

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590172

研究課題名(和文)薬物代謝酵素CYP3Aの雌性優勢発現におけるエピジェネティック調節の役割

研究課題名(英文)Role of epigenetic regulation on female-predominant expression of drug-metabolizing enzyme CYP3A gene

研究代表者

佐久間 勉(SAKUMA, TSUTOMU)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・准教授

研究者番号：30250468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：CYP3A遺伝子の雌性優勢発現のメカニズムを解析し、クロマチン構造の雌雄差がモデル遺伝子としたマウスCyp3a41の雌特異的発現調節機構の1つになっている事を明らかにした。また、雌由来初代培養肝細胞において転写因子HNF4 とCOUP-TFII の協調的相互作用がCyp3a41遺伝子上で起こることも雌特異的発現に関与することも示され、複数のメカニズムによってCYP3Aの雌性優勢発現が起こることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Some of CYP3A genes including human CYP3A4 and mouse Cyp3a41 express female-predominantly. The objective of this study is to clarify the mechanisms, especially epi-genetic manner, for female-predominant expression. Our study demonstrated that female-dominant binding of HNF4a to the promoter (-99/-87) was involved in female specific expression of mouse Cyp3a41 gene. CHART-PCR analysis demonstrated that the chromatin prepared from female mouse hepatocytes was more relaxed than that from male hepatocytes. It is, therefore, likely that this difference is a cause of the female-dominant binding of HNF4a on Cyp3a41 gene. Reporter gene assay demonstrated that COUP-TFII and HNF4a interact in a synergic manner on Cyp3a41 gene in female hepatocytes. Thus, sex difference in chromatin structure and synergistic interaction between HNF4a and COUP-TFII may contribute to the female-specific expression of Cyp3a41 in the livers of mice.

研究分野：薬物代謝学

キーワード：性差 CYP 発現調節 マウス エピジェネティック

1. 研究開始当初の背景

薬物代謝酵素は薬物の体内動態の鍵を握る重要な酵素であり、その個人差や活性変動は薬物-薬物間相互作用に起因する薬効変動や有害作用発現の一因となる。シトクロム P450 (P450) は酸化的代謝を行う代表的な薬物代謝酵素であり、その活性に個人差や個人内変動をもたらす因子の情報は、薬物の安全かつ効果的な使用を目指すテーラーメイド医療の実現には重要な情報といえる。

薬物代謝の個人差の原因として遺伝的多型が知られ勢力的に研究されているが、薬物代謝の男女差も個人差の一因と考えられる。トリアゾラムなど副作用の発現頻度に男女差が認められる薬もあり、薬物代謝酵素活性の性差がその背景にあるものと考えられている。実際、ヒトの P450 の発現に性差が認められる。ヒト肝で最も存在量が多く臨床で使用される薬の約半数の酸化的代謝を担っている CYP3A4 も、男女間に 2 から 3 倍の差があり男性より女性で発現が高い。臨床での重要さの点からもこの性差の原因を明らかにし、性差の変動を予測することは重要な研究課題と考えられる。

P450 の性差は齧歯類でより顕著に観察され、ヒト CYP3A4 遺伝子のマウスにおける相同遺伝子 *Cyp3a41* は雌特異的に発現している。そこで我々はマウス *Cyp3a41* 遺伝子の雌特異的発現機構の解明がヒト CYP3A4 の性依存発現の機構解明につながると考え解析を進めてきた。その結果、*Cyp3a41* 遺伝子の肝細胞における発現には遺伝子近位プロモーターへの肝特異的転写因子 HNF4 の結合が重要であることが明らかになった。肝細胞の HNF4

活性には雌雄差が無いにもかかわらず、HNF4 結合に 4 倍の雌雄差(雌 > 雄)があり、それが雌特異的発現の一因と推測した (Bhadhprasit W. *et al.*, 2011)。この雌雄差はクロマチン構造の性差を仮定すると他のデータも含め合理的に説明でき、有望なメカニズムの 1 つと考えられる。同時に HNF4

結合量の性差は CYP3A4 の mRNA やタンパク質発現の性差 (>20 倍) より小さく、クロマチン構造の雌雄差に加えその違いを増幅する他の性依存的メカニズムの存在も必要と考えられた。候補の 1 つとして HNF4 と他の転写因子の性依存的相互作用を仮定し、それらが相まって性特異的発現が生じているメカニズムを想定していた。

2. 研究の目的

本研究は CYP3A 遺伝子の雌性優勢発現をもたらす機構としてエピジェネティック調節(クロマチン構造の雌雄差を原因とした性依存発現)の存在とメカニズムを明らかにする事を目的とした。特に *Cyp3a41* 遺伝子の調節に関わる事が明らかになっている因子の中で性特異性が明確なものは成長ホルモン(GH)分泌の性差が唯一であることから、クロマチン構造の性差と GH の関わりを明ら

かにする事を目的とした。また併せて HNF4 と他の転写調節因子との性依存相互作用の可能性についても検討することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス初代培養肝細胞は 8 週齢以上の ddY 系マウス(日本 SLC, 静岡)よりコラーゲナーゼ灌流法により調製し、血清およびフェノールレッド非含有ウェイマス培地で培養した。ホルモンによる調節を解析した際にはヒト組換え GH 終濃度 71ng/ml 和光純薬, 077-04593), デキサメタゾン(終濃度 $10^{-7}M$, Sigma-Aldrich, D-1756)を添加した。GH を雄雌の異なる分泌様式を再現する様にして細胞に暴露する際には、雄型では 1 時間の GH 含有培地での培養と 11 時間の GH 非含有培地での培養を 4 サイクル繰り返し、雌型では 48 時間連続して GH 含有培地で培養した。

(2) CHART-PCR (Chromatin accessibility by real time PCR)法でのクロマチン構造の解析は Bio-Rad 社の EpiQ Chromatin Analysis Kit を利用した。増幅した *Cyp3a41* 遺伝子プロモーター領域は -207/+18 であり、その範囲には HNF4 結合部位(-99/-87)が含まれる。

(3) *Cyp3a41* 遺伝子レポーターアッセイはマウスの肝細胞初代培養系を受容細胞とし、-163/+61 領域を pGL3 basic ベクター

(Promega) に挿入したものをレポーターとして転写因子発現プラスミドと共にトランスフェクションした。細胞溶解液のレポーター活性の測定には dual-luciferase reporter assay system (Promega)を用いた。

(4) EMSA(electrophoretic mobility shift assay)には ^{32}P で放射標識したプローブと TNT[®]T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega)で調製した組換えタンパク質を用いた。

(5) ChIP アッセイはマウス初代培養肝細胞を対象として ChIP assay kit (Upstate Biotechnology)と Santa Cruz Biotechnology より購入した抗 HNF4 抗体(sc-8987), 抗 COUP-TFII 抗体(sc-6576), コントロールウサギ IgG (sc-2027)を用い実施した。PCR で増幅した *Cyp3a41* 遺伝子の範囲は CHART PCR と同じ領域である。

(6) トータル RNA 画分はグアニジウムチオシアネート法により調製し、定量的リアルタイム RT-PCR は TaqMan プローブを用いた方法あるいは SYBR-Green を用いた方法で実施した。

4. 研究成果

(1) 遠位調節領域における HNF4 結合量の性差と性特異的発現への関与

Cyp3a41 遺伝子上には近位プロモーター(-99/-87)以外に遠位(-4.0kb と -2.7kb の 2 カ所)にも HNF4 が結合可能と思われる配列が存在する。その部位における HNF4 の結合と性差を ChIP アッセイで調べたところ、

HNF4 の結合は示されたものの雌雄差はなかった。そのことよりその領域のクロマチン構造に雌雄差はなく性特異的発現への寄与も低いことが示唆された。

(2) CHART-PCR 法を用いたマウス *Cyp3a41* 遺伝子近位プロモーター領域のクロマチン構造の解析

CHART-PCR法は予め細胞を DNaseI で処理した後に染色体 DNA を回収し、解析対象の領域を PCR で増幅するものである。クロマチンが弛緩し DNA が露出している領域は DNaseI による消化を受けやすく、その領域は断片化される。そのため、その領域は PCR によって増幅されにくくなる。一方クロマチンが凝縮し閉じた状態にある領域では DNA が DNaseI による消化を受けにくく、DNA の断片化の程度も小さくなり、容易に PCR で増幅される。この原則を基に DNaseI の接近し易さをクロマチン構造の弛緩の程度とみなし比較解析する手法である。この方法を用いて雌雄マウスの初代培養肝細胞における *Cyp3a41* 遺伝子 HNF4 結合領域のクロマチン構造を比較した結果、雄に比べ雌においてより弛緩したクロマチン構造を有している事が確認された(図1)。なおマウス初代培養細胞は単離調製後も由来する性に従った *Cyp3a41* 遺伝子の発現を示し、性差を保持していることは確認済みである。

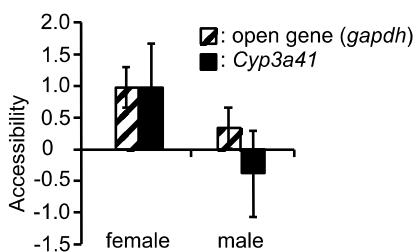


図1 CHART-PCR法を用いた*Cyp3a41* 遺伝子のクロマチン構造の雌雄比較

従来はクロマチン中の *Cyp3a41* 遺伝子を解析した ChIP アッセイの結果とヒストンタンパク質が結合していない裸の DNA を用いた解析 (EMSA やレポーター遺伝子アッセイ) の結果との比較から、クロマチン構造が雌雄で異なり雌でより弛緩し転写因子がアクセスし易い状態にあることを仮定していた。その仮説が CHART-PCR 法によって確認できたと言える。

次にクロマチン構造が GH の雌型分泌によって変化するか否か解析した。マウス初代培養肝細胞を雌雄の異なる GH 分泌を再現するようにして GH で処理をすると、雌型の GH 暴露によってのみ *Cyp3a41* 遺伝子の mRNA が増加し、この細胞系が GH 分泌の性差を認識し *Cyp3a41* 遺伝子の性依存的調節機構を保持している事を確認できた。*Cyp3a41* 遺伝子は GH の雌型暴露とグルココルチコイドホルモンとの協調作用で高い発現が起こることから、GH とデキサメタゾン (Dex) との同時処理と

クロマチン構造の関係を解析した(図2)。その結果、GH 雌型処理は mRNA レベルを上昇させるもののクロマチン構造には影響を与えなかった。一方で Dex 処理は mRNA レベルの上昇と共にクロマチンの弛緩を引き起こした。GH と Dex の同時処理は mRNA レベルをさらに上昇させたものの、クロマチン構造は無処理細胞や GH 処理細胞と同等の弛緩状態となった。この結果は Dex 処理がクロマチンの弛緩を引き起こし GH の雌型暴露は閉じる方向の作用を有する事を示し、我々の仮説とは異なる結果となった。

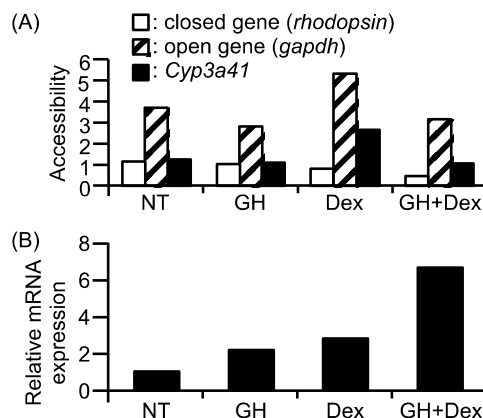


図2 CHART-PCR法を用いた*Cyp3a41* 遺伝子のクロマチン構造の解析(A)およびqRT-PCRを用いたCYP3A41 mRNAの解析(B)

(3) HNF4 と COUP-TFII の協調的調節による雌特異的発現誘導

COUP-TFII は HNF4 と相互作用することが知られている転写因子の1つである。*Cyp3a41* 遺伝子上で両者の協調作用が雌優位に起こり雌特異的発現の一因となる可能性を検討した。

siRNA を用いてマウス初代培養肝細胞における *Cyp3a41* mRNA 発現への COUP-TFII の寄与を調べた。COUP-TFII ノックダウンによって *Cyp3a41* mRNA は 50%程度に低下し発現に促進的に関与している可能性が示された。

マウス *Cyp3a41* レポーター遺伝子の転写を GH の雌型分泌を再現しつつ培養した雌由来初代肝細胞を用いて解析すると、COUP-TFII 発現プラスミドの導入で転写活性が上昇し、HNF4 との共導入ではさらに強い転写活性が観察された(図3A)。受容細胞自身の *Cyp3a41* mRNA も COUP-TFII と HNF4 の共導入により増加が観察された(図3B)。一方、雄型 GH 分泌を再現しつつ培養した雄由来初代肝細胞を用いて解析すると、COUP-TFII と HNF4 共導入による協調的転写活性化は観察されなかった(図3A)。

COUP-TFII による転写活性化が *Cyp3a41* 遺伝子のどの領域を介したものであるか調べるため、レポーター遺伝子上に存在する推定核内受容体結合配列に変異を導入したレポーターコンストラクトを用い転写活性を調べたところ、HNF4 結合部位 (-99/-87) に

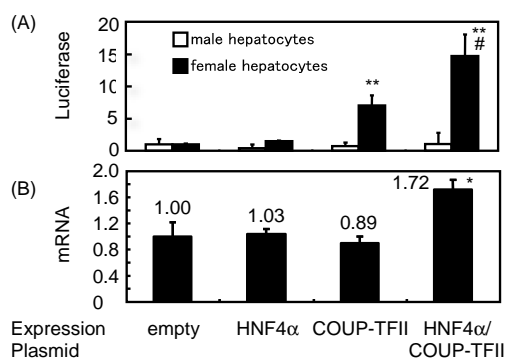


図3 HNF4α, COUP-TFII発現プラスミド導入による*Cyp3a41* レポーター遺伝子活性(A)およびメス由来初代培養肝細胞におけるmRNA発現(B)の変動. 平均±SD (n=3) ** p<0.01 (vs empty), # p<0.05 (vs COUP-TFII)。

変異を有するレポーターではCOUP-TFIIによる転写活性化が消失し, COUP-TFIIの作用がHNF4結合部位を介したものであることが示唆された(図4B)。

EMSAおよびChIPアッセイを用いて-99/-87領域を含む近位プロモーターへのCOUP-TFIIの結合を解析した。組換えタンパク質を用いたEMSAではCOUP-TFII単独での-99/-87領域への直接的結合および-99/-87領域へのHNF4結合への阻害は観察されなかった。しかしChIPアッセイではCOUP-TFIIが結合していることが示された。矛盾した結果となったが両アッセイでは用いているタンパク質が一方は組換え体でもう一方は細胞内で生理的に発現したものと翻訳後修飾などが質的な面で異なっている可能性があり, この違いが一因となっている可能性がある。これらの結果より, -99/-87領域を介したCOUP-TFIIの転写促進作用はその領域に結合しているHNF4とのタンパク質-タンパク質相互作用を介したものである可能性が考えられる。

COUP-TFII導入の効果はHNF4応答配列変異型レポーター遺伝子で大幅に低下したものの完全には消失しなかった(図4B)。そこで他の部位への結合の可能性も検討したところ, 図4A中でCOUP-TFIIと記した領域には弱いながらCOUP-TFII結合活性が検出され

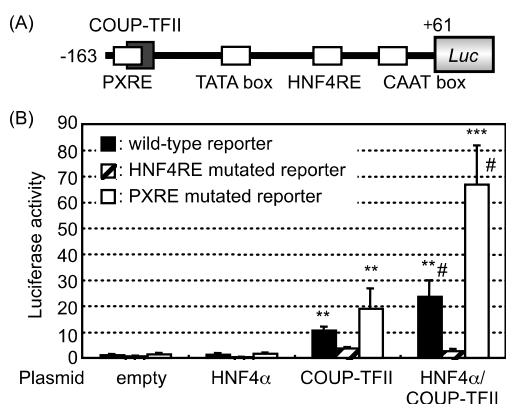


図4 変異型レポーター遺伝子に対するHNF4α, COUP-TFII導入効果
A: マウス*Cyp3a41*遺伝子近位プロモーター領域の構造(推定結合配列)。B: レポーター遺伝子活性. 平均±SD (n=3), ** p<0.01, *** p<0.001 (vs empty), # p<0.05 (vs COUP-TFII)

た。しかし, その領域に塩基置換を有するレポーター遺伝子(COUP-TFII結合配列変異型レポーター遺伝子)ではCOUP-TFIIへの応答性の低下は認められず, 当該部位への結合は転写活性への機能的寄与が小さいものと推定される。

(4) 総括および展望

本研究では, *Cyp3a41* 遺伝子が常染色体上に存在することからエピジェネティックな機構により雌のみでの遺伝子活性化が起こると推測し, そのメカニズムをクロマチン構造の雌雄差と仮定し検証した。その結果, クロマチン構造の雌雄差をCHART-PCR法によって検出することができ, それが*Cyp3a41* 遺伝子の雌特異的発現の分子機構の一つである可能性がより高まった。しかし同時に, これまでに*Cyp3a41* 遺伝子の調節に関わることが明らかになっている因子の中で唯一性特異的である雌型GH刺激が*Cyp3a41* 遺伝子プロモーター近傍のクロマチン構造をより凝縮する方向に働く(図2, Dex処理とDex+GH処理の比較より)という観察結果は我々の仮説と一致せず, 仮説に修正を求めるものとなった。クロマチン構造に雌雄差をもたらす因子はGHではなく未同定の性特異的因子, あるいはグルココルチコイドホルモンを介した未同定の因子であり, 雌型GHによって誘導される細胞内刺激は別の機構によって*Cyp3a41* 遺伝子の活性化に寄与しているのかもしれない。レポーター遺伝子上でHNF4とCOUP-TFIIとの協調的転写誘導が観察されたが, それは雌型GH刺激をした雌の肝細胞で顕著であり, その協調作用は有望な候補と考えられる。今後この点の解析はGH依存性特異発現のメカニズム解析で重要な課題になると考える。

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4件)

Zhou Y, Tanaka T, Sugiyama N, Yokoyama S, Kawasaki Y, Sakuma T, Ishihama Y, Saiki I and Sakurai H. p38-Mediated phosphorylation of Eps15 endocytic adaptor protein. FEBS Lett., 588, 131-7, 2014. 査読有り。

Shindo S, Sakuma T, Negishi M and Squires J. Phosphorylation of serine 212 confers novel activity to human estrogen receptor. Steroids, 77, 448-53, 2012. 査読有り。

Chatuphonprasert W, Nemoto N, Sakuma T and Jarukamjorn K. Modulations of cytochrome P450 expression in diabetic mice by berberine. Chem. Biol. Interact., 196, 23-9, 2012. 査読有り。
Udomsuk L, Jarukamjorn K, Putalun W,

Sakuma T, Kawasaki Y and Nemoto N. Modified expression of aryl hydrocarbon receptor-related genes by deoxymiroestrol, a phytoestrogen, in mouse hepatocytes in primary culture. J. Ethnopharmacol., 137, 902-8, 2011. 査読有り.

[学会発表](計 13 件)

佐久間勉, 河崎優希, 古野幸美, 後藤雄真, 茂木優治, 根本信雄, 櫻井宏明: マウス *Cyp1a2* 遺伝子フェノバルビタール型誘導剤応答領域の解析. 日本薬学会第 135 回年会, 2015, 3, 25-28, 神戸.

佐久間勉, 河崎優希, 古野幸美, 後藤雄真, 茂木優治, 根本信雄, 櫻井宏明: マウス *Cyp1a2* 遺伝子のフェノバルビタール型誘導剤による発現調節機構の解析. 日本薬学会北陸支部第 126 回例会, 2014, 11, 16, 金沢.

佐久間勉, 谷翔太, 手賀悠真, 進藤佐和子, 根岸正彦, 河崎優希, 根本信雄, 櫻井宏明: 高度に保存されている DBD 内スレオニンのリン酸化による核内受容体の活性調節. フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2013, 9, 13-14, 福岡.

谷翔太, 佐久間勉, 手賀悠真, 進藤佐和子, 根岸正彦, 梅寄雅人, 河崎優希, 根本信雄, 櫻井宏明: 高度に保存されたスレオニンのリン酸化を介した PPAR の活性調節機構. 第 28 回日本薬物動態学会年会, 2013, 10, 9-11, 東京.

栗本夕夏, 佐久間勉, 宅間祐太郎, 池松怜美, 河崎優希, 櫻井宏明, 根本信雄: マウス *Cyp3a* 遺伝子 mRNA 発現量の比較解析. 日本薬学会第 132 回年会, 2012, 3, 28-31, 札幌.

古野幸美, 河崎優希, 後藤雄真, 佐久間勉, 櫻井宏明, 根本信雄: Constitutive androstane receptor アクチベーターによる誘導性発現を担うマウス *Cyp1a2* 遺伝子 5'-上流域. 日本薬学会第 132 回年会, 2012, 3, 28-31, 札幌.

佐久間勉, 栗本夕夏, 松井友理恵, 池松怜美, 宅間祐太郎, 河崎優希, 根本信雄, 櫻井宏明: 成長ホルモンおよびグルココルチコイドホルモンによるマウス *Cyp3a* 遺伝子発現の比較解析. 第 27 回日本薬物動態学会年会, 2012, 11, 20-22, 千葉.

Kawasaki Y, Furuno Y, Goto Y, Sakuma T, Sakurai H and Nemoto N: Regulatory elements for transcriptional activation of the mouse *Cyp1a2* gene by constitutive androstane receptor-ligand. 50th Anniversary Symposium on Cytochrome P450 in Fukuoka, 2012, 12, 2-3, Fukuoka.

山縣由佳, 佐久間勉, 亀井美穂, 留場麻衣, 近藤佐千子, 河崎優希, 櫻井宏明, 根本信雄: アミノ酸加熱分解生成物

Trp-P-1 による肝細胞毒性発現機構の解析. 日本薬学会北陸支部第 123 回例会, 2011, 11, 27, 金沢.

立石裕樹, 佐久間勉, 河崎優希, 櫻井宏明, 根本信雄: マウス CYP3A の酵母内発現系の構築と基質特異性の解析. 日本薬学会北陸支部第 123 回例会, 2011, 11, 27, 金沢.

栗本夕夏, 佐久間勉, 宅間祐太郎, 池松怜美, 河崎優希, 櫻井宏明, 根本信雄: マウス全 CYP3A 分子種の mRNA 発現量の比較解析. 日本薬学会北陸支部第 123 回例会, 2011, 11, 27, 金沢.

Sakuma T, Ikematsu S, Kurimoto Y, Kawasaki Y and Nemoto N: Periodic fluctuation of *Cyp3a* gene expression in the mouse liver. 第 26 回日本薬物動態学会年会, 2011, 11, 16-18, 広島.

Kawasaki Y, Goto Y, Honryo A, Furuno Y, Sakuma T, and Nemoto N: Constitutive androstane receptor responsive region in the 5'-flanking region of the mouse *Cyp1a2* gene. 第 26 回日本薬物動態学会年会, 2011, 11, 16-18, 広島.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐久間 勉 (SAKUMA, Tsutomu)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・准教授

研究者番号: 30250468

(2) 研究分担者

河崎 優希 (KAWASAKI, Yuki)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号: 30432107