

チトクローム P450オキシドレダクターゼ (POR) 異常症の分子基盤: POR 遺伝子発現制御機構

深見 真紀¹⁾, 曾根田 瞬¹⁾, 矢澤 隆志²⁾, 宮本 薫²⁾, 緒方 勤^{1,3)}

1) 独立行政法人国立成育医療研究センター研究所分子内分泌研究部

2) 福井大学医学部生命情報医科学講座分子生体情報学領域

3) 浜松医科大学小児科

はじめに

チトクローム P450オキシドレダクターゼ (POR) は、すべてのミクロゾーム P450酵素と一部の非 P450ミクロゾーム酵素の活性化に関与する電子伝達系補酵素である [1]。POR は、ヒトにおいて50種類以上の酵素の活性化に関与する。POR 遺伝子は、酵母からヒトまで種を超えて保存され、広範な組織で発現している [1]。従来、POR 異常症は胎性致死であると推測されていたが、2004年、ヒトにおいてはじめて POR 遺伝子変異が同定された [2]。その後、2011年までに80例以上の患者が相ついで報告されている。POR 異常症は常染色体劣性遺伝疾患であり、保因者は通常無症状である。

POR 異常症患者の臨床症状

POR 異常症患者では、骨形成異常、複合型副腎ステロイド産生障害、男女に共通する性分化疾患と性成熟遅延、患児妊娠中の母体男性化など、多彩な臨床症状が認められる [3]。これは、下記の POR 依存性ミクロゾーム酵素の活性低下によって説明される (図1) [4]。骨形成異常は、骨細胞内コレステロール合成に関与する squalene epoxidase (SQLE) と CYP51A1, およびビタミン A 代謝に関与する CYP26A1, B1, C1 の活性低下によって説明される。コレステロール合成障害は、Hedgehog シグナルの異常を介して骨細胞の分化増殖の異常を招くと推測される。副腎と性腺のホルモン産生障害には、ステロイド合成酵素である CYP17A1, CYP21A2, CYP19A1 の活性低下が寄与する。これらの酵素の活性低下により、コルチゾルと性ホルモンの産生が低下し、17-

OHP に代表されるステロイド中間代謝産物の蓄積が生じる。女兒の外性器男性化には、胎盤での CYP19A1 活性低下によるテストステロンの蓄積と backdoor pathway と称される胎児期・新生児期特異的男性ホルモン産生経路を介した dihydrotestosterone (DHT) 過剰産生が関与すると推測される。胎盤に蓄積したテストステロンは、母体に流入し母体男性化の原因となる。また、本症においてしばしば認められる鎖肛や腎奇形は、CYP26 活性低下に起因するビタミン A 代謝障害によって説明される [5]。

POR 転写障害患者の同定

われわれはこれまでに、臨床的に POR 異常症と診断された日本人患者35例の遺伝子解析を行っている [4]。POR 翻訳領域の直接塩基配列決定とエクソン4から7を包含するプローブを用いた FISH 解析では、35例中32例でホモ接合性または複合ヘテロ接合性変異が同定された。また、本邦においては日本人特異的創始者変異である R457H が変異アリルの75%以上を占めることが見い出された。さらに、全例において少なくとも一方のアリルには残存活性陽性ミスセンス変異が存在することから、POR の完全な機能喪失は胎性致死であることが示唆された。なお、3例では一方のアリルに R457H 変異が同定されたが、他方のアリルには異常が同定されなかった。この成績は、POR 異常症患者の約12%で一方のアリルに変異が存在しないとする過去の報告に一致する [3]。

われわれは、この一見正常なアリルを有する3例 (症例1-3) の詳細な解析を行った [6]。リンパ芽球様細胞株の mRNA 解析では、3例ともに R457H を有するアリルのみが発現していることが見い出された。この結果は、mRNA 分解阻害剤 (cycloheximide) で処理した細胞株を用いた場合でも同様であった。以上の結果から、この一見正常なアリルは、ゲノム DNA から mRNA へ

連絡先: 深見真紀, 独立行政法人国立成育医療研究センター
研究所分子内分泌研究部

〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1

TEL: 03-5494-7025

FAX: 03-5494-7026

e-mail: fukami-m@ncchd.go.jp

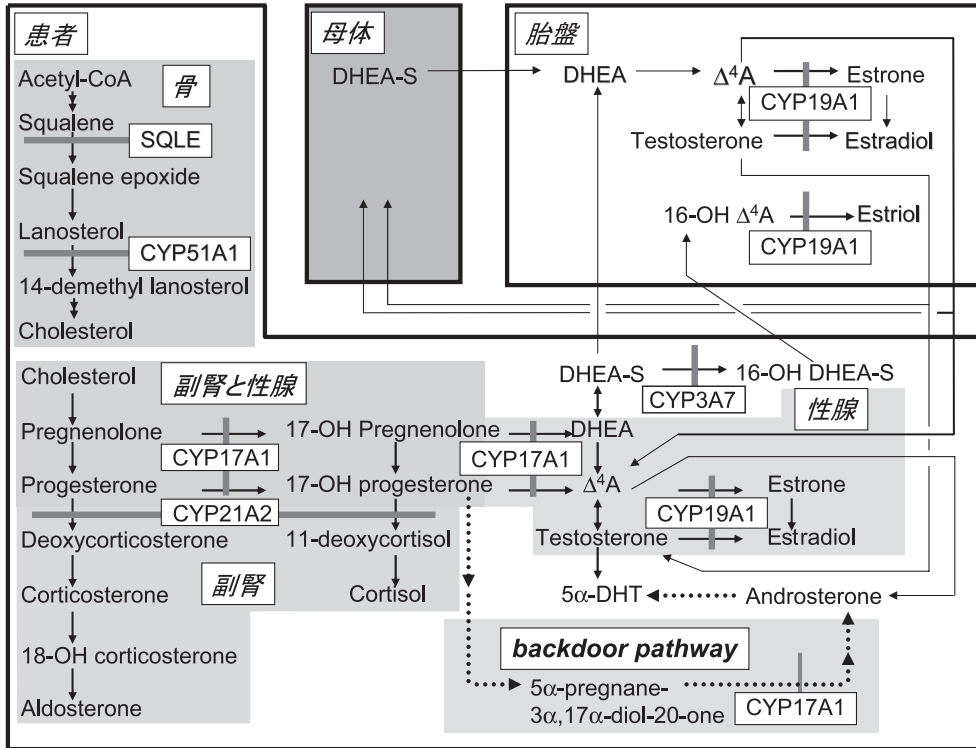


図1 POR 異常症の臨床症状に関与する POR 依存性マイクロゾーム酵素 (文献4より引用・改変)
ここに示した酵素の活性には、POR が必須である。このほか、ビタミンA代謝に関与するPOR 依存性酵素 (CYP26A1, B1, C1) の活性低下が骨症状と泌尿消化管奇形の原因となると推測される。

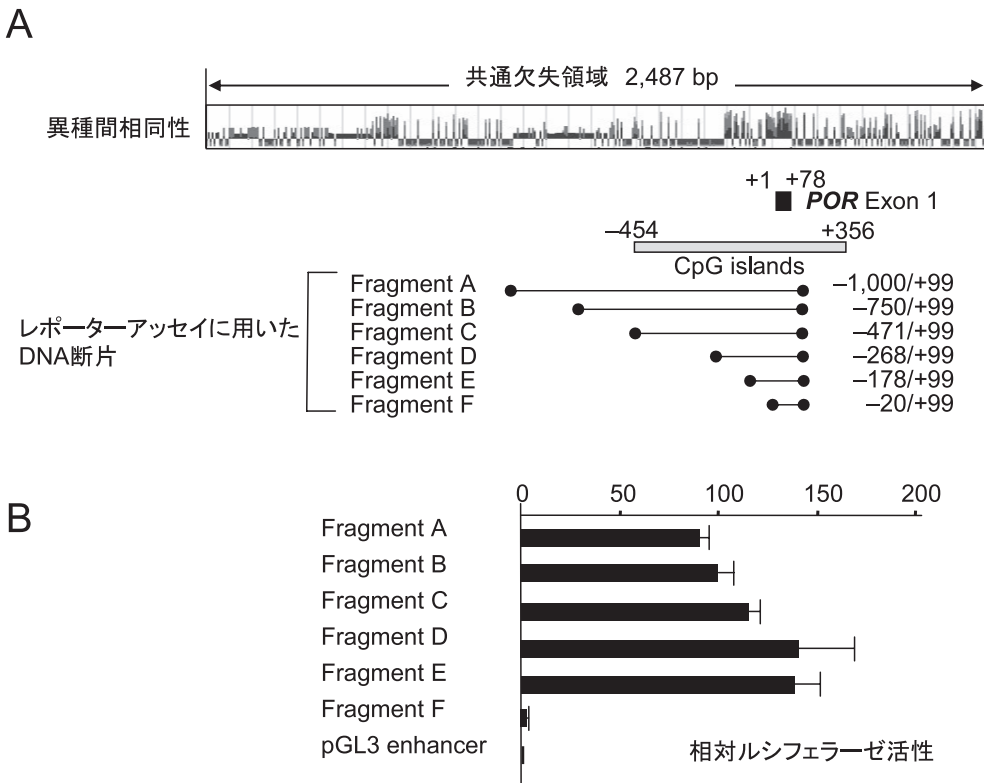


図2 転写障害患者における共通欠失領域の解析 (文献6より引用・改変)
POR エクソン1周辺の178 bpの異種間相同配列 (Fragment Eに含まれるが、Fragment Fには含まれない領域) が高い転写活性化能を有することが見出された。

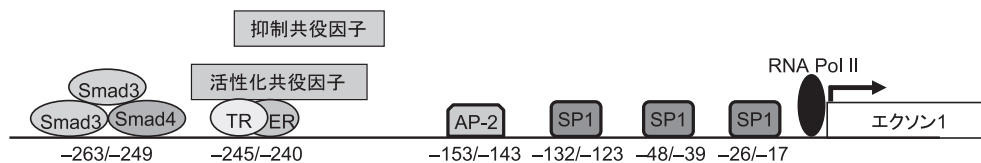


図3 ヒト *POR* 遺伝子のプロモーター構造 (文献6より引用・改変)
POR 非翻訳エクソン1直前の3つのSP1結合配列が、*POR* 遺伝子の広範性発現に必須であると推測される。
 TR, 甲状腺ホルモン受容体; ER, エストロゲン受容体.

の転写が障害されていると推測される。なお、この3例の患者が無機変異陽性患者と同等の重度の臨床症状を有していたことは、この変異陰性アリの発現がほぼ完全に消失していることに一致する。

POR 近位プロモーター構造

ついでわれわれは、これらの転写障害患者を対象にしたアレイ comparative genomic hybridization (CGH) 解析を行い、*POR* 遺伝子周囲のコピー数異常について検討した。その結果、全例で *POR* 遺伝子周囲領域の微小欠失が同定された。症例1では非翻訳領域であるエクソン1を包含する2,487 bpの領域、症例2と3ではエクソン1および翻訳領域であるエクソン2を包含する49,604 bpの領域がヘテロ接合性に欠失していた。これらの患者では微小欠失によって当該 *POR* アリの転写が消失したと推測される。

3例の共通欠失領域である2,487 bpの領域のバイオインフォマティクス解析では、この領域内に810 bpの CpG 配列、約350 bpの異種間保存配列、約1.3 kbのプロモーター関連ヒストン構造が同定された (図2)。一方、組織特異的プロモーターに多く認められる TATA Box は同定されなかった。HEK293細胞を用いたレポーターアッセイでは、エクソン1周囲の178 bpの異種間相同配列が高い転写活性化能を有することが見いだされた (図2)。この178 bp領域内には、転写因子 SP1の結合コンセンサス配列が-26/-27, -48/-39, -132/-123の位置に存在した。なお、ラットの研究では、Sp1の結合が *Por* の発現に重要であることが見いだされている。われわれは、レポーターアッセイと EMSA により、この3つの SP1結合配列に実際に SP1蛋白が結合すること、およびこの配列に変異を導入することにより転写活性化能が消失することを明らかとした。さらに、内在性 SP 蛋白ファミリーを欠く昆虫 SL2細胞では178 bp配列を組み込んだレポーターは転写活性化されないが、SP1発現ベクターを共導入することにより濃度依存性に活性が生じることを見いだした。なお、SP3発現ベクターの導入では

レポーターの転写活性化がほとんど認められないことから、*POR* プロモーターに対する SP3の作用はわずかであることが示唆された。また、リンパ球と HEK293細胞由来のゲノム DNA 解析では、この SP1結合配列周囲の282bp領域がメチル化を受けていないことが見いだされた。これは、*POR* が広範な組織で発現していることに一致する。

以上の成績は、ヒト *POR* の発現が主として非翻訳エクソン1直前に位置する3つの非メチル化 SP1結合配列への SP1蛋白の結合によって制御されていること、この領域の欠失によってほぼ完全な *POR* 転写障害が生じることを示唆する。すなわち、エクソン1直前の塩基配列が *POR* の広範囲発現を制御する近位プロモーターとして機能していると推測される。なお、Huang らが行った842人の多型解析では、この SP1結合配列内には多型が同定されていない [7]。このことは、この領域の塩基配列の機能的な重要性を支持する。

POR 遺伝子の発現制御機構

POR のプロモーター構造については先行研究がなされている。Scott らは、異種間塩基配列比較により、*POR* の非翻訳エクソン1の塩基配列を明確とした [8]。その後、Tee らは、甲状腺ホルモンが、エクソン1周囲の361 bpの領域への甲状腺ホルモン受容体βの結合を介して *POR* の発現を制御することを見出した [9]。さらに Tee らは、甲状腺ホルモン受容体α、エストロゲン受容体α、Smad3、Smad4、AP-2も *POR* の発現調節に関与すること、これらの因子の結合配列は-263から-240の間に存在することを明らかとした [9]。これは、前述の SP1結合配列の上流に相当する。また、Tee らは、-152C→Aの多型がステロイド合成や薬物代謝に影響を及ぼすことを見出した。この多型は AP-2結合コンセンサス配列内に存在するが、この多型の機能の差は AP-2に依存していないことから、未知の機序により *POR* 発現に影響を与えていると推測される [9]。

以上の知見とわれわれの研究成果を統合すると、*POR*

の発現制御には図3のようなプロモーター構造が関与していることが示唆される。すなわち、*POR*の基礎的発現には非翻訳エクソン1直前の配列へのSP1の結合が必須であり、*POR*の個々の組織における発現調節にはその上流領域へのさまざまな因子の結合が関与していると推測される。

まとめ

ヒト*POR*遺伝子の非翻訳エクソン1直前に3つのSP1結合配列が存在し、この配列へのSP1蛋白結合が*POR*の発現に必須であることが明らかとなった。また、各組織における*POR*発現量の制御には、上流に存在する配列への転写因子の結合が関与していると推測される。*POR*は代表的広範性発現性遺伝子であることから、このようなプロモーター構造は他のハウスキーピング遺伝子にも認められる可能性がある。

引用文献

1. Shephard EA, Palmer CN, Segall HJ, Phillips IR (1992) Quantification of cytochrome P450 reductase gene expression in human tissues. *Arch Biochem Biophys* 294, 168-172.
2. Flück CE, Tajima T, Pandey AV, Arlt W, Okuhara K, Verge CF, Jabs EW, Mendonca BB, Fujieda K, Miller WL (2004) Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley-Bixler syndrome. *Nat Genet* 36, 228-230.
3. Scott RR, Miller WL (2008) Genetic and clinical features of P450 oxidoreductase deficiency. *Horm Res* 69, 266-275.
4. Fukami M, Nishimura G, Homma K, Nagai T, Hanaki K, Uematsu A, Ishii T, Numakura C, Sawada H, Nakacho M, Kowase T, Motomura K, Haruna H, Nakamura M, Ohishi A, Adachi M, Tajima T, Hasegawa Y, Hasegawa T, Horikawa R, Fujieda K, Ogata T (2009) Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: identification and characterization of biallelic mutations and genotype-phenotype correlations in 35 Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 1723-1731.
5. Fukami M, Nagai T, Mochizuki H, Muroya K, Yamada G, Takitani K, Ogata T (2010) Anorectal and urinary anomalies and aberrant retinoic acid metabolism in cytochrome P450 oxidoreductase deficiency. *Mol Genet Metab* 100, 269-273.
6. Soneda S, Yazawa T, Fukami M, Adachi M, Mizota M, Fujieda K, Miyamoto K, Ogata T (2011) Proximal Promoter of the Cytochrome P450 Oxidoreductase Gene: Identification of Microdeletions Involving the Untranslated Exon 1 and Critical Function of the SP1 Binding Sites. *J Clin Endocrinol Metab* 96 (11), E1881-1887.
7. Huang N, Agrawal V, Giacomini KM, Miller WL (2008) Genetics of P450 oxidoreductase: Sequence variation in 842 individuals of four ethnicities and activities of 15 missense mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 1733-1738.
8. Scott RR, Gomes LG, Huang N, Van Vliet G, Miller WL (2007) Apparent manifesting heterozygosity in P450 oxidoreductase deficiency and its effect on coexisting 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 2318-2322.
9. Tee MK, Huang N, Damm I, Miller WL (2011) Transcriptional regulation of the human P450 oxidoreductase gene: hormonal regulation and influence of promoter polymorphisms. *Mol Endocrinol* 25, 715-731.