

総説

概日リズムホルモン・メラトニン合成の レドックス制御機構

守谷 智恵, 川上 賀代子, 坪井 誠二*
就実大学 薬学部 生化学研究室

Redox regulatory mechanism of melatonin synthesis in pineal gland

Chie Moritani, Kayoko Kawakami, Seiji Tsuboi*

Department of Biochemistry, School of Pharmacy, Shujitsu University

(Received 2 October 2015; accepted 4 November 2015)

Abstract: Melatonin is a highly lipophilic hormone in pineal glands and plays important roles in many biological processes, especially in circadian rhythm and seasonal reproduction. Serotonin *N*-acetyltransferase (NAT) is a key enzyme for melatonin synthesis. The regulation of the enzyme is very important to understand the molecular mechanism of circadian rhythm. So far two kinds of regulatory mechanisms have been known: one is transcriptional control and another is proteasomal control through the direct binding of 14-3-3 protein with NAT. NAT is also known to be regulated through thiol-disulfide exchange. However, the molecular mechanism for the thiol-disulfide exchange remains unknown. We demonstrated that interconversion of disulfide bond between Cys 61 and Cys 177 directly transforms the active and inactive form NAT. Thus, the disulfide bond between Cys 61 and Cys 177 behaves as a switch to open the gate for substrates to the catalytic center. In this paper, we described novel regulation of NAT activity by glutathione, in which an intramolecular disulfide bond may function as a switch for catalysis. Our results suggest that cellular oxidoreduction state is important to regulate NAT at enzyme level.

Keywords: melatonin, glutathione, serotonin *N*-acetyltransferase, redox regulation

1. はじめに

概日リズムを司る松果体ホルモンであるメラトニン, その生合成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) を介して複雑に制御されている. ここでは, 今まで報告されているタンパク質レベル及び転写調節レベルでの制御と, 我々が明らかにしたレドックス制御機構について述べる.

2. 概日リズムとメラトニン合成機構

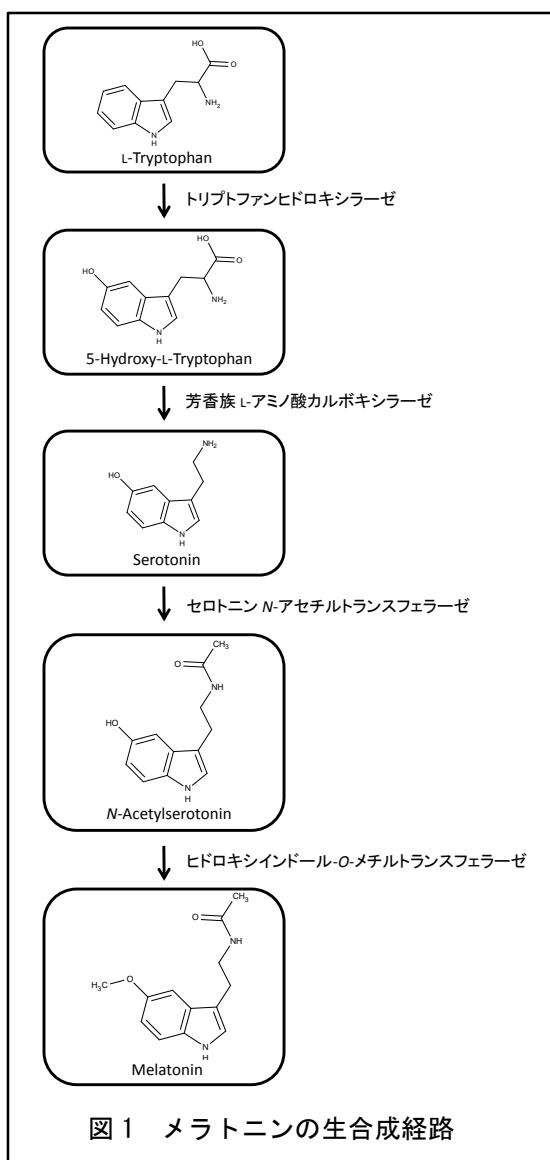
生物は, 広く地球の自転周期に適応するため, 約 24 時間周期の生物リズム (概日リズム) を持っている. 概日リズムは, 睡眠・覚醒だけでなく自律神経や代謝系といった全身の生理活動に影響を与え, 生物が 1 日の昼夜リズムに伴って効率よく快適に生活していく上で重要なシステムである. このリズムを生み出す生物時計は, 単細胞生物からヒトに至るまで広く存在しており, 様々な活動や代謝の日内変動を制御している. 哺乳類において, 生物時計は視床下部の「視交叉上核」と呼ばれる神経細胞集団に存在している. この視交叉上核は, 本来約 25 時間の自律的な内因性のリズムを持っているが, 網膜で光刺激を受け, 網膜視床下部神経経路を介して時間をリセットする事で, 約 24 時間周期の外界リズムに同調させている. 視交叉上核で形成された概日リズムは, 上頸部交感神経節の交感神経を介して松果体と呼ばれる内分泌器官に伝えられる. 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, 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. 従って, 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事は極めて重要である. NAT 活性の調節機構を明らかにするために, まず, NAT の構造について説明する.

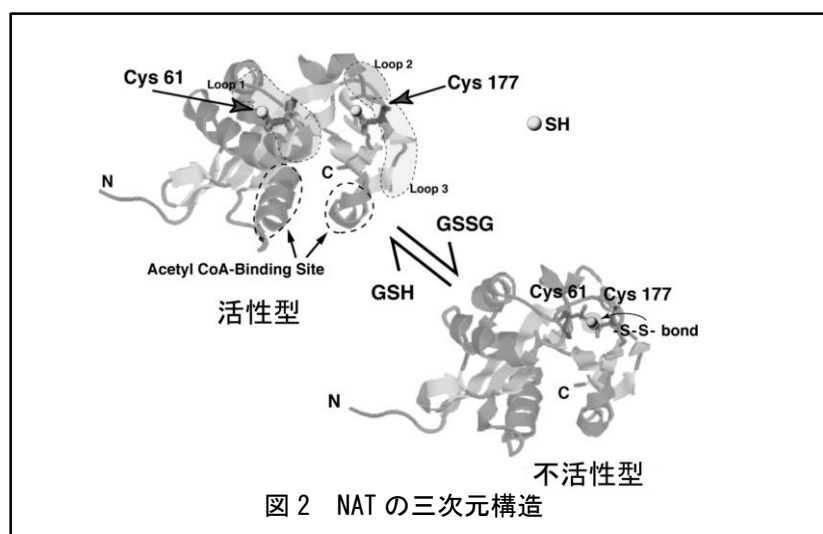
3. NAT の構造

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^{1,2)}. 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. NAT は全体的には球状であり, 5 つのアルファ・ヘリックス及び 7 つのベータ・シートを持っている. 3 つのポリペプチド鎖 (ループ 1, 2 及び 3) がアセチル



CoA 結合部位の上であり、漏斗状の形をとっている。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 結合の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 及び Pro 64、ループ 3 に存在する Val 183, Leu 186 及び 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修条件であり、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 (図 2)。

さらに、NAT と 14-3-3 ζ タンパク質との複合体の構造が報告されている³⁻⁵⁾。14-3-3 タンパク質は現在 9 つのサブタイプ (α, β, γ, δ, ε, η, σ, τ, ζ) 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^{6,7)}。リン酸化された Thr 31 のリン酸基部分が 14-3-3 ζ タンパク



質の Arg 56, Arg 127 及び 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おり、この結果は、14-3-3 とタンパク質と NAT との結合にリン酸化が重要であることを示している。

4. NAT の制御機構

1) 転写調節レベルでの制御

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明らかになっている。すなわち、時間情報により夜間に交感神経末端より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にのみ起こる。明け方には交感神経からのノルアドレナリン入力がなくなり、NAT 活性上昇とメラトニン出力もなくなる⁸⁾。ヒツジ等の有蹄類においても、同様に 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。従って、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。

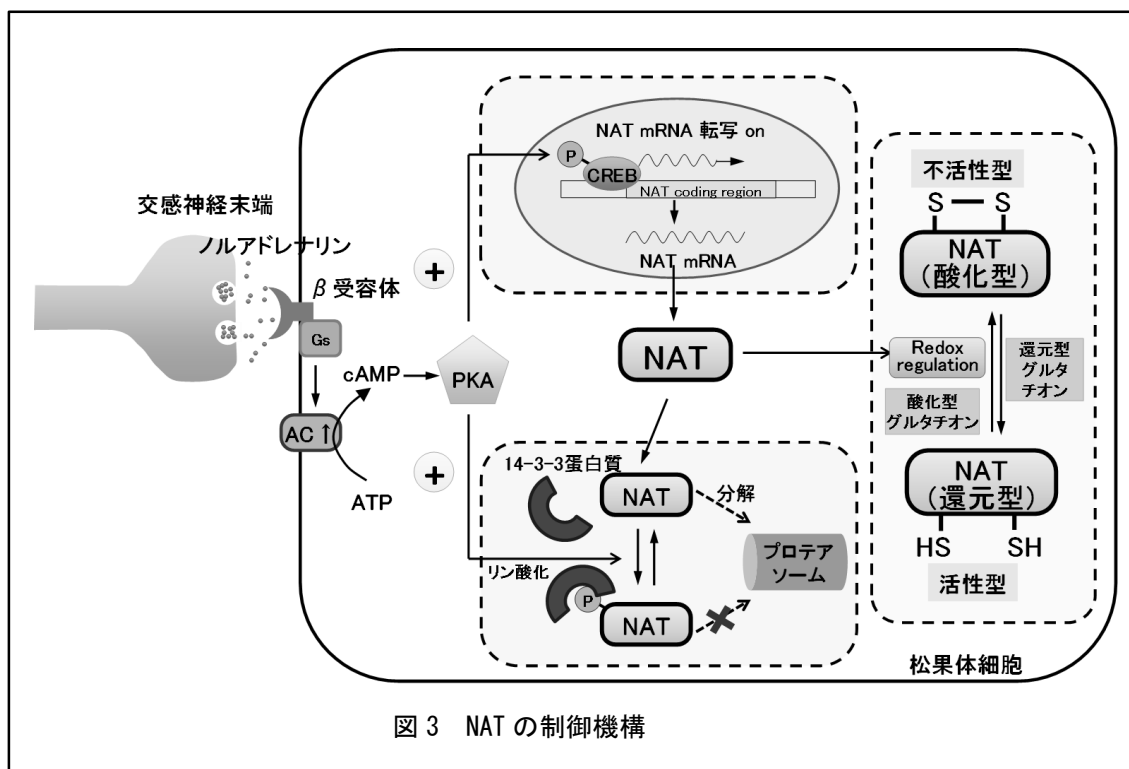


図3 NAT の制御機構

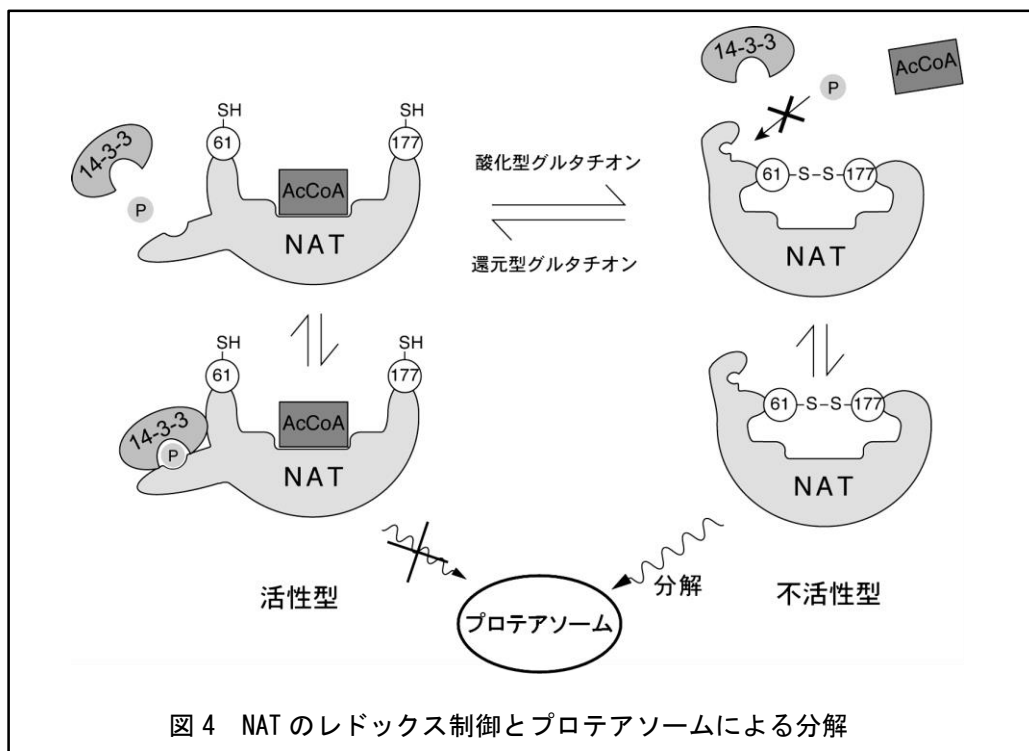
2) タンパク質レベルでの制御

タンパク質レベルで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。そのため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ている (図3)⁹⁾。

5. グルタチオンによる NAT のレドックス制御機構

NAT 活性制御が cAMP を介して転写及びタンパク質レベルで行われていることを述べてきた。しかし、実際の生理現象はもっと複雑

である。例えば、夜間に強い光を受けると NAT 活性は急速に消失する。この現象を cAMP を介する制御だけで説明することは困難である。そこで、全く別の制御機構の存在が示唆された。以前より、NAT は N-ethylmaleimide (NEM) のような SH 基修飾試薬によって活性が阻害される事から、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¹⁰⁾。著者らは NAT をアセチル CoA で前処理した場合、NEM による活性阻害が抑制されることから、¹⁴C-NEM を用いてアセチル CoA 存在下または非存在下における ¹⁴C-NEM の取り込みを比較することにより、このシステイン残基を同定した。その結果 Cys 61 及び Cys 177 が活性発現に重要であることがわかった。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¹¹⁾。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-結合の変換がアセチルCoAの触媒部位への入り口を開閉する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。-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活性がオンとなり、酸化型については-S-S-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2)。

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は活性型になった¹¹⁾。更に、最近の研究結果より酸化型NATはアセチルCoAが結合できないだけでなくAキナーゼによるリン酸化を受けないことが明らかとなった(未発表)。このことは、NATの分子内-SH/-S-S-結合の変換がタンパク質レベルでの制御に影響を及ぼしていることを示している。夜間においてNATが酸化型になった場合、活性が消失するだけでなくプロテアソームによる分解を受けることが示唆された(図4)。

著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、既知のcAMPを介した制御機構だけでな

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。

6. 終わりに

グルタチオンは種々の生物に高濃度に存在するトリペプチドであり、細胞内の主な非タンパク性チオールである。グルタチオンは抗酸化作用等種々の生理活性を持つことが知られており¹²⁻¹³⁾、生体防御機構において重要な役割を果たしている。また、脳内グルタチオンは睡眠リズムに一致したサーカディアンリズムをもって変動することから内因性睡眠物質であることが知られており、この睡眠作用はN-メチル-D-アスパラギン酸レセプターを介するものである¹⁴⁾。

著者らは、細胞内の酸化・還元状態でオン・オフが切り替わるというNAT活性の分子内スイッチを同定した。このスイッチの切り替えにグルタチオンが重要な働きをしており、前述した睡眠効果とは異なったメカニズムでのグルタチオンによる概日リズム制御であった。今回明らかにした成果は、細胞内の酸化・還元状態によりNAT活性が制御できること、即ち、細胞内中のグルタチオンの酸化・還元状態を調節することによりメラトニンの合成を制御し、最終的に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。実際、細胞中グルタチオン量を増加させる物質が報告されており^{15, 16)}、臨床への応用が期待されている。

引用文献

1) Hickman, A.B., Namboodiri, M.A., Klein, D.C.,

- and Dyda, F.: The structural basis of ordered substrate binding by serotonin *N*-acetyltransferase: enzyme complex at 1.8 Å resolution with a bisubstrate analog., *Cell*, **97**, 361-369 (1999).
- 2) Hickman, A.B., Klein, D.C., and Dyda, F.: Melatonin biosynthesis: the structure of serotonin *N*-acetyltransferase at 2.5 Å resolution suggests a catalytic mechanism., *Mol. Cell*, **3**, 23-32 (1999).
- 3) Liu, D., Bienkowska, J., Petosa, C., Collier, R.J., Fu, H., and Liddington, R.: Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein., *Nature*, **376**, 191-194 (1995).
- 4) Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J., and Cntley, L.C.: The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity., *Cell*, **91**, 961-971 (1997).
- 5) Obsil, T., Ghirlando, R., Klein, D.C., Ganguly, S., and Dyda, F.: Crystal structure of the 14-3-3 zeta: serotonin *N*-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation., *Cell*, **105**, 257-267 (2001).
- 6) Aitken, A., Howell, S., Jones, D., Madrazo, J., and Patel, Y.: 14-3-3 alpha and delta are the phosphorylated forms of raf-activating 14-3-3 beta and zeta. *In vivo* stoichiometric phosphorylation in brain at a Ser-Pro-Glu-Lys MOTIF., *J. Biol. Chem.*, **270**, 5706-5709 (1995).
- 7) Ganguly, S., Gastel, J.A., Weller, J.L., Schwartz, C., Jaffe, H., Namboodiri, M.A.A., Coon, S.L., Hickman, A.B., Rollag, M., Obsil, T., Beauverger, P., Ferry, G., Bontin, J.A., and Klein, D.C.: Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine *N*-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 8083-8088 (2001).
- 8) Klein, D.C., Coon, S.L., Roseboom, P.H., Weller, J.L., Bernard, M., Gastel, J.A., Zatz, M., Iuvone, P.M., Rodriguez, I.R., Begay, V., Falcon, J., Cahill, G.M., Cassone, V.M., and Baler, R.: The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin *N*-acetyltransferase in the pineal gland., *Recent Prog. Horm. Res.*, **52**, 307-358 (1997).
- 9) Gastel, J.A., Roseboom, P.H., Rinaldi, P.A., Weller, J.L., and Klein, D.C.: Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin *N*-acetyltransferase regulation., *Science*, **279**, 1358-1360 (1998).
- 10) Namboodiri, M.A.A., Favilla, J.T., and Klein, D.C.: Pineal *N*-acetyltransferase is inactivated by disulfide-containing peptides: insulin is the most potent., *Science*, **213**, 571-573 (1981).
- 11) Tsuboi, S., Kotani, Y., Ogawa, K., Hatanaka, T., Yatsushiro, S., Otsuka, M., and Moriyama, Y.: An intramolecular disulfide bridge as a catalytic switch for serotonin *N*-acetyltransferase., *J. Biol. Chem.*, **277**, 44229-44235 (2002).
- 12) Joachim, D.U., Patrick, J.M., and Danyelle, M.T.: Glutathione and redox signaling in substance abuse., *Biomed. Pharmacother.*, **68**,

- 799-807 (2014).
- 13) Ji, L.L., Fu, R.: Response of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide., *Am. J. Physiol.*, **189**, 549-554 (1992).
- 14) 塩見浩人, 睡眠誘発機構と痛覚制御機構 – 睡眠誘発へのオピオイドペプチドの関与, 井上昌次郎, 山本郁男 編, 睡眠のメカニズム, 74-102, 朝倉書店 (1997).
- 15) Yama, K., Sato, K., Abe, N., Murao, Y., Tatsunami, R., and Tampo, Y., Epalrestat increase glutathione, thioredoxin, and heme oxygenase-1 by stimulating Nrf2 pathway in endothelial cells., *Redox Biology*, **4**, 87-96 (2015).
- 16) Lou, H., Jing, X., Ren, D., Wei, X., and Zhang, X.: Eriodictyol protects against H₂O₂-induced neuron-like PC12 cell death through activation of Nrf2/ARE signaling pathway., *Neurochem. Int.*, **61**, 251-257 (2012).