

令和元年6月26日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04502

研究課題名(和文) 神経組織受容体に作用する新規硫酸化生体制御分子の創製

研究課題名(英文) Discovery of novel sulfated bioregulatory molecules acting on neural tissue receptors

研究代表者

榊原 陽一 (SAKAKIBARA, YOICHI)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：90295197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体制御分子の機能制御および代謝機構としての硫酸化に着目した。まず、硫酸化された生体制御分子の酵素的調製法開発した。さらに、受容体を介した情報伝達機構の解析技術開発と培養細胞におけるその生理機能解明を目的とした研究を行った。具体的にはヒト細胞質硫酸転移酵素を発現する大腸菌を用いて、遺伝子工学的に食品成分などの生体制御分子の代謝物である硫酸体を調製する技術を確立した。得られた代謝物はNMR等により構造を決定した。さらに、GPR30など受容体を介した作用を評価できるルシフェラーゼアッセイを確立し、調製した硫酸化代謝物の評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、市場に流通する医薬品のほとんどがGタンパク質共役受容体を介して作用すると言われ、生体制御分子(ホルモン、食品機能性成分、医薬品など)の多くが受容体を標的として作用する。さらに、これら生体制御分子の多くは、肝臓等で代謝され、その代謝産物が神経細胞などで受容体に作用し機能していることが想定される。本研究は、硫酸化を受けた代謝物が受容体を介して細胞に作用することを確認した。このことは、硫酸化された代謝物は不活性な状態として排泄されているという定説を覆す知見となる。さらに、硫酸化代謝物に新規機能を開発することで医薬品等の候補分子としての優位性を示すことが可能となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the functional control of bioregulatory molecules by sulfation as a metabolic mechanism. First, enzymatic preparation method of sulfated bioregulatory molecules were developed. Furthermore, we conducted research aimed at developing analysis technology for cell surface receptor-mediated signal transduction and elucidating its physiological function in cultured cells. Specifically, using E. coli that expressing human cytosolic sulfotransferase, we have established a biotechnology method to prepare a sulfated metabolite of a bioregulatory molecules such as food components. The obtained sulfated metabolite confirmed the chemical structure by NMR. Furthermore, a luciferase assay to evaluate GPR30 receptor-mediated activity was established, and the sulfated metabolites were evaluated for functional analysis.

研究分野：応用生物化学

キーワード：硫酸転移酵素 硫酸化 レセプター 生体制御分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、市場に流通する医薬品のほとんどがGタンパク質共役受容体(GPCR)を介して作用していると言われるように、生体制御分子(ホルモン、食品機能性成分、医薬品など)の多くが受容体を標的として生理作用を発現する。さらに、これらの生体制御分子の多くは、生体内において肝臓等の臓器で代謝され、その代謝産物が神経細胞などで受容体に作用し機能していることが想定される。また、作用標的としての受容体は、GPCR以外には、転写調節因子である核内受容体等も考えられる。本研究では、上述の生体制御分子の機能制御および代謝機構としての硫酸化に着目し、硫酸化された生体制御分子の酵素的調製法開発、受容体を介した情報伝達機構の解析技術開発と神経系細胞におけるその生理機能解明を目的とした研究を行った。

具体的には、細胞応答を基盤にしたGタンパク質共役受容体評価システムの検討を実施し、4種の異なる情報伝達経路をそれぞれ評価可能なレポーターアッセイ系の構築を目指して研究を実施した。NFAT-REやSREを標的とした複数のレポーターアッセイ系を構築し、主として食品成分およびその硫酸体の評価を行った。

さらに、プロテオミクスによる生体制御分子硫酸体の生理機能解やモデル動物実験による生体制御分子硫酸体のメタボローム解析など、先端計測機器を用いて、タンパク質や代謝産物を網羅的に解析する事から、生体制御分子硫酸体の生理機能を明らかにする事を目的に研究を実施した。

2. 研究の目的

食品機能性成分の一種のポリフェノール化合物は、果実や野菜等に多く含まれ、癌や心血管系の疾患の予防に効果がある等の、様々な健康に有益な機能があると信じられている。これらの機能性に関する研究は、*invitro*にて、ポリフェノールの一種のフラボノイド類の配糖体(グルコシド)や糖を含まないアグリコンを用いて試験・評価したものが多く。しかしながら、これらの食品機能性成分の多くは生体内に取り込まれると、硫酸抱合やグルクロン酸抱合等の代謝反応を受け、その多くは代謝物として存在していることが分かっている。一般的にこのような抱合反応を受けた代謝物は機能が不活性化すると考えられている。しかしながら、近年の研究により抱合反応を受けた後でも機能を有するポリフェノール化合物の存在が報告されている。そのため、ポリフェノール類の食品成分の機能を詳細に解明するためには、抱合体のような代謝物の機能性も配糖体やアグリコンの化合物と同様に評価する必要がある。しかしながら、ポリフェノール化合物のような複数の水酸基を持つ化合物は、それぞれの水酸基が位置特異的に抱合反応を受けた代謝物が複数存在することが考えられる。このような代謝物の有機合成法による調製には非常に煩雑な工程を踏む必要があり、調製が困難である。そのため、ポリフェノール化合物のような複数水酸基を持つ化合物の位置特異的な硫酸体の調製も同様に困難であり、現在その簡便な調製方法は確立されていないため、ポリフェノール化合物の硫酸抱合体の機能性はほとんど解明されていないのが現状である。近年、このような調製が困難な化合物の生産方法として、遺伝子組換え微生物の代謝を利用した技術が開発されてきている。例として、ポリフェノール類の位置特異的なグルクロン酸抱合体やメチル抱合体を、遺伝子組み換え大腸菌を用いて調製した報告等がある。そこで、現在までに調製技術が確立されていない複数の水酸基を持つ化合物の硫酸抱合体を遺伝子組換えにより硫酸化を担うSULTを発現させた大腸菌を利用して簡便かつ大量に硫酸抱合体を調製する技術開発と、硫酸化を受けた抱合代謝物(メタボライト)の培養細胞系による評価技術を開発することを目的に研究を実施した。

これらの研究により、硫酸化代謝物に新規機能性を開発することで医薬品等の候補分子としての優位性を示すことが可能となる。

3. 研究の方法

遺伝子工学的手法による様々なポリフェノール硫酸体の生産

食品機能性成分硫酸体の調製には、様々なポリフェノール類(chrysin, apigenin, daidzein, genistein, biochanin A, galangine, kaempferol, naringenin, resveratorol)を使用した。硫酸体の調製方法には、ヒト SULT 発現大腸菌 (SULT1A3, SULT1C4, SULT1E1) を使用した。ポリフェノール類が硫酸体調製用培地中での終濃度が 0.5 mM (DMSO 終濃度 5%) になるように添加し培養した。その後、培養上清を回収し HPLC を用いて硫酸体の有無を確認した。

ポリフェノール硫酸体の精製

培養上清 100 mL を回収し、C18 逆相カートリッジである Sep Pak C18 Cartridges を用いて粗精製した。その後、溶出液を逆相弱陰イオン交換カートリッジである Oasis WAX cartridge を使用し更に精製した。その後、溶出液をエバポレーターで濃縮し MeOH と NH₃ を取り除いた。残った溶液に少量の炭酸アンモニウムを加え、溶液を塩基性にした後に -80 °C で凍結させ、凍結乾燥機を使い完全に乾燥し、凍結乾燥粉末をポリフェノール硫酸体として使用した。

細胞培養

ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞およびヒト胎児腎細胞株 293T 細胞は Dulbecco 's modified Eagle 's medium (DMEM) に 10% FBS, 100 IU/mL ペニシリン, 50 µg/mL ストレプトマイシンを加えた培地を使用して 37 °C, 5% CO₂ にて培養した。

細胞増殖抑制試験

細胞増殖抑制試験には HepG2 細胞を用いた。様々なポリフェノール類とその硫酸体の終濃度が 20 µM なるように調製した培地に置き換え、37 °C, 5% CO₂ で更に 24 時間培養した。24 hr 処理後に cell counting kit-8 を用いて各 plate 内の吸光度を precision microplate reader で 450 nm の波長を測定しそれぞれの細胞数を算出した。

GPR30 を標的とした CRE-luciferase assay

ヒト GPR30 (hGPR30) を 293T 細胞および HepG2 細胞に強発現させるために、*hGPR30* マルチジーントランスフェクションが容易な動物細胞発現用ベクターである pEBMulti-Hyg にサブクローニングした。作製した pEBMulti-Hyg-GPR30 plasmid および CRE-TATA-pGL4.17 plasmid を使用した。293T 細胞に CRE-TATA-pGL4.17 plasmid と pEBMulti-Hyg-GPR30 および control vector として pEBMulti-Hyg を Lipofectamin LTX を用いて同時トランスフェクションした。genistein, genistein 4'-O-sulfate および genistein 7-O-sulfate を終濃度が 20 µM になるように添加し、6 hr 後、細胞を回収し可溶化したものをサンプルとした。サンプルに Bright-Glo™ Luciferase Assay System のルシフェラーゼアッセイ用の基質を等量加え、発光強度をルミノメーターで測定し、GPR30 への作用を評価した。

4. 研究成果

様々な SULT を発現させた大腸菌を用いた遺伝子工学的手法による genistein 硫酸体の調製技術を開発することができた。また、本手法において、硫酸体を効率的に生産するためには、glucose 濃度、SO₄²⁻濃度および培養温度が重要であることが判明した。また、本手法のモデル化合物に用いた genistein はポリフェノール化合物であり複数の水酸基を持ち、その硫酸体も

複数存在する。このようなポリフェノール化合物の硫酸体を調製する場合、従来は有機合成法や酵素反応を用いた手法が用いられていた。有機合成法を用いてこのようなポリフェノール化合物の位置特異的な硫酸体を調製する場合、煩雑な工程を要し、簡便に位置特異的な硫酸体を調製することができなかった。また、酵素的な手法において硫酸体を生産する場合は、コストがかかり大量に調製することが困難であった。本手法は有機化学的手法と比較し、簡便に位置特異的な硫酸体を選択的に調製でき、酵素的な手法と比較して 1/10 以下の低コストで大量にポリフェノール化合物の位置特異的な硫酸体を調製できる画期的な手法であることが考えられる。本研究では genistein をモデル化合物として、genistein 7-*O*-sulfate および genistein 4' -*O*-sulfate を選択的に生産できることを実証したが、この手法を応用することで様々なポリフェノール化合物の位置特異的な硫酸体を生産できることが期待できると考えられた。

本研究の結果から、様々なポリフェノール類の硫酸体にがん細胞に対する増殖抑制作用が確認されたため、ポリフェノール類の多くは代謝を受けた後も様々な器官で作用する可能性が示唆された。また、硫酸体は細胞内へ取り込まれにくいいため、その作用機序として細胞膜上の GPCR のような受容体を介して機能することが考えられた。そこで、GPCR のひとつの GPR30 に作用することが判明している genistein に着目した。レポーターアッセイにて genistein およびその硫酸体である genistein 4' -*O*-sulfate および genistein 7-*O*-sulfate が GPR30 に作用するか評価したところ、硫酸体である genistein 4' -*O*-sulfate および genistein 7-*O*-sulfate に GPR30 への作用が確認された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 18 件）

Effects of Genetic Polymorphisms on the Sulfation of Dehydroepiandrosterone and Pregnenolone by Human Cytosolic Sulfotransferase SULT2A1. Abunnaja, M.S., Alherz, F.A., El Daibani, A.A., Bairam, A.F., Rasool, M.I., Gohal, S.A., Kurogi, K., Suiko, M., Sakakibara, Y., Liu, M.-C. **Biochem. Cell Biol.** 96, 655-662. (2018) doi: 10.1139/bcb-2017-0341.

（査読有）

On the Role of Genetic Polymorphisms in the Sulfation of Cholesterol by Human Cytosolic Sulfotransferase SULT2B1b. Alherz, F.A., El Daibani, A.A., Bairam, A.F., Abunnaja, M.S., Rasool, M.I., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. J. Biochem. 164, 215-221. (2018) doi: 10.1093/jb/mvy042. （査読有）

The critical role of His48 in mouse cytosolic sulfotransferase SULT2A8 for the 7-hydroxyl sulfation of bile acids. Shimohira, T., Kurogi, K., Liu, M.-C., Suiko, M., Sakakibara, Y. Biosci. Biotechnol. Biochem. 82, 1359-1365. (2018) doi: 10.1080/09168451.2018.1464897. （査読有）

Sulfation of catecholamines and serotonin by SULT1A3 allozymes. Bairam, A.F., Rasool, M.I., Alherz, F.A., Abunnaja, M.S., El Daibani, A.A., Gohal, S.A., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. Biochem. Pharmacol. 151, 104-113. (2018) doi: 10.1016/j.bcp.2018.03.005. （査読有）

Radical Scavenging Effects of 1-Naphthol, 2-Naphthol, and Their Sulfate-conjugates. Sugahara, S., Fukuhara, K., Tokunaga, Y., Tsutsumi, S., Ueda, Y., Ono, M., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C., Yasuda, S. **J. Toxicol. Sci.** 43,213-221. (2018) doi: 10.2131/jts.43.213. (査読有)

Effects of Human *SULT2A1* Genetic Polymorphisms on the Sulfation of Tibolone. Miller, E., Zalzal, M.H., Abunnaja, M.S., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinetics** Accepted for Publication. (2018) doi: 10.1007/s13318-017-0458-2. (査読有)

Human Cytosolic Sulphotransferase SULT1C3: genomic analysis and functional characterization of splice variant SULT1C3a and SULT1C3d. Kurogi, K., Shimohira, T., Kouriki-Nagatomo, H., Zhang, G., Miller, E.R., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. **J. Biochem.** 162, 403-414. (2017) doi: 10.1093/jb/mvx044. (査読有)

Structure basis for the broad substrate specificity of the human tyrosylprotein sulfotransferase-1. Tanaka, S., Nishiyori, T., Kojo, H., Otsubo, R., Tsuruta, M., Kurogi, K., Liu, M.-C., Suiko, M., Sakakibara, Y., Kakuta, Y. **Sci. Rep.** 7,8776. (2017) doi:10.1038/s41598-017-07141-8. (査読有)

Identification and characterization of 5 α -cyprinol-sulfating cytosolic sulfotransferases (Sults) in the Zebrafish (*Danio rerio*). Kurogi, K., Yoshihama, M., Horton, A., Schiefer, I.T., Krasowski, M.D., Hagey, L.R., Williams, F.E., Sakakibara, Y., Kenmochi, N., Suiko, M., Liu, M.C. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 174,120-127. (2017) doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.08.005. (査読有)

4-3-Ketosteroids as a New Class of Substrates for the Cytosolic Sulfotransferases. Hashiguchi T, Kurogi, K., Shimohira, T., Teramoto, T., Liu, M.C., Suiko, M., Sakakibara, Y. **Biochim. Biophys. Acta.** 1861,2883-2890. (2017) doi: 10.1016/j.bbagen.2017.08.005. (査読有)

Sulfation of vitamin D3-related compounds: Identification and characterization of the responsible human cytosolic sulfotransferases. Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.C. **FEBS Lett.** 591,2417-2425. (2017) doi: 10.1002/1873-3468.12767. (査読有)

Identification and Characterization of the Zebrafish Glutathione S-Transferase Pi-1. Abunnaja, M.S., Kurogi, K., Mohammed Y.I., Sakakibara, Y., Suiko, M., Hassoun, E.A., Liu, M.-C. **J. Biochem. Mol. Toxicol.** 31(10). (2017) doi: 10.1002/jbt.21948. (査読有)

Regioselective production of sulfated polyphenols using human cytosolic sulfotransferase (SULT)-expressing *Escherichia coli* cells. Shimohira, T., Kurogi, K., Hashiguchi, T., Liu, M.-C., Suiko, M., Sakakibara, Y. **J. Biosci. Bioeng.** **124**,84-90. (2017) doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.02.006. (査読有)

Updated perspectives on the cytosolic sulfotransferases (SULTs) and SULT-mediated sulfation. Suiko, M., Kurogi, K., Hashiguchi, T., Sakakibara, Y., Liu, M.-C. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** **81**, 63-72. (2017) (査読有)

A proteomic approach for the analysis of S-nitrosylated proteins using a fluorescence labeling technique. Yoshimura, T., Kurogi, K., Liu, M.-C., Suiko, M., Sakakibara, Y. **J. Electrophoresis** **60**, 5-14. (2016) (査読有)

Human Cytosolic Sulfotransferase SULT1A3 Mediates the Sulfation of Dextrorphan. Yamamoto, A., Kurogi, K., Schiefer, I.T., Liu, M.-Y., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. **Biol. Pharm. Bull.** **39**, 1432-1436. (2016) (査読有)

Identification and Characterization of the Human Cytosolic Sulfotransferases Mediating the Sulfation of Clioquinol and Iodoquinol. Yamamoto, A., Debrah-Pinamang, M., DiModica, N.J., Kurogi, K., Naqvi, A.A., Hui, Y., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. **Drug Metab. Lett.** **10**, 200-205. (2016) (査読有)

植物硫酸転移酵素の諸性質と今後の展開, 橋口拓勇, 榊原陽一, 黒木勝久, 水光正仁 **日本農薬学会誌** **41**, 198-202. (2016) (査読無)

〔学会発表〕(計27件)
日本生化学会、日本農芸化学会、日本電気泳動学会 など。

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：水光正仁

ローマ字氏名：Masahito Suiko

所属研究機関名：宮崎大学

職名：副学長

研究者番号(8桁)：00128357

研究分担者氏名：榊原啓之

ローマ字氏名：Hiroyuki Sakakibara

所属研究機関名：宮崎大学

部局名：農学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：20403701