

平成 22 年 7 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19310143

研究課題名（和文）グルタチオン代謝と酸化ストレスを制御する薬剤の開発とケミカルバイオロジー

研究課題名（英文） Development of chemicals that control the glutathione metabolism and oxidative stress and their use for chemical biology

研究代表者

平竹 潤 (HIRATAKE JUN)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：80199075

研究成果の概要（和文）：

本研究は、生体内で、活性酸素種や生体異物の解毒、除去、代謝に中心的役割を担っているシステイン含有トリペプチド、グルタチオン(γ -Glu-Cys-Gly)について、その生合成の律速酵素である γ -グルタミルシステイン合成酵素 (GCS) および、グルタチオン代謝の初発酵素である γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) について、それぞれの酵素の反応機構にもとづいた特異的阻害剤（遷移状態アナログ）を合成し、生体内のグルタチオン濃度および酸化ストレスを化学的に制御する新規生理活性物質を得ることにより、グルタチオン代謝と生理現象（疾患）の解明に役立つ化学プローブや医薬品のリード、薬用化粧品等への応用の端緒をつかむことを目指したものである。

研究成果の概要（英文）：

This study concerns the development and applications of chemical tools that regulate the redox status of cells by designing and synthesizing specific inhibitors of γ -glutamylcysteine synthetase (GCS), the rate-determining enzyme in glutathione synthesis, and γ -glutamyl transpeptidase (GGT), the initial and primarily important enzyme in the glutathione metabolism. The inhibitors are to serve as chemical probes to investigate the relationships between cell redox potential and various diseases and as leads to agrochemicals and pharmaceuticals, as well as to antiaging cosmetics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：生物有機化学、酵素化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：グルタチオン、 γ -グルタミルシステイン合成酵素、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ、遷移状態アナログ阻害剤、酸化ストレス制御、病原性連鎖球菌、アンチエイジング化粧品、急性腎障害軽減

1. 研究開始当初の背景

グルタチオンは細胞中に高濃度 (1-10 mM) 含まれ、細胞内の活性酸素種や生体異物 (重金属、アルキル化剤等) の除去にきわめて重要な働きをしている。グルタチオンは、構成アミノ酸である Glu, Cys, Gly により、N 末端から逐次縮合で生合成されるが、第一段階を触媒する GCS による γ -Glu-Cys の生成が律速である。したがって、GCS の阻害は、細胞内のグルタチオン濃度を直接的に引き下げ、細胞の酸化ストレスに大きな影響を与える。特に、グルタチオンによる活性酸素解毒機構を高度に発達させているマラリア原虫や病原性連鎖球菌等に対しては、GCS を標的とした酸化ストレスの亢進が有効と考えられる。したがって強力な阻害活性をもつ GCS 選択的阻害剤の開発が待たれていた。

一方、細胞内で合成されたグルタチオンは細胞外へと輸送され、外部のグルタチオンは細胞表面に発現する GGT によって、まず γ -グルタミル結合が切断され、次いで構成アミノ酸まで分解されてから細胞に取り込まれグルタチオンに再合成される。そのため、グルタチオンは血中濃度の低い Cys の供給源でもあり、GGT はその供給酵素とされている。また、生体異物と反応したグルタチオンは、GGT による γ -グルタミル結合の切断が代謝の開始点となるため、GGT は γ -グルタミル結合を切断できるほぼ唯一の酵素として、グルタチオンを介した生体異物解毒の初発段階を担う重要な酵素である。しかし、哺乳類 GGT の生理学的役割にはまだ不明な点が多い。例えば、血中の GGT 活性は、肝機能を調べるマーカー酵素として臨床検査に頻用されるが、その因果関係は明らかではない。また、多くの疫学調査により、狭心症、心筋梗塞などの虚血性心疾患と血中 GGT 活性との間には、他の因子とは独立した高い相関がみつねにみられるが、その因果関係ははっきりしていない。さらに、動脈硬化症では血管内壁に GGT が高発現し、脂質の過酸化に関与しているとする報告があり、GGT が抗酸化酵素と考えられる一方で、むしろ酸化ストレスを増大させる働き (pro-oxidant effect) をもつことが提唱されている。仮説として、グルタチオンが GGT により加水分解されて生じる Cys-Gly が高い反応性 SH をもち、これが金属イオンを介して酸素を一電子還元し活性酸素種を作り出すことが提唱されているが、真相ははっきりしない。ヒトを含めた哺乳類の GGT は、その立体構造も不明であり、生体における役割には、抗酸化および酸化ストレス増強という相反する作用が混在し、GGT 本来の生理学的役割と疾病との因果関係など、不明な点が多いのが現状である。そのため、GGT 選択的で強力な阻害剤の開発が期待されていた。

2. 研究の目的

本研究では、グルタチオン生合成および代謝に関わる 2 つの鍵酵素、GCS および GGT に注目し、それぞれの酵素の反応機構をもとにした遷移状態アナログ阻害剤を精密設計することにより、

(1) 両酵素を、それぞれ選択的かつ強力に阻害する阻害剤を開発し、生体内のグルタチオン生合成と代謝を人為的に制御する化学的ツールを開発すること、

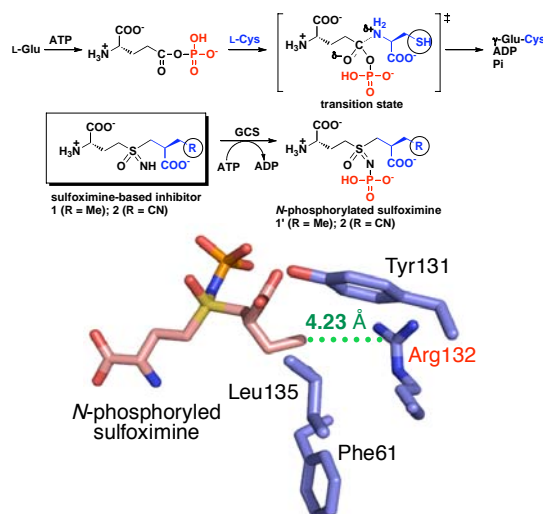
(2) 両阻害剤を化学プローブとして、グルタチオン代謝が関係すると思われる様々な生理現象、例えば、抗ガン剤耐性や放射線耐性の獲得機構、ピロリ菌の生活環、酸化ストレスによる疾患の発病メカニズムの解明すること、

(3) グルタチオン代謝異常 (酸化ストレス) を引き起こすことによって作用を発揮する新しい化学療法剤、たとえば、抗ガン剤・放射線耐性を克服する薬剤や、マラリアなどの寄生性原虫に有効な薬剤、あるいは、アテローム性動脈硬化症の治療薬につながるリード化合物を開発すること、

(4) これら阻害剤を用いて、*in vitro* および *in vivo* 試験を広く行い、未知の生理活性を見出し、そのメカニズムをさぐると同時に、その有効性を利用した実用化を図ることを目的として研究を行った。

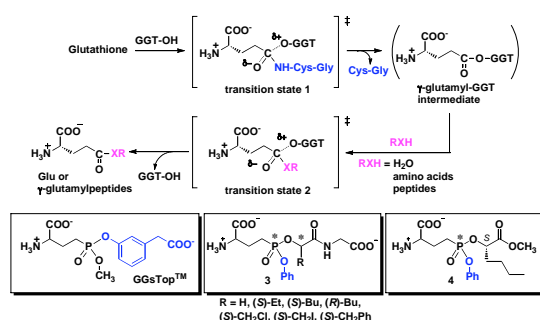
3. 研究の方法

(1) グルタチオン生合成の律速酵素である GCS は、Glu, Cys および ATP を基質とし、以下のような反応機構によりペプチド結合を形成する。そこで、反応の遷移状態に類似した反応機構依存性のスルホキシミン型遷移状態アナログ阻害剤に着目し、大腸菌 GCS の X 線結晶構造解析から、その Cys 結合サイトで側鎖の SH 基と相互作用するアミノ酸残基として Arg132 を特定し、そのグアニジノ基と SH 基との距離を、4.23 Å と見積もった。



そこで、この原子間距離に近く、Arg132のグアニジノ基と相互作用するよう、置換基Rにシアノ基を導入したようなスルホキシミン誘導体**2**を合成し、大腸菌および

*Streptococcus agalactiae*由来GCSについて阻害活性を測定した。
 (2) GGTは小サブユニットのN末端Thr残基を活性残基とし、 γ -グルタミル中間体を経る以下のような反応機構でグルタチオンを加水分解(ペプチド交換)すると考えられる。そこで、良好な脱離基を持った一連の遷移状態アナログ、 γ -ホスホン酸誘導体GGsTopTM、Cys-Gly部分を部分構造にもつペプチド型阻害剤**3**および**4**を合成し、ヒトおよび大腸菌GGTに対する阻害活性を調べた。また、Cys-Gly部分を単純化した構造を有し、ヒト



GGTに対する阻害活性および選択性が特に高かったGGsTopTMについて、その安定性、急性毒性を調べ、同時に、ヒト線維芽細胞のコラーゲン発現に対する効果、および、虚血再灌流による腎不全モデルラットにおける急性腎障害に対する影響を調べた。

4. 研究成果

(1) シアノ基を有するスルホキシミン型阻害剤**2**のGCSに対する阻害活性

本阻害剤**2**は、予想どおり、従来のスルホキシミン型阻害剤**1'**(R = CH₃)に比べ、大腸菌GCSに対する阻害活性が数倍増大していた(図1)。いずれも、阻害剤共存下でアッセイ曲線が上に凸のカーブを描く、いわゆるslow-binding inhibitorの様相を呈し、いずれの阻害剤も、酵素自身の作用により、酵素

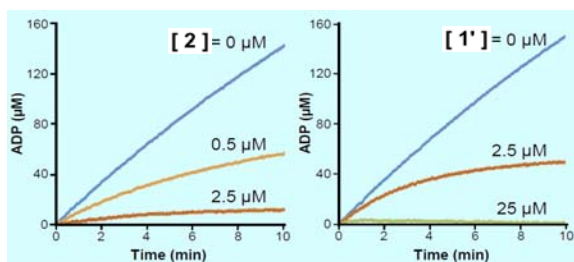


図1 大腸菌GCSに対するスルホキシミン型阻害剤の阻害アッセイ曲線

化合物**2**: スルホキシミン(R = CN)

化合物**1'**: スルホキシミン(R = Me)

の活性中心内でスルホキシミンNHがリン酸化を受け、遷移状態ときわめて類似したN-phosphorylated sulfoximine**1'**を生じる、いわゆる反応機構依存的阻害が起こっていることが示唆された。化合物**2**は、従来から用いられている市販のGCS阻害剤buthionine sulfoximine(BSO)の約7000倍の活性をもつ、世界最強のGCS阻害剤である。これは、化合物**2**が、Cysの認識に重要なカルボキシ基に加え、SH基をうまくミミクしたシアノ基を併せ持つ遷移状態アナログであるためと思われる。図2に、病原性微生物である*Streptococcus agalactiae*由来GCSに対する阻害活性を示す。

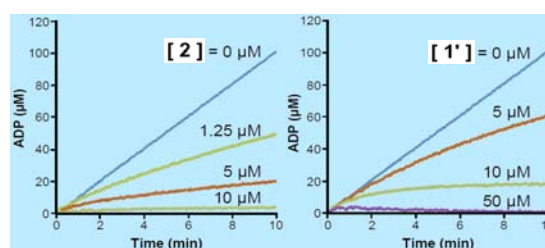


図2 *Streptococcus agalactiae* GCSに対するスルホキシミン型阻害剤の阻害アッセイ曲線

化合物**2**: スルホキシミン(R = CN)

化合物**1'**: スルホキシミン(R = Me)

この場合も、予想どおり、シアノ基をもつスルホキシミン**2**は、メチル基をもつ**1'**に比べて2倍程度の阻害活性を有していた。両酵素の一次構造のアラインメントを取るとArg132は保存されており、やはりシアノ基とArg132との相互作用により強い阻害が得られたものと考えられる。

(2) GGT阻害剤の合成とヒトGGTに対する阻害活性および生理活性

ヒトをはじめとする哺乳類のGGTは、グルタチオンおよびその抱合体を天然の基質とする。したがって、その活性中心は、グルタチオンのGlu部分に加え、Cys-Gly部分に対応する基質結合部位を持つはずで、その構造に最も近い遷移状態アナログ阻害剤**3**(R = Et)は、実際に非常に強い阻害活性を示した(酵素失活の二次反応速度定数 $k_{on} = 145 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)。一方、Cys部分がPheタイプの化合物**3**(R = CH₂Ph)は、ヒトGGTに対する阻害活性が極めて低かったのに対し($k_{on} = 4.4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)、大腸菌GGTに対しては、他の阻害剤に比べてとりわけ高い活性を示した($k_{on} = 389 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)。さらに興味あることに、ヒトGGTは、C末端のGly部分およびそのカルボキシ基を欠く化合物**4**に対しては不活性で、阻害は全く観察されなかった。一方、大腸菌GGTは弱いながらも阻害活性がみられたことから($k_{on} = 8.8$

$M^{-1}s^{-1}$)、ヒト GGT の本来の基質はグルタチオンそのものであるのに対し、大腸菌 GGT の本来の基質はグルタチオンではなく、芳香環を含む広い範囲の γ -グルタミルペプチドであることが示唆された。ヒト GGT が化合物 **4** では全く阻害されなかったことから、ヒト GGT にはグルタチオンの C 末端のカルボキシ基を特異的に認識する残基を有していると思われる。そこで、阻害剤 **3** (R = Et) をリガンドとする大腸菌 GGT の X 線結晶構造解析のデータ (図 3a) を用いてモデリングを行い、ヒト GGT の基質ポケットを予想した (図 3c)。

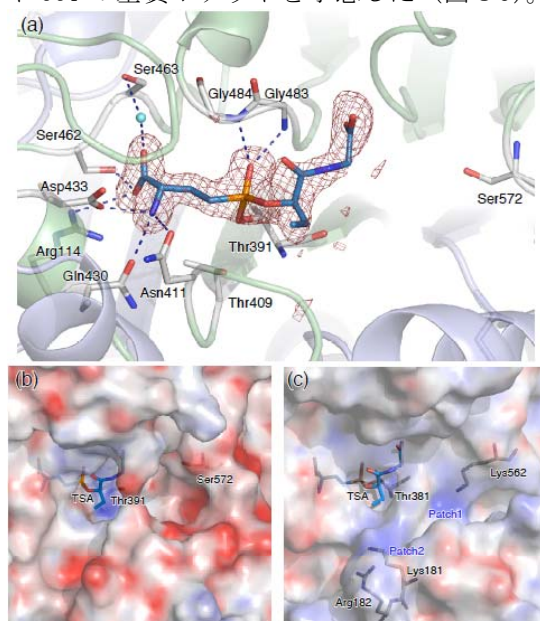


図 3 (a)大腸菌 GGT と阻害剤 **3** (R = Et) の複合体の X 線結晶構造。(b)大腸菌 GGT の基質ポケットにおける分子表面の静電ポテンシャル (赤：負電荷、青：正電荷)。(c) ヒト GGT 基質ポケットのモデルおよび阻害剤 **3** (R = Et) との結合モデル。分子表面の静電ポテンシャルを (b) と同様に示す。Patch1 および Patch2：特に正電荷の強い領域。

このモデルから、ヒト GGT の基質結合ポケットは正電荷を持つ領域が多く分布し、Patch1 および Patch2 で示した領域で特に正電荷が強いことから、このどちらかの領域により Gly 末端のカルボキシ基が認識されていると考えられた。そこで、リガンドである阻害剤 **3** (R = Et) の C 末端カルボキシ基から、Patch1 および Patch2 までの距離を計算したところ、それぞれ、約 3–8 Å、約 13–18 Å と見積もられた。この距離から、Patch1 領域、すなわち Lys562 (大腸菌 GGT では Ser572 に相当。図 3 (a)) の側鎖 ϵ アミノ基の正電荷が Gly 末端のカルボキシ基を認識していることが強く示唆された。そこで、ヒト GGT の Lys562 に部位特異的アミノ酸変異を導入して Lys562Ser 変異体を作成し、その活性を野生

型酵素と比較したところ、加水分解活性における野生型と Lys562Ser 変異体の活性比は 2.2 : 1 であったのに対し、Gly-Gly に対するトランスペプチダーゼ活性比は 51 : 1 となり、Lys562Ser 変異体は Gly-Gly に対するトランスペプチダーゼ活性が著しく低下していることがわかった。また、Gly メチルエステルに対するトランスペプチダーゼ活性では、野生型と変異酵素でほとんど差がなかった。すなわち、ヒト GGT は、活性中心にある Lys562 によって、グルタチオンおよび Gly-Gly など γ -グルタミル受容体の C 末端カルボキシ基を静電的相互作用により強く認識していることが明らかになった。

一方、合成的に興味あることに、阻害剤 **3** における Cys 部分の α 炭素の立体化学がリン原子上のキラリティーに影響を与え、リン原子上の不斉に由来するジアステレオマーを分離することができた。そこで、リン原子上の立体化学が阻害活性に及ぼす影響を調べたところ、ヒト GGT では、キラルなリン原子をもつジアステレオマーの片方にのみ強い阻害活性が見られ、逆の立体配置のリン原子をもつジアステレオマーには、全く阻害活性がなかった。この傾向および有効なリン原子の立体配置は、大腸菌 GGT でも同じであった。すなわち、GGT はホスホン酸のリン原子上のキラリティーを厳密に見分け、片方の立体配置をもつリン原子とだけ反応し、失活することが判明した。さらに、Cys 部分の α 炭素の立体配置も重要であり、特にヒト GGT は、L-配置のアミノ酸特異的であった。たとえば、ヒト GGT は、L-アミノ酸に対応する阻害剤 **3** (R = (S)-Bu) によって著しく阻害を受けるのに対し ($k_{on} = 63.2 M^{-1}s^{-1}$)、逆の立体配置をもつ化合物 **3** (R = (R)-Bu) によっては、全く阻害を受けなかった。このことは、ヒト GGT が L-Cys をもつ天然型のグルタチオンに特化した酵素であることを強く示唆している。興味深いことに、大腸菌 GGT では、この部分の立体特異性がゆるく、弱いながらも、D-型のアミノ酸に対応する化合物 **3** (R = (R)-Bu) によって阻害された ($k_{on} = 1.3 M^{-1}s^{-1}$)。すなわち、大腸菌 GGT はグルタチオンだけでなく、広く γ -グルタミルペプチドを基質とする選択性の低い酵素であり、芳香族アミノ酸を好む傾向があることが、一連の遷移状態アナログ阻害剤を用いた研究から明らかとなった。

ヒト GGT が Cys-Gly 部分、特に C 末端のカルボキシ基に対する特異性が高いことを利用し、Cys-Gly 部分を簡略化した構造の阻害剤 GGSTop™ を合成した。この化合物は、ヒト GGT に対し高い阻害活性を示し ($k_{on} = 55$

M⁻¹s⁻¹)、構造が単純で脱離基の反応性もそれほど高くないため、化学的に安定で扱いやすい。これまで GGT 阻害剤として頻用されてきた天然物 acivicin は、グルタミンアンタゴニストとして、GGT ばかりでなく、グルタミンアミドトランスフェラーゼ類を広く阻害するため選択性に劣り毒性が強かった。しかし、我々の開発した GGsTop™ は GGT 特異的で、グルタミンアミドトランスフェラーゼを阻害しない。事実、ヒト線維芽細胞に対して 10 mM の高濃度でも全く毒性を示さないことを確認した。そのため、*in vitro* のみならず、*in vivo* 実験にも使える安全な GGT 阻害剤として、2008 年に和光純薬工業株式会社から市販されるに至った。最近、acivicin が世界的に販売中止となったため、現在のところ、GGsTop™ は市販されている唯一の GGT 阻害剤として、国内外で広く使われている。

この化合物を使い、ヒト線維芽細胞に対する作用を調べたところ、用量依存的にヒト線維芽細胞のコラーゲン産生能を亢進させ、10 μM の濃度でコラーゲンは約 2.7 倍増大した。濃度比を勘案すると、この作用はビタミン C の約 18 倍であった。現在のところ、なぜ GGT を阻害するとコラーゲン産生が増強されるのかは不明であるが、酸化ストレスやシグナル伝達系との関連において、今後の新たな研究課題として科学的興味は尽きない。また、この効果をもとに、新たな有効成分として、アンチエイジング用の薬用化粧品等に応用できる可能性を秘めており、当初、酵素阻害剤として開発した化合物が身近な化粧品として実用化されれば、今後のアンチエイジング化粧品のマーケット規模を考えたとき、その社会的インパクトはきわめて大きい。

ところで、腎臓の近位尿細管には GGT が高発現している。そこで、腎障害に対する効果を調べるため、虚血再灌流による急性腎不全モデルラットに GGsTop™ を投与したところ、用量依存的に、虚血直後および再灌流後のスーパーオキシド産生量が減少し、それともなって、腎組織中の過酸化脂質の濃度が減少した。すなわち、GGsTop™ は、酸化ストレスによる急性腎障害を軽減する効果があることが判明した。GGT の阻害で急性腎不全の軽減作用のある安全な化合物は他には見当たらないことから、そのメカニズム解明や GGT と酸化ストレスとの因果関係など、学術的に興味深い研究の端緒を開いたばかりでなく、将来的には、急性腎不全治療の新たなターゲットを特定し、治療薬リードを開発する上でも有用な情報をもたらすものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Wada K, Hiratake J, Irie M, Okada T, Yamada C, Kumagai H, Suzuki H, Fukuyama K Crystal Structures of *Escherichia coli* γ-Glutamyl Transpeptidase in Complex with Azaserine and Acivicin: Novel Mechanistic Implication for Inhibition by Glutamine Antagonists.

J.Mol. Biol. **380**, 361-372 (2008). (査読有)

② Han L, Hiratake J, Kamiyama A, Sakata K Design, Synthesis and Evaluation of γ-Phosphono Diester Analogues of Glutamate as Highly Potent Inhibitors and Active Site Probes of γ-Glutamyl Transpeptidase.

Biochemistry **46**, 1432-1447 (2007). (査読有)

[学会発表] (計 13 件)

① 伊田知代、和田啓、平竹 潤、鈴木秀之、福山恵一 「グルタチオン代謝の鍵酵素 γ-グルタミルトランスペプチダーゼに対する古典的阻害剤アシピシンの結合様式」 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会合同大会、2010.12.7-10、神戸

② 中島靖記、日比隆雄、Blythe Janowiak, Owen Griffith, 平竹 潤 「連鎖球菌由来新規グルタチオン合成酵素と sulfoximine 型遷移状態アナログ阻害剤複合体のX線結晶構造解析」 日本農芸化学会 2009 年度 (平成 21 年度) 大会、2009. 3. 28、福岡マリンメッセ

③ 川村直裕、平竹 潤、中島靖記、日比隆雄、Griffith, Owen W. 「γ-グルタミルシステイン合成酵素の遷移状態アナログ阻害剤 一基質認識にもとづく分子設計と阻害活性一」 日本農芸化学会 2008 年度 (平成 20 年度) 大会、2008. 3. 28、名古屋 (名城大学)

④ Hiratake J, Nakajima M, Han L, Kawamura N, Hibi T, Nakajima Y, “Rational Design of Specific Inhibitors of γ-Glutamyl Transpeptidase (GGT) and γ-Glutamylcysteine Synthetase for Modulating Cellular Glutathione Redox Status.” 2nd World Conference on Magic Bullets (Ehrlich II), 2008.10.4, Nürnberg, Germany

⑤ Wada K, Hiratake J, Irie M, Okada T, Kijima K, Yamada C, Suzuki H, Kumagai H, and Fukuyama K. “Crystal structures of γ-glutamyltranspeptidase in complexes with inhibitors and an analogue mimicking the transition state.”

2nd International Symposium on Diffraction Structural Biology 2007, 2007. 9. 11, Tokyo

[図書] (計 1 件)

平竹 潤、池内秀幸、エヌ・ティー・エス、「遷移状態アナログを利用した酵素解析に

ついて」 pp. 93-98 in 「酵素 利用技術体系
—基礎・解析から改変・高機能化・産業利用
まで—」 2010

〔産業財産権〕

○出願状況（計4件）

名称：腎不全治療剤

発明者：平竹 潤、渡辺文太、松村靖夫、大
喜多 守

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：特願 2010-032161

出願年月日：2010.2.17

国内外の別：国内

名称：ホスホン酸ジエステル誘導体及びその
製造方法

発明者：平竹 潤、坂田完三、韓 立友

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：W0 2007/066705 A1

公開年月日：2007.6.14

国内外の別：国外（PCT）

〔その他〕

平竹 潤「 γ -Glutamyl transpeptidase(GGT)の
新規阻害剤—GGT の生理的意義をさぐる新
たな化学ツール」和光純薬時報 **76**(3), 2-6
(2008).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平竹 潤 (HIRATAKE JUN)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：80199075

(2) 研究分担者

渡辺 文太 (WATANABE BUNTA)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：10544637

(3) 連携研究者

水谷 正治 (MIZUTANI MASAHARU)

神戸大学大学院・農学研究科・准教授

研究者番号：60303898

(4) 連携研究者

清水 文一 (SHIMIZU BUNICHI)

東洋大学・生命科学部・准教授

研究者番号：50324695