

ヒト胎児に発現する *CYP3A7* 遺伝子の 転写制御機構に関する研究

学位論文内容の要旨

1. はじめに

チトクローム P450 (CYP) は内在性ホルモンの代謝・生合成に加え、薬物や毒物などの代謝および代謝的活性化にも関与している。CYP はスーパーファミリーを形成しており、ヒトにおいては 17 ファミリー、42 サブファミリーが存在する。この中でも、CYP3A サブファミリーが外来性異物の代謝に関わる主要臓器である肝臓と消化管に最も豊富に発現しており、様々な構造を持つ物質の代謝に関与している。ヒト CYP3A サブファミリーには、CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7 および CYP3A43 の 4 つの分子種が存在し、これらは第 7 染色体長腕 21 にクラスターを形成している。これら 4 つの分子種は類似した基質選択性を有するが、その発現臓器および発現時期は大きく異なる。

CYP3A7 はヒト胎児肝における主要な CYP 分子種であり、デヒドロエピアンドロステロン 3-硫酸抱合体やレチノイン酸などの代謝に関与している。CYP3A7 はこれら生理的に重要な内在性ホルモンの代謝に加え、様々な薬物や毒物の代謝および代謝的活性化にも関与している。マイコトキシンであるアフラトキシン B₁ やステリグマトシスチンは CYP3A7 により代謝的に活性化され遺伝子損傷を誘発するため、CYP3A7 は胎児期に生じた遺伝子変異が原因でがんが発生する経胎盤発がんにも関与する可能性が推測される。興味深いことに、CYP3A7 の発現は出生後徐々に減少し、成人肝ではほとんど認められなくなる。また、CYP3A7 の発現が肝がん組織において再活性化されることも報告されている。これらの知見から、CYP3A7 の発現を制御する分子機構は肝細胞の増殖、分化およびがん化と密接に関連している可能性が推測された。しかしながら、CYP3A7 の発現制御機構についてはこれまで不明であった。そこで本研究では、ヒト胎児に発現する *CYP3A7* 遺伝子の転写制御機構を解明することを目的とした。

2. *CYP3A7* 遺伝子の新規転写制御領域の同定

胎児肝細胞に似た特徴を有するヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用い、また、相同性の高い *CYP3A4* 遺伝子と比較することにより、*CYP3A7* 遺伝子に特異的な転写活性化領域を同定した。HepG2 細胞における *CYP3A7* 遺伝子の転写活性化には、5' 上流約 -2.3 kb に

存在する κ B 様モチーフ (3A7 κ B エンハンサー) と 5'-上流-140 b から-35 b までの領域に存在する HNF-3 β , USF1 および Sp1/Sp3 の結合配列がそれぞれ重要であった。3A7 κ B エンハンサーおよび近接プロモーターの HNF-3 β 結合配列においては, *CYP3A4* 遺伝子の対応する領域とは 1 塩基のみ異なり, これら 1 塩基置換が両遺伝子間におけるプロモーター活性の違いに重要であった。HepG2 細胞より調製した核抽出液を用いたゲルシフトアッセイの結果, この 3A7 κ B エンハンサーに結合する核内因子は Sp1 および Sp3 であった。3A7 κ B エンハンサーはこれまで同定されたいずれのエンハンサーとも異なったことから, *CYP3A7* 遺伝子に特異的な発現制御に関与する可能性が示唆された。

3. 転写因子 LSF/CP2/LBP-1c 複合体を介した *CYP3A7* 遺伝子の転写活性化機構

新規に同定した 3A7 κ B エンハンサーによる転写活性化機構についてさらに詳細に検討した。Sp1 および Sp3 の典型的な結合配列では 3A7 κ B エンハンサーの機能を代替できないこと, および, Sp1 および Sp3 が結合できない変異型 3A7 κ B 配列でもエンハンサーが認められることなどから, Sp1 および Sp3 以外の因子が 3A7 κ B エンハンサーに関与することが示唆された。ゲルシフトアッセイの結果, 3A7 κ B エンハンサーの転写活性に重要な配列には非特異的競合 DNA として加える poly(dI-dC) 感受性の因子 X が結合することがわかった。因子 X は転写因子 LSF/CP2/LBP-1c (以下, LSF) と配列特異性の低い, ゲル移動度の速い因子の複合体であることが明らかとなった。HepG2 細胞における 3A7 κ B エンハンサー活性はドミナントネガティブ LSF により約 50% まで抑制された。以上の結果から, *CYP3A7* 遺伝子は LSF を含む転写因子複合体により 3A7 κ B エンハンサーを介して転写活性化されることが示唆された。

4. C/EBP α による *CYP3A7* 遺伝子の転写抑制機構

GFP トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 解析により, 3A7 κ B エンハンサーが胎児期の肝で働くエンハンサーであることを見出した。興味深いことに, 3A7 κ B エンハンサー活性は成獣肝では抑制された。成獣マウス肝より調製した核抽出液を用いたゲルシフトアッセイの結果, 成獣マウス肝において 3A7 κ B エンハンサーに主に結合する因子は C/EBP α であることがわかった。HepG2 細胞において, C/EBP α は *CYP3A7* 遺伝子のプロモーター活性を 3A7 κ B エンハンサー依存的に約 20% のレベルまで抑制した。以上の結果から, 成熟肝細胞に高発現する C/EBP α が *CYP3A7* 遺伝子の時期依存的な転写抑制因子である可能性が示唆された。

5. まとめ

ヒト胎児に発現する *CYP3A7* 遺伝子の転写制御機構を検討し, 以下の知見を得た。

- 1) *CYP3A7* 遺伝子の転写活性化には新規な転写制御領域, 3A7 κ B エンハンサー, が重要であった。
- 2) 3A7 κ B エンハンサーの活性化には転写因子 LSF を含む複合体が重要であった。
- 3) 3A7 κ B エンハンサーは転写因子 C/EBP α により抑制された。

以上, ヒト *CYP3A7* 遺伝子の時期依存的な発現は, 転写活性化因子 LSF と転写抑制因子 C/EBP α のバランスにより制御されていることが示唆された.

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 平 敬 宏
副 査 助 教 授 山 崎 浩 史

学 位 論 文 題 名

ヒト胎児に発現する *CYP3A7* 遺伝子の 転写制御機構に関する研究

チトクローム P450 (CYP) は内在性ホルモンの代謝・生合成に加え、薬物や毒物などの代謝および代謝的活性化にも関与している。CYP はスーパーファミリーを形成しており、ヒトにおいてはCYP3Aサブファミリーが外来性異物の代謝に関わる主要臓器である肝臓と消化管に最も豊富に発現している。ヒト CYP3A サブファミリーには、CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7 および CYP3A43 の 4 つの分子種が存在する。これら 4 つの分子種は類似した基質選択性を有するが、その発現臓器および発現時期は大きく異なる。CYP3A7 はヒト胎児肝における主要な CYP 分子種であり、デヒドロエピアンドロステロン 3-硫酸抱合体やレチノイン酸などの生理的に重要な内在性ホルモンの代謝に関与している。CYP3A7 はまた、様々な薬物や毒物の代謝および代謝的活性化にも関与している。マイコトキシンであるアフラトキシン B₁ は CYP3A7 により代謝的に活性化され遺伝子損傷を誘発するため、CYP3A7 は胎児期に生じた遺伝子変異が原因でがんが発生する経胎盤発がんにも関与する可能性が推測される。興味深いことに、CYP3A7 の発現は出生後徐々に減少し、成人肝ではほとんど認められなくなる。また、CYP3A7 の発現が肝がん発症時に再活性化されることも報告されている。これらの知見から、CYP3A7 の発現を制御する分子機構は肝細胞の増殖、分化およびがん化と密接に関連している可能性が推測された。しかしながら、CYP3A7 の発現制御機構についてはこれまで不明であった。本研究では、ヒト *CYP3A7* 遺伝子の時期特異的な発現制御に関する新規な機構を提案することに成功した。本研究の成果は以下に詳述するように極めて優れたものであると評価される。

(1) *CYP3A7* 遺伝子の新規転写制御領域の同定

胎児肝細胞に似た特徴を有するヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用い、また、相同性の高い *CYP3A4* 遺伝子と比較することにより、*CYP3A7* 遺伝子に特異的な転写活性化領域を同定した。HepG2 細胞における *CYP3A7* 遺伝子の転写活性化には、5'-上流約 -2.3 kb に

存在するκB様モチーフ (3A7κB エンハンサー) と 5'-上流-140 b から-35 b までの領域に存在する HNF-3β, USF1 および Sp1/Sp3 の結合配列がそれぞれ重要であった。3A7κB エンハンサーおよび近接プロモーターの HNF-3β 結合配列においては, *CYP3A4* 遺伝子の対応する領域とは 1 塩基のみ異なり, これら 1 塩基置換が両遺伝子間におけるプロモーター活性の違いに重要であった。HepG2 細胞より調製した核抽出液を用いたゲルシフトアッセイの結果, この 3A7κB エンハンサーに結合する核内因子は Sp1 および Sp3 であった。3A7κB エンハンサーはこれまで同定されたいずれのエンハンサーとも異なったことから, *CYP3A7* 遺伝子に特異的な発現制御に関与する可能性が示唆された。

(2) 転写因子 LSF/CP2/LBP-1c 複合体を介した *CYP3A7* 遺伝子の転写活性化機構

新規に同定した 3A7κB エンハンサーによる転写活性化機構についてさらに詳細に検討した。Sp1 および Sp3 の典型的な結合配列では 3A7κB エンハンサーの機能を代替できないこと, および, Sp1 と Sp3 が結合できない変異型 3A7κB 配列でもエンハンサー活性が認められることなどから, Sp1 および Sp3 以外の因子が 3A7κB エンハンサーに関与することが示唆された。ゲルシフトアッセイの結果, 3A7κB エンハンサーの転写活性に重要な配列には非特異的競合 DNA として加える poly(dI-dC) 感受性の因子 X が結合することがわかった。因子 X は転写因子 LSF/CP2/LBP-1c (以下, LSF) と配列特異性の低い, ゲル移動度の速い因子の複合体であることが明らかとなった。HepG2 細胞における 3A7κB エンハンサー活性はドミナントネガティブ LSF により約 50% まで抑制された。以上の結果から, *CYP3A7* 遺伝子は LSF を含む転写因子複合体により 3A7κB エンハンサーを介して転写活性化されることが示唆された。

(3) C/EBPα による *CYP3A7* 遺伝子の転写抑制機構

GFP トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 解析により, 3A7κB エンハンサーが胎児期の肝で働くエンハンサーであることを見出した。興味深いことに, 3A7κB エンハンサー活性は成獣肝では抑制された。成獣マウス肝より調製した核抽出液を用いたゲルシフトアッセイの結果, 成獣マウス肝において 3A7κB エンハンサーに主に結合する因子は C/EBPα であることがわかった。HepG2 細胞において, C/EBPα は *CYP3A7* 遺伝子のプロモーター活性を 3A7κB エンハンサー依存的に約 20% のレベルまで抑制した。以上の結果から, 成熟肝細胞に高発現する C/EBPα が *CYP3A7* 遺伝子の時期依存的な転写抑制因子である可能性が示唆された。

以上, *CYP3A7* 遺伝子の新規な転写制御領域 (3A7κB エンハンサー) とこれに関与する転写活性化因子 LSF および転写抑制因子 C/EBPα を同定し, ヒト *CYP3A7* 遺伝子の時期特異的な発現制御機構に関する新しい重要な概念を提案することに成功した。本論文『ヒト胎児に発現する *CYP3A7* 遺伝子の転写制御機構に関する研究』に含まれる研究成果は薬学研究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。