

宮崎大学大学院

博士学位論文

食品に含まれる機能性成分硫酸体の
生理機能に関する研究

宮崎大学大学院農学工学総合研究科

生物機能応用科学専攻

下平武彦

目次

略語	i
序論	1
方法	8
第1章	11
マウス硫酸転移酵素 mSULT2A8 の胆汁酸7位特異的硫酸化機構解明 および生理機能の解明	
実験方法	14
結果・考察	22
要約	34
第2章	35
食品機能性成分硫酸体の調製技術開発および生理機能解明	
実験方法	37
結果・考察	43
要約	61
結論	63
参考文献	66
謝辞	74

略語

ABC :	ATP-binding cassette transporter
ADP :	adenosine diphosphate
APS :	adenosine 5'-phosphosulfate (APS)
ATP :	adenosine triphosphate
CA :	cholic acid
cAMP :	cyclic adenosine monophosphate
CDCA :	chenodeoxycholic acid
cDNA :	complementary DNA
CRE :	cAMP response element
CREB :	cAMP response element binding protein
CYP :	cytochrome P450
DHEA :	dehydroepiandrosterone
DMEM :	dulbecco's modified eagle's medium
DMSO :	dimethyl sulfoxide
DNA :	deoxyribonucleic acid
dNTPs :	deoxynucleotide triphosphates
EDTA :	ethylenediaminetetraacetic acid
FBS :	fetal bovine serum
FXR :	farnesoid X receptor
GCA :	glycocholic acid hydrate
GPCR :	G protein-coupled receptor
GPR30 :	G protein-coupled receptor 30
GST :	glutathione S-transferase
HPLC :	high performance liquid chromatography
IPTG :	isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
LCA :	lithocholic acid
MAPK :	mitogen-activated protein kinase
MS :	mass spectrometry
MSF :	major facilitator superfamily
NMR :	nuclear magnetic resonance
ORF :	open reading frame
PAP :	3'-phosphoadenosine 5'-phosphate
PAPS :	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate
PAPSS :	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthetase
PCR :	polymerase chain reaction
PMA :	phorbol 12-myristate 13-acetate
RND :	resistance-nondulation-division

SDS :	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE :	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SRM :	small multidrug resistance
SULT :	cytosolic sulfotransferase
TCA :	taurocholic acid sodium salt hydrate
TCDCA :	sodium taurochenodeoxy cholate
TFA :	trifluoroacetic acid
THF :	tetrahydrofuran
TLC :	thin layer chromatography
TMS :	tetramethylsilane
UDCA :	ursodeoxycholic acid
UDP :	uridine diphosphate
UGT :	UDP-glucuronosyltransferase
WAX :	weak anion exchanger

序論

多くの生物は生体内に取り込まれた様々な薬物や生体外異物に対する防御機構として、解毒代謝機構を備えている (Figure 1) (1)。そのうち、肝臓における、薬物や生体外異物を代謝する解毒代謝機構として、薬物代謝第一相反応(phase I reaction)、第二相反応(phase II reaction)の二つがあることが知られている。第一相反応にて、水に難溶性の低極性の化合物は酸化・還元・加水分解を受け、水酸基・アミノ基などの親水性の高い官能基が導入される。その後、抱合反応と称される第二相反応を受ける。この第二相反応を担う酵素として細胞質硫酸転移酵素 (Cytosolic sulfotransferase : SULT)、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UDP-glucuronosyltransferase : UGT)、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (Glutathione S-transferase : GST) 等があり、それぞれの酵素が対応する極性の高い官能基 (硫酸、グルクロン酸、グルタチオン) を化合物に付加し、第一相反応によって代謝を受けた化合物の極性を更に高める。その後、極性が高められた第二相代謝産物は ATP-binding cassette (ABC) トランスポーター等により血中に運ばれ、最終的に尿中へ排泄される(2)。このように、生体内に取り込まれた化合物の多くは様々な代謝を受けることが分かる。本研究ではこのうち、薬物代謝第二相酵素の SULT に焦点を当て研究を行った。この SULT によって触媒される硫酸抱合反応は、一般的に薬物や食品成分等を含む生体外異物の代謝、内因性化合物の濃度調節に関わっていることが知られている。

硫酸抱合は 1876 年に Baumann らが初めて報告し (3)、現在までに薬物や食品成分等の生体外異物の解毒代謝・排泄およびステロイド、甲状腺ホルモン、カテコールアミン、胆汁酸等の内因性化合物の濃度調節に関与することが知られている (4-6)。この、硫酸化反応は、一般的に活性硫酸 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) の硫酸基を基質のヒドロキシル基やアミノ基に転移する反応で、硫酸転移酵素と呼ばれる酵素ファミリーによって触媒される酵素反応である (Figure 1)。硫酸抱合の研究は前述の PAPS が 1957 年に Lipmann らによって発見された(7)ことにより生化学的な手法を中心に行われるようになった。PAPS は哺乳動物の全ての組織で合成される生体内唯一の硫酸基供与体であり (8, 9)、哺乳動物において、PAPS を合成する PAPS synthase は ATP sulfurylase 活性と adenosine 5'-phosphosulfate kinase (APS kinase) 活性を合わせ持つ bifunctional な酵素として存在している (8-10)。細菌類、真菌類、藻類や植物も同様に PAPS を合成することができるが、それぞれ ATP sulfurylase と APS kinase を独立した遺伝子として有し、機能していることが判明している (11, 12)。PAPS 合成は最初に ATP sulfurylase により無機硫酸塩と ATP から APS が合成され、更にもう 1

分子の ATP のリン酸基が APS kinase により APS に転移され、最終的に 2 分子の ATP から 1 分子の PAPS と ADP が生成される。この反応は生体内でのエネルギー源として重要な ATP を消費していることから、硫酸化が生体内で極めて重要な役割を担っていることが想定される (Figure 1)。

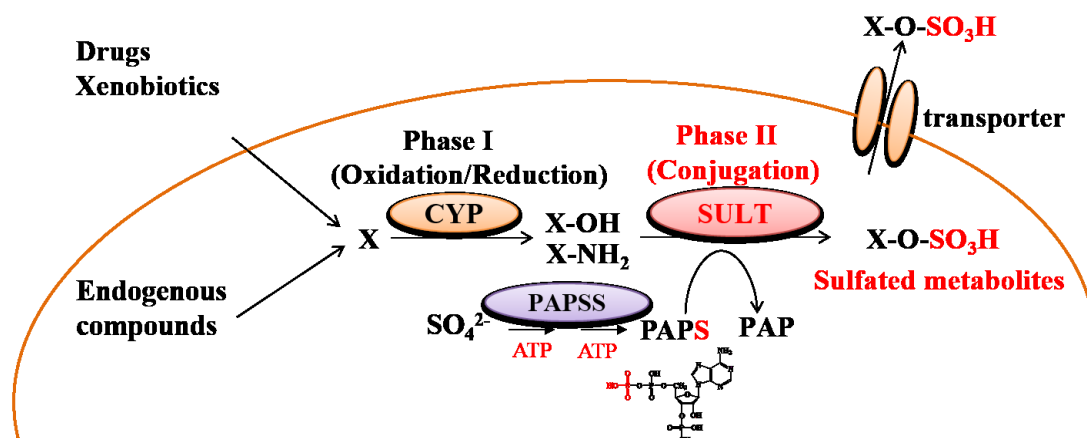


Figure 1. 様々な化合物の硫酸化による代謝の概略図

CYP : cytochrome P450, SULT: cytosolic sulfotransferase, PAPS: 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate, PAP: 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate, PAPSS: PAPS synthase

硫酸転移酵素に関する研究は 1980 年代までは臓器由来の酵素タンパク質を扱う生化学的な手法による研究が中心であった。しかし、1990 年代後半にはヒト、マウス、ラットを始め様々な動物種において硫酸転移酵素のクローニングが盛んに行われ、多数の硫酸転移酵素が発見された。SULTs においては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(13) (Figure 2)。現在、ヒトにおいては 4 つの遺伝子ファミリー (SULT1, SULT2, SULT4 および SULT6) からなる 13 種類、マウスにおいては 7 つの遺伝子ファミリー (SULT1, SULT2, SULT3, SULT4, SULT5, SULT6 および SULT7) からなる 23 種類の酵素が発見されている。これらの SULT 遺伝子ファミリーはそれぞれの SULTs のアミノ酸配列の相同性に基づき分類されており、アミノ酸の相同性が 45% 以上であればファミリー、65% 以上の相同性を持つ場合はサブファミリーとして区分している(13)。



Figure 2 human SULT および mouse SULT の分子系統樹

SULT のタンパク質の配列は GenBank から取得し使用した。GenBank accession number : hSULT1A1 (NP_001046), hSULT1A2 (NP_001045), hSULT1A3 (NP_808220), hSULT1A4 (NP_808220), hSULT1B1 (NP_055280), hSULT1C2 (NP_001047), hSULT1C3a (NP_001008743), hSULT1C3d (DAA01770), hSULT1C4 (NP_006579), hSULT1E1 (NP_005411), hSULT2A1 (NP_003158), hSULT2B1a (NP_004596), hSULT2B1b (NP_814444), hSULT4A1 (NP_055166), hSULT6B1 (Q6IMI4), mSULT1A1 (NP_598431), mSULT1B1 (NP_063931), mSULT1C1 (NP_061221), mSULT1C2 (NP_081211), mSULT1D1 (NP_058051), mSULT1E1 (NP_075624), mSULT2A1 (NP_001104766), mSULT2A2 (AAA40145), mSULT2A3 (NP_001095056), mSULT2A4(NP_001095004), mSULT2A5 (NP_001171909), mSULT2A6 (NP_001074794), mSULT2A7 (modified from LOC194586), mSULT2A8 (NP_780459), mSULT2B1a1 (XP_006541060), mSULT2B1a2 (XP_006541061), mSULT2B1b (NP_059493), mSULT3A1(NP_065590), mSULT3A2 (NP_001094922), mSULT4A1 (NP_038901), mSULT5A1 (NP_065589), mSULT6B1 (NP_001157097), mSULT7A1 (NP_001138862)。SULT のタンパク質のアライメント解析には Clustal W を使用し、分子系統樹は MEGA6 ソフトウェアを用いて UPGMA 法にて作成した。それぞれの SULT はアミノ酸配列の相同性により分類した。

これらの SULTs のうち、ヒトにおいて SULT1 ファミリー (SULT1) は SULT1A, SULT1B, SULT1C および SULT1E の 4 つのサブファミリーから構成されており、主に生体外異物の解毒代謝を担っていることが知られている。SULT1A は 4 つのメンバー (SULT1A1, SULT1A2, SULT1A3 および SULT1A4) から成り、主にフェノール性の化合物の硫酸化を触媒する。SULT1A1 および SULT1A2 は主に *p*-nitrophenol, α -naphthol または minoxidil 等の様々なフェノール性の化合物を幅広く硫酸化する(14)。一方で SULT1A3 は dopamine 等のカテコールアミン類を主に硫酸化する(15)。SULT1A4 は SULT1A3 と遺伝子配列が 98.5%の相同性を持つが、翻訳されるアミノ酸配列は SULT1A3 と同一であり、これは SULT1A3 の遺伝子重複した結果だと考えられる (16)。SULT1B はヒトにおいては SULT1B1 の 1 種類のみ確認されており、肝臓、小腸、大腸や白血球に発現し、主に dopa/tyrosine または 3,3',5-triiodo-L-thyronine (T₃), thyroxine (T₄), 3,3',5'-triiodothyronine (rT₃) および 3,3'-diiodothyronine (T₂)等の甲状腺ホルモンを硫酸化することが報告されている(17,18)。SULT1C には SULT1C2, SULT1C3a, SULT1C3d, SULT1C4 の 3 つのサブファミリーからなる 4 つの酵素が存在する。SULT1C2 は胃、腎臓、肝臓、甲状腺等で発現しているが、SULT1C4 は胎児期の肺や腎臓で発現するという特徴を持ち、*p*-nitrophenol や *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene 等の硫酸化を行うことが報告されている (19)。また近年の報告により SULT1C4 はエストロゲン類の 17 β -estradiol(E₂)やエストロゲン様の化合物である genistein に対して強い硫酸化活性を持ち、胎児期のホルモンの代謝制御に関与することが示唆されている(20)。SULT1C3 遺伝子は選択的 exon (exon7a,7b および exon8a,8b) を持ち、選択的スプライシングによって SULT1C3a および SULT1C3d の 2 つのスプライスバリエントを生成する。SULT1C3 は霊長類にのみ確認されているが、ヒトの SULT1C3 の exon7b および exon8b の配列はげっ歯類の SULT1C1 との相同性が非常に高く SULT1C3 はヒトの欠損している SULT1C1 遺伝子から進化した遺伝子ではないかと示唆されている。SULT1C3a は hydroxyl-chlorinated biphenyl 類に対して特異的だが弱い硫酸化活性を持ち、一方 SULT1C3d は hydroxyl-chlorinated biphenyl 類 および胆汁酸や甲状腺ホルモン等幅広い基質を硫酸化することが報告されている (21)。SULT1E はヒトにおいては SULT1E1 の 1 種類が存在するが、エストロゲン硫酸転移酵素とも呼ばれ、E₂, estrone および様々な合成エストロゲンに対して高い親和性を持つことが判明している(4, 22)。

SULT2 ファミリーにおいては SULT2A1 と SULT2B1 の 2 つの遺伝子が存在する。さらに SULT2B1 は SULT2B1a および SULT2B1b の 2 つのスプライスバリエントが存在する。SULT2A1 は DHEA 硫酸転移酵素とも呼ばれ、DHEA, androsterone, testosterone, や estradiol 等の様々な内因性のステロイド類を硫酸化する (4,23)。ステロイド類の硫酸体は活性型ステロイドの前駆体として呼ばれる

こともあり、硫酸基を酵素反動的に加水分解する働きを持つ *sulfatase* によって活性型ステロイドへ変換される (24,25)。このように SULT2A1 が非常に幅広くステロイド類を硫酸化するが、SULT2B1 の基質特異性は非常に限定的であり、SULT2B1a は *pregnenolone* を特異的に硫酸化するのに対して、SULT2B1b は *cholesterol* を主に硫酸化することが報告されている (26)。

SULT3 ファミリーの酵素はヒトには存在しないが、ウサギやマウスで発見されている (27,28)。マウスにおいて SULT3 には SULT3A1 および SULT3A2 の 2 つのアイソフォームが存在し、1-naphtylamine に対して高い硫酸化活性を持つことが報告されている。また、肝臓でのみ発現が確認されていることから、マウスの肝臓において芳香族アミン類等の生体外異物の解毒代謝に関わると考えられる。

SULT4 ファミリーは脳において高発現しており、様々な種間で高度に保存されているが、その基質は未だ判明していない(29,30)

SULT5 ファミリーは我々の研究室にてマウス SULT5A1 がクローニングおよび諸性質検討が行われており *pregnenolone* や *ergosterol* 等のヒドロキシステロイドに対して活性を持つことが判明している (31)。

SULT6 ファミリーはヒトにおいては SULT6B の mRNA 発現が精巣にて確認されているが、タンパク質の発現およびその活性は確認されていない (32)。一方でマウスにおいて、SULT6B1 は *thyroxine* や *bithionol* に対して硫酸化活性を持つことが報告されているが、その機能は完全には解明されていない (33)。

SULT7 ファミリーは我々の研究室にてマウスの SULT7A1 がクローニングおよび諸性質検討がなされており、興味深いことに胃や小腸に存在し、強い生理活性を持つ *prostaglandin* 類に対して硫酸化活性をもつことが判明している(34)。そのため、SULT7A1 は *prostaglandin* 類が関与する炎症等の生理機能を硫酸化によって制御している可能性が考えられる。

このように、SULT は様々な外因性・内因性の化合物を解毒代謝・不活性化し、体外への排泄を促進させていることが分かる。しかしながら、近年の報告によりコレステロール硫酸体である *cholesterol 3-O-sulfate (CH-3S)* は、補体タンパク質である C3a に結合し、*protein kinase A (PKA)* や *casein kinase-1 (CK-1)* によるリン酸化を阻害したり(35)、*sulfatide* と *cholesterol-3-O-sulfate* に結合する *SCS-binding proteins* が CK-1 を活性化することがわかっており(36)、このように、硫酸化を受けることにより化合物が新たな機能を獲得することが報告されている。また食品中に含まれる機能性成分であるポリフェノール類の化合物は硫酸化による代謝を受けても機能を持つという報告がある。例えば、*resveratrol* の硫酸体である *resveratrol 3-O-sulfate* および *resveratrol 3,4'-O-disulfate* がマクロファージにおいて

resveratrol と同様に LPS 誘導性の TNF- α の産生を抑制し抗炎症に関与するといったような報告がある (37)。また、他の研究においても、大豆に含まれるイソフラボンの daidzein の硫酸体において daidzein 7-O-sulfate のみが癌細胞において、核内受容体の estrogen receptor- β (ER- β) に作用し増殖を抑制するという報告があるように(38)ポリフェノールにおいて硫酸化される水酸基の位置によって、その機能が異なるということが明らかになりつつある。このように、従来、一般的に不活性化されると考えられてきた硫酸化において、その代謝物に機能性を持つ化合物が発見されてきているため、代謝産物の機能性を評価することは重要だと考えられる。しかしながら、このような代謝物のうち硫酸体に関する報告は少ない。そのため、本研究ではこのような代謝に関する SULT の機能解明の一環として、食品に含まれる機能性成分や、内因性化合物の硫酸化に注目し、さらにその代謝物である硫酸体の機能解明に関する研究を行った。

本研究では、まず第 1 章にて SULT の機能解明の一環として、機能解明が進んでいないマウスの硫酸転移酵素 mSULT2A8 に焦点を当てた研究を行った。近年の研究報告から、mSULT2A8 は脂質の分解や吸収に関わる胆汁酸類の 7 位の水酸基を特異的に硫酸化する酵素だということが報告されている(39)。しかしながら、mSULT2A8 の胆汁酸 7 位特異的な硫酸化メカニズムは未だ分かっていない。また、硫酸体の機能性を解明するためには、SULT による化合物の硫酸化における位置特異性および基質認識機構を理解しておく必要がある。胆汁酸やポリフェノール類等の食品成分は複数の水酸基を持ち、代謝物である硫酸体も複数の位置特異的硫酸体が存在する。そして、上記したように代謝物の硫酸基の位置や数の違いにより、その機能が異なるようである。そこで、mSULT2A8 のように、複数水酸基を持つ化合物を位置特異的に硫酸化するような SULT は非常に興味深く、基質の水酸基位置特異的な認識機構を解明することは、硫酸体の機能解明を行う上で重要であると考えた。さらに基質の水酸基位置特異的な認識機構を解明することで、食品成分含む様々な複数水酸基を持つ化合物の硫酸化にも応用できることが期待できる。そこで、その他の SULT と比較して特徴的な基質認識機構を持つと考えられる mSULT2A8 の胆汁酸 7 位特異的な硫酸化メカニズム解明を目的に研究を行った。また、上記した研究背景から、mSULT2A8 による胆汁酸 7 位硫酸化によって化合物の機能がどのように変化するのか解析する必要がある。そのため、胆汁酸 7 位硫酸体を調製し、硫酸体の機能解析を行った。以上を踏まえ、第 1 章では、mSULT2A8 による胆汁酸 7 位硫酸化メカニズムと、胆汁酸 7 位硫酸体の機能を関連付け、マウスにおける mSULT2A8 による胆汁酸 7 位硫酸化の生理学的意義の解明を試みた。

次に第 2 章にて食品機能性成分のひとつのポリフェノール類の硫酸体の調製

技術の開発を行った。ポリフェノール類や第 1 章で取り扱った胆汁酸のような複数の水酸基を持つ化合物の硫酸体は調製が困難(硫酸化部位の制御、コスト、収量や調製の煩雑さ等)であり、市販品もほとんど存在しておらず、機能を解析する上で硫酸体の調製方法が確立していないことが大きな問題点であった。そこで、このような調製困難な硫酸体を簡便かつ大量に調製する新技術として、SULT 発現大腸菌を用いた遺伝子工学的な手法による硫酸体の調製法の確立を行った。さらに、確立した調製法にて様々なポリフェノール硫酸体を調製し、その硫酸体の機能解析を試みた。

材料

[Cells]

HepG2 細胞

JCRB 細胞バンク

293T 細胞

[Bacterial strain]

XL1-Blue MRF' (*E.coli*)

Stratagene (La Jolla, CA, USA)

BL21 (*E.coli*)

[Plasmid Vector]

pBluescript II SK(+)

Stratagene

pGEX-2TK

GE Helthcare Biosciences

pGL4.17

Promega

pEBMulti-Hyg

Wako

I.M.A.G.E. cDNA clone ID 1499725

Genome Systems, Inc

[Reagent]

acetic acid

Wako

ammonia solution

Wako

ampicillin

Wako

ammonium carbonate

Wako

ammonium chloride

Wako

apigenin

Wako

biochanin A

Wako

bromophenol blue (BPB)

Wako

dimethyl sulfoxide (DMSO)

Wako

dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)

Wako

EDTA

Wako

formic acid

Wako

forskolin

Wako

galangin

wako

genistein

wako

glucose	wako
hexane	wako
isopropanol	wako
kaempferol	wako
magnesium sulfate (MgSO ₄)	wako
methanol	wako
NaCl	wako
<i>n</i> -butanol	wako
penicillin-streptomycin solution (×100)	wako
pyridine	wako
sodium dodecyl sulfate (SDS)	wako
thiamine hydrochloride	wako
KOD plus Neo	TOYOBO
benzoyl chloride	TOKYO CHEMICAL INDUSTRY
tetrahydrofuran (THF)	TOKYO CHEMICAL INDUSTRY
triethylamine - sulfur trioxide complex	TOKYO CHEMICAL INDUSTRY
acetonitrile	Thermo Fisher Scientific
isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)	Takara
Pfu Turbo DNA polymerase	Stratagene
bis-tris propane	Sigma
chenodeoxycholic acid (CDCA)	Sigma
cholic acid (CA)	Sigma
dehydroepiandrosterone(DHEA)	Sigma
glycocholic acid hydrate (GCA)	Sigma
pregnenolone	Sigma
sodium taurochenodeoxy cholate (TCDCA)	Sigma
sulfatase from <i>Helix pomatia</i> Type H-1	Sigma
taurocholic acid sodium salt hydrate (TCA)	Sigma
trifluoroacetic acid (TFA)	Sigma
trizma-base	Sigma
ursodeoxycholic acid (UDCA)	Phoenix pharmaceuticals Inc.
Diaion HP20	Nippon Rensui
ligation convenience Kit	Nippon gene
Bam HI	New England Biolabs
Bgl II	New England Biolabs
deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)	New England Biolabs

Dpn I	New England Biolabs
Eco RI	New England Biolabs
Hind III	New England Biolabs
Kpn I	New England Biolabs
Not I	New England Biolabs
chrysin	LKT laboratories, inc.
daidzein	Cayman Chemical Company
trans-resveratrol	Cayman Chemical Company
DMSO-d6	Aldrich
phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Adipogen, Inc.
Bright-Glo™ Luciferase Assay System	Promega
TRIzol® Reagent	Life Technologies
cell counting kit-8	Dojindo

[Column / Extruction cartridge]

Capcell PAK C18 MGII (5µm, 4.6 × 250 mm)	SHISEIDO
TSKgel Amide-80 (5µm, 4.6 × 250 mm)	TOSOH BIOSCIENCE
Oasis WAX Plus Short Cartridg	Waters
Sep-Pak C18 Plus Short Cartridge	Waters

[Instrument / Analysis software]

Q-Exactive hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer	Thermo Fisher Scientific
Xcalibur	Thermo Fisher Scientific
Prominence HPLC system	Shimadzu
Labsolutions	Shimadzu
FLA-3000G	GE Healthcare
Bruker Advance 400 instrument	Bruker
XWINNMR	Bruker
precision microplate reader	Wako

第 1 章

マウス硫酸転移酵素 mSULT2A8 の胆汁酸 7 位特異的 硫酸化機構および生理機能の解明

胆汁酸は肝臓でコレステロールから合成され、十二指腸へ分泌された後、脂質の分解や吸収を促進する役割を持つことが一般的に知られている (40)。さらに、胆汁酸はホルモン様の作用を持つことも報告されており、核内受容体の *farnesoid X receptor (FXR)* や G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の *TGR5* へ作用し、コレステロールやグルコースの代謝、胆汁酸自身の恒常性維持等 (フィードバック機構) に関わることが判明している (41-45)。また、病理学的に、胆汁酸が肝臓毒性や発がんに関与するといった報告もある (46,47)。これらの胆汁酸の SULT による硫酸化は、胆汁酸の解毒代謝や排泄に重要な役割を持つことが知られている (48)。硫酸化はこれらの化合物の受容体への反応性の低下、水溶性の増加、体外への排泄を促進させることによって、胆汁酸の恒常性の維持に極めて重要な役割を果たしている (48)。また、ヒトにおいて胆汁酸は 3 位の水酸基が硫酸化されることが判明している (49)。対照的にマウスにおいては胆汁酸の 7 位が硫酸化された *bile acid 7-O-sulfate* が検出されている (50)。ヒトおよびマウスにおいて、胆汁酸の硫酸化にこのような差異が見られるため (Figure I-1)、ヒトとマウスでは、胆汁酸の硫酸化における生理的意義が異なっている可能性が考えられる。

ヒトにおいて SULT2A サブファミリーの酵素は Figure 2 に示したように hSULT2A1 の 1 種類のみが存在し、DHEA、androsterone, testosterone や estradiol 等の様々な内因性のステロイド類や chenodeoxycholic acid (CDCA) のような胆汁酸類を硫酸化する (4, 23)。また、hSULT2A1 は以前の研究により、胆汁酸類の 3 α 位の水酸基を標的として硫酸化することが判明している (48)。それに対して、マウスの SULT2A サブファミリーには 8 種類の SULTs (mSULT2A1, mSULT2A2, mSULT2A3, mSULT2A4, mSULT2A5, mSULT2A6, mSULT2A7 および mSULT2A8) が確認されており (13, 51, 52) (Figure 2)、ヒトと同様に内因性のステロイドや胆汁酸を硫酸化することが報告されている (4,23)。マウスにおいて、この 8 種類の SULT2A サブファミリーは SULT2A 遺伝子がマウスのゲノム上で遺伝子重複を繰り返したことで生み出されたと考えられる。mSULT2A1 は hSULT2A1 と同様に詳しく研究されており、様々なステロイド化合物を幅広く硫酸化することが判明している (4,23)。しかしながら、その他のマウスの SULT2A

サブファミリーの酵素は知見が少なく、その機能は未だ解明されていない。近年の報告により、その中でも **mSULT2A8** が特徴的な胆汁酸硫酸化活性持ち、胆汁酸類の7位を特異的に硫酸化することが示唆された(39)。一般的に **SULT** は幅広い基質特異性を持ち、様々な生体外異物や内因性の化合物の解毒代謝および排泄を担っている (4, 6, 23)。しかしながら、**mSULT2A8** は厳密に胆汁酸類のみを硫酸化し、さら7位水酸基特異的という非常にユニークな酵素である(39)。マウスにおいて、このような特徴的な **SULT** によってヒトと異なる胆汁酸硫酸体を生じるということは非常に興味深く、ヒトとマウスにおいて **SULT2A** による胆汁酸類の硫酸化の生理的意義が異なるのかもしれない。そのため、マウスにおいて **mSULT2A8** によって産生される胆汁酸7位硫酸体の機能を解明することは重要であり、さらに **mSULT2A8** の胆汁酸7位特異的硫酸化機構を解き明かすことで、**SULT2A8** の厳密な基質特異性を説明するだけでなく、その生理学的意義の解明に繋がることを期待できる。

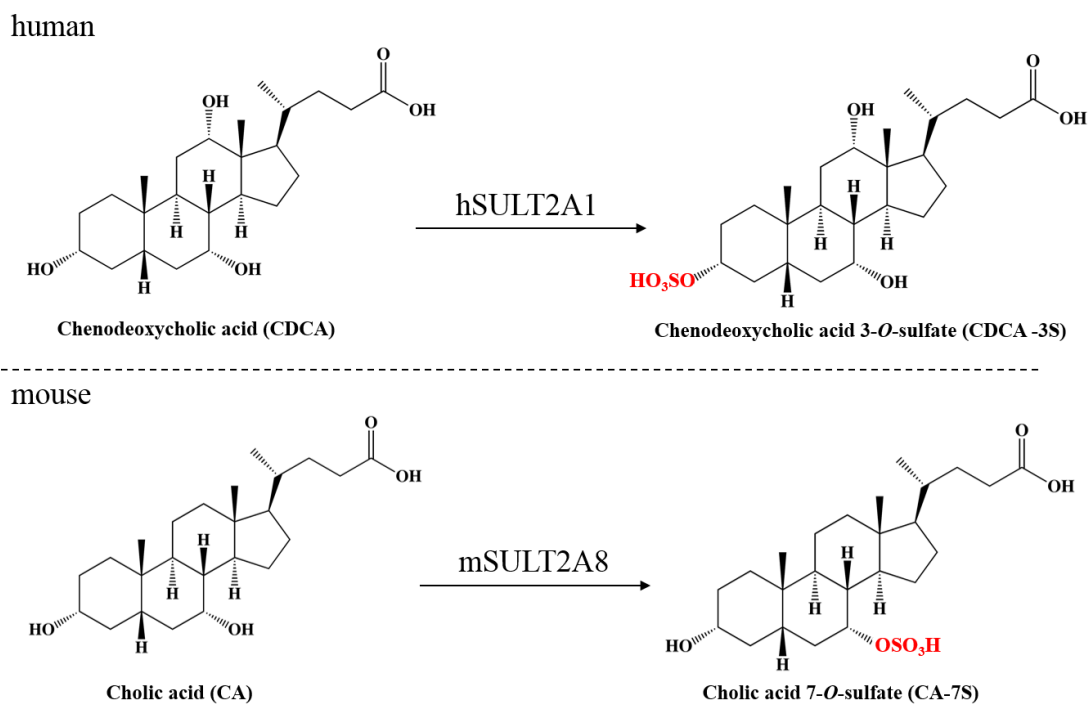


Figure I-1. hSULT および mSULT における胆汁酸類の硫酸化

そこで第 1 章では、mSULT2A8 における胆汁酸 7 位硫酸化の生理的意義の解明と胆汁酸 7 位硫酸体の機能解明を目的に研究を展開する。本研究では、最初に、mSULT2A8 がどのような硫酸化機構で胆汁酸類の 7 位を特異的に硫酸化するのかを明らかにすることとした。まず、mSULT2A8 の胆汁酸 7 位硫酸化の機構解明の手がかりを得るために、SULT2A8 のアライメント解析を行ったところ、その他の SULT では見られない特徴的なアミノ酸残基 (His48 および Leu99) を見出した。そのため、我々はこれらのアミノ酸残基 (His48 および Leu99) が胆汁酸 7 位の基質認識に重要だと推定し、これらの配列の mSULT2A8 における重要性をミューテーション解析にて実証した。そして、mSULT2A8 の代謝物である胆汁酸 7 位硫酸体の機能解析を行い、マウスにおける胆汁酸 7 位硫酸化の生理的意義の解明を行った。

実験方法

mSULT2A subfamily のアミノ酸配列に基づく系統樹解析

mSULT2A subfamily のアミノ酸配列は National Center for Biotechnology Information (NCBI)の GenBank データベースから取得した。取得したアミノ酸配列は ClustalW program (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)を用いてアライメント解析を行い、MEGA6 ソフトウェアを用いて unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA)法による系統樹解析を行った。

mouse SULT2A8 のクローニング

I.M.A.G.E. cDNA clone1499725 を鋳型に *mSULT2A8* 遺伝子を PCR によって増幅した。PCR 反応は *mSULT2A8* の ORF を増幅できるように設計したオリゴヌクレオチドプライマー (sense primer: 5'-CGCGGATCCATGACAGATGAATTTCTGTGG-3', antisense primer: 5'-CGCGGATCCTTATTCCCATGAAAAGAGCTC-3'; Table I-1) , *Pfu Turbo* DNA polymerase, clone 1499725 cDNA が組み込まれたプラスミドを鋳型に用い、製品プロトコールに従って 20 μ L の反応系で行った。PCR 反応の増幅条件は 94°C で 0.5 min (denature)、50°C で 0.5 min (anneal)、72°C で 3 min (extention)を 30 サイクルで行った。増幅後、精製した cDNA 断片はクローニング用ベクターである pBluescript II SK(+)のマルチクローニングサイト(MCS)の Bam HI site にサブクローニングし、*E.coli* XL1-Blue MRF'にトランスフェクションした。その後シーケンス解析を行い、挿入した *mSULT2A8* cDNA の塩基配列を解析し正しい配列が挿入されていることを確認した。その後、pBluescript II SK(+)にクローニングされた *mSULT2A8* cDNA を BamHI で切断し、大腸菌発現用ベクターである pGEX-2TK vector にサブクローニングした。

mouse SULT2A8 変異体 (H48N, H48T, L99H) の作製

mSULT2A8 を組み込んだ pGEX-2TK ベクターを鋳型に、H48N, H48T, L99H の一アミノ酸変異が入るように設計したプライマーを用いたポイントミューテーション PCR による *mSULT2A8* 変異体の作製を行った。PCR は 250 ng の pGEX-

2TK-mSULT2A4 vector を鋳型として用い、0.4 μ M primer (Table I-1)、200 μ M dNTPs、1.25 units of Pfu Turbo DNA polymerase を含む反応組成で行った。PCR 増幅条件は、95°C で 0.5 min, 55°C で 0.5 min, 68°C で 6 min を 12 サイクル行った。その後 PCR 産物を DpnI で 37°C、1 hr 処理した後に *E.coli* XL1-Blue MRF' にトランスフェクションした。作製した mSULT2A8 変異体の塩基配列はシーケンス解析を行い正しい配列であることを確認した。

Table I -1. WT および変異型 mSULT2A8 のクローニングに使用したオリゴヌクレオチドプライマー

Enzyme name	Sense/Antisense	Sequence
mSULT2A8 (WT)	Sense	5'-CGCGGATCCATGACAGATGAATTTCTGTGG-3'
	Antisense	5'-CGCGGATCCTTATTCCCATGAAAAGAGCTC-3'
H48N	Sense	5'-CCAAAATCAGGAACCAACTGGTTGAATGAA-3'
	Antisense	5'-TTCATTCAACCAGTTGGTTCCTGATTTTGG-3'
H48T	Sense	5'-CAAAAATCAGGAACCACCTGGTTGAATGAAA-3'
	Antisense	5'-TTTCATTCAACCAGGTGGTTCCTGATTTTGG-3'
L99H	Sense	5'-GTCTCATGGCCTCTCACCTTCCCATCCAAC-3'
	Antisense	5'-GTTGGATGGGAAGGTGAGAGGCCATGAGAC-3'

大腸菌によるリコンビナント mSULT2A8 及び mSULT2A8 変異体の発現・精製

野生型(WT)、および変異型 (H48N, H48T, L99H) の mSULT2A8 の cDNA が組み込まれた pGEX-2TK を *E.coli* BL21 にトランスフェクションした。その後、100 μ g/mL ampicillin を含む LB 培地にて 37°C で前培養し、200 mL の同様の培地を用いて 37°C で大量培養を行った。OD_{600 nm} = 0.3 になるまで培養した時点で 0.1 mM IPTG を添加し 24°C で 4 hr 酵素の誘導を行った後、BL21 を遠心分離にて回収し、15 mL の氷冷した lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, and 1 mM EDTA) で懸濁し、フレンチプレスを用いて細胞を破碎した。回収した菌体破碎溶液を 20,400 x g、4°C で 15 min 遠心分離し、その上清を粗酵素画分とし回収した後、0.5 mL の glutathione sepharose 4B と供し 4°C で 1 hr 転倒混和し GST-fusion SULTs をビーズへ吸着させた。その後 3000 x g、4°C で 2 min 遠心した後、上清を廃棄し、lysis buffer で 5 回洗浄した。そして、thrombin digestion buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, and 2.5 mM CaCl₂) で 3 回洗浄し、thrombin

digestion buffer に 5 U/mL bovine thrombin を加え 4°C で 2 hr 転倒混和し GST と SULT 間の結合を切断した。それから、12000 x g、4°C で 1 min 遠心し glutathione sepharose 4B を取り除き、その上清を精製酵素画分とした。タンパク質濃度は BSA をスタンダードに用いた Lowry 法 (53) にて測定し、10% polyacrylamide gel を用いた SDS-PAGE (54) にて精製酵素の確認を行った。精製した SULTs は後の酵素活性測定に用いた。

硫酸化活性測定

SULTs の硫酸化活性測定には放射ラベルした活性硫酸 [³⁵S]-PAPS を硫酸基供与体として用いて行った。 [³⁵S]-PAPS (45 Ci/mmol) は ATP、 [³⁵S]-sulfate およびリコンビナント hPAPSS を用いて合成したものを使用した (55)。硫酸化の反応組成は 50 mM Bis-tris propane-HCl (pH 6.27)、0.2 μM [³⁵S]-PAPS、0.6 μg の精製酵素、10 μM 基質を用いて 25 μl の反応系にて行った。硫酸化には主に胆汁酸類や hydroxysteroid 類を中心に substrate として用いた (Figure I-2)。硫酸化反応は酵素を添加した時点からウォーターバスを用いて 37°C で 30 min インキュベートし、98°C で 3 min ヒートすることで反応を停止した。その後、20400 x g で 1 min 遠心し、その上清に含まれる硫酸体を TLC にて分離した (56)。TLC にはシリカゲルプレートを用い、*n*-butanol/isopropanol/formic acid/water (3:1:1:1) を展開溶媒として使用した。展開後、プレートは乾燥した後にイメージングプレートに 6 hr 以上接触し、fluoro image analyzer (FLA-3000G) にて解析を行い硫酸化活性の測定を行った。

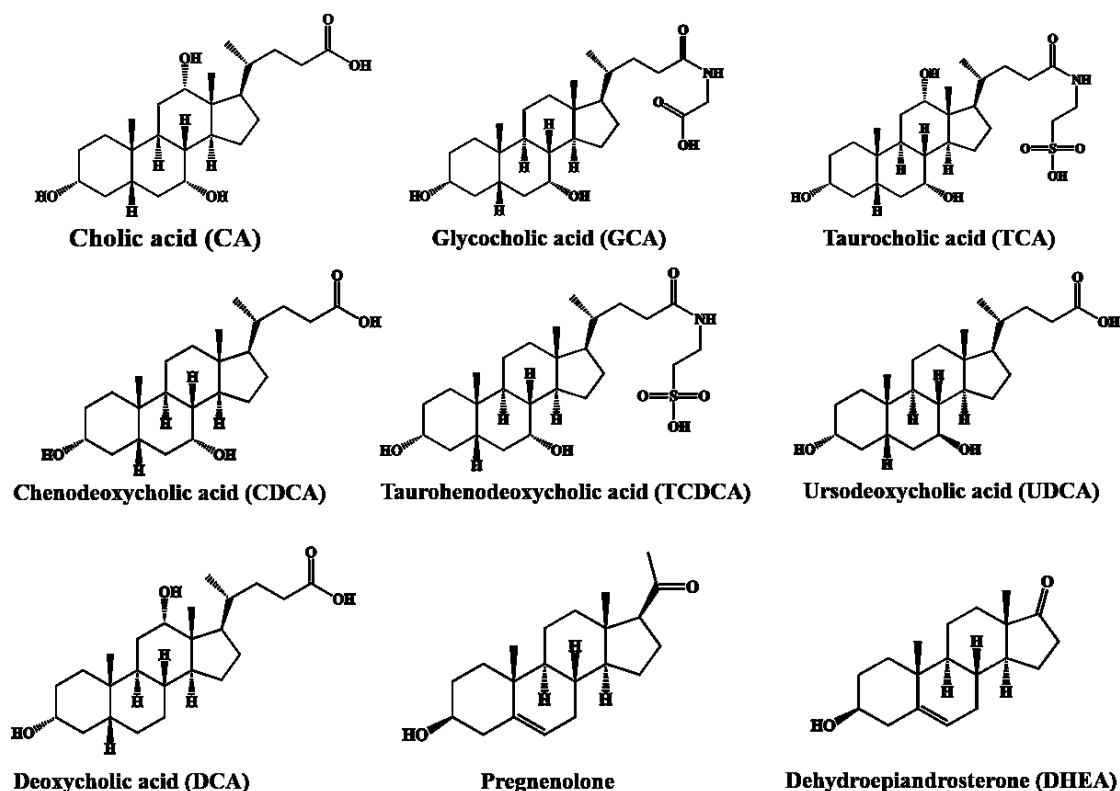


Figure I-2. 硫酸化活性測定に使用した基質の化学構造

胆汁酸 7 位硫酸体の有機化学的手法による調製

胆汁酸硫酸体として CDCA の 7 位硫酸体である CDCA 7-*O*-sulfate (CDCA-7S) を調製することとした。CDCA 1g を 30 mL の pyridine に溶解させ、THF 10 mL に benzoyl chloride 280 μ L を添加した溶液を CDCA 溶解液に氷上で少しずつ加えた。反応液にはモレキュラーシーブ 4A を加え脱水条件にて 4°C で 24 hr 静置して反応した。その後、溶液と等量の MeOH を加え反応を止めた後、5 倍量の MilliQ 水および 1/10 量の HCl を氷中で加え、析出したペレットを遠心分離にて回収した。回収したペレットは 0.1 M の塩酸で 3 回洗浄した後、MilliQ 水で更に 3 回洗浄した。洗浄後、できるだけ水分を取り除き THF にペレットを溶解した。溶解した画分に溶液と等量の MeOH を加え、この混合溶液に MilliQ 水を等量加え、遠心分離を行い、褐色～透明の油状の画分を回収した。この操作を 2 回繰り返した。回収した油状画分は THF に溶解し、これを 3-benzoyl CDCA 含有画分 (BzCDCA 画分) としモレキュラーシーブ 4A を加え脱水した。次に、pyridine に triethylamine - sulfur trioxide complex を 2.5 g 溶かし、モレキュラーシーブ 4A

にて脱水した溶液を作製した。この溶液を BzCDCA 画分に加え 40°C で 24 hr 硫酸化反応を行った。反応終了後、MilliQ 水を反応液の 10 倍量加え、C18 逆相カートリッジである Sep Pak C18 Cartridges を用いて粗精製をした。その後、逆相陰イオン交換カートリッジである Oasis WAX cartridge を用いて強陰イオン性の化合物である硫酸体のみを溶離液 (MeOH : NH₃ 水 = 95:5) を使用して溶出した。この時点で、溶離液には 3-benzoyl CDCA-7S、CDCA-7S、CDCA-3S、CDCA disulfate 等の硫酸体の混合物が溶解していると考えられたので、3-benzoyl CDCA-7S を Prominence HPLC にて分離した。化合物の分離には粒径 5 μm の HILIC (hydrophilic interaction) カラムである TSKgel Amide-80 (4.6 × 250 mm) を使用し、カラムオーブンを 40°C に保ち、以下に記す条件のグラジエントモードによる分離を行った。移動相には 0.1% formic acid を添加した acetonitrile (A) および MeOH (B) を使用し、MeOH の濃度が 0-20% (0-10 min), 20-30% (10-20 min), 30-100% (20-25 min), 100% (25-30 min), 100-0% (30-35 min), 0% (35-50 min) となるようにした。3-benzoyl CDCA-7S を含む 0~15min の画分を回収し、再度 Oasis WAX cartridge を用いて強陰イオン性の化合物である硫酸体のみを溶離液 (MeOH: NH₃ 水 = 95:5) を使用して溶出した。その後、シリカゲルプレートを用いた TLC にて BzCDCA-7S の検出を行った。BzCDCA-7S は ethyl acetate: hexane: *n*-butanol: formic acid: acetic acid = 6:1:1:0.5:0.5 を展開溶媒として用いて 24°C の飽和展開層にて分離を行った。BzCDCA-7S の検出には 10% 希硫酸を噴霧し、110°C で加熱することで BzCDCA-7S の単一のバンドを確認した。次に 3-benzoyl CDCA-7S の保護基である benzoyl 基を脱保護するために、溶離液に終濃度が 0.5 M になるように NaOH を加え 37°C で 4 hr 反応した。その後、氷上で酢酸を過剰量加え、溶液を酸性にした後に、再び Oasis WAX cartridge にて上記と同様の手順で硫酸体の精製を行った。精製画分はフーリエ変換型質量分析装置である Q-Exactive を用いて解析し CDCA-7S の有無を確認した。その後、遠心エバポレーターを用いて MeOH、NH₃ を揮発した。そして、残った少量の液体に炭酸アンモニウムを少量加え塩基性条件にして -80°C にして凍結した。後に凍結乾燥機にて完全に乾燥した。乾燥粉末を精製 CDCA-7S として DMSO に可溶化し、後の実験に使用した。

Mass Spectrometry (MS) 解析 (質量分析)

上記手法にて有機合成したサンプルをフーリエ変換型質量分析装置 Q-Exactive hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer を用いて解析した。electrospray ionization (ESI) プローブを使用し、シリンジポンプにてサンプルを direct infusion 注入した。分析は Target-MS² スキャンにて行った。分析条件は negative ionization mode; spray voltage 2.0 kV; heath gas flow rate, 10; auxiliary gas, 0; sweep gas, 0; heated

capillary temperature, 270°C で行った。また解像度は 140000, AGC target は 2E5、maximum injection time は 100 ms, normalized collision energy は 20%にて行った。データ解析には Xcalibur に内包されている Qual browser software を使用した。

胆汁酸硫酸体の TGR5 への作用評価系の構築および機能評価

細胞培養

ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞および、ヒト胎児腎細胞株 293T 細胞は Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) に 10% FBS, 100 IU/mL ペニシリン, 50 µg/mL ストレプトマイシンを加えた培地を使用して 37°C, 5% CO₂ インキュベーターで培養した。

CRE-Luciferase Assay 系の構築

TGR5 等の GPCR のシグナル下流に位置する応答配列である CRE (cAMP response element)を 3 回繰り返した配列およびコアプロモーターである TATA box を含む配列、TATA box のみを含む配列 (Table I-2)をルシフェラーゼアッセイ用ベクターである pGL4.17 vector に組み込んだ。組み込んだ応答配列は (Table I-2) に記したオリゴヌクレオチドをアニーリングして作成した。アニーリングは、10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl およびそれぞれのオリゴヌクレオチドの終濃度が 10 µM になるように反応溶液を調製し、サーマルサイクラーを用いて 98°C で 15 min 加熱した後、90 min かけて 30°C まで冷却し、pGL4.17 に組み込む応答配列を調製した。その後、Bgl II および Hind III を用いて制限酵素処理した pGL4.17 と調製した応答配列を 2×Ligation convenience kit を用いてライゲーションした。その後、*E.coli* XL1-Blue MRF' に作成した CRE-TATA-pGL4.17 および TATA-pGL4.17 をトランスフェクションした。その後、これらの CRE-TATA-pGL4.17 plasmid および TATA-pGL4.17 plasmid を Quantum Prep® Plasmid Midiprep Kit を用いて精製した。次に、HepG2 細胞および 293T 細胞を 48well plate に細胞数が 4.0×10^4 cells/well になるように播種し、24 hr 培養しサブコンフルエントになるまで細胞を増殖した。その後、精製した 200 ng の CRE-TATA-pGL4.17 plasmid および TATA-pGL4.17 plasmid を Lipofectamin LTX を用いてトランスフェクションした。24 hr 後に培地を交換し、CRE を活性化させることが知られている forskolin (10 µM) および PMA(1 µM)を添加し 24 hr 作用した。その後、細胞を回収し 100 µL の lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH8.0], 1% Triton X-100)に可溶化しサンプルとした。サンプル 50 µL に Bright-Glo™ Luciferase Assay System のルシフェラーゼアッセイ用の基質である Bright-Glo™ Luciferase substrate を等量加え、発光強度をルミノメーター(ATTO)で測定し、CRE-TATA-pGL4.17 plasmid が

作動していることを確認した。

胆汁酸硫酸体の TGR5 への作用評価

ヒト TGR5 (hTGR5)を 293T 細胞に強発現させるために、*hTGR5* のクローニングを行なった。*hTGR5* は肝臓に発現していることが知られているため HepG2 細胞から Tryzol を用いて total RNA の抽出を行った。抽出した total RNA は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を用いて逆転写し cDNA を調製した。調製した cDNA と *hTGR5* (GenBank accession number ; NM_170699)に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー (Table I-3) および KOD plus Neo を用いて、製品プロトコールに従って 50 μ L の反応系で PCR 増幅を行った。PCR 反応は 94°C で 3 min 加熱した後、98°C で 20sec、68°C で 1.5 min の 2 step を 35 サイクル行った。増幅後、精製した ϵ DNA 断片はクローニング用ベクターである pBluescript II SK(+)のマルチクローニングサイト(MCS)の KpnI および NotI サイトにサブクローニングし、*E.coli* XL1-Blue MRF' にトランスフェクションした。その後シーケンズ解析を行い、挿入した TGR5 の ϵ DNA 断片の塩基配列を解析し正しい配列が挿入されていることを検証した。その後、pBluescript II SK(+)にクローニングされた hTGR5 ϵ DNA 断片を KpnI および NotI で切断し、マルチジーントランスフェクションが容易な動物細胞発現用ベクターである pEBMulti-Hyg にサブクローニングした。作製した pEBMulti-Hyg-TGR5 plasmid および CRE-TATA-pGL4.17 plasmid を Quantum Prep® Plasmid Midiprep Kit を用いて精製した。次に、293T 細胞を 4.0×10^4 の割合で 48well plate に播種し、24 hr 培養しサブコンフルエントになるまで細胞を培養した。その後、精製した 20 ng の CRE-TATA-pGL4.17 plasmid と 180 ng の pEBMulti-Hyg-TGR5 および control vector として pEBMulti-Hyg を Lipofectamin LTX を用いて同時トランスフェクションした。12hr 後、DMEM に 1% FBS, 100 IU/mL ペニシリン, 50 μ g/mL ストレプトマイシンを加えた培地と交換し、DMSO に可溶化した CDCA および CDCA-7S を終濃度が 5 μ M および 50 μ M になるように添加した。また、処理時の DMSO 濃度は 0.1%となるようにした。6 hr 後、細胞を回収し 100 μ L の lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH8.0], 1% Triton X-100)に可溶化しサンプルとした。サンプル 50 μ l にルシフェラーゼアッセイ用の基質を等量加え、発光強度をルミノメーターで測定し、CDCA および CDCA-7S の TGR5 への作用を評価した。

Table I-2. CRE-Luciferase assay 系構築に使用したオリゴヌクレオチドプライマー

Sequence name	Sense/Antisense	Sequence
CRE-TATA	Sense	5'-GATCT(AGCCTGACGTCAGAG) ³ CAGCGGAGACTCTAGAGGGTATATA -3'
	Antisense	5'-AGCTTTATATACCCTCTAGAGTCTCCGCTG(CTCTGACGTCAGGCT) ³ -3'
TATA-Box	Sense	5'- GATCTCAGCGGAGACTCTAGAGGGTATATA -3'
	Antisense	5'- AGCTTTATATACCCTCTAGAGTCTCCGCTG-3'

Table I -3. hTGR5 のクローニングに使用したオリゴヌクレオチドプライマー

Protein name	Sense/Antisense	Sequence
human TGR5	Sense	5'-AGAGGTACCATGACGCCCAACAGCACTGGC-3'
	Antisense	5'- ATTGCGGCCGCTTAGTTCAAGTCCAGGTTCG -3'

結果・考察

マウスのゲノム上に見られる 8 つの *SULT2A* 遺伝子は 7 番染色体上の近傍に位置している(51)。そのため、これらの 8 つの *SULT2A* 遺伝子はマウスの染色体上で遺伝子重複を繰り返すことで生まれたと考えられる。その結果、マウスにおいて *SULT2A* サブファミリーによるステロイドホルモンや胆汁酸の硫酸化による制御が複雑になっている。現在、これら *SULT2A* サブファミリーの酵素学的諸性質および生理学的役割は完全には解明されていない。近年の研究により、マウスの *SULT2A8* が 7 位に水酸基を持つ胆汁酸類(7 α -hydroxyl bile acids)を硫酸化するという特徴的な性質を持つことが報告された。しかしながら、m*SULT2A8* の胆汁酸 7 位特異的な硫酸化メカニズムは解明されていない。そこで、我々は m*SULT2A8* の 7 α -hydroxyl bile acids 特異的な硫酸化メカニズムを解明する手がかりを得るためにヒトおよびマウスの *SULT2A* サブファミリーを用いたアライメント解析を行い、m*SULT2A8* に特徴的なアミノ酸残基 (His48 および Leu99) を見出した。本研究では、これらの 2 つのユニークなアミノ酸残基が胆汁酸 7 位特異的な硫酸化に重要な配列だと推定し、m*SULT2A8* における His48 および Leu99 の胆汁酸 7 位特異的な硫酸化における役割を解明するために m*SULT2A8* の酵素学的諸性質の検討と、突然変異解析により m*SULT2A8* の胆汁酸 7 位特異的な硫酸化メカニズム解明を行った。さらに、胆汁酸 7 位硫酸体の生理機能を解明するために、有機合成法にて胆汁酸 7 位硫酸体を調製し、胆汁酸が作用する受容体である TGR5 への作用を luciferase assay にて評価した。これらの結果を基に、m*SULT2A8* のマウスにおける胆汁酸 7 位硫酸化の生理学的意義の解明を試みた。

m*SULT2A8* のクローニングおよびアライメント解析

m*SULT2A8* の ORF(open reading frame)は I.M.A.G.E. cDNA clone1499725(GenBank accession number AI119640)を鋳型に m*SULT2A8* に特異的なプライマー (Table I-1) を用いて PCR で増幅した。PCR 増幅産物の遺伝子配列は以前の研究で報告された m*SULT2A8* (GenBank accession number: NM_175250) と完全に一致していることを確認した(39)。m*SULT2A8* の ORF は 849 のヌクレオチドで構成されており、282 のアミノ酸残基から成る m*SULT2A8* タンパク質をコードしており、m*SULT2A8* の配列中に SULT において重要な配列である N 末端付近 5'-PSB loop (5'-phosphosulfate binding loop)と中央付近に 3'-PB motif (3'-phosphate binding motif)が見られた(57)。また、m*SULT2A8* とその他の m*SULT2A* サブファミリー

およびヒトの SULT2A1 (hSULT2A1) のアミノ酸配列の相同性を解析したところ、比較解析に用いた SULT2A サブファミリー (mSULT2A1、mSULT2A2、mSULT2A3、mSULT2A4、mSULT2A5、mSULT2A6、mSULT2A7 および hSULT2A1) との相同性がそれぞれ 58%、59%、58%、59%、57%、60%、54% および 59% となった。さらに、mSULT2A8 とその他の SULT2A サブファミリーのアミノ酸配列を比較解析すると、mSULT2A8 に特徴的な配列を見出すことができた。今まで発見された SULT において、触媒残基である His 残基はアミノ酸配列の 100 番目付近に存在し高度に保存されている(57)。しかしながら、mSULT2A8 においてアミノ酸配列の 99 番目の位置で触媒残基と考えられる His 残基が Leu 残基に置き換わっていることが判明した。硫酸化反応において、触媒残基である His 残基は基質の水酸基からプロトンを引き抜きぬく重要な役割を持つ。Leu は疎水性アミノ酸であり His と性質が大きく異なり、基質の水酸基からのプロトンの引き抜きを起こせないと考えられる。そのためこの Leu 残基には触媒としての作用はなく、基質ポケットの構造に影響を与えることが考えられた。また、mSULT2A8 は 5'-PSB loop 中のアミノ酸配列の 48 番目の位置に His 残基を持つということも明らかとなった (Figur I-2)。5'-PSB loop は SULT における活性部位に位置しており、PAPS の硫酸基と相互作用する領域であるため、この位置に存在する 48 番目の His 残基は mSULT2A8 の酵素反応において重要な役割を果たす可能性が推察された。mSULT2A8 におけるこれらの 2 つのアミノ酸配列の置換 (N48H および H99L) は、マウス *SULT2A* の遺伝子重複の結果により起きたもので、その結果ユニークな基質特異性を持つ SULT2A8 が生まれたのかもしれないと推察された。

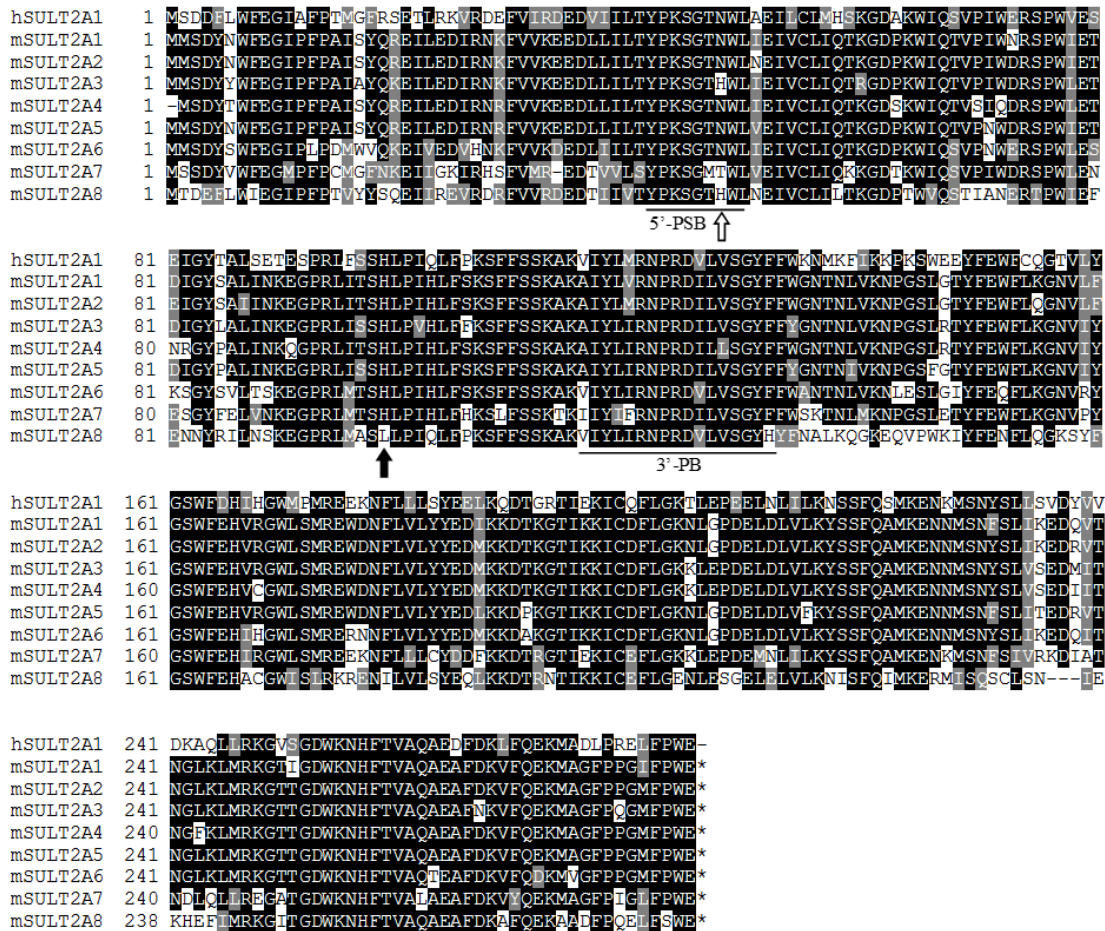


Figure I-3. マウスおよびヒトの SULT2A subfamily のアライメント解析

9つの SULT のうち少なくとも2つ以上で最も保存されていてアミノ酸残基は黒色、同様の性質をもつアミノ酸は灰色で記している。5'-PSB loop および 3'-PB motif は、それぞれ下線で記した N 末端付近と中央付近の領域に存在している。mSULT2A8 以外の全ての SULT は 100 番目付近に触媒残基である His 残基を有している。mSULT2A8 は矢印で示した位置に特徴的なアミノ酸残基 (His48 および Leu99) を有している。

WT mSULT2A8 と変異型 mSULT2A8 (H48N, H48T, L99H) の発現および精製

野生型 (WT) と変異型の mSULT2A8 のリコンビナント酵素は実験方法に記載した通りに大腸菌にて GST 融合タンパク質として発現したのちに glutathione sepharose 4B を用いたアフィニティークロマトグラフィーにて精製した。SDS-PAGEにて精製した WT の mSULT2A8 分子量の確認をしたところ、およそ 33kDa 付近に精製 mSULT2A8 と考えられるバンドを確認することができた (Figure I-4)。WT の mSULT2A8 の推定分子量は 32,295 Da であるので、この結果から mSULT2A8 が精製出来たと考えられた。また、変異型 mSULT2A8 (H48N, H48T, L99H) も同様の結果を示した (date not shown)。

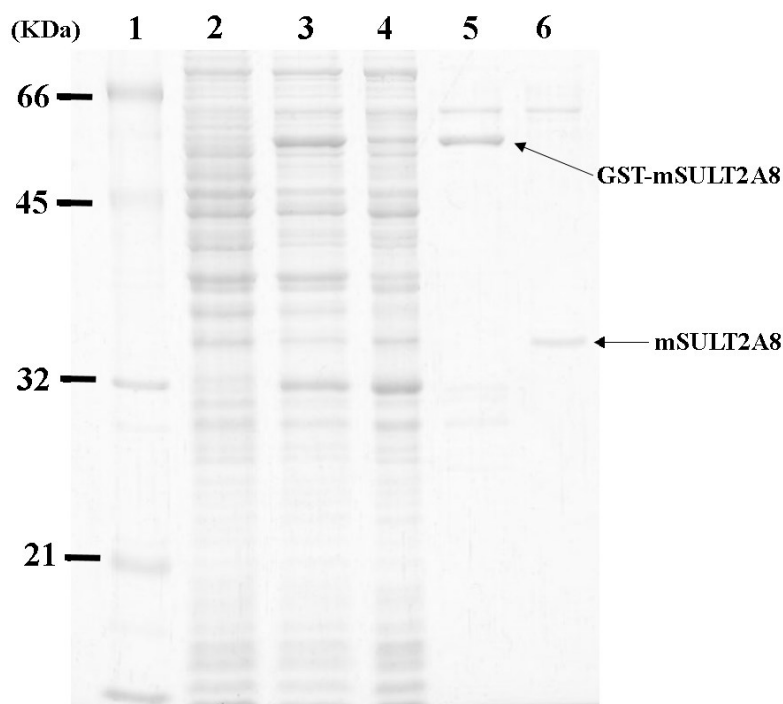


Figure I-4. SDS-PAGE による mSULT2A8 の精製確認

Lane 1, molecular weight markers; lane 2, IPTG 誘導前 BL21 cells; lane 3, IPTG 誘導後 BL21 cells; lane 4, 粗酵素 5, GST-mSULT2A8 融合タンパク質; lane 6, 精製 mSULT2A8

WT mSULT2A8 の酵素学的諸性質検討

哺乳動物において、SULT2A サブファミリーの酵素はヒドロキシステロイド類や胆汁酸類に対して硫酸化活性を持つことが知られている (4, 23)。以前の研究から、mSULT2A8 は 7α -hydroxyl bile acids を好んで硫酸化し 7 位の水酸基を硫酸化することで胆汁酸 7 位硫酸体 (bile acid 7-*O*-sulfate) を生産することが報告されている(39)。そこで我々は、最初にクローニングした WT の mSULT2A8 の様々なヒドロキシステロイド類や胆汁酸類に対する基質特異性の確認を行った。その結果、mSULT2A8 は 7 位に水酸基を持つ様々な 7α -hydroxyl cholic acids(CA, GCA, CDCA, TCA, TCDCA)に対して高い硫酸化活性を示し、 7β -hydroxyl cholic acid である UDCA に対する硫酸化活性は比較的低かった (Table I-4)。一方で、CA が腸内細菌によって 7α -脱水酸化されることで生じる 7 位に水酸基を有しない二次胆汁酸の DCA に対しては硫酸化活性を示さなかった。また、その他の SULT2A サブファミリーの酵素の典型的な基質である DHEA や pregnenolone に対しても全く硫酸化活性を示さなかった。さらに、mSULT2A8 の 7α -hydroxyl cholic acids に対する反応速度定数を解析すると、水酸基を最も多く有する CA に対して最も高い基質親和性を示すことが判明した (Table I-5)。これらの結果は、マウスにおいて検出される胆汁酸の主要硫酸体である cholic acid 7-*O*-sulfate の生産メカニズムの解明に大いに役立つと考えられる。また、酵素学的諸性質検討の結果、mSULT2A8 は CA に対する至適 pH が 6.27 となった。ヒトにおいては、胆汁酸類を基質とする SULT2A1 が胆汁酸類の LCA に対する至適 pH が 8.5 であることが以前に報告されている(49)。これらの結果を踏まえると、マウス SULT2A8 およびヒト SULT2A1 において、これらの 2 つの酵素は、触媒 His 残基 (側鎖 pKa \approx 6.0) を含む活性部位のイオン化状態が大きく異なっていると考えられた。

Table I-4. mSULT2A8の基質特異性

Substrate Compound	Specific Activity (pmol/min/mg protein)
Cholic acid (CA)	70.7±2.52
Glycocholic acid hydrate (GCA)	89.1±2.43
Chenodeoxycholic acid (CDCA)	38.1±0.44
Taurocholic acid sodium salt hydrate (TCA)	89.5±1.30
Sodium taurochenodeoy cholate (TCDCA)	74.1±1.33
Ursodeoxycholic acid (UDCA)	6.31±0.17
Deoxycholic acid (DCA)	N.D.
Pregnenolone	N.D.
Dehydroepiandrosterone (DHEA)	N.D.

各データは平均値±標準偏差 (S.D.)で表記した (n=3)。Specific Activity が検出限界 (5.0 pmol/min/mg protein) 以下を示した場合は N.D. (not detected)と表記した。

Table I- 5. mSULT2A8の胆汁酸類に対する硫酸化の反応速度定数

Substrate compound	K_m (μ M)	V_{max} (pmol/min/mg)	V_{max}/K_m
CA	1.2	73.5	61.3
GCA	5.3	82.7	15.6
CDCA	4.75	31.5	6.61
TCA	21.1	100	4.8
TCDCA	3.6	60.1	16.9

反応速度定数はミカエリス・メンテン式に基づきラインウィーバー＝バークプロットを用いて解析した。

WT mSULT2A8 と変異型 mSULT2A8 (H48N, H48T, L99H) の酵素学的諸性質の比較

アライメント解析の結果を見ると、上記に記したように mSULT2A8 にはアミノ酸配列の一次構造上に、他の SULT には見られないユニークなアミノ酸残基である His48 と Leu99 を有していることがわかる (Figure I-3)。まず、mSULT2A8 のこれらの 2 つのアミノ酸残基のタンパク質中での 3 次元的位置関係の手がかりを得るために、既に報告されている、ヒト SULT2A1 と Lithocholic acid (LCA) および PAP との複合体 (PDBid : 3F3Y) の結晶構造を調べた (Figure I -5)。ヒトの SULT2A1 の活性部位の結晶構造を見ると、Asn47, Thr48 および His99 が基質の水酸基と相互作用可能な位置に存在していることが分かる。この情報を基にすると、マウス SULT2A8 の His48 は、ヒト SULT2A1 の His99 と同様に PAPS からの硫酸基の転移に関与し、Leu99 が基質認識において重要な役割を持つことが推察された。そのため、これらの 2 つのアミノ酸残基が胆汁酸の 7 位の硫酸化にどのような役割を果たしているかを確認するために 3 種類の mSULT2A8 の変異体 (H48N, H48T, L99H) を作製し、WT mSULT2A8 との諸性質の比較解析をおこなった。Table I-6 を見ると、H48N, H48T および L99H の 3 つのミュータントは WT の mSULT2A8 と比較して CA や GCA に対する硫酸化活性が著しく低く、ほとんど活性が確認できなかった。また、同様にミュータントの反応速度定数を解析すると、WT の mSULT2A8 は CA に対する親和性が高い ($K_m = 1.2 \mu\text{M}$) のに対し、ミュータントは K_m が $185.9 \mu\text{M}$ (H48N) および $393.5 \mu\text{M}$ (L99H) とそれぞれ著しく大きく、CA に対する親和性が低い。また反応効率も WT の mSULT2A8 ($V_{\max}/K_m = 61.3$) に対して、ミュータントである H48N ($V_{\max}/K_m = 0.14$) および L99H ($V_{\max}/K_m = 0.4$) は非常に低いことが分かる。また、注目すべき点として、L99H のミュータントは CA に対する硫酸化活性は低下しているが、WT の mSULT2A8 では見られなかった DHEA への硫酸化活性が現れている (Table I-7)。これらの結果は、mSULT2A8 において Leu99 残基は 7α -hydroxyl bile acids に対する厳密な基質認識に重要な役割を果たすことが示唆された。

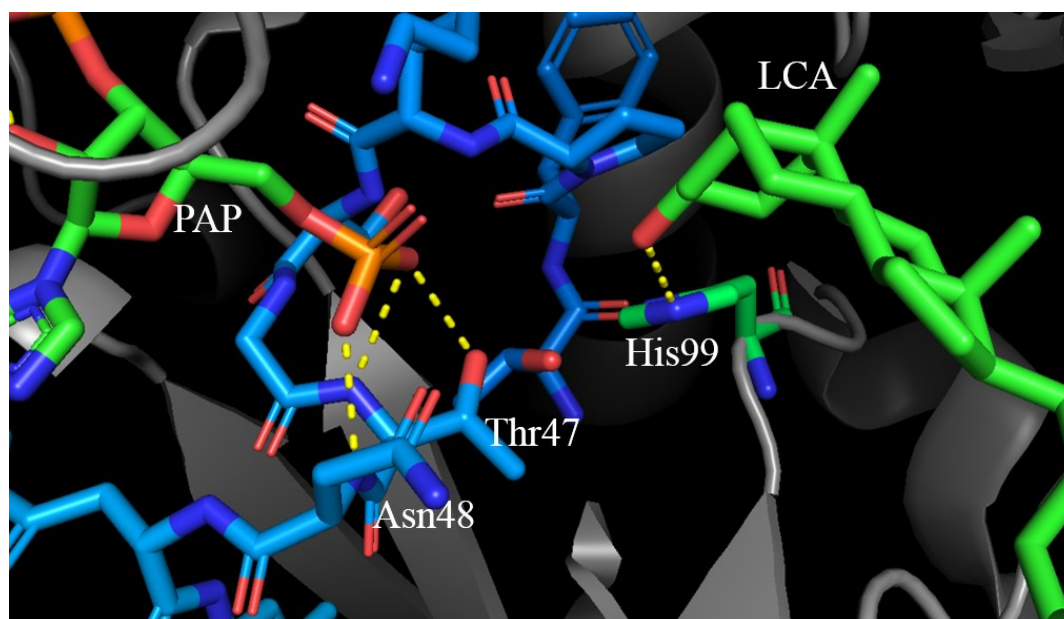


Figure I-5. ヒト SULT2A1 と LCA および PAP との複合体の結晶構造

ヒト SULT2A1 の LCA および PAP との複合体の活性中心の結晶構造。結晶構造は PDBid : 3F3Y から引用した。Thr47, Asn48 が PAP、His99 が基質の LCA の水酸基と相互作用可能な位置に存在している。

Table I-6. mSULT2A8 変異体の胆汁酸類およびヒドロキシステロイドに対する基質特異性

Substrate	Specific Activity (pmol/min/mg protein)			
	Wild type	H48N	H48T	L99H
CA	70.7±2.52	7.34±0.42	N.D.	26.3±0.62
GCA	89.1±2.43	8.72±0.42	N.D.	11.6±0.91
Pregnenolone	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
DHEA	N.D.	N.D.	N.D.	11.2±0.26

各データは平均値±標準偏差 (S.D.)で表記した (n=3)。Specific Activity が検出限界 (5.0 pmol/min/mg protein) 以下を示した場合は N.D. (not detected)と表記した。

Table I-7. mSULT2A8 の WT および変異体の Cholic acid に対する硫酸化の反応速度定数

Enzymes	K_m (μM)	V_{max} (pmol/min/mg)	V_{max}/K_m
Wild type	1.2	73.5	61.3
H48N	185.9	26.9	0.14
L99H	393.5	158.7	0.4

反応速度定数はミカエリス・メンテン式に基づきラインウィーバー・バークプロットを用いて解析した。

胆汁酸 7 位硫酸化の生理学的意義の解明

一般的に硫酸化を受けた化合物は水溶性が増し、細胞外へ排出され解毒代謝されると考えられる。そのため、硫酸化を受けることによって、胆汁酸の持つ細胞毒性や肝毒性等は低減されると考えられる。また、これらの胆汁酸類は FXR や TGR5 等の受容体へ作用し、エネルギー生産や胆汁酸の恒常性維持等に関わることが報告されている (39-43)。硫酸化を受けた化合物は細胞内へ取り込まれにくいため、細胞内の核に存在する核内受容体である FXR への作用は低減すると考えられる。しかしながら、細胞膜上に存在する GPCR のひとつである TGR5 へは細胞外から硫酸体が作用する可能性を含む。そのため、硫酸体が TGR5 に作用するか否かで硫酸化の生理的意義が大きく異なってくる。そこで、我々は、胆汁酸の硫酸体のモデルとして CDCA の 7 位硫酸体である CDCA7-*O*-sulfate (CDCA-7S) を有機合成にて調製し、TGR5 への作用をルシフェラーゼアッセイにて評価した。CDCA-7S は実験方法の通りに調製し質量分析装置にて解析を行い、CDCA-7S が調製できていることを確認した (Figure I-6)。1 g の CDCA から 0.5 mg の CDCA-7S を得ることができたが、収率は 0.05% と非常に少なかった。少量ではあるが CDCA 7-S が得られたので、これを用いて引き続き実験を行った。TGR5 への作用の評価には実験方法通りにルシフェラーゼアッセイ系を構築し (Figure I-7)、HepG2 細胞および 293T 細胞を用いて評価系が機能することを確認した後に胆汁酸硫酸体の作用評価を行った。構築した評価系は GPCR シグナルの下流に位置する cAMP response element (CRE) を利用したルシフェラーゼアッセイ系であり、胆汁酸をリガンドとする GPCR である TGR5 はこのシグナル経路を活性化させることが分かっている。そのため、このアッセイ系が TGR5 の作用評価に利用できると考えられた。Figure I-8 を見ると、作製した CRE-TATA-pGL4.17 が TGR5 のシグナル経路に位置する cAMP の産生 (Forskolin) や MAPK の活性化 (PMA) によって反応し、ルシフェラーゼの産生を増加させることが分か

る。また宿主である HepG2 細胞および 293T 細胞では 293T 細胞の方が CRE-TATA-pGL4.17 のレスポンスが良好であったため、293T 細胞を TGR5 の作用評価系の宿主細胞に用いた。次に、293T 細胞に TGR5 を強発現し、CRE-TATA-pGL4.17 を用いた CRE-Luciferase assay 系にて CDCA および CDCA-7S の TGR5 への作用を解析した。Figure I -9 を見ると、TGR5 を強発現した細胞において、CDCA と比較して CDCA-7S は TGR5 への作用が低下していることが分かる。胆汁酸類は TGR5 に作用し、主にエネルギー代謝に関与することが知られている (42,44,45)。そのため、mSULT2A8 は胆汁酸類の TGR5 に対するリガンド活性を 7 位の硫酸化を通じて調節していることが考えられた。

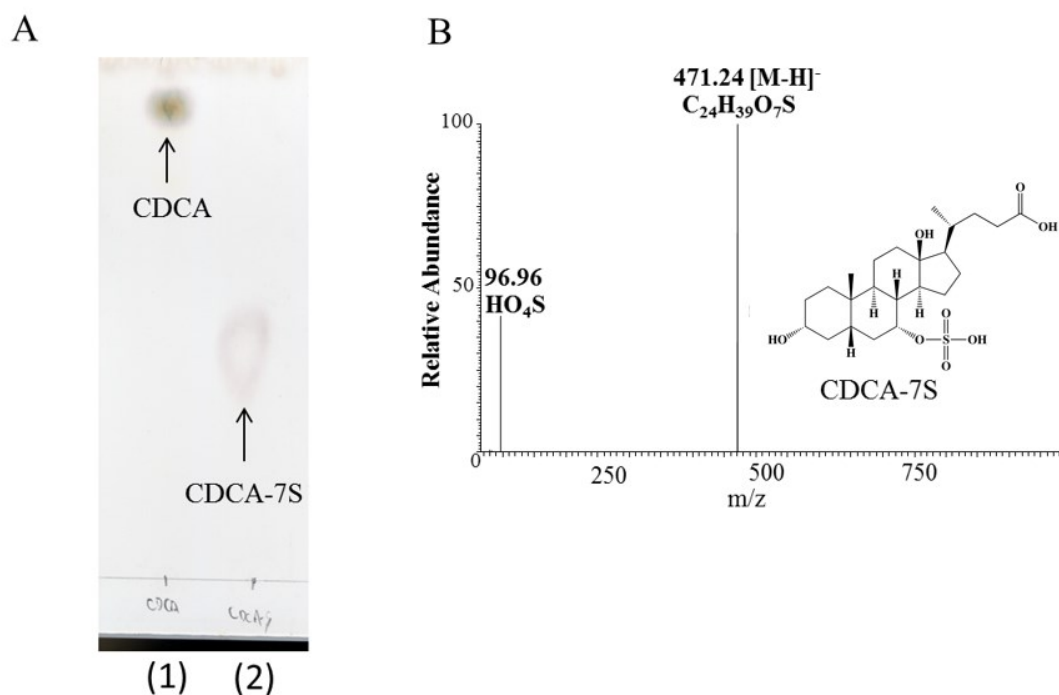


Figure I -6. 有機合成法によって調製した CDCA-7S

(A)CDCA および CDCA-7S の TLC による分離。Lane 1, CDCA(標品) ; Lane 2, 調製した CDCA-7S。(B) 調製した CDCA-7S の MS/MS スペクトル。MS/MS 解析には 471.24 m/z を示すイオンをプリカーサーイオンとして使用した。

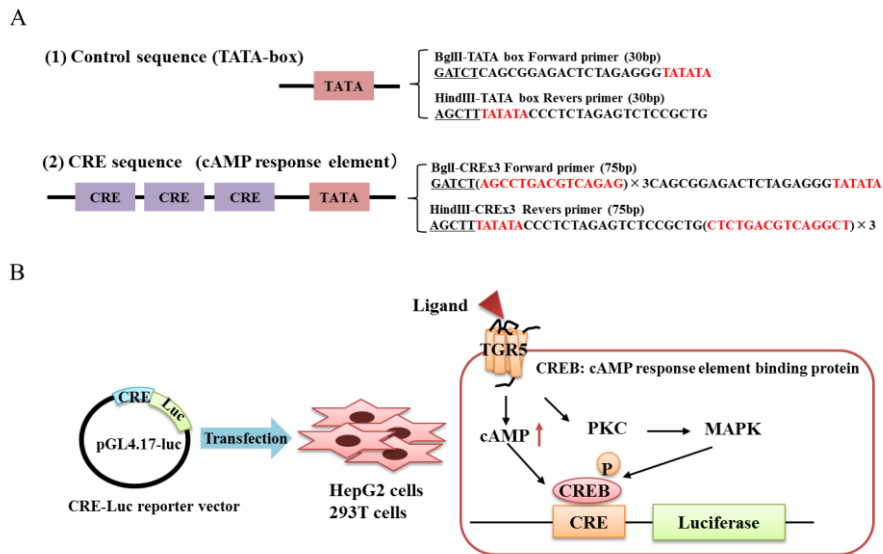


Figure I-7. 構築した CRE-ルシフェラーゼアッセイ系の概略図

(A);CRE-Luciferase assay 系の構築に用いたオリゴヌクレオチド。(1)コアプロモーターである TATA-Box のみを組み込んだコントロール配列。(2)cAMP response element (CRE)と TATA-box を組み込んだ配列。(B):構築したレポーターベクターを用いたルシフェラーゼアッセイ系の概略。TGR への作用を CREB の活性化を介したルシフェラーゼの上昇によって検出する。

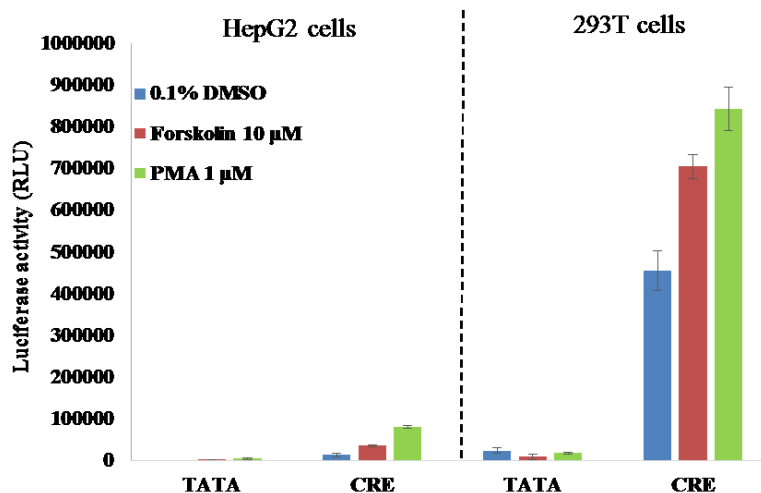


Figure I-8 構築した CRE-luciferase assay 系の作動確認

構築した CRE-Luciferase assay 系が機能するかどうかを HepG2 細胞および 293T 細胞を用いて確認した。各データは平均値±標準偏差 (S.D.)で表記した (n=3)

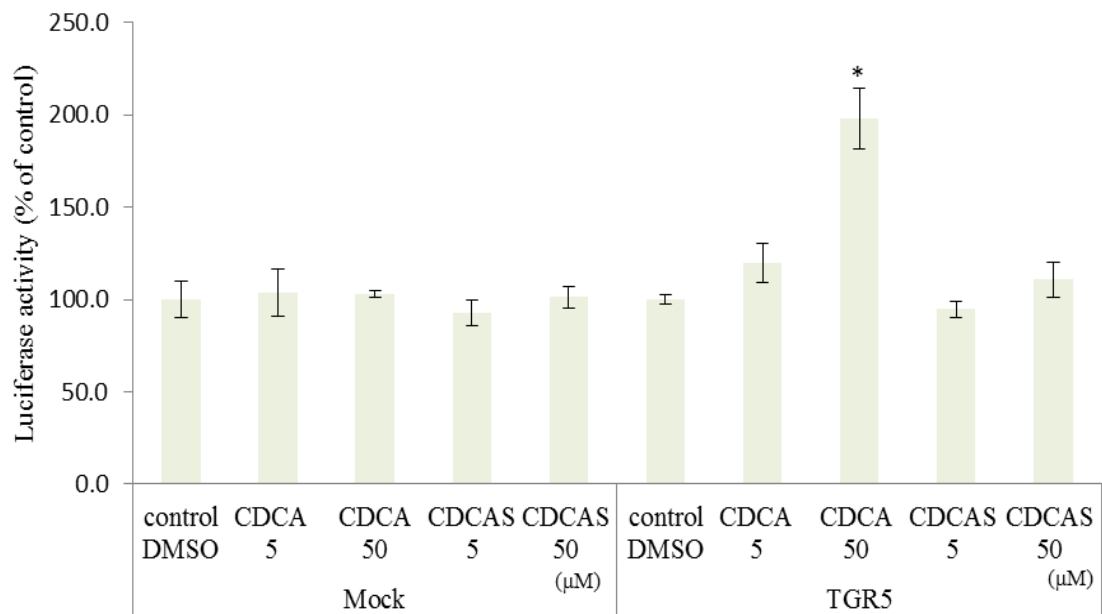


Figure I-9. TGR5-CRE-luciferase assay による CDCA および CDCA-7S の機能評価

CDCA および CDCA-7S の TGR5 への作用を 293T 細胞を用いて、CRE-ルシフェラーゼアッセイ系にて確認した。Control; pEBMulti-Hyg をトランスフェクションした 293T 細胞, TGR5;pEBMulti-Hyg-TGR5 をトランスフェクションした 293T 細胞。各データは平均値±標準偏差 (S.D.)で表記した (n=3)。また、Control との有意差検定は Dunnett's test (*p<0.05)によって解析した。

要約

まとめると、本研究により、マウスの SULT2A8 は他の SULT にはないユニークなアミノ酸残基である His48 と Leu99 を有しており、そしてこれらのアミノ酸残基がマウスにおける 7 α -hydroxyl bile acids の特異的な硫酸化に関与することが判明した。変異体を用いた解析の結果から、Leu99 と His48 の2つのアミノ酸残基は7位に水酸基を持つ 7 α -hydroxyl bile acids の基質認識に重要であることが明らかとなった。通常、SULTs においてアミノ酸配列の 100 番目付近に触媒残基である His 残基が存在し、mSULT2A8 以外の全ての SULTs において高度に保存されている(57)。mSULT2A8 においては、その触媒残基である His 残基の代わりに 99 番目の Leu 残基が存在し、これが mSULT2A8 における 7 α -hydroxyl bile acids の基質認識に関与しており、5'-PSB loop に存在する His48 が硫酸化に必須な触媒残基として働いている。マウス SULT2A8 における胆汁酸類の 7-O-硫酸化の触媒機構をさらに明らかにするためにはさらなる研究が必要であるが、本研究によってそのメカニズムの一端を解明することができたと考えられる。また、腸内細菌の一種 *Clostridium* 属は bile acids 3-O-sulfate の硫酸基を加水分解することができるが、bile acids 7-O-sulfate の硫酸基は加水分解できないという知見がある(58)。胆汁酸硫酸体が加水分解されると、それに引き続き、腸内細菌類の 7 α 脱水酸化酵素により毒性の強い2次胆汁酸の生産が起こると考えられる。そのため、マウスにおいて mSULT2A8 による胆汁酸類の7位の硫酸化は毒性が強い2次胆汁酸の生産の抑制に重要な反応であることが示唆される。さらに本研究により、bile acids 7-O-sulfate になることにより胆汁酸類が持つ TGR5 受容体へのリガンド活性が低下していることが判明し、胆汁酸類が持つエネルギー代謝に関与するホルモン様作用の活性調節を行っていることが示唆された。これらの結果から、mSULT2A8 はマウスにおいて胆汁酸類の解毒代謝し、胆汁酸類のホルモンとしての作用を、7位の硫酸化によって調節していることが考えられた。

第 2 章

食品機能性成分硫酸体の調製技術開発

および生理機能解明

SULTs は序論で前述したように、様々な薬物やポリフェノール類等の食品成分等の生体外異物の代謝や、内因性化合物の濃度調節に関わる酵素である (4-6)。そのうち、ヒトにおける SULTs の中でも SULT1 ファミリーに属する 7 種類の SULTs (SULT1A1, SULT1A2, SULT1A3, SULT1B1, SULT1C2, SULT1C4, SULT1E1) がポリフェノール類に対して硫酸化活性を有し、イソフラボンの一種の daidzein や genistein, フラボノール類の quercetin や kaempferol 等を硫酸化することが知られている(59)。また、SULT はこれらのポリフェノール類に対して位置特異的な硫酸化を行うことが報告されている。例えば、SULT1A3 は genistein や daidzein の 4'位の水酸基を位置特異的に硫酸化し、一方で、SULT1E1 はこれらのポリフェノール類の 4'位と 7'位の水酸基の両方を硫酸化する(60)。このように、それぞれの SULTs に特徴的な基質認識機構と位置特異性があることが伺える。

食品機能性成分として知られているのポリフェノール化合物は、果実や野菜等に多く含まれ、癌や心血管系の疾患の予防に効果がある等の、様々な健康に有益な機能があると信じられている(61, 62)。これらの機能性に関する研究は、*in vitro* にて、ポリフェノールの一種のフラボノイド類の配糖体 (グルコシド) や糖を含まないアグリコンを用いて試験・評価したものが多い(63,64)。しかしながら、これらの食品機能性成分の多くは生体内に取り込まれると、硫酸抱合やグルクロン酸抱合等の代謝反応を受け、その多くは代謝物として存在していることが分かっている。一般的にこのような抱合反応を受けた代謝物は機能が不活性化すると考えられている。しかしながら、近年の研究により抱合反応を受けた後も機能を有するポリフェノール化合物の存在が明らかとなった(36,37)。そのため、ポリフェノール類の食品成分の機能を詳細に解明するためには、抱合体のような代謝物の機能性も配糖体やアグリコンの化合物と同様に評価する必要がある。しかしながら、ポリフェノール化合物や第 1 章で使用した胆汁酸のような複数の水酸基を持つ化合物は、それぞれの水酸基が位置特異的に抱合反応を受けた代謝物が複数存在することが考えられる。このような代謝物の有機合成法による調製には非常に煩雑な工程を踏む必要があり、調製が困難である。そのため、ポリフェノール化合物のような複数水酸基を持つ化合物の位置特異的な硫

酸体の調製も同様に困難であり、現在その簡便な調製方法は確立されていないため、ポリフェノール化合物の硫酸抱合体の機能性はほとんど解明されていないのが現状である。近年、このような調製が困難な化合物の生産方法として、遺伝子組換え微生物の代謝を利用した技術が開発されてきている。例として、ポリフェノール類の位置特異的なグルクロン酸抱合体やメチル抱合体を、遺伝子組み換え大腸菌を用いて調製した報告等がある(65,66)。そこで、我々は、現在調製技術が確立されていない複数の水酸基を持つ化合物の硫酸抱合体も同様に、遺伝子組換えにより硫酸化を担う SULT を発現した大腸菌を利用することで簡便かつ大量に硫酸抱合体が調製できるのではないかと考えた。今まで調製が困難であったポリフェノール硫酸体を大量調製出来るようになれば、これらの食品機能性成分の更なる詳細な機能解明に貢献できると考えられる。

第2章では、このような調製が困難な食品機能性成分の硫酸体の調製技術の開発を行い、開発した技術にて調製したポリフェノール硫酸体を用いて、その硫酸体の機能解析も併せて行った。

実験方法

SULT 発現大腸菌による genistein の代謝変換

代謝変換試験に用いるモデル基質としてイソフラボン類の一つである genistein を使用した。また、大腸菌 BL21 株に *hSULT1A3* (Genbank accession number: NM_177552), *hSULT1C4* (Genbank accession number: NM_006588) 及び *hSULT1E1* (Genbank accession number: NM_005420) の ORF を組み込んだ大腸菌発現用ベクターである pGEX-2TK をトランスフェクションし、遺伝子改変した hSULT 発現大腸菌を実験に使用した。これらの hSULT 発現大腸菌を 100 mg/mL の ampicillin を含む 2 mL の LB 培地で 37°C、5~9 hr 前培養したのち、200 mL の同様の LB 培地にて 37°C で大量培養した。OD_{600 nm}=0.6~1.0 になった時点で終濃度が 0.25 mM になるように IPTG を添加し、24°C で 9 hr 培養しリコンビナント hSULT の発現を誘導した。それぞれの大腸菌における hSULT の発現は 10% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE にて確認した(53)。リコンビナント hSULT を誘導した後、遠心にて大腸菌を回収し、培地を大腸菌培養用の最小培地である M9 培地を 50 mM glucose, 2 mM MgSO₄ を含むように改変し、100 mg/mL の ampicillin, 0.25 mM IPTG を添加した硫酸体調製用培地 100 mL と交換した。そして、DMSO に溶解した genistein を、硫酸体調製用培地中での終濃度が 0.5 mM (DMSO 終濃度 5%) になるように添加し、24°C 及び 37°C で 24 hr 培養した。その後、培養上清を回収し、以降に記す実験に使用した。

genistein 硫酸体の精製

上記の手法で調製した培養上清 100 mL に対して逆相担体である Diaion HP20 を 20 mL 加え 1hr 攪拌した。その後、化合物を吸着させた Diaion HP20 を H₂O で十分に洗浄し、100 mL の MeOH で化合物を溶出した。溶出液に 10 mL の H₂O を加え、濃縮・凍結乾燥を行い、その凍結乾燥粉末を 2 mL の DMSO に溶解した。そして、溶解した genistein とその代謝物を Prominence HPLC にて分離した。化合物の分離には粒径 5 µm の Capcell PAK C18 MGII column (4.6 × 250 mm) を使用し、カラムオーブンを 40°C に保ち、以下に記す条件のグラジエントモードによる分離を行った。移動相には、0.05% TFA 入りの H₂O と 100% MeOH を用い、流速 1 mL/min にて 50 min 行った。グラジエントの条件は MeOH 濃度が 0% (0-5 min), 0-70% (5-40 min), 70-100% (40-45 min), 100% (45-50 min), 100-0% (50-55 min) となるようにした。検出には photodiode array detector (258 nm) を使用した。

回収した画分は濃縮し MeOH を揮発した後再び Diaion HP20 に吸着させ、MeOH で再溶出した。そして濃縮・凍結乾燥したサンプルは MeOH に溶解し、質量分析装置を用いて化合物の分析を行った。また、一部は DMSO-d₆ に溶解し NMR 解析に使用した。

Mass spectrometry (MS)解析 (質量分析)

上記手法にて調製したサンプルをフーリエ変換型質量分析装置 Q-Exactive hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer を用いて解析した。electrospray ionization (ESI)プローブを使用し、シリンジポンプにてサンプルを direct infusion 注入した。分析は Target-MS² スキャンにて行った。分析条件は negative ionization mode; spray voltage 2.0 kV; heath gas flow rate, 10; auxiliary gas, 0; sweep gas, 0; heated capillary temperature, 270°C で行った。また解像度は 140000, AGC target は 2E5、maximum injection time は 100 ms, normalized collision energy は 20%にて行った。データ解析には Xcalibur に内包されている Qual browser software を使用した。

NMR 解析

DMSO-d₆ に溶解したサンプルは Bruker Advance 400 instrument (400 MHz, 9.4 T) を用いて NMR 解析を行った。化合物のプロトンの化学シフト (δ) は tetramethylsilane (TMS) を内部標準として計算した。¹H NMR 解析は 8000 Hz にて 32 回積算条件にて行った。NMR データは XWINNMR ソフトウェアを用いて解析した。硫酸体の化学構造の決定は NMR データを基に行った。

硫酸体の定量解析

硫酸体は標品が市販されていないものが多く直接的な定量が難しいため、type H-1 sulfatase にて化合物の硫酸基を脱抱合し遊離の genistein 量を測定することによって定量解析した。Sulfatase による脱抱合は製品マニュアルに記載された方法を一部改編して行った。反応組成は全量 100 μ L で行い、sulfatase (0.1 unit), sample, 150 mM Tris-HCl(pH8.0)で行い、37°C で 4 hr 脱抱合を行った。その後、50 μ L の MeOH を加え 98°C にて 3 min 加熱し反応を停止した。そして、1,5000 \times g で 10 min 遠心したのち、上清を HPLC にて解析し、genistein を用いて作成した検量線を使用して硫酸体の定量を行った。

食品機能性成分硫酸体の機能解析

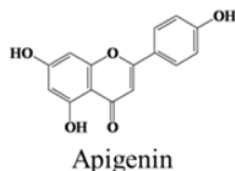
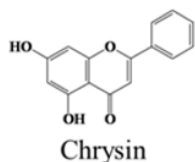
遺伝子工学的手法による様々なポリフェノール硫酸体の生産

食品機能性成分硫酸体の調製には、様々なポリフェノール類(chrysin、apigenin、daidzein、genistein、biochanin A、galangine、kaempferol、naringenin、resveratorol)を使用した。硫酸体調製に使用した食品機能性成分の構造は Figure II-1 に示す。硫酸体の調製方法には上記した手法を利用した。まず、hSULT 発現大腸菌 (SULT1A3, SULT1C4, SULT1E1) を 100 mg/mL の ampicillin を含む 2 mL の LB 培地で 37°C、5~9 hr 前培養したのち、200 mL の同様の LB 培地にて 37°C で大量培養した。OD_{600nm}=0.6~1.0 になった時点で終濃度が 0.25 mM になるように IPTG を添加し、24°C で 9 hr 培養しリコンビナント hSULT の発現を誘導した。リコンビナント hSULT を誘導した後、遠心にて大腸菌を回収し、M9 培地を 50 mM glucose, 2 mM MgSO₄ を含むように改変し NaOH で pH8.5 に調整し、100 mg/mL の ampicillin, 0.25 mM IPTG を添加した硫酸体調製用培地 100 mL と交換した。そして、DMSO に溶解したポリフェノール類を、硫酸体調製用培地中での終濃度が 0.5 mM (DMSO 終濃度 5%) になるように添加し、24°C 及び 37°C で 24 hr 培養した。その後、培養上清を回収し HPLC を用いて硫酸体の有無を確認した。化合物の分離には粒径 5µm の Capcell PAK C18 MGII column (4.6 × 250 mm) を使用し、カラムオーブンを 40°C に保ち、以下に記す条件のグラジエントモードによる分離を行った。移動相には、0.05% TFA 入りの H₂O と 100% MeOH を用い、流速 1mL/min にて行った。グラジエントの条件は MeOH 濃度が 0% (0-5 min), 0-100% (5-55 min), 100% (55-60 min), 100-0% (60-65 min), 0%(65-70 min) となるようにしたまた回収した培養上清は以降に記す実験に使用した。

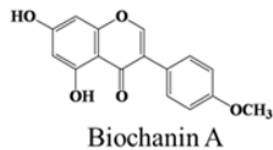
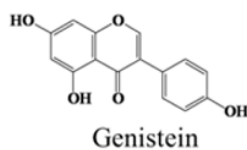
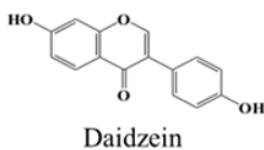
ポリフェノール硫酸体の精製

上記の手法で調製した培養上清 100 mL を回収し、C18 逆相カートリッジである Sep Pak C18 Cartridges を用いて粗精製した。洗浄には H₂O、化合物の溶出には MeOH を用いた。その後、溶出液を逆相弱陰イオン交換カートリッジである Oasis WAX cartridge を使用し更に精製した。洗浄には 2% formic acid を加えた MeOH を使用し、溶出には MeOH : NH₃ 水 = 95:5 の混合液を使用した。その後、溶出液をエバポレーターで濃縮し MeOH と NH₃ を取り除いた。残った溶液に少量の炭酸アンモニウムを加え、溶液を塩基性にした後に -80°C で凍結し、凍結乾燥機を使い完全に乾燥した。凍結乾燥粉末をポリフェノール硫酸体として使用した。

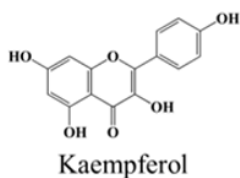
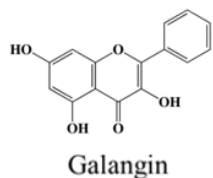
Flavone



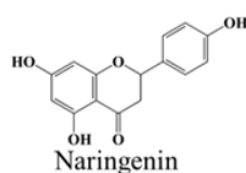
Isoflavone



Flavonol



Flavanone



Stilbenoid

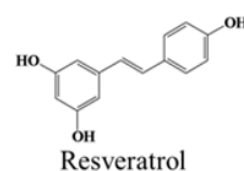


Figure II-1. 硫酸体の調製に使用した食品成分の構造

細胞培養

ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞およびヒト胎児腎細胞株 293T 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に 10% FBS, 100 IU/mL ペニシリン, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを加えた培地を使用して 37°C, 5% CO₂ にて培養した。

細胞増殖抑制試験

細胞増殖抑制試験には HepG2 細胞を用いた。HepG2 細胞を 100 mm dish で数回継代した後、96 well plate に 1.0×10^4 cells/well になるように播き、37°C、5% CO₂ で 24 hr 前培養を行った。24 hr 後、培地を取り除き、様々なポリフェノール類とその硫酸体の終濃度が 20 μM なるように調製した培地に置き換え、37°C、5% CO₂ で更に 24 時間培養した。DMSO の終濃度は 0.1% とし事前に細

胞毒性がないことを確認した。そして、24 hr 処理後に cell counting kit-8 を用いて各 plate 内の吸光度を precision microplate reader で 450 nm の波長を測定しそれぞれの細胞数を算出した。

GPR30 を標的とした CRE-luciferase assay

ヒト GPR30 (hGPR30)を 293T 細胞および HepG2 細胞に強発現させるために、*hGPR30* のクローニングを行なった。*hGPR30* は肝臓に発現していることが知られているため HepG2 細胞から Tryzol を用いて total RNA の抽出を行った。抽出した total RNA は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を用いて逆転写し cDNA を調製した。調製した cDNA と *hGPR30* (Gene ID: NM_001505)に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー (sense primer: 5'-TCGGGTACCATGGATGTGACTTCCCAAGC-3', antisense primer: 5'-ATTGCGGCCGCTACACGGCACTGCTGAC-3') (Table II-1)および KOD plus Neo を用いて、製品プロトコールに従って 50 μ L の反応系で PCR 増幅を行った。PCR 反応は 94°C で 3 min 加熱した後、98°C で 20 sec、68°C で 1.5 min の 2 steps を 35 サイクル行った。増幅後、精製した DNA 断片はクローニング用ベクターである pBluescript II SK(+)のマルチクローニングサイト(MCS)の KpnI および NotI サイトにサブクローニングし、*E.coli* XL1-Blue MRF' にトランスフェクションした。その後シークエンス解析を行い、挿入した *hGPR30* の塩基配列を解析し正しい配列が挿入されていることを検証した。その後、pBluescript II SK(+)にクローニングされた *hGPR30* cDNA を KpnI および NotI で切断し、マルチジーントランスフェクションが容易な動物細胞発現用ベクターである pEBMulti-Hyg にサブクローニングした。作製した pEBMulti-Hyg-GPR30 plasmid および第 1 章の Experimental procedure に記した手法で作製した CRE-TATA-pGL4.17 plasmid を Quantum Prep® Plasmid Midiprep Kit を用いて精製した。次に、293T 細胞を 4.0×10^4 cells/well で 48well plate に播種し、24 hr 培養しサブコンフルエントになるまで細胞を増殖した。その後、1 well 毎に精製した 20 ng の CRE-TATA-pGL4.17 plasmid と 180 ng の pEBMulti-Hyg-GPR30 および control vector として 180ng の pEBMulti-Hyg を Lipofectamin LTX を用いて同時トランスフェクションした。12hr 後培地を DMEM に 1% FBS, 100 IU/mL ペニシリン, 50 μ g/mL ストレプトマイシンを加えた培地と交換し、DMSO に可溶化した genistein, genistein 4'-*O*-sulfate および genistein 7-*O*-sulfate を終濃度が 20 μ M になるように添加し。また、処理時の DMSO 濃度は 0.1%となるようにした。6 hr 後、細胞を回収し 100 μ L の lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1% Triton X-100)に可溶化しサンプルとした。サンプル 50 μ L に Bright-Glo™ Luciferase Assay System のルシフェラーゼアッセイ用の基質を等量加え、発光強度をルミノメー

ターで測定し、GPR30 への作用を評価した。

Table II -1. hGPR30 のクローニングに使用したオリゴヌクレオチドプライマー

Protein name	Sense/Antisense	Sequence
human GPR30	Sense	5'-TCGGGTACCATGGATGTGACTTCCCAAGC -3'
	Antisense	5'- ATTGCGGCCGCTACACGGCACTGCTGAAC-3'

結果・考察

hSULT 発現大腸菌を用いた遺伝子工学的手法による genistein 硫酸体の生産

まず本、hSULT 発現大腸菌を用いた、遺伝子工学的なポリフェノール化合物の硫酸体の調製法を確立させるためのモデル化合物として、大豆イソフラボンの一種の genistein を選択した。また、大腸菌に発現させる硫酸転移酵素は hSULT1A3, hSULT1C4, hSULT1E1 を選んだ。以前の報告により、hSULT1A3 は主に genistein の 4'位の水酸基を標的として硫酸化し genistein 4'-O-sulfate を生産し、一方で hSULT1E1 は genistein の 4'位と 7 位の水酸基の両方を標的として硫酸化することで genistein 4'-O-sulfate 及び genistein 7-O-sulfate の 2 種類の硫酸体を生産することが知られている(60)。また、hSULT1C4 においては genistein に対して強い硫酸化活性を持つことが報告されている(58)(59)が、genistein のどの位置の水酸基を標的として硫酸化を行うのかは明らかではない。これらの SULTs はいずれも genistein に対して強い硫酸化活性を持ち、SULT1A3 および SULT1E1 においては硫酸化における位置選択性も明らかとなっているため本実験に使用した。また、SULT1 family のその他の酵素(hSULT1A1, hSULT1A2 および hSULT1B1)は genistein に対して硫酸化活性を持つことが報告されている(59)が、予備試験において硫酸化の位置特異性および、硫酸体の生産効率が低く、SULT1C2 においては genistein に対する硫酸化活性が著しく低く(59)、予備試験においても genistein 硫酸体の生産が見られなかったため本実験から除外した。

最初に、pGEX-2TK-SULT1A3, SULT1C4, SULT1E1 をトランスフェクトした大腸菌 BL21 を LB 培地で培養し、0.25 mM の IPTG で各種 SULT の発現誘導を行い SDS-PAGE にて確認を行った(Figure II-2)。本実験において、大腸菌体内で不溶性の封入体を形成しないように SULTs は高い水溶性を持つ GST 融合タンパク質(GST-SULTs)として発現させた。HPLC による分析の結果、培養上清に genistein とその硫酸体と考えられる代謝産物 (P1 および P2) が検出された(Figure II-3 A)。また、解析の結果から hSULT1A3 発現大腸菌は P1 を、GST-hSULT1C4 発現大腸菌は P2 を選択的に生産でき、GST-hSULT1E1 発現大腸菌は P1 および P2 の両方を大量に生産できることが判明した。

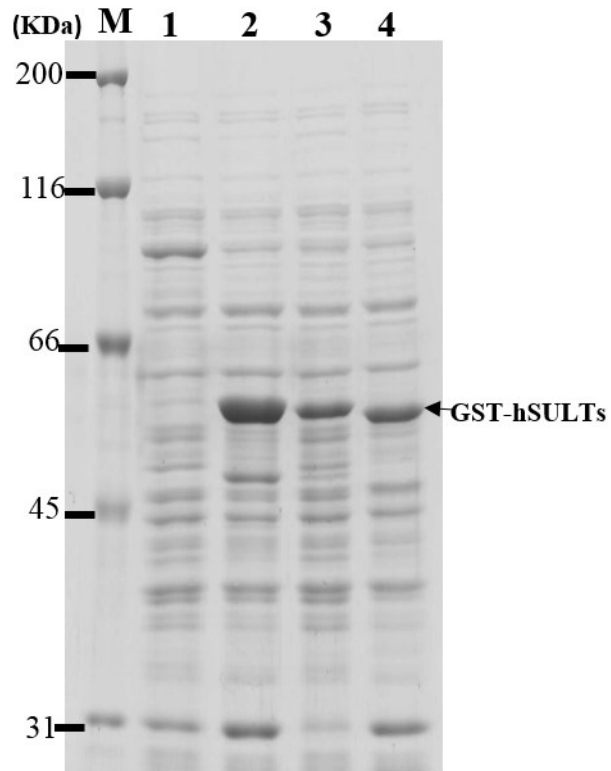


Figure II-2. 大腸菌内での GST-SULT の発現確認.

pGEX-2TK および pGEX-2TK-SULT をトランスフェクションした *E.coli* BL21 を用いて実験方法通りに IPTG を使用して酵素を誘導した。リコンビナント GST-SULTs の発現は SDS-PAGE にて確認した。Lane M, molecular maker; lane 1, Mock *E.coli* BL21; lane 2, *E.coli* BL21 (GST-SULT1A3); lane 3, *E.coli* BL21 (GST-SULT1C4); lane 4, *E.coli* BL21 (GST-SULT1E1)。

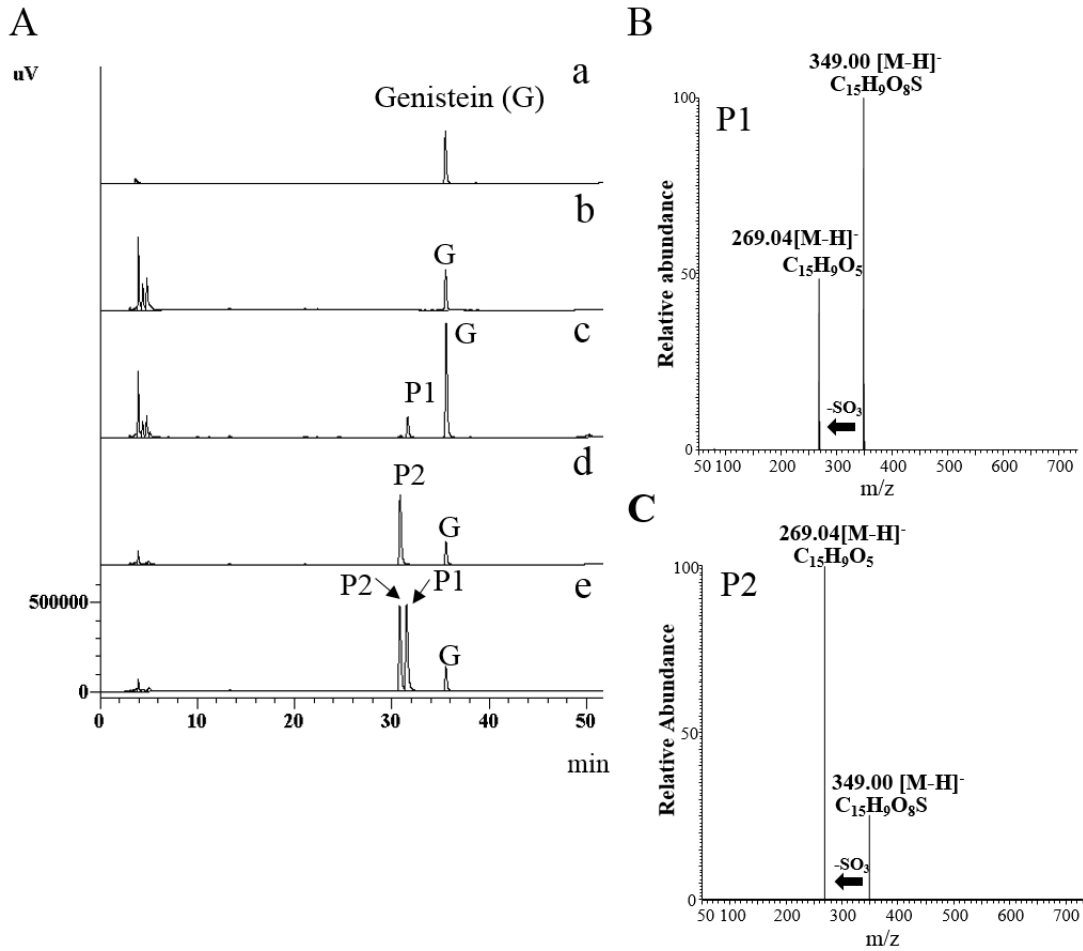


Figure II-3. 培養上清の HPLC 解析および代謝産物の MS/MS 解析

(A)培養上清中に含まれる代謝物を C18 逆相カラムを用いた HPLC にて分離し PDA 検出器 (258 nm) を使用して化合物を検出した。genistein の代謝変換は実験方法に記した通りに行った。(a) genistein; (b) *E.coli* BL21(Mock);(c) *E.coli* BL21(GST-SULT1A3) ;(d) *E.coli* BL21(GST-SULT1C4); (e) *E.coli* BL21(GST-SULT1E1)。図中の genistein およびその代謝産物は G、P1 および P2 で表記している。(B)P1 の MS/MS スペクトラム。(C)P2 の MS/MS スペクトラム。MS/MS 解析には 349.00 *m/z* を示すイオンをプリカーサーイオンとして使用した。

また、この実験から、SULT 発現大腸菌によって生産された硫酸化代謝物はそのほとんどが大腸菌体内ではなく、培養上清中に放出されていることが分かった。以前の報告により、*E.coli* は RND (resistance-nondulation-division)、MSF(major facilitator superfamily)、ABC (ATP binding cassette)、SRM(small multidrug resistance) family 等に属する 37 種類の多剤耐性輸送体 (Multidrug Resistance Transporters)を発現しており、これらの輸送体を介して、多くの生体外異物、薬物、硫酸体を含む有機アニオン化合物等を細胞外へ排出することが判明している(67-70)。さらに、培地中に排出された硫酸体は負に荷電しており水溶性が高く、大腸菌の細胞膜を透過し難くなり、再取り込みされにくいことが考えられる。そのため SULT 発現大腸菌によって生産された硫酸体のほとんどが培養上清中に検出されたと考察された。

SULT 発現大腸菌によって生産された genistein 硫酸体の構造決定

SULT 発現大腸菌によって生産された genistein 硫酸体と推察された代謝物(P1 および P2) の化学構造を明らかにするために、“実験方法”に記した手法にしたがって化合物の精製を行った後、MS 解析および NMR 解析にて化合物の化学構造を決定した。MS 解析の結果、P1 および P2 ともに m/z が 349.00 を示し、genistein に硫酸基が 1 つ付与された genistein mono sulfate (genistein 7-*O*-sulfate or genistein 4'-*O*-sulfate)の[M-H]⁺イオンの理論上の m/z と一致した。Figure II-3 B の MS/MS 解析の結果を見ると P1 および P2 共に、親イオンである 349.00 m/z のピークから、high-energy collision-induced dissociation (high-energy CID: 高エネルギー衝突誘起解離)により SO₄が脱離した 269.04 m/z のフラグメントイオンが生成していることが分かる。このフラグメントイオンは genistein の m/z と一致している。これらの結果により P1 および P2 は genistein mono sulfate (genistein 7-*O*-sulfate or genistein 4'-*O*-sulfate)であることが判明した。さらに、P1 および P2 がそれぞれ、genistein 7-*O*-sulfate および genistein 4'-*O*-sulfate のどちらの化合物であるかを決定するために ¹H NMR 解析を行った(Figure II-4)。genistein, P1 および P2 の ¹H NMR スペクトルは以下に示す。

(G) genistein: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ 8.33 (H₂, s), 7.37 (H₂' and H₆', d, J = 8.6 Hz), 6.81 (H₃' and H₅, d, J = 8.7 Hz), 6.38 (H₈, d, J = 2.1 Hz), 6.23 (H₆, d, J = 2.1 Hz)

(P1) genistein 4'-*O*-sulfate: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ 8.4 (H₂, s), 7.46(H₂' and H₆, d, J = 8.6 Hz), 7.22 (H₃' and H₅', d, J = 8.6 Hz), 6.4 (H₈, d, J = 2.0 Hz), 6.24d

(H6, d, $J = 2.0$ Hz)

(P2) genistein 7-*O*-sulfate: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ 8.42 (H2, s), 7.40 (H2' and H6', d, $J = 8.6$ Hz), 6.9 (H8, $J = 2.1$ Hz, H8), 6.82 (H3' and H5', d, $J = 8.6$ Hz), 6.63 (H6, d, $J = 2.1$ Hz).

genistein と P1 の ^1H NMR スペクトルを比較すると、H3'および H5'のスペクトルが低磁場側へシフト($\Delta\delta -0.41$)していることが分かる。これは genistein の 4'位の水酸基が硫酸基に置換されたことで起こったと考えられる。また、genistein と P2 の ^1H NMR スペクトルを比較すると H6 と H8 のスペクトルが低磁場側へシフト(H6: $\Delta\delta -0.4$, H8: $\Delta\delta -0.5$)している。この結果から P2 は P1 の考察と同様に H6 と H8 に隣接する 7 位の水酸基が硫酸基に置換したため起こったと考えられる。さらに、これらの結果は、以前の報告により有機合成法によって調製された genistein 4'-*O*-sulfate および genistein 7-*O*-sulfate の ^1H NMR スペクトルと一致した (59)。以上の結果から、SULT 発現大腸菌によって生産された化合物 P1 は genistein 4'-*O*-sulfate であり、P2 は genistein 7-*O*-sulfate であることが判明した。このことから、本手法を用いた genistein 硫酸体の調製において、GST-hSULT1A3 発現大腸菌を用いることで genistein 4'-*O*-sulfate を選択的に調製でき、一方で GST-hSULT1C4 発現大腸菌を使用することで genistein 7-*O*-sulfate を選択的に調製できるということが明らかとなった。

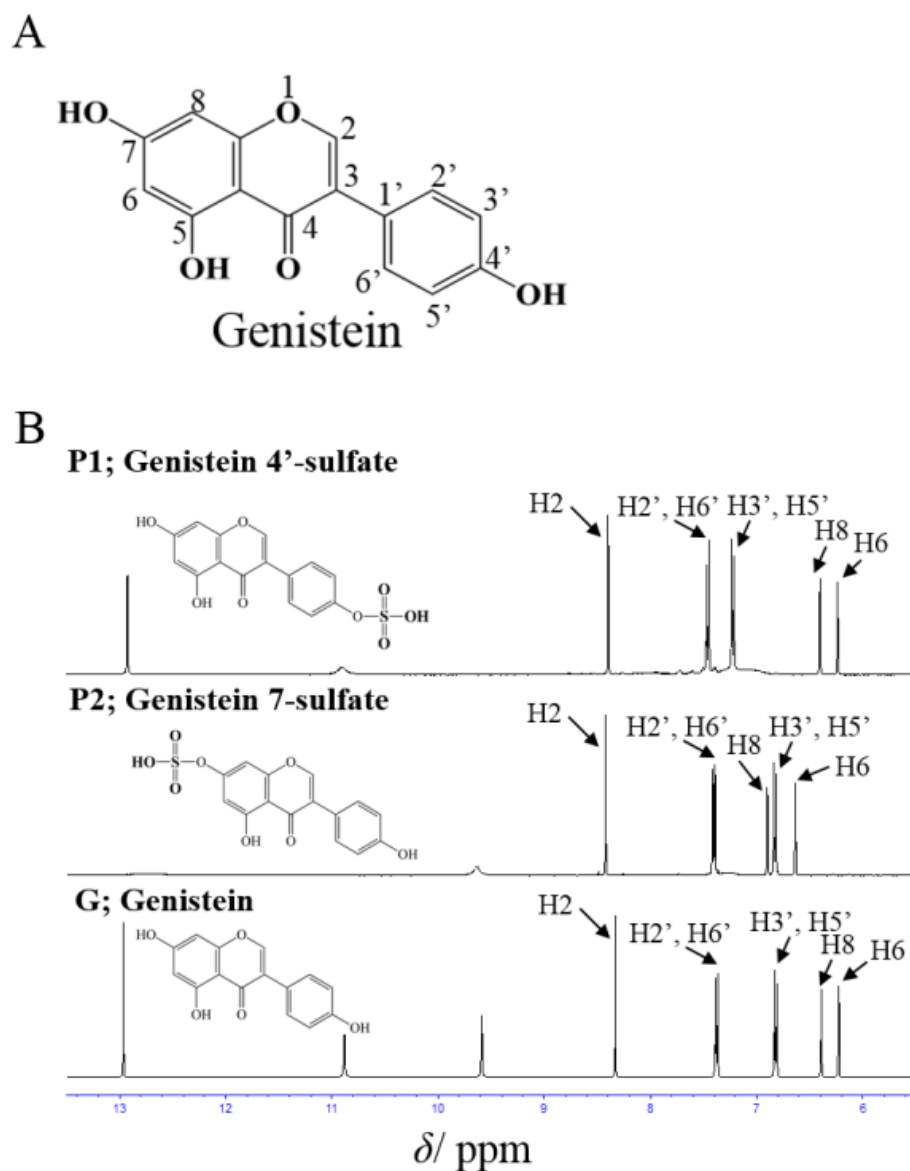


Figure II-4. genistein および genistein sulfate(P1 および P2)の ^1H -NMR 解析

(A) genistein の化学構造。(B) P1(genistein 4'-*O*-sulfate), P2(genistein 7-*O*-sulfate)および genistein の ^1H NMR スペクトル。 ^1H NMR 解析は実験方法に記述した通りに行った。P1 および P2 の ^1H NMR スペクトルは以前の研究で報告された genistein 4'-*O*-sulfate および genistein 7-*O*-sulfate のスペクトルと一致した (59)。矢印は化学構造中のプロトンの位置を示している。

遺伝子工学的手法による genistein 硫酸体調製における至適条件の検討

SULT 発現大腸菌を用いた遺伝子工学的手法による genistein 硫酸体調製において、その生産効率に与える重要な因子として、硫酸体調製用培地に含まれる glucose および無機硫酸 (SO_4^{2-}) の濃度や培養温度が大きく影響することが推察される。硫酸化反応における硫酸基の供与体である PAPS は ATP と SO_4^{2-} から合成されることが知られている。そこで、本手法における硫酸体調製用培地中の、ATP の生産に関与する glucose 濃度および SO_4^{2-} の供与源である MgSO_4 の濃度が硫酸体の生産効率にどのように影響するのかを検討した。

glucose および無機硫酸 (SO_4^{2-}) の濃度の影響

glucose 濃度および MgSO_4 の濃度の検討には GST-SULT1C4 発現大腸菌を用いた。glucose 濃度の検討において、genistein の代謝変換には 500 μM の genistein および、異なる濃度の glucose および 2 mM の MgSO_4 を使用し、24°C で 24 hr の培養条件で実験方法に記した条件で行った。Figure II-5 の結果を確認すると、まず、glucose および MgSO_4 を含まない条件で培養すると、genistein 7-*O*-sulfate の生産量が著しく低いことが分かる。また、glucose 濃度を 0~400 mM (0, 25, 50, 100, 200, 400 mM) 間で検討したところ 50 mM で genistein 7-*O*-sulfate の生産量が 58.6 ± 5.0 mg/L となり生産量が最も高くなり、一方で glucose 濃度が 100~400 mM 間では生産量が glucose 濃度 50 mM と比較して低かった。そして、同様に SO_4^{2-} 濃度を 0~4 mM (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mM) で検討した。genistein の代謝変換には 500 μM の genistein および、50 mM glucose と異なる濃度の MgSO_4 を使用し、24°C で 24 hr の培養条件で実験方法に記した条件で行った。その結果、 SO_4^{2-} 濃度が 1 mM 以上で genistein 7-*O*-sulfate の生産量が最大となることが判明した。これらの結果から、SULT 発現大腸菌を用いた遺伝子工学的手法による硫酸体の生産において、硫酸体調製用培地の glucose 濃度と SO_4^{2-} 濃度が重要な因子であることが判明した。

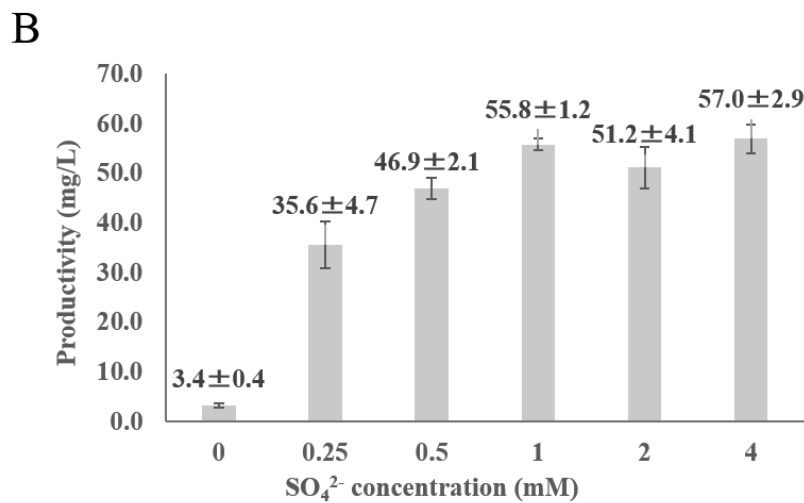
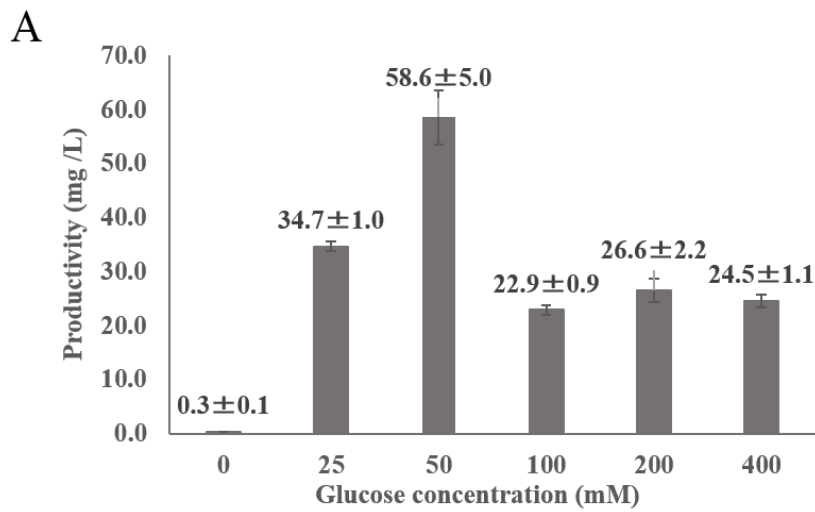


Figure II-5. グルコース濃度および SO₄²⁻濃度が GST-SULT 発現 *E.coli* BL21 による genistein sulfate の産生に及ぼす影響

(A)グルコース濃度 (0, 25, 50, 100, 200 および 400mM) が *E.coli* BL21(GST-SULT1C4)の genistein 7-sulfate の産生に及ぼす影響。 (B) SO₄²⁻濃度 (0, 0.25, 0.5, 1, 2 および 4 mM) が *E.coli* BL21(GST-SULT1C4)の genistein 7-*O*-sulfate の産生に及ぼす影響。 genistein の代謝変換には各データは平均値±標準偏差 (S.D.)で表記した。

培養温度の影響

引き続き、SULT 発現大腸菌の硫酸体生産時の培養温度の影響を検討した。硫酸化時の培養温度は 18°C、24°C、30°C、37°C で 24 hr 培養を行い、SULT 発現大腸菌は BL21 (GST-hSULT1A3, GST-hSULT1C4, GST-hSULT1E1) の 3 種類を用いて検討した。Figure II-6 の結果を見ると、全ての SULT 発現大腸菌において 18°C の培養条件では genistein 硫酸体の生産量が低かった。また、BL21 (GST-hSULT1A3) においては 18°C での培養条件と比較し、培養温度を上昇させることで硫酸体の生産量が上昇した。しかしながら、24~37°C 間では硫酸体の生産量の上昇は確認できなかった。一方で、BL21 (GST-hSULT1C4) においては温度依存的に硫酸体の生産量が上昇し、37°C で硫酸体の生産量が最大となることが確認された。BL21 (GST-hSULT1E1) においても BL21 (GST-hSULT1C4) 同様に温度依存的に硫酸体の生産量が上昇することが判明した。これらの結果から、硫酸化時の培養温度が硫酸体の生産量に大きく影響することが示唆された。

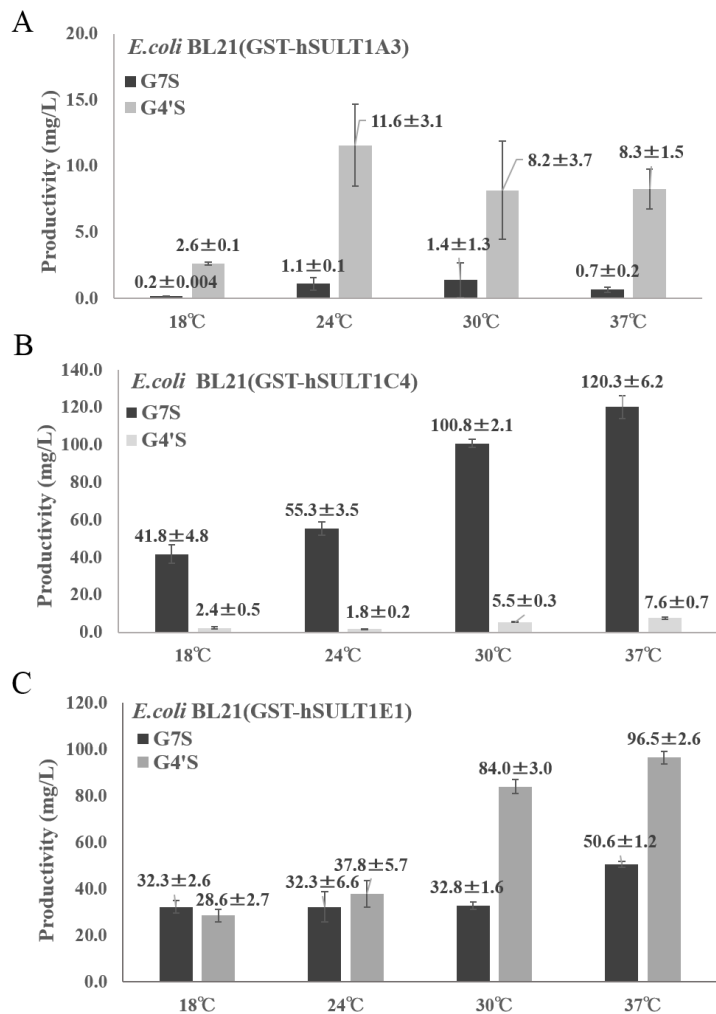


Figure II-6 培養温度が GST-SULT 発現 *E. coli* BL21 を用いた genistein sulfate の産生に及ぼす影響

異なる培養温度条件（18, 24, 30 および 37°C）が *E. coli* BL21(GST-SULT)による genistein sulfate の生産に及ぼす影響を検討した。(A) *E. coli* BL21(GST-SULT1A3)を使用した培養上清; (B) *E. coli* BL21(GST-SULT1C4)を使用した培養上清; (C) *E. coli* BL21(GST-SULT1E1)を使用した培養上清。genistein sulfate の定量解析は実験方法に記した通りに行った。各データは平均値 ± 標準偏差 (S.D.)で表記した。

以上の結果をまとめると、本手法において genistein 硫酸体を調製する場合、50 mM glucose および 1 mM 以上の MgSO₄ を含む M9 培地を用いることで効率的に genistein 硫酸体を調製できることが示された。また、BL21 (GST-hSULT1C4) を用いて 37°C の条件下で硫酸化を行うことで、genistein 7-*O*-sulfate を選択的且つ高効率に生産できることが示された (Figure II-6 B)。また、同様に BL21 (GST-hSULT1E1) を用いた場合、37°C の条件下で硫酸化を行うことで、genistein 4'-*O*-sulfate を最も効率的に生産できることが考えられた。しかしながら、BL21 (GST-hSULT1E1) は genistein の硫酸化における位置選択性が低く、genistein 7-*O*-sulfate も同時に多量に生産することが Figure II-6 C の結果から分かる。そのため、genistein 4'-*O*-sulfate の選択的な調製においては、BL21 (GST-hSULT1A3) を用いた方が良いということが考察された。

以上の結果を踏まえると本手法を用いた genistein の硫酸化には Figure II-7 に記すように GST-SULT1A3 発現 *E.coli* BL21 を用いることで genistein 4'-*O*-sulfate を選択的に調製することができ、対照的に GST-SULT1C4 発現 *E.coli* BL21 を用いることで genistein 7-*O*-sulfate の選択的な生産が可能であった。また、GST-SULT1E1 を発現させた場合は位置選択性が低く genistein 4'-*O*-sulfate、genistein 7-*O*-sulfate の 2 種類の硫酸体が生産される。本手法を応用することで、様々なポリフェノール化合物の位置特異的硫酸体が生産可能だと考えられる。

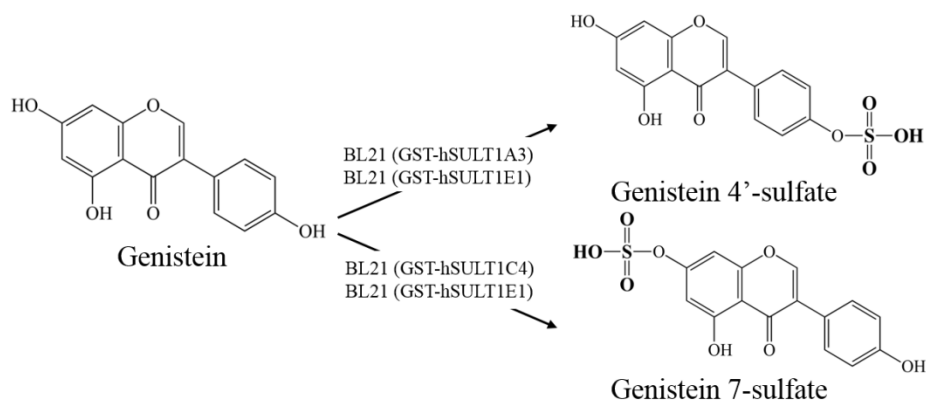


Figure II-7. GST-SULT 発現 *E.coli* BL21 による genistein の位置特異的硫酸化

BL21(GST-hSULT1A3)、BL21(GST-hSULT1C4)、BL21(SULT1E1)を用いた遺伝子工学的手法によって生産される位置特異的な genistein 硫酸体。

食品機能性成分硫酸体の機能解析

様々なポリフェノール類の硫酸体の調製

上記にて開発した手法を応用して、様々なポリフェノール化合物の硫酸体の調製を行った。硫酸体の調製には chrysin, apigenin, daidzein, genistein, biochanin A, galangine, kaempferol, naringenin, resveratorol を用いて行った。硫酸体の調製には hSULT1A3、hSULT1C4 および SULT1E1 を発現させた遺伝子組み換え大腸菌を用いて、位置特異的な硫酸体を調製した。また、これらのポリフェノール化合物は pH が中性付近で難溶性である場合が多いため、pH8.5 に調整しポリフェノール類が可溶化し易い条件の硫酸体調製用培地を使用した。Figure II-8 に遺伝子工学的手法にて調製したポリフェノール硫酸体の HPLC 解析結果を示す。

hSULT1C4 を発現させた大腸菌により、chrysin 7-O-sulfate (C7S), apigenin 7-O-sulfate (A7S), daidzein 7-O-sulfate (D7S), genistein 7-O-sulfate (G7S), biochanin A 7-O-sulfate (B7S), galangin 7-O-sulfate (Ga7S), kaempferol 7-O-sulfate (K7S), naringenin 7-O-sulfate (N7S) および resveratrol 3-O-sulfate (R3S) を調製した。また、SULT1E1 発現大腸菌を用いて、apigenin 4'-O-sulfate (A4'S), SULT1A3 発現大腸菌にて genistein 4'-O-sulfate (G4'S) を調製した。硫酸体の精製には固相抽出カートリッジを使用した簡易的な手法を用いた。SULT1C4 発現大腸菌は genistein の 7 位の水酸基の硫酸化を選択的に行っている (Figure II-2, II-3)。そのため hSULT1C4 発現大腸菌によって生産されたポリフェノール硫酸体は 7 位の水酸基が硫酸化されるものがほとんどであった。apigenin 4'-O-sulfate は SULT1E1 による生産効率が良かったため SULT1E1 発現大腸菌を用いて生産した。なお apigenin sulfate に関しては SULT による位置特異的硫酸化の報告および、構造的な推察ができなかったため、MS/MS 解析および NMR 解析にて構造の確認をおこなった (date not shown)。また、resveratrol の硫酸体は以前の研究 (70) 報告から、3 位が硫酸化されていると判断した。この結果が示すように、本手法を利用することで様々なポリフェノール硫酸体を調製可能ということが判明し、様々なポリフェノール硫酸体を生産することができた。

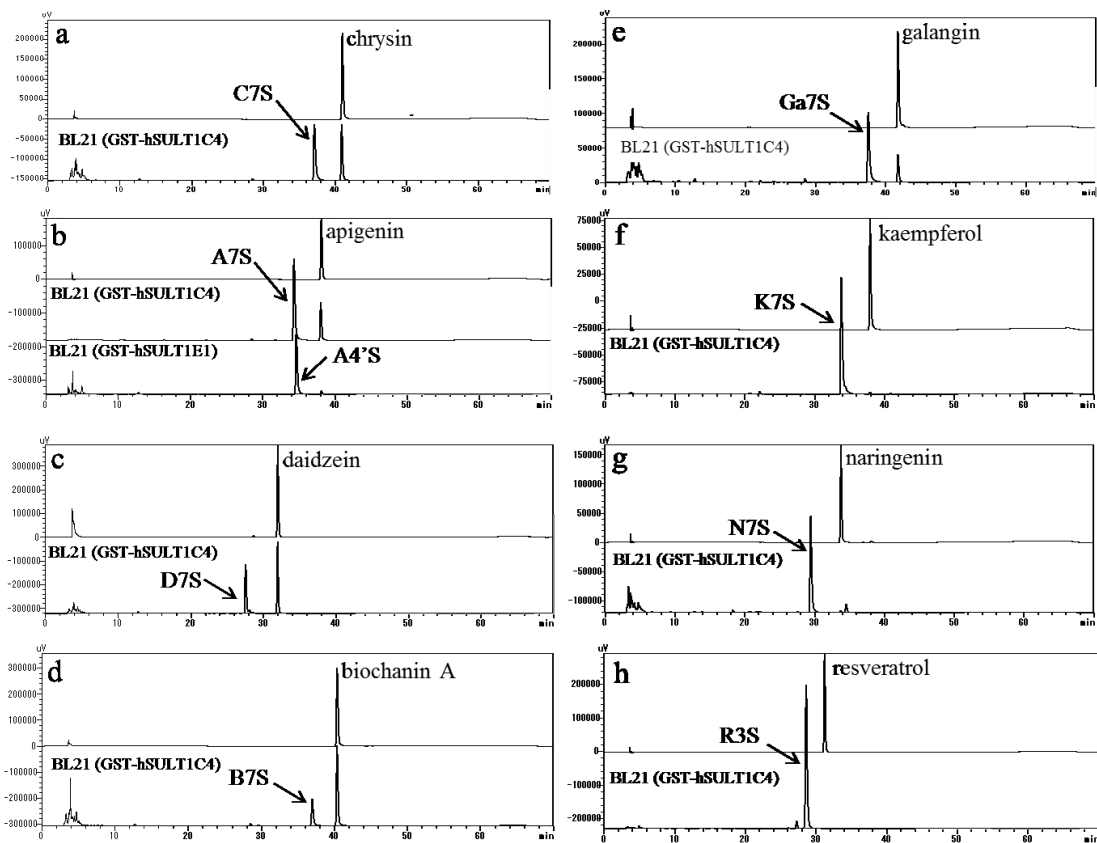


Figure II-8 遺伝子工学的な手法により調製した様々なポリフェノール硫酸体の HPLC 解析結果

培養上清に含まれる代謝物を C18 逆相カラムを用いた HPLC にて分離し PDA 検出器を使用して化合物を検出した。ポリフェノール化合物の代謝変換は実験方法に記した通りに行った。様々な SULT 発現大腸菌による、(a) chrysin および chrysin の代謝変換後の培養上清、C7S; chrysin 7-*O*-sulfate, PDA: 267 nm (b) apigenin および apigenin の代謝変換後の培養上清、A7S; apigenin 7-*O*-sulfate、A4' S; apigenin 4' -*O*-sulfate、PDA: 338 nm or 268 nm (c) daidzein および daidzein の代謝変換後の培養上清、D7S; daidzein 7-*O*-sulfate、PDA: 248 nm (d) biochanin A および biochanin A の代謝変換後の培養上清、B7S; biochanin A 7-*O*-sulfate、PDA: 259 nm (e) galangin および galangin の代謝変換後の培養上清、Ga7S; galangin 7-*O*-sulfate、PDA: 264 nm (f) kaempferol および kaempferol の代謝変換後の培養上清、K7S; kaempferol 7-*O*-sulfate、PDA: 264 nm (g) naringenin および naringenin の代謝変換後の培養上清、N7S; naringenin 7-*O*-sulfate、PDA: 289 nm (h) resveratrol および resveratrol の代謝変換後の培養上清、R3S; resveratrol 3-*O*-sulfate、PDA: 309 nm。genistein および genistein sulfates の調製は Figure II-2 を参照。また全てのポリフェノール硫酸体は過去の文献情報、質量分析装置、NMR により構造決定した。

。

細胞増殖抑制試験

ポリフェノール化合物には、様々な機能が報告されているが、そのひとつに癌増殖を抑制するといったような抗癌作用が報告されている(60)。また、daidzein において、その硫酸体である daidzein 7-*O* -sulfate に癌増殖抑制作用があることが報告されている(36)。しかしながら、その他のポリフェノール硫酸体における癌抑制作用を評価した研究は少ない。そこで、ポリフェノール硫酸体の機能解析として、癌増殖抑制作用の評価を行った。細胞増殖抑制試験にはヒト肝癌細胞である HepG2 細胞を使用した。HepG2 細胞にポリフェノール類の chrysin、apigenin、daidzein、genistein、biochanin A、galangine, kaempferol, naringenin, resveratrol および調製したそれぞれの硫酸体である、chrysin 7-*O* -sulfate (C7S), apigenin 7-*O* -sulfate (A7S), apigenin 4' -*O* -sulfate (A4'S), genistein 4' -*O* -sulfate (G4'S), daidzein 7-*O* -sulfate (D7S), genistein 7-*O* -sulfate (G7S), biochanin A 7-*O* -sulfate (B7S), galangin 7-*O* -Sulfate (Ga7S), kaempferol 7-*O* -sulfate (K7S)、naringenin 7-*O* -sulfate (N7S) および resveratrol 3-*O* -sulfate (R3S) の 20 種類の化合物をそれぞれ 20 μ M の濃度で処理した。生体内でのポリフェノール化合物の濃度はアグリコンで nM オーダー、抱合体で最大 20 μ M 程度存在することが知られている。そのため、サンプルの処理濃度は 20 μ M に統一した。Figure II-9 を見ると、多くのポリフェノール化合物が HepG2 細胞の増殖を抑制している。興味深いことに、硫酸体の HepG2 細胞に対する増殖抑制作用を見ると、C7S、B7S、Ga7S を除く多くのポリフェノール硫酸体にがん増殖抑制作用があることが分かる。これらのアグリコンの構造を見ると、chrysin および galangin は 4'位に水酸基が無く比較的、水酸基が少ない化合物である。また biochanin A は 4'位の水酸基がメチル化した構造を持ち、同様に水酸基が少ないことが分かる。chrysin および galangin はそのためか、その他のポリフェノール化合物と比較し癌増殖が 20 μ M の濃度でほとんど確認できなかった。アグリコンの化合物に作用が確認できなかったためその硫酸体である C7S、Ga7S も同様にがん増殖抑制作用が無いと考えられた。一方で biochanin A は 4'位がメチル化されているが、癌増殖抑制を有している。しかしながら、7位の水酸基が硫酸化され、B7S に代謝されることで癌増殖抑制作用が低下している。このように、癌増殖抑制作用が見られないポリフェノール化合物および、その硫酸体は水酸基がその他の試験に用いた化合物と比較して少なく、ポリフェノール類水酸基の数が癌増殖抑制作用を発揮するために重要であることが示唆された。また、対照的に多くの水酸基を持つポリフェノール化合物においてはがん増殖抑制作用が確認でき、更にその硫酸体においても同程度の癌増殖抑制作用を確認することができた。これらの結果から、一般的に

不活性化されると考えられていた硫酸体であるが、ポリフェノール類においては硫酸化を受けた後も機能性（癌増殖抑制作用）を有していることが判明した。

また、生体内や血中において硫酸体はアグリコンと比較して多く存在しているため、ポリフェノール類の化合物は硫酸体として全身に輸送された後も、様々な器官で機能を発揮することが示唆された。一般的に硫酸体は負電荷を持ち水溶性が高いため、アグリコン化合物より細胞膜を透過し難くなっていると考えられる。そのため、ポリフェノール硫酸体は細胞内に取り込まれて作用するのではなく、細胞膜上の受容体等に作用し機能を発揮する可能性があると考えた。

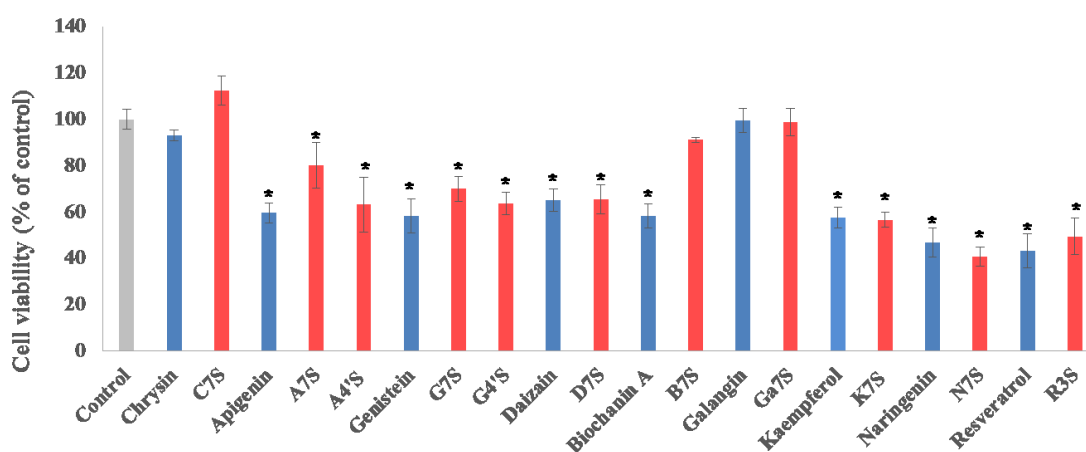


Figure II-9 様々なポリフェノール類とその硫酸体の HepG2 細胞に対する増殖抑制作用

様々なポリフェノール類とその硫酸体の HepG2 細胞に対する増殖抑制作用を Cell counting kit-8 にて評価した。それぞれの化合物は DMSO に溶解し、終濃度が 20 μ M (0.1% DMSO) になるように処理した。また、Figure 中のバーの色は、グレー; control (0.1% DMSO), ブルー; アグリコン化合物, レッド; 硫酸体となるように表示した。各データは平均値 \pm 標準偏差 (S.D.)で表記した。また、Control との有意差検定は Dunnett's test (* p <0.05)によって解析した。

食品機能性成分硫酸体の GPCR に対する作用解析

一般的に硫酸化を受けた化合物は水溶性が増し、細胞外へ排出され解毒代謝されると考えられる。しかしながら、Figure II-9 の結果から、細胞の外側からポリフェノール硫酸体を処理して HepG2 細胞に対するがん増殖抑制作用が確認できている。通常、このような硫酸体は負電荷を持ち水溶性が高いため、アグリコン化合物より細胞膜を透過し難く、細胞内へ取り込まれたとしても速やかにトランスポーターにより細胞外へ輸送される (2)。近年、ポリフェノールのひとつの quercetin の第二相代謝産物であるグルクロン酸抱合体が GPCR の α_2 -adrenergic receptor に作用することが報告されている (72)。そのため、硫酸体が細胞膜上に存在する GPCR 等の受容体等を介して作用する可能性が推察された。そこで我々はグルクロン酸抱合体と同様の第二相代謝産物である硫酸体も同様に GPCR 等の受容体に作用するのではないかと考えた。Figure II-10 に示すように、ポリフェノール類は細胞内に取り込まれた後、細胞内で抗酸化、抗炎症、抗がん作用等に関与する様々なシグナル伝達分子に影響を及ぼした後、その多くが硫酸体のような抱合体として速やか細胞外へ輸送される。通常は排泄された硫酸体は不活性化していると考えられるが、ポリフェノール硫酸体は細胞膜上の受容体 (GPCR) 等に作用し機能を発揮する可能性があると考えた。

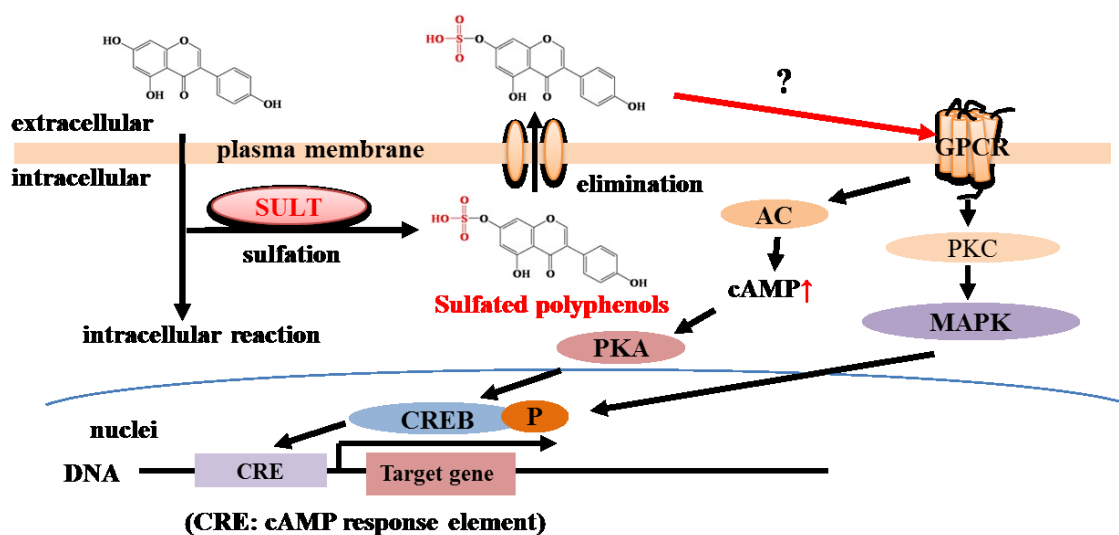


Figure II-10 推定される硫酸体の作用メカニズム

まず硫酸体の受容体への作用を評価するために、第 1 章 で構築した CRE-Luciferase assay 系を用いて評価することとした。作用を評価する化合物としては、genistein と、その硫酸体である genistein 4'-O-sulfate および genistein 7-O-sulfate を選択した。genistein は以前の研究から、癌増殖に關与する GPCR 型エストロゲン受容体である GPR30 に作用することが報告されている (73)。また本実験において、genistein は genistein 4'-O-sulfate および genistein 7-O-sulfate の異なる位置特異的硫酸体を調製することができたため、硫酸基の位置の違いによる作用の差異を評価できると考えた。また、このような硫酸体の GPCR への作用は現在までに報告されていないため、まずは GPCR への作用評価のモデルとして Genistein およびその硫酸体を使用し、硫酸体が GPCR へ作用するかどうかを解析した。genistein の硫酸体である genistein 4'-O-sulfate および genistein 7-O-sulfate の GPR30 に対する作用を、GPR30 を強発現した HepG2 細胞および 293T 細胞を用いた CRE-Luciferase assay 系にて評価した。Figure II-11 を見ると、HepG2 細胞および 293T 細胞どちらにおいても、GPR30 強発現株において genistein の GPR30 への作用が上昇していることが分かる。また、硫酸体においては genistein 程ではないが GPR30 に作用していることが判明した。genistein は GPR30 だけではなく、GPR30 のシグナル下流の MAPK にも作用することが分かっているため、その複合的な作用の結果 CRE-Luciferase の活性が高くなっていると考えられる。硫酸体は細胞内に取り込まれにくいいため、細胞表面上の受容体のみ作用し、genistein と比較して低い CRE-Luciferase 活性になったと考えられた。この結果から、genistein は GPR30 および細胞内の MAPK を活性化させるが、genistein sulfate は GPR30 のみを活性化させ、細胞内の MAPK には作用せず細胞内には取り込まれず作用していることが示唆された。しかしながら、同じイソフラボン類の daidzein は細胞内に取り込まれ ERb に作用していることから (38)、細胞内への取り込みや硫酸基の sulfatase による脱抱合も同様に今後検討する必要がある。また、GPR30 を強発現させていない HepG2 細胞においては genistein および genistein sulfate の GPR30 への作用は低いいため、HepG2 細胞における genistein および genistein sulfate の GPR30 を介した癌増殖抑制への関与は少ないのかもしれない。GPR30 は様々な組織で発現しているが、GPR30 へのリガンドの作用と機能との関連性は複雑であり、未解明の部分が多い(73)。GPR30 は特に乳がん細胞等で強発現していることが報告されており、genistein の GPR30 への作用および癌増殖への関連性が良く研究されているため (73)、そのような細胞での評価が今後必要になってくると考えられる。

これらの結果をまとめると Figure II-10 で示したように、ポリフェノール化合物は生体内に取り込まれ、細胞内で作用した後に、硫酸体のような代謝物として細胞外へ排泄され、細胞膜表面の受容体等を介して機能する可能性が示唆され

た。しかしながら、硫酸体の機能を更に明らかにするには、細胞内への取り込みや、sulfatase による脱抱合による影響等未解明な点多く、様々な観点から機能解明する必要があり、今後更なる研究が必要であると考えられた。本研究にて様々なポリフェノール硫酸体を調製できるようになったため今後の機能解明が期待される。

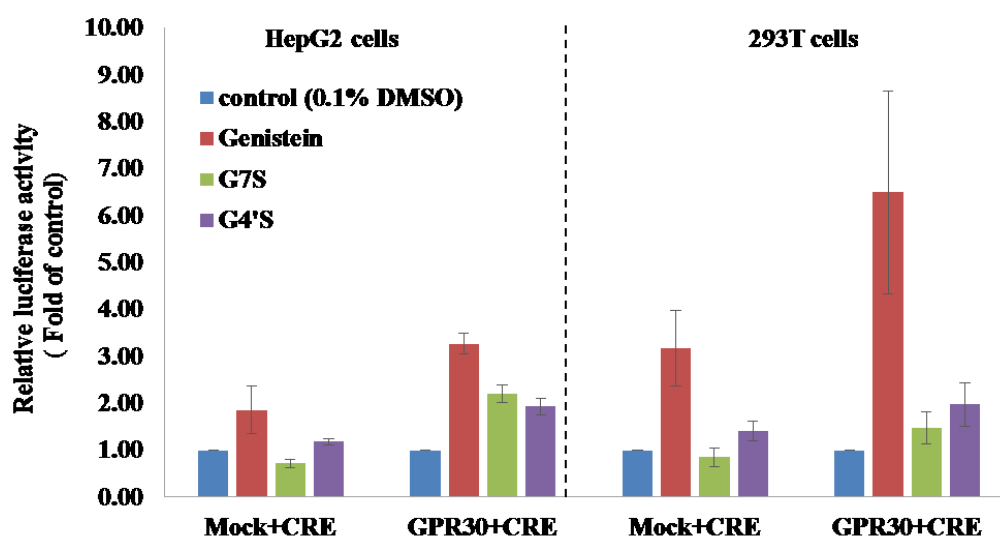


Figure II-11. GPR30-CRE-luciferase assay による genistein および genistein sulfate の機能評価

genistein および genistein sulfate(G7S および G4'S)の GPR30 への作用を HepG2 細胞および 293Ts 細胞を用いた GPR30-CRE-Luciferase assay にて確認した。Mock; pEBMulti-Hyg をトランスフェクションした HepG2 細胞および 293T 細胞, GPR30; pEBMulti-Hyg-GPR30 をトランスフェクションした HepG2 細胞および 293T 細胞。また、各データは平均値±標準偏差 (S.D.) で表記した (n=3)。

要約

本研究において、様々な SULT を発現させた大腸菌を用いた遺伝子工学的手法による genistein 硫酸体の調製技術を開発することができた。また、本手法において、硫酸体を効率的に生産するためには、glucose 濃度、 SO_4^{2-} 濃度および培養温度が重要であることが判明した。また、本手法のモデル化合物に用いた genistein はポリフェノール化合物であり複数の水酸基を持ち、その硫酸体も複数存在する。このようなポリフェノール化合物の硫酸体を調製する場合、従来は有機合成法や酵素反応を用いた手法が用いられていた。有機合成法を用いてこのようなポリフェノール化合物の位置特異的な硫酸体を調製する場合、煩雑な工程を要し、簡便に位置特異的な硫酸体を調製することができなかった。また、酵素的な手法において硫酸体を生産する場合は、コストがかかり大量に調製することが困難であった。本手法は有機化学的手法と比較し、簡便に位置特異的硫酸体を選択的に調製でき、酵素的な手法と比較して 1/10 以下の低コストで大量にポリフェノール化合物の位置特異的な硫酸体を調製できる画期的な手法であることが考えられる。本研究では genistein をモデル化合物として、genistein 7-O-sulfate および genistein 4'-O-sulfate を選択的に生産できることを確認したが、この手法を応用することで様々なポリフェノール化合物の位置特異的な硫酸体を生産できることが期待できると考えられた。また、近年の報告によりポリフェノール化合物の第二相代謝産物に様々な機能性があることが示唆されてきている (36,37)。従来このような第二相代謝産物は親化合物と比較し機能が不活性化すると考えられていた。しかしながら、このような報告からも代謝物の機能性に関して再考する必要性があることが考察される。本手法の開発により、調製が困難であったポリフェノール化合物の位置特異的な硫酸体を簡便かつ大量に調製できるようになったため、このような硫酸体の機能性の評価が可能となると考えられる。また、本手法はこのような硫酸体の機能性の評価だけでなく、生体内に存在する代謝物の定量等にも応用が可能と考えられる。前述したように、ポリフェノール化合物は合成が困難であったため、市販品がほとんど存在しない。そのため、ポリフェノール等を含む食品を摂取した後の化合物の代謝物の体内動態は、代謝された化合物を sulfatase で脱抱合し遊離した親化合物を定量するような間接的な手法が主流である。そこで本手法を応用し、市販されていないポリフェノール硫酸体を調製し利用することで、従来行われてこなかったポリフェノール硫酸体の直接的な定量にも応用できる可能性を秘めていると考えられる。このように、本研究にて開発した手法は、ポリフェノール類を含む様々な食品成分の機能性の評価や定量等に応用できると考えられた。

また、我々は開発した遺伝子工学的な硫酸体の調製技術を応用して **genistein** 以外の様々なポリフェノール硫酸体を調製し、いままで市販品がなく困難であったポリフェノール硫酸体の機能評価を行った。ポリフェノール化合物は様々ながん細胞において細胞増殖抑制作用が確認されている。食品機能性成分としてこれらの化合物を摂取した場合、小腸や肝臓でほとんどが硫酸体のような代謝物へと変換される。そのため、小腸や肝臓以外のその他の器官においてこれらの機能性を期待するには硫酸体のような代謝物にも機能性があることが好ましい。本研究の結果から、様々なポリフェノール類の硫酸体にがん細胞に対する増殖抑制作用が確認されたため、ポリフェノール類の多くは代謝を受けた後も様々な器官で作用する可能性が示唆された。また、硫酸体は細胞内へ取り込まれにくいため、その作用機序として細胞膜上の GPCR のような受容体を介して機能することが考えられた。そこで、GPCR のひとつの GPR30 に作用することが判明している **genistein** に着目した。レポーターアッセイにて **genistein** およびその硫酸体である **genistein 4'-O-sulfate** および **genistein 7-O-sulfate** が GPR30 に作用するか評価したところ、硫酸体である **genistein 4'-O-sulfate** および **genistein 7-O-sulfate** に GPR30 への作用が確認された。これらの結果から、食品機能性成分であるポリフェノール類は生体内へ取り込まれ、硫酸化を受け代謝された後でも GPCR 等の受容体を介して機能を発揮することが示唆された。しかしながら、このような硫酸体の機能性においては未解明な点が数多く存在するため、今後更なる研究が必要であると考えられた。

結論

硫酸体の機能性を解明するためには、SULT の基質認識機構および標的官能基の位置特異性を理解する必要がある。胆汁酸やポリフェノール類等の食品成分は複数の水酸基を持ち、代謝物である硫酸体も複数の位置特異的硫酸体が存在する。そして、代謝物の硫酸基の位置や数の違いにより、その機能性が異なるようである。そこで、複数水酸基を持つ化合物を位置特異的に硫酸化するような SULT は非常に興味深く、基質の水酸基位置特異的な認識機構を解明することは、硫酸体の機能解明を行う上で重要であると考えられる。さらに基質の水酸基位置特異的認識機構を解明することで、食品成分含む様々な複数水酸基を持つ化合物の硫酸化にも応用できることが期待できる。そこで、本研究では第 1 章にて複数の水酸基を持つ胆汁酸類の 7 位の水酸基を特異的に硫酸化する mSULT2A8 に着目し、その位置特異的な認識機構を理解することで、硫酸体機能解明への足がかりとした。第 2 章では第 1 章で明らかとなった複数の水酸基を持つ化合物の位置特異的硫酸体の調製の困難さを解決するために、食品機能性成分のポリフェノール化合物をモデルに位置特異的硫酸体の調製技術を開発した。さらに本技術を用いて調製した様々な食品機能性成分硫酸体の機能解明を行った。

本研究の第 1 章にて、我々は硫酸転移酵素の機能解明の一環として、胆汁酸類の 7 位の水酸基を特異的に硫酸化する mSULT2A8 の硫酸化機構の解明および、マウスにおける胆汁酸 7 位特異的な硫酸化の生理的意義の解明を試みた。本研究により mSULT2A8 はその他の SULT には無い特徴的なアミノ酸残基 (His48 および Leu99) を持ち、これらのアミノ酸残基が mSULT2A8 における胆汁酸類の 7 位の水酸基の認識と硫酸化において重要であることを明らかにした。マウスにおいて SULT2A 遺伝子は進化の過程で遺伝子重複が起こり 8 種類もの SULT が生まれたと考えられる。mSULT2A8 におけるこれらの 2 つのアミノ酸配列の置換 (N48H および H99L) は、マウス SULT2A の遺伝子重複の結果により起きたもので、その結果このようなユニークな基質特異性を持つ SULT2A8 が生まれたと考えられた。胆汁酸類は腸内細菌類の 7 α 脱水酸化酵素により毒性の強い 2 次胆汁酸の生成が起こると考えられる。そのため、マウスにおいて mSULT2A8 による胆汁酸類の 7 位の硫酸化は毒性が強い 2 次胆汁酸の生産の抑制に重要な反応であることが示唆された。また、mSULT2A8 により生成される胆汁酸 7 位硫酸体の機能解析を行ったところ、胆汁酸が持つ機能のひとつである TGR5 への作用が低下していたため、mSULT2A8 は胆汁酸類の TGR5 へのリガンド活性を 7 位の硫酸化を通じて調節していることが考えられた。これらの結果をまとめ

ると、マウスにおいて mSULT2A8 による胆汁酸類の 7 位の硫酸化は、胆汁酸類の解毒代謝とホルモンとしての活性を制御する重要な生理機能を持つということが示された。

第 2 章では、食品機能性成分の一種で複数の水酸基を持つ化合物であるポリフェノール類に焦点を当て、その位置特異的硫酸体の調製技術を開発し、さらにその硫酸体の機能解明を行った。ポリフェノール類のような複数の水酸基を持つ化合物は、生体内では SULT による代謝反応を受け、その多くが硫酸体として存在する。通常、硫酸化を受けた化合物は機能が不活性化すると考えられてきたが、近年の研究によりこのようなポリフェノール類の硫酸体に機能性が報告された。そのため、生体内に多く存在するポリフェノール類硫酸体の機能を解析することで、ポリフェノール類の生体内代謝を考慮に入れた食品機能性成分の詳細な機能解明へ貢献できると考えられる。しかしながら、ポリフェノール類の硫酸体の機能解析における問題点として複数の水酸基を持つ化合物の硫酸体の調製法が確立されておらず、市販品も少ないため、機能解析が困難な状況であった。また、第 1 章で取り上げた胆汁酸類も複数の水酸基を持ち、その硫酸体を有機化学的手法にて調製したが、調製工程が煩雑であり調製が非常に困難であった。そこで、第 2 章にて SULT 発現大腸菌を使用した遺伝子工学的な手法を用いることによって、今まで調製が困難であってポリフェノール類の位置特異的な硫酸体の大量調製が非常に簡便に行えるようになった。また、開発した技術にて様々なポリフェノール化合物の硫酸体を調製し機能解析を行ったところ、様々なポリフェノール硫酸体に癌細胞に対する増殖抑制作用があることが確認できた。また、GPCR のような受容体を介して機能を発揮することも示唆された。これらの結果からポリフェノール類のような食品機能性成分は硫酸化による代謝を受け、全身に輸送された後に様々な器官で機能することが示唆された。

結論づけると、第 1 章の研究において、硫酸転移酵素の機能解明の一環として、通常の SULT とは異なるユニークなアミノ酸配列を持つ mSULT2A8 の胆汁酸類 7 位特異的な硫酸化メカニズムを解明することができ、さらに胆汁酸 7 位硫酸体の機能解明を介して SULT2A8 の生理機能の一端を解き明かした。

さらに、第 2 章の研究において、以前では調製が困難であったポリフェノール類等の複数の水酸基を持つ化合物の硫酸体を調製する技術を開発し、さらにその硫酸体の機能を評価することができた。近年の報告等により、食品機能性成分の硫酸体を含む代謝物の機能性が注目されてきている。しかしながら、ポリフェノール類の硫酸体は調製が難しく機能は未解明な点が多かった。本研究により、その調製が困難で評価ができなかったポリフェノール類の硫酸体が調製可能となり、さらに機能評価できたので、今後、開発した本技術は硫酸体の機能性

研究を行う上での基盤技術となりうると考えられる。展望として、本技術を利用することで、今まで機能解析が困難であったポリフェノール類だけに限らず、様々な化合物の硫酸体の機能解析が可能となり、化合物の生体内代謝を踏まえた上での詳細な機能評価が可能になることが期待できる。また、標品が市販されていない化合物の直接的な定量等にも応用が可能と考えられる。本研究にて開発した技術は薬学・医薬品・食品分野等の様々な分野で貢献が期待できると考えられた。

参考文献

- (1) Köhle, C., Bock, KW. Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. *Biochem. Pharmacol.* 2007, 73, 1853-1862.
- (2) Oostendorp, RL., Beijnen, JH., Schellens, JH. The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier. *Cancer Treat. Rev.* 2009, 37, 137-147.
- (3) Baumann, E. Ueber sulfosauren im harn. *Dtsch. Chem. Ges.* 1876, 9, 54-58.
- (4) Falany, CN. Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *FASEB J.* 1997, 11, 206-216.
- (5) Hemmerich, S., Verdugo, D., Rath, VL. Strategies for drug discovery by targeting sulfation pathways. *Drug Discov. Today* 2004, 9, 967-975.
- (6) Gamage, N., Barnett, A., Hempel, N., Duggleby, RG., Windmill, KF., Martin, JL., McManus ME. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol. Sci.* 2006, 90, 5-22.
- (7) Lipmann, F. Biological sulfate activation and transfer. *Science* 1958, 128, 575-580.
- (8) Robbins, PW., Lipman, F. Enzymatic synthesis of adenosine-5'-phosphosulfate., *J. Biol. Chem.* 1958, 223, 686-690.
- (9) Robbins, PW., Lipman, F. Separation of the two enzymatic phases in active sulfate synthesis. *J. Biol. Chem.* 1958, 233, 681-685.
- (10) Li, H., Deyrup, A., Mensch, JR Jr., Domowicz, M., Konstantinidis, AK., Schwartz NB. The isolation and characterization of cDNA encoding the mouse bifunctional ATP sulfurylase-adenosine 5'-phosphosulfate kinase. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 29453-29459.
- (11) Leyh, TS. The physical biochemistry and molecular genetics of sulfate activation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1993, 28, 515-542

- (12) Thomas, D., Surdin-Kerjan, Y. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1997, 61,503-532.
- (13) Blanchard, RL., Freimuth RR., Buck, J., Weinshilboum, RM., Coughtrie, M.WH. A proposed nomenclature system for the cytosolic sulfotransferase (SULT) superfamily. *Pharmacogenetics*. 2004, 14, 199-211.
- (14) Wilborn, TW., Comer, KA., Dooley, TP., Reardon, IM., Heinrikson, RL., Falany, CN. Sequence analysis and expression of the cDNA for the phenol-sulfating form of human liver phenol sulfotransferase *Mol. Pharmacol.* 1993, 43, 70–77.
- (15) Ozawa, S., Nagata, K., Shimada, M., Ueda, M., Tsuzuki, T., Yamazoe, Y., Kato R. Primary structures and properties of two related forms of aryl sulfotransferases in human liver. *Pharmacogenetics*. 1995, 5, 135–140.
- (16) Hildebrandt, MA., Salavaggione, OE., Martin, YN., Flynn, HC., Jalal, S., Wieben, ED., Weinshilboum, RM. Human SULT1A3 pharmacogenetics: gene duplication and functional genomic studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 321, 870-878.
- (17) Sakakibara, Y., Takami, Y., Zwieb, C., Nakayama, T., Suiko, M., Nakajima, H., Liu, M.C. Purification, characterization, and molecular cloning of a novel rat liver Dopa/tyrosine sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 30470-30478.
- (18) Wang, J., Falany, JL., Falany, CN. Expression and characterization of a novel thyroid hormone-sulfating form of cytosolic sulfotransferase from human liver. *Mol. Pharmacol.* 1998, 53, 274-282.
- (19) Sakakibara, Y., Yanagisawa, K., Katafuchi, J., Ringer, DP., Takami, Y., Nakayama, T., Suiko, M., Liu MC. Molecular cloning, expression, and characterization of novel human SULT1C sulfotransferases that catalyze the sulfonation of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 33929–33935.
- (20) Guidry, AL., Tibbs, ZE., Runge-Morris, M., Falany, CN. Expression, purification and characterization of human cytosolic sulfotransferase (SULT) 1C4. *Mol. Biol. Clin. Investig.* 2017, 29, 27-36.

- (21) Kurogi, K., Shimohir, T., Kouriki, Nagatomo, H., Zhang, G., Miller, ER., Sakakibara, Y., Suiko, M. Liu, MC., Human Cytosolic Sulphotransferase SULT1C3: genomic analysis and functional characterization of splice variant SULT1C3a and SULT1C3d. *J. Biochem.* 2017, 162, 403-414.
- (22) Falany, CN., Krasnykh, V., Falany, JL. Bacterial expression and characterization of a cDNA for human liver estrogen sulfotransferase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1995, 52, 529-539.
- (23) Otterness, DM., Wieben, ED., Wood, TC., Watson WG, Madden BJ, McCormick DJ, Weinshilbom RM. Human liver dehydroepiandrosterone sulfotransferase: molecular cloning and expression of cDNA. *Mol. Pharmacol.* 1992, 41, 865-872.
- (24) Hobkirk, R. Steroid sulfation Current concepts. *Trends Endocrinol. Metab.* 1993, 4, 69-74.
- (25) Purohit, A., Dauvois, S., Parker, M.G., Potter, B.V., Williams, G.J., Reed, M.J. The hydrolysis of oestrone sulphate and dehydroepiandrosterone sulphate by human steroid sulphatase expressed in transfected COS-1 cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1994, 50, 101–104.
- (26) Fuda, H., Lee, YC., Shimizu, C., Javitt, NB., Strott, CA. Mutational analysis of human hydroxysteroid sulfotransferase SULT2B1 isoforms reveals that exon 1B of the SULT2B1 gene produces cholesterol sulfotransferase, whereas exon 1A yields pregnenolone sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 36161–36166.
- (27) Yoshinari, K., Nagata, K., Ogino, M., Fujita, K., Shiraga, T., Iwasaki, K., Hata, T., Yamazoe, Y. Molecular cloning and expression of an amine sulfotransferase cDNA: a new gene family of cytosolic sulfotransferases in mammals. *J. Biochem.* 1998, 123, 479-486.
- (28) Takahashi, S., Sakakibara, Y., Mishiro, E., Kouriki, H., Nobe, R., Kurogi, K., Yasuda, S., Liu, M.C., Suiko, M. Molecular cloning, expression, and characterization of mouse amine N-sulfotransferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008, 375, 531-535.

- (29) Falany, CN., Xie, X., Wang, J., Ferrer J., Falany, JL. Molecular cloning and expression of novel sulphotransferase-like cDNAs from human and rat brain. *Biochem. J.* 2000, 346, 857-864.
- (30) Sakakibara, Y., Suiko, M., Pai, TG., Nakayama, T., Takami, Y., Katafuchi, J., Liu, MC. Highly conserved mouse and human brain sulfotransferases: molecular cloning, expression, and functional characterization. *Gene.* 2000, 285, 39–47.
- (31) 近藤知巳, マウス硫酸転移酵素 SULT5A1 の生理機能解明, 宮崎大学大学院修士論文 2007
- (32) Freimuth, RR., Wiepert, M., Chute, CG., Wieben, ED., Weinshilboum, RM. Human cytosolic sulfotransferase database mining: identification of seven novel genes and pseudogenes. *Pharmacogenomics J.* 2004, 4, 54-65.
- (33) Takahashi, S., Sakakibara, Y., Mishiro, E., Kouriki, H., Nobe, R., Kurogi, K., Yasuda, S., Liu, MC., Suiko, M. Molecular cloning, expression and characterization of a novel mouse SULT6 cytosolic sulfotransferase. *J. Biochem.* 2009, 146, 399–405.
- (34) Kurogi, K. Studies on biochemical characterization of cytosolic sulfotransferases. Doctoral dissertation of University of Miyazaki. 2011.
- (35) Kawakami, F., Ito, M., Matsuda, Y., Hayashi, I., Ohtsuki, K. The effects of cholesterol-3-sulfate (CH-3S) on the phosphorylation of human C3a (hC3a) in vitro and on the ability of hC3a to induce vascular permeability in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 2004, 27, 282-287.
- (36) Kawakami F., Suzuki K., Ohtsuki K., A novel consensus phosphorylation motif in sulfatide- and cholesterol-3-sulfate-binding protein substrates for CK1 in vitro. *Biol Pharm Bull.* 2008, 31, 193-200.
- (37) Walker, J., Schueller, K., Schaefer, L. M., Pignitter, M., Esefelder, L., Somoza, V. Resveratrol and its metabolites inhibit pro-inflammatory effects of lipopolysaccharides in U-937 macrophages in plasma-representative concentrations. *Food Funct.* 2014, 5, 74e84.

- (38) Totta, P., Acconcia, F., Virgili, F., Cassidy, A., Weinberg, PD., Rimbach, G., Marino, M. Daidzein-sulfate metabolites affect transcriptional and antiproliferative activities of estrogen receptor-beta in cultured human cancer cells. *J. Nutr.* 2005, 135, 2687-2693.
- (39) Feng, L., Yuen, YL., Xu, J., Liu, X., Chan, MY., Wang, K., Fong, WP., Cheung WT., Lee, SS. Identification and characterization of a novel PPARalpha-regulated and 7alpha-hydroxyl bile acid-preferring cytosolic sulfotransferase mL-STL (Sult2a8). *J. Lipid Res.* 2017, 58, 1114-1131.
- (40) Borgström, B., Barrowman, JA., Lindström, M. Roles of bile acids in intestinal lipid digestion and absorption. In: Danielsson H, Sjövall J, editors. *Sterols and Bile Acids*. Vol. 12., Elsevier. 1985. p. 405-425.
- (41) Kalaany, NY., Mangelsdorf, DJ. LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* 2006, 68, 159-191.
- (42) Claudel, T., Staels, B., Kuipers, F. The Farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005, 25, 2020-2030.
- (43) Staudinger, JL., Lichti, K., Cell signaling and nuclear receptors: new opportunities for molecular pharmaceuticals in liver disease. *Mol. Pharm.* 2008, 5, 17-34.
- (44) Maruyama, T., Miyamoto, Y., Nakamura, T., Tamai, Y., Okada, H., Sugiyama, E., Nakamura, T., Itadani, H., Tanaka, K. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 298, 714–719.
- (45) Kawamata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Harada, M., Yoshida, H., Miwa, M., Fukusumi, S., Habata, Y., Itoh, T., Shintani, Y., Hinuma, S., Fujisawa, Y., Fujino, M. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 9435–9440.
- (46) Kim, ND., Moon, JO., Slitt, AL., Copple, BL. Early growth response factor-1 is critical for cholestatic liver injury. *Toxicol. Sci.* 2006, 90, 586-595.
- (47) Fukase, K., Ohtsuka, H., Onogawa, T., Oshio, H., Ii, T., Mutoh, M., Katayose, Y., Rikiyama, T., Oikawa, M., Motoi, F., Egawa, S., Abe, T. Unno M. Bile acids repress E-

cadherin through the induction of Snail and increase cancer invasiveness in human hepatobiliary carcinoma. *Cancer Sci.* 2008, 99, 1785-1792.

(48) Palmer, RH. The formation of bile acid sulfates: a new pathway of bile acid metabolism in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1967, 58, 1047-1050.

(49) Radomska, A., Comer, KA., Zimniak, P., Falany, J., Iscan, M., Falany, CN. Human liver steroid sulphotransferase sulphates bile acids. *Biochem. J.* 1990, 272, 597-604.

(50) Eyssen, HJ., Parmentier, GG., Mertens, JA. Sulfate bile acids in germ-free and conventional mice. *Eur. J. Biochem.* 1976, 66, 507-514.

(51) Kocarek, TA., Duanmu, Z., Fang, HL., Runge-Morris M. Age- and sex-dependent expression of multiple murine hepatic hydroxysteroid sulfotransferase (SULT2A) genes. *Biochemical Pharmacology.* 2008, 76, 1036-1046.

(52) Suiko, M., Kurogi, K., Hashiguchi, T., Sakakibara, Y., Liu, MC. Updated perspectives on the cytosolic sulfotransferases (SULTs) and SULT-mediated sulfation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2017, 81, 63-72.

(53) Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL., Randall, RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265-275.

(54) Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227,680-685

(55) Yanagisawa, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Takami, Y., Nakayama, T., Nakajima, H., Takayanagi, K., Natori, Y., Liu, MC. cDNA cloning, expression, and characterization of the human bifunctional ATP sulfurylase/adenosine 5'-phosphosulfate kinase enzyme. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998, 62, 1037-1040.

(56) Liu, MC., Lipmann, F. Decrease of tyrosine-O-sulfate-containing proteins found in rat fibroblasts infected with Rous sarcoma virus or Fujinami sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984, 81, 3695-3698.

- (57) Negishi, M., Pedersen, LG., Petrotchenko, E., Shevtsov, S., Gorokhov, A., Kakuta, Y., Pedersen, LC. Structure and function of sulfotransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001, 390, 149-157.
- (58) Robben, J., Parmentier, G., Eyssen, H. Isolation of a rat intestinal Clostridium strain producing 5 alpha- and 5 beta-bile salt 3 alpha-sulfatase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986, 51, 32-38.
- (59) Pai, TG., Suiko, M., Sakakibara, Y., Liu, MC. Sulfation of flavonoids and other phenolic dietary compounds by the human cytosolic sulfotransferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, 5, 1175-1179.
- (60) Nakano, H., Ogura, K., Takahashi, E., Harada, T., Nishiyama, T., Muro, K., Hiratsuka, A., Kadota, S., Watabe, T. Regioselective monosulfation and disulfation of the phytoestrogens daidzein and genistein by human liver sulfotransferases, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2004, 19, 216-226.
- (61) Kris-Etherton, PM., Hecker, KD., Bonanome, A., Coval, SM., Binkoski, AE., Hilpert, KF., Griel, AE., Etherton, TD. Bioactive compounds in foods, their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.* 2002, 113, 71S-88S.
- (62) Ullah, MF., Khan, MW. Food as medicine: potential therapeutic tendencies of plant derived polyphenolic compounds, *Asian. Pac. J. Cancer. Prev.* 2008, 9, 187-195.
- (63) García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, MA., Martínez, JA.:Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm. Res.* 2009, 58, 537–552.
- (64) Crozier, A., Jaganath, IB., Clifford, MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* 2009, 26, 1001–1043.
- (65) Kim, SY., Lee, HR., Park, KS., Kim, BG., Ahn, JH. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the biosynthesis of flavonoid-O-glucuronides and flavonoid-O-galactoside. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015, 99, 2233-2242.

- (66) Kim, MJ., Kim, BG., Ahn, JH. Biosynthesis of bioactive O-methylated flavonoids in *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biot.* 2013, 97, 7195-7720.
- (67) Rouch, DA., Cram, DS., DiBerardino, D., Littlejohn, TG., and Skurray, RA. Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline- and sugar-transport proteins. *Mol. Microbiol.* 1990, 4, 2051-2062.
- (68) Wilmut, I., Beaujean, N., Sousa, PA., Dinnyes, A., King, TJ., Paterson, LA., Wells, DN., and Young, LE. Somatic cell nuclear transfer. *Nature*, 2002, 419, 583-586.
- (69) McMurry, L., Petrucci, RE., Jr., and Levy, SB. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980, 77, 3974-3977.
- (70). Poole, K., Krebs, K., McNally, C., Neshat, S. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.*, 1933, 175, 7363-7372.
- (71) Nishikawa, M., Masuyama, Y., Nunome, M., Yasuda, K., Sakaki, T., Ikushiro, S. Whole-cell-dependent biosynthesis of sulfo-conjugate using human sulfotransferase expressing budding yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018,102, 723-732.
- (72) Yamazaki, S., Sakakibara, H., Takemura, H., Yasuda, M., Shimoi, K. Quercetin-3-O-glucuronide inhibits noradrenaline binding to α 2-adrenergic receptor, thus suppressing DNA damage induced by treatment with 4-hydroxyestradiol and noradrenaline in MCF-10A cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2014, 143, 122e129 .
- (73) Prossnitz, ER., Barton, M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2011, 7, 715-726.

謝辞

本研究を進めるに際して終始ご指導ご鞭撻頂きました水光正仁教授(現・副学長、理事)、榊原陽一教授、黒木勝久助教に心より感謝致します。

また、研究活動を通じてお世話になった宮崎大学の橋口拓勇博士研究員並びに株式会社くらこん：白杉一郎博士研究員に深く感謝致します。

そして、宮崎大学での研究活動を通して切磋琢磨し、お互いに刺激し合ってきた芳村俊宏博士および同期のメンバーに感謝致します。

最後に、生体分子機能化学研究室のメンバーに感謝と今後のご活躍を期待しております。本当に長い間、様々な面でご指導、サポートしていただいた関係者の皆様に感謝の意を述べます。ありがとうございました。