

ヒト Cytidine

Deaminase 遺伝子における一塩基変異多型と Cytosine Arabinoside に対する薬剤感受性の検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4536

ヒト Cytidine Deaminase 遺伝子における一塩基変異多型と Cytosine Arabinoside に対する薬剤感受性の検討

金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管発生発達病態学
(旧講座名：小児科学)
(主任：小泉晶一教授)

岳 麗 杰

種々の薬物の標的遺伝子多型を解析することは、遺伝子情報を基盤とした癌治療法の開発に有用であるという仮説を検討するため、ヒトのシチジンデアミナーゼ (human cytidine deaminase, HCD) 遺伝子における一塩基変異多型 (single-nucleotide polymorphism, SNP) を同定し、その機能を研究した。本研究では52例の白血病/悪性リンパ腫症例と169例の対照からHCD cDNAを作成し、その塩基配列を直接シーケンスした。同定されたSNPの機能は、酵母遺伝子発現システムを用いて解析した。酵素活性は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、原型HCDと変異HCDの基質特異的代謝活性を測定した。さらに変異HCDを発現した酵母株のシトシンアラビノシド (cytosine arabinoside, ara-C) に対する感受性を増殖抑制法によって検定した。HCD遺伝子の翻訳領域に3つの異なるSNP (A79C, G208A, およびT435C) が同定され、その変異頻度はそれぞれ20.1%, 4.3%, および70.1%であった。疾患との関連性は認められなかった。新規SNPであるG208Aによりコドン70はAlaからThrに置換 (A70T) された。このAlaはHCDの酵素活性領域内に存在し、種属間でよく保存されていた。原型HCDと比較して、この置換酵素HCD-A70Tではシチジンとara-Cを基質とした場合の活性はそれぞれ47%と37%と低値を示した ($p < 0.01$)。HCD-A70Tを発現した変異酵母のara-Cに対する50%増殖阻害濃度値は $757 \pm 33 \mu\text{M}$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$) であり、原型 ($941 \pm 58 \mu\text{M}$) より有意に低かった ($p < 0.01$)。本研究ではHCDの208A変異遺伝子型が樹立され、この変異形質発現株では原型株に比較し、ara-C治療がより有効で、感受性が高まることが示唆された。薬剤代謝に関連する遺伝子のSNPの検索およびSNPからの誘導物質の生物学的表現型の解析は、小児悪性腫瘍の化学療法選択において、新たな治療戦略を提供するものである。

Key words cytidine deaminase, single-nucleotide polymorphism, coding region, yeast expression system, ara-C sensitivity

近年のゲノム研究における劇的な進歩によって遺伝子変異に関する理解が深まりつつある。一塩基変異多型 (single-nucleotide polymorphism, SNP) はヒト遺伝子に認められる最も頻度の多い変異である。SNPは遺伝子地図を作成するマーカーとして重要なだけでなく、一般のおよび遺伝的な疾患に関する多様性 (多型) として、また薬剤感受性に対する多型を理解するうえでも重要である。高度な技術の進歩によりSNPの発見が加速され、その頻度が1%以上で存在する部位が遺伝子上に証明されている^{1)~3)}。最近、国際協力のもと、SNP地図の作成グループにより、142万以上のSNPがゲノム地図に同定され⁴⁾、それらは人類遺伝学の研究、病気に関連する遺伝子の研究、および薬物代謝関連遺伝子研究の急速な発展を可能にした。しかし、これら同定されたSNPの機能は不明な点が多い。機能遺伝子の翻訳領域 (coding region) 中のSNP (cSNP) は生物学的な形質変異を直接誘導しうる。この点から、癌化学療法に使用

される薬物の代謝関連酵素遺伝子におけるcSNPの同定は、治療における薬剤感受性の分野で、遺伝子を基盤とした情報を提供しうると考えられる。

シチジンデアミナーゼ (cytidine deaminase, CDA), (EC.3.5.4.5) はピリミジン代謝回路に働き、シチジンとデオキシシチジンを脱アミノ化し、それぞれのウリジン誘導体を生成する酵素の一つである。さらに、CDAはシトシンアラビノシド (cytosine arabinoside, ara-C), アザシチジン (aza-cytidine), および2',2'-ジフルオロデオキシシチジン (2',2'-difluorodeoxycytidine) に代表されるシトシンヌクレオシド誘導体の代謝に重要な役割を果たしている。例えば、ara-CはCDAにより代謝され、不活性化産物ウリジンアラビノシド (uridine arabinoside, ara-U) となる。一方、ara-Cはその効果発現のためには活性化酵素であるデオキシシチジンキナーゼ (deoxycytidine kinase, DCK), デオキシシチジレートキナーゼ

平成14年1月15日受付, 平成14年2月15日受理

Abbreviations : ara-C, cytosine arabinoside; ara-U, uridine arabinoside; CDA, cytidine deaminase; DCK, deoxycytidine kinase; HCD, human CDA; HPLC, high-pressure liquid chromatography; ORF, open reading frame; PCR-RFLP, PCR-restriction fragment polymorphism; SNP, single-nucleotide polymorphism; TE, Tris-EDTA.

(deoxycytidylate kinase), およびジホスファートキナーゼ (diphosphate kinase) の作用により活性化型の ara-CTP への転化が必要である⁵⁾。このように ara-C の細胞毒性は活性化酵素と不活性化酵素のバランスの上に成り立っているといえる。ヒト CDA (human CDA, HCDA) は生体内では 4 つの同一 16 kDa サブユニットからなる四量体を形成し、それぞれのサブユニット内の活性部位に亜鉛原子を有する⁶⁾。CDA の発現は組織や種属間で大きく異なる⁷⁾。例えば、ヒト肝には高いレベルの CDA 発現が認められており⁸⁾、そのため薬物は投与後肝で速やかに不活性化されるので、血漿中の ara-C 半減期は非常に短くなっている⁹⁾¹⁰⁾。HCDA の高発現と ara-C 耐性獲得との相関は耐性細胞株を用いた研究のみならず¹¹⁾¹²⁾、薬剤抵抗性の AML 患者で高レベルの HCDA 活性を示すことが報告されている¹³⁾。したがって、ara-C の不活性化は薬物療法の有効性を低下させる一つの重要な因子と考えられている。HCDA 遺伝子のクローニングにより、遺伝子多型の検定が可能になった¹⁴⁾¹⁵⁾。翻訳部位の 2 つの変異、A79C (K27Q) と T435C (silent) が報告されている⁷⁾¹³⁾¹⁶⁾。このコドン 27 の多型は、試験管内で ara-C の脱アミノ率を変化させる¹⁶⁾。Ara-C 代謝にみられる大きな個体差の一部は遺伝子多型で説明できるかもしれない⁹⁾¹⁰⁾。しかし、HCDA 遺伝子の構造と機能的な関連性はなお詳細に研究する必要がある。

本研究では HCDA 遺伝子に、報告されている 2 つの cSNP 以外に新たな cSNP を同定した。これら cSNP の薬物代謝活性への関与を検討するため、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 遺伝子発現システムを構築し、ara-C の脱アミノ活性および SNP を導入された酵母の薬剤感受性を測定した。新しく同定された HCDA 遺伝子の SNP、G208A (A70T) は CDA 活性を有意に低下させ、結果として、この SNP を導入した酵母は ara-C に対する感受性が高まった。本研究の結果は、デオキシシチジン類似薬に、より高い感受性を有する亜群の存在を明らかにし、それは特異的な SNP 発現に関連づけられることを示した。

対象および方法

I. 対象

1990 年から 1997 年の間に、金沢大学医学部小児科において治療管理がなされた小児血液腫瘍患者のうち、説明と同意後、検体採取が可能であった急性リンパ性白血病 (ALL) 37 名、急性骨髄性白血病 (AML) 10 名、非ホジキンリンパ腫 (NHL) 5 名、合計 52 名を対象とした。また、血液腫瘍疾患を伴わない小児で、末梢血採取が可能であった 169 名を正常対照とした。すべての症例は日本小児癌・白血病研究グループの臨床研究に登録され、危険群別プロトコールにしたがって治療された¹⁷⁾。

なお、本研究に用いた試料はヒトゲノム研究に関する基本原則が公表される以前のもので、既提供資料に属する。したがって、試料を匿名化することで研究結果が提供者に影響を与えないよう考慮し、さらに、個人情報結果は結果に全く表現されず、保護されている。以上の点について、金沢大学医学部等医の倫理委員会の承認を得た。

II. 方法

1. 材料

診断時の患者の骨髄からの単核細胞 (白血病細胞は 80 % 以上)、あるいは非白血病小児からの末梢血単核細胞を Ficoll-Hypaque 密度勾配遠心法で分離し、液体窒素中に保管した。

2. RNA の抽出

Chomczynski ら¹⁸⁾の方法を以下のように改良して行った。単核球 5×10^6 個にフェノールとチオシアン酸グアニジンを含む TRIzol (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) 1 ml を加え細胞を融解した。0.2 ml のクロロホルム (イソアミルアルコールを加えないもの) を加え攪拌し室温で 5 分間静置後、微量高速冷却遠心器 (トミー精工, 東京) にて 12,000 rpm, 15 分間, 4°C で遠心分離した。上層部を採取し、等量のイソプロパノールを加えて 5 分間室温静置し、RNA を析出させ、12,000 rpm で 10 分間遠心した。沈殿 (RNA) を 70 % 冷エタノールで洗浄後、上清を完全に除き、室温で 5 分間放置し乾燥させた。1 × Tris-EDTA (TE) 緩衝液 (10 nM トリスアミノメタン, 1 mM EDTA, pH6.8) に溶解し 260 nm の吸光度を測定して総 RNA 濃度を測定した。また 260 nm, 280 nm の吸光度の比を測定し RNA の純度の参考としたが、本法によって得られた RNA はこの比が 1.5 から 2.0 と良好であった。

3. 一本鎖 cDNA の合成

上記によって得られた総 RNA を鋳型としランダムプライマーにて一本鎖 cDNA を合成した。まず、総 RNA 2 μ g に 80 mM ランダムヘキサスクレオチドプライマー (宝酒造, 東京) 3 μ l を加え、1 × TE 緩衝液 (pH6.8) で総量 50 μ l に調整した。GeneAmp[®] PCR System 9700 (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社, 東京) を用い 65°C で 10 分間保持後、20 分かけて 25°C まで冷却した。この過程で RNA の変性とプライマーのアニーリングを行った。引き続き、反応液 [100 mM Tris-HCl (pH8.3), 200 nM KCl, 20 mM MgCl₂, 20 mM ジチオスレイトール (dithiothreitol), 各 2 mM の 4 種類の dNTP, 逆転写酵素 RAV2 (宝酒造) 10 単位] 50 μ l を加え、42°C で 60 分間保持し cDNA を合成させた後、90°C, 2 分間で逆転写酵素を失活させた。反応終了後 1 × TE 緩衝液 (pH8.0) 100 μ l を加え、総量 200 μ l とした。

4. 逆転写 PCR 反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR)

ヒト CDA mRNA の塩基配列は GenBank accession No. L27943 を引用し、全翻訳領域 (ORF) 配列を含むように特異的なプライマー 5'-GAGGAGCCG CAATCGTGTCTG-3' (センス) と 5'-TGCTGACTCAGGCTGGAGTGTAATC-3' (アンチセンス) を設計した。合成はフナコシ株式会社 (東京) に委託した。PCR 反応は調製した一本鎖 cDNA のうち 5 μ l を鋳型として、最終 0.2 μ M の各プライマー、各 200 μ M の 4 種類の dNTP, PCR 反応緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂), LA-Taq ポリメラーゼ (Takara) 2.5 単位を加え、全量 50 μ l で行った。反応は GeneAmp[®] PCR System 9700 (アプライドバイオシステムズ, ジャパン) を用い、94°C × 5 分の初期変性の後、95°C × 30 秒, 59°C × 30 秒, 72°C × 30 秒のサイクルで 30 回増幅した。なお、塩基配列番号はスタートコドンの A を 1 番とした。

5. PCR 直接シーケンス法による塩基配列の確認

PCR 反応産物を 1.5 % アガロースゲル (H14-Takara, 宝酒造) に泳動しエチジウムブロマイド染色後、紫外線照射装置 (トランスイルミネーター, フナコシ) 上で観察した。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) を用いて PCR 産物を精製した後、シーケンス反応を Catalyst 800 (アプライドバイオシステムズジャパン, 東京) にて行った。すなわち、96°C × 20 秒, 50°C × 30 秒, 60°C × 4 分のサイクルで 25 回繰り返した。シーケ

エンスプライマーにはRT-PCRのプライマーをそのまま使用した以外に、あらたに設計し、増幅したcDNAの全塩基配列が検索できるようにした。過剰なプライマーと蛍光色素をエタノール沈殿にて除去した後、塩基配列は310 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムジャパン, 東京) にて自動解析した。GenBankに登録された塩基配列を標準対照として変異を検索した。

6. 変異アレル特異的制限酵素切断

検出された変異のうちHCDA 208GからA, と435TからCへの置換は、それぞれ*Rsr* IIと*Hinf* I制限酵素切断点を消失させることから、制限酵素切断片長多型 (PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 分析法を用いてこれらの変異の確認を行った。すなわち、得られたPCR産物5 μ lを、それぞれ塩基配列を特異的に切断する制限酵素*Rsr* IIと*Hinf* I (New England BioLabs, USA) により至適温度37°Cで1時間反応させた。反応後のDNA断片を2.0%アガロースゲルに泳動しエチジウムブロマイド染色後、紫外線照射装置上で観察した。

7. 酵母株

本研究で使用した*Saccharomyces cerevisiae*酵母株YPH499 (*MATa*, *ura3-52*, *lys2-801*, *ade2-101*, *trp1- Δ 63*, *his3- Δ 200*, *leu2- Δ 1*) は, YNN216の誘導体である¹⁹⁾。培地はYPDA (1% 酵母抽出物, 2% ペプトン, 0.004% 硫酸アデニン, 2% グルコース) と合成完全培地 [(SC), 0.67% アミノ酸無添加酵母窒素源, 2% グルコース, 2% 寒天, 0.2% 混合アミノ酸 (20 mg/L L-Arg, 20 mg/L L-Met, 30 mg/L L-Tyr, 30 mg/L L-Lys, 50 mg/L L-Phe, 100 mg/L L-Glu, 100 mg/L L-Asp, 150 mg/L L-Val, 200 mg/L L-Thr, 400 mg/L L-Ser)]を用い、それぞれSigma-Aldrich (東京) および和光純薬工業 (大阪) から購入した。必要に応じてL-Leu, L-His, およびアデニン各100 mg/Lを添加した。

遺伝子導入はリチウム酢酸塩法²⁰⁾を用い、薬性耐性の遺伝子導入株の選択にはgeneticin® (200 μ g/ml, G418, Sigma) を使用した。

8. 酵母CDA遺伝子(CDD1)の欠失

酵母染色体上のCDA遺伝子CDD1 [GenBank accession No. U20865] のORFを欠失させるために、相同染色体組み換えに基づいた段階遺伝子取替法²¹⁾を用いた。まず、CDD1遺伝子を選択マーカーであるG418をコードする遺伝子(kanMX)と置換する目的で、loxP-kanMX-loxP cassetteを有するpLKGプラスミド(金沢大学がん研究所太田一寿博士から供与)を用いた。PCR法にてpLKGからこのcassetteを増幅する際に、CDD1遺伝子翻訳領域の上流および下流それぞれ40塩基配列を含むように合成されたプライマーを用いた: CDD1-KOup (5'-GGAAAACCAACAGAGAAATCTCAAGCAGAGAAATAAGGTACTAATACGACTCACTATAGG-3'); CDD1-KOdown (5'-TTTCGCTTTCTTTTCGGGGAGCAGCCAAATAAAGATTGCTGAGTTCCAAGTACTAGTGATCTG-3')。したがって、増幅されたDNA断片は中心にloxP-kanMX-loxP cassetteを、両端にCDD1遺伝子と相同性の塩基配列を有する。増幅の条件は、94°C×5分の変性、94°C×30秒、50°C×30秒、72°C×2分30秒の5サイクル後、94°C×30秒、68°C×3分の25サイクルで増幅させ、最後に72°C×10分で伸長させた。YPH499酵母細胞にこの遺伝子断片を導入し、相同組み換えによって生じたCDD1-null変異株(YPH499 Δ cdd1) は200 μ g/ml G418を含むYPAD培地で選択した。欠失したCDD1染色体の構造は診断的PCRを用いて再

確認した。

9. 発現ベクター

HCDA発現に用いたpA7WAプラスミド(pAS2-1の誘導体²²⁾)は、ADHプロモーターにより高レベルの組み換え蛋白の発現が可能であり、その選択マーカーとしてTRP1を用いた。HDCKの発現には、URA3を選択マーカーとしたpA7WAの誘導体、pA7Uプラスミドを用いた。どちらのプラスミドにも挿入部位5'末端側にT7エピトープ塩基配列が導入されており、これにより発現蛋白質のN-末端にT7-タグが標識された²³⁾。

10. 酵母中のDNA組み換えと機能発現

原型および変異型配列を含むHCDA遺伝子の全翻訳領域cDNAをPCR法にて増幅した。プライマーは5'-ATATGGATCCATGGCCCAGAAGCGTCCTG (センス) と5'-ATATGAATTCAGTCTTCTGCAGGTCAATTCAGTCTTCTGCAGGTC (アンチセンス)を用いた。同様に、酵母CDD1 ORFはプライマー5'-ATATGGATCCATGAAAGTAGGTGGCATAGAAGACとプライマー5'-ATATGAATTCAGTTAAATGAGATGGACCを用いて増幅し、pA7WAに導入した。HDCK (GenBank M60527) cDNAのORFはプライマー5'-ATATGGATCCATGGCCACCCCGCCCAAGAと5'-ATATGAATTCACAAAGTACTCAAAAAGTCTTTGACを用いて増幅し、pA7Uプラスミドに導入した。導入したHCDA, CDD1, およびDCKの塩基配列は直接シーケンス法にて再度確認した。Ara-Cへの感受性の測定にはDCKによるara-Cの活性化が必須である。酵母はDCKを欠如するため、酵母 Δ cdd1株にpA7U-DCKを導入した。

11. ウエスタンブロッティング法

対数的増殖期の酵母変異株から細胞粗抽出物を作製した。1 OD A₆₀₀当量の細胞(1×10⁷)を氷上で150 μ lの破壊溶液(2M NaOH, 2% β -メルカプトエタノール)で10分間処理した。その後130 μ lの60%三塩化酢酸で中和し、細胞蛋白は遠心により収集した。蛋白濃度はBradford assay (Nippon Bio-Rad Laboratories, 大阪)で測定した。1×10⁶細胞相当の蛋白抽出物を15% SDS-PAGEにて分離し、ニトロセルロース膜に転写した。一次抗体として抗T7-タグ(tag)マウス単クローン抗体(Novagen, Darmstadt, Germany)、二次抗体としてホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)標識した羊抗マウスIgG抗体(Dako Co., Carpinteria, Canada)を用いた。ECLキットで発色検定し、NIHイメージソフトウェア(Version1.60)で定量化した。

12. 酵母中に発現した組み換えHCDA酵素活性の高速液体クロマトグラフィー(high performance liquid chromatography, HPLC)分析

高速液体クロマトグラフィー(HPLC, M-8000, LC/3DQM, Hitachi Ltd., 東京)法によって、酵母中に発現した組み換えHCDAのウリジン誘導体への転換率を測定した。対数的増殖期の遺伝子導入酵母細胞を、ガラスビーズ法を用いて蛋白質分解酵素阻害剤(1 mM AEBBSF 塩酸塩, 2 μ g/ml アプロチニン, 2 mM ベンズアミジン塩酸塩, 10 μ M leupeptin, 10 μ M chymostatin, 1 μ M pepstatin)の存在下に破壊した。蛋白濃度はBradford assay (Nippon Bio-Rad Laboratories)で測定した。5-10 μ gの蛋白抽出物を125 μ M シチジン(Sigma)あるいはara-C (Sigma)とそれぞれ200 μ lの10 mM リン酸緩衝液の中で反応させた。37°Cで3, 5, 10, 15, 30分間の反応後、2分間沸騰させ

停止させた。この反応混合物を C-18 HPLC カラム (0.46 × 25 cm, Shiseido, 東京) に注入し、5%メタノール (0.5 ml/分) で溶出した。シチジンとウリジン, ara-C と ara-U は 254 nm で測定し、それぞれ 9.4 と 12.2 分, 10.9 と 15.3 分の溶出時間で完全に分離された。反応物と基質の全ピーク区域の面積から転換率を計算した。酵素の活性は 37 °C での nmol 反応物で計算し、細胞抽出物の mg 蛋白当たり (nmol/mg) で表示した。

13. Ara-C の細胞増殖抑制率の測定

Ara-C による細胞増殖抑制効果をコロニー形成試験によって

測定した。遺伝子導入酵母を一昼夜液体培養し、その後 3 倍希釈し、うち 10 μ l を種々の濃度 (0, 10, 50 mM) の ara-C を含む SC-Trp-Ura 寒天培地に接種した。この酵母を 30 °C で 3 日間培養し、形成されたコロニーの細胞密度を肉眼で観察した。Ara-C 50% 増殖阻害濃度 (the concentration for 50% inhibition of cell viability, IC₅₀) の測定には 10⁵/ml の酵母細胞を 0 ~ 10mM の ara-C を含む培養液中で 30 °C, 15 時間培養後、600 nm で光密度を測定し、増殖曲線を作成した。各実験はすべて 3 回ずつ独立して行なった。対照値の百分率 (%) 対 ara-C 濃度の対数 log の座

Table 1. Number of leukemia/lymphoma patients and controls, and ORs and 95% CIs by CDA79, 208, and 435

Variable	Case (%)	Control	OR ^{a)}	95% CI	p value ^{b)}
79 ^{c)} A/A ^{d)}	31 (59.6)	70 (66.7)	1 ^{e)}	—	—
79 A/C	17 (32.7)	32 (30.5)	0.83	0.09-0.24	0.75
79 C/C	4 (7.7)	3 (2.8)	0.33	1.06-2.09	0.15
208 G/G ^{d)}	47 (92.2)	157 (92.9)	1 ^{e)}	—	—
208 G/A	2 (3.9)	11 (6.5)	1.65	0.09-0.41	0.40
208 A/A	2 (3.9)	1 (0.6)	0.15	1.17-3.11	0.14
435 T/T ^{d)}	8 (16)	11 (10.1)	1 ^{e)}	—	—
435 T/C	18 (36)	39 (35.8)	1.57	0.31-0.70	0.28
435 C/C	24 (48)	59 (54.1)	1.79	0.71-1.25	0.20

^{a)} ORs were calculated in the standard unmatched fashion. ^{b)} Fisher's exact probability. ^{c)} Nucleotide position is the first base of the start codon. ^{d)} prototype. ^{e)} Reference category.

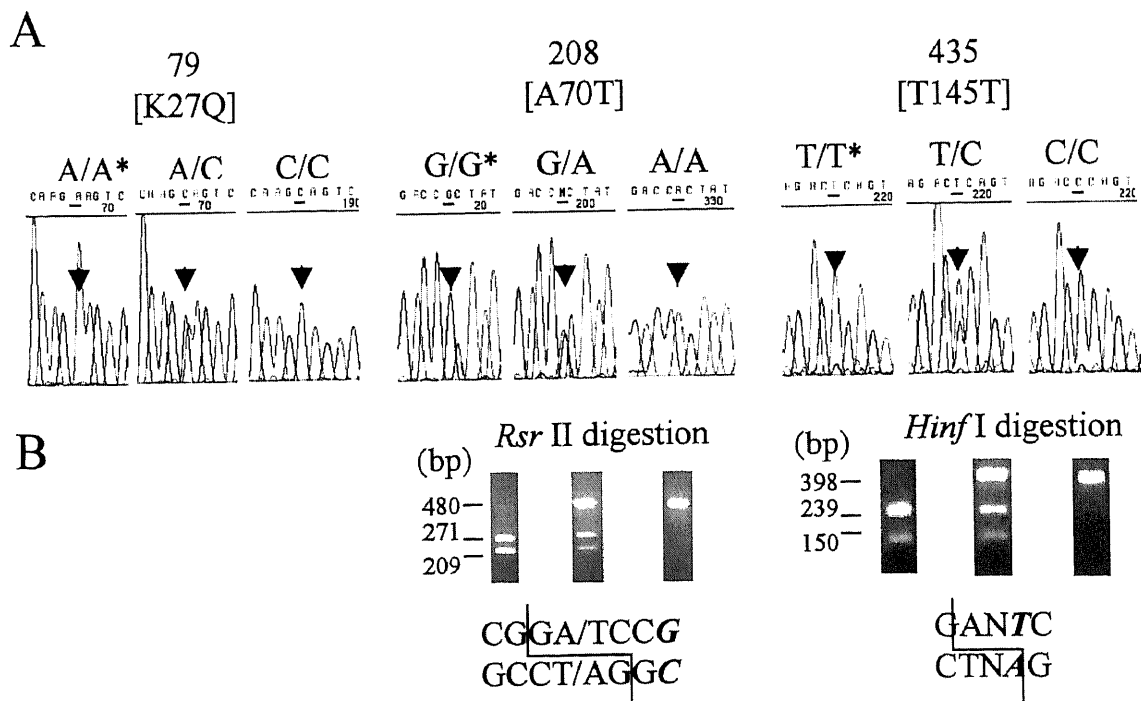


Fig. 1. Identification of the SNPs in the coding region of the HCDA gene. (A) Representative electropherogram of the genotypes of each SNP. The nucleotide position 1 is the first base of the start codon and the position of SNP is shown on the top of each electropherogram. An asterisk represents the prototype and an arrow indicates a variant base. (B) Representative PCR-RFLP assays to confirm the variants. The *Rsr* II-digestion for the 208 variant producing 271- and 209-bp fragments in prototype (G/G); 480-, 271-, and 209-bp fragment in heterozygotes (G/A); and a single band at 480 bp in homozygous variants (A/A). Similarly, the *Hinf* I-digestion for the 435 variant produced 239- and 150-bp fragments in prototype (T/T); 398-, 239-, and 150-bp fragments in heterozygotes (T/C); and a single band at 398 bp in homozygotes (C/C). No adequate restriction enzymes for the 79 variant were available.

標図上で、非線形S字状の細胞増殖抑制曲線が描かれた。この曲線をもとにIC₅₀値を細胞数が50%低下した時の薬剤の濃度として計算した。

14. 血液腫瘍患者における ara-C 投与時の副作用

我々の施設は小児白血病・悪性腫瘍治療研究グループ

(CCLSG) に参加している。症例は ALL-941, AML-9205 あるいは NHL-960 プロトコルのいずれかにて治療された。すべてのプロトコルには ara-C の持続投与 (160-200 mg/m² × 5 日間持続) または大量投与 (1.2 g/m²/12 時間 × 8 回) が含まれ、中枢神経系予防的治療として ara-C の髄注も施行されている。今回、

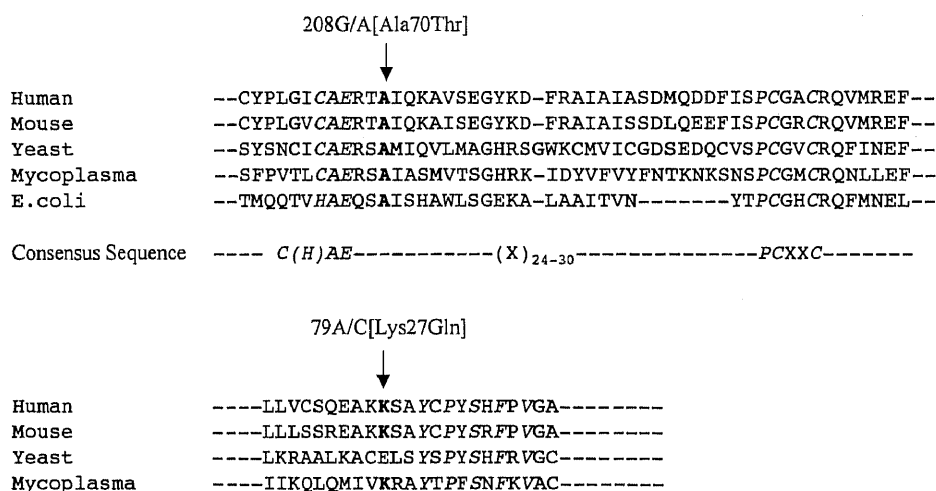


Fig. 2. Multiple alignment of the conserved catalytic domain of CDA from different species. GenEMBL accession numbers for the reference amino acid sequences are as follows: Human (P32320), Mouse (P56389), Yeast (Q06549), Mycoplasma genitalium (P47298), and E. coli (P13652). The conserved amino acid residues of the active site signature are shown as consensus sequences in parallel, and the corresponding residues in the alignments are in italics. The conserved amino acids at codons 70 and 27 referred to in the text are indicated in bold letters, respectively.

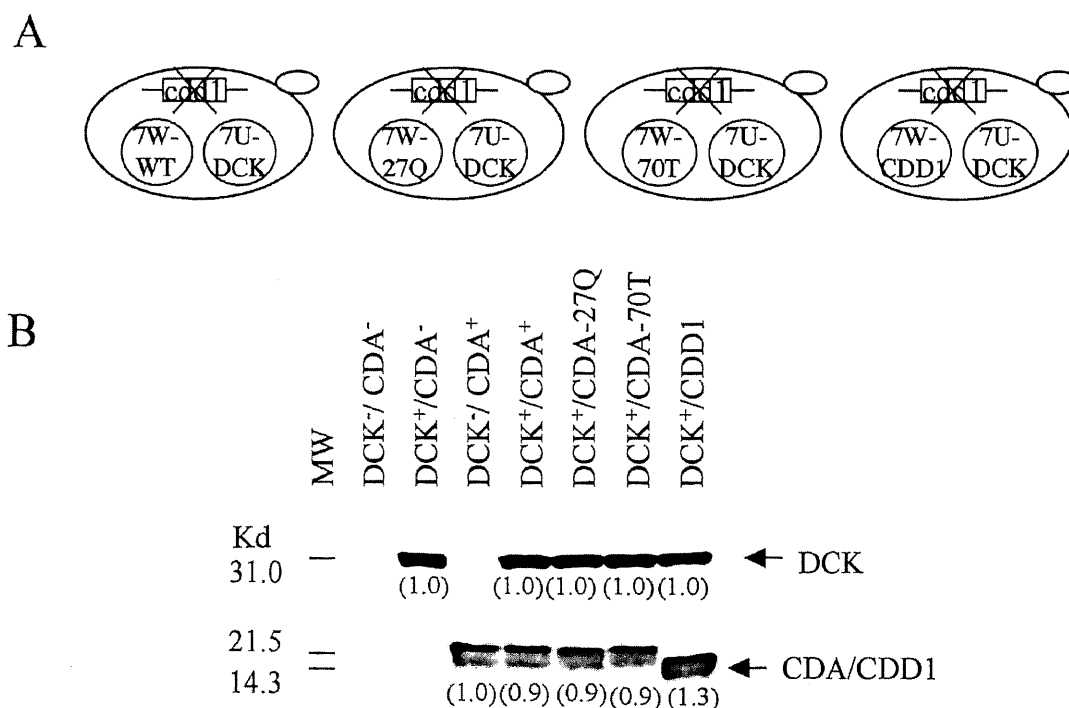


Fig. 3. (A) Human cDNA of CDA-WT, CDA with SNPs, or yeast CDD1 was co-transformed with HDCK gene into the YPH499- Δ cdd1 strain. (B) Cellular extracts from the transformants with the plasmid containing T7-tagged human cDNA of CDA, DCK, or yeast CDD1 were separated on 15% SDS-PAGE, detected with anti-T7-tag antibody, and qualified using NIH Image. The relative intensity of each protein is shown in parentheses.

ara-C を投与した症例で臨床経過を追えた ALL 24 名, AML 9 名, NHL 4 名において, ara-C を含むレジメン後の主だった副作用の発症を調べた. なお, 副作用の重症度は National Cancer Institute の Common Toxicity Criteria (CTC, version 2.0, DCTD, NCI, NIH, DHHS, June, 1999) を参照し, スコア化することで客観性を持たせた.

15. 統計学的分析

測定値はすべて平均値±標準偏差 ($\bar{x} \pm SD$) あるいは%で表わした. 遺伝子型との相対危険率は Odds 比率と 95% の信頼区間で推定した. 危険率は Fisher's 確率で算定した. 酵素の活性と ara-C 感受性の分析には Student の t 検定と Welch の t 検定を使用した. すべての統計学的な分析は Stat View 4.5 (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, Canada) にて行った. P 値 0.05 以下を統計学的有意とした.

成 績

I. HCDA 遺伝子多型

全 221 例からの PCR で増幅した cDNA 断片により, 新しい変異 (G208A) と 2 つの既知の変異 (A79C と T435C) を確認した. これらの SNP はすべて HCDA 遺伝子の翻訳領域に存在した. それぞれの変異の塩基配列と PCR-RFLP 分析を図 1A と 1B に示した. 各変異の頻度, ORs と 95% CI は表 1 にまとめた. この 3

種類の多型は Hardy-Weinberg's 平衡に従っていた. 危険率の分析では, 血液・悪性リンパ腫疾患と HCDA 遺伝子多型との間に統計的に有意な相関は認められなかった. エクソン 1 に位置する第 79 番ヌクレオチドは HCDA 遺伝子のコドン 27 の第一塩基であり, A から C への変異は N-末に想定される反応主要領域内²⁴⁾の Lys を Gln へ置換 (K27Q) する. 図 2 で表されるごとく, コドン 27 Lys は種属間で比較的良好に保存されている. 一方, エクソン 2 の第 208 番ヌクレオチドの G から A への変異により, HCDA のコドン 70 における Ala は Thr へ置換される (A70T). この部位は亜鉛結合部位を含む触媒活性領域 [(C/H)AE……PCXXC] 内に存在し, 種属間でよく保存されている²⁴⁾. さらにこの Ala-70 のアミノ酸残基は種属間でも完全に保存されており (図 2), 活性領域内の重要な部位である可能性が示唆された. T435C は静的変異であり, 435C アレルは 159 例中 140 例に認められた (88%). ヘテロ接合体 (435C/T) は 36% に, ホモ接合体 (435C/C) は 52% に認められた. したがって, 435C/C ホモ接合体が日本人の多数を占めるものと思われた.

II. 原型 HCDA, 変異型 HCDA, および HDCK の酵母内発現

今回同定された SNP の HCDA 活性と薬物感受性への関与を検討するために, 酵母遺伝子発現システムを開発した. まず, PCR による遺伝子欠失法により酵母自身の CDA 遺伝子 (CDD1)

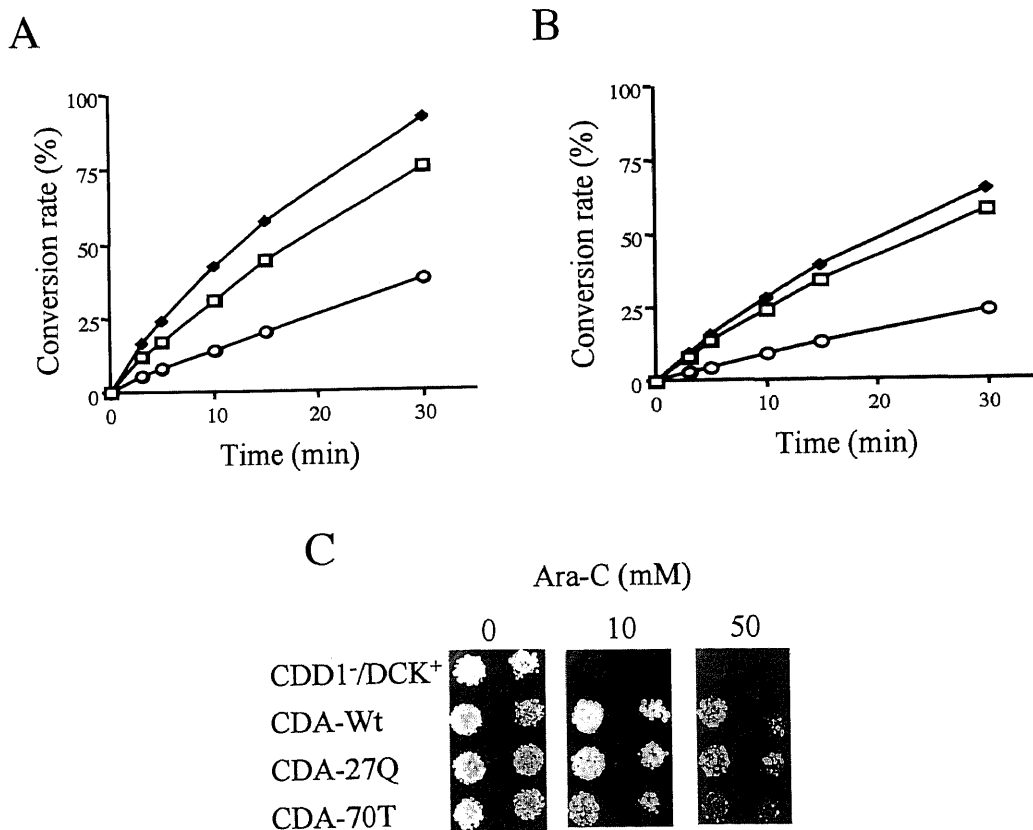


Fig. 4. Comparison of conversion rates (%) of cytidine (A) and ara-C (B) by recombinant HCDA-Wt (□), and HCDA variants [27Q (■), and 70T (○)] expressed in yeast. Cellular extracts from the yeast transformant cells were incubated with 125 μ M substrates for 3, 5, 10, 15, and 30 min. The respective substrates and products were separated through a HPLC column. The representative results were shown using two independent HCDA preparations. (C) Colony formation assays. The diluted transformants (3×10^3 cells and 1×10^3 cells) co-transfected with HCDA or variant HCDA and HDCK were spotted onto SC-Trp-Ura plates containing indicated concentrations of ara-C. The plates were then incubated for 3 days at 30 $^{\circ}$ C, and photographed.

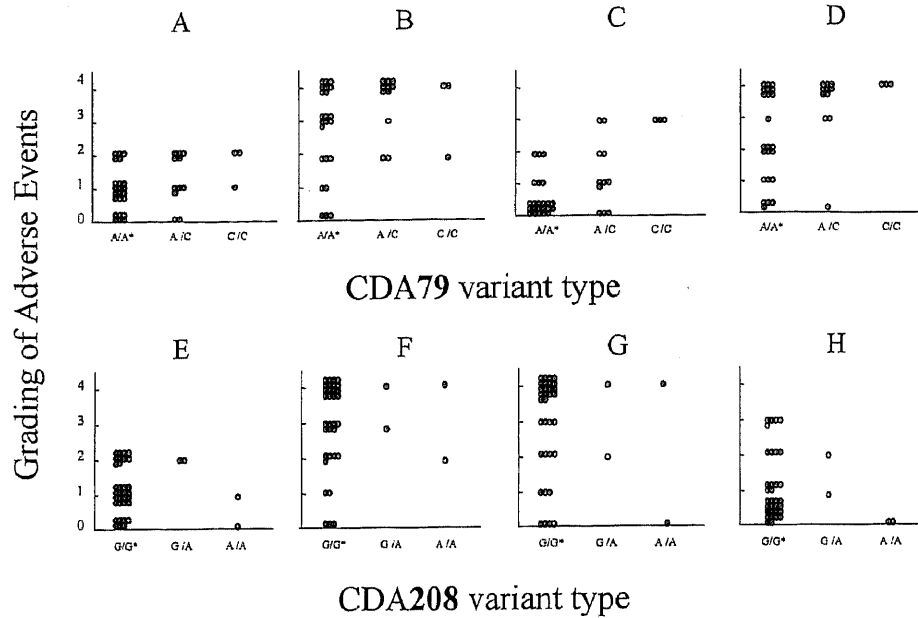


Fig. 5. Ara-C-related adverse events with CDA genotypes. Treatment-related adverse events were graded using Common Toxicity Criteria (CTC, version 2.0) with special criteria for pediatric populations from the Cancer Therapy Evaluation Program (NCI). Adverse events are as follows: Hb. in (A) and (E), leukocytes in (B) and (F), platelets in (C) and (G), serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT)/serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) in (D) and (H).

Table 2. CDA activity determined by HPLC assay and ara-C IC₅₀

	CDA activity ^{a)}		
	Cytidine ^{b)}	Ara-C	IC ₅₀ (μM) ^{d)}
Wt	165 ± 21.8 (100) ^{c)}	54 ± 9.4 (100)	941 ± 58
27Q	190 ± 13.8 (114)	64 ± 6.2 (118)	856 ± 38
70T	78 ± 15.9 ^{d),e)} (47)	20 ± 3.8 ^{d),e)} (37)	757 ± 33 ^{d),e)}

^{a)} Enzyme activity is given as nmol/min/mg protein. Values are $\bar{x} \pm SD$ of three separate experiments measured at 15 min after incubation. ^{b)} substrates; ^{c)} % of control; ^{d)} $P < 0.01$ vs. Wt; ^{e)} $P < 0.01$ vs. 27Q; ^{f)} Ara-C concentration inhibiting the growth of cells by 50% compared with untreated control cells. Values are $\bar{x} \pm SD$ of three independent experiments. ^{g)} $P < 0.05$ vs. 27Q.

を欠失させ、CDD1-null変異株 (YPH499 Δ cdd1) を作成した。次に、原型HCDAとその変異型 (27Qと70T) をこのYPH499 Δ cdd1に遺伝子導入した。なお、酵母はara-Cの活性化に必要なDCKを欠如するため、ヒトDCK-cDNAを同時に遺伝子導入した (図3A)。変異株中のHCDAとHDCKの発現レベルは組み換え蛋白に融合したT7-タグの検出により検定した。図3Bに示すごとく、16 kD、15 kDおよび31 kDの蛋白はそれぞれHCDA、CDD1誘導蛋白およびHDCK蛋白を示している。NIHイメージを用いて発現レベルを定量すると、細胞抽出物に含まれているHCDAあるいはHDCKの信号強度 (10⁶細胞当たり) は変異株間で同一であった。

III. 変異型HCDAの酵素活性

HPLCを用い、シチジン/ara-Cからウリジン/ara-Uへの転換率を測定した。測定には原型HCDAあるいは変異型HCDA

(27Q, 70T) のみを遺伝子導入した酵母からの蛋白抽出物を使用した。シチジンとウリジンおよびara-Cとara-Uの出現ピークはそれぞれ溶出時間の9.4と12.2, 10.9と15.3分であった。基質と転換産物を示すピーク以外にいくつかの小さなピークも種々の溶出時間に観察されたが、これらのピーク強度の和は総強度の10%以下であり、経時的にも明らかな変化は認められなかった。基質との反応時間による酵素活性は15分まで直線的に変化した (図4A, B), したがって、反応時間15分での活性値を比較した。シチジンとara-C基質の異なるKm (ara-CのKmは8倍高い) を反映し、ara-C基質の脱アミノ率はシチジンの1/3であった (表2)。原型HCDAと比較すると、HCDA-70Tのシチジンとara-C基質に対する脱アミノ率はそれぞれ47%と37%であり、有意に低値を示した ($p < 0.01$)。一方、LysからGlnへの変異株 (K27Q) では原型HCDAと比較して、シチジンあるいはara-C基質に対する活性には有意差は認められなかった。

IV. 変異株におけるara-Cの増殖抑制効果

HCDAとHDCKの同時遺伝子導入酵母株のara-Cに対する感受性を細胞増殖抑制効果で判定した。まず、図4Cで示されるごとく、HDCKの導入によりara-C耐性YPH499 Δ cdd1株がara-C感受性の表現型 (CDD1⁻/DCK⁺) に転換し、ara-C活性化におけるDCKの基本的重要性が示された。つぎに、このCDD1⁻/DCK⁺株はHCDAの導入により、ara-C耐性の表現型を獲得した。原型HCDA導入株と比較して、コロニー形成の減少はHCDA-70T導入株において明らかに認められたが、HCDA-27Q株では変化は認められなかった。Ara-C IC₅₀値は液体培養法により測定した (表2)。HCDA-70T株のIC₅₀は757 ± 33 μMであり、原型HCDA株 (941 ± 58 μM) に比較し有意に減少していた ($p < 0.01$)。HCDA-27Q株 (IC₅₀値856 ± 38 μM) ではara-C感受性において有意差は認められなかった。

V. 血液腫瘍患者における ara-C 投与時の副作用の検討

HCDA の遺伝子型により ara-C の投与症例をグループ分けすると、79A/A 23 例、79A/C 11 例、79C/C 3 例、および 208G/G 33 例、208G/A 2 例、208A/A 2 例であった。副作用の発症として、血液障害（血小板減少、白血球減少、ヘモグロビン減少）と肝毒性（トランスアミナーゼ増加）の重症度を評価し、図 5 に示した。多剤併用療法であることから ara-C 単独の反応性や副作用の出現の評価は困難であり、また、ホモ変異症例数が少なく、今回の限られた症例数の検討では統計学的な判断はできなかった。

考 察

本研究では、HCDA の酵素活性保存領域内に A70T の置換を生じる新規 cSNP (G208A) を同定した。従来のヒト^{24,26)}と大腸菌 CDA^{27,28)}の部位特異的変異導入研究は、この保存領域、特に亜鉛結合残基 (Cys-65, Cys-99, および Cys-102) を含む領域を中心に行われてきた。これら残基の一置換は CDA の特異的酵素活性²⁹⁾を完全に失活させることから、この領域の CDA 酵素活性発現における重要性が確認されている。Ala-70 も異種属間で良く保存され^{24,29)}(図 2)、プロトン転換機能において重要と考えられている²⁴⁾ Glu-67 残基の近傍に位置する。こういった構造上の特徴は Ala-70 残基の活性化部位としての重要性を示唆した。本研究では、この Ala-70 残基の置換をもたらし HCDA 遺伝子の G208A 変異が遺伝子多型 (アレル発現率 4.3%) であることを証明した。現在のところ、このアミノ酸置換が酵素活性を低下 (原型 HCDA の 50% 以下) させる機序はなお不明である。疎水性の Ala が比較的親水性の Thr へ置換されることによりこの部位に 2 つの Thr 残基が連続するため、親水特性が増強されるためかもしれない。

本研究ではさらに、HCDA 遺伝子において 2 つの遺伝子変異、A79C^{14)~16)}と T435C¹³⁾のアレル発現率と遺伝子型の分布を明らかにした。コドン 27 をコードするヌクレオチド 79 の遺伝子変異型の存在は HCDA 遺伝子の cDNA クローニング過程で明らかにされた¹⁴⁾¹⁵⁾。事実 79C のアレル変異率は 20.1% であり、この多型は本研究の症例中では優位であった。コドン 27 は N-末端の反応主要領域内に位置している。この領域は亜鉛結合領域と関連して結合ポケットループの形成に関与している可能性が報告されている²⁴⁾。実際、コドン 27 の Lys から Gln への置換により ara-C の脱アミノ活性の低下 (1.3 倍) が Kirch ら¹⁶⁾によって報告されている。しかし、本研究では酵素活性、あるいは ara-C 感受性においてこれら HCDA-27Q 変異では有意な変化は認められなかった。この相違は酵素活性の分析方法におけるいくつかの相異によることが一原因として考えられる。酵母細胞蛋白にはウリジンヌクレオシダーゼとウリジンキナーゼが含まれており、それらは HCDA と同じ基質を競合する³⁰⁾。したがって、これらの酵素によるシチジン基質の消費が、報告¹⁶⁾されたような比較的小さな差違を不明確にした可能性は除外できない。シチジン代謝における HCDA と関連する酵母自身もつ酵素的意義はなお不明である。HPLC 分析法で観察された複数の余剰ピークは、基質とその産物を示すピークに比較してきわめて小さく、したがって転換率算出への影響は少ないと考えられた。

酵母菌属 (*Saccharomyces cerevisiae*) がヒト遺伝子産物の機能解析モデルとして有用な理由は、酵母遺伝子操作が容易であり、酵母染色体上の単一遺伝子の完全削除 (null mutant) が可

能である³¹⁾、ヒトと酵母間で、遺伝子の基本機能が保存されている³¹⁾、最初の真核生物としてそのゲノム全配列が解明されている³²⁾、ことなどである。抗癌剤を開発し、それらの機能メカニズムを分析するためには、薬物の標的遺伝子に関連する突然変異酵母を使うことが成功の秘訣となっている^{31)33)~35)}。酵母におけるシチジン代謝はこれまで検討されてきており³⁰⁾、また酵母では DCK を欠如していることを除いてその代謝系の遺伝子がヒトと酵母との間ではよく保存されている。本研究では以上の利点を考慮して *S. cerevisiae* をモデルとして選択した。この方法を用いて、新しい一塩基置換が生化学的活性の変化と薬剤感受性において機能していること実証した。しかし当然ながら、酵母とヒト細胞の生物学的特性は多くの点において異なっており、酵母で見出された薬剤感受性の変化がヒトの細胞に直接応用することができるかどうかは議論のあるところである。

HCDA はホモ四量体として機能する。したがって、変異 HCDA (70T) サブユニット分子の四量体形成への関与が HCDA の活性に影響する可能性がある。例えば、理論的には原型と変異 HCDA のサブユニットの組み合わせから五種類の四量体のアイソフォームを形成しうる。70T が四量体としての活性部位かあるいは四量体形成そのものに影響を及ぼす場合、HCDA の酵素活性発現においてドミナントネガティブ効果を生じる可能性がある。構造とそれに関連する機能を解明するためには、HCDA の 3 次構造解析を考慮したさらなる検討が必要である。この点に関して、208A 遺伝子型におけるヘテロ接合体とホモ接合体の ara-C 感受性と毒性発現に関しての臨床的検討は重要である。本研究の症例中、208A アレルにおけるヘテロ接合体とホモ接合体は ara-C で治療した 37 人の患者でそれぞれわずか 2 例ずつ発見されたのみであり、HCDA208 遺伝子型と ara-C 関連毒性との間の直接的関連性は統計学的に結論づけられなかった。より多くの臨床的サンプルの蓄積を目的とした大規模な研究が必要である。

治療とそれに関係する遺伝子多型に対する薬物ターゲットを分析する努力は、癌患者一人一人にそれぞれ適した治療を実施するための遺伝子情報を得るためである。本研究では、酵母遺伝子発現システムを有効に利用して、ara-C 治療に感受性の高い亜群の存在を提唱した。このアプローチは痛の治療におけるリスク別プロトコールにおいて、遺伝子学的な薬剤反応性に基づいた治療戦略を確立するための研究の基盤を提供すると考えられる。

結 論

52 例の白血病/悪性リンパ腫と 169 例の対照からの HCDA cDNA を直接シークエンスし、一塩基変異多型を検索した。酵母遺伝子発現システムを用いて、原型 HCDA と変異 HCDA 導入酵母株の ara-C に対する感受性を酵母の増殖抑制法によって測定し、次の結論を得た。

1. CDA 遺伝子の翻訳領域に 3 つの異なる SNP が同定された。
2. 新規 SNP G208A は、HCDA の種属間でよく保存されている代謝活性領域内の Ala を Thr へ置換 (A70T) した。
3. 酵母への変異 HCDA-208A 遺伝子導入により、変異導入酵母株 HCDA-70T の脱アミノ活性が有意に低下し、ara-C への感受性が増加した。
4. HCDA 208 遺伝子型と臨床上的 ara-C 治療の有効性および ara-C 関連毒性との相関性は、臨床サンプル数が少ないため、

本研究では確認できなかった。

5. 以上より、薬剤代謝に関連する遺伝子のSNPの検索およびSNPから誘導される生物学的表現型の変異の解析は、小児悪性腫瘍の治療において、新たな治療学的戦略を提供しうると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました小泉晶一教授ならびに、終始直接懇切なる御教示、御鞭撻賜りました犀川太講師に心から深甚なる謝意を捧げます。また、本研究遂行に際し、御指導御支援を頂きました金沢大学がん研究所腫瘍分子科学研究部門遺伝子染色体構築研究分野伊藤隆司教授、太田一寿助手と皆様、金沢大学がん研究所腫瘍制御研究部門化学療法研究分野佐々木琢磨教授と田中基裕助教授に深謝いたします。さらに、多大なる御協力をいただきました金沢大学医学部小児科学講座の方々に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Lane CR, Lim EP, Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R, Daley GQ, Lander ES. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 22: 231-238, 1999
- 2) Buetow K, Edmonson MN, Cassidy AB. Reliable identification of large numbers of candidate SNPs from public EST data. *Nat Genet* 21: 323-325, 1999
- 3) Ohnishi Y, Tanaka T, Yamada R, Suematsu K, Minami M, Fuji K, Hoki N, Kodama K, Nagata S, Hayashi T, Kinoshita N, Sato H, Kuzuya T, Takeda H, Hori M, Nakamura Y. Identification of 187 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) among 41 candidate genes for ischemic heart disease in the Japanese population. *Hum Genet* 106: 288-292, 2000
- 4) The International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409: 928-933, 2001
- 5) Chabner BA. Cytidine Analogues. *In* Chabner BA, Longo DL (eds). *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, 2nd ed, p213-233, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996
- 6) Vincenzetti S, Cambi A, Neuhaard J, Garattini E, Vita A. Recombinant human cytidine deaminase: expression, purification, and characterization. *Protein Expr Purif* 8: 247-253, 1996
- 7) Watanabe S, Uchida T. Expression of cytidine deaminase in human solid tumors and its regulation by 1-alpha, 25-dihydroxyvitamin D3. *Biochim Biophys Acta* 1312: 99-104, 1996
- 8) Ho DH. Distribution of kinase and deaminase of 1-beta-D-arabinofurano sylcytosine in tissues of man and mouse. *Cancer Res* 33: 2816-2820, 1973
- 9) Ho DH, Frei E, III. Clinical pharmacology of 1- β -D-arabinofuranosyl cytosine. *Clin Pharmacol Ther* 12: 944-954, 1971
- 10) DeAngelis LM, Kres W, Chan K, Dantis E, Akerman S. Pharmacokinetics of ara-C and ara-U in plasma and CSF after high-dose administration. *Cancer Chemother Pharmacol* 29: 173-177, 1992
- 11) Yusa K, Oh-hala T, Tsuro T. Induction of resistance to 1- β -D-arabinofuranosylcytosine in human H9 cell line by simian immuno deficiency virus. *Biochem Biophys Res Commun* 206: 486-491, 1995
- 12) Honma Y, Onozuka Y, Okabe-Kado J, Kasukabe Y, Hozumi M. Hemin enhances the sensitivity of erythroleukemia cells to 1- β -D-arabinofurano sylcytosine by both activation of deoxycytidine kinase and reduction of cytidine deaminase activity. *Cancer Res* 51: 4535-4538, 1991
- 13) Schroder JK, Kirch C, Seeber S, Schutte J. Structural and functional analysis of the cytidine deaminase gene in patients with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 103: 1096-1103, 1998
- 14) Laliberte J, Momparler RL. Human cytidine deaminase: purification of enzyme, cloning, and expression of its complementary DNA. *Cancer Res* 54: 5401-5407, 1994
- 15) Kühn K, Bertling WM, Emmrich F. Cloning of a functional cDNA for human cytidine deaminase (CDD) and its use as a marker of monocyte/macrophage differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 190: 1-7, 1993
- 16) Kirch HC, Schroder J, Hoppe H, Esche H, Seeber S, Schütte J. Recombinant gene products of two natural variants of the human cytidine deaminase gene confer different deamination rates of cytarabine in vitro. *Exp Hematol* 26: 421-425, 1998
- 17) Koizumi S, Fujimoto T, Oka T, Watanabe C, Kikuta A, Tsuchiya T, Matsushita T, Asami K, Yanase T, Mimaya J, Ohta S, Miyake M, Nishikawa K, Furuyama T, Yamaura Y, Takaue Y, Ninomiya T, Shimokawa T, Iwai A, Ishida Y, Ariyoshi N, Kimura K, Gushiken T, Sekine I. Overview of clinical studies of childhood acute lymphoblastic leukemia for more than ten years by the Japanese Children's Cancer Study Group. *Pediatr Hematol Oncol* 14: 17-28, 1997
- 18) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 19) Sikorski RS, Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19-27, 1989
- 20) Gietz D, Jean AS, Woods RA, Schiestl RH. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20: 1425, 1992
- 21) Baudin A, Ozier-Kalogeropoulos O, Denouel A, Lacroute F, Cullin C. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 21: 3329-3330, 1993
- 22) Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75: 805-816, 1993
- 23) Kubota H, Ota K, Sakaki Y, Ito T. Budding yeast GCN1 binds the GI domain to activate the eIF2a kinase GCN2. *J Biol Chem* 276: 17591-17596, 2001
- 24) Betts L, Xiang S, Short SA, Wolfenden R., Carter Jr CW. Cytidine deaminase. The 2·3 A crystal structure of an enzyme: transition-state analog complex. *J Mol Biol* 235: 635-656, 1994
- 25) Cambi A, Vincenzetti S, Neuhaard J, Cossanzi S, Natalini P, Vita A. Identification of four amino acid residues essential for

- catalysis in human cytidine deaminase by site-directed mutagenesis and chemical modifications. *Protein Eng* 11: 59-63, 1998
- 26) Vincenzetti S, Cambi A, Maury G, Bertorelle F, Gaubert G, Neuhard J, Natalini P, Salvatori D, Sanctis GD, Vita A. Possible role of two phenylalanine residues in the active site of human cytidine deaminase. *Protein Eng* 13: 791-799, 2000
- 27) Smith AA, Carlow DC, Wolfenden R, Short SA. Mutations affecting transition-state stabilization by residues coordinating zinc at the active site of cytidine deaminase. *Biochemistry* 33: 6468-6474, 1994
- 28) Carlow DC, Smith AA, Yang CC, Short SA, Wolfenden R. Major contribution of a carboxymethyl group to transition-state stabilization by cytidine deaminase: mutation and rescue. *Biochemistry* 34: 4220-4224, 1995
- 29) Gran C, Boyum A, Johansen RF, Lovhaug D, Seeberg EC. Growth inhibition of granulocyte-macrophage colony-forming cells by human cytidine deaminase requires the catalytic function of the protein. *Blood* 91: 4127-4135, 1998
- 30) Kurtz JE, Exinger F, Erbs P, Jund R. New insights into the pyrimidine salvage pathway of *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of six genes for cytidine metabolism. *Curr Genet* 36: 130-136, 1999
- 31) Hartwell LH, Szankasi P, Roberts CJ, Murray AW, Friend SH. Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science* 278: 1064-1068, 1997
- 32) Mewes HW, Albermann K, Bahr M, Frishman D, Gleissner A, Hani J, Heumann K, Kleine K, Maierl A, Oliver SG, Pfeiffer F, Zollner A. Overview of the yeast genome. *Nature* 387: 7-8, 1997
- 33) Black SM, Beggs JD, Hayes JD, Bartoszek A, Muramatsu M, Sakai M, Wolf R. Expression of human glutathione S-transferases in *Saccharomyces cerevisiae* confers resistance to the anticancer drugs adriamycin and chlorambucil. *Biochem J* 268: 309-315, 1990
- 34) Hille B van, Clerc X, Creighton AM, Hill BT. Differential expression of topoisomerase I and RAD52 protein in yeast reveals new facets of the mechanism of action of bisdioxopiperazine compounds. *Br J Cancer* 81: 800-807, 1999
- 35) Simon JA, Szankasi P, Nguyen Di K, Ludlow C, Dunstan HM, Roberts CJ, Jensen EL, Hartwell LH, Friend SH. Differential toxicities of anticancer agents among DNA repair and checkpoint mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res* 60: 328-333, 2000

Functional analysis of a novel single-nucleotide polymorphism in the human cytidine deaminase gene Lijie Yue, Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **111**, 142 — 151 (2002)

Key words cytidine deaminase, single-nucleotide polymorphism, coding region, yeast expression system, ara-C sensitivity

Abstract

Analyses of drug targets for polymorphism will help to establish gene-based information for the treatment of cancer patients. To test this hypothesis, we attempted to identify and analyze functional single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human cytidine deaminase (HCDA) gene the products of which catalyze inactivation of ara-C. By sequencing cDNA derived from 52 tumor samples with leukemia/lymphoma and 169 blood samples with non-hematological disorder, we have identified three different SNPs in the coding region of the HCDA gene. A novel SNP at position 208 within the conserved catalytic domain of HCDA is a G-to-A transition (G208A) producing an alanine to threonine substitution [A70T]. Two known variants, A79C [K27Q] and T435C [silent] were also defined as SNPs in this study. These SNPs at position 79, 208, and 435 display allelic frequencies of 20.1, 4.3, and 70.1 %, respectively, and were not associated with susceptibility to the disease. Using the yeast expression systems, catalytic activities of the prototype HCDA and variant HCDAs were determined by an HPLC assay. Relative to the prototype HCDA, the HCDA-70T showed 47 and 37 % activity for cytidine and ara-C substrates, respectively ($P < 0.01$). The ara-C IC_{50} value of the yeast carrying HCDA-70T was $757 \pm 33 \mu\text{M}$ and was significantly lower ($p < 0.01$) than that of prototype ($941 \pm 58 \mu\text{M}$). These results indicate that a subpopulation with 208A homozygous genotype in the HCDA gene is potentially more sensitive to ara-C treatment than prototype. Accumulation of SNPs in the genes responsible for drug metabolism and determination of SNP-induced biological variations could provide the additional therapeutic strategies in risk-stratified protocols for the treatment of childhood malignancies.