



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

博士論文

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

2022 年

大阪大学大学院薬学研究科

村岡 未彩

目次

略語表

結論 -1

第一章

第一節 緒言 -7

第二節 実験材料及び実験方法 -9

第三節 結果 -12

第四節 考察 -16

第二章

第一節 緒言 -17

第二節 実験材料及び実験方法 -18

第三節 結果 -22

第四節 考察 -27

第三章

第一節 緒言 -30

第二節 実験材料及び実験方法 -32

第三節 結果 -35

第四節 考察 -40

結論 -43

謝辞 -45

参考文献 -46

略語表

GSH:	グルタチオン
Cys:	L-システイン
GCL:	glutamate-cysteine ligase
Glu:	L-グルタミン酸
γ -EC:	γ -グルタミルシステイン
GS:	glutathione synthetase
Gly:	L-グリシン
GSSG:	酸化型グルタチオン
GS-X:	グルタチオン包合体
GR:	glutathione reductase
GGT:	γ -glutamyltransferase
DP:	dipeptidase
GCLC:	GCL catalytic subunit
GCLM:	GCL modifier subunit
NAC:	N-acetyl cysteine
PCS:	phytochelatin synthase (フィトケラチン合成酵素)
PC:	phytochelatin (フィトケラチン)
TB:	Terrific Broth
IPTG:	イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド
EDTA:	エチレンジアミン四酢酸
DTT:	ジチオトレイトール
TCEP:	トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン
BSA:	ウシ血清アルブミン
β -ME:	β -メルカプトエタノール
RA:	相対活性
DSC:	N,N-ジスクシンイミジルカルボネート
DMAP:	N,N-ジメチル-4-アミノピリジン
GPx:	glutathione peroxidase
GGsTop:	アミノ-4-[[3-(カルボキシメチル)フェニル](メチル)ホスホノ}ブタン酸

結論

グルタチオン(GSH)(Fig.1A(a))は、生体内で最も豊富な低分子チオールであり、原核生物から真核生物まで広く存在し、抗酸化防御や異物除去に重要な役割を果たしている[1]。例えば、我が国では白内障の治療薬や解毒剤と言った医薬品として使用されているほか、活性酸素除去を期待する機能性成分として食品や化粧品へ添加されている。GSH は、生体内で L-システイン(Cys)から ATP 依存的に 2 段階の反応で生合成される(Fig.1B)[2]。第 1 段階では、glutamate-cysteine ligase(GCL)により、Cys と L-グルタミン酸(Glu)から γ -グルタミルシステイン(γ -EC)(Fig.1A(b))が生成される。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[3]。GSH 生合成系の律速は GCL が触媒する第 1 反応にあり、GCL の活性は細胞内の GSH 濃度によって巧みに調節されており、GSH のホメオスタシス維持を担っている。一方、第 2 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。合成された GSH は細胞内で活性酸素種や求電子的化合物(X)と反応し、自身は酸化型グルタチオン(GSSG)やグルタチオン包含体(GS-X)となる(Fig.1B)。GSSG は、NADPH を補酵素として glutathione reductase(GR)によって GSH へと還元され再利用される。これらの GSH とその誘導体(GSSG および GS-X)は、ABC トランスポーターによって ATP を使って細胞外へと排出され、細胞外に出た GSH は、そのままでは再び細胞内に取り込まれにくいと考えられる。多くの細胞は、細胞膜の外側に結合した γ -glutamyltransferase(GGT)を持ち、これが細胞外に存在する GSH とその誘導体の構成アミノ酸への分解と再取り込みの初発段階の反応を担う。すなわち、細胞外の GSH は GGT によって γ -グルタミル結合が切断され Glu と Cys-Gly に分解されたのち、dipeptidase(DP)によってさらに加水分解を受けて Glu、Cys、Gly となり、それぞれのアミノ酸はトランスポーターを介して細胞内に取り込まれて、GSH の生合成に用いられる。細胞内外の GSH 濃度は、その合成、消費、輸送および再生される量、すなわち細

胞内の生理状態によって決まる。GSH の生合成については、利用可能な基質、特に Cys 濃度と GCL の発現量ならびにその活性によって調節されている。GCL は触媒作用を担う GCL catalytic subunit (GCLC)と、調節作用を担う GCL modifier subunit (GCLM)からなる二量体であり、GCLC と GCLM はジスルフィド結合で結合しているが、それぞれをコードする遺伝子は異なる染色体上に存在している。GCLC が全ての触媒作用を担い、また、GSH によるフィードバック阻害を受けるのも GCLC である。一方、酸化ストレス下などで還元型の GSH 量が低下すると GCLC 遺伝子の転写が促進され、発現量の増加により GSH 生合成が促進される。このように、GCL の活性は、GSH のホメオスタシス維持のために巧妙に調節されている[4](Fig.1B)。

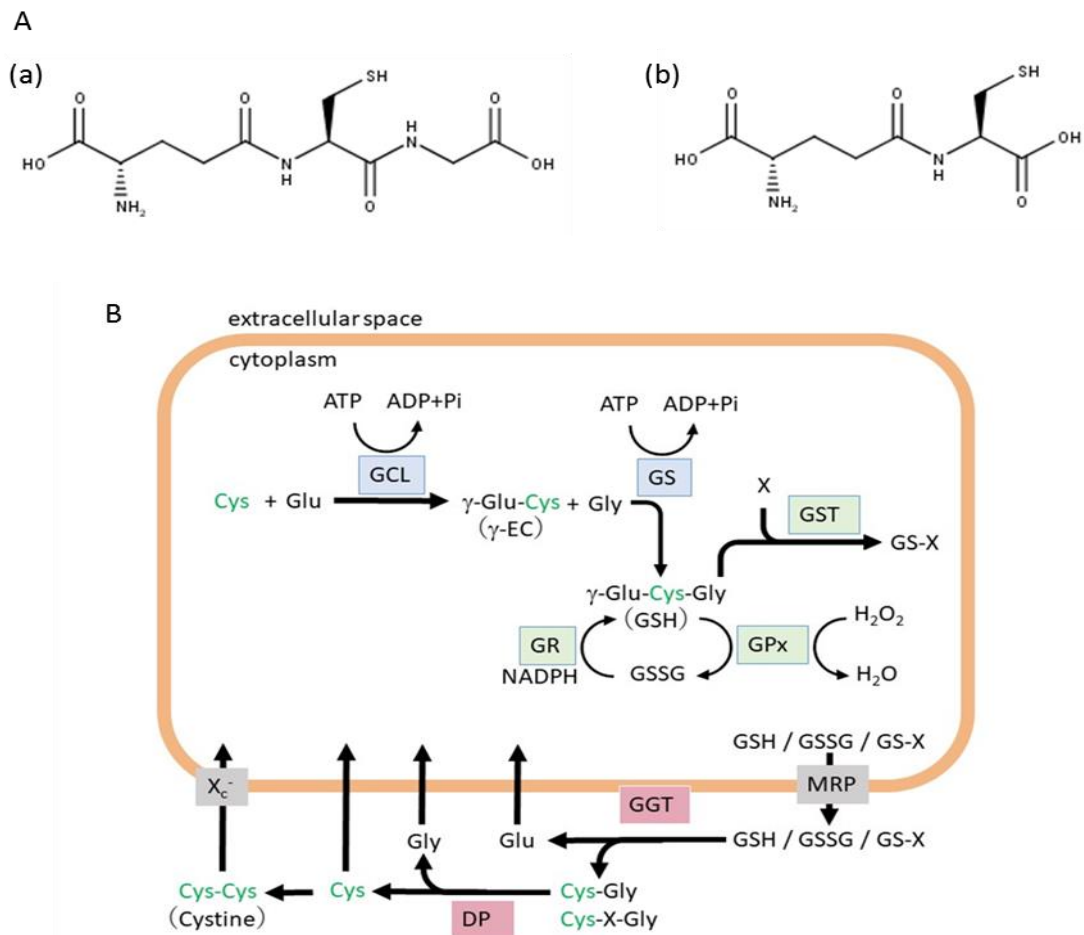


Fig. 1 (A) Structure of (a)GSH and (b) γ -EC. (B) Intracellular and extracellular (plasma) metabolism of glutathione and the enzymes responsible for it.

GSH は生体内で重要な機能を担うことから、その代謝調節については古くから数多くの研究が行われてきた。また、細胞内の GSH の機能を直接強化するための研究、特に外部から GSH が医薬品や食品、化粧品の機能性成分として生体内に入った場合の動態や、抗酸化制御や異物除去の機能に関する研究も盛んに行われている。既に、白内障治療薬[5]として眼球に対する局所的投与による抗酸化作用や、消化管における異物抱合による解毒作用[6]を期待して医薬品として利用されているが、これまでの多くの研究結果から、GSH の外部からの投与によって細胞内の GSH 濃度は大きく変化しにくいことが示されている[7][8]。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なく、また細胞内の GSH 濃度は一般的に 1~10 mM であるのに対し、細胞外では 2~10 μ M と大きな濃度勾配があるため、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 に変わる N-acetyl cysteine(NAC)を投与し、細胞内で GSH 生合成の基質となる Cys 濃度を上昇させる研究が行われてきた[9][10](Fig.2)。GSH 生合成は、細胞内の Cys 濃度と GCL の活性に影響されると考えられるので、細胞内の Cys 濃度の上昇により GSH 生合成が促進される可能性はあるが、Cys は哺乳類では肝臓において容易にメチオニンからの変換によって供給されることから、例えばよく知られる過剰投与されたアセトアミノフェンの解毒に Cys が大量に消費されるような場合な稀なケース [11]以外は、Cys 濃度が GSH の生合成量に大きな影響を及ぼすとは考え難い[12]。したがって、NAC の投与による細胞内の Cys 濃度の上昇は、GSH 生合成の促進に大きく寄与することはないと考えられる。

老化やアルツハイマー型認知症などのコンフォメーション病に分類される慢性疾患等においては、細胞内の GSH 濃度が低下することが知られている[13]。老化の予防やこのような疾患の治療法の開発において重要な知見となることから、このような現象について多くの解析研究が行われるようになったが、未だ明らかになっていない点が多い。しかしながら、近年このような GSH 濃度の低下は、GCL の発現異常[14][15]や活性低下[16]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[17]。前述したように GCL の発現は細胞内の GSH 濃度によってフィードバック

調節を受けることが知られている。通常の健全な細胞では、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、そのホメオスタシス維持のために GCL の発現が促進されて迅速に GSH が供給される[18]が、老化した細胞や慢性的疾患の細胞においてはこの GCL 発現系が異常をきたし、GCL 活性が上昇せず GSH の補給が十分にできなくなることが示唆されている[17]。そのため、一過性の中毒症のような場合はその効果が期待できる先の NAC 投与に関しても、老化した細胞や慢性疾患の細胞では GCL による Cys の γ -EC への変換が抑えられるので、十分な GSH の補給は期待できないと考えられる。一方で、GCL の合成産物である γ -EC は、直ちに GS によって GSH へ変換されるので、外部から投与した γ -EC が細胞内に取り込まれるとすれば、細胞内の Cys 濃度や GCL の活性に関わらず GSH を補給できるので、老化や慢性疾患によって GCL の活性調節が破綻した細胞でも GSH の補給とホメオスタシスの維持に有効であると考えられる。実際に、近年 γ -EC のこういった機能に関する研究が徐々に増加しており、その GSH 投与にはない有効性が注目されている。

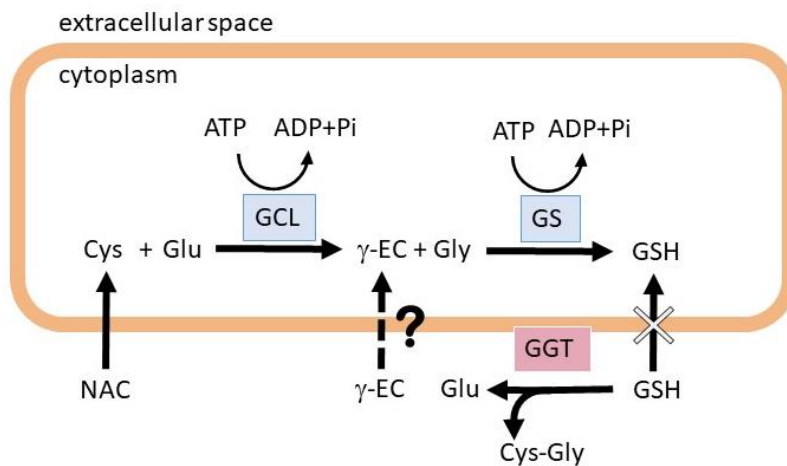


Fig.2 Schematic diagram of cellular uptake of GSH and its precursors when administered externally.

γ -EC は γ -グルタミル結合と Cys 残基から構成されることから、構造的には GSH と同様の抗酸化機能を持つと考えられている[19]。例えば、GS 欠損症患者の培養線維芽細胞は、GSH 濃度は非常に低い代わりに γ -EC が蓄積され、酸化ストレスに対する防御において GSH の機能を補うこと

が報告されている[20]。また、 γ -EC をヒトに経口投与した場合にリンパ球の GSH 濃度が上昇したことから[21]、実際に生体内で γ -EC が GSH へ変換されることも示されている。さらに、ラットの海馬がてんかん重積状態に陥った際に外部から投与した γ -EC が神経保護機能を発揮し、これを改善したという報告もある[22]。

GSH を外部から投与した場合、吸収されて血漿中に至ると直接細胞内へと取り込まれるかわりに細胞表層に存在する GGT 等によって構成アミノ酸へ分解され、これらが細胞内に取り込まれて GSH の生合成に使われることが期待できる。しかし、GGT による分解産物である Cys-Gly は強いプロオキシダント効果を有することが知られており、高濃度存在することで却って活性酸素の発生によって細胞に傷害を与える恐れがある[23]。したがって、外部からの GSH 投与については適切な濃度管理が必要となる。一方、 γ -EC については外部から投与した場合の細胞内外での動態は未だ明らかではないが、仮に血漿中で GGT によって分解された場合も Glu と Cys を生じるのみで、GSH のように Cys-Gly の生成によるプロオキシダント効果は考慮する必要はなく、生体内物質であることから高濃度での使用が可能となる。

これらのこれまでの報告と我々の研究から得られた知見から、 γ -EC は GSH と同程度の抗酸化機能を有することに加え、細胞内に取り込まれて GSH 濃度を上昇させるという GSH にはない機能を有すること、さらに GSH で懸念されるプロオキシダント効果を有する Cys-Gly を生成しないことから、GSH よりも優れた機能を有する物質として、医薬品や食品、化粧品の機能成分としての応用が期待できる。しかしながら、 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[24]、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。供給量も GSH に比べて圧倒的に少なく、試薬レベルの価格は 100 mg で約 90,000 円であり、キロ単位での購入が可能な GSH と比較すると単位重量当たりの価格では 500~1,000 倍となる。

先に述べたとおり、 γ -EC は有用かつ安全な高機能性物質であり、特に老化や慢性疾患におい

では GSH よりも優れた機能が期待できるが、未だ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。また、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、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が困難となる。

そこで本研究では、当研究室において世界で初めて発見した先の GSH 生合成系の第2段階の逆反応を触媒する酵素 NsPCS を利用した γ -EC の安定かつ安価な新規生産方法の確立に向けて、NsPCS の酵素工学的な解析と反応条件の最適化、さらには工業生産に適した固定化 NsPCS による γ -EC の安定生産プロセスの構築を行った。加えて、これまでほとんど知見がない γ -EC の生体内での動態と機能の分子レベルでの解析に向けた基礎研究として、GGT を始め細胞内外の GSH の代謝酵素、特にその機能と細胞内濃度維持に関わる酵素に対する γ -EC の反応性を解析した。これらの研究において、新規の学術的価値の高い結果を得たので、ここに報告する。

本論

第一章 γ -EC の生産系の確立に向けた NsPCS の酵素工学的な解析と反応条件の最適化

第一節 緒言

本章では、NsPCS を用いた γ -EC の安価で安定な生産系の確立に向けて、NsPCS の酵素工学的な解析と反応条件の最適化を行った。

フィトケラチン合成酵素 (phytochelatinsynthase・PCS) は、glutamylcysteine-dipeptidyl-(trans) peptidase (EC 2.3.2.15) であり、高等植物、緑藻、真菌などの真核生物に広く存在している。一方、哺乳類には存在せず、またラン藻や細菌などの原核生物については、真核生物の PCS 遺伝子のホモログが数例報告されているのみである[25]。PCS は、GSH を基質とする、重金属結合能を有し、有害重金属を無毒化するフィトケラチン (phytochelatins・PC) を合成する反応を触媒する酵素[26]であり、Fig.3 のように本来は多機能酵素として 2 段階の反応を触媒する。初期反応では、GSH の Cys-Gly 間のペプチド結合を切り、 γ -EC と Gly を生成する。この反応が GSH 生合成系の GS で触媒される最終反応 (第2反応) の逆反応である。続いて γ -EC 残基を GSH の N 末端側に結合させ、 $(\gamma\text{-EC})_2\text{-Gly}$ を生成する。これが最も重合度が小さいフィトケラチンであり、PC₂ と呼ばれる。この 2 段階目の PC₂ の N 末端に初期反応で生成した γ -EC を結合させることで PC₃ が生成され、以下同様な反応が繰り返されて γ -EC と PC_n から PC_{n+1} が生成される。通常の生理条件下では、n が 2~4 のフィトケラチンが大部分を占める。これらの反応には活性化因子として重金属の存在が必須であり、特にカドミウムによって強く活性化されることが知られている[27]。生物の中でカドミウムによって活性化される酵素は極めて珍しく、その活性化機構に興味を持たれるが、未だ構造解析が完了しておらず、分子レベルでの解明はできていない。我々は、光合成生物のストレス応答の機能進化プロセスの解析研究の一環として行った原核生物における PCS ホモログの探索により、淡水性ラン藻 *Nostoc* sp. Pasteur Culture Collection

(PCC) 7120 において高等植物シロイヌナズナの PCS1 (AtPCS1、Accession No.At5g44070) の遺伝子の塩基配列と 36%の相同性を有する遺伝子 alr0975 を発見した[28]。本遺伝子がコードする NsPCS と命名したタンパク質は真核生物 PCS の N-末端ドメインのみからなり、その機能を解析したところ真核生物 PCS が触媒する初発反応である GSH を γ -EC と Gly に分解する活性のみを示した。さらにこの反応は重金属非存在下でも進行した[29][30]。

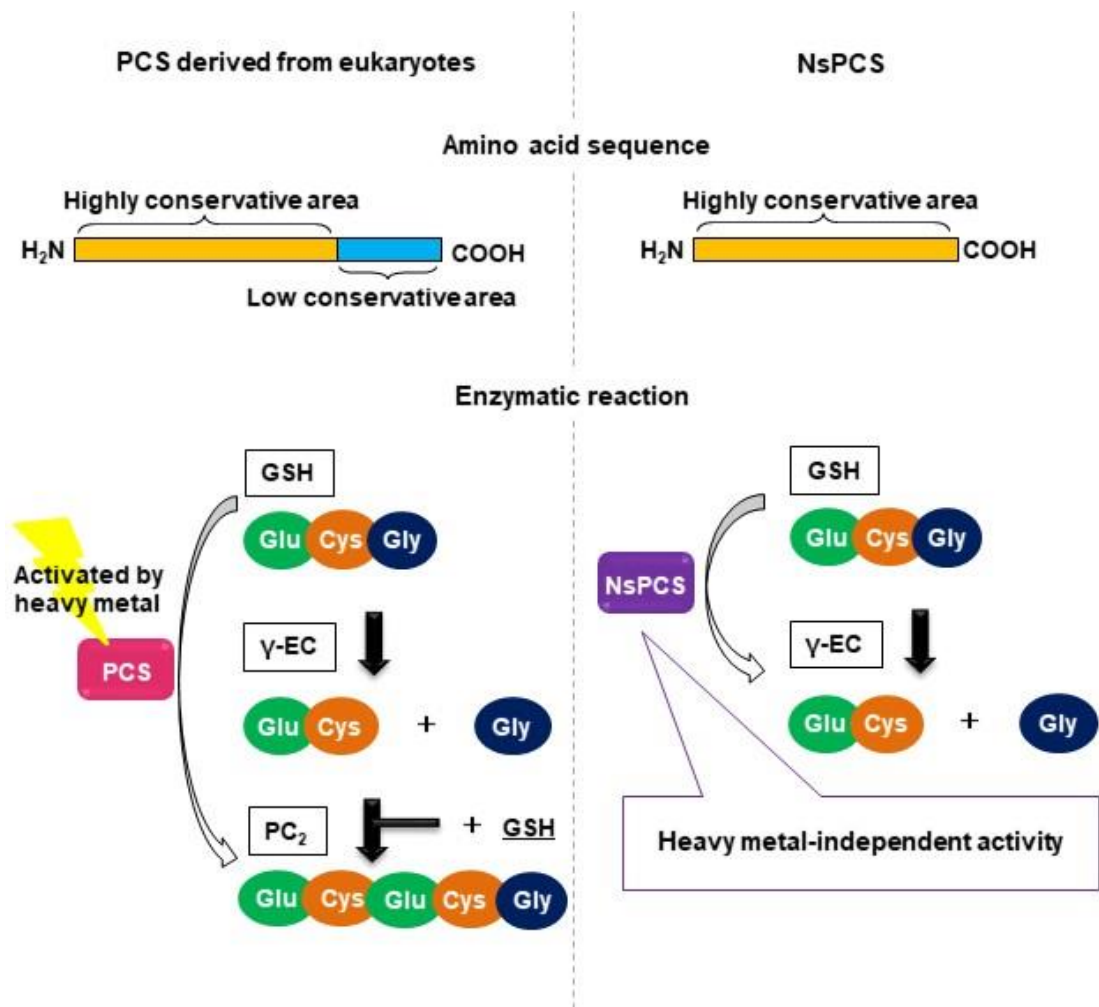


Fig. 3 Comparison of amino acid sequences and enzymatic reactions between eukaryotic PCS and NsPCS.

γ -EC の生産については、現在市販されている製品の製造方法である Glu と Cys を原料とする化学合成法以外に、発酵法や酵素法が検討されている。発酵法については、GSH や他のアミノ酸の工業生産に用いられている方法である。例えば、GSH の発酵生産系である酵母において

GSH 生合成系の最終段階の反応を触媒する GS の活性を抑制し、中間生成物である γ -EC を蓄積させる方法がある[31]。発酵法においては生産物の精製にコストがかかることから高い生産性が要求されるが、現状、本法によって製造された γ -EC の製品化は行われていない。酵素法としては、GSH 生合成系の律速段階である Glu と Cys から γ -EC を生成する酵素である GCL を用いた方法[32]や、GGT の γ -グルタミル基転移反応を利用して適当な γ -グルタミル基を持つ物質を基質、Cys をアクセプターとして γ -EC を生成する方法がある[33]。前者では高価な ATP や Mg^{2+} といった補因子が必要であり、後者についても原料となる γ -グルタミル基を持つ物質の供給にコストがかかると言った欠点があり、これらの方法についても未だ市場では流通していない。いずれの方法も生産コストの点で化学合成法を凌ぐ方法ではないと考えられる。

一般に、PCS は GSH を唯一の基質とし、重金属以外の補因子を必要としない。NsPCS は重金属も要求しないことから、反応性や特性の面で優れていれば、容易に入手可能である GSH を原料とした新規酵素法による γ -EC 生産への応用が可能と考えられる。そこで本章では、NsPCS の酵素工学的な特性解析とそれに基づいた反応条件の最適化を行い、 γ -EC の安定生産へ向けた有用性と利用性について評価した。

第二節 実験材料および実験方法

組換え NsPCS の調製

NsPCS は、以下のように調製し、部分精製したものをを用いた。大腸菌で NsPCS 遺伝子を発現させるにあたり、Tsuji ら[28]によって構築されたプラスミド pET25b-*alr0975* を用いた。組換え NsPCS は、pET25b-*alr0975* を形質転換した大腸菌 C43(DE3)(Lucigen, Wisconsin, USA)を 2L の Terrific Broth(TB) (Invitrogen, Massachusetts, USA)中で培養し、20°Cで発現させた。タンパク質は、イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を最終濃度 0.5 mM になるように添加することで発現誘導し、その後 20°Cで 20 時間培養した。菌体を遠心分離により回収し、200 mL

の Buffer A (100 mM NaCl, 1 mM エチレンジアミン四酢酸[EDTA], 1 mM ジチオトレイトール [DTT]を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0))中で超音波により破碎した。18,000 × g で 30 分間遠心して得られた上清を 0.22 μm フィルターで濾過した。この上清を、Buffer B(10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0))で平衡化した 5 mL HiTrap Q HP カラム(Cytiva, Japan)に供した。10 mL の Buffer B で 2 回洗浄した後、Buffer C(1 M NaCl, 1 mM EDTA, and 1 mM DTT を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0))で溶出した。流出した画分を繰り返し 4 回カラムに供した。4 回目の素通り画分と洗浄画分を Amicon Ultra-15 遠心フィルターユニット(Merck Millipore, Massachusetts, USA)を用いて濃縮し、100 mM NaCl, 5 mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)、25%グリセロールを含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0)に対して透析した。遠心分離(18,000 × g、60 分)して得られた上清の量は 22 mL であった。精製したタンパク質の均一性は SDS-PAGE で確認した(Fig.4)。最も濃いバンドは NsPCS の予測分子量である 27 kDa に対応していた。精製したタンパク質の純度は、ウシ血清アルブミン (BSA)を標準物質として用いて測定したバンドの強度から推測すると約 50%であった。

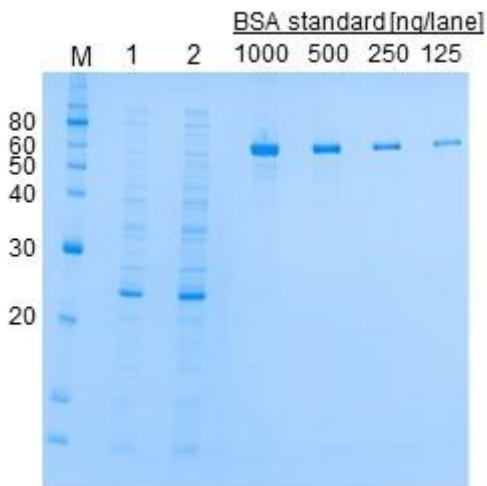


Fig.4 Estimation of recombinant protein analyzed by SDS-PAGE.

M stands for marker. 0.0125 μL of sample was loaded on 1 and 0.025 μL of sample was loaded on 2.

組換え NsPCS を用いた酵素反応

Oven らの AtPCS1 の反応条件[34]を基に組換え NsPCS の反応を行った。10 mM β -メルカプトエタノール(β -ME)、200 mM Tris-HC 緩衝液(pH 8.0)、10 mM GSH の反応溶液 100 μ L に対し、0.5 μ g の組換え NsPCS を加えた。反応は 37°C で 60 分間行った。単位時間あたりに生成された γ -EC の濃度を NsPCS の活性として表した。なお、反応条件を変更した場合は、実験毎に明記した。また、最適条件の設定後はその条件を用いて反応を行った。

[Km 値および Vmax 値の算出]

125、250、500、750、1000、2500、5000 μ M の GSH を含む反応溶液 100 μ L に粗精製 NsPCS 0.5 μ g 添加し、37°C で 5 分間反応させた。

[経時変化]

100 mM GSH を含む反応溶液 100 μ L に粗精製 NsPCS を添加して 37°C で 0.5、1、2、4 時間反応させた。

HPLC による GSH、 γ -EC の定量

試料中の GSH、 γ -EC の濃度の測定には、日立ハイテクの HPLC (ポンプ:L-7100、オートサンブラ:L-7200、検出器:L-7450、インターフェイス:D-7000)を用いた。カラムオーブンは GL Sciences の CO 631A、カラムは逆相カラム (Inertsil ODS-3 5 μ m 4.6 \times 250 nm、GL Sciences、Japan)を用いた。

HPLC 分析は Hirata らの方法で行った[35]。酵素反応溶液に等量の 3.6 N HCl を加えて反応を停止させ、15,000 \times g、4°C、10 分間の遠心分離に供し、上清 20 μ L を回収後、超純水を加えて液量を 200 μ L とし、そのうちの 100 μ L を逆相カラムを用いたポストカラム-HPLC 法に供した。溶離液 A として 0.02%トリフルオロ酢酸を含む 7.5 mM オクタンスルホン酸ナトリウム水溶液、溶離液 B として 0.02%トリフルオロ酢酸と、

7.5 mM オクタンスルホン酸ナトリウムを含む 30% アセトニトリル溶液を用い、流速 1.5 mL/min で右記のグラジエントプログラムを実施することによって分析した。

分離したチオール化合物を 10 %アセトニトリル、75.7 μ M 5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)を含む 50 mM リン酸緩衝液とポストカラム法で 40°Cに加熱することによってチオール基を誘導体化し、412 nm の吸光度を測定した。

GSH(Sigma-Aldrich、Missouri、USA)と γ -EC(Sigma-Aldrich)を超純水で希釈し、既知濃度の標準物質とし、サンプル中の GSH ならびに γ -EC 濃度を決定した。

Time (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
1	87	13
20	30	70
21	0	100
28	0	100
29	100	0
32	100	0

第三節 結果

NsPCS 反応の最適化

高等植物の生理学および分子生物学的な研究におけるモデル植物であるシロイヌナズナ由来の AtPCS1 の反応で用いた条件(200 mM Tris-HCl 緩衝液(pH8.0)、10 mM β -ME) [34] を基本条件として、温度、還元剤の添加、緩衝液の濃度と pH の順に NsPCS 活性を指標に反応条件の最適化を行った。これらの条件で得られた NsPCS の活性は、基本条件での活性との相対値(相対活性 \cdot RA)で示した。

温度

まず、温度の NsPCS の活性に対する影響について調べた。その結果、Fig.5a に示すように、30°Cと 37°Cで最も高い活性が認められた。そこで、以降の実験では 37°Cを最適温度として用いた。

還元剤の添加

γ -EC は酸化されやすいため、反応系に酸化を防ぐ還元剤を添加する必要がある。そこで、還元剤の NsPCS 活性に対する影響について調べた。AtPCS1 の反応においては β -ME が還元剤として使用されており、非存在下ではほとんど反応が起こらないことから、10 mM β -ME の存在下と非存在下での NsPCS の活性の違いを調べた。その結果、Fig.5b に示すように、 β -ME 非存在下において、存在下に比べて 10 倍以上高い NsPCS 活性が認められた。また、 β -ME の代わりに非チオール系還元剤として一般的に用いられる TCEP を添加したところ、非存在下と同等の活性が認められた。TCEP の存在は直接 NsPCS 活性に影響しないが、 γ -EC は非常に酸化されやすい物質なので、反応過程や実験操作による γ -EC の酸化分解を防ぐために、その後の実験では 1 mM の TCEP を加えることとした。

緩衝液の pH・種類と濃度

次に、反応に用いる緩衝液の pH・種類と濃度の NsPCS 活性に対する影響について調べた。酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0、5.0、6.0)、リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0、7.0、8.0)、Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0、9.0、10.0) を 10 および 200 mM の 2 種類の濃度で試験した。その結果、Fig.5c に示したように、すべての緩衝液において 10 mM よりも 200 mM の濃度で高い活性が認められた。最も高い活性が得られたのは、200 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH8.0) であった。最適な pH は AtPCS1 の場合と変わらなかったが、AtPCS1 の最適緩衝液である Tris-HCl 緩衝液よりもリン酸カリウム緩衝液で有意に高い活性が得られた。そこで、その後の実験では 200 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH8.0) を用いることとした。

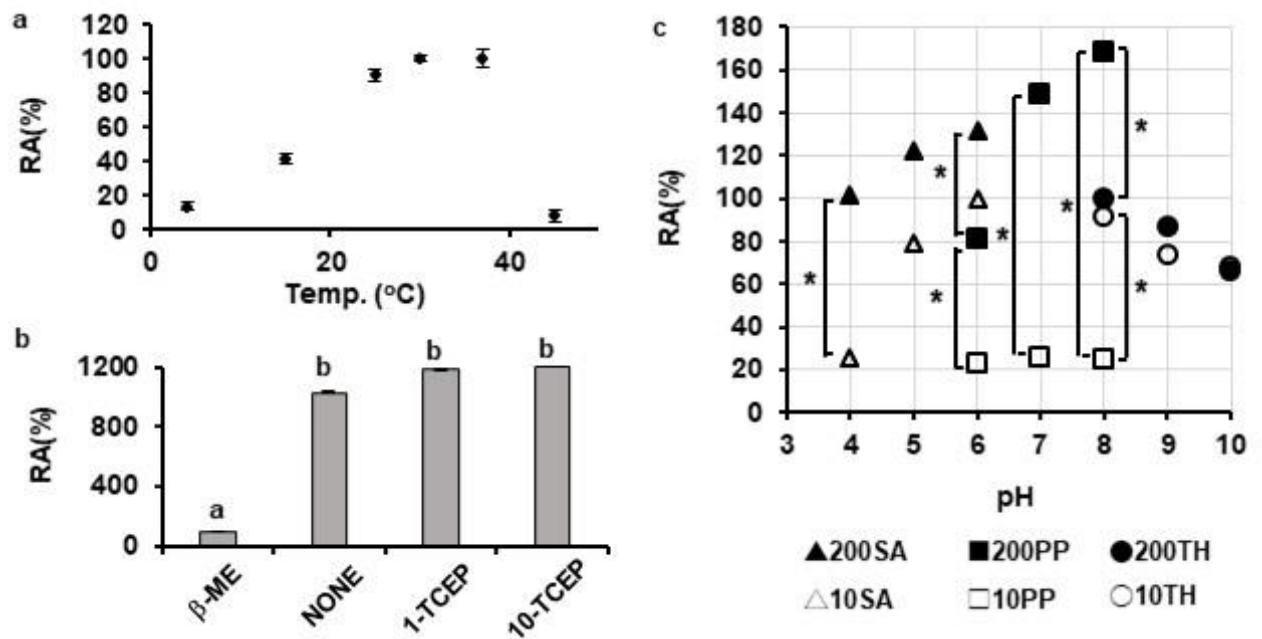


Fig.5 NsPCS activities obtained under the tested conditions relative to those under basal conditions.

(a) NsPCS activity as a function of temperature. The activity at 37 °C was set as 100%. Data are expressed as means ± S.D. (n = 3). (b) Effect of reducing agents on NsPCS activity. Activity in the presence of 10 mM β-ME was set as 100%, with activities without reductant (NONE), and in the presence of 1 and 10 mM TCEP (1-TCEP and 10-TCEP) presented as RAs. Data are expressed as means ± S.D. (n = 3). Different letters indicate significant differences at p < 0.05. (c) Effect of buffer and pH on NsPCS activity. Production of γ-EC in 200 mM Tris-HCl buffer (200 TH) at pH 8.0 was set as 100%, with production in different buffers; 10 mM Tris-HCl buffer(10 TH), 200 and 10 mM potassium phosphate buffer (200 PP and 10 PP), 200 and 10 mM sodium acetate buffer (200 and 10 SA), as well as different pH values are presented as RAs. All of the S.Ds. (n = 3) were below 15. * p < 0.00039 after Bonferroni correction.

NsPCS の酵素工学的評価

NsPCS が GSH を γ-EC に変換する能力について、酵素工学的な評価を行った。Fig.6 に示すように、上述の最適化された反応条件下(37°C、1 mM TCEP 存在下、200 mM リン酸カリウム緩衝液・pH8.0)で、粗精製 NsPCS を 125、250、500、750、1000、2500、5000 μM の GSH と

5 分間反応させた。各 GSH 濃度における γ -EC 生成の初期反応速度を求めて Lineweaver-Burk double-reciprocal plot[36]とすることにより、 K_m と V_{max} を求めたところ、それぞれ 385 μ M、と 26 mol/min/mg-protein であった。

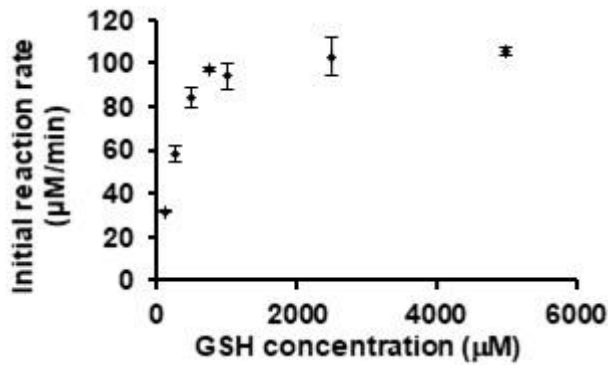


Fig.6 Initial activity rates of crude NsPCS. Data are expressed as the mean values \pm S.D. (n = 3).

高濃度 GSH からの γ -EC への変換

GSH の水への溶解度; 163 mM (chemical book)に近い 100 mM の GSH を基質として 2.0 μ g の NsPCS を反応させた。Fig.7 に示すように、最初の 2 時間は GSH が直線的に減少し、それに比例して γ -EC が増加していた。4 時間後には 100 mM の GSH が完全に消失し、 γ -EC の収率は約 90%であった。また、生成物による反応の阻害(生成物阻害)は認められなかった。

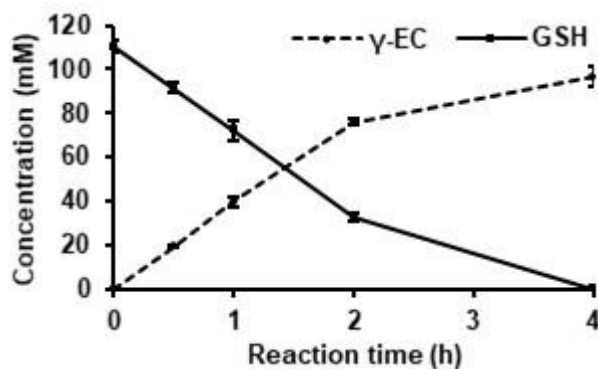


Fig.7 Concentration of GSH (substrate) and γ -EC (product) in the reaction catalyzed by NsPCS. Data are expressed as means \pm S.D. (n = 3).

第四節 考察

今回得られた結果から、NsPCS の最適な反応条件は 200 mM リン酸カリウム緩衝液、pH8.0、温度 30~37°Cであり、また反応に還元剤の添加は必要ではなく、AtPCS1 で用いられるチオール基を有する β -ME は却って NsPCS の活性を抑制し、一方チオール基を持たない TCEP は活性に影響を与えないことを明らかにした。これまでに研究を実施してきた中で、 γ -EC が容易に酸化されることを確認しているため、反応や精製といった生産工程の中で安定に生産物を保持するためには還元剤の添加が望ましいと考え、TCEP を添加することとし、最適条件を 200 mM リン酸カリウム緩衝液、pH8.0、1 mM TCEP 存在下、温度 37°Cとした。最適条件下での粗精製 NsPCS では、 K_m が 385 μ M、 V_{max} が 26 mol/min/mg-protein となった。Fig.4 に示すように SDS-PAGE の結果から NsPCS の純度は約 50%と推定されるため、実際の V_{max} は 2倍程度でさらに大きい可能性があると考えられる。

NsPCS による γ -EC の生産性を調べるために、上記最適条件下で水への溶解度に近い 100mM の GSH の γ -EC への変換を行ったところ、GSH は 4 時間後に完全に消失し、得られた γ -EC の収率は約 90%であった。この変換速度は NsPCS の濃度に比例して大きくなると考えられ、本反応系においても 2.6 μ g の酵素で 100 mM の GSH 100 μ L を 4 時間で γ -EC へ変換できることから、生産能の非常に優れた酵素と言える。しかし、遊離酵素を用いた反応では反応終了後に生産物を NsPCS から分離する必要があり、また酵素が不安定な場合は繰り返し利用もできないので、生産コストの点から工業生産への応用は難しいと考えられる。そこで、次章では生産物と酵素の分離が容易で酵素の安定性が上昇することも報告されている固定化生体触媒の技術を今回、優れた生産能を有することが明らかとなった NsPCS に適用して、安価かつ安定な γ -EC 生産に向けて、固定化 NsPCS の反応性について検討を行った。

第二章 固定化 NsPCS による γ -EC 生産系の構築

第一節 緒言

第一章では、NsPCS が 100 mM の高濃度の GSH を高収率で γ -EC へと変換できることを明らかにした。しかし、酵素と基質を溶液の状態では、反応終了後に生産物を酵素から分離する必要がある。今回のように生成物がペプチドである γ -EC の場合、物性がタンパク質である NsPCS と類似しているため、ゲルろ過や限外ろ過といった分子量の違いによる物理的方法を用いなければならず、相応のコストと時間を要する。さらに工業規模での生産では分離操作が大掛かりになる。また、酵素と生産物の分離・精製過程で酵素が失活する、あるいは回収率が著しく低くなることも多く、安定に繰り返し使用することは多くの場合、難しい。そこで、酵素法による有用物質の工業生産においては、しばしば固定化酵素が用いられる。固定化酵素とは、一般的に水に不溶性の担体に何らかの方法で固定化した酵素であり、代表的な固定化方法には共有結合法、格子型包括法、マイクロカプセル型包括法、吸着法などがある[37]。固定化酵素を用いた物質生産系では、固液分離、すなわち個体の固定化酵素と液体の生産物溶液の分離が容易で、酵素活性に影響しない緩和な沈降や簡易的なろ過といった方法で分離でき、酵素の繰り返し使用や連続使用が可能となる。また、固定化によって遊離状態の酵素よりも活性が安定に維持される場合もあり、高濃度で固定できれば容積効率の高い生産系を構築することができる。特に NsPCS については、反応に ATP や補因子を必要とせず、また 100 mM の高濃度 GSH を完全に γ -EC へと変換することができ、生産物阻害も起こらないので、固定化酵素を用いた生産に有利な酵素と言える。一方、酵素の個々の物理化学的性質によって適した固定化材料・方法が異なり、固定化する際に大幅な失活が起こったり、反応中に酵素が脱離あるいは遊離して反応液に混入することも多い。したがって、遊離酵素の反応に見合う、活性が安定に維持される固定化の材料や方法は、試行錯誤によって選定しなければならない。

本章では、固定化 NsPCS による安定かつ効率的な γ -EC 生産系の構築を目指して、固定化後の活性の維持とその安定性を指標にした固定化条件の探索を行い、決定した条件で固定した NsPCS の保存安定性と γ -EC の生産性について検討を行った。

第二節 実験材料および実験方法

アルギン酸カルシウムゲルへの包括法・ガラスビーズへの共有結合法・セルロースへの吸着法による NsPCS 固定化

アルギン酸カルシウムゲルに封入するために、NsPCS 溶液を 1.5%アルギン酸ナトリウム溶液に加え、これを 1%塩化カルシウム溶液中に滴下した。得られた NsPCS を固定化したゲルを 200 mM Tris-HCl 緩衝液で洗浄した。100 μ L 反応液に対し、0.20~0.24 g の酵素固定化ゲル(2.13~2.55 μ g の酵素)を反応に使用した。

ガラスビーズに固定化するために、ガラスビーズ Aminopropyl-CPGTM(particle size: 70 – 140 μ m、pore size: 500 Å. Biosearch Technologies INC. Petaluma、California、America)を固定化担体として用いた。ガラスビーズ 100 mg に対して 10 mL 2.5%(w/w)グルタルアルデヒド(ナカライテスク、Japam)水溶液を加え、25°Cで 2 時間攪拌し、ろ過した後、残渣を超純水で洗浄した。乾燥後、ガラスビーズ 40 mg に対して NsPCS 30 μ g を加え超純水で 2 mL に希釈し、4°Cで 24 時間攪拌した。その後、上清を取り除き、超純水による洗浄を 2 回行うことで得た NsPCS 固定化ガラスビーズを反応に用いた。100 μ L 反応液に対し、0.75 μ g の NsPCS が固定化されたガラスビーズを使用した。

セルロースに NsPCS 吸着させるために、直径 2~3 mm、重量 0.8~0.9 mg の表面修飾をしていない多孔質のセルロース粒を 200 mM リン酸緩衝液に入れて脱気した。その後、748.3 μ g/mL の NsPCS 溶液にセルロースを浸した。酵素液から取り出した後、200 mM リン酸緩衝液で洗浄

し、反応液に用いた。100 μ L 反応液に対し、3.0 μ g の NsPCS が固定化されたセルロース粒子を使用した。

アルギン酸カルシウムゲル、ガラスビーズ、セルロース(吸着法)に固定化された NsPCS を用いた酵素反応

ガラスビーズへの共有結合およびセルロースへの物理的吸着により固定化した NsPCS を、第一章で示した最適条件であるリン酸緩衝液(pH8.0)、TCEP を含む反応液に加えた。アルギン酸カルシウムゲルに固定化した NsPCS を用いる場合のみ、ゲルを維持するためにリン酸緩衝液(pH8.0)の代わりに Tris-HCl 緩衝液(pH8.0)を用いた。

100 mM GSH、200 mM リン酸緩衝液(pH8.0)あるいは Tris-HCl 緩衝液(pH8.0)、1 mM TCEP を含む反応液を 100 μ L 加えた。これを 37°C で反応させ、3.6 N HCl を等量の 100 μ L 加えて反応を停止させた。遠心分離(15,000 \times g、10 分、4°C)して得られた上清を HPLC で分析した。

NsPCS 固定化セルロースシート作製方法

セルロースシート(円形定性ろ紙 No.2 を直径 5 mm の円形に切断したもの)を固定化担体として用いた。セルロースシートの質量をグルコース量として扱い、その2倍のモル量の N,N-ジスクシンイミジルカルボネート(DSC)とN,N-ジメチル-4-アミノピリジン(DMAP)を脱水アセトニトリルに加えて溶解させ、セルロースシートを加えて 10 分間減圧脱気したのち、24 時間常温で攪拌させた。その後脱水アセトニトリルで 3 回洗浄した。固定化直前に減圧乾燥し、20 mM リン酸カリウム緩衝液で洗浄した。220 μ g/mL に調製した NsPCS 溶液をセルロースシート全体が浸るように加え、30 分間反応させた後、20 mM リン酸カリウム緩衝液 1000 μ L で 3 回洗浄した。

NsPCS 固定化セルロースシートを用いた酵素反応

上記の方法で準備した 2 枚の計 2.6 μ g の NsPCS を固定化したセルロースシートに 200 mM

リン酸カリウム緩衝液(pH8.0)、1 mM TCEP、100 mM GSH を含む反応液 100 μ L を加えて、37°Cで反応を行った。

NsPCS 固定化セルロースシートを用いた保存安定性試験

保存安定性を調べるために、NsPCS 固定化セルロースシートを 25%グリセロールを含む 200 mM リン酸カリウム緩衝液(pH8.0)に浸し、液体窒素中で2日間保存、もしくは2日間かけて凍結乾燥した。その後、NsPCS 固定化セルロースシートを 20 mM リン酸カリウム緩衝液(pH8.0)で2回洗浄し、前述と同様の方法で酵素反応試験を行った。

NsPCS 固定化セルロースシートを用いたスケールアップ

より大容量で反応を行うために、上記の方法で作成した NsPCS 固定化セルロースシート 200 枚を γ -EC 生産に使用した。酵素反応は、200 mM リン酸カリウム緩衝液(pH8.0)、1 mM TCEP、100 mM GSH を含む反応液を 10 mL 添加し、37°Cで反応を行った。

NsPCS 固定化セルロースシートを用いた繰り返し試験

固定化 NsPCS の繰り返し使用における安定性を調べるため、上記の 10 mL の反応系において 100%の変換を確認した後、200 枚の NsPCS 固定化セルロースシートを反応液から取り出し、20 mM リン酸カリウム緩衝液(pH8.0)で洗浄後、新しい反応液に加えた。この反応を5回繰り返し、毎回溶液交換から 2 時間後に試料を採取し、変換率を調べた。

NsPCS 固定化カラム型セルロースモノリスの作製

カラム型の多孔質セルロースモノリス小(直径 5 mm、長さ 15 mm)または大(直径 13 mm、長さ 17 mm)を固定化担体として用いた。カラム型の多孔質セルロースモノリスは大阪大学工学部の宇山浩先生に提供いただいた。固定化は、NsPCS 固定化セルロースシートの作成に記載した

方法で行った。その結果、それぞれ 234 μg 、169 μg 、151 μg 、129 μg の NsPCS が固定化された小セルロースモノリスが 4 個得られた。また、522 μg の NsPCS を固定化した大セルロースモノリスも調整した。使用した大セルロースモノリスの走査型電子顕微鏡画像を Fig.8 に示す。撮影前に試料にスパッタ法により金をコーティングし、Hitachi の S-3000N を用いて 15 kV で撮影した。

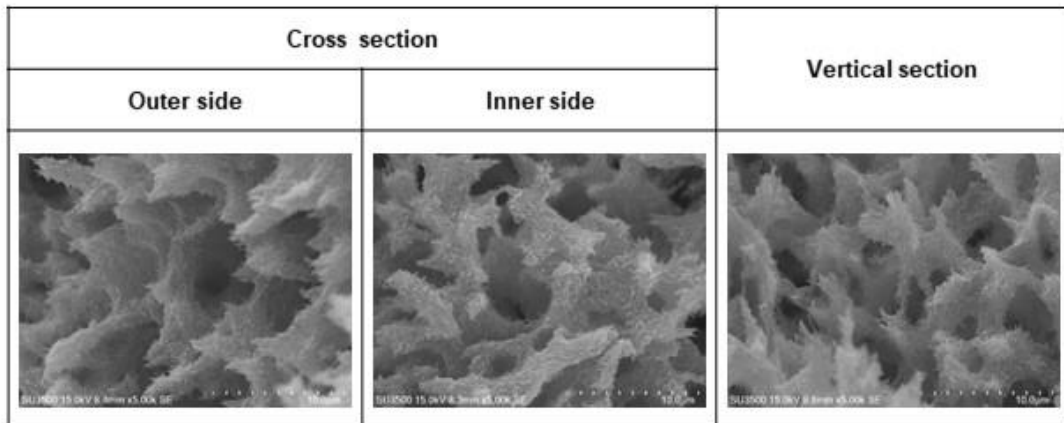


Fig.8 Scanning electron microscopy images of cellulose monoliths with 13 mm diameter and 17 mm length.

NsPCS 固定化カラム型セルロースモノリスによる γ -EC 生産

内径 1.15 mm のチューブ(125610、EYELA、Japan)と熱収縮チューブ(HCT150-6.4-T、Denka Electron、Japan)で覆われた調製済みの NsPCS 固定化カラム型多孔質セルロースモノリスにポンプ(MP-3000、EYELA、Japan)を接続した。

200 mM リン酸カリウム(pH8.0)、1 mM TCEP、NsPCS 固定化小セルロースモノリスの場合は 10 mM GSH、NsPCS 固定化大セルロースモノリスの場合は 100 mM GSH を加えた反応液を 35~37°C で送液した。連続的な反応では、送液開始から 1、4、7、10 日後に試料を採取した。

固定化された NsPCS 量の測定

担体を浸した後の NsPCS 溶液ならびに洗浄液の残留タンパク質量を Bradford 法により測定し、固定化前の NsPCS 溶液から差し引くことで固定化された NsPCS 量を算出した。

HPLC による GSH、 γ -EC の定量

酵素反応は反応液と等量の 3.6 N HCl を加えて停止させ、第一章に記載した方法と同様の方法で HPLC による GSH と γ -EC の定量を行った。

第三節 結果

アルギン酸カルシウムゲルへの包括法、ガラスビーズへの共有結合法及びセルロースへの吸着法によって固定化した NsPCS による γ -EC の生産

代表的な固定化方法である包括法、共有結合法及び物理的吸着法について、それぞれこれまで報告のある条件を用いて NsPCS を固定化し、GSH から γ -EC への変換反応を行った。その結果、アルギン酸カルシウムゲルへの包括あるいはガラスビーズへの共有結合による固定化を行った場合、固定化後の NsPCS の活性は遊離酵素の活性に比べて著しく低く、試験時間中に変換が完了しなかった (data not shown)。表面処理や修飾を行わないセルロースに物理吸着させて固定化した場合は、100 mM GSH が完全に消失し、それに対応する γ -EC が得られた。しかし、洗浄後の 2 回目の反応の際には γ -EC の収率が 5% 以下にまで低下した (data not shown)。セルロースを取り除いた 1 回目の反応液に再度 100 mM GSH を添加すると GSH が消失し、 γ -EC が得られたことから、固定化 NsPCS の大きな活性低下は 1 回目の反応中に NsPCS が担体から脱離したためと考えられる。

NsPCS 固定化セルロースシートを用いた γ -EC 生産

上記の3つの代表的な固定化方法では、酵素の活性維持あるいは安定な固定化ができなかったため、より安定で脱離しない固定化に向けて、すでに報告がある DSC と DMAP を用いてセルロースと酵素を共有結合させる固定化方法を[38]を試みた。その結果、Fig.9 に示した通り、反応

開始 12.5 時間に、100 mM の GSH が完全に γ -EC へ変換された。この間の平均変換速度は 8 mM/h であった。これは第一章で実施した遊離酵素による GSH から γ -EC への変換速度の 38% にあたる。固定化によって酵素活性は低下するものの、同等の 100%の変換が達成された。この固定化 NsPCS においても遊離酵素と同様に生成した γ -EC による阻害は認められなかった。

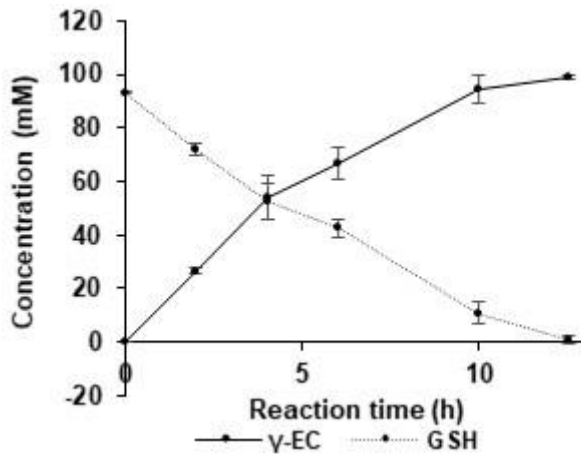


Fig.9 Conversion of GSH to γ -EC by NsPCS immobilized on cellulose sheet by covalent binding. Data are expressed as means \pm SD (n = 3).

酵素を安定に保存できることは、酵素法を用いた有用物質の工業生産において非常に重要な要件となる。酵素の保存には、一般的には液体窒素中での超低温保存や凍結乾燥後の低温保存が用いられる。遊離の NsPCS は、いずれの方法でも活性を低下させることなく保存することが可能である。そこで、セルロースシートに固定化した NsPCS を液体窒素中で超低温保存、あるいは凍結乾燥した場合の活性の変化について調べた。その結果、液体窒素中で保存した場合、変換速度は保存前の 90%に低下したものの GSH から γ -EC への変換は完了し、収量は変わらなかった。一方、凍結乾燥した場合は活性が完全に消失した。これらの結果から、固定化 NsPCS は遊離酵素と同様に、液体窒素中で安定に保存できることが示された。一方、固定化した状態で凍結乾燥した場合に NsPCS が失活する理由は不明であるが、乾燥過程あるいは乾燥した酵素に水が浸潤する過程で遊離酵素には起こらない不可逆的な構造変化が起こった可能性もある。

固定化 NsPCS を用いた γ -EC の大量生産に向けた検討として、反応液の容量を 100 μ L から

10 mL にスケールアップし、固定化した NsPCS の繰り返し使用した場合の生産性と安定性を調べた。100 mM GSH について、完全に γ -EC へ変換されることを確認してから固定化 NsPCS と反応液を分離し、洗浄後、新たな反応液を加えることによって 5 回反応を繰り返した。新たな反応液を加えた後、毎回2時間後に試料を採取して、変換率を調べた結果、Fig.10 に示すように、変換速度は5回の繰り返しの間大きな変化はなく維持された。完全に変換されるのに必要な時間は反応を繰り返す毎に長くなったが、いずれの場合も変換は完了し収率の低下は認められなかった。これらの結果から、セルロースシートに固定化した NsPCS は γ -EC の収率を低下させることなく、少なくとも 5 回の繰り返し反応が行えることが明らかとなった。今回用いた NsPCS は、大腸菌を宿主として得た組換えタンパク質であり、比較的安価に入手はできるものの付加価値の高い酵素であることから、100%の収率が得られる連続使用回数が多いほど低コストでの生産が可能となるため、今回得られた安定に繰り返し使用できる固定化 NsPCS の特性は、安価で安定な工業的生産を目指す上で非常に有利と言える。

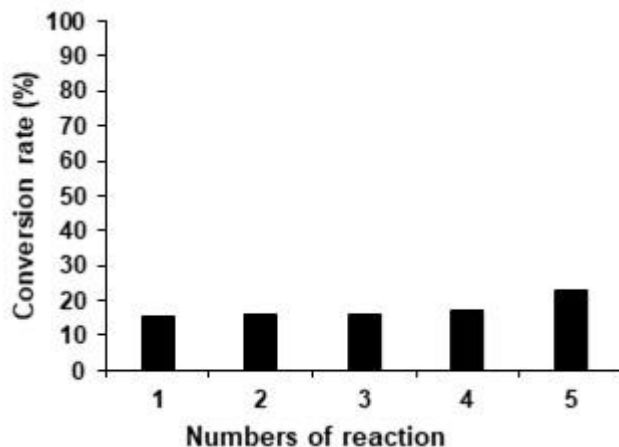


Fig.10 Conversion of GSH to γ -EC in 2h by repeated incubation with NsPCS immobilized on cellulose sheet by covalent binding.

NsPCS 固定化カラム型セルロースモノリスによる NsPCS 連続生産

次に、固定化 NsPCS による GSH の γ -EC への連続変換について検討を行った。固定化酵素を用いた有用物質生産については、上記のようにバッチ式での繰り返し反応と同様に、例えば反

応液を一定速度でカラム型の固定化担体を通過させる連続反応が一般的に用いられる。NsPCS による GSH の γ -EC への変換の場合、GSH 溶液をカラムの入り口から一定の速度で流し入れ、カラム内で変換された γ -EC をカラム出口から流出させることになる。基質の濃度、固定化する酵素量と流速によって変換速度が異なるので、これらを最短時間で 100%変換できるように適切に設定すれば、生産物を効率よく連続生産させることができる。変換速度と固定化した酵素の安定性によるが、一般にこういった 100%変換を相応の容積で行うことができれば、工業生産においては先のバッチ式での繰り返し反応よりも効率的と言える。そこで本研究では、円筒状のカラム型のセルロースモノリスを用いて、固定化 NsPCS による GSH の γ -EC への連続変換系の構築を図った。

まず、小容量のカラム型多孔質セルロースモノリス小(直径 5 mm、長さ 15 mm)を用いて、GSH から γ -EC への連続的変換反応を試みた。10 mM GSH を使用し、流量が γ -EC の収率に及ぼす影響を評価した。同量の酵素を用いて同じ手順で固定化しても固定化される酵素量に大きな変動が生じたため、同じ固定化手順で個別に作製した同サイズの 4 種類の担体を用いて流量と γ -EC 収率の関係を調べた。その結果、Fig.11 に示すように、0.25 mL/h の流速では 4 個のモノリス全てで 10 mM GSH が約 95%の収率で γ -EC へ変換された。0.25 mL/h を超える流速ではいずれの担体でも、収率が徐々に低下し、担体間の収率の差も大きくなった。これらの結果から、多孔質セルロースモノリスについてもセルロースシートと同様の方法で NsPCS を安定に固定化することができ、0.25 mL/h の低流速ながら GSH を連続的にほぼ完全に γ -EC へ変換できることが明らかとなった。同じ条件で 0.25 mL/h の流速で 10 日間連続変換を行ったところ、収率は低下することなくほぼ 100%に維持された(Fig.12a)。

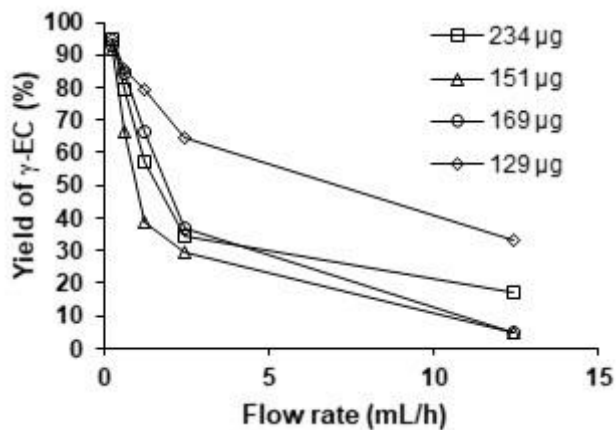


Fig.11 Effect of flow rate on yield of γ -EC from GSH with NsPCS immobilized on column-shaped cellulose monolith.

The amounts of immobilized NsPCS were 234 μg for square, 151 μg for triangle, 169 μg for circle, 129 μg for rhombus individually.

次に、セルロースシートによるバッチ式での変換に用いた高濃度、100 mM の GSH のモノリスによる γ -EC への連続変換を行った。本検討では、10 mM の連続変換が認められたモノリスの約 7.7 倍の容積のセルロースモノリス(直径 13 mm、長さ 17 mm)を用い、流速が γ -EC 収率に及ぼす影響を調べた。その結果、流速 0.2 mL/において試験期間である 3 日間、100 mM GSH が連続的にほぼ完全に γ -EC へ変換された。流速が大きくなると収率は低下し、1.2 mL/h では 26% であった。

また、この条件で 0.1 mL/h の流速で 10 日間連続変換を行ったところ、収率は低下することなくほぼ 100%に維持された(Fig.12b)。

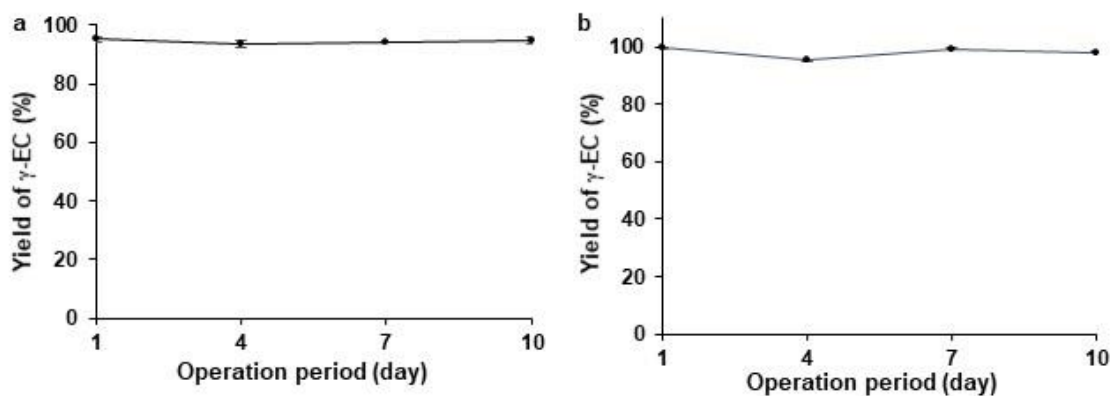


Fig.12 Continuous production of γ -EC from GSH with NsPCS immobilized on (a) small-scale column-shaped cellulose, and (b) large-scale column-shaped monolith by covalent binding. Data are expressed as means \pm SD (n = 3).

これらの結果から、カラム状の多孔質セルロースモノリスに固定化した NsPCS を用いて、GSH を連続的に γ -EC へ変換することができ、しかもセルロースシートに固定化した NsPCS と同様に 100 mM の高濃度の GSH を変換できることが明らかとなった。

第四節 考察

本章では、安定かつ効率的な γ -EC 生産系の構築を目指して、固定化 NsPCS を用いた GSH の γ -EC への変換系について検討を行った。

NsPCS を固定化する方法については、まず一般的によく用いられている代表的な固定化方法であるアルギン酸カルシウムゲルへの包括法、ガラスビーズへの共有結合法及びセルロースへの吸着法の3法について検討した。第一章で示した通り、NsPCS は遊離状態、すなわち溶液中で 100 mM の GSH をほぼ完全に γ -EC へ変換できる。100 mM の GSH は水への溶解度に近い非常に高い濃度である。高濃度の基質は固定化酵素を用いた反応においては変換に長時間を要し、連続生産においても流速や反応時間の調節が難しい場合が多い。一方で、工業生産を考えれば基質濃度は生産系における容積効率、すなわち反応装置の規模や運転条件に影響を与える重要な要因であり、高濃度の方がより容積効率が高くなる。そこで、固定化 NsPCS においても 100 mM GSH の γ -EC への完全高収率での変換を目指した。固定化酵素の場合、酵素の個々の物理化学的性質によって適した固定化材料が異なり、また酵素毎に適した方法を予想することは難しいことから最初に古くから汎用される代表的な 3 つの固定化方法を用いて GSH の γ -EC への変換実験を行った。しかし、いずれの方法においても活性を維持しながら安定に固定化することができず、これらの方法は NsPCS の固定化には適さないとの結論に至った。NsPCS の固定化過程

での失活や担体からの NsPCS の脱離の原因は不明であるが、詳細な検討は行わず次の方法を試みた。

宇山らは、固定化生体触媒としてセルロースに酵素を共有結合させる方法を用い、カラム状のモノリスを担体として horseradish peroxidase の高い活性を維持した安定な固定化に成功している[39]。固定化に用いる担体と固定化方法は数多く報告されているが、共同研究の実績があり、また同じ大阪大学に研究室があって材料譲受も容易なことから、次にセルロースモノリスを用いた固定化 NsPCS による γ -EC の連続生産について検討を行った。宇山らの方法に従って NsPCS をセルロースシートおよび多孔性円筒型セルロースモノリスに固定化し、その GSH の γ -EC への変換活性を調べたところ、両者において NsPCS を安定に固定化することに成功し、共に 100 mM の GSH をほぼ完全に γ -EC へ変換することができた。セルロースシートに固定化した NsPCS の場合は 10 mL 容量での 5 回までのバッチ式による繰り返し反応に堪え、5 回目でもほぼ 100% の γ -EC 収率が得られた。また、セルロースシートに固定化した NsPCS は遊離状態の酵素同様、液体窒素中で保存できること確認した。セルロースモノリスに固定化した NsPCS は流速は小さいものの 100 mM の GSH から 10 日間連続でほぼ 100% の収率を維持して反応を続けることができた。

セルロースシートに固定化した NsPCS を用いた系の場合、バッチ式をとるため、反応終了後に反応液を入れ替えて γ -EC の回収と GSH の補給を行う工程が必要となるが、酵素は固定化されているため固液分離によって反応液と容易に分離することができるので、操作は非常に簡便に行うことができる。10 mL の 100 mM の GSH をこの方法で変換した場合、 γ -EC の分子量が 250.3 であることから、61.8 μ g の NsPCS を用いて 26 時間で 10 mL の 100 mM の γ -EC、0.25 g を得ることができる。カラム状のセルロースモノリスへ固定化した場合も 100 mM の GSH をほぼ完全に γ -EC へ変換することができる。この方法では反応液の入れ替えを行う必要はなく、連続的に γ -EC を生産することができ、522 μ g の固定化 NsPCS を用いて流速 0.2 mL/h とした場合、24 時間で 0.12g を得ることができる。固定化した酵素量が異なることや生産系がバッチ式と連続方式

で異なることから生産性を単純に比較することはできないが、いずれも 100 mM の高濃度 GSH を変換できるため、生産系として高い容積効率が得られる。

セルロースシートの場合、反応系は非常に単純であることから比較的容易に大容量にスケールアップすることができ、反応液の交換も容易である。一方、モノリスについては連続生産であることから反応液の交換を必要としないが、バッチ式に見合う大容量で生産を行うことができるカラム状の担体を作製するのは容易ではない。したがって、工業規模での生産を考えた場合、今回の研究結果からみればバッチ式の方が有利と考えられる。なお、本研究では固定化担体として入手しやすいセルロースシート(ろ紙)を用いたが、大容量での繰り返し生産を行う場合は形状や機械的強度の面で実用的とは言えない。セルロースは細胞や酵素と言った生体触媒の吸着材として広く用いられており、安価に入手可能で形状や大きさも簡単に調整できるので、スポンジ様の多孔質セルロースを固定化担体として利用するのが実用的である。本研究において、セルロースに固定化した NsPCS を用いることによって γ -EC の高い生産性と容積効率が得られ、また大容量生産系構築に繋がる知見が得られたので、今後医薬品、食品や化粧品の機能性成分としての工業生産への応用が期待される。

第三章 γ -EC の GSH 代謝関連酵素との反応性の解析

第一節 緒言

緒論でも述べたように、細胞内の GSH は活性酸素を直接消去し、また glutathione peroxidase (GPx) の基質となって H_2O_2 を H_2O へ還元するなど細胞内の抗酸化反応を担っている[40]。GR は、NADPH を補酵素として抗酸化反応によって生じた GSSG を GSH に還元し、その *de novo* 合成と共に細胞内の GSH 量の維持、すなわちホメオスタシスの維持に働く[41]。Glutathione-S-transferase (GST) は、細胞内に侵入した親油性の異物(X)に GSH の SH 基を結合させ、水溶性抱合体である Glu-Cys(S-X)-Gly を生成することによって無毒化し、細胞外へ排出する[42]。合成された Glu-Cys(S-X)-Gly は、一部の GSH および GSSG とともに、細胞質から血漿中へ輸送され、細胞表面の膜結合型 GGT によって分解される[43][44]。すなわち、GGT は、Glu-Cys(S-X)-Gly を Glu と Cys(S-X)-Gly に、GSH を Glu とシステイニル-グリシン(Cys-Gly)に、GSSG を Glu とシスチン(Cys-Cys)に分解する。Cys(S-X)-Gly と Cys-Gly は、さらに血漿中の peptidase によって Cys-X、Cys、Gly に分解される。これらの反応によって得られた 3 つの GSH 構成アミノ酸、Glu、Cys、Gly は、それぞれ細胞膜に存在するトランスポーターによって細胞内へ輸送されて、GSH の生合成系に入り、その合成に利用される[2]。したがって、GGT は GSH の分解・代謝サイクルにおいて重要な役割を果たす酵素と言える[45]。

GSH は、抗酸化機能や異物除去機能を持つことから、白内障治療薬[5]、解毒剤[6]、食品や化粧品の機能性成分として使用されている[46][47]。こういった外部から投与された GSH は、そのまま細胞内に取り込まれることはないものの、血漿中で直接的な活性酸素消去能を発揮し、また上記のように GGT によって分解されてその構成アミノ酸が細胞内に取り込まれれば、正常な細胞においては GSH 生合成に使われることから、間接的に細胞内の GSH 濃度維持に働く。これが、GSH が医薬品や機能性成分として用いられる所以である。しかし、先に述べたように老化し

た細胞やアルツハイマー病やパーキンソン病、糖尿病、線維症などの加齢に伴う慢性疾患の細胞においては、GSH の恒常的な細胞内濃度の維持ができなくなることが知られている[13]。最近、この現象が GSH 生合成系の律速反応を触媒する GCL が細胞内の GSH 濃度によって活性調節を受ける機構が破綻することによって起こることが明らかとなってきた[14-17]。すなわち、正常な細胞では GSH が抗酸化反応等によって消費されて細胞内濃度の低下が低下した場合、これを感知して、GCL が発現・活性化されることにより GSH を生合成し、補填できるが、この調節機構が破綻すれば GCL が機能しなくなり、GSH の細胞内濃度は回復しなくなる。このように GSH のホメオスタシスが崩れることが、さらに老化や慢性疾患を進行させることになる。この場合、外部から投与した GSH が GGT を介した分解によって生成され、細胞内に取り込まれた構成アミノ酸は GSH の生合成に使われなくなることから、GSH の投与は老化や慢性疾患では有効に機能しないと考えられ、実際に効果がないことが報告されている[2][48]。

一方、 γ -EC は GSH と同じ γ -Glu-Cys 構造を持ち、同様の活性酸素消去能を有することは知られていたが[49]、細胞内外での代謝や動態、生理活性についてはほとんど研究が行われていなかった。しかし、 γ -EC の経口投与によってヒトの細胞や組織の GSH 濃度上昇することが報告されるようになり[13][21]、さらに γ -EC の投与が GSH 投与の効果が認められない加齢性疾患においても細胞内の GSH 濃度を上昇させること示されている[17]。また Henderson らは、 γ -EC エチルエステルの血管内投与によりラットの脳内の GSH 濃度が上昇することを報告し [50]、 γ -EC がカイニン酸による興奮障害を受けたラットの海馬において神経保護機能を発揮すること[22]や、 γ -EC が虚血による神経細胞のアポトーシスを抑制する[51]こと、アルツハイマー病のモデルマウスの空間記憶を改善するという報告もある[52]。したがって、例えば γ -EC を投与すると脳に至り、細胞に取り込まれて GSH 投与では認められない GSH 濃度の上昇が起こり、その抗酸化機能が発揮されて活性酸素等による酸化傷害が緩和されるものと考えられる。実際に、 γ -EC が脳において強い抗酸化作用を示すという報告がある[53]。これらの研究から、 γ -EC は GSH と同等の抗酸化機能を示すと同時に GSH の前駆体としても働き、哺乳類の加齢に伴う疾患において GSH 投与

よりも優れた緩和効果を持つことが示された。加えて、 γ -EC は Gly 残基を持たないことから、GSH においては GGT との反応によって生成される Cys-Gly による強いプロオキシダント効果[16][23]を回避でき、GSH に比べて高濃度での投与が可能となる。これらのこれまでの研究結果や知見から、 γ -EC はすでに医薬品や食品、化粧品の機能性成分として利用されている GSH よりも有用で安全な物質であると言える。

しかし、先述の通り γ -EC の哺乳類の細胞内および細胞外における動態についてはほとんど明らかになっていない。したがって、 γ -EC の GSH に優る機能を精査し、その医薬品や機能性成分としての有用性を示すためには、体内動態や細胞内外における挙動を明らかにする必要がある。本章では、こういった γ -EC の動態や挙動に関する研究の一環として、GSH の抗酸化機能、異物除去、分解・代謝サイクルを担う細胞内外の酵素との反応性について解析を行った。これまでに γ -EC の GPx および GR に対する反応性については報告されているものの[49]、反応性に関する定量的な解析は行われていない。また GST および GGT については γ -EC の反応性を解析した報告はない。そこで本章では、細胞内で機能する GPx、GR および GST と細胞表層に存在し主に血漿中において機能する GGT の 4 つの酵素について、 γ -EC の反応性の定量的な解析を行った。

第二節 実験材料および実験方法

GPx を用いた酵素反応

1 mM GSH もしくは γ -EC と 1.0×10^{-3} U/mL GPx を等量混合した溶液 70 μ L に 1 μ M H_2O_2 70 μ L を添加して 37°C で反応させた。GSH を基質とする反応は 5、15、30、60 分、 γ -EC を基質とする反応は 15、30、60、120、180 分行い、その後 2 M HCl 14 μ L の添加によって停止した。基質と GPx 混合溶液に HCl を添加して GPx を失活させた後、 H_2O_2 を添加したものを反応開始時の試料とした。酵素反応溶液を $15,000 \times g$ 、4°C、15 分間の遠心分離に供し、上清 80 μ L を 2 倍希釈した後、HPLC による定量を行った。

GR を用いた酵素反応

500 μ M GSSG 溶液もしくは酸化型 γ -EC 溶液 70 μ L に対して、PBS に溶解した 4 mM NADPH 溶液で希釈した 15×10^{-2} U/mL の GR 70 μ L を添加して 37°C で反応させた。30 分後、メタノール 140 μ L を加え、反応を停止した。酵素反応溶液を 15,000 \times g、4°C、15 分間の遠心分離に供し、上清を回収した後、HPLC による定量を行った。

GPx および GR 反応における HPLC による定量

試料中の GSH、GSSG、 γ -EC および酸化型 γ -EC の濃度測定には、第一章で示した日立ハイテクの HPLC、カラムオーブン、逆相カラムを用いた。

溶離液 A として 0.02 %トリフルオロ酢酸を含む 7.5 mM オクタンスルホン酸ナトリウム水溶液、溶離液 B として 0.02 %トリフルオロ酢酸と、7.5 mM オクタンスルホン酸ナトリウムを含む 30 %アセトニトリル水溶液を用い、カラム温度 40°C にて、流速 1.5 mL/min で右記のグラジエントプログラムにより分析を行った。分離した物質は 215 nm の吸光度で検出した。

Time (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
1	70	30
15	30	70
16	0	100
23	0	100
24	100	0
25	100	0

GST を用いた酵素反応

PBS (pH 6.5) 980 μ L、100 mM 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン 10 μ L、10、20、40、60、80、100 mM の GSH もしくは γ -EC 10 μ L を混合した反応溶液を作製し、37°C で 5 分間反応させた。その後、1.5 mL プラスチックキュベットにて反応溶液 900 μ L と 1 U/mL GST 100 μ L を混合し、分光光度計 Gene Quant 1300 (Biochrom、UK) にて 340 nm の吸光度を 30 分間測定した。

GGT を用いた酵素反応

[経時変化]

500 μ M GSH、 γ -EC、酸化型 γ -EC 溶液 60 μ L に 1 U/mL GGT 60 μ L を添加して 37°C で 0.5、1.5、4 時間反応させた。GGT に HCl を添加して失活させた後、GSH、 γ -EC、酸化型 γ -EC 溶液を添加したものを反応開始時の試料とした。酸化型 γ -EC 試料のみ、反応停止後に酵素反応溶液を 15,000 \times g、4°C、15 分間の遠心分離に供し、上清 80 μ L を 2 倍希釈した後、上記に示した GPx および GR 反応と同様に HPLC による定量を行った。

[Km 値および Vmax 値の算出]

γ -EC については 100、200、300、500、1,000 μ M の溶液、GSH については 50、100、200、300、500 μ M の溶液 60 μ L に 1U/mL GGT 60 μ L を添加し、37°C で 15 分反応させた。

[GSH に対する γ -EC 共存の影響]

酵素量変化

1 mM GSH と γ -EC の等量混合溶液 60 μ L に 0.025、0.05、0.1 U/mL の GGT 60 μ L を添加して 37°C で 2 時間反応させた。

基質量変化

1 mM GSH と 0、20、100、200、1000 μ M の γ -EC の等量混合溶液 60 μ L に 1 U/mL GGT 60 μ L を添加して 37°C で 45 分間反応させた。

[GGsTop の影響]

1 mM GSH、 γ -EC と 0、20、100、200、1000 μ M の GGsTop を等量混合した溶液 60 μ L に 1 U/mL GGT 60 μ L を添加して 37°C で 45 分間反応させた。

[HPLC による定量]

酵素反応は 2 M HCl を添加することによって停止させ、酵素反応溶液を 15,000 × g、4°C、15 分間の遠心分離に供し、上清 80 μL を回収し、2 倍希釈後、第一章で示した HPLC による定量法で定量した。

第三節 結果

GPx および GR に対するγ-EC の反応性

GSH は GPx の基質として細胞内 H₂O₂ の還元を担い、この反応によって GSSG を生じる。GSSG は GR によって GSH へと還元され、この機能によって細胞内の GSH/GSSG のバランスは常に GSH に大きく傾き、細胞内の還元状態が維持される (Fig.1B)。これまでの報告では、γ-EC は GSH 同様 GPx の基質となり H₂O₂ を消去するが、これに GR を添加しても更なる H₂O₂ 濃度の低下が確認できなかったため、酸化型γ-EC は GR の基質とならないと考えられている[49]。この報告では H₂O₂ 濃度の減少速度により GPx 活性を測定しており、生成物である酸化型γ-EC は直接検出しておらず、H₂O₂ の不安定さから、H₂O₂ の減少速度が正確に基質であるγ-EC の変化量を表しているとは言い切れない。そこで本研究では、γ-EC および酸化型γ-EC の濃度を HPLC を用いて検出・定量することにより、γ-EC および酸化型γ-EC の GPx および GR に対する反応性を解析した。

GPx に対する GSH とγ-EC の反応性の比較

250 μM の GSH あるいはγ-EC を基質として GPx と反応させたところ、GSH は1時間、γ-EC は3時間でほぼ完全に消失し、HPLC 分析によってこれらの基質濃度の減少に伴って、それぞれ GSSG あるいは酸化型γ-EC の濃度が上昇することが観察された(Fig.13a、b)。これらの結果から、GPx により H₂O₂ を消去する際、γ-EC は基質として GSH の約 30%の速度で反応し、酸化されて二量体の酸化型γ-EC を生成することが明らかとなった。なお、今回の実験における H₂O₂ の

添加濃度では、 H_2O_2 単独では GSH および γ -EC を酸化しないことを確認している。

次に、GSH に対して同濃度の γ -EC を共存させたところ、GSH 単独の場合よりも有意に減少速度が小さくなることが観察された(Fig. 13c)。この場合、 γ -EC も GSH と同様に単独の場合よりも有意に減少速度が小さくなることが観察された(data not shown)。これらの結果から、 γ -EC は GPx の基質として GSH と競合的に反応すると考えられる。

今回用いたウシ由来 GPx とヒト由来 GPx のアミノ酸配列の相同性は約 91%と高いことから、 γ -EC はヒトにおいても同様に GPx と反応すると予想される。 γ -EC は GPx に対して GSH と競合的に反応することから、 γ -EC が細胞内に存在すれば、GSH の代替物質として H_2O_2 消去機能を担うと考えられる。

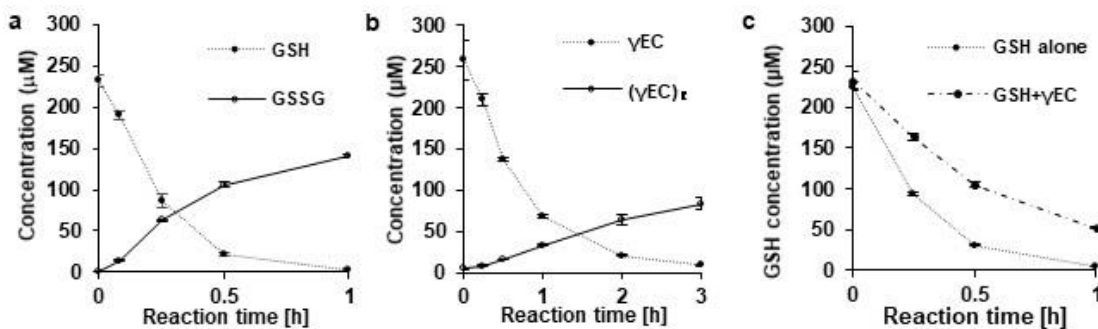


Fig.13 GSH and γ -EC reactivities with GPx.

(a) Concentrations of GSH (substrate) and GSSG (product) in reaction with GPx. (b) Concentrations of reduced form of γ -EC (substrate) and oxidized form of γ -EC (γ -EC₂) (product) in reaction with GPx. (c) Concentrations of GSH in reaction with GPx, alone or in the presence of γ -EC. Data are expressed as the means \pm standard deviation (n = 3)

GR に対する酸化型 GSH および酸化型 γ -EC の反応性の比較

GSSG を対照として、酸化型 γ -EC の GR に対する反応性を検討した。現在市販されている GR のうち、先行研究[49]で用いられたパン酵母由来 GR に加え、ヒト由来 GR も用いた。酵母 GR とヒト GR のアミノ酸配列の相同性は約 51%である。

まず、GSSG はどちらの GR でも GSH に還元され、本条件下で酵素反応が問題なく進むことを確認した(Fig.14a)。ここで、GSSG の GSH への還元はヒト GR においてパン酵母 GR よりも

反応速度が大きいことが明らかとなった。これまでに GR において種間の活性を比較した報告はなく、活性がヒトで酵母よりも有意に高いことは新たな知見である。同条件で酸化型 γ -EC を反応させたところ、どちらの GR においても γ -EC への還元は認められなかった (Fig.14b)。これらの結果

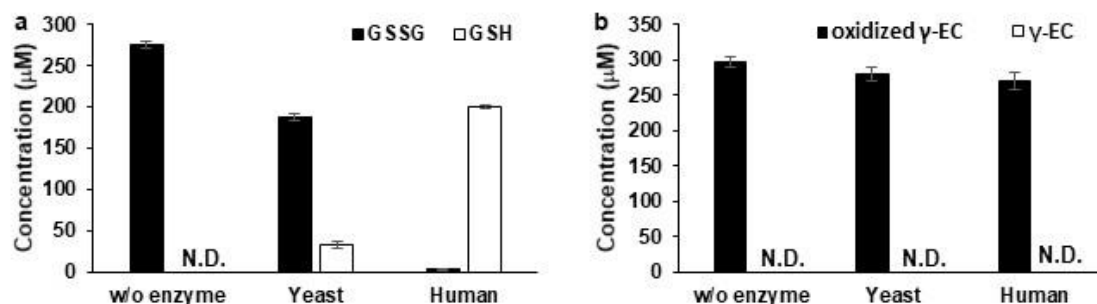


Fig.14 GSSG and Oxidized γ -EC reactivities with GR.

(a) Concentrations of GSSG (substrate) and GSH (product) in reaction with GR. (b) Concentrations of oxidized form of γ -EC (substrate) and γ -EC (product) in reaction with GR. N.D. stands for not detected. Data are expressed as the means \pm standard deviation (n = 3)

から、酸化型 γ -EC は GR の基質とならず、 γ -EC が GPx による反応や γ -EC 自身の活性酸素消去等によって生じた酸化型 γ -EC は、還元型に戻ることなく分解されるか、細胞外へ排出されるものと考えられる。また、細胞内の酸化型 γ -EC は GR による GSSG の還元を阻害しないことから、細胞内において還元型/酸化型のバランスによって維持される GSH のホメオスタシスには影響を与えないと考えられる。

GST に対する γ -EC の反応性

GST は、GSH の異物との抱合反応を触媒する酵素である。 γ -EC が GSH と同様に GST の基質となるかどうか CDNB を人工基質として用いた反応により解析を行った。その結果、 γ -EC の反応速度は GSH の約 20%となり、Lineweaver-Burk プロットに変換して求めた K_m 値および V_{max} 値は、GSH の 223 μ M および 1.24 μ mol/min/mg-protein に対して、 γ -EC では 152 μ M および 0.047 μ mol/min/mg-protein となった。これらの結果から、 γ -EC は GSH に比べて反応速度

は劣るものの GST の基質となり、異物抱合能を有することが明らかとなった。GSH と γ -EC の反応速度の差は、Gly の有無による両者の構造の違いに起因するものと考えられる。また、今回用いたウマ由来 GST とヒト GST のアミノ酸配列相同性は約 81%と高いことから、 γ -EC はヒトにおいても同様の反応性を示すと予想される。したがって、 γ -EC が細胞内に存在すれば、GSH の代替物質として抱合による異物に対する無毒化反応を担うことができると考えられる。

GGT に対する γ -EC の反応性

GGT は、細胞膜の外側に存在する膜結合型の酵素であり、 γ -グルタミル結合を加水分解する作用、さらにはこれによって得られた γ -グルタミル基をアミノ酸やジペプチドなどに転移させる作用を持つ。GGT は、

- (1) 細胞内での GSH の合成に必要な構成アミノ酸を供給する
- (2) 細胞外に放出された GSH 抱合体を代謝し生体異物を解毒する
- (3) GSH および GSSG の分解により生体内の酸化還元バランスを調節する

などの重要な役割を担う。一方、がん細胞では GGT を高発現するものが多く、抗がん剤に対する耐性獲得や転移に関わるといった報告もある[54-56]。

GGT に対する GSH と γ -EC の反応性の比較

γ -EC が GGT の基質となるかどうかについて検討した。まず、ウシ腎臓由来 GGT を用いて、GSH および γ -EC の基質としての反応性を調べたところ、両者の減少速度はほぼ同等であり、 γ -EC が GSH と同様に GGT の基質となることが示された (Fig.15a,c)。また、その分解物が Glu および Cys であることも確認した。

さらに、 γ -EC が直接的および間接的に活性酸素消去作用を示した際に生成されることが考えられる酸化型 γ -EC に対する反応性を調べたところ、GSSG と同様に GGT の基質となることが示された (Fig.15b,d)。また、酸化型 γ -EC の減少とともに、HPLC のクロマト上で二つのピークが順に増

えることが確認された。これらの生産物の同定はできていないものの、酸化型 γ -EC には二つの γ -グルタミル結合が存在するため、GGT によってその結合が順番に分解され、Cys の酸化二量体である Cys-Cys が生成されると考えられる。

また、 K_m 値および V_{max} 値を求めたところ、 γ -EC についてはそれぞれ 46.9 μ M および 4.07 μ mol/min/mg-protein となり、GSH の 26.1 μ M および 2.52 μ mol/min/mg-protein と同等の値となった。これは、Fig.15 に示した両者を基質とする GGT の反応速度がほぼ同等であることを裏付けるものである。

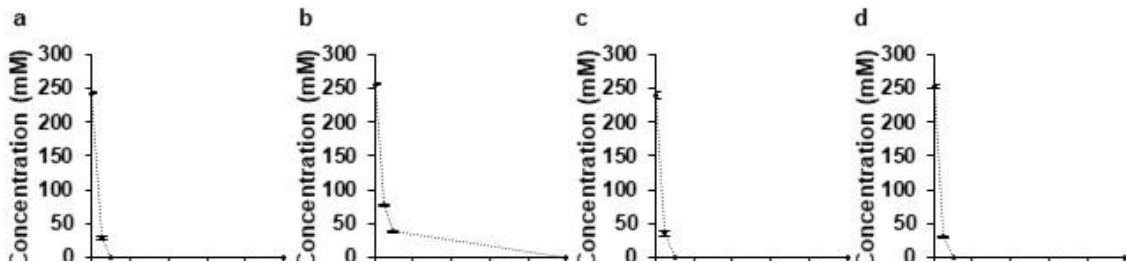


Fig.15 Reactivities of (a) GSH, (b) GSSG, (c) γ -EC, and (d) oxidized form of γ -EC with GGT. Data are expressed as the means \pm standard deviation ($n = 3$)

γ -EC の GGT との反応における GGT 阻害剤の影響

GGT は、N 末端求核性加水分解酵素の一種であり、Thr381 の OH 基の酸素による求核攻撃により γ -グルタミル結合を形成する Glu と Cys のペプチド結合を切断することが知られている[57]。先の検討で、 γ -EC は GSH と同様に GGT の基質となったことから、GGT においては同じ基質結合部位に結合して反応すると考えられる。そこで、 γ -EC の結合部位を確認するために、GSH のアナログであり、GSH の GGT における結合部位に結合し GSH の反応を不可逆的に阻害する 2-アミノ-4-[[3-(カルボキシメチル)フェニル](メチル)ホスホ]ブタン酸(GGsTop)[58]の γ -EC の反応性に対する影響を調べた。その結果、GGsTop は γ -EC の反応を GSH と同様に濃度依存的に強く阻害した(Fig.16a,b)。これらの結果から、 γ -EC は GGT において GSH と同じ基質結合部位に結合してペプチド結合が切断されることが示された。

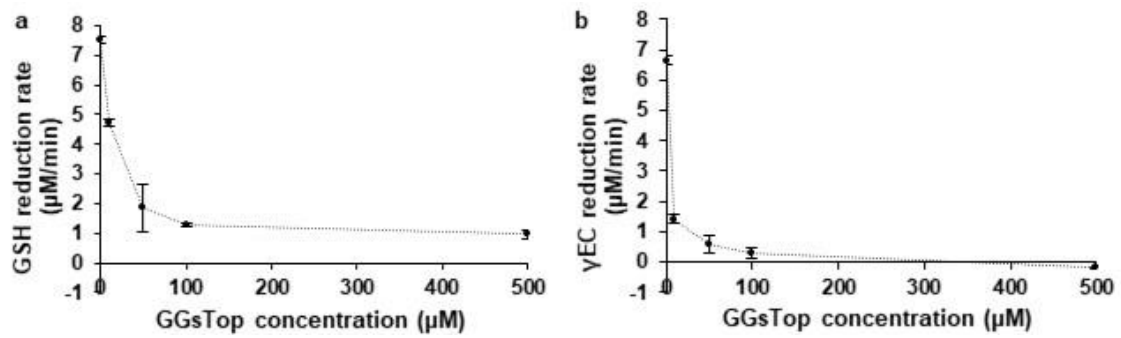


Fig.16 Inhibition of GGSTop to reactivities of (a) GSH, and (b) γ -EC with GGT. Data are expressed as the means \pm standard deviation (n = 3)

第四節 考察

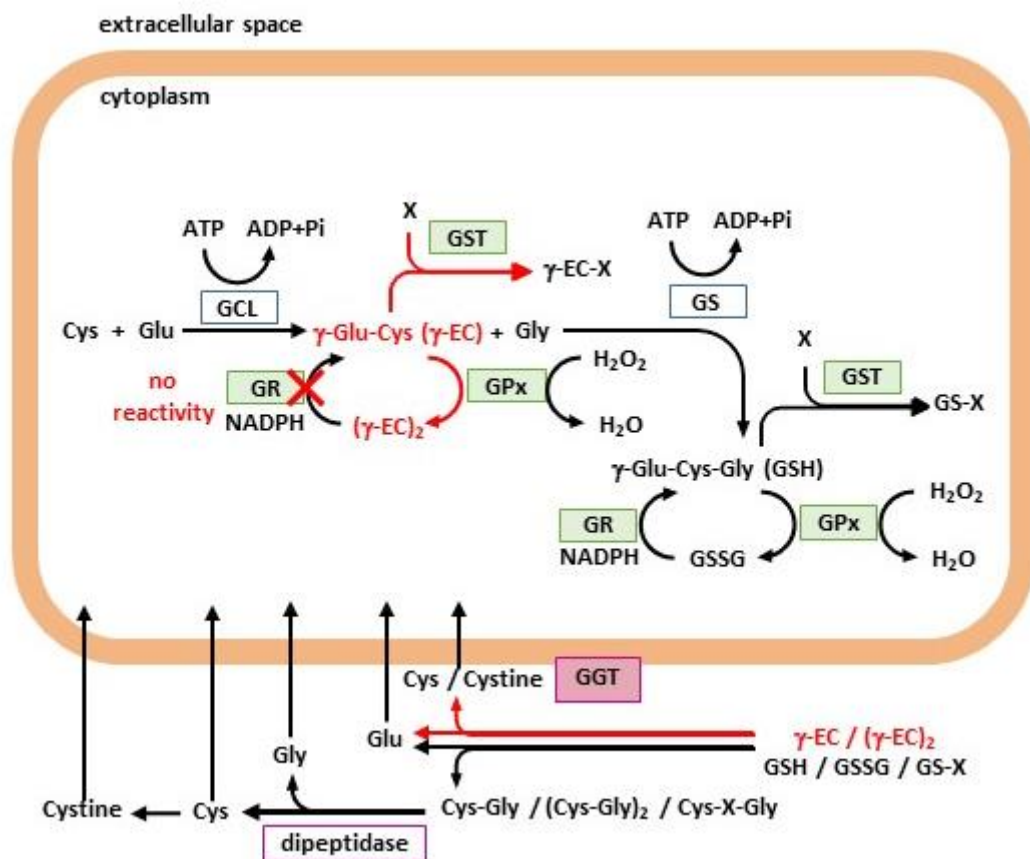


Fig.17 Reactivity of γ -glutamyl-cysteine with intracellular and extracellular glutathione metabolic enzymes.

本章における検討により、 γ -EC は GPx および GST の基質となるが、酸化型 γ -EC は GR の基質とならないことが明らかとなった。細胞内では、酸化された γ -EC を GR によって還元型に戻すことはできないものの、細胞内に存在すれば GSH の代替物質として H_2O_2 消去や異物抱合を担い、GSH の働きを補助することができると考えられる。この場合、生じた酸化型 γ -EC や γ -EC の異物抱合体は GSH と同様に ABC トランスポーターの一種である MRP によって細胞外へと能動輸送されると予想される[59-61]。本研究により、 γ -EC と酸化型 γ -EC が GGT の基質となることが初めて明らかとなった。したがって、細胞外へ出た酸化型 γ -EC は GGT によって分解されて 2 つの Glu と Cys-Cys となると考えられる。これらはそれぞれ細胞内に取り込まれて GSH の生合成に用いられる。

これまでの研究から、外部から γ -EC を投与した場合に細胞内の GSH 濃度が増加することから、 γ -EC が血漿中に存在すれば GSH とは異なり相当量が細胞内に取り込まれると考えらる。細胞膜における γ -EC の輸送は、Glu や Cys、あるいは Cys-Cys のトランスポーターによって行われる可能性もあるが、輸送機構の詳細は明らかとなっていない。外部から投与されて血漿に入った γ -EC は、そのまま細胞に取り込まれるのと並行して、GGT によって Glu と Cys に分解され、GSH の場合と同様にこれらの構成アミノ酸は細胞内に輸送されて GSH の生合成に使われると考えられる。 γ -EC は、直接活性酸素を消去する機能を示すことから、血漿中で活性酸素と反応することによって生成した酸化型 γ -EC も同様に GGT による分解を受け、その構成アミノ酸は細胞内へ輸送されることが考えられる。したがって、外部から投与された γ -EC は、血漿中に入ると、

- 1) 直接細胞内に取り込まれた後 GS によって GSH へ変換され、GSH 濃度を上昇させる。
- 2) 血漿中や取り込まれた細胞内で、抗酸化機能や異物除去機能を果たす。
- 3) 血漿中で GGT によって構成アミノ酸の Glu と Cys に分解され、これらは細胞内へ輸送されて GSH 生合成系に入り、細胞の生理条件によっては速やかに GSH へと変換される。
- 4) 血漿中での抗酸化反応により酸化されて酸化型 γ -EC になると、3)と同じく GGT によって構成アミノ酸に分解され、得られた Glu と Cys-Cys は細胞内へ輸送されて GSH 生合成系に

入る。

なお、Cys-Cys は、Cys とは異なるトランスポーターによって細胞内に取り込まれること[62][63]、細胞内では速やかに Cys に還元されることが知られている。 γ -EC は、上記の 1)から 4)によって自らの抗酸化機能と細胞内の GSH 濃度を上昇させる働きを示すが、老化した細胞や慢性疾患の細胞においては 3)と 4)に示した GSH の生合成が正常に機能しなくなるので、1)によって有効な GSH 供給源となる。外部から投与した GSH についても γ -EC と同様に 3)と 4)により細胞内 GSH の生合成に貢献するが、細胞内へ取り込まれにくいこと 1)のような直接的に GSH 濃度の上昇させる機能は期待できない。そのため、GSH の生合成が正常に機能しない老化した細胞や慢性疾患の細胞においては GSH の投与は大きな効果を示さないと考えられる。また、GSH の GGT による分解物である Cys-Gly は強いプロオキシダント効果を示し細胞に傷害を与えることから、GSH を外部から投与する場合は濃度管理が重要となる。 γ -EC は、GSH にはない 1)の機能を有することと、Gly 残基を持たないために GGT で分解されても Cys-Gly を生成せず、また GSH 生合成中間体という生体成分であるため高濃度での投与が可能となる。NAC については細胞内へは取り込まれることがこれまでの研究から明らかとなっているが、GSH の生合成が正常に機能しない老化した細胞や慢性疾患の細胞においては大きな効果を示さないと考えられる。これらのことから、 γ -EC を投与した場合には GSH・NAC よりも優れた機能が期待できる。前述したとおり、細胞内の GSH 濃度の低下は老化やアルツハイマー型認知症などのコンフォメーション病に分類される慢性疾患等、多くの疾患で起こっている。そのような GCL の発現や活性が低下した細胞内でも GSH の供給源となり得る γ -EC には、細胞内の酸化還元バランスを整える新規の医薬品や、機能性食品として有用であり、高齢化社会の中で国民の健康をサポートできる可能性がある。

第二章に示したように本研究により、現在非常に高価で入手し難い γ -EC の安価で安定な生産系の構築が可能になったことから、今後研究が進んでその体内動態や細胞内外での挙動が明らかとなり、また安全性の確認や GSH との機能の差別化が明確になることにより、新規の医薬品や食品、化粧品の機能性成分として利用されることを期待したい。

結論

γ -EC は有用かつ安全な高機能性物質であり、特に老化や慢性疾患においては GSH よりも優れた機能が期待できるが、未だ作用機構や生体内での動態については詳細な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。また、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、その有用性が認められたとしても、現状の製造方法は高コストであることから、製品化に向けた工業生産は難しいと考えられる。そこで本研究では、 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 NsPCS を用いた新規生産系の構築を図った。また、これまでほとんど知見がない γ -EC の生体内での機能と動態の分子レベルでの解明に向けた基礎研究として、GGT を始め細胞内外の GSH 代謝酵素、特にその機能と細胞内濃度維持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、我々が初めて発見したこれまでに生物で見出されていない GSH を γ -EC へ変換することができるラン藻由来の酵素、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。本反応は、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、 γ -EC の新規生産系として非常に有用である。

第二章においては、第一章で得られた知見をもとに、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 を用いて安価で安定な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、100 mM の GSH を完全に γ -EC へ変換できることを確認した。さらにセルロースシートを担体とした場合には、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回のバッチ式での繰り返し生産が可能なこと、カラム型セルロースモノリスを担体とした場合には、少なくとも 10 日間連続して安定に γ -EC を生産できることを確認した。100 mM の GSH から短期間に高収率で γ -EC を生産できることから、高い生

産性と容積効率が得られ、安価で安定な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 が優れた機能を示すための生体内での動態や挙動に関する研究の一環として、GSH の代謝酵素、特に GGT を始め GSH の機能と細胞内濃度維持に関わる重要な酵素に対する反応性の解析を行った。その結果、 γ -EC は GPx および GST の基質となるが、酸化型 γ -EC は 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 が GGT の良好な基質となることも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 濃度を上昇させること、血漿中および細胞中で抗酸化機能を示すことだけでなく、血漿中で GGT により分解された構成アミノ酸が細胞内に取り込まれ GSH 生合成に用いられることにより、GSH の持つ機能を補完・強化することができると考えられる。これに加えて、老化や慢性疾患により GSH の生合成調節が破綻した場合は、 γ -EC 投与により GSH にはない細胞内の GSH 濃度維持効果が期待できることから、これらにおいては GSH よりも優れた機能を発揮できると考えられる。

今後本研究で得られた知見をもとに研究が進み、 γ -EC の安価で安定な供給が実現し、 γ -EC が安全で優れた機能を持つ物質として、医薬品、食品や化粧品へ広く利用されることを期待する。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、学部時代から長年にわたり、時に叱咤激励し、終始熱心に御指導、御鞭撻、そしてあたたかなご配慮をいただきました和歌山県立医科大学薬学部教授 平田 收正先生に衷心より感謝の意を表します。

また、本稿を終えるにあたり、大阪大学大学院薬学研究科教授 荒井 雅吉先生に懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました。ここに心より感謝の意を表します。

また、本論文を纏めるにあたり、貴重な御助言を賜りました大阪大学大学院薬学研究科教授 堤 康央先生、同准教授の岡田 欣晃先生に心より感謝の意を表します。

また、固定化の研究にあたり、セルロースモノリスをご提供いただき、丁寧に御指導いただきました大阪大学大学院工学研究科教授 宇山 浩先生に心より感謝の意を表します。

また、研究を遂行するにあたり、終始励まし、御支援をいただきました大阪大学大学院薬学研究科准教授 原田 和生先生に心より感謝の意を表します。

また、本研究に際し、貴重な御助言を賜りました和歌山県立医科大学薬学部教授 長野 一也先生に心より御礼申し上げます。

また、研究を遂行するにあたり、あたたかな御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科講師 松浦 秀幸先生に心より感謝の意を表します。

また、研究を遂行するにあたり、御支援を賜りました大阪大学大学院薬学研究科准教授 辻野 博文先生に心より感謝の意を表します。

また、共に研究に従事してくれた大野 萌華修士、中井 拓也修士、吉田 紗季学士、立石 誠 学士、中野 充貴学士、豊田 裕介学士、宮澤 隆太学士をはじめとする大阪大学大学院薬学研究科応用環境生物学分野、死因究明学研究室、薬用資源学研究室の皆さまに心より感謝の意を表します。

最後に、いつも温かく見守りサポートし続けてくれた母・姉、学び続ける背中を見せてくれた父・兄、その存在で支え、応援してくれた夫と娘：空那・息子：風翔に心より感謝の意を表します。

参考文献

1. Petters C, Dringen R. Uptake, metabolism and toxicity of iron oxide nanoparticles in cultured microglia, astrocytes and neurons. Springerplus. 2015;4(Suppl1):L32. Published 2015 Jun 12. doi:10.1186/2193-1801-4-S1-L32
2. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. Mol Aspects Med. 2009;30(1-2):1-12. doi:10.1016/j.mam.2008.08.006
3. Meister A, Anderson ME. Glutathione. Annu Rev Biochem. 1983;52:711-760. doi:10.1146/annurev.bi.52.070183.003431
4. Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. J Amino Acids. 2012;2012:736837. doi:10.1155/2012/736837
5. Heruye SH, Maffofou Nkenyi LN, Singh NU, et al. Current Trends in the Pharmacotherapy of Cataracts. Pharmaceuticals (Basel). 2020;13(1):15. Published 2020 Jan 16. doi:10.3390/ph13010015
6. Siegert M, Kranawetvogl A, Thiermann H, John H. Glutathione as an antidote for sulfur mustard poisoning: Mass spectrometric investigations of its potency as a chemical scavenger. Toxicol Lett. 2018;293:31-37. doi:10.1016/j.toxlet.2017.12.013
7. Park EY, Shimura N, Konishi T, et al. Increase in the protein-bound form of glutathione in human blood after the oral administration of glutathione. J Agric Food Chem. 2014;62(26):6183-6189. doi:10.1021/jf501338z
8. Allen J, Bradley RD. Effects of oral glutathione supplementation on systemic oxidative stress biomarkers in human volunteers. J Altern Complement Med. 2011;17(9):827-833. doi:10.1089/acm.2010.0716
9. Morrison JP, Coleman MC, Aunan ES, Walsh SA, Spitz DR, Kregel KC. Thiol

- supplementation in aged animals alters antioxidant enzyme activity after heat stress. *J Appl Physiol* (1985). 2005;99(6):2271-2277. doi:10.1152/jappphysiol.00412.2005
10. Nakata K, Kawase M, Ogino S, et al. Effects of age on levels of cysteine, glutathione and related enzyme activities in livers of mice and rats and an attempt to replenish hepatic glutathione level of mouse with cysteine derivatives. *Mech Ageing Dev*. 1996;90(3):195-207. doi:10.1016/0047-6374(96)01771-x
11. McGill MR, Jaeschke H. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharm Res*. 2013;30(9):2174-2187. doi:10.1007/s11095-013-1007-6
12. Pressman P, Bridge WJ, Zarka MH, Hayes AW, Clemens R. Dietary γ -Glutamylcysteine: Its Impact on Glutathione Status and Potential Health Outcomes [published online ahead of print, 2020 Dec 11]. *J Diet Suppl*. 2020;1-11. doi:10.1080/19390211.2020.1856266
13. Gould RL, Pazdro R. Impact of Supplementary Amino Acids, Micronutrients, and Overall Diet on Glutathione Homeostasis. *Nutrients*. 2019;11(5):1056. Published 2019 May 11. doi:10.3390/nu11051056
14. Chen CN, Brown-Borg HM, Rakoczy SG, Ferrington DA, Thompson LV. Aging impairs the expression of the catalytic subunit of glutamate cysteine ligase in soleus muscle under stress. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010;65(2):129-137. doi:10.1093/gerona/glp194
15. Yuan J, Zhang Z, Li L, Song W. Resveratrol affects the expression of glutamate cysteine ligase in the kidneys of aged rats. *Exp Ther Med*. 2014;7(6):1762-1766. doi:10.3892/etm.2014.1664
16. Rebrin I, Sohal RS. Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging. *Adv Drug*

- Deliv Rev. 2008;60(13-14):1545-1552. doi:10.1016/j.addr.2008.06.001
17. Ferguson G, Bridge W. Glutamate cysteine ligase and the age-related decline in cellular glutathione: The therapeutic potential of γ -glutamylcysteine. Arch Biochem Biophys. 2016;593:12-23. doi:10.1016/j.abb.2016.01.017
 18. Franklin CC, Backos DS, Mohar I, White CC, Forman HJ, Kavanagh TJ. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. Mol Aspects Med. 2009;30(1-2):86-98.
doi:10.1016/j.mam.2008.08.009
 19. Grant CM, MacIver FH, Dawes IW. Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. Mol Biol Cell. 1997;8(9):1699-1707. doi:10.1091/mbc.8.9.1699
 20. Ristoff E, Hebert C, Njålsson R, Norgren S, Rooyackers O, Larsson A. Glutathione synthetase deficiency: is gamma-glutamylcysteine accumulation a way to cope with oxidative stress in cells with insufficient levels of glutathione? J Inherit Metab Dis. 2002;25(7):577-584. doi:10.1023/a:1022095324407
 21. Zarka MH, Bridge WJ. Oral administration of γ -glutamylcysteine increases intracellular glutathione levels above homeostasis in a randomised human trial pilot study. Redox Biol. 2017;11:631-636. doi:10.1016/j.redox.2017.01.014
 22. Yalcin A, Armagan G, Turunc E, Konyalioglu S, Kanit L. Potential neuroprotective effect of gamma-glutamylcysteine ethyl ester on rat brain against kainic acid-induced excitotoxicity. Free Radic Res. 2010;44(5):513-521. doi:10.3109/10715761003645964
 23. Corti A, Bonetti J, Dominici S, et al. Induction of Gamma-Glutamyltransferase Activity and Consequent Pro-oxidant Reactions in Human Macrophages Exposed to Crocidolite

- Asbestos. *Toxicol Sci.* 2020;177(2):476-482. doi:10.1093/toxsci/kfz175
24. Mårtensson J. Method for determination of free and total glutathione and gamma-glutamylcysteine concentrations in human leukocytes and plasma. *J Chromatogr.* 1987;420(1):152-157. doi:10.1016/0378-4347(87)80166-4
25. Bellini E, Varotto C, Borsò M, Rugnini L, Bruno L, Sanità di Toppi L. Eukaryotic and Prokaryotic Phytochelatin Synthases Differ Less in Functional Terms Than Previously Thought: A Comparative Analysis of *Marchantia polymorpha* and *Geitlerinema* sp. PCC 7407. *Plants (Basel)*. 2020;9(7):914. Published 2020 Jul 20. doi:10.3390/plants9070914
26. Zenk MH. Heavy metal detoxification in higher plants--a review. *Gene*. 1996;179(1):21-30. doi:10.1016/s0378-1119(96)00422-2
27. Rea PA. Phytochelatin synthase: of a protease a peptide polymerase made. *Physiol Plant*. 2012;145(1):154-164. doi:10.1111/j.1399-3054.2012.01571.x
28. Tsuji N, Nishikori S, Iwabe O, et al. Characterization of phytochelatin synthase-like protein encoded by *alr0975* from a prokaryote, *Nostoc* sp. PCC 7120. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;315(3):751-755. doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.122
29. Tsuji N, Nishikori S, Iwabe O, et al. Comparative analysis of the two-step reaction catalyzed by prokaryotic and eukaryotic phytochelatin synthase by an ion-pair liquid chromatography assay. *Planta*. 2005;222(1):181-191. doi:10.1007/s00425-005-1513-9
30. Harada E, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S. A cyanobacterial protein with similarity to phytochelatin synthases catalyzes the conversion of glutathione to gamma-glutamylcysteine and lacks phytochelatin synthase activity. *Phytochemistry*. 2004;65(24):3179-3185. doi:10.1016/j.phytochem.2004.09.017
31. Nishiuchi H., Sushiro M., Sugimoto R., Nishimura Y., Kuroda M.: Gamma-

- glutamylcysteine –producing yeast and method of screening the same,
WO/2003/046154, 2003-06-05
32. Nojiri M., Yasohara Y.: Method for producing γ -glutamylcysteine and glutathione,
International patent, WO2016/017631, 2016-02-04.
33. Bridge W. J., Zarka M. H.: Process for the production of γ -glutamylcysteine,
WO2006/102722,2006-10-05
34. Oven M, Page JE, Zenk MH, Kutchan TM. Molecular characterization of the homo-
phytochelatin synthase of soybean *Glycine max*: relation to phytochelatin synthase. *J*
Biol Chem. 2002;277(7):4747-4754. doi:10.1074/jbc.M108254200
35. Hirata K, Tsujimoto Y, Namba T, et al. Strong induction of phytochelatin synthesis by
zinc in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. *J Biosci Bioeng.* 2001;92(1):24-29.
doi:10.1263/jbb.92.24
36. Lineweaver, H. and Burk, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants.
Journal of American Chemical Society,1934 ;56, 658. doi:10.1021/ja01318a036
37. 田中渥夫、松野隆一：“酵素工学概論”、p.3, 21、コロナ社(1995)
38. Morpurgo M, Bayer EA, Wilchek M. N-hydroxysuccinimide carbonates and carbamates
are useful reactive reagents for coupling ligands to lysines on proteins. *J Biochem*
Biophys Methods. 1999;38(1):17-28. doi:10.1016/s0165-022x(98)00027-x
39. Xin Y, Wang G, Han W, Shen Y, Uyama H. An ideal enzyme immobilization carrier: a
hierarchically porous cellulose monolith fabricated by phase separation method. *Pure*
and Applied Chemistry. 2018;90(6): 1055-1062. doi.org/10.1515/pac-2017-0710
40. Toppo S, Flohé L, Ursini F, Vanin S, Maiorino M. Catalytic mechanisms and specificities
of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim Biophys Acta.*
2009;1790(11):1486-1500. doi:10.1016/j.bbagen.2009.04.007

41. Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med*. 2016;95:27-42. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028
42. Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7369-7375. doi:10.1038/sj.onc.1206940
43. Hanigan MH. Gamma-glutamyl transpeptidase: redox regulation and drug resistance. *Adv Cancer Res*. 2014;122:103-141. doi:10.1016/B978-0-12-420117-0.00003-7
44. Zhang H, Forman HJ, Choi J. Gamma-glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis. *Methods Enzymol*. 2005;401:468-483. doi:10.1016/S0076-6879(05)01028-1
45. Bachhawat AK, Yadav S. The glutathione cycle: Glutathione metabolism beyond the γ -glutamyl cycle. *IUBMB Life*. 2018 Jul;70(7):585-592. doi: 10.1002/iub.1756.
46. Franco R, Navarro G, Martínez-Pinilla E. Antioxidants versus Food Antioxidant Additives and Food Preservatives. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(11):542. Published 2019 Nov 11. doi:10.3390/antiox8110542
47. Dilokthornsakul W, Dhipayom T, Dilokthornsakul P. The clinical effect of glutathione on skin color and other related skin conditions: A systematic review. *J Cosmet Dermatol*. 2019;18(3):728-737. doi:10.1111/jocd.12910
48. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem*. 2009;390(3):191-214. doi:10.1515/BC.2009.033
49. Quintana-Cabrera R, Fernandez-Fernandez S, Bobo-Jimenez V, et al. γ -Glutamylcysteine detoxifies reactive oxygen species by acting as glutathione peroxidase-1 cofactor. *Nat Commun*. 2012;3:718. Published 2012 Mar 6.

doi:10.1038/ncomms1722

50. M, Rice B, Sebastian A, et al. Neuroproteomic study of nitrated proteins in moderate traumatic brain injured rats treated with gamma glutamyl cysteine ethyl ester administration post injury: Insight into the role of glutathione elevation in nitrosative stress. *Proteomics Clin Appl.* 2016;10(12):1218-1224. doi:10.1002/prca.201600004
51. Li HQ, Xia SN, Xu SY, Liu PY, Gu Y, Bao XY, Xu Y, Cao X. γ -Glutamylcysteine Alleviates Ischemic Stroke-Induced Neuronal Apoptosis by Inhibiting ROS-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2021 Nov 16;2021:2961079. doi: 10.1155/2021/2961079.
52. Liu Y, Chen Z, Li B, et al. Supplementation with γ -glutamylcysteine (γ -GC) lessens oxidative stress, brain inflammation and amyloid pathology and improves spatial memory in a murine model of AD. *Neurochem Int.* 2021;144:104931. doi:10.1016/j.neuint.2020.104931
53. Lai Y, Hickey RW, Chen Y, et al. Autophagy is increased after traumatic brain injury in mice and is partially inhibited by the antioxidant gamma-glutamylcysteinyl ethyl ester. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28(3):540-550. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600551
54. Bansal A, Simon MC. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *J Cell Biol.* 2018;217(7):2291-2298. doi:10.1083/jcb.201804161
55. Fliedl L, Wieser M, Manhart G, et al. Controversial role of gamma-glutamyl transferase activity in cisplatin nephrotoxicity. *ALTEX.* 2014;31(3):269-278. doi:10.14573/altex.1311152
56. Pompella A, De Tata V, Paolicchi A, Zunino F. Expression of gamma-glutamyltransferase in cancer cells and its significance in drug resistance. *Biochem Pharmacol.* 2006;71(3):231-238. doi:10.1016/j.bcp.2005.10.005

57. Castonguay R, Halim D, Morin M, et al. Kinetic characterization and identification of the acylation and glycosylation sites of recombinant human gamma-glutamyltranspeptidase. *Biochemistry*. 2007;46(43):12253-12262. doi:10.1021/bi700956c
58. Han L, Hiratake J, Kamiyama A, Sakata K. Design, synthesis, and evaluation of gamma-phosphono diester analogues of glutamate as highly potent inhibitors and active site probes of gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemistry*. 2007;46(5):1432-1447. doi:10.1021/bi061890j
59. Ballatori N, Hammond CL, Cunningham JB, Krance SM, Marchan R. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;204(3):238-255. doi:10.1016/j.taap.2004.09.008
60. Gordillo GM, Biswas A, Khanna S, Spieldenner JM, Pan X, Sen CK. Multidrug resistance-associated protein-1 (MRP-1)-dependent glutathione disulfide (GSSG) efflux as a critical survival factor for oxidant-enriched tumorigenic endothelial cells. *J Biol Chem*. 2016;291(27):14394. doi:10.1074/jbc.A115.688879
61. Homolya L, Váradi A, Sarkadi B. Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors*. 2003;17(1-4):103-114. doi:10.1002/biof.5520170111
62. Lo M, Wang YZ, Gout PW. The x(c)- cystine/glutamate antiporter: a potential target for therapy of cancer and other diseases. *J Cell Physiol*. 2008;215(3):593-602. doi:10.1002/jcp.21366
63. Sweiry JH, Sastre J, Viña J, Elsässer HP, Mann GE. A role for gamma-glutamyl transpeptidase and the amino acid transport system xc- in cystine transport by a human

pancreatic duct cell line. J Physiol. 1995;485 (Pt 1):167-177.

doi:10.1113/jphysiol.1995.sp020721