

Title	The primary structure of human $\gamma$ -glutamyl transpeptidase
Author(s)	坂室, 大徳
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37183">https://hdl.handle.net/11094/37183</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 【6】

氏名・(本籍)	坂 室 大 徳
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9657 号
学位授与の日付	平成3年3月26日
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	The primary structure of human $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (ヒト $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼの一次構造)
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 直之 (副査) 教授 吉川 寛 教授 田川 邦夫

## 論文内容の要旨

## (目 的)

$\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ ( $\gamma$ GTP) は、広く動物組織に存在する膜結合型の糖タンパク質であり、 $\gamma$ -グルタミルペプチドやグルタチオンの $\gamma$ -グルタミル基の加水分解反応あるいは転移反応を触媒する。組織別の酵素活性は、腎臓が最も高く、以下胎児肝、膵臓、成熟肝、小腸、脳、筋肉の順となっている。特に肝臓では、癌化に伴う著しい活性の上昇が知られている。現在までのところ、 $\gamma$ GTPの癌性変化として明らかにされている点は、糖含有量の増加と異常糖鎖構造の出現という翻訳後レベルの変異であり、タンパク質側の解析は必ずしも進んでいるとは言えない。本研究では、ヒト $\gamma$ GTPのcDNAをクローニングし、その一次構造を明らかにすることを目的とした。合わせて、既に報告されているラットの $\gamma$ GTPとの相違についても検討した。

## (方 法)

- (1) 谷口らの精製法、即ちルブロールで可溶化し、ブロメライン処理したものを、DEAEイオン交換カラムを通し、更にイムノアフィニティーカラムを用いる方法によって、ヒト腎臓より高純度の標品を得た。この精製標品を、LDS存在下、HPLC TSK-GEL G3000SWカラムを通して重鎖、軽鎖に分離し、両サブユニットのN末端からのアミノ酸配列を気相シーケンサーを用いて解析した。
- (2) ヒト胎児肝臓cDNAライブラリーを、ラット $\gamma$ GTP cDNAフラグメント131, 101 (Dr. H. C. Pitotより供与) をプローブに用い、40%ホルムアミド存在下、42°Cでスクリーニングを行った。その他の条件は、すべてManiatis等の方法に従った。単離した陽性クローンの欠失ミュータントを複製し、ジデオキシ法によって両ストランドの塩基配列を決定した。

(成績)

- (1)  $\gamma$  GTPの重鎖, 軽鎖のN末端アミノ酸配列は, 各々29残基, 28残基が明らかとなった。この配列は, クローニングしたcDNAの真偽を判別する根拠となった。
- (2)  $6.0 \times 10^5$ 個のフェージより, プローブ131, 101ともに陽性のクローンが3個単離された。3個とも, アガロース電気泳動上1.9kbのフラグメントが組み込まれており, 各々の5'側, 3'側から約400dpにわたる塩基配列を調べた結果, これらのクローンは同一であると判断した。
- (3) 得られたクローンには, 1,866dpからなるフラグメントが組み込まれており, 1,709dpの翻訳配列(569アミノ酸)と157dpの3'非翻訳配列を持っていた。開始コドンは見いだせなかったが, この読み取り枠には, タンパク質側の解析から求めたN末端アミノ酸配列が, 重鎖, 軽鎖の順で完全にコードされていたことから, 本cDNAクローンはヒト $\gamma$  GTPのmRNAに対するものであると判断した。同時に両サブユニットは一本の前駆体ペプチドがプロセッシングを受けた結果であることが明らかとなった。
- (4) 成熟過程でアミノ酸の消失が無いとすると, 重鎖は351アミノ酸(推定分子量38,336), 軽鎖は189アミノ酸(同20,000)より成っている。重鎖のN末端側には, 29アミノ酸から成るペプチドが存在しており, 他のどの領域と比べてもはるかに高い疎水性を帯びていることから,  $\gamma$  GTP分子はこの部分で細胞膜に埋め込まれて存在し, プロメライン消化によって重鎖から切り放されるものと考えられた。
- (5) N-グリコシル化され得る配列は, 重鎖に6ヶ所, 軽鎖に1ヶ所見いだされた。重鎖の1ヶ所以外はすべて親水性領域に位置しており, 容易にグリコシル化されるものと考えられる。
- (6)  $\gamma$ -グルタミル基の結合部位は軽鎖に存在すること, また $\gamma$  GTPは, グルタミンナーゼ活性を有していることから, 既に活性中心が明らかにされている類縁の酵素群とのアミノ酸配列を比較したところ, 軽鎖に1つ存在するシステインの近傍に弱いホモロジーが見いだされた。
- (7) 既報のラット $\gamma$  GTPの塩基配列に一部誤りを見だし, 訂正した結果, ヒト, ラット間で一次構造上のホモロジーは79%であった。また, N-グリコシル化される部位や軽鎖システイン付近の配列は良く保存されていた。

(総括)

ヒト腎 $\gamma$  GTPを精製し, 重鎖, 軽鎖のN末端アミノ酸配列を決定した。また, ヒト胎児肝cDNAライブラリーより得た陽性クローンの全塩基配列を決定した。

両配列を照合し, 重鎖, 軽鎖がこの順序で1本のmRNAにコードされていること, 少なくとも29アミノ酸の疎水性ペプチドがN末端に存在し, この部分で細胞膜に結合していること, N-グリコシル化部位が親水性領域に存在すること, 軽鎖に1つあるシステインの近傍に活性部位が予想されること, そしてヒト, ラット間で一次構造がよく保存されていることが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

種々の癌組織、特に肝癌において著しく高い活性をとる $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ ( $\gamma$  GTP) は、糖鎖部分に量的、質的な「癌性変化」を受けるが、タンパク質側の解析は必ずしも十分ではなかった。

本研究は、ヒト $\gamma$  GTPタンパク質重鎖、軽鎖のN末端アミノ酸配列を明らかにし、この情報に基づいて世界に先駆けて、ヒト $\gamma$  GTP cDNAをクローニングし、全一次構造を決定したものである。この結果、ヒト、ラット間の本酵素の高い相同性、Asn型糖鎖結合部位、そしてグルタミン結合部位が明らかとなった。また今後、発癌による $\gamma$  GTP活性化機構を遺伝子レベルで解析する道が拓かれた。

以上により、本論文は医学博士の学位授与に値するものと評価できる。