

雌マウス肝臓におけるセレン結合性タンパク質 (SelenBP) の発現と2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- p-dioxin被誘導性：SelenBP1欠損動物を用いた検討

宋, 穎霞
九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野

藤本, 景子
九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野

黒瀬, 厚
九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学分野

石田, 卓巳
崇城大学薬学部

他

<https://doi.org/10.15017/2328868>

出版情報：福岡醫學雑誌. 110 (2), pp.128-132, 2019-06-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：

雌マウス肝臓におけるセレン結合性タンパク質 (SelenBP) の 発現と 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin 被誘導性： SelenBP1 欠損動物を用いた検討

¹⁾九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野

²⁾九州大学大学院薬学研究院 細胞生物薬学分野

³⁾崇城大学薬学部

⁴⁾第一薬科大学

宋 穎霞¹⁾, 藤本 景子²⁾, 黒瀬 厚¹⁾, 石田卓巳³⁾, 古賀貴之⁴⁾, 李 任時¹⁾,
武田知起¹⁾, 武知進士³⁾, 山田英之¹⁾, 田中嘉孝²⁾, 石井祐次¹⁾

Hepatic Expression of Selenium Binding Protein (SelenBP) in Female Mice and Its Inducibility by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : Study with SelenBP1-Knockout Mice

Yingxia SONG¹⁾*, Keiko FUJIMOTO²⁾*, Atsushi KUROSE¹⁾, Takumi ISHIDA³⁾, Takayuki KOGA⁴⁾,
Ren-shi LI¹⁾, Tomoki TAKEDA¹⁾, Shinji TAKECHI³⁾, Hideyuki YAMADA¹⁾,
Yoshitaka TANAKA²⁾ and Yuji ISHII¹⁾

¹⁾Laboratory of Molecular Life Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University

²⁾Division of Pharmaceutical Cell Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University

³⁾Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sojo University

⁴⁾Daiichi University of Pharmacy

Abstract

Hepatic expression of selenium binding protein (SelenBP) in female mice and its inducibility by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) was studied using wild-type (WT) C57BL/6J and SelenBP1-knockout mice. Female WT mice (4 weeks old) received TCDD at the dose of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (i. p.). The control group received the vehicle, corn oil. In addition, SelenBP1-KO mice received TCDD at the same dose as the WT. A control group of SelenBP1-KO mice received the vehicle, corn oil. Five days after treatment, livers were removed and homogenized. The level of SelenBP in the liver homogenate was compared between the control and TCDD-treated groups by immunoblotting using anti-human SelenBP1 antibody as the primary antibody. It has been discovered that there are two SelenBP isoforms in mice, SelenBP1 and SelenBP2. The antibody used was expected to recognize both SelenBP1 and SelenBP2 in mice. The level of SelenBP in the livers of female SelenBP1-KO mice was far lower than those in WT mice. In addition, the level of SelenBP in WT mice was induced to approximately 5 times by TCDD treatment while there was no substantial increase in SelenBP level in SelenBP1-KO mice. Therefore, SelenBP1 is constitutively expressed as the predominant SelenBP isoform in the liver of female WT mice whereas the level of SelenBP2 remains low. In addition, the SelenBP2 is barely induced in the liver of female mice by TCDD. These results suggest that the

*Equally contributed to this work.

Corresponding author : Yuji ISHII
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan
Tel : + 81-92-642-6586 E-mail : ishii@phar.kyushu-u.ac.jp

induction of hepatic SelenBP at the protein level in female mice by TCDD is mainly due to the induction of SelenBP1.

Key words : SelenBP1, dioxin, selenium, TCDD, knockout mouse

はじめに

ダイオキシン類は、消耗症、免疫抑制、肝障害、発がんプロモーション作用等、多彩な毒性を引き起こすが¹⁾、それらは細胞の可溶性画分に存在する芳香族炭化水素受容体 (AhR) の活性化を通して生起すると考えられている²⁾。活性化した AhR は核内で AhR nuclear translocator とヘテロダイマーを形成し、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)] に結合することでそれらの遺伝子発現を変動させることが知られている³⁾。ダイオキシン類により変動することが報告されている遺伝子は 300 種類以上にもほぼが⁴⁾、どの遺伝子変動が毒性発現に重要であるのかは未だ十分に理解されていない。

当教室では、ダイオキシン類の一種である 3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl (PCB126)、および多環芳香族炭化水素の 3-methylcholanthrene (3MC) が雄ラット肝臓のセレン結合性タンパク質 (SelenBP1) mRNA およびタンパク質発現を顕著に誘導することを既に報告している⁵⁾⁻⁷⁾。一方、マウスには相同性の高い 2 種の SelenBP isoform, SelenBP1 および SelenBP2 があると報告されている⁸⁾⁹⁾。当教室では、さらに、マウスを用いた研究により、肝臓 SelenBP1 の誘導には AhR 活性化が関わることを突き止めた¹⁰⁾。前述の通り、ダイオキシンによる毒性発現には、AhR が中心的な役割を果たすと考えられている。従って、SelenBP1 誘導が AhR 活性化を介するという事実は、本誘導がダイオキシン毒性発現に寄与する可能性を示唆する。そこで、SelenBP1 の誘導とダイオキシン毒性との関連性を明らかにすることを目指し、SelenBP1 ノックアウト (KO) マウスを作製した¹⁰⁾。SelenBP1-KO および野性型マウスそれぞれに最強ダイオキシンである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を処理し、急性毒性発現状況を比較することにより、SelenBP1 誘導がダイオキシン毒性に関与するか

否かを検討した。その結果、高用量のダイオキシン曝露により出現する代表的な毒性である体重増加抑制、肝臓肥大、胸腺萎縮、ならびに酸化ストレスの増大に対して、両マウス間で程度に違いが確認されなかった¹⁾。このことから、ダイオキシンによる SelenBP1 誘導は、少なくとも上記の毒性に対して見る限り、それらの発現には関与しないことが示唆された。また、SelenBP1 の誘導がダイオキシン毒性に拮抗するための防御的応答であるなら、SelenBP1 の欠失は毒性増強をもたらさなければならない。しかし、我々の先行研究ではこれも観察されなかったことから、SelenBP1 の誘導はダイオキシン毒性の軽減にも働かないことが示唆された¹⁰⁾。但し、この先行研究の成果をもってしても、SelenBP1 が全ての TCDD 毒性発現/軽減に関与しないと結論づけることはできない。それは、先行研究では、高用量を用いての解析が行われていたことに加え、SelenBP1-KO マウスに発現する SelenBP2 の寄与の可能性も否定できないからである。当研究室の先行研究では、mRNA レベルでの解析を行ったものの、イムノブロットングによる発現変動までは調べておらず、SelenBP1-KO がマウスの SelenBP レベルに及ぼす影響をタンパク質レベルでは評価していない。一方、mRNA レベルでの解析からは、雌マウスには SelenBP2 の発現が低い可能性があり、SelenBP1-KO による影響の評価に適している可能性もある¹⁰⁾。

そこで、本研究では、基礎的なデータの収集を目指し、雌マウスにおける SelenBP の発現をイムノブロットングにより解析した。また、TCDD による誘導性と SelenBP1-KO による影響についても合わせて検討した。

実験方法

1. 実験材料

TCDD は、AccuStandard 社から購入して使用した。Corn oil は、味の素株式会社の市販品を使用した。抗ヒト SelenBP1 抗体は、Santa Cruz

Biotechnology 社, 抗 β -actin 抗体は Sigma-Aldrich 社および 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. その他の試薬は, 実験に適した純度のものを使用した. TCDD は, 100 μ g TCDD/mL acetone 溶液として使用まで -30°C に保存した. 投与時に必要量 corn oil と混和したのち, 窒素ガス噴射にて acetone を留去した.

2. 動物実験

本研究における動物実験は, 九州大学動物実験委員会および遺伝子組換え実験安全委員会による実験計画の承認を受けた上で実施した. SelenBP1-KO マウスは, SelenBP1 遺伝子の第3エクソンから第11エクソンまでをネオマイシン耐性遺伝子 (Neo) と置換することにより作製したものであり, 遺伝子型の決定は, 既報に従って行った¹⁰⁾. 野生型 C57BL/6J マウスは, 日本クレアより購入した. 4週齢の野性型および SelenBP1-KO 雌性マウスに TCDD を 100 μ g/kg/5 mL の用量で単回腹腔内投与した. 対照群には, corn oil を投与した. 投与5日後に肝臓を摘出し液体窒素中で凍結後, 使用まで -80°C にて保存した¹⁰⁾. これを解凍し, 肝重量の3倍容の 1.15% KCl 中でホモジナイズを行い, 使用まで -80°C にて保存した. また, 5週齢の野性型および SelenBP1-KO 雄性マウスから肝臓を摘出し, 使用まで -80°C にて保存した. 肝重量の3倍容の 0.25 M スクロース中でホモジナイズを行い, 9,000xg, 20分遠心を行って, その上清を S9 として使用まで -80°C にて保存した. ホモジネートおよび S9 のタンパク質濃度は, Lowry 法¹¹⁾ にて定量した.

3. 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.

結 果

5週齢雌マウス肝臓における SelenBP の発現と, TCDD による被誘導性について検討した. ホモジネートをサンプルとして, SelenBP1 抗体反応性バンドを検出した. また, ホモジネートサンプルであるため, 均質性を担保する目的で, β -actin に対する抗体によるイムノブロットングを行い, この抗体へ反応するバンドの強度との比をもって, SelenBP 発現量を評価した. 野生型 C57BL マウスと SelenBP1-KO マウスを未処理動物間で比較すると, SelenBP1-欠損雌マウス肝臓では, 野生型に比べ, 抗ヒト SelenBP 抗体と交差性を示すバンドの強度が著しく低かった (Fig. 1A). また, 野生型雌マウス肝臓の SelenBP のタンパク質レベルは, TCDD により約5倍に誘導されたが, SelenBP1-KO 雌マウスでは, タンパク質発現レベルの増加は確認できなかった (Fig. 1B). 一方, 5週齢雄マウスの肝 S9 を用い, 野生型 C57BL マウスと SelenBP1-KO マウスを未処理動物間で比較すると, SelenBP1-KO 雄マウス肝臓においても, SelenBP は野生型の約60%発現していた (Fig. 2). これらタンパク質レベルでの解析から, SelenBP1-KO 雄マウスには, SelenBP2 が高レベルに発現していること, SelenBP1-KO 雌マウスには, SelenBP2 の発現は著しく低いことが明らかになった.

考 察

5週齢マウス肝臓における SelenBP のタンパク質発現レベルについて検討した. 構成的条件下において, 雄マウス肝臓には, SelenBP2 が SelenBP1 と同程度, あるいはそれより多く発現しており, SelenBP1-KO 雄マウス肝臓においても, SelenBP2 の発現レベルが無視し得ないほど高く, SelenBP の機能を解析するには良いモデルとは言い難いと考えられた. 一方, 構成的条件下において, 雌マウス肝臓の主要な SelenBP は SelenBP1 であり, SelenBP2 の発現レベルは著しく低いと考えられた. また, 雌マウスの SelenBP2 は TCDD による誘導をほとんど受けず, TCDD によるタンパク質レベルでの SelenBP の誘導は主に SelenBP1 の誘導によることが明らかになった. SelenBP2 は, 生体内での局在は SelenBP1 と若干

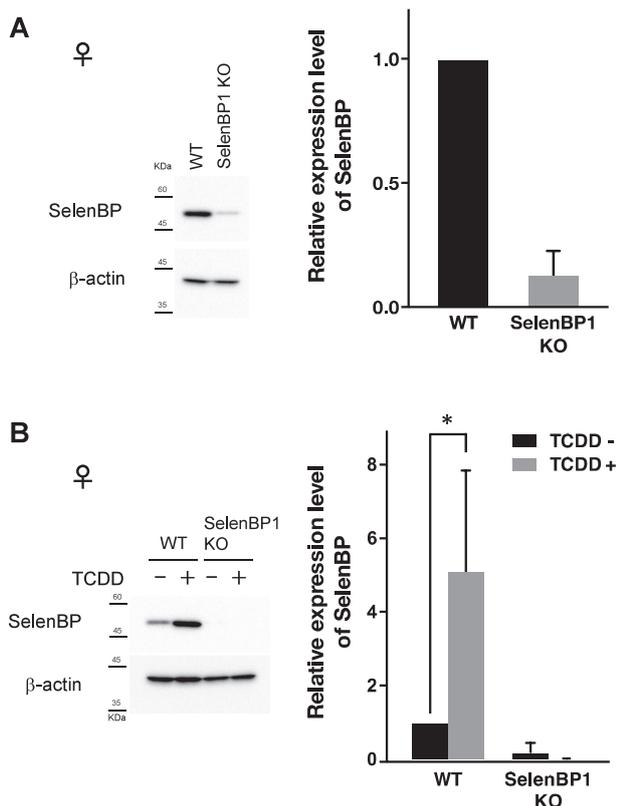


Fig. 1 Comparison of the hepatic expression level of SelenBP between female C57BL and SelenBP1-KO mice and its inducibility by TCDD. (A) The levels of SelenBP protein and β -actin were determined by immunoblotting in 5-week-old female wild-type (WT) C57BL/6J and SelenBP1-KO mice. The levels of SelenBP in the liver homogenate was normalized to that of β -actin. Protein amounts subjected for SelenBP and β -actin were 10 and 15 μ g/lane, respectively. Bars are the means \pm S.E. of 5 mice. One of the representative data is shown. (B) The effect of TCDD treatment on the levels of SelenBP protein and β -actin was determined by immunoblotting. Female WT and SelenBP1-KO mice (4 weeks old) were treated with TCDD (100 μ g/kg, i.p.) and the livers were removed five days after treatment (5 weeks old). The level of SelenBP in the liver homogenate was normalized to that of β -actin. Protein amounts subjected for SelenBP and β -actin were 10 and 15 μ g/lane, respectively. Bars are the means \pm S.E. of 3 mice. Significant difference from the untreated group: * $p < 0.05$. One of the representative data is shown.

異なるものの⁹⁾¹⁰⁾, その相同性の高さから機能的連携が示唆されている. 当研究室の先行研究で mRNA レベルでの影響を雄マウスで調べた結果, ダイオキシンによる応答性に関して, SelenBP1 は高用量においても誘導されるのに対し, SelenBP2 は低用量でこそ誘導傾向があるものの, 高用量では抑制された¹⁰⁾. これらのことから, 両タン

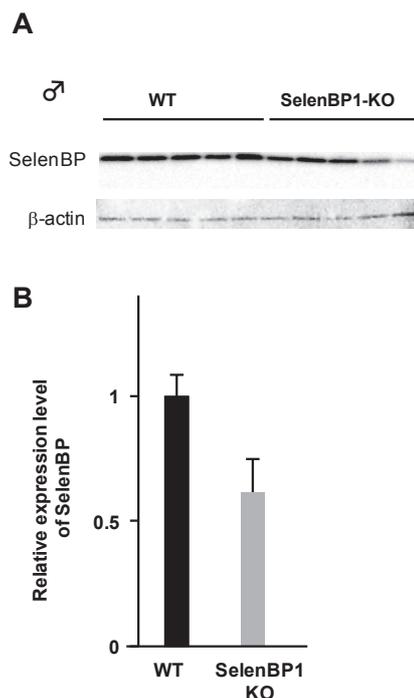


Fig. 2 Comparison of the hepatic expression level of SelenBP between male C57BL and SelenBP1-KO mice. A) immunoblot analyses of the liver S9 fraction of male WT and SelenBP1-KO mice (5 weeks old) with anti-human SelenBP1 and anti- β -actin are shown. B) the level of SelenBP was determined and normalized to that of β -actin. Protein amount subjected was 10 μ g/lane. Bars are the means \pm S.E. of 5 mice.

パク質の関連性については注視すべき点である. このように, ダイオキシンによる SelenBP1 誘導意義に関しては, 異なる毒性指標での解析を行うとともに, SelenBP2 との関係性も考慮して更なる解析を行う必要がある. この点において, 今後, 野生型と SelenBP1-KO 雌マウスの肝臓を用いた比較を行うことは有用であろう. また, 近年, 重金属による腎臓障害の際, 尿中に漏出する SelenBP1 が, 腎障害マーカーとして有用であることも報告されている¹²⁾. 筆者の知る限り, 油症と腎疾患との間に明確な関連を見出した報告はなされていないと考えるが, ダイオキシン受容体である AhR 欠損動物では, 水腎症が引き起こされることが知られている¹³⁾. また, 腎臓においては, SelenBP2 の mRNA 発現レベルが低いと報告されている⁹⁾¹⁰⁾. 今後, SelenBP1-KO マウスの腎

臓を用いた検討も必要であろう。多くのがんのタイプにおいて SelenBP1 の発現が低下しており、これが、がんの臨床成績、生存期間に負の影響を及ぼす可能性があるとして指摘されている¹⁴⁾。ダイオキシンによる SelenBP1 誘導の意義を明らかにするために、SelenBP1 および SelenBP2 の生理的機能の更なる解明が必要である。

結 論

SelenBP1-KO 雄マウス肝臓においては、SelenBP2 の発現レベルが無視し得ないほど高く、SelenBP の機能を解析するには良いモデルとはいえないと考えられた。一方、雌マウス肝臓の主要な SelenBP は SelenBP1 であり、SelenBP2 の発現レベルは著しく低いと考えられた。ダイオキシンの新たな毒性指標を設定し、肝臓の SelenBP1 の機能を評価するのに SelenBP1-KO 雌マウスは有用であると期待される。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)(課題番号: H24-食品-指定-014, H27-食品-指定-017 および H30-食品-指定-005)によった。

参 考 文 献

- Poland A and Knutson JC : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons : examination of the mechanism of toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26 : 517-554, 1982.
- Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM and Gonzalez FJ : Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140 : 173-179, 1996.
- Mimura J and Fujii-Kuriyama Y : Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta* 1619 : 263-268, 2003.
- Boverhof DR, Burgoon LD, Tashiro C, Sharratt B, Chittim B, Harkema JR, Mendrick DL and Zacharewski R : Comparative toxicogenomic analysis of the hepatotoxic effects of TCDD in Sprague Dawley rats and C57BL/6 mice. *Toxicol. Sci.* 94 : 398-416, 2006.
- Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N and Oguri K : A coplanar PCB induces a selenium binding protein as a major cytosolic protein in rat liver. *Chemosphere* 32 : 509-515, 1996.
- Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N and Oguri K : Significant induction of a 54-kDa protein in rat liver with homologous alignment to mouse selenium binding protein by a coplanar polychlorinated biphenyl, 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl and 3-methylcholanthrene. *Toxicol. Lett.* 87 : 1-9, 1996.
- Ishida T, Tasaki A, Fukuda Y, Ishii Y and Oguri K : Induction of a cytosolic 54 kDa protein in rat liver that is highly homologous to selenium-binding protein. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 6 : 249-255, 1998.
- Bansal MP, Oborn CJ, Danielson KG and Medina D : Evidence for two selenium-binding proteins distinct from glutathione peroxidase in mouse liver. *Carcinogenesis* 10 : 541-546, 1989.
- Lanfear J, Fleming J, Walker M and Harrison P : Different patterns of regulation of the genes encoding the closely related 56 kDa selenium- and acetaminophen-binding proteins in normal tissues and during carcinogenesis. *Carcinogenesis* 14 : 335-340, 1993.
- 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 and Yamada H : Selenium-binding protein 1 : its physiological function, dependence on aryl hydrocarbon receptors, and role in wasting syndrome by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biochim. Biophys. Acta* 1830 : 3616-3624, 2013.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
- Lee EK, Shin YJ, Park EY, Kim ND, Moon A, Kwack SJ, Son JY, Kacew S, Lee BM, Bae ON and Kim HS : Selenium-binding protein 1 : a sensitive urinary biomarker to detect heavy metal-induced nephrotoxicity. *Arch. Toxicol.* 91 : 1635-1648, 2017.
- Harrill JA, Hukkanen RR, Lawson M, Martin G, Gilger B, Soldatow V, Lecluyse EL, Budinsky RA, Rowlands JC and Thomas RS : Knockout of the aryl hydrocarbon receptor results in distinct hepatic and renal phenotypes in rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272 : 503-518, 2013.
- Elhodaky M and Diamond AM : Selenium-Binding Protein 1 in Human Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 19 : pii : E3437, 2018.

(Received for publication March 15, 2019)