

博士(医学) 佐田文宏

学位論文題名

CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exon 7 and 12:evidence for an allelic variant with altered catalytic activity

(*CYP3A4 遺伝子のエクソン 7 および 12 のアミノ酸置換を伴う遺伝子変異 - 触媒活性変化を伴う遺伝子変異の証拠*)

学位論文内容の要旨

シトクロム P450 (CYP) 遺伝子スーパーファミリーは、非常に多くの薬物、発癌物質、毒素などの外因性化学物質およびステロイド、脂肪酸、プロスタグランジンなどの内因性化合物の酸化的代謝を触媒する一群のヘム蛋白質をコード化している。このうち CYP3A4 はヒトの肝臓、腎臓および小腸で発現し、臨床的に、生理学的および中毒学的に重要な多くの化合物の代謝に関与している。テストステロンの 2 β 、6 β 、15 β の水酸化反応やエストラジオールの 16 α の水酸化反応などには、この酵素が関わっている。また、CYP3A4 は、ニフェジピン、サイクロスボリンなど臨床でよく使われる薬物の代謝や不活化に関与する代表的な P450 でもある。臨床医学の分野では、CYP3A4 が関与する薬物の相互作用に関心が集まっている。CYP3A4 の発現レベルは、個体による差が著しいにもかかわらず、今まで機能変化を伴う遺伝子多型は知られていなかった。CYP3A4 遺伝子は、染色体上 7q22.1 に位置し、13 個のエクソンを持っている。現在までにプロモーター領域に点突然変異の箇所があることが知られ、野生型遺伝子は CYP3A4*1A と、変異型遺伝子は CYP3A4*1B と名付けられている。この変異型遺伝子と前立腺がんあるいは白血病との関連が示唆されたが、機能変化を伴う変異であるという証拠はなく、最近ヒト肝臓における酵素の活性との関連を否定する報告も出された。

本研究では、CYP3A4 遺伝子の変異とその頻度を、人種の異なる 3 集団において明らかにし、変異型遺伝子の機能を、cDNA を発現させることにより評価することを目的としている。ヒト BAC ライブラリーから、CYP3A4 遺伝子を分離し、エクソン近傍のイントロンを直接シークエンスし、CYP3A4 遺伝子の全 13 エクソンとその周辺のイントロンを含む領域およびプロモーター領域をシークエンスするのに必要なプライマーを設計した。次に、健康な白人、黒人および中国人の各 20 人ずつ総計 60 人から得た検体について、これらの領域

を PCR により増幅した後、直接シークエンスすることにより、CYP3A4 遺伝子の全 13 エクソンおよびプロモーター領域の突然変異の検索を行った。いずれかの集団で頻度が 1 % 以上あると思われる変異に関しては、インフォームドコンセントを経て疫学研究のために parallel してある検体について変異の有無を調べ、人種毎に変異の頻度を算出した。また、アミノ酸置換を伴う突然変異の場合は、変異型遺伝子の機能を評価するために、野生型の cDNA に、変異と同じ場所に人工的に変異をおこさせた変異型 cDNA を作成し、バキュロウイルスを用いた発現系を用いて、ニフェジピンとテストステロンによる薬物動態の解析を行った。

CYP3A4 遺伝子の全 13 エクソンとその周辺のイントロンを含む領域およびプロモーター領域をシークエンスすることにより、全部で 4 種類の変異型遺伝子を発見した。既に知られている CYP3A4 遺伝子の 5' 側のプロモーター領域にある A が C に代わる点突然変異からなる変異型遺伝子 CYP3A4*1B は、黒人では 66.7 % と高頻度であり、白人においても 4.2 % みられたが、中国人には全くみられなかった。CYP3A4 遺伝子のアミノ酸に翻訳される領域では、3 種類の突然変異がみつかった。まず、エクソン 7 にある 222 番目のセリンがプロリンに代わる変異型遺伝子 CYP3A4*2 は、白人では 2.7 % の頻度でみられたが、黒人や中国人には全くみられなかった。エクソン 7 には、アミノ酸置換を伴わない別の変異があり、黒人にのみ認められ、その頻度は 4.7 % であった。もうひとつのまれな変異型遺伝子 CYP3A4*3 は、エクソン 12 のヘム結合部位の近傍の 445 番目のメチオニンがトレオニンに代わる点突然変異で、ひとりの中国人にのみ認められた。バキュロウイルスを用いた cDNA 発現系により、変異型遺伝子 CYP3A4*2 はニフェジピンに対して、野生型に比べると低い固有クリアランスを持つことが明らかになった。一方、テストステロンの 6β の水酸化反応に対しては、野生型と有意差は認められなかった。

本研究で新しく発見された変異型遺伝子 CYP3A4*2 を持つ人は、いずれも一方の対立遺伝子のみに限局していた。ウィルスを用いた発現系では機能変化が認められたが、実際に生体内でもこのような機能変化が起こるかはまだ明らかになっていない。ただ、セリンがプロリンに代わるアミノ酸の変化は、プロリンが helix breaker として知られる性質のため、発現される酵素の三次元構造を大きく変え得るであろうことは推測できる。バキュロウイルスを用いた発現系による薬物動態の解析から、ニフェジピンとテストステロンとでは、酵素活性に明らかな量的な差が認められた。このような基質特異性は、他の P450 でもみられ、CYP2C9 遺伝子の変異型では、ワーファリンに対する固有クリアランスは低下するのに対し、ジクロフェナックやトルブタミドにはあまり影響を及ぼさないことがわかっている。今後、CYP3A4 遺伝子の性質や疾病との関連を明らかにするには、さらに広範な疫学研究、他の基質での薬物動態の解析および *in vivo* 実験などが必要と考えられる。

本研究は、CYP3A4 遺伝子のアミノ酸置換を伴う遺伝子変異による機能変化を初めて示した例である。人種の異なる 3 集団のいずれにも、ナンセンス突然変異やスプライス部位の変

異が存在しなかったことと肝臓において CYP3A4 蛋白または酵素活性の存在しない例は知られていないことから、機能しない CYP3A4 遺伝子変異は稀であることと CYP3A4 は、生体に重篤な変化がない限り、欠損することのない必須酵素であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査教授 岸 玲子

副査教授 守内 哲也

副査教授 藤田 博美

学位論文題名

CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exon 7 and 12:evidence for an allelic variant with altered catalytic activity

(*CYP3A4 遺伝子のエクソン 7 および12のアミノ酸置換を伴う遺伝子変異－触媒活性変化を伴う遺伝子変異の証拠*)

本研究では、人種の異なる3集団（白人、黒人、中国人）における *CYP3A4* 遺伝子の全エクソンおよびプロモーター領域の変異の検索と人種毎にその頻度の算出を行い、アミノ酸変異を伴う変異型遺伝子の機能を検討した。*CYP3A4* 遺伝子の 5'側のプロモーター領域にある A が C に代わる点突然変異からなる変異型遺伝子 *CYP3A4*1B* は、黒人では 66.7% と高頻度であり、白人においても 4.2% みられたが、中国人には全くみられなかった。エクソン 7 にある 222 番目のセリンがプロリンに代わる変異型遺伝子 *CYP3A4*2* は、白人では 2.7% の頻度でみられたが、黒人や中国人には全くみられなかった。エクソン 7 には、アミノ酸置換を伴わない別の変異があり、黒人にのみ認められ、その頻度は 4.7% であった。もうひとつのまれな変異型遺伝子 *CYP3A4*3* は、エクソン 12 のヘム結合部位の近傍の 445 番目のメチオニンがトレオニンに代わる点突然変異で、ひとりの中国人にのみ認められた。バキュロウイルスを用いた cDNA 発現系により、変異型遺伝子 *CYP3A4*2* はニフェジピンに対して、野生型に比べると低い固有クリアランスを持ち、テストステロンに対しては有意な影響を及ぼさない基質特異性の機能変化が示された。

公開発表において、守内哲也教授から、BAC ライブラリーからのサブクローニングの難易、genetic sequence を 60 例全部についてインtronも含めて調べたのか、なぜDNAチップを使わなかったのか、P450 の SNPs で抗癌剤に対する感受性が異なる例があるなどについて、藤田博美教授から、Ser222Pro の立体構造、変異と酵素機能との関係、活性変化の起きる理由などについて、岸玲子教授から、テストステロン代謝に関連して前立腺癌などホルモン依存性腫瘍の疫学、特に黒人における発生頻度と遺伝子変異との関係、環境要因のデータの有無などについて質疑があった。いずれの質疑に対しても、申請者は、自らの研究に基づく経験や過去の論文の結果を引用し、妥当な回答を行った。

この論文は、シトクロム P450 遺伝子群のひとつである CYP3A4 遺伝子におけるアミノ酸置換を伴う遺伝子変異を世界ではじめて示し、それが酵素活性の変化をもたらすことを証明したもので、今後の疫学研究に多くの示唆を与えるものであった。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。