

## 細菌による $\gamma$ -グルタミル化合物代謝の 遺伝生化学的・構造生物学的研究とその応用展開



京都工芸繊維大学応用生物学系 鈴木 秀之

### はじめに

$\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (以下GGT と省略) は、 $\gamma$ -グルタミル化合物の  $\gamma$ -グルタミル基を他のアミノ酸やペプチドに転移する反応と  $\gamma$ -グルタミル結合を加水分解する反応を触媒する。GGT は血液検査における肝硬変や肝癌などの肝疾患のマーカー酵素であるため、哺乳類の GGT を対象に生化学的な性質や病気との関連性について世界中の非常に多くの研究者が研究を進めてきた。しかし、(1) その活性中心、(2) 立体構造、(3) 翻訳後修飾による成熟化という酵素科学的な基本的性質を誰も解明できていなかった。私は、大腸菌を 20°C で培養することにより GGT がペリプラズムに発現することを初めて見出して以来<sup>1)</sup>、細菌、特に大腸菌の GGT について遺伝生化学的、構造生物学的手法により研究を進め、様々な生物由来の GGT を研究する全世界の研究者に先駆け、大腸菌の GGT を用いて上記の (1) ~ (3) をすべて明らかにすることに成功した。さらに、その過程で全生物種を通して初めてとなる ABC 型グルタチオントランスporter YliABCD を発見し<sup>2)</sup>、また、GGT がグルタチオンを分解した後に働くペプチダーゼ 4 種を特定した<sup>3)</sup>。

### 1. 酵素反応依存アフィニティーラベル化剤による GGT の求核原子の修飾と修飾残基の同定

GGT のアフィニティーラベル化阻害剤としてアシピシンを用いる多くの研究が行われたが、特異性が低く、酵素とアシピシンとの結合が不安定なため、酵素の活性中心の求核原子が特定されていなかった。本研究では京大化研の故平竹先生が開発された 2-amino-4-(fluorophosphono) butanoic acid を用いた。このラベル化剤は大腸菌 GGT と 1対1 にホスホン酸モノエステルを形成して結合し、安定なラベル化酵素が得られた。このラベル化剤が酵素のどの残基に結合しているかを LC-MS で分析することで (図1)、小サブユニット N 末端の Thr391 の側鎖の酸素原子が GGT の求核原子であることを、全生物種を通して

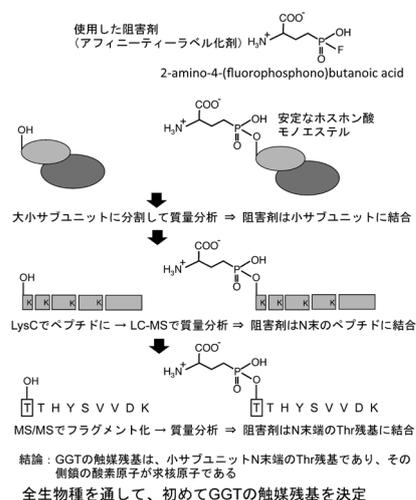


図1. 活性中心探索のスキーム

初めて明らかにした<sup>4)</sup>。小サブユニット N 末端の Thr 残基はこれまで配列の分かった全生物種の GGT で保存されている。

### 2. 大腸菌 GGT の 3 次構造の解明

大腸菌の GGT を初めて精製したときから、硫酸で針状結晶が得られることが分かっていたが、X線結晶構造解析に不向きであった。条件を検討し、PEG で解析に適した結晶が得られることを見出し、Se-Met を大腸菌に取り込ませて GGT を精製し、重原子同型置換法で 3 次構造を当時大阪大学理学研究科におられた福山先生、和田先生との共同研究で初めて明らかにすることに成功した<sup>5)</sup>。この結晶を GGT の生理的基質であるグルタチオン溶液に浸すと速やかに  $\gamma$ -グルタミル酵素中間体となり、Thr391 の側鎖の酸素原子がグルタミン酸とエステル結合を形成していることを構造生物学的にも示すことに成功した (図2)。さらに、 $\gamma$ -グルタミル基と水素結合を作る残基を特定し、酵素の反応機構を分子レベルで解明した。

### 3. 大腸菌 GGT のプロセッシング機構の解明

GGT は細菌からヒトに至るまでヘテロダイマー酵素である。大腸菌で初めて GGT 欠損株を作成して遺伝子座位を決め、その遺伝子 *ggt* をクローニングし、塩基配列を明らかにしたとき、大腸菌の場合、シグナルペプチド-大サブユニット-小サブユニットの順にコードされたオープンリーディングフレーム 1 つからなっており、前駆体として翻訳された後に大小 2 つのサブユニットに分かれることが分かった。前駆体 GGT の精製に成功し、不活性な 1 本のポリペプチド鎖として翻訳された GGT が分子内の自己触媒反応により、エステル型中間体を経て大小 2 つのサブユニットからなる活性型成熟酵素にプロセッシングする機構を全生物種の GGT で初めて解明した<sup>6)</sup>。さらに前駆体 GGT の 3 次構造を解明し、前駆体と成熟型 GGT の立体構造を比較することで、プロセッシングにより全体構造が大きく変わる

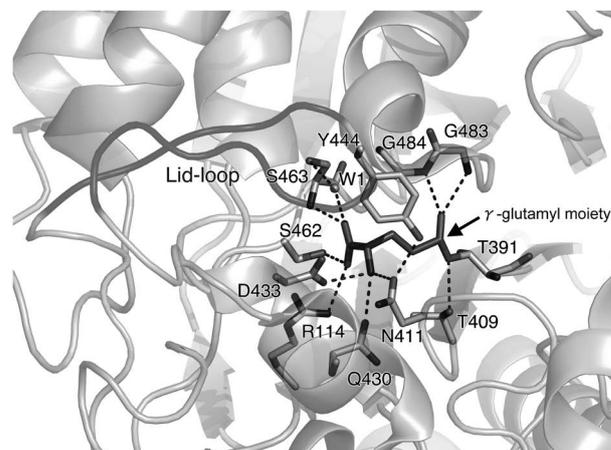


図2. 大腸菌 GGT の  $\gamma$ -グルタミル酵素中間体の活性中心付近の 3 次構造 (Appl. Environ. Microbiol. 74, 3400-9 (2008) より一部改変して転載)

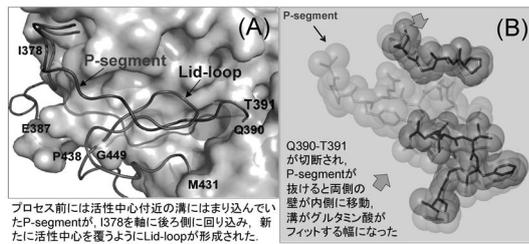


図3. プロセッシングによる活性中心付近の構造変化 (A は *J. Biol. Chem.* **282**, 2433–9 (2007) より転載)

ことはないものの、活性中心付近がダイナミックな構造変化を起こし、成熟型活性中心が形成されることを示した (図3)<sup>7)</sup>。

#### 4. GGT の応用

##### 4.1. GGT の転移反応の応用

大腸菌のGGTは転移反応と加水分解反応の至適pHが明確に異なっているため、反応液のpHをうまく調節することによって、いずれか一方の反応を選択的に進行させることが可能である。

この性質を利用して、緑茶のうま味成分であるテアニンや抗結核剤候補である $\gamma$ -D-グルタミル-L-トリプトファンなど、医薬や食品添加物として有望な数多くの $\gamma$ -グルタミル化合物の効率的酵素合成法を開発した<sup>8)</sup>。また、苦味アミノ酸を $\gamma$ -グルタミル化すると苦味が劇的に低減することを発見した<sup>9)</sup>。さらに、現状では最も微量でコク味をもたらすと報告されている $\gamma$ -グルタミルバリルグリシンをGGTで酵素合成できることを最初に示した<sup>10)</sup>。一方、タンパク加水分解物を $\gamma$ -グルタミル化したものもコク味調味料となることを示した<sup>11)</sup>。

##### 4.2. GGT の加水分解反応の応用

*Bacillus* 属細菌のGGTが耐塩性であることを見出し、醤油や味噌の醗に枯草菌GGTを添加することにより、耐塩性グルタミナーゼとして利用できることを示した<sup>12)</sup>。

グルタミル基とグルタリル基の違いである $\alpha$ アミノ基と水素結合を作るN411, Q430, D433に変異を導入した。グルタリル- $\alpha$ -ナフチルアミドを有機合成し、グルタリルアミド加水分解活性のスクリーニングに用いた。コロニーをメンブレンに移し取ってから反応液をメンブレンの下から浸ませると、白い背景の中で赤いコロニーが目立つため、グルタリルアミド加水分解活性を持つ株を極めて効率的に選別できた。さらに7-ACAの生成量を*p*-dimethylaminobenzaldehydeを用いた比色法で定量することでスクリーニングを行い、GGTにセフェム系抗生物質の合成中間体である7-アミノセファロスポラン酸の工業生産に重要なグルタリル-7-アミノセファロスポラン酸アシラーゼ活性を付与し、さらにその触媒効率を50倍上昇させることに成功した<sup>13)</sup>。

##### 5. 新規プロテシシ異化経路の発見

培養条件によっては*ggt*遺伝子を完全に欠失した大腸菌株が、GGTの酵素活性の測定に用いる人工基質である $\gamma$ -グルタミル-カニトリアニドの加水分解活性をわずかながら持つことを見出したことから、その加水分解活性を指標に酵素を精製し、N末端アミノ酸分析を行ったところ、その酵素は機能未知とされていた*ycjL*遺伝子がコードしており、生理的には $\gamma$ -グルタミル-GABA加水分解酵素であることを明らかにした。この遺伝子前後の遺伝子群が、菌体外から取り込んだプロテシシを $\gamma$ -グルタミルプロテシシを経由してコハク酸にすることで、プロテシシをN源・C源として利用するまったく新規なプロテシシ

シシ異化経路をコードしていることを明らかにした<sup>14)</sup>。この発見は、バクテリアにおけるポリアミン研究のブレイクスルーとなった<sup>15)</sup>。さらに、大腸内のポリアミン濃度を一定に保つことが、ヒトやマウスの健康寿命を伸長する上で大切であり、腸内細菌群の調整とアルギニンの摂取が有効であることをモデル腸内細菌として大腸菌を用いて明らかにした<sup>16)</sup>。

おわりに

一般に $\gamma$ -グルタミル化合物は自然界に多くないと考えられているが、ごく一部の例外を除き、好気呼吸をしている生物はグルタチオン( $\gamma$ -グルタミルシステイニルグリシン)を生合成している。納豆のネバネバの主成分はポリ $\gamma$ -グルタミン酸であり、さらには細菌細胞壁のペプチドグリカンには $\gamma$ -グルタミル結合が存在する。GGTがグルタチオン濃度、ひいてはシステイン濃度を調節していることは分かっているが、その他の生理的役割は不明瞭なままである。GGTの神経変性疾患、糖尿病、心血管疾患、肺疾患への関与を指摘する報告もあり、GGTにはまだ未解明な問題がたくさん残っている。

(引用文献)

- 1) H. Suzuki *et al.* *J. Bacteriol.* **168**, 1332–5 (1986).
- 2) H. Suzuki *et al.* *J. Bacteriol.* **187**, 5861–7 (2005).
- 3) H. Suzuki *et al.* *J. Bacteriol.* **183**, 1489–90 (2001).
- 4) M. Inoue *et al.* *Biochemistry* **39**, 7764–71 (2000).
- 5) T. Okada *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 6471–6 (2006).
- 6) H. Suzuki, H. Kumagai. *J. Biol. Chem.* **277**, 43536–43 (2002).
- 7) T. Okada *et al.* *J. Biol. Chem.* **282**, 2433–9 (2007).
- 8) H. Suzuki *et al.* *Amino Acids* **32**, 333–40 (2007).
- 9) H. Suzuki *et al.* *J. Agric. Food Chem.* **50**, 313–8 (2002).
- 10) H. Suzuki, C. Yamada. In *Recent Highlights in Flavor Chemistry & Biology*. Ed. by T. Hofmann *et al.*, pp. 227–232. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (2008).
- 11) H. Suzuki *et al.* *J. Agric. Food Chem.* **65**, 10514–9 (2017).
- 12) K. Kijima, H. Suzuki. *Enzyme Microb. Technol.* **41**, 80–4 (2007).
- 13) Y. Yamada *et al.* *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 3400–9 (2008).
- 14) S. Kurihara *et al.* *J. Biol. Chem.* **280**, 4602–8 (2005).
- 15) T. Kusano, H. Suzuki (eds.) *Polyamines: A universal molecular nexus for growth, survival and specialized metabolism*. Springer, Tokyo (2015).
- 16) R. Kibe *et al.* *Sci. Rep.* **4**, 4548 (2014).

謝辞 私が京都大学農学研究科の博士課程に進学する際、当時の食品工学専攻微生物生産学研究室を主宰されておられた柄倉辰太郎先生に「大腸菌のGGTの研究をやりたい」とお願いし、テーマ換えを許していただいたことがこの研究の始まりです。その他何かと我が儘な学生であった私にいつも寛大な心で接し、育てて下さった先生に感謝申し上げます。それ以来、熊谷英彦先生のご指導・激励の下、GGTの研究を続けてきました。熊谷先生は、良き師、良き指導者、信頼できる相談相手という意味で“mentor”です。先生に感謝申し上げ、今回の受賞で少しでもご恩に報いることができるならと願っています。京都大学化学研究所教授だった故平竹潤先生、大阪大学名誉教授 福山恵一先生、宮崎大学医学部准教授 和田啓先生をはじめとする多くの共同研究者に恵まれ、研究を進めることができたことは幸運であり、感謝申し上げます。この研究は、京都大学大学院農学研究科微生物生産学研究室、同生命科学研究所微生物細胞機構学研究室、京都工芸繊維大学微生物工学研究室で行ったものです。これらの研究室と共同研究者の研究室でこの研究に携わって下さった多くの学生、研究員の皆様のお力添えのおかげであると心より御礼を申し上げます。最後に、私の研究生活を理解し、支えてくれた家族に感謝します。