

博士（薬 学） 佐々木 恭 正

学 位 論 文 題 名

CYP2C12 遺伝子の発現制御機構に関する研究

学位論文内容の要旨

ラットの肝臓における薬物代謝能には性差が存在する。その原因の1つとして、ラットでは雌性と雄性とで各々特異的に発現するチトクローム P450 (CYP) の存在が挙げられる。本研究では、雌性ラットに特異的に発現する CYP2C12 の発現制御機構を転写レベルで解析し、多くの知見を得た。すなわち、雌性ラットの肝臓を用いた *in vivo* 解析法を確立し、その手法を用いて CYP2C12 遺伝子の成長ホルモン (GH) 依存性、肝特異性、性特異性の分子機構を明らかにした。

(1) ラット肝における CYP2C12 遺伝子の発現制御機構の *in vivo* 解析法の開発

CYP2C12 遺伝子の発現制御機構の研究がこれまで困難であった理由として、CYP2C12 を発現する肝由来の培養細胞が存在しなかったことが挙げられる。この問題を解決するため、新規の実験系としてラットの肝臓に直接遺伝子を注入するダイレクト DNA インジェクション法を CYP2C12 遺伝子の転写制御機構の解析に適用した。CYP2C12 遺伝子の 5'-上流 -5132 から +16 までの領域をルシフェラーゼに連結したレポータープラスミド (Luc5132) を構築し、雌性ラットの肝臓に直接注入した。その転写活性を測定したところ、Luc5132 の注入部分において、CYP2C12 のプロモーターに由来した有意な転写活性が検出された。この転写活性は下垂体を切除して、GH が分泌されなくなった Hypox ラットでは全く検出されず、Hypox ラットに GH を持続的に投与すると回復した。したがって、本研究で用いたダイレクト DNA インジェクション法は、CYP2C12 遺伝子の GH 依存的な転写制御機構を解析する実験系として有用であることが明らかとなった。

(2) ラット CYP2C12 遺伝子の成長ホルモン依存的な発現制御の分子機構

上述の *in vivo* 解析法を用いて、GH 依存的な発現制御領域と、その制御領域に結合する因子を探査した。5'-上流領域を段階的に欠失させたレポータープラスミドを用いた検討から、その制御領域が -4213 から -4162 に存在することを見い出した。この領域中には、転写因子、signal transducer and activator of transcription (STAT) の結合配列と類似したバリンドローム配列、GH responsive element (GHRE) が存在した。この GHRE 配列が、雌性で見られる持続型の GH 分泌に応答性を有することを、下垂体を切除した Hypox ラットを用いた *in vivo* 解析より明らかにした。さらに GHRE 配列に結合する GH 応答因子として、STAT5 を見い出した。この STAT5 はラットの肝臓において GH により誘導される因子であった。このことから、CYP2C12 の GH 依存的な発現制御は、GHRE に結合する STAT5 により制御されることが明らかとなった。

(3) ラット CYP2C12 の肝特異的および性特異的な発現制御の分子機構

CYP2C12 の発現の肝特異性または性特異性が STAT5 のみでは説明できないことから、STAT5 とは別の転写制御因子が CYP2C12 の発現制御機構に関わる可能性が推測された。そこで先ず、CYP2C12 の肝特異的な発現を制御する転写制御領域を調べたところ、上流 -4122 から -4036 さらに -535 から -80 の領域を新たに発現制御領域として見い出した。-535 より下流の領域について解析し、肝に豊富に発現する転写因子、HNF-4 と HNF-6 が CYP2C12 の肝特異的な発現に重要であることを明らかにした。上流 -4122 から -3036 についても解析し、新規の転写制御領域である 2C12-I と 2C12-II を見い出した。さらにゲルシフトアッセイ法により 2C12-I と 2C12-II に結合する因子を調べ、2C12-I には転写因子 CREB が結合し、2C12-II には、C/EBP α と HNF-3 α が結合することが明らかとなった。これらの結果より、CYP2C12 の肝特異的な発現には、C/EBP α 、HNF-3 α 、HNF-4 および、HNF-6 の 4 つの肝特異的因子が重要であることが明らかとなった。

次に、CYP2C12 の性特異的な発現がどのような分子機構により引き起こされるかを調べるために、CYP2C12 の誘導因子の発現量を雌雄両ラットで比較検討した。しかし、これら誘導因子の発現量に性差は認められなかった。そこで、CYP2C12 を発現しない雄性ラットが雌性と同様に CYP2C12 の誘導能を有している可能性を考えた。この可能性を検証するため、CYP2C12 遺伝子の欠失変異体を、雄性と雌性ラットの肝臓に注入し、その転写活性を比較した。興味深いことに CYP2C12 の発現が見られない雄性ラットで、顕著な転写活性の上昇が見られた。のことより、雌性と同様に雄性ラットでも CYP2C12 の誘導機構が維持されていることが明らかとなった。したがって、雄性ラットで CYP2C12 の発現が見られない原因は、雄性ラットで特異的に働く抑制機構が存在しているためと推測された。この抑制機構を探索するために、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を特異的に阻害するトリコスタチン A を雄性ラットに投与したところ、CYP2C12 の発現が部分的に誘導されることが明らかとなった。したがって、雄性ラットで CYP2C12 が発現しない原因が、遺伝子のクロマチン構造レベルで HDAC により抑制されているためであることが強く示唆された。

以上本研究より、未知であった CYP2C12 遺伝子の GHI 依存的または肝特異的な発現制御機構を明らかにし、さらに、性特異的な発現制御機構について、新しいモデルを確立することに成功した。

学位論文審査の要旨

主査 教授 鎌 滉 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

CYP2C12 遺伝子の発現制御機構に関する研究

申請者は、雌性ラットに特異的に発現する CYP2C12 の発現制御機構を転写レベルで解明することを目的とし、世界的な研究成果を得た。すなわち、本研究では雌性ラットの肝臓を用いた *in vivo* 解析法を確立し、その手法を用いて CYP2C12 遺伝子の成長ホルモン (GH) 依存性、肝特異性、性特異性の分子機構を明らかにした。本研究は性特異的な CYP 分子種または成長ホルモン(GH)による遺伝子の発現制御機構の研究に有用な概念を提供する極めて優れた研究である。

(1) ラット肝における CYP2C12 遺伝子の発現制御機構の *in vivo* 解析法の開発

新規の実験系としてラットの肝臓に直接遺伝子を注入するダイレクト DNA インジェクション法を CYP2C12 遺伝子の転写制御機構の解析に適用した。CYP2C12 遺伝子の 5'-上流 -5132 から +16 までの領域をルシフェラーゼに連結したレポーター プラスミド (Luc5132) を構築し、雌性ラットの肝臓に直接注入した。その転写活性を測定したところ、Luc5132 の注入部分において、CYP2C12 のプロモーターに由来した有意な転写活性が検出された。この転写活性は下垂体を切除して、GH が分泌されなくなった Hypox ラットでは全く検出されず、Hypox ラットに GH を持続的に投与すると回復した。したがって、本研究で用いたダイレクト DNA インジェクション法は、CYP2C12 遺伝子の GH 依存的な転写制御機構を解析する実験系として有用であることが明らかとなった。

(2) ラット CYP2C12 遺伝子の成長ホルモン依存的な発現制御の分子機構

上述の *in vivo* 解析法を用いて、GH 依存的な発現制御領域と、その制御領域に結合する因子を探査した。上流-4213 から -4162 には、転写因子、STAT の結合配列と類似したパリンドローム配列、GII responsive element (GHRE) が存在していた。この GHRE 配列が、雌性で見られる持続型の GH 分泌に応答性を有することを、下垂体を切除した Hypox ラットを用いた *in vivo* 解析より明らかにした。さらに GHRE 配列に結合する GH 応答因子として、STAT5 を同定した。このことから、CYP2C12 の GH 依存的な発現制御は、GHRE に結合する STAT5 により制御されることが明らかとなった。

(3) ラット CYP2C12 の肝特異的および性特異的な発現制御の分子機構

CYP2C12 の発現の肝特異性または性特異性が STAT5 のみでは説明できないことから、STAT5 とは別の転写制御因子が CYP2C12 の発現制御機構に関わる可能性が推測された。検討の結果、CYP2C12 の肝特異的な発現は、C/EBP α 、HNF-3 α 、HNF-4 および、HNF-6 の 4 つの肝特異的因子により制御されていることが明らかとなった。

さらに、CYP2C12 の性特異的な発現がどのような分子機構により引き起こされるかを検討した結果、CYP2C12 の発現が雌性ラットでのみ見られる原因として、CYP2C12 の発現が雄性ラットで特異的に抑制される機構が存在することが新たに推測された。この抑制機構を探索するため、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を特異的に阻害するトリコスタチン A を雄性ラットに投与したところ、CYP2C12 の発現が部分的に誘導されることが明らかとなった。したがって、雄性ラットで CYP2C12 が発現しない原因が、遺伝子のクロマチン構造レベルで HDAC により抑制されているためであることが強く示唆された。

以上本研究では、未知であった CYP2C12 遺伝子の GH 依存的または肝特異的な発現制御機構を明らかにした。さらに、性特異的な発現制御機構について、新しいモデルを確立することに成功し、世界的にもユニークな研究を展開した。本研究は分子生物学から薬物代謝学に至る広範な分野で極めて高く評価される。本論文『CYP2C12 遺伝子の発現制御機構に関する研究』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。