

氏 名	井 上 まこと い の う え ま こ と
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1157 号
学位授与の日付	平 成 12 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 科 学 専 攻
学位論文題目	Synthesis and Characterization of Mechanism-Based Inhibitors of γ - Glutamyl Amide Bond Forming/Cleaving Enzymes (γ -グルタミルアミド結合生成/切断酵素の反応機構にもとづく阻害剤の合 成と性質)
論文調査委員	(主 査) 教 授 坂 田 完 三 教 授 江 崎 信 芳 教 授 熊 谷 英 彦

論 文 内 容 の 要 旨

生理学的に重要な化合物であるグルタチオンやグルタミンは、通常のタンパク質には見られない γ -グルタミルアミド結合という特殊なアミド結合を有している。これら化合物の γ -グルタミルアミド結合の生成に関わる γ -グルタミルシステイン合成酵素(γ -GCS)とグルタミン合成酵素(GS)、およびグルタチオンの γ -グルタミルアミド結合を切断する γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ(GGT)の反応機構を、阻害剤を用いることによって解明することを目的とした。

γ -GCSおよびGSは、基質グルタミン酸を γ -グルタミルリン酸中間体として活性化させ、これに基質アミンを求核攻撃させることで、四面体型の遷移状態を経て γ -グルタミルアミド結合を生成させると考えられる。一方GGTは、酵素の活性残基が γ -グルタミル化された中間体に、水を求核攻撃させ、四面体型遷移状態を経てアミド結合切断を行うと考えられる。すなわちこれら酵素の反応は、いずれもグルタミン酸の γ -位が四面体型となった遷移状態を経由して進行する。一般に、反応の遷移状態に類似した化合物は強力な酵素阻害剤となりうる。そこで、上記酵素反応に共通する四面体型遷移状態にもとづいて阻害剤を合成し、各酵素に対する作用を調べた。本論文の主な内容は以下に示すとおりである。

1. γ -GCSおよびGSの γ -グルタミルリン酸中間体のアナログは、基質グルタミン酸と同程度の強さで酵素に結合し、阻害した。一方で、 γ -位に四面体型遷移状態の骨格を持つグルタミン酸の γ -ホスホン酸フルオリド誘導体は、中間体アナログよりも強く酵素を阻害した。さらに、ホスホン酸フルオリドは基質アミン、ATP共存下でのみGSの失活を引き起こした。これはアミンによる求核置換およびATPによるリン酸化を受け遷移状態類似の付加物を与えたことで酵素を失活させたと考えられた。以上より、 γ -グルタミルリン酸は酵素によって強く安定化された中間体ではなく、むしろその後位置する四面体型遷移状態をこれらの酵素は強く認識していることが示唆された。

2. γ -位に四面体型遷移状態の骨格を持つホスフィン酸およびホスホン酸誘導体の γ -GCSに対する阻害活性を評価した。一方、ホスフィン酸誘導体は、ATP共存下で時間依存的に酵素を強く阻害した。ホスホン酸誘導体は、ATP共存下でも時間依存的に阻害は示さず、また阻害活性もはるかに低かった。ホスフィン酸誘導体による酵素の時間依存的阻害はATP共存下でのみ見られたことから、ホスフィン酸誘導体はATPによるリン酸化を受けたのち、遷移状態類似の付加物を与え、酵素を強く阻害したと考えられた。一方、 $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_4]\text{ATP}$ を用いた同位体交換実験より、ホスホン酸誘導体はATPでリン酸化されることがわかった。以上より、強い阻害活性を発揮するためには、ATPによるリン酸化が不可欠であることが見いだされた。ホスホン酸誘導体はホスフィン酸誘導体よりリン酸化を受ける部位(P-O^-)の塩基性が低かったことから、この部位の求核性がリン酸化に重要であることが示唆された。ホスフィン酸誘導体はATPでリン酸化を受け酵素を強く阻害したものの、この阻害は不可逆ではなく、阻害された酵素の活性の回復は速かった。別のホスホン酸型阻害剤は、リン酸化を受けるものの容易に逆反応により脱リン酸化されたことから、前述のホスフィン酸誘導体で見られた酵素の回復は、リン酸化されたホスフィン酸が、逆反応により脱リン酸化することが原因であると考えられた。従って、強力な阻害活性を発揮するためには、阻害剤が一度リン酸化を受けると、逆反応によって脱リン酸化されないことが必須条件であ

ることを明らかにした。

3. GGTの活性残基は未だ明らかにされていない。そこで、この活性残基を同定するために、この残基と反応し、特異的にホスホニル化すると期待されるグルタミン酸の γ -ホスホン酸フルオリド誘導体をGGTの遷移状態アナログとして用いた。ホスホン酸フルオリドは、きわめて低濃度で時間依存的に酵素を完全に失活させた。失活の速度は基質濃度が高くなるほど減少したことから、ホスホン酸フルオリドは活性中心に作用し、基質と競合していることが示唆された。失活した酵素のイオンスプレー質量分析より、1分子の小サブユニットが1分子の阻害剤でホスホニル化されていることが明らかとなった。小サブユニットをプロテアーゼで限定加水分解し、得られたペプチド断片の質量分析(LC/MSおよびMS/MS)による解析から、小サブユニットN末端 Thr-391 がホスホニル化されていることがわかった。以上より、GGTの活性残基は小サブユニットN末端 Thr-391 であり、さらにこのことから、GGTは近年見いだされたアミド結合加水分解酵素群 N-terminal nucleophile hydrolase の新たな一員であることがわかった。

論文審査の結果の要旨

γ -グルタミルシステイン合成酵素(γ -GCS)、グルタミン合成酵素(GS)、および γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(GGT)はグルタチオンやグルタミンの代謝の鍵酵素であり、その特異的な阻害剤は、これら酵素の反応機構解析のツールとなるのみならず、医薬、農薬として広い応用の可能性を持つ化合物である。本論文は、各酵素反応に共通して存在すると考えられる四面体型の遷移状態にもとづき阻害剤を設計、合成し、これら阻害剤の阻害挙動を詳細に解析することで、これら酵素反応機構の解明を目指したものである。その評価すべき点は以下に示すとおりである。

1. γ -GCSとGSの酵素反応における活性化中間体および四面体型遷移状態のアナログを合成し、それらの阻害活性の比較検討を行った。この結果、これら酵素は活性化中間体はあまり認識せず、むしろ基質の構造がすべてそろった四面体型の遷移状態を強く認識することを明らかにした。

2. γ -GCSの阻害剤として、四面体型遷移状態の骨格を持ち、ATP共存下で時間依存的に酵素を強く阻害するホスフィン酸誘導体と、これと似た構造を持つもののATP共存下でも時間依存的な阻害を示さず、前者よりはるかに弱い阻害剤であるホスホン酸誘導体との比較検討を行った。この結果、強力な阻害活性を発揮するために必要な要素として、(1)阻害剤はATPによるリン酸化を受け、四面体型遷移状態に酷似した付加物を与える必要があり、このリン酸化を受けるためにはリン酸化を受ける部位の求核性が十分高いこと、(2)阻害剤は、一度リン酸化を受けると逆反応により脱リン酸化を起こさないこと、の2点を見いだした。以上の知見は、 γ -GCSのみならず、ATPを用いて同様の反応機構でペプチド結合を作る多くのリガーゼに対しても特異的な阻害剤を得る指針となる点において意義深い。

3. GGTの遷移状態アナログを、反応機構にもとづくアフィニティーラベル化剤として用いることにより、これまで明らかにされていなかったGGTの触媒残基の同定に成功した。同定された触媒残基は、小サブユニットのN末端のスレオニン残基であった。この事実より、GGTは近年見いだされたアミド結合加水分解酵素群である N-terminal nucleophile hydrolase の新たな一員であることを明らかにした。

以上のように本論文は、これまで不分明であった γ -GCS、GSおよびGGTの酵素の反応機構、阻害剤の阻害機構を明らかにしたばかりでなく、反応機構の異なる酵素であっても、共通の化学種を推定することが出来れば、これにもとづいた阻害剤が有効なプローブとなることを示した点で生物有機化学および酵素化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12年10月16日、論文並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。