

腸内菌由来 Arylsulfate Sulfotransferase  
に関する生化学的研究

今村 理佐

①

博士論文

腸内菌由来 Arylsulfate Sulfotransferase  
に関する生化学的研究

今村 理佐

## 目 次

緒論	1
第一章 酵素の抗体カラムによる精製	4
1-1 実験材料および実験方法	4
1-2 実験結果	6
1-2-1 ポリクローナル抗体の調製	8
1-2-2 アフィニティーカラムによる酵素精製	9
1-2-3 N末端アミノ酸配列	10
1-3 考察	11
第二章 フェノール性化合物の酵素的硫酸化	11
2-1 実験材料および実験方法	11
2-2 実験結果	13
2-2-1 カテコールアミンとチロシン含有ペプチドの硫酸化と薬理的性質	22
2-2-2 配糖体およびアグリコンの位置特異的硫酸化	25
2-3 考察	28
第三章 硫酸転移活性と基質の物理化学的性質との相関	28
3-1 実験材料および実験方法	28
3-2 実験結果	28
3-3 考察	33
第四章 酵素の活性調節に関する検討	34
4-1 実験材料および実験方法	34
4-2 実験結果	34
4-2-1 阻害物質の検索	36
4-2-2 ATPによる活性調節	39
4-2-3 ATPと酵素の結合	39
4-3 考察	41
第五章 ラット腸内菌 <i>Klebsiella</i> 由来硫酸転移酵素の生化学的性質	41
5-1 実験材料および実験方法	41
5-2 実験結果	42
5-3 考察	43
総括	45
謝辞	46
参考文献	47

## 緒 論

硫酸抱合反応は、種々の水酸基を有する化合物の解毒の主な経路である。この硫酸化を触媒する酵素として sulfotransferase が知られており、この酵素は、arylamine、phenol、steroid や bile acid などの基質の違いにより分類されている<sup>1-4)</sup>。この酵素は硫酸基を 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) からアルコール性あるいはフェノール性水酸基に転移する反応を触媒する。最近、同様な酵素が植物、*Flaveria* からも見つかっている<sup>5,6)</sup>。そのうち、フェノール性化合物の硫酸化を触媒する phenol sulfotransferase (PST, EC. 2.8.2.1) は第 2 相薬物代謝酵素であり、ヒト組織において種々の薬物、ホルモンのような外因性あるいは内因性物質の硫酸抱合に寄与している。PST はほ乳動物の肝臓、脳、腎臓や他の組織中に見出されている<sup>7-10)</sup>。ラット肝臓由来の PST は、その生化学的性質や基質である硫酸受容体に対する至適 pH の違いにより 4 つのグループに分けられている<sup>9)</sup>。ヒトの脳では、基質特異性の研究から 2 つのタイプがみつまっている<sup>10)</sup>。さらに、PST をコードしている cDNA の解析も行われている<sup>11,12)</sup>。

ヒトにおいて、dopamine や norepinephrine のような神経伝達物質は、monoamine oxidase (MAO) や catechol-O-methyltransferase (COMT) により、不活性化されていると考えられてきた<sup>13)</sup>。しかしながら、ヒト脳の PST が dopamine や norepinephrine に対して非常に高い親和性をもつことが明らかになってきたことより<sup>14)</sup>、catecholamine の硫酸化はヒト中枢神経系において重要であると考えらるに至った<sup>10,15,16)</sup>。一方、硫酸抱合はフェノール性化合物の薬理活性の低下（不活性化）あるいは解毒のための代謝過程であると一般に考えられてきた。しかし、脳-腸管ペプチドホルモンとして発見された cholecystokinin (CCK) はその tyrosine 残基が硫酸化されている。その活性は非硫酸化体の 600 倍であり<sup>17)</sup>、硫酸化は CCK の薬理的活性には不可欠である。そのほかにも抗凝血ペプチドである hirudin<sup>18)</sup> や高血圧症治療薬である minoxidil<sup>1)</sup> も硫酸化により活性化される。それゆえに、PST はフェノール性化合物や tyrosine 含有ペプチドの活性化にいままでの役割とは異なる働きをしていると考えられる。しかしながら、硫酸化の生化学的あるいは薬理的役割が明らかになっているのは数例にすぎない。

一方、肝臓で抱合された化合物は、胆汁を経て腸管に達すると、腸内細菌により加水分解、還元あるいは再抱合をうける場合がある。ほ乳類や植物由来の PST が広く研究されているのに反して、腸内細菌による硫酸化はほとんど研究されていなかった。下剤である sodium picosulfate は、それ自身では薬効を示さないが、経口投与後に徐々に薬効を発揮する薬物である。Picosulfate の効果は動物種により異なり、またヒトで抗生物質の連続投与により薬効がなくなることから、この薬理作用には腸内細菌由来の酵素による代謝が必要であると推定されていた。検索の結果、ヒト腸内優性菌 *Eubacterium* が硫酸転移酵素を産

生していることを発見した<sup>19)</sup>。実際、この酵素はpicosulfateから薬効本体であるphenol体へ反応を触媒した<sup>20)</sup>。さらに、従来から知られているPSTの硫酸供与体がPAPSであるのに対して、この硫酸転移酵素はPAPSを硫酸供与体としない新しいタイプの硫酸転移酵素 arylsulfate sulfotransferase (ASST, EC. 2.8.2.22)であることが明かとなった<sup>21,22)</sup>。この酵素により触媒される硫酸転移反応は、ping pong bi bi mechanismであり、組織由来のPSTとは明かに異なっていた<sup>21,22)</sup>。

また、すでにこのASSTはフラボンやタンニン類のポリフェノールの水酸基を位置特異的に硫酸化することを報告している<sup>23-25)</sup>。これらのポリフェノールは植物界に広く分布しており、食品や和漢薬成分として摂取、吸収されれば、肝臓で抱合をうけると推察されてきた。しかし、肝臓で硫酸抱合をうけた後、胆汁に排泄されると腸内細菌由来の酵素により他のフェノール性化合物に硫酸基が転移することやさらに硫酸化されることも考えられる。また、摂取したポリフェノールの配糖体はヒトの消化酵素で加水分解されにくいいため、腸管下部に達する。それゆえ、細菌性ASSTはこれらポリフェノールの硫酸抱合体の生成にも重要な役割を果たしているのではないかと考えられる。

さらに、sulfataseのメカニズムとして、Fendlerはフェノールエステルの硫酸基の加水分解の一次速度定数とそのフェノールのpKaとの間に直線関係があることを報告している<sup>26)</sup>。このことより、硫酸供与体のpKaが硫酸転移酵素の活性に影響している可能性が考えられる。また、一般に基質に対する酵素の親和性は反応溶液のpHの影響をうけると報告されている<sup>27)</sup>。我々は硫酸受容体基質の違いにより、ASST活性のpH profileが異なることを報告している<sup>21)</sup>、さらに基質のpKaの違いとASST活性の関係を研究する必要があると考える。

先に記したようにヒトの脳や血小板由来のPSTはその基質特異性からmonoamine sulfating PST (M-PST)とphenol sulfating PST (P-PST)の2種に分類されている。また、この2種のPSTは特異的阻害剤であるdichloronitrophenolに対しての感受性が異なることも知られている<sup>28)</sup>。ヒト脳のM-PSTとP-PSTの反応機構の実験より、最終産物である3'-adenosine 5'-phosphate (3',5'-PAP)とPAPSの類似体であるATPが本酵素活性を競合的に阻害することが報告されている<sup>29)</sup>。また、ヒト赤血球中にはPSTの内因性阻害剤が高分子体と低分子体として存在することが示されている。このうち、高分子のものは、PAPS分解酵素であり<sup>30)</sup>、低分子はATPやADP、3',5'-PAPのようなPAPSの構造類似体である<sup>31)</sup>。このように、組織由来のPSTでは、特異的阻害剤が発見され、また、内因性の阻害物質も見つかっており、これらの化合物による酵素活性の生体内制御機構も考えられているが、腸内菌由来のASSTに関しては、特異的な阻害物質あるいは活性化物質はまだ見つかっていない。

今回、ASSTの生化学的性質を研究するために、抗体カラムを用いて精製方法の簡便化を試み<sup>32)</sup>、第一章に結果を記した。また、種々の薬物や内因性物質、ペプチド、生薬成分に含まれる配糖体の酵素的硫酸化を行い、硫酸化による薬理活性の変化やチロシン残

基の硫酸化による生化学的变化を検討し、二ヶ以上のフェノール性残基を持つdopamineやesculetinについては酵素的硫酸化体の構造決定を行った<sup>33,34)</sup>。以上のことを第二章に詳述した。さらに、基質であるフェノール性化合物のpKa値と硫酸化活性の相関を求め<sup>35)</sup>、第三章に記した。本酵素の活性調節物質を調べるために、本研究では阻害物質の検索と金属イオンやヌクレオチドの影響を検討し<sup>36)</sup>、第四章に示した。またラット腸内菌*Klebsiella*よりも、硫酸転移酵素を分離しえたので、その硫酸化反応機構を検討し<sup>37)</sup>、第五章に示した。

## 第一章 酵素の抗体カラムによる精製

これまでに試みられてきた本酵素の精製法<sup>22)</sup>は、数種のカラムクロマトグラフィーの組み合わせによるものであったが、繁雑で時間がかかるため活性の低下が著しく、単一蛋白までに精製することも難しかった。そこで、精製酵素をウサギに投与して抗体を得、この抗体を用いてアフィニティーカラムを作製し、酵素精製を試みた。

### 1-1 実験材料および実験方法

#### 実験材料

*p*-Nitrophenyl sulfate (PNS)、4-methylumbelliferyl sulfate (MUS)および牛血清アルブミン(BSA)はSigma Chemicalより購入した。Tyramine はナカライテスクより、4-chloro-1-naphthol は和光純薬工業より購入した。

#### 酵素の調製

*Eubacterium* A-44を嫌氣的に培養後、集菌、超音波破碎、DEAE-Cellulose、Hydroxyapatite、Sephadex S-300 カラムクロマトグラフィーにより部分精製した<sup>22)</sup>。

#### 酵素活性測定法

酵素活性は、PNSを硫酸供与体としtyramineを硫酸受容体として測定した。反応液は、50 mM PNS 30  $\mu$ l、20 mM tyramine 0.29 ml、0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 0.21 mlにASST 0.1 mlを加え、37°Cで15分間反応させ、1 N NaOH 0.4 mlで反応を停止後、405 nmの吸光度を島津UV-160で測定した。蛋白定量は、Lowryらの方法に従い、BSAを標準として求めた<sup>38)</sup>。

酵素1 unitは、上記条件で1分間に1  $\mu$  molの*p*-nitrophenolを生成する酵素量として示した。

#### 抗体の調製法

部分精製ASST (2 mg)をFreund's complete adjuvant (和光純薬工業)に懸濁後、ウサギ(日本白色種、♂、2 kg、SLC)の10箇所筋肉内注射した。この投与は1週間に1回、4週間続けて行った。抗原の投与終了1カ月後に血液を耳の静脈より100 ml採取した。この血液を30分間室温放置し、血餅を除き、一晚4°Cで保存した。さらに、遠心分離(3,000 rpm、5分間)し血清を集め、この一部を硫酸沈殿(0~33%飽和)後、DEAE-celluloseカラム(column size 28×70 mm)にかけ、10 mM NaCl/10 mM phosphate buffer, pH 7.2で溶出し、IgG画分を得た。

#### 抗体の定性法

直径2 mmのキャピラリーに抗血清を8~10 mm入れ、その上に抗原(ASST)を重層した。室温で30~90秒反応後に沈降線の有無を観察した。

#### 抗体価の定量法

Phosphate-buffered saline (PBS, 10 mM phosphate buffer, pH 7.5/120 mM NaCl)に抗原(ASST, 0-30  $\mu$ g)を溶かした溶液0.45 mlと、50  $\mu$ lの抗血清を37°Cで1時間、さらに4°Cで72時間反応した。2,000 g、5分間遠心後、沈殿をPBSで洗い、0.1 mlの0.1 N NaOHに溶解して、蛋白量を測定した。

#### ラット肝臓由来フェノールスルフォトランスフェラーゼ(PST)の調製

ラット肝臓cytosol由来PSTを、Sekuraらの方法に従って<sup>7)</sup>、部分精製した。ラット(Wistar, ♂, 10週齢, SLC)の肝臓(6.72 g)を取り出し脱血後、3倍量の0.25 M sucroseでホモゲナイズし、14万gで90分間超遠心した。遠心後、上に浮いているlow density materialを吸引除去した後、上清を集めた。この上清をAffi-gel Blue (Econo-Pac Blue Cartridge, 5 ml, Bio-Rad)カラムクロマトグラフィーで分画した。

#### ラット肝臓由来PST酵素活性測定法

PSTの酵素活性は、Sekuraらの方法に従って<sup>7)</sup>、以下の通り行った。0.5 M acetate buffer (pH 5.5) 200  $\mu$ l, 0.1 M  $\beta$ -mercaptoethanol 30  $\mu$ l, 5 mM  $\beta$ -naphthol(硫酸受容体) 20  $\mu$ l, 4 mM PAPS 20  $\mu$ l, H<sub>2</sub>O 100  $\mu$ lに酵素30  $\mu$ lを加え、10分間37°Cで反応後、Methylene blue Reagent (250 mg methylene blue, 50 g anhydrous sodium sulfate, 10 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/1 L)を500  $\mu$ l加えて反応を止め、chloroform 2 mlを加えて攪拌、遠心後、無水硫酸ナトリウムを加え、有機層の吸光度を651 nmで測定した。

#### イムノブロッティング

SDS-PAGE(10% polyacrylamide)を行った後、ゲルを半分に切った。片方はquick-CBB(和光純薬工業)で蛋白染色した。残りのゲルを室温でTG buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3)中で30分間振盪した後、Zeta-Probe (Bio-Rad)膜上へ、200 mA、4時間でブロッティングした。ブロッティング後のゲルはCBB染色を行い、ゲルに蛋白が残留していないか確認した。

ブロッティング後、Zeta-Probe膜は3% BSAを含むPBS中でブロッッキングし、免疫染色を行った。染色には、Vectastain ABC kit (Vector Laboratories)を用い、添付の説明書に従って行った。ペルオキシダーゼの基質には4-chloro-1-naphtholと過酸化水素水を10 mM phosphate buffer pH 7.5に溶解したものをを用いた。

#### 抗体カラムの作製

精製したAnti-ASST IgG 30 mgと0.1 M HEPES buffer, pH 8.0に懸濁したAffi-Gel 10 (Bio-Rad) 5 mlを4°Cで12時間攪拌した。1 M ethanolamine(pH 8.0)を0.2 ml加え、さらに4°Cで1時間攪拌することにより反応を止めた。その後ゲルをガラスフィルターで濾過し、カップリングの効率を確認するために口液の蛋白定量を行った。さらに、ゲルを0.1 M HEPES buffer, pH 8.0で洗浄し、0.2 M phosphate buffer, pH 7.2で洗浄し、平衡化して保存した。

ASSTの抗体カラムによる精製では、DEAE-cellulose溶出後のcrude ASST(0.631 unit/mg protein, 2.25 mg)を用い、10 mM phosphate buffer pH 8.0で透析後、IgG-coupled



Affi-Gel 10と混合し、4°C一晩攪拌した。反応後、ゲルをdisposable columnに移し、10 mM phosphate buffer pH 8.0で洗浄後、0.1 M glycine-HCl buffer, pH 3.3で溶出した。溶出後、サンプルは直ちに0.2 M phosphate buffer, pH 7.2で中和した。活性を示すフラクションを集めUltrascent-30(東ソー)で濃縮した。

## 1-2 実験結果

### 1-2-1 ポリクローナル抗体の調製

免疫に使用した部分精製ASST (26.2 unit/mg protein)は、SDS-PAGEにより、サブユニット分子量80 kDaで、90%以上の純度であった。Fig. 1に示したように、native-PAGE後活性染色をしたところ、単一バンドのみ検出できた。この活性バンドはCoomassie Brilliant Blue(CBB)で染色した蛋白のバンドと一致した。

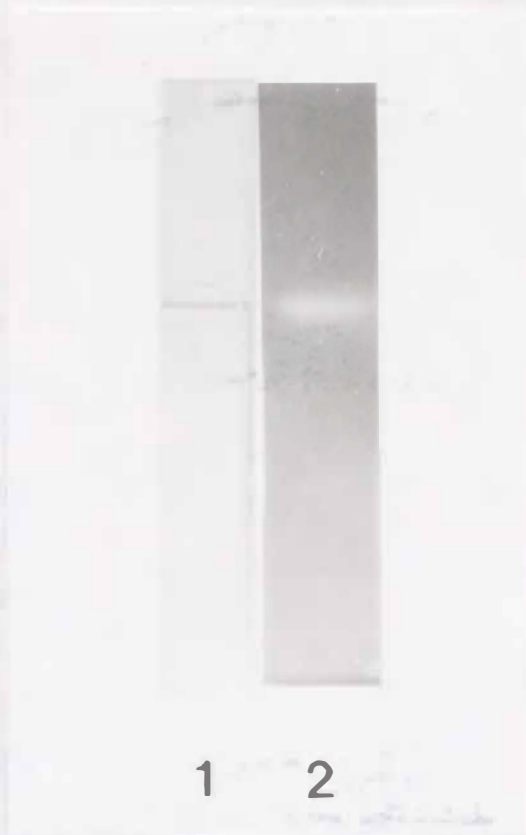


Fig. 1. Electrophoretic Analysis of Enzyme.

By using polyacrylamide (6.5%) slab gel (1 mm thickness) containing 0.1 mM MUS, ASST was specifically identified as a fluorescent band after incubation of the gel with 5 mM tyramine in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0). Protein was stained Quick-CBB. Lane 1 shows the CBB-stained gel and lane 2 shows fluorescence.

ウサギを免疫後、血清を採取し、重層法により、抗原溶液と抗血清の境界部分に沈降線が観察され、目的の抗体が得られていることを確認した。

抗原に対する抗体価をみるため、定量的沈降反応を行った。その結果、Fig. 2に示したように、抗血清50  $\mu$ lに対して、抗原量10-15  $\mu$ gで等量域に達した。

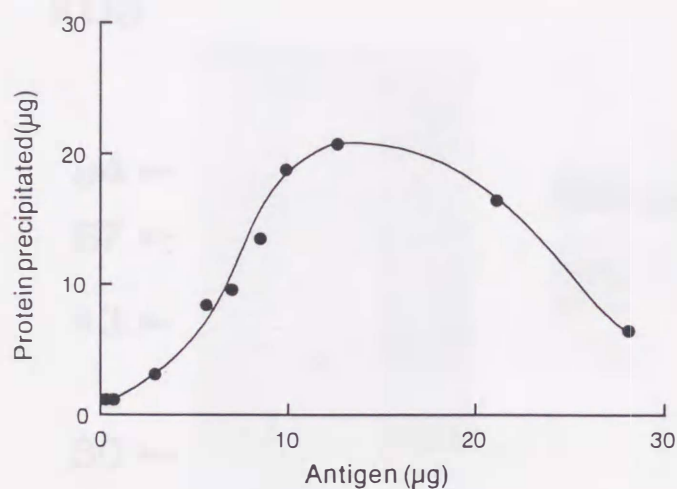


Fig. 2. Immunoprecipitation of Antiserum and ASST.

A reaction mixture contained 50  $\mu$ l of anitibody, PBS and ASST(1 mg/ml). The mixture was incubated for 1 h at 37°C and for 72 h at 4°C.

50  $\mu$ lの抗血清存在下、ASST(20  $\mu$ g, 1 mg/ml)の酵素活性は影響を受けなかった。抗血清を硫酸沈殿、DEAE-celluloseカラムクロマトグラフィーにて精製し、ASSTに対するポリクローナル抗体を得た。

ASSTとラット肝臓由来のPSTとの交差性を検討するために、免疫染色を行った。初めに、ラットPSTを部分精製し、Affi-Gel Blue (Bio-Rad)分画後の比活性はPAPSと $\beta$ -naphtholを基質とし、pH 5.5で測定したとき、106.8 nmol/min/mg proteinであった。Fig. 3に示したように、粗酵素と部分精製したASSTは、IgGにより認識され(lane 4と5)、移動度はCBB染色された蛋白のバンド(lane 1と2)と同じであった。抗体が均一のものでなかったため、ASSTのsubunit分子量(80 kDa)に相当しない蛋白がlane 4と5で免疫染色された。しかし、ラット肝臓由来のPST(subunit分子量：約34 kDa)は抗ASST IgGで認識されなかった(lane 6)。これらのことより、ASSTとラット肝臓由来のPSTの間には交差性がないことが明かとなった。



Fig. 3. Western Blot of ASST and Rat Liver PST with Polyclonal Anti-ASST Antibody.

Lanes 1-3 show CBB-staining of gels and lanes 4-6 show Western blots: 1 and 4, DEAE fraction of ASST; 2 and 5, purified ASST; 3 and 6, rat liver PST (106.8 nmol/min/mg protein). Molecular weight markers were phosphorylase b(94 kDa), BSA(67 kDa), ovalbumin(43 kDa), and carbonic anhydrase(30 kDa).

#### 1-2-2 アフィニティーカラムによる酵素精製

これまでの精製法をより簡便かつ精製度を高くするために、ウサギ抗ASST IgGと結合したアフィニティーカラムで酵素を特異的に吸着させ、溶出することを試みた。Fig. 4に示したように、DEAE-celluloseカラム分画後の酵素は、アフィニティーカラムに吸着し、0.1 M glycine-HCl buffer, pH 3.0で溶出することができた。SDS-PAGE後のCBB染色では単一バンドのみ検出された(Fig. 5)。アフィニティーカラム溶出後の酵素活性は、4.55 units/mg proteinであり、収率は4.9%であった。



### 1-3 考察

ASSTをウサギに投与して得た抗体は、ASSTの粗酵素と部分精製酵素のどちらにおいても免疫染色で、ASSTのsubunitである80 kDaのポリペプチドを認識した。この抗体は、他にもいくつかのポリペプチドを認識した。しかし、精製酵素のN末端アミノ酸解析より、1種類のアミノ酸配列しか検出されず、本酵素は4つの同一subunitからなる酵素であると考えられることより、抗体によりASSTとは関係のないポリペプチドが認識されていたことがわかった。また、この抗血清は、ASST活性を阻害しなかったことより、触媒部位ではない部位を認識していると考えられた。

今回行った*Eubacterium* A-44からASSTの精製法は、従来報告してきた方法より簡便であり<sup>21,22)</sup>、精製ステップを6から3に減らすことができた。また、アフィニティーカラムより溶出した蛋白はSDS-PAGEで単一となった。抗ASST IgGはいくつかのコンタミネーションしたポリペプチドを認識したが、これらのポリペプチドは今回の溶出条件ではカラムから溶出されなかった。しかし、アフィニティーカラムからの溶出を低いpHのbufferで行うため、酵素の比活性は上昇しなかった。このため、高塩濃度(0.5 M)のbufferでの溶出を試みたが成功しなかった。これらのことより、高い活性のASSTを得るためにはさらに溶出条件の検討が必要であると考えられた。

ほ乳類や植物由来のPSTのN末端アミノ酸は、メチオニンであり、そのアミノ酸配列の中には4つのよく保持された部位があり、subunit分子量は30~40 kDaであることが報告されている<sup>6,11,39,40)</sup>。ヒト血小板由来のM-PSTの抗体は、P-PST(subunit分子量 32 kDa)とM-PST(subunit分子量 34 kDa)の両方を認識している<sup>41)</sup>。これと同様の酵素がヒト肝臓細胞質にも存在する<sup>42)</sup>。しかし、今回の実験で、ASSTのN末端アミノ酸はセリンであることが明かとなり、抗ASST抗体はラット肝臓PSTを認識しなかった。これらのことより、細菌由来のASSTは、他のPSTと比べて、酵素の触媒機構が異なるだけでなく、蛋白構造もかなり異なると推定された。PSTは体内において、種々の薬物の代謝や発癌物質の活性化に寄与している<sup>43)</sup>。腸内菌由来のASSTも、組織由来のPSTとは異なる制御を受け、薬物や内因性物質の硫酸抱合に重要な役割を果たしているかも知れない。

## 第二章 フェノール性化合物の酵素的硫酸化

組織由来のPSTは、その基質特異性によりM型とP型に分類されていることから、この細菌由来のASSTの基質特異性を明らかにするために、種々の薬物や内因性物質、ペプチド、生薬成分に含まれる配糖体の酵素的硫酸化を試みた。このうち、dopamineとesculetinの酵素的硫酸化物についてはその構造解析を行った。さらに、硫酸化により、その薬理活性が変化しているかをtyramineやLeu-enkephalinについて検討した。また、ペプチドは体内においてプロテアーゼにより代謝されるが、ペプチド中のチロシン残基の硫酸化がこのプロテアーゼによる消化に影響を及ぼすか否かを検討した。

### 2-1 実験材料および実験方法

#### 実験材料

Chymotrypsin、aminopeptidase、carboxypeptidase、pronase、esculin、esculetin、rutin、quercetinはSigma Chemicalより購入した。Dopamine-HCl、baicalin、baicaleinは和光純薬工業より購入した。Kyotorphinはフナコシより購入した。Leu-enkephalinは森川博士（富士薬品工業）より分与された。Leu-enkephalin-O-sulfateとkyotorphin-O-sulfateはさきの報告<sup>22)</sup>に従って酵素的に生成した。

#### 酵素の調製

酵素は、第一章に示した方法に従って部分精製した<sup>22)</sup>。

#### 酵素活性測定法

酵素活性は、前章に示したように硫酸受容体標品としてtyramineを用い、PNSを硫酸供与体として測定した。また、測定したい基質が水溶液中で黄色を呈している場合は、MUSを硫酸供与体として、反応で生じた4-methylumbelliferoneをex. 330 nm、em. 450 nmの蛍光で測定した（RF-500、島津）。蛋白定量は、前章に示した方法で行った。

#### 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

ASST(2 mg)により硫酸化した化合物やプロテアーゼ消化して生じたアミノ酸のフラグメントは逆相系カラム(Microsorb (RAININ), Develosil (Nomura))をつけたHPLC (Gilson)で分離同定した。

#### Dopamine-O-sulfateの合成法

Dopamine-4- と-3-sulfate esterは Harbesonらの方法<sup>44)</sup>に従って合成した。Dopamine-4-sulfate esterは文献の1/20のスケールで合成し、収率は14.1% (5.21 mg)であった。Dopamine-3-sulfateは一部分方法を変えて以下の通り合成した。反応溶媒としてDMF 4.5 ml を用い、dopamine塩酸塩〈I〉 900 mg (10.5 mmol) に、triethylamine 0.657 ml (10.5 mmol) を加え溶解した後氷冷しながら、benzylchloroformate 3.33 ml

(0.66 ml x 5, 30分毎)加え、4時間反応後、ろ過 (triethylamine塩除去) し、ethylacetate を加え、1 N HCl で3回洗い、有機層を濃縮し、無色のオイルを得た。このオイルを EtOAc - hexane で結晶化し、N-carbobenzyloxy-dopamine <II> を866.9 mg得た (収率 64.3%)。つぎに <II> 300 mg (1.05 mmol)をDMF 3 mlと *tert*-BuOK 200 mg (40 mg x 5) に溶かし、benzyl bromide 0.17 ml (0.57 ml x 3, 30分毎, 1.43 mmol)を滴下し、6時間 反応した。反応後、ether - 1 N HClで3回洗浄後、ether層を濃縮、シリカゲルカラム (silicic acid 1.5 g + Merck saulen 1.5 g, 1.6 i.d. x 33 mm)で分離後、シリカゲルTLC (Slica gel plate, Merck 60F254, 0.5 cm, 20 x 20 cm)でCHCl<sub>3</sub>を溶媒として用いて精製し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - hexaneで再結晶し、N-carboxybenzyloxy-4-benzyl-dopamine <III> の結晶44.3 mgを得た(収率11.2%)。<II> → <III> の操作を3回行った。さらに、<III> 91.6 mg (0.24 mmol)をTHF 15.5 mlに溶かし、pyridine-SO<sub>3</sub> complex 386.4 mg (Aldrich, 243 mmol) を加え、14時間反応した。その後、上清を濃縮 (THFの除去)し、TLCで20% MeOH-CHCl<sub>3</sub>を溶媒として用いて精製した <IV>。この操作を3回行った(収率36.9%)。ついで、<IV> 85.6 mg(0.187 mmol)に dry MeOH 2.8ml、ammonium formate 250 mg(3.97 mmol)、10% palladium carbon 140 mgと acetic acid 39.2 μl を加えて1時間反応後、吸引ろ過(Pd-C除去)、濃縮し、H<sub>2</sub>O - EtOHで再結晶し、dopamine-3-sulfate <V> の結晶 1.5 mgを得た(収率 3.4%)。

得られたDopamine-4-sulfateおよびdopamine-3-sulfateのIR (KBr)、NMR、Mass分析結果は、文献値<sup>44)</sup>と一致した。

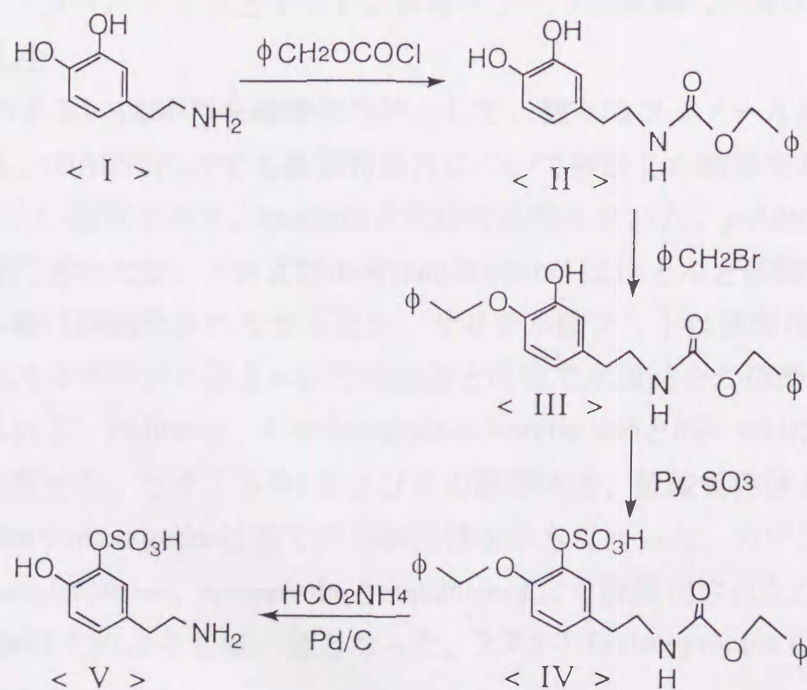


Fig. 7. Synthesis of Dopamine-3-sulfate

## 薬理実験法

Tyramineとtyramine-O-sulfateの交感神経終末からのnorepinephrine遊離を介する作用を、ラット(Wistar系、♂、200 g、SLC)の心臓を用いて、Johanssonの方法<sup>45)</sup>に従って測定した。

Leu-enkephalinとその硫酸体の、モルモット(♂、200 g、SLC)の回腸縦走筋電気刺激後のacetylcholine遊離による収縮作用をKosterlitzらの方法<sup>46)</sup>により測定した。

### Esculetinの酵素的硫酸化とその硫酸化物の分離と同定

Esculetinは、10% dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した。10 mM esculetin 60 ml、50 mM PNS 4 ml、0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0 60 mlとASST (162 units) 26 mlを含む反応液を48時間、37°Cで反応した。反応は、逆相系HPLC (Chemcosorb 7-ODS-H, column size 4.6 x 150 mm, ChemcoとLC-6A, Shimadzu) を用い、10% methanol/0.1% trifluoroacetic acidを溶出溶媒として確認した。

反応後、蛋白を除くためにDiaflo-PM25 (Amicon) で限外ろ過し、凍結乾燥した。乾燥残渣を、25 ml 純水に溶解しSephadex LH-20 column (2.8 x 77 cm, Pharmacia) にかき、純水で溶出した。反応物は280 nmの吸収と蛍光強度(ex. 365 nm, em. 455 nm)を測定することにより検出した。

Esculetinの硫酸化体は、NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>溶液, JNM-GX 400 spectrometer, JEOL)とFAB-MS (JMS-SX 102 spectrometer, JEOL)を測定し、同定した。

## 2-2 実験結果

### 2-2-1 カテコールアミンとチロシン含有ペプチドの硫酸化と薬理的性質 基質特異性

PNSあるいはMUSを硫酸供与体として、種々のフェノール性薬物およびペプチドホルモンのASSTに対する基質特異性について検討した結果をTable 1 に示した。Phenolはよい基質であり、tyramineと同程度硫酸化された。*p*-Acetamidophenolはすばやく硫酸化されたが、*o*-および*m*-acetamidophenol はほとんど硫酸化されなかった。サリチル酸は硫酸化されなかったが、サリチル酸アミドは硫酸化されたことより、フリーのカルボキシル基と*o*-位の水酸基との間で水素結合が硫酸化を妨害するものと考えられる。Naloxone、5-hydroxyindole-3-acetic acidとfolic acidはわずかながら受容体活性を認めた。ビタミンB<sub>6</sub>およびその誘導体は、硫酸受容体とはならなかった。Tetracyclineやminocyclineは全く受容体活性を示さなかった。カテコールアミン類の中では、norepinephrine、epinephrineとdopamineはよく硫酸化されたが、dopaやoctopamineはそれよりも低い値となった。3,3',5-Triiodothyronine (T<sub>3</sub>) はthyroxine (T<sub>4</sub>) よりも硫酸化され易いことから、5'位のヨウ素がフェノール性水酸基の硫酸化の障害となるためであると考えられる。



Table 1. Substrate Specificity

Acceptors	Activity (%)	Acceptors	Activity (%)
Phenol	101	Tetracycline	0 <sup>a)</sup>
Acetamidophen		Minocycline	0 <sup>a)</sup>
<i>o</i> -Acetamidophenol	3	Tyramine	100
<i>m</i> -Acetamidophenol	1	Norepinephrine	106
<i>p</i> -Acetamidophenol	129	Epinephrine	91
Salicylic acid	0	Dopamine	170
Salicylamide	14	Dopa	27
Naloxone	5	Octopamine	17
5-Hydroxyindole-3-acetic acid	6	Phenylephrine	1
Pyridoxin (VB <sub>6</sub> )(0.8 mM)	0 <sup>a)</sup>	Thyroxine (T <sub>4</sub> ) (0.16 mM)	2
Pyridoxal (0.8 mM)	0 <sup>a)</sup>	3,3',5-Triiodothyronine (T <sub>3</sub> )	36
Pyridoxal phosphate (0.8 mM)	0 <sup>a)</sup>	(0.16 mM)	
Pyridoxamine (0.8 mM)	0 <sup>a)</sup>	Serotonin	100
Folic acid (5 mM)	2 <sup>a)</sup>		

Specific activity of the enzyme was 5.21 U/mg protein in a PNS-tyramine system, which was taken as 100%. Final acceptor concentrations were 9.2 mM except VB<sub>6</sub> derivatives, folic acid, T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> whose final concentrations were indicated in parentheses. a) The activities were measured fluorometrically using MUS as a donor.

Dopamineを硫酸受容体、PNSを硫酸供与体としてASSTの酵素反応を行ったときのHPLCパターンをFig. 8に示した。反応開始後2時間では、dopamine-O-sulfateの大小2つのピークが生成した。この2つのピークの生成比はretention timeの短い方が、85%で、長い方が、15%であった。この2つのピークが、3位、4位いずれが硫酸化されたものであるかを検討するため、これら化合物の有機化学的合成を行った。この合成した硫酸化体と酵素反応生成物をHPLCで同定したところ、85%のピークがdopamine-4-sulfateと一致し、dopamineでは、酵素的に4位すなわち*p*-位が硫酸化されやすいことを確認した。さらに、dopamine-3-sulfateとASSTを他の受容体非存在下で反応したところ、dopamine-4-sulfateが生成した。これらのことより、*m*-位の硫酸基は酵素により、直ちにdopamineの*p*-位に分子内転移することが示唆された。

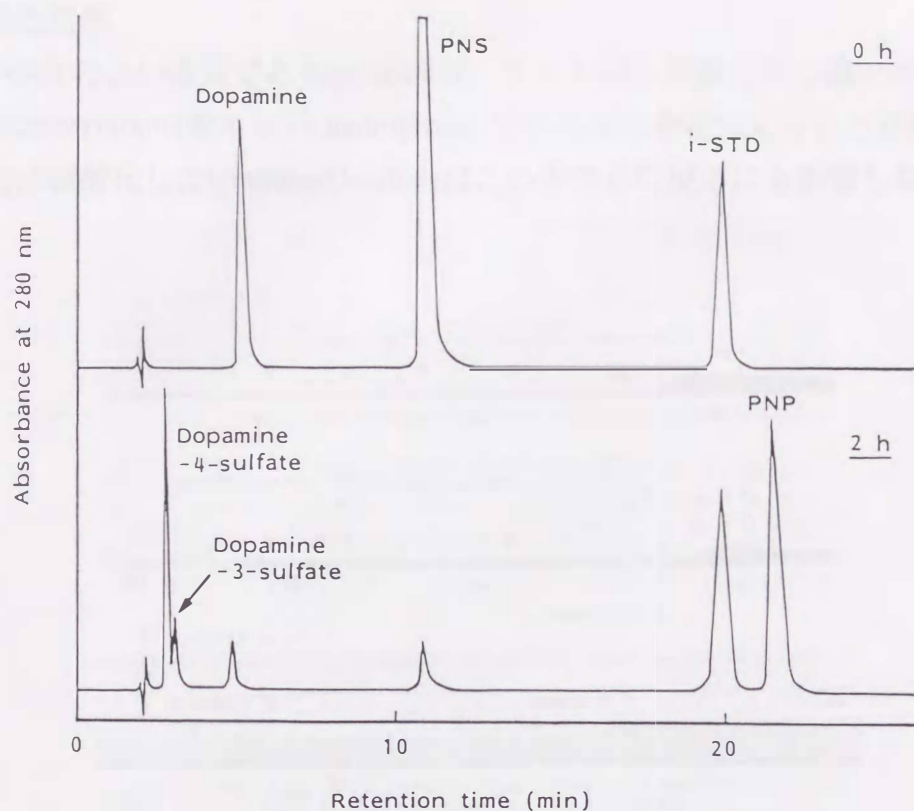


Fig. 8. HPLC Chromatograms of Sulfated Dopamine

HPLC conditions: column, Microsorb C-18 5  $\mu$  m (4.5 x 250 mm); solvent, 10% MeOH/0.1% TFA; flow rate, 1.0 ml/min; wavelength, 280 nm. A reaction mixture contained 0.1 ml of 5 mM dopamine, 0.1 ml of 5 mM PNS, 0.2 ml of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) and 0.2 ml of enzyme (5.21 U/mg protein, 50  $\mu$  g). After incubation of the reaction mixture at 37°C for 2 h, 90  $\mu$  l of a reaction mixture and 10  $\mu$  l of 5 mM tryptophan (i-STD) were injected into HPLC.

硫酸受容体として、CCK-8、kyotorphin、Met-enkephalinとLeu-enkephalinを用いて、PNSと6時間酵素反応後、HPLCパターンより収量を求めTable 2に%で示した。鎮痛性ペプチドであるenkephalinは非常によく硫酸化された。また、kyotorphinとCCK-8も硫酸化され、反応24時間後にはそれぞれ51%、84%硫酸化された。

Table 2. Substrate Specificity (Peptides)

Acceptors	Amino Acid Sequence	Yeild (%)
Kyotorphin	YA	28.6
CCK-8	DYNGWMDF-NH <sub>2</sub>	31.3
Met-Enkephalin	YGGFM	96.1
Leu-Enkephalin	YGGFL	98.1

Yeild (%) was calculated by HPLC analysis after 6 hr incubation at 37°C.

## 薬理学的活性

ASSTのよい基質であるtyramineは、ラットより単離した心臓のnorepinephrine依存性のchronotropic(変時性)とinotropic(変力性)の反応を増強することが知られている。酵素的に硫酸化したtyramine-O-sulfateはこのどちらの反応にも影響しなかった(Fig. 9)。

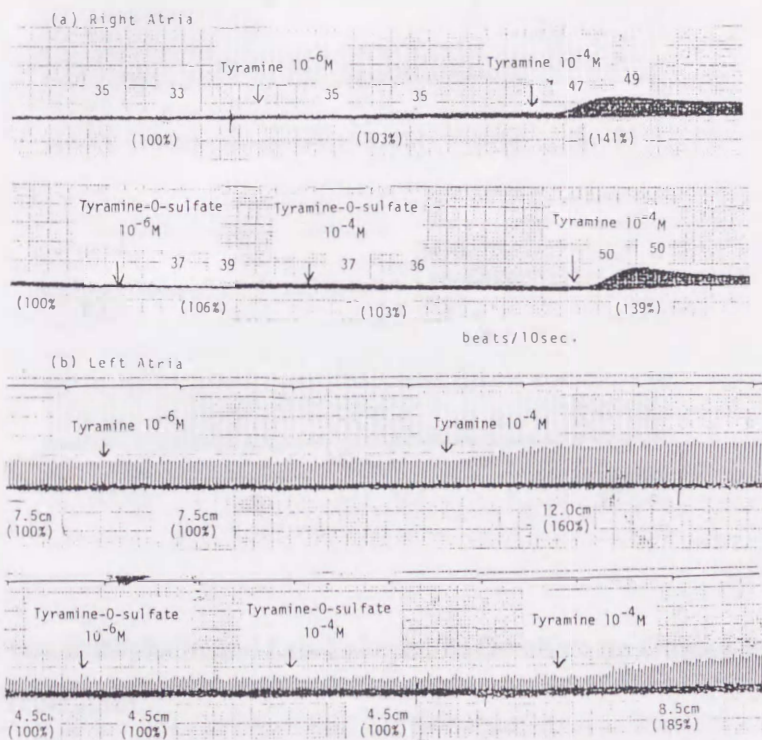


Fig. 9. Effects of Tyramine and Tyramine-O-sulfate on Chronotropic and Inotropic Responses.

The rat was killed by scaffold and the heart was removed rapidly. (a) The right atria contracted spontaneously and were used to chronotropic responses. (b) The left atrial preparations, indicating inotropic effects (measured as contraction amplitude (cm)), were driven at 0.5 Hz by electrical field stimulation.

さらに、dopamine-4-sulfateについて、本学和漢薬研究所生物試験部門にbinding assayによる活性測定を依頼したところ、 $[^3H]$ sipiperoneとのreceptor competitionは $10^{-3} M$  dopamine-4-sulfateでも認められないとの報告であった。

Leu-Enkephalinの硫酸化の影響を、モルモット回腸縦走筋に電気刺激を与え、acetylcholine遊離による収縮作用で測定した。 $3 \times 10^{-7} M$  enkephalinで46%抑制された標本は、 $10^{-5} M$  enkephalin-O-sulfateで約12%回復した(Fig. 10)。さらに、 $10^{-3} M$  enkephalin-O-sulfateで上昇した収縮力は $2 \times 10^{-7} M$  enkephalinによって抑制されたことから、enkephalin-O-sulfateによってopiate性ではない何らかのアセチルコリンの遊離がみられると考えられた。これらのことより、enkephalin-O-sulfateはenkephalinのアンタゴニストではないことが示唆された。

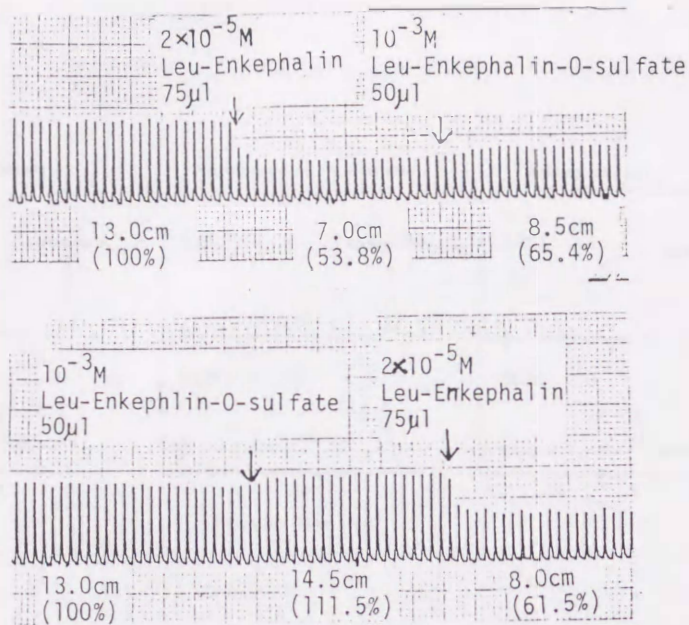


Fig. 10. Effects of Leu-Enkephalin and Leu-Enkephalin-O-sulfate on Guinea-Pig Ileum Longitudinal-Myenteric Plexus Preparation.

The inotropic effects were driven at 0.1 Hz by electrical field stimulation. Square wave pulses of 1 V and 1 msec were delivered to platinum electrodes on muscle holder.

つぎに、kyotorphinとその硫酸化体の薬理活性については、簡便な方法が得られなかったため、kyotorphinのアミノペプチダーゼ阻害作用を検討した<sup>47)</sup>。ASSTを用いて硫酸化したkyotorphin-O-sulfateをHPLCで分取後、凍結乾燥し標品として使用した。アミノペプチダーゼ活性は、Leu-enkephalinを基質として用い、HPLCで解析した(Fig. 11)。Kyotorphinとkyotorphin-O-sulfateは、それぞれアミノペプチダーゼと30分間 preincubationした後、Leu-enkephalinを加え、6時間後と24時間後に基質の減少を測定し、Table 3にまとめた。この結果、33  $\mu$ M kyotorphinは約50%の阻害作用を有したが、kyotorphin-O-sulfateは、アミノペプチダーゼ活性を全く阻害しなかった。このことより、kyotorphinは、硫酸化によりアミノペプチダーゼ阻害作用を失うことが明らかになった。

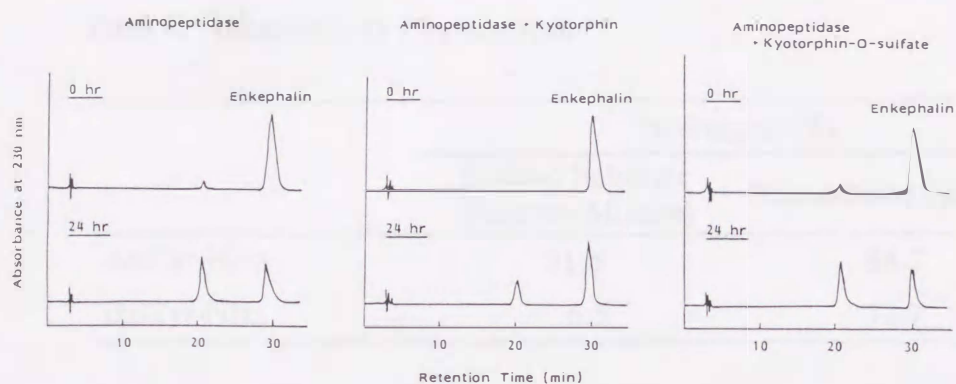


Fig. 11. Effects of Kyotorphin and Kyotorphin-O-sulfate on Enkephalin Degradation by Aminopeptidase.

Aminopeptidase (Leucine aminopeptidase, Cytosol, from Porcine kidney Type III-cP (Sigma))  $0.1 \mu\text{g}$  (200 U/mg protein) was used for each measurement. Final concentrations of Kyotorphin and Kyotorphin-O-sulfate were  $3.3 \times 10^{-5}$  M. A final concentration of Enkephalin was  $3.3 \times 10^{-4}$  M.

Table 3. Effects of Kyotorphin and Kyotorphin-O-sulfate on Enkephalin Degradation by Aminopeptidase.

Addition	Enkephalin Degradation (%)	
	6 h	24 h
Aminopeptidase	28.8	41.3
Aminopeptidase + Kyotorphin	10.8	20.0
Aminopeptidase + Kyotorphin-O-sulfate	22.6	43.6

### プロテアーゼに対する感受性

体内において、生理活性ペプチドは種々のプロテアーゼによって加水分解され、不活性化される<sup>56)</sup>。しかしながら、これらペプチド中のチロシン残基が硫酸化され

るとプロテアーゼに対する抵抗性が上昇するものと考えられる。このことより、enkephalin-O-sulfateおよびkyotorphin-O-sulfateを種々のプロテアーゼによって処理した。

まず、合成基質であるAc-Tyr-NH<sub>2</sub>とBz-Tyr-NH<sub>2</sub>を酵素的に硫酸化し、キモトリプシンで処理した。Table 4に示したように硫酸化によって、Ac-Tyr-NH<sub>2</sub>とBz-Tyr-NH<sub>2</sub>の分解率は、それぞれ1/2と1/10に減少した。

Table 4. Hydrolysis by Chymotrypsin

2	Hydrolysis (%)	
	Sulfated Substrate (Reaction Mixture)	Non-sulfated Substrate
Ac-Tyr-NH <sub>2</sub>	31.5	58.2
Bz-Tyr-NH	6.5	72.7

1.11 M Ac-Tyr-NH<sub>2</sub> was enzymatically sulfated in the presence of PNS, and the sulfated product was hydrolyzed by the addition of 1 mg of chymotrypsin (62 U/mg protein) for 24 h at 37°C. 1.11 M Ac-Tyr-NH<sub>2</sub> was hydrolyzed under the same conditions. 0.42 M Bz-Tyr-NH<sub>2</sub> was enzymatically sulfated by the addition of 0.5 mg of chymotrypsin (62 U/mg protein) for 24 h at 37°C. 0.42 M Bz-Tyr-NH<sub>2</sub> was hydrolyzed under the same conditions.

次に、enkephalinとenkephalin-O-sulfateをキモトリプシン消化した。その結果、Fig. 12に示したように、enkephalinは加水分解をうけ、retention time 4分にtyrosine、6分にleucine、12分にGly-Gly-Phe、20分にTyr-Gly-Gly-Phe残基と推定されるピークがみられた。Enkephalin-O-sulfateも加水分解をうけ、retention time 7分にLeucine、9分にTyr(OSO<sub>3</sub>H)-Gly-Gly-Pheと考えられるピークが検出されたが、12分、20分のピークは認められないのでTyr(OSO<sub>3</sub>H)-Gly結合は切断されないと推察した。またenkephalin分解酵素としてよく知られているアミノペプチダーゼ消化を試み、その結果をFig. 13に示した。Leu-Enkephalin-O-sulfateを基質とした時には、Leu-enkephalin消化で用いた酵素の10倍量を用いて初めてわずかな分解が認められた。この分解率は、非硫酸化体の約1/40であった。また、Leu-enkephalinは加水分解によりN末のチロシン残基が切れ、Gly-Gly-Phe-Leuとなることをretention time 21分のピークを分取し、DABITC法によるN末端分析を行うことにより確認した。このテトラペプチドは、Leu-enkephalin-O-sulfate分解でも微量生成した。またこのとき、HPLCの溶出条件を変えることにより、Tyr(OSO<sub>3</sub>H)を確認した(溶出溶媒 5% MeOH/0.1% TFA)。

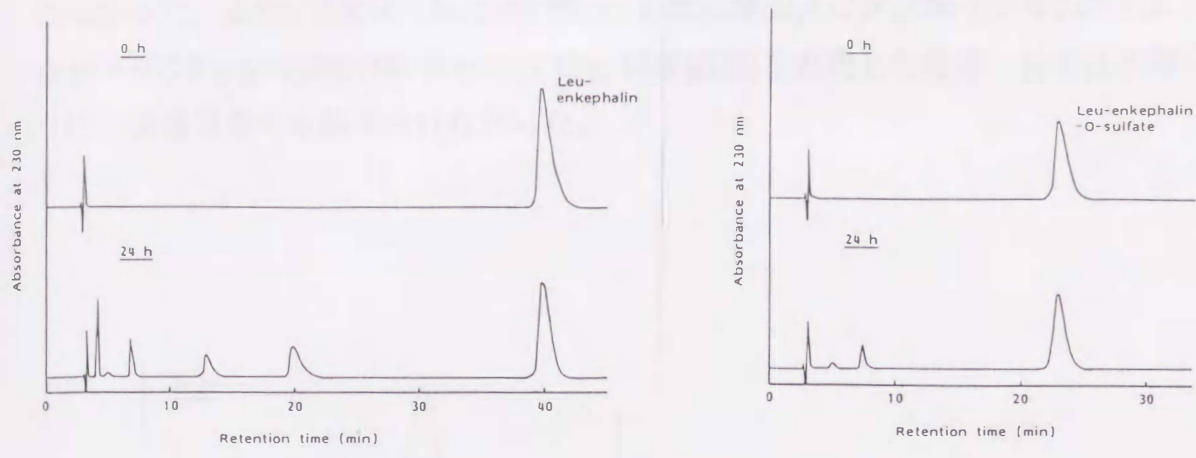


Fig. 12. Enkephalin and Enkephalin-O-sulfate Hydrolysis by Chymotrypsin

Chymotrypsin ( $\alpha$ -Chymotrypsin, Bovine Pancreas Type I-S, Sigma)  $2 \mu\text{l}$  (62 U/mg protein) was used for each measurement. Final concentrations of Enkephalin and Enkephalin-O-sulfate were 1.67 mM.

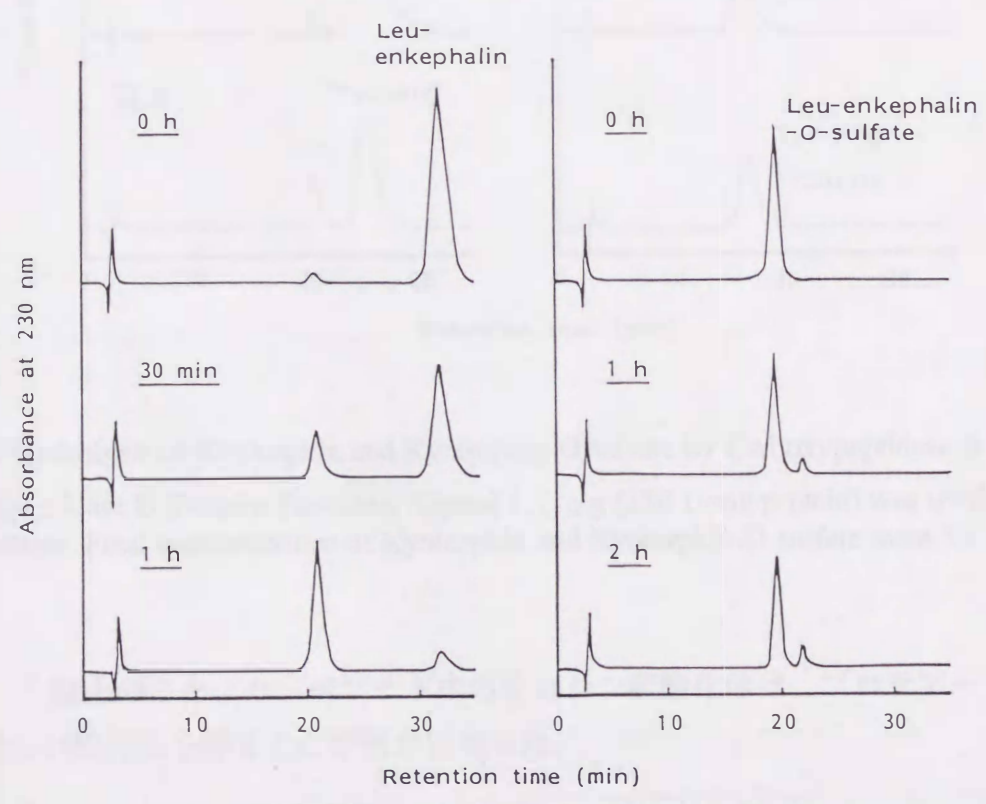


Fig. 13. Degradation of Leu-Enkephalin and Leu-Enkephalin-O-sulfate by Aminopeptidase.

Aminopeptidase (Leuconic Aminopeptidase, Cytosol, Porcine Kidney Type III-CP, Sigma)  $4 \mu\text{g}$  (200 U/mg protein) was used for Leu-Enkephalin degradation and  $40 \mu\text{g}$  was used for Leu-Enkephalin-O-sulfate. Final concentrations of Leu-Enkephalin and Leu-Enkephalin-O-sulfate were  $3.3 \times 10^{-4}$  M.

さらに、kyotorphinのカルボキシペプチダーゼB処理を行った。Kyotorphinを、24時間カルボキシペプチダーゼで加水分解したところFig. 14に示したように、約40%分解し、tyrosineが検出された。同様の実験を硫酸化体で行ったが、全く分解されなかった。また、 $5 \times 10^{-5}$  M kyotorphinの硫酸化体および非硫酸化体それぞれにプロナーゼ(10  $\mu$ g, 1,000,000 チロシン U/g, 科研製薬)を処理した場合、前者は水解をうけ、後者は全く水解をうけなかった。

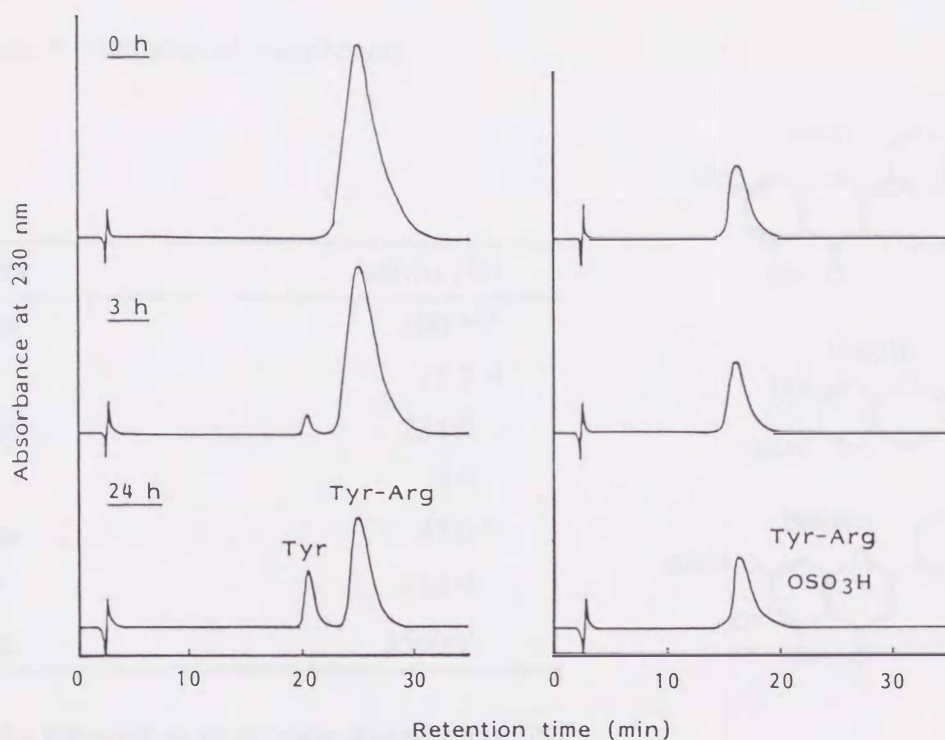


Fig. 14. Hydrolysis of Kyotorphin and Kyotorphin-O-sulfate by Carboxypeptidase B

Carboxypeptidase B (Porcine Pancreas, Sigma) 1.1  $\mu$ g (130 U/mg protein) was used for each measurement. Final concentrations of Kyotorphin and Kyotorphin-O-sulfate were  $5 \times 10^{-5}$  M.

以上のことより、ペプチド中のチロシン硫酸化体は、プロテアーゼに対して、著しい抵抗性を示すことが明かになった。



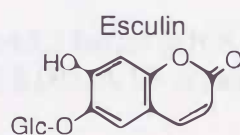
## 2-2-2 配糖体およびアグリコンの位置特異的硫酸化

### 配糖体とそのアグリコンの酵素的硫酸化

植物由来の3種類の配糖体とそのアグリコンをASSTにより、酵素的に硫酸化した(Table 5)。配糖体であるrutinやesculinはtyramineと比べて、ほとんど硫酸化されなかったが、baicalinはよく硫酸化された。それらのアグリコンであるquercetin、esculetin、baicaleinはtyramineと同様またはより良い基質となった。すでにASSTによりquercetinは位置特異的に3,3',7位が硫酸化されることを報告しているので<sup>23)</sup>、今回は、esculetinの水酸基のどの位置が硫酸化されたかを検討した。

Table 5. Sulfation of Polyphenols

Acceptors	Activity (%)
Tyramine	100 a,b)
Rutin	17.7 a)
Quercetin	234 a)
Esculin	0 b)
Esculetin	87.0 b)
Baicalin	144 a)
Baicalein	3560 a)



Activity for tyramine as an acceptor was taken as 100.

a) The activities were assayed in a MUS-tyramine system. Final acceptor concentrations were 0.1 mM.

b) The activities were measured with HPLC using PNS as a donor. Final acceptor concentrations were 2 mM.

### Esculetin硫酸化体の分離と同定

PNSに対してesculetinをモル比で3倍量加えて酵素反応を行い、HPLCで反応を追ったところ、24時間でプラトーに達した。Fig. 15-Bに示したように反応48時間後のHPLCパターンでは、PNSは検出されず、retention time17分に生成物のピークが一つ認められた。この反応生成物をSephadex LH-20カラムにより分離し、凍結乾燥した。

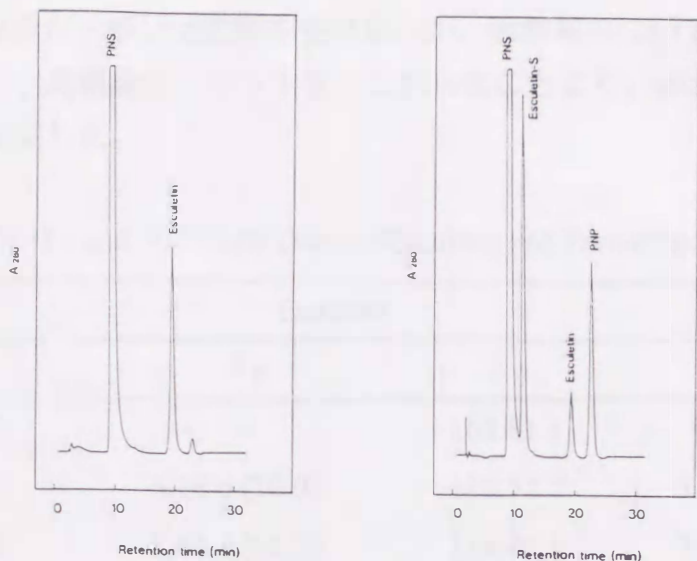


Fig. 15. Isolation of Esculetin-S by Reverse-Phase HPLC.

The reaction mixture (150 ml) contained 1.3 mM PNS, 4 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and the enzyme (162 units). It was incubated at 37°C for 0 min (A) and 48 h (B). A 10  $\mu$ l aliquot of the reaction mixture was injected after millipore filtration.

反応生成物の構造を解析する前にesculetinの $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトラムを測定して、すでに報告されている値と同一であることを確認した<sup>48)</sup>(Table 6)。さらに $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  COSYスペクトラムでは4つのプロトンのシグナルとそれぞれのカーボンのピークとの間に相関が認められた。反応生成物のnegative ion FAB-MSでの(M-H) $^-$ イオンピークは $m/z$  257であり、 $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_7\text{S}$ の構造式の分子量と一致することから、esculetin-O-sulfate体(esculetin-S)であると確認した。 $^1\text{H}$ -と $^{13}\text{C}$ -NMRを測定して、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ と $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  long-range COSYスペクトラムを得た(Fig. 16)。その結果、4級カーボンである $\delta$  141.38 (C-6)は5-H( $\delta$  7.20, s)と8-H( $\delta$  6.27, s)とにlong-range correlationがみとめられ、一方4級カーボンの $\delta$  154.35 (C-9)は4-H( $\delta$  7.68, d,  $J=9.0$  Hz)と5-H( $\delta$  7.20, s)と8-H( $\delta$  6.27, s)とにlong-range correlationがみとめられた。これらのことより、前者は6位のカーボン、後者は9位のカーボンと帰属した。他のlong-range correlationはFig. 17に示した。最終的に帰属した $^1\text{H}$ と $^{13}\text{C}$ のシグナルはTable 6にまとめた。esculetin-Sの $^1\text{H}$ -NMRスペクトラムはesculetinと非常に似ていた(Table 6)。しかしながら、 $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトラムで比較すると、esculetinに対してesculetin-SではC-10のシグナルが明らかに高磁場側にシフトしており( $\delta$  110.78 $\rightarrow$ 104.56)、またC-5、C-7とC-9では低磁場側にシフトしていた( $\delta$  112.36 $\rightarrow$ 119.40, 150.40 $\rightarrow$ 165.82, 148.52 $\rightarrow$ 154.35)(Fig. 17)。他のシグナルは

esculetinとほぼ同様の位置であった。これらのシグナルのシフトは過去の我々の報告と一致している<sup>25)</sup>。すなわち、*O*-sulfate基が電子吸引基であるため、電子密度は *ortho*位と*para*位のカーボンで減少し、明らかな低磁場シフトが認められる。そして、*meta*位のカーボンは影響を受けないが、硫酸基のついているカーボンの電子密度は増加し、高磁場にシフトする。これらのことより、esculetin-Sは、6-*O*-sulfate体であると同定した。

Table 6. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR Data for Esculetin and Esculetin-S.

Position	Esculetin		Esculetin-S	
	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$
2	—	160.81 s	—	161.96 s
3	6.16 d (10.0)	111.51 d	5.73 d (9.0)	104.22 d
4	7.86 d (10.0)	144.45 d	7.68 d (9.0)	144.90 d
5	6.97 s	112.36 d	7.20 s	119.40 d
6	—	142.90 s	—	141.38 s
7	—	150.40 s	—	165.82 s
8	6.73 s	102.68 d	6.27 s	104.35 d
9	—	148.52 s	—	154.35 s
10	—	110.78 s	—	104.56 s

$\delta$  values in ppm were measured in DMSO-*d*<sub>6</sub>. Multiplicities of carbon signals were indicated as s and d. Coupling constants (Hz) are in parentheses. Signal assignments are based on the analysis of the <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C long-range COSY spectra.

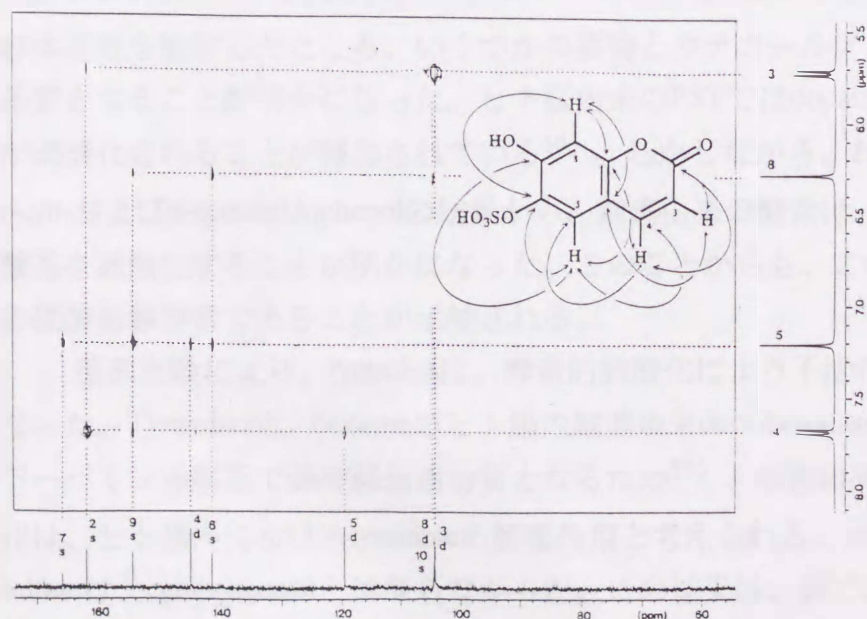


Fig. 16. <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C Long-Range COSY Spectrum of Esculetin-S in DMSO-*d*<sub>6</sub>.

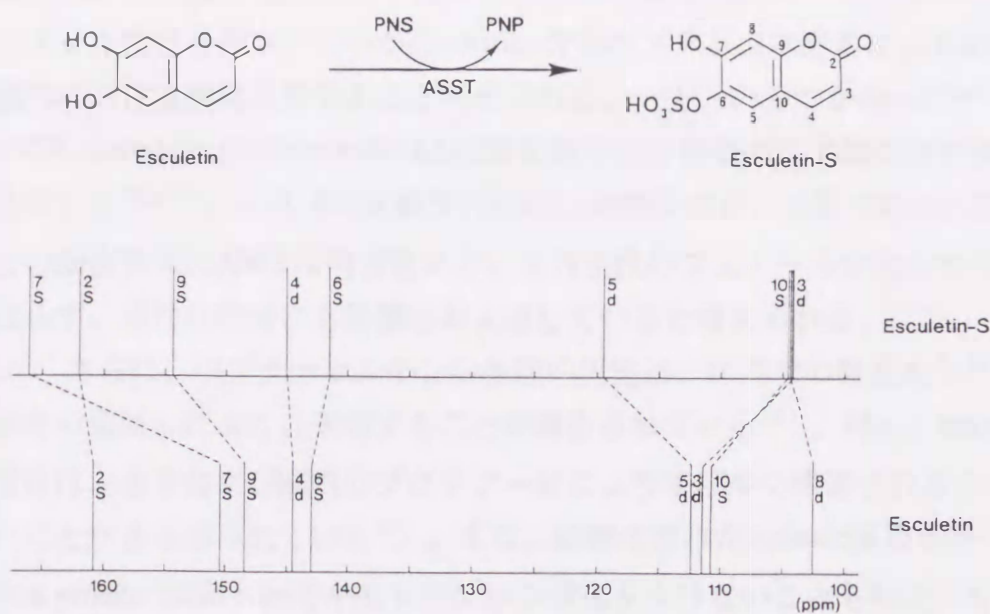


Fig. 17. Comparison of the <sup>13</sup>C-NMR Signals of Esculetin with Those of Esculetin-S.

## 2-3 考察

### 2-3-1 カテコールアミンとチロシン含有ペプチドの硫酸化と薬理的性質

これまでに、種々の動物組織に分布するPSTにより、O-硫酸化されるフェノール性化合物の役割を解明するためにいくつかの研究がなされてきた<sup>8,49)</sup>。これらの酵素の硫酸供与体はPAPSのみであるが、PAPSは、我々が単離した新しいタイプの硫酸転移酵素ASSTの硫酸供与体とはならない<sup>19)</sup>。そこで今回、種々の化合物の受容体活性を検討したところ、いくつかの薬物とカテコールアミン類が本酵素の良い基質となることが明らかになった。ヒト脳由来のPSTではdopamineは主に3位の水酸基が硫酸化されることが報告されている<sup>50)</sup>。しかしながら、われわれのdopamineと*o*-,*m*-および*p*-acetamidophenolの結果から、細菌由来の酵素は、4位のフェノール性水酸基を硫酸化することが明らかになった。このことから、この酵素が新しいタイプの硫酸転移酵素であることが示唆される。

薬理実験により、tyramineは、酵素的硫酸化により不活化されることが明らかになった。Tyramineは、tyrosineのヒト腸内細菌由来decarboxylaseによる代謝物であり、ドーパミン神経系で偽神経伝達物質となるため<sup>51)</sup>、細菌の硫酸転移酵素による硫酸化は、ヒト腸内におけるtyramineの解毒作用と考えられる。さらに、enkephalin-O-sulfateは、opiate agonistとはならなかった。この結果は、脳で、Leu-enkephalinの生理的活性がtyrosine残基の硫酸化により、阻害されていたことと一致する<sup>52)</sup>。同様に、

angiotensin-IIのtyrosine残基も本酵素により硫酸化され、angiotensinに比べて単離平滑筋に対する収縮作用が弱くなることが明らかになっている<sup>53)</sup>。これらのことより、フェノール性化合物やいくつかのtyrosine含有ペプチドの本酵素による硫酸化は、ヒト腸内における解毒作用であると考えられる。一方、いくつかのペプチドホルモン(CCK, caerulein, phyllocaerulein)は硫酸化体でのみ特徴的な生理作用を現すことが知られている<sup>54,55)</sup>。CCK-8の非硫酸化体は、本酵素の良い基質である。以上のことより、この細菌由来のASSTは内因性あるいは外因性のフェノール性化合物の解毒作用のみならず、活性化作用にも影響をおよぼしていると考えられる。

さらに、ペプチドホルモンの生理的活性は、体内での酵素的な代謝(ペプチド結合の切断)により、失活することが報告されている<sup>56)</sup>。特に、enkephalinの生理活性は、血中および脳内のプロテアーゼによりすばやく代謝されるため、非常に短いことがよく知られている<sup>57)</sup>。また、硫酸化されたtyrosine残基を持つcaeruleinやyork protein 2は*in vitro*でキモトリプシン消化をうけないことも明らかになっている<sup>58)</sup>。今回、O-硫酸化されたペプチドを用いて、プロテアーゼ消化に対する影響を検討したところ、硫酸化されたtyrosine残基のC-末端側はプロテアーゼに対して抵抗性を示すことが明らかになった。これらのことより、ペプチドホルモンのtyrosine残基がASSTにより、硫酸化されると、これらのペプチドは体内ですぐに加水分解されにくくなり、体内でのペプチドの安定性にtyrosine残基の硫酸化が重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

### 2-3-2 配糖体およびアグリコンの位置特異的硫酸化

植物や生薬成分のポリフェノール類には、 $\beta$ -glycoside体や $\beta$ -glucuronide体のものが多数存在している。これらの配糖体は、ヒトおよび動物の消化酵素では水解されにくく、腸内菌由来の酵素によってアグリコンと糖に分解される。糖は腸内細菌の栄養源となり、アグリコンは吸収されるか、さらに他の腸内菌酵素によって代謝される。

腸内優勢菌*Eubacterium*から単離したASSTはスルファターゼではないことから、植物やヒト肝臓中で硫酸化されたポリフェノールを内因性の硫酸供与体として、さらに腸内菌により加水分解されたフェノール性アグリコンを硫酸受容体にして、硫酸基の転移を触媒する可能性が考えられる。すでに本研究室では、日常的に摂取する植物や薬として服用する生薬に含まれるタンニンやフラボン類のASSTによる硫酸化を報告し、quercetin, (+)-catechin, isoamylgallateと(-)-epigallocatechin gallateの酵素的硫酸化体の化学構造を明らかにしている<sup>23-25)</sup>。今回の結果より、アグリコンであるesculetinとbaicaleinがASSTにより硫酸化され、今回実験に用いたアグリコンはすべてもとの配糖体よりもはるかに硫酸化されやすいことが明らかになった。これらのことより、配糖体の糖部の親水性や立体的な障害がASSTによる硫酸化を妨げていると考

えられる。さらに、摂取した配糖体は、腸管で最初に $\beta$ -glycosidaseによって加水分解され、その後そのアグリコンがASSTにより硫酸化されより水に可溶性な形に代謝されると推測される。

Esculinはトチノキ中に含まれるクマリン誘導体で、antihepatotoxic活性をもつことが知られている<sup>59)</sup>。Esculinはしばしば $\beta$ -glucosidase活性をスクリーニングするための基質として用いられ、多くの細菌がesculinをesculetinへと加水分解する $\beta$ -glucosidase活性を有することが報告されている<sup>60)</sup>。アグリコンであるesculetinには、硫酸化される可能性のある水酸基が2個存在しているが、esculetinに対してPNSを過剰にして酵素反応を行ってもesculetinの硫酸基の数は一個のみであった。またこのmono-sulfate体の化学構造はNMRより、esculetin-6-sulfateであった。さらに、esculinはASSTにより硫酸化されなかったことより、ASSTにより生成したesculetin-Sは、6-hydroxy groupが硫酸化されたものであることが明らかになった。

生薬、黄芩の主成分であるbaicalinは、漢方薬として炎症、化膿性皮膚炎、アレルギー症状、高脂血症や動脈硬化症の治療に長年使われてきた<sup>61)</sup>。Baicalinをラットに経口投与すると、その硫酸エステル体(6-O- $\beta$ -glucopyranosyl-baicalin 7-O-sulfate)が胆汁排泄物のなかに見出されている<sup>62)</sup>。このことより、この硫酸エステル体がヒト腸管でASSTの硫酸供与体となる可能性が考えられた。また、*in vitro*でASSTによりbaicalinよりもbaicaleinの方が硫酸化されやすいことと、これまでのわれわれの実験で、カルボニル基の存在により酵素的硫酸化が阻害されていることから<sup>24)</sup>、baicaleinは6位あるいは7位の水酸基が硫酸化されていると推測される。

以上のことより、ポリフェノールの場合、配糖体よりもアグリコンの方がASSTのよい基質となることが明らかになった。また、フラボンやタンニン類と同様、クマリン誘導体のesculetinをASSTにより硫酸化し、その化学構造を明らかにした。これらのことより、ポリフェノール類の位置特異的硫酸化には細菌由来の酵素を用いた硫酸転移反応が有用であることが確かめられ、野菜などの食品や生薬に含まれるフェノール性化合物の代謝にこの酵素が重要な働きをしていることが考えられる。

### 第三章 基質の物理化学的性質と硫酸化活性

本酵素は、ping pong bi bi mechanismで硫酸基の転移を触媒するが、基質の物理化学的性質と酵素反応メカニズムの関係は明かとなっていない。そこで、pKaの異なる基質を用いて、その違いとASST活性との関係について、至適pHやKm値を求めることにより検討した。

#### 3-1 実験材料および実験方法

##### 2,4-Dinitrophenylsulfate (DNS)の合成法

DNSカリウム塩の合成は、FendlerとFendlerらの方法<sup>26)</sup>に従って以下の通り行った。Dimethylaniline 11.73 ml (12.5 mmol)を、carbon disulfide 12.5 mlに加えて-16 ~ -21°Cに冷却し、chlorosulfonic acid 2.32 ml (35 mmol)を滴下し、35~40°Cにして、2,4-dinitrophenol 4.6 g (25 mmol)を加え、14時間室温で反応後、0°Cにして冷4 M KOH 50 mlを反応液にすばやくそそぎ、ろ過した。さらに、95% EtOH 20 mlで3回洗い乾燥した。つぎに、acetonitrile (dinitrophenol除去)に懸濁し、300 rpm、10分間遠心後、上清を取り、濃縮し、黄色結晶(1.8 g)を得た。この結晶をIRで同定した。また、純度を逆相系HPLCで測定したところ、95%であった。

##### 酵素の調製と活性測定

酵素は、第一章に述べた方法に従って*Eubacterium* A-44より部分精製した<sup>22)</sup>。

酵素活性は、第一章に示したように硫酸受容体標品としてtyramineを用い、PNSを硫酸供与体として測定した。蛋白定量も第一章に示した方法で行った。

##### pH測定法

反応液のpHは、ガラス電極(Orion, SA520, U.S.A.)で測定した。

##### 物理定数

用いたフェノール性化合物のpKaは以下の通りである<sup>63)</sup>。2,4-dinitrophenol : 4.11, *p*-nitrophenol : 7.15, 2,4-dichlorophenol : 7.85, *o*-chlorophenol : 8.48, *p*-chlorophenol : 9.38, phenol : 9.99, *p*-cresol : 10.26.

#### 3-2 実験結果

pKa値の異なる4種のフェノール性化合物を硫酸受容体として、ASSTを用いて硫酸転移活性をPNSあるいはDNSを硫酸供与体として求めた。PNSはこれまで一般的に本酵素のよい硫酸供与体であったが、pKaが4.11の2,4-dinitrophenolに対しては全く反応しなかった(Table 7)。DNSは*p*-nitrophenol (pKa=7.15)と反応し、その硫酸基は今回用いたすべてのフェノール化合物に転移し、PNSの硫酸基はphenol (pKa=9.99)と*p*-cresol (pKa=10.26)に転移した。

Table 7. Substrate Specificity of ASST with Different Donors.

Acceptors	pKa	Activity (%)	
		Donors	
		DNS	PNS
2,4-Dinitrophenol	4.11	—	0 <sup>a</sup>
<i>p</i> -Nitrophenol	7.15	29 <sup>a</sup>	—
Phenol	9.99	57	100 <sup>b</sup>
<i>p</i> -Cresol	10.26	59	171

<sup>a</sup> Measured by HPLC (column, Microsorb C18; solvent, 10% MeOH/0.1% TFA).

<sup>b</sup> Activity for phenol as an acceptor and PNS as a donor substrate (4.29 U/mg protein) is taken as 100.

PNSを硫酸供与体として、酵素活性の至適pHをpKaの異なる5種のフェノール性化合物を用いて測定した(Fig. 18)。至適pHは、弱アルカリ性付近で、基質により異なっていた。酵素活性はpHが10以上で非可逆的に不活性化された。酵素活性がほぼ安定なpHの間では、活性の至適pHは、2,4-dichlorophenol (pKa=7.85)と*o*-chlorophenol (pKa=8.45)では8.0、*p*-chlorophenol (pKa=9.36)では8.5、phenol (pKa=9.99)と*p*-cresol (pKa=10.26)では9.0であった。これらの結果より、酵素活性の至適pHは硫酸受容体となるフェノール性化合物のpKa値の高いほど上昇することが明らかになった。また、これらの基質の至適pHでの硫酸化活性は異なっており、phenolのモノクロロ体は活性が高く、phenolに比べて2~3倍であったが、ジクロロ体となるとphenolと同程度の活性しか認められなかった。このことや2,6-dichloro-4-nitrophenolやpentachlorophenolがPSTの阻害剤であることから<sup>28)</sup>、ジクロロ基によるASST阻害と考えられた。

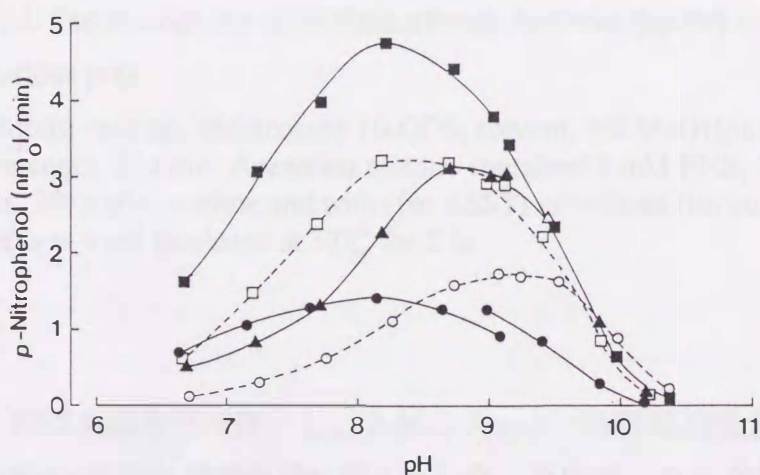


Fig. 18. pH Activity Profile of ASST.

Using PNS as a donor substrate, pH activity profiles were measured for 1 mM each of phenol (○), 2,4-dichlorophenol (●), *p*-chlorophenol (□), *o*-chlorophenol (■), and *p*-cresol (▲) as an acceptor, under the standard assay conditions.



さらに、sulfatase活性とsulfotransferase活性をpH 7~10の間で測定し、HPLCで分析した(Fig. 19)。測定したpHの範囲では、PNSを基質としたときsulfatase活性は全く認められなかった(Fig. 19、下段)。しかしながら、硫酸受容体の基質としてphenolを加えた場合phenylsulfateが生成し(Fig. 19、上段)、それと等量のPNPの生成も認められ、至適pHも9.0で分光光度的に測定した結果(Fig. 18)と一致した。

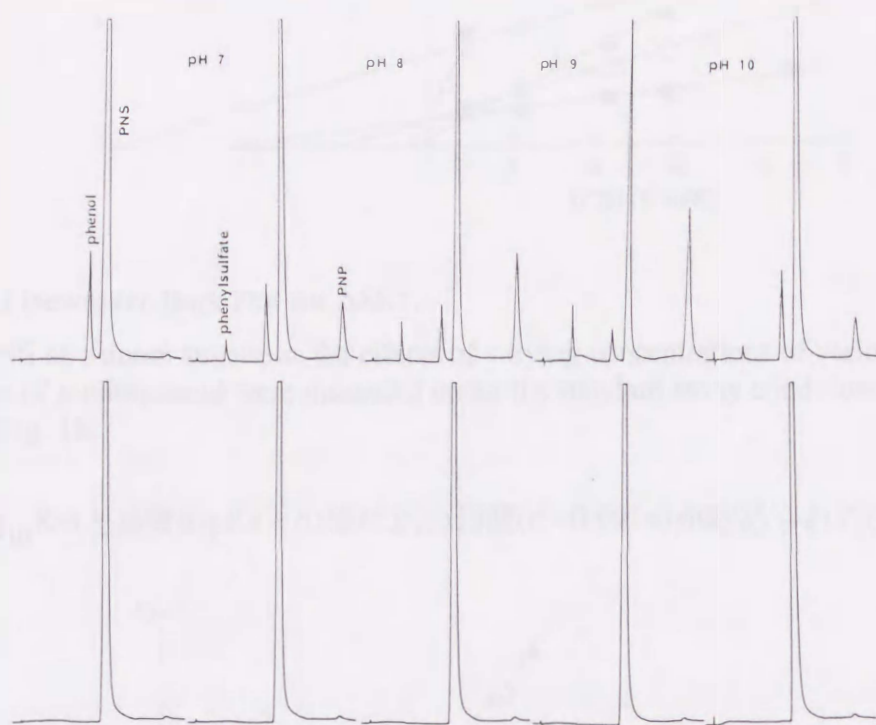


Fig. 19. HPLC Chromatograms of Sulfotransferase Activities (upper) and Sulfatase Activities (lower) at Various pHs.

HPLC conditions: column, chemcosorb 10-ODS; solvent, 5% MeOH/0.1% TFA; flow rate, 1.0 ml/min; wavelength, 254 nm. A reaction mixture contained 1 mM PNS, 20 mM Tris-HCl or glycine-NaOH buffer, 20  $\mu$ g of enzyme and with (for ASST) or without (for sulfatase) 1 mM phenol. Reaction mixtures were incubated at 37°C for 2 hr.

PNSを硫酸供与体とし、5種のフェノール性硫酸受容体の基質を用いたときのLineweaver-Burk plotsをFig. 20に示した。反応は、それぞれの硫酸受容体の至適pHで行った。Km値は、2,4-dichlorophenol、*o*-、*p*-chlorophenol、phenolと*p*-cresolでそれぞれ0.221, 0.391, 1.93, 3.90と6.10 mMであった。2,4-dichlorophenolを基質としたときの酵素活性は、pH8.0から9.0の間で高い基質濃度では阻害がみられた。

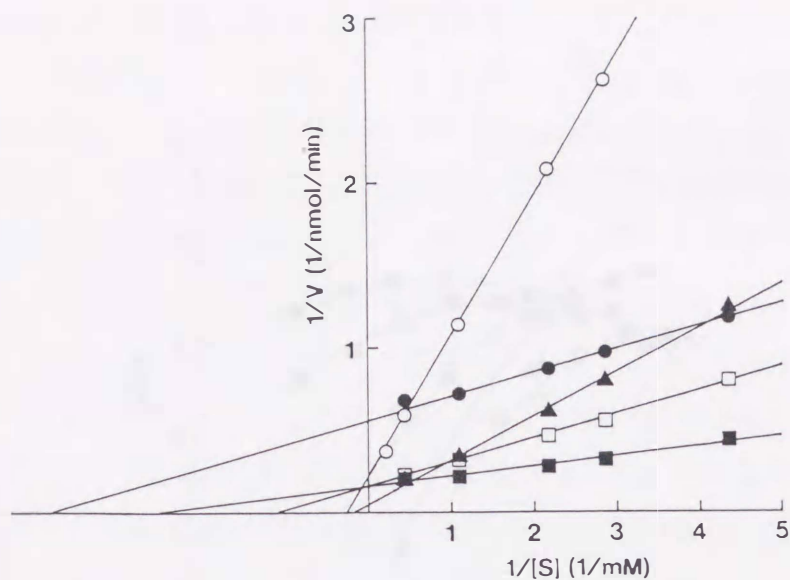


Fig. 20. Lineweaver-Burk Plot for ASST.

Using PNS as a donor substrate, the effects of varying concentrations of various acceptors on the formation of *p*-nitrophenol were measured under the standard assay conditions. Symbols were the same as Fig. 18.

$\log_{10} K_m$  と基質の  $pK_a$  との間に正の相関 ( $r^2=0.9914$ ) が認められた (Fig. 21)。

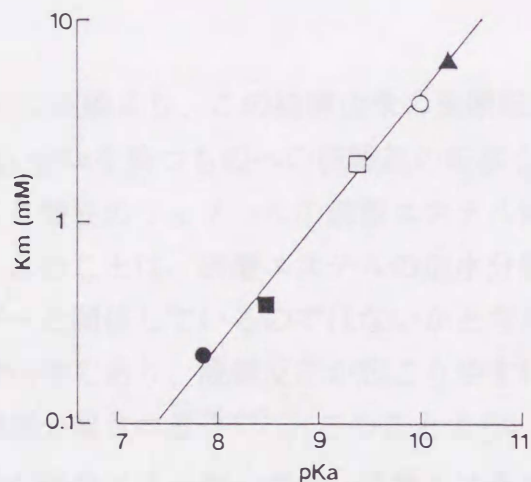


Fig. 21. The Plot of  $K_m$  Versus  $pK_a$  of Phenol Acceptor Substrates.

$K_m$  values were obtained from Fig. 20. Symbols were the same as Fig. 18.

それぞれのフェノール性化合物を基質として、 $pH$  の変化に伴う、 $K_m$  値の変動をみた。 $-\log_{10} K_m$  ( $pK_m$ ) を縦軸に、 $pH$  を横軸にとって Fig. 22 に示した。硫酸受容体の  $K_m$  値は反応液の  $pH$  が上昇するのに伴い、著しく減少した。しかしながら、2,4-dichlorophenol と *o*-chlorophenol では  $pH$  6.5 から 10.5 の間、 $K_m$  値の変動はほとんど認められなかった。

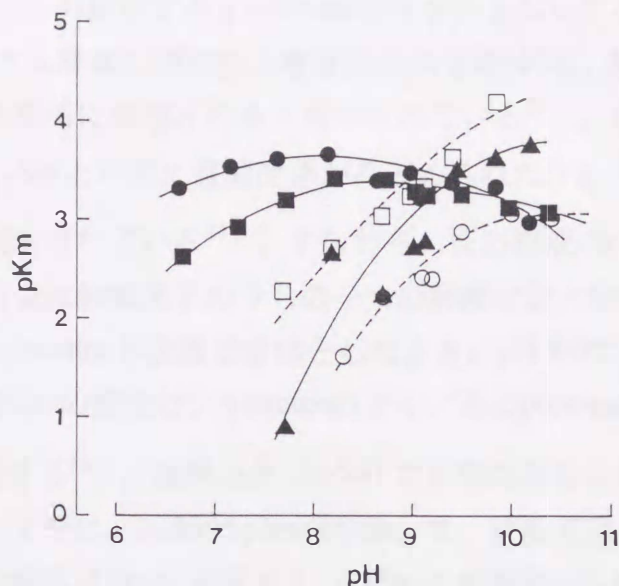


Fig. 22. pKm Dependence on pH in ASST Activity.

Km values were determined from Lineweaver-Burk plot at various pHs for each acceptor substrate. Symbols were the same as Fig. 18.

### 3-3 考察

今回の実験より、この細菌由来の硫酸転移酵素は、低いpKaを持つフェノール類から高いpKaを持つものへの硫酸基の転移を触媒することが明らかになった。すなわち、より酸性のフェノールの硫酸エステル体から酸性の低いフェノールへ転移していた。このことは、硫酸エステルの加水分解速度、あるいは硫酸エステルの結合エネルギーと関係しているのではないかと考えられる。2,4-dinitrophenolのニトロ基は電子吸引性であり、脱離反応が起こりやすいため、DNSはPNSよりも非常に早い速度で加水分解される<sup>26,64)</sup>。このことより、結合エネルギーの高い硫酸エステルがより安定な結合エネルギーの低い硫酸エステルとなることが明かである。しかしながら、ASST活性は、PNSを供与体とし、phenolや*p*-cresolを硫酸受容体としたときにDNSよりも高い値を示した。このことより、ASSTの活性は硫酸供与体や受容体となるフェノール化合物のpKaの違いだけではなく、オルト位の大きなニトロ基の立体的な障害も影響していることが示唆された。

我々はすでにこの酵素の至適pHが基質によって異なることを報告している<sup>21)</sup>。今回5種のpKaの異なるフェノール性化合物を用いてその至適pHとpKaの関係を明らかにすることを試みた。比較的低いpKaをもつ硫酸受容体の場合、至適pHもpH 8前

後と低く、pKaの高い硫酸受容体の至適pHはpH 9前後と高いことが明らかになった。この結果から、解離したフェノール性水酸基が真の硫酸受容体であり、至適pHは解離と酵素の活性部位の構造変化の両方に影響されるものと考えられた。さらに、この酵素が実験したpH範囲で全く sulfatase 活性を示さないことも明らかになった。

基質に対する酵素の親和性と酵素反応の至適pHは、酵素や基質または酵素と基質の複合体の解離基に影響されると説明されている<sup>27)</sup>。我々の結果では、硫酸受容体のpKaと $\log_{10} K_m$ との間に直線関係がみとめられた(Fig. 21)。一方、pHと $pK_m$ の間にも規則性が報告されている<sup>27)</sup>。すなわち、反応溶液のpHに対して $pK_m$ をプロットすると、変曲点は触媒因子のうちの一つの解離定数と関係している。ラット肝臓由来のPSTは、tyramineを硫酸受容体としたとき、pH 9.0でただ一つの負の変曲点が見られた。この $K_m$ の変化は、tyramineのアミノ基のprotonationによるもので、 $pK_1 = 9.25$ とほぼ一致する<sup>64)</sup>。細菌由来のASSTで5種の異なる硫酸受容体を用いた場合、Fig. 22に示したように、*o*-chlorophenolを除いて、変曲点はほぼpH 9.0に認められた。この傾きの負の変化はfreeな基質あるいはfreeの酵素のpKaを反映しており、enzyme-substrate複合体の影響はない<sup>27)</sup>。硫酸受容体はそれぞれ異なるpKaをもつため、これらの変曲点はenzymeの解離によるものと考えられる。すなわち、酵素の解離は酵素の受容体基質に対する親和性に影響する可能性があることがわかった。

以上のことより、pK値の異なるフェノール性化合物を基質としたとき、細菌由来の硫酸転移酵素による硫酸化を行った場合の基質活性に関していろいろな情報を得ることができた。Ping pong bi bi メカニズムで硫酸基が転移するこの細菌由来のASSTでは、硫酸受容体のイオン化と $K_m$ との間に直線関係が認められた。さらに、種々の硫酸受容体の $K_m$ 値に対するpHの効果はfreeの酵素のイオン化によるものであった。しかしながら、ほ乳類の肝臓由来のPSTは、rapid equilibrium random bi bi mechanismであり<sup>66)</sup>、反応の $V_{max}$ がフェノール性の基質の電子供与基と相関がある<sup>67)</sup>。触媒反応に含まれているいろいろな部位の解離は、このような反応メカニズムの違いによるものである可能性が考えられる。

## 第四章 酵素の活性調節に関する検討

ASST活性は、SH基の化学修飾剤であるPCMBやPCMSにより阻害され、種々のphenylphosphateによっても阻害されることを報告しているが<sup>19)</sup>、生体内での活性調節機構を検討するために、ヌクレオチドや金属イオンの影響について検討した。また、肝臓由来のPSTの阻害剤に対する影響も調べた。

### 4-1 実験材料および実験方法

#### 実験材料

ATP、GTP、ADP、PPiとpentachlorophenolは和光純薬工業より購入した。UTP、CTP、UDP、CMPとUMPはBoehringer Mannheimより購入した。[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATPと[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATPはNew England Nuclearより購入し、液体シンチレーション用Bray's reagentはBrayの方法により調製した<sup>68)</sup>。

#### 酵素の調製と活性測定法

酵素は、*Eubacterium* A-44より第一章に述べた方法に従って部分精製した<sup>22)</sup>。

酵素活性は、tyramineを硫酸受容体とし、PNSを硫酸供与体として第一章に示した通りに測定した。蛋白定量も同様に行った<sup>38)</sup>。

#### 酵素の阻害と活性化

ヌクレオチド、リン酸、金属塩化物、EDTAとpentachlorophenolは0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0に溶解し、それぞれの化合物を種々の濃度となるように酵素反応液に添加し、酵素活性を測定した。

#### ATPとASSTとの結合

ATPと酵素の結合反応は以下の条件のもとで行った。0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.0に溶解した精製酵素(18  $\mu$ g) 50  $\mu$ l、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATPあるいは[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (0.37 MBq, 111 TBq/mmol) 5  $\mu$ lと2 mM 非放射性ATP、さらに0.2 M MgCl<sub>2</sub> 5  $\mu$ l添加または無添加の反応液(total volume 80  $\mu$ l)を、180分間、18°Cで反応した。それぞれの反応液は50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0で0.5 mlとした後、Sephadex G-50 coarse column (1.6 x 37 cm)に添加した。カラムは、50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0で溶出し、2 mlずつ分取した。溶出サンプル0.25 mlにBray's reagentを加えて、液体シンチレーションカウンター(Aloka, LSC 671)で放射活性を測定した。

### 4-2 実験結果

#### 4-2-1 阻害物質の検索

Mulderらは、pentachlorophenolがラット肝臓由来の硫酸転移酵素活性を*in vitro*で、2,6-dichloro-4-nitrophenolと同様に阻害することを報告している<sup>69)</sup>。そこで、今

回ASST活性に対するpentachlorophenolの影響を調べた(Fig. 23)。硫酸受容体として tyramineまたはphenolを用いたとき、25.5  $\mu$ Mまたは34  $\mu$ M pentachlorophenolで酵素活性を50%阻害した。

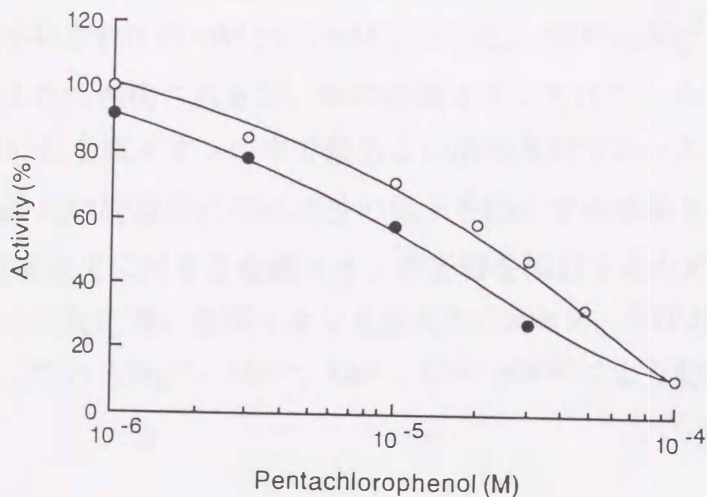


Fig. 23. Inhibition of ASST Activity by Pentachlorophenol.

ASST (0.04 unit) was incubated in the presence of various concentrations of pentachlorophenol using PNS and tyramine (○) or phenol (●) as substrates. Each value shows the mean of triplicate determinations.

ほ乳類由来のPSTは、3'-phosphoadenosine 5'-phosphateやADP、ATPにより阻害されることが知られている<sup>31)</sup>。しかしながら、Table 8に示したように細菌由来の本酵素は、ATP、GTP、UTPやCTPのようなnucleoside triphosphates (NTP)では0.6 mMで阻害されたが、nucleoside monophosphates (NMP)やnucleoside diphosphates (NDP)、sodium phosphateではNTPの濃度の5倍量でも阻害されなかった。

Table 8. Effects of Nucleotides and Mg<sup>2+</sup> on the Activity of ASST

Compounds			Compounds		
Nucleotides*	Mg <sup>2+</sup> *	Activity (%)#	Nucleotides*	Mg <sup>2+</sup> *	Activity (%)#
ATP	—	38	GDP**	—	90
GTP	—	38	UDP**	—	90
UTP	—	40	AMP**	—	98
CTP	—	69	CMP**	—	105
NTPs	+	148 — 155	Pi**	—	99
—	+	157	PPi	—	39
ADP**	—	97	PPi	+	151

\*Final concentration was 0.6 mM. \*\*Final concentration was 3 mM.

#The activity for PNS and tyramine (81.5 unit/mg protein) was taken as 100.

#### 4-2-2 ATPによる活性調節

NTPによる阻害はphenylphosphate esterによる阻害<sup>19)</sup>よりも強かったので、さらに実験を行った。Phenylphosphate esterは競合的拮抗阻害であったが、ATPとPPiは酵素を非競合的に阻害した(Fig. 24)。PNS ( $K_m=0.1$  mM)に対するATPとPPiの $K_i$ 値はそれぞれ0.6 mMと0.7 mMであった。また、tyramine ( $K_m=2.0$  mM)に対するATPとPPiの $K_i$ 値はそれぞれ0.45 mMと0.2 mMであった。ASSTは $Mg^{2+}$ や $Mn^{2+}$ のような2価のカチオンにより活性化されるが、他の金属イオンではむしろ阻害していた(Table 9)。 $Mg^{2+}$ は用いた金属イオンの中で最もよい活性化剤であった。データでは示していないが、 $Mg^{2+}$ には酵素保存時に活性の低下を防止する効果も認められた。ATPあるいはPPiの阻害効果に対する金属イオンの影響を検討するために、ATPとPPiの同一濃度となるように反応液に金属イオンを加えた(Table 9)。ATPあるいはPPiによる阻害は金属イオンである $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ と $Ni^{2+}$ により防止された。

Table 9. Effects of Various Metal Ions, ATP and Their Mixture on the Activity of ASST

Metal ions**	Activity (%)*		
		plus ATP	plus PPi
$Mg^{2+}$	151	148	150
$Mn^{2+}$	123	133	129
$Ca^{2+}$	105	102	100
$Cu^{2+}$	50	28	35
$Co^{2+}$	98	142	141
$Fe^{2+}$	95	32	48
$Ni^{2+}$	67	97	93
$Zn^{2+}$	1	1	2
None	100	43	40

\*The activity for PNS as a donor substrate and tyramine as an acceptor substrate without the addition of metal ion (28 units/mg protein) was taken as 100.

\*\*All metal ions were added as chloride salts at a final concentration of 0.6 mM. ATP and PPi were added at the same final concentration (0.6 mM).

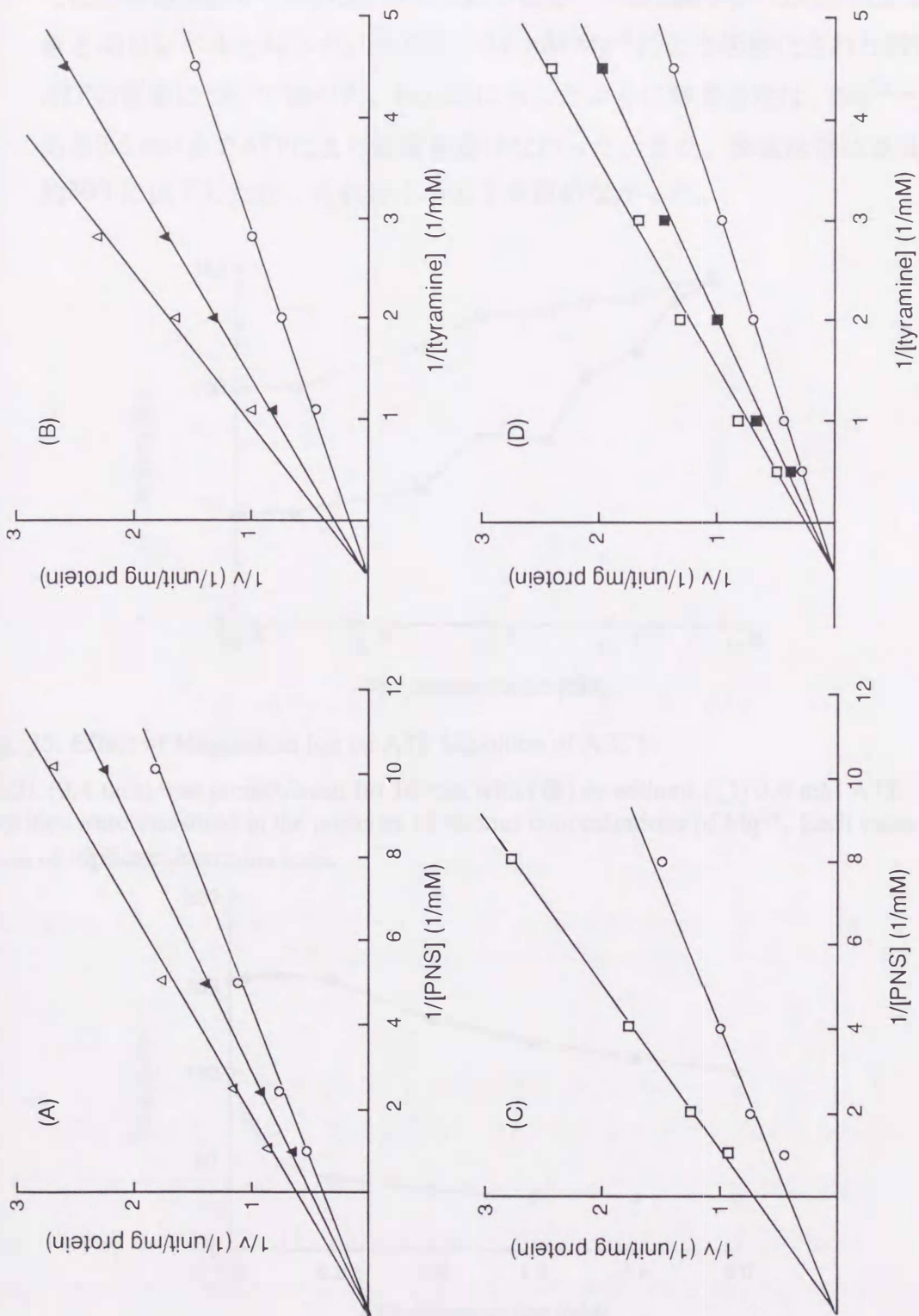


Fig. 24. Lineweaver-Burk Plot of Inhibition of ASST. PPI for PNS (A), PPI for tyramine (B), ATP for PNS (C) and ATP for tyramine (D). Concentrations of inhibitors were as follows:  $\blacktriangle$ , 0.16 mM PPI;  $\triangle$ , 0.80 mM PPI;  $\blacksquare$ , 0.1 mM ATP;  $\square$ , 0.45 mM ATP;  $\circ$ , none. Each value shows the mean of triplicate determinations.



ATPによる阻害の防止は $Mg^{2+}$ イオン濃度に依存していた(Fig. 25)。0.6 mM ATP添加時の酵素活性は2価のカチオン非存在下では43%に低下していたが、0.06 mM  $Mg^{2+}$ 添加により活性は100%に回復した。さらに、0.6 mM ATPと0.6 mM  $Mg^{2+}$ 存在下では、酵素活性が150%に活性化されており、0.06 mM  $Mg^{2+}$ のみを反応液に加えたときと同じレベルとなった。さらに、0.6 mM  $Mg^{2+}$ により活性化された酵素に対するATPの影響について調べた。Fig. 26に示したように酵素活性は、 $Mg^{2+}$ と同じ濃度である0.6 mMまでATPにより影響を受けなかった。また、酵素活性は高濃度のATPで約30%に低下したが、それ以上の低下を認めなかった。

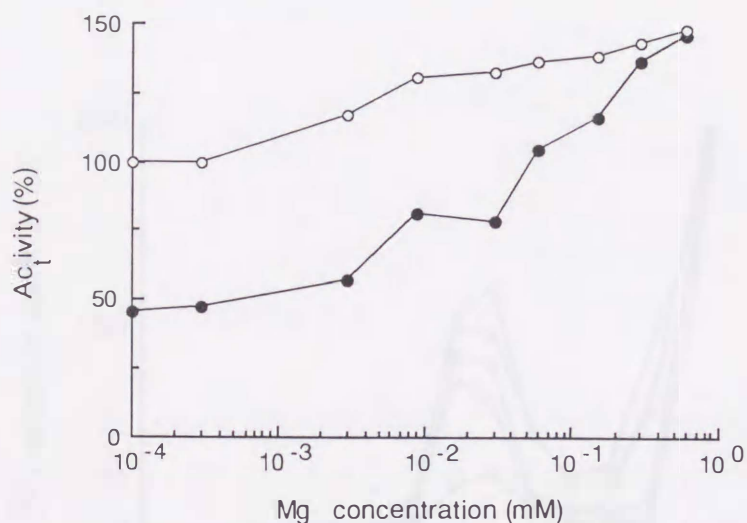


Fig. 25. Effect of Magnesium Ion on ATP Inhibition of ASST.

ASST (0.4 unit) was preincubated for 10 min with (●) or without (○) 0.6 mM ATP. Then, ASST activities were measured in the presence of various concentrations of  $Mg^{2+}$ . Each value shows the mean of triplicate determinations.

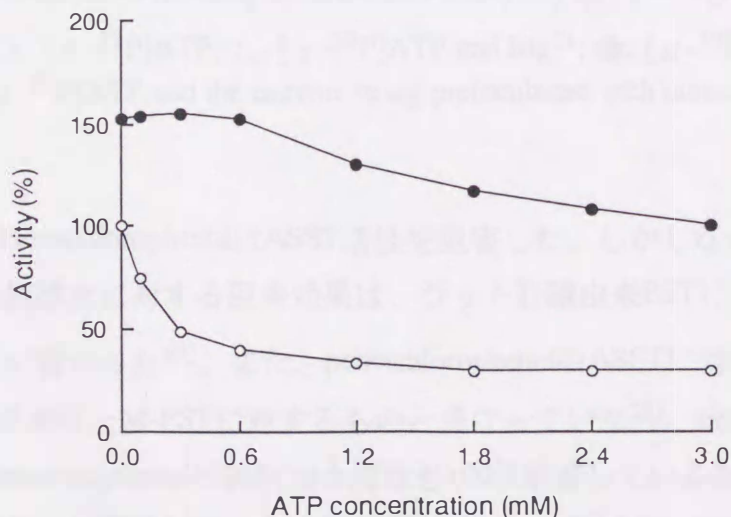


Fig. 26. Inhibition of Magnesium Ion-activated Enzyme by ATP.

ASST (0.4 unit) was preincubated for 10 min with (●) or without (○) 0.6 mM  $Mg^{2+}$ . Then, ASST activities were measured in the presence of various concentrations of ATP. Each value shows the mean of triplicate determinations.

#### 4-2-3 ATPと酵素の結合実験

ATPによる酵素活性阻害のメカニズムを知るために、酵素と $[\alpha-]$ と $[\gamma-^{32}\text{P}]$ でラベルしたATPを種々の条件下でincubationした。反応後、これらはSephadex G-50で酵素に結合したATPと遊離ATPに分けた。Fig. 27に示した通り、酵素蛋白の画分には $[\alpha-]$ と $[\gamma-^{32}\text{P}]$ のどちらの場合もほぼ同じ量の放射活性が検出された。このことより、酵素とATP自体との結合体の存在が示唆された。

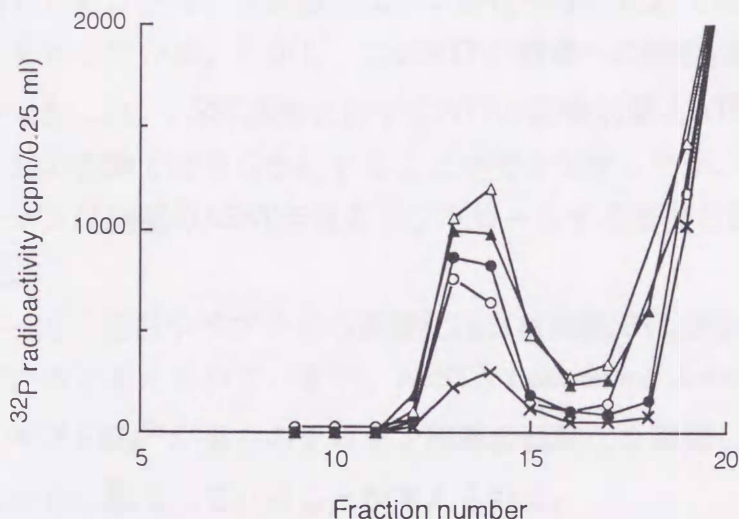


Fig. 27. Gel Filtration of the Enzyme Incubated with  $[\alpha-]$  or  $[\gamma-^{32}\text{P}]$ ATP.

Conditions: ○,  $[\gamma-^{32}\text{P}]$ ATP; △,  $[\gamma-^{32}\text{P}]$ ATP and  $\text{Mg}^{2+}$ ; ●,  $[\alpha-^{32}\text{P}]$ ATP; ▲,  $[\alpha-^{32}\text{P}]$ ATP and  $\text{Mg}^{2+}$ ; ×,  $[\alpha-^{32}\text{P}]$ ATP and the enzyme being preincubated with nonradioactive ATP.

#### 4-3 考察

PentachlorophenolはASST活性を阻害した。しかしながら、このフェノール性化合物の硫酸化に対する阻害効果は、ラット肝臓由来PSTに対するもの( $I_{50}=10^{-7}\text{M}$ )よりも非常に弱かった<sup>69)</sup>。また、pentachlorophenolのASSTに対する影響は、ヒト血小板由来のP-PSTとM-PSTに対するものと異なっていた<sup>28)</sup>。後者の場合、 $10^{-5}\text{M}$  pentachlorophenolはphenolの硫酸抱合活性を100%阻害しているが、dopamineの硫酸抱合活性は20%しか阻害していない。ASSTの場合、 $10^{-5}\text{M}$  pentachlorophenolではtyramineとphenolをそれぞれ基質とすると25%と40%の阻害であった。このことより、PSTと比べてASSTでは、pentachlorophenolによるphenolの硫酸化に対する阻害力が弱くなって

いることが明らかになった。すなわち、組織由来PSTと細菌由来ASSTでは活性機構に違いのあることと推察される。

エネルギー産生系に関わるいくつかの酵素は、nucleotideのアロステリックな調節により活性が上昇あるいは阻害をうけていることが知られている<sup>70-73</sup>)。我々はすでにASSTが、 $Mg^{2+}$ や $Mn^{2+}$ のような2価のカチオンにより活性化され、EDTAにより阻害されることを報告している<sup>21</sup>)。今回の実験で、新たにNTPやPPiがこの細菌由来のASSTの阻害剤であるが、NTP- $Mg^{2+}$ やPPi- $Mg^{2+}$ が酵素の活性化剤であることを見出した。 $Mg^{2+}$ はATPによる阻害を等モルで防止したことから(Fig. 25)、ATP- $Mg^{2+}$  complexはASSTの活性を阻害しないと考えられる。

Fig. 27に示したように、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ と $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPからほぼ同じ量の放射活性が酵素と結合したことは、この蛋白はリン酸化を受けたのではなく、ATP分子が結合したことを示している。しかし、このATPの酵素への結合は $Mg^{2+}$ によってあまり影響を受けなかった。ASST活性に対するATPの阻害効果とATPの酵素への結合との関係は、今回の実験では明らかにすることができなかったが、nucleotide triphosphatesと2価カチオンは細菌のASST活性をコントロールする重要な調節物質であることが示唆された。

一方、蛋白やペプチドの硫酸化は真核細胞では分泌機構において重要な働きをしていると考えられている<sup>74</sup>)。ASSTが*Eubacterium* A-44の主要な酵素であることから、ATPと $Mg^{2+}$ が蛋白のチロシン残基の硫酸化を調節して、細菌からいくつかの蛋白を分泌に関与していることが考えられる。

## 第五章 ラット腸内菌 *Klebsiella* 由来硫酸転移酵素の生化学的性質

ASSTは、ヒト腸内細菌分離株 *Eubacterium* より得たものであるが、ラット腸内細菌 *Klebsiella* より、ASSTと基質特異性がよく似た硫酸転移酵素K-36 sulfotransferaseを分離した<sup>75)</sup>。この酵素は、ASSTでは硫酸化されなかったtyrosineをわずかではあるが硫酸化したが、良い基質であったtyramineは、phenolよりも明かに硫酸化されにくいことなど、いくつか *Eubacterium* 由来のASSTとは異なる性質をもつが、PAPSを硫酸供与体としないことからASSTの一つであると考えられる。さらに、この酵素の反応機構を明かにするために、反応生成物の酵素活性に対する影響を検討した。

### 5-1 実験材料および実験方法

#### 実験材料

$\alpha$ -Naphthylsulfate、 $\alpha$ -naphthol、naringin、propyl gallate、gallic acidとtannic acidはSigma Chemicalより購入した。PoncirinはRothより購入した。

#### 酵素の精製

ラット糞便の希釈液をMUSを含むGAM寒天培地で培養し、蛍光下でコロニーを単離し、sulfotransferase陽性株 *Klebsiella* K-36を得た。さらにこの *Klebsiella* K-36を0.1% agarを含むLB brothで前培養した後、100 mlのLB brothで培養し、次に5 LのLB brothに植菌し、好氣的に37°C、15時間培養した。培養後、5,000 g、20分間、4°Cで集菌し、上清を除いた。集めた菌は生理食塩水で2回洗った。残った沈殿は、150 mlの0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.0に懸濁し、超音波破碎(Heat Systems, U.S.A.)した。超音波破碎後、20,000 g、30分間、4°Cで遠心し、上清を得た。沈殿は50 mlの同様なbufferに懸濁後超音波破碎し遠心分離した。これらの上清を集めて、粗抽出液とし精製を進めた。硫酸分画(60%飽和)後、沈殿は100 mlの0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.0に懸濁し、3回透析外液を変えながら、15時間同じbufferで透析した。その後、DEAE-Cellulose column chromatography・chromatofocusing column chromatography・Sephacryl S-300 column chromatographyにより精製した。精製酵素の比活性は8.12  $\mu$  mol/min/mg proteinであった。

#### 酵素活性測定法

酵素活性は、phenolあるいは $\alpha$ -naphtholを硫酸受容体とし、PNSを硫酸供与体とし、bufferとして0.1 M glycine-NaOH buffer, pH 10.5を用いた点以外は第一章に示した方法に従って測定した。蛋白量はBSAを標準としてLowryらの方法により測定した<sup>38)</sup>。

## 5-2 実験結果

### K-36 sulfotransferaseの不可逆反応

K-36 sulfotransferaseはphenylsulfate esterからphenolへの硫酸基の転移を触媒する<sup>75)</sup>。酵素をPNS (硫酸供与体)と $\alpha$ -naphthol (硫酸受容体)と反応させると、酵素は化学量論的にPNSの硫酸基を $\alpha$ -naphtholへ転移させるが、 $\alpha$ -naphthol非存在下では反応は全く進行しなかった。しかしながら、 $\alpha$ -naphthol-*O*-sulfateと*p*-nitrophenol (PNP)を酵素とincubationしても反応が進まないことから、この酵素は逆反応を触媒しないことがわかった。

### 酵素活性に対する反応生成物の影響

PNSと $\alpha$ -naphtholを基質とした場合、それぞれのKm値はLineweaver-Burk plotより、0.11 mMと0.66 mMであり、Vmaxは12.13 units/mg proteinであった。この酵素反応が生成物である、 $\alpha$ -naphthol-*O*-sulfateとPNPによって影響を受けるか否かを検討した。PNPはPNSに対して酵素活性を非競合的に阻害したが、 $\alpha$ -naphtholに対しては競合的拮抗であった。PNSと $\alpha$ -naphtholに対するPNPのKi値はそれぞれ0.23 mMと0.08 mMであった。 $\alpha$ -Naphthol-*O*-sulfateは、PNSと $\alpha$ -naphtholに対して酵素活性を非競合的に阻害し、Ki値はそれぞれ4.2 mMと0.52 mMであった。Ki値が高いことからこれらの反応生成物が阻害剤として弱いことは明かである。さらに、4-methyl-umbelliferyl sulfateはnaphthol-*O*-sulfateのPNSと $\alpha$ -naphtholに対する効果と同様の阻害パターンを示した。

### 酵素活性に対するMg<sup>2+</sup>とEDTAの効果

この酵素は2価のカチオンであるMg<sup>2+</sup>とMn<sup>2+</sup>により活性化され、EDTAにより阻害された。Mg<sup>2+</sup>濃度を増すとVmaxは増加したがKmは一定に保たれた。2 mM Mg<sup>2+</sup>でVmaxは最も高く、無添加時の163%であった。一方、2 mM EDTA存在下では酵素活性は53%阻害された。

### 基質特異性

硫酸受容体活性をTable 10に示した。天然に存在するgallic acidは良い基質となったが、フラボノイドは硫酸化されにくかった。Serotoninも良い基質であった。

Table 10. Acceptor Substrate Specificity

Acceptor	Activity (%)*	Acceptor	Activity (%)*
Phenol	100	Poncirin	< 0.4
$\alpha$ -Naphthol	268	Hesperidin	< 0.4
Serotonin	14.9	Naringin	2.1
Tannic acid	4.3	Gallic acid	25.5
Propyl gallate	70.2	Quercetin	6.3

\* Specific activity of the enzyme for phenol + PNS was 8.12 units/mg protein, which was taken as 100%.

### 5-3 考察

ラット腸内菌より分離した*Klebsiella*より精製したK-36 sulfotransferaseの比活性(8.12 unit/mg protein)は、ヒト腸内菌*Eubacterium*由来のASSTに比べて、粗酵素で約1/20、精製酵素で約1/10と低いことが明らかとなった。このことは、picosulfateがラットにおいて無効であることやヒトと比べてラットの糞便の硫酸転移活性が低いこと<sup>76)</sup>と関連していると考えられた。また、基質特異性について検討した硫酸受容体の中では、 $\alpha$ -naphtholが最もよい基質であった。しかしながら、酵素自体の比活性も低いことから、全ての基質において硫酸化活性はASSTに比べて低いと考えられた。

ラット脳由来のPSTはsequentially ordered bi bi reaction mechanismであり<sup>77)</sup>、ラット肝臓のPSTはrapid equilibrium random bi bi reaction mechanismである<sup>66)</sup>。しかしながら、*Eubacterium*由来のASSTはping pong bi bi reaction mechanismであることをすでに報告している<sup>22)</sup>。K-36 sulfotransferaseについて検討した結果、酵素活性は反応生成物によりわずかに影響を受けた。活性に対するこれらの反応をTable 11にまとめた。これらの結果より、腸内細菌由来のK-36 sulfotransferaseの反応メカニズムはordered bi bi reactionであると考えられた。すなわち、酵素は硫酸基の転移を反応性の高い中間体を経て触媒している(Fig. 28)。酵素はしかしながら、逆反応を触媒しなかった。この酵素はASSTと同様、 $Mg^{2+}$ により活性化され、EDTAにより阻害された。

Table 11. Inhibitory Pattern of the Reaction Products as to the K-36 Bacterial Sulfotransferase

Reaction product	Enzyme substrate	
	PNS	$\alpha$ -Naphthol
PNP	Non-competitive	Competitive
$\alpha$ -Naphthol-O-sulfate	Non-competitive	Non-competitive

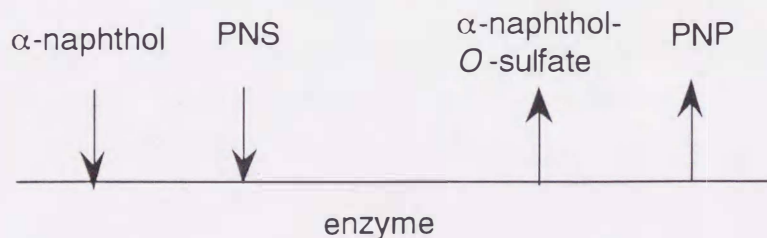


Fig. 28. The Proposed Reaction Mechanism of K-36 Bacterial Sulfotransferase.

$\alpha$ -Naphtholとphenolの2種の硫酸受容体基質を反応液に同時に加えると活性は増加した（データ示さず）。このことから、いくつかのフェノール性化合物が腸内に存在する時、そこでは酵素が硫酸供与体からそれらに同時に硫酸基の転移を触媒する可能性が考えられる。

以上のことより、ASSTやK-36 sulfotransferaseの存在が明らかになり、種々の化合物がこれらの酵素の基質となることから、腸内で内因性あるいは外因性のフェノール性化合物が硫酸化される可能性が高いと考えられる。

## 総括

1. 抗体カラム法により、ASSTの精製ステップを簡略化し、アフィニティーカラムから溶出した蛋白はSDS-PAGEで単一となった。精製酵素のN末端アミノ酸配列は、SVKYSFEDHIINRQYEAEQAMLAKFであった。
2. フェノール性化合物では*p*-acetoamidophenol、dopamine、norepinephrineなどが、チロシン含有ペプチドではenkephalinが、ASSTの良い基質となり、硫酸化された。Dopamineの酵素的硫酸化体は、主にdopamine-4-sulfateであることを明かにした。
3. 酵素的に硫酸化された生理活性ペプチドは、プロテアーゼ消化をうけにくくなり、体内でのこれらペプチドの安定性に硫酸化が寄与している可能性が考えられる。
4. ポリフェノールとその配糖体のASSTによる硫酸化を検討したところ、配糖体は、そのアグリコンよりも硫酸化されにくく、糖の親水性や立体障害が酵素的硫酸化を妨げていると考えられる。
5. 本酵素は、低いpKaの水酸基をもつフェノール性硫酸エステルの硫酸基が、高いpKaをもつフェノール性化合物へ転移する反応を触媒していることが明らかになった。
6. ASST活性はNTPやpyrophosphateにより阻害されたが、Mg<sup>2+</sup>やMn<sup>2+</sup>は活性化し、ATPやpyrophosphateによる阻害を防止した。ATPと酵素の結合実験より、酵素阻害は、酵素のリン酸化によるものではなく、ATPとの結合によるものであることを明らかにした。
7. ラット腸内細菌*Klebsiella*より分離した硫酸転移酵素の反応メカニズムは、ordered bi bi reaction mechanismであると考えられる。

以上のことより、種々の内因性あるいは外因性のフェノール性化合物がASSTの基質となることが明らかになり、これら細菌由来の酵素は組織由来の硫酸転移酵素とは基質特異性、反応メカニズム、生体内活性制御の点で明かに異なることから、腸内でのこれらの化合物の硫酸転移が、薬効発現や代謝経路に影響をおよぼしている可能性が示唆される。



## 謝 辞

本研究に関する有益な御指導と御助言を賜りました、富山医科薬科大学薬学部衛生化学教室小橋恭一教授に心から感謝致します。

また、直接の御指導で、実験の細部にわたり適切な御助言を頂きました富山医科薬科大学薬学部衛生化学教室赤尾光昭講師、竹部幸子博士、金 東鉉博士（現慶熙大学校薬学大学助教授）に深謝致します。

硫酸エステル体合成および硫酸エステル体の構造決定にあたり、直接御指導御教授賜りました本学和漢薬研究所菊地 徹教授、難波恒雄教授、門田重利助教授、また共同研究者の坪田浩二君ならびに化学応用部門の方々に深く感謝致します。

薬理試験に関し、御協力いただきました本学和漢薬研究所野村靖幸教授（現北海道大学薬学部教授）、とくに、直接御指導御教授を賜りました金子周司助手（現京都大学薬学部助教授）ならびに生物試験部門の方々に心より感謝致します。

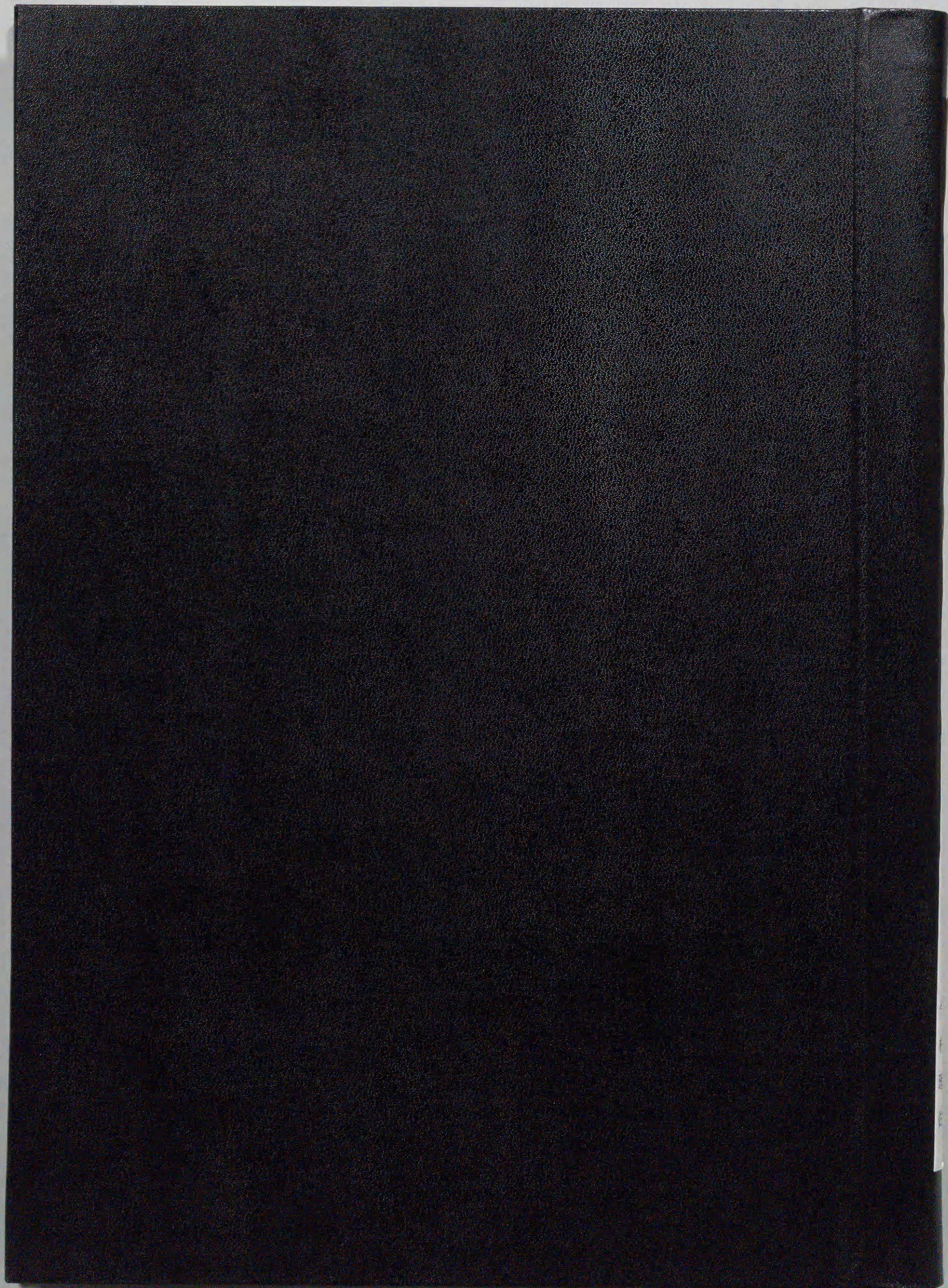
各種ペプチドの合成および硫酸化を行っていただいた富士薬品工業（株）森川忠則博士、岩崎有紀氏、稲垣智子さんならびに研究所の皆様に深く感謝致します。

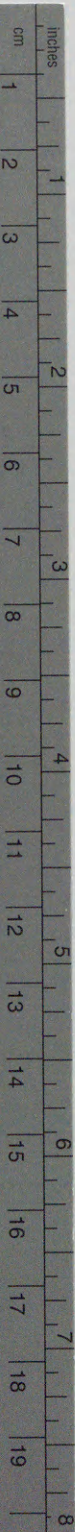
折りにふれ有益な御助言、御討論下さいました富山医科薬科大学薬学部衛生化学教室酒井立夫助教授、福井医科大学中井 昇教授に深く感謝致します。また、共同研究者として本研究を支えてくださいました、古泉素明博士（現ツムラ）、土肥啓司修士（現塩野義製薬）、佐藤 誠君（大学院生）、朝日奈穂さんに心より感謝致します。最後に研究を暖かく見守って下さりました富山医科薬科大学薬学部衛生化学教室の卒業生の皆様と秘書の高柳しのぶさんと牧野圭子さんに感謝致します。

## 参考文献

1. Falany, C.N., Kerl, E.A. (1990) *Biochem. Pharmacol.* **40**, 1027-1032.
2. Falany, C.N., Vazquez, M.E., Heroux, J.A., Roth, J.A. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* **278**, 312-318.
3. Falany, C.N., Vazquez, M.E., Kalb, J.M. (1989) *Biochem. J.* **260**, 641-646.
4. Falany, C.N. (1991) *Trends Pharmacol. Sci.* **12**, 255-259.
5. Varin, L., Ibrahim, R.K. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 1858-1863.
6. Varin, L., DeLuca, V., Ibrahim, R.K., Brisson, N. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 1286-1290.
7. Sekura, R.D., Duffel, M.W., Jakoby, W.B. (1981) *Methods Enzymol.* **77**, 197-206.
8. Hart, R.F., Renskers, K.J., Nelson, E.B., Roth, J.A. (1979) *Life Sci.* **24**, 125-130.
9. Sekura, R.D., Jakoby, W.B. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **211**, 352-359.
10. Rein, G., Glover, V., Sandler, M. (1984) *J. Neurochem.* **42**, 80-85.
11. Ozawa, S., Nagata, K., Gong, D., Yamazoe, Y., Kato, R. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 4001.
12. Wilborn, T.W., Comer, K.A., Dooley, T.P., Reardon, I.M., Henrikson, R.L., Falany, C.N. (1992) *Mol. Pharmacol.* **43**, 70-77.
13. Goodall, M., Rosen, L. (1963) *J. Clin. Invest.* **42**, 1578-1588.
14. Roth, J.A., Rivett, A.J. (1982) *Biochem. Pharmacol.* **31**, 3017-3021.
15. Young, Jr., W.F., Okazaki, H., Laws, Jr., E.R., Weinshilboum, R.M. (1984) *J. Neurochem.* **43**, 706-715.
16. Yu, P.H., Rozdilsky, B., Boulton, A.A. (1985) *J. Neurochem.* **45**, 836-843.
17. Bodansky, M., Natarajan, S., Wahne, W., Gardner, J.D. (1977) *J. Med. Chem.* **20**, 1047-1050.
18. Niehrs, C., Huttner, W.B., Carvallo, D., Degryse, E. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 9314-9318.
19. Kobashi, K., Fukaya, Y., Kim, D.-H., Akao, T., Takebe, S. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **245**, 537-539.
20. Kim, D.-H., Hyun, S.-H., Shin, S.-B., Kobashi, K. (1992) *Jpn. J. Pharmacol.* **59**, 1-5.
21. Kim, D.-H., Konishi, L., Kobashi, K. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **872**, 33-41.
22. Kim, D.-H., Kobashi, K. (1991) *J. Biochem.* **109**, 45-48.
23. Koizumi, M., Shimizu, M., Kobashi, K. (1990) *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 794-796.
24. Koizumi, M., Akao, T., Kadota, S., Kikuchi, T., Okuda, T., Kobashi, K. (1991) *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 2638-2643.
25. Koizumi, M., Akao, T., Imamura, L., Dohi, K., Yoshida, T., Okuda, T., Kobashi, K. (1992) *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 1864-1867.
26. Fendler, E.J., Fendler, J.H. (1968) *J. Org. Chem.* **33**, 3852-3859.
27. Dixon, M. (1953) *Biochem. J.* **55**, 161-170.
28. Rein, G., Glover, V., Sandler, M. (1982) *Biochem. Pharmacol.* **31**, 1893-1897.
29. Whittemore, R.M., Pearce, L.B., Roth, J.A. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **249**, 464-471.
30. Roth, J.A., Morphy, M., Szymanski, H. (1986) *Biochem. Pharmacol.* **35**, 3646-3649.
31. Rens-Domiano, S.S., Roth, J.A. (1987) *J. Neurochem.* **48**, 1411-1415.
32. Konishi-Imamura, L., Dohi, K., Sato, M., Kobashi, K. (1994) *J. Biochem.* **115**, 1097-1100.
33. Konishi-Imamura, L., Kim, D.-H., Kobashi, K. (1991) *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 2994-2998.
34. Konishi-Imamura, L., Sato, M., Dohi, K., Kadota, S., Namba, T., Kobashi, K. (1994) *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 1018-1022.
35. Konishi-Imamura, L., Kim, D.-H., Kobashi, K. (1992) *Biochem. Int.* **28**, 725-734.
36. Konishi-Imamura, L., Kim, D.-H., Koizumi, M., Kobashi, K., *J. Enz. Inhibit.* (in press)
37. Kim, D.-H., Kim, H.-S., Imamura, L., Kobashi, K. (1994) *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 543-545.
38. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-

39. Zhu, X., Veronese, M.E., Sansom, L.N., McManus, M.E. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 671-676.
40. Kong, A.-N.T., Ma, M., Tao, D., Yang, L. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1171**, 315-318.
41. Heroux, J.A., Falany, C.N., Roth, J.A. (1989) *Mol. Pharmacol.* **36**, 29-33.
42. Borthwick, E.B., Burchell, A., Coughtrie, M.W.H. (1993) *Biochem. J.* **289**, 719-725.
43. Watabe, T., Ishizuka, T., Isobe, M., Ozawa, N. (1982) *Science* **215**, 403-405.
44. Harbeson, S.L., Kerkman, D.J., DeBernardis, J.F. (1983) *Org. Prep. Pro. Int.* **15**, 243-249.
45. Johansson, B. (1973) *Eur. J. Pharmacol.* **24**, 194-204.
46. Kosterlitz, H.W., Lydon, R.J., Watt, A.J. (1970) *Br. J. Pharmacol.* **39**, 398-413.
47. Takagi, H., Ueda, H. (1981) *Tampakushitsu Kakusan Koso* **26**, 151-159.
48. Cussans, N.J., Huckerby, T.N. (1975) *Tetrahedron* **31**, 2719-2726.
49. Bostrom, H., Wengle, B. (1967) *Acta Endocrinol.* **56**, 691-704.
50. Renskers, K.J., Feor, K.D., Roth, J.A. (1980) *J. Neurochem.* **34**, 1362-1368.
51. Suzuki, O., Katsumata, Y., Oya, M. (1981) *Tampakushitsu Kakusan Koso* **26**, 1438-1446.
52. Unsworth, C.D., Hughes, J., Morley, J.S. (1982) *Nature (London)* **295**, 519-522.
53. Hagiwara, M., Ohuchi, E., Hongo, K., Oki, M., Wada, K., Morikawa, T., Kobashi, K. (1990) *Jpn. J. Pharmacol.* **52**, 493-495.
54. Johnson, L.R., Stening, G.F., Grossman, M.I. (1970) *Gastroenterology* **58**, 208-216.
55. Hagiwara, M., Ohuchi, E., Hongo, K., Nakano, M., Amemiya, M., Morikawa, T., Kobashi, K. (1990) *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 1369-1372.
56. Coletti-Previero, M.-A., Mattras, H., Descomps, B., Previero, A. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **657**, 122-127.
57. Schwartz, J.-C., Malfroy, B., Labaume, S.D. (1981) *Life Sci.* **29**, 1715-1740.
58. Huttner, W.B. (1988) *Ann. Rev. Physiol.* **50**, 363-376.
59. Kiso, Y., Ogasawara, S., Hirota, K., Watanabe, N., Oshima, Y., Konno, C., Hikino, H. (1984) *Planta Medica* **50**, 81-85.
60. Qadri, S.M.H., Smith, J.C., Zubairi, S., DeSilva, M.I. (1981) *Med. Microbiol. Immunol.* **169**, 67-74.
61. Kubo, M., Matsuda, H., Kimura, Y., Okuda, H., Arichi, S. (1984) *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 5051.
62. Kortun, G., Vogel, W., Andrussov, K., Ed. (1961) *Dissociation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution*, Butterworths, London.
63. Abe, K., Inoue, O., Yumioka, E. (1990) *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 208-211.
64. Benkovic, S.J. (1971) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **172**, 563-569.
65. Mattock, P., Barford, D.J., Basford, J.M., Jones, J.G. (1970) *Biochem. J.* **116**, 805-810.
66. Banerjee, R.K., Roy, A.B. (1968) *Biochem. Biophys. Acta* **151**, 573-586.
67. Duffel, M.W., Jakoby, W.B. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 11123-11127.
68. Bray, G.A. (1960) *Anal. Biochem.* **1**, 279-285.
69. Mulder, G.J., Scholtens, E. (1977) *Biochem. J.* **165**, 553-559.
70. Rozengurt, E., DeAsua, L.J., Carminatti, H. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 3142-3147.
71. Wright, J.A., Sanwal, B.D. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 1689-1699.
72. Li, J., Zhu, X., Byrnes, M., Nelson, J.W., Chang, S.H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 24599-24606.
73. Um, H.-D., Klein, C. (1993) *Biochem. J.* **295**, 821-826.
74. Huttner, W.B. (1988) *Ann. Rev. Physiol.* **50**, 363-376.
75. Kim, D.-H., Kim, H.-S., Kobashi, K. (1992) *J. Biochem.* **112**, 456-460.
76. Kim, D.-H., Kobashi, K. (1986) *Biochem. Pharmacol.* **35**, 3507-3510.
77. Pennings, E.J.M., van Kempen, G.M.J. (1982) in "Metabolism and Sulfate Conjugation," ed. by Mulder, G.J., Caldwell, J., van Kempen, G.M.J., Vonk, R.J., Taylor and Francis, New York, pp. 37-44.





# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

