

# 結晶構造に基づく $\gamma$ -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

○岡田敏洋<sup>1</sup>、和田啓<sup>1</sup>、鈴木秀之<sup>2</sup>、熊谷英彦<sup>3</sup>、福山恵一<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>阪大院理, <sup>2</sup>京大院生命科学 <sup>3</sup>石川県大生物資源工学)

t-okada@bio.sci.osaka-u.ac.jp

$\gamma$ -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、グルタチオン( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly)をはじめとする $\gamma$ -グルタミル化合物の代謝で主要な働きを担っている[1]。グルタチオンはほとんどの生物で存在し、抗酸化作用や解毒作用に深く関わっている。GGTは細胞外に存在し、細胞外に分泌されたグルタチオンから $\gamma$ -グルタミル基をグルタミン酸として遊離させる。GGTは医学的にも重要な酵素で、ヒトのGGT活性( $\gamma$ -GTP値)は肝胆道系疾患の医療診断の指標の一つとして広く利用されている。

## [GGTの基質認識と酵素反応]

GGTはグルタチオンなどの $\gamma$ -グルタミル化合物から $\gamma$ -グルタミル基を切断し、他のアミノ酸やペプチドに受け渡す転移反応と $\gamma$ -グルタミル基を加水分解してグルタミン酸を生成する反応を触媒する(図1)。これらの反応は $\gamma$ -グルタミル化合物から引き抜かれた $\gamma$ -グルタミル基がGGTに結合した「 $\gamma$ -グルタミル酵素中間体」を経て進行すると信じられている。これまでの生化学的・遺伝学的な解析から活性残基(大腸菌ではThr-391)が決定され[2]、また基質結合に関与する残基が推定された。

我々は基質の結合様式や反応機構の詳細を明らかにするために*Escherichia coli* GGTのX線結晶構造解析を行い立体構造を1.9 Å分解能で決定した。更にGSHを含む溶液に短時間(10秒)浸けた結晶を急速凍結させることにより「 $\gamma$ -グルタミル酵素

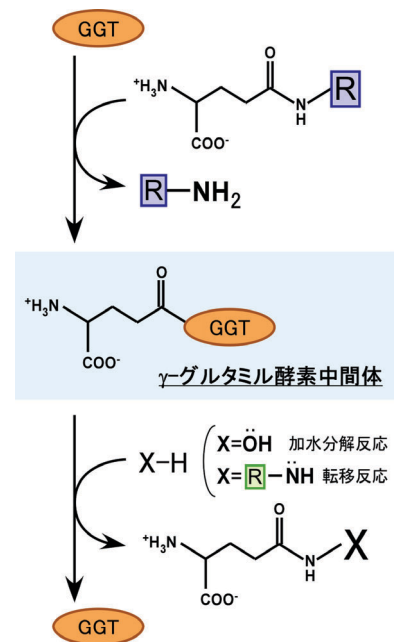


図1. GGTの酵素反応

中間体」をトラップし、その構造を明らかにした[3]。「 $\gamma$ -グルタミル酵素中間体」(GGT- $\gamma$ G; 図2)の構造から、GSHの $\gamma$ -グルタミル基が活性残基Thr-391の側鎖O $\gamma$ 原子に共有結合し、GGTに捉えられている様子が明らかになった。GGT結晶をGSHを含む溶液に一分および一晩浸けた結晶では、共有結合が切断されていたことから、この酵素反応の律速段階は中間体の分解過程であるといえる。 $\gamma$ -グルタミル基は6つの残基によって厳密に認識されていた。これはヒトGGTの変異体の解析結果とよく一致することや、これらの残基に加え、活性残基や遷移状態の安定化に寄与する残基がいずれも異なる種間でよく保存されていることから、GGTの基質認識や酵素反応は全ての生物で同一であると考えられる。

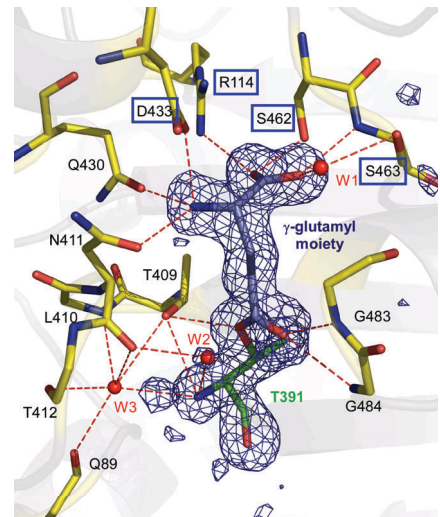


図2. GGT- $\gamma$ Gの基質結合部位  
 $\gamma$ -グルタミル基、Thr-391(活性残基)、W2(水分子)をオミットした $F_o - F_c$  マップ(contoured 3 $\sigma$ )を示す。ヒトGGTでは青色の四角で囲った残基に相当するアミノ酸残基を変異させると活性を失う。

### [GGTの成熟化]

GGTは一つのオープンリーディングフレームから合成され、翻訳後プロセッシングにより二つのサブユニットに分かれヘテロダイマーとなり、成熟型酵素になる。この反応は自己触媒的に起こり、その活性残基はThr-391で、酵素反応の活性残基と同じである[4]。Thr-391をAlaに置換(T391A)すると、プロセッシングを受けないT391A前駆体が得られる。我々はGGTの自己触媒的なプロセスの過程を明らかにするため、T391A前駆体の構造を2.55 Å分解能で決定した。

本討論会では、これまでに得たGGTの前駆体および成熟型の構造を基に、GGTの酵素反応と自己触媒的なプロセスの機構について構造学的見地から考察を行う。

[1] Tate, S. S. & Meister, A. (1981) *Mol. Cell. Biochem.* **39**, 357-368

[2] Inoue, M., Hiratake, J. *et al.* (2000) *Biochemistry* **39**, 7764-7771

[3] Okada, T., Suzuki, H. *et al.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 6471-6476

[4] Suzuki, H. & Kumagai, H. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 43536-43543