

20020789

ヒト硫酸転移遺伝子ファミリーの 網羅的機能解析に関する研究

(厚生労働科学研究費補助金)

平成14年度
萌芽的先端医療技術推進研究事業
総括研究報告書

平成15年3月

主任研究者：榊原陽一
(宮崎大学農学部)

目 次

I. 総括研究報告

ヒト硫酸転移酵素遺伝子ファミリーの網羅的機能解析に関する研究 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 8

III. 研究成果の刊行物・別刷 9

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

総括研究報告書

ヒト硫酸転移酵素遺伝子ファミリーの網羅的機能解析に関する研究

主任研究者 榊原 陽一 宮崎大学・助手

研究要旨

生体内において非常に多様な機能に関与するヒト硫酸転移酵素に関して網羅的機能解析を行い、トキシコゲノミクス分野における硫酸転移酵素の機能解明と研究成果のテーラーメイド医療への応用の可能性を検討する。現在までに硫酸転移酵素は非常に多様な分子種からなり、シトクロム P-450 酵素群と同様に大きな遺伝子ファミリーを形成していることが明らかとなっている。しかしながら、現時点ではゲノム上にいくつかの異なる機能を持った硫酸転移酵素が存在しているのかと行ったことも正確には把握されていない。そこで、平成14年度は新規硫酸転移酵素遺伝子(SULT)ファミリーのクローニングを行った。具体的には、ヒト SULT1C1 のに関してゲノムデータベース情報を基に cDNA およびアミノ酸配列を予測し、PCR による ORF の増幅とリコンビナント酵素の発現系の構築を目指した。その結果、ヒト SULT1C1 はC端のエクソンを使い分けることで2種類のスプライスバリエーションが存在する可能性が示された。今回配列決定したヒト SULT1C1 はこれまでに報告された2種と比較してラットおよびマウス SULT1C1 と最も高いホモロジーを示した。現在、これら2種の ORF を GST との融合タンパク質として大腸菌で発現し、活性の確認を行っている。これらの研究結果より、ヒト SULT1C1 はスプライシングにより酵素活性を変化し、機能を多様にしている可能性が考えられた。さらに SULT6 という新規ファミリーに属すると考えられる硫酸転移酵素 SULT6A1 の存在をゲノムデータベース上に見出し、ヒトおよびマウスにおけるクローニングを行っている。

平成14年度は以上のように、新規硫酸転移酵素のクローニングにおいて研究が進展し、今後これらの機能解明に関する結果をふまえて、硫酸転移酵素の機能を網羅的に明らかとする。平成14年度は申請時の研究計画に沿った研究成果が得られたと考えられる、しかしながら依然としてゲノム上に存在する硫酸転移酵素の数ははっきりとせず、新規硫酸転移酵素のクローニングに関しては平成15年度も継続して行う必要があると考えられた。

A. 研究目的

生体内において非常に多様な機能に関与するヒト硫酸転移酵素に関して網羅的機能解析を行い、トキシコゲノミクス分野における硫酸転移酵素の機能解明と研究成果のテーラーメイド医療への応用の可能性を検討する。現在までに硫酸転移酵素は非常に多様な分子種からなり、シトクロム P-450 酵素群と同様に大きな遺伝子ファミリーを形成していることが明らかとなっている。しかしながら、現時点ではゲノム上にいくつかの異なる機能を持った硫酸転移酵素が存在しているのかといったことも正確には把握されていない。そこで、本研究計画において、全ての硫酸転移酵素遺伝子(SULT)ファミリーのクローニングとリコンビナント酵素の調製を行い、ヒト硫酸転移酵素の網羅的機能解析を行う。

生体内における硫酸化は、生体外異物や薬物の解毒代謝機構、ステロイドホルモンや神経伝達物質の生体内濃度調節機構、食品機能性成分の作用機構への関与などが知られている。このような観点から、硫酸転移酵素はテーラーメイド医療やテーラーメイド栄養指導のための指標として注目を集めつつある。今後、トキシコゲノミクス分野においてヒト硫酸転移酵素を網羅的に機能解析し、生体外異物（食品添加物、環境ホルモン、環境変異原物質など）や薬物にたいする解毒代謝機構としての硫酸化に関して生化学的

に諸性質を検討する必要がある。そこで、平成14年度は新規ヒト硫酸転移酵素のクローニングとその大腸菌における発現系を確立し、リコンビナント硫酸転移酵素を使った生化学的な諸性質を網羅的に解析することを目的に研究を行った。さらに、テーラーメイド医療やテーラーメイド栄養指導を導入するための基盤を確立するためにヒト硫酸転移酵素の遺伝子多型(SNPs)に関する研究を開始した。

B. 研究方法

新規ヒト硫酸転移酵素のクローニングとして、ヒト SULT1C1 のクローニングはすでに報告されているラットおよびマウスの SULT1C1 配列と相同性の高い部分配列をヒトゲノムデータベースから検索した。得られた情報は断片的なエクソン配列のため、コンピューター上で既知の硫酸転移酵素のスプライスジャンクションと比較しながら cDNA 配列を予想した。得られた予想 cDNA 配列をもとにオープンリーディングフレームをヒトトータル RNA から RT-PCR により増幅した。PCR 断片は塩基配列の決定を行い、ゲノムから予想された配列との比較を行い、最終的に大腸菌用発現ベクター pGEX-2TK にサブクローニングし GST との融合タンパク質としてリコンビナント酵素を発現した。

新規硫酸転移酵素ヒト SULT6A1 は SULT1C1 と同様にゲノムデータベースの解析により発見し、PCR により ORF の増幅を行った。現在、PCR 産物の塩基配列の確認を行い、今後リコンビナント酵素の発現と諸性質の検討を行う。

ヒト硫酸転移酵素の遺伝子多型(SNPs)に関する研究として、ヒトヒドロキシステロイド硫酸転移酵素(SULT2A1)に関して PCR による部位特異的変異の導入によりアミノ酸配列の異なるリコンビナント酵素 5 種類を調製した。鋳型として、ヒト SULT2A1 を大腸菌で GST 融合タンパク質として発現するベクター pGEX-2TK にサブクローニングし、発現および酵素活性を確認した物を使用した。得られた変異クローンは塩基配列の確認を行い、目的の部位特異的変異の導入の確認およびフレームの確認を行った。これらの変異クローンを含むプラスミドは発現用宿主 BL21 に遺伝子導入しリコンビナント酵素を調製した。これらのリコンビナント変異硫酸転移酵素は活性の確認および変異原試験法への応用に関して Ames 試験による 9-ヒドロキシメチルアントラセンの変異原物質への代謝活性化を試験した。

倫理面への配慮

新規ヒト硫酸転移酵素のクローニングにおいて、その試料提供者の倫理面への配慮が必要と考えられる、しかしこれに関しては市販の RNA を用いることにより

対処した。さらにヒト硫酸転移酵素の多型に関する情報が考えられるが、本研究においては遺伝子の多型に関する情報はデータベース上で公開されている情報のみを使用することで倫理面への配慮を十分に行った。

C. 結果および考察

ヒト SULT1C1 に相当する遺伝子が、第 2 染色体上の約 30 kbp 長の範囲内で 8 つのエクソンに別れて存在していることがゲノムデータベースより明かとなった。またゲノム上のエクソン 7 とエクソン 8 は、7A と 8A または 7B と 8B 2 つの異なる構造の組み合わせが、ゲノム上にタンデムに並んで存在していることが明らかとなり (図 1)、スプライシングの過程でどちらの構造が選択されるかによって、C 末端 97 残基にバリエーションのある 2 種類の酵素として発現していると推測された。このようなスプライスバリエーションはヒト SULT2B1 の N 端で報告されており、機能が異なることが知られている。

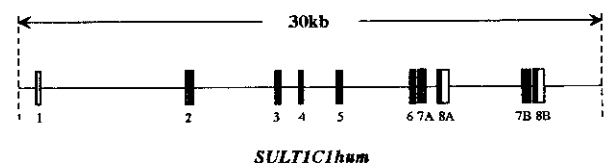


図 1. ヒト SULT1C1 のゲノム構造

そこで、その2種のスプライスバリエント SULT1C1-A および SULT1C1-B のオープンリーディングフレームの配列データをもとに、5'末端と 3'末端のプライマーをそれぞれ設計し、ヒトの各種臓器の totalRNA 混合サンプルを用いた RT-PCR により、SULT1C1 の cDNA の増幅を試みた。その結果、SULT1C1-A については、完全長の cDNA が得られたが、一方で、SULT1C1-B はスプライシングの不完全な断片しか得られなかった。そこで、SULT1C1-A を鋳型にして PCR 増幅したエクソン2～6の断片（約 600 b p）と、SULT1C1-B 不完全断片を鋳型にして PCR 増幅したエクソン7～8の断片（約 300 b p）を用いて、SULT1C1-B の cDNA を合成した。2種類の cDNA は pGEX-4T-3 ベクターの BamHI サイトにそれぞれサブクローニングし、酵素とグルタチオン S トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として大腸菌で発現し、それぞれのリコンビナント酵素を調製した。酵素活性の確認は、硫酸供与体として[³⁵S]放射活性硫酸ラベルした 3'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate（活性硫酸 PAPS）を用いて、基質 p-nitrophenol の硫酸化反応を行った。反応後は TLC により酵素反応によって[³⁵S]放射活性硫酸ラベルされた基質の硫酸体を分離し、イメージアナライザー FLA3000 により放射活性を酵素活性として測定した。現在引き続き SULT1C1-A と SULT1C1-B の2種の酵素活性の諸性質について、比較検討を行っている。

ヒト SULT6A1 はヒト由来トータル RNA の混合物を鋳型に RT-PCR により行った。使用した PCR プライマーはゲノムデータベースの解析から判明した N 端の開始コドンから C 端の終止コドンを含むプライマーをデザインした。その結果、912bp の ORF を完全に含む PCR 産物が増幅し、303 アミノ酸をコードしていることが判明した。これらの結果より、ヒトにおいて SULT6A1 はゲノムから転写されていることが判明したので、現在リコンビナント酵素の調製を進めている。

ヒトヒドロキシステロイド硫酸転移酵素(SULT2A1)は大腸菌発現用ベクター pGEX-2TK にサブクローニングされたものを鋳型に部位特異的変異の導入により5種のアミノ酸配列の異なる遺伝子多型(SNPs)の調製をした。変異の確認は塩基配列の決定により行い、それぞれの硫酸転移酵素の多型を発現するクローンを選別した。リコンビナント硫酸転移酵素グルタチオンセファロースで精製し、酵素活性の測定及び9-ヒドロキシメチルアントラセンを変異源物質として Ames 試験による変異原試験に使用した。その結果、これら5種はすべて硫酸転移酵素活性を示し、そのうち1種は酵素活性も低く変異原代謝活性化能も低いことが判明した。これらの研究から、発ガンリスク診断や新規の抗変異原物質に関する研究に使用できる可能性が示唆された。

D. 結論

平成14年度は、新規硫酸転移酵素のクローニングとしてヒト SULT1C1 のクローニングと大腸菌におけるリコンビナント酵素の発現を行った。クローニングの結果、ヒト SULT1C1 はスプライシングによりC端のエクソンを使い分け酵素機能を多様化している可能性が示された。

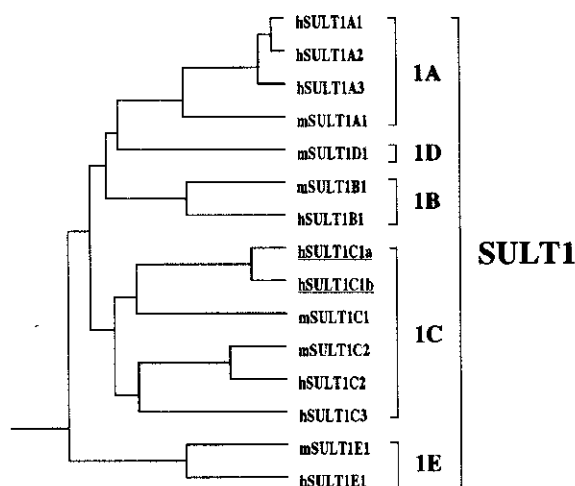


図2. ヒトとマウス SULT1 ファミリー硫酸転移酵素の系統樹

その結果、図2に示したように、ヒトにおいて SULT1C1a、SULT1C1b、SULT1C2、SULT1C3 の4種の酵素が存在することが考えられた。これまでの報告で、ヒトに関しては SULT1C2 が最初にヒト SULT1C1 であるといった間違っただ報告がされ、それ以来ヒトにおいては SULT1C サブファミリーの分類が曖昧なまま結論が示され

ずに今日に至った。今回の研究結果は、ヒトゲノム上に SULT1C1 と分類される新規の硫酸転移酵素の存在を世界で初めて明確に示した。またヒト硫酸転移酵素の遺伝子多型(SNPs)に関する研究として、ヒトヒドロキシステロイド硫酸転移酵素(SULT2A1)に関する研究を開始した。現在、遺伝子多型に関しては共同研究先であるテキサス大学ヘルスセンターと分担して研究を行っている。テキサス大学においては、ヒト SULT1A1 およびヒト SULT1A3 に関して現在研究が行われている。今後は、引き続き新規硫酸転移酵素のクローニングを行う予定であり、現在 SULT6A1 という新規ファミリーに属す硫酸転移酵素のクローニングを開始している。また硫酸転移酵素の遺伝子多型に関しては、データベースを詳細に検討し、すべての硫酸転移酵素の多型(SNPs)に関して酵素学的な諸性質を網羅的に解析する計画である。

F. 健康危険情報

平成14年度の研究においては、特に健康危険情報として早急に報告すべき研究結果や事例は見られなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

榊原陽一、Ming-Cheh Liu、水光正仁

「フェノール硫酸転移酵素遺伝子ファミリーの構造と機能」
生化学、74 (7), 539-546, 2002.

Xu F, Suiko M, Sakakibara Y, Pai TG, Liu MC. “Regulatory effects of divalent metal cations on human cytosolic sulfotransferases.”
J. Biochem. (Tokyo) 132(3), 457-462, 2002.

Pai TG, Ohkimoto K, Sakakibara Y, Suiko M, Sugahara T, Liu MC.
“Manganese stimulation and stereospecificity of the Dopa (3,4-dihydroxyphenylalanine) /tyrosine-sulfating activity of human monoamine-form phenol sulfotransferase. Kinetic studies of the mechanism using wild-type and mutant enzymes.”
J. Biol. Chem. 277(46), 43813-43820, 2002.

Pai TG, Sugahara T, Suiko M, Sakakibara Y, Xu F, Liu MC.
“Differential xenoestrogen-sulfating activities of the human cytosolic sulfotransferases: molecular cloning, expression, and purification of human SULT2B1a and SULT2B1b sulfotransferases.”
Biochim. Biophys. Acta 1573(2), 165-170, 2002.

Pai TG, Oxendine I, Sugahara T, Suiko M, Sakakibara Y, Liu MC.

“Structure-function relationships in the stereospecific and manganese-dependent 3,4-dihydroxyphenylalanine /tyrosine-sulfating activity of human monoamine-form phenol sulfotransferase, SULT1A3.”
J. Biol. Chem. 278(3), 1525-1532, 2003.

2. 学会発表

田村廣人、○大木本圭、榊原陽一、水光正仁 「エストロゲン硫酸化阻害によるトリブチルスズのホルモンかく乱作用」
日本農芸化学会 2002 年度大会 (仙台)

榊原陽一、○嶋亮一、Ming-Cheh Liu、水光正仁 「コレステロール硫酸化に関与する硫酸転移酵素の同定とその諸性質」
日本農芸化学会 2002 年度大会 (仙台)

榊原陽一、○三城恵美、Ming-Cheh Liu、水光正仁 「タンパク質の翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化の機能解明」
平成 14 年度日本生化学会九州支部例会 (福岡)

○榊原陽一、近藤知己、Ming-Cheh Liu、水光正仁 「マウスヒドロキシステロイド硫酸転移酵素ファミリーにおける諸性質の比較検討」平成 14 年度日本生化学会九州支部例会 (福岡)

○ 榊原陽一、水光正仁

「神経特異的硫酸転移酵素のクローニングとその諸性質の検討」

第26回 タンパク質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム（佐賀）

榊原陽一、○嶋亮一、Ming-Cheh Liu、水光正仁 「ヒトおよびマウス硫酸転移酵素 SULT2B1 の構造と機能」

第256回 日本農芸化学会西日本支部大会（熊本）

○榊原陽一、近藤知己、野邊理花、大木本圭、嶋亮一、Ming-Cheh Liu、水光正仁

「マウスヒドロキシステロイド硫酸転移酵素の諸性質の比較検討」

第75回 日本生化学会大会（京都）

榊原陽一、○水野貴之、西山和夫、Liu, Ming-Cheh、水光正仁

「リコンビナント硫酸転移酵素を組み込んだ変異原試験法の確立とカテキン類の新規抗変異原作用」

平成14年度 日本栄養・食糧学会 日本食品科学工学会 西日本支部合同大会（宮崎）

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
榊原陽一 Ming-Cheh Liu 水光正仁	フェノール硫酸転移酵素遺伝子ファミリーの構造と機能	生化学	74(7)	539-546	2002
Xu F Suiko M Sakakibara Y Pai TG Liu MC	Regulatory effects of divalent metal cations on human cytosolic sulfotransferases.	J. Biochem. (Tokyo)	132(3)	457-462	2002
Pai TG Ohkimoto K Sakakibara Y Suiko M Sugahara T Liu MC	Manganese stimulation and stereospecificity of the Dopa (3,4-dihydroxyphenylalanine) /tyrosine-sulfating activity of human monoamine-form phenol sulfotransferase. Kinetic studies of the mechanism using wild-type and mutant enzymes.	J. Biol. Chem.	277(46)	43813-43820	2002
Pai TG Sugahara T Suiko M Sakakibara Y Xu F Liu MC	Differential xenoestrogen-sulfating activities of the human cytosolic sulfotransferases: molecular cloning, expression, and purification of human SULT2B1a and SULT2B1b sulfotransferases.	Biochim. Biophys. Acta	1573(2)	165-170	2002
Pai TG Oxendine I Sugahara T Suiko M Sakakibara Y Liu MC	Structure-function relationships in the stereospecific and manganese-dependent 3,4-dihydroxyphenylalanine /tyrosine-sulfating activity of human monoamine-form phenol sulfotransferase, SULT1A3.	J. Biol. Chem.	278(3)	1525-1532	2003

20020789

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.8の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。