

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580179

研究課題名(和文) 遺伝子改変酵母を用いた食品成分代謝物調製技術の開発

研究課題名(英文) Whole cell-dependent production of polyphenol conjugates using genetically engineered budding yeast

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では食品中機能性成分であるポリフェノールの代謝産物を合成するために、哺乳動物由来UDP-グルクロン酸転移酵素(UGT)及び硫酸基転移酵素(SULT)の出芽酵母発現系の構築を行なった。グルクロン酸抱合についてはUGT及びUDP-グルコース脱水素酵素(UGDH)の同時発現株を構築し、静止菌体における部位特異的なケルセチン抱合体の合成に成功した。また、ヒト由来SULT発現酵母株を用いて硫酸化ケルセチン合成にも成功した。ヒトを含めた哺乳動物由来UGT及びSULT発現出芽酵母株を用いた食品成分代謝物調製技術はポリフェノールなどの機能性を評価する上で重要なツールとして有用である。

研究成果の概要(英文)：In order to synthesize the conjugates as dietary metabolites, polyphenols, we have developed several mammalian UDP-glucuronosyltransferases (UGT) or sulfotransferase (SULT) expression systems in budding yeast. For the glucuronide production, mammalian UGT and UDP-glucose dehydrogenase (UGDH) were expressed in budding yeas using a multicopy and a genome integrated vectors. Using genetically engineered yeast containing UGT and UGDH, glucuronide formation of quercetin was examined. Quercetin with multiple glucuronidating sites was conjugated as isoform-dependent formation using UGT isoforms. In the presence of glucose and ammonium sulfate, formation of sulfated quercetin was observed in whole-cell production system with SULT isoforms. These expression system of mammalian UGT or SULT in budding yeast would be a powerful tool for enzyme-assisted synthesis of various dietary metabolites including glucuronides and sulfates.

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：機能性成分 ポリフェノール グルクロン酸抱合 硫酸抱合

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 (P450 や UGT、硫酸基転移酵素など) 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た。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。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されており、そのグルクロン酸抱合や硫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。

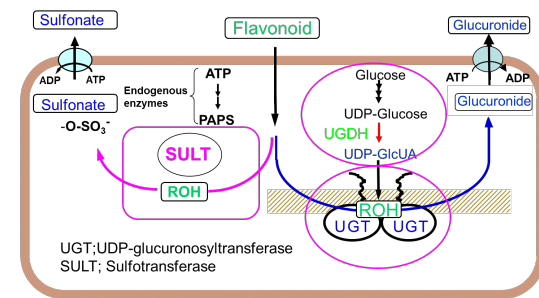
2. 研究の目的

食品中の多くの機能性成分は、生体における異物代謝酵素系 (シトクロム P 450、グルクロン酸転移酵素や硫酸基転移酵素) によって解毒代謝を受ける。近年、これら代謝物が体内において機能性を発揮する可能性が示唆されており、食品成分の持つ機能性評価のための標準品として代謝物調製の必要性が高まってきているにもかかわらず、一般的にこれら抱合体の化学合成は困難な場合が多い。

本研究では遺伝子改変酵母を用いた酵素的変換方法による機能性食品成分の主要な代謝物であるグルクロン酸及び硫酸抱合体を大量にかつ簡便に調製するシステムの確

立を目指した (下図)

Whole cell-production of flavonoid conjugates using genetically engineered yeast with UGT or SULTs



3. 研究の方法

3-1. ほ乳動物由来 UGT 及びヒト由来 SULT 遺伝子の取得

出芽酵母における抱合体産生を可能にするために、多様な基質特異性及び抱合能を有する UGT 及び SULT 遺伝子を得た。ヒト及び実験動物の肝臓、小腸 cDNA ライブラリーを鋳型にして遺伝子クローニングをおこなった。発現量の微量な分子種に関してはゲノム情報より遺伝子配列を取得して、その配列情報をもとに人工遺伝子合成を受託によりおこなった。酵母発現において最適化されたコドン配列を採用して発現量の増強を試みた。その結果、UGT 分子種に関してはヒト: 13 種、ラット: 10 種、マウス: 6 種、ブタ: 2 種の計 31 種の cDNA を取得した。また、SULT に関してはヒトでの主要な発現分子種である SULT1A1, 1A3, 1B1, 1E1, 2A1 の 5 種の cDNA 遺伝子を取得した。

3-2. 抱合体生成能をもつ出芽酵母の構築

酵母株においてグルクロン酸抱合能を付与するために UDP-グルコース脱水素酵素 (UGDH) した出芽酵母を作成した。3-1 で得られた種々の UGT 分子種と UGDH を同時に組み込んだ染色体組み込み型発現ベクター (pAUR) により同時発現とグルクロン抱合能を可能にした。

3-3. 静止菌体を用いたポリフェノール抱合体の調製

3-2 で得られた形質転換体酵母株を大量培養しスケールアップした反応条件にてケルセチンやレスベラトロールなどの複数の水酸基を有するポリフェノールの抱合体調製

を行なった。培地あるいは抽出画分より逆相カラムを用いた精製によってグルクロン酸抱合体あるいは硫酸抱合体を単離純化した。

4. 研究成果

グルクロン酸抱合体に関しては、酵母にUDP-グルコース脱水素酵素を同時に導入することによりグルコースからのUDP-グルクロン酸供給を可能にした。また、硫酸抱合体に関してはヒト由来活性硫酸（PAPS）合成酵素を同時に導入して硫酸抱合能の強化を図る。さらに抱合体の合成効率を増強するために、基質取り込みのトランスポーター及び抱合体排泄のトランスポーターなどの遺伝子導入をおこなうことにより、抱合体産生に特化した遺伝子改変酵母の創出を目指す。1) グルクロン酸転移酵素（UGT）及びUDP-グルコース脱水素酵素（UGDH）同時発現酵母株の構築：これまでに構築したものを含めてUGT分子種としてはヒト13種、ラット10種、マウス6種を選定し、酵母遺伝子への導入は染色体組み込み型ベクターを用いてUGDH遺伝子との同時発現株を構築した。選択培地にて選別した酵母株についてはUGT及びUGDH発現量をウエスタンブロット法にて確認した。2) 遺伝子改変酵母株を用いたケルセチン部位特異的な抱合体調製の検討：分子種はケルセチンの特異的な水酸基に抱合能を示すことが知られており、例えばUGT1A8を用いるとB環の3'位抱合体を優先的に合成することが可能である。部位特異的な抱合分子種を選定して、培養条件及び酵素反応条件を検討して最大収量が得られる条件を決定した。また、UGTあるいはSULT分子種を選択することによりさまざまな構造を有するポリフェノール化合物の抱合体を合成することが可能となった。

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15件）全て査読有

Uchihashi, S., Fukumoto, H., Onoda, M.,

Hayakawa, H., Ikushiro, S., and Sakaki, T.: Multiple isoform dependent glucuronidation of a selective c-Fos/activator protein-1 inhibitor T-5224. *Drug Metabolism and Disposition*, **39**, 803-813 (2011)

Yasuda K, Ikushiro S, Kamakura M, Munetsuna E, Ohta M, Sakaki T. Sequential metabolism of sesamine by cytochrome P450 and UGT-glucuronosyltransferase in human liver. *Drug Metabolism and Disposition* **39**, 1538-1545 (2011)

Uchihashi S, Nishikawa M., Sakaki T., and Ikushiro S.: The critical role of amino acid residue at position 117 of mouse UDP-glucuronosyltransferase 1a6a and 1a6b in resveratrol glucuronidation. *J. Biochem.* **152**, 331-340 (2012)

Zhang H., Patana A., Mackenzie PI., Ikushiro S., Goldman A., and Finel M.: Human UGT expression in insect cells; the ratio of active to inactive recombinant proteins and the effects of a C-terminal His-tag on glucuronidation kinetics. *Drug Metabolism and Disposition*, **40**, 1935-1944 (2012)

Uchihashi S, Nishikawa M., Sakaki T., and 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.*, **28**, 260-264 (2013)

Yasuda K, Endo M, Ikushiro S, Kamakura M, Ohta M, Sakaki T: UV-dependent production of 25-hydroxyvitamin D2 in the recombinant yeast cells expressing human CYP2R1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **434**, 311-315 (2013)

〔学会発表〕（計19件）

生城真一、西川美宇、布目基倫、増山優香、鎌倉昌樹、榊利之：出芽酵母発現系を用いた硫酸抱合体調製技術の開発 第84回日本生化学会大会（京都、2011.9.21-24）

Shinichi Ikushiro, Miyu Nishikawa, Yuuka Masuyama, Masaki Kamakura, and

Toshiyuki Sakaki :Whole cell-dependent production of dietary conjugated metabolites using genetically engineered budding yeast

ICoFF2011(第5回食品因子国際会議) 台北、2011.11.19-23)

生城真一、西川美宇、増山優香、鎌倉昌樹、榊利之：遺伝子改変出芽酵母を用いた食品成分代謝物調製技術の開発
第17回日本フードファクター学会 (静岡 2012.11.10-11.)

生城真一、長谷川嵩、黒田将司、西川美宇、鎌倉昌樹、榊利之：異物抱合酵素発現酵母を用いたフラボノイド抱合体の調製
日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台 2013.3.25-28.)

S. Ikushiro, M. Nishikawa, T. Sakaki

Whole cell-dependent production of polyphenol conjugates using genetically engineered budding yeast. 第6回国際ポリフェノール学会、(ブエノスアイレス 2013.10.16-19)

上野千来、安田佳織、西川美宇、生城真一、鎌倉昌樹、榊利之：ラットを用いたセサミンと医薬品の相互作用の解析
第18回日本フードファクター学会、(東京 2013.11.9-10)

[産業財産権]

取得状況 (計 1 件)

名称：出芽酵母形質転換体
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：5207201
取得年月日：2013 年 3 月 13 日
国内外の別：国内

[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)

富山県立大学・工学部・准教授

研究者番号：50244679

(2) 研究分担者

榊 利之 (SAKAKI TOSHIYUKI)

富山県立大学・工学部・教授
研究者番号：70293909
(3) 連携研究者
なし