

遺伝子改変出芽酵母株を用いた医薬品代謝物調製技術の開発

生城 真一

富山県立大学 工学部 生物工学科 准教授

Whole cell-dependent production of human drug metabolites using genetically engineered yeast cells.

Shinichi IKUSHIRO

Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Toyama Prefectural University

Abstract Xenobiotic phase I and II reactions generally render a compound more water soluble and pharmacologically inactive, thereby eliminating the need for further evaluation. However, if the metabolite forms a toxic compound such as acylglucuronide additional safety assessment may be needed. Glucuronidation is the most common pathway for detoxification and elimination of hydrophobic xenobiotics in mammals. Thus, development of an efficient *in vitro* synthesis of glucuronides from parent drugs often becomes critical during studies of drug metabolism undertaken in the development of a new pharmaceutical product. In order to produce glucuronides as drug metabolites, we have developed coexpression systems for mammalian cytochrome P450 (CYP), UDP-glucuronosyltransferase (UGT), and UDP-glucose dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* cells, and combination between each of human CYPs and UGTs was achieved. Glucuronide formation in yeast cells was performed in reaction medium containing 8% glucose, and most of glucuronides were readily recovered from cell medium. In addition, we have expressed human sulfotransferase (SULT) with CYPs in *Saccharomyces cerevisiae* cells, and successfully obtained sulfoconjugates from the cell medium. In conclusion, our coexpression systems have made it possible to produce human phase I and phase II metabolites in the milligram to gram scale.

Keyword Drug metabolite, Drug metabolizing enzymes, Yeast

はじめに

医薬品をはじめとする多くの生体外異物は抱合体代謝物となり水溶性を増すことで体外へ解毒排泄されるが、一部の医薬品抱合体は反応性代謝物となり副作用を惹起することが知られている。2008年に米国FDAから提出された「代謝物の安全性評価に関するガイドダンス」ではヒト特有の代謝物について特に安全性

評価が必要であるとされており、グルクロン酸抱合体やシトクロム P450 (P450) による代謝物が主たる対象となる。安全性評価のためにはこれらの代謝物標準品が必要となるが、有機合成困難な場合が少なくない。その場合、従来法においてはマウス、ラットなど実験動物の臓器（主に肝臓）をすりつぶし、これを酵素源として代謝物を調製していた。しかし、実験動物とヒトでは代謝様式が異なり、ヒト代謝物を容易に調製で

きない場合も多い。したがって医薬品開発過程での候補化合物の安全性試験において、代謝物取得が医薬品承認までの大きな障壁となっており、安価かつ大量の医薬品代謝物合成技術の確立が望まれている。本稿ではヒト薬物代謝酵素群を導入した遺伝子改変出芽酵母を用いた医薬品代謝物調製技術について紹介する。

ヒト薬物代謝能を有する遺伝子組換え出芽酵母の構築

榊らは出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主として薬物代謝に関与する P450 電子伝達系を発現させることに成功し、ヒト由来 P450 分子種発現酵母を用いて様々な医薬品の代謝物を調製することが可能となった[1]。さらに生城らはもう一つの薬物代謝酵素である UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) を酵母に P450 と同時に発現させることにより医薬品の連続的な代謝反応 (水酸化及びグルクロン酸抱合) を再現した[2]。これら発現系の細胞抽出液により医薬品代謝物の調製が可能となったが、グルクロン酸抱合反応には補基質として高価な UDP-グルクロン酸を添加しなければならず、代謝物調製に関してはコスト面の問題があった。そこで酵母内でのグルクロン酸抱合反応を可能にするために、酵母が本来持っていない酵素、UDP-グルコース脱水素酵素遺伝子を導入し、酵母の中で UDP-グルクロン酸が供給を可能な酵母株を構築した。静止菌体の状態においてグルコース添加により細胞内への UDP-グルクロン酸の蓄積が見られた。この遺伝子改変酵母株を用いて菌体培養液に医薬品を添加することにより容易かつ大量に薬物代謝酵素による代謝産物を調製することに成功した[3-5]。

ヒト特異的な医薬品代謝物の調製

ヒトUGTは遺伝子ファミリーを形成しており、前半領域の基質結合ドメインにおけるアミノ酸配列の多様性により抱合化基質に対して異なる基質特異性及び部位特異性を示すことが知られている。複数の抱合化部位を有する医薬品の抱合体代謝物合成において有機合成では部位特異的な抱合体合成が困難な場合が多いが、

酵母を用いた合成系では基質特異性の異なるUGT分子種を選択することで部位特異的な抱合体代謝物の調製が可能である。免疫抑制剤であるミコフェノール酸は分子内にフェノール性水酸基とカルボキシル基を有するが、ヒトUGT1A9を用いることにより水酸基に対するグルクロン酸抱合体の特異的合成に成功した。さらに、反応性代謝物としての可能性が示唆されているカルボキシル基へのエステル型結合性アシル抱合体は有機合成条件下では不安定であるが、酵母反応系においては酵母代謝により培養液が酸性条件になることで安定なアシル抱合体産生が可能である。ヒトUGT1ファミリー分子種を用いることにより、カルボキシル基を有する非ステロイド性抗炎症薬であるジクロフェナックやメフェナミック酸のアシル抱合体を高効率で調製できた。

生体内の薬物代謝は複数の代謝酵素によっておこなわれる場合もあり、それらの代謝過程を再現するために複数の薬物代謝酵素を同時に発現させた出芽酵母の構築をおこなった。ヒト肝臓や小腸で発現している薬物代謝第1相酵素であるP450及び第2相酵素であるUGTあるいは硫酸基転移酵素の複数の組み合わせをもつ同時発現酵母株によりモデル化合物である7-エトキシシクマリンの脱エチル及び抱合化反応の連続的な代謝過程を再現することを示した。

本稿で紹介した技術は医薬品開発の初期段階における探索ステージで早期に候補化合物の毒性を評価する上で重要な役割を担う技術である。数多くの候補化合物の反応性代謝物を含んだ薬物代謝産物を簡便に酵素的に合成することにより、迅速な安全性試験を可能にすることで大幅に医薬品開発コストを削減することができる。さらに、候補化合物の毒性発揮による副作用を予測することにより、投薬対象者を限定した医薬品開発 (遺伝子多型による代謝異常に起因した) も可能となり、これからの個別医療に貢献できる可能性をもっている。また、効果的で安全な薬物治療において血中の薬物濃度モニタリングには、未変化体とともに代謝物の同定、定量のために標準物質が必須であり、本技術を用いた医薬品代謝物の供給は薬物治療の臨床の現場においても有用であると考えている。

文献

- [1] 榑 利之：P450 の分子生物学 第2版（大村ら編）,p268 (2009).
- [2] Ikushiro, S., Sahara, M., Emi, Y., Yabusaki, Y., and Iyanagi, T. Functional Coexpression of Xenobiotic Metabolizing Enzymes, Rat Cytochrome P4501A1 and UDP-Glucuronosyltransferase 1A6, in Yeast Microsomes. *Biochimica Biophysica Acta*, 1672:86–92,2004
- [3] 「グルクロン酸転移酵素の製造方法」
特許第 4918582 号
- [4] 「出芽酵母を用いたグルクロン酸抱合体の製造方法」特許第 5051485 号
- [5] 「出芽酵母形質転換体」特許第 5207201 号

和文抄録

医薬品をはじめとする多くの生体外異物は抱合体代謝物となり水溶性を増すことで体外へ解毒排泄されるが、一部の医薬品抱合体は反応性代謝物となり副作用を惹起する。新規医薬品の開発段階における抱合体代謝物の安全性・機能性評価は極めて重要である。本発表では抱合体を簡便に調製することを目的として、出芽酵母に薬物代謝酵素を発現させることで、酵母菌体に添加した基質の抱合体への効率的な変換を試みた。抱合反応の代表的なものとしてはグルクロン酸抱合および硫酸抱合があり、それぞれ UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) と硫酸基転移酵素 (SULT) により触媒される。ヒト及び実験動物 UGT や SULT 分子種をそれぞれ発現する酵母株を作製し、数種の医薬品の部位特異的なグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体の産生を可能にした。

キーワード：医薬品代謝物、薬物代謝酵素、酵母