



Title	Structural studies on the mechanisms of enzyme reaction and maturation in g-glutamyltranspeptidase
Author(s)	岡田, 敏洋
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47655
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

氏 名	おか だ とし ひろ 岡 田 敏 洋
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 2 0 6 7 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 9 月 27 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	Structural studies on the mechanisms of enzyme reaction and maturation in γ -glutamyltranspeptidase (γ -グルタミルトランスぺプチターゼの酵素反応および成熟化機構の構造生物学的研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 福 山 恵 一 (副査) 教 授 金 澤 浩 教 授 倉 光 成 紀

論 文 内 容 の 要 旨

γ -グルタミルトランスぺプチターゼ (GGT, EC2.3.2.2) はバクテリアから哺乳類まで幅広い生物に存在する酵素である。GGT は細胞外にあって、グルタチオン (GSH) などの、 γ -グルタミル化合物の代謝の最初のステップを触媒する。細胞外の GSH は GGT によって代謝され、細胞のシステイン源として使われる。更に哺乳類では、細胞から排出された GSH と毒物の抱合体はメルカプツール酸に変換され尿中に排出されるが、その変換反応に GGT が関与している。

GGT の基質認識と酵素反応

GGT は γ -グルタミル化合物の γ -グルタミル基を加水分解する反応と、 γ -グルタミル基を他のアミノ酸やペプチドに受け渡す転移反応とを触媒する。これらの反応は γ -グルタミル基が GGT に結合した「 γ -グルタミル酵素中間体」を経て進行するとされている。これまでの解析から活性残基が推定され、基質結合・酵素反応に関与する残基が示されている。

基質の結合様式や反応の分子機構を明らかにするため、大腸菌由来 GGT の X 線結晶解析により立体構造を 1.95 Å 分解能で決定した。更に GSH を含む溶液に GGT 結晶を様々な時間浸けて反応させた後、瞬間的に凍結させることで不安定な分子種をトラップし、酵素反応を結晶学的に追跡した。結晶を GSH 溶液に 10 秒間浸けた結晶から、 γ -グルタミル基が活性残基と共有結合した「 γ -グルタミル酵素中間体」(GGT- γ G) の構造を捉えた。GGT- γ G の構造から、酵素反応に関与している残基を明らかにし、酵素反応に対する分子基盤を与えた。酵素反応に関与する残基は異なる種間でよく保存されており、GGT の基質認識や反応機構は全ての生物で同一であることを示唆した。

GGT の成熟化

GGT は、一本のポリペプチド鎖からなる前駆体として合成され、自己触媒的な翻訳後プロセッシングによってヘテロダイマーとなり成熟する。プロセッシングの活性残基である Thr-391 を Ala に置換すると、プロセッシングをうけない。GGT の成熟に伴う構造変化と、プロセッシング反応の分子機構の解明を目指して、T391A 変異体の X 線結晶解析を行

い、立体構造を 2.55 Å 分解能で決定した。

T391A の構造は全体として成熟型 GGT とよく似ていたが、成熟型で L-サブユニットの C 末端にあたる P-loop と、その近傍の残基の構造が大きく異なっていた。T391A 中の P-loop は、成熟型 GGT ではポケット上部を覆っている Lid-loop を押しのけて存在し、またポケット側面と接触してポケットを広げていた。プロセッシングがおこり P-loop がポケットから移動すると、ポケットがちょうど基質を受け入れられるサイズとなり、また Lid-loop がポケット上に移動できるようになって、成熟型の基質結合ポケットが完成することが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

γ -グルタミルトランスぺプチターゼ (GGT) は幅広い生物に存在し、グルタチオンをはじめとする γ -グルタミル化合物の代謝で主要な働きを担っている酵素である。GGT は γ -グルタミル化合物の γ -グルタミル基を加水分解する反応と、 γ -グルタミル基を他のアミノ酸やペプチドに転移させる反応とを触媒する。GGT は一本のポリペプチド鎖からなる前駆体に翻訳され、その後自己触媒的プロセッシングによってヘテロダイマーの成熟型酵素になる。

岡田敏洋君は、まず大腸菌由来 GGT の立体構造を決定した。これは GGT として最初の解析例であり、ユニークな構造を明らかにした。さらに、不安定な γ -グルタミル酵素中間体を捕捉することに成功し、この中間体の構造を決定するとともに、反応後の複合体構造や生成物との複合体構造をも決定した。これらの結果は、基質認識や酵素反応に関与する残基を明らかにしただけでなく、反応過程を可視化し、遺伝学的知見をも説明することもできた。また、GGT の一次構造情報とあわせて、大腸菌 GGT についての結論が全ての GGT について基本的に適用できることを示した。

岡田君は、プロセッシングをうけない GGT の T391A 変異体タンパク質の構造解析をし、成熟型酵素との構造比較から、GGT 成熟化の分子機構にも光を与えた。すなわち、プロセッシングにより、L-サブユニットの C 末端 (P-loop) の構造変化だけでなく、P-loop の移動に伴い活性部位を覆っている Lid-loop が形成されることを明らかにした。さらに、活性部位側面を構成するアミノ酸残基も移動し、活性部位の構造ができていくことを示した。

以上のように、GGT の酵素反応の分子機構について画期的に理解を深め、また GGT の翻訳後プロセッシングにより活性型酵素へ成熟する過程を具体的に示した。よって、本論文は博士 (現学) の学位論文として十分価値あるものと認める。