

硫酸化チロシン蛋白質の形成とその機能解明

(蛋白質チロシン硫酸化および脱硫酸化酵素の単離・精製)

細胞内の高分子のうちで最も主要な成分である蛋白質は量的に多いだけでなく、多種類の酵素やホルモンなどとして生体内における代謝の調節などを行う重要な生体の構成成分である。細胞内において蛋白質が合成されるには、まずアミノ酸が各アミノ酸に特異的に対合するtRNAの3'末端のリボースに結合してアミノアシルtRNAとなる。次にmRNAがリボソームと結合し開始複合体を形成する。そして、リボソームに結合したmRNAのコドンに対応するアンチコドンを持ったアミノアシル-tRNAのアミノアシル転移が起こりポリペプチド鎖が伸長され、mRNAの終止コドンがリボソームに達するとポリペプチド鎖はtRNAより切り離され遊離する。リボソームから遊離したポリペプチド鎖はさらに種々の修飾を受け完成した蛋白質となる。この翻訳後の蛋白質の共有結合的修飾としてグリコシル化、メチル化、硫酸化、リン酸化、N末端の何個かのアミノ酸の除去およびN末端アミノ酸のブロック、S-S結合の新生による分子内架橋、ミリスチン酸によるアシル化等が知られている。リン酸化については、細胞増殖制御、特に癌化との極めて重要な関係が示唆されており、近年、リン酸化と分子的に非常に類似した硫酸による蛋白質チロシン残基上における共有結合的修飾が見つかり注目されている。

生体内での硫酸化は解毒代謝、そしてムコ多糖類や蛋白質糖鎖について研究が進められ、蛋白質中のチロシン残基についてはあまり注目されていなかった。硫酸供与体として活性硫酸3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate(PAPS)が1950年代に、Fritz Lipmannにより発見された。

硫酸化チロシン残基は最初にFibrinopeptide Bに見出された。しかし、硫酸エステルが酸に対して不安定なため、従来のアミノ酸分析では検出されず、FibrinogenとFibrin, Gastrin, Phyllokinin, Caerulein, Cholecystokin, Hirudin, Leu-enkephalinなどのほんの数種の蛋白質やペプチドにのみその存在が限られ、蛋白質中のチロシン硫酸化は稀な修飾と見なされていた。 [^{35}S] 硫酸ラベルによる硫酸化チロシンの検出法

の使用に至り、生体内の広範囲の蛋白質中のチロシンが硫酸化されていることがわかった。またいくつかの生物中の様々な分子量の蛋白質、例えば Complement C4, Fibronectin, Hybridoma immunoglobulin G, Secretogranins, Drosophila yolk protein, Human α -Fetoprotein, Entactin, Thyroglobulin, Collagen V, A431細胞膜糖蛋白質, 副甲状腺分泌蛋白質 I そして α -2-antiplasmin等に硫酸化チロシンの存在が明らかにされた。

蛋白質中の硫酸化チロシンの生物化学的意義・機能として蛋白質の生理活性の調節、機能の多様化、蛋白質分解に対する安定性の変化等が現在報告されている。Huttner等は硫酸化チロシンが分泌性の蛋白質に多いことから低分子化合物同様に分泌のためのシグナルではないかと考えている。

Liu, Lipmann 等はロックフェラー大学において3Y1細胞(Rat embryo fibroblast)とその悪性転換した細胞を用いてそれぞれの細胞中の蛋白質中の硫酸化チロシン含量を測定し、悪性転換した細胞は正常細胞に比べてその含量が激減していたことを報告し、Liu,水光等はこれが悪性転換細胞においてPAPSの生成が抑えられるためであることを解明した。そして硫酸化チロシン蛋白質の最終分解産物として硫酸化チロシンを同定し、それらの細胞内から細胞外への早いターンオーバーを明らかにした。

1. Tyrosylprotein sulfotransferaseの生体内からの単離・精製

生体内において硫酸化は、多くの外因性や内因性の化合物の代謝や、タンパク質のチロシン残基や糖鎖の翻訳後修飾として重要な役割を演じている。これらの硫酸化は異なる硫酸転移酵素により活性硫酸(PAPS)から基質のOH基へ硫酸基を転移することにより行われる。種々の硫酸転移酵素は細胞質と膜の両画分に局在し、タンパク質チロシン硫酸化に関与する転移酵素(TPST)は、ゴルジ体の膜に結合する膜内在性糖タンパク質である。今回牛肝臓ミクロゾーム画分およびゴルジ体に存在する硫酸転移酵素の諸性質の検討と遺伝子工学の産物すなわちリコンビナントタンパク質の効率良いチロシン硫酸化を目的として研究を行った。

その結果、ゴルジ体を含むミクロゾーム画分にはシンプルフエノール

誘導体やチラミンやドーパミンを硫酸化し、熱安定性の低いモノアミンフォームの新しい硫酸転移酵素が存在することを明らかにした。一方、牛肝臓のゴルジ体から調製したTPSTはZ-Glu-TyrやBoc-CCK-8など数種のオリゴペプチドを硫酸化し、TyrのN端側がAspの時Gluに比べ効率よく硫酸化し、Lysの場合硫酸化しないことを明らかにした。このことよりTPSTの基質の認識はアミノ酸配列に依存していることが示唆された。また牛血清中の硫酸化チロシン結合性タンパク質(TSBP)を反応混液に加えることにより、 K_m 値が1/10に減少した。

ヒル由来の血液凝固阻害剤ヒルジンは63番目のTyrのみ硫酸化を受けており、遺伝子工学的に酵母が生産したヒルジンは硫酸化されていないため、*in vitro*での硫酸化が必要とされる。TPSTによる硫酸化を試みた結果、63番目のTyrのみの硫酸化に成功した。これらのことより、リコンビナントタンパク質の翻訳後修飾として、牛肝臓由来のTPSTを用いて特異的チロシン硫酸化が可能となった。

2. Tyrosylprotein sulfataseの検索および単離・精製

ある種の蛋白質は翻訳された後にチロシン残基の硫酸エステル化を受ける。この化学修飾は分泌または生物機能調節に関与していると推測されるが、その他は明らかでなく、その生物化学的意義、機能の解明が急がれている。ヒト尿中に多量のフリーの硫酸化チロシンが排泄されており、これは最終代謝産物と考えられている。しかし培養細胞系で [35 S]無機硫酸を用いラベル化した後、分解された蛋白質と生じた硫酸化チロシンの量の間には差がある事、また *in vitro* 系で、cholecystokinin や gastrin の硫酸体と非硫酸体の示すホルモン活性に差があることが報告された。この事から、ホ乳類の体内に脱硫酸化により生理機能を調節する機構の存在を想定し、いまだ報告されていない、蛋白質の硫酸体に特異的に作用する脱硫酸化酵素の検索を行った。

様々な非ホ乳類や、ウシ肝臓、ブタ脳、ヒト白血球、ヒト血清、ヒト胎盤由来の aryl-sulfatase を調製し硫酸化ペプチドやフリーの硫酸化チロシンに対する活性を HPLC で分析したところ、VI型以外の非ホ乳類の酵素は全ての硫酸化チロシンに活性を示し、VI型は N端の硫酸化チロ

シンに特異的であり、脱硫酸化活性が硫酸化チロシン付近の官能基に強く影響を受けることが明らかとなった。一方、ホ乳類の酵素は全ての硫酸化チロシンに活性を示さなかった。さらに、ウシ肝臓より調製した arylsulfatase とホモジネートを用い、培養細胞より分泌された [^{35}S] ラベル蛋白質に対する活性を測定したが、放射活性の低下は見られなかった。以上よりウシ肝臓には求める sulfatase は存在しないこと、また生物種の間で arylsulfatase の機能に差異がある可能性が示された。チロシン硫酸体の特異的な sulfatase は極めて高い基質特異性を持つか、局在していること等が考えられる。

以上、これらの研究は文部省科学研究費補助金（平成元年、2年度）に負うところ極めて大であり、ここに厚く感謝する。

平成3年3月

研究代表者 水光 正仁