

学位論文題名

ヒトジヒドロジオール脱水素酵素（DD4）発現の 変動要因の解析：転写制御機構に基づいたアプローチ

学位論文内容の要旨

序論

ジヒドロジオール脱水素酵素 (DD) は、多環式芳香族炭化水素 (PAH) の中間代謝物である PAH *trans*-ジヒドロジオールの PAH カテコールへの脱水素反応を NAD(P)^+ 依存的に触媒する酵素である。また、DD は種々のケトン含有薬物の還元に関与している薬物代謝酵素でもある。ヒトにおいては、DD 活性を持つ分子種として DD1-DD4 の 4 分子種および type II DD の計 5 分子種が報告されている。また、これらの分子種のうち、DD4 は肝における主要な DD 分子種である。興味深いことに、ヒト肝における DD の活性には約 40 倍もの個体差があることが報告されている。この DD の活性の個体間、もしくは個体内での変化によりケトン含有薬物の代謝の個体差や発がんリスクの個体差が引き起こされる可能性が考えられる。したがって、ヒト肝における DD 活性の個体差の原因を解明することは重要であるが、その分子機構はこれまで不明であった。そこで本研究では、ヒト肝における DD 活性の個体差の原因をヒト DD4 遺伝子の転写調節機構の観点から探索し、その分子機構を明らかにすることを目的とした。

第 I 章: ヒト DD4 遺伝子の転写調節機構の解析

本章では、ヒト DD4 遺伝子の転写調節機構を解析するため、まず、ヒト DD4 遺伝子の 5'-上流 -2220 から +441 までの領域の塩基配列を解析した。決定した塩基配列を報告されている他の DD 分子種と比較したところ、ヒト *type II DD* 遺伝子の 5'-上流領域の -0.9 kb から -0.3 kb までの領域に比較的連続して保存されている塩基配列が認められ、そこにおける相同性は 76% であった。また、この領域において転写調節に関与する領域を探索し、3 箇所の転写活性化に寄与する領域および 1 箇所の転写抑制に寄与する領域を見出した。さらに、そのうちの主要な転写活性化領域 (領域 A および B) に作用する転写因子について解析し、これらの領域にはそれぞれ肝転写因子である HNF4 α , HNF4 γ および HNF1 α が結合し、HepG2 細胞におけるヒト DD4 遺伝子の転写を活性化することを明らかにした。

第 II 章: ヒト DD4 遺伝子の肝特異的な転写活性化機構の解析

本章では、肝における DD4 mRNA の発現を調節する因子として、第 I 章において同定した転写活性化に寄与する因子に加えて、ヒト DD4 遺伝子の転写抑制に寄与する因子

もまた重要な役割を担っている可能性を考えた。そのために、ヒト *DD4* 遺伝子の組織特異的な転写調節機構を肝以外の組織において転写抑制に寄与する因子に着目して解析することを通して、その転写抑制因子が、肝におけるヒト *DD4* 遺伝子の転写調節においても寄与しているか否かを検討した。内在性の *DD4* mRNA の発現の有無を指標として探索したモデル細胞である HepG2 および ACHN 細胞を用いて、両細胞におけるヒト *DD4* 遺伝子の転写調節機構の違いを比較検討したところ、細胞特異的な転写調節においても第 I 章で同定した領域 A および B が関与していることが明らかとなった。さらに、両細胞においてこれらの領域 A および B に結合する転写因子を解析し、ヒト *DD4* 遺伝子における細胞特異的な転写調節は領域 A および B に結合する転写因子の違いによって成されていることを示した。すなわち、肝以外の組織においては、vHNF1 が転写抑制因子として作用することにより、ヒト *DD4* 遺伝子の転写は抑制されていることが推測された。一方、肝においては vHNF1 と同じ結合配列を認識する HNF1 α がヒト *DD4* 遺伝子の転写に対して転写活性化因子として主に作用するため、vHNF1 の作用は小さいと考えられた。

第 III 章: *DD4* mRNA 発現量の個体差の原因の解析: 遺伝子変異と転写因子の両面から

本章では、第 I 章および第 II 章の検討により、肝におけるヒト *DD4* 遺伝子の転写調節には、転写因子 HNF1 α 、HNF4 α および HNF4 γ が主に関与していることが考えられたため、ヒト肝におけるこれらの転写因子と *DD4* mRNA 発現量との関係について解析した。まず、ヒト *DD4* 遺伝子の転写調節領域の塩基配列に多型が存在する、もしくはヒト *DD4* 遺伝子に作用する転写制御因子の遺伝子に多型が存在することが *DD4* mRNA 発現量の個体差の原因であるという仮説を立て、*DD4* mRNA の発現量を調べたヒト肝 19 検体におけるヒト *DD4* 遺伝子の 5'-上流領域およびヒト HNF1 α 、HNF4 α および HNF4 γ 遺伝子の塩基配列と *DD4* mRNA 発現量との関係について解析した。しかしながら、いずれの遺伝子においても個体差を説明できる多型は存在していなかったことから、これらの仮説は否定された。そこでさらに、ヒト *DD4* 遺伝子に作用する転写因子の発現量が個体間で異なることが *DD4* mRNA 発現量の個体差の原因であるという仮説を検証するため、ヒト肝 19 検体における HNF1 α 、HNF4 α および HNF4 γ mRNA の発現量を定量し、*DD4* mRNA 発現量との間の関係を調べた。その結果、検討した検体において、*DD4* mRNA 量と各 HNF mRNA 量との間にいずれも有意な相関性が認められたことから、これらの転写因子の発現量の違いによって *DD4* mRNA の発現量が規定されている可能性が示された。また、ヒト肝において認められた様に各 HNF の発現量が同時に変化した時、ヒト *DD4* 遺伝子の転写活性へどの様な影響をおよぼすのかを明らかにするために、各転写因子発現プラスミドの量比を保ちつつ、導入量を変化させた時のヒト *DD4* 遺伝子の転写への影響を培養細胞を用いて検討した。その結果、ヒト *DD4* 遺伝子のエンハンサー活性は検討した範囲において各転写因子発現プラスミドの導入量依存的に上昇したことから、ヒト肝においても現象としては同様の機構、すなわち同調的な発現を示す HNF1 α 、HNF4 α および HNF4 γ により *DD4* mRNA の発現量は規定されていることが推測された。

以上、*DD* 活性の個体差の原因をヒト *DD4* 遺伝子の転写調節機構の観点から探索し、

薬物代謝酵素活性の個体差の原因となり得る、新しい機構を提出することが出来た.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鎌 滝 哲 也
副 査 教 授 原 島 秀 吉
副 査 助 教 授 紙 谷 浩 之
副 査 助 教 授 有 吉 範 高

学 位 論 文 題 名

ヒトジヒドロジオール脱水素酵素 (DD4) 発現の 変動要因の解析：転写制御機構に基づいたアプローチ

申請者はヒト肝臓に存在する薬物代謝酵素の一つである DD4 の活性にみられる個体差の原因をヒト DD4 遺伝子の転写調節機構の観点から明らかに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、DD4 の発現量の個体差が、遺伝子の転写制御因子の個体間における量の違いによって規定されることを示した。本研究は薬物代謝酵素の研究、およびヒトにおける毒性学に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。

(I) ヒト DD4 遺伝子の転写調節機構の解析

ヒト DD4 遺伝子の転写調節機構を解析するため、まず、ヒト DD4 遺伝子の 5'-上流領域の塩基配列を決定した。また、この領域において転写調節に関与する領域を探索し、3 箇所の転写活性化に寄与する領域および 1 箇所の転写抑制に寄与する領域を見出した。さらに、そのうちの主要な転写活性化領域（領域 A および B）に作用する転写因子について解析し、これらの領域にはそれぞれ肝転写因子である HNF4 α 、HNF4 γ および HNF1 α が結合し、HepG2 細胞におけるヒト DD4 遺伝子の転写を活性化することを明らかにした。

(II) ヒト DD4 遺伝子の肝特異的な転写活性化機構の解析

肝における DD4 mRNA の発現を調節する因子として、転写活性化に寄与する因子に加えて、ヒト DD4 遺伝子の転写抑制に寄与する因子もまた重要な役割を担っている可能性を考え、ヒト DD4 遺伝子の肝以外の組織において転写抑制に寄与する因子を解析した。HepG2 および ACHN 細胞を用いて、両細胞におけるヒト DD4 遺伝子の転写調節機構の違いを比較検討し、ヒト DD4 遺伝子における細胞特異的な転写調節は領域 A および B と命名した領域に結合する転写因子の違いによって成されて

いることを明らかにした。すなわち、肝以外の組織においては、領域 B に vHNF1 が転写抑制因子として作用することにより、ヒト *DD4* 遺伝子の転写は抑制されていることが推測された。一方、肝においては vHNF1 と同じ結合配列を認識する HNF1 α がヒト *DD4* 遺伝子の転写に対して転写活性化因子として主に作用するため、vHNF1 の作用は小さいと考えられた。

(3) *DD4* mRNA 発現量の個体差の原因の解析：遺伝子変異と転写因子の両面から

肝におけるヒト *DD4* 遺伝子の転写調節には、転写因子 HNF1 α , HNF4 α および HNF4 γ が主に関与していることが考えられたため、これらの転写因子と *DD4* mRNA 発現量との関係について解析した。まず、ヒト *DD4* 遺伝子の転写調節領域もしくはヒト *DD4* 遺伝子に作用する転写制御因子の遺伝子に多型が存在することが *DD4* mRNA 発現量の個体差の原因であるという仮説を立て、ヒト *DD4*, HNF1 α , HNF4 α および HNF4 γ 遺伝子の塩基配列と *DD4* mRNA 発現量との関係について解析した。しかしながら、いずれの遺伝子においても個体差を説明できる多型は存在していなかったことから、これらの仮説は否定された。そこでさらに、ヒト *DD4* 遺伝子に作用する転写因子の発現量が個体間で異なることが *DD4* mRNA 発現量の個体差の原因であるという仮説を立て、ヒト肝検体における HNF1 α , HNF4 α および HNF4 γ mRNA の発現量を定量し、*DD4* mRNA 発現量との間の関係を調べた。その結果、検討した検体において、*DD4* mRNA 量と各 HNF mRNA 量との間にいずれも有意な相関性が認められたことから、これらの転写因子の発現量の違いによって *DD4* mRNA の発現量が規定されている可能性が示された。また、各 HNF の発現量が変化した時の、ヒト *DD4* 遺伝子の転写活性への影響を調べるため、各転写因子発現プラスミドの量比を保ちつつ、導入量を変化させた時のヒト *DD4* 遺伝子の転写への影響を培養細胞を用いて検討した。その結果、ヒト *DD4* 遺伝子のエンハンサー活性は検討した範囲において各転写因子発現プラスミドの導入量依存的に上昇したことから、ヒト肝においても、同調的な発現を示す HNF1 α , HNF4 α および HNF4 γ により *DD4* mRNA の発現量は規定されていることが推測された。

以上、本研究は DD 活性の個体差の原因をヒト *DD4* 遺伝子の転写調節機構の観点から探索し、薬物代謝酵素活性の個体差の原因となり得る、新しい機構を提出することに成功し、世界的にもユニークな研究を展開した。分子生化学から毒性学に到る広範な分野で極めて高く評価される。本論文『ヒトジヒドロジオール脱水素酵素 (DD4) 発現の変動要因の解析：転写制御機構に基づいたアプローチ』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。