

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05881

研究課題名(和文) 硫酸化代謝の生理的意義に関する研究：フェノール性硫酸体の合成と機能評価

研究課題名(英文) Study on physiological role of sulfation metabolism: challenges on the synthesis of phenolic sulfates and functional evaluation

研究代表者

安田 伸 (Yasuda, Shin)

東海大学・農学部・教授

研究者番号：10512923

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)：硫酸化は、一般的に標的化合物の代謝および不活性化に関与すると考えられてきたが、個々の化合物におけるその程度は不明であった。本研究では、解熱鎮痛薬であるアセトアミノフェン(APAP)の硫酸体であるAPAPSを合成し、その抗酸化活性を親化合物であるAPAPと比較した。その結果、APAPSの抗酸化活性がAPAPよりも低いものの、APAPの類似化合物であるp-アミノフェノールとその硫酸体は同等の活性を持つことが明らかとなった。以上より、硫酸化が必ずしも標的化合物の不活性化を導くと限らないことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、硫酸化は異物代謝と排泄の面のみで考えられがちであった。本研究では、一部のフェノール性化合物を例に有機合成を試み、更に生理活性の増減や減弱に、硫酸化がどの程度貢献しているのかを明らかにした。本研究で得られた成果により、将来的には硫酸化代謝後の化合物の効能を予測するための基礎となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Sulfation has been generally thought to play a role in the metabolism and inactivation of target compounds; however, the extent of this process has been unclear for individual compounds. In this study, we successfully synthesized the sulfated form of acetaminophen (APAPS) and investigated its antioxidant activity compared to that of the parent compound APAP, an antipyretic and analgesic drug. The results showed that while the antioxidant activity of APAPS was lower than that of APAP, both p-aminophenol and its sulfate, analogous compounds to APAP, exhibited comparable activity. Collectively, we concluded that sulfation may not always lead to the inactivation of target compound(s).

研究分野：食品機能科学、食品生化学、薬物代謝化学、健康食品学

キーワード：硫酸化 フェノール性硫酸体 代謝物 合成 機能性評価

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内における硫酸化は、生理活性物質や外来異物の代謝および不活性化を担う主要な代謝抱合反応の一つと考えられてきた。しかしながら、様々な硫酸化代謝物の入手が容易ではない現状のもと、個々の化合物における硫酸化による不活性化の程度は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、解熱鎮痛薬であるアセトアミノフェン(APAP)を例に、その硫酸体である APAPS を合成することとし、次にその抗酸化活性を親化合物である APAP と比較した。ここでは、類似化合物の *p*-アミノフェノール(*p*-AP)とその硫酸体(*p*-APS)においても、同様に抗酸化活性の比較評価を行った。

3. 研究の方法

- (1) 既存のチロシン硫酸体(TyrS)合成法を利用し、APAP と濃硫酸とを反応させることで、APAPS の有機合成を行い、分離精製後に各種機器分析にて真正性を確認した。
- (2) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)ラジカル消去活性試験：酢酸緩衝液中に異なる濃度で試験化合物と DPPH ラジカル溶液を加えて反応を開始した。吸光度の変化をもとに、ラジカル消去活性を指標に抗酸化力を測定し、比較評価した。
- (3) 活性型ヒト顆粒球様好中球モデル細胞における O₂ラジカル産生試験：HL-60 細胞を顆粒球様好中球細胞に分化させ、これに phorbol 12-myristate 13-acetate 刺激によって産生された O₂ラジカル量を WST-1 の変色に伴う比色法により調べた。

4. 研究成果

4-1. APAPS の有機合成 (森田ら, 2022. 東海大学紀要農学部 41, 39-46 (査読有))

最初に、解熱鎮痛薬であるアセトアミノフェン(APAP)の硫酸体である APAPS の合成を試みた。既存の TyrS 合成法を利用して、APAP を濃硫酸と反応させることで APAPS の合成と分離精製が可能か検証を行った。その結果、1 g の APAP から 91.1 mg の生成物が結晶として得られ、モル換算で 5.11%の収率を得た。得られた生成物の真正性を検証した結果、¹H-NMR スペクトル測定により APAPS の各プロトンに由来するシグナルが認められた(Figure 1)。TLC 上で APAP と異なる R_f 値を示すこと、HPLC により(Figure 2)、標品の溶出時間と一致する単一のピークが認められたことから、生成物は APAPS であることが支持された。さらに UV 吸収スペクトルの極大吸収波長における吸光度より、標品を基準とした際の APAPS 生成物は 97.0%の純度であることを確認した(Figure 3)。

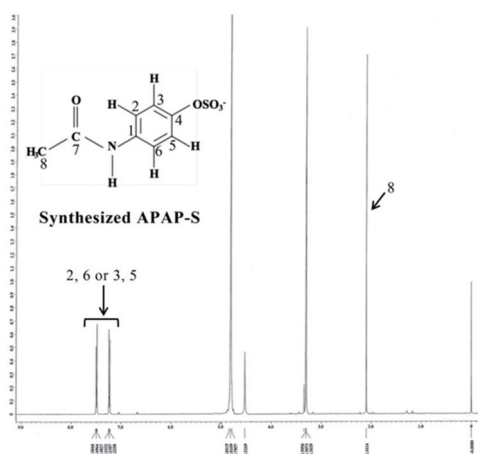


Figure 1. ¹H-NMR spectrum of the synthesized APAP-S (in deuterated methanol, 500 MHz).

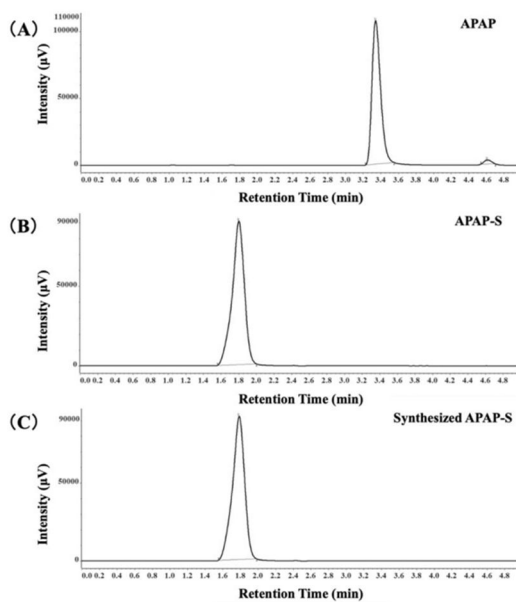


Figure 2. HPLC chromatograms of standards of APAP (A) and APAP-S (B), and the synthesized APAP-S (C).

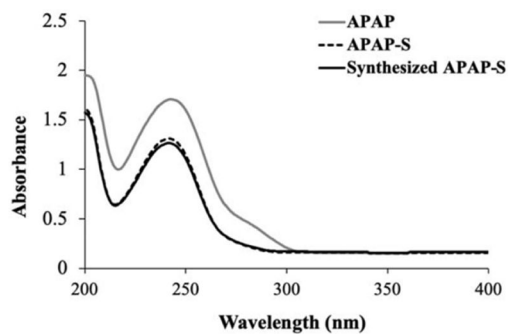


Figure 3. UV spectrum of the synthesized APAP-S with standards of APAP and APAP-S at 0.03 mg/mL ranging from 200 nm to 400 nm.

4-2. APAP、*p*-AP とそれらの *O*-硫酸体の抗酸化活性の比較評価 (Morita et al., 2022. J Toxicol Sci 47, 421-428)

DPPH ラジカル消去活性を指標に、APAPS の抗酸化活性を親化合物である APAP と比較した。その結果、APAPS の抗酸化活性が APAP よりも低いものの、APAP の類似化合物である *p*-アミノフェノールとその硫酸体は同等の活性を持つことが明らかとなった(Figure 4)。さらに活性型ヒト顆粒球様好中球モデル細胞を用いて、細胞の O₂ ラジカル産生に及ぼすこれら化合物の抑制作用を調べた。その結果、ここでも同様の傾向が得られ、とくに *p*-APS は *p*-AP と同程度の活性を示した(Figure 5)。複数の他の類似化合物を用いて構造活性相関を検証した結果、APAPS の「アセトアミド基」よりも *p*-APS の「アミノ基」が高い活性に寄与していた(figure not shown)。

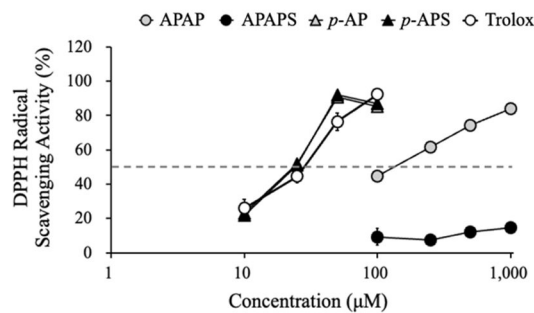


Figure 4. Effects of APAP (gray circle), *p*-AP (gray triangle), and their sulfate conjugates, APAPS (black circle) and *p*-APS (black triangle), respectively, on the DPPH radical scavenging assay.

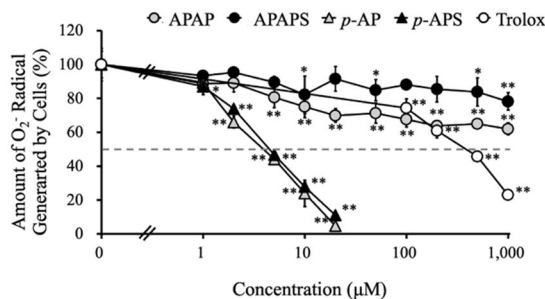


Figure 5. Effects of APAP (gray circle), *p*-AP (gray triangle), and their sulfate conjugates, APAPS (black circle) and *p*-APS (black square), respectively, on the cellular O₂⁻ radical generation in PMA-stimulated granulocytic neutrophil cell model.

4-3. 結論

以上より、APAP を濃硫酸と反応させることで、高純度の APAPS を合成することができた。次に、APAPS の抗酸化作用は APAP よりも低いものの、*p*-APS は *p*-AP と同等の活性を有することを明らかにした。そのため、活性部位となる「アミノ基」を有するフェノール性化合物においては、硫酸化が必ずしも標的化合物の抗酸化活性を不活性化へ導くとは限らない場合があることを、初めて見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Morita Chihiro, Tokunaga Yuki, Ueda Yuto, Ono Masateru, Kinoshita Hideki, Kurogi Katsuhisa, Sakakibara Yoichi, Suiko Masahito, Liu Ming-Cheh, Yasuda Shin	4. 巻 47
2. 論文標題 Investigation of radical scavenging effects of acetaminophen, <i>p</i>-aminophenol and their <i>O</i>-<i>S</i>-<i>S</i>-<i>S</i>-sulfated conjugates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 421 ~ 428
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/jts.47.421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 森田千紘, 元山優作, 谷口玲央真, 上田裕人, 木下英樹, 小野政輝, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, 安田伸	4. 巻 42
2. 論文標題 高速液体クロマトグラフィーを用いたアセトアミノフェン0-硫酸体とチロシン0-硫酸体のUV検出による測定法	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 東海大学紀要農学部	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 森田千紘, 谷口玲央真, 吉田実央, 徳永祐希, 木下英樹, 小野政輝, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, 安田伸	4. 巻 41
2. 論文標題 Acetaminophen硫酸体の有機合成	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 東海大学紀要農学部	6. 最初と最後の頁 39-46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kurogi Katsuhisa, Rasool Mohammed I., Alherz Fatemah A., El Daibani Amal A., Bairam Ahsan F., Abunnaja Maryam S., Yasuda Shin, Wilson Lauren J., Hui Ying, Liu Ming-Cheh	4. 巻 17
2. 論文標題 SULT genetic polymorphisms: physiological, pharmacological and clinical implications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology	6. 最初と最後の頁 767 ~ 784
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/17425255.2021.1940952	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsutsumi S, Tokunaga Y, Shimizu S, Kinoshita H, Ono M, Kurogi K, Sakakibara Y, Suiko M, Liu M-C, Yasuda S.	4. 巻 45
2. 論文標題 Effects of indole and indoxyl on the intracellular oxidation level and phagocytic activity of differentiated HL-60 human macrophage cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Toxicol Sci	6. 最初と最後の頁 569-579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.45.569	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsutsumi Shuhei, Tokunaga Yuki, Shimizu Shunsuke, Kinoshita Hideki, Ono Masateru, Kurogi Katsuhisa, Sakakibara Yoichi, Suiko Masahito, Liu Ming-Cheh, Yasuda Shin	4. 巻 84
2. 論文標題 Investigation of the effects of indoxyl sulfate, a uremic toxin, on the intracellular oxidation level and phagocytic activity using an HL-60-differentiated human macrophage cell model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1023 ~ 1029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1715782	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 安田伸, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁	4. 巻 8
2. 論文標題 (総説) 第2相薬物代謝における硫酸抱合体の抗酸化活性研究	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 東海大学先進生命科学研究所紀要	6. 最初と最後の頁 5-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 安田伸, 堤秀平, 森田千紘, 岩本若菜, 上田裕人, 木下英樹, 小野政輝, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁.
2. 発表標題 ヒトマクロファージ細胞モデルを用いた食食作用に及ぼす尿毒素インドキシル硫酸の影響
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田千紘, 徳永祐希, 上田裕人, 木下英樹, 小野政輝, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, 安田伸
2. 発表標題 Acetaminophen、p-Aminophenolとそれら硫酸体の抗酸化活性の比較評価
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩本若菜, 森田千紘, 瀬尾優太, 後藤優貴, 上田裕人, 平野将司, 小野政輝, 木下英樹, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, 安田伸
2. 発表標題 937ヒト分化マクロファージの細胞内酸化レベルと貪食能に及ぼす硫酸化代謝物Indoxyl Sulfateの影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度西日本支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田千紘, 徳永祐希, 谷口玲央真, 元山優作, 岩本若菜, 上田裕人, 小野政輝, 木下英樹, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, 安田伸
2. 発表標題 Acetaminophen、p-AminophenolとそれらのO-硫酸体の抗酸化活性の比較
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度西日本支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田千紘, 谷口玲央真, 吉田実央, 徳永祐希, 木下英樹, 小野政輝, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, 安田伸
2. 発表標題 Acetaminophen硫酸体の合成と真正性の検証
3. 学会等名 令和3年度 日本栄養食糧学会九州沖縄支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田千紘, 原口和也, 吉田実央, 徳永祐希, 堤秀平, 上田裕人, 木下英樹, 小野政輝, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, 安田伸
2. 発表標題 Acetaminophen硫酸体合成法の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本支部ほか化学関連支部共催, 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安田伸, 堤秀平, 森田千紘, 上田裕人, 木下英樹, 小野政輝, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁
2. 発表標題 ヒトマクロファージ細胞モデルを用いた尿毒素インドキシル硫酸の細胞内酸化レベルに及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本支部ほか化学関連支部共催, 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩本若菜, 池田知弘, 西川大貴, 上田裕人, 平野将司, 小野政輝, 木下英樹, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, 安田伸
2. 発表標題 U937ヒト分化マクロファージの細胞内酸化レベルと貪食能に及ぼすIndoxyl Sulfateの影響とその制御
3. 学会等名 第60回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安田伸, 森田千紘, 岩本若菜, 上田裕人, 小野政輝, 木下英樹, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁
2. 発表標題 Acetaminophen、p-AminophenolとそれらのO-硫酸体の抗酸化活性：構造上の他の類似化合物との比較
3. 学会等名 第60回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shin Yasuda
2. 発表標題 Investigation of antioxidant activities of Phase-II sulfated compounds
3. 学会等名 2023 International Joint Meeting of the 23rd International Conference on Cytochrome P450 and the 38th Annual Meeting of the Japanese Society for the Study of Xenobiotics [2023 ICCP/JSSX] (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩本若菜, 池田知弘, 西川大貴, 澄川碧緯, 上田裕人, 平野将司, 小野政輝, 木下英樹, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, 安田伸
2. 発表標題 Tryptophan由来Indoxyl SulfateがU937ヒト分化マクロファージ細胞に及ぼす影響と抗酸化剤による制御
3. 学会等名 令和5年度(2023年度)日本食品科学工学会西日本支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasuda S, Morita C, Motoyama Y, Ikemura N, Shiozawa H, Ueda Y, Kinoshita H, Ono M.
2. 発表標題 Determination of acetaminophen O-sulfate and tyrosine O-sulfate by high-performance liquid chromatography with UV detection
3. 学会等名 The 19th Asian Agricultural Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ikeda T, Iwamoto W, Nishikawa H, Seo Y, Goto Y, Ueda Y, Hirano M, Kinoshita H, Ono M, Yasuda S.
2. 発表標題 Effect of p-cresyl sulfate on the intracellular oxidation levels of HL-60-differentiated macrophage cells under oxidative stress: concerted actions with hydrogen peroxide and nitric oxide.
3. 学会等名 The 19th Asian Agricultural Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Iwamoto W, Sumikawa A, Goto Y, Seo Y, Ikeda T, Nishikawa H, Ueda Y, Hirano M, Ono M, Kinoshita H, Yasuda S.
2. 発表標題 On the suppression of HL-60 human leukocyte cell growth by indoxyl sulfate: regulatory effect with a representative antioxidant, Trolox
3. 学会等名 The 19th Asian Agricultural Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究室ホームページ https://sites.google.com/view/shokuki2525</p> <p>大学のホームページ ニュース掲載 農学部食生命科学科の安田教授が国際会議のシンポジウムで講演 (2023.10.03) https://www.u-tokai.ac.jp/news-campus/663206/</p> <p>修士課程の学生による硫酸化代謝と抗酸化活性に関する論文が国際誌 J Toxicol Sci に掲載されました (2022.10.06) https://www.u-tokai.ac.jp/news-campus/245852/</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小野 政輝 (Ono Masateru) (60177269)	東海大学・農学部・教授 (32644)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------