

機関番号：23201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580138

研究課題名 (和文) ヒト由来異物代謝酵素発現系を用いた食品成分代謝評価システムの構築

研究課題名 (英文) Construction of evaluation system of metabolism for dietary compounds using human xenobiotic enzymes

研究代表者

生城 真一 (IKUSHIRO SHINICHI)

富山県立大学・工学部・准教授

研究者番号：50244679

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、食品中非栄養成分の複雑な異物代謝経路を試験管内で予測するために、ヒト由来異物代謝酵素群の酵母内同時発現系を構築し、さまざまな食品機能性成分の代謝反応の解析を可能にすることを目指した。特にフラボノイドの生体内での代謝をヒトシトクロム P450 と UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) による同時発現系を構築することで生体における異物代謝予測を可能にした。

研究成果の概要 (英文)：

Dietary compounds such as polyphenols are conjugated by UGT and SULT isoforms and its biological effects depend, in partly, on formation of the conjugates. In order to investigate the sequential metabolism of the dietary bioflavonoid in vitro, xenobiotic metabolizing enzymes, several human P450 and UGT were coexpressed in *Saccharomyces cerevisiae* AH22. These human P450 and UGT co-expression system in yeast allows us to investigate the sequential biotransformation of xenobiotics including dietary flavonoids to be simulated in vitro.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品化学

キーワード：食品生化学、食品代謝物、フラボノイド、グルクロン酸転移酵素、シトクロム P450

## 1. 研究開始当初の背景

食品中の生理作用に関わる非栄養性の機能性成分は、薬物と同様に肝臓や小腸における一連の異物代謝酵素群 (シトクロム P450 (P450) や UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) など) により代謝を受け、その体内動態が機能性発揮に大きく関わってくることが明らかとなってきた。さらに、『食の安全』という観

点からも、既存あるいは新しく開発される食品における非栄養成分の安全性を評価する上においてもその代謝産物の同定は非常に重要となってきている。ヒトにおいてはこれらの異物代謝酵素群は細胞内において機能的に協調しながら効率よく解毒過程に関与していると考えられている。前述のように異物代謝酵素にはそれぞれの酵素には基質特異性の異な

る複数のアイソザイムが存在しており、これらの組み合わせによって様々な化学構造を有する化合物に対する異物代謝の多様性を生み出している。一方でこの異物代謝の多様性が体内での代謝経路（体内動態）や生成する代謝物の予測を困難にしている（図1）。

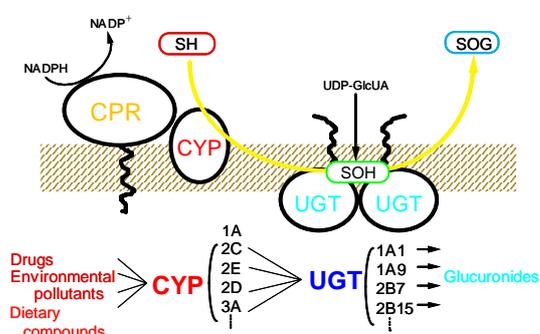


図1. ヒト異物代謝酵素による脂溶性化合物の解毒代謝

また、機能性成分の代謝による構造変換は自身が有する機能性にも大きく影響を及ぼすことが明らかになってきた。たとえば、バイオフィラボノイドであるケルセチンは複数の水酸基を有するが、そのグルクロン酸抱合の位置によって抗酸化能が大きく変動することが知られており、異物代謝酵素による変換反応が機能性を評価する上でも重要であるとの認識が高まっている。

## 2. 研究の目的

本研究では食品中の非栄養成分の機能性を評価する目的で、肝臓や小腸における複雑な異物代謝経路を試験管内で予測するために、ヒト由来異物代謝酵素群の酵母内同時発現系を構築し、さまざまな食品機能性成分の代謝反応の解析を可能にすることを旨とする。特にバイオフィラボノイドとしてさまざまな生理機能を持つとされているケルセチンの生体内での代謝をP450とUGTによる同時発現系を構築し、その詳細な代謝予測をおこなった。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト UDP-グルクロン酸転移酵素(UGT) 遺伝子クローニング及び酵母発現系の構築及び機能評価

#### ①ヒトUGT遺伝子の取得

UGTは遺伝子ファミリーを形成し複数の分子種が臓器特異的に発現しており、臓器特異的な抱合能を有している。代謝予測にはこの複数のUGT分子種における代謝解析が必要である。現在、ヒトUGT遺伝子に関してはUGT1ファミリー遺伝子9種、UGT2ファミリー遺伝

子12種が知られている。本申請グループはこれまでに主要なUGT1分子種に関しては8種、UGT2分子種に関しては5種をすでに取得している。本研究室にて未取得のUGT遺伝子を得るために、ヒト肝臓あるいは腸管組織由来のcDNAライブラリーをよりオリゴTプライマーとUGT遺伝子特異的配列由来のプライマーを用いてPCRクローニングによって各分子種のcDNAを得る。

#### ②UGT分子種の酵母発現株の構築及び機能評価

ヒトP450に関しては、前述のpGYR発現ベクターに酵母P450還元酵素をともに挿入された分子種(12種)がすでに構築されている。そこで先に構築したpGYRプロモーター領域を含むUGT遺伝子断片を染色体組み込み型ベクターであるpAURに際挿入して酵母ゲノムに組み込みUGT発現株を作成した。UGT発現株を大量培養し、酵素源として酵母ミクロソームを遠心分画法にて調製した。UGTタンパク発現は特異的ペプチド抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した。モデル基質としての7ヒドロキシクマリン(7HC)の代謝反応を解析するために、補酵素としてUDP-グルクロン酸を反応系に添加して抱合体(7GC)をHPLCにて分析した。また、UGT単独発現系における種々のバイオフィラボノイドに対する抱合能についても評価した。

### (2) ヒトP450及びUGT分子種の同時発現酵母株の構築及び機能評価

#### ①P450及びUGT分子種の同時発現株の構築

ヒトP450に関しては、前述のpGYR発現ベクターに酵母P450還元酵素を共に挿入された分子種(12種)がすでに構築されている。そこで先に構築したpGYRプロモーター領域を含むUGT遺伝子断片を染色体組み込み型ベクターであるpAURに際挿入して酵母ゲノムに組み込んだ。両発現ベクターの選択培地(Histidine及びAureobasidin A)を同時に用いることにより同時発現株を得た。UGTタンパク発現は特異的ペプチド抗体を用いたウエスタンブロット法で、P450量はCO差スペクトル測定にて解析した。モデル基質としての7エトキシクマリン(7EC)の代謝反応を解析するために、補酵素としてNADPH及びUDP-グルクロン酸を反応系に添加して水酸化体(7HC)及び抱合体(7GC)をHPLCにて分析した。

#### ②P450,UGT同時発現ミクロソームを用いたフラボノイド代謝解析

P450,UGT同時発現株の中でも特にP450 1A2とUGT1A1,1A7,1A8,1A9との組み合わせに注目した。30Hフラボンあるいは60Hフラ

ボンの P450 及び UGT による代謝反応を解析するために、補酵素として NADPH 及び UDP-グルクロン酸を反応系に添加して水酸化体及び抱合体を HPLC にて分析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 遺伝子クローニング及び酵母発現系の構築及び機能評価

###### ① ヒト UGT 遺伝子の取得

ヒト肝臓あるいは腸管組織由来 cDNA ライブラリーより、オリゴTプライマーと UGT 遺伝子特異的配列由来のプライマーを用いて PCR クローニングによって UGT2B10, 15 及び UGT1A5 の cDNA を得ることができた。GAPDH 発現領域を付加させた UGT 遺伝子を自律複製型発現プラスミド pAUR に挿入し酵母発現ベクターへの構築を行った。

###### ② UGT 分子種の酵母発現株の構築及び機能評価

ヒト UGT 発現酵母株 (13 種) を作成してミクロソーム調製を行ない発現量を測定したところ数種の分子種 UGT1A1, 1A4, 1A9) において低発現の傾向が見られた (図 2 パネル上)。発現量の増強を目的としてシグナルペプチド領域の遺伝子改変 (高発現分子種である UGT1A7 配列による置換) をおこなうことにより高発現することに成功した (図 2 パネル下、特許出願①)。

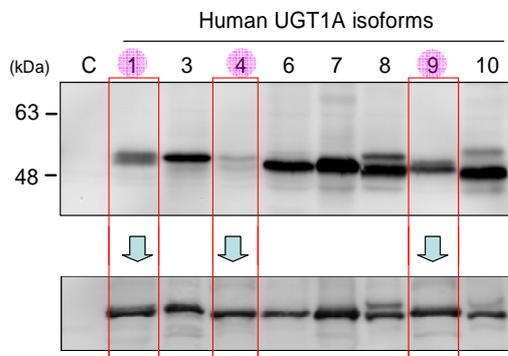


図 2. 遺伝子改変による酵母における UGT 発現量の増強

これら UGT 発現酵母ミクロソームにおける 7HC 抱合能を測定したところ、発現増強した分子種においてはタンパク発現に比例した活性値の上昇がみられた。とくに UGT1A1 におけるケルセチン抱合能は 3 ~ 5 倍の活性上昇を示した。

##### (2) ヒト P450 及び UGT 分子種の同時発現酵母株の構築及び機能評価

① P450 及び UGT 分子種の同時発現株の構築  
ヒト CYP 分子種は CYP1A2, 2C9, 2C19, 3A4 を、

UGT 分子種は UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 2B7 を選定し複数の組み合わせで同時発現系を構築した。形質転換株よりミクロソーム画分を調製して発現確認をおこなった。同時発現株における 7EC 代謝解析をおこなったところ、いずれの同時発現においても 7HC 及び 7GC への変換がみられた。分子種によっては 7EC への 3 位水酸化と引き続き抱合化がおり 3G-7EC の生成も見られた (図 3)。

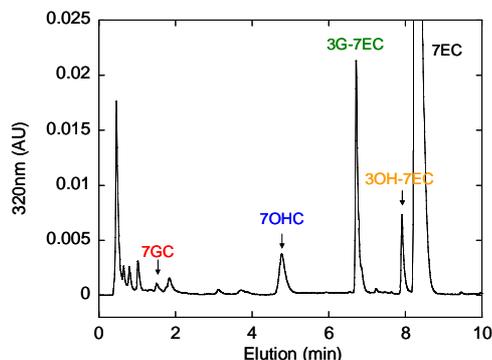


図 3. P450、UGT 同時発現酵素系における 7EC 代謝

###### ② P450, UGT 同時発現ミクロソームを用いたフラボノイド代謝解析

前述の同時発現株を用いて試験管内での種々のフラボノイド代謝過程の解析をおこなった。NADPH 及び UDP-グルクロン酸存在下において 3OH フラボンはその抱合体 (P2) と水酸化体 (P1)、さらにその抱合体 (P3) へ変換をうけ酵母発現 P450 と UGT が機能的に協調していることを確認した (図 4 上段チャート)。

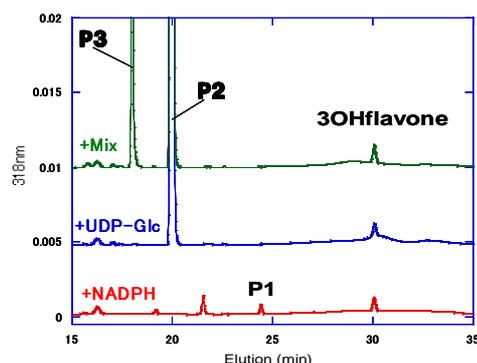


図 4. P450 1A2 と UGT1A7 同時発現系における 3OH フラボン代謝

P450 1A2 との他の分子種 (UGT1A1 等) との同時発現においては P450 代謝物に対する抱合体の生成能は低かった。また、60H フラボンに対してはいずれの組み合わせにおいても直接の水酸化体あるいは抱合体が主要な代謝物であった。したがって、同時発現における分子種の組み合わせに依存して対象基質の

代謝パターンが変動することが示された。

以上、これらヒト P450 及び UGT 同時発現系を用いてさまざま食品中機能性成分の代謝解析をおこない、*in vitro*でのヒトによる代謝予測を可能にすることで、バイオフラボノイドなどの機能性を評価する上で重要なファクターを提供すると考えている。

#### 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 12 件) 全て査読有り

①Itäaho, K, Mackenzie, PI, Ikushiro, S, Miners, J, and Finel, M: Broad diversity of stereo- and regioselectivity in estradiol glucuronidation by human UDP-glucuronosyltransferases *Drug Metabolism and Disposition*, **36**, 2307-2315 (2008)

②Izukawa, T., Nakajima, M., Fujiwara, R., Yamanaka, H., Fukami, T., Takamiya, M., Aoki, Y., Ikushiro, S., Sakaki, T., and Yokoi, T.: Quantitative analysis of UGT1A and UGT2B expression levels in human livers *Drug Metabolism and Disposition*, **37**, 1759-1768 (2009)

③Yasuda, K., Ikushiro, S., Kamakura, M., Ohta, M., and Sakaki, T.: Metabolism of sesamin by cytochromes P450 in human liver microsomes *Drug Metabolism and Disposition*, **38**, 2117-2123 (2010)

[学会発表] (計 23 件)

①Ikushiro, S 「Functional co-expression of xenobiotic metabolizing enzymes, human cytochromes P450 and UDP-glucuronosyltransferases, in yeast microsomes」、第 16 回シトクロム P450 国際会議 (沖縄、2009.6.21-25)

②生城真一 「Enzyme-assisted synthesis of glucuronides using UGT-expressed in yeast」日本薬物動態学会第 24 回年会 (京都、2009.11.25-27)

③生城真一 「食品成分のグルクロン酸抱合反応の分子機構」2010 日本農芸化学会大会 (東京、2010.3.27-29)

[図書] (計 2 件)

①生城真一、鎌倉昌樹、榊利之 ヒトグルクロン酸転移酵素分子種によるケルセチン抱合代謝、ビタミン 83, 351-358 (2009)

②Ikushiro, S.: Takashi Iyanagi: *UGT1* gene complex ( From Gunn rat to Human ) *Drug Metb. Rev.* **42**, 14-22 (2010)

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

①名称: グルクロン酸転移酵素の製造方法  
発明者: 生城真一、榊利之、安田佳織  
権利者: 富山県  
種類: 特許  
番号: 特願 2009-222731

出願年月日: 平成 21 年 9 月 28 日

国内外の別: 国内

②名称: 出芽酵母を用いたグルクロン酸抱合体の製造方法  
発明者: 生城真一、榊利之、安田佳織  
権利者: 富山県  
種類: 特許  
番号: 特願 2010-040150

出願年月日: 平成 22 年 2 月 25 日

国内外の別: 国内

③名称: 遺伝子改変酵母を用いた硫酸抱合体の製造方法  
発明者: 生城真一、榊利之  
権利者: 富山県  
種類: 特許  
番号: 特願 2011-28515

出願年月日: 平成 23 年 2 月 14 日

国内外の別: 国内

④名称: 出芽酵母を用いたグルクロン酸抱合体の製造方法  
発明者: 生城真一、榊利之、安田佳織  
権利者: 富山県  
種類: PCT  
番号: JP2011/053016

出願年月日: 平成 23 年 2 月 14 日

国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ:

<http://www.pu-toyama.ac.jp/BR/sakaki/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

生城 真一 (IKUSHIRO SHINICHI)

富山県立大・工学部・准教授

研究者番号: 50244679

(2) 研究分担者

榊 利之 (SAKAKI TOSHIYUKI)

富山県立大・工学部・教授

研究者番号: 70293909

(3) 連携研究者

なし