

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580114

研究課題名（和文） マウスにおける胆汁酸硫酸化の生理機能解明

研究課題名（英文） Characterization of mouse bile acid sulfotransferase

研究代表者

榊原 陽一 (SAKAKIBARA YOICHI)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：90295197

研究成果の概要（和文）：リコンビナントSULT2A4を大腸菌で発現し、基質特異性を検討した。その結果、胆汁酸類のC-7位の水酸基を特異的に硫酸化することが明らかとなった。次に、反応機構解明のため、触媒中心に位置するLeu99およびHis48を標的として部位特異的変異の導入を行い、変異酵素を作製し解析を行った。その結果、全ての変異酵素でVmax/Kmの値が低下した。さらに、L99H、H48T、H48NはKm値を著しく大きくしたことから、基質との親和性に関わる残基であると判明した。

研究成果の概要（英文）：Recombinant mouse SULT4A1 was expressed in *E. coli*. This SULT can catalyze the sulfation of 7-hydroxy group of bile acids. The site specific mutagenesis experiments show the Leu99 and His48 are important amino acid residues for substrate recognition and enzyme catalysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学化学、応用生物化学

キーワード：硫酸転移酵素、硫酸化、胆汁酸、解毒代謝

1. 研究開始当初の背景

新規硫酸転移酵素(SULT2A4)はEST(Expression Sequence Tag) data baseのクローン(clone 1499725)として機能未知の硫酸転移酵素として同定された。現在までに、我々の研究室においてSULT2A4をクローニングし、リコンビナント酵素の発現系を確立した。大腸菌で発現したリコンビナントSULT2A4は、その基質特異性を検討した結果、通常

SULT2ファミリーの硫酸転移酵素が効率よく硫酸化するプレグネノロンやデヒドロエピアンドロステロン(DHEA)に対して全く活性を示さなかった。そこで、ステロイド骨格を基本構造として持つ化合物に対する基質特性を幅広く検討した結果、胆汁酸であるコール酸やケノデオキシコール酸に特異的な活性を示すことが判明した。よって、胆汁酸を中心に基質特異性を検討した結果、C-7位に水酸基を持つ胆汁酸を特異的に硫酸化す

ることから、C-7位の水酸基特異的な新規硫酸転移酵素であることが酵素学的研究から示唆された。

現在までに報告されている胆汁酸の硫酸転移酵素は、C-3位の水酸基の硫酸化であり、C-7位の硫酸転移酵素に関する報告は無い。C-3位の硫酸化は、SULT2A1やSULT2A2などステロイドホルモンの代謝に関与する硫酸転移酵素が関与し、胆汁酸特異的な硫酸転移酵素は存在しないとされてきた。C-7位の水酸基は胆汁酸に特異的であり、このことからSULT2A4が胆汁酸特異的な硫酸転移酵素として初めて同定された酵素であり、その生理的な意義を解明することは重要である。

さらに、九州大学の角田准教授との共同研究においてSULT2A4の立体構造の解明を行った。基質であるコール酸との複合体の結晶構造解析の結果より、コール酸(水色の構造)のC-7位の水酸基が硫酸供与体であるPAPSと相互作用できる位置に存在することが示された(図1)。このことより、SULT2A4が胆汁酸C-7位特異的な硫酸転移酵素であることが構造生物学的に証明されたことになる。今後の展開として、胆汁酸C-7位の硫酸化の生理的意義の解明を目指して本研究提案を実施する。

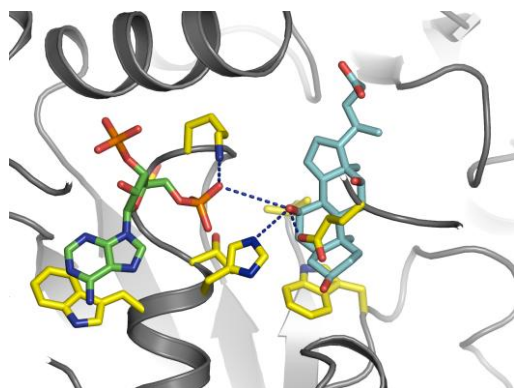


図1 SULT2A4触媒部位のアミノ酸残基とコール酸

2. 研究の目的

胆汁酸C-7位の硫酸化に関与する新規硫酸転移酵素(SULT2A4)がマウスに存在することを明らかにしていた。よって、本研究計画の期間内にSULT2A4の酵素学的諸性質の詳細な検討から胆汁酸C-7位の硫酸化の生理機能解明を目的に研究を行う。

SULT2A4の酵素学的諸性質の検討として、まず一次胆汁酸および二次胆汁酸として知られている胆汁酸類及びその代謝物である胞合胆汁酸類に対して幅広く基質特異性を検討し、各基質に関する親和性の指標

となるKmおよびVmaxを決定する。

さらに、アミノ酸配列および立体構造解析より判明した特徴的な点として、現在までに報告されているすべての低分子硫酸転移酵素(SULT)の中で、この硫酸転移酵素のみが活性中心に重要なN末端から100アミノ酸付近のヒスチジン残基を有していないことがあげられる。このことは、硫酸転移酵素の反応メカニズムを考える上で、SULT2A4のみがその他すべての硫酸転移酵素において共通に保存されているヒスチジンを触媒残基とする反応メカニズムと異なる点であり、化学反応として硫酸化のメカニズムを理解する上で新しい知見をもたらすと考えられる。よって、本研究計画において、本来ヒスチジン残基である位置のLeu99および構造解析の結果、胆汁酸のC-7位水酸基と近接するHis48およびGlu237を標的とした部位特異的な変位の導入により、鍵となる触媒残基の特定及び反応メカニズムの解明を目指した研究を実施する。

これらの一連の研究により、胆汁酸C-7位硫酸化の生理的意義を解明する。

3. 研究の方法

(1) 胆汁酸特異的な硫酸転移酵素 SULT2A4 の基質特異性の解明

リコンビナントSULT2A4は既に大腸菌において発現したものを使用した。幅広く胆汁酸類の硫酸化を検討し、硫酸化される基質に関してKm、Vmaxなど酵素学的パラメーターの決定を行った。

硫酸転移酵素の活性測定には、硫酸供与体としてPAPS(3'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate)を用いた。高感度な硫酸転移酵素アッセイには、³⁵Sで放射活性ラベルした硫酸供与体[³⁵S]-PAPSを酵素的に調製して研究に使用した。

(2) SULT2A4の部位特異的な変異の導入による触媒反応メカニズムの解明

部位特異的な変異の導入は、調製済みである大腸菌発現プラスミドpGEX-4T1にサブクローニングしたSULT2A4を鋳型に、PCRを基盤として変異を導入した。

L99H、H48T、H48N、E237A、E237Qの5種類の変異酵素を作製した。

(3) 胆汁酸硫酸転移酵素の動物種間における比較解析

ゼブラフィッシュリコンビナントSULTは、pGEX-2TKまたはpET23cを発現ベクターとして大腸菌で発現し、精製したものを使用した。

4. 研究成果

(1) 胆汁酸特異的硫酸転移酵素 SULT2A4 の基質特異性の解明

リコンビナントSULT2A4を大腸菌で発現し、得られた酵素を用いて基質特異性を検討した。その結果、予想していたとおり胆汁酸類のC-7位の水酸基を特異的に硫酸化することが明らかとなった。またSULT2A4のコール酸を基質にした場合の至適pHが6~6.5と低いことを明らかにした。また、コール酸、ケノデオキシコール酸、タウロコール酸、タウロケノデオキシコール酸、グリココール酸に対するKm値、Vmax値を決定した。その結果、コール酸がもっとも効率よく硫酸化を受ける基質であることが判明した。

(2) SULT2A4 の部位特異的変異の導入による触媒反応メカニズムの解明

SULT2A4の反応メカニズム解明のため、触媒中心に位置するLeu99およびHis48を標的として部位特異的変異の導入を行い、変異硫酸転移酵素を作製した。L99H、H48T、H48N、E237A、E237Qの5種の変異酵素を作製し解析を行った。一般に硫酸転移酵素SULTは、Leu99(SULT2A4の場合)の位置にHisが保存され、触媒残基として機能している。SULT2A4においては、保存されたHisが無く、His48が代わりに触媒残基としてプロトンを引き抜く重要な残基と予想された。H48T、H48Nの解析結果より、His48に変異を導入した変異酵素においては、活性が著しく低下し、予想を指示する結果が得られた。さらに興味深い結果として、L99Hにおいては、活性は比較的保持されたまま、野生型SULT2A4では全く活性を示さなかったPregnenoloneやDHEAに活性を示すようになった。この結果は、ステロイドC-3位の水酸基を硫酸化したと考えられ、変異により導入されたHis99がステロイドC-3位の水酸基からプロトンを引き抜き、硫酸化反応を触媒したと考えられた。Glu237の変異酵素においては、活性低下はほとんど確認できなかった。

ミュータント酵素を用いて、コール酸をモデル基質にした場合のKmおよびVmaxなどの酵素反応パラメーターを検討した。その結果を表1に示すが、L99H、H48T、H48N、E237A、E237QでVmax/Kmの値が低下した、すなわち全ての変異酵素で反応効率が低下した。特に、L99H、H48T、H48Nでは著しい反応効率の低下であった。さらに、L99H、H48T、H48NはKm値を著しく大きくしたことから、基質と

の親和性に関わる残基であると判明した。

表1. SULT4A1の変異酵素の反応速度定数

酵素名	Km (μ M)	Vmax (pmol/min/mg)	Vmax/Km
wild type	1.2	73.5	61.3
H48N	185.9	26.9	0.14
H48T	30.5	2.9	0.11
L99H	393.5	158.7	0.4
E237A	13.9	74.1	5.35
E237Q	9.3	60.6	6.51

(3) 胆汁酸硫酸転移酵素の動物種間における比較解析

マウスでは、SULT2A4が特異的に胆汁酸硫酸化に関与するが、ヒトやゼブラフィッシュなど異なる生物種ではどの硫酸転移酵素が胆汁酸硫酸化に関与するのか確認し、ヒトではSULT2A1が、ゼブラフィッシュではSULT3 ST2およびSULT3 ST3が幅広く胆汁酸硫酸化に関与することを明らかにした。

これらの結果より、マウス SULT2A4 は、胆汁酸 C-7 位の水酸基を特異的に硫酸化する非常にユニークな硫酸転移酵素である。その生理機能としては、細胞毒性の高い2次胆汁酸の生成を抑える機構への関与が考えられた。すなわち1次胆汁酸から2次胆汁酸への腸内細菌による代謝の初期に関わる C-7 位の脱水酸化をあらかじめ硫酸化しておくことで抑制し、毒性の高い2次胆汁酸の生成を抑制する解毒機構として機能している可能性が考えられた。

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 19 件)

① Mohammed, Y.I., Kurogi, K., Shaban, A.A., Xu, Z., Liu, M.-Y., Williams, F.E., Sakakibara, Y., Suiko, M., Bhuiyan, S., Liu, M.-C. "Identification and characterization of zebrafish SULT1 ST9, SULT3 ST4, and SULT3 ST5." *Aquat. Toxicol.* 112-113, 11-18 (2012). 査読有

② Kurogi, K., Krasowski, M.D., Injeti, E., Liu, M.-Y., Williams, F.E., Sakakibara, Y., Suiko, M., 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, 307-314 (2011).

査読有

- ③ Nagahama, K., Eto, N., Yamamori, K., Nishiyama, K., Sakakibara, Y., Iwata, T., Uchida, A., Yoshihara, I., Suiko, M. “Efficient approach for simultaneous estimation of the multiple health-promoting effects of foods.” *J. Agric. Food Chem.* 59, 8575-8588 (2011). 査読有
- ④ 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, 第 36 巻, 297-299 (2011). 査読無
- ⑤ Hashiguchi, T., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Yamasaki, M., Nishiyama, K., Yasuda, S., Liu, M.-C., Suiko, M. “Enzymatic sulfation of tocopherols and tocopherol metabolites by human cytosolic sulfotransferases.” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 1951-1956 (2011). 査読有
- ⑥ Yasuda, S., Yasuda, T., Liu, M.-Y., Shetty, S., Idell, S., Boggaram, V., Suiko, M., Sakakibara, Y., Fu, J., Liu, M.-C. “Sulfation of chlorotyrosine and nitrotyrosine by human lung endothelial and epithelial cells: Role of the human SULT1A3.” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 251, 104-109 (2011). 査読有
- ⑦ Alazizi, A., Liu, M.-Y., Williams, F.E., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. “Identification, characterization, and ontogenic study of a catechol *O*-methyltransferase from zebrafish.” *Aquat. Toxicol.*, 102, 18-23 (2011). 査読有
- ⑧ Hui, Y., Yasuda, T., Yasuda, S., Liu, M.-Y., Sakakibara, Y., Suiko, M., Wall, K.A., Liu, M.-C. “Inhibitory effects of nitrate stress on the sulfation of 17beta-estradiol and 4-methoxyestradiol by human MCF 10A mammary epithelial cells.” *Biol. Pharm. Bull.*, 33, 1633-1637 (2010). 査読有
- ⑨ Kurogi, K., Sakakibara, Y., Kamemoto, Y., Takahashi, S., Yasuda, S., Liu, M.-C., Suiko, M. “Mouse cytosolic sulfotransferase SULT2B1b interacts with cytoskeletal proteins via a proline/serine-rich C-terminus.” *FEBS J.*, 277, 3804-3811 (2010). 査読有
- ⑩ Liu, T.A., Bhuiyan, S., Liu, M.-Y., Sugahara, T., Sakakibara, Y., Suiko, M., Yasuda, S., Kakuta, Y., Kimura, M., Williams, F.E., Liu, M.-C. “Zebrafish as a Model for the Study of the Phase II Cytosolic Sulfotransferases.” *Curr. Drug Metab.*, 11, 538-546 (2010). 査読有
- ⑪ Kurogi, K., Dillon, J., Nasser, A., Liu, M.-Y., Williams, F.E., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. “Sulfation of drug compounds by the zebrafish cytosolic sulfotransferases (SULTs).” *Drug Metab. Lett.*, 4, 62-68 (2010). 査読有
- ⑫ Kurogi, K., Sakakibara, Y., Yasuda, S., Liu, M.-C., Suiko, M. “Molecular cloning and characterization of a novel canine sulfotransferase” *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, 16, 221-229 (2010). 査読有
- ⑬ Yasuda, S., Burgess, M., Yasuda, T., Liu, M.-Y., Bhuiyan, S., Williams, F.E., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. “A novel hydroxysteroid-sulfating cytosolic sulfotransferase, SULT3 ST3, from zebrafish: Identification, characterization, and ontogenic study.” *Drug Metab. Lett.*, 3, 217-227 (2009). 査読有
- ⑭ Teramoto, T., Adachi, R., Sakakibara, Y., Liu, M.-C., Suiko, M., Kimura, M., Kakuta, Y. “On the similar spatial arrangement of active site residues in PAPS-dependent and phenolic sulfate-utilizing sulfotransferases.” *FEBS Lett.*, 583, 3091-3094 (2009). 査読有
- ⑮ 安田伸, 榊原陽一, 水光正仁 「疾病環境における硫酸転移酵素とそのはたらき」バイオサイエンスとインダストリー, 第 67 巻, 19-23 (2009). 査読無
- ⑯ Yasuda, S., Yasuda, T., Hui, Y., Liu, M.-Y., Suiko, M., Sakakibara, Y., Liu M.-C. “Concerted action of the cytosolic sulfotransferase, SULT1A3, and catechol-*O*-methyltransferase in the metabolism of dopamine in SK-N-MC human neuroblastoma cells.” *Neurosci. Res.*, 64, 273-279 (2009). 査読有
- ⑰ Takahashi, S., Sakakibara, Y., Mishihiro, E., Kouriki, H., Nobe, R., Kurogi, K., Yasuda, S., Liu, M.-C., Suiko, M. “Molecular cloning, expression, and characterization of a novel mouse SULT6 cytosolic sulfotransferase.” *J. Biochem.*, 146, 399-405 (2009). 査読有
- ⑱ Liu, T.A., Yasuda, S., Williams, F.E., Liu, M.-Y., Suiko, M., Sakakibara, Y., Yang, Y.S., Liu, M.-C. “A target-specific approach for the identification of tyrosine-sulfated hemostatic proteins.” *Anal. Biochem.*, 390, 88-90 (2009). 査読有

⑭ Teramoto, T., Sakakibara, Y., Liu, M.-C., Suiko, M., Kimura, M., Kakuta, Y. "Snapshot of a Michaelis complex in a sulfuryl transfer reaction: Crystal structure of a mouse sulfotransferase, mSULT1D1, complexed with donor substrate and acceptor substrate." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 383, 83-87 (2009).

査読有

〔学会発表〕(計 28 件)

① 榑原陽一ほか「生理活性脂質の硫酸化による機能性発現・制御」第2回学際的脂質創生研究部会講演会、2012年1月27日、大阪、(招待講演)

② 榑原陽一ほか「マウス硫酸転移酵素 (SULT) 研究の新展開」BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同大会)、2010年12月6日、神戸、(大会シンポジウム、招待講演)

③ 榑原陽一ほか「食品成分の代謝に関与する硫酸転移酵素の多様な機能」日本農芸化学会2010年度大会、2010年3月30日、東京 (大会シンポジウム、招待講演)

ほか25件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榑原 陽一 (SAKAKIBARA YOICHI)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：90295197

(2) 研究分担者

水光 正仁 (SUIKO MASAHIRO)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：00128357