γ -グルタミルトランスぺプチダーゼの立体構造と特異的反応

大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻 (現所属：大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻)

福山恵一

宮崎大学テニユアトラック推進機構 和田 啓

Keiichi FUKUYAMA and Kei WADA: Structure and Reaction Mechanism of γ -Glutamyltranspeptidases

γ -Glutamyltranspeptidase (GGT) is a heterodimeric enzyme that undergoes post-translational processing and catalyzes the hydrolysis of γ -glutamyl bond in such compounds as glutathione and/or the transfer of the γ -glutamyl group to other amino acids and peptides. We have determined the several crystal structures of GGT orthologs and their complex structures with the substrate/product and inhibitors as well as GGT precursor. These structures demonstrate the mechanism of the maturation, catalytic reaction and substrate recognition of GGT.

1. はじめに

γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT) は、グルタチオン (γ -Glu-Cys-Gly) をはじめとする γ -グルタミル化合物の加水分解, または γ -グルタミル基をほかのアミノ酸やペプチドに転移させる反応を触媒する酵素である (スキーム 1).¹⁾ この酵素はバクテリアから高等動植物まで広く分布し N-terminal nucleophile ヒドロラーゼスーパーファミリータンパク質に属する.^{2),3)} バクテリアや植物の GGT は水溶性であるが, 動物の GGT は膜アンカータンパク質であり, さらに高度に糖鎖修飾されている. ヒトの酵素は, 血液検査における肝機能マーカー, γ -GTP 値, に使われており, なじみ深い.

この酵素は大小 2 つのサブユニット (L-サブユニットと S-サブユニット) からなるヘテロダイマーである.⁴⁾ この酵素は一本の前駆体ポリペプチドとして転写・翻訳され, その後自己触媒的にプロセスされて成熟酵素となる.⁵⁾ Thr 残基 (大腸菌の GGT の場合 Thr391) がこのプロセスで必

須であると同時に, S-サブユニットの N 末端になったこの Thr 残基が触媒基として働く.⁶⁾

われわれはバクテリアの GGT を中心に, 酵素の触媒反応, 自己触媒的にプロセスされる機構, この酵素の阻害機構や阻害剤の結合様式が酵素によって多様であることなどについて研究してきた. ここではわれわれの研究を中心に紹介したい.

2. GGT の結晶構造と触媒反応

精製した大腸菌の GGT を, PEG6000 を沈殿剤に用いた蒸気拡散法によって結晶化した (硫酸アンモニウムを沈殿剤に用いても結晶ができるが, 回折能が悪い.).⁷⁾ 位相問題の解決には紆余曲折があったが, 最終的にセレノメチオン置換体を MAD 法で解決した.⁸⁾ SPRing-8 の放射光を用いて回折強度を測定し, 通常のソフトウェアを用いてプロセスした. ネイティブの GGT は最初 1.95 Å 分解能で解析した.

図 1 に GGT のフォールディングを示す. L-サブユニットが主に分子の外側を, S-サブユニットが内側を形成し, 全体として $\alpha\beta\alpha$ の 2 層構造をなしている. 活性残基である Thr391 は図 1a では中央にある. 興味深いことに, L-サブユニットの C 末端は Thr391 と 36 Å 程離れており (図 1b), プロセッシングによりコンフォメーション変化を起こしていることを示している.

われわれは次に基質であるグルタチオンを, 種々のソーキング時間で GGT 結晶に取り込ませ, 各々の結晶を凍結させて電子密度を検討した. すると, ソーキング時間が短いと (~ 10 sec) γ -グルタミル基が GGT の Thr391 O γ にエステル結合した中間体を捉えることができた (図 2).⁸⁾

スキーム 1 GGT が触媒する反応. (The reaction catalyzed by GGT.) X = OH の場合は加水分解反応となり, X = R-NH の場合は転移反応となる.

図1 GGTのフォールディング. (Structure of *E. coli* GGT.) 濃灰色でL-サブユニット, 灰色でS-サブユニットを示している.

図2 γ-グルタミル-酵素中間体の構造. (The structure of γ-glutamyl-enzyme-intermediate.) (a) T391 に結合したγ-グルタミル基の電子密度, (b) グルタチオンの化学構造.

図3 反応の時間経過に伴う電子密度変化. (The electron density of the active pocket of *E. coli* GGT by time-lapse soaking.)

それよりソーキング時間が長いと、遊離したグルタミン酸が結合していた (図3). 中間体の電子密度には、中間体を加水分解する水分子も現れていた. 大腸菌 GGT では、中間体を形成する反応速度は速く、中間体を加水分解する速度は比較的遅かったのであろう. ちなみに *Helicobacter pylori* の GGT で同様の実験を試みたが、成功しなかったと聞いている (*Bacillus subtilis* GGT では試していない).⁹⁾ *E. coli* GGT では、lid-ループと呼んでいるセグメントがγ-グルタミル基/グルタミン酸を外界から覆っている.

3. 自己触媒反応により起こる構造変化

われわれはプロセッシングによりどのような構造変化が起こるかを見るために、プロセッシングが起こり得ないミュータント (Thr391Ala) を調製 (図4a) し、その結晶解析をした.^{10),11)} まずわかったことは、プロセッシングが起こると Ile378 の ϕ 角が変化し、L-サブユニットのC末端セグメントが大きく動くことであった (図4b). このセグメントが移動すると、代わりに lid ループはこの位置をカバーできるようになる (図4c). Lid ループの両端のアミノ酸残基は Gly439 と Ala436 で、lid ループがフレキシブルであるよう設計されている. L-サブユニットのC末端セグメントがこの場を離れると、411 ~ 416 の部分が移動し、ちょうど基質が適合する大きさのポケットが完成する (図4d). ちなみに、GGT のもう1つの結晶系では、lid ループの電子密度は見えない. 基質の有無によりフレキシブルな lid ループは開いたり閉じたりしているのであろう. なお、このミュータントの全体構造は、上記以外 wild-type と目立った違いはない (図4b).

図4 自己触媒反応に伴う構造変化. (Structural changes by autocatalytic maturation.) (a) GGTのwild-typeと自己触媒反応が起きないT391Aミュータントの電気泳動. (b) T391Aミュータントの構造. Wild-typeでは自己触媒反応に伴い大きくコンフォメーション変化をするセグメント(I378-Q390)を黒で示す. (c) T391周辺の前駆体と成熟型のクローズアップ. L-サブユニットのC末端セグメントのコンフォメーション変化に伴い, lidループが所定の位置に来ることができるようになる. (d) 前駆体GGTと成熟型GGTにおける活性部位近傍の重ね合わせ. C末端セグメントが移動するに伴い, N411-T416が移動して適切な幅の活性部位が完成する.

4. 大腸菌GGT以外のGGTで構造や機能は同じなのか?

われわれは変わった一次構造をもつGGTに着目した. それは*B. subtilis* GGTで, 一次構造のアラインメントから, 多くのGGTでみられるlidループに相当するセグメントがなく, L-サブユニットのC末端セグメントが長い. このような特徴からいろいろな憶測を呼び, 構造解析を試みた.¹²⁾

B. subtilis GGTのグルタミン酸結合型では, *E. coli* GGTのそれとよく似た基質結合構造をとっていた. 両者で大きく違う点は前者にはlidループがなく, したがってグルタミン酸は外界から丸見えである. もう1つの違いは, L-サブユニットのC末端は*E. coli* GGTや*H. pylori* GGTのようなプロセッシングに伴う大きなコンフォメーションは起こっていない. *E. coli* GGTなどに見られた, 酵素反応中に基質が覆われることは必ずしも必要でないであろう. なお, *B. subtilis*は高塩濃度で生育できる. *E. coli* GGTと異なり, このGGTはsurface potentialがNaCl濃度を3 Mに上げて0 Mのときに変化しないことによるからであろう.

5. 阻害剤の結合様式

GGTを阻害する化合物はいくつか知られていた. 代表的な阻害剤であるacivicin (図5a)は, *Streptomyces sviveus* から代謝産物として単離されたものである.¹³⁾ AcivicinがGGTのどこに結合して阻害するのか報告されていたが, 結果はまちまちであった.¹⁴⁾ われわれはまず*E. coli* GGT結晶をacivicin溶液にソーキングし, 結合サイトを1.65 Å分解能で調べた.¹⁸⁾ 結果は, acivicinは活性残基であるThr391に共有結合していた. ところが予期しなかったことであるが, 電子密度の形状から単にacivicinのCl原子がThr391のO γ 原子に置き換わったようには見えなかった (図5b). われわれはacivicinのC3が sp^3 であることから, 5員環内の2重結合が転移したメカニズムを提唱した. その後*H. pylori* GGTや*B. subtilis* GGTでもacivicin結合サイト・様式がそれぞれ1.7 Åと1.8 Å分解能で調べられた.^{16), 17)} 結合サイトはすべて活性残基Thrであったが, acivicinの5員環内の2重結合は転移していないようである. Acivicinの結合様式はGGTによって多様であるようだ (図5b~d).

一方, アザセリンも*E. coli* GGTに結合させ, 1.65 Å分

図5 阻害剤アシビシンの化学構造とGGT中でのコンフォメーション。(The structure of acivicin and its adduct form in GGTs.) (a) アシビシンの化学構造, (b) 大腸菌GGT-アシビシン複合体構造, (c) ピロリ菌GGT-アシビシン複合体構造, (d) 枯草菌GGT-アシビシン複合体構造. アシビシンの電子密度 (Fo-Fc omit map) を重ねて描画している. いずれの場合も, アシビシンは活性残基 (Thr) に共有結合していた.

解能で調べた.¹⁵⁾ アザセリンの電子密度も活性部位に現れ, Thr391 Oγにはテトラヘドラルをした原子を介して結合していた. どのようなグループを介して結合しているか, この分解能でははっきりと同定できていない.

6. GGTの改変

GGTはグルタチオンなどを加水分解や転移反応を触媒する酵素であるが, 似た(メチレン基が1つ多い)基質を日本結晶学会誌 第55巻 第6号 (2013)

特異的に処理する酵素 (glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase) に改変しようとした. 7-Aminocephalosporanic acid (7-ACA) は半合成セファリスポリンの原料で, 世界で最もよく売られている抗生物質の生産に必須な化合物である. われわれは最初 *E. coli* GGTを出発に, 活性部位近くのアミノ酸残基をさまざまに変換した酵素を作り, GL-7-ACA 合成能を調べた.^{18),19)} われわれが調べた限り D433N/Y444A/G484A が最も活性が高く, k_{cat}/K_m 値がそれまで知られていた一残基置換体 (D433N) の50倍になった.

われわれは出発酵素を *B. subtilis* GGTに選び, 同様の試みをした.²⁰⁾ *B. subtilis* GGTはもともと弱いながら glutaryl-7-ACA acylase 活性をもっていた. 部位特異的変異およびランダム変異の結果, E423Y/E442Q/D445N 変異体は k_{cat}/K_m 値が $3.41 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ (catalytic efficiency が1000倍, turnover rate が10倍) になった.

7. バクテリア由来以外のGGT

これまでにX線解析ができているGGTは, どれもバクテリア由来のものばかりである. 植物由来 (*Arabidopsis thaliana*) のGGTアイソザイムとバクテリア由来のものとを比べてみると, 二次構造領域をつなぐループ領域の長さがさまざまであることがうかがえ, 両者の立体構造は基本的には同じであろう (3種の *A. thaliana* GGTと *E. coli* GGTで sequence identity は31~35%).²¹⁾ 活性部位を取り囲むアミノ酸残基も保存されている.

一方, 動物とりわけヒトのGGTに関しては, さまざまな観点から研究例が非常に多い. GGTはさまざまな病気に関係しているからであろう, 医学・薬学関係の観点からの研究例が多い. バクテリアのGGTの立体構造は, ヒトGGTのために利用されているという感さえする.⁹⁾ ヒトGGTは酵素活性 (加水分解/転移反応) など諸性質が, バクテリアGGTのそれらとはかなり違う.²²⁾ ヒトGGTを含め哺乳類のGGTは糖鎖で修飾されているので, 結晶化が困難と予想される. なお, 糖鎖で修飾されていないヒトGGTを, 大腸菌を使って発現させてもまともにフォールドしない.

この原稿の査読中にヒトGGTの結晶構造解析が報告された.²³⁾ ヒトGGTの構造はバクテリアGGTと類似していたが, lid-loopが短く触媒ポケットが露出した構造であった. このような基質フリーの構造は報告されたものの, ヒトGGTがもつユニークな諸性質の構造要因は現在も不明のままである. これまでわれわれはヒトGGTに特異性が高い新規阻害剤を用いて, 基質認識や構造・活性相関をみてきた.²⁴⁾ これらの阻害剤を用いることで, ヒトGGTの基質認識機構の解明に目下取り組んでいる.

謝辞

GGTの一連の研究には多くの方々の貢献によりでき上

がった。とりわけGGTの研究をライフワークのように取り組んできた熊谷英彦先生(現)石川県立大学学長がいなければ、この研究は存在しなかっただろう。生化学・分子生物学実験には鈴木秀之・京都工芸繊維大学教授や平竹潤・京都大学化学研究所教授をはじめ構成員の方々、結晶解析では岡田敏洋博士をはじめ多くの学生諸君が貢献した。坂部知平・貴和子先生達には結晶構造解析の初期段階でお世話になった。

文 献

- 1) S. S. Tate and A. Meister: *Mol. Cell Biochem.* **39**, 357 (1981).
- 2) J. A. Brannigan, G. Dodson, H. J. Duggleby, P. C. E. Moody, J. L. Smith, D. R. Tomchick and Murzin: *Nature* **378**, 416 (1995).
- 3) C. Oinonen and J. Rouvinen: *Protein Sci.* **9**, 2329 (2000).
- 4) H. Suzuki, H. Kumagai and T. Tochikura: *J. Bacteriol.* **168**, 1325 (1986).
- 5) H. Suzuki, H. Kumagai, T. Echigo and T. Tochikura: *J. Bacteriol.* **171**, 5169 (1989).
- 6) H. Suzuki and H. Kumagai: *J. Biol. Chem.* **277**, 43536 (2002).
- 7) H. Kumagai, S. Nohara, H. Suzuki, W. Hashimoto, K. Yamamoto, H. Sakai, K. Sakabe, K. Fukuyama and N. Sakabe: *J. Mol. Biol.* **234**, 1259 (1993).
- 8) T. Okada, H. Suzuki, K. Wada, H. Kumagai and K. Fukuyama: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 6471 (2006).
- 9) G. Boanca, A. Sand, T. Okada, H. Suzuki, H. Kumagai, K. Fukuyama and J. J. Barycki: *J. Biol. Chem.* **282**, 534 (2007).
- 10) T. Okada, H. Suzuki, K. Wada, H. Kumagai and K. Fukuyama: *J. Biol. Chem.* **282**, 2433 (2007).
- 11) 鈴木秀之, 和田 啓, 福山恵一: 蛋白質 核酸 酵素 **54**, 245 (2009).
- 12) K. Wada, M. Irie, H. Suzuki and K. Fukuyama: *FEBS J.* **277**, 1000 (2010).
- 13) L. Allen, R. Meck and A. Yunis: *Res. Commun. Chem. Path. Pharm.* **27**, 175 (1980).
- 14) T. K. Smith, Y. Ikeda, J. Fujii, N. Taniguchi and A. Meister: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2360 (1995).
- 15) K. Wada, J. Hiratake, M. Irie, T. Okada, C. Yamada, H. Kumagai, H. Suzuki and K. Fukuyama: *J. Mol. Biol.* **380**, 361 (2008).
- 16) K. Williams, S. Cullati, A. Sand, E. I. Biterova and J. J. Barycki: *Biochemistry* **48**, 2459 (2009).
- 17) T. Ida, H. Suzuki, K. Fukuyama, J. Hiratake and K. Wada: *Acta Cryst. Sect. D*, in press.
- 18) C. Yamada, K. Kijima, S. Ishihara, C. Miwa, K. Wada, T. Okada, K. Fukuyama, H. Kumagai and H. Suzuki: *Appl. Env.*

Microbiol. **74**, 3400 (2008).

- 19) 鈴木秀之, 和田 啓, 福山恵一: バイオサイエンスとインダストリー **66**, 660 (2008).
- 20) H. Suzuki, C. Yamada, K. Kijima, S. Ishihara, K. Wada, K. Fukuyama and H. Kumagai: *Biotech. J.* **5**, 829 (2010).
- 21) N. Ohkama-Ohtsu, K. Fukuyama and D. J. Oliver: *Adv. Botanical Res.* **52**, 87 (2009).
- 22) L. Han, J. Hiratake, A. Kamiyama and K. Sakata: *Biochemistry* **46**, 1432 (2007).
- 23) M. B. West, Y. Chen, S. Wickham, A. Heroux, K. Cahill, M. H. Hanigan and B. H. Mooers: *J. Biol. Chem.* **288**, 31902 (2013).
- 24) M. Nakajima, B. Watanabe, L. Han, B. Shimizu, K. Wada, K. Fukuyama, H. Suzuki and J. Hiratake: *Bioorg. Med. Chem.*, in press.

プロフィール

福山恵一 Keiichi FUKUYAMA
大阪大学大学院工学研究科
Graduate School of Engineering, Osaka University
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1
2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
e-mail: fukuyama@chem.eng.osaka-u.ac.jp
最終学歴: 岡山大学大学院理学研究科修士課程修了(1973年), 理学博士(1979年)
専門分野: 構造生物学
現在のテーマ: 静的な結晶解析から脱却することなど、少しでもこの方法の能力を広げること
趣味: TV番組などを通じて、時代背景や人の思いなどを思いめぐらすこと

和田 啓 Kei WADA
宮崎大学 テニユアトラック推進機構
Organization for Promotion of Tenure Track, University of Miyazaki
〒889-1692 宮崎県宮崎市清武町木原5200
5200 Kihara, Kiyotaka, Miyazaki, Miyazaki 889-1692, Japan
e-mail: keiwada@med.miyazaki-u.ac.jp
最終学歴: 大阪府立大学大学院農学生命科学研究科・博士(農学)
専門分野: 構造生物化学
現在のテーマ: タンパク質複合体のダイナミックな構造変化を伴う系の分子機構の解明
趣味: “宮崎ライフ”を満喫すること全般。にわかアウトドア遊び。