

発達過程に伴うグルクロン酸転移酵素
遺伝子複合体の発現制御

姫路工業大学理学部教授

井柳 堯

発達過程に伴うグルクロン酸転移酵素遺伝子複合体の発現制御

1 研究の背景と目的

ビリルビンはヘモグロビンの胎児型から成体型への変換に伴い生ずる、細胞毒性を持った内因性異物である。この化合物はグルクロン酸抱合を受けて胆汁中に排泄される。小児の黄疸やクロラムフェニコールによるGrey ベビー症候群は、ビリルビンを抱合するグルクロン酸転移酵素の未発達によるものである。しかし、グルクロン酸転移酵素遺伝子の発現が、グロビン遺伝子の胎児型から成体型へのスイッチングにどのように応答しているかは殆ど明らかにされていない。私共はビリルビンを抱合するグルクロン酸転移酵素の分子種(アイソザイム) は、抗体産生遺伝子に類似して1つの遺伝子座(遺伝子複合体)から第一エクソンの選択的な使い分けにより、アミノ末端側(基質結合ドメイン)を異にするが、カルボキシ末端側は共通のアミノ酸配列(UDP-結合ドメイン)をもつキメラ分子として産生されることを明らかにしている。第一エクソンの塩基配列から推定される構造より、ビリルビンを抱合する分子種は少なくとも5個存在する。これらの研究により、小児の発達に伴うビリルビン異常の原因を遺伝子の構造レベルで明らかにすることが可能となった。

本研究では、特にラット遺伝子複合体の構造を基にグルクロン酸転移酵素の分子種の、(a)ビリルビンに対する相対的な抱合活性、(b)発達過程に伴う発現量の変動を解析し、どの分子種が抱合活性を担っているかを明らかにした。また、(c)遺伝子の発現調節機構を解析した。

2 研究方法・研究内容

本研究の対象とするラットのグルクロン酸転移酵素分子種(アイソザイム)を指定する遺伝子複合体は、5'上流に基質結合ドメインをコードする第一エクソン(~850 bp)が約12Kbp間隔でクラスターを形成して配列しており、それらの下流に各分子種に共通なUDP-グルクロン酸が結合するドメインを指定するエクソン(2,3,4,5)が存在する。第一エクソンは塩基配列の相同性と基質特異性の上からビリルビんクラスター(1A1~1A5)とフェノールクラスター(1A6~1A9)に分類される。

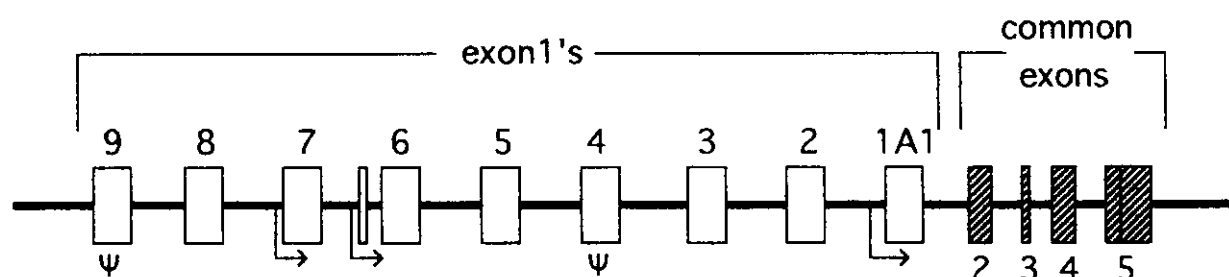


図1 Rat UGT1 gene complex

UGT1分子種は図1に示す単一の遺伝子座から抗体産生遺伝子に類似して、少なくとも9個が作られる。本研究では、ラット遺伝子複合体の構造を基に、第一エクソン,1A1から1A5 (Bilirubin cluster)分子種の、発達過程に伴う遺伝子発現の機構を以下の研究より検討した。

(1) 分子種のビリルビンに対する抱合活性：1A1～1A5に相当するcDNAを発現ベクターに組み込み、COS細胞に発現させ各々のビリルビンに対する抱合活性をHPLCにより測定する。(2) 出生前後の発現量の変動：1A1～1A5の発現量をmRNAレベルおよび特異的抗体（ペプチド抗体）を用いて解析する。(3) 出生前後の転写制御の解析、(4) 小胞体膜での分子種の存在状態と、タンパク質の細胞内半減期を測定する。

3 研究成果

(1) ビリルビンに対する相対的な抱合活性：

UGT1A1,UGT1A2,UGT1A3,UGT1A5の cDNAを各々COS細胞に発現させ、細胞膜画分を調製してビリルビン活性を測定した。UGT1A1のみにラット肝に相当する活性が観察された。この結果はビリルビングルスターのうちUGT1A1が、ビリルビン活性を持つ主要な分子種であることを示す。また、高ビリルビン血症を伴うGunn ラットでは共通領域の異常に伴いUGT1分子種が全て欠損していることから(ref. 1-4,5,6)、他のファミリー(UGT2)に属する分子種は、ビリルビンの抱合活性には関与していないことが強く示された。

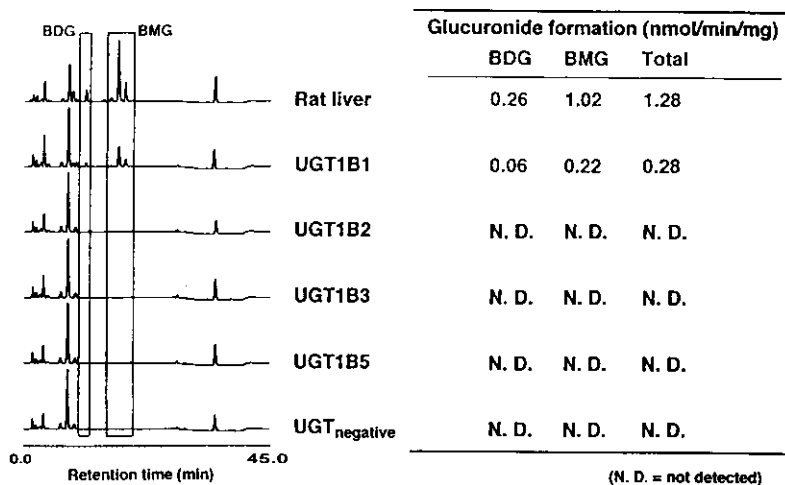


図2 Bilirubin-glucuronidating activities in Transfected COS Cells.

(2) グルクロン酸転移酵素遺伝子複合体の発現制御

UGT1ファミリーの中でUGT1A1は定常的に発現している分子種であり、誕生後に増加した (Table 1)。一方、フェノールクラスターに含まれ、3-methylcholanthreneにより誘導される分子種、UGT1A6は誕生後に減少した。UGT1A1は抗高脂血薬であるクロフィブラートや合成ステロイド剤であるデキサメタゾンにより誘導された。1A6エクソンの上流にはシトクロムP-4501A1の誘導にかかわっている xenobiotic responsive element(XRE)が見い出された。この誘導現象については、既に詳細な研究結果を報告してる(ref 6).誕生後に、この分子種の発現量が減少する機構については解析中である。

(3) ミクロソーム膜におけるグルクロン酸転移酵素の活性制御とタンパク質の安定性

ミクロソームを界面活性剤などの処理により膜を破壊するとグルクロン酸転移酵素活性の著しい上昇が観察される。ビリルビンを基質とした場合も数倍の活性化が起こる。この現象は"latency (潜在性)"と呼ばれ、この説明と"compartmentation"と"conformation"の2つのモデルが提案されている。前者では、細胞質で作られた水溶性のUDP-グルクロン酸が小胞体膜の内腔側に局在する活性部位に到達するために特殊な担体を必要とし、このステップが律速段階となっていると説明する。後者では、酵素は膜内で最大活性を発揮出来ない状態、あるいは構造をとっていると説明する。本研究では分子種を特異的に認識する抗体を作製し、またUGT1分子種を全て欠いたGunnラットミクロソームを用いて、UGT1A6とUGT2B1の分子種間でのタンパク質-タンパク質相互作用を検討したところ、これら分子種はダイマーあるいはオリゴマーを形成していることが判明した。また、ミクロソームにUDP-N-アセチルグルコサミンを加えると酵素の活性化が見られるが、複合体形成とこの活性化の間には強い相関関係がある。この結果は複合体形成が酵素活性の制御に関与していることを強く示唆する。ビリルビンを抱合するUGT1A1のオリゴマー構造がビリルビン活性に及ぼす効果についても研究を進めている。

UGT1A1分子種のCOS細胞内での半減期($t_{1/2}$)を測定したところ、ラット (10.2時間)とヒト(12.2時間)で殆ど同じであった。細胞内では、UGT1A1タンパク質は比較的安定に小胞体膜に存在していることが示された。

4 生活や産業への貢献および波及効果

アイソザイム,UGT1A1はビリルビンを抱合する主要なものである。この分子種の欠損により生ずる遺伝子疾患としてCrigler-Najjar type I 型、II型、Gilbert's型が知られている。Crigler-Najjar type I 型は稀な疾患であるが、Gilbert's型は比較的高い頻度(人口の数%)で見出だされる。軽度のビリルビン血症は、私達の健康と密接に関係している。また、小児の黄疸にも関与し、本研究はこれらの疾患の原因の解明に大きく貢献してきた。また、グルクロン酸転移酵素はビリルビン以外に薬物や環境汚染物質の代謝、解毒にも関与している。グルクロン酸転移酵素の発達に伴う遺伝子発現と分子的多様性の解明は、医薬品の開発に伴う薬物の代謝、毒性、排泄経路を知る上でも重要な情報を提供するものである。

5 参考文献 (ref)

1. Iyanagi, T., Watanabe, T., and Uchiyama, Y. (1989) *J. Biol. Chem.*, 264, 21302-21307
2. Iyanagi, T. (1991) *J. Biol. Chem.*, 266, 24048-24052.
3. Burchell, B., Nebert, D.W., Nelson, D.R., Bock, K.W., Iyanagi, T., Jansen, P.L.M., Lancet, D., Mulder, G.J., Roy Chowdhury, J., Siest, G., Tephly, T.R., and Mackenzie, P.I. (1991) *DNA Cell Biol.* 10, 478-494.

4. Emi,Y., Ikushiro,S., and Iyanagi,T. (1995) *J. Biochem.* 117,392-399.
5. Ikushiro,S., Emi,Y., and Iyanagi, T. *Arch. Biochem.Biophys.* 325, 267-272.
6. Emi,Y., Ikushiro, S., and Iyanagi,T. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 3952-3958.
7. 井柳堯：UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ、新生化学実験講座（和田博他編集）東京化学同人（1992）5, 333-337
8. 井柳堯：グルクロン酸転移酵素の分子的多様性 ファルマシア（日本薬学会）Vol 31, NO 8,874-878(1995)
9. 井柳堯：解毒に酵素はどう関わる。日刊工業新聞 平成7年9月18日

6 発表論文

1. Ikushiro, S., Emi, Y., and Iyanagi, T. (1997) Protein-Protein interactions between UDP-glucuronosyltransferase isozymes in rat hepatic miocrosomes. *Biochemistry* . 36,7154-7161.
2. Emi,Y., Ikushiro, S., and Iyanagi, T. (1998) Gene organization and genetic defects of bilirubin UDP- glucuronosyltransferase. *Oxygen Homeostasis and its Dynamics* (Ed, Ishimura, Y) pp261-264, Springer-Verlag
3. Mackenzie,P.I.,Owen,S.,Burchell,B.,Bock,K.W.,Bairoch,A.,Belanger,A., Fournel-Gigleux,S.,Green,M.,Hum,D.W., Iyanagi,T., Lancet,D et al . (1997) The UDP-glycosyltransferase gene superfamily: Recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics*, 7, 255-269.
4. Iyanagi, T., Emi,Y., and Ikushiro, S.,(1998) Biochemical and molecular aspects of genetic disorders of bilirubin metabolism. *Biochim.Biophys. Acta* . in press.
5. 井柳堯、衣斐義一、生城真一（1998）グルクロン酸転移遺伝子複合体とビリルビン代謝異常。 生化学（日本生化学会）70巻2号、105-109