

## 研究概要

本研究基盤研究(B)では「内分泌かく乱物質の体内動態、特にステロイド代謝と硫酸化との関係解明」を目的として研究した。

生体内における硫酸化は、生体外異物や薬物の解毒代謝機構として、さらにステロイドホルモンや神経伝達物質の濃度調節機構として広く知られている。近年、解毒代謝機構としての硫酸化がテーラーメイド医療やトキシコゲノミクス分野で注目されつつある。ここでは、この解毒代謝機構としての硫酸化について最近の研究の動向を紹介する。

### 1: はじめに

生物は太古の昔より、リン酸と硫酸の無機酸のうちリン酸を情報伝達やエネルギー生産の道具として用いていたが、硫酸に関しては長年その機能は分からなかった。生体内における無機硫酸の機能として、様々な生体外異物や生理活性物質の硫酸エステル化に関して近年の研究から色々なことが分かってきた。

生体内における硫酸化は、生体外異物や薬物の解毒代謝機構、そしてステロイドホルモンや神経伝達物質であるカテコールアミン類の濃度調節機構として古くから研究されてきた。この様な背景から、硫酸転移酵素は我々の生体内で不必要となった化学物質を体外に排泄する機能を担っていると考えられている。近年、硫酸転移酵素の研究分野にも分子生物学的手法が取り入れられ、酵素学的あるいは生化学的な研究から明らかにすることが困難な様々なことが分かってきた。筆者等の研究グループは分子生物学的手法を導入し、この硫酸転移酵素に関して精力的に cDNA クローニングを行った。その結果、少なくともヒトにおいて 12 種類、マウスにおいて 14 種類の硫酸転移酵素遺伝子が存在することが明らかになった。このことから、同じく解毒代謝機構の酵素として知られるシトクロム P-450 酵素群と同様に硫酸転移酵素が、遺伝子スーパーファミリーを形成していることが判明した。ヒトおよびマウス硫酸転移酵素遺伝子の解析の結果、硫酸転移酵素遺伝子スーパーファミリーは、少なくとも 5 つのファミリーから形成されることが明らかとなった(1,2)。現在、ポストゲノム時代の研究として、体質や性質を決定していると考えられている遺伝子の個人や個体間の違い(遺伝子多型)が注目されている。硫酸転移酵素の遺伝子多型は薬物の代謝や応答に密接な関わりがあることが予想され、テーラーメイド医療における投薬時の「さじ加減」を決定する重要な情報となることが期待されている。

### 2: 活性硫酸 PAPS の合成と硫酸化

生体内における硫酸化に関してまずその反応を簡単に説明する。生体内での硫酸化は、最初に硫酸の活性化が必要である。我々ヒトをはじめ生物は硫酸供与体として 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) という活性硫酸を ATP と無機硫酸塩から合成される必要がある(3)。生体内におけるエネルギー源として大切な 2 分子の ATP を消費して 1 分子の活性硫酸(PAPS)を合成することからも硫酸化がいかに重要か容易に予想されます。この PAPS の合成には、ATP sulfurylase と Adenosine 5'-phosphosulfate kinase (APS kinase)によって触媒される二つの酵素反応が関与することが知られています(図1)。これら二つの PAPS 合成に関与する酵素は、大腸菌、カビといった微生物や植物においては二つの異なる酵素タンパク質として存在している。しかし、ヒトやマウスといった哺乳動物や、ショウジョウバエにおいては二つの酵素が進化の過程で融合した酵素 PAPS 合成酵素(PAPS synthetase)として存在しより効率よく PAPS が合成できるようになってきたと考えられます。1998年に我々はヒトの PAPS 合成に関与する PAPS synthetase (Bifunctional ATP sulfurylase/adenosine

5'-phosphosulfate kinase)をクローニングし、大腸菌で発現した。その結果、bifunctional な酵素の ATP sulfurylase と APS kinase の領域を単独で発現させた場合でもそれぞれの酵素活性を有していることを明らかとし報告した(4)。このようにして合成された PAPS を用いて PAPS 上の硫酸基をフェノール性の水酸基の上に転移する反応が硫酸化であり図 2 に反応の概要をまとめた。

現在、我々の研究室では遺伝子工学的に大腸菌で発現したヒト PAPS 合成酵素を用いて硫酸転移酵素研究に不可欠な活性硫酸 PAPS を酵素的に合成している。さらに同じく大腸菌で発現したリコンビナントヒト硫酸転移酵素を調製し研究している。今後の応用の可能性として、これらの活性硫酸 PAPS や硫酸転移酵素を利用することで、様々な化学物質の硫酸体を酵素的に合成するのに利用できると考えられる。

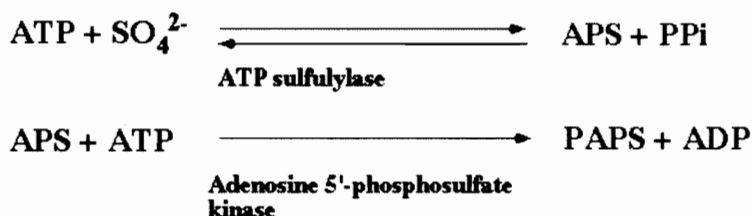


図 1：活性硫酸 PAPS の合成

PAPS: 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate ; APS: adenosine 5'-phosphosulfate ; PPi: pyrophosphate

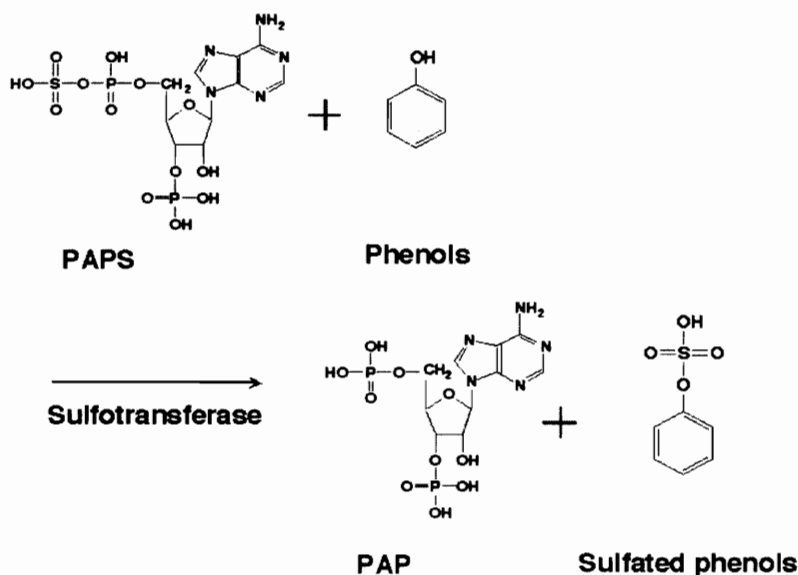


図 2：フェノール性化合物の硫酸化

PAPS: 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate ; PAP: 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate

### 3：硫酸転移酵素遺伝子スーパーファミリー

近年、硫酸転移酵素の研究分野において分子生物学的手法を導入することによって、これまでの生化学的な研究では困難であった新しいタイプの硫酸転移酵素遺伝子が多数発見されるようになった。硫酸転移酵素として初めて cDNA クローニングが報告されたのはウシのエストロゲン硫酸転移酵素である。その後、ラットヒドロキシステロイド硫酸転移酵素、ヒトフェノール硫酸転移酵素等の cDNA クローニングが報告され、現在までの研究で少なくともヒトで 12 種類、マウスにおいて 14 種類以上の硫酸転移酵素が存在しトクロム P-450 同様に硫酸転移酵素も遺伝子スーパーファミリーを形成していることが判明した (図 3) (1,2)。

現在、これらの硫酸転移酵素の分類に関しては硫酸転移酵素ワークショップにおいて提唱された

分類法によりアミノ酸配列をもとに分類することが推奨されている(5)。分類法としては硫酸転移酵素遺伝子は *SULT* という略号を用いて、その後にファミリーを表す数字を付ける。例えば、*SULT1* はフェノール硫酸転移酵素ファミリー、*SULT2* はヒドロキシステロイド硫酸転移酵素ファミリーというように分類される。さらにこれらのファミリーごとにアミノ酸配列が60%以上一致するグループをサブファミリーとし、アルファベットをAから順に付けていく。以下はこの硫酸転移酵素分類法に基づく分類名を用いることとする。

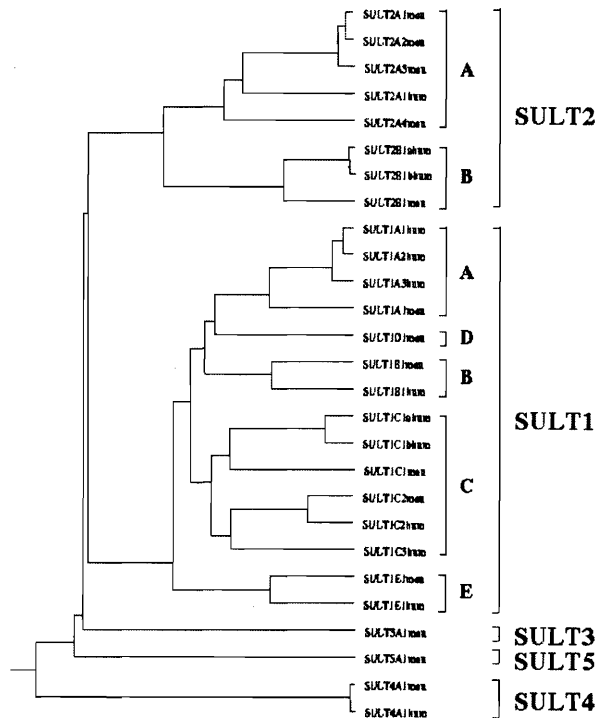


図3：ヒトおよびマウス硫酸転移酵素遺伝子ファミリーの分子系統樹

### フェノール硫酸転移酵素遺伝子ファミリー

古くから解毒代謝機構に関与する酵素としてフェノール硫酸転移酵素がある。このフェノール硫酸転移酵素遺伝子ファミリー (*SULT1* Family) は図3に示したように、AからEの5種のサブファミリーにより形成されていることが知られている。この *SULT1* ファミリーに属する硫酸転移酵素の機能としてはフェノール性の生体外異物や薬物の解毒代謝やカテコールアミン、甲状腺ホルモンおよびエストロゲンの濃度調節機構に関与すると考えられている。

*SULT1A* サブファミリーはヒトにおいてP型フェノール硫酸転移酵素 (*SULT1A1*、*SULT1A2*) 2種とM型フェノール硫酸転移酵素 (*SULT1A3*) の3種が存在することが報告されている。これらの酵素は肝臓における解毒代謝機構としての硫酸化において中心的な役割を果たしていると考えられ非常に精力的に研究されてきた。

我々の研究グループが発見したドーパ・チロシン硫酸転移酵素(*SULT1B1*)は新規サブファミリー *SULT1B* に属する。この酵素は、ドーパやチロシンそして甲状腺ホルモンなどの硫酸化による濃度調節に関与すると考えられている(6)。

*SULT1C* サブファミリーは最初ラット肝臓のアリルアミン硫酸転移酵素 *ST1C1* として報告された(7)。この酵素の特徴として、硫酸化により変異原性が著しく活性化される前駆変異原物質 *N*-ヒドロキシアセチルアミノフルオレンの代謝活性化に関与し、変異原作用や発ガンと密接な関係があると考

えられた。我々の研究グループはヒト *SULT1C* サブファミリーに属する酵素 2 種をクローニングしそれらが発ガンと密接な関係があることを報告した(8)。

マウス *SULT1D1* はナフチルアミンのアミノ基の硫酸化やプロスタグランジンやロイコトリエンといった炎症性メディエーターの硫酸化を触媒するユニークな活性を持つことが明らかとなった(9,10)。ヒトにおいて *SULT1D1* は偽遺伝子となり機能していないと考えられ、硫酸転移酵素遺伝子ファミリーの進化を考える上で非常に興味深い対称である。

*SULT1E* サブファミリーはエストロゲン硫酸転移酵素と呼ばれてきた酵素 (*SULT1E1*) がこれに該当し、標的臓器におけるエストロゲンの不活性化や濃度調節に関与すると考えられている。

#### ヒドロキシステロイド硫酸転移酵素遺伝子ファミリー

ヒドロキシステロイド硫酸転移酵素遺伝子ファミリー(*SULT2* Family)は図 3 に示したように A と B の二つのサブファミリーの存在が報告されている。これら *SULT2* ファミリーに属する硫酸転移酵素は、水酸基を持つステロイドホルモン類を特異的に硫酸化することが知られている。

*SULT2A* サブファミリーはデヒドロエピアンドロステロン硫酸転移酵素(*SULT2A1*)がヒトでクローニングされている。我々研究グループは、この *SULT2A1* を利用した新規変異原試験法を考案している。この試験法は、9-ヒドロキシメチルアントラセンなど硫酸化によって特異的に代謝活性化される変異原物質の検出に有用である。現在、この新規試験法を用いて、緑茶カテキン類をはじめとした様々な食品機能性成分の抗変異原作用に関して研究を行っている(11)。

*SULT2B* サブファミリーはヒトおよびマウスでその存在が報告されている(9,12)。*SULT2B* サブファミリーの特徴としては、コレステロールを特異的に硫酸化することが最近報告された。またアミノ末端のアミノ酸配列の異なるスプライズバリエーションが存在し、基質特異性がスプライシングにより変化することが硫酸転移酵素として初めて報告されている(13)。

#### その他の硫酸転移酵素遺伝子ファミリー

ヒトやマウスをはじめとした、哺乳動物の細胞質硫酸転移酵素には、*SULT1* および *SULT2* の二つのファミリーの外に、*SULT3* から *SULT5* の全部で少なくとも 5 つの遺伝子ファミリーが存在することが明らかとなっている。*SULT3* ファミリーは最初ウサギから *SULT3A1* が芳香族アミンを特異的に硫酸化する酵素として報告された(14)。我々もマウス *SULT3A1* をクローニングし同様に芳香族アミンを特異的に硫酸化することを確認している。*SULT4* ファミリーは脳に特異的に発現する硫酸転移酵素として *SULT4A1* がヒト、ラット、マウスから報告されている(15,16)。この *SULT4A1* に関しては、ヒトとマウスの間でアミノ酸配列が 98%一致し、進化の過程で非常に良く保存されていることや、脳において特異的に発現していることから重要な機能に関与すると考えられている。*SULT5* ファミリーは我々が新規マウス硫酸転移酵素として *SULT5A1* の存在を明らかにしている。これらの新しいファミリーに分類される硫酸転移酵素に関しては、生理機能が未だに不明な点も多く、今後の研究から、生体内における硫酸化の機能が現在考えられているよりもずっと複雑で多岐にわたっていることが明らかになると期待される。

#### 4：硫酸転移酵素ファミリーの多様な機能

これまで述べてきた硫酸転移酵素の生体内での機能として、我々の研究グループは大きく以下に箇条書きで示した 4 種に分類して研究している(2)。

- ①：生体外異物の解毒代謝機構としての硫酸化

- ②：内因性の生理活性物質の濃度調節機構
- ③：食品機能性成分の硫酸化
- ④：前駆変異原物質の硫酸化による代謝活性化

硫酸転移酵素は、長い間解毒代謝機構として地道に研究されてきた。最近になり、硫酸転移酵素もシトクロム P-450 酵素群同様に注目されるようになってきた。このような背景をふまえて、上述した機能の中で、特に本稿においては解毒代謝機構としての硫酸化に的を絞り、今後の展望に関して解説する。

#### 生体外異物の解毒代謝機構としての硫酸化

我々の研究グループをはじめ、硫酸化は生体外異物や薬物の解毒代謝機構を主体として、肝臓で発現する硫酸転移酵素の研究が精力的に行われてきた。硫酸転移酵素の生体外異物の解毒代謝に関する機能と密接に関係がある我々の研究として、水酸基またはアミノ基を持つ内分泌かく乱物質（環境ホルモン）の硫酸化がある。ビスフェノールA、アルキルフェノール、ジエチルスチルベステロール(DES)そしてエチニルエストラジオール等の内分泌かく乱物質候補物質にはフェノール性の水酸基をもつものが多く見られる。そこで、我々はフェノール性水酸基を持つ内分泌かく乱物質の硫酸化を検討し報告した(17)。この研究の結果、これらの化合物は種々の硫酸転移酵素によりすみやかに硫酸化を受けること。さらにこれらの化合物の硫酸エステル類は細胞に再吸収されないことから最終代謝産物として尿中に排泄されていることが分かった。内分泌かく乱物質（環境ホルモン）の硫酸化に関しては「化学と生物」誌に解説しているのでぜひそちらも参考にしていきたい(18)。

硫酸転移酵素の解毒代謝機構に関する研究は、地道な研究が続けられてきたにもかかわらず脚光を浴びることはあまり無かった。しかしながら、硫酸化に関する研究を取り巻く環境が少しずつ変化し、現在様々な分野で注目を集めつつある。そのような背景から、国家の政策や大型プロジェクトとしても解毒代謝機構に関する研究が注目されるようになり、そのような研究の一つとして、ゲノム情報を活用した創薬基盤技術の確立を目指してトキシコゲノミクス分野の研究が厚生労働省を中心に進められている。解毒代謝機構に関する硫酸転移酵素に関してもトキシコゲノミクス分野の研究の重要性が認識されている。このような研究から、硫酸転移酵素の機能を網羅的に解明することは、医薬品の開発のみならず種々の化学物質の有機成分分野において、新規化合物の生理機能や生体内代謝に関する有用な情報基盤が確立されると期待されている。

さらに、これからの研究として、薬物代謝酵素の一つである硫酸転移酵素の遺伝子多型(polymorphism)も格好のテーラーメイド医療の対象と考えられている(19,20)。硫酸転移酵素の遺伝子多型に関しては現在わずかな情報が得られているのみである、しかしながら、今後の多型解析プロジェクトなどからますます新しい情報が発信されることが期待されている。これらの硫酸転移酵素の遺伝子多型による個体間の薬物に対する感受性や代謝能力の違いが明らかとなれば、投薬時の薬物の選択や投与量を決定する情報として大いに活用されるものと期待されている。このような研究による情報の蓄積が、将来硫酸転移酵素の遺伝的な背景を考慮したテーラーメイド医療を可能とするであろう。さらに硫酸転移酵素遺伝子多型と発ガンリスクの関係や食品機能性成分の個体間の有効性の差と硫酸化の関係など興味の尽きない研究分野としてますます発展していくことが期待されている。

#### 参 考 文 献

- 1) 榊原陽一、水光正仁：バイオサイエンスとインダストリー 59, 17-21 (2001).
- 2) 榊原陽一：日本農芸化学会誌 77, 1094-1101 (2003).
- 3) P. W. Robbins and F. Lipmann: *J. Biol. Chem.* 229, 837-851 (1957).
- 4) K. Yanagisawa, Y. Sakakibara, M. Suiko, Y. Takami, T. Nakayama, H. Nakajima, K. Takayanagi, Y.

- Natori and M.-C. Liu: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62,1037-1040 (1998).
- 5) R.M. Weinshilboun, D.M. Otterness, I.A. Aksoy, T.C. Wood, C. Her and R.B. Raftogianis: *FASEB J.* 11, 3-14 (1997).
  - 6) Y.Sakakibara, Y. Takami, C. Zwieb, T. Nakayama, M. Suiko, H. Nakajima and M.-C. Liu: *J. Biol. Chem.* 270, 30470-30478 (1995).
  - 7) K. Nagata, S. Ozawa, M. Miyata, M. Shimada, D.W. Gong, Y. Yamazoe and R. Kato: *J. Biol. Chem.* 268, 24720-24725 (1993).
  - 8) Y. Sakakibara, K. Yanagisawa, J. Katafuchi, D.P. Ringer, Y. Takami, T. Nakayama, M. Suiko and M.-C. Liu: *J. Biol. Chem.* 273, 33929-33935 (1998).
  - 9) Y. Sakakibara, K. Yanagisawa, Y. Takami, T. Nakayama, M. Suiko and M.-C. Liu: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 681-686 (1998).
  - 10) M.-C. Liu, Y. Sakakibara and C.-C. Liu: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 65-69 (1999).
  - 11) 榊原陽一、水野貴之、Ming-Cheh Liu、水光正仁 : *New Food Industry* 45, 60-64 (2003).
  - 12) C. Her, T.C. Wood, E.E. Eichler, H.W. Mohrenweiser, L.S. Ramagli, M.J. Siciliano, R.M. Weinshilboun: *Genomics* 53, 284-295 (1998).
  - 13) H. Fuda, Y.C. Lee, C. Shimizu, N.B. Javitt and C.A. Strott: *J. Biol. Chem.* 277, 36161-36166 (2002).
  - 14) T. Shiraga, K. Iwasaki, T. Hata, K. Yoshinari, K. Nagata, Y. Yamazoe and Y. Ohno: *Arch. Biochem. Biophys.* 362, 265-274 (1999).
  - 15) C.N. Falany, X. Xie, J. Wang, J. Ferrer and J.L. Falany: *Biochem. J.* 346, 857-864 (2000).
  - 16) Y. Sakakibara, M. Suiko, T.G. Pai, T. Nakayama, Y. Takami, J. Katafuchi and M.-C. Liu: *Gene* 285, 39-47 (2002).
  - 17) M. Suiko, Y. Sakakibara and M.-C. Liu: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267, 80-84 (2000).
  - 18) 榊原陽一、水光正仁 : *化学と生物* 38, 776-778 (2000).
  - 19) R.B. Raftogianis, T.C. Wood, D.M. Otterness, J.A. Van Loon and R.M. Weinshilboun: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 298-304 (1997).
  - 20) A. Iida, A. Sekine, S. Saito, Y. Kitamura, T. Kitamoto, S. Osawa, C. Mishima and Y. Nakamura: *J. Hum. Genet.* 46, 225-240 (2001).