S2-05 Phenobarbital 誘導性のモルモット肝 P450 : 分子種と遺伝子構造

○山田 英之、 山本 緑、 伊藤 正一、 三瀬 雅史、 小栗 一太
九州大学薬学部

PHENOBARBITAL-INDUCIBLE GUINEA PIG CYTOCHROMES P450: ISOZYMES AND THE GENE STRUCTURE

Hideyuki YAMADA, Midori YAMAMOTO, Shoichi ITO, Masashi MISE
and Kazuta OGURI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University 62,
Fukuoka 812-82

【目 的】

Phenobarbital (PB) によるCYP2B subfamilyの誘導は、ラット遺伝子5'-上流構造とこれに相互作用する因子を中心にして解明が試みられているが (1-7)、まだ未解明の点が多い。一方、PB によるCYP2B subfamilyの誘導には著しい動物種差が存在する。すなわち、PBによるラット肝CYP2B1/2の誘導は数十倍～数百倍にも達するが、モルモット肝 CYP2B18 の増加は2倍以下の微弱なものでしかない (8, 9)。我々は、この違いを説明することが、機構解明の有力な手掛かりになると考え、この問題にアプローチしている。現在、CYP2B18 遺伝子構造を解析中であり、今回はラットCYP2B1/2 遺伝子構造との比較を報告する。またラットP450 では、CYP2B subfamily 以外の分子種にも PB 誘導性のものが知られている。そこで今回は、CYP2B 以外のモルモット肝P450 分子種の誘導性を明らかにするために検討を加えたので併せて報告する。

【実験方法】

イムノブロッティング：未処理および PB 処理雄性 Hartley 系モルモットより常法に従って肝ミクロゾームを調製した。抗モルモットCYP2B18 抗体、抗ラット CYP2C11

抗体および抗イヌ CYP3A12 抗体は当教室で調製したものを使用した。検出は peroxidase 反応に基づく呈色によって行った。DNA 配列の解析：Shotgun/dideoxy 法によって解読し、解析用ソフトAssemblerを用いて配列の連結を行った。

【結果・考察】

PB 誘導性のモルモット肝 P450 分子種：抗ラット CYP2C11 抗体によるイムノブロット分析の結果、モルモット肝ミクロゾーム中に本抗体と反応性を示す2分子種が検出された。これらのうち、電気泳動上で移動度の大きい方の分子種は、PB処理によって顕著にバンド強度が増加した。一方、抗イヌ CYP3A12抗体によるイムノブロットでは、未処理モルモットに1分子種が検出され、この分子種も PB 処理によって増加したが、その程度は顕著ではなかった。従って、モルモットにおいては PB 誘導性の主要な分子種はCYP2C subfamily に属するものと考えられた。

CYP2B18 遺伝子の構造：λFIXII モルモット遺伝子ライブラリー (STRATAGENE) より、CYP2B18 cDNA をプローブとしてスクリーニングを行った。その結果、陽性クローン1個が得られたので、スクリーニ

Fig. 1. A CYP2B gene of guinea pig and the amplification by PCR.

ングを繰り返して純化し、全長 19.1 kb の遺伝子 DNA を含むクローンを得た。クローン化した λFIX II DNA を鋳型とし、翻訳領域（ラット CYP2B2 遺伝子の第 4 エクソンに相当する領域）とベクター領域にプライマーを設定して PCR を行った結果、外来遺伝子全長をほぼ 2 分する増幅産物が得られた (Fig. 1)。このことから、単離した遺伝子は目的の CYP2B のものであることが示唆された。PCR 産物 A の配列を解析した結果、上記の結果と符合して、CYP2B18

cDNA と酷似する配列が確認された。完全に一致しないの理由は現在のところ不明であるが、シークエンスエラーの可能性も残っている。また、ラット CYP2B2 遺伝子と比較した結果、エクソン 5 および 6 に相当する領域はその長さが完全に一致した。そのほか、エクソン 7 および 8 と予想される領域についても部分的に配列を解析できた。現在、イントロンおよび上流域の配列についても解析続行中であり合わせて報告する。

[ABSTRACT]

Guinea pig liver cytochromes P450 capable of being inducible with phenobarbital (PB) was studied. Immunoblot analysis of liver microsomes showed that guinea pig CYP2C subfamily is increased markedly by PB treatment while CYP2B18 and a CYP3A isozyme are increased only slightly. To clarify the difference in inducibility between rat and guinea pig CYP2B subfamily, we performed cloning of guinea pig genomic DNA coding the CYP2B. A clone of 19.1 kb was obtained, and sequenced by Shotgun method. The result showed that our clone contains regions corresponding to exon 5, 6, 7 and 8 of rat CYP2B2 gene. The sequencing has not yet been completed, and we wish to present the sequence data in more detail than described above.

[REFERENCES]

- 1) Hen, J.-S., and Fulco, A.J., *J. Biol. Chem.*, **266**, 7864-7869 (1991).
- 2) Shaw, G.-C., and Fulco, A.J., *J. Biol. Chem.*, **268**, 2997-3004 (1993).
- 3) Ramsden, R., Sommer, K.M., and Omiecinski, C.J., *J. Biol. Chem.*, **268**, 21722-21726 (1993).
- 4) Shephard, E.A., Forrest, L.A., Shervington, A., Fernandez, L.M., Ciaramella, G., and Phillips, I.R., *DNA Cell Biol.*, **13**, 793-804 (1994).
- 5) Prabhu, L., Upadhyay, P., Ram, N., Nirodi, C.S., Sultana, S., Vatsala, P.G., Mani, S.A., Rangarajan, P.N., Surolia, A., and Padmanaban, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9628-9632 (1995).
- 6) Liang, Q., and Fulco, A.J., *J. Biol. Chem.*, **270**, 18606-18614 (1995).
- 7) Nirodi, C.S., Sultana, S., Ram, S., Prabhu, N., and Padmanaban, G., *Arch. Biochem. Biophys.*, **331**, 79-86 (1996).
- 8) Oguri, K., Kaneko, H., Tanimoto, Y., Yamada, H., and Yoshimura, H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **287**, 105-111 (1991).
- 9) Yamada, H., Kaneko, H., Takeuchi, K., Oguri, K., and Yoshimura, H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **299**, 248-254 (1992).