

グルタセレノンジアステレオマーによるグルタチオンペルオキシダーゼ反応

田 村 隆^{a)}, 中 里 仁, 江 崎 信 芳, 左右田 健 次
(京大・化研, ^{a)}現: 岡大・農)

Glutathione peroxidase like reaction catalyzed by glutaselenone diastereomers.

Takashi Tamura, Hitoshi Nakazato, Nobuyoshi Esaki and Kenji Soda.

Institute for Chemical Research.

Selenium analogue of glutathione (glutaselenone) catalyzes a glutathione peroxidase-like reaction. We found that glutaselenone and glutathione form a selenosulfide conjugate intermediate in the presence of hydrogen peroxide. We synthesized glutaselenone diselenide and seleninic acid: they were converted to the selenosulfide in the presence of glutathione and hydrogen peroxide. Therefore, it appeared that the selenosulfide is essentially the catalyst in reduction of peroxide and oxidation of glutathione.

Glutathione peroxidase-like activity is usually determined by the glutathione reductase method (GR-method). Four diastereomers of glutaselenone were different in catalytic activity from one another, when the activity was determined by GR-method. However, their activities were essentially the same when determined by the o-phthalaldehyde method (OPA-method). GR acts on glutaselenone diselenide and selenosulfide, and the discrepancy can be attributed to the action of GR among these selenium containing peptides.

セレンは周期律表のⅥB族に属し、金属、非金属両方の性質を併せ持つユニークな元素である。近年セレンの特性を利用して、様々な有機セレン化合物が抗酸化剤として開発され注目を集めている^{1,2)}。著者らは既にグルタチオン、メタロチオネインのそれぞれのセレンアナログである、グルタセレノン(ジセレニド体)、メタロセレネインを合成し、その物理化学的諸性質を明らかにしている³⁾。

本研究では、このグルタセレノンについて、in vitroにおけるグルタチオンペルオキシダーゼ様反応の機構を検討した。さらに、グルタセレノンやそのセレノスルフィド体がグルタチオン還元酵素の基質になることを示し、これまでグルタチオンペルオキシダーゼ様反応の評価に広く使われてきたグルタチオン還元酵素共役アッセイ法の問題点を明らかにした。

実験方法

グルタチオンペルオキシダーゼ様反応⁴⁾ 6.5nM GSH, 0.7nM グルタセレン, 3 mM/H₂O₂, 10mM リン酸緩衝液 (pH7.0) からなる反応液を37℃でインキュベートし, 生成する酸化型グルタチオンを以下に示すグルタチオン還元酵素法あるいはオルトフタルアルデヒド法で定量することにより測定した。

反応中間体・生成物の HPLC 分析

反応中間体・生成物は HPLC で分析あるいは分取した。Waters600E ポンプ, U6K インジェクタ, 484UV デテクターと Cosmocil 5C₁₈ (4.6×150mm) を用いた。移動相は2.5%アセトニトリル, 0.1% トリクロロ酢酸の水溶液を流速 1 ml/min で流した。

グルタチオンペルオキシダーゼ様活性の測定

①グルタチオン還元酵素法⁴⁾

GR はバーリンガー・マンハイム山之内から購入した酵母由来の酵素を用いた。

反応生成物である酸化型グルタチオンを, GR-NADPH 系をもちいる共役法により分光学的に測定した。NADPH の減少を340nm の吸光度変化を測定することにより定量した。

②オルトフタルアルデヒド法⁵⁾

一定時間毎にグルタチオンペルオキシダーゼ様反応の反応液に *N*-Ethylmaleimide を加えて反応を止めた後, OPA を加え, 生成する蛍光物質を励起波長350nm, 測定波長410nm で定量することにより測定した。

結果と考察

グルタチオンペルオキシダーゼ (EC1, 11, 1, 9) は赤血球内や細胞組織内に発生する過酸化水素や脂肪酸のヒドロペルオキシドを水やアルコールに還元することにより, 細胞及び細胞構成成分の安定化に寄与している。

グルタチオンペルオキシダーゼの活性中心に存在するセレンシステイン残基はその触媒過程においてセレノール (Enz-SeH), セレネニン酸 (Enz-SeOH), セレノスルフィド (Enz-SeSG) などの化学形態に変換され, 反応に直接関与している。セレンシステイン残基を含むトリペプチドであるグルタセレンは本酵素の反応機構を解析するための良好なモデル化合物となる。そこでグルタセレンの反応中間体を単離, 同定しグルタセレンの反応機構の解析を行った。グルタセレンジセレニド (GSeSeG) の他にセレニニン酸型グルタセレン (GSeO₂H) とセレノスルフィド体 (GSeSG) を単離した。

それぞれのグルタセレン中間体によるグルタチオンペルオキシダーゼ様反応を HPLC を用いて経時的に分析した。グルタセレンジセレニドは, 過酸化水素添加後, 速やかにセレノスルフィド体に変換され, グルタチオンペルオキシダーゼ反応を触媒した。セレニニン酸型の場合も同様に速やかにセレノスルフィド体に変換されてグルタチオンペルオキシダーゼ反応を触媒した (Fig.1.)。

グルタセレンのセレノスルフィド体は, 還元型グルタチオンと共にインキュベートしても, 酸化型のグルタチオンを生成しなかった。しかし, 過酸化水素を添加するとペルオキシダーゼ反応が開始され,

還元型グルタチオンと酸化型グルタチオンの増加が認められた (Fig.2.)。

以上の結果から、グルタセレンはセレンスルフィド体に変換されてグルタチオンペルオキシダーゼ反応を触媒しており、セレンスルフィド結合が過酸化物の還元反応とグルタチオンの酸化反応を触媒していることが明らかとなった。

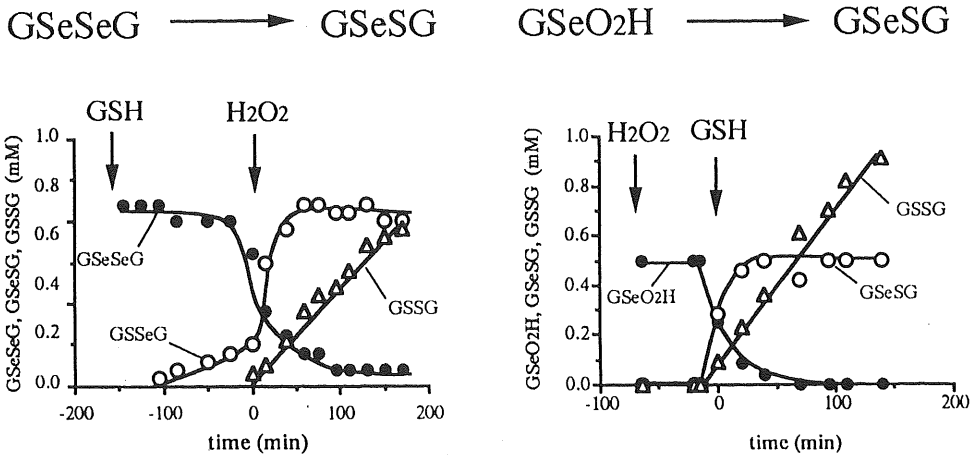


Fig. 1. Glutathione Peroxidase-like Activity of GSeSeG and GSeO₂H

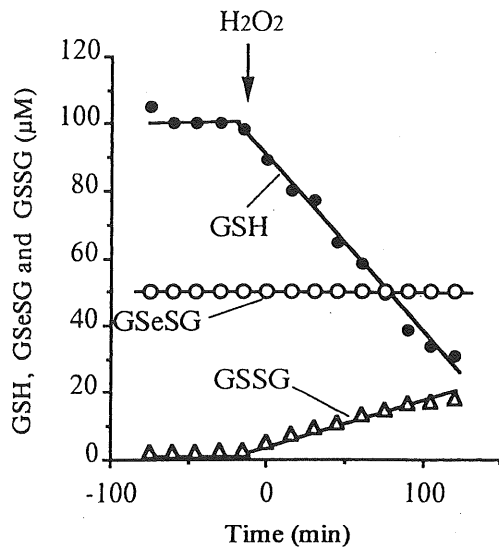


Fig. 2. Glutathione Peroxidase-like Activity of GSeSG

Table. 1. Glutathione Peroxidase-like Activity of Glutaselenone Diastereomers.

Glutaselenone (20 μ M Se)	GR-assay		OPA-assay	
	μ MGSSG/min	turnover/min	μ MGSSG/min	turnover/min
LL	18.0	0.9	8.7	0.4
DL	5.8	0.3	7.7	0.4
LD	3.0	0.2	8.5	0.4
DD	1.1	0.1	7.7	0.4

Table. 2. Action of Glutathione Reductase on GSeSeG and GSeSG.

Diastereomers (24 μ M Se)	GSeSeG (diselenide)		GSeSG (selenosulfide)	
	μ M NADPH/min	relative rate	μ M NADPH/min	relative rate
LL	7.2	1	2.4	1
DL	2.1	0.3	0.56	0.2
LD	0.3	0.04	0.46	0.2
DD	0.3	0.04	0.40	0.1

含セレン化合物のグルタチオンペルオキシダーゼ様活性の測定法として、グルタチオン還元酵素法 (GR 法) が広く用いられている。この方法では反応生成物である酸化型グルタチオンを GR-NADPH の系によって定量する。グルタセレンの4つ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様活性を GR 法で測定すると、LL 体>DL 体>LD 体>DD 体の順に活性に差が表れた。しかしこれを OPA 法で測定すると、4つのジアステレオマーがすべて同じ活性を示した (Table.1.)。これは GR 法に用いるグルタチオン還元酵素がグルタセレンやセレンスルフィド体を基質にするためであり (Table.2.)、酵素によって識別される立体異性が活性の差として現れているためである。グルタチオンペルオキシダーゼ様活性を正確に測定するためには、OPA 法を用いる必要があることを示した。

文 献

- 1) Muller, A., Cadenas, E. Graf, P. and Sies, H. (1984) *Bioch. Pharm.* **33** : 20, 1185-1189.
- 2) Muller, A., Cadenas, E. Graf, P. and Sies, H. (1985) *ibid.* **34** : 8, 1185-1189.
- 3) 老川典夫, 江崎信芳, 芦田裕之, 左右田健次 (1991) 微量栄養素研究 第8集 75-79.
- 4) Littie, C. and O'Brien, P. J. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**, 145-150.
- 5) Hissin, P. L. and Hilf, R. (1976) *Anal. Biochem* **74**, 214-226.