

学位論文題名

グルタチオンS-トランスフェラーゼPにおける疎水性
リガンド結合領域の同定とタンパク質高次構造変化の解析

学位論文内容の要旨

研究目的

グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)は種々の親電子性の薬物をグルタチオン(GSH)抱合し解毒する酵素として知られている。一方 GST はビリルビン、ヘム、ステロールなどの疎水性分子を結合し、その細胞内輸送に関与すると言われている。また GST には多くの分子種が存在し、それらのアミノ酸配列、基質特異性、免疫学的諸性質などから α 、 μ 、 π の3つのクラスに分類されている。このうちクラス π に属する分子種（ヒトでは GST- π 、ラットでは GST-P）は胎盤由来の分子種として発見されたが、細胞の癌化に伴い発現することから本分子種の生理的役割が注目されている。

本研究ではこの GST 分子種（GST-P）に着目し、大腸菌への遺伝子導入により本酵素を発現させた recombinant GST-P を精製の試料とした。精製 GST-P の分析の結果本分子種は酵素分子中に脂肪酸を結合していることが明らかとなったため、本論では特に酵素の疎水性リガンドの結合領域に焦点を絞り、その構造と機能の解析を行った。

実験成績

Recombinant 精製 GST-P の性質

精製された本酵素は SDS-PAGE 上均一でありその分子量は約25kDa で、ゲル濾過(Sephadex G-100)で計測された分子量（約50kDa）からホモ2量体であることが示された。またそのアミノ酸組成は大腸菌への遺伝子導入に用いた cDNA から予想される結果とほぼ一致していることを確認した。

GST-P 結合脂肪酸の分析とその分子内動態

精製 GST-P の脂肪酸の分析を行ったところ、本酵素は内因性に脂肪酸を結合しており、パルミチン酸が最も多く他にステアリン酸、オレイン酸、ミリスチン酸、パルミトリン酸が検出

され、脂肪酸対酵素のモル比は約 1 : 1 であった。また遺伝子導入に用いた大腸菌の脂肪酸の組成も精製 GST-P とほぼ同様な分布を示すことから、GST-P への脂肪酸の付加に鎖長の特異性はないものと考えられる。

一方精製 GST-P の ¹H-NMR では本酵素に結合する脂肪酸のシグナルは酵素の変性温度 (60°C) 以上になってはじめて検出され、その運動性は GST-P 分子内に強く拘束されていることが明らかとなった。一方、対照に用いた BSA では 25°C~45°C の温度範囲で脂肪酸のシグナルが出現しており、その運動性はタンパク質分子内で比較的高く、結合脂肪酸の分子内拘束の強さは GST-P とは明らかに相違した。

疎水性リガンド結合領域の同定

脂肪酸-Sephrose への結合部位 : GST-P をオレイン酸-Sephrose に吸着させトリブリン処理を行った後、ゲルに吸着するペプチドの SDS-PAGE を行う分子量約 1.5kDa (T1) と 2.7kDa (T2) の 2 つの主なバンドが得られ、それぞれの 1 次構造は遺伝子導入に用いた cDNA より予測されるアミノ酸配列の N 端より 142-157 及び 122-141 番残基と同定された。

蛍光標識脂肪酸の結合部位 : 蛍光標識脂肪酸 (12-(9-anthroyloxy) stearic acid) を Woodward 試薬で GST-P に covalent に結合させ lysyl endopeptidase で消化後 HPLC によりペプチドマッピングを行うと単一の蛍光標識フラグメントが得られ、そのアミノ酸配列は N 端より 142-189 番残基と同定された。

ビリルビンの結合部位 : 蛍光標識脂肪酸と同様 Woodward 試薬でビリルビンを酵素に covalent に結合させ、以後上記脂肪酸と同様の操作を行いその結合部位を解析すると N 端より 142-189 番残基と同定された。

以上、これらの疎水性リガンドが結合する領域で重複するのは N 端より 142-157 番残基と同定された。

疎水性リガンドの結合と酵素活性への影響

ANS は酵素タンパク質の疎水部に結合すると短波長側に新たな蛍光を発する。その性質を利用して ANS の GST-P への結合を解析した。ANS は GST-P の濃度に依存して結合数は増大し、それに伴い極大発光も短波長側にシフトした。またその解離定数は約 15 μM と計測された。

一方このような GST-P と ANS の結合を Woodward 試薬で修飾したパルミチン酸が拮抗的に阻害することから、ANS は脂肪酸と同一の領域に結合することを確認した。

更に ANS 結合による GST 酵素活性に対する影響を検討すると、ANS は GSH 及び CDNB の両基質に対して非拮抗的に阻害した (阻害定数はそれぞれ約 40 μM と 50 μM であった)。この

結果は ANS は酵素の活性中心とは異なる部位に結合することを示唆している。

疎水性リガンドの結合・解離に伴う酵素タンパク質の2次構造の変化

ANS の結合により GST-P の2次構造は著明に変化し、 β シート構造が減少し、酵素活性も著しく低下した。しかしながらこの様な GST-P の2次構造や活性の変化は可逆的であり、酵素から ANS を除去することにより活性はほぼ63%まで回復した。

疎水性リガンド結合に伴う活性中心の局所微細構造の変化

上記酵素反応の阻害実験から ANS は活性中心とは異なる部位に結合することを示したが、その結合が活性中心そのものの構造を変化させるか否かを明らかにするため、既に活性中心の形成に与ると予測したトリプトファン38に由来する蛍光強度の変化を検討した。GST-P にはサブユニット1 mol に2個(28番と38番残基)のトリプトファンが存在するが、活性中心の形成に関与するのは38番のトリプトファンであると予測し、28番トリプトファンのみを部位特異的アミノ酸変換によりヒスチジンに変換した GST-P を作成し、ANS を加えたときのトリプトファン由来の蛍光強度の変化を測定した。その結果蛍光強度は加えた ANS の濃度に依存して減少することから、疎水性リガンドである ANS の結合は酵素の活性中心の形成に与るトリプトファン38近傍の局所微細構造を変化させることが明らかとなった。

結 語

グルタチオンS-トランスフェラーゼP (GST-P) の遺伝子導入により本酵素を大腸菌に発現させ、その細胞質画分より GST-P を均一に精製した。精製 GST-P は酵素1 mol 当たり約1 mol の脂肪酸を結合しており、 ^1H -核磁気共鳴(^1H -NMR)による解析から、その脂肪酸は酵素の変性温度(60°C)以上になってはじめてそのシグナルが出現することから、この内因性結合脂肪酸の運動性は生理的条件下では酵素タンパク質内に強く拘束されていることが明らかとなった。

一方、本酵素には脂肪酸やビリルビンなどの疎水性分子の結合や解離が比較的容易な、内因性脂肪酸の結合部位とは異なる他の疎水領域が存在することを明らかにした。またその結合部位を脂肪酸固定化-Sepharose への吸着、蛍光標識脂肪酸によるアフィニティーラベル、及びビリルビンの結合などによる解析から、これら疎水性リガンドの結合部位をN端より142-157番残基を含む領域と同定した。更にこの部位への疎水性リガンドの結合は GST-P 酵素タンパク質の2次構造を変化させ、酵素活性の調節に寄与することを円偏光2色性(CD)による解析から明らかにした。また、アミノ酸部位特異的変換によりトリプトファン38が酵素の活性中心の形成に与

ると予測したが、この活性中心の局所微細構造が疎水性リガンドの結合により変化することを、同残基の蛍光スペクトルの変化から明らかにした。

学位論文審査の要旨

主査 教授 石橋 輝雄
副査 教授 西 信三
副査 教授 牧田 章

研究目的

本研究では一つの GST 分子種 (GST-P) に着目し、大腸菌への遺伝子導入により本酵素を発現させた recombinant GST-P を精製の試料とした。精製 GST-P の分析の結果本分子種は酵素分子中に脂肪酸を結合していることが明らかとなったため、本論では特に酵素の疎水性リガンドの結合領域に焦点を絞り、その構造と機能の解析を行った。

実験成績

疎水性リガンド結合領域の同定

脂肪酸-Sepharose への結合部位 : GST-P をオレイン酸-Sepharose に吸着させトリプシン処理を行った後、ゲルに吸着するペプチドの SDS-PAGE を行うと分子量約 1.5kDa (T1) と 2.7kDa (T2) の 2 つの主なバンドが得られ、それぞれの 1 次構造は遺伝子導入に用いた cDNA より予測されるアミノ酸配列の N 端より 142-157 及び 122-141 番残基と同定された。

蛍光標識脂肪酸の結合部位 : 蛍光標識脂肪酸 (12-(9-anthroyloxy) stearic acid) を Woodward 試薬で GST-P に covalent に結合させ lysyl endopeptidase で消化後 HPLC によりペプチドマッピングを行うと単一の蛍光標識フラグメントが得られ、そのアミノ酸配列は N 端より 142-189 番残基と同定された。

ビリルビンの結合部位 : 蛍光標識脂肪酸と同様 Woodward 試薬でビリルビンを酵素に covalent に結合させ、以後上記脂肪酸と同様の操作を行いその結合部位を解析すると N 端より 142-189 番残基と同定された。

以上、これらの疎水性リガンドが結合する領域で重複するのは N 端より 142-157 番残基と同定

された。

疎水性リガンドの結合と酵素活性への影響

ANSは酵素タンパク質の疎水部に結合すると短波長側に新たな蛍光を発する。その性質を利用してANSのGST-Pへの結合を解析した。ANSはGST-Pの濃度に依存して結合数は増大し、それに伴い極大発光も短波長側にシフトした。またその解離定数は約 $15\mu\text{M}$ と計測された。

一方この様なGST-PとANSの結合をWoodward試薬で修飾したパルミチン酸が拮抗的に阻害することから、ANSは脂肪酸と同一の領域に結合することを確認した。

更にANS結合によるGST酵素活性に対する影響を検討すると、ANSはGSH及びCDNBの両基質に対して非拮抗的に阻害した(阻害定数はそれぞれ約 $40\mu\text{M}$ と $50\mu\text{M}$ であった)。この結果はANSは酵素の活性中心とは異なる部位に結合することを示唆している。

疎水性リガンドの結合・解離に伴う酵素タンパク質の2次構造の変化

ANSの結合によりGST-Pの2次構造は著明に変化し、 β シート構造が減少し、酵素活性も著しく低下した。しかしながらこの様なGST-Pの2次構造や活性の変化は可逆的であり、酵素からANSを除去することにより活性はほぼ63%まで回復した。

疎水性リガンド結合に伴う活性中心の局所微細構造の変化

上記酵素反応の阻害実験からANSは活性中心とは異なる部位に結合することを示したが、その結合が活性中心そのものの構造を変化させるか否かを明らかにするため、既に活性中心の形成に与ると予測したトリプトファン38に由来する蛍光強度の変化を検討した。GST-Pにはサブユニット1molに2個(28番と38番残基)のトリプトファンが存在するが、活性中心の形成に関与するのは38番のトリプトファンであると予測し、28番トリプトファンのみを部位特異的アミノ酸変換によりヒスチジンに変換したGST-Pを作成し、ANSを加えたときのトリプトファン由来の蛍光強度の変化を測定した。その結果蛍光強度は加えたANSの濃度に依存して減少することから、疎水性リガンドであるANSの結合は酵素の活性中心の形成に与るトリプトファン38近傍の局所微細構造を変化させることが明らかとなった。

以上、本研究はグルタチオンS-トランスフェラーゼにおける疎水性リガンドの結合領域の同定とリガンド結合に伴うタンパク質高次構造の変化を初めて明らかにしたものであり、博士(医学)の学位を授与するに値するものと認定された。