

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	高橋早樹
題 目	マウス細胞質硫酸転移酵素の網羅的機能解明に関する研究 (Studies on the comprehensive functional characterization of mouse cytosolic sulfotransferases)
<p>創薬プロセスにとって生体内における生理活性物質の biotransformation や解毒代謝機構を明らかにすることは重要である。硫酸化は、カテコールアミン、コレステロール、ステロイド、甲状腺ホルモンなどの内因性化合物の biotransformation や、薬物および生体外物質の解毒代謝に特に重要な経路だと考えられている。これらの硫酸化は細胞質硫酸転移酵素 (SULTs) により触媒される。SULTs は硫酸基供与体 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) の硫酸基を基質の水酸基もしくはアミノ基に転移させ、基質の水溶性を高めることにより尿中への排泄を促す。本研究では、生体内の硫酸化による代謝機構の解明を目的とし、ゲノム等のデータベースを有効に活用して、効率的に新規 mouse SULTs (SULT3A1, SULT3A2, SULT6B1) を発見し、そのクローニングと諸性質検討を行った。さらに、18種類の既知 mouse SULTs すべてについて基質特異性及び臓器特異性を網羅的に検討した。</p> <p>SULT6 ファミリー硫酸転移酵素として哺乳動物で初めて見出された SULT6B1 は、thyroxine に硫酸化活性を示し、広範囲の臓器で発現していることが明らかになった。また、SULT3A1 と SULT3A2 の諸性質を検討した結果、1-naphthylamine に高い硫酸化活性を示し、どちらの酵素も肝臓で特異的に発現していることが明らかになった。このことより、SULT3 はマウスの肝臓において芳香族アミンをはじめとした生体外物質の解毒代謝を担うことが示唆された。</p> <p>SULTs の基質特異性及び臓器特異性を知ることは、様々な臓器での内因性化合物や生体外物質の代謝機構解明に役立つと思われる。そこで、既知の mouse SULTs すべてにおいて基質特異性と臓器特異性のプロファイリングを行った。その結果、SULT2, SULT5 family においてステロイド骨格を有する化合物との構造相関を見いだした。SULT2A1, SULT2B1, SULT5A1 はステロイド骨格の 3β 位、SULT2A2, SULT2A3 は 3α と β 位、SULT2A4 は 7α 位の水酸基を認識して硫酸化を行っていることが示唆された。特に、SULT2B1 は厳密に 3β 位の水酸基を認識していた。また、多くの SULTs は、肝臓もしくは腎臓で発現し解毒排泄機構に関与している。今回の結果から、多くの SULTs (SULT1B1, SULT1C2, SULT1D1, SULT2A1/2/3, SULT2B1) が胃で発現していることが明らかになった。胃は食事などから外因性物質がはじめに入り込む臓器であることから、SULTs が胃においても解毒代謝を担っている可能性が示された。全ての SULTs が網羅的に比較検討されたことにより、ここに示したような多くの新しい知見を見出すことができた。これらの知見は創薬における候補化合物のスクリーニングに役立つことが大いに期待される。</p>	

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	Saki Takahashi
題 目	Studies on the comprehensive functional characterization of mouse cytosolic sulfotransferases (マウス細胞質硫酸転移酵素の網羅的機能解明に関する研究)
<p>The elucidation of biotransformation or metabolic detoxification mechanism of bioactive substances in body is important in a drug discovery process. The sulfonation is thought an important pathway for the biotransformation of endogenous compounds such as catecholamines, cholesterol, steroid and thyroid hormones, and the metabolic detoxification of drugs and xenobiotics. The sulfonation is catalyzed by "cytosolic sulfotransferases (SULTs)". The SULTs in general catalyze the transfer of a sulfonate group from the active sulfate, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS), to a substrate compound containing a hydroxyl or an amino group. The sulfonated substrates are elevated water-solubility and thereby aiding their excretion in urine. In this study, three novel mouse SULTs (SULT3A1, SULT3A2 and SULT6B1) were efficiently discovered by the exploiting the mouse genome or other database, cloned and characterized. Furthermore, the substrate and tissue specificity of all mouse SULTs was comprehensively examined.</p> <p>The SULT6B1 that belong to SULT6 family was discovered for the first time in mammals. The SULT6B1 catalyzed the sulfonation of thyroxine, and was expressed in a wide range of tissues/organs. The SULT3A1 and SULT3A2 showed high catalytic activity toward 1-naphthylamine and were specifically expressed only in the liver. It is suggested that the SULT3 enzymes involved in the metabolic detoxification of xenobiotic compounds including aromatic amines in mouse liver.</p> <p>Understanding of the substrate and tissue specificities of all the SULTs possibly helps us to elucidate the metabolic mechanism of endogenous and xenobiotic compounds in various tissues. Therefore, the author performed the profiling of catalytic activities of drugs, xenobiotics and endogenous compounds using 18 mouse SULTs. The results indicated that the SULT2 and SULT5 family had structure-activity relationship to steroids. The SULT2A1, SULT2B1 and SULT5A1 catalyzed the sulfonation of the 3β-hydroxy group and the SULT2A2 and SULT2A3 sulfonated 3α and 3β-hydroxy group of steroid with unsaturated 'A' rings. In particular, the SULT2B1 recognized strictly the 3β-hydroxy group. The SULT2A4 catalyzed the sulfonation of 7α-hydroxyl group rather than 7β-hydroxyl group of steroid with unsaturated 'B' rings. Most SULTs express in liver and kidney and are thought to be involved in the detoxification and excretion mechanism. In this study, the expression of SULT1B1, SULT1C2, SULT1D1, SULT2A1/2/3 and SULT2B1 were detected in stomach. Uptake of xenobiotic compounds was initially performed in stomach. These findings suggested that the SULTs may play the detoxification mechanism in stomach. The comparative examination was comprehensively performed in all mouse SULT, these results found the many novel observations such as structure-activity relationship. These observations are expected to be helpful in screening candidate compound for drug discovery.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	高 橋 早 樹
審査委員	主査 宮崎 大学 教授 水 光 正 仁
	副査 宮崎 大学 准教授 榊 原 陽 一
	副査 佐賀 大学 教授 渡 邊 啓 一
	副査 鹿児島 大学 教授 杉 元 康 志
	副査 琉球 大学 教授 安 田 正 昭
審査協力者	
題 目	<p>Studies on the comprehensive functional characterization of mouse cytosolic sulfotransferases (マウス細胞質硫酸転移酵素の網羅的機能解明に関する研究)</p>
<p>硫酸化は、カテコールアミン、コレステロール、ステロイド、甲状腺ホルモンなどの内因性化合物の濃度調節や、薬物および生体外物質の解毒代謝に特に重要な経路だと考えられている。これらの硫酸化は細胞質硫酸転移酵素 (SULTs) により触媒される。SULTs は硫酸基供与体 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) の硫酸基を基質の水酸基もしくはアミノ基に転移させ、基質の水溶性を高めることにより尿中への排泄を促す。一方、血管拡張剤であるミノキシジルのようにプロドラッグとして投与されたものが肝臓の硫酸転移酵素で代謝されることにより新たな生理活性を示すものが知られている。また、ニューロステロイドの硫酸体は、GABA 受容体に拮抗的に作用することも知られ、硫酸化が生理活性物質の機能発現に重要なことが注目されるようになってきた。</p> <p>本研究において、申請者は、哺乳動物の細胞質に存在する全ての硫酸転移酵素の機能について、マウスをモデル動物として遺伝子工学的手法を用いて組換えタンパク質を作製し、それらの基質および臓器特異性等について次のように取りまとめた。まず、ゲノム等のデータベースを活用して、3種類の新規マウス SULTs (SULT3A1, SULT3A2, SULT6B1) を見出し、それらのクローニングと諸性質の検討を行った。その結果、SULT6 ファミリー硫酸転移酵素として哺乳動物で初めて見出した SULT6B1 は、甲状腺ホルモン Thyroxine に硫酸化活性を示し、広範囲の臓器で発現していることを明らかにした。また、SULT3A1 と SULT3A2 の諸性質を検</p>	

討した結果、両酵素とも 1-Naphthylamine に高い硫酸化活性を示し、どちらの酵素も肝臓で特異的に発現していることを明らかにした。このことより、SULT3 はマウスの肝臓において芳香族アミンをはじめとした生体外物質の解毒代謝を担うことが示唆された。

次に、18 種類の既知の mouse SULTs 全てについて基質特異性及び臓器特異性のプロファイリングを行った。その結果、SULT2, SULT5 family においてステロイド骨格を有する化合物に対して、立体特異的硫酸化を起こすことを明らかにした。SULT2B1, SULT5A1 はステロイド骨格の 3 β 位、SULT2A2 は 3 α と 3 β 位、SULT2A4 は 7 位の水酸基を認識して硫酸化を行っていることを明らかにした。特に、SULT2B1 は厳密に 3 β 位の水酸基を認識していた。また、肝臓もしくは腎臓で発現する多くの SULTs は、解毒排泄機構に関与する。今回の結果から、多くの SULTs (SULT1B1, SULT1C2, SULT1D1, SULT2A1/2/3, SULT2B1) が胃で発現していることを明らかにした。胃は食事などから外因性物質がはじめに入り込む臓器であることから、SULTs が胃においても解毒代謝を担っている可能性が示された。全ての SULTs が網羅的に比較検討されたことにより、多くの新しい知見を見出すことができた。これらの知見は薬物や食品の機能性成分の代謝産物の新たな機能を明らかにする場合、極めて重要な情報を与えることになる。また、今後硫酸化による機能性発現に関する知見が蓄積していくことは、創薬における新規医薬品候補物質のドラッグデザイン等に役立つことが大いに期待される。

このように、細胞質 SULTs を網羅的に解析することでその生理的役割分担を明らかにしたことは硫酸化の機能解明に関する極めて重要な発見であり、これらの研究結果は、薬物代謝および代謝された後新たに機能性を示す生理活性物質の探索に極めて重要な情報を与えている。以上のことから、本論文は、博士（農学）の学位論文として十分に価値あるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	高橋早樹
審査委員	主査 宮崎 大学 教授 水光正仁
	副査 宮崎 大学 准教授 榊原陽一
	副査 佐賀 大学 教授 渡邊啓一
	副査 鹿児島 大学 教授 杉元康志
	副査 琉球 大学 教授 安田正昭
審査協力者	
実施年月日	平成21年7月24日
試験方法 (該当のものを○で囲む) ○口答・筆答	
<p>主査および副査は、平成21年7月24日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏名

高橋早樹

[質問1] 生体内において活性硫酸 PAPS は常に供給されているのか。また、ATP を使って PAPS を合成するのは、硫酸化に生理的意義があるはずと考えられるが、実際に硫酸化は生体内でどのような働きをしているのか。

[回答1] 生体内ではすべての臓器において PAPS 合成酵素が存在し、PAPS が合成されているので、常に十分な量の PAPS が供給されている状態である。ニューロステロイドは、硫酸化されることで、レセプターから解離しているという報告がある。

[質問2] 至適 pH が SULTs によって異なるが、SULTs の細胞内での局在性はどのようになっているのか。

[回答2] 細胞内の局在性は調べていないので、細胞質に存在するとしかたないが、SULT2B1 においては核に存在しているという報告がある。

[質問3] 細胞内で硫酸化された硫酸体が細胞外へ排泄されるときにのトランスポーターは存在するのか。

[回答3] すべては明らかになっていないが、細胞外へ輸送するトランスポーターは存在するという報告がある。

[質問4] 他の SULTs に関して 2 価陽イオンは阻害剤として働いているのか。

[回答4] humanSULT1A3 では Mn^{2+} 存在下で活性が著しく上昇するという報告がある。一方で、今回の研究結果の様に阻害的に働いている報告もある。

[質問5] 胃において発現している SULTs が解毒代謝に関与しているという報告は今までにあるのか。また胃において発現している SULTs はペプシンなどで分解されるのか。

[回答5] タンパク質レベルで網羅的に解析し、検出されたのは初めての報告になる。SULTs は細胞質に発現しており、他の臓器の細胞と同様に胃の細胞内の pH は生理的条件になっている。そのため、疎水性の高いものが細胞内に取り込まれ、硫酸化されると考えられる。

[質問6] SULT2A ファミリーでは活性に立体選択性があるが、実際にどれくらいのアミノ酸配列の相同性があり、どのアミノ酸が影響しているのか。

[回答6] mouseSULT2A1~2A4 のアミノ酸配列の相同性は 90% 以上あり、アライメントをとった時に違いのあるアミノ酸が影響していると考えられる。実際にミュータントを作成し、実験を行っていないので、どこが影響しているかは明確にはわからない。

[質問7] rabbitSULT3A1 と mouseSULT3A1、3A2 は同じ齧歯類だが、基質特異性などの違いはみられるのか。また、ヒトには SULT3 は存在するのか。

[回答7] rabbitSULT3A1 と mouseSULT3A1 は dopamine のような内因性化合物も硫酸化し、比較的同じような基質特異性をもっている。一方、mouseSULT3A2 は内因性化合物を硫酸化せず、SULT3A1 とは少し異なる基質特異性をもつ。また、ヒトに関しては偽遺伝子となっていることがデータベース解析からわかっている。

[質問8] 臓器特異性があることがわかったが、脳に発現している硫酸転移酵素はどのような基質を硫酸化しているのか。

[回答8] SULT1A1 は dopamine などのカテコールアミン類、SULT1E1 は estrogen など、SULT2B1 は dehydroepiandrosterone などのステロイド類、SULT4A1 はおそらく pregnenolone などのステロイド類を硫酸化していると考えられる。

[質問9] なぜ His101 ではなく Ser99 に変異を入れたのか。

[回答9] His101 のアミノ酸はほぼすべての SULT において硫酸化反応をするために重要であることがすでに明らかとなっており、新たに反応に関与している部位の候補として Ser99 に着目した。