

# セレノグルタチオンの合成法と応用例

## Synthesis and Applications of Selenoglutathione

下平 伸吾<sup>1)</sup>、岩岡 道夫<sup>1),3)</sup>、荒井 堅太<sup>1),3)</sup>、金森 審子<sup>2),3)</sup>

<sup>1)</sup>東海大学理学部化学科、<sup>2)</sup>東海大学工学部生命化学科、<sup>3)</sup>東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門

Shingo Shimodaira<sup>1)</sup>, Michio Iwaoka<sup>2),3)</sup>, Kenta Arai<sup>2),3)</sup>, Akiko Kanamori<sup>1),3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Chemistry, School of Science, Tokai University,

<sup>2)</sup>Department of Applied Biochemistry, School of Engineering, Tokai University

<sup>3)</sup>Division of Pharmaceutical Sciences, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

### [要旨]

セレノグルタチオン(GSeSeG)は、グルタチオンの硫黄原子がセレン原子に置き換わった水溶性のトリペプチドであり、グルタチオンよりも高い酸化還元活性を示すことから、基礎生物学分野や医学分野への応用が期待されている。本稿では、これまでに報告されたセレノグルタチオンの合成法と生化学分野の研究への応用例について解説し、セレノグルタチオンの今後の研究を展望する

### [Abstract]

Selenoglutathione (GSeSeG) is a water-soluble tripeptide, which has selenium atoms instead of sulfur atoms of glutathione disulfide (GSSG). Because of the higher redox activity than glutathione, selenoglutathione is expected to be applicable to various research fields of fundamental biology and medical science as an alternative to glutathione. In this report, we summarize synthesis and applications of GSeSeG reported in the literature and discuss on the future applications as a drug for a variety of disorder conditions caused by oxidative stress.

### [Key Words]

Selenium, Peptide synthesis, Redox reaction, Oxidative stress

## 1. はじめに

グルタチオン(GSH)は、 $\gamma$ -Glu-Cys-Gly の分子構造をもつ3残基の水溶性ペプチドであり、細胞内に豊富に存在し、フリーラジカルや過酸化物などの活性酸素種の分解やタンパク質中のジスルフィド結合の切断など、重要な役割を果たしている。一方、セレンは生体内の必須微量元素であり、システイン(Cys)の硫黄原子の代わりにセレン原子をもつセレノシステイン(Sec)は、21番目のタンパク質構成アミノ酸として近年、注目を集めている。セレン原子は高い求核性と低い酸化還元電位を示すので、グルタチオンを構成するCysの代わりにSecをもつ還元型セレノグルタチオン(GSeH)は、グルタチオンよりも高い抗酸化作用を示すと考えられ、基礎生物学分野や医学分野への応用が期待されている。GSeHは容易に酸化されるので、セレノグルタチオンは通常は酸化型、すなわちGSeSeGとして単離される(図1)。本稿では、これまでに報告されたGSeSeGの合成

法と応用例について解説し、セレノグルタチオンを用いた今後の研究について展望する。

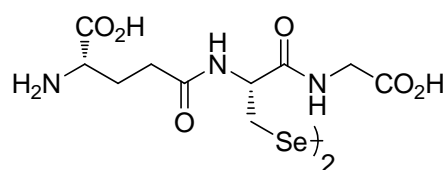


図1 セレノグルタチオン(酸化体、GSeSeG)

## 2. GSeSeGの合成法

セレノグルタチオンは通常は生体内に存在しないが、セレンを多量に摂取するなど、セレン化合物の代謝の過程でわずかに生成することが確認されている<sup>1)</sup>。セレノグルタチオンの化学合成については、1960年代に既に報告がある<sup>2,3)</sup>。初期の検討では、合成手法として液相ペプチド合成法が用いられた。その後、1993年に京都大学の左右田・江崎ら<sup>4)</sup>は、やはり液相法によって、

Se-(*p*-メトキフェニルメチル)-L-セレノシスチン (Fmoc-Sec(MPM)-OH) を出発原料として 0.13 g の GSeSeG をアンモニウム塩として合成し、各種スペクトルによる GSeSeG の特徴づけに初めて成功した。しかし、通算収率が 9% と低かったことから、これ以降は液相法による GSeSeG の合成は顧みられることはなかった。

2000 年代には、実験操作がより簡便な固相ペプチド合成法による GSeSeG の化学合成が、Hilvert ら<sup>5)</sup>によって報告された。固相法では、固体の樹脂上にカルボキシ基末端側からグリシン(Gly)、セレノシスチン(Sec)、 $\gamma$ -グルタミン酸( $\gamma$ Glu)を順次連結し、最終段階でペプチドを樹脂から切り離すと同時に保護基を外すことで GSeSeG を得る。Hilvert ら<sup>5)</sup>は、自動合成機を用いて Fmoc-Gly を担持した Wang 樹脂に活性化したセレノシスチン(Fmoc-Sec(MPM)-OPfp)と  $\gamma$ -グルタミン酸(Boc-Glu(OPfp)-OtBu)を順次反応させ、トリフルオロ酢酸：臭化トリメチルシラン：チオアニソール：*m*-クレゾール(750:132:120:50)カクテルを用いて脱樹脂及び脱保護を行うことで、GSeSeG を収率 33% で得ている。また、岩岡ら<sup>6)</sup>は手動による固相法を用いて、Fmoc-Gly を担持した Alko-PEG 樹脂に HOBt/DCC で活性化したセレノシスチン(Fmoc-Sec(MPM)-OBt)と  $\gamma$ -グルタミン酸(Boc-Glu(OBt)-OtBu)を順次反応させ、トリフルオロ酢酸：水：フェノール：チオアニソール：エタンジチオール(825:50:50:50:25)カクテルで脱樹脂を行った後、トリフルオロ酢酸/2,2'-ジチオビス(5-ニトロピリジ

ン)(DTNP)を用いて脱保護することにより、収率 9% で GSeSeG を得ている。バイオタージ社では、マイクロウェーブ合成機を用いることで、少量ながら短時間で GSeSeG を得ることに成功している<sup>7)</sup>。しかし、固相法ではアミノ酸連結時に各アミノ酸試薬を過剰に加える必要があり、また、樹脂からペプチドを切り出す際の効率も悪いため、GSeSeG は低収率、低収量でしか得られない。

表 1 GSeSeG 合成における液相法と固相法の比較

	液相法	固相法
C 末端の保護基	エステルなど	固体樹脂
実験操作の難易度	難しい	易しい
必要な試薬の量	1~2 当量	4~5 当量
精製の手法	各段階で精製が必要	最後に精製するだけでよい
伸長可能なアミノ酸残基数	~10 残基	~50 残基
収量と収率	高い	低い

以上のように、液相法と固相法はペプチドの化学合成に適用した場合に、それぞれに長所と短所がある(表 1)。GSeSeG の化学合成に関しては、セレノグルタチオンが短いペプチドであること、原料となるセレノシスチン誘導体(Fmoc-Sec(MPM)-OH)が高価であることを考慮すると、固相法よりも液相法の方が大量合成に向いていると思われる。このような考察から、下平

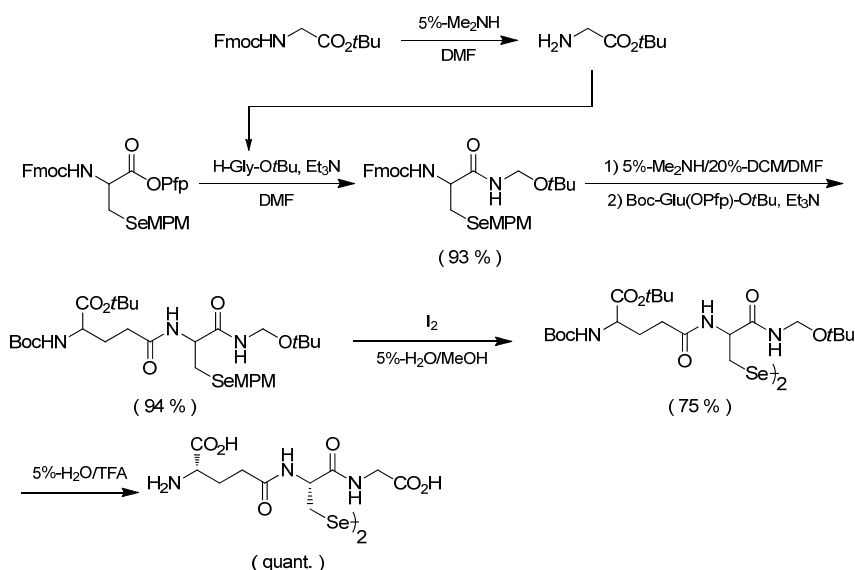


図 2 液相法による下平らの GSeSeG 合成スキーム

ら<sup>8)</sup>は液相法による GSeSeG の合成を再検討した。その結果、カルボキシ基を *t*Bu 基で保護したグリシン (Fmoc-Gly-*Ot*Bu) に活性化したセレノシステイン (Fmoc-Sec(MPM)-OPfp) と  $\gamma$  グルタミン酸 (Boc-Glu(OPfp)-*Ot*Bu) を順次反応させ、ヨウ素を用いてセレン原子上の MPM 保護基を外した後、10% 水-トリフルオロ酢酸でその他の保護基を脱保護することによって、GSeSeG を収量 0.2 g、収率 66% で得ることに成功した (図 2)。この手法は、過去に報告された GSeSeG の合成法の中で最も効率的な手法である。

### 3. GSeSeG の応用例

セレノグルタチオンの応用研究としては、これまでにタンパク質の酸化的フォールディングへの応用<sup>9)</sup>、ラジカスカベンジャーとしての利用<sup>9)</sup>、含セレン抗酸化酵素のグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の酵素モデルとしての応用<sup>6)</sup>などが、検討されている。

Hilvert らは、合成した GSeSeG を用いてウシ膵臓トリプシンインヒビター (BPTI) やウシ膵臓リボヌクレアーゼ A (RNaseA) など、ジスルフィド結合を複数もつタンパク質の酸化的フォールディングへの応用を検討した。各タンパク質の還元体 (R) に過剰量の GSeSeG を添加したところ、通常用いられる酸化型グルタチオン (GSSG) を用いた場合より、タンパク質の天然構造 (N) が迅速に生成することが確認された<sup>5)</sup>。その要因は、高い求核性を持つ GSe<sup>-</sup> がフォールディング過程で生成し、それがタンパク質分子内で掛け違えた SS 結合の開裂と掛け換えを効率よく促すためであると考えられている。また、酸素分子 (O<sub>2</sub>) 存在下では GSe<sup>-</sup> は容易に GSeSeG に再酸化されたため、図 3 のような触媒的 SS 架橋も進行することから、フォールディング反応をより効率よく促すことができる<sup>10)</sup>。

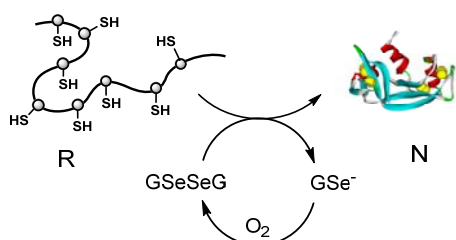


図 3 GSeSeG を用いた SS 結合含有タンパク質の触媒的フォールディング

GSeSeG を用いた酸化的フォールディング反応は、ヒルジン、ヒト上皮細胞成長増殖因子、リゾチーム、牛

血清アルブミンなど、全 8 種類の SS 結合含有タンパク質に应用され、その広い基質一般性が示された<sup>11)</sup>。

Koppenol ら<sup>9)</sup>は、*N*-アセチルチロシンやインスリンから生じるフェノキシラジカルに対するラジカスカベンジャーとしての効果が、グルタチオンよりもセレノグルタチオンの方が高いことを示した。

一方、岩岡ら<sup>6)</sup>は、過酸化水素と GSH との酸化還元反応が GSeSeG によって触媒されることを示し、GSeSeG が Sec を活性中心にもつ GPx と同様の抗酸化作用を示すことを明らかにした (図 4)。その際、GSeSeG と過酸化水素または GSH との反応を逆相 HPLC で追跡することで、GSeSeG はグルタチオン還元酵素 (GR) の作用を受けて GSeH となることや GPx の触媒サイクルにおける重要な中間体の観測にも成功した。下平ら<sup>8)</sup>は、同様の反応を <sup>77</sup>Se NMR によって追跡し、同様の中間体を観測した。

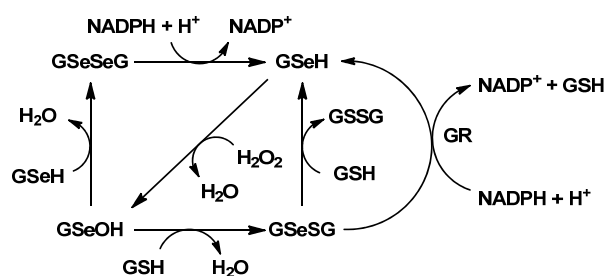


図 4 GSeSeG の GPx 様触媒サイクル

### 4. 展望

このように、GSeSeG のユニークな反応特性を利用し、生体内の様々な酸化還元反応を *in vitro* で模倣する試みがなされてきた。さらに、反応における活性中間体を種々の分析手法を駆使することで同定し、詳細な反応機構についても明らかにされつつある。一方で、GSeSeG が生体内における機能検証、すなわち *in vivo* での実験に関する報告例は少ない<sup>12)</sup>。これは、*in vivo* での研究へ供給し得るだけの GSeSeG の大量合成法が確立されていなかったことに他ならない。しかし下平らの研究により、現在では液相ペプチド合成法を応用することによって、GSeSeG を大量に入手することが可能となった<sup>8)</sup>。これにより、以前は検討することができなかった細胞実験、動物実験を計画し、実行することが現実味を帯びてきた。GSeSeG の特性を活かした応用法の新しい試みとして、以下のような計画を立案して進めている。

何らかの理由で生体内に過剰な活性酸素が存在する状態の酸化ストレスは、老化を早め、多くの疾病の要因となる。抗酸化分子である GSH は、疾病の予防および治療を目的として、点眼薬やサプリメント成分として用いられているが、細胞膜や血中に存在するグルタチオン分解酵素によって速やかに分解されるため、十分な抗酸化効果が得られていない。そこで、金森らは、GSeH の高い抗酸化能を利用して、細胞の酸化ストレス抵抗性向上を試みている。これまでに、ナノリポソームを活用して GSeSeG を細胞に効率的に取り込ませ、過酸化水素による致死率の低下に成功している（第 89 回日本生化学会大会で発表）。細胞に取り込まれた GSeSeG は GR により還元され、生じた GSeH が還元剤として機能したと考えられる。酸化ストレスは白内障やアルツハイマー病で生じる変性タンパク質の蓄積や炎症部位の悪化を促進すると報告されており、GSeSeG は幅広い分野で治療薬として有効であると期待される。

## 5. 引用文献

- [1] Y. Rao, M. McCooney, A. Windust, E. Bramanti, A. D'Ulivo, Z. Mester, *Anal. Chem.*, **2010**, *82*, 8121-8130.
- [2] W. Frank, W., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **1964**, *339*, 214-221.
- [3] D. Theodoropoulos, I. L. Schwartz, R. Walter, *Biochemistry*, **1967**, *6*, 3927-3932.
- [4] T. Tamura, T. Oikawa, A. Ohtaka, N. Fujii, N. Esaki, K. Soda, *Anal. Biochem.*, **1993**, *208*, 151-154.
- [5] J. Beld, K. J. Woycechowsky, D. Hilvert, *Biochemistry*, **2007**, *46*, 5382-5390.
- [6] S. Yoshida, F. Kumakura, I. Komatsu, K. Arai, Y. Onuma, H. Hojo, B. G. Singh, K. I. Priyadarsini, M. Iwaoka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 2125-2128.
- [7] セレノシステインを含んだペプチド合成における ChemMatrix の有効性、バイオターゲット社 Application Note, 2011 年.
- [8] 下平伸吾, 岩岡道夫, 第 42 回有機典型元素化学討論会, 2015 年 12 月 4 日, 名古屋, 要旨集 p.134.
- [9] D. Steinmann, T. Nauser, J. Beld, M. tanner, D. Günther, P. L. Bounds, W. H. Koppenol, *Biochemistry*, **2008**, *47*, 9602-9607.
- [10] J. Beld, K. J. Woycechowsky, D. Hilvert,

*Biochemistry*, **2008**, *47*, 6985-6987.

[11] J. Beld, K. J. Woycechowsky, D. Hilvert, *J. Biotechnol.* **2010**, *150*, 481-489.

[12] J. Beld, K. J. Woycechowsky, D. Hilvert, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 177-182.

## 6. 業績

### 【論文発表】

- 1) S. Shimodaira, M. Iwaoka. Improved Synthetic Routes to the Selenocysteine Derivatives Useful for Boc-Based Peptide Synthesis with Benzylic Protection on the Selenium Atom. *Arch. Org. Chem (ARKIVOC)*, part ii, 260-271 (2017).

### 【学会等発表】

- 1) 下平伸吾, 岩岡道夫: 液相法によるセレノグルタチオンの合成と GPx 様触媒サイクルの再検討。第 43 回有機典型元素化学討論会, 2016 年 12 月 8 日, 仙台
- 2) 今野結女子, 熊坂実優, 下平伸吾, 荒井堅太, 岩岡道夫, 清水佳隆, 小島直也, 金森審子: グルタチオン分子種を封入したナノリポソーム添加による細胞の酸化ストレス抵抗性の向上。第 89 回日本生化学会大会, 2016 年 9 月 25 日, 仙台

### 【特許】

- 1) 岩岡道夫, 下平伸吾, 液相法によるセレノグルタチオンの製造方法. 特願 2016-232816, **2016** (出願日平成 28 年 11 月 30 日).

## 7. 謝辞

本研究を遂行するにあたりご協力いただいた研究室の学生の皆さんに感謝いたします。