

《農芸化学奨励賞》



X線結晶構造解析による酵素反応の分子機構に関する研究

九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門 助教授 角田 佳 充

酵素反応の分子機構を立体構造情報に基づいて明らかにしていく研究は、近年ますます盛んになりつつある。構造解析の実験手段としては、X線結晶構造解析がその中心的なものとなっている。この手法によって、酵素単独の立体構造を決定するだけでなく、基質との複合体の構造、反応中間状態の構造などを解析することで、さまざまな酵素の反応メカニズムの分子機構の詳細が明らかになってきている。本研究では、硫酸転移酵素、リボスクレアーゼ、ほか、さまざまな酵素について、X線結晶構造解析による酵素反応の分子機構を解明することを目指した。本要旨では、硫酸転移酵素の研究について記述する。

1. 硫酸転移酵素

硫酸基は細胞内、外においてさまざまな場面で働いており、ステロイドホルモン、神経伝達物質などの内因性物質の不活性化とその活性濃度の制御、薬物、癌原物質などの外来性物質の不活性化、活性化、糖鎖を通じたシグナル伝達、タンパク質の翻訳後修飾によるタンパク質の機能の制御など重要な役割を担っている。この硫酸基の転移反応を触媒する酵素は硫酸転移酵素 (sulfotransferase) と呼ばれている。硫酸転移酵素は基質分子の水酸基もしくはアミン基に3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホサルフェート (PAPS) から硫酸基を転移する反応を触媒する。

硫酸転移酵素は、その局在性から細胞質型とゴルジ膜結合型に大別できる。細胞質型の硫酸転移酵素は低分子を基質としてとり、ゴルジ膜結合型の硫酸転移酵素は、糖鎖やタンパク質を基質としてとる。筆者らのこれまでの硫酸転移酵素の研究において、細胞質型としてマウス肝臓で働く硫酸転移酵素を3種類、ゴルジ膜結合型としてヒトのゴルジ体内でヘパラン硫酸の生合成過程で働く硫酸転移酵素を2種類、結核菌にある硫酸転移酵素と思われるタンパク質を2種類、立体構造を決定してきた。これらの構造解析を通して行った硫酸転移反応のメカニズムについての研究を紹介する。

2. 細胞質型のマウスエストロゲンスルホトランスフェラーゼ (EST) の X線結晶構造解析

ESTは分子量約33,000の可溶性タンパク質で、ヒトでは主に肝臓で、マウスでは主に精巣で発現している。アクセプター基質の女性ホルモンであるエストロゲンの3位のフェノール基に硫酸基を転移する反応を触媒し、体外から摂取した物質も基質とする。転移反応により基質分子はエストロゲン活性を消失し、可溶性が上がる。

硫酸転移酵素として最初の立体構造解析は、EST、アクセプター基質である β -エストラジオール (E2) 分子、PAPSの反応後生成物 PAP の3分子複合体として行った。その結果、ESTは α/β 構造をとっており、E2分子、PAP分子ともタンパク質にほとんど覆われる状態で結合していた。基質結合部位と補酵素結合部位はつながったトンネルになっており、基質と補酵素がそれぞれ外からタンパク質内部に入ってきて、分子中央の活

性部位で反応し、また外に出ていくということが想像できる。非常に疎水的な E2 分子に対応して、EST の多くの疎水性アミノ酸が E2 分子全体を覆っていると同時に、E2 分子の両端の3位のフェノール基と17位の水酸基には、EST の Lys106 と His108, Asn86 がそれぞれ水素結合していた。したがって、EST は疎水性相互作用と水素結合の両方によって、基質分子を酵素反応に適切な位置と方向に決めていると考えられる。PAP は、5' と 3' の二つのリン酸基と間の水素結合と、アデニンリングと間のスタッキング結合 (Phe229 と Trp53) によって認識されていた。3'リン酸基は、PAP, PAPS に特異的に存在しているため、EST 分子が PAP, PAPS 分子を選択するにあたって、この水素結合が重要であると考えられる。

3. 膜結合型のヒトヘパラン硫酸 *N*-デアセチラーゼ/*N*-スルホトランスフェラーゼ 1 の硫酸転移酵素ドメイン (NST1) の X線結晶構造解析

ヘパラン硫酸 *N*-デアセチラーゼ/*N*-スルホトランスフェラーゼ (NDST-1) は、ヘパラン硫酸の生合成過程において、*N*-アセチルグルコサミンのアセチル基をアミノ基へ置換し、さらに硫酸基を転移する反応を触媒する酵素である。筆者らは、ヒトの NDST-1 のスルホトランスフェラーゼドメイン (NST1) を大腸菌で発現させ、スルホトランスフェラーゼ活性のみのあるタンパク質を得た。このタンパク質を PAP との複合体の状態で結晶化を行い、Se-Met を用いた MAD 法で位相情報を得、立体構造を決定した。NST1 の立体構造も α/β 構造であった。

4. 硫酸基転移反応のメカニズム

NST1 の結晶構造は、EST と非常によく似た PAPS 結合構造を保持したものであった。したがって、重ね合わせによって、PAPS に対する相対的な位置関係を比較することができ、EST で予想される活性残基を、NST1 の立体構造上で対応づけることで、NST1 の活性残基を予想することができた。特に、硫酸基転移反応の遷移状態に擬似的な構造と考えられる EST-PAP-vanadate 複合体の立体構造との重ね合わせによって、EST において活性残基であると考えられる Lys48, Lys106, His108 のそれぞれに対応して、NST1 の Lys614, Lys676, Glu642 が配置していた。

NST1 の Lys614 は、EST の Lys48 とほとんど同じ部位に同じコンホメーションで存在しており、同様の役割 (PAPS 分子の硫酸基と5'リン酸基との間のブリッジ酸素へのプロトン供与体) をしていることが示唆される。NST1 の Lys676 は、EST の Lys106 とほぼ同様な位置にあり、硫酸基を遷移状態において安定化していると考えられる。NST1 の Glu642 は、硫酸基が転移される部位と考えられる位置と水素結合できる配置をしている。Glu はプロトン受容体として働きうるアミノ酸であることから、EST の His108 と同様に基質に対するプロトン受容体としての役割をしていると考えられる。

以上のことから、NST1 は鎖状ポリマーのアミン、EST が低分子のフェノールを基質とし、全く異なった基質との反応を担っているにもかかわらず、同様の役割をもったアミノ酸残基が存在し、類似の硫酸基転移反応のメカニズムが働いていることが示唆された。

近年、硫酸転移酵素の研究は、分子生物学や医学など、多方面の研究分野から興味をもたれ、本研究成果は硫酸転移酵素ノックアウトマウスを作製する場合の欠損領域の特定など、スルホトランスフェラーゼに関する今後の研究の展開に大きく貢献している。現在は、結核菌由来硫酸転移酵素についての研究も進めており、感染への関与を含めて、構造生物学的な観点から研究を進めている。

本研究は、九州大学大学院農学研究院、NIEHS/NIH (USA),

および大阪大学大学院理学研究院において行われたものであり、本研究の機会を与えてくださり、終始ご指導、ご鞭撻をいただきました九州大学大学院農学研究院の木村 誠教授、NIEHS の根岸正彦先生、大阪大学大学院理学研究院の福山恵一教授に心より感謝いたします。本研究は、こららの研究室の多くの学生、ポスドク研究員の協力によるものであり、ここに厚く御礼申し上げます。また、学生時代より研究をご指導いただいた北海道大学名誉教授・引地邦男先生に感謝いたします。NIEHS において分子生物学実験技術についてご指導いただいた末吉達也博士、構造解析についてご指導いただいた Lars Pedersen 博士に感謝いたします。おわりに、本奨励賞にご推薦くださいました農芸化学会西日本支部長の今泉勝己先生ならびにご支援を賜りました諸先生方に厚く御礼申し上げます。