

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590185

研究課題名（和文） オーダーメイド医療を目指したヒトUDP-グルクロン酸転移酵素活性の検証

研究課題名（英文） Evaluation of mutation effects on UDP-glucuronosyltransferase 1A1 activity toward personalized medicine

研究代表者

竹内 敦子 (TAKEUCHI ATSUKO)

神戸薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80154970

研究成果の概要（和文）：UDP-glucuronosyltransferase A1 (UGT1A1) は主に肝臓で発現しており、ビリルビンの抱合反応を行っている。遺伝性非抱合型高ビリルビン血症患者は、ある種の薬剤投与による副作用を発現することが予想される。そこで、種々のミスセンス変異 UGT1A1 発現プラスミドを発現させた細胞を使って、3種のビリルビン抱合体の生成量を測定したところ、変異によって生成パターンに差異が認められた。この差が高ビリルビン血症の重症度および薬剤の副作用発現に関係していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) is the only physiological relevant enzyme in bilirubin glucuronidation. Mutations of the UGT1A1 gene reduce the enzyme activity, leading unconjugated hyperbilirubinemia. Bilirubin has two sites capable of glucuronidation and forms bilirubin mono- and di-glucuronides (BMG and BDG). We constructed the several expression plasmids for UGT1A1 with missense mutation (G71R, F83L, I322V, and G493R) in the gene. In this study, we established the high-throughput quantitative methods for BMG and BDG using UPLC-Orbitrap MS technique, and estimated each glucuronidation capacity of the mutated UGT1A1 by transient transfection and expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：質量分析, UGT1A1, 遺伝子変異, 酵素活性, LC/MS

## 1. 研究開始当初の背景

生体内物質であり、ヘムの代謝産物であるビリルビンの抱合を行うビリルビン UDP-glucuronosyltransferase A1 (UGT1A1) は主に肝臓で発現しており、この酵素遺伝子の変異は遺伝性非抱合型高ビリルビン血症である Gilbert 症候群, Crigler-Najjar 症候

群を引き起こす。

UDP-glucuronosyltransferase (UGT) は、生体内代謝における第 II 相反応の中で主要な働きをしており、生体内物質のみならず、さまざまな薬剤の抱合を行うことが知られている。本酵素は細胞の小胞体に存在し、C-

末端領域に疎水性に富むアミノ酸配列があり、小胞体を1回貫通し、膜に結合している。基質となる生体内物質や薬剤は、細胞質側よりこの酵素上で UGT-グルクロン酸 (UDPGA) を補酵素として UGT によりグルクロン酸抱合され、小胞体に送られる。この酵素には、多数の分子種が存在し、非常に多くの物質のグルクロン酸抱合に対応している。ヒトの UGT は2つのファミリーに分けられる (1型と2型)。ビリルビンを抱合する UGT1A1 は1型に属する。

Gilbert 症候群の遺伝子解析により、日本人の多くは G71R 変異が原因であるとされている。これは、エクソン1の211番目の塩基がグアニンからアデニンへ点変異を起こしたもので、これによりコドン71がGGAからAGAになり、アミノ酸がグリシンからアルギニンに変わるミスセンス変異である。この変異は酵素の活性を正常の約30%に低下させる。我が国の調査では、人口のおよそ25%がG71R変異を有しており (ヘテロ接合体+ホモ接合体)、2~3%がホモ接合体であるとされており、決して無視できない頻度である。また、現在ではG71Rのほかにも、F83R、I322V、G493Rなどの変異も発見されてきている。

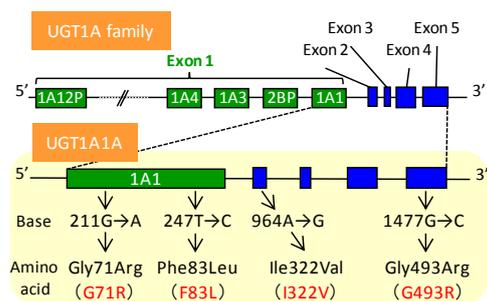


図1 UGT1A family と UGT1A1

このような背景のもと、遺伝性非抱合型高ビリルビン血症患者は変異タイプによって、ある種の薬剤投与による副作用を発現することが予想される。そこで、本症のような遺伝性疾患のモデルが確立されれば、薬剤の副作用発現を予測することができると考えられる。さらに、副作用発現の程度が定量できれば、診断や治療に大きく役立つことが期待され、オーダーメイド医療を実施できる。

## 2. 研究の目的

### (1) 新生児 Gilbert 症候群モデルの確立

UGT1A1 遺伝子の変異が UGT1A1 酵素の活性にどの程度の影響を及ぼすか、ビリルビン代謝に対してどのような影響を及ぼすかについて変異タイプごとに研究を進め、遺伝性非抱合型高ビリルビン血症のメカニズムを解明することを目的とする。そのために、細胞を用いた Gilbert 症候群モデル系を確立する。

### (2) 副作用発現の定量的解析

遺伝性非抱合型高ビリルビン血症である Gilbert 症候群患者は、UGT1A1 酵素活性の低下により、ある種の薬剤によって副作用を発現する可能性が指摘されている。1. で作成した Gilbert 症候群モデル細胞を用い、薬剤による副作用発現を定量的に解析し、変異タイプに応じたオーダーメイド医療を目的とする。また、UGT1A1 遺伝子の変異が薬剤の血中濃度に影響し、変異タイプに応じた副作用の発現に関与する感受性の違いの原因となるメカニズムを解明することも目的とする。

## 3. 研究の方法

UGT1A1 cDNA clone およびそのミスセンス変異クローンの作成後、遺伝子 UGT1A1 変異酵素導入細胞系の樹立し、薬剤使用による副作用発現の定量的分析を行う。

### (1) UGT1A1 cDNA clone およびそのミスセンス変異クローンの作成

UGT1A1 酵素タンパク質を細胞内で発現させるための発現プラスミドを作成する。

#### 《方法》

野生型 (wild) および4種類のミスセンス変異クローン (G71R, F83R, I322V, G493R) を作成するために、まずエンタリークローンを作り、点変異導入を行った後、発現クローンを作成する。まず、ヒト肝臓細胞由来 cDNA library のコード領域 約 1.7kb を PCR 法にて増幅する。PCR 増幅産物と pENTR/D-TOPO vector をインキュベート後、One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli に形質転換し、エンタリークローンを調製する。Sawano らの方法を用いて、Thermal cycle 反応によりエンタリークローンに点変異を導入し、ミスセンス変異導入エンタリークローンを作成する。以上のようにして作成したエンタリークローンまたはミスセンス変異導入エンタリークローンとディスティネーションベクター pcDNA-DEST40 とで組み換え反応 (LR 反応) を行い、発現クローンを作成する。その後、サイクルシーケンスを行い、シーケンサーで全配列を確認する。

### (2) 一時的遺伝子 UGT1A1 酵素導入細胞を用いる酵素活性の比較

Cos-7 細胞に上記発現プラスミドを細胞内で発現させ、変異が酵素の活性に与える影響を調べる。

#### 《方法》

(1) で作成した発現プラスミドを Cos-7 細胞にトランスフェクションして、一時的に酵素を発現させる。その細胞ホモジネートに基質と補酵素溶液を添加し、一定時間反応させ、API 3000 LC-MS/MS システムを用いてグルク

ロン酸抱合体量を定量する。LC-MS/MS は、基質および基質の抱合体の標準品（必要な場合には合成する）を用い、最適化した条件の MRM 法で定量する。基質として、ビリルビンの他に、内因性の女性ホルモンであるエストラジオールを使用する。また、発現した酵素タンパク質を抽出し、電気泳動システム（設備備品として申請）で分離後、消化した後 Voyager DE-PRO TOF-MS 装置を用いて発現を確認する。

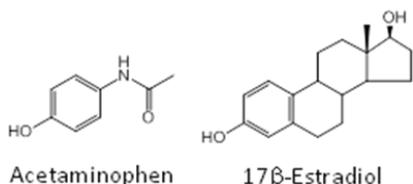


図 2 AAP および E2 の構造

(3) 薬剤使用による副作用発現の定量的分析

(2) で用いた実験系を用いて、小児で最も多く使用される鎮痛解熱剤であるアセトアミノフェンや抗がん剤として使用されるエトポシドなどの薬剤に対して、変異が与える影響を調べる。

《方法》

(2) の実験系を薬剤に応用して実験を行い、同様に LC-MS/MS を用いて定量を行い、副作用発現への影響を解析する。

(4) 安定 UGT1A1 酵素形質導入細胞系の樹立

Cos-7 細胞に上記発現プラスミドを安定形質発現させた細胞系を樹立する。

《方法》

(1) で作成した発現プラスミドを Cos-7 細胞にトランスフェクションしたのち、抗生物質 G418 を用いてトランスフェクト細胞を選択すれば、一過性の発現または安定な発現に利用できる。細胞系に基質を加えて培養し、LC-MS/MS を用いてグルクロン酸抱合体量を定量する。

(5) 安定 UGT1A1 酵素形質導入細胞系を用いた酵素活性の比較および薬剤使用による副作用発現の定量的分析

樹立した安定形質発現させた細胞系を用い、引き続きモデルとして変異が酵素の活性に与える影響を調べる。また、小児で最も多く使用される鎮痛解熱剤であるアセトアミノフェンや抗がん剤として使用されるエトポシドなどの薬剤に対して、変異が与える影響を調べる。

《方法》

(4) で作成した発現プラスミドを HepG2 細胞にトランスフェクションしたのち、抗生物質 G418 を用いてトランスフェクト細胞を選択すれば、一過性の発現または安定な発現に利用できる。細胞系に基質を加えて培養し、

LC-MS/MS を用いてグルクロン酸抱合体生成量を定量する。

4. 研究成果

(1) アセトアミノフェン、エストラジオールおよびエトポシドを基質とした UGT1A1 抱合能の比較

UGT1A1 により生成したグルクロン酸抱合体 (AAPG, E2G) と IS (PNPG, EE2) を LC-MS/MS を用いて測定した際の MS/MS フラグメントを図 3 に、最適化した測定条件を用いて測定した SRM クロマトグラムを図 4 に示した。AAPG および E2G ともに単一ピークが認められ、定量可能であった。

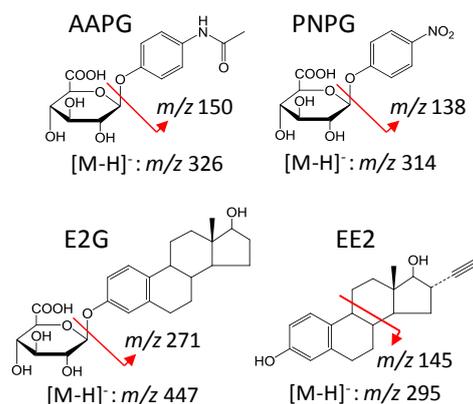


図 3 各化合物の構造および MS/MS フラグメント

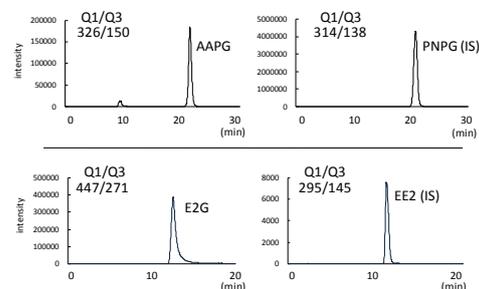


図 4 各化合物における LC-MS/MS クロマトグラム

AAPG および E2G の定量値を、Wild を 100% として図 5 に示した。ETPG を含めたいずれの基質においても、UGT1A1 の変異部位の違いにより抱合能に差が認められ、G493R では抱合能が認められなかった。AAP と E2 を比較した場合、AAP では F83L のみが Wild に対して抱合能が低下したのに対し、E2 では G71R および F83L で Wild に対して抱合能が低下した。両基質ともに I322V では 79%、89% と Wild に匹敵する抱合能を、F83L では 10%、19% と Wild に対して低い抱合能を示した。しかし G71R の抱合能は、AAP では 81% であるのに対して、E2 では 25% と差が認められた。このように、UGT1A1 変異体の中には基質の種

類により抱合能に差が認められるものが存在した。以上の結果から、遺伝子のミスセンス変異により UGT1A1 の構造が変化するため、基質の違いにより反応性に差が生じて抱合能が変化するのではないかと考えられた。さらに、変異体の種類により抱合能が消失したり、基質の種類により抱合能が低下する場合も認められたので、Gilbert 症候群および Crigler-Najjar 症候群患者にこのような薬剤を服用させる際には、副作用が発現する危険性を考えて投与量を減らすなどの配慮が必要であることが示唆された。

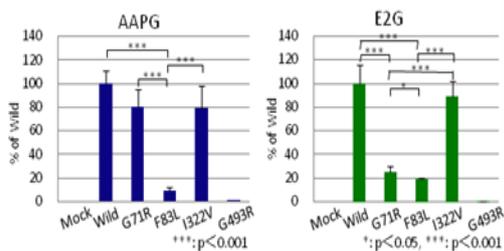


図 5 UGT1A1 Wild および変異体の抱合能

(2) アセトアミノフェンおよびエストラジオールに関する *in silico* ドッキングシミュレーション

Wild の立体構造データを基に作製した変異型 UGT1A1 と UDPGA とのドッキングシミュレーションを行った結果、各 UGT1A1 変異体間において差は認められなかった。よって抱合能の違いは、UGT1A1 内部に UDPGA が入り込んで保持された後、基質が進入する段階（進入の様式）で生じると考えた。そこで、UDPGA を取り込んだ UGT1A1 と抱合される基質（AAP または E2）とのドッキングシミュレーションを行った。

Wild UGT1A1-UDPGA ドッキングモデルの抱合反応部位において AAP または E2 とドッキングシミュレーションした代表的な結果を図 6 に示した。左は、基質が抱合反応可能な

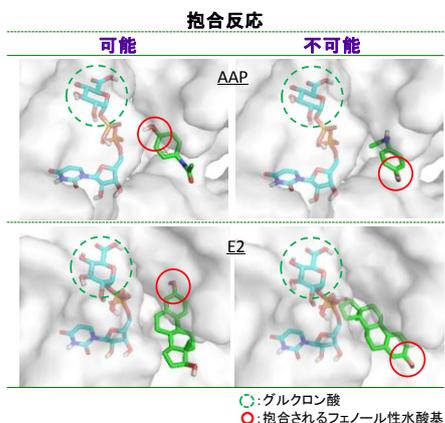


図 6 AAP および E2 と UGT1A1 とのドッキングシミュレーション

様式で進入する場合を示しており、右は不可能な様式で進入する場合を示している。抱合反応可能な様式は、基質のフェノール性水酸基が UGT1A1 の反応部位の内部に向けた状態であり、UDPGA のグルクロン酸部分と反応することができると判定した。抱合反応不可能な様式は、基質が逆向きに進入しており、抱合反応は生じないと判定した。各基質につきドッキングシミュレーションを 100 回行い、基質が進入する様式が抱合可能である場合の数を計算し、Wild の数を 100% に換算して図 7 に示した。AAP の場合は Wild, G71R, I322V は同等の確率であるのに対して、F83L は確率

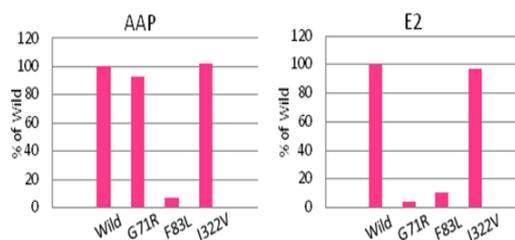


図 7 AAP および E2 のドッキングシミュレーション結果

が低下した。E2 の場合は G71R および F83L で Wild に対して確率が低下した。

図 7 の *in silico* の結果が図 5 の *in vivo* の結果とほぼ一致したことから、本ドッキングシミュレーション法は抱合能の予測に充分適用可能であることが明らかとなった。

ビリルビンのグルクロン酸抱合における各変異の抱合体生成量において、wild では反応時間と共にビリルビンが代謝され、BMG から BDG へと段階的に抱合体が生成するのに対して、G71R では BMG は生成するが反応時間を長くしても BDG はほとんど生成しなかった。F83L 及び G493R では時間の経過に関わらず、BMG, BDG 共にほとんど生成しなかった。I322V では両代謝物の生成量及び反応速度において wild と同等の挙動を示した。また、AAP 及び E2 に関しても、wild と比較して G71R では AAPG では同程度抱合体が生成したのに対して E2G では有意に低下が見られた。また、他の変異では薬物間による差は見られなかった。

UGT1A1 変異型によって抱合能及び反応速度に変化が見られ、酵素の基質に対する相互作用の変化が示唆された。特に G71R では、wild と比較してビリルビンの抱合体化が BMG から BDG へ進行しないこと、さらには E2G のみで活性が低下したことから、基質結合部における構造変化が起こったと考えられる。更には、

UGT1A1 変異型における高ビリルビン血症の新たな診断法の開発に向けて、UGT1A1 の酵素反応速度論における解析結果より速度論パラメーターを求め、変異と反応速度の関係性についても検討している。

### (3) ビリルビンを基質とした UGT1A1 抱合能の比較

ビリルビンのグルクロン酸抱合における各変異の抱合体生成量において、wild では反応時間と共にビリルビンが代謝され、BMG から BDG へと段階的に抱合体が生成するのに対して、G71R では BMG は生成するが反応時間を長くしても BDG はほとんど生成しなかった。F83L 及び G493R では時間の経過に関わらず、BMG, BDG 共にほとんど生成しなかった。I322V では両代謝物の生成量及び反応速度において wild と同等の挙動を示した。また、AAP 及び E2 に関しても、wild と比較して G71R では AAPG では同程度抱合体が生成したのに対して E2G では有意に低下が見られた。また、他の変異では薬物間による差は見られなかった。

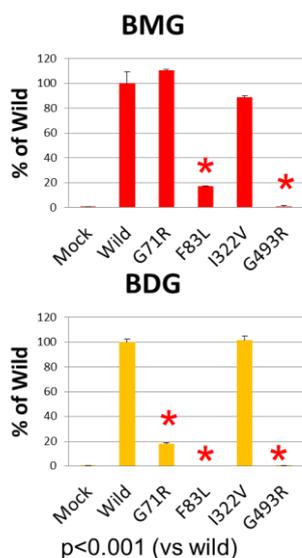


図8 UGT1A1 Wildおよび変異体のビリルビン抱合能

UGT1A1 変異型によって抱合能及び反応速度に変化が見られ、酵素の基質に対する相互作用の変化が示唆された。特に G71R では、wild と比較してビリルビンの抱合体化が BMG から BDG へ進行しないこと、さらには E2G のみで活性が低下したことから、基質結合部における構造変化が起こったと考えられる。更には、UGT1A1 変異型における高ビリルビン血症の新たな診断法の開発に向けて、UGT1A1 の酵素反応速度論における解析結果より速度論パラメーターを求め、変異と反応速度の関係性

についても検討した。

### 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2件)

① Yusoff S., Takeuchi A., Ashi C., Tsukada M., Ma'amor N.H., Zilfalil B.A., Yusoff N.M., Nakamura T., Hirai M, Harahap I.S., Gunadi, Lee M.J., Nishimura N., Takaoka Y., Morikawa S., Morioka I., Yokoyama N., Matsuo M., Nishio H., van Rostenberghe H., A polymorphic mutation, c.-3279T>G, in the UGT1A1 promoter is a risk factor for neonatal jaundice in the Malay population., *Pediatr. Res.*, 査読あり, 2010, 401-496.

② Takaoka Y., Ohta M., Takeuchi A., Miura K., Matsuo M., Sakaeda T., Ligand orientation governs conjugation capacity of UDP-glucuronosyltransferase 1A1, Sugano A., Nishio H., *J Biochem.*, 査読あり, 2010, 25-28.

〔学会発表〕(計7件)

① 竹内敦子, 塚田雅子, 西尾久英, UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 のグルクロン酸抱合能の解析研究, 第57回日本質量分析総合討論会(2009.5.15 大阪).

② Takeuchi A., Tsukada M., Nishio H., Analysis of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 capacity., 18th International Mass Spectrometry Conference (2009.9.2 Bremen).

③ 葎ちとせ, 竹内敦子, 和田昭盛, 西尾久英, UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) 遺伝子の転写調節領域における変異が転写活性に及ぼす影響, 日本薬学会第130年会(2010.03.28 岡山)

④ 竹内敦子, 葎ちとせ, 西尾久英, UDP-glucuronosyltransferase 1A1 遺伝子の転写に関与する因子の解析, 第58回質量分析学会/第1回アジア・オセアニア質量分析会議(2010.06.17 つくば)

⑤ 近江昇一, 竹内敦子, 和田昭盛, 西尾久英, UDP-glucuronosyltransferase 1A1 遺伝子多型抱合能の高分解能質量分析法による測定ビリルビン代謝能の解析, 日本薬学会第131年会(2011.03.29 静岡)

⑥ 近江昇一, 竹内敦子, 和田昭盛,

西尾 久英, UDP-glucuronosyltransferase 1A1 によるビリルビン代謝能の解析, 第 59 回 質量分析総合討論会 (2011.09.14 吹田)

⑦ 塚本 恵梨, 近江 昇一, 竹内 敦子, 西尾 久英, UDP-glucuronosyltransferase 1A1 の安定発現培養細胞中の酵素活性の測定, 日本薬学会第 132 年会 (2012.03.30 札幌)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹内 敦子 (TAKEUCHI ATSUKO)  
神戸薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号：80154970

### (2) 研究分担者

都出 千里 (TODE CHISATO)  
神戸薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：20289036

### (3) 連携研究者

無