

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名	三城 恵美
題 目	翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化の機能解明 (Studies on Post-Translational Modification by Tyrosine Sulfation)
<p>ポストゲノム時代となり、少ない遺伝子から効率的に多様なタンパク質をつくり出す機構として翻訳後修飾が注目されている。この修飾の一つであるチロシン硫酸化は、小胞体からゴルジ体を経て生合成される分泌や膜タンパク質に多く見られ、生理活性ペプチドの活性調節やタンパク質間相互作用などに重要な役割を持つ。その反応は、硫酸供与体である 3'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate (PAPS) からチロシン残基へ硫酸基を転移するもので、トランスゴルジネットワークに存在する Tyrosylprotein Sulfotransferase (TPST) により触媒される。</p> <p>TPST は、1983 年に初めて酵素活性が確認され、その後 15 年を経て 1998 年にクローニングが報告された。その結果、ヒトおよびマウスにおいて 2 つの TPST 遺伝子がゲノム上に存在することが明らかとなった。これにより、以前の生化学的研究では、2 つの TPST 遺伝子産物は区別されておらず、それらの違いを明らかにすることが必要と考えられた。</p> <p>本研究では、ヒト、マウスおよびゼブラフィッシュに複数存在する TPST をクローニングし、酵素学的諸性質の違いを明らかにした。また、ヒト、マウス TPST に関して各臓器における発現量比を比較した。さらに、チロシン硫酸化の <i>in vivo</i> における生理的意義を明らかにする手がかりを得るために、ゼブラフィッシュを用いて TPST の発現抑制実験を行った。</p> <p>諸性質検討の結果、各々の TPST は、酸性条件の至適 pH、<math>Mn^{2+}</math> や <math>Mg^{2+}</math> での活性増強に違いが見られた。これらの結果は、各々の TPST の至適 pH や二価陽イオンによる活性増強の差異を初めて明らかにしたものである。また、基質特異性や速度論的解析のため、モデル基質ペプチドを大腸菌で発現し調製する方法を確立し、それを用いてヒト、マウスの TPST-1、TPST-2 を比較し TPST-1 は基質に対する親和性が高い傾向が明らかとなった。さらに、定量的リアルタイム PCR 法を用いた解析から、各々の酵素は脳・神経系や生殖器系において発現量比の違いが見られた。</p> <p>さらに、ゼブラフィッシュの受精卵にアンチセンスモルフォリノオリゴを微量注入し、3 種類の zTPST 遺伝子の発現を抑制した。その結果、zTPST-1、zTPST-1-like の抑制胚では脳構造や血液循環に異常が見られ、また zTPST-1-like の抑制では尾の先端が屈曲し、zTPST-2 では体幹全体が湾曲した。これら表現型の違いから、各 TPST の硫酸化の標的タンパク質が異なる可能性が示唆された。さらに 3 種類の zTPST の発現を同時に抑制した結果、胚発生が停止した。このことから、TPST は正常な発生において重要な役割を果たしており、チロシン硫酸化は生命を維持するのに必須と考えられた。</p>	

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	Emi Mishiro
題 目	Studies on Post-Translational Modification by Tyrosine Sulfation (翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化の機能解明)

In the post-genome era, the importance of post-translational modifications as mechanisms for effectively producing multiple proteins from a single gene is increasingly being appreciated. Tyrosine *O*-sulfation is a post-translational modification of numerous membrane and secretory proteins that occurs in multicellular eukaryotic organisms. It has been shown to be involved in the alteration of biological activity of proteins and modulation of extracellular protein-protein interaction. Tyrosylprotein sulfotransferases (TPSTs) are the enzymes that catalyze the transfer of a sulfate group from 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) to the tyrosine residues of target proteins. In 1998, two TPST isoforms, designated TPST-1 and TPST-2, from human and mouse were identified. It has since become an important issue whether the different physiological involvements of protein tyrosine sulfation is due to distinct TPSTs with differential substrate specificity and/or their tissue-specific expression. I therefore decided to carry out a systematic study to investigate the characteristics of TPST-1 and TPST-2.

In this dissertation, I presented the results from the molecular cloning of human, mouse, and zebrafish TPSTs, and enzymatic characterization of the recombinant TPSTs. Moreover, the relative levels of expression of TPST-1 and TPST-2 in various human and mouse tissues/organs were evaluated. Additionally, the knockdown experiments using zebrafish, which has three kinds of TPSTs genes, were examined in order to clarify their differential physiological involvements. I presented the characterization of the recombinant human, mouse, and zebrafish TPSTs with respect to pH optimum, divalent cation requirement, substrate specificity, and kinetic constants using model substrate peptides designed based on the tyrosine sulfation sites of known sulfated proteins. The results showed that these TPSTs exhibited some characteristics (acidic pH optima, stimulation by divalent cations, *etc.*). It is to be pointed out that this is the first time that individual TPST-1 and TPST-2 were independently examined and demonstrated to be differentially stimulated by  $Mn^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ . The results of substrate specificity and kinetic constants analysis showed that both human and mouse TPST-1 tended to display higher affinity for most of the tested peptide substrates than TPST-2. By employing quantitative real-time PCR analysis, the expression of TPST-1 and TPST-2 in different human and mouse tissues/organs was investigated. Both human and mouse TPST-1, TPST-2 were ubiquitously expressed in all tissue/organ samples examined, albeit at different levels. In the knockdown study, I demonstrated three kinds of different patterns of deformities in brains or body trunks when zebrafish embryos were treated with morpholino antisense oligos (MOs) targeting each of the three zebrafish zTPSTs genes. Furthermore, zebrafish embryo treated with the MOs against all three TPSTs genes resulted in embryonic lethality. These results indicate that all TPSTs play important roles in the early development of zebrafish embryo and might have differential substrate specificity and act upon different subsets of target proteins. In view of the lethal phenotype of triple knockdown embryos and nonfatal single knockdown embryos, tyrosine sulfation likely plays essential roles in maintaining life in early development.

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	三 城 恵 美
審査委員	主査 宮崎 大学 教授 水 光 正 仁
	副査 宮崎 大学 助教授 榊 原 陽 一
	副査 佐賀 大学 教授 渡 邊 啓 一
	副査 鹿児島 大学 教授 杉 元 康 志
	副査 琉球 大学 教授 安 田 正 昭
審査協力者	
題 目	<p style="text-align: center;">Studies on Post-Translational Modification by Tyrosine Sulfation (翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化の機能解明)</p>
<p>ポストゲノム時代となり、少ない遺伝子から効率的に多様な機能を持つタンパク質をつくり出す機構として翻訳後修飾が注目されている。この修飾の一つであるチロシン硫酸化は、小胞体からゴルジ体を経て生合成される分泌タンパク質や膜タンパク質に多く見られ、生理活性ペプチドの活性調節やタンパク質間相互作用などに重要な役割を持つ。その反応は、硫酸供与体である活性硫酸 3'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate (PAPS)からチロシン残基へ硫酸基を転移するもので、トランスゴルジネットワークに存在する Tyrosylprotein Sulfotransferase (TPST)により触媒される。</p> <p>TPST は、1983年に初めて酵素活性が確認され、その後15年を経て1998年にクローニングが報告された。その結果、ヒトおよびマウスにおいて2つのTPST遺伝子がゲノム上に存在することが明らかとなった。これにより、以前の生化学的研究では、2つのTPST遺伝子産物は区別されておらず、それらの違いを明らかにすることが必要と考えられた。</p> <p>本研究では、ヒト、マウスおよびゼブラフィッシュに複数存在するTPSTをクローニングし、酵素学的諸性質の違いを明らかにした。また、ヒト、マウスTPSTに関して各臓器における発現量比を比較した。さらに、チロシン硫酸化の <i>in vivo</i> における生理的意義を明らかにする手がかりを得るために、ゼブラフィッシュを用</p>	

いてTPSTの遺伝子の機能阻害実験を行った。

本研究で得られた結果の骨子は以下のとおりである。

諸性質検討の結果、各々のTPSTは、酸性条件の至適pH、 $Mn^{2+}$ や $Mg^{2+}$ での活性増強に違いが見られた。これらの結果は、各々のTPSTの至適pHや二価陽イオンによる活性増強の差異を初めて明らかにしたものである。また、基質特異性や速度論的解析のため、モデル基質ペプチドを大腸菌で発現し調製する方法を確立し、それを用いてヒト、マウスのTPST-1、TPST-2を比較しTPST-1は基質に対する親和性が高い傾向が明らかとなった。さらに、定量的リアルタイムPCR法を用いた解析から、各々の酵素は脳・神経系や生殖器系において発現量比の違いが見られた。

さらに、ゼブラフィッシュの受精卵にアンチセンスモルフォリノオリゴを微量注入し、3種類のzTPST遺伝子の機能を阻害した。その結果、zTPST-1およびzTPST-1-likeの抑制個体では脳構造や血液循環に異常が見られ、またzTPST-1-likeの抑制では尾の先端が屈曲し、zTPST-2では体幹全体が湾曲した。これら表現型の違いから、各TPSTの硫酸化の標的タンパク質が異なる可能性が示唆された。さらに3種類のzTPSTの発現を同時に抑制した結果、個体発生が停止した。このことから、TPSTは正常な発生において重要な役割を果たしており、チロシン硫酸化は生命を維持するのに必須と考えられた。

以上のように、本研究では、翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化に関与する個々の硫酸転移酵素の諸性質を明らかにし、また、ヒト、マウスTPSTに関して各臓器における発現量比の違いを明確にする新たな知見を得た。ついで、ゼブラフィッシュの受精卵を用いて、TPSTの遺伝子の機能阻害実験を行いチロシン硫酸化の*in vivo*における生理的意義を明らかにする手がかりを得たことは翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化の機能解明に関する極めて重要な発見であり、本論文は、博士（農学）の学位論文として十分に価値のあるものと判定した。

## 最終試験結果の要旨

学位申請者 氏名	三 城 恵 美	
審査委員	主査 宮崎 大学 教授	水 光 正 仁
	副査 宮崎 大学 助教授	榊 原 陽 一
	副査 佐賀 大学 教授	渡 邊 啓 一
	副査 鹿児島 大学 教授	杉 元 康 志
	副査 琉球 大学 教授	安 田 正 昭
審査協力者		
実施年月日	平成19年1月26日	
試験方法 (該当のものを○で囲む) <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答		
<p>主査および副査4名は、平成19年1月26日(金)の公開審査会において、学位申請者に対して学位論文について説明を求め、その内容および関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分な学力ならびに識見を有すると認めた。</p>		

学位申請者  
氏名

三 城 恵 美

[質問 1] TPST の wild-type の酵素と今回作製したリコンビナントの酵素を比べると特徴は類似しているのか。

[回答 1] 以前行われてきた研究はウシやラット、マウスの臓器由来の TPST 活性を用いて諸性質の検討を行ったものであり、それと今回のリコンビナント酵素を用いた結果を比較すると至適 pH やマンガン依存性に関して一致している。

[質問 2] 二価陽イオンの濃度の影響は、生理的条件下で発現しているものと比較してどのような関係か。

[回答 2] 成人において 10~20 mg という文献があり、生理的条件下から考慮すると非常に高い濃度であるが、本研究で行っている試験管内の反応では、生体内の硫酸化反応を完全に再現することが出来ていないために 20 mM という濃度を必要としている可能性がある。

[質問 3] 構造解析を行った場合、マンガンは直接酵素に結合しているのか。

[回答 3] これまでに構造解析が行われた硫酸転移酵素ではマンガンとの結合を証明したものはない。また、TPST の構造解析はまだ行われていないため、これからの課題である。

[質問 4] マンガンと酵素の関係はどう考えているか。

[回答 4] 二価陽イオンの影響を調べた実験において、EDTA を加えた場合何も加えていないときと同等の活性が得られたという結果から、ヘモグロビンの鉄のように活性中心にマンガンが入っているのではなく、硫酸化の反応機構の中でマンガンが関与すると考えている。

[質問 5] PAPS と二価陽イオンの相互作用により活性が上がっていると考えられるか。

[回答 5] PAPS と二価陽イオンの相互作用により活性に影響があるのであれば、他の硫酸転移酵素に関しても PAPS を必要とするため、二価陽イオンとの相互作用があると考えられるが、そのような報告はほとんどないので、基質のチロシン残基とマンガンとの間に相互作用するのではないかと考えている。

[質問 6] TPST の生理的役割を発展させて行くには、ターゲットタンパク質を明らかにすることが大事だと思うが、ゼブラフィッシュでノックダウンしたものを使って、ターゲットタンパク質を明らかにすることは可能か。

[回答 6] ゼブラフィッシュにおいて、硫酸化されることが報告されている基質はない。そこで、今後行うことが可能な実験方法としては、放射活性によるラベル化の実験をして硫酸化タンパク質の検出を行うことと、最近チロシン硫酸化を特異的に認識する抗

体の作製方法が報告されたので、抗体を用いて検出する方法もある。

[質問 7] 原核生物や植物に TPST はないのか。

[回答 7] 原核生物にはない。植物に関して、TPST の遺伝子は報告されていないが、チロシン硫酸化ペプチドの存在は報告されているので、存在すると考えられる。

[質問 8] ゼブラフィッシュ TPST-2 のノックダウン実験の結果と骨形成との関係はどう考えるか。

[回答 8] 関節において、ファイブロネクチン等のタンパク質が硫酸化されることが知られていることから、ゼブラフィッシュ TPST-2 は細胞外マトリクスの硫酸化に関与していると考えられる。

[質問 9] ヒト TPST は fetal liver と adult liver において発現量に違いがあるのはなぜか。

[回答 9] TPST に関する研究は少ないため、これまでの報告では発現時期を明らかにするものはないが、今回のデータで、同じ臓器でも時期的な違いがあることを示唆することが出来た。

[質問 10] マウスとヒトの TPST-1 と-2 の役割は同じか。ノックアウトマウスの実験で TPST-2 をノックアウトするとオスが不妊になるが、臓器特異性の結果では TPST-1 の方が睾丸での発現量が高いがどう考えるか。

[回答 10] 相同性という点から考えると、ヒトとマウスは 95% という高い相同性があるので似通ったところがあると考えられる。しかし、今回の研究で二価陽イオンなどの影響に関して異なる性質も明らかになったために、生物種や細胞、組織ごとでの違いもある可能性があると考えられる。ノックアウトマウスと臓器特異性の研究結果から、発現量の高さによる影響だけではなく、TPST の基質特異性の違いによる影響もあることを示唆したと考えている。

[質問 11] ゼブラフィッシュの実験で、インジェクションによる影響はどれくらいあるのか。

[回答 11] インジェクションによる影響はコントロールの実験を行っていて、影響ないことを確認している。また何も処理していないゼブラフィッシュでも約 1% の奇形が生まれる。

[質問 12] ニワトリの場合、発生異常を観察するのに体節を数えるが、ゼブラフィッシュの場合はどうか。

[回答 12] 今回のゼブラフィッシュを用いた実験では体節を数える事を行っていないので今後検討する。