

200400213B

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14年度～16年度
萌芽的先端医療技術推進研究事業
総合研究報告書

平成17年4月

主任研究者：榊原陽一
(宮崎大学農学部)

目 次

I. 総合研究報告

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 19

III. 研究成果の刊行物・別刷 22

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）
（総合）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・助教授

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医薬品の効率的な開発およびテーラーメイド医療への応用の可能性を検討するものである。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。現在、ゲノム情報をもとにヒトゲノム上に異なる機能を持った硫酸転移酵素遺伝子が少なくとも12種類存在し、スプライスバリエーションを含めるとそれ以上に多様な種類の酵素タンパク質として存在すると考えられている。

我々は、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 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、機能を多様に行っ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ビ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ビナント酵素を調製しその諸性質を検討した。平成 16 年度は、12 種類の薬物成分 (p-Acetoamidophenol, Amoxicillin, Allopurinol、Ethinylestradiol, (R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride, Potassium Guaiacol-4-sulfate hemihydrate, Sodium salicylate, Salbutamol sulfate, Tetracycline hydrochloride, Methotrexate, Folic acid) に対する硫酸転移酵素の基質特異性を検討した。さらに、内分泌かく乱物質 (Octylphenol, Nonylphenol, Bisphenol A, Diethylstilbestrol) による硫酸転移酵素の阻害作用についても検討した。

平成 14 年度より 16 年度の 3 年の期間で、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による薬物代謝に関する研究が進展した。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、興味深い結果が多数得られている。将来的には、これらの結果を活用し、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これらの研究成果の医薬品の効率的な開発、さらにはテーラーメイド医療への応用を目指す。

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目指し、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)に関する研究を実施した。

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種のアミノ酸バリエーション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。

平成16年度は、11種類の薬物成分（*p*-Acetoamidophenol, Amoxicillin, Allopurinol、Ethinylestradiol、(R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride, Potassium Guaiacol-4-sulfate hemihydrate, Sodium salicylate, Salbutamol sulfate, Tetracycline hydrochloride, Methotrexate, Folic acid) に対する硫酸転移酵素の基質特異性を検討

した。さらに、内分泌かく乱物質 (Octylphenol, Nonylphenol, Bisphenol A, Diethylstilbestrol) による硫酸転移酵素の阻害作用についても検討した。

平成14年度より16年度までの期間を通じて、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による薬物代謝に関する研究が進展した。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ている。将来的には、これらの結果を活用し、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これらの研究成果の医薬品の効率的な開発およびテーラーメイド医療への応用を目指す。

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。

新規ヒト硫酸転移酵素 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 ベクターにサブクローニングし、リコンビナント酵素を 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ビナント酵素 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ホスト 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。

ヒト硫酸転移酵素 SULT1A1, SULT1A2, SULT1A3, SULT1B1, SULT1C2, SULT1E1, SULT2A1, SULT1B1b の 8 種は、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。精製酵素は、11 種類の薬物成分 (*p*-Acetoamidophenol, Amoxicillin, Allopurinol、Ethinylestradiol, (R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride, Potassium Guaiacol-4-sulfate hemihydrate, Sodium salicylate, Salbutamol sulfate, Tetracycline hydrochloride, Methotrexate, Folic acid) に対する基質特異性を検討した。

さらに、同じく 8 種の硫酸転移酵素を用いて 4 種の内分泌かく乱物質 (Octylphenol, Nonylphenol, Bisphenol A, Diethylstilbestrol) が硫酸転移酵素を阻害し、内因性のホルモン濃度調節機構としての硫酸化に与える影響を検討した。

硫酸転移酵素の活性測定は [³⁵S]-放射活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 の合成にはリコンビナント PAPS 合成酵素を使用し、ATP および [³⁵S]-放射活性無機

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ゼブラフィッシュの硫酸転移酵素のクローニングを行った。これらの生物種間を比較することで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、ゼブラフィッシュに関しては共同研究者であるテキサス大学の Dr. Ming-Cheh Liu によって研究を精力的に行っている。

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、その試料提供者への倫理面への配慮が必要と考えられる。しかしこれらに関しては市販の RNA やライブラリーを用いることにより対処し、倫理的な問題が発生しないよう配慮した。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もののみを使用することで対応することで倫理面への配慮を十分に行った。

C. 研究結果

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8B2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。

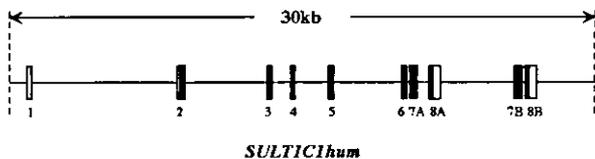


図1. ヒト SULT1C1 のゲノム構造

そこで、その2種のスプライスバリエーション SULT1C1a および SULT1C1b 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、SULT1C1a については、完全長の

cDNA が得られたが、一方で、SULT1C1b 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、SULT1C1a を鋳型にして PCR 増幅したエクソン2~6の断片(約600 bp)と、SULT1C1b 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 bp)を用いて、SULT1C1b 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 $[^{35}\text{S}]$ 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 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 $[^{35}\text{S}]$ 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。

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。SULT6A1 の ORF は pGEX-4T1 ベクタ

一の 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。SULT6A1 はマウスにおいてヒド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 (表 1)。

表 1. リコンビナントマウス SULT6A1 の基質特異性

基質	v(pmol/min/mg)
Pregnenolone	1.36±0.17
DHEA	2.75±0.09
β -Estradiol	0.16±0.01
Cholesterol	N.D.
Bisphenol A	N.D.
<i>o</i> -Bromophenol	N.D.
<i>p</i> -Nitrophenol	N.D.
Dopamine	N.D.
Naphtylamine	N.D.
3,3',5-L-Triiodothyronine	N.D.

基質濃度 = 10 μ M

N.D. = not detected

マウス SULT6A1 が Pregnenolone や DHEA に活性を示したことから、現在ヒト SULT6A1 のリコンビナント酵素を調製し、同様な活性測定を行っている。

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 10 種のアミノ酸配列の異なる遺伝子多型 (SNPs) 由来のアミノ酸バリエーションの調製をした。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バリエーション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 10 種はすべて硫酸転移酵素活性を示した (表 2)。

しかしながら、M57T や K227E において反応効率を示す V_{\max}/K_m 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が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。

表2. 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バリエーションの Km 値および Vmax

	Enzymatic Assay		
	Km for DHEA	Vmax for DHEA	Vmax/Km
	(μ 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

表3. 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

アミノ酸バリエーション	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

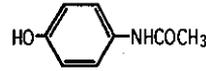
変異原物質としては、硫酸化により代謝活性化が報告されている 9-ヒドロキシメチルアントラセンを使用した。その結果が表2である、ここでは WT の代謝活性化の結果生じてきたコロニー数を 100 とし相対的な活性で示している (表3)。

さらに、8種類のヒト硫酸転移酵素 SULT1A1, SULT1A2, SULT1A3, SULT1B1, SULT1C2, SULT1E1, SULT2A1, SULT1B1b を使用して、下記の11種類の薬物成分 (*p*-Acetoamidophenol, Amoxicillin, Allopurinol、Ethinylestradiol, (R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride, Potassium Guaiacol-4-sulfate hemihydrate, Sodium salicylate, Salbutamol sulfate, Tetracycline hydrochloride, Methotrexate, Folic acid) (構造式は図2参照) に対する基質基質特異性を検討した (表4)。

さらに、同じく8種類のヒト硫酸転移酵素 SULT1A1, SULT1A2, SULT1A3, SULT1B1, SULT1C2, SULT1E1, SULT2A1, SULT1B1b を使用して、4種類の内分泌かく乱物質 (Octylphenol, Nonylphenol, Bisphenol A, Diethylstilbestrol) が硫酸転移酵素活性を阻害し、ホルモンや神経伝達物質の濃度調節機構としての硫酸化を阻害するか検討した。その結果として、阻害剤を作用しない条件をコントロール 100%とし、相対活性でまとめた (表5)。

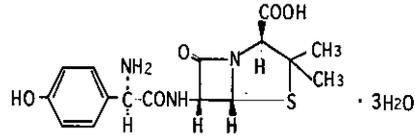
p-Acetamidophenol

解熱、頭痛・関節痛の緩和



Amoxicillin

グラム陽性菌を中心に殺菌



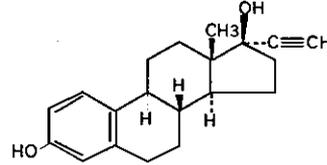
Allopurinol

尿酸合成阻害剤（痛風治療）



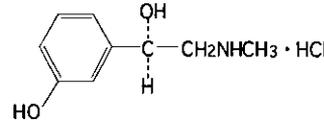
Ethinylestradiol

卵胞ホルモン剤（前立腺ガンの育増殖抑制）



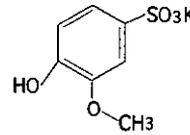
(R)-(-)-Phenylephrine

気管支拡張、診断及び治療を目的とする散瞳と調節麻痺



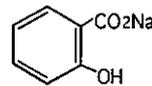
Potassium Guaiacol-4-Sulfate Hemihydrate

鎮咳去痰剤



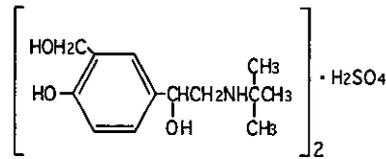
Sodium Salicylate

鎮痛消炎剤



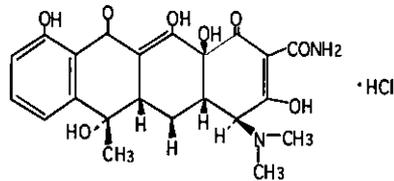
Salbutamol Sulfate

気管支拡張剤



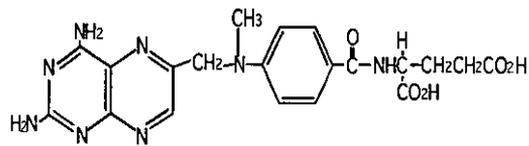
Tetracycline Hydrochloride

抗菌作用（グラム陽性・陰性菌、レプトスピラ、リケッチクラミジアに強く作用）



Methorexate

関節の腫れや痛みを緩和（慢性関節リウマチ治療薬）



Folic Acid

貧血治療

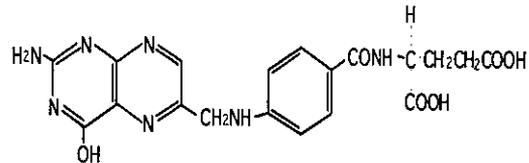


図2. 使用した薬物成分及びその構造

表4. ヒト硫酸転移酵素による薬物成分の硫酸化

Substrates (10 μ M)	Specific activity (pmol/min/mg)										
	SULT1A1	SULT1A2	SULT1A3	SULT1B1	SULT1C2	SULT1E1	SULT2A1	SULT2B1b			
<i>p</i> -Nitrophenol	1434.65 \pm 58.40	830.80 \pm 30.57	61.74 \pm 2.30	346.17 \pm 12.38	5.40 \pm 0.21	1411.96 \pm 64.87	ND	ND			
Cholesterol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	16.98 \pm 0.76			
Pregnenolone	ND	ND	ND	ND	ND	263.93 \pm 12.12	363.74 \pm 16.26	273.32 \pm 13.50			
<i>o</i> -Bromophenol	259.51 \pm 14.08	160.50 \pm 8.47	2452.30 \pm 102.52	414.34 \pm 18.27	7.82 \pm 0.45	996.25 \pm 44.25	ND	ND			
<i>p</i> -Acetamidophenol	ND	ND	56.85 \pm 2.44	ND	ND	ND	ND	ND			
Amoxicillin	81.64 \pm 4.06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
Allopurinol	ND	ND	58.73857 \pm 1.38	ND	ND	ND	ND	ND			
Ethinylestradiol	517.40 \pm 22.93	ND	51.15044 \pm 1.10	ND	ND	357.13 \pm 13.17	88.20 \pm 4.43	ND			
(R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride	4.58 \pm 0.26	ND	2577.99 \pm 134.41	ND	ND	ND	ND	ND			
Potassium Guaiaccol-4-sulfate Hemihydrate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
Sodium Salicylate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
Salbutamol Sulfate	ND	ND	2446.67 \pm 86.93	ND	ND	ND	ND	ND			
Tetracycline Hydrochloride	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
Methotrexate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
Folic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			

ND; not detected

表5. 内分泌かく乱物質による硫酸転移酵素阻害活性

Substrate (100 mM)	DHEA		17 β -Estradiol				Dopamine			Pregnenolone			
	1E1	2A1	2B1b	1A1	1A2	1A3	1E1	2A1	1A1	1A3	1E1	2A1	2B1b
Inhibitor (100 mM)	*Relative Activity (%)												
Octylphenol	0	57.1	64.5	0	0	36.1	26.9	0	0	18.2	0	65.0	181.3
Nonylphenol	25.7	77.1	172.7	6.5	0	91.2	48.6	74.3	0	48.4	40.9	110	232
Diethylstilbestrol (DES)	55.6	88.2	142.6	28.6	97.2	90.3	134.6	80.6	0	48.4	0	117.4	129.2
Bisphenol A (BPA)	52.9	92.5	152.3	77.1	22.2	67.1	100.0	76.7	0	35.3	3.2	130.4	69.2

* Results were expressed using activity obtained without inhibitors as 100%.

D. 考察

新規ヒト硫酸転移酵素 SULT1C1 遺伝子は、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らかとなった。またエクソン7と8は、7Aと8Aまたは7Bと8B2つの異なる組み合わせが存在し、スプライシングの過程で、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。

新規ヒト硫酸転移酵素 SULT6A1 のクローニング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。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。

前駆変異原物質の硫酸化による代謝活性化において K227E の影響が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が可能となった。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。

薬物成分の基質特異性を検討した結果より、SULT1A1 が Amoxicillin, Ethinylestradiol, (R)-(-)-Phenylephrine に対し硫酸化を触媒し、SULT1A3 が Allopurinol, Ethinylestradiol, (R)-(-)-Phenylephrine, Salbutamol sulfate に対し硫酸化を触媒することが判明した。ここで得られた結果よ

り、ヒトにおいては SULT1A1 および SULT1A3 が薬物成分の解毒代謝機構において中心的な役割を果たしていると考えられた。

さらに、内分泌かく乱物質による硫酸転移酵素阻害作用を検討した結果、基質が異なると阻害作用が異なること及び酵素の種類によっても異なることが判明した。特に、SULT1A1 が Dopamine の硫酸化に対する今回試験した内分泌かく乱物質の阻害作用は著しく、全く活性は検出されなくなった。

D. 結論

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3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、SULT 2 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

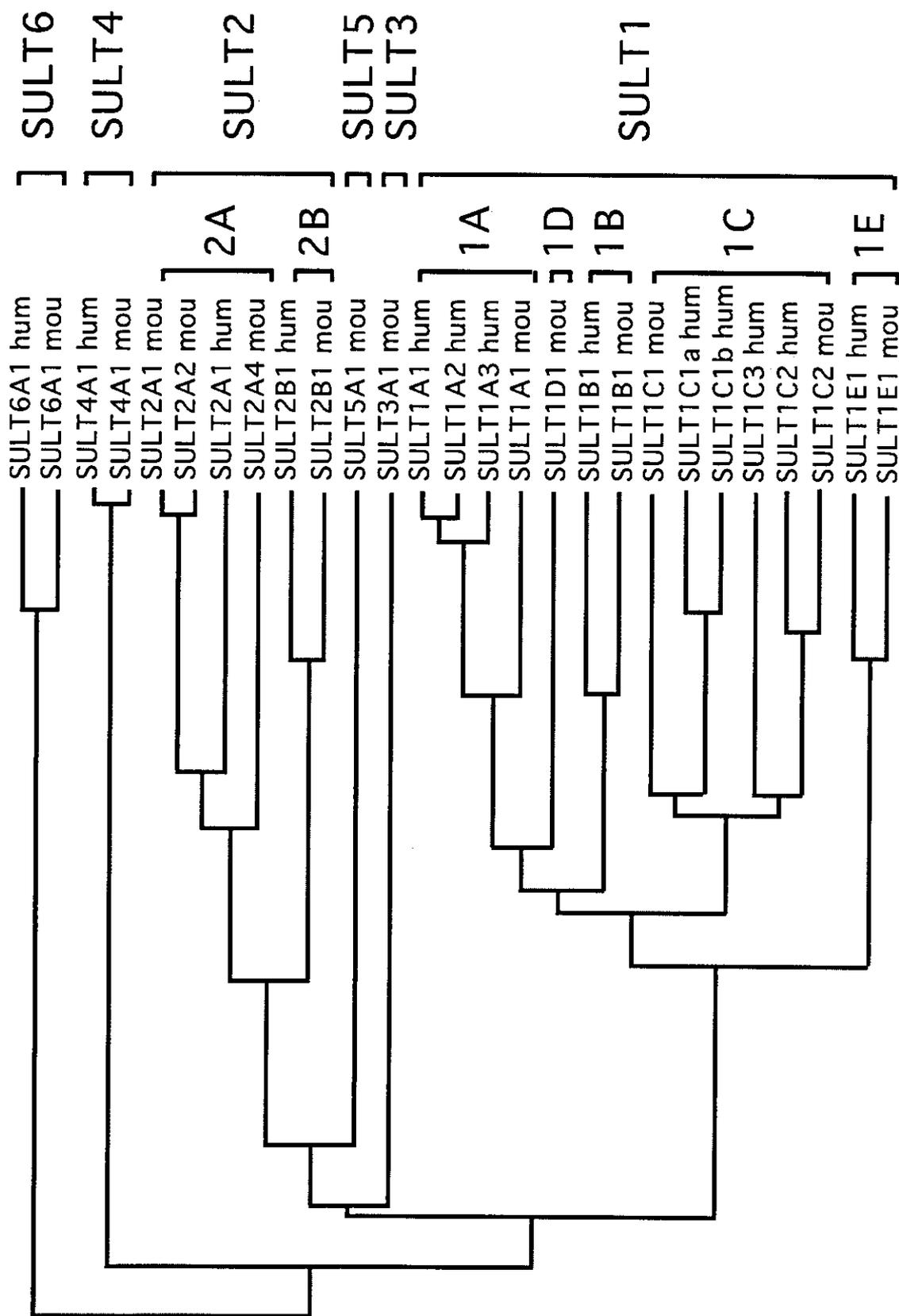


図3. ヒトおよびマウス硫酸転移酵素の系統的分類

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3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が分かる。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がわかり、今後これらのヒトにおけるオルソログ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、ヒトヒド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。

種々の薬物成分の硫酸化に関する研究より、ヒトにおいては SULT1A1 および SULT1A3 が薬物成分の解毒代謝機構において中心的な役割を果たしていると考えられた。しかしながら、今後より多くの医薬品及び医薬品候補成分に関する研究の必要性が強く考えられた。そして、生体外異物が硫酸転移酵素によって代謝されるとともに内因性のホルモンや神経伝達物質の濃度調節機構としての硫酸化を阻害することが内分泌かく乱物質を用い

た研究で明らかになった。今後、より多くの医薬品及び医薬品候補成分に関して硫酸化を検討するのみならず、硫酸転移酵素活性を阻害する作用も同時に検討する必要があると考えられた。

F. 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, T.G., and Liu, M.C.

“Regulatory effects of divalent metal cations on human cytosolic sulfotransferases.”

J. Biochem. (Tokyo) 132(3), 457-462, 2002.

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

“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, T.G., Sugahara, T., Suiko, M., Sakakibara, Y., Xu, F., and Liu, M.-C.

“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, T.G., Oxendine, I., Sugahara, T., Suiko, M., Sakakibara, Y., and Liu, M.-C.

“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.

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

“Differential roles of human monoamine (M)-form and simple phenol (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. 82(2), 295-303, 2004.

境田博至、甲斐孝憲、榎原陽一、水光正仁
「蕎麦焼酎揮発成分の抗変異原性と抗酸化作用」

AROMA RESEARCH 5(3), 263-267, 2004.

Ohkimoto, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Yoshikawa, H., Liu, M.-C. and Tamura, H.

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

Pesticide Biochem. Physiol. 81(1), 32-38, 2005.

榎原陽一、Liu, M.-C.、水光正仁

「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」

硫酸と工業、掲載準備中、2005.

2. 学会発表

田村廣人、○大木本圭、榑原陽一、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)

榑原陽一、○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)

榑原陽一、○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)

○榑原陽一、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)

○ 榑原陽一、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)

榑原陽一、○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)

○榑原陽一、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)

榑原陽一、○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)

○榑原陽一
「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)

榑原陽一、○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)

榑原陽一、○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)

○榑原陽一
「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., ○Morinaga, 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)

榊原陽一、○大木本圭、Ming-Cheh Liu、
水光正仁 「硫酸化による環境中のエストロ
ゲン様化合物の不活性化」 第2回環境バイ
オワーキングセッション (熊本)

榊原陽一、○阿部圭輔、大木本圭、
下位香代子、寺尾良保、Ming-Cheh Liu、
水光正仁
「ビスフェノール A の塩素および臭素置換体
によるエストロゲン硫酸転移酵素の阻害作
用」日本農芸化学会 2004 年度大会 (東広島)

榊原陽二、○大木本圭、西山和夫、
Ming-Cheh Liu、水光正仁
「大豆イソフラボンの硫酸化とイソフラボン
によるエストロゲン硫酸化の制御」
日本農芸化学会 2004 年度大会（東広島）

○三城恵美、榊原陽二、Ming-Cheh Liu、
水光正仁
「Tyrosylprotein Sulfotransferase の生化学的諸
性質の検討」平成 16 年度日本生化学会九州
支部例会（熊本）

○三城恵美、榊原陽二、Ming-Cheh Liu、
水光正仁「Tyrosylprotein Sulfotransferase の生
化学的諸性質の検討」第 28 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
（雲仙）

○大木本圭、榊原陽二、Ming-Cheh Liu、
水光正仁
「硫酸転移酵素の遺伝子多型とそれらのホル
モン濃度調節作用」
平成 16 年度日本農芸化学会西日本・北海道
支部合同大会（福岡）

榊原陽二、○餅原康範、水野貴之、Ming-Cheh
Liu、水光正仁
「遺伝子多型を考慮した食品機能性評価試験
法の確立」
平成 16 年度日本農芸化学会西日本・北海道
支部合同大会（福岡）

○Kouriki, H., Sakakibara, Y., Liu, M.-C. and
Suiko, M.
“Molecular cloning, expression, and
characterization of novel human sulfotransferase
1C1.” 第 77 回日本生化学会大会（横浜）

○三城恵美、榊原陽二、Ming-Cheh Liu、
水光正仁
「ヒト Tyrosylprotein Sulfotransferase の生化学
的諸性質の検討」
日本農芸化学会 2005 年度大会（札幌）

榊原陽二、○高橋早樹、神力はるな、
Ming-Cheh Liu、水光正仁
「新規マウス硫酸転移酵素 SULT6A1 のクロ
ーニングとその諸性質」
日本農芸化学会 2005 年度大会（札幌）

G. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |