

ヒト CYP4B1 mRNA 発現の臓器差

菅原 実香, 比内 雄大, 平塚 真弘, 佐々木崇光, 金野由美子, 水柿 道直*

Tissue distribution of the human CYP4B1 mRNA expression

Mika SUGAWARA, Yudai HINAI, Masahiro HIRATSUKA, Takamitsu SASAKI, Yumiko KONNO,
and Michinao MIZUGAKI

(Received November 22, 2005)

The cytochrome P450 enzymes (CYP) play important roles in the metabolism of many therapeutic agents and environmental compounds. Differences in the activities of these enzymes are thought to be responsible for individual variability in drug response and/or toxicity. Among the CYP enzymes, the isoform CYP4B1 is of particular interest and involved in the metabolism of several protoxins such as 2-aminoanthracene and 2-aminofluorene, all of which are bladder carcinogens. The present study compared the relative expression pattern of CYP4B1 in cDNA panels of human tissues. We developed an assay for CYP4B1 mRNA by performing real-time RT-PCR. Using this method, CYP4B1 mRNA levels were analyzed in human tissues. CYP4B1 mRNA was selectively expressed in lung, bladder, and prostate. These findings suggest that a high expression of CYP4B1 increases the risk of tumor by activation of carcinogenic compounds.

Key words — CYP4B1; tissue distribution; mRNA; real-time RT-PCR

はじめに

Cytochrome P450 (CYP) は遺伝子スーパーファミリーを形成し, 多くの分子種の存在が知られている。それらは薬物や化学物質などの外因性物質, ホルモンや生理活性物質のような内因性物質の代謝及びステロイドの生合成に関与している。その中でも CYP4 ファミリーは, 脂肪酸やプロスタグランジン類などの内在性基質の代謝活性を示すことが知られている¹⁾。その分子種の一つである CYP4B1 は, バルプロ酸などの薬物代謝や前発癌物質である 2-アミノフルオレンや 2-ナフチルアミンなどの芳香族アミン類の代謝活性化に関与していることが知られている^{2,3)}。

CYP4B1 は肺, 胎盤及び膀胱における発現が報告されており^{4,5)}, 主に肝臓での薬物代謝に関与している CYP1, 2 及び 3 ファミリーと異なる

発現パターンが認められている。また, CYP4B1 はラットやウサギの膀胱において, 前発癌物質の代謝活性化を触媒することから, 膀胱癌のリスクファクターと考えられている。ヒトにおいては, 膀胱癌患者における膀胱組織の CYP4B1 mRNA 発現量は健常人に比べて高く, 膀胱癌患者の CYP4B1 タンパクの発現レベルの高さが注目されている³⁾。よって, ヒトにおいても CYP4B1 が様々な臓器の発癌に関与している可能性がある。

しかし, ヒトの各臓器における CYP4B1 の mRNA 発現パターンは, これまでに詳細に検討されていない。そこで今回, リアルタイム RT-PCR 法を用いて, ヒト CYP4B1 mRNA の定量系を作製し, ヒトにおける各臓器の mRNA 定量を行った。

実験材料及び実験方法

1. プライマーの配列

今回用いたプライマーの配列を以下に示した.

4B1-TOPO-F:	5'-caccatggtgccagcttctctcctgag-3'
4B1-TOPO-R:	5'-ctacttcccagaccaggcccagtggtt-3'
M13F30:	5'-cagtcacgacgttgtaaacgacggccag-3'
M13R(30)V2:	5'-gggcccagagctgccaggaaacagctatgac-3'
4B1-SF1:	5'-agctgtgtacagccgtggggaccctaagg-3'
4B1-SF2:	5'-atgacttcatctactggctcaccacatgg-3'
4B1-SF3:	5'-ctgaccatgtgcatcaaggagagcttcc-3'
4B1-SR1:	5'-tgcaggtagagaccggccatccacaaagg-3'
4B1-SR2:	5'-ccttccgctccctgatgacctggtctgt-3'
4B1-SR3:	5'-aaccaattggcccctcaagaaccagc-3'
4B1-RF2:	5'-accatgtgcatcaaggagag-3'
4B1-RR2:	5'-gggatggcgtttggatg-3'
GAP-TF3:	5'-gaaggtgaaggtcggagtc-3'
GAP-TR3:	5'-gaagatggtgatggatttc-3'
GAP-CF3:	5'-gagccacatgctcagacacc-3'
GAP-CR3:	5'-tgattttggaggatctcgtc-3'

2. リファレンス配列

CYP4B1 mRNA のリファレンス配列として, GenBank の NM000779 及び BC017758 を用いた.

3. CYP4B1 の cDNA クローニング

3-1. PCR による CYP4B1 cDNA の増幅

Human Lung cDNA Library (TaKaRa) を TE で 20 倍希釈し, これをテンプレートとして用いた. 反応液組成は Template DNA 1.0 μ L, $MgCl_2$ を含有する GeneAmp High Fidelity 10 倍濃度 PCR Buffer 2.0 μ L, 10 μ M Forward primer (4B1-TOPO-F) 0.5 μ L, 10 μ M Reverse primer (4B1-TOPO-R) 0.5 μ L, GeneAmp dNTP Mix 2.0 μ L, GeneAmp High Fidelity Enzyme Mix 0.5 μ L を混合し, 全量 20.0 μ L となるように調製した. 反応は, 変性を 94 $^{\circ}C$ で 15 秒間, アニールを 55-65 $^{\circ}C$ で 30 秒間, 伸長反応を 68 $^{\circ}C$ で 60 秒間のサイクルを 30 サイクル行い, 72 $^{\circ}C$ で 7 分間処理した.

3-2. アガロースゲル電気泳動による PCR 産物の確認と PCR 産物の精製

PCR 産物は 1% アガロースゲルを用いて 100V, 30 分間電気泳動を行った. エチジウムブロマイドで染色し, UV 照射によりバンドを確認した. 泳動槽には i-Mupid (コスモバイオ) を, 泳動用緩衝液として TAE を用いた. 55 $^{\circ}C$ でアニールを行った PCR 産物において, より濃いバンドが確認できたため (Fig. 1), この PCR 産物を Montage PCR Centrifugal Filter Devices (日本ミリポア) により精製した.

3-3. PCR 産物のライゲーション及びトランスフォーメーション

クローニングベクター (pENTR/D-TOPO) 0.5 μ L を用い, 精製した PCR 産物 2.0 μ L, Salt solution 0.5 μ L を加え, 室温で 5 分間インキュベートしライゲーションを行った. 次に, 調製した反応液 1 μ L を TOP10 大腸菌コンピテントセル 25 μ L に加え, 30 分間氷上でインキュベートし, 42 $^{\circ}C$ で 30 秒間 heat shock によりトランスフォーメーションを行った. これに S.O.C. Medium を 125 μ L 添加後, 37 $^{\circ}C$ で 1 時間, 200 rpm で振とう培養した. その後, 反応液を 50 μ L, 100 μ L に分けてカナマイシン含有 LB 寒天プレートにスプレッドし, 37 $^{\circ}C$ で 16 時間培養した.

3-4. PCR によるインサートの確認

単一のコロニーを滅菌した爪楊枝でピックアップし, 20 μ L の滅菌精製水を入れたマイクロチューブ内で溶出後, 100 $^{\circ}C$, 10 分間インキュベートすることで大腸菌を溶菌し, プラスミドを取り出した. このプラスミドを鋳型とし, PCR によるインサートチェックを行った. 反応液組成は Template DNA 3.0 μ L, 10 μ M Forward primer 0.5 μ L, 10 μ M Reverse primer 0.5 μ L, 2 倍濃度 Ampli Taq Gold PCR Master Mix 10.0 μ L を混合し, 全量 20.0 μ L となるように調製した. Primer は 4B1-TOPO-F, 4B1-TOPO-R の組み合わせ及び M13F30, M13R (30) V2 の組み合わせの 2 種類を用いた. 反応条件は, 95 $^{\circ}C$ で 10 分間処理後, 95 $^{\circ}C$ で 15 秒間, 55 $^{\circ}C$ で 30 秒間, 68 $^{\circ}C$ で 60 秒間

のサイクルを30サイクル行い、72℃で7分間処理した。その後、1%アガロースゲルを用いて100 V、30分間電気泳動を行い、インサートの確認を行った。また、単一のコロニーをピックアップする際、新たに用意したLB寒天培地に大腸菌を移植し、再度培養した。

3-5. 液体培養及びプラスミド精製

インサートが確認されたコロニーをピックアップし、2 mLカナマイシン含有液体培地に移植し、37℃で18時間、200 rpmで振とう培養した。プラスミド精製はWizard Plus SV Minipreps DNA Purifications System (Promega) を用いた。液体培地で培養した大腸菌を10,000 × gで5分間遠心し、上清を取り除き、Cell Resuspension Solutionを250 μL加えて懸濁させた。その後、Cell Lysis Solutionを250 μL加え、4回倒置混和し、室温で5分間インキュベートした。次に、Alkaline Protease Solutionを10 μL加え、4回倒置混和し、室温で5分間インキュベート後、Neutralization Solutionを350 μL加え倒置混和し、14,000 rpmで10分間遠心した。上清850 μLをSpin Columnに移し、14,000 rpmで1分間遠心した後、Column Wash Solutionを750 μL加え14,000 rpmで1分間遠心した。再度Column Wash Solutionを250 μL加え、14,000 rpmで2分間遠心した後、Spin Columnをマイクロチューブに乗せ、14,000 rpmで1分間遠心した。再び、Spin Columnを新たにマイクロチューブに移し、Nuclease-Free Waterを100 μL加え、14,000 rpmで1分間遠心し、プラスミドを溶出した。なお、これらの試薬はキット付属品を用いた。その後、吸光度測定器によりプラスミド溶液の濃度を測定した。

3-6. シークエンス解析

96℃で1分間前処理した精製プラスミドを2.5 μL、2.5倍濃度Buffer*を1.0 μL、10 μM primerを0.5 μL、DTCS Quick Start Master Mix 1.0 μLを混合し、全量5.0 μLとなるように反応液を調製した。反応は、96℃を20秒間、50℃を20秒間、60℃を4分間のサイクルを40サイクル行った。

シークエンス反応後、反応物中の未反応蛍光色素の除去と濃縮の目的でエタノール沈殿を行い、SLSに溶解した後にDNAシークエンサーで塩基配列を解析した。解析条件はInjection Timeを15秒間とし、Separation Timeを85分間とした。シークエンスプライマーは、4B1-TOPO-F、4B1-TOPO-R、4B1-SF1、4B1-SF2、4B1-SF3、4B1-SR1、4B1-SR2及び4B1-SR3の8種類を用いた。2.5×倍濃度Buffer*: 200 mM Tris-HCl (pH 9.0)、5.0 mM MgCl₂

4. 検量線の作製

シークエンス解析により、CYP4B1 cDNAの配列が確認できたものをcDNAクローン挿入プラスミドとした。そのプラスミドが得られたコロニーを新たにLB寒天培地と液体培地に移植し、それぞれ前述と同様

$$\text{コピー数/L} = \frac{\text{吸光度}(A_{260}) \times \text{希釈倍数}}{A \times 15300 + C \times 7400 + G \times 11800 + T \times 9300} \times 6.02 \times 10^{23}$$

の方法で培養を行った。液体培地についてはプラスミドを精製した後に、吸光度測定器を用いてプラスミド溶液の吸光度を測定した。そのプラスミド溶液のコピー数を、上記の式により求めた。なお、A、C、G、Tは、それぞれ塩基配列上のアデニン、シトシン、グアニン、チミンを示す。

求めたコピー数から 1.97×10^6 、 1.97×10^5 、 1.97×10^4 、 9.85×10^3 、 1.97×10^3 、 9.85×10^2 及び 1.97×10^2 の7段階の希釈系を調製し、検量線を作製した。

5. 膀胱由来RNAのReverse Transcription

ヒト膀胱総RNAを鋳型として、TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0を用い逆転写反応を行った。反応液組成はTemplate RNA 1.0 μL、MgCl₂ 2.0 μL、10×RT Buffer 1.0 μL、RNase Free dH₂O 3.75 μL、dNTP Mixture 1.0 μL、RNase Inhibitor 0.25 μL、Oligo dT-Adaptor Primer 0.5 μL、AMV Reverse Transcriptase XL 0.5 μLを混

合し, 全量10.0 μL となるように調製した. 反応条件は, 伸長反応を55°Cで30分間, 酵素の変性を99°Cで5分間, 最後に5°Cで5分間処理した.

6. リアルタイムRT-PCR法による mRNA 定量

Human MTC Panel I 及び Human MTC Panel II による cDNA 及びヒト膀胱 cDNA をテンプレートとして, リアルタイム RT-PCR 法により CYP4B1 mRNA を定量した. 検量線用 cDNA クローン及び Panel cDNA については, テンプレート cDNA 1.0 μL , H₂O 13.6 μL , 10 μM Forward primer (4B1-RF2) 0.2 μL , 10 μM Reverse primer (4B1-RR2) 0.2 μL , SYBR Green PCR Master Mix 15.0 μL を混合し, 全量 30 μL となるように反応液を調製した. 一方, 膀胱 cDNA は, テンプレート cDNA 2.0 μL , H₂O 12.6 μL , 10 μM Forward primer (4B1-RF2) 0.2 μL , 10 μM Reverse primer (4B1-RR2) 0.2 μL , SYBR Green PCR Master Mix 15.0 μL を混合し, 全量 30 μL となるように反応液を調製した. 反応条件は 50°C で 2 分, 95°C で 10 分処理後, 変性を 95°C で 15 秒間, アニールリング及び伸長反応を 60°C で 1 分間のサイクルを 35 サイクル行った. サイクルごとに検出した蛍光シグナルをプロットすることにより得られた増幅曲線において, ベースラインより上の指数関数的増幅が認められる領域で threshold cycle (Ct) を測定し, 検量線用 cDNA クローン挿入プラスミドの Ct に対してそのテンプレートコピー数の常用対数を取った負の直線を検量線とした. 個々の増幅曲線から得られた Ct より鋳型 cDNA の初期量を求め, mRNA 発現量を比較した.

7. PCR 産物のシーケンス解析

7-1. Wizard SV Gel and PCR Clean-up System を用いた PCR 産物の精製

リアルタイム RT-PCR による増幅が, CYP4B1 cDNA の目的とする塩基配列部分で行われていたかを確認するため, 定量後の PCR 産物を精製し, シークエンス解析を行った. PCR 産物は, 3% アガロースゲルを用いて 100 V, 20 分間電気泳動を行った. マーカーと PCR 産物の一部をエチジウムブロマイドにより染色することで, UV

照射下で泳動距離を測定し, ゲルから目的のバンド (221 bp) を切り出した. 切り出したゲル 10 mg に対し 10 μL の Membrane Binding Solution を加え, ボルテックスで懸濁させた. 65°C, 5 分間インキュベートした後, ボルテックスで懸濁させ, 再度 65°C で 5 分間インキュベートした. 専用のカラムに移し, 室温で 1 分間インキュベートした後, 10,000 \times g で 1 分間遠心し, 700 μL Membrane Wash Solution を加え, 10,000 \times g で 1 分間遠心した. 500 μL Membrane Wash Solution を加え, 10,000 \times g で 5 分遠心した後, さらに 10,000 \times g で 1 分間遠心した. カラムを新しいマイクロチューブに移し, 50 μL Nuclease-Free Water を加え, 室温で 1 分間インキュベートした後, 10,000 \times g で 1 分間遠心することにより, PCR 産物を精製した. 精製した産物はエタノール沈殿により濃縮し, 電気泳動によりバンドの確認をした後, シークエンス反応に用いた.

7-2. シークエンス解析

PCR 産物を 2.5 μL , 2.5 \times Buffer 1.0 μL , 10 μM primer 0.5 μL , DTCS Quick Start Master Mix 1.0 μL を混合し, 全量 5.0 μL となるように反応液を調製した. 反応は, 96°C を 20 秒間, 50°C を 20 秒間, 60°C を 2 分 30 秒間のサイクルを 40 サイクル行い, その後 1-(6) と同様に処理し, DNA シークエンサーで塩基配列を解析した. 解析条件はサンプル注入時間を 15 秒間とし, 分離時間を 60 分間とした. シークエンスプライマーは, 4B1-RF2 及び 4B1-RR2 を用いた.

結 果

CYP4B1 mRNA の定量系を作製するため, CYP4B1 cDNA のクローニングを行った際, 目的の CYP4B1 cDNA の配列 (1536 bp, リファレンス配列 NM000779 と同じ) の他に, 3 塩基 (AGC) が挿入された配列 (1539 bp, リファレンス配列 BC017758 と同じ) を持つ, 2 種類のクローンが確認された (Fig. 2). この 3 塩基の挿入により, アミノ酸配列の 207 番目にセリンが挿入される

ということが明らかとなった。CYP4B1 mRNA の定量には、セリンの挿入のないクローンを用いた。作製した希釈系により、傾き (-3.4 付近) 及び相関係数 ($r=0.99$ 以上) の値ともに適切な検量線を得ることができ (Fig. 3), mRNA 定量系を作製することができた。mRNA 定量後の PCR 産物は電気泳動 (Fig. 4) とシーケンス解析により、目的とする配列が増幅されたことを確認した。また、mRNA 発現量補正のために用いた glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) は、当教室で既に作製してある定量系を用いた。

心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、筋肉、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、結腸、白血球及び膀胱の 17 臓器について、作製

した定量系を用い、リアルタイム RT-PCR 法による CYP4B1 mRNA の定量を行った。三回定量を行い、平均値と標準偏差を求めたところ、肺における発現量が最も高く、膀胱や前立腺においても mRNA の発現が認められた (Fig. 5)。小腸においてもわずかながら発現が認められたが、その他の臓器では検出限界以下だった。

考 察

ヒトにおける CYP4B1 mRNA 発現の臓器差を検討するため、リアルタイム RT-PCR 法を用いて mRNA の定量系を作製し、各臓器の CYP4B1 mRNA 定量を行った。その結果、ヒトでは特に肺、膀胱及び前立腺において CYP4B1 mRNA の

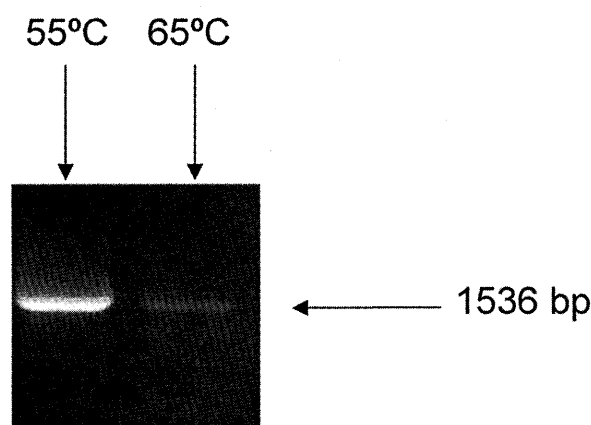


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products of CYP4B1 cDNA.

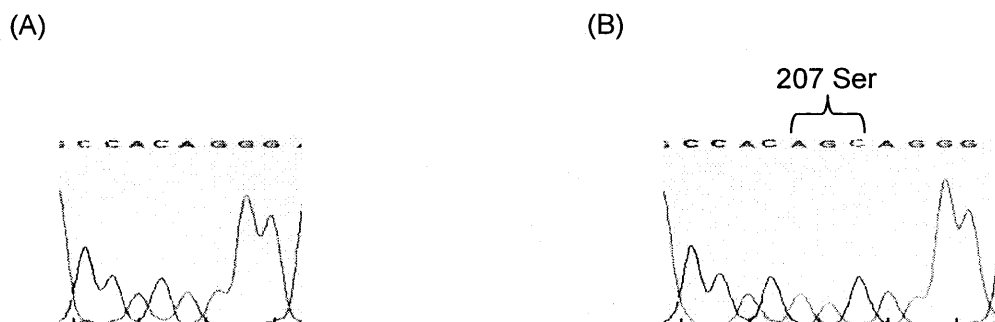
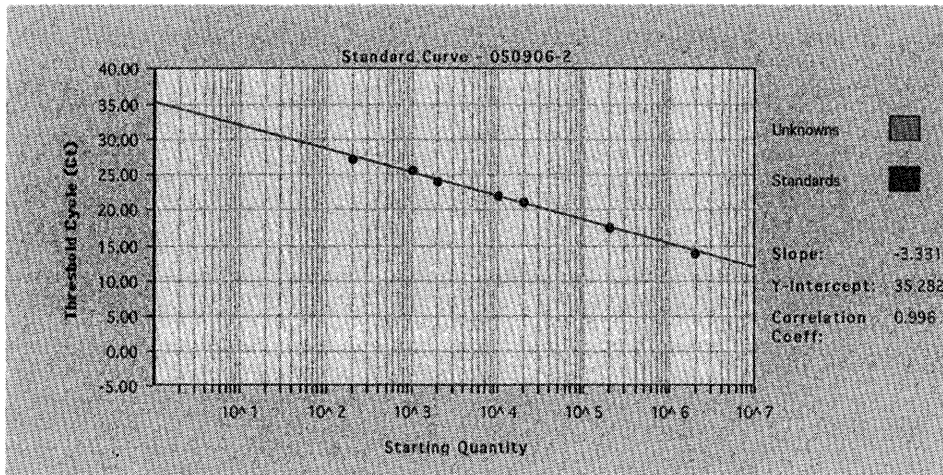


Fig. 2. Sequence analysis of CYP4B1 cDNA.

Wild type CYP4B1 cDNA (A) and CYP4B1 cDNA with an insert of three nucleotides (AGC), which coded for Ser in position 207 (B).

(A)



(B)

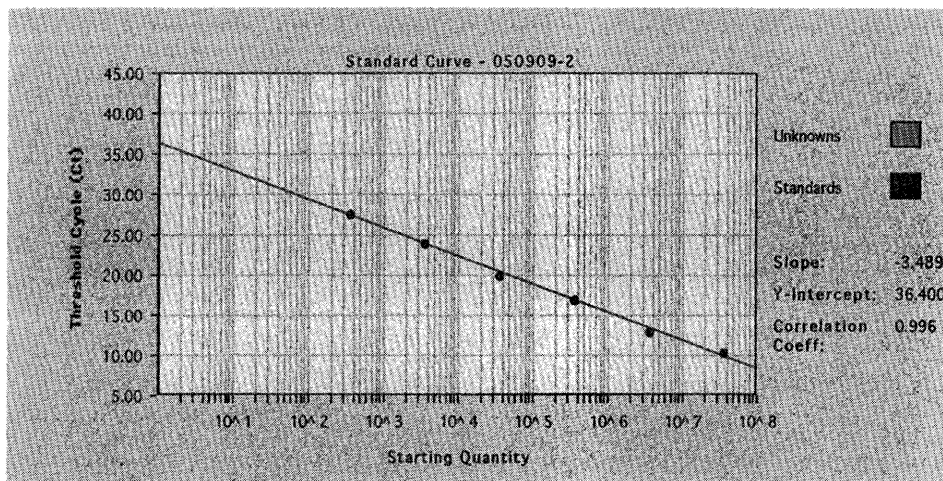


Fig. 3. Standard curve of CYP4B1 mRNA (A) and GAPDH mRNA (B).

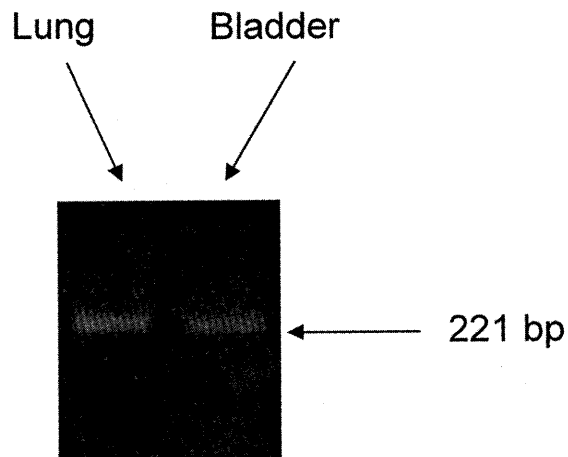


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of PCR products of CYP4B1 cDNA.

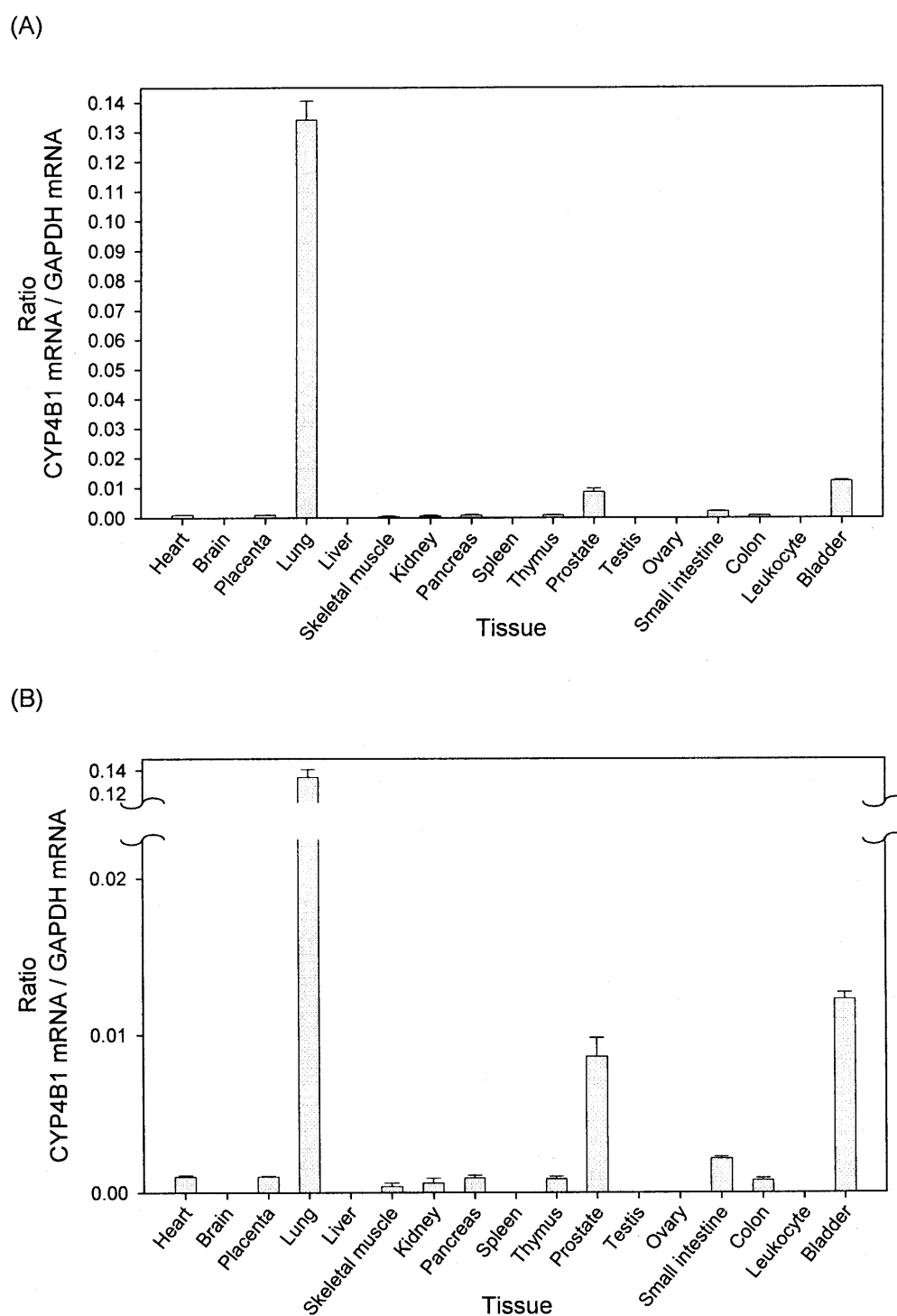


Fig. 5. Tissue distribution of CYP4B1 mRNA.

CYP4B1 mRNA was determined by real-time RT-PCR and normalized to GAPDH. Data are the representation of three independent experiments and are plotted as mean values \pm SD. For Brain, Liver, Spleen, Testis, Ovary and Leukocyte, quantitative value was shown below the threshold of detection. (B) shows magnified figure of (A).

高い発現が認められた。これらの臓器ではCYP4B1の転写促進因子が多い,あるいは転写抑制因子が少ないためにmRNAの発現量が多いことが考えられた。また,これまでにCYP4B1 mRNAは胎盤にも発現していることが報告されていたが⁵⁾,今回の結果から,その発現量は肺,膀胱及び前立腺に比較して非常に低いことが明らかとなった。

これまでに,膀胱癌患者は女性よりも男性に多く発症することが明らかになっている。また,ラットの膀胱におけるCYP4B1 mRNA発現量も雌よりも雄において高いことが示されており⁶⁾,この性特異的な発現はアンドロゲンによるCYP4B1の発現調節の関与が報告されている^{6,7)}。これらの点から,膀胱癌発症の男女差はCYP4B1の存在量に依存し,CYP4B1活性が高いことで前発癌物質が活性化しやすくなっている可能性が考えられた。

今回,CYP4B1 mRNAの肺特異的な発現が認められたが,肺癌患者における正常な肺細胞においてもCYP4B1 mRNAの高い発現が認められる。一方,腫瘍細胞においては発現量が低いことが報告されており⁸⁾,肺におけるCYP4B1の関与についてはまだ明らかになっていない点が多い。肺は生体内へ外来浮遊物質の主要な入り口であり,環境汚染物質などによる空気感染により曝露されやすい部位である。そのため,タバコの煙や工業用化学物質にも含まれている2-ナフチルアミンなどの前発癌物質が,肺に存在するCYP4B1により代謝活性化され,肺癌を引き起こす可能性も考えられる。

さらに今回,前立腺においてもCYP4B1 mRNAの高発現が認められた。しかし,これまでに前立腺癌とCYP4B1の関与については,ほとんど検討されていない。今後,前立腺癌発症に対して,CYP4B1による前発癌物質代謝活性化が関連するか否かをケース・コントロールスタディー等により検討する必要がある。

cDNAクローンの作製において認められた207番目のSerの挿入は,スプライシングの過程において生じたものであると考えられた。しかし,この現象がどのようなメカニズムで起こるのか,

また,どの程度の頻度で生じているかは不明である。207番目のSer挿入により発現する酵素タンパクが持つ機能を解析することは,CYP4B1の各アレルにより発現するタンパクの機能解析と同様に興味深い。

今回,CYP4B1 mRNA定量による臓器分布についての検討の結果,ヒトの肺,膀胱及び前立腺において,CYP4B1 mRNAの高発現が確認された。しかし,CYP4B1の遺伝子には野生型のCYP4B1 *1アレルを含め7種のバリエーションアレルが報告されており⁹⁾,各アレル由来タンパクによる酵素活性変化については明らかにされていない。したがって,どのタイプのCYP4B1タンパクが肺,膀胱あるいは前立腺で,どの程度発現しているかにより,その臓器における変異原活性が大きく変化する可能性がある。さらに,mRNAの発現が認められてもCYP4B1タンパクが発現していない場合も考えられるため,これらの評価は単純ではない。今後,CYP4B1タンパクの臓器分布を検討し,その発現が認められれば,これらの臓器におけるCYP4B1の発癌への関与をさらに検討できると考えられる。

REFERENCES

- 1) 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., Gunsaus I. C., Nebert D. W., *Pharmacogenetics*, **6**, 1-42 (1996).
- 2) Robertson I. G. C., Serabjit-Singh C., Croft J. E., Philpot R. M., *Mol. Pharmacol.*, **24**, 156-162 (1983).
- 3) Imaoka S., Yoneda Y., Sugimoto T., Hiroi T., Yamamoto K., Nakatani T., Funae Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **277**, 776-780 (2000).
- 4) Choudhary D., Jansson I., Stoilov I., Sarfarazi M., Schenkman J. B., *Arch. Biochem. Biophys.*, **436**, 50-61 (2005).
- 5) Yokotani N., Sogawa K., Matsubara S., Gotoh O.,

- Kusunose E., Kusunose M., Fujii-Kuriyama Y., *Eur. J. Biochem.*, **187**, 23-29 (1990).
- 6) Imaoka S., Yoneda Y., Sugimoto T., Ikemoto S., Hiroi T., Yamamoto K., Nakatani T., Funae Y., *Cancer Lett.*, **166**, 119-123 (2001).
- 7) Isern J., Meseguer A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **307**, 139-147 (2003).
- 8) Czerwinski M., McLemore T. L., Gelboin H. V., Gonzalez F. J., *Cancer Res.*, **54**, 1085-1091 (1994).
- 9) Hiratsuka M., Nozawa H., Konno Y., Saito T., Konno S., Mizugaki M., *Drug Metab. Pharmacokin.*, **19**, 114-119 (2004).