

Studies on the molecular basis of GSH metabolism in insects and mammals

アフリン, ワジファ

<https://hdl.handle.net/2324/7329544>

出版情報 : Kyushu University, 2024, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)



氏 名	ワジファ アフリン (Wazifa Afrin)			
論 文 名	Studies on the molecular basis of GSH metabolism in insects and mammals (昆虫と哺乳類におけるグルタチオン代謝の分子基盤に関する研究)			
論文調査委員	主 査	九州大学	教授	古屋 茂樹
	副 査	九州大学	教授	土居 克実
	副 査	九州大学	准教授	藤井 告

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、生物界に広く分布する内在性の抗酸化成分であるグルタチオン (GSH) の代謝恒常性に関わる制御因子の解明を目的に、昆虫において合成と分解に関わる酵素を同定し、さらに動物細胞を用いて GSH の細胞内含量の制御におけるセリン (Ser) との代謝的連関の重要性を具体的に明らかにしたものである。

GSH は微生物から動植物において、活性酸素種 (ROS) の還元的消去、外来異物の解毒代謝、酸化還元シグナルの制御に関与している。チョウ目昆虫モデルであるカイコでは、GSH の代謝機構が除草剤応答において中心的な役割を果たしていると考えられているが、その分子的特性は十分に解明されていない。そこで、SilkBase EST database を利用して、GSH 合成の律速酵素であるグルタミン酸システインリガーゼ (GCL) のカイコホモログ (bmGcl) を同定し、脂肪体における逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) とその後のシーケンシング解析により、bmGcl のコーディングシーケンス (CDS) 全長配列を決定し、遺伝子産物のアミノ酸配列比較を行っている。その結果、基質結合部位における配列保存性から同 CDS が GCL ファミリーに属するタンパク質をコードし、系統解析から本タンパク質が非植物を中心とするグループ 2 に分類されることを示している。大腸菌で発現させた組換え bmGcl の酵素活性を検出し、グルタミン酸 (Glu)、システイン (Cys)、ATP を基質として Mg^{2+} 依存的に γ Glu-Cys を合成することを明らかにした。さらに bmBcl の 5 齢カイコにおける遺伝子発現を定量的逆転写 PCR (RT-qPCR) 法で定量し、その mRNA が幅広い組織分布を示すものの脂肪体に高発現していること、脂肪体では、殺虫剤や UV-B 曝露後に mRNA 量が増加して組織内 GSH 含量の増加と対応していることを見いだしている。

次にカイコでの内在的な GSH の分解機構を理解するために、GSH 分解の第 1 段階を触媒する酵素 γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (bmChac) をコードする遺伝子を bmGcl と同様の手法で同定し、遺伝子産物のアミノ酸配列に基質結合部位が保存されており、哺乳類の 2 種の Chac 遺伝子ファミリーの中で Chac2 ファミリーに属することを見いだしている。また、大腸菌で発現させた組換え bmChac は、二量体で存在し還元型 GSH を基質に 5-オキソプロリンとシステイニルグリシン (Cys-Gly) に分解する活性を持つことを質量分析による活性測定により実証している。bmChac mRNA の組織分布を RT-qPCR 法で検討し、検査したすべての組織に mRNA が分布しているが、中腸での高発現を検出している。これらの観察結果より、bmChac が哺乳類とは異なり単一の遺伝子によってコードされており、GSH 代謝に構成的に関与していることを明らかにしている。

続いて *de novo* Ser 合成を触媒する酵素 Phgdh を欠損させたマウス胚性線維芽細胞 (KO-MEF) を用い、GSH 代謝の Ser 合成による制御を検討している。KO-MEF は Ser 合成能力を欠いているが、Ser 制限培地で 24 時間培養すると細胞内の還元型および酸化型 GSH 含量が大幅に低下している

ことを見いだしている。その際に GSH の合成と分解に関わる *Gclc* と *Chac1* の遺伝子発現は上方制御されていた。還元型 GSH の合成においては細胞内 Cys 含量も律速因子となるが、Ser 制限条件下の KO-MEF では、細胞外から Cys の二量体であるシスチンを輸送する System Xc- トランスポーターをコードする *Slc7a11* mRNA が大幅に下方制御されていることも検出している。実際に Ser 制限条件の KO-MEF において細胞外からのシスチン輸送能力の減弱を確認している。これらの変化に加え、鉄硫黄クラスター合成経路を構成するフラタキシシン (*Fxn*)、グルタレドキシシン (*Glr*x)、CDGSH 鉄硫黄ドメイン含有タンパク質 1 (*Cisd1*) mRNA 発現の顕著な下方制御も見だし、細胞内 Ser 充足度の低下が GSH 欠乏を誘引するだけでなく、鉄硫黄クラスター合成の制御異常も起こすことを明らかにしている。また、Ser 欠乏条件に 24 時間暴露すると、KO-MEF の生存率が低下するが、還元型 GSH およびその前駆体である *N*-アセチル Cys を添加すると、Ser 制限下でも細胞生存率が改善して増殖することを見いだしている。これらの結果より、Ser 欠乏による GSH 枯渇が生存率低下の直接的な原因であり、その細胞死の機序は酸化ストレスによるフェロトーシスに類似していることを推定している。

以上要するに、本研究は、これまで不明であったカイコの GSH 代謝に関与する 2 種の酵素を同定し、その活性と発現分布からカイコにおける GSH 含量の制御にこれらの酵素が寄与していること、さらに哺乳類の GSH 代謝恒常性における上流制御因子として Ser の *de novo* 生合成経路の重要性和細胞生存における必須性を実証した研究である。以上の研究成果は、GSH 代謝恒常性の維持機構の一端を解明するだけでなく、アミノ酸代謝と GSH 代謝の強固な連関を明らかにしたものであり、代謝生理学およびシステム生物学の発展に寄与する価値のある業績と認める。

よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。