

ナノリポソームに封入したセレノグルタチオンの添加による細胞の酸化ストレス抵抗性向上

Enhancement of resistance against oxidative stress of cells by incorporation of selenogluthione enclosed in nanoliposome

金森 審子^{1,2)}

1) 東海大学工学部生命化学科、2) 東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門

Akiko Kanamori^{1,2)}

1) Department of Applied Biochemistry, School of Engineering, Tokai University

2) Division of Pharmaceutical Sciences, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

酸化ストレスは、多くの疾病の要因となる。生体内で最も強力な抗酸化物質であるグルタチオンは、通常の細胞では直接取り込むシステムがなく、細胞外で分解されてしまうため添加しても効果が上がりにくい。グルタチオンのシステインをセレノシステインに変換したセレノグルタチオンは、生体内環境下の pH では、格段に高い抗酸化活性を有する。本研究では、セレノグルタチオンをナノリポソームに封入して細胞に効率的に取り込ませ、細胞の酸化ストレス抵抗性を向上させることができた。この手法は幅広い分野での治療への応用が期待できる。

[Abstract]

Excess amount of active oxygen species in cells cause oxidative stress to induce various diseases. Glutathione is one of the main anti-oxidant molecules to detoxicate active oxygen species and peroxides *in vivo* and exists in both reduced form (GSH) and oxidized form (GSSG). GSH is a tripeptide which consists of L-glutamine, L-cysteine (Cys), and glycine, while GSSG is a disulfide dimer of GSH formed due to oxidation. Selenogluthione also exists in both reduced form (GSeH) and oxidized form (GSeSeG) containing L-selenocysteine (Sec) instead of Cys residue. Sec is a Cys residue analogue with a selenium-containing selenol group in place of the sulfur-containing thiol group in Cys. As the selenol of Sec is mainly in its anionic selenolate form at physiological pH, Sec is significantly more reactive than Cys whose thiol is typically protonated in that conditions. In this study, we examined the anti-oxidative effect of GSeH formed through reduction of GSeSeG in cytoplasm of the cell by glutathione reductase after incorporation of GSeSeG enclosed in nanoliposome to avoid degradation catalyzed by γ -glutamyltransferase. Higher improvement of cell viability which results from reduction of hydrogen peroxide was brought by incorporation of GSeSeG than that of GSSG or GSH.

[Key Words]

glutathione, selenogluthione, oxidative stress, nanoliposome, γ -glutamyltransferase

1. はじめに

生体内で最も有力な抗酸化分子であるグルタチオンは、L-グルタミン酸、L-システイン、グリシンから成るトリペプチド (γ -Glu-Cys-Gly) であり、還元型 (GSH) および二量体である酸化型 (GSSG) として存在する。その存在比は存在部位によって厳密に制御されており、レドックス環境の維持に関与する酵素の活性調節に携わり、活性酸素の無毒化や求電子的な有害化合物の解毒に重要な役割を果たしている。

細胞の酸化ストレスが高まるとグルタチオンの消費量

が増加するため、補充が必要となる。GSH は細胞質で生合成され、特異的なトランスポーターによって細胞外に排出される。ところが、GSH は細胞膜を透過せず、細胞外から直接 GSH を取り込むトランスポーターは通常の細胞にはほとんど発現されていないため [1]、GSH の供給は容易ではない。また、上皮組織の細胞膜および血流中には、GSH の γ -グルタミル結合を切断する γ -glutamyltransferase (GGT) という酵素が存在し、血中 GSH の半減期は数分と言われている。そのため、細胞は細胞外で GGT およびジペプチダーゼの作用によって構成ア

ミノ酸 (L-Glu, L-Cys, Gly) まで分解された材料をトランスporterを介して細胞内に取り込み、改めて GSH を生合成して抗酸化反応に用いるという手間をかけている (図 1, [1, 2])。

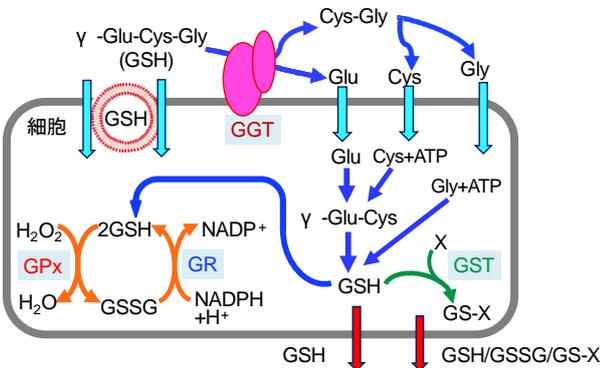


図1 高等動物細胞におけるグルタチオン代謝とナノリポソームを利用した GSH の取り込みの概要。GPx : glutathione peroxidase, GR : glutathione reductase, GST : glutathione S-transferase, GS-X : glutathione-S-conjugates (グルタチオン抱合体)を示す。

2. 研究の概要

本研究では、高還元力を有するセレノグルタチオンを利用した活性酸素の無毒化と、グルタチオン分子種をナノリポソームに封入して、分解・取り込み・再合成のステップを踏むことなく細胞に直接取り込ませることによる時間とエネルギーの効率化により、細胞の酸化ストレス抵抗性の向上を目標としている。

1) セレノグルタチオンの利用

セレノグルタチオンは、グルタチオンの L-Cys をセレノシステイン (L-Sec) に変換した化合物であり、還元型 (GSeH, 図 2) と二量体の酸化型 (GSeSeG) として存在する。セレン (Se) は必須微量元素であり、生体内で GPx (図 1) の活性部位に Sec として存在して機能していることがよく知られている。活性部位の Sec を Cys に変換すると GPx を含む酵素群の非活性が著減する例が報告されている [3]。これは、Cys の pKa は 8.3、Sec の pKa は 5.2 であり、生体内の中性付近の pH ではそれぞれ $-SH$ と $-Se^-$ となっているため、反応性すなわち還元力が大きく異なるためと考えられる。

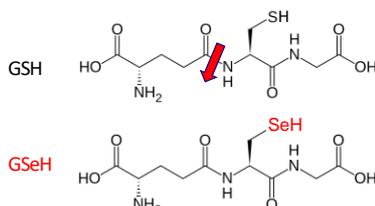


図2 還元型グルタチオン(GSH)と還元型セレノグルタチオン(GSeH)の構造式。矢印は GGT による切断部位を示す。

本研究では、GSeH の高い還元力を細胞の酸化ストレス抵抗性の向上に利用するため、高純度の化学合成品を用いて解析を進めている [4]。GSeH は非常に反応性が高く、容易に安定な酸化型となるため、化学合成品は GSeSeG として調製した。また、岩岡らは先行研究で、GSeSeG が glutathione reductase (GR) の作用を受けて GSeH となり、非酵素的に H_2O_2 を還元し、GPx 様の抗酸化作用を示すことを *in vitro* の系で明らかにした (図 3, [5])。

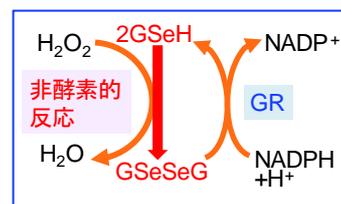


図3 GSeH は非酵素的に H_2O_2 を還元可能である。

したがって、GSeSeG を取り込ませることができれば、以下のような反応が進行すると推測される。①まず、GR によって GSeSeG が還元されて GSeH が生成される。②次に、GSeH は反応性が高いため、生成後迅速に対象を還元して GSeSeG に戻るか、あるいは GSH と反応して GSeSG となった後、再度 GR の作用を受けて GSeH となるサイクルを繰り返す。③ ②の理由により、GSeH が GSH に特異的なトランスporterによって細胞外に排出される可能性は極めて低い。すなわち、GSeSeG または GSe-X として排出される場合を除いて、比較的長い期間、細胞内で上記の反応機構が維持されると予想される。

他方、細胞内には γ -グルタミル結合を切断する γ -glutamyl cyclotransferase (GGCT) という酵素が存在するが、X 線結晶構造解析から得られた結果 [6] を考慮すると、その反応特異性から、GGCT は γ -グルタミル結合の C 末端直近に α -カルボキシ基のない GSH や GSeH およびその酸化型を基質としないと推定されている。

以上の考察により、GSeSeG を導入することによって細胞の酸化ストレス抵抗性の向上が期待できると考えた。

2) リポソームに封入したグルタチオン分子種の細胞への添加

GGT は、一般的なペプチダーゼやプロテアーゼでは切断できない GSH を細胞外で分解するほぼ唯一の酵素であり、

細胞外に排出されたグルタチオン抱合体 (GS-X, 図1) を加水分解して GST による有害化合物の解毒に寄与する役割を担っている。しかしながら、GSH および GSSG も基質とするため、外部から治療薬剤としてグルタチオンを投与する際に効果が明確に得られない主要因でもある。そこで、GGT による分解を防ぎ、細胞へのグルタチオン分子種の取り込み効率を高めるために、リポソームに化合物を封入して細胞に添加する系の構築を試みた。

ところで、本研究で使用するセレングルタチオンはセレン含有化合物であるため、適用濃度の範囲が狭い。厚生労働省によって平成 26 年 3 月に示された食事摂取基準によると、成人と小児のセレン耐容上限量は、6.7 μ g/kg 体重/日である[7]。体内への拡散による過剰なセレン摂取を防ぐためにも、効率の良いドラッグデリバリーシステム (DDS) が必要となる。リポソームを利用した薬物投与方法は、リポソーム表面に標的細胞に特異的に吸着する分子を結合させる等の工夫により特定の細胞への取り込み効率の向上効果が期待でき、セレン含有化合物の DDS として適している。

3. 結果の概要

ナノリポソームに封入したグルタチオン分子種の細胞への添加による抗酸化力への影響の比較

本研究では、グルタチオン分子種を封入したリポソームの粒径が細胞への取り込み効率に与える影響を以下のように解析した。まず、化合物を封入したリポソームを調製して超遠心により分画し、粒子径の小さい方の画分をナノリポソーム、大きい方をリポソームと称した(図4)。

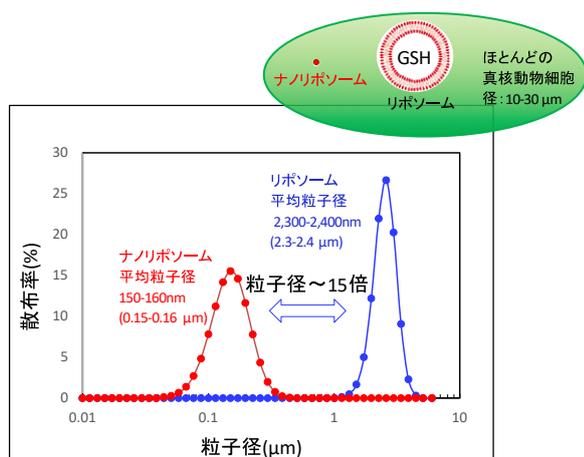


図4 リポソームおよびナノリポソームの粒子径の比較

ナノリポソームとリポソームでは粒子径が約 15 倍異なり、一般的な動物細胞の大きさを考慮すると、ナノリポソームの方が高い取り込み効率を示すと予想された。

東海大学先進生命科学研究紀要 第 2 巻 2018 年 3 月

次に、培養細胞にグルタチオン分子種 (GSH, GSSG, または GSeSeG) を封入したリポソームまたはナノリポソームを添加し、一定時間培養した後に H₂O₂ による酸化ストレスを加え、細胞の生存率を比較した。その際、コントロールとして、化合物を封入していない空のリポソームまたはナノリポソームを用いた。その結果、グルタチオン分子種の添加により致死率が低下して生存率が上昇し、その効果は GSeSeG > GSSG > GSH の順に認められた[8]。GSeSeG のもたらす影響をさらに解析したところ、生存率の向上は GSeSeG の濃度依存性を示した。また、ナノリポソームを用いた場合にのみ効果が認められ、リポソームを用いた場合はコントロールと有意の差は見られなかった。

他方、我々は GSeH および GSeSeG も GGT の作用を受けることを HPLC を用いた解析により確認している[9]。したがって、ナノリポソームに封入することにより、GGT による分解を受けずに一定量の GSeSeG が細胞内に取り込まれ、細胞の酸化ストレス抵抗性を向上させたと考えられる。

また、GSeSeG を封入したナノリポソームを取り込ませた細胞は、H₂O₂ による酸化ストレスを加えない場合には致死率の上昇は観察されなかった。すなわち、セレン化合物の添加による悪影響が認められない濃度内で効果を発揮できたと考えられる。

4. 展望

酸化ストレスとは、生体内で産生された活性酸素の消費と解毒の均衡が崩れた状態のことである。過剰となった活性酸素はタンパク質や脂質を酸化して本来の機能を失わせるほか、抗酸化作用をもつ分子を消費して枯渇させるため、生体内の幅広い領域の反応に破綻が生じて多くの疾患を発症させる。酸化ストレスによるダメージは年を経る過程で蓄積されていくため、通常から予防と改善に取り組む必要がある。また、急激な症状悪化をもたらす場合には、迅速な原因物質の無毒化・除去が必須となる。

セレンの抗酸化力を利用した治療薬としては、エブセレンが GPx を模してデザインされたが、水に不溶で扱いにくく、国内では治療薬として承認されていない。セレンの高い抗酸化能を活かし、かつ、安全性が保たれる治療薬の開発が望まれる。GSeH は酸化ストレスが関与する幅広い疾患、特に老化を促進する疾患発症の予防や進行の抑制のための新規な治療に活用できると期待できる。

本研究で施行した GSeSeG をナノリポソームに封入して

投与する手法は、その布石になると期待して、さらに改善と解析を進める所存である。

5. 引用文献 (関連学会発表等を含む)

- [1] A. K. Bachhawat *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 3154-3164 (2013)
- [2] R. Franco, *et al.*, *Arch. Physiol. Biochem*, **113**, 224-258 (2007)
- [3] L. Johansson, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1726**, 1-13 (2005)
- [4] S. Shimodaira, K. Arai, M. Iwaoka, A. Kanamori, *Bull. Inst. Adv. Biosci.* **1**, 10-13 (2017)
- [5] S. Yoshida, K. Arai, M. Iwaoka, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 2125-2128 (2011)
- [6] A. J. Oakley, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **283**, 22031-22042 (2008).
- [7] 「日本人の食事摂取基準 (2015年版)」策定検討会 報告書、厚生労働省、平成26年3月
- [8] 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、第89回日本生化学会大会、2016年9月25日、仙台。論文準備中。
- [9] 熊坂実優、今野結女子、下平伸吾、荒井堅太、岩岡道夫、清水佳隆、小島直也、金森審子、第89回日本生化学会大会、2016年9月24日、仙台。

6. その他の業績

【論文発表】

- 1) S. Shimodaira, Y. Asano, K. Arai, M. Iwaoka,
Selenoglutathione Diselenide: Unique Redox Reactions in the
GPx-Like Catalytic Cycle and Repairing of Disulfide Bonds in
Scrambled Protein.
Biochemistry, **56**, 5644-5653(2017)
- 2) K. Arai, A. Tashiro, Y. Osaka, M. Iwaoka,
Glutathione Peroxidase-Like Activity of Amino-Substituted
Water-Soluble Cyclic Selenides: A Shift of the Major
Catalytic Cycle in Methanol.
Molecules, **22**, 354(2017).
- 3) K. Arai, H. Ueno, Y. Asano, G. Chakrabarty, S. Shimodaira,
Go. Mughesh, M. Iwaoka, Protein Folding by Water-Soluble
Cyclic Diselenides with Novel Oxidoreductase and
Isomerase Activities.
ChemBioChem, published.
[<https://doi.org/10.1002/cbic.201700624>]

【学会等発表】

(1)熊坂実優、下平伸吾、岩岡道夫、金森審子：セレノグルタチオンの高還元力を利用したメチルグリオキサールの低減、Decrease of the amount of methylglyoxal by high antioxidant activity of selenoglutathione。2017年度 生命科学系学会合同年次大会 (第90回日本生化学会大会を含む)、2017年12月6日、神戸。

7. 謝辞

本稿を書く機会を与えていただき、常に様々なご指導を賜っている平山令明先生、共同研究を行わせていただいている東海大学工学部生命化学科、小島直也先生と清水佳隆先生、理学部化学科、岩岡道夫先生、荒井堅太先生と下平伸吾さん、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心より感謝いたします。