

スペシエーションによるセレン及びテルルのメタボローム解析

小 椋 康 光

16族元素であるセレンとテルルは、金属元素と典型元素の物理化学的性質を併有する元素であるため、動植物体内では無機イオンとしてのみならず、炭素-金属元素結合を持った有機金属代謝物が代謝、解毒、利用などの過程において生成されることが知られている。しかし生体内での存在量が微量であるため、その代謝・解毒過程の全容は明らかになっていない。近年、金属元素を測定するための分析機器の性能が向上し、特にスペシエーションと呼ばれる生体微量元素の化学形態別分析を利用することにより、生体内で生成されるユニークな有機金属代謝物の構造を明らかにすることができるようになり、新たな代謝、解毒過程が明らかとなりつつある。本稿では、スペシエーションを利用したセレン及びテルルを含む有機金属代謝物の同定法と同定された代謝物から予測される代謝過程について概説する。

1. はじめに

16族に属する元素のうち、硫黄は動物及び植物にとって必須であるが、セレンは動物にとってのみ必須であると考えられている。またテルルについては動物及び植物ともに必須性は認められていない。セレンは生体内では、硫黄と同じように典型元素としての性質に基づき挙動する。言い換えるならば、生体分子にイオンとして配位するのではなく、炭素-セレンの共有結合性の代謝物が生成される。したがって、代謝物の化学形態が明らかになれば、セレンがどのような代謝を経ているのかを知ることができる。テルルに至っては、その動植物体内における代謝過程には、ほとんど明らかになっていない。生体内で同族の硫黄に比べてはるかに存在量の少ないセレンやテルルの代謝物を分析するには、一般的な代謝物分析法に加えて、金属元素を高感度に分析可能な機器を生体成分分析に応用する必要がある。

ある。まずは、セレンやテルルなどの金属性を有する元素を含む代謝物分析に用いるスペシエーションの装置構成を概説し、次いで著者らが行ってきたセレンやテルルを含有する代謝物の同定について紹介する。

2. スペシエーションとハイフネーテッドテクニック

従前は、生体微量元素の測定というと測定対象となるものが微量であるがゆえに、存在量を定量的に把握することのみに注意が払われていた。しかし、生体微量元素の生物学的作用を理解するためには、生体微量元素が生体内でどのような化学形態をとることによって生体構成成分として機能するのか、あるいは生体成分と相互作用を発揮するのかという定性的な一面を同時に把握することが必要である。そこで、この目的に用いられるのが化学形態別分析である。化学形態別分析は、スペシエーション (speciation) とも呼ばれ、最近ではこの呼び名の方がよく使われているため、本稿ではスペシエーションと記載した。

生体微量元素のスペシエーションとは、生体や環境由来の試料中に存在する元素を、元素に着目して化学形態別に定性分離し、それらの化学種を定量すること、またその分析法と定義される¹⁾。実際のスペシエーションの実施には、生体成分を分子量、荷電状態あるいは機能などに基づき分離する手法と、それに引き続き一般的には元素特異的に検出するという二つの分析法がオンラインで組み合わせられ

昭和薬科大学衛生化学研究室 (〒194-8543 東京都町田市東玉川学園 3-3165)

Analysis of selenometabolome and tellurometabolome by speciation

Yasumitsu Ogra (Laboratory of Chemical Toxicology and Environmental Health, Showa Pharmaceutical University, 3-3165 Higashi-Tamagawagakuen, Machida, Tokyo 194-8543, Japan)

る^{2,3)}。分離の手段としては、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、ガスクロマトグラフィーあるいはキャピラリー電気泳動などが利用されているが、もっぱら用いられるのは HPLC である。一方、元素特異的な検出手段としては、原子吸光光度計、誘導結合プラズマ発光分光計あるいは誘導結合プラズマ質量分析計 (inductively coupled plasma mass spectrometry: ICP-MS) などが用いられている。最近では多元素同時分析が可能である、他の機器分析法よりも一般に高感度である、同位体別分析が可能であるなどの理由から、ICP-MS の利用が一般的である。図 1 に HPLC を分離手段とし、ICP-MS を検出手段としたいわゆる HPLC-ICP-MS の概念図を示した。このように本来は別々の分析機器として利用可能であるもの同士を接続して利用する手法をハイフネーテッドテクニック (hyphenated technique) と呼んでいる⁴⁾。つまり HPLC-ICP-MS を端的に言えば、生体成分を HPLC で分離し、ICP-MS で金属などの元素を特異的に検出するということである。

スペシエーションにおける分離手法として HPLC が汎用される理由は、1) 生体試料を前処理なしでも適用可能なこと、2) イオン交換、サイズ排除及び吸着・分配など種々の分離原理に基づく分離が可能であること、3) 分離と検出手法が液相-液相であり ICP-MS への接続が容易なことなどが挙げられる。特に 3) については、ICP-MS への試料導入速度が 0.1~1.0 mL/min 程度であり、一般的な HPLC の流速とほぼ等しいことから、特別なインターフェースを用いることなく接続できることも HPLC が選択される大きな理由の一つである。

一方 HPLC-ICP-MS の最大の欠点は、標準物質のない未知の化合物やタンパク質の同定ができないことである。これを克服するため、HPLC-ICP-MS の分析条件をほぼそのまま移植できることから、未知の化合物を同定するために HPLC-ESI-MS (いわゆる LC-MS) が相補的に利用される⁵⁾。ESI-MS (エレクトロスプレーイオン化質量分析装置) の

質量分離部は、タンデム型 (MS-MS)、イオントラップ型 (MSⁿ)、飛行時間型 (TOF) あるいはハイブリッド型 (Q-TOF) など多彩であることから、MS-MS 及び MSⁿ では分子構造の情報を、TOF や Q-TOF では精密質量から元素組成式を得ることが可能である⁶⁾。ただし、ESI-MS はイオン化がマイルドであるため、これに起因する欠点も有している。すなわち ICP-MS に比べて、1) 汎用機器を用いた場合、同じ化合物を検出する場合 3~5 桁ほど感度が低い、2) マトリックスによる影響を受けやすく、測定対象によっては血清や尿などの高マトリックス試料はそのままでは測定できない、などが挙げられる。セレンやテルルは前述の通り、生体内の代謝を通じて、共有結合性の代謝物として変換されるため、代謝物の構造が同定できれば、その代謝過程を明らかにすることができる⁷⁾。セレンやテルルの分析においては、ICP-MS の感度には ESI-MS の感度が追いついていないため、HPLC-ICP-MS でスクリーニングを行い、HPLC-ESI-MS-MS で同定するといった相補的な利用が必要である。以下にこれまで著者らが行ってきたセレン及びテルルを含有する代謝物の分析について概説する。

3. 尿中セレン代謝物のスペシエーション

セレンは動物体内では、セレンを特異的に要求する酵素、例えばグルタチオンペルオキシダーゼやチオレドキシンレダクターゼなどの活性中心をセレンシステインという形で構成する^{8,9)}。セレンタンパク質の翻訳に関する詳細な機構については他の総説等を参照されたいが^{10,11)}、金属イオンのように、タンパク質の一次構造が完成し高次構造を形成するとともにイオンやイオンを含む複合体としてタンパク質分子に組み込まれるのではなく、21 番目のアミノ酸といわれるセレンシステインとして、一次構造内に組み込まれる¹²⁾。アミノ酸としてタンパク質の機能発現に利用される元素という観点から見れば硫黄とセレンには共通点を見いだせるが、システインと異なりセレンタンパク質に組み込まれるセレンシステインは、動物体内で無機のセレン塩 (亜セレン酸塩やセレン酸塩) から *de novo* 合成可能である。また、それぞれのアミノ酸の SeH 基と SH 基の pKa はそれぞれ、5.2 と 8.3 であることから、生体内での機能も当然異なっている。これまでセレンがセレンタンパク質として生合成される機構については、詳細な分子メカニズムが明らかにされてきたが、セレンの排泄に向かう代謝過程の詳細は不明であった。すなわち生体内で利用されたセレンは、最終的にはほとんど尿中へと排泄され、尿中にはトリメチルセレンニウムイオン (TMSe) が検出されることが知られていたものの^{13~16)}、TMSe は主にセレンを過剰に摂取したときに見いだされる尿中代謝物であって、生理条件下で見いだされるセレンの尿中代謝物は別の化学

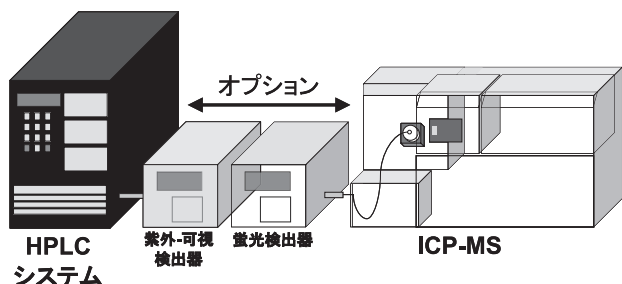


図 1 HPLC-ICP-MS の概念図。

HPLC と ICP-MS の間に一つまたは複数の検出器 (紫外-可視吸光検出器や蛍光検出器など) を入れることも可能。HPLC あるいは間に入れた検出器からの溶離液を、直接 ICP-MS の試料導入部 (ネブライザーチューブ) に導入することにより、HPLC-ICP-MS の装置が構成できる。

形態であることが示唆されていた^{17~21)}。実際に、セレンを軽度で過剰摂取させたラットの尿では、HPLC-ICP-MS解析により二つの異なる尿中代謝物が検出され(図2)、そのうちの一つはTMSeの標準物質と同じ保持時間を持つことから、TMSeであることが確認できていた。

図2でXと記したTMSeと異なる代謝物が、生理的なセレンの尿中代謝物であったが、最初にHPLC-ICP-MSにより入手可能なセレン化合物及び比較的簡単に化学合成が可能なセレン化合物との保持時間の比較を行ったところ、いずれもXの保持時間と一致しなかった。そこで、HPLC-ESI-MS-MSによる分析を試みたが、尿中に含まれる多量の塩と有機物が、微量にしか存在しないセレン代謝物の検出を妨害した。そこで脱塩と酵素処理による有機物

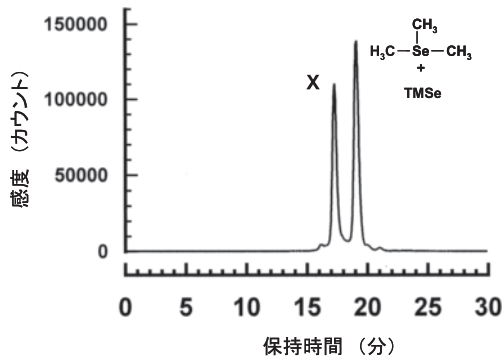


図2 セレンを摂取したラットの尿中のセレンのスペシエーション。

5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の亜セレン酸ナトリウムを含む飲料水を14日間摂取させたラット尿をShodex GS-320HQカラムにかけ、50 mM酢酸アンモニウム溶液で溶出し、ICP-MS (HP4500, アジレントテクノロジーズ社)によりセレンを m/z 82で検出した。

の分解、濃縮を経て、HPLC-ESI-MS-MSによる分析が可能となるように前処理を行ったところ、図3のマスペクトラムを得ることができた²²⁾。セレンは特異的な同位体の存在比(^{74}Se 0.89%, ^{76}Se 9.36%, ^{77}Se 7.63%, ^{78}Se 23.8%, ^{80}Se 49.6%, ^{82}Se 8.73%)を有しており、セレンを分子中に含む化合物であれば、この同位体比がマスペクトラムに現れる。実際に、 m/z 300を中心に(^{80}Se として)セレンの同位体のパターンが観察された。その他の実験から得られた情報も勘案して、尿中の未知のセレン代謝物の分子量は299であることが予想できた。次にHPLC-ESI-MS-MS分析を実施し、検出されたフラグメントイオンから構造を組み立てると、尿中セレン代謝物はSe-メチルセレン-N-アセチルヘキソサミンと想定された(図4)。この際には、 ^{78}Se 、 ^{80}Se 及び ^{82}Se を含むそれぞれ m/z 298、300及び302のプリカーサーイオンからプロダクトイオンのフラグメント解析を行うことにより、Seを含むフラグメントと含まないフラグメントの識別が容易になり、構造推定に役立った。しかし、極めて微量の尿中セレン代謝物の絶対構造をMS-MSで決定するのは難しい。この後、著者らはNMRによる絶対構造の決定と候補化合物の化学合成を行い、最終的に生理的条件下で尿中に排泄されるセレン化合物が図4に示したSe-メチルセレン-N-アセチルガラクトサミンであることを明らかにした²³⁾。さらに尿中セレン代謝物の生合成経路を明らかにするため、肝臓中でのセレン代謝物の探索を行ったところ、経時的に尿中セレン代謝物Xへと変化する肝臓中セレン代謝前駆体AがHPLC-ICP-MSにより検出された。この化合物についてもESI-MS-MSで分析したところ、Se-グルタチオニル-N-アセチルガラクトサミンであることが明らかとなった(図5)²³⁾。無機のセレ

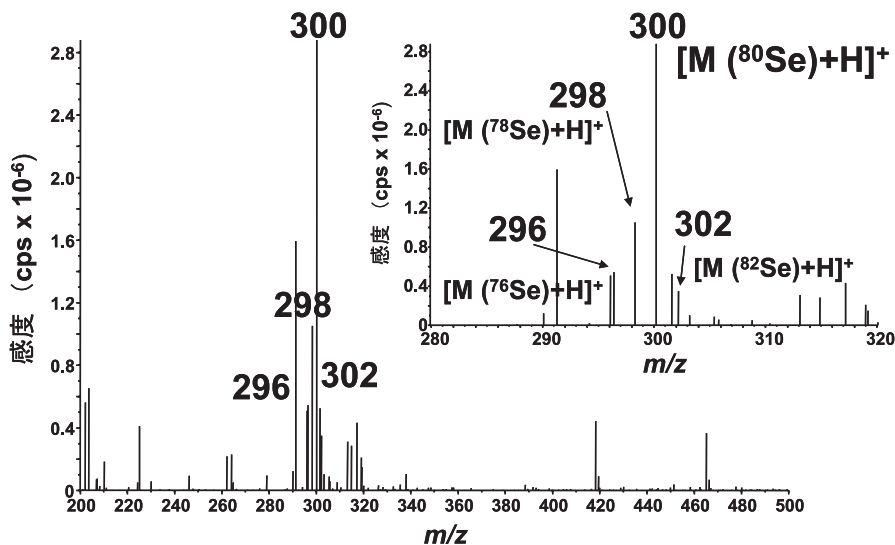


図3 尿中セレン代謝物Xのマスペクトラム。

図2で得られたセレン代謝物Xを精製・濃縮し、ESI-MS (API3000, アプライドバイオシステムズ社)により positive ion モードで測定した。

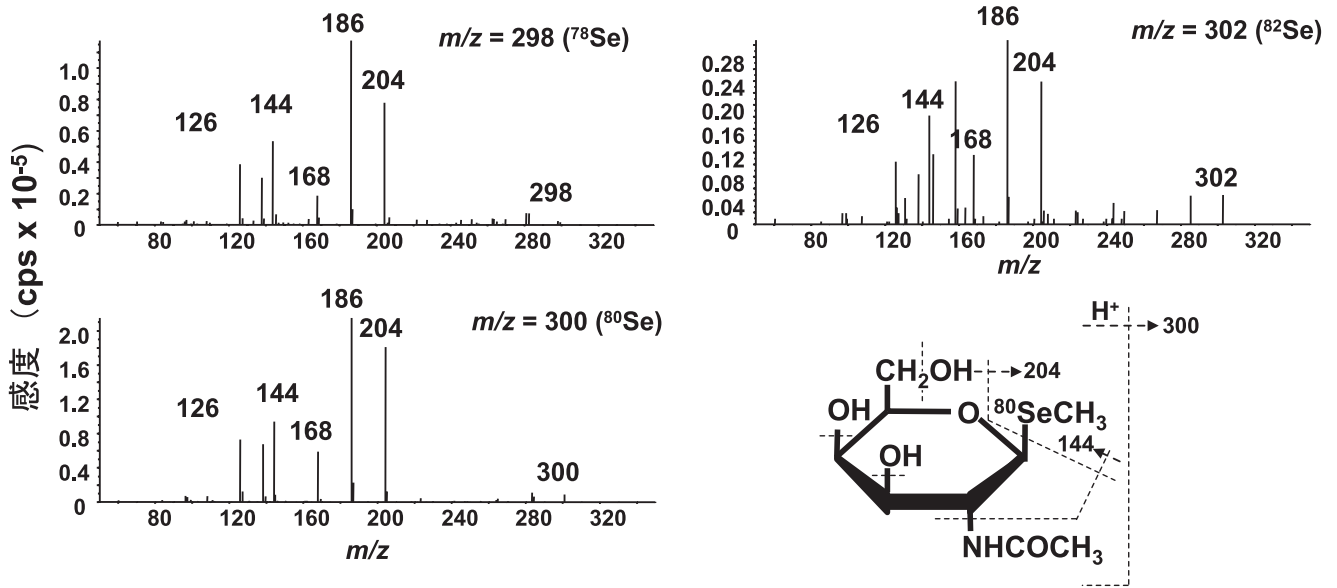


図4 尿中セレン代謝物Xのタンデムマススペクトラムと構造。

図3で得られたプリカーサーイオンをコリジョンエネルギー20 eVで生成させたフラグメントイオンを得た。

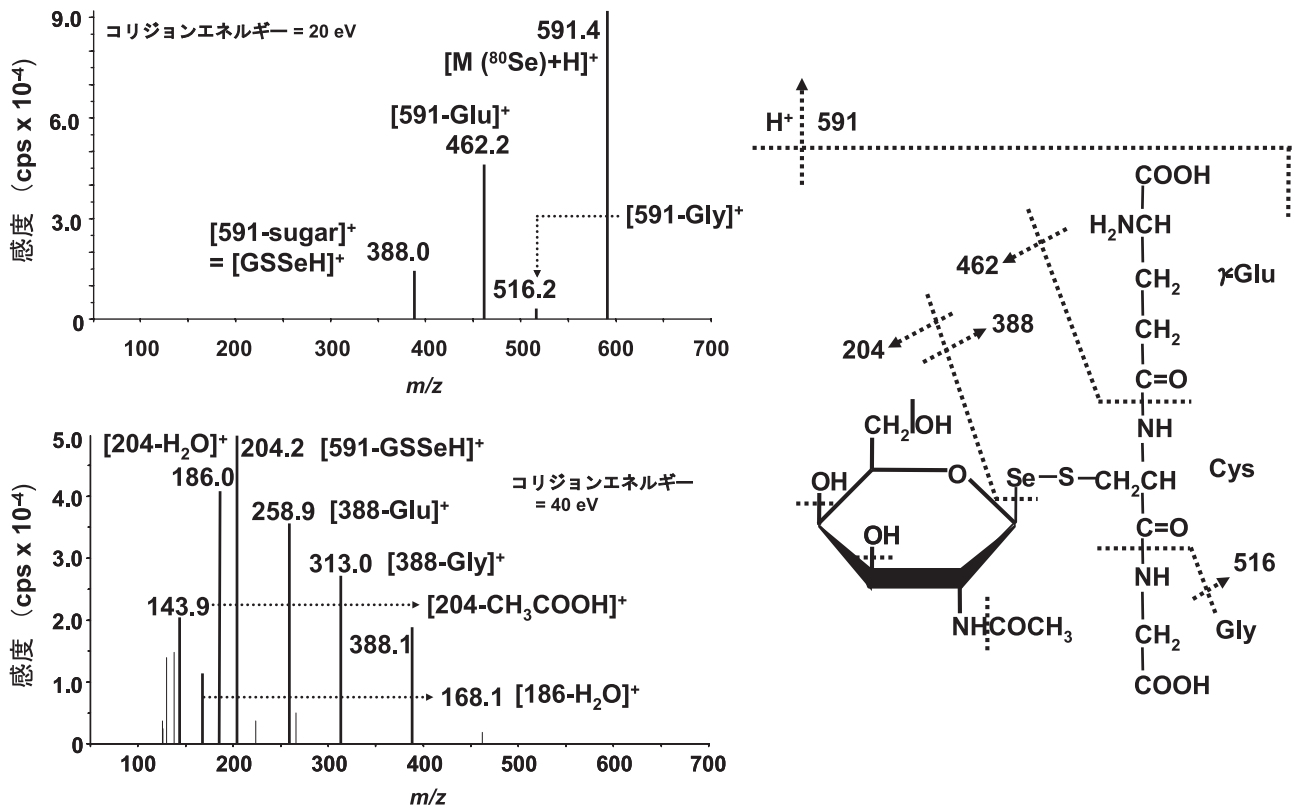


図5 ラット肝臓における尿中セレン代謝物前駆体の同定。

図2の条件で処置したラットより得られた肝臓可溶性画分中に存在する尿中セレン代謝物前駆体をHPLC-ESI-MS-MSにより解析した。コリジョンエネルギーは20及び40 eVとし、positive ionモードにて測定した。

ン塩は、硫酸塩や亜硫酸塩とは異なり、生体内で- II価まで還元可能であり、この- II価のセレンがセレンタンパク質の生合成に必要なセレンシステインの *de novo* 合成に用いられる。この- II価のセレンの詳細な化学形態は明らか

になっていないが、タンパク質のシステイン残基やグルタチオンのシステインに結合したセレンペルスルフィド (CysSSeHやGSSeH)、あるいはセレントリスルフィド (GS-Se-SGなど)、あるいは遊離のHSe⁻などが想定されて

いる。排泄に向かう際には、まず肝臓内で糖が付加され、次いでグルタチオンの部分が外されると同時に代わりにメチル基が付加されて、尿中へ排泄される経路が想定できた²⁴⁾。したがって、少なくとも排泄に向かう経路においては、代謝中間体としての-Ⅱ価のセレンはGSSeHあるいはGSSeSGの化学形態ではないかと考えている。セレンは生理条件下ではセレノ糖として尿中に排泄されるが、同様の構造を有した硫黄置換体は報告されていないため、糖による抱合体の尿中排泄はセレンに特異的な排泄経路であると考えられる。糖の部分については、*N*-アセチルグルコサミンを含むセレノ糖を検出したという報告もあるが²⁵⁾、圧倒的に*N*-アセチルガラクトサミンがセレノ糖の生合成には用いられる。またセレノ糖は、哺乳類のみならず、魚類、爬虫類、鳥類でもセレン代謝物として検出できる^{26,27)}。なぜセレノ糖の生合成に、ほぼ特異的と言っても良いほど*N*-アセチルガラクトサミンが利用されるのか、著者は明快な解答を今のところ持っていない。セレンの摂取が過剰になるとTMSeが尿中に検出されるようになるが、これは糖の転移反応が追いつかなくなり、メチル化反応のみで、化学的に安定で水溶性の高いTMSeに変換し、排泄しやすいためと思われる。しかし、TMSeの生合成には、毒性が高く、揮発性の高いモノメチル化体やジメチル化体のセレン化合物を代謝中間体として経なければならないため、過剰摂取という非常事態以外では単純メチル化の経路ではなく、より安全なセレノ糖の生合成という経路で排泄しているものと考えられることができる。

4. テルルの尿中代謝物のスペシエーション

テルルは産業材料として、近年我々の生活圏に浸透しつつある元素であるが、その生体影響については明らかになっていない点が多い。テルルは動物にとっても植物にとっても必須性が確認されていない元素であり、その代謝経路も明らかにされていない。セレンよりも金属性の高い元素であるが、生体内で金属として挙動するのか、典型元素として挙動するのかも不明である。著者らは、ラットに亜テルル酸ナトリウムとしてテルルを与え、その尿中代謝物のスペシエーションを行った²⁸⁾。

テルル投与後の尿には主たるテルル代謝物が一つのピークとして検出された(図6)。このピークの保持時間は、与えた亜テルル酸やその酸化体であるテルル酸あるいは-Ⅱ価のテルルのグルタチオン抱合体であるGSTeHとは異なっていた。用いたHPLCカラムの溶出条件では、陽イオン性の化合物は、相対的に遅く溶出されることから、このテルル代謝物はトリメチルテルロニウムイオン(TMTe)ではないかと想定し、TMTeを研究室で化学合成し、保持時間を確認した。その結果、このHPLCカラムに加えて、陰イオン交換HPLCカラムにおいても、尿

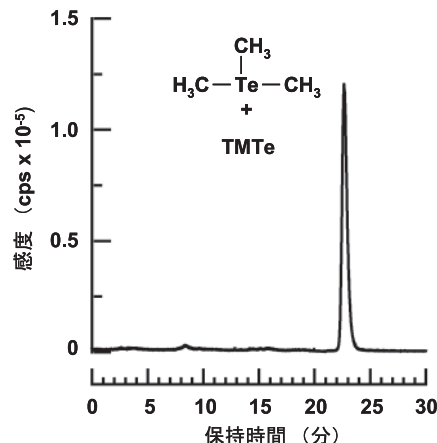


図6 テルルを摂取したラットの尿中のテルルのスペシエーション。

9.0 μg/mLの亜セレン酸ナトリウムを含む飲料水を14日間摂取させたラット尿をShodex GS-320HQカラムにかけ、50 mM酢酸アンモニウム溶液で溶出し、ICP-MS (Agilent7500, アジレントテクノロジー社)によりテルルを m/z 128で検出した。

中テルル代謝物と化学合成したTMTeとの保持時間が一致したことから、尿中のテルル代謝物はTMTeであると結論した。すなわち、テルルは亜テルル酸塩として摂取された場合、セレンと同様に-Ⅱ価まで生体内で還元され、単純メチル化反応により、トリメチル化体までメチル化され、尿中へ排泄される経路が想定された²⁸⁻³⁰⁾。またセレノ糖に対応するテルル糖は検出できなかったため、*N*-アセチルガラクトサミンを転移する酵素は、セレンに特異的であり同族のテルルを識別しているが、メチル化酵素は、セレンとテルルを識別できていないと考えられた。モノメチル化体及びジメチル化体はテルルにおいても揮発性が高く、毒性の高い化合物であるため、単純メチル化反応よりも糖転移反応の方が毒性学的に有利であると考えられるが、あえて糖転移反応においてはセレンとテルルを識別しているため、セレノ糖の生合成には何らかの生物学的な理由があるものと想定している。しかし、その理由は今のところ明らかにできていない。

5. 海棲生物特異的なセレン代謝物のスペシエーション

著者の研究室では、ある種の家棲生物中の肝臓の可溶性画分中には、ヒトや実験動物などの哺乳類の肝臓では検出されないセレン含有代謝物が多量に存在することを見いだしていた(図7)。陸棲爬虫類であるカミツキガメには、哺乳類の肝臓や尿中で見いだされる*Se*-メチルセレノ-*N*-アセチルガラクトサミンが認められたが、海棲爬虫類であるタイマイの肝臓中には未知のセレン代謝物が多量に存在した。HPLC-ESI-MS-MSによる同定を試みたところ、 m/z 278の代謝物が検出され、それをプリカーサーイオンとしてフラグメントパターンを解析したところ、図8に示

したようなセレノネイン (selenoneine, 2-セレニル- N^{α} , N^{α} , N^{α} -トリメチル-L-ヒスチジン) と命名された化合物であることが明らかとなった²⁷⁾。セレノネインは山下由美子らにより、マグロの赤血球中から初めて同定された化合物であるが³¹⁾、マグロに限らず他の海棲の魚類や爬虫類にも存在することが明らかとなった³²⁾。セレノネインの硫黄置換体はエルゴチオネイン (ergothioneine) と呼ばれ 1909 年に M.C. Tanret によって麦角から初めて単離された化合物である。現在エルゴチオネインは、ヒスチジンからヒスチジンのアミノ基がトリメチル化されたヘルシニン (hercynine) を経て、システインからイミダゾール環へ硫黄が供給されて生合成される経路が示されている³³⁾。セレノネインもこの経路をたどり生合成されるとすると、システインの代わりにセレノシステインが必要になる。しかし、セレンを必須元素として要求し、セレンタンパク質を生合成している

動物には、セレノシステイン残基や tRNA と結合したセレノシステインは存在しているものの³⁴⁾、遊離のセレノシステインの存在は確認されていない。また食物連鎖の上位にいる生物ほどセレノネインの肝臓中濃度が高いこと、海綿や海藻中에서도セレノネインが見いだされることから、セレノネインは食物連鎖に従って肝臓中に濃縮されるのではないかと著者らの研究室では考えている。一方、ヒトが魚を摂取した場合、セレノネインがメチル化された Se-メチルセレノネインが生成することが報告されている³⁵⁾。このことは、セレノネインが生体内で何らかの反応性を有していることを示唆していると考えられる。現在著者らの研究室では、セレノネインと他の金属との生体内相互作用について検討を行っている³⁶⁾。

6. セレン蓄積性植物におけるセレンとテルルの代謝物のスペシエーション

動物体内でセレノシステインがセレンタンパク質の一次構造内に取り込まれるためには、インフレームに UGA コドンがあり、mRNA の 3' 側に特殊なヘアピン構造 (これを selenocysteine insertion sequence: SECIS という) が必要であるが、SECIS が植物では認められないため、セレンの必須性は植物では認められていない³⁷⁻³⁹⁾。しかし、ある種の植物では、無機のセレン塩を有機セレン化合物に代謝変換する高い能力を有することが知られている⁴⁰⁻⁴⁵⁾。これらの植物が毒性の高い無機セレン塩を毒性の低い有機セレン化合物 (主にセレン含有アミノ酸誘導体) に変換できることを利用して、1) セレン汚染土壌の浄化、いわゆるファ

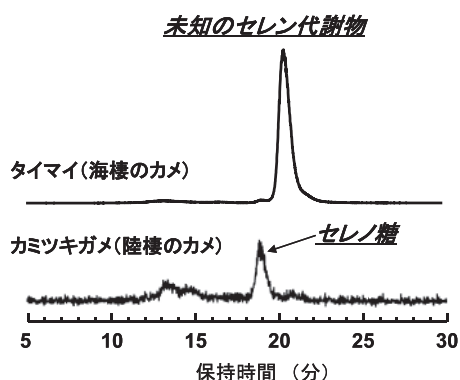


図7 海棲及び陸棲爬虫類肝臓中のセレン代謝物の比較。

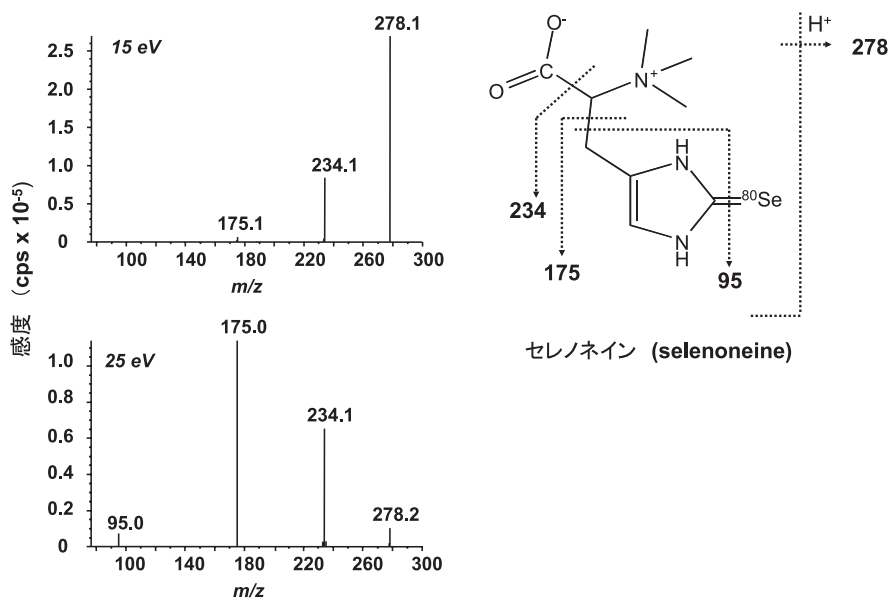


図8 海棲爬虫類肝臓中の代謝物のマススペクトラムと構造。

図7で得られた海ガメ肝臓中の未知のセレン代謝物を HPLC-ESI-MS-MS により分析した。

イトレメディエーションや2)セレンの抗がん作用を期待した医薬品開発,などに応用可能であるため,植物における非必須元素であるセレンの代謝過程の解明も多数報告されている⁴⁶⁻⁵⁵⁾.

ニンニク (*Allium sativum*) やタマネギ (*Allium cepa*) などのユリ科ネギ属の植物やブロッコリ (*Brassica oleracea* var. *italica*), カラシナ (*Brassica juncea*), 小松菜 (*Brassica rapa* var. *perviridis*) 及び大根 (*Raphanus sativus*) のようなアブラナ科の植物は, 無機のセレン化合物を特有のセレンアミノ酸に代謝し, 蓄積することが知られている⁵⁶⁾. 前述の通り, セレンは植物にとっての必須元素ではないが, ある種の植物にとっては少量のセレン曝露が植物の成長に有用であるということが知られており, 有用元素と位置づけることもある. 上述のセレン蓄積性の植物においては, 硫黄代謝が盛んなことから, 同族のセレンについても高い代謝能を有していると考えられている. そこで, アブラナ科植物の中でも硫黄を含む辛味成分の産生能力の高い辛味大根 (*Raphanus sativus* L. cv. 'Yukibijin') を用いて, セレン代謝物の解析を行った⁴²⁾.

辛味大根を, セレン酸を含む土壌で栽培し, 可食部である根部から可溶性のセレン化合物を抽出し HPLC-ICP-MS により測定した. 最も多く存在したセレンの化学形態は, 曝露に用いたセレン酸であったが, 次いで *Se*-メチルセレンシステインが確認された (図9). HPLCの保持時間からセレン化合物を同定するために, 分離モードの異なる2

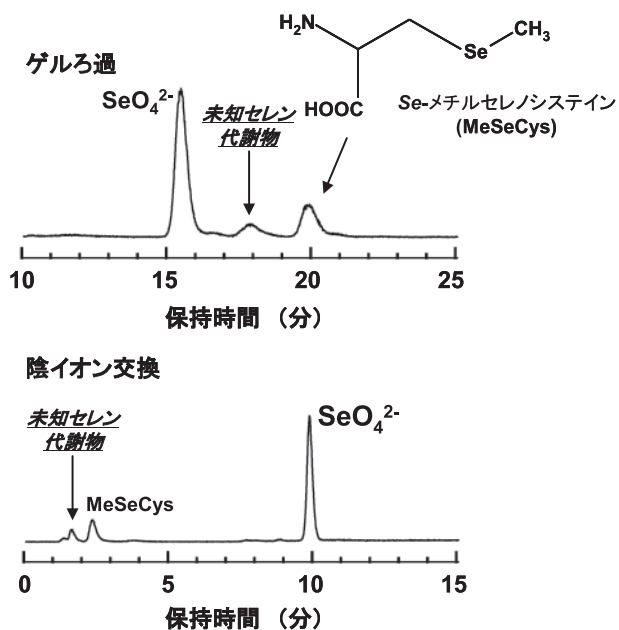


図9 辛味大根抽出液中のセレンのスペシエーション. セレン酸ナトリウムを与えて生育させた辛味大根の水抽出液中のセレンの分布. 上段はゲルろ過カラム (Shodex GS-320HQ), 下段は陰イオン交換カラム (PRP X-100, ハミルトン社) を用いた.

種類 (ゲルろ過と陰イオン交換) のカラムを用いた. さらに三つ目のセレン化合物が検出されたが, この化合物の保持時間は既存のセレン化合物の保持時間とは一致しなかったため, HPLC-ESI-MS-MS による分析を行った.

まず HPLC-ESI-MS により m/z 285 を中心としてセレンの同位体パターンを検出することができた. 次いで MS-MS 分析により, 得られたフラグメントパターンから辛味大根で検出された未知のセレン化合物は 4,4'-セレノ-ビス [2-アミノブタン酸] (セレノホモランチオニン, SeHLan) であると推定できた (図10). 辛味大根抽出液ではメチオニン (Met) のセレンアナログであるセレノメチオニン (Se-Met) が検出されなかったことから, セレノホモランチオニンは, セレノホモシステインから SeMet へ行くメチル化反応が進行する代わりに, セレノホモシステインに *O*-ホスホホモセリンが反応して生合成されると想定された (まとめの図14を参照). 同様なメチル化反応を必要とするセレノシステインから *Se*-メチルセレノシステインは生合成されているにもかかわらず, SeMet は生合成されずに, セレノホモランチオニンが生合成されることは興味深い. セレンを必須元素とする動物であれ, 必須元素としない植物であれ, セレノシステインとシステインは厳密に識別するものの, SeMet と Met の識別はゆるいと言われている^{57,58)}. このことから考えると, セレンを効率よくセレンアミノ酸へ変換できるセレン蓄積性の植物では, SeMet に代謝をしてしまうと Met と区別できず, Met が SeMet に置き換わってしまうことによる毒性発現を避けるために, SeMet へとは代謝せずに, セレノホモランチオニンへと代謝をするのではないかと考えている. 植物がどの程度 Se-Met と Met とが見分けられないのかを次節で検討した. また, セレノホモランチオニンへを動物に投与すると, Se-Met とは異なる体内分布を示す^{59,60)}. SeMet は特異的に膵臓に集積するが, セレノホモランチオニンへにはこのような性質はない. SeMet に代わるセレンのサプリメントとして, 期待できる化合物でもある.

一方, カラシナやニンニクにテルル酸ナトリウムとしてテルルを曝露すると, セレンをセレン酸ナトリウムとして曝露した時に比べて量は少ないものの, やはりテルルの蓄積が認められた (図11)⁶¹⁾. また取り込まれたテルルは曝露した化学形態であるテルル酸から代謝され, 異なる化学形態で蓄積していた. 最近, 著者らの研究室では, ESI-MS-MS により, ニンニクに最も存在量の多いテルル代謝物として抽出液中に *Te*-メチルテルロシステノキドを検出している (投稿準備中). *Te*-メチルテルロシステインは *Se*-メチルセレンシステインに比べて酸化されやすく, 測定の段階で *Te*-メチルテルロシステノキドに変化しているのではないかと想定している. セレン蓄積性植物では, 吸収の段階でセレンとテルルを識別しているものの,

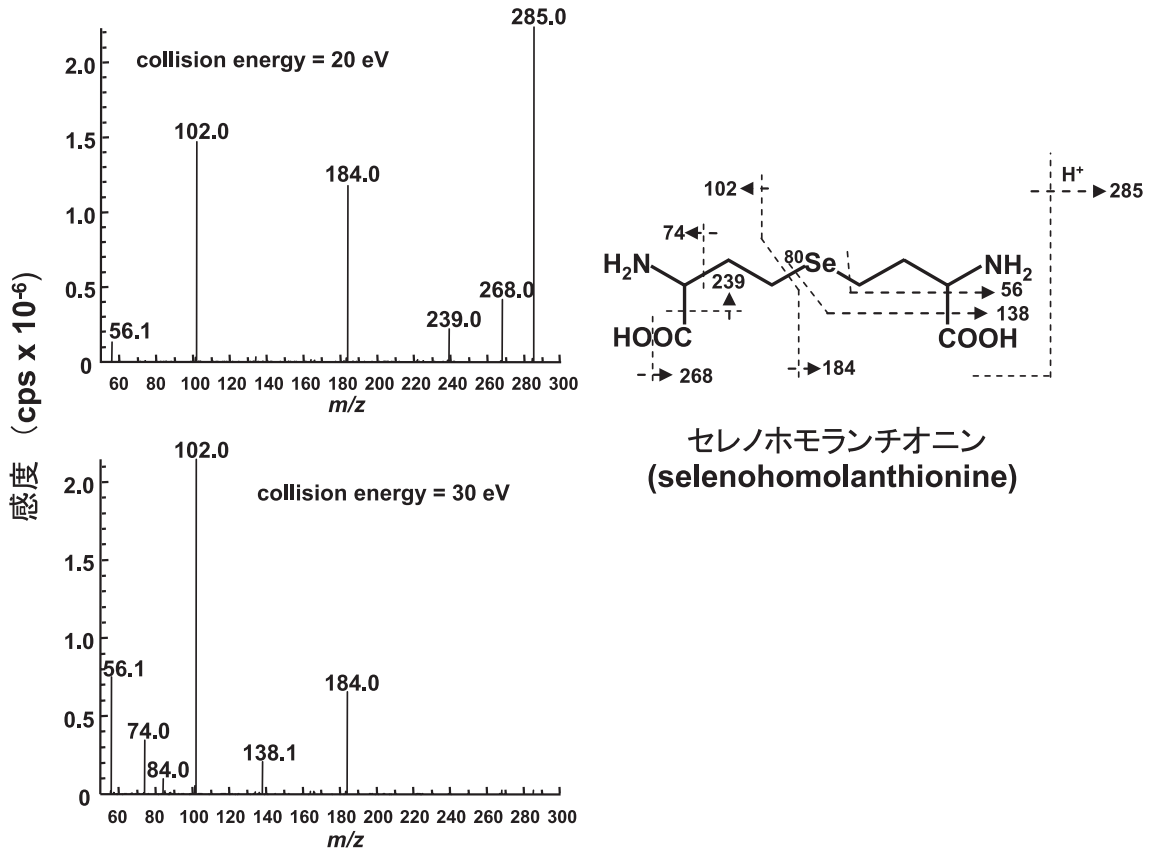


図10 辛味大根抽出液中の新規セレン代謝物のマススペクトラムと構造。
 図9で得られた辛味大根中の未知のセレン代謝物をHPLC-ESI-MS-MSにより分析した。

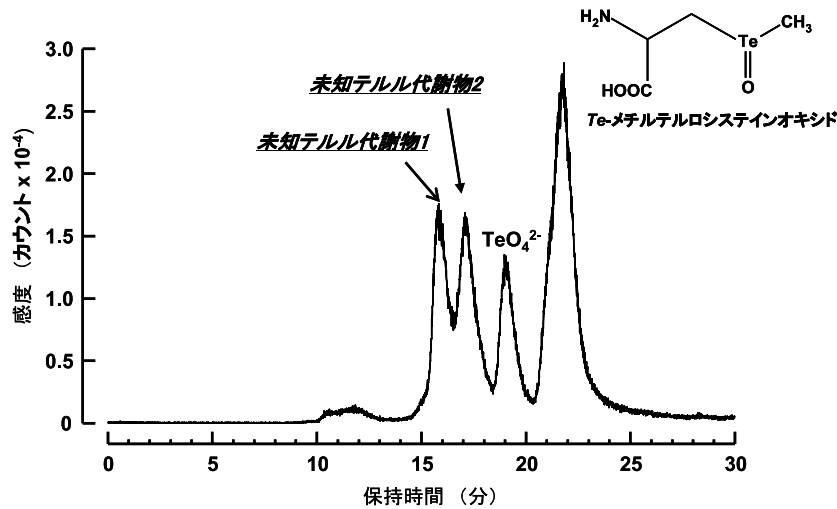


図11 テルル酸ナトリウムを曝露したニンニク葉抽出液中のテルルのスペシエーション。
 テルル酸ナトリウムを与えて生育させたニンニクの葉の水抽出液中のテルルの分布をゲルろ過カラム (Shodex GS-320HQ) を用いたHPLC-ICP-MSにより分析した。最大のピークを引き続きESI-MS-MSにより分析したところ、図中の構造を推定している。

吸収されたテルルについては、セレン同様に *O*-ホスホセリンにより、還元したテルルを捕捉し、テルロアミノ酸として解毒しているものと考えている。また動物で見いださ

れた単純メチル化体である TMTe は、これら植物では検出限界以下であった。したがって、非必須元素であっても、動物と植物では解毒の経路が異なっているものと考えられた。

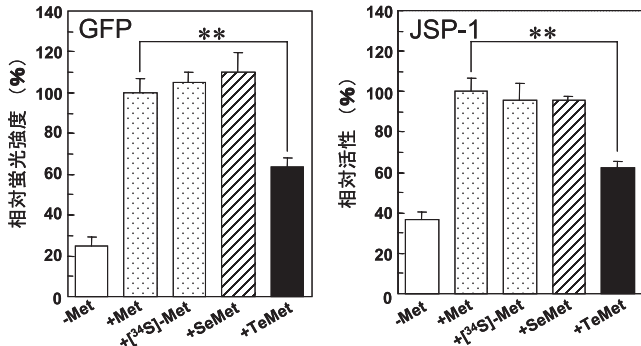


図12 ³⁵S-Met, SeMet 及び TeMet の *in vitro* 翻訳によるタンパク質の構造及び活性に与える影響の比較。
Met を添加したときの値を 100% として翻訳後の GFP の蛍光量 (左) 及び JSP-1 の酵素活性 (右) を相対値で表した。カラムは平均値 ± 標準偏差 (n=3) を表し, **は p<0.01 を示す。

7. コムギ胚抽出液中における Met, SeMet 及びテルロメチオニン (TeMet) の識別

前節において、セレン蓄積性植物では SeMet の生合成を避けるような代謝を行うのではないかと想定したが、実際に SeMet あるいは TeMet が Met と区別されずに代謝されるのかをコムギ胚抽出液を用いた *in vitro* の反応系で検討した^{62,63}。

まず Met の SeMet や TeMet への置換が、構造と酵素活性に与える影響を調べるため、green fluorescence protein (GFP) 及び JNK stimulatory phosphatase-1 (JSP-1) の mRNA を鋳型として *in vitro* 翻訳を行った。コムギ胚抽出液中には内在性の硫黄を含む物質が多量に含まれているため、*in vitro* 翻訳に利用され、タンパク質に取り込まれた Met の

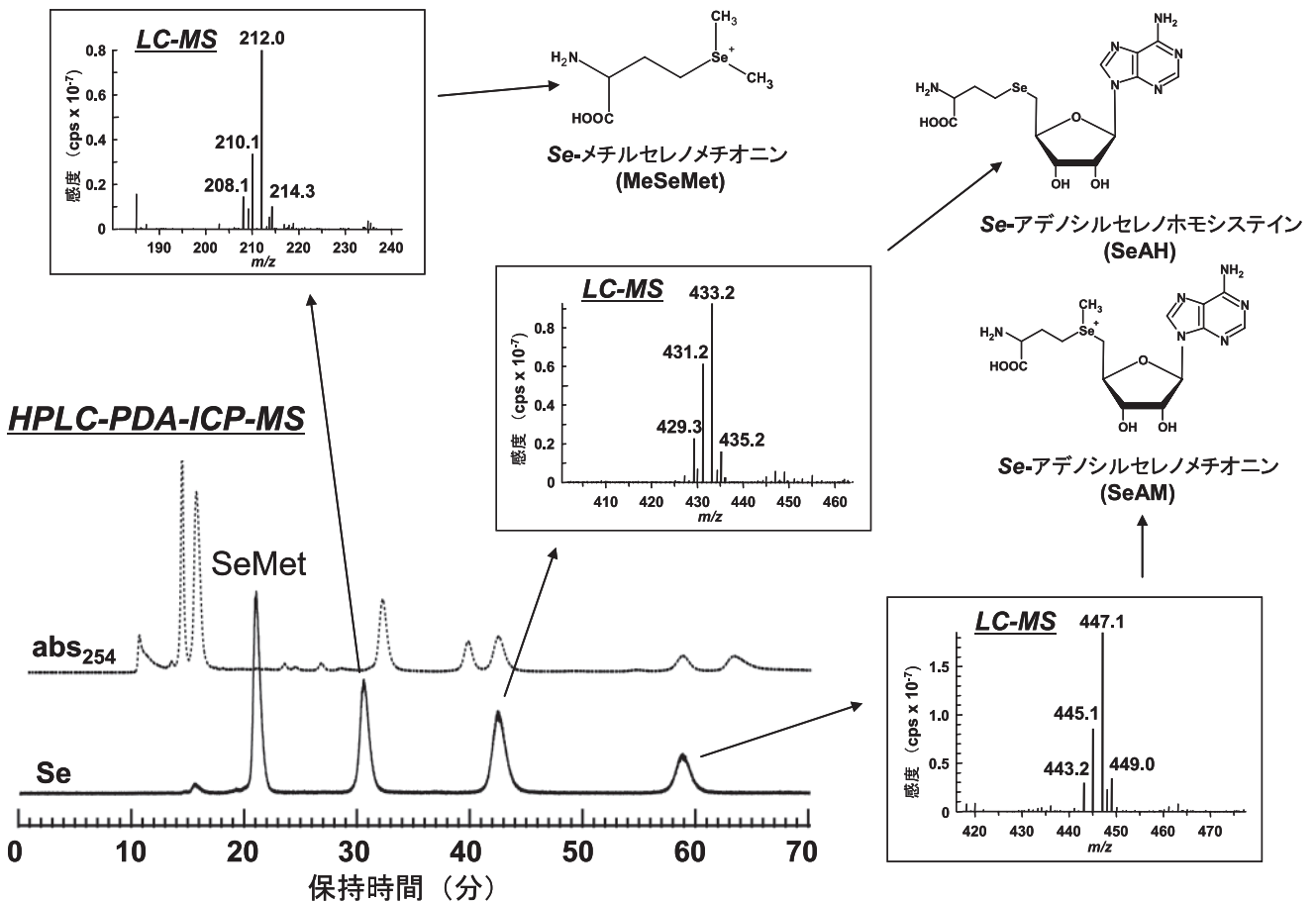


図13 コムギ胚抽出液中の低分子セレン化合物のスペシエーションと ESI-MS による解析。
左下の溶出図は、反応液を Shodex GS-320HQ カラムを装着した HPLC により分離した後、フォトダイオードアレイ検出器 (PDA) により 254 nm の吸光度と ICP-MS により m/z 82 でセレンを検出したものである。SeMet 以外のピークを HPLC-ESI-MS (LC-MS) さらに LC-MS-MS により、その構造をそれぞれ明らかにした。

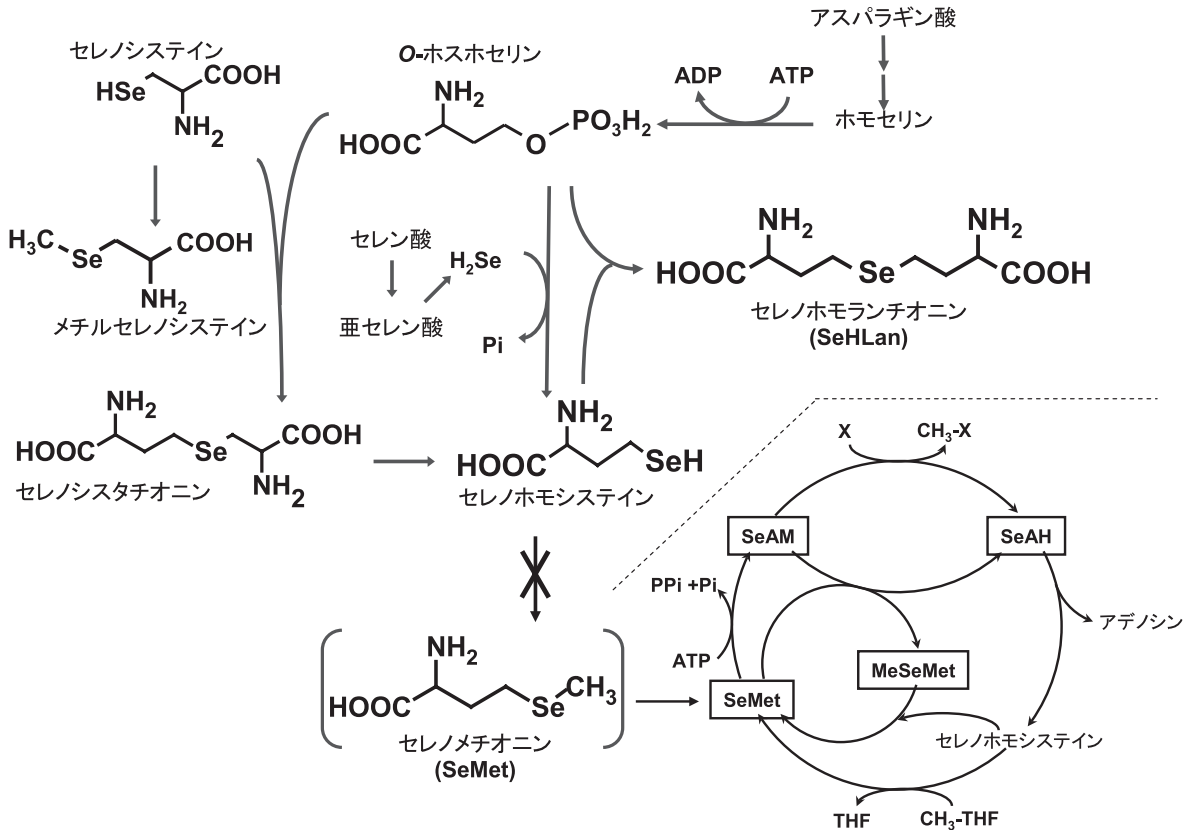


図14 想定される植物におけるセレンの代謝機構。
X: メチル基受容体, THF: テトラヒドロ葉酸。

定量的な把握が難しい。そこで、Met については硫黄の安定同位体である³⁴S で標識した Met も合成し、実験に供した。安定同位体標識を用いて、ICP-MS で硫黄を測定することにより、内在性の硫黄含有化合物と外来の [³⁴S]-Met を区別可能であるため、翻訳されたタンパク質量を定量的に把握できる。結果は図12に示した通り、Met と SeMet では GFP の蛍光量及び JSP-1 の酵素活性に変化はなかった。また TeMet では、GFP の蛍光量及び JSP-1 の酵素活性が Met と比べて低い、これは TeMet を取り込んだ GFP や JSP-1 の蛍光量や酵素活性が低いのではなく、TeMet が *in vitro* 翻訳で翻訳され難いためであり、翻訳されたタンパク質量あたりに換算すると、Met や SeMet を含むタンパク質と同程度であった。したがって、少なくともコムギ胚抽出液においては、Met と SeMet の間に識別はなく、今回用いた二つのタンパク質の活性についても差異は認められなかった。なお、TeMet の翻訳効率が低いのは、前節で Te-メチルテルロシステインは Se-メチルセレンシステインに比べて酸化されやすいと述べたが、同様に TeMet も SeMet に比べて酸化されやすく、反応液中にテルロメチオニンオキシドとして存在してしまうためであると考えられた。

Met はタンパク質合成に用いられるのみならず、メチ

ル化反応の補酵素として重要な S-アデノシルメチオニン (SAM) の生合成原料としても利用される。そこで、SeMet が SAM の生合成経路においても Met と識別されるのか否かを引き続きコムギ胚抽出液を用いた *in vitro* の反応系で検討した。SAM の生合成経路における識別を確認するため、SeMet を添加したコムギ胚抽出液の低分子量画分を HPLC-ICP-MS で精査した。SeMet を添加したコムギ胚の低分子量画分中には、3種類の未知のセレン含有化合物が検出できた (図13)。これら三つの化合物を HPLC-ESI-MS で分析したところ、図13に示した通り、*m/z* 212, 433 及び 447 を中心にセレンの同位体パターンを検出できた。これらをそれぞれ MS-MS により解析したところ、Se-メチルセレンメチオニン、Se-アデノシルセレンホモシステイン及び Se-アデノシルセレンメチオニンであると同定できた。すなわちこれらの化合物がコムギ胚中で生成しているということは、SAM の生合成経路においても Met と SeMet が区別されていないことを示している。なお、動物の *in vitro* 翻訳系であるウサギ網状赤血球溶解液を用いた場合でも、SeMet を添加すると量は少ないものの Se-アデノシルメチオニンが検出できることを確認している。

以上のことをまとめると、今回用いたタンパク質2種では、いずれも SeMet を含むタンパク質に質的な変化は見

られなかったが, *in vitro* の反応系による検討から, SeMet は Met と区別されることなく, タンパク質の翻訳や補酵素の生合成に供されてしまうため, 植物ではセレンは Se-メチルセレノシステイン, 今回結果は示していないが γ -グルタミル-Se-メチルセレノシステインやセレノホモランチオニンへと代謝され, SeMet の生合成は回避しているのではないかと考えられた (図 14)。

8. おわりに

ICP-MS の高感度分析によって, 本稿で紹介したように代謝物の存在を HPLC-ICP-MS によりスクリーニングし, 新規の化合物が見つければ, ESI-MS-MS による同定を試みるというストラテジーが確立されつつある⁶⁴⁾。本稿で取上げたセレンやテルルについては, 自然界には明らかとなっていない金属含有代謝物がまだ数多く残されているようであり, これら元素の代謝過程の全容解明には, さらなる研究の進展が望まれる。著者らも金属含有代謝物分析における ICP-MS と ESI-MS の感度差 (ICP-MS では検出できるが, ESI-MS では検出できない) がボトルネックとなり同定できずにいるセレンあるいはテルル含有代謝物の候補化合物を, 現在いくつか抱えている。思いも寄らない金属含有代謝物の構造にたどり着き, 生命と金属の思わぬ関係に気づかされるのが, 生体と金属のオミクスサイエンスであるメタロミクス研究の醍醐味の一つであるように思う。

謝辞

本稿で取上げた著者らの研究は, 著者が前所属である千葉大学大学院薬学研究院衛生化学研究室に在籍していた頃からの多数の共同研究者らとの成果です。全ての共同研究者の方々に御礼申し上げます。本稿に関連したプロジェクトは著者の現在の研究室で進行中であり, 科学研究費補助金をはじめ, 米国 Agilent Technologies 財団及び武田科学振興財団の研究助成を受けております。これらの助成金に対し感謝申し上げます。

文 献

- Templeton, D.M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L., Muntau, H., van Leeuwen, H.P., & Lobiński, R. (2000) *Pure Appl. Chem.*, **72**, 1453.
- Szpunar, J. & Lobiński, R. (2002) *Anal. Bioanal. Chem.*, **373**, 404-411.
- Szpunar, J. & Lobiński, R. (2003) *Hyphenated Techniques in Speciation Analysis*, Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Szpunar, J. (2005) *Analyst*, **130**, 442-465.
- Ogra, Y. (2008) *Anal. Bioanal. Chem.*, **390**, 1685-1689.
- Mounicou, S., Szpunar, J., & Lobiński, R. (2009) *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 1119-1138.
- Ogra, Y. (2009) *Anal. Sci.*, **25**, 1189-1195.
- Suzuki, K.T. & Ogra, Y. (2002) *Food Addit. Contam.*, **19**, 974-983.
- Bock, A., Flohe, L., & Kohrle, J. (2007) *Biol. Chem.*, **388**, 985-986.
- Lu, J. & Holmgren, A. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 723-727.
- Reeves, M.A. & Hoffmann, P.R. (2009) *Cell. Mol. Life Sci.*, DOI: 10.1007/s00018-00009-00032-00014.
- Driscoll, D.M. & Copeland, P.R. (2003) *Annu. Rev. Nutr.*, **23**, 17-40.
- Byard, J.L. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**, 556-560.
- Palmer, I.S., Gunsalus, R.P., Halverson, A.W., & Olson, O.E. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **208**, 260-266.
- Foster, S.J. & Ganther, H.E. (1984) *Anal. Biochem.*, **137**, 205-209.
- Nahapetian, A.T., Young, V.R., & Janghorbani, M. (1984) *Anal. Biochem.*, **140**, 56-62.
- Suzuki, K.T., Itoh, M., & Ohmichi, M. (1995) *Toxicology*, **103**, 157-165.
- Robinson, M.F., Thomson, C.D., Jenkinson, C.P., Luzhen, G., & Whanger, P.D. (1997) *Br. J. Nutr.*, **77**, 551-563.
- Gammelgaard, B. & Larsen, E.H. (1998) *Talanta*, **47**, 503-507.
- Quijano, M.A., Gutierrez, A.M., Perez-Conde, M.C., & Camara, C. (1999) *Talanta*, **50**, 165-173.
- Zheng, J., Shibata, Y., & Tanaka, A. (2002) *Anal. Bioanal. Chem.*, **374**, 348-353.
- Ogra, Y., Ishiwata, K., Takayama, H., Aimi, N., & Suzuki, K. T. (2002) *J. Chromatogr. B, Anal. Tech. Biomed. Life Sci.*, **767**, 301-312.
- Kobayashi, Y., Ogra, Y., Ishiwata, K., Takayama, H., Aimi, N., & Suzuki, K.T. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15932-15936.
- Ogra, Y. & Anan, Y. (2009) *J. Anal. At. Spectrom.*, **24**, 1477-1488.
- Gammelgaard, B. & Bendahl, L. (2004) *J. Anal. At. Spectrom.*, **19**, 135-142.
- Anan, Y., Ohbo, A., Tani, Y., Hatakeyama, Y., Yawata, A., & Ogra, Y. (2012) *Metallomics*, **4**, 457-462.
- Anan, Y., Ishiwata, K., Suzuki, N., Tanabe, S., & Ogra, Y. (2011) *J. Anal. At. Spectrom.*, **26**, 80-85.
- Ogra, Y., Kobayashi, R., Ishiwata, K., & Suzuki, K.T. (2007) *J. Anal. At. Spectrom.*, **22**, 153-157.
- Ogra, Y., Kobayashi, R., Ishiwata, K., & Suzuki, K.T. (2008) *J. Inorg. Biochem.*, **102**, 1507-1513.
- Kobayashi, A. & Ogra, Y. (2009) *J. Toxicol. Sci.*, **34**, 295-303.
- Yamashita, Y. & Yamashita, M. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 18134-18138.
- Yamashita, Y., Information, C., Amlund, H., Suzuki, T., Hara, T., Hossain, M.A., Yabu, T., Touhara, K., & Yamashita, M. (2011) *Fish. Sci.*, **77**, 679-686.
- Askari, A. & Melville, D.B. (1962) *J. Biol. Chem.*, **237**, 1615-1618.
- Lee, B.J., Rajagopalan, M., Kim, Y.S., You, K.H., Jacobson, K.B., & Hatfield, D. (1990) *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 1940-1949.
- Klein, M., Ouerdane, L., Bueno, M., & Pannier, F. (2011) *Metallomics*, **3**, 513-520.
- Anan, Y., Tanabe, S., & Ogra, Y. (2011) *J. Toxicol. Sci.*, **36**, 725-731.
- Romero, H., Zhang, Y., Gladyshev, V.N., & Salinas, G. (2005) *Genome Biol.*, **6**, R66.
- Zhang, Y., Romero, H., Salinas, G., & Gladyshev, V.N.

- (2006) *Genome Biol.*, **7**, R94.
- 39) Xu, X.M., Carlson, B.A., Zhang, Y., Mix, H., Kryukov, G.V., Glass, R.S., Berry, M.J., Gladyshev, V.N., & Hatfield, D.L. (2007) *Biol. Trace Elem. Res.*, **119**, 234–241.
- 40) Whanger, P.D. (2002) *J. Am. Coll. Nutr.*, **21**, 223–232.
- 41) Kitaguchi, T., Ogra, Y., Iwashita, Y., & Suzuki, K.T. (2008) *Eur. Food Res. Technol.*, **277**, 1455–1460.
- 42) Ogra, Y., Kitaguchi, T., Ishiwata, K., Suzuki, N., Iwashita, Y., & Suzuki, K.T. (2007) *J. Anal. At. Spectrom.*, **22**, 1390–1396.
- 43) Dumont, E., Ogra, Y., Vanhaecke, F., Suzuki, K.T., & Cornelis, R. (2006) *Anal. Bioanal. Chem.*, **384**, 1196–1206.
- 44) Ogra, Y., Ishiwata, K., Iwashita, Y., & Suzuki, K.T. (2005) *J. Chromatogr. A*, **1093**, 118–125.
- 45) Ogra, Y., Ishiwata, K., Ruiz Encinar, J., Lobinski, R., & Suzuki, K.T. (2004) *Anal. Bioanal. Chem.*, **379**, 861–866.
- 46) LeDuc, D.L., AbdelSamie, M., Montes-Bayon, M., Wu, C.P., Reisinger, S.J., & Terry, N. (2006) *Environ. Pollut.*, **144**, 70–76.
- 47) Gergely, V., Montes-Bayón, M., Fodor, P., & Sanz-Medel, A. (2006) *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 4524–4530.
- 48) LeDuc, D.L., Tarun, A.S., Montes-Bayon, M., Meija, J., Malit, M.F., Wu, C.P., AbdelSamie, M., Chiang, C.Y., Tagmount, A., deSouza, M., Neuhierl, B., Bock, A., Caruso, J., & Terry, N. (2004) *Plant Physiol.*, **135**, 377–383.
- 49) Grant, T.D., Montes-Bayón, M., LeDuc, D., Fricke, M.W., Terry, N., & Caruso, J.A. (2004) *J. Chromatogr. A*, **1026**, 159–166.
- 50) Grant, T.D., Montes-Bayón, M., LeDuc, D., Fricke, M.W., Terry, N., & Caruso, J.A. (2003) *J. Chromatogr. A*, **1026**, 159–166.
- 51) Montes-Bayón, M., Yanes, E.G., Ponce de León, C., Jayasimhulu, K., Stalcup, A., Shann, J., & Caruso, J.A. (2002) *Anal. Chem.*, **74**, 107–113.
- 52) Dong, Y., Zhang, H., Hawthorn, L., Ganther, H.E., & Ip, C. (2003) *Cancer Res.*, **63**, 52–59.
- 53) Ip, C., Dong, Y., & Ganther, H.E. (2002) *Cancer Metastasis Rev.*, **21**, 281–289.
- 54) Medina, D., Thompson, H., Ganther, H., & Ip, C. (2001) *Nutr. Cancer*, **40**, 12–17.
- 55) Jiang, W., Zhu, Z., Ganther, H.E., Ip, C., & Thompson, H.J. (2001) *Cancer Lett.*, **162**, 167–173.
- 56) Yawata, A., Oishi, Y., Anan, Y., & Ogra, Y. (2010) *J. Health Sci.*, **56**, 699–704.
- 57) Beilstein, M.A. & Whanger, P.D. (1987) *J. Inorg. Biochem.*, **29**, 137–152.
- 58) Schrauzer, G.N. (2000) *J. Nutr.*, **130**, 1653–1656.
- 59) Anan, Y., Mikami, T., Tsuji, Y., & Ogra, Y. (2011) *Anal. Bioanal. Chem.*, **399**, 1765–1772.
- 60) Tsuji, Y., Mikami, T., Anan, Y., & Ogra, Y. (2010) *Metallomics*, **2**, 412–418.
- 61) Ogra, Y., Okubo, E., & Takahira, M. (2010) *Metallomics*, **2**, 328–333.
- 62) Ogra, Y., Kitaguchi, T., Suzuki, N., & Suzuki, K.T. (2008) *Anal. Bioanal. Chem.*, **390**, 45–51.
- 63) Ogra, Y., Kitaguchi, T., Ishiwata, K., Suzuki, N., Toida, T., & Suzuki, K.T. (2009) *Metallomics*, **1**, 78–86.
- 64) Preud'homme, H., Far, J., Gil-Casal, S., & Lobinski, R. (2012) *Metallomics*, **4**, 422–432.
-