

- [8] M.H. Kester, S. Bulduk, D. Tibboel, W. Meinel, H. Glatt, C.N. Falany, M.W. Coughtrie, A. Bergman, S.H. Safe, G.G. Kuiper, A.G. Schuur, A. Brouwer, T.J. Visser, *Endocrinology* 141 (2000) 1897–1900.
- [9] T.J. Ridgway, H. Wiseman, *Biochem. Soc. Trans.* 26 (1998) 675–680.
- [10] L.J. Guillette Jr., T.S. Gross, D.A. Gross, A.A. Rooney, H.F. Percival, *Environ. Health Prospect. (Suppl. 103)* (1995) 31–36.
- [11] D.M. Fry, *Environ. Health Prospect. (103)* (1995) 165–171.
- [12] E. Carlsen, A. Giwercman, N. Keiding, N.E. Skakkebaek, *Br. Med. J.* 305 (1992) 609–613.
- [13] J. Auger, J.M. Kunstmann, F. Czyglik, P. Jouannet, *New Engl. J. Med.* 332 (1995) 281–285.
- [14] F. Falck Jr., A. Ricci Jr., M.S. Wolff, J. Godbold, P. Deckers, *Arch. Environ. Health* 47 (1992) 143–146.
- [15] M.S. Wolff, P.G. Toniolo, E.W. Lee, M. Rivera, N. Dubin, *J. Natl. Cancer Inst.* 85 (1992) 648–652.
- [16] M. Suiko, Y. Sakakibara, M.-C. Liu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267 (2000) 80–84.
- [17] T.G. Pai, T. Sugahara, M. Suiko, Y. Sakakibara, F. Xu, M.-C. Liu, *Biochim. Biophys. Acta* 1573 (2002) 165–170.
- [18] J.P. Briggs, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282 (2002) R3–R9.
- [19] A.C. Ward, G.J. Linschke, *Front. Biosci.* 7 (2002) d827–d833.
- [20] T. Sugahara, C.C. Liu, T.G. Pai, M.-C. Liu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300 (2003) 725–730.
- [21] T. Sugahara, C.-C. Liu, T.G. Pai, P. Collodi, M. Suiko, Y. Sakakibara, K. Nishiyama, M.-C. Liu, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 2404–2411.
- [22] T. Sugahara, C.-C. Liu, G. Carter, T.G. Pai, M.-C. Liu, *Arch. Biochem. Biophys.* 414 (2003) 67–73.
- [23] K. Yanagisawa, Y. Sakakibara, M. Suiko, Y. Takami, T. Nakayama, H. Nakajima, K. Takayanagi, Y. Natori, M.-C. Liu, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 (1998) 1037–1040.
- [24] M.-C. Liu, F. Lipmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 3695–3698.
- [25] U.K. Laemmli, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [26] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.

## 硫酸転移酵素の多様な機能

(2003 年度農芸化学奨励賞受賞)

榊原陽一

(宮崎大学農学部応用生物科学科)

**Key words:** sulfotransferase; sulfation; detoxification; *SULT* family; molecular cloning

硫酸転移酵素に関するわれわれの知識はここ十年間で急速に増加しつつある。特に、生化学を基盤とした研究では困難であった性質の非常に似通った硫酸転移酵素の分離や諸性質の検討が分子生物学的手法の導入により可能となった。それにより新規硫酸転移酵素遺伝子が多数発見された。硫酸転移酵素に関する研究は 80 年代までの生化学(酵素学)の時代から 90 年代の分子生物学(遺伝子クローニング)の時代を経て、今再び生化学(構造生物学)の時代へと進みつつある。これらの研究から、硫酸転移酵素が非常に多様な生理機能に関与することが明らかとなってきた。ここでは、硫酸転移酵素のクローニングや生理機能について筆者らの研究を中心に紹介する。

### 1. はじめに

硫酸転移酵素は 1980 年代後半になるまで、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研究されてきた。このような背景から、硫酸転移酵素はわれわれ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きた。筆者らはそのような硫酸転移酵素の機能の一つとして、チロシンおよびドーパとその関連化合物の硫酸化に関する研究を行った。ラット肝臓のドーパ・チロシン硫酸転移酵素のクローニングを手始めにその後、精力的に硫酸転移酵素のクローニングを行ってきた。硫酸転移酵素のクローニングに関しては、研究対象とされたのが遅く、1990 年代中盤においてさえヒト硫酸転移酵素として 3 種類の存在しか知られていなかった。その後、クローニングを中心とした分子生物学的研究により、硫酸転移酵素(*SULT*) 遺伝子ファミリーもシト

クロム P-450 遺伝子ファミリー同様に非常に多様な分子種より構成されることが判明した。現在、筆者らはこれら硫酸転移酵素遺伝子ファミリーの生理機能を大きく四つの項目に分類して研究を行っている。

### 2. 活性硫酸 PAPS の合成と硫酸化

生体内での硫酸化はまず硫酸の活性化、すなわち 50 年代に Lipmann らにより発見された哺乳動物に普遍的な硫酸供与体としての 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) の合成が必要である<sup>1)</sup>。この PAPS は 2 段階の酵素反応により合成される。最初の反応は ATP sulfurylase により ATP と無機硫酸塩から Adenosine 5'-phosphosulfate (APS) が合成される反応であり、二つ目の反応は Adenosine 5'-phosphosulfate kinase (APS kinase) により APS と ATP から PAPS が合成される反応である(図 1)。これら二つの PAPS 合成に関与する酵素は、大腸菌やカビなどの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など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 synthetase として存在している。こうすることで生物はより効率よく PAPS が合成できるように進化してきたと考えられる<sup>2), 3)</sup>。1998 年に筆者らはヒトの 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<sup>4)</sup>。その後、PAPS synthetase は PAPS synthetase 1 と PAPS synthetase 2 の 2 種がヒトおよびマウスにおいて

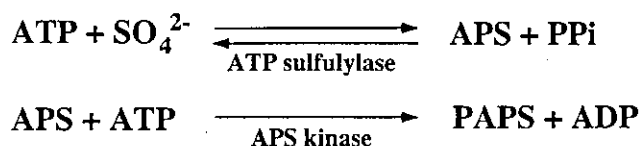


図 1 活性硫酸 PAPS (3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate) の合成

Functional diversity of sulfotransferases

Yoichi SAKAKIBARA (Department of Biochemistry and Biosciences, Faculty of Agriculture, Miyazaki University)

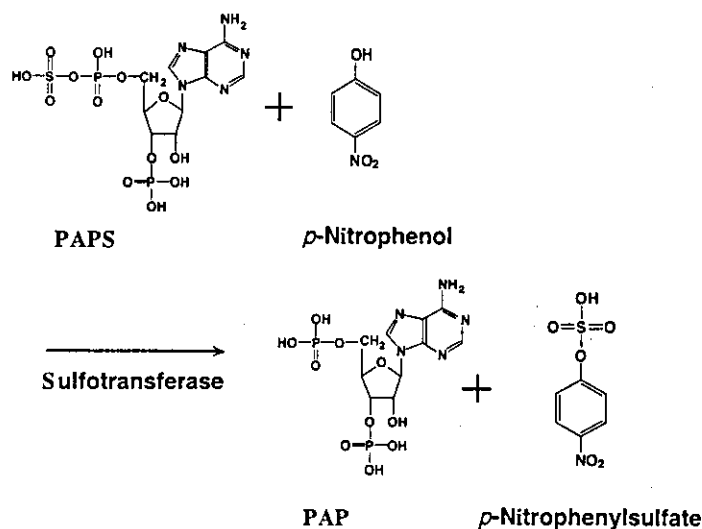


図2 p-Nitrophenolの硫酸化

存在することが報告されている<sup>5)</sup>。このことからこれらの2種類のPAPS synthetaseの発現により硫酸化が生理的に機能制御されていることも考えられる。

このようにして合成されたPAPSを用いてPAPS上の硫酸基を基質の水酸基やアミノ基の上に転移する反応が硫酸化であり図2にp-Nitrophenolを例に反応の概要をまとめた。

### 3. 哺乳動物培養細胞を用いたチロシンおよびドーバとその関連化合物の硫酸化

遊離の硫酸化チロシンは、1955年に Tallan らにより初めてヒト尿中に見いだされた<sup>6)</sup>。それ以降、ラット、マウス、ウサギなど数種の哺乳動物種からもその存在が報告されている。その後、尿中に排泄される遊離の硫酸化チロシンの起源を求めて、種々の細胞ホモジネートやフェノール硫酸転移酵素を用いて遊離のチロシンに対する酵素活性を見いだす研究が行われたが、その発見には至らなかった。

そして、1982年に Huttner らにより真核生物において広範囲のタンパク質の翻訳後修飾としてチロシン残基が硫酸化されることが報告されるに及んで、尿中に排泄される

遊離の硫酸化チロシンは、硫酸化チロシンタンパク質の分解のみによって生じると広く考えられるようになった<sup>7)</sup>。

ヒトにおいて、健康成人一人当たり1日に28 mgもの遊離硫酸化チロシンが尿中に排泄される<sup>8)</sup>。果たしてこれらの硫酸化チロシンは本当にタンパク質の分解のみによってしか生体内で生じないのか？

筆者らはヒト肝腫瘍細胞由来のHepG2細胞を用いて遊離チロシンの硫酸化が培養細胞レベルで生じていることを世界で初めて証明した<sup>9)</sup>。その後の研究でこの遊離チロシンの硫酸化はマンガンイオン依存的にヒトM型フェノール硫酸転移酵素(SULT1A3)によって触媒され、チロシンのみでなくその構造類似体であるメタチロシンやドーバも同様に硫酸化されることが明らかとなった<sup>10)</sup>。

同様な遊離チロシンの硫酸化はHepG2細胞のみでなく、Chang Liver細胞、Caco-2細胞、MDCK細胞においても同様に観察された。このことから遊離チロシンの硫酸化は哺乳動物細胞において広く見られる現象であると考えられた<sup>11)</sup>。

筆者らは遊離チロシンの硫酸化に関与するドーバ・チロシン硫酸転移酵素(D/TST)をラット肝臓から精製した。

表 ドーバ・チロシン硫酸転移酵素の精製

Purification step	Protein (mg)	Total activity (pmol/min)	Specific activity (pmol/min/mg)	Purification (-fold)
Cytosol	13,486	37,890	2.8±0.3	1
Bio-Gel HTP	2,814	33,990	12.1±0.3	4.3
DEAE Bio-Gel	710.4	23,140	32.6±1.3	11.5
ATP-agarose	37.3	9,020	241.8±6.1	85.8
2nd Bio-Gel HTP	16.9	7,380	436.7±7.4	154.9
2nd ATP-agarose	1.3	2,781	2,153.4±47.1	763.6

最終的に得られた酵素の比活性は  $2153.4 \pm 47.1$  pmol/min/mg となりラット肝臓のサイトゾルから 763.6 倍に精製された (表)<sup>12)</sup>。精製酵素は至適 pH 9.25 であり、ドーパおよびチロシンの異性体のほかにトリヨードチロニンを含む甲状腺ホルモン類、ドーパミン、および *p*-ニトロフェノールを硫酸化した。精製酵素から得られた部分アミノ酸配列をもとに cDNA クローニングを行った結果、新規サブファミリーに属する硫酸転移酵素であることが判明した<sup>12)</sup>。この研究をきっかけとし筆者らは精力的に硫酸転移酵素のクローニングを行った。

#### 4. 硫酸転移酵素遺伝子ファミリー

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<sup>13)</sup>。その後、ラットヒドロキシステロイド硫酸転移酵素<sup>14)</sup>、ヒトフェノール硫酸転移酵素<sup>15)</sup>などの 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 11 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ファミリーを形成していることが明らかとなった (図 3)。

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<sup>16)</sup>。

#### フェノール硫酸転移酵素遺伝子ファミリー

現在までにフェノール硫酸転移酵素遺伝子ファミリー (*SULT1* family) は 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。フェノール硫酸転移酵素遺伝子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代謝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<sup>15), 17), 18)</sup>。*SULT1A* サブファミリーに属する硫酸転移酵素はヒト以外にラット<sup>19)</sup>、マウス<sup>20)</sup>、ウシ<sup>21)</sup>など多数の動物種から cDNA がクローニングされ報告されている。

筆者らの研究グループにより発見したドーパ・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<sup>12)</sup>。現在ではラット以外にヒト<sup>22)</sup>、マウス<sup>23)</sup>、イ

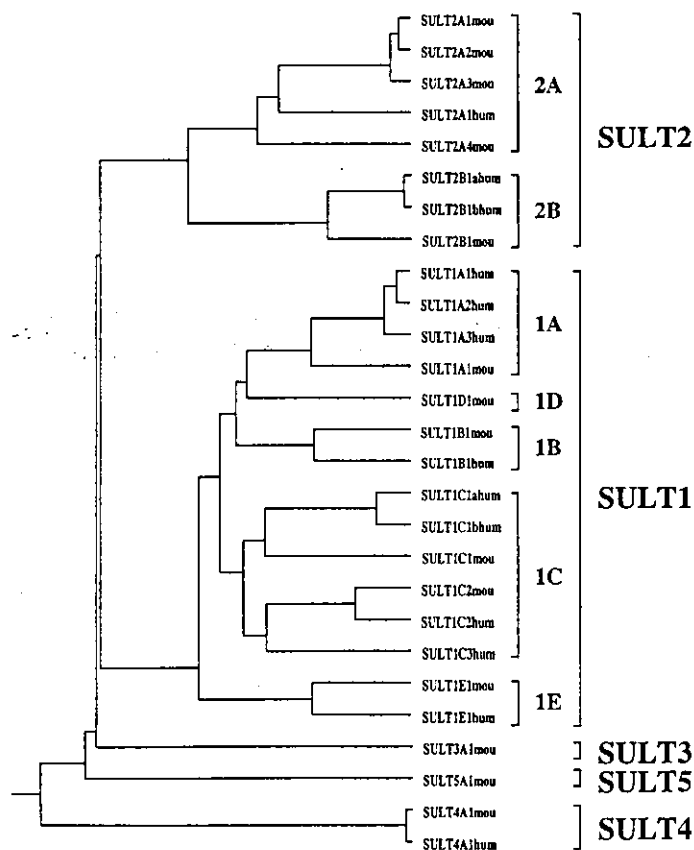


図 3 硫酸転移酵素遺伝子ファミリーの分子系統樹

ヌ<sup>24)</sup>などからその存在が報告され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。

*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<sup>25)</sup>。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する酵素と考えられ、変異原作用や発がんと密接な関係があると考えられた。筆者ら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がんと密接な関係があることを報告した<sup>26)</sup>。現在までに *SULT1C* サブファミリーに属する酵素としてはラット *SULT1C1*<sup>25)</sup>, *SULT1C2*<sup>27)</sup>, ヒトより *SULT1C2* および *SULT1C3* の2種<sup>26)</sup>, <sup>28)</sup>, ウサギ *SULT1C2*<sup>29)</sup>, マウス *SULT1C1*<sup>30)</sup> などが報告されている。

*SULT1D* サブファミリーに関しては、筆者らの研究グループによるマウス *SULT1D1* が最初の報告である。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もつことが明らかとなった<sup>31)</sup>, <sup>32)</sup>。マウス以外にはイヌ<sup>33)</sup>において報告されている。

*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に関与すると考えられている<sup>34~36)</sup>。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<sup>13)</sup>。ヒトにおいては1994年に酵素の単離よりも先に cDNA クローニングが報告された<sup>37)</sup>。 *SULT1E1* はそれ以外の動物種としてラット<sup>38)</sup>, モルモット<sup>39)</sup>, マウス<sup>40)</sup> などで報告されている。

#### 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 A と B の二つのサブファミリーから構成されている。これらは水酸基をもつステロイドホルモン類を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アン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<sup>41)</sup>。マウスでは *SULT2A* サブファミリーに少なくとも4種類の硫酸転移酵素が存在することを筆者らは見いだしている。これらはそれぞれ異なる基質特異性を示し、デヒドロエピアンドロステロンやプレグネノロンのステロイド骨格の3位の水酸基を硫酸化するもののほかに胆汁酸の7位の水酸基を特異的に硫酸化する硫酸転移酵

素が存在する。またモルモットから17位の水酸基を特異的に硫酸化するものもクローニングされて報告されている<sup>42)</sup>。

*SULT2B* サブファミリーはヒト<sup>43)</sup> およびマウス<sup>31)</sup> でその存在が報告されている。 *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ている<sup>44)</sup>。またアミノ末端のアミノ酸配列の異なるスプライズバリエーションが存在し、基質特異性がスプライシングにより変化することが報告されている<sup>45)</sup>, <sup>46)</sup>。

#### その他の硫酸転移酵素遺伝子ファミリー

細胞質硫酸転移酵素には *SULT1* および *SULT2* の2種類以外に *SULT3* から *SULT5* の全部で少なくとも5種類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<sup>47)</sup>。筆者らもマウス *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<sup>48)</sup>, <sup>49)</sup>。 *SULT4A1* の特徴としては種間でそのアミノ酸配列が非常に良く保存されており、ヒトとマウスで97%以上一致する。 *SULT5* ファミリーは筆者ら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。 *SULT5A1* に関しては、現在その機能解析を行っている。

#### 5. 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を大まかに4種に分類することができる。

- 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

#### 生体外異物の解毒代謝機構としての硫酸化

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研究として、水酸基またはアミノ基をもつ内分泌かく乱物質 (環境ホルモン) の硫酸化がある。そこで筆者らは、7種のヒト由来リコンビナント硫酸転移酵素を用いてビスフェノール A, アルキルフェノール, ジエチルstilbestrol (DES) としてエチニルエストラジオールなどの環境ホルモン候補物質に対する硫酸化を検討し報告した<sup>50)</sup>。

これらの結果をわかりやすくまとめたものが図4に示

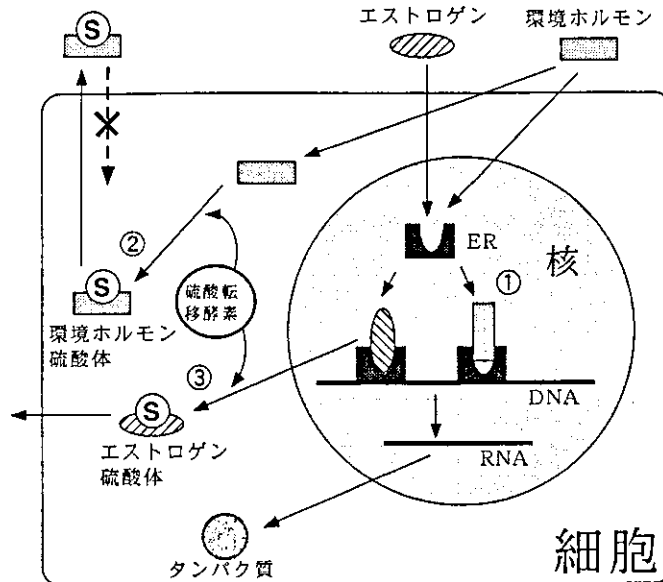


図4 内分泌かく乱物質（環境ホルモン）の硫酸化

してある。このように環境ホルモンは従来エストロゲンレセプター (ER) と結合し DNA の転写調節部位に作用し、あたかもエストロゲンが作用したときのように特定のタンパク質合成を促すことで内分泌かく乱作用を生じると考えられてきた①。しかし、筆者らの研究結果より、環境ホルモンの多くは硫酸転移酵素 (SULT) により硫酸化を受けることが明らかとなり、速やかに細胞外に出されて排泄されていくことが明らかとなった②。エストロゲンなどの本来生体をもつステロイドホルモン類も硫酸化により代謝されて濃度調節されていることが知られている③。環境ホルモンによる内分泌かく乱作用機構の一つとしてエストロゲンなどのホルモンの濃度調節に関与する硫酸転移酵素の特異的な阻害が考えられる。その結果、内因性のホルモンの生体内濃度の調節に狂いが生じ、内分泌かく乱を生じる可能性が現在指摘されている<sup>51)</sup>。

食品機能性成分の硫酸化と抗変異原作用

食品機能性成分の硫酸化および前駆変異原物質の硫酸化による代謝活性化と関係する研究として、筆者らは前駆変異原物質の硫酸化による代謝活性化を特異的に検出できる変異原試験法を考案した。この試験法は、従来から用いられている Ames 試験を改良し、S9 mix による変異原物質の代謝活性化の代わりにリコンビナント硫酸転移酵素による反応を行うものである。硫酸転移酵素としてはヒト SULT2A1 を使用し、前駆変異原物質としては硫酸化により変異原が代謝活性化されることが知られている 9-ヒドロキシメチルアントラセンを使用した。その結果、図5に示したように硫酸供与体である PAPS および硫酸転移酵素依存的に 9-ヒドロキシメチルアントラセンの変異原作用が特異的に検出された。

さらに、本試験法を用いて緑茶機能性成分の一つである

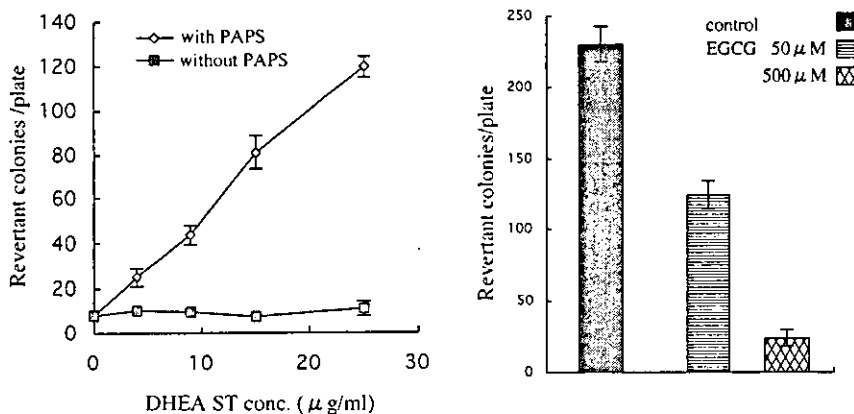


図5 硫酸転移酵素を応用した抗変異原試験

エピガロカテキンガレート (EGCG) の抗変異原作用を検討した。その結果、EGCG は非常に強い抗変異原作用を示した。その後の研究より、EGCG は硫酸転移酵素 SULT2A1 を非常に強く阻害し、その結果 9-ヒドロキシメチルアントラセンの代謝活性化を特異的に抑制するという新規抗変異原作用機構が判明した<sup>52)</sup>。

## 6. おわりに

ゲノムプロジェクトによりヒトゲノムの全塩基配列が決定され、これからのポストゲノムの時代を迎えるにあたって、薬物代謝酵素の一つである硫酸転移酵素も格好のターゲット医療の対象と考えられている。硫酸転移酵素も他の遺伝子同様に遺伝子多型 (polymorphism) が存在することが知られている<sup>53)~56)</sup>。これらの硫酸転移酵素の遺伝子多型による個体間の薬物に対する感受性の違いが明らかとなれば、投薬時に個人に最も適した薬剤の種類や投薬のさじ加減が可能となるであろう。さらに硫酸転移酵素遺伝子多型と発がんリスクの関係や食品機能性成分の個体間の有効性の差と硫酸化の関係など興味の尽きない研究分野としてますます発展していくことが考えられる。

**謝 辞** 本研究は主に宮崎大学農学部およびテキサス大学ヘルスセンタータイラー校において行われたものであり、本研究の機会を与えてくださり、終始ご指導、ご鞭撻をいただきました水光正仁先生 (宮崎大学教授) および Ming-Cheh Liu 先生 (テキサス大学ヘルスセンター準教授) に心より感謝いたします。有益なご指導とご鞭撻をいただきました中山建男先生 (宮崎医科大学化学第二講座教授) および高見恭成先生 (宮崎医科大学化学第二講座助教授) に心より感謝いたします。研究を行うにあたりご協力をいただきました中島 宏博士 (ユニチカ、現 赤穂化成) をはじめとする共同研究者の皆様にも心より御礼申し上げます。最後になりましたがご支援を賜りました諸先生方に厚く御礼申し上げます。

本研究は厚生労働科学研究費「萌芽的先端医療技術推進研究事業 (トキシコゲノミクス)」および文部科学研究費「基盤研究 B、若手研究 B」の支援により遂行されている。

- 1) P. W. Robbins and F. Lipmann: *J. Biol. Chem.*, **229**, 837-851 (1957).
- 2) H. Li, A. Deyrup, J. R. Mensch, Jr., M. Domowicz, A. K. Konstantinidis and N. B. Schwartz: *J. Biol. Chem.*, **270**, 29453-29459 (1995).
- 3) E. Rosenthal and T. Leustek: *Gene*, **165**, 243-248 (1995).
- 4) K. Yanagisawa, Y. Sakakibara, M. Suiko, Y. Takami, T. Nakayama, H. Nakajima, K. Takayanagi, Y. Natori, and M.-C. Liu: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1037-1040 (1998).
- 5) K. Kurima, M. L. Warman, S. Krishnan, M. Domowicz, R. C. Krueger, Jr., A. Deyrup, and N. B. Schwartz: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 8681-8685 (1998).
- 6) H. H. Tallan, S. T. Bella, W. H. Stein, and S. Moore: *J. Biol. Chem.*, **217**, 703-708 (1955).
- 7) W. B. Huttner: *Nature*, **299**, 273-276 (1982).
- 8) M. Suiko, P. H. Fernando, Y. Arino, M. Terada, S. Nakatsu, and M.-C. Liu: *Clin. Chim. Acta*, **193**, 193-197 (1990).
- 9) Y. Sakakibara, M. Suiko, and M.-C. Liu: *Eur. J. Biochem.*, **226**, 293-301 (1994).
- 10) Y. Sakakibara, J. Katafuchi, Y. Takami, T. Nakayama, M. Suiko, H. Nakajima, and M.-C. Liu: *Biochim. Biophys. Acta*, **1355**, 102-106 (1997).
- 11) Y. Sakakibara, M. Suiko, H. Nakajima, and M.-C. Liu: *Biochem. J.*, **305**, 993-998 (1995).
- 12) Y. Sakakibara, Y. Takami, C. Zwieb, T. Nakayama, M. Suiko, H. Nakajima, and M.-C. Liu: *J. Biol. Chem.*, **270**, 30470-30478 (1995).
- 13) A. R. Nash, W. K. Glenn, S. S. Moore, J. Kerr, A. R. Thompson, and E. O. Thompson: *Aust. J. Biol. Sci.*, **41**, 507-516 (1988).
- 14) K. Ogura, J. Kajita, H. Narihata, T. Watabe, S. Ozawa, K. Nagata, Y. Yamazoe, and R. Kato: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**, 168-174 (1989).
- 15) T. W. Wilborn, K. A. Comer, T. P. Dooley, I. M. Reardon, R. L. Henrikson, and C. N. Falany: *Mol. Pharmacol.*, **43**, 70-77 (1993).
- 16) R. M. Weinshilboum, D. M. Otterness, I. A. Aksoy, T. C. Wood, C. Her, and R. B. Raftogianis: *FASEB J.*, **11**, 3-14 (1997).
- 17) S. Ozawa, K. Nagata, M. Shimada, M. Ueda, T. Tsuzuki, Y. Yamazoe, and R. Kato: *Pharmacogenetics*, **5**, S135-S140 (1995).
- 18) T. C. Wood, I. A. Aksoy, S. Aksoy, and R. M. Weinshilboum: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **198**, 1119-1127 (1994).
- 19) S. Ozawa, K. Nagata, D. W. Gong, Y. Yamazoe, and R. Kato: *Nucl. Acids Res.*, **18**, 4001 (1990).
- 20) A. N. Kong, M. Ma, D. Tao, and L. Yang: *Biochim. Biophys. Acta*, **1171**, 315-318 (1993).
- 21) S. J. Schauss, T. Henry, R. Palmatier, L. Halvorson, R. Dannenbring, and J. D. Beckmann: *Biochem. J.*, **311**, 209-217 (1995).
- 22) K. Fujita, K. Nagata, S. Ozawa, H. Sasano, and Y. Yamazoe: *J. Biochem. (Tokyo)*, **122**, 1052-1061 (1997).
- 23) Y. Saeki, Y. Sakakibara, Y. Araki, K. Yanagisawa, M. Suiko, H. Nakajima, and M.-C. Liu: *J. Biochem. (Tokyo)*, **124**, 55-64 (1998).
- 24) C. Tsoi, C. N. Falany, R. Morgenstern, and S. Swedmark: *Arch. Biochem. Biophys.*, **390**, 87-92 (2001).
- 25) K. Nagata, S. Ozawa, M. Miyata, M. Shimada, D. W. Gong, Y. Yamazoe, and R. Kato: *J. Biol. Chem.*, **268**, 24720-24725 (1993).
- 26) Y. Sakakibara, K. Yanagisawa, J. Katafuchi, D. P. Ringer, Y. Takami, T. Nakayama, M. Suiko, and M.-C. Liu: *J. Biol. Chem.*, **273**, 33929-33935 (1998).
- 27) L. Xiangrong, C. Johnk, D. Hartmann, F. Schestag, W. Kromer, and V. Gieselmann: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **272**, 242-250 (2000).
- 28) C. Her, G. P. Kaur, R. S. Athwal, and R. M. Weinshilboum: *Genomics*, **41**, 467-470 (1997).
- 29) N. Hehonah, X. Zhu, L. Brix, R. Bolton-Grob, A. Barnett,

- K. Windmill, and M. McManus: *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **31**, 869-882 (1999).
- 30) H. O. Tamura, Y. Harada, A. Miyawaki, K. Mikoshiba, and M. Matsui: *Biochem. J.*, **331**, 953-958 (1998).
- 31) Y. Sakakibara, K. Yanagisawa, Y. Takami, T. Nakayama, M. Suiko, and M.-C. Liu: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247**, 681-686 (1998).
- 32) M. C. Liu, Y. Sakakibara, and C.-C. Liu: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **254**, 65-69 (1999).
- 33) C. Tsoi, C. N. Falany, R. Morgenstern, and S. Swedmark: *Biochem. J.*, **356**, 891-897 (2001).
- 34) S. C. Brooks, C. Christensen, S. Meyers, J. Corombos, and B. A. Pack: in "Steroids and Endometrial Cancer," V. M. Jasonni *et al.*, Raven Press, New York, 1983, pp. 145-155.
- 35) A. K. Roy: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1999**, 265-272.
- 36) R. Hobkirk: *Steroid Sulfation*, **4**, 69-74 (1993).
- 37) I. A. Aksoy, T. C. Wood, and R. M. Weinshilbom: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**, 1621-1629 (1994).
- 38) W. F. Demyan, C. S. Song, D. S. Kim, S. Her, W. Gallwitz, T. R. Rao, M. Slomczynska, B. Chatterjee, and A. K. Roy: *Mol. Endocrinol.*, **6**, 589-597 (1992).
- 39) T. Oeda, Y. C. Lee, W. J. Driscoll, H. C. Chen, and C. A. Strott: *Mol. Endocrinol.*, **6**, 1216-1226 (1992).
- 40) W. C. Song, R. Moore, J. A. McLachlan, and M. Negishi: *Endocrinology*, **136**, 2477-2484 (1995).
- 41) D. M. Otterness, E. D. Wieben, T. C. Wood, W. G. Watson, B. J. Madden, D. J. McCormick, and R. M. Weinshilbom: *Mol. Pharmacol.*, **41**, 865-872 (1992).
- 42) Y. C. Lee, C. S. Park, and C. A. Strott: *J. Biol. Chem.*, **269**, 15838-15845 (1994).
- 43) C. Her, T. C. Wood, E. E. Eichler, H. W. Mohrenweiser, L. S. Ramagli, M. J. Siciliano, R. M. Weinshilbom: *Genomics*, **53**, 284-295 (1998).
- 44) N. B. Javitt, Y. C. Lee, C. Shimizu, H. Fuda, and C. A. Strott: *Endocrinology*, **142**, 2978-2984 (2001).
- 45) H. Fuda, Y. C. Lee, C. Shimizu, N. B. Javitt, and C. A. Strott: *J. Biol. Chem.*, **277**, 36161-36166 (2002).
- 46) C. Shimizu, H. Fuda, H. Yanai, and C. A. Strott: *Endocrinology*, **144**, 1186-1193 (2003).
- 47) T. Shiraga, K. Iwasaki, T. Hata, K. Yoshinari, K. Nagata, Y. Yamazoe, and Y. Ohno: *Arch. Biochem. Biophys.*, **362**, 265-274 (1999).
- 48) C. N. Falany, X. Xie, J. Wang, J. Ferrer, and J. L. Falany: *Biochem. J.*, **346**, 857-864 (2000).
- 49) Y. Sakakibara, M. Suiko, T. G. Pai, T. Nakayama, Y. Takami, J. Katafuchi, and M.-C. Liu: *Gene*, **285**, 39-47 (2002).
- 50) M. Suiko, Y. Sakakibara, and M.-C. Liu: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **267**, 80-84 (2000).
- 51) 榎原陽一, 水光正仁: *化学と生物*, **38**, 776-778 (2000).
- 52) 榎原陽一, 水野貴之, M.-C. Liu, 水光正仁: *ニューフードインダストリー* (印刷中).
- 53) R. B. Raftogianis, T. C. Wood, D. M. Otterness, J. A. Van Loon, and R. M. Weinshilbom: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **239**, 298-304 (1997).
- 54) S. Ozawa, Y. M. Tang, Y. Yamazoe, R. Kato, N. P. Lang, and F. F. Kadlubar: *Chem. Biol. Interact.*, **109**, 237-248 (1998).
- 55) M. W. Coughtrie, R. A. Gilissen, B. Shek, R. C. Strange, A. A. Fryer, P. W. Jones, and D. E. Bamber: *Biochem. J.*, **337**, 45-49 (1999).
- 56) A. Iida, A. Sekine, S. Saito, Y. Kitamura, T. Kitamoto, S. Osawa, C. Mishima, and Y. Nakamura: *J. Hum. Genet.*, **46**, 225-240 (2001).



# 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—

Post-translational modification by tyrosine sulfation  
—Characterization of tyrosylprotein sulfotransferases—

宮崎大学農学部応用生物科学科

\*テキサス大学ヘルスセンター

榊原 陽一 Yoichi SAKAKIBARA

三城 恵美 Emi MISHIRO

ミン・チェリュウ\* Ming-Chen LIU

水光 正仁 Masahito SUIKO

**Key words:** tyrosylprotein sulfotransferase; post-translational modification; sulfation

## 1. はじめに

タンパク質の翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化は、タンパク質の分泌のためのシグナルまたは生理活性の調節に関与すると考えられてきた。タンパク質のチロシン硫酸化は1954年にウシFibrinopeptide B中に見いだされた<sup>1)</sup>。その後、いくつかの生理活性ペプチド中のみ見いだされて報告されたことから、1982年になってHuttnerらにより生体内の広範囲のタンパク質がチロシン硫酸化されていることが報告されるまで非常にまれな翻訳後修飾と考えられてきた<sup>2)</sup>。ここでは、この翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化に関する酵素 tyrosylprotein sulfotransferase (TPST) に関する生化学的諸性質を中心に紹介する。

## 2. Tyrosylprotein sulfotransferase (TPST) 研究の歴史

タンパク質チロシン残基の硫酸化にはゴルジ体の酵素 tyrosylprotein sulfotransferase (TPST) が関与することが知られていた。TPST は1983年にPC12細胞の細胞抽出液中に初めてその酵素活性が見いだされた<sup>3)</sup>。その後、ゴルジ体粗画分を用いてその生化学的諸性質が検討された。TPST もその他の硫酸転移酵素と同様に硫酸供与体として3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) を利用する。タンパク質のチロシン残基の硫酸化はこのPAPSからチロシン残基のOH基への硫酸基の転移反応である(図1)。タンパク質は粗面小胞体で生合成された後にゴルジ体に運ばれ、ゴルジ体の最終画分であるトランスゴルジネットワークに局在するTPSTによりチロシン残基の硫酸化を受ける。このように、チロシン硫酸化のター

ゲットとなるタンパク質は分泌タンパク質または細胞表面の膜タンパク質であり、チロシン硫酸化が分泌のためのシグナルとして機能している可能性が考えられている<sup>4)</sup>。われわれの研究グループはゴルジ体を多く含むミクロゾーム膜画分から硫酸化チロシンに特異的に結合するタンパク質 (tyrosine-O-sulfate binding protein) を精製し、硫酸化チロシンをシグナルとしたレセプター依存的なタンパク質選別輸送機構の可能性を報告した<sup>5)</sup>。

チロシン硫酸化に関するコンセンサス配列は厳密に決定されていないが、タンパク質のチロシン硫酸化部位の分析結果よりその周辺環境に共通項目が見いだされている。

- 1) チロシン残基の-1の位置に酸性アミノ酸がある、または-5から+5に位置に少なくとも三つの酸性アミノ酸が存在すること。
- 2) プロリンやグリシンといった折れ曲がりを誘導するアミノ酸が-7から-2または+1から+7の位置に多く

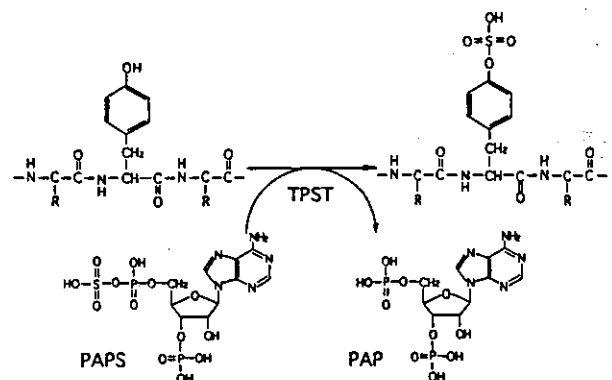


図1 翻訳後修飾としてのチロシン残基硫酸化  
TPST: tyrosylprotein sulfotransferase, PAPS: 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate, PAP: 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate.

見られること。

3) 疎水性アミノ酸が比較的少なく硫酸化されるチロシン残基がタンパク質の表面に露出していること。

4) ジスルフィド結合やN-結合型糖鎖といった障害となるような他の修飾が硫酸化されるチロシン残基の近くに存在しないこと。

これらの情報を基に合成オリゴペプチドを用いた TPST の諸性質の検討が行われてきた<sup>6),7)</sup>。われわれもウシ肝臓とウシ心臓のマイクロゾーム画分を用いた TPST の諸性質の検討を行い報告してきた<sup>8),9)</sup>。しかしながら、TPST は細胞内での発現量も少なく、われわれの研究報告も含めて諸性質に関する研究のほとんどはゴルジ体を多く含むマイクロゾーム画分の Triton X-100 抽出画分を用いて行われた。1990年にウシ副腎髄質より初めて TPST は基質ペプチドをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーにより16万倍に精製された<sup>10)</sup>。TPST の精製によりタンパク質のチロシン硫酸化に関する研究は飛躍的に発展することが期待された、にもかかわらず TPST を含めたチロシン硫酸化に関する研究は生化学主体の研究から分子生物学や細胞生物学的研究はなかなか導入されなかった。精製が報告されてから8年の月日が費やされ、1998年になり初めて TPST の cDNA クローニングが報告された<sup>11)</sup>。その後の研究より、ヒトをはじめ哺乳動物に TPST1 および TPST2 の2種の異なる TPST がゲノム上に異なる遺伝子として存在することが判明した<sup>12),13)</sup>。現在、われわれはこれらの異なる TPST の発現調節によって、基質タンパク質の機能が多様化している可能性を想定し研究を行っている。

### 3. Tyrosylprotein sulfotransferase (TPST) の諸性質の比較検討

ゲノムプロジェクトが終了した現在、ポストゲノム時代と呼ばれている。ゲノムプロジェクトの結果より予想された遺伝子の数は3から4万個と当初予想されていた10万個以上から比べると非常に少ないものであった。そこで、ヒトをはじめとした生物は翻訳後修飾などにより少ない遺伝子からより多くの多様な機能をもったタンパク質を生合成していると考えられている。このような観点から、タンパク質チロシン残基の硫酸化もタンパク質の生理機能の調節や多様化に関与していることが考えられた。そこで、われわれはヒトで2種類存在している tyrosylprotein sulfotransferase (TPST) の諸性質を比較検討し、2種類の TPST 遺伝子の使い分けでタンパク質の生理機能が多様化している可能性について検討した。

2種類のヒト TPST は PCR によるクローニングを行っ

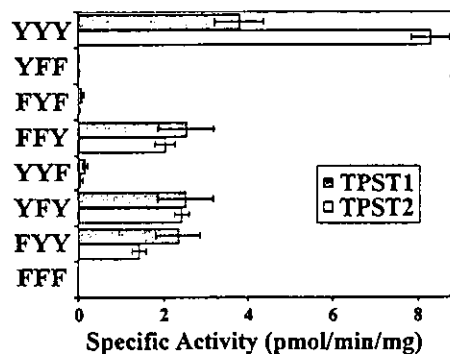


図2 ヒト tyrosylprotein sulfotransferase による PSGL-1 をモデルとしたペプチドへの基質特異性 TPST1: tyrosylprotein sulfotransferase-1, TPST2: tyrosylprotein sulfotransferase-2.

た後に哺乳動物細胞発現ベクター pcDNA3 にサブクローニングし、293T細胞へリポフェクタミンを用いて導入した。一過性に発現した TPST1 および TPST2 は細胞から膜画分を調製後 Triton X-100 による可溶化を行い粗酵素画分とした。293T細胞で一過性に発現した TPST の基質ペプチドに対する特異性を図2に示した。基質ペプチドはチロシン残基が硫酸化されていると報告されている P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) のチロシン硫酸化部位をモデルとした。基質ペプチドは ATEYEYLDYDFL (YYY) をもとにチロシン残基をそれぞれフェニルアラニンに置換した YFF, FYF, FFY, YYF, YFY, FYY, FFF の8種類について基質特異性を検討した。その結果、293T細胞で一過性に発現した TPST1 および TPST2 とともに3番目のチロシン残基をもつ基質ペプチドを効率良く硫酸化したことから、3番目のチロシンすなわちC末端に近いチロシン残基を効率良く硫酸化することが考えられた(図2)。

次に、293T細胞で一過性に発現した TPST1 および TPST2 の基質ペプチド ATEYEYLDYDFL (YYY) に対する反応速度定数の決定を行った。その結果、TPST1 は YYY に対する  $K_m = 19.32 \mu\text{M}$ ,  $V_{\text{max}} = 3.95 \text{ pmol/min/mg}$  となり、TPST2 は YYY に対する  $K_m = 207.95 \mu\text{M}$ ,  $V_{\text{max}} = 95.24 \text{ pmol/min/mg}$  となった(図3)。これらの結果は、今回使用した基質ペプチド YYY に対しては TPST1 が高親和性を示したが、反応効率である  $V_{\text{max}}/K_m$  の値で比較すると TPST1 が 0.204, TPST2 が 0.458 となり TPST2 が2倍以上効率よく硫酸化することが判明した。

以上述べたようにわれわれの研究から、TPST1 および TPST2 は共に基質ペプチド YYY のC末端に近いチロシン残基を硫酸化することが判明した。最近、CCR5をモデルとした4つのチロシン残基をもつ基質ペプチドを用いた研究では、やはり同様にC末端に近いチロシン残基を効

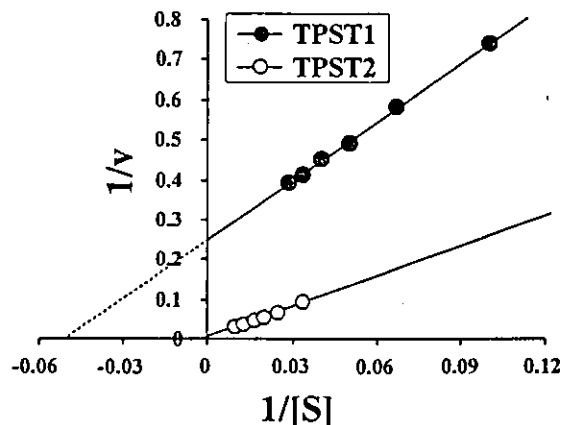


図3 PSGL-1をモデルとしたペプチド ATEYEYLDYDFL (YYY) に対する Lineweaver-Burk プロット  
TPST1: tyrosylprotein sulfotransferase-1, TPST2: tyrosylprotein sulfotransferase-2.

率良く硫酸化することが報告されている<sup>14)</sup>。以前に CCR5 の全長を用いた報告ではこれら4つのチロシン残基の中でN端に近いものが硫酸化されていることが報告されていた<sup>15)</sup>。これらの結果より、TPSTの基質の認識は前後のアミノ酸配列のみではなくタンパク質の立体構造などの影響も重要だと考えられた。そのため、TPSTの諸性質を比較検討するためには、短いペプチドではなくタンパク質を基質とした研究の必要性が考えられた。これからの課題としては、TPST1およびTPST2のタンパク質を基質とした特異性の比較検討と、それぞれのTPSTにより硫酸化されたタンパク質の機能に関する検討が不可欠である。

ポストゲノム時代のチロシン硫酸化に関する研究としては、リン酸化タンパク質で現在行われているプリカーサーイオンスキャン法<sup>16)</sup>などによる質量分析装置を最大限に利用した硫酸化タンパク質の網羅的解析法の開発が待ち望ま

れている。

また本研究は文部科学研究費「特定領域研究(ゲノム生物学)」の支援により遂行されている。

- 1) F. R. Bettelheim: *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 2838-2839 (1954).
- 2) W. B. Huttner: *Nature*, 299, 273-276 (1982).
- 3) R. W. Lee and W. B. Huttner: *J. Biol. Chem.*, 258, 11326-11334 (1983).
- 4) W. B. Huttner: *Annu. Rev. Physiol.*, 50, 363-376 (1988).
- 5) J. Liu, J. R. Han, C.-C. Liu, M. Suiko and M.-C. Liu: *Biochem. J.*, 294, 407-417 (1993).
- 6) C. Niehrs, M. Kraft, R. W. Lee, and W. B. Huttner: *J. Biol. Chem.*, 265, 8525-8532 (1990).
- 7) W. H. Lin, K. Larsen, G. L. Hortin, and J. A. Roth: *J. Biol. Chem.*, 267, 2876-2879 (1992).
- 8) M. Suiko, P. H. Fernando, Y. Sakakibara, H. Nakajima, M.-C. Liu, S. Abe and S. Nakatsu: *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 27, 183-184 (1992).
- 9) M. Suiko, P. H. Fernando, Y. Sakakibara, H. Kudo, T. Nakamura, and M.-C. Liu: *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 43, 485-490 (1997).
- 10) C. Niehrs, and W. B. Huttner: *EMBO J.*, 9, 35-42 (1990).
- 11) Y. Ouyang, W. S. Lane, and K. L. Moore: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 2896-2901 (1998).
- 12) Y. Ouyang and K. L. Moore: *J. Biol. Chem.*, 273, 24770-24774 (1998).
- 13) R. Beisswanger, D. Corbeil, C. Vannier, C. Thiele, U. Dohrmann, R. Kellner, K. Ashma, C. Niehrs, and W. B. Huttner: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 11134-11139 (1998).
- 14) C. Seibert, M. Cadene, A. Sanfiz, B. T. Chait, and T. P. Sakmar: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 11031-11036 (2002).
- 15) M. Farzan, T. Mirzabekov, P. Kolchinsky, R. Wyatt, M. Cayabyab, N. P. Gerard, C. Gerard, J. Sodroski, and H. Choe: *Cell*, 96, 667-676 (1999).
- 16) C. Borchers, C. E. Parker, L. J. Deterding, and K. B. Tomer: *J. Chromatogr. A*, 854, 119-130 (1999).



## Characterization of a zebrafish estrogen-sulfating cytosolic sulfotransferase: inhibitory effects and mechanism of action of phytoestrogens

Kei Ohkimoto<sup>a</sup>, Ming-Yih Liu<sup>a,b</sup>, Masahito Suiko<sup>a</sup>,  
Yoichi Sakakibara<sup>a</sup>, Ming-Cheh Liu<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Biomedical Research Center, The University of Texas Health Center, 11937 US Highway 271, Tyler, TX 75708, USA

<sup>b</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, The University of Georgia, Athens, GA 30602, USA

Received 21 July 2003; received in revised form 21 August 2003; accepted 18 September 2003

### Abstract

Cytosolic sulfotransferases (STs) are generally thought to be involved in detoxification of xenobiotics, as well as homeostasis of endogenous compounds such as thyroid/steroid hormones and catecholamine hormones/neurotransmitters. We report here the identification and characterization of a zebrafish estrogen-sulfating cytosolic ST. The zebrafish ST was bacterially expressed, purified, and examined for enzymatic activities using a variety of endogenous compounds as substrates. Results showed that the enzyme displayed much higher activities toward two endogenous estrogens, estrone (E<sub>1</sub>) and 17β-estradiol (E<sub>2</sub>), in comparison with thyroid hormones, 3,3',5-triiodothyronine (T<sub>3</sub>) and thyroxine (T<sub>4</sub>), dopamine, dihydroxyphenylalanine (Dopa), and dehydroepiandrosterone (DHEA). The kinetic parameters,  $K_m$ , and  $V_{max}$ , with estrogens and thyroid hormones as substrates were determined. The calculated  $V_{max}/K_m$  for E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, and T<sub>4</sub> were, respectively, 31.6, 16.7, 1.5, and 0.8 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> μM<sup>-1</sup>, indicating clearly the estrogens being preferred physiological substrates for the enzyme. The inhibitory effects of isoflavone phytoestrogens on the sulfation of E<sub>2</sub> by this zebrafish ST were examined. The IC<sub>50</sub> determined for quercetin, genistein, and daidzein were 0.7, 2.5, and 8 μM, respectively. Kinetic analyses revealed that the mechanism underlying the inhibition by these isoflavones to be of the competitive type.

© 2003 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Sulfotransferase; Estrogen; Zebrafish; Phytoestrogen

### 1. Introduction

In mammals, the cytosolic sulfotransferases (STs) constitute a group of enzymes that catalyze the transfer of a sulfonyl group from the active sulfate, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) [1], to substrate compounds containing hydroxyl or amino groups [2–5]. Such sulfation reactions are generally

**Abbreviations:** ST, sulfotransferase; PAPS, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

\* Corresponding Author. Tel.: +1-903-877-2862; fax: +1-903-877-2863.

E-mail address: [ming.liu@uthct.edu](mailto:ming.liu@uthct.edu) (M.-C. Liu).

thought to serve for detoxification of xenobiotics, as well as biotransformation of endogenous compounds such as steroid and thyroid hormones, catecholamines, and bile acids [2–5]. Despite a considerable amount of work carried out in the past two decades, the physiological involvement of the various cytosolic STs, to a large extent, still remain unclear. Moreover, only fragmentary information is available concerning the cell type/tissue/organ-specific expression of the different cytosolic STs, and very little is known with regard to the ontogeny of these enzymes. To resolve these outstanding issues, a suitable animal model is required.

Zebrafish has in recent years emerged as a popular animal model for a wide range of studies [6,7]. Its advantages, compared with mouse, rat, or other vertebrate animal models, include the small size, availability of relatively large number of eggs, rapid development externally of virtually transparent embryo, short generation time, etc. These unique characteristics of the zebrafish make it an excellent model for a systematic investigation on the ontogeny, cell type/tissue/organ-specific expression, and physiological involvement of individual cytosolic STs. A prerequisite for using zebrafish in these studies, however, is the identification of the various cytosolic STs and their functional characterization. We have recently embarked on the molecular cloning of zebrafish cytosolic STs [8–10]. Sequence analysis via BLAST search revealed that the zebrafish cytosolic STs we have cloned [8–10] display sequence homology to mammalian cytosolic STs. Preliminary characterization of several recombinant zebrafish cytosolic STs that have been expressed and purified revealed that one of them, designated SULT1 ST #2, displayed a strong sulfating activity toward estrone ( $E_1$ ), an endogenous estrogen. While their physiological levels have not yet been determined, both the two major endogenous estrogens,  $E_1$  and  $E_2$ , have been shown to exert estrogenic effects in zebrafish, leading to the induction of the expression of, for example, vitellogenin [11,12]. Whether SULT1 ST #2, like the estrogen ST (EST) in mammals [13], is involved in the homeostasis of estrogens in zebrafish therefore poses an interesting issue.

We report here the characterization of the zebrafish estrogen-sulfating SULT1 ST #2. The enzyme, bacterially expressed and purified, was examined with respect

to its substrate specificity. Kinetic parameters of the sulfation of endogenous estrogens were determined. Moreover, the inhibitory effects of isoflavone phytoestrogens on  $17\beta$ -estradiol sulfation by this zebrafish estrogen-sulfating ST and the underlying mechanism were studied.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Estrone (1,3,5[10]-estratrien-3-ol-17-one;  $E_1$ ),  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), 3,3',5-triiodo-L-thyronine ( $T_3$ ; sodium salt), thyroxine ( $T_4$ ), dopamine, dehydroepiandrosterone (DHEA), L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-Dopa), quercetin, daidzein, genistein, adenosine 5'-triphosphate (ATP), sodium dodecyl sulfate (SDS), aprotinin, thrombin, *N*-2-hydroxylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES), Trizma base, dithiothreitol (DTT), isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG), and dimethyl sulfoxide (DMSO) were products of Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Zebrafish SULT1 ST #2 cDNA (GenBank accession number: AY181065) packaged in pGEX-2TK glutathione *S*-transferase (GST) gene fusion vector was prepared as previously described [9]. BL21 *E. coli* host strain was from Stratagene. Glutathione Sepharose 4B was product of Amersham Biosciences. Recombinant human bifunctional ATP sulfurylase/adenosine 5'-phosphosulfate kinase was prepared as described previously [14]. Cellulose thin-layer chromatography (TLC) plates were products of EM Science. Carrier-free sodium [ $^{35}$ S]sulfate was from ICN Biomedicals. All other reagents were of the highest grades commercially available.

### 2.2. Expression and purification of recombinant zebrafish SULT1 ST #2

BL21 cells, transformed with pGEX-2TK harboring zebrafish SULT1 ST #2 cDNA, were grown in 1 L of LB broth containing  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  ampicillin. After the cell density reached  $0.7 \text{ OD}_{600 \text{ nm}}$ ,  $0.1 \text{ mM}$  IPTG was added to induce the expression of recombinant zebrafish SULT1 ST #2. After an overnight induction at room temperature, cells were collected by centrifugation and homogenized in 20 ml of a lysis buffer

(50 mM Tris–HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, and 1 mM EDTA) using an Aminco French Press. Twenty microliters of  $10 \text{ mg ml}^{-1}$  aprotinin (a protease inhibitor) was added to the crude homogenate. The crude homogenate was centrifuged at  $10,000 \times g$  for 30 min at  $4^\circ\text{C}$  to pellet the particulate fraction. The zebrafish SULT1 ST #2–GST fusion protein present in the supernatant collected was fractionated by equilibrating with 1.5 ml of glutathione Sepharose for 30 min at  $4^\circ\text{C}$ , and the bound fusion protein was treated with 2 ml of a thrombin digestion buffer (50 mM Tris–HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, and 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) containing  $5 \text{ unit ml}^{-1}$  bovine thrombin. After a 30-min digestion at room temperature, the preparation was centrifuged. The recombinant zebrafish SULT1 ST #2 present in the supernatant was shown to be homogeneous upon SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE). Purified zebrafish SULT1 ST #2 was then determined for protein concentration and used in the enzymatic assays.

### 2.3. Enzymatic assay

The ST assays were performed using  $\text{PAP}^{[35\text{S}]}$  as the sulfuryl group donor. The standard assay reaction mixture contained, in a final volume of  $25 \mu\text{l}$ , 50 mM HEPES, pH 7.0, and  $14 \mu\text{M}$   $\text{PAP}^{[35\text{S}]}$  ( $15 \text{ Ci mmol}^{-1}$ ). The substrate, dissolved in DMSO (for  $\text{E}_1$ ,  $\text{E}_2$ ,  $\text{T}_3$ ,  $\text{T}_4$ , DHEA, quercetin, daidzein, and genistein) or  $\text{H}_2\text{O}$  (for L-Dopa and dopamine) at 10 times the final concentration ( $50 \mu\text{M}$ ) in the assay mixture, was added subsequent to HEPES buffer and  $\text{PAP}^{[35\text{S}]}$ . Controls with DMSO or  $\text{H}_2\text{O}$  alone were also prepared. The reaction was started by the addition of enzyme ( $0.025 \mu\text{g}$ ), allowed to proceed for 3 min at  $28^\circ\text{C}$ , and stopped by placing the assay mixture-containing thin-wall tube on a heating block, pre-heated to  $100^\circ\text{C}$ , for 2 min. Upon brief centrifugation to pellet down the precipitates,  $1 \mu\text{l}$  aliquot of the reaction mixture was spotted on a cellulose TLC plate. The TLC plate was then subjected to ascending TLC for the analysis of  $^{[35\text{S}]}$  sulfated product using a solvent system containing *n*-butanol; isopropanol; 88% formic acid;  $\text{H}_2\text{O}$  in a 2:1:1:2 ratio by volume [15]. Afterwards, the plate was air-dried and autoradiographed. The radioactive spot on the TLC plate due to the  $^{[35\text{S}]}$  sulfated product was cut out and eluted by shaking in  $0.5 \text{ ml}$   $\text{H}_2\text{O}$  in a glass vial. Four milliliters of scintillation fluid

was then added to the vial, thoroughly mixed, and the radioactivity counted using a liquid scintillation counter. The count obtained was used to calculate the specific activity of the enzyme in unit of  $\text{nmol}$  sulfated product formed  $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  enzyme. Based on the efficiency of scintillation counting, the estimated limit of detection for this procedure was approximately  $0.1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  enzyme.

For the kinetic studies on the sulfation of endogenous estrogens ( $\text{E}_1$  and  $\text{E}_2$ ) and thyroid hormones ( $\text{T}_3$  and  $\text{T}_4$ ), varying concentrations (ranging from 5 to  $20 \mu\text{M}$ ) of these latter substrate compounds and 50 mM HEPES at pH 7.0 were used. To determine the inhibitory effects of quercetin, genistein, and daidzein, enzymatic assays in the presence of varying concentrations ( $0$ – $50 \mu\text{M}$ ) of these phytoestrogens (dissolved in DMSO at 10 times the final concentrations) were performed with  $50 \mu\text{M}$   $17\beta$ -estradiol as substrate. To investigate the mechanism underlying the inhibition of the sulfation of  $17\beta$ -estradiol by quercetin or genistein, enzymatic assays using varying concentrations ( $5$ – $20 \mu\text{M}$ ) of  $17\beta$ -estradiol in the presence or absence of fixed concentrations of quercetin ( $0$ ,  $0.5$ ,  $0.75$ , and  $0.9 \mu\text{M}$ ) or genistein ( $0$ ,  $1$ ,  $2.5$ , and  $6 \mu\text{M}$ ), dissolved in DMSO at 10 times the final concentrations, were performed.

### 2.4. Miscellaneous methods

$\text{PAP}^{[35\text{S}]}$  (carrier-free) was synthesized from ATP and carrier-free  $^{[35\text{S}]}$ sulfate using the human bifunctional ATP sulfurylase/APS kinase as described previously [14]. The  $\text{PAP}^{[35\text{S}]}$  synthesized was then adjusted to a specific activity of  $15 \text{ Ci mmol}^{-1}$  at a concentration of  $1.4 \text{ mM}$  by the addition of cold PAPS. SDS–PAGE was performed on a 12% polyacrylamide gel using the method of Laemmli [16]. Protein determination was based on the method of Bradford with bovine serum albumin as the standard [17].

## 3. Results and discussion

The present study represents part of an overall effort to develop zebrafish as a model for a systematic investigation on the physiological involvement, as well as ontogeny and cell type/tissue/organ-specific expression of cytosolic ST enzymes. As mentioned earlier,

Table 1  
Specific activity of the zebrafish SULT1 ST #2 with endogenous compounds and phytoestrogens as substrates<sup>a</sup>

Substrate	Specific activity (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )
Estrone (E <sub>1</sub> )	80.5 ± 4.7
17β-Estradiol (E <sub>2</sub> )	91.6 ± 5.9
3,3',5-Triiodothyronine (T <sub>3</sub> )	3.5 ± 0.5
Thyroxine (T <sub>4</sub> )	2.1 ± 0.4
L-Dopa	1.4 ± 0.2
Dehydroepiandrosterone (DHEA)	0.9 ± 0.1
Dopamine	0.3 ± 0.2
Quercetin	60.5 ± 2.7
Genistein	96.9 ± 2.9
Daidzein	79.5 ± 3.4

<sup>a</sup> Data shown represent mean ± S.D. derived from three determinations. The final concentration of the substrate in the assay mixture was 50 μM.

we have recently embarked on the molecular cloning of zebrafish cytosolic ST enzymes [8–10]. Preliminary studies showed that one of the zebrafish STs (designated SULT1 ST #2) we have cloned exhibited a strong sulfating activity toward estrone (E<sub>1</sub>), an endogenous estrogen. The studies presented below aimed to characterize further the estrogen-sulfating activity of this enzyme and to investigate the inhibitory effects and mode of action of isoflavone phytoestrogens on the sulfation of endogenous estrogen by this zebrafish ST.

### 3.1. Characterization of the estrogen-sulfating SULT1 ST #2

The previously cloned zebrafish SULT1 ST #2 was expressed and purified to homogeneity. Purified recombinant zebrafish SULT1ST #2 was examined for enzymatic activities toward endogenous compounds including estrone (E<sub>1</sub>), 17β-estradiol (E<sub>2</sub>), T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, DHEA, L-Dopa, and dopamine. The results obtained are compiled in Table 1. We used a substrate concen-

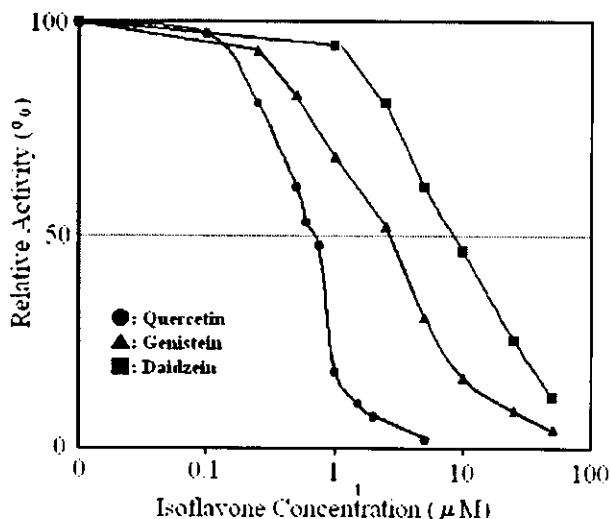


Fig. 1. Inhibition of 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) sulfation by quercetin (●), genistein (▲), and daidzein (■). Enzymatic assays in the presence of varying concentrations of these phytoestrogens were performed with 50 μM 17β-estradiol as substrate. Data were calculated based on the activity determined in the absence of phytoestrogen as 100%.

tration of 50 μM in these assays. Under the assay conditions adopted, the enzyme displayed the highest activities toward the two endogenous estrogen, E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub>. Much lower activities were detected with thyroid hormones, T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub>, DHEA, L-Dopa, and dopamine as substrates. Interestingly, the enzyme also exhibited strong activities toward three representative phytoestrogens. The kinetic parameters of SULT1 ST #2 in catalyzing the sulfation of estrogens and thyroid hormones were determined. As shown in Table 2, while the  $K_m$  values for thyroid hormones were lower than those for E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub>, the  $V_{max}$  values for the latter were much higher than those for the former. The catalytic efficiency of the enzyme, as reflected by  $V_{max}/K_m$ , with E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub> as substrates was more than an order of magnitude higher than with thyroid hormones as

Table 2  
Kinetic constants of the zebrafish SULT1 ST #2 with E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub>, as substrates<sup>a</sup>

Substrate	$V_{max}$ (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	$K_m$ (μM)	$V_{max}/K_m$ (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> μM <sup>-1</sup> )
Estrone (E <sub>1</sub> )	394.6	12.5	31.6
17β-Estradiol (E <sub>2</sub> )	217.4	13.0	16.7
3,3',5-Triiodothyronine (T <sub>3</sub> )	5.4	3.6	1.5
Thyroxine (T <sub>4</sub> )	3.5	4.6	0.8

<sup>a</sup> Data shown represent mean ± S.D. derived from three determinations.

substrates. These results indicated the estrogens being preferred physiological substrates for SUL1 ST #2. It should be pointed out, however, that, while sequence analysis based on BLAST search revealed it to belong to the phenol ST (SULT1) gene family [9], the identity of SULT1 ST #2 as the EST in zebrafish is equivocal. The  $K_m$  values of SULT1 ST #2 for  $E_1$  and  $E_2$ , as shown in Table 2, were determined to be, respectively, 12.5 and 13  $\mu\text{M}$ , whereas the  $K_m$  values

of human EST for  $E_1$  and  $E_2$  have been reported to be in the nM range [18,19].

### 3.2. Inhibitory effects of isoflavone phytoestrogens on $17\beta$ -estradiol sulfation by the estrogen-sulfating SULT1 ST #2

Over the past three decades, a substantial body of evidence has accumulated on the estrogenic activities

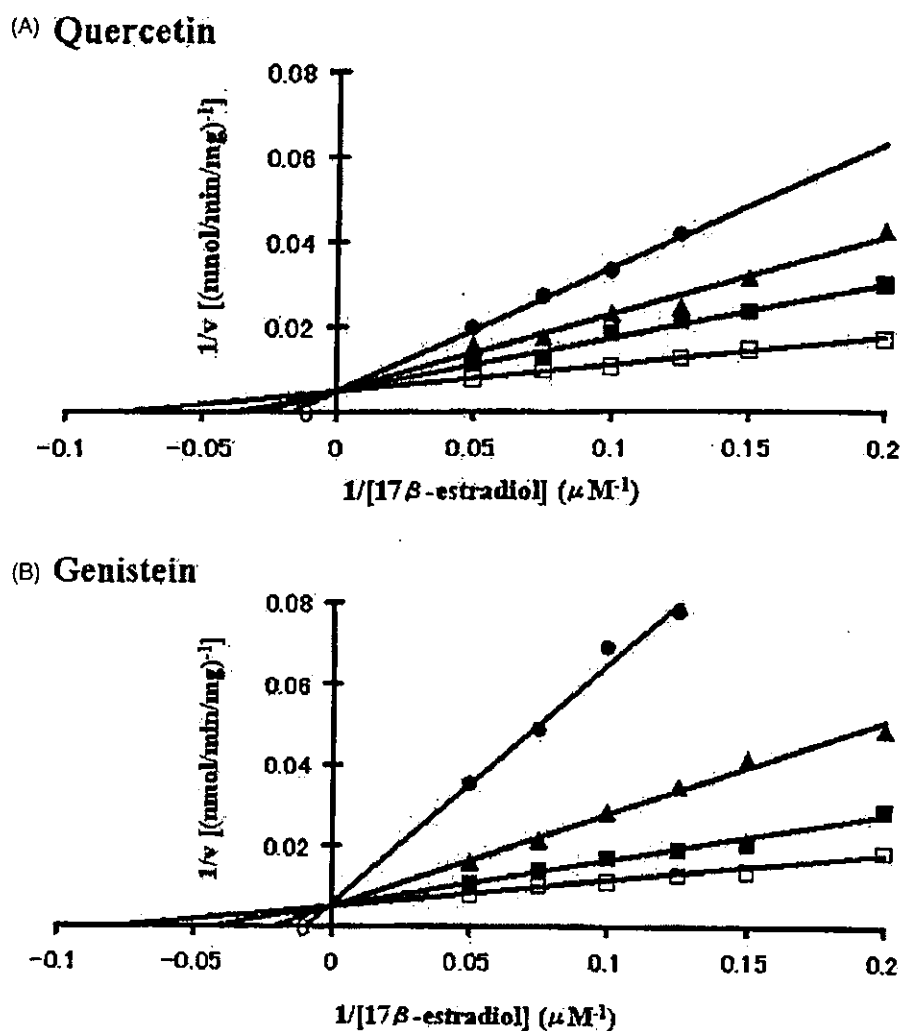


Fig. 2. (A) Lineweaver–Burk double-reciprocal plot of the zebrafish SULT1 ST #2 with  $17\beta$ -estradiol as substrate in the presence of different concentrations of quercetin. Concentrations of quercetin tested were: 0  $\mu\text{M}$  ( $\square$ ), 0.5  $\mu\text{M}$  ( $\blacksquare$ ), 0.75  $\mu\text{M}$  ( $\blacktriangle$ ), and 0.9  $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ). (B) Lineweaver–Burk double-reciprocal plot of the zebrafish SULT1 ST #2 with  $17\beta$ -estradiol as substrate in the presence of different concentrations of genistein. Concentrations of genistein tested were: 0  $\mu\text{M}$  ( $\square$ ), 1  $\mu\text{M}$  ( $\blacksquare$ ), 2.5  $\mu\text{M}$  ( $\blacktriangle$ ), and 6  $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ). Concentrations of  $17\beta$ -estradiol are expressed in  $\mu\text{M}$  and velocities are expressed as  $\text{nmol of product formed min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  enzyme. Each data point represents the mean value derived from three determinations.



of numerous dietary and environmental compounds. Exposure to plant-derived “phytoestrogens” via the dietary route has been suggested to have beneficial effects on human health [20,21], but potentially adverse consequences have also been pointed out [22,23]. Exposure to high levels of synthetic estrogen mimics, often called the “xenoestrogens”, has been associated with harmful effects for humans as well as wildlife [24–27]. Our recent studies have revealed that human EST and some other cytosolic STs are capable of sulfating both phytoestrogens and environmental estrogens [28–30]. The role of EST and other cytosolic STs in the metabolism and/or modulation of phytoestrogens and environmental estrogens as well as the interference of these latter compounds with the normal functioning of EST and other cytosolic ST enzymes, however, remain to be clarified. As an aquatic animal, the zebrafish may serve as a particularly useful model for studying these important issues. We decided first to examine the inhibitory effects of three isoflavone phytoestrogens, quercetin, genistein, and daidzein, on the sulfation of endogenous estrogens by the zebrafish SULT1 ST #2. Enzymatic assays were performed using 50  $\mu\text{M}$  17 $\beta$ -estradiol ( $\text{E}_2$ ) as substrate in the presence of varying concentrations (ranging from 0 to 50  $\mu\text{M}$ ) of these phytoestrogens. Results shown in Fig. 1 revealed concentration-dependent inhibition of the 17 $\beta$ -estradiol-sulfating activity of the zebrafish SULT1 ST #2. Based on these results, the  $\text{IC}_{50}$  values determined for quercetin, genistein, and daidzein were 0.7, 2.5, and 8  $\mu\text{M}$ , respectively. We then proceeded to investigate the mechanism underlying the inhibition of 17 $\beta$ -estradiol sulfation by these phytoestrogens. Enzymatic assays using varying concentrations (5–20  $\mu\text{M}$ ) of the substrate, 17 $\beta$ -estradiol, in the presence of fixed concentrations of quercetin (0, 0.5, 0.75, and 0.9  $\mu\text{M}$ ) or genistein (0, 1, 2.5, and 6  $\mu\text{M}$ ) were performed. Data obtained were used to generate the Lineweaver–Burk double reciprocal plot (Fig. 2). A striking feature observed for the double reciprocal plot generated is that the lines corresponding to the various concentrations of quercetin or genistein tested, while crossing the  $X$ -axis at different positions, appeared to converge within a narrow region on the  $Y$ -axis. These results indicated that the  $V_{\text{max}}$  value of the zebrafish SULT1 ST #2 for 17 $\beta$ -estradiol did not change much in the presence of quercetin or genistein. Whereas the  $K_{\text{m}}$  increased dramatically with increasing concentra-

tions of quercetin or genistein. These data imply quite clearly a competitive-type of inhibition.

To summarize, we demonstrated in the present study the specificity for estrogens of the previously cloned zebrafish SULT1 ST #2. The estrogen-sulfating activity of the enzyme appeared to be vulnerable to the inhibition by isoflavone phytoestrogens that acted as competitive inhibitors.

### Acknowledgements

This work was supported in part by a grant from the American Heart Association (Texas Affiliate) (MCL), and an award from the Naito Foundation (MS).

### References

- [1] F. Lipmann, *Science* 128 (1985) 575–580.
- [2] G.J. Mulder, W.B. Jakoby, in: G.J. Mulder (Ed.), *Conjugation Reactions in Drug Metabolism*, Taylor and Francis, London, 1990, pp. 107–161.
- [3] C. Falany, J.A. Roth, in: E.H. Jeffery (Ed.), *Human Drug Metabolism: From Molecular Biology to Man*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993, pp. 101–115.
- [4] R. Weinshilboum, D. Ottemess, in: F.C. Kaufmann (Ed.), *Conjugation–Deconjugation Reaction in Drug Metabolism and Toxicity*, Springer–Verlag, Berlin, 1994, pp. 45–78.
- [5] M.W.H. Coughtrie, S. Sharp, K. Maxwell, N.P. Innes, *Chem. Biol. Interact.* 109 (1998) 3–27.
- [6] J.P. Briggs, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282 (2002) R3–R9.
- [7] A.C. Ward, G.J. Linschke, *Front. Biosci.* 7 (2002) d827–d833.
- [8] T. Sugahara, C.-C. Liu, T.G. Pai, M.-C. Liu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300 (2003) 725–730.
- [9] T. Sugahara, C.-C. Liu, T.G. Pai, P. Collodi, M. Suiko, Y. Sakakibara, K. Nishiyama, M.-C. Liu, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 2404–2411.
- [10] T. Sugahara, C.-C. Liu, G. Carter, T.G. Pai, M.-C. Liu, *Arch. Biochem. Biophys.* 414 (2003) 67–73.
- [11] J. Rose, H. Holbech, C. Lindholm, U. Norum, A. Povlsen, B. Korsgaard, P. Bjerregaard, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 131 (2002) 531–539.
- [12] H. Segner, J.M. Navas, C. Schafers, A. Wenzel, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54 (2003) 315–322.
- [13] J.L. Falany, C.N. Falany, *Cancer Res.* 56 (1996) 1551–1555.
- [14] K. Yanagisawa, Y. Sakakibara, M. Suiko, Y. Takami, T. Nakayama, H. Nakajima, K. Takayanagi, Y. Natori, M.-C. Liu, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 (1998) 1037–1040.
- [15] M.-C. Liu, F. Lipmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81 (1984) 3695–3698.

- [16] U.K. Laemmli, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [17] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [18] C.N. Falany, V. Krasnykh, J.L. Falany, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52 (1995) 529–539.
- [19] Y. Otake, A.L. Nolan, U.K. Walle, T. Walle, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 73 (2000) 265–270.
- [20] L.W. Lissin, J.P. Cooke, *J. Am. Coll. Cardiol.* 35 (2000) 1403–1410.
- [21] M.T. Velasquez, S.J. Bhatena, *Am. J. Kidney Dis.* 37 (2001) 1056–1068.
- [22] M.L. de Lemos, *Ann. Pharmacother.* 35 (2001) 1118–1121.
- [23] J. Kanno, H. Kato, T. Iwata, T. Inoue, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3883–3885.
- [24] L. Guillet Jr., T.S. Gross, G.R. Masson, J.M. Matter, H.F. Percival, A.R. Woodward, *Environ. Health Perspect.* 102 (1994) 680–688.
- [25] D.M. Fry, *Environ. Health Perspect.* 103 (1995) 165–171.
- [26] C.R. Tyler, S. Jobling, J.P. Sumpter, *Crit. Rev. Toxicol.* 28 (1998) 319–361.
- [27] J.A. McLachlan, *Endocr. Rev.* 22 (2001) 319–341.
- [28] M. Suiko, Y. Sakakibara, M.-C. Liu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267 (2000) 80–84.
- [29] T.G. Pai, M. Suiko, Y. Sakakibara, M.-C. Liu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285 (2001) 1175–1179.
- [30] T.G. Pai, T. Sugahara, M. Suiko, Y. Sakakibara, F. Xu, M.-C. Liu, *Biochim. Biophys. Acta* 1573 (2002) 165–170.

# Zebrafish tyrosylprotein sulfotransferase: molecular cloning, expression, and functional characterization

Emi Mishiro, Ming-Yih Liu, Yoichi Sakakibara, Masahito Suiko, and Ming-Cheh Liu

**Abstract:** By employing the reverse transcriptase – polymerase chain reaction technique in conjunction with 3' rapid amplification of cDNA ends, a full-length cDNA encoding a zebrafish tyrosylprotein sulfotransferase (TPST) was cloned and sequenced. Sequence analysis revealed that this zebrafish TPST is, at the amino acid sequence level, 66% and 60% identical to, respectively, the human and mouse TPST-1 and TPST-2. The recombinant form of the zebrafish TPST, expressed in COS-7 cells, exhibited a pH optimum at 5.75. Manganese appeared to exert a stimulatory effect on the zebrafish TPST. The activity of the enzyme determined in the presence of 20 mM MnCl<sub>2</sub> was more than 2.5 times that determined in the absence of MnCl<sub>2</sub>. Of the other nine divalent metal cations tested at a 10 mM concentration, Co<sup>2+</sup> also showed a considerable stimulatory effect, while Ca<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, and Cd<sup>2+</sup> exerted some inhibitory effects. The other four divalent cations, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, and Hg<sup>2+</sup>, inhibited completely the sulfating activity of the zebrafish TPST. Using the wild-type and mutated P-selectin glycoprotein ligand-1 N-terminal peptides as substrates, the zebrafish TPST was shown to exhibit a high degree of substrate specificity for the tyrosine residue on the C-terminal side of the peptide. These results constitute a first study on the cloning, expression, and characterization of a zebrafish cytosolic TPST.

*Key words:* XXXXXXXXX.

**Résumé :** À l'aide de la technique d'amplification en chaîne par polymérase après transcription inverse (RT-PCR) et de l'amplification rapide des extrémités 3' d'ADNc (3'-RACE), un ADNc pleine longueur codant une tyrosylprotéine sulfotransférase (TPST) du poisson-zèbre a été cloné et séquencé. L'analyse de la séquence des acides aminés montre que cette TPST du poisson-zèbre est, respectivement, 66% et 60% identique aux TPST-1 et TPST-2 de la souris et humaines. La TPST recombinante du poisson-zèbre, exprimée dans des cellules COS-7, a un pH optimum de 5,75. Le manganèse semble avoir un effet stimulant sur la TPST du poisson-zèbre. L'activité de l'enzyme en présence de MnCl<sub>2</sub> 20 mM est 2,5 fois plus élevé qu'en absence de MnCl<sub>2</sub>. Des neuf autres cations divalents métalliques évalués à une concentration de 10 mM, le Co<sup>2+</sup> a également un effet stimulant considérable, alors que le Cu<sup>2+</sup>, le Pb<sup>2+</sup> et le Cd<sup>2+</sup> ont un petit effet inhibiteur. Les quatre autres cations divalents, le Fe<sup>2+</sup>, le Cu<sup>2+</sup>, le Zn<sup>2+</sup> et le Hg<sup>2+</sup>, inhibent complètement l'activité de sulfatation de la TPST du poisson-zèbre. En utilisant les peptides N-terminaux du ligand glycoprotéique 1 de la P-sélectine (PSGL-1) de type sauvage ou muté comme substrats, nous montrons que la TPST du poisson-zèbre a une très grande spécificité de substrat envers le résidu tyrosine du côté C-terminal du peptide. Ceci constitue la première étude sur le clonage, l'expression et la caractérisation d'une TPST cytosolique du poisson-zèbre.

*Mots clés :* (non transmis).

[Traduit par la Rédaction]

## Introduction

The structure of a mature protein is dependent on not only its amino acid sequence but also on various covalent modifications that take place after ribosomal protein synthesis. These posttranslational protein modifications, including glycosylation,

proteolytic cleavage, phosphorylation, acylation, adenylation, farnesylation, ubiquitination, and sulfation, abound among proteins in eukaryotic cells (Tuboi et al. 1992). First discovered in a peptide (fibrinopeptide B) derived from fibrinogen (Bettelheim 1954), protein tyrosine sulfation has emerged as a widespread post-translational modification in multicellular

Received 1 August 2003. Revision received 18 November 2003. Accepted 1 December 2003. Published on the NRC Research Press Web site at <http://bcf.nrc.ca> on XX XXXX 2004.

E. Mishiro, Y. Sakakibara, and M. Suiko, Biomedical Research Center, University of Texas Health Center, Tyler, TX 75708, U.S.A., and Department of Biochemistry and Applied Biosciences, Miyazaki University, Miyazaki 889-2192, Japan.  
M.-Y. Liu, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Georgia, Athens, GA 30602, U.S.A.  
M.-C. Liu,<sup>1</sup> Biomedical Research Center, University of Texas Health Center, Tyler, TX 75708, U.S.A.

<sup>1</sup>Corresponding author (e-mail: [ming.liu@uthct.edu](mailto:ming.liu@uthct.edu)).

eukaryotes (Huttner 1982). It has been shown to be involved in the alteration of biological activity of proteins (Jensen et al. 1981; Brand et al. 1984), proteolytic processing of bioactive peptides (Rosa et al. 1985), change in half-life of proteins in circulation (Pauwels et al. 1987), intracellular transport of secretory proteins (Hille et al. 1984), and modulation of extracellular protein-protein interactions (Kehoe and Bertozzi 2000). More recently, tyrosine sulfation has been demonstrated to be a key modulator of protein-protein interactions that mediate inflammatory leukocyte adhesion (Pouyani and Seed 1995; Sako et al. 1995; Wilkins et al. 1995). The recent discovery of tyrosine-sulfated chemokine receptors (Farzan et al. 1999) suggests an even broader role in the inflammatory response.

Tyrosylprotein sulfotransferase (TPST), the enzyme responsible for protein tyrosine sulfation, catalyzes the transfer of a sulfonyl group from 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS), the "active" sulfate, to specific tyrosine residues of proteins (Lee and Huttner 1983). This enzyme, following its first description in rat pheochromocytoma 12 cells (Lee and Huttner 1983), has been found in numerous cell lines and tissues and has been characterized from the bovine adrenal medulla (Lee and Huttner 1985) and heart (Suiko et al. 1997), rat brain (Vargas et al. 1985), liver (Rens-Domiano and Roth 1989; Rens-Domiano et al. 1989; Ramaprasad and Kashinathan 1998), gastric mucosa (Kashinathan et al. 1992), submandibular salivary glands (Sundaram et al. 1992; William et al. 1997), human liver (Lin and Roth 1990; Young 1990), and platelets (Sane and Baker 1993). Comparison of the properties reported for TPSTs from the mammalian tissues mentioned above reveals some common properties including acidic pH optima, stimulation by  $Mn^{2+}$ , and the use of PAPS as the sulfate donor. Biochemical evidence indicates that TPST is an integral membrane protein with a lumenally oriented active site localized in the trans-Golgi network. Tyrosine sulfation was demonstrated to take place in the same compartment as galactosylation and sialylation (i.e., the trans-Golgi), occurring shortly after these terminal glycosylation reactions (Baeuerle and Huttner 1987). A major advance in the field came with the molecular cloning of two distinct TPSTs, designated TPST-1 and TPST-2, from both human and mouse (Ouyang et al. 1998; Beisswanger et al. 1998; Ouyang and Moore 1998). Both enzymes were shown to be membrane-bound, *N*-glycosylated Golgi enzymes with a luminal catalytic domain, a single-span transmembrane domain, and a short cytosolic tail. The two human TPSTs share 67% sequence identity. Northern analysis indicated that both human TPSTs are expressed in many tissues (Ouyang et al. 1998; Beisswanger et al. 1998; Ouyang and Moore 1998). The existence of more than one TPST might explain the diversity of sequences that are tyrosine sulfated. The two enzymes might have differential substrate specificity and act upon different subsets of target proteins. A recent gene-knockout study revealed that mice deficient in TPST-1 had reduced body mass and increased postimplantation fetal death (Ouyang et al. 2002).

Zebrafish has in recent years emerged as a popular animal model for a wide range of studies (Briggs 2002; Ward and Lieschke 2002). Its advantages, compared with mouse, rat, or other vertebrate animal models, include the small size (3–4 cm length for adult fish), the availability of relatively large

number of eggs (>200 eggs per week per mature female), rapid development externally of virtually transparent embryo (in 2–4 days), and short generation time (~3 months). These unique characteristics of the zebrafish make it an excellent model for a systematic investigation on the ontogeny of the expression of various proteins and their tissue- and cell-type-specific distribution as well as physiological relevance.

We report here the molecular cloning of a full-length zebrafish TPST cDNA. Using COS-7 cells as the host, the zebrafish TPST was expressed in a recombinant form. The enzymatic properties of the recombinant zebrafish TPST were analyzed using as substrates wild-type and a series of mutated P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) N-terminal peptides.

## Experimental procedures

### Materials

Adenosine 5'-triphosphate (ATP), sodium dodecyl sulfate, *N*-2-hydroxylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (Hepes), 3-[*N*-tris-(hydroxymethyl)methylamino]-propanesulfonic acid, Trizma base, and dithiothreitol were products of the Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo.). A zebrafish cDNA clone, ID 2644043 (GenBank accession No. AW344308), encoding the N-terminal region of a TPST was obtained from Genome Systems, Inc. AmpliTaq DNA polymerase was a product of Perkin Elmer. Takara *Ex Taq* DNA polymerase and the 3'-Full RACE core set were purchased from PanVera Corporation.  $T_4$  DNA ligase and all restriction endonucleases were from New England Biolabs. XL1-Blue MRF *Escherichia coli* host strain was purchased from Stratagene (La Jolla, Calif.). Eukaryotic TOPO TA cloning kit and Lipofectamine 2000 were products of Invitrogen (Carlsbad, Calif.). TNT coupled reticulocyte lysate system was from Promega (Madison, Wis.). Oligonucleotide primers were synthesized by MWG Biotech. Recombinant human bifunctional ATP sulfurylase/adenosine 5'-phosphosulfate kinase was prepared as described previously (Yanagisawa et al. 1998). COS-7 SV40 transformed African green monkey kidney cells (ATCC CRL1651) were from the American Type Culture Collection. TRI reagent was from Molecular Research Center, Inc. Total RNA from zebrafish was prepared using the TRI reagent according to the manufacturer's instructions. Sep-Pak Plus C18 cartridges were from Waters. Cellulose thin-layer chromatography plates were products of EM Science. Carrier-free sodium [ $^{35}S$ ]sulfate and [ $^{35}S$ ]methionine were from ICN-Biomedicals. All other reagents were of the highest grades commercially available.

### Molecular cloning of the zebrafish TPST

By searching the expressed sequence tag database, a zebrafish cDNA clone (GenBank accession No. AW344308) encoding the N-terminal region of a TPST was identified. This zebrafish TPST cDNA was purified and subjected to nucleotide sequencing based on the cycle sequencing method using, respectively, M13 forward and M13 reverse as primers. The nucleotide sequences, as well as the deduced amino acid sequences, of the cDNA were analyzed using BLAST search for sequence homology to known TPSTs.

To obtain the 3'-coding region and the untranslated sequence further downstream, 3' rapid amplification of cDNA