

(学術資料)

グルタチオン S - トランスフェラーゼ入門

清水 学 ・ 船隈 透 ・ 原 彰

名城大学農学部生物化学研究室
〒468-8502 名古屋市天白区塩釜 1-501
(1998年4月29日 受理)

Introduction to Glutathione S - Transferases

Manabu SHIMIZU, Toru FUNAGUMA and Akira HARA

Laboratory of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Meijo University,
Shiogamaguchi, Tempaku-ku, Nagoya, 468-8502 Japan

1. グルタチオン

グルタチオンは図1に示すように、グルタミン酸、システインおよびグリシンよりなるトリペプチド (γ -グルタミルシステイニルグリシン) である。グルタミン酸は α 炭素に結合したカルボキシル基ではなく、 γ 炭素に結合したカルボキシル基がシステインのアミノ基とペプチド結合を形成した構造をもつ。生化学辞典⁽¹⁾によれば、「グルタチオンはタンパク質その他のジスルフィドと酵素的、非酵素的に反応し、そのSH基を維持する機能、あるいは過酸化水素、遊離反応基と反応し、解毒機構がある。これらの反応において、還元型グルタチオン (GSH と略す) は酸化型グルタチオン (グルタチオン2分子がジスルフィド結合した

もの、GSSG と略す) に変換される。」とある。

動物ではスーパーオキシドや過酸化水素、過酸化脂質を除去するために、ビタミンEやアスコルビン酸などの抗酸化剤のほかに、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、GSHペルオキシダーゼ等の酵素をもっている。このうち、GSHペルオキシダーゼはGSHによる過酸化水素、有機ヒドロペルオキシド、脂質過酸化物等の2電子還元を触媒する。この酵素は哺乳動物で唯一知られている、セレン (Se) を含有するという特徴をもつ。

植物では、上述のGSHペルオキシダーゼに相当する酵素はアスコルビン酸ペルオキシダーゼであり、図2に示すようなアスコルビン酸-グルタチオンサイクルを形成し、活性酸素の消去に関与している。この過

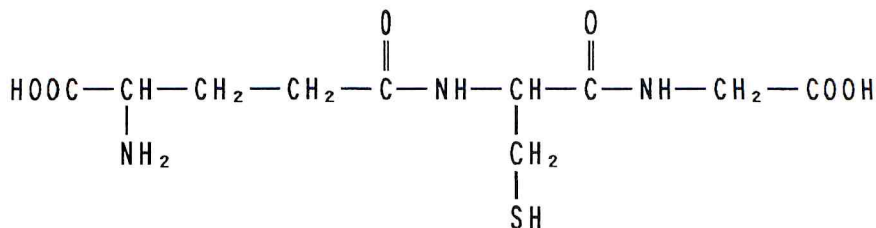


図1 グルタチオンの構造。

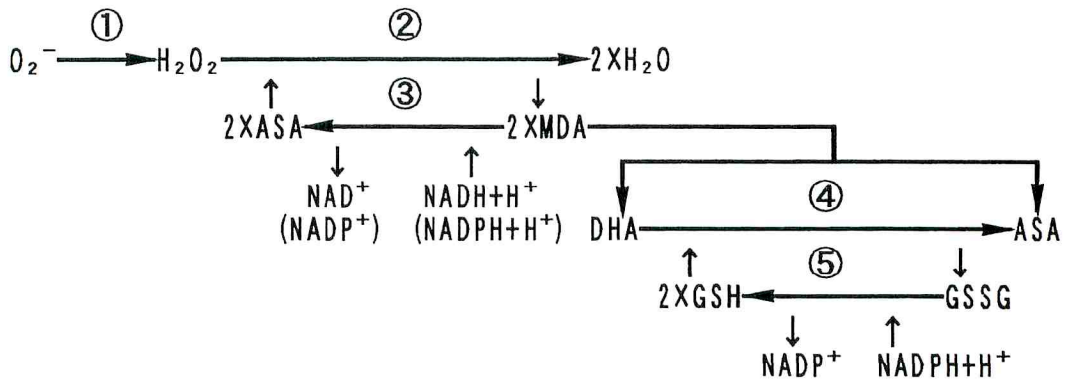


図2 グルタチオン-アスコルビン酸サイクル。

①スーパーオキシドジスムターゼ；②アスコルビン酸ペルオキシダーゼ；③モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ；④デヒドロアスコルビン酸レダクターゼ；⑤グルタチオンレダクターゼ；ASA，アスコルビン酸；MDA，モノデヒドロアスコルビン酸；DHA，デヒドロアスコルビン酸。

程で、モノデヒドロアスコルビン酸の自発的不均化反応によって生じたデヒドロアスコルビン酸は、特異的な電子供与体としてGSHを用いるデヒドロアスコルビン酸レダクターゼによって、還元型アスコルビン酸に再生される。生じたGSSGはNADPHを電子供与体として用いるGSSGレダクターゼによってGSHに還元される。著者らはガマおよびクロマツ花粉における、この過程に関与する酵素群について報告した⁽²⁻⁵⁾。

ガマおよびマツ花粉ともに、新鮮重1g当たり約20 μ molのGSHを含んでいるが、このGSHを利用する重要な別の酵素として、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GSTと略す)がある。花粉においてこの酵素を調べたところ、マツ花粉では活性がほとんど検出されなかったのに対し、ガマ花粉にはかなり強力な活性が検出された。GSTは動物でも、植物でも多数のアイソザイムを有し、GSHを利用して基質となる物質と複合体(抱合体)を形成し、代謝産物や外来性物質を排泄する性質をもっている。本稿では植物のGSTの性質を解説し、花粉での役割を考えてみる。

2. GSTの作用機構

GSTの触媒反応にはGSHのシステイン残基のスルフィドリル基(-SH)が利用される。SH基は求核性を持ち、より高いpHでは解離してチオレートアニオン(GS⁻)として存在する。抱合反応を受ける物質のタイプは、反応生成物から2種類に分類され

る⁽⁶⁾。タイプI化合物では、分子中に強い電子吸引性原子または原子団(脱離基)が存在し、基質分子内の分極に応じて、GS⁻が攻撃し、脱離基がアニオンとして除去され、抱合反応が完結する。GSTの活性測定に使用される合成基質である、1-クロロ、2,4-ジニトロベンゼン(CDNB)はこのタイプである。このタイプの化合物には除草剤であるatrazine, metolachlorがある(図3)。一方、タイプII化合物では脱離基がなく、GSHが付加することにより、抱合体を形成する。1,4-hydroxyalkenalや植物色素cyanidin-3-glucosideはこのタイプである(図3)。なお、CDNBは最も普遍的に使用されているGSTの基質であるが、CDNBに作用しないか、活性の低いGSTも存在するので、注意が必要である^(7,8)。著者らもトウモロコシのGST測定にもCDNBを使用した。

XenobioticsのGSH抱合化合物の代謝を図4に示す⁽⁹⁾。抱合化合物から、グルタミン酸、続いてグリシンの順序で除去され、相当するシステイン抱合体に転換される。システイン抱合体はアセチル化によってmercapturateに代謝されるか、 β -lyaseの作用でメルカプタン(R-SH)を生じる。メルカプタンはさらに2つの経路で代謝される。第1の反応はメチル化されメチルチオ複合体を形成する反応であり、第2の反応はグルクロニル化である。この経路のうち、(システイン抱合体) β -lyaseは肝臓、腎臓、腸内細菌および数種の微生物で確認されているが、植物では明らかではない。

3. 植物の GST

植物の GST の最初の総説は、引用文献⁽⁶⁾に掲載された。それによると、植物の GST は 1970 年にトウモロコシで発見された。GST は除草剤の解毒能力をもつために、精力的に同定され、研究されており、主要国穀物に関して各クラスの GST の性質が明らかにされている。また、最近では GST のサブクラスが病原菌の攻撃、酸化ストレスおよび重金属の毒性を含む、多くのストレス応答に関連していることが明らかにされつつある。GST は多様なアイソザイムをもち、また GST の中には GSH ペルオキシダーゼ活性をもつ（セレン含有ペルオキシダーゼとは異なる GST も存在する）多機能性の酵素も存在するために、歴史的に様々な分類方法が提唱されている。動物、特にラットとヒトの GST の分類については、引用文献^(7, 8, 10)において紹介されているが、複雑過ぎて簡単に解説することができない。

しかし、植物の GST は進化的な観点から動物の GST とは大きな差異があるようである。GST タンパク質はアミノ酸配列の類似性の程度と、ヒトの GST のサブユニットとの免疫交叉性とから Mu, Alpha, Pi および Theta の 4 つのクラスに分類される^(8, 10)。このうち Theta クラスのタンパク質は進化的に最も古いグループであり、ラット、ショウジョウバエ、トウモロコシ、*Methylobacterium* に保存されている。Pemble と Taylor は、このファミリーが Purple bacterium（紅色硫黄細菌）の細胞内共生を経てミトコンドリアに起源を発する、先祖となる GST 遺伝子であると推測している⁽¹¹⁾。これまで明らかにされた限りでは、植物 GST は Theta クラスであるが、カーネーションの GST は Alpha クラスに似ており、GST の進化が植物界と動物界に別れる前に始まったらしい^(8, 12)。

Droog は、植物 GST を基質特異性や抗体による交叉性ではなく、アミノ酸配列の同定、intron : exon の配置の保存に基づいて Type I ~ III に分類している^(8, 13)。これによると、Type I GST は 3 個の exon と 2 個の intron を含み、トウモロコシではサブユニット組成と除草剤に対する基質特異性において異なる 4 つのアイソザイムを含んでいる。Type II GST はカーネーションにのみ報告されており、Type III GST と著しいアミノ酸配列の相同性をもつが、intron : exon パターンは哺乳動物の Alpha クラスの GST に類似し、10 個の exon と 9 個の intron をもっている。

Type III GST は 2 個の exon と 1 個の intron をもつが、元々は様々な処理、オーキシシン、エチレン、病原菌感染、重金属、熱ショックにより誘導される一連の相同遺伝子として同定されたが、Droog らが GST 活性をもつことを発見したものである。この中にはトウモロコシにおいて、細胞質アントシアニン前駆体に GSH を抱合することが見いだされたアントシアニン生合成遺伝子 Bronze-2 (BZ-2) 遺伝子が含まれている。この他に、トウモロコシはケイ皮酸やフェニルプロパノイド基質に対し活性のある GST を含んでいる⁽¹⁴⁾。

4. トウモロコシ花粉の GST

花粉での GST の役割を明らかにするための予備的実験として、トウモロコシの花粉および種子の GST の精製を試みた。トウモロコシ種子はハニーバンタム（ピーター 235, サカタ交配）を使用し、栽培によって得た花粉および種子を精製に使用した。種子 (50g) および花粉 (10g) の Tris-HCl 緩衝液、pH 7.8, による抽出液の、DEAE-Sephacel カラム (2 × 36 cm) クロマトグラフィ結果を図 5 に示す。この条件下では両試料ともに GST はシャープな活性ピークとして溶出されたが、種子では別の弱い活性ピークが検出された。主活性画分について DEAE-5PW (0.75 × 7.5cm) による HPLC を行ったところ、両画分ともに不均一であることを示唆する複雑な活性曲線を示し、それらの限定された活性画分のゲル濾過 (HiLoad 26/60 Superdex 75pg カラム, 2.6 × 60cm) においても、ピークは 1 つであるものの、幅広い活性曲線を示した（データは示していない）。これらの結果は花粉の GST もアイソザイムとして存在することを示している。トウモロコシの Type I 酵素は、GST I-IV の全てがサブユニット当たりのアミノ酸数が 222 ~ 227 の範囲にある⁽⁸⁾ので、花粉においてもそれらが発現しているとすれば、均一な酵素を得るにはかなりてこずりそうである。

問題は花粉の GST はどういう機能を果たしているのかということである。前述の GST I-IV のいずれも、除草剤の alachlor か、metolachlor を基質とすることができる。花粉の GST にそのような触媒反応があるかどうか分らないが、少なくとも花粉において除草剤を抱合することを目的として GST が必要であるとは考えにくい。植物特有の GST の役割として、ケイ皮酸やフェニルプロパノイド化合物の代謝、

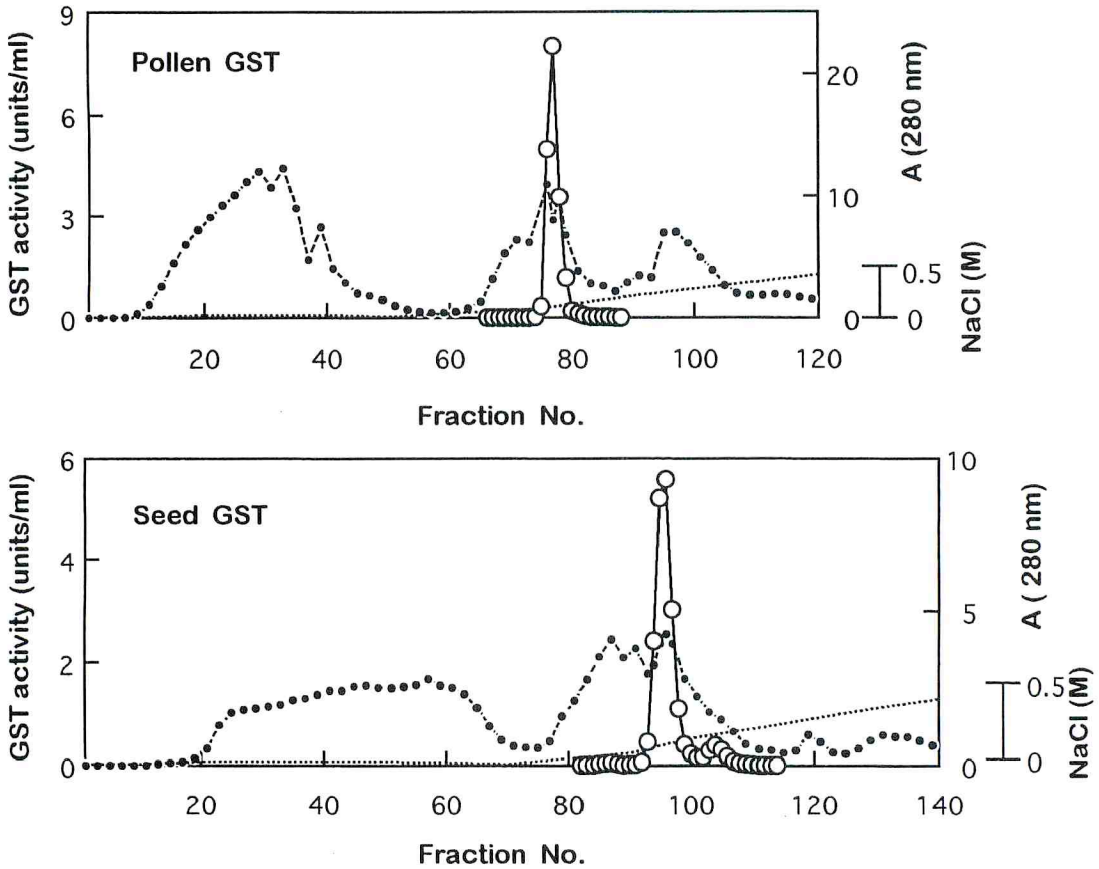


図5 トウモロコシ種子および花粉抽出物の DEAE - Sephacel カラムクロマトグラフィによる GST の分離。

—●—, A_{280nm} (タンパク質); —○—, GST 活性; , NaCl 濃度。

アントシアニン色素の液胞への輸送があるが、これらも雄性配偶体として役割を果たす上で要求されるとは考えにくい。トウモロコシの種子および花粉の部分精製酵素を CDNB を基質として、IAA (インドール酢酸) の存在下で活性を測定したところ、20% 以上の阻害が観察された。IAA に対して GST が親和性を示すことは既に知られているが、それが花粉において意味があるかどうか分からない。また、発芽や花粉管伸長の遅いマツ花粉では活性が極めて弱く、トウモロコシやガマ花粉では活性が強いことがどのような意味をもつか興味ある課題である。花粉を含めて、植物の GST にはまだ本質的な機能があるような気がするが、それを知る手がかりを掴めていない。

引用文献

- (1) 今堀和友・山川民夫監修：生化学辞典、東京化学同人 p.376 (1984).
- (2) 古谷一郎・船隈 透・原 彰：ガマおよびクロマツ花粉のスーパーオキシドジスムターゼ。花粉誌 40, 85-93 (1994).
- (3) 古谷一郎・船隈 透・原 彰：クロマツ花粉のアスコルビン酸ペルオキシダーゼとカタラーゼ。花粉誌 41, 1-11 (1995).
- (4) 星 奈保美・丹羽達也・船隈 透・原 彰：クロマツ花粉のモノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼとグルタチオンレダクターゼ。花粉誌 42, 15-25 (1996).
- (5) 原 彰・星 奈保美・船隈 透：カタラーゼ阻

- 害剤がクロマツおよびガマ花粉の花粉管伸長に及ぼす影響・花粉誌 42, 101-106 (1996).
- (6) 渡辺 烈・平塚 明：グルタチオン抱合反応、蛋白質核酸酵素 33, 1405-1416 (1988).
- (7) 土田成紀・佐藤清美：グルタチオン S-トランスフェラーゼアイソザイム、蛋白質核酸酵素 33, 1564-1573 (1988).
- (8) Marrs, K. A.: The function and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physion. Plant Mol. Biol.* 47, 127-158 (1996).
- (9) Pickett, C. B. and A. Y. H. Lu : Glutathione S-transferase : Gene structure, regulation and biological function. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 743-764 (1989).
- (10) Mannervik, B., Y. C. Awasthi, P. G. Board, J. D Hayes, C. Di Ilio, B. Ketterer, I. Listowski, R. Morgenstern, M. Muramatsu, W. R. Pearson, C. B. Pickett, K. Sato, M. Widersten and C. R. Wolf : Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem. J.* 282, 305-306 (1992). (11)
- Pemble, S. E. and J. B. Taylor : An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class-Theta glutathione transferase cDNA sequences. *Biochem. J.* 287, 957-963 (1992).
- (12) Itzhaki, H. and W. R. Woodson : Characterization of an ethylene-responsive glutathione S-transferase gene cluster in carnation. *Plant Mol. Biology.* 22, 43-58 (1993).
- (13) Droog, F. N. J., P. J. J. Hooykaas and B. J. van der Zaal : 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid and related chlorinated compounds inhibit two auxin-regulated type-III tobacco glutathione S-transferase. *Plant Physiol.* 107, 1139-1146 (1995).
- (14) Dean, J. V., T. P. Devarenne, I-S. Lee and L. E. Orlofsky : Properties of a maize glutathione S-transferase that conjugates coumaric acid and other phenylpropanoids. *Plant Physiol.* 108, 985-994 (1995).
-