

Table 5 Haplotypes in block 1 (the enhancer/promoter regions and exon 1) of *UGT1A1* for three ethnic groups

Position	-3279		TA box					211		686		Haplotype frequency		
	T	G	5	6	7	8	G	A	C	A	African-American	Caucasian	Japanese	
*1a	■			■			■		■		0.150	0.451	0.610	
*6a	■			■				■	■		0.000	0.000	0.141	
*6d									■	■	0.000	0.000	0.003	
*28b							■		■		0.446	0.389	0.097	
*28c							■			■	0.000	0.000	0.003	
*36b							■		■		0.044	0.017	0.000	
*37b								■	■		0.065	0.007	0.000	
*60a									■	■	0.296	0.135	0.145	

Haplotype distribution patterns in Block 1 were statistically different among the three ethnic groups ( $p < 0.0001$  by the  $\chi^2$ -test). Fourteen subjects with ambiguous diplotypes were excluded from the analysis.

Table 6 Haplotypes in block 2 (exons 2-5) of *UGT1A1* for three ethnic groups

Position	1813		1941		2042		Frequency		
	C	T	C	G	C	G	African-American	Caucasian	Japanese <sup>a</sup>
*IA	■		■		■		0.617	0.757	0.903
*IB		■		■		■	0.183	0.157	0.097
*IC		■	■			■	0.163	0.060	0.000
*ID	■		■			■	0.033	0.017	0.000
*IE	■			■		■	0.000	0.007	0.000
*IF		■	■		■		0.003	0.003	0.000

Haplotype distribution patterns in Block 2 were statistically different among the three ethnic groups ( $p < 0.0001$  by the  $\chi^2$ -test).

<sup>a</sup> Haplotypes in Japanese were determined according to the genotype of 1941C>G, because it was previously reported that all three marker genotypes were completely associated each other in a Japanese population.

Table 7 Kinetic parameters of SN-38 glucuronidation by Wild-type and P229L UGT1A1s

Parameter	Km	Vmax	Vmax/Km	Normalized Vmax	Normalized Vmax/Km
(Unit)	( $\mu$ M)	(pmol/min/mg protein)	(mL/min/mg protein)	(pmol/min/mg protein)	(mL/min/mg protein)
<b>UGT1A1</b>					
Wild-type	8.67 $\pm$ 0.18	71.2 $\pm$ 4.73	8.23 $\pm$ 0.65	71.7 $\pm$ 2.46	8.26 $\pm$ 0.15
P229L	37.6 $\pm$ 2.34	5.27 $\pm$ 0.32	0.14 $\pm$ 0.02	8.93 $\pm$ 0.98	0.24 $\pm$ 0.03

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
総合研究報告書(トランスポーター)

分担研究者 家入 一郎 鳥取大学医学部附属病院薬剤部助教授・副薬剤部長

研究要旨: 本研究では薬物トランスポーター遺伝子に注目し、多型解析とともに、主要変異頻度の人種間比較を行い、体内動態や効果にみる個人差や人種差を理解するための情報整備を目的とした。トランスポーター遺伝子は;OATP-C, BCRP, OATP-B, OATP8, MDR1, OCT1~3, MRP4。遺伝子解析は、SNPs検索、ハプロタイプ検索を中心に行い、一部については、ヒトでの機能評価を加えた;OCTP-C遺伝子多型とプラバスタチン体内動態、コレステロール低下作用との関連、肝特異的発現するトランスポーター遺伝子多型とビリルビン輸送能との関連、BCRP遺伝子多型と胎盤でのタンパク発現量ならびに基質薬物の体内動態との関連、MDR1遺伝子非翻訳領域多型と胎盤でのタンパク発現量との関連など。取り扱った遺伝子総てに変異を認めたが、OCTs遺伝子での変異は他の遺伝子と比べ、その頻度が低い傾向にあった。また、一部の変異の頻度には人種間での差が観察されたが、日本人の頻度は、黒人と共通点が多い傾向にあった。機能評価の結果、一部の変異は、あきらかに機能変化を伴い、効果や体内動態の個人差の原因と言える。従って、頻度からの考察でも、人種間での効果や体内動態の差は存在すると考えられる。

#### A. 研究目的

薬物トランスポーター遺伝子に注目し、多型解析、主要変異頻度の人種間比較、さらには、一部の多型については、ヒトでの機能評価を実施した。以上の検討を通し、体内動態や効果に見る個人差、人種差を評価する際の基礎的な情報整備を目的とした。

#### B. 研究方法

以下の薬物トランスポーター遺伝子の多型解析を健康な日本人、白人、黒人より得たゲノムDNA(n = 150 each)を試料に、主に翻訳領域を中心に実施した;OATP-C, BCRP, OATP-B, OATP8, MDR1, OCT1~3, MRP2, MRP4, OAT1~2。さらに以下の遺伝子については、機能評価を加えた;OCTP-C(遺伝子多型とプラバスタチン体内動態とコレステロール低下作用)、肝に発現する数種のトランスポーター群(ビリルビン輸送能)、BCRP遺伝子(胎盤でのタンパク発現量、4MUの体内動態)、MDR1遺伝子非翻訳領域(胎盤でのタンパク発現量)、OCT1&2(メトホルミンによる血糖降下作用)。倫理面への配慮一使用した血液は、研究用に採取されたもので、米国血液供給会社より購入した。これら血液検体や機能評価に使用したヒト臓器は、提供者に研究の目的等を説明した後、提供の同意を得た場合のみに試料として使用した。健康成人に対しても、同様な説明を行い、臨床試験参加の意思確認とともに文書で同意を得た上で、実施した。また、総ての研究は、鳥取大学医学部倫理審査委員会において、審査、承認を得た後に実施した。さらに、総ての検体は、提供個人等が識別できない匿名化の後に使用した。

#### C. 研究結果

本検討では、多くの遺伝子を対象に検討を加えた。その例として、OATP-Cの結果を以下に記載する。OCTP-C遺伝子には、6カ所のアミノ酸置換を伴う変異を同定した。その中で、N130D, V174A, 2種類のSNPsについて、ハプロタイプも合わせ評価を加えた。日本人、白人、黒人における130D変異の頻度(mean, 95%CI)はそれぞれ、(0.629, 0.568-0.690)、(0.457, 0.401-0.513)、(0.769, 0.712-0.826)であった。また、174Aの頻度は(0.158, 0.112-0.204)、(0.120, 0.083-0.157)、(0.013, 0.0002-0.026)であった。ハプロタイプについては、\*5(130D単独)、\*15(130D174A)について検討した結果、\*5 alleleの頻度はそれぞれ、0.000, 0.015, 0.000であり、\*15 alleleでは、0.150, 0.056, 0.014であった。以上のことから、V174A変異を有する日本人は、同時にN130D変異を有している一方、白人では両変異は独立して発現している例も比較的高い頻度で存在することが明らかとなった。次に、プラバスタチンを基質薬物として体内動態への変異の関与について検討を加えた。

その結果、\*15 alleleは、血中濃度の上昇を伴う変異であり、ホモ接合体での濃度が最も高く、次いで、ヘテロ型、変異無し群で低くなるgene-dose effectが観察された。\*15 alleleの構成変異であるV174A変異は、輸送能の低下の原因変異であることから、本変異保有者では、プラバスタチンの肝取り込みが低下すること、血中濃度は上昇するもののコレステロール低下作用の減弱が予想された。次に、この仮説の検討を行った。鳥取大学病院に通院し、プラバスタチンを長期に服用する患者を対象として、多型とコレステロール低下作用との関連について検討を加えた。\*1a, \*1b, \*15, \*17遺伝子型で層別した結果、\*1b/\*1b患者の平均低下率が約25%であったのに対し、\*15/\*1b型では、約10%前後であった。\*15変異を有する患者では、コレステロールの低下率が低い傾向が認められた。

#### D. 考察

今回解析した遺伝子総てにアミノ酸置換を伴う遺伝子変異を同定した。しかし、その種類や日本人での頻度はトランスポーター間で異なる。さらに、一部の変異の頻度については、明らかな人種差が認められ、日本人での頻度は黒人と共通点が多い傾向にあった。OATP-Cの例にみるように、一部の変異は、明らかに体内動態の個人差の原因となる。N130D, V174Aをハプロタイプで評価すると、明らかに人種差がみとめられることから、体内動態や効果に対する人種差の存在が予想される。本検討では、主に、体内動態関連遺伝子に注目した。今後は、効果に関与するタンパク遺伝子も視野に入れることで、さらに良好に遺伝子型と表現型が関連付けられると考えられる。

#### E. 結論

機能に変化を伴う遺伝子変異の頻度の人種間で異なるケースが散見された。これらの現象が臨床でどの程度の意義を有するかは不明であり、データの蓄積が望まれるが、国外の臨床データ評価時の留意点と言える。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

別紙一覧を参照。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

現在までに出願、登録はない。

総合研究報告書（CYP3A+OATP-C）

分担研究者 千葉 寛 千葉大学大学院教授

研究要旨

平成 14 年度は、本研究で使用するゲノムが、白人種、黒人種、日本人の一般的な母集団であることを確認するため、CYP3A4\*1B 変異の頻度解析を行いこれまでに報告されている変異頻度と比較した。その結果、その結果、CYP3A4\*1B の遺伝子頻度は、白人種、黒人種、日本人においてそれぞれ、3.85、71.3、0%とこれまでの結果と良く一致することが示され、本研究で使用するゲノム DNA が各人種の特徴を有する母集団であることが確認された。平成 15 年度は CYP3A4 の機能低下に関わるとされる遺伝子変異（CYP3A4\*2, CYP3A4\*4, CYP3A4\*5, CYP3A4\*6, CYP3A4\*8）について、人種間での変異発現頻度の比較を行った。また、分担研究者である家入が人種差の存在を確認した OATP-C\*5 と OATP-C\*15 について機能への影響を *in vitro* で検討した。その結果、CYP3A4\*6 については、白人種、黒人種では解析した全てのサンプルにおいて野生型であったのに対し、日本人のサンプルでは 1 検体ヘテロ型として CYP3A4\*6 変異が検出され、この変異がアジア特徴的な者である可能性が示唆された。一方、OATP-C\*5 と OATP-C\*15 のを導入発現した HEK293 細胞におけるプラバスタチンの輸送活性は OATP-C\*5、OATP-C\*15 のいずれについても野生型の 1/6 以下の大きな低下を示したが、低下の程度に大きな差は認められなかった。OATP-C\*5 と OATP-C\*15 を足した頻度で考えた場合、日本人は白人種の約二倍、黒人種の約 10 倍の頻度でこれらの遺伝子が発現していることから、OATP-C の機能低下者の頻度や平均的な機能に人種差が存在する可能性が示唆された。平成 16 年度は、日本人と白色人種の肝組織を用い、CYP3A4\*2, CYP3A4\*5, CYP3A4\*6, CYP3A5\*3 が薬物代謝活性に与える影響を人種間で比較した。その結果、CYP3A4\*6 のヘテロ型が日本人検体に一例検出され、その TS6  $\beta$ -hydroxylation 活性は日本人の野生型の平均値の約 1/3 の低値を示した。一方、日本人、白人種すべての肝ミクロソーム検体の中で、CYP3A5\*1/\*1 の遺伝子型を持つ検体が最も高い MDZ 水酸化活性を示し、1'-hydroxylation 活性については CYP3A5\*3 との間に比較的明瞭な gene-dose effect が認められた。これらの結果は、CYP3A4\*6 と CYP3A5\*3 がヒト肝ミクロソームにおける CYP3A 活性の個人差を決定する重要な要因の一つである可能性を強く示唆するものと考えられた。しかし、CYP3A4\*6 の頻度はきわめて低いこと、CYP3A5\*3 の頻度は高いが日本人と白人種間に頻度の差がないことから、これらの遺伝子変異は日本人と白人種間の人種差の原因となる可能性は低いものと考えられた。

A. 研究目的

CYP3A は、多くの医薬品の代謝に重要な役割を果たす CYP subfamily であり、CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43 の 4 分子種からなる。これらの分子種の中で医薬品の代謝に最も重要なのは CYP3A4 であり、

CYP で代謝を受ける薬物の 50%以上に関わっているとされている。CYP3A4 の肝臓における発現量に 10-50 倍のばらつきがあり、クリアランスでも 11-48 倍のばらつきがある。この原因の一つとして遺伝子多型の存在が示唆されているが、これまでに報告されている CYP3A4 遺

伝子に関する変異発現頻度の多くは白人種について解析されたものであり、日本人や黒人種に関する情報は極めて少ない。本研究の目的は、白人種、黒人種、日本人のゲノムを対象として、*CYP3A4*の変異遺伝子の発現頻度を解析し、人種間で比較することにより、*CYP3A* 活性の人種差を考える基盤となる情報を得ることである。

上記の研究目的に加え、初年度に分担研究者である家入は肝に特異的に発現しているトランスポーターである *OATP-C* の変異遺伝子 (*OATP-C\*5* と *OATP-C\*15*) の発現頻度に人種差が存在することを明らかにした。即ち、\*5は白人種のみで認められ (15%)、\*15は日本人で高く (15%)、ついで白人種 (5.6%)、黒人種 (1.4%) の順である。\*15は *in vivo* で、\*5は *in vitro* で機能の低下が報告されているが、同じ系での比較は行われていない。本研究ではこれらの変異遺伝子を HEK293 細胞に導入発現させ機能への影響を *in vitro* で比較する検討についても行った。

## B. 研究方法

*CYP3A4\*1B* は、PCR-RFLP 法により解析した。すなわち、ゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、得られた PCR 産物を *Pst* I により制限酵素処理することにより変異の有無を調べた。*CYP3A4\*2* と *CYP3A4\*5* は、PCR-RFLP 法により解析した。すなわち、ゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、得られた PCR 産物をそれぞれ *Sly* I あるいは *Cla* I で制限酵素処理することにより変異の有無を調べた。*CYP3A4\*6* については、PCR-RFLP 法と denaturing HPLC 法を組み合わせた DNA フラグメント解析法により解析した。すなわち、野生型では *Hinf* I により切断されないため、denaturing HPLC 法によりクロマトグラフ上で単一ピークとして検出されるのに対し、*CYP3A4\*6* 変異型では、二つのピークとして検出されることに基づいて判定した。Testosterone (TS) 6 $\beta$ -hydroxylation 活性、midazolam (MDZ) 1'および 4-hydroxylation 活性は、HPLC により

測定した。

## C. 研究結果

初年度は、*CYP3A4* 遺伝子の 5'-上流の変異である *CYP3A4\*1B* の発現頻度を解析することにより、本研究で使用するゲノムが、白人種、黒人種、日本人の一般的な母集団であることを確認した。即ち、*CYP3A4\*1B* に関しては、日本人 56 人すべてにおいて *CYP3A4\*1B* は検出されなかった。一方、黒人種では、54 人中 28 人 (51.8%) が *CYP3A4\*1B* のホモであり、21 人 (38.9%) がヘテロであり、*CYP3A4\*1B* を保有しない黒人種はわずか 5 人 (9.3%) であった。白人種では、52 人中 4 人 (7.7%) が *CYP3A4\*1B* のヘテロであり、48 人 (92.3%) では *CYP3A4\*1B* は検出されなかった。

第二年度は、*CYP3A4* の機能低下に関わるとされる変異のうち *CYP3A4\*2*、*CYP3A4\*5*、*CYP3A4\*6* について解析し、人種間での変異発現頻度の比較を行った。その結果、*CYP3A4\*2* および *CYP3A4\*5* に関しては、解析した白人種 (150 人)、黒人種 (150 人)、日本人 (149 人) すべてにおいて変異は検出されなかった。一方、*CYP3A4\*6* に関しては、白人種 (150 人) と黒人種 (150 人) とともに変異が検出されなかったのに対し、日本人では 149 名中 1 名がヘテロ型の変異を保有していた。これらの結果より、*CYP3A4\*6* の遺伝子頻度は、日本人が 0.34%、黒人種が 0%、白人種が 0%であることが明らかとなった。

一方、*OATP-C\*5* と *OATP-C\*15* のを導入発現した HEK293 細胞におけるプラバスタチンの輸送活性は *OATP-C\*5*、*OATP-C\*15* のいずれについても野生型の 1/6 以下の大きな低下を示したが、低下の程度に大きな差は認められなかった。

第三年度は日本人と白色人種の肝組織を用い、*CYP3A4\*2*、*CYP3A4\*5*、*CYP3A4\*6*、*CYP3A5\*3* が薬物代謝活性に与える影響を両人種間で比較した。その結果、日本人の検体で *CYP3A4\*6* が一例ヘテロで見いだされ、その TS6 $\beta$ -hydroxylation 活性は日本人の野生型の平均値の約 1/3 の低値を示した。

しかし、この検体を除いた日本人 15 検体の TS6 $\beta$ -hydroxylation 活性の平均値は白人種 21 検体の平均値との間で差が認められなかった。また、日本人および白人種の肝組織由来ゲノム DNA について CYP3A5\*3 の頻度を調べた結果、日本人が 0.81、白人種が 0.85 であり、これまでの報告とよく一致した値が得られた。両人種の中で一例野生型 CYP3A5\*1 アレルをホモでもつ個体 (CYP3A5\*1/\*1) が存在し、その検体の TS 6 $\beta$ -hydroxylation 活性は、全検体中最も高い活性を示し、白人種の平均活性値の約 4 倍であった。同様に MDZ 水酸化活性に関しても、1'-, 4-水酸化いずれの活性についても CYP3A5\*1 をホモで保有する検体が最も高い活性を示した。さらに 1'-hydroxylation 活性については、高基質濃度(200 $\mu$ M)、低基質濃度(2.5 $\mu$ M)のいずれについても、CYP3A5\*1/\*3 の活性は\*3/\*3 の活性よりも高値を示し、比較的明瞭な gene-dose effect を示すことが明らかとなった。しかし、TS6 $\beta$ -hydroxylation 活性と高濃度(200 $\mu$ M)の MDZ 4-hydroxylation 活性については、CYP3A5\*1/\*3 と\*3/\*3 の間に明らかな差は認められなかった。

#### D. 考察

日本人、白人種、黒人種における CYP3A4\*1B 遺伝子頻度は、それぞれ 0%、3.85%、71.3%であり、これまでに報告されている値とほぼ一致する結果であった。この事により、本研究で使用した白人種、黒人種、日本人のゲノムは、各人種の特徴を有する母集団であることが確認された。

CYP3A4\*2 および CYP3A4\*5 に関しては、検討したいずれの人種においても変異が検出されなかったことから、変異遺伝子の発現頻度は非常に低く、人種差を説明する因子とは言い難いことが示唆された。一方、CYP3A4\*6 に関しては、日本人においてのみ変異遺伝子が検出された。CYP3A4\*6 は、これまで中国人での検討以外に報告が無い。今回の結果から CYP3A4\*6 変異は、頻度は低いもののアジア人特有の変異である可能性が考えられた。

一方、OATP-C\*15 は日本人に多い変異であるが、白人種では日本人で認められていない OATP-C\*5 が存在する。そのため、今回の結果から OATP-C\*5 と OATP-C\*15 を足した頻度で考えた場合、日本人は白人種の約二倍、黒人種の約 10 倍の頻度でこれらの遺伝子が発現していることから、これらの遺伝子変異に起因する OATP-C の機能低下者の頻度や OATP-C の平均的な機能に人種差が生じる可能性が示唆された。

今回肝検体に見いだされた CYP3A4\*6 の heterozygote (GHL29) の *in vitro* における TS 6 $\beta$ -hydroxylation 活性は日本人の平均値の約 1/3 程度であった。CYP3A4\*6 は 1 塩基挿入によりフレームシフトが起こり、その結果、ストップコドンを形成する。そのため、CYP3A4\*6 を heterozygote として持つ個体では活性が通常約 1/2 程度に低下するものと予想される。したがって、今回、得られた活性はその予想とほぼ一致するものであった。しかし、CYP3A4\*6 の頻度はきわめて低く、昨年度行った結果では日本人 149 人中 1 人が heterozygote として検出されたのみであった。従って、CYP3A4\*6 は日本人における CYP3A4 の活性低下に一部寄与する可能性はあるものの、頻度がきわめて低いため、日本人と白人種における CYP3A4 活性の人種差を説明する主要な要因とはなる可能性は低いものと思われた。

一方、CYP3A subfamily の一分子種である CYP3A5 は個体によっては CYP3A4 と同程度発現していることもあり、さらに CYP3A4 と類似した基質特異性を示すこともあり、CYP3A 活性に一部寄与している可能性が指摘されている。これまでに、発現系およびヒト肝ミクロソームを用いた検討により、CYP3A5 の TS 6 $\beta$ -hydroxylation 活性は CYP3A4 より高いあるいは同程度であるという報告や低いという報告があり統一した見解は得られていないが、MDZ 1'-hydroxylation 活性については CYP3A5 の活性が CYP3A4 より高いという報告が多く、逆に MDZ 4-hydroxylation 活性は、CYP3A4 よりも低いか、同程度であるという報告が

多い。今回の結果はこれらの報告とよく一致し、MDZ 1'-hydroxylation では CYP3A5 の関与が大きいと、比較的明瞭な gene-dose effect を示したのに対し、MDZ 4-hydroxylation 活性については低濃度のみ gene-dose effect が認められ、TS 6 $\beta$ -hydroxylation 活性については明瞭な gene-dose effect が認められなかったものと考えられた。実際、MDZ 4-hydroxylation 活性については高濃度時において CYP3A4 活性と高い相関を示すとされており、高濃度の MDZ 4-hydroxylation 活性では \*1/\*3 と \*3/\*3 に差が認められなかったという今回の結果とよく一致するものと考えられた。

#### E. 結論

1) CYP3A4\*6は、日本人における CYP3A4 の活性低下に一部寄与する可能性はあるものの、日本人を含めたすべての人種における発現頻度がきわめて低いため、CYP3A 活性の人種差を説明する主要な要因とはなり得ないものと思われた。

2) CYP3A5\*3は頻度が高く CYP3A5 の関与が高い薬物の代謝の個人差には重要な要因となると考えられた。しかし、日本人と白人種における CYP3A5\*3 の頻度にはほとんど差がないため、個人差の原因とはなっても、人種差の原因になる可能性は低いものと思われる。ただし、黒人種については白人種や日本人と比較して CYP3A5\*3 の頻度が有意に低いことから、日本人あるいは白人種との間に人種差が生じる原因となる可能性を考慮する必要があるものと考えられた。

3) OATP-C\*5 と OATP-C\*15 に起因する OATP-C の機能低下者の頻度は日本人で最も高く、OATP-C の平均的な機能が日本人では低い可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表 論文発表

Shiraishi T, Hosokawa M, Kobayashi K, Tainaka H, Yamaura Y, Taguchi M, Chiba K. Effects of G169R and P34S substitutions produced by mutations of CYP2D6\*14 on the functional properties of CYP2D6 expressed in V79 cells. *Drug Metab Dispos.* (2002) 30: 1201-5.

Mitsunaga Y, Kubota T, Ishiguro A, Yamada Y, Sasaki H, Chiba K, Iga T. Frequent occurrence of CYP2D6\*10 duplication allele in a Japanese population. *Mutat Res.* (2002) 505: 83-5.

Kobayashi K, Urashima K, Shimada N, Chiba K. Substrate specificity for rat cytochrome P450 (CYP) isoforms: screening with cDNA-expressed systems of the rat. *Biochem Pharmacol.* (2002) 63: 889-96.

Kobayashi K., Urashima K., Shimada N., Chiba K. Selectivities of human P450 inhibitors toward rat P450 isoforms: study with cDNA-expressed systems of the rat. *Drug Metab Dispos* (2003) 31: 833-836.

Senda C., Toda S., Tateishi M., Kobayashi K., Igarashi T., Chiba K. Mexiletine carbonyloxy  $\beta$ -D-glucuronide: a novel metabolite in human urine. *Xenobiotica* (2003) 33:871-84.

Mimura N., Kobayashi K, Nakamura Y., Shimada N., Hosokawa M., Chiba K. Metabolism of medroxyprogesterone acetate (MPA) via CYP enzymes *in vitro* and effect of MPA on bleeding time in female rats in dependence on CYP activity *in vivo*. *Life Science* (2003) 73:3201-3212.

Iwahori T, Matsuura T, Maehashi H, Sugo K, Saito M, Hosokawa M, Chiba K, Masaki T, Aizaki H, Ohkawa K, Suzuki T. CYP3A4 inducible model for *in vitro* analysis of human drug metabolism using a bioartificial liver. *Hepatology.* (2003) 37:665-673.

Morita J, Kobayashi K, Wanibuchi A, Kimura M, Irie S, Ishizaki T, Chiba K. A novel single nucleotide polymorphism (SNP) of the CYP2C19 gene in a Japanese subject with lowered capacity of mephobarbital 4'-hydroxylation. *Drug Metab Pharmacokinet.* 19:236-8,2004

Hirota T, Ieiri I, Takane H, Maegawa S, Hosokawa M, Kobayashi K, Chiba K, Nanba E, Oshimura M, Sato T, Higuchi S, Otsubo K. Allelic expression imbalance of the human CYP3A4 gene and individual phenotypic status. *Hum Mol Genet.* 13:2959-69, 2004

Kobayashi K, Morita J, Chiba K, Wanibuchi A, Kimura M, Irie S, Urae A, Ishizaki T.



Pharmacogenetic roles of CYP2C19 and CYP2B6 in the metabolism of R- and S-mephobarbital in humans. *Pharmacogenetics*. 14:549-56, 2004

Iida I, Miyata A, Arai M, Hirota M, Akimoto M, Higuchi S, Kobayashi K, Chiba K. Catalytic roles of CYP2C9 and its variants (CYP2C9\*2 and CYP2C9\*3) in lornoxicam 5'-hydroxylation. *Drug Metab Dispos*. 32:7-9, 2004

Morimoto K, Oishi T, Ueda S, Ueda M, Hosokawa M, Chiba K. A novel variant allele of OATP-C (SLCO1B1) found in a Japanese patient with pravastatin-induced myopathy. *Drug Metab Pharmacokinet*. 19:453-5, 2004

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

別添4

## II 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shiraishi et al.	Effects of G169R and P34S substitutions produced by mutations of CYP2D6*14 on the functional properties of CYP2D6 expressed in V79 cells	Drug Metab Dispos	30	1201-5	2002
Mitsunaga et al.	Frequent occurrence of CYP2D6*10 duplication allele in a Japanese population	Mutat Res	505	83-5	2002
Kobayashi et al.	Substrate specificity for rat cytochrome P450 (CYP) isoforms: screening with cDNA-expressed systems of the rat	Biochem Pharmacol	63	889-96	2002
Iwahori et al.	CYP3A4 inducible model for in vitro analysis of human drug metabolism using a bioartificial liver	Hepatology	37	665-73	2003
Takahashi et al.	Population differences in	Clin Pharmacol Ther	73	253-63	2003

	(S)-warfarin metabolism between CYP2C9 genotype-matched Caucasians and Japanese.				
Takahashi and Echizen	Pharmacogenetics of CYP2C9 and interindividual variability in anticoagulant response to warfarin.	Pharmacogenomics J	3	202-14	2003
Kobayashi et al.	Selectivities of human P450 inhibitors toward rat P450 isoforms: study with cDNA-expressed systems of the rat.	Drug Metab Dispos	31	833-6	2003
Senda et al.	Mexiletine carbonyloxy $\beta$ -D-glucuronide: a novel metabolite in human urine.	Xenobiotica	33	871-4	2003
Mimura et al.	Metabolism of medroxyprogesterone acetate (MPA) via CYP enzymes <i>in vitro</i> and effect of MPA on bleeding time in female rats in dependence on CYP activity <i>in vivo</i> .	Life Science	73	3201-12	2003
Saeki et al.	Comprehensive <i>UGT1A1</i> genotyping in a Japanese	Clin. Chem.	49	1182-5	2003

	population by Pyrosequencing.				
Nishizato et al.	Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics.	Clin Pharmacol Ther	73	554-65	2003
Takane et al.	Genetic polymorphism of organic anion and cation transporters: pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences in pharmacotherapy.	Curr Pharmacogenomics	1	245-57	2003
家入ら	トランスポーターの臨床域意義—遺伝子多型から見る薬物療法への寄与	ファルマシア	39	427-30	2003
Takahashi H, Wilkinson GR, Padrini R, Echizen H	CYP2C9 and oral anticoagulation therapy with acenocoumarol and warfarin: similarities yet differences.	Clin Pharmacol Ther.	75	376-80	2004
Takahashi H, Ieiri I, Wilkinson GR, Mayo G, Kashima T, Kimura S, Otsubo K, Echizen H	5'-Flanking region polymorphisms of <i>CYP2C9</i> and their relationship to S-warfarin metabolism in Caucasian and Japanese patients	Blood	103	3055-3057	2004

N. Kaniwa, K. Kurose, H. Jinnno, T. Tanaka-Kagawa, Y. Saito, M. Saeki, J. Sawada, M. Tohkin and R. Hasegawa	Racial variability in haplotype frequencies of UGT1A1 and glucuronidation activity of a novel SNP 686C>T (P229L) found in an African-American	Drug Metab. Dispos.	33	458-465	2005
Ieiri I, Takane H, Otsubo K.	The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications.	Clin Pharmacokinet	43	553-576	2004
Kobayashi D, Ieiri I, Hirota T, Takane H, Maegawa S, Kigawa J, Suzuki H, Nanba E, Oshimura M, Terakawa N, Otsubo K, Mine K, Sugiyama Y.	Functional assessment of ABCG2 (BCRP) gene polymorphisms to protein expression in human placenta.	Drug Metab Dispos	33	94-101	2005
Takane H, Kobayashi D, Hirota T, Kigawa J, Terakawa N, Otsubo K, Ieiri I.	Haplotype-oriented genetic analysis and functional assessment of promoter variants in the MDR1 (ABCB1) gene.	J Pharmacol Ther Exp	311	1179-1187	2004
Hirota T, Ieiri I, Takane H, Maegawa S, Hosokawa M, Kobayashi K, Chiba K, Nanba E,	Allelic expression imbalance of the human CYP3A4 gene and individual phenotypic status.	Hum Mol Genet	13	2959-2969	2004

Oshimura M, Sato T, Higuchi S, Otsubo K.					
Morita J, Kobayashi K, Wanibuchi A, Kimura M, Irie S, Ishizaki T, Chiba K.	A novel single nucleotide polymorphism (SNP) of the CYP2C19 gene in a Japanese subject with lowered capacity of mephobarbital 4'-hydroxylation.	Drug Metab Pharmacokinet.	19	236-8	2004
Kobayashi K, Morita J, Chiba K, Wanibuchi A, Kimura M, Irie S, Urae A, Ishizaki T.	Pharmacogenetic roles of CYP2C19 and CYP2B6 in the metabolism of R- and S-mephobarbital in humans.	Pharmacogenetics.	14	549-56	2004
Iida I, Miyata A, Arai M, Hirota M, Akimoto M, Higuchi S, Kobayashi K, Chiba K.	Catalytic roles of CYP2C9 and its variants (CYP2C9*2 and CYP2C9*3) in lornoxicam 5'-hydroxylation.	Drug Metab Dispos	32	7-9	2004
Morimoto K, Oishi T, Ueda S, Ueda M, Hosokawa M, Chiba K	A novel variant allele of OATP-C (SLCO1B1) found in a Japanese patient with pravastatin-induced myopathy.	Drug Metab Pharmacokinet.	19	453-5	2004
家入一郎 大坪健司	薬物トランスポーターの遺伝的多型と臨床的意義	臨床検査	48	139-147	2004

### III 研究成果の刊行物・別刷



## EFFECTS OF G169R AND P34S SUBSTITUTIONS PRODUCED BY MUTATIONS OF CYP2D6\*14 ON THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF CYP2D6 EXPRESSED IN V79 CELLS

TOMOKO SHIRAIISHI, MASAKIYO HOSOKAWA, KAORU KOBAYASHI, HITOSHI TAINAKA, YOSHIYUKI YAMAURA, MIWO TAGUCHI, AND KAN CHIBA

Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba-shi (T.S., M.H., K.K., H.T., Y.Y. M.T., K.C.); Third Biological Section, Department of First Forensic Science, National Research Institute of Police Sciences, Kashiwa-shi (T.S.), and Asahi Technoglass, Funabashi-shi, Chiba, Japan (H.T.)

(Received May 6, 2002; accepted August 5, 2002)

This article is available online at <http://dmd.aspetjournals.org>

### ABSTRACT:

CYP2D6 is a polymorphic enzyme that catalyzes the oxidation of various drugs. At least 40-mutant alleles of CYP2D6 have been reported. CYP2D6\*14, which is one of them found in Asian populations, causes deficient activity of CYP2D6. Four amino acid substitutions, P34S, G169R, R296C, and S486T, are present in the protein encoded by CYP2D6\*14 (CYP2D6 14). Among them, G169R is thought to be a definitive substitution because it is unique to CYP2D6 14. However, a previous study showed that the activity of G169R-substituted CYP2D6 was about 40% of wild-type CYP2D6, suggesting that a combination of G169R and other substitutions may be required to abolish the activity of CYP2D6. In the present study, we examined the effects of combined substitutions of G169R and P34S on the functional properties of CYP2D6 and compared them with those of a single substitution of G169R or P34S

using a cDNA expression system of V79 cells. The results showed that a combined substitution of G169R and P34S reduced the activities of CYP2D6 to less than the detection limit of our analytical method for bufuralol 1'-hydroxylation and dextromethorphan O-demethylation. However, these activities were not completely abolished by a single substitution of P34S or G169R. The findings suggest that simultaneous substitution of G169R and P34S is crucial for almost completely abolishing the activity of CYP2D6 at least in V79 cells, although whether the absence of metabolism is due to the absence of functional protein or catalytic incompetency remains unclear because the levels of CYP2D6 protein expressed in V79 cells were too low to be determined by difference CO-reduced spectra.

Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) catalyzes the oxidative metabolism of various clinically important drugs (Rendic and Di Carlo, 1997). Interindividual and interethnic differences have been seen in the metabolic activity of CYP2D6, mainly due to the polymorphism of CYP2D6 gene (Marez et al., 1997; Sachse et al., 1997; Griese et al., 1998). The percentage of poor metabolizers that have a deficiency in CYP2D6 activity varies from 5 to 10% in Caucasian populations (Gonzalez et al., 1988; Sachse et al., 1997), whereas it is less than 1% in Asian populations (Yokoi et al., 1996). In Caucasian populations, CYP2D6\*3, \*4, \*5, and \*6 are mainly involved in the deficiency of CYP2D6 activity (Sachse et al., 1997), whereas CYP2D6\*5 and \*14 are mainly involved in the deficiency of CYP2D6 activity in Asian populations (Kubota et al., 2000; Nishida et al., 2000).

CYP2D6\*14 is a mutant allele that was first found in a Chinese subject (Wang, 1992) and has since been found only in Asian populations (Wang et al., 1999; Kubota et al., 2000). The variant protein corresponding to CYP2D6\*14 (CYP2D6 14) is thought to have little

activity, because a Chinese subject carrying CYP2D6\*5/\*14 was shown to be the phenotype of a poor metabolizer (Wang et al., 1999). There are four amino acid substitutions in CYP2D6 14: P34S, G169R, R296C, and S486T (Daly et al., 1996; Wang et al., 1999). Among them, only G169R is unique to this variant protein (Human CYP Allele Nomenclature Committee, <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2d6.htm>). Therefore, G169R substitution was considered to be mainly responsible for the deficient activity of CYP2D6 14. However, a previous study using a Rat-1 cell cDNA expression system showed that substitution of P34S caused a dramatic decrease in CYP2D6 activity, whereas the decrease induced by G169R substitution was not as dramatic as that induced by substitution of P34S. Based on these findings, Wang et al. (1999) speculated that G169R is not a critical substitution but that its combination with P34S, R296C, and/or S486T may abolish the activity of CYP2D6 14. However, this possibility has not been studied by direct construction of variant CYP2D6 protein having combined substitutions of G169R and others.

Therefore, we constructed mutated cDNAs that yield CYP2D6 variant proteins substituted with G169R and/or P34S, expressed in V79 cells, and compared their metabolic properties for the prototype substrates of CYP2D6. R296C and S486T substitutions were not examined in the present study, since they are present in CYP2D6 2, and subjects with CYP2D6\*2/\*2 show similar metabolic activities to those of wild type for various substrates of CYP2D6 (Johansson et al., 1993; Dahl et al., 1995; Tateishi et al., 1999). On the other hand, P34S

This study was supported in part by a grant-in-aid from Ministry of Health Labor and Welfare (Sciences Research Grant, Research on Human Genome, Tissue Engineering, Food Biochemistry)

Address correspondence to: Kan Chiba, Ph.D., Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba-shi, Chiba 263-8522, Japan. E-mail: [kchiba@p.chiba-u.ac.jp](mailto:kchiba@p.chiba-u.ac.jp)

substitution has been reported to cause a significant reduction in CYP2D6 activity in cDNA expression systems (Kagimoto et al., 1990; Johansson et al., 1994; Fukuda et al., 2000).

#### Materials and Methods

**Construction of Mammalian Cell Expression Vectors.** A G1758A mutation for a Gly169-to-Arg169 change was introduced into wild-type CYP2D6 cDNA in a pUC19 plasmid vector using a transformer site-directed mutagenesis kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). The sequence of the oligonucleotide used for the mutation was 5'-CGCCAACCACTCTAGACGCC-CCC-3'. The mutation was confirmed by sequencing, and the mutated fragment was subcloned into a pBluescript II SK+ vector (Stratagene, La Jolla, CA). CYP2D6/pTARGET and CYP2D6 G169R/pTARGET expression vectors were obtained by ligating the wild-type CYP2D6 and mutated CYP2D6 G169R cDNA to a pTARGET Mammalian Cell Expression Vector (Promega, Madison, WI), respectively.

A 562-bp DNA fragment containing a C100T mutation for a Pro34-to-Ser34 change was prepared by PCR<sup>1</sup> methods using a human genomic DNA that showed the genotype of CYP2D6\*10/\*10 as a template. The nucleotide sequences of the primers used for the amplification were 5'-ATTCGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCATGGGGCTAGAAGCACTG-3' and 5'-AAGAGACCGTTGGGGCGAAAGGGGC-3'. The obtained PCR product was subcloned into a pGEM-T vector (Promega) and digested by BamHI and ApaI. CYP2D6 P34S/pTARGET and CYP2D6 P34S+G169R/pTARGET expression vectors were obtained by ligating the digested DNA fragment containing the C100T mutation into BamHI- and ApaI-digested CYP2D6/pTARGET and CYP2D6 G169R/pTARGET, respectively. The nucleotide sequences of all the recombinant expression vectors were confirmed.

**Mammalian Cell Culture and Expression of Recombinant Protein.** Parental V79 cells (V79-4, CL93; American Type Cell Culture Collection, Manassas, VA) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin in 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37°C. The V79 cells were plated at 1 × 10<sup>6</sup> cells/100-mm plate. On the following day, recombinant expression vectors were transfected into V79 cells using LIPOFECTAMINE Reagent and Plus Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to manufacturer's recommendations. For negative control, V79 cells were transfected with an empty pTARGET vector. After two days of transfection, V79 cells were plated into a 100-mm plate with a medium containing the selective agent G418 (Invitrogen) at 800 µg/ml. Each medium was changed every 2 to 3 days, and cells were maintained for at least 3 weeks to obtain stable expression colonies. After selection with G418, V79 cells were harvested and cell homogenate was prepared.

The amount of CYP2D6 protein expressed in V79 cells was measured by Western blot analysis. The V79 cell homogenates were electrophoresed on SDS-polyacrylamide gels and transferred onto a nitrocellulose sheet. CYP2D6 protein was detected immunochemically using rabbit anti-human CYP2D6 antiserum (Daiichi Pure Chemicals, Tokyo, Japan), goat antiserum to rabbit IgG and rabbit peroxidase anti-peroxidase complex (ICN Pharmaceuticals Biochemicals Division, Aurora, OH). Human CYP2D6\*1 (2–32 pmol P450/ml) expressed in B-lymphoblastoid cells (Daiichi Pure Chemicals) were used as a standard. Densitometric quantification was carried out using a ScanJet II image scanner (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) and National Institutes of Health image version 1.62.

**Quantification of mRNA Content in V79 Cells.** Total RNA was extracted from V79 cells using an RNeasy mini kit and QIA shredder column (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), and then first-strand cDNA was prepared. CYP2D6 mRNA contents in V79 cells were analyzed in a GeneAmp 5700 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) using fluorescence detection for SYBR-Green II. The nucleotide sequences of the primers used for the amplification were 5'-GCAGCACTTCAGCTTCTCGG-3' and 5'-CT-CACCAGGAAAGCAAAGACACCAT-3'. Each PCR product was confirmed by the dissociation curve and agarose gel electrophoresis. The GAPDH mRNA contents in each cell were also measured, and CYP2D6 mRNA content was

normalized to GAPDH mRNA content. The nucleotide sequences of reverse transcription-PCR products were confirmed.

**Enzyme Assay and Kinetic Analysis of CYP2D6 Activity in V79 Cells**  
*Bufuralol 1'-hydroxylation.* The activity of bufuralol 1'-hydroxylation was measured by the method of Kronbach et al. (1987) with slight modifications. Reaction mixtures containing the cell homogenates (0.22–0.29 mg/ml) and 0.5 to 80 µM bufuralol were incubated for 60 min at 37°C. The reaction was performed in a linear range with respect to protein concentration and incubation time and was stopped by the addition of cold acetonitrile. The determination of 1'-hydroxybufuralol was carried out using the following HPLC methods. The HPLC system consisted of a model L-7100 pump, a model L-7485 fluorescence detector, a model L-7200 autosampler, a model D-7500 integrator (Hitachi, Tokyo, Japan), and a 4.6 × 150-mm CAPCELL PAK C<sub>18</sub> UG120 column (Shiseido, Tokyo, Japan). The mobile phase consisted of acetonitrile and water at the ratio of 20:80 (v/v) in 0.01 M citric acid buffer (pH 3.4), and it was delivered at a flow rate of 1.0 ml/min. The elute was monitored at an excitation wavelength of 252 nm and emission wavelength of 302 nm. A calibration curve was generated from 0.002 to 0.2 µM by processing the authentic standard substance through the entire procedure. The detection limit of this analytical method was 0.04 pmol/ml.

The kinetic parameters ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) were estimated by graphic analysis of Michaelis-Menten plots. The values were subsequently used as initial estimates for nonlinear least-squares regression analysis.

*Dextromethorphan O-Demethylation.* The activity of dextromethorphan O-demethylation was measured by the method of von Moltke et al. (1998) with slight modifications. The reaction mixture containing the cell homogenates (0.22 to 0.29 mg/ml) and 10 µM dextromethorphan was incubated for 60 min at 37°C. The reaction was performed in a linear range, with respect to protein concentration and incubation time, and stopped by the addition of cold acetonitrile. The determination of dextrophan was carried out by the same HPLC system and mobile phase used for the determination of 1'-hydroxybufuralol. The eluate was monitored at excitation wavelength of 270 nm and emission wavelength of 312 nm. A calibration curve was generated from 0.01 to 1.0 µM by processing the authentic standard substance through the entire procedure. The detection limit of this analytical method was 0.37 pmol/ml.

#### Results

**Expression of Wild-Type and Mutated CYP2D6 in V79 Cells.** The expression of CYP2D6 protein in V79 cells transfected with recombinant CYP2D6 cDNA was confirmed by Western blot analysis (Fig. 1A). There were no significant differences between CYP2D6 protein levels in V79 cells expressing wild-type (2D6WT) and G169R-substituted CYP2D6 (2D6G169R). On the other hand, CYP2D6 protein levels in V79 cells expressing P34S-substituted CYP2D6 (2D6P34S) and those expressing both G169R- and P34S-substituted CYP2D6 (2D6G169R/P34S) decreased to approximately 26% that of 2D6WT (Fig. 1B). No significant differences were found between mRNA levels of CYP2D6 in V79 cells transfected with wild-type and mutated CYP2D6 cDNAs (Fig. 2).

**Enzyme Activities.** Bufuralol 1'-hydroxylation activity of 2D6G169R (1.00 pmol/min/pmol CYP2D6) was slightly lower than that of 2D6WT, whereas 2D6P34S (0.05 pmol/min/pmol CYP2D6) was much lower than that of 2D6WT (1.23 pmol/min/pmol CYP2D6), which corresponds to 4% of 2D6WT (Fig. 3A). However, the activity of 2D6G169R/P34S was under the detection limit of our analytical method (Fig. 3A).

Similar results were also found for dextromethorphan O-demethylation activity (Fig. 3B). The activity of 2D6G169R (1.19 pmol/min/pmol CYP2D6) was not different, whereas that of 2D6P34S (0.37 pmol/min/pmol CYP2D6) was approximately one-third (32%) of that of 2D6WT (1.17 pmol/min/pmol CYP2D6). However, the activity of 2D6G169R/P34S was under the detection limit of the analytical method employed in the present study.

**Kinetic Analysis of Bufuralol 1'-Hydroxylation.** Kinetic parameters for bufuralol 1'-hydroxylation in V79 cells expressing wild-type

<sup>1</sup> Abbreviations used are: PCR, polymerase chain reaction; GAPDH, glyceraldehyde triphosphate dehydrogenase; HPLC, high-performance liquid chromatography.

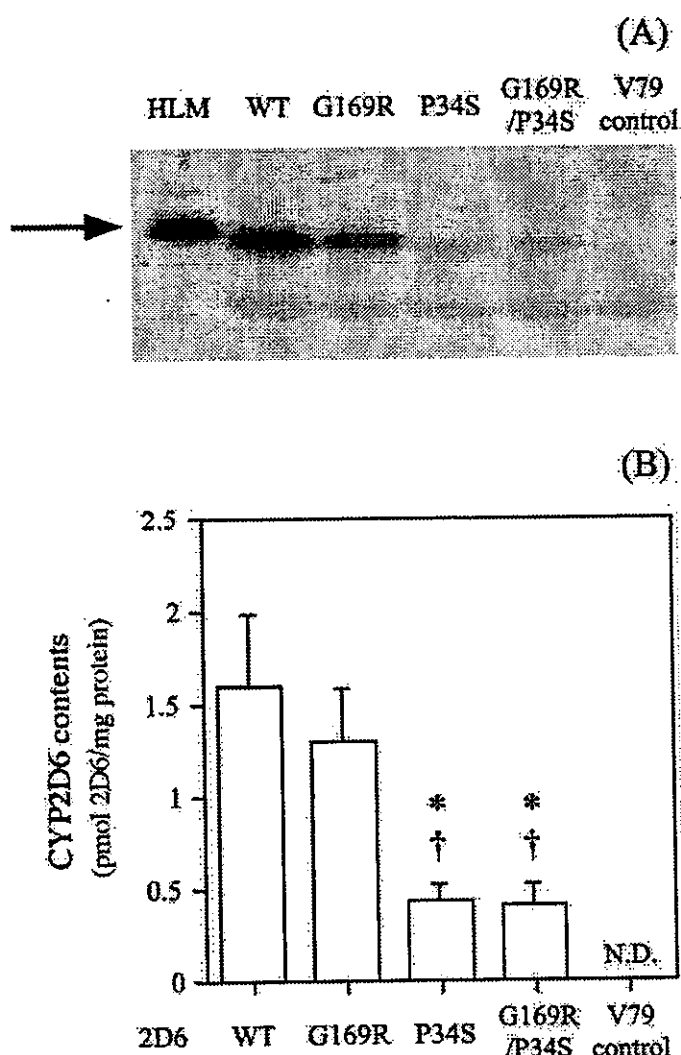


FIG. 1. CYP2D6 apoprotein contents in homogenate of V79 cells expressing wild-type CYP2D6 or CYP2D6 substituted with G169R and/or P34S.

V79 cell homogenates (1.6  $\mu$ g/well) were separated by SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose sheet and then stained immunochemically as described under *Materials and Methods*. A, Western blot analysis; B, densitometric quantification of CYP2D6 apoprotein levels. Values in columns are means  $\pm$  S.D. calculated from six independent analyses. Marked columns are significantly different from CYP2D6 wild type (\*,  $P < 0.005$ ) or G169R-substituted CYP2D6 ( $\dagger$ ,  $P < 0.005$ ) determined by Student's *t* test. PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; HLM, human liver microsomes; WT, wild type; N.D., not detected.

and mutated CYP2D6 are shown in Table 1. While the  $K_m$  value was not affected, the  $V_{max}$  value slightly decreased in 2D6G169R. On the other hand, the  $K_m$  value and  $V_{max}$  value of 2D6P34S were 5.4-times higher and 7.2-times lower than those of 2D6WT, respectively, thus the  $V_{max}/K_m$  value of 2D6P34S was 40-times lower than that of 2D6WT. The kinetic parameters could not be determined for 2D6G169R/P34S because of the extremely low activity of bufuralol 1'-hydroxylation.

#### Discussion

The present study clearly showed that a combination of G169R and P34S substitutions diminishes the activities of CYP2D6 to less than the detection limit of our analytical method for bufuralol 1'-hydroxylation and dextromethorphan *O*-demethylation. Considering that the activities of CYP2D6 are not completely abolished by the substitution of P34S (4 and 32% of 2D6WT for bufuralol 1'-hydroxylation and

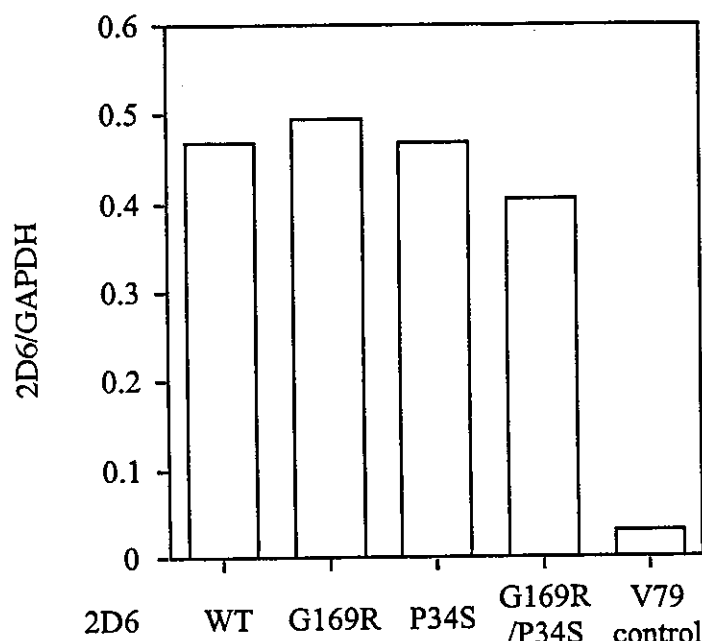


FIG. 2. CYP2D6 mRNA contents in V79 cells expressing wild-type CYP2D6 or CYP2D6 substituted with G169R and/or P34S.

CYP2D6 mRNA contents in V79 cells were quantified as described under *Materials and Methods*. CYP2D6 mRNA content was normalized to GAPDH mRNA content. WT, wild type.

dextromethorphan *O*-demethylation, respectively), the findings suggest that simultaneous substitution of G169R and P34S is crucial for almost completely abolishing the activity of CYP2D6 at least in a cDNA expression system using V79 cells.

P34S is a key substitution of CYP2D6 10 encoded by *CYP2D6\*10*, which has been found to reduce but not abolish the activity of CYP2D6 by in vitro studies (Ramamoorthy et al., 2001; Senda et al., 2001; Shimada et al., 2001). In vivo studies have also shown that the metabolic capacity of homozygous *CYP2D6\*10* is between those of extensive and poor metabolizers for various substrates of CYP2D6, and homozygous *CYP2D6\*10* has therefore been categorized as an intermediate metabolizer (Wang et al., 1993; Dahl et al., 1995; Lai et al., 1995; Tseng et al., 1996). In addition, heterozygous subject with *CYP2D6\*10* and a defective allele (e.g., *CYP2D6\*5/\*10*) has also been categorized as intermediate metabolizer (Griese et al., 1998). However, a heterozygous subject with *CYP2D6\*5* and *\*14* showed a metabolic ratio of debrisoquine of more than 12.6, indicating that the subject can be categorized as a poor metabolizer (Wang et al., 1999). Based on that finding, Wang et al. (1999) concluded that the suppressive effect of *CYP2D6\*14* on CYP2D6 activity is more pronounced than that of *CYP2D6\*10* and that *CYP2D6\*14* is a mutant allele causing defective activity of CYP2D6.

There are four amino acid substitutions (P34S, G169R, R296C, and S486T) in CYP2D6 14. Two of them (P34S and S486T) are overlapped with substitution in CYP2D6 10. Since S486T does not affect the suppressive effect of P34S on the activity of CYP2D6 (Fukuda et al., 2000; Tsuzuki et al., 2001), the pronounced effect of *CYP2D6\*14* appears to be derived from the combination of either G169R and P34S or R296C and P34S. The results of the present study support the former possibility. However, the possibility that interaction between R296C and P34S or among R296, S486T, and P34S plays a role in the pronounced effect of *CYP2D6\*14* cannot be ruled out, since *CYP2D6\*41* allele contains the substitutions R296C and S486T and

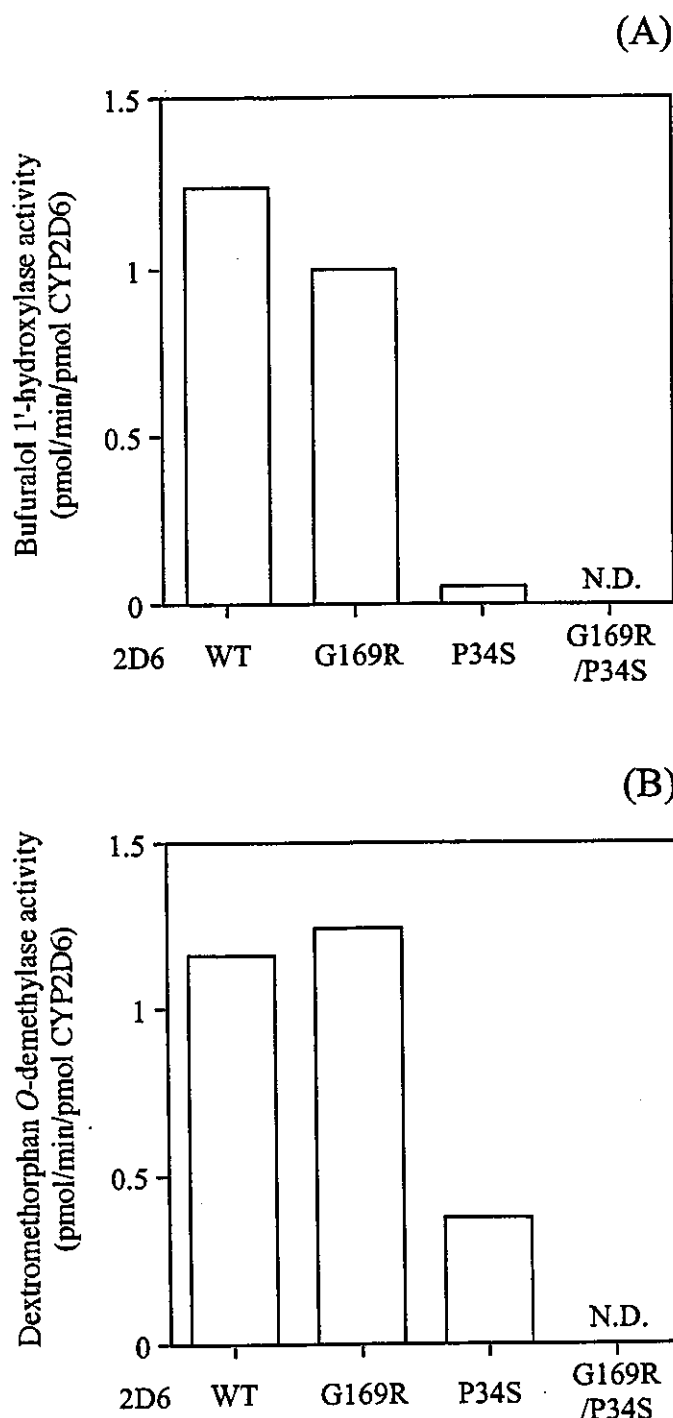


FIG. 3. Enzyme activities of V79 cells expressing wild-type CYP2D6 or CYP2D6 substituted with G169R and/or P34S.

A, bufuralol 1'-hydroxylation; B, dextromethorphan O-demethylation. The protein levels of wild-type and substituted CYP2D6 determined here were those of the apoprotein and not of the native protein. The data are means of two or three independent experiments. WT, wild type; N.D., not detected.

has a significantly lower in vivo activity when compared with both \*1 and \*2 (Raimundo et al., 2000).

The precise mechanism underlying the combined effects of G169R and P34S could not be determined in the present study. However, based on three-dimensional models of bacterial P450 CYP102, G169R substitution of CYP2D6 corresponds to Ala135 of CYP102, which is located in the turn region between the D and E helices (Lewis

TABLE 1

Kinetic parameters for bufuralol 1'-hydroxylation catalyzed by wild-type and mutated CYP2D6 expressed in V79 cells

2D6	Bufuralol 1'-Hydroxylation		
	$K_m$	$V_{max}$	$V_{max}/K_m$
	$\mu M$	pmoles/min/pmol 2D6 <sup>a</sup>	$\mu l/min/pmol$ 2D6 <sup>a</sup>
Wild type	10.8	2.51	0.24
G168R	11.7	2.13	0.19
P34S	58.2	0.35	0.0060
G168R/P34S	— <sup>b</sup>	— <sup>b</sup>	— <sup>b</sup>

<sup>a</sup> The protein levels of wild-type and substituted CYP2D6 determined here were those of the apoprotein and not of the native protein.

<sup>b</sup> Kinetic parameters could not be calculated because of lower activity for bufuralol 1'-hydroxylation.

et al., 1997; Lewis, 1998). Since Gly in a turn region is important for maintenance of a tertiary structure of a protein, it is assumed that substitution of Gly169 to Arg alters the conformation of the CYP2D6 protein. On the other hand, Pro34 of CYP2D6 is the first residue in the proline-rich region, and this region is followed by the N-terminal signal anchor region (Yamazaki et al., 1993), which is highly conserved in the mammalian CYP2 family (Yamazaki et al., 1993). Although the proline-rich region is far from the catalytic domain of CYP2D6 (Lewis, 1998) and not involved in the substrate-binding sites of CYP2D6 (Modi et al., 1996), P34S substitution has been reported to alter the catalytic properties of CYP2D6 for bufuralol 1'-hydroxylation, venlafaxine O-demethylation, and bunitrolol 4-hydroxylation (Fukuda et al., 2000; Tsuzuki et al., 2001). The present study also showed that the  $K_m$  value and  $V_{max}$  value of 2D6P34S for bufuralol 1'-hydroxylation were 5.4-times higher and 7.2-times lower than those of 2D6WT, respectively, thus the  $V_{max}/K_m$  value of 2D6P34S was 40-times lower than that of 2D6WT (Table 1). These findings suggest that the substitution of P34S, although it is not in a substrate-recognition site, affects the tertiary structure of CYP2D6 and reduces the activities of CYP2D6. Therefore, we are tempted to speculate that combined substitutions of G169R and P34S cause a more drastic change in the structure of CYP2D6 than that caused by a single substitution of P34S, which results in a more pronounced reduction in CYP2D6 activity. Similar combined effects of substitutions have also been reported for CYP2D6\*17 (Oscarson et al., 1997). Alternatively, combined substitutions of G169R and P34S may deteriorate the incorporation of heme into the CYP2D6 apoprotein, although this possibility could not be assessed in the present study, since the levels of CYP2D6 protein expressed in V79 cells were too low to be determined by difference CO-reduced spectra.

Regarding the level of CYP2D6 protein, a combined substitution of G169R and P34S decreased it substantially in V79 cells (Fig. 1). However, the extent of decrease was not different from that caused by a single substitution of P34S (Fig. 1). This finding suggests that G169R substitution does not accelerate the decreasing effect of P34S substitution on the protein level of CYP2D6 reported previously (Johansson et al., 1994; Fukuda et al., 2000; Tsuzuki et al., 2001).

The present study also showed that there were no major differences between the levels of CYP2D6 mRNA in V79 cells transfected with wild-type and mutated CYP2D6 cDNA (Fig. 1). The finding suggests that substitutions of P34S and G169R do not appear to affect the transcriptional efficiency of CYP2D6 cDNA introduced to V79 cells.

In conclusion, the present study showed that a combination of G169R and P34S substitutions reduced the activities of CYP2D6 to undetectable levels despite the fact that the activities of CYP2D6 were not completely abolished by the substitution of P34S. The findings suggest that simultaneous substitution of G169R and P34S is required