

氏名	ハン 韓	リ 立	ユウ 友
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)		
学位記番号	農 博 第 1593 号		
学位授与の日付	平 成 18 年 11 月 24 日		
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当		
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 命 学 専 攻		
学位論文題目	Studies on γ -Glutamyl Transpeptidases by Using Mechanism-Based Inhibitors (反応機構依存型阻害剤を用いた γ -グルタミルトランスぺプチダーゼの研究)		
論文調査委員	(主 査) 教 授 坂 田 完 三	教 授 江 崎 信 芳	教 授 宮 川 恒

論 文 内 容 の 要 旨

γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT, EC 2.3.2.2) は哺乳類やバクテリア, 植物などに広く存在する酵素で, グルタチオンやそのアナログの γ -グルタミル結合を加水分解, あるいは, γ -グルタミル基をさまざまなアミノ酸やペプチドへと転移する反応を触媒する。これらの反応は Thr 残基を活性中心として γ -グルタミル酵素中間体を経る ping-pong 機構によって進行する。GGT は, グルタチオン代謝や生体異物の解毒において重要な役割を担っており, グルタチオンの恒常性を介して, 酸化ストレスの軽減やガン細胞の薬剤耐性ばかりでなく, 神経変性疾患, 糖尿病, 心血管疾患といった多くの疾病にも関係しているが, その生理学的役割の多くは不明である。これまで, acivicin などの天然物が阻害剤として使われてきたが, GGT を強力かつ特異的に阻害する化合物は見出されていなかった。本研究は, 以前, グルタミン酸の γ -モノフルオロホスホン誘導体 (1) が, GGT の反応機構にもとづいたアフィニティラベル化剤として, GGT の触媒残基であるスレオニン残基と共有結合を形成し, 酵素を不可逆的に失活させることが明らかにされていたことにもとづいて, GGT の特異的阻害剤として, 親電子的な γ -ホスホノエステルを有するグルタミン酸アナログに焦点を当て, 一連の化合物をデザインして, 合成し, 評価を行ったものである。また, これらの化合物を化学プローブとして, GGT の反応機構や活性部位の構造についての知見を得ている。その内容は以下のようにまとめられる。

1) 反応機構を基にした GGT 阻害剤ホスホン酸モノエステル

グルタミン酸の γ - (モノフェニル) ホスホン酸エステル誘導体 γ -Glu-P(=O)(O⁻)(OR) 2a-d (R=Ph, *p*-AcPh, *p*-CF₃Ph, *p*-CNPh) を合成した。フェノールのパラ位にさまざまな電子吸引性置換基を有するこれらのホスホン酸モノエステル類は, 大腸菌およびヒト GGT の活性 Thr 残基を特異的にリン酸化することによって, 両酵素を不可逆的に阻害した。酵素の失活の2次反応定数 k_{on} を測定し, 酵素に対する阻害活性を評価したところ, 2a-d は, ヒト GGT よりも100倍以上強く大腸菌 GGT を失活させた。大腸菌 GGT の失活速度は, 置換フェノールの脱離能に強く依存しており, 電子吸引基によって著しく阻害活性が増大したのに対し, ヒト GGT の失活速度は脱離基の性質に影響されなかった。とりわけ, 2d はヒト GGT に比べて大腸菌 GGT を2300倍以上強く阻害する活性を示しており, 大腸菌 GGT の特異的阻害剤として使える可能性も示唆された。しかしながら, ヒト GGT に対する 2a-d の阻害活性 (k_{on}) は $5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 以下と低いものであり, ホスホン酸エステルの構造改変について改善の余地を残した。

2) 強力な GGT 阻害剤ホスホン酸ジエステル

ホスホン酸モノエステル 2a-d の低い阻害活性は, リン原子の近傍にある負電荷に由来すると考えられ, またこの負電荷は, ヒト GGT の活性部位に対する親和性をも低下させると考えられた。そこで, 電氣的に中性な一連の γ -ホスホン酸ジエステル類を分子設計し, 単純なメチルフェニルホスホン酸である 3a-g に加え, グルタチオンの Cys-Gly 部分やその部分構造をもつ 4, 5, 6a を合成した。その結果, 予想どおり, これらの化合物は, いずれも, 大腸菌およびヒト GGT を, ホスホン酸モノエステル類 2a-d と比べて100倍以上速く失活させる強力な阻害活性を示した。化合物 3a-g は, 大腸菌およ

びヒト GGT の両方に対し、置換フェノールの脱離能に強く依存した阻害活性を示し、良好な脱離基を持つホスホン酸ジエステル 3f, 3g, 4 は、両酵素に対する良い阻害剤となることが明らかとなった。その結果として、従来から使用されている非特異的な GGT 阻害剤である acivicin よりも強力な阻害剤を開発することができた。

3) ホスホン酸ジエステルによる GGT 失活の遷移状態

酵素の活性中心 (Thr 残基) と阻害剤との反応機構を探るために、阻害剤の脱離基の pK_a に対してそれぞれの阻害剤の $\log k_{on}$ 値をプロットしたところ (Brønsted plot), 大腸菌 GGT, ヒト GGT とともに、傾きが負の良好な直線関係が得られた ($\beta_{lg} = -1.0$ および -0.94)。これらの値から、酵素失活反応の遷移状態が大腸菌 GGT とヒト GGT できわめて類似しており、脱離基とリン原子の間の結合がほとんど切れかけている、解離的な遷移状態をとっていることが解明された。

4) 大腸菌またヒト GGT 活性部位の探索

ヒト GGT の X 線結晶構造解析は報告されておらず、その活性部位の構造は、主として一連の γ -グルタミル供与体または受容体となる基質を用いた構造活性相関により調べられてきた。しかし、各基質による相対速度や基質に対する見かけの K_m 値を用いて、真の基質特異性を明らかにするには限界があった。そこで、ホスホン酸ジエステル 3a-g, 4, 5, 6a が GGT による触媒反応の遷移状態をミミックした反応機構依存的阻害剤であることに注目し、阻害剤の親和性が、酵素の真の基質特異性と高い相関性を持つと考え、阻害剤を用いて GGT の活性部位を探索した。その結果、特徴的な構造をもつ 4, 5, 6a のヒト GGT に対する阻害活性は、その脱離能から推測される値の100倍以上であった。すなわち、C 末端にカルボキシ基、あるいは、それを含むグルタチオンの部分構造をミミックする部位をもつこれら阻害剤は、ヒト GGT に対しとりわけ高い親和性を示し、その結果、非常に高い阻害活性を示したものと考えられる。この事実は 4, 5, 6a の C-末端カルボキシ基がヒト GGT に特異的に認識されていることを示している。これとは対照的に、大腸菌 GGT は、すべてのホスホン酸ジエステルに対し、その化学的活性に応じて一様に阻害されており、化合物 4, 5, 6a の C 末端カルボキシ基やグルタチオンの部分構造は、大腸菌 GGT の活性部位と特異的な相互作用をしていないことが判明した。このように、ホスホン酸ジエステルはヒト GGT と大腸菌 GGT における活性部位の構造と酵素認識機構の明瞭な違いを見事に明らかにした。

5) GGT の特異的阻害剤としてのホスホン酸ジエステル

さらに、ホスホン酸ジエステルの GGT 阻害剤としての特異性を調べた。古くから使われている GGT 阻害剤の acivicin は、多くの重要な生合成プロセスに関わるグルタミン依存性アミドトランスフェラーゼ (GA) をも不活性化するため、強い細胞毒性を示す。そこで、典型的な GA であるアスパラギン酸合成酵素 (AS) について、ホスホン酸ジエステル 6a の阻害活性を調べた。その結果、高濃度 (10 mM) の化合物 6a で 2 時間処理しても、AS は全く阻害されなかったのに対し、100 μ M の acivicin では AS はほぼ完全に失活した。これらの結果から、本研究で合成したホスホン酸ジエステルは高い選択性を持つ GGT 阻害剤であることが示された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) の反応機構にもとづいて、ホスホン酸エステル型の遷移状態アナログ阻害剤を設計、合成し、その阻害活性を評価したものである。このタイプの GGT 阻害剤は従来の阻害剤より強力かつ高い選択性を持つとともに、遷移状態アナログとして反応機構依存的に酵素を阻害するため、酵素の反応機構や基質特異性および活性中心の構造を探るプローブとして最適であり、実際に、これらの阻害剤を用いて大腸菌 GGT とヒト GGT の活性中心の構造の違いを明らかにすることに成功している。GGT は、さまざまな疾患、例えば、ガン、動脈硬化症、糖尿病、アルツハイマー症、パーキンソン病などに関与していることが指摘されているが、その生理作用には謎が多い。本研究によって得られた阻害剤は GGT の生理作用を解明する上でも、重要な生化学的知見を与える化学プローブとして重要である。評価される主な点は以下の通りである。

1) ホスホン酸エステル型阻害剤は GGT の活性中心である Thr 残基と共有結合を形成することにより、大腸菌およびヒト GGT を強力かつ不可逆的に阻害した。特にヒト GGT に対して、従来の阻害剤より 6000 倍以上強力な阻害剤を示した。

2) 阻害活性を脱離基における電子的効果を用いて定量的に解析することにより、大腸菌 GGT およびヒト GGT は、ともにホスホン酸ジエステル型阻害剤と解離的な遷移状態を経て反応し、失活していることを明らかにした。

3) 構造の異なる一連の阻害剤を化学プローブとして用い、それらの構造と阻害活性を比較することにより大腸菌 GGT およびヒト GGT の活性中心の構造と基質認識の違いを明らかにした。

4) Acivicin など従来の GGT 阻害剤は、GGT ばかりでなく、グルタミン依存性アミドトランスフェラーゼを同時に強く阻害するのに対し、ホスホン酸エステル型の本阻害剤は GGT のみを特異的に阻害することを明らかにした。

以上のように、本論文は、新規ホスホン酸エステル型 GGT 阻害剤を合成し、大腸菌およびヒト GGT に対する阻害活性を評価することにより、GGT 失活の遷移状態と活性中心の構造の違いおよび基質認識の機構を解明したものである。その結果は、さまざまな疾患に関与すると言われている GGT の生理的意義の解明および医薬リードの開発に役立つことが期待される。これらの点で本論文は、酵素化学、生化学、ならびに生理学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成18年10月19日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。