

氏 名 (本 籍) 岩 井 勝 (京都府)

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博 士 第 4 7 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 6 年 3 月 2 5 日

学 位 論 文 題 目 Six novel UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A3) polymorphisms with varying activity

(活性に影響を及ぼす、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT1A3) の新しい6つの遺伝子多型)

審 査 委 員 主 査 教 授 大 久 保 岩 男

副 査 教 授 服 部 隆 則

副 査 教 授 藤 山 佳 秀

論文内容要旨

*整理番号	472	氏名	(いわけい ちか) 岩井 勝
学位論文題目	Six novel UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A3) polymorphisms with varying activity (活性に影響を及ぼす、UDP-グルクロン酸転移酵素(UGT1A3)の新しい6つの遺伝子多型)		
<p>【研究の目的】 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の可変エクソン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)。これらの酵素の一つであるUGT1A1には、活性の変化を引き起こす遺伝子多型が知られている。一方、この酵素群に属するUGT1A3は、エストロンや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、まだ多型に関する研究が全く行われていない。本研究では、薬の副作用や発ガンに関与している可能性があるUGT1A3の多型について検討を行った。</p> <p>【研究の対象・方法】 UGT1A3 (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、UGT1A3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UGT1A3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。各変異はpKF18ベクターを用い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UGT1A3を発現させた。 酵素活性の測定: 200 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100mM-Tris・maleate buffer (pH7.4)、UDP-グルクロン酸、基質(エストロン)、$[^{14}C]$ UDP-グルクロン酸を加え、37$^{\circ}C$ 25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UGT1A3特異抗体により、発現されたUGT1A3タンパクを定量した。特異抗体は化学合成したUGT1A3の15アミノ酸残基を使って作成した。統計解析: 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分散分析で解析した。</p>			
<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。</p>			

【結果】

日本人100人のUGT1A3のエクソン1を解析した。その結果、①17A→G: Q6R②31T→C: W11R ③81G→A: E27E ④133C→T: R45W ⑤140T→C: V47A ⑥477A→G: A159Aの6つの点突然変異 (SNPs: single nucleotide polymorphisms) が存在することを発見した (①②④⑤はアミノ酸置換を伴う)。さらに、点突然変異の組み合わせにより、5種類の対立遺伝子: 野生型、W11R-E27E-A159A、Q6R-W11R-E27E-A159A、W11R-E27E-V47A-A159A、R45Wが認められた。タンパクの発現型としてはアミノ酸置換が起きない変異があるため、実際には以下の5つで発現する: 野生型、W11R、Q6R-W11R、W11R-V47A、R45W。遺伝子頻度はそれぞれ、0.61、0.10、0.055、0.125、0.11であった。

人工変異導入によって発現ベクターを作成したW11R、Q6R-W11R、W11R-V47A、R45Wは野生型酵素と比べてそれぞれ121、86、369、70%の酵素活性を示した。W11R+V47Aの活性は他の全ての酵素と比べて有意に高かった。

【考察】

研究により、UGT1A3には6つの点突然変異が存在し、そのうちの4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5つの対立遺伝子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。本研究でもUGT1A3の対立遺伝子による抱合活性の差が見い出されたことから、個人レベルでの薬剤や内因性ホルモンへの抱合活性に差が生ずると考えられた。これはUGT1A3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、UGT1A3で代謝される種々の薬物の副作用やステロイドホルモンが関与する疾患の発症と、この多型との関連を検討する。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	472	氏名	岩井 勝
(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 (UGT1A3) の遺伝子多型の解析と、多型による活性への影響について検討をおこなったものである。</p> <p>健康ボランティア100人でUGT1A3の遺伝子解析を行い多型の有無を調べた。さらに変異遺伝子の発現ベクターを作成し、培養細胞を用いてのアレル毎の酵素活性の比較を行った。</p> <p>その結果、UGT1A3に新しい6つの一塩基多型が存在し、組み合わせにより5種類のアレルが認められた。5種類のアレルのうち、1つに野生型の3.7倍の活性が認められた。この結果は、UGT1A3多型とこの酵素の生体基質に関連する疾患や、代謝される薬物の感受性の差との密接な関係を示唆するものであった。</p> <p>本研究は、UGT1A3における遺伝子多型を初めて明らかにし、各変異に関する酵素活性の比較を行った論文であり、博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>なお本学位授与申請者は、平成16年2月3日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
(平成16年2月10日)			