血漿 (1.5 l) を出発材料に、5% polyethylene glycol 分画, Heparin-Sepharose, Q-Sepharose, Ni-NTA agarose カラムクロマトグラフィーを行い、精製 SeP 標品 1.0 mg を得た。これにより SeP の生化学的研究や生物活性の研究が初めて可能となった。一方、筆者はこの精製過程において、69 K の SeP が血漿由来のセリンプロテアーゼにより 60 K および 17 K のフラグメント (60 KF, 17 KF) に限定分解されることを見いだした。これらのフラグメントを精製し、N 末端アミノ酸配列分析を行った結果、60 KF が N 末端側に、17 KF が C 末端側に由来することが明らかとなった。前者を SeP-NF、後者を SeP-CF として以下の実験に用いた。また、精製ヒト SeP をラットに免疫し、11 種類のラット抗ヒト SeP モノクローナル抗体を得た。作成した 2 種類の抗体を用いてサンドウィッチ ELISA 法による SeP の測定法を確立した。

II. SeP の酵素活性およびその性質

GPx は、GSH 存在下に過酸化物を還元する酵素で、過酸化物 (過酸化水素や脂質過酸化物)

に対する特異性および局在性の異なるタイプの存在が知られている。cellular GPx は細胞質に局在しており、過酸化水素を基質とするが、過酸化脂質を還元する活性はない。phospholipid hydroperoxide GPx は細胞質、ミトコンドリアの両方に存在しており、過酸化水素だけでなく、過酸化脂質も還元する。血漿中に存在する extracellular GPx (eGPx) は、過酸化水素と過酸化脂質の両方を基質とする。GPx に代表される selenoprotein の多くが酸化還元酵素であることから、SeP の GPx 活性を測定した。活性測定は、GSH の消費を間接的に検出するカップリング法を用いて行った。過酸化水素を基質とした場合、活性は認められなかったが、過酸化リン脂質である phosphatidylcholine hydroperoxide (PCOOH) を基質とした場合、GSH の消費が認められた。HPLC 法により PCOOH の還元を解析したところ、PCOOH の減少に伴う還元体 PCOH の生成が確認され、PC-OOH の還元が確認できた。SeP 精製標品に不溶化ラット抗ヒト SeP モノクローナル抗体 BD1 を加えると、上清中の酵素活性が消失した。このことから、精製標品中への他の酵素の混入が否定され、SeP が過酸化リン脂質特異的な GPx 様の酵素であることが明らかとなった。SeP の比活性は 83 nmol/min/nmol of protein であり、SeP-NF に SeP と同等の酵素活性が認められた (69 nmol/min/nmol of protein)。一方、SeP-CF には活性は認められなかった。GPx では Sec が酵素活性部位であり、SeP の場合も N 末端側の孤立した Sec が活性部位と考えられる。

III. SeP の Se 運搬作用

細胞培養に無血清培地を用いる際、亜セレン酸ナトリウムの添加が必須であるが、血清を添加した培地では亜セレン酸ナトリウムを加える必要はない。これより血清中に Se を供給する因子の存在が示唆され、SeP、eGPx がその候補として挙げられる。そこで、ヒト血清と SeP および eGPx に対する抗体結合した Sepharose 4B を反応し、各 selenoprotein 欠乏血清を作成した。Se 含量を測定した結果、血清中の Se の内 SeP、eGPx はそれぞれ 53、19%を占めることが明らかとなった。5%の各欠乏血清を含む RPMI-1640 培地で T リンパ球腫 Jurkat 細胞を 3 日間培養し、細胞内の selenoprotein である GPx および TR 活性を測定した。その結果、SeP 欠乏血清の場合のみ活性の低下が認められた。また、細胞内の Se 含量の低下も認められ、SeP 欠乏血清で培養することにより、Jurkat 細胞が Se 欠乏になることが明らかとなった。次に、SeP 欠乏血清を含む培地に可変量の Se 含有物を添加し、それぞれの Se 供給活性を比較した。その結果、SeP は最も低い Se 濃度で細胞内の cGPx 活性を上昇させた。さらに、SeP フラグメントの Se 供給活性を比較したところ、SeP-CF でのみ有意な cGPx 活性の上昇が認められた。これより、C 末端側の Sec が Se 運搬作用を担っていると考えられる。

以上の結果から、SeP の N 末端側の Sec を 1 残基含むドメインが酵素活性を有し、C 末端側の 9 残基局在した Sec を含むドメインが Se 運搬作用を担うと思われ、SeP は二つの機能を

合わせ持つマルチファンクショナルなタンパク質と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	長 澤 滋 治
副 査	教 授	横 沢 英 良
副 査	助教授	高 橋 和 彦
副 査	助教授	澤 田 均

学 位 論 文 題 名

ヒト血漿セレン含有蛋白質 Selenoprotein P の 構造と機能に関する研究

必須微量元素セレン (Se) は、生体内では Cys の S が Se に置き換わったアミノ酸 selenocysteine (Sec) の形で蛋白質中に存在しており、Sec を含む蛋白質は selenoprotein と総称されている。Sec は翻訳されうる 21 番目のアミノ酸であり、終止コドンの一つ UGA でコードされ、ユニークな翻訳機構によって蛋白質中に取り込まれる。

Selenoprotein P は、血漿中の主要な selenoprotein であり、その最大の特徴は、他の selenoprotein がポリペプチド鎖内に Sec を 1 残基しか含まないのに対し、10 残基の Sec を含む点である。Sec は N 末端側に 1 残基が、C 末端側に 9 残基が局在しており、中央付近に連続した His 残基を含む配列の繰り返しが認められる。SeP の存在が見出されて以来、長い間その機能は不明であった。本論文の前半部では、SeP の精製法を確立し、後半部では SeP の生物活性に関する解析を行い、以下の成果を挙げた。

ヒト血漿 (1.5 l) を出発材料に、5% polyethylene glycol 分画, Heparin-Sepharose, Q-Sepharose, Ni-NTA agarose を行い、精製 SeP 標品 1.0 mg を得た。これにより SeP の生化学的研究や生物活性の研究が初めて可能となった。一方、筆者はこの精製過程において、69 K の SeP が血漿由来のセリンプロテアーゼにより 60 K および 17 K のフラグメント (60 KF, 17 KF) に限定分解されることを見いだした。これらのフラグメントを精製し、N 末端アミノ酸配列分析を行った結果、60 KF が N 末端側に、17 KF が C 末端側に由来することが明らかとなった。前者を SeP-NF、後者を SeP-CF として以下の実験に用いた。

GPx は、GSH 存在下に過酸化物を還元する酵素で、過酸化物 に対する特異性および局在性の異なるタイプの存在が知られている。GPx に代表される selenoprotein の多くが酸化還元酵素であることから、SeP の GPx 活性を測定した。活性測定は、GSH の消費を間接的に検出するカップリング法を用いて行った。過酸化水素を基質とした場合、活性

は認められなかったが、過酸化リン脂質である phosphatidylcholine hydroperoxide (PCOOH) を基質とした場合、GSH の消費が認められた。HPLC 法により PCOOH の還元を解析したところ、PCOOH の減少に伴う還元体 PCOH の生成が確認され、PC-OOH の還元が確認できた。SeP の比活性は 83 nmol/min/nmol of protein であり、SeP-NF に SeP と同等の酵素活性が認められた (69 nmol/min/nmol of protein)。一方、SeP-CF には活性は認められなかった。GPx では Sec が酵素活性部位であり、SeP の場合も N 末端側の孤立した Sec が活性部位と考えられる。

細胞培養に無血清培地を用いる際、亜セレン酸ナトリウムの添加が必須であるが、血清を添加した培地では亜セレン酸ナトリウムを加える必要はない。これより血清中に Se を供給する因子の存在が示唆され、SeP、eGPx がその候補として挙げられる。そこで、ヒト血清と SeP および eGPx に対する抗体結合した Sepharose 4B を反応し、欠乏血清を作成した。5% の各欠乏血清を含む RPMI-1640 培地で T リンパ球腫 Jurkat 細胞を 3 日間培養し、細胞内の selenoprotein である GPx 活性を測定した。その結果、SeP 欠乏血清の場合のみ活性の低下が認められた。また、細胞内の Se 含量の低下も認められ、SeP 欠乏血清で培養することにより、Jurkat 細胞が Se 欠乏になることが明らかとなった。次に、SeP 欠乏血清を含む培地に可変量の Se 含有物を添加し、それぞれの Se 供給活性を比較した。その結果、SeP は最も低い Se 濃度で細胞内の cGPx 活性を上昇させた。さらに、SeP フラグメントの Se 供給活性を比較したところ、SeP-CF でのみ有意な cGPx 活性の上昇が認められた。これより、C 末端側の Sec が Se 運搬作用を担っていると考えられる。

以上の結果から、SeP の N 末端側の Sec を 1 残基含むドメインが酵素活性を有し、C 末端側の 9 残基局在した Sec を含むドメインが Se 運搬作用を担うと思われ、SeP は二つの機能を合わせ持つマルチファンクショナルなタンパク質と考えられた。

以上の研究成果から、SeP のこれまで明らかでなかった多様な機能が明らかになり、Se により制御される疾患の治療法の開発に有力な手がかりを与えるものであり、博士 (薬学) の学位に値する業績と評価した。