

研究要旨：

ヒトフェノール硫酸転移酵素分子種、SULT1A1hum によるビスフェノール A の代謝能を調べた。日本人で、本酵素の 213Arg/His 多型が認められた（遺伝子型頻度：Arg, 83%、His, 17%）。異種細胞内発現酵素を用いたとき、Arg 型、His 型酵素のビスフェノール A の硫酸抱合能は nmol 酵素分子当たり顕著な差異はなく、どちらの遺伝子型のヒトでも本代謝経路の欠損など注意すべき問題は出現しなかった。

A. 研究目的

内分泌攪乱物質（EDC）の作用の修飾に種々の薬物代謝酵素が関与している多くの例が知られている。第 I 相、第 II 相薬物代謝酵素による解毒代謝はもちろん、代謝活性化も EDC の作用の修飾と考えられる。ヒトにおいて、これらの経路にどのような薬物代謝酵素が関与するのかは十分に明かにされていない。また、ある物質の代謝活性化過程は、DNA やタンパクなど生体高分子と、活性化体との共有結合体を形成することを意味することが多いが、その過程と、EDC としての作用との関連性も必ずしも明確ではない。本研究において、以上の点を明らかにするために、EDC 応答性を有する細胞を含み、種々の細胞内にヒト薬物代謝酵素を cDNA の導入等の方法で発現させる。これらの系を用いて EDC の代謝に関与し、作用を修飾するヒト薬物代謝酵素を明かにする。また、EDC 応答性の細胞を用いた場合、EDC の作用により、どのような遺伝子の発現に変化が起きるかにつき調べ、代謝活性化が EDC の作用機構の一端であるかどうかを評価する。

B. 研究方法

1. SULT1A1hum の野生型（213Arg, 223Met）および異型（213His, 223Val）をコードする遺伝子型の判定

健常日本人群（143名、男性79名、女性64名）の末梢血液5mlより分離した白血球より、ゲノムDNAをフェノール・クロロホルム法にて抽出した。また、52名の米国人の肝は、Cooperative Human Tissue Network を通じ、または手術材料として得られた正常組織を用い、白血球と同様な方法でゲノムDNAを抽出した。このようにして得たDNAを、遺伝子型判定のための試料とした。SULT1A1hum 遺伝子の遺伝子型は polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)法を用いた。ヒトは SULT1A1hum と極めて相同性の高い遺伝子（少なくとも SULT1A2 および 1A3）を有している。これら相同性の高い遺伝子のうち、SULT1A1hum のみを特異的に増幅するために本遺伝子に特異的なイントロンプライマー（5'-GGTTGAGGAGTTGGCTCTGC-3'）を上流側に、下流側プライマーとしては（5'-ATGAACCTCCTGGGGACGGT-3'）を用いた。その後、213Arg/Met の判定のため、制限酵素 *Hae*II を、223Met/Val の判定のため、制

限酵素 NlaIII を用いた。

2. 野生型、及び 213His 異型酵素をコードする cDNA の単離

野生型、213His 異型酵素をコードする cDNA を単離するため、213Arg、213His 両方の遺伝子を有する複数の米国人肝組織を 2-1 の方法により選択した。米国人の肝組織より guanidine isothiocyanate 法、および oligo(dT)カラムを用いて poly(A)+RNA を抽出した。さらに、逆転写酵素を用いて cDNA 画分を得、SULT1A1hum に特異的な配列を含む上流側プライマー

(5'-GGAATTCAGGAACATGGAGCTGAT CCA-3')および下流側プライマー(5'-ACGAATTCTGAACTCCTGGGCTCAAA-3')を用いて PCR 増幅を行って cDNA を単離した。

3. SULT1A1hum の大腸菌内発現系の構築: 報告者らは、ヒトの本酵素遺伝子がコードするアミノ酸と全く同一の配列を有するタンパクを大腸菌内で合成させるため、Invitrogen 社の TrcHisB および cDNA を NcoI、および EcoRI で処理し、cDNA とベクターとを連結することとした。そのため、2-2 の様にして得た cDNA の 5'-末端の配列に NcoI 部位を導入するため、cDNA を鋳型として(5'-ACCATGGAGCTGATCCAGGACA-3')および(5'-GGAATTCAGGCTTCGAACTCCTGGGCTCCAAA-3')というプライマーを用いて PCR 増幅した。その後、ベクター、cDNA を NcoI および EcoRI 処理し、両者を連結した。このようにして得た cDNA の塩基配列を自動シーケンサ (Applied Biosystems Model 373A) を用いて決定し、既に報告されている SULT1A1hum cDNA の配列と比較した。作成した大腸菌内発現ベクターを CaCl₂ 法により大腸菌 Top10 に導入し、isopropylthiogalactopyranoside でタンパクの発現を誘導した。発現タンパクを DEAE-Sepharose 6B (Pharmacia Biotech)

カラムを用いて部分精製し、酵素活性測定 (p-ニトロフェニルスルフェートを硫酸基供与体、2-ナフトールを硫酸基受容基質とした比色定量法)、ならびに Western blot 法で、活性画分を検出して集めた。Western blot 法による検出のための抗体には、SULT1A1hum 特異的な 12 アミノ酸残基のオリゴペプチド (KVHPEPGTWDSF) 抗原をウサギに免疫することにより作成したポリクローン抗体を用いた。発色は、アマシャム社製 ECL™を用いて行いタンパクバンドの強度をデンシトメトリーで定量した。野生型、及び異型酵素の硫酸抱合能を酵素分子の絶対量当たりで比較するために、本発現系において用いた pTrcHisB ベクターがコードする 6 つのヒスチジンが連続する領域を含む 46 アミノ酸残基を野生型酵素分子種の N-末端に融合させたタンパクも発現させた。この融合タンパクは連続するヒスチジン残基とニッケルカラムとの親和性を利用して、ニッケルカラムアフィニティークロマトグラフィーによりほぼ電気泳動的に純粋なタンパクとして精製することができた。純粋なタンパクの量を測定し、今回の研究で EDC の代謝活性の測定に用いた酵素液中の酵素タンパクの含量を Western blot 法で求めることが可能となった。

4. 硫酸転移酵素活性の測定

本研究においては種々の EDC および関連物質の硫酸転移酵素活性を測定しなければならない。そこで、基質によって異なった条件設定が必要な高速液体クロマトグラフィーのような方法を用いずに本酵素活性を測定できるバリウム沈殿法を採用した。本方法は、バリウムイオンの存在下では、脂溶性化合物の硫酸抱合体に比し、PAPS が著しく溶解度が低いことを利用するものであり、硫酸転移酵素活性を測定するための信頼できる方法の一つとして広く用いられている。ただし、本方法はアイソトープ化合物、すなわち [³⁵S]PAPS を硫酸基供与体として用いなければならない

ので、フェノール硫酸転移酵素に限り、p-ニトロフェニルスルフェートを硫酸基供与体、2-ナフトールを硫酸基受容基質として反応を行い、硫酸転移反応により生成する p-ニトロフェノールを 405nm の吸光度の増加として捉える方法もある。この方法は 2-ナフトールの硫酸転移酵素活性の測定には極めてよい方法である。ここでは EDC の一つの例として本研究で取り上げたビスフェノール A についてのみ詳しく述べる。反応系は、50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4)、5 mM MgCl_2 、1 mM dithiothreitol、100 μM ビスフェノール、20 μM ^{35}S PAPS および cDNA の大腸菌内発現酵素液 (陰イオン交換クロマトグラフィーで部分生成したもの、タンパクの終濃度は野生型酵素液 5.6 $\mu\text{g/ml}$ 、213His 異型酵素液 110 $\mu\text{g/ml}$) で構成され、全容量を 100 μl とした。以上の反応系で 37°C、10 分間反応させ、0.1 M $\text{Ba}(\text{OH})_2$ を 20 μl 加えることにより反応を停止し、さらに、0.1 M ZnCl_2 、0.1 M $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ を各 20 μl 加えて未反応の ^{35}S PAPS を約 8,000 x g、6 分間の遠心分離により沈殿させた。溶液の半量にあたる 80 μl を別のチューブに移した。さらに、もう一度同じ濃度の 0.1 M $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 、0.1 M ZnCl_2 、0.1 M $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ を各 20 μl 加え約 8,000 x g、6 分間の遠心分離により未反応の ^{35}S PAPS を完全に沈殿させた。溶液の半量に相当する 70 μl をシンチレーションカクテル (Aquasol) と混合し、 ^{35}S の放射活性を液体シンチレーションカウンタで測定することにより、酵素活性を求めた。このとき、常に、硫酸基受容基質 (この場合はビスフェノール A) を加えない反応液を作成し、そこから得られた ^{35}S のカウントをバックグラウンドとし、ビスフェノール A を加えた反応液について得られたカウントから差し引いて、基質依存性の硫酸転移酵素活性として求めた。

C. 研究結果および考察

1. SULT1A1hum 遺伝子に認められる 2 ヲ所の遺伝多型の日本人、米国人における頻度

SULT1A1hum 遺伝子に認められる 2 ヲ所 (213Arg/His 及び 223Met/Val) の遺伝多型の頻度はこれまで米国人においてのみ調べられていたので、今回初めて健常日本人について調べた。表 1 に示す様に、異型である 213His の頻度は米国人に比べてやや低かったが、213Arg/His の遺伝多型は日本人についても認められた。それに対して、223Val 異型接合体を有する日本人は今回調べた集団中には認められなかった。

2. 野生型、213His 異型、および 2 アミノ酸置換異型 (7Ile, 213His) SULT1A1hum の一次構造

複数の米国人肝組織より、今回の発現系を構築するために cDNA を単離した。

野生型酵素と 213His 型異型との間にはコドン 213 にしか差がなかった。213His 型をコードする cDNA および遺伝子の配列がいくつかのヒト組織を用い、複数の研究施設から合計 4 つの文献に報告されている。それらはすべて、コドン 213 を除き、野生型と同じアミノ配列を示していた。このことより、今回報告者が単離した異型酵素はヒトに存在する 213 異型の最も一般的な分子種であると考えられた。コドン 7 の Ile への変異は、それをコードする cDNA を単離してきたヒトのゲノム DNA 上の相当部位の塩基配列の解析ではその変異の存在が確認されず、この 7Ile 変異は、PCR に用いた Taq polymerase による増幅エラーで生じたものが、偶発的にクローニングされたと考えられた。

3. 野生型及び 2 種の異型酵素の大腸菌内発現の確認

野生型、及び 2 種の異型 SULT1A1hum

分子種の大腸菌内発現を 2-ナフトールに対する硫酸転移酵素活性と、Western blot で確認した。タンパクの発現を誘導した大腸菌ホモジネートを用いた実験で、ベクターのみを導入した大腸菌に比べて、(His)₆ の融合タンパクを含め、高い活性を示した。ヒト肝に比べ、最低でも、約 5 倍以上の発現が確認された。

野生型、および 2 種の異型酵素の発現菌のホモジネートを陰イオン交換クロマトグラフィーで部分精製し、酵素活性などの性質の比較に用いた。Western blot 法により、精製 (His)₆ 融合タンパクの抗体認識バンドの強度との比較を行い、野生型、異型酵素の酵素液中での含量を求めた。SULT1A1hum は野生型、異型共にサブユニット分子量約 34,200 であった。他の 2 種の異型酵素に比べ、213His 異型酵素は陰イオン交換クロマトグラフィーの過程であまり比活性が上がらなかったためにタンパク比含量が高くなかったと考えられた。しかし、213His 異型酵素は、その酵素タンパク比含量が低いにもかかわらず、いくつかの基質を効率良く硫酸抱合した。ある基質に対する酵素活性の差異を、表 4 の数値から酵素分子種間で直接比較することができる。コドン 213 が Arg→His に変異しても、ほとんど表 4 に示した基質の硫酸転移酵素活性に対しては影響が認められなかった。それに対し、コドン 7 が Thr→Ile に変異すると、特にビスフェノール A の硫酸抱合能が低下することが示された。このことから、コドン 7 の Thr は特にビスフェノール A に対する硫酸転移酵素活性の維持に重要なアミノ酸であることが示唆された。

ビスフェノールなど、フェノール構造をもち、代謝活性化により作用を発現する物質の解毒代謝にかかわると想定されたヒトフェノール硫酸転移酵素 SULT1A1hum 及び、その異型分子種の大腸菌内発現系を構築した。今年度は、この発現酵素を用い、EDC の一

つと考えられるビスフェノール A が、本酵素の基質となることを明らかにした。本酵素の活性を脂溶性基質一般に用いることができるバリウム沈殿法で測定できるので、今回構築した発現系と本酵素活性測定法で種々の EDC の解毒代謝に本酵素が関与するかどうかを評価することができると考えられた。

今回、種々の基質に対する活性測定に用いた野生型酵素液の 2-ナフトールに対する活性は約 2,360 nmol/min/mg protein と考えられ、この値は、ヒト肝の酵素活性の約 120 倍に上った。これらのことより、ヒト肝におけるビスフェノール A の平均的代謝活性は約 95 pmol/min/mg protein と考えられ、これは無視してよいほど低い値であるとは決して言えないと考えられた。また、Western blot 法を用いて、野生型、213His 異型酵素の間にビスフェノール A の解毒代謝に差異があるかどうかを厳密に評価したが、有意な差異があるとは認められなかった。この異型酵素の遺伝子型を両方の染色体とも有する日本人は約 2.8% 存在するという結果が得られたが (表 1)、特に問題は生じないと思われた。しかし、213His 異型 (7Thr, 213His) と比較して、2 アミノ酸置換型 (7Ile, 213His) 分子種のビスフェノールに対する硫酸抱合能は著明に低下していた。7Ile はヒト集団に存在する証拠は今のところ得られていないが、コドン 7 の Thr はビスフェノールの硫酸抱合活性を維持するのに重要なアミノ酸の一つであるという蛋白化学的に興味深い結果がえられた。本発現系は酵素含量が高いので、EDC などの化学物質の解毒代謝経路として本酵素が関与するかどうかを評価するために非常に有用ではないかと思われた。フェノール性基質の抱合には本酵素以外にも、UDP-グルクロニル転移酵素が考えられ、ヒト肝ミクロソーム画分を用いて、代謝能を評価することが、ビスフェノール A の解毒代謝を完全に明らかにするためには必要と考え

られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

M. Nakajima, H. Takahashi, M. Sasaki, Y. Kobayashi, T. Awano, D. Irie, K. Sakemi, Y. Ohno, M. Usami, Developmental toxicity of indium chloride by intra-venous or oral administration in rats. *Terato. Carcino. Mutage.*, 18, 231-238, 1998.

Y. Ohno, M. Sunouchi, A. Miyajima, Y. Ogawa, T. Umemura, T. Inoue, K. Nagamatsu, Lack of preneoplastic changes and induction of CYP2B1 in the liver of dogs treated with CNP. *Rev. in Toxicology*, 2, 47-51, 1998.

A Nakajima, Y. Ohno et al, Effects on fetal growth of repeated blood collection for toxicokinetics from pregnant rats, *J. Toxicol. Sci.* 22, 455-459, 1997.

M. Nakajima, Y. Ohno, et al, Rat embryo culture using rabbit serum as a medium for developmental toxicity studies. *J. Appl. Toxicol.*, 17, 185-188, 1997.

2. 学会発表

清水万紀子、松本宜明、福岡正道、大野泰雄、小澤正吾、多型性ヒトフェノール硫酸抱合酵素 (SULT1A1hum) の野生型、異型分子種の内分泌かく乱物質や種々の薬物に対する硫酸抱合活性：日本薬学会第119年会プログラム (1999年徳島)、演題 (30[PV]14-039)、71頁