

翻訳後修飾および薬物代謝における硫酸化の意義・機能に関する研究



宮崎大学農学部応用生物科学科 教授 水光正仁

1984年、ノーベル賞学者リップマンはタンパク質および様々な生理活性物質の硫酸化が、種々の生理機能において重要な役割を担っていることを提唱し、その生理的意義や硫酸化反応を触媒する酵素の構造と機能に関する研究の重要性を指摘した。著者は、九州大学において学位取得後、ロックフェラー大学のリップマン博士の下で博士研究員として研究に従事して以来、「硫酸化」をキーワードとして、主として1. 翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化の機能に関する研究、および2. 細胞質硫酸転移酵素の構造と機能に関する研究を展開してきた。これらの研究は、研究者の数が極めて少ないフロンティア研究として位置づけられている。また、これらの応用生物化学的手法を3. 食品の機能性評価法開発にも応用してきた。以下に、その主要な成果の概要を紹介する。

1. 翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化の機能

翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化は、1982年に同定法が確立し、種々のタンパク質のチロシン残基に硫酸化が起ることが明らかになったが、その生理機能および意義などについての詳細は全く不明であった。

1-1 タンパク質チロシン硫酸化の生理的機能

今日までに、著者等は、翻訳後修飾としてのタンパク質のチロシン硫酸化に関して数多くの新発見を報告した。まず、硫酸転移酵素活性の測定に不可欠な硫酸供与体である活性硫酸3'-ホスホアデノシン5'-ホスホ硫酸 (PAPS) の好熱性細菌酵素、およびヒト PAPS 合成酵素を利用した効率の良い合成法を考案した。次いで、がん細胞では正常細胞に比べてタンパク質のチロシン硫酸化は著しく増加するが、チロシン硫酸化は逆に減少することを明らかにし、この原因が、PAPS 生成量の減少に起因することを証明した。また、細胞間の接着等に関与する糖タンパク質であるフィブロネクチンのチロシン硫酸化の部位を決定し、その後脱硫酸化したところ、フィブロネクチンのフィブリンに対する結合力が著しく減少することを見出し、チロシン硫酸化がタンパク質の立体構造とその機能に重要な影響を及ぼす可能性を提案した。

1-2 タンパク質チロシン硫酸転移酵素 (TPST) の構造と機能

細胞内における TPST の局在性は長い間不明であったが、ラット肝臓ゴルジ体 (トランス) にこの TPST が存在することを明らかにすると同時に、チロシン硫酸化をシグナルとしたタンパク質の細胞外への分泌機構の存在を提案した。また、牛肝臓および心臓のゴルジ体を用いて、TPST の単離精製を行い、その諸性質を明らかにした (図1)。さらに、哺乳動物において2種類存在する TPST をヒトおよびマウスからクローニングし、培養動物細胞で発現させて酵素化学的にその諸性質を比較検討した。魚類のモデル生物であるゼブラフィッシュに関して、TPST 遺伝子が3種類存在することを明らかにし、*in vivo* 遺伝子ノックダウン実験により、チロシン硫酸化は生命にとって不可欠であることを明らかにした。

この TPST が、ターゲットとなるタンパク質を硫酸化修飾するメカニズムは長い間不明であったが、この酵素の立体構造を、X線結晶構造解析により原子レベルで解明することに成功した。その結果、この酵素は二量体 (ホモダイマー) を形成し、その二量体の間につくられる奥深い溝の部分でターゲットとな

るタンパク質のチロシン残基部分を認識して、その部分で特異的に硫酸基をつけていることが判明した。この成果は、2013年3月 Nature Communications に掲載された (図2)。

最近の研究から、このタンパク質チロシン硫酸化は、ヒトにおける生体防御機構において、重要な役割を果たしていることが判明した。例えば、抗体の異物認識、白血球の炎症部位への移動、補体因子の活性化などが挙げられる。その一方で、ヒト細胞表面に存在する受容体タンパク質につけられた硫酸基は、エイズや手足口病などの原因ウイルスがヒト細胞へ感染する際の目印として使われている。タンパク質チロシン硫酸転移酵素の立体構造が明らかになり、そのターゲットとなるタンパク質の認識方法が判明したことで、この酵素に対する阻害剤の開発が可能になった。従って、特異的な阻害剤が開発できれば、ウイルス感染に対する薬としての利用だけでなく、生体防御反応の制御など、新しいタイプの医薬品としての応用が期待される。

2. 細胞質硫酸転移酵素の構造と機能

細胞質硫酸転移酵素 (SULT) が触媒する生体内の硫酸化反

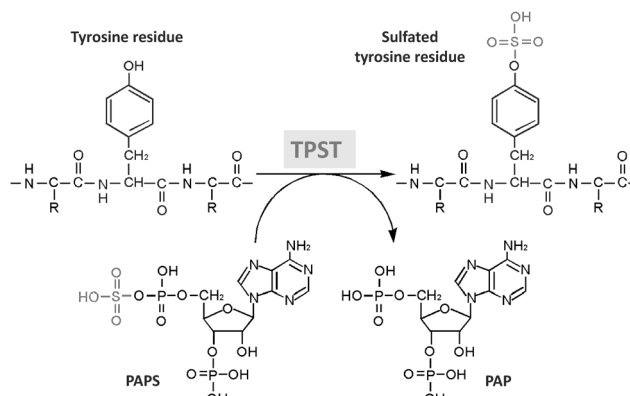
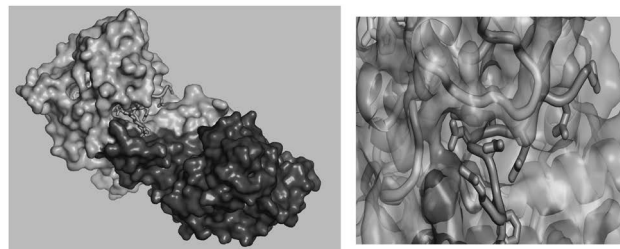


図1 翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化反応機構

チロシン硫酸化は、分泌タンパク質や膜タンパク質を基質とし、細胞内輸送や分泌のシグナルとして働く。また、タンパク質の生理活性・寿命を変化させたり、タンパク質間相互作用を調節したりする機能がある。



黄土色と茶色の二量体活性部位に結合しているターゲットタンパク質 拡大図 硫酸基がつけられるタンパク質 (青) は、90° 折れ曲がって深い溝に結合

図2 ヒト TPST の X線結晶構造解析

柔らかい構造をしたターゲットタンパク質は、TPST の深い溝の奥に入り込み、さらに90°折れ曲がることで活性部位の適切な位置に結合して、硫酸化修飾をうける。TPST の溝表面には、プラスの電荷が準備されていて、ターゲットとなるタンパク質のマイナス電荷部位を特異的に認識する。

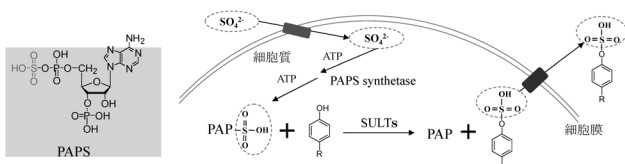


図3 細胞質硫酸転移酵素 (SULT) の構造と機能

SULT は活性硫酸PAPSを利用して低分子化合物の水酸基やアミノ基に硫酸基を転移する反応を触媒する。SULTの役割は、生体外異物・薬物・食品成分の代謝・排泄に関わると同時にステロイドホルモン等の内因性化合物の生理活性調節および恒常性維持に関与している。最近では、硫酸化された代謝物が新たな機能を発揮することが分かってきた。

応は、異物・薬物の解毒代謝機構や、ステロイドホルモンや神経伝達物質などの内因性生理活性物質のホメオスタシスや活性調節に関与する(図3)。

2-1 脊椎動物硫酸転移酵素のクローニング、発現および諸性質

著者等は、分子生物学的手法を用いてSULTを探索し、ヒトにおいて既知14種のうち5種、マウスにおいて既知17種のうち10種の新規酵素を発見した。これらの研究により、SULTはシトクロムP450のように遺伝子スーパーファミリーを形成し、様々な薬物や内因性生理活性物質の代謝に関与することが明らかとなった(図4)。さらに、ヒト、マウス、ゼブラフィッシュおよびモデル植物であるシロイヌナズナを対象として、これらの生物種の持つSULTを遺伝子工学的に大腸菌で発現させ、リコンビナント酵素を用いた酵素化学的研究を展開した。その結果、キメラ硫酸転移酵素を用いた研究において酵素の基質認識領域を明らかにした。

分子生物学と生化学的手法を駆使したコレステロール硫酸転移酵素SULT2B1と細胞骨格タンパク質との相互作用を発見した。さらに、新規硫酸転移酵素SULT7A1による既存の硫酸化反応とは全く異なる α,β -不飽和カルボニル化合物を標的とした新規硫酸化反応の発見は興味深い。

一方、多くのSULTは胎児期および新生時期に強く発現していることが知られているが、その時期における機能は全く分かっていない。著者等は、モデル生物としてゼブラフィッシュを用いて、その18種類のSULTをクローニングし、全てのSULTの発現解析および諸性質を明らかにした。さらに、ヒトにおける硫酸化の重要な機能の一部である薬物、胆汁酸、ステロイド類の代謝が、ゼブラフィッシュにおいても同様に行われていることを酵素化学的、および肝臓培養細胞を用いた代謝実験により明らかにした。

その後、著者等は食品機能分野におけるSULTの役割に着目し、ポリフェノール性食品機能成分の代謝に硫酸化が強く関与することを明らかにした。

2-2 脊椎動物硫酸転移酵素の構造活性相関

ターゲットとなる低分子化合物の硫酸化のメカニズムは不明であったため、いくつかの細胞質硫酸転移酵素の立体構造をX線結晶構造解析により、原子レベルで解明することに成功し、ヒスチジン等を中心とする触媒メカニズムや基質認識機構を明らかにした。

3. 食品の機能性評価法

生化学的、細胞情報工学的手法を駆使して、一つの実験系で10種類の食品の機能性を効率的に推定できる画期的なシステム「ハイスルーブット食品機能性評価法」を開発し、その特許を取得した。このシステムを用いて「食品の機能性評価と活性成分の探索および作用機序解明に関する研究」を行い、ブルーベリー葉から成人T細胞白血病(ATL)のウイルスHTLV1の増殖を抑えるプロアントシアニジンの存在を明らかにした。

以上のように、著者は、翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化

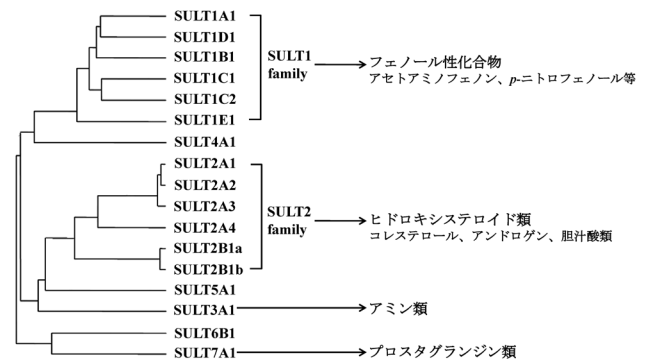


図4 マウスSULTsの系統樹

SULTは、ヒトには14種類、マウスには17種類、ゼブラフィッシュには18種類そして植物には17種類存在する。植物SULTは、フラボノイドやブラシノステロイド類を硫酸化する。

および薬物・異物の薬物代謝第二相反応の硫酸化を中心に農芸化学的研究手法を駆使して、研究を行ってきた。これらの研究は、JSPS主催「頭脳循環を加速する若手研究者戦略的海外派遣プログラム」(2013年~2015年)に採択され、活発に事業を展開している。更に、これらの技術を応用して、JST主催の宮崎県地域結集型共同研究事業「食の機能を中心としたがん予防基盤技術創出」(2004年~2008年)(予算総額13億円)を立ち上げ、その研究リーダーを務めた。

おわりに

生体内での無機硫酸が活性硫酸PAPSとなり、それはそれぞれの硫酸転移酵素により薬物・異物および内因性生理活性物質の代謝としての硫酸抱合反応、タンパク質の翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化、またムコ多糖類や糖脂質の糖鎖の硫酸化のために使われる。この硫酸化は、低分子から高分子タンパク質まで関わり、細胞から細胞外への分泌、機能の調節および体外への排出と極めて重要な働きをしている。タンパク質チロシン硫酸化に関わるTPSTの遺伝子をノックダウンすると致死的になることから、それぞれの硫酸化されたタンパク質の生体内での機能性は、極めて重要な役割を演じている。生物は、シグナル伝達のためにリン酸化を利用し、まだ十分に機能性が解明されていないが、硫酸化もなくてはならない修飾であることが分かってきた。今後、この無機硫酸による生体内制御機構をさらに深く解明し、故リッブマン教授の遺言に報いたい。

謝辞 本研究は、九州大学農学部農芸化学科農薬化学教室故前川一之教授、故江藤守総教授および谷口栄二教授の下で行った核酸塩基類似体チアジアゾピリミジンの合成とその生理活性研究の中で、イオウを含む化合物の酸化物に機能性があることから出発した。そのイオウの酸化物が縁で、ロックフェラー大学故リッブマン教授の下で硫酸化に関する研究を行うことが出来、極めて幸運な研究へと発展した。これらの4先生に心より感謝致します。また、この留学の機会を紹介頂いた九州大学故向井純一郎教授に心より感謝致します。リッブマンラボで出会い、生涯の共同研究者となった現米国オハイオ州トレド大学薬学部教授Liu Ming-Cheh博士に感謝致します。Liu教授とは30年にわたり、オクラホマ大学、テキサス大学そして現在のトレド大学において、研究を継続してきた。これらの研究が基で、トレド大学との大学間交流協定締結も出来、今後の若手研究者の交流の機会も作ることが出来た。この研究は、宮崎大学農学部応用生物科学科の榊原陽一教授、黒木勝久博士を始め、多くの卒業生、在校生ならびに学内外の多くの共同研究者のご協力をいただいていた行われたものです。最後になりますが、本賞にご推薦下さいました九州大学大学院教授木村 誠先生にお礼申し上げます。