



Title	加齢関連疾患治療薬候補 γ -glutamylcysteine (γ -EC) の大量生産系および精製系の構築
Author(s)	中井, 拓也
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101942
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (中 井 拓 也)

論文題名

加齢関連疾患治療薬候補 γ -glutamylcysteine (γ -EC) の大量生産系および精製系の構築

論文内容の要旨

Glutathione (GSH)は細胞内に最も多く存在するチオール性化合物であり、細胞内の代謝反応における還元力の提供や酸化ストレスの低減、細胞外異物の除去等、多くの重要な生理的役割を果たす¹。細胞内のGSH合成は、 γ -glutamylcysteine ligase (GCL)が触媒するglutamate (Glu)とcysteine (Cys)からの γ -glutamylcysteine (γ -EC)合成と、glutathione synthetase (GS)が触媒する γ -ECとglycine (Gly)からのGSH合成の二段階の反応からなり、第1反応が律速段階である¹。細胞におけるGSH生合成能は老化に伴い低下することが知られており²、多くの疾患の発症・増悪との相関が示されている³。特にミトコンドリアを多く有し酸化ストレスを受けやすい神経細胞のGSH濃度低下がアルツハイマー病などの神経変性疾患を惹起する⁴と考えられる。高齢化社会における加齢関連疾患の予防や治療に対する要求を満たすために、病因となる細胞内GSH濃度低下を防ぐ方法の開発が求められる。

しかしGSHは生体内の多くの組織の細胞においては直接取り込まれないため、細胞外からの投与により細胞内GSH濃度を向上させることはできない。薬物中毒などによる急性的な細胞内GSHの枯渇に対応しN-acetylcysteine (NAC)が投与される例はあるが⁵、慢性的な細胞内GSHの低下に対しては効果が期待できない。これは、老化細胞におけるGSH濃度の低下はGCL活性の低下に起因するため⁶、NAC投与によりCysを供給しても γ -EC合成が進まず十分量のGSH補給に至らないためである。こうした状況を踏まえGSHの細胞内濃度を上昇させる方法として γ -ECの投与が注目されている。 γ -ECはGSが触媒する反応の基質となるが、GCL活性が低下した細胞においてもGSは高い活性を維持しており⁶、投与した γ -ECが直接細胞内に取り込まれるならば細胞内GSH濃度の上昇が期待できる。最近の研究ではヒト臨床試験において γ -ECを経口摂取した健常成人のリンパ球内GSH濃度が上昇することが確認されている⁷。また γ -EC経口投与により、加齢モデルマウスにおいて骨格筋減少や海馬神経細胞減少が抑制されること⁸、 γ -ECの静脈注射により健常マウスの脳、心臓、肺、肝臓、筋肉組織におけるGSHレベルが大幅に上昇すること⁹などが報告されており、投与した γ -ECが中枢神経系を含む全身の細胞内GSH濃度を上昇させると期待できる。

現在 γ -ECの生産は化学合成に依存しているが、安全性や価格、純度等に課題がある。 γ -ECは反応性の高い官能基を複数持つため、選択的な化学反応を行うためには各官能基に対して保護基の導入と脱保護を行う必要があり、工程が複雑となり収率が低下する。このことが最終製品の純度が低いことや高価格であることの理由となっている。さらに化学合成による γ -EC生産はヒトへの適用が認められていないトリフルオロ酢酸(TFA)中で実施されており、ヒトへの適用を目的とする場合、製法の見直しを要する。実際に γ -EC研究に汎用されるSigma-Aldrich社製品は化学合成された γ -EC市販品の代表例であるが、物質質量としての正確な純度を示しておらず、主たる不純物をTFAとしているため、その用途は研究用試薬に限られる。ヒトを対象とした γ -ECの生理活性や動態の解析を進め、医薬品原料や食品成分等としての応用を図るために、安全で高効率低コストの γ -EC大量生産系構築が必要である。

過去に当研究室において、淡水性ラン藻*Nostoc* sp. PCC7120からGSHを γ -ECとGlyに加水分解する新奇酵素NsPCSが見出されている¹⁰。本酵素はセルロース製基材への固定化により容易に再利用可能であり、補因子等を必要とせず100 mMの高濃度GSHを完全に γ -ECとGlyに加水分解するため、高効率・低コストの γ -EC生産方法と期待できる。

本研究では、まずGSH転化率および γ -EC収率を指標とし、5 mLスケールにおいて固定化NsPCSの反応条件最適化を試みた。固定化酵素の反応では遊離酵素に比べて反応速度が小さくなり、これがGSHおよび γ -ECの熱分解を引き起こすと考えられたことから、反応温度を遊離酵素の至適温度である37° Cから25° Cへ下げることにより収率が向上することを明らかにした。また、これまで固定化基材として用いたろ紙よりも機械的強度が大きいセルローススポンジを用いることで、繰返し回数の少ない段階では高い空時収量を達成した。更にセルローススポンジよりもさらに機械的強度が大きい結晶セルロース粉末を基材とした場合、反応速度は低下するものの酵素反応の安定性は更に向上することを明らかにした。セルローススポンジを基材とした場合、市販試薬の価格換算で27.5万円の γ -EC生産に要するコストは1,890円であり、大幅な生産コスト削減が可能であることを示した。また本反応は単純な反応器を用いて25° Cと温

和な条件で低速攪拌により実施できるため、容易に反応のスケールアップが可能と考えられる。

次に実質的な工業生産規模である100 Lスケールへの拡大を志向し、セルローススポンジに固定化したNsPCSによる550 mLスケールでの γ -EC生産を評価した。その結果、550 mL反応においてもGSH転化率100%、推定 γ -EC収率90%が得られることを確認した。この収率は繰返し回分反応2回目においても維持され、550 mLスケールにおいても生産コスト削減が可能な連続使用ができることを示した。本反応では、合計18.5万円の試薬を使用することにより、推定値ではあるが24.7 gの γ -ECを取得した。これは市販試薬の価格に換算すると約2,200万円に相当する。

続いて医薬品原料等への応用に必要の高純度 γ -ECの獲得に向けて、副生成物であるGlyの分離と反応液中に存在するリン酸塩の除去について検討した。その結果、陰イオン交換樹脂カラムを用いることで γ -ECを精製過程での損失なくGlyから完全分離することに成功した。最大の回収率が得られた画分では、精製収率は49%、凍結乾燥後の重量ベースの純度は96%と推定され、 γ -EC研究で汎用されるSigma-Aldrich社製品よりも約1.2倍高い純度であることを確認した。本研究で用いた陰イオン交換樹脂は安価かつ再利用可能なだけでなく、スケールアップに伴う線速度変化を始めとした分離条件変動に対し堅牢であり溶出操作も簡便なため工業規模への応用も容易と考えられる。

上記より γ -EC生産工程において反応収率90%で推定24.7 gの γ -ECを取得でき、続く精製工程において精製収率49%で推定純度96%の高純度 γ -ECを取得できることを確認した。すなわちGSHから高純度 γ -ECを取得する場合、総収率46%で12.1 gの高純度 γ -ECが取得できると推定される。 γ -EC 12.1 gは市販試薬の価格に換算すると1,090万円に相当し、既報の化学合成法でも基質となる物質のみで約60.8万円を要するが¹¹、本生産法に要した試薬価格は約18.5万円であり、精製工程での収率低下を加味しても従来の生産法の約30%のコストで γ -EC生産を可能とした。更に市販の試薬と異なり、有害な溶媒の残留がなく主たる不純物と考えられるリン酸の質量分率も正確に定量できているため、高純度な γ -ECが求められる臨床研究や実際の予防・治療への応用に適していると言える。

更に、本研究で取得した精製 γ -ECを培養神経芽細胞に投与することで細胞内GSH濃度が向上することを明らかにした。続いて取得した精製 γ -ECとCys残基のアミノ基を安定同位体¹⁵Nで標識した γ -ECを細胞外に投与し、質量分析装置を用いて解析することにより、 γ -ECが細胞内に取り込まれてGSH合成の基質になることを初めて示した。以上の結果から、本研究により固定化NsPCSによる γ -EC大量生産系および精製系の基盤を構築し、目的とする高効率で低コスト、さらには高純度で γ -ECを生産できることを示した。さらに、取得した γ -ECが細胞内に取り込まれ、GSH濃度を向上させることを確認した。以上から、本研究により γ -ECの工業生産への展開と加齢関連疾患の予防・治療研究の基盤となる有用な知見が得られたと言える。

1. Alanazi, A. M., Mostafa, G. A. E. & Al-Badr, A. A. Glutathione. *Profiles Drug Subst. Excipients Relat. Methodol.* **40**, 43-158 (2015).
2. Lapenna, D. Glutathione and glutathione-dependent enzymes: From biochemistry to gerontology and successful aging. *Ageing Res. Rev.* **92**, 102066 (2023).
3. Forman, H. J. & Zhang, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 689-709 (2021).
4. Aoyama, K. Glutathione in the brain. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
5. Raghu, G. *et al.* The Multifaceted Therapeutic Role of N-Acetylcysteine (NAC) in Disorders Characterized by Oxidative Stress. *Curr. Neuropharmacol.* **19**, 1202-1224 (2020).
6. Franco, R., Schoneveld, O. J., Pappa, A. & Panayiotidis, M. I. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch. Physiol. Biochem.* **113**, 234-258 (2007).
7. Ferguson, G. & Bridge, W. Glutamate cysteine ligase and the age-related decline in cellular glutathione: The therapeutic potential of γ -glutamylcysteine. *Arch. Biochem. Biophys.* **593**, 12-23 (2016).
8. Lu, S. *et al.* γ -Glutamylcysteine ameliorates D-gal-induced senescence in PC12 cells and mice via activating AMPK and SIRT1. 7560-7571 (2022) doi:10.1039/d2fo01246d.
9. Le, T. M. *et al.* γ -Glutamylcysteine ameliorates oxidative injury in neurons and astrocytes in vitro and increases brain glutathione in vivo. *Neurotoxicology* **32**, 518-525 (2011).
10. Tsuji, N. *et al.* Comparative analysis of the two-step reaction catalyzed by prokaryotic and eukaryotic phytochelatase synthase by an ion-pair liquid chromatography assay. *Planta* **222**, 181-191 (2005).
11. Liu, Y. *et al.* Visualizing glioma margins by real-time tracking of γ -glutamyltranspeptidase activity. *Biomaterials* **173**, 1-10 (2018).

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (中 井 拓 也)			
	(職)		氏 名
論文審査担当者	主 査	教授	荒井 雅吉
	副 査	教授	小比賀 聡
	副 査	教授	堤 康央

論文審査の結果の要旨

γ -グルタミルシステイン (γ -EC) は、抗酸化作用や解毒機能を有するグルタチオン (GSH) の前駆体であり、その安定供給は医薬品や健康食品分野において極めて重要である。特に、加齢関連疾患の予防や治療のために、高純度の γ -EC を安価に供給できる技術の確立は、社会的にも大きな意義を持つ。

申請者は、GSH を γ -EC とグリシン (Gly) に加水分解する、淡水性ラン藻 *Nostoc sp.* PCC7120 由来の phytochelatase 様酵素 (NsPCS) を固定化し、高効率かつ低コストで γ -EC を大量生産・精製する方法論を確立した。具体的には、固定化基材や反応条件の最適化を行うとともに、安価な陰イオン交換樹脂カラムを用いることで、 γ -EC の損失を防ぎつつ、副生成物である Gly を効率的に除去することに成功した。そして、本研究で確立した大量生産・精製法により、反応収率90%、精製収率49%で、凍結乾燥後の重量ベースで純度96%の γ -EC を得ることができた。これは、市販の研究用製品と比較して約1.2倍高い純度を誇るだけでなく、約6割のコストでの提供が可能であると考えられる。さらに、工業生産規模である100 Lスケールでの生産も実現可能であると予測される。これらの成果に加えて、申請者は、高純度 γ -EC とシステイン残基のアミノ基を安定同位体¹⁵Nで標識した γ -EC が、培養神経芽細胞内に取り込まれ、GSH 生合成に利用されることを世界で初めて明らかにし、細胞内の GSH 濃度を向上させる効果があることを確認した。

本研究で構築した γ -EC の大量生産・精製法は、学術的な新規性が高く、今後、健康食品や医薬品開発分野において広く応用される可能性がある。また、加齢に伴う酸化ストレスの増加がさまざまな疾患の発症に関与していることが知られており、 γ -EC の活用によって健康寿命の延伸や疾患予防への貢献が期待される。

以上、本研究成果は、学術的価値が高く、社会貢献の観点からも意義深いものであることから、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。