

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660081

研究課題名(和文) ,  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の新規代謝経路としての硫酸化研究課題名(英文) Sulfation of  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds.

## 研究代表者

榊原 陽一 (Sakakibara, Yoichi)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：90295197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体内における硫酸化は、薬物等の解毒代謝機構として知られ、硫酸転移酵素(SULT)が関与する。我々は、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物が硫酸化を受けることを見出し、ナフトキノンなどが幅広いSULTにより硫酸化を受けることが明らかとなった。ナフトキノン骨格を基本構造として持つ生体分子であるビタミンKの硫酸化を発見し、リコンビナントSULTを用いてビタミンK硫酸化の酵素学的な諸性質を検討した。硫酸化反応産物の構造決定をNMRと質量分析により行った。これらの知見より、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル基を有した医薬品候補分子の代謝機構として硫酸化を考慮した開発が求められることが示された。

研究成果の概要(英文)：Sulfation is involved in the metabolism and detoxification of drug and endogenous compounds. Cytosolic sulfotransferases (SULTs) responsible for the sulfation reaction have been recognized as enzymes transferring a sulfonate group from the sulfonate donor, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS), to a hydroxyl or an amino group of substrate compounds. Recently, we found a new acceptor group of sulfonate,  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl, and indeed naphthoquinone compounds have been shown to be sulfated by SULTs. In this study, we focused on the vitamin K as a novel substrate of SULTs, and intended to elucidate the mechanism of the sulfation. As a result of this study, it is clearly shown that vitamin K1 and its metabolite vitamin K3 undergo sulfation by SULTs. Structure of vitamin K3 sulfate was also estimated from the results of mass spectrometry and  $^1\text{H-NMR}$ . The physiological function of vitamin K sulfation, need to be elucidated by further research.

研究分野：応用生物化学

 キーワード：硫酸化 硫酸転移酵素 ,  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物 プロスタグランジン ナフトキノン 解毒代謝

## 1. 研究開始当初の背景

SULT は遺伝子スーパーファミリーを形成し、ヒトで 12 種、マウスで 18 種存在することが知られる。しかしながら、未だに標的基質および機能が未知の SULT がいくつか存在する。我々は、機能未知の SULT の一つである SULT7A1 が、シクロペンテノン環を有するプロスタグランジン類を特異的に硫酸化することを見いだした。この発見から、SULT の標的構造として、シクロペンテノン等の

-不飽和カルボニル化合物が基質補分子として考えられた。その後の研究により、シクロペンテノンやシクロヘキセノン等の

-不飽和カルボニル構造を持った環状化合物が広く硫酸化の標的となる可能性を確認した。従来、硫酸化による代謝を受ける生理活性物質や薬物の特徴は、水酸基またはアミノ基を有する芳香族やステロイドなどの環状化合物として知られており、この知見は長い間広く受け入れられてきた。生理活性脂質であるプロスタグランジン中のシクロペンテノン構造が硫酸化による代謝の標的構造であるという我々の研究成果は、幅広く、

-不飽和カルボニル構造を有する生理活性物質が硫酸化による代謝を受ける実験的証拠を示した。これにより、この発見は従来の硫酸化による生理活性物質や薬物代謝の常識を覆すブレークスルーとなる知見であると確信する。

生体分子としては、プロスタグランジン類 (プロスタグランジン A2 など) の他に、ケトステロイド類 (アンドロステンジオンなど) やビタミン K 類 (フィロキノンなど) など種々の生理活性物質が環状  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を有する。また、生体外化合物としてナフトキノン類やシコニン (ムラサキ由来植物色素) など生体外異物や植物二次代謝産物など多様な生理作用を有する化合物も多数存在する。そこで、これらを標的化合物として硫酸化による代謝研究を行う。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、常識的には解毒代謝機構として硫酸化の標的化合物とは考えられていなかった  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を有する生体分子や、薬物などが硫酸化による代謝を受けることを実験的に証明することであ

る。そのために、全てのヒトおよびマウスリコンビナント SULT において  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の新規代謝経路としての硫酸抱合反応への関与を明らかにする。また、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の硫酸化反応産物 (硫酸抱合体) の構造を明らかにし、加えて酵素タンパク質の構造生物学的解析により、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物硫酸化に関与するアミノ酸残基の特定し、その反応メカニズムを解明することでその生理的意義の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

環状  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物硫酸体の構造解析:

環状  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の硫酸化は、新規反応メカニズムにより進行すると想定している。その結果、従来の硫酸化反応とは異なり、反応産物としては電子の移動に伴って環状骨格の二重結合の状態が変化した化合物が生じてくることが想定されている。そこで、前述のシクロペンテノン、ナフトキノン、アンドロステンジオン、ビタミンKをモデル基質に酵素的に調製した反応産物を HPLCにて精製し、その後LC-MS/MSやNMR等を用いて有機化学的な構造解析を実施する。

部位特異的変異導入酵素による触媒アミノ酸残基の解析:

推定された触媒アミノ酸残基を標的にPCRを基盤にした方法で部位特異的変異を導入し、そのアミノ酸残基の硫酸化反応メカニズムにおける役割を解析する。His94、Lys47に加えて、部位特異的変異導入の標的アミノ酸候補としては、His51、Cys234、Leu236等がX線結晶構造解析の結果から基質と相互作用できる空間的位置に存在することから、これらのアミノ酸の変異酵素及び、これらの標的アミノ酸の変異を複数併せ持つ変異酵素なども調製し、詳細な反応メカニズムの提案を目指して研究する。さらに、SULT7A1に加えて、SULT1ファミリーおよびSULT2ファミリー硫酸転移酵素も変異導入酵素の標的とし、シクロペンテノンに加えて、ナフトキノンやアンドロステンジオンを含めた  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物の硫酸化に共通する普遍的な反応機構を明らかにする。

#### 4. 研究成果

環状 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物硫酸体の構造解析:

研究開始当初、ナフトキノンをモデル化合物としてその硫酸体の構造解析を試みて研究を行った。しかしながら、ナフトキノンは反応性が高く、酵素的硫酸化と同時に、化学的に種々の化合物やタンパク質と反応する可能性が示唆された。また、反応性が高いために硫酸化反応産物の構造決定には至らなかった。

その後、表1に示すように、ナフトキノンを基本骨格とするビタミン K 類の硫酸化が確認出来た。

表1 ヒト硫酸転移酵素によるビタミン K 硫酸化

Substrate	Specific activity (pmol/min/mg)				
	hSULT1A1	hSULT1A2	hSULT1B1	hSULT1C4	hSULT1E1
Vitamin K1	1 $\mu$ M	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	100 $\mu$ M	N.D.	N.D.	0.274 $\pm$ 0.0890	0.236 $\pm$ 0.0150
Vitamin K3	1 $\mu$ M	N.D.	N.D.	3.91 $\pm$ 0.144	0.207 $\pm$ 0.0510
	100 $\mu$ M	15.7 $\pm$ 2.78	8.15 $\pm$ 0.379	45.6 $\pm$ 3.95	23.3 $\pm$ 0.108
					11.3 $\pm$ 0.775

mean  $\pm$  S.D. N.D. = not detected

次いで、ビタミン K<sub>3</sub> の硫酸化をモデルに硫酸体のマススペクトル (図1) および <sup>1</sup>H-NMR (図2) による構造解析を検討した。

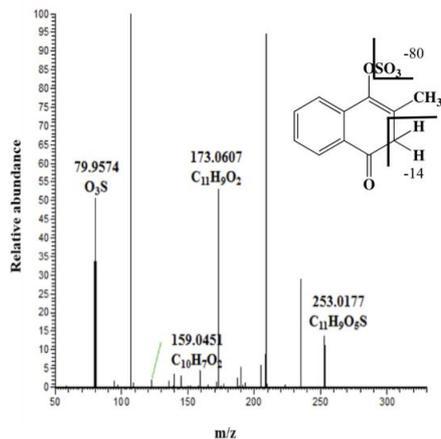


図1 ビタミン K<sub>3</sub> 硫酸体の MS 解析

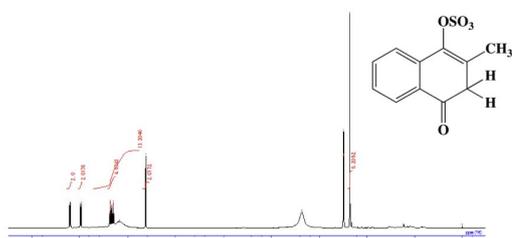


図2 ビタミン K<sub>3</sub> 硫酸体の <sup>1</sup>H-NMR 解析

部位特異的変異導入酵素による触媒アミノ酸残基の解析:

マウス SULT7A1 は、環状 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル化合物であるシクロペンテン型プロスタグランジンの特異的に硫酸化する酵素である。その反応メカニズムを解明することを目的に、その立体構造 (図3) 解析結果を基に、触媒残基と予想される His94 に変位を導入した部位特異的変異導入による酵素活性の検討を行った (表2)。

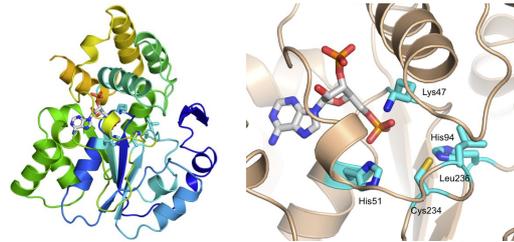


図3 マウス SULT7A1 の立体構造および触媒残基

表2 マウス SULT7A1 の部位特異的変異導入酵素

Substrate	Specific activity (pmol/min/mg)	
	WT	H94A
15d-PGJ <sub>2</sub>	267.0 $\pm$ 12.8	ND
2-Cyclopentenone	339.5 $\pm$ 13.5	ND

その結果、His94 に変異を導入した SULT7A1 は酵素活性を示さなかった。さらに、Cys234 に変異を導入した SULT7A1 も酵素活性を示さなかった (データ未掲載) ことから、これらのアミノ酸残基が触媒作用の中心を担っていることが推察された。

反応機構に関しては、完全に解明には至っていないが、触媒残基であるヒスチジンが $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造の $\beta$ -炭素を求核敵に攻撃する、または酵素反応により生じたヒドリルイオンが求核攻撃するメカニズムを想定している。

#### 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5件)

Yamamoto, A., Kim, J., Liu, M.-Y., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. Sulfation of phenylephrine by the human cytosolic sulfotransferases. Drug Metab. Lett. 8, 96-100 (2014) (査読有り)

Kurogi, K., Chepak, A., Hanrahan, M.T.,

Liu, M.Y., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.C. Sulfation of opioid drugs by human cytosolic sulfotransferases: Metabolic labeling study and enzymatic analysis. Eur. J. Pharm. Sci. 62, 40-48 (2014) (査読有り) doi: 10.1016/j.ejps.2014.05.003.

Hashiguchi, T., Sakakibara, Y., Shimohira, T., Kurogi, K., Yamasaki, M., Nishiyama, K., Akashi, R., Liu, M.-C., Suiko, M. Identification of a novel flavonoid glycoside sulfotransferase in Arabidopsis thaliana. J. Biochem. 155, 91-97 (2014) (査読有り) doi: 10.1093/jb/mvt102.

Kurogi, K., Liu, T.A., Sakakibara, Y., Suiko, M., 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, 431-440 (2013) (査読有り) doi: 10.3109/03602532.2013.835629.

Hashiguchi, T., Sakakibara, Y., Hara, Y., Shimohira, T., Kurogi, K., Akashi, R., Liu, M.-C., Suiko, M. Identification and characterization of a novel kaempferol sulfotransferase from Arabidopsis thaliana. Biochem. Biophys. Res. Commun. 434, 829-835 (2013) (査読有り) doi: 10.1016/j.bbrc.2013.04.022.

〔学会発表〕(計 23 件)

武安智樹、黒木勝久、榊原陽一、Liu Ming-Cheh、水光正仁 「ビタミン K の新規代謝経路としての硫酸化」  
2015 年度日本農芸化学会大会  
2014 年 3 月 26 日～29 日(岡山)

下平武彦、黒木勝久、Liu Ming-Cheh、榊原陽一、水光正仁 「生体制御分子硫酸体の調製技術の開発」  
2015 年度日本農芸化学会大会  
2014 年 3 月 26 日～29 日(岡山)

下平武彦、黒木勝久、橋口拓勇、Liu Ming-Cheh、榊原陽一、水光正仁 「生体制御分子硫酸体の調製技術の開発」  
2014 年度日本生物工学会九州支部熊本大会  
2014 年 12 月 6 日(熊本)

Ming-Cheh Liu, Yoichi Sakakibara, Katsuhisa Kurogi, Masahito Suiko “SULT-mediated Sulfation in Drug Metabolism”  
12<sup>th</sup> International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology  
2014 年 9 月 24 日～27 日(京都)

Katsuhisa Kurogi, Yoichi Sakakibara, Yoshimitsu Kakuta, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki, Ming-Cheh Liu, Makoto Kimura, Masahito Suiko “Study on the prostaglandin sulfation through a novel sulfation reaction mechanism”  
12<sup>th</sup> International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology  
2014 年 9 月 24 日～27 日(京都)

Takahiko Shimohira, Katsuhisa Kurogi, Takuyu Hashiguchi, Ming-Cheh Liu, Yoichi Sakakibara, Masahito Suiko “Preparatin and functions of regiospecific sulfated polyphenols”  
12<sup>th</sup> International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology  
2014 年 9 月 24 日～27 日(京都)

武安智樹、黒木勝久、Liu Ming-Cheh、榊原陽一、水光正仁 「ナフトキノン新規代謝経路としての硫酸化とその機能」  
2014 年度日本農芸化学会西日本支部大会  
2014 年 9 月 18 日～19 日(佐賀)

上中勝護、黒木勝久、Liu Ming-Cheh、水光正仁、榊原陽一「変異型酵素を用いた PAPS synthetase の酵素学的諸性質に関する研究」  
2014 年度レドックスライフイノベーション第 170 委員会 2014 年 8 月 21 日～23 日(宮崎)

武安智樹、黒木勝久、榊原陽一、水光正仁「ナフトキノン硫酸化の生理学的意義」  
2014 年度レドックスライフイノベーション第 170 委員会 2014 年 8 月 21 日～23 日(宮崎)

武安智樹、黒木勝久、榊原陽一、水光正仁「ナフトキノンの標的タンパク質探索」  
2014 年度 生物機能研究会  
2014 年 7 月 12 日 (大分)

下平武彦、黒木勝久、橋口拓勇、Liu

Ming-Cheh、榊原陽一、水光正仁 「食品機能性成分の硫酸体の調製技術開発と機能解明」2014年度 生物機能研究会  
2014年7月12日（大分）

上中勝護、黒木勝久、Liu Ming-Cheh、水光正仁、榊原陽一 「変異型酵素を用いた PAPS synthetase の酵素学的諸性質に関する研究」2014年度 生物機能研究会  
2014年7月12日（大分）

上中勝護、黒木勝久、Liu Ming-Cheh、水光正仁、榊原陽一 「変異型酵素を用いた PAPS synthetase の酵素学的諸性質に関する研究」2014年度 日本生化学会九州支部例会  
2014年5月17日～18日（福岡）

榊原陽一 「硫酸転移酵素の多様な機能」第86回日本生化学会大会 シンポジウム  
2013年9月11日～14日（横浜）

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」  
日本農芸化学会中四国支部・西日本支部合同大会 2013年9月5日～6日（広島）

高瀬憲太郎、黒木勝久、橋口拓勇、Liu Ming-Cheh、水光正仁、榊原陽一 「マウス SULT2 硫酸転移酵素の転写調節領域解析」  
日本農芸化学会中四国支部・西日本支部合同大会 2013年9月5日～6日（広島）

下平武彦、榊原陽一、橋口拓勇、原洋介、黒木勝久、Liu Ming-Cheh、水光正仁 「代謝工学的手法による位置特異的硫酸化ポリフェノールの生産」  
2013年度 P450, UGT, SULT 研究会  
2013年6月1日～2日（宮崎）

黒木勝久、榊原陽一、Liu Ming-Cheh、水光正仁 「 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和カルボニル基を標的とした新規硫酸化反応に関する研究」  
2013年度 P450, UGT, SULT 研究会  
2013年6月1日～2日（宮崎）

橋口拓勇、榊原陽一、下平武彦、原洋介、

黒木勝久、Liu Ming-Cheh、水光正仁 「フラボノイド配糖体硫酸転移酵素の諸性質検討」  
2013年度 P450, UGT, SULT 研究会  
2013年6月1日～2日（宮崎）

世良奈津子、橋口拓勇、黒木勝久、榊原陽一、水光正仁、木村誠、角田佳充 「シロイヌナズナ硫酸転移酵素 SOT8 の構造解析」  
2013年度 P450, UGT, SULT 研究会  
2013年6月1日～2日（宮崎）

②原洋介、榊原陽一、橋口拓勇、下平武彦、黒木勝久、Liu Ming-Cheh、水光正仁 「フラボノイド硫酸体特異的硫酸転移酵素の探索」 2013年度 P450, UGT, SULT 研究会  
2013年6月1日～2日（宮崎）

②菅原進太郎、竹内良、小野正輝、井越敬司、榊原陽一、水光正仁、安田伸 「p-Nitrophenol 硫酸抱合体 O<sub>2</sub>-radical 産生系に及ぼす影響」  
2013年度 P450, UGT, SULT 研究会  
2013年6月1日～2日（宮崎）

③西依利晃、兼清美帆、水光正仁、榊原陽一、黒木勝久、木村誠、角田佳充 「ヒト硫酸転移酵素 SULT1C4 の X 線結晶構造解析」  
2013年度 P450, UGT, SULT 研究会  
2013年6月1日～2日（宮崎）

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://biochemistrylab.web.fc2.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

榊原 陽一 (SAKAKIBARA, Yoichi)  
宮崎大学・農学部・教授  
研究者番号：90295197

### (2) 研究分担者

水光 正仁 (SUIKO, Masahito)  
宮崎大学・農学部・教授  
研究者番号：00128357

黒木 勝久 (KUROGI, Katsuhisa)  
宮崎大学・農学部・助教  
研究者番号：20647036