【解説】

メラトニン合成酵素の構造生物学と概日リズム制御

坪井誠二 *1, 森山芳則 *2

概日リズムを司る松果体ホルモンであるメラトニン。その複雑に制御されている生合成の中心は律速酵素であるセロトニン *N*-アセチルトランスフェラーゼ (NAT) を介したものである。最近、NAT が結晶化されその構造が明らかになり、NAT の活性制御機構も原子・分子レベルで理解できるようになってきた。ここでは、NAT の構造生物学の進展と、それに基づいた概日リズムの制御について述べる。

概日リズムとメラトニン

生物は約 24 時間周期の生物リズム (概日リズム) をもち、地球の自転周期に適応して生活している。このリズムを生み出す生物時計は、単細胞生物からヒトに至るまで広く存在しており、様々な活動の日内変動を制御している。哺乳類では、生体時計は脳視床下部の“視交叉上核”と呼ばれる神経細胞集団に存在している。視交叉上核の生体時計は、本来約 25 時間のリズムを示すが、網膜が光刺激を受けることにより、生体時計がリセットされ、24 時間という外界リズムに同調している。この概日

リズムは、上頸部交感神経を介して松果体に伝えられる。松果体は、概日リズムに応答してメラトニンを合成している。すなわち、松果体のメラトニン量は昼間は非常に低レベル (ほとんど 0) に抑えられているが、夜間に劇的に上昇して真夜中頃にピークとなり、その後急速に減じ、朝方には消失する。メラトニンは合成後直ちに血中に放出され、体中を循環し、メラトニン受容体を介して時間情報を全身に伝える。メラトニンは時間の液性情報ホルモンであり、松果体は時間情報を液性情報に変換する装置である。

メラトニンは血中より供給される L-トリプトファンを前駆物質としてトリプトファンヒドロキシラーゼと芳香族-L-アミノ酸デカルボキシラーゼの 2 つの酵素によりセロトニンに変換された後、セロトニン *N*-アセチルトランスフェラーゼ (NAT) とヒドロキシインドール-O-メチルトランスフェラーゼにより合成される (図 1)。これらの酵素のうち NAT が最もよく時間情報に応答し、その活性は強いリズム性を示す。つまり、NAT 活性の変動とメラトニンの合成量はほぼ対応しており、NAT はメラトニン合成の律速酵素である。したがって、概日リズムの形成と維持機構を明らかにする上で、松果体における NAT 活性の調節機構の全貌を明らかにすることはきわめて重要である。

Regulation of Serotonin *N*-Acetyltransferase Activity in the Pineal Gland: Structural Biology and Its Correlate to Circadian Rhythm

*1Seiji TSUBOI, 就実大学薬学部

*2Yoshinori MORIYAMA, 岡山大学薬学部

図1 ■ 概日リズムとメラトニン合成

視交叉上核からのシグナルが交感神経を介して松果体に伝えられ、cAMPが上昇し、そしてNAT活性が上昇する。その結果、メラトニンが合成され血中に分泌される。このメラトニン量は、昼間は低レベルに抑えられているが、夜間上昇し、真夜中頃をピークに朝方には消失する。AADC: 芳香族L-アミノ酸カルボキシラーゼ, HIOMT: ヒドロキシインドール-O-メチルトランスフェラーゼ, NAT: セロトニンN-アセチルトランスフェラーゼ, SCG: 上頸部交感神経, TPH: トリプトファンヒドロキシラーゼ

NATの制御機構: これまでの知見

生体時計によるNAT活性の制御機構の研究は、転写調節制御とタンパク質レベルでの活性制御の両方向から研究が進められてきた。転写調節による制御については、ラットやヒトの細胞を用いてこれまでに次のカスケードがわかっている。すなわち、時間情報により交感神経末端よりノルアドレナリンが夜間に放出される。放出されたノルアドレナリンは松果体細胞上の β 受容体に結合し、Gsタンパク質を介してアデニル酸シクラーゼを活性化し細胞内のcAMP濃度を上昇させる。その結果、Aキナーゼが活性化され、転写因子CREBがリン酸化される。リン酸化CREBはNAT遺伝子の転写量を増加させ、その結果、NAT活性が上昇しメラトニン出力が増加する。この一連のカスケードは夜間のみ起こる。明け方には交感神経からのノルアドレナリン入力なくなり、NAT活性とメラトニン出力もなくなる⁽¹⁾。ヒツジなどの有蹄類においても、NAT活性は昼低く(ほとんど検出されない)夜高いというリズム性を示すが、NAT遺伝子の転写量は昼と夜の間でほとんど差がない。したがって、この場合はラットやヒトで見られるような転写調節による活性制御より、後述するタンパク質レベルでの活性制御が優勢であると考えられる。

タンパク質レベルの制御は次のように理解されている。すなわち、ノルアドレナリン刺激により活性化されたAキナーゼはNATタンパク質自体をもリン酸化する。NATタンパク質は、昼間はプロテアソームにおいて分解されているため検出できないが、夜間、リン酸化

されたNATにはシャペロンである14-3-3タンパク質が結合する。この複合体はプロテアソームで分解されず活性を維持していることが明らかとなった(図2)⁽²⁾。14-3-3タンパク質は現在9つのサブタイプ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \eta, \theta, \tau, \zeta$)が同定され、松果体には ϵ, ζ が発現しており、特に ζ はNATとの複合体形成に重要である^(3,4)。

NATはノルアドレナリンによる制御に加えて vasoactive intestinal polypeptide (VIP, 血管作動性腸管ポリペプチド) やプロスタグランジンなどの様々な化学伝達物質によっても複雑に制御されている。すなわち、松果体細胞はこうした様々な化学伝達物質の受容体を発現しているまれな細胞である⁽⁵⁾。それらの受容体を刺激してやるとNAT活性は増加したり抑制されたりする。たとえば、セロトニンは松果体細胞の有芯性分泌顆粒内に濃縮されていて、ノルアドレナリン刺激により放出される。分泌されたセロトニンはS2受容体を介してNAT活性を上昇させる⁽⁶⁾。また、松果体細胞は興奮性化学伝達物質であるグルタミン酸やアスパラギン酸をシナプス小胞様オルガネラに濃縮しており、アセチルコリン刺激により細胞外へ放出する^(7,8)。放出されたグルタミン酸やアスパラギン酸は、クラスIIの代謝型受容体に結合し、細胞内cAMP濃度の低下をもたらすNAT遺伝子の転写量を減少させ、NAT活性を低下させる。ヒドロキシインドール-O-メチルトランスフェラーゼにも影響を与える⁽⁹⁾。こうした化学伝達物質によるNAT活性の調節は、図2で示したカスケードのどこかを遮断あるいは増強することによって起こっている。すなわち、NAT活性はノルアドレナリンとその他の化学伝達物質により

図2 ■ NAT 活性制御の様々な様式

NAT 活性は遺伝子レベルおよびタンパク質レベルで制御されている。AC: アデニル酸シクラーゼ, PKA: cAMP 依存プロテインキナーゼ, CREB: cAMP 応答配列結合タンパク質, NE: ノルエピネフリン (ノルアドレナリン)

正・負の双方向に調節されているものと考えられる。多くの化学伝達物質による制御を、我々はパラクリン・オートクリン制御と呼んでいる^(10,11)。

NAT の結晶化

さて、NAT は、207 個 (ラットは 205 個) のアミノ酸からなる分子量 23,076 の可溶性タンパク質である。基質はセロトニンとアセチル CoA であり、*N*-アセチルセロトニンを生成する反応を触媒する。近年、NAT が低イオン条件下、ハンギングドロップ法により結晶化された。1.8Å の解像度でその構造が解明され、NAT の反応機構とそのタンパク質レベルでの制御の様式が分子・原子レベルで理解できるようになってきた (図3)^(10,11)。

NAT は全体的には球状であり、5つの α ヘリックスおよび7つの β シートをもっている。3つのポリペプチド鎖 (ループ1, 2 および 3) がアセチル CoA 結合部位の上にあり、漏斗状の形をとっている。ループ1に存在する Phe 56 および Pro 64, ループ3に存在する Val 183, Leu 186 および Phe 188 は、アセチル CoA との結合および活性部位の形成に関与している。NAT が活性化するためには、まずアセチル CoA が NAT のアセチル CoA 結合部位に結合することが必要である。その結果、ループ1に存在する Phe 56 および Pro 64, ループ3に存在する Val 183, Leu 186 および Phe 188 により疎水性のポケットが形成される。セロトニンはこの疎水性のポケットに入り込み、アセチル CoA よりアセチル基を受け取り、*N*-アセチルセロトニンとして NAT から離れていく。すなわち、セロトニンが NAT の基質となるためにはアセチル CoA による疎水性ポケットの形成が必須

図3 ■ NAT の結晶化構造

基質アナログである CoA-S-アセチルトリプタミンと結合している。トリプタミン部分を青色で示している。疎水性ポケットが形成されているのがわかる。(文献 12; A. B. Hickman *et al.*: *Cell*, 97, 73 (1999) より引用)

条件であり、NAT の安定化剤としてアセチル CoA が報告されているのはこの理由からである。NAT の構造をもとにして阻害剤が開発された。CoA-S-アセチルトリプタミンは CoA とアセチルトリプタミンからなる基質アナログの阻害剤であり、CoA のパントテン酸部分がアセチル CoA 結合部位に、またアセチルトリプタミンがセロトニン結合部位に入り込む。また、セロトニン結合部位である疎水性ポケットに入り込むメラトニンアナログも強く活性を阻害する⁽¹⁴⁾。

引き続き、NAT と 14-3-3 タンパク質との複合体の結晶構造が報告された^(15~17)。14-3-3 タンパク質は 9 つのアンチパラレルな α ヘリックス (A1~A9) をもって

図4 ■ NAT/14-3-3複合体の結晶化構造

(A) 14-3-3を緑、リン酸化された NAT (pNAT) を赤、リン酸化された Thr 31 残基 (pT) を黄色、基質アナログである Co A-S-アセチルトリプタミンを青色で示している。リン酸化された Thr 31 を 14-3-3 の A3, A5, A7 および A9 の α ヘリックスが取り囲んでいるのがよくわかる。(B) 電子密度マップ。14-3-3 と Thr 31 を含む NAT の N 末端領域との関係を示している。NAT を赤で示している。リン酸化された Thr 31 のリン酸基部分が 14-3-3 の Arg 56, Arg 127 および Tyr 128 残基と水素結合している。(文献 17; T. Obsil *et al.* : *Cell*, **105**, 257 (2001) より引用)

おり、NAT との複合体の形成には A3, A5, A7 および A9 の α ヘリックスが関係している (図 4)。特に、この複合体形成には NAT の Thr 31 のリン酸化が重要である。リン酸化された Thr 31 のリン酸基部分が 14-3-3 とタンパク質の Arg 56, Arg 127 および Tyr 128 残基と水素結合することにより、複合体を安定化しているからである。この結果により 14-3-3 とタンパク質と NAT との結合にリン酸化が必要な理由が判明した。

NAT の活性スイッチ

NAT の立体構造が解明されたことから、NAT の反応機構について予想もされなかった新しい知見が得られるようになった。筆者らの研究室から得られた一例を述べる。NAT は *N*-エチルマレイミドのような SH 基修飾試薬によって活性が阻害されることから、活性発現に重要

なシステイン残基を有していることが予想されていた⁽¹⁸⁾。筆者らはこのシステイン残基を同定した。Cys 61 および Cys 177 がそれであった。この 2 つのシステイン残基の間で -SH/-S-S- の交換反応が起こり、還元型 (SH 型) で 100% の活性を示す一方、酸化型 (-S-S- 型) では活性がゼロになることが判明した。NAT の立体構造からこの現象を考えると、Cys 61 と Cys 177 のシステインの間での -S-S- 結合の形成が、触媒部位へのアセチル CoA の結合を阻害していると考えられる。つまり、-SH/-S-S- 結合の変換が構造的なスイッチの役割を果たしており、基質が活性中心に到達することをここで制御していると考えられる (図 5)。-S-S- 結合が解裂して 2 つのシステイン残基が還元型になることで NAT 反応がオンとなるわけである。

これまでの結晶構造はいわゆる還元型に対するものである。筆者らは酸化型の NAT の構造をコンピューター

図5 ■ NAT 活性のレドックス制御

NATは酸化されるとCys 61とCys 177間で-S-S-結合を形成する。その結果、アセチルCoAは結合できなくなり、NATは不活性化となる。還元状態ではアセチルCoAは容易に結合でき活性化される。このジスルフィド結合の形成と開裂は、グルタチオンによって行なわれる。

によりシミュレートしてみた。その結果、55～58番目のアミノ酸残基で形成していた短い α ヘリックスがループ状となり、結果として54～64番目のアミノ酸残基が非常に動きやすい状態となった。これによりCys 61およびCys 177間でジスルフィド結合が形成され、アセチルCoA結合部位の上部を閉じたためNAT活性が消失したと考えられる(図5)。

さて、重要なことは、NATの分子内-SH/-S-S-結合の変換(スイッチング)は細胞内においても観察されたことである。すなわち、過酸化水素を加えて酸化型グルタチオンを増加させてやるとNATは酸化型に変換され活性はなくなるが、細胞内環境を還元状態にしてやるとNATは活性型になる⁽¹⁹⁾。筆者らの得たこの結果はNATの制御について重要な意味があると考えられる。すなわち、上述の制御機構だけでなく細胞内の酸化・還元状態によっても制御されている可能性があるわけである。

*

NAT分子の構造が解明され、これまで不明であった反応機構の詳細と制御の全貌が明らかにされようとしている。筆者らはこの成果を踏まえ、NATのSH感受性を生化学的に解析するという古典的な方法で、NAT活性の分子内スイッチを同定した。このスイッチは細胞内の酸化・還元状態でオン・オフが切り替わるものであった。筆者らは、このスイッチはノルアドレナリンによる既知の制御機構と同様にNATの活性制御に重要である

と考えている。このスイッチの働きを考えることで、これまで不明であったNATをめぐる現象の理解が進むものと考えている。この成果は、細胞内の酸化・還元状態によりNAT活性が制御できること、すなわちメラトニンの合成を制御することにより人工的に概日リズムを制御する方法の開発につながるものと考えている。今後、さらなる新しいタンパク質レベルでのNAT制御機構について検討していく予定である。

文献

- 1) D. C. Klein, S. L. Coon, P. H. Roseboom, J. L. Weller, M. Bernard, J. A. Gastel, M. Zatz, P. M. Iuvone, I. R. Rodriguez, V. Begay, J. Falcon, G. M. Cahill, V. M. Cassone & R. Baler: *Recent Prog. Horm. Res.*, **52**, 307 (1997).
- 2) J. A. Gastel, P. H. Roseboom, P. A. Rinaldi, J. L. Weller & D. C. Klein: *Science*, **279**, 1358 (1998).
- 3) A. Aitken, S. Howell, D. Jones, J. Madrazo & Y. Patel: *J. Biol. Chem.*, **270**, 5706 (1995).
- 4) S. Ganguly, J. A. Gastel, J. L. Weller, C. Schwartz, H. Jaffe, M. A. A. Namboodiri, S. L. Coon, A. B. Hickman, M. Rollag, T. Obsil, P. Beauverger, G. Ferry, J. A. Bontin & D. C. Klein: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8083 (2001).
- 5) R. J. Reiter: *Am. J. Anat.*, **162**, 287 (1991).
- 6) H. Yamada, M. Hayashi, S. Uehara, M. Kinoshita, A. Muroyama, M. Watanabe, K. Takei & Y. Moriyama: *J. Neurochem.*, **81**, 533 (2002).
- 7) H. Yamada, S. Yatsushiro, S. Ishio, M. Hayashi, T. Nishi, A. Yamamoto, M. Futai, A. Yamaguchi & Y. Moriyama: *J. Neurosci.*, **18**, 2056 (1998).
- 8) H. Yamada, A. Ogura, S. Koizumi, A. Yamaguchi & Y. Moriyama: *J. Neurosci.*, **18**, 4946 (1998).
- 9) S. Ishio, H. Yamada, C. M. Craft & Y. Moriyama: *Brain Res.*, **850**, 73 (1999).

- 10) Y. Moriyama, M. Hayashi, H. Yamada, Y. Yatsushiro, S. Ishio & A. Yamamoto : *J. Exp. Biol.*, **203**, 117 (2000).
- 11) Y. Moriyama & M. Hayashi : *Trends Pharmacol. Sci.*, **24**, 511 (2003).
- 12) A. B. Hickman, M. A. Namboodiri, D. C. Klein & F. Dyda : *Cell*, **97**, 361 (1999).
- 13) A. B. Hickman, D. C. Klein & F. Dyda : *Mol. Cell.*, **3**, 23 (1999).
- 14) W. Zheng & P. A. Cole : *Curr. Med. Chem.*, **9**, 1187 (2002).
- 15) D. Liu, J. Bienkowska, C. Petosa, R. J. Collier, H. Fu & R. Liddington : *Nature*, **376**, 191 (1995).
- 16) M. B. Yaffe, K. Rittinger, S. Volinia, P. R. Caron, A. Aitken, H. Leffers, S. J. Gamblin, S. J. Smerdon & L. C. Cantley : *Cell*, **91**, 961 (1997).
- 17) T. Obsil, R. Ghirlando, D. C. Klein, S. Ganguly & F. Dyda : *Cell*, **105**, 257 (2001).
- 18) M. A. A. Namboodiri, J. T. Favilla & D. C. Klein : *Science*, **213**, 571 (1981).
- 19) S. Tsuboi, Y. Kotani, K. Ogawa, T. Hatanaka, S. Yatsushiro, M. Otsuka & Y. Moriyama : *J. Biol. Chem.*, **277**, 44229 (2002).

求人情報

国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部研究員公募

募集人員：研究員（研究職）1名

所属：食品添加物部

専門分野：天然物化学，食品化学，分析化学

業務内容：今回公募する研究員は，天然添加物の規格基準と試験・検査法に関する研究・調査を行なう業務に従事する予定である。

応募資格：薬学，農学，化学系の研究領域における大学院博士課程修了者，もしくは博士課程修了相当の研究歴を有している方。天然成分の分析，分離精製，構造解析に関する研究を行なうための高度な専門知識，経験を有していること。機器分析，特に NMR および MS の技術に習熟していること。原則として 32 歳までの方。

応募締切：平成 17 年 5 月 13 日（金）必着

採用予定：平成 17 年 7 月 1 日

公募詳細：<http://www.nihs.go.jp/index-j.html> に掲載の公募文書を参照。

問合せ先：国立医薬品食品衛生研究所総務部庶務課人事係長 會森 章

Tel. 03-3700-1141（内線 208）

（独）理化学研究所 平成18年度基礎科学特別研究員公募

募集分野：物理学，化学，生物科学，医科学，工学の各分野で理化学研究所で実施可能な研究。

応募資格：平成 18 年 4 月 1 日現在 35 歳未満で，自然科学の博士号取得者，またはこれと同等の能力を有すると認められる者。日本国に永住権を有さない外国人にあっては，上記に加え次の条件を満たす者。①応募日現在日本国に在住している者，②日本国の大学院博士課程を修了（見込を含む）し，博士号を取得（見込を含む）の者。

応募要項頒布：頒布開始は 4 月上旬予定。応募要項の請求

は，下記 Fax または E-mail へ①郵便番号，②住所，③氏名（漢字），④氏名（カタカナ）を記入し，送信すること。要項代は無料。

応募願書の締切：平成 17 年 5 月 31 日（火）必着

着任時期：平成 18 年 4 月 1 日

問合せ先：〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1 （独）理化学研究所研究調整部 研究交流課基礎科学特別研究員

Tel. 048-467-9268（直通），Fax. 048-463-3687

E-mail : wakate@riken.jp

その他：本件は当研究所予算の成立を前提としており，その事情により変更がありえる。

室蘭工業大学工学部応用化学科教員公募

募集人員：助教授 1 名

所属：生物工学講座

専門分野：環境微生物工学分野

応募資格：博士の学位を有し，45 歳以下の方が望ましい。

着任時期：決定後できる限り早い時期

提出書類：①履歴書（写真貼付），②教育業績（民間企業などの社員教育業績を含む），③研究業績，④主要論文 3 編（コピー可），⑤研究助成金採択状況と特許，⑥現在の専門，および従来の教育研究の概要と今後の抱負（1,200 字程度），⑥応募者について意見を伺える方 2 名の氏名と連絡先。

応募締切：平成 17 年 5 月 31 日（当日消印有効）

書類送付先：〒050-8585 北海道室蘭市水元町 27-1 室蘭工業大学工学部応用化学科長 杉岡正敏

問合せ先：生物工学講座主任教授 菊池慎太郎

Tel. 0143-46-5741

E-mail : shintaro@mmm.muroran-it.ac.jp

なお，詳細は本学ホームページを参照して下さい。

<http://www.muroran-it.ac.jp/>