

家兎硫酸基転移酵素 SULT2B1のクローニングと 特異性の解析

学位論文内容の要旨

硫酸抱合は、硫酸基転移酵素と共基質である 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) により起こる反応である。硫酸抱合により生体内物質や生体異物の生化学的活性ならびに物理学的特性が変化することが知られている。硫酸基転移酵素は細胞質型硫酸基転移酵素と膜結合型硫酸基転移酵素の2つに分類されるが、細胞質型硫酸基転移酵素は SULT と呼ばれ、ステロイドホルモン、甲状腺ホルモン、カテコラミンなどのホルモンや胆汁酸といった比較的分子量の小さな生体内物質や薬物などを基質とする酵素である。硫酸抱合によりホルモンの不活性化、疎水性物質の親水性物質への変換、薬物の解毒が起こる。SULT は複数の遺伝子ファミリーで構成され、さらにサブファミリーに分類される。SULT2 のうちサブファミリーである SULT2B1 は主に dehydroepiandrosterone (以下 DHEA), cholesterol, pregnenolone を基質として持つ酵素である。

DHEA は、近年抗老化ホルモンとして注目されており、多岐にわたる作用が報告されているが、今回我々は特に抗動脈硬化作用に着目した。DHEA-sulfate (以下 DHEA-S) の低下により心血管疾患のリスクが増加するという報告や DHEA-S は加齢とともに低下すると報告されている。一方 DHEA についても血管内皮細胞、マクロファージ、中膜平滑筋細胞に対して動脈硬化症抑制作用に関して多数報告がなされている。しかし、DHEA および DHEA-S については、作用機序は不明であるため、どちらが動脈硬化症抑制作用を持つのか一定の見解は得られていない。したがって DHEA を基質とする SULT2B1 の発現の検討は DHEA あるいは DHEA-S の作用を明らかにするため重要な知見を与えるものと考えられる。

また、脂質代謝がヒトと近似しているため、従来より動脈硬化研究にウサギが頻用されてきたが、ウサギの SULT2B1 遺伝子はいまだ単離・報告されていない。よって DHEA ならびに DHEA-S の動脈硬化症への関与を明らかにする目的の一環としてウサギの SULT2B1 遺伝子のクローニングとその発現部位、基質特異性、酵素活性の検討を行った。

日本白色ウサギの皮膚より、RNA を抽出し RACE 法によってウサギ SULT2B1 遺伝子をクローニングした。また、各臓器での SULT2B1 の発現を RT-PCR 法を用いて検討した。さらに大腸菌を用いてリコンビナント蛋白を作製し、放射性同位元素を用い、薄層クロマトグラフィーにより酵素動態解析を行った。同時に、ペプチド抗体を作製しウエスタンブロット法、免疫組織染色により動脈での SULT2B1 の発現について検討した。

以下に結果の要約を示す。

- 1) 得られたクローンは、330 アミノ酸で構成されており予測される分子量は 37.3kDa で

あった。既報のヒトならびにマウス SULT2A1 および SULT2B1 とアミノ酸配列の相同性について検討したところ、マウス SULT2B1 と 73.7%であり、得られたクローンは、ウサギ SULT2B1 と考えられた。

2) ウサギ SULT2B1 は、腎、大腸、皮膚、動脈、静脈に発現を認めた。

3) リコンビナント SULT2B1 の酵素動態解析では、 K_m 1.5 μ M と基質親和性は cholesterol で高く、代謝回転は k_{cat}/K_m 64.1 $M^{-1}sec^{-1}$ であり pregnenolone で速いと推測された。

4) ウエスタンブロット法より SULT2B1 は動脈で発現しており、免疫組織染色から特に動脈内皮細胞に発現していることが明らかになった。

ウサギ SULT2B1 はヒトやマウスのこれまでの報告と同様に、腎臓、大腸、皮膚で発現していた。さらに、ウサギ SULT2B1 は、動脈において mRNA ならびに蛋白レベルで発現していることを初めて明らかにした。RT-PCR 法の検討より動脈において SULT2B1 と共通の基質を持つ SULT2A1 の発現を認めなかったことより、DHEA, pregnenolone, cholesterol の脈管系における硫酸抱合反応は SULT2B1 が担っていることが推測された。動脈硬化症抑制作用について、DHEA によるものか DHEA-S によるものかはいまだ未解決の問題である。現在特異的受容体が同定されておらず、作用機序の解明には受容体単離が必須である。今回我々は動脈硬化症発症の重要な構成因子である血管内皮細胞における SULT2B1 の発現を同定した。これは、動脈硬化症の発症・進展における DHEA および DHEA-S の役割を解明する上で非常に興味深いと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 三 輪 聡 一
副 査 教 授 笠 原 正 典

学 位 論 文 題 名

家兎硫酸基転移酵素 SULT2B1のクローニングと 特異性の解析

硫酸抱合は、硫酸基転移酵素と共基質である 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) により起こる反応であり、基質の生化学的活性や物理学的特性が変化することが知られている。細胞質型硫酸基転移酵素は SULT と呼ばれるが、SULT2B1 は主に dehydroepiandrosterone (DHEA), cholesterol, pregnenolone を基質として持つ酵素である。DHEA は、近年抗老化ホルモンとして注目されているが、我々は特に抗動脈硬化作用に着目した。DHEA-sulfate (DHEA-S) の低下により心血管疾患のリスクが増加すると報告されている一方、DHEA についても血管内皮細胞、マクロファージ、中膜平滑筋細胞に対して動脈硬化症抑制作用に関して報告がなされており、DHEA および DHEA-S について、どちらが動脈硬化症抑制作用を持つのか一定の見解は得られていない。また、動脈硬化研究に頻用されてきたウサギの SULT2B1 遺伝子はいまだ単離・報告されていない。よって DHEA/DHEA-S の動脈硬化症への関与を明らかにする目的の一環としてウサギ SULT2B1 遺伝子のクローニングとその発現部位、基質特異性、酵素活性の検討を行った。日本白色ウサギの皮膚より RNA を抽出し、RACE 法によってウサギ SULT2B1 遺伝子をクローニングした。得られたクローンは、330 アミノ酸で構成され予測される分子量は 37.3kDa であり、マウス SULT2B1 とアミノ酸配列の相同性は 73.7% で、ウサギ SULT2B1 と考えられた。また、RT-PCR 法を用いて各臓器での SULT2B1 の発現を検討したところ、腎、大腸、皮膚、動脈、静脈に発現を認めた。さらにリコンビナント蛋白を作製し、放射性同位元素を用い、薄層クロマトグラフィーにより酵素動態解析を行った。Km 1.5 μ M と基質親和性は cholesterol で高く、代謝回転は kcat/Km 64.1M⁻¹sec⁻¹ であり pregnenolone で速いと推測された。同時に、ペプチド抗体を作製し、ウェスタンブロット法を行い、SULT2B1 は動脈で発現していること、免疫組織染色から特に動脈内皮細胞に発現していることが明らかになった。RT-PCR 法の検討より動脈において SULT2B1 と共通の基質を持つ SULT2A1 の発現を認めなかったことより、DHEA, pregnenolone, cholesterol の脈管系における硫酸抱合反応は SULT2B1 が担っていることが推測された。今回我々は動脈硬化症発症の重要な構成因子である血管内皮細胞における SULT2B1 の発現を初めて同定した。質疑応答では、主査から紹介があった後、申請者はスライドを用いながら約 20 分に渡って学位論文内容の発表を行った。その後、副査三輪教授から、1) ウェスタン

ブロット法において組織から抽出した蛋白とリコンビナント SULT2B1 のバンドの大きさの差異について、2) リコンビナント SULT2B1 の実際の組織内での活性について、3) ウェスタンブロット法において今回示した以外のバンドの有無、4) DHEA/DHEA-S について細胞内へ入る際の機序および細胞内での硫酸抱合について、5) 動脈内皮細胞での DHEA-S の細胞外への分泌、細胞内での作用についての質問があった。次いで副査笠原教授から、1) SULT2B1a の臓器別発現の検討について、2) 加齢に伴う SULT2B1 の活性の変化を検討した報告の有無、3) DHEA から DHEA-S への硫酸抱合反応の主となる臓器について、4) sulfatase の臓器別発現の検討の有無についての質問があった。次いで主査小池教授から、1) DHEA/DHEA-S のどちらが抗動脈硬化作用を有すると考えるか、またそのために今後必要と考えている実験について、2) SULT2B1 のモノクローナル抗体の作成について、3) 今後 SULT2B1 と動脈硬化の関連を検討するにあたっての実験方針、4) DHEA の経口投与の効果についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者はこれまでの文献的報告および実験結果を引用し、概ね適切に回答した。

この論文は、血管内皮細胞における SULT2B1 の発現を初めて同定した点で高く評価され、今後、モデル動物等を用いて SULT2B1 の発現を検討し、動脈硬化症発症・進展における DHEA および DHEA-S の役割が解明されることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。