

新しいセレノシステイン含有ペプチドの合成と性質

老川 典夫¹⁾・江崎 信芳¹⁾・田中英彦²⁾・左右田 健次¹⁾

(¹⁾京都大学化学研究所微生物化学研究部門*, ²⁾岡山大学農学部**)

Synthesis of New Selenocysteine-Containing Peptides, and Their Characterization

Tadao OIKAWA¹⁾, Nobuyoshi ESAKI¹⁾, Hidehiko TANAKA²⁾, and Kenji SODA¹⁾

¹⁾Institute for Chemical Research, Kyoto University and ²⁾Faculty of Agriculture, Okayama University

We have developed a rapid and simple method for synthesis of a selenocysteine-analog of glutathione, glutaselenone, in which selenocysteine residue is substituted for cysteine residue, and its three diastereoisomers with an automated peptide synthesizer according to the standard protocol. Four diastereoisomers of glutaselenone were purified by Sephadex G-10 column chromatography. Amino acid composition of 6N HCl hydrolysate of glutaselenone was in good agreement with the expected value. Oxidized form of glutaselenone, which showed a broad absorption band between 270 and 400 nm ascribable to an absorption by diselenide bond, was obtained. Circular dichroism of glutaselenone showed several cotton extrema between 210 and 400 nm attributable to asymmetric carbon atoms. Glutaselenone showed a glutathione peroxidase activity when it was incubated with glutathione, H₂O₂, glutathione reductase and NADPH. The mechanism of the glutaselenone-catalyzed glutathione peroxidase activity is discussed.

タンパク質中のセレノシステ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、その反応性は極めて高い。セレノシステインは、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。このような背景において、生理活性を持つ新しい含セレンペプチドの創製は、含セレン酵素の触媒機構の解明と応用面の開発の両面から大きな意義を持つ。特にD型含セレンアミノ酸を導入したペプチドは、生体内でのプロテオリシスや代謝を受けにくく、セレンの生理活性を維持しつつも毒性の低い特色が示唆される。しかしこれらに関する優れた合成方法はなく、生理活性に関する研究はほとんど進展していなかった。本研究では、生体内で多くの生理作用を示すことが知られているグルタチオンのセレンアナログ、グルタセレンの4種のジアステレオマーを合成し、これらの分光光学的諸性質を明らかにすると共に、*in vitro*におけるグルタチオンペルオキシダーゼ活性を検討した。

*所在地：宇治市五ヶ庄（〒611）

**所在地：岡山市津島中1-1-1（〒700）

方 法

1) 試薬

β -クロロアラニンは、セリンから合成した¹⁾。ジソジウムジセレニドは、金属セレンと水素化ホウ素ナトリウムから合成した²⁾。Se-*p*-メトキシ-ベンジルセレノシステインは、セレノシスチンと*p*-メトキシ-ベンジルクロライドから合成した³⁾。Se-*p*-メトキシ-ベンジル-*N*-*t*-Boc-セレノシステインは、Se-*p*-メトキシ-ベンジルセレノシステインと*S*-*t*-Boc-4,6-ジメチル-2-チオピリミジンから合成した⁴⁾。他の試薬は、市販品を用いた。

2) 固相ペプチド合成と分析方法

グルタセレノンの4種のジアステレオマーは、アプライドバイオシステム430Aペプチド合成機を用いて合成した。合成は、1グラムの*N*^α-*t*-Boc-Gly-OH₂-Pam樹脂(0.5ミリモル/グラム-樹脂)を用いて開始した。ブトキシカルボニル(Boc)基は、N末端アミノ基の保護に用い、アミノ酸側鎖の保護には、次の保護基を用いた; Glu(OBzl), SeCys(MBzl)(MBzl;*p*-メトキシベンジル)。カップリング反応は、2mmolの保護アミノ酸を用いて行った。樹脂からのペプチドの切り出しは、合成ペプチド樹脂(0.7g)を、チオアニソール(0.08%)と1,2-エタンジチオール(0.04%)存在下、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルホン酸(1M)-トリフルオロ酢酸溶液中で25°C 24時間処理することにより行った。反応溶液から樹脂を濾去後、100mlのエチルエーテルで洗浄した。0°Cに冷却後、2mlの脱イオン水を加え、5% NH₄OHでpHを7にした。これをSephadex G-10カラム(2×50cm)に重層した。1N酢酸で溶出し、目的画分を凍結乾燥した。

アミノ酸分析は、ベックマン7300アミノ酸分析計で行った。ペプチドは、ウォーターズPICO-TAGワークステーションを用い、減圧容器中で108°C 3時間塩酸加水分解を行った。セレン含量は、島津AA-670G原子吸光により定量した。

3) 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、基質としてグルタチオンと過酸化水素を用い、反応の結果生じた酸化型グルタチオンをグルタチオンレダクターゼを用いて、その補酵素であるNADPHの酸化に由来する340nmの吸光度の減少から定量した⁵⁾。

結果と考察

我々は、固相法に基づく全自動ペプチド合成機を用いてグルタセレノンの4種のジアステレオマーを合成した。そのアミノ酸配列は、 γ -L-GLU-L-SECYS-GLY, γ -L-GLU-D-SECYS-GLY, γ -D-GLU-L-SECYS-GLY, γ -D-GLU-D-SECYS-GLY (SECYS: セレノシステイン)である。アミノ末端やアミノ酸側鎖は、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルホン酸によって切断されるものを使用した。すなわちN末端は、*t*-Boc基によって、グルタミン酸については、ベンジル基を用いて保護した。しかしながら、セレノシステインのセレノール基に対する保護は、これまでほとんど進展していない⁶⁾。そこで我々は、システインのチオール基の保護に一般に使用されている*p*-メトキシベンジル基の導入を試みた。

また近年開発された新たな技術を合成途中の副反応を抑えるために導入した。すなわち樹脂には、酸に安定な PAM 樹脂を用い、合成途中のトリフルオロ酢酸による脱保護サイクル時のペプチドの脱離を防いだ^{7,8)}。またカップリングは、ジメチルホルムアミド中、対称酸無水物法により20分間行った。得られた標品は、各種機器分析目的物であることを確認した。

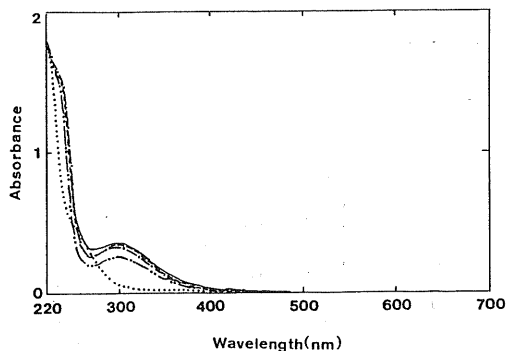


Fig. 1. Absorption spectra of glutaselenone (—) 1mM oxidized form of L,L-glutaselenone in H₂O ; (-·-·) 1mM oxidized form of D,L-glutaselenone in H₂O ; (-·-·) 1mM oxidized form of D,D-glutaselenone in H₂O ; (-----) 1mM oxidized form of L,D-glutaselenone in H₂O ; (-----) 1mM oxidized form of glutathione in H₂O.

グルタセレノンは、270から400nmにかけて幅広い吸収を示した (Fig. 1)。この吸収は、水素化ホウ素ナトリウムで還元すると消失すること、酸化型グルタチオンにはこの吸収帯がないこと (Fig. 1) から、ダイセレニド結合に由来すると考えられ、標品は酸化型グルタセレノンであることが明らかとなった。またグルタセレノンの4種のジアステレオマーは、210から400付近に特徴的な CD スペクトルを示した (Fig. 2)。これは不斉炭素原子に由来するものと考えられる。

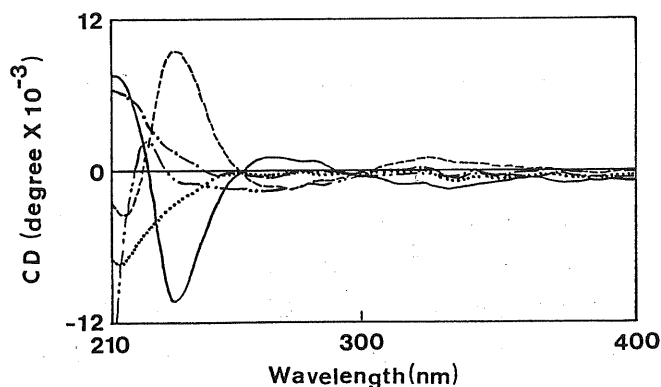


Fig. 2. Circular dichroism spectra of glutaselenone (—) 1mM oxidized form of L,L-glutaselenone in H₂O ; (·····) 0.1mM oxidized form of D,L-glutaselenone in H₂O ; (-----) 1mM oxidized form of D,D-glutaselenone in H₂O ; (-·-·) 0.1mM oxidized form of L,D-glutaselenone in H₂O ; (-----) 1mM oxidized form of glutathione in H₂O.

さて近年、エブセレンと称する有機セレン化合物(2-フェニル-1, 2-ベンゾイセテナゾール-3(2H)-オン)は、毒性も低く数々の炎症モデルに対し強い抗炎症作用を示すことが明らかにされた⁹⁾。エブセレンはセレン原子当りに換算して、グルタチオンペルオキシダーゼの100分の1程度のグルタチオンペルオキシダーゼ活性を示す。グルタセレンの4種のジアステレオマーは、*in vitro*において、グルタチオンペルオキシダーゼ活性を示し、その反応速度は、それぞれ LL ; 1.93, LD ; 0.21, DD ; 0.14, DL ; 0.84 min⁻¹であった。グルタセレンは、グルタチオンの生体内における多種多様な生理作用とセレンの特異な触媒作用を合わせ持つと考えられ、*in vivo*における薬理活性が期待される。

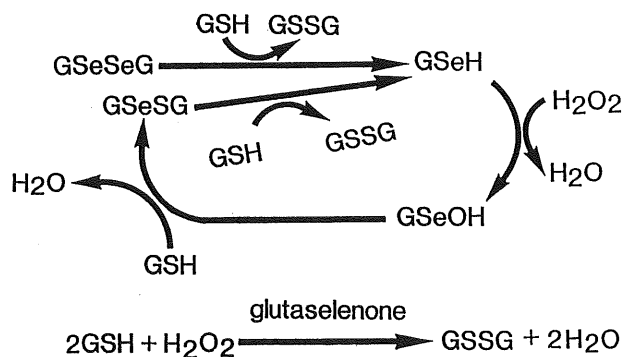


Fig. 3. Proposed mechanism for glutathione peroxidase activity of glutaselenone.

Fig. 3は、以上の結果をもとに想定したグルタセレンとグルタチオンペルオキシダーゼ活性の反応機構を示している。反応液中に添加したグルタセレン(酸化型)は、過剰の基質であるグルタチオン(還元型)により還元され、ペルオキシドである過酸化水素と反応した後、グルタチオン(還元型)と反応し、GSeSG複合体を形成した後、もう1分子のグルタチオン(還元型)と反応しもとのグルタセレンにもどる。すなわちグルタセレンは、2分子のグルタチオン(還元型)と1分子の過酸化水素から1分子のグルタチオン(酸化型)と2分子の水を生じる反応を触媒すると考えられる。

文 献

1. WALSH, C., A. SCHONBRUMM and R. T. ABLES (1971) J. Biol. Chem. 246 : 6855
2. KLAYMAN, D. J. and S. T. GFIFFIN (1973) J. Am. Chem. Soc. 95 : 197
3. ERICKSON, B. W. and R. B. MERRIFIELD (1973) J. Am. Chem. Soc. 95 : 3750
4. NAGASAWA, T., K. KUROIWA, K. NARITA and Y. ISOWA (1973) Bull. Chem. Soc. Japan 46 : 1269
5. LITTLE, C. (1972) Biochem. Biophys. Acta. 284 : 375
6. 老川典夫, 杉本学, 江崎信芳, 田中英彦, 左右田健次 (1988) 微量栄養素研究 5 : 75
7. MITCHELL, A. R., B. W. ERICKSON M. N. RYABTSEV, R. S. HODGES and R. B. MERRIFIELD (1976) J. Am. Chem. Soc. 98 : 7357

8. MERRIFIELD, R. B. (1986) *Science* 232 : 341
9. MULLER, A., E. CADENAS, P. GRAF and H. SIES (1984) *Biochem. Pharmacol.* 33 : 3235
10. BURK, R. F., K. NISHIKI, R. A. LAWRENCE and B. CHANCE, (1978) *J. Biol. Chem.* 253 : 43
11. FLOHE, L., W. A. GUNZLER and H. H. SCHOCK (1973) *FEBS Lett.* 32 : 132

