

含セレンペプチド，グルタセレノンのグルタチオンペルオキシダーゼ活性

老川典夫¹⁾・江崎信芳²⁾・芦田裕之²⁾・左右田健次²⁾

(¹⁾関西大学工学部生物工学科*, (²⁾京都大学化学研究所**)

Glutathione Peroxidase Activity of Glutaselenone

Tadao OIKAWA²⁾, Nobuyoshi ESAKI²⁾, Hiroyuki ASHIDA²⁾, and Kenji SODA²⁾

¹⁾Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Kansai University, and ²⁾Institute for Chemical Research, Kyoto University

We synthesized four diastereoisomers of a selenium analogue of glutaselenone, γ -L-glutamyl-L-selenocysteinylglycine (i.e. LL-glutaselenone), LD, DL, and DD-glutaselenone, using *N*-*p*-methoxybenzyloxycarbonyl-*Se-p*-methoxybenzyl-D(L)-selenocysteine by liquid phase method. Each diastereoisomers of glutaselenone showed glutathione peroxidase activity *in vitro*, and the molecular activities were as follows: LL-isomer, 0.97 min^{-1} ; DL-isomer, 0.42 min^{-1} ; LD-isomer, 0.11 min^{-1} ; DD-isomer, 0.07 min^{-1} . We determined the apparent K_m values of glutaselenone for both glutathione and various hydroperoxides: for glutathione, LL-isomer (0.088 mM), DL-isomer (0.23 mM), LD-isomer (0.23 mM), DD-isomer (0.54 mM); for hydrogen peroxide, LL-isomer (0.10 mM), DL-isomer (0.11 mM), LD-isomer (0.12 mM), DD-isomer (0.28 mM); for cumene hydroperoxide, LL-isomer (0.32 mM); for *t*-butyl hydroperoxide, LL-isomer (1.46 mM). We proposed the mechanism of the glutaselenone-catalyzed glutathione peroxidase activity: the oxidized form of glutaselenone added to the reaction mixture was reduced with glutathione (GSH), and reacted with hydroperoxide to form glutaselenone-selenenic acid (GSeOH); GSeOH was reacted with GSH to form glutaselenone-glutathione selenosulfide (GSeSG), and reduced form of glutaselenone was regenerated through the thiol-selenosulfide interchange reaction between GSeSG and GSH.

セレノシステイン残基は、ほ乳類のグルタチオンペルオキシダーゼをはじめとする種々の含セレン酵素の活性中心に存在し、触媒作用に不可欠にして特異な役割を果たしている^{1,2,3)}。そのセレノシステ

*所在地：吹田市山手町3-3-35 (〒564)

**所在地：宇治市五ヶ庄 (〒611)

イン残基のセレノール基は、システイン残基のチオール基に比べ酸化還元電位が低く、反応性も高い⁴⁾。しかしながらセレンの生化学的役割については、グルタチオンペルオキシダーゼの生合成機構や、生体内に存在する役割不明のセレノシステイン含有タンパク質の機能などに関連して未解決な問題が多い。このような背景において、生理活性を持つ新しいセレノシステイン含有ペプチドの創製と機能の解明は、含セレン酵素の触媒機構の解明とその応用面の開発の両面から大きな意義を持つ。しかし、これらに関する研究は、ほとんど進展していない⁵⁾。

本研究では、セレノシステインの機能を化学及び生化学の両面から総合的に解明することを目的とし、本来生理活性の高いグルタチオンのセレノシステインアナログの4種のジアステレオマーを初めて化学合成し、グルタセレンと命名したこれらのセレノシステイン含有ペプチドの示す *in vitro* グルタチオンペルオキシダーゼ活性の反応機構について検討した。

実験方法

1) 試薬

グルタセレンの4種のジアステレオマーは、*N-p*-メトキシベンジルオキシカルボニル-*Se-p*-メトキシベンジル-D(L)-セレノシステイン誘導体を用い、液相法により合成した。ジフェニルジセレニドは、Aldrich から購入した。グルタチオンレダクターゼは、ベーリンガー・マンハイム山之内から購入した。還元型グルタチオン (GSH)、酸化型グルタチオン (GSSG)、NADPH は、興人から購入した。グルタチオン-グルタセレン混合セレノスルフィド (GSSeG) は、酸化型グルタセレン (GSeSeG) と GSH から調製した。

2) 酵素活性の測定方法

a) グルタチオンペルオキシダーゼ活性

グルタチオンペルオキシダーゼ活性は、Little の方法に従い、NADPH の吸収に由来する 340 nm の吸光度の減少により測定した⁶⁾。基質には、過酸化水素、*t*-ブチルヒドロペルオキシド、クメンヒドロペルオキシドを用いた。酵素反応液組成 (1 ml) は、次の通りである：50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)、2.0 mM EDTA、5.0 mM アジ化ナトリウム、5.0 mM GSH、0.8 mM NADPH、グルタチオンレダクターゼ (0.24 U)、5-25 μ M セレン化合物。反応は、0.2 mM のヒドロペルオキシドの添加によって開始した。ブランクは、酵素反応液中から、セレン化合物あるいは、ヒドロペルオキシドを除いて測定した。酵素反応は、37°Cで行った。NADPH の分子吸光係数は、 $6,220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いた。

b) グルタチオンレダクターゼ活性

グルタチオンレダクターゼ活性は、Carlbergs らの方法に従い、NADPH の吸収に由来する 340 nm の吸光度の減少により測定した⁷⁾。酵素反応液組成 (1 ml) は、次の通りである：50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)、25 μ M GSeSeG (あるいは、GSSG)、0.1 mM NADPH、1.0 mM EDTA、グルタチオンレダクターゼ (0.22 U)。反応は、グルタチオンレダクターゼの添加によって開始した。酵素反応は、37°Cで行った。NADPH の分子吸光係数は、 $6,220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いた。

c) 逆相高速液体クロマトグラフィー

逆相高速液体クロマトグラフィーは、(COSMOSIL 5C18-AR カラム $\phi 4.6 \times 150$ mm, ナカライテスク社製)を用い、流速 1 ml/min で行った。移動相には、4%アセトニトリルを含む0.1%トリフルオロ酢酸水溶液を用いた。ペプチドは、220 nm における吸収により検出した。

結果と考察

我々は、グルタセレンの4種のジアステレオマーが、*in vitro*において、グルタチオンペルオキシダーゼ活性を示すことを見いだした (Fig. 1)。グルタセレンの各ジアステレオマーのセレン原子1モ

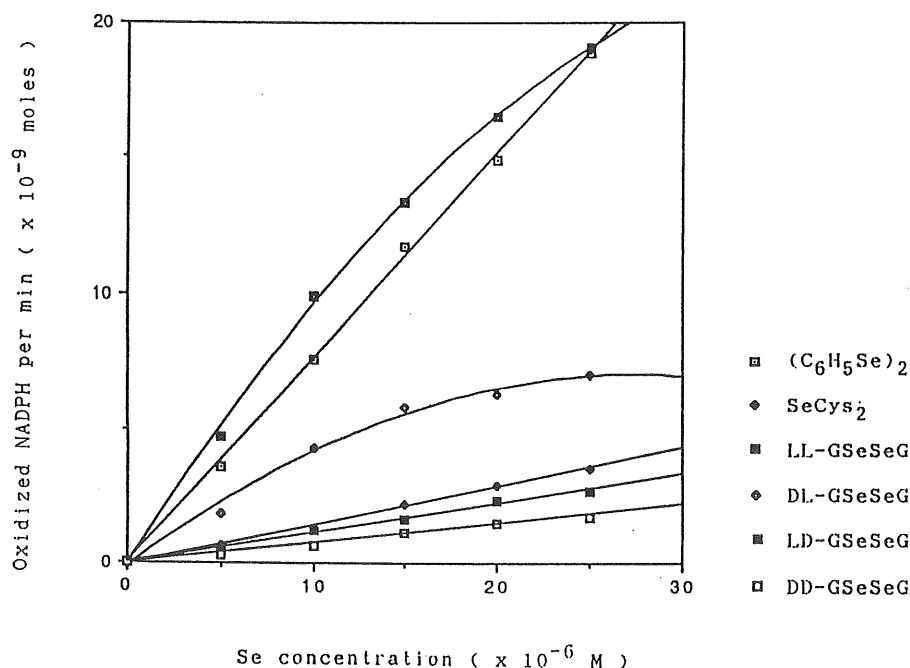


Fig. 1. Glutathione peroxidase activity of glutaselenone.

Table 1. Glutathione peroxidase activity of diselenide compounds

Se-compound	Molecular activity (min^{-1})		
	H_2O_2	cumene hydroperoxide	<i>t</i> -butyl hydroperoxide
Diphenyl diselenide	0.76	0.54	0.18
LL-Glutaselenone	0.97	0.47	0.21
DL-Glutaselenone	0.42	0.23	0.11
LD-Glutaselenone	0.11	0.08	0.04
DD-Glutaselenone	0.07	0.05	0.02
Selenocystine	0.14	0.15	0.08

ルあたりのモル活性は、過酸化水素に対して、それぞれ、LL 異性体, 0.97 min^{-1} ; DL 異性体, 0.42 min^{-1} ; LD 異性体, 0.11 min^{-1} ; DD 異性体, 0.07 min^{-1} であった (Table 1)。またグルタセレノンの4種のジアステレオマーは、有機ヒドロペルオキシド (クメンヒドロペルオキシド, *t*-ブチルヒドロペルオキシド) を基質とした場合にもグルタチオンペルオキシダーゼ活性を示した (Table 1)。その過酸化水素に対する相対活性は、LL 異性体の場合、クメンヒドロペルオキシド (48%), *t*-ブチルヒドロペルオキシド (22%) であった。

また、各異性体のグルタチオンに対する K_m 値は、それぞれ、LL 異性体, 0.088 mM ; DL 異性体, 0.23 mM , LD 異性体, 0.23 mM ; DD 異性体, 0.54 mM であり、また、過酸化水素に対する K_m 値は、それぞれ、LL 異性体, 0.1 mM ; DL 異性体, 0.11 mM , LD 異性体, 0.12 mM ; DD 異性体, 0.28 mM であった。また、LL 異性体の有機ヒドロペルオキシドに対する K_m 値は、クメンヒドロペルオキシド (0.32 mM), *t*-ブチルヒドロペルオキシド (1.46 mM) であった。これらの結果から、グルタセレノンの4種のジアステレオマー間のグルタチオンペルオキシダーゼ活性の差異は、グルタセレノンの基質 (グルタチオン, ヒドロペルオキシド) に対する親和性の差に基づくと考えられる。

これまでに、いくつかの含セレン化合物が、*in vitro* において、グルタチオンペルオキシダーゼ活性を示すことが報告されている⁸⁾。エブセレン (2-フェニル-1,2-ベンジゾセリナゾール-3(2H)-オン) は、グルタチオンペルオキシダーゼ活性だけでなく、抗炎症、抗酸化など、各種の生理作用を示す。また、近年、ジフェニルジセレニドが、エブセレンの約2倍のグルタチオンペルオキシダーゼ活性を示すことが明らかにされたが、その触媒発現機構は、未だ明らかではない⁹⁾。我々は、グルタチオンのセレノシ

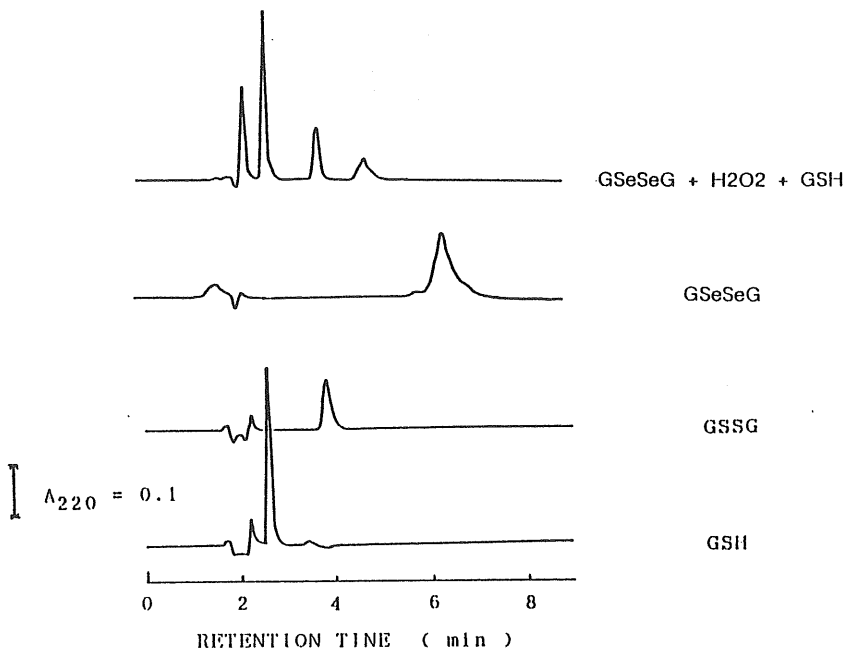


Fig. 2. Reversed phase HPLC profiles of the reaction mixture.

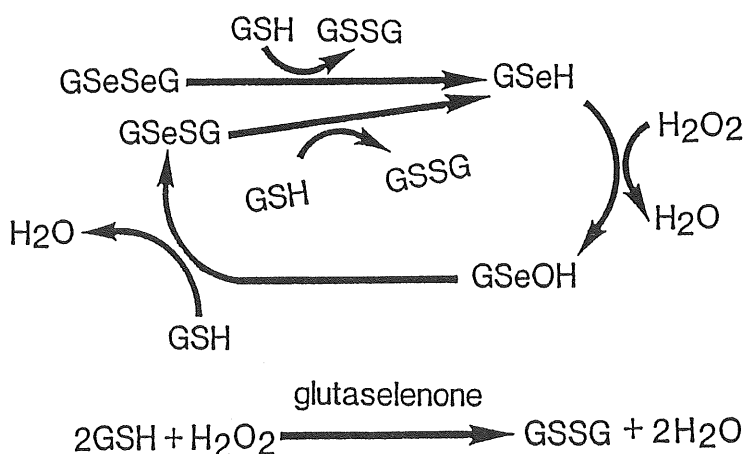


Fig. 3. Proposed mechanism for glutathione peroxidase activity.

ステインアナログであるグルタセレンの4種のジアステレオマーが, *in vitro*において, グルタチオンペルオキシダーゼ活性を示すことを明らかにした。これは, 含セレンペプチドの示すグルタチオンペルオキシダーゼ活性の最初の例である。

我々は, グルタセレンの示すグルタチオンペルオキシダーゼ活性の反応機構を明らかにするために, 反応中間体の単離, 同定を行った。グルタチオン-グルタセレン混合セレンスルフィドは, 安定な反応中間体として存在した (Fig. 2)。また, グルタチオン-グルタセレン混合セレンスルフィド及びグルタセレン (酸化型) は, グルタチオンレダクターゼの基質にはならなかった。一方, 過酸化水素の存在下で生成し, グルタチオンの添加によって消失する特徴的な反応中間体は, 逆相高速液体クロマトグラフィーの結果, グルタセレンセレネニン酸 (GSeOH) と同定された (Fig. 2)。以上の結果から, グルタセレン (酸化型) は, グルタチオン (還元型) によって還元され, グルタセレン (還元型) になった後, ヒドロペルオキシドとの反応により, グルタセレンセレネニン酸となり, グルタチオンによって還元され, グルタセレン-グルタチオン混合セレンスルフィドを形成後, さらにグルタチオンによる還元を受け, グルタチオン (酸化型) を生成すると考えられる (Fig. 3)。

文 献

1. FLOHE, L., B. EISELE and A. WENDEL (1971) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352 : 151
2. CONE, J. E., R. MARTIN DEL RIO, J. N. DAVIS and T. C. STADTMAN (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73 : 2659
3. AENOCH, H. G. and R. L. LESTER (1975) J. Biol. Chem. 250 : 6693
4. SHAMBERGER, R. J. (1983) Biochemistry of Selenium, Plenum, New York.
5. OIKAWA, T., N. ESAKI, T. TANAKA and K. SODA (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88 : 3057

- 6 . LITTLE, C. Biochem. Biophys. Acta. (1972) 284 : 375
- 7 . CARLBERG, I., and B. MANNERVIK (1985) Methods in Enzymology 113 : 484
- 8 . MULLER, A., E. CADENAS, P. GRAF and H. SIES (1984) Biochem. Pharmacol. 33 : 3235
- 9 . WILSON, S. R., P. A. ZUCKER, R.-R. C. HUANG and A. SPECTOR (1989) J. Am. Chem. Soc. 111 : 5936