

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450130

研究課題名(和文) ウイルス侵入の鍵となる硫酸化の仕組みの解明

研究課題名(英文) Mechanism of protein tyrosine sulfation in virus entry

研究代表者

水光 正仁 (Suiko, Masahito)

宮崎大学・ 理事・副学長

研究者番号：00128357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化は、ゴルジ体の2種類の膜結合酵素Tyrosylprotein Sulfotransferase (TPST)によって触媒される。本研究では、結晶構造解析の未決定のヒトhTPST1の精密な立体構造を基質ペプチドとの複合体として決定した。いずれの基質ペプチドもL字型に折れ曲がり、hTPST1の深い溝に結合していた。また、3種類のゼブラフィッシュTPST遺伝子の発現をダブルまたはトリプルノックダウンした結果、胚発生が停止して生育途中で致死に至る胚が多数観察された。これらのことから、TPSTは正常な発生において重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tyrosylprotein sulfotransferases (TPSTs) are enzymes that catalyze post-translational tyrosine sulfation of proteins and membrane proteins located in the trans Golgi network. In humans, there are two TPST isoforms, designated hTPST1 and hTPST2. We reported the crystal structure of hTPST2. In this research project, we focused on the crystal structure of hTPST1 complexed with two substrate peptides that are catalysed by hTPST1 with significantly different efficiencies. hTPST1 appeared to recognize the substrate peptide in a deep cleft by using a short parallel β -sheet type interaction, and the bound peptide forms an L-shaped structure in the same way as hTPST2.

We knocked down TPST isoform genes in zebrafish and analyzed the effects of TPST deficiency on morphological development. TPST2 knockdown zebrafish resulted in a bent body trunk phenotype, and triple TPST knockdown led to lethal. These suggest that TPST plays an important role during zebrafish development.

研究分野：農芸化学・応用生物化学

キーワード：硫酸転移酵素 翻訳後修飾 チロシン硫酸化 ゼブラフィッシュ 遺伝子ノックダウン モルフォリノアンチセンスオリゴ X線結晶構造解析 構造と活性

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、細胞内でつくられた後、様々な修飾を受けることで、その働きが制御される。この一例として、タンパク質に含まれるチロシン残基に硫酸基がつけられる修飾(硫酸化修飾)を受けると、そのタンパク質の働きが大きく変わることが知られている。この硫酸化修飾の報告は、これまでに62種類のタンパク質のみであるが、ヒトにおける生体防御機構において、重要な役割をしている。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である。その一方で、ヒト細胞表面に存在する受容体タンパク質(ケモカインレセプター)につけられたチロシン硫酸基は、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る。また、単球のセレクチンの硫酸化が動脈硬化病変への集合に関与していることが報告されている。

これらの硫酸基をつける反応(硫酸化修飾)を行っているのが、タンパク質チロシン硫酸転移酵素(TPST)であり、硫酸基供給源は活性硫酸(PAPS)である。このTPSTは、トランスゴルジネットワークに局在する膜結合型酵素で、これまでに、この酵素が働くメカニズムはほとんど知られていなかった。特に、この酵素が硫酸基をつけるタンパク質とつけないタンパク質をどのようにして選別しているのかが、大きな謎であった。

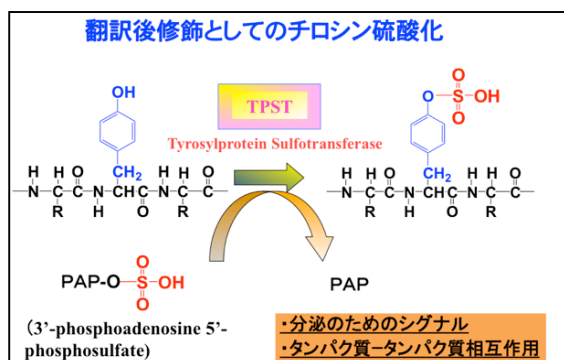


図1. タンパク質の翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化は、トランスゴルジ体中存在するTPSTにより触媒される。硫酸化されるタンパク質中のチロシンの周辺には、酸性アミノ酸が多く存在する。

この酵素TPSTと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を明らかにするために、この酵素とターゲットタンパク質が結合している状態の立体構造を、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結合して、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。また、硫酸化修飾を受ける部分は、特徴的なL字型に90度折れ曲がっていた。この構造が決定されたことにより、これまで謎であったターゲットとなるタンパク質の選

別方法が明らかになった。この成果は、2013年3月Nature Communicationsに掲載された。

TPST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分かったことで、この酵素に対する阻害剤の開発が可能になった。硫酸基がつくことによるタンパク質の機能変化は、様々な生命現象に関わっている。したがって、特異的な阻害剤が開発できれば、ウイルス感染予防を目的とした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応用が期待できる。

硫酸化修飾を担っているTPSTは、ヒトにはhTPST1とhTPST2の2種類が存在し、様々なタンパク質に対する硫酸化反応を分担していると考えられている。これまでに、我々は、hTPST2の立体構造を分解能1.6Åの高分解能で報告した(Teramoto, Suiko, et al, Nature communication, 2013)。今回は、hTPST1について絞り込み、精密な立体構造を決定することで、TPSTが様々なタンパク質に対して硫酸化を行うメカニズムについて明らかにした。

また、TPSTの特異的な阻害剤の探索を既存の食品成分ライブラリーを用いることによって行った。さらに、チロシン硫酸化は生物界に広く存在する翻訳後修飾であることから、ゼブラフィッシュをモデルとして、TPSTノックダウン個体のより詳細な表現型解析および二重・三重ノックダウン個体の表現型解析よりTPSTの詳細なin vivoにおける生理機能を明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、結晶構造解析が終わっていないhTPST1の精密な立体構造をまず決定し、TPSTが様々なタンパク質に対して硫酸化を行うメカニズムの解明を行った。計画は以下の4つからなる。

- 1) hTPST1の発現系構築において、触媒部位以外(膜結合領域)を欠くことにより、E.coliによる可溶性変異酵素の大量発現系の構築を行った。
- 2) hTPST1のX線結晶構造解析を行った。
- 3) ウイルス感染予防を目的とした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応用が期待できるTPSTの特異的な阻害剤の探索を行った。
- 4) ゼブラフィッシュをモデルとしたTPST遺伝子ノックダウンによる生理機能解析を行った。

3. 研究の方法

(1) ヒトTPSTの構造と機能に関する解析
ワイルドタイプのヒトTPSTは膜タンパク質で水に難溶性で、精製が不可能であった。しかし、hTPST2の発現系構築において、触媒部位以外(膜結合領域)を欠くことにより、E.coliによる可溶性のhTPST-2変異酵素の発現系の構築に成功した(Teramoto, Suiko et al,

Nature communication, 2013)。この発現系を hTPST1 にも応用した。hTPST1 は、大腸菌 (Origami(DE3))を用い、シャペロン(GroES-EL)と共発現することで、可溶性タンパク質として大量発現した。その後、各種クロマトグラフィーによる精製を行い安定した収量を得た。反応後生成物である 3',5'-Phosphoadenosine phosphate (PAP)と基質となる補体 C4 タンパク質からデザインした 11 残基のペプチド(C4 ペプチド)との共存下で結晶を得た。この結晶を用いて X 線回折実験を行い、分解能 1.6Å の回折データを得た。hTPST2 をテンプレートとした分子置換法により位相を決定し、構造精密化を行い、hTPST1-PAP-C4 ペプチド複合体として立体構造を決定した。

次に、hTPST2 および hTPST1 の立体構造の情報を基に、hTPST1 を大腸菌で変異酵素を作成し、構造と活性の関係を考察した。特に、酵素タンパク質の 78 および 195 番目のアルギニン、158 番目のリジン、191 および 285 番目のセリン等を中心にアラニンに変換し変異酵素を調製した。活性を測定して、TPST の触媒活性と基質認識に必要なアミノ酸残基の特定を行った。

(2) ヒト TPST の特異的阻害剤の探索

hTPST2 のターゲットサイトが決定できているので、当研究室に多く保存している食品の機能性成分を使用して、網羅的にアッセイを行い、hTPST2 の特異的阻害剤の探索を行った。

リコンビナント TPST 酵素は、pET15b 発現ベクターを用いて大腸菌 Origami (DE3)に発現させ、Ni-NTA にて精製した。基質には、Z-Glu-Tyr および生体内基質モデルとして P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)のチロシン硫酸化部位を含んだ PSGL-1 ペプチドを使用した。PSGL-1 基質ペプチドは pGEX4T-1 発現ベクターを用いて大腸菌 BL21 に発現させ、逆相クロマトグラフィーによって精製した。TPST 酵素活性は、放射活性標識 PAP^[35S]を硫酸供与体として酵素反応を行い、薄層クロマトグラフィーにて反応産物の分離を行い、^[35S]標識された酵素反応産物の放射活性にて測定した。

(3) ゼブラフィッシュをモデルとした TPST 遺伝子ノックダウンによる生理機能解析

ゼブラフィッシュはモルフォリノアンチセンス RNA を用いた個体レベルの遺伝子抑制法が確立されている。我々は、本学のフロンティア科学実験総合センターの剣持教授の協力で TPST 遺伝子ノックダウン実験を実施した。合成オリゴをマイクロインジェクションによりゼブラフィッシュの受精卵に導入し、初期発生における 3 種の TPST の機能阻害実験からチロシン硫酸化の *in vivo* における生理機能を明らかにした。さらに、2 種及び 3 種の合成オリゴを組み合わせ、同時に二

つ以上の TPST 遺伝子の機能阻害実験も実施した。

4. 研究成果

(1) ヒト TPST の構造と機能に関する解析
2 種類の基質ペプチドと hTPST1 の複合体の立体構造を決定し、hTPST1 が様々な基質タンパク質を硫酸化する機構を明らかにした。いずれの基質ペプチドも L 字型に折れ曲がり、hTPST1 の深い溝に結合していた。

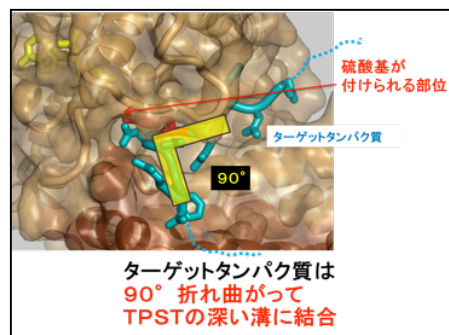


図 2. TPST とターゲットタンパク質が結合した立体構造

硫酸化機構は、hTPST2 とほぼ同様であった。即ち、柔らかい構造をしたターゲットタンパク質は、hTPST の深い溝の奥に入り込み、さらに 90 度折れ曲がることで活性部位の適切な位置に結合して、硫酸化修飾を受けることが出来た。しかし、チロシン硫酸化されない硬い構造をしたタンパク質は、この溝に入ることが出来ず、硫酸化修飾を受けることは出来なかった。また、hTPST1 が持つ深い溝表面には、プラスの電荷が多数準備されていて、ターゲットとなるタンパク質のマイナスの電荷を持った部分を特異的に認識していた。

次に、hTPST2 および hTPST1 の立体構造の情報を基に、hTPST1 を大腸菌で変異酵素を作成し、構造と活性の関係を考察した。特に、酵素タンパク質の 78 および 195 番目のアルギニン、158 番目のリジン、191 および 285 番目のセリン等を中心にアラニンに変換し変異酵素を調製した。活性を測定して、TPST の触媒活性と基質認識に必要なアミノ酸残基の特定を行った。その結果、TPST 変異酵素は、R78A、K158A などいくつかの酵素で、活性の著しい低下が確認された。TPST の触媒活性と基質認識に重要なアミノ酸残基のいくつかが明らかになった。これらの結果より、TPST の触媒反応及び基質認識に重要なアミノ酸残基が特定され、今後は工業的なチロシン硫酸化タンパク質の効率的生産を目的に、触媒能を高めた TPST や、基質特異性を改変した TPST を開発できる可能性が示された。

(2) ヒト TPST の特異的阻害剤の探索

スクリーニングの結果、オレアノール酸やβ-カロテンなどいくつかの食品機能性成分が TPST 活性阻害作用を持つことが明らかとな

った。さらに、 β -カロテンにおいては、その阻害様式を確認した。これらの研究結果から、食生活の改善や機能性食品により TPST 活性を制御することでウイルス感染防御や免疫システムを強化できる可能性が示唆された。

(3) ゼブラフィッシュをモデルとした TPST 遺伝子ノックダウンによる生理機能解析

ゼブラフィッシュには、3 種類の TPST が存在する。ゼブラフィッシュの受精卵にモルフォリノアンチセンスオリゴを注入し、3 種類の TPST 遺伝子の発現を抑制した。その結果、zTPST1 および zTPST1-like の抑制胚では、脳構造に異常が見られた。また、zTPST1-like の抑制では、尾の先端が屈曲し、zTPST2 では体幹全体が湾曲した。さらに、3 種類の zTPST の発現をダブルノックダウンまたはトリプルノックダウンした結果、各 zTPST 遺伝子の抑制において見られた表現型が同時に観察され、胚発生が停止して生育途中で致死に至る胚が多数観察された。これらのことから、TPST は正常な発生において重要な役割を果たしていることが示唆された。

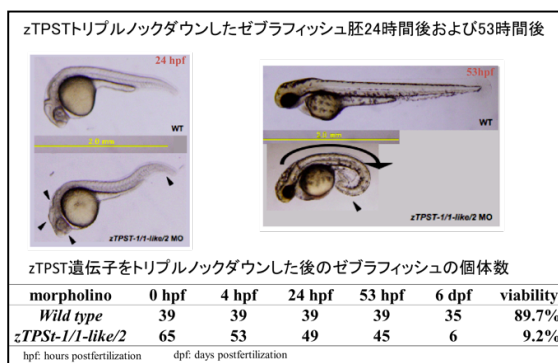


図3. ゼブラフィッシュの受精卵にモルフォリノアンチセンスオリゴを注入し、3 種類の TPST の遺伝子発現をそれぞれ抑制した。TPST のトリプルノックダウンは、胚発生が停止して生育途中で致死に至った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

1) Shimohira, T., Kurogi, K., Hashiguchi, T., Liu, M.-C., Suiko, M., Sakakibara, Y., ”

Regioselective production of sulfated polyphenols using human cytosolic sulfotransferase-expressing *Escherichia coli* cells.” *J. Biosci. Bioeng.*, in press, (2017). doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.02.006. (査読有)

2) Takao, H., Hirabayashi, K., Nishigaya, Y., Sakakibara, Y., Suiko, M., Asada, Y., Takahashi, Y., Yamamoto, K., Fukuyama, K., Sugishima, M., Wada, K., ” A substrate-bound structure of cyanobacteria biliverdin reductase identifies stacked substrates as critical for activity.” *Nat. Commun.*, in press, (2017) doi: 10.1038/ncomms14397. (査読有)

3) Suiko, M., Kurogi, K., Hashiguchi, T.,

Sakakibara, Y., Liu, M.-C., “Updated perspectives on the cytosolic sulfotransferases (SULTs) and SULT-mediated sulfation.” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 81(1), 63-72 (2017). doi: 10.1080/09168451.2016.1222266. (査読有)

4) Yamamoto, A., Kurogi, K., Schiefer, I.T., Liu, M.-Y., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C., “Human cytosolic sulfotransferases SULT1A3 mediates the sulfation of dextrorphan.” *Biol. Pharm. Bull.*, 39(9), 1432-1436 (2016). doi: 10.1248/bpb.b16-00015. (査読有)

5) Yamamoto, A., Debran-Pinamang, M., DiModica, N. J., Kugogi, K., Hui, Y., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C., ”Identification and characterization of the human cytosolic sulfotransferases mediating the sulfation of clioquinol and iodoquinol.” *Drug Metab. Lett.*, 10(3), 200-205 (2016). (査読有)

6) Han, Z., Xi, Y., Luo, L., Zhou, C., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C., “Sulfate conjugation of daphnetin by the Human cytosolic sulfotransferase.” *J. Ethnopharmacol.*, 189, 250-252 (2016). doi: 10.1016/j.jep.2016.05.041. (査読有)

7) Luo, L., Zhou, C., Hui, Y., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C., “Human cytosolic sulfotransferase SULT1C4 mediates the sulfation of doxorubicin and epirubicin.” *Drug Metab. Pharmacokin.*, 31(2), 163-166 (2016). doi: 10.1016/j.dmpk.2016.01.003. (査読有)

8) Zhang, L., Kurogi, K., Liu, M.-Y., Schnapp, A. M., William, F. E., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C., “Sulfation of benzyl alcohol by the human human cytosolic sulfotransferases (SULTs): a systematic analysis.” *J. Appl. Toxicol.*, 36(9), 1090-1094 (2016). doi: 10.1002/jat.3268. (査読有)

9) 橋口拓勇、榎原陽二、黒木勝久、水光正仁、” 植物硫酸転移酵素の諸性質と今後の展望。” *日本農薬学会誌*, 41(2), 198-201 (2016). doi: 10.1584/jpestics.W16-06. (査読無)

10) Luo, L., Zhou, C., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C., “Sulfation of 6-hydroxymelatonin, N-acetylserotonin and 4-hydroxyramelteon by the human cytosolic sulfotransferases (SULTs).” *Xenobiotica*, 1-8 (2015). doi: 10.3109/00498254.2015.1107656 (査読有)

11) Luo, Y., Mei, X., Xi, Y., Zhou, C., Hui, Y., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C.,

“Sulfation of 6-gingerol by the human cytosolic sulfotransferases: A systematic analysis.” *Planta Med.*, 82(3), 238-243 (2015). (査読有)

12) Yamamoto, A., Liu, M.-Y., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Saeki, Y., Suiko, M., Liu, M.-C., “Sulfation of acetaminophen by the human cytosolic sulfotransferases: A systematic Analysis.” *J. Biochem.*, 158(6), 497-504 (2015). (査読有)

13) Hui, Y., Luo, L., Zhang, L., Kurogi, K., Zhou, C., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C., “Sulfation of afimoxifene, endoxifen, raloxifene, and fulvestran by the human cytosolic sulfotransferases (SULTs): A system analysis.” *J. Pharmacol. Sci.*, 128(3), 144-149 (2015). doi: 10.1016/j.jphs.2015.06.004 (査読有)

14) Yamamoto, A., Kim, J., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C., “Sulfation of phenylephrine by the human cytosolic sulfotransferases.” *Drug Metab. Lett.*, 8(2), 96-100 (2014). (査読有)

15) Kurogi, K., Chepak, A., Hanrahan, M.T., Liu M.-Y., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C., “Sulfation of opioid drugs by human cytosolic sulfotransferases: Metabolic labeling study and enzymatic analysis.” *Eur. J. Pharm. Sci.*, 62, 40-48 (2014). (査読有)

16) Hashiguchi, T., Sakakibara, Y., Kurogi, K., Yamasaki, M., Nishiyama, K., Liu, M.-C., Suiko, M., “Identification of a novel flavonoid glycoside sulfotransferase in *Arabidopsis thaliana*.” *J. Biochem.*, 155(2), 91-97 (2014). (査読有)

[学会発表] (計 38 件)

1) 下平武彦、黒木勝久、Liu Ming-Cheh、榊原陽一、水光正仁：「食品機能性成分硫酸体の生理機能解明」日本農芸化学会 2017 年度大会「京都女子大学・(京都府・京都市)」(平成 29 年 3 月 20 日)

2) 吉瀬仁宣、下平武彦、黒木勝久、水光正仁、榊原陽一：「ウシ細胞質硫酸転移酵素クロニングとその性質」第 23 回日本生物工学会九州支部大会「九州工業大学情報工学部・(福岡県・飯塚市)」(平成 28 年 12 月 3 日)

3) 上中勝護、上地珠代、剣持直哉、黒木勝久、Liu Ming-Cheh、水光正仁、榊原陽一：「ゼブラフィッシュをモデルとした PAPS 合成酵素の生理機能解明」第 89 回日本生化学会「東北大学川内北キャンパス・(宮城県・仙台市)」(平成 28 年 9 月 26 日)

4) 下平武彦、黒木勝久、Liu Ming-Cheh、榊原陽一、水光正仁：「生体制御分子硫酸体の

受容体を介した機能発現メカニズム解明を目指して」

蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム「指宿バイテラス・(鹿児島県・指宿市)」(平成 28 年 8 月 26 日)

5) 小川穂乃香、下平武彦、黒木勝久、Liu Ming-Cheh、水光正仁、榊原陽一：「フラボノイドおよびフラボノイド硫酸体結合タンパク質の探索」

平成 28 年度日本生化学会九州支部例会「鹿児島大学郡元キャンパス・(鹿児島県・鹿児島市)」(平成 28 年 5 月 15 日)

6) 吉瀬仁宣、黒木勝久、Liu Ming-Cheh、水光正仁、榊原陽一：「ウシ細胞質硫酸転移酵素クロニングとその性質」

平成 28 年度日本生化学会九州支部例会「鹿児島大学郡元キャンパス・(鹿児島県・鹿児島市)」(平成 28 年 5 月 15 日)

7) 水光正仁：「薬物代謝および生体機能における硫酸化の役割」日本農薬学会第 41 回大会(招待講演)「くにびきメッセ・(島根県・松江市)」(平成 28 年 3 月 17 日)

8) 田中慎之助、西依利晃、古城英貴、坂上功樹、黒木勝久、榊原陽一、水光正仁、木村誠、角田佳充：「ヒト蛋白質チロシン硫酸転移酵素の結晶構造に基づく硫酸化機構解明」

日本農芸化学会中四国・西日本支部合同大会「愛媛大学農学部・(愛媛県・松山市)」(平成 27 年 9 月 18 日)

9) 水光正仁：「硫酸化の基礎研究から応用研究へ」日本農芸化学会中四国・西日本支部合同大会(招待講演)「愛媛大学農学部・(愛媛県・松山市)」(平成 27 年 9 月 17 日)

10) Liu, M.-C., Sakakibara, Y., Kurogi, K., Suiko, M.： “SULT-mediated sulfation in drug metabolism”

12th International symposium on cytochrome P450 biodiversity and biotechnology, 「Kyoto International Community House・(Kyoto Pref. Kyoto City)」(2014, 9,27)

他 28 件

6. 研究組織

(1)研究代表者

水光 正仁 (SUIKO, Masahito)

宮崎大学・理事・副学長

研究者番号：00128357

(2)研究分担者

榊原 陽一 (SAKAKIBARA, Yoichi)

宮崎大学・大学院農学工学総合研究科・

教授

研究者番号：90295197