

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850074

研究課題名(和文)プロスタグランジン硫酸体の構造決定と機能解析

研究課題名(英文)Chemical structure and receptor action analyses of newly identified sulfated form of prostaglandin

研究代表者

黒木 勝久(Kurogi, Katsuhisa)

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号：20647036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、プロスタグランジン硫酸体の調製法確立、構造決定、そして、受容体の探索を目的に実施した。酵素反応により硫酸体を産生し、固相抽出およびHPLCによる単離精製を行うことで、硫酸体の調製法を確立した。さらに、質量分析計およびNMR装置を用いて、硫酸体の構造決定を行い、a,b-不飽和カルボニルにスルホン基が付加されている構造であることが判明した。11種類の各種プロスタグランジン受容体に対するアゴニスト・アンタゴニスト活性を確認した結果、アゴニスト活性およびアンタゴニスト活性を確認することが出来た。また、硫酸体特異的結合タンパク質が存在することも明らかにすることが出来た。

研究成果の概要(英文)：In this grant research, we aimed to establish the preparation method, to determine the chemical structure, and to clarify the agonist/antagonist action of sulfated prostaglandin, specially sulfated form of 15d-PGJ2. We first embarked to produce the sulfated 15d-PGJ2 using an enzyme responsible for the reaction and then isolated and purified the sulfated compound through solid-phase extraction and HPLC technique. The chemical structure was analyzed using ESI-MS and NMR instruments, which revealed that the sulfonated group is located at a,b-unsaturated carbonyl group in the cyclopentenone portion. The sulfated 15d-PGJ2 was further subjected to the agonist/antagonist activity test toward each of eleven prostanoid receptors. The sulfated product showed the agonist and antagonist activity toward certain receptors. Further interaction experiments showed the sulfated product may interact with certain specific proteins.

研究分野：生物化学

キーワード：硫酸化 プロスタグランジン 受容体

1. 研究開始当初の背景

硫酸化は、薬物やホルモンなどの内因性化合物の代謝・活性調節を担う生体内反応である。この反応を触媒する硫酸転移酵素(SULT)は、標的基質のヒドロキシル基やアミノ基に硫酸基を転移することが出来る酵素であり、脊椎動物に普遍的に存在している。

近年、新規の硫酸転移酵素遺伝子 SULT7A1が見出され、申請者らのグループによって、その標的基質が同定された。硫酸化は、ヒドロキシル基またはアミノ基を標的とする反応であるが、この SULT7A1は、 α,β -不飽和カルボニル基を有する環状化合物を特異的に硫酸化する極めて特徴的な酵素であった。また、その生体内標的分子として、シクロペンテン型プロスタグランジン類が同定された。この酵素は、これまでの酵素とは全く異なる基質をもつことから、従来の反応メカニズムとは異なる機構によって反応を触媒していることが想定された。本酵素は、腸上皮細胞特異的に発現していることから、食物などに含まれる生体外異物の代謝の他、異物の侵入を妨げる機能を有しているのではないかと考えられている。特に、炎症や腸管免疫機能のほか、粘膜保護作用など多様な機能を有する生理活性脂質であるプロスタグランジンは、その特異的受容体に作用することで機能を発揮していることから、その代謝体である硫酸体は、プロスタグランジン受容体、もしくは、別の硫酸体特異的な受容体を介して、腸上皮機能調節などの多彩な生理活性を有していると考えている。

2. 研究の目的

以上の研究背景を踏まえ、本研究では、シクロペンテン型プロスタグランジン硫酸体の機能解明の一端として、その作用点(受容体)を明らかにするため、プロスタグランジン受容体に対するアゴニスト/アンタゴニスト活性のほか、硫酸体特異的な結合タンパク質の同定を最終目的に研究を実施した。また、本研究を実施するにあたって、その硫酸体を調製する必要があるため、その硫酸体の調製法の確立を始めに実施した。また、プロスタグランジン硫酸体の構造を決定することは、硫酸体と受容体タンパク質との相互作用を理解する上で重要であるほか、反応機構を解き明かす上でも重要であるため、本研究ではその構造解析も試みた。

以上のことから、本研究では、プロスタグランジン硫酸体の調製法確立 (I)、硫酸体の構造決定 (II)、そして受容体探索 (III)を目的に実験を実施した。

3. 研究の方法

(I)プロスタグランジン硫酸体の調製法確立

①低分子化合物硫酸体の簡便で大量調製可能な手法として当研究室で確立された代謝工学的手法によるプロスタグランジン硫酸

体の調製を試みた。プロスタグランジン硫酸転移酵素 SULT7A1を発現するように組み換えた大腸菌 (BL21) を、2 mM 硫酸マグネシウム、50 mM グルコース、100 μ M プロスタグランジン含有培地中で、24 時間培養し、その培養液上清を Shimazu 社の高速液体クロマトグラフィー-HPLC (フォトダイオードアレイ検出器 SPD-M20A)にて解析することで、硫酸体産生能を評価した。

②精製酵素を用いた試験管内酵素反応によるプロスタグランジン硫酸体の調製を試みた。リコンビナント酵素は、プロスタグランジン硫酸転移酵素 SULT7A1を発現するように組み換えた大腸菌 (BL21) からグルタチオンセファロースビーズを用いて精製した。精製酵素、50mM Bistris-propane (pH 9.5)、基質プロスタグランジン、硫酸基供与体 PAPS (3'-phosphoadenosine 5'-phosphate)を混ぜ合わせ、30°Cで3時間反応後、硫酸体の抽出を行った。始めに、Sep-Pak C18 カートリッジ (Waters)を用いて硫酸体の粗抽出画分を調製し、更に、HPLCを用いて硫酸体の精製を行った。

(II)プロスタグランジン硫酸体の構造決定

①HPLCにより精製したプロスタグランジン硫酸体をメタノールに溶解し、精密質量分析計 Q-Exactive (Thermo Scientific)を用いて、構造解析を行った。

②15d-PGJ2 硫酸体を重水素水に溶解後、核磁気共鳴装置 NMR (Bruker Advance 400 MHz, 9.4 T)を用いて、¹H-NMR スペクトルの解析を行った。

(III)プロスタグランジン硫酸体の受容体探索

①:プロスタグランジン受容体に対する作用解析

ヒト小腸 mRNA から作製した cDNA を鋳型に PCR によるクローニングを行った。得られた計 11 種類のプロスタノイド受容体(DP, EP1-4, FP, IP)の CDS 領域(タンパク質コーディング領域)を培養細胞発現ベクター pcDNA4 に導入することで発現系を作製した。作製したプロスタグランジン受容体発現ベクターをリポフェクション法によりヒト胎児腎細胞株(HEK-293)に導入後、プロスタグランジン硫酸体を作用させ、cAMP および Ca²⁺の測定を行うことでリガンド活性およびアンタゴニスト活性を測定した。

cAMP 測定実験：cAMP 誘導性のプロスタノイド受容体である DP1, DP2, EP2, EP3-I,-II,-III,-IV, EP4, IP に対するアゴニスト/アンタゴニスト活性に関しては、Promega 社の cAMP-Glo Assay キットを用いて、解析を行った。ATTO 社のルミネセンス-PSN を用いて発光強度を測定することでプロスタグランジンの cAMP 産生誘導性を評価した。
Ca²⁺測定実験：Ca²⁺誘導性のプロスタノイ

ド受容体である EP1 および FP に対するアゴニスト/アンタゴニスト活性は、同仁化学研究所の細胞内カルシウム測定キット Calcium Kit II-Fluo4 を用いて解析を行った。TECAN 社の蛍光プレートリーダー GENios を用いて蛍光強度を測定することで、プロスタグランジンによる細胞内 Ca²⁺濃度誘導性を評価した。

②硫酸体特異的な受容体探索

ビオチン標識プロスタグランジンを基質に、50mM Bistris-propane (pH 9.5)、リコンビナント精製 SULT7A1 酵素、および硫酸基供与体 PAPS を混ぜ合わせ、30°C で 3 時間反応後、HPLC を用いてビオチン標識 15d-PGJ2 硫酸体の精製を行った。次に、結合タンパク質の材料として、ラット十二指腸および小腸をホモジネイトして作製した膜面分タンパク質溶液と作製したビオチン標識 15d-PGJ2 硫酸体を 37°C で 1 時間反応させた。反応後、NeutrAvidin-HRP (Pierce) を用いたウエスタンブロッティングにて、ビオチン標識硫酸体結合タンパクの検出を行った。

4. 研究成果

プロスタグランジン硫酸体調製に先立って、当初基質として予定していたシクロペンテノンプロスタグランジンである prostaglandin A₂ (PGA₂) の硫酸体がフォトダイオードアレイ検出器により解析可能であるかを検討した結果、PGA₂ (極大吸収波長 216 nm) の硫酸体は、フォトダイオードアレイの測定波長範囲である 190-800nm の波長域では観測できないことが明らかとなったことから、本研究では当初予定していた PGA₂ ではなく、シクロペンテノン型プロスタグランジンである 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15d-PGJ₂) の硫酸体調製を試み、以降の実験は、15d-PGJ₂ の硫酸体を使用した。尚、15d-PGJ₂ は、極大吸収波長が 231 nm および 308 nm であるのに対し、その硫酸体の極大吸収波長は 308 nm から 301 nm にシフトした一方、231 nm の極大吸収波長は消失していた。同様に、別のシクロペンテノン型プロスタグランジンである Δ^{12} -PGJ₂ (d12-PGJ₂) についても同様に解析した結果、極大吸収波長が 248 nm から 250 nm へと若干シフトすることが明らかになった。特に、PGA₂ の極大吸収波長が消失したことは、硫酸化によって共役 π 結合を形成している a,b-不飽和カルボニル構造(図 1)が変化していることを示していた。

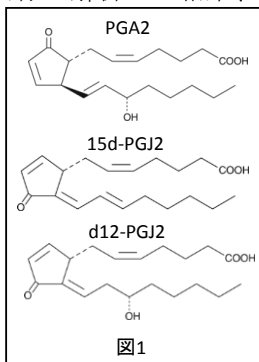


図1

(I)プロスタグランジン硫酸体の調製法確立

①硫酸転移酵素 SULT7A1 を発現誘導させた

大腸菌 (BL21) に、15d-PGJ₂ を添加し、24 時間に、その培養液上清を HPLC にて解析したところ、15d-PGJ₂ 自体が大腸菌によって代謝を受けており、完全に分解されていた。15d-PGJ₂ の添加濃度や培養時間を検討したが、硫酸体を検出することが出来なかった。このことより、代謝工学的的手法による 15d-PGJ₂ 硫酸体の調製法は、困難であることが示唆された。

②次に、代謝工学的的手法の代替法として、試験管内酵素反応によるプロスタグランジン硫酸体の調製の最適化を試みた。基質濃度および PAPS 濃度の最適化を行った結果、基質濃度および PAPS 濃度ともに 50 μ M が最適条件であったことから、本条件の下、反応を行い、精製を行ったところ、反応に使用した基質の 50% 近くの硫酸体を単離精製することが出来た。

(II)プロスタグランジン硫酸体の構造決定

①15d-PGJ₂ 硫酸体をメタノールに溶解し、MS スペクトルを解析した結果、ネガティブイオンモードにて m/z 398.17 [M-H]⁻ のスペクトルとして検出されたが、ポジティブモードでは検出されなかった。15d-PGJ₂ のスペクトル (m/z 316.20) と比較して、81.97 m/z のシフトが確認された。このシフトは、フェノール性の硫酸化にみられるスルホン酸基 (-SO₃) 付加に相当する 79.96 のシフトとは異なることから、本硫酸化反応ではスルホン酸基 (-SO₃H) のほかにプロトンの付加も同時に起きていることが示された。更なる構造解析のため、m/z 398.17 の MS/MS 解析を行ったところ、実際に 80.96 のスルホン酸基 (-SO₃H) の MS/MS スペクトルが確認されたが、この他に、硫酸基の位置を特定できるようなスペクトルを見出すことはできなかった (図 2)。

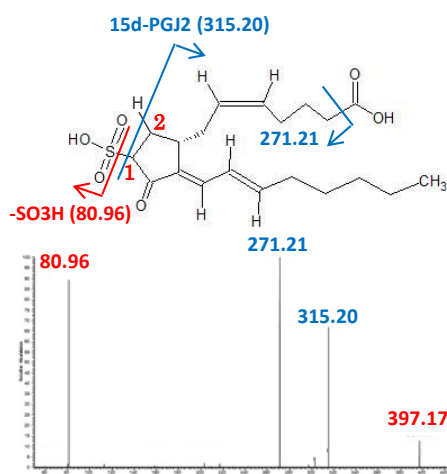


図2: m/z 397.17のMS/MSスペクトル

また、興味深いことに、MS/MS スペクトルの中に、15d-PGJ₂ に相当する m/z 315.20 および 15d-PGJ₂ が脱カルボキシル化された m/z 271.21 のピークも確認された。このことは、硫酸基が遊離する際に、隣のプロトンも

同時に遊離され、元の 15d-PGJ2 の構造に戻っていることが考えられた。

②MS 解析だけでは、十分に硫酸体の構造を解析できなかったため、¹H-NMR によって、その構造決定を試みた。H-H COSY および HSQC 解析の結果、図 2 中の構造に付してある 1 と 2 の炭素に結合しているプロトン以外には、15d-PGJ2 と一致したプロトンスペクトルが得られたことから、この 2 つの炭素に構造変化が起きていることが示され、特に、スルホン酸基の位置は、1 の炭素に結合していることが想定された。フォトダイオードアレイ、MS 解析、NMR の結果を総合して考えると、15d-PGJ2 硫酸体の構造は、図 2 に示した構造であると推定された。

(III)プロスタグランジン硫酸体の受容体探索

①:プロスタグランジン受容体に対する作用解析

各種プロスタノイド受容体(DP1-2, EP1-4, FP, IP)を発現させたヒト胎児腎細胞株(HEK-293)に、プロスタグランジン硫酸体を用いて作用させ、cAMP および Ca²⁺の測定を行った結果、プロスタグランジン E2 (PGE2)の受容体である EP1, EP2, EP3, EP4 およびプロスタグランジン F2(PGF2)の受容体である FP に対しては、アゴニスト活性およびアンタゴニスト活性を確認することはできなかった。一方、プロスタグランジン D2 (PGD2)受容体の一つである DP1 に対しては、PGD2 や基質の 15d-PGJ2 と比較するとその効果は弱い、アゴニスト活性を示した(図 3)。15d-PGJ2 は、PGD2 の代謝産物であり、DP1 に対するアゴニスト活性を保持していることが知られているが、その硫酸化は、その DP1 受容体に対するアゴニスト活性をさらに弱めるため、PGD2 代謝においてその活性制御の役割を有していることが考えられた。

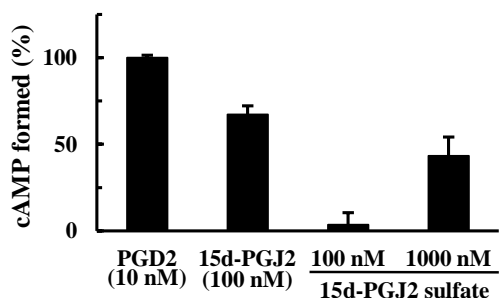


図3: DP1に対するアゴニスト活性

もう一方の PGD2 受容体である DP2 に関しては、cAMP のほか、Ca²⁺に関しても測定実験を行ったが、受容体としての活性を確認できなかったため、DP2 受容体に対する評価を行うことが出来なかった。今後、実験系を再検討し、確実に評価できる系を構築し、評価する予定である。特に興味深い結果として、プロスタグランジン I2 (PGI2)受容体で

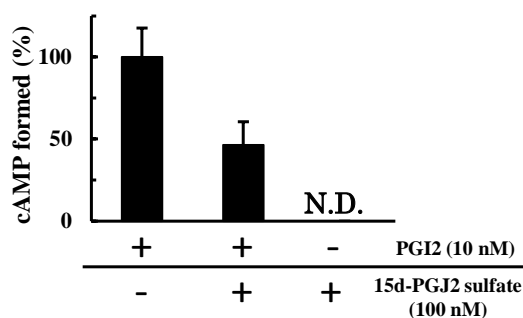


図4: IPに対するアンタゴニスト活性

ある IP に対して、アゴニスト活性は示さなかったが、アンタゴニスト活性を示した(図 4)。PGI2 は血管内皮細胞から分泌され、受容体である IP を通して、血管拡張作用や血小板凝集作用などを有する生理活性脂質である。15d-PGJ2 硫酸体は、この IP に作用して PGI2 の作用を軽減させる機能を有することが考えられ、今後、より詳細にその機能性に関して検討する計画である。

②硫酸体特異的な受容体探索

15d-PGJ2 は、a,b-不飽和カルボニル基の b 炭素原子を介したマイケル付加反応により、タンパク質と結合することが知られている。硫酸体の構造解析から、15d-PGJ2 が有する 2 つの a,b-不飽和カルボニル基の内、一方の a,b-不飽和カルボニル基を保持していることから、マイケル付加反応によるタンパク質との共有結合がどの程度保存されているのかを調べるため、ビオチン標識 15d-PGJ2 の硫酸体とラットの小腸膜画分タンパク質との結合をアビジン HRP 抗体で検出したところ、15d-PGJ2 と比較してその結合タンパク質は明らかに減少していたが、15d-PGJ2 とは異なるバンドパターンを示していた。このことから、15d-PGJ2 とは異なるタンパク質に共有結合的に結合していることが明らかになった。今後は、そのタンパク質の同定と、共有結合以外の相互作用タンパク質も検討していく計画である。

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)

[学会発表] (計 4 件)

<口頭発表>

①: Katsuhisa Kurogi, Yoichi Sakakibara, Yoshimitsu Kakuta, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki, Ming-Cheh Liu, Makoto Kimura, and Masahito Suiko: 「Study on the prostaglandin sulfation through a novel sulfation mechanism」 12th International symposium on Cytochrome P450 - Biodiversity & Biotechnology (Kyoto: 2014 年 9 月 27 日)

②: 黒木勝久: 「a,b-不飽和カルボニルを標的とした新規硫酸化反応に関する研究」 P450,

UGT, SULT 研究会 (宮崎: 2013 年 6 月 2 日)

<ポスター発表>

③: 黒木勝久、榊原陽一、角田佳充、馬場武史、福崎英一郎、Ming-Cheh Liu、木村誠、水光正仁: 「a,b-不飽和カルボニル基を標的としたプロスタグランジン硫酸化反応に関する研究」 第 87 回日本生化学会大会 (京都: 2014 年 10 月 16 日)

④: Katsuhisa Kurogi, Yoichi Sakakibara, Yoshimitsu Kakuta, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki, Ming-Cheh Liu, Makoto Kimura, and Masahito Suiko: 「Study on the prostaglandin sulfation through a novel sulfation mechanism」 12th International symposium on Cytochrome P450 – Biodiversity & Biotechnology (Kyoto: 2014 年 9 月 27 日)

[その他]

ホームページ

<http://biochemistrylab.web.fc2.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒木 勝久 (Kurogi, Katsuhisa)

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号: 20647036