

論文審査報告書

氏名	ますやま ゆうか 増山 優香
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博生第28号
学位授与日	令和3年3月20日
論文題目	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
論文審査委員	(主査) 富山県立大学 教授 生城 真一 教授 五十嵐 康弘 教授 榊 利之 講師 安田 佳織 金沢大学 教授 中島 美紀

内容の要旨

医薬品の多くは体内に取り込まれた後に肝臓をはじめとする種々の組織において複数の薬物代謝酵素による変換を受ける。この薬物代謝は酸化、還元、加水分解等を行う第 I 相反応と、極性の高い置換基を付加する第 II 相反応に大別される。第 I 相を担う代表的な薬物代謝酵素にはシトクロム P450 (CYP) があり、第 II 相酵素には UDP-グルクロン酸転移酵素 (UDP-glucuronosyltransferase, UGT) や硫酸転移酵素 (sulfotransferase, SULT) などが挙げられる。近年では創薬プロセスにおける HTS (high throughput screening) の利用が促進され、肝ミクロゾーム依存的な代謝に対して代謝安定性が高い化合物、すなわち肝 P450 酵素で代謝を受けにくいリード化合物が選択される傾向が強くなった。しかしながら、低クリアランスを示すリード化合物を選択することにより、P450 以外の第 I 相や第 II 相薬物代謝酵素によって代謝されるケースが多くなり、non-CYP 代謝の予測・評価が重要になってきた。また、一部の医薬品においては代謝により毒性が増し、副作用などを引き起こすことが明らかになってきた。これを受けて、2008 年には米国食品医薬品局 (FDA) から「医薬品代謝物の安全性に関するガイダンス」が発出され、医薬品開発において代謝物の安全性試験を実施する必要性が生じてきた。医薬品の代謝物合成には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、多大なコストと手間がかかる。また、安全性試験に必要とされるグラム単位の代謝物調製も技術的およびコスト的に課題となっている。

本研究では真核微生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に種々の薬物代謝酵素を発現させ、医薬品代謝物の効率的な生産システムを構築した。本論文は薬物代謝酵素発現酵母による代謝物合成の特

徴と、医薬品や食品由来成分からの代謝物合成に関する研究について記述した。第一章では UGT 発現酵母を用いてアシル抱合体をはじめとするグルクロン酸抱合体の生合成について、第二章ではヒト SULT 発現酵母を用いて硫酸抱合体の位置特異的な生合成について、さらに第三章ではヒトフラビン含有モノオキシゲナーゼ(FMO)発現酵母を用いて酸化反応の生合成について述べている。

第一章では出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた医薬品グルクロン酸抱合体の生合成系の構築およびアシル抱合体調製の有用性について検討している。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, UDP-GA) を添加しなければならず、代謝物の大量調製にはコスト面で課題があり、補酵素の添加を必要としない生産システムの確立が必要であった。そこで、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産システムの確立を試みた。酵母菌体内で薬物代謝反応を再現するために、酵母が持っていない UDP-GA 合成に必要な UDP-グルコース脱水素酵素 (UDP-glucose dehydrogenase, UGDH) 遺伝子を導入した。UGT および UGDH の同時発現酵母を構築し、基質となる医薬品を培地に添加するだけで菌体内でのグルクロン酸抱合反応を可能にした。次に酵母に導入した UGT 分子種の発現量を比較したところ、分子種間で差が見られた。高い発現量を有する UGT1A7 のシグナル配列を低い発現量の UGT1A1, UGT1A4 および UGT1A9 に導入することで発現量の向上に成功した。またその生産能力は UGT の標準基質として使用されている 4-メチルウンベリフェロンのグルクロン酸抱合体を 2 日で 4-5g 合成可能であることを示した。さらにこのツールの利点となる性質として、生成された抱合体の多くが菌体外に排出されていることを明らかにした。抱合体の単離および精製スキームの中で菌体の破碎に伴うステップや不純物の低減が見込まれ容易に大量の代謝物を調製することが可能となった。さらに酵素学的に抱合体を合成する利点としては、複数の抱合部位を持つ化合物に対して位置特異的なグルクロン酸抱合体を合成できることである。ヒト以外の生物種由来 UGT を酵素源として使用することで、ミコフェノール酸のフェノール性水酸基への抱合体あるいはカルボキシル基へのアシル抱合体を選択的に合成することが可能であった。本章の結論として、出芽酵母を用いた医薬品グルクロン酸抱合体の生合成はさまざまな哺乳類種 UGT の機能の特徴付けることができ、低コスト及び高効率なバイオコンバージョン法によりグルクロン酸抱合体を生産する有用なツールであることを示した。

第二章ではヒト硫酸転移酵素発現出芽酵母を用いた医薬品および食品成分の硫酸抱合体の生合成について述べている。試験管内での SULT による硫酸抱合反応には、高価な補酵素である活性硫酸(3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホ硫酸, PAPS) の添加が必要であり、十分な量の代謝物調製には補酵素の添加を必要としない生産システムの確立が必要であった。酵母においては PAPS 合成系を有しているため内在性酵素により十分な量の PAPS が合成されていることが判明した。さらに細胞質に発現する SULT は封入体を形成することなく安定的に発現したため、菌体の凍結溶液を使用して再現性の良い生産性を生み出した。ヒト SULT1A1 発現酵母を用いることにより、モデル基質である 7-ヒドロキシクマリンに対して数百 mg の抱合体を生合成することに成功した。食品中機能性成分であるポリフェノール代謝産物の生理活性機能が報告されて以来、ポリフェノールの硫酸抱合体も近年注目を集めている。SULT 発現酵母を用いてブドウ果皮やワインに多く含まれるポリフェノールであるレスベラトロールを代謝させた結果、SULT1A3 は 3 位硫酸抱合体を、SULT2A1 は 4' 位硫酸抱合体をそれぞれ選択的に合成可能であることを明らかにした。一方で SULT1E1 は 3 位および 4' 位における両抱合反応を触媒した。このように、SULT 発現酵母の最適分子種を選定することにより位置選択的に抱合化を受けた硫酸抱合代謝物を合成することが可能であった。これは、本発現システムが医薬品のみならずヒトのポリフェノール代謝経路

予測をするツールとなることが期待できる。

本章の結論として、ヒト硫酸転移酵素発現出芽酵母を用いた硫酸抱合体の生合成系は、外因性 PAPS の必要性を回避し、より簡便な手法で高収率に生産し、かつ位置特異的な硫酸抱合体を選択できるという利点を有することを示した。

第三章ではヒト由来フラビン含有モノオキシゲナーゼ(FMO)発現酵母菌体による医薬品の N-及び S-酸化体の生合成について述べている。FMO は、薬物代謝第I相酵素の一つであり、医薬品を含む生体異物の酸化反応を触媒する。酸化代謝物はしばしば生理学的活性を有するが、有効性や安全性評価に必要な量を合成することは難しい場合がある。また FMO は CYP, UGT や SULT に比べるとその酵素機能が未開拓な部分が多く、細胞等の発現系を使用した評価ツールが乏しいのが現状である。本章では5種のヒト由来 FMO 分子種を発現する酵母発現系を構築し、その発現菌体による N-及び S-酸化体のバイオコンバージョン系の確立をおこなった。FMO 発現酵母における各 FMO 分子種のタンパク発現を特異的抗体により確認した。標準基質である methyl p-tolyl sulfide 及び benzydamine に対する酸化体の生成活性を確認した。FMO4 発現酵母は5つの分子種の中で予想に反し最も高い活性を示し、24 時間以内に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。また、コントロール菌体でも代謝活性があったことから酵母の内因性酵素によっても酸化体が生成されていることが判明した。FMO 酵素の特性として CYP に比べ高い pH (>8.0)を至適とされていることから pH 依存性を確認したところ、酵母で発現させた FMO においても高い pH で benzydamine N-oxide の活性が増加した。FMO3 の反応に必要な補因子 NADPH を細胞内の内因性の生成系に依存することにより添加の必要がなく生成可能であることを示した。このような新しい酵母発現システムは、医薬品候補化合物の酸化代謝物予測・生産のための強力なツールとなる可能性を示した。ヒト由来フラビン含有モノオキシゲナーゼ(FMO)発現酵母菌体による医薬品の N-及び S-酸化体の生合成系は、これまでの CYP、UGT および SULT 発現系と組み合わせることで医薬品の代謝物研究を促進させることが期待される。

審査の結果の要旨

医薬品開発において初期段階での候補化合物探索では、多くの化合物についてその母化合物の薬理作用のみならず、生体内代謝物に関しても検討することが要求される。多くの医薬品代謝において主要な役割を果たす P450 は遺伝子多型による個人差、人種差や薬物相互作用による誘導、阻害を示すことから、探索段階から P450 に対して代謝抵抗性を有する化合物が選択される傾向にある。しかしながら、近年になり臨床段階における予期せぬ Non-P450 酵素代謝による開発中止あるいは再検討となる事例が知られるようになり、抱合酵素である UDP-グルクロン酸転移酵素や硫酸転移酵素、酸化酵素である FMO 等の Non-CYP 酵素による代謝が注目されるようになった。これまでの薬物代謝の試験管内評価系としては市販されている代謝酵素発現系が用いられるが、P450 酵素に比べてニーズが少なくかつ研究対象としても注目度が低いことから、評価ツールとして開発することが困難であった。

本論文は、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と題し、全三章で構成されている。主な内容は以下に示すとおりである。

(1) 出芽酵母において UGT 及び UDP-グルコース脱水素酵素の同時発現系を構築し、基質となる医薬品を添加するだけで菌体内でのグルクロン酸抱合反応を可能にした。さらに、遺伝子ファミリーを形成する UGT 分子種を選択することにより複数の抱合部位を持つ化合物の位置特異的なグルクロン酸抱合体を容易に取得することを可能にした。とくに、医薬品としての安全性の懸念されるアシル抱合体の合成系として有用であることを示した。

(2) ヒト由来 SULT 分子種発現酵母株を構築することにより、内在性の補基質である活性硫酸を用いて医薬品や食品成分の硫酸抱合体の産生を可能にした。基質特異性の異なるヒト由来 SULT 分子種を選択することにより位置特異的な硫酸抱合体を容易に取得することを可能にし、食品中機能性成分でポリフェノール化合物の硫酸抱合体の調製にも有用であることを示した。

(3) ヒト由来フラビン含有モノオキシゲナーゼについて 5 種のヒト由来分子種の酵母発現系を構築し、菌体反応による N-及び S-酸化体の合成を可能にした。既存の評価系の乏しい FMO 発現系において、酵母を用いた本システムは代謝物同定および代謝予測が可能な non-CYP 酵素代謝ツールとして貴重である。

本論文の独創的かつ革新的な点は、P450 発現系で実績のある出芽酵母をプラットフォームとして用いて、これまで注目度の低かった薬物代謝酵素発現酵母株を作出することにより酵母菌体内での代謝物合成を可能にしたことである。開発初期段階における化合物の代謝物をすべて有機合成することはきわめて困難であるが、薬物酵素発現株を用いることによりヒト代謝物を簡便に調製同定することが可能となる。当該技術の開発により、生体内において生じる可能性のある代謝物についての体内動態および安全性の評価が可能となり、本技術が医薬品代謝研究に与える影響は極めて大きい。本技術の一部は特許化されており、抱合体合成技術としてすでに実用化されている。

本論文に関連する発表は、3 報の原著論文として公表されており、うち 1 報については申請者が筆頭著者である。令和 2 年 11 月 5 日に予備検討委員会を開催、令和 3 年 1 月 28 日に博士論文の審査および最終試験を行った結果、申請者は、学術研究にふさわしい討論ができ、当該分野に関して博士としての十分な学識と独立して研究を遂行する能力を有するものと判定し、本論文は博士（工学）の学位論文として合格であると認められた。