The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Significance of Arg-107 and Glu-108 in the catalytic mechanism of human γ-glutamyl transpeptidase : Identification by site-directed mutagenesis
Author(s)	池田, 義孝
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38150
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【1】

氏　　名	池　田　義　孝（いけだ　よしたか）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　10609　号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学　位　論　文　名	Significance of Arg-107 and Glu-108 in the catalytic mechanism of human γ-glutamyl transpeptidase: Identification by site-directed mutagenesis **（ヒトγ-グルタミルトランスペプチダーゼの触媒機構における107位アルギニン残基と108位グルタミン酸残基の重要性：部位特異的変異法による同定）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　谷口　直之 （副査） 教　授　吉川　　寛　　教　授　岡本　光弘

論　文　内　容　の　要　旨

（目　　的）

γ－グルタミルトランスペプチダーゼ（GGT）はグルタチオンやその関連化合物のγ－グルタミル基を加水分解したり，アミノ酸やペプチドのアミノ基へ転移する反応を触媒する酵素であり，大小二つのサブユニットから成る糖タンパク質である。これまで本酵素の触媒機構の研究には主に化学修飾が用いられてきたが，この酵素の立体構造が明らかにされていないこともあり，その明確な触媒機構はもとより，それに関与するアミノ酸残基の同定もほとんどなされていなかった。そこで今回，部位特異的変異法によりアミノ酸置換を導入した変異酵素の性質を調べることにより，酵素活性に重要な役割をもつアミノ酸残基の同定を試み，反応機構におけるその残基の役割について検討した。

（方法および結果）

発現に使用したヒトGGT cDNAは当教室の坂室らがクローニングしたものを用いた。変異を導入する領域は，γ－グルタミル基を加水分解するGGT関連酵素であるGGT-relと高いホモロジーがある大サブユニット中のアミノ酸残基で50位から150位の間とした。置換したアミノ酸は，フェニルグリオキサールによる化学修飾の報告からアルギニンとリジン及び保存されているグルタミン酸とした。変異の導入はKunkel法により行った。発現ベクター（pSVK3）に組み込んだ野生型及び変異酵素のcDNAを，COS－1細胞に電気穿孔法によって導入し，酵素蛋白を一過性に発現させた。発現された酵素の解析には細胞のホモジネートを使用した。各変異酵素蛋白の発現レベルをELISA法にて測定して，それらの酵素活性を発現された蛋白あたりの相対値に補正し，野生型酵素と比較した。

その結果，100位のリジンをアスパラギン，112位，139位，147位及び150位の各アルギニンをグルタミンに置換した変異酵素では野生型酵素とほぼ同じ活性を示したが，107位のアルギニン残基をグルタミンに置換した変異酵素では活性は全く認められなかった。107位のアルギニン残基のもつ陽性電荷が重要である可能性があったため，これをリジンに置換した。この変異酵素（R107K）の活性は野生型の1.3％まで回復した。また107位の近傍において102位と108位のグルタミン酸残基が保存されていたので，これらをグルタミンに置換した。その結果，102位の置換では酵素活性には全く影響はなかったが，108位を置換した変異酵素（E108Q）ではその活性が著しく低下した（野生型の1.7％）。これらの変異酵素を抗ヒト腎GGT抗体を用いてイムノブロットを行ったところ，すべての変異酵素は野生型と同様に大小二つのサブユニットに分かれ，糖鎖付加も起こっていることから，導入されたアミノ酸置換は酵素のプロセッシングには影響を与えていないと考えられた。

次に変異酵素の動力学的解析を行った。γ－グルタミル基のドナー基質（γ－グルタミル－3－カルボキシ－4－ニトロアリニド）に対するみかけの動力学的パラメーター（appVmax,appKm）は150mMのアクセプター基質（グリシルグリシン）存在下で，アクセプター基質に対しては5mMのドナー基質存在下で求めた。野生型酵素と各変異酵素のパラメーターを比較したところ，R107KとE108Q以外の変異酵素は野生型酵素と全く同じ値であった。R107Kのドナー基質のappKmは，野生型0.82mMに対して6.9mMと8.4倍の値であり，appVmaxは野生型の5.7％であった。しかしながら，この変異酵素はアクセプターを添加しても活性が1.5倍ほどにしか促進されなかった（野生型では約20倍促進される）ため，アクセプターに対するパラメーターは求められなかった。また，ドナーの加水分解活性におけるVmax，Kmはそれぞれ野生型の30％及び，6.8倍であった。以上の結果から，107位のアルギニン残基は活性に必須ではあるが，触媒基そのものではなく，その陽性電荷を通して基質結合に関与することが示唆された。一方，E108Qのドナー基質に対するappKmは1.3mMと野生型に近い値であったが，アクセプター基質に対しては，野生型8.7mMに対して74mMと約9倍に増加していた。また各基質に対するappVmaxは野生型の4－5％であった。以上の結果から108位のグルタミン酸は酵素活性に不可欠ではないが，アクセプター基質の結合及び触媒機構において補助的な役割をもっていることが示唆された。

（総　　括）

1．ヒトγ－グルタミルトランスペプチダーゼの大サブユニット中の107位のアルギニンと108位のグルタミン酸の置換により酵素活性が著しく減少した。

2．107位のアルギニン残基は酵素活性に必須であり，おそらく静電的にその陽性電荷を通して基質結合に関与する可能性が示唆された。

3．108位のグルタミン酸残基は不可欠ではないが，反応機構において重要な役割をもつと考えられた。

論文審査の結果の要旨

γ－グルタミルトランスペプチダーゼはグルタチオンの分解を行い，グルタチオンのターンオーバーに重要な酵素である。これまで，本酵素の触媒機構や活性部位の検索は，化学修飾法により行われてきたが，特定のアミノ酸酸基が活性発現に関与しているという直接的な証拠は得られていなかった。

本研究では，部位特異的変異法を用いアミノ酸置換を導入した変異酵素を野生型酵素と比較することにより，触媒機構において重要な役割をもつアミノ酸残基の同定を試みた。その結果，107位のアルギニン残基の陽性電荷は活性発現に必須であること，また108位のグルタミン酸残基は補助的ではあるが重要な役割を担っていることを明らかにした。これは本酵素の触媒機構の研究に初めて遺伝子工学的手法を取り入れたものであり，触媒機構に関与するアミノ酸残基の同定だけでなく，その機能にも言及している点に意義がある。

したがって，本論文は学位論文に値するものと考えられる。