

学 位 論 文 題 名

チトクローム P4501A1の発現抑制の 分子機構に関する研究

学位論文内容の要旨

薬物代謝酵素の中でも中心的な役割を担っているチトクローム P450 は、薬物の解毒化や活性化を触媒するだけでなく、がん原物質の代謝的活性化をも触媒することが知られている。これらの代謝にかかわる P450 が生体内で誘導されると、がん原物質は反応性中間体の生成が亢進するため、その発がん性が増す。P450 の誘導現象の中でも CYP1A1 の誘導はベンゾ(a)ピレンなどのがん原物質の代謝的活性化を促進し、発がんを引き起こすことから毒性的に重要な意味を持っている。本酵素は3-メチルコランスレン(MC)などの芳香族炭化水素(Ah)によって誘導される。すなわち、Ahが細胞内に入るとまず細胞質中の Ah リセプター(AhR)と結合する。次いで AhR は核内に移行し、Aml とヘテロダイマーを形成する。この複合体は 5'-上流に存在する XRE に結合し CYP1A1 遺伝子の転写を活性化する。Ah による CYP1A1 の誘導には顕著な動物種差が存在し、ウサギにおいては幼若期で CYP1A1 が誘導されるが成熟期では誘導されず、Ah に対する発がん感受性も低い。これまでこの分子機構は全く解明されていない。そこで本研究では、ウサギに見られる CYP1A1 の誘導の抑制の原因を明らかにすることを目的とした。まずウサギ成獣の肝臓に発現する AhR および Aml の cDNA を単離し、AhR および Aml タンパク質を発現させ、AhR/Aml 複合体が XRE に対し結合活性を示すかどうか解析した。その結果、MC 存在下では AhR/Aml 複合体は XRE に対し強い結合活性を示すことが分かった。したがって CYP1A1 が誘導されないウサギ成獣の肝臓においても正常に機能しう AhR および Aml が十分に発現していると考えられた。そこで新たに CYP1A1 の発現の抑制の原因となりうる 2つの可能性を考えた。すなわち、CYP1A1 の誘導的発現が DNA のメチル化により抑制されている可能性、そしてウサギ成獣の肝臓に転写抑制因子が存在するために誘導されない可能性の 2つである。ウサギ成獣に見られた CYP1A1 の誘導抑制は培養細胞においても認められた。すなわち、CYP1A1 の誘導はウサギ腎臓由来 RK13 細胞では認められたが、ウサギ肺由来 R9ab 細胞では全く検出されなかった。ウサギ成獣に見られた現象と同様、R9ab 細胞においても AhR や Aml mRNA が発現していることも分かった。そこで、まず培養細胞における発現抑制機構を明らかにし、ウサギ成獣に見られる CYP1A1 の誘導抑制をその分子機構で説明できるか検討した。ウサギ CYP1A1 遺伝子の 5'-上流領域にはメチル化を受ける可能性のある CpG 配列が数多く存在していた。そこで CYP1A1 遺伝子のメチル化による発現抑制の可能性に注目した。その目的のために、脱メチル化剤として知られている 5-aza-2'-deoxycytidine (AzaC) 存在下で R9ab 細胞を培養し、CYP1A1 mRNA の発現を解析した。その結果、MC に非応答性であった R9ab 細胞においても RK13 細胞とほぼ同じレベルまで CYP1A1 が発現してくることが分かった。脱メチル化剤は CYP1A1 の構成的発現よりもむしろ誘導的発現に効果が見られたことから、XRE のような CYP1A1 遺伝子の活性化に関与する領域がメチル化されていると推測された。亜硫酸ナトリウムによる脱アミノ反応と PCR 法を

組み合わせた方法により XRE のメチル化の状態を調べたところ、RK13 細胞では XRE のメチル化はほとんど起こっていなかったのに対し、CYP1A1 が誘導されない R9ab 細胞では XRE3 および XRE4 が高度にメチル化されていた。また、XRE がメチル化されると AhR/AhR 複合体は XRE に結合できなくなることを見出した。しかし、ウサギの幼若期および成熟期ともに XRE のメチル化はほとんど見られなかった。次に、AhR/AhR 複合体による CYP1A1 遺伝子の活性化を抑制する転写因子がウサギ成獣の肝臓に存在する可能性についてゲルシフトアッセイにより解析した。その結果、ウサギ成獣の肝臓において XRE3 および XRE5 に対し構成的に転写因子が結合していることが分かった。そこで、この因子が XRE のコア配列を認識しているかどうかを調べるために XRE のコア配列中に変異を導入したプローブを用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、この因子は変異を導入した XRE に対し全く結合しないことが分かった。このことから、XRE に構成的に結合している因子は AhR/AhR 複合体と同様、XRE のコア配列を認識していることが明らかとなった。次に、ウサギ成獣より調製した核抽出液中に AhR/AhR 複合体を加え、実際に AhR/AhR 複合体と XRE の結合がこの因子によって抑制されるかどうか検討した。その結果、AhR/AhR 複合体はこの因子と XRE 上で競合し、多量の AhR/AhR 複合体を加えない限り AhR/AhR 複合体の十分な結合活性が得られないことが分かった。次に、XRE3 の配列を既知の転写因子の結合配列と比較した。興味深いことに、ウサギの XRE3 の配列はマウスのメタロチオネイン I プロモーターにみられる upstream stimulatory factor1 (USF1) の結合配列と重複していることが分かった。事実、USF1 の抗体を用いたゲルシフトアッセイでは USF1 のスーパーシフトバンドが検出された。またチミジンキナーゼのプロモーターの上流に XRE を 4 個連結したレポータープラスミドを構築し、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、USF1 をトランスフェクトしない場合には MC により 16 倍の誘導能が認められたが、USF1 をトランスフェクトすることで、その誘導能は 6.3 倍にまで低下することが分かった。このことから、USF1 が AhR/AhR 複合体による CYP1A1 遺伝子の転写活性化を直接阻害した結果、ウサギ成獣では CYP1A1 が誘導されない可能性が考えられた。ヒト CYP1A1 遺伝子の上流に存在する XRE の配列には USF1 の結合配列が保存されていた。しかしヒトでは多くの場合 CYP1A1 が誘導される。この原因を調べたところ、ヒトにおいても USF1 による CYP1A1 の発現抑制の可能性はあるものの、多くの場合、XRE に対する USF1 の結合量が少ないために CYP1A1 が誘導されることが分かった。以上、これまで未知であった CYP1A1 の発現抑制の原因を調べ、USF1 による新しい発現調節モデルを提唱することに成功した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鎌 滝 哲 也

副 査 教 授 有 賀 寛 芳

副 査 助 教 授 松 本 健 一

副 査 助 教 授 有 吉 範 高

学 位 論 文 題 名

チトクローム P4501A1の発現抑制の 分子機構に関する研究

チトクロームP450の一種CYP1A1は、がん原性多環芳香族炭化水素(AH)の代謝的活性化を触媒し、発がんのイニシエーションに関わる。したがって、CYP1A1が3-メチルコランズレン(MC)などによって誘導されると、AHの反応性中間体の生成が亢進するため、その発がん性が増すことになる。一方、AHによる CYP1A1 の誘導には顕著な動物種差が存在し、ウサギにおいては幼若期で誘導されるが成熟期では誘導されず、成熟期ではAHに対する発がん感受性も低い。本研究では、なぜ成熟ウサギでは誘導が見られないのかを検討し、新しい発現調節機構を発見した。本研究はがん原物質による発がん感受性の動物種差、ひいてはヒトにおける発がん感受性に関して有用な概念を提供するものであり、以下に詳述するように極めて優れた研究成果であると評価される。

(1) ウサギにおける既知CYP1A1誘導因子の存在

CYP1A1の誘導機構は次のように考えられている。すなわち、AHは細胞質中の AhR と結合し、次いで AhR-AH結合物は核内に移行し、パートナーである Arnt とヘテロダイマーを形成する。この複合体は 5'-上流領域に存在する XRE と呼ばれるエンハンサーに結合して CYP1A1 遺伝子の転写を活性化する。しかしながら、CYP1A1 遺伝子の活性化に必要なこれらの転写因子がウサギ成獣の肝臓に発現し、かつ正常な機能を有していた。したがって、これらの転写因子以外の因子が成熟ウサギにおけるCYP1A1の発現を調節していることになる。

(2) DNAのメチル化によるCYP1A1誘導発現の抑制

ウサギにおいて CYP1A1 が誘導されない原因として、DNA のメチル化によって誘導が抑制されている可能性がある。CYP1A1 の誘導はウサギ腎臓由来 RK13 細胞では認められたが、ウサギ肺由来 R9ab 細胞では全く検出されなかった。検討の結果、R9ab細胞においても AhR や Arnt mRNA が発現していることが分かった。R9ab 細胞のDNAを脱メチル化処理するとRK13 細胞とほぼ同じレベルまで CYP1A1 が発現した。ウサギ CYP1A1 遺伝子の 5'-上流領域にはメチル化を受ける可能性のある CpG 配列が存在している。そこで、CYP1A1 の誘導に関与する XREのメチル化の状態を詳細に解析した結果、RK13 細胞では XRE のメチル化はほとんど起こっていなかったのに対し、R9ab 細胞では高度にメチル化されていた。しかし、ウサギの幼若期および成熟期ともに XRE のメチル化はほとんど見られなかった。

(3) CYP1A1遺伝子発現抑制因子の解明

ウサギ成獣の肝臓に、AhR/Arnt 複合体による CYP1A1 遺伝子の活性化を抑制する転写因子が存在する可能性について検討した。まず、ウサギの肝核抽出液の中に、ウサギ CYP1A1 の誘導的発現に関与する XRE3、XRE4 および XRE5 に結合する因子が存在することを見出した。ウサギ新生仔における、この因子の存在量は少なかったことから、成熟ウサギにおける CYP1A1 の発現抑制の原因因子となっている可能性が期待された。次に、この因子を同定するために XRE3 の配列を既知の転写因子の結合配列と比較した。興味深いことに、ウサギの XRE3 の配列はマウスのメタロチオネイン I プロモーターにみられる USF1 の結合配列と重複していることが分かった。いくつかの実験的証拠から、USF1 が AhR/Arnt 複合体による CYP1A1 遺伝子の転写活性化を直接阻害する結果、成熟ウサギでは CYP1A1 が誘導されない可能性が考えられた。

(4) ヒトにおけるUSF1 とCYP1A1の誘導

USF1 による発現抑制がヒトでも見られるか否か検証した。ヒト CYP1A1 遺伝子上流に存在する XRE の配列には USF1 の結合配列が保存されているが、ヒトでは CYP1A1 が誘導される。USF1 による CYP1A1 の発現抑制の可能性を HepG2 細胞を用いて検討した。HepG2 細胞における USF1 の結合量はウサギと比べて非常に少なく TCDF で細胞を処置することにより USF1 の結合配列を含む XRE に対しても AhR/Arnt 複合体が結合することが判明した。しかし、USF1 を HepG2 細胞に過剰に発現させた場合には CYP1A1 mRNA の発現が抑制された。これらの結果から、ヒトにおいても USF1 による CYP1A1 の発現抑制の可能性はあるものの、XRE に対する USF1 の結合量が少なく、XRE もメチル化されていないために CYP1A1 が誘導されると考えられた。

以上、これまで未知であった CYP1A1 の発現抑制の原因を明らかにし、USF1 による新しい発現調節モデルを明らかにした。本研究は CYP1A1 の発現調節機構に関して新しい重要な概念を提案した。本論文『チトクローム P4501A1 の発現抑制の分子機構に関する研究』に含まれる研究成果は薬学における基礎および応用のいずれにおいても優れており、博士（薬学）の学位を受けるに充分値するものと認めた。