

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 29 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292062

研究課題名(和文) ビタミンD水酸化酵素の高度利用

研究課題名(英文) Advanced use of vitamin D hydroxylases

研究代表者

榭 利之(SAKAKI, TOSHIYUKI)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：70293909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：放線菌由来ビタミンD水酸化酵素の3重変異体を作製し、活性型ビタミンD<sub>2</sub>の製造に成功した。また、微生物由来および哺乳動物由来のビタミンD水酸化酵素を用いて多くの天然型ビタミンDおよびビタミンD誘導体の代謝物標準品製造技術を確立した。一方、ビタミンD受容体とルシフェラーゼのキメラタンパク質を用いた25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>の高感度検出システムを開発した。

研究成果の概要(英文)：We have successfully produced the active form of vitamin D<sub>2</sub> by a triple variant of CYP105A1. Many metabolites of natural or chemically synthesized vitamin D were also produced by bacterial or mammalian vitamin D hydroxylases to use them as authentic standards. In addition, we have developed a novel and highly sensitive system to detect serum 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>.

研究分野：生化学

キーワード：ビタミンD シトクロムP450 ビタミンD水酸化酵素 ビタミンD受容体 高感度検出系

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は長年にわたり、哺乳動物由来あるいは微生物由来のビタミン D 水酸化酵素の構造と機能の解析およびそれらの酵素を用いた有用物質生産、酵素阻害剤の医薬品への応用研究に取り組んできた。25-ヒドロキシビタミン D (25(OH)D) の血中変動を測定することにより骨粗鬆症発症のリスク評価ができるため、ビタミン D 水酸化酵素を固定した電極を用いた 25(OH)D 測定システムの開発を着想した。開始当初の状況を以下に示す。

### (1) 天然型ビタミン D 水酸化体の生産

申請者は CYP105A1 に 2 箇所のアミノ酸置換を導入し、ビタミン D<sub>3</sub> に対する 25 位水酸化活性および 1 $\alpha$ 位水酸化活性を飛躍的に増大させることに成功したが、ビタミン D<sub>2</sub> に対しては、1 $\alpha$ 位水酸化活性は検出されなかった。

### (2) ビタミン D 誘導体代謝物の生産

多くのビタミン D 誘導体については CYP24A1 発現微生物を用いた製造が可能である。しかし、中外製薬のエディロール (ED-71) は CYP24A1 による代謝をきわめて受けにくく、代謝酵素は同定されていなかった。

### (3) ビタミン D 水酸化酵素結合電極の血中 25-ヒドロキシビタミン D 測定への応用

微生物由来あるいは哺乳動物由来のシトクロム P450 を電極に結合させ、薬物濃度を測定した例がある。

## 2. 研究の目的

### (1) 天然型ビタミン D 水酸化体の製造法の確立

25(OH)D<sub>2</sub> および D<sub>3</sub>、1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> および D<sub>3</sub> を効率よく生産する方法を確立する。

### (2) ビタミン D 誘導体代謝物の製造の確立

現在、骨粗鬆症治療薬として汎用されているエディロール (ED-71) および抗がん作用が強いビタミン D 誘導体 (2 位置換体) を中心に代謝酵素、代謝物の同定、代謝物

の効率的製造法を確立する。

### (3) 血中 25-ヒドロキシビタミン D の高感度測定システムの開発

ビタミン D 水酸化酵素を電極に結合し、血中の 25(OH)D を高感度で簡便に検出するシステムを確立する。

## 3. 研究の方法

### (1) 天然型ビタミン D 水酸化体の製造法の確立

(i) 25(OH)D<sub>3</sub> および 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> については CYP105A1 の二重変異体を発現する放線菌 *Rodococcus erythropolis* 菌体を用いた生産法を確立する。

(ii) 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> の製造については CYP105A1 の二重変異体にさらに変異を導入することにより 1 $\alpha$ 位水酸化活性を上昇させる。

### (2) ビタミン D 誘導体代謝物の製造

エディロール (ED-71) については肝臓における代謝がシアン感受性であることを元に、コレステロール生合成に関わるメチルステロール酸化酵素 (SC4MOL) が ED-71 の主要代謝酵素であると推測し、大腸菌、酵母などで発現させ、代謝を調べる。

### (3) 血中 25-ヒドロキシビタミン D の高感度測定システムの開発

CYP24A1、CYP27B1、CYP105A1 など 25(OH)D<sub>3</sub> を基質とする酵素を電極に結合させ 1ml 程度の血液に含まれる 25(OH)D<sub>3</sub> (数 10 pmol) を定量する。

## 4. 研究成果

### (1) 天然型ビタミン D 水酸化体の製造法の確立

(i) CYP105A1 の二重変異体遺伝子を導入し、放線菌 *Rodococcus erythropolis* 内で発現させることに成功し、25(OH)D<sub>3</sub> および 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> の生産に成功した。また、ビタミン D<sub>2</sub> を基質として 25,26(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> の生産に成功した。

(ii) 分子モデリングにより CYP105A1 の Met239 の側鎖が立体障害により 1 位水

酸化反応を妨害していると推測し、Met239を他のアミノ酸に置換したところ、AlaあるいはSer置換体において、25(OH)D<sub>3</sub>に対する1 $\alpha$ 位水酸化活性が二重変異体の約20倍に上昇した。

#### (2) ビタミンD誘導体代謝物の製造

SC4MOLを大腸菌、酵母、COS7細胞で発現させ、ED-71を代謝させたところ、いずれも2位水酸化体が得られた。水酸化反応により生じたヘミアセタールの自発的切断反応により生成したと推定される。さらに、数種のビタミンD誘導体の代謝を調べたところ、多くの2位置換体の側鎖に水酸基を導入することがわかった。したがって、SC4MOLはある種のビタミンD誘導体を水酸化する酵素という表現が可能である。さらに、SC4MOLによって生じた2位水酸化体はCYP24A1の基質となり、多くの代謝物を生み出すことがわかった。ED-71の代謝の全貌を明らかにするとともに、それら代謝物の製造法を確立した。

#### (3) 血中25-ヒドロキシビタミンDの高感度測定システムの開発

膜結合型シトクロムP450であるCYP3A4およびCYP21A2を用いてP450電極の基礎を固める研究を実施した。ジドデシルジメチルアンモニウムブロマイド(DDAB)存在下でCYP21A2を修飾した電極を用いて電気化学測定を行った。その結果、CYP21A2は酸素の4電子還元反応を触媒し、水分子を生成することがわかった。一方、基質となる17 $\beta$ -ヒドロキシプロゲステロンを添加したが、酵素反応による電流の変化は見られなかった。CYP24A1およびCYP105A1を用いた検討もうまくいかず、酵素の電極への結合や水酸化反応とのカップリングに問題があることがわかった。そこで、25(OH)Dの高感度検出システムとして分割型ルシフェラーゼとビタミンD受容体のキメラ蛋白質を用いたシステムの

構築を試みた。変異型ビタミンD受容体R274Lを用いることにより1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>や他のビタミンD代謝物の影響をほとんど受けずに血中25(OH)D濃度を測定するシステムの開発に成功した。

#### 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 14 件)

- Nesterova G, K., Sakaki T. (他 10 名) 1,25-(OH)<sub>2</sub>D-24-hydroxylase (CYP24A1) deficiency as a cause of nephrolithiasis *Clin J Am Soc Nephrol* 8, 649-657 (2013)
- Yasuda K, Sakaki T. (他 4 名) UV-dependent production of 25-hydroxy vitamin D<sub>2</sub> in the recombinant yeast cells expressing human CYP2R1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434, 311-315(2013)
- Takano M, Sakaki T. (他 8 名) Synthesis and Biological Activity of 1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ ,25-Trihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: Active Metabolite of 2 $\alpha$ -(3-Hydroxypropoxy)-1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> by Human CYP3A4. *Chem. Pharm. Bull.* 62, 182-184 (2014)
- Munetsuna E, Ikushiro S., Sakaki T. (他 7 名) Anti-proliferative activity of 25-(OH)D<sub>3</sub> in human prostate cells, *Mol. Cell. Endocrinol.* 382, 960-970 (2014)
- Sakaki T. (他 3 名) CYP24A1 as a Potential Target for Cancer Therapy *Anticancer Agents Med Chem.* 14, 97-108 (2014)
- 榊 利之 25-ヒドロキシビタミンDの生理作用ビタミン、88 (3)、158-160(2014)
- Sakaki T. (他 9 名) Potent antiproliferative effects of 25-hydroxy-16 $\alpha$ -ene-23 $\alpha$ -vitamin D<sub>3</sub> that resists the catalytic activity of both CYP27B1 and CYP24A1 *J. Cell. Biochem.* 115, 1392-402 (2014)
- 安田佳織, 生城真一, 榊利之 (他 4 名) ヒト由来 CYP2R1 発現酵母を用いた 25(OH)D<sub>2</sub>

の生産ビタミン、88(9)、451-457 (2014)

Yasuda K, Ikushiro S, Sakaki T. (他 7 名) Human hepatic metabolism of the anti-osteoporosis drug eldecalcitol (ED-71) involves sterol C4-methyl oxidase. *Pharmacology Research & Prospectives* Vol.3, No.2, e00121 (2015)

Sakaki T. (他 6 名)

Biological evaluation of double point modified analogues of 1,25-dihydroxy vitamin D<sub>2</sub> as potential anti-leukemic agents, *Int.J. Mol. Sci.* 17, e91 (2016)

榊 利之, 代謝研究に基づくビタミン D 作用メカニズムの再考  
生化学, Vol.87, No.4 438-444 (2015)

Mano, H, Ikushiro S, Sakaki T. (他 5 名) Development of novel bioluminescent sensor to detect and discriminate between vitamin D receptor agonists and antagonists in living cells. *Bioconjugate Chemistry*. 26, 2038-2045 (2015)

Sakaki T (他 4 名) Metabolism and Action of 25-Hydroxy-19-nor-vitamin D<sub>3</sub> in Human Prostate Cells. *VITAMIN D HORMONE*. Vol 100, 357-377 (2016),

Ikushiro S, Sakaki T. (他 8 名)  
Sequential hydroxylation of vitamin D<sub>2</sub> by a genetically engineered CYP105A1  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473, 853-858 (2016)

#### 【学会発表】(計 44 件)

西川 美宇、生城 真一、榊 利之 (他 9 名) ビタミン D<sub>1</sub> 位水酸化酵素 CYP27B1 遺伝子欠損マウスを用いたビタミン D 作用の解析. 日本ビタミン学会第 65 回大会 2013.5.17-18

生城 真一、榊 利之 (他 4 名) ヒト由来 CYP2R1 発現酵母における UV 照射による 25-ヒドロキシビタミン D<sub>2</sub> の生産. 同上

Sakaki T. Possible application of bacterial and mammalian vitamin D hydroxylases 18<sup>th</sup> International Conference on Cytochrome P450 2013.6.18-22, Seattle

榊 利之 (他 6 名) P450 発現菌体を用いたビタミン D 水酸化体の生成 2013 年度酵素・補酵素研究会 2013.6.21-22

生城 真一、榊 利之 (他 11 名)

CYP27B1 ノックアウトマウス腎臓近位尿細管初代培養細胞における 25-ヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> の生理作用 第 86 回日本生化学会大会 2013.9.11-13

Sakaki T (他 6 名) Microbial Production of Hydroxylated Forms of Vitamin D Enzyme Engineering XXII 2013.9.22-26 Toyama

Sakaki T (他 10 名)

C5-C6 Coupling of MART-10 Synthesis and Its Anticancer Activity in Vivo 10<sup>th</sup> International Symposium on Carbanion Chemistry 2013.9.23-26

Sakaki T, (他 10 名) Synthesis and Biological activity of 1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ ,25- and 1 $\alpha$ ,4 $\alpha$ ,25-trihydroxyvitamin D with metabolic studies 16th vitamin D workshop 2014.6.11-6.14

生城真一、榊利之 (他 9 名) メチルステロール酸化酵素 SC4MOL による 2 位置換基付加型ビタミン D 誘導体の代謝 2014 年度日本ビタミン学会 2014.6.13-6.14

生城真一、榊利之 (他 4 名) 25-ヒドロキシビタミン D の生理機能 同上

Ikushiro S, Sakaki T. (他 11 名) Protein engineering of actinomycete CYP105A1 to produce the active form of vitamin D<sub>2</sub> 12th International Symposium on cytochrome P450 2014.9. 24-28 Kyoto

Yasutake Y, Tamura T, Sakaki T. (他 7 名) Microbial production of hydroxylated metabolites of vitamin D 同上

生城真一、榊利之 (他 12 名)

CYP27B1 ノックアウトマウス腎臓近位尿管初代培養細胞における 25-ヒドロキシビタミン D3 の生理作用 第 87 回 日本生化学会大会 2014.10.15-18

生城真一、榊利之 (他 7 名) ヒト由来メチルステロール酸化酵素 SC4MOL によるビタミン D 誘導体の代謝. 同上

生城真一、榊利之 (他 5 名) 強い骨密度上昇作用を有するビタミン D 誘導体の代謝様式の解明. 同上

安武義晃、田村具博、生城真一、榊利之 (他 8 名) CYP105A1 変異体発現 Rhodococcus 属放線菌を用いたビタミン D 水酸化体の生産. 同上

Sakaki T. (他 5 名) Synthesis of 2 $\alpha$ -(3-Hydroxypropyl)-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamin D3 (MART-10) and Its Anticancer Activity. 15th Tetrahedron Symposium 2014.10.28-29 Singapore

榊利之 (他 6 名) CYP27B1 ノックアウトマウスにおける 25-ヒドロキシビタミン D3 の生理作用. 第 7 回 北陸合同バイオシンポジウム 2014.11.28-29

生城真一、榊利之 (他 5 名) 2 位にアゾール基を有するビタミン D 誘導体の生理活性. 同上

生城真一、榊利之 (他 5 名) CYP105A1 三重変異体発現 Rhodococcus 属放線菌を用いたビタミン D2 水酸化体の生産、同上

21 安武義晃、田村具博、生城真一、榊利之 (他 8 名) CYP105A1 三重変異体発現 Rhodococcus 属放線菌を用いたビタミン D 水酸化体の生産 日本農芸化学会 2015 年度大会 2015.3.26-3.29

22 生城真一、榊利之 (他 5 名) 強い骨密度上昇作用を有するビタミン D 誘導体の代謝様式の解明 日本ビタミン学会第 67 回大会 2015.6.5-6.8

23 生城真一、榊利之 (他 7 名) 分割型ルシフェラーゼを用いたビタミン D バイオセンサー

の開発. 同上

24 生城真一、榊利之 (他 8 名) 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. 同上

25 生城真一、榊利之 (他 6 名) CYP27B1 ノックアウトマウスを用いた 25-ヒドロキシビタミン D3 の生理作用の検討 同上

26 Sakaki T.、Ikushiro S. (他 5 名) CYP24A1 is a key enzyme to develop vitamin D analogs as anti-osteoporosis or anti-cancer drugs The 19th International Conference on Cytochrome P450 2015.6.12-15 Tokyo

27 Ikushiro S.、Sakaki T. (他 5 名) CYP24A1-dependent metabolism of a promising vitamin D analog for osteoporosis treatment 同上

28 Ikushiro S.、Sakaki T. (他 10 名) Protein engineering of CYP105A1 to produce active forms of vitamin D and drug metabolites 同上

29 Ikushiro S.、Sakaki T. (他 5 名) CYP24A1-dependent metabolism of a vitamin D analog which has a potent ability to increase bone mineral density Metals in Biology in Wako 2015.6.16-17

30、生城真一、榊利之 (他 7 名) ヒト由来メチルステロール酸化酵素 SC4MOL によるビタミン D 誘導体の代謝. 第一回ネオビタミン D ワークショップ 2015.8.28-29

31 榊利之 CYP27B1 ノックアウトマウスを用いた 25-ヒドロキシビタミン D3 の生理作用の検討 同上

32 生城真一、榊利之 (他 8 名) CYP27B1 ノックアウトマウスを用いた 25-ヒドロキシビタミン D3 の生理作用に関する研究 日本農芸化学会中部・関西合同支部会 2015.8.18-19

33 生城真一、榊利之 (他 9 名) 放線菌由来 CYP105A1 の三重変異体の大腸菌での発現

とビタミン D2 と 7-メトキシマリニンに対する酵素活性. 同上

34 生城真一、榊利之 (他 10 名) 活性型ビタミン D や医薬品代謝物を生産する CYP105A1 の機能解析. 同上

35 生城真一、榊利之 (他 6 名) SC4MOL, CYP3A4 および CYP24A1 による骨粗鬆症治療薬エルデカルシトールの代謝 日本薬物動態学会第 30 年会 2015.11.12-14

36 生城真一、榊利之 (他 6 名) メチルステロイド酸化酵素 SC4MOL による 2 位置換基付加型ビタミン D 誘導体の代謝 同上

37 生城真一、榊利之 (他 7 名) CYP27B1 ノックアウトマウスにおける 25(OH)D3 の代謝解析 第 38 回日本分子生物学会、第 88 回日本生化学会合同大会 2015.12.1-4

38 生城真一、榊利之 (他 6 名) メチルステロイド酸化酵素 SC4MOL によるビタミン D 誘導体の代謝. 同上

39 生城真一、榊利之 (他 10 名) CYP105A1 の立体構造に基づく機能改変と医薬品生産への応用. 同上

40 榊利之 CYP24A1 はビタミン D 誘導体開発における鍵酵素である  
日本薬学会第 136 年会 2015.3.26-29

41 榊利之 (他 7 名) 骨粗鬆症治療薬 エルデカルシトールの代謝様式の解明 同上

42 生城真一、榊利之 (他 6 名) メチルステロイド酸化酵素 SC4MOL によるビタミン D 誘導体の代謝 同上

43 生城真一、榊利之 (他 7 名) CYP27B1 ノックアウトマウスにおける 25-ヒドロキシビタミン D3 の代謝解析. 日本農芸化学会 2016 年度大会 2015.3.27-30

44 生城真一、榊利之 (他 7 名) CYP27B1 ノックアウトマウスを用いた 25 - ヒドロキシビタミン D3 の骨形成および生殖機能に対する生理作用の検討. 同上

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 2 件)

名称: 1,25-ジヒドロキシビタミン D2 の製造方法

発明者: 榊 利之、生城真一、戸田佳織

権利者: 富山県

種類: 特許

番号: 2014-193073

出願年月日: 2014 年 9 月 22 日

国内外の別: 国内

名称: VDR ビタミン D 結合ドメインを含む融合タンパク質及びその利用

発明者: 榊 利之、真野寛生、西川美宇

権利者: 富山県

種類: 特許

番号: 2015-036022

出願年月日: 2015 年 2 月 25 日

国内外の別: 国内

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

榊 利之 (SAKAKI TOSHIYUKI)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号: 70293909

(2) 研究分担者

加納 健司 (KANO KENJI)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号: 10152828

(3) 連携研究者

生城 真一 (IKUSHIRO SHINICHI)

富山県立大学・工学部・准教授

研究者番号: 50244679

安武 義晃 (YASUTAKE YOSHIAKI)

産業技術総合研究所・生物プロセス研究

部門・研究員

研究者番号: 20415756

田村 具博 (TAMURA TOMOHIRO)

産業技術総合研究所・生物プロセス研究

部門・研究部長

研究者番号: 30357488