

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05923

研究課題名（和文）独自の合成法と検出法を基盤とした ECの特性評価と機能性食品への応用

研究課題名（英文）Characteristic analysis of gamma-glutamyl cystein for application to functional foods

研究代表者

平田 収正（Hirata, Kazumasa）

和歌山県立医科大学・薬学部・教授

研究者番号：30199062

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、グルタチオンの前駆体である グルタミルシステイン（EC）に着目し、特性を解析した。まず、ECが有するSH基が、血圧低下作用の起点となっているアンジオテンシン変換酵素（ACE）の阻害活性を検証したところ、濃度依存的にACEを阻害した（ $IC_{50}=0.03 \mu M$ ）。したがって、ECは体内に入ることができれば、血圧低下作用が期待される。そこで、Caco2細胞モデルを用いて消化管透過性を解析した。本モデルの上層にECを添加した結果、時間・濃度依存的に下層のEC濃度が上昇し、ECが腸管を透過する可能性が示された。今後、血圧が気になる方への機能性食品成分としての応用を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康寿命の延伸に向けて、機能性食品が注目されている。様々な身体の不具合に対応するためには、多種多様な機能性関与成分を取りそろえる必要があるものの、保健機能食品に利用されている成分は限局されている。その点、グルタチオン（GSH）は、生体内で酸化ストレスを緩和していることから、機能性関与成分としての応用が期待されるものの、本邦では既に医薬品として使用されていることから、食品として利用することはできない。そこで、GSHの前駆体であるECに着目した。これまで殆ど明らかでなかったECの特性を理解することは、学術的意義があるうえ、新たな機能性関与成分になりうることは社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, the characteristics of γ -glutamyl cysteine (γ -EC), as the GSH precursor, was analyzed. At first, the ACE inhibitory function of γ -EC was evaluated, since ACE was inhibited by SH group which γ -EC has. ACE inhibitory analysis showed that the IC_{50} of γ -EC against ACE were $3.9 \times 10^2 \mu M$. These data suggested that γ -EC is expected to have a hypotensive effect, if γ -EC can be absorbed in the body. Next, gastrointestinal absorbability of γ -EC was evaluated using the Caco2 cell model. Addition of γ -EC to the upper layer of the model resulted in a time- and concentration-dependent increase in the concentration of EC in the lower layer. The findings suggested that γ -EC may be absorbed from gastrointestinal tract. In the future, we aim to apply EC as a functional food ingredient for those who are concerned about blood pressure.

研究分野：食品科学

キーワード：グルタチオン 機能性食品

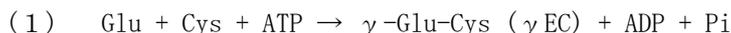
1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた本邦においては、自立した生活を継続的に送ることができる期間である「健康寿命」を延伸させることが、大きな課題となっている。即ち、これからは、病気の治療だけでなく、病気になる前の軽度な症状を改善し、健康状態を維持することが重要となる。このような背景のもと、日常から口にすることのできる機能性食品が注目を集めており、体の不調の改善など、多様な機能を有した成分を数多く揃えることが求められている。一方で、現在までに届出された機能性表示食品 7,749 件の成分を眺めると、利用が多いものから順に、γアミノ酪酸 (GABA) 738 件 (9.5%)、難消化性デキストリン 447 件 (5.8%)、エイコサペンタエン酸 (EPA)・ドコサヘキサエン酸 (DHA) 270 件 (3.5%) と、上位 3 成分だけで全体の約 2 割を占めており (2023 年 12 月 22 日時点)¹、機能と安全性が担保された既存の成分を使い回しているのが現状で、機能の範囲を限局してしまう要因となっている。したがって、健康寿命の延伸を目指し、様々な体の不具合に対して機能性食品で対応していくためには、多種多様な機能を有した機能性関与成分を数多く揃える必要があり、機能と安全性を合わせもった新規シーズの発掘が求められている。

上述のようなシーズの発掘にあたっては、機能の実証はもちろんのこと、食品に強く求められる安全性を如何に確保していくかが最重要課題の 1 つである。本観点から、機能性食品の開発においては、「食経験」の有無が重要視されている一方で、新規シーズ発掘を限局する一因にもなっている。このような現状をふまえ、我々は、生体内成分を利用することを考えた。食経験はなくとも、生体内に存在している成分は、量的な議論は必要なものの、生体内での存在量の範囲内では、少なくとも有害反応は考えにくい。そのうえで、生体内で恒常性を維持する機能も期待される。実際、現在届出されている機能性関与成分を眺めてみても、GABA やヒアルロン酸、ルテイン、カルニチンなど、生体内で機能している成分が多く含まれている。そこで我々は、恒常性維持に寄与している生体内成分の中でも、抗酸化機能を担うグルタチオン (GSH) に着目した。GSH は、生体内に最も多く含まれるチオール化合物であり、SH 基による還元作用によって活性酸素種 (H₂O₂、・OH など) を消去するほか、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の補酵素として活性酸素や過酸化脂質の無毒化に必要な還元力を提供している点で、魅力的なシーズである²。実際、タチオン点眼用やタチオン錠のように、白内障治療や金属中毒の解毒などを目的とした医薬品として利用されており、日常的な酸化ストレス緩和を担う機能性食品としての応用も期待され、実際に海外ではサプリメントとして製品化されている。しかし、本邦においては、食薬区分の観点から、GSH のように、医薬品リストに収

載されている成分は、香料などとして極少量加える場合を除き、機能性食品としては使用することはできないことになっている³。そこで我々は、GSH そのものではなく、その生合成前駆体である γ グルタミルシステイン (γ EC) の機能性食品成分応用を検証することにした (Figure 1)。

GSH の生合成は、構成アミノ酸であるグルタミン酸 (Glu)、システイン (Cys)、グリシン (Gly) から、ATP 依存性リガーゼによって、以下の反応で進行し、γ EC は 1 段階目の生成物である。



Glu と Cys からなる γ EC は、チオール基を有することから、GSH と類似の生理活性を発揮することが期待される。しかしながら、生体内における γ EC の生成は、GSH 生合成における律速反応であるため、生合成の場である細胞内ではほとんど検出されない。そのうえ、通常のペプチドとは異なり、Glu は γ 位で Cys とペプチド結合しているため、化学合成も困難である。そのため、γ EC の入手自体が難しく、魅力的なシーズ候補ながら、その生理活性や動態に関する情報が乏しいのが現状である。

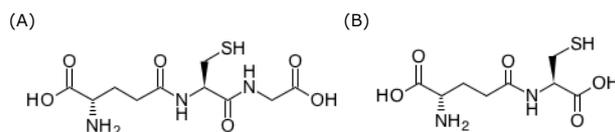


Figure 1 生体内抗酸化成分 GSH とその前駆体 γ EC
(a) GSH、(b) γ EC の構造式。GSH は Glu、Cys、Gly からなるトリペプチド、γ EC は Glu と Cys からなるジペプチドである。いずれも Glu と Cys 間に γ ペプチド結合を有する。

その点、当研究室ではこれまでに、GSH から γ EC への変換を触媒する酵素：phytochelatin synthase (PCS)様のタンパク質が、原核生物である *Nostoc* (ラン藻の一種) の PCC7120 株に存在することを初めて見出し、これを NsPCS と名付けて、その特性を明らかにしてきた^{4,5}。具体的に、NsPCS は、ATP などの補因子や補酵素を必要とせず、1段階の反応で、GSH を γ EC へ変換することができる。これらの知見をもとに、我々はこれまでに、溶解度に近いほどの高濃度 GSH を γ EC へ簡便かつ効率的に 100 %変換されることが可能であることを明らかにした。そのため、酵素の固定化や再利用などの条件の最適化により、将来的には *in vivo* 実験に必要な γ EC も確保しうる環境を整備している。さらに、 γ EC の機能については、スーパーオキシドラジカルに対する蛍光プローブを用いた抗酸化活性評価により、 γ EC が GSH とほぼ同等の抗酸化能を持つことを先駆けて示してきた。

2. 研究の目的

本研究では、 γ EC の機能性関与成分としての特性を明らかにすべく、*in vitro* アッセイ系を活用し、抗酸化能以外の新規生理活性を探索したうえで、腸管吸収性を評価した。

3. 研究の方法

いずれの検討においても、 γ EC として Des-Gly glutathione ammonium salt (Bachem, Switzerland) を使用し、GSH はナカライテスク社(Japan)のものを用いた。

(1) PPAR α に対するアゴニスト作用 (TG の低下作用) の評価

HepG2-Tet-off-hPPAR α -Luc 細胞は、通常の培養時は、D-MEM (10% FBS, 2% Penicillin-Straptomycin, 2 μ g/mL Tetracycline, 0.5 μ g/mL Puromycin, 300 μ g/mL G418, 2 μ g/mL Blasticidin S) で継代した。Tetracycline を除去する前の継代時に、培地 (10% Charcoal/Dextran Treated FBS, 2% Penicillin-Straptomycin, 2 μ g/mL Tetracycline, 0.5 μ g/mL Puromycin, 300 μ g/mL G418, 2 μ g/mL Blasticidin S) を交換した。

試験のために、細胞を播種するときには、D-MEM (10% Charcoal/Dextran Treated FBS, 2% Penicillin-Straptomycin) に懸濁し、 5.0×10^4 cells/150 μ L/well で播種後、37 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートした。細胞播種 24 時間後に培地を除去し、リガンド含有培地 150 μ L に交換し、24 時間、37 $^{\circ}$ C でインキュベートした。培地を除去し、70 μ L の 1 \times Luciferase Cell Culture Lysis Reagent (Promega K.K., Wisconsin, USA) を添加し、室温で 15 分以上攪拌して細胞膜を溶解させた。4 $^{\circ}$ C、1,400 rpm で 5 分間遠心し、上清 20 μ L に Luciferase Assay Reagent (Promega K.K.) を 50 μ L 添加して、Glomax (Promega K.K.) で 0.3 秒間発光を測定した。

(2) ACE に対する阻害作用 (血圧の低下作用) の評価

ACE Kit - WST (同仁堂, Kumamoto, Japan) のプロトコルに準じ、ラミプリル (Selleck, Houston, TX, USA)、 γ EC、GSH 水溶液とキット試薬を混合し、ACE の触媒によって 3-hydroxybutyryl-Gly-Gly-Gly から切り出される 3-hydroxybutyric acid 量を蛍光で検出した。

(3) *in vitro* Caco2 細胞モデルにおける γ EC の腸管吸収性の評価

ヒト結腸癌由来細胞株 (Caco2 細胞) は American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) より購入し、Transwell (CORNING, NY, USA) のインサート内に 6×10^4 cells /200 μ L/well で播種した。以降、経日的に経上皮電気抵抗値 (TEER) を測定した。

TEER 値が定常状態に達したことを確認後、上層に各濃度の γ EC または GSH を 100 μ L を加えた。添加直後と 2, 4 時間後に、下層と上層から 溶液を回収し、HPLC によって γ EC と GSH 濃度を定量した。

4. 研究成果

(1) *in vitro*アッセイ系を活用した γ ECの機能探索

我々は、 γ ECの機能をハイスループットに探索するため、1) 脂質代謝の鍵となる転写因子：Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α (PPAR α)の活性化を簡便に解析可能なルシフェラーゼレポーターアッセイ系と、2) 昇圧物質であるアンジオテンシン II への変換を触媒するAngiotensin-Converting Enzyme (ACE)の阻害活性を試験管内で評価可能なアッセイ系で、 γ ECが中性脂肪 (TG)の分解作用と血圧の低下作用といった機能を有するか検証した。

(2) PPAR α に対するアゴニスト作用 (TGの低下作用) の評価

我々はこれまでに、独自開発した高水溶性クルクミンの有用性を評価する一環として、PPAR α のアゴニスト活性を介した血中TG濃度の低下作用を見出している。この際、*in vitro*でのPPAR α のアゴニスト活性評価法としては、luciferase (Luc)発現による発光で簡便に解析可能なHepG2-Tet-off-hPPAR α -Luc細胞 (土井健史先生・橘敬祐先生より譲渡)を活用して明らかにしてきた実績を有している。HepG2-Tet-off-hPPAR α -Luc細胞は、テトラサイクリン (Tet)の添加の有無で、特定の遺伝子の発現を制御するTet-on/offシステムを用いた細胞である。この細胞では、Tet-offでPPAR α の発現が誘導される。さらに本細胞は、活性化したPPAR α が結合する転写因子結合領域と、その下流にLucが繋がった遺伝子も安定的に発現している。そのため、機能性成分がPPAR α を活性化すると、Lucを発現させるため、発光を指標に評価可能である。

このように、PPAR α のアゴニスト活性をハイスループットにアッセイできることから、本手法を γ ECとGSHに適用し、これら成分にTGを分解する活性があるか比較した。ポジティブコントロールとして、PPAR α の合成アゴニストとして知られるGW7647⁶を選択し、 γ ECとGSHとともに、HepG2-Tet-off-hPPAR α -Luc細胞添加し、luciferaseによる発光量を指標にPPAR α のアゴニスト活性を評価した。その結果、GW7647を添加した群では、Control群と比較して、発光量が有意に増加し、PPAR α のアゴニスト作用が観察できたことから、スクリーニング系が適切に構築されていることが確認された。本条件下で、 γ ECとGSHをそれぞれ添加した結果、GSH添加群では、Control群に比較して、殆ど変化は認められなかった。また、 γ EC添加群においても、Control群と比較して発光量に変化は認められなかった (Data not shown)。

以上、 γ ECとGSHにはPPAR α の活性化を介したTG低下作用は見込めないことが示唆された。

(3) ACEに対する阻害作用 (血圧の低下作用) の評価

次に、アンジオテンシン変換酵素(ACE)に対する阻害作用を検証した。高血圧治療薬のうち、ACE阻害薬として臨床応用されているカプトプリルは、化合物中のSH基がACEの活性中心に存在するZn²⁺と結合することで阻害活性を示すことが知られており⁷、化合物のSH基がACE中のZn²⁺と結合することは、阻害活性機序の1つとなっている。前述のとおり、 γ ECもSH基を有することから、ACE阻害活性を有することが期待されたため、ACEの酵素活性を*in vitro*で評価可能な系に、ラミプリル (ポジティブコントロール)とGSH、 γ ECを添加し、その阻害活性を解析した。まず、ラミプリル添加群では、Control群と比較して、ACEの酵素活性が阻害されていたことから、スクリーニング系が適切に構築されていることが確認された。本条件下で、GSH添加群では、Control群に比較して、ACEに対する阻害活性を有していることが示唆された。また、 γ EC添加群においても、Control群に比較して、3-hydroxybutyric acid量が有意に低下し、ACEに対する阻害活性を有していることが示唆された。そこで、その阻害活性を詳細に評価すべく、各添加濃度における酵素活性をプロットしたうえで、フィッティングにより、それぞれのIC₅₀を算出した。その結果、GSHのIC₅₀は8.3 μ Mであったのに対し、 γ ECのIC₅₀は3.9 x 10² μ Mと (Figure 2)、 γ ECのACE阻害活性は、GSHを下回るものの、医薬品として利用されているGSHに比べ、微弱な活性であったことは、食品成分としてはより適している可能性も考えられる。

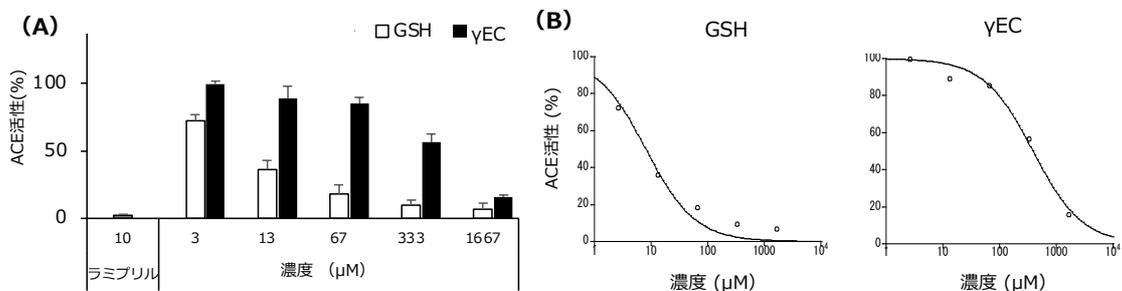


Figure 2 GSH およびγEC による ACE 阻害活性

(A) γEC, GSH および ACE 阻害薬として知られるラミプリル (ポジティブコントロール) と酵素液を混合し、ACE の触媒によって 3-hydroxybutyryl-Gly-Gly-Gly から生成する 3-hydroxybutyric acid を蛍光で検出することで、ACE の活性を計算した。(平均±SD, n=3)。

(B) 各添加濃度における ACE 活性をプロットし、フィッティングで各 IC₅₀ を算出した。

(4) *in vitro* Caco2 細胞モデルにおける γEC の腸管吸収性の評価

前節において、γEC は、体内に入ることができれば、ACE 阻害を介した血圧低下作用が期待されることが示された。そこで本節では、動態解析の一環として、*in vitro* Caco2 細胞モデルではあるものの、その消化管透過性の可能性を検証した。

Caco2 細胞を transwell 上で培養し、経上皮電気抵抗値 (TEER) がプラトーとなり、消化管バリアー機能が維持されたことを確認のうえ、上層に GSH と γEC を添加した。下層の GSH 濃度と γEC 濃度を HPLC により定量したところ、GSH 濃度に比べて γEC 濃度は低い傾向にあるものの、共に経時的かつ濃度依存的に上昇していったことから、GSH と γEC は、少なくとも共に消化管吸収される可能性が示された (Figure 3)。

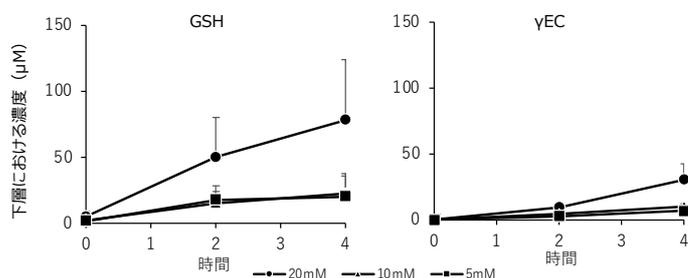


Figure 3 *in vitro* Caco2 細胞モデルにおける腸管吸収性の評価

Transwell の上層に γEC または GSH (5, 10, 25 mM) を添加し、0, 2, 4 時間後の下層の濃度を HPLC で定量した (平均±SD, n=4)。

<引用文献>

- 健康美容 EXPO. 「機能性表示食品制度」 機能性関与成分一覧表.
- Meister, A., Anderson, ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem.* **52**, 711-760 (1983).
- 東京都福祉保健局. 「物の成分本質(原材料について)」
https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/smph/kenkou/kenko_shokuhin/ken_syoku/kanshi/seibun.html
- Tsuji, N., Nishikori, S., Iwabe, O., Miyasaka, H., Takagi, M., Hirata, K., Miyamoto, K. Characterization of phytochelatin synthase-like protein encoded by alr0975 from a prokaryote, *Nostoc* sp. PCC7120. *BBRC.* **315**, 751-755, (2004).
- Tsuji, N., Nishikori, S., Iwabe, O., Matsumoto, S., Shiraki, K., Miyasaka, H., Takagi, M., Miyamoto, K., Hirata, K. Comparative analysis of the two-step reaction catalyzed by prokaryotic and eukaryotic phytochelatin synthase by anion-pair liquid chromatography assay. *Planta.* **222**, 181-191 (2005).
- Fresno, N. & Decara, J. Discovery of potent dual PPAR alpha agonists / CB1 ligands. 1-10
- Natesh, R., Schwager, SL., Evans, HR., Sturrock, ED., Acharya, KR. Structural details on the binding of antihypertensive drugs captopril and enalaprilat to human testicular angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry.* **43**, 8718-8724 (2004).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Muraoka M., Yoshida S., Ohno M., Matsuura H., Nagano K., Hirata Y., Arai M., Hirata K.	4. 巻 596(2)
2. 論文標題 Reactivity of γ -glutamyl-cysteine with intracellular and extracellular glutathione metabolic enzymes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letter	6. 最初と最後の頁 180-188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14261.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Muraoka M., Ohno M., Nakai T., Matsuura H., Nagano K., Arai M., Hirata Y., Uyama H., Hirata K.	4. 巻 45(8)
2. 論文標題 Gamma-glutamylcysteine production using phytochlatin synthase-like enzyme derived from Nostoc sp. Covalently immobilized on a cellulose carrier.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1191-1197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b22-00316	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Muraoka M., Ohno M., Tateishi M., Matsuura H., Nagano K., Hirata Y., Hirata K.	4. 巻 44
2. 論文標題 Optimization of reaction conditions for γ -glutamylcysteine production from glutathione using a phytochelatin synthase-like enzyme from Nostoc sp. Pasteur Culture Collection 7120.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 1832-1836
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b21-00494	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okajima C., Imakawa N., Nagano K., Arai M., Arisawa M., Muraoka M., Tsujino H., Hirata Y., Hirata K.	4. 巻 4
2. 論文標題 Inhibitory activity and proposed binding model of γ -glutamyl cysteine, the precursor of glutathione, on angiotensin converting enzyme.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BPB reports.	6. 最初と最後の頁 116-119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpbreports.4.4_116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中井拓也, 大野萌華, 村岡未彩, 松浦秀幸, 長野一也, 荒井雅吉, 平田善彦, 平田收正
2. 発表標題 gamma-glutamyl transferase の glutamyl-cysteine に対する反応性
3. 学会等名 第16回次世代を担う若手のための医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長野一也, 岡嶋千智, 今川直樹, 橘 敬祐, 土井健史, 荒井雅吉, 有澤光弘, 村岡未彩, 辻野博文, 平田善彦, 平田收正
2. 発表標題 新規機能性化粧品・食品の開発を目指したグルタチオン前駆体 グルタミルシステインの特性評価
3. 学会等名 日本薬学会142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 固定化酵素を用いたグルタチオンを原料とする -グルタミルシステインの連続かつ安定な生産技術	発明者 村岡、平田收、長野、宇山、大野、平田善、田端	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-185985	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長野 一也 (Nagano Kazuya) (40548301)	和歌山県立医科大学・薬学部・教授 (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------