

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 4日現在

機関番号：12702

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370106

研究課題名（和文） 霊長類チトクローム P450 遺伝子群の多型・発現・パースアンドデス

研究課題名（英文） Polymorphism, gene expression and birth and death process of primate cytochrome P450 gene family

研究代表者

颯田 葉子 (SATTA YOKO)

総合研究大学院大学・先導科学研究科・教授

研究者番号：20222010

研究成果の概要（和文）：チトクローム P450（CYP）は生体内外に由来する物質の代謝に関わる酵素である。この酵素の種類は生物によって異なることが知られており、生息環境や食性の違いを反映していると考えられる。本研究では、特に、薬物の代謝に関わる CYP サブファミリーの分子進化や肝臓での発現解析を行い、CYP の多様化の生物学的機構を明らかにすることを目的とした。その結果、サブファミリーの起源は、羊膜類と両生類との共通祖先にまで遡ること、またその酵素の基質特異性を決める領域での特異的な進化の様相を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Cytochrome P450 (CYP) is an enzyme that is involved in metabolism of chemicals derived from inside or outside of bodies. The variety of the enzymes is observed among different species, probably reflecting the difference in habitats or diets of species. To know biological mechanism for diversifying enzymes among species, we examined molecular evolution of *CYP2D* subfamily that is involved in drug metabolism, and *CYP* mRNA expression differences between primate species. The analysis shows the origin of the subfamily in an ancestor of amphibian and Amniota and the specific feature of evolution at amino acid substitutions at the substrate recognition sites of the enzyme.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 6,100,000 | 1,830,000 | 7,930,000 |
| 2010年度 | 7,200,000 | 2,160,000 | 9,360,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,500,000 | 4,350,000 | 18,850,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：環境、遺伝的多型、基質特異性、霊長類、偽遺伝子化、人類進化、遺伝子重複

1. 研究開始当初の背景

チトクローム P450 は 450nm に最大吸収波長を持つ色素として同定された。1960 年代にこの色素が薬物やステロイドの代謝に関わる酵素であることが明らかになった。1980 年代には様々な生物から cDNA が単離

されチトクローム P450 はヒトにも細菌にも存在する起源の古い酵素であることが明らかになった。同時に、チトクローム P450 の遺伝子は相同性が比較的高いメンバーにより構成される多重遺伝子族を構成していることもわかってきた。21 世紀に

なりヒトやマウスなどのゲノム塩基配列が明らかになると、ゲノム中にチトクローム P450 多重遺伝子族メンバーがいくつ存在するかが明らかになってきた。ヒトでは、57 個の機能遺伝子と 58 の機能を失った偽遺伝子がある。機能遺伝子の数はマウスでは 102 個、イヌでは 54 個等、生物種による違いも大きく、これらの多重遺伝子族メンバーの多くが各々の生物種に特異的である事も知られている。しかし、ヒトに近縁な他の霊長類でこの多重遺伝子族メンバーがどのような構成要素になっているか、種特異的な機能遺伝子、偽遺伝子がどのくらいあるのか、遺伝子重複・欠損の程度に種間差はあるのか、遺伝子発現のパターンは種間でどの程度異なるのかについては明らかになっていない。チトクローム P450 分子進化の詳細な解析により、ヒト及び霊長類での多様性獲得の歴史を明らかにしたい。

2. 研究の目的

本研究では以下の視点から *CYP* 遺伝子群の進化を明らかにすることを試みた。

1) 分子進化的視点：*CYP* の霊長類での birth-and-death プロセスを、ヒト・チンパンジー・オラウータン・アカゲザルのゲノム塩基配列の比較から明らかにする。この時、遺伝子重複と偽遺伝子化に着目し、霊長類各種での *CYP* の多様性構築の過程を明らかにする。特に、*CYP* 多重遺伝子族にはヒトで特異的に機能を失った偽遺伝子が 4 つ知られているが、他の霊長類での種特異的な偽遺伝子、あるいは複数の種が共有する偽遺伝子について、いつ機能を失ったのか、他の霊長類ではどのように進化しているのかを調べる。また種特異的な遺伝子重複についても解析する。このようにして、*CYP* の進化過程における birth-and-death プロセスの特性を明らかにし、主要組織抗原遺伝子群 (*MHC*) や苦味受容体 (*T2R*) の場合と比較する。

2) 遺伝子発現の視点：*CYP* の発現の違いによる種特異性を明らかにする。ヒトの *CYP* の発現の頻度が高いのは肝臓である。そこで、ヒトおよび近縁霊長類 (ゴリラとフクロテナガザル) の肝臓 (サンプル現有) から mRNA を抽出し、肝臓で発現する *CYP* のプロファイルを種間で比較する。更に RT-PCR 法を利用してこれら肝臓で発現する *CYP* の mRNA の定量比較を行い、種ごとの発現パターンを明らかにする。さらに、*CYP* の発現に関与する転写因子や核内受容体に着目し、これらの因子が *CYP* の発現と連

関して変化しているかを調べる

3) 集団遺伝学的視点：*CYP* 遺伝子族の中でも、*CYP2D6* には多数の対立遺伝子があり、民族間でもその対立遺伝子の分布に違いのあることが知られている。また、この多型維持に自然選択の関与している可能性が指摘されている。*CYP* での自然選択の機構、対立遺伝子の頻度分布の違いがどのように生まれたかを明らかにする。

3. 研究の方法

1) 分子進化的解析

① 偽遺伝子化について：ヒト特異的な偽遺伝子といわれている *CYP* 偽遺伝子が 4 つあるが、それらを含めて、種特異的な機能遺伝子、偽遺伝子を調べるため、ヒト、チンパンジー、オラウータン、アカゲザル、マーモセットのゲノムデータベースから *CYP* 遺伝子を相同性検索で単離し、解析した。

② *CYP2D* サブファミリーを含む、染色体領域について、ヒト、チンパンジー、オラウータン、アカゲザルの比較を行った。このとき、チンパンジーとオラウータンでそれぞれ、塩基配列が未決定の領域等を含んでいたため、その部分の配列決定も行った。

2) 遺伝子発現解析

① 肝臓 mRNA での *CYP* 遺伝子群の発現
ヒト 4 個体、ゴリラ 2 個体、フクロテナガザル 2 個体の計 8 個体それぞれの肝臓サンプルから total RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法で異なるサンプル間の *CYP* について定量比較を行った。mRNA 量の補正のために、内在性コントロール遺伝子として PPIA (peptidylprolyl isomerase A) を用いた。

3) 集団遺伝学的解析

さまざまなデータベースを利用して、*CYP* 対立遺伝子頻度や、対立遺伝子の塩基配列情報を収集し、解析する。

4. 研究成果

1) 分子進化的解析 (安河内・川嶋・颯田)

① ヒト特異的 *CYP* 偽遺伝子の探索。

ヒトのゲノムには 115 個の *CYP* 遺伝子があるが、そのうち 58 個は機能を失った偽遺伝子で、残りの 57 個が酵素をつくることのできる遺伝子である。この 58 個の偽遺伝子のなかで、4 個の遺伝子がヒト特異的であると報告されている。そこでこれらの遺伝子にどのようなヒト特異的な変異

が、起きたのかを明らかにするために、他の霊長類 *CYP* との比較を行ったところ、ヒト特異的な偽遺伝子は、*CYP2G2P* だけであった。他の3遺伝子では、偽遺伝子化の原因と考えられる変異が、新世界ザルとも共有していることが明らかとなった。さらに、偽遺伝子化により遺伝子に蓄積する非同義置換の速度が加速するという性質を利用して、偽遺伝子が誕生した時間を推定すると、およそ260万年前であることがわかった。現在入手可能なデータベースのヒト塩基配列の多型データにもとづくと、現存するヒトは全て、この偽遺伝子を持っている。*CYP2G2* の元の機能を、マウスのオーソログから推測すると、ステロイドホルモンの代謝に関与している可能性が高い。260万年前に偽遺伝子化したことが、ヒトのステロイドホルモンの代謝に何らかの特異的な変化を生じさせて可能性を示唆できた。この成果は現在、論文として国際誌に投稿準備中である。

② *CYP2D6* の起源

さまざまな代謝に関与する *CYP* の中で、*CYP2D6* は薬物の代謝に関与していることが知られており、*CYP2D6* の多型が、薬物の代謝速度を制御していることも知られている。しかし、ヒトが天然由来以外の化学物質を薬物として利用する様になった歴史は大変浅い。そこで、この *CYP2D6* の遺伝子の起源を明らかにするために、*CYP2D* サブファミリーを17種の脊椎動物のゲノムとホヤゲノムで網羅的に探索した。また、相同性からだけでなく、シンテニーの情報も用いて、オーソログの同定を行った。その結果、周辺領域を含んだシンテニー (*NDUFA6* と *TCF20* が *CYP2D* サブファミリー両隣にある) は、羊膜類(哺乳類、鳥類、は虫類)には、検出できた。しかし、魚類とホヤのゲノムには、相同な領域がみつからなかった。両生類のゲノムには、*NDUFA6* と *TCF20* はなかったが、別の隣接遺伝子 *SREBF2* と *WBP2NL* が *CYP2D* とともに同定され、オーソログな領域であると判断された。*CYP2D* サブファミリーの出現は、両生類と羊膜類の祖先にまで遡る。水中生活から陸上生活へと生息環境が変わったことにより、新規の化学物質にさらされる様になったことと、このサブファミリーの出現との関連が示唆される。この結果は、国際誌 (GGs) に掲載された。

③ *CYP2D* サブファミリーの進化

ヒト *CYP2D6* 遺伝子は、二つの偽遺伝子 *CYP2D7P* と *CYP2D8P* とともに *CYP2D* サブファミリーを構成し、ヒト22番染色体にクラスターとして存在する。*CYP2D* サブファ

ミリーの進化を明らかにするために、ヒト及びその他の霊長類から、計14の *CYP2D* 遺伝子を単離し、分子進化学的解析を行った。ヒト、チンパンジー、オラウータンには *CYP2D6*、*CYP2D7* と *CYP2D8* の3遺伝子座が存在するが、アカゲザルとマーモセットは *CYP2D6* と *CYP2D8* の2遺伝子座だけであった。*CYP2D6* の重複により、ヒトと類人猿の祖先で、*CYP2D7* が誕生した。また、オラウータンとヒトは *CYP2D7* と *CYP2D8* の2遺伝子が偽遺伝子化していたが、チンパンジーは *CYP2D8* だけが偽遺伝子化していた。一方、アカゲザルとマーモセットでは *CYP2D6* と *CYP2D8* に機能を損なう様な塩基置換は観察されていない。塩基配列の比較から、*CYP2D7* の偽遺伝子化はヒト、オラウータンで独立に起きたことが明らかとなった。また、*CYP2D8* もヒトとチンパンジーの共通祖先とオラウータンの系統で2回の偽遺伝子化が起きている。*CYP2D7*、*CYP2D8* の機能は明確ではないが、これらの遺伝子が独立に複数系統で機能を失ったことは興味深い。

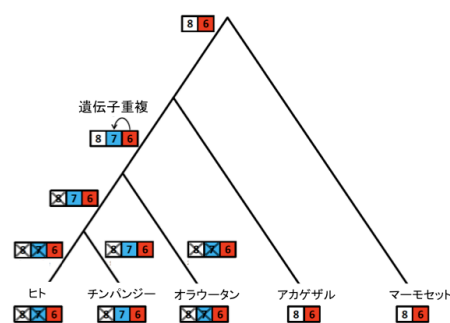
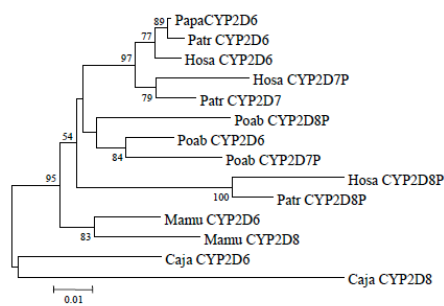


図1. ヒト *CYP2D* サブファミリーの進化過程。 *CYP2D7* はヒト・チンパンジー・オラウータンの祖先で、遺伝子重複により誕生し、ヒトとオラウータンの系統で独立に機能を失った。

更に、14遺伝子のアミノ酸配列の系統樹解析から基質特異性を決める領域 (SRS) では、*CYP2D6* と *CYP2D8* はそれぞれ異なるクラスターを形成するのに対して、遺伝子全体では、*CYP2D6*、*CYP2D7*、*CYP2D8* が入り交じる系統樹となった。



ミリーの系統関係。基質認識部位 (SRS) 以外の領域を用いた。Hosa: ヒト、Papa: ピグミーチンパンジー、Patr: チンパンジー、Poab: オラウータン、Mamu: アカゲザル

この結果は、SRS 以外の領域では、遺伝子変換のために、異なる遺伝子座間で配列の交換が起きているためであることを確認した。一方、SRS にはその機能特性を維持するため、遺伝子変換に対して純化選択が働いた可能性を示している。SRS でのアミノ酸の置換には、多様化選択 (平衡選択) が働いているとする報告もあるが、少なくとも、CYP2D6 については、そのような選択が働いていることは、同義置換・非同義置換の蓄積からも示唆されなかった (表 1)。しかし、非同義置換の数だけを比較すると、基質認識領域では、それ以外の領域のおよそ 2 倍を蓄積しており、基質認識領域とそれ以外の領域では、機能的制約の違いに明らかかな差があることが示された。

| | 配列数 | 基質特異性領域 | | 基質特異性領域外 | | 全領域 | | |
|--------|-----|------------------|-----------|------------------|-----------|------------------|------------------|-----------|
| | | d_N | d_N/d_S | d_N | d_N/d_S | d_N | d_S | d_N/d_S |
| CYP2D | 9 | 0.090 (0.016) | 0.60 | 0.036 (0.004) | 0.24 | 0.044 (0.004) | 0.151 (0.013) | 0.29 |
| CYP2D6 | 6 | 0.046 (0.010) | 0.34 | 0.025 (0.004) | 0.19 | 0.028 (0.003) | 0.134 (0.013) | 0.21 |

表 1 霊長類 CYP2D および CYP2D6 の非同義置換数 (d_N) と同義置換数 (d_S) の比較。全ての場合で比率 (d_N/d_S) は 1 よりも有意に小さかった。

CYP 遺伝子群の多様性の維持は、体外に由来する非自己を認識する必要がある主要組織適合性遺伝子群 (MHC) の多型維持とその生物学的意義の点で共通性が考えられる。しかし、MHC の多様性維持には多様化選択が強く働いているのに対して、CYP ではその傾向がみられなかったのは興味深い。この結果は、現在国際誌に投稿準備中である。

④ CYP3A サブファミリーの進化

CYP2D6 と同様に生体外由来の化学物質 (主に薬物) の代謝に関与しているのが、CYP3A サブファミリーである。4 つの機能遺伝子と二つの偽遺伝子がヒト 7 番染色体の長腕に存在している。これら 4 つの機能遺伝子について霊長類 6 種から遺伝子の塩基配列を集め、それらの系統解析を行った。その結果は、CYP2D の場合とは異なり、遺伝子座ごとにあきらかなクラスターを形成した。このことは、CYP2D と CYP3A では異なる進化のパターンであることを示している。この違いの原因が CYP の基質の違

いと関連しているのかもしれない。

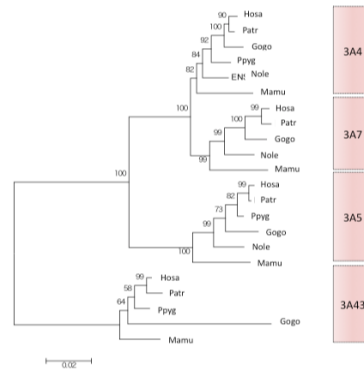


図 3. 霊長類 CYP3A サブファミリーの系統関係。遺伝子の全コード領域を用いた。Hosa: ヒト、Patr: チンパンジー、Gogo: ゴリラ、Ppyg: オラウータン、Nole: テナガザル、Mamu: アカゲザル

2) 遺伝子発現解析 (西岡・颯田)

① ヒト、ゴリラ、フクロテナガザルの肝臓での CYP 遺伝子の発現

ヒト 57 機能遺伝子の中で、22 遺伝子についてヒト、ゴリラ、フクロテナガザルの肝臓での発現が PCR 法により確認できた。そこで、発現の種差を定量するために、この 22 種の遺伝子座について、定量 PCR に用いるプライマーの設計を行った。標的とする遺伝子座について定量ができるプライマーセットは 17 種の遺伝子座で設計できた。

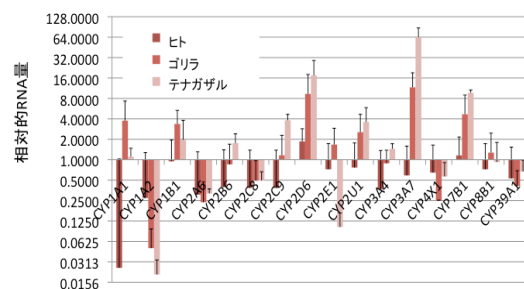


図 4. 霊長類における CYP 遺伝子の発現量の比較。ヒトの PPIA の発現量を 1 としたときの相対値。発現量の標準誤差はそれぞれヒト 4 個体、ゴリラ 2 個体、テナガザル 2 個体のデータからとめた。

このなかで、CYP3A4 と CYP3A7 の発現量にはヒトとテナガザル間に有意な差があることが統計的に示された。いずれの場合もテナガザルでヒトよりも発現量が高い (図 3)。さらに、これらの遺伝子の発現量を制御している因子についても発現量を調

べた。これらの CYP の発現には、いくつかの核内受容体や転写因子がその制御に関わっていることが知られているが、多くの因子は種間での発現差は観察されなかった。

今後は、この種差の生物学的意義を明らかにしていくとともに、発現量の種差の要因となったと推測される CYP 遺伝子の領域の配列比較を進めたい。

3) 多型解析 (颯田)

CYP2D6 の遺伝子座には、機能的な多型が存在することが知られている。この多型が個人の薬物の代謝の速度に大きな影響を与えている。しかしヒトと薬物の歴史は、CYP2D6 の歴史と比較すると非常に最近のできごとである。そこで、ヒトの CYP2D6 の多型の起源と、多型維持の機構を明らかにするために、CYP2D6 遺伝子座のヒト集団での対立遺伝子の配列をデータベースから収集することおよび、対立遺伝子の民族集団における頻度データの収集を中心に行った。今後は、これらのデータをもとに、CYP での自然選択の機構、対立遺伝子の頻度分布の違いがどのように生まれたかを明らかにする。

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 1 件)

- ① YASUKOCHI Y. and Y. SATTA, 2011
Evolution of the CYP2D gene cluster in humans and four non-human primates. *Genes Gent Syst* 86:109-116.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/ggs/86/2/86_2_109/_article

[学会発表] (計 7 件)

- ① KAWASHIMA A. and Y. SATTA, Molecular Evolution of detoxification genes in human, *Phylomedicine Symposium*, March 2012, Alizona, USA
② KAWASHIMA A. and Y. SATTA, Molecular evolution of CYP2 cluster genes in primates, *Society for Molecular Biology and Evolution*, July 2011, Kyoto, Japan,
③ KAWASHIMA A. and Y. SATTA, Molecular evolution of human CYP2 cluster genes, *International Conference on Cytochrome P450*, June 2011, Manchester, UK

- ④ YASUKOCHI Y. and Y. SATTA, Molecular evolution of the CYP2D subfamily in the human and non-human primates. *International Conference on Cytochrome P450*, June 2011, Manchester, UK
⑤ 安河内彦輝、颯田葉子 「ヒトの薬物・化学物質に対する代謝システム構築過程の解明－霊長類 CYP2D サブファミリーの分子進化－、日本遺伝学会第 82 回大会、2010 年 9 月、札幌、

[その他] (計 1 件)

安河内彦輝、颯田葉子 「ヒトの薬物・化学物質に対する代謝システム構築過程の解明－霊長類 CYP2D サブファミリーの分子進化－」が「日本遺伝学会第 82 回大会ベストペーパー賞」を受賞 2010 年 9 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

颯田 葉子 (SATTA YOKO)
総合研究大学院大学・先導科学研究科・教授
研究者番号：20222010

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

西岡 輔 (NISHIOKA TASUKU)
総合研究大学院大学・先導科学研究科・先導研特別研究員
研究者番号：50507192

安河内 彦輝 (YASUKOUCHI YOSHIKI)
総合研究大学院大学・先導科学研究科・先導研特別研究員
研究者番号：60624525

(4) 研究協力者

川嶋 彩夏 (KAWASHIMA AYAKA)
総合研究大学院大学・先導科学研究科・5 年一貫性博士課程学生