

総 説

薬物代謝酵素誘導の分子機構と個人差の研究

永田 清

Molecular Studies of Induction Mechanism and Individual Differences in Drug Metabolizing Enzymes

Kiyoshi NAGATA

(Received November 21, 2006)

はじめに

薬は、個人間で必ずしも同様な効果が得られないために、各個人にあった薬物投与設計、即ち Personal Medicine が近年注目を浴びている。この個人間によって異なる薬効あるいは副作用・毒性発現の原因を遺伝子配列の違いによって説明する試みが行われてきた。その一つに近年、全世界的な一大プロジェクトとして行なわれたヒトの全遺伝子配列解析が完了した。その結果、莫大なデータの集積とその整理によって、現在では生物学の基礎研究においては不可欠となったデータベース使用が可能となっている。また、それを基にした Single Nucleotide Polymorphism (SNP) の解析が行われた¹⁾。これらのデータを基に薬効あるいは副作用・毒性発現の個人差についての解析も行われている。中でも、薬物代謝酵素、殊にチトクローム P450 (P450) は、早くから遺伝子解析が行われ、酵素活性の大きな個人差を引き起こす遺伝子多型が明らかとされている^{2,3)}。また、つい最近、Nature 誌に個人間の遺伝子数に違いがあることが報告され、これも個人差を生む原因の一つと考えられている⁴⁾。薬物代謝酵素においても既にいくつかの多重遺伝子 (CYP2D6, CYP2A6, SULT1A3) の報告もなされている⁵⁻⁷⁾。しかしながら、一方で薬物代謝酵素活性の個人間変動は、これら酵素の遺伝子多型ではすべて説明できないことも判明してきた。ではその他の個人差を引き起こす要因として何が考えられるのか。それは直接的な遺伝子変動によるものに加え、遺伝子の転写活性化の個人差の違いあるいは外来性の化学物

質による活性変動、いわゆる薬物相互作用がもう一つの大きな原因であると考えられる⁸⁾。本著においては、著者が薬物代謝酵素の個人差解明研究の一環として行ってきた薬物代謝酵素遺伝子の転写活性の分子機構について解説する。

薬物代謝酵素研究の歴史

肝臓を酵素試料源とする *in vitro* の薬物代謝研究は、1950年代に始まった⁹⁾。1948年に Mueller と Miller によって初めてラット肝ホモジネートを用いた研究の報告があるが¹⁰⁾、その後、1955年に Axelrod によってアンフェタミンの脱アミノ化反応に、肝ミクロゾーム分画すなわち小胞体に存在する酵素が必要なこと、さらにエフェドリンの代謝研究から、これらの酵素反応には酸素分子と NADPH が必要であると報告された^{11,12)}。Axelrod (Axelrod は 1970 年に、神経伝達物質であるカテコールアミンの研究により、ノーベル賞を受賞) によるこの研究が、薬物代謝酵素系の研究の始まりと言ってよい。

一方、薬理効果が薬物の血中濃度に依存していることは、J. Shannon によって 1944 年に提唱され¹³⁾、B.B. Brodie らの研究グループによって明らかとされた^{14,15)}。その後、1954年に同グループの J.R. Cooper らによって SKF-525A がバルビタールの作用を増強する原因として、バルビタールの代謝が SKF-525A により阻害されることが見出された¹⁶⁾。さらに、1959年に A. Conney, および同時期に H. Remmer や R. Kato らにより薬物代謝酵素の誘導が見出されたことで、薬物の血中濃度は

Table 1. Human P450 involved in drug metabolism

P450 forms	Individual difference	Percentage in liver	Percentage of drug	No. of allele (protein)	No. of low or no activity
CYP1A2	40	12	4	36 (14)	7
CYP2A6	30	4	2	50 (21)	14
CYP2B6	50	< 1	-	53 (15)	11
CYP2C9	25	18	10	37 (29)	19
CYP2C19	~100	< 1	2	27 (16)	11
CYP2D6	> 1000	4	30	101 (42)	37
CYP2E1	20	6	2	13 (4)	1
CYP3A4	30	28	50	40 (18)	6
CYP3A5	> 100	0-8	-	24 (7)	6

薬物代謝活性によって大きな影響を受けることが明らかとされた。これらが薬物相互作用の初めての研究報告である¹⁷⁻¹⁹⁾。

この発見から現在まで約半世紀過ぎたが、薬物代謝酵素の研究は、1960-1970年代にその存在が明らかにされたP450を中心に、精製、cDNAクローニング、遺伝子解析そして遺伝子転写活性化機構解明へと発展してきた²⁰⁾。

ヒトの薬物代謝に関与している主要P450

Table 1に薬物代謝に関与する主要ヒトP450の発現量の個人変動幅とそれらの特性を示した。

特に、薬物の代謝寄与率の高いものは、CYP3A4、CYP2D6およびCYP2C9であり、比較的寄与率の高いものとしてCYP1A2およびCYP2C19が挙げられる。これらの中でもCYP2D6、CYP2C19およびCYP3A5が大きな個人差(100倍以上)を示すことがわかっており、他の分子種は20-50倍程度である。これらの個人変動の原因の最も顕著なものとして酵素遺伝子多型が挙げられる。P450の遺伝子多型については、多くの研究がなされ、多くの遺伝子多型がHuman Cytochrome P450 Allele Nomenclature Site (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>)に登録されている。その中でもCYP2D6の遺伝子多型の数が圧倒的に多く現在101種見いだされている。興味のあることとして、Table 1に示した100倍以上の個人差のある分子種と不活性型の遺伝子多型の出現率の高いものが一致しているようである。しかし、これらの個体

差をP450の遺伝子多型のみで説明ができるであろうか。最も問題となる遺伝子多型は活性がなくなるか、大きく活性が変化し、そして出現頻度が高いものである。CYP2D6、CYP2C19およびCYP3A5はこれに当たる⁸⁾。一方、CYP3A4の遺伝子多型の報告は多く見い出されているが、不活性あるいは活性低下に繋がる報告は少ない。このような個体差を引き起こす遺伝的要因として、酵素遺伝子配列以外にも原因があると考えられる²¹⁾。

酵素誘導とは

薬物代謝酵素誘導とは、薬物の投与により幾つかの代謝酵素活性が上昇する現象を指している。薬物代謝酵素誘導の生体における意義については、生体に対して毒性を示す化合物を多量に摂取した場合の対抗処置として、進化の過程で獲得したものと考えられる⁹⁾。昆虫においても同様なことが認められる²²⁾。タバコにつくある虫は、タバコの葉を食べ始めるとニコチンの作用により一時的に食欲が低下するが、しかし、その後ニコチンあるいはその代謝物によりニコチンを代謝するP450が誘導され、ニコチンの代謝、即ち、解毒されるために再び葉っぱを食べることが出来るようになることが報告されている。ではなぜ活性が上昇するのか。単純に2つの場合が考えられる。1つは、薬物によりある酵素の触媒力が上昇する。もう一つは、酵素タンパク質の発現量が増加することである。酵素タンパク質の発現量増加には、さらに発現タンパク質およびmRNAの安定化などの

原因が考えられるが、薬物代謝酵素誘導において最も問題とされるのは、遺伝子の転写活性が上昇することでmRNAの転写量が増え、酵素タンパク質の発現量が増えることである。

昔の酵素誘導の研究は、もっぱらフェノバルビタール (PB) や発ガン物質である3-メチルコロンスレン (3-MC) 等の化合物を実験動物に投与することで行われていた^{23,24)}。著者も大学院生時代は、PCBによる薬物代謝酵素誘導の研究をテーマに、ラットやマウスにPCB, PBや3-MCを投与し、肝臓の薬物代謝活性の変動と毒性発現の関係を明らかにする実験を行っていた。その結果、毒性の強いPCBは、3-MC型の酵素誘導を引き起こすと同時に他の代謝酵素活性を著しく抑制することを明らかにした²⁵⁾。特にテストステロンの水酸化活性について述べると、2 α -水酸化活性は、強く増大する一方、16 α -や6 β -水酸化活性は著しく抑制された²⁶⁾。著者はこの結果に強く興味を引かれ、ラット肝臓から5種類のP450を精製し、誘導されるP450分子種と抑制される分子種を明らかにした^{27,28)}。現在では、ラット肝臓におけるテストステロンの2 α -、6 β -および16 α -水酸化活性を触媒するP450は、それぞれCYP2A1、CYP3A1/3A2およびCYP2C11であり、さらにPB処置によって16 β -水酸化活性 (CYP2B1) が誘導されることが知られている²⁹⁾。しかし、このとき6 β -水酸化活性を触媒しているP450は精製できなかった。この精製できなかったことが著者の研究の原点であるように思われる。その後は、この活性を触媒するCYP3A分子種の研究にのめり込むようになり、CYP3A分子種の単離同定、酵素化学的性質の解明、そして遺伝子単離解析および誘導の分子機構の研究を行ってきた。

CYP3A分子種の酵素学的特性

CYP3A分子種は、他のP450分子種とはその酵素化学的性質が大きく異なっているようである。この分子種は、現在哺乳動物から鳥類、ハ虫類、魚類まで見出されている⁸⁾。先にも述べたように、P450の単離精製が行われた1980年代には、この酵素の活性を有する精製品の報告はなかった。著者もテストステロンの6 β -水酸化活性をモニター

することにより、このP450の精製を試みた。P450は膜タンパクであるために精製するにあたり、可溶化剤をバッファー中に加える必要がある^{30,31)}。しかし、可溶化剤を加えるとカラムから溶出してきたサンプルを用いて直接活性を測定することはできず、活性を測定するたびに可溶化剤を除くことが必要であった。著者は可溶化剤の濃度を下げて、カラムからの溶出液の活性を測定しながら精製する手法を開発した³²⁾。この手法にて最終的に4種のラットCYP3A分子種の精製に成功した³³⁾。しかしながら、精製の純度が上がると活性は落ちていき、最後のカラムを通すと活性はほとんど見られなくなった。その後、CYP3A分子種の触媒反応にはチトクローム b_5 (b_5)が必要であることが明らかとされた³⁴⁾。おそらく、精製が進むにつれ活性がなくなってしまうのは、精製純度が上昇するに従い b_5 が除かれたためであると思われる。著者らは、本酵素が至適活性を示すには b_5 に加え、ミクロゾームの脂質が必要であることを明らかとした³⁵⁾。そこで著者は、先に精製したP450分子種にこれらの因子を加え活性を測定したところ、いずれも非常に高いテストステロンの6 β -水酸化反応を示した。

ところで、このP450を精製する過程で偶然的に、それまでに予期されなかったP450による触媒反応を見出した³⁵⁾。P450は、基本的に酸素存在下で一酸素付加反応を触媒する。その結果、多くの代謝産物は、酸素付加を受けた水酸化体、エポキシド体、N-, S-オキシドおよびN-, O-エチルあるいはメチル基が酸化された後に脱アルキルを起こしたものである³⁶⁾。ところが著者がこの時見出した反応は、テストステロンの炭素の6と7位の間に脱水素化され、2重結合を生成するものであった^{36,37)}。この論文を投稿したときは、レフリーになかなか信用してもらえなかった。その後、バルプロン酸の代謝産物として脱水素体が生成することが報告された³⁸⁾。しかも、バルプロン酸投与による毒性発現は、この代謝産物によることも明らかとされた。

ラットのCYP3A遺伝子は、遺伝子クローニングから6つ見出されているが、実際にタンパクとして、同定されているものは5つである。その中

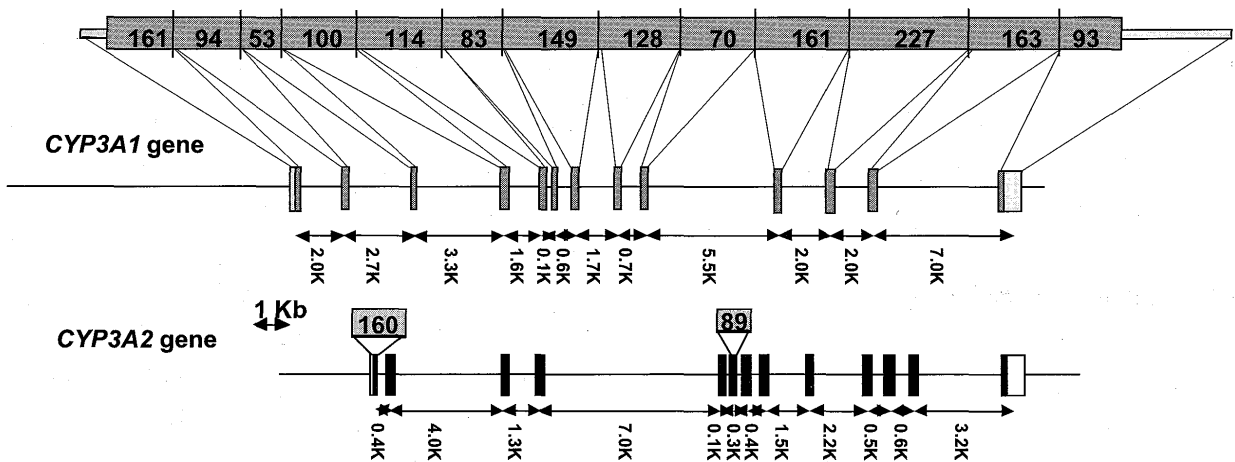
でも近年著者が見出したCYP3A63は、他のものとは異なり触媒反応には、必ずしも b_5 が必要でないことを明らかとした³⁹⁾。一方、ヒトにおいても同様の性質を示す3種のCYP3A分子種の存在が明らかとなっている。中でも先にも述べたようにCYP3A4は多くの薬物の代謝に関与するが⁴⁰⁾、CYP3A分子種の一つの大きな特徴として、基質となる化合物間に構造的にあまり共通性がなく、しかも一部の抗生物質や抗ガン剤等の大きな構造のものも基質としている点である⁴¹⁾。CYP3A以外のP450の基質は、構造的にはある程度共通性があることが判明してきている⁴²⁾。近年、CYP3A4は結晶化され、その立体構造が解明された。そして、コンピューターを用いた立体構造の解析結果より、基質の大きさによってその結合ポケットの大きさが変動すると報告されている⁴³⁾。

CYP3A分子種の遺伝子構造

一般に、構造遺伝子上流域には特定の塩基配列が存在していて、正しく転写を開始させるのみならず、その活性化の程度も制御している。この特定の塩基配列は、プロモーター、エンハンサー(サイレンサー)と呼ばれ、そのうちプロモーターは主に基本的な転写制御に関与しており、エンハンサーは転写の頻度や組織特異性に関与している⁴⁴⁾。従って、これら特定の塩基配列を同定して

そこに作用する転写因子の働きを知れば、その遺伝子の転写調節機構を理解することができ、また、人工的に誘導評価可能なレポーターアッセイ法を構築することが可能となる。これらのことが、構造遺伝子上流域を解析する理由の1つである⁴⁵⁾。

著者らは、CYP3A分子種の誘導分子機構を解明するために、まず、ラットのCYP3A1/3A2の遺伝子を単離し、全構造を明らかにすることを試みた⁴⁶⁻⁴⁸⁾。現在は、ヒト、ラットおよびマウス等の全遺伝子配列は、ゲノムプロジェクトの成果としてNCBIの遺伝子データベースの中に見出され、その情報は自由に利用できる。従って、遺伝子配列の情報が得られれば、PCRを用いることにより簡単にそのDNA断片は単離可能である。しかし、その当時は、自分で作成したゲノムライブラリーからCYP3AcDNAをプローブに用いて単離する手法しかなかった。遺伝子を単離する上で、類似した複数の遺伝子が存在することと目的の遺伝子が長い場合は非常に困難となる。ラットには、CYP3A遺伝子が6つ存在するため、単離の過程ではこれらの遺伝子断片が幾つもとれてきた。実際に幾つのクローンを単離したかは覚えていないが、100クローン以上は単離した。最終的にCYP3A1およびCYP3A2の全遺伝子を解明するのに5年以上かかった⁴⁸⁾。CY3A1/3A2の遺伝子構造



Numerical values in boxes indicate numbers of nucleotide in each exon.

Fig. 1. Gene structure of rat CYP3A forms

を Fig. 1 に示すが、13 エクソンにて約 30 kb ほどの塩基配列で構成されていることが判明した。その後、ヒトを含め CYP3A 遺伝子は、ラットの CYP3A2 と同様に 13 個のエクソンによって構成されていることが判明した。一方、Fig. 2 に示すようにヒトの CYP3A 遺伝子は 4 個存在し、遺伝子のクラスターを形成している⁴⁹⁾。この中で近年のゲノム解析の結果見出された CYP3A43 遺伝子は、mRNA の検出は可能であるが、酵素としての機能はないようであり、偽遺伝子と思われる。

ラット CYP3A1/3A2 の酵素誘導に関わるシスエレメントの解析

著者は、ラット CYP3A1 と CYP3A2 の誘導分子機構について早くから研究してきた⁴⁶⁻⁴⁸⁾。CYP3A1 と CYP3A2 は、何れも同様な薬物によって誘導されるが、CYP3A2 は常在型であり、CYP3A1 は未処置ラットではほとんど発現していないことが知られている⁵⁰⁾。遺伝子解析の結果、CYP3A1 と CYP3A2 のプロモーター領域 (-180 nt) には、Fig. 3A に示すように 3 つの転写因子の結合するシスエレメントの存在が明らかになった⁴⁷⁾。著者は、

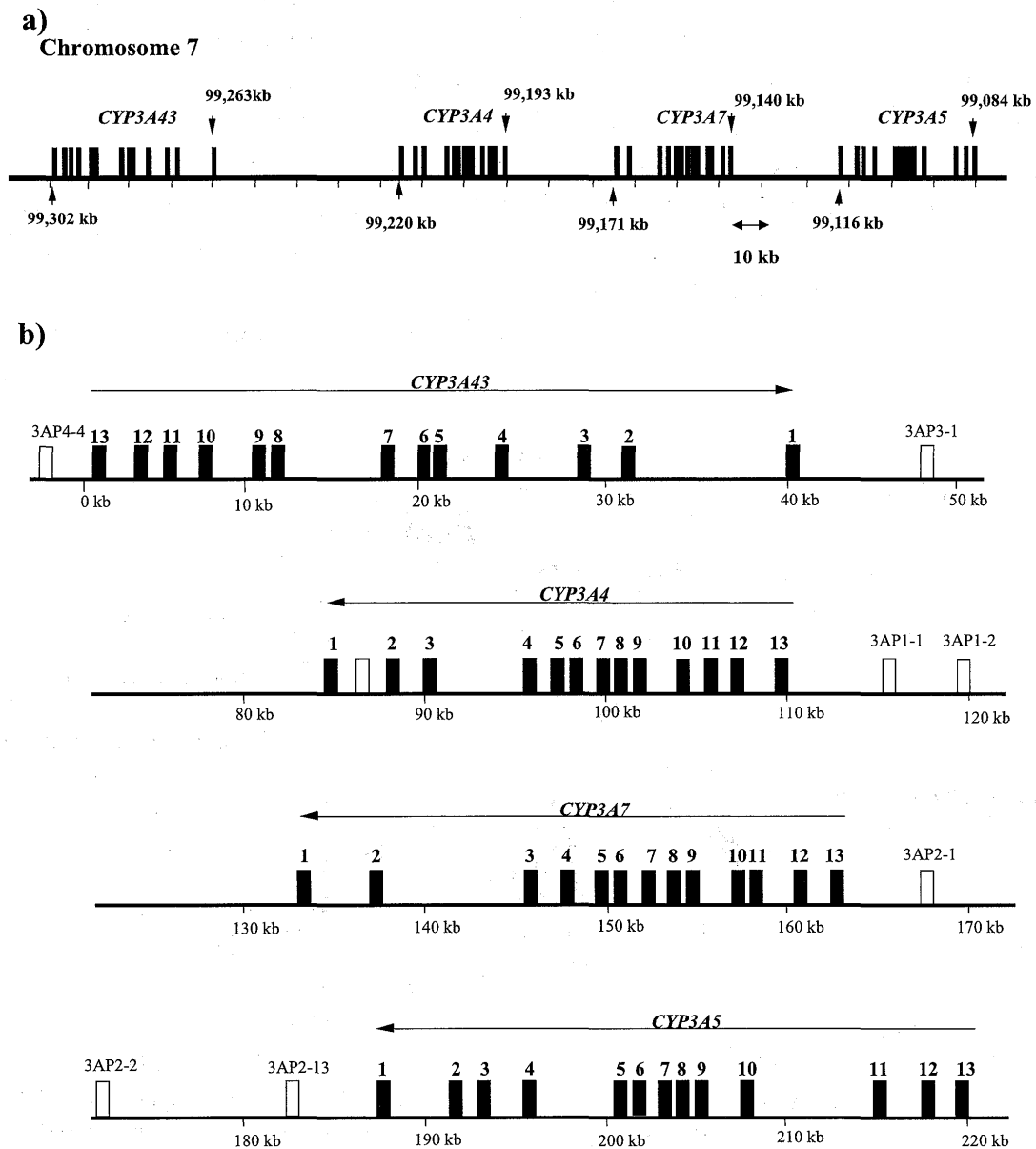


Fig. 2. Gene structure and location of human CYP3A forms

この結合サイトをTATA ボックスに近い方から A site, B site, C siteと命名したが, A siteには肝臓での特異的発現に参与している hepatocyte nuclear factor-4 (HNF-4) が結合し, 肝における CYP3A1 の発現に参与していることを初めて明らかにした⁴⁷⁾.

一方, B siteには核内レセプターが結合し得る AGTTCA が3つの塩基を挟んで direct repeat (DR-3) として存在しており, また C siteには AGTTAT と AGGTCA によって6つの塩基を挟んだ everted repeat (ER-6) が存在している. 著者は, 当時この塩基配列が核内レセプターの結合配列に類似していることから, 誘導剤の結合した未知の核内レセプターがこの部分に結合することで転写が活性化されることを予測していた. しかしながら, その当時はその核内レセプターを明らかにするまでには至らなかった. 1998年に Kliewer によって CYP3A 分子種の誘導に関する核内レセプターの一つである pregnane X receptor (PXR:NR1I2) が単離同定され, CYP3A 分子種の誘導分子機構が急速に解明されてきた⁵¹⁾.

PXRは, そもそも CYP3A 分子種を誘導するレセプターを目指して単離されたのではない. DNA データベースには機能が明らかとなっていない mRNA の断片塩基配列情報が多く蓄積されていたが, このデータベースより既知の核内レセプターと相同性を有する未知の DNA 配列が見いだされ, この情報を元に PCR を用いてマウス肝 mRNA よりその cDNA が単離された. 単離された cDNA を発現させその機能を調べたところ, CYP3A 分子種の誘導に関わっていることが判明したわけである⁵¹⁾. リコンビナント PXR および Retinoid X Receptor α (RXR α) を用い, B site および C site にこれらが結合するかを調べたゲルシフトアッセイの結果より, PXR は確かに RXR α とヘテロダイマーを形成して, B site および C site に結合していることが明らかとなっている⁵²⁾. しかしながら, 著者らの研究結果は, Fig. 3A に示すように PXR および RXR α は確かにヘテロダイマーを形成し, ラット CYP3A1 の DR-3 や ER-6 に結合するが, オーフアン核内レセプターである apolipoprotein A1 regulatory protein-1 (ARP-1) や v-ErbA related

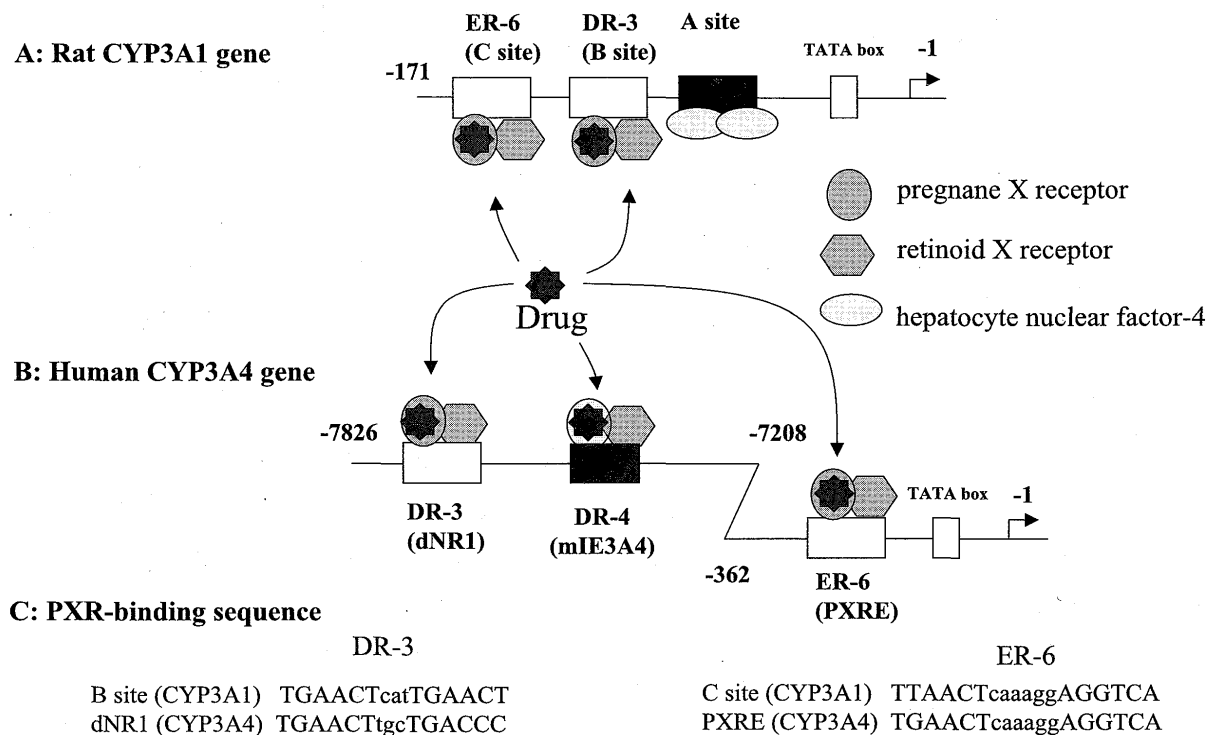


Fig. 3 Induction mechanism of human CYP3A4 and rat CYP3A1 through PXR activation

protein-3 (EAR-3) などの chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP) もこのDR-3やER-6に結合することを明らかにしている⁵³⁾。そこで著者らは、ラット CYP3A1 遺伝子を用いて、ヒト PXR (hPXR) と RXR α あるいは ARP-1 を肝がん由来の培養細胞である HepG2 に共発現させ、これらが誘導に関与しているかを検討した。その結果を Fig. 4A に示したが、誘導は hPXR と RXR α を同時発現させた時にはほとんど認められず、hPXR と ARP-1 を同時発現したときのみ認められ、しかもラット CYP3A1 遺伝子のプロモーター部分を用いたのにも関わらず、その化合物による誘導パターンは、デキサメサゾンや pregnenolone carbonitrile (PCN) では認められず、リファンピシンで認められるヒト型のものと一致していた⁵⁴⁾。

ヒト CYP3A4 の酵素誘導に関わるシスエレメント

CYP3A1 と CYP3A4 遺伝子のプロモーターを比較すると、全体にあまり相同性が認められない。CYP3A1 プロモーター領域の A site と B site に対応する CYP3A4 プロモーター領域の塩基配列には、ほとんど相同性はなく、C site に相当する PXR response element (PXRE) のみに相同性が認めら

れる (Fig. 3C)。ラット CYP3A1 遺伝子については先に述べたように、この遺伝子の誘導剤による活性化は、B site に結合している PXR を介して基本的に引き起こされ、C site に結合している転写因子によりその誘導が増幅していることが判明した⁵⁴⁾。そこで CYP3A4 遺伝子のプロモーターから 5' -上流-362 の DNA 断片の転写活性化への関与を明らかとするために Hep G2 細胞を用いて解析したが、ヒトにおける代表的な CYP3A4 誘導剤のリファンピシンによる転写活性化は、ほとんど認められなかった^{54,55)}。

一方、CYP3A4 遺伝子の上流域約 7.2kb から 7.8kb の領域が誘導に関わることが報告された。この領域にラット CYP3A1 遺伝子の B site に類似した DR-3 が見出され、誘導に関与することが明らかとなり dNR1 と命名された (Fig. 3B, C)⁵⁶⁾。そこで著者は、CYP3A4 遺伝子のプロモーター領域 (-362 bp) の 5' 上流にこの 7.2kb から 7.8kb の領域 (約 600 bp) を結合させたレポーターベクター (pCYP3A4-362-7k) を構築し、培養細胞を用いて誘導剤による転写活性化を検討した。その結果、pCYP3A4-362 では僅かしか認められなかった誘導が、pCYP3A4-362-7k でリファンピシンおよびデータは示さないがクロトリマゾールでも非常

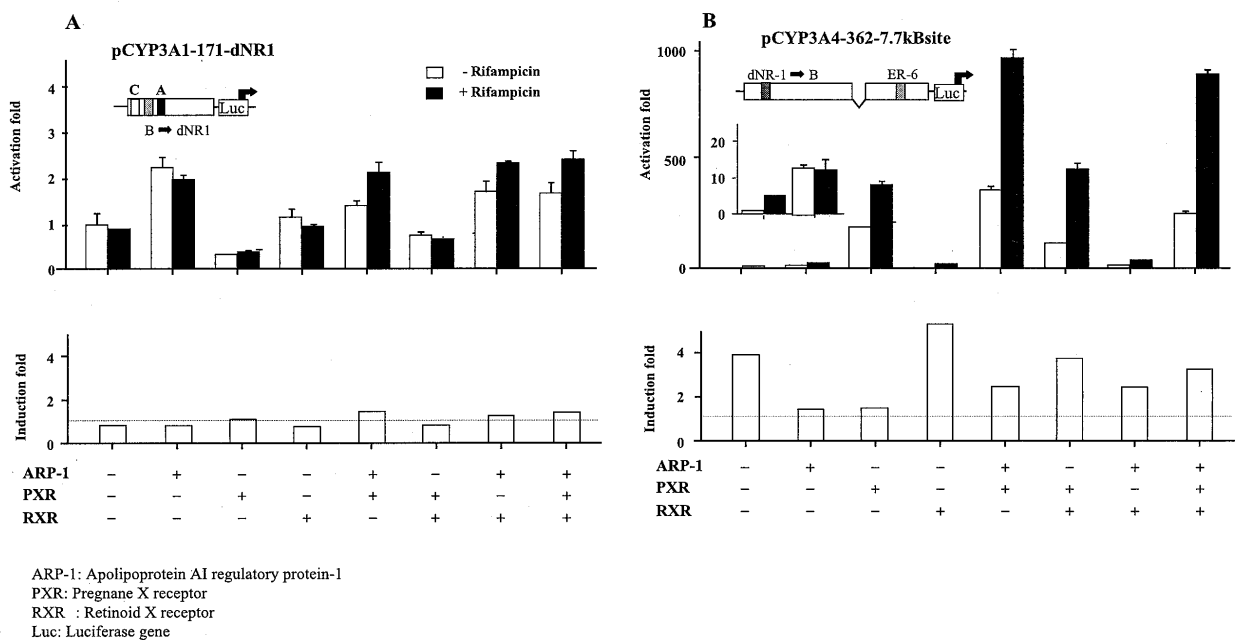


Fig. 4. Difference of transcriptional activation between CYP3A1 and CYP3A4 genes

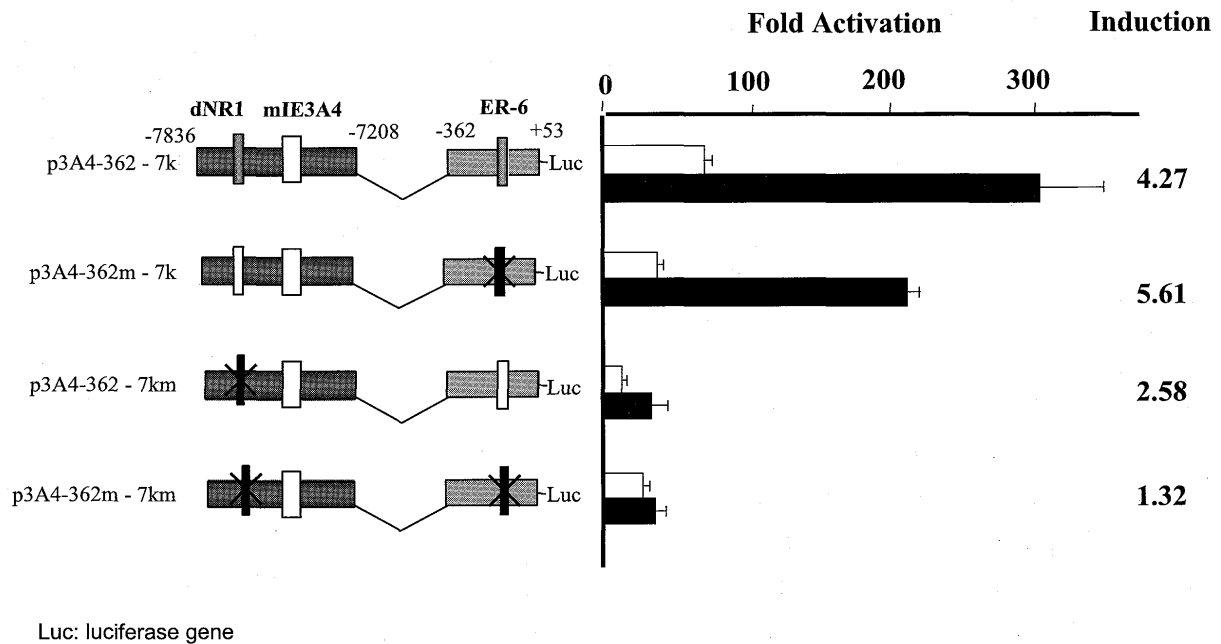


Fig. 5. Effect of mutation on reporter activity

に強く認められた (Fig. 4B). 次に, Fig. 5に示すように distal nuclear receptor binding element (dNR1) 領域の塩基配列に変異を加え PXR が結合できなくなったレポーターベクター (pCYP3A4-362-7km) は, 誘導剤による CYP3A4 遺伝子の活性化を著しく低下した. また, 同様に PXRE に変異を加えたもの (pCYP3A4-362m-7k) は, 転写活性化には大きな影響を与えなかった⁵⁴⁾. この結果は, ER-6 よりも DR-3 の方が誘導により強く関与していることを示唆しているが, 現在までは, ヒト CYP3A4 およびラット CYP3A1 遺伝子の ER-6 と DR-3 に PXR が結合することによって転写活性化が引き起こされると考えられていた.

その一方で, CYP3A1 遺伝子と CYP3A4 遺伝子の転写活性化の挙動は必ずしも同一ではなく, いくつかの点で異なる可能性が示唆された. その中でも特徴的なものは, 同じ培養細胞を用いてもラット CYP3A1 遺伝子のリファンピシンによる転写活性化はほとんど認められず, さらに PXR 過剰発現によってもラット CYP3A1 遺伝子は基本的な転写は活性化されなかった. 一方, 今回実験に用いた CYP3A4 レポーターは, HepG2 用いた場合 PXR を過剰発現させなくともリファンピシン処置による転写活性化は認められた. また, PXR を過

剰発現させると基礎的な転写活性化は大きく増加したが, 誘導倍率は変わらなかった⁵⁴⁾. この結果から, PXR は CYP3A4 遺伝子の基礎的な転写活性化にも寄与すると共に, 誘導剤によって活性化されることで誘導を引き起こしていることが予測された.

PXR による CYP3A4 転写活性化には DR-3 である dNR1 が強く関与しているものの, Fig. 6 に示すようにラット CYP3A1 の B site を dNR1 に入れ替えても, CYP3A1 の誘導剤による転写活性化に大きな変化が見られなかった. このことから, CYP3A4 遺伝子のエンハンサー領域に存在する dNR1 以外のシスエレメントが重要な役割を持っている可能性が考えられた. そこで, 次にこの未知のシスエレメントの同定を試みた. CYP3A4 遺伝子の転写開始点より約 7.6 kb 上流に PXR 応答配列に類似した構造を複数見出し, この領域を a major inducer responsive element of the CYP3A4 gene (mIE3A4) と命名した. この領域には HepG2 細胞由来のタンパク因子の結合が認められただけでなく, PXR による基礎的な転写活性化やリファンピシン添加に対する応答にも強く関与している可能性が示唆された. その中でも mIE3A4 α と名付けた DR-4 モチーフが, PXR および誘導

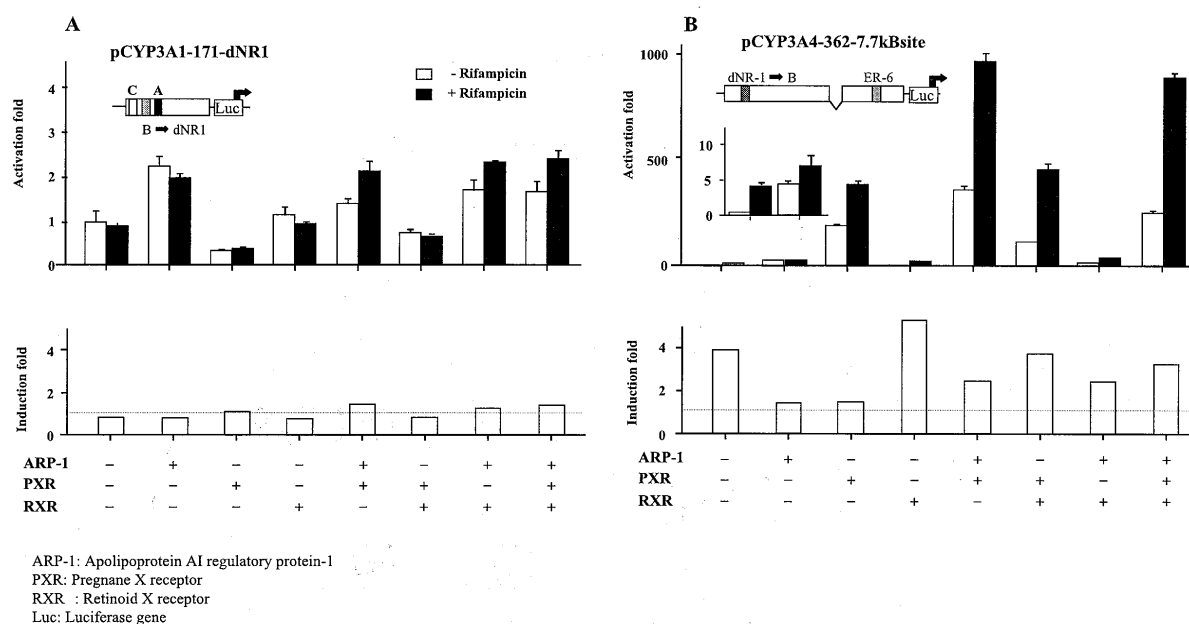


Fig. 6. Effect of changing dNR-1 and B site between CYP3A1 and CYP3A4 genes on their transcriptional activation

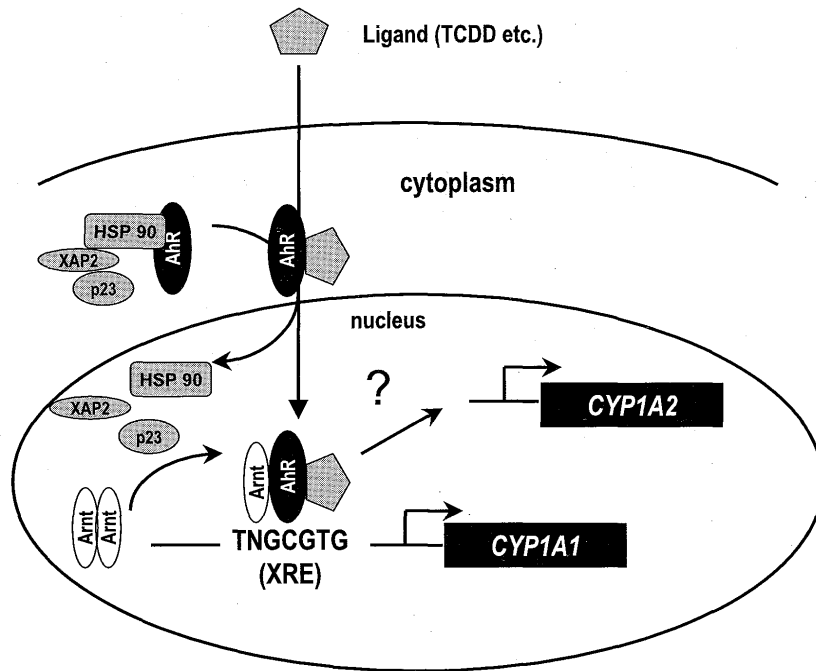
物質に対する応答に中心的に関わっている可能性が明らかとなった。一方、リファンピシンとクロトリマゾールを添加した場合には、その応答、すなわち転写活性化の挙動に違いが認められた。このことは誘導物質によるCYP3A4遺伝子の転写活性化には、複数の作用機序が存在することを示唆している (Manuscript in preparation)。

CYP1A1/1A2の酵素誘導に関わるシスエレメント

薬物代謝酵素誘導の中でもCYP1A1誘導の研究は古くから行われ、詳細な分子機構が明らかとなっている。その模式図をFig. 7に示しているが、AhRは、ステロイドホルモンレセプターなどを含む核内レセプターとは異なり、bHLH/PAS (basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim) ファミリーに属すレセプターである。AhRは細胞質中においてheat shock protein 90 (hsp90) および AhR-interacting protein (AIP) と共役して存在しているが、誘導剤がAhRに結合するとAhRは核内に入り、同じbHLH/PASタンパクであるAhR nuclear translocator (Arnt) とヘテロダイマーを形成した後に、CYP1A1遺伝子の5'上流に複数存在するXenobiotic responsive element (XRE) (5'-TNGCGTG-3') に結合して遺伝子の転写を活性化させる。

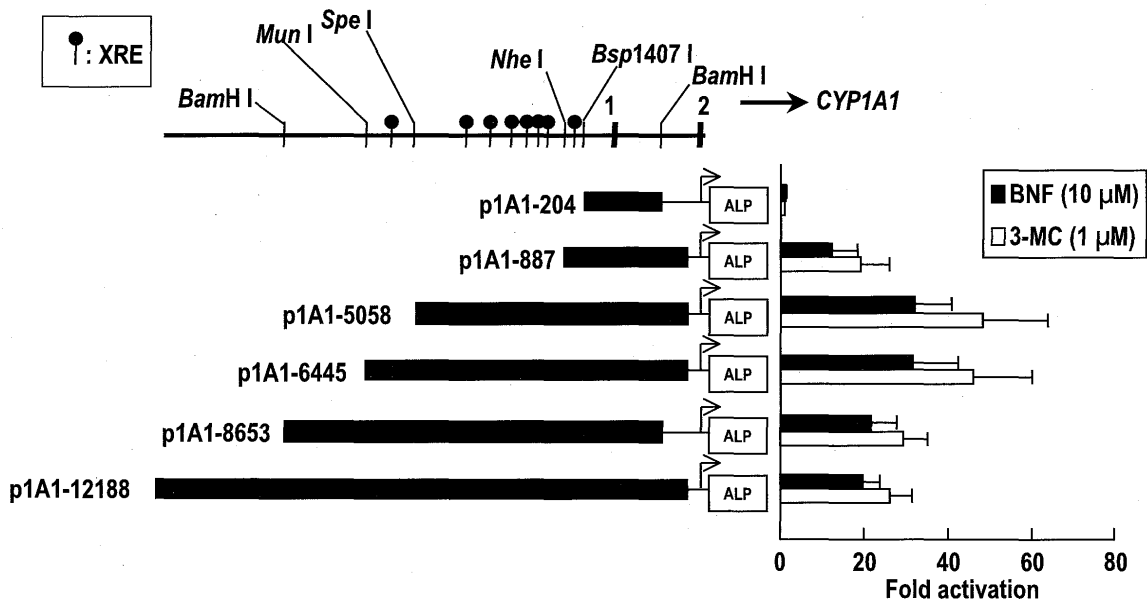
Fig. 8に示したものは、CYP1A1遺伝子プロモーターを含む種々のDNA断片について、レポーターアッセイ法にて誘導に関わる領域を解析したものである。この結果が示すように、このプロモーター上流領域-200から-4000の間に存在する複数のXREがCYP1A1の誘導に関わっていることはすでに明らかとなっており、このようなAhRを介したCYP1A1の誘導に関しては、実験動物を含め非常に多くの報告がなされ、これらの知見を基に、CYP1A1の誘導を評価するレポーターアッセイ系が数多く確立されている⁵⁸⁻⁶⁰。

一方、AhRのノックアウトマウスにおいてTCDD投与によるCYP1A1/2の誘導が見られないことや⁶¹⁻⁶³、3-MCや β -naphthoflavoneなど多くの化合物がCYP1A1だけではなくCYP1A2も同時に誘導することなどから、CYP1A2に関してもCYP1A1と同様のAhRを介した誘導機構が存在すると考えられている。しかしながら、CYP1A1と比較するとCYP1A2の誘導メカニズム解析に関する報告は非常に少なく、未だに不明な点も多い⁶⁴。また、これら2つの分子種の発現様式は全く同じというわけではない。例えば、CYP1A2は恒常的な肝臓特異的発現を示しているのに対し、CYP1A1は恒常的には発現していないが、誘導に



AhR, aryl hydrocarbon receptor; Arnt, AhR nuclear translocator; XRE, xenobiotic responsive element (5'-TNGCGTG-3')

Fig. 7. Transcriptional activation of the *CYP1A1* gene by AhR



The reporter vector was transiently transfected to HepG2 cells. After 40 h exposure of cells to compounds, ALP activities were measured. BNF, -naphthoflavone, 3-MC, 3-methylchorantherene. ALP: alkaline phosphatase gene

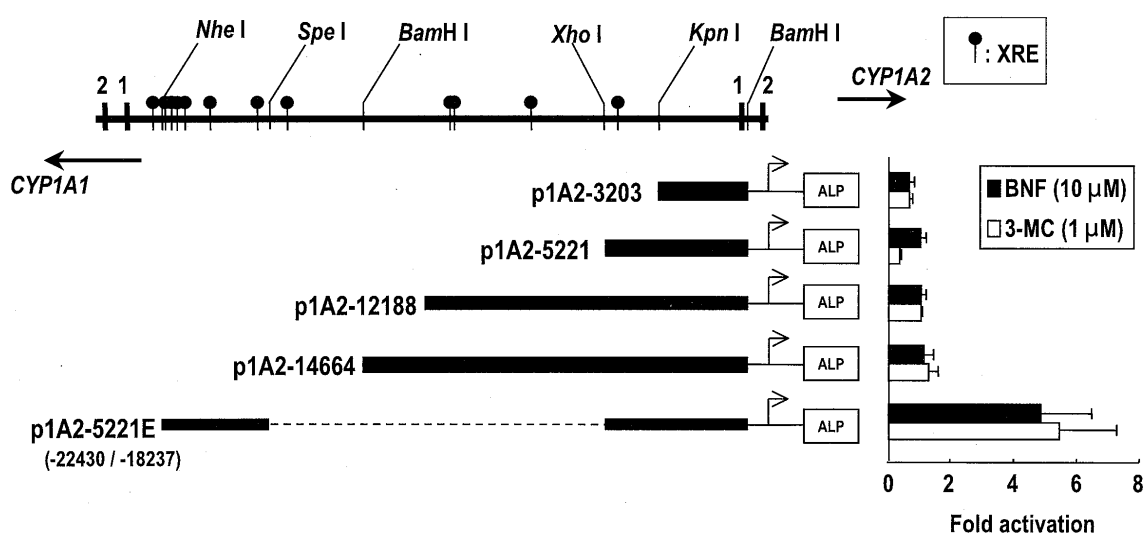
Fig. 8. Characterization of the 5'-flanking region of the *CYP1A1* gene

よって初めて広範囲の組織において強い発現が認められる⁶⁵⁾。

著者は、ヒト CYP1A2 の誘導の分子機構の解明のために、レポーターアッセイ法を用いて CYP1A1 遺伝子と同様の手法にて解析を試みた。その結果を Fig. 9 に示しているが、CYP1A2 遺伝子プロモーターを含む DNA 断片について転写開始点より約 14kb 間の領域を解析したが、3-MC 等の誘導剤処置によってほとんど転写活性化は認められな

った。

一方、先にも述べたように CYP1A1 のプロモーターから 5'-上流に AhR が結合する XRE が複数存在し、クラスターを形成している⁵⁷⁾。このクラスターの存在は、Fig. 10 に示すようにラット、マウスおよびヒトにおいて共通しており、それぞれの XRE が CYP1A1 誘導に対して相加的に関わっているようである。これは偶然の結果とは考えにくく、CYP1A1 の誘導に必要なために動物間において高



The reporter vector was transiently co-transfected to HepG2 cells. After 40 h exposure of cells to compounds, ALP activities were measured. ALP: alkaline phosphatase gene

Fig. 9 Characterization of the 5'-flanking region of the *CYP1A2* gene

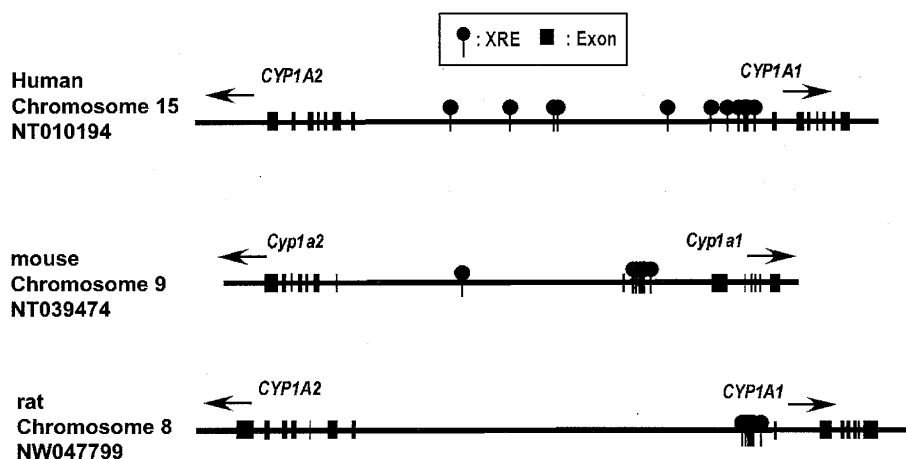


Fig. 10 Diagrams of *CYP1A* cluster in human, mouse and rat

く保存されていると考えられる。そこで、CYP1A2遺伝子の全構造をNCBI (National Center for Biochemistry Information) のBLAST (Basic Local Alignment Search Tool: 遺伝子配列を検索するソフト) Human Sequencesデータベースから調べてみた。

ヒトCYP1A1とCYP1A2遺伝子は第15番染色体上に隣接して存在していることが明らかになっている⁶⁶⁾。Fig. 10に示すようにそれぞれの遺伝子は逆向きに位置しており、二つの遺伝子間の距離は約23kbである。この間に他の遺伝子は見出されていない⁶⁷⁾。従って、CYP1A1とCYP1A2遺伝子は逆向きに互いの5'側の転写調節領域を共有している可能性が考えられる。即ち、CYP1A1遺伝子側にあるXREクラスターが約23kb離れたCYP1A2遺伝子の転写にも関与することが予測された。そこで、プロモーター領域上流約5kbを含むCYP1A2遺伝子レポーターベクターにCYP1A1遺伝子のXREクラスターを組み込むと誘導剤によるCYP1A2の転写活性化が見られるようになった(Fig. 9)。これをさらに証明するために、CYP1A1およびCYP1A2遺伝子間の23kbを含むデュアルレポーターベクターを構築し、XREクラスターの影響を検討した⁶⁸⁾。Fig. 11に示すように、明らか

にCYP1A1遺伝子近傍のXREクラスターを欠損させると両遺伝子の誘導剤処置による転写活性化は全く見られなくなった。

この結果より、隣接したCYP1A1およびCYP1A2遺伝子がXREクラスターにより同時に転写調節されているということが明らかになったが、このようなbidirectional enhancerに関する知見はP450において初めての報告である⁶⁸⁾。類似したP450分子種は同じ染色体上でクラスターを形成しており、例えば、CYP3AやCYP2Cファミリーに属する分子種は、それぞれ第7および第10染色体上に存在している^{49,69)}。これらのクラスター内には偽遺伝子も存在しているが、今回の結果から偽遺伝子にクラスター内の複数の遺伝子の発現調節や転写活性化に関与している領域が存在している可能性も考えられる。

CYP2A6の酵素誘導に関わるシスエレメント

著者が遺伝子クローニングで最初に報告したものは、ラットのテストステロン7 α -水酸化活性を触媒するCYP2A1 cDNAである⁷⁰⁾。当時のcDNAクローニングは、目的タンパク質の抗体を用いて単離するか、あるいは予め予測された塩基配列よりプローブを作成し、目的のDNAあるいは類似

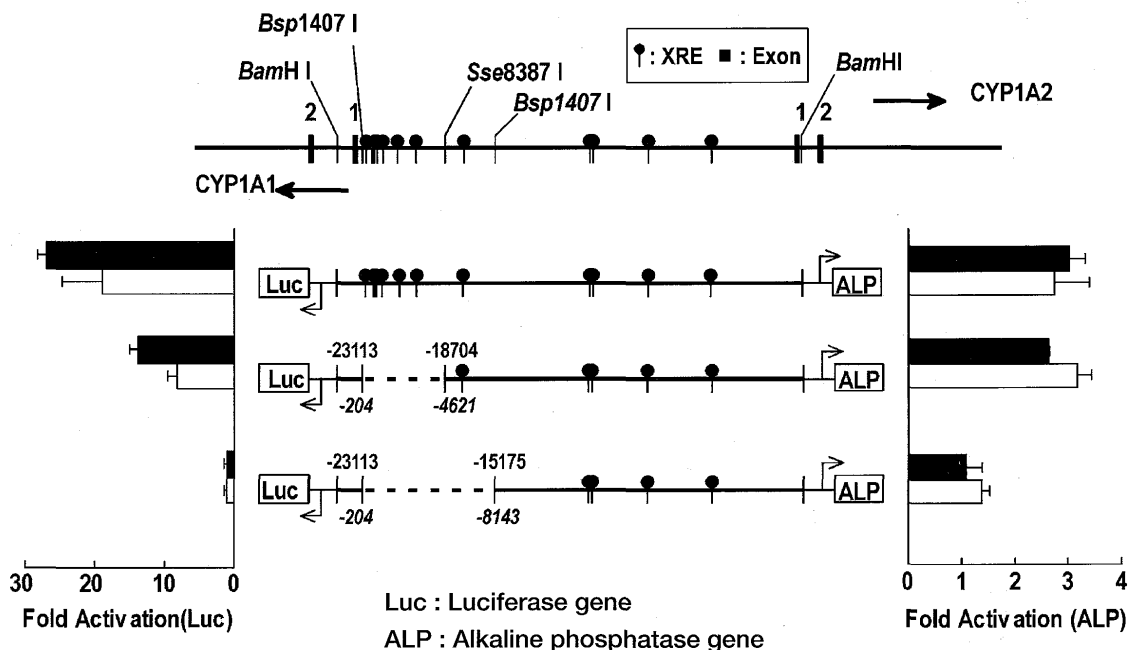


Fig. 11 Influence of XRE cluster on the transcriptional activation of *CYP1A1* and *CYP1A2* genes

Table 2. Nucleotide sequence of nuclear receptor binding sites in *P450* genes

Gene	Element		Sequence			
CYP2A6	DR-4	-6683	TGACCT	caag	TGATCT	-6698
	DR-4	-5461	TGACCT	taag	TGATCC	-5476
	DR-4	-4603	TGACCT	cagg	TGATCT	-4618
CYP2B6	DR-4	-8547	TGGA CT	ttcc	TGACCC	-8557
	DR-4	-1713	TGTACT	ttcc	TGAACC	-1733
	DR-4	-1685	TGTACT	ttcc	TGACCC	-1700
CYP2C8	DR-4	-8806	TCAACT	ttga	TGACCC	-8790
	DR-5	-2796	TAAACC	ctatg	TGAACT	-2780
CYP2C9	DR-5	-2898	TGAACC	ctaca	TAAACT	-2881
	DR-4	-1839	CAA ACT	cttc	TGACCT	-1824
CYP2C19	DR-5	-2648	TGAACC	ccaca	GAAACT	-2631
	DR-4	-1891	CAA ACT	cttc	TGACCC	-1875
CYP3A4	DR-3	-7732	TGAACT	tgc	TGACCC	-7718
	DR-4	-7618	TGTCCT	gtgt	TGACCC	-7602
	ER-6	-171	TGAACT	caaagg	AGGTCA	-154

したDNAとハイブリダイゼーションを形成させることによって行われた。その後、著者らはCYP2A1 cDNAをプローブとしてラットCYP2A2およびヒトCYP2A6のcDNAの単離に成功した^{71,72)}。先にも述べたが、ラットCYP2A1は、3-MC処置によって誘導されるのみならず、PB処置によっても誘導を受けるが、ヒトCYP2A6はCYP3A4の誘導剤によって同様に誘導される⁷³⁾。近年、金沢大学のItohらによってCYP2A6の誘導の分子機構が報告された(著者との共同研究)⁷⁴⁾。CYP2A6遺伝子のプロモーター上流には、PXRが結合するシスエレメントが3つあることが見出された(Table 2)。

しかしながら、CYP3A4の誘導様式とは異なり、HepG2細胞を用いたレポーターアッセイでは、誘導剤による転写活性化は認められず、co-activatorであるperoxisomal proliferators activate receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α)を外から過剰発現させることにより、初めて誘導が認められている。

CYP2B6の酵素誘導に関わるシスエレメント

最初に遺伝子クローニングされたP450は、ラットのCYP2B分子種である。これは1983年にFujii-Kuriyamaらによって報告されたが⁷⁵⁾、この論文を読んで著者は大きな衝撃を受け、このような

研究を自分も是非やってみようと思った。そしてその翌年には、遺伝子も同じグループより報告された⁷⁶⁾。CYP2B分子種の誘導機構の解明は、最初に遺伝子が単離されたラットCYP2B2において行われた⁷⁷⁻⁷⁹⁾。CYP2B2遺伝子上流-2318から-2155の163bpに誘導に関わる領域の存在が報告された⁸⁰⁾。その後、NegishiらによってマウスCyp2b10の誘導解析からphenobarbital-responsive enhancer module (PBREM)と命名された誘導に関わる遺伝子領域の存在が報告された⁸¹⁾。これは、Cyp2b10遺伝子の上流-2239から-2289に存在しており、ラットCYP2B2遺伝子の誘導領域とほぼ同等の位置であり、配列も高い類似性を示している。ヒトについてもその後Table 2に示すようにCYP2B6遺伝子の上流域-1685/-1732にPBREMの存在が明らかとされた⁸²⁾。近年、さらに5'上流域-8.5k/-8.6kに誘導剤の転写活性化に関与するxenobiotic responsive enhancer module (XREM)が見出された。ラット、マウス、ヒトにおけるPB処置によるCYP2B分子種の誘導は、細胞質に存在する核内レセプターであるconstitutive androstane receptor (CAR:NR1I3)がPB処置により核内へ移行し、PBREM中およびXREM中の核内レセプター結合DNA配列(NR-1およびNR-3)に結合し、CYP2B

遺伝子の転写が活性化されることによって引き起こされる⁸³⁾。

CYP2C分子種の酵素誘導に関わるシスエレメント

CYP2C9のcDNAは、1987年に著者らが最初にクローニングし報告した⁸⁴⁾。また、東洋人において遺伝子多型が問題となっているCYP2C19のcDNAについても単離を試みたが成功せず、1991年にRomkesらによってクローニングされた⁸⁵⁾。その後、その情報を基に遺伝的多型の原因も明らかとされている⁸⁶⁾。一方、現在までにラットやマウスのCYP2C分子種誘導に関する明確な報告はない。ところが、近年ヒトの肝初代培養細胞を用いた研究から、薬物の代謝に関与するCYP2C8、CYP2C9およびCYP2C19は、リファンピシン処置にて誘導されることが報告された⁸⁷⁻⁸⁹⁾。また、CYP2C8、CYP2C9およびCYP2C19の薬物による誘導には大きな個人差があることが知られているが、しかし、その明確な原因は現在のところ明らかでない^{88,89)}。CYP2C9の遺伝子単離解析の結果、酵素誘導に関するシスエレメントとしてTable 2に示すように-1824/-1839と-2881/-2898にDR-4とDR-5が見出され、CARがこれらに結合してCYP2C9の転写活性化を行っていることが明らかとされている^{90,91)}。また、CYP2C19についても-1875/-1891および-2631/-2646にそれぞれDR-4とDR-5が見出され、CYP2C9と同様にCARがこれらに結合して転写活性化を行っている⁹²⁾。一方、CYP2C8もCYP2C9およびCYP2C19と同様に-2780/-2796にDR-4が存在するがDR-5は見出されていない。しかし、-8790/-8806に新たなDR-4が見出されており、この両DR-4にはCARのみならずPXRも結合し、両核内レセプターにて転写活性化されることが報告された⁹³⁾。

薬物動態関連酵素誘導に関わる転写因子

薬物代謝酵素誘導に関わる核内レセプターには、PXRとCARが主に知られている。これらは、RXR α とヘテロダイマーを形成しており、PXRやCARに誘導剤が結合すると遺伝子は転写活性化され、その結果、P450のみならず硫酸転移酵素やトランスポーターなどの誘導が引き起こされると

現在考えられている^{52,94,95)}。PXRやCAR以外の、ステロイドホルモンレセプターを含む核内レセプターも、多くの遺伝子の基本的な転写活性化に関わっている。中でも、glucocorticoid receptor (GR: NR3C1), farnesoid x receptor (FXR: NR1H4), vitamin D receptor (VDR: NR1H1), peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α : NR1C1)などは、一部の薬物代謝酵素の誘導にも関わっているとの報告もある^{52,95)}。

核内レセプターは、基本的に2つの類似した6つのコア塩基配列を有するシスエレメントに結合する。実際の結合は、ホモダイマー (HNF4など) かあるいは他の核内レセプターがパートナーとなりヘテロダイマーを形成してシスエレメントに結合する。Table 3には、各核内レセプターが結合する代表的なシスエレメントの塩基配列を示したが、シスエレメントのハーフサイトのコア塩基配列は各レセプター間で非常に類似しており、各シスエレメント間で-AGN(AT)C(A/C)-の塩基配列が保持されている。各レセプターが結合するシスエレメント間においては何処が異なっているかと言うと2つのコア配列が同じ方向を向いているのか (direct repeat:DR), 内側に向かって相保的に対称であるか (inverted repeat:IR) または外側に向かって相保的に対照であるか (everted repeat:ER) であり、これに、さらに2つのコア配列間に幾つの塩基スペースが存在している⁵²⁾。P450遺伝子中に見いだされたシスエレメントには、程度の差はあれPXR, CARやVDRが結合することが報告されており、明確なルールはまだ明らかとなっていないが、これらのレセプターは少なくとも他の核内レセプターサブファミリー分子種、たとえばステロイドホルモンレセプターのシスエレメントには結合しない。

一方、核内レセプタータンパク質は、幾つかのドメインによって構成されている。中でもDNAと結合するDNA binding domain (DBD), リガンドと結合するLigand binding domain (LBD) は、レセプターの特性に大きく関わっている。Fig. 12は核内レセプター間におけるDBDとLBDのアミノ酸配列の相同性を示したものである。ここで示しているLBDにはco-activator recruitment domainを

Table 3 Typical binding motifs of nuclear receptors

Nuclear receptor	Typical binding sequence	Element
Pregnane X receptor	AGTTCAnnnAGTTCA	DR-3
	TGAACTnnnnnnAGTTCA	ER-6
Constitutive androstane receptor	AGTTCAnnnAGTTCA	DR-4
Vitamin D receptor	AGGTCAAnnnAGGTCA	DR-3
Liver X receptor	AGGTCAAnnnAGGTCA	DR-4
Farnesoid X receptor	TGACCTnAGGTCA	ER-1
Estrogen receptor	AGGTCAAnnnTGACCT	IR-3
Androgen receptor	AGAACAAnnnTGTTCT	IR-3
Progesterone receptor	AGAACAAnnnTGTTCT	IR-3
Glucocorticoid receptor	AGAACAAnnnTGTTCT	IR-3
Mineralcorticoid receptor	AGAACAAnnnTGTTCT	IR-3
Thyroid hormone receptor	AGGTCAAnnnAGGTCA	DR-4
Retinoic acid receptor	AGGTCAAnnnnnAGGTCA	DR-5
Consensus sequence	AGN(A/T)C(A/C)	

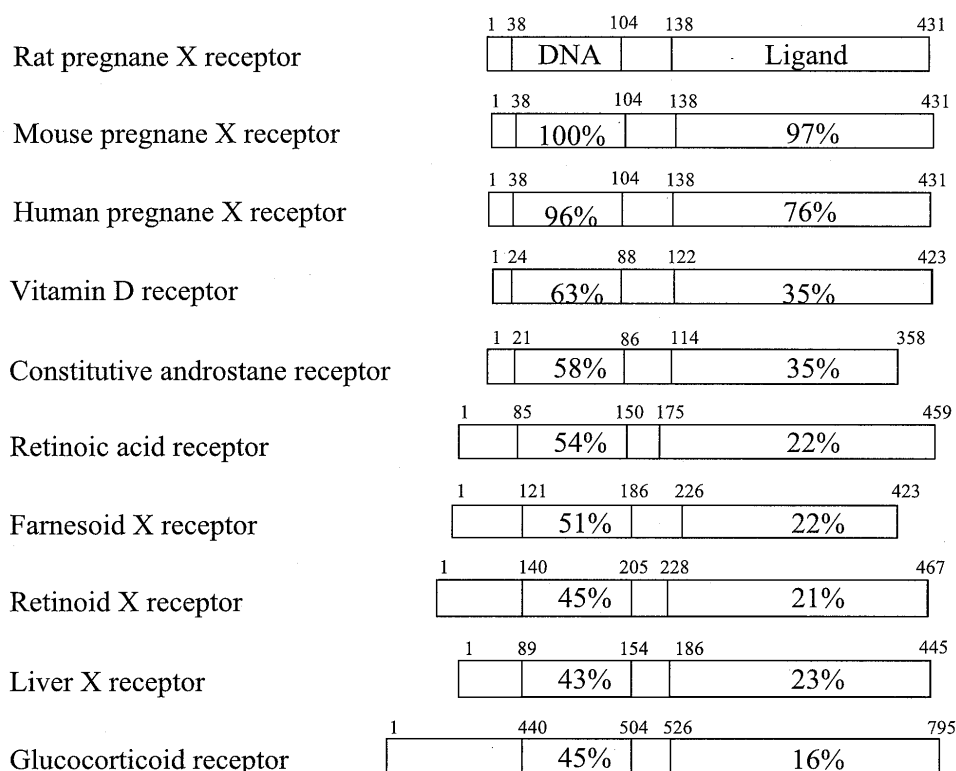


Fig. 12 Similarity of DNA- and ligand-binding domains among nuclear receptors

含むAF-2も含まれているが、各レセプター間では、DBDのアミノ酸配列の相同性は、LBDのものより高く保持されている⁵²⁾。

これは、それぞれのレセプターは、比較的類似した特異的DNA配列に結合することを示してい

る。一方、LBDは、各動物種のPXR間で大きく異なっており、中でもPXRはヒトとマウスと比較すると76%程度しかなく、同様にデータは示さないが、CARもヒトとマウスとでは71%程度の相同性しかなく、LBDのアミノ酸配列の違いが

薬物に対する応答性（親和性）の違いを引き起こしている。従って、誘導の大きな種差の原因は、主にLBDのアミノ酸配列の違いにあると考えられている⁹⁶⁾。

薬物代謝酵素誘導の種差

以前からCYP3A分子種誘導の様相がヒトと実験動物では違うことが知られている。例えば、リファンピシンがヒトにおいてCYP3A4を強く誘導することは良く知られているが、マウスではわずかしかCYP3A分子種を誘導せず、ラットではほとんど誘導しない。一方、ラットにおいてCYP3A分子種を強く誘導するPCNは、ヒトCYP3A4を誘導しない⁹⁶⁾。その原因としてFig. 12でも示したように、PXRのLBDのアミノ酸配列の相同性が動物種間で異なるために、現在ではもっぱら、酵素誘導の種差は、レセプターの薬物に対する応答性の違いによって説明されている。Fig. 13にヒトを含む各実験動物のPXR発現CV-1細胞を用いた実験結果を示した。リファンピシンはヒトおよびウサギPXRを活性化するが、ラットおよびマウスPXRは活性化せず、逆にPCNはウサギ、ラットおよびマウスPXRを活性化する。また他の化

学物質によるPXRの活性化程度を見ると、その活性化パターンはヒトと実験動物種間では、大きく異なっている⁹⁶⁾。

この結果からするとやはりCYP3A誘導の種差は、薬物に対するPXRの応答性に依存していると言える。では、本当にそれだけで酵素誘導の種差の原因をすべて説明できるだろうか。そもそも、ヒトの薬物代謝酵素遺伝子、例えば、CYP3A分子種の場合、先にも述べたように、ヒトのCYP3A遺伝子は4つ存在するのに対してラットでは6つ、マウスでは8つ現在のところ同定されている⁸⁾。薬物の代謝に最も関わっているヒトCYP3A4に対応するラットあるいはマウスの分子種はどれかと言われても1つの分子種を挙げることは難しい。ラットではCYP3A4に、アミノ酸配列、プロモーター領域の塩基配列および臓器発現様式において最も類似しているのは、ラットの肝臓の主P450であるCYP3A1やCYP3A2ではなく、CYP3A18、CYP3A9あるいは我々が最近単離同定したCYP3A62である^{39,97,98)}。またCYP3A1やCYP3A2の発現は、肝臓特異的であり、誘導剤を投与しても肝臓以外では誘導されない³⁹⁾。このような違いは、個々の遺伝子の転写に関わる部分、即ち、プロモーター

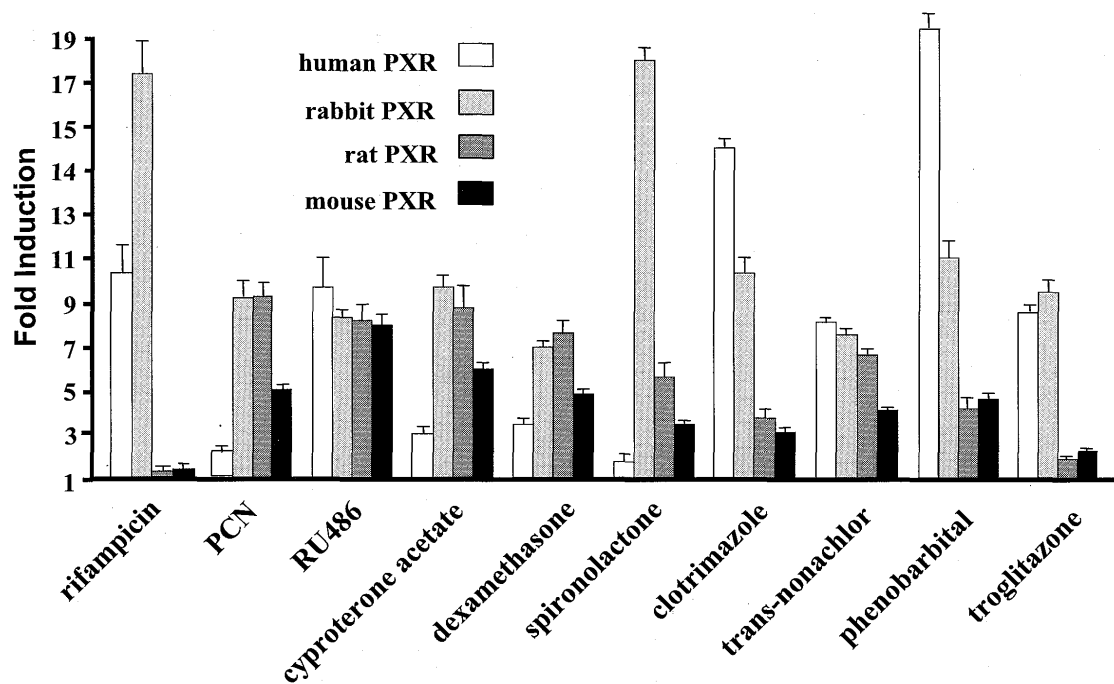


Fig. 13 Species difference of PXR responsiveness for drugs

あるいはエンハンサー領域の遺伝子配列の違いに起因していると考えられる。

Table 4にヒトおよび実験動物において、薬物投与により誘導を受ける酵素を示した⁹⁹⁻¹⁰¹⁾。すべての遺伝子において明らかになっているわけではないが、実験動物で誘導されるものは、比較的ヒトでも誘導を受けるようである。ただし、遺伝子配列は、互いに大きく異なっておりその誘導様式は必ずしも同じものではない。従って、誘導の種差は、核内レセプターに依存するのみならず個々の遺伝子配列の違いにも大きく影響を受けることになる。しかし、プロモーター領域から上流のDNAの塩基配列の相同性がかなり異なっているにもかかわらず、同様な誘導を示すものがあることは驚きである。やはりその酵素の誘導は必要であったために、ヒトおよび実験動物間で保持されてきたものと解釈すべきであろう。

おわりに

薬物代謝酵素活性は、本著のはじめに述べたように古くから薬物の薬理効果に大きな影響を与えるファクターとして論じられていたが、医療現場においてその重要性が再認識されたのは、ソリブジンによる薬害の原因が明らかになってからと思

われる。この事件をきっかけに薬物動態や安全性の優れた医薬品の開発が求められるようになり、現在では創薬の早期からこれらを考慮した薬物開発が行われている。一方、薬物療法を行う上で個々の患者に合った個別化処方注目され、薬効に大きな影響を与える薬物代謝酵素活性の個人差を予測することが求められるようになってきている。では、どのようにすると正確に個人差の予測が可能となるのであるのか。本著の中でも述べたように遺伝子多型によって説明可能な個人差は一部である。一方、一つの遺伝子の発現には、多くの転写因子が関わっており、更に、これらの転写因子も他の遺伝子発現から影響を受けていると考えられる。これに加え、体内に取り込まれる化学物質あるいはそのときの生理状態によって薬物酵素活性は大きな影響を受けている。したがって、薬物代謝酵素活性は日々変動しているといっても過言でないと思われる。やはり、薬物代謝酵素活性の個人差を予測するには、血中あるいは尿中の薬物の代謝産物量と未変化体量を求めると考えられる。現在著者は、薬物代謝酵素活性の個人差を予測する手法として、個々のP450に対する特異基質、

Table 4 Receptors and induced enzymes

Receptor	CYP	UGT	Transporter
AhR	CYP1A1/2 (r, m, h) CYP1B1 (r, m, h)	UGT1A1 (r, m, h) UGT1A6 (h)	Oatp3a1 (m) Mrp2 (m), Mrp3 (m), Mrp5 (m), Mrp6 (m), Mrp7 (m)
PXR	CYP3A1/2 Cyp3a11 CYP3A4/7 CYP2A6 CYP2C8/9/19	UGT1A1 (m, h) UGT1A3 (h), UGT1A4 (h) UGT1A6 (h), UGT1A9 (m)	Oatp1A4 (r, m) Mdr1b (r) Mrp2 (r, m, h), Mdr3 (m, h), Mrp5 (h)
CAR	CYP2B1/2 Cyp2b10 CYP2B6 CYP2C8/9/19	UGT1A1 (m), UGT2B1 (h)	Oatp1a4 (r), Oatp1a6 (m), Oatp2b1 (m) Mrp2 (r, m, h), Mrp3 (r, m, h), Mrp4 (m, h) Mrp5 (m), Mrp6 (m), Mrp7 (m)
FXR	CYP3A4	UGT2B4 (h)	BSEP (m, h) Mdr3
PPAR α	CYP4A2/3 Cyp4A14	UGT2B4 (h) UGT1A9 (h)	Mrp3 (m) Oct1 (m)

h: human, m: mouse, r: rat

即ちプローブのカクテルドリンクを予め投与することで、生体内での個々のP450分子種の触媒活性力が予測可能なシステムの開発を夢見ている。

REFERENCES

- 1) Masood, E. As consortium plans free SNP map of human genome. *Nature* 398, 545-546 (1999).
- 2) Nagata, K. and Yamazoe, Y. *Drug Metab Pharmacokinet* 17, 167-189 (2002).
- 3) Ingelman-Sundberg, M. *Toxicology* 181-182, 447-452 (2002).
- 4) Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K.R., Feuk, L., Perry, G.H., Andrews, T.D., Fiegler, H., Shapero, M.H., Carson, A.R., Chen, W., Cho, E.K., Dallaire, S., Freeman, J.L., Gonzalez, J.R., Gratacos, M., Huang, J., Kalaitzopoulos, D., Komura, D., MacDonald, J.R., Marshall, C.R., Mei, R., Montgomery, L., Nishimura, K., Okamura, K., Shen, F., Somerville, M.J., Tchinda, J., Valsesia, A., Woodwark, C., Yang, F., Zhang, J., Zerjal, T., Armengol, L., Conrad, D.F., Estivill, X., Tyler-Smith, C., Carter, N.P., Aburatani, H., Lee, C., Jones, K.W., Scherer, S.W. and Hurles, M.E. *Nature* 444, 444-454 (2006).
- 5) Johansson, I., Lundqvist, E., Bertilsson, L., Dahl, M.L., Sjoqvist, F. and Ingelman-Sundberg, M. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11825-11829 (1993).
- 6) Rao, Y., Hoffmann, E., Zia, M., Bodin, L., Zeman, M., Sellers, E.M. and Tyndale, R.F. *Mol Pharmacol* 58, 747-755 (2000).
- 7) Nagata, K., Shimada, M. and Yamazoe, Y. *Species differences in cytosol sulfotransferases.*, 253-278 (Taylor and Francis Ltd., London, 2005).
- 8) 永田 清. 創薬動態, 26-55 (日本薬物動態学会, 2006).
- 9) <http://www.issx.org/pages/page04a.html>.
- 10) Mueller, G.C. and Miller, J.A. *J Biol Chem* 176, 535-544 (1948).
- 11) Axelrod, J. *J Pharmacol Exp Ther* 114, 430-438 (1955).
- 12) Axelrod, J. *J Biol Chem* 214, 753-763 (1955).
- 13) Shannon, J.A., Earle, D.P., Brodie, B.B., Taggart, J. and Berliner, R.W. *J Pharm Exp Ther* 81, 307-330 (1944).
- 14) Brodie, B.B., Udenfriend, S. and Baer, J.E. *J Biol Chem* 168, 299-309 (1947).
- 15) Gillette, J.R. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 18-41 (2000).
- 16) Cooper, J.R., Axelrod, J. and Brodie, B.B. *J Pharmacol Exp Ther* 112, 55-63 (1954).
- 17) Conney, A.H., Gillette, J.R., Inscoc, J.K., Trams, E.R. and Posner, H.S. *Science* 130, 1478-1479 (1959).
- 18) Remmer, H. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 237, 296-307 (1959).
- 19) Kato, R. *Experientia* 16, 427-428 (1960).
- 20) Estabrook, R.W. *Drug Metab Rev* 31, 317-331 (1999).
- 21) 永田 清. 薬物代謝の個人変動と薬物相互作用. *TDM 研究*, 9-19 (2002).
- 22) Feyereisen, R. *Annu Rev Entomol* 44, 507-533 (1999).
- 23) Lu, A.Y., Kuntzman, R. and Conney, A.H. *Front Gastrointest Res* 2, 1-31 (1976).
- 24) Gelboin, H.V. *Rev Can Biol* 31, 39-60 (1972).
- 25) Yoshihara, S., Nagata, K., Yoshimura, H., Kuroki, H. and Masuda, Y. *Toxicol Appl Pharmacol* 59, 580-588. (1981).
- 26) Yoshihara, S., Nagata, K., Wada, I., Yoshimura, H., Kuroki, H. and Masuda, Y. *J Pharmacobiodyn* 5, 994-1004. (1982).
- 27) Nagata, K., Matsunaga, T., Buppodom, P., Ishimatsu, M., Yamato, H., Yoshihara, S. and Yoshimura, H. *J Pharmacobiodyn* 8, 948-957. (1985).
- 28) Nagata, K., Buppodom, P., Matsunaga, T., Ishimatsu, M., Yamato, H., Yoshihara, S. and Yoshimura, H. *J Biochem (Tokyo)* 97, 1755-1766. (1985).
- 29) Oguri, K., Yamada, H. and Yoshimura, H. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34, 251-279 (1994).
- 30) Imai, Y. and Sato, R. *J Biochem (Tokyo)* 75, 689-697 (1974).
- 31) van der Hoeven, T.A. and Coon, M.J. *J Biol Chem*

- 249, 6302-6310 (1974).
- 32) Nagata, K., Martin, B.M., Gillette, J.R. and Sasame, H.A. *Drug Metab Dispos* 18, 557-564. (1990).
- 33) Nagata, K., Gonzalez, F.J., Yamazoe, Y. and Kato, R. *J Biochem (Tokyo)* 107, 718-725. (1990).
- 34) Imaoka, S., Terano, Y. and Funae, Y. *J Biochem (Tokyo)* 104, 481-487 (1988).
- 35) Nagata, K., Liberato, D.J., Gillette, J.R. and Sasame, H.A. *Drug Metab Dispos* 14, 559-565. (1986).
- 36) Guengerich, F.P. *Human cytochrome P450 enzymes*, 377-530 (Academic / Plenum Publishers, New York, 2005).
- 37) Aoyama, T., Korzekwa, K., Matsunaga, T., Nagata, K., Gillette, J., Gelboin, H.V. and Gonzalez, F.J. *Drug Metab Dispos* 18, 378-382. (1990).
- 38) Rettie, A.E., Rettenmeier, A.W., Howald, W.N. and Baillie, T.A. *Science* 235, 890-893 (1987).
- 39) Matsubara, T., Kim, H.J., Miyata, M., Shimada, M., Nagata, K. and Yamazoe, Y. *J Pharmacol Exp Ther* 309, 1282-1290 (2004).
- 40) Cholerton, S., Daly, A.K. and Idle, J.R. *Trends Pharmacol Sci* 13, 434-439 (1992).
- 41) Guengerich, F.P. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 1-17 (1999).
- 42) Lewis, D.F. *Biochem Pharmacol* 60, 293-306 (2000).
- 43) Ekroos, M. and Sjogren, T. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13682-13687 (2006).
- 44) Rosenthal, N. *Methods Enzymol* 152, 704-720 (1987).
- 45) 永田 清、山添 康、摘出ヒト組織・細胞を用いた非臨床試験、大野康雄、上川雄一郎、杉山雄一、山添康編 138-143 (エル・アイ・シー、2005)。
- 46) Miyata, M., Nagata, K., Yamazoe, Y. and Kato, R. *Biochem Biophys Res Commun* 177, 68-73. (1991).
- 47) Miyata, M., Nagata, K., Shimada, M., Yamazoe, Y. and Kato, R. *Arch Biochem Biophys* 314, 351-359, (1994).
- 48) Nagata, K., Ogino, M., Shimada, M., Miyata, M., Gonzalez, F.J. and Yamazoe, Y. *Arch Biochem Biophys* 362, 242-253. (1999).
- 49) Finta, C. and Zaphiropoulos, P.G. *Gene* 260, 13-23 (2000).
- 50) Shimada, M., Nagata, K., Murayama, N., Yamazoe, Y. and Kato, R. *J Biochem (Tokyo)* 106, 1030-1034. (1989).
- 51) Kliewer, S.A., Moore, J.T., Wade, L., Staudinger, J.L., Watson, M.A., Jones, S.A., McKee, D.D., Oliver, B.B., Willson, T.M., Zetterstrom, R.H., Perlmann, T. and Lehmann, J.M. *Cell* 92, 73-82. (1998).
- 52) Handschin, C. and Meyer, U.A. *Pharmacol Rev* 55, 649-673 (2003).
- 53) Ogino, M., Nagata, K., Miyata, M. and Yamazoe, Y. *Arch Biochem Biophys* 362, 32-37. (1999).
- 54) Takada, T., Ogino, M., Miyata, M., Shimada, M., Nagata, K. and Yamazoe, Y. *Drug Metab Pharmacokinet* 19, 103-113 (2004).
- 55) Furukawa, M., Okubo, T., Ogino, M., Yamazaki, T., Shimada, M., Nagata, K. and Yamazoe, Y. *J Biochem (Tokyo)* 131, 71-78 (2002).
- 56) Goodwin, B., Hodgson, E. and Liddle, C. *Mol Pharmacol* 56, 1329-1339. (1999).
- 57) Whitlock, J.P., Jr. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 103-125 (1999).
- 58) Postlind, H., Vu, T.P., Tukey, R.H. and Quattrochi, L.C. *Toxicol Appl Pharmacol* 118, 255-262 (1993).
- 59) Garrison, P.M., Tullis, K., Aarts, J.M., Brouwer, A., Giesy, J.P. and Denison, M.S. *Fundam Appl Toxicol* 30, 194-203 (1996).
- 60) Bessette, E.E., Fasco, M.J., Pentecost, B.T. and Kaminsky, L.S. *Drug Metab Dispos* 33, 312-320 (2005).
- 61) Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D.M., McPhail, T., Lee, S.S., Kimura, S., Nebert, D.W., Rudikoff, S., Ward, J.M. and Gonzalez, F.J. *Science* 268, 722-726 (1995).
- 62) Schmidt, J.V., Su, G.H., Reddy, J.K., Simon, M.C. and Bradfield, C.A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6731-6736 (1996).

- 63) Mimura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T.N., Nakao, K., Ema, M., Sogawa, K., Yasuda, M., Katsuki, M. and Fujii-Kuriyama, Y. *Genes Cells* 2, 645-654 (1997).
- 64) Eaton, D.L., Gallagher, E.P., Bammler, T.K. and Kunze, K.L. *Pharmacogenetics* 5, 259-274 (1995).
- 65) Goldstein, J.A. and Linko, P. *Mol Pharmacol* 25, 185-191 (1984).
- 66) Jaiswal, A.K., Nebert, D.W., McBride, O.W. and Gonzalez, F.J. *J Exp Pathol* 3, 1-17 (1987).
- 67) Corchero, J., Pimprale, S., Kimura, S. and Gonzalez, F.J. *Pharmacogenetics* 11, 1-6 (2001).
- 68) Ueda, R., Iketaki, H., Nagata, K., Kimura, S., Gonzalez, F.J., Kusano, K., Yoshimura, T. and Yamazoe, Y. *Mol Pharmacol* 69, 1924-1930 (2006).
- 69) Gray, I.C., Nobile, C., Muresu, R., Ford, S. and Spurr, N.K. *Genomics* 28, 328-332 (1995).
- 70) Nagata, K., Matsunaga, T., Gillette, J., Gelboin, H.V. and Gonzalez, F.J. *J Biol Chem* 262, 2787-2793. (1987).
- 71) Matsunaga, T., Nagata, K., Holsztynska, E.J., Lapenson, D.P., Smith, A., Kato, R., Gelboin, H.V., Waxman, D.J. and Gonzalez, F.J. *J Biol Chem* 263, 17995-18002. (1988).
- 72) Yamano, S., Nagata, K., Yamazoe, Y., Kato, R., Gelboin, H.V. and Gonzalez, F.J. *Nucleic Acids Res* 17, 4888. (1989).
- 73) Meunier, V., Bourrie, M., Julian, B., Marti, E., Guillou, F., Berger, Y. and Fabre, G. *Xenobiotica* 30, 589-607 (2000).
- 74) Itoh, M., Nakajima, M., Higashi, E., Yoshida, R., Nagata, K., Yamazoe, Y. and Yokoi, T. *J Pharmacol Exp Ther* 319, 693-702 (2006).
- 75) Fujii-Kuriyama, Y., Mizukami, Y., Kawajiri, K., Sogawa, K. and Muramatsu, M. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 2793-2797 (1982).
- 76) Mizukami, Y., Sogawa, K., Suwa, Y., Muramatsu, M. and Fujii-Kuriyama, Y. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 3958-3962 (1983).
- 77) Trottier, E., Belzil, A., Stoltz, C. and Anderson, A. *Gene* 158, 263-268 (1995).
- 78) Park, Y., Li, H. and Kemper, B. Phenobarbital induction *J Biol Chem* 271, 23725-23728 (1996).
- 79) Honkakoski, P. and Negishi, M. *J Biol Chem* 272, 14943-14949 (1997).
- 80) Honkakoski, P., Moore, R., Washburn, K.A. and Negishi, M. *Mol Pharmacol* 53, 597-601 (1998).
- 81) Sueyoshi, T., Kawamoto, T., Zelko, I., Honkakoski, P. and Negishi, M. *J Biol Chem* 274, 6043-6046 (1999).
- 82) Sueyoshi, T. and Negishi, M. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 123-143 (2001).
- 83) Wang, H., Faucette, S., Sueyoshi, T., Moore, R., Ferguson, S., Negishi, M. and LeCluyse, E.L. *J Biol Chem* 278, 14146-14152 (2003).
- 84) Yasumori, T., Kawano, S., Nagata, K., Shimada, M., Yamazoe, Y. and Kato, R. *J Biochem (Tokyo)* 102, 1075-1082. (1987).
- 85) Romkes, M., Faletto, M.B., Blaisdell, J.A., Raucy, J.L. and Goldstein, J.A. *Biochemistry* 30, 3247-3255 (1991).
- 86) de Morais, S.M., Wilkinson, G.R., Blaisdell, J., Nakamura, K., Meyer, U.A. and Goldstein, J.A. *J Biol Chem* 269, 15419-15422 (1994).
- 87) Rae, J.M., Johnson, M.D., Lippman, M.E. and Flockhart, D.A. *J Pharmacol Exp Ther* 299, 849-857 (2001).
- 88) Pichard-Garcia, L., Hyland, R., Baulieu, J., Fabre, J.M., Milton, A. and Maurel, P. *Drug Metab Dispos* 28, 51-57 (2000).
- 89) Gerbal-Chaloin, S., Pascussi, J.M., Pichard-Garcia, L., Daujat, M., Waechter, F., Fabre, J.M., Carrere, N. and Maurel, P. *Drug Metab Dispos* 29, 242-251 (2001).
- 90) Ferguson, S.S., LeCluyse, E.L., Negishi, M. and Goldstein, J.A. *Mol Pharmacol* 62, 737-746 (2002).
- 91) Gerbal-Chaloin, S., Daujat, M., Pascussi, J.M., Pichard-Garcia, L., Vilarem, M.J. and Maurel, P. *J Biol Chem* 277, 209-217 (2002).
- 92) Chen, Y., Ferguson, S.S., Negishi, M. and Goldstein, J.A. *Mol Pharmacol* 64, 316-324

- (2003).
- 93) Ferguson, S.S., Chen, Y., LeCluyse, E.L., Negishi, M. and Goldstein, J.A. *Mol Pharmacol* 68, 747-757 (2005).
- 94) Kitada, H., Miyata, M., Nakamura, T., Tozawa, A., Honma, W., Shimada, M., Nagata, K., Sinal, C.J., Guo, G.L., Gonzalez, F.J. and Yamazoe, Y. *J Biol Chem* 278, 17838-17844 (2003).
- 95) Tirona, R.G. and Kim, R.B. *J Pharm Sci* 94, 1169-1186 (2005).
- 96) Jones, S.A., Moore, L.B., Shenk, J.L., Wisely, G.B., Hamilton, G.A., McKee, D.D., Tomkinson, N.C., LeCluyse, E.L., Lambert, M.H., Willson, T.M., Kliewer, S.A. and Moore, J.T. *Mol Endocrinol* 14, 27-39 (2000).
- 97) Miyata, M., Nagata, K., Yamazoe, Y. and Kato, R. *Arch Biochem Biophys* 318, 71-79. (1995).
- 98) Nagata, K., Murayama, N., Miyata, M., Shimada, M., Urahashi, A., Yamazoe, Y. and Kato, R. *Pharmacogenetics* 6, 103-111. (1996).
- 99) Klaassen, C.D. and Slitt, A.L. *Curr Drug Metab* 6, 309-328 (2005).
- 100) Dixit, S.G., Tirona, R.G. and Kim, R.B. *Curr Drug Metab* 6, 385-397 (2005).
- 101) Zhou, J., Zhang, J. and Xie, W. *Curr Drug Metab* 6, 289-298 (2005).