◇◇平成7年度日本薬物動態学会奨励賞受賞論文◇◇

ステロイド 6 β -水酸化酵素 (CYP3A) の分子多様性と遺伝子発現

永田 清

Multiple Forms of Steroid 6 β -Hydroxylase (CYP3A) and the Gene Expression

Kiyoshi NAGATA

*Division of Drug Metabolism and Molecular Toxicology,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokoku University, Sendai*

Summary: Cytochrome P450 including in CYP3A subfamily is a major form and is induced by the treatment with several drugs in livers of humans and experimental animals. Human CYP3A forms were recently reported to relate to a half of clinical available drugs in the metabolism. To better understand the molecular mechanism of the tissue specific expression and the induction, we have purified four CYP3A forms from rat livers, and isolated their cDNAs and genes. Enzymatic properties of recombinant CYP3A forms expressed in COS-1 cells were similar to those of purified forms. Expression profile of these forms in a rat liver differed in sexes and changed during the development. In addition, extent of induction level showed different manners in individual form. Isolated genes (*P450/6 β A* and *P450/6 β B* corresponding to *CYP3A2* and *CYP3A1* genes, respectively) were analyzed nucleotide sequences of the exon-intron boundary and compared. Both genes spread of 25-35 Kb and consisted of 13 exons. Nucleotide sequences of these proximal promoter regions conserved a high similarity with each other and included three binding sites similar to a consensus sequence of hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4). By further study of CAT and gel mobility shift assays, the site (6 β A-A or 6 β B-A site) binding with HNF-4 related to the liver specific expression of *CYP3A2* or *CYP3A1* gene. Other site (6 β A-B or 6 β B-B) interacting with unknown nuclear transactors, however, related to suppressive regulation of these genes.

Key words: Cytochrome P450, CYP3A form, Cytochrome *b₅*, Purification, Recombinant enzyme, Gene structure, Liver specific expression, Induction, Hepatocyte nuclear factor 4, Suppressive element

はじめに

多剤が併用されている現在の医療体制において、薬物の相互作用を正しく把握することは、薬を投与する医療の現場のみならず薬を製造するメーカー側にも、薬の安全性あるいは有効な薬理効果を予測する上で非常に重要になっている。一般に薬物相互作用は薬力学的なものや薬動態学的な作用に分類されるが、薬物代謝が関与する薬動態学的相互作用には、主に特異的な酵素活性阻害あるいは酵素誘導が知られている。これらの分子機構は、近年多くの薬物代謝酵素およびその分子種が存在が明らかになるにつれ明らかになってきた。さらに、個々のリコンビナント酵素が市販されるようになった現在では、薬が生体中でどの薬物代謝酵素分子種により代謝されるのか、または阻害するのかを調べることは比較的簡単に

なっている。しかしながら、薬物代謝酵素誘導の詳細な分子機構については、芳香族炭化水素等の発ガン物質あるいは TCDD 等の環境汚染物質による酵素誘導 (Ah レセプターを介するもの) 以外はわかっていない。その原因の一つに高い薬物代謝活性を、ことにチトクローム P450 の高い発現を示す培養細胞系がないことによる。一般に肝臓に存在する薬物代謝酵素は初代培養細胞系にすると速やかにその発現は低下し、しかも一定の発現量を維持することは難しい。これは肝臓の組織特異的な発現機構が薬物代謝酵素の発現にも関与していると考えられる。我々は薬物代謝酵素の誘導および肝臓特異的な発現の分子機構を解明するために、早くからチトクローム P450 の CYP3A サブファミリーに属する分子種¹⁾に注目し研究を進めてきた。本論文の内容は、慶應義塾大学医学部薬理学教室においてなされた研究成果を中心にま

とめたものである。

ラット CYP3A 分子種の精製

そもそも CYP3A 分子種に著者が囚われの身となったのは10年ほど前になる。著者が NIH に留学していたときに、偶然にテストステロンの新しい代謝産物を発見したときからである。当時ラットのミクロゾームを用いてテストステロンの代謝活性を測定していた時に、245 nm と同時に 280 nm の検出器もたまたま動かしていた。その時、未変化体であるテストステロンのピークのすぐ前の位置に 245 nm では検出されないが、280 nm で検出されるピークが認められた。しかもこのピークは、フェノバルビタールやデキサメサゾン等の代表的な CYP3A の誘導剤によって大きくなることが認められた。これが酵素的に起こるのかについて種々検討したところ、やはりテストステロンの代謝産物であると思われた。そこで同じ部屋にいた Dr. Henry Sasame と共同でその代謝産物の構造 (Δ^6 テストステロン) およびその生成に P450 が (主に CYP3A 分子種) 関与することを証明した²⁾。次に反応機構を解明することになり³⁾、CYP3A 分子種を精製することになった。その当時、CYP3A 分子種の精製は試みられていたが、いずれも高い活性を有する分子は得られていなかった。著者は、そこで活性 (テストステロン 6β -水酸化) を追いつながら精製したが、最終精製品の再構成系ではやはり活性は認められなかった。Imaoka および Funae は、チトクローム b_5 (b_5)、コール酸およびリピッドにジラウリスホスファチジルコリンとホスファチジルセリンを添加した再構成系を用い、CYP3A 分子種の活性を示すことに成功した⁴⁾。その後、再構成系における b_5 および不飽和脂肪酸の要求性は CYP3A 分子種に共通した性質であることが明らかになった。著者は帰国後、ラット肝より4種の CYP3A 分子種 (P450_{6 β -1}, P450_{6 β -2}, P450_{6 β -3}, P450_{6 β -4}) を精製し、 b_5 、コール酸およびミクロゾームリピッドを用いて活性を得ることに成功した^{5,6)} (Table I)。我々が精製した P450_{6 β -1} および P450_{6 β -3} は非常に類似した分子種であり、おそらく allelic variant か発現後修飾され

た可能性が考えられるが、現在のチトクローム P450 の命名法では、これらは CYP3A2 に相当する¹⁾。また P450_{6 β -4} は CYP3A1 に、P450_{6 β -2} は CYP3A18 に対応する。以後これらの分子種はチトクローム P450 の命名法に従って述べる。

ラット CYP3A cDNA の単離および一次構造の比較

著者がクローニングを始めたきっかけは、先に述べたように精製した CYP3A 分子種ではその当時活性を得ることができず、また CYP3A18 (P450_{6 β -2}) が新規分子種であったことから、その cDNA を単離し一次構造を明らかにすること、およびリコンビナント酵素として発現させその活性を検討することを考えたことに始まる。そこで遺伝子操作技術を NCI の Frank J. Gonzalez 博士に学ぶと同時に CYP2A1, CYP2A2, CYP2D1 および CYP2B1 の P450 について共同研究を行った⁷⁻¹⁰⁾。

現在まで我々はラット肝 cDNA ライブラリーより3つの cDNA (6 β -A, 6 β -B および 6 β -C cDNA) を単離したが、これらは互いに異なった塩基配列を示し、すでに Gonzalez らによって報告されている P450PCN1 (CYP3A1 に対応) および P450PCN2 (CYP3A2 に対応)¹¹⁾ に非常に高い相同性を示した。これらより推定されたアミノ酸の配列から 6 β -A cDNA は CYP3A2 を、6 β -B cDNA は CYP3A1 をコードしていると推定されたが、6 β -A は P450PCN2 に対して2つのアミノ酸の変異が、6 β -B は P450PCN1 に対して13個のアミノ酸の変異がそれぞれ認められた¹²⁾。そこで我々が単離した cDNA と Gonzalez らが単離した cDNA のどちらが実際に我々が使用した SD 系ラットで発現しているのかをノーザンブロットングおよび RT-PCR で検討した。その結果、P450PCN1 および P450PCN2 mRNA は検出されず、6 β -A および 6 β -B cDNA mRNA は検出された¹²⁾。しかもその発現パターンは、CYP3A1 および CYP3A2 の発現パターンと一致していた。また 6 β -C cDNA は、その推定アミノ酸配列より CYP3A18 をコードしていることが示唆された¹³⁾。

Table I Effect cytochrome b_5 and lipids on testosterone hydroxylation by purified P450 forms in reconstituted systems

	P450 _{6β-1}	P450 _{6β-2}	P450 _{6β-3}	P450 _{6β-4}	CYP2A1	CYP2C11	CYP2B1
	6 β -OH	6 β -OH	6 β -OH	6 β -OH	7 α -OH	16 α -OH	16 α -OH
	(nmol/min/nmol P450)						
DLPC + b_5	0.7	1.1	0.8	1.1	15.2	23.9	5.8
Ms Lipid - b_5	2.7	9.5	2.2	2.8	13.6	25.1	5.7
Ms Lipid + b_5	28.5	20.7	10.5	8.7	20.2	23.7	5.0

DLPC : Dilauroylphosphatidylcholine, Ms: Microsomes.

CYP3A2 corresponds to P450_{6 β -1} or P450_{6 β -3}, CYP3A1 and CYP3A18 correspond to P450_{6 β -4} and P450_{6 β -2}, respectively.

これらの cDNA の塩基配列より推定されるアミノ酸配列を現在までに報告されている CYP3A 分子種のものと比較したところ、ラットの CYP3A 分子種は他のどの CYP3A 分子種に対しても 60% 以上の相同性を示していた。その中でも CYP3A18 はハムスターより単離された CYP3A10 に約 97% のもっとも高い相同性を示しており、他のものに対しては 70% 以下であった¹³⁾。一方、CYP3A18 および CYP3A10 以外の分子種は互いにはほぼ 70% 以上の相同性を示していた。このことは、CYP3A18 および CYP3A10 が他の分子種より進化の過程のより早い時期に分岐した分子種と考えられる。

CYP3A 分子種の酵素化学的性質

単離された CYP3A1 と CYP3A2 cDNA より推定されたアミノ酸配列は、すでに報告されたものとは一致しない¹¹⁾。そこで我々が単離した cDNA が、実際に活性を有す P450 をコードしているのか、そして単離した 3 種の cDNA がコードするタンパクが精製 P450 とその酵素化学的性質が一致するののかについて、これらの cDNA を異種細胞へ発現させ、精製 CYP3A 分子種とその特性について検討した。哺乳動物発現ベクターに構築したプラスミド DNA をエレクトロポレーション法により COS-1 細胞にトランスフォームした。それぞれのプラスミド DNA をトランスフォームした COS-1 細胞よりマイクロゾームを調製し、抗 CYP3A1 抗体を用いてウエスタンブロッティングを実施した。その結果、SDS-電気泳動上の移動度がラット肝マイクロゾームから精製したものに一致するバンドをそれぞれのマイクロ

ーム中に認めた。さらに我々が単離した CYP3A1 および CYP3A2 cDNA によってコードされる P450 は、テストステロンの 6 β -水酸化に対し高い活性を示し、その水酸化部位およびそれぞれの代謝速度比は精製した P450_{6 β -4}あるいは P450_{6 β -1/3} とほぼ同一であった¹²⁾ (Table II)。CYP3A18 についても P450_{6 β -2} に同様の酵素化学的性質を示した¹³⁾。また b_5 の添加により COS-1 細胞に発現した CYP3A1 および CYP3A2 は精製酵素と同様に強い活性上昇が認められたが、CYP3A18 については精製標品で認められたように約 2 倍程の活性上昇しか認められず b_5 の効果は低かった^{12,13)} (Table I, Fig. 1)。これらの結果より、我々が単離した 3 つの cDNA は、Table II に示すように先に精製した CYP3A 分子種にそれぞれ対応することが明らかとなった。一方、我々は b_5 による P450 の活性化について、ヒト肝より b_5 cDNA を単離し、ワクシニアウイルスを発現ベクターに用いて P450、P450 還元酵素および b_5 を共発現させ、リコンビナント酵素レベルでも証明した^{14,15)}。さらに第二相の薬物代謝酵素である硫酸転移酵素およびアセチル転移酵素についても、COS-1 細胞に高い活性を示すリコンビナント酵素として発現させることに成功している^{16,17)}。

性差および加齢に伴う発現変動

タンパクあるいは mRNA レベルでの検討により、各 CYP3A 分子種は肝においてそれぞれ異なった発現様式を示すことがわかってきた (Table II)。まず未処置ラットでは、CYP3A2 および CYP3A18 の発現は認めら

Table II Properties of CYP3A1, CYP3A2 and CYP3A18

	CYP3A1	CYP3A2	CYP3A18
Correspondence			
Purified form	P450 _{6β-4}	P450 _{6β-1/3}	P450 _{6β-2}
Gene	P450/6 β -B	P450/6 β -A	P450/6 β -C
Expression			
Tissue specificity	Liver	Liver	Liver
Adult male	+/-	##	##
Adult female	+/-	+/-	+/-
Effect of chemicals			
Tiriodothyronine	↓	↓	?
Growth hormone	↓	↓	↓
Phenobarbital	↑ (♂ ♀)	↑↑ (♂)	+/- (♂ ♀)
Dexamethasone	↑↑↑ (♂ ♀)	↑↑ (♂)	↑↑ (♂ ♀)
PCN	↑↑↑ (♂ ♀)	↑↑ (♂)	↑↑ (♂ ♀)
Catalytic activity			
Requirement			
Cytochrome b_5	##	##	+
Lipid	Ms lipid	Ms lipid	Ms lipid
Oxidation site			
Testosterone	6 β >>2 β >15 β	6 β >>2 β	6 β >>16 α >15 β >2 α

Fig. 1 Requirement of cytochrome b_5 for testosterone hydroxylases by recombinant CYP3A forms in COS-1 cells

The reaction mixture consisted of 25 μ g of microsomal protein from P450-expressed COS-1 cells, 0.1 U of NADPH-cytochrome P450 reductase, various concentrations of cytochrome b_5 (0, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 2, 4, 8, 20 and 40 pmol) and 5 ng of sodium cholate in 0.1 ml of 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5). The reaction was carried out at 37°C for 30 min.

○—○; COS-1 cells expressing 6 β -C protein
●—●; COS-1 cells expressing 6 β -A protein

れるが CYP3A1 はほとんど認められない。しかも CYP3A2 と CYP3A18 の発現には性差が存在し、さらに加齢とともに大きく変動する。CYP3A2 は未成熟期では雌雄ともに高い発現が認められ、成熟に伴い雄ではその発現は保持されるが、雌では非常に低いレベルまで減少する。CYP3A18 は雄ラットに特異的に発現する分子種であるが、未成熟期では僅かな発現しか認められない。また雌においては 4-8 週齢にかけて僅かな発現が認められるのみであった。我々は、肝臓におけるこれらの発現には生体中のホルモンである成長ホルモンや甲状腺ホルモンが関与することも明らかにしている。すなわちいずれのホルモンも CYP3A2 の発現に対して抑制的に作用しており¹⁸⁾、また CYP3A18 の発現も成長ホルモンによって抑制的に調節されていることがわかった。

酵素誘導

一方、これらの分子種は薬物の投与によって誘導されることが知られている。ことに CYP3A1 分子種は、未処置肝臓ではほとんどその発現は認められないが、誘導剤の投与により初めて高い発現が認められる (Table II)¹⁸⁾。その発現量は誘導剤の種類によって多少異なっている。デキサメサゾンやプレグネノロン α -カーボニトリルなどは CYP3A1 を非常に強く誘導するが、フェ

ノバルビタールではわずかな誘導が認められるのみであった¹⁸⁾。また CYP3A18 はデキサメサゾンや PCN 投与により強く誘導されるが、フェノバルビタールではほとんど誘導されないようである¹³⁾。これらの誘導の程度にも性差が認められ、CYP3A18 は雌よりも雄のほうで強い誘導が、CYP3A2 では雄のみに誘導が認められる。さらに下垂体切除によって雌でも誘導剤投与により CYP3A2 の誘導が認められることより、これらの誘導も成長ホルモンの抑制的影響を受けていると推定される¹⁸⁾。

CYP3A 遺伝子の単離および一次構造の比較

CYP3A1 および CYP3A2 の全遺伝子は、CYP3A1 cDNA をプローブとしてラット遺伝子ライブラリーより複数のクローンとして単離し、全エクソン-イントロンの解析を実施した¹⁹⁾。また CYP3A18 遺伝子は、この cDNA の 5'-上流域をプローブとして第一エクソンおよびプロモーター領域を含むクローンを単離し解析した。

第一エクソンの塩基配列から CYP3A2 および CYP3A1 cDNA に対応する遺伝子をそれぞれ P450/6 β A および P450/6 β B と命名した。Fig. 2 に P450/6 β A および P450/6 β B 遺伝子の全構造をヒト CYP3A4 のもの²⁰⁾と比較示した。P450/6 β A 遺伝子は全長約 25 Kbp に、P450/6 β B 遺伝子は全長約 35 Kbp に広がっていた。全エクソン領域の塩基配列を解析した結果、これらの塩基配列は、我々が単離した CYP3A2 および CYP3A1 cDNA の塩基配列と完全に一致していた。いずれの遺伝子も 13 個のエクソンによって構成されており、またすべてのエクソンに翻訳領域が含まれることも明らかとなった。この 13 個のエクソン構成数は、現在までに明らかにされている CYP 遺伝子のうちで最大であった。P450/6 β A および P450/6 β B 遺伝子のエクソンとイントロンの接合部位の塩基配列は、GT/AG であり、いわゆる“GT/AG 則”とよく一致していた。また GT/AG 近傍の塩基配列についても現在までにエクソン-イントロン接合部位の共通配列として知られている塩基配列をよく保持していた。

CYP3A の肝特異的活性化

P450/6 β A および P450/6 β B 遺伝子の 5'-flanking 領域の塩基配列を各々約 3.4 Kbp, 1.1 Kbp 解析し比較したところ、これらの 5'-flanking 領域は高い相同性領域が存在していた (Fig 3)。特に転写開始点より上流約 180 bp は互いに高い相同性を示した。このことは、この領域が 2 つの遺伝子に共通な発現調節に関与している可能性を示唆している。一般に TATA ボックス上流約 200 bp までの proximal promoter 領域には遺伝子の

Fig. 2 Gene structure of CYP3A forms. The vertical boxes represent exons; closed boxes and open boxes are coding and noncoding regions corresponding to the cDNA, respectively. The numbers in boxes represent the nucleotide number consisting of the individual exon. Arrows under the individual gene indicate the approximate DNA length of the introns.

基本的な活性化に関与するタンパク因子が結合すると考えられている。そこで P450/6 β A 遺伝子の 5'-flanking 領域を用いこれを CAT 発現ベクターに組み込み、ヒト肝ガン由来の HepG2 細胞を用いて CAT の転写活性を測定した。予備実験の結果より P450/6 β A 遺伝子の転写活性を促進する領域が、転写開始点より 0.48 Kb 以内に存在することが示唆され、さらにゲルシフト法により -165 bp から -73 bp の領域をプローブとした時のみに顕著なシフトバンドが認められた。そこで正確なタンパク因子の結合部位を同定するため、この領域をプローブとした DNase I フットプリント法を実施した。その結果、この 3 つの領域に転写因子の結合が認められ、これらの転写開始点側から 6 β A-A, 6 β A-B, 6 β A-C と命名した。この 3 つの部位の塩基配列は、Table III に示すように互いに高い相同性が認められた²¹⁾。

次に 6 β A-A, 6 β A-B および 6 β A-C サイトが P450/6 β A 遺伝子の肝臓での活性化に関与するのかどうかを明らかにするため、種々の長さのプロモーター領域を Basic-CAT (BCAT) ベクターに組み込んだプラスミド p-80BCAT, p-110BCAT, p-141BCAT および p-164BCAT を構築した。これらのベクターを HepG2 細胞およびマウス副腎由来の Y-1 細胞にトランスフォームし CAT 活性を測定した (Fig. 4)。HepG2 細胞中でのそれぞれの CAT 活性を比較すると 6 β A-A のみを含んだ p-110BCAT ベクターの CAT 活性が一番高く、そ

の活性は p-80BCAT および p-BCAT ベクターの活性のそれぞれ 7.4 および 67 倍であった。また 6 β A-A サイトを塩基置換したもの (Table III 6 β A-MA) では CAT 活性は 86% 減少した。6 β A-B サイトは 6 β A-A サイトと高い相同性が認められたにもかかわらず、6 β A-A と 6 β A-B サイトを含む p-141BCAT の CAT 活性はむしろ p-110BCAT のそれに比べて低下した。3 つのサイトすべてを含む p-164BCAT についても同様であった。一方、Y-1 細胞へトランスフォームしたときには 4 つのプラスミド間で CAT 活性に有意な差は認められなかった²¹⁾。

P450/6 β A 遺伝子の活性化に関与することが明らかとなった 6 β A-A サイトの塩基配列と既知の転写因子の結合塩基配列を比較すると (Table III), Hepatocyte Nuclear Factor 4 (HNF-4) のコンセンサス結合塩基配列と高い相同性が認められた。そこでゲルシフトを行い、その結果、CYP3A2 の肝における特異的発現には HNF-4 が関与することが示唆された。これに類似した配列は、P450/6 β B 遺伝子の中にも認められ、同様にゲルシフトの実験結果から 6 β B-A サイトにも HNF-4 が結合することが示唆された。したがって P450/6 β B 遺伝子の活性化にも HNF-4 が関与すると推定された。次により直接的に証明するために、HNF-4 が発現していない培養細胞に、HNF-4 をリコンビナントタンパクとして発現させ、これらの CYP3A 分子種の活性化に

Fig. 3 Comparison of 5'-flanking region of P450/6βA and P450/6βB genes.

Nucleotide sequences of the regions which showed high sequence similarity between two genes are also indicated. The sequences of 6βA-A, 6βA-B and 6βA-C sites are underlined.

ついて検討した。その結果を **Fig. 5** に示しているが、明らかに HNF-4 と 6βA-A サイトのみを含む p3A2-110BCAT を共発現した細胞で10倍以上の活性化が認められた。6βA-A サイトにさらに 6βA-B と 6βA-C サイトを含むものでは、その活性化は 6βA-A サイトのみを含むものに比べ低い値を示していた。この結果は、先に示した HepG2 細胞を用いた結果と一致していた。CYP3A1 プロモーターについても同様な実験を行ったところ、HNF-4 による活性化が認められた。一方、ヒト CYP3A4 プロモーターを用いた実験では HNF-4 の活性化は認められなかった。これらの結果からラットの CYP3A 分子種の肝特異的発現は、現在 hepatocyte-enriched transcription factor の一つとして知られている HNF-4 が、6βA-A あるいは 6βB-A サイトへの結合により活性化されるためであることが初めて明らかとなった。

P450/6βA および P450/6βB 遺伝子の 6βA-B および 6βB-B あるいは 6βA-C サイトは AGTTCA および AG (C/G) TCA のダイレトリピート構造を、さらに 6βA-B と 6βB-B サイトにはパリンδροーム様の塩基配列を含んでおり (Table III), このような配列はステロイドホルモンレセプタースーパーファミリーに属する甲状腺ホルモン、ビタミン D₃, レチノイン酸レセプターの結合サイトにみられる。6βA-B および 6βA-C サイトに結合するタンパク因子は肝臓、腎臓、肺、脳からの核抽出液中に認められ、この因子は普遍的因子だと考えられるが、このタンパク因子が既知のものなのか新しいものなのか現在のところ同定できない²¹⁾。肝臓を主要発現臓器としている apolipoprotein A1 (アポ A1) 遺伝子も TATA ボックス近傍に P450/6βA と同様に HNF-4 の結合サイトや RXRα (retinoic acid responsive receptor) 結合サイトなどのダイレトリピート構造を持ち、互い

Fig. 4 Transient expression of CAT activities by CYP3A2 deletion constructs in HepG2 and Y-1 cells. CYP3A2 deletion constructs with the CAT gene were shown schematically. Various deletion constructs (20 μ g) were cotransfected with 10 μ g of plasmid pCH110. CAT activities were normalized by β -galactosidase activity. Four independent transfections were performed for each constructs in the experiment. The mean of four independent values are shown. Relative CAT activities are calculated as ratio of BCAT activities (taken as 1) in each cell.

Fig. 5 Effect of HNF-4 on transcriptional activation of CYP3A1 and CYP3A2 promoters in Y-1 cells. CYP3A2 deletion constructs with the CAT gene are described in Fig. 4. CYP3A1 deletion construct (p3A1-164BCAT) was made with -165 bp of the proximal promoter region in Basic CAT-vector. Various deletion constructs (30 μ g) were cotransfected with 10 μ g of HNF-4 expression vector (pLEN4s) and plasmid pCH110. CAT activities were normalized by β -galactosidase activity. Four independent transfections were performed for each constructs in the experiment. The mean of four independent values are shown. Relative CAT activities are calculated as ratio of BCAT activities (taken as 1) in each cell.

に相同性の高い3箇所の塩基配列を有している。HepG2細胞を用いたアポA1遺伝子のCAT活性はこれらの3つのタンパク因子結合サイト間で相乗的に作用し、活性を増加させることが報告されている。ところがP450/6 β A遺伝子の場合にはむしろ6 β A-Bおよび6 β A-CサイトがあるとCAT活性は減少傾向を示し

た²¹⁾。6 β A-Bおよび6 β B-Bサイトへのタンパク因子の結合は、ゲルシフトの結果から2つ以上のタンパク因子が複合的に結合し、6 β A-Aあるいは6 β B-Aサイトを介したHNF-4によるこれら遺伝子の転写活性の活性化を抑制している可能性が考えられるが、実際には*in vivo*における6 β A-B、6 β B-Bおよび6 β A-Cサイトに結

Table III Consensus sequences of HNF-4

Name	Sequence	Position
6 β A-A (CYP3A2)	GAGTACCAAAGTCCAGGTGA	(-106 to -87)
6 β A-MA (CYP3A2)	GAGTACCAGATTCCAGGTGA	(-106 to -87)
6 β A-B (CYP3A2)	AGTTCATAAAGTTCATCTACA	(-119 to -140)
	→ → →	
6 β A-C (CYP3A2)	AGCTCAAGAAGGTCAAAG	(-163 to -145)
	→ → →	
6 β B-A (CYP3A1)	GAGTACCAAAGTCCACGTGA	(-107 to -88)
6 β B-B (CYP3A1)	AGTTCATGAAGTTCATCTACA	(-120 to -141)
	→ → →	
	← ← ←	
CYP3A18	TAAGCTCAAGGGTCAGTA	
CYP3A4	AGTTGGCAAAGAATCACAC	(-121 to -140)
HNF4D (TTR)	TCTCTGCAAGGGTCATCAGTAC	
AFP1 (apoCIII)	GCTGGGCAAAGGTCACCTGC	(-68 to -87)
LF-A1 (α 1-AT)	CAGGGGCTAAGTCCACTTGGCT	
Consensus	GGCAAAGGTCAT	
Sequence	T T G T C C	

Arrows indicate a direct repeat and a palindromic sequence.

合するタンパク因子の相互作用については明らかでない。

CYP3A の薬物による誘導

ポリ塩化ビフェニルや3-メチルコランズレンによる CYP1A の誘導についてはヒトとラットにおいて同様な機構が明らかにされている²²⁾。ところが薬物による CYP2B および CYP3A の誘導の分子機構は未解決のままであり進展していない。これまでに報告されている CYP1A の誘導の機構については、細胞質内に存在する受容体に薬物が結合するとその複合体は核へ移行できるようになり、核内で CYP1A 遺伝子の 5'-flanking 領域に存在する Xenobiotic Responsive Element (XRE) に結合し CYP1A 遺伝子の転写を活性化するとされている²²⁾。CYP3A の誘導の機構を解析するには、内在性の CYP3A が実際に誘導される反応系で解析をする必要があるが、現在用いられている培養細胞系において CYP2B あるいは CYP3A が誘導されるものはほとんど知られていない。このことが薬物によるこれらの誘導機構の解明を遅らせている原因である。

最近他のグループより、ラット初代培養肝細胞を用いて CYP3A1 のデキサメサゾンによる発現誘導に関与する転写因子の結合部位の同定が報告された²³⁾。この転写因子の結合部位は、我々が先に同定し報告した 6 β A-B あるいは 6 β B-B サイトに一致していた。そしてこの結合部位に常在的に結合している転写因子がデキサメサゾンにより何らかの修飾を受け、CYP3A1 遺伝子を活性化すると報告されている。この報告と我々のデータを総合すると、おそらくラットの CYP3A 分子種の発現誘導は次のような分子機構によるものと著者は推定して

いる。CYP3A1 あるいは CYP3A2 遺伝子は HNF-4 の A サイトへの結合によって転写活性化される。しかし、B サイトへの転写因子の結合により、常在的には HNF-4 によるこれらの遺伝子の活性化は抑制されている。デキサメサゾン等の誘導剤の投与は、B サイトに結合している転写因子 (複合体) にリン酸化等の修飾を引き起こしこの抑制的な制御を解除する。そのために結果的に遺伝子が活性化され酵素誘導を示す。以上述べたことはまだ推測の域を出ず、他の多くのファクターの介在も考えられ、今後の研究成果を待つところであるが、成長ホルモンや甲状腺ホルモンによるラット CYP3A 分子種の抑制的な発現調節についても同様な分子機構が存在するのかもしれない。

おわりに

近年の遺伝子操作技術の飛躍的な進歩により、多くの新しい知識の蓄積がなされてきている。薬物動態学の分野も少なからずその恩恵を受けており、その一つに各薬物代謝酵素のリコンビナントが市販され入手可能となっている。これを使うことにより比較的簡単に、薬物を代謝する分子種の同定や薬物による活性阻害の検討が可能となった。しかしながら、医療サイトにおける薬物による酵素誘導についてはほとんどわかっていない。我々は、ラット CYP3A 分子種を研究テーマとしこの分子機構の解明を試み、多少の知見を得たがまだ多くの未知の問題が残されている。今後、新しい手法の導入などによりヒトにおける CYP3A 分子種の発現誘導の分子機構を明らかにし、将来的には培養細胞中で薬物の酵素誘導が簡単にスクリーニング可能な系を確立していきたい。

本研究の機会と御指導を賜りました慶應義塾大学医学部名誉教授加藤隆一先生に厚く御礼申し上げますとともに、本研究を直接御指導、御助言いただきました東北大学薬学部衛生化学講座山添 康教授、島田美樹博士ならびに慶應義塾大学医学部薬理学教室の諸先生方、共同研究者であり遺伝子操作の技術を教えていただいたNCIのGonzalez博士およびNIHのSasame博士に心より感謝致します。さらに本研究の一部を手伝っていただいた宮田昌明博士に心より感謝致します。

文 献

- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus I. C. and Nebert D. W.: The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**: 1-42 (1996).
- Nagata, K., Liberato, D. J., Gillette, J. R. and Sasame, H. A.: An unusual metabolite of testosterone 17 β -hydroxy-4,6-androstadiene-3-one. *Drug Metab. Dispos.*, **14**: 559-565 (1986).
- Kozakwa, K., Trager, W. F., Nagata, K., Parkinson, A. and Gillette, J. R.: Isotope effect studies on the mechanism of the cytochrome P-450IIA1-catalyzed formation of Δ^6 -testosterone from testosterone. *Drug Metab. Dispos.*, **18**: 974-979 (1990).
- Imaoka, S., Terano, Y. and Funae, Y.: Constitutive testosterone 6 β -hydroxylase in rat liver. *J. Biochem.*, **104**: 481-487 (1988).
- Yamazoe, Y., Murayama, N., Shimada, M., Nagata, K., Imaoka, S., Funae, Y. and Kato, R.: A sex-specific form of cytochrome P-450 catalyzing propoxycoumarin O-depropylation and its identity with testosterone 6 β -hydroxylase in untreated rat livers: Reconstitution of the activity with microsomal lipids. *J. Biochem.*, **104**: 785-790 (1988).
- Nagata, K., Gonzalez, F. J., Yamazoe, Y. and Kato, R.: Purification and characterization of four catalytically active testosterone 6 β -hydroxylase P-450 from rat liver microsomes: Comparison of a novel form with three structurally and functionally related forms. *J. Biochem.*, **107**: 718-725 (1990).
- Nagata, K., Matunaga, T., Gillette, J., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. K.: Rat testosterone 7 α -hydroxylase Isolation, sequence, and expression of cDNA and its developmental regulation and induction by 3-methylcholanthrene. *J. Biol. Chem.*, **262**: 2787-2793 (1987).
- Gonzalez, F. J., Matsunaga, T., Nagata, K., Meyer, U. A., Nebert, D. W., Pastewka, J., Kozak, C. A., Gillette, J., Gelboin, H. V. and Hardwick, J. P.: Debrisoquine 4-hydroxylase: Characterization of a new P450 gene subfamily, regulation, chromosomal mapping, and molecular analysis of the DA rat polymorphism. *DNA*, **6**: 149-161 (1987).
- Matsunaga, T., Nagata, K., Holsztynska, E. J., Lampenson, D. P., Smith, A., Kato, R., Gelboin, H. V., Waxman, D. J. and Gonzalez, F. J.: Gene conversion and differential regulation in the rat P-450 IIA gene subfamily: Purification, catalytic activity, cDNA and deduced amino acid sequence, and regulation of an adult male-specific hepatic testosterone 15 α -hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, **263**: 17995-18002 (1988).
- Aoyama, T., Korzekwa, K., Nagata, K., Adesnik, M., Reiss, A., Lampenson, D. P., Gillette, J., Gelboin, H. V., Waxman, D. J. and Gonzalez, F. J.: Sequence requirements for cytochrome P-450IIB1 catalytic activity: Alteration of the stereospecificity and radiosensitivity of steroid hydroxylation by a simultaneous change of two hydrophobic amino acid residues to phenylalanine. *J. Biol. Chem.*, **264**: 21327-21333 (1990).
- Gonzalez, F. J., Song, B.-J., Hardwick, J. P.: Pregnenolone 16 α -carbonitrile-inducible P-450 gene family: Gene conversion and differential regulation. *Mol. Cell. Biol.*, **6**: 2969-2976 (1986).
- Miyata, M., Nagata, K., Yamazoe, Y. and Kato, R.: Structure of a gene and cDNA of a testosterone 6 β -hydroxylase (P450/6 β A encoding CYP3A2: Comparison of the cDNA with P450PCN2. *Arch. Biochem. Biophys.*, **314**: 351-359 (1994).
- Nagata, K., Murayama, N., Miyata, M., Shimada, M., Urahashi, A., Yamazoe, Y. and Kato, R.: Isolation and characterization of a new rat P450 (CYP3A18) cDNA encoding P450_{6 β -2} catalyzing testosterone 6 β - and 16 α -hydroxylations. *Pharmacogenetics*, **6**: 103-111 (1996).
- Miyata, M., Nagata, K., Yamazoe, Y. and Kato, R.: Isolation and characterization of human liver cytochrome b₅ cDNA. *Pharmacol. Res.*, **21**: 513-520 (1989).
- Aoyama, T., Nagata, K., Yamazoe, Y., Kato, R., Matsunaga, E., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. J.: Cytochrome b₅ potentiation of cytochrome P-450 catalytic activity demonstrated by a vaccinia virus-mediated *in situ* reconstitution system. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**: 5425-5429 (1990).
- Nagata, K., Ozawa, S., Miyata, M., Shimada, M., Yamazoe, Y. and Kato, R.: Isolation and expression of a cDNA encoding a male-specific rat sulfotransferase that catalyzes activation of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene. *J. Biol. Chem.*, **263**: 24720-24725 (1993).
- Nagata, K., Ozawa, S., Miyata, M., Shimada, M., Yamazoe, Y. and Kato, R.: Primary structure and molecular basis of polymorphic appearance of an acetyltransferase (AT-II) in hamsters. *Pharmacogenetics*, **4**: 91-100 (1994).
- Shimada, M., Nagata, K., Murayama, N., Yamazoe, Y. and Kato, R.: Role of growth hormone in modulating the constitutive and phenobarbital-induced levels of two P-450_{6 β} (testosterone 6 β -hydroxylase) mRNA in rat livers. *J. Biochem.*, **108**: 1030-1034 (1989).
- Miyata, M., Nagata, K., Yamazoe, Y. and Kato, R.: A gene structure of testosterone 6 β -hydroxylase (P450IIIA). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **177**: 68-73 (1991).
- Hashimoto, H., Toide, K., Kitamura, R., Fujita, S., Tagawa, S., Itoh, S. and Kamataki, T.: Gene structure of CYP3A4, an adult-specific form of cytochrome P450 in human livers, and its transcriptional control. *Eur. J. Biochem.*, **218**: 585-595 (1993).
- Miyata, M., Nagata, K., Yamazoe, Y. and Kato, R.: Transcriptional elements directing a liver-specific expression of P450/6 β A (CYP3A2) gene-encoding testosterone 6 β -hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **318**: 71-79 (1995).
- Fujii-Kuriyama, Y., Imataka, H., Sogawa, K., Yasumoto, K., Kikuchi, Y.: Regulation of CYP1A1 expression. *FASEB J.*, **6**: 706-710 (1992).
- Quattrochi, L. C., Mills, A. S., Barwick, J. I., Yockey, C. B. and Guzelian, P. S.: A novel cis-acting element in a liver cytochrome P450 3A gene confers synergistic induction by glucocorticoids plus antigluco-corticoids. *J. Biol. Chem.*, **270**: 28917-28923 (1995).