

- tyrosylprotein sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* **258**: 11 326 – 11 334.
- Lee, R.W.H., and Huttner, W.B. 1985. (Glu62, Ala30, Tyr8)*n* serves as high-affinity substrate for tyrosylprotein sulfotransferase: a Golgi enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 6143–6147.
- Lin, W.-H., and Roth, J.A. 1990. Characterization of a tyrosylprotein sulfotransferase in human liver. *Biochem. Pharmacol.* **40**: 629–635.
- Lin, W.H., Marcucci, K., and Roth, J.A. 1994. Effect of manganese on tyrosylprotein sulfotransferase activity in PC12 cells. *Biochem. Pharmacol.* **47**: 1575–1580.
- Lipmann, F. 1958. Biological sulfate activation and transfer. *Science (Wash., D.C.)*, **128**: 575–580.
- Liu, M.-C., and Lipmann, F. 1984. Decrease of tyrosine-*O*-sulfate-containing proteins found in rat fibroblasts infected with Rous sarcoma virus or Fujinami sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 3695–3698.
- Mellman, I., Fuchs, R., and Helenius, A. 1986. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 663–700.
- Moore, K.L. 2003. The biology and enzymology of protein tyrosine *O*-sulfation. *J. Biol. Chem.* **278**: 24 243 – 24 246.
- Negishi, M., Pedersen, L.G., Petrotchenko, E., Shevtsov, S., Gorokhov, A., Kakuta, Y., and Pedersen, L.C. 2001. Structure and function of sulfotransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* **390**: 149–157.
- Ouyang, Y.B., and Moore, K.L. 1998. Molecular cloning and expression of human and mouse tyrosylprotein sulfotransferase-2 and a tyrosylprotein sulfotransferase homologue in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **273**: 24 770 – 24 774.
- Ouyang, Y., Lane, W.S., and Moore, K.L. 1998. Tyrosylprotein sulfotransferase: purification and molecular cloning of an enzyme that catalyzes tyrosine *O*-sulfation, a common posttranslational modification of eukaryotic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 2896–2901.
- Ouyang, Y.B., Crawley, J.T., Aston, C.E., and Moore, K.L. 2002. Reduced body weight and increased postimplantation fetal death in tyrosylprotein sulfotransferase-1-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **277**: 23 781 – 23 787.
- Pauwels, S., Dockray, G.J., and Walker, R. 1987. Comparison of the metabolism of sulfated and unsulfated heptadecapeptide gastrin in humans. *Gastroenterology*, **92**: 1220–1225.
- Pouyani, T., and Seed, B. 1995. PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus. *Cell*, **83**: 333–343.
- Ramaprasad, P., and Kashinathan, C. 1998. Isolation of tyrosylprotein sulfotransferase from rat liver. *Gen. Pharmacol.* **30**: 555–559.
- Rens-Domiano, S., and Roth, J.A. 1989. Characterization of tyrosylprotein sulfotransferase from rat liver and other tissues. *J. Biol. Chem.* **264**: 899–905.
- Rens-Domiano, S., Hortin, G.L., and Roth, J.A. 1989. Sulfation of *tert*-butoxycarbonylcholecystokinin and other peptides by rat liver tyrosylprotein sulfotransferase. *Mol. Pharmacol.* **36**: 647–653.
- Rosa, P., Hille, A., Lee, R.W.H., Zanini, A., De Camilli, P., and Huttner, W.B. 1985. Secretogranins I and II: two tyrosine-sulfated secretory proteins common to a variety of cells secreting peptides by the regulated pathway. *J. Cell Biol.* **101**: 1999–2011.
- Sako, D., Comess, K.M., Barone, K.M., Camphausen, R.T., Cumming, D.A., and Shaw, G.D. 1995. A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding. *Cell*, **83**: 323–331.
- Sane, D.C., and Baker, M.S. 1993. Human platelets possess tyrosylprotein sulfotransferase (TPST) activity. *Thromb. Haemostasis*, **69**: 272–275.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463–5467.
- Suiko, M., Fernando, P.H., Sakakibara, Y., Kudo, H., Nakamura, T., and Liu, M.-C. 1997. Characterization of bovine heart sulfotransferase catalyzing the sulfation of tyrosine-containing peptides. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **43**: 485–490.
- Sundaram, P., Slomiany, A., Slomiany, B.L., and Kashinathan, C. 1992. Tyrosylprotein sulfotransferase in rat submandibular salivary glands. *Int. J. Biochem.* **24**: 663–667.
- Tuboi, S., Taniguchi, N., and Katunuma, N. 1992. The post-translational modification of proteins: roles in molecular and cellular biology. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Vargas, F., Frerot, O., Tuong, M.D., and Schwartz, J.C. 1985. Characterization of a tyrosine sulfotransferase in rat brain using cholecystokinin derivatives as acceptors. *Biochemistry*, **24**: 5938–5943.
- Ward, A.C., and Lieschke, G.J. 2002. The zebrafish as a model system for human disease. *Front. Biosci.* **7**: d827–d833.
- Westerfield, M. 2000. The zebrafish book. University of Oregon Press, Eugene, Oreg.
- Wilkins, S.P., Moore, K.L., McEver, R.P., and Cummings, R.D. 1995. Tyrosine sulfation of P-selectin glycoprotein ligand-1 is required for high affinity binding to P-selectin. *J. Biol. Chem.* **270**: 22 677 – 22 680.
- William, S., Ramaprasad, P., and Kashinathan, C. 1997. Purification of tyrosylprotein sulfotransferase from rat submandibular salivary glands. *Arch. Biochem. Biophys.* **338**: 90–96.
- Yanagisawa, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Takami, Y., Nakayama, T., Nakajima, H., Takayanagi, K., Natori, Y., and Liu, M.-C. 1998. cDNA cloning, expression, and characterization of the human bifunctional ATP sulfurylase/adenosine 5'-phosphosulfate kinase enzyme. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 1037–1040.
- Young, W.F., Jr. 1990. Human liver tyrosylsulfotransferase. *Gastroenterology*, **99**: 1072–1078.

蕎麦焼酎揮発性成分の抗変異原性と抗酸化作用

境田博至¹⁾ 甲斐孝憲¹⁾ 榊原陽一²⁾ 水光正仁²⁾雲海酒造(株)¹⁾ 宮崎大学農学部応用生物科学科²⁾

Abstract

We produced buckwheat shochu to investigate the functional materials such as volatile compounds included it. Obtained Buckwheat shochu was determined about identification and quantification of volatile compounds by GC and GC/MS. Volatile compounds of buckwheat shochu were examined to investigate whether they have antimutagenic and/or antioxidant activity or not. Investigation was carried out by Ames test, modified Ames test and DPPH radical scavenger test. We identified several volatile compounds with antimutagenicity or antioxidant activity. Those results suggested that Buckwheat shochu may possess potential of functional volatile compounds.

Key words : Buckwheat Shochu, antimutagenicity, antioxidant activity, recombinant sulfotransferase

はじめに

本格焼酎は麴、酵母を用いた並行複発酵により得た醪(もろみ)^{*1}を単式蒸留することで製造される日本古来の蒸留酒である。これまでは、主に南九州を中心に製造、消費されていた。しかしながら、近年の本格焼酎ブームで全国的なアルコール飲料として多くのファンを獲得するに至った。この焼酎ブームは、二日酔いにくい等の消費者の健康志向に上手く乗った形で、従来のアルコール飲料とは異なり、本格焼酎の健康的なイメージが大きく貢献していると考えられる。現在、健康志向の高まりを受け食品の機能性について数多くの報告が見られる。アルコール飲料も例外ではなく、赤ワインのポリフェノールの機能性等様々な報告が見られるようになってきた。しかしながら、本格焼酎は蒸留酒であるため、压榨工程で得られるワインより含有成分が少ないこと等の理由でその機能性に注目された研究はあまり報告されていない。そこでわれわれは蕎麦^{*2}焼酎の揮発性成分を詳細に検討し、これら揮発性成分の抗変異原作用などの機能性を評価す

ることで本格焼酎の機能性の開拓を試みた。

1. 方法

1-1. 焼酎製造

一次仕込みは河内菌白麴(*Aspergillus kawachii*)を用いた麦麴原料800g、汲み水960mlに協会焼酎酵母2号(SH-2)を添加した。二次仕込みは蕎麦グリッツ1600g、汲み水2880mlとした。発酵条件は一次25℃、6日間、二次30℃、14日間で行った。醪はロータリーエバポレーターで蒸留し、得られた焼酎を濃縮サンプルとした。以上のように本格焼酎製造は定法で行った。

1-2. 蕎麦焼酎揮発性成分の同定

アルコール濃度を10%に希釈したソバ焼酎をポー

*1 醪

酵母、麴、水、主発酵原料(本論文では蕎麦)から成る。

*2 蕎麦

タデ科の一年草の草本作物。焼酎原料として使用する場合は、殻(果皮)を除去して使用する。

Antimutagenicity and antioxidant activity of volatile compounds from Buckwheat shochu.

SAKAIDA Hiroshi¹⁾, KAI Takanori¹⁾, SAKAKIBARA Yoichi²⁾ and SUIKO Masahito²⁾

Unkai Shuzo Co., Ltd.¹⁾

Department of Biochemistry and Applied Bioscience, Miyazaki University²⁾

Accepted Mar. 29 2004

ラスポリマー樹脂に通し、ジエチルエーテルで揮発性成分を抽出したものを濃縮サンプルとした。このサンプルを窒素気流下で500 μ lまで濃縮後GC-FID (水素炎イオン化検出器), GC/MSで同定分析した。GC条件はキャリアガス圧150kpa, カラム温度を70 $^{\circ}$ Cから240 $^{\circ}$ Cまで3 $^{\circ}$ C/minで昇温後34分間保持した。分離カラムはDB-WAXetr (60m \times 0.32mm i. d., 膜厚0.25 μ m)を使用した。インジェクション, 検出器の温度は260 $^{\circ}$ C, スプリット比は10:1で行った。また, GC/MSはインジェクション部をスプリットレスにした以外は全て同条件で実施した。

1-3. Ames法による抗変異原性の検討

サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98株を用いた抗変異原試験を行った。間接変異原物質としてTrp-P-1 (酢酸塩) をプレート1枚あたり1.5ng使用した。DMSOに溶解した試料 (揮発性成分), ラット肝臓由来S-9に補酵素溶液を添加したS-9mixを滅菌小試験管で混合した。試料の終濃度は1mMとした。ここに, 前培養したTA98菌株懸濁液を加え, 37 $^{\circ}$ C, 20分間振とうした。振とう後, 小試験管にトップアガーを加え最少グルコース培地に重層した。シャーレは37 $^{\circ}$ C 48時間暗所で倒置培養し生じたヒスチジン非要求性復帰変異コロニー数を計数した。抗変異原性 (%) は下式により求めた。陽性対照試験として直接変異原物質である4-nitroquinoline-1-oxideを用いた場合は, S-9mixの代わりに滅菌水を用いた。また, 抗変異原物質のコントロールとして, (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) を終濃度500 μ Mで用いた。

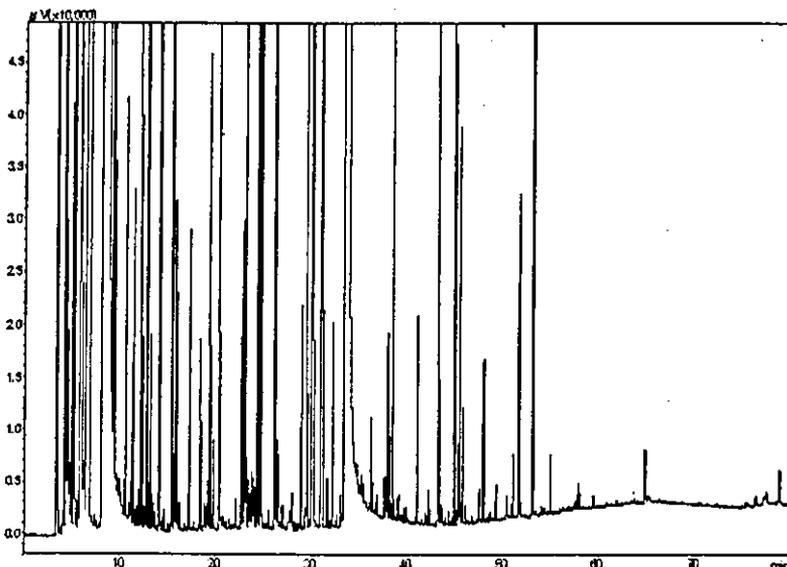


図1 濃縮した蕎麦焼酎のガスクロマトグラム

Trp-P-1のみ添加した時のプレートコロニー数は141 \pm 13コロニーであった。

$$\text{抗変異原性 (\%)} = (1 - (A - B) / (C - B)) \times 100$$

A: 試料とTrp-P-1添加時のコロニー数

B: 添加物無しのコロニー数 (自然復帰)

C: Trp-P-1のみ添加時のコロニー数

1-4. リコンビナント硫酸転移酵素を用いたAmes変法

測定法はGlatt et alらの方法を改変して行った¹⁾。まず, 活性硫酸である3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) を16.7 μ MになるようにBuffer B (150mM KCl, 15mM Na₂SO₄, 15mM MgCl₂, 10mM Phosphate Buffer, pH7.4) で調製した。次にヒト肝臓由来のdehydroepiandrosterone硫酸転移酵素 (hDHEAST) の酵素液を60 μ g/mlになるようにBuffer C (150mM KCl, 0.5mg/ml BSA, 10mM Phosphate Buffer, pH7.4) で調製した。さらに前培養したTA98菌株懸濁液を加えた。間接変異原物質として9-hydroxymethylanthraceneをプレートあたり104.1ng使用した。最後に, 終濃度が1mMになるようDMSOに溶解した試料 (揮発性成分) を小試験管で混合した。以下, 方法3と同様に行った。陽性対照試験および抗変異原性 (%) も方法3と同様に実施した。9-hydroxymethylanthraceneのみ添加した時のプレートのコロニー数は180 \pm 5コロニーであった。

1-5. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性法

35%エタノールに溶解した各試料2.1mlを500mM Acetate Buffer (pH5.5) 300 μ l, 99.5%エタノール300 μ l, 0.25mM DPPHエタノール溶液300 μ lとともに試験管に加えた後よく攪拌し, 暗所で室温, 1時間反応させて, 517nmでの吸光度を測定した。試料の終濃度は1mMとした。試料の代わりに35%エタノールを対照として, 下式のようにして求めた。また陽性対照試験として終濃度2.5 μ M EGCGを用いて行った。

$$\text{DPPHラジカル消去率 (\%)} = (A - B) / A \times 100$$

A: ブランクの吸光度

B: 試料添加時の吸光度

表1 蕎麦焼酎に含まれる揮発性成分

Peak no.	Compound name	mg/l	Peak no.	Compound name	mg/l
1	isopropyl alcohol*	0.02	35	n-octanol	0.02
2	ethyl alcohol	a)	36	isobutyric acid*	0.45
3	ethyl isobutyrate*	0.01	37	ethyl caprate	0.41
4	allyl formate*	0.01	38	1-nonanal	0.02
5	isobutyl acetate*	0.09	39	isovaleric acid	1.35
6	n-propyl alcohol	1.58	40	diethyl succinate	0.51
7	ethyl butyrate*	0.98	41	methionol	0.48
8	butyl acetate*	0.01	42	valeric acid	0.01
9	isobutyl alcohol	32.7	43	2-ethylbutyric acid*	0.01
10	isoamyl acetate	10.66	44	ethyl phenylacetate	0.05
11	1-butanol	0.62	45	nerol	0.01
12	1-ethoxy-2-propanol*	0.01	46	β -phenethyl acetate	5.77
13	3-methyl-1-butanol (I. A. OH)	551.83	47	caproic acid	0.37
14	ethyl caproate	0.61	48	2-methyl-hexanoic acid*	0.01
15	1-pentanol*	tr	49	benzyl alcohol	0.04
16	3-methyl-3-buten-1-ol*	0.02	50	phenethyl alcohol	103.32
17	3-hydroxy-2-butanone*	0.13	51	ethyl myristate	0.02
18	4-methyl-1-pentanol*	0.01	52	caprylic acid	0.3
19	2-heptanol	0.01	53	1-methyl-4-hydroxybenzene	0.01
20	3-methyl-2-buten-1-ol*	0.03	54	ethyl cinnamate	0.05
21	3-methyl-1-pentanol	0.05	55	ethyl pentadecanoate	0.01
22	ethyl lactate	tr	56	ethyl palmitate	0.11
23	1-hexanol	0.07	57	capric acid	0.1
24	3-ethoxy-1-propanol*	0.03	58	trans, trans-farnesol	0.04
25	2-ethylhexyl acetate*	0.01	59	ethyl stearate	0.01
26	ethyl caprylate	1.2	60	ethyl oleate	0.12
27	1-octen-3-ol	0.02	61	ethyl linoleate	0.21
28	1-heptanol	0.07	62	ethyl nonadecanoate*	0.01
29	acetic acid	0.1	63	myristic acid	0.01
30	ethylhexanol	0.05	64	dibutyl phthalate	0.01
31	2-nonanol	n. d.	65	nerolidol (cis-& trans-mixture)	0.09
32	ethyl DL-3-hydroxybutyrate*	0.07	66	palmitic acid	0.03
33	ethyl n-nonanoate*	0.01	67	oleic acid	0.01
34	linalool	0.09	68	bis (2-methoxyethyl) phthalate*	0.02

n. d. : not detected, a) Concentrations of ethanol was adjusted to 10% by material method., RI : retention index, tr : less than 0.01 ppm, * : newly identified

2. 結果および考察

2-1. 本格焼酎由来の揮発性成分

単式蒸留により得られる本格焼酎は図1に示したように、非常に多様な成分から構成され、それらが豊かな味と香りを生み出している。われわれは、蕎麦焼酎の揮発性成分の網羅的な分析を行い、表1に示したように68種類の成分を同定、定量し報告した²⁾。その結果、本格焼酎の香気成分は、アルコール類の他に脂肪酸やそのエステル類など非常に多様な化合物が含まれていることが判明した。健康志向の消費者の支持もあって、本格焼酎は体によいと考えられているが、科学的な根拠に乏しく、それらを裏付ける研究報告もあまり知られていない。そこで、われわれは蕎麦焼酎よ

り同定した68種類の香気成分に関して網羅的にその機能性を検討した。今回注目した機能性は抗変異原作用と抗酸化作用であり、それぞれAmes法およびコンビナント硫酸転移酵素を用いた抗変異原試験とDPPHラジカル消去活性法により検討した。

2-2. 抗変異原性試験

Ames法による抗変異原性試験は、突然変異原性物質やガン原性物質としての可能性のある物質の第一次スクリーニング法として優れていることから、食品科学の分野でも広く実施されている^{3,4)}。S-9を用いたAmes法では、9サンプルが30%以上の抗変異原性を示した(表2)。その中で7サンプルがエステル化合物であり、さらに6サンプルがエチルエステル化合物で

表2 Ames法および硫酸転移酵素を組み込んだ Ames変法を用いた抗変異原性試験結果

Peak No.	Compound name	Inhibition (%)		Peak No.	Compound name	Inhibition (%)	
		A	B			A	B
3	ethyl isobutyrate	n. d.	34.7±3.7	46	β -phenethyl acetate	34.1±6.8	28.1±2.6
4	allyl formate	n. d.	23.6±5.2	47	caproic acid	n. d.	40.1±1.7
5	isobutyl acetate	n. d.	14.0±1.5	48	2-methyl-hexanoic acid	n. d.	28.6±1.8
6	1-propanol	12±4.3	15.8±3.6	49	benzyl alcohol	14.7±4.1	20.2±4.7
10	isoamyl acetate	n. d.	31.0±7.6	50	phenethyl alcohol	n. d.	28.3±3.6
11	1-butanol	n. d.	28.6±0.8	51	ethyl myristate	35.3±3.1	n. d.
13	3-methyl-1-butanol	n. d.	39.4±1.1	53	1-methyl-4-hydroxybenzene	30.9±3.5	n. d.
19	2-heptanol	n. d.	30.5±5.8	55	ethyl pentadecanoate	30.6±0.2	n. d.
32	ethyl DL-3-hydroxybutyrate	36.5±5.1	8.1±1.2	60	ethyl oleate	31.9±0.7	2.6±0.8
33	ethyl n-nonanoate	33.3±7.0	n. d.	61	ethyl linoleate	53.7±0.5	n. d.
35	n-octanol	n. d.	25.4±4.1	67	oleic acid	46.1±0.4	n. d.
42	valeric acid	n. d.	20.7±1.5		EGCG*)	76.2±6.2	86.1±3.0

A: Ames test. B: Modified Ames test using sulfotransferase. n. d.: not detected. Value showed means \pm S. D. (N=3)*): Final concentration of EGCG was 500 μ M.

あった。不飽和脂肪酸およびそのエチルエステル体である no. 61/ethyl linoleate (53.7 \pm 0.5%), no. 67/oleic acid (46.1 \pm 0.4%) において40%以上の抗変異原性が認められた。

リコンビナント硫酸転移酵素を用いた Ames変法では、40%以上の抗変異原性が no. 47/caproic acid (40.1 \pm 1.7%) で認められた。また、20%以上の抗変異原性を示すサンプルは、従来の Ames法で9サンプルであるのに対して、硫酸転移酵素を用いた Ames変法では13サンプル確認された(表2)。特に no. 46/ β -phenethyl acetate (28.1 \pm 2.6%), no. 49/benzyl alcohol (20.2 \pm 4.7%), no. 50/phenethyl alcohol (28.3 \pm 3.6%) 等のフェニル化合物で抗変異原性が多く認められた。従来の Ames法では低沸点揮発性成分で活性が認められなかったのに対して、硫酸転移酵素を用いた Ames変法では20%以上の抗変異原性が4サンプル認められ、no. 11/1-butanol (28.6 \pm 0.8%), no. 13/3-methyl-1-butanol (39.4 \pm 1.1%) のアルコール類で高い値を示した。

2種類の抗変異原性試験でいずれも20%以上の活性のある試料は no. 46/ β -phenethyl acetate のみであった。これは、間接変異原物質を直接変異原物質に代謝活性化する異化代謝経路が、S-9mixの酸化還元反応を利用している Ames法に対して、硫酸転移酵素による極性の高い物質との硫酸抱合反応を利用した Ames変法の違いによると推測される。このように2種の抗変異原試験を併用することで、反応機構の異なる抗変異原作用を検討することが可能となる。

2-3. DPPHラジカル消去活性法

DPPHラジカル消去活性法の結果を表3に示した。No. 53/1-methyl-4-hydroxybenzene (74.4 \pm 0.9%) で高い抗酸化性が認められたが、フェニル化合物である benzyl alcohol, β -phenylethyl isobutyrate, phenethyl alcohol, β -phenethyl acetate, ethyl cinnamate において活性は見られなかった。アントシアニジンのB環に水酸基が増えると抗酸化活性も高まることから^{5,6)}、芳香環の水酸基すなわちフェノール基の存在が重要であると推測される。1-methyl-4-hydroxybenzeneの活性はEGCG (71.0 \pm 0.0%) と同程度であるが、測定に使用した濃度が1-methyl-4-hydroxybenzeneの1mMに対してEGCGの2.5 μ Mと40倍も高いことから、EGCGの抗酸化性には及ばない結果となった。

1-methyl-4-hydroxybenzene (30.9 \pm 3.5%) は従来の Ames法においても抗変異原活性が確認されたが、硫酸転移酵素を用いた Ames変法において活性は認められなかった(表2)。また、今回の実験で抗変異原性試験および抗酸化性試験で共に活性のあるサンプルは認められなかった。

おわりに

本格焼酎の機能性成分については、本誌において血栓溶解活性の存在が報告されているが、それ以外には

*3 甘藷

サツマイモのこと。焼酎用原料としては、澱粉含量の高いコガネセンガン(農林31号)が主流。

表3 DPPHを用いた抗酸化活性試験の結果

Peak No.	Compound name	Radical scavending activity (%)
41	methionol	3.9±1.3
48	2-methyl-hexanoic acid	3.4±1.5
53	1-methyl-4-hydroxybenzene	74.4±0.9
	EGCG*)	71.0±0.0

Value showed means ± S. D. (N=3)

*): Final concentration of EGCG was 2.5 μM.

ほとんど報告されていない⁷⁾。今回、2通りの抗変異原性試験を実施したところ、従来のAmes法では高沸点揮発性成分で多く活性が認められ、硫酸転位酵素を用いたAmes変法では低沸点揮発性成分で多く活性が認められるという結果になった。また、甲類焼酎と本格焼酎の抗酸化性については僅かではあるが、本格焼酎の活性が高いことから本格焼酎は抗酸化活性などの機能性を有する可能性が考えられた(データ未掲載)。これらの結果より、本格焼酎は抗変異原作用や抗酸化作用をもつ多様な香気成分が含まれ、これらの作用が組み合わさることで相乗的に高い機能性を示す可能性が考えられた。現在、これらの香気成分の構造と機能との関係について詳細に検討を進めている。また、蕎麦以外に甘藷³⁾、麦、米などを原料とした本格焼酎に関しても分析を進め広く本格焼酎に秘められた機能性を明らかにしていきたいと考えている。

参考文献

- 1) Glatt H., Pauly K., Czich A. et al.: Eur. J. Pharmacol., 293, 173 (1995)
- 2) 境田博至, 中原徳昭, 渡司奈穂子他: 日本食品科学工学会誌, 50, 555 (2003)
- 3) 新本洋士, 木村俊之, 山岸賢治他: 日本食品科学工学会誌, 49, 736 (2002)
- 4) 任恵峰, 高木敬彦, 包航他: 日本食品科学工学会誌, 47, 460 (2000)
- 5) Tsuda T., Shiga K., Ohshima K. et al.: Biochem. Pharmacol., 52, 1033 (1996)
- 6) Yoshimoto M., Okuno S., Yamaguchi M. et al.: Biosci. Biotechnol. Biochem., 65, 1652 (2001)
- 7) 須見洋行: AROMA RESEARCH, 15, 60 (2003)

略歴

*1 境田博至 (さかいだ ひろし) *1

1994年 熊本工業大学工学部 卒業
1996年 宮崎大学大学院農学研究科修士課程 修了
1996年 雲海酒造(株)入社

連絡先: 〒880-1303 宮崎県東諸県郡綾町南俣1800-5
雲海酒造(株)研究開発部
e-mail: kenkyu3@unkai.co.jp



*2 甲斐孝憲 (かい たかのり) *2

1982年 琉球大学農学部 卒業
1982年 雲海酒造(株)入社

連絡先: 〒880-1303 宮崎県東諸県郡綾町南俣1800-5
雲海酒造(株)研究開発部



*3 神原陽一 (さかきばら よういち) *3

1990年 宮崎大学農学部農業化学科卒業
1992年 宮崎大学大学院農学研究科修士課程(農業化学専攻)修了
1995年 鹿児島大学大学院連合農学研究科博士課程(生物資源利用科学専攻)修了
1995年 博士(農学)(鹿児島大学)
1995年 テキサス大学ヘルスセンター(米国)博士研究員
1996年 日本学術振興会特別研究員
1996年 宮崎大学農学部助手(生物資源利用学科)
1997年~1999年 日本学術振興会海外特別研究員としてテキサス大学ヘルスセンター(米国)およびパーゼル免疫研究所(スイス)へ留学
2004年 宮崎大学農学部助教授(応用生物科学科)
受賞: 2003年度農芸化学奨励賞



連絡先: 〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1
宮崎大学農学部応用生物科学科
e-mail: ysakaki@cc.miyazaki-u.ac.jp

*4 水光正仁 (すいこう まさひと) *4

1974年 九州大学農学部農芸化学科卒業
1979年 九州大学大学院農学研究科修士課程(農芸化学専攻)修了
1979年 日本学術振興会奨励研究員
1979年 宮崎大学農学部助手
1985年~87年 米国ロックフェラー大学留学(博士研究員)
1990年 宮崎大学農学部助教授
1990年~97年 米国オクラホマ大学およびテキサス大学へ国際共同研究(各年1~2カ月)
1997年 宮崎大学農学部教授
1997年 鹿児島大学大学院連合農学研究科教授(併任, 現在に至る)
1999~00年 米国テキサス大学留学(文部省在外研究員)



連絡先: 〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1
宮崎大学農学部応用生物科学科
e-mail: msuiko@cc.miyazaki-u.ac.jp



Biocides, tributyltin and triphenyltin, as possible inhibitors of the human sulfotransferase involved in the estrogen homeostasis

Kei Ohkimoto^a, Yoichi Sakakibara^a, Masahito Suiko^a, Hiromichi Yoshikawa^b,
Ming-Cheh Liu^c, Hiroto Tamura^{d,*}

^a Department of Biochemistry and Applied Biosciences, Miyazaki University, 1-1 Gakuenkinanadainishi, Miyazaki 889-2192, Japan

^b Department of Functional Materials Engineering, Fukuoka Institute of Technology, Fukuoka 811-0295, Japan

^c Biomedical Research Center, The University of Texas Health Center at Tyler, 11937 United States

^d Department of Applied Biological Chemistry, Meijo University, 1-501 Shiogunaguchi, Tenpakuku, Nagoya 468-8502, Japan

Received 8 June 2004; accepted 26 August 2004

Available online 25 September 2004

Abstract

This work using purified recombinant human estrogen sulfotransferase (hSULT1E1) aimed to investigate the mechanism of the inhibition of estrogen sulfation by organotin compounds. Tributyltin (TBT) inhibited the sulfation of estrone (E1) and 17 β -estradiol (E2) by hSULT1E1 competitively, with IC₅₀ values of, respectively, 3 and 12 μ M. The sulfation of E1 and E2 was also inhibited competitively by triphenyltin (TPT), with IC₅₀ of, respectively, 10 and 5 μ M. These data strongly suggested that His¹⁰⁷ residue might act as a ligand to establish a coordination bond with organotins at estrogen binding site in hSULT1E1. A more surprising finding was that TBT competed with 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS), indicating that TBT may coordinate with certain amino acid residue such as Lys⁴⁷ at the PAPS binding site of hSULT1E1. Taken together, these data provided clear evidence that TBT and TPT have a capacity to disrupt endocrine-mediated events by inhibiting hSULT1E1 involved in the metabolism of sex steroids. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Organotin; Endocrine disruptor; 3'-Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate; PAPS; Estrogen; Estradiol

1. Introduction

Organotins have been widely used as biocides like fungicides and antifouling agents primarily due to their capacity to inhibit the biosynthesis of ATP [1]. As these organotins accumulated in a

* Corresponding author. Fax: +81 52 835 7450.

E-mail address: hiroto@ccmfs.meijo-u.ac.jp (H. Tamura).

wide range of marine organisms [2], numerous species of gastropod have developed a sub-lethal genital disorder known as imposex in correlation with the concentrations of these compounds. The recent identification of environmental chemicals capable of disrupting endocrine function in wildlife has raised concern that they may also interfere with human reproductive health and/or stimulate steroid hormone-dependent cancers.

Although the phenomenon of imposex has been explained by the hypothesis that organotins act as the inhibitors of aromatase (CTP 19A) [3,4], which converts androgen to estrogen, there has been no precise molecular mechanism underlying their inhibition. Even more, there was no significant decrease in aromatase activity found in gastropods exhibiting imposex [5,6]. Instead of the aromatase inhibition hypothesis, inhibition of sulfo conjugation of testosterone by tributyltin (TBT) has been proposed as a major cause of TBT-induced imposex phenomena [5]. However, the mechanism underlying the inhibition of sulfo conjugation has not been studied yet. In addition to the possible involvement in imposex in marine organisms, sulfation does play a key role in regulating human hormonal and neuronal homeostasis [7–10], as well as in biological events such as cell growth and differentiation in humans [11,12]. Furthermore, sulfation may facilitate the removal of xenobiotics from the human body [13,14]. Moreover, it has been reported that significant amounts of tins were found in organs such as brain, kidney, and liver from juvenile rats after oral administration of organotins [15]. Therefore, it is one of the important issues to understand how organotins inhibit the cytosolic sulfotransferases (STs) in order to have perspective on human reproductive health, though it is still difficult to assess whether there are true harmful events that occur in human.

At present, the accumulating structural knowledge of STs through the recent crystal structure studies [16–19] provides an opportunity to clarify the inhibition mechanism of organotins. Moreover, the crystal structure of the human estrogen sulfotransferase (hSULT1E1)–PAPS complex provided a detailed view of the catalytic reaction mechanism [20,21]. Therefore, this study is focused on the effect of organotins on the activity of recombinant

hSULT1E1 with β -estradiol (E2) and estrone (E1) as substrates, based on the known crystal structure and catalytic mechanism of STs.

This is the first report showing the evidence for molecular mechanism underlying the inhibition of hSULT1E1 by organotins.

2. Materials and methods

2.1. Expression and purification of recombinant human estrogen sulfotransferase

Recombinant human estrogen sulfotransferase (hSULT1E1) expressed using pET23c prokaryotic expression system was prepared as previously described [22]. Transformed BL21 (DE3) cells were grown in 100 ml of LB broth containing 50 mg/ml ampicillin. After the cell density reached to 0.6 OD_{600 nm}, 0.1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to induce the production of recombinant hSULT1E1. After 4-h induction at 25 °C, cells were collected by centrifugation and homogenized in 10 ml of a lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, and 1 mM EDTA) using Aminco French press. The crude homogenates were centrifuged at 10,000g for 20 min at 4 °C on two times to down particulate fraction. The supernatant was applied onto an anion-exchange column (Resource-Q) and Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) system was used to get purified hSULT1E1. Obtained eluted fractions containing estrogen sulfotransferase activity were used as enzyme source to study.

2.1.1. Enzymatic assay

The sulfotransferase activity of recombinant hSULT1E1 was assayed using 3'-phosphoadenosine 5'-phospho[³⁵S]sulfate ([³⁵S]PAPS) as the sulfonate donor. The standard mixture, with a final volume of 25 μ l, contained 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.0), 0.5 μ M [³⁵S]PAPS (45 Ci/mmol), and 100 μ M of the substrate tested. All assays were started by the addition of the purified enzyme preparation, allowed to proceed for 20 min at 37 °C, and terminated by heating at 100 °C for 3 min. After centrifugation at 10,000g for 5 min at 4 °C, resultant supernatants were subjected to

the analysis of [³⁵S]sulfated product by TLC. Radioactivities of the sulfate products identified on the TLC plates were quantified using an image analyzer FLA 3000. Results presented in this study represent mean values derived from at least three separate experiments.

2.1.2. Synthesis of 3'-phosphoadenosine 5'-phospho [³⁵S]sulfate

[³⁵S]PAPS (45 Ci/mmol) was synthesized from ATP and [³⁵S]sulfate using the bifunctional human ATP sulfurylase/adenosine 5'-phosphosulfate kinase (PAPS-synthase 1) as described previously [22]. Protein determination was based on the method of Bradford [23] with bovine serum albumin as standard. The analysis of [³⁵S]sulfated products generated during the enzymatic assays was based on the TLC separation using ethyl acetate/*n*-butanol (2:1; by volume) as the solvent system [24].

3. Results and discussion

In spite of the fact that the mechanism underlying imposex in marine snails induced by organotins remains unclear, the inhibition of sulfo conjugation of testosterone by, for example, TBT has been proposed as a major cause [5]. Additional concerns about the safety of human exposure to organotins have been raised based on the results of experiments addressing the quantitative assessment of total tin in various tissues of juvenile rats after oral administration of organotins. When tributyltin acetate (1 mg Sn/kg) and triphenyltin acetate (0.87 mg Sn/kg) were administered orally to neonatal rats from day 2 to day 29 of age and sacrificed on day 30, total tin contents of liver were 610 and 348 ng Sn/g tissue, respectively [15]. Therefore, it is one of the important potential problems for endocrine disruption issues in human to determine whether and/or how organotins inhibit the cytosolic sulfotransferases (STs), although data are sparse regarding the effect of organotins on human reproductive health.

The recent crystallographic analysis had revealed the key amino acid residues involved in the sulfonate transfer reaction and PAPS hydrolysis. β -estradiol (E2) is buried deeply in the hydrophobic

substrate pocket and the conserved His¹⁰⁷ residue serves as a catalytic base facing the 3-hydroxy group of the E2 [20,21]. Notably, the imidazole ring of His¹⁰⁷ plays an essential role in the charge relay mechanism [20,21,25]. Since the 3-hydroxy group of E2 is less nucleophilic to react with PAPS, this His¹⁰⁷ residue may form a low-barrier hydrogen bond to increase the reactivity of the 3-hydroxy group of the E2, similar to the reaction mechanism of serine proteases [26]. Based on the chemical structure of organotins and the crystal structure of the STs, we hypothesized that hydrophobic moieties of trisubstituted organotins may interact with the hydrophobic regions of STs and tin atom with unoccupied orbital will form a coordination bond with the lone pair electrons of the nitrogen atom in the imidazole ring of the His¹⁰⁷ residue. If this working hypothesis is correct in thinking, the catalytic reaction of STs is competitively inhibited by organotins. The obtained results should give important clues to understanding the mechanism based inhibition of STs by organotins and may be the first step for elucidating the true harmful events that occur in human by such the xenobiotics as organotins.

3.1. Inhibition of human recombinant SULT1E1 by TBT and TPT

To determine what extent TBT and TPT inhibit the sulfation caused by hSULT1E1, a range of these compounds were incubated with recombinant hSULT1E1. A preliminary experiment showed that TBT clearly inhibited the sulfation of E1 and E2. The IC₅₀ values of the inhibition by TBT were then determined and calculated to be 3 and 12 μ M, respectively (Fig. 1A). TPT also inhibited the sulfation of both E1 and E2 with IC₅₀ values of 10 and 5 μ M, respectively (Fig. 1B). These obtained IC₅₀ values are very similar to the concentrations of the ATP synthesis inhibition in mitochondria by TBT as a potent ATP synthase inhibitor [1].

To determine the effect of TBT on the kinetic properties of hSULT1E1, the linear regression and extrapolation of data in the Lineweaver–Burk plot gave a series of lines crossing each other in the proximity of the ordinate indicating that TBT served as a competitive inhibitor of hSULT1E1 (Fig. 2).

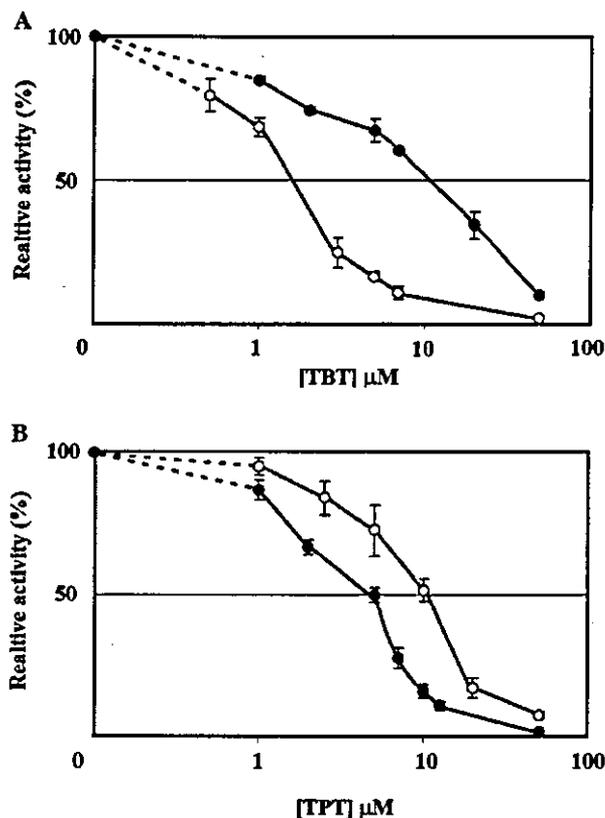


Fig. 1. (A) Effect of tributyltin (TBT) on recombinant human estrogen sulfotransferase, hSULT1E1. Dose-dependent inhibition by TBT of hSULT1E1 activity toward estrone (E1, 0.1 μM ; \circ) and β -estradiol (E2, 0.1 μM ; \bullet). The IC_{50} values for E1 and E2 were calculated to be 3 and 12 μM , respectively. (B) Effect of triphenyltin (TPT) on recombinant human estrogen sulfotransferase, hSULT1E1. Dose-dependent inhibition by TPT of hSULT1E1 activity toward estrone (E1, 0.1 μM ; \circ) and β -estradiol (E2, 0.1 μM ; \bullet). The IC_{50} values both for E1 and E2 were calculated to be 10 and 5 μM , respectively.

In the case of TPT (Fig. 3), TPT was also defined as a competitive inhibitor of hSULT1E1 based on this analysis. These results mean that TBT and TPT bind to the same catalytic site in hSULT1E1 as natural substrates like estrogens do. The fact thus fully supported our hypothesis that hydrophobic moieties of trisubstituted organotins may interact with the hydrophobic regions of STs and tin atom with unoccupied orbital may form a coordination bond with the lone pair electrons of the nitrogen atom in the imidazole ring of the His¹⁰⁷ residue (Fig. 5). As a result, target estrogens could not reach the substrate binding

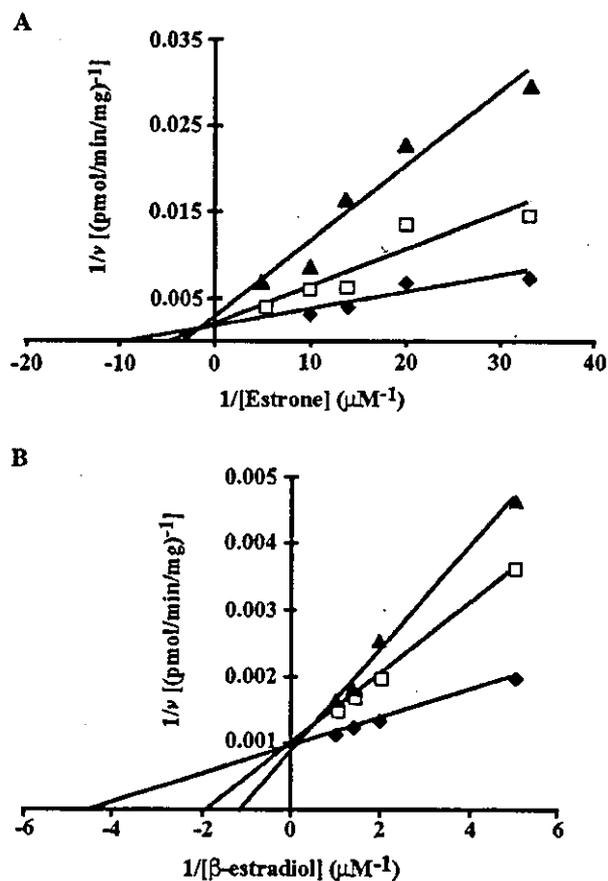


Fig. 2. Influence of TBT on the kinetic properties of hSULT1E1. The data were subjected to Lineweaver-Burk analysis of the inhibition of the sulfation of E1 and E2 at various TBT concentrations. hSULT1E1 activities on E1 in the range from 30 to 200 nM were determined in the presence (\square , 2 μM ; \blacktriangle , 7 μM) or absence (\blacklozenge) of TBT (A). hSULT1E1 activities on E2 in the range from 0.2 to 1 μM were determined in the presence (\square , 2 μM ; \blacktriangle , 7 μM) or absence (\blacklozenge) of TBT (B).

site and His¹⁰⁷ could not form a low-barrier hydrogen bond to increase the reactivity of the 3-hydroxy group of the target estrogens. These results imply that organotins may have an impact on human hormone metabolism.

3.2. Influence TBT on the binding of PAPS

Since sulfotransferases including hSULT1E1 contain two binding sites, that is, one for the acceptor substrate and the other for PAPS that serves as the sulfonate donor, the inhibitory mechanism of TBT on the binding of PAPS was characterized

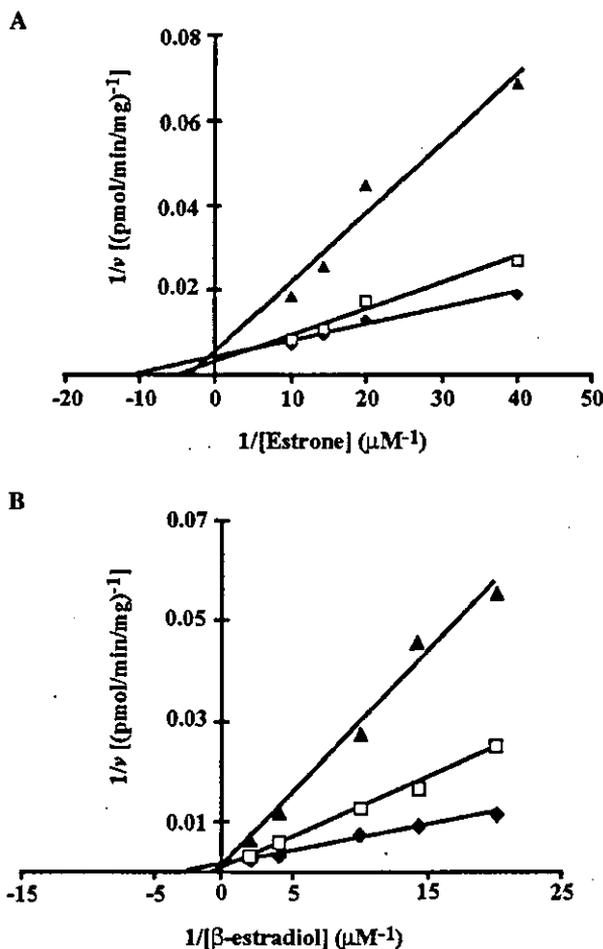


Fig. 3. Influence of TPT on the kinetic properties of hSULT1E1. The data were subjected to Lineweaver-Burk analysis of the inhibition of the sulfation of E1 and E2 at various TPT concentrations. hSULT1E1 activities on E1 in the range from 25 to 100 nM were determined in the presence (\square , 5 μM ; \blacktriangle , 15 μM) or absence (\blacklozenge) of TPT (A). hSULT1E1 activities on E2 in the range from 50 to 500 nM were determined in the presence (\square , 5 μM ; \blacktriangle , 15 μM) or absence (\blacklozenge) of TPT (B).

based on the Lineweaver-Burk plot analysis. As expected, based on the information of the crystal structure of hSULT1E1, the type of inhibition mechanism of hSULT1E1 by TBT was that of a competitive nature (Fig. 4). This type of inhibition occurs at the same concentration range as those of substrates. This suggests that TBT shares the same binding site with PAPS in hSULT1E1 to coordinate with the critical amino acids residues such as Lys⁴⁷ for the binding of PAPS to the enzyme.

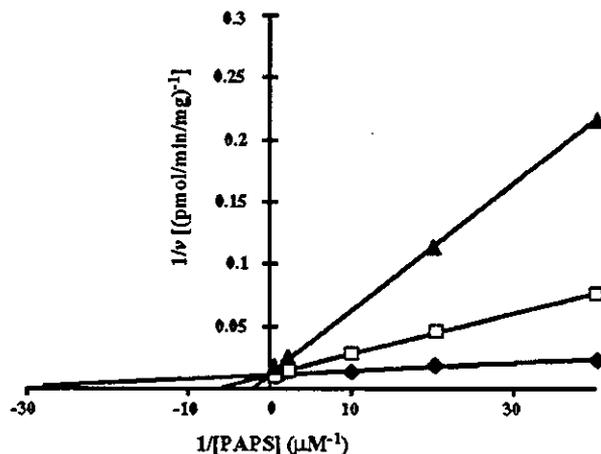


Fig. 4. The interaction activity of TBT with PAPS on the kinetic properties of hSULT1E1 activity. The data were subjected to Lineweaver-Burk analysis of the inhibition of the sulfation of E1 at various TBT concentrations. PAPS at concentrations ranging from 0.025 to 2.5 μM with E1 (25 nM) were used in the presence of different concentrations of TBT.

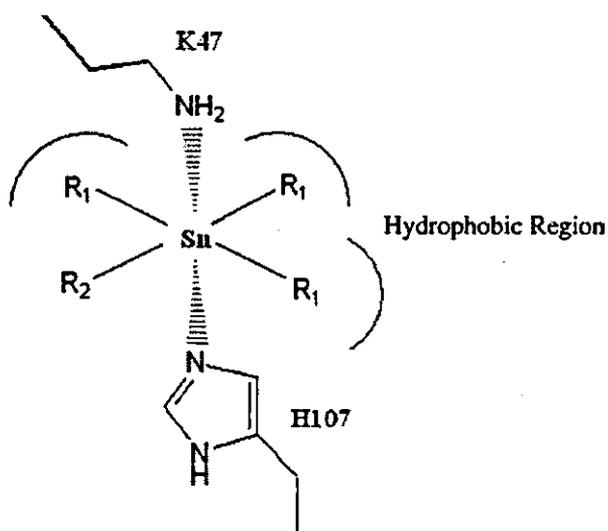


Fig. 5. The proposed inhibition mechanism of organotin on sulfotransferases. Residue numbers are those of SULT1E1 [20,21].

As conclusions, our data demonstrated that organotin such as TBT competitively inhibited the binding of both estrogens to the substrate binding site and PAPS to the catalytic site, leading to the decreased sulfation activity. The most likely explanation of the results obtained in the present study is that the tin atom could form a

coordination bond with the important conserved amino acid residues in all STs, i.e., His¹⁰⁷ and Lys⁴⁷, in the catalytic triad as illustrated in our mechanism based hypothesis (Fig. 5). The inhibition of STs leading to reduced sulfation of estrogens and bioactive chemicals may have important implications in the abnormal sexual development in animals as well as increased incidence of hormone-dependent tumors. More studies on the interaction between the structure favoring the enzyme catalysis and the inhibitors are warranted in order to fully understand the involvement of different sulfotransferases including brain neurosteroid ST, dehydroepiandrosterone ST, and the Golgi-membrane heparan ST.

This is the first report showing the evidence for molecular mechanism underlying the inhibition of ST by organotins. Therefore, the inhibition of STs may cause an adverse effect not only in marine organisms but also in humans if sufficient amount of organotins is accumulated by food chains. Moreover, the idea based on our hypothesis may in the future aid in useful drug design to control the activity of STs.

Acknowledgments

This research was supported in part by a grant from Agricultural High-Tech Research Center, Meijo University, under the "Environmental Control through the Function of Microorganisms" project (H.T.). This work was supported by Grant-in-Aid for Scientific Research (B), (C) (M.S., Y.S.), and Grant-in-Aid for Encouragement of Young Scientists (Y.S.) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan. This work was also supported by Health and Sciences Research Grants (Toxicogenomics) from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (Y.S.).

References

- [1] A. Matsuno-Yagi, Y. Hatefi, Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 1539–1545.
- [2] J.W. Short, F.P. Thrower, Accumulation of butyltins in muscle tissue of Chinook salmon reared in sea pens treated with tri-*n*-butyltin, *Mar. Pollut. Bull.* 17 (1986) 542–547.
- [3] N. Spooner, P.E. Gibbs, G.W. Bryan, L.J. Good, The effects of tributyltin upon steroid titers in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex, *Mar. Environ. Res.* 32 (1991) 37–49.
- [4] C. Bettin, J. Oehlmann, E. Stroben, TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level, *Helgol. Meeresunters.* 50 (1996) 299–317.
- [5] M.J.J. Ronis, A.Z. Mason, The metabolism of testosterone by the periwinkle (*Littorina littorea*) in vitro and in vivo: effects of tributyl tin, *Mar. Environ. Res.* 42 (1996) 161–166.
- [6] Y. Morcillo, C. Porte, Evidence of endocrine disruption in the imposex-affected astropod, *Bolinus brandaris*, *Environ. Res.* 81 (1999) 349–354.
- [7] C.A. Strott, Steroid sulfotransferases, *Endocr. Rev.* 17 (1996) 670–697.
- [8] R. Hobkirk, Sulfation by guinea pig chorion and uterus: differential action towards estrone and estradiol, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 59 (1996) 479–484.
- [9] R.M. Whittemore, J.A. Roth, Effect of phosphatase inhibition of in vitro dopamine sulfation and 3'-phospho-adenosine-5'-phosphosulfate catabolism in human brain, *Biochem. Pharmacol.* 34 (1985) 3853–3856.
- [10] W.E. Rainey, B.R. Carr, H. Sasano, T. Suzuki, I.J. Mason, Dissecting human adrenal androgen production, *Trends Endocrinol. Metab.* 13 (2002) 234–239.
- [11] K.G. Bowman, C.R. Bertozzi, Carbohydrate sulfotransferases: mediators of extracellular communication, *Curr. Biol. Chem. Biol.* 6 (1999) 9–22.
- [12] O. Habuchi, Diversity and function of glycosaminoglycan sulfotransferases, *Biochem. Biophys. Acta* 1474 (2000) 115–127.
- [13] M. Suiko, Y. Sakakibara, M.-C. Liu, Sulfation of environmental estrogen-like chemicals by human cytosolic sulfotransferase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267 (2000) 80–84.
- [14] R.M. Harris, R.H. Waring, C.J. Kirk, P.J. Hughes, Sulfation of "estrogenic" alkylphenols and 17 β -estradiol by human platelet phenol sulfotransferase, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 159–166.
- [15] P. Mushak, M.R. Krigman, R.B. Mailman, Comparative organotin toxicity in the developing rat: somatic and morphological changes and relationship to accumulation of total tin, *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 4 (1982) 209–215.
- [16] Y. Kakuta, L.G. Pederdon, C.W. Carter, M. Negishi, L.C. Pedersen, Crystal structure of estrogen sulfotransferase, *Nat. Struct. Biol.* 4 (1997) 904–908.
- [17] R. Dajani, A. Cleasby, M. Neu, A.L. Wonacott, H. Jhoti, S. Hood, A. Modi, A. Hersey, J. Taskinen, R.M. Cooke, G.R. Manchee, M.W.H. Coughtrie, X-ray crystal structure of human dopamine sulfotransferase, SULT1A3, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 37862–37868.

- [18] P. Rehse, M. Zhou, S.X. Lin, Crystal structure of human dehydroepiandrosterone sulfotransferase in complex with substrate. *Biochem. J.* 364 (2002) 165–171.
- [19] N.U. Gamage, R.G. Duggleby, A.C. Barnett, M.C. Tre-sillian, F. Latham, N.F. Liyou, M.E. McManus, J.L. Martin. Structure of a human carcinogen-converting enzyme SULT1A1, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 7655–7662.
- [20] Y. Kakuta, E.V. Petrotchenko, L. Pedersen, M. Negishi, The sulfuryl transfer mechanism, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 27325–27330.
- [21] M. Negishi, L.G. Pedersen, E. Petrotchenko, S. Shevtsov, A. Gorokhov, Y. Kakuta, L.C. Pedersen, Structure and function of sulfotransferase, *Arch. Biochem. Biophys.* 390 (2001) 149–157.
- [22] T.G. Pai, M. Suiko, Y. Sakakibara, M.-C. Liu, Sulfation of flavonoids and other phenolic dietary compounds by the cytosolic human sulfotransferases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285 (2001) 1175–1179.
- [23] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [24] M.-C. Liu, F. Lipmann, Decrease of tyrosine-O-sulfate-containing proteins found in rat fibroblasts infected with Rous sarcoma virus or Fujinami sarcoma virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 3695–3698.
- [25] L.C. Pedersen, E. Petrotchenko, S. Shevtsov, M. Negishi, Crystal structure of the human estrogen sulfotransferase–PAPS complex, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 17928–17932.
- [26] P.A. Frey, S.A. Whitt, J.B. Tobin, A low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad of serine protease, *Science* 264 (1994) 1927–1930.

生物が獲得した無機硫酸の賢い利用法：

硫酸転移酵素による解毒代謝機構

榊原陽一*、Liu, Ming-Cheh**、水光正仁***

* Yoichi Sakakibara

宮崎大学農学部応用生物科学科 助教授

Associate Professor, Department of Biochemistry and Biosciences,

Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

〒889-2192 宮崎市学園木花台西 1-1

** テキサス大学ヘルスセンター 准教授

Associate Professor, Biomedical Research Center, The University of Texas Health Center,

Tyler, TX 75708

*** Masahito Suiko

宮崎大学農学部応用生物科学科 教授

Professor, Department of Biochemistry and Biosciences,

Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

〒889-2192 宮崎市学園木花台西 1-1

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として、さらにステロイドホルモンや神経伝達物質の濃度調節機構として広く知られている。近年、解毒代謝機構としての硫酸化がテーラーメイド医療やトキシコゲノミクス分野で注目されつつある。ここでは、この解毒代謝機構としての硫酸化について最近の研究の動向を紹介する。

1 : はじめに

生物は太古の昔より、リン酸と硫酸の無機酸のうちリン酸を情報伝達やエネルギー生産の道具として用いていたが、硫酸に関しては長年その機能は分からなかった。生体内における無機硫酸の機能として、様々な生体外異物や生理活性物質の硫酸エステル化に関して近年の研究から色々なことが分かってきた。

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、そしてステロイドホルモンや神経伝達物質であるカテコールアミン類の濃度調節機構として古くから研究されてきた。この様な背景から、硫酸転移酵素は我々の生体内で不必要となった化学物質を体外に排泄する機能を担っていると考えられている。近年、硫酸転移酵素の研究分野にも分子生物学的手法が取り入れられ、酵素学的あるいは生化学的な研究から明らかにすることが困難な様々なことが分かってきた。筆者等の研究グループは分子生物学的手法を導入し、この硫酸転移酵素に関して精力的に cDNA クローニングを行った。その結果、少なくともヒトにおいて 12 種類、マウスにおいて 14 種類の硫酸転移酵素遺伝子が存在することが明らかになった。このことから、同じく解毒代謝機構の酵素として知られるシトクロム P-450 酵素群と同様に硫酸転移酵素が、遺伝子スーパーファミリーを形成していることが判明した。ヒトおよびマウス硫酸転移酵素遺伝子の解析の結果、硫酸転移酵素遺伝子スーパーファミリーは、少なくとも 5 つのファミリーから形成されることが明らかとなった(1, 2)。現在、ポストゲノム時代の研究として、体質や性質を決定していると考えられている遺伝子の個人や個体間の違い(遺伝子多型)が注目されている。硫酸転移酵素の遺伝子多型は

薬物の代謝や応答に密接な関わりがあることが予想され、テーラーメイド医療における投薬時の「さじ加減」を決定する重要な情報となることが期待されている。

2：活性硫酸 PAPS の合成と硫酸化

生体内における硫酸化に関してまずその反応を簡単に説明する。生体内での硫酸化は、最初に硫酸の活性化が必要である。我々ヒトをはじめ生物は硫酸供与体として 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) という活性硫酸を ATP と無機硫酸塩から合成される必要がある(3)。生体内におけるエネルギー源として大切な 2 分子の ATP を消費して 1 分子の活性硫酸(PAPS)を合成することからも硫酸化がいかに重要か容易に予想されます。この PAPS の合成には、ATP sulfurylase と Adenosine 5'-phosphosulfate kinase (APS kinase)によって触媒される二つの酵素反応が関与することが知られています(図1)。これら二つの PAPS 合成に関与する酵素は、大腸菌、カビといった微生物や植物においては二つの異なる酵素タンパク質として存在している。しかし、ヒトやマウスといった哺乳動物や、ショウジョウバエにおいては二つの酵素が進化の過程で融合した酵素 PAPS 合成酵素(PAPS synthetase)として存在しより効率よく PAPS が合成できるようになってきたと考えられます。1998 年に我々はヒトの PAPS 合成に関与する PAPS synthetase (Bifunctional ATP sulfurylase/adenosine 5'-phosphosulfate kinase)をクローニングし、大腸菌で発現した。その結果、bifunctional な酵素の ATP sulfurylase と APS kinase の領域を単独で発現させた場合でもそれぞれの酵素活性を有していることを明らかとし報告した(4)。このようにして合成された PAPS を用いて PAPS 上の硫酸基をフェノール性の水酸基の上に転移する反応が硫酸化であり図2に反応の概要をまとめた。

現在、我々の研究室では遺伝子工学的に大腸菌で発現したヒト PAPS 合成酵素を用いて硫酸転移酵素研究に不可欠な活性硫酸 PAPS を酵素的に合成している。さらに同じく大腸菌で発現したリコンビナントヒト硫酸転移酵素を調製し研究している。今後の応用の可能性として、これらの活性硫酸 PAPS や硫酸転移酵素を利用することで、様々な化学物質の硫酸体を酵素的に合成する

のに利用できると考えられる。

3：硫酸転移酵素遺伝子スーパーファミリー

近年、硫酸転移酵素の研究分野において分子生物学的手法を導入することによって、これまでの生化学的な研究では困難であった新しいタイプの硫酸転移酵素遺伝子が多数発見されるようになった。硫酸転移酵素として初めて cDNA クローニングが報告されたのはウシのエストロゲン硫酸転移酵素である。その後、ラットヒドロキシステロイド硫酸転移酵素、ヒトフェノール硫酸転移酵素等の cDNA クローニングが報告され、現在までの研究で少なくともヒトで 12 種類、マウスにおいて 14 種類以上の硫酸転移酵素が存在しシトクロム P-450 同様に硫酸転移酵素も遺伝子スーパーファミリーを形成していることが判明した (図 3) (1, 2)。

現在、これらの硫酸転移酵素の分類に関しては硫酸転移酵素ワークショップにおいて提唱された分類法によりアミノ酸配列をもとに分類することが推奨されている (5)。分類法としては、硫酸転移酵素遺伝子は SULT という略号を用いて、その後にファミリーを表す数字を付ける。例えば、*SULT1* はフェノール硫酸転移酵素ファミリー、*SULT2* はヒドロキシステロイド硫酸転移酵素ファミリーというように分類される。さらにこれらのファミリーごとにアミノ酸配列が 60% 以上一致するグループをサブファミリーとし、アルファベットを A から順に付けていく。以下はこの硫酸転移酵素分類法に基づく分類名を用いることとする。

フェノール硫酸転移酵素遺伝子ファミリー

古くから解毒代謝機構に関与する酵素としてフェノール硫酸転移酵素がある。このフェノール硫酸転移酵素遺伝子ファミリー (*SULT1* Family) は図 3 に示したように、A から E の 5 種のサブファミリーにより形成されていることが知られている。この *SULT1* ファミリーに属する硫酸転移酵素の機能としてはフェノール性の生体外異物や薬物の解毒代謝やカテコールアミン、甲状腺ホルモンおよびエストロゲンの濃度調節機構に関与すると考えられている。

SULT1A サブファミリーはヒトにおいて P 型フェノール硫酸転移酵素 (SULT1A1、SULT1A2) 2 種と M 型フェノール硫酸転移酵素 (SULT1A3) の 3 種が存在することが報告されている。これらの酵素は肝臓における解毒代謝機構としての硫酸化において中心的な役割を果たしていると考えられ非常に精力的に研究されてきた。

我々の研究グループが発見したドーパ・チロシン硫酸転移酵素 (SULT1B1) は新規サブファミリー—SULT1B に属する。この酵素は、ドーパやチロシンそして甲状腺ホルモンなどの硫酸化による濃度調節に関与すると考えられている (6)。

SULT1C サブファミリーは最初ラット肝臓のアリルアミン硫酸転移酵素 ST1C1 として報告された (7)。この酵素の特徴として、硫酸化により変異原性が著しく活性化される前駆変異原物質 *N*-ヒドロキシアセチルアミノフルオレンの代謝活性化に関与し、変異原作用や発ガンと密接な関係があると考えられた。我々の研究グループはヒト SULT1C サブファミリーに属する酵素 2 種をクローニングしそれらが発ガンと密接な関係があることを報告した (8)。

マウス SULT1D1 はナフチルアミンのアミノ基の硫酸化やプロスタグランジンやロイコトリエンといった炎症性メディエーターの硫酸化を触媒するユニークな活性を持つことが明らかとなった (9, 10)。ヒトにおいて SULT1D1 は偽遺伝子となり機能していないと考えられ、硫酸転移酵素遺伝子ファミリーの進化を考える上で非常に興味深い対称である。

SULT1E サブファミリーはエストロゲン硫酸転移酵素と呼ばれてきた酵素 (SULT1E1) がこれに該当し、標的臓器におけるエストロゲンの不活性化や濃度調節に関与すると考えられている。

ヒドロキシステロイド硫酸転移酵素遺伝子ファミリー

ヒドロキシステロイド硫酸転移酵素遺伝子ファミリー (SULT2 Family) は図 3 に示したように A と B の二つのサブファミリーの存在が報告されている。これら SULT2 ファミリーに属する硫酸転移酵素は、水酸基を持つステロイドホルモン類を特異的に硫酸化することが知られている。

SULT2A サブファミリーはデヒドロエピ안ドロステロン硫酸転移酵素 (*SULT2A1*) がヒトでクローニングされている。我々研究グループは、この *SULT2A1* を利用した新規変異原試験法を考案している。この試験法は、9-ヒドロキシメチルアントラセンなど硫酸化によって特異的に代謝活性化される変異原物質の検出に有用である。現在、この新規試験法を用いて、緑茶カテキン類をはじめとした様々な食品機能性成分の抗変異原作用に関して研究を行っている (11)。

SULT2B サブファミリーはヒトおよびマウスでその存在が報告されている (9, 12)。*SULT2B* サブファミリーの特徴としては、コレステロールを特異的に硫酸化することが最近報告された。またアミノ末端のアミノ酸配列の異なるスプライスバリエントが存在し、基質特異性がスプライシングにより変化することが硫酸転移酵素として初めて報告されている (13)。

その他の硫酸転移酵素遺伝子ファミリー

ヒトやマウスをはじめとした、哺乳動物の細胞質硫酸転移酵素には、*SULT1* および *SULT2* の2つのファミリーの外に、*SULT3* から *SULT5* の全部で少なくとも5つの遺伝子ファミリーが存在することが明らかとなっている。*SULT3* ファミリーは最初ウサギから *SULT3A1* が芳香族アミンを特異的に硫酸化する酵素として報告された (14)。我々もマウス *SULT3A1* をクローニングし同様に芳香族アミンを特異的に硫酸化することを確認している。*SULT4* ファミリーは脳に特異的に発現する硫酸転移酵素として *SULT4A1* がヒト、ラット、マウスから報告されている (15, 16)。この *SULT4A1* に関しては、ヒトとマウスの間でアミノ酸配列が 98%一致し、進化の過程で非常に良く保存されていることや、脳において特異的に発現していることから重要な機能に関与すると考えられている。*SULT5* ファミリーは我々が新規マウス硫酸転移酵素として *SULT5A1* の存在を明らかにしている。これらの新しいファミリーに分類される硫酸転移酵素に関しては、生理機能が未だに不明な点も多く、今後の研究から、生体内における硫酸化の機能が現在考えられているよりもずっと複雑で多岐にわたっていることが明らかになると期待される。

4：硫酸転移酵素ファミリーの多様な機能

これまで述べてきた硫酸転移酵素の生体内での機能として、我々の研究グループは大きく以下に箇条書きで示した4種に分類して研究している(2)。

- ①：生体外異物の解毒代謝機構としての硫酸化
- ②：内因性の生理活性物質の濃度調節機構
- ③：食品機能性成分の硫酸化
- ④：前駆変異原物質の硫酸化による代謝活性化

硫酸転移酵素は、長い間解毒代謝機構として地道に研究されてきた。最近になり、硫酸転移酵素もシトクロム P-450 酵素群同様に注目されるようになってきた。この様な背景をふまえて、上述した機能の中で、特に本稿においては解毒代謝機構としての硫酸化に的を絞り、今後の展望に関して解説する。

生体外異物の解毒代謝機構としての硫酸化

我々の研究グループをはじめ、硫酸化は生体外異物や薬物の解毒代謝機構を主体として、肝臓で発現する硫酸転移酵素の研究が精力的に行われてきた。硫酸転移酵素の生体外異物の解毒代謝に関与する機能と密接に関係がある我々の研究として、水酸基またはアミノ基を持つ内分泌かく乱物質（環境ホルモン）の硫酸化がある。ビスフェノールA、アルキルフェノール、ジエチルステルベステロール(DES)そしてエチニルエストラジオール等の内分泌かく乱物質候補物質にはフェノール性の水酸基をもつものが多く見られる。そこで、我々はフェノール性水酸基を持つ内分泌かく乱物質の硫酸化を検討し報告した(17)。この研究の結果、これらの化合物は種々の硫酸転移酵素によりすみやかに硫酸化を受けること。さらにこれらの化合物の硫酸エステル類は細胞に再吸収されないことから最終代謝産物として尿中に排泄されていることが分かった。内分泌かく乱物質（環境ホルモン）の硫酸化に関しては「化学と生物」誌に解説しているのでぜひそちらも参考にしていきたい(18)。