還元型セレノグルタチオンの高い抗酸化能力によるメチルグリオキサールの低減

Decrease of methylglyoxal level by high antioxidant activity of reduced selenoglutathione

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

Akiko Kanamori[1,2)]

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

[2)] Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

［要旨］

酸化ストレスと糖化ストレスは密接に関係しており、生体内で相乗効果的に負の作用を増加させる。酸化ストレスでは過剰な活性酸素が、糖化ストレスではメイラード反応によって生じる AGEs（Advanced Glycation End Products, 終末糖化産物）とその前駆体が原因物質となって、様々な機能性分子を変性・失活させる。その結果、痴呆や糖尿病を含む多様な疾病を誘発して老化を促進する。主要な抗酸化分子であるグルタチオンは、両ストレスの原因物質の無毒化・生成抑制に深く寄与している。本研究では、必須微量元素セレンを含むアミノ酸「セレノシステイン(Sec)」の抗酸化力を利用してグルタチオンの反応性を高めた「セレノグルタチオン」の活用により、細胞の酸化及び糖化ストレス抵抗性を総合的に向上させることを目指す。先に、セレノグルタチオンを添加すると培養細胞の酸化ストレス抵抗性が向上する知見を得ている。今回、セレノグルタチオンによる非酵素的反応により迅速に AGEs 前駆体（メチルグリオキサール）が減少することを *in vitro* の系で独自に見出した。これらの成果は、アンチエイジングな効果をもつ治療薬の開発への応用が期待される。

［**Abstract**］

“Oxidative stress” and “glycation stress” are closely related each other to increase the negative effects for organisms in synergistic manners. While the excess amount of active oxygen species makes various functional molecules denatured and inactive to cause oxidative stress, advanced glycation end products (AGEs) and those precursors indicate similar effects to cause glycation stress for cells. Both stress induce various diseases such as dementia or diabetes resulting in enhancement of aging . Glutathione, which is one of main antioxidants, contributes to control the production and detoxification of the causative compounds of the above stress. In this study, we made use of the high antioxidant activity of L-selenocysteine (Sec), which contains an essential trace element selenium, as a component of selenoglutathione to enhance the resistance ability to oxidative and glycation stress of cells. Previously we observed improvement of cell viability against hydrogen peroxide (H_2O_2) was brought by addition of selenoglutathione into the conditioned medium. This time, rapid decrease of methylglyoxal, a precursor of AGEs, was detected by non-enzymatic reaction with selenoglutathione *in vitro*. These results are expected to be applied to development of medicinal compounds having anti-ageing effects.

［**Key Words**］

glutathione, selenoglutathione, oxidative stress, glycation stress, methylglyoxal

1. はじめに

「**酸化ストレス**」と「**糖化ストレス**」は別個の系ではなく、相互に関係して相乗効果的に老化を進ませる。

まず、酸化ストレスとは、主に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り、過剰となった活性酸素がタンパク質や脂質を酸化して本来の機能を失わせる。特に小胞体内のシャペロン分子（タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、PDI）の触媒部位のシステイン残基が一酸化窒素によってS-ニトロシル化されると酵素活性が著しく低下することが報告されている

[1]。S-ニトロシル化されたPDI は孤発性神経変性疾患患者（アルツハイマー病やパーキンソン病）の死後脳においてのみ著明に認められており、シャペロン分子の失活が変性タンパク質の蓄積につながったと考えられる。S-ニトロシル基がさらに酸化されたスルホン酸化 PDI が過酸化水素（H_2O_2）で処理された培養細胞で検出されており [2]、機能性分子の活性部位にあるシステイン残基は日常的に同様な酸化を受けている可能性がある。

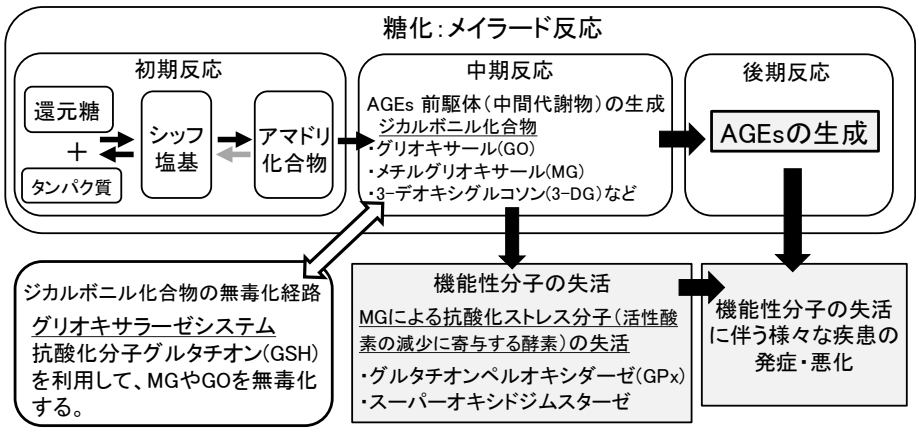

図1 メイラード反応の概略とAGEs 及びその前駆体がもたらす糖化ストレス（カルボニルストレスを含む）

次に、糖化ストレスは、還元糖とタンパク質のアミノ酸の縮合反応であるメイラード反応が進行して生じる AGEs（Advanced Glycation End-products, **終末糖化産物**）が原因物質であり、様々な機能性分子を変性・失活させる。AGEs 前駆体であるジカルボニル化合物による弊害も報告されており、「**カルボニルストレス**」と呼ばれている。中でも**メチルグリオキサール(MG)** は、細胞に酸化ストレス抵抗性をもたらす酵素類を失活させることが報告されており[3]、その結果、酸化ストレスと糖化ストレスが相乗効果的に生体に負の影響を及ぼすことになる（**図1**）。また、MG はアルツハイマー病との関連性が研究されており[4]、過剰量の存在は望ましくない。

両ストレスによるダメージの蓄積が加齢依存的疾病の発症の要因となっているが、生体内にはそれらの負の効果を軽減させる防御システムが存在する。主要な抗酸化分子である**グルタチオン**は、活性酸素の無毒化や AGEs の生成抑制に深く寄与している（**図1**）。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（γGlu-Cys-Gly）であり、還元型（GSH）および二量体である酸化型（GSSG）として存在して生体内のレドックス環境の維持に重要な役割を果たしている。

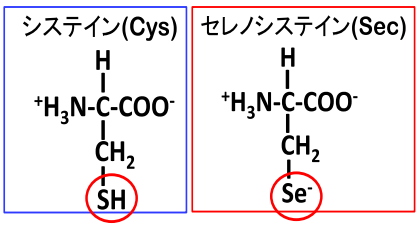

図2 システインとセレノステインの構造

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、$-Se^-$となっているため、反応性が大きく異なる。Sec は GPx の活性部位に存在し、Cys に変換すると活性が著減する。

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、**図2**）に変換した化合物であり、還元型(GSeH)と二量体の酸化型(GSeSeG)として存在する。Sec は**グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)**の活性部位で機能していることがよく知られている。GPx は GSH を用いて H_2O_2 を還元・無毒化する酵素であるが、岩岡らは先行研究で、GSeSeG が**グルタチオンレダクターゼ(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]）。岩岡らは、H_2O_2 の減少を NADPH の消費量をもとに定量していたため、さらに、FOX (ferrous oxidation-xylenol orange) assay によって直接 H_2O_2 濃度の経時変化を測定したところ、GPx 非存

2. 研究の概要

本研究では、21 番目のアミノ酸である**セレノシステイン(Sec)**を含む**セレノグルタチオン**の活用により、細胞の酸化及び糖化ストレス抵抗性を総合的に向上させることを目的として解析を進めている。

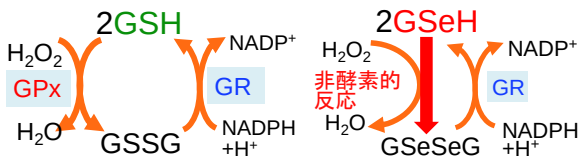

図3 GSH は GPx の基質として利用されて H_2O_2 を還元・無毒化する。GSeH は非酵素的に H_2O_2 を迅速に還元可能である。

セレノグルタチオンの効果

在下では、GSH に比べて GSeH の方が著明に効率よく H_2O_2 濃度を低下させた[6]。

そこで、「**GSeH の高い反応性を MG の無毒化・低減、ひいては糖化ストレスの低下に利用可能か**」についての検討を企画した。もともと生体内には**グリオキサラーゼシステム**と呼ばれる MG をはじめとするジカルボニル化合物を無毒化するシステムが機能している（**図１、図４**）。

このシステムでの反応機構は、まず、グリオキサラーゼ１(GLO1)によって MG が GSH と結合し、S-D-lactoyl-glutathione という中間体が生じる。次に、グリオキサラーゼ２の作用を受けて加水分解され、乳酸と GSH が生成され、GSH は再びグリオキサラーゼサイクルあるいは他の酸化物の還元に携わる。GSeH は高い抗酸化力に基づき、H_2O_2 の無毒化と同様に MG の無毒化も非酵素的反応として効率よく進行することが予想された。

GSeH は反応性の高さにより、容易に安定な酸化型となるため、GR で還元して生じた直後に反応を進行させる必要がある。本研究では、岩岡らによって化学合成された高純度の GSeSeG を用いて解析を進めており[7]、*in vitro* の系で GR を反応させた直後に MG の溶液と混合し、各反応時間の後にα-ケト酸と反応して蛍光を発するラベル化試薬である MDB (1,2-diamino-4,5-methylene-dioxybenzene, dihydro-chloride)を用いて定量及び検出を試みた。

3. 結果の概要

GSeH による MG 減少の効果

(1) GSeSeG を脱気した溶液中で GR 処理した後に、生じた GSeH を MG と反応させ、GLO1 非存在下での MG 減少の有無を評価した。すなわち、上述の蛍光ラベル処理をしたサンプルを対象に、マイクロプレートリーダー(MPR) 及び高速液体クロマトグライー(HPLC) を使用して解析した。まず、GSeH のみで MG に対する反応を確認した後、細胞内の環境に準じるよう、一定量の GSH 共存下でも効果を検討した。その結果、GSH の共存の有無に関わらず、迅速に MG の減少が認められ、GSeH と MG の量比に応じて未反応の残存 MG が検出された。したがって、GSeH による MG の減少は、GSH 共存の影響を受けないことがわかった。

使用した蛍光ラベル化試薬は、未反応な状態では蛍光を発しない。HPLC による検出により、蛍光で検出される

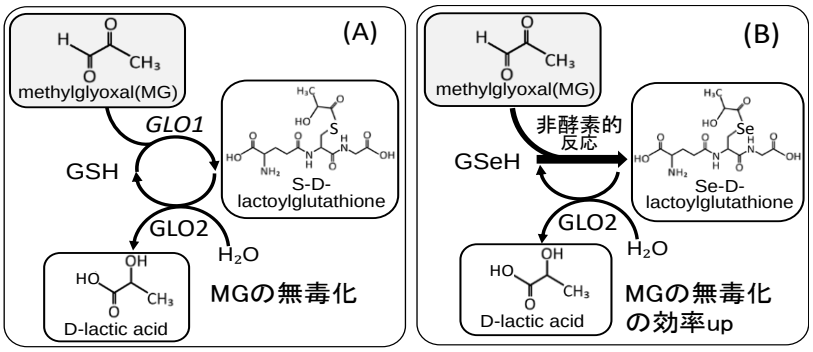

図4 細胞内における糖化ストレス軽減システム

(A) 細胞に元来備わっている GSH を用いる系であり、グリオキサラーゼシステムと呼ばれる。(B) 細胞に GSeSeG を取り込ませた場合に展開が予想される系。GR の作用で生じた GSeH は非酵素的反応によって迅速に MG を還元・無毒化すると考えられる。GR: グルタチオンレダクターゼ、GLO1: グリオキサラーゼ 1、GLO2: グリオキサラーゼ 2 を示す。

ピークが一本だけであることを確認し、ピーク面積を MPR による定量値と照らし合わせた[8],[9]。

(2) GSSG を(1)と同様に GR で処理し、(1)と効果を比較した。GSH は、GLO1 非存在下では MG 減少速度が非常に低かった。細胞内の環境に近づける目的での一定量の GSH 共存下で検討したため、GSeH の数倍の高濃度でも GSH の効果はかなり低いということになる[8,9]。

これらの結果から、GSeSeG の添加により細胞内 MG 量(濃度)の制御がしやすくなると考えられ、GLO1 の発現量低下や活性低下が報告されている疾病の治療への応用が期待されると考えられる。

4. 展望

メイラード中期反応で生じるジカルボニル化合物は非常に化学的反応性が高く、本研究で着目している MG は、グルコースの 1000 倍の速度で AGEs 化を進めると言われる。酸化ストレス及び糖化ストレスによるダメージは、急激な症状悪化をもたらす場合もあるが、年月を経る過程で蓄積されていく場合も多いと考えられるため、あらかじめ予防と改善に取り組む必要がある。

MG を無毒化するグリオキサラーゼシステムの第一段階で働く GLO1 は、反応に GSH を必要とする。そのため、酸化ストレスが高まり GSH が枯渇すると MG を無毒化する系がうまく機能しなくなる。また、糖尿病や統合失調症では GLO1 の発現量や活性の低下が報告されている[10-13]。非酵素的反応で MG を減少させる GSeH の効果は *in vitro* の系で確認できた。次は、細胞への添加が MG をはじめとするジカルボニル化合物の無毒化と AGEs の生成抑制に

及ぼす効果を評価する必要がある。現在、分子生物学的手法または阻害剤で GLO1 の発現あるいは活性を低下させたモデル細胞を調製中である。

セレンは必須微量元素でありながら使用許容濃度の範囲が狭いため、できるだけ少量で標的細胞のみに的確に運ばれることが期待される。継続的な摂取が必要な場合はさらに安全性が望まれる。セレンの高い抗酸化能を活かし、かつ、分解を防いで安全性が保たれる治療薬の開発のため、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され [14]、さらに改善と解析を進める予定である。

5. 引用文献（関連学会発表等を含む）

[1] Uehara T, *et al.*,. *Nature*, **441**, 513-7 (2006)

[2] 上原 孝, 浦上財団研究報告書, **19**, 17-25 (2012)

[3] S. Suravajjala, *et al.*, *Clin. Chim. Acta*, **421**, 170-176 (2013)

[4] M. Krautwald, *et al.*, *Exp.Geront.*, **45**, 744-751(2010)

[5] S. Yoshida, K. Arai, M. Iwaoka, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50** , 2125-2128 (2011)

[6] 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封入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91回日本生化学会大会、2018年9月25日、京都。

[7] S. Shimodaira, Y. Asano, K. Arai, M. Iwaoka., *Biochemistry* , 56 , 5644–5653 (2017)

[8] 熊坂実優、下平伸吾、岩岡道夫、金森審子: 糖化ストレス制御への還元型セレノグルタチオンの抗酸化力の活用、第37回日本糖質学会年会、2018年8月29日、仙台。

[9] 熊坂実優、下平伸吾、岩岡道夫、金森審子： メチルグリオキサール無毒化への還元型セレノグルタチオンの抗酸化力の活用、第 28 回日本メイラード学会年会、2018 年 10 月 7 日、札幌。

[10] M. G. Distler and A. A. Palmer, *Frontiers in Genetics*, **3**, 1-10 (2012)

[11] M. Toyoshima, *et al.*, *Br. J. Psychiarty*, **199**, 245-246 (2011)

[12] M. M. Jack, *et al.*, *Diabetologia*, **54**, 2174-2182 (2011)

[13] N. Rabbani, *et al.*, *Diabetes*, **63**, 50-52 (2014)

[14] A. Kanamori, *Bull. Inst. Adv. Biosci.* **2,** 10-13 (2018)

6. その他の業績

【学会等発表】

日向寺祥子、根本大輝、鉄本智章、金森審子：γ－グルタミルトランスペプチダーゼによる分解を阻害するグルタチオン誘導体の設計。第91回日本生化学会大会、2018年9月25日、京都。

7. 謝辞

本稿を書く機会を与えていただき、常に的確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。