

氏名 酒 井 宏 明

学位（専攻分野） 博士（理学）

学 位 記 番 号 総研大甲第118号

学位授与の日付 平成7年3月23日

学位授与の要件 数物科学研究科 放射光科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 γ -GlutamyltranspeptidaseのX線結晶構造解析

論文審査委員 主 査 教 授 大 隅 一 政
教 授 下 村 理
教 授 松 下 正
助教授 小 林 克 己
助教授 雨 宮 慶 幸
教 授 月 原 富 武（徳島大学）
教 授 坂 部 知 平（筑波大学）
教 授 佐々木 教 祐（名古屋大学）

論文内容の要旨

(研究の目的)

グルタチオン (Glutathione, γ -Glu-Cys-Gly: GSH) は細胞内に高濃度に存在する遊離型SH化合物である。 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -Glutamyltranspeptidase:GGT) はこのGSHを加水分解し、GSHの代謝の重要な鍵を担っている。また種々の γ -グルタミル化合物の γ -グルタミル基の転移反応を触媒する。本酵素の構造と活性の相関を明らかにすることを目的として放射光X線による結晶構造解析を行った。

(構造解析)

結晶は京都大学農学部熊谷研より供給されたものを使用した。酵素は大腸菌由来であり、分子量が約6万で大サブユニット(アミノ酸365残基)と小サブユニット(同190残基)からなる。GGT結晶は沈澱剤として硫酸もしくはPEG6000を用いてそれぞれ異なった斜方晶系の結晶が得られる。構造解析には放射光X線に対して比較的安定で2A近い分解能を与えるPEG6000を用いて得られる結晶を使用した。この結晶は空間群が $P2_12_12_1$ に属し、格子定数は $a=127.3$, $b=129.8$, $c=78.5$ (Å)であった。X線回折強度測定は放射光実験施設BL6A2に設置されたワイセンベルグカメラを用いて行った。Packing Density (V_m 値)の見積りから結晶学的非対称単位中に2つのGGT分子が含まれていると予想された。このため2つの分子が非結晶学的2回回転軸によって関係付けられている可能性がある。これを検証すべく自己回転関数を計算したところ、極座標表示で $\omega=39.8^\circ$, $\phi=90^\circ$, $\kappa=180^\circ$ にその関係を示唆する解を得た。これを後に2分子の電子密度の平均化に利用する。

位相決定のためには最も信頼のある手法である多重同型置換法(MIR)を適用した。ところがnative結晶に対して誘導体結晶のc軸長は1%から2%も小さくなる傾向がみられ、重原子結合位置を決めるために差Patterson関数を計算したところいずれの場合も有意に重原子結合部位と認識されるような解を見いだせなかった。これは同型の崩れによる影響と考えられた。もし仮に重原子が結合していたとしても、重原子からの寄与による構造振幅の変化よりも同型の崩れに伴う構造振幅の変化の方が上回っておれば、差Patterson関数に重原子のピークを認めることは不可能であると考えられる。このためnative結晶に比べれば同型性の保たれている誘導体結晶間で差Patterson関数を計算してみた。その結果native結晶としてヨード酢酸を浸透させた結晶を用いた時に、鉛の誘導体を見つけることができた。この鉛誘導体をもとに異常分散効果を考慮した単一同型置換法により初期位相を計算した。またヨード酢酸と酢酸鉛の混合溶液から得られたもう一つの鉛誘導体においても鉛結合部位を同定した。ただしその結合部位は前の鉛誘導体とほとんど同じである。この2つの鉛誘導体をもとにMIRによる位相計算を3Å分解能まで計算した。位相精度は不十分であり、得られた電子密度はノイズの多いものであった。このため電子密度修飾法による位相改良を行った。実質的に電子密度は改良され蛋白質と溶媒領域の境界を見いだすことができるようになった。また特徴的な2次構造である α ヘリックスや β シートの存在を確認できた。しかしながら主鎖の追跡が可能なほどではなく、更に誘導体結晶を得て良い位相を求める必要があった。ひき続き誘導体の探索を行ったが差Patterson関数に重原子の結合を示すような誘導体を得ることは出来なかった。このため差Fourier法によって誘導体検索を行い、良好ではないがサマリウムとイッテリビウム誘導体を見つけだした。これらを加えてMIRに

よる位相計算を行った。しかし得られた電子密度は鉛誘導体をもとにした時とほとんど大差なかった。ここで非結晶学的対称要素により関係付けられた2つのGGT分子間で電子密度の平均化を伴う電子密度修飾法によって位相改良を行った。この結果、2次構造がより明瞭に確認され、さらに主鎖を追跡することが可能な電子密度を得ることができた。3 Å分解能電子密度上においてポリアラニン鎖によってGGTの約93%の主鎖を構築し、2次構造の所在を示すことができた。

(構造と活性部位について)

特徴として大きな2重のβシート平面があり、その両側をαヘリックスが取り囲んでいる構造が確認される。構造のモチーフはα/β構造に属すると考えられる。確認されているうちではαヘリックスは長いものから短いものを含め16本、βシート鎖は17本存在する。追跡した主鎖のうち2次構造をとる部分が約58%を占めている。大サブユニットと小サブユニットは空間的には明確な区切れを示すものではなかった。両者は互いに密に接しており、あたかも1本のポリペプチド鎖であるかのようなようである。追跡したポリペプチド鎖はA、Bの2本にわかれ、A鎖が336残基、B鎖が180残基となった。アミノ酸残基数から判断すれば、A鎖は大サブユニット、B鎖は小サブユニットに対応する部分と考えられる。

GGTは生化学的研究が長く行われているが、活性残基の特定には至っていない。これまで解析された酵素蛋白質のうちα/β構造を持つものでは、活性部位はβシート鎖のC末端側とαヘリックスのN末端を結ぶループ部分に存在するケースが多いとされる。これをGGTの場合にも当てはまるものと仮定する。追跡した構造ではβシート鎖のC末端側とαヘリックスのN末端を結ぶループ部分が5カ所存在する。これらのいずれかの部分に活性残基が存在することが予想される。一方、他種由来のGGTとの間でアミノ酸配列を比較した場合、小サブユニットに相同性の高い部分が多いことから、活性残基は小サブユニットに存在する可能性が高いとされる。B鎖が小サブユニットであると仮定してみると、アミノ酸配列の相同性の高い部分において、B鎖に存在するβシート鎖のC末端側とαヘリックスのN末端とを結ぶループ部分に対応する領域が存在し、活性残基がこの部分に存在する可能性が示唆される。

しかし最終的な判断はすべてのアミノ酸を追跡して、立体構造が完全に明らかにされるまで待たねばならない。活性残基の特定には基質類似物や阻害剤との複合体結晶の解析が必要である。

博士論文審査結果の要旨

γ -グルタミルトランスぺプチダーゼは、 γ -位にグルタミル基をもつペプチドの γ -位の加水分解と転移反応を媒介する生化学的に大変重要な酵素である。然しながらこの酵素の生物学的定説については未だ定説がない。

この酵素は動物からバクテリアまで広く分布するが、結晶化に成功した例は京都大学熊谷研究室の大腸基菌由来のもののみである。アミノ酸の配列はいくつかのグルタミルトランスぺプチダーゼについて行われているが、活性部位については未だ不明である。既に3次元構造が決定されたものの中のアミノ酸配列から見ると、この酵素に類似物はなく新しいタイプの構造をもつであろうと期待される点から、結晶構造解析が強く望まれている。

結晶は熊谷研究室から提供されたが、サンプルの大量調製が困難であり、さらに結晶化の再現性が低いため、3年間に提供された結晶中X線解析に利用できたものはわずか20個に見えない。

また、本酵素は溶液中では365残基からなる大サブユニットと190残基を有する小サブユニットからなるヘテロダイマーであり、分子量は6万ダルトン、555残基を持つ。しかも通常重原子化を容易にするシステイン残基を含まない。さらにこの分子は結晶中では2分子が集合して存在するため12万ダルトンを対象として結晶解析を行う必要があり、解析は容易ではない。

硫酸による結晶の存在は知られていたがX線回折強度がきわめて弱く、解析は不可能であった。学位申請者はこの酵素のPEGによる結晶が2A領域まで回折強度を与えることを見だし、ついで多くの重原子誘導体の作成を試みたが格子定数が大きく変化するため良い重原子同型置換結晶を得ることができなかつた。このため、ヨード酢酸誘導体を母結晶とみなし鉛誘導体とその異常分散を用いて初期位相を求めた。ここで得られた電子密度分布に基づきソルベントフラッタリング法とアベレジリング法による位相改良を行い、良質な電子密度分布を得ることに成功した。

この電子密度分布を基礎としてグラフィックスを用いて3次元構造の組立てをほぼ完了し、活性部位の推定が可能な段階となっている。得られた構造には類似物がなく、まったく新しい構造である。

以上のような複雑な構造を有する蛋白結晶の構造解析を行うに際し遭遇する各種の困難を排除して得られた研究成果は、蛋白質結晶学に新しい知見を加えるものである。よって、酒井氏の研究成果は学位論文に値すると判断した。