

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580138

研究課題名(和文) 硫酸転移酵素の生理機能と生体シグナルの変換・伝達

研究課題名(英文) Functions of sulfotransferases and their signal transductions

研究代表者

水光 正仁 (Suiko, Masahito)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：00128357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生理機能の不明なオーファン硫酸転移酵素(SULT)のSULT4A1およびSULT7A1の生理機能解明と生体シグナルの変換・伝達への関与解明を目的に研究を行った。SULT4A1に関しては、ゼブラフィッシュ胚を用いた発生段階での遺伝子発現解析を行った結果、神経系の発生・発達において機能を担っていることを明らかにした。一方、SULT7A1に関しては、基質特異性を検討して、シクロペンテン型のプロスタグランジン(PGA2や15d-PGJ2)の硫酸化を明らかにした。以上のことから、SULT4A1およびSULT7A1の生理機能と生体シグナルの変換・伝達への関与を明らかにすることが出来た。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we focused on the evaluation of physiological relevance of two kinds of orphan sulfotransferases (SULTs) such as SULT4A1 and SULT7A1 whose biochemical/physiological functions are unknown. RT-PCR and in situ hybridization analyses using zebrafish embryos revealed that SULT4A1 was specifically expressed in whole brain and spinal cord. These results indicate that SULT4A1 plays important roles in the early development of a nervous system of zebrafish embryos. On the other hand, detail characterization of mouse SULT7A1 demonstrated that SULT7A1 exhibited the specific sulfating activity toward cyclopentenone prostaglandins including PGA2 and 15-deoxy-delta-12,14-PGJ2 (15d-PGJ2), which were endogenous metabolites of PGE2 and PGD2, respectively, but not PGE2 and PGD2. These studies would encourage us to investigate additional biochemical characterization of these orphan SULTs in the pursuit of yet-to-be-defined function.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：酵素 硫酸転移酵素 薬物代謝 硫酸化 プロスタグランジン オーファン ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

(1) 硫酸転移酵素 (SULT) に関しては、国内外にいくつかの研究グループがあり精力的に研究が行われていた。特に、薬物の解毒代謝機構としてヒト肝臓の SULT に関する薬学的研究が多く、研究計画時、テーラーメイド医療を目指した SULT の遺伝子多型に関する研究が多数見受けられた。このような SULT 研究の潮流にあって、申請者らの研究グループは、マウス SULT に関しては 17 種類中 12 種類を発見していたことと、全てのマウス SULT のリコンビナント酵素の発現系を持つことで、世界でも最も整備されたマウス SULT の研究基盤を有すると確信していた。また、生体シグナルの変換・伝達への関与に着目した点、それによって生体制御分子の硫酸体に新規生理機能を想定した研究を計画している点など、独創的な発想から独自の研究領域を確立していた。

(2) 生体内における硫酸化を触媒する酵素は SULT と呼ばれ、現在までにマウス SULT は、17 種類以上存在することが知られ、その内の 12 種類を申請者らの研究グループが発見した実績があった。これらの SULT の多くは、解毒代謝機構に関与する酵素として研究されてきたものであるが、数種の新規 SULT はその生理的な基質が同定されておらず、生理機能も不明なままのためオーファン SULT と位置づけられていた。

2. 研究の目的

本研究においては、これらのオーファン SULT の生理機能の解明と生体シグナルの変換・伝達への関与を中心に研究を実施することにした。標的としては、オーファン SULT と位置づけられている SULT4A1 および SULT7A1 に絞り込み、リコンビナント酵素の調製と生化学的な諸性質の検討、*in situ* ハイブリダイゼーションによる組織特異的発現解析、培養細胞における機能解析などを中心に研究を実施することにした。これらの研究の結果より、オーファン SULT を中心に SULT の生体シグナルの変換・伝達制御機構における生理機能を明らかにすることにした。

(1) マウス SULT4A1 は、脳で特異的に発現する硫酸転移酵素であり、ヒトとマウスの間でアミノ酸配列が 98% 以上保存されているユニークな SULT である。これらの特徴から、重要な生理機能への関与が示唆され、最近の報告では統合失調症への関与などが考えられていた。しかしながら、その基質分子は同定されていないことから、*in situ* ハイブリダイゼーションによる組織特異的発現解析を行うことにより、基質分子を推定し、それらを発展させ生理的な基質同定から生理機能を解明する。

(2) マウス SULT7A1 に関しては、現在までの研究で生体内における情報伝達分子である生理活性脂質プロスタグランジン類を特異的に硫酸化するユニークな機能を持つこ

とを見出している。プロスタグランジンは、炎症や免疫、血圧低下作用や血小板凝集作用など種々の生理活性を持つ化合物群であり、アラキドン酸から合成されるエイコサノイドの一つである。今回、硫酸化プロスタグランジンの調製法確立とそれらを用いて生理機能解明を行うことにした。

3. 研究の方法

(1) *in situ* ハイブリダイゼーションによる SULT4A1 の脳内局在性の検討

SULT4A1 は脳で特異的に発現していることが知られる、しかしながら、脳の内部において局所的な発現部位 (海馬、視床、小脳など) や、発現している細胞の種類 (ニューロン、グリア、アストロサイトなど) に関して詳細な結果が得られていない。そこで、ゼブラフィッシュをモデルに *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現部位の解析を行った。プローブとしては、SULT4A1 の cDNA を鋳型に *in vitro* transcription による RNA プローブを作製し実験を行った。同時に、コントロールとして SULT1A1, SULT2A1, SULT2B1 などのプローブを用いた実験を行い比較し、空間的な SULT の局在性とニッチに関する情報を得た。

次に、SULT4A1 は、哺乳動物から魚類まで幅広い生物種で発現が確認されている。そこで、ゼブラフィッシュをモデルとしてモルフォリノアンチセンスオリゴの受精卵へのマイクロインジェクションによる SULT4A1 遺伝子ノックダウン試験を行った。特に、受精から 10 日までの期間における胎児期から稚魚期において行動学的な観点から解析を進めた。

(2) マウス SULT7A1 の生理機能解明

1) SULT7A1 の生物種間の諸性質比較

SULT7A1 によるプロスタグランジン硫酸化が生物種間で普遍的に存在するのか調べるために、ヒト、ラット、ニワトリ、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエルなど種々のモデル生物のゲノムデータベースの検索を行った。さらに、これらのモデル生物の SULT7A1 遺伝子が見出された場合、PCR によりオープンリーディングフレーム (ORF) を増幅し、大腸菌発現用ベクター (pGEX シリーズ、または pET シリーズ) にサブクローニングしてリコンビナント酵素を調製した。得られた酵素を用いて、種々のプロスタグランジン類をはじめとした化合物の硫酸化を検討し、SULT7A1 が生物種を超えてプロスタグランジンを特異的に硫酸化するか確認した。

さらに、SULT7A1 はマウスで特徴的な発現を示すことから、PCR や *in situ* ハイブリダイゼーションにより SULT7A1 の発現組織を解析し、生物種間の発現組織の比較等を行った。これらの結果より、生体内におけるプロスタグランジン硫酸化の機能を生体シグナルの変換・伝達に関連して明らかにした。

2) プロスタグランジン硫酸体の酵素的硫酸化による調製法確立

SULT7A1を用いてPGB₂、PGD₂、PGE₂など既に硫酸化が確認されている化合物の酵素的硫酸化による硫酸体の調製法の確立を行った。反応には、リコンビナント SULT7A1と硫酸供与体として活性硫酸 PAPS そして基質としてPGを加えた反応系で行い、反応後プロスタグランジン硫酸体を分離用HPLCにより単離精製した。さらに、精製した化合物は、質量分析、NMR等によりその構造を決定した。

3) プロスタグランジン硫酸体の生理機能解明

プロスタグランジン硫酸体をプロスタグランジンの標的細胞由来の細胞株に作用し、その影響を蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動を基盤にしたプロテオーム解析によりタンパク質を網羅的に解析することで検討した。種々のプロスタグランジンおよびその硫酸体、さらにその他の生体制御分子およびその硫酸体の影響を生体シグナルの変換・伝達に関連して同様に調べて比較解析した。

4. 研究成果

(1) *in situ* ハイブリダイゼーションによるSULT4A1の脳内局在性の検討

SULT4A1の機能解明に向けた新たな糸口を得るため、ゼブラフィッシュ胚を用いたホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法による発生段階での遺伝子発現解析を行った。その結果、SULT4A1は脳全体および脊髄において発現していることを確認することが出来た(図1)。

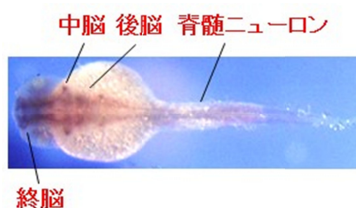


図1. *in situ* ハイブリダイゼーションによるSULT4A1の発現解析

また、ノックダウン実験において、前脳、中脳、後脳の形態的異常が観察された。受精後6時間胚においては、既に神経系分化の予定運命が決まっており、今回RT-PCRでSULT4A1の発現を確認したところ受精後3時間胚では発現していないが、6時間胚では発現していることが確認出来た。このことから、ノックダウン実験における形態的発達の異常は、SULT4A1遺伝子のノックダウンが大きく影響して起こったものであるということが示唆され、SULT4A1が神経系の発生・発達においてなんらかの機能を担っていることが考えられた。

(2) マウス SULT7A1 の生理機能解明

1) 硫酸転移酵素 SULT7A1 の生物種間の諸性質比較

マウス SULT7A1 の遺伝子配列情報を基に、様々なモデル生物のゲノムデータベースを調べたところ、ヒトやチンパンジーなどの霊長類やゼブラフィッシュなどの魚類には SULT7A1 遺伝子の存在を確認することができなかった。一方、ラットやウシ、ニワトリ、アメリカツメガエルといった霊長類以外の哺乳類や鳥類、両性類では、SULT7A1 遺伝子がタンパク質をコードしている遺伝子として見出された。マウス SULT7A1 のアミノ酸配列との相同性は、それぞれ、94%、74%、64%、78%であった。このことから、SULT7A1 は、両生類、鳥類、霊長類以外の哺乳類に広く保存され、その触媒作用の保存性は、今後の検討課題となった。

マウス SULT7A1 の遺伝子発現解析をRT-PCRおよび *in situ* hybridizationを用いて行った。その結果、小腸上皮細胞特異的に発現していることが明らかとなった。また、ラットに免疫して作成した抗 SULT7A1 抗体を用いてタンパク質発現の解析を行った結果、やはり小腸特異的に発現していた。プロスタグランジンは腸管においては粘膜保護作用や腸管免疫作用を有することから、本酵素は小腸における上述のプロスタグランジンの生理作用を調節していることが考えられた。

2) プロスタグランジン硫酸体の酵素的硫酸化による調製法確立

マウス SULT7A1 の基質特異性を詳しく調べたところ、PGE₂ や PGD₂ といったプロスタグランジンではなく、それらの非酵素的な代謝物であるシクロペンテン型のプロスタグランジン(PGA₂ や 15d-PGJ₂)を硫酸化していることが明らかとなり(表1)、PGE₂ や PGD₂ に対する活性は、酵素反応中に非酵素的に変換されたPGA₂ や 15d-PGJ₂ が SULT7A1 により硫酸化を受けたためであることが判明した。

表1. マウス SULT7A1 の基質特異性

| 基質 | 比活性 (pmol/min/mg) |
|----------------------|-------------------|
| PGD ₂ | 66.8 ± 2.6 |
| PGE ₂ | 33.7 ± 1.8 |
| PGA ₂ | 96.1 ± 4.6 |
| PGJ ₂ | 248.5 ± 11.7 |
| 15d-PGJ ₂ | 267.0 ± 12.8 |
| 2-Cyclopentenone | 339.5 ± 13.5 |

以上のことから、PGE₂ や PGD₂ の硫酸体調製に代わり、15d-PGJ₂ の硫酸体調製法の確立を行った。硫酸体調製の最適な酵素反応条件として、50 μM の基質、50 μM の硫酸基供与体 PAPS、pH 9.5、30℃、3時間反応を確立することができた。さらに、HPLCによる硫酸

体の分離・精製手法も確立することができた。こうして、基質である 15d-PGJ₂ の約 30% の硫酸体を調製することが可能になった。

3) プロスタグランジン硫酸体の生理機能解明
免疫担当細胞である白血球 T 細胞やマクロファージの細胞株 (Jurkat と RAW264.7) にプロスタグランジン硫酸体を作用させ、その影響を蛍光ディフュージョン二次元電気泳動により解析した。その結果、白血球 T 細胞株 (Jurkat) においては、T 細胞活性化や免疫シナプス形成に関わる plasmin-2 を始めとした 9 つのタンパク質スポットの発現変動が認められた。マクロファージ細胞株 (RAW264.7) では、マクロファージの食作用に重要な働きをもつ protein disulfide-isomerase A3 を始めとした 6 つのタンパク質スポットの発現変動が認められた。以上のことから、15d-PGJ₂ 硫酸体は、免疫担当細胞に作用し、その免疫機能に何らかの影響を与えていることが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

1) Hashiguchi, T., Sakakibara, Y., Kurogi, K., Yamasaki, M., Nishiyama, K., Akashi, R., Liu, M.-C. and Suiko, M. “Identification of a novel flavonoid glycoside sulfotransferase in *Arabidopsis thaliana*.”

J. Biochem., 155(2), 91-97 (2014). doi: 10.1093/jb/mvt102. (査読有)

2) Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M. and Liu, M.-C. “The use of zebrafish as a model system for investigating the role of the SULTs in the metabolism of endogenous compounds and xenobiotics”

Drug Metab Rev., 45(4), 431-440 (2013). doi: 10.3109/03602532.2013.835629. (査読有)

3) Hashiguchi, T., Sakakibara, Y., Hara, Y., Kurogi, K., Akashi, R., Liu, M.-C. and Suiko, M. “Identification and characterization of a novel kaempferol sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*.”

Biochem Biophys Res Commun., 434 (4), 829-835 (2013). doi: 10.1016/j.bbrc.2013.04.022. (査読有)

4) Teramoto, T., Fujikawa, Y., Kawaguchi, Y., Kurogi, K., Soejima, M., Adachi, R., Nakanishi, Y., Mishiro-Sato, M., Liu, M.-C., Sakakibara, Y., Suiko, M., Kimura, M., and Kakuta, Y. “Crystal structure of human tyrosylprotein sulfotransferase-2: Insights into the mechanism of protein tyrosine sulfation reaction.”

Nature Commun., 4, 1572, (2013). doi: 10.1038/ncomms2593. (査読有)

5) Kurogi, K., Davidson, G., Mohammed, Y.I.,

Williams, F.E., Liu, M.Y., Sakakibara, Y., Suiko, M. and Liu, M.-C. “Ethanol sulfation by the human cytosolic sulfotransferases: a systematic analysis.”

Bio. Pharm. Bull., 35(12), 2180-2185 (2012). (査読有)

6) Kurogi, K., Chen, M., Lee, Y., Shi, B., Yang, T., Liu, M.Y., Sakakibara, Y., Suiko, M. and Liu, M.-C. “Sulfation of buprenorphine, pentazocine, and naloxone by human cytosolic sulfotransferases.”

Drug Metab. Lett., 6(2), 109-115 (2012). (査読有)

7) Kurogi, K., Alazizi, A., Liu, M.Y., Sakakibara, Y., Suiko, M., Sugahara, T. and Liu, M.-C. “Concerted actions of the catechol O-methyltransferase and the cytosolic sulfotransferase SULT1A3 in the metabolism of catecholic drugs.”

Biochem. Pharmacol., 84, 1186-1195 (2012). doi: 10.1016/j.bcp.2012.08.009. (査読有)

8) Ko, K., Kurogi, K., Davidson, G., Liu, M.-Y., Sakakibara, Y., Suiko, M. and Liu, M.-C.

“Sulfation of ractopamine and salbutamol by the human cytosolic sulfotransferases.” *J. Biochem.*, 152(3), 275-283 (2012). doi: 10.1093/jb/mvs073. (査読有)

9) Mohammed, Y.I., Kurogi, K., Shaban, A.A., Xu, Z., Liu, M.Y., Williams, F.E., Sakakibara, Y., Suiko, M., Bhuiyan, S. and Liu, M.-C.

“Identification and characterization of zebrafish SULT1 ST9, SULT3 ST4, and SULT3 ST5.”

Aquat. Toxicol., 112-113, 11-18 (2012). doi: 10.1016/j.aquatox.2012.01.015. (査読有)

10) 水光正仁, 榊原陽一 “タンパク質の翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化” *バイオサイエンスとインダストリー*, 70(3), 201-205 (2012). (査読なし)

11) Hashiguchi, T., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Yamasaki, M., Nishiyama, K., Yasuda, S., Liu, M.-C. and Suiko, M. “Enzymatic sulfation of tocopherols and tocopherol metabolites by human cytosolic sulfotransferases.”

Biosci. Biotechnol. Biochem., 75, 1951-1956 (2011). (査読有)

12) Kurogi, K., Krasowski, M.D., Injeti, E., Liu, M.-Y., Williams, F.E., Sakakibara, Y., Suiko, M. and Liu, M.-C. “A comparative study of the sulfation of bile acids and a bile alcohol by the Zebra danio (*Danio rerio*) and human cytosolic sulfotransferases (SULTs).”

J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 127(3-5), 307-14

(2011). doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.07.011. (査読有)

13) Alazizi, A., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M. and Liu, M.-C. "Identification, characterization, and ontogenic study of a catechol O- methyltransferase from zebrafish." *Aquat. Toxicol.*102, 18-23 (2011). doi: 10.1016/j.aquatox.2010.12.016. (査読有)

14) Yasuda, S., Yasuda, T., Liu, M.-Y., Shetty, S., Idell, S., Boggaram, V., Suiko, M., Sakakibara, Y. and Liu, M.-C. "Sulfation of chlorotyrosine and nitrotyrosine by human lung endothelial and epithelial cells: Role of the human SULT1A3." *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 251(2), 104-109 (2011). doi: 10.1016/j.taap.2010.12.006.(査読有)

15) 橋口拓勇、榊原陽一、水光正仁：薬物代謝と農薬の効能：特に硫酸化について *日本農薬学会誌*, 36(2), 297-299 (2011). (査読なし)

[学会発表] (計 4 1 件)

1) 黒木勝久、榊原陽一、Liu Ming-Cheh、水光正仁：「ゼブラフィッシュグルタチオン転移酵素の同定とその諸性質検討」
日本農芸化学会 2014 年度大会 (東京)(平成 26 年 3 月)

2) 芳村俊広、黒木勝久、水光正仁、榊原陽一：「タンパク質蛍光標識技術を用いた S-ニトロシル化タンパク質の網羅的解析」
日本農芸化学会 2014 年度大会 (東京)(平成 26 年 3 月)

3) 下平武彦、黒木勝久、橋口拓勇、Ming-Cheh Liu、榊原陽一、水光正仁：「代謝工学的手法による食品機能性成分硫酸体の産生技術開発」
第 20 回日本生物工学会九州支部佐賀大会 (2013) (平成 25 年 12 月)

4) 西依利晃、古城英貴、大坪怜央、川口喜郎、黒木勝久、榊原陽一、水光正仁、木村誠、角田佳充：「ヒトタンパク質チロシン硫酸転移酵素の構造機能解析」
第 37 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) (平成 25 年 9 月)

5) 橋口拓勇、芳村俊宏、榊原陽一、下平武彦、黒木勝久、水光正仁：「プロテオーム解析によるフラボノイド硫酸体の生理機能解明」
第 37 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) (平成 25 年 9 月)

6) 福島文恵、榊原陽一、黒木勝久、角田佳充、木村誠、Ming-Cheh Liu、水光正仁：
「Tyrosylprotein Sulfotransferase 活性阻害が期

待される食品成分の探索」
第 37 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) (平成 25 年 9 月)

7) Hashiguchi, T., Sakakibara, Y., Shimohira, T., Yoshimura, T., Kurogi, K., Hara, Y., Liu, M.-C., Suiko, M. "Two-dimensional gel electrophoresis analysis of flavonoid sulfate effects on A. thaliana T87 cells."
The 12th Human Proteome Organisation World Congress (HUPO 2013) (Yokohama) (平成 25 年 9 月)

8) Yoshimura, T., Kurogi, K., Liu, M.-C., Suiko, M., Sakakibara, Y. "Proteomic analysis of the cellular signal regulation mechanism by cholesterol sulfation."
The 12th Human Proteome Organisation World Congress (HUPO 2013) (Yokohama) (平成 25 年 9 月)

9) 榊原陽一、黒木勝久、角田佳充、Ming-Cheh Liu、水光正仁：「硫黄の生体利用に関する最新知見と新展開：硫酸転移酵素の多様な機能」
第 86 回日本生化学会大会 (パシフィコ横浜) (平成 25 年 9 月)

10) 原洋介、橋口拓勇、下平武彦、黒木勝久、榊原陽一、Liu Ming-Cheh、水光正仁：「シロイヌナズナ硫酸転移酵素によるフラボノイド硫酸化」
日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部 2013 年度合同広島大会 (広島)(平成 25 年 9 月)

他 31 件

その他
ホームページ
<http://tpststult.web.fc2.com/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者
水光 正仁 (SUIKO, Masahito)
宮崎大学・大学院農学工学総合研究科・教授
研究者番号：00128357

(2)研究分担者
榊原 陽一 (SAKAKIBARA, Yoichi)
宮崎大学・大学院農学工学総合研究科・教授
研究者番号：90295197