

研究紹介

セレノシステイン含有ペプチド
の合成と生化学的機能の研究

田村 隆

(生物資源開発学講座)

Synthesis and Biochemical Studies of
Selenocysteine-Containing Peptides

Takashi Tamura

(Department of Bioresources Chemistry)

Selenium belongs to the VIb group of the periodic table, and possesses both metallic and non-metallic characteristics. Physicochemical properties of selenium resemble more or less those of sulfur, and selenium may be indiscriminately incorporated in place of sulfur in cellular constituents and disturb metabolism. Alkali disease and blind stagger disease of livestock are caused by selenium-polluted grass. Carcinogenic effect is also one of the marked biological properties of selenium.

In spite of the toxic and carcinogenic effects, selenium is actually an essential trace element for bacteria, fish, and mammals. Life has exploited the high reactivity and unique characteristics of organoselenium compounds, especially in the form of selenoenzymes. Mammalian glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) has selenocysteine residue at the active site, and the enzyme plays a central role in the biological defense system against oxidative challenge by activated oxygens and radicals.

The author has studied the low redox potential and high reactivity of selenium-containing compounds, and developed glutathione peroxidase mimics. Glutaselenone, a selenium analog of glutathione, catalyzes a glutathione peroxidase-

like reaction *in vitro*. Studies on the mechanism of glutaselenone-catalyzed reaction revealed that glutaselenone is converted to a selenosulfide conjugate with glutathione in its catalysis.

Thioredoxins contain a conserved sequence, Cys-Gly-Pro-Cys, which is known to form intramolecular disulfide bond with consecutive β -turn conformations. The peptide is expected to serve as an ideal template for intramolecular selenosulfide bond formation when either the cysteine is replaced by selenocysteine. A tetrapeptide, Secys-Gly-Pro-Cys, was synthesized chemically. It showed glutathione peroxidase-like activity three times as high as glutaselenone. The high catalytic activity is ascribed to an intramolecular selenosulfide bond formation in the catalytic reaction.

Key words : Selenium, Glutathione Peroxidase, Selenocysteine, Thioredoxin

緒 言

著者は生化学的機能を持つ含セレンペプチドの研究を進めてきたが、その内容について紹介する前に、セレンの化学的特性といくつかの重要な生物活性について紹介したい。

セレンは周期律表第VI b族に属し、金属と非金属の両方の性質を合わせ持つユニークな元素である。セレンは、その同族体である硫黄とよく似た物理化学的諸性質を持っているため、硫黄代謝に紛れ込んで正常な代謝を攪乱すると考えられている。例えば、土壌中のセレン含量が高い牧草地では、植物体内にセレノメチオニンやセレノシステインなどの含セレンアミノ酸が蓄積し、それを食べた家畜が激しいセレン中毒症を示すことが古くから知られている。また、セレンは毒性が強いばかりでなく発癌作用を示すことも動物実験によって明らかにされていた。

このようにセレンは猛毒性の発ガン物質として認識されていたが、近年になってほ乳類、魚類、ある種の細菌にとって必須の微量栄養素であることが明らかにされてきた¹⁾。中国の東北部や雲南省などの内

陸部において多発する風土病，克山病がセレンの欠乏によって起こることが明らかにされ，同様の症状がセレン供給の少ない経静脈高カロリー輸液療法を受けた患者に見いだされている。ヒトに対するセレンの必要摂取量は1日約60 μ gとされているが，実際には我々の通常の食事を通じて1日100–300 μ gのセレンが摂取されている。(セレンは特徴的な赤茶色をしており，300 μ gのセレンといえばガラスの試験管に取れば目で見える量なのである。)これまで明らかにされたセレンの生理的役割としては抗酸化作用，制癌作用，抗炎症作用さらには免疫賦活化作用など，我々の健康を維持して行く上で重要な機能が挙げられる。

生体内に取り込まれたセレンがどのようにしてその作用を発揮するのか，分子レベルでの研究が進められている。最も詳細に研究された例として活性中心にセレノシステイン残基を持つセレン酵素，グルタチオンペルオキシダーゼが挙げられる²⁾。本酵素は還元型グルタチオンを電子供与体として過酸化物の還元的分解反応を触媒し，活性酸素やラジカルからの生体防御機構において中心的役割を果たしている。セレンの生理作用である抗炎症作用，抗酸化作用，免疫賦活化作用はこの含セレン酵素の機能で説明できると考えられている。

ところで本酵素におけるセレノシステイン残基の役割が研究されるにつれ，この酵素と同様の触媒能をもった低分子のセレン化合物が開発され注目を集めるようになった。そのような含セレン化合物は抗炎症剤や抗酸化剤など医薬品としての応用面が期待されるためである³⁾。著者は酵素の反応機構や立体構造の知見をもとに高いグルタチオンペルオキシダーゼ様活性を示すセレノシステイン含有ペプチドを合成し，触媒機構を検討した。

1. グルタチオンのセレンアナログ，グルタセレンの化学合成

グルタチオンは γ -グルタミル-システイニルグリシンからなるトリペプチドであり，生体内において様々な酵素反応の基質や補酵素となる。とくにシステイン残基のチオール基がグルタチオンの生化学的機能に不可欠であるとされている。そこでグルタチオンよりもさらに高い生理活性を付与された化合物を開発するために，システインより高い反応性と低い酸化還元電位を有するセレノシステインを組み込んだ

トリペプチド， γ -グルタミル-セレノシステイニルグリシン (Fig. 1) を考案しこれを合成した⁴⁾。

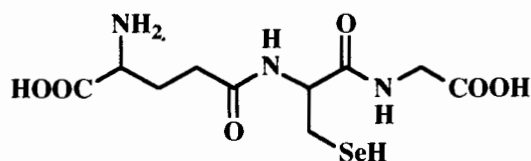


Fig. 1 Glutaselenone, a selenium analog of glutathione.

目的とするトリペプチドを合成するためにセレノール基を *p*-メトキシベンジル基で保護したセレノシステインを用いる液相合成法を開発した。この方法により，反応性が高く化学的に不安定なセレノシステインを効率よくペプチド合成に利用できることを示した。こうして得られた含セレンペプチドをグルタセレンと命名した。

2. 酵素を用いたグルタセレンの合成

グルタセレンの化学合成において最も煩雑な操作を必要とするのはセレノシステイニルグリシンに γ -グルタミル基を導入する過程であった。化学合成による γ -グルタミル化反応ではグルタミン酸の α 位のアミノ基とカルボキシル基をあらかじめ保護しておく必要がある。そこで γ -グルタミル基転移酵素を用いて，安価な市販のアミノ酸グルタミンを基質として，簡便に行なうための諸条件を検討した⁵⁾。本酵素を利用することによって α 位に保護基を導入する操作が大幅に省略され効率よくグルタセレンを調製する方法が確立された (Fig. 2)。

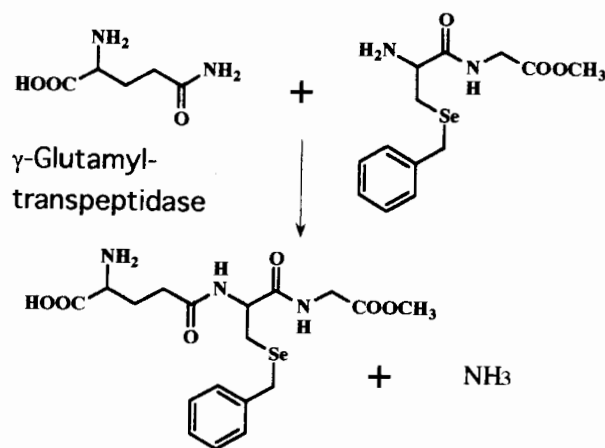


Fig. 2 Enzymatic introduction of a γ -glutamyl group to SeCys-Gly.

3. グルタセレンのグルタチオンペルオキシダーゼ様活性

グルタチオンペルオキシダーゼのセレンシステイン残基はその触媒反応においてセレンオール(-SeH), セレネニン酸(-SeOH), セレノスルフィド(-SeS-グルタチオン)などの化学的形態を取ると考えられている。しかし実際には本酵素が触媒として作用しているときにセレンシステインがどのような状態にあるのか明らかにすることは困難であり、本酵素の反応機構は十分に明らかにされていない。

グルタセレンはグルタチオンペルオキシダーゼ様活性を示し、還元型グルタチオン存在下で過酸化物の還元的分解反応を触媒する⁶⁾。そこでグルタセレンをセレン酵素のモデルとして反応機構の解析を行なった。グルタセレンのセレンシステイン残基はセレン酵素のそれと大変よく似た化学的性質を示し、セレンオール型、セレネニン酸型(-SeO₂H), セレノスルフィドなどの様々な酸化状態に誘導できることが分かった。さらに好都合なことに異なる酸化状態のグルタセレンはHPLCを用いて分離して定量できるため、触媒作用を行なっているセレンシステイン残基の化学的挙動を直接観察できた。その結果、グルタセレンはほとんどがセレノスルフィド型 (Fig. 3) として存在していることがわかった⁷⁾。

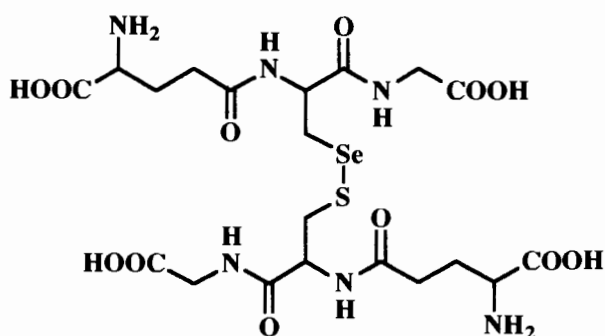


Fig. 3 Selenosulfide intermediate of glutaseleonone.

この知見はより高い抗酸化活性を有する含セレン化合物を分子設計して合成する上で貴重な指針となった。つまり、セレノスルフィドを可逆的に形成、開裂できる構造を持つようにデザインされた化合物はより活性の高いグルタチオンペルオキシダーゼ反応を示すと考えられる。

4. チオレドキシンの活性中心を模倣したテトラペプチド

チオレドキシンは108個のアミノ酸からなる蛋白質で活性中心の部分構造 Cys-Gly-Pro-Cys の2つのシステイン (Cys) 残基間で可逆的にジスルフィド結合を形成、開裂させて生体内の酸化還元電位を調整する⁸⁾。そこでこの蛋白質の部分構造を利用してチオール基とセレンオール基が相互作用できる構造を持つテトラペプチド, Secys-Gly-Pro-Cys (Fig. 4) を考案し上記の液相法によって合成した。

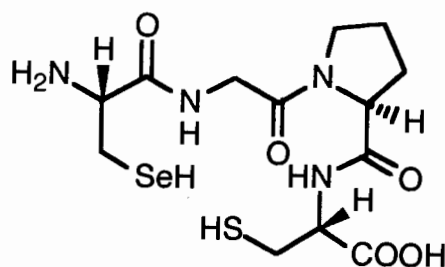


Fig. 4 Secys-Gly-Pro-Cys.

このテトラペプチドのグルタチオンペルオキシダーゼ様活性はグルタセレンやジフェニルジセレニドの約3倍の分子活性を示した。ジフェニルジセレニドはこれまで報告された中でもっとも高いグルタチオンペルオキシダーゼ様活性をしめす含セレン化合物とされていた⁹⁾。テトラペプチドの高い活性はシステイン残基のチオールとセレンシステイン残基のセレンオールとが互いに接近したコンフォメーションを取るによって発現していると考えられる。

要 約

セレンは2-, 0, 2+, 4+, 6+と多彩な酸化還元状態をとるという点で金属的な性質を持つ。また有機セレン化合物として求核的・求電子的な反応性に関与できるという点で酸素や硫黄などの典型元素のような振る舞いをする。生命は進化の過程で、セレンのユニークな化学的特性をうまく利用し、グルタチオンペルオキシダーゼなどのセレン酵素を獲得してきたと考えられる。

セレン酵素の研究に触発されて、セレン化合物を医薬品として利用する研究が進められており注目を集めている。このような背景のもと、グルタセレンとテトラペプチドを合成した。とくにテトラペプチドはグルタセレンの反応機構研究から生まれた

ペプチドである。今後さらに高い活性を持つ人工酵素がデザインされ、合成されるだろう。その時、鑄型として蛋白質や核酸、オリゴ糖などある特定のコンフォメーションをとる生体物質が利用されると思われる。

謝 辞

本研究は、筆者が京都大学大学院博士後期課程に在学中、京都大学化学研究所左右田健次教授のご指導のもとに行われたものであります。左右田教授のご指導、ご鞭撻に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 田中英彦：セレン Se, 206-213, (桜井 弘・田中英彦編 生体微量元素), 廣川書店, 東京 (1994)
- 2) Epp, O., R. Ladenstein and A. Wendel : The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *Eur. J. Biochem.* **133**, 51-59 (1983)
- 3) Sies, H. : Ebselene, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Radical Biology & Medicine* **14**, 313-323 (1993)
- 4) Tamura, T., T. Oikawa, A. Ohtaka, N. Fujii, N. Esaki, and K. Soda : Synthesis and characterization of the selenium analog of glutathione disulfide. *Anal. Biochem.* **208**, 151-154 (1993)
- 5) 田村 隆・下豊留玲・江崎信芳・左右田健次：含セレンペプチドの酵素的合成 微量栄養素研究 第9集 127-133 (1993)
- 6) Tamura, T., N. Esaki, T. Oikawa, H. Ashida, and K. Soda : Glutathione peroxidase activity of selenocysteine analog of glutathione, glutathione. The First International Congress on Vitamins and Biofactors in Life Science (ICVB) 93 (1991)
- 7) 田村 隆・中里 仁・江崎信芳・左右田健次：グルタセレン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様活性 微量栄養素研究 第10集 (1993)
- 8) Holmgren, A. : Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 237-271 (1985)
- 9) Wilson, S. R., A. Z. Paul, R. C. Huang, and A. Spector : Development of synthetic compounds with glutathione peroxidase activity. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 5936-5939 (1989)