

ヒトCYP3A4遺伝子の転写活性化に関わるトランスア クチベーターおよびシスエレメントの研究

著者	高田 智成
号	345
発行年	2003
URL	http://hdl.handle.net/10097/15633

氏名（本籍） 高 田 智 成

学位の種類 博 士 (薬 学)

学位記番号 薬博第 345 号

学位授与年月日 平成16年3月25日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

研究科、専攻 東北大学大学院薬学研究科
(博士課程) 医療薬科学専攻

学位論文題目

ヒト *CYP3A4* 遺伝子の転写活性化に関わるトランスアクチベーター
およびシスエレメントの研究

論文審査委員 (主査) 教授 山 添 康

教授 永 沼 章

助教授 関 政 幸

論文内容要旨

CYP3A4 はチトクローム P450 の中でもヒト肝および小腸における主要な薬物代謝酵素である。CYP3A4 は現在使用されている多数の医薬品の代謝に関与するとともに、その活性が薬物によって誘導あるいは阻害されるために大きく変動することが知られている。このような薬物代謝酵素活性の誘導あるいは阻害は、複数の薬物が同時に投与されることの多い現在の薬物療法において、薬物間相互作用を引き起こす原因の一つとして大きな問題となっている。しかしながら、CYP3A4 の誘導あるいは阻害の分子機序、特に誘導に関しては不明な点が多く残っており、この薬物相互作用を事前に予測するためには CYP3A4 の誘導機構を解明することが重要な課題である。1998 年、ヒトおよび実験動物の CYP3A 分子種の発現および誘導に関わる新規オーファンレセプターとして pregnane X receptor (PXR; NR112) が報告された。PXR はステロイドホルモン受容体の一種であり、CYP3A 分子種の転写活性化においてホモニ量体ではなく、同じくステロイドホルモン受容体である retinoid X receptor α (RXR α ; NR2B1) とヘテロ二量体を形成し、TGA (A/G) CT の塩基配列に特徴付けられる PXR 応答配列を介してトランスアクチベーターとして機能すると考えられている。

一方、当研究室ではラット *CYP3A1* 遺伝子を CYP3A 誘導の詳細な分子機序を解明するための誘導モデルとして研究を行い、そのプロモーター領域には 3 つのシスエレメント (TATA box よりも近いものから A, B, C site) が存在することを明らかにした。B site および C site は PXR 応答配列であると報告されているが、PXR と相互作用しうる転写因子として RXR α だけでなく、apolipoprotein AI regulatory Protein-1 (ARP-1; NR2F2) や v-ErbA related protein-3 (EAR-3; NR2F1) といったオーファンレセプターが *CYP3A1* 遺伝子の B site および C site に結合し、*CYP3A1* の誘導に関わっている可能性を明らかにした。

本研究ではこれらの知見を基に、ラット *CYP3A1* 遺伝子とヒトの *CYP3A4* 遺伝子の転写活性化の挙動を比較することで転写活性化機構の解析を行った。*CYP3A4* 遺伝子のプロモーター領域には *CYP3A1* 遺伝子の C site に相当する proximal everted repeat separated by six nucleotide (proximal ER-6) が存在する。一方、*CYP3A4* 遺伝子の転写開始点より約 7.7knt 上流のエンハンサー領域に distal nuclear receptor binding element-1 (dNRI) が存在することが報告され、その塩基配列は *CYP3A1* 遺伝子の B site に類似しており、ともに direct repeat separated by three nucleotides (DR-3) モチーフを有している。PXR は proximal ER-6 および dNRI に結合して *CYP3A4* 遺伝子の転写活性化に大きく寄与していると考えられており、*CYP3A4* 遺伝子も *CYP3A1* 遺伝子と同様にこれらの類似したシスエレメントによって転写制御が行われているだけでなく、ARP-1 などのステロイドホルモン受容体が転写活性化に関わると予想された。培養細胞を用いたレポーターアッセイによる解析の結果、*CYP3A1* 遺伝子と *CYP3A4* 遺伝子の転写活性化にはともに ER-6 および DR-3 モチーフからなる PXR 応答配列がシスエレメントとして重要な役割を果たし、それぞれの機能も類似していると示唆された。また、*CYP3A4* 遺伝子の転写活性化に関わるトランスアクチベーターについて解析を行った結果、PXR は誘導物質による応答に関わるだけでなく *CYP3A4* の常在的な発現にも強く関わっている可能性が示唆された。また、RXR α および ARP-1 もこの常在的な発現に寄与するトランス

アクチベーターである可能性が考えられた。

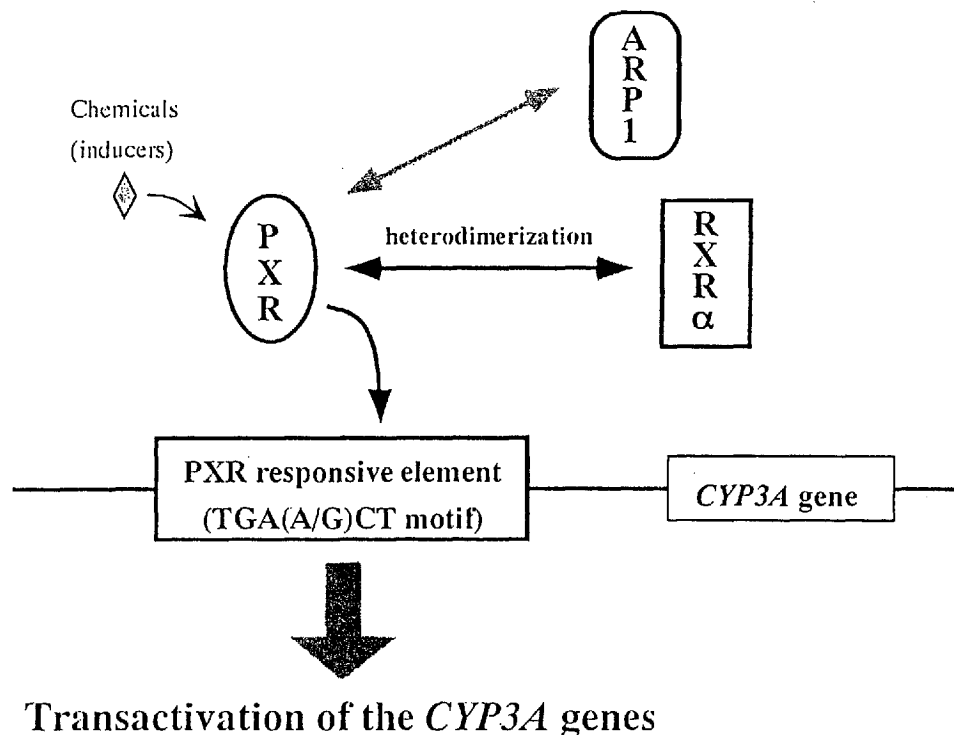


Fig. 1 Transactivation of the *CYP3A* genes by steroid hormone receptors.

PXR; pregnane X receptor, RXR α ; retinoid X receptor α , ARP-1; apolipoprotein AI regulatory protein-1

しかしながら、*CYP3A1* 遺伝子と *CYP3A4* 遺伝子の転写活性化を詳細に比較した結果、その転写活性化の挙動は完全に同一ではなく、一部に違いが認められた。特に、*CYP3A4* 遺伝子の転写活性化は proximal ER-6 および dNRI だけでは不十分である可能性が示された。すなわち、*CYP3A4* 遺伝子の転写活性化および誘導物質に対する応答には従来から報告されている proximal ER-6 および dNRI などとは別に未知のシスエレメントが関わっていると考えられた。そこで、さらに詳細な解析を行った結果 *CYP3A4* 遺伝子の約 7.6knt 上流に PXR 応答配列に類似した構造を発見し、これを a major inducer responsive element of the *CYP3A4* gene (mIE3A4) と名付けた。

mIE3A4 には PXR-RXR α ヘテロ二量体の結合が認められただけではなく、PXR による転写活性化およびリファンピシンやクロトリマゾールのような誘導物質に対する応答にも強く関わりと示唆された。mIE3A4 には複数の PXR 応答配列およびステロイドホルモン受容体応答配列からなる複雑な構造が存在するが、この中でも mIE3A4 $\epsilon\alpha$ と名付けた direct repeat separated by four nucleotide (DR-4) モチーフが PXR による転写活性化並びに誘導物質に対する応答に最も強く関わるシスエレメントである可能性が示唆された。また、リファンピシンに対する応答において mIE3A4 $\epsilon\alpha$ の存在は不可欠であったのに対し、クロトリマゾールでは mIE3A4 $\epsilon\alpha$ が存在しなくとも転写活性化が認められ、mIE3A4 $\epsilon\alpha$ 以外にも誘導物質に対する

応答に関わるシスエレメントが mIE3A4 に含まれている可能性が考えられた。このことはまた、転写活性化におけるリファンピシンとクロトリマゾールではその作用機序が異なる、すなわち CYP3A4 遺伝子の転写活性化には複数の機序が存在する可能性を示唆している。

本研究の結果より、mIE3A4 は PXR による CYP3A4 遺伝子の転写活性化および薬物による誘導において最も重要な役割を担うシスエレメントであることを明らかにした。

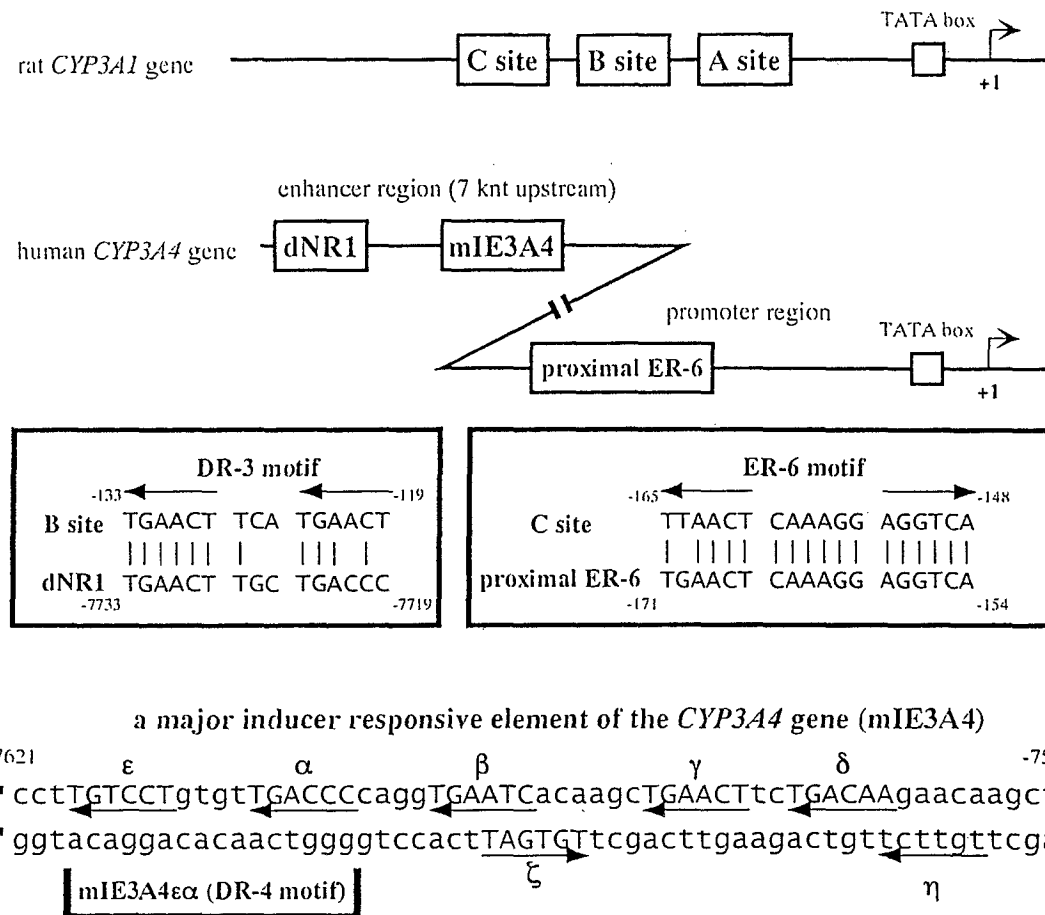


Fig. 2 Gene structures and DNA sequences of PXR responsive elements of rat *CYP3A1* and human *CYP3A4* gene.

Gene structures of both genes are not drawn to accurate scale. dNR1; distal nuclear receptor binding element-1, DR-3; direct repeat separated by three nucleotides, ER-6; everted repeat separated by six nucleotides, DR-4; direct repeat separated by four nucleotides.

審査結果の要旨

薬物相互作用を事前に予測するためにはCYP3A4の誘導機構を解明することが重要な課題である。CYP3A分子種の発現および誘導に関わる新規オーファンレセプター、pregnane X receptor (PXR; NR1I2)はステロイドホルモン受容体の一種であり、CYP3A分子種の転写活性化においてホモ二量体ではなく、同じくステロイドホルモン受容体であるretinoid X receptor α (RXR α ; NR2B1)とヘテロ二量体を形成し、TGA(A/G)CTの塩基配列に特徴付けられるPXR応答配列を介してトランスアクチベーターとして機能するとされている。本研究ではラットCYP3A1遺伝子とヒトCYP3A4遺伝子の転写活性化の挙動を比較することで転写活性化機構の解析を行った。培養細胞を用いたレポーターアッセイによる解析の結果、CYP3A1遺伝子とCYP3A4遺伝子の転写活性化にはともにER-6およびDR-3モチーフからなるPXR応答配列がシスエレメントとして重要な役割を果たし、それぞれの機能も類似していると示唆された。また、CYP3A4遺伝子の転写活性化に関わるトランスアクチベーターについて解析を行った結果、PXRは誘導物質による応答に関わるだけでなくCYP3A4の常在的な発現にも強く関わっている可能性が示唆された。また、RXR α およびARP-1もこの常在的な発現に寄与するトランスアクチベーターである可能性が考えられた。しかしながら、CYP3A1遺伝子とCYP3A4遺伝子の転写活性化を詳細に比較した結果、その転写活性化の挙動は完全に同一ではなく、一部に違いが認められた。そこで、さらに詳細な解析を行った結果CYP3A4遺伝子の約7.6 knt上流にPXR応答配列に類似した構造を発見し、これをa major inducer responsive element of the CYP3A4 gene (mIE3A4)と名付けた。本研究の結果より、mIE3A4はPXRによるCYP3A4遺伝子の転写活性化および薬物による誘導において最も重要な役割を担うシスエレメントであることが明らかとなった。

以上の研究は、CYP3A酵素の誘導機序の解明だけでなく薬物相互作用の予測への寄与が期待され、博士論文として十分に値すると判断される。