

## Ebselen の細胞毒性と SH 基修飾作用

村上 恵子<sup>1)</sup>, 細川 好孝<sup>2)</sup>, 吉野 昌孝<sup>1)</sup><sup>1)</sup>一宮研伸大学看護学部\*, <sup>2)</sup>愛知医大・医・生化<sup>†</sup>

(受付 2017 年 8 月 31 日, 受理 2017 年 9 月 29 日)

## Cytotoxicity of Ebselen: Modification of Sulfhydryl Groups in Enzyme Proteins

Keiko MURAKAMI<sup>1)</sup>, Yoshitaka HOSOKAWA<sup>2)</sup>, Masataka YOSHINO<sup>1)</sup><sup>1)</sup>*Ichinomiya Kenshin College of Nursing, Ichinomiya\**<sup>2)</sup>*Department of Biochemistry, Aichi Medical University School of Medicine<sup>†</sup>*

## Summary

Ebselen, a selenium containing compound, is known as a ROS scavenger under the experimental conditions and further under the cerebral infarction. However, ebselen shows some cytotoxic effects, which are considered to be related to the modification of sulfhydryl groups of proteins. In this report, we examined the effect of SH modification by ebselen and p-chloromercuribenzoate (PCMB) on the enzymes of energy metabolism in permeabilized yeast cells. Ebselen and PCMB inactivated glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase potently, and NAD-isocitrate dehydrogenase and malate dehydrogenase to a lesser extent. Inactivation of these enzymes may be due to the modification of sulfhydryl groups of the enzyme protein. Aconitase with a SH groups in the active site was not at all inactivated by ebselen, but potently inactivated by PCMB. Ebselen inactivated NADP-isocitrate dehydrogenase (NADP-ICDH) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), but PCMB that caused a potent inactivation of the former enzyme showed only a little effect on G6PDH. Glutathione reductase was inactivated by ebselen, but more potently by PCMB. Cytotoxic effects of ebselen can be explained by its inactivation of the glycolytic/oxidative enzymes and further antioxidant system.

Ebselen (2-Phenyl-1,2-benzisoxaselenazol-3(2H)-one) はセレンを含有し、強力な活性酸素消去能をもち<sup>1)</sup>, グルタチオンペルオキシダーゼ様活性を示すことから抗酸化物質として実験的に使用される他、急性期脳梗塞に対する治療薬<sup>2)</sup>, 双極性障害にも応用が考えられている。その一方で副作用として細胞毒性も報告されており SH 基の修飾がその原因と想定されており、ebselen によるグルタミン酸脱水素酵素 (GDH) の失活とその SH 基修飾が報告されている<sup>3)</sup>。今回エネルギー代謝系酵素に対する ebselen の修飾・失活作用を酵母細胞の酵素を対象として解析した。SH 基修飾について ebselen とともに p-クロロマーキュリ安息香酸<sup>4)</sup> (PCMB) による失活をあわせて検討した。Ebselen と PCMB の構造を Fig. 1 に示す。

## 実験方法

試薬, 実験材料 - パン酵母, NADP 依存性イソクエン

酸脱水素酵素はオリエンタル酵母 (東京), ebselen とトリリス (Trizma base) はシグマ, NAD, NADP はロシュ・ダイアグノスティックス (東京), PCMB は東京化成の製品をそれぞれ用いた。

低分子物質透過性パン酵母の調製<sup>5)</sup> - 市販のパン酵母 1 g を 0.5 M ソルビトールを含む 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 4 ml に懸濁し, 2.5 ml のトルエンを加えた。43-45°C で 1 分間加温後, 遠心分離によって上清を除き, 0.5 M ソルビトールを含む 50 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.1) 4 ml に懸濁した。これによって酵母は低分子の物質に対する透過性を増しアコニターゼ活性を細胞そのまま (*in situ*) で測定できるようになる<sup>5)</sup>。酵母 1 g を 1 ml と仮定し, 以後この懸濁液を酵母 200 mg/ml として計算した。

試料の調製 - 上記の透過性パン酵母懸濁液 50 ml を各濃度の Ebselen または PCMB, 40 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.1) 0.95 ml に加えて酵母の濃度を 10 mg/ml とし 37°C にて 5 分間加温後, 800×g にて 5 分間遠心し, 沈殿

\*所在地: 愛知県一宮市常願通5-4-1 (〒491-0063)

†所在地: 愛知県長久手市岩作雁又1-1 (〒480-1195)

した酵母を 40 ml の 0.5 M ソルビトールを含む 50 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.1) に懸濁した。これを酵素活性の測定に用いた。このとき各試料を同時に 3 本調製して活性の平均値と標準偏差を算出した。

Dunnet 検定 - JMP5.IJ (SAS institute inc) を用いて各試料と対照の有意差を判定した。

酵素活性の測定 - 上記の酵母懸濁液 5 ml を各酵素反応液 1 ml に加えて混合し、分光光度計 UV1600 (島津製作所, 京都) を用いて 340 nm あるいは 412 nm の吸光度増加を 30 秒間測定した。この時の酵母濃度を 1 mg/ml として反応速度を算出した。反応液の組成は以下の通り。

Glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) — 20 mM  $KPO_4$  (pH 7.4), 0.5 mM Fructose1,6-bisphosphate, 0.5 mM ADP, 0.5 mM NAD, 1 mM  $NaN_3$ , 1 mM spermine. Alcohol dehydrogenase (ADH) — 50 mM Hydrazine-glycine (pH 9.8), 100 mM Ethanol, 0.5 mM NAD, 1 mM  $NaN_3$ , Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) — 100 mM Tris-HCl (pH 7.8), 0.5 mM NADP, 0.5 mM Glucose

6-phosphate, 1 mM spermine. Glutathione reductase (GR) — 100 mM Tris-HCl (pH 7.8), 0.5 mM Oxidized glutathione, 0.5 mM NADP, 0.5 mM Glucose 6-phosphate, 0.2 mM DTNB, 1 mM spermine. NADP-isocitrate dehydrogenase (NADP-ICDH) — 100 mM Tris-HCl (pH 7.8), 0.5 mM NADP, 0.5 mM isocitrate, 4 mM  $MgCl_2$ , 1 mM spermine. NADP-Glutamate dehydrogenase (NADP-GDH) — 50 mM Hydrazine-glycine (pH 9.8), 40 mM glutamate, 0.5 mM NADP, 1 mM spermine. NAD-isocitrate dehydrogenase (NAD-ICDH) — 100 mM Tris-HCl (pH 7.8), 0.5 mM isocitrate, 0.5 mM NAD, 1 mM spermine, 1 mM  $NaN_3$ , 4 mM  $MgCl_2$ , 1 mM AMP. Malate dehydrogenase (MDH) — 50 mM Hydrazine-glycine (pH 9.8), 40 mM malate, 0.5 mM NAD, 1 mM spermine, 1 mM  $NaN_3$ . Aconitase — 100 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM citrate, 0.25 mM NADP, 4 mM  $MgCl_2$ , 0.1 U/ml NADP-isocitrate dehydrogenase

## 結果

Ebselen のエネルギー生成系に対する失活効果を検討し、PCMB の作用と比較した。解糖系酵素の GAPDH (Fig. 2A) と ADH (Fig. 2B) は ebselen と PCMB の作用により同程度に強力に失活した。両酵素とも SH 基をもつことから<sup>6,7)</sup>これらに対する ebselen の標的は SH 基であることが示唆された。

NAD 依存性脱水素酵素に対する ebselen と PCMB の効果を Fig. 3 に示す。NAD-ICDH (Fig. 3A) と MDH (Fig. 3B) はともに ebselen, PCMB により同程度に失活したが、GAPDH と ADH に比較してその作用は弱かった。

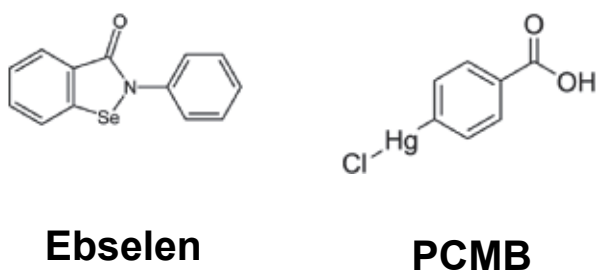


Fig. 1 Structure of ebselen and PCMB

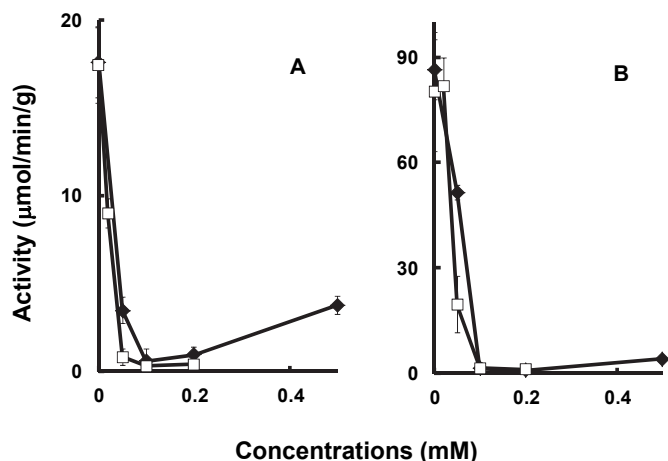


Fig. 2 Effects of ebselen and PCMB on the activities of glycolytic enzymes in permeabilized yeast cells. Permeabilized yeast cells (10 mg/ml) prepared according to the method reported previously<sup>4)</sup> were mixed with each compound in 40 mM Tris-HCl (pH 7.1). After incubation at 37°C for 5 min, cells were collected by centrifugation at 800 × g for 5 min and suspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.1) containing 0.5 M sorbitol at the concentration of 200 mg/ml. Enzyme activities were determined by reaction mixtures described in "Materials and Methods" and 1 mg/ml of yeast. The increase in the absorbance at 340 nm was recorded. Error bars indicate Mean ± SD (n = 6-30). A, GAPDH; B, ADH. ◆, Ebselen; □, PCMB added.

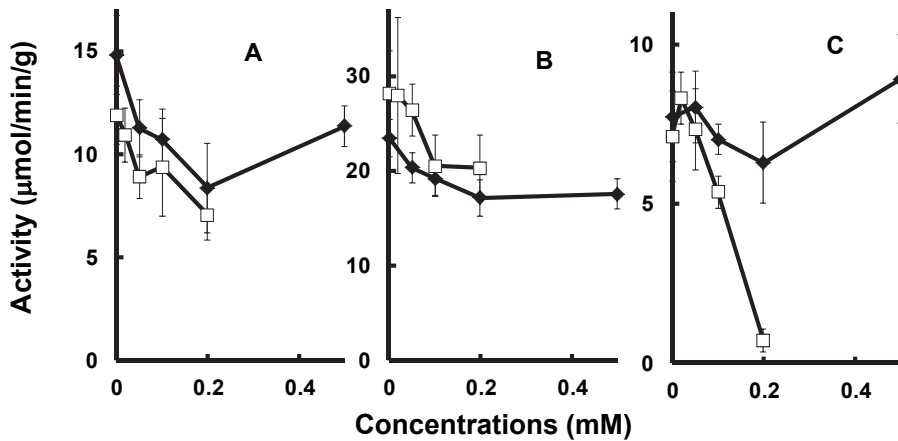


Fig. 3 Effects of ebselen and PCMB on the activities of mitochondrial enzymes in permeabilized yeast cells. Inactivation of enzymes and determination of enzyme activity were similar to those in Fig. 2. A, NAD-ICDH; B, MDH; C, aconitase. ◆, Ebselen; □, PCMB added.

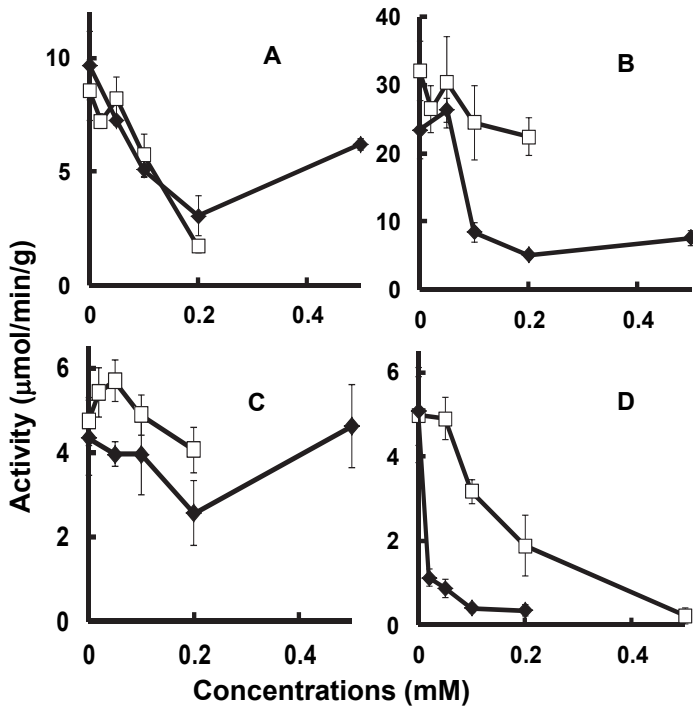


Fig. 4 Effects of ebselen and PCMB on the enzyme activities of NADPH generating and antioxidant enzymes in permeabilized yeast cells. Experimental conditions were similar to those in Fig. 2 except that the activity of GR was determined by the increase in the absorbance at 412 nm. A, NADP-ICDH; B, G6PDH; C, NADP-GDH; D, GR. ◆, Ebselen; □, PCMB added.

Aconitase (Fig. 3C) は活性中心の鉄結合部位に SH 基を持つ<sup>8)</sup>が, ebselen は殆ど失活作用を示さなかった一方, PCMB は強力な失活を引き起こし, 対照的な効果を示した。

NADPH 供給酵素に対する ebselen と PCMB の効果を Fig. 4 に示す。NADP-ICDH (Fig. 4A) は ebselen と PCMB によって同程度に失活し, 標的は SH 基であることが示された。G6PDH (Fig. 4B) は ebselen によって著明に失活

したが PCMB は有意ではあるがきわめて弱い失活作用しか示さなかった。NADP-GDH (Fig. 4C) の活性は低濃度の PCMB によって上昇する傾向があった (5%水準で有意) 一方, ebselen によっては上昇せず 0.1 mM の ebselen によって有意 (5%水準) に低下した。

NADPH を利用して還元型グルタチオンを再生する機能をもつ GR (Fig. 4D) は活性中心のフラビン結合部位に

SHを持つ<sup>9)</sup>が、ebselenによる失活効果はPCMBの作用に比べて弱かった。

## 考 察

Ebselenはエネルギー生成系酵素、とくに解糖系酵素(GAPDH, ADH)に対して強力に失活効果を示した。呼吸系酵素(NAD-ICDH, MDH)に対する作用は解糖系酵素に比べて弱かったが、失活を引き起こした。Ebselenの作用はPCMBの失活効果とほぼ対応しており、これらの酵素に対するebselenの標的はSH基であることを示唆している。呼吸系酵素の中で、Aconitaseはebselenの作用を殆ど受けない一方、PCMBにより強力に失活する機構は不明である。

抗酸化系に属するNADPH供給系酵素のNADP-ICDH, G6PDHはいずれもebselenにより失活した。前者のebselen効果はPCMBによる失活と同程度であり、SH基の修飾による効果を示唆する一方、G6PDHはPCMBによる失活を受けない。*In situ*においてG6PDHとして測定される酵素活性は一部6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH)の活性を含んでいる。G6PDHはSH基を1個しか持たないが、6PGDHは複数のSHを持つのでSH修飾による失活は一部、こちらの酵素ではないかと推測される。NADPHを利用して還元型グルタチオン再生機能をもつGRは、PCMBより弱いですが、ebselenにより失活した。以上の結果からebselenはNADPH生成の抑制を介して、抗酸化系を阻害することが推測された。

Ebselenは解糖系を高度に阻害し、GRとNADPH供給酵素を失活させ活性酸素処理系を中等度に阻害することによって細胞毒性を示す可能性がある。一方、アコニターゼを含むミトコンドリア酵素に対する影響は小さいと推測された。

## 参考文献

1) Daiber A, Zou M-H, Bachschmid M, Volker UV

(2000) Ebselen as a peroxynitrite scavenger *in vitro* and *ex Vivo*. *Biochem Pharmacol* 59: 153-60.

- 2) Ogawa A, Yoshimoto T, Kikuchi H, Sano K, Saito I, Yamaguchi T, Yasuhara H (1999) Ebselen in acute middle cerebral artery occlusion: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Cerebrovasc Dis* 9(2): 112-8.
- 3) Azad GK, Singh V, Mandal P, Singh P, Golla U, Baranwal S, Chauhan S, Tomar RS (2014) Ebselen induces reactive oxygen species (ROS)-mediated cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae* with inhibition of glutamate dehydrogenase being a target. *FEBS openbio* 4(1): 77-89.
- 4) Kielley WW, Bradley (1956) The relationship between sulfhydryl groups and the activation of myosin adenosinetriphosphatase. *J Biol Chem* 218: 653-59.
- 5) Murakami K, Nagura H, Yoshino M (1980) Permeabilization of yeast cells: Application to study on the regulation of AMP deaminase activity *in situ*. *Anal Biochem* 105: 407-13.
- 6) Mohr S, Hallak H, de Boitte A, Lapetina EG, Brüne B (1999) Nitric oxide-induced S-glutathionylation and inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 274: 9427-30.
- 7) Gergel D, Cederbaum AI (1996) Inhibition of the catalytic activity of alcohol dehydrogenase by nitric oxide is associated with S nitrosylation and the release of Zinc. *Biochem* 35(50): 16186-94.
- 8) Kennedy MC, Emptage MH, Dreyer JL, Beinert H (1983) The role of iron in the activation-inactivation of aconitase. *J Biol Chem* 258: 11098-105.
- 9) Colman RF, Black S (1965) On the role of flavin adenine dinucleotide and thiol groups in the catalytic mechanism of yeast glutathione reductase. *J Biol Chem* 240: 1796-803.