

セレノプロテインPの機能と疾患——疾患バイオマーカーとしての可能性

斎藤 芳郎

1. はじめに

必須微量元素であるセレン (Se) について、これまでに毒性や必須微量元素としての役割、特に酸化ストレス防御・レドックス制御における重要性が明らかにされた。Seは、セレノシステイン (Sec: システインの硫黄がSeに置き換わったアミノ酸) という形でタンパク質中に存在する。Secは、翻訳される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、ユニークな機構により生合成される。Secを含むタンパク質は、“セレノプロテイン”と総称され、これまでに25種類のセレノプロテインが同定されている。血漿中に存在する主要なセレノプロテインであるセレノプロテインP (以下、SeP) は、存在する血漿 (plasma) にちなんでも名づけられた。SePは、肝臓で主に産生され、血漿中に分泌された後、各組織にSeを運搬する重要な生理機能を持つ¹⁾。しかし、近年、2型糖尿病などSePの発現増加が関わる疾患が認められるようになった²⁾。本稿では、SePの構造と機能、そして疾患との関わりについて、最新の知見とともに紹介する。さらに、疾患バイオマーカーとしての可能性、またSePを標的としたテラーメイド型治療法の開発について記す。

2. セレノプロテインPの構造と機能

1) セレノプロテインPのドメイン構造³⁾

SePの最大の特徴は、その一次構造にある (図1)。SePは、N末端側に1残基、C末端側に9残基、合計10残基のSecを含むタンパク質であり、そのmRNAには10個のUGAコドンが含まれる。Secの翻訳には、mRNAの3' UTR

に存在する安定なループ構造、Sec挿入配列 (SECIS) が必要だが、SePのmRNAには、二つのSECISが存在する。このように、複数のSecを持つセレノプロテインは他には存在せず、SePのみが持つ特徴である。SePのN末端側に存在するSecは、リン脂質ヒドロペルオキシドPL-OOHをグルタチオンなどの還元剤存在下に、アルコール体PL-OHに還元するグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) 様の酵素活性部位を形成する⁴⁾。一方、他の9残基のSecは、細胞にSeを効率よく供給するSe運搬作用を担っている³⁾。SePは、セリンプロテアーゼである血漿カリクレインにより限定分解を受け、N末端およびC末端フラグメントを生じる (図1)。SePのドメイン構造は、各フラグメントの機能に基づいている。ゼブラフィッシュでは、全長およびN末端側のみのSePが見つかっており、それぞれ独立した機能を持つと考えられている。SePの中央には、連続したHisおよび塩基性アミノ酸に富む領域が存在し、典型的なヘパリン結合配列XBBXB (Bは塩基性アミノ酸) がみられる。実際、SePはヘパリン/ヘパラン硫酸への親和性を有しており、この親和性が細胞への結合にも関与することが示されている。Hisタグ融合タンパク質の精製にNi-NTAカラムが用いられるが、SePは連続したHis部位を介してNi-NTAカラムにも高親和性を示す。SePは、メチル水銀やカドミウムなどの重金属結合能も報告されており、重金属毒性の抑制に機能している可能性も示されている。

2) 過酸化リン脂質還元活性

代表的なセレノプロテインであるGPxは、GSHなどの還元剤存在下において、過酸化水素やPL-OOHなどさまざまなヒドロペルオキシドを還元無毒化する。本酵素反応は、ピンポンメカニズムに従い、Secと過酸化物が反応し

東北大学大学院薬学研究科代謝制御薬学分野 (〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-3 C301)

Function of selenoprotein P and relation to diseases——Possibility as a disease biomarker

Yoshiro Saito (Laboratory of Molecular Biology and Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, C301, 6-3 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8578, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910686

© 2019 公益社団法人日本生化学会

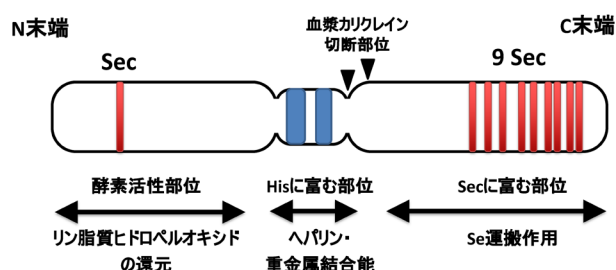


図1 セレノプロテインPの構造と機能

Sec: セレノシステイン。

て酸化されたSecが2分子のGSHにより還元される。SePと過酸化水素との反応性について検討した結果、SePは過酸化水素などの水溶性の基質には反応性を示さなかったが、PL-OOHの還元活性を示した³⁾。速度論的解析においてもピンポンメカニズムに従うことが明らかとなり、SePは過酸化リン脂質特異的GPx様の酵素活性を持つことがわかった。細胞内には、PL-OOH還元活性を持つGPx4が存在するが、PL-OOHに対する反応速度係数 k_1 を比較すると、SePはGPx4の170分の1であり、その反応性は低い。また、細胞内GSH濃度が数mMであるのに対し、細胞外の濃度は、 μM オーダーであることが知られている。SePは、GPx4が還元できない脂質二重膜の細胞外側のPL-OOHを還元すると思われるが、このSePが有する過酸化脂質還元の生理的・病理学的意義は不明な点が残されている。SePとGPx4のアミノ酸配列の相同性は低く、典型的なGPxの配列を有していない。一方、SePのN末端側はレドックス制御因子にみられるUXXC配列(UはSec)を持ち、またSePはチオレドキシンにより還元されることもわかっている⁵⁾。SePのC末端側を欠失したN末端フラグメント発現マウスを用いた研究では、感染症モデルにおける組織修復にN末端側が重要な役割を示すことが報告されているが、PL-OOH還元作用によるかは明らかにされていない。

3) セレン運搬メカニズム

細胞の生存維持・増殖にSeは必須であり、通常の血清を含む培地では血清に含まれるSeがSe源となっている。血清中に存在するセレノプロテインとしては、SePと細胞外型GPx (GPx3)が存在し、それぞれ血清Seの50%およ

び20%を占める。残りの30%は、アルブミンなどに結合するSeと考えられている(図2)¹⁾。各セレノプロテインに対する抗体を用い、SePまたはGPx3欠乏血清を作製し、Tリンパ球腫Jurkat細胞を培養した結果、SeP欠乏血清において培養時間依存的に細胞内セレノプロテインの低下がみられ、細胞がSe欠乏化した。Se源としてSePやGPx3など種々のSe含有物を比較すると、SePは最も効率よくSeを供給することがわかった¹⁾。SeP受容体として、ApoER2やmegalin, LRP1などのリポタンパク質受容体が同定されており、SePのSe運搬作用にはSeP受容体が重要な役割を果たしている⁶⁾。SePノックアウト(KO)マウスを用いた解析では、脳や精巣内のSeが低下し、精子形成不全がみられることから、これらの臓器への優先的なSe運搬作用がSePの重要な生理機能と考えられる。SeP KOマウスの表現型は、ApoER2 KOマウスとの類似性が認められており、SeP-ApoER2経路が優先的なSe運搬作用に中心的な役割をしていると考えられる。SePのC末端側が、ApoER2の β -プロペラドメインに結合することが報告されており、C末端フラグメントがSe運搬作用を示した知見と一致する。SePは受容体を介して細胞内に取り込まれた後、リソソームおよびセレノシステインリアーゼによる分解を経て、Se源となることが示されている。

4) 発現制御メカニズム

SePは主に肝臓で合成され、血漿中に分泌される。肝臓は、Se代謝において中心的な役割を果たしており、食事由来のSeは、肝臓に取り込まれると、図2に示す経路に入ると考えられる。亜セレン酸Naなどの低分子Seが細胞内に取り込まれると、還元された後、セレノプロテイン

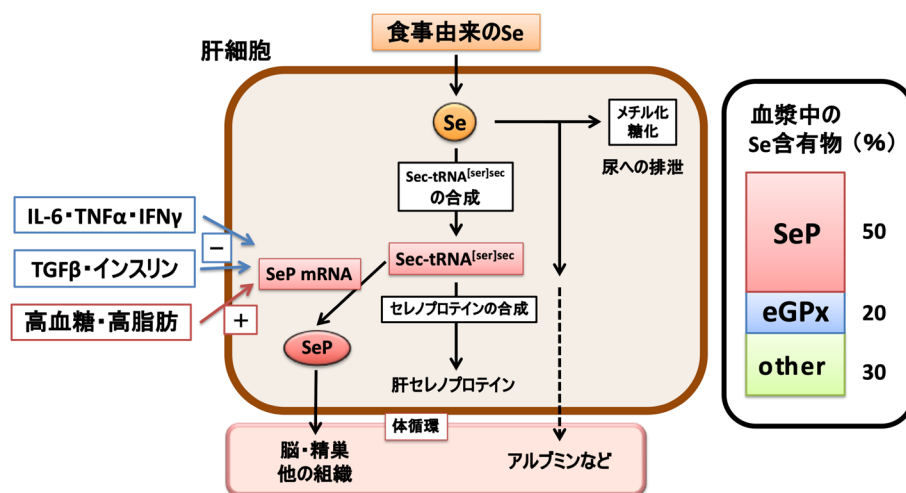


図2 肝臓におけるセレン代謝

食事に由来するセレンは、セレノプロテインの合成や、直接血中に移行する経路、あるいは排泄の経路に入る。セレノプロテインの合成に用いられるSec-tRNA^{[ser]sec}のうち、SePの合成に使われたセレンは、全身循環へと至る。SePの発現を正あるいは負に制御する因子が複数同定されている。

の生合成系に入る。還元されて生じたSeH₂は、リン酸化された後、Ser-tRNA^{[ser]sec}に結合し、tRNA上でSecが合成される。Sec-tRNA^{[ser]sec}は、セレノプロテインの生合成に用いられるが、肝臓内のセレノプロテイン合成、あるいはSePの生合成に用いられる。後者は全身循環に回り、各組織に取り込まれる。食事由来のSeとして、SecやSeMet（セレノメチオニン）などのアミノ酸の形態も知られ、Secはセレノシステインリアーゼにより切り出されたSeがリン酸化を経て、Sec-tRNA^{[ser]sec}の生合成に用いられる。一方、SeMetは、Metと区別されずにタンパク質合成等の代謝経路に入る。SeMetのメチル基が外されてSeが露出すると、生体にSeとして認識され、セレノプロテインの合成経路に入る。その他、食事から摂取されたSeのうち、低分子のSeはそのまま血中に移行するものも存在すると考えられている。血漿中のセレノプロテイン以外のSeは、SeMetあるいは低分子Seと考えられており、これらはSePに比べると効率は低下するがSe源となりうる。SeP KOマウスでは、先述のように脳・精巣のSeが減少するが、他の組織には顕著なSe減少がみられない。マウス通常食では、0.4mg/kgのSeが含まれており、各臓器のセレノプロテインが最大値を示す十分なSeが含まれている。SeP KOマウスの餌のSeを0.1mg/kgまで減らすと、野生型マウスではセレノプロテイン減少を生じないSe量であるが、KOマウスでは重篤な神経症状を呈し、死に至る。これらの結果は、Seを多く含む通常食において、SeP以外のSe含有物が脳および他の組織のSe源となりうることを示している。一方、SePは肝臓だけでなく、脳を含め他の組織でも合成されている。肝臓特異的SeP KOマウスでは、脳内Se含量が保持されていることから、脳内で合成したSePがオートクライン／パラクラインを介して細胞に取り込まれ、脳内のSe保持に機能していると考えられている。

SePの発現は、Seレベルだけでなく、転写レベルでの制御も受けている（図2）。SePのプロモーターは、サイトカイン応答性であることが知られており、炎症性サイトカインであるIL-6やIFN γ による発現低下が知られる。他、TGF β やインスリンによる低下も報告されている。一方、高血糖・高脂肪はSeP発現を増加する。高血糖に伴うAMPK活性の低下に伴い転写因子FoxO3aの核内移行が増加し、SeP発現が増加することが知られている⁷⁾。AMPK活性化作用を持つメトフォルミンは、上記経路を阻害して、SeP発現抑制効果を示す。SePは、脂肪酸の制御に関わるSREBP1によっても制御を受け、 ω 脂肪酸に属するエイコサペンタエン酸（EPA）によるSREBP1抑制を介したSePの発現低下が報告されている⁸⁾。SeP発現が炎症やエネルギー代謝と深く関連することが明らかとなってきた。

3. 過剰セレノプロテインPと疾患

1) インスリン抵抗性の増加作用

2型糖尿病患者の肝生検サンプルの網羅的遺伝子発現解析から、血糖値やインスリン抵抗性と相関する肝臓からの分泌因子“ヘパトカイン”としてSePが同定された²⁾。肝臓におけるSePのmRNAレベルや血漿SePタンパク質レベルと、空腹時血糖値や糖負荷後の血糖値に相関性がみられている。糖尿病態における増加したSeP（過剰SeP）に相当するSePを投与したマウスにおいて、糖負荷試験による血糖値の増加や、インスリン投与による血糖値の低下が減弱した。SeP KOマウスでは、高脂肪高ショ糖食誘導性の高血糖・インスリン抵抗性の増加に対して、軽減効果がみられている。過剰SePは、骨格筋や肝臓において、インスリン誘導性のAktリン酸化を抑制したことから、インスリンシグナル伝達を抑制し、インスリン抵抗性を増加すると考えられた。SePの増加は、運動による健康増進効果を抑制する“運動抵抗性”を惹起することも明らかとなってきた⁶⁾。運動により生じる活性酸素種（ROS）は、骨格筋におけるAMPK活性化を促し、PGC1 α の活性化を介したミトコンドリアや遅筋の増加など、骨格筋の適応反応誘導に関与することが知られている。SePの増加は、運動により生じたROSの好ましい効果を消去し、運動抵抗性を誘導すると考えられる。

2) インスリン分泌の低下作用

過剰SePは、膵 β 細胞からのインスリン分泌を抑制することが明らかとなっている⁹⁾。SeP投与マウスにおいて、糖負荷後のインスリン分泌が有意に低下した。膵臓の免疫組織学的な解析から、SeP投与により膵島の形態が変化し、抗インスリン抗体で染色される膵 β 細胞の面積が有意に低下した。過剰SePにより膵臓内のインスリンレベル低下が認められ、膵 β 細胞モデルMIN6でも過剰SeP処理によりインスリンが低下した。過剰SeP処理により細胞内インスリンレベルが低下したMIN6細胞では、グルコース刺激によるインスリン分泌も低下した。以上、過剰SePによるインスリン分泌の低下が、*in vivo*および*in vitro*で認められている。SePレベルとインスリン分泌能の負の相関性が、臨床研究でも認められており、SePレベルは膵 β 細胞のインスリン分泌能を制御する重要な役割を担っていると考えられる¹⁰⁾。膵 β 細胞は、活発なインスリン合成・分泌を継続的に行っており、小胞体に負荷がかかっている。過剰SePによる膵 β 細胞障害にも小胞体ストレスが関与する可能性が考えられる。小胞体は、ジスルフィド結合形成のため、細胞質側より酸化環境にあると考えられており、DTTなど還元剤処理によっても小胞体ストレスが誘導されることが知られている。過剰SePにおいても還元

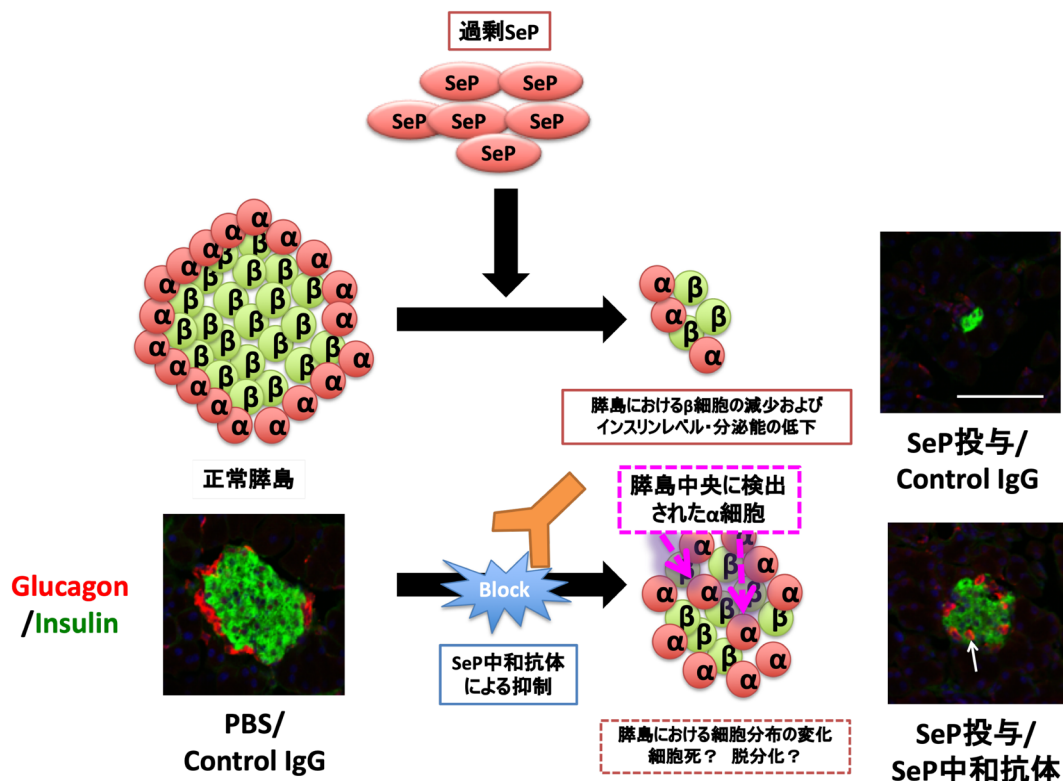


図3 過剰セレンプロテインPによる膵島障害

過剰セレンプロテインPが膵島に作用した結果、 β 細胞だけでなく、 α 細胞の低下も観察された。中和抗体による部分的な抑制により、膵島中央部に α 細胞が検出された。セレンプロテインPが膵 β 細胞の分化を制御する可能性が考えられる。

系の亢進が、小胞体ストレスを介し膵 β 細胞障害を誘導している可能性がある。先述のSeP投与マウスの膵島では、 β 細胞だけでなく、 α 細胞も減少していることが明らかとなっている(図3)。膵 β 細胞にストレスがかかると、 α 細胞に脱分化する反応も知られており、過剰SePにより膵 β 細胞の分化レベルも制御されている可能性がある。

3) 血管恒常性に及ぼす影響

糖尿病患者では、血管恒常性に障害が生じ、目や腎臓の毛細血管障害である重篤な血管合併症が知られる。過剰SePは、血管恒常性の障害にも関与することが示されている¹¹⁾。血管新生を促すVEGFが惹起する細胞内シグナル伝達において、NOXの活性化やROSのシグナル伝達における役割が認識されている。血管内皮細胞を過剰SePで処理すると、VEGFシグナルの抑制および細胞増殖の抑制効果がみられる。過剰SePによる血管内皮細胞の増殖抑制は、GSH合成阻害剤BSOで抑制されることから、抗酸化システム・還元作用の亢進が関与すると考えられる。

他方、肺高血圧症の血管病変形成にSePの過剰発現が関与することが明らかとなってきた¹²⁾。肺高血圧症は、心臓から肺に向かう肺動脈の血管閉塞により、血圧が上昇

し、右心不全を引き起こす疾患である。肺高血圧症の病変部位では、血管細胞の異常増殖が起こり、血管閉塞に至る。肺高血圧症患者由来の増殖性を獲得した平滑筋細胞(PAH-PASMC)と正常平滑筋細胞の網羅的遺伝子発現解析およびプロテオーム解析から、PAH-PASMCにおけるSeP高発現が見いだされている¹²⁾。病変部位におけるSePの高発現は、肺高血圧モデルマウスでも認められ、また平滑筋細胞特異的SeP KOマウスや、PAH-PASMCのSeP発現を低下するSanguinarine (3336化合物のスクリーニングから同定された植物アルカロイド)投与により、肺高血圧モデルの改善効果が認められた。PAH-PASMCが発現するSePは、SeP受容体であるApoER2を介したオートクライン/パラクラインによりPAH-PASMCの増殖を促進することが明らかとなっている。肺高血圧症患者における血中SeP濃度の増加も認められ、当該疾患におけるSePレベルは新しい診断バイオマーカーとなることが見いだされている。

4) 疾患バイオマーカーとしての可能性

SePの低下あるいは増加は、全身の恒常性に大きな影響を及ぼすことが明らかになり、SeP測定系の重要性が増している。SePのN末端側やC末端側を認識するモノクロー

ナル抗体の組合わせにより、SeP全長のみを測定する系やSeP全長およびN末端フラグメントを測定するELISA系が開発されている¹³⁾。SeP測定キットも複数販売されているが、抗体作製に用いた免疫原により、各キットの測定値が異なるため、キット選択には注意が必要である¹⁴⁾。我々は、一般病棟に設置されている自動分析器対応型のSeP測定系を開発している¹³⁾。本測定系を用いることで、臨床現場でのSeP評価が容易になり、各関連疾患におけるSeP濃度の評価が可能になると考えられる。

高SeP値の患者に対するSeP標的薬の開発は、今後さらに重要性を増すと思われる。先述のメトフォルミンやEPA、SanguinarineがSeP低下化合物として同定されており、これらは各関連疾患におけるSeP高値患者への適用が期待される^{7, 8, 12)}。他方、SePの細胞内取り込みおよびセレン運搬作用を抑制する中和抗体が同定されており、インスリン抵抗性およびインスリン分泌の改善効果が認められている(図3)⁹⁾。SePレベルの評価から標的治療薬の選択を実施するテーラーメイド型治療の確立が期待される。

謝辞

本稿で紹介した筆者らのSePに関する研究内容は、北海道大学で直接ご指導いただいた高橋和彦先生、同志社大学・野口範子先生、金沢大学・御簾博文先生・篁俊成先生、東北大学・佐藤公雄先生・下川宏明先生をはじめ、多くの先生方との共同研究の成果です。これまでご指導いただいた先生方・共同研究者の皆様に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Saito, Y. & Takahashi, K. (2002) Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 5746–5751.
- 2) Misu, H., Takamura, T., Takayama, H., Hayashi, H., Matsuzawa-Nagata, N., Kurita, S., Ishikura, K., Ando, H., Takeshita, Y., Ota, T., et al. (2010) A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab.*, **12**, 483–495.
- 3) Saito, Y., Sato, N., Hirashima, M., Takebe, G., Nagasawa, S., & Takahashi, K. (2004) Domain structure of bi-functional selenoprotein P. *Biochem. J.*, **381**, 841–846.
- 4) Saito, Y., Hayashi, T., Tanaka, A., Watanabe, Y., Suzuki, M., Saito, E., & Takahashi, K. (1999) Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein P. *J. Biol. Chem.*, **274**, 2866–2871.
- 5) Takebe, G., Yarimizu, J., Saito, Y., Hayashi, T., Nakamura, H., Yodoi, J., Nagasawa, S., & Takahashi, K. (2002) A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J. Biol. Chem.*, **277**, 41254–41258.
- 6) Misu, H., Takayama, H., Saito, Y., Mita, Y., Kikuchi, A., Ishii, K.A., Chikamoto, K., Kanamori, T., Tajima, N., Lan, F., et al. (2017) Deficiency of the hepatokine selenoprotein P increases responsiveness to exercise in mice through upregulation of reactive oxygen species and AMP-activated protein kinase in muscle. *Nat. Med.*, **23**, 508–516.
- 7) Takayama, H., Misu, H., Iwama, H., Chikamoto, K., Saito, Y., Murao, K., Teraguchi, A., Lan, F., Kikuchi, A., Saito, R., et al. (2014) Metformin suppresses expression of the selenoprotein P gene via an AMP-activated kinase (AMPK)/FoxO3a pathway in H4IIEC3 hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **289**, 335–345.
- 8) Tajima-Shirasaki, N., Ishii, K.A., Takayama, H., Shirasaki, T., Iwama, H., Chikamoto, K., Saito, Y., Iwasaki, Y., Teraguchi, A., Lan, F., et al. (2017) Eicosapentaenoic acid down-regulates expression of the selenoprotein P gene by inhibiting SREBP-1c protein independently of the AMP-activated protein kinase pathway in H4IIEC3 hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **292**, 10791–10800.
- 9) Mita, Y., Nakayama, K., Inari, S., Nishito, Y., Yoshioka, Y., Sakai, N., Sotani, K., Nagamura, T., Kuzuhara, Y., Inagaki, K., et al. (2017) Selenoprotein P-neutralizing antibodies improve insulin secretion and glucose sensitivity in type 2 diabetes mouse models. *Nat. Commun.*, **8**, 1658.
- 10) Oo, S.M., Misu, H., Saito, Y., Tanaka, M., Kato, S., Kita, Y., Takayama, H., Takeshita, Y., Kanamori, T., Nagano, T., et al. (2018) Serum selenoprotein P, but not selenium, predicts future hyperglycemia in a general Japanese population. *Sci. Rep.*, **8**, 16727.
- 11) Ishikura, K., Misu, H., Kumazaki, M., Takayama, H., Matsuzawa-Nagata, N., Tajima, N., Chikamoto, K., Lan, F., Ando, H., Ota, T., et al. (2014) Selenoprotein P as a diabetes-associated hepatokine that impairs angiogenesis by inducing VEGF resistance in vascular endothelial cells. *Diabetologia*, **57**, 1968–1976.
- 12) Kikuchi, N., Satoh, K., Kurosawa, R., Yaoita, N., Elias-Al-Mamun, M., Siddique, M.A.H., Omura, J., Satoh, T., Nogi, M., Sunamura, S., et al. (2018) Selenoprotein P Promotes the Development of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*, **138**, 600–623.
- 13) Tanaka, M., Saito, Y., Misu, H., Kato, S., Kita, Y., Takeshita, Y., Kanamori, T., Nagano, T., Nakagen, M., Urabe, T., et al. (2016) Development of a Sol Particle Homogeneous Immunoassay for Measuring Full-Length Selenoprotein P in Human Serum. *J. Clin. Lab. Anal.*, **30**, 114–122.
- 14) Saito, Y., Misu, H., Takayama, H., Takashima, S.I., Usui, S., Takamura, M., Kaneko, S., Takamura, T., & Noguchi, N. (2018) Comparison of Human Selenoprotein P Determinants in Serum between Our Original Methods and Commercially Available Kits. *Biol. Pharm. Bull.*, **41**, 828–832.

著者寸描

●斎藤 芳郎（さいとう よしろう）



東北大学大学院薬学研究科教授、博士（薬学）。

■略歴 1973年宮城県大崎市古川生まれ。96年北海道大学薬学部卒業，2001年同大学院薬学研究科博士課程修了。2000年よりJSPS特別研究員DC2，02年産業技術総合研究所研究員，08年同志社大学生命医科学部講師，18年9月より現職。

■研究テーマと抱負 セレンなど微量元素や活性種の代謝を分子レベルで理解し，その生理的意義を明らかにするとともに，関連する疾患の治療に役立てることを目指しています。生体内の絶妙なバランスを分子レベルで明らかにしていきたい。

■ウェブサイト <http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~taisya/index.html>

■趣味 スポーツ（観戦），飲み会とコーヒー。