

(様式第 5 号)

## 薬物代謝に関わる硫酸転移酵素 SULT の X 線結晶構造解析

### X-ray crystal structural analysis of sulfotransferase

西依 利晃, 角田 佳充

Toshiaki Nishiyori, Yoshimitsu Kakuta

九州大学農学部

**Faculty of Agriculture, Kyushu University**

- ※ 1 先端創生利用(長期タイプ、長期トライアルユース)課題は、実施課題名の末尾に期を表す(I)、(II)、(III)を追記して下さい。
- ※ 2 利用情報の開示が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後二年以内に研究成果公開(論文(査読付)の発表又は研究センターの研究成果公報で公表)が必要です。(トライアルユースを除く)

#### 1. 概要 (注: 結論を含めて下さい)

硫酸転移酵素 (SULT) は哺乳動物において、PAPS を硫酸基供与体として用い、生体内のホルモンや神経伝達物質、また生体異物や薬物などといった低分子化合物のヒドロキシル基に硫酸基を転移する反応を触媒し、それらの濃度調節や解毒代謝を行う。SULT には、数多くのアイソフォームが存在し、それぞれ基質特異性が異なっている。ヒト SULT の一つ hSULT1C4 は主に低分子フェノール化合物に対して基質特異性を持つ。本酵素の基質特異性の構造基盤を明らかにするために X 線結晶構造解析による立体構造決定を試みた。回折実験を行った結果、分解能が低く、立体構造解析には適さない結晶であることが判明した。今後は、結晶化条件を最適化して立体構造解析に適した結晶の作製を行っていく予定である。

In mammals, the cytosolic sulfotransferases (SULTs) play important roles in the Phase II detoxification of xenobiotics as well as in the homeostasis of catecholamine neurotransmitters and steroid/thyroid hormones. SULTs utilize 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulphate (PAPS) as the sulfonate donor to catalyze the sulfonation of substrate compounds, yielding 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate (PAP) and sulfonate conjugates. In human, hSULT1C4 has a widespread tissue distribution and has been shown to metabolize catecholamines and play a significant role in the metabolism of a broad range of xenobiotics. To better understand the structural basis for its substrate specificity, we attempted to determine the crystal structure of hSULT1C4 in complex with a variety of xenobiotics.

#### 2. 背景と目的

硫酸転移酵素 (SULT) は哺乳動物において、PAPS を硫酸基供与体として用い、生体内のホルモンや神経伝達物質、また生体異物や薬物などといった低分子化合物のヒドロキシル基に硫酸基を転移する反応を触媒し、それらの濃度調節や解毒代謝を行う<sup>1)</sup>。SULT には、数多くのアイソフォームが存在し、それぞれ基質特異性が異なっている。その内、ヒト hSULT1C2 は主に低分子フェノール化合物に対して基質特異性を持つ。特に、合成女性ホルモン Diethylstilbestrol (DES) などの、より大きなサイズの基質に対しても活性を持つ特徴を持っている。そこで本研究は、X 線結晶構造解析により hSULT1C4 の立体構造を決定し、hSULT1C2 との基質特異性の構造基盤を明らかにすることを目的とした。

### 3. 実験内容 (試料、実験方法、解析方法の説明)

事前に作成したhSULT1C4の結晶を、クライオループを用いてglycerolを含むCryoprotectant solutionのドロップに数秒間浸し、結晶を $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ で凍らせ、X線を照射した。X線照射後、得られた回折点の観察を行った。今回、X線の照射を行った結晶の結晶化条件はFig. 1に示す2条件である。なお、いずれの結晶ともサンプル溶液とリザーバー溶液をそれぞれ $1\text{ }\mu\text{l}$ ずつ混合し、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行うことにより得られた。

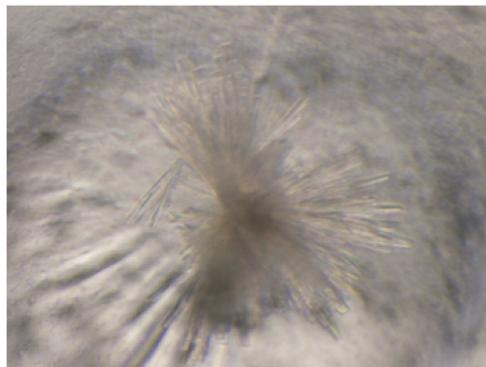
#### (A)

サンプル溶液

- 15 mg/ml hSULT1C4
- 1 mM DTT
- 2 mM PAP

リザーバー条件

- 2% Tacsimate pH 8.0
- 100 mM Tris-HCl pH 8.5
- 16%(w/v) PEG 3350



#### (B)

サンプル溶液

- 15 mg/ml hSULT1C4
- 1 mM DTT
- 2 mM PAP

リザーバー条件

- 0.2M Sodium Fluoride
- 26%(w/v) PEG 3350



Fig1. X線照射を行った結晶とその結晶化条件

また、結晶を浸した Cryoprotectant solution の組成は、Fig. 1 (A)の結晶を浸したものが、50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 2% Tacsimate pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 18% PEG 3350, 30% glycerol で X 線を照射するのに適切なクライオ条件となり、Fig. 1 (B)の結晶は、結晶化ドロップそのものが蒸気拡散により十分に PEG 3350 の濃度が高い状態となっていたので、Cryoprotectant solution に浸さず、そのままの状態でもクライオ条件となった。

### 4. 実験結果と考察

X線回折実験の結果、Fig. 1 (A) の結晶ではFig. 2 のように、回折点を得ることはできたものの、回折データを取ることができるとははっきりした点ではなかった。また、Fig. 1 (B) の結晶では回折点を全く得ることができなかった。この結果から、Fig. 1 (A) の結晶は hSULT1C4 の結晶ではあるものの、結晶の大きさ、厚みが不十分であったためうまく回折点を得ることができなかったのではないかと考えられ、Fig. 1 (B) の結晶は結晶自体の大きさはあったが、回折能を与えるのに十分な質がなかったものと考えられた。

### 5. 今後の課題

今回の回折実験により、結晶の質が確認できた。今後、十分な回折能を与える結晶を作製するために、結晶化条件の最適化を進める予定である。

## 6. 参考文献

- 1) Robinsons.P.W, and Lipmann. F. *J Biol Chem.* 229, 837-851 (1957)
- 2) Abdellah Allali-Hassani, Patricia W Pan,Ludmila Dombrovski, Rafael Najmanovich,Wolfram Tempel, Aiping Dong, Peter Loppnau,Fernando Martin, Janet Thonton, Aled M Edwards, Alexey Bochkarev, Alexander N Plotnikov, Masoud Vedadi, and Cheryl H Arrowsmith. *PLoS Biol.* 5, e97(2007)

## 7. 論文発表・特許 (注：本課題に関連するこれまでの代表的な成果) なし

## 8. キーワード (注：試料及び実験方法を特定する用語を2～3) 硫酸転移酵素 (SULT) / X線結晶構造解析

## 9. 研究成果公開について

②研究成果公報の原稿提出

(提出時期：2014年10月)