

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2007年度～2008年度  
課題番号：19570106  
研究課題名（和文） 硫酸転移酵素による多様な生体異物認識の立体構造基盤解明  
研究課題名（英文） Structural analysis of sulfotransferase

研究代表者  
角田佳充 (KAKUTA YOSHIMITSU)  
九州大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：00314360

## 研究成果の概要：

薬物代謝酵素の一つである硫酸転移酵素（SULT）は、様々な外来性異物に硫酸基を転移することで、主に解毒を行っている酵素である。SULT が多様な外来性異物に対して反応する仕組みは、基質の形状に対応して SULT の基質結合部位の構造が変化することによって行われていることを明らかにした。この結果は、SULT の持つ広い基質特異性の構造基盤の一端を明らかにしたものと考えられる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：硫酸転移酵素、X線結晶構造解析、薬物代謝、構造変化

## 1. 研究開始当初の背景

すでに SULT の立体構造は複数報告されていたが、複数の基質の複合体による詳しい解析は報告されていない状況であった。

## 2. 研究の目的

薬物代謝酵素の一つである硫酸転移酵素（SULT）は、様々な外来性異物に対応し代謝するために、広い基質特異性をもっている。

現在までの蛋白質の構造研究において、特異性の高い物質認識に関する研究は広く行われてきているが、広範囲の物質を認識する立体構造の機構に関する知見は非常に乏しい。そこでマウス由来硫酸転移酵素 mSULT1D1 の X 線結晶構造解析を行い、mSULT1D1 と様々な基質との複合体構造を得て、SULT の広い基質特異性決定メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 様々な基質との複合体構造の決定

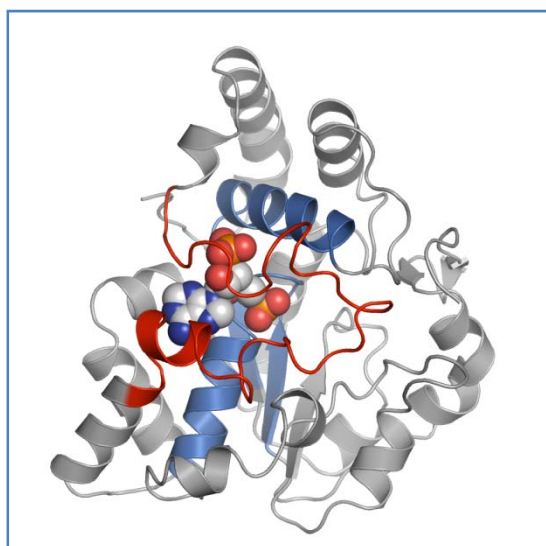
マウスからクローニングした mSULT1D1 を発現ベクターに組み込み、大腸菌における発現系を構築し、大量発現、精製、結晶化を行った。得られた結晶を用いて、ソーキング法および共結晶化法により、様々な基質との基質結合体結晶を作製し、その複合体構造決定を行った。

(2) 決定した様々な基質結合状態の結晶構造から、基質と相互作用しているアミノ酸残基に対して部位特異的変異を導入し、変異体の硫酸転移活性と結合活性を測定することで、そのアミノ酸残基の重要性や役割を評価した。

(3) 酵素反応メカニズムの詳細を解明する為に E S 複合体の立体構造決定を試みた。短時間の基質のソーキング、逆反応、クライオトラップを利用して、PAPS とパラニトロフェノールノールの 3 成分複合体の結晶の作成を試みた。

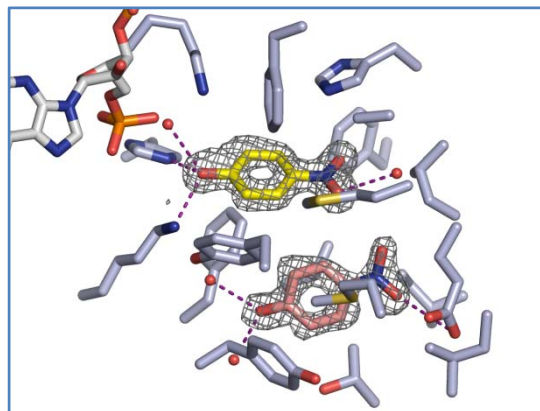
### 4. 研究成果

(1) 得られた SULT1D1 結晶を Spring8 のビームラインを用いた回折実験によって、分解能 1 Å の立体構造を決定して報告した。

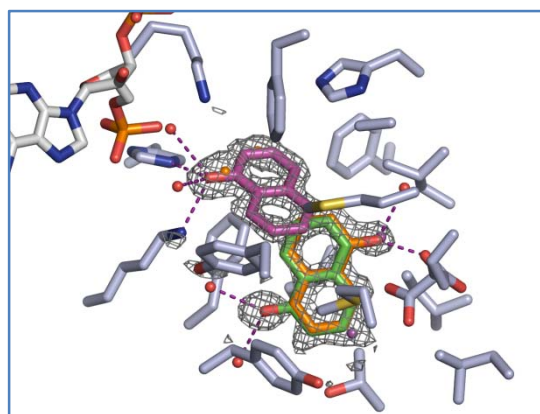


SULT1D1-PAP 複合体の全体構造

(2) 2種類の基質複合体の立体構造を決定し、詳しく構造の違いを考察することで、基質結合部位の構造が基質の形状に対応して変化することを見出した。これは、この酵素が広い基質特異性を持つ理由の一つであると考えられる。

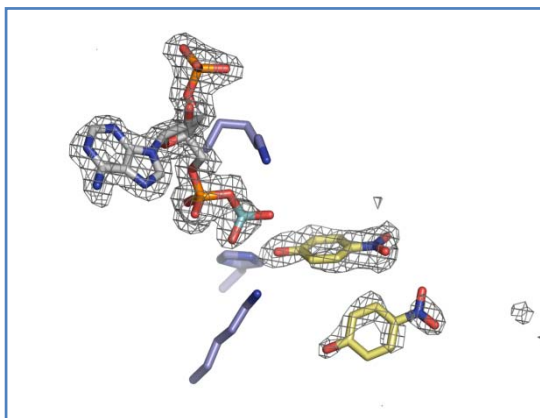


SULT1D1-PAP-パラニトロフェノール複合体の基質結合部位付近の構造と基質の電子密度



SULT1D1-PAP-ナフトール複合体の基質結合部位付近の構造と基質の電子密度

(3) PAPS とパラニトロフェノールの3成分複合体の立体構造を決定した。この構造は、ES-complex の構造であり、詳細な酵素反応メカニズムの解明貢献するものであった。



SULT1D1 の ES 複合体の基質結合部位周辺の構造

PAPS の電子密度とパラニトロフェノールの電子密度が明確に観察される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Snapshot of a Michaelis complex in a sulfuryl transfer reaction: Crystal structure of a mouse sulfotransferase, mSULT1D1, complexed with donor substrate and acceptor substrate. Teramoto T, Sakakibara Y, Liu MC, Suiko M, Kimura M, Kakuta Y. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;**383**(1):83-87.
- ② Structural basis for the broad range substrate specificity of a novel mouse cytosolic sulfotransferase-mSULT1D1. Teramoto T, Sakakibara Y, Liu MC, Suiko M, Kimura M, Kakuta Y. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;**379**(1):76-80.

- ③ Crystal structure of mSULT1D1, a mouse catecholamine sulfotransferase.

Teramoto T, Sakakibara Y, Inada K, Kurogi K, Liu MC, Suiko M, Kimura M, Kakuta Y.

*FEBS Lett.* 2008;582(28):3909-3914.

[学会発表] (計9件)

- ① 角田佳充, 硫酸転移酵素の立体構造, 日本農芸化学会, 2008年3月29日, 東京農業大学
- ② 寺本岳大、稲田加奈子、水光正仁、木村誠、榊原陽一、角田佳充, マウス SULT1D1 の X 線結晶構造解析, 日本農芸化学会, 2008年3月28日, 東京農業大学
- ③ 角田佳充, X線結晶構造解析による酵素反応の分子機構に関する研究, 日本農芸化学会西日本支部例会, 2007年5月25日, アサヒビール博多工場
- ④ 寺本岳大、稲田加奈子、榊原陽一、水光正仁、木村誠、角田佳充, マウス由来硫酸転移酵素 SULT1D1 の X 線結晶構造解析, 日本分子生物学会年会・日本生化学会年会合同大会, 2008年12月, 神戸
- ⑤ 寺本岳大、藤井理恵子、近藤知己、水光正仁、木村誠、榊原陽一、角田佳充, マウス由来硫酸転移酵素 SULT5A1 の X 線結晶構造解析, 日本生物物理学会年会, 2008年12月、福岡
- ⑥ 黒木勝久、榊原陽一、園田麻紀子、高橋早樹、西尾健明、寺本岳大、角田佳充、Liu Ming-Cheh、水光正仁、新規胆汁酸来硫酸転移酵素 SULT2A4 の生理機能解析、日本農芸学会年会, 2008年3月、名古屋
- ⑦ 寺本岳大、稲田加奈子、水光正仁、木村誠、榊原陽一、角田佳充、マウス由来硫酸転移酵素 SULT1D1 の X 線結晶構造解析、日本分子生物学会年会・日本生化学会年会合同大会, 2007年12月、横浜
- ⑧ ○藤井理恵子、寺本岳大、近藤知己、水光正仁、木村誠、榊原陽一、角田佳充、マウス由来硫酸転移酵素 SULT5A1 の X 線結晶構造解析、日本分子生物学会年会・日本生化学会年会合同大会, 2007年12月、横浜

- ⑨ 西尾健明、園田麻紀子、寺本岳大、稲田加奈子、水光正仁、木村誠、榊原陽一、角田佳充、マウス由来硫酸転移酵素 SULT2A4 の X 線結晶構造解析、日本蛋白質科学会年会、2007 年 5 月、仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角田 佳充 (KAKUTA YOSHIMITSU)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：00314360