

博士論文

薬物代謝酵素群発現酵母株を用いた  
医薬品及び食品成分代謝物調製技術の開発

生物工学専攻

増山 優香

2021年3月

# 目次

序論 .....	4
引用文献 .....	10
略語 .....	12
第 1 章: 出芽酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 菌体内における医薬品のグルクロン酸抱合体	
代謝物の合成.....	14
1.1 はじめに .....	14
1.2 実験方法 .....	18
1.2.1 試薬.....	18
1.2.2 遺伝子の単離とサブクローニングおよびラット UGDH とさまざまな UGT 分子種との共発現のための酵母ベクターの構築.....	18
1.2.3 UGDH/UGT 共発現プラスミドによる酵母細胞の形質転換 .....	19
1.2.4 静止菌体を用いたグルクロン酸抱合体生成 .....	20
1.2.5 ラット UGDH 遺伝子を発現する酵母細胞における UDP-グルクロン酸の産生 ..	21
1.2.6 イムノブロッティングによる酵母で発現した UGDH および UGT 酵素の分析 ..	21
1.2.7 ジクロフェナクアシル抱合体の合成と精製.....	22
1.3 実験結果.....	23
1.3.1 酵母における UGT1A1, 1A4 および 1A9 の発現レベルの増強 .....	23
1.3.2 ラット UGDH 発現酵母における UDP-グルクロン酸の産生 .....	23
1.3.3 pAUR-UGDH / UGT で形質転換された酵母細胞におけるグルクロン酸抱合体の 生合成.....	24
1.3.4 出芽酵母と分裂酵母におけるグルクロン酸抱合体生成能の比較 .....	24
1.3.5 ヒトおよび他の哺乳類由来 UGT を用いたグルクロン酸抱合体の生合成 .....	25

1.3.6	複数の結合部位を持つ位置特異的グルクロン酸抱合体の生合成 .....	26
1.3.7	酵母におけるアシル抱合体の生合成と精製 .....	26
1.4	考察 .....	28
1.5	引用文献 .....	31
第2章: ヒト硫酸転移酵素発現酵母による硫酸抱合体の合成 .....		55
2.1	はじめに .....	55
2.2	実験方法 .....	59
2.2.1	試薬及び材料 .....	59
2.2.2	ヒト SULT 発現プラスミドの構築と酵母形質転換 .....	59
2.2.3	SULT 発現酵母の培養 .....	60
2.2.4	組換え酵母の S9 画分の調製 .....	60
2.2.5	イムノブロッティングによる酵母細胞で発現した SULT 酵素の分析 .....	60
2.2.6	菌体反応による硫酸抱合体の合成 .....	61
2.2.7	HPLC による硫酸抱合体の分析 .....	61
2.3	実験結果 .....	62
2.3.1	ヒト SULT 発現組換え酵母を用いた硫酸抱合体合成システムの確立 .....	62
2.3.2	硫酸抱合体合成システムにおける反応条件の最適化 .....	62
2.3.3	生体異物からの硫酸抱合体の調製 .....	63
2.3.4	SULT によるポリフェノールの位置選択的抱合 .....	64
2.4	考察 .....	65
2.5	引用文献 .....	67
第3章: ヒトフラビン含有モノオキシゲナーゼ発現酵母による N-, S- 酸化体の合成 .....		83
3.1	はじめに .....	83
3.2	実験方法 .....	86

3.2.1	試薬及び材料.....	86
3.2.2	酵母における FMO 発現システムの構築.....	86
3.2.3	FMO を発現する組換え酵母の培養.....	87
3.2.4	イムノブロットィングによる酵母細胞で発現した FMO 酵素の分析.....	87
3.2.5	FMO 発現酵母を用いた N-oxides と S-oxides の合成.....	88
3.2.6	HPLC による FMO 代謝物の分析.....	88
3.2.7	LC-MS/MS による FMO 代謝物の分析.....	88
3.3	実験結果.....	90
3.3.1	ヒト FMO 発現酵母を使用した N-酸化および S-酸化代謝物の whole-cell 産生システムの確立.....	90
3.3.2	whole-cell での N-および S-オキシド生成のための反応条件の最適化.....	90
3.4	考察.....	92
3.5	引用文献.....	94
	総括.....	104
	謝辞.....	109
	原著論文.....	110

## 序論

私たちは日々の生活の中で、医薬品や食品などから様々な脂溶性化合物を摂取している。摂取した化合物は胃を通り小腸で吸収され、肝臓で代謝を受け最終的に糞や尿として体外に排出される。生体内における酵素による化合物の化学構造の変化を薬物代謝という。

薬物代謝の研究は 1800 年代の後半、生化学者によりヒトや動物の尿サンプルから水酸化代謝物や抱合代謝物が報告された。*In vitro* における酵素学的研究は、Brodie のグループにより、1950 年代から組織的な研究が行われ肝ミクロソームに存在する酵素が薬物代謝酵素と命名され[1]、大村、佐藤（1964）により肝ミクロソームに存在するヘムタンパク質がシトクロム P450（CYP）と命名された[2]。後にこのヘムタンパク質が、副腎ステロイドホルモンの生合成反応や肝臓の薬物酸化反応を触媒する酵素であることが明らかにされた。これにより CYP の研究に医学、薬学分野の多数の研究が行われるようになった。1950 年代から 1960 年代にかけて肝臓の薬物酸化活性が特定の薬物で誘導または阻害されることが発見され、薬物代謝研究が医薬品の有効性や毒性評価に重要であることが広く認識された。薬物代謝酵素は、医薬品のみならず、ポリフェノールやステロイドホルモンなどの生体内外の化合物の活性の変化やクリアランスに重要な役割を担っている。

薬物代謝は酸化、還元、加水分解等により極性基の生成もしくは導入を行う第 I 相反応（phase I）と、水酸基やアミノ基等に高極性物質を付加する第 II 相反応（phase II）に大別され、第 II 相反応は抱合反応とも呼ばれる（図 1）。代表的な第 I 相酵素として CYP があり、医薬品の主要な代謝経路の 70% に寄与する[3]。フラビン含有モノオキシゲナーゼ（Flavin-containing monooxygenase, FMO）もまた第 I 相酵素に属し NADPH と酸素分子を消費して含窒素、硫黄、リン化合物の酸化を触媒する一原子酸素添加酵素である。第 II 相酵素には、UDP-グルクロン酸転移酵素（UDP-glucuronosyl transferase, UGT）、硫酸転移酵素（sulfotransferase, SULT）等が存在する。UGT は主に肝臓に存在し、疎水性の化合物にグルクロン酸を付与する。硫酸転移酵素は活性硫酸 PAPS（3'-phosphoadenosine

-5'-phosphosulfate) を補酵素とし、PAPS 上の硫酸基を水酸基またはアミノ基に転移する。

脂溶性化合物の水溶性を高め体外に排泄する機能を担っている。



図 1. 薬物代謝

薬物代謝酵素は、一般的に生体外異物や薬物の解毒代謝機構として知られている。しかし、代謝により化合物の反応性が高まり予期しない毒性の原因となる場合がある(反応性代謝物)。解熱鎮痛薬であるアセトアミノフェンは通常投与量においては、硫酸抱合体やグルクロン酸抱合体へ代謝されるが、過量投与時に重篤な肝毒性が生じることが知られている[4]。これは抱合代謝が飽和し、CYPによる酸化代謝を受けることで反応性の高い求電子化合物 N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) が生成することが一因である。NAPQI は通常グルタチオン抱合を受けるが、グルタチオンが枯渇した場合には細胞内に存在する生体高分子と結合し細胞毒性を示す(図2)。

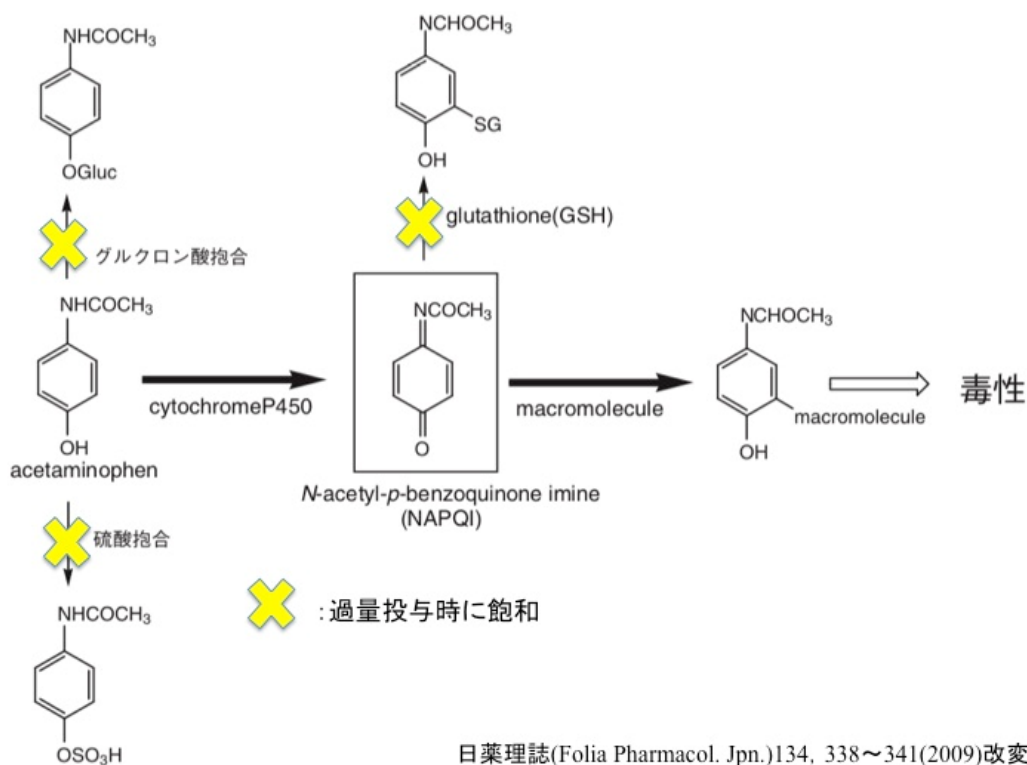


図 2. アセトアミノフェンの代謝経路

他にも糖尿病治療薬 troglitazone は、1997年に上市されたが重篤な肝障害により2000年に市場から撤退しており、その原因の一つにCYPによる反応性代謝物の関与が示唆されている[5,6]。またCYPによる代謝物だけでなく、非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDs)に含まれるカルボン酸は、UGTによって不安定な反応性代謝物となるアシル抱合体となることが知られている[7-9]。これら反応性代謝物は生体内のタンパク質とエステル交換により、薬物のタンパク結合体を形成し、肝障害を引き起こす最初のステップと考えられており、過去には多数のNSAIDが劇症肝炎により販売が中止されている。

市販後の撤退や開発中止を避けるため、医薬品開発研究において代謝物の安全性を適切に評価する必要がある。FDAのMIST(Metabolite in safety testing)[10]やICH(International conference on harmonization)のM3[11]では、全暴露量の10%を超えて存在し動物よりヒト特異的に存在する代謝物、体内での反応性が高く、毒性を示すことが多い代謝物(反応性代

謝物)がある場合、大規模臨床試験 (Phase 3 試験) の前までに代謝物に関する追加の安全性試験の実施を要求している。代謝物の安全性試験を行うにはヒトでできる代謝物を g 単位で大量に合成し、実験動物に投与して代謝物の毒性を評価する必要がある。また臨床開発の早い段階からヒトの代謝物プロファイルを正確に把握しておくことが重要なため、代謝物の構造決定や血中濃度測定の標準物質として、ステージに応じて代謝物を必要とするタイミングが多々ある。また近年、食品科学分野では薬物代謝酵素による代謝に関する研究への関心が高まっている。いくつかの報告では、血漿中の輸送形態として、ポリフェノールの第 II 相代謝物の生理学的機能が示唆されている[12-14]。中でも、野菜に含まれる典型的な抗酸化フラボノイドであるケルセチンは、体内に吸収されるとグルクロン酸抱合や硫酸抱合を受け血中を循環する。しかし体内に残存した代謝物が炎症部位に蓄積し、炎症時に放出される  $\beta$ -グルクロニダーゼ等の加水分解酵素による脱抱合を受けることで生じたアグリコンが局所的な生理作用を及ぼす可能性が示された。したがって、薬物代謝酵素により生成される代謝物を調製することは、医薬品開発、機能性食品分野などでの代謝研究で有用になる可能性がある。

医薬品代謝物の調製法には有機合成の他、医薬品を投与した実験動物の胆汁や尿からの代謝物の単離、および肝臓ミクロソームなどの粗酵素画分を用いた生合成法などがある (図 3)。一般に実験動物を使用した安全性試験にはグラム単位の代謝物が必要であり、有機合成法による調製が有用であるが、位置および立体選択的な水酸化あるいは抱合化は困難であるため、多くの場合、医薬品自身とは全く異なる合成ルートを考案する必要があり、多大なコストと手間がかかる。また、酵素的アプローチは、位置選択的および立体選択的な方法で代謝物を合成するための魅力的な方法であるが、高価な補酵素が必要であり、工業規模での酵素合成の欠点となっている。



方法	収量		デメリット
	標品, NMR (~mg)	安全性試験 (~g)	
有機合成	○	○	技術的に困難な場合がある
生体サンプル(尿, 胆汁等) からの単離	○	×	費用と時間がかかる
<i>In vitro</i> 酵素法 (肝ミクロソーム 発現系ミクロソーム)	○	△	費用と時間がかかる
微生物変換	○	○	

図 3. 代謝物の調製法

1990 年, 榊らは出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*) を宿主として薬物代謝に関与する CYP および NADPH-P450 還元酵素を発現させることに成功し[15], ヒト由来 CYP 分子種発現酵母を用いてさまざまな医薬品や食品成分の代謝物を調製することが可能となった. さらに生城らは P450 と UGT を酵母に同時発現させることにより, 医薬品の連続的な代謝反応を再現した[16]. これらの酵素が局在するミクロソーム画分を使用した代謝物調製が可能になったが, UGT によるグルクロン酸抱合反応には補酵素として高価な UDP-グルクロン酸 (UDP-glucuronic acid, UDPGA) を添加しなければならず, 安全性試験に必要な代謝物の大量調製にはコスト面での課題があった. 同様に, *in vitro* での SULT による硫酸抱合反応には, UDPGA よりもさらに高価な補酵素である PAPS の添加が必要であり, 安全性試験に必要な量の代謝物調製には高価な補酵素の添加を必要としない生成システムの確立が必要であった (図 4).

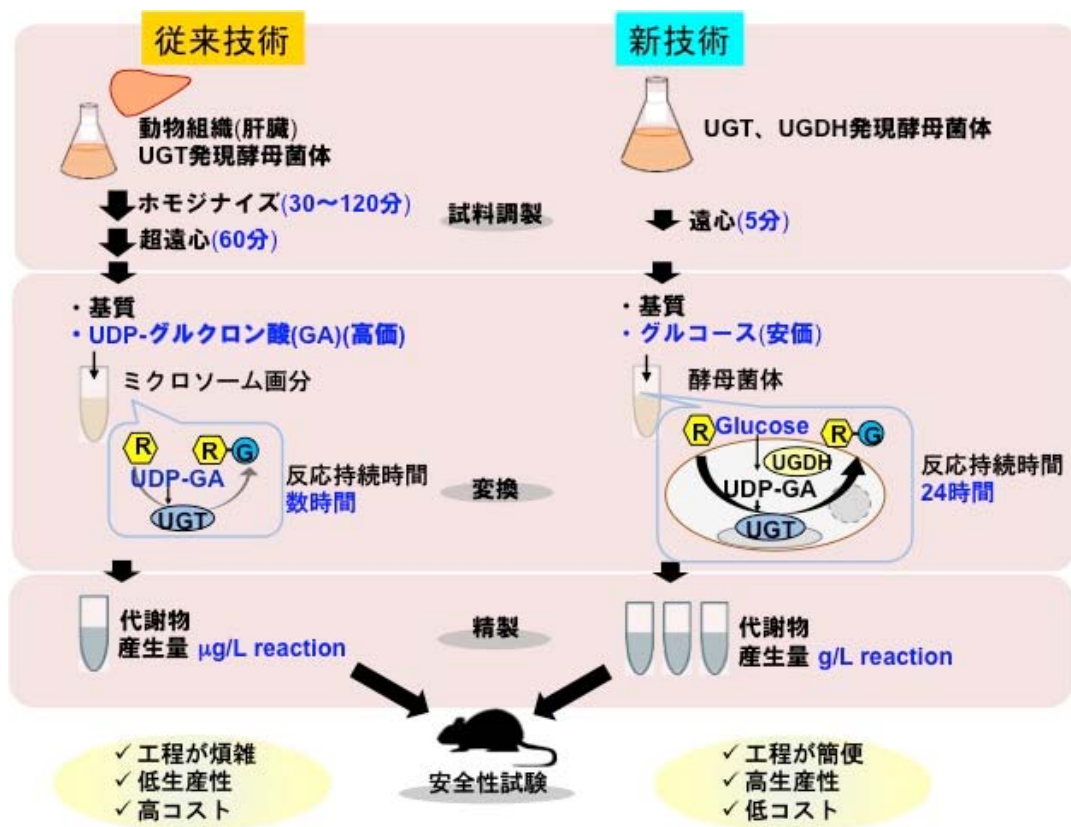


図4. 補酵素非添加でのバイオコンバージョン法による代謝物生成法

そこで、本研究ではさまざまな基質化合物の効率的な生成を目的として、補酵素供給系を含んだ酵母菌体を用いたバイオコンバージョン法による代謝物生成システムの確立を試みた。本稿では、UGT（第1章）、SULT（第2章）、FMO（第3章）の発現システムを構築し、酵母における薬物代謝酵素発現システムについて述べる。CYP代謝によって引き起こされる開発候補医薬品のドロップアウトや市場撤退に関連して、今後UGT、SULT、FMOなどのnon-CYP代謝をスクリーニングすることが重要になってくる。代謝スクリーニングから代謝物調製までが可能な本技術で、薬物代謝酵素プラットフォームを確立することは、代謝研究をサポートするツールとして有用であると考えられる。

## 引用文献

1. 加藤 隆一, 鎌滝 哲也 編, 薬物代謝学 第二版 P2
2. Omura, T.; Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239: 2370-2378.
3. Williams JA, Hyland R, Jones BC, et al. Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC<sub>i</sub>/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos.* 2004;32(11):1201-1208.
4. 大江 知之, 肝毒性を示す医薬品の代謝活性化機構の解析とそれに基づいた創薬戦略, *YAKUGAKU ZASSHI*, 2017, 137 巻, 3 号, p. 249-255
5. He K, Talaat RE, Pool WF, et al. (2004a) Metabolic activation of troglitazone: identification of a reactive metabolite and mechanisms involved. *Drug Metab Dispos* 32(6):639-646
6. Yamazaki H, Shibata A, Suzuki M, Nakajima M, Shimada N, Guengerich FP, Yokoi T (1999) Oxidation of troglitazone to a quinone-type metabolite catalyzed by cytochrome P-450 2C8 and P-450 3A4 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 27:1260-1266
7. Iwamura A, Nakajima M, Oda S, Yokoi T. Toxicological potential of acyl glucuronides and its assessment. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2017;32(1):2-11.
8. Regan SL, Maggs JL, Hammond TG, Lambert C, Williams DP, Park BK. Acyl glucuronides: the good, the bad and the ugly. *Biopharm Drug Dispos.* 2010;31(7):367-395.
9. Bailey MJ, Dickinson RG. Chemical and immunochemical comparison of protein adduct formation of four carboxylate drugs in rat liver and plasma. *Chem Res Toxicol.* 1996;9(3):659-666. doi: 10.1021/tx960017o
10. Guidance for Industry Safety Testing of Drug Metabolites (2008) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER).
11. 医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス (平成22年2月19日薬食審査発0219第6号)
12. Kunihiro AG, Luis PB, Brickey JA, et al. Beta-Glucuronidase Catalyzes Deconjugation and Activation of Curcumin-Glucuronide in Bone. *J Nat Prod.* 2019;82(3):500-509.
13. Terao J, Murota K, Kawai Y. Conjugated quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone in vivo. *Food Funct.* 2011;2(1):11-17.
14. Patel KR, Andreadi C, Britton RG, et al. Sulfate metabolites provide an intracellular pool for resveratrol generation and induce autophagy with senescence. *Sci Transl Med.* 2013;5(205):205ra133.
15. Sakaki T, Shibata M, Yabusaki Y, Murakami H, Ohkawa H. Expression of bovine cytochrome P450c21 and its fused enzymes with yeast NADPH-cytochrome P450 reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Cell Biol.* 1990;9(8):603-614.
16. Ikushiro, S.; Sahara, M.; Em,i Y.; Yabusaki, Y.; Iyanagi, T. Functional co-expression of xenobiotic metabolizing enzymes, rat cytochrome P450 1A1 and UDP-glucuronosyltransferase 1A6, in yeast microsomes. *Biochim Biophys Acta.* 2004, 1672,

86-92.

17. Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:581-616.
18. Coughtrie MWH. Function and organization of the human cytosolic sulfotransferase (SULT) family. *Chem Biol Interact.* 2016;259(Pt A):2-7.
19. Sakaki T, Shibata M, Yabusaki Y, Murakami H, Ohkawa H. Expression of bovine cytochrome P450c21 and its fused enzymes with yeast NADPH-cytochrome P450 reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Cell Biol.* 1990;9(8):603-614.
20. Inouye K, Kondo S, Yamamura M, Nakanishi D, Sakaki T. Inhibitory effects of detergents on rat CYP1A1-dependent monooxygenase: comparison of mixed and fused systems consisting of rat CYP 1A1 and yeast NADPH-P450 reductase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280(5):1346-1351.

## 略語

APAP: N-Acetyl-*p*-Aminophenol

APS: Adenosine-5'-phosphosulfate

ATP: Adenosine triphosphate

BPA: Bisphenol A

BPAF: Bisphenol AF

BZD: Benzylamine

BZDO: Benzylamine N-oxide

CYP: Cytochrome P450

DHEA: Dehydroepiandrosterone

DMEs: Drug metabolizing enzymes

DMSO: Dimethylsulfoxide

FMO: Flavin-containing monooxygenase

GABAAR: gamma-Aminobutyric acid A receptor

GAP: Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase

GST: Glutathione S-transferase

7GC: 7-hydroxycoumarin- $\beta$ -D- glucuronide

7HC: 7-hydroxycoumarin

7HC-S: 7-hydroxycoumarin-sulfate

HES: Hesperetin

His: Histidine

ICH: International conference on harmonization

Leu: leucine

MIST: Metabolite in safety testing

MRM: Multiple reaction monitoring

MTS: Methyl *p*-tolyl sulfide

MTSO: Methyl *p*-tolyl sulfoxide

NADPH:  $\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form

NAPQI: N-acetyl-*p*-benzoquinone imine

NMDA: N-methyl-D-aspartic acid

NSAID: Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug

1-OHP: 1-hydroxypyrene

PAPS: 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate

PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride

QUE: Quercetin

*S.cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae*

*S. pombe*: *Schizosaccharomyces pombe*

SULT: Sulfotransferase

TES: Testosterone

UGT: Uridine 5'-diphospho (UDP) -glucuronosyltransferase

UGDH: UDP-glucose dehydrogenase

UDPGA: UDP-glucuronic acid

# 第1章: 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 菌体内における医薬品のグルクロン酸抱合体代謝物の合成

## 1.1 はじめに

ビリルビン, ステロイド, さまざまな薬物, 環境汚染物質を含む多くの内因性および外因性化合物のグルクロン酸抱合は, UGT によって触媒され, 疎水性生体異物の生体内変化と薬物動態において重要な役割を果たす[1]. UGT は, 補酵素である UDP-グルクロン酸 (UDPGA) から基質化合物上の求核性基 (主にヒドロキシル基またはアミノ基) へのグルクロン酸部分の転移を触媒する. ヒト UGT のサブファミリー 1A, 2A, および 2B には 19 分子種があり (図 1), サブファミリー 1A の 9 つのメンバーはすべて, 共有するエクソンと選択的スプライシングを受ける単一の遺伝子複合体によってコードされている[2].

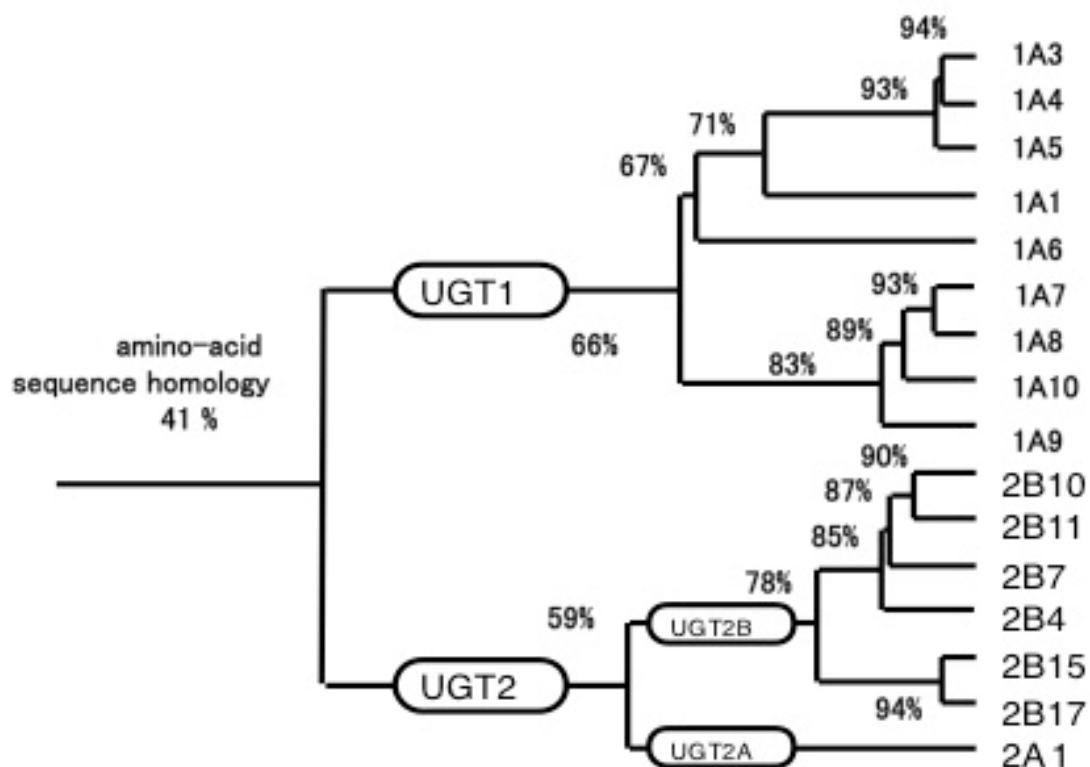


図 1. ヒト UGT 系統樹

ヒト UGT1A サブファミリーの mRNA には、N 末端ドメインをコードする分子種により異なるエクソン I と、残 C 末端ドメインをコードする同一のエクソン II-V が含まれている[3]. したがって、同じ補酵素を使用して多様な生体内外基質の解毒を可能にするため、UGT1A 分子種は N 末端可変領域と C 末端共通共有領域を組み合わせることによって産生される [1] (図 2) .

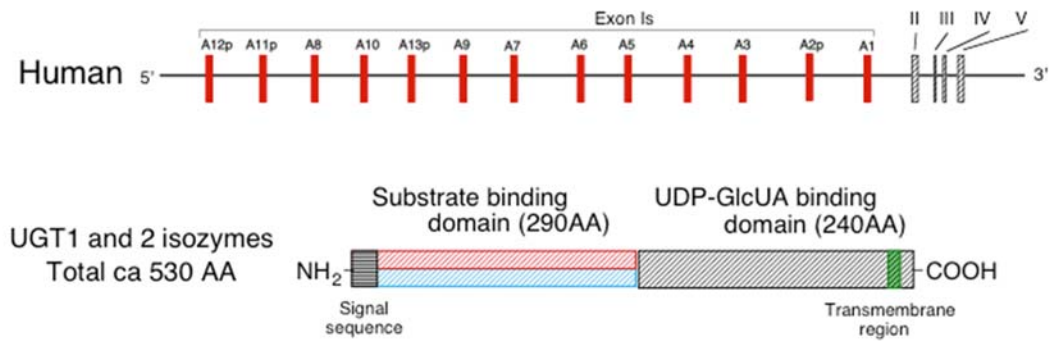


図 2. UGT 遺伝子

ほとんどの場合、薬物を含む生体異物のグルクロン酸抱合は、それらの不活化と排泄に関連している。それにもかかわらず、アシル抱合体のように、生物学的に活性な、あるいは反応性の代謝物の生成も報告された [4-6] (図 3) .

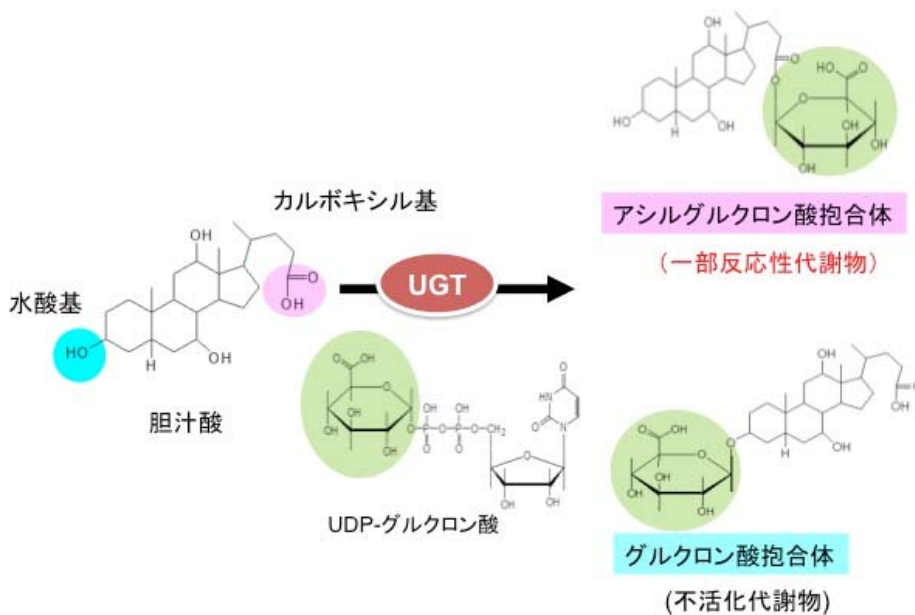


図 3. UGT によるグルクロン酸抱合反応



さらに、UGT 遺伝子の多型は、薬物動態の変化を引き起こし薬物治療の副作用につながる場合がある[7, 8]. したがって、医薬品開発においてグルクロン酸抱合体の合成法には効果的な方法が必要である. 従来、そのようなグルクロン酸抱合体は、有機化学合成、胆汁や尿などの生体サンプルからの代謝物の精製、または肝ミクロソームを使用した酵素的生合成のいずれかによって得ることができる [9-12]. グリコシターゼを使用したグルクロン酸抱合体形成の代替アプローチも最近開発された. Ma らは、ステロイドグルクロン酸抱合体のライブラリーは、大腸菌 $\beta$ -グルクロニダーゼに由来するグルクロニルシターゼを使用して調製したと報告している[13].

出芽酵母細胞は、以前から UGT の異種発現に使用されていた[14-17]. それにもかかわらず、本来、酵母は UDPGA を生成できないため、発現した UGT を使用して薬物をグルクロン酸抱合体に変換することができない. しかし後に、植物 UGDH の異種発現によって出芽酵母が内因性 UDP-グルコースからのデノボ合成によって UDP-グルクロン酸を生成することが可能になった[18]. その画期的な報告に続いて、Dragan ら[19]は、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) でのヒト UGDH と UGT の共発現を使用して、グルクロン酸抱合体生産のための菌体を用いたバイオコンバージョンシステムを開発し、高価な補酵素である UDPGA を必要とせずに医薬品化合物のグルクロン酸抱合体へのバイオコンバージョンを達成した. これは大きな進歩だったが、いくつかの欠点や制限も見られた. たとえば、UGT1A6 は、別の分子種である UGT1A9 と比較して、4-メチルウンベリフェロンに対して完全なグルクロン酸抱合活性を示さなかった[19]. もう 1 つは、グルクロン酸抱合体代謝物に加えて、イブプロフェンのグルコシル化代謝物（アシルグルコシド）が、おそらく UDP-グルコースの過剰産生のために、UGT2B7 と UGDH を共発現する分裂酵母細胞によって産生されたことである[20].

出芽酵母は、CYP による薬物代謝物を含むさまざまな化合物を生産するためのバイオテクノロジープラットフォームで広く使用されている[21, 22]. 本研究では分裂酵母ではなく出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をベースにし、ラット UGDH と選択した哺乳類 UGT 酵

素を共発現する(図 4), アシル抱合体を含むグルクロン酸抱合体の生合成システムを開発した. 新しく柔軟な酵母システムは, 低コストで高効率のグルクロン酸抱合体合成のための便利で用途の広いプラットフォームである.

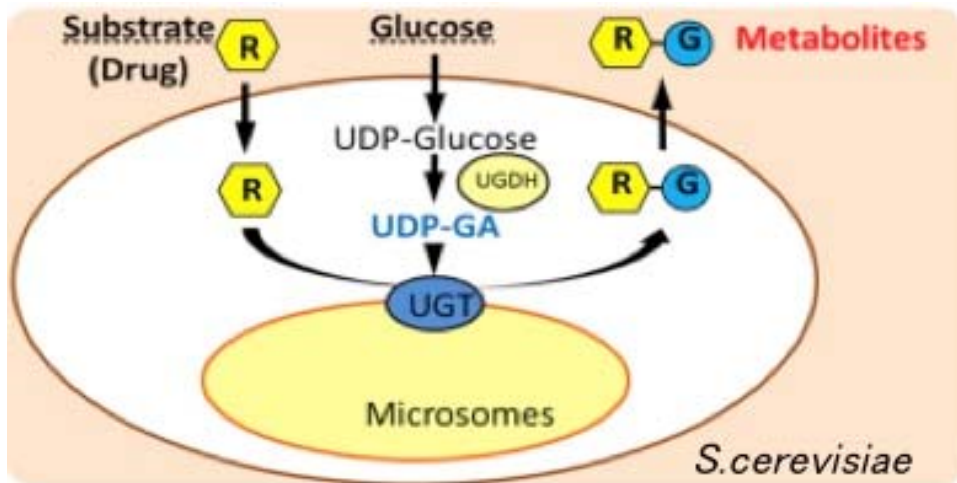


図 4. UGT/UGDH 共発現酵母

## 1.2 実験方法

### 1.2.1 試薬

7-ヒドロキシクマリン (7HC), 11 $\alpha$ -ヒドロキシprogesterone, ミコフェノール酸, 7-ヒドロキシクマリン- $\beta$ -D-グルクロニド (7GC) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した. ジクロフェナクアシルグルクロン酸抱合体, フェノール性  $\beta$ -D-グルクロン酸抱合体, ミコフェノール酸のアシル- $\beta$ -D-グルクロン酸抱合体誘導体は Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, Canada) から購入した. アセトニトリル [高速液体クロマトグラフィー用] は関東化学株式会社 (日本) から購入した. その他全ての化合物は Nacalai Tesque (日本) で購入した. 本研究で使用した UGT 基質の化学構造は Fig. S1 に示した.

### 1.2.2 遺伝子の単離とサブクローニングおよびラット UGDH とさまざまな UGT 分子種との共発現のための酵母ベクターの構築

本研究で使用されたすべての UGT 遺伝子は, 表 S1 に示す. ラット UGT サブファミリー 1A および 2B, ならびにヒト UGT 1A7, 1A8 および 1A10 の cDNA は, 以前に報告されたように得られた [23, 24]. ヒト UGT1A5, UGT2A1, UGT2B17, ブタ UGT2B18, UGT2B31, UGT2C1 およびウシ UGT1A6 の cDNA は, Eurofins MWG Operon (日本) により *S.cerevisiae* 発現に最適化された合成遺伝子として得られた. ヒト, マウス, ブタの他の UGT, およびラット UGDH (GenBank アクセッションナンバー NM\_031325) の cDNA は, 肝臓 cDNA ライブラリー (OriGene Technologies Inc., Rockville, MD) から HindIII 部位を含むプライマーを使用して PCR によって増幅された.

UGDH と選択された UGT 酵素を含む酵母共発現ベクターの構築スキームを Fig. S2 に示した. 一部の UGT 酵素 (ヒト UGT1A1, 1A4, および 1A9) は, 酵母発現システムで比較的低い発現レベルを示した (Fig. 1A). それらの発現レベルは, 元の N 末端配列 (推定シグナル配列) を UGT1A7 の対応するシグナル配列で置き換えることによって増加した

(UGT 1A1, 1A4, 1A7 および 1A9 の N 末端シグナルペプチド配列については, Table. S2 を参照). UGT1A1, 1A4 または 1A9 の元の N 末端シグナルペプチドを UGT1A7 で置き換えるために, pUC119 と UGT cDNA および修飾配列を含む特異的プライマーを使用して PCR を行った. DNA 配列決定による確認後, 得られた修飾配列を pGYR の HindIII 部位にライゲーションした. UGDH 遺伝子を GAP プロモーターおよびターミネーターとともに, 染色体組込型酵母発現ベクター pAUR101 (TaKaRa, 日本) に挿入するために, QuickChange™ mutagenesis (Agilent Technologies) を使用してベクターのマルチクローニングサイトに NotI サイトを生成した. UGDH 遺伝子は, GAP プロモーターおよびターミネーターとともに, NotI による制限酵素処理によって pGYR / UGDH プラスミドから取得され, InFusion™ Advantage PCR クローニングキット (日本) を使用して pAUR-N にクローニングされ, pAUR-UGDH が得られた. UGT 遺伝子は GAP プロモーターおよびターミネーターとともに pGYR / UGT から NotI で制限酵素処理され, NotI 部位で pAUR / UGDH にライゲーションされた. これによりラット UGDH と選択された UGT を含む酵母発現ベクターが構築された.

### 1.2.3 UGDH/UGT 共発現プラスミドによる酵母細胞の形質転換

以前に報告されたように, 酵母 (*S. cerevisiae*) AH22 をタンパク質発現宿主に使用した [14-17]. 染色体組込型酵母発現ベクター pAUR はオーレオバシジン A 耐性遺伝子を持っているため, pAUR を含む AH22 形質転換体は YPD 培地 (1% (w/v) 酵母エキス, 2% (w/v) ポリペプトン, 2% (w/v) グルコース) に 0.5 µg/mL オーレオバシジン A (TaKaRa, 日本) を添加で増殖できる. 発現プラスミドは, BsiWI によって制限酵素処理した後に塩化リチウム法による形質転換 (0.5 –1µg DNA/10 µL, 10 µL) を行った [26]. コロニー PCR を使用して, オーレオバシジン A 耐性酵母細胞, すなわち形質転換細胞の染色体への pAUR 発現ベクターの導入を確認した.

#### 1.2.4 静止菌体を用いたグルクロン酸抱合体生成

形質転換酵母株を、0.5 µg/mL オーレオバシジン A を添加した 5mL の YPD に播種し、培養物を 30°C で 2 日間インキュベートした。次に、前培養液を、500mL の合成最小 (SD) 培地 (2% (w/v) D-グルコースおよび 0.67% (w/v) ニトロゲンベース (アミノ酸不含)) に移した。20µg/ mL L-ヒスチジンと 100µg/ mL L-ロイシン (SD + His + Leu) を加え、40 時間インキュベートした。酵母細胞を遠心分離 (3,000×g, 5 分, 室温) によって回収し、8% (w/v) グルコースを含む 0.2mL の 100mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に再懸濁した。次に、DMSO に溶解した基質の 100 mM ストック溶液 2 µL を添加することにより、グルクロン酸抱合基質を最終濃度が 1 mM になるように添加した。アッセイは、96 ディープウェルマイクロプレートで 30°C で 24 時間、180 rpm で振とうし、恒温インキュベーターシェーカー (micro tube Maximizer MBR-022UP; TAITEC Co., 日本) を使用して実施した。インキュベーション後、2.5 倍量のクロロホルム : メタノール (3 : 1, v/v) を反応培地に添加した。抽出物は、遠心分離 (12,000×g, 10 分, 室温) によって上部水相と下部有機相に分離した。下側の有機相を収集し、蒸発させ、100µL のアセトニトリルに再溶解し、UPLC システムを使用して各相を分析した。また、酵母細胞の細胞外と細胞内のグルクロン酸抱合体の量を分析するために、酵母細胞でグルクロン酸抱合体を抽出する前に、反応培地を遠心分離によって分離し、続いて 2 つの画分を別々に抽出した。

本研究におけるすべてのグルクロン酸抱合体と親化合物の検出は、Cosmosil 2.5C18-MS-II カラム (2.0 mm x 100 mm, ナカライテスク) を備えた UPLC システムを使用して実施した。7-ヒドロキシクマリンとそのグルクロン酸抱合体の分析では、カラム温度は 45°C、流速は 0.5 mL/min、検出は 320 nm とした。グラジエント溶出条件は、1% (v/v) トリフルオロ酢酸を含む水-アセトニトリル、10% (v/v) アセトニトリル (4 分)、10~70%アセトニトリル (6 分)、70~10%アセトニトリル (2 分)、10%アセトニトリル (4 分) とした。ミコフェノール酸とそのグルクロン酸抱合体の分析では、流速は 0.5 mL/min、検出は 250 nm、カラム温度は 40°C とした。グラジエント溶出条件は、1% (v/v) トリフルオロ酢酸を含む

水-アセトニトリル, 20~40% (v/v) アセトニトリル (7分), 40%アセトニトリル (2分), 40~20%アセトニトリル (2分), 20%アセトニトリル (2分) とした. ジクロフェナク, メフェナム酸, フルフェナム酸, ゾメピラクなどの非ステロイド性抗炎症薬からのアシル抱合体の分析では, 流速は 0.5mL/min, UV 250 nm で検出, カラム温度は 40°C とした. グラジエント溶出条件は, 1% (v/v) トリフルオロ酢酸を含む水-アセトニトリル, 5~40% (v/v) アセトニトリル (5分), 40~100%アセトニトリル (3分), 100%アセトニトリル (1分), 100-5%アセトニトリル (5分), 5%アセトニトリル (3分) とした. いずれの場合も, グルクロン酸抱合体生成の確認は,  $\beta$ -グルクロニダーゼの加水分解によって行われた. 分析におけるグルクロン酸抱合体の定量のための検量線は, 入手可能な場合標準品を使用した. その他, UV 吸光度で検出を行った場合, 親化合物の吸光係数を抱合体の吸光係数の近似値として使用した[27].

#### 1.2.5 ラット UGDH 遺伝子を発現する酵母細胞における UDP-グルクロン酸の産生

出芽酵母細胞における UDPGA の産生は, 細胞内 UDPGA の検出によって確認した. UGDH 遺伝子を発現する酵母形質転換体を選択培地で 30°C, 48 時間培養した後, 2.5 倍量のクロロホルム:メタノール (3:1, v/v) を酵母細胞ペレットに添加した. 次に, 上部の水相を遠心分離 (12,000×g, 10 分, 室温) によって分離した. 酵母細胞内の細胞内 UDPGA は, WakoPack Navi C30-5 カラム (和光純薬工業, 日本) -HPLC システムと, 移動相として 20 mM 酢酸トリエチルアミン (pH 7.0) を使用したアイソクラティック分析 (流速 0.35 mL/min, UV= 260 nm) を使用して分離および検出された.

#### 1.2.6 イムノブロッティングによる酵母で発現した UGDH および UGT 酵素の分析

ラット UGDH とヒト UGT1A の発現を確認するために, 酵母タンパクをイムノブロット

解析した。酵母ペレットを 0.5mg/mL ザイモリアーゼ 100T (Nacalai Tesque) で 30°C, 30 分間処理した後, SDS-PAGE (10%アクリルアミドゲル) を行った。得られたポリペプチドバンドをニトロセルロース膜に転写し, UGT またはラット UGDH に対するポリクローナル抗体を使用して検出した。抗ヒト UGT1A または抗ラット UGDH 抗体は, 対応する特定のペプチド領域, すなわち, 前述[28]のように 516-GKGRVKKSHKSKTH-529 および 420-FKELDYERIHKRML-433 を認識する。標的タンパク質は, 化学発光 (ECL 検出キット; Amersham Biosciences Inc., Piscataway, NJ) によって可視化され, 各タンパク質のレベルは, ImageJ ソフトウェアを使用してデンストメトリーで決定された。

### 1.2.7 ジクロフェナクアシル抱合体の合成と精製

形質転換された酵母株を, 0.5 µg/mL のオーレオバシジン A を添加した 5 mL の YPD 培地に播種し, 30°C で 2 日間インキュベートした。次に, 前培養液をオーレオバシジン A 不含 200mL の YPD 培地に移し 30°C, 12 時間培養した。10L の単回使用培養バッグ (藤森工業株式会社, 日本) を使用し, これらの培養物を, 20 µg/mL L-ヒスチジンおよび 100 µg/mL L-ロイシンを添加した 10L の SD 培地に移し 40 時間インキュベートした。このインキュベーションに続いて, 酵母細胞を遠心分離し (3,000g, 5 分, 室温), 8% (w/v) グルコースを含む 400 mL の 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に再懸濁した。DMSO のストック溶液から 4 mL の 100 mM ジクロフェナクを添加することにより, 基質を最終濃度 1 mM まで添加した。静止細胞で 48 時間バイオコンバージョンした後, ジクロフェナクアシルグルクロニドを含む反応培地を遠心分離 (3,000×g, 5 分, 室温) によって酵母細胞から分離した。ジクロフェナクアシル抱合体の精製は, Cosmosil 140C<sub>18</sub>-OPN カラム (140µm, 2.7 x 20 cm) を使用した分取 RP クロマトグラフィーを使用して, 水-メタノールを段階的に溶出することにより行った。各フラクションの純度を UPLC で評価し, 純粋なフラクションをプールして蒸発させ, 溶媒量を減らした。より短い Cosmosil 140C<sub>18</sub>-OPN カラム (140µm, 2.7 x 10 cm) を使用して精製も行った。グルクロン酸抱合体を含む画分をプール

し、蒸発させ、凍結乾燥させた。ジクロフェナクのインタクトなアシルグルクロニドの純度は、その UPLC 溶出パターンを標準物質と比較し、 $\beta$ -グルクロニダーゼ処理の効果を調べることによって確認された。アシル抱合体のさらなる構造確認は、MS および NMR スペクトルの測定によって行われた (Fig. S5 および Fig. S6 を参照)。

### 1.3 実験結果

#### 1.3.1 酵母における UGT1A1, 1A4 および 1A9 の発現レベルの増強

出芽酵母システムで発現したヒト UGT1A1, 1A4, および 1A9 の最初のイムノブロット解析では、他のヒト UGT と比較して比較的低い発現レベルであった (Fig. 1A)。これら 3 つの UGT の発現レベルを高めるために、UGT1A7 の発現レベルがヒト UGT の中で最も高かったため、シグナルペプチドを UGT1A7 の対応するセグメントに置き換えた。この置換の効果は UGT1A4 で特に大きかったが、UGT1A1 と UGT1A9 でも明らかであった (ヒト UGT 1A1, 1A4, 1A7, 1A9 の N 末端シグナルペプチドのアミノ酸配列を Table. S2 に示す)。結果として、UGT1A7 のシグナルペプチドを含む修飾 UGT の発現レベルが 2~4 倍に増加し、すべての UGT1A 酵素で同様の発現レベルをもたらしたことを示した (Fig. 1B)。7HC のグルクロン酸抱合活性の同等の増加がマイクロソーム画分で観察された (結果は未掲載)。

#### 1.3.2 ラット UGDH 発現酵母における UDP-グルクロン酸の産生

酵母で UDPGA を産生するために、染色体組込型ベクター pAUR-UGDH を使用してラット UGDH 遺伝子を酵母ゲノムに導入した (Fig. S2)。pAUR-UGDH を組み込んだザイモリアーゼ処理酵母を免疫検出し、53 kDa の分子量を持つタンパク質の発現を確認した (Fig. S3)。酵母における UDPGA の産生は、内因的に産生された糖ヌクレオチドの分析によって確認された (Fig. S4)。対照酵母では糖ヌクレオチドとして UDP-グルコースのみが検出されたが (ライン B, ピーク 1)、導入酵母では UDP-グルコースに加えて UDPGA (ライ



ン A, ピーク 2) の有意なピークが検出された. これらのラット UGDH 発現酵母におけるこの糖ヌクレオチドの細胞内濃度は約 1.2~1.6mM だった.

### 1.3.3 pAUR-UGDH / UGT で形質転換された酵母細胞におけるグルクロン酸抱合体の生合成

酵母でグルクロン酸転移酵素を産生するために, ヒトまたは別の哺乳動物 UGT およびラット UGDH をコードする共発現ベクター, pAUR-UGDH / UGT を構築した (Fig. S2). グルクロン酸抱合活性が最も高い共発現プラスミド pAUR-ratUGDH / humanUGT1A6 で形質転換された酵母株 AH22 における, 7HC のグルクロン酸抱合体への変換の時間経過は, 24 時間以内に 7HC-グルクロン酸抱合体へのほぼ完全な変換をした (Fig. 2) . 反応溶液の生成物を  $\beta$ -グルクロニダーゼで処理すると, グリコシドではなく, 7HC の  $\beta$  結合グルクロン酸抱合体の形成が確認された (結果は未掲載). 7HC のそのグルクロン酸抱合体への変換に対するグルコース濃度依存性は, グルコース濃度 8% (w/v) で最も高いことを示した (Fig. 3). さらに, 培地中および細胞内のグルクロン酸抱合体の量の分析により, 形成されたグルクロン酸抱合体の約 90% が培地に分泌され, 遠心分離による細胞の除去後に培地から収集できることが見出された.

### 1.3.4 出芽酵母と分裂酵母におけるグルクロン酸抱合体生成能の比較

これまで遺伝子操作された分裂酵母, *S. pombe* を使用したバイオコンバージョンによるグルクロン酸抱合体産生が報告された[19]. 出芽酵母 (*S. cerevisiae*) と分裂酵母 (*S. pombe*) のグルクロン酸産生能を比較するために, 両方とも UGDH と UGT を含み, 新しいシステムからいくつかの形質転換体, すなわちヒト UGT1A1 と 1A6 を発現するものを選択した. Table. 1 は, 出芽酵母と分裂酵母の 4-メチルウンベリフェロングルクロン酸抱合体生産の比較を示した. UGT1A1 および UGT1A6 を含む出芽酵母におけるこのグルクロン酸抱合体の産生率は, 分裂酵母よりもそれぞれ 10 倍および 50 倍高かった. 出芽酵母の乾燥重量あた

りのグルクロン酸抱合体の量は、分裂酵母と比較して 20~100 倍の増加を示した。

### 1.3.5 ヒトおよび他の哺乳類由来 UGT を用いたグルクロン酸抱合体の生合成

ヒトを含む哺乳類の UGT 遺伝子は、UGT1 および UGT2 サブファミリーを含む遺伝子ファミリーに属している。各 UGT 酵素は、生体異物化合物に対して、部分的に重複している場合でも、基質および領域の特異性が異なる。酵母で構造的に多様な化合物のグルクロニドを高効率で生成するために、15 種のヒト UGT, 10 種のラット UGT, 8 種のマウス UGT, 5 種のブタ UGT, またはウシ UGT1A6 のいずれかをコードする cDNA 配列を pAUR-UGDH ベクターに挿入した (完全なリストは Table. S1)。これらの共発現 pAUR ベクターをそれぞれ導入した形質転換酵母は、哺乳動物 UGT とラット UGDH を共発現する 39 の異なる酵母株のセットリストを作成した。これらすべての菌株のグルクロン酸抱合活性は、3 つの基質、7HC, ジクロフェナク, 11 $\alpha$ -ヒドロキシprogesterone をそれぞれ使用して評価された (Fig. S1)。この基質を選択した理由は、7HC がほとんどの UGT によってさまざまな速度でグルクロン酸抱合される小さなフェノール基質であるためである。ジクロフェナクはカルボン酸を含み、グルクロン酸抱合されてアシル抱合体を形成する、11 $\alpha$ -ヒドロキシprogesterone はステロイド基質である。この比較の結果は Table. S3 に示した。これらの 39 の共発現酵母株の大部分が 3 つの選択された基質の少なくとも 1 つからグルクロン酸抱合体生成を示した。ヒト UGT1A6, ヒト UGT2A1, ラット UGT2B1 およびマウス Ugt1a6 形質転換体は、7HC-グルクロン酸抱合体の産生において比較的高い生成効率を示した。ジクロフェナクアシルグルクロン酸抱合体の有意な特異的産生が、ラット UGT2B1 およびマウス Ugt2b1 を発現する酵母で得られた。UGT2 サブファミリーメンバー酵素の中で、ラット UGT2B6 は 11 $\alpha$ -ヒドロキシprogesterone グルクロン酸抱合体の最も高い生成率を示した。生成速度は 0.001 から 10.26 ( $\mu\text{mol}/\text{d}/\text{g}$  湿重量) だった。したがって、ヒトまたは哺乳類の UGT 酵素とラット UGDH の組み合わせにより、出芽酵母の遺伝子組換え株がさまざまなグルクロン酸抱合体を生成できることを示した。

### 1.3.6 複数の結合部位を持つ位置特異的グルクロン酸抱合体の生合成

有機合成と比較した，グルクロン酸抱合体の酵素的生合成の主な利点の 1 つは，複数の結合部位を持つ基質の場合の位置特異的グルクロン酸抱合である．免疫抑制薬として使用されるミコフェノール酸には，フェノール結合またはカルボキシル結合のいずれかのコンジュゲートを生成する 2 つの潜在的なグルクロン酸抱合部位がある．Fig. 4 は，UGT-UGDH 発現酵母菌体を使用したミコフェノール酸グルクロン酸抱合体の生成を示している．酵母におけるヒト UGT1A9 は，HEK293 細胞で発現された組換えヒト UGT1A9 と同様に，ミコフェノール酸のフェノール性グルクロン酸抱合体形成を特異的に触媒することができる [29]．一方，ラット UGT2B1 は，ミコフェノール酸のアシル抱合体を生成する (Fig. 4)．したがって，ヒトだけでなく他の種にも由来する適切な哺乳動物 UGT 酵素を選択することにより，複数の結合部位を含む様々な化合物の目的のグルクロン酸抱合体を得ることができる．

### 1.3.7 酵母におけるアシル抱合体の生合成と精製

カルボキシル基を持ついくつかの薬物の  $1\beta$ -*O*-アシルグルクロニドは，タンパク質に共有結合し，潜在的な毒性を引き起こす可能性のある反応性代謝物であると報告された [4-6]．その結果，アシルグルクロニドは医薬品開発中の安全性試験にとって最も重要な代謝物の 1 つであり， $1\beta$ -*O*-アシルグルクロニドの安定性と反応性は化学的に合成されたアシル抱合体を使用して調べられた [30,31]．ヒトまたは他の哺乳動物 UGT で形質転換された酵母株の中から，ジクロフェナクグルクロン酸抱合活性を評価することによって最も適した酵素が選択された．ミコフェノール酸アシル抱合体と同様に，ラット UGT2B1 はジクロフェナクグルクロン酸抱合の媒介に非常に効率的であることがわかり，この抱合活性に対する反応培地の pH の影響も調べた (Fig. 5)．Table. 2 は，ラット UGT2B1-UGDH 発現酵母を使用した，カルボン酸基を持ついくつかの薬物のアシル抱合体の生成能を示した．これらの薬物の化学構造を Fig. S1 に示す．アシル抱合体の生産速度は 0.39 から 4.19 ( $\mu\text{mol/day/g}$

湿重量) だった。上記の結果に基づいて、ジクロフェナクアシル抱合体の生成は、最適化された条件下でラット UGT2B1 発現出芽酵母株を使用して行った。ジクロフェナクアシル抱合体を精製し、サンプルの HPLC プロファイル (Fig. 6) から、アシル転移のない高純度のジクロフェナクアシル抱合体が得られた。生成物であるアシル抱合体の同定は、HPLC での市販の標準物質アシル抱合体によって確認された (データは未掲載)。精製されたジクロフェナクアシル抱合体の LC-MS 分析は、抱合体のプロトン化分子イオン ( $m/z$  472  $[M+1]^+$ ) と、抱合体よりフラグメント化で生じたアグリコン ( $296 [472-C_6H_8O_6]^+$ ) の検出からジクロフェナクのモノグルクロニドの生成が確認された (Fig. S5)。さらに、ラット UGT2B1 と UGDH を共発現する酵母株で生合成された精製ジクロフェナクアシル抱合体の  $^1H$ -および  $^{13}C$ -NMR スペクトル (Fig. S6A および B) は、 $\beta$  結合の特徴的な NMR シグナルを明らかにした。以前に報告されたように、グルクロン酸の C1 炭素はアノマープロトンに対して  $\delta_H$  5.66 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, 1'-H), アノマー炭素に対して  $\delta_C$  95.8 である [32]。湿重量 50g の酵母細胞を使用して、最終精製工程で約 40mg のジクロフェナクアシル抱合体が得られた。ジクロフェナクアシル抱合体の収率および純度は、それぞれ 21% および 96% であった。したがって、本稿で説明している方法は、数十ミリグラム相当の高純度なアシル抱合体を妥当なコストで製造するのに適している。まとめると、UGDH と適切な UGT 分子種を発現する遺伝子組換え出芽酵母 *S. cerevisiae* は、さまざまなニーズに合わせて選択および最適化することが可能であり酵母菌体を介した UGT 代謝産物の生産に有用なシステムであることを示唆した。

## 1.4 考察

遺伝子組換え出芽酵母は、P450 依存性薬物代謝物を含むさまざまな化合物を生産するためのバイオテクノロジープラットフォームで広く使用されている[21, 22]. 本研究では、選択された哺乳類由来 UGT 酵素を共発現する出芽酵母株（これまでに開発した 39 種の 1 つをラット UGDH と一緒に）を、第 II 相薬物代謝物としてのグルクロン酸抱合体の生合成のために構築した。GAP プロモーター およびターミネーターを備えた pGYR ベクターを使用することにより、宿主細胞として出芽酵母を UGT 酵素の発現に使用できることを示した[14-17,25]. 出芽酵母においてヒト UGT を発現させると、それらのいくつか、特に UGT1A4 は、他のものよりも低い発現レベルを示した (Fig. 1). 低レベルで発現した UGT のシグナルペプチドをヒト UGT1A7 のシグナルペプチドに置き換えると、それらの発現レベルが上昇し、すべてのヒト UGT1A でほぼ同様の発現レベルが得られることがわかった (Fig. 1). 同様に、膜におけるシトクロム P450 の異種発現では、N 末端領域の変異が宿主細胞におけるタンパク質の発現に有利に働くことが知られている[33].

Bureik らは、分裂酵母である (*S. pombe*) によるバイオコンバージョンを利用したグルクロン酸抱合体合成システムを開発した [19, 20, 34, 35]. *S.cerevisiae* と *S.pombe* はどちらも酵母に分類され、約 3 億から 4 億年前の進化の過程で分岐したと考えられている[36]. 2 つの酵母は類似したゲノムサイズと遺伝子数を持っているが、染色体数と成長特性に顕著な違いがある。酵母菌体を用いたグルクロン酸抱合体合成における出芽酵母のいくつかの利点を特定し、ここで基質として 4-メチルウンベリフェロンを使用してそれを実証した (Table. 1). ラット UGDH とヒト UGT1A1 または UGT1A6 を含む出芽酵母におけるグルクロン酸抱合体の産生能力は、対応する遺伝子を保有する分裂酵母よりもそれぞれ 10 倍から 50 倍高い。遺伝子のプロモーター依存的発現レベルやベクター依存のコピー数など、出芽酵母と分裂酵母の間の生産能力のこれらの違いにはいくつかの可能性がある。別の可能性は、出芽酵母で形成されたグルクロン酸抱合体のより効率的な排泄であり、さらなる合

成を遅らせる可能性のある菌体内の蓄積を防ぐ。そしておそらく出芽酵母と分裂酵母の生産の違いの他の理由を解明するためにさらなる調査が必要であるが、これはこの研究の範囲外である。グルクロン酸抱合体生産の高効率に加えて、出芽酵母株は、分裂酵母の 1~2 g/L のバイオマス収量とは対照的に、2 日間の培養後に 4~5 g/L のバイオマスをもたらした[19].

この研究の追加の重要な結果は、生成されたグルクロン酸抱合体のほとんどが、基質の完全な変換後に菌体外に排出されたことである (Fig. 3)。したがって、酵母細胞の破壊など、グルクロン酸抱合体精製のための面倒な処理ステップは必要なかった。おそらく出芽酵母における内在性 ABC トランスポーターの存在により、培地へのグルクロン酸抱合体が促進されると推測している[37]。したがって、分裂酵母システムとの類似性が高いにもかかわらず、グルクロン酸抱合体生産のために出芽酵母を使用することには大きな利点である..

酵素合成の主な利点は、いくつかの潜在的な結合部位を含む薬物の位置特異的グルクロン酸抱合である。実際、そのような化合物の合成（一度に目的の部位に結合したモノグルクロニド）は、従来の化学合成では非常に困難である可能性がある。Kittelman らは、馬由来肝臓ホモジネートと過剰な UDPGA を使用して、ミコフェノール酸のアシル抱合体の酵素合成を報告した[38]。UGT 酵素は、可変の N 末端半分と高度に保存された C 末端半分を持っている[1]。グルクロン酸抱合の基質および位置特異性は、主に UGT の可変領域である N 末端ドメインに依存する。目的の医薬品に応じて適切な UGT 酵素を選択することにより、出芽酵母発現系を使用して、望ましいグルクロン酸抱合体を得ることができる。たとえば、本研究では、ミコフェノール酸のフェノール性およびアシル抱合体は、それぞれヒト UGT1A9 およびラット UGT2B1 発現酵母株によって合成可能であった (Fig. 4)。

ほとんどの哺乳類由来 UGT（ヒト、ラット、マウス、ブタ、ウシなど）は、出芽酵母発現系において適切な基質のグルクロン酸抱合を触媒することができる (Table S4)。ゲノム解析からのさまざまな UGT の cDNA を pAUR-rUGDH 発現ベクターに導入することで、

*in vitro* アッセイ用の膜画分を用意することなく、基質特異性や位置特異性などの UGT 機能の特徴づけることができた。ヒト UGT に加えて、ラットやマウスなどの前臨床動物由来の UGT のセットを持つ酵母株は、開発候補品の抱合に関与する UGT を同定するためのハイスループットスクリーニングシステムの開発に役立つツールとなる可能性がある。

2008 年の FDA ガイダンスは、ヒト血漿でのみ同定された代謝物、またはどの動物試験種よりもヒトに高いレベルで存在する代謝物の安全性評価に注意を促した[39]。候補薬のアシル抱合体の形成は、安全性試験段階に評価される。ジクロフェナクアシル抱合体産生に最も適したアイソフォームのスクリーニング実験に基づいて、ヒト UGT2B7 のオルソログであるラット UGT2B1 [40]が、アシル抱合体生合成を必要とする反応のために選択された。Table. 2 は、ラット UGT2B1-UGDH 発現酵母を使用した、カルボン酸基を含むさまざまな薬物のアシル抱合体の生成能を示した。試験された薬物の中で、ゾメピラクは、対応するアシル抱合体が生理学的条件下で化学的不安定性および反応性を示すため、その特異な薬物毒性リスクのために「中止」の安全性カテゴリーに分類される[41]。興味深いことに、その不安定性にもかかわらず、酵母生産システムでゾメピラクのアシル抱合体を生合成することが可能である。

結論として、UGDH 遺伝子を有する遺伝子組換え出芽酵母 *S. cerevisiae* は、さまざまな哺乳動物種の UGT の機能の特徴づけ、菌体での合成を介して低コスト及び高効率で UGT 依存的なグルクロン酸抱合体を産生するための有用な宿主生物である。

## 1.5 引用文献

1. Iyanagi, T. Molecular mechanism of phase I and phase II drug-metabolizing enzymes: implications for detoxification. *Int Rev Cytol.* **2007**, *260*, 35-112.
2. Mackenzie, P. I.; Bock, K.W.; Burchell, B.; Guillemette, C.; Ikushiro, S.; Iyanagi, T.; Miners, J.O.; Owens, I. S.; Nebert, D.W. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* **2005**,*15*,677–685.
3. Guillemette, C.; Lévesque, E.; Harvey, M.; Bellemare, J.; Menard, V. UGT genomic diversity: beyond gene duplication. *Drug Metab Rev.* **2010**, *42*, 24-44.
4. Spahn-Langguth, H.; Benet, L. Z. Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism? *Drug Metab Rev.* **1992**, *4*, 5-47.
5. Bailey, M. J.; Dickinson, R. G. Acyl glucuronide reactivity in perspective: biological consequences. *Chem Biol Interact.* **2003**, *145*, 117-137.
6. Hammond, T.G.; Meng, X.; Jenkin,s R.E.; Maggs, J.L.; Castelazo, A.S.; Regan, S.L.; Bennett, S.N.; Earnshaw, C.J.; Aithal, G.P.; Pande, I.; Kenna, J.G., Stachulski, A.V.; Park, B.K.; Williams, D.P. Mass spectrometric characterization of circulating covalent protein adducts derived from a drug acyl glucuronide metabolite: multiple albumin adductions in diclofenac patients. *J Pharmacol Exp Ther.* **2014**, *350*, 387-402.
7. Maruo, Y.; Iwai ,M.; Mori, A.; Sat,o H.; Takeuchi, Y. Polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase and drug metabolism. *Curr Drug Metab.* **2005**, *6*, 91-99.
8. Guillemette, C.; Lévesque. É.; Rouleau. M. Pharmacogenomics of human uridine diphospho-glucuronosyltransferases and clinical implications. *Clin Pharmacol Ther.* **2014**, *96*, 324-339.



9. Stachulski, A. V.; Meng, X. Glucuronides from metabolites to medicines: a survey of the in vivo generation, chemical synthesis and properties of glucuronides. *Nat Prod Rep.* **2013**, *30*, 806-848.
10. McGurk, K.A.; Remmel, R. P.; Hosagrahara, V. P.; Tosh, D.; Burchell, B. Reactivity of mefenamic acid 1-*o*-acyl glucuronide with proteins in vitro and ex vivo. *Drug Metab Dispos.* **1996**, *24*, 842-849.
11. Alonen, A.; Jansson, J.; Kallonen, S.; Kiriazis, A.; Aitio, O.; Finel, M.; Kostianen, R. Enzyme-assisted synthesis and structure characterization of glucuronic acid conjugates of losartan, candesartan, and zolarsartan. *Bioorg Chem.* **2008**, *36*, 148-155.
12. Alonen, A.; Gartman, M.; Aitio, O.; Finel, M.; Yli-Kauhaluoma, J.; Kostianen, R. Synthesis, structure characterization, and enzyme screening of clenbuterol glucuronides. *Eur J Pharm Sci.* **2009**, *37*, 581-587.
13. Ma, P.; Kanizaj, N.; Chan, S.A.; Ollis, D.L.; McLeod, M.D. The Escherichia coli glucuronylsynthase promoted synthesis of steroid glucuronides: improved practicality and broader scope. *Org Biomol Chem.* **2014**, *12*, 6208-6214.
14. Iwano, H.; Yokota, H.; Ohgiya, S.; Yotumoto, N.; Yuasa, A. A critical amino acid residue, asp446, in UDP-glucuronosyltransferase. *Biochem J.* **1997**, *325*, 587-591.
15. Ikushiro, S.; Sahara, M.; Em,i Y.; Yabusaki, Y.; Iyanagi, T. Functional co-expression of xenobiotic metabolizing enzymes, rat cytochrome P450 1A1 and UDP-glucuronosyltransferase 1A6, in yeast microsomes. *Biochim Biophys Acta.* **2004**, *1672*, 86-92.
16. Uchihashi, S.; Nishikawa, M.; Sakaki, T.; Ikushiro, S. The critical role of amino acid residue at position 117 of mouse UDP-glucuronosyltransferase 1a6a and 1a6b in resveratrol glucuronidation. *J.Biochem.* **2012**, *152*, 331-340.
17. Uchihashi, S.; Nishikawa, M.; Sakaki, T.; Ikushiro, S. Comparison of Serotonin

- Glucuronidation Activity of UDP-glucuronosyltransferase 1a6a (Ugt1a6a) and Ugt1a6b: Evidence for the Preferential Expression of Ugt1a6a in the Mouse Brain *Drug Metab Pharmacokinet.* **2013**, *28*, 260-264.
18. Oka, T.; Jigami, Y. Reconstruction of de novo pathway for synthesis of UDP-glucuronic acid and UDP-xylose from intrinsic UDP-glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J.* **2006**, *273*, 2645-2657.
  19. Drăgan, C.A.; Buchheit, D.; Bischoff, D.; Ebner, T.; Bureik, M. Glucuronide production by whole-cell biotransformation using genetically engineered fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Drug Metab Dispos.* **2010**, *38*, 509-515.
  20. Buchheit, D.; Drăgan, C. A.; Schmitt, E. I.; Bureik, M. Production of ibuprofen acyl glucosides by human UGT2B7. *Drug Metab Dispos.* **2011**, *39*, 2174-2181.
  21. Sakaki, T.; Inouye, K. Practical application of mammalian cytochrome P450. *J Biosci Bioeng.* **2000**, *90*, 583-590.
  22. Borodina, I.; Nielsen, J. Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. *Biotechnol J.* **2014**, *9*, 609-620.
  23. Kanoh, H.; Tada, M.; Ikushiro, S.; Mohri, K. Characterization of Bucolome N-Glucuronide Formation: Organ specificity and Identification of Rat UDP-Glucuronosyltransferase Isoform(s). *Pharmacology & Pharmacy* **2011**, *2*, 151-158.
  24. Kuuranne, T.; Kurkela, M.; Thevis, M.; Schänzer, W.; Finel, M.; Kostianen, R. Glucuronidation of anabolic androgenic steroids by recombinant human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos.* **2003**, *31*, 1117-1124.
  25. Ikezawa, N.; Tanaka, M.; Nagayoshi, M.; Shinkyō, R.; Sakaki, T.; Inouye, K.; Sato, F. Molecular cloning and characterization of CYP719, a methylenedioxy bridge-forming enzyme that belongs to a novel P450 family, from cultured *Coptis japonica* cells. *J Biol Chem.* **2003**, *278*, 38557-38565.

26. Hashida-Okado, T.; Ogawa, A.; Kato, I.; Takesako, K. Transformation system for prototrophic industrial yeasts using the AUR1 gene as a dominant selection marker. *FEBS Lett.* **1998**, *425*, 117-122.
27. Court, M.H. Isoform-selective probe substrates for in vitro studies of human UDP-glucuronosyltransferases. *Methods Enzymol.* **2005**, *400*, 104-116.
28. Ikushiro, S.; Emi, Y.; Kato, Y.; Yamada, S.; Sakaki, T. Monospecific antipeptide antibodies against human hepatic UDP- glucuronosyltransferase 1A subfamily ( UGT1A) isoforms. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **2006**, *21*, 70-75.
29. Miles, K.K.; Stern, S.T.; Smith, P.C.; Kessler, F.K.; Ali, S.; Ritter, J.K. An investigation of human and rat liver microsomal mycophenolic acid glucuronidation: evidence for a principal role of UGT1A enzymes and species differences in UGT1A specificity. *Drug Metab Dispos.* **2005**, *33*, 1513-1520.
30. Stachulski, A.V.; Harding, J.R.; Lindon, J.C.; Maggs, J.L.; Park, B.K.; Wilson, I.D. Acyl glucuronides: biological activity, chemical reactivity, and chemical synthesis. *J Med Chem.* **2006**, *49*, 6931-6945.
31. Berry, N.G.; Iddon, L.; Iqbal, M.; Meng, X.; Jayapal, P.; Johnson, C.H.; Nicholson, J.K.; Lindon, J.C.; Harding, J.R.; Wilson, I.D.; Stachulski, A.V. Synthesis, transacylation kinetics and computational chemistry of a set of arylacetic acid 1 $\beta$ -O-acyl glucuronides. *Org Biomol Chem.* **2009**, *7*, 2525-2533.
32. Bowkett, E.R.; Harding, J.R.; Maggs, J.L.; Park, B.K.; Perrie, J.A.; Stachulski, A.V. Efficient synthesis of 1 $\beta$ -O-acyl glucuronides via selective acylation of allyl or benzyl D-glucuronate. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 7596-7605.
33. Barnes, H. J.; Arlotto, M. P.; Waterman, M. R. Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1991**, *88*, 5597-5601.

34. Zöllner, A.; Buchheit, D.; Meyer, M. R.; Maurer, H. H.; Peters, F.T.; Bureik, M. Production of human phase 1 and 2 metabolites by whole-cell biotransformation with recombinant microbes. *Bioanalysis*. **2010**, *2*, 1277-1290.
35. Buchheit, D.; Schmitt, E. I.; Bischoff, D.; Ebner, T.; Bureik, M. S-Glucuronidation of 7-mercapto-4-methylcoumarin by human UDP glycosyltransferases in genetically engineered fission yeast cells. *Biol Chem*. **2011**, *392*, 1089-1095.
36. Wixon, J. Featured organism: Schizosaccharomyces pombe, the fission yeast. *Comp Funct Genomics* **2002**, *3*, 194-204.
37. Paumi, C.M.; Chuk, M.; Snider, J.; Stagljar, I.; Michaelis, S. ABC transporters in Saccharomyces cerevisiae and their interactors: new technology advances the biology of the ABCC (MRP) subfamily. *Microbiol. Mol Biol Rev*. **2009**, *73*, 577-593.
38. Kittelmann, M.; Rheinegger, U.; Espigat, A.; Oberer, L.; Aichholz, R.; Francotte, E.; Ghisalba, O. Preparative enzymatic synthesis of the acylglucuronide of mycophenolic acid. *Adv.Synth.Catal*. **2003**, *345*, 825-829.
39. Anderson, S.; Knadler, M. P.; Luffer-Atlas, D. Overview of metabolite safety testing from an industry perspective. *Bioanalysis* **2010**, *2*, 1249-1261.
40. King, C.; Tang, W.; Ngu, J.; Tephly, T.; Braun, M. Characterization of rat and human UDP-glucuronosyltransferases responsible for the in vitro glucuronidation of diclofenac. *Toxicol Sci*. **2001**, *61*, 49-53.
41. Sawamura, R.; Okudaira, N.; Watanabe, K.; Murai, T.; Kobayashi, Y.; Tachibana, M.; Ohnuki, T.; Masuda, K.; Honma, H.; Kurihara, A.; Okazaki, O. Predictability of idiosyncratic drug toxicity risk for carboxylic acid-containing drugs based on the chemical stability of acyl glucuronide. *Drug Metab Dispos*. **2010**, *38*, 1857-1864.

## TABLES

**Table 1. UGT-UGDH 発現出芽酵母及び分裂酵母における抱合体生成能の比較**

Human UGT	Glucuronidation of 4-Methylumbelliferone			
	$\mu\text{M} / 24\text{hrs}$		$\mu\text{mol} / 24\text{hrs} / \text{g dry weight}$	
	<i>S.cerevisiae</i>	<i>S.pombe</i> <sup>(a)</sup>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>S.pombe</i> <sup>(a)</sup>
UGT1A1	20.2	1.8	2.6	0.14
UGT1A6	195.7	3.5	24.8	0.22

<sup>(a)</sup> Drăgan CA, Buchheit D, Bischoff D, Ebner T, Bureik M (2010) *Drug Metab Dispos.* **38**,

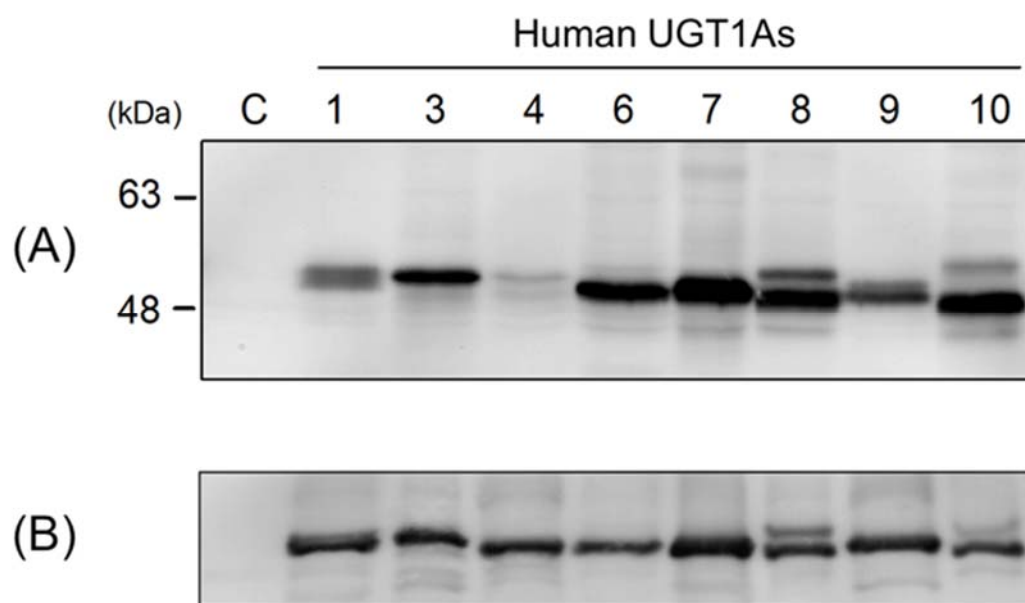
509-515

**Table 2.** ラット UGT2B1 発現酵母におけるアシル抱合体生成能

Substrates	Specific production rate ( $\mu\text{mol} / 24 \text{ hrs} / \text{g wet weight}$ )
Mycophenolic acid	0.54
Mefenamic acid	0.56
Flufenamic acid	1.12
Diclofenac	4.19
Naproxen	0.60
Loxoprofen	0.43
Zomepirac	0.39

Each value of specific production rate was an average of duplicate experiments

## FIGURES



**Fig. 1** 出芽酵母における N 末端改変ヒト UGT タンパク質の発現解析

それぞれのレーンは 10  $\mu$ g のコントロールマイクロソーム(レーン C) 及び各 UGT1A 分子種発現酵母マイクロソーム画分の泳動パターンを示す. 抗原タンパク検出には 抗 UGT1AC 抗体を用いた. (A)は野生型 UGT1A 分子種, (B)は N 末端改変 UGT1A1, UGT1A4, UGT1A7 及び UGT1A9 を含む.

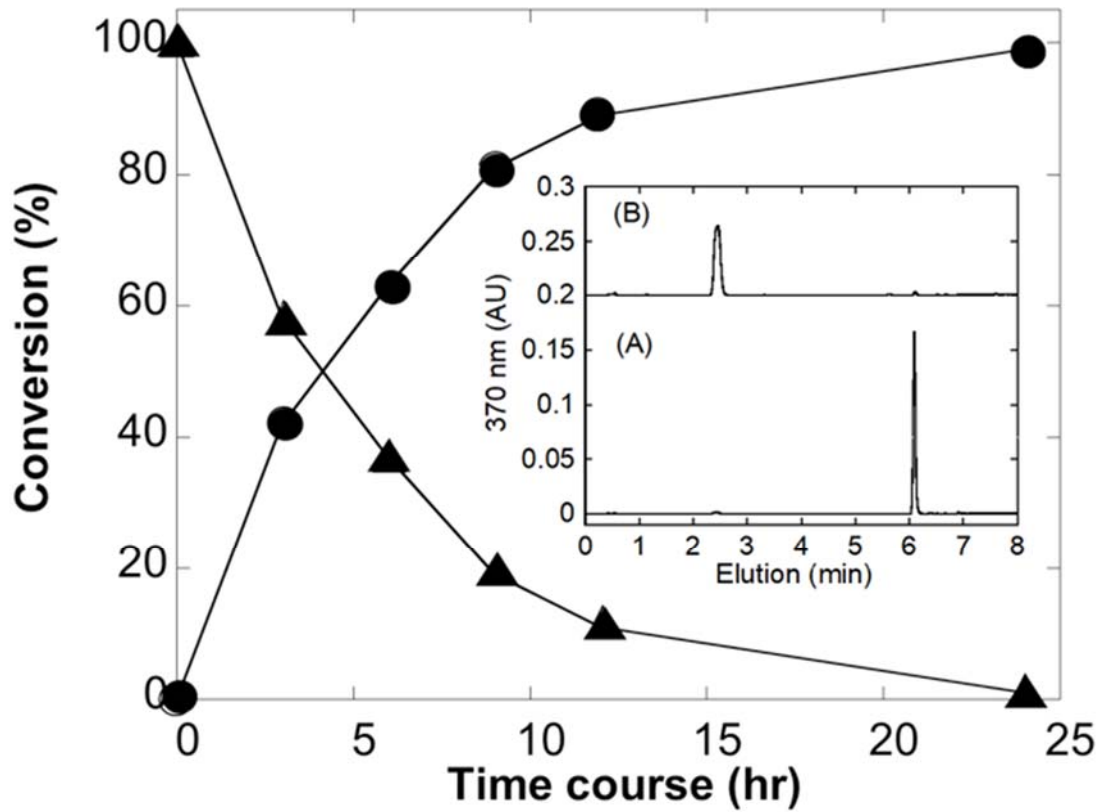
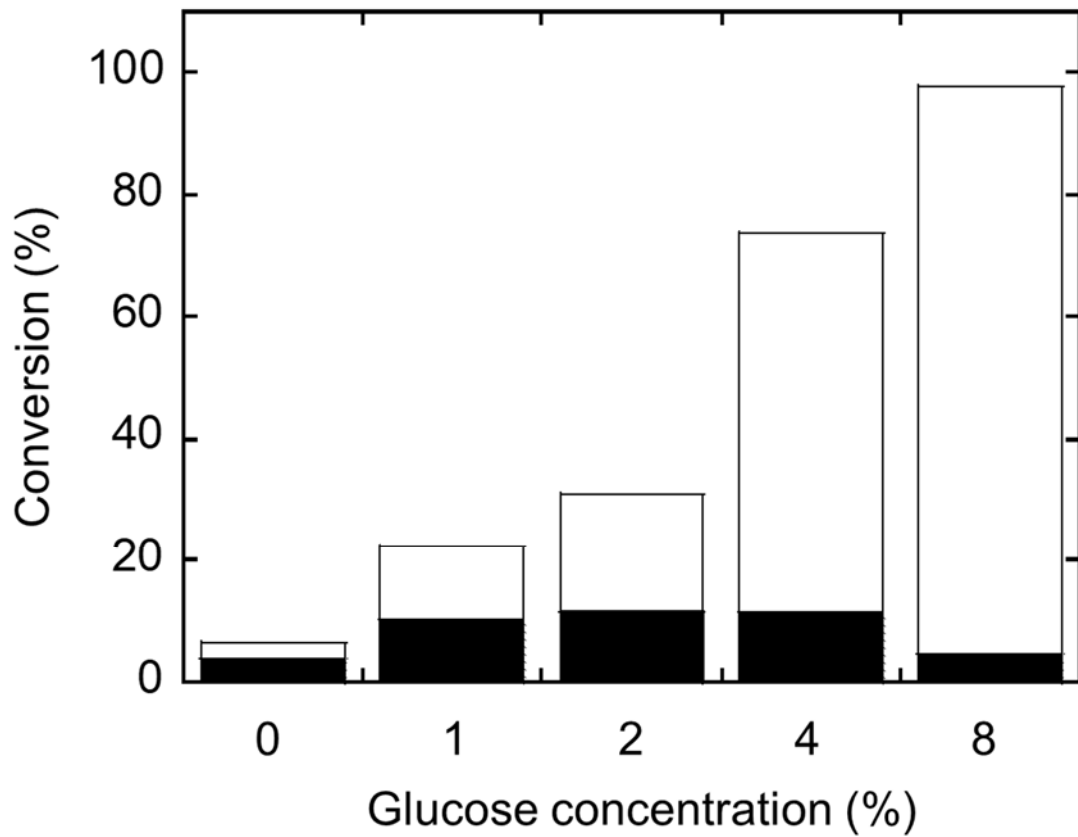


Fig. 2 ラット UGDH 及びヒト UGT1A6 同時発現出芽酵母株における

7-ヒドロキシマリングルクロン酸抱合体生成の時間依存性

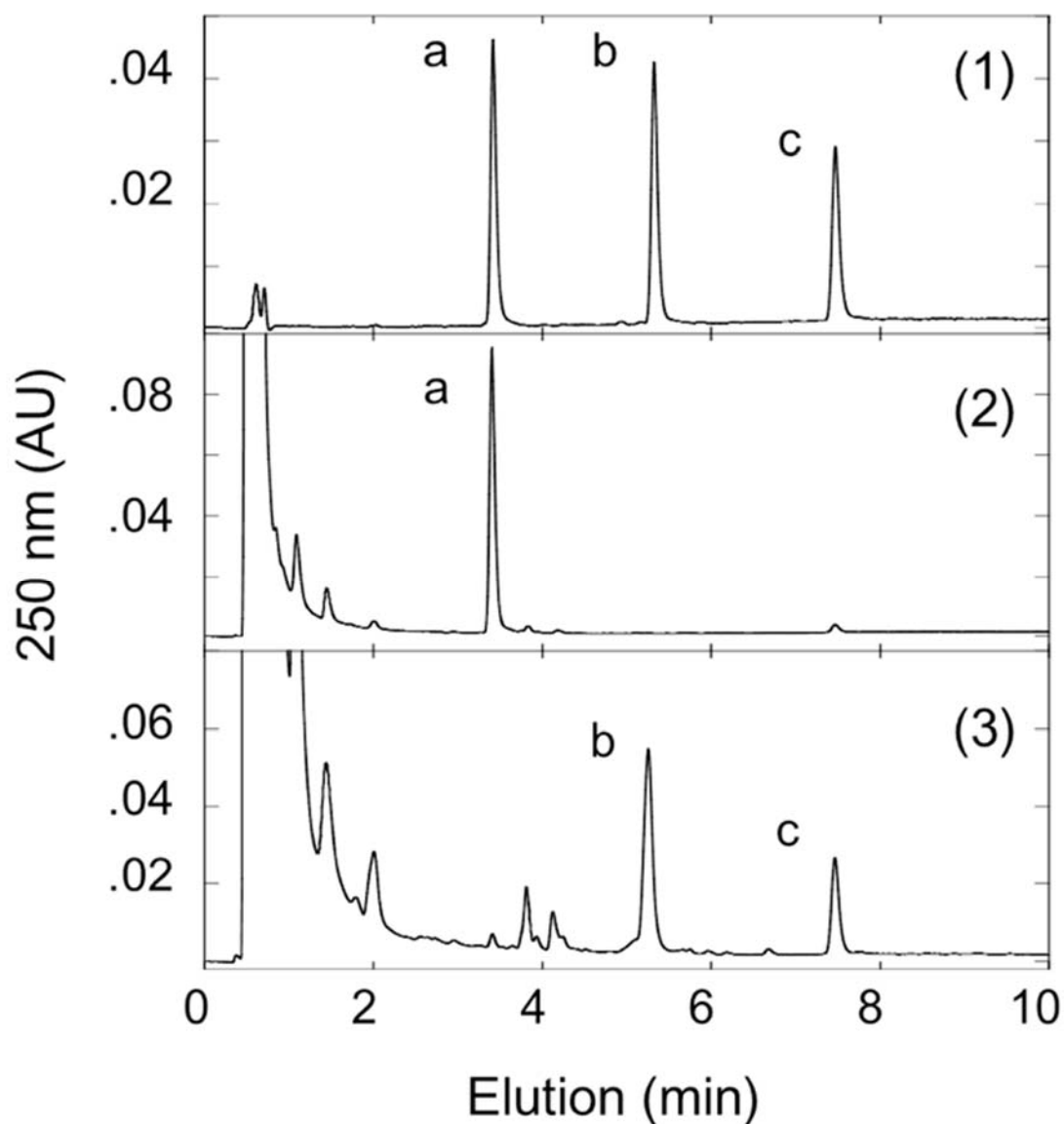
休止菌体における抱合体生成の時間変化を測定した. 図中の(●)及び(▲)はそれぞれ抱合体及び基質量を示している. 挿入図には反応開始時 (A) 及び 24 時間反応後 (B) の HPLC 溶出パターンを示し, 抱合体及び基質の溶出時間はそれぞれ 2.4 分及び 6.1 分である.





**Fig. 3** ラット UGDH 及びヒト UGT1A6 同時発現出芽酵母株における  
7-ヒドロキシマリングルクロン酸抱合体生成に対するグルコース  
濃度依存性

休止菌体における抱合体生成に対するグルコース濃度依存性を測定した。図中の白枠及び黒塗部分はそれぞれ菌体の外及び内側における抱合体量を示す。



**Fig. 4** ラット UGDH 及び UGT 同時発現出芽酵母株における

ミコフェノール酸部位特異的抱合体生成

(1) ミコフェノール酸及び抱合体標準品の HPLC 溶出パターンを示す. a:エーテル型抱合体, b:アシル抱合体, c:ミコフェノール酸 (2) ラット UGDH 及びヒト UGT1A9 同時発現株におけるミコフェノール酸抱合代謝物の HPLC 溶出パターンを示す. (3) ラット UGDH 及びラット UGT2B1 同時発現株におけるミコフェノール酸抱合代謝物の HPLC 溶出パターンを示す.

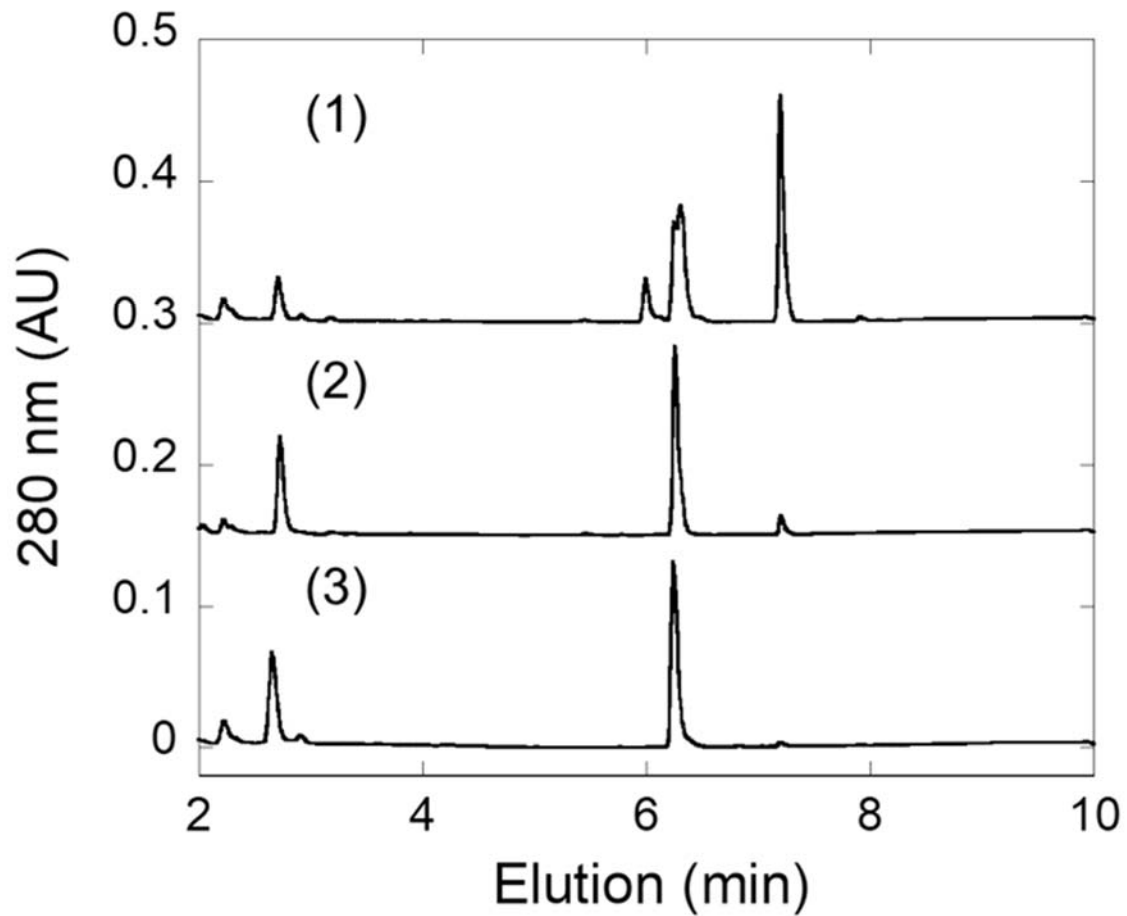


Fig. 5 ラット UGDH 及びラット UGT2B1 同時発現出芽酵母株による

ジクロフェナクグルクロン酸抱合体生成及び安定性に対する反応液中  
pH の効果

ラット UGDH 及びラット UGT2B1 同時発現出芽酵母株により生成されたジクロフェナク抱合体の HPLC 溶出パターンを示す. 反応液の pH は次に示すとおりである. (1) pH 8.5 (2) pH 7.5 (3) pH 6.5. 図中のグルクロン酸抱合体及び基質の溶出時間はそれぞれ 6.25 分及び 7.20 分である.

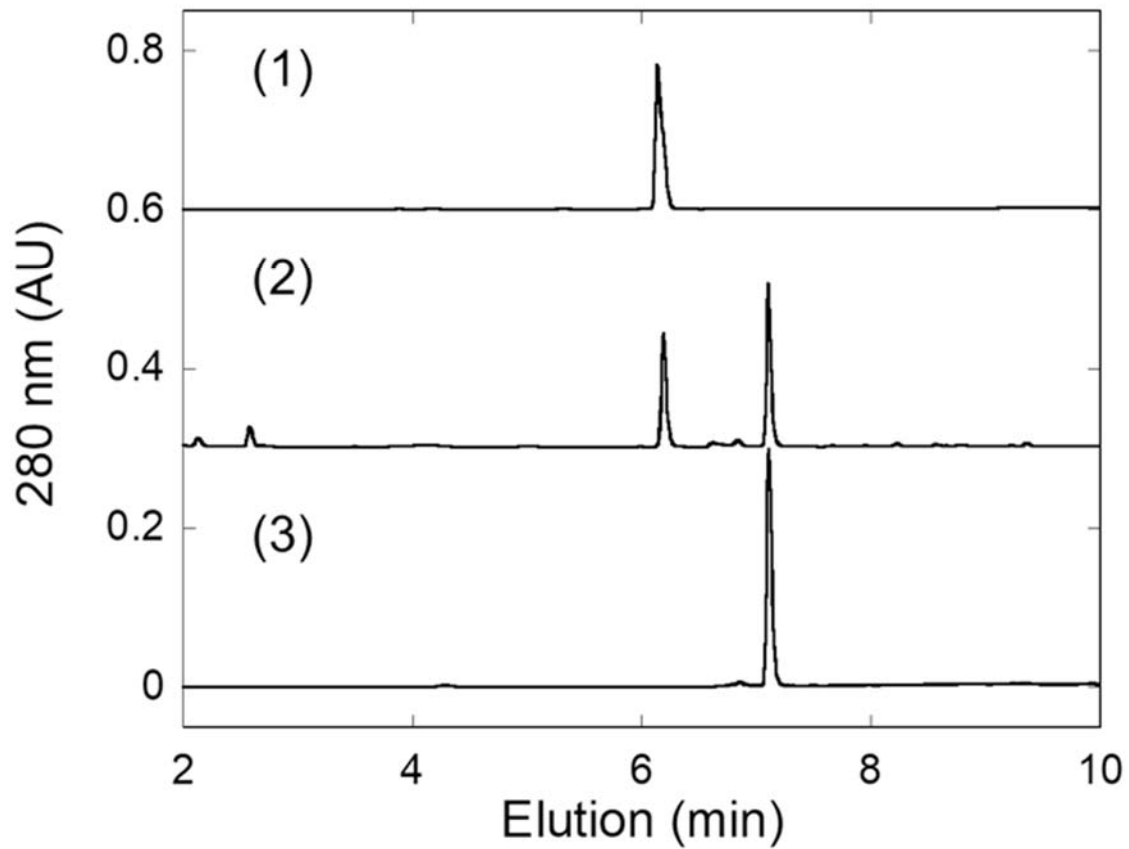


Fig. 6 ラット UGDH 及びラット UGT2B1 同時発現出芽酵母株による

ジクロフェナクグルクロン酸抱合体の合成及び精製.

(1)ラット UGDH 及びラット UGT2B1 同時発現出芽酵母株により生成されたクロフェナク抱合体の精製標品の HPLC 溶出パターンを示す. (2) 酵母菌体より抽出した画分におけるクロフェナク抱合体の HPLC 溶出パターンを示す. (3) 野生株の酵母菌体より抽出した画分におけるクロフェナク代謝物の HPLC 溶出パターンを示す. 図中のジクロフェナク抱合体及び基質ジクロフェナクの溶出時間はそれぞれ 6.25 分及び 7.20 分である.

## SUPPLEMENTAL TABLES

Table S1. 本研究に用いた UGT 遺伝子一覧

Species	UGTs	GenBank accession no.
Human	UGT1A1	M57899
	UGT1A3	M84127
	UGT1A4	M57951
	UGT1A5	NM 019078
	UGT1A6	M39570
	UGT1A7	U89507
	UGT1A8	NM 019076
	UGT1A9	AF056188
	UGT1A10	U89508
	UGT2A1	AJ006054
	UGT2B4	Y00317
	UGT2B7	J05425
	UGT2B10	NM 001075
	UGT2B15	U08854
	UGT2B17	U59209
Rat	UGT1A1	U20551
	UGT1A2	M34007
	UGT1A3	AY435131
	UGT1A5	D38069(E1)
	UGT1A6	J02612

Species	UGTs	GenBank accession no.
	UGT1A7	D38062(E1)
	UGT2B1	M13506
	UGT2B3	M31109
	UGT2B6	M33746
	UGT2B12	U06273
Mouse	Ugt1a1	L02333
	Ugt1a5	AY227196
	Ugt1a6a	U16818
Mouse	Ugt1a6b	AY227198
	Ugt1a9	L27122
	Ugt2b1	BC027200
	Ugt2b5	X06358
	Ugt2b34	AI788959
Porcine	UGT1A3a	AK235866
	UGT1A3b	AK235866*(variant)
	UGT2B18-like	100516628**
	UGT2B31-like	100623255**
	UGT2C1-like	100515394**
Bovine	UGT1A6	AB008677

\*Porcine UGT1A3b is a variant of UGT1A3a (AK235866) with replacement of amino acids; K78Q, T82I, R95G, L97F, I180L, K221R, F227S, V228F and V269I.

\*\* The information of porcine UGT gene is from the database resource of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

**Table S2.** ヒト UGT1A1, 1A4, 1A7 及び 1A9 における推定 N 末端シグナル配列

Human UGT	Amino acid sequence alignment of putative signal peptide
UGT1A1	MAVESQGGRPLVLGLLLCVLGPVVSHAG
UGT1A4	MARGLQVPLPRLATGLLLLLSVQPWAESG
UGT1A7	MARAGWTGLLPLYVCLLLTCGFAKAG
UGT1A9	MACTGWTSPPLCVCLLLTCGFAEAG

**Table S3.** 哺乳動物由来 UGT 分子種発現酵母株におけるグルクロン酸抱合能

Species	UGT	Specific production rate ( $\mu\text{mol}/24\text{hrs}/\text{g}$ wet weight)		
		7HC	Diclofenac	11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone
Human	UGT1A1	0.49	ND	ND
	UGT1A3	ND	ND	0.001
	UGT1A4	ND	ND	0.002
	UGT1A5	ND	ND	ND
	UGT1A6	10.26	0.02	ND
	UGT1A7	4.25	0.04	0.008
	UGT1A8	1.17	0.04	0.006
	UGT1A9	2.54	0.09	0.144
	UGT1A10	0.88	ND	ND
	UGT2A1	10.43	0.03	0.006
	UGT2B4	ND	ND	0.001
	UGT2B7	0.03	0.01	0.015
	UGT2B10	ND	ND	0.001
	UGT2B15	0.45	0.08	ND
	UGT2B17	0.09	ND	ND

Species	UGT	Specific production rate ( $\mu\text{mol}/24\text{hrs}/\text{g}$ wet weight)		
		7HC	Diclofenac	11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone
Rat	UGT1A1	0.02	ND	ND
	UGT1A2	0.62	0.11	0.14
	UGT1A3	0.02	ND	ND
	UGT1A5	0.01	ND	ND
	UGT1A6	0.08	ND	ND
	UGT1A7	1.5	ND	ND
	UGT2B1	7.41	4.19	ND
	UGT2B3	1.67	0.32	0.011
	UGT2B6	0.07	0.08	0.283
	UGT2B12	0.02	ND	ND
Mouse	Ugt1a1	0.02	ND	ND
	Ugt1a5	0.05	0.07	0.001
	Ugt1a6a	2.68	ND	ND
	Ugt1a6b	5.57	ND	ND
	Ugt1a9	1.16	0.02	ND
	Ugt2b1	3.58	1.85	0.002
	Ugt2b5	0.33	ND	0.001
	Ugt2b34	0.02	ND	ND
Porcine	UGT1A3a	1.86	1.36	0.014
	UGT1A3b	0.42	0.89	0.006
	UGT2B18-like	0.16	ND	ND
	UGT2B31-like	0.15	ND	ND
	UGT2C1-like	0.07	0.02	0.022
Bovine	UGT1A6	2.85	ND	ND

Each value of specific production rate was an average of duplicate experiments



## SUPPLEMENTAL FIGURES

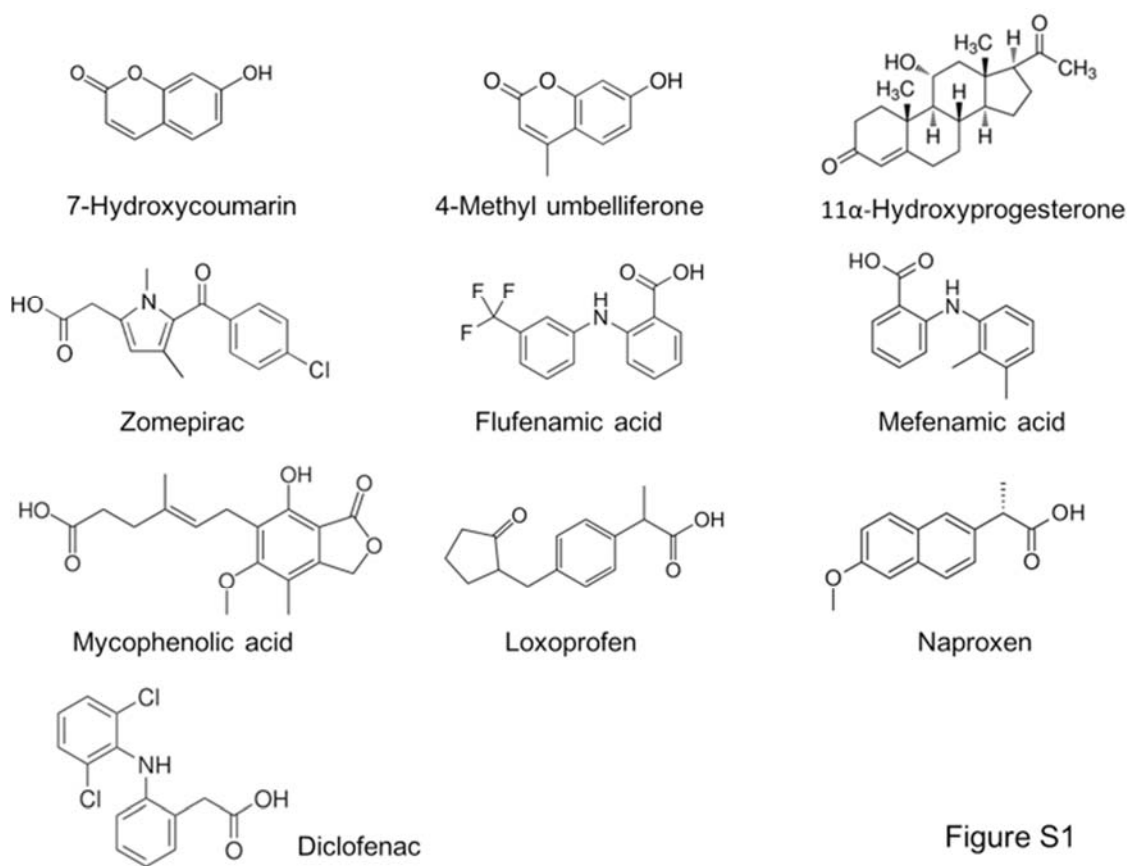
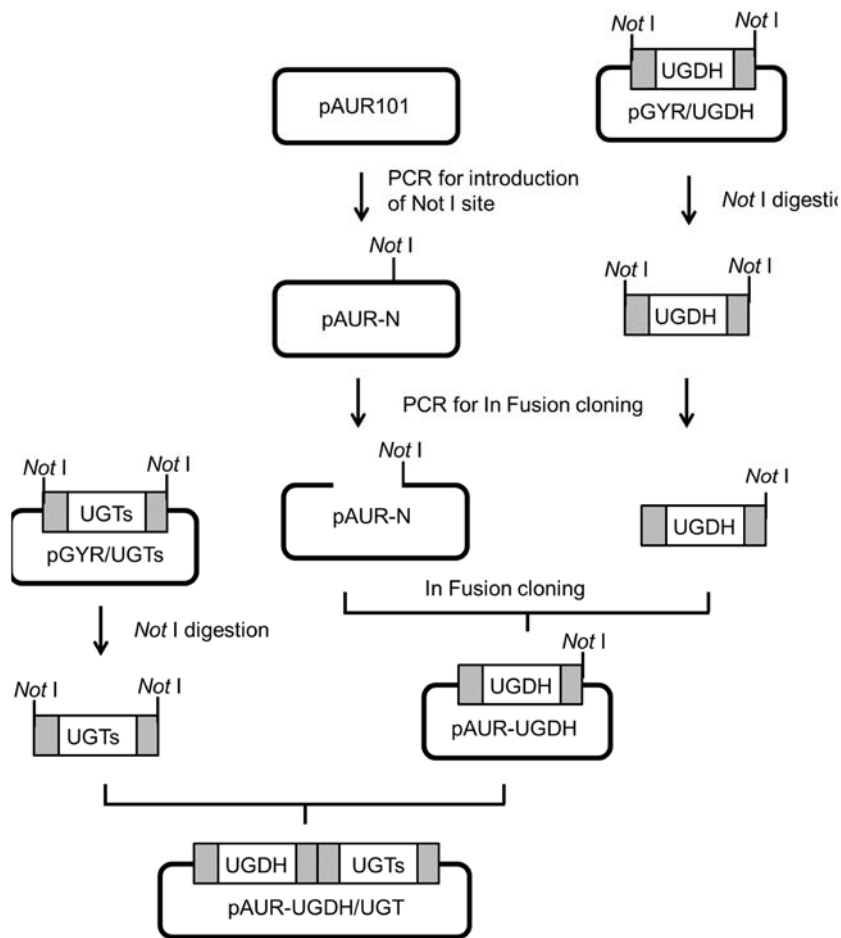


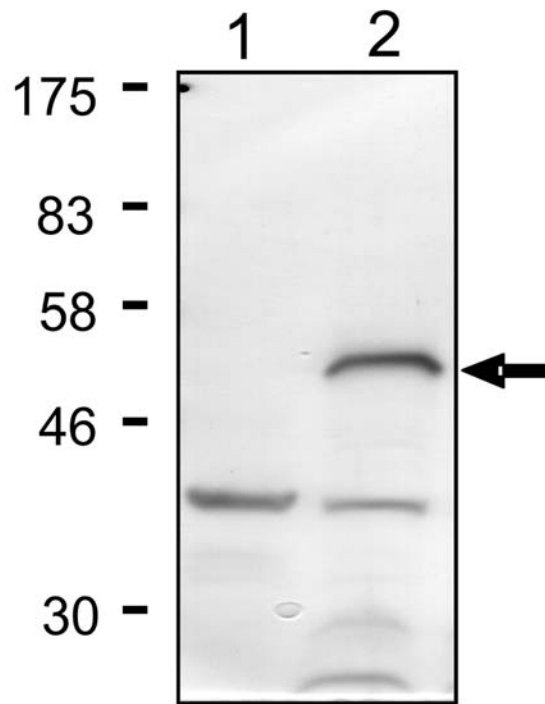
Figure S1

Fig. S1 本研究で用いた抱合化基質の化学構造



**Fig. S2** 出芽酵母におけるラット UGDH 及び哺乳動物由来 UGT 分子種同時発現株の構築

上部左部分にはラット UGDH 遺伝子組み込みのための Not I サイトを含むゲノム組み込み型発現ベクターを示す(pAUR-N). 上部右部分にはラット UGDH 遺伝子を示し, pAUR-N への組み込みの後 (pAUR-UGDH), 選択された UGT 分子種を Not I サイトに挿入することで同時発現ベクターを構築した (pAUR-UGDH/UGT). UGDH あるいは UGT 遺伝子におけるハーフトーン部分は *Zygosaccharomyces rouxii* 由来 GAP のプロモーター及びターミネーター領域配列を示す. (Ikezawa, *et al.*, 2003) [25].



**Fig. S3** 出芽酵母におけるラット UDP-グルコース脱水素酵素の発現解析

レーン1及び2には野生型及びラットUGDH遺伝子導入酵母からの細胞抽出タンパクの泳動パターンを示す. 抗原タンパク検出には 抗ラットUGDH抗体を用いた. 矢印はラットUGDHを示す.

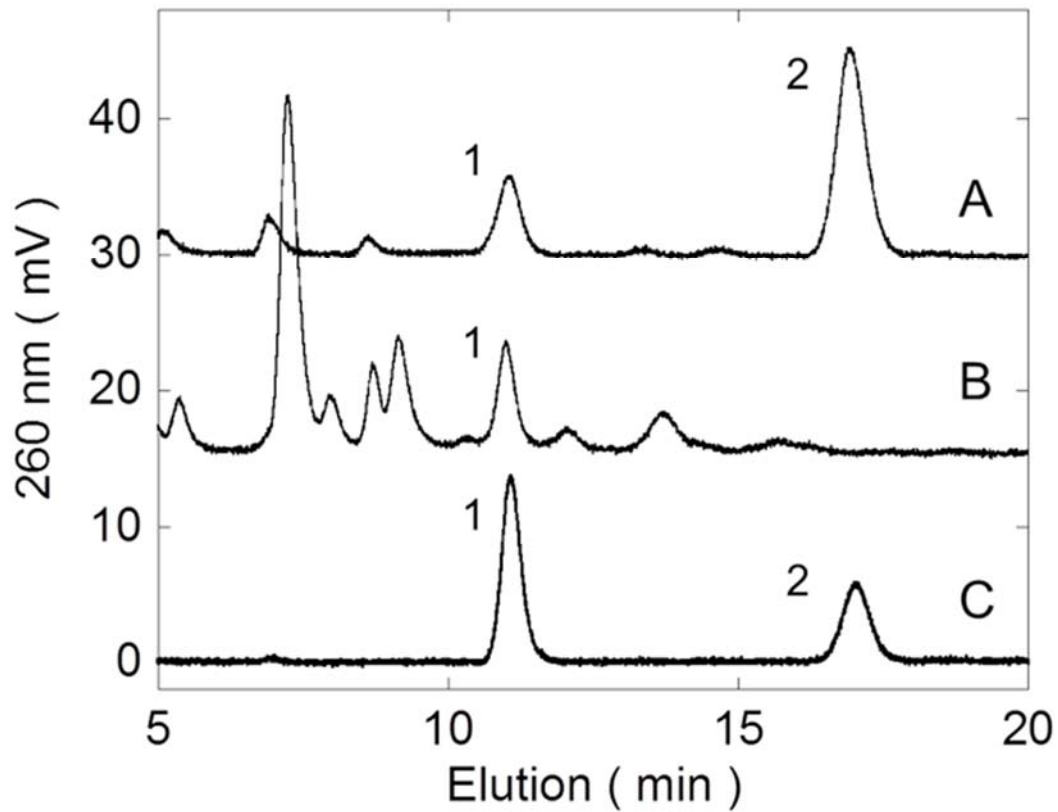


Fig. 4S ラット UGDH 発現酵母株における UDP 糖の分析

- (A) ラット UGDH 発現酵母株菌体抽出画分における UDP-糖の HPLC 溶出パターンを示す.
- (B) コントロール株 (野生株) 菌体抽出画分における UDP-糖の HPLC 溶出パターンを示す.
- (C) UDP-グルコース (ピーク 1) 及び UDP-グルクロン酸標品 (ピーク 2) の HPLC 溶出パターンを示す.

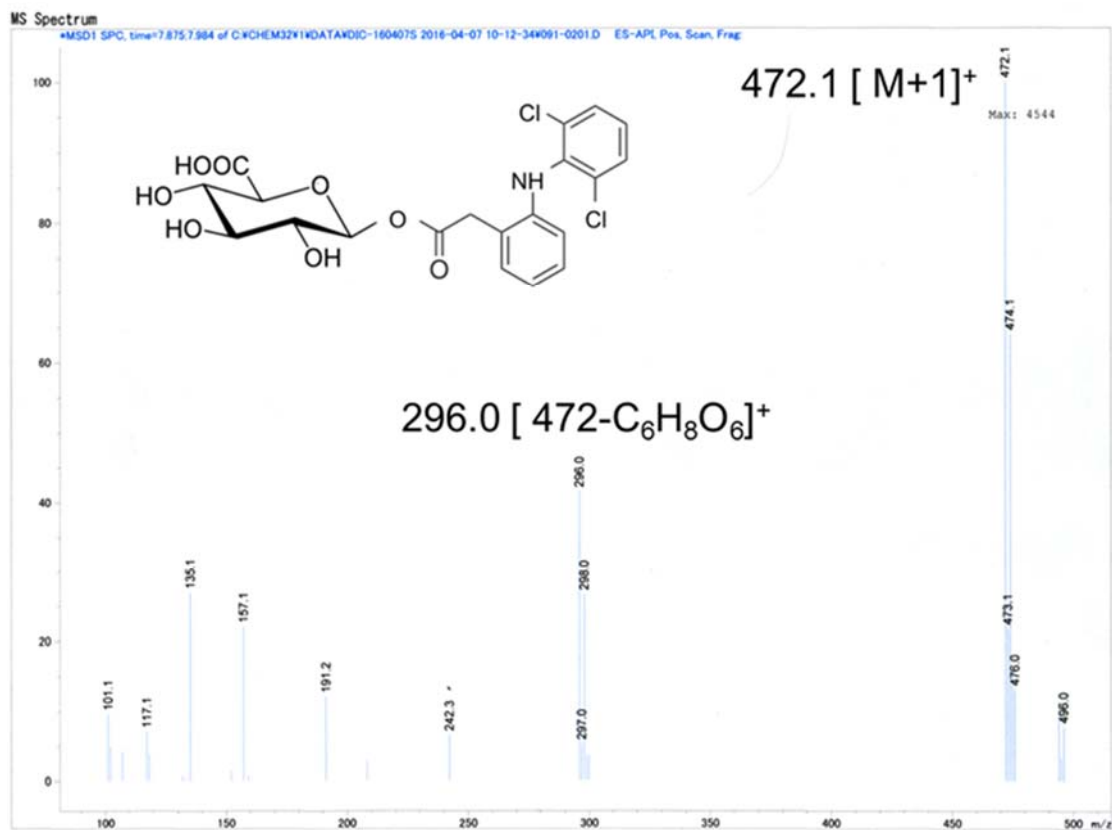
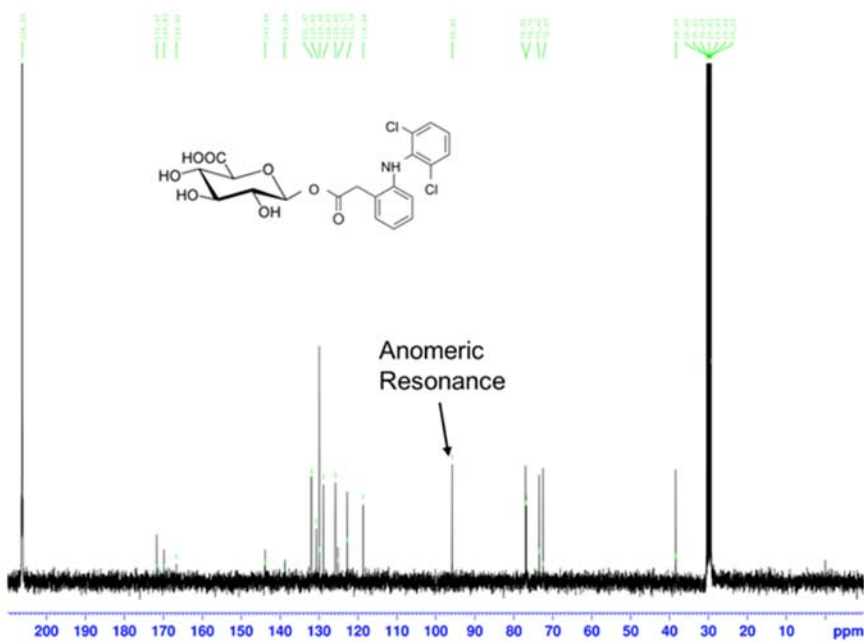
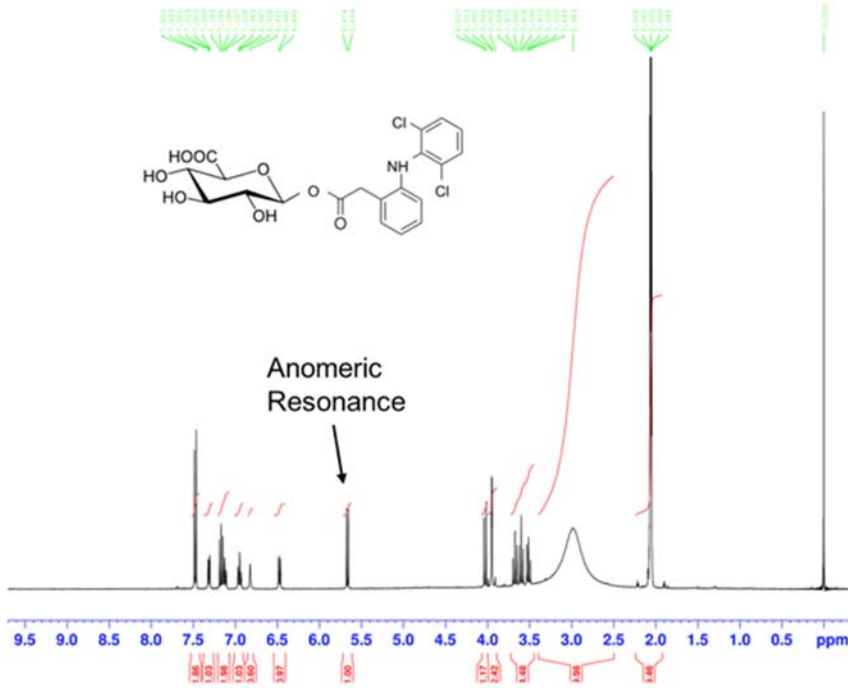


Fig. S5 精製ジクロフェナグルクロン酸抱合体の質量分析

精製ジクロフェナグルクロン酸抱合体の質量分析には Quadrupole 6120 and LC system 1260 Infinity (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA)を用いた。分析は窒素ガス流量、スプレー電流及び電圧値は抱合体分析に対して最適条件下で行った。測定モードはポジティブイオンモードを用いて分子量100-500間でスキャンした。クロマトグラフィー分析には Poroshell 120 EC-C18 カラム(4.6 X 50 mm, 2.7 $\mu$ m, Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA) を用いた。溶出条件は 0.1%ギ酸を含む蒸留水とアセトニトリルを用い、初期条件として 0.1%ギ酸を含む蒸留水で 2 分間溶出した後、2~10 分間に 0.1%ギ酸を含むアセトニトリル 100%のグラジエント溶出を行い、さらに 1 分間 100%アセトニトリルで溶出した。カラム流速は 0.5mL/min で行った。プロトン化したジクロフェナグルクロン酸抱合体 ( $m/z$  472 [M+1]<sup>+</sup>) 及び抱合体よりフラグメント化で生じたアグリコン(296 [472-C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>]<sup>+</sup>) の検出からジクロフェナのモノグルクロニドの生成が確認された。



**Fig. 6S 精製ジクロフェナグルクロン酸抱合体の NMR スペクトル**

精製ジクロフェナグルクロン酸抱合体の  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル測定は Bruker Biospin AVANCE II 400 (400 and 100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) を用いた。化学シフト及びカップリング定数は、 $\delta$  values (ppm) 及び hertz で示した。(A)  $^1\text{H}$  NMR [400MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]: 3.51, 3.60 and 3.67 (3H, 3m, 2-H, 3-H and 4-H), 3.95 (2H, ABq,  $J=15.6$  and 9.0 Hzs,  $\text{ArCH}_2\text{CO}$ ), 4.03 (1H, d,  $J=9.6$  Hz, 5-H), 5.66 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, 1-H, anomeric), 6.47 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, ArH), 6.82 (1H, br, s, NH), 6.95 (1H, m, ArH), 7.11-7.19 (2H, m, ArH), 7.31 (1H, m, ArH) and 7.47 (2H, m, ArH). (B)  $^{13}\text{C}$  NMR [100MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ]: 38.4, 72.5, 73.4, 76.7, 76.9, 95.8 (anomeric), 118.6, 122.9, 125.2, 125.8, 128.9, 129.9, 130.7, 132.0, 138.9, 143.8, 169.8 and 171.7. これらの NMR スペクトルは化学的に合成されたジクロフェナク  $1\beta$ -*O*-アシル抱合体と同一であった (Bowkett, *et al.* 2007) [32].

## 第2章: ヒト硫酸転移酵素発現酵母による 硫酸抱合体の合成

### 2.1 はじめに

低分子医薬品、環境汚染物質及び食餌性ポリフェノールなどの生体異物は、薬物代謝酵素によって代謝され、その結果、これらの生体異物化合物の生理活性が低下し、水溶性が高まり、体からそれらをよりよく排除する。細胞質にあるスルホトランスフェラーゼ (SULT) は、硫酸基供与体である PAPS から生体異物および内因性化合物 (神経伝達物質, ステロイド, 甲状腺ホルモン) を含む小さな基質分子への硫酸基の転移を触媒する第 II 相反応に属する薬物代謝酵素である (図 1) [1].

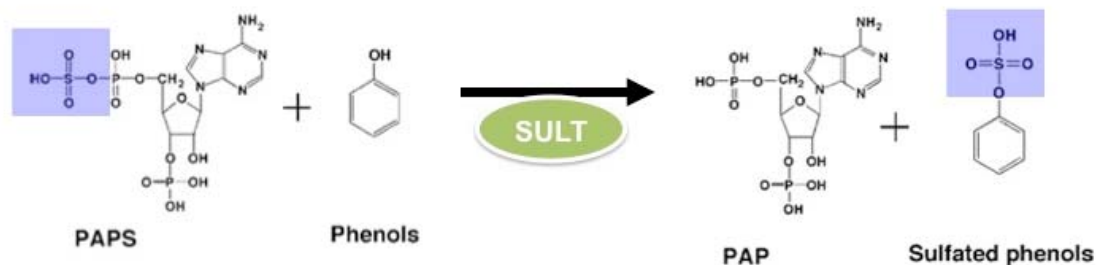


図 1. SULT による硫酸抱合反応

生体異物の解毒に関与するヒト SULT は, SULT1 と SULT2 の 2 つのファミリーに分類される. SULT1 ファミリーのメンバーは, 主に, 低分子薬物, カテコールアミン, エストロゲンなどのフェノール性ヒドロキシル基を持つ化合物の硫酸化を触媒するが, SULT2 ファミリーは, プレグネノロン, デヒドロエピアンドロステロン (DHEA), コレステロールなどのアルコール性ヒドロキシル基を持つ化合物を好む [2]. ヒト肝臓では, SULT1A1 が最も豊富なアイソフォームであり, SULT の総含有量の半分以上 (53%) であり, SULT2A1



(27%) がそれに続く。一方, SULT1B1 と SULT1E1 は肝臓に比較的少量しか存在しない。小腸では, SULT1B1, SULT1A3, および SULT1A1 が主要なアイソフォームであり, それぞれ 36%, 31%, および 19% を構成する。SULT1E1 は肺で最も豊富なアイソフォームであり, 総 SULT 含有量の 40% を占める (図 2) [3]。

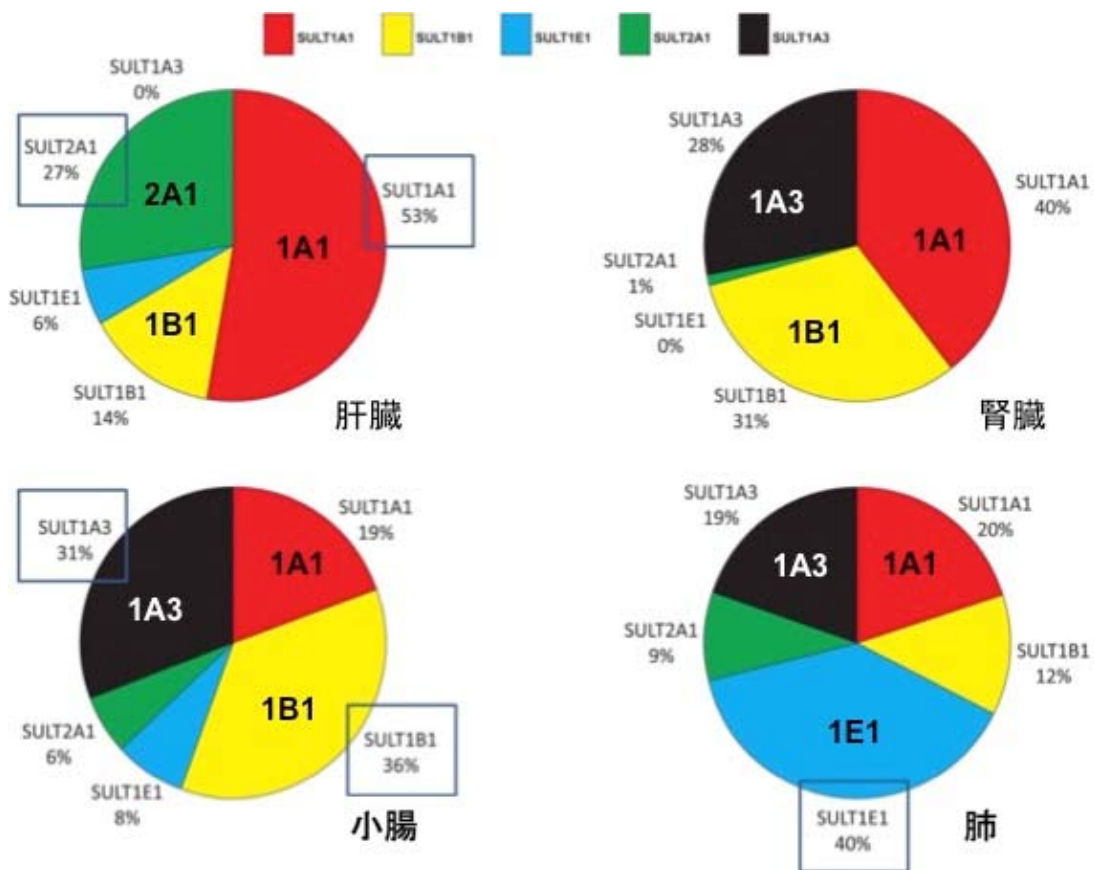


図 2 ヒト SULT の組織発現分布

SULT1C4 は榊原らによって同定され [4], SULT1C サブファミリーに分類された。このアイソフォームはいくつかのグループによってクローン化され [5-7], 主に胎児組織で発現することが報告されている [8]。しかし, SULT1C4 の生理学的役割はまだ不明である。

一般に, フェーズ II 代謝物は, 元の化合物よりもはるかに低い生理活性を示す。ただし, 場合によっては, 代謝によって化合物の化学反応性が高まることもある [2]。この代謝活性化は SULT 反応でも起こり, 強い求電子性陽イオンが形成される。よく知られている例

はミノキシジルの代謝活性化である。その硫酸抱合体が高血圧から保護し、発毛を促進する[9, 10]。これにより硫酸抱合体は新薬開発にとって興味深いものになっている。

硫酸抱合体の生理活性への関心が高まっているにもかかわらず、硫酸抱合体の調製が困難なため、研究が制限されることがある。有機合成は大規模生産の最初の選択肢であるが、位置特異的またはエナンチオ特異的な代謝物を取得することはしばしば困難であり、時には不可能である。しかし最近、エピカテキングルクロン酸抱合体や硫酸抱合体などのいくつかの代謝物の位置特異的的化学合成が可能になった [11]。それでも、硫酸抱合体は一般に酸性条件で不安定であり、硫酸抱合化に必要とされる pH は低いため化学合成は制限されることがよくある [12]。小スケールの硫酸抱合体の調製には、動物組織の細胞内画分または異種 SULT 発現システムから調製された精製酵素を使用する酵素的アプローチも使用されている。このような *in vitro* システムには、高価な硫酸基供与体 PAPS が必要である。しかし、PAPS 合成の効率的な方法は、ごく最近開発された[13]。これらの問題に対処するために、比較的単純で費用対効果の高い手法で硫酸抱合体を生成するヒト SULT の酵母発現システムを構築した。

他のグループも、CYP および UGT を発現する薬物代謝酵素の異種発現システムを開発した。宿主として *S. cerevisiae* をすることには、いくつかの利点がある。榊らは、*S. cerevisiae* AH22 細胞で哺乳類 CYP の発現に成功し[14]、これらの組換え酵母は薬物、環境汚染物質、フラボノイド、および食品中機能性成分の代謝を可能にした [15,16,14,17,18]。生城らは、*S. cerevisiae* AH22 株を使用して UGT を発現させた [19]、UGT と UDP-グルコース脱水素酵素 (UGDH) を同時に発現させることにより、UDP-グルクロン酸を添加せずにグルクロン酸抱合体を生成する whole-cell システムを確立した (第 1 章) [20]。この *S. cerevisiae* システムは、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を使用した同様のシステム[21]よりも生産性が高かった。

本研究では、*S. cerevisiae* AH22 における 6 種のヒト SULT 分子種 (1A1, 1A3, 1B1, 1C4, 1E1, および 2A1) の発現 (図 3)、および硫酸抱合体の生成におけるこのシステム使用の

可能性について述べる.

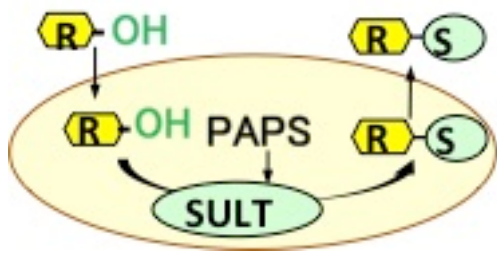


図 3. SULT 発現酵母

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 試薬及び材料

硫酸アンモニウムを含む酵母窒素ベースは、MP biomedical (Santa Ana, United States) から購入した。L-ヒスチジンは和光純薬工業株式会社から購入した。 *Arthrobacter luteus* 由来ザイモリアーゼは、生化学工業株式会社から購入した。7-HC とミノキシジルは Sigma-Aldrich Corp から購入した。ビスフェノール A とケルセチンはナカライテスク株式会社から購入した。アセトアミノフェン、1-ヒドロキシピレン、ビスフェノール AF、ヘスペレチン、レスベラトロール、およびテストステロンは、東京化成工業株式会社から購入した。

SULT1A1, SULT1A3 / 1A4 (A-24, sc-135674) の検出用のウサギポリクローナル抗 SULT1 (H-55, sc-23928), SULT1A3, SULT1B1 (N-19, sc-130273), SULT1E1 の検出用 (I-15, sc-130109) および SULT2A1 (FL-285, sc-32941) 抗体は Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, United States) から購入し、抗 SULT1C4 (ab71356) は Abcam (Cambridge, UK) から購入した。ヤギ-アルカリホスファターゼ (AP) 結合抗ウサギ IgG (H&L) 抗体 (7054) は、Cell Signaling Technology (Massachusetts, United States) から購入した。

### 2.2.2 ヒト SULT 発現プラスミドの構築と酵母形質転換

[1] 酵母で SULT 発現システムを構築するために、 *Escherichia coli* (*E.coli*) -酵母シャトルベクター pGYR を使用した。 pGYR には、 *Zygosaccharomyces rouxii* に由来する GAP プロモーターおよびターミネーターが含まれており、以前の研究で CYP の発現に使用されていた [22]。ヒト SULT 遺伝子および隣接する HindIII 部位を含むプライマー配列の Genbank 情報を表 S1 および表 S2 に示した。 PrimeSTAR Max (TaKaRa) を使用した PCR により、 Hind III 部位を持つ SULT cDNA を増幅した。 PCR 産物と pGYR を Hind III (Roche Applied Sciences, Penzberg, Germany) で酵素処理した後、得られた SULT cDNA フラグメントと

pGYR を Ligationhigh Ver.2 (TOYOBO Co., Ltd.) を使用してライゲーションした。SULT1B1 および 1C4 発現ベクターの構築手順を補足情報の材料に示す。

酵母 *S. cerevisiae* AH22 (ATCC 38626) の形質転換は、以前に記載されているように[20] 酢酸リチウム法によって実施された。得られたクローンは、KOD FX Neo (TOYOBO Co., Ltd.) を使用したダイレクトコロニーPCR によって確認された。

### 2.2.3 SULT 発現酵母の培養

SULT 形質転換体の 30%グリセロールストック 200  $\mu$ l を SD + His アガロースプレートに広げ、30°C で 2~3 日間プレインキュベートした。コロニーを採取した後、細胞を 1 L の SD + His 培地で、200 rpm で振とうしながら 30°C で一晩培養した。細胞を 2.0~2.5 OD<sub>660</sub> の細胞密度で回収し、続いて等量の蒸留水に再懸濁した。細胞は-80°C で保存され、解凍後の生体触媒として使用された。

### 2.2.4 組換え酵母の S9 画分の調製

細胞を 0.5mM EDTA および 0.5mM DTT (pH 8.0) を含む 100 mM Tris-HCl に再懸濁し、穏やかに攪拌しながら 30°C でザイモリアーゼ (100 unit/mL) 処理した。ザイモリアーゼ処理後、反応溶液を 6,000  $\times$ g で 5 分間遠心分離し、上清を除去した。1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド (phenylmethylsulfonyl fluoride ; PMSF) を含む 100 mM Tris-HCl バッファーにペレットを再懸濁した後、4°C の冷却下で超音波処理により細胞を破碎し、9,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離した。得られた上清を S9 画分として使用した。S9 画分のタンパク質濃度は、Protein Assay Bicinchoninate キット (nacalai tesque) を使用して定量した。

### 2.2.5 イムプロットティングによる酵母細胞で発現した SULT 酵素の分析

ジチオスレイトールを含む 6 $\times$ SDS バッファーを S9 画分に加え、95°C で 5 分間加熱した。SDS-PAGE 後、タンパク質をゲルからメタノールで平衡化したニトロセルロースメン

ブレン (Bio-Rad Laboratories, Berkeley, CA, US) に転写し, 10%ウシ血清アルブミン (BSA) /TBS バッファーでブロッキング (室温, 1 時間) した. 一次抗体および AP 結合抗ウサギ二次抗体とそれぞれインキュベート後, 電気泳動試験したアルカリホスファターゼ染色用 BCIP-NBT Solution Kit (nacalai tesque Inc) を使用して検出を行った.

### 2.2.6 菌体反応による硫酸抱合体の合成

SULT 形質転換体の酵素活性は, 典型的基質 7HC および生体内外基質を使用して評価した. 反応条件の最適化は, 異なる反応条件を変化させて実施され, 最適化された条件は以下の通りであった. 湿酵母細胞を, 1% (w/v) 硫酸アンモニウム, 8% (w/v) グルコース, 10 または 100mM 基質 DMSO 溶液を含む 100 mM Kpi バッファー (pH 7.4) に 25% (w/v) の濃度で懸濁した (基質の最終濃度 0.1 または 1 mM). 反応は 30°C で振とうしながら行った. 反応後, 3 倍量のアセトニトリルを反応液に加えた. 15,000×g で 10 分間遠心分離した後, 上清を乾燥させ, HPLC 分析用の 50 µl の溶媒に溶解した.

### 2.2.7 HPLC による硫酸抱合体の分析

分析機器は, COSMOSIL 2.5C18-MS-II カラム (2.0 x 100 mm, ナカライテスク株式会社) を備えた Lachrom Ultra シリーズ UHPLC クロマトグラフ (HITACHI High-Technologies Corporation) または, poroshell 120 EC-C18 カラム (4.6 x 50 mm, Agilent Technologies) を備えた Agilent 1260 Infinity LC (Agilent Technologies) が使用された. Fig. S3 に示すように, 各化合物の分析プログラムを実行した.

## 2.3 実験結果

### 2.3.1 ヒト SULT 発現組換え酵母を用いた硫酸抱合体合成システムの確立

ウエスタンブロット解析は、*S. cerevisiae* AH22 における SULT1A1, 1A3, 1B1, 1C4, 1E1 および 2A1 の発現の成功を示した。6 つの SULT 分子種の中で、1A3 が最も高い発現レベルを示し、1E1 が最も低い発現レベルを示した (Fig. 1)。典型基質 7HC に対する代謝活性を 6 つの SULT 発現株で比較した。7HC 硫酸抱合体 (7HC-S) は、PAPS の添加なしで、すべての SULT 発現株で生成され、酵母細胞の内因性 PAPS が 7HC-S の生成に使用されたことを示唆した。注目することに 0.1 mM 7HC は、SULT1A1 および 1E1 によって 6 時間以内にほぼ完全に 7HC-S に変換された (Fig. 2)。

### 2.3.2 硫酸抱合体合成システムにおける反応条件の最適化

酵母細胞における 7HC-S の生産性を向上させるために、高い活性を示す SULT1A1 または 1E1 の 10% (w/v) 湿重量細胞を使用して反応条件を最適化した。1%硫酸アンモニウム (w/v) の添加により、1 mM 7HC で 7HC-S 産生が約 2 倍に増加し、酵母細胞の内因性 PAPS レベルが増加したことが示唆された (Fig. 3B)。

また、PAPS 合成には 2 分子の ATP が必要であるため、ATP 生成の炭素源としてのグルコースが 7HC-S の生成量に及ぼす影響を調べた。SULT1A1 と 1E1 の両方で、1 mM 7HC での 7HC-S 産生は、1%硫酸アンモニウムの条件下で最大 8%のグルコース濃度に応じて有意に増加した (Fig. 3C)。

10% (w/v) 湿重量細胞を 0.1 mM 7HC とインキュベートすると、7HC の完全な変換が観察されたため、7HC-S 生成に対する基質濃度の影響を調べた。1 mM 7HC は 8%グルコースと 1%硫酸アンモニウムの条件下で最高の生成量を示し (Fig. 3D)、7HC の濃度が高いと 7HC-S の生成が抑制された。得られた硫酸抱合体は分取 HPLC で精製されるため、容積 (L) あたりの生成量は重要である。7HC-S 生成に対する細胞量の影響を調べた。予想通り、容

量 (L) あたり 7HC-S の生成量は、25% (w/v) までの細胞量の増加とともに増加した (Fig. 3A). 細胞量をさらに増やすと、反応溶液の粘度が高くなり、7HC-S の収率が低くなった。その結果、その後のすべての代謝反応は、以下の条件下で行われた。8% (w/v) グルコースと 1% (w/v) 硫酸アンモニウムを含む 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) 中に 25% (w/v) の酵母細胞。インキュベーションは、振とうしながら 30°C で 6 時間行った。

### 2.3.3 生体異物からの硫酸抱合体の調製

次に、いくつかの生体異物に対する代謝活性を調べた。SULT の基質の 1 つであるミノキシジル (MX) は、すべての SULT 分子種によって親水性の硫酸抱合化 (MX-S) された (Fig. 4)。特に、SULT1E1 ( $6.2 \pm 0.4 \text{ mg/L}$ ) と SULT2A1 ( $6.9 \pm 0.4 \text{ mg/L}$ ) は高い生産性を示した。MX-S は、7HC (Fig. 4A-C) と同様に高基質濃度 (1 mM) で効率的に生成されました。硫酸抱合の生産性をさらに調べたところ、1 リットルあたりの収量が 100 ミリグラムを超える硫酸抱合体の生成に成功したことが明らかになった。(Table. 1)。鎮痛薬および解熱薬として一般的に使用されているアセトアミノフェン (N-Acetyl-*p*-Aminophenol, APAP) は、SULT1A3 および 1E1 によって硫酸抱合体 (APAP-S) に変換されるのに対し、SULT2A1 には活性がなかった。環境汚染物質として知られている化合物。ビスフェノール A (Bisphenol A ; BPA), その誘導体であるビスフェノール AF (Bisphenol AF ; BPAF), および 1-ヒドロキシピレン (1-OHP) は、SULT1A1, 1B1, および 1E1 によって十分に変換された。各 SULT 分子種は、BPA および BPAF に対して同様の代謝活性を示した。1-OHP は、100 ミリグラムを超える生産性で SULT1A3 および 1B1 によって変換されました。これらの生体異物化合物とは対照的に、内因性のテストステロン (TES) の硫酸抱合は、ステロイド代謝において重要な役割を果たすことが知られている SULT2A1 によって主に代謝された。



### 2.3.4 SULT によるポリフェノールの位置選択的抱合

代謝物の位置選択的合成は、化学合成と比較した生合成の最大の特徴の1つである。したがって、複数のヒドロキシル基を持ついくつかのポリフェノールに対する SULT 形質転換体の位置選択性を調べた。3-, 5-, および 4'-位置に3つのヒドロキシル基を持つレスベラトロール (RES) は、SULT1A1, 1A3, 1B1, および 1C4 によって主に 3-硫酸抱合体 (3S) に変換され、全体 RES-S (3S と 4S) に対する 3S の比率は 90%を超えた。一方、SULT2A1 により、生成量が低い、3S および 4'-硫酸抱合体 (4'S) に変換された (RES-S 全体に対する 4'S の比率 95.2%)。対照的に、硫酸抱合体 1E1 は、3-および 4'-ヒドロキシ基の両方に対してほぼ同等の選択性を示し、3S の比率は 46.8%, 4'S の比率は 53.2%だった (Fig. 5A, 5B)。タマネギやリンゴなどの野菜や果物が豊富な主要なフラボノールの1つであるケルセチン (QUE) も、2つの硫酸塩型 7S と 3'S に変換された。SULT1A1, 1A3, および 1B1 は、QUE-S 全体 (7S+3'S) に対する S2 の比率が 99.0%を超えて選択的に 3'S 変換された。一方で SULT1C1 と 1E1 は、7S と 3'S に対してほぼ同等の選択性を示し、比率はそれぞれ 51.3%と 51.4%だった (Fig. 5C, D)。ヘスペレチン (HES) は、SULT1A1, 1A3, 1B1, および 1E1 によって 3'-スルホコンジュゲート (3'S) に変換され、HES-S 全体 (3'S + 7S) に対する 3'S の比率は 95.6%, 88.8%, 80.1%, および 93.6%だった。一方で、SULT1C4 と 2A1 は 96.5%を超えた比率で 7-ヒドロキシグループに選択性を示した (Fig. 4E, 4F)。これは細菌で発現した組換えヒト SULT 酵素によるヘスペレチン硫酸抱合に関与する SULT 分子種を決定した以前の報告と同様だった[23]。したがって、これらのポリフェノールにおける硫酸抱合の位置選択的調製は、最も適切な SULT アイソフォームを選択することによって可能である。

## 2.4 考察

硫酸抱合体の生理活性は、医薬品、食品成分および内因性ステロイドホルモンの作用メカニズムに関与する可能性が示されている。これまで酵母を用いることにより CYP および UGT を発現する薬物代謝酵素発現システムを開発し、生体内外の多くの代謝物の生成に成功している[14,20]。本研究では、SULT についても酵母内で発現させることにより、薬物代謝酵素発現システムを改善した。各 SULT を発現する形質転換体は、PAPS を添加せずに、数百 mg/L の内外因性物質の硫酸抱合体を生成した。細胞内画分または精製 SULT 酵素を使用する *in vitro* システムは、硫酸化のために高価な補酵素 (PAPS) を必要とするため、PAPS の必要性を回避することは、硫酸抱合体の工業生産にとって大きな利点である。最近、下平らは封入体形成を回避するため GST-SULT 融合タンパク質を大腸菌で発現させ、硫酸抱合体を外因性 PAPS なしに生成することに成功した[24]。 *E.coli* や *S.cerevisiae* などの一部の生物では、PAPS は 2 段階の反応で合成される。ATP スルフリラーゼによる硫酸ナトリウムと ATP からの APS の合成に続いて、APS キナーゼによる APS と ATP からの PAPS 合成である[25,26]。高等生物では、PAPS は ATP スルフリラーゼと APS キナーゼの両方の活性を持つ二機能性 PAPS シンターゼによって合成される[27]。したがって、*E.coli* と *S.cerevisiae* はどちらも、PAPS を内因的に産生できるため、菌体による硫酸抱合体の産生に適した宿主と考えられる。*S. cerevisiae* では、SULT は封入体を形成することなく十分なレベルで発現していた。組換え酵母の凍結標品を融解して使用することにより、良好な再現性で安定した硫酸抱合体産生能が得られた。

代謝物の位置選択的またはエナンチオ選択的生成は、生合成の最大の特徴の 1 つである。本システムでは、位置選択的な方法でポリフェノールの硫酸抱合体を生成することに成功した。ヘスペレチンに対する各 SULT 種の位置選択性は、Brand らが報告したもの[23]と一致した、これは、SULT の酵母発現システムがヒトのポリフェノールの代謝経路の予測に使用できることを示唆している。

ポリフェノール代謝物の生理活性が報告されて以来、近年、ポリフェノールの硫酸抱合体にも注目が集まっている。ブドウ果皮に主に見られ、複数の健康上の利点を発揮することが報告されているポリフェノールであるレスベラトロールは、UGT と SULT によってそれぞれグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体に排他的に変換される[28]。別の研究では、レスベラトロール硫酸抱合体が加水分解によるレスベラトロール再生の細胞内プールとして機能し、レスベラトロール硫酸抱合体による結腸直腸癌細胞株の治療がこれらの細胞に対して抗増殖効果を示したことが報告された[29]。さらに、トランスレスベラトロール硫酸抱合体は、炎症誘発性サイトカインおよび下流のケモカインの mRNA 発現およびタンパク質放出を阻害することにより、リポポリサッカリド刺激 U-937 マクロファージに対して抗炎症効果を示した[30,31]。ただし、レスベラトロール硫酸抱合体がこれらの効果を直接的または間接的に示すかどうかは不明である。

ポリフェノールに加えて、内因性硫酸抱合体の生理活性が報告されている。プレグネロン硫酸抱合体は、 $\gamma$ -アミノ酪酸の A 型受容体 (GABAAR) や N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体などの神経受容体のシグナルを調節する[32-34]。ラット海馬ニューロンでは、DHEA 硫酸塩、ならびに DHEA および  $\beta$ -エストラジオールが、NMDA 誘発性神経毒性に対して保護効果を発揮する[35]。SULT 酵母発現システムは、これらの硫酸抱合体の生成に使用して、それらの分子メカニズムを明らかにすることができる。

結論として、酵母細胞における SULT の異種発現システムの確立には、3 つの利点がある。外因性 PAPS の必要性を回避し、比較的簡単な手順で酵母培地から高収率の硫酸抱合体を回収できる、さらに可能な限り適切な SULT 分子種を選択することにより位置選択的硫酸抱合体を生成できる。したがって、この SULT 発現システムは、硫酸抱合体の生理活性を明らかにするのに役立つ可能性があり、P450 および UGT 発現システムと組み合わせることで、代謝とその代謝物の研究を加速することが期待できる。

## 2.5 引用文献

1. Coughtrie MW (2016) Function and organization of the human cytosolic sulfotransferase (SULT) family. *Chem Biol Interact.* 259:2-7.
2. Gamage N, Barnett A, Hempel N, Duggleby RG, Windmill KF, Martin JL, McManus ME. (2006) Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol Sci.* 90:5-22.
3. Riches Z, Stanley EL, Bloomer JC, Coughtrie MW (2009) Quantitative evaluation of the expression and activity of five major sulfotransferases (SULTs) in human tissues: the SULT "pie". *Drug Metab Dispos* 37:2255-2261.
4. Sakakibara Y, Yanagisawa K, Katafuchi J, Ringer DP, Takami Y, Nakayama T, Suiko M, Liu MC (1998) Molecular cloning, expression, and characterization of novel human SULT1C sulfotransferases that catalyze the sulfonation of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene. *J Biol Chem* 273:33929-33935.
5. Hehonah N, Zhu X, Brix L, Bolton-Grob R, Barnett A, Windmill K, McManus M (1999) Molecular cloning, expression, localisation and functional characterisation of a rabbit SULT1C2 sulfotransferase. *Int J Biochem Cell Biol.* 31:869-882.
6. Her C, Kaur GP, Athwal RS, Weinshilboum RM (1997) Human sulfotransferase SULT1C1: cDNA cloning, tissue-specific expression, and chromosomal localization. *Genomics* 41:467-470.
7. Yoshinari K, Nagata K, Shimada M, Yamazoe Y (1998) Molecular characterization of SULT1C-related human sulfotransferase. *Carcinogenesis* 19:951-953.
8. Stanley, E. L., Hume, R., & Coughtrie, M. W. (2005). Expression profiling of human fetal cytosolic sulfotransferases involved in steroid and thyroid hormone metabolism and in detoxification. *Molecular and cellular endocrinology*, 240(1-2), 32–42.

9. Buhl AE, Waldon DJ, Baker CA, Johnson GA (1990) Minoxidil sulfate is the active metabolite that stimulates hair follicles. *J Invest Dermatol* 95:553-557.
10. Leblanc N, Wilde DW, Keef KD, Hume JR (1989) Electrophysiological mechanisms of minoxidil sulfate-induced vasodilation of rabbit portal vein. *Circ Res* 65:1102-1011.
11. Zhang M, Jagdmann GE Jr, Van Zandt M, Sheeler R, Beckett P, Schroeter H (2013) Chemical synthesis and characterization of epicatechin glucuronides and sulfates: bioanalytical standards for epicatechin metabolite identification. *J Nat Prod* 76:157-169.
12. Jandik KA, Kruep D, Cartier M, Linhardt RJ (1996) Accelerated stability studies of heparin. *J Pharm Sci* 85:45-51.
13. Zhou X, Chandarajoti K, Pham TQ, Liu R, Liu J (2011) Expression of heparan sulfate sulfotransferases in *Kluyveromyces lactis* and preparation of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate. *Glycobiology* 21:771-780.
14. Sakaki T, Oeda K, Miyoshi M, Ohkawa H (1985) Characterization of rat cytochrome P-450MC synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem.* 98:167-175.
15. Kasai N, Ikushiro S, Hirose S, Arisawa A, Ichinose H, Wariishi H, Ohta M, Sakaki T (2009) Enzymatic properties of cytochrome P450 catalyzing 3'-hydroxylation of naringenin from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Biophys Res Commun* 387:103-108.
16. Oeda K, Sakaki T, Ohkawa H (1985) Expression of rat liver cytochrome P-450MC cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA* 4:203-210.
17. Sakaki T, Shinkyō R, Takita T, Ohta M, Inouye K (2002) Biodegradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins by recombinant yeast expressing rat CYP1A subfamily. *Arch Biochem Biophys* 401:91-98.

18. Sakaki T, Yamamoto K, Ikushiro S (2013) Possibility of application of cytochrome P450 to bioremediation of dioxins. *Biotechnol Appl Biochem.* 60:65-70.
19. Ikushiro S, Sahara M, Emi Y, Yabusaki Y, Iyanagi T. Functional co-expression of xenobiotic metabolizing enzymes, rat cytochrome P450 1A1 and UDP-glucuronosyltransferase 1A6, in yeast microsomes. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1672(2):86-92.
20. Ikushiro S, Nishikawa M, Masuyama Y, Shouji T, Fujii M, Hamada M, Nakajima N, Finel M, Yasuda K, Kamakura M, Sakaki T (2016) Biosynthesis of drug glucuronide metabolites in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharm* 13:2274-2282.
21. Drăgan CA, Buchheit D, Bischoff D, Ebner T, Bureik M (2010) Glucuronide production by whole-cell biotransformation using genetically engineered fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Drug Metab Dispos* 38:509-515.
22. Yasuda K, Ikushiro S, Kamakura M, Ohta M, Sakaki T (2010) Metabolism of sesamin by cytochrome P450 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 38:2117-2223.
23. Brand W, Boersma MG, Bik H, Hoek-van den Hil EF, Vervoort J, Barron D, Meinel W, Glatt H, Williamson G, van Bladeren PJ, Rietjens IM (2010) Phase II metabolism of hesperetin by individual UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases and rat and human tissue samples. *Drug Metab Dispos* 38:617-625.
24. Shimohira T, Kurogi K, Hashiguchi T, Liu MC, Suiko M, Sakakibara Y (2017) Regioselective production of sulfated polyphenols using human cytosolic sulfotransferase-expressing *Escherichia coli* cells. *J Biosci Bioeng pii: S1389-1723(16)30404-2.*
25. Karamohamed S1, Nilsson J, Nourizad K, Ronaghi M, Pettersson B, Nyrén P (1999) Production, purification, and luminometric analysis of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* MET3 adenosine triphosphate sulfurylase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 15:381-388.
26. Schriek U, Schwenn JD (1986) Properties of the purified APS-kinase from *Escherichia coli*

and *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 145:32-38.

27. Li H, Deyrup A, Mensch JR Jr, Domowicz M, Konstantinidis AK, Schwartz NB (1995) The isolation and characterization of cDNA encoding the mouse bifunctional ATP sulfurylase-adenosine 5'-phosphosulfate kinase. *J Biol Chem* 270:29453-29459.
28. Wenzel E, Somoza V (2005) Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol Nutr Food Res* 49:472-481.
29. Patel KR, Andreadi C, Britton RG, Horner-Glister E, Karmokar A, Sale S, Brown VA, Brenner DE, Singh R, Steward WP, Gescher AJ, Brown K (2013) Sulfate metabolites provide an intracellular pool for resveratrol generation and induce autophagy with senescence. *Sci Transl Med* 5(205):205ra133.
30. Schueller K, Pignitter M, Somoza V (2015) Sulfated and Glucuronated trans-resveratrol metabolites regulate chemokines and sirtuin-1 expression in U-937 macrophages. *J Agric Food Chem*. 63:6535-6545.
31. Walker J, Schueller K, Schaefer LM, Pignitter M, Esefelder L, Somoza V (2014) Resveratrol and its metabolites inhibit pro-inflammatory effects of lipopolysaccharides in U-937 macrophages in plasma-representative concentrations. *Food Funct* 5:74-84.
32. Adamusová E, Cais O, Vyklický V, Kudová E, Chodounská H, Horák M, Vyklický L Jr. (2013) Pregnenolone sulfate activates NMDA receptor channels *Physiol Res*62:731-736.
33. Mienville JM, Vicini S (1989) Pregnenolone sulfate antagonizes GABA A receptor-mediated currents via a reduction of channel opening frequency. *Brain Res* 489:190-194.
34. Wu FS, Gibbs TT, Farb DH (1991) Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* 40:333-336.
35. Kurata K, Takebayashi M, Morinobu S, Yamawaki S (2004) Beta-estradiol, dehydroepiandrosterone, and dehydroepiandrosterone sulfate protect against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by different

mechanisms. J Pharmacol Exp Ther 311:237-245



## TABLE

Table 1. 内外因性化合物に対する硫酸抱合体の産生性

Substrates	Productivity (mg/L)						Conversion (%) <sup>*2</sup>
	1A1	1A3	1B1	1C4	1E1	2A1	
APAP <sup>*1</sup>	187.8 ± 22.8	313.9 ± 40.4	116.5 ± 17.2	33.2 ± 16.6	206.1 ± 26.3	ND <sup>*3</sup>	13.5 ± 40.4 (1A3)
BPA	74.8 ± 5.6	ND <sup>*3</sup>	68.8 ± 0.3	3.7 ± 0.5	57.4 ± 4.5	21.0 ± 0.1	24.4 ± 1.8 (1A1)
BPAF	63.9 ± 1.8	4.7 ± 0.1	103.9 ± 10.9	3.7 ± 0.03	67.3 ± 1.8	50.9 ± 0.3	25.0 ± 2.6 (1B1)
1-OH-P	36.9 ± 1.5	113.4 ± 7.8	187.3 ± 2.1	19.6 ± 1.2	42.7 ± 3.2	8.7 ± 0.6	62.9 ± 0.7 (1B1)
TES	ND <sup>*3</sup>	ND <sup>*3</sup>	1.5 ± 1.1	ND <sup>*3</sup>	ND <sup>*3</sup>	227.4 ± 1.5	61.7 ± 0.4 (2A1)

APAP: Acetoaminophen, BPA: Bisphenol A, BPAF: Bisphenol AF, 1-OH-P: 1-hydroxypyrene

TES: Testosterone

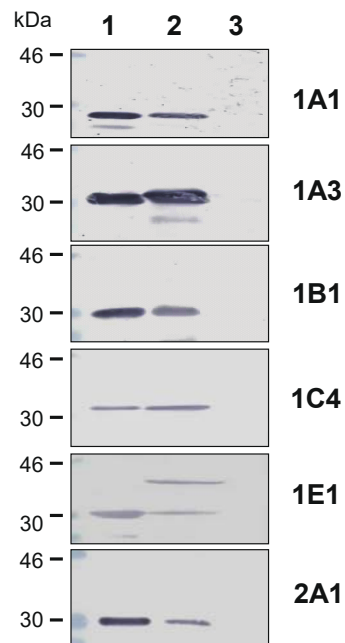
値は平均±標準誤差で示した。(n=3)

\*1 APAP の基質濃度は10 mM, その他は1 μM.

\*2 総ピーク面積に対する硫酸抱合体ピーク面積の比率 (6時間反応で最も効率的な分子種) を示した.

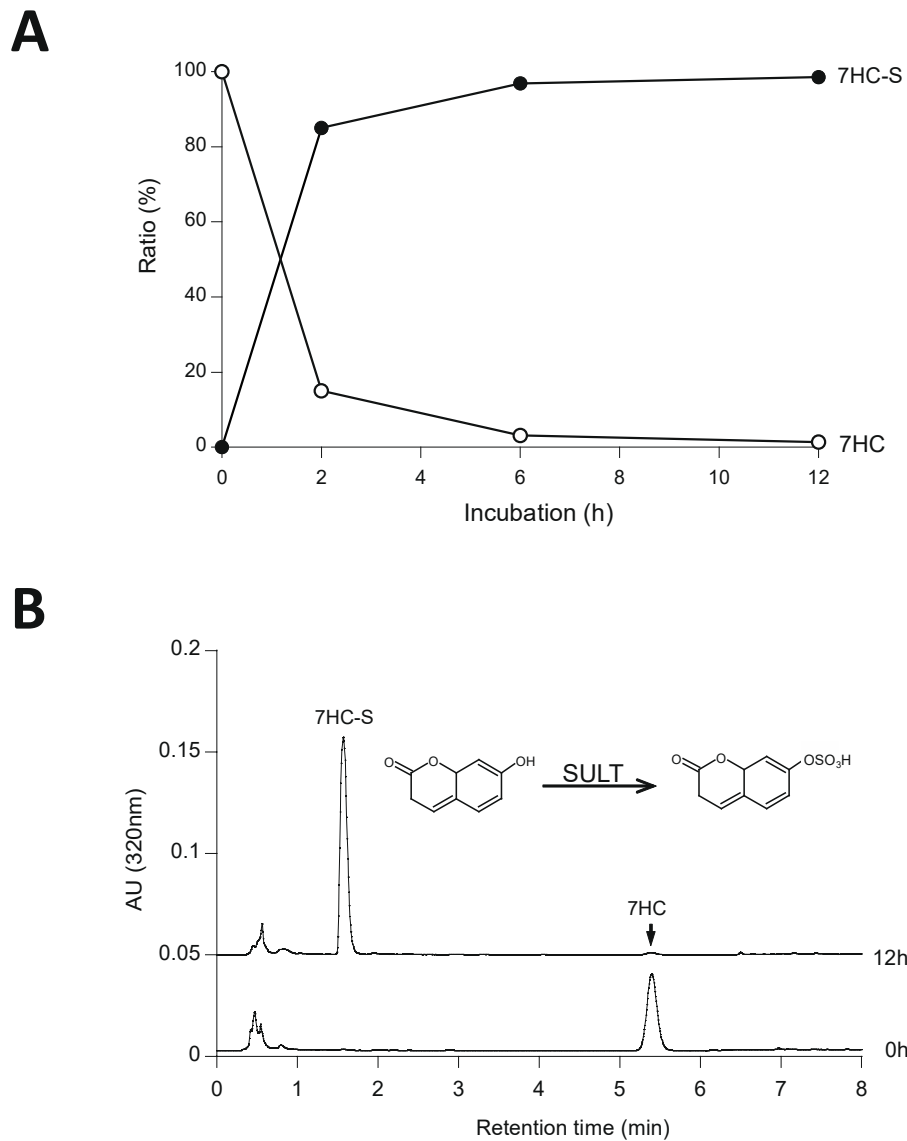
\*3 HPLC-UVで検出されなかった.

## FIGURES



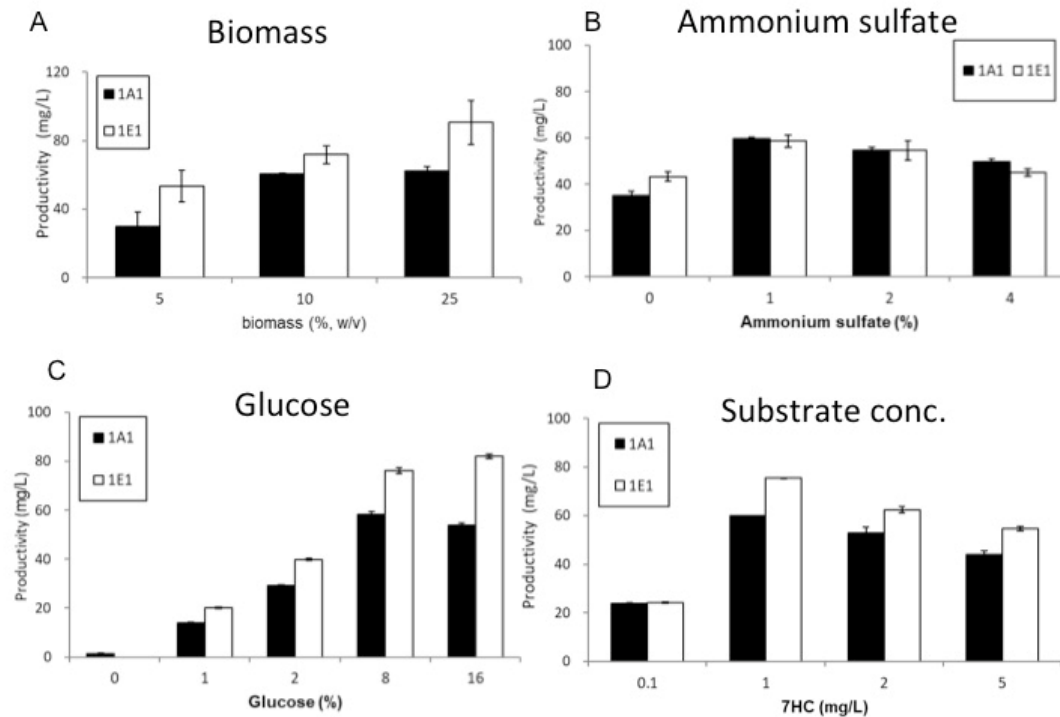
**Fig. 1** SULT 形質転換体のタンパク質発現.

レーン 1, 標準品として SULT 組換えタンパク質. タンパク量は 10  $\mu\text{g}$  (SULT1E1) または 1.0  $\mu\text{g}$  (他の分子種) のタンパク質をそれぞれロードした. レーン 2, SULT 形質転換体から調製された S9 画分. タンパク量は 10  $\mu\text{g}$  (SULT1A1, 1A3, 1B1, および 2A1), 20  $\mu\text{g}$  (SULT1C4), または 100  $\mu\text{g}$  (SULT1E1) のタンパク質がそれぞれロードされた. レーン 3, モック AH22 細胞から調製された S9 画分. 各 S9 画分と同量のタンパク質がロードされた.



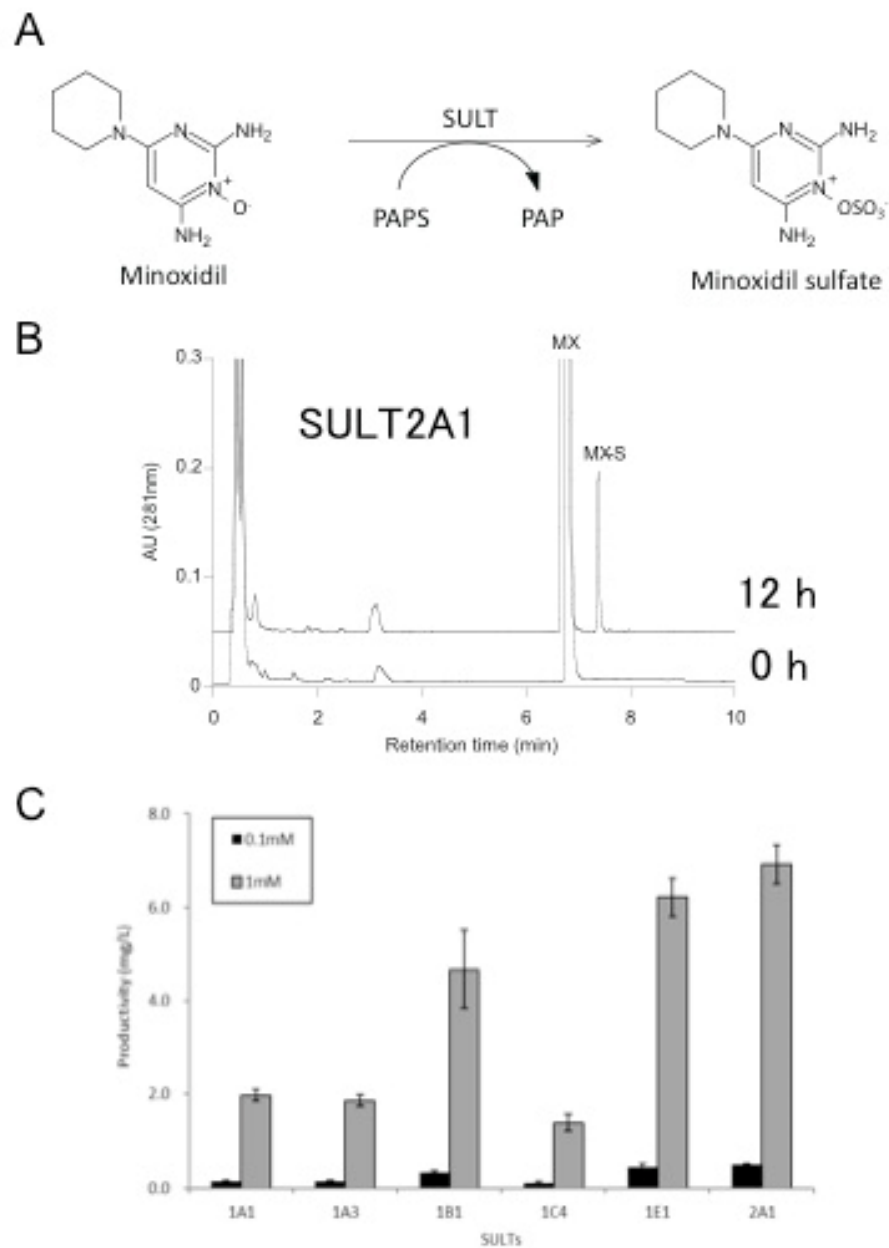
**Fig. 2 7HC に対する SULT1A1 and 1E1 の代謝活性.**

SULT1A1 および 1E1 による 7HC (白丸) から 7HC-S (黒丸) への時間依存変換. 0.1 mM 7HC を 10% (w/v) バイオマスとともにインキュベートした (A). SULT1E1 と 0 時間および 12 時間インキュベートした 7HC の HPLC プロファイル (B). 値は平均±標準誤差として示す (n = 3~4).



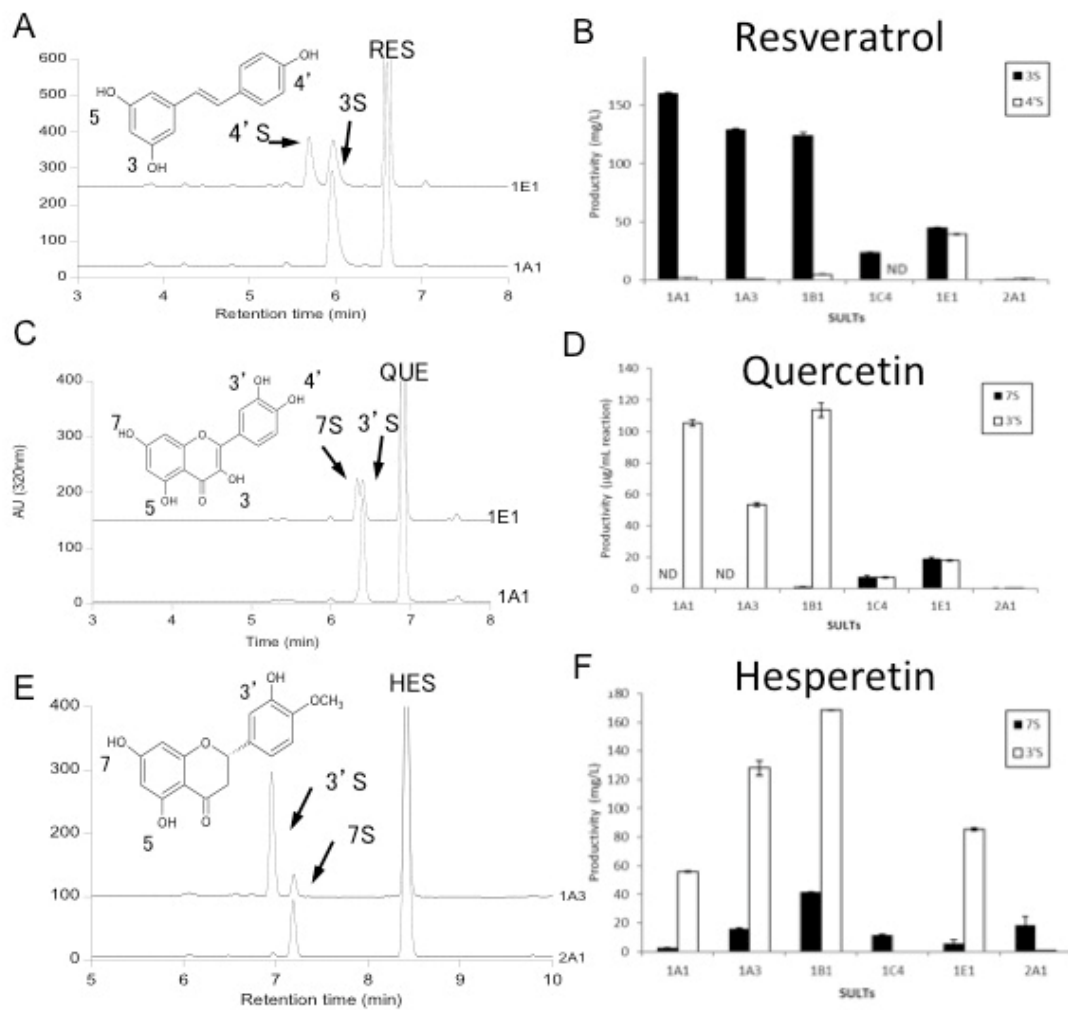
**Fig. 3** 標準基質 7HC を使用した反応条件の最適化.

菌体量の異なる条件での 7HC-S の生産性 (A). 1 mM 7HC は, 1%硫酸アンモニウムと 8% グルコースの条件下で, 各量のバイオマス SULT1A1 (黒棒) または SULT1E1 (白棒) とともにインキュベートされた. 硫酸アンモニウム (B) またはグルコース濃度 (C) に依存した 7HC-S の生成. 1 mM 7HC は, それぞれ 10% (w/v) 菌体とインキュベートされた. 基質濃度の異なる条件での 7HC-S の生産性 (D). 7HC の各濃度は, 1%硫酸アンモニウムと 8%グルコースの条件下で 10%菌体とインキュベートされた (C). 値は平均±標準誤差 (n=3) として示した.



**Fig. 4 SULT 形質転換体の MX に対する硫酸化活性.**

MX 硫酸化の反応式 (A). 0 時間および 12 時間インキュベートした MX-SULT2A1 抽出物の HPLC プロファイル. MX-S は疎水性代謝物として検出された (B). 0.1 mM (黒棒) または 1.0 mM (灰色棒) MX とインキュベートした各 SULT 形質転換体における MX-S の生産性 (C). 値は平均±標準誤差 (n=3).



**Fig. 5** SULT 形質転換体によるポリフェノールの位置特異的硫酸抱合.

レスベラトロール、ケルセチン、ヘスペレチン（それぞれ A, C, E）に対する異なる代謝パターンを示す 2 つの SULT 分子種の HPLC クロマトグラム. B : レスベラトロール (4'S はオープンバー, 3S は影付きバー), D : ケルセチン (S1 はオープンバー, S2 は影付きバー) または F : ヘスペレチン (3'S はオープンバー, 7S は影付きバー) に対する SULT 形質転換体の代謝選択性.

N.D. ; HPLC-UV では検出されなかった. 値は平均±標準誤差 (n = 3).

## SUPPLEMENTAL METHODS

### S1. SULT1B1 および SULT1C4 の発現ベクターの構築

SULT1B1 および 1C4 の発現ベクターの構築は、In-Fusion クローニングシステム（タカラバイオ株式会社，大津，日本）を使用して実施した。サーモフィッシャーサイエンティフィック社（マサチューセッツ州ウォルサム）から入手した合成 cDNA フラグメントには，5'および3'末端に 15 bp の追加配列を含めた。これは，*Hind* III によって線形化された pGYR の 3'および5'末端とそれぞれ相同な配列であり，*Saccharomyces cerevisiae* のコドン使用頻度に最適化された。合成された cDNA フラグメントは，In-FusionHD クローニングキットを使用して *Hind* III によって線形化された pGYR とライゲーションされた。合成 SULT1B1 および SULT1C4 コード配列の Genbank アクセッション番号は，それぞれ LC318803 および LC318804 である。

### S2. 酵母における SULT 発現システムの構築手順

サケ精子一本鎖 DNA と混合した pGYR-SULT 発現ベクターを酢酸リチウム法により AH22 コンピテントセルに形質転換した。形質転換手順後，5,000g で 1 分間の遠心分離により細胞を沈殿させた。ペレットを SD + His 培地に再懸濁し，30°C で 6 時間インキュベートした。プレインキュベーション後，SD + His プレートに広げ，形質転換体を選択するために 30°C で 3～5 日間インキュベートした。KOD FX Neo (TOYOBO Co., Ltd., Osaka, Japan) を使用した直接コロニー PCR により，コロニーをピックアップし，遺伝子型を決定した。

## SUPPLEMENTAL FIGURE

```
      10          20          30          40          50          60
GATAACCCGC AAGCTAAAAA AATGTTGTCC CCAAAGGATA TCTTGAGAAA GGATTTGAAG

      70          80          90          100         110         120
TTGGTTCACG GTTACCCAAT GACTTGTGCT TTTGCTTCTA ACTGGGAAAA GATCGAACAA

      130         140         150         160         170         180
TTCCATTCCA GACCAGATGA TATCGTTATT GCTACTTACC CAAAGTCTGG TACTACTTGG

      190         200         210         220         230         240
GTTTCCGAAA TTATCGACAT GATCTTGAAC GATGGTGACA TCGAAAAATG CAAGAGAGGT

      250         260         270         280         290         300
TTCATTACCG AAAAGGTCCC AATGTTGGAA ATGACTTTGC CAGGTTTGAG AACCTCTGGT

      310         320         330         340         350         360
ATTGAACAAT TGGAAAAGAA CCCATCCCA AGAATCGTTA AGACTCATTT GCCAACTGAT

      370         380         390         400         410         420
TTGTTGCCAA AGTCTTTCTG GGAAAACAAC TGCAAGATGA TCTACTTGGC TAGAAACGCT

      430         440         450         460         470         480
AAGGATGTTT CCGTTTCTTA CTACCACTTC GACTTGATGA ACAACTTGCA ACCATTTCCA

      490         500         510         520         530         540
GGTACTTGGG AAGAATACTT GGAAAAGTTT TTGACCGGTA AGGTTGCTTA CGGTTCTTGG

      550         560         570         580         590         600
TTTACTCATG TTAAGAATTG GTGGAAGAAG AAAGAAGAAC ACCCAATCTT GTTCTTGTAC

      610         620         630         640         650         660
TACGAAGATA TGAAGGAAAA CCCAAAAGAA GAAATCAAGA AGATCATCAG ATTCTTGAA

      670         680         690         700         710         720
AAAAACTTGA ACGACGAAAT CTTGGACAGA ATCATCCATC ATACCTCATT CGAAGTCATG

      730         740         750         760         770         780
AAGGATAATC CATTGGTTAA CTACACACAC TTGCCAACTA CTGTTATGGA TCATTCTAAG

      790         800         810         820         830         840
TCCCCATTCA TGAGAAAAGG TACTGCTGGT GATTGGAAGA ACTACTTTAC TGTGCTCAA

      850         860         870         880         890         900
AACGAAAAGT TCGACGCTAT CTACGAAACC GAAATGTCTA AACTGCCTT GCAATTCAGA

      910         920         930         940         950         960
```

Fig. S1 SULT1B1 の合成オリゴ DNA の配列.

コドンは酵母発現のために最適化された. In Fusion クローニングでは, 線状化された pGYR の持つ 15bp の相同配列がコンストラクトの 5'および 3'末端に結合した.



```

      10          20          30          40          50          60
GATAACCCGC AAGCTAAAAA AATGGCCTTG CATGATATGG AAGATTTTAC CTTTGATGGT

      70          80          90         100         110         120
ACTAAGAGAT TGTCGGTTAA CTACGTTAAG GGTATCTTGC AACCTACTGA TACCTGTGAT

     130         140         150         160         170         180
ATTTGGGATA AGATCTGGAA CTTTCAAGCC AAGCCAGATG ATTTGTTGAT TTCTACTTAT

     190         200         210         220         230         240
CCAAAGGCTG GTACTACTTG GACTCAAGAA ATCGTTGAAT TGATCCAAAA CGAAGGTGAC

     250         260         270         280         290         300
GTCGAAAAAT CTAAAAGAGC ACCAACTCAT CAAAGATTCC CATTCTTGGA AATGAAGATC

     310         320         330         340         350         360
CCATCTTTGG GTTCTGGTTT GGAACAAGCT CATGCTATGC CATCTCCAAG AATTTTGAAA

     370         380         390         400         410         420
ACCCATTTGC CATTCCATTT GTTGCCACCA TCTTTGTTGG AAAAGAAGT CAAGATTATC

     430         440         450         460         470         480
TACGTTGCCA GAAATCCAAA GGACAACATG GTTTCTTACT ACCACTTCCA AAGAATGAAC

     490         500         510         520         530         540
AAGGCTTTGC CAGCTCCAGG TACTTGGGAA GAATATTTTG AAACCTTCTT GGCCGGTAAG

     550         560         570         580         590         600
GTTTGTGGGG GTTCTTGGCA TGAACATGTT AAGGGTTGGT GGAAGCTAA AGACAAACAT

     610         620         630         640         650         660
AGAATCTTGT ACTTGTTCTA CGAAGATATG AAGAAGAACC CTAAGCACGA AATTCAAAG

     670         680         690         700         710         720
TTGGCCGAAT TCATCGGTAA AAAGTTGGAT GATAAGGTCT TGGACAAGAT CGTTCATTAC

     730         740         750         760         770         780
ACCTCATTGC ATGTCATGAA GCAAAATCCA ATGGCCAACT ACTCTTCTAT TCCAGCCGAA

     790         800         810         820         830         840
ATTATGGACC ATTCTATCTC TCCATTCATG AGAAAAGGTG CTGTTGGTGA TTGGAAGAAA

     850         860         870         880         890         900
CATTTCACTG TTGCTCAAAA CGAAAGATTC GACGAAGATT ACAAAAAGAA GATGACCGAT

     910         920         930         940         950         960
ACCAGATTGA CCTTCATTT CCAATTCTAA AGCTTGCTCA TGTTT

```

Fig. S2 SULT1C4 の合成オリゴ DNA の配列.

コドンは酵母発現のために最適化された. In Fusion クローニングでは, 線状化された pGYR の持つ 15bp の相同配列がコンストラクトの 5'および 3'末端に結合した.

**Program 1**  
 Target compound: acetaminophen, 1-hydroxypyrene  
 Column: Poroshell 120 EC-C18, 4.6IDx50mm, 2.7 $\mu$  m (Agilent)  
 Column oven (D): 40  
 Flow (mL/min): 0.5  
 UV (nm): 254  
 Mobile phase: A: 0.1% formic acid (FA)  
 B: acetonitrile containing 0.1% FA

Gradient program:	
Time (min)	B (%)
0	0
10	100
11	100
12	0
15	0

**Program 2**  
 Target compound: bisphenol A, bisphenol AF  
 Column: Poroshell 120 EC-C18, 4.6IDx50mm, 2.7 $\mu$  m (Agilent)  
 Column oven (D): 40  
 Flow (mL/min): 0.5  
 UV (nm): 234  
 Mobile phase: A: 10mM ammonium acetate containing 0.1% FA  
 B: 10mM ammonium acetate/acetonitrile=10/90

Gradient program:	
Time (min)	B (%)
0	5
1	10
10	80
11	100
13	5
15	5

**Program 3**  
 Target compound: hesperetin  
 Column: Poroshell 120 EC-C18, 4.6IDx50mm, 2.7 $\mu$  m (Agilent)  
 Column oven (D): 35  
 Flow (mL/min): 0.5  
 UV (nm): 285  
 Mobile phase: A: 0.1% formic acid (FA)  
 B: acetonitrile containing 0.1% FA

Gradient program:	
Time (min)	B (%)
0	0
10	100
11	100
12	0
15	0

**Program 4**  
 Target compound: minoxidil  
 Column: COSMOSIL 2.5C18 MS-II, 2.0IDx100mm (nacalai)  
 Column oven (D): 45  
 Flow (mL/min): 0.5  
 UV (nm): 281  
 Mobile phase: A: 0.1% tetrahydrofurfuryl acetate (TFA)  
 B: acetonitrile containing 0.1% TFA

Gradient program:	
Time (min)	B (%)
0	10
4	10
8	40
10	10
12	10

**Program 5**  
 Target compound: quercetin  
 Column: Poroshell 120 EC-C18, 4.6IDx50mm, 2.7 $\mu$  m (Agilent)  
 Column oven (D): 35  
 Flow (mL/min): 0.5  
 UV (nm): 320  
 Mobile phase: A: 10mM ammonium acetate containing 0.1% FA  
 B: 10mM ammonium acetate/acetonitrile/FA=10/90/0.1

Gradient program:	
Time (min)	B (%)
0	10
1	10
10	100
11	100
13	10
15	10

**Program 6**  
 Target compound: 7-hydroxycoumarin  
 Column: COSMOSIL 2.5C18 MS-II, 2.0IDx100mm (nacalai)  
 Column oven (D): 45  
 Flow (mL/min): 0.5  
 UV (nm): 254  
 Mobile phase: A: 0.1% tetrahydrofurfuryl acetate (TFA)  
 B: acetonitrile containing 0.1% TFA

Gradient program:	
Time (min)	B (%)
0	10
4	10
8	60
10	10
12	10

Fig. S3 HPLC の分析条件.

各ターゲット化合物の HPLC 分析は、上記プロトコルによって実行された。

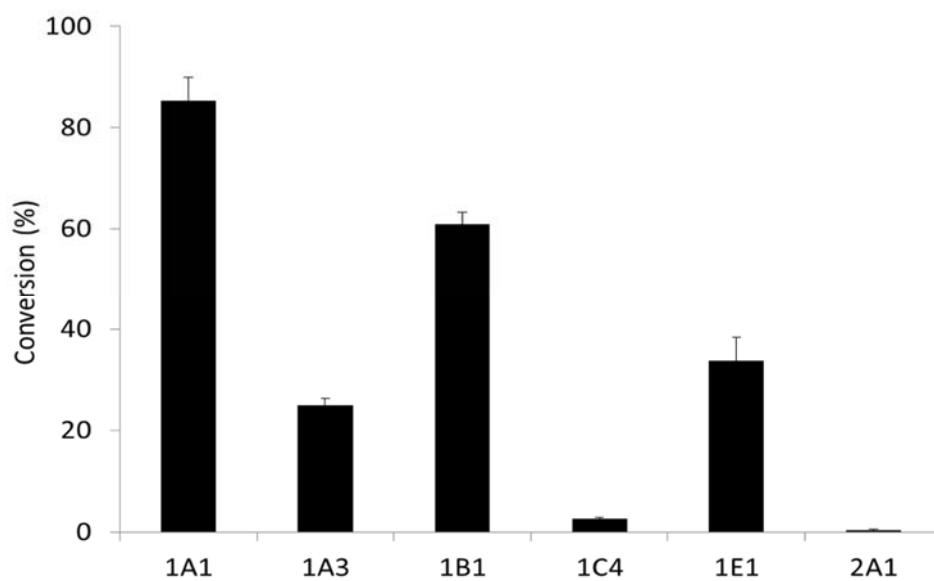


Fig. S4 7HC に対する組換え SULT の代謝活性.

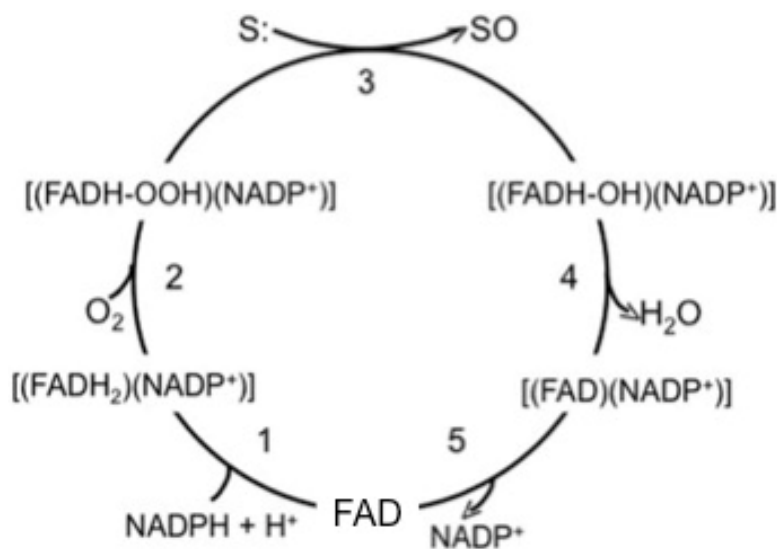
1 mM 7HC を SULT 発現菌体とともに 24 時間インキュベートした. 変換率は, HPLC-UV クロマトグラムの総ピーク面積に対する硫酸抱合体のピーク面積の比率として計算された.

### 第3章: ヒトフラビン含有モノオキシゲナーゼ発現 酵母による N-, S- 酸化体の合成

#### 3.1 はじめに

生体異物（低分子医薬品，食品成分等）は，薬物代謝酵素によって代謝される．これにより，これらの生体異物の生理活性が低下し，水溶性が高まり，体から排出されやすくなる．薬物代謝酵素のひとつであるフラビン含有モノオキシゲナーゼ（FMO; EC 1.14.13.8）は，薬物代謝第I相反応に属する一原子酸素添加酵素である．調査した 860 の薬剤のうち，FMO は約 5%の代謝に寄与し，これらの薬剤が受ける 4000 を超える酸化還元反応の約 2% を触媒することが知られている[1].

FMO は，硫黄や窒素などの求核ヘテロ原子を含む構造的に多様な化学物質の酸化的代謝を触媒する．酸化反応には，補欠分子族としてフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD），補酵素として NADPH，および共基質として酸素分子を必要とする(図 1).

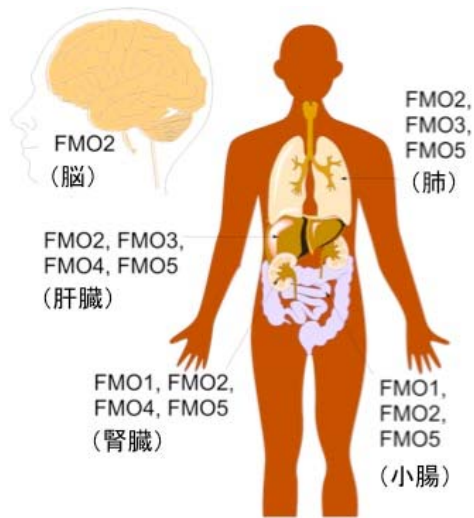


Pharmacol Ther. 2005 Jun; 106(3): 357-387. 改変

図 1. 哺乳類 FMO の反応サイクル

FMO は，細菌，真菌，植物を含むすべての生命界に存在し[2,3]，真核生物の小胞体膜に局

在する。ヒトにおいては FMO1 から FMO5 と呼ばれる 5 つの機能的な FMO 遺伝子を持っている[4] (図 2)。



Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2006;46:65-100. 改変

図 2. FMO 発現の組織分布

FMO1 は胎児の肝臓[5]と成人の腎臓[6]で発現し, FMO2 は肺組織で発現する[7]. ヒト FMO2 の場合, 2 つの対立遺伝子が報告されている. FMO2\*1 はサハラ以南のアフリカの集団で高頻度に見られる機能的な完全長バージョンだが[8], FMO2\*2 は配列の途中で機能しないタンパク質をもたらす終止コドンがある[7]. FMO3 は, 成人の肝臓で発現する特に機能的な FMO 分子種と見なされている [9,10]. FMO3 の変異は, 遺伝性疾患であるトリメチルアミン尿症と呼ばれる表現型が知られている [11]. FMO4 はいくつかの組織で発現しているが, その発現レベルは非常に低い. FMO5 は成人の肝臓で発現する[9,10].

哺乳類とは異なり, 酵母 (*S. cerevisiae*) は FMO アイソフォームを持っていないが, 生体異物を代謝しない yFMO が存在する. yFMO は, 生物学的チオール<sup>y</sup>の O<sub>2</sub>および NADPH 依存的酸化を触媒することにより, ジスルフィド結合を含むタンパク質のフォールディングを助けられていると考えられている[12, 13].

創薬および開発プロセス全体を通じて, 薬物の代謝物は構造決定のための標準品として役

立つ可能性がある。さらに、2008年にMISTガイドラインに代謝物が導入されたことにより、親化合物と比較して10%を超えるヒト代謝に存在するすべての代謝物に対して毒性試験を実施する必要がある[14]。薬物代謝物の化学合成には、多くの場合、さまざまな官能基のいくつかの保護および脱保護反応を含む複数の合成ステップが必要である。この問題を回避するために、*in vitro*での第I相代謝反応の単一ステップでの生成を目指した。これは、大腸菌や酵母などで異種発現されたヒト酵素を使用して達成できた。発現菌体での反応は、実際の酵素合成をする酵素を単離および精製する必要がなく、時間とコストを節約するため、多くの面で有益である。FMOは大腸菌での発現に成功しており、薬物代謝物のwhole-cellでの変換はヒトFMO3と改変ヒトFMO2によって酵素合成された。[15,16].

これまで薬物代謝酵素であるCYP、UGT、SULTなどの酵素の異種発現システムが開発されてきた。これらの組換え酵母細胞は、薬物、環境汚染物質、フラボノイド、および食品成分を効果的に代謝することが報告された[17-21]。 *S. cerevisiae* AH22株を使用してUGTを発現させ[22]、次にUGTとUGDHを同時に発現させることにより、UDP-グルクロン酸を添加することなくグルクロン酸抱合体を可能にするシステムを確立した[23]（第1章）。さらに、酵母でSULT発現システムを使用して、高価な補酵素3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホ硫酸（PAPS）を添加することなく、硫酸抱合体を合成することに成功した[24]（第二章）。 *S.cerevisiae* システムは、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を使用した同様のシステムよりも生産性が高いことがわかっている[25]。

本研究では、*S.cerevisiae* AH22酵母における5つのヒトFMOアイソフォーム(FMO1-5)の発現と、N-およびS-酸化体の生産におけるこのシステム利用の可能性について述べる。

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 試薬及び材料

硫酸アンモニウムを含む酵母ニトロゲンベースは, MP Biomedicals (Santa Ana, USA) から購入した. L-His とミダゾラムは和光純薬工業株式会社 (日本) から購入した. ザイモリアーゼ 100T (*Arthrobacter luteus*)は, ナカライテスク (日本) から購入した. メチル *p*-トリルスルフィド (MTS) およびベンジダミン塩酸塩 (BZD) は東京化成工業株式会社 (日本) から購入した. ベンジダミン *N*-オキシドマレイン酸水素塩 (BZDO) は, Sigma-Aldrich Corp.から入手した. メチル *p*-トリルスルホキシド (MTSO) は, Apollo Scientific Ltd. (Manchester, UK) から購入した.

ウサギポリクローナル抗FMO1 (ab97720), 抗FMO2 (ab95977), および抗FMO3 (ab126711) 抗体は, Abcam (Cambridge, UK)から購入し, 抗FMO5 抗体 (GTX114414)は GeneTex, Inc. (Irvine, CA)から購入した. ヤギポリクローナル抗FMO4 抗体 (T14, sc-104258) は, Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, USA) から購入した. ウサギ IgG に対するアルカリホスファターゼ (AP) 結合ヤギポリクローナル抗体 (7054) は, Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA) から入手した. ヤギ IgG に対する AP 結合ウサギポリクローナル抗体 (A4187) は, Sigma-Aldrich Corp から購入した. すべての化合物と溶媒は市販されている最高のグレードだった.

### 3.2.2 酵母における FMO 発現システムの構築

酵母で FMO 発現システムを構築するために, *E. coli*-酵母シャトルベクター-pGYR を使用した. ベクターには, *Zygosaccharomyces rouxii* に由来する GAP プロモーターおよびターミネーターが含まれており, 以前の研究で P450 の発現に使用されている[26]. 合成 cDNA フラグメントは ThermoFisher Scientific Inc. (Massachusetts, USA) から入手した. それらは 5'および3'末端に, *Hind*III による線形化した pGYR の 3'末端および5'末端と相同な配

列である 15bp の追加配列を含めた。また *S. cerevisiae* での発現に合わせてコドンの最適化を行った。これらの cDNA フラグメントは、In-Fusion HD クローニングキット（タカラバイオ株式会社，日本）を使用し，*Hind*III によって線形化された pGYR とライゲーションされた。ヒト FMO 遺伝子の GenBank 情報を以下に示す。FMO1; NM\_001282692, FMO2; NM\_001460, FMO3; NM\_006894, FMO4; NM\_002022, FMO5; NM\_001461.

*S. cerevisiae* AH22 (ATCC 38626) の形質転換は，以前に記載されているように酢酸リチウム法を使用して実施した[23]。得られたクローンを，KOD FX Neo（東洋紡株式会社，日本）を使用したダイレクトコロニーPCR によって確認した。

### 3.2.3 FMO を発現する組換え酵母の培養

組換え酵母の培養は，以前に記載されたように実施された[24]。FMO 形質転換体のグリセロールストックを SD + His アガロースプレートに広げ，30°C で 2~3 日間プレインキュベートした。コロニーを採取した後，細胞を 1 L SD + His 培地で，200rpm で振とうしながら 30°C で一晚培養した。細胞を 2.0~2.5 OD<sub>660</sub> の細胞密度で回収し，続いて等量の蒸留水に再懸濁した。細胞は-80°C で保存され，解凍後の生体触媒として使用された。

### 3.2.4 イムノブロットイングによる酵母細胞で発現した FMO 酵素の分析

酵母での FMO 発現は，以前に記載されたようにウエスタンブロット法によって解析された[23, 24]。酵母ペレットを 0.5mg / mL ザイモリアーゼ 100T で 30°C，5 分間処理した後，10%アクリルアミドゲルを使用して SDS-PAGE を行いった。得られたポリペプチドバンドをニトロセルロースメンブレンに転写し，メタノールで平衡化した後，10% BSA でブロックした。

一次抗体および AP 結合二次抗体を TBS バッファーで希釈し，それぞれインキュベートした（室温，1 時間）。その後，アルカリホスファターゼ染色用の BCIP-NBT 溶液キットを使用して検出を行った。



### 3.2.5 FMO 発現酵母を用いた N-oxides と S-oxides の合成

FMO 形質転換体の酵素活性は、典型的基質である MTS と BZD を使用して評価した。反応条件の最適化は、異なる反応パラメータを変化させて実施され、最適化された条件は以下の通りであった。湿酵母細胞を、8% (w/v) グルコースを含む 100 mM KPi バッファー (pH 8.3) に 25% (w/v) の濃度で懸濁し、DMSO 中の 10mM 基質を最終的に 0.1mM の濃度で細胞懸濁液に添加した。反応は振とうしながら 30°Cで行った。インキュベーション後、2.5 倍量のクロロホルム：メタノール (3 : 1, v/v) を反応液に添加した。抽出物は、遠心分離 (12000×g, 10 分, 室温) により、上部の水相と下部の有機相に分離された。下側の有機相をエバポレート後、HPLC および LC-MS / MS 分析に使用する 100μL の溶媒に溶解させた。

### 3.2.6 HPLC による FMO 代謝物の分析

酵母細胞における MTS の S-酸化活性は、HPLC-UV システム (構成 : Waters 2695 セパレーションモジュール, Waters 2487 デュアル吸光度 UV 検出器, Cosmosil 5C18-Ar-II column (5 μm, 4.6 × 150 mm; Waters, Milford, MA)) を使用して測定した。

溶出条件は、0.1% (v / v) ギ酸を含む水-アセトニトリルで、10%アセトニトリル (2 分)、10~80%アセトニトリル (8 分)、80%アセトニトリル (2 分)、および 10%アセトニトリル (3 分) だった。流量は 1.0mL / min, カラム温度は 40°C, 注入量は 10 μL に設定した。MTSO の生成を波長 254 nm で検出し、標準物質を使用して定量を行った。

### 3.2.7 LC-MS/MS による FMO 代謝物の分析

ベンジダミンの N-酸化活性は、Agilent 1200 シリーズ LC システム (Agilent Technologies Inc.) と API 3200 QTRAP 質量分析計 (AB Sciex, Toronto, Canada) で構成される LC-MS / MS システムを使用して分析した。カラムは Capcell Pak C18 UG120 カラム (5μm, 4.6×250 mm, Shiseido, 東京, 日本) を使用した。溶出条件は、0.1%ギ酸を含む 20%アセトニトリルの

アイソクラティックで、流量は 0.8 mL min, カラム温度は 40°C, 注入量は 2  $\mu$ L とした..

MS 分析は、マルチプルリアクションモニター (MRM) モードでの陽イオンモードスキャンによるエレクトロスプレーイオン化 (ESI) によって実行された。MRM トランジションは、BZDO (m/z 326 $\rightarrow$ 102), BZD (m/z 310 $\rightarrow$ 86), および内部標準としてミダゾラム (m/z 326 $\rightarrow$ 291) のプリカーサーおよびプロダクトイオンペアに対応してそれぞれモニターされた。BZDO を定量には、0.1~30 $\mu$ M の濃度範囲で標準物質と内部標準物質のピーク面積比を使用して検量線を作成した。

### 3.3 実験結果

#### 3.3.1 ヒト FMO 発現酵母を使用した N-酸化および S-酸化代謝物の whole-cell 産生システムの確立

FMO を形質転換した酵母の FMO 発現レベルは、FMO 特異的抗体を使用したイムノブロット解析によって評価した。Fig. 1 に示すように、酵母におけるそれぞれの FMO アイソフォームの発現を確認した。

FMO 形質転換体の N-および S-酸化活性を決定するために、MTS および BZD を典型的な基質として使用した (Fig. 2A および Fig. 3A)。MTS は、FMO によって S 酸化型 MTSO に正常に変換された (Fig. 2B)。FMO4 形質転換体は、BZD の N-酸化も効率的に触媒した (Fig. 3B)。MTSO と BZDO は、NADPH の外因性サプリメントを追加する必要なく、whole-cell での反応で生成された。しかし FMO 形質転換体だけでなく、pGYR のみの形質転換体でも生成された。これは、酵母細胞に存在する内因性 NADPH が N-および S-酸化反応を触媒する酸化酵素により消費されて生成したと考えられる。MTSO および BZDO への時間依存性は、FMO4 およびコントロール pGYR 形質転換体を使用した (Fig. 4)。FMO4 によって、0.1 mM MTS の半分が 2 時間以内に MTSO に変換されたことが明らかになった (Fig. 4A)。BZDO 生成量は少ないものの 24 時間まで時間依存的に増加した (Fig. 4B)。

#### 3.3.2 whole-cell での N-および S-オキシド生成のための反応条件の最適化

酵母細胞における N-および S-酸化活性を向上するために、反応条件を最適化した。S-酸化反応に使用する菌体量の影響を、FMO3 および FMO4 形質転換体を使用して調べた。予想通り、MTS から MTSO への変換率は、25% (w/v) まで菌体量に応じて増加した (Fig. 5A)。さらに、FMO 代謝反応は通常、最大の FMO 活性を得るために pH 8.0 以上で行われるため[27]、酵母菌体における N-および S-酸化活性に対するバッファー pH の影響を調べた。FMO3 によって触媒される BZD の N-酸化は、pH 6.8 および 7.4 の緩衝液と比較し

て、pH 8.3 の緩衝液で反応を行った場合に有意に増加した (Fig. 5B). 対照的に、FMO4 によって触媒される MTS の S 酸素化は、バッファーpH の変化による有意な影響を受けなかった (Fig. 5C).

FMO 発現酵母は、緩衝液 pH8.3 および 25% (w/v) バイオマスの条件下で、MTS および BZD に対して最適な活性を示した。次に、5 つの FMO 形質転換体の MTS および BZD に対する代謝活性を比較した (Fig. 6)。MTS に対する酸化活性は、FMO1, FMO3, および FMO4 形質転換体で確認され、FMO4 で最も高い活性が観察された。得られた N-および S-酸化体は分取 HPLC で精製されるため、容量 (L) あたりの生産性は実用的な観点から重要である。FMO4 形質転換体の存在下での MTSO と BZDO の最大の生成量は、それぞれ 6.9 と 1.6 mg / L であった。

### 3.4 考察

酵母を使用して当研究室では P450, UGT, および SULT を発現する薬物代謝酵素発現システムを開発し, 生体内外のさまざまな代謝物の生成に成功した[17, 23 (第 1 章), 24 (第 2 章)]. 本研究では, さらに FMO 発現酵母システムを構築した. FMO4 発現酵母では, NADPH を添加せずに 1 リットルあたり数ミリグラムの N-および S-酸化代謝物を生成した. ミクロソーム画分や精製 FMO 酵素を使用する *invitro* システムは, 酸化反応に必要な高価な補酵素 (NADPH) を添加する必要があるため, 本システムのように外因性 NADPH の必要性を回避することは, 生産コストに大きな利点をもたらす. 最近, Hanlon ら[15]や Geieretal ら [16]は, 細菌系で発現した組換え FMO を使用して, N-および S-酸化代謝物の生成に成功した. *E.coli* と *S.cerevisiae* はどちらも, NADPH を内因的に生成する能力があるため, N-および S-酸化代謝物の whole-cell での生成に適した宿主と考えられる. *S. cerevisiae* では, FMO の封入体形成がなかった. 菌体凍結ストックを使用した whole-cell 合成は, 良好な再現性ととも安定した発現をもたらした.

代謝物の位置選択的またはエナンチオ選択的生成は, 微生物合成の最大の特徴の 1 つである. 第 1 章および第 2 章では, 位置選択的な方法でポリフェノールの抱合体を生成することに成功した. FMO による酸化反応でもラニチジンおよびホスホ NSAID に対する FMO と CYP 分子種の位置選択的酸化について報告されている[28, 29]. FMO 酵母発現システムでも同様の性質を有することが期待でき, FMO, CYP 分子種を選択することで位置選択的な酸化代謝物の取得できる可能性がある.

これに加えて, 創薬および開発プロセスにおいて構造解析のための薬物代謝物標準物質が必要である. FDA による 2008 年の MIST ガイドラインでは, ヒトの代謝において親化合物と比較して 10%を超える量で存在するすべての代謝物を毒性試験にかける必要があると定められている[14]. 現在の FMO 酵母発現システムは, 定量分析用の標準物質の生成に程度では使用できるが, 毒性研究に十分な量 (~g オーダー) の代謝物を得るには改

善が必要である。

結論として、この研究で開発された酵母細胞における FMO 発現システムは、2つの主な利点を提供する。(1) NADPH の添加が不要である、(2) 酵母反応液から N-および S-酸化代謝物を比較的簡単な手順回収できる。したがって、この FMO 発現システムは、FMO 代謝物の生理活性を明らかにするのに役立つ可能性があり、P450, UGT, および SULT 発現システムと組み合わせることにより、代謝研究を加速する可能性が示唆された。

### 3.5 引用文献

1. Rendic S, Guengerich FP. Survey of human oxidoreductases and cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of xenobiotic and natural chemicals. *Chem Res Toxicol* 2015; 28: 38-42.
2. Mascotti ML, Lapadula WJ, Juri Ayub M. The origin and evolution of Baeyer-villiger monooxygenases (BVMOs): an ancestral family of flavin monooxygenases. *PLoS One*. 2015; 10: e0132689.
3. Mascotti ML, Ayub MJ, Furnham N, Thornton JM, Laskowski RA. Chopping and changing: the evolution of the flavin-dependent monooxygenases. *J. Mol. Biol.* 2016; 428: 3131-3146.
4. Hernandez D, Janmohamed A, Chandan P, Phillips IR, and Shephard EA Organization and evolution of the flavin-containing monooxygenase genes of human and mouse: identification of novel gene and pseudogene clusters. *Pharmacogenetics* 2004; 14:117-130.
5. Koukouritaki, SB, Simpson, P., Yeung, CK, Rettie, AE, and Hines, RN. Human hepatic flavin-containing monooxygenases 1 (FMO1) and 3 (FMO3) developmental expression. *Pediatr. Res.* 2002; 51, 236-243.
6. Yeung CK, Lang DH, Thummel KE, et al. Immunoquantitation of FMO1 in human liver, kidney, and intestine. *Drug Metab Dispos.* 2000; 28:1107-1111
7. Dolphin CT, Beckett DJ, Janmohamed A, Cullingford TE, Smith RL, Shephard EA. The flavin-containing monooxygenase 2 gene (FMO2) of humans, but not of other primates, encodes a truncated, nonfunctional protein. *J Biol Chem* 1998; 273:30599-30607.
8. Veeramah KR, Thomas MG, Weale ME, Zeitlyn D, Tarekegn A, Bekele E. The potentially deleterious functional variant flavin-containing monooxygenase 2\*1 is at high frequency throughout sub-Saharan Africa. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18:877-886.

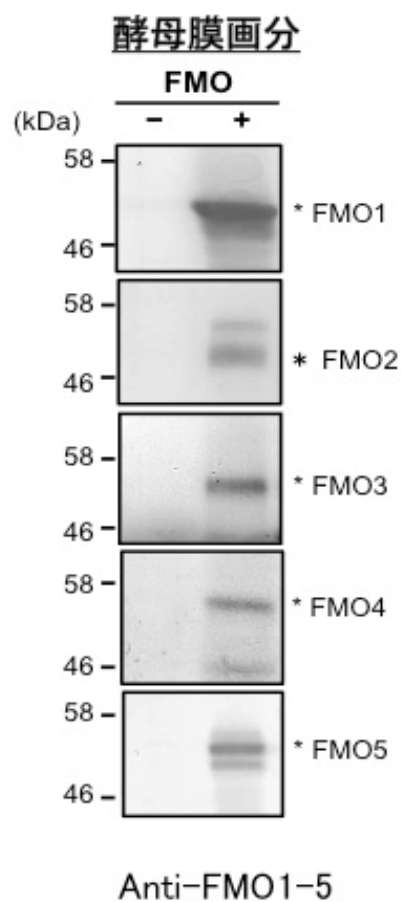
9. Koukouritaki SB, Poch MT, Cabacungan ET. Discovery of novel flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) single nucleotide polymorphisms and functional analysis of upstream haplotype variants. *Mol Pharmacol.* 2005; 68:383-92.
10. Shimizu M, Denton T, Kozono M, Cashman JR, Leeder JS, Yamazaki H.. Developmental variations in metabolic capacity of flavin-containing mono-oxygenase 3 in childhood. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2011; 71: 585-591.
11. Yamazaki H, Shimizu M. Survey of variants of human flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) and their drug oxidation activities. *Biochem Pharmacol.* 2013; 85:1588-1593.
12. Suh JK, Poulsen LL, Ziegler DM, Robertus JD. Molecular cloning and kinetic characterization of a flavin-containing monooxygenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys.* 1996; 336:268-2674.
13. Suh JK, Robertus, JD.. Yeast flavin-containing monooxygenase is induced by the unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000; 97: 121-126.
14. Smith DA, Obach RS. Metabolites in safety testing (MIST): considerations of mechanisms of toxicity with dose, abundance, and duration of treatment. *Chem Res Toxicol* 2009; 22: 267–279. [http://doi.org/ 10.1021/tx800415j](http://doi.org/10.1021/tx800415j).
15. Hanlon SP, Camattari A, Abad S, Glieder A, Kittelmann M, Lütz S, Wirz B, Winkler M. Expression of recombinant human flavin monooxygenase and moclobemide-N-oxide synthesis on multi-mg scale. *Chem Commun (Camb).* 2012; 48: 6001-6003.
16. Geier, M., Bachler, T., Hanlon, S. P., Eggimann, F. K., Kittelmann, M., Weber, H., Winkler, M. Human FMO2-based microbial whole-cell catalysts for drug metabolite synthesis. *Microbial Cell Factories*, 2015;14: 82.
17. Sakaki T, Oeda K, Miyoshi M, Ohkawa H. Characterization of rat cytochrome P-450MC synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem*, 1985; 98:167-175



18. Kasai N, Ikushiro S, Hirose S, Arisawa A, Ichinose H, Wariishi H, Ohta M, Sakaki T. Enzymatic properties of cytochrome P450 catalyzing 3'-hydroxylation of naringenin from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 387:103-108.
19. Oeda K, Sakaki T, Ohkawa H. Expression of rat liver cytochrome P-450MC cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA* 1985; 4:203-210.
20. Sakaki T, Shinkyo R, Takita T, Ohta M, Inouye K. Biodegradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins by recombinant yeast expressing rat CYP1A subfamily. *Arch Biochem Biophys* 2002; 401:91-98.
21. Sakaki T, Yamamoto K, Ikushiro S. Possibility of application of cytochrome P450 to bioremediation of dioxins. *Biotechnol Appl Biochem* 2013; 60:65-70.
22. Ikushiro S, Sahara M, Emi Y, Yabusaki Y, Iyanagi T. Functional co-expression of xenobiotic metabolizing enzymes, rat cytochrome P450 1A1 and UDP-glucuronosyltransferase 1A6, in yeast microsomes. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1672: 86-92.
23. Ikushiro S, Nishikawa M, Masuyama Y, Shouji T, Fujii M, Hamada M, Nakajima N, Finel M, Yasuda K, Kamakura M, Sakaki T. Biosynthesis of drug glucuronide metabolites in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharm* 2016; 13: 2274-2282.
24. Nishikawa M, Masuyama Y, Nunome M, Yasuda K, Sakaki T, Ikushiro S. Whole-cell-dependent biosynthesis of sulfo-conjugate using human sulfotransferase expressing budding yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018;102: 723-732.
25. Drăgan CA, Buchheit D, Bischoff D, Ebner T, Bureik M. Glucuronide production by whole-cell biotransformation using genetically engineered fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Drug Metab Dispos* 2010; 38:509–515.
26. Yasuda K, Ikushiro S, Kamakura M, Ohta M, Sakaki T. Metabolism of sesamin by cytochrome P450 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*. 2010; 38: 2117-2123.

27. Taniguchi-Takizawa T, Shimizu M, Kume T, and Yamazaki H. Benzydamine N-oxygenation as an index for flavin-containing monooxygenase activity and benzydamine N-demethylation by cytochrome P450 enzymes in liver microsomes from rats, dogs, monkeys, and humans. *Drug Metab Pharmacokinet* 2015; 30:64-69.
28. Chung WG, Park CS, Roh HK, Lee WK, Cha YN. Oxidation of ranitidine by isozymes of flavin-containing monooxygenase and cytochrome P450. *Jpn J Pharmacol.* 2000; 84 :213-220.
29. Xie G, Wong CC, Cheng KW, Huang L, Constantini PP, Rigas B. Regioselective oxidation of phospho-NSAIDs by human cytochrome P450 and flavin monooxygenase isoforms: implications for their pharmacokinetic properties and safety. *British Journal of Pharmacology* 2012; 167: 222-232.

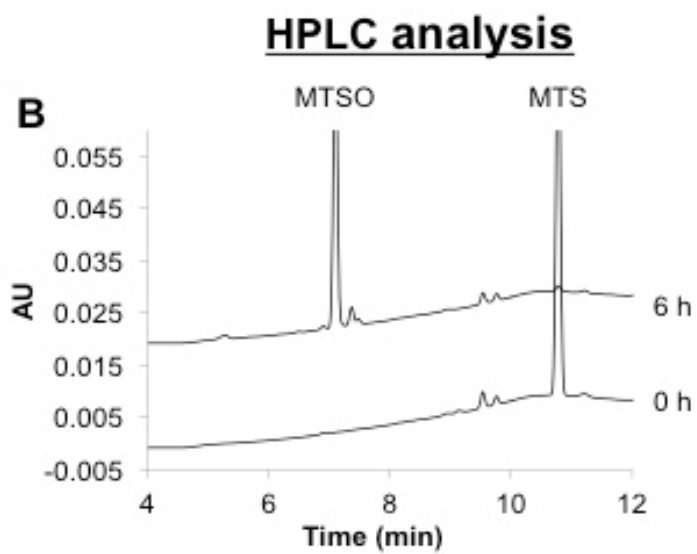
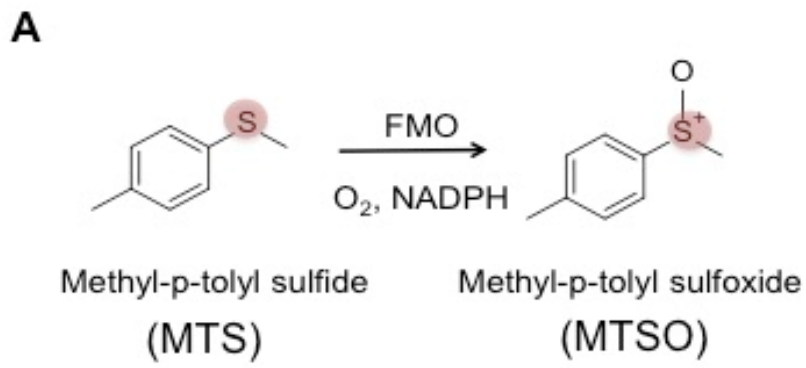
## FIGURES



**Fig. 1** ヒト FMO 形質転換体のタンパク発現

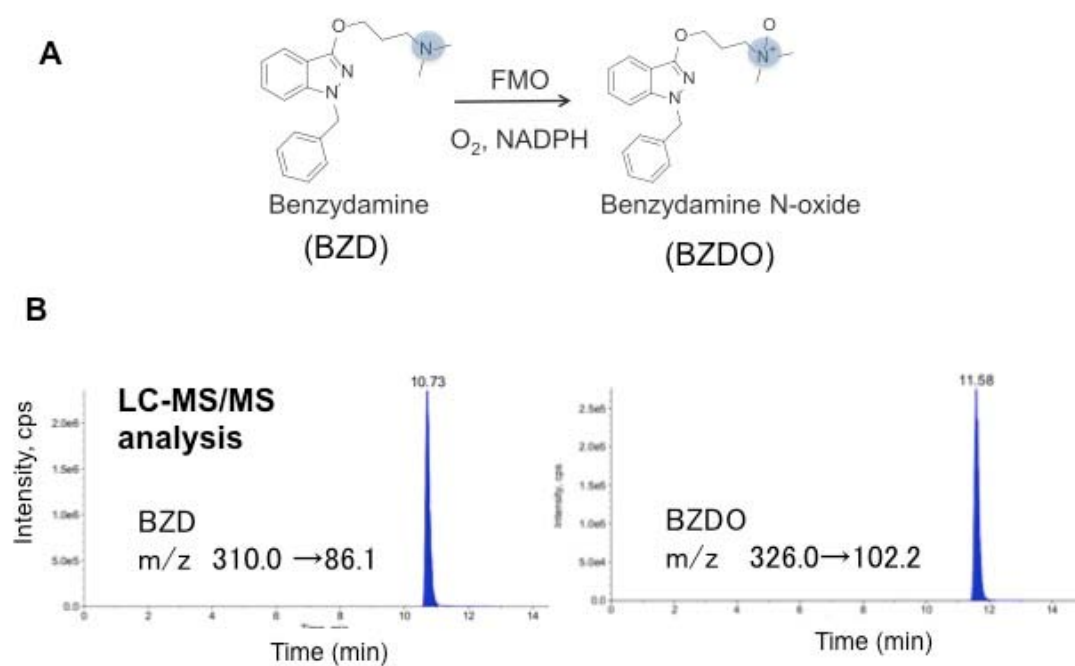
免疫染色は、それぞれ抗 FMO1, FMO2, FMO3, FMO4, および FMO5 抗体を使用した.

コントロール pGYR ベクターのみ (-) またはヒト FMO 形質転換酵母 (+) からの同量の酵母トータルプロテイン (10  $\mu$ g) を各レーンにロードした.



**Fig. 2** ヒト FMO4 形質転換体の MTS に対する S-酸化活性

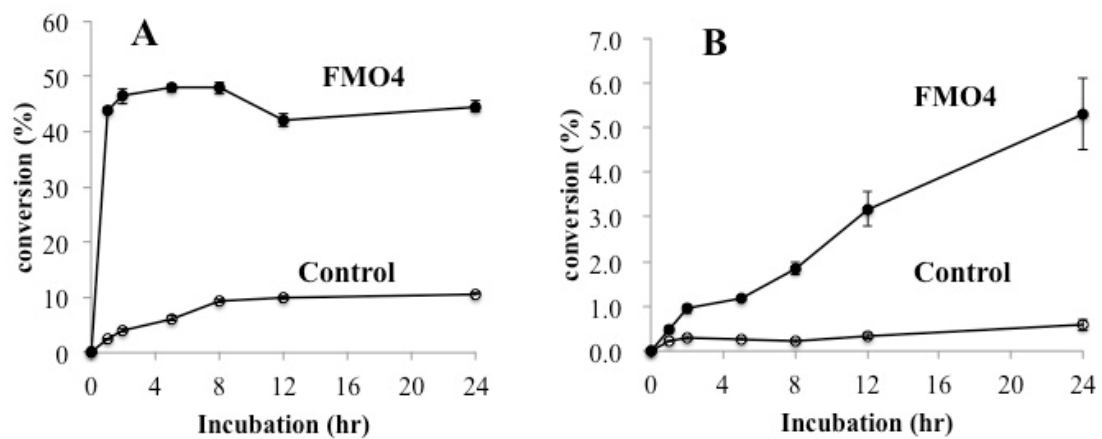
(A) MTS の S-酸化の反応スキーム. (B) FMO4 形質転換体と 0.1 mM MTS を 0 時間および 6 時間反応後の溶出パターンを示す.



**Fig. 3 BZD に対するヒト FMO4 形質転換体の N-酸化活性**

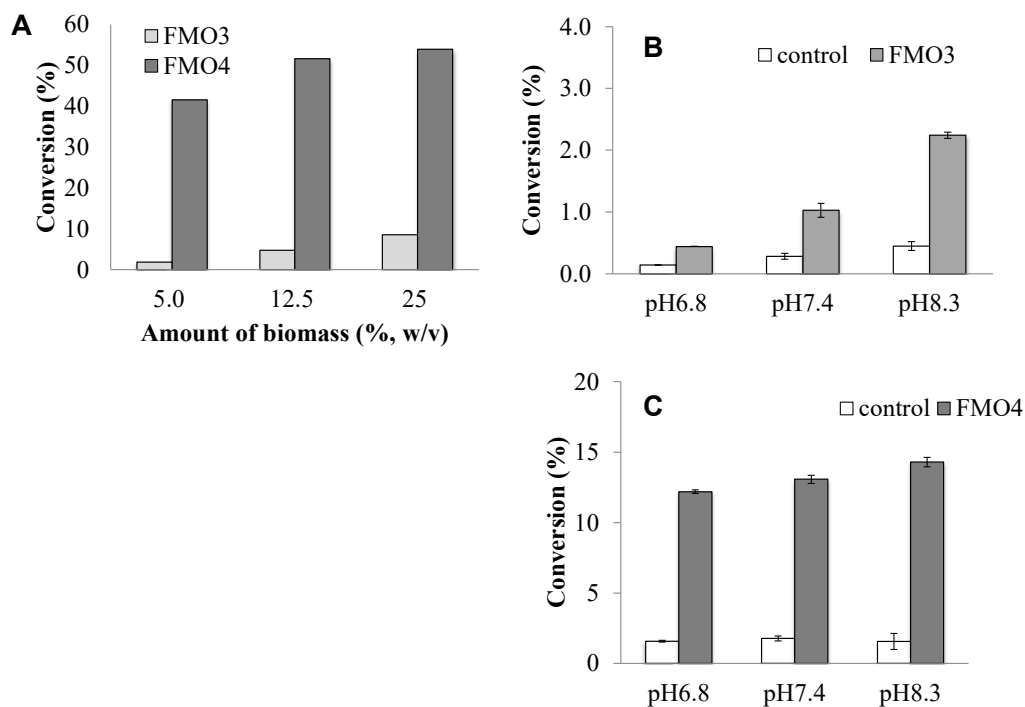
(A) BZD の N-酸化反応. (B) コントロールまたは FMO4 形質転換体と 0.1 mM BZD を 24 時間後の反応液の TIC クロマトグラム. MRM モードを使用した LC-タンデム質量分析による定量は、トランジション m/z 310 $\rightarrow$ 86 (BZD), 326 $\rightarrow$ 102 (BZDO), および 326 $\rightarrow$ 291 (MDZ, IS) で行い、ベンジダミンと N-オキシドの間の分析干渉は検出されなかった.

TIC, total ion chromatogram; MRM, multiple reaction monitoring.



**Fig. 4 MTS 及び BZD 酸化体生成の時間依存性**

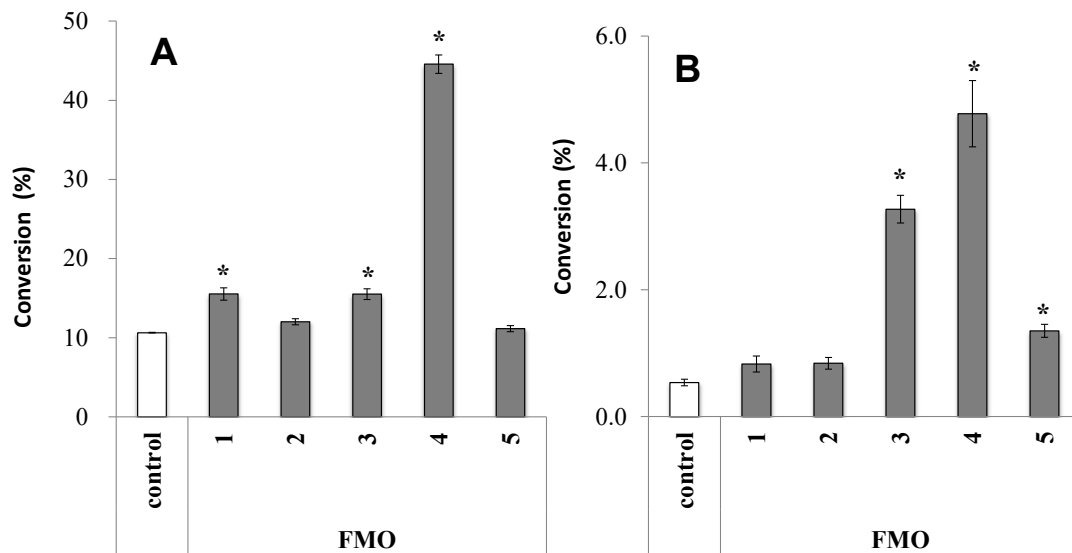
(A) MTS から MTSO への生成 (B) BZD から BZDO への生成, pGYR のみ (白丸) および FMO4 形質転換体 (黒丸). 0.1 mM の MTS および BZD を 25% (w/v) バイオマスとともに反応させた. 値は平均±標準誤差 (n = 3) で示す.



**Fig. 5 MTS および BZD 基質を使用した反応条件の最適化の検討**

(A) 異なる量のバイオマスを使用した MTS から MTSO への変換. バイオマスの量ごとに, 0.2 および 0.1mM の MTS をそれぞれ FMO3 および FMO4 形質転換体とともに反応させた. 値は平均±標準誤差 (n = 2-3). MTS の S-酸化反応 (B) および BZD の N-酸化反応 (C) に対する反応液 pH の影響. 0.1 mM MTS および BZD を, それぞれ 25% (w/v) バイオマスの pGYR のみ (白カラム) および FMO3 または FMO4 (黒カラム) と反応させた. 値は平均±標準誤差 (n = 3) で示す.

**Fig. 6**



\* : □ 1.5 fold increase compared to control activity

**Fig. 6 FMO 分子種(FMO1-5) 形質転換体における MTSO および BNZ への変換**

0.1 mM MTS (A) および BNZ (B) を, pGYR のみ (白カラム) および FMO 形質転換体 (黒カラム) とともにインキュベートした. 値は平均±標準誤差 (n=3) で示す.



## 総括

多大な時間や費用と人的資源を必要とする医薬品開発において、開発途中における中止の要因のうち、安全性に起因する中止は、20~30%と報告されており、顕著な改善は認められていない。特に薬物性肝障害（DILI: drug-induced liver injury）の発現は、臨床試験中止および市販後の撤退の主な原因となっている。薬物性肝障害には non-CYP 酵素による反応性代謝物の生成が要因の一つになると考えられており、代謝物の安全性評価が重要になってきている。安全性評価を動物や細胞等で行うには、目的の代謝物を合成する必要があるが、技術的に困難な場合があり、委託費用も高額である。また、創薬ステージのより早期での安全性評価を推奨されることから、より簡便に安価に代謝物を入手できる体制が望まれている。

創薬におけるニーズに応えるため、本稿では、遺伝子組換え酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて医薬品、食品成分、内分泌物質、環境汚染物質等の様々な化合物の代謝物生成システムを開発した。これまでに当研究室では酵母を用いた CYP 発現システムを開発しており、機能性食品成分の代謝経路予測や生理活性評価を行ってきた。その技術を基にしてさらに、non-CYP 酵素の発現系を構築し、ヒト及び哺乳類の UGT を 39 分子種、ヒト SULT を 6 分子種およびヒト FMO を 5 分子揃えたラインナップを保有した。本稿では、医薬品、ポリフェノール、ステロイドホルモンなどのさまざまな基質について検討を行い、1L スケールの反応で複数の基質より数百 mg の代謝物を生成することに成功した。

第 1 章では、哺乳類由来 UGT 酵素とラット UGDH を共発現する出芽酵母を、第 II 相薬物代謝物であるグルクロン酸抱合体を効率的かつ簡便に合成のために構築した。宿主細胞として酵母は、以前から UGT の異種発現に使用されていたが、酵母は UDPGA を生成できないため、発現した UGT を使用して薬物をグルクロン酸抱合体に変換することができなかった。その為グルクロン酸抱合体を調製するには菌体を破砕し、高価な補酵素を添加する必要があるステップの多さとコストの面で課題があった。そこで新たに UGDH 遺伝子を

導入することで、出芽酵母が内因性 UDP-グルコースからのデノボ合成によって UDP-グルクロン酸を生成することを可能になった。これにより高価な UDPGA を必要とせず、グルクロン酸抱合体のバイオコンバージョンを達成した。同時期に、Bureik らは、分裂酵母である *S. pombe* によるバイオコンバージョンを利用したグルクロン酸抱合体合成システムを開発した。*S. cerevisiae* と *S. pombe* はどちらも酵母に分類され、染色体数と成長特性には顕著な違いがある。基質として 4-MU を使用して、ラット UGDH とヒト UGT1A1 または UGT1A6 を含む出芽酵母におけるグルクロン酸抱合体の産生能力を比較し、分裂酵母よりもそれぞれ 10 倍から 50 倍高いことを示した。また生成されたグルクロン酸抱合体のほとんどが、菌体外に排出された。したがって、酵母細胞の破壊など、グルクロン酸抱合体精製のための面倒な処理ステップは必要なかった。おそらく出芽酵母における内在性 ABC トランスポーターの存在により、培地へのグルクロン酸抱合体が促進されると推測している。したがって、分裂酵母システムとの類似性が高いにもかかわらず、グルクロン酸抱合体生産のために出芽酵母を使用することには大きな利点である。他にも酵素合成の利点として、いくつかの結合部位を含む化合物の位置特異的グルクロン酸抱合である。実際、そのような化合物の合成（一度に目的の部位に結合したモノグルクロン酸抱合）は、従来の化学合成では非常に困難である場合がある。グルクロン酸抱合体には O-エーテルグルクロニド、O-アシルグルクロニド、N-グルクロニド、C-グルクロニドなど複数のパターンが存在する。このうちカルボキシ基から生じる O-アシルグルクロニドは毒性を示し得る反応性代謝物（活性エステル）として、近年盛んに研究が行われている。このような場合でも、出芽酵母発現系を使用して目的の医薬品に応じて適切な UGT 酵素を選択することにより、望ましいグルクロン酸抱合体を得ることができる。たとえば、本研究では、ミコフェノール酸のフェノール性およびアシル抱合体は、それぞれヒト UGT1A9 およびラット UGT2B1 発現酵母株によって合成可能であった。これにより毒性評価に必要なアシル抱合体だけを合成することができ、次の精製のステップでの労力が軽減される利点がある。

また、ほとんどの哺乳類由来 UGT（ヒト、ラット、マウス、ブタ、ウシなど）は、出芽

酵母発現系において適切な基質のグルクロン酸抱合を触媒することができる。ヒト UGT に加えて、ラットやマウスなどの前臨床動物由来の UGT のセットを持つ酵母株は、開発候補品の抱合に関与する UGT を同定するためのハイスループットスクリーニングシステムの開発に役立つツールとなる可能性がある。

第 2 章では、ヒト SULT についても酵母内で発現させ、薬物代謝酵素発現システムを構築した。各 SULT を発現する形質転換体は、PAPS を添加せずに、数百 mg/L の内外因性物質の硫酸抱合体を生成した。細胞内画分または精製 SULT 酵素を使用する *in vitro* システムは、硫酸化のために高価な補酵素 (PAPS) を必要とするため、PAPS の必要性を回避することは、硫酸抱合体の工業生産にとって大きな利点である。下平らは封入体形成を回避するためグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) -SULT 融合タンパク質を大腸菌で発現させ、硫酸抱合体を外因性 PAPS なしに生成することに成功している。*E.coli* や *S.cerevisiae* などの一部の生物では、PAPS は ATP スルフィラーゼと APS キナーゼにより合成される。したがって、*E.coli* と *S.cerevisiae* はどちらも、PAPS を内因的に産生できるため、菌体による硫酸抱合体の産生に適した宿主と考えられる。しかし *S. cerevisiae* では、SULT は封入体を形成することなく十分量のレベルで発現しており、組換え酵母の凍結標品を融解して使用することにより、良好な再現性で安定した硫酸抱合体産生能が得られた、また GST 等の付加体が必要ないため本来の SULT 酵素としての活性を評価できる。

本システムでは、位置選択的な方法でポリフェノールの硫酸抱合体を生成することに成功した。ヘスペレチンに対する各 SULT 種の位置選択性は、報告されているものと一致した、これは、SULT の酵母発現システムがヒトのポリフェノールの代謝経路の予測に使用できることを示唆している。ポリフェノール代謝物の生理活性が報告されて以来、近年、ポリフェノールの硫酸抱合体にも注目が集まっている。レスベラトロール硫酸抱合体が加水分解によるレスベラトロール再生の細胞内プールとして機能し、トランスレスベラトロール硫酸抱合体による抗炎症効果が示されている。ポリフェノールに加えて、内因性硫酸抱合体の生理活性も報告されている。SULT 酵母発現システムは、これらの硫酸抱合体の生

成に使用することで、それらの生理的な分子メカニズムを解明することの手助けとなると期待している。

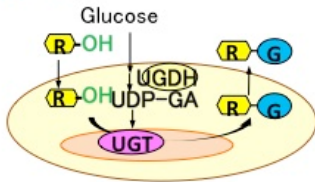
第3章では、ヒト FMO5 分子種 (FMO1-5) 発現酵母システムを構築した。FMO の N-および S-酸化活性を測定するために、MTS および BZD を基質として使用した。それぞれの酸化体 MTSO と BZDO は、whole-cell の反応でうまく生成された。これまで Hanlon らや Geieretal らは、細菌系で発現した組換え FMO を使用して、N-および S-酸化代謝物の生成に成功していたが、酵母でヒト FMO の活性を確認した例はなかった。予想外に FMO4 が最も活性が高く、NADPH を添加せずに 1 リットルあたり数ミリグラムの N-および S-酸化代謝物を生成した。*E.coli* と *S.cerevisiae* はどちらも、NADPH を内因的に生成する能力があるため、N-および S-酸化代謝物の whole-cell での生成に適した宿主と考えられる。酵母と細菌系での活性の比較は行っていないが、*S. cerevisiae* では、FMO の封入体形成がなかった。菌体凍結ストックを使用した whole-cell 合成は、良好な再現性ととも安定した発現をもたらした。MTS および BZD 酸化活性において、形質転換体だけでなく pGYR ベクターのみ導入した mock 細胞でも酸化体の一定の生成が確認された。これは酵母内在性の酸化酵素により両基質は代謝を受けることが示唆された。

代謝物の位置選択的またはエナンチオ選択的生成は、微生物合成の最大の特徴の 1 つである。第1章および第2章では、位置選択的な方法でポリフェノールの抱合体を生成することに成功した。FMO による酸化反応でも胃酸分泌抑制剤であるラニチジンおよびホスホ NSAID に対する FMO と CYP 分子種の位置選択的酸化について報告されている。FMO 酵母発現システムでも同様の性質を有することが期待でき、FMO および CYP 分子発現酵母を選択することで位置選択的な酸化代謝物の取得できる可能性がある。現在の FMO 酵母発現システムの生成量は、定量分析用の標準物質の程度には使用できるが、毒性研究に十分な量 (~g オーダー) の代謝物を得るには改善が必要である。今後様々な FMO 基質の代謝活性を調べ、酵素活性を向上する手段を見出していきたい。

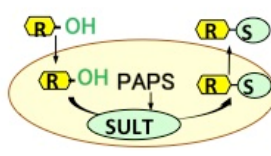
まとめると、これらの発現システムには以下の 3 つの利点がある。1) 外因性コファク

ターの必要性を排除することで生産コストを削減できる， 2) 比較的簡単な手順で酵母培地から高収量の代謝物を回収できる， 3) 適切な酵素分子種を選択することで位置選択的代謝物を可能になる． 多様な代謝酵素， 分子種， 動物種の品揃えにより， 幅広い化合物への対応が可能となり， 様々な医薬品や食品成分の代謝物を調製した． 本システムをプラットフォームにして， より安価に医薬品や食品代謝物標品を提供することで， 製薬企業での安全性試験や有効性試験， 創薬早期での代謝予測に貢献できるものと考えている．

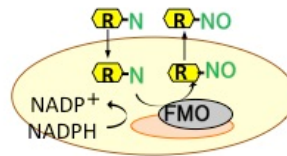
**第1章: グルクロン酸抱合体**



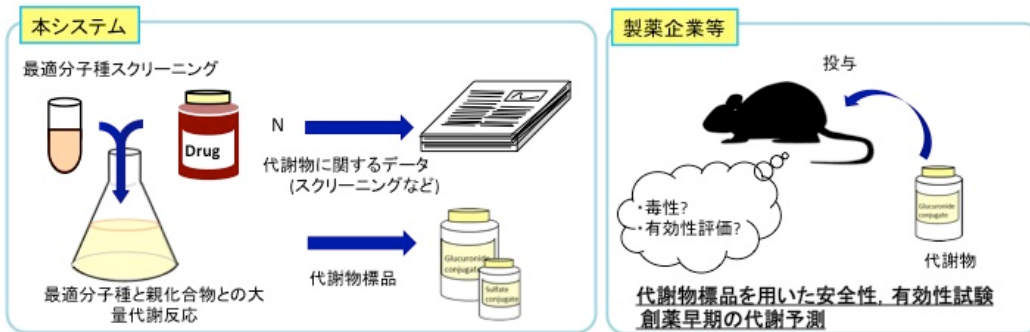
**第2章: 硫酸抱合体**



**第3章: N-,S-酸化体**



多様な代謝酵素、分子種、動物種の品揃えにより、幅広い化合物への対応が可能



## 謝辞

富山県立大学工学部生物工学科の生城 真一 教授には、指導教官として多くのご指導ご鞭撻を賜りました。博士課程進学以前から今日まで長年にわたり育てていただき心から御礼申し上げます。

富山県立大学工学部医薬品工学科の榊 利之 教授には貴重なご意見ユーモアのある励ましを多く賜り、研究を楽しませていただいたことに深く感謝申し上げます。

金沢大学医薬保健研究域薬学系の中島 美紀 教授, 富山県立大学工学部生物工学科 五十嵐 康弘 教授, 富山県立大学工学部医薬品工学科の安田 佳織 講師には、副査としてご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導いただき感謝の意を表します。

共著者の富山県立大学工学部生物工学科の西川 美宇 助教は、実験の指導や日常の議論を通じて多くの知識や助言をしてくださいました。

富山県立大学工学部生物工学科の鎌倉 昌樹 講師は、研究における考え方や進め方、研究者としての姿勢をご教示くださいました。

富士フイルム富山化学株式会社（旧富山学工業株式会社）の同僚の皆様、富山県立大学工学部生物工学科の皆様に研究生活を支えていただきました。

皆様の心温まるご支援ご指導に深く感謝申し上げます。

最後に、これまで自分の思う道を進むことに対し、温かく見守りそして辛抱強く支援してくれた私の大切な家族に深い感謝の意を表して謝辞と致します。

## 原著論文

1. Ikushiro S, Nishikawa M, Masuyama Y, Shouji T, Fujii M, Hamada M, Nakajima N, Finel M, Yasuda K, Kamakura M, Sakaki T. Biosynthesis of Drug Glucuronide Metabolites in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Pharmaceutics* 2016 Jul 5;13(7):2274-2282.
2. Nishikawa M, Masuyama Y, Nunome M, Yasuda K, Sakaki T, Ikushiro S. Whole-cell-dependent biosynthesis of sulfo-conjugate using human sulfotransferase expressing budding yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2018 Jan;102(2):723-732.
3. Masuyama Y, Nishikawa M, Yasuda K, Sakaki T, Ikushiro S. Whole-cell dependent biosynthesis of N- and S-oxides using human flavin containing monooxygenases expressing budding yeast. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2020 Jun;35(3):274-280.