

氏 名 (本 籍)	森 麻 美 (滋賀県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 1 0 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 7 年 9 月 1 4 日
学 位 論 文 題 目	UDP-glucuronosyltransferase 1A4 polymorphisms in a Japanese population and kinetics of clozapine glucuronidation (UDP-グルクロン酸転移酵素 1A4 の日本人の遺伝子多型とクロザピンのグルクロン酸抱合の動態)
審 査 委 員	主 査 教 授 藤 山 佳 秀 副 査 教 授 堀 池 喜 八 郎 副 査 教 授 谷 徹

論文内容要旨

※整理番号	516	(ふりがな) 氏名	もり 森	あさみ 麻美
学位論文題目	UDP-glucuronosyltransferase1A4 polymorphisms in a Japanese population and kinetics of clozapine glucuronidation. (UDP-グルクロン酸転移酵素 1A4 の日本人の遺伝子多型とクロザピンのグルクロン酸抱合の動態)			
[研究の目的]				
<p>UDP-グルクロン酸転移酵素（以下UGT）ファミリーは、肝臓での薬物代謝の第2相の酵素群に属し、内在性物質や薬物の代謝・解毒を行う。この遺伝子は13的可変エクソン1と不変エクソン2～5をもち、エクソン1を切り替えることで一つの遺伝子から、様々な基質に対応する13の酵素をコードしている（UGT1A1～UGT1A13P）。これらの酵素のうちUGT1A1、UGT1A3、UGT1A6など多数のUGTファミリーに、活性の変化を引き起こす遺伝子多型がすでに知られている。一方、この酵素群に属するUGT1A4は、ステロイド、第1級～第3級アミンなどの代謝に関与していることが知られているが、まだ日本人における多型に関する報告はされていない。また、抗精神病薬であるクロザピンはUGT1A4によりグルクロン酸抱合されることが知られている。本研究では、薬物の副作用や効果の違いに関与している可能性があるUGT1A4の多型および酵素活性について検討を行った。</p>				
[方法]				
<p>UGT1A4（エクソン1）の遺伝子多型解析：健康ボランティア100人の末梢血からDNAを抽出し、UGT1A4に特異的なプライマーを設計してPCR法によりエクソン1の部位とイントロン1の一部を増幅した後、ダイレクトシーケンスを行って塩基配列を確認した。発現ベクターの作成および培養細胞での酵素タンパク質の発現：肝臓cDNAライブラリーよりPCR法で増幅単離したUGT1A4のcDNAを、pCR3.1ベクターに組み込んで発現ベクターを作成した。変異はpKF18ベクターを用いた site directed mutagenesis法にて導入した。COS7細胞にリポフェクション法を用いて発現ベクターを遺伝子導入し、正常と変異を持つUGT1A4を発現させた。酵素活性の測定：150 μgの細胞にジギトニン溶液を加え、超音波破碎をした後、細胞破碎溶液に50mM-Tris・HCl buffer (pH8.4)、10mM MgCl₂、8.5mM サッカロラクトン、UDP-グルクロン酸、基質（クロザピン）、¹⁴C]UDP-グルクロン酸を加えての最終濃度とし、37℃ 30分反応させた。100%エタノールで反応を止め、濃縮したものを、薄層クロマトグラフィで展開し、Instant Imager (Packard) で活性を測定した。ウエスタンブロッティング：発現細胞の破碎液は、電気泳動後、PVDF membrane (BIO-RAD)に転写した。ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences) を用いてUGT1A4特異抗体により、発現されたUGT1A4タンパクを定量した。特異抗体は化学合成したUGT1A4の10アミノ酸残基を使って作成した。統計解</p>				

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

析：酵素の K_m と V_{max} 、efficiency (V_{max}/K_m)の結果は独立した3回の実験で得られた値をt検定で解析した。同条件下でトランス-アンドロステロン、イミプラミン、シプロヘプタジン、チゴゲニンについて酵素活性測定を行った。

[結果]

日本人100人のUGT1A4のエクソン1およびイントロン1の一部を解析した。その結果、エクソン1の①142T→G: L48V ②448T→C: L150L ③804G→A: P268P、イントロン1の④867+43C→Tの4つの点突然変異 (SNPs: single nucleotide polymorphisms) が存在することを発見した。それぞれのSNPsの出現頻度は①0.165、②0.155、③0.165、④0.155であり①はアミノ酸置換を伴った。さらに、点突然変異を同時に複数個もつ遺伝子が存在し、4種類の対立遺伝子：野生型、L48V-L150L-P268P-867+43C→T、L48V、P268Pが認められ、遺伝子頻度はそれぞれ、0.825、0.155、0.01、0.01であった。欧米人にみられるP24Tの多型は今回の研究では認められなかった。UGT1A4の多型に人種差が存在することが示唆された。

人工変異導入によって発現ベクターを作成したL48Vは野生型酵素と比べ、クロザピンを基質とした場合、2倍の酵素活性を示した。また、野生型の酵素活性は基質阻害を疑わせる活性パターンを示した。同様にトランス-アンドロステロン、イミプラミン、シプロヘプタジン、チゴゲニンで活性の比較をしたところ、efficiencyはそれぞれ10.4、1.8、1.6、0.6と基質により異なった。

[考察]

本研究により、日本人においてUGT1A4にはエクソン1に3つのSNPs、イントロン1に1つのSNPが存在し、そのうちの1つはアミノ酸置換を起こす変異であることを明らかにした。また、その組み合わせにより4つのアレルが存在することを発見した。UGT1A1とUGT1A6では、酵素活性の低下を引き起こす多型が報告されており、これらの多型が癌の発症し易さや、基質となる薬によって引き起こされる副作用の個人差の原因となっていることが示唆されている。またUGT1A3では多型の一つであるW11R-V47Aが、野生型に比べて3.7倍高いエストロン抱合活性をもつことが報告されている。今回UGT1A4の多型の一つであるL48Vは野生型にくらべて2倍高いクロザピン抱合活性をもつことが分かった。Ehmerらは欧米人でP24TおよびL48Vの多型について発癌性物質およびステロイドについて活性を下げる、もしくは消失させる報告をした。本研究においては同じトランス-アンドロステロンを用いた活性測定で V_{max} を比較すると、L48Vで野生型よりも低くなるが、 K_m も低くなるため、酵素活性を比較する値であるefficiencyは高くなった。L48Vの変異型において基質により異なるefficiencyを示した。すなわち、L48Vの変異型が基質によってグルクロン酸抱合を促進させたり遅延させたりすることが示唆された。これはUGT1A4により代謝される薬物の副作用発現の背景を明らかにする上で重要な知見である。今後、UGT1A4で代謝される種々の薬物の副作用や効果について、この多型との関連を検討する必要がある。

[結論]

日本人においてUGT1A4に多型が存在し、その多型が基質によって異なる酵素活性を持つことを明らかにした。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	516	氏名	森 麻 美
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>本研究は UDP-グルクロン酸転移酵素 1A4 (UGT1A4) の遺伝子多型解析および多型による活性への影響について検討を行ったものである。</p> <p>健康ボランティア 100 人に UGT1A4 のエクソン1とイントロン1の一部のダイレクトシーケンスより多型解析を行った。また、UGT1A4 酵素発現蛋白質を用い、多型による酵素活性への影響を比較・検討した。</p> <p>その結果、UGT1A4 のエクソン1とイントロン1に4つの一塩基多型とその組み合わせによる4種類のアレルを同定した。そのうち L48V は野生型に比べてクロザピンに対する酵素活性が2倍になり、他の基質においても活性の様々な変化を生じた。UGT1A4 の多型が薬物代謝や副作用出現に影響することが示唆された。</p> <p>本研究は日本人の UGT1A4 の遺伝子多型を明らかにし、多型による酵素活性の変化を検討した論文であり、博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p>			
(平成17年 9月 1日)			