



宮崎大学農学部 黒木 勝久

生物進化に伴った硫酸転移酵素機能の多様性に関する研究

はじめに

生物は進化の過程で様々な生体異物に対応するため、広範囲の化合物に対応できる生体応答機構（解毒排泄機構）を備えている。この機構はステロイドホルモンなどの内分泌ホルモン機能を制御する側面もあわせもつ。生体内外の多様な低分子化合物に対応する代謝酵素の中でも、私は、「硫酸転移酵素」と呼ばれる「硫酸基」を転移する酵素に着目している。他の代謝酵素と同様、生物進化に伴った多様な遺伝子ファミリーを形成した結果、広範囲の化合物の代謝を担っている。中でも、内分泌ホルモン代謝における硫酸化は複雑で多岐にわたるため、その機能はあまり理解されていない。そこで、私は生物進化に伴った硫酸転移酵素の機能変遷を理解することで、ヒトにおける硫酸化の生理機能解明につながると考え、基質多様性と生物進化をテーマに硫酸転移酵素の機能解明研究を行ってきた。

1. 硫酸転移酵素の基質多様性

1-1. 多様な硫酸化基質の発見と代謝経路の解明

硫酸化代謝物は水溶性が高いことと標品の入手が難しいことから、メタボローム解析などの網羅的代謝解析の標的とされることが少なく、硫酸化が関与する代謝は未だに全貌が掴めていない。そこで、私は酵素学的解析により、オピオイド薬物やパーキンソン治療薬を始めとした薬物の他、ビタミンやしょうが成分ジゲロールなどの食事由来化合物など、20種類以上の化合物の硫酸化による代謝経路をこれまでに明らかにした。

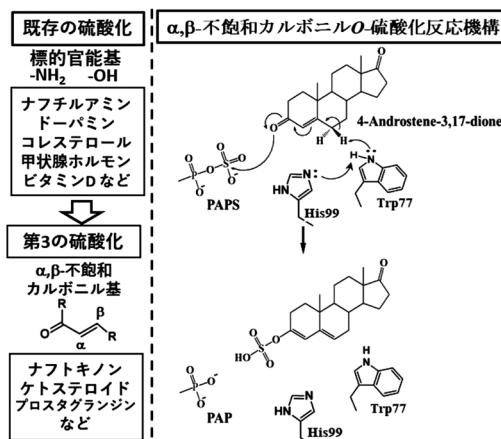
その中でも、ビタミンD₃硫酸化はその代謝物が血中で多く検出されているにもかかわらず、その機能や硫酸化経路は未解明のままであった。ビタミンD₃は皮膚内の7-デヒドロコレステロールからの生合成もしくは、経口摂取によって腸から吸収され、25-ヒドロキシビタミンD₃へと代謝変換される。この代謝中間体が、循環型ビタミンD₃として機能し、標的細胞内で更なる代謝変換を受け、活性型のビタミンD₃となる。そこで、私は、ビタミンD₃の生合成経路上にある化合物の代謝解析を、ヒトの細胞や臓器由来ライゼートおよび精製酵素を用いて行い、その硫酸化経路を明らかにした¹⁾。興味深いことに、ビタミンD₃でも活性型ビタミンD₃でもなく、25-ヒドロキシビタミンD₃が顕著に硫酸化された。25-ヒドロキシビタミンD₃が特異的に硫酸化を受ける構造生物学的疑問は今後の課題であるが、生理学的には非常に理にかなっている結果である。活性型ビタミンD₃の血中濃度は極めて低く、前駆体である25-ヒドロキシビタミンD₃の量に依存して生体のビタミンD₃活性は決まる。そのため、25-ヒドロキシビタミンD₃硫酸化が生体内のビタミンD₃活性を制御しているといえる。この硫酸化は硫酸転移酵素SULT2A1だけが触媒し、肝臓や腸でこの硫酸化が行われることも明らかにしている。このことから、腸や肝臓が生体内のビタミンD₃活性を制御する要となる臓器であることが

考えられた。SULT2A1は、元来、ステロイドホルモンの硫酸化を担う酵素であり、ステロイドサルファターゼによる脱硫酸化と共にステロイド機能を制御する。ビタミンD₃に関しても硫酸化と脱硫酸化による機能制御機構が想定され、より詳細なビタミンD₃の活性制御機構の解明を行っている。

1-2. α,β -不飽和カルボニルに対する第3の硫酸化の発見

SULTの標的官能基はこれまで、ヒドロキシ基とアミノ基が知られていた。一方、ヒドロキシ基でもアミノ基でもない「 α,β -不飽和カルボニル基」を標的とした全く新しい硫酸化反応を、近年、見出している。この反応は新規硫酸転移酵素として新たに同定したSULT7A1の機能解析の過程で見出した反応である。本酵素はこれまでのどの基質化合物にも活性を示さなかった。そこで、これまでのSULTとは異なる触媒機構を想定し、様々な構造をもつ化合物に対する酵素活性を検討した。多様な官能基を有する5員環と6員環化合物の中から、特異的に硫酸化される構造を見出し、最終的に「 α,β -不飽和カルボニル基」を標的とすることを明らかにした。「 α,β -不飽和カルボニル硫酸化」の普遍性に着目し、生理的基質化合物に対する酵素活性を調べた結果、内因性基質の1つとしてケトステロイドを見出した²⁾。質量分析により推定した代謝物の構造と酵素の触媒部位の構造から、既存の機構とは異なる新規硫酸化反応機構を提案している(図1)。また、「 α,β -不飽和カルボニル硫酸化」の基質としてナフトキノンやシクロペンテン型プロスタグランジンを見出しており、これまでの概念にはない、新たな硫酸転移酵素の標的基質の発見に至った。

生体内の「 α,β -不飽和カルボニル基」は酸化ストレスを受けて生じる求電子性の高い官能基であり、DNAやタンパク質などの生体分子との反応性が高い。硫酸化はこの求電子性の高い構造をより安定な構造へと変化させる理想的な代謝反応であり、酸化ストレス防御機構として重要な機能をもつと考え、現

図1. 第3の硫酸化である α,β -不飽和カルボニル硫酸化

在, 生理機能解明研究を展開している。

2. 生物進化に伴った硫酸転移酵素 (SULT) の機能変遷

2-1. 生物進化とスプライシングにより生じたキメラ酵素

硫酸転移酵素遺伝子の一部は生物進化に伴った構造変化を受けることが知られている。その中の一つである SULT1C3 はフェノール化合物の硫酸化を担う酵素であり, C末端スプライズバリエーションが存在することが知られていた (SULT1C3a と SULT1C3d)。一方, この遺伝子の起源となる相同遺伝子は, 長年見出されてこなかった。そこで, げっ歯類から霊長類までの SULT1C サブファミリー遺伝子のゲノム配列を解析した結果, SULT1C3 遺伝子は, げっ歯類に見出されていた SULT1C1 遺伝子の重複遺伝子として生み出され, 進化の過程で起源となった SULT1C1 遺伝子が欠損していたことが判明した。この過程で欠損せずに残った SULT1C1 遺伝子の C末端エクソンが SULT1C3 遺伝子に取り込まれた結果, SULT1C1 と SULT1C3 遺伝子に由来するキメラ酵素が生み出されることが明らかになった (図2)³⁾。この SULT1C1 由来の C末端エクソンをもつキメラ型酵素 (SULT1C3d) と SULT1C3 酵素 (SULT1C3a) の酵素活性を解析した結果, スプライシングによるキメラ化が酵素活性を著しく増強させることを明らかにした。本酵素のスプライズバリエーションの発現臓器や発現制御機構は良く分かっておらず, このキメラ酵素の発現制御機構の解明と共に, スプライシングと本酵素の機能が明らかにされることが期待される。

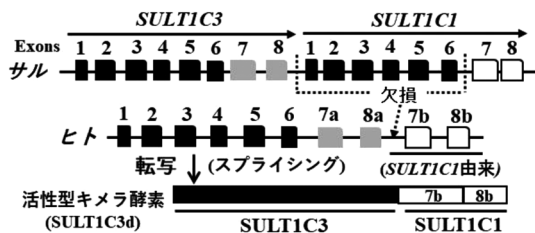


図2. 欠損とスプライシングによる活性型キメラ酵素生成

2-2. 生物進化に伴った胆汁酸硫酸化の機能変遷

胆汁塩 (胆汁酸と胆汁アルコールの総称) は原始の脊椎動物から高等脊椎動物への進化に伴った代謝変換経路の進化により, その化学形態も進化している。ゼブラフィッシュの主要胆汁塩である炭素数27の胆汁アルコールから, ヒトやマウスの炭素数24の胆汁酸など炭素数・側鎖構造・立体構造に大きな多様性がある (図3)。胆汁塩の硫酸化は生物種を超えた重要な代謝反応であるが, その代謝物の化学形態には大きな違いがあり, その違いを説明できる研究事例はなかった。そこで, ゼブラフィッシュ・マウス・ヒトの胆汁塩代謝に関わる酵素を用いて詳細に解析した結果, ヒト胆汁酸硫酸転移酵素 SULT2A1 は胆汁酸3位の OH基を硫酸化するが, ゼブラフィッシュ相同酵素は胆汁酸3位の OH基の硫酸化能力が低い一方, アルコール側鎖の OH基を硫酸化する能力が高いことが分かった^{4,5)} (図3)。また, ヒト SULT2A1 はステロイド代謝にも機能するが, ゼブラフィッシュ相同酵素は胆汁アルコールだけに活性を示した。詳細に解析した結果, ゼブラフィッシュにおけるステロイド硫酸化は, ヒトでは偽遺伝子となる SULT3 が担うことが判明した。一方, マウス相同酵素は7位OH基を特異的に硫酸化する能力を有しており, たった一つのアミノ酸置換が3位と7位の硫酸化を決定づけていることを明らかにした⁶⁾。これら

3つの硫酸化は, 各生物種に特化した化学形態と生体内機能に適応しており, 硫酸転移酵素がそれぞれの生物種に適応した形で独自に進化したように見えることから, 代謝酵素の柔軟性を現した一つの代表例として考えている (図3)。

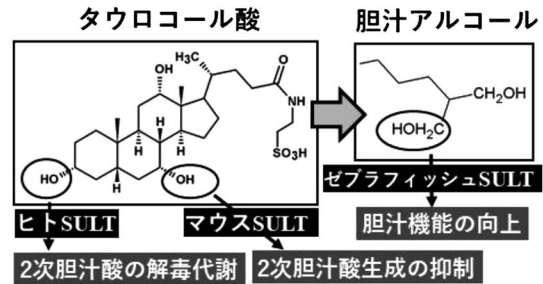


図3. 胆汁酸硫酸化の酵素反応と機能の多様性

おわりに

本研究では, ヒト・マウス・ゼブラフィッシュの研究成果を中心に紹介した。それ以外に, 昆虫や植物においても硫酸転移酵素の機能変遷研究を展開している。今後は, 「 α,β -不飽和カルボニル硫酸化」の生物多様性に関する研究展開を通して, 低分子化合物代謝酵素の生物進化に伴った機能の多様性研究から, 最終的にはヒトにおける生理機能解明につなげていきたい。

(引用文献)

- 1) Kurogi K, Sakakibara Y, Suiko M, Liu MC. *FEBS Lett.*, Vol. 591, p 2417-2425, (2017)
- 2) Hashiguchi T, Kurogi K, Shimohira T, Teramoto T, Liu MC, Suiko M, Sakakibara Y. *Biochim. Biophys. Acta.*, Vol. 1861, p 2883-2890, (2017)
- 3) Kurogi K, Shimohira T, Kouriki-Nagatomo H, Zhang G, Miller ER, Sakakibara Y, Suiko M, Liu MC. *J. Biochem.*, Vol. 162, p 403-414, (2017)
- 4) Kurogi K, Krasowski, M.D., Injeti, E., Liu, M.Y., Williams, F.E., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 127, p 307-314 (2011).
- 5) Kurogi K, Yoshihama M, Horton A, Schiefer IT, Krasowski MD, Hagey LR, Williams FE, Sakakibara Y, Kenmochi N, Suiko M, Liu MC. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 174, p 120-127 (2017)
- 6) Shimohira T, Kurogi K, Liu MC, Suiko M, Sakakibara Y. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 82, p 1359-1365 (2018).

謝辞 本研究は, 宮崎大学農学部応用生物科学科生体分子機能化学研究室ならびに米国オハイオ州立トレド大学薬学部において行われたものです。本研究のきっかけを与えてくださり, 学生時代から現在に至るまで御指導を賜りました, 宮崎大学理事・副学長の水光正仁先生に篤く御礼申し上げます。また, 私に研究者としての礎を与えていただき, 終始ご指導頂きました宮崎大学農学部教授・榎原陽一先生には心から感謝申し上げます。合計4年間の海外留学中は, 公私に渡って面倒を見ていただき, 現在も論文執筆などでお世話になっておりますトレド大学薬学部教授・Ming-Cheh Liu先生に感謝致します。本研究を展開するにあたりまして, 様々な助言とサポートを下さいました多くの先生方と研究室のこれまでの修了生や学生にもこの場を借りて感謝申し上げます。また, 妻や家族のこれまでの理解と支えのもと研究生活を送ることができていることに感謝いたします。最後になりましたが, 本奨励賞に御推薦賜りました, 日本農芸化学会西日本支部長で九州大学大学院農学研究教授の酒井謙二先生に御礼申し上げます。