13SM-10 酸化ストレスに対する Alpha クラスグルタチオン S-トランスフェラーゼの役割

東京薬科大学薬学部第二衛生化学教室

○平塚 明、小倉健一郎、平藤 彰、坂本康浩、斉藤 博、
広瀬健一郎、渡部 烈

THE ROLE OF ALPHA-CLASS GLUTATHIONE S-TRANSFERASES AGAINST OXIDATIVE STRESS

Akira HIRATSUKA, Kenichiro OGURA, Akira HEITO, Yasuhiro SAKAMOTO, Hiroshi SAITO, Kenichiro HIROSE, and Tadashi WATABE,

Department of Drug Metabolism and Molecular Toxicology, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, Hachioji, Tokyo 192-0392

【目的】 Glutathione S-transferases (GSTs) は、哺乳動物の各種臓器・組織の主として細胞質に分布するホモあるいはヘテロ二量体酵素で多くの分子種が存在する¹⁾。これら GST 分子種は、発癌性物質から生体内で生成する親電子性活性代謝物を GSH 抱合解毒^{1,2)}する GST 活性の他に、生体膜構成多不飽和脂肪酸 (PUFA) 等のヒドロペルオキシドを還元消去する GSH ペルオキシダーゼ (GSH Px) 活性を有する^{3,4)}。

生体内酸化ストレスは、細胞の機能障害や細胞老化等の成因の一つとして注目されている⁵⁾。なかでも *n*-6 系 PUFA のヒドロペルオキシドの分解産物である 4-hydroxy-2(*E*)-nonenal (4-HNE) は、強力な細胞毒性物質であり⁶⁾、また 4-HNE と蛋白質との反応生成物が、動脈硬化病巣やアルツハイマー患者の脳組織などより検出されることから⁶⁾、4-HNE とこれら疾病との関係が示唆されている。演者らは、基質特異性を異にする多様な GST 分子種による、4-HNE ならびにその前駆体である PUFA ヒドロペルオキシド (PUFA-OOH) の解毒代謝における Alpha クラス GST の役割について報告する。

【結果・考察】 I. ラット加齢指標物質コレステロール 7-ヒドロペルオキシドの Alpha クラス GST 分子種による還元：既に演者らは細胞膜リン脂質の過酸化により細胞膜中のコレステロール (Ch) からそのエポキシドとともに Ch 7-ヒドロペルオキシド (Ch 7-OOH) が生成すること、さらにラット皮膚組織中では Ch 7-OOH が比較的安定であり加齢にともない蓄積し、良好な加齢指標物質となることを見出した⁷⁾。そこで Ch 7-OOH がラット皮膚組織内に蓄積する理

由について検討した結果、ラット皮膚組織内には、Ch 7-OOH を Ch 7-OH へ主に還元する rGSTA1-2 が不在であり、さらに Se-GSH Px による Ch 7-OOH 還元活性が著しく低いためであることが判明した⁸⁾。

II. モルモット Alpha クラス GST の PUFA-OOH に対する GSH Px 活性：モルモット肝は Se-GSH Px が不在であり、過酸化物の消去は専ら Alpha クラスの GST 分子種が行っているとされているが、モルモットの GST (gpGST) 分子種の研究は極めて乏しいため必ずしも明確ではない。そこでモルモット肝の主要 GST 分子種の GSH Px 活性について検討した結果、既知 (gpGSTsA1-1 および M1-1) および新種 (gpGSTsM1-2 および M1-3)⁹⁾ の GST 分子種の PUFA-OOH に対する GSH Px 活性は、GSTsA1-1>>M1-1>M1-2>M1-3 の順であった。なかでも最大活性を示した gpGSTA1-1 の肝可溶性画分における GSH Px 活性の寄与率は約 90% であった。また、gpGSTA1-1 のアラキドン酸ヒドロペルオキシドに対する還元活性は rGSTA1-2 の約 6 倍、そして既知 GST 中最大の GSH Px 活性を示す rGSTT2-2^{4,10)} とはほぼ同程度の活性を示した。

III. モルモット肝における強毒性物質 4-HNE の GSH 抱合解毒：Alpha クラスの GSTA4-4 はヒトをはじめラット、マウス等多くの動物種に分布する分子種で、PUFA-OOH の分解産物である 4-HNE の主要解毒酵素として良く知られている¹¹⁾。しかしながら、モルモット肝における 4-HNE の GSH 抱合解毒反応に関しては、これまで全く報告がなくこの点について検討した。その結果、モルモット肝可溶性画分の

4-HNE-GSH抱合反応は、ヒトおよびラットとは大きく異なり、GSTA4-4 オルトログ酵素が不在であるため、gpGSTsM1-1、A1-1、およびM1-2の3分子種（寄与率、4.6:1.6:1）によって行われていることが初めて明らかになった。

【まとめ】ラット皮膚組織中にCh 7-OOHが加齢指標物質として蓄積する理由がrGSTA1サブユニットの不在に帰せられることが明らかになった。生体内酸化ストレスにより生成する各種内因性過酸化物およびその強毒性分解産物である4-HNEの解毒代謝におけるモルモット肝GSTの役割を下記に要約図示する(Fig. 1)。

Fig.1. Proposed Scheme for the Role of Guinea Pig Liver GSTs in Scavenging PUFA Hydroperoxides and 4-HNE Formed Thereof

[ABSTRACT]

Cholesterol 7 α - and 7 β -hydroperoxides are mutagenic and cytotoxic steroids existing as minor components in rat skin and regarded as good aging markers in the rat. Rat liver and skin cytosols had high and very low activities of the reduction of cholesterol 7-hydroperoxides to the corresponding steroidal alcohols, respectively, in the presence of GSH. The GSH-dependent reduction of the steroid hydroperoxides in rat liver was catalyzed mainly by GSTs with the subunit A1(2) of the Alpha class, but not catalyzed by any other isoform of GST existing in rat liver. Se-containing GSH peroxidase (Se-GSH Px) also played a partial role, to a lesser extent than rat (r) GSTA1-3, in the GSH-dependent reduction of the hydroperoxides in rat liver cytosol. However, rat skin cytosol contained no detectable level of rGSTsA1-1(2) and A1-3, but contained a very low level of Se-GSH Px. The above facts strongly suggest that the age-dependent linear increase in the dermal levels of the cholesterol hydroperoxides as the aging markers in the rat is mainly responsible for the absence of rGSTs bearing the subunit A1(2) and for the very low level of Se-GSH Px in the skin.

gpGSTA1-1 existed at a concentration of 1% of cytosolic protein in the liver of guinea pigs, which are well known to lack Se-GSH Px in their tissues. A comparative study using rGSTA1-2 and Theta-class rGSTT2-2 indicated gpGSTA1-1 to have the highest GSH Px activity toward cumene hydroperoxide of all known mammalian GSTs and also to have Px activity toward polyunsaturated fatty acid hydroperoxides (PUFA-OOHs) comparable to rGSTT2-2, with the highest activity toward PUFA-OOHs of rGSTs. No detectable level of the GSTA4-4 ortholog highly active toward 4-hydroxy-2(E)-nonenal (4-HNE) was found in the liver of guinea pigs. All gpGST isoforms isolated from hepatic cytosol showed modest GSH-conjugating activity toward 4-HNE.

[References]

- 1) Hayes, J.D. *et al.*, *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Med.*, **30**, 445 (1995).
- 2) Hiratsuka, A. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **265**, 11973 (1990).
- 3) Mannervik, B. *et al.*, *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Med.*, **23**, 283 (1988).
- 4) Hiratsuka, A. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **202**, 278 (1994).
- 5) Stadtman, E.R., *Science*, **257**, 1220 (1992).
- 6) Esterbauer, H. *et al.*, *Free Radic. Biol. Med.*, **11**, 81 (1991).
- 7) Ozawa, N. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **202**, 278 (1994).
- 8) Hiratsuka, A. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **272**, 4763 (1997).
- 9) Hiratsuka, A. *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **354**, 188 (1998).
- 10) Hiratsuka, A. *et al.*, *Anal. Biochem.*, **252**, 229 (1997).