

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：23201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18686

研究課題名(和文) ビタミンD水酸化体の新規生産法の開発

研究課題名(英文) Production of vitamin D hydroxylated compounds

研究代表者

安田 佳織 (Yasuda, kaori)

富山県立大学・工学部・助教

研究者番号：70707231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多数存在するビタミンD水酸化体の中には、有用なものが多数存在する。本研究では、活性型ビタミンD2など、これまでバイオコンバージョン法による生産報告例のなかったビタミンD水酸化体を簡便に提供することを目的とした。これまでに我々は、放線菌由来CYP105A1の二重変異体R73A/R84Aを利用した活性型ビタミンD3生産を報告してきたが、今回、新たに活性型ビタミンD2生産を可能とする三重変異体R73A/R84A/M239Aを取得した。また、ヒト体内に存在するビタミンD2代謝物25,26-ジヒドロキシビタミンD2生産にR73A/R84Aが有用であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：There are lots of vitamin D hydroxylated compounds, and some of them are useful as medical drugs or authentic standard. In this study, we aimed to provide some vitamin D hydroxylated compounds such as active form of vitamin D2 by bioconversion process. We have reported the production of active form of vitamin D3 using the actinomycete CYP105A1 double variant, R73A/R84A. In this study, we found the new triple variant R73A/R84A/M239A to produce active form of vitamin D2. We also clarified that R73A/R84A was useful for the production of 25,26-dihydroxyvitamin D2, which is one of the vitamin D2 metabolite in the human body.

研究分野：農学・農芸化学・応用生物化学

キーワード：ビタミンD水酸化体 シトクロムP450 骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

体内で生合成あるいは食物から摂取されたビタミン D₃ (VD₃) やビタミン D₂ (VD₂) は、肝臓で 25 位が、続いて腎臓で 1 α 位が水酸化され、1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D (1 α ,25D₃; 活性型ビタミン D₃ および 1 α ,25D₂; 活性型ビタミン D₂) になることによって生理作用を示す。その生理作用としては、カルシウムの吸収促進、細胞分化誘導、免疫調節作用などが挙げられ、このことから、1 α ,25D やその誘導体が骨粗鬆症、くる病、乾癬、副甲状腺機能亢進症などの治療薬として使用されている。これらを化学合成するためには複雑な反応工程が必要で収率がきわめて低いことから、安価な製造法が求められてきた。活性型ビタミン D₃ については、放線菌の一種である *Pseudonocardia autotrophica* を用い、安価なビタミン D₃ を基質としたバイオコンバージョン法による生産が実用化されており、その水酸化を担う酵素は Vdh (CYP107) であることが明らかになっている。Vdh の高活性化を目指した研究も行われており、進化工学的に機能改変した Vdh を組換え大腸菌やロドコッカス属放線菌に導入することで高い生産性が得られている。一方で我々は、放線菌 *Streptomyces griseolus* 由来 CYP105A1 についても同様の活性があることを見出し、本酵素の立体構造を基に作製した二重変異体 (R73A/R84A) により、野生株の 400 倍もの活性上昇を実現させている。

このように、活性型ビタミン D₃ についてはバイオコンバージョン法による生産が実用化され、さらにより高生産を目指した研究が行われている一方で、活性型ビタミン D₂ についてはバイオコンバージョンによる生産の報告がない。また、活性型ビタミン D 以外にも生体内には多数のビタミン D 水酸化体が存在するが、その多くについては標準品が市販されておらず、生理活性が知られないままになっている。

2. 研究の目的

ビタミン D 水酸化体は多数存在するが、そのほとんどは、化学合成が困難なため高価である、もしくは未だ標準品が市販されていない状態である。すでに医薬品となっている活性型ビタミン D₃ については、近年、安価なビタミン D₃ を基質としたバイオコンバージョン法が実用化された。活性型ビタミン D₃ と同様の生理活性を有することが知られている活性型ビタミン D₂ も有用な化合物であり、バイオコンバージョン法による簡便な提供が望まれる。また、他の多数のビタミン D 水酸化体の提供が可能になれば、分析用標準品としてビタミン D 研究に貢献できるとともに、新規に有用な生理活性を有するビタミン D 類縁体の探索にもつながる。

本研究では、活性型ビタミン D₂ を中心に、複数のビタミン D 水酸化体をバイオコンバージョン法により簡便に提供することを目

的とする。

3. 研究の方法

これまでに我々は放線菌由来 CYP105A1 二重変異体 (R73A/R84A) がビタミン D₃ を基質として高い活性型ビタミン D₃ 生産能を有することを明らかにしていたことから、まず、野生型 CYP105A1 および本変異体によるビタミン D₂ の代謝を調べた。後述するとおり、本変異体はビタミン D₃ の場合と異なり 1 α 位水酸化可能が著しく低く、活性型ビタミン D₂ 生産には適さなかった。そこで、ドッキングモデルを基に、新たに変異を導入した三重変異体を作製した。得られた三重変異体を大腸菌で発現させ、その粗酵素画分を用いて 25-ヒドロキシビタミン D₂ に対する 1 α 位水酸化活性を測定した。

4. 研究成果

CYP105A1 二重変異体 (R73A/R84A) はビタミン D₃ (VD₃) を基質に 25-ヒドロキシビタミン D₃ (25D₃) を経て、活性型ビタミン D₃ (1,25D₃) を生成する (図 1 上)。当初、ビタミン D₂ (VD₂) に対しても VD₃ と同様の反応を示すと予想しており、活性型ビタミン D₂ 生産にも本変異体が有用であると推測していた。しかしながら、本変異体によるビタミン D₂ (VD₂) の代謝を調べたところ、本変異体は、VD₂ に対して 25 位水酸化活性を有したが、1 α 位水酸化活性が著しく低いことがわかった。すなわち、VD₂ から 25-ヒドロキシビタミン D₂ (25D₂) が生産されるが、25D₂ から 1 α ,25D₂ の生成がほとんどみられなかった (図 1 下)。

VD₂ を基質に 25D₂ を経て 1 α ,25D₂ を生成する酵素の取得を目的とし、R73V/R84A と 25D₂ とのドッキングモデルを作製した。25D₂ の場合、25D₃ の場合と比較し、Met239 が VD₂ と立体障害を起こしている可能性が示唆された。そこで Met239 をアラニンに置換した CYP105A1 三重変異体 (R73A/R84A/M239A) を作製し、25D₂ に対する 1 α 位水酸化活性を測定した。その結果、変異導入前の二重変異体 (R73A/R84A) と比較し、20 倍の 1 α 位水酸化活性を有することがわかった。

一方で、今回、活性型ビタミン D₂ 以外の新たなビタミン D 水酸化体の生産を行う上で、R73A/R84A が 25,26-ヒドロキシビタミン D₂ (25,26D₂) の生産に適していることが明らかになった。25,26D₂ は、ビタミン D₂ 代謝物としてヒト体内に存在するが、標準品が市販されていない化合物である。既知のビタミン D 水酸化酵素で 25,26D₂ を生成した報告はなく、R73A/R84A は 25,26D₂ を生産する上で、有用な酵素であるといえる。

また、上述した CYP105A1 変異体を放線菌 *Rhodococcus erythropolis* に発現させ、その菌体懸濁液に 25D₂ を添加することで、1 α ,25D₂ 及び 25,26D₂ の生産に成功した。

今回、VD2 水酸化体の合成を中心に報告したが、R73A/R84A は、VD3 を基質に、25D3 や活性型ビタミン D3、さらには、1 α ,25,26-トリヒドロキシビタミン D3 (1,25,26D3) の生産を行うことも明らかにしている。1,25,26D3 は細胞増殖抑制作用が強く、一方で活性型ビタミン D3 に比べてカルシウム作用が弱いため、本物質あるいはその誘導体が癌の治療薬になる可能性がある。このように本酵素およびその変異体を利用することで、簡便に数種の有用なビタミン D 水酸化体取得を行うことが可能となった。

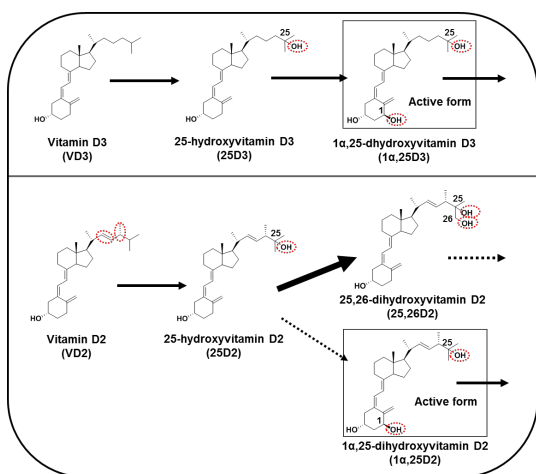


図 1. CYP105A1 二重変異体 (R73A/R84A) によるビタミン D3(上)およびビタミン D2(下)の代謝。Met239 をアラニンに置換することで、25D2 の 1 α 位水酸化活性が著しく向上した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件) 全て査読あり

Yasuda K, Yogo Y, Sugimoto H, Mano H, Takita T, Ohta M, Kamakura M, Ikushiro S, Yasukawa K, Shiro Y, Sakaki T; Production of an active form of vitamin D2 by genetically engineered CYP105A1. *Biochem Biophys Res Commun.* 486:336-341. (2017)
 Hayashi K*, Yasuda K*, Yogo Y, Takita T, Yasukawa K, Ohta M, Kamakura M, Ikushiro S, Sakaki T; Sequential hydroxylation of vitamin D2 by a genetically engineered CYP105A1. *Biochem Biophys Res Commun.* 473: 853-858 (2016), *contributed equally

[学会発表](計 16 件)

Yasuda K, Yogo Y, Takita T, Sugimoto H, Shiro Y, Mano H., Hayashi K, Kamakura M, Ohta M, Ikushiro S, Yasukawa K, Sakaki T; Production of an active form of vitamin D

and drug metabolites by recombinant actinomycete expressing genetically engineered CYP105A1.

The Fifth International Conference on Cofactors and Active Enzyme Molecule 2016 (2016.9.4-8. Toyama)

Yasuda K, Yogo Y, Takita T, Sugimoto H, Shiro Y, Mano H, Hayashi K, Kamakura M, Ohta M, Ikushiro S, Yasukawa K, Sakaki T; Protein engineering of actinomycete CYP105A1 to produce active forms of vitamin D and drug metabolites *Cytochrome P450 Biodiversity & Biotechnology* 2016 (2016.7.22-26. Vancouver)

余語祐哉、安田佳織、滝田禎亮、杉本宏、城宜嗣、真野寛生、林恵子、鎌倉昌樹、太田美穂、生城真一、保川清、榊利之; CYP105A1 の構造機能解析およびビタミン D 水酸化体・医薬品代謝物の生産への応用. 第 88 回 日本生化学会大会 (2015.12.1-4. 神戸)

Yogo Y, Yasuda K, Takita T, Sugimoto H, Shiro Y, Mano H, Hayashi K, Kamakura M, Ohta M, Ikushiro S, Yasukawa K, Sakaki T; Protein engineering of CYP105A1 to produce active forms of vitamin D and drug metabolites.

19th International Conference on Cytochrome P450 (2015.6.12-15. Tokyo)

安田佳織、余語祐哉、滝田禎亮、保川清、杉本宏、城宜嗣、真野寛生、太田美穂、生城真一、榊利之; 放線菌由来 CYP105A1 変異体を用いたビタミン D 水酸化体および医薬品代謝物の生産.

日本ビタミン学会 67 回大会 (2015.6.5-6. 奈良)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

安田 佳織 (YASUDA, Kaori)
富山県立大学・工学部・助教
研究者番号：70707231

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし