

## 薬物代謝酵素の遺伝的多型の変異原活性化における意義

鎌滝 哲也, 藤田 健一, 串田 浩孝  
梅津 有理, 宮本 昌美, 有吉 範高

北海道大学大学院薬学研究科代謝分析学分野 〒060-0812 札幌市北区北12条西6丁目

### Effects of polymorphism in drug-metabolizing enzymes in the mutagenic activation of chemicals

Tetsuya Kamataki, Ken-ichi Fujita, Hirotaka Kushida, Yuri Umetsu,  
Masami Miyamoto, Noritaka Ariyoshi

Laboratory of Drug Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Hokkaido University, N12W6, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan

#### Summary

The role of human cytochrome P450 (CYP) in the metabolic activation of tobacco-related *N*-nitrosamines was examined by *Salmonella* mutation test using genetically engineered *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) YG7108 cells expressing CYP2A6 together with human NADPH-cytochrome P450 reductase. Seven tobacco-related *N*-nitrosamines, viz. *N*-nitrosoanabasine, *N*-nitrosoanatabine, *N*-nitrosodiethylamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, *N*-nitrosornicotine, *N*-nitrosopiperidine and *N*-nitrosopyrrolidine were used. Interestingly, CYP2A6 was responsible for the mutagenic activation of essentially all tobacco-related *N*-nitrosamines examined in the present study.

Genetic polymorphism of the *CYP2A6* gene appears to be the major factor in the interindividual variability of cancer susceptibility. We found the deletion of the whole *CYP2A6* gene (*CYP2A6\*4C*) as a type of genetic polymorphism in Japanese, and developed a gene diagnosis method to detect the variant. Thus, we evaluated the relationship between *CYP2A6\*4C* and the susceptibility to lung cancer. The frequency of *CYP2A6\*4C* was significantly lower in lung cancer patients than in healthy volunteers, suggesting that the subjects carrying the *CYP2A6\*4C* alleles are resistant to carcinogenesis caused by *N*-nitrosamines because of reduced metabolic activation capacity.

**Keywords** : cytochrome P450, lung cancer, *N*-nitrosamine, tobacco smoke

#### 結 言

環境中に分布する変異原・がん原物質は生体内の薬物代謝酵素によって代謝的に活性化される。生成した化学的に反応性の高い代謝物は遺伝子の損傷を誘発する。チトクローム P450 (CYP) は、化学物質の代謝的活性化

に関与する主要な薬物代謝酵素である。CYPには多くの分子種が存在し、それぞれがある程度重複した基質特異性を示し多くの変異原・がん原物質を代謝的に活性化する。したがって、それぞれのCYP分子種の性質や発現量の差異は、発がんに大きく影響すると考えられている。多くのCYP分子種には遺伝的多型が存在することが知られている。化学物質の活性化に関与するCYP分子種の酵素活性や発現量を変化させる遺伝的多型は、ヒトにおけるこれら化合物の発がんリスクを変化させると考え

受付：2001年4月24日 受理：2001年4月26日

©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第29回大会シンポジウム I 「レスポナーとノンレスポナー；遺伝的多型と環境変異原研究」で発表された。This paper was presented to the symposium I "Responders and nonresponders ; Genetic polymorphism and environmental mutagen research" at the 29th JEMS annual meeting, 2000.

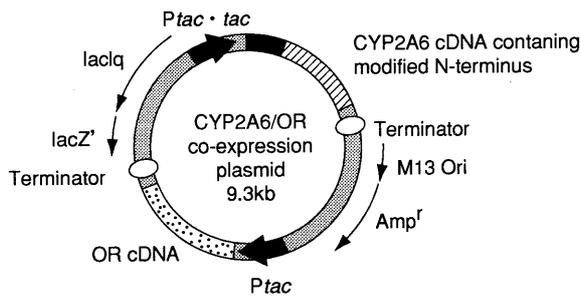


Fig. 1 Structure of co-expression plasmid for human CYP and OR

られる。著者らはこれまでに、CYPにおける遺伝的な多型の研究を展開してきた。これらの研究の中で、日本人においてCYP2A6遺伝子を完全に欠損する個体が存在することを見いだした。CYP2A6により主として代謝的に活性化される化学物質は、これらの個体においてはまったく活性化されず、発がんリスクが低下すると期待される。

以下に、CYP2A6遺伝子を欠損する遺伝子多型の化学物質の変異原活性化と、その発がんリスクにおける意義について述べる。

### 1. N-ニトロソアミン類の変異原活性化におけるヒトCYP2A6の役割

化学物質の変異原性を調べるための試験系として、Ames試験が頻用されてきた。Ames試験においては、化学物質を代謝的に活性化するために齧歯類の肝より調製したS9を添加して行う。しかしCYPの酵素活性には種差が存在するため、旧来の齧歯類の酵素を用いて得られた結果をヒトCYPに外挿することは困難である。そこで著者らが開発したヒトCYPを大腸菌に発現する技術 (Iwata et al., 1998) をAmes試験に用いるサルモネラ菌株に適用し、ヒトCYP2A6とNADPH-CYP還元酵素 (OR) を同時に発現するサルモネラ試験菌YG7108株を樹立した (Kushida et al., 2000)。サルモネラ菌YG7108株はアルキル化されたDNAよりアルキル基を除去する修復酵素である*ada*および*ogt*遺伝子を欠損するため、N-ニトロソアミン類を含むアルキル化剤に対する感受性の高い菌株である (Yamada et al., 1995)。

CYP2A6とORのそれぞれのcDNAを別々の*tac*プロモータの下流に連結し、CYP2A6およびORの同時発現プラスミドを構築した (Fig. 1)。構築した発現プラスミドをエレクトロポレーション法によりサルモネラ菌YG7108株に導入した。サルモネラ菌YG7108株におけるCYP2A6およびORの発現量は、培地1Lあたり156 nmolおよび179 nmolであった。CYP2A6の発現量は、ヒトの肝臓約390 gに発現している量に相当した。精製したCYPおよびORを用いた再構成系において、CYPの最大の酵素活性はCYPとORの比率がほぼ1においてみ

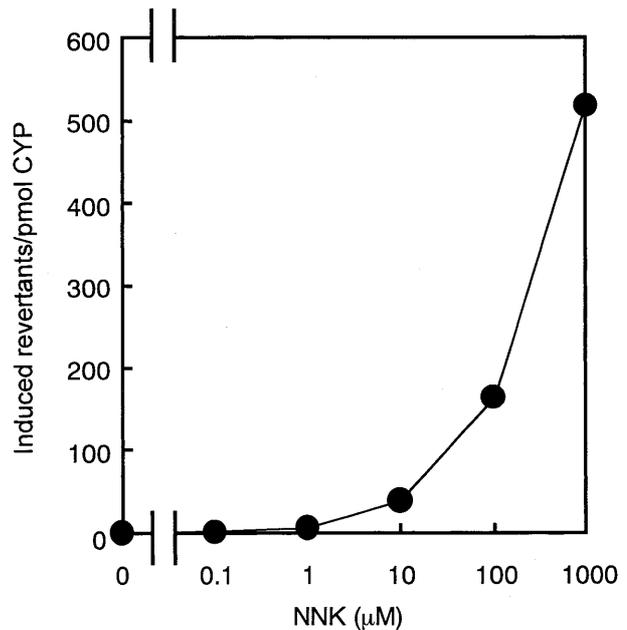


Fig. 2 Metabolic activation of NNK by CYP2A6 expressed in the established *S. typhimurium* YG7108 cells

られるとの報告がある (Taniguchi et al., 1979)。サルモネラ菌におけるORの発現量は、CYP2A6が触媒活性を示すために十分であると考えられた。そこでサルモネラ菌YG7108株に発現したCYP2A6が触媒活性を有するか否かを、CYP2A6の典型的な基質であるクマリンを用いて検討した。キネティックパラメータを算出したところ、 $K_m$ 値は $0.72 \mu\text{M}$ 、 $V_{max}$ 値は $10.5 \text{ nmol/min/nmol CYP}$ であった。これらの値は、ヒト肝ミクロゾームや他の宿主に発現したCYP2A6を用いて得られた結果と概ね一致した。

樹立した菌株を用いて、たばこ煙中に含まれることが知られているN-ニトロソアミン類の変異原活性化におけるCYP2A6の役割を検討した。具体的には樹立したサルモネラ菌YG7108株を用いて変異原性試験を行い、N-ニトロソアミン類がCYP2A6により活性化されて復帰変異コロニー数を上昇するか否かを検討した。たばこ煙中に含まれるN-ニトロソアミン類として、N-nitrosoanabasine (NABS)、N-nitrosoanatabine (NATB)、N-nitrosodiethylamine (NDEA)、(4-methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)、N-nitrosornicotine (NNN)、N-nitrosopiperidine (NPiP) およびN-nitrosopyrrolidine (NPYR) を用いた。一例としてNNKを被験物質として用いた場合の結果をFig. 2に示す。NNKはCYP2A6により活性化され濃度依存的に復帰変異コロニー数が上昇した。CYP2A6によるNNKの活性化における最少陽性濃度は $0.451 \mu\text{M}$ 、CYP2A6の変異原産能は $7.61 \text{ induced revertants/nmol NNK/pmol CYP}$ であった (Table 1)。NNKの変異原性が $1 \mu\text{M}$ 以下の低濃度から検出された原因として、宿主

**Table 1** MC values for activation of tobacco-related *N*-nitrosamines by CYP2A6 and mutagen-producing capacities of CYP2A6

	NABS	NATB	NDEA	NNK	NNN	NPIP	NPYR
MC <sup>a</sup>	125	44.7	0.769	0.451	21.3	27.3	3.87
Mutagen-producing Capacity <sup>b</sup>	0.00751	0.164	11.4	7.61	2.82	0.537	4.15

<sup>a</sup>: The results were judged as positive when the number of colonies increased linearly with the concentration of a promutagen and reached a level twice as high as that obtained with a vehicle alone as a control. MC value of a promutagen was defined as the concentration of the chemical giving positive result ( $\mu\text{M}$ ).

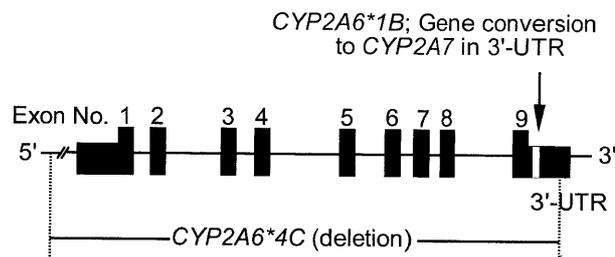
<sup>b</sup>: A slope of the increase of revertant colonies against the increase of the amount of promutagen (nmol) at around MC was calculated. The slope was then divided by pmol CYP present in a reaction mixture.

としてアルキル化剤に対して高い感受性を示す YG7108 株を用いたこと、また本試験系では変異原物質はサルモネラ菌の菌体内でヒト CYP2A6 により活性化されるので、生成した化学的に不安定な代謝物が効率よく DNA などの生体成分に結合し変異を誘発したことが考えられる。CYP2A6 は NNK 以外の調査したすべてのたばこ煙中に存在する *N*-ニトロソアミンの活性化に関与した (Table 1)。

これらの結果は CYP2A6 が喫煙者における発がんのリスクに関係することを示唆する。

## 2. CYP2A6 遺伝子欠損と肺がんリスクの関係

著者らはこれまでに、CYP における遺伝的な多型の研究を数多く展開してきた。これらの研究の中で、日本人において CYP2A6 遺伝子を完全に欠損する個体が存在することを見出した (Fig. 3) (Nunoya et al., 1998)。また、見出した CYP2A6 遺伝子の全欠損変異 (CYP2A6\*4C) の遺伝子診断法を開発し、日本人の 3~4% が欠損者であることを明らかにした (Miyamoto et al., 1999)。上述のように、CYP2A6 はたばこ煙中に含まれる多くの *N*-ニトロソアミン類の変異原活性化に関与する。CYP2A6\*4C をホモで有する個体においては、CYP2A6 により代謝的に活性化されるたばこ煙中の *N*-ニトロソアミン類が活性化されないため、喫煙による肺がんのリスクが低下すると考えられた。そこで喫煙歴を有する肺がん患者において CYP2A6\*4C の頻度が健常人と比較して少ないか否かを検討した。喫煙歴を有する男性の肺がん患者 392 名および健常人 423 名について調査した (ケース、コントロールとも平均年齢 58 歳)。少なくとも 0.5 pack/day の喫煙を、1 年以上続けたヒトを喫煙者と定義した。その結果、喫煙歴を有する肺がん患者では、CYP2A6\*4C の頻度が対照と比較して有意に少ないことを見出した (Fig. 4)。一方、喫煙歴のない肺がん患者においては、CYP2A6\*4C の頻度の健常人に対する有意差は認められなかった (Fig. 5)。続いて、肺がんを組織学的に分類して CYP2A6\*4C の頻度を調べた。肺

**Fig. 3** Major CYP2A6 variants found in Japanese

がん患者 392 名の内訳は、扁平上皮がん (sqcc) 104 名、小細胞がん (smcc) 49 名および非扁平上皮がんと非小細胞がん 239 名である。興味深いことに sqcc および smcc においては、CYP2A6\*4C は、1 例も認められなかった。以上の知見は、たばこ煙中に含まれる *N*-ニトロソアミンなどの化学物質を CYP2A6 がヒト体内において活性化することを示唆する。さらに CYP2A6 によって活性化された物質が肺がん、特に sqcc および smcc の形成に関与する可能性を示唆する。

## 結 語

ヒト CYP2A6 と OR を同時に発現するサルモネラ菌 YG7108 株を用いた研究により、CYP2A6 がたばこ煙中に含まれる *N*-ニトロソアミン類を代謝的に活性化することを明らかにした。日本人の 3~4% は CYP2A6 の全欠損者 (CYP2A6\*4C) である。著者らは、喫煙歴を有する肺がん患者においては、CYP2A6\*4C の頻度が健常人と比較して有意に少ないことを見出した。以上の知見を総合すると、CYP2A6 がたばこ煙中に含まれる *N*-ニトロソアミンなどの化学物質をヒト体内において活性化し、肺がんを誘発する可能性が考えられた。

以上本研究では、CYP2A6 を例として変異原・がん原物質の活性化に関与する酵素の活性が発がんリスクの一因となり得ることを示した。変異原・がん原物質の活性化に関与する薬物代謝関連酵素の活性を選択的に阻害することができれば、発がんの化学予防が実現できる可能

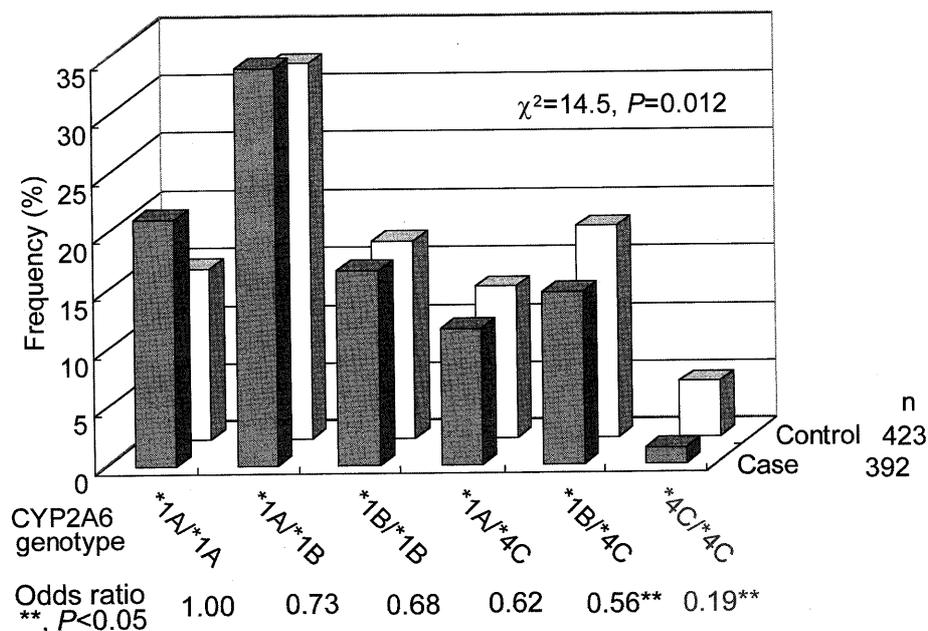


Fig 4 Distribution of CYP2A6 genotype in male smokers

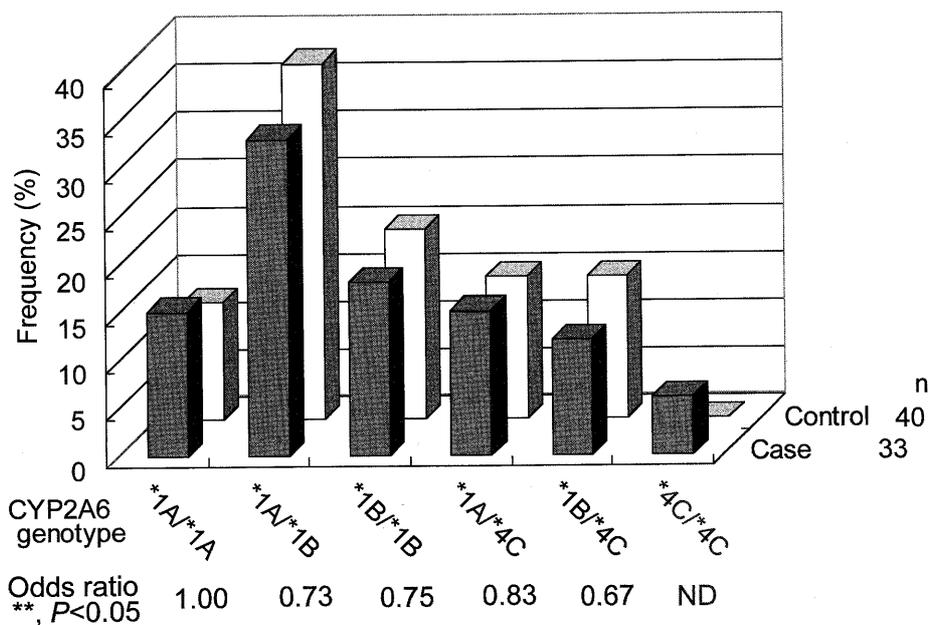


Fig. 5 Distribution of CYP2A6 genotypes in male non-smokers

性が考えられる。特にCYP2A6の酵素活性を強力かつ選択的に阻害する化学物質により、N-ニトロソアミン類による発がんを抑制できると考えられる。

参考文献

Iwata, H., K. Fujita, H. Kushida, A. Suzuki, Y. Konno, K. Nakamura, A. Fujino and T. Kamataki (1998) High catalytic activity of human cytochrome P450 co-expressed with human NADPH-cytochrome P450 reductase in Escherichia coli, *Biochem. Pharmacol.*, 55, 1315-1325.

Kushida, H., K. Fujita, A. Suzuki, M. Yamada, T. Nohmi and T.

Kamataki (2000) Development of *Salmonella* tester strain sensitive to promutagenic N-nitrosamines : expression of recombinant CYP2A6 and human NADPH-cytochrome P450 reductase in *S. typhimurium* YG7108, *Mutat. Res.*, 471, 135-143.

Miyamoto, M., Y. Umetsu, H. Dosaka-Akita, Y. Sawamura, J. Yokota, H. Kunitoh, N. Nemoto, K. Sato, N. Ariyoshi and T. Kamataki (1999) CYP2A6 gene deletion reduces susceptibility to lung cancer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 261, 658-660.

Nunoya, K., T. Yokoi, K. Kimura, K. Inoue, T. Kodama, M. Funayama, K. Nagashima, Y. Funae, C. Green, M. Kinoshita and T. Kamataki (1998) A new deleted allele in the human cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene found in individuals

showing poor metabolic capacity to coumarin and (+)-*cis*-3,5-dimethyl-2-(3-pyridyl) thiazolidin-4-one hydrochloride (SM-12502), *Pharmacogenetics*, 8, 239-249.

Taniguchi, H, Y. Imai, T. Iyanagi and R. Sato (1979) Interaction between NADPH-cytochrome P-450 reductase and cytochrome P-450 in the membrane of phosphatidylcholine vesicles, *Biochem.*

*Biophys. Acta.*, 550, 341-356.

Yamada, M., T. Sedgwick, T. Sofuni and T. Nohmi (1995) Construction and characterization of mutants of *Salmonella typhimurium* deficient in DNA repair of O<sup>6</sup>-methylguanine, *J. Bacteriol.*, 177, 1511-1519.