

は他の分子種に比べ同定されている変異型遺伝子の数は多い (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2c19.htm>)。CYP2C19*2A 及び CYP2C19*3 は東洋人で高頻度に出現しており、S-メフェニトインの代謝能が極めて低いことが報告されており、SU 剤の代謝や薬効・副作用発現にも CYP2C19 の遺伝子多型が何らかの影響を与えることが考えられる。

Fukushima-Uesaka ら[1]は、134 名の糖尿病患者及び 119 名の健常人ボランティアの血液から、新たにアミノ酸置換を伴う CYP2C19*18 及び CYP2C19*19 をそれぞれ 0.2% の出現頻度で見出している (Table 1)。本研究では SU 剤の薬効・副作用発現と CYP2C19*18 及び CYP2C19*19 遺伝子多型の関連性を明確にし、SU 剤の適正投薬法を確立することを目的として、異種細胞発現系で作製した野生型及び変異型 CYP2C19 酵素の機能を S-メフェニトイン 4'-水酸化及びオメプラゾール 5-水酸化反応をプローブに用いて解析した。

B. 研究方法

試薬

実験に用いた試薬は以下に示す会社からそれぞれ入手した。KOD-plus DNA polymerase: Toyobo; HindIII: Takara Bio; BigDye terminator cycle sequencing reaction kit v3.1: Applied Biosystems; pcDNA3.1(+) vector: Invitrogen; QuikChange site-directed mutagenesis kit: Stratagene; Yeast nitrogen base: BD Diagnostics; Zymolyase 100T: 生化学; S-メフェニトイン: Toronto Research Chemicals; 4'-ヒドロキシメフェニトイン: Ultrafine Chemicals; オメプラゾール: 和光純薬工業; 5-ヒドロキシオメプラゾール: AstraZeneca; ランソプラゾール: Sigma; NADPH, glucose 6-phosphate (G-6-P), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH): オリエンタル酵母; PVDF 膜: Bio-Rad; ウサギ抗ヒト CYP2C19 抗体: BD Bioscience; ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG: Zymed Laboratories; ECL plus

reagent: GE Healthcare Bioscience。pBluescript-SK(±)/CYP2C19*1A プラスミドは Joyce A. Goldstein 博士 (米国国立環境保健研究所) から供与された。pGYR I 酵母細胞発現ベクター及び *Saccharomyces cerevisiae* AH22 株は船江良彦教授 (大阪市立大学大学院医学研究科) から供与された。その他試薬は分析用、特級及び HPLC 用試薬を購入した。

野生型及び変異型 CYP2C19 プラスミドの作製

CYP2C19*1A cDNA は pBluescript/CYP2C19*1A を鋳型にして、Table 2 に示すプライマーを用いて PCR 法で増幅した。pGYR I へのサブクローニングを可能にするためセンス及びアンチセンスプライマーの 5'-末端にそれぞれ HindIII 認識配列 (下線部) を付加した。また、センスプライマーには酵母細胞の翻訳効率を上げるために、コンセンサス配列 (波線部) を付加した。PCR 産物を HindIII で消化後、DNA ligation kit v2.1 を用いて 16°C で 16 時間 pcDNA3.1(+) とライゲーション反応を行った (pcDNA3.1/CYP2C19*1A)。pcDNA3.1/CYP2C19*1A はシーケンシングを行い、PCR エラーがないことを確認した。CYP2C19*1C、CYP2C19*18 及び CYP2C19*19 cDNA は pcDNA3.1/CYP2C19*1A を鋳型にして部位特異的変異導入法により Table 3 に示すプライマーを用いて作製した。CYP2C19*1C (991A>G) の変異は pcDNA3.1/CYP2C19*1A を鋳型にして導入した。CYP2C19*18 (991A>G, 986G>A) 及び CYP2C19.19 (991A>G, 151A>G) の変異は pcDNA3.1/CYP2C19*1C を鋳型にしてそれぞれ導入した。目的部位への変異の導入の成否は BigDye terminator cycle sequencing reaction kit v3.1 を用いてシーケンシングにより確認した。

pcDNA3.1/CYP2C19s を制限酵素 HindIII で完全消化 (37°C、24 時間) 後、エタノール沈殿を行って DNA を精製し、インサート DNA 溶液を調製した。また、pGYR I ベクターも HindIII で完全消化し、ベクターのセルフライゲーションを防ぐため、ア

ルカリフォスファターゼ(CIAP)を用いて 37°Cで 4 時間反応させ、5'-末端リン酸基を除去した。次に、野生型及び変異型 CYP2C19 cDNA を pGYR I の HindIII 切断部位に、16°Cで 16 時間ライゲーションし、塩化カルシウム法により *Escherichia coli* DH5 α を形質転換した。目的 cDNA の挿入及び pGYR I ベクターの発現プロモーターに対する挿入方向はシーケンシングにより確認した。

CYP2C19 酵素の発現

酵母細胞の形質転換は、Ito らの方法[2]に従って行った。すなわち、YPD 培地[1% Bacto yeast extract、2% Tryptone peptone、2% D-(+)-Glucose]2 mL で *Saccharomyces cerevisiae* AH22 株を 30°Cで 振盪培養し、YPD 培地 5 mL に植菌後、対数増殖期(OD₆₀₀=0.6-1.0)まで振盪培養した。その酵母細胞液 1 mL を 4°C、2,000×g で 2 分間遠心して集菌し、0.1 M 塩化リチウム 1 mL で懸濁した後、同条件で遠心した。得られた菌体を 1 M 塩化リチウム 20 μ L で懸濁し受容菌とした。この受容菌にプラスミド DNA(pGYR I /CYP2C19s) 及び 70%ポリエチレングリコール溶液 30 μ L を加え穏やかに懸濁後、30°Cで 1 時間静置した。次いで滅菌精製水 140 μ L を加えて希釈し、SDH 寒天培地[0.67% Yeast nitrogen base w/o amino acids、8% D-(+)-Glucose、0.02% L-Histidine、1.5% Agar]に蒔き、30°Cで 72 時間培養した。培養後、Wan らの方法[3]に従い得られたコロニーを SDH 液体培地[5.4% Yeast nitrogen base w/o amino acids、8% D-(+)-Glucose、0.02% Histidine]に植菌し、30°Cで 60 時間振盪培養した。その酵母培養液 1 mL を SDH 液体培地 10 mL に植菌し、同条件下 24 時間振盪培養した。次いで、その酵母培養液 5 mL を SDH 液体培地 200 mL に植菌し、同条件下 24 時間振盪培養した。さらにその全量を 1.8 L の SDH 液体培地に植菌し、pH 5.5、好氣的条件下で 24 時間培養した。

酵母マイクロソーム画分の調製

Hichiya らの方法[4]に準じて行った。上記酵母培養液を 2,000×g で 20 分間遠心し、得られた菌体を氷冷した超純水で懸濁後、再度同条件で遠心した。上清を除去し、菌体を Solvent A[10 mM Tris-HCl、2 M D-Glucitol、0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA (pH 7.4)]で懸濁後、同条件で遠心した。上清を除去し、菌体を 50 U/mL zymolyase 含有 Solvent A で穏やかに懸濁し 35°Cで 90 分間振盪した後、2,000×g で 10 分間遠心した。上清を除去し、菌体をプロテアーゼ阻害剤(1 mM EDTA、1 mM PMSF、0.1 μ M アプロチニン、0.1 μ M ロイペプチン)を含む Solvent B[10 mM Tris-HCl、0.65 M D-Glucitol、0.1 mM EDTA (pH 7.4)]で穏やかに懸濁後、超音波細胞粉碎器(日立精機製作所)を用いて 30 秒間、5 分間隔で 10 回細胞破壊を行った。得られたライセートを 9,000×g で 30 分間遠心分離し、上清を 105,000×g で 60 分間遠心分離した。得られた沈殿に 1 mM EDTA、1 mM DTT、20%グリセロール含有 100 mM NaH₂PO₄(pH 7.4)を加えホモジナイズし、マイクロソーム画分を調製した。得られたマイクロソーム画分は使用するまで-80°Cで保存した。陰性対照として pGYR I のみをトランスフェクションしたものを同様に作製した(mock)。マイクロソーム画分のタンパク質量は Lowry らの方法[5]に従って牛血清アルブミンを標準物質として定量した。

還元型 CO 差スペクトルの測定

マイクロソーム画分を Buffer D[100 mM phosphate buffer (pH 7.4)-0.4% Emulgen911-20% glycerol]に懸濁し(10 mg/ml)、Omura と Sato の方法[6]に従って吸収スペクトルを測定した。希釈した試料 1 ml ずつを試料セル及び対照セルに入れ、400~500 nm 間のベースラインを補正した。次いで試料セルのみに一酸化炭素を通じ、両セルに約 1 mg のハイドロサルファイトナトリウムを加え穏やかに混和した後、400~500 nm 間のスペクトルを記録した。得られた 450 及び 490 nm の吸光度差より吸光度係数 91 mM⁻¹cm⁻¹を用いて CYP 含量を算出した。

ウェスタンブロット分析

酵母ミクロソームを Laemmli らの方法[7]に準じて 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付した。泳動後、Towbin らの方法[8]に従いタンパク質を PVDF 膜に転写した。PVDF 膜は一次抗体として抗ヒト CYP2C19 抗体を、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG を加え、室温でインキュベートした。洗浄後、抗体と結合したタンパク質を化学発光法により検出した。それらのバンド強度は ScionImage v4.0 (Scion Co.) を用いて定量した。

S-メフェニトイン 4'-水酸化活性の測定

S-メフェニトイン 4'-水酸化活性は、Hanioka らの方法[9]に準じて測定した。S-メフェニトイン 4'-水酸化反応を Fig. 1 に示す。

	Final concentration
Kpi buffer (pH 7.4)	50 mM
MgCl ₂	10 mM
G-6-P	10 mM
G-6-PDH	0.5 U/mL
EDTA	0.2 mM
S-Mephenytoin	10–1000 μM
Microsomes	2000 μg protein/mL
NADPH	1 mM
Total volume	500 μL

CYP2C19 発現酵母ミクロゾームを除く上記の反応混合液を、37°C で 1 分間予備反応した後、CYP2C19 発現酵母ミクロゾームの添加によって反応を開始した。37°C で 20 分間反応した後 dichloromethane を 4 mL 添加して反応を停止した。内部標準物質としてフェノバルビタール (5 nmol) を加えて 2 分間激しく攪拌した後、2,500×g で 10 分間遠心分離した。その有機溶媒相を分取し、窒素ガス気流下 (35°C) で乾固した。残渣は 200 μL の 50% methanol に溶解し、その内の 20 μL を HPLC に付し、4'-ヒドロキシメフェニトイン生成量を内部標準法にて算出した。なお、S-メフェニトインは DMSO : methanol (50:50, v/v) に溶解し、この反応液中の有機溶媒濃度は 1% とした。

HPLC 条件は下記のように設定した。

HPLC conditions

Column: Inertsil ODS 80A (4.6 mm i.d. × 150 mm)
Column temperature: 40°C
Elution: 20 mM KH₂PO₄ (pH 4.0)-methanol-acetonitrile (77:6:17, v/v/v)
Flow rate: 1.0 mL/min
Detection: UV 204 nm

オメプラゾール 5-水酸化活性の測定

オメプラゾール 5-水酸化活性は、Yamazaki らの方法[10]に準じて測定した。オメプラゾール 5-水酸化反応を Fig. 2 に示す。

	Final concentration
Kpi buffer (pH 7.4)	50 mM
MgCl ₂	10 mM
G-6-P	10 mM
G-6-PDH	0.5 U/mL
EDTA	0.2 mM
Omeprazole	0.5–50 μM
Microsomes	500 μg protein/mL
NADPH	1 mM
Total volume	500 μL

CYP2C19 発現酵母ミクロゾームを除く上記の反応混合液を、37°C で 1 分間予備反応した後、CYP2C19 発現酵母ミクロゾームの添加によって反応を開始した。37°C で 10 分間反応した後、0.5 M Na₂HPO₄ を 0.1 mL 及び dichloromethane: acetonitrile (90:10, v/v) 溶液を 4 mL 添加して反応を停止した。内部標準物質としてランソプラゾール (25 nmol) を添加し 2 分間激しく攪拌した後、2,500×g で 10 分間遠心分離した。その有機溶媒相を分取し、窒素ガス気流下 (35°C) 乾固した。残渣は 200 μL の 20 mM Na₂HPO₄/methanol (50:50, v/v) に溶解し、その内の 20 μL を HPLC に付し、5-ヒドロキシオメプラゾール生成量を内部標準法にて算出した。なお、オメプラゾールは DMSO : methanol (50:50, v/v) に溶解し、この反応液中の有機溶媒濃度は 1% とした。

HPLC 条件は下記のように設定した。

HPLC conditions

Column: Inertsil ODS 80A (4.6 mm i.d. × 150 mm)
Column temperature: 40°C
Elution: 20 mM Phosphate buffer (pH 6.8)-acetonitrile (72:28, v/v)
Flow rate: 1.0 mL/min
Detection: UV 302 nm

データ解析

S-メフェニトイン 4'-及びオメプラゾール 5-水酸化反応の速度論的解析は、Prism v4.0 (GraphPad Software)を用いて Michaelis-Menten プロット及び Eadie-Hofstee プロットを作成し、 K_m 及び V_{max} 値を算出した。In vitro クリアランス値は V_{max}/K_m とした。いずれの値も 3 回の実験の平均値 \pm S.D.とした。有意差検定は Dunnett's *post-hoc* test を行い、有意差の有無は危険率 5%を基準とした。

C. 研究結果

酵母細胞における野生型及び変異型 CYP2C19 タンパク質の発現

酵母細胞で発現させた野生型及び変異型 CYP2C19 酵素タンパク質の細胞マイクロゾーム画分における発現量をウェスタンブロット分析により確認した。その結果を Fig. 3 に示す。陰性対照を除く野生型及び変異型いずれの CYP2C19 酵母細胞発現マイクロゾームにおいても抗ヒト CYP2C19 抗体と交差するバンドが検出された。CYP2C19.18 及び CYP2C19.19 の相対的バンド強度は野生型のそれぞれ 171 及び 57%であった。また、CYP2C19 発現酵母細胞マイクロゾームを用いて還元型 CO 差スペクトルによる CYP 含量の測定を行った。その結果を Fig. 4 に示す。野生型及び変異型 CYP2C19 のいずれにおいても 450 nm に吸収極大を示すスペクトルが認められ、野生型 CYP2C19 の機能性 CYP 含量は 15.6 pmol/mg protein であった。CYP2C19.18 の CYP 含量は、野生型より約 2 倍高かったのに対し、CYP2C19.19 の CYP 含量は野生型の 65%であり、いずれも有意差が認められた。

野生型及び変異型 CYP2C19 酵素の機能解析

野生型及び変異型 CYP2C19 の詳細な酵素化学的特性を明らかにするために、CYP2C19 発現酵母細胞マイクロゾームを酵素源にして S-メフェニトイン

4'-及びオメプラゾール 5-水酸化反応の速度論的解析を行った。S-メフェニトイン 4'-水酸化反応の Michaelis-Menten プロット及び得られた速度論的パラメーターを Fig. 5 及び Table 4 にそれぞれ示す。野生型 CYP2C19 の K_m は 33.5 μ M であった。CYP2C19.19 の K_m 値は野生型 CYP2C19 と比較して約 3 倍有意に高かったが、CYP2C19.18 では野生型 CYP2C19 との間に有意な差はなかった。野生型 CYP2C19 のマイクロゾームタンパク質量当たりの V_{max} 及び V_{max}/K_m 値は、それぞれ 73.0 pmol/min/mg protein 及び 2.19 μ L/min/mg protein であった。野生型 CYP2C19 の V_{max} 及び V_{max}/K_m 値を CYP 含量で補正すると、それぞれ 4.64 pmol/min/pmol CYP 及び 138 nL/min/pmol CYP であった。マイクロゾームタンパク質量及び CYP 含量あたりの CYP2C19.19 の V_{max} 値は、野生型との間に有意な差はなかったが、 V_{max}/K_m 値は野生型 CYP2C19 に比べマイクロゾームタンパク質量あたりでは 29%、CYP 含量あたりでは 47%と有意に低かった。一方、CYP2C19.18 の V_{max} 及び V_{max}/K_m 値はいずれの単位においても野生型 CYP2C19 との間に有意な差は認められなかった。

さらに、オメプラゾールを基質に用いて野生型及び変異型 CYP2C19 の酵素機能について CYP2C19 発現酵母細胞マイクロゾームを用いて検討した。オメプラゾール 5-水酸化反応の Michaelis-Menten プロット及び得られた速度論的パラメーターを Fig. 6 及び Table 5 にそれぞれ示す。野生型の K_m 、 V_{max} 及び V_{max}/K_m 値はそれぞれ 1.50 μ M、131 pmol/min/mg protein 及び 85.4 μ L/min/mg protein であった。CYP2C19.19 の K_m 値は野生型のそれと比較して約 1.4 倍有意に高かったが、CYP2C19.18 では野生型 CYP2C19 との間に有意な差は認められなかった。マイクロゾームタンパク質量当たりの V_{max} 値及び V_{max}/K_m 値は CYP2C19.18 及び CYP2C19.19 いずれの変異型 CYP2C19 においても野生型 CYP2C19 との間に有意な差は認められなかった。CYP 含量あたりでは、CYP2C19.19 の

V_{\max} 値は野生型 CYP2C19 の 1.8 倍有意に高く、CYP2C19.18 の V_{\max}/K_m は 66%まで減少した。

D. 考察

本章では日本人で新たに見出されたアミノ酸置換を伴う 2 種類の変異型 CYP2C19 (CYP2C19.18 及び CYP2C19.19) 酵素の機能解析を、酵母細胞で発現した酵素を用いて行った。ウェスタンブロット分析において、野生型及び変異型 CYP2C19 発現酵母細胞マイクロゾームいずれにおいても抗ヒト CYP2C19 抗体と免疫交差するバンドが認められ、その強度は CYP2C19.18 > CYP2C19.1B > CYP2C19.19 の順であった。また、CYP2C19 発現酵母細胞マイクロゾームの還元型 CO 差スペクトルを測定し、野生型及び変異型 CYP2C19 いずれにおいても 450 nm に吸収極大を示すことを確認した。それらの機能性 CYP 含量は、CYP2C19.18 > CYP2C19.1B > CYP2C19.19 の順であり、ウェスタンブロット分析の結果とほぼ一致していた。このように本研究で検討した野生型及び変異型 CYP2C19 の酵母細胞における発現量は酵素間で大きく異なっていた。この現象が何に起因しているのか不明であるが、酵母細胞での酵素タンパク質発現の過程におけるそれぞれの転写/翻訳効率、あるいは CYP2D6*10 や CYP2D6*36 で認められているような発現タンパク質の折りたたみ構造の安定性の違いによる可能性が考えられる[11,12]。今後さらに酵母細胞における野生型及び変異型 CYP2C19 の *in vitro* 転写について検討を行うことが必要である。

CYP2C19 酵素の機能に与える新規変異型 CYP2C19 におけるアミノ酸置換の影響を明らかにするために、CYP2C19 により特異的に触媒される *S*-メフェニトイン 4'-及びオメプラゾール 5-水酸化反応を指標にして、野生型及び変異型 CYP2C19 酵素についての速度論的解析を行った。Ser51Gly/Ile331Val 置換を伴う CYP2C19.19 の *S*-メフェニトイン 4'-水酸化反応の K_m 値は野生型

CYP2C19 に比べ有意に高く、マイクロゾームタンパク質量及び CYP 含量あたりの V_{\max}/K_m 値は有意に低かった。これに対し、Arg329His/Ile331Val 置換を伴う CYP2C19.18 の K_m 、 V_{\max} 及び V_{\max}/K_m 値は野生型 CYP2C19 とほぼ同程度であり、Ser51Gly 置換は *S*-メフェニトインに対する親和性を低下させ、その代謝能も低下させることが示唆された。オメプラゾール 5 位水酸化反応においても CYP2C19.19 の K_m 値は野生型 CYP2C19 に比べ有意に高かったが、CYP 含量あたりの V_{\max}/K_m 値は野生型 CYP2C19 とほぼ同程度であった。CYP2C19 の Ser51Gly 置換はオメプラゾールに対しても親和性を低下させるが、*S*-メフェニトインとは様相が異なっていた。これらの結果から、CYP2C19*19 が引き起こすアミノ酸置換による酵素機能変化は基質(医薬品)によって異なることが推察された。

これまでいくつかの哺乳動物 CYP 分子種の X 線結晶構造解析結果が報告されている[13-17]。Lewis ら[18,19]は、ウサギ CYP2C5 を鋳型として CYP2C19 の立体構造を構築し、それに基づいて 6 つの SRS を同定している。CYP2C19 と CYP2C9 はアミノ酸配列で 91%の相同性を示すが基質特異性は大きく異なる[20-22]。Tsao ら[22]及び Oda ら[23]は CYP2C19 と CYP2C9 のキメラ及び部位特異的変異酵素を用いた検討結果に基づき、CYP2C19 の I ヘリックス及び SRS-4 に位置する Asp286、Ala292、Asp293 及び Leu295 は *S*-メフェニトイン 4'-水酸化反応に重要な役割を担うアミノ酸残基であると報告している。本研究で注目した Ser51 及び Arg329 はそれぞれ A 及び J ヘリックスに位置しているが、これらのアミノ酸残基は CYP2C19 のいずれの SRS にも *S*-メフェニトインの結合部位にも位置していない。しかし、本研究で得られた CYP2C19.19 の *S*-メフェニトイン 4'-及びオメプラゾール 5-水酸化反応の K_m 値は野生型に比べて顕著に高かった。これらのことから、CYP2C19 における Ser51Gly 置換は CYP2C19 の基質に対する親和性を低下させることが示唆された。

E. 結論

本研究では、日本人で新たに見出された 2 種類のアミノ酸置換を伴う変異型 CYP2C19 (CYP2C19.18 及び CYP2C19.19) 酵素を酵母細胞に発現させ、それらの機能を *S*-メフェニトイン及びオメプラゾールを基質に用いて解析した。CYP2C19.18 の *S*-メフェニトイン 4'-及びオメプラゾール 5-水酸化反応の速度論的パラメーター値は野生型 CYP2C19 のそれらとよく類似していたが、CYP2C19.19 はいずれの反応においても野生型 CYP2C19 より有意に高い K_m 値を示した。これらの結果は、CYP2C19.19 における Ser51Gly 置換が CYP2C19 酵素の *S*-メフェニトイン及びオメプラゾールに対する親和性を低下させることを示唆しており、CYP2C19*19 は医薬品の薬効及び副作用発現に何らかの影響を及ぼす変異型遺伝子である可能性が考えられた。

参考文献

- [1] Fukushima-Uesaka, H., Saito, Y., Maekawa, K., Ozawa, S., Hasegawa, R., Kajio, H., Kuzuya, N., Yasuda, K., Kawamoto, M., Kamatani, N., Suzuki, K., Yanagawa, T., Tohkin, M., and Sawada, J. (2005). Genetic variations and haplotypes of CYP2C19 in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **20**, 300–307.
- [2] Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**, 163–168.
- [3] Wan, J., Imaoka, S., Chow, T., Hiroi, T., Yabusaki, Y., and Funae, Y. (1997). Expression of four rat CYP2D isoforms in *Saccharomyces cerevisiae* and their catalytic specificity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **348**, 383–390.
- [4] Hichiya, H., Takemi, C., Tsuzuki, D., Yamamoto, S., Asaoka, K., Suzuki, S., Satoh, T., Shinoda, S., Kataoka, H., and Narimatsu, S. (2002). Complementary DNA cloning and characterization of cytochrome P450 2D29 from Japanese monkey liver. *Biochem. Pharmacol.*, **64**, 1101–1110.
- [5] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- [6] Omura, T., and Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370–2378.
- [7] Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- [8] Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350–4354.
- [9] Hanioka, N., Ozawa, S., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Nishimura, T., Ando, M., and Sawada, J. (2002). Interaction of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) with human cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 391–396.
- [10] Yamazaki, H., Inoue, K., Shaw, P.M., Checovich, W.J., Guengerich, F.P., and Shimada, T. (1997). Different contributions of cytochrome P450 2C19 and 3A4 in the oxidation of omeprazole by human liver microsomes: effects of contents of these two forms in individual human samples. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 434–442.
- [11] Johansson, I., Oscarson, M., Yue, Q.Y., Bertilsson, L., Sjoqvist, F., and Ingelman-Sundberg, M. (1994). Genetic analysis of the Chinese cytochrome P4502D locus: characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. *Mol. Pharmacol.*, **46**, 452–459.
- [12] Fukuda, T., Nishida, Y., Imaoka, S., Hiroi, T., Naohara, M., Funae, Y., and Azuma, J. (2000). The decreased *in vivo* clearance of CYP2D6

substrate by CYP2D6*10 might be caused not only by the low-expression but also by low affinity of CYP2D6. *Arch. Biochem. Biophys.*, **380**, 303–308.

- [13] Williams, P.A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E.F., and McRee, D.E. (2000). Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol. Cell*, **5**, 121–131.
- [14] Schoch, G.A., Yano, J.K., Wester, M.R., Griffin, K.J., Stout, C.D., and Johnson, E.F. (2004). Structure of human microsomal cytochrome P450 2C8. Evidence for a peripheral fatty acid binding site. *J. Biol. Chem.*, **279**, 9497–9503.
- [15] Williams, P.A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H.C., Matak, Vinkovic, D., and Jhoti, H. (2003). Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature*, **424**, 464–468.
- [16] Rowland, P., Blaney, F.E., Smyth, M.G., Jones, J.J., Leydon, V.R., Oxbrow, A.K., Lewis, C.J., Tennant, M.G., Modi, S., Eggleston, D.S., Chenery, R.J., and Bridges, A.M. (2006). Crystal structure of human cytochrome P450 2D6. *J. Biol. Chem.*, **281**, 7614–7622.
- [17] Williams, P.A., Cosme, J., Vinkovic, D.M., Ward, A., Angove, H.C., Day, P.J., Vonnrhein, C., Tickle, I.J., and Jhoti, H. (2004). Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science*, **305**, 683–686.
- [18] Lewis, D.F. (2002). Homology modelling of human CYP2 family enzymes based on the CYP2C5 crystal structure. *Xenobiotica.*, **32**, 305–323.
- [19] Lewis, D.F. (2003). Essential requirements for substrate binding affinity and selectivity toward human CYP2 family enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **409**, 32–44.
- [20] Romkes, M., Faletto, M.B., Blaisdell, J.A., Raucy, J.L., and Goldstein, J.A. (1991). Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P450IIC subfamily. *Biochemistry*,

30, 3247–3255.

- [21] Goldstein, J.A., and de Morais, S.M. (1994). Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics*, **4**, 285–299.
- [22] Tsao, C.C., Wester, M.R., Ghanayem, B., Coulter, S.J., Chanas, B., Johnson, E.F., and Goldstein, J.A. (2001). Identification of human CYP2C19 residues that confer *S*-mephenytoin 4'-hydroxylation activity to CYP2C9. *Biochemistry*. **40**, 1937–1944.
- [23] Oda, A., Yamaotsu, N., and Hirono, S. (2004). Studies of binding modes of (*S*)-mephenytoin to wild types and mutants of cytochrome P450 2C19 and 2C9 using homology modeling and computational docking. *Pharm. Res.*, **21**, 2270–2278.

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Narimatsu, S., Yonemoto, R., Saito, K., Takaya, K., Kumamoto, T., Ishikawa, T., Asanuma, M., Funada, M., Kiryu, K., Naito, S., Yoshida, Y., Yamamoto, S., and Hanioka, N. (2006). Oxidative metabolism of 5-methoxy-*N,N*-diisopropyltryptamine (Foxy) by human liver microsomes and recombinant cytochrome P450 enzymes. *Biochem. Pharmacol.* **71**, 1377-1385.
- [2] Narimatsu, S., Torigoe, F., Tsuneto, Y., Saito, K., Hanioka, N., Masuda, K., Katsu, T., Yamamoto, S., Yamano, S., Baba, T., and Miyata, A. (2006). Cloning of a cDNA encoding a novel marmoset CYP2C enzyme, expression in yeast cells and characterization of its enzymatic functions. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1738-1748.
- [3] Hanioka, N., Tsuneto, Y., Saito, Y., Sumada, T., Maekawa, K., Saito, K., Sawada, J., Narimatsu, S. (????). Functional characterization of two novel CYP2C19 variants (*CYP2C19*18* and

*CYP2C19*19*) found in a Japanese population.
Xenobiotica in press.

2. 学会発表

- [1] 辻さや香, 岩部寛之, 山本真紀, 竹田友理, 鳥越史宙, 埴岡伸光, 成松鎮雄: 酵母発現ベクター-pYES を用いた CYP-fp2 共発現系の構築. 第 45 回日本薬学会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 広島, 2006 年 10 月.
- [2] 齋藤啓太, 山野茂, 増田和文, 勝孝, 埴岡伸光, 成松鎮雄: CYP2C19 の薬物酸化反応に関与する Glu-300 の役割. 日本薬物動態学会第21回年会, 東京, 2006 年 11 月.
- [3] 経遠祐美, 埴岡伸光, 齋藤嘉朗, 角田知子, 前川京子, 齋藤啓太, 澤田純一, 成松鎮雄: 日本人で新たに見出された CYP2C19 (CYP2C19*18 及び CYP2C19*19) の機能解析. 日本薬物動態学会第21回年会, 東京, 2006 年 11 月.

H. 知的財産権の出願・特許

なし。

Table 1. Characterization of *CYP2C19* alleles examined

Allele	Protein	Nucleic acid change	Amino acid substitution
<i>CYP2C19*1C</i> ^a	CYP2C19.1B ^a	991A>G	Ile331Val
<i>CYP2C19*18</i>	CYP2C19.18	99C>T/986G>A/991A>G/IVS7-106T>C	Arg329His/Ile331Val
<i>CYP2C19*19</i>	CYP2C19.19	99C>T/151A>G/991A>G/IVS7-106T>C	Ser51Gly/Ile331Val

^aWild-type.

Table 2. Primers used for cDNA subcloning

Primer	Sequence
CYP2C19-F	5'- <u>CCCAAGCTT</u> AAAAAATGGATCCTTTTGTGGTCC-3'
CYP2C19-R	5'- <u>GGAAAGCTT</u> AGGAGCAGCCAGACCATCTGT-3'

Hind III sites marked with the solid lines. Yeast consensus sequence marked the wave lines.

Table 3. Primers used for site-directed mutagenesis

Mutation	Primer	Sequence	Position
991A>G ^a	I331V-F I331V-R	5'-GATTGAACGTGTC <u>CGTTGGCAGAAAACCGGAGCC</u> -3' 5'-GGCTCCGGTTTCTGCCAA <u>CGACACGTTCAATC</u> -3'	978-1009
986G>A/(991A>G) ^b	R329H/(I331V)-F R329H/(I331V)-R	5'-CCAGGAAGAGATTGAAC <u>ATGTCGTTGGCAGAAAACCGG</u> -3' 5'-CCGGTTTCTGCCAACGACAT <u>GTTCAATCTCTTCCTGG</u> -3'	969-1005
151A>G ^c	S51G-F S51G-R	5'-CCTACAGATAGATATTAAGGATGTC <u>GGCAAATCCTTAACC</u> -3' 5'-GGTTAAGGATTTGC <u>CGACATCCTTAATATCTATCTGTAGG</u> -3'	126-165

Bold and underlined letters indicate the mutation sites introduced by PCR-based mutagenesis.

^aPrimer for *CYP2C19*1C*, *CYP2C19*18* and *CYP2C19*19*.

^bPrimer for *CYP2C19*18*.

^cPrimer for *CYP2C19*19*.

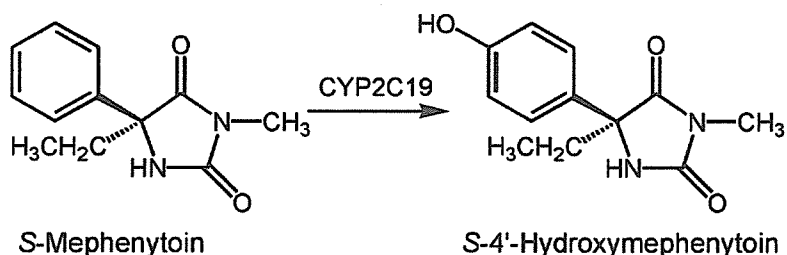


Fig. 1. *S*-Mephenytoin 4'-hydroxylation by CYP2C19.

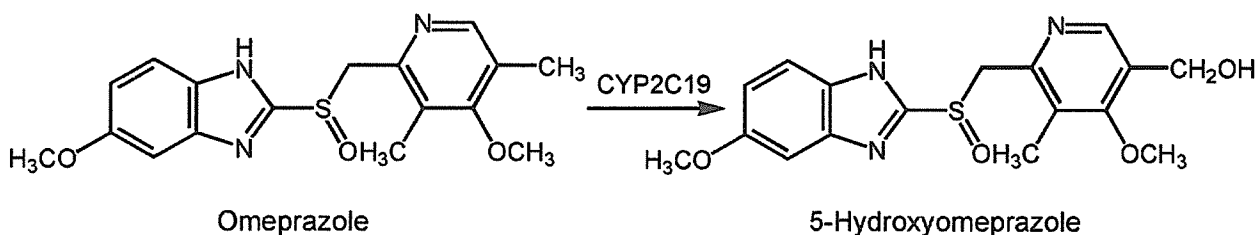


Fig. 2. Omeprazole 5-hydroxylation by CYP2C19.

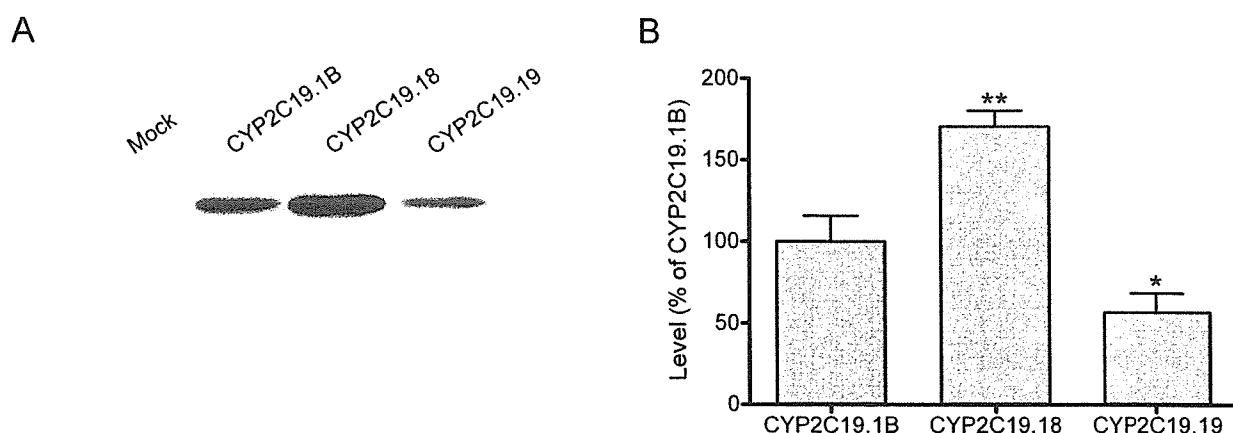


Fig. 3. Western blot analysis of microsomes from yeast cells expressing wild-type and variant CYP2C19s. (A) Representative results of pooled microsomes from three independent preparations. The microsomal protein level applied was 10 μ g/lane. (B) Expression level of CYP2C19 holo- and apoprotein. The results are expressed as percentage of the level of wild-type CYP2C19.19. Each bar represents the mean \pm S.D. of three separate experiments derived from independent preparations. *Significantly different from CYP2C19.1B ($p < 0.05$). **Significantly different from CYP2C19.1B ($p < 0.01$).

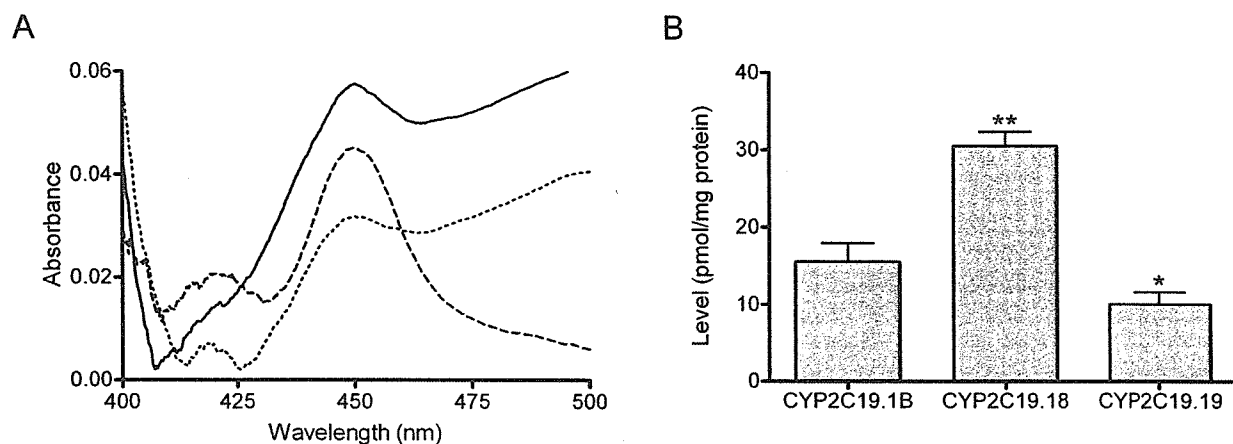


Fig. 4. Reduced CO-difference spectra of microsomes from yeast cells expressing wild-type and variant CYP2C19s. (A) Representative results of pooled microsomes from three independent preparations. The microsomal protein concentration used was 10 mg/mL. Solid line, CYP2C19.1B; broken line, CYP2C19.18; dotted line, CYP2C19.19. (B) Expression level of CYP2C19 holoprotein. The results are expressed as pmol/mg protein. Each bar represents the mean \pm S.D. of three separate experiments derived from independent preparations. *Significantly different from CYP2C19.1B ($p < 0.05$). **Significantly different from CYP2C19.1B ($p < 0.01$).

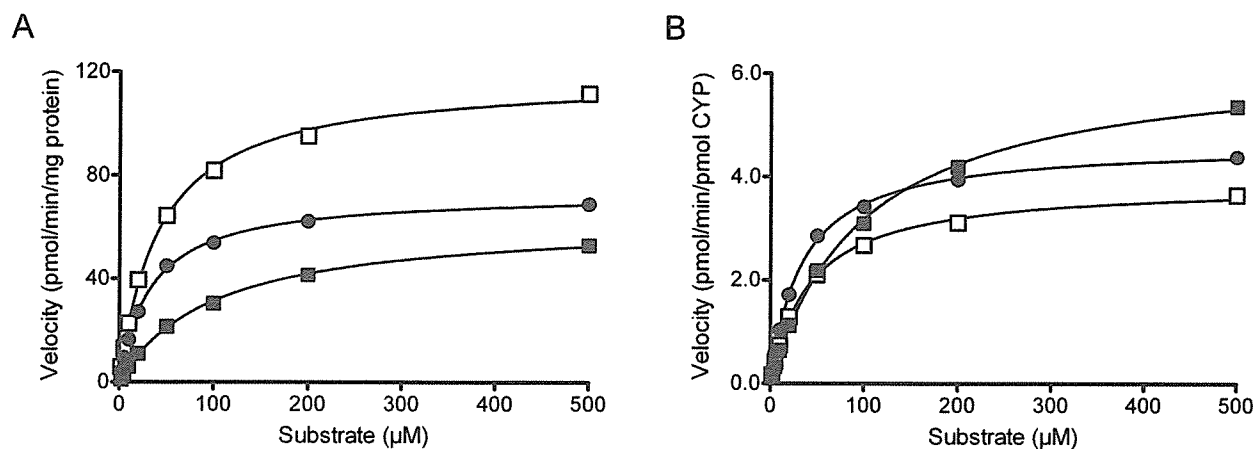


Fig. 5. Representative Michaelis-Menten kinetics for *S*-mephenytoin 4'-hydroxylation by microsomes from yeast cells expressing wild-type and variant CYP2C19s. (A) Results on the basis of microsomal protein level. (B) Results on the basis of CYP protein level. The substrate concentrations used were 2–500 μM. ●, CYP2C19.1B; □, CYP2C19.18; ■, CYP2C19.19.

Table 4. Kinetic parameters for *S*-mephenytoin 4'-hydroxylation by microsomes from yeast cells expressing wild-type and variant CYP2C19s

Variant	K_m^a	V_{max}		V_{max}/K_m	
		Protein ^b	CYP ^c	Protein ^d	CYP ^e
CYP2C19.1B	33.5±2.5	73.0±25.2	4.64±1.63	2.19±0.77	138±47
CYP2C19.18	42.6±1.6	118±28	3.87±0.92	2.80±0.71	91.2±23.6
CYP2C19.19	99.7±6.6**	62.9±9.3	6.35±1.10	0.63±0.12*	64.3±14.7*

Each value represents the mean ± S.D. of three separate experiments derived from independent preparations.

^a μM.

^b pmol/min/mg protein.

^c pmol/min/pmol CYP.

^d μl/min/mg protein.

^e nl/min/pmol CYP.

*Significantly different from CYP2C19.1B ($p < 0.05$).

**Significantly different from CYP2C19.1B ($p < 0.01$).

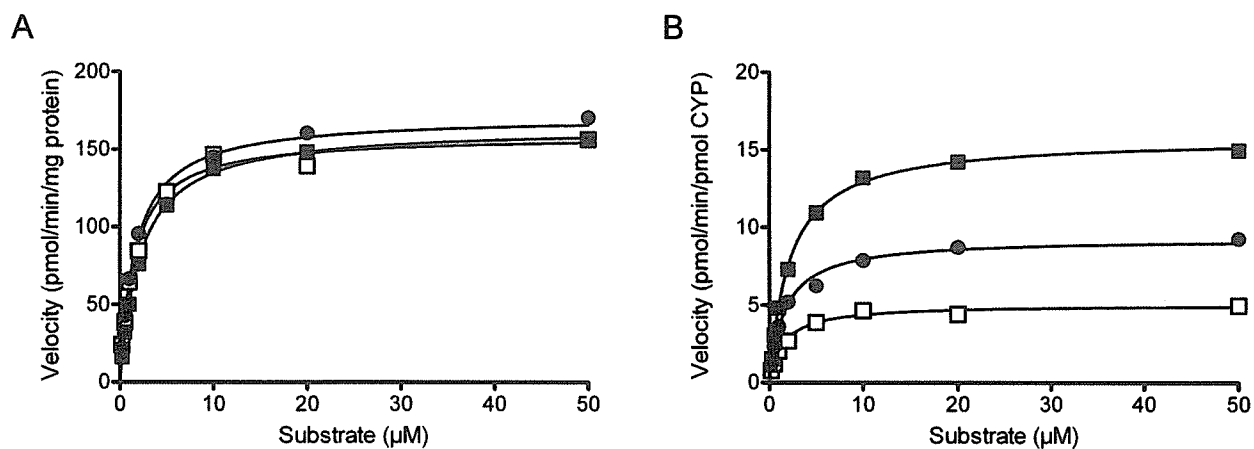


Fig. 6. Representative Michaelis-Menten kinetics for omeprazole 5-hydroxylation by microsomes from yeast cells expressing wild-type and variant CYP2C19s. (A) Results on the basis of microsomal protein level. (B) Results on the basis of CYP protein level. The substrate concentrations used were 2–50 μM . ●, CYP2C19.1B; □, CYP2C19.18; ■, CYP2C19.19.

Table 5. Kinetic parameters for omeprazole 5-hydroxylation by microsomes from yeast cells expressing wild-type and variant CYP2C19s

Variant	K_m^a	V_{max}		V_{max}/K_m	
		Protein ^b	CYP ^c	Protein ^d	CYP ^e
CYP2C19.1B	1.50±0.26	131±48	8.17±2.41	85.4±18.9	5.37±0.83
CYP2C19.18	1.72±0.18	188±32	6.15±1.11	109±8	3.56±0.28*
CYP2C19.19	2.14±0.32*	144±21	14.6±3.47*	67.5±7.3	6.75±0.69

Each value represents the mean \pm S.D. of three separate experiments derived from independent preparations.

^a μM .

^bpmol/min/mg protein.

^cpmol/min/pmol CYP.

^d $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ protein.

^enl/min/pmol CYP.

*Significantly different from CYP2C19.1B ($p < 0.05$).

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

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
K. Maekawa, H. Fukushima-Uesaka, M. Tohkin, R. Hasegawa, H. Kajio, N. Kuzuya, K. Yasuda, M. Kawamoto, N. Kamatani, K. Suzuki, T. Yanagawa, Y. Saito and J. Sawada	Four novel defective alleles and comprehensive haplotype analysis of <i>CYP2C9</i> in Japanese.	Pharmacogenet. Genomics	16	497-514	2006
K. Sai, M. Itoda, Y. Saito, K. Kurose, N. Katori, N. Kaniwa, et al.	Genetic variations and haplotype structures of the <i>ABCB1</i> gene in a Japanese population: an expanded haplotype block covering the distal promoter region, and associated ethnic differences.	Ann. Hum. Genet.	70	605-622	2006
K. Maekawa, M. Itoda, K. Sai, Y. Saito, N. Kaniwa, K. Shirao, T. et al.	Genetic variations and haplotype structure of the ABC transporter gene <i>ABCG2</i> in a Japanese population.	Drug Metab. Pharmacokin.	21	109-121	2006
S. Narimatsu, R. Yonemoto, K. Saito, K. Takaya, T. Kumamoto, T. Ishikawa, M. Asanuma, M. Funada, K. Kiryu, ...and N. Hanioka	Oxidative metabolism of 5-methoxy- <i>N,N</i> -diisopropyltryptamine (Foxy) by human liver microsomes and recombinant cytochrome P450 enzymes.	Biochem. Pharmacol.	71	1377-1385	2006
S. Narimatsu, F. Torigoe, Y. Tsuneto, K. Saito, N. Hanioka, et al.	Cloning of a cDNA encoding a novel marmoset CYP2C enzyme, expression in yeast cells and characterization of its enzymatic functions.	Biochem. Pharmacol.	72	1738-1748	2006
H. Fukushima-Uesaka, Y. Saito, K. Maekawa, ..., H. Kajio, N. Kuzuya, K. Yasuda and J. Sawada	Novel genetic variations and haplotypes of hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4A) found in Japanese type II diabetic patients.	Drug Metab. Pharmacokin.	21	337-346	2006
H. Fukushima-Uesaka, Y. Saito, M. Tohkin, K. Maekawa, ..., K. Suzuki, T. Yanagawa, H. Kajio, N. Kuzuya, K. Yasuda and J. Sawada	Genetic variations and haplotype structures of the ABC transporter gene <i>ABCC1</i> in a Japanese population.	Drug Metab. Pharmacokin.	22	48-60	2007

Y. Saito, K. Maekawa, S. Ozawa and J. Sawada	Genetic polymorphisms and haplotypes of major drug metabolizing enzymes in East Asians and their comparison with other ethnic populations.	Curr. Pharmacogenomics	5	49-78	2007
H. Fukushima-Uesaka, Y. Saito, K. Maekawa,K. Suzuki, T. Yanagawa, H. Kajio, N. Kuzuya, M. Noda, K. Yasuda, M. Tohkin and J. Sawada	Genetic variations of the ABC transporter gene ABCC3 in a Japanese population.	Drug Metab. Pharmacokin.		in press	
N. Hanioka, Y. Tsuneto, Y. Saito, T. Sumada, K. Maekawa, K. Saito, J. Sawada and S. Narimatsu	Functional characterization of two novel CYP2C19 variants (CYP2C19*18 and CYP2C19*19) found in a Japanese population.	Xenobiotica		in press	

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Four novel defective alleles and comprehensive haplotype analysis of *CYP2C9* in Japanese

Keiko Maekawa^{a,b}, Hiromi Fukushima-Uesaka^a, Masahiro Tohkin^{a,c}, Ryuichi Hasegawa^c, Hiroshi Kajio^d, Nobuaki Kuzuya^d, Kazuki Yasuda^e, Manabu Kawamoto^f, Naoyuki Kamatani^f, Kazuko Suzuki^g, Tatsuo Yanagawa^g, Yoshiro Saito^{a,b} and Jun-ichi Sawada^{a,b}

Genetic variations in cytochrome P450 2C9 (*CYP2C9*) are known to contribute to interindividual and interethnic variability in response to clinical drugs such as warfarin. In the present study, *CYP2C9* from 263 Japanese subjects was resequenced, resulting in the discovery of 62 variations including 32 novel ones. In addition to the two known non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs), Ile359Leu (*3; allele frequency=0.030) and Leu90Pro (*13; 0.002), seven novel non-synonymous SNPs, Leu17Ile (0.002), Lys118ArgfsX9 (*25; 0.002), Thr130Arg (*26; 0.002), Arg150Leu (*27; 0.004), Gln214Leu (*28; 0.002), Pro279Thr (*29; 0.002) and Ala477Thr (*30; 0.002), were found. Functional characterization of novel alleles using a mammalian cell expression system *in vitro* revealed that *25 was a null allele and that *26, *28 and *30 were defective alleles. The *26 product showed a 90% decrease in the V_{max} value but little change in the K_m value towards diclofenac. Both *28 and *30 products showed two-fold higher K_m values and three-fold lower V_{max} values than the *1 allele, suggesting the importance of Gln214 and Ala477 for substrate recognition. Linkage disequilibrium and haplotype analyses were performed using the detected variations. Only five haplotypes (frequency >0.02) accounted for most (>87%) of the inferred haplotypes, and they were closely associated with the haplotypes of *CYP2C19* in Japanese. Although the haplotype structure of *CYP2C9* was rather simple in Japanese, the haplotype distribution was quite

Introduction

Cytochrome P450 2C9 (*CYP2C9*) is said to metabolize approximately 15% of the drugs that undergo Phase I metabolism. This enzyme belongs to the human *CYP2C* subfamily (including *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C18* and *CYP2C19*) and hydroxylates weakly acidic or neutral drugs of diverse therapeutic categories, including the hypoglycemic agents tolbutamide and glimepiride, the anticonvulsant phenytoin, the anticoagulant warfarin, the non-steroidal anti-inflammatory drugs flurbiprofen and diclofenac, the antihypertensive losartan, and the diuretic torsemide [1]. Several genetic polymorphisms in *CYP2C9* are already known to affect the metabolism of many of these drugs [2]. However, highly variable interindividual and ethnic differences in the metabolisms

different from those previously reported in Caucasians and Africans. Taken together, novel defective alleles and detailed haplotype structures would be useful for determining metabolic phenotypes of *CYP2C9* substrate drugs in Japanese and probably Asians. *Pharmacogenetics and Genomics* 16:497–514 © 2006 Lippincott Williams & Wilkins.

Pharmacogenetics and Genomics 2006, 16:497–514

Keywords: *CYP2C9*, function, haplotype, Japanese, non-synonymous SNP

^aProject Team for Pharmacogenetics, ^bDivision of Biochemistry and Immunochemistry, ^cDivision of Medicinal Safety Science, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan, ^dDivision of Endocrine and Metabolic Diseases, the Hospital, ^eDepartment of Metabolic Disorder, Research Institute, International Medical Centre of Japan, Tokyo, Japan, ^fDivision of Genomic Medicine, Department of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan and ^gNejima General Hospital, Tokyo, Japan.

Correspondence and requests for reprints to Keiko Maekawa, Division of Biochemistry and Immunochemistry, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan.
Tel: +81 3 3700 9453; fax: +81 3 5717 3832;
e-mail: maekawa@nihs.go.jp

Sponsorship: This study was supported in part by the Program for the Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences, by the Health and Labour Sciences Research Grant (Research on Advanced Medical Technology) from the Ministry of Health, Labour and Welfare.

Received 29 December 2005 Accepted 22 February 2006

of these *CYP2C9* substrate drugs [3,4] suggest that the unidentified genetic, dietary, or ethnic-specific environmental factors might account for these differences.

To date, at least 24 non-synonymous *CYP2C9* alleles have been identified and published on the Human CYP Allele Nomenclature Committee homepage (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>). The *2 (Arg144Cys) and *3 (Ile359Leu) alleles of *CYP2C9* are found in Caucasians at frequencies of 10–15% and 5–10%, respectively, but are less prevalent in African-American and Asian populations, and exhibit reduced activities towards a number of substrates such as warfarin, phenytoin and losartan both *in vitro* and *in vivo* [5]. In particular, the subjects bearing the diplotype, *2/*3 or *3/*3, showed lowered daily warfarin or phenytoin dose

requirements and appeared to be more susceptible to their adverse effects during initiation of therapy [6]. On the other hand, a number of reported alleles (*4 to *24), some of which exhibit catalytic defects, are mostly ethnic-specific and relatively rare [7–13].

It is possible that the single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the promoter region of *CYP2C9* are responsible for altering metabolic activities, which may result in adverse reactions or therapeutic failures. These SNPs might influence not only the basal transcriptional activity, but also the induction of *CYP2C9* by various drugs such as rifampicin and phenobarbital [14]. A previous study in a Japanese population indicated that promoter SNPs of *CYP2C9* were associated with reduced intrinsic clearance of phenytoin, but these findings might be due largely to the linkage between the *3 allele and promoter SNPs (–1911T > C, –1885C > G, –1537G > A and –981G > A) [15]. Other studies on Caucasian, Asians and Japanese did not find any associations between the promoter SNPs and warfarin sensitivity [12,13,16,17] or acenocoumarol pharmacodynamics [18].

Collectively, the known genetic variations in *CYP2C9* can only partially explain the interindividual or ethnic differences in *CYP2C9* activity *in vivo*. A recent extensive review on allelic variants of 11 Phase I enzyme genes has pointed out that members of the CYP2 subfamily have the highest level of genetic diversity [19]. Very recently, Ahmadi *et al.* [20] illustrated differences in long-range linkage disequilibrium (LD) profiles of the CYP2C cluster covering the four *CYP2C* genes (*2C18*, *2C19*, *2C8* and *2C9*) between Europeans and Japanese. These reports have prompted us to resequence *CYP2C9* in Japanese and to identify detailed Japanese-specific genetic variations and haplotype structures.

In the present study, we sequenced the coding exons, their flanking introns and the upstream putative promoter regions in *CYP2C9* from 263 Japanese subjects. Seven novel alleles with non-synonymous SNPs were functionally assessed by using diclofenac as a substrate in a mammalian cell expression system. In addition, the haplotype structures with high-density SNPs were analysed and compared with those in previous reports to provide a plausible explanation for the variability in the *in-vivo* metabolic activity of *CYP2C9* in different ethnic groups. Furthermore, the associations between *CYP2C9* and *CYP2C19* haplotypes in Japanese were analysed.

Materials and methods

Human genomic DNA samples

Two hundred and sixty-three Japanese subjects analysed in this study consisted of 134 diabetic patients and 129 healthy volunteers. The diabetic patients were administered an antidiabetic drug, gliclazide, at the International Medical Center of Japan or Nerima General Hospital. Healthy volunteers were recruited at Tokyo

Women's Medical University. Genomic DNA was extracted from blood leukocytes of diabetic patients and from Epstein–Barr virus-transformed lymphoblastoid cells derived from healthy volunteers. Written informed consent was obtained from all participating subjects. The ethical review boards of the International Medical Center of Japan, the Nerima General Hospital, the Tokyo Women's Medical University, and the National Institute of Health Sciences approved this study.

Polymerase chain reaction (PCR) conditions for DNA sequencing

First, multiplex PCR was performed to amplify the 5'-flanking region or all nine exons of *CYP2C9* by using the two sets of mixed primers (Mix 1 and Mix 2 in 'first PCR', respectively, as listed in Table 1). Namely, the four (5'-flanking, exons 2–3, 6 and 7) or three (5'-flanking to exon 1, exons 4–5 and 8–9) genomic DNA fragments were amplified simultaneously from 50 ng of genomic DNA using 1.25 U of Ex-Taq (Takara Bio. Inc., Shiga, Japan) with 0.60 μ M mixed primers. The first PCR conditions were 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 1 min and 72°C for 2 min; and then a final extension for 7 min at 72°C. Next, the 5'-flanking region and each exon were amplified separately (second PCR) using the first PCR products as template with Ex-Taq (1.25 U) and the primer sets (0.4 μ M); listed in the 'second PCR' of Table 1. To cover approximately 3 kb from the transcriptional initiation site, three discontinuous fragments of the 5'-flanking region (–3377 to –2590, –2093 to –1506 and –1283 to –106) were amplified by second PCR. The regions –2589 to –2094 and –1505 to –1284 were omitted from the present analysis. For the amplification of each exon, the flanking intronic sites were included to analyse the sequences of exon–intron splice junctions. The second PCR conditions were the same as the first PCR. The PCR products were then treated with a PCR Product Pre-Sequencing Kit (USB Co., Cleveland, Ohio, USA) and sequenced directly on both strands using an ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) with the primers listed in 'sequencing' of Table 1. The excess dye was removed by a DyeEx96 kit (Qiagen, Hilden, Germany). The eluates were analysed on an ABI Prism 3730XL DNA Analyser (Applied Biosystems). All the novel SNPs were confirmed by repeated sequencing of the PCR products generated by new genomic DNA amplifications. The genomic and cDNA sequences of *CYP2C9* obtained from GenBank (NT_030059.12 and NM_000771.2, respectively) were used as the reference sequences. Description of SNPs was based on the cDNA sequence, and adenine of the translational initiation site in exon 1 was numbered +1.

Cloning and site-directed mutagenesis of *CYP2C9* cDNA

Construction of the wild-type *CYP2C9* expression plasmid (pCDNA3.1D/*CYP2C9*/wild-type) was performed

Table 1 Primer sequences used for the analysis of the human CYP2C9 gene

Amplified and sequenced region	Forward primer		Reverse primer		PCR product (bp)		
	Sequence (5' to 3')	Position ^b	Sequence (5' to 3')	Position ^b			
First PCR	Mix 1	5'-flanking (-4658 to -1506) ^a	CTATGAAGCTAATCAAGACAGTGTGG	CTCATGTCCTTTTGAATCTCT	15445460		
		Exons 2-3	GTAGAGACGGTATCACCTTGG	GGTAATGGGAAAAACACTGTCT	15450959		
		Exon 6	AAGAGCCCTGATGAATGGAAT	ACTACAGATGGGATTTGGC	15480811		
	Mix 2	5'-flanking to exon 1 (-1702 to exon 1) ^a	Exon 7	GACTAACCCATGCCCTTTTG	ATCTGGAGAACACACACTGCG	15489858	
			Exons 4-5	CCAACTGAACCTGAATGTTTGG	GAATCTAACATGCAAAAGACC	15447354	
		Exons 8-9	TTGGTTCCTCTACTGGTTC	GGTAGTTATTTCTGTGGGCTC	15457823		
	Second PCR	5'-flanking (-3377 to -2590) ^a	Exon 6	ATCTGGTAGTTGTGCTTTTGG	CATGTCACATCCCACATCTAAG	15444376	
			Exon 7	TAAACTGAAAGGTCTAGGAAGG	CTCATGTCCTTTTGAATCTCT	15445460	
		5'-flanking (-1283 to -106) ^a	Exon 1 (-245 to exon 1) ^a	Exon 7	ATCCTCAACTCAGTATGTCAGC	ATCACCTAGGTCCACCTATATGC	15446860
				Exons 2-3	CTCCAAACCAAGTACAGTGAA	GAATCTAACATGCAAAAGACC	15447354
Exon 4		Exon 5	Exon 4	GTAGAGACGGTATCACCTTGG	GGTAATGGGAAAAACACTGTCT	15450959	
			Exon 5	TTGGTTCCTCTACTGGTTC	GCAGAAAAACATTGATGAGGGAG	15456464	
Sequencing		5'-flanking (-3373 to -2590) ^a	Exon 6	CTGGTTAGAAATGATCCTCTG	GGTAGTTATTTCTGTGGGCTC	15457823	
			Exon 7	AAGAGCCCTGATGAATGGAAT	ACTACAGATGGGATTTGGC	15480811	
			Exon 8	GACTAACCCATGCCCTTTTG	ATCTGGAGAACACACACTGCG	15489858	
			Exon 9	CTCATCCATCCATTCATCATG	CCAACCTATTTCAGCTTCTC	15494695	
	5'-flanking (-2093 to -1506) ^a		Exon 1 (-222 to exon 1) ^a	Exon 9	GGTAGTTGTGCTCTTTGGTA	CTCTAACACTACCCCAAATAGC	15497828
				Exon 2	TAAACTGAAAGGTCTAGGAAGG	CATGTCACATCCCACATCTAAG	15444376
	5'-flanking (-1283 to -612) ^a		Exon 1 (-659 to -137) ^a	Exon 2	ATCCTCAACTCAGTATGTCAGC	CTCATGTCCTTTTGAATCTCT	15445460
				Exon 1 (-222 to exon 1) ^a	CAATTCCTGCCTCAGGA	ACCTTTACCATTAACCCCTCC	15446354
	Exon 2		Exon 3	Exon 2	GGAATGACAGAGTGGACAATG	AAGGACTTGGACCCACTGAT	15446829
				Exon 3	TCTTGAACCTCCTGACCTTGT	GACCCAAATCTTTCTCTACT	15447338
Exon 4	Exon 5	Exon 4	AGGAGTTTCTGGGAGAGG	GGAGCTCTGTAAGTCTCTGT	15450378		
		Exon 5	CCTTCCATCAGTGCCTT	GAAAAACACTGCTCTTAACCTC	15450952		
Exon 6	Exon 7	Exon 6	CTGGTTAGAAATGATCCTCTG	GCCCGTCTTTCCAGATATTC	15456374		
		Exon 7	GCATGGAAATAGGGAGTAGG	GGTAGTTATTTCTGTGGGCTC	15457823		
Exon 8	Exon 9	Exon 8	CCATGCCCTTTTGTATTGG	ACTACAGATGGGATTTGGC	15480811		
		Exon 9	GTTGCATCCAAAGTATCCAAAG	AACACACACTGCCACACACTAG	15489850		
Exon 9	Exon 9	Exon 9	CTCATCCATCCATTCATCATG	CCAACCTATTTCAGCTTCTC	15494695		
		Exon 9	CTGCAGCTCTCTTCTCCTC	CGAATGTTCACTAGATCTTCAG	15497455		
				CTCTAACACTACCCCAAATAGC	15497828		

^aA of the translational start codon is 1, based on NT_030059.12.

^bThe nucleotide position of the 5' end of each primer on NT_030059.12. PCR, Polymerase chain reaction.

using pcDNA3.1 Directional TOPO Expression kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Briefly, the wild-type CYP2C9 cDNA was amplified by PCR from human adult normal liver Quick-Clone cDNA (Clontech, Palo Alto, California, USA) with the forward primer, 5'-*CACCAGAAGGCTTCAATGGATTCTC*-3', and the reverse primer, 5'-GAGAAAAGGCATTACAGATAGTG-3'. The sequence in italics was introduced for the directional TOPO cloning system. The PCR products were cloned directly into the pcDNA3.1D/TOPO vector according to the manufacturer's instructions. Seven single CYP2C9 variations, 49C > A (Leu17Ile), 353_362del AGAAATGGAA (Lys118ArgfsX9, which denotes a frame shift starting with Lys118Arg and ending with a stop codon at the 9th residue), 389C > G (Thr130Arg), 449G > T (Arg150Leu), 641A > T (Gln214Leu), 835C > A (Pro279Thr) and 1429G > A (Ala477Thr), were introduced into the wild-type plasmid (pcDNA3.1D/CYP2C9/Wild-type) using a QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, California, USA). The primer sequences used for the construction of variant plasmids were: 5'-GTCTCTCATGTTTGCTTCTCATTTCACCTCTGGAGACAGAGC-3' (sense) and 5'-GCTCTGTCTCCAGAGTGAATGAGAAGCAAACATGAGAGAC-3' (antisense) for pcDNA3.1D/CYP2C9/Leu17Ile, 5'-GAATTGTTTTTCAGCAATGGAAGGAGATCCGGCGTTTCT-3' (sense) and 5'-AGAAACGCCGATCTCC^TTCCATTGCTGAAAACAATT C-3' (antisense) for pcDNA3.1D/CYP2C9/Lys118ArgfsX9, 5'-CGTTTCTCCCTCATGAGGCTGCGGAATTTTGGG-3' (sense) and 5'-CCC AAAATTCGGAGCCTCATGAGGAGAAACG-3' (antisense) for pcDNA3.1D/CYP2C9/Thr130Arg, 5'-TCAAGAGGAAGCCCTCTGCCTTGTGAGG-3' (sense) and 5'-CCTCCACAAGGCAGAGGGCTTCCTCTTGA-3' (antisense) for pcDNA3.1D/CYP2C9/Arg150Leu, 5'-GCAGCCCCTGGATCCTGATCTGCAATAATTTTTCT-3' (sense) and 5'-AGAAAAATTATTGCAGATCAGGATCCAGGGGCTGC-3' (antisense) for pcDNA3.1D/CYP2C9/Gln214Leu, 5'-GAGAAGGAAAAGCACAACCAAACATCTGAATTTACTATTGAAAGCTT-3' (sense) and 5'-AAGCTTCAATAGTAAATTCAGATGTTGGTTGTGCTTTTTCCTTCTC-3' (antisense) for pcDNA3.1D/CYP2C9/Pro279Thr, 5'-CAGTTGTC AATGATTTACCTCTGTGCCGCCCT-3' (sense) and 5'-AGGCGGCACAGAGGTAATCCATTGACAACCTG-3' (antisense) for pcDNA3.1D/CYP2C9/Ala477Thr. The positions where the nucleotides are exchanged or deleted are in italic and bold or indicated with the mark ^, respectively. To ensure that no errors had been introduced during amplification, the entire cDNA regions were confirmed by sequencing all plasmid constructs.

Transient transfection in COS-1 cells and preparation of microsomal fractions

COS-1 cells, an African green monkey kidney cell line, were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin

and 10% fetal bovine serum under 5% CO₂ at 37°C. The cells (2.4 × 10⁶) were seeded in a 10-cm culture dish one day before transfection. After 24 h of culture, the cells were rinsed with serum-free DMEM. Fourteen µg of the wild-type or variant CYP2C9 or empty pcDNA3.1 plasmid was transfected using the LIPOFECTAMINE 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After 28 h after transfection, the cells were rinsed with ice-cold 10 mM phosphate buffered saline (pH 7.4) and scraped in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.25 M sucrose, 25 mM KCl and 0.5 mM ethylenediamine tetraacetic acid. Microsomes from transfected COS-1 cells were prepared by sequential centrifugation according to a standard procedure described by Ekins *et al.* [21]. After centrifugation, the microsomes were suspended in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) and stored at -90°C until used. The protein concentration of the microsomes was assayed with the Protein Assay Kit (BioRad Lab., Hercules, California, USA) using bovine γ globulin as a standard.

Determination of CYP2C9 mRNA expression levels by TaqMan real-time reverse transcription (RT)-PCR

Total cellular RNA was isolated from the transfected COS-1 cells using the RNAeasy Mini kit (Qiagen), and then treated with RNase-free DNase (Invitrogen) to avoid plasmid DNA contamination in the samples. DNase-treated total RNA (500 ng) was used to prepare first-strand cDNA with a High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems) using random primers. Real-time PCR assays were performed by an ABI PRISM 7700 Sequence Detection System using TaqMan Gene Expression Assay for CYP2C9 (Assay ID: Hs01682803_mH, Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommendations. The TaqMan probe used for this assay was designed to bind to the junction between exons 1 and 2 of human CYP2C9 cDNA. For internal controls, β-actin mRNA levels were quantified using TaqMan β-actin control reagents (Applied Biosystems). Standard curves of CYP2C9 and β-actin were obtained from a serial dilution of cDNAs from COS-1 cells expressing wild-type CYP2C9. For each sample, the relative amount of mRNA of the target (CYP2C9) and the control (β-actin) were determined, and the CYP2C9 mRNA expression level was normalized against β-actin mRNA levels and expressed as a ratio to the wild-type (100%). Expression levels were shown as mean ± SD of four to six separate transfection experiments.

Determination of protein expression levels by immunoblotting

Western blotting was performed to determine the protein expression levels of CYP2C9 and calnexin, an endoplasmic reticulum-resident protein, as a control. Thirty µg protein of the microsomal fractions from COS-1 cells were dissolved in sodium dodecyl sulfate (SDS)-sample