

20030947

---

# 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

---

(厚生労働科学研究費補助金)

平成15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16年3月

主任研究者 榑原陽一  
(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	10
III	研究成果の刊行物・別刷	12

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

本研究は、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。現在までの研究で、硫酸転移酵素はシトクロム P-450 酵素群と同様に大きな遺伝子ファミリーを形成し、非常に多様な分子種により構成され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年度から15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 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 の増幅とリコンヒナント酵素の発現系を構築した。ヒト SULT1C1 はC端のエクソンを使い分けることで2種類のスプライスハリアントが存在する可能性が示された。今回配列決定したヒト SULT1C1 はこれまでに我々が報告した2種（現在では SULT1C2 および SULT1C3 と分類している）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、これらスプライスの違いに由来する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、機能を多様化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およびリコンヒナント酵素の発現系の構築を行った。さらに、ヒト SULT2A1 に関しては、アミノ酸配列の置換をともなった遺伝子の多型(SNPs)が10種類存在することが報告されており、これらのアミノ酸配列の異なる10種の SNPs 由来のバリエーションに関してリコンヒナント酵素を調製しその諸性質を検討した。

平成15年度は以上のように、新規硫酸転移酵素のクローニングおよび硫酸転移酵素遺伝子多型に関する研究が進展した、しかしながら新規硫酸転移酵素のクローニングに関しては平成16年度も継続して行う必要があると考えられた。。さらに、硫酸転移酵素の遺伝子多型に関する研究にも取り組み、興味深い結果が得られはしめている。今後はこれらの機能解明に関する結果をふまえ、硫酸転移酵素の機能を網羅的に明らかとする。

## 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何種類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15年度は新規ヒト硫酸転移酵素のクローニングと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の検討に関して、ヒト SULT1C1a、SULT1C1b、SULT6A1 に関して検討した。さらに、遺伝子多型(SNPs)由来のアミノ酸置換の影響に関して、ヒト SULT2A1 の10種のアミノ酸ハリアントに関して解析を行った。

これらの研究は、ヒト硫酸転移酵素遺伝子ファミリーの網羅的機能解析及び硫酸転移酵素遺伝子多型由来のアミノ酸置換の影響をすべての硫酸転移酵素及びその多型(SNPs)において網羅的に解析することを目的に研究を行った。

## 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 のクローニングは平成14年度の総括研究報告書に記した。ヒト SULT1C1 のリコンビナント酵素は pGEX-4T3 ヘクターを使用し、大腸菌 BL21 株で発現した。発現誘導後、菌体をフレンチプレスにて破碎し、リコンビナント酵素を精製しようと試みたが、目的の GST と SULT1C1 の融合タンパク質が封入体となり可溶性の酵素として回収できなかった。そこで現在、さらに発現条件を検討中である。

新規硫酸転移酵素ヒト SULT6A1 はゲノムデータベースの解析により発見し、PCR により ORF の増幅を行いそのアミノ酸配

列を決定した。さらに、SULT1C1 同様に pGEX-4T3 ヘクターにサブクローニングし、リコンヒナント酵素を GST との融合タンパク質として発現した。菌体をフレンチプレスにより破碎後グルタチオンセファロースによる精製を行った。

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ヒナント酵素 10 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ヘクター 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ホスト BL21 に遺伝子導入しリコンヒナント酵素を調製した。これらのリコンヒ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。

硫酸転移酵素の活性測定は $[^{35}\text{S}]$ -放射性硫酸でラベルされた硫酸供与体 3'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate (PAPS) を酵素的に合成し PAPS から基質への放射

活性の転移を測定することで行った。PAPS の合成にはリコンヒナント PAPS 合成酵素を使用し、ATP および無機硫酸より合成した。この活性硫酸 PAPS は硫酸転移酵素の研究に不可欠であり、我々は非常に効率のよい合成方法を開発して研究に使用している。

さらに、ヒト硫酸転移酵素遺伝子ファミリーの全体を明らかにするために、ヒト以外にマウスおよびセフラフィノシユの硫酸転移酵素のクローニングを行った。これらの生物種を比較することによって未発見の新規ヒト硫酸転移酵素をより効率よく発見できると考えている。現在、マウスに関しては宮崎大学で行い、セフラフィノシユに関しては共同研究者であるテキサス大学の Dr Ming-Cheh Liu によって精力的に行われている。

#### 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か考えられるか、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によって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 に相当する遺伝子か、第2染色体上の約30kbp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らかとなった。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8B2つの異なる構造の組み合わせが、ゲノム上にタンテ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か選択されるかによって、C末端97残基にハリアントのある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ントはヒト 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。

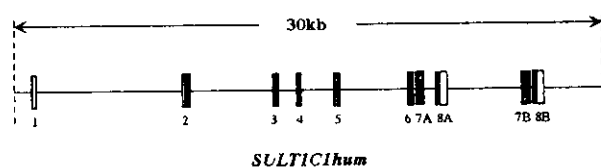


図1 ヒト SULT1C1 のゲノム構造

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 端の開始コトンから C 端の終止コト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。SULT6A1 の ORF は pGEX-4T3 ヘクターの BamHI サイトにそれぞれサブクローニングし、酵素と 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 $[^{35}\text{S}]$ 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 $[^{35}\text{S}]$ 放射活性硫酸ラベルされた基質の硫酸体を分離し、イメシアナライサー FLA3000 により放射活性を酵素活性として測定した。SULT6A1 はマウスにおいてヒトロキシステロイド類を硫酸化する結果がごく最近得られた。よって、ヒトに関しても同様な基質を硫酸化することが考えられる。

ヒトヒトロキシステロイド硫酸転移酵素(SULT2A1)は大腸菌発現用ヘクター 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10種のアミノ酸配列の異なる遺伝子多型(SNPs)由来のアミノ酸ハリアントの調製をした。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由来のアミノ酸ハリアント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はク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-ヒト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10種はすへ

て硫酸転移酵素活性を示した (表 1)。

表 1 ヒトヒドロキシステロイド硫酸転移酵素 SULT2A1 の遺伝子多型由来アミノ酸ハリアントの Km 値および Vmax

	Enzymatic Assay		
	Km for DHEA	Vmax for DHEA	Vmax/Km
	( $\mu$ M)	(pmol/min/mg)	
WT	0.33	2000	6061
M57T	0.45	1500	3333
T90S	0.33	2100	6364
L159V	0.33	2000	6061
E186V	0.38	1800	4737
M57T,E186V	0.33	1400	4242
A63P	0.39	1700	4359
K227E	0.42	1700	4048
A261T	0.33	1800	5455
A63P,A261T	0.33	1800	5455

しかしながら、M57T や K227E において反応効率を示す Vmax/Km の値が大きく低下した。特に K227E は塩基性アミノ酸から酸性アミノ酸への変化であること、さらに酵素の活性中心に近い部位での変異であることなどから大きく反応効率か低下したと考えられた。

さらに、これらの遺伝子多型由来のアミノ酸の変異が前駆変異原物質の代謝活性化に与える影響に関して、Ames 試験を改良した試験法を用いて検討した。変異原物質としては、硫酸化により代謝活性

化が報告されている 9-ヒドロキシメチルアントラセンを使用した。その結果が表 2 である、ここでは WT の代謝活性化の結果生じてきたコロニー数を 100 とし相対的な活性で示している。

表 2 前駆変異原物質の硫酸化による代謝活性化への遺伝子多型由来のアミノ酸変異の影響

アミノ酸ハリアント	相対活性
WT	100
M57T	94.3
T90S	97.6
L159V	100.9
E186V	90.6
M57T,E186V	94.9
A63P	107.7
K227E	115.3
A261T	100.9
A63P,A261T	92.3

前駆変異原物質の硫酸化による代謝活性化においても K227E の影響かもっとも大きかった。さらに、同様な試験法に緑茶ポリフェノール類を併用することで緑茶ポリフェノール類の抗変異原作用を検討することか可能となった。

これらの研究から、発癌リスク診断や新規の抗変異原物質の有効性を遺伝的な背景を元に評価する可能性が示された。

## D 結論

平成15年度は、新規硫酸転移酵素のクローニングとして平成14年度から引き続きヒト SULT1C1 およびヒト SULT6A1 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に示したように、ヒトおよびマウス硫酸転移酵素のアミノ酸配列をもとに系統樹を作製した。硫酸転移酵素の分類はアミノ酸配列の相同性をもとに30%以上一致するグループをファミリーとし SULT の略称の後に発見順に数字をつけ SULT1 ファミリー、SULT2 ファミリーのように分類した。さらにその後ろにアミノ酸配列で60%程度以上一致するグループをサブファミリーとし、発見順にAからアルファベットを使用し、最後に同じサブファミリーに分類される酵素は発見順に番号を配した。このような硫酸転移酵素の分類法に基づき、分類を行った結果、図2に示すようにヒトやマウスといった哺乳動物では、硫酸転移酵素は少なくとも SULT1 から SULT6 までの6種のファミリーから構成されることか分かる。このようにヒトとマウスを比較することで、ヒトでは未だに SULT1D1 や SULT3A1 が発見されていないことか分かり、今後これらのヒトにおけるオルソロクのクローニングが大きな課題となる。

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、ヒトヒトロキシステロイド硫酸転移酵素(SULT2A1)のアミノ酸の置換を伴った10主に関して研究を行った。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。ヒトに関しては、SULT1A1、SULT1A2、SULT1A3 および SULT1E1 に関して現在研究を行っている。

今後も、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、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。さらに今後の展開として、硫酸転移酵素のX線結晶構造解析を網羅的に進めることで硫酸転移酵素をターゲットとした創薬や反応メカニズムの解明を九州大学の角田佳充助教と共同で計画中である。

## F 健康危険情報

平成15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。



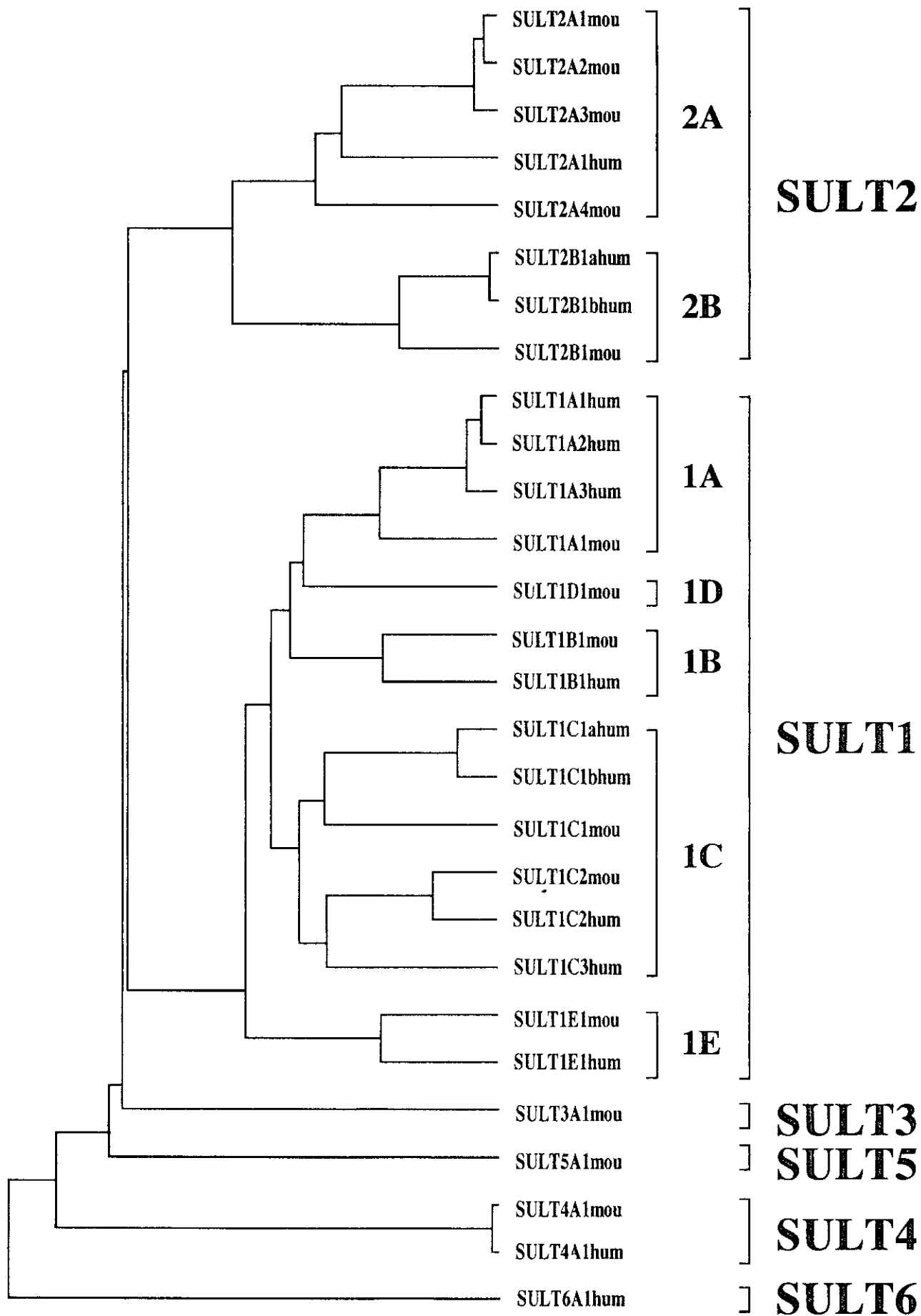


図2 ヒトおよびマウス硫酸転移酵素の分類

## G 研究発表

### 1 論文発表

Sugahara, T, Pai, T G, Suiko, M, Sakakibara, Y and Liu, M -C

“Differential roles of human monoamine (M)-form and simplephenol (P)-form phenol sulfotransferases in drug metabolism ”

**J Biochem (Tokyo)** 133(2), 259-262, 2003

Sugahara, T, Liu, C -C, Pai, T G, Collodi, P, Suiko, M, Sakakibara, Y, Nishiyama, K and Liu, M -C

“Sulfation of hydroxychlorobiphenyls Molecular cloning, expression, and functional characterization of zebrafish SULT1 sulfotransferases ”

**Eur J Biochem** 270(11), 2404-2411, 2003

榎原陽一、水野貴之、Liu, M -C、水光正仁

「硫酸転移酵素を用いた変異原試験法における食品の機能性評価に関する研究」

**New Food Industry** 45(10), 60-64, 2003

Ohkimoto, K, Sugahara, T, Sakakibara, Y, Suiko, M, Liu, M -Y, Carter, G and Liu, M -C

“Sulfonation of environmental estrogens by zebrafish cytosolic sulfotransferases ”

**Biochim Biophys Res Commun** 309(1), 7-11, 2003

榎原陽一

「硫酸転移酵素の多様な機能」

日本農芸化学会誌 77(11), 1094-1101, 2003

榎原陽一、三城恵美、Liu, M -C、水光正仁

「翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化と機能解明 Tyrosylprotein Sulfotransferase の生化学的諸性質の検討」

日本農芸化学会誌 78(1), 34-36, 2004

Ohkimoto, K, Liu, M -Y, Suiko, M, Sakakibara, Y and Liu, M -C

“Characterization of a putative zebrafish estrogen sulfotransferase inhibitory effects and mechanism of action of phytoestrogens ”

**Chem Biol Interact** 147(1), 1-7, 2004

Mishiro, E, Liu, M -Y, Sakakibara, Y, Suiko, M and Liu, M -C

“Zebrafish tyrosylprotein sulfotransferase molecular cloning, expression, and functional characterization ”

**Biochem Cell Biol** In press, 2004

### 2 学会発表

○榎原陽一 「硫酸転移酵素の多様な機能に関する研究」 日本農芸化学会 2003 年度大会 受賞講演（東京）

榎原陽一、○三城恵美、Ming-Cheh Liu、

水光正仁「Tyrosylprotein Sulfotransferase の諸性質の検討」日本農芸化学会 2003 年度大会（東京）

榎原陽一、○小林樹、大木本圭、菅原卓也、西山和夫、Ming-Cheh Liu、水光正仁

「マウス硫酸転移酵素の諸性質の比較検討」日本農芸化学会 2003 年度大会（東京）

○榊原陽一

「翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化の機能解明 Tyrosylprotein Sulfotransferase の生化学的諸性質の検討」日本農芸化学会 2003 年度大会シンポジウム (東京)

○ 神力はるな、榊原陽一、Ming-Cheh Liu、水光正仁 「新規ヒト硫酸転移酵素遺伝子 *SULT1C1* のクローニング」平成 15 年度日本生化学会九州支部例会 (福岡)

○榊原陽一 「硫酸転移酵素の多様な機能に関して」第 258 回 日本農芸化学会西日本支部例会 (福岡)

○榊原陽一、水光正仁 「ポストゲノム時代の硫酸転移酵素研究とその将来展望」第 7 回 生物機能研究会 (鹿児島)

榊原陽一、○三城恵美、Ming-Cheh Liu、水光正仁「翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化の機能解明 Tyrosylprotein Sulfotransferase の生化学的諸性質の検討」第 7 回 生物機能研究会 (鹿児島)

○榊原陽一

「硫酸転移酵素遺伝子ファミリーの網羅的機能解析を目指して」第 27 回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム (宮崎)

○水野貴之、榊原陽一、Ming-Cheh Liu、水光正仁「硫酸転移酵素 SULT2A1 の遺伝子

多型と緑茶ポリフェノールの抗変異原作用」第 27 回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム (宮崎)

○Ohkimoto, K, Sakakibara, Y, Suiko, M, Yoshikawa, H, Liu, M-C and Tamura, H “Tributyltin and triphenyltin as inhibitors of the sulfotransferase involved in the endocrine homeostasis” Toxicogenomics International Forum 2003 (Tokyo)

Sakakibara, Y, ○Mizuno, T, Ohkimoto, K, Nishiyama, K, Liu, M-C and Suiko, M “Effect of amino acid sequence variations of SULT2A1 polymorphisms, involved in the anti-mutagenetic activity of green tea polyphenols” 第 76 回日本生化学会大会 (横浜)

Sakakibara, Y, ○Mornaga, H, Shima, R, Liu, M-C and Suiko, M “Possible involvement of cholesterol sulfotransferase on cholesterol-enriched microdomains (raft) mediated signaling process” 第 76 回日本生化学会大会 (横浜)

○榊原陽一「翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化の機能解明」第 13 回 WS フォーラム (福岡)

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
Sugahara, T Pai, T G Suiko, M Sakakibara, Y Liu, M -C	Differential roles of human monoamine (M)-form and simplephenol (P)-form phenol sulfotransferases in drug metabolism	J Biochem (Tokyo)	133(2)	259-262	2003
Sugahara, T Liu, C -C Pai, T G Collodi, P Suiko, M Sakakibara, Y Nishiyama, K Liu, M -C	Sulfation of hydroxychlorobiphenyls Molecular cloning, expression, and functional characterization of zebrafish SULT1 sulfotransferases	Eur J Biochem	270(11)	2404-2411	2003
榊原陽一 水野貴之 Liu, M -C 水光正仁	硫酸転移酵素を用いた変異原試験法における食品の機能性評価に関する研究	New Food Industry	45(10)	60-64	2003
Ohkimoto, K Sugahara, T Sakakibara, Y Suiko, M Liu, M -Y Carter, G Liu, M -C	Sulfonation of environmental estrogens by zebrafish cytosolic sulfotransferases	Biochim Biophys Res Commun	309(1)	7-11	2003
榊原陽一	硫酸転移酵素の多様な機能	日本農芸化学会誌	77(11)	1094-1101	2003
榊原陽一 三城恵美 Liu, M -C 水光正仁	翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化と機能解明 Tyrosylprotein Sulfotransferaseの生化学的諸性質の検討	日本農芸化学会誌	78(1)	34-36	2004

Ohkimoto, K Liu, M -Y Suiko, M Sakakibara, Y Liu, M -C	Characterization of a putative zebrafish estrogen sulfotransferase inhibitory effects and mechanism of action of phytoestrogens	Chem Biol Interact	147(1)	1-7	2004
Mishiro, E Liu, M -Y Sakakibara, Y Suiko, M Liu, M -C	Zebrafish tyrosylprotein sulfotransferase molecular cloning, expression, and functional characterization	Biochem Cell Biol	in press		2004

20030647

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