

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：23201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21275

研究課題名(和文)薬物代謝酵素発現酵母を用いた指定薬物代謝物合成法の確立

研究課題名(英文) Biosynthesis of illegal drug metabolites using heterologous expression system of drug metabolizing enzymes in yeast

研究代表者

西川 美宇 (Nishikawa, Miyu)

富山県立大学・工学部・研究員

研究者番号：90749805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、指定薬物の浸透拡大が社会問題となっている。これらの薬物は体内で薬物代謝酵素により代謝物へと変換されるため、鑑定には代謝物標準品が必要となる。本研究では、指定薬物鑑定の迅速化を目指して薬物代謝酵素を発現させた遺伝子組換え酵母を用いた代謝物調製を試みた。申請者は既に、代表的な薬物代謝酵素発現酵母を有しているが、指定薬物代謝に関わる酵素であるMAOおよびFMOの発現酵母を新たに構築した。基質市販品の入手が困難であったため、合成麻薬であるMDMAを用いた代謝物調製を試みたが、代謝物を調製することは不可能であった。今後は、入手可能なモデル化合物の代謝解析を行い、指定薬物の代謝予測モデルを確立する。

研究成果の概要(英文)：Recently, widespread illegal drugs become social issues. Authentic standard of these metabolite are needed for analysis because these drugs are converted to metabolite by drug metabolizing enzymes (DMEs). In general, it is difficult or sometimes impossible to prepare the metabolites. Purpose of the present study is to prepare the metabolites of illegal drugs using heterologous expression system of DMEs in yeast. Two monoamine oxidase (MAO) isoforms and five flavin-containing monooxygenase (FMO) isoforms were newly constructed using budding yeast cell. It was impossible to evaluate the activity of MAO or FMO toward illegal drugs because suitable substrate was not commercially available by legal restriction. We next tried to prepare the multiple metabolites from MDMA or MDA using expression system of CYP, COMT and UGT, which was established in previously. However, it was impossible to prepare the metabolites because first metabolic reaction by CYP was not occurred.

研究分野：薬物代謝学

キーワード：指定薬物 薬物代謝酵素 遺伝子組換え酵母

### 1. 研究開始当初の背景

近年、日本国内において危険ドラッグ等の指定薬物使用者による事件及び事故が増加している。これらの薬物は、法規制をかいくぐった類縁体の合成や、入手経路の多様化および易化により検挙が困難になっている。

薬物使用の鑑定には、尿や毛髪に残存する薬物を検出することが重要であるが、多くの指定薬物は、医薬品と同様に体内で速やかに代謝物に変換されて構造が変化するため、指定薬物を未変化体として検出することが困難な場合がある。そのため迅速な鑑定には指定薬物そのものだけでなく、ヒト体内で作られる代謝物の標準品が必要となる。しかし、次々に類縁体が合成される指定薬物に対し、それぞれの代謝物を迅速に合成するのは概して困難である。また、指定薬物の中には複数の薬物代謝酵素により多段階に代謝される化合物もあり、代謝物合成の難易度を上げている。このように、代謝物標準品の入手が、鑑定の律速となっていると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、指定薬物の分析・鑑定に必要な代謝物標準品を迅速に提供するために、薬物代謝酵素発現酵母を用いた指定薬物代謝物の合成システムを構築することを目的とした。研究代表者らはすでに、医薬品の代謝に重要な薬物代謝酵素を発現させた遺伝子組換え酵母を用いて、医薬品からヒト体内で生成される種々の代謝物を合成することに成功している。本研究では、(1) 指定薬物の代謝に重要なモノアミンオキシダーゼ(MAO)およびフラビン含有モノオキシゲナーゼ(FMO)の新規発現系を構築すると共に、(2) 既存および新規薬物代謝酵素発現系を用いた指定薬物の代謝物調製を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 薬物代謝酵素発現系の構築

指定薬物の代謝に重要な MAO 2 分子種 (MAO-A, MAO-B)、および FMO5 分子種 (FMO1~5) の単独発現系を構築した。各遺伝子の ORF は GeneArt Strings DNA Fragments (Thermo Fisher Scientific) にて全合成を行い、酵母発現用にコドン最適化を実施した。各遺伝子は、Infusion cloning system (TaKaRa) を用いて酵母発現用自律複製型ベクターである pGYR に DNA フラグメントをライゲーションした。完成したプラスミドベクターを用いて、酢酸リチウム法で出芽酵母である *Saccharomyces cerevisiae* AH22 株の形質転換を行った。形質転換体はセルライゼートを用いたウエスタンブロッティングでタンパク発現を確認した。

#### (2) 薬物代謝酵素発現酵母を用いた指定薬物代謝物の調製

昨今の指定薬物の事件を受け、指定薬物研究

用試薬の市販入手が極めて困難であったため、譲渡により入手可能であった 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) および 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) を用いた代謝物調製を試みた。代表的な合成麻薬である MDMA および MDA はヒト体内で CYP2C9 と UGT や COMT により多段階に代謝されることが知られている (図)。そこで、CYP2C9 発現酵母を用いた代謝物調製を試みた。グルコース含有リン酸バッファー中で CYP2C9 発現酵母と MDMA を 24 時間インキュベートした。反応液の 3 倍量の 1%TFA 含アセトニトリルを添加して反応停止および抽出操作を実施した。抽出液の上清を HPLC に供し、代謝解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 薬物代謝酵素発現系の構築

研究代表者らは、医薬品などの代謝物合成システムとして、代表的な薬物代謝酵素であるシトクロム P450 (CYP) 19 分子種、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 35 分子種、硫酸転移酵素 (SULT) 6 分子種、およびカテコール-O-メチル基転移酵素 (COMT) 2 分子種の酵母発現系を有しているが、幅広い指定薬物の代謝物合成を可能にするために、2 分子種の MAO (MAO-A, MAO-B) および 5 分子種の FMO (FMO1~5) の発現系を新たに構築した (図 1)。さらに、既存酵素の性能改良を目的とし、4 分子種の SULT 発現系 (ラット SULT1A1, 1B1, 1C1, 1E1) を新たに構築した。

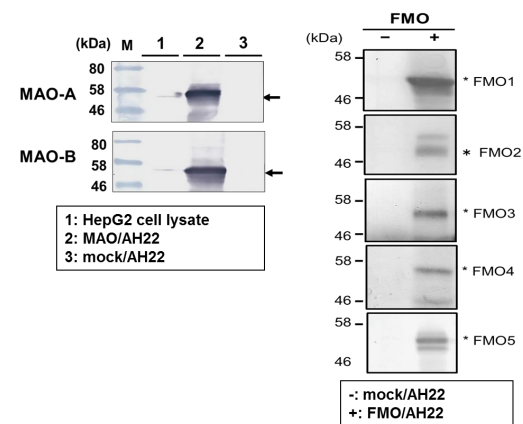


図 1: 酵母発現系における MAO および FMO のタンパク発現解析

#### (2) 薬物代謝酵素発現酵母を用いた指定薬物代謝物の調製

代表的な合成麻薬である MDMA はヒト体内で CYP、COMT および UGT により多段階に代謝され、UGT による最終代謝物が尿中に検出されることが知られている (図 2)。各代謝物を段階的に調製して最終代謝物を得るため、MDMA を出発物質として CYP2D6 発現酵母を用い DHMA (代謝物 1) の調製を試みたが、反応液中の DHMA は検出限界以下であった。構築済みの 19 分子種の CYP 全てを用いた代

謝スクリーニングを実施した他、MDMA 類縁体である MDA を用いて同様に代謝物調製を試みたが、中間代謝物を調製することは困難であったため、最終代謝物の調製には至らなかった(図3)。

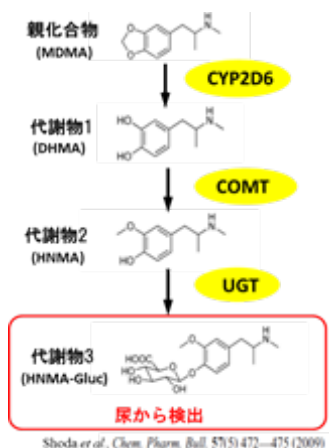


図2：ヒト体内における MDMA の代謝様式

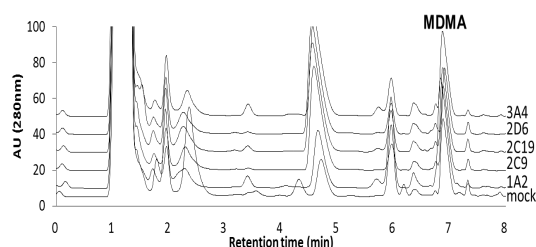


図3：ヒト CYP 発現酵母における MDMA 代謝プロファイル

本研究では、指定薬物代謝物の調製技術確立を目指して、代表的な薬物代謝酵素の既存発現系に加えて、新たに MAO および FMO の新規発現系を構築した。これらの薬物代謝酵素を用いた代謝物調製を試みたが、基質化合物の入手困難により、MAO および FMO による指定薬物の代謝活性評価を検討することはできなかった。本研究では MDMA および MDA を用いた尿中最終代謝物の調製を試みたが、中間代謝物の調製が困難であり最終代謝物の調製は不可能であった。今後は、本研究で構築した酵素発現系を内因性生理活性物質や既存医薬品の代謝解析に応用し、いわゆる non-CYP 型酵素による代謝スクリーニングを実施する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Nishikawa M, Masuyama Y, Nunome M, Yasuda K, Sakaki T, Ikushiro S. Whole-cell-dependent biosynthesis of sulfo-conjugate using human sulfotransferase expressing budding yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* (2018) 102(2):723-732. doi:10.1007/s00253-017-8621-x. (査読有)

Sakaki T, Yasuda K, Nishikawa M, Ikushiro S. Metabolism of Sesamin and Drug-Sesamin Interaction. *Yakugaku Zasshi.*(2018), 138(3):357-363. doi:10.1248/yakushi.17-00191-4. (査読有)

Ikushiro S, Nishikawa M, Masuyama Y, Shouji T, Fujii M, Hamada M, Nakajima N, Finel M, Yasuda K, Kamakura M, Sakaki T. Biosynthesis of Drug Glucuronide Metabolites in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharm.* (2016) 13(7):2274-82. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00954. (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

増山優香、西川美宇、安田佳織、榊利之、生城真一、出芽酵母菌体を用いたヒトフラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO) 反応解析系の構築、日本薬物動態学会第 32 回年会 (東京 2017)

生城真一、高平李可、増山優香、西川美宇、安田佳織、宇野泰弘、村山典恵、山崎浩史、榊利之、出芽酵母を用いたカニクイザル UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT1A) 発現系の構築、日本薬物動態学会第 32 回年会 (東京 2017)

藤井美春、西川美宇、小池りりい、生城真一、榊利之、薬用植物の有効成分であるペンタガロイルグルコースのグルクロン酸抱合代謝、平成 27 年度内外環境応答代謝酵素研究会 (静岡 2016)

Miyu Nishikawa, Toshiyuki Sakaki, Shinichi Ikushiro, Whole cell-dependent synthesis of drug metabolites using genetically engineered yeast cells, Toyama Basel joint symposium 2016 (Basel, Switzerland, 2016)

Toshiyuki Sakaki, Miyu Nishikawa, Shinichi Ikushiro, Whole cell-dependent synthesis of phase I and phase II metabolites using genetically engineered yeast, 13th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity (Vancouver, Canada 2016)

Miyu Nishikawa, Shinichi Ikushiro, Toshiyuki Sakaki, Whole cell-dependent synthesis of phase II metabolites using genetically engineered yeast cells, International Workshop on Conjugation 2016 (Vancouver, Canada 2016)

生城真一、西川美宇、榊利之、異物代謝における種差同定を目指した異物代謝酵素発現酵母株の構築 第 42 回日本毒性学会学術集会 (名古屋、2016)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

西川美宇（Miyu Nishikawa）

富山県立大学・工学部・研究員

研究者番号：90749805

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし