

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07273

研究課題名(和文) 翻訳後修飾を行う植物タンパク質チロシン硫酸転移酵素の立体構造解析

研究課題名(英文) Structural analysis of sulfotransferase

研究代表者

角田 佳充 (Yoshimitsu, Kakuta)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：00314360

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の一つであるチロシン残基の硫酸化の詳細な分子メカニズムを明らかにするため、植物であるシロイヌナズナ硫酸転移酵素と動物であるヒト硫酸転移酵素の二種類について、立体構造解析を行なった。シロイヌナズナ硫酸転移酵素については、立体構造決定に至らなかったが、ヒト硫酸転移酵素については、2種類の基質との複合体を決定することに成功した。これにより、TPSTの基質認識機能の分子メカニズムについて、多くの情報が得られた。以上より、タンパク質の翻訳後修飾であるチロシン残基の硫酸化反応についてより一般性を持った理解をえることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト硫酸転移酵素の立体構造情報を得たことにより、主要なタンパク質の翻訳後修飾の一つであるチロシン残基の硫酸化の詳細な分子メカニズムを明らかにすることができた。多くのタンパク質はチロシン残基が硫酸化することにより、その生理活性が変化する。今回の情報から、この反応を人工的に制御できる可能性が高まったことから、今後の多くの展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the detailed molecular mechanism of sulfation of a tyrosine residue, which is one of the post-translational modifications of proteins, the three-dimensional structure analysis of tyrosylprotein sulfotransferase (TPST) was done. We have determined crystal structure of human tyrosyltransferase-1 using X-ray crystallography. This provided a lot of information on the molecular mechanism of the substrate recognition function of TPST.

研究分野：構造生物学

キーワード：硫酸転移酵素 結晶構造解析 タンパク質チロシン硫酸化

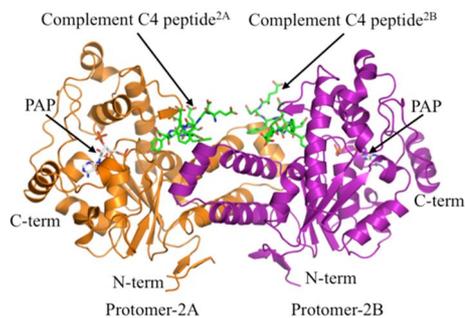
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトにおいて、1割以上の分泌蛋白質と膜蛋白質において、チロシン残基が硫酸化修飾されていると推定されており、様々な蛋白質間相互作用の制御への関わりが報告されている。チロシン残基の硫酸化は、1954年にウシフェブリノペプチドB中で初めて発見された。1982年には、様々な哺乳動物の細胞や組織で、多くの蛋白質が硫酸化修飾を受けていることが明らかとなり、現在では多くの真核多細胞生物で、蛋白質のチロシン硫酸化が行われることが分かっている。チロシン硫酸化は、蛋白質の生理活性の変化、生理活性ペプチドのプロセッシング、蛋白質の半減期の変化、蛋白質間相互作用の調節に関与することが示唆されてきた。このように蛋白質の翻訳後修飾であるチロシン残基の硫酸化は様々な生命現象に関わっている。

この主要な翻訳後修飾の一つであるチロシン残基の硫酸化修飾反応(下図)を行う酵素が、蛋白質チロシン硫酸転移酵素 (Tyrosyl protein sulfotransferase:TPST)である。TPSTは3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate(PAPS)の硫酸基を、蛋白質中のチロシン残基のヒドロキシル基に転移させる働きを持つ酵素である。これまでの研究から、TPSTはゴルジ体膜に結合した膜蛋白質であり、その活性部位はゴルジ体内腔に向いていることが報告されている。

ヒトにおいてTPSTは、hTPST1とhTPST2の2つの異なるアイソフォームが存在している。hTPST1とhTPST2は、どちらも型膜貫通タンパク質で、N末端側の短い細胞内ドメイン、17残基からなる1回膜貫通ドメイン、約40残基のステム領域、C末端側の触媒ドメインから構成される。hTPST1は370アミノ酸残基、hTPST2は377アミノ酸残基からなり、配列同一性は64%である。hTPST1とhTPST2はMn<sup>2+</sup>の活性への影響や様々な組織での発現量が異なるが、同様の酵素化学的性質を持つ。この2つのhTPSTが触媒効率の異なる様々な基質蛋白質の硫酸化を担っている



ヒト TPST 2 の立体構造

一方、植物においても、成長を制御する複数のペプチドホルモンについて、その生理活性を持つためには、チロシン残基の硫酸化が必須であることが知られている。一方、植物のTPSTは近年まで同定すらされていなかったが、2009年にKomoriらによってシロイヌナズナから植物として初のTPSTが同定された (AtTPST)。植物として初めて同定されたTPSTであるAtTPSTはゴルジ体内腔に存在する型膜貫通タンパク質で、酵素反応様式としては、ヒトTPSTと同様な反応を触媒する。しかし、植物TPSTであるAtTPSTは、ヒトTPST(hTPST)とは1次構造が全く異なるため、AtTPSTの基質認識機構と触媒反応メカニズムを明らかにするには、立体構造を明らかにすることが必須であると考えられる。

AtTPSTにより硫酸化されたペプチドホルモンは、プロテアーゼにより切断され、個体の成長を促す機能を獲得することが明らかとなっている。AtTPST遺伝子を欠損した植物は、矮小化し、成長が遅れる(下図)。このように、AtTPSTは植物の成長という重要な生命現象に深く関わる酵素である

### 2. 研究の目的

植物のタンパク質チロシン硫酸化の分子メカニズムの詳細を明らかにするために、AtTPSTの立体構造決定を目指した。

また、植物TPSTの理解を深めるために、哺乳動物TPSTについても、複数の基質との複合体の立体構造を決定することで、詳細な比較を行うことを目指した。具体的には、ヒトTPSTの立体構造未報告のhTPST1と2種類の基質複合体について、立体構造を決定することを目指した。

種が異なるTPSTについて、立体構造の詳細を比較することで、基質認識機構と酵素活性メカニズムを明らかにすることを目指した。これらの比較検討によって、蛋白質チロシン硫酸化について、広く生物に対する一般性を持った理解を目指した。

### 3. 研究の方法

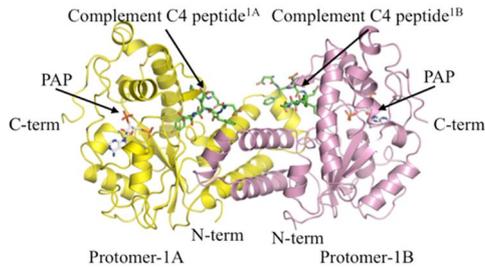
AtTPSTについて、様々な発現系を用いて、使用ベクターの検討、発現領域の検討、発現条件の検討を行った。また、hTPST1を大量に調整し、カラムクロマトグラフィーによる精製を行い、X線結晶構造解析による立体構造決定を行なった。

#### 4. 研究成果

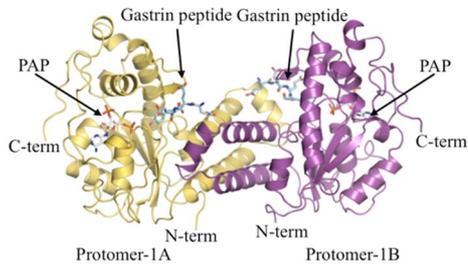
AtTPST について、様々な発現系を用いて、使用ベクターの検討、発現領域の検討、発現条件の検討を行った。その結果、微量ながら高純度の精製タンパク質を得ることに成功した。得られた精製サンプルを用いて、結晶化スクリーニングを行ったところ、タンパク質結晶と思われるものが得られた。しかし、これについて X 線回折実験を行ったところ、ほぼ回折能のない結晶であった。様々な条件検討を行なったが、結果として十分な回折能を持つ結晶は得られなかった。

一方で、ヒトの持つ TPST の構造未知のアイソフォーム(hTPST1)について、2 種類の基質ペプチド複合体として立体構造を決定するに至った。

a

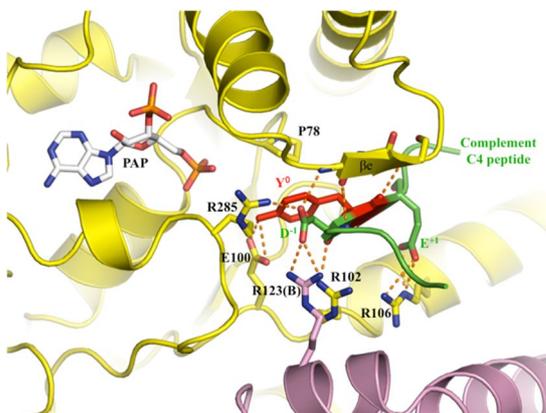


b



hTPST1 の結晶構造

ヒトにおいては、hTPST1 と hTPST2 の 2 つのアイソフォームがチロシン残基の硫酸化を担っている。しかしながら、hTPST1 の詳細な触媒メカニズムは明らかになっていなかった。そこで、hTPST1-PAP-補体 C4 ペプチド複合体と hTPST1-PAP-Gastrin ペプチド複合体の結晶構造を決定した。基本的に hTPST1 と hTPST2 の構造の類似性から hTPST は共通の触媒メカニズムを持つことが示された。さらに、どのように hTPST の様々な基質蛋白質を認識するかについて新たな情報を得ることができた。



hTPST1 の基質結合部位

AtTPST については、予定通りの結果とならなかったが、hTPST1 の立体構造が決定できたことで、結果として TPST についての理解が大きく進んだと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka Shinnosuke, Nishiyori Toshiaki, Kojo Hidetaka, Otsubo Reo, Tsuruta Moe, Kurogi Katsuhisa, Liu Ming-Cheh, Suiko Masahito, Sakakibara Yoichi, Kakuta Yoshimitsu	4. 巻 7
2. 論文標題 Structural basis for the broad substrate specificity of the human tyrosylprotein sulfotransferase-1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1038/s41598-017-07141-8">https://doi.org/10.1038/s41598-017-07141-8</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 角田佳充
2. 発表標題 翻訳後修飾を行うヒトタンパク質チロシン硫酸転移酵素の結晶構造解析
3. 学会等名 日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 角田佳充
2. 発表標題 硫酸転移酵素の立体構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本支部例会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----