



Title	γ -Glutamylcysteineの効率的な生産系の開発と glutathione代謝酵素に対する反応性の解析
Author(s)	村岡, 未彩
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/89571
rights	
Note	

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 (村岡 未彩)

論文題名

 γ -Glutamylcysteineの効率的な生産系の開発とglutathione代謝酵素に対する反応性の解析

論文内容の要旨

γ -グルタミルシステイン (γ -EC) はglutamate-cysteine ligase (GCL) がATP依存的に、L-グルタミン酸 (Glu) を γ 位でL-システイン (Cys) に結合させることで生成されるジペプチドである。この反応はグルタチオン (GSH) 生合成の2段階の反応のうちの第1段階であり、第2段階では、glutathione synthetase (GS) により、 γ -ECとグリシン (Gly) からGSHが生成される。GSH生合成系の律速はこの第1段階の反応にあり、GCLの活性は細胞内のGSH濃度によって巧妙に調節されており、GSHのホメオスタシス維持を担っている。一方、第2段階の反応を触媒するGSは常時高い活性を維持しており、第1反応で合成された γ -ECは直ちにGSHへ変換される。このため、通常の生理条件では細胞中の γ -EC濃度は極めて低い状態にある。 γ -ECは、GSHと同様にGluが γ 位でCysと結合した構造を持つことから、GSHと同等の抗酸化機能を有すること、さらに細胞内に取り込まれればGSHの供給源となることが期待され、実際に γ -ECの機能に関する研究が行われるようになってきた。しかし、その生理機能の詳細に関してはほとんど明らかになっていない。

GSHは生体内で重要な機能を担うことから、その代謝調節や細胞内のGSHの機能を直接強化するための研究が数多く行われてきた。しかしこれまでの研究結果から、外部からのGSHの投与によって細胞内のGSH濃度は大きく変化しないことが示されている。これは、一部の細胞種を除いてGSHを細胞内に取り込むトランスポーターが存在せず、また細胞内のGSH濃度は一般的に1~10 mMと高濃度であるのに対し、細胞外では2~10 μ Mであり大きな濃度勾配があるため、GSHが細胞外から細胞内に積極的に取り込まれ難いことが理由として挙げられる。そこで、細胞内のGSH濃度を増加させるための手段として、細胞内に取り込まれCysに変換されるN-acetyl cysteine (NAC) を投与し、GSH生合成の基質となるCysの濃度を上昇させる研究が行われた。一方で、老化や加齢に伴って罹患率が上昇する慢性疾患等においては、細胞内のGSHの濃度が常時低い状態にあることが知られている。近年このようなGSH濃度の低下は、GCLの発現異常や活性低下に起因することを示唆する研究が報告されるようになった。通常健全な細胞では、GSHが細胞内で抗酸化機能を発揮することによって濃度が低下した場合、GCLの発現が促進されて迅速にGSHが供給されるが、老化した細胞や慢性疾患の細胞においてはこのGCL発現系が異常をきたし、GSHが十分に補給できず、ホメオスタシスの維持が困難となることが示唆されている。この場合、NACを投与して細胞内のCys濃度が上昇しても、GCLが正常に機能しないために γ -ECへの変換が抑制されるので、健全な細胞のようなGSHの補給は期待できないと考えられる。外部から投与した γ -ECが細胞内に取り込まれれば、GCLが触媒する第1反応を経ずにGSが触媒する第2反応によりGSHへ変換されるので、このようなGCLの活性調節機構が破綻している老化した細胞や慢性疾患の細胞においても、GSHのホメオスタシスの維持ができると考えられる。実際に、近年細胞や個体レベルで外部からの γ -ECの投与において細胞内のGSHが上昇することや、抗酸化機能が認められたとする研究報告が認められるようになり、このような外部からのGSH投与では期待できない作用が注目されている。しかしながら、未だ γ -ECの分子レベルでの作用機構や生体内での動態についてはほとんど研究が行われておらず、今後の詳細な解析が待たれるところである。こういった研究が進まない一因として、 γ -ECの安定な供給が困難であることが挙げられる。加えて、 γ -ECの医薬品や食品、化粧品の機能性成分としての有用性が認められたとしても、現状の製造方法では高コストのために製品化に向けた工業生産は困難と言える。

γ -ECは前述した通り細胞内における濃度が非常に低く5~10 μ M程度であることから、GSHや主要なアミノ酸の工業生産に用いられている発酵法による生産が難しく、試薬として市販されている γ -ECは化学合成法によってGluとCysから製造されている。したがって、供給量はGSHに比べて圧倒的に少なく、試薬レベルでの単位重量当たりの価格はGSHの500~1,000倍となる。

そこで本研究では、まず γ -ECの安価で安定な供給を目指し、GSHを γ -ECへ変換することができるラン藻由来の酵素、NsPCSを用いた新規生産系の構築を図った。次に、これまでほとんど知見がない γ -ECの分子レベルでの作用

機構や動態の解明に向けた基礎研究として、細胞内外のGSHの代謝酵素、特にその機能と細胞内濃度調節に関わる酵素に対する反応性を解析した。

第一章においては、NsPCSの反応条件の最適化を行い、また本条件において100 mMという高濃度のGSHを高収率で γ -ECへ変換できることを明らかにした。NsPCSは、補因子等の添加を必要とせず、また生成物阻害を起さずにGSHを完全に γ -ECへ変換できることから、本研究で得られた知見は本酵素を用いたGSHを原料とする γ -ECの新たな生産系の構築に向けて、非常に有用な知見であると考えられる。

そこで第二章においては、工業生産に堪えるGSHを原料とする γ -EC生産を可能にするために、固定化NsPCSを用いた生産系の構築を図った。その結果、セルロースを担体としたアミド結合法を用いた場合に、NsPCSの活性を維持したまま安定に固定化できることを明らかとした。さらにセルロースシートに固定化したNsPCSは担体として、遊離酵素と同様に液体窒素中で安定に保存できること、活性を低下させることなく少なくとも5回のバッチ式による繰り返し使用によって100 mMのGSHを γ -ECへ変換できること、カラム型セルロースモノリスに固定化したNsPCSは、少なくとも10日間連続して安定に100 mMのGSHを γ -ECへ変換できることを確認した。いずれの生産方法においても高い生産性と容積効率が得られ、安価で安定な γ -EC生産系として実用的な生産への応用が期待できる。

第三章では、 γ -ECの生体内での作用や動態に関する研究の一環として、GSHの機能と細胞内濃度調節に関わるglutathione peroxidase (GPx)、glutathione reductase (GR)、glutathione-S-transferase (GST)及び γ -glutamyl transferase (GGT)に対する反応性の解析を行った。その結果、 γ -ECは細胞内でGSHを基質として活性酸素の除去を担うGPx及びGSH抱合による異物代謝を担うGSTの基質となるが、酸化型 γ -ECは細胞内で酸化型GSHを還元型に戻す反応を担うGRの基質とならないことを確認した。さらに、 γ -ECと酸化型 γ -ECは、GSHと酸化型GSHの γ -Glu-Cys結合を加水分解するGGTの良好な基質となることを初めて明らかにした。これらの結果から、外部から投与した γ -ECは、血漿中から細胞内へ取り込まれてGSH濃度を上昇させるだけでなく、血漿中でGGTにより分解されてGluとCysとなり、これらが細胞内に取り込まれてGSHの生合成に用いられることにより、GSHの機能を補完・強化し、さらに細胞内のGSHのホメオスタシスを維持する働きを示すと考えられる。

今後本研究で得られた知見をもとに γ -ECの安価で安定な供給が実現するとともに、その分子レベルでの作用機構や動態の解析が進むことにより、優れた抗酸化機能を有する物質として、老化防止や慢性疾患の予防や治療に向けた医薬品や、食品、化粧品等へ広く利用されることが期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (村 岡 未 彩)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 荒井 雅吉
	副 査	教授 堤 康央
	副 査	准教授 岡田 欣晃

論文審査の結果の要旨

γ -グルタミルシステイン (γ -EC) は glutamate-cysteine ligase (GCL) が ATP 依存的に、L-グルタミン酸 (Glu) を γ 位で L-システイン (Cys) に結合させることで生成されるジペプチドである。この反応はグルタチオン (GSH) 生合成の第 1 段階でもあり、さらに第 2 段階で、glutathione synthetase (GS) が γ -EC とグリシン (Gly) を結合させることで GSH が生成される。また、GSH 生合成の律速はこの第 1 段階の反応であり、GCL の活性は細胞内の GSH 濃度による制御を受けることから、GCL は、GSH のホメオスタシス維持の役割を担っている。一方、第 2 段階の反応を触媒する GS は常時高い活性を維持しており、第 1 反応で合成された γ -EC は直ちに GSH へ変換される。このため、通常の生理条件では細胞中の γ -EC 濃度は極めて低い状態にある。 γ -EC は、GSH と同様に Glu が γ 位で Cys と結合した構造を持つことから、GSH と同等の抗酸化機能を有すること、さらに細胞内に取り込まれれば GSH の供給源となることが期待されており、近年 γ -EC の機能に関する研究は注目されている。しかし、その生理機能の詳細に関してはほとんど明らかになっていない。

GSH については、生体内での生理機能に関する研究、その代謝調節や細胞内の GSH の機能を直接強化するための研究が行われてきた。特に、老化や加齢に伴って罹患率が上昇する慢性疾患等においては、細胞内の GSH の濃度が常時低い状態にあることが知られていることから、老化した細胞や慢性疾患の細胞における GSH 生合成に関する研究、GSH によるレドックスホメオスタシスの維持に関する研究が精力的に進められている。しかしこれまでの研究結果から、外部からの GSH の投与では、細胞内の GSH 濃度は大きく変化しないことが示されている。これは、一部の細胞種を除いて GSH を細胞内に取り込むトランスポーターが存在しないことに加え、細胞内の GSH 濃度は一般的に 1~10 mM と高濃度であるのに対し、細胞外では 2~10 μ M と大きな濃度差があることが理由として考えられている。また、細胞内の GSH 濃度を増加させるための手段として、細胞内に取り込まれ Cys に変換される *N*-acetyl cysteine (NAC) を投与し、GSH 生合成の基質となる Cys の濃度を上昇させる研究が行われている。しかし、老化した細胞や慢性疾患の細胞では、GCL の発現異常や活性低下が報告されており、NAC の投与による GSH の補給とレドックスホメオスタシスの維持への期待は低い。

一方、 γ -EC については、外部から投与した γ -EC が細胞内に取り込まれた場合には、GCL が触媒する第 1 反応を経ずに GS が触媒する第 2 反応により GSH へ変換されるので、老化した細胞や慢性疾患の細胞においても、GSH のホメオスタシスの維持が期待できる。実際に、近年、動物への γ -EC の投与により、細胞内の GSH 濃度が上昇することや、抗酸化機能が改善することも報告されている。さらに γ -EC 自身が有するレドックスホメオスタシスの維持も期待される。しかし前述の通り、未だ γ -EC の分子レベルでの作用機構や生体内での動態については、ほとんど研究が行われていない。この一因として、 γ -EC の安定な供給が困難であることが挙げられる。加えて、 γ -EC の医薬品や食品、化粧品の機能性成分としての有用性が認められたとしても、現状の化学合成による製造方法では高コストのために製品化に向けた工業生産は困難と言える。 γ -EC は前述した通り細胞内における濃度が非常に低く 5~10 μ M 程度であることから、GSH や主要なアミノ酸の工業生産に用いられている発酵法による生産は難しいが、発酵生産により大量に入手可能な GSH を原料として γ -EC を生成できる酵素があれば γ -EC 生産系の構築に有用であると考えられる。

申請者はこれまで、光合成生物の環境ストレス応答について研究を行ってきた。高等植物などの真核光合成生物は有害重金属を無毒化する手段として、GSH を基質として重金属キレート能を有するファイトケラチン (PC) を

合成することが知られている。このPC合成酵素 (PCS) はCdなどの特定の有害重金属によって活性化され、GSHから γ -ECを生成し、その γ -ECをGSHと結合させる二段階目の反応、さらに続く重合反応によってPCを合成する。PCSはこれまで原核生物には存在しないと考えられていたが、申請者らのグループにおいて原核生物であるラン藻

(*Nostoc* sp. PCC 7120) に高等植物のPCS遺伝子と高い相同性を示す遺伝子が存在することを見出した。当該遺伝子がコードするPCS様タンパク質 (NsPCS) はPC合成反応の1段階目の反応のみを触媒し、重金属による活性化や補酵素、補因子を必要とせず、GSHから γ -ECを合成する。本研究において申請者は、これらの知見を基盤として、 γ -ECの安価で安定な供給を指向した、NsPCSを活用する新規生産系の確立を行った。さらに、これまでほとんど知見がない γ -ECの分子レベルでの作用機構や動態の解明に向けた基礎研究として、細胞内外のGSHの代謝酵素、特にその機能と細胞内濃度調節に関わる酵素に対する反応性を解析した。

γ -ECの新規生産系の確立では、第一章として、NsPCSの反応条件の最適化を行い、100 mMという高濃度のGSHを高収率で γ -ECへ変換することに成功した。NsPCSは、補因子等の添加を必要とせず、また生成物阻害を起こさずにGSHを完全に γ -ECへ変換できることから、本研究で得られた知見は本酵素を用いたGSHを原料とする γ -ECの新たな生産系の構築に向けて、非常に有用な知見と考えられた。

第二章においては、工業生産に堪えるGSHを原料とする γ -EC生産を可能にするために、固定化NsPCSを用いた生産系の構築を検討した。その結果、セルロースを担体としたアミド結合法を用いた場合に、NsPCSの活性を維持したまま安定に固定化できることを明らかとした。さらにセルロースシートに固定化したNsPCSは、担体として、遊離酵素と同様に液体窒素中で安定に保存できること、バッチ式生産による繰り返し使用実験では、少なくとも5回まで、100 mMのGSHを γ -ECへ変換できること、カラム型セルロースモノリスに固定化したNsPCSでは、少なくとも10日間連続して安定に100 mMのGSHを γ -ECへ変換できることを明らかにした。いずれの生産方法においても高い生産性と容積効率が得られ、安価で安定な γ -EC生産系として実用的な生産への応用が期待できる。

第三章では、 γ -ECの生体内での作用や動態に関する研究の一環として、GSHの機能と細胞内濃度調節に関わるglutathione peroxidase (GPx)、glutathione reductase (GR)、glutathione-S-transferase (GST)及び γ -glutamyl transferase (GGT)に対する反応性の解析を行った。その結果、 γ -ECは、細胞内でGSHを基質として活性酸素の消去を担うGPxおよびGSH抱合による異物代謝を担うGSTの基質となることを初めて見出した。また、酸化型 γ -ECは細胞内で酸化型GSHを還元型に戻す反応を担うGRの基質とならないこと、さらに、 γ -ECと酸化型 γ -ECは、GSHと酸化型GSHの γ -Glu-Cys結合を加水分解するGGTの良好な基質となることも明らかにした。これらの結果から、外部から投与した γ -ECは、血漿中から細胞内へ取り込まれてGSH濃度を上昇させるだけではなく、血漿中でGGTにより分解されてGluとCysとなり、これらが細胞内に取り込まれてGSHの生合成に用いられることにより、GSHの機能を補完・強化し、さらに細胞内のGSHのホメオスタシスを維持する働きを示すと考えられる。

本研究で得られた成果は、 γ -ECの安価で安定な供給を実現するとともに、これまで研究が皆無であった、 γ -ECの分子レベルでの作用機構や動態の解析研究の基礎となるものである。さらに、優れた抗酸化機能を有する物質として、老化防止や慢性疾患の予防や治療に向けた医薬品や、食品、化粧品等への応用を強く示唆する内容を含んでおり、その社会的な波及効果も大きい。

上記のように新規知見が得られ、これらは学術的価値も高く、また社会貢献につながるものと評価できることから、以上の研究結果は、博士(薬学)の学位論文に値するものと認める。