

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-501811
(P2018-501811A)

(43) 公表日 平成30年1月25日(2018.1.25)

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	Z N A G	4 B O 5 O	
C 1 2 N	9/00	(2006.01)	C 1 2 N	9/00		4 B O 6 4	
C 1 2 N	1/20	(2006.01)	C 1 2 N	1/20	Z	4 B O 6 5	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A		

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2017-537981 (P2017-537981)
 (86) (22) 出願日 平成28年1月15日 (2016.1.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年7月18日 (2017.7.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2016/000433
 (87) 国際公開番号 W02016/114618
 (87) 国際公開日 平成28年7月21日 (2016.7.21)
 (31) 優先権主張番号 10-2015-0008174
 (32) 優先日 平成27年1月16日 (2015.1.16)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

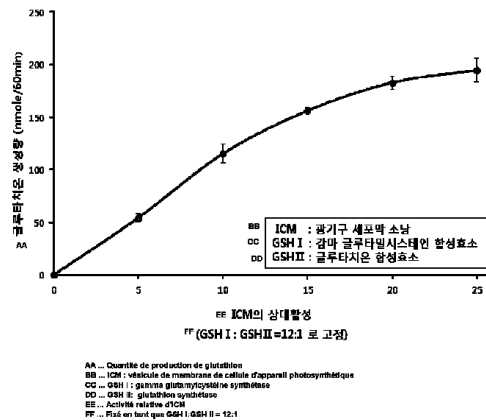
(71) 出願人 516224101
 ソガン・ユニヴァーシティ・リサーチ・フ
 ァンデーション
 大韓民国・ソウル・121-742・マボ
 ーグ・ベクボム-ロ・35
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉
 (74) 代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦
 (72) 発明者 ジョン・クグ・イ
 大韓民国・ソウル・04139・マボー
 グ・ベクボム-ロ・25-ギル・63・10
 5-1504

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光合成細胞膜小胞を利用したグルタチオンの持続的生産方法

(57) 【要約】

本発明は、光合成細胞膜小胞とグルタチオン合成を触媒する酵素を組み合わせるグルタミン酸、システイン及びグリシンを反応基質としてグルタチオンを生産する方法に関する。グルタチオン合成を触媒する酵素を使用する方法には、ガンマグルタミルシステインとグルタチオン合成酵素を一緒に使用する方法、又は二機能性グルタチオン合成酵素を使用する方法がある。グルタチオンの合成には、高価のアデノシン三リン酸を持続的に供給しなければならない問題があるが、本発明は、アデノシン三リン酸の供給源として光合成細胞膜小胞を利用して追加的なアデノシン三リン酸の投入なしに持続的にグルタチオンを生産でき、これは、グルタチオン生産コストの節減に大きく寄与できる。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

光合成細胞膜小胞 (photosynthetic membrane vesicle) とガンマグルタミルシステイン合成酵素 (γ-glutamylcysteine synthetase、GSHI) 及びグルタチオン合成酵素 (glutathione synthetase、GSHII) を利用したグルタチオン (glutathione) の生産方法において、前記方法は、光合成細胞膜小胞に光を照射し、アデノシン二リン酸 (adenosine diphosphate、ADP) と無機リン酸 (phosphate) からアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate、ATP) を形成する段階を含むことを特徴とする生産方法。

10

【請求項 2】

光合成細胞膜小胞 (photosynthetic membrane vesicle) と二機能性グルタチオン合成酵素 (bifunctional γ-glutamylcysteine synthetase / glutathione synthetase、GshF) を利用したグルタチオン (glutathione) の生産方法において、前記方法は、光合成細胞膜小胞に光を照射し、アデノシン二リン酸 (adenosine diphosphate、ADP) と無機リン酸 (phosphate) からアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate、ATP) を形成する段階を含むことを特徴とする生産方法。

20

【請求項 3】

次の段階を含むグルタチオン (glutathione) の生産方法：

(a) 光合成細胞膜小胞 (photosynthetic membrane vesicle) に光を照射し、アデノシン二リン酸 (adenosine diphosphate、ADP) 及び無機リン酸 (inorganic phosphate) からアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate、ATP) を生成する段階と、

(b) グルタチオンの合成を触媒する酵素が、前記段階 (a) で生成されたアデノシン三リン酸を利用してグルタチオンを合成し、アデノシン二リン酸及び無機リン酸を形成する段階と、

(c) 前記段階 (b) で生成されたアデノシン二リン酸及び無機リン酸が、光合成細胞膜小胞のアデノシン三リン酸の生成に再使用される段階。

30

【請求項 4】

前記光合成細胞膜小胞は、紫色非硫黄細菌 (purple nonsulfur bacteria) から分離したクロマトホア細胞膜小胞 (chromatophore membrane vesicle) 及び藍色細菌 (cyanobacteria) 又は藻類 (algae) から分離したチラコイド細胞膜小胞 (thylakoid membrane vesicle) で構成された群から選択される小胞であることを特徴とする請求項 1～3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記グルタチオンの合成を触媒する酵素は、ガンマグルタミルシステイン合成酵素 (γ-glutamylcysteine synthetase、GSHI)、グルタチオン合成酵素 (glutathione synthetase、GSHII) 及び二機能性グルタチオン合成酵素 (bifunctional γ-glutamylcysteine synthetase / glutathione synthetase、GshF) で構成された群から選択される 1 以上の酵素であることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

40

【請求項 6】

前記方法は、グルタチオン生産のための基質 (substrate) としてグルタミン酸 (glutamate)、システイン (cysteine) 及びグリシン (glycine) を添加する段階を含むことを特徴とする請求項 1～3 のいずれかに記載の方法。

50

【請求項 7】

前記ガンマグルタミルシステイン合成酵素は、アデノシン三リン酸をアデノシン二リン酸と無機リン酸に転換しながら、グルタミン酸及びシステインをガンマグルタミルシステインに合成する過程を触媒し、前記グルタチオン合成酵素は、アデノシン三リン酸をアデノシン二リン酸と無機リン酸に転換しながら、ガンマグルタミルシステイン及びグリシンをグルタチオンに合成する過程を触媒する酵素であることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記二機能性グルタチオン合成酵素は、請求項 7 に記載のガンマグルタミルシステイン合成酵素が触媒する反応及びグルタチオン合成酵素が触媒する反応を共に触媒し得る酵素であることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

10

【請求項 9】

前記段階 (b) は、段階 (a) で生成されたアデノシン三リン酸が、アデノシン二リン酸と無機リン酸に転換されながら、グルタミン酸とシステインがガンマグルタミルシステイン合成酵素によりガンマグルタミルシステインを形成する段階と、前記形成されたガンマグルタミルシステインとグリシンがグルタチオン合成酵素によりグルタチオンに合成されながら、段階 (a) で生成されたアデノシン三リン酸がアデノシン二リン酸と無機リン酸に転換される段階と、を含むことを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 10】

前記段階 (b) は、グルタミン酸、システイン及びグリシンが二機能性グルタチオン合成酵素によりグルタチオンに合成されながら、段階 (a) で生成されたアデノシン三リン酸がアデノシン二リン酸と無機リン酸に転換される段階を含むことを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 11】

前記ガンマグルタミルシステイン合成酵素：グルタチオン合成酵素の相対活性比 (relative activity ratio) は、4 : 1 ~ 20 : 1 の間であることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記光合成細胞膜小胞：ガンマグルタミルシステイン合成酵素：グルタチオン合成酵素の相対活性比 (relative activity ratio) は、1 : 12 : 1 ~ 50 : 12 : 1 の間であることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 13】

光合成細胞膜小胞：二機能性グルタチオン合成酵素の相対活性比 (relative activity ratio) は、10 : 1 ~ 500 : 1 の間であることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

(i) 光合成細胞膜小胞 (photosynthetic membrane vesicle) と；

(ii) ガンマグルタミルシステイン合成酵素 (γ-glutamylcysteine synthetase、GSHI)、グルタチオン合成酵素 (glutathione synthetase、GSHII) 及び二機能性グルタチオン合成酵素 (bifunctional γ-glutamylcysteine synthetase / glutathione synthetase、GshF) で構成された群から選択されるグルタチオン合成触媒酵素と；

40

を含むグルタチオン生産用組成物。

【請求項 15】

(i) アデノシン三リン酸の供給手段として光合成細胞膜小胞 (photosynthetic membrane vesicle) と；

(ii) グルタチオン合成反応触媒手段としてガンマグルタミルシステイン合成酵素 (γ-glutamylcysteine synthetase、GSHI)、グルタチオ

50

ン合成酵素 (glutathione synthetase、GSHII) 及び二機能性グルタチオン合成酵素 (bifunctional - glutamylcysteine synthetase / glutathione synthetase、GshF) で構成された群から選択されるグルタチオン合成触媒酵素と；を含むグルタチオン持続生産用システム。

【請求項 16】

請求項 15 に記載のシステムにグルタチオン生産のための基質 (substrate) としてグルタミン酸 (glutamate)、システイン (cysteine) 及びグリシン (glycine) を添加する段階を含むグルタチオンの持続生産方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、光合成細胞膜小胞を利用してグルタチオン (glutathione) を持続的に生産する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

グルタチオン (glutathione、GSH) は、L - グルタミン酸 (L - glutamate)、L - システイン (L - Cysteine)、グリシン (Glycine) が結合された物質であって、大部分の真核生物 (eukaryote) 及び一部の原核生物 (prokaryote) で合成される。グルタチオンは、L - グルタミン酸、L - システイン、グリシンを開始物質として、ガンマグルタミルシステイン合成酵素 (- glutamylcysteine synthetase、GSHI、EC 6.3.2.2) 及びグルタチオン合成酵素 (glutathione synthetase、GSHII、EC 6.3.2.3) が触媒する二つの段階の酵素反応により生合成される。最近、前記二つの酵素の反応が一つの酵素により行われる新しい生合成経路が明らかにされ、この役目をする酵素を二機能性グルタチオン合成酵素 (bifunctional - glutamylcysteine synthetase / glutathione synthetase、GshF) と言う (Janowiak and Griffith. 2005. J. Biol. Chem. 280: 11829 - 11839、Verga uwen et al. 2006. J. Biol. Chem. 281: 4380 - 4394)。

20

30

【0003】

グルタチオンは、還元力が強いチオール基 (thiol group) を保有していて、生体内でグルタチオン過酸化酵素 (GSH peroxidase)、グルタチオン還元酵素 (GSH reductase)、グルタチオン S - 転移酵素 (GSH S - transferase) とともに作用して抗酸化剤 (antioxidant) の機能を行い、免疫促進及び生体異物 (xenobiotics) の無毒化 (detoxification) に関与することがある (Pastore et al. 2003. Clinica Chimica Acta 333: 19 - 39)。通常、グルタチオン合成遺伝子は、生存に必須であり、これら遺伝子が欠損された生物体は、酸化ストレス (oxidative stress) 及び各種有害物質に対する抵抗性が減少すると知られている。また、ヒトの様々な疾病が体内グルタチオンの濃度減少と関連しているという報告がある (Wu et al. 2004. J. Nutr. 134: 489 - 492)。このために、グルタチオンは、抗酸化作用による老化防止及び健康増進を目的に食品、医薬品及び化粧品添加物として広く使用されている。

40

【0004】

現在まで知られたグルタチオンを生産する方法には、有機合成法、酵素を利用した (enzymatic) 方法、そして発酵を利用した (fermentative) 方法がある。有機合成法は、化学的方法でグルタチオンを合成する方法であって、1935年に開発され、1950年に商業化された (Harington and Mead. 1935. 50

Biochem. J. 29:1602-1611、Li et al. 2004. Appl. Microbiol. Biotechnol. 66:233-242)。有機合成法で合成されたグルタチオンは、光学的に不活性状態 (optically inactive、racemic) で得られ、生物体は、L-グルタチオンのみを選択的に使用する。したがって、有機合成法で合成されたグルタチオンを食品や医薬品に利用するためには、L-グルタチオンを分離する過程が追加的に必要である。

【0005】

1950年代にグルタチオンの生合成経路が発見され (Bloch, 1949. J. Biol. Chem. 179:1245-1254)、生物学的にグルタチオンを生産しようとする試みが始まった。そのうち、発酵を利用してグルタチオンを生産する方法は、現在商業的に最も多く使用される方法であって、通常、大腸菌 (*Escherichia coli*) 又は酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*、*Candida sp.*) を利用する。炭素源としては、ブドウ糖又は糖蜜 (molasses) を利用し、通常、20~30時間発酵条件で培養後、グルタチオンを抽出する。これに追加的に、グルタチオンの生産量を増進させるための多様な方法がある。一例として、L-システインを培地に添加し、グルタチオンの生産速度を増進させる方法がある (Alfafa et al. 1992. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37:141-146)。また、グルタチオンを合成する二つの遺伝子 (GSH I、GSH II) を発酵菌株内で過発現 (overexpress) させて、グルタチオンの生産量を増進させようとする努力があったが、顕著な生産量の増加は現われないと知られている。

10

20

【0006】

生物学的にグルタチオンを生産するまた一つの方法は、酵素を利用するものである。大部分使用される方法は、大腸菌や酵母に界面活性剤 (surfactant) を処理し、物質透過性を高めた後、全体細胞を触媒として使用して、L-グルタミン酸、L-システイン、グリシン及びアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate) を添加し、L-グルタチオンを生産するものである。また、他の方法として、精製されたガンマグルタミルシステイン合成酵素及びグルタチオン合成酵素を利用して生産する方法があるが、多く使用される方法ではない。このような酵素を利用した方法の長所は、反応が選択的であり、発酵を利用した方法より収率が高いということである。しかし、反応に必要なアデノシン三リン酸のコストが高くて、商業化が難しいという短所がある。これを克服するために、アデノシン三リン酸を再生する酵素や細胞自体の解糖過程 (glycolysis) を利用してアデノシン三リン酸を供給することはできるが、費用問題を完全に解決しない状況である。したがって、低価で持続的にアデノシン三リン酸を供給できるシステムを具備する場合、酵素を利用したグルタチオンの生産が商業化される可能性が高い。

30

【0007】

前述した背景技術として説明された事項は、本発明の背景に対する理解を増進させるためのものに過ぎず、この技術分野における通常の知識を有する者に既に知られた従来技術に該当することを認めるものと受け入れられるべきではない。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Janowiak and Griffith. 2005. J. Biol. Chem. 280:11829-11839

【非特許文献2】Vergauwen et al. 2006. J. Biol. Chem. 281:4380-4394

【非特許文献3】Pastore et al. 2003. Clinica Chimica Acta 333:19-39

【非特許文献4】Wu et al. 2004. J. Nutr. 134:489-492

50

【非特許文献5】Harington and Mead, 1935, Biochem. J., 29: 1602 - 1611

【非特許文献6】Li et al., 2004, Appl. Microbiol. Biotechnol., 66: 233 - 242

【非特許文献7】Bloch, 1949, J. Biol. Chem., 179: 1245 - 1254

【非特許文献8】Alfafara et al., 1992, Appl. Microbiol. Biotechnol., 37: 141 - 146

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0009】

グルタチオンは、食品、医薬品及び化粧品の添加物として非常に有用であり、酵素を利用したグルタチオンの合成は、反応が簡素化されるという長所があるが、酵素を利用する場合、助酵素の高いコストが現実的な問題になり得る。これにより、本発明者は、グルタチオンを比較的低价で生産できる方法を探そうと努力した。その結果、光合成細菌又は藻類の細胞膜に存在する小胞を分離し、光合成明反応実行機構を構成し、これにグルタチオンの合成を触媒する酵素を組み合わせる光を照射する場合、コストが非常に高いアデノシン三リン酸などの追加投入なしも、持続的にグルタチオンを合成できることを確認し、本発明を完成した。

【0010】

20

したがって、本発明の目的は、光合成細胞膜小胞とガンマグルタミルシステイン合成酵素及びグルタチオン合成酵素を利用したグルタチオンの生産方法を提供することにある。

【0011】

本発明の他の目的は、光合成細胞膜小胞と二機能性グルタチオン合成酵素を利用したグルタチオンの生産方法を提供することにある。

【0012】

本発明のさらに他の目的は、光合成細胞膜小胞を含むグルタチオン生産用組成物を提供することにある。

【0013】

本発明のさらに他の目的は、アデノシン三リン酸の供給手段として光合成細胞膜小胞を含むグルタチオン持続生産用システムを提供することにある。

30

【0014】

本発明のさらに他の目的は、前記システムにグルタチオン生産のための基質を添加する段階を含むグルタチオンの持続生産方法を提供することにある。

【0015】

本発明の他の目的及び利点は、下記の発明の詳細な説明、請求範囲及び図面によって一層明確になる。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明の一例によれば、本発明は、光合成細胞膜小胞 (photosynthetic membrane vesicle) とガンマグルタミルシステイン合成酵素 (γ-glutamylcysteine synthetase, GSII) 及びグルタチオン合成酵素 (glutathione synthetase, GSIII) を利用したグルタチオン (glutathione) の生産方法を提供する。

40

【0017】

本発明の他の例によれば、本発明は、光合成細胞膜小胞 (photosynthetic membrane vesicle) と二機能性グルタチオン合成酵素 (bifunctional γ-glutamylcysteine synthetase / glutathione synthetase, GshF) を利用したグルタチオン (glutathione) の生産方法を提供する。

50

【0018】

本発明者は、食品、医薬品及び化粧品の添加物として有用なグルタチオンを持続的に生産できる方法を探そうと努力した。その結果、光合成細菌又は藻類の細胞膜に存在する小胞を分離し、光合成明反応実行機構を構成し、これにグルタチオンの合成を触媒する酵素を組み合わせ、光を照射する場合、コストが非常に高いアデノシン三リン酸などの追加投入なしに、持続的にグルタチオンを合成できることを確認した。

【0019】

本明細書で使用される用語「光合成細胞膜小胞 (photosynthetic membrane vesicle)」は、光エネルギーを利用して光合成を行うことができる光合成細菌 (photosynthetic bacteria) 又は藻類 (algae) から小胞 (vesicle) 形態で分離され得、適切な光が照射される条件で光合成の明反応を行うことができる細胞膜 - タンパク質複合体を意味する。

10

【0020】

前記光合成細胞膜小胞を形成する光合成細胞膜 (photosynthetic membrane) は、酸素非発生型の光合成細菌 (anoxygenic photosynthetic bacteria) に存在するクロマトホア細胞膜 (chromatophore membrane、或いはintracytoplasmic membrane (ICM)) と、酸素発生型の光合成細菌 (oxygenic photosynthetic bacteria) 又は藻類 (algae) に存在するチラコイド細胞膜 (thylakoid membrane、TM) を含む。

20

【0021】

クロマトホア細胞膜小胞 (chromatophore membrane vesicle) は、クロマトホア細胞膜に由来し、光反応中心体 (reaction center)、光吸収体 (light-harvesting complex)、アデノシン三リン酸合成酵素 (ATP synthase) 及び電子伝達系 (electron transfer chain) タンパク質を含む細胞膜 - タンパク質複合体を意味する。クロマトホア細胞膜は、循環的電子伝達 (cyclic electron flow) を通じて形成された陽性子濃度勾配 (proton motive force) を利用してアデノシン三リン酸 (adenosine diphosphate) と無機リン酸 (inorganic phosphate) からアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate) を形成する。また、クロマトホア細胞膜に存在する複合体 I (complex I) と複合体 II (complex II) を用いた逆電子伝達 (reverse electron flow) を通じて酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (nicotinamide adenine dinucleotide oxidized、 NAD^+) から還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (nicotinamide adenine dinucleotide reduced、 NADH) を形成できる。かくして形成された還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) は、ピリジンヌクレオチド水素転移酵素 (pyridine nucleotide transhydrogenase) を介して還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced、 NADPH) に転換され得る。

30

40

【0022】

前記クロマトホア細胞膜小胞を分離できる酸素非発生型の光合成細菌は、制限がなく、好ましくは、紫色非硫黄細菌 (purple non-sulfur bacteria) から分離でき、より好ましくは、ロドバクター属 (*Rhodobacter* sp.)、ロドスピリルム属 (*Rhodospirillum* sp.)、ロドシュードモナス属 (*Rhodopseudomonas* sp.)、ロゼオバクター属 (*Roseobacter* sp.)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium* sp.) 及びルブリヴィヴァックス属 (*Rubrivivax* sp.) で構成される群から選択される紫色非硫黄細菌から分離できる。

50

【0023】

チラコイド細胞膜小胞 (thylakoid membrane vesicle) は、チラコイド細胞膜 (thylakoid membrane) に由来し、二つの種類の光系 (photosystem I / II) とアデノシン三リン酸合成酵素及び電子伝達系タンパク質を含む細胞膜 - タンパク質複合体を意味する。チラコイド細胞膜は、電子受容体として酸素を使用する電子伝達を通じて還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) と陽性子濃度勾配を形成する。かくして形成された陽性子濃度勾配は、アデノシン三リン酸合成酵素によりアデノシン二リン酸と無機リン酸をアデノシン三リン酸に合成するのに使用される。

【0024】

前記チラコイド細胞膜小胞を分離できる酸素発生型の光合成細菌又は藻類は、制限がなく、好ましくは、藍色細菌 (cyanobacteria) から分離でき、より好ましくは、シネコシステイス属 (Synechocystis sp.)、シネココックス属 (Synechococcus sp.)、ノストック属 (Nostoc sp.)、アナバエナ属 (Anabaena sp.)、グロイオバクター属 (Gloeobacter sp.) 及びシアノバクテリア属 (Cyanobacterium sp.) で構成される群から選択される藍色細菌から分離できる。

【0025】

本発明の好ましい具現例によれば、本発明は、前記光合成細胞膜小胞に光を照射し、アデノシン二リン酸 (adenosine diphosphate, ADP) と無機リン酸 (inorganic phosphate) からアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate, ATP) を形成する段階を含む。

【0026】

本発明では、光合成細胞膜小胞をアデノシン三リン酸の供給源として利用し、グルタチオンの合成を触媒する酵素は、グルタチオンを形成する過程でアデノシン三リン酸を消耗しながらアデノシン二リン酸及び無機リン酸を形成する (図1a及び図1b)。かくして形成されたアデノシン二リン酸及び無機リン酸は、光合成条件の下で光合成細胞膜小胞の明反応によりアデノシン三リン酸に再生され、グルタチオンの合成に關与する酵素の反応に再使用され得る。

【0027】

本明細書で使用される用語「光合成条件」は、光合成細胞膜小胞の明反応を誘導するための条件を意味する。例えば、クロマトホア細胞膜小胞の場合、好ましくは、20~37の温度、3~300 Watts/m²の光度、350~1000nm波長帯の光が照射される条件の下で行われることができ、このような波長帯を満たすために、白熱灯を使用できる。また、チラコイド細胞膜小胞の場合、好ましくは、20~37の温度と5~500 µEinstein/m²・s (µmole photons/m²・s)の光度、400~700nm波長帯の光で行われることができ、このような波長帯を満たすために、蛍光灯を使用できる。

【0028】

本発明のさらに他の様態によれば、本発明は、次の段階を含むグルタチオン (glutathione) の生産方法を提供する：(a) 光合成細胞膜小胞 (photosynthetic membrane vesicle) に光を照射し、アデノシン二リン酸 (adenosine diphosphate, ADP) 及び無機リン酸 (inorganic phosphate) からアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate, ATP) を生成する段階と、(b) グルタチオンの合成を触媒する酵素が前記段階 (a) で生成されたアデノシン三リン酸を利用してグルタチオンを合成し、アデノシン二リン酸及び無機リン酸を形成する段階と、(c) 前記段階 (b) で生成されたアデノシン二リン酸及び無機リン酸が光合成細胞膜小胞のアデノシン三リン酸の生成に再使用される段階。

【0029】

本明細書で使用される用語「グルタチオンの合成を触媒する酵素」は、アデノシン三リン酸を消耗しながらアデノシン二リン酸及び無機リン酸を形成し、これからグルタチオンを生成する反応を触媒する酵素を意味し、好ましくは、ガンマグルタミルシステイン合成酵素 (γ -glutamylcysteine synthetase、GSHI)、グルタチオン合成酵素 (glutathione synthetase、GSHII) 及び二機能性グルタチオン合成酵素 (bifunctional γ -glutamylcysteine synthetase / glutathione synthetase、GshF) で構成された群から選択される 1 以上の酵素を含む。

【0030】

前記グルタチオンの合成を触媒する酵素は、グルタチオン生産のための基質 (substrate) を必要とし、好ましくは、グルタミン酸 (glutamate)、システイン (cysteine) 及びグリシン (glycine) を基質として利用する。生物体は、L-グルタチオンのみを選択的に生産及び使用する点を考慮するとき、前記グルタミン酸及びシステインは、L-グルタミン酸 (L-glutamate) 及び L-システイン (L-cysteine) を利用することがより効率的である。

10

【0031】

本発明の好ましい具現例によれば、前記グルタチオンの合成を触媒する酵素のうちガンマグルタミルシステイン合成酵素は、アデノシン三リン酸をアデノシン二リン酸と無機リン酸に転換しながらグルタミン酸及びシステインをガンマグルタミルシステインに合成する過程を触媒し、グルタチオン合成酵素は、アデノシン三リン酸をアデノシン二リン酸と無機リン酸に転換しながらガンマグルタミルシステイン及びグリシンをグルタチオンに合成する過程を触媒する酵素である。

20

【0032】

すなわち、前記方法で、段階 (b) は、段階 (a) で生成されたアデノシン三リン酸がアデノシン二リン酸と無機リン酸に転換されながら、グルタミン酸とシステインがガンマグルタミルシステイン合成酵素によりガンマグルタミルシステインを形成する段階と、前記形成されたガンマグルタミルシステインとグリシンがグルタチオン合成酵素によりグルタチオンに合成されながら、段階 (a) で生成されたアデノシン三リン酸がアデノシン二リン酸と無機リン酸に転換される段階と、を含んで行われることができる (参照：図 1 a、以下、全体反応 A という)。

30

【0033】

本発明の好ましい具現例によれば、前記グルタチオンの合成を触媒する酵素のうち二機能性グルタチオン合成酵素は、ガンマグルタミルシステイン合成酵素が触媒する反応及びグルタチオン合成酵素が触媒する反応を共に触媒し得る酵素である。

【0034】

すなわち、前記方法で、段階 (b) は、グルタミン酸、システイン及びグリシンが二機能性グルタチオン合成酵素によりグルタチオンに合成されながら、段階 (a) で生成されたアデノシン三リン酸がアデノシン二リン酸と無機リン酸に転換される段階を含んで行われることができる (参照：図 1 b、以下、全体反応 B という)。

【0035】

本発明では、光合成細胞膜小胞及び各酵素間の相対量を表現するために、酵素活性 (enzyme activity) を利用した。本明細書で用語「酵素活性」(以下、活性という) は、特定の量の酵素が単位時間当り生成できる産物の量を意味 ($\mu\text{mole product/min}$) し、実際活性がある酵素の量を反映する。「相対活性」は、クロマトホア細胞膜小胞及び酵素間の実際活性比 (activity ratio) を簡単な整数比で示したとき、当該酵素又はクロマトホア細胞膜小胞の比率値を意味する。全体反応 A においてガンマグルタミルシステイン合成酵素：グルタチオン合成酵素の相対活性比 (relative activity ratio) は、制限されないが、好ましくは、1 : 1 ~ 100 : 1、より好ましくは、4 : 1 ~ 20 : 1、最も好ましくは、8 : 1 ~ 16 : 1 である。また、光合成細胞膜小胞：ガンマグルタミルシステイン合成酵素：グルタ

40

50

チオン合成酵素の相対活性比には、制限を設けないが、好ましくは、1 : 12 : 1 ~ 100 : 12 : 1、より好ましくは、1 : 12 : 1 ~ 50 : 12 : 1、最も好ましくは、1 : 12 : 1 ~ 25 : 12 : 1である。最後に、光合成細胞膜小胞：二機能性グルタチオン合成酵素の相対活性比も、制限がなく、好ましくは、1 : 1 ~ 1000 : 1、より好ましくは、10 : 1 ~ 500 : 1、最も好ましくは、40 : 1 ~ 200 : 1である。前記相対活性比を外れると言って、グルタチオンの生成が不可能なことではないが、全体的なグルタチオンの収率及び生産費用などを考慮すると、前記比率によることが一層効率的である。

【0036】

本発明の好ましい具現例によれば、前記全体反応A又は全体反応Bを無酸素条件 (anaerobic condition) で行う。これにより、光合成細胞膜小胞の活性を極大化し、生産物であるグルタチオンの酸化 (oxidation) を防止できる。

10

【0037】

本発明のさらに他の様態によれば、本発明は、(i) 光合成細胞膜小胞 (photosynthetic membrane vesicle) と；(ii) ガンマグルタミルシステイン合成酵素 (γ-glutamylcysteine synthetase、GSHI)、グルタチオン合成酵素 (glutathione synthetase、GSHII) 及び二機能性グルタチオン合成酵素 (bifunctional γ-glutamylcysteine synthetase / glutathione synthetase、GshF) で構成された群から選択されるグルタチオン合成触媒酵素と；を含むグルタチオン生産用組成物を提供する。

20

【0038】

本発明は、組成物の形態に製品化され得、本発明の組成物は、適当な容器 (ガラス瓶、プラスチック容器など) に収納されて流通され、グルタチオンの生産に活用され得る。グルタチオンを生産しようとする者は、前記光合成細胞膜小胞及びグルタチオンの合成を触媒する酵素が含まれた組成物に光源を照射し、グルタチオンを持続的に生産できる。

【0039】

本発明のさらに他の様態によれば、本発明は、(i) アデノシン三リン酸の供給手段として光合成細胞膜小胞 (photosynthetic membrane vesicle) と；(ii) グルタチオン合成反応触媒手段としてガンマグルタミルシステイン合成酵素 (γ-glutamylcysteine synthetase、GSHI)、グルタチオン合成酵素 (glutathione synthetase、GSHII) 及び二機能性グルタチオン合成酵素 (bifunctional γ-glutamylcysteine synthetase / glutathione synthetase、GshF) で構成された群から選択されるグルタチオン合成触媒酵素と；を含むグルタチオン持続生産用システムを提供する。

30

【0040】

本明細書で用語「グルタチオン持続生産用システム」は、アデノシン三リン酸の最初投入又はアデノシン二リン酸と無機リン酸の最初投入以外に追加的な投入を必ず必要とするものではないシステムであって、グルタミン酸、システイン及びグリシンのみを添加しても、グルタチオンを持続的に生産できるシステムを意味し、これは、反応器、キット、装置、設備などを含む。

40

【0041】

本発明のさらに他の様態によれば、本発明は、前記システムにグルタチオン生産のための基質 (substrate) としてグルタミン酸 (glutamate)、システイン (cysteine) 及びグリシン (glycine) を添加する段階を含むグルタチオンの持続生産方法を提供する。

【発明の効果】

【0042】

本発明の特徴及び利点を要約すると、次の通りである：

(i) 本発明は、光合成細胞膜小胞、ガンマグルタミルシステイン合成酵素及びグルタチ

50

オン合成酵素を利用したグルタチオンの生産方法を提供する。

(i i) また、本発明は、光合成細胞膜小胞、二機能性グルタチオン合成酵素を利用したグルタチオンの生産方法を提供する。

(i i i) 本発明は、ガンマグルタミルシステイン合成酵素、グルタチオン合成酵素、二機能性グルタチオン合成酵素がグルタチオンを合成するときに消耗されるアデノシン三リン酸を供給する手段として光合成細胞膜小胞を利用して、光が照射される条件でアデノシン三リン酸を持続的に供給することによって、アデノシン三リン酸の追加的な投入にかかる費用を節減できる長所を有する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 3 】

10

【図 1 a】図 1 a は、全体反応 A であって、クロマトホア細胞膜小胞、ガンマグルタミルシステイン合成酵素及びグルタチオン合成酵素を利用してグルタチオンを合成する方法の反応模式図である。

【図 1 b】図 1 b は、全体反応 B であって、クロマトホア細胞膜小胞及び二機能性グルタチオン合成酵素を利用してグルタチオンを合成する方法の反応模式図である。

【図 2】図 2 は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S P A G E) を行い、精製されたガンマグルタミルシステイン合成酵素、グルタチオン合成酵素及び二機能性グルタチオン合成酵素を確認した図である。

【図 3】図 3 は、ガンマグルタミルシステイン合成酵素の活性を、アデノシン三リン酸の形成を検出する方法を利用して測定した例示である。

20

【図 4】図 4 は、グルタチオン合成酵素の活性を、アデノシン三リン酸の形成を検出する方法を利用して測定した例示である。

【図 5】図 5 は、グルタチオン合成酵素の相対活性 (r e l a t i v e a c t i v i t y) を 1 に固定させ、ガンマグルタミルシステイン合成酵素の相対活性によるグルタチオンの生成量を確認した図である。

【図 6】図 6 は、ガンマグルタミルシステイン合成酵素の相対活性：グルタチオン合成酵素の相対活性比を 1 2 : 1 に固定させ、クロマトホア細胞膜小胞の相対活性によるグルタチオン生成量を確認した図である。

【図 7】図 7 は、L - グルタミン酸、L - システイン、グリシン、アデノシン三リン酸が含まれた反応液において二機能性グルタチオン合成酵素のグルタチオン生成活性を測定した例示である。

30

【図 8】図 8 は、二機能性グルタチオン合成酵素の相対活性を 1 に固定させ、クロマトホア細胞膜小胞の相対活性によるグルタチオン生成量を確認した図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 4 4 】

以下、実施例を通じて本発明をさらに詳しく説明する。これらの実施例は、単に本発明を具体的に説明するためのものであって、本発明の要旨によって本発明の範囲がこれらの実施例により制限されないことは、当業界において通常の知識を有する者に自明だろう。

【 0 0 4 5 】

40

実施例

実施例 1 : クロマトホア細胞膜小胞の分離

【 0 0 4 6 】

クロマトホア細胞膜小胞 (c h r o m a t o p h o r e m e m b r a n e v e s i c l e) は、韓国特許出願第 1 0 - 2 0 1 4 - 0 1 5 1 9 0 7 号に開示された方法を利用して分離した。クロマトホア細胞膜小胞の分離のために使用された菌株は、紫色非硫黄細菌の一種であるロドバクター・スフェロイデス (R h o d o b a c t e r s p h e a r o i d e s 2 . 4 . 1 、 A T C C B A A - 8 0 8 、 C o h e n - B a z i r e e t a l . 1 9 5 6 . J . C e l l . C o m p . P h y s i o l . 4 9 : 2 5 - 6 8) を利用した。前記菌株を培養するとき、シストロム最小培地 (S i s t r o m . 1 9 6 2 . J . G e n . M i c r o b i o l . 2 8 : 6 0 7 - 6 1 6 、 表 1) を使用した。培養方法は、

50

まず、5 mLの培地が入っている試験管に菌株を接種した後、30、250 rpmで振とう培養した。660 nmにおける吸光度が2.0程度になったとき、18 mL容量のスクリーキャップ (screw cap) 試験管に初期吸光度が0.05となるように継代培養した後、酸素の流入を遮断するために、スクリーキャップ試験管に培地を全部満たし、シールした。培養は、光合成の条件で行い、温度が30に維持される培養器 (incubator) に白熱灯により15 Watts/m²の光度で光が照射される条件の下で18時間嫌気培養した。260 mLの透明なガラス瓶を用意し、18 mLのスクリーキャップ試験管で培養した菌株を8 mL入れた後、残りの容量を培地で全部満たし、シールし、30の温度、15 Watts/m²の光度の白熱灯の前で18時間嫌気培養した。その後、クロマトホア細胞膜の分離過程は、すべて嫌気性チャンバー (anaerobic chamber、model 10、Coy laboratory product) で行われた。嫌気性チャンバー内の気体組成は、窒素90%、二酸化炭素5%、水素5%で構成される。260 mLで培養したロドバクター・スフェロイデス菌株を7000 g、4に10分間遠心分離した後、上澄み液 (supernatant) を捨て、菌体 (cell pellet) を得た。菌体は、リン酸バッファー (phosphate buffer、10 mMのNa₂HPO₄、2 mMのKH₂PO₄、pH 7.6) を4 mL入れ、溶解 (resuspension) させた後、プロテアーゼ抑制剤混合液 (protease inhibitor cocktail、Roche) を製造社の指針によって添加した。以後の過程では、すべての試料を氷に載置し、温度を低く維持しながら進行された。次の過程は、細胞を破碎するために、超音波破碎機 (sonicator、model VCX130、Sonic & Materials) を利用して、100%増幅 (amplification) で2分間超音波を照射した後、2分間氷水で冷却させる過程を3回繰り返した。超音波を照射するときは、過熱を防止するために、菌体を氷水で冷却しつつ行われた。破碎した菌体は、6,000 g、4で10分間遠心分離した後、その上澄み液のみを収得し、超高速遠心分離機 (Optima XE-90、Beckman Coulter) を利用して4、200,000 gで1時間遠心分離した。上澄み液を除去した後、ショ糖密度勾配遠心分離 (sucrose-density gradient ultracentrifugation) のために、クロマトホア細胞膜小胞を含む沈殿物 (pellet) を1 mLのリン酸バッファーで溶解させた。ショ糖密度勾配は、13.5 mL容量の超高速遠心分離用容器の最下層から、60% (w/v、リン酸バッファーで溶解) ショ糖溶液8 mL、40%ショ糖溶液1 mL、20%ショ糖溶液1 mLよりなり、最上層に1 mLのクロマトホア細胞膜小胞沈殿物を上げた後、200,000 gで4時間超高速遠心分離を行った。クロマトホア細胞膜小胞は、20%ショ糖溶液階と40%ショ糖溶液層との間に位置するようになり、赤褐色の層として現われる。クロマトホア細胞膜小胞を含む赤褐色の層を分離した後、同じ体積のリン酸バッファーを添加して希釈し、さらに、一般汚染菌の増殖を防止するために、カナマイシン (kanamycin) を100 µg/mLの濃度で添加した後、プロテアーゼ抑制剤混合液を製造社の指針によって添加した後、無酸素 (anaerobic) の状態にシールし、4で保管した。

【0047】

10

20

30

40

【表 1】

ロドバクター・スフェロイデス培養用シストロム最小培地組成

添加物	最終濃度
KH_2PO_4	20 mM
NaCl	8.5 mM
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.78 mM
L-グルタミン酸	0.67 mM
L-アスパラギン酸	0.25 mM
コハク酸	3.4 mM
ニトリロ三酢酸	1.05 mM
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.2 mM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.23 mM
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7 μM
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0.16 μM
EDTA	4.7 μM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	38 μM
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	9.1 μM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.6 μM
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.85 μM
H_3BO_3	1.8 μM
ニコチン	8.1 μM
チアミン塩酸塩	1.5 μM
ビオチン	41 nM

10

20

30

【0048】

実施例 2：グルタチオン合成に關与する酵素を暗号化する遺伝子確保

【0049】

全体反応 A (図 1 a) のガンマグルタミルシステイン合成酵素とグルタチオン合成酵素を暗号化 (coding) する遺伝子、及び全体反応 B (図 1 b) の二機能性グルタチオン合成酵素をクローニング (cloning) するために、重合酵素連鎖反応 (polymerase chain reaction) を行った。ガンマグルタミルシステイン合成酵素の場合、前方プライマー (forward primer) として配列番号 1 を使用し、後方プライマー (reverse primer) として配列番号 2 を使用し、グルタチオン合成酵素の場合、前方プライマーとして配列番号 3 を使用し、後方プライマーとして配列番号 4 を使用し、それぞれ大腸菌 (*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655) の染色体 DNA (chromosomal DNA) を鋳型 (template) として重合酵素連鎖反応を行った。二機能性グルタチオン合成酵素は、前方プライマーとして配列番号 5 を使用し、後方プライマーとして配列番号 6 を使用し、ストレプトコッカス・アガラクティアエ (*Streptococcus Agalactiae* str. 2603V/R, ATCC BAA-611) の染色体 DNA (chromosomal DNA) を鋳型 (template) として重合

40

50

酵素連鎖反応を行った。かくして重合酵素連鎖反応で確保した遺伝子切片 (fragment) の両末端には、制限酵素 BsaI の認識配列及び IBA 社で勧奨する追加配列を挿入し、これを IBA 社で提供する発現ベクター (expression vector) である pASK-IBA7plus (ガンマグルタミルシステイン合成酵素、二機能性グルタチオン合成酵素) 及び pASK-IBA3plus (グルタチオン合成酵素) に接合した。結果的に、N-末端にストレプトタグ (strep-tag) が接合されたガンマグルタミルシステイン合成酵素及び二機能性グルタチオン合成酵素と、C-末端にストレプトタグ (strep-tag) が接合されたグルタチオン合成酵素を発現させる構造物を完成した。

【0050】

10

【表2】

ガンマグルタミルシステイン合成酵素遺伝子配列確保用プライマー

配列番号	方向	配列
1	gshA-F	5' -AAAAAAGGTCTCTGCGCTTGATCCCG GACGTATCACA-3'
2	gshA-R	5' -AAAAAAGGTCTCTTATCATCAGGCGT GTTTTTCCAGCC-3'

20

【0051】

【表3】

グルタチオン合成酵素遺伝子配列確保用プライマー

配列番号	方向	配列
3	gshB-F	5' -AAAAAAGGTCTCTAATGATCAAGCTC GGCATCGT-3'
4	gshB-R	5' -AAAAAAGGTCTCTGCGCTCTGCTGCT GTAAACGTGCTT-3'

30

【0052】

【表 4】

二機能性グルタチオン合成酵素遺伝子配列確保用プライマー

配列番号	方向	配列
5	g s h F-F	5' -AAAAAAGGTCTCAGCGCATGATTATC GATCGACTGTTAC-3'
6	g s h F-R	5' -AAAAAAGGTCTCGTATCATTATAATT CTGGGAACAGTTTAG-3'

10

【0053】

実施例 3：グルタチオン合成反応を触媒する酵素の精製

【0054】

本実施例では、実施例 2 で製作した発現ベクター構造物で大腸菌菌株 B L 2 1 (D E 3) を形質転換 (t r a n s f o r m a t i o n) し、ガンマグルタミルシステイン合成酵素とグルタチオン合成酵素及び二機能性グルタチオン合成酵素をそれぞれ過発現する形質転換菌株を獲得した。前記三つの酵素の精製時に、同一の方法を使用する。まず、試験管に 50 μg / mL のアンピシリン (a m p i c i l l i n) を含む L B (L u r i a - B e r t a n i) 培地 5 mL を入れ、形質転換菌株を接種し、250 rpm、37 °C で 12 時間振とう培養する。試験管で振とう培養した菌株を 50 μg / mL のアンピシリンが含まれた 500 mL の L B 培地が収納された 1 L のフラスコ (f l a s k) に接種した。接種時、600 nm の最初吸光度が 0.05 となるようにした後、250 rpm、37 °C で振とう培養しつつ、吸光度が 0.4 に到達すると、無水テトラサイクリン (a n h y d r o t e t r a c y c l i n e) を 0.2 μg / mL の濃度で添加した。250 rpm、30 °C で約 12 時間振とう培養した後、4,000 g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を除去し、菌体 (p e l l e t) を獲得した。菌体を 10 mL のバッファー W (100 mM の T r i s - H C l 、 p H 8.0、150 mM の N a C l 、 1 mM の E D T A) に溶解した後、プロテアーゼ抑制剤混合液 (R o c h e) を製造社の勧奨量で添加し、菌体を破碎するために超音波破碎機 (B r a n s o n s o n i f i e r 250) を利用した。超音波破碎は、アウトプット (o u t p u t) 3 の強度で 5 分間破碎した後、5 分間氷水で冷却する過程を 3 回繰り返した。破碎後、6,000 g で 10 分間遠心分離し、水溶性酵素が含まれた上澄み液を分離し、ストレプタグを利用した親和性クロマトグラフィー (a f f i n i t y c h r o m a t o g r a p h y) で酵素を精製した。ストレプタグ親和性クロマトグラフィーは、製造社 (I B A) で勧奨する方法を使用した。最終的に、精製した酵素は、10% の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S p o l y a c r y l a m i d e g e l e l e c t r o p h o r e s i s) で確認した (図 2) 。予想分子量は、ガンマグルタミルシステイン合成酵素が約 58 k D a (W a t a n a b e e t a l . 1986 . N u c l e i c a c i d s R e s . 14 : 4393) 、グルタチオン合成酵素が約 35 k D a (G u s h i m a e t a l . 1984 . N u c l e i c a c i d s R e s . 12 : 9299) 、二機能性グルタチオン合成酵素が約 85 k D a (J a n o w i a k a n d G r i f f i t h . 2005 . J . B i o l . C h e m . 280 : 11829 - 11839) であった。

20

30

40

【0055】

実施例 4：光の照射によるクロマトホア細胞膜小胞のアデノシン三リン酸生成活性測定

【0056】

クロマトホア細胞膜小胞の定量及び活性測定は、韓国特許出願第 10 - 2014 - 0151907 号に開示された方法を利用した。クロマトホア細胞膜小胞は、バクテリオクロロ

50

フィルエイ (bacteriochlorophyll a, bch a) 濃度を利用して定量し、アデノシン三リン酸 (ATP) の生成活性の測定時、0.25 ~ 0.5 μg bch a / mL の濃度でクロマトホア細胞膜小胞を使用した。反応は、10 mM のリン酸ナトリウム (Na_2HPO_4)、2 mM のリン酸カリウム (KH_2PO_4)、10 mM の塩化マグネシウム (MgCl_2)、0.4 mM のアデノシン三リン酸で構成されたバッファにクロマトホア細胞膜小胞を適量投入した後、30、15 Watts/m^2 の白熱灯が照射される無酸素 (anaerobic) の条件で時間別に生成されるアデノシン三リン酸の量をアデノシン三リン酸検出キット (Sigma-Aldrich) を利用して測定した。クロマトホア細胞膜小胞の活性は、単位時間当たり生成されたアデノシン三リン酸の量 ($\text{nmole ATP}/\text{min}$) で表現した。

10

【0057】

実施例 5 : ガンマグルタミルシステイン合成酵素とグルタチオン合成酵素の酵素活性測定
【0058】

本実施例では、実施例 3 で精製したガンマグルタミルシステイン合成酵素及びグルタチオン合成酵素の酵素活性 (enzyme activity) を測定するために、アデノシン三リン酸の形成を測定する方法 (Seelig and Meister, 1985, Methods in Enzymol. 113: 379 - 390) を使用した。活性測定時に使用した反応バッファは、0.1 mM のトリス (Tris-Cl, pH 7.6)、10 mM の塩化マグネシウム (MgCl_2)、0.8 mM のアデノシン三リン酸 (ATP)、2 mM のホスホエノールピルビン酸 (phosphoenolpyruvate)、0.2 mM のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH)、14.3 Unit / mL のピルビン酸キナーゼ (pyruvate kinase)、14.3 Unit / mL の乳酸脱水素酵素 (lactic dehydrogenase) で構成される。ガンマグルタミルシステイン合成酵素の活性を測定する場合、前記反応バッファに 10 mM の L - グルタミン酸 (L - glutamate) と 10 mM の L - システイン (L - cysteine) を添加し、グルタチオン合成酵素の活性を測定する場合、前記反応バッファに 10 mM のグリシン (glycine)、1 mM のガンマグルタミルシステイン (L - glutamylcysteine) を添加した。反応温度は、30 にした。ガンマグルタミルシステイン合成酵素とグルタチオン合成酵素の酵素反応が起こる場合、アデノシン三リン酸が生成され、これと同時に、アデノシン三リン酸と同じ当量の還元されたニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) が酸化された形態 (NAD^+) に転換される。還元されたニコチンアミドアデニンジヌクレオチドは、340 nm で吸光性を示す一方で、酸化された形態は、吸光性がないので、時間による 340 nm における吸光度の減少を測定することによって、二つの酵素の活性を把握できる。図 3 は、ガンマグルタミル合成酵素の活性を測定した例示であり、図 4 は、グルタチオン合成酵素の活性を測定した例示である。酵素活性の計算時、340 nm でモル吸光係数 ($6220 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) を利用してニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) の濃度変化量を求め、1 当量のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドが消費されるとき、各酵素の産物が 1 当量生成されると仮定した。かくして計算された単位時間当たり生成された産物の数 ($\text{nmole product}/\text{min}$) を酵素活性で表現した。

20

30

40

【0059】

実施例 6 : ガンマグルタミルシステイン合成酵素とグルタチオン合成酵素によるグルタチオン生成確認

【0060】

本実施例では、ガンマグルタミルシステイン合成酵素とグルタチオン合成酵素により L - グルタミン酸、L - システイン、グリシン及びアデノシン三リン酸からグルタチオンが生成されることを確認した。使用した反応バッファは、10 mM のリン酸ナトリウム (Na_2HPO_4)、2 mM のリン酸カリウム (KH_2PO_4)、10 mM の塩化マグネシウム (MgCl_2)、0.8 mM のアデノシン三リン酸 (ATP)、10 mM の L - グルタミン酸、10 mM の L - システイン、10 mM のグリシンで構成し、生成されたグルタチ

50

オンの酸化を防止するために、30℃、無酸素の条件(anaerobic)で反応を進行した。グルタチオンの検出は、グルタチオン検出キット(GSH-Glo(登録商標) Glutathione Assay, Promega)を利用した。各酵素は、実施例5の方法で活性を測定した後、活性を基盤として定量した。図5は、グルタチオン合成酵素の相対活性を固定させ、それによるガンマグルタミルシステイン合成酵素の相対活性を変化させながら、グルタチオンが生成される量を測定したものである。結果的に、二つの酵素によりグルタチオンが形成されることを確認し、グルタチオン生産量が最大になる二つの酵素間の最小活性比(activity ratio、図5のGSHI:GSHII)は、約12:1であった。したがって、下記の実施例では、ガンマグルタミルシステイン合成酵素とグルタチオン合成酵素の比を12:1で使用した。

10

【0061】

実施例7:光が照射される条件でクロマトホア細胞膜小胞、ガンマグルタミルシステイン合成酵素及びグルタチオン合成酵素によるグルタチオン生成確認

【0062】

本実施例では、クロマトホア細胞膜小胞、ガンマグルタミルシステイン合成酵素、グルタチオン合成酵素によりアデノシン三リン酸(ATP)がなく、光が照射される条件でグルタチオンの生成を確認した。使用した反応バッファーは、10mMのリン酸ナトリウム(Na_2HPO_4)、2mMのリン酸カリウム(KH_2PO_4)、10mMの塩化マグネシウム(MgCl_2)、0.4mMのアデノシン二リン酸(ADP)、10mMのLグルタミン酸、10mMのLシステイン、10mMのグリシンを含み、30℃、無酸素の条件で反応を進行した。光源(light source)としては、15Watts/m²の光度の白熱灯を使用した。図6は、ガンマグルタミルシステイン合成酵素:グルタチオン合成酵素の相対活性を12:1に固定させ、クロマトホア細胞膜小胞の相対活性を変化させながら、グルタチオンの生成量を確認したものである。クロマトホア細胞膜小胞の量が増加するほど、グルタチオンの生成量(又は生成速度)が増加することを確認し、クロマトホア細胞膜小胞の相対活性が25以上であるとき、グルタチオンの生成量が最大に近接した。

20

【0063】

実施例8:二機能性グルタチオン合成酵素のグルタチオン生成活性測定

【0064】

本実施例では、L-グルタミン酸、L-システイン、グリシン及びアデノシン三リン酸が含まれた反応液において二機能性グルタチオン合成酵素がグルタチオンを生成することを確認した。反応液の組成は、10mMのリン酸ナトリウム(Na_2HPO_4)、2mMのリン酸カリウム(KH_2PO_4)、10mMの塩化マグネシウム(MgCl_2)、100mMのLグルタミン酸、10mMのLシステイン、25mMのグリシン、0.8mMのアデノシン三リン酸(ATP)で構成し、30℃で反応を行った。図7は、それぞれ異なる量の二機能性グルタチオン合成酵素を含む反応液において時間によるグルタチオン生成量を測定し、二機能性グルタチオン合成酵素の活性(nmole glutathione/min)を決定したものである。二機能性グルタチオン合成酵素の反応は、初期に誘導期(lag phase)が存在するため、活性を計算するときには、線形(linear)区間の反応速度で計算する。

30

40

【0065】

実施例9:光が照射される条件でクロマトホア細胞膜小胞と二機能性グルタチオン合成酵素によるグルタチオン生成確認

【0066】

本実施例では、アデノシン三リン酸の代わりに、アデノシン二リン酸を添加した後、光が照射される条件でクロマトホア細胞膜小胞と二機能性グルタチオン合成酵素と一緒に使用してL-グルタミン酸、L-システイン、グリシンからグルタチオンが生成されることを確認した。反応液は、前記実施例8の反応液において0.8mMのアデノシン三リン酸の代わりに0.4mMのアデノシン二リン酸を添加したものをを使用した。反応は、15W

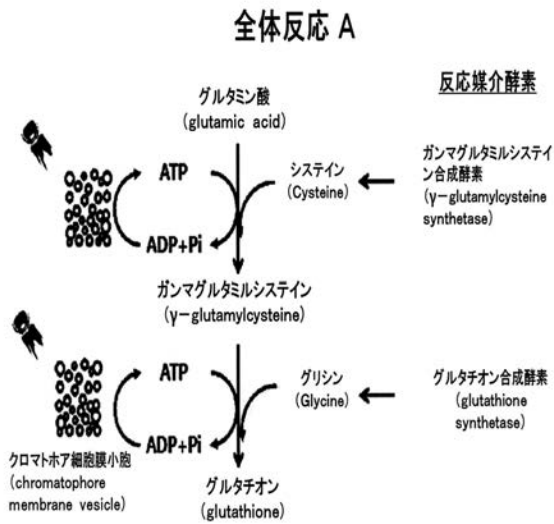
50

tts/m^2 の光度の白熱灯が照射される 30 の無酸素の条件で行われた。図 8 は、二機能性グルタチオン合成酵素の相対活性を 1 に固定させ、クロマトホア細胞膜小胞の活性によるグルタチオンの生成量を測定したものであり、クロマトホア細胞膜小胞の量が増加するほど、グルタチオンの生成量が増加することを確認した。

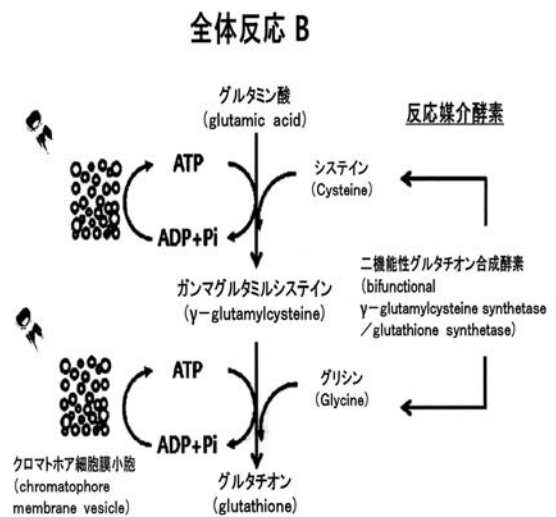
【 0 0 6 7 】

以上、本発明の特定の部分を詳しく記述したところ、当業界において通常の知識を有する者にとってこのような具体的な技術は、単に好ましい具現例に過ぎず、これに本発明の範囲が制限されるものではない点は、明白である。したがって、本発明の実質的な範囲は、添付の請求項とその等価物によって定義されると言える。

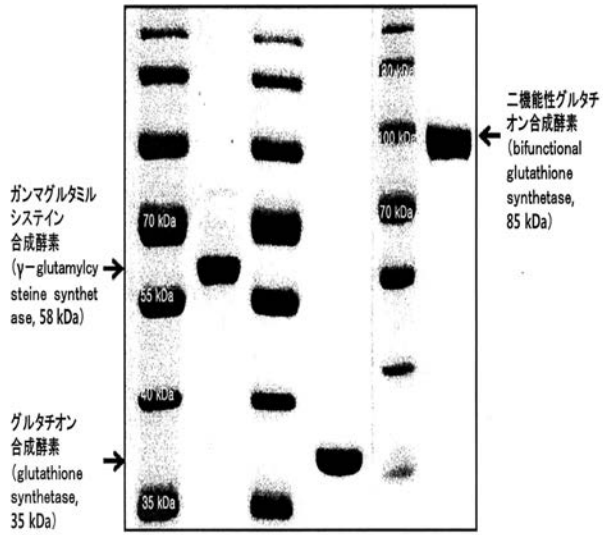
【 図 1 a 】



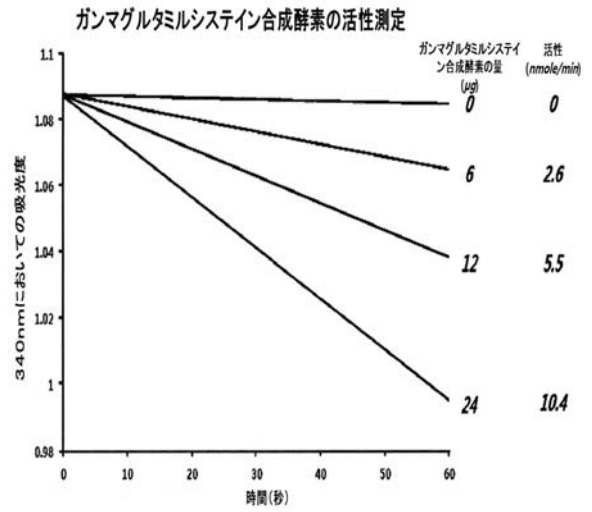
【 図 1 b 】



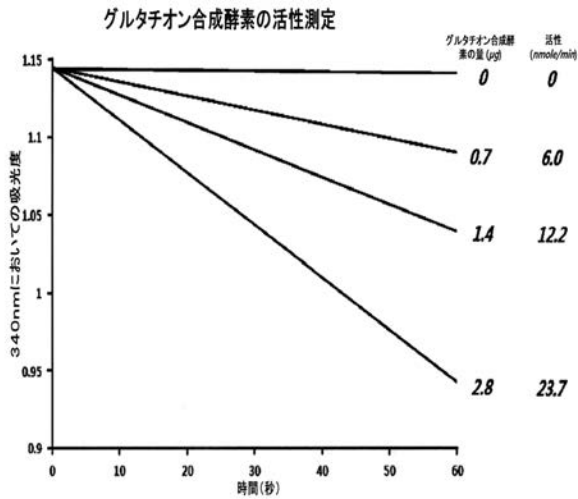
【 図 2 】



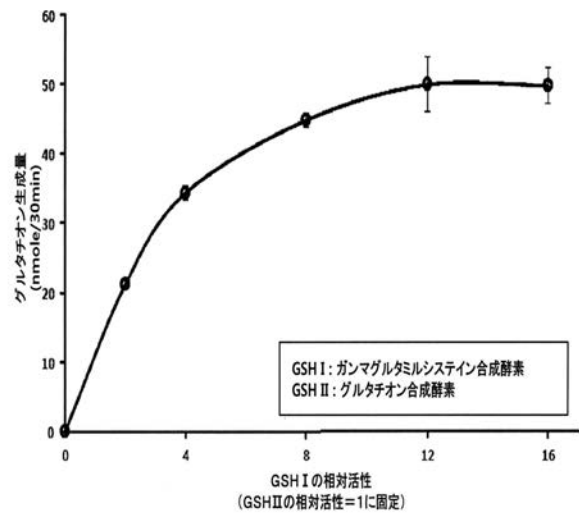
【 図 3 】



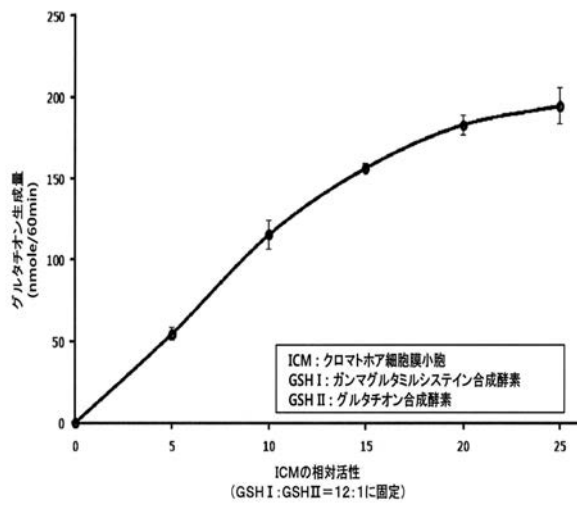
【 図 4 】



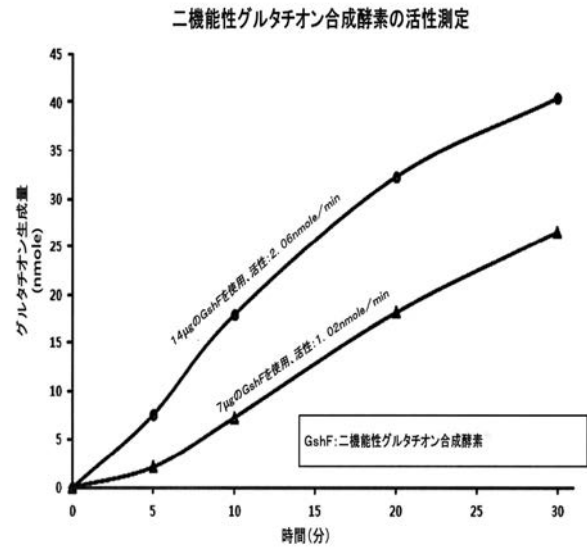
【 図 5 】



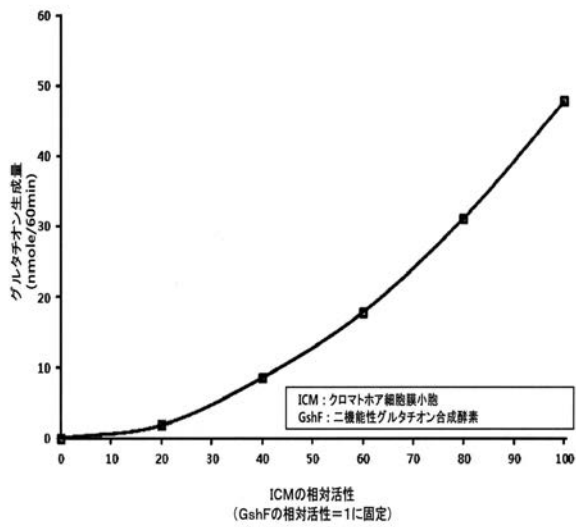
【 図 6 】



【 図 7 】




【 図 8 】



【配列表】

2018501811000001.app

【 国際調査報告 】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2016/000433
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12P 21/02(2006.01)i, C12N 9/00(2006.01)i</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12P 21/02; A61K 31/095; C12N 11/00; C12Q 1/00; C12N 11/02; C12N 9/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: photosynthetic membrane vesicle, gamma glutamylcysteine synthetase, glutathione synthesizing enzyme, multi-functional glutathione synthesizing enzyme, glutathion		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAWA, Yoshihiro et al., "Photosynthetic Glutathione Production using Intact Cyanobacterial Cells", Agricultural and Biological Chemistry, 1986, vol. 50, no. 5, pages 1361-1363 See pages 1361-1362; figures 1-2.	1-16
A	CREISSEN, Gary et al., "Elevated Glutathione Biosynthetic Capacity in the Chloroplasts of Transgenic Tobacco Plants Paradoxically Causes increased Oxidative Stress", The Plant Cell, 1999, vol. 11, no. 7, pages 1277-1291 See the entire document.	1-16
A	CN 102220400 A (BEIJING UNIVERSITY OF CHEMICAL TECHNOLOGY) 19 October 2011 See abstract; claim 1; paragraphs [0005]-[0006], [0023]-[0029].	1-16
A	US 2008-0194701 A1 (GRIFFITH, Owen W. et al.) 14 August 2008 See abstract; claims 5, 24, 27-28; paragraph [0002].	1-16
A	CN 103627691 A (HUZHOU RESEARCH CENTER OF INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 12 March 2014 See the entire document.	1-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
30 MAY 2016 (30.05.2016)		30 MAY 2016 (30.05.2016)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/000433

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 102220400 A	19/10/2011	CN 102220400 B	05/02/2014
US 2008-0194701 A1	14/08/2008	WO 2006-063116 A2 WO 2006-063116 A3	15/06/2006 16/04/2009
CN 103627691 A	12/03/2014	NONE	

국제조사보고서		국제출원번호 PCT/KR2016/000433
A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12P 21/02(2006.01)i, C12N 9/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류들 기재) C12P 21/02; A61K 31/095; C12N 11/00; C12Q 1/00; C12N 11/02; C12N 9/00		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사가 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 광합성 세포막 소낭, 감마 글루타밀 시스템인 합성효소, 글루타치온 합성효소, 이기능 글루타치온 합성효소, 글루타치온		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	SAWA, YOSHIHIRO 등, 'Photosynthetic glutathione production using intact cyanobacterial cells', Agricultural and Biological Chemistry, 1986, 50권, 5호, 페이지 1361-1363 페이지 1361-1362; 도면 1-2 참조.	1-16
A	CREISSEN, GARY 등, 'Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress', The Plant Cell, 1999, 11권, 7호, 페이지 1277-1291 전체 문헌 참조.	1-16
A	CN 102220400 A (BEIJING UNIVERSITY OF CHEMICAL TECHNOLOGY) 2011.10.19. 요약; 청구항 제1항; 단락 [0005]-[0006], [0023]-[0029] 참조.	1-16
A	US 2008-0194701 A1 (GRIFFITH, OWEN W. 등) 2008.08.14. 요약; 청구항 제5, 24, 27-28항; 단락 [0002] 참조.	1-16
A	CN 103627691 A (HUZHOU RESEARCH CENTER OF INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 2014.03.12. 전체 문헌 참조.	1-16
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 복려 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2016년 05월 30일 (30.05.2016)		국제조사보고서 발송일 2016년 05월 30일 (30.05.2016)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150 

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2016/000433

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 102220400 A	2011/10/19	CN 102220400 B	2014/02/05
US 2008-0194701 A1	2008/08/14	WO 2006-063116 A2 WO 2006-063116 A3	2006/06/15 2009/04/16
CN 103627691 A	2014/03/12	없음	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ

(72)発明者 ヒョン・ジュン・キム

大韓民国・ソウル・04107・マポ・グ・ベクボム - 口・35・ソガン・ユニヴァーシティ・ゴンザガ・インターナショナル・バカロレイト・ビー1060

(72)発明者 ウン・キョン・オ

大韓民国・ソウル・04094・マポ・グ・グワンソン - 口・35 - 14・ルーム・303

Fターム(参考) 4B050 CC03 CC08 KK20 LL05

4B064 AG01 CA21 CC03 CC06 CC24 CC30 CD02 CD13 CD15 CD30

4B065 AA01X BC03 BC09 BC26 BC48 BC50 BD01 BD15