

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19790132
 研究課題名（和文）
 タンパク／タンパク相互作用による薬物代謝酵素の活性調節
 研究課題名（英文）
 Effects of protein/protein interaction on activity of drug metabolizing enzymes
 研究代表者
 清谷 一馬 (Kiyotani Kazuma)
 独立行政法人理化学研究所・遺伝情報解析チーム・研究員
 研究者番号：30433642

研究成果の概要（和文）：

チトクローム P450 (CYP) は薬物代謝酵素であり、薬物の体内動態を制御する最も重要な因子である。本研究では、CYP の新たな活性調節機構として、CYP 同士のタンパク/タンパク相互作用 (CYP/CYP 相互作用) による CYP の酵素活性を調節について検討を行った。Mammalian two-hybrid system および免疫沈降法により、CYP3A4 同士の結合、CYP3A4 および CYP3A5 の結合が認められることを明らかにした。また、CYP3A4 と CYP2C 分子種との結合も認められた。細胞内で CYP/CYP が相互作用していることが明らかとなった。この相互作用が発現量または酵素活性に影響を及ぼす可能性が十分にあると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Cytochrome P450 (CYP) is one of the most important drug-metabolizing enzymes. In this study, we investigated the effects of protein/protein interaction on the enzyme activity of CYPs. Mammalian two-hybrid system and immunoprecipitation assay revealed that CYP3A4 interacted with CYP3A4 or CYP3A5 in the cells transfected with expression plasmids for myc- or flag-tagged proteins. CYP3A4 also interacted with CYP2C isoforms. These results suggest the CYPs interact with each other in the cells, and possibly these interactions were associated with CYP expression or function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	510,000	3,710,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：チトクローム P450, 相互作用, 遺伝子多型, 酵素活性

1. 研究開始当初の背景

チトクローム P450 (CYP) は薬物代謝酵素であり、薬物の体内動態を制御する最も重要な因子である。哺乳動物の CYP は小胞体膜結合型のタンパク質であるため、構造生物学的な研究がなかなか進まなかった。近年、哺乳動物の CYP についても構造生物学的な研究が進み、研究開始当初、4 種類のヒト CYP の X 線結晶構造が報告されていた。興味深いことにそれらの CYP は二量体で結晶化されている。すなわち CYP は複合体を形成 (多量体化) することにより、熱力学的に安定な構造をとっていることが示唆される。そこで、CYP 同士のタンパク/タンパク相互作用 (CYP/CYP 相互作用) が起こるのではないかという仮説をたてた。さらに、この CYP/CYP 相互作用が CYP の酵素活性を調節している可能性を考えた。これは単独の CYP 分子種同士の相互作用のみならず、2 種類の異なる CYP 分子種間での相互作用の可能性も考えられる。また、古くから CYP の酵素活性には大きな個人差があることが知られている。近年遺伝子解析が進み、その個人差の一部は CYP の遺伝子多型が原因となっていることが明らかになった。我々も CYP の遺伝子多型と酵素活性の個人差の検討、さらに酵素活性を変化させるような新規遺伝子多型の網羅的探索を行ってきたが、未だ CYP の酵素活性の個人差は完全には説明がついていない。したがって、CYP/CYP 相互作用における遺伝子多型の影響を証明することができれば、これまで説明できなかった CYP の酵素活性の個人差を説明できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、CYP におけるタンパク/タンパク相互作用を介した CYP の酵素活性の制御機構を解明することを目的としている。具体的には以下に述べる 2 点について明らかにする。1 点目は、CYP 同士のタンパク/タンパク相互作用を解析し、ある CYP 分子種の酵素活性に他の CYP 分子種がどのように影響するかを検討する。また、様々な CYP 分子種による相互作用の程度を比較する。さらに、その相互作用に関わる領域を同定する。2 点目には、CYP/CYP 相互作用に及ぼす遺伝子多型の影響を検討する。すなわち、遺伝子多型により生じるアミノ酸置換を有する変異体を用いて、タンパク/タンパク相互作用を検討し、その影響を評価する。以上の研究から最終的に、遺伝子レベルでの個人個人の薬物酵素活性の予測を可能にし、さらに個別薬物療法 (テーラーメイド医療) の確立を目指している。

3. 研究の方法

ヒト CYP は膜結合型タンパク質であるた

め、凝集してしまい CYP 同士の特異的な相互作用を見ることできない可能性がある。そこで、いくつかの方法を用いて CYP/CYP 相互作用を評価する必要があるため、Mammalian two-hybrid system および免疫沈降法により検討を行った。同一 CYP 同士の相互作用だけでなく、異分子種同士の相互作用についても検討を行った。陽性対象として、CYP と相互作用することが知られている NADPH-チトクローム P450 還元酵素 (CPR) およびチトクローム b5 を用いた。

まず、Mammalian two-hybrid system での CYP/CYP 相互作用の検討を行なうため、それぞれの CYP 分子種 (CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4, CYP3A5) につき、GAL4 フュージョン CYP 発現用のプラスミド (pBIND CYP) および VP16 フュージョン CYP 発現用のプラスミド (pACT CYP) を作製した。これらの 2 種類のプラスミドおよび GAL4 結合サイトを含むルシフェラーゼレポータープラスミド (pG5luc) を Hek293 細胞に導入し、そのルシフェラーゼ活性を測定することにより、CYP 同士の相互作用を検討した。

免疫沈降法での CYP/CYP 相互作用の検討を行なうため、C-末端に FLAG- または Myc- タグを付加した CYP タンパク質を発現するプラスミドを作製した。作製したプラスミドを Hek293 細胞に導入し、Myc- (または FLAG-) 抗体で免疫沈降し、SDS PAGE で分離後、FLAG- (または Myc-) 抗体で検出した。

さらに、2007 年に Hughes AL らにより Dap1/PGRMC1 が CYP3A4 と相互作用することが報告された。そこで、85 検体の臨床検体を用いて、*Dap1/PGRMC1* 遺伝子の 5' - 上流領域から 3' - 下流領域を含む 11.5 kb の領域をダイレクトシーケンシングすることにより、遺伝子多型の探索を行った。

4. 研究成果

Mammalian two-hybrid system で結合を確認したところ、CYP3A4 と CPR, CYP3A4 とチトクローム b5 との結合が認められた。さらに、CYP3A4 同士または CYP3A4 と別の分子種 (CYP2C9 または CYP3A5) との結合が示唆された。これらの相互作用を免疫沈降法で確認したところ、myc-tagged CYP3A4 と flag-tagged CYP3A4, また、myc-tagged CYP3A4 と flag-tagged CYP3A5 がそれぞれ結合していることを確認した。さらに、CYP3A4 が CYP2C 分子種とも結合していることを明らかにした。以上の検討より、細胞内で CYP/CYP が相互作用していることが明らかとなった。

Dap1/PGRMC1 遺伝子の SNP discovery では、検討した 11.5 kb の領域内に 15 種類の新規遺伝子多型を含む、合計 18 種類の遺伝子多型を見出した。そのうち 2 種類はアミノ酸置換を伴う遺伝子多型 (115A/G および 6836C/T) であり、そのアリル頻度はいずれも 1% であった。さらに、5' - 上流領域に 2 種類の遺伝子多型 (-406A/T および -130G/A) を見出した。これらの遺伝子多型は *Dap1/PGRMC1* の機能、および CYP との相互作用、

さらには CYP の酵素活性に影響を及ぼす可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Kazuma Kiyotani, Taisei Mushiroda, Chiyo K. Imamura, Naoya Hosono, Tatsuhiko Tsunoda, Michiaki Kubo, Yusuke Tanigawara, David A. Flockhart, Zeruesenay Desta, Todd C. Skaar, Fuminori Aki, Koichi Hirata, Yuichi Takatsuka, Minoru Okazaki, Shozo Ohsumi, Takashi Yamakawa, Mitsunori Sasa, Yusuke Nakamura and Hitoshi Zembutsu. Significant Effect of Polymorphisms in CYP2D6 and ABCC2 on Clinical Outcomes of Adjuvant Tamoxifen Therapy for Breast Cancer Patients. J Clin Oncol(査読有), 28, 1287-1293 (2010).

2. Masayuki Matsunaga, Hiroshi Yamazaki, Kazuma Kiyotani, Shunsuke Iwano, Junji Saruwatari, Kazuko Nakagawa, Akiko Soyama, Shogo Ozawa, Jun-ichi Sawada, Eiji Kashiya, Moritoshi Kinoshita, Tetsuya Kamataki. Two novel CYP2D6*10 haplotypes as possible causes of a poor metabolic phenotype in Japanese. Drug Metab Dispos(査読有) 37, 699-701 (2009).

3. Kazuma Kiyotani, Taisei Mushiroda, Mitsunori Sasa, Yoshimi Bando, Ikuko Sumitomo, Naoya Hosono, Michiaki Kubo, Yusuke Nakamura, Hitoshi Zembutsu. Impact of CYP2D6*10 on recurrence-free survival in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy. Cancer Sci(査読有) 99, 995-999 (2008).

4. Kazuma Kiyotani, Taisei Mushiroda, Michiaki Kubo, Hitoshi Zembutsu, Yuichi Sugiyama, Yusuke Nakamura. Association of genetic polymorphisms in SLC01B3 and ABCC2 with docetaxel-induced leukopenia. Cancer Sci(査読有) 99, 967-972 (2008).

[学会発表] (計 9 件)

1. Kazuma Kiyotani, Taisei Mushiroda, Mitsunori Sasa, Takashi Yamakawa, Koichi Hirata, Minoru Okazaki, Shozo Ohsumi, Yuichi Takatsuka, Yoshimi Bando, Ikuko Sumitomo, Tatsuhiko Tsunoda, Naoya Hosono, Michiaki Kubo, Yusuke Nakamura and Hitoshi Zembutsu. Association of polymorphisms of CYP2D6 and other PK-related genes on

recurrence-free survival in Japanese breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy. 59th Annual Meeting, the American society of Human Genetics. Honolulu, 2009. 10. 22.

2. Naoya Hosono, Mamoru Kato, Kazuma Kiyotani, Taisei Mushiroda, Keiko Yamazaki, Tatsuhiko Tsunoda, Hitoshi Zembutsu, Yusuke Nakamura and Michiaki Kubo. CYP2D6 genotyping for functional gene dosage analysis by allele copy number detection. 59th Annual Meeting, the American society of Human Genetics. Honolulu, 2009. 10. 22.

3. 清谷一馬, 蒔田泰誠, 笹三徳, 山川卓, 平田公一, 岡崎稔, 大住省三, 高塚雄一, 角田達彦, 細野直哉, 久保充明, 前佛均, 中村祐輔. 乳がん患者におけるタモキシフェンの再発予防効果と薬物代謝酵素の遺伝子型. 日本人類遺伝学会第 54 回大会. 東京, 2009. 9. 24.

4. Kazuma Kiyotani, Hitoshi Zembutsu, Taisei Mushiroda, Mitsunori Sasa, Takashi Yamakawa, Koichi Hirata, Minoru Okazaki, Shozo Ohsumi, Yuichi Takatsuka, Yoshimi Bando, Ikuko Sumitomo, Tatsuhiko Tsunoda, Naoya Hosono, Michiaki Kubo and Yusuke Nakamura. Effects of polymorphisms in CYP2D6 and PK-related genes on clinical efficacy of adjuvant tamoxifen treatment in Japanese breast cancer patients. Cold Spring Harbor Laboratory Pharmacogenomics meeting. London, 2009. 9. 12-16.

5. 清谷一馬, 前佛均, 蒔田泰誠, 中村祐輔. 乳がん患者におけるタモキシフェンの再発予防効果に及ぼす CYP2D6 遺伝子型の影響. 第 29 回日本臨床薬理学会年会. 東京. 2008. 12.

6. 細野直哉, 久保充明, 加藤護, 角田達彦, 蒔田泰誠, 清谷一馬, 佐藤寛子, 網谷花枝, 高田定暁, 前佛均, 中村祐輔. mPCR-RETINA およびリアルタイムPCRを用いた CYP2D6 ジェノタイプング方法の確立. 日本人類遺伝学会第 53 回大会. 横浜. 2008 9.

7. 清谷一馬, 蒔田泰誠, 久保充明, 前佛均, 杉山雄一, 中村祐輔. ドセタキセルの副作用に関連する SLC01B3 および ABCC2 遺伝子多型. 日本人類遺伝学会第 53 回大会. 横浜. 2008 9.

8. Kazuma Kiyotani, Hitoshi Zembutsu, Taisei Mushiroda, Mitsunori Sasa, Koichi Hirata, Minoru Okazaki, Yuichi Takatsuka, Yoshimi Bando, Ikuko Sumitomo, Naoya Hosono, Michiaki Kubo, Yusuke Nakamura. Clinical outcome with Adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 genotypes. 日本薬物動態学会第

23 回年会. 熊本. 2008.10.

9. Kazuma Kiyotani, Hitoshi Zembutsu, Taisei Mushiroda, Mitsunori Sasa, Koichi Hirata, Minoru Okazaki, Yuichi Takatsuka, Yoshimi Bando, Ikuko Sumitomo, Naoya Hosono, Michiaki Kubo, Yusuke Nakamura. : Effects of CYP2D6*10 on recurrence-free survival in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy. The American Society of Human Genetics 58th Annual Meeting (ASHG2008). Philadelphia. 2008.11.

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清谷 一馬 (Kiyotani Kazuma)

独立行政法人理化学研究所・遺伝情報解析チ
ーム・研究員

研究者番号 : 30433642

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者