

研究概要

本基盤研究(C)(2)では翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化の機能解明、特にタンパク質の分泌および選別輸送機構におけるチロシン硫酸化の役割、を目的として研究した。なお、本研究は平成6年度～8年度の基盤研究(C)(2)の研究を更に進めたものである。

生体内での硫酸化は化合物の水酸基に活性硫酸(3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホサルフェート:PAPSと略)の硫酸基を転移し硫酸エステルを作る酵素反応である。

現在までに、硫酸化されることが知られている様々な外因性および内因性の化合物として、フェノール性の異物、カテコールアミン、ステロイド、アルコール、胆汁酸、アリルアミン、タンパク質のチロシン残基および糖鎖、ペプチド、プロテオグリカン、糖脂質等がある。タンパク質によっては、単なるポリペプチド鎖に翻訳されただけでは十分な機能を持たないが、翻訳後、様々な修飾を受けることによって初めてタンパク質としての機能を有するようになる。この様な翻訳後修飾の一つに、チロシン残基および糖鎖の硫酸化がある。タンパク質のチロシン残基および糖鎖の硫酸化は分泌タンパク質において主としておこり、タンパク質の分泌におけるシグナルとなるのではないかと考えられている。そこで、分泌タンパク質の細胞内輸送におけるチロシンおよび糖鎖の硫酸化の役割を研究する上で、硫酸化チロシンおよび糖鎖に特異的結合性を持つ分子量175 kDaの膜結合性糖タンパク質を牛肝臓ミクロソーム膜画分において見いだした。この硫酸化チロシン残基および糖鎖に対して特異的に結合するタンパク質を硫酸化チロシンおよび糖レセプター(TyrS-Receptor)と呼ぶ。TyrS-Receptorは肝臓中で硫酸化チロシンおよび糖タンパク質と結合し、その細胞内輸送を媒介していると考えられている。TyrS-Receptorの機能として、生合成された新しい硫酸化チロシンタンパク質の運搬、または、外因性硫酸化チロシンタンパク質のエンドサイトシスが挙げられる。このTyrS-Receptorの研究を行うにあたって、遺伝子解析を行いアミノ酸配列を決定した結果、補体C3と非常に高いホモロジーを示した。また、抗TyrS-Receptor抗血清と抗補体C3抗血清を用いての交差性の検討の結果、この2つのタンパク質は同一のタンパク質であることが示唆された。このことより我々は、TyrS-Receptorはトランスゴルジネットワークからリガンドと共に輸送小胞中にパッケージングされ、CURL小胞や細胞膜のような低pH領域でリガンドを解離した後、遊離の状態になったTyrS-Receptorは細胞外に分泌され、何らかの免疫機能を持つのではないかと考え、TyrS-Receptorの細胞内移動経路についての検討を行った。

研究方法

イヌ肝臓(75g)を材料として、スクロースグラジエントを用いてホモジナイズと遠心分離を繰り返し、得られた小胞画分を可溶化し、内在性の膜タンパク質を得た。得られた内在性膜タンパク質を、精製した抗TyrS-Receptor抗血清を用いてウエスタンブロットティング法によって検討した。次に、パーコール法を用いてホモジナイズと遠心分離を繰り返し、得られた細胞膜画分を可溶化し、内在性の膜タンパク質を得た。その後、同様に、精製した抗TyrS-Receptor抗血清を用いてウエスタンブロットティング法によって検討した。

研究成果

得られた小胞と細胞膜の可溶化は、TyrS-Receptor の精製の際のミクロソーム画分の可溶化と同じ方法で行った。今回、小胞から得られた膜内在性タンパク質は、TyrS-Receptor と同じ分子量 180 kDa を示し、また精製した抗 TyrS-Receptor 抗血清を用いてのウエスタンブロッティングの結果、このタンパク質は TyrS-Receptor であることが示唆された。細胞膜から得られたタンパク質についても同様の検討を行った結果、TyrS-Receptor であることが示唆された。

考 察

チロシン残基の硫酸化はタンパク質の生理活性の調節機能以外にも細胞内タンパク質の選別や輸送機能にも関与していることが明らかになっているが、これまで報告されている硫酸化チロシンタンパク質の多くは、分泌性タンパク質である。この分泌タンパク質は、分泌経路で分泌顆粒に取り込まれるが、これにチロシンの硫酸化が関与し、その分泌を媒介する TyrS-Receptor が重要な役割を演じているのではないかと考えている。今回は輸送小胞及び細胞膜より膜内在性タンパク質の精製を行い、抗 TyrS-Receptor 抗血清を用いて TyrS Receptor との関係について検討した。この両実験において得られた膜内在性タンパク質が TyrS-Receptor であることが確認されたことより、TyrS-Receptor はトランスゴルジネットワークからリガンドと共に輸送小胞中にパッケージングされ、細胞内を移動することが明らかとなった。

まとめ

今年度は、昨年度報告した「イヌ TyrS-Receptor がイヌ補体 C3 であることの証明」を裏付けるために、イヌ TyrS-Receptor の細胞内の移動経路について検討を行った。輸送小胞と細胞膜、両分泌拠点において TyrS Receptor の存在が確認されたことによって、これまで、あくまで仮説であった TyrS-Receptor の細胞内移動経路が明らかになったと同時に、補体 C3 がらみの研究だけでなく、翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化の研究にも一つの役割を果たしたと言えるだろう。今後の研究課題としては、TyrS-Receptor が補体 C3 であることを明らかにするためにも、TyrS-Receptor のゴルジ体への局在性と TyrS-Receptor の細胞外への分泌についての検討を行う予定である。また、補体 C3 欠損症などの様々な疾患における TyrS-Receptor の役割についても検討したいと考えている。

以上、これらの研究は文部省科学研究費補助金基盤研究(C)(2) (平成9年および10年度)に負うところ極めて大であり、ここに深く感謝する。

平成11年3月

研究代表者 水 光 正 仁