19S1-08

CYP3Aサブファミリーの発現調節機構における種差

○荻野 淳、古川 正幸、山崎 亨、宮田 昌明、永田 清、山添 康
東北大学大学院薬学研究科医療薬科学専攻薬物動態学分野

TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF CYP3A SUBFAMILY

Makoto OGINO, Masayuki FURUKAWA, Toru YAMAZAKI, Masaaki MIYATA,
Kiyoshi NAGATA and Yasushi YAMAZOE

Division of Drug Metabolism and Molecular Toxicology,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

【目的】CYP3Aサブファミリーは肝臓および消化管における主要なP450分子種であり、現在使用されている多数の医薬品の代謝に関与している。またその活性は種々の薬物によって誘導や阻害されることから、薬物のCYP3A活性への影響を知ることは薬物相互作用の機序を理解するという点で非常に重要である。しかし、CYP3Aサブファミリーの発現調節、特に誘導現象には顕著な種差が存在し、実験動物で得られた結果をそのままヒトに外挿することが難しい。このような種差は遺伝子の5'上流域における転写制御機構の差がその一因と考えられる。そこで我々は、ラットCYP3A1、CYP3A2およびヒトCYP3A4遺伝子の転写制御について解析し、両者の発現調節機構の差について比較検討した。

【方法】レポーター遺伝子アッセイは、レポーター遺伝子にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) およびルシフェラーゼの遺伝子を用いて行った。DNAのトランスフェクションはリン酸カルシウム法またはエレクトロポレーション法を用いた。トランスフェクション後48時間培養したのち、細胞を回収、全細胞抽出液を調製してCATおよびルシフェラーゼ活性を測定した。

【結果・考察】まず、ラット肝で強く誘導されるが、これまでに報告のなかったCYP3A1遺伝子の単離を試みた。単離したクローンのうちCYP3A1をコードしていると思われたものをP450/6βBと命名した。このP450/6βBが実際にCYP3A1をコードしていることを分子生物学的、免疫化学的および酵素学的に証明し、さらに、最近単離同定されたCYP3A23と呼ばれる分子種はCYP3A1と同じであることを明らかにした¹⁾。

次にこのCYP3A1遺伝子の5'上流域を解析し他

のCYP3A遺伝子と比較したところ、-180 bpまでの領域ではCYP3A2遺伝子と高い相同性を示した (Fig. 1)。ラット肝核抽出液を用いてゲルシフトアッセイを行った結果、CYP3A1遺伝子もCYP3A2遺伝子とほぼ同じ位置にタンパク結合部位を少なくとも3ヶ所 (下流側よりそれぞれA、BおよびCサイト) 持つことが明らかとなり、両者の転写制御機構が一部で共通している可能性が示唆された。

CYP3A2遺伝子における予備検討から、CYP3A1遺伝子およびCYP3A2遺伝子の転写制御に肝臓特異的な転写因子HNF-4 (Hepatocyte Nuclear Factor-4) のAサイトを介した関与が予測された²⁾。そこで、両遺伝子の転写制御へのHNF-4の直接的な関与を調べるためにHNF-4発現ベクターとCOS-1細胞を用いたCATアッセイを行った。その結果、CYP3A1遺伝子およびCYP3A2遺伝子はともに、Aサイトを介してHNF-4により転写活性化されることが明らかとなった³⁾。HNF-4による転写活性化はARP-1 (Apolipoprotein A1 Regulatory Protein 1) およびEAR-3 (v-ErbA-Related Protein 3) といった転写因子によって競合的に阻害されることが知られている。そこでこれらの因子によるCYP3A1遺伝子の転写制御について検討した。予想に反して、CYP3A1遺伝子ではAサイトへのARP-1 およびEAR-3の結合は認められず、Bサイトに結合してHNF-4による転写活性化を抑制的に調節していることが明らかとなった³⁾。このBサイトは、昨年新たに発見されたPXR (Pregnane X Receptor)の結合サイトでもあり⁴⁾、これら複数の転写因子による複合的制御が予想された。

PXRの結合サイトはCYP3A4遺伝子中にも確認されており⁵⁾、またヒトPXRとマウスPXRと

では薬物への応答性が異なることから、CYP3A誘導能の種差の原因の一つはこのPXRの応答性の差が考えられている。我々はラットPXR cDNAを単離解析し、これがマウスPXRと高い相同性を示すことを明らかにした。5'上流域の構造自体がラットとヒトでは相同性が低く (Fig. 1)、実際PXRの結合サイトの位置はCYP3A1およびCYP3A2遺伝子とCYP3A4遺伝子とは異なる。この点も両者の転写制御の違いの原因になっているのではないかと考えられる。そこでCYP3A4遺伝子の転写制御について検討した。CYP3A4遺伝子をプロモーター領域を改変せず本来に近い形のコンストラクトを作製し、HepG2細胞におけるレポーター遺伝子の発現を調べた。その結果、CYP3A4遺伝子は少なくともプロモーター領域ではラットCYP3A1およびCYP3A2遺伝子とは異なり、HNF-4によって転写活性化されないことが示唆された。またリファンピシンなどの薬物による誘導もHepG2細胞においてはほとんど観察さ

れなかった。この細胞でのPXRの発現はRT-PCRによって確認された。ところが、CYP3A4遺伝子はARP-1およびEAR-3によって強く転写活性化されることが、我々の検討から示唆された。従って、この誘導能の欠如はHNF-4やPXRの欠如ではなく別の機能の欠落によるのではないかと推定された。この点に関してはさらに詳細な検討を進めている。以上のことから、CYP3Aサブファミリーの発現調節の種差、特にラットとヒトにおける差は、PXRの応答性の差だけではなくプロモーター領域での転写制御の差にもよることが示唆された。

このようなことから、CYP3A4遺伝子の誘導能を評価する系としてHepG2細胞そのものでは不十分であると考え、我々はアデノウイルスをベクターに用いた*in vivo*レポーター遺伝子アッセイ系を構築し、実験動物を利用した*in vivo*でのCYP3A4遺伝子の転写制御について検討した。

-180			PXR-RXR					
CYP3A4	-----CTCAT	AGAATATGAA	CTCAAAGGAG	GTCACTGAGT	GGTGTGTGTG	TGATCTCTTTG	CCACATCTCA	AGGTG
CYP3A2	GATGCCACAC	AGAATGTITAG	CTCAA-GAAG	GTCA-AA-GA	AGC-TGTAGA	TGA-ACITTTA	TGAAGTGTCT	AGGGG
CYP3A1	-ACGCCAACC	AGAATGTITAA	CTCAAAGGAG	GTCA-AAATTA	GGC-TGTAGA	TGA-ACITTTA	TGAAGTGTCT	AGGGG
ARP-1, EAR-3, PXR-RXR								
CYP3A4	GAGA-AGCCT	C---TTTCCA	CTGCAGGAG	AGCACAGGTG	GGCTGTCTAC	TGGCTGCAGC	TCCAGCCCTG	CCTCC
CYP3A2	AAGGAGTAC	CAAAGTCCAG	GTG-AGCCAG	AG-----GTG	ATCCATCTAC	TGGTGTGGATC	CCTGGTGGCA	CCCAT
CYP3A1	AAGGAGTAC	CAAAGTCCAC	GTG-AGCCAG	AG-----GTG	ATCCATCTAC	TGGCTGGATC	CCTGGTGGCA	CCCAT
HNF-4			-1					
CYP3A4	TTTCTCTAGCA	TATTAACAAT	CCA--ACAGC	CTCACTGAAT	C			
CYP3A2	CTTTCCAGCA	TATTAATTAAT	GCAGGCTGGC	CTCAGTGCAG	C			
CYP3A1	CTTTCCAGCA	TATTAATTAAT	GCAGGCTGGC	CTCAGTGCAG	-			
TATA								

Fig.1 Alignment of 5'-flanking regions of CYP3A genes

【Abstract】 A CYP3A1 gene, which encodes testosterone 6 β -hydroxylase in rats, is isolated and analyzed. This gene encodes an active P450 form also corresponding to CYP3A23¹⁾. The promoter region of CYP3A1 gene contains three binding sites (A, B and C site) for liver nuclear proteins similar to CYP3A2 gene^{1, 2)}. Both CYP3A1 and CYP3A2 genes are transactivated by HNF-4 through A sites, in COS-1 cells co-transfected with a HNF-4 expression vector³⁾. The HNF-4-mediated activation of CYP3A1 gene is suppressed by ARP-1 and/or EAR-3 through B site without competition with HNF-4. The B site is known as a binding site for PXR-RXR heterodimer⁴⁾. The PXR-RXR binding site also exist in CYP3A4 gene⁵⁾ but its position differs from that of CYP3A1 gene. The homology of the 5' region from -1 bp to -180 bp is low between two genes. A CYP3A4-reporter fused gene is not activated in the presence of inducer, rifampicin, in HepG2 cells, which expresses native HNF-4 and PXR, although the CYP3A4-reporter fused gene is activated by ARP-1 and/or EAR-3. These results suggest, in addition to PXR response, that the different induction profile CYP3A1 and CYP3A4 may be arisen from species-specific transcriptional regulation by nuclear factors.

【Reference】 1) Nagata, K. *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **362**, 242-253 (1999). 2) Miyata, M. *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **318**, 71-79 (1995). 3) Ogino, M. *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **362**, 32-37 (1999). 4) Kliewer S. A. *et al.*, *Cell*, **92**, 73-82 (1998). 5) Lehmann J.M. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **102**, 1016-1023 (1998)