

Complete Amino Acid Sequence of Human Liver Cytosolic Alanine Aminotransferase (GPT) Determined by a Combination of Conventional and Mass Spectral Methods[†]

Mariko Ishiguro,^{1,§} Koji Takio,[§] Masami Suzuki,[‡] Rieko Oyama,[‡] Takeo Matsuzawa,[‡] and Koiti Titani^{*,‡§}
Division of Biomedical Polymer Science, Institute for Comprehensive Medical Science, and Department of Biochemistry, School of Medicine, Fujita Health University, Toyoake, Aichi, Japan 470-11, and Laboratory for Aging Process, Frontier Research Program, Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Wako, Saitama, Japan 351-01

Received April 29, 1991; Revised Manuscript Received July 24, 1991

ABSTRACT: The complete amino acid sequence of human liver cytosolic alanine aminotransferase (GPT) (EC 2.6.1.2) is presented. Two primary sets of overlapping fragments were obtained by cleavage of the pyridylethylated protein at methionyl and lysyl bonds with cyanogen bromide and *Achromobacter* protease I, respectively. Isolated peptides were analyzed with a protein sequencer or with a plasma desorption time of flight mass spectrometer and placed in the sequence on the basis of their molecular mass and homology to the sequence of rat GPT. The protein was found to be acetylated at the amino terminus and contained 495 amino acid residues. The M_r of the subunit was calculated to be 54 479, which was in good agreement with a M_r of 55 000 estimated by SDS-PAGE, and also indicated that the active enzyme with a M_r of 114 000 was a homodimer composed of two identical subunits. The amino acid sequence is highly homologous to that of rat GPT (87.9% identity) recently determined [Ishiguro, M., Suzuki, M., Takio, K., Matsuzawa, T., & Titani, K. (1991) *Biochemistry* 30, 6048–6053]. All of the crucial amino acid residues are conserved in human GPT, which seem to be hydrogen bonding to pyridoxal 5'-phosphate in rat GPT by the sequence homology to other α -aminotransferases with known tertiary structures.

Alanine aminotransferase (GPT)¹ (EC 2.6.1.2) is a pyridoxal enzyme which catalyzes reversible transamination between alanine and 2-oxoglutarate to form pyruvate and glutamate. In human tissues including liver, kidney, heart, and skeletal muscles, this enzyme localizes in both cytosol and mitochondria as isoenzymes (Katunuma et al., 1962; Noguchi et al., 1977; Kamoda et al., 1980). The cytosolic enzyme is inducible by glucocorticoid, but the mitochondrial enzyme is not (Hopper & Segal, 1964; Noguchi et al., 1977). These isoenzymes participate in cellular nitrogen metabolism and also in liver gluconeogenesis starting with precursors transported from skeletal muscles (DeRosa & Swick, 1975). The cytosolic GPT activity leaked into blood is an important clinical marker of human acute hepatitis, but characteristics of the enzyme itself have not yet been studied in detail. Recently, we have reported the complete amino acid sequence of rat liver cytosolic GPT (Ishiguro et al., 1991). More recently, we have purified human liver cytosolic GPT to a homogeneous state as judged by SDS-PAGE and noted that the human enzyme has some physicochemical properties different from those of the rat enzyme. We herein report the complete amino acid sequence of human liver cytosolic GPT determined by a combination of conventional Edman degradation and newly developed plasma desorption mass spectral analysis and describe its sequence homology to the rat enzyme and to other α -aminotransferases.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Human liver cytosolic GPT was purified to homogeneity as judged by SDS-PAGE by a modification of

the previous methods (Gatehouse et al., 1967; Matsuzawa & Segal, 1968): chromatography on tandem DE-52 and CM-52 columns instead of DE-52 column chromatography because the human enzyme is a more cationic protein than the rat enzyme, followed by calcium phosphate gel treatment, ammonium sulfate precipitation, octyl-Sepharose, Sepharose CL-6B, and DEAE-Sepharose column chromatography. About 1 mg of the enzyme was purified from 105 g of fresh remnant liver supplied from autopsy material of a 53-year-old Japanese woman. API, which specifically cleaves lysyl bonds even in the presence of urea (Masaki et al., 1981), was a generous gift of Dr. T. Masaki of the Department of Agricultural Chemistry, Ibaraki University, Ibaraki, Japan. TPCK-treated trypsin was obtained from Cooper Biomedical (Malvern, PA). V8 protease was a product of Miles (Naperville, IL). Cyanogen bromide and succinic anhydride were from Wako Pure Chemical (Osaka, Japan). BNPS-skatole was obtained from Pierce Chemical (Rockford, IL). *N*-Acetyl-L-serine was a generous gift of Dr. S. Tsunazawa of the Institute for Protein Research, Osaka University, Suita, Japan, and *N*-acetyl-L-alanine was obtained from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan).

Reduction and Pyridylethylation of GPT. GPT was reduced with tri-*n*-butyl phosphine (Wako Pure Chemical) (Ruegg & Rudinger, 1977) and pyridylethylated with 4-vinylpyridine (Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo, Japan) (Hermanson et al., 1973) in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5)/1 mM EDTA

[†] This work was supported in part by Grants-in-Aid from the Fujita Health University (to K.T. and T.M.).

^{*} To whom correspondence should be addressed at Division of Biomedical Polymer Science, Institute for Comprehensive Medical Science, School of Medicine, Fujita Health University, Toyoake, Aichi, Japan, 470-11.

[‡] Fujita Health University.

[§] Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN).

¹ Abbreviations: amu, atomic mass unit; API, *Achromobacter* protease I; BNPS-skatole, 2-[(2'-nitrophenyl)thio]-3-methyl-3-bromo-3H-indole; GOT, aspartate aminotransferase; GPT, alanine aminotransferase; MH⁺, molecular ion; *m/z*, mass to charge ratio; N^α, α -amino; PE, pyridylethyl; PLP, pyridoxal 5'-phosphate; PTH, phenylthiohydantoin; RP-HPLC, reversed-phase high-performance liquid chromatography; SDS-PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate; TFA, trifluoroacetic acid; TPCK, L-(1-tosylamino)-2-phenylethyl chloromethyl ketone; V8, *Staphylococcus aureus* V8.

containing 7 M guanidine hydrochloride in the dark at room temperature overnight. The reaction mixture was separated by gel permeation HPLC on tandem columns of TSK G3000 SW_{XL} (7.8 × 300 mm each) (Tosoh, Tokyo, Japan) in 6 M guanidine hydrochloride containing 10 mM sodium phosphate (pH 6.0) and then desalted by dialysis and lyophilized.

Enzymatic Digestion and Chemical Cleavage. The PE-protein was digested overnight with API at a substrate to enzyme ratio of 100 (w/w) at 37 °C in 50 mM Tris-HCl, pH 9.0, containing 2.0 M urea. Peptides were separated by RP-HPLC using a Bakerbond WP-C4 column (4.6 × 50 mm; J. T. Baker, Phillipsburg, NJ). Further purification of peptides was carried out by RP-HPLC on an Aquapore PH 300 column (2.1 × 30 mm; Applied Biosystems, Foster City, CA) with gradients of acetonitrile into 0.1% aqueous TFA (Mahoney & Hermanson, 1980). The PE-protein was cleaved at room temperature with cyanogen bromide in 70% formic acid as described by Gross (1967). Fragments were separated by HPLC on tandem columns of TSK G2000 SW_{XL} (7.8 × 300 mm each) (Tosoh). Further purification of fragments was achieved by RP-HPLC on an Aquapore PH 300 column. The largest cyanogen bromide fragment (M3) was succinylated in the presence of 8 M urea and 0.5 M sodium bicarbonate (pH 8.5) by a modification of Klotz (1967). After succinylation of the fragment, the reaction mixture was diluted with 4 volumes of deionized water and then digested with TPCK-trypsin at 37 °C overnight. Other enzymatic digestions were performed overnight at a substrate to enzyme ratio of 100 (mol/mol) at 37 °C in 0.1 M ammonium bicarbonate, pH 8.0. Cleavage with BNPS-skatole, dilute acid, concentrated HCl, or 70% formic acid followed the procedure of Omenn et al. (1970), Inglis (1983), Titani and Narita (1964), or Landon (1977).

Amino Acid and Sequence Analysis. Amino acid analysis was performed with a Hitachi Model L8500 amino acid analyzer or by the Waters Pico-tag system (Heinrikson & Meredith, 1984; Bidlingmeyer et al., 1984). Amino-terminal sequence analysis was performed with an Applied Biosystems Model 470A or 477A protein sequencer (Hewick et al., 1981) connected on line to a Model 120A PTH analyzer.

Mass Spectral Analysis. Mass spectral analysis was performed with a BioIon 20 biopolymer mass analyzer (Applied Biosystems) on nitrocellulose-coated targets. Data were collected with 50–100 pmol of peptides for 1–30 million fission events at 15-kV acceleration voltage.

RESULTS

Sequence Analysis. The digest of the PE-protein (ca. 4.1 nmol) with API was separated into 13 fractions by RP-HPLC as shown in Figure 1. One of the major fractions (K4) was further purified by RP-HPLC on an Aquapore PH 300 column (data not shown). Thirteen major peptides designated as K1–K15 except for K6 and K11 (Table I), accounting for more than 99% of the entire protein, were thus isolated and subjected to sequence analysis. A free lysine (K6, residue 290) and one dipeptide, Ala-Lys (K11, residues 389–390), were not recovered. They may have been overlooked in the breakthrough peak. From the cyanogen bromide digest of the PE-protein (ca. 1.3 nmol), nine peptides were isolated, M1–M11/12 (resulted from an uncleaved methionylthreonine bond between residues 467 and 468), and analyzed to provide overlaps of 15 K peptides. The PE-protein was cleaved with 70% formic acid at two Asp-Pro bonds (residues 149–150 and 368–369). The mixture was separated by size-exclusion HPLC on tandem columns of TSK G3000 SW_{XL}. Peptides DP1 and DP2 thus isolated were subjected to sequence analysis to provide overlaps

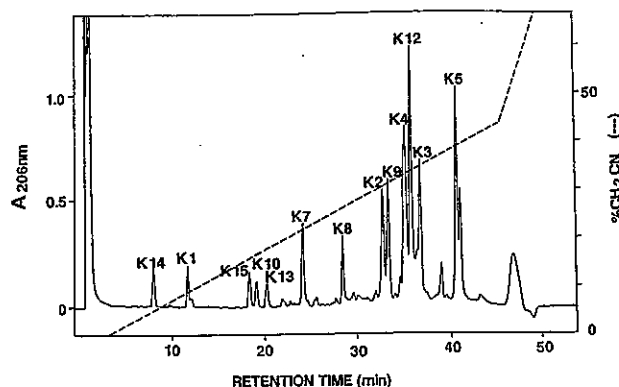


FIGURE 1: Primary separation of peptides generated by digestion of the PE-protein with API. The digest (4.1 nmol) was separated on a Bakerbond WP-C4 column (4.6 × 50 mm) using a TFA/acetonitrile system at a flow rate of 0.5 mL/min. Peptides were monitored at 206 nm. Peptides are identified by the prefix K as in Figure 2.

of K4 and K5 and K9–K12, respectively. The intact PE-protein was cleaved with BNPS-skatole at a single tryptophanyl bond between residues 213 and 214. After extraction of excess reagents with 1-chlorobutane, the mixture was subjected to sequence analysis.

Sequenator analysis of the intact protein (50 pmol) yielded only minor signals under 6.5 pmol due to impurities in five cycles of Edman degradation, indicating that the amino terminus of the protein is blocked. The analysis of 13 major K peptides (K1–K15) and their subpeptides provided most of the sequence as shown in Figure 2. Of the 13 peptides, only peptide K1 was N^α-blocked, as was the intact protein, indicating that this peptide was derived from the amino terminus of the protein. Peptide K1 was cleaved with 2% formic acid at Asp (residue 6) and separated on a Superspher RP Select B column (2 × 119 mm; Merck, Darmstadt, Germany). The amino-terminal peptide K1–D1, Ac(ASSTG), thus isolated was subjected to further cleavage with 12 N HCl at Ser and Thr. The mixture was separated on the same column, and a fraction with the retention time for Ac-Ala (retention times of Ac-Ala and Ac-Ser were determined with synthetic Ac-Ala and Ac-Ser) was collected. After acid hydrolysis of this fraction, only Ala was detected by amino acid analysis, indicating that the amino terminus is Ac-Ala. The blocking group was further confirmed to be an acetyl group by mass spectral analysis. Analysis of peptides M1 and K1 derived from the amino terminus of the PE-protein yielded MH⁺ values of 2623.0 and 1941.4, respectively (Table II), in accord with the sequences of Ac-Ala-Ser-Ser...Hse (residues 1–25) and Ac-Ala-Ser-Ser...Lys (residues 1–18). Thus, analyses of 13 K and 9 M peptides and their subpeptides yielded the complete amino acid sequence of human cytosolic GPT of 495 residues starting with Ac-Ala, as summarized in Figure 2.

Mass Spectral Analysis. Unambiguous data were easily obtained for peptides of MH⁺ values less than 4000. For peptides of MH⁺ values above 5000, the signals tended to broaden and it became increasingly difficult to obtain the precise *m/z* values. In such cases, doubly or triply charged signals were also evident. Most of the major signals were obtained as the protonated free form accompanied by the sodium forms except for fragments M2 and M9 (Table II, Figure 3), which seemed to give the protonated monosodium form as the major signal. With cyanogen bromide fragments, major signals were obtained as the lactone forms. Mass numbers for fragments M8/9 and M9 were obtained from a mixture (65 pmol total), and the intensity of the signals was very low. The rather big discrepancy between the calculated

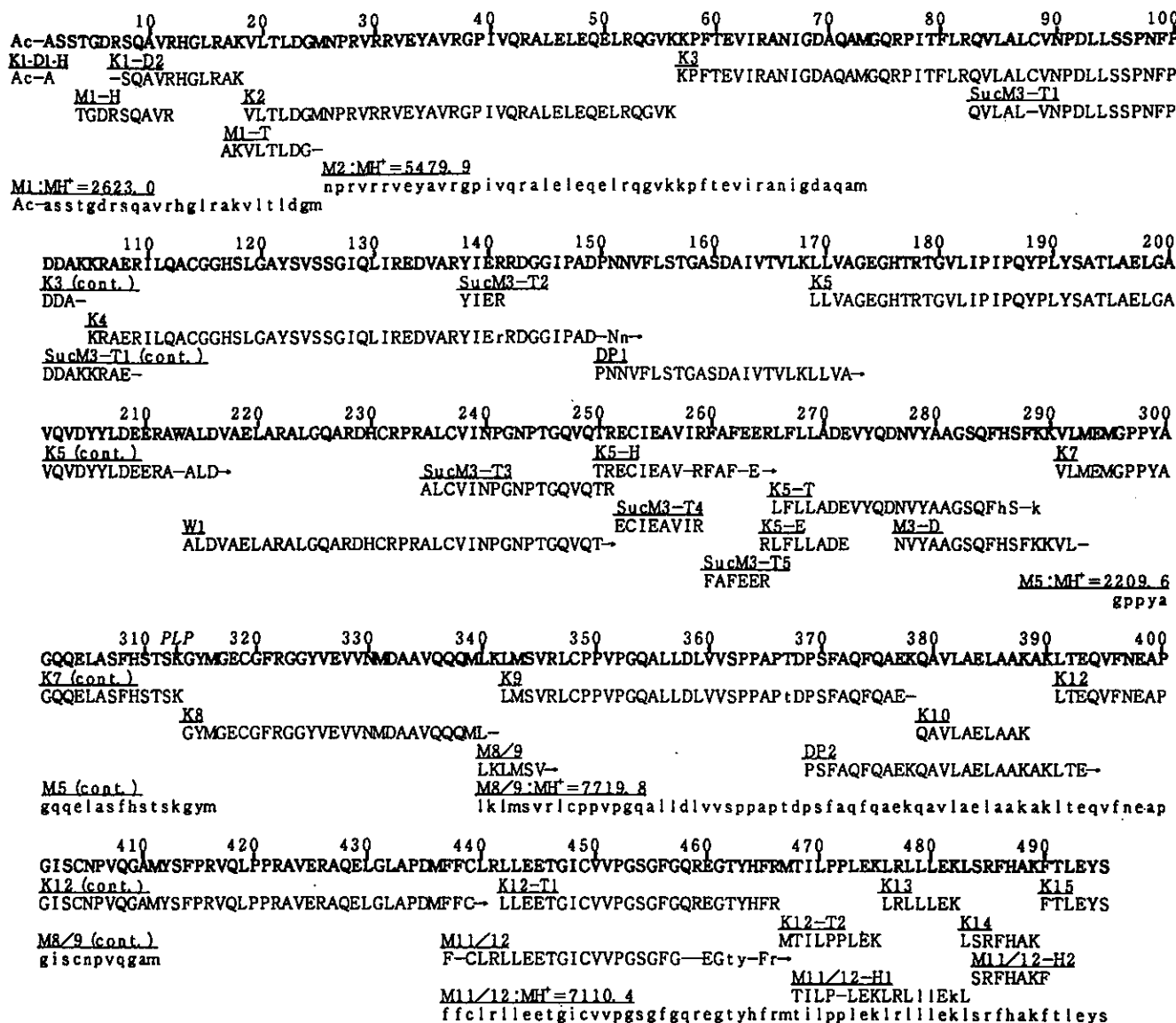


FIGURE 2: Summary of the sequence proof of human liver cytosolic GPT. The proven sequences of specific peptides (underlined) are given in the one-letter code below the summary sequence (bold type). The prefixes K, M, and W denote peptides generated by cleavage of the PE-protein at lysyl (with API), methionyl (with cyanogen bromide), and tryptophanyl bonds (with BNPS-skatole), respectively. The products of lysyl or methionyl cleavage are numbered from the amino terminus toward the carboxyl terminus of the protein. DP indicates peptides generated by cleavage of the PE-protein with 70% formic acid. Suc indicates succinylation of fragment M3 with succinic anhydride. Subpeptides are identified by hyphenated suffixes, where the following codes indicate the subdigesting agents: E, V8 protease; T, trypsin; H, chemical cleavage with 12 N HCl; D, chemical cleavage with 2% formic acid. Peptide sequences written in upper-case letters are proven by Edman degradation unambiguously; those in lower case letters indicate tentative identifications. Unidentified residues are shown by dashes or horizontal arrows; the latter indicate long unidentified sequences. Ac denotes an acetyl group. The results of the mass spectral analysis are indicated above the sequences of specific peptides in lower case letters. The putative PLP binding site is indicated at residue 313.

and observed masses for these fragments might have resulted from the low amount. A higher amount of the sample may help ionization and result in signals of better quality. In many cases, differences between the calculated and observed masses were within the channel resolutions which were 0.66, 1.5, and 2.1 amu at m/z 1000, 5000, and 10 000, respectively.

Isoelectric Point Prediction. Isoelectric points of human and rat cytosolic GPT, predicted by the methods of Skoog et al. (1986) from the amino acid sequences, were 6.51 and 5.89, respectively.

DISCUSSION

Human liver cytosolic GPT showed a more cationic nature on DE-52 column chromatography at pH 5.7 than rat GPT; i.e., it passed through a DE-52 column but adsorbed to a CM-52 column at pH 5.7. Therefore, we used a tandem column chromatography of DE-52 and CM-52 at pH 5.7 for the first step of purification. The specific activity of the pu-

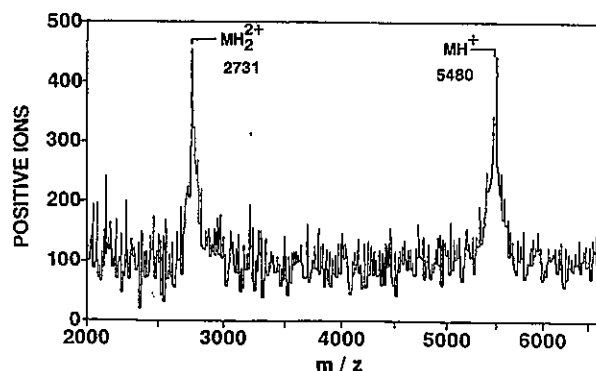


FIGURE 3: Positive-ion californium-252 plasma desorption mass spectrum of fragment M2 (65 pmol). Calculated mass (MH^+) is 5456.

riated human enzyme was ca. 120 units/mg, which was much lower than that of the rat enzyme (ca. 500 units/mg) probably because of the instability. Details of the enzymological

Table I: Amino Acid Compositions of Intact PE-GPT and Its Peptides Derived by Digestion with API^a

peptide residue no.	K1 1-18	K2 19-56	K3 57-104	K4 105-168	K5 169-289
Asp/Asn (D/N)	0.7 (1)	1.9 (2)	5.7 (7)	5.7 (6)	8.3 (9)
Thr (T)	1.2 (1)	1.4 (1)	2.3 (2)	2.1 (2)	5.6 (5)
Ser (S)	2.7 (3)		2.1 (2)	5.4 (6)	3.6 (3)
Glu/Gln (E/Q)	0.9 (1)	6.3 (7)	4.1 (4)	5.4 (5)	17.4 (17)
Pro (P)		3.6 (2)	5.8 (5)	2.3 (2)	7.9 (6)
Gly (G)	2.1 (2)	2.9 (3)	2.5 (2)	6.9 (7)	9.6 (8)
Ala (A)	3.3 (3)	2.7 (2)	5.1 (5)	7.1 (7)	17.0 (16)
Val (V)	0.9 (1)	4.5 (6)	2.7 (3)	4.7 (5)	8.1 (10)
Met (M)		1.0 (1)	1.4 (1)		
Ile (I)		0.5 (1)	2.2 (3)	4.7 (6)	4.0 (5)
Leu (L)	<u>1.0</u> (1)	<u>5.0</u> (5)	<u>5.0</u> (5)	<u>5.0</u> (5)	<u>14.0</u> (14)
Tyr (Y)		1.0 (1)		2.0 (2)	5.9 (6)
Phe (F)			2.8 (3)	1.1 (1)	5.1 (5)
His (H)	1.1 (1)			1.0 (1)	4.2 (3)
Lys (K)	0.8 (1)	1.0 (1)	1.6 (2)	0.8 (2)	1.9 (1)
Arg (R)	2.8 (3)	4.8 (6)	3.4 (3)	5.8 (6)	9.3 (9)
PE-Cys (C)			1.7 (1)	0.9 (1)	3.0 (3)
Trp ^b (W)	ND (0)	ND (0)	ND (0)	ND (0)	ND (1)
total res.	18	38	48	64	121
yield (%)	28	56	41	26	19
peptide residue no.	K7 291-313	K8 314-341	K9 342-378	K10 379-388	K12 391-475
Asp/Asn (D/N)		1.6 (2)	1.8 (2)		3.5 (3)
Thr (T)	1.3 (1)		1.4 (1)		4.1 (4)
Ser (S)	2.7 (3)		2.9 (3)		3.3 (3)
Glu/Gln (E/Q)	3.8 (4)	4.2 (5)	3.9 (4)	2.0 (2)	12.8 (13)
Pro (P)	2.1 (2)		7.1 (7)		9.5 (9)
Gly (G)	2.2 (2)	4.4 (5)	1.6 (1)		8.8 (8)
Ala (A)	2.5 (2)	2.0 (2)	4.0 (4)	<u>4.0</u> (4)	6.6 (5)
Val (V)	1.3 (1)	2.8 (4)	3.6 (4)	1.0 (1)	5.2 (6)
Met (M)	1.6 (2)	2.1 (3)	1.1 (1)		2.5 (3)
Ile (I)					2.8 (3)
Leu (L)	2.1 (2)	<u>1.0</u> (1)	<u>5.0</u> (5)	2.3 (2)	<u>9.0</u> (9)
Tyr (Y)	1.0 (1)	1.7 (2)			2.2 (2)
Phe (F)	<u>1.0</u> (1)	0.9 (1)	2.0 (2)		5.6 (6)
His (H)	1.0 (1)				1.2 (1)
Lys (K)	0.9 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.1 (1)
Arg (R)		1.3 (1)	1.5 (1)		6.5 (6)
PE-Cys (C)		0.8 (1)	0.9 (1)		1.1 (3)
Trp ^b (W)	ND (0)	ND (0)	ND (0)	ND (0)	ND (0)
total res.	23	28	37	10	85
yield (%)	39	28	49	53	39
intact PE-GPT					
peptide residue no.	K13 476-482	K14 483-489	K15 490-495	human 1-495	rat ^c 1-495
Asp/Asn (D/N)				35.4 (32)	(32)
Thr (T)			1.0 (1)	21.3 (18)	(16)
Ser (S)		0.9 (1)	1.0 (1)	22.3 (25)	(27)
Glu/Gln (E/Q)	1.3 (1)		1.0 (1)	62.3 (64)	(71)
Pro (P)				37.6 (33)	(33)
Gly (G)				37.7 (38)	(36)
Ala (A)		1.3 (1)		46.6 (52)	(44)
Val (V)				38.2 (41)	(39)
Met (M)				12.0 (11)	(16)
Ile (I)				16.5 (18)	(21)
Leu (L)	<u>4.0</u> (4)	<u>1.0</u> (1)	<u>1.0</u> (1)	<u>55.0</u> (55)	(48)
Tyr (Y)			0.9 (1)	15.0 (15)	(16)
Phe (F)		0.9 (1)	0.9 (1)	20.8 (21)	(22)
His (H)		1.0 (1)		8.7 (8)	(7)
Lys (K)	1.0 (1)	0.9 (1)		18.8 (16)	(19)
Arg (R)	1.0 (1)	1.0 (1)		40.5 (37)	(33)
PE-Cys (C)				14.4 (10)	(14)
Trp ^b (W)	ND (0)	ND (0)	ND (0)	ND (1)	(1)
total res.	7	7	6	495	495
yield (%)	57	52	54		

^aResults are expressed as residues per peptide or protein by amino acid analysis or, in parentheses, from the sequence (Figure 2). Vapor-phase hydrolysis was carried out with 6 N HCl at 110 °C for 20 h. Each composition was calculated on the basis of the integral value of the residue underlined. ^bTrp was not determined (ND). ^cTaken from Ishiguro et al. (1991).

properties of human liver cytosolic GPT will be published elsewhere. It is well-known that there is a genetic polymor-

phism in human GPT as reported for the erythrocyte enzyme (Chen et al., 1972) and the liver enzyme (Saha & Bhatta-

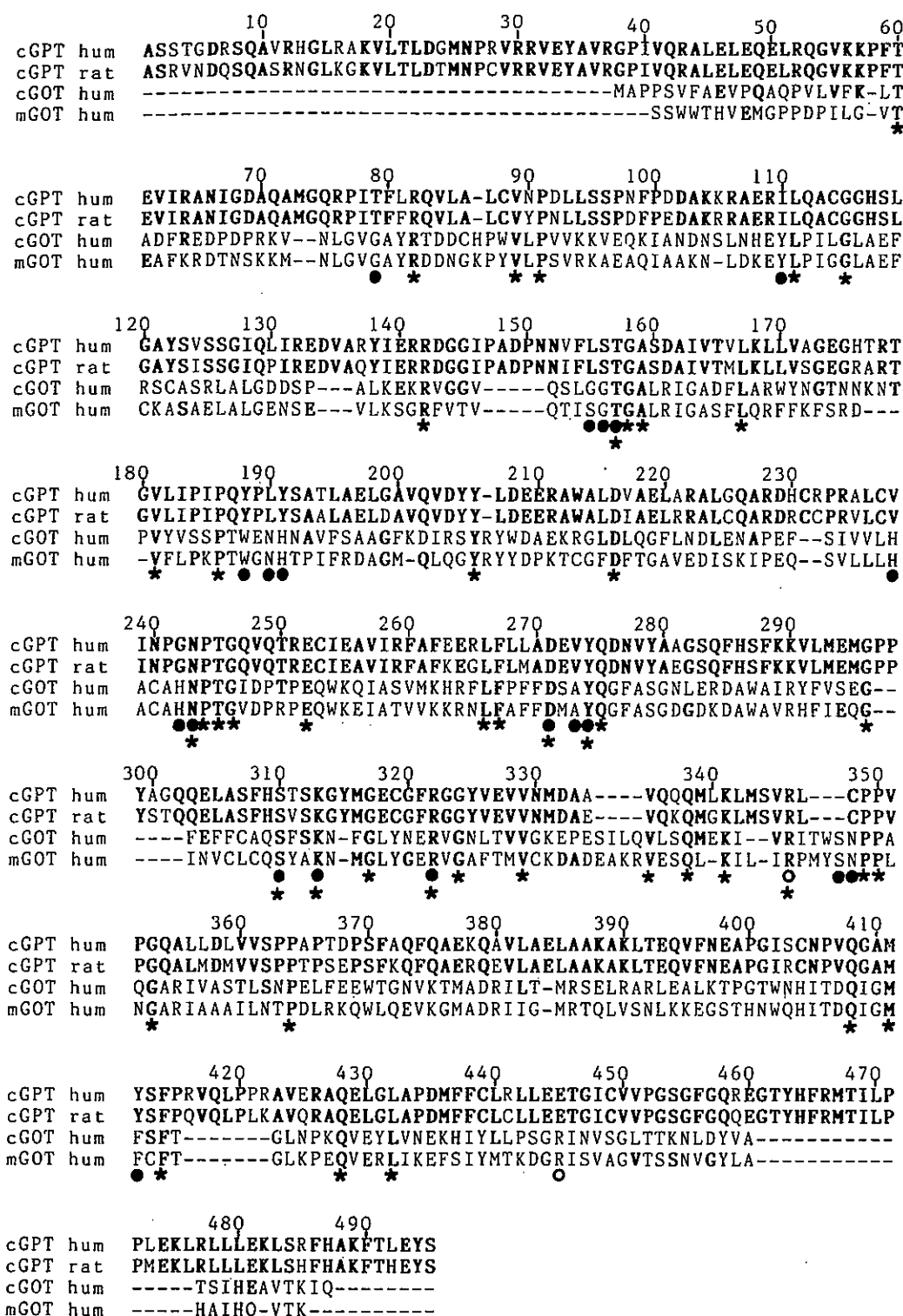


FIGURE 4: Sequence alignment of human GPT, rat GPT, and human GOT. Residue numbers above the alignment represent those of human cytosolic GPT. Bold letters indicate residues identical to human GPT. Asterisks indicate residues conserved among the four sequences. The substrate binding residues in GOT (Arg 292 and Arg 386 in cytosolic pig GOT, Arg 346 and Arg 445 in this figure) are marked with open circles. Filled circles indicate the residues present in the PLP-binding pocket. cGPT hum, cytosolic human GPT; cGPT rat, cytosolic rat GPT (Ishiguro et al., 1991); cGOT hum, cytosolic human GOT (Choudhury et al., 1990); mGOT hum, mitochondrial human GOT (Martini et al., 1985).

charyya, 1989; Kanemitsu et al., 1990) as well. The most popular types among Japanese people seem to be GPT1, GPT2-1, and GPT2 (Ishimoto & Kuwata, 1974; Ueda et al., 1979). The purified enzyme in the present study was probably GPT1 because the predicted isoelectric point was closest to that of the most cationic enzyme. But the cause of the GPT polymorphism remains to be clarified. We are now investigating the other types of human liver cytosolic GPT.

In general, the proof of the sequence of human GPT involved two primary sets of overlapping peptides derived by cleavage at either lysyl or methionyl bonds. As shown in Figure 2, all of the K peptides and their subpeptides and a part of the M peptides were determined by conventional Edman degradation. Mass spectral analysis of the rest of the M peptides and some of the K peptides facilitated the sequence proof by either providing overlaps of K peptides or confirming

Table II: Mass Spectral Analysis of Peptides Derived from GPT^a

peptide	residue no.	MH ⁺		MH ₂ ²⁺ obsd
		calcd	obsd	
M1	1-25	2621.9	2623.0	1321
M2	26-73	5456.3	5479.9 (+Na?)	2731
M5	296-317	2209.4	2209.6	1103
M6	317-331	1674.9	1676.5	
M8/9	340-411	7707.1	7719.8	3848
M9	344-411	7221.4	7245.4 (+Na?)	3623
M10	412-436	2794.2	2795.8	1386
M11	437-467	3714.3	3715.6	1860
M11/12	437-495	7101.5	7110.4	3558
K1 ^b	1-18	1940.1	1941.4	
K2	19-56	4391.2	4392.8	2197
K7	291-313	2509.9	2509.7	1256
K8	314-341	3187.7	3187.3	1592
K9	342-378	4026.8	4028.3	2025
K1-T1 ^b	1-12	1277.4	1277.3	
K1-T2 ^b	1-16	1741.0	1741.9	

^aMH⁺ for M peptides were calculated as the lactone forms.^bPeptides observed in a partial tryptic digest of peptide K1.

the sequences obtained by the conventional method, together with the sequence homology to rat GPT (Ishiguro et al., 1991). Mass spectral analysis was also very useful for identification of the amino-terminal blocking group as in analysis of rat GPT. For some reason, acyl-amino acid releasing enzyme (Tsunasawa & Narita, 1976) failed to remove acetylalanine from the N^α-blocked peptide K1. Although Ac-Ala itself meets the enzyme specificity, either the length of the peptide (16 residues; the enzyme generally prefers shorter substrate) or the presence of charged residues near the blocked amino terminus may have prevented the cleavage of the Ala-Ser bond. Information on the precise molecular mass of a peptide is of great value for estimation of posttranslational modifications such as the amino-terminal blocking group and phosphorylation. In the present study, we wanted to know its utility as well as limitations. The data presented here are some of our very first trials before establishing routine procedures. Although there are reports concerning many different ways of use in protein chemistry (Roepstorff et al., 1988; Klarskov et al., 1989), we limited our use of the instrument just to molecular mass determination in the present study. We also limited the sample amount to 100 pmol because the amount of the enzyme (starting material) was limited. The sequence shown in Figure 2 contains regions of relatively weak analytical proofs at overlaps aligning residues 56-57, 264-266, 313-314, 339-341, 466-467, 482-484, and 489-491, but these alignments are supported by either the compositional (Table I) or the mass spectral data (Table II) in addition to the sequence homology to rat GPT (Ishiguro et al., 1991). Thus, the only weak point in the proof of sequence is the lack of direct identification of Trp at residue 213. The presence of Trp was monitored by the UV spectrum obtained with a diode array detector during the HPLC separation. Among the isolated peptides, only K5 and M3 showed the characteristic spectrum of Trp-containing peptides. Trp was placed in the sequence at residue 213 by the specificity of the BNPS-skatole and sequence homology with the rat enzyme.

From the present study, the human GPT subunit is composed of 495 residues. The *M_r* of this subunit, calculated from the amino acid sequence, is 54479, which is in good agreement with a *M_r* of about 55 000 estimated by SDS-PAGE. As shown in Figure 4, the sequence of human GPT can be aligned with that of rat GPT (Ishiguro et al., 1991) without any gap and is highly homologous to it as expected from the species difference. Out of 495 residues, 435 are identical to each other (87.9% identity). Differences between human and rat GPT

are scattered throughout the sequence, but there are several regions with relatively many differences such as residues 3-17, 217-235, 263-269, 334-340, 357-380, and 416-425. Although the tertiary structure of human GPT is not yet known, these regions are likely to be not involved in the active site. As discussed in a previous paper (Ishiguro et al., 1991), the amino acid sequence of cytosolic GPT is quite unique among those of pyridoxal enzymes with known structures registered in an updated protein data base. However, the detailed sequence homology search indicated that the sequence of human cytosolic GPT is significantly homologous to those of human cytosolic GOT and mitochondrial GOT with 14.3% and 12.5% identity, respectively. As shown in Figure 4, the homology is much higher in the middle portion of the molecules than the amino- and carboxyl-terminal regions. From the X-ray crystallographic studies on GOT, the middle portion comprises the active site large domain and the amino- and carboxyl-terminal regions comprise the small domain involved in the substrate specificity. In spite of rather low overall homology between GPT and GOT, most of the crucial amino acid residues providing hydrogen bonds to PLP at the binding pocket in the large domain of both cytosolic and mitochondrial GOT are also retained in both rat and human GPT as shown in Figure 4. This suggests that the tertiary structure of GPT should resemble that of GOT in the middle portion of the molecule comprising the active site large domain, but it may be quite different from GOT in the small domain composed of the amino- and carboxyl-terminal regions and involved in the substrate specificity.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. M. Naito, Department of Forensic Medicine, School of Medicine, Fujita Health University for the generous gift of the autopsy liver. We also thank Applied Biosystems for their generous offer of the use of a BioIon 20 biopolymer mass analyzer.

REFERENCES

- Bidlingmeyer, B. A., Cohen, S. A., & Tarvin, T. L. (1984) *J. Chromatogr.* 336, 93-104.
- Chen, S., Giblett, E. R., Anderson, J. E., & Fossum, B. L. G. (1972) *Ann. Hum. Genet. (London)* 35, 401-409.
- Choudhury, B. K., Setoyama, C., & Shimada, K. (1990) *Biochem. Int.* 22, 583-591.
- DeRosa, G., & Swick, R. W. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 7961-7967.
- Gatehouse, P. W., Hopper, S., Schatz, L., & Segal, H. L. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 2319-2324.
- Gross, E. (1967) *Methods Enzymol.* 11, 238-255.
- Heinrikson, R. L., & Meredith, S. C. (1984) *Anal. Biochem.* 136, 65-74.
- Hermanson, M. A., Ericsson, L. H., Neurath, H., & Walsh, K. A. (1973) *Biochemistry* 12, 3146-3153.
- Hewick, R. M., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E., & Dreyer, W. J. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 7990-7997.
- Hopper, S., & Segal, H. L. (1964) *Arch. Biochem. Biophys.* 105, 501-505.
- Inglis, A. S. (1983) *Methods Enzymol.* 91, 324-332.
- Ishiguro, M., Suzuki, M., Takio, K., Matsuzawa, T., & Titani, K. (1991) *Biochemistry* 30, 6048-6053.
- Ishimoto, G., & Kuwata, M. (1974) *Jpn. J. Hum. Genet.* 18, 373-377.
- Kamoda, N., Minatogawa, Y., Nakamura, M., Nakanishi, J., Okuno, E., & Kido, R. (1980) *Biochem. Med.* 23, 25-34.
- Kanemitsu, F., Kawanishi, I., Mizushima, J., & Okigaki, T. (1990) *Clin. Biochem.* 23, 121-125.

- Katunuma, N., Mikumo, K., Matsuda, M., & Okada, M. (1962) *J. Vitaminol.* 8, 68-73.
- Klarskov, K., Breddam, K., & Roepstorff, P. (1989) *Anal. Biochem.* 180, 28-37.
- Klotz, I. M. (1967) *Methods Enzymol.* 11, 576-580.
- Landon, M. (1977) *Methods Enzymol.* 47, 145-149.
- Mahoney, W. C., & Hermodson, M. A. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11199-11203.
- Martini, F., Angelaccio, S., Barra, D., Pascarella, S., Maras, B., Doonan, S., & Bossa, F. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 832, 46-51.
- Masaki, T., Tanabe, M., Nakamura, K., & Soejima, M. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 660, 44-50.
- Matsuzawa, T., & Segal, H. L. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 5929-5934.
- Noguchi, T., Takada, Y. & Kido, R. (1977) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358, 1533-1542.
- Omenn, G. S., Fontana, A., & Anfinsen, C. B. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 1895-1902.
- Roepstorff, P., Nielsen, P. F., Klarskov, K., & Hejrup, P. (1988) *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 16, 9-18.
- Ruegg, U., & Rudinger, J. (1977) *Methods Enzymol.* 47, 111-116.
- Saha, N., & Bhattacharyya, S. P. (1989) *Hum. Hered.* 39, 110-112.
- Skoog, B., & Wichman, A. (1986) *Trends Anal. Chem.* 5, 82-83.
- Titani, K., & Narita, K. (1964) *J. Biochem. (Tokyo)* 56, 241-265.
- Tsunasawa, S., & Narita, K. (1976) *Methods Enzymol.* 45, 552-561.
- Ueda, S., Omoto, K., Park, K. S., & Kudo, T. (1979) *Hum. Hered.* 29, 208-212.

Complete Amino Acid Sequence of Rat Liver Cytosolic Alanine Aminotransferase[†]Mariko Ishiguro,^{‡§} Masami Suzuki,[†] Koji Takio,[§] Takeo Matsuzawa,[†] and Koiti Titani^{*.‡§}*Division of Biomedical Polymer Science, Institute for Comprehensive Medical Science, and Department of Biochemistry, School of Medicine, Fujita Health University, Toyoake, Aichi, Japan 470-11, and Laboratory for the Aging Process Research, Frontier Research Program, Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Wako, Saitama, Japan 351-01**Received January 29, 1991; Revised Manuscript Received March 20, 1991*

ABSTRACT: The complete amino acid sequence of rat liver cytosolic alanine aminotransferase (EC 2.6.1.2) is presented. Two primary sets of overlapping fragments were obtained by cleavage of the pyridylethylated protein at methionyl and lysyl bonds with cyanogen bromide and *Achromobacter* protease I, respectively. The protein was found to be acetylated at the amino terminus and contained 495 amino acid residues. The molecular weight of the subunit was calculated to be 55 018 which was in good agreement with a molecular weight of 55 000 determined by SDS-PAGE and also indicated that the active enzyme with a molecular weight of 114 000 was a homodimer composed of two identical subunits. No highly homologous sequence was found in protein sequence databases except for a 20-residue sequence around the pyridoxal 5'-phosphate binding site of the pig heart enzyme [Tanase, S., Kojima, H., & Morino, Y. (1979) *Biochemistry* 18, 3002-3007], which was almost identical with that of residues 303-322 of the rat liver enzyme. In spite of rather low homology scores, rat alanine aminotransferase is clearly homologous to those of other aminotransferases from the same species, e.g., cytosolic tyrosine aminotransferase (24.7% identity), cytosolic aspartate aminotransferase (17.0%), and mitochondrial aspartate aminotransferase (16.0%). Most of the crucial amino acid residues hydrogen-bonding to pyridoxal 5'-phosphate identified in aspartate aminotransferase by X-ray crystallography are conserved in alanine aminotransferase. This suggests that the topology of secondary structures characteristic in the large domain of other α -aminotransferases with known tertiary structure may also be conserved in alanine aminotransferase.

Alanine aminotransferase (GPT)¹ (EC 2.6.1.2) is a pyridoxal enzyme which catalyzes reversible transamination between alanine and 2-oxoglutarate to form pyruvate and glutamate. This enzyme localizes in both cytosol and mitochondria in various tissues including liver, heart, and skeletal muscle. The cytosolic enzyme is inducible by glucocorticoid administration, but the mitochondrial enzyme is not (Hopper & Segal, 1964). These isoenzymes participate in nitrogen metabolism and liver gluconeogenesis starting with precursors generated by muscular action (DeRosa & Swick, 1975). The enzyme is one of the two important aminotransferases, GOT and GPT, in clinical aspects, because the enzyme in blood is a representative diagnostic marker of human liver diseases. Physicochemical properties and turnover of the cytosolic enzyme have been described in a number of reports (Segal & Kim, 1963; Hopper & Segal, 1962; Bulos & Handler, 1965; Saier & Jenkins, 1967a,b; Gatehouse et al., 1967; Matsuzawa & Segal, 1968; Golichowski et al., 1977). The relationships between protein structure and function have been extensively studied with GOT (Jansson et al., 1985), but only a little with GPT. So far, only a 20 amino acid residue sequence around the pyridoxal 5'-phosphate (PLP) binding site of the pig heart enzyme has been reported by Tanase et al. (1979). The best preparation purified from rat liver by previous methods (Gatehouse et al., 1967; Matsuzawa & Segal, 1968) still showed two other minor components as judged by poly-

acrylamide gel electrophoresis. Recently, purification of the cytosolic enzyme from rat liver to absolute homogeneity as judged by SDS-PAGE was accomplished (Matsuzawa et al., unpublished results) by a modification of previous methods (Gatehouse et al., 1967; Matsuzawa & Segal, 1968). We herein report the complete amino acid sequence of the enzyme and discuss its structural resemblance to other aminotransferases.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Rat liver cytosolic GPT was purified to homogeneity as judged by SDS-PAGE with a modification of previous methods (Gatehouse et al., 1967; Matsuzawa & Segal, 1968) by octyl-Sepharose hydrophobic interaction chromatography, Sepharose CL-6B column chromatography, DEAE-Sepharose column chromatography, and crystallization successively, after the second ammonium sulfate precipitation. The highest specific activity of the crystalline preparation was 500 units/mg at 37 °C as assayed by the method of Segal and Matsuzawa (1970). A value of 6.9 for the absorbance at 278 nm (1%) was used for calculating the enzyme concentration.

Achromobacter protease I, which specifically cleaves lysyl bonds (Masaki et al., 1981), and arginylendopeptidase were generous gifts of Dr. T. Masaki of the Department of Agri-

[†] This work was supported in part by grants-in-aid from the Fujita Health University (to K. Titani and T.M.).

^{*} To whom correspondence should be addressed at the Division of Biomedical Polymer Science, Institute for Comprehensive Medical Science, School of Medicine, Fujita Health University, Toyoake, Aichi, Japan 470-11.

[‡] Fujita Health University.

[§] Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN).

¹ Abbreviations: API, *Achromobacter protease* I; BNPS-skatole, 2-[(2-nitrophenyl)sulfonyl]-3-methyl-3-bromoindolenine; GOT, aspartate aminotransferase; GPT, alanine aminotransferase; N^α, α -amino; PE, pyridylethyl; PLP, pyridoxal 5'-phosphate; PTH, phenylthiohydantoin; RP-HPLC, reversed-phase high-performance liquid chromatography; SDS-PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate; TAT, tyrosine aminotransferase; TFA, trifluoroacetic acid; TPCK, L-(1-tosylamino)-2-phenylethyl chloromethyl ketone; V8, *Staphylococcus aureus* V8.

cultural Chemistry, Ibaraki University (Ibaraki, Japan), and of Takara Shuzo Co. (Otsu, Japan), respectively. TPCK-treated trypsin was obtained from Cooper Biomedical (Malvern, PA). *Staphylococcus aureus* V8 protease was a product of Miles (Naperville, IL). Cyanogen bromide and BNPS-skatole were from Wako Pure Chemical (Osaka, Japan) and Pierce Chemical Co. (Rockford, IL), respectively.

Reduction and Pyridylethylation of GPT. GPT was reduced with tri-*n*-butylphosphine (Wako Pure Chemical) (Ruegg & Rudinger, 1977) and pyridylethylated with 4-vinylpyridine (Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo, Japan) (Hermanson et al., 1973) in the presence of 7 M guanidine hydrochloride, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5), and 1 mM EDTA in the dark at room temperature overnight. The reaction mixture was separated by gel permeation HPLC on tandem columns of TSK G3000 SW_{XL} (7.8 × 300 mm each) (Tosoh, Tokyo, Japan) in 6 M guanidine hydrochloride containing 10 mM sodium phosphate (pH 6.0), and then desalted by either gel filtration or dialysis and lyophilized.

Enzymatic Digestion and Chemical Cleavage. The PE-protein was digested overnight with API at a substrate to enzyme ratio of 200 (mol/mol) at 37 °C in 50 mM Tris-HCl, pH 9.0, containing 2.0 M urea. The enzyme was fully active in 2.0 M urea as reported by Masaki et al. (1981). Other enzymatic digestions were performed overnight at a substrate to enzyme ratio of 100 (mol/mol) at 37 °C in 0.1 M ammonium bicarbonate, pH 8.0. Peptides were separated by RP-HPLC using a Bakerbond WP-C4 column (4.6 × 50 mm; J. T. Baker, Phillipsburg, NJ). Further purification was carried out by RP-HPLC on a column of Superspher RP Select B (2.1 × 125 mm; Merck, Darmstadt, Germany) or Aquapore PH 300 (2.1 × 30 mm; Applied Biosystems, Foster City, CA) with gradients of acetonitrile into 0.1% aqueous TFA (Mahoney & Hermanson, 1980). The S-PE-protein was cleaved with cyanogen bromide in 70% formic acid as described by Gross (1967), and peptides were separated by RP-HPLC on an Aquapore PH 300 column. Cleavage with BNPS-skatole, dilute acid, concentrated HCl, or 70% formic acid followed the procedure of Omenn et al. (1970), Inglis (1983), Titani and Narita (1964), or Landon (1977).

Amino Acid and Sequence Analysis. Amino acid analysis was performed with a Hitachi Model L8500 amino acid analyzer or by the Waters Pico-tag system (Heinrikson & Meredith, 1984; Bidlingmeyer et al., 1984). Amino-terminal sequence analysis was performed with an Applied Biosystems Model 470A or 477A protein sequencer (Hewick et al., 1981) connected on-line to a Model 120A PTH analyzer. Mass spectral analysis was kindly performed by Dr. Carl J. March of Immunex, Seattle, WA, on a BioIon 20 Biopolymer mass analyzer (Applied Biosystems).

Homology Search, Hydropathy Index, and Secondary Structure Prediction. Homologous sequences were searched through protein sequence databases (NBRF-PIR and SWISS-PROT) using DNASIS (Hitachi Software Engineering). The hydropathy index was calculated by the method of Kyte and Doolittle (1982), and the secondary structure was predicted by the method of Chou and Fasman (1978). Multiple sequence alignment was performed by CLUSTAL (Higgins & Sharp, 1988).

RESULTS

Sequence Analysis. Sequenator analysis of the intact protein (320 pmol) yielded only minor signals under 8.2 pmol due to impurities in five cycles of degradation, indicating that the amino terminus of the protein is blocked. The blocking group was identified to be an acetyl group by mass spectral analysis

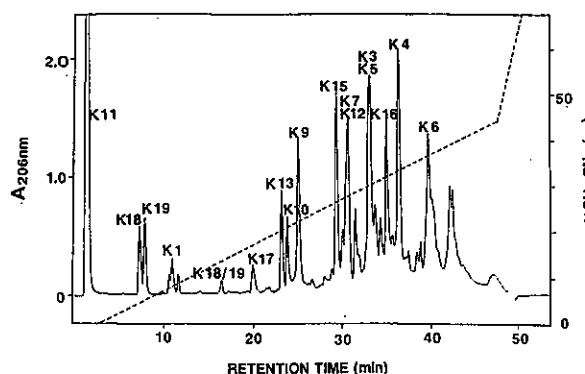


FIGURE 1: Primary separation of peptides generated by digestion with API. The digest (4 nmol) was separated on a Bakerbond WP-C4 column (4.6 × 50 mm) using a TFA/acetonitrile system at a flow rate of 0.5 mL/min. Peptides were monitored at 206 nm. Peptides are identified by the prefix K as in Figure 2.

of a peptide derived from the amino terminus of the PE-protein as later described.

The digest of the PE-protein (ca. 4 nmol) with API was separated into 16 fractions by RP-HPLC as shown in Figure 1. Three major fractions (K11, K7 and K12, and K3 and K5) were further purified on a Superspher RP Select B column or an Aquapore PH 300 column by RP-HPLC (data not shown). Sixteen major peptides designated as K1 through K19 except for K2, K8, and K14 (Table I), accounting for 99% of the entire protein, were thus isolated and subjected to sequence analysis. A free lysine (K8, residue 290) and two dipeptides, Gly-Lys (K2, residues 17–18) and Ala-Lys (K14, residues 389–390), were not recovered. They may have been overlooked in the breakthrough peak. Cyanogen bromide fragments of the PE-protein (ca. 4 nmol) were separated in a similar manner by RP-HPLC (data not shown). Thirteen peptides isolated, M1 through M17 except for M6, M12, M15, and M16, were analyzed to provide overlaps of 19 K peptides. The PE-protein was cleaved with 70% formic acid at a single Asp-Pro bond (residues 149–150). The mixture was separated by size-exclusion HPLC on tandem columns of TSK G3000 SW_{XL} and G4000 SW_{XL}. Peptide DP1 thus isolated was subjected to sequence analysis to fill gaps in the sequence obtained with peptide K5–E1. To obtain alignment of the six tryptic subpeptides of the peptide K6, a single tryptophanyl bond (between residues 213 and 214) in peptide K6 was cleaved with BNPS-skatole. After extraction of excess reagents with 1-chlorobutane, the mixture was separated by RP-HPLC. The isolated peptide K6–W1 was subjected to sequence analysis.

Analysis of 16 major K peptides (K1–K19) and their subpeptides provided most of the sequence as shown in Figure 2. Of the 16 peptides, only peptide K1 was N^α-blocked, as was the intact protein, indicating that this peptide was derived from the amino terminus of the protein. Mass spectral analysis of this peptide (ca. 200 pmol) showed that the peptide had an MH⁺ of 1773.9, in accord with the sequence of Ac-Ala-Ser-Arg-----.

Thus, analysis of 16 K and 13 M peptides and their subpeptides yielded the complete amino acid sequence of rat cytosolic GPT of 495 residues starting with Ac-Ala, as summarized in Figure 2.

Sequence Homology. Homology search through the two protein sequence databases (NBRF-PIR and SWISS-PROT) found only the 20-residue PLP binding site sequence of the pig GPT and rat TAT as related proteins. Functionally closely related GOT was not found among the 400 proteins which scored highest in the homology search. However, when the

Table I: Amino Acid Compositions of Intact PE-GPT and Its Peptides Derived by Digestion with API^a

Table 1. Amino Acid Compositions of Intact and Cleaved PE-GPT

peptide residue no.	K1 1-16	K3 19-56	K4 57-104	K5 105-168	K6 169-263	K7 264-289
Asp/Asn (D/N)	2.7 (3)	1.7 (2)	5.6 (5)	3.3 (6)	7.0 (7)	2.4 (3)
Thr (T)		1.5 (2)	2.3 (2)	1.7 (2)	3.2 (3)	
Ser (S)	2.7 (3)		1.8 (2)	4.6 (6)	2.4 (2)	2.1 (2)
Glu/Gln (E/Q)	2.8 (2)	6.1 (7)	7.3 (5)	6.0 (6)	14.6 (12)	5.2 (5)
Pro (P)		1.7 (2)	4.3 (5)	2.8 (3)	5.6 (6)	
Gly (G)	2.2 (1)	1.6 (2)	2.5 (2)	5.5 (7)	5.5 (5)	1.7 (2)
Ala (A)	2.0 (2)	2.0 (2)	5.0 (5)	5.3 (7)	10.6 (12)	2.0 (2)
Val (V)	1.2 (1)	3.7 (6)	2.1 (3)	2.2 (2)	6.0 (8)	2.0 (2)
Met (M)		0.8 (1)	1.1 (1)	0.8 (1)		1.2 (1)
Ile (I)		0.6 (1)	2.0 (3)	5.4 (8)	4.5 (6)	
Leu (L)	1.5 (1)	3.4 (5)	3.3 (4)	4.0 (4)	9.1 (11)	2.0 (2)
Tyr (Y)		0.8 (1)	0.9 (1)	1.5 (2)	3.2 (4)	1.6 (2)
Phe (F)			3.4 (4)	1.0 (1)	2.5 (2)	2.3 (3)
His (H)				0.8 (1)		0.6 (1)
Lys (K)	1.4 (1)	0.9 (1)	1.3 (2)	1.1 (1)	1.2 (1)	1.5 (1)
Arg (R)	2.1 (2)	4.2 (5)	3.1 (3)	4.7 (6)	10.0 (10)	
PE-Cys (C)		0.5 (1)	0.3 (1)	+ (1)	1.7 (5)	
Trp ^b (W)	ND (0)	ND (0)	ND (0)	ND (0)	ND (1)	ND (0)
total residues	16	38	48	64	95	26
yield (%)	84	55	50	75	23	69
peptide residue no.	K9 291-313	K10 314-337	K11 338-341	K12 342-372	K13 373-388	K15 391-422
Asp/Asn (D/N)		2.4 (2)		1.0 (1)		2.6 (2)
Thr (T)	1.1 (1)			1.0 (1)		1.2 (1)
Ser (S)	3.8 (4)			3.3 (4)		1.1 (1)
Glu/Gln (E/Q)	5.8 (4)	6.0 (4)	1.2 (1)	2.5 (2)	7.1 (6)	7.8 (6)
Pro (P)	1.9 (2)			5.9 (7)		4.0 (4)
Gly (G)	1.6 (1)	4.5 (5)	0.9 (1)	1.0 (1)		1.9 (2)
Ala (A)	1.9 (1)	1.8 (1)		1.1 (1)	4.0 (4)	2.8 (2)
Val (V)	2.1 (2)	2.9 (4)		2.9 (4)	0.8 (1)	2.5 (3)
Met (M)	1.9 (2)	1.8 (2)	0.8 (1)	2.7 (3)		1.0 (1)
Ile (I)						0.8 (1)
Leu (L)	1.6 (2)			2.7 (3)	1.4 (2)	2.2 (3)
Tyr (Y)	1.2 (1)	1.9 (2)				0.9 (1)
Phe (F)	1.0 (1)	1.0 (1)		1.0 (1)	0.8 (1)	1.7 (2)
His (H)	1.8 (1)					
Lys (K)	0.9 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	1.1 (1)	0.8 (1)	0.7 (1)
Arg (R)		1.0 (1)		1.0 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)
PE-Cys (C)		0.4 (1)		0.6 (1)		0.4 (1)
Trp ^b (W)	ND (0)	ND (0)	ND (0)	ND (0)	ND (0)	ND (0)
total residues	23	24	4	31	16	32
yield (%)	50	50	69	77	63	52
peptide residue no.	K16 423-475	K17 476-482	K18 483-489	K19 490-495	intact PE-GPT 1-495	
Asp/Asn (D/N)	1.9 (1)				29.3 (32)	
Thr (T)	2.6 (3)			1.2 (1)	17.3 (16)	
Ser (S)	1.5 (1)		1.3 (1)	1.2 (1)	24.5 (27)	
Glu/Gln (E/Q)	10.0 (9)	+ (1)		1.5 (1)	74.9 (71)	
Pro (P)	3.3 (4)				34.3 (33)	
Gly (G)	4.6 (6)				36.0 (36)	
Ala (A)	4.3 (3)		1.2 (1)		45.1 (44)	
Val (V)	1.9 (3)				36.4 (39)	
Met (M)	0.2 (3)				14.9 (16)	
Ile (I)	1.3 (2)				17.8 (21)	
Leu (L)	3.4 (6)	4.0 (4)	1.0 (1)		49.1 (48)	
Tyr (Y)	0.8 (1)			1.1 (1)	16.2 (16)	
Phe (F)	2.5 (4)		1.1 (1)	1.0 (1)	22.0 (22)	
His (H)	0.6 (1)		2.1 (2)	1.0 (1)	5.3 (7)	
Lys (K)	0.6 (1)	1.2 (1)	0.9 (1)		11.7 (19)	
Arg (R)	2.0 (2)	1.7 (1)			33.6 (33)	
PE-Cys (C)	0.8 (3)				14.5 (14)	
Trp ^b (W)	ND (0)	ND (0)	ND (0)	ND (0)	ND (1)	
total residues	53	7	7	6	495	
yield (%)	61	86	96	70		

^a Results are expressed as residues per peptide or protein by amino acid analysis or, in parentheses, from the sequence (Figure 2). Hydrolysis was carried out with 6 N HCl at 110 °C for 20 h. Each composition was calculated on basis of the integral value of the residue underlined. ^b Trp was not determined (ND).

search was repeated against known sequences of amino-transferases, it was noticed that GOT sequences show sequence similarity, although with marginal significance, in wider re-

gions. Common residues were scattered throughout almost the entire sequence but with very limited clustering. To evaluate whether the weak homology between GPT and GOT

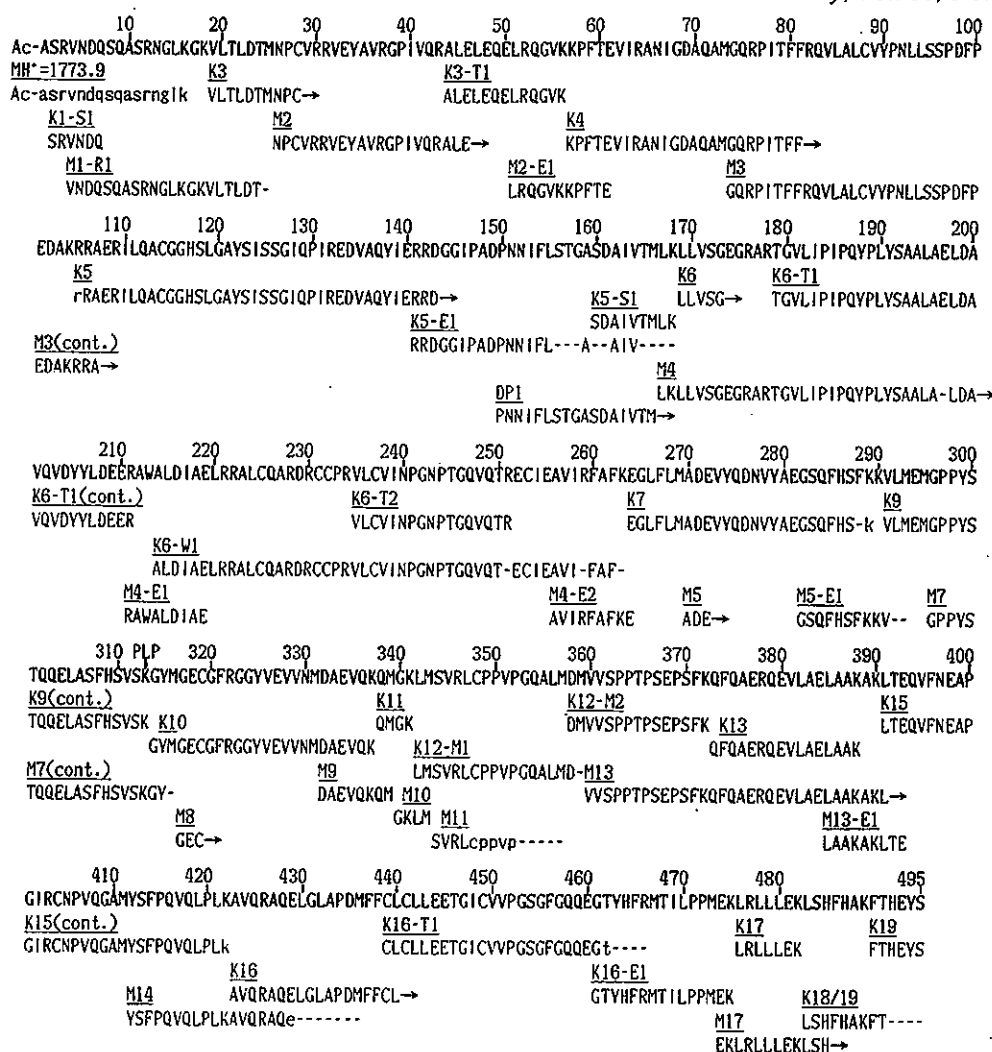


FIGURE 2: Summary of the sequence proof of rat liver GPT. The proven sequences of specific peptides (underlined) are given in one-letter code below the summary sequence (boldface type). Prefixes K and M denote peptides generated by cleavage of the S-PE-protein at lysyl bonds (with API) and methionyl bonds (with cyanogen bromide), respectively; DP indicates a peptide generated by cleavage of S-PE-GPT with 70% formic acid. The products of lysyl or methionyl cleavage are numbered from the amino terminus toward the carboxyl terminus of the protein. Subpeptides are identified by hyphenated suffixes, where the following code indicates the subdigesting agent: E, V8 protease; K, API; T, trypsin; R, arginylendopeptidase; S, chemical cleavage with 12 N HCl; M, chemical cleavage with cyanogen bromide; W, chemical cleavage with BNPS-skatole. Peptide sequences written in upper case letters are proven by Edman degradation unambiguously; those in lower case letters indicate tentative identifications. Unidentified residues are shown by dashes or horizontal arrows; the latter indicate long unidentified sequences. Ac denotes an acetyl group. The result of the mass spectral analysis of the N-terminal peptide is indicated above the N-terminal sequence in lower case letters. The putative PLP binding site is indicated at residue 313.

really reflects their evolutionary relationship, amino acid sequences of rat cytosolic GPT and aminotransferases of various origins were aligned by using a multiple sequence alignment program, CLUSTAL (Higgins & Sharp, 1988), with standard parameters. Close examination of the sequence alignment obtained revealed that most of the residues involved in binding of PLP and substrate in GOT are conserved in GPT, indicating that these two proteins are products of extensive divergent evolution. From the alignment, sequence identities between GPT and TAT, cytosolic GOT, and mitochondrial GOT were calculated to be 24.7%, 17.0%, and 16.0%, respectively (Figure 3).

Hydropathy Profile and Secondary Structure Prediction. The hydropathy profile of rat cytosolic GPT (Figure 4) indicated a rather even distribution of hydrophobic and hydrophilic regions throughout the molecule. When compared to that of rat cytosolic GOT, the general patterns were similar, especially in the middle of the molecule (the PLP binding large domain, residues ca. 88 through 385 by the numbering system in Figure 3). Prediction of secondary structure by the method of Chou and Fasman (1978) indicated the presence of α -helices (42.2%) and β -sheets (25.9%) in rat cytosolic GPT. Again,

some resemblance in the predicted structures of rat cytosolic GPT and GOT was found.

DISCUSSION

In general, proof of the sequence of rat GPT involved two primary sets of overlapping peptides derived by cleavage at either lysyl or methionyl bonds. A special problem was presented by an N^α-blocked amino terminus. Attempts to remove the acylamino acid from the N^α-blocked peptide K1 with acylamino acid releasing enzyme (Tsunasawa & Narita, 1976) failed. The N^α-blocked amino acid was finally identified to be an acetylated alanine residue by mass spectral analysis. Although most of the residues in the sequence were identified in the two complementary peptides, there are regions of relatively weak analytical proof at the single-residue overlaps aligning residues 210–212, 263–265, 290–292, and 357–359. The first of these occurred in peptides K6 and M4. From the substrate specificity of V8 protease, the sequence of M4–E1 was most likely preceded by Glu or Asp. The single Asp-Arg in M4 was firmly placed at residues 229–230 in the analysis of K6–W1, and the only possible place to put M4–E1 was at residues 211–219 to overlap K6–T1 to K6–W1. Among the

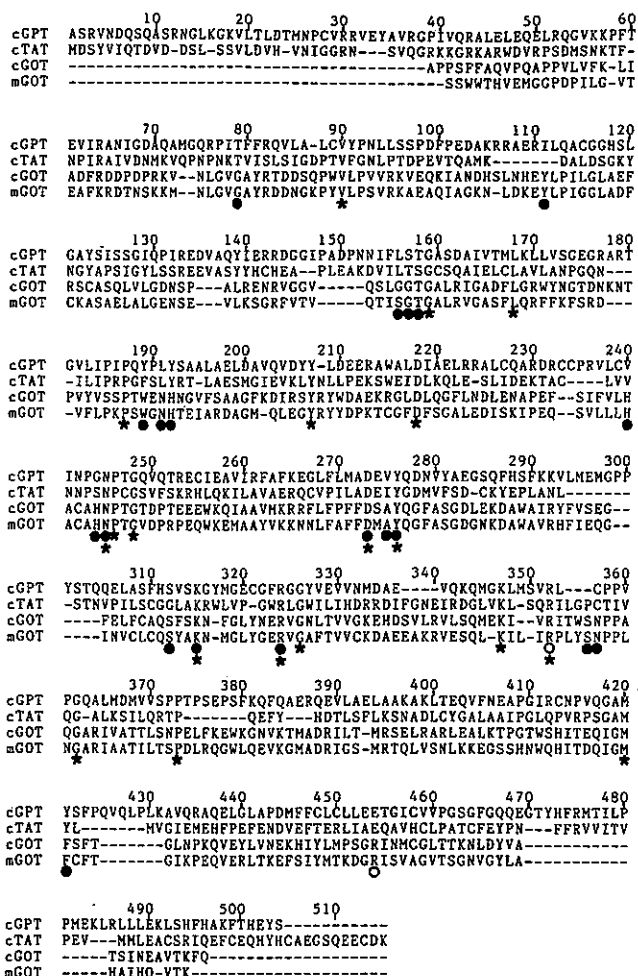


FIGURE 3: Sequence alignment of rat aminotransferases. Asterisks indicate residues conserved among the sequences. The substrate binding residues in GOT (Arg-292 and Arg-386 in cytosolic GOT) are marked with open circles. Filled circles indicate the residues present in the PLP binding pocket. cGPT, cytosolic GPT; cTAT, cytosolic TAT (Grange et al., 1985); cGOT, cytosolic GOT (Hayashi et al., 1987); mGOT, mitochondrial GOT (Huyuh et al., 1980). In Huyuh et al. (1980), glycine was assigned at position 189 but corrected to tryptophan in Kondo et al. (1987).

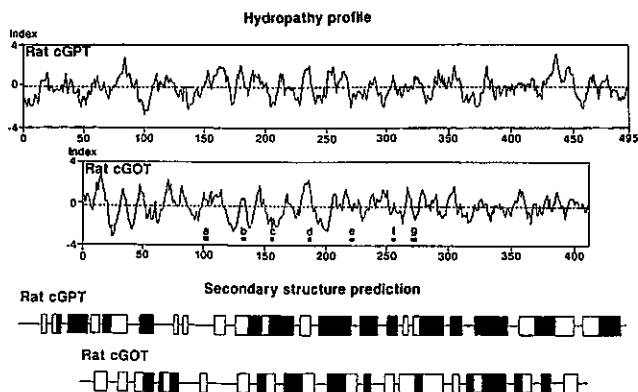


FIGURE 4: Comparison of the hydropathy profile and the predicted secondary structure of rat cytosolic GPT with those of rat cytosolic GOT. The hydropathy profiles were calculated by the method of Kyte and Doolittle (1982) with a window size of 7. The midpoint dashed line corresponds to the grand average of the hydropathy of the protein. Horizontal bars below the hydropathy profile of rat cytosolic GOT indicate the putative locations of β -sheets participating in the seven-stranded pleated-sheet structure which correspond to pig cytosolic GOT of known tertiary structure (Jansonius et al., 1985). Seven β -sheets are labeled a-g. The secondary structures were predicted according to the method of Chou and Fasman (1978). Closed and open boxes indicate α -helix and β -sheet, respectively. cGPT, cytosolic GPT; cGOT, cytosolic GOT.

API peptides, only K7 had the amino-terminal Glu. Therefore, the sequence of M4-E2 clearly indicated the overlap between K6 and K7. The weakest overlap at residues 290-292 was supported by the amino acid composition of M5 (D/N 2.9, E/Q+Hse 5.0, S 2.0, G 1.2, A 2.0, V 2.9, L 1.0, F 1.9, K 1.8, H 1.2, and Y 1.8 mol/mol of peptide). The remaining one occurred at the middle of K12, and the compositional data of K12 (Table I) were in good agreement with the conclusion (Figure 2). From the present study, the rat GPT subunit is composed of 495 residues. The molecular weight of this subunit, calculated from the amino acid sequence, is 55 018, which is in good agreement with a molecular weight of about 55 000 estimated by SDS-PAGE.

Three important results emerged from the determination of the complete amino acid sequence of rat liver cytosolic GPT.

(1) The active enzyme with a molecular weight of 114 000 (Gatehouse et al., 1967) should be a homodimer containing 2 mol of PLP.

(2) The PLP binding site of rat liver GPT is most likely Lys-313. The sequence of residues Gln-303 to Arg-322 of rat liver GPT presented herein coincided with the 20-residue sequence around the PLP binding lysyl residue of pig heart GPT reported by Tanase et al. (1979) except for only a single residue replacement of Tyr-315 to Phe. This also suggests that the sequence around the PLP binding site is highly conserved in GPT beyond tissue and species differences.

(3) The amino acid sequence of rat liver cytosolic GPT presented herein is quite unique among those of pyridoxal enzymes with known structure registered in updated protein databases. The detailed sequence homology search, however, indicated that rat liver GPT is significantly homologous to those of rat liver cytosolic GOT and mitochondrial GOT with 17.0% and 16.0% identity, respectively, and moderately homologous to that of rat liver TAT with 24.7% identity as shown in Figure 3. Mitochondrial GOT was reported to have catalytic activity also toward alanine and aromatic amino acids at 10^5 and 10^3 times slower rates, respectively, than dicarboxylic substrates (Mavrides & Christen, 1978). In this regard, it is interesting that the sequence of GPT is more homologous to that of TAT than that of mitochondrial GOT (Figure 3). The sequence homology between GPT and other α -aminotransferases is much higher in the middle portion comprising the active-site large domain than the amino- and carboxyl-terminal portions comprising the small domain involved in the substrate specificity. In spite of rather low homology to GOT, most of the crucial amino acid residues providing hydrogen bonds to PLP at the PLP binding pocket in the large domain of both cytosolic and mitochondrial GOT with known tertiary structure are also retained in rat liver cytosolic GPT as shown in Figure 5. Furthermore, the tertiary structures of cytosolic and mitochondrial GOTs resemble each other despite rather extensive divergence in their sequences. These suggest that the topology of secondary structures surrounding the PLP binding site in the large domain of GOT, containing a large pleated-sheet structure composed of seven β -strands and sandwiched in eight helices, revealed by X-ray crystallography (Jansonius et al., 1985), may also be conserved in rat liver GPT. Some resemblance in the tertiary structure between GPT and GOT, particularly in the large domain binding to PLP, is also suggested by comparison of the hydropathy index and the secondary structures predicted for GPT with those of GOT as shown in Figure 4.

Two arginyl residues (residues 292 and 386) are involved in substrate binding in pig cytosolic GOT (Figure 5). As seen in the alignment (Figure 3), corresponding residues to Arg-292

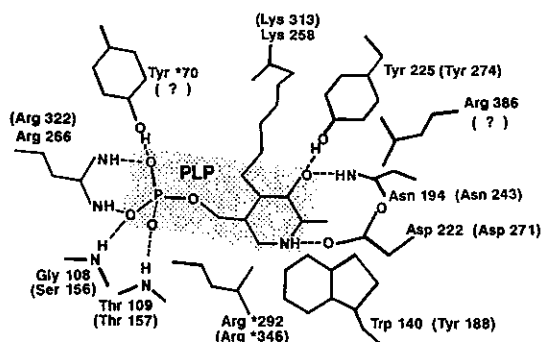


FIGURE 5: Active center of pig cytosolic GOT (rat cytosolic GPT). The shadowed area indicates pyridoxal 5'-phosphate (PLP). All side chains interacting with either the coenzyme PLP or the substrate are included. Residues belonging to the adjacent subunit are labeled with asterisks. The putative residues in the active center of rat cytosolic GPT are indicated in parentheses.

in GOT, which binds the β -carboxyl group of the substrate, are conserved in GPT and TAT, but those of Arg-386 appear to be substituted. The small domain regions containing Arg-386 are so poorly conserved that any change in parameters (i.e., gap penalties) results in different alignment. It is possible that the Arg-386 in GOT, which binds the α -carboxyl group of the substrate, is conserved as Arg-466 in GPT or Arg-417 in TAT as indicated for the latter in the alignment of Mehta et al. (1989). More sequence information is necessary for the real evolutionary alignment for regions of the small domain. It is interesting to see how the tertiary structure of GOT is conserved in GPT and TAT.

It seems clear that GPT is a member of the family of α -aminotransferases but it is more closely related to TAT than GOT and others in sequence homology and length of polypeptides. This suggests that GPT and TAT have diverged from a GOT family at an earlier stage of evolution.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Dr. Harold L. Segal of the State University of New York at Buffalo for his interest and encouragement throughout this study and critical reading and editing of the manuscript and to Dr. Carl J. March of Immunex, Seattle, WA, who kindly performed mass spectral analysis of peptides. We are also grateful to Ms. Atsuko Nagata for typing the manuscript.

REFERENCES

- Bidlingmeyer, B. A., Cohen, S. A., & Tarvin, T. L. (1984) *J. Chromatogr.* 336, 93-104.
- Bulos, B., & Handler, P. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 3283-3294.
- Chou, P. Y., & Fasman, G. O. (1978) *Annu. Rev. Biochem.* 47, 251-276.
- DeRosa, G., & Swick, R. W. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 7961-7967.
- Gatehouse, P. W., Hopper, S., Schatz, L., & Segal, H. L. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 2319-2324.
- Golichowski, A., Harruff, R. C., & Jenkins, W. T. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 178, 459-467.
- Grange, T., Guenet, C., Dietrich, J. B., Chasserot, S., Fromont, M., Befort, N., Jami, J., Beck, G., & Pictet, R. (1985) *J. Mol. Biol.* 184, 347-350.
- Gross, E. (1967) *Methods Enzymol.* 11, 238-255.
- Hayashi, H., Horio, Y., Tanaka, T., Taketoshi, M., & Wada, H. (1987) in *Biochemistry of Vitamin B₆* (Korpela, T., & Christen, P., Eds.) pp 39-42, Birkhäuser, Basel.
- Heinrikson, R. L., & Meredith, S. C. (1984) *Anal. Biochem.* 136, 65-74.
- Hermanson, M. A., Ericsson, L. H., Neurath, H., & Walsh, K. A. (1973) *Biochemistry* 12, 3146-3153.
- Hewick, R. M., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E., & Dreyer, W. J. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 7990-7997.
- Higgins, D. G., & Sharp, P. M. (1988) *Gene* 73, 237-244.
- Hopper, S., & Segal, H. L. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 3189-3195.
- Hopper, S., & Segal, H. L. (1964) *Arch. Biochem. Biophys.* 105, 501-505.
- Huyuh, Q. K., Sakakibara, R., Watanabe, T., & Wada, H. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97, 474-479.
- Inglis, A. S. (1983) *Methods Enzymol.* 91, 324-332.
- Jansonius, J. N., Eichele, G., Ford, G. C., Picot, D., Thaller, C., & Vincent, M. G. (1985) in *Transaminase* (Christen, P., & Metzler, D. E., Eds.) pp 110-138, Wiley, New York.
- Kondo, K., Wakabayashi, S., & Kagamiyama, H. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 8648-8659.
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982) *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- Landon, M. (1977) *Methods Enzymol.* 47, 145-149.
- Mahoney, W. C., & Hermanson, M. A. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11199-11203.
- Masaki, T., Tanabe, M., Nakamura, K., & Soejima, M. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 660, 44-50.
- Matsuzawa, T., & Segal, H. L. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 5929-5934.
- Mavrides, C., & Christen, P. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85, 769-773.
- Mehta, P. K., Hale, T. I., & Christen, P. (1989) *Eur. J. Biochem.* 186, 249-253.
- Omenn, G. S., Fontana, A., & Anfinsen, C. B. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 1895-1902.
- Ruegg, U., & Rudinger, J. (1977) *Methods Enzymol.* 47, 111-116.
- Saier, M. H., & Jenkins, W. T. (1967a) *J. Biol. Chem.* 242, 91-100.
- Saier, M. H., & Jenkins, W. T. (1967b) *J. Biol. Chem.* 242, 101-108.
- Segal, H. L., & Kim, Y. S. (1963) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 50, 912-918.
- Segal, H. L., & Matsuzawa, T. (1970) *Methods Enzymol.* 17A, 153-159.
- Tanase, S., Kojima, H., & Morino, Y. (1979) *Biochemistry* 18, 3002-3007.
- Titani, K., & Narita, K. (1964) *J. Biochem. (Tokyo)* 56, 241-265.
- Tsunasawa, S., & Narita, K. (1976) *Methods Enzymol.* 45, 552-561.

アラニンアミノ基転移酵素の構造に関する研究
—ラット及びヒト肝サイトゾルアラニン
アミノ基転移酵素の全アミノ酸配列決定—
Structural Studies on Alanine Aminotransferase
—Complete Amino Acid Sequence of
Human and Rat Liver Cytosolic
Alanine Aminotransferase—

石 黒 麻利子 *Mariko Ishiguro*



藤田学園医学会誌
臨時増刊第11巻第3号別刷

Reprinted from
THE FUJITA MEDICAL SOCIETY
September 1992

アラニンアミノ基転移酵素の構造に関する研究

—ラット及びヒト肝サイトゾルアラニンアミノ基転移酵素の全アミノ酸配列決定—

藤田保健衛生大学医学部

総合医科学研究所・医高分子学研究部門（指導教授：千谷晃一）

石 黒 麻利子

序 論

アミノ基転移酵素 (EC 2.6.1) は、高等動物から微生物に至るまで広く存在する、アミノ酸代謝に必須の酵素群である。1937年、Braunstein と Kritzman は、動物においてグルタミン酸のアミノ基がピルビン酸に移り、アラニンと α -ケトグルタル酸が作られることを発見した。その後、種々のアミノ酸から α -ケトグルタル酸にアミノ基が転移してグルタミン酸が生成することが明らかとなった。1945年、Snell¹により、アミノ基転移反応はアミノ酸とケト酸の間で直接起こるのではなく、ピリドキサルリン酸 (PLP) 及びピリドキサミンリン酸 (PMP) を介して起こる事が見いだされた。アミノ基転移酵素の研究は、主にアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (GOT) を中心に行われ、その成果によりアミノ基転移酵素の構造や構造と機能の関係、アミノ基転移反応機構等について詳細な知見が蓄積されてきた。アラニンアミノ基転移酵素 (GPT) は、GOT に比べ不安定で、絶対量も少なく、構造解析に必要な充分量の試料の精製が困難であった事から、その構造は殆ど明らかにされていなかった。一方、タンパク質の一次構造決定法については、従来のタンパク質によるアミノ酸配列決定法に変わり、近年の遺伝子操作技術の発展を反映し、cDNA クローニングによる構造推定が盛んに用いられるようになってきている。しかし、筆者は、微量な試料を、タンパク質の一次構造解析法により分析し、迅速にラット及びヒト肝サイトゾル GPT の全アミ

ノ酸配列を決定することに成功した。本研究は、世界に先駆け初めてアラニンアミノ基転移酵素の全アミノ酸配列を決定し、その高次構造を推定した点と、タンパク質を用いた微量迅速構造決定法の改善という二つの点で意義のあるものと確信している。

第1章 ラット肝アラニンアミノ基転移酵素の全アミノ酸配列決定

第1節 緒 言

アラニンアミノ基転移酵素 (EC 2.6.1.2) は、GPT (glutamic pyruvic transaminase) と呼ばれ、 L -alanine + 2-oxoglutarate $\rightleftharpoons$ pyruvate + L -glutamate の可逆的アミノ基転移反応を触媒して、窒素排泄と糖新生に関与するピリドキサル酵素の一種である。本酵素は、サイトゾルとミトコンドリアに2種類のアイソザイムが存在し⁴⁻⁶、サイトゾルの GPT はグルココルチコイドにより誘導されるが、ミトコンドリアの酵素は誘導されないことが知られている⁷。生体内では、肝臓、腎臓、心臓、筋肉など殆どの臓器に分布している。未変性状態の酵素は、1分子当り 2 mol の PLP を含み、その分子量は 114,000 ダルトンである⁸。サブユニットの分子量が約 55,000 ダルトンであることから、2 個のほぼ同一のサブユニットから構成されるホモダイマーと考えられている。サイトゾル GPT の物理化学的性質や代謝に関し、現在まで多くの報告がなされてきた⁸⁻¹⁴。一方、タンパク質の構造や、構造と機能の相関については、機能的に類

似している GOT では詳しく研究され、多くのアミノ酸配列情報が蓄積されてきている。ブタ、ニワトリ、大腸菌などの GOT の X 線結晶解析が行われ、活性中心の立体構造と有機化学的データにより触媒反応機構の解明が進められている。¹⁵⁻¹⁷ 更に、近年の遺伝子操作技術の進展により、アミノ酸残基の部位特異的変異による反応機構の検証が可能となり、活性中心に存在する各アミノ酸残基の役割についての新たな知見も報告されてきている。しかし、GPT は量的な問題などからこれまで研究対象として取り上げられず、本研究以前に報告された構造解析は、ブタ心筋 GPT の PLP 結合部位を含む20残基のアミノ酸から構成されるペプチドの一次構造のみで、¹⁸ GPT の構造や、構造と機能の相関については殆ど明らかにされていなかった。しかし、本学松澤健夫教授が、従来の GPT 精製法 (Gatehouse らや、Matsuzawa らが1967年、1968年にそれぞれ報告した方法では、精製酵素のポリアクリルアミドゲル電気泳動で、主成分の他に2つのマイナー成分が出現する) を改良し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で完全に均一の成分として同定されるラット肝サイトゾル GPT の精製に成功した事から、本酵素の構造研究の道が開けたのである。本研究では、ラット肝サイトゾル GPT の全アミノ酸配列を決定し、その全一次構造を、他の α -アミノ基転移酵素と比較することにより、相同性、立体構造の推定やタンパク質の構造上・機能上の関連性及び分子進化についての検討を行った。

第2節 実験材料及び方法

1-2-1 実験材料

ラット肝サイトゾル GPT は、松澤教授により従来法を改変した方法、即ち2度の硫酸アンモニウム分画後、オクチルセファロース、セファロース CL-6B、DEAE-セファロースカラムクロマトグラフィーで順次精製後、結晶化され

た。Segal & Matsuzawa²⁰ の活性測定法により測定した結晶精製酵素の比活性値は、37℃で500unit/mgであった。Lys-X 結合を特異的に切断するアクロモバクタープロテアーゼ I (API)²¹ 及び、Arg-X 結合に作用するアルギニルエンドペプチダーゼは、それぞれ茨城大学農学部正木武治教授及び宝酒造社から贈与いただいた。TPCK-処理トリプシンは Cooper Biomedical 社 (Malvern, PA) 製を使用した。Staphylococcus aureus V8プロテアーゼ (V8プロテアーゼ) は Miles 社 (Naperville, IL) より、臭化シアンと BNPS-スカトールはそれぞれ和光純薬社と Pierce Chemical 社 (Rockford, IL) より購入した。アシルアミノ酸遊離酵素 (AARE) は宝酒造社製を、又ピログルタミルペプチダーゼはナカライテスク社製を用いた。

1-2-2 還元とピリジルエチル化

0.1M トリス-HCl (pH8.5)、1 mM EDTA 及び7M 塩酸グアニジンの存在下、精製酵素をトリ-n-ブチルフォスフィン (和光純薬社製) で還元し、²² 4-ピニルピリジン (東京化成社製) を加え、暗所一夜室温でピリジルエチル化 (PE) を行った。²³ 反応生成物は、10mM リン酸ナトリウム (pH6.0) を含む 6M 塩酸グアニジン溶液で平衡にした TSK G3000 SW_{XL} カラム (7.8×300mm; トーソー社製) を2本連結したゲル濾過カラムを用い、高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) 装置 (モデル HP1090 liquid chromatograph; Hewlett Packard 社製) によって精製した。得られた PE 化酵素 (PE-タンパク質) は、超純水に対する透析により脱塩後、凍結乾燥した。この操作により4.2mgの出発酵素より1.3mg (サブユニットとして23.6nmol) の PE 化酵素が得られた。

1-2-3 GPT の初期断片化

PE-タンパク質は、2.0M 尿素を含む50mM トリス-HCl (pH9.0) に溶解した後、基質/酵素 (mol/mol) = 200の割合で API を加え、37℃で一夜消化した。正木らが報告しているように、

API は尿素, グアニジン, SDS などによる変性に対して非常に強い抵抗性を示し, 2.0M 尿素存在下でも, 酵素活性を保持する。反応終了後, 70% ギ酸で消化物の pH を下げ (pH 2 付近), トリフルオロ酢酸-アセトニトリル系を移動相とした Bakerbond WP-C4 カラム (4.6 × 50mm; J. T. Baker 社製) による逆相 HPLC で分離した。単離出来なかったペプチド断片は更に Superspher RP Select B カラム (2.1 × 125mm; Merck 社製), または Aquapore PH 300 カラム (2.1 × 30mm; Applied Biosystems (ABI) 社製) を用いた逆相 HPLC で再精製した。また, PE-タンパク質を, Gross の方法により 70% ギ酸に溶解後, 臭化シアンで室温一夜切断した。分解物は凍結乾燥後, Aquapore PH 300 カラムによる逆相 HPLC により分離した。精製ペプチドは Pico-Tag システム (Waters 社) でアミノ酸組成 (後述) を, ABI 社製モデル 470A または 477A プロテイン・シーケンサーでアミノ酸配列を決定した。²⁶

1-2-4 ペプチドの再断片化

大きなペプチドやアミノ末端ペプチドは, トリプシン, V8プロテアーゼあるいはアルギニルエンドペプチダーゼによる酵素消化や, 12N 塩酸, 2% ギ酸または BNPS-スカトールによる化学的切断法により更に断片化し, 逆相 HPLC で分離した。精製したサブペプチドは, プロテイン・シーケンサーで分析した。

1) トリプシン消化: 大きいサイズのペプチドは, 完全に乾燥すると溶解し難くなる為, 出来るだけ少量になるよう濃縮した。小さいサイズのペプチドは完全に乾燥した。これらの試料を, 0.1M 重炭酸アンモニウム (pH 8.0) 緩衝液に溶解する。酵素を重量比で基質の 2% 加える。アミノ酸 20 残基以下の小さいサイズのペプチドの消化には, モル比で 2% の酵素を添加した。又, 尿素の存在下で酵素消化を行う場合には, 重量比で基質の 5% に相当する量の酵素を加えた。よく混和後 37°C で一夜消化した。反応終了

後, 少量の 70% ギ酸を添加して pH を下げた後, 逆相 HPLC カラムで分離した。

2) V8プロテアーゼ消化: 0.1M 重炭酸アンモニウム (pH 8.0) 中, 基質/酵素 (mol/mol) = 100 で 37°C, 一夜消化を行った。

3) アルギニルエンドペプチダーゼ消化: 最適 pH は 8.0~9.0 で, 50mM トリス-HCl (pH 9.0) 中, 基質/酵素 (mol/mol) = 50 で 37°C, 3 時間消化した。

4) セリン及びトレオニン残基のアミノ基側での切断: 12N 塩酸中, セリンはトレオニンより切断され易い。²⁹ セリンやトレオニンを含むペプチドを濃塩酸中で室温 15~24 時間放置し, 部分加水分解した。³⁰

5) アスパラギン酸 (アスパラギン) を含む結合の切断: 酸として, 特級ギ酸 (98~100%) 2 ml を超純水で 100ml に希釈したもの (溶液の pH は 2 ± 0.04 となる) を用い, 真空封管中 108°C で 2 時間加熱する。反応時間を 2 時間に限定する事により切断の特異性が高まる。反応時間が長くなると, アスパラギンの脱アミドにより新しく生じたアスパラギン酸を含むペプチド結合も切断されてくる。アスパラギン酸及びアスパラギン残基両者を切断する目的では, 反応時間を 5 時間に延長して反応させた。

6) トリプトファン (Trp-X) 結合の切断:^{32, 33} ラット肝サイトゾル GPT の API 消化物を逆相 HPLC カラムにより分離中, トリプトファンに特徴的な吸収がモニターされた。このトリプトファンの含有を示した K ペプチド (K6) を, Omenn らの方法に従い BNPS-スカトールで以下の要領で切断後分離した。(1) 1 nmol の K6 ペプチドを濃縮後, 80 μ l の氷酢酸を加え混合。(2) 0.5mg の BNPS-スカトールを添加。(3) 20 μ l の超純水を加え混合。(4) 密封遮光し, 時々ボルテックスで攪拌しながら室温で 6 時間反応。(5) 反応終了後, 等量の超純水で希釈。(6) 200 μ l の 1-クロロブタンで 3 回抽出。(7) 下層 (水相) を濃縮遠心器で乾燥。(8) 反応生成物を

希ギ酸溶液に溶解後、逆相 HPLC カラム Aquapore RP 300 (2.1×30mm) を用い分離。精製ペプチドはプロテイン・シーケンサーで分析し、アミノ酸配列を決定した。

1-2-5 インタクト PE-タンパク質のアスパラギン酸-プロリン (Asp-Pro) 結合の切断

以上に述べた方法で同定出来なかったアミノ酸配列を決定するため、インタクト PE-タンパク質の Asp-Pro 結合を、70%ギ酸で切断し、プロテイン・シーケンサーで分析してオーバーラップの証明に用いた。Asp-Pro 結合は、70%ギ酸溶液中で、37℃48時間切断した³⁴。トリプトファンはこの反応で分解される。反応混合物は、6M 塩酸グアニジン溶液 (pH6.0) で平衡にした TSK G3000SW_{XL} と G4000SW_{XL} カラム (7.8×300mm) を連結したゲル濾過 HPLC カラムにより分離後、溶出液に33%酢酸を用いたセファデックス G25 (Pharmacia LKB 社製) のカラム (10×115mm) で脱塩を行った。

1-2-6 タンパク質の組成分析

インタクト PE-タンパク質とその断片化により得られた種々のペプチドのアミノ酸組成の定量分析を、酸加水分解後、アミノ酸自動分析法により行った。加水分解操作は、チロシン保護の為 1%フェノールを添加した6N 塩酸を用い、気相法で110℃20時間加水分解を行った。アミノ酸分析は、日立モデル L8500アミノ酸分析装置または Waters Pico-Tag システムを用いて行った^{35,36}。

1-2-7 アミノ末端閉鎖基の確認

タンパク質の α -アミノ基が置換されている場合、そのアミノ末端アミノ酸配列は直接エドマン分解法では同定することが出来ない。インタクト PE-タンパク質のシーケンス分析の結果、アミノ末端が閉鎖されていることがわかり (1-3-1 参照)、アミノ末端から単離したペプチドを用い、以下の方法でアミノ末端閉鎖基の確認を行った。

1) AARE: タンパク質のアミノ末端 α -アミノ基の修飾残基の内、アセチル基による修飾が最も頻繁に見いだされる。N-アシル化タンパク質の一次構造解析法として、AARE (acylamino-acid-releasing enzyme) を用いてアミノ末端アシルアミノ酸を遊離後、アミノ酸配列を同定する方法が報告されている^{37,38}。AARE が作用するのは短いペプチドの場合であり、直接 N-アシル化タンパク質からアシルアミノ酸を遊離することはできない。酵素反応は、アミノ末端由来 API ペプチド (K1) 500pmol を 10mmol リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) に溶解後、AARE (宝酒造社製) を基質/酵素 (mol/mol) = 200の割合で加え、37℃ 3時間反応させた。反応物は、少量の70%ギ酸で pH を下げて、Superspher RP Select B カラムによる逆相 HPLC で分離した。

2) ピログルタミルペプチダーゼ: タンパク質やペプチドには、アミノ末端がピログルタミン酸残基 (PCA) で保護されているものも多数存在する。又、タンパク質一次構造決定の際、タンパク質やペプチドが加水分解されて生じた新しいアミノ末端グルタミンが、非酵素的に閉環して PCA-ペプチドが形成される。こうした PCA-ペプチドのアミノ末端ピログルタミンを特異的に遊離する酵素 (ピログルタミルペプチダーゼ (EC 3.4.19.3)) が、いくつかの生物種のもので精製され市販されている。実際の使用に当たっては、アミノ末端由来ペプチド K1 (100pmol) を 5 mM ジチオトレイトール、10mM EDTA を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH8.0) に溶解した後、0.02mU のピログルタミルペプチダーゼ (ナカライテスク社製) を加え、窒素ガスを軽く吹き付けて反応容器内を充分置換した後、37℃一夜消化した。^{40,41}

3) 質量分析: アミノ末端から単離したペプチド K1は C. J. March 博士 (Immunex 社研究所, Seattle, WA) によりモデル20バイオポリマー・マスアナライザー (ABI 社製) を用いて分析

して頂いた (方法の詳細は 2-2-8 参照)。
1-2-8 相同性の探査, ホモロジープロット, 疎水性の予測及び 2 次構造の推定

構造解析の結果得られたタンパク質の全一次構造は, コンピュータを利用して, 相同性探査, ホモロジープロット, 疎水性の予測及び二次構造の推定を行った。相同性の探査は, 日立ソフトウェアエンジニアリング社製プログラム DNASIS を利用し, タンパク質一次構造データベース (NBRF-PIR 及び SWISS-PROT) を用いて行った。タンパク質のホモロジープロットは, 1) Ala=Ser=Thr=Pro=Gly, 2) Asn=Gln=Asp=Glu, 3) His=Arg=Lys, 4) Met=Leu=Ile=Val, 5) Trp=Tyr=Phe のように, それぞれ相同なアミノ酸とみなし, チェックサイズ 12, マッチング数 6 のパラメータを用いて表示させた。疎水性の予測と二次構造の推定は, それぞれ, Kyte & Doolittle の方法と Chou & Fasman の方法を用いた。一次構造のアラインメントは CLUSTAL プログラムを用いて行った。

第 3 節 結 果

1-3-1 ラット肝サイトゾル GPT の全一次構造

インタクト PE-タンパク質 (320pmol) をプロテイン・シーケンサーで分析したところ, 5 サイクルの分析で有意なシグナルが得られなかったことから (8.2pmol 以下), タンパク質のアミノ末端は閉鎖されていると推定した。アミノ末端閉鎖基は, PE-タンパク質のアミノ末端から単離されたペプチド (K1) の質量分析の結果からアセチル基であることが明らかになった (後述)。

PE-タンパク質の API 消化物 (約 4 nmol) は図 1-A に示すように逆相 HPLC で 16 のフラクションに分離した。そのうち 3 つの主要なフラクション (K11 と K7, K12 と K3, K5) は別種カラムによる逆相 HPLC で更に分離精製した

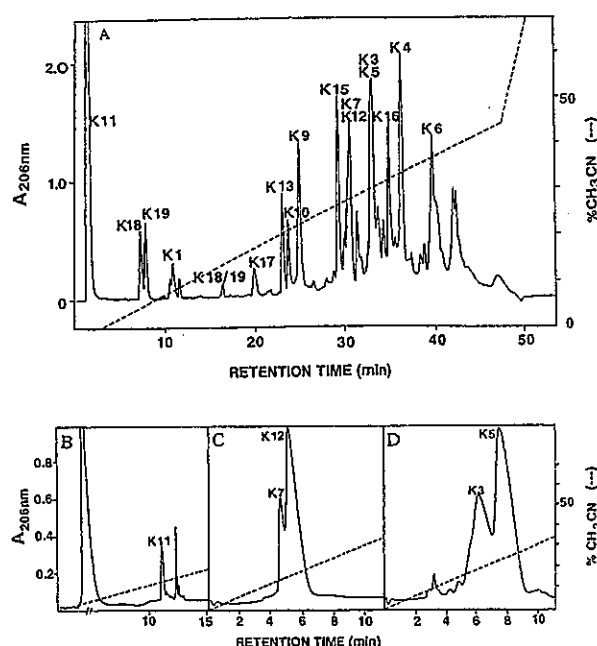


図 1 PE-ラット GPT の API 消化物の逆相 HPLC による分離
A: 一次分離のパターン。Bakerbond WP-C4 カラム (4.6×50mm) 使用。流速=0.5ml/min。
B-D: K11, K7 と K12 及び K3 と K5 の逆相 HPLC カラムによる再精製のパターン。B) Superspher RP Select B カラム (2.1×125mm) 使用。流速=0.2ml/min。
C 及び D) Aquapore PH 300 カラム (2.1×30mm) 使用。流速=0.3ml/min。

表 1 インタクト PE-ラット GPT とその API ペプチドのアミノ酸組成

Peptide	K1	K3	K4	K5	K6	K7	K9	K10
Residue No.	1-16	19-26	37-104	105-168	169-263	264-289	291-313	314-337
Asp/Asn(D/N)	2.7 (3)	1.7 (2)	5.6 (3)	3.3 (6)	7.0 (7)	2.4 (3)	1.1 (1)	2.4 (2)
Thr	1.5 (2)	2.3 (2)	2.3 (2)	1.7 (2)	2.2 (3)	2.1 (2)	3.2 (4)	6.0 (4)
Ser	2.7 (2)	2.0 (3)	2.0 (3)	4.6 (6)	2.4 (3)	2.1 (2)	3.2 (4)	6.0 (4)
Glu/Gln(E/Q)	2.8 (3)	4.1 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)	1.6 (1)	2.1 (2)	1.9 (2)	4.5 (3)
Pro	1.7 (2)	1.7 (2)	4.3 (2)	2.8 (3)	5.0 (6)	1.7 (2)	1.9 (2)	4.5 (3)
Gly	2.2 (1)	1.6 (2)	2.1 (2)	2.3 (2)	10.6 (12)	2.0 (2)	1.9 (2)	1.8 (1)
Ala	2.0 (2)	2.0 (2)	2.1 (2)	2.3 (2)	6.0 (8)	2.0 (2)	2.1 (2)	2.9 (2)
Val	1.7 (2)	2.7 (2)	2.1 (2)	2.2 (2)	6.0 (8)	1.7 (2)	1.9 (2)	1.8 (1)
Met	0.8 (1)	0.8 (1)	1.1 (1)	0.8 (1)	0.4 (1)	1.2 (1)	1.9 (2)	1.8 (1)
Ile	0.4 (1)	0.4 (1)	0.4 (1)	0.4 (1)	0.4 (1)	1.2 (1)	1.9 (2)	1.8 (1)
Leu	1.5 (1)	2.4 (2)	2.3 (2)	4.0 (4)	9.1 (11)	2.0 (2)	1.4 (2)	1.9 (2)
Tyr	0.6 (1)	0.6 (1)	1.0 (1)	1.7 (2)	2.3 (2)	1.7 (2)	1.7 (2)	1.7 (2)
His	1.4 (1)	0.8 (1)	1.3 (2)	1.1 (1)	1.2 (1)	1.5 (1)	0.9 (1)	0.9 (1)
Lys	2.1 (2)	4.2 (2)	3.1 (3)	4.7 (6)	10.0 (10)	1.5 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Arg	0.3 (1)	0.3 (1)	0.3 (1)	0.3 (1)	1.7 (2)	1.5 (1)	1.0 (1)	0.4 (1)
PE-Cys	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)
Trp*	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)
Total Res.	16	38	68	64	95	26	23	24
Field (%)	84	59	50	75	23	89	58	50

Peptide	K11	K12	K13	K15	K16	K3	K5	K19	Enzyme PE-CPT 1-495
Residue No.	338-341	342-372	373-388	391-422	423-475	476-482	483-489	490-495	
Asp/Asn(D/N)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.2 (2)	1.9 (1)	1.3 (1)	1.2 (1)	1.2 (1)	29.3 (32)
Thr	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.2 (2)	2.6 (3)	1.3 (1)	1.2 (1)	1.2 (1)	17.3 (16)
Ser	2.3 (2)	2.3 (2)	2.3 (2)	1.1 (1)	1.5 (1)	1.3 (1)	1.2 (1)	1.2 (1)	24.5 (27)
Glu/Gln(E/Q)	1.2 (1)	2.5 (2)	7.1 (8)	7.8 (8)	10.0 (9)	1.3 (1)	1.5 (1)	1.5 (1)	74.9 (77)
Pro	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	34.2 (33)
Gly	0.9 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.9 (2)	1.6 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	36.0 (36)
Ala	1.1 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	45.1 (46)
Val	1.1 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	36.4 (36)
Met	0.8 (1)	0.8 (1)	0.8 (1)	0.8 (1)	0.8 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	14.9 (15)
Ile	0.8 (1)	0.8 (1)	0.8 (1)	0.8 (1)	0.8 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	17.8 (18)
Leu	2.7 (2)	2.7 (2)	2.7 (2)	2.7 (2)	2.7 (2)	1.3 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	49.1 (49)
Tyr	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	16.2 (16)
His	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	22.0 (22)
Lys	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	3.7 (4)
Arg	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	11.7 (12)
PE-Cys	0.4 (1)	0.4 (1)	0.4 (1)	0.4 (1)	0.4 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	1.3 (1)	14.5 (14)
Trp*	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)
Total Res.	4	31	16	32	33	7	6	6	495
Field (%)	69	77	63	52	61	86	96	70	

アミノ酸分析の結果はペプチドまたはタンパク質 1 モル当りのアミノ酸残基数を示している。括弧内は, アミノ酸配列から得たアミノ酸残基数を示している (図 2 参照)。各アミノ酸組成はアンダーラインを引いたアミノ酸の残基数に基づき計算された。*トリプトファンは同定されなかった (N.D.)。

(図1-B~D)。こうして得られた16個のKペプチド(K2, K8及びK14を除く—後述)をK1~K19と命名した(表1)。得られたKペプチドの分析からタンパク質全体の99%のアミノ酸配列を決定することができた。遊離のリジン(K8, 残基290)と2つのジペプチドGly-Lys(K2, 残基17-18)及びAla-Lys(K14, 残基389-390)は回収されなかった。これらは素通り部分に溶出したと考えられる。PE-タンパク質(約4 nmol)の臭化シアン切断物も、同様にして、逆相HPLCで精製した。M6, M12, M15及びM16を除くM1~M17の13個のMペプチドが得られ、それらの分析結果から19個のK

ペプチドのオーバーラップが証明された(図2)。

次にKペプチド内部のオーバーラップの証明を行った。まず、PE-タンパク質のAsp-Pro結合(残基149-150)の切断で得られたDP1ペプチドの分析結果から、K5-E1ペプチドのアミノ酸配列中のギャップが埋められた。次にK6ペプチドのトリプシン消化による6つのサブペプチドの配列順序を確認する為、K6ペプチド中に存在するTrp-X結合(残基213-214間)を切断し、得られたK6-W1ペプチドの分析結果から、残りのオーバーラップが証明できた。16個のKペプチド(K1-K19)とそのサブペプチドによって、図2に示すように、ほとんどのアミノ酸配列を決定することが出来た。

最後にアミノ末端閉鎖の問題が残った。16個のKペプチドのうち、K1ペプチドだけがインタクトのタンパク質同様アミノ末端が閉鎖されており、このペプチドがタンパク質のアミノ末端に由来することが示唆された。タンパク質のアミノ末端 α -アミノ基の修飾残基として今まで知られているものの中で、最も頻繁に見いだされるのはアセチル基による修飾で、この他ではピログルタミル基による修飾がしばしば見いだされる。まずK1ペプチドにAAREを作用させ、逆相HPLCカラムで分離精製後プロテイン・シーケンサーで分析したが、有意のシグナルは得られなかった。続いてピログルタミルペプチダーゼを作用させたが同様に成功しなかった。最後にK1ペプチド(約200pmol)の質量分析を試みた。Ala-Ser-Arg—Lys(残基1-18)から計算される分子量は1731.9で、質量分析からはAc-Ala-Ser-Arg—Lysというアミノ酸配列に相当する $MH^+ = 1773.9$ に一致する質量スペクトルが得られた。計算値と分析値の差は42.0で、従って、アミノ末端閉鎖基はアセチル基であり、アミノ末端がAc-Alaであることが明らかになった。以上、16個のKペプチドと13個のMペプチド及びそれらのサブペプチ

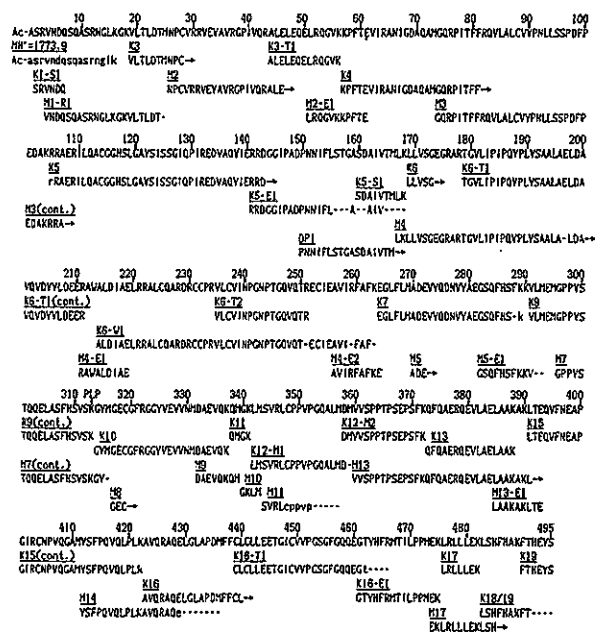


図2 ラット肝サイトゾルGPTの全アミノ酸配列
ペプチド表示に用いた記号はそれぞれ次の切断法によって得られたペプチドを示す。
DP: 70% 酢酸による Asp-Pro 結合切断。E: V8 プロテアーゼによる Glu-X 切断。K: API による Lys-X 切断。T: トリプシンによる Arg-X または Lys-X 切断。R: アルギニルエンドペプチダーゼによる Arg-X 切断。S: 12N 塩酸による X-Ser または X-Thr 切断。M: 臭化シアンによる Met-X 切断。W: BNPS-スカトールによる Trp-X 切断。大文字はエドマン分解法で同定された配列、小文字はシグナルの同定が曖昧な配列、—または→は同定出来なかったアミノ酸残基を示す。Ac- はアセチル基を、PLP は推定 PLP 結合位置を示す。アミノ末端ペプチドの質量分析結果は小文字で示したアミノ末端アミノ酸配列上に表記してある。

ドの分析から、Ac-Alaで始まるラット肝サイトゾル GPT の495残基からなる全アミノ酸配列が明らかとなった(図2)。

1-3-2 相同性探査

タンパク質データベースの検索で相同性の高いタンパク質を探索したが、既報のブタ心筋 GPT の PLP 結合 Lys 周辺20残基のアミノ酸配列とラット肝サイトゾルチロシンアミノ基転移酵素 (TAT)⁴⁶ の2つだけが有意の相同性を持つものとして検出された。機能の類似している GOT は、相同性スコアの高かった上位400種のタンパク質に含まれていなかった。しかし、構造既知のアミノ基転移酵素を対象に、更に詳細な相同性の探索を行ったところ、一次構造全体の相同性はきわめて低いが、GOT との間に有意な相同性のあることが示唆された。共通するアミノ酸残基はアミノ酸配列全体に分散していた。GPT, GOT 間の弱い相同性が分子進化の上で本当に有意と言えるのかどうかを評価するため、GPT といろいろなアミノ基転移酵素のアミノ酸配列のアラインメントを、標準パラメータを用いた CLUSTAL プログラム⁴⁵により行った(図3)。その結果の詳細な検討により、X線結晶解析による立体構造の研究から明らかにされた、GOT で補酵素 PLP と結合するアミノ酸残基や基質と結合するアミノ酸残基の殆どが GPT でも保存されていることが示された。このことから、これら2つのタンパク質は共通する祖先から分岐進化したことが示唆された。

1-3-3 ホモロジープロットの表示

ラット肝サイトゾル GPT と、相同性探索で検出されたラット肝サイトゾル TAT の全アミノ酸配列を用いてホモロジープロットの表示を行った(図4)。又、ラット肝サイトゾル GPT と機能の類似したラット肝サイトゾル GOT とのホモロジープロットも行った(図4)。ラット GPT と TAT では、マトリックスの対角線に沿って斜線が出現した。一方、ラット GPT と GOT では、相同な領域は認められず、従って

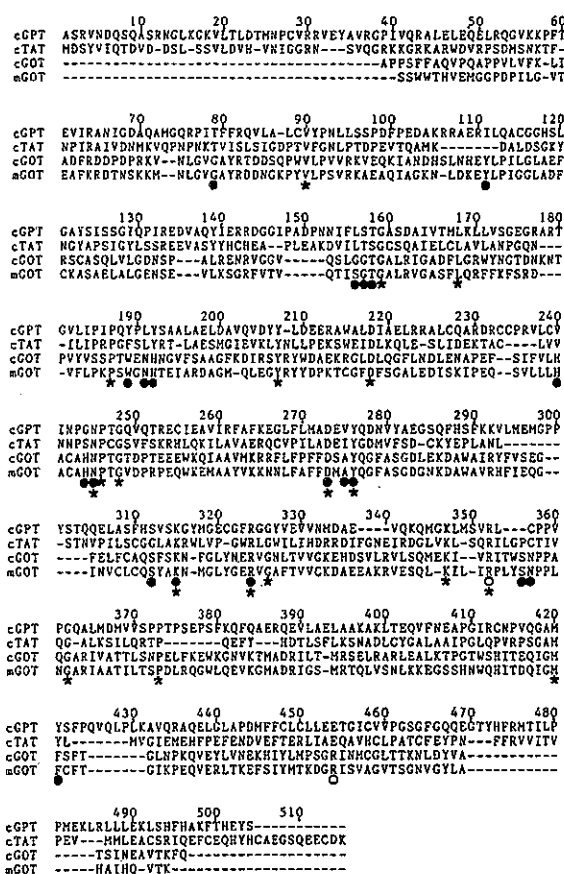


図3 ラットアミノ基転移酵素のアラインメント

* : 4つのアミノ酸配列間で保存されていたアミノ酸残基。
○ : GOT で基質と結合するアミノ酸残基の位置 (ブタサイトゾル GOT の Arg-292及び Arg-386)。
● : GOT で PLP との結合に関与するアミノ酸残基 (図7参照)。cGPT : サイトゾル GPT。cTAT : サイトゾル TAT。cGOT : サイトゾル GOT。mGOT : ミトコンドリア GOT。

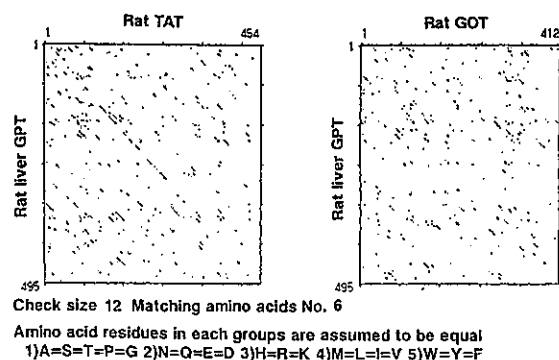


図4 ラットサイトゾル GPT と TAT 及び GOT のホモロジープロット

両者の間には相同なアミノ酸配列が存在しないか、あるいは極めて相同性が低いことが示され

た。

1-3-4 疎水性の予測と二次構造の推定

アミノ酸配列に基づき、ラット肝サイトゾル GPT の疎水性の予測を行った。図5に示されるように、疎水性領域と親水性領域がタンパク質分子全体に渡って、比較的平均して分布しており、特に高い疎水性領域も親水性領域も含まれていないことが分かった。ラット肝サイトゾル GPT と GOT の疎水性の予測のパターンを比較したところ、全体のパターンが良く似ており、特にタンパク質分子の中間部分はアミノ末端やカルボキシル末端部分より疎水性のパターンが類似していた。GOT の X 線結晶解析による研究結果から、分子の中間部分は酵素活性に重要なラージドメインを構成し、アミノ末端とカルボキシル末端部分は基質特異性を決定するスモールドメインを構成していることが報告されている⁴⁸。このことから、ラット肝サイトゾル GPT の疎水性のパターンは、PLP が結合しているラージドメイン（図3の残基番号88-385付近）で GOT と類似していると考えられる。

Chou & Fasman 法によるラット GPT の二次構造の推定で、 α -ヘリックス及び β -シートの含有量は、それぞれ42.2%と25.9%と計算された（図5）。ラット肝サイトゾル GPT 及び GOT のアミノ酸配列から予測した二次構造を

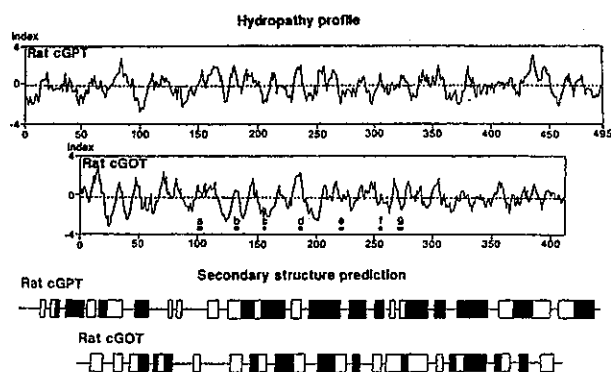


図5 ラットサイトゾル GPT 及び GOT の疎水性の予測と二次構造の推定

疎水性の予測。…：タンパク質の疎水性度の平均値を示す。a-g：三次構造既知のブタサイトゾル GOT に存在する7つの β -構造の位置を示す。二次構造。■： α -ヘリックス。□： β -シート。

比較したところ、疎水性の予測のパターンの比較で類似性が見られたように、二次構造の推定においても特にラージドメインに相当する分子の中間部分で、 α -ヘリックス及び β -構造の配置に共通性が認められた。

第4節 考 察

ラット肝サイトゾル GPT の全アミノ酸配列は、リジンまたはメチオニン結合の切断により生成された、2種の異なるペプチド断片群の分析から解析した。本酵素の構造解析で特に問題になったのは、アミノ末端が閉鎖されていたことである。アミノ末端から単離した、アミノ末端が閉鎖した K1 ペプチドに AARE を作用させたが、アシルアミノ酸は遊離されなかった。アミノ末端 α -アミノ基は、K1 ペプチドの質量分析によってアセチル基で修飾されていることが明らかとなった。アミノ末端が Ac-Ala であるにも関わらず、なぜ AARE が K1 ペプチドに作用しなかったかは不明であるが、アミノ末端から3残基目に存在する塩基性アミノ酸残基アルギニンが酵素の作用を妨げているのかもしれない。アミノ酸配列中、殆どのアミノ酸残基が2種類の相補的ペプチド断片（K ペプチドと M ペプチド）で同定されたが、図2に示される様に残基210-212、263-265、290-292及び357-359間の配列は、オーバーラップがアミノ酸1残基のみで、分析の証明としては幾分弱い領域である。このうち殆どの残基210-212の配列は、ペプチド K6 及び M4 を用いて分析している。V8 プロテアーゼの基質特異性から、M4-E1 ペプチドはアミノ酸配列中 Glu か Asp のカルボキシル基側で切断されて生成したはずである。即ち残基210-211の配列は、Glu-Arg か Asp-Arg のいずれかになる。M4 ペプチド中に存在する唯一の Asp-Arg 配列は、K6-W1 の分析からアミノ酸残基229-230に位置することが確定している。従って、M4-E1 を並べられる唯一可能な位置は、K6-T1 と K6-W1 が重複する

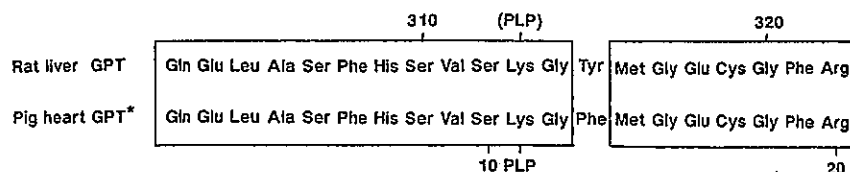
211から219番目のみである。API ペプチドの中、K7のアミノ末端だけがGluであった。この事は、M4-E2が明らかにK6とK7のオーバーラップペプチドであることを示している。最も証明が弱い残基290-292のオーバーラップは、M5のアミノ酸組成（ペプチド当り Asp/Asn 2.9, Glu/Gln + Hse 5.0, Ser 2.0, Gly 1.2, Ala 2.0, Val 2.9, Leu 1.0, Phe 1.9, Lys 1.8, His 1.2, Tyr 1.8mol/mol）により支持される。オーバーラップの証明が弱い残りの部位（残基357-359）は、K12ペプチドの中間部に位置し、図2に示した配列に基づくアミノ酸組成は、K12のアミノ酸分析結果（表1）と一致した。以上の結果から、ラットGPTのサブユニットは、アミノ末端がAc-Alaで始まる495アミノ酸残基から構成されている事に誤りはないものと判断できる。このアミノ酸配列から計算される分子量は55,018ダルトンで、SDS-PAGEで測定された値（55,000ダルトン）とよく一致していた。ラット肝サイトゾルGPTサブユニットの全アミノ酸配列決定から、次の3つの重要な結果が導き出された。

- 1) 活性酵素（114,000ダルトン）は、2分子のPLPを含むほぼ同一のサブユニットから構成されるホモダイマーである。
- 2) ラット肝サイトゾルGPTのGln-303からArg-322のアミノ酸配列は、既報の¹⁸ブタ心筋GPTのPLP結合Lys周辺20残基のアミノ酸配

列と1残基（Tyr-315がPheに置換）を除いて完全に一致し、PLP結合Lys周辺のアミノ酸配列が、異なる種や臓器で高度に保存されていることが示唆された。この結果から、PLPは313番目のLysに結合しているものと類推した（図6）。

3) ラット肝サイトゾルGPTのアミノ酸配列は、タンパク質データベース中の構造既知の全てのピリドキサル酵素と比較して非常にユニークであり、タンパク質データベースによる相同性の探査では、ブタ心筋GPTの部分構造を除き、相同性の高いものは認められなかった。しかし、更に詳細に相同性の検索を行ったところ、ラット肝サイトゾル⁴⁷GOT及びサイトゾル⁴⁶TATとの間に有意な相同性が認められた。しかし、その同一性はそれぞれ17.0%、16.0%及び24.7%と低値であった（図3）。ホモロジープロットでは、ラット肝サイトゾルGPTとTATでは相同な領域が検出されたが、ラット肝サイトゾルGPTとGOTでは相同性が認められなかった（図4）。これは、GPTとGOT間に相同性が在るとする前述の相同性探査結果と一見矛盾するようであるが、ラット肝サイトゾルGPTとGOTの相同性がホモロジープロットで検出可能な限界値以下であった為と考えられる。

ニワトリ心筋サイトゾル及びミトコンドリアGOTの研究から、ミトコンドリアGOTは、ア



*Tanase, S., Kojima, H. & Morino, Y. (1979) Biochemistry 18, 3002-3007.

図6 ブタ心筋サイトゾルGPTのPLP結合Lysを含むペプチドとラット肝サイトゾルGPTのアミノ酸配列の比較
PLP: ブタ心筋サイトゾルGPTのPLP結合。(PLP)
: ブタGPTとの相同性から予測したラット肝サイトゾルGPTの推定PLP結合位置。

ラニンや芳香族アミノ酸に対しても、ジカルボン酸基質よりそれぞれ 10^5 及び 10^3 倍遅い速度で、触媒活性を持つことが報告されている。この事から考えると、ラットサイトゾル GPT がラットミトコンドリア GOT よりラットサイトゾル TAT と相同性が高いことは非常に興味深い。ラット肝サイトゾル GPT と他の α -アミノ基転移酵素の相同性は、活性中心であるラージドメインを構成するタンパク質分子の中間部分の方が、基質特異性を決定するスモールドメインを構成するアミノ末端やカルボキシル末端部分より相同性が高かった。また、ラット GOT との相同性が余り高くはないにも関わらず、図 3 に示すように、三次構造既知のサイトゾル及びミトコンドリア GOT のラージドメインの PLP 結合ポケットで PLP と水素結合を形成していると同定されている重要なアミノ酸残基の殆どが、ラット肝サイトゾル GPT にも相同な位置に存在していた。更に、ブタ GOT の X 線結晶解析の結果から、サイトゾル GOT とミトコンドリア GOT ではアミノ酸配列にかなりの相違が見られるが（同一性48%）、立体構造は非常に類似していることが明らかにされている。⁵¹これらの事から、ブタ GOT の X 線結晶解析により明らかにされた、ラージドメインの PLP 結合部位を取り囲む二次構造の配置、即ち7つの β -シート構造から構成される大きな折りたたまれた構造と8つの α -ヘリックスではさまれた構造が、⁴⁸ラット肝サイトゾル GPT でも同様に保存されていることが示唆される。GPT と GOT の高次構造上の類似性、特に PLP を結合するラージドメインの類似性は、図 5 に示した疎水性の予測の比較と二次構造の推定の比較により更に裏付けられる。疎水性の予測及び二次構造の推定においても、GOT のラージドメインに相当する領域が GPT でも類似していることから、サイトゾルやミトコンドリア GOT などに存在する PLP 結合ドメインは、GPT にも同じように存在し、GPT の活性中心

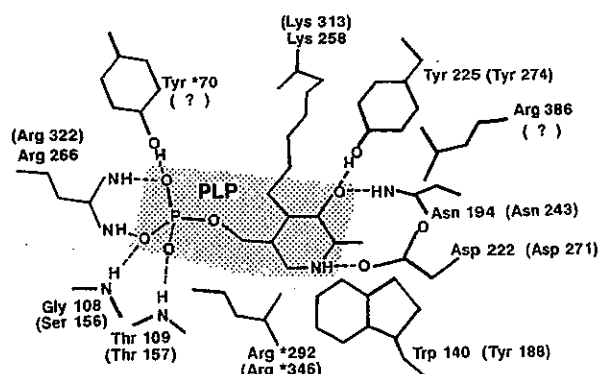


図7 ブタサイトゾル GOT (ラットサイトゾル GPT) の活性中心
 ::: PLP。*:隣接するサブユニットのアミノ酸残基。
 括弧内: ラットサイトゾル GPT の活性中心に存在すると推定されるアミノ酸残基。

の立体構造も類似しているものと推定される。三次構造既知のブタサイトゾル GOT で、Arg-292 は基質の ω -COO⁻ と、Arg-386 は α -COO⁻ と結合する事が知られている（図 7）。図 3 に示すアラインメントの結果では、GPT と TAT で Arg-292 は保存されているが、Arg-386 の位置は他のアミノ酸 (Glu) に置き変わっており Arg-386 の保存については不明である。Arg-386 を含むスモールドメイン領域のアミノ酸配列は、GPT では殆ど保存されていない為、ギャップペナルティなどのパラメータを変更すると異なるアラインメントの結果になる可能性は大きい。⁵²Mehta らのアラインメントの結果で示されているように、GPT では Arg-466, TAT では Arg-417 がブタサイトゾル GOT の Arg-386 に相当する可能性は大きい。スモールドメイン領域での進化論的アラインメントを行う為には、より多くのアミノ酸配列情報が必要である。又、GOT の三次構造が、GPT や TAT でどの様に保存されているかということも大変興味深いことであり、今後 GPT の X 線結晶構造解析が重要である。しかし、以上の結果から、ラット肝サイトゾル GPT は α -アミノ基転移酵素ファミリーに属することは明らかである。加えて、GPT は機能の類似している GOT や他のアミノ基転移酵素とよ

り、若干ではあるがTATとの相同性が高く、ポリペプチドの長さも近似し、分子進化上より近い関係にあると考えられる。これらの事から、GPTとTATはGOTや他のアミノ基転移酵素と進化の過程でかなり早い時期に分岐してきたことが示唆される（第2章第4節，図13参照）。

第2章 ヒト肝アラニンアミノ基転移酵素の全アミノ酸配列決定

第1節 緒言

ヒトGPTも、サイトゾルとミトコンドリアに2種類のアイソザイムが存在し、肝臓、腎臓、心臓、筋肉など殆どの臓器に分布している。特に肝臓に多く、肝疾患時に血中GPT活性が著しく増加することから肝機能障害の指標として臨床的に重要である。しかし、酵素の構造や構造と機能の相関等については殆ど研究されていなかった。ラット肝サイトゾルGPTの全アミノ酸配列の決定に¹⁹続いて、本研究ではヒト肝サイトゾルGPTの構造解析を行った。出発材料が微量であった為、全一次構造決定は困難を極めたが、微量分析技術を駆使し、従来のエドマン分解法と近年発展したプラズマデソーブション質量分析法を効果的に組み合わせることにより、微量精製試料を用いながら迅速にヒトGPTの全アミノ酸配列決定に成功した。⁵³又、ヒトとラット肝サイトゾルGPTの相同性が非常に高かったことが、ペプチド断片の順序やオーバーラップのアミノ酸配列の推定を行う上で有用であった。ヒト肝サイトゾルGPTは、ラット肝サイトゾルGPTよりも陽イオン性のタンパク質で失活しやすいが（Matsuzawa⁵⁴ら）、その一次構造はラット酵素と類似していた（同一性；87.9%）。ヒト肝サイトゾルGPTはラット酵素と同じようにアミノ末端がアセチル基で閉鎖されており、495アミノ酸残基から構成されていることが明らかとなった。サブユニットの分子量は、54,479ダルトンと計算され、SDS-PAGEで同定された値（55,000）とよく

一致した。未変性状態の酵素の分子量が114,000ダルトンであることから、2つのほぼ同一のサブユニットから構成されるホモダイマーと考えられる。得られたヒト肝サイトゾルGPTのアミノ酸配列とラットGPT及び他のアミノ基転移酵素との相同性を検討し、更に立体構造及び分子系統樹の推定を行った。

第2節 実験材料及び方法

2-2-1 実験方法

ヒト肝サイトゾルGPTは、従来法^{8,13}を一部改変した方法を用い、本学松澤健夫教授により以下に記載したように、SDS-PAGEで均一な状態にまで精製された。53歳日本人女性の剖検から得られた新鮮肝切片105gから出発して、酸性加熱処理、硫酸アンモニウム分画、DE-52とCM-52のタンデムカラムクロマトグラフィーについてカルシウムリン酸ゲル処理、硫酸アンモニウム分画、オクチルセファロース、セファロースCL-6B及びDEAE-セファロースカラムクロマトグラフィーで順次精製され、約1mgの酵素が得られた。pH5.7でラットGPTが負に荷電するのに対しヒト肝サイトゾルGPTが陽電荷を示す事から、最初の精製段階で従来のDE-52カラムクロマトグラフィーに代わりDE-52とCM-52のタンデムカラムクロマトグラフィーが行われた。⁵⁴

無水コハク酸は和光純薬社製を用いた。N-アセチル-L-セリンは、大阪大学蛋白質研究所の網沢進博士から供与していただいた。又、N-アセチル-L-アラニンは、ナカライテスク社製を使用した。

2-2-2 還元とピリジルエチル化

GPTは前述（1-2-2参照）のごとく、0.1M トリス-HCl（pH8.5）、1mM EDTA及び7M 塩酸グアニジン溶液中、トリ-n-ブチルフォスフィンで還元²²し、4-ビニルピリジンでピリジルエチル化を行った。²³反応生成物は、10mM リン酸ナトリウムを含む6M 塩酸グアニ

ジン溶液 (pH6.0) で平衡にした TSK G3000SW_{XL} (7.8×300mm) を2本連結したゲル濾過カラムを用いた HPLC によって精製した。得られた主ピークを、超純水に対して透析して脱塩後凍結乾燥した。

2-2-3 GPT の初期断片化

PE-タンパク質はラット GPT の場合 (1-2-3 参照) と同様, 2.0M 尿素存在下 50mM トリス-HCl (pH9.0) に溶解後, 重量比にして 1% の API を加え, 37℃ で一夜消化した。消化物の pH を 70% ギ酸で下げ (pH 2 付近), トリフルオロ酢酸-アセトニトリル系を移動相とした Bakerbond WP-C4 カラム (4.6×50mm) による逆相 HPLC で分離した。単離出来なかったペプチド断片は, 更に Aquapore PH 300 カラム (2.1×30mm) を用いた逆相 HPLC で再精製した。また, PE-タンパク質は, 前述 (1-2-3 参照) のごとく臭化シアンで切断した。ペプチド断片は, TSK G2000SW_{XL} カラム (7.8×300mm) を2本連結したゲル濾過カラムを用いた HPLC により分離後, 単離出来なかったペプチド断片は, 更に Aquapore PH 300 カラムによる逆相 HPLC で再精製した。

2-2-4 ペプチドの再断片化

臭化シアン切断物の中で最も大きいペプチド (M3) は, Klotz⁵⁵ の方法の変法によりサクシニル化を行った。サクシニル化されるとタンパク質の溶解度が増すため, 難溶性タンパク質の可溶化に用いられる。又, API 消化して得られるカルボキシル末端にリジン残基をもつペプチドをサクシニル化すると, カルボキシル末端リジンの ε-アミノ基が修飾されてプロテイン・シーケンサー分析時にポリブレン処理ガラスフィルターから流失し難くなり, カルボキシル末端までのシーケンスが得られることがある。この他に, トリプシンで Arg-X 結合のみを特異的に切断する目的も兼ね, 以下のステップでペプチド M3 のリジン残基の ε-アミノ基をサクシニル化した。(1)ペプチド試料 (200~300pmol)

に 8M 尿素-0.5M 炭酸水素ナトリウム (pH8.5) 60μl を加え溶解した。(2)試料の量が少ないので出来るだけ少量の試薬を測り (数100μg), これを一度に加えて完全に溶解した。この際, pH を確認し, 2N 水酸化ナトリウムで pH 8~9 に保った。(3)時々ボルテックスで攪拌しながら 1 時間反応させた。(4)サクシニル化後の反応混合物は, 4 倍量の超純水で希釈した後, 基質に対し重量で 5% の TPCK-トリプシンで 37℃ 一夜消化した。(5)トリプシン消化物は, 逆相 HPLC Aquapore RP 300 カラム (2.1×30mm) を用いて分離した。(6)精製ペプチドは, プロテイン・シーケンサーで分析し, アミノ酸配列を決定した。その他, 一部のペプチドは, V8 プロテアーゼやトリプシンによる酵素消化, 12N 塩酸や 2% ギ酸による化学的切断法により更に断片化し, 逆相 HPLC で分離後, プロテイン・シーケンサーで分析した。酵素消化は, 0.1M 重炭酸アンモニウム (pH8.0) 中, 重量比で 1% の酵素を用い, 37℃ 一夜消化した。濃塩酸及び 2% ギ酸による化学的切断は, それぞれ Titani & Narita³⁰ 及び Inglis³¹ の方法によって行った。

2-2-5 インタクト PE-タンパク質の Asp-Pro 結合切断

以上述べた方法で同定できなかったアミノ酸配列を決定するため, 前述のように (1-2-5 参照), インタクト PE-³⁴プロテインの 2 つの Asp-Pro 結合を切断した。濃縮遠心器で乾燥させて反応を停止し, 10mM リン酸ナトリウムを含む 6M 塩酸グアニジン溶液 (pH6.0) で平衡にした TSK G3000SW_{XL} カラム (7.8×300mm) を2本連結したゲル濾過 HPLC カラムにより分離後, 33% 酢酸を用いたセファデックス G25 カラム (10×115mm) で脱塩した。得られたペプチド DP1 及び DP2 をプロテイン・シーケンサーで分析し, オーバーラップのアミノ酸配列を決定した。

2-2-6 インタクト PE-タンパク質の Trp-X 結合切断

更に、インタクト PE-タンパク質のトリプトファンのカルボキシル基側の結合を Omenn³²らの方法に従って BNPS-スカトールで切断した。切断物は 1-クロロブタンで 3 回抽出後、下層（水相）を濃縮遠心器で乾燥させ、混合物のままプロテイン・シーケンサーで分析した。

2-2-7 タンパク質の組成分析

アミノ酸分析は、前述のごとく行った（1-2-6 参照）。

2-2-8 プラズマデソープション質量分析法

質量分析は、バイオイオンモデル 20 バイオリマー・マスアナライザー（ABI 社製）を用い、ニトロセルロース被覆サンプルターゲット上でを行った。本装置は、プラズマデソープション質量分析法を利用した装置で、与えられたイオンの質量を、高真空下の無電界領域における飛行時間の関数として測定する。データは、50~100 pmol のペプチドを用いて 1~30 million fission events, 15 kV の高電位下で分析し、収集した。

2-2-9 相同性の探査, アラインメント, 疎水性の予測, 等電点の予測

相同性の探査は、日立ソフトウェアエンジニアリング DNASIS を利用し、タンパク質一次構造データベース (NBRF-PIR 及び SWISS-PROT) で行った。一次構造のアラインメントは CLUSTAL⁴⁵ プログラムを用いて行った。疎水性の予測は、Kyte & Doolittle⁴³の方法を用いた。等電点は、Skoog⁵⁶らの方法で計算した。

第3節 結果

2-3-1 アミノ酸配列

PE-タンパク質（約 4.1 nmol）の API 消化物は、逆相 HPLC で 13 のフラクションに分離した（図 8-A）。主なフラクションの一つ K4 は、複数のペプチドが混合していた為 Aquapore PH 300 カラムで更に精製し、その後の分析に用いた（図 8-B）。13 個の主なペプチドの分

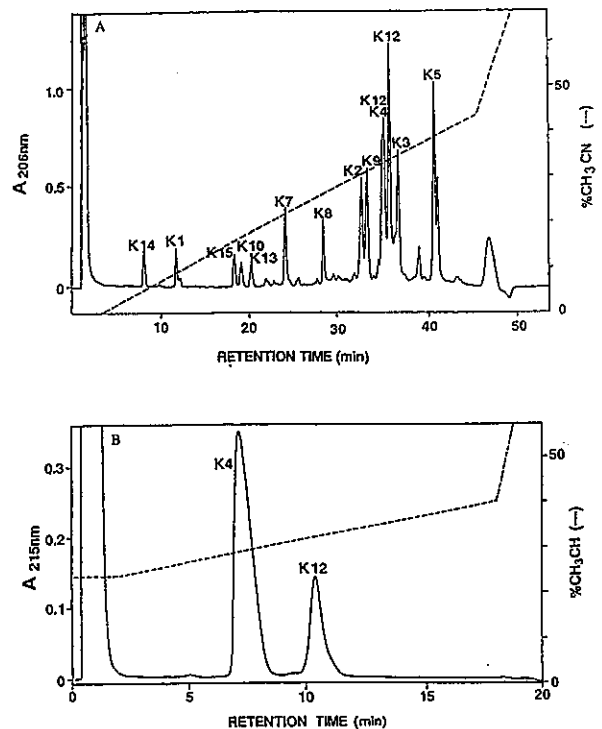


図 8 PE-ヒト GPT の API 消化物の逆相 HPLC による分離
A: 一次分離のパターン。Bakerbond WP-C4 カラム (4.6×50mm) 使用。流速=0.5 ml/min。B: K4 の逆相 HPLC カラムによる再精製のパターン。Aquapore PH 300 カラム (2.1×30mm) 使用。流速=0.3 ml/min。

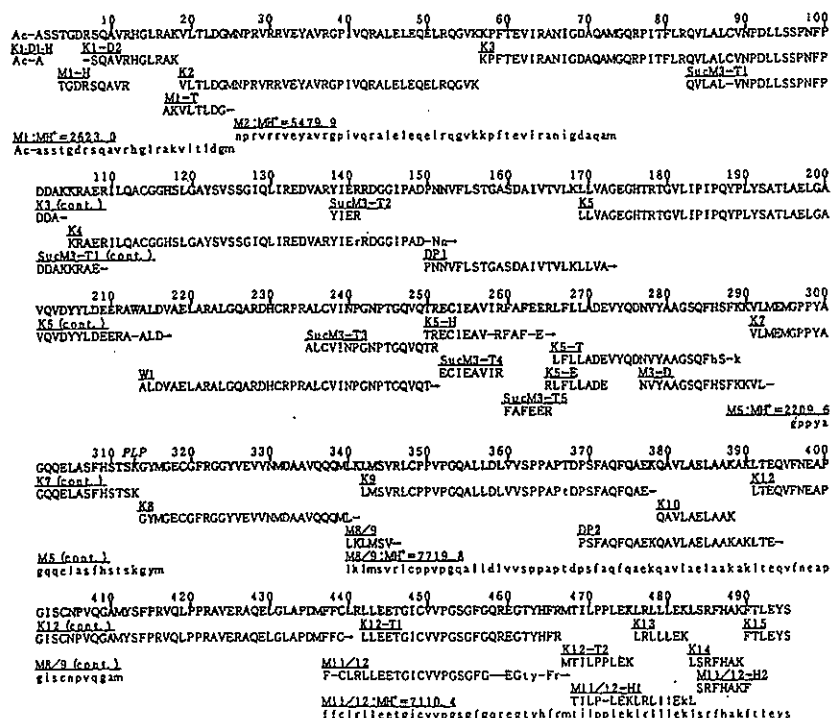
表 2 インタクト PE-ヒト GPT とその API ペプチドのアミノ酸組成

Peptide	K1	K2	K3	K4	K5	K7	K8
Residue No.	1-18	19-56	57-104	105-168	169-289	291-313	314-341
Asp/Asn(D/N)	0.7 (1)	1.9 (2)	5.7 (7)	5.7 (6)	8.3 (9)	1.3 (1)	1.6 (2)
Thr (T)	1.2 (1)	1.4 (1)	2.3 (2)	2.1 (2)	5.6 (5)	2.7 (3)	1.7 (2)
Ser (S)	2.7 (3)	6.3 (7)	4.1 (4)	5.4 (5)	17.4 (17)	3.8 (4)	4.2 (5)
Glu/Gln(E/Q)	0.9 (1)	6.3 (7)	5.8 (5)	2.3 (2)	7.9 (6)	2.1 (2)	4.4 (5)
Pro (P)	2.1 (2)	2.9 (2)	2.5 (2)	6.9 (7)	9.6 (8)	3.2 (2)	2.0 (2)
Gly (G)	3.3 (3)	2.7 (2)	5.1 (5)	7.1 (7)	17.0 (16)	2.5 (2)	2.8 (2)
Ala (A)	0.9 (1)	4.5 (6)	2.7 (2)	4.7 (5)	8.1 (10)	1.3 (1)	2.8 (2)
Val (V)	0.5 (1)	1.4 (1)	2.2 (2)	4.7 (6)	4.0 (3)	1.6 (2)	2.1 (3)
Met (M)	1.0 (1)	3.0 (5)	2.0 (2)	5.0 (5)	16.0 (16)	2.1 (2)	1.0 (1)
Ile (I)	1.0 (1)	3.0 (5)	2.0 (2)	5.0 (5)	16.0 (16)	2.1 (2)	1.0 (1)
Leu (L)	1.0 (1)	3.0 (5)	2.0 (2)	5.0 (5)	16.0 (16)	2.1 (2)	1.0 (1)
Tyr (Y)	1.0 (1)	3.0 (5)	2.0 (2)	5.0 (5)	16.0 (16)	2.1 (2)	1.0 (1)
Phe (F)	1.0 (1)	3.0 (5)	2.0 (2)	5.0 (5)	16.0 (16)	2.1 (2)	1.0 (1)
His (H)	1.1 (1)	1.0 (1)	1.6 (2)	1.0 (1)	4.2 (3)	1.0 (1)	0.9 (1)
Lys (K)	0.8 (1)	1.0 (1)	1.6 (2)	0.8 (2)	1.9 (1)	0.9 (1)	0.9 (1)
Arg (R)	2.8 (3)	4.8 (6)	1.7 (2)	3.8 (6)	9.3 (9)	1.1 (1)	0.8 (1)
PE-Cys (C)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)
Trp (W)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)
Total Res.	18	38	48	64	121	32	28
Yield (%)	20	36	41	26	19	39	28

Peptide	K9	K10	K12	K13	K14	K15	INTACT PE-GPT
Residue No.	342-378	379-388	391-475	476-482	483-489	490-495	Human Rat 1-495
Asp/Asn(D/N)	1.8 (2)	3.5 (3)	3.5 (3)	1.3 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	35.4 (32) (32)
Thr (T)	1.4 (1)	4.1 (4)	4.1 (4)	1.3 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	21.3 (18) (18)
Ser (S)	2.9 (3)	3.9 (3)	3.9 (3)	1.3 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	22.3 (25) (27)
Glu/Gln(E/Q)	3.9 (3)	2.0 (2)	12.8 (13)	1.3 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	65.3 (66) (71)
Pro (P)	7.1 (7)	9.5 (9)	9.5 (9)	1.3 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	37.6 (33) (33)
Gly (G)	1.5 (1)	6.6 (6)	6.6 (6)	1.3 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	37.7 (38) (36)
Ala (A)	4.0 (4)	6.6 (6)	6.6 (6)	1.3 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	46.6 (52) (44)
Val (V)	3.6 (4)	7.0 (7)	7.0 (7)	1.3 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	38.2 (41) (39)
Met (M)	1.1 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)	1.3 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	12.0 (11) (16)
Ile (I)	1.1 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)	1.3 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	16.5 (18) (21)
Leu (L)	2.0 (2)	2.2 (2)	2.2 (2)	1.3 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	55.0 (55) (48)
Tyr (Y)	2.0 (2)	2.2 (2)	2.2 (2)	1.3 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	13.0 (15) (16)
Phe (F)	2.0 (2)	2.2 (2)	2.2 (2)	1.3 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	20.8 (21) (22)
His (H)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.3 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	6.7 (6) (7)
Lys (K)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.3 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	16.8 (16) (19)
Arg (R)	1.5 (1)	1.5 (1)	1.5 (1)	1.3 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	40.5 (37) (33)
PE-Cys (C)	0.5 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)	1.3 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	14.4 (10) (14)
Trp (W)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(0)	N.D.(1) (1)
Total Res.	37	10	85	7	7	6	495
Yield (%)	49	33	39	57	52	54	495

アミノ酸分析の結果はペプチドまたはタンパク質 1 モル当りのアミノ酸残基数を示している。括弧内はアミノ酸配列から得たアミノ酸残基数を示している（図 9 参照）。*トリプトファンは同定されなかった (N. D.)。

M8とM9間及びM11とM12間は、それぞれMet-SerとMet-Thr結合であったため臭化シアンで殆ど切断されず、それぞれオーバーラップペプチドとして分離された(M8/9, M11/12と命名)。精製された9つのMペプチドは、Kペプチドの配列順序を決める為に分析した。PE-タンパク質中の2つのAsp-Pro結合(残基149-150, 368-369間)を、70%胃酸で切断後、ゲル濾過HPLCで分離して得られたペプチドDP1とDP2は、それぞれK4とK5及びK9からK12のオーバーラップを証明するのに用いられた。更に、インタクトPE-タンパク質の



ペプチド表示に用いた記号はそれぞれ次の切断法によって得られたペプチドを示す。

DP: 70% ギ酸による Asp-Pro 結合切断。Suc: 無水コハク酸によるサクシニル化後切断。E: V8 プロテアーゼによる Glu-X 切断。T: トリプシンによる Arg-X または Lys-X 切断。H: 12N 塩酸による X-Ser または X-Thr 切断。D: 2% ギ酸による Asp-X 切断。W: BNPS-スカトールによる Trp-X 切断。大文字はエドマン分解法で同定された配列, 小文字はシグナルの同定が曖昧な配列, 一または→は同定出来なかったアミノ酸残基を示す。Ac- はアセチル基を, PLP は推定 PLP 結合位置を示す。質量分析結果は小文字で示したペプチドのアミノ酸配列上に表記してある。

Trp-X 結合 (残基213-214) を切断後, プロテイン・シーケンサーで分析して Trp (残基213) に続くアミノ酸配列に関する情報と, ヒト GPT にトリプトファンがサブユニット当たり 1 残基しか含まれていない事の傍証に用いた。

インタクト PE-タンパク質約50pmol をプロテイン・シーケンサーで分析したところ, 5 サイクルのエドマン分解で不純物に基づくと思われる6.5pmol 以下の弱いシグナルしか得られず, このタンパク質のアミノ末端が閉鎖されている事が分かった。図9に示されるように, 13 個の主要な K ペプチドとそれらのサブペプチドの分析により, タンパク質の殆どのアミノ酸配列が明らかにされた。13個のペプチドのうちペプチド K1だけが, インタクト PE-タンパク質と同様にアミノ末端が閉鎖されていたことから, このペプチドがタンパク質のアミノ末端に由来することが明らかとなった。ペプチド K1 のアスパラギン酸残基 (Asp-6) を切断し, 分離されたアミノ末端ペプチド K1-D1, すなわち Ac- (Ala, Ser, Ser, Thr, Gly) をセリン及びトレオニン残基のアミノ基側に作用する12N 塩酸で切断した。切断混合物を, 逆相 HPLC で分離し, Ac-Ala の溶出位置に一致したフラクションを集め (Ac-Ala 及び Ac-Ser の溶出位置は予め合成品で同定した), 加水分解してアミノ酸分析を行ったところ Ala のみ検出された事から, アミノ末端が Ac-Ala であることが化学的に証明された。アミノ末端閉鎖基がアセチル基であることは, 質量分析により更に確認された。PE-タンパク質のアミノ末端から分離されたペプチド M1及び K1の閉鎖基を除く分子量はそれぞれ2579.9及び1898.1と計算される。質量分析による測定値は, それぞれ2623.0と1941.4となった (表3)。これらの値は, それぞれ Ac-Ala-Ser-Ser-Hse (残基1-25) と Ac-Ala-Ser-Ser-Lys (残基1-18) の平均質量に一致する事から閉鎖基はアセチル基と推定された。

表3 ヒト GPT ペプチドの質量分析結果

Peptide	Residue No.	MH ⁺		MH ₂ ⁺⁺
		Calculated	Observed	
M1	1-25	2621.9	2623.0	1321
M2	26-73	5456.3	5479.9 +Na?	2731
M5	296-317	2209.4	2209.6	1103
M6	317-331	1674.9	1676.5	
M8/9	340-411	7707.1	7719.8	3848
M9	344-411	7221.4	7245.4 +Na?	3623
M10	412-436	2794.2	2795.8	1386
M11	437-467	3714.3	3715.6	1860
M11/12	437-495	7101.5	7110.4	3558
K1*	1-18	1940.1	1941.4	
K2	19-56	4391.2	4392.8	2197
K7	291-313	2509.9	2509.7	1256
K8	314-341	3187.7	3187.3	1592
K9	342-378	4026.8	4028.3	2025
K1-T1*	1-12	1277.4	1277.3	
K1-T2*	1-16	1741.0	1741.9	

Mペプチドの MH⁺ はラクトン型の計算値。*K1ペプチドのトリプシンによる部分分解で得られたサブペプチド。

以上, 13個の K ペプチドと 9 個の M ペプチド及びそれらのサブペプチドの分析によって, ヒト肝サイトゾル GPT の495アミノ酸残基から構成される全アミノ酸配列が決定された (図9)。

2-3-2 質量分析

質量分析の際, 約100pmol のペプチドを用いた時, 質量数が4,000以下のペプチドの分析では正確な値が得られたが, 質量数が5,000以上になるとシグナルはブロードになり正確な値が得難かった。このような場合, 2プロトンフォーム (MH₂⁺⁺) や3プロトンフォーム (MH₃⁺⁺⁺) に相当するシグナルが出現したものもあった。殆どのペプチドでは, プロトンフォームにナトリウムフォームを若干伴って検出された。ペプチド M2と M9は, 1プロトンのモノソデュウムフォームが主要なシグナルとして出現したものと推定される (表3, 図10)。臭化シアンペプチドの主要なシグナルは, ラクトンフォームとして得られた。ペプチド M8/9と M9の質量数は, 混合物として (合計65pmol) 得られ,

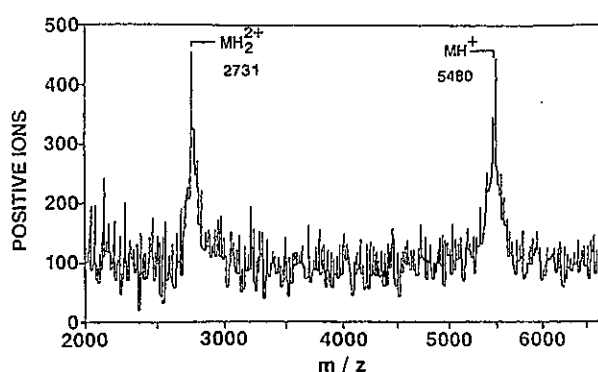


図10 プラズマデソーブション質量分析装置によるペプチドM2の質量スペクトル
ペプチドM2のMH⁺の計算値(平均質量)=5456。

それらのシグナルは弱かった。これらのペプチドの計算値と実測値の差が大きかったのは、測定したサンプル量が少なかった為と推察される。従って、充分量のサンプルを用いればイオン化が助けられ、より正確な値が得られるものと期待される。多くの場合、計算値と実測値の質量数の差は、1,000, 5,000及び10,000m/z (mass to charge ratio) に対して、それぞれ0.66, 1.5及び2.1amu (atomic mass unit) のチャンネル分解能の範囲内である。

2-3-3 等電点の予測

アミノ酸配列から計算されたヒト及びラット肝サイトゾルGPTの等電点は、それぞれ6.51と5.89であった。

第4節 考 察

本学松澤健夫教授により精製されたヒト肝サイトゾルGPTは、ラット酵素より等電点が高く、その為pH5.7では、DE-52カラムを素通りする代わりにCM-52カラムに吸着された。その為、精製の初期の段階に於てpH5.7でDE-52とCM-52のタンデムカラムクロマトグラフィーが行われた。精製ヒト酵素の比活性は、ラット酵素の比活性(約500unit/mg)より低く(約120unit/mg)、ヒト酵素がかなり不安定である事が推察される。

ヒトサイトゾルGPTは、GOT同様遺伝的多型性が知られており赤血球酵素(Chenら⁵⁷)、肝

酵素(Saha & Bhattacharyya, Kanemitsuら^{58, 59})の研究が報告されている。ヒトサイトゾルGPTでは、GPT1, GPT2-1, GPT2の3つの異型が知られており、等電点電気泳動の結果、各々の等電点は、GPT1でpI=6.45, GPT2-1は、pI=6.1, 6.2, 6.45の3バンドに分離し、GPT2はpI=6.1であると報告されている。日本人では、GPT1, GPT2-1, GPT2の順に多く分布することが報告されている。この内、今回の研究に用いた精製酵素は、アミノ酸配列から予測した等電点(pI=6.51)との近似からGPT1型と推定される。本研究では、インタクトPE-タンパク質のアミノ末端のアミノ酸配列の分析で、アミノ末端13残基を欠き14残基目のGlyから始まるGly-Leu-Arg—のシグナルが若干(添加量の1割程度)検出された事を除き、多型性に基づくと考えられるようなアミノ酸残基の置換(ミクロ不均一性)は確認されなかった。このアミノ末端13残基の欠損が生体内で既に生じたプロセッシングによるものか、精製過程での分解によるものか、あるいは酵素の不均一性を示唆しているのかは現在のところ明らかではない。更に、現在のタンパク質のアミノ酸配列決定法に限界がある為(部分的にAspとAsn, GluとGlnが混合しているような場合は見逃すことになる。又、サイクル数が増加するに従って先立つアミノ酸残基のキャリーオーバーが生じて結果の判定が難しくなる。)、多型性の存在は否定できない。GPTの多型性については、GOTの場合同様未知の部分が多く、今後の研究が待たれる。

ヒト肝サイトゾルGPTのアミノ酸配列は、リジンまたはメチオニンでの基質特異性の高い断片化法によって得られた2種類のオーバーラップのペプチドによって証明した。図9に示されるように、全てのKペプチドとそのサブペプチド及び一部のMペプチドのアミノ酸配列は、従来のエドマン分解法(プロテイン・シーケンサー)により決定した。残りのMペプチドと

K ペプチドの一部は、質量分析法によって分析した。質量分析法を用いることにより、オーバーラップの証明やエドマン分解法で得られたアミノ酸配列の確認を容易に行うことができた。又、質量分析法は、アミノ末端閉鎖基の同定にも、ラット酵素の分析の場合同様、非常に役立った。更に、先に決定したラット GPT と相同性の高いことも、ヒト酵素の構造決定を迅速に行う上で有用であった。

K1 ペプチドに AARE を作用させ アセチルアミノ酸を遊離させる試みは、K1 ペプチドのアミノ末端 (Ac-Ala) が、AARE の特異性に合致しているのにもかかわらず成功しなかった。この理由として、AARE は短いペプチドには作用するが、大きいサイズのペプチドには作用しない性質⁶²に基づく事が考えられる。ペプチド K1 は、16 アミノ酸残基から構成される比較的小さいペプチドであるが、AARE が作用するにはより小さいペプチドであることが要求されるのかも知れない。あるいは、閉鎖されたアミノ末端近傍に存在する荷電したアミノ酸残基 (Arg-7) が、Ala-Ser 結合の切断を妨げたのかも知れない。いずれにせよ、限られた微量サンプルを用いての実験であった為、遊離酵素に関する詳細な検討は続けられなかった。

質量分析により得られる分子量に関する情報は、アミノ末端閉鎖やリン酸化などの翻訳後の修飾に関し、その修飾部位の同定や修飾基の性質 (例えば、アセチル基によるアミノ末端 α -アミノ基の修飾) 等を明確にするのに有用である。タンパク質化学の分野では、質量分析法の様々な応用方法が報告されているが、本研究に於いては、ペプチドの質量分析決定にのみ用いた。又、質量分析用のサンプル量は、出発材料が微量であったため、100 pmol 以下に限定せざるを得なかった。

図 9 に示したアミノ酸配列中、アミノ酸残基 56-57, 264-266, 313-314, 339-341, 466-467, 482-484 及び 489-491 の配列は、オー

バーラップの証明が若干弱い¹⁹が、これらはアミノ酸分析の結果 (表 2) と質量分析の結果 (表 3) 及びラット GPT のアミノ酸配列との相同性により支持される。213 残基目のトリプトファンは、直接同定出来なかったが、トリプトファンの存在は、PE-タンパク質やペプチドの HPLC カラムでの分離時に、ダイオードアレイ検出器上の UV スペクトルとして確認された。分離されたペプチドの中、K5 と M3 だけが、トリプトファン含有ペプチドに特徴的なスペクトルを示した。Trp-213 は、BNPS-スカトールが、トリプトファン残基のカルボキシル基側のペプチド結合を選択的に切断する特異性と、ラット酵素とのアミノ酸配列の相同性 (ラット酵素では直接同定された) により支持されるものと考えた (ペプチド K5 の分析から 2 個の Trp 残基が連続して存在する可能性は否定される)。

以上の結果、495 アミノ酸残基からなるヒト肝サイトゾル GPT のサブユニットの全アミノ酸配列が得られた。サブユニットの分子量は 54,479 と計算され、この値は、SDS-PAGE で測定された分子量 (約 55,000) とよく一致していた。

図 11 に示されるように、ヒト及びラット肝サイトゾルと、ヒトサイトゾル及びミトコンドリア GOT⁶⁶ のアミノ酸配列を比較した。アラインメントの上のアミノ酸残基数はヒト肝サイトゾル GPT の残基数を表している。又、ヒト肝サイトゾル GPT と一致したアミノ酸残基を太字で示した。ブタ心筋サイトゾル GOT の X 線結晶解析の結果から、補酵素ピリドキサルリン酸と結合するアミノ酸残基や基質と結合するアミノ酸残基の存在が明らかにされており、図 11 では、前者を●で、後者を○で示した。ヒトとラット肝サイトゾル GPT のアミノ酸配列を比較したところ、図 11 に示されるように、ギャップを挿入する事無くアラインメントが行われ、高い相同性を示した。495 アミノ酸残基中 435 残基が完全に一致し、その同一性は 87.9% であっ

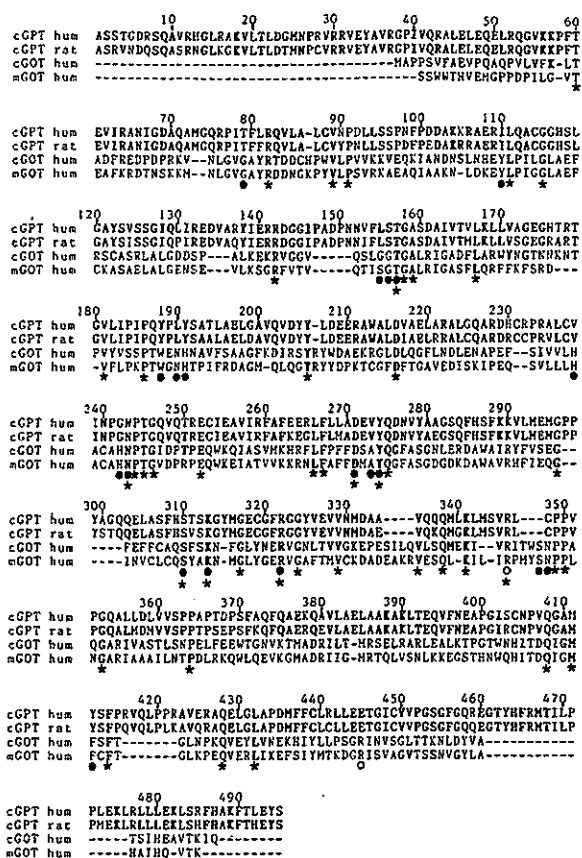


図11 ヒト及びラット肝サイトゾルGPTとヒトサイトゾル及びミトコンドリアGOTのアラインメント

アラインメント上のアミノ酸残基数はヒト肝サイトゾルGPTの残基数を表す。太字はヒトGPTと一致したアミノ酸残基、*は4つのアミノ酸配列間で保存されていたアミノ酸残基、○はブタサイトゾルGOTで基質と結合するアミノ酸残基の位置（ブタサイトゾルGOTのArg-292とArg-386）、●はブタサイトゾルGOTでPLPとの結合に関与するアミノ酸残基を示す。

cGPT hum: ヒトサイトゾルGPT。cGPT rat: ラットサイトゾルGPT。cGOT hum: ヒトサイトゾルGOT。mGOT hum: ヒトミトコンドリアGOT。

た。ヒト及びラット肝サイトゾルGPTの一次構造上の相違は、アミノ酸配列全般に渡って散在していたが、残基3-17, 217-235, 263-269, 334-340, 357-380及び416-425で特に差の多い領域が見られた。ヒト肝サイトゾルGPTの三次構造はまだ明らかにされていないが、これら置換の多い領域は酵素活性部位や立体構造維持に必要な部位に含まれないと考えられる。ラットと同様に、ヒト肝サイトゾルGPTのアミノ酸配列は、タンパク質データベースに登録さ

れている構造既知の他のピリドキサル酵素に比べ極めてユニークである。ヒト肝サイトゾルGPTはヒトサイトゾル及びミトコンドリアGOTとそれぞれ14.3%と12.5%の低い同一性を示した。詳細に相同性の検索を行ったところ、GPTとGOTの全体としての相同性がそれほど高くないのにも関わらず、図11に示されるように、GOTのラージドメインに存在し、酵素活性に重要なPLPと水素結合を形成するアミノ酸残基の殆どがGPTにも保存されていた。又、GOTは同一アイソザイムでは異種異臓器間でも相同性が高いが（ブタ心筋サイトゾル及びニワトリ肝サイトゾルGOTの相同性は83%、同ミトコンドリアGOT同士の相同性は85%）、同一種、同一臓器由来でもサイトゾルとミトコンドリアGOTではアミノ酸配列にかなりの相違が認められる（ブタ心筋サイトゾルGOTとミトコンドリアGOTの相同性は48%、ニワトリ肝サイトゾル及びミトコンドリアGOTの相同性は46%程度である）。この様に、一次構造上の相違が大きくても、サイトゾル及びミトコンドリアGOTの三次構造は非常に類似している事が報告されている。これらの事からGPTとGOTは、一次構造全体の相同性が低くても、活性部位であるPLP結合ポケットを構成するラージドメインの高次構造は、互いに類似していると推定される。

ヒト及びラット肝サイトゾルGPTとヒトサイトゾル及びミトコンドリアGOTのアラインメントの結果から推定された、ラージドメインの高次構造上の類似性は、図12に示した疎水性の予測の比較により更に裏付けられた。アミノ酸配列に基づいて、ヒト及びラット肝サイトゾルGPTとヒトサイトゾル及びミトコンドリアGOTの疎水性の予測を行い比較した。図12に示すように、タンパク質分子の中間部分はアミノ末端やカルボキシル末端部分よりも疎水性のパターンが類似していた。GOTのX線結晶解析によって、中間部分は酵素活性に重要なラー

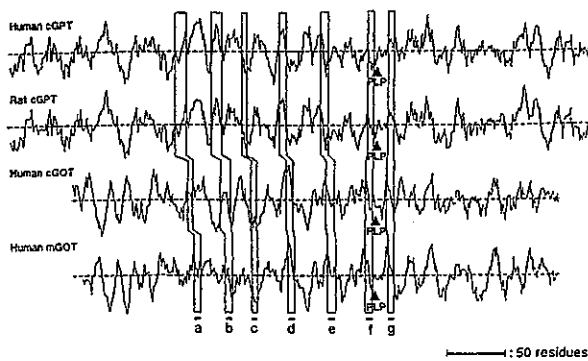


図12 ヒト及びラットサイトゾル GPT とヒトサイトゾル及びミトコンドリア GOT の疎水性の予測
 …：タンパク質の疎水性度の平均値。a-g：三次構造既知のブタサイトゾル GOT に存在する 7 つの β -構造の位置。PLP：推定 PLP 結合位置。

ジドメインを構成し、アミノ末端とカルボキシル末端部分は基質特異性を決定するスモールドメインを構成していることが報告されている。以上の事から、GPT の立体構造は、活性中心のラージドメインで類似しているが、基質特異性を決めるスモールドメインは GOT とかなり異なっているものと推定される。CLUSTAL プログラムを用いて、ヒト及びラット肝サイトゾル GPT のアミノ酸配列と、タンパク質データベース中の構造既知の全てのアミノ基転移酵素のアラインメントを行い、分子系統樹を作成した⁶⁷。図13は、種や臓器が異なる合計35種類のアミノ基転移酵素を含む14種類のアミノ基転移酵素の分子系統樹である。アミノ酸配列の相同性や疎水性の予測のパターンの類似性によって示されたように GPT と GOT は、共通する祖先から進化していると考えられる。しかし、GPT は機能の類似している GOT とより、ラット及びヒト肝チロシンアミノ基転移酵素 (TAT)^{46,68} や *Sulfolobus solfataricus* (*S. solf*) の GOT (後述)⁶⁹ と相同性が高く、分子進化上より近い関係にあることが示されている。以上の事から、ヒトとラットの GPT 及び TAT と *S. solf* GOT は、他の GOT やアミノ基転移酵素と進化の過程でかなり早い時期に分化した事が示唆される。

この分子系統樹から他のアミノ基転移酵素について次の様に考察される。

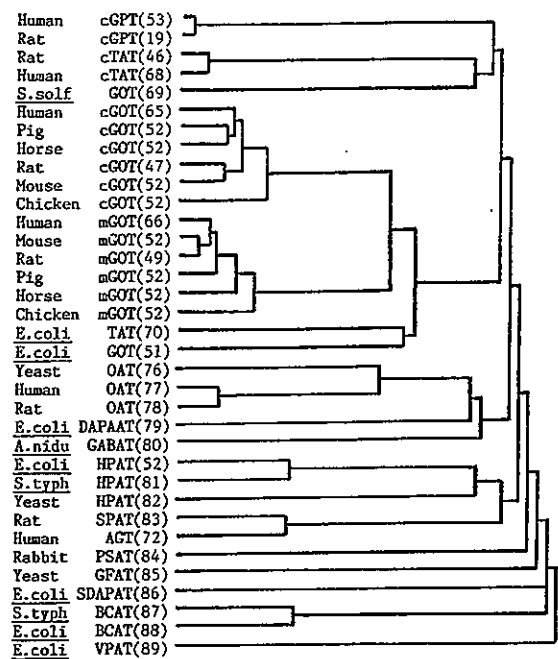


図13 アミノ基転移酵素の分子系統樹

略号：S. solf, *Sulfolobus solfataricus*; E. coli, *Escherichia coli*; A. nidu, *Aspergillus nidulans*; S. typh, *Salmonella typhimurium*; GPT, alanine aminotransferase (AT); TAT, tyrosine AT; GOT, aspartate AT; OAT, ornithine AT; DAPAAT, 7, 8-diaminopelargonic acid AT; GABAT, gamma-amino-N-butyrates AT; HPAT, histidinol-phosphate AT; SPAT, serine pyruvate AT; AGT, L-alanine glyoxylate AT; PSAT, probable phosphate AT; GFAT, glucosamine fructose-6-phosphate AT; SDAPAT, succinylidiamino-pimelate AT; BCAT, branched-chain amino acid AT; VPAT, valine pyruvate AT. 括弧内の番号は文献番号を示す。

1) 大腸菌 GOT：大腸菌 GOT は、高等動物のサイトゾル GOT やミトコンドリア GOT と約40%の相同性がある。大腸菌 GOT と高等動物 GOT の一次構造を比較したところ、酵素活性に関わるアミノ酸残基は大腸菌 GOT に於て殆ど保存されていた。大腸菌 GOT の酵素比活性は高等動物より低く、また広い基質特異性を持っており、芳香族アミノ酸に対しても活性を有している⁵¹。しかし、大腸菌 GOT の X 線結晶解析の結果、その立体構造は高等動物 GOT と極めて類似していることが明らかにされている¹⁷。

2) 大腸菌 TAT：大腸菌 TAT は、大腸菌 GOT と約40%の相同性を持ち、大腸菌 GOT の

酵素活性に関わるアミノ酸残基の多くが大腸菌 TAT にも保存されている。⁷⁰ 両酵素の基質特異性は重なり、反応速度論的解析によって、基質特異性の指標である K_{max}/K_d 値は、大腸菌 TAT では芳香族アミノ酸に対して約 $10^6 M^{-1} S^{-1}$ 、アスパラギン酸に対して $10^4 M^{-1} S^{-1}$ 、GOT では芳香族アミノ酸に対して約 $10^3 M^{-1} S^{-1}$ 、アスパラギン酸に対して $10^5 M^{-1} S^{-1}$ と報告されている。⁷¹ 即ち、大腸菌 TAT はアスパラギン酸に対しても大腸菌 GOT と同程度の活性を有すると共に、芳香族アミノ酸に対しては、大腸菌 GOT と比較して1000倍の活性を示している。大腸菌 TAT のアスパラギン酸に対する活性から、本酵素を大腸菌 GOT のアイソザイムと考える向きもあるほどである。

3) ヒト及びラット TAT: ヒト及びラット TAT⁴⁶ は、高等動物 GOT や大腸菌 GOT 及び TAT と一次構造上殆ど相同性が見られないが、詳細なアラインメントから、酵素活性に重要なアミノ酸残基の多くが保存されている事が明らかにされている。

4) 高度好酸性好熱古細菌

Sulfolobus solfataricus GOT: 古細菌 (archaeobacteria) は、他の細菌と生化学的性質が著しく異なる事から独立した生物群として扱われる。即ち、生物界は真核生物、真正細菌及び古細菌に三分される。古細菌という名称は、異常環境下にしか生育できないなど、特異な生化学的性質を持つことから、原始細胞の直系と見て命名されたものである。しかし、その後の研究で、いくつかの核酸やタンパク質が真核細胞のものにより高い相同性を示すなど、真核細胞との近親性を示す事実が見つかり、この事から古細菌を真核細胞の起原形細胞とする考えも提出されている。*Sulfolobus solfataricus* (*S. solf*) は、古細菌のうち高度好酸性好熱菌に属している。この *S. solf* の GOT の全アミノ酸配列が報告されており、興味深い事に本酵素は、ラット TAT

と最も高い相同性 (25%) を示し、高等動物 GOT や大腸菌 GOT 及び TAT とは一次構造上殆ど類似性が認められなかった。しかし、詳細なアラインメントにより、酵素活性中心に存在するアミノ酸残基の殆どは、本酵素でも保存されていた。同じ GOT でありながら他の GOT と極めて相同性が低く、この事は古細菌のタンパク質が、真核生物や真正細菌の同じタンパク質と全く似ていないという報告と合致している。一方、*S. solf* GOT とラット肝 TAT との相同性は、分子進化上興味深い。

5) アラニン: グリオキシレートアミノ基転移酵素 (AGT): AGT⁷² は動物のペルオキシソームに存在する唯一のアミノ基転移酵素である。AGT1 は哺乳動物のペルオキシソームあるいはミトコンドリアに分布している。ペルオキシソーム AGT1 の機能の一つはグリオキシル酸の解毒である。筆者は、本酵素が GPT と共通のアラニンを基質とすることから、両者の一次構造上の相同性が高いのではないかと考え、ヒト GPT とヒト AGT のアミノ酸配列を比較した。しかし、両者の間には一次構造上の相同性が殆ど見られなかった。

この他にも、例えば微生物の ω -アミノ酸アミノ基転移酵素の場合では、GOT サブファミリーとの間に一次構造上の類似性が殆ど無いのにも関わらず、結晶解析の結果、サブユニットの立体構造 (4 量体) は、極めて類似していることが報告されている。⁷³ 又、好熱菌 D-アミノ酸アミノ基転移酵素⁷⁴ と大腸菌分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素⁷⁵ では、GOT サブファミリーを始め、他のアミノ基転移酵素と一次構造上の有意の相同性が殆どない。ところが基質特異性、特に立体特異性を異にするこれら二つの酵素は、50% の高い相同性を持っていた。

GPT を始め、これら GOT 以外のアミノ基転移酵素は、GOT サブファミリーと一次構造上の相同性は低いが、PLP を補酵素とする共通の性質を持っており、酵素活性部位のアミノ酸

残基の多くが保存されている。しかも、それらの活性中心部位の立体構造が類似していることが報告されている。この様な研究の蓄積を通して、今後更にアミノ基転移酵素の構造や特性、また分子進化の様相も明らかにされて行くであろう。

第3章 総括及び結語

第1節 総 括

第1章に於ては、ラット肝サイトゾル GPT の全アミノ酸配列を決定し、その全一次構造を GOT や他のアミノ基転移酵素と比較することにより GPT のユニークなアミノ酸配列を示した。また、ラット GPT のアミノ酸配列から、機能的に類似している GOT との一次構造上の相違を明らかにすると共に、一次構造に基づく二次構造の推定や疎水性の予測を比較し、GPT と GOT の高次構造上の類似性について言及した。

第2章では、ヒト肝サイトゾル GPT の全アミノ酸配列をエドマン分解法とプラズマデソーブション質量分析法の併用により決定した。又、GPT のアミノ酸配列とタンパク質データベース中の全構造既知の全てのアミノ基転移酵素とのアラインメントを行い分子系統樹を作成し、それらの分子進化の過程を推定した。その結果、アミノ基転移酵素スーパーファミリーの全員には、一次構造上の相同性が低くても、酵素活性に重要な PLP と水素結合を形成するアミノ酸残基の多くが保存されている事が明らかになった。更に、GPT と GOT や TAT の比較から、以下にまとめた様に、アミノ基転移酵素スーパーファミリーの分子進化上の興味深い関連性を見いだした。1) 機能の類似している高等動物の GPT と GOT の相同性は低く、基質特異性が異なる高等動物の TAT と GPT の相同性が高かった。2) また、生物分類学上真核生物や真生細菌とは異なる古細菌 *S. solf* の GOT が、他の GOT とよりラットやヒト TAT 及び GPT

と相同性が高かった。3) 高等動物と大腸菌の GOT は相同性が高く、立体構造も類似しているが、大腸菌 GOT はアスパラギン酸の他に芳香族アミノ酸にも基質として作用する。この様に広い基質特異性を有する大腸菌 GOT は、芳香族アミノ酸を基質としアスパラギン酸にも活性を持つ大腸菌 TAT と約40%の高い相同性を持っていた。4) ところが、大腸菌 TAT とラット及びヒト TAT では相同性がきわめて低かった。

以上の事から、ヒト及びラット GPT, TAT と *S. solf* GOT は、高等動物及び大腸菌 GOT や他のアミノ基転移酵素と進化の過程でかなり早い時期に分岐したと考えられる。また、アミノ基転移酵素スーパーファミリーは、多数の一次構造及び高次構造情報の検討により、共通する祖先から複雑な経路を通して分岐進化してきた事が示唆された。

第2節 結 語

GPT は、ヒト肝疾患の指標として一般的に測定されている検査項目の一つであるが、精製の困難さが酵素自体の研究を遅らせ、特に一次構造に関しては、これ迄殆ど明らかにされていなかった。本研究で初めてラット及びヒト肝サイトゾル GPT の全アミノ酸配列が明らかとなり、多種類の既知のアミノ基転移酵素との比較により、相同性、酵素活性中心部分の共通構造及び分子進化について多くの新たな知見が得られた。

稿を終えるに臨み終始御懇篤な御指導及び御校閲を賜りました藤田保健衛生大学医学部総合医科学研究所医高分子学研究部門、千谷晃一教授に深甚なる謝意を捧げます。ラット及びヒト肝サイトゾル GPT の貴重な精製酵素を提供していただき、かつ多くの御助言をいただきました藤田保健衛生大学医学部第二生化学教室、松澤健夫教授に深謝致します。また、本研究を遂行するに当たり、懇切な御教示を賜りました理化学研究所国際フロンティア研究システムバイオメディア研究チーム研究員（現同生体分子解析

室主任), 瀧尾廣士先生に厚く御礼申し上げます。本研究に当たり, アミノ酸分析やアミノ酸配列決定にご協力いただいた藤田保健衛生大学総合医科学研究

所医高分子学研究部門, 鈴木政美さんを始め, いろいろ御教示下さった医高分子学研究部門の皆様に感謝致します。

文 献

- 1) Braunstein, A. E. and Kritzman, M. G. (1937) Formation and breakdown of amino-acids by intermolecular transfer of the amino group. *Nature* 140. 503-504.
- 2) Snell, E. E. (1945) The vitamin B₆ group. *J. Biol. Chem.* 154. 491-505.
- 3) DeRosa, G. and Swick, R. W. (1975) Metabolic implications of the distribution of the alanine aminotransferase isoenzymes. *J. Biol. Chem.* 250. 7961-7967.
- 4) Katunuma, N., Mikumo, K., Matsuda, M., and Okada, M. (1962) Differences between the transaminases in mitochondria and soluble fraction. I. Glutamic-pyruvic transaminase. *J. Vitaminol.* 8. 68-73.
- 5) Noguchi, T., Takada, Y., and Kido, R. (1977) Glutamate-glyoxylate aminotransferase in rat liver cytosol. *Hopper-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 35. 1533-1542.
- 6) Kamoda, N., Minatogawa, Y., Nakamura, M., Nakanishi, J., Okuno, E., and Kido, R. (1980) The organ distribution of human alanine-2-oxoglutarate aminotransferase and alanine-glyoxylate aminotransferase. *Biochem. Med.* 23. 25-34.
- 7) Hopper, S. and Segal, H. L. (1964) Comparative properties of glutamic-alanine transaminase from several sources. *Arch. Biochem. Biophys.* 105. 501-505.
- 8) Gatehouse, P. W., Hopper, S., Schatz, L., and Segal, H. L. (1967) Further characterization of alanine aminotransferase of rat liver. *J. Biol. Chem.* 242. 2319-2324.
- 9) Segal, H. L. and Kim, Y. S. (1963) Glucocorticoid stimulation of the biosynthesis of glutamic-alanine transaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 50. 912-918.
- 10) Hopper, S. and Segal, H. L. (1962) Kinetic studies of rat liver glutamic-alanine transaminase. *J. Biol. Chem.* 237. 3189-3195.
- 11) Bulos, B. and Handler, P. (1965) Kinetics of beef heart glutamic-alanine transaminase. *J. Biol. Chem.* 240. 3283-3294.
- 12) Saier, M. H. and Jenkins, W. T. (1967) Alanine aminotransferase. *J. Biol. Chem.* 242. 91-108.
- 13) Matsuzawa, T. and Segal, H. L. (1968) Rat liver alanine aminotransferase. *J. Biol. Chem.* 243. 5929-5934.
- 14) Golichowski, A., Harruff, R. C., and Jenkins, W. T. (1977) The effects of pH on the rates of isotope exchange catalyzed by alanine aminotransferase. *Arch. Biochem. Biophys.* 178. 459-467.
- 15) Arnone, A., Rogers, P. H., Hyde, C. C., Briley, P. D., Metzler, C. M., and Metzler, D. E. (1985) Pig cytosolic aspartate aminotransferase: The structures of the internal aldimine, external aldimine, and ketimine and of the β -sobform. In *Transaminase*. P. Christen and D. E. Metzler (eds.), pp. 138-155, Wiley, New York
- 16) Borisov, V. V., Borisova, S. N., Kachalova, G. S., Sosfenov, N. L., and Vainshtein, B. K. (1985) X-ray studies of chicken cytosolic aspartate aminotransferase. In *Transaminase*. P. Christen and D. E. Metzler (eds.), pp. 155-164, Wiley, New York
- 17) Kamitori, S., Okamoto, A., Hirotsu, K., Higuchi, T., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H., Matsuura, Y., and Katsube, Y. (1990) Three-dimensional structures of aspartate aminotransferase from *Escherichia coli* and its mutant enzyme at 2.5 Å resolution. *J. Biochem.* 108. 175-184.
- 18) Tanase, S., Kojima, H., and Morino, Y. (1979) Pyridoxal 5'-phosphate binding site of pig heart alanine aminotransferase. *Biochemistry* 18. 3002-3007.
- 19) Ishiguro, M., Suzuki, M., Takio, K., Matsuzawa, T., and Titani, K. (1991) Complete amino acid sequence of rat liver cytosolic alanine aminotransferase. *Biochemistry* 30. 6048-6053.
- 20) Segal, H. L. and Matsuzawa, T. (1970) L-alanine aminotransferase (rat liver). *Methods Enzymol.* 17A. 153-159.
- 21) Masaki, T., Tanabe, M., Nakamura, K., and Soejima, M. (1981) Studies on a new proteolytic enzyme from *achromobacter lyricus* M497-1. *Biochim. Biophys. Acta* 660. 44-50.
- 22) R egg, U. and Rudinger, J. (1977) Reductive cleavage of cystine disulfides with tributylphosphine. *Methods Enzymol.* 47. 111-116.
- 23) Hermodson, M. A., Ericsson, L. H., Neurath, H., and Walsh, K. A. (1973) Determination of the amino acid sequence of porcine trypsin by sequenator analysis. *Biochemistry* 12. 3146-3153.
- 24) Mahoney, W. C. and Hermodson, M. A. (1980) Separation of large denatured peptides by reverse phase high performance liquid chromatography. *J. Biol. Chem.* 255. 11199-11203.

- 25) Gross, E. (1967) The cyanogen bromide reaction. *Methods Enzymol.* 11. 238-255.
- 26) Hewick, R. M., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E., and Dreyer, W. J. (1981) A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J. Biol. Chem.* 256. 7990-7997.
- 27) Smyth, D. G. (1967) Techniques in enzymic hydrolysis; Trypsin. *Methods Enzymol.* 11. 216-222.
- 28) 網沢 進, 崎山文夫 (1987) グルタミン酸およびアスパラギン酸特異的酵素. pp. 268-269, 日本生化学会編「続生化学実験講座 2. タンパク質の化学上」東京化学同人, 東京
- 29) 瀧尾擴士 (1990) N→O 転移によるヒドロキシアミノ酸のアミノ基側での切断. pp. 94-95, 日本生化学会編「新生化学実験講座 1. タンパク質 II 一次構造」東京化学同人, 東京
- 30) Titani, K. and Narita, K. (1964) Amino acid sequences of eighteen peptides isolated from the tryptic hydrolysate of baker's yeast cytochrome c. *J. Biochem. (Tokyo)* 56. 241-265.
- 31) Inglis, A. S. (1983) Cleavage at aspartic acid. *Methods Enzymol.* 91. 324-332.
- 32) Omenn, G. S., Fontana, A., and Anfinsen, C. B. (1970) Modification of the single tryptophan residue of staphylococcal nuclease by a new mild oxidizing agent. *J. Biol. Chem.* 245. 1895-1902.
- 33) 瀧尾擴士 (1990) トリプトファン結合の化学的切断. pp. 89-92, 日本生化学会編「新生化学実験講座 1. タンパク質 II 一次構造」東京化学同人, 東京
- 34) Landon, M. (1977) Cleavage at aspartyl-prolyl bonds. *Methods Enzymol.* 47. 145-149.
- 35) Heinrikson, R. L. and Meredith, S. C. (1984) Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* 136. 65-74.
- 36) Bidlingmeyer, B. A., Cohen, S. A., and Tarvin, T. L. (1984) Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. Chromatogr.* 336. 93-104.
- 37) Tsunasawa, S. and Narita, K. (1976) Acylamino acid-releasing enzyme from rat liver. *Methods Enzymol.* 45. 552-561.
- 38) Tsunasawa, S. and Narita, K. (1982) Micro-identification of aminoterminal acetyl amino acids in proteins. *J. Biochem.* 92. 607-613.
- 39) Arai, M. K., Takahashi, R., Yokote, Y., and Akahane, K. (1983) Amino-acid sequence of feather keratin from fowl. *Eur. J. Biochem.* 132. 501-507.
- 40) 網沢 進, 崎山文夫 (1987) ブロックされている N 末端基の決定法. pp. 224-229, 日本生化学会編「続生化学実験講座 2. タンパク質の化学上」東京化学同人, 東京
- 41) 鶴 大典 (1983) ピログルタミン酸ペプチダーゼ (ピロリドンカルボキシリルペプチダーゼ). 蛋・核・酵 28. 1349-1354.
- 42) Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 48. 443-453.
- 43) Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157. 105-132.
- 44) Chou, P. Y. and Fasman, G. D. (1978) Empirical predictions of protein conformation. *Annu. Rev. Biochem.* 47. 251-276.
- 45) Higgins, D. G. and Sharp, P. M. (1988) CLUSTAL: A package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73. 237-244.
- 46) Grange, T., Guenet, C., Dietrich, J. B., Chasserot, S., Fromont, M., Befort, N., Jami, J., Beck, G., and Pictet, R. (1985) Complete complementary DNA of rat tyrosine aminotransferase messenger RNA. *J. Mol. Biol.* 184. 347-350.
- 47) Hayashi, H., Horio, Y., Tanaka, T., Taketoshi, M., and Wada, H. (1987) Rat cytosolic aspartate aminotransferase; Molecular cloning of cDNA and expression in *E. coli*. In: *Biochemistry of Vitamin B₆*. T. Korpela and P. Christen (eds.), pp. 39-42, Birkhäuser, Basel
- 48) Janssonius, J. N., Eichele, G., Ford, G. C., Picot, D., Thaller, C., and Vincent, M. G. (1985) Spatial structure of mitochondrial aspartate aminotransferase. In: *Transaminase*. P. Christen and D. E. Metzler (eds.), pp. 109-138, Wiley, New York
- 49) Huyuh, Q. K., Sakakibara, R., Watanabe, T., and Wada, H. (1980) Primary structure of mitochondrial glutamic oxaloacetic transaminase from rat liver: Comparison with that of the pig heart isozyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97. 474-479.
- 50) Mavrides, C. and Christen, P. (1978) Mitochondrial and cytosolic aspartate aminotransferase from chicken activity toward aromatic amino acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85. 796-773.
- 51) Kondo, K., Wakabayashi, S., and Kagamiyama, H. (1987) Structural studies on aspartate aminotransferase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262. 8648-8659.
- 52) Mehta, P. K., Hale, T. I., and Christen, P. (1989) Evolutionary relationships among aminotransferases. *Eur. J. Biochem.* 186. 249-253.
- 53) Ishiguro, M., Takio, K., Suzuki, M., Oyama, R.,

- Matsuzawa, T., and Titani, K. (1991) Complete amino acid sequence of human liver cytosolic alanine aminotransferase (GPT) determined by a combination of conventional and mass spectral methods. *Biochemistry* 30. 10451-10457.
- 54) Matsuzawa, T., Tashiro, K., Kasahara, M., Ishiguro, M., and Titani, K. (1991) Human liver cytosolic alanine aminotransferase: Purification, properties and localization. *1st Int. Congr. "Vitamins Biofact. Life Sci." (ICVB)*. 66.
 - 55) Klotz, I. M. (1967) Succinylation. *Methods Enzymol.* 11. 576-580.
 - 56) Skoog, B. and Wichman, A. (1986) Calculation of the isoelectric points of polypeptides from the amino acid composition. *Trends Anal. Chem.* 5. 82-83.
 - 57) Chen, S., Giblett, E. R., Anderson, J. E., and Fossum, B. L. G. (1972) Genetics of glutamic-pyruvic transaminase: Its inheritance, common and rare variants, population distribution, and, differences in catalytic activity. *Ann. Hum. Genet. Lond.* 35. 401-409.
 - 58) Saha, N. and Bhattacharyya, S. P. (1989) Glutamate-pyruvate transaminase subtypes in Singapore ethnic groups. *Hum. Hered.* 39. 110-112.
 - 59) Kanemitsu, F., Kawanishi, I., Mizushima, J., and Okigaki, T. (1990) Electrophoretic and kinetic characterization of three variants of soluble cytoplasmic L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase in human liver tissue. *Clin. Biochem.* 23. 121-125.
 - 60) Ishimoto, G. and Kuwata, M. (1974) Red cell glutamic-pyruvic transaminase polymorphism in Japanese populations. *Jpn. J. Hum. Genet.* 18. 373-377.
 - 61) Ueda, S., Omoto, K., Park, K. S., and Kudo, T. (1979) Polymorphism of red cell glutamic-pyruvic transaminase in Japanese: Gene frequencies in samples from northern Japan. *Hum. Hered.* 29. 208-212.
 - 62) 網沢 進, 今中健博 (1985) アシルアミノ酸遊離酵素. 蛋・核・酵30. 496-501.
 - 63) Roepstorff, P., Nielsen, P. F., Klarskov, K., and Hojrup, P. (1988) Applications of plasma desorption mass spectrometry in peptide and protein chemistry. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 16. 9-18.
 - 64) Klarskov, K., Breddam, K., and Roepstorff, P. (1989) C-terminal sequence determination of peptides degraded with carboxypeptidases of different specificities and analyzed by 252-Cf plasma desorption mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 180. 28-37.
 - 65) Choudhury, B. K., Setoyama, C., and Shimada, K. (1990) Molecular cloning and sequence analysis of the human cytosolic aspartate aminotransferase gene. *Biochem. Int.* 22. 583-591.
 - 66) Martini, F., Angelaccio, S., Barra, D., Pascarella, S., Maras, B., Doonan, S., and Bossa, F. (1985) The primary structure of mitochondrial aspartate aminotransferase from human heart. *Biochim. Biophys. Acta* 832. 46-51.
 - 67) Ishiguro, M., Takio, K., Suzuki, M., Oyama, R., Matsuzawa, T., and Titani, K. (1991) Complete amino acid sequence of human liver cytosolic alanine aminotransferase (GPT). *1st Int Congr. "Vitamins Biofact. Life Sci." (ICVB)*. 66.
 - 68) Rettenmeier, R., Natt, E., Zentgraf, H., and Scherer, G. (1990) Isolation and characterization of the human tyrosine aminotransferase gene. *Nucleic Acids Res.* 18. 3853-3861.
 - 69) Cubellis, M. V., Rozzo, C., Nitti, G., Arnone, M. I., Marino, G., and Sannia, G. (1989) Cloning and sequencing of the gene coding for aspartate aminotransferase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Eur. J. Biochem.* 186. 375-381.
 - 70) Kuramitsu, S., Inoue, K., Ogawa, T., Ogawa, H., and Kagamiyama, H. (1985) Aromatic amino acid aminotransferase of *Escherichia coli*: Nucleotide sequence of the tyrB gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133. 134-139.
 - 71) 井上 桂, 倉光成紀, 鏡山博行 (1991) 大腸菌芳香族アミノ酸アミノ基転移酵素の Leu 39 の役割. 第64回日本生化学会大会発表抄録集. 654.
 - 72) Takada, Y., Kaneko, N., Esumi, H., Purdue, P. E., and Danpure, C. J. (1990) Human peroxisomal L-alanine: Glyoxylate aminotransferase. *Biochem. J.* 268. 517-520.
 - 73) Watanabe, N., Sakabe, K., Sakabe, N., Sasaki, K., Yonaha, K., Toyama, S., Aibara, S., and Morita, Y. (1990) Crystal structure analysis of ω -amino acid: Pyruvate aminotransferase and study on reaction mechanism using synchrotron radiation. In *Protein Engineering, Protein Design in Basic Research, Medicine, and Industry*. M. Ikehara (ed.), pp. 97-102, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo.
 - 74) Tanizawa, K., Asano, S., Masu, Y., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H., Tanaka, H., and Soda, K. (1989) The primary structure of thermostable D-amino acid aminotransferase from a thermophilic bacillus species and its correlation with L-amino acid aminotransferase. *J. Biol. Chem.* 264. 2450-2454.
 - 75) Kuramitsu, S., Ogawa, T., Ogawa, H., and Kagamiyama, H. (1985) Branched-chain amino acid aminotransferase of *Escherichia coli*: Nucleotide

- sequence of the *ilvE* gene and the deduced amino acid sequence. *J. Biochem.* 97. 993–999.
- 76) Degols, G., Jauniaux, J. C., and Wiame, J. M. (1987) Molecular characterization of transposable–element–associated mutations that lead to constitutive L–ornithine aminotransferase expression in *saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 165. 289–296.
 - 77) Inana, G., Totsuka, S., Redmond, M., Dougherty, T., Nagle, J., Shiono, T., Ohura, T., Kominami, E., and Katunuma, N. (1986) Molecular cloning of human ornithine aminotransferase mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83. 1203–1207.
 - 78) Mueckler, M. M. and Pitot, H. C. (1985) Sequence of the precursor to rat ornithine aminotransferase deduced from a cDNA clone. *J. Biol. Chem.* 260. 12993–12997.
 - 79) Otsuka, A. J., Buoncristiani, M. R., Howard, P. K., Flamm, J., Johnson, C., Yamamoto, R., Uchida, K., Cook, C., Ruppert, J., and Matsuzaki, J. (1988) The *Escherichia coli* biotin biosynthetic enzyme sequences predicted from the nucleotide sequence of the *bio* operon. *J. Biol. Chem.* 263. 19577–19585.
 - 80) Richardson, I. B., Hurley, S. K., and Hynes, M. J. (1989) Cloning and molecular characterisation of the *amdR* controlled *gatA* gene of *aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 217. 118–125.
 - 81) Carlomagno, M. S., Chiariotti, L., Alifano, P., Napo, A. G., and Bruni, C. B. (1988) Structure and function of the *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* K–12 histidine operons. *J. Mol. Biol.* 203. 585–606.
 - 82) Nishiwaki, K., Hayashi, N., Irie, S., Chung, D. H., Harashima, S., and Oshima, Y. (1987) Structure of the yeast *HIS5* gene responsive to general control of amino acid biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 208. 159–167.
 - 83) Oda, T., Miyajima, H., Suzuki, Y., and Ichiyama, A. (1987) Nucleotide sequence of the cDNA encoding the precursor for mitochondrial serine: pyruvate aminotransferase of rat liver. *Eur. J. Biochem.* 168. 537–542.
 - 84) Misrahi, M., Atger, M., and Milgrom, E. (1987) A novel progesterone–induced messenger RNA in rabbit and human endometria. Cloning and sequence analysis of the complementary DNA. *Biochemistry* 26. 3975–3982.
 - 85) Watzele, G. and Tanner, W. (1989) Cloning of the glutamine: Fructose–6–phosphate aminotransferase gene from yeast. *J. Biol. Chem.* 264. 8753–8758.
 - 86) Richaud, C., Richaud, F., Martin, C., Haziza, C., and Patte, J. C. (1984) Regulation of expression and nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *dapD* gene. *J. Biol. Chem.* 259. 14824–14828.
 - 87) Feild, M. J., Nguyen, D. C., and Armstrong, F. B. (1989) Amino acid sequence of *Salmonella typhimurium* branched–chain amino acid aminotransferase. *Biochemistry* 28. 5306–5310.
 - 88) Inoue, K., Kuramitsu, S., Aki, K., Watanabe, Y., Takagi, T., Nishigai, M., Ikai, A., and Kagamiyama, H. (1988) Branched–chain amino acid aminotransferase of *Escherichia coli*: Overproduction and properties. *J. Biochem.* 104. 777–784.
 - 89) Liu, L., Whalen, W., Das, A., and Berg, C. M. (1987) Rapid sequencing of cloned DNA using a transposon for bidirectional priming: Sequence of the *Escherichia coli* K–12 *avt A* gene. *Nucleic Acids Res.* 15. 9461–9469.