

博士論文

フッ化ピリミジン系抗がん剤代謝酵素の 遺伝子多型バリエーションにおける機能変化 及び分子メカニズムの解明

平成 29 年度

東北大学大学院薬学研究科

医療薬学専攻

菱沼 英史

略語表

本文中及び図表中に次の略語を用いた。

5-FU	5-Fluorouracil
β -UP	β -ureidopropionase
β UPA	β -ureidopropionic acid
CBB	Coomassie brilliant blue
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DHP	Dihydropyrimidinase
DPD	Dihydropyrimidine dehydrogenase
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	Ethidium bromide
FAD	Flavin adenine dinucleotide
FMN	Flavin mononucleotide
FUH ₂	5-Fluorodihydrouracil
FUPA	α -fluoro- β -ureidopropionic acid
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
I.S.	Internal standard
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
NADPH	β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced
PBS	Phosphate-buffered saline

PCR	Polymerase chain reaction
PVDF	Polyvinylidene difluoride
S.D.	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis
SDM	Site-directed mutagenesis
TBS	Tris-buffered saline
TE	Tris-EDTA buffer
TOP10	One Shot TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>
Tris-HCl	Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride
Tween 20	Polyoxyethylene sorbitan monolaurate
U	Uracil
U- ¹⁵ N ₂	Uracil- ¹⁵ N ₂
UH ₂	5,6-Dihydrouracil
UV	Ultraviolet
XL1-Blue	XL1-Blue Supercompetent Cells
XL10-Gold	XL10-Gold Ultracompetent Cells

目次

緒言	1
第一章 21 種の DPD バリエントの機能変化解析と分子メカニズムの解明	
第一節 序論	4
第二節 <i>DPYD</i> バリエント発現プラスミドの作製	7
第三節 DPD 補因子の DPD 発現及び酵素活性に対する影響	12
第四節 ヒト胎児腎臓由来 293FT 細胞株を用いた DPD バリエントの発現	13
第五節 U を用いた DPD バリエント酵素の機能評価	15
第六節 5-FU を用いた DPD バリエント酵素の機能評価	19
第七節 Blue native-PAGE による DPD 二量体形成の確認	23
第八節 考察	25
第二章 21 種の DHP バリエントの機能変化解析と分子メカニズムの解明	
第一節 序論	45
第二節 <i>DPYS</i> バリエント発現プラスミドの作製	48
第三節 ヒト胎児腎臓由来 293FT 細胞株を用いた DHP バリエントの発現	60
第四節 UH_2 を用いた DHP バリエント酵素の機能評価	62
第五節 FUH_2 を用いた DHP バリエント酵素の機能評価	65
第六節 Blue native-PAGE による DHP 多量体形成の確認	68
第七節 DHP バリエントの安定性の検討	70
第八節 DHP の分解に対するオートファジー系の関与	72
第九節 DHP の分解に対するプロテアソーム系の関与	74
第十節 考察	76

総括	87
実験材料	90
実験方法	
第一章関連実験	98
第二章関連実験	109
謝辞	126
参考文献	128

緒言

フッ化ピリミジン系抗がん剤（FP 剤）は 5-Fluorouracil（5-FU）を活性本体とするピリミジン代謝拮抗薬であり、胃がん、大腸がん、肝臓がん、乳がん、肺がんなどの様々な固形がんの治療や再発予防に用いられる[1-4]。多くの抗がん剤は正常細胞に対しても毒性を発揮するため、抗がん剤治療では様々な副作用発現を伴う場合が多い[5, 6]。特にフッ化ピリミジン系抗がん剤においては、約 10-30%の患者に重篤な副作用として、骨髄抑制、口内炎、嘔吐、下痢、手足症候群などが生じる[7-12]。2016 年の厚生労働省患者調査において、日本のがん患者全 160 万人のうち、FP 剤が適応となる胃がん、大腸がん、肝臓がん、肺がん、乳がん患者がその約半数を占めており、さらに、FP 剤が治療の中心となる胃がん及び大腸がん患者は合計で約 45 万人と推計されている[13]。重篤な副作用発現は患者にとって負担となるだけでなく、重篤化して死に至る場合もあるため、治療開始前に患者個々における副作用発現リスクを予測することは、治療関連死の回避や最適な薬剤選択を行うために極めて重要であると考えられる[14]。

投与された 5-FU は生体内でその約 80%以上が 3 段階のピリミジン異化代謝を受けて排泄される (Fig. 1) [15-17]。まず、主に肝臓に発現している Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) による還元反応を受け、続く Dihydropyrimidinase (DHP) 及び β -ureidopropionase (β -UP) による加水分解反応により分解される。DPD と DHP の反応は可逆的であるが、生体内環境においては正反応が優位である[18, 19]。これらの反応は 5-FU の唯一の分解経路であり、内因性ピリミジン塩基であるウラシル (U) の分解経路と同一である。

これまでに FP 剤投与による重篤な副作用が発現した患者において、DPD 及び DHP の遺伝子多型が報告されており、特に酵素活性の低下を誘引する一部の遺伝子多型が重篤な副作用発現の一因となることが知られている[20-23]。これらの酵素活性の低下は主に遺伝子多型に伴う

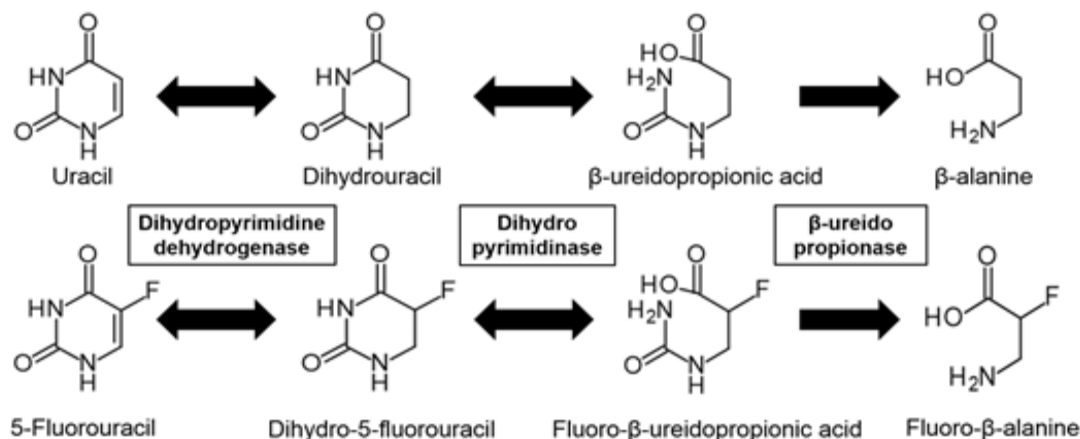


Fig. 1. Catabolic pathway of uracil (U) and 5-fluorouracil (5-FU). U and 5-FU are inactivated by dihydropyrimidine dehydrogenase, dihydropyrimidinase, and β -ureidopropionase. β -Alanine and fluoro- β -alanine are the final metabolites in this pathway.

アミノ酸配列の置換や欠失によって生じ、DPD 活性が欠損している患者では血中 5-FU の上昇が[24]、DHP 活性が欠損している患者では血中フルオロジヒドロウラシル (FUH₂) の上昇が認められ、副作用発現に繋がると考えられている[25, 26]。

特に DPD に関して、いくつかの遺伝子多型は FP 剤による重篤な副作用発現を予測するゲノムマーカーとなることが欧米人における解析で明らかになっている[27, 28]。しかし、遺伝子多型の位置や頻度には人種差が存在し、現在までに日本人集団で有用性の高い遺伝子多型マーカーの報告はほとんどない。したがって、5-FU 投与患者の副作用発現の予測精度を向上させるためには、日本人集団に存在する低頻度遺伝子多型に由来するバリエーション酵素を含めた網羅的な機能解析が必要であると考えられる。近年、東北大学・東北メディカル・メガバンク機構による大規模な全ゲノム解析により、低頻度であるが故にこれまでに見落とされてきたバリエーションも多く同定されており、これらの低頻度バリエーションの中に日本人特有の副作用発現予測ゲノムマーカーとなり得るバリエーションが存在する可能性がある[29]。

本研究では、日本人 1,070 人の全ゲノム解析等で同定された 21 種の *DPYD* 遺伝子多型に由来する DPD バリエーション及びこれまでに酵素機能解明が不十分な既報の 21 種の DHP バリエーションを対象とし、酵素タンパク質の機能変化を網羅的に解析し、その分子メカニズムを明らかにする系を構築することで、FP 剤の副作用発現を予測する研究基盤の構築を行うことを目的と

した。DPD や DHP の遺伝子多型が FP 剤の薬物動態に与える影響の大きさを明らかにするためには、実際にそれぞれの遺伝子型を有するヒトに FP 剤を投与し、血中や尿中の代謝物濃度を *in vivo* で評価することが最も直接的な方法である。しかしながら、この方法は FP 剤投与に伴う副作用発現のリスクがあり、採血などによる侵襲性も高く、また頻度の非常に低い遺伝子多型を有する被検者をリクルートすることが難しいため、*in vivo* 臨床研究を実際に行うのは極めて困難である。一方で、cDNA による組換えタンパク質発現系を用いた *in vitro* 実験は、そのような問題を生じることなく、低頻度の遺伝子多型による影響も解析が容易になるため、*in vivo* 試験を補完する意味でも非常に有用であると考えられる。そこで本研究では、第一章において DPD バリエント、第二章において DHP バリエントの酵素タンパク質発現系を構築し、それぞれのバリエント酵素の機能変化とその分子メカニズムの解明を行った。

第一章 21 種の DPD バリエントの機能変化解析と分子メカニズムの解明

第一節 序論

DPD は *DPYD* 遺伝子にコードされており、ピリミジン異化代謝経路の一段階目の還元反応を触媒する律速酵素である。*DPYD* 遺伝子は第 1 番染色体上に存在し、3078 bp の Open-reading frame からなる[30]。DPD はほとんど全身の細胞に発現しているが、特に肝臓及びリンパ球での活性が高い[31]。細胞内では可溶性画分に存在しており、生体内基質であるウラシル (U) 及びチミン、抗がん剤である 5-FU の還元反応を触媒する。

DPD の遺伝的欠損症は常染色体劣性遺伝形式をとり[32]、臨床症状としては痙攣、精神発達障害、小頭症、自閉症から無症状まで個人差が大きい[33-35]。特に無症状の場合、FP 剤による抗がん剤治療開始後に重篤な副作用が発現することによって、DPD 欠損症が発見される場合があり、薬物療法前に副作用の発現リスクを予測することは非常に重要である[36-40]。

DPYD 遺伝子には、現在まで 100 種類以上のバリエントアレルが同定されており[28, 41-50]、白人種においては FP 剤の副作用予測マーカーとして c.1905+1G>A (IVS14+1G>A、*DPYD**2A)、c.1679T>G (*DPYD**13、I560S)、c.1129-5923C>G/hapB3 及び c.2846A>T (D949V) の 4 種の *DPYD* リスクバリエントが報告されている[51, 52]。これらはスプライシング異常やアミノ酸置換によって DPD 酵素活性が低下するとされており[34, 53-56]、米国の研究者を中心に創設された Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) において、*DPYD* 遺伝子多型に基づいた最適投与量のガイドラインが設定されている[57-60]。しかしながら、*DPYD* の遺伝子多型の位置や頻度には人種差が存在し、これら 4 種類のバリエントは日本人を含めアジア人種においては同定されていない[34, 61]。したがって、日本人集団において、FP 剤による副作用発現を予測するためには日本人集団に特有のゲノムマーカーの同定が必要であると考えられる。

近年、東北大学・東北メディカル・メガバンク機構が実施した日本人を対象とする 1,070 人

の全ゲノム配列解析において、低頻度の多型も含めた 21 種類の *DPYD* 遺伝子多型が同定されたが、新規に同定された多型が多く、これらの多型に由来するバリエーション酵素の機能変化や 5-FU による副作用発現との関連については未だ明らかにされていない (Table 1)。これらのバリエーションの中には、これまで低頻度であるが故に見落とされてきたが、日本人集団において FP 剤による副作用発現の原因になり得るバリエーションがあると考えられる。そこで本章では、大規模全ゲノム解析で同定された 21 種の *DPYD* 遺伝子多型に由来する DPD バリエーションの機能変化について網羅的に解析することで、日本人集団における FP 剤による副作用発現の予測マーカー同定に繋がるような DPD 機能解析系の研究基盤の構築を目的とした。

Table 1. *DPYD* variants identified in 1,070 Japanese population

dbSNP rsID	Location	Nucleotide change	Amino acid substitution	Frequency (%)
–	Exon 2	74A>G	H25R	0.047
–	Exon 5	325T>A	Y109N	0.23
rs200562975	Exon 5	451A>G	N151D	0.14
rs2297595	Exon 6	496A>G	M166V	2.24
rs371792178	Exon 6	524C>T	S175L	0.047
–	Exon 9	893C>T	T298M	0.047
–	Exon 9	937G>T	V313L	0.047
–	Exon 10	1003G>A	V335M	0.19
–	Exon 10	1097G>C	G366A	0.047
–	Exon 11	1139C>T	A380V	0.047
–	Exon 11	1150A>G	K384E	0.047
–	Exon 11	1300G>C	V434L	0.047
rs148994843	Exon 13	1543G>A	V515I	0.047
rs1801159	Exon 13	1627A>G (<i>DPYD</i> *5)	I543V	25.68
rs59086055	Exon 14	1774C>T	R592W	0.047
rs1801160	Exon 18	2194G>A (<i>DPYD</i> *6)	V732I	1.82
rs56005131	Exon 19	2303C>A	T768K	2.20
–	Exon 19	2420A>G	H807R	0.047
–	Exon 20	2476G>A	V826M	0.14
rs188052243	Exon 21	2678A>G	N893S	0.19
–	Exon 22	2777G>T	G926V	0.047

第二節 *DPYD* バリエント発現プラスミドの作製

2-1. DPD バリエント発現エントリークローンの作製

野生型 *DPYD* の cDNA 配列が挿入されたエントリークローン (pENTR/D-TOPO 中に挿入) を鋳型として、21 種類の DPD バリエント発現エントリークローンを作製した。それぞれの塩基置換の導入は Table 2 に示したプライマーセットを用いて、Site-directed mutagenesis (SDM) 法により行った。得られた PCR 産物は、鋳型 DNA を *DpnI* により選択的に消化後、コンピテントセル (XL10-Gold) にトランスフォーメーションし、カナマイシン含有培地で培養した。それぞれのエントリークローンに対してサンガーシーケンス法により塩基置換の導入を確認した。

2-2. DPD バリエント発現クローンの作製

得られた発現エントリークローンは Gateway システム (Life Technologies) を利用した LR 組み換え反応により、哺乳動物細胞発現ベクターである pcDNA3.4 に乗せ換えた。反応産物をコンピテントセル (TOP10) にトランスフォーメーションし、アンピシリン含有培地で培養した。部位特異的組み換え反応によって生成した DPD バリエント発現クローンはサンガーシーケンス法により *DPYD* cDNA の両末端からベクターの配列にかけての塩基配列を確認し、エントリーベクターから発現ベクターへ目的部位以外の塩基置換等のエラーがなく組み換えられていることを確認した。

Table 2. Primers used for the site-directed mutagenesis.

Primer	Amino acid	Nucleotide change	Forward primer (5′–3′)	Reverse primer (5′–3′)
No.	change			
P1	H25R	74A>G	TCCTCGAACACAAACTC <u>G</u> TGCAACTCTGTGTTCCA	TGGAACACAGAGTTGCAC <u>G</u> AGTTTGTGTTTCGAGGA
P2	Y109N	325T>A	CACAAGTATTGCAAACAAGAAC <u>A</u> ATTATGGAGCTGC TAAGATGAT	ATCATCTTAGCAGCTCCATAAT <u>T</u> GTTCTTGTTTGCAA TACTTGTG
P3	N151D	451A>G	CTGAAGAGGGACCCATT <u>G</u> ATATTGGTGGATTGCAG	CTGCAATCCACCAATAT <u>C</u> AATGGGTCCCTCTTCAG
P4	M166V	496A>G	GCTACTGAGGTATTCAAAGCAG <u>T</u> GAGTATCCCACAG ATC	GATCTGTGGGATACTCA <u>C</u> TGCTTTGAATACCTCAGTA GC
P5	S175L	524C>T	CCCACAGATCAGAAATCCTT <u>T</u> GCTGCCTCCCC	GGGGAGGCAGC <u>A</u> AAGGATTTCTGATCTGTGGG

P6	T298M	893C>T	GCCATCTTCCAAGGCCTGA <u>T</u> GCCAGGACCAG	CTGGTCCTGC <u>A</u> TCAGGCCTTGGGATGGC
P7	V313L	937G>T	ACATCCAAAGACTTTTTGCCACTTT <u>T</u> TAGCCAAAGGC	CTGCCTTTGGCTA <u>A</u> AAGTGGCAAAAAGTCTTTGGAT
			AG	GT
P8	V335M	1003G>A	CATCGATACGGGGAGTC <u>A</u> TGATTGTACTTGGAGCT	AGCTCCAAGTACAATCA <u>T</u> GACTCCCCGTATCGATG
P9	G366A	1097G>C	GTGTTCA ^{TC} GTCTTCAGAAAAG <u>C</u> CTTTGTTAATATAA	GACAGCTCTTATATTAACAAAG <u>G</u> CTTTTCTGAAGAC
			GAGCTGTC	GATGAACAC
P10	A380V	1139C>T	CCTGAGGAGATGGAACCTG <u>T</u> TAAGGAAGAAAAGTG	TTCACACTTTTCTTCCTTA <u>A</u> CAAGTTCCATCTCCTCA
			TGAA	GG
P11	K384E	1150A>G	GATGGAACTTGCTAAGGAAGA <u>A</u> GAGTGTGAATTTCT	GAATGGCAGAAATTCACACT <u>C</u> TTCTTCCTTAGCAAG
			GCCATTC	TTCCATC

P12	V434L	1300G>C	TCTGAAAGCCGATGTG <u>C</u> TCATCAGTGCCTTTGG	CCAAAGGCACTGATGAG <u>C</u> ACATCGGCTTTCAGA
P13	V515I	1543G>A	CACAATATGGAGCTTCC <u>A</u> TTTCTGCCAAGCCTGAA	TTCAGGCTTGGCAGAAA <u>T</u> GGAAGCTCCATATTGTG
P14	I543V	1627A>G	GAAATGGCCGGATTGAAGTTT <u>G</u> TAAATCCTTTTGGT	TAGCAAGACCAAAAGGATTTA <u>C</u> AAACTTCAATCCGG
			CTTGCTA	CCATTTC
P15	R592W	1774C>T	CCCCCAGAATCATC <u>T</u> GGGGAACCACTCT	AGAGGTGGTTCCCC <u>A</u> GATGATTCTGGGGG
P16	V732I	2194G>A	GGTGGTGCCAATGGC <u>A</u> TTACAGCCACCAACA	TGTTGGTGGCTGTAA <u>T</u> GCCATTGGCACCACC
P17	T768K	2303C>A	ACATATGGAGGAGTGTCTGGGA <u>A</u> AGCAATCAGACC	GGTCTGATTGCT <u>T</u> TCCCAGACACTCCTCCATATGT
P18	H807R	2420A>G	GGTCTTCAGTTTCTCC <u>G</u> TAGTGGTGCTTCCGTC	GACGGAAGCACCCTA <u>C</u> GGAGAAACTGAAGACC
P19	V826M	2476G>A	AGTGCCATTCAGAATCAGGATTTCACT <u>A</u> TGATCGAA	GTAGTCTTCGATCA <u>T</u> AGTGAAATCCTGATTCTGAATG
			GACTAC	GCACT

P20	N893S	2678A>G	AGCGCAAGAAAATCATAGCAGAA <u>AG</u> CAAGATTAGA	GTTCTTTCAGTCTAATCTTG <u>CT</u> TTTCTGCTATGATTTTC
			CTGAAAGAAC	TTGCGCT
P21	G926V	2777G>T	TACCATCAAGGATGTAATAG <u>T</u> AAAAGCACTGCAGTA	CAAGGTACTGCAGTGCTTTT <u>ACT</u> TATTACATCCTTGAT
			CCTTG	GGTA

The under-lined sequence in the primer indicates the position of the nucleotide change positions.

第三節 DPD 補因子の DPD 発現及び酵素活性に対する影響

DPD バリエーションの酵素機能変化を解析する系の構築に当たり、DPD の補因子が DPD の発現及び活性に与える影響を検討した。DPD は分子内に鉄-硫黄[4Fe-4S]クラスターをもつフラビン酵素タンパク質である[20, 62, 63]。補因子である鉄の供給源として Ammonium ferric citrate、硫黄の供給源として Sodium sulfide 及びフラビン酵素に必要とされる Flavin adenine dinucleotide (FAD) 及び Flavin mono nucleotide (FMN) を、ヒト胎児腎細胞由来 293FT 細胞に対する野生型 DPD 発現ベクターのトランスフェクション 6 時間後に添加した。得られた DPD タンパク質を含む S9 画分及び可溶性画分を用いて SDS-PAGE 後のイムノブロットによりタンパク質の発現を確認し、併せて酵素活性を測定することで、補因子の活性に対する影響を評価した。また、タンパク質非変性状態で行う Blue native-PAGE 後のイムノブロットにより多量体形成への影響も検討した。

その結果、補因子無添加群と比較して 50 μ M の U を代謝させた場合、代謝物である UH₂ の生成量は補因子添加群で高かった (Fig. 2A)。また、SDS-PAGE 後のイムノブロットでは補因子の有無に関わらず DPD の発現が確認されたが、Blue native-PAGE 後のイムノブロットにおいては補因子を添加した場合にのみ、242 kDa 付近に DPD の二量体と推察されるバンドが検出された (Fig. 2B、2C)。

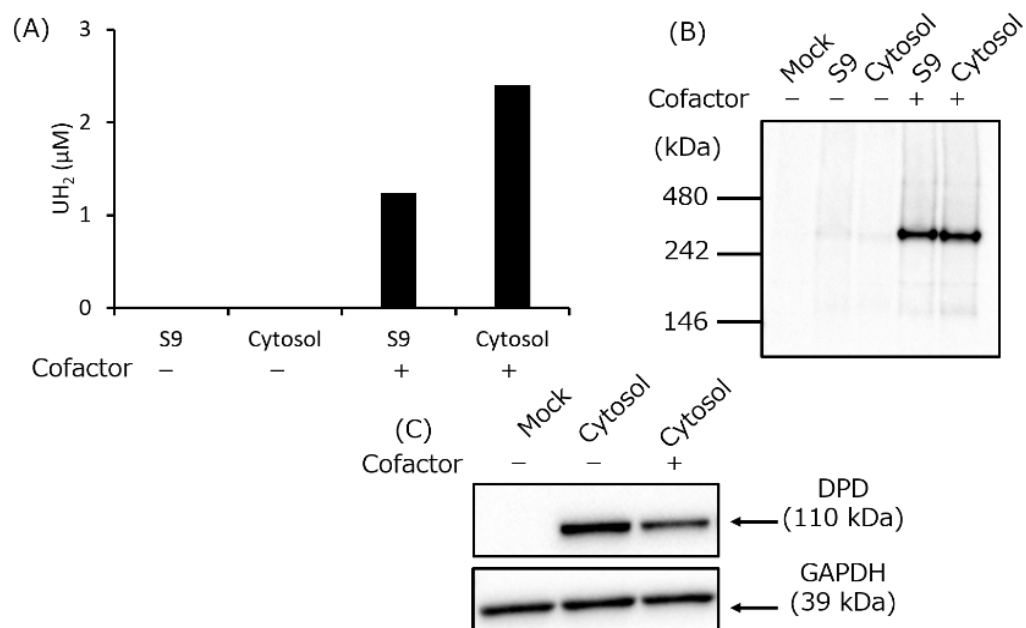


Fig. 2. (A) DPD activity with or without cofactors were determined at 50 μ M uracil. (B) DPD proteins in 293FT cells with or without cofactors were determined through blue native-PAGE and immunoblotting analysis. (C) DPD proteins in 293FT cells with or without cofactors were determined through SDS-PAGE and immunoblotting analysis.

第四節 ヒト胎児腎臓由来 293FT 細胞株を用いた DPD バリエーションの発現

293FT 細胞を用いて野生型及びバリエーション DPD を一過性に発現させた。70%以上コンフルエントの状態となった細胞に、リポフェクション法で野生型及びバリエーション DPD 発現プラスミド DNA を導入し6時間培養した。その後、DPD の補因子の供給源として、Sodium sulfide、Ammonium ferric citrate、FAD 及び FMN を添加し、42 時間培養した。なお、トランスフェクション効率補正のため、pCMV6-lacZ 発現プラスミドを同時に導入し、 β -galactosidase を共発現させた。次に、回収した細胞から遠心分離法により可溶性画分を調製した。画分中の DPD 発現量は、抗ヒト DPD ポリクローナル抗体を用いたイムノブロット法により確認した。

その結果、発現させた全てのバリエーション DPD において、DPD の分子量である 110 kDa 付近に抗ヒト DPD 抗体と特異的に反応するタンパク質が検出された (Fig. 3A)。また、DPYD cDNA 発現ベクターを導入していない 293FT 細胞の可溶性画分では抗ヒト DPD 抗体と反応するタンパク質は認められなかった。全ての DPD 含有可溶性画分及びコントロール可溶性画分間において、内在性コントロールとして用いた GAPDH の発現量は同程度であった。野生型 DPD タンパク質発現可溶性画分 10 μ g の DPD 発光強度を 1 Unit として Unit 換算することで DPD の発現量とした (Fig. 3B)。Y109N、T298M 及び V313L の DPD バリエーションにおいては有意に発現量が上昇した。また、H25R の DPD バリエーションは有意に発現量が低下した。

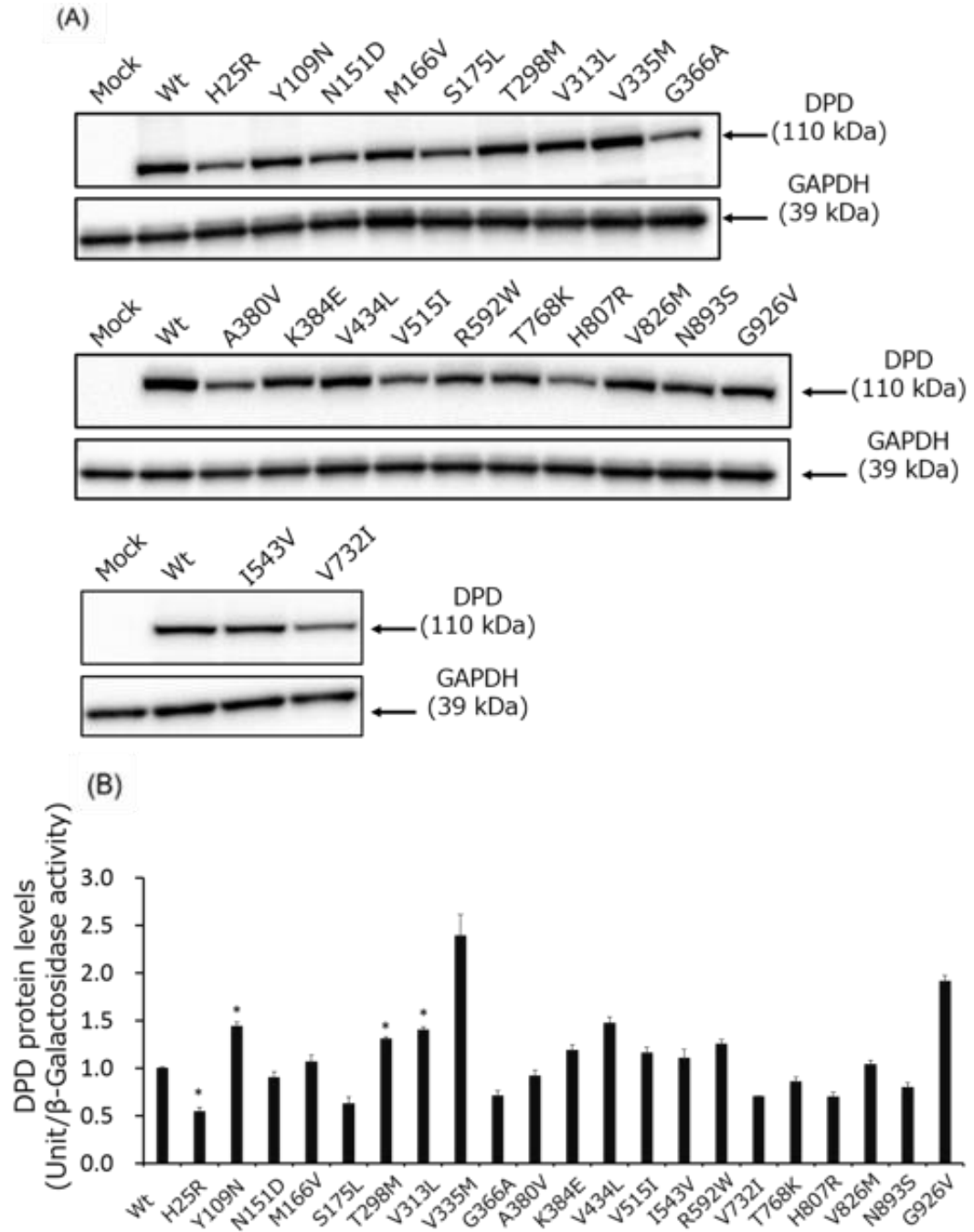


Fig. 3. Expression levels of wild-type and variant DPD proteins. (A) DPD protein levels were determined through SDS-PAGE and immunoblotting analysis. (B) DPD expression levels were normalized relative to β -galactosidase activity in 293FT cells. Bars represent means \pm SD of three independent assays. * $P < 0.05$ compared to wild-type DPD.

第五節 U を用いた DPD バリエント酵素の機能評価

野生型及び各 DPD バリエント酵素を発現させた 293FT 細胞の可溶性画分 50 μg に対して、0.1~20 μM の U を加えて 37°C で 30 分間 *in vitro* 代謝させた。生成物である UH_2 を LC-MS/MS により定量し、各 DPD バリエントの酵素反応速度論的パラメータを算出した。なお、U 還元反応の V_{\max} 及び固有クリアランス CL_{int} はイムノブロット法により換算した DPD Unit により補正した。

G926V を除く 21 種のバリエントで、Michaelis-Menten の式に従うキネティックカーブが得られた (Fig. 4)。G926V の DPD バリエントでは酵素活性の消失が認められた。各バリエントの U 還元反応の酵素反応速度論的パラメータを Table 3 に示した。N151D、M166V、S175L、T298M、V313L、V335M、G366A、A380V、V434L、V515I、I543V、R592W、V732I、H807R 及び V826M の 15 種のバリエントで V_{\max} の低下が認められたが、 CL_{int} については有意な差は認められなかった。

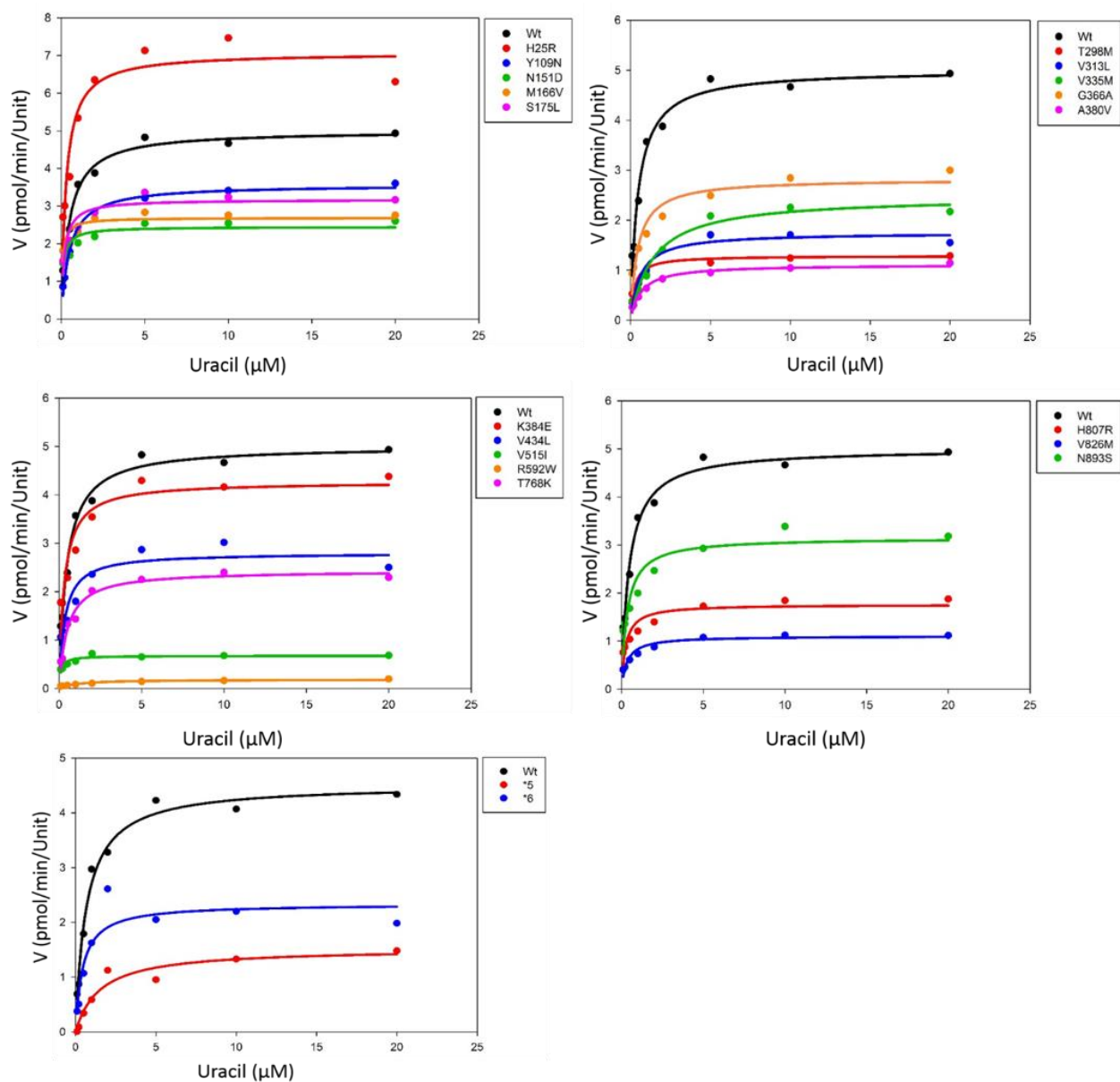


Fig. 4. Michaelis-Menten curves of DPD variants. The kinetic parameters K_m , V_{max} , and intrinsic clearance of U reduction were determined.

Table 3. Kinetic parameters of DPD variant mediated uracil metabolism

Variants	K_m (μ M)	V_{max} (pmol/min/Unit)	CL_{int} (V_{max}/K_m)(μ L/min/Unit)	% of Wild-type CL_{int}
Wild type	0.75 ± 0.27	4.58 ± 0.20	6.89 ± 3.36	100.00
H25R	0.51 ± 0.14	6.05 ± 0.34	12.67 ± 4.06	183.89
Y109N	0.66 ± 0.33	3.38 ± 0.99	5.78 ± 2.22	83.89
N151D	0.77 ± 0.24	1.50 ± 0.20 ***	2.04 ± 0.55	29.61
M166V	0.71 ± 0.27	1.35 ± 0.11 ***	2.10 ± 0.86	30.48
S175L	0.38 ± 0.05	2.51 ± 0.19 **	6.61 ± 0.36	95.94
T298M	0.70 ± 0.04	0.92 ± 0.02 **	1.31 ± 0.07	19.01
V313L	0.90 ± 0.41	1.62 ± 0.08 **	2.02 ± 0.71	29.32
V335M	2.35 ± 0.06	2.16 ± 0.07 *	0.92 ± 0.05	13.35
G366A	1.15 ± 0.08	2.44 ± 0.04 *	2.13 ± 0.16	30.91
A380V	1.05 ± 0.15	1.02 ± 0.07 ***	0.97 ± 0.09	14.08
K384E	1.01 ± 0.12	3.33 ± 0.26	3.35 ± 0.68	48.62
V434L	0.74 ± 0.08	2.34 ± 0.12 **	3.17 ± 0.39	46.01
V515I	0.74 ± 0.04	0.29 ± 0.02 **	0.39 ± 0.01	5.66
I543V (DPYD*5)	1.53 ± 0.29	1.53 ± 0.16 ***	1.04 ± 0.30	15.09
R592W	2.85 ± 0.27 *	0.18 ± 0.01 **	0.06 ± 0.01	0.91
V732I (DPYD*6)	0.46 ± 0.05	2.34 ± 0.20 **	5.20 ± 0.96	75.47
T768K	0.71 ± 0.07	2.20 ± 0.49	3.09 ± 0.37	44.85

H807R	0.92 ± 0.28	1.41 ± 0.15 ***	1.61 ± 0.36	23.37
V826M	0.77 ± 0.07	0.92 ± 0.04 **	1.21 ± 0.15	17.56
N893S	1.47 ± 0.55	2.52 ± 0.37	1.86 ± 0.58	27.00

These data represent the mean \pm SD of three independently performed catalytic assays.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.005$ compared to wild-type DPD.

The kinetic parameters of G926V could not be determined because the enzymatic activity was not detected at the highest substrate concentration assayed (20 μ M uracil).

第六節 5-FU を用いた DPD バリエント酵素の機能評価

野生型及び各 DPD バリエント酵素を発現させた 293FT 細胞の可溶性画分 50 μg に対して、0.1~20 μM の 5-FU を加えて 37°C で 30 分間 *in vitro* 代謝させた。生成物である FUH₂ を LC-MS/MS により定量し、各 DPD バリエントの酵素反応速度論的パラメータを算出した。なお、5-FU 還元反応の V_{max} 、及び固有クリアランス CL_{int} はイムノプロット法により換算した DPD Unit により補正した。

U 還元活性と同様に、G926V を除く 21 バリエントで、Michaelis-Menten の式に従うキネティックカーブが得られた (Fig 5)。G926V の DPD バリエントでは活性の消失が認められた。各バリエントの 5-FU 還元反応の酵素反応速度論的パラメータを Table 4 に示した。H25R では CL_{int} の有意な上昇が認められた。また、T298M、V313L、V335M、A380V、V434L、V515I、R592W、T768K、H807R 及び V826M の 10 種のバリエントでは CL_{int} の有意な低下が認められた。

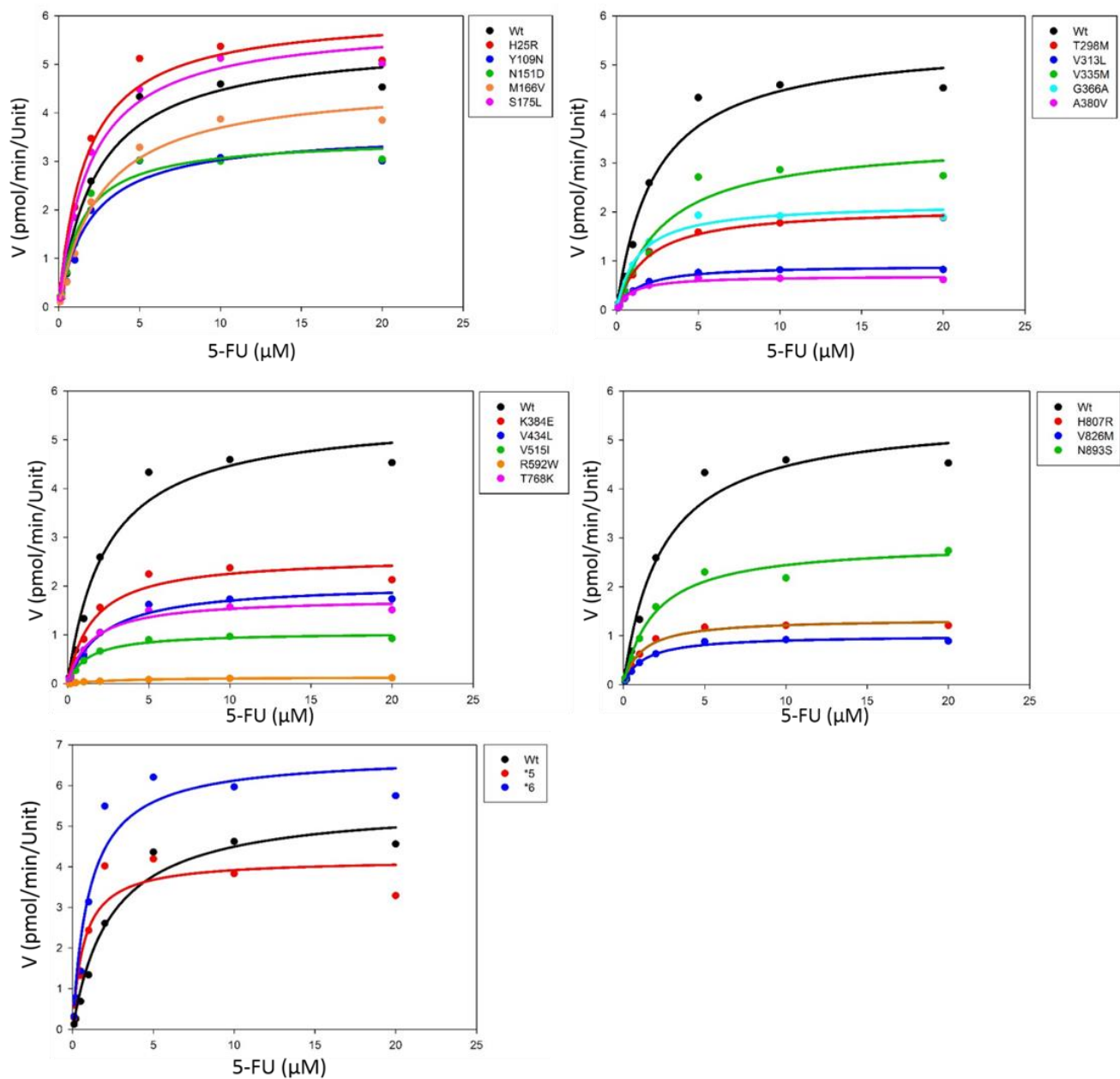


Fig. 5. Michaelis-Menten curves of DPD variants. The kinetic parameters K_m , V_{max} , and intrinsic clearance of 5-FU reduction were determined.

Table 4. Kinetic parameters of DPD variant mediated 5-fluorouracil metabolism

Variants	K_m (μM)	V_{max} (pmol/min/Unit)	CL_{int} (V_{max}/K_m)($\mu\text{L}/\text{min}/\text{Unit}$)	% of Wild-type CL_{int}
Wild type	2.37 ± 0.24	5.53 ± 0.40	2.34 ± 0.15	100.00
H25R	1.67 ± 0.13	6.07 ± 0.29	3.64 ± 0.16 *	155.87
Y109N	1.97 ± 0.05	3.63 ± 0.09	1.84 ± 0.06	78.91
N151D	1.44 ± 0.26	3.50 ± 0.32	2.50 ± 0.59	107.10
M166V	2.59 ± 0.26	4.65 ± 0.11	1.81 ± 0.14	77.25
S175L	1.95 ± 0.34	5.89 ± 0.40	3.05 ± 0.32	130.61
T298M	1.80 ± 0.06	2.10 ± 0.08 *	1.17 ± 0.03 *	50.00
V313L	1.32 ± 0.15	0.92 ± 0.01 *	0.70 ± 0.08 **	30.07
V335M	2.92 ± 0.17	3.50 ± 0.20	1.20 ± 0.14 *	51.49
G366A	1.30 ± 0.08	2.18 ± 0.01 *	1.68 ± 0.09	71.92
A380V	0.88 ± 0.09	0.70 ± 0.03 *	0.79 ± 0.05 *	33.91
K384E	1.57 ± 0.08	2.61 ± 0.15	1.66 ± 0.06	70.85
V434L	2.13 ± 0.12	2.06 ± 0.05 *	0.97 ± 0.07 *	41.56
V515I	1.25 ± 0.08	1.06 ± 0.04 *	0.84 ± 0.03 *	36.04
I543V (DPYD*5)	2.01 ± 0.18	4.79 ± 0.20	2.38 ± 0.18	101.78
R592W	3.50 ± 0.43	0.14 ± 0.01 *	0.04 ± 0.00 *	1.73
V732I (DPYD*6)	2.85 ± 0.46	7.51 ± 0.45	2.67 ± 0.35	114.10
T768K	1.46 ± 0.07	1.76 ± 0.07 *	1.20 ± 0.03 *	51.46

H807R	1.10 ± 0.04	1.35 ± 0.07 *	1.23 ± 0.10 *	52.57
V826M	1.22 ± 0.12	1.01 ± 0.08 *	0.83 ± 0.03 *	35.58
N893S	1.92 ± 0.28	2.91 ± 0.15 *	1.53 ± 0.19	65.65

These data represent the mean ± SD of three independently performed catalytic assays.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.005$ compared to wild-type DPD.

The kinetic parameters of G926V could not be determined because the enzymatic activity was not detected at the highest substrate concentration assayed (20 μ M 5-fluorouracil).

第七節 Blue native-PAGE による DPD 二量体形成の確認

発現 DPD タンパク質を含む可溶性画分と Blue native-PAGE 用 sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 7.4、40% glycerol) 及び 10% G-250 を混合し、5-20% グラジエントポリアクリルアミドゲルを用いてタンパク質非変性状態での電気泳動を行った。泳動後の DPD タンパク質は、抗ヒト DPD ポリクローナル抗体を用いたイムノブロット法により確認した (Fig. 6)。その結果、野生型を含め、H25R、Y109N、M166V、S175L、T298M、V335M、K384E、V434L、I543V (*DPYD*5*) 及び V732I (*DPYD*6*) の 11 種の DPD バリエントでは二量体の分子量である 242 kDa 付近にバンドが認められた。また、N151D、V313L、G366A、A380V、V515I、R592W、T768K、H807R、V826M 及び N893S の 10 種の DPD バリエントでは、他のバリエントと比較してバンド強度が低下していた。活性の消失する G926V DPD バリエントではバンドが観察されなかった。

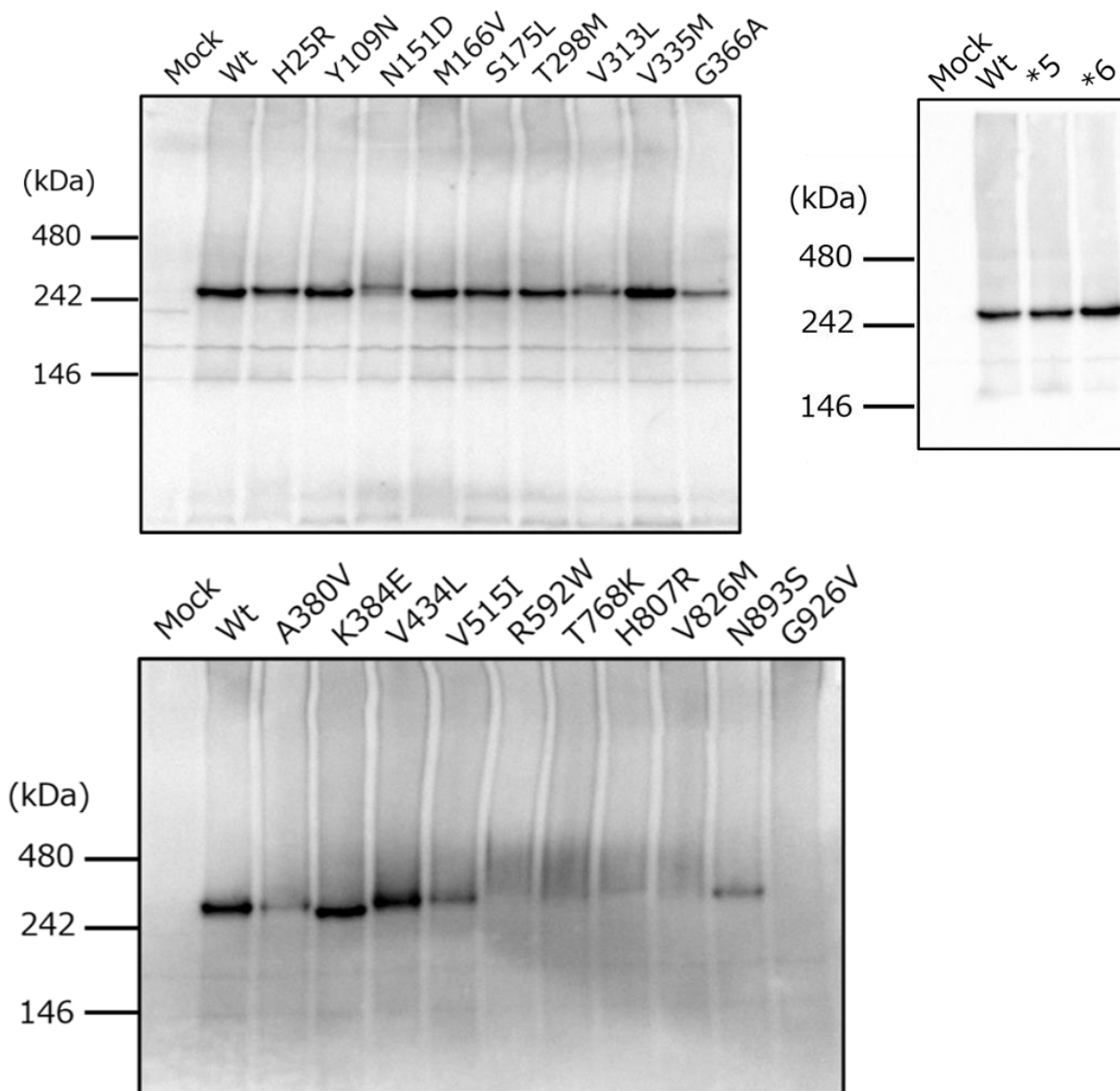


Fig. 6. Blue native PAGE and immunoblotting analysis showing immunoreactive DPD variant proteins. Blue native PAGE was performed using Tris-glycine buffer and 5%–20% polyacrylamide gels; 9 μ g of soluble fractions of DPD variant proteins was loaded into each lane in triplicate. DPD variants were detected using polyclonal antibodies against human DPD.

第八節 考察

本章では、日本人集団における FP 剤による副作用発現の予測ゲノムマーカー同定に繋がるような DPD 機能解析系の研究基盤の構築を目的として、1,070 人の日本人集団の全ゲノム解析から同定された 21 種の DPYD 遺伝子多型に由来する DPD バリエント酵素の機能変化を *in vitro* 解析系により評価した。

今回、DPD バリエントの酵素機能変化を解析する系の構築に当たり、DPD の 4 種の補因子（鉄、硫黄、FAD 及び FMN）が活性に与える影響を初めに検討した。その結果、DPD タンパク質は補因子添加の有無に関わらず発現が確認されたが、DPD 活性は補因子添加群で非添加群に比較して有意に高く、Blue native-PAGE においても補因子を添加した場合にのみ DPD の二量体と推察されるバンドが検出された。この結果より、今回用いた組換え DPD タンパク質の発現系において、補因子の添加が極めて重要であることが示された。これは分子内に補因子が取り込まれることで DPD タンパク質が正常にフォールディングされ、酵素活性発現に不可欠な二量体が形成されるためと考えられた。

同一の実験条件で 21 種の DPD バリエントを 293FT 細胞で一過性に発現させ、得られた DPD バリエントタンパク質について、U 及び 5-FU を基質として代謝反応させ、キネティックパラメータを求めることでそれぞれのバリエントの酵素活性を評価した。21 種の DPD バリエントの中で、G926V バリエントは両基質で代謝物の生成が認められず、酵素活性が消失することが明らかとなった。U の代謝反応において、15 種の DPD バリエント（N151D、M166V、S175L、T298M、V313L、V335M、G366A、A380V、V434L、V515I、I543V、R592W、V732I、H807R 及び V826M）で有意な V_{max} の低下が認められたが、 CL_{int} については有意な差は認められなかった。一方で、5-FU の代謝活性については、T298M、V313L、V335M、A380V、V434L、V515I、R592W、T768K、H807R 及び V826M の 10 種の DPD バリエントにおいて、 V_{max} の低下に伴う CL_{int} の有意な低下が認められた。両基質に対して得られた野生型に対する CL_{int} の割合の相関解析を行ったところ、有意な正の相関が得られたが ($r^2=0.5962$ 、 $P<0.001$)、二基質の間で

大きく活性が異なるバリエントが認められた (Fig. 7)。今回解析したほとんど全てのバリエントにおいて、5-FU 代謝活性と比較して U 代謝活性が低下する傾向にあったが、特に N151D、M166V 及び I543V バリエントにおいて U 代謝活性が大きく低下した。U の代謝活性を測定する際、内因性の U の影響を考慮するため、基質を加えずに反応させた場合の UH_2 生成量を差し引いているが、N151D、M166V 及び I543V バリエントについては基質を加えていない場合でも、 UH_2 生成量が他のバリエントよりも多かった。この定量値を差し引いた結果、 V_{\max} が低下し、それに連動して CL_{int} が低下したと考えられた。したがって、今回用いた評価系においては、内因性 U の影響が非常に大きいことを考慮すると、U の活性評価よりも 5-FU の活性評価値がより DPD バリエントの酵素活性変化を反映していると考えられた。

タンパク質非変性状態で行う Blue native-PAGE 下で各 DPD バリエントの泳動を行った場合、酵素活性が消失する G926V 以外のバリエントでは二量体と推測される 242 kDa 付近のバンドが

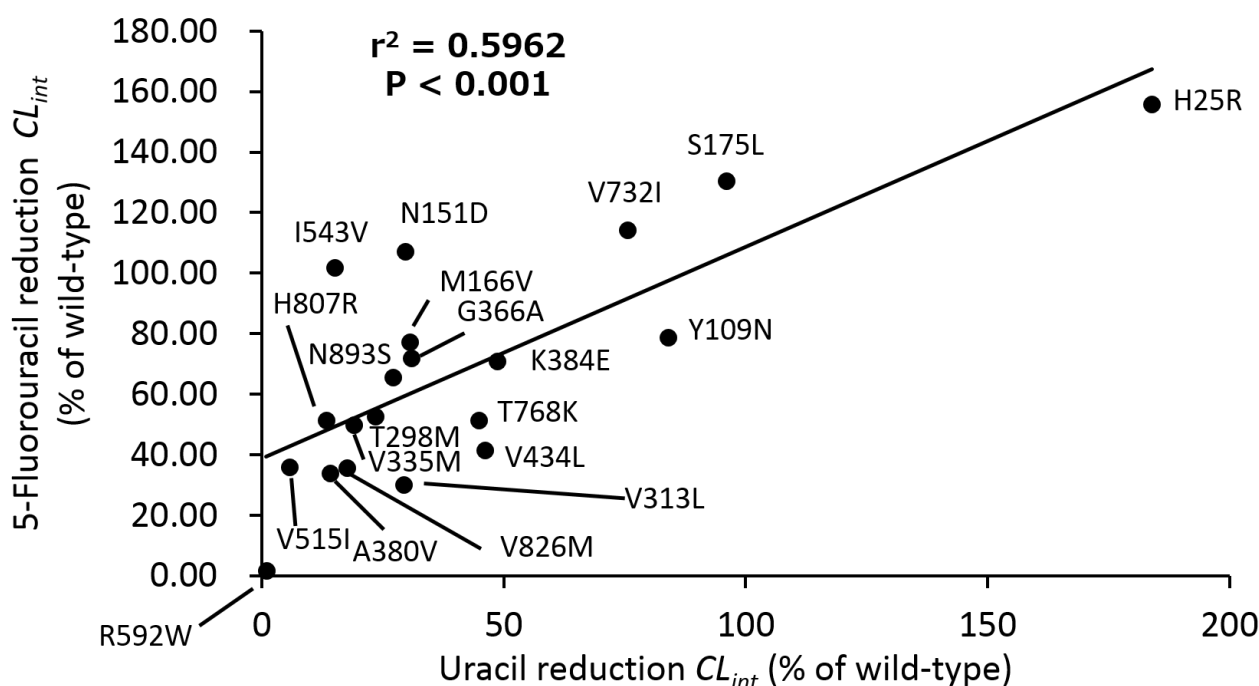


Fig. 7. Correlation between CL_{int} ratios calculated for DPD variants relative to the wild type, with regard to reduction of U and 5-FU. The CL_{int} ratios for the reduction of 5-FU and U are plotted on the horizontal and vertical axes, respectively.

検出された。しかしながら、5-FU 代謝における CL_{int} 値とバンド強度には明らかな相関性は認められなかった。DPD タンパク質が酵素活性を発揮するには二量体の形成が必須であると考えられているが、各アミノ酸置換が二量体形成に与える影響と酵素活性に及ぼす影響はバリエーションによって大きく異なることが今回の解析から示唆された。

各 DPD バリエーションタンパク質に生じたアミノ酸置換は立体構造変化を引き起こす可能性があり、この変化が DPD 活性に影響を及ぼすと考えられる。DPD 分子は大きく 5 つのドメインから構成され、ドメイン I 及び V にはそれぞれ 2 分子ずつの[4Fe-4S]クラスター、ドメイン II には FAD、ドメイン IV には FMN が含まれている[20, 30, 63, 64]。また、還元反応に必要な電子の供給源である β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) 結合部位はドメイン III に、基質であるピリミジン塩基の代謝活性中心はドメイン IV に存在する。これらのドメインのアミノ酸配列は様々な動物種において高度に保存され、DPD の活性発現に重要な役割を果たしていると考えられている[64]。また、DPD は二量体を形成し、それぞれ 2 分子ずつの[4Fe-4S]クラスターを介して電子を運搬することで活性を発現することが明らかとなっている[65]。これらのドメインあるいは二量体形成の際に相互作用する部位にアミノ酸置換が生じて立体構造が変化することで酵素活性が大きく変化する可能性があるため、3D シミュレーションモデル解析によりアミノ酸置換が DPD 構造に与える影響を検討することとした。しかし、ヒト DPD の結晶構造は未だ同定されていないため、ヒト DPD と 93%のアミノ酸相同性を示すブタ DPD の X 線回折結晶構造をテンプレートにして、ホモロジーモデリングによりヒト DPD の 3D 構造を作製した (Fig. 8)。作製したヒト DPD に対し基質として 5-FU をドッキングさせ、各バリエーションのアミノ酸置換部位から、5-FU に対する各バリエーションの代謝活性変化を構造化学的に考察した。

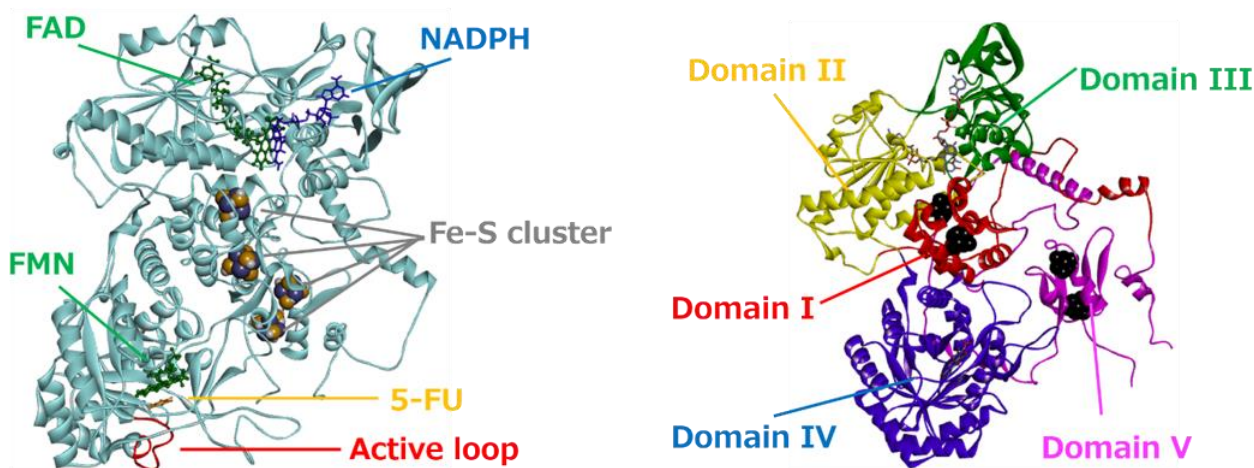


Fig. 8. Diagram showing overall structure of human DPD and each domain.

H25R

本研究において、H25R DPD バリエントの 5-FU 還元活性の CL_{int} は野生型の 156%に上昇した。H25 はドメイン V に存在し、2つの[4Fe-4S]クラスターの近傍に位置する。H25 の側鎖は分子の外側を向いており、ドメイン IV から離れているため、R25 への置換による 5-FU 代謝に対する直接の影響は少ないと考えられるが、[4Fe-4S]クラスターを経由する電子の輸送効率を上昇させている可能性も考えられた。

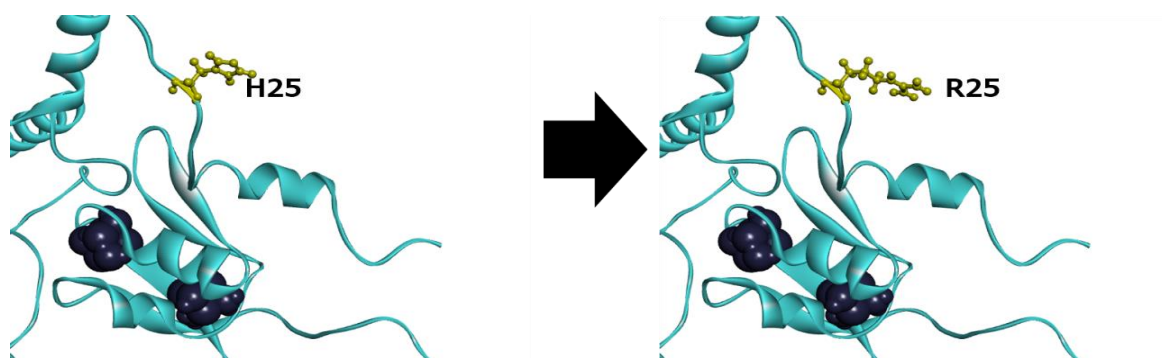


Fig. 9. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and H25R (right panel). The residues H25 and R25 are shown in yellow.

Y109N

Y109N DPD バリエントの 5-FU 還元活性の CL_{int} は野生型の 79%に低下した。Y109 はドメイン I の[4Fe-4S]クラスター近傍に存在する。Y109 は F158 及び V162 と疎水性相互作用を形成しているが、N109 への置換によって相互作用が消失する。これにより、DPD タンパク質全体のコンフォメーションが変化し、活性が低下したと考えられた。

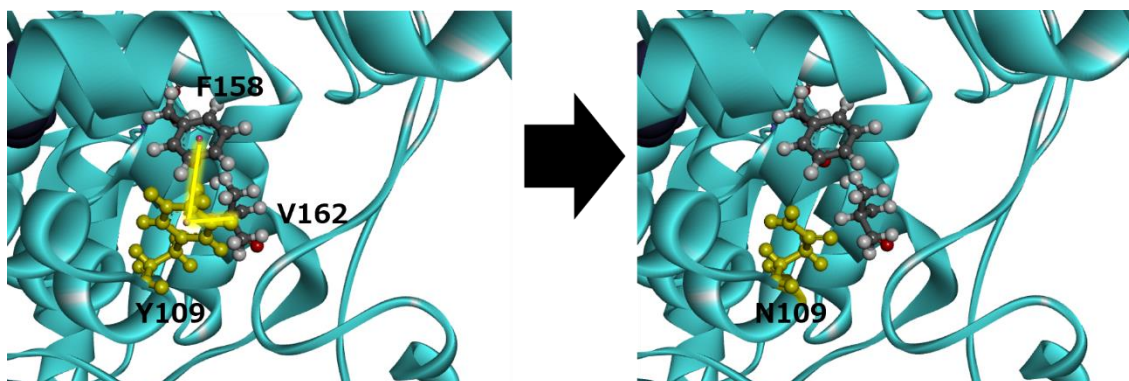


Fig. 10. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and Y109N (right panel). The residues Y109 and N109 are shown in yellow.

N151D

Offer らによる HEK293T/c17 細胞中に組換え DPD を発現させた報告では、N151D バリエントは野生型 DPD と同等の酵素活性であった[66]。本研究においても、N151D バリエントの 5-FU 還元活性の CL_{int} は野生型の 107%であった。N151 はドメイン I の[4Fe-4S]クラスター近傍に存在し、T65 と水素結合を形成している。D151 へ置換した場合でも、3D シミュレーション上では T65 との相互作用に変化はなかったため、酵素活性に与える影響は少ないと考えられた。

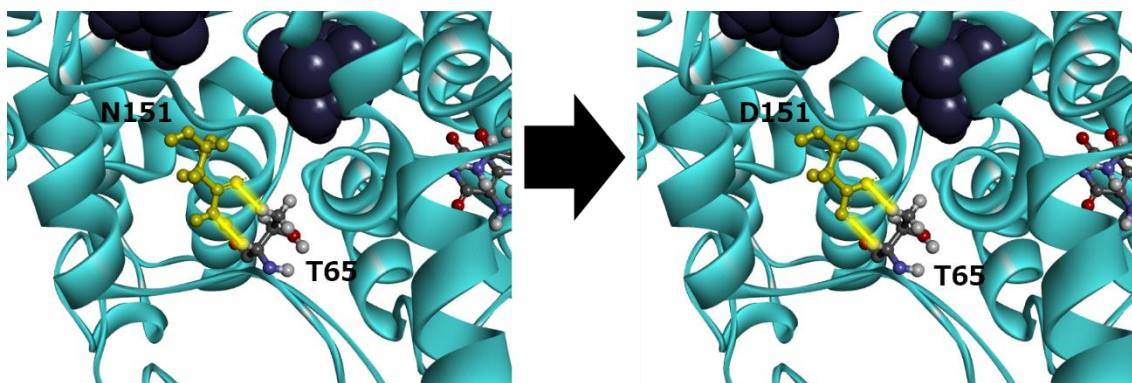


Fig. 11. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and N151D (right panel). The residues N151 and D151 are shown in yellow.

M166V

Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) が作成した FP 剤投与に関するガイドラインでは、M166V は酵素活性が *inactive* に分類されており、副作用発現との関連が示唆されている [67]。一方、Offer らによる HEK293T/c17 細胞中に組換え DPD を発現させた報告において、M166V では野生型 DPD に比較して酵素活性が上昇しており、両者で一致した結果が得られていない [66]。本研究において、M166V の 5-FU 還元活性の CL_{int} は野生型の 77% に低下しており、従来のどちらの研究結果とも一致しなかった。この差異は、代謝反応に使用した NADPH や基質濃度あるいは活性測定法の相違などが原因として考えられた。M166 部位はドメイン I に位置し、近傍の I168 や L840 及び W849 と疎水性相互作用している。V166 へのアミノ酸置換によってこれらの疎水性相互作用が消失し、新たに F163 と相互作用することで立体構造が変化して活性が低下したと考えられた。

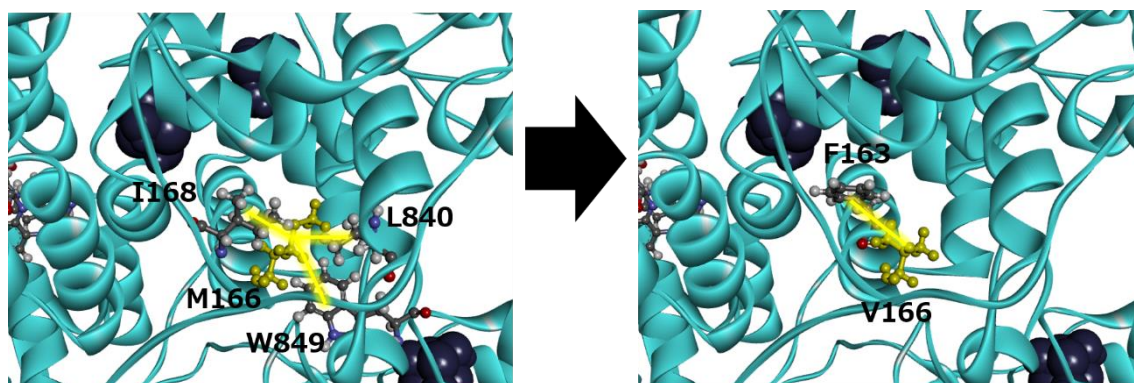


Fig. 12. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and M166V (right panel). The residues M166 and V166 are shown in yellow.

S175L

本研究における S175L バリエントの 5-FU 還元活性の CL_{int} は、野生型の 131%に上昇した。S175 はドメイン II に位置しているが、側鎖と近傍のアミノ酸は相互作用しておらず、FAD 結合領域から離れているため、L175 へ置換しても酵素活性低下の要因とはならないことが推測された。

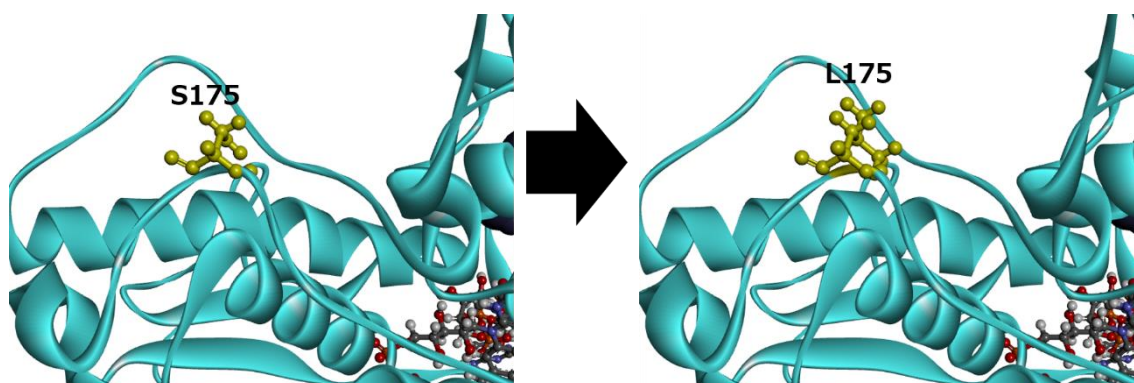


Fig. 13. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and S175L (right panel). The residues S175 and L175 are shown in yellow.

T298M

本研究における T298M バリエントの 5-FU 還元活性の CL_{int} は、野生型の 50%にまで低下した。T298 は NADPH 結合領域であるドメイン III に位置している。しかし、3D シミュレーション解析からは明らかな側鎖間の結合や相互作用の変化は見出せなかった。この領域は、還元反応に重要な電子の供給源である NADPH が結合する領域であるため、微小な構造変化が NADPH の電子の授受に影響して酵素活性が低下したと推測された。

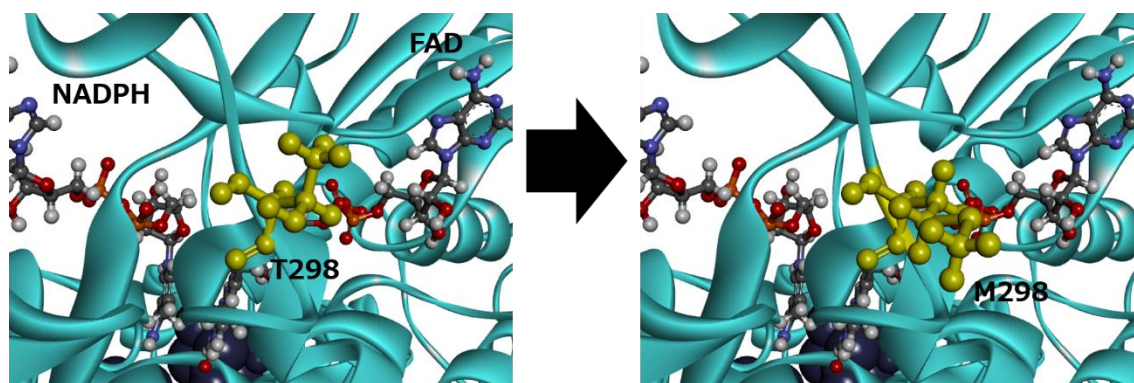


Fig. 14. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and T298M (right panel). The residues T298 and M298 are shown in yellow.

V313L

本研究における V313L バリエントの 5-FU 還元活性の CL_{int} は、野生型の 30%にまで低下した。V313 は NADPH 結合領域であるドメイン III に位置しており、F309 や P329 と疎水性相互作用を形成している。V313 から L313 への置換により、これらの相互作用が消失して、新たに F59 との疎水性相互作用が形成される。この変化により、NADPH 結合領域の立体構造が歪むことで酵素活性が低下したと考えられた。

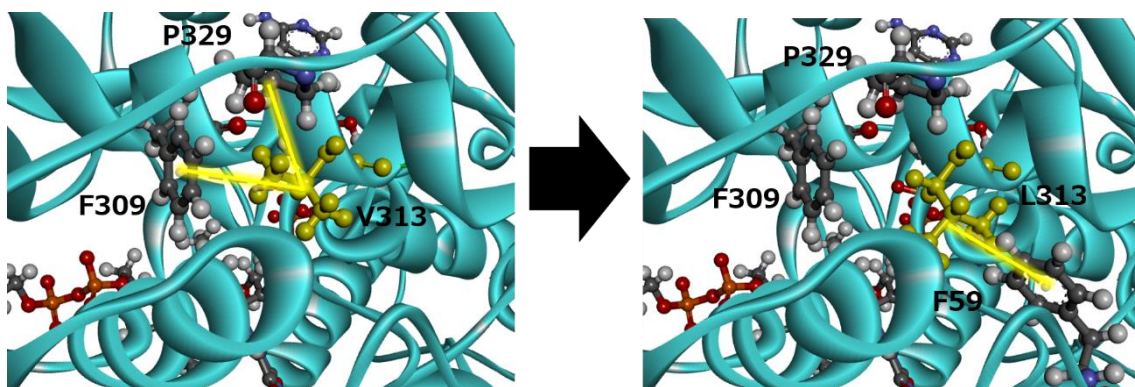


Fig. 15. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and V313L (right panel). The residues V313 and L313 are shown in yellow.

V335M

本研究における V335M バリエントの 5-FU 還元活性の CL_{int} は、野生型の 51%にまで低下した。V335 はドメイン III に位置し、周囲の I331、A351、A356、V359 及び V433 と疎水性相互作用を形成している。V335 から M335 に置換されることで側鎖が長くなり、これらの疎水性相互作用が変化するが、特に A351 との相互作用が消失することが 3D シミュレーション解析で明らかになった。これらの変化により、NADPH 結合領域の立体構造が歪むことで酵素活性が低下したと考えられた。

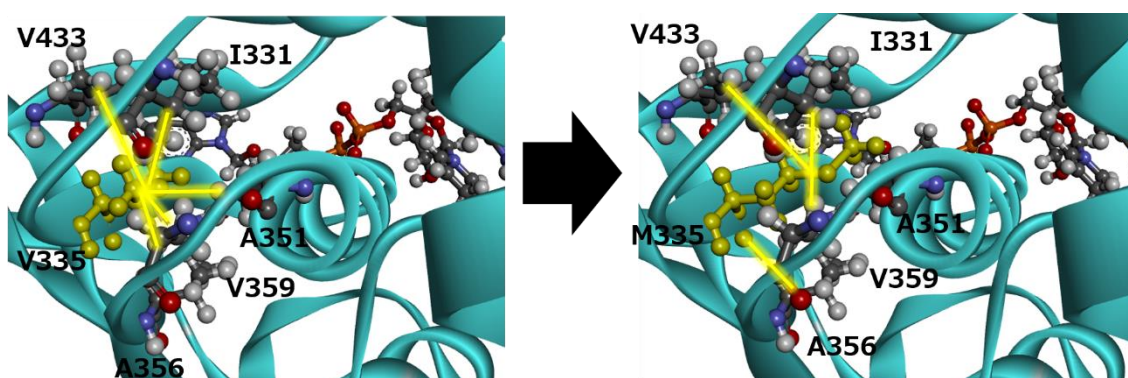


Fig. 16. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and V335M (right panel). The residues V335 and M335 are shown in yellow.

G366A

本研究における G366A バリエントの 5-FU 還元活性の CL_{int} は、野生型の 72%に低下した。G366 はドメイン III の NADPH 近傍に位置しているが、周囲のアミノ酸との相互作用は 3D シミュレーション上認められなかった。G366 から A366 への置換により、F390 との間で疎水性相互作用が形成されるために周囲の立体構造が変化し、酵素活性が低下したと推測された

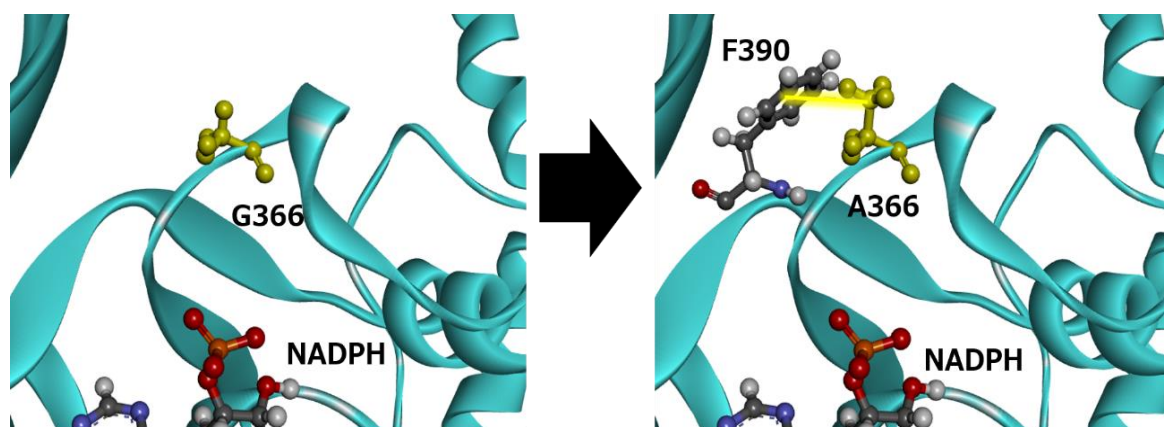


Fig. 17. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and G366A (right panel). The residues G366 and A366 are shown in yellow.

A380V

本研究における A380V バリエントの 5-FU 還元活性の CL_{int} は、野生型の 34%にまで低下した。A380 もドメイン III に位置しており、近傍の F345 及び C385 と疎水性相互作用を形成している。V380 への置換により側鎖の炭素数が増加することで I361 及び A348 との疎水性相互作用も形成される。これにより NADPH 結合領域の立体構造が歪むことで酵素活性が低下したと考えられた。

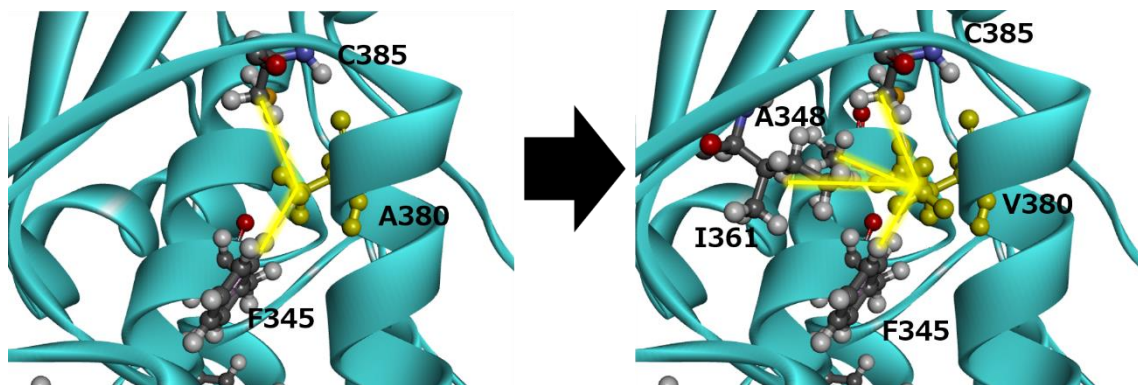


Fig. 18. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and A380V (right panel). The residues A380 and V380 are shown in yellow.

K384E

本研究における K384E バリエントの 5-FU 還元活性の CL_{int} は、野生型の 71%に低下した。K384 も NADPH 結合領域であるドメイン III に位置し、C49 及び C52 と水素結合やアルキル相互作用を形成している。E384 への置換によりこれらの相互作用が消失することで立体構造が変化した、酵素活性が低下したと考えられた。

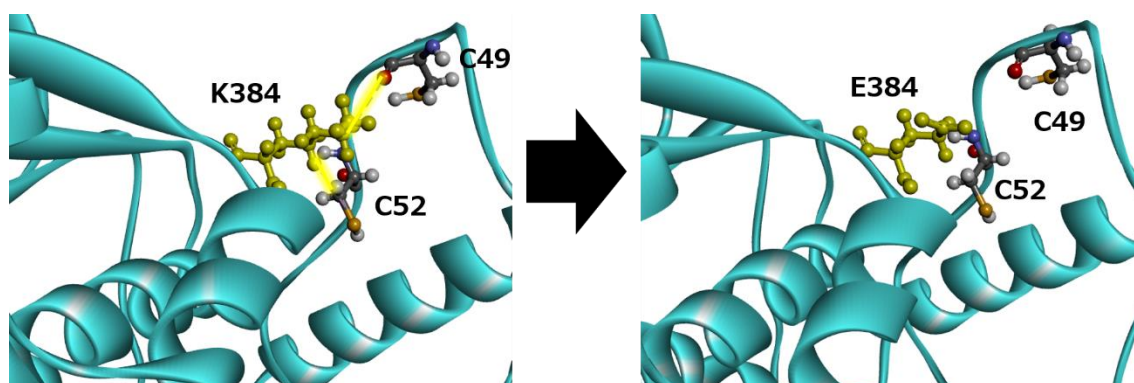


Fig. 19. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and K384E (right panel). The residues K384 and E384 are shown in yellow.

V434L

本研究における V434L バリエントの 5-FU 還元活性の CL_{int} は、野生型の 42%にまで低下した。K384 も NADPH 結合領域であるドメイン III に存在し、I403 及び M406 と疎水性相互作用を形成している。L434 への置換により I403 との相互作用が消失し、新たに F294、L338、V396 と疎水性相互作用を形成する。これにより NADPH 結合領域の立体構造が変化することで NADPH の結合や電子の授受に影響し、活性が低下したと考えられた。

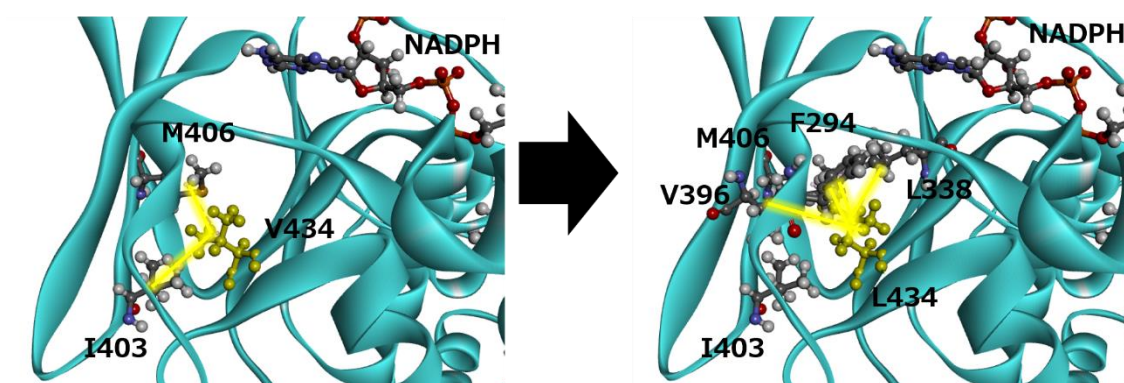


Fig. 20. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and V434L (right panel). The residues V434 and L434 are shown in yellow.

V515I

Offer らによる HEK293T/c17 細胞を用いた *in vitro* の酵素活性測定の結果では、V515I バリエントは野生型と比較し同程度の活性である[66]。一方で、本研究における V515I バリエントの 5-FU 還元活性の CL_{int} は、野生型の 36%にまで低下した。この差異は、代謝反応に使用した NADPH や基質濃度及び活性測定法の相違などが原因として考えられた。V515 は FAD 結合領域であるドメイン II に属しているが[4Fe-4S]クラスターの近傍に位置し、周囲の W501、H504、K505 と疎水性相互作用を形成している。I515 への置換により大きな相互作用の変化は認められなかったが、アミノ酸置換により FAD や[4Fe-4S]クラスターの配位が変化し、活性に影響を与えていると考えられた。

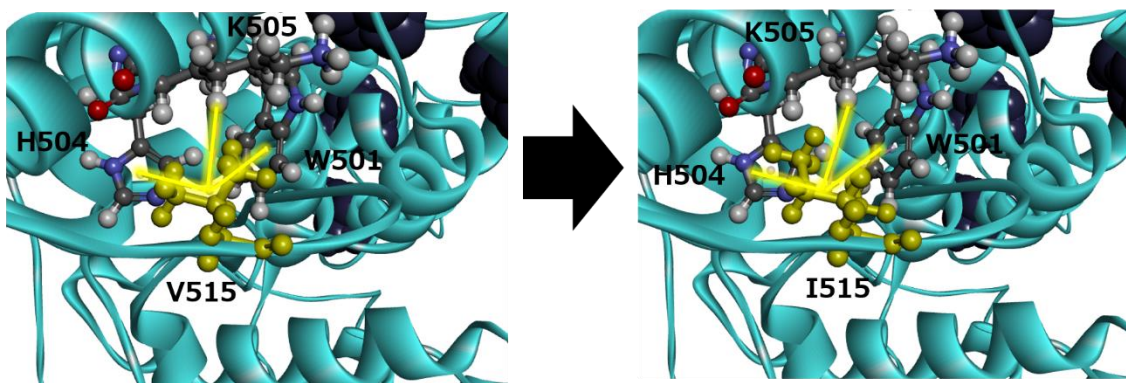


Fig. 21. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and V515I (right panel). The residues V515 and I515 are shown in yellow.

I543V (*DPYD*5*)

*DPYD*5*は様々な人種に共通して存在するバリエーションである[68]。Kuilenburg らによる *in vitro* 試験における酵素活性は野生型と同程度であると報告されており、*DPYD*5* バリエーションは 5-FU 副作用発現には関連しないと推測されている[69]。本研究においても、*DPYD*5* バリエーションの 5-FU 還元活性における CL_{int} は野生型と同程度であり、先行研究の結果と一致した。I543 は DPD タンパクの基質代謝部位であるドメイン IV に位置し、TIM バレルを形成する。I543 は基質ポケットや FMN から離れた外側の位置に存在しており、V543 への置換による立体構造の変化が酵素活性に及ぼす影響は小さいと考えられた。

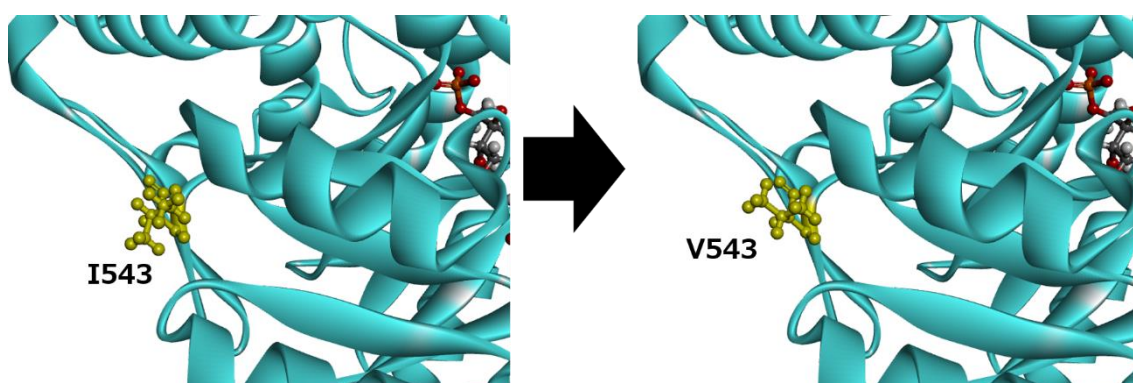


Fig. 22. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and I543V (right panel). The residues I543 and V543 are shown in yellow.

R592W

Offer らによる HEK293T/c17 細胞を用いた *in vitro* の酵素活性測定の結果では、R592W バリエーションは野生型と比較しほとんど活性が消失している[66]。本研究においても R592W バリエーションの 5-FU 還元活性における CL_{int} は野生型の 2%にまで低下しており、先行研究の結果と一致した。R592 はドメイン IV に位置し、FMN と 5-FU が配位する基質ポケット近傍のループ上に存在する。R592 と Y600、Q604 の間で水素結合が形成されているが、W592 への置換に伴いこれらの相互作用が消失する。その結果基質ポケット周囲の立体構造が変化し、活性が大きく低下したと考えられた。

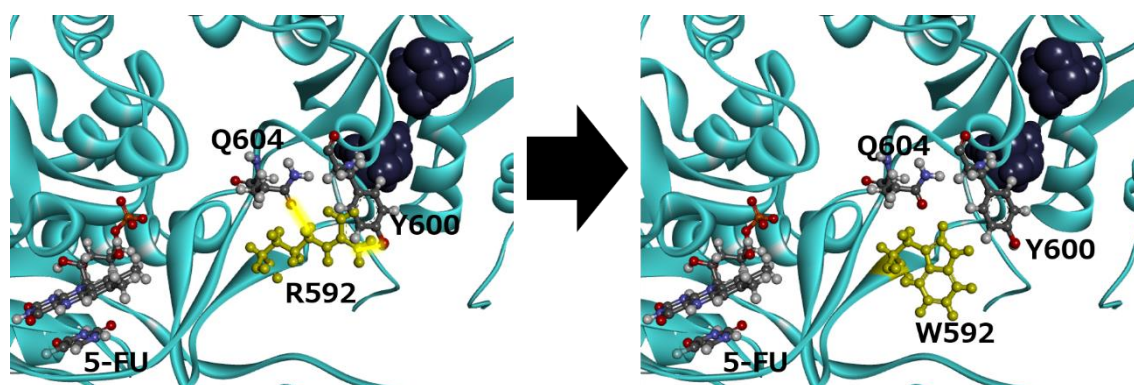


Fig. 23. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and R592W (right panel). The residues R592 and W592 are shown in yellow.

V732I (DPYD*6)

DPYD*6 は DPYD*5 同様に様々な人種に共通して存在するバリエーションである[68]。Offer らによる、大腸菌発現系を用いた *in vitro* 代謝における酵素活性は野生型と同程度と報告されているが[70]、FP 剤による副作用発現リスクとの関連性については一貫した結果が得られていない[69, 71, 72]。本研究における DPYD*6 バリエーションの 5-FU 還元活性の CL_{int} は野生型と同程度であり、先行研究の結果と一致した。V732 はドメイン IV に位置し、近傍にある A708、L710、A721、A724 と疎水性相互作用あるいは水素結合を形成している。I732 へ置換した場合においても相互作用は大きく変化していないため、活性が野生型と同程度であると考えられた。

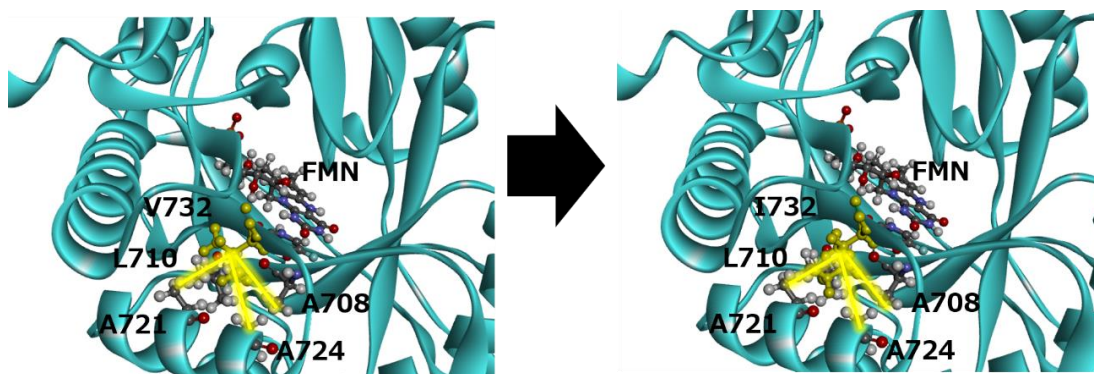


Fig. 24. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and V732I (right panel). The residues V732 and I732 are shown in yellow.

T768K

T768K は Ogura らによる日本人スクリーニングにおいて同定され、大腸菌発現系を用いた *in vitro* 代謝における 5-FU の CL_{int} は野生型の約 80% と報告されている[73]。一方で、Offer らによる HEK293T/c17 細胞を用いた *in vitro* の酵素活性測定の報告では、T768K バリエントは野生型と同等の活性である[66]。本研究においては T768K バリエントの 5-FU 還元活性における CL_{int} は野生型の 51% にまで低下しており、先行研究と異なる結果が得られた。この差異は、代謝反応に使用した NADPH や基質濃度及び活性測定法の相違などが原因として考えられた。T768 はドメイン IV の基質結合部位の近傍に位置している。3D モデル上で K768 への置換による大きな相互作用は認められなかったが、かさ高い K768 への置換により近傍のアミノ酸との立体的反発が生じ、基質ポケット周辺の立体構造が変化していると推測された。

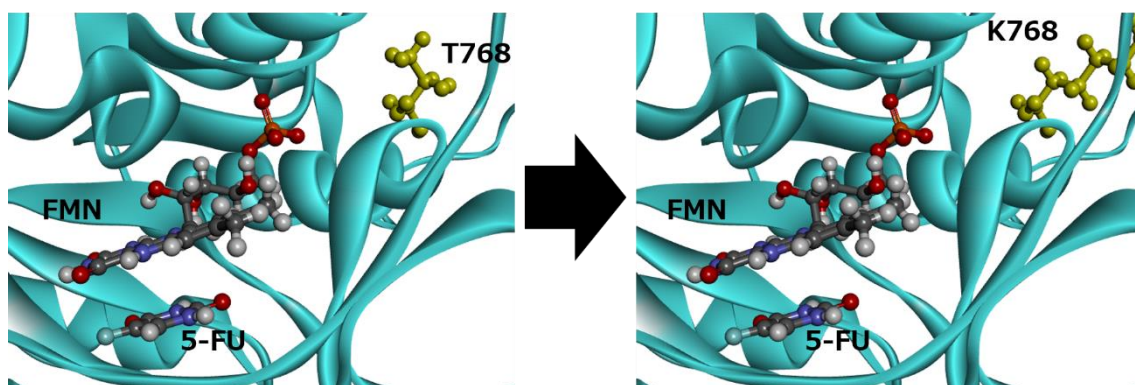


Fig. 25. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and T768K (right panel). The residues T768 and K768 are shown in yellow.

H807R

本研究における H807R バリエントの 5-FU 還元活性の CL_{int} は、野生型の 53%にまで低下した。H807 はドメイン IV に属し[4Fe-4S]クラスターと基質ポケットの間に位置している。L803 及び V924 と疎水性相互作用を形成しているが、R807 への置換に伴い V924 との相互作用が消失し、新たに A928 と疎水性相互作用が形成される。これにより周囲の立体構造が変化し、[4Fe-4S]クラスターからの FAD への電子の授受への影響や、基質ポケット自体の構造変化に寄与すると示唆された。

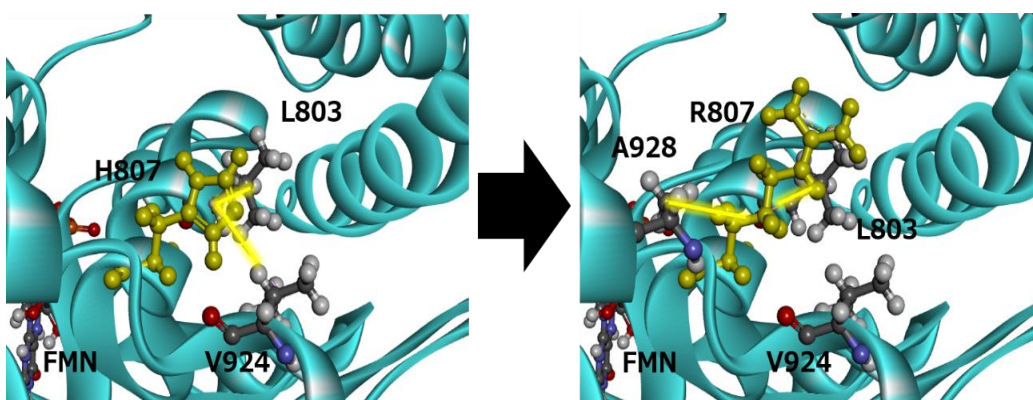


Fig. 26. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and H807R (right panel). The residues H807 and R807 are shown in yellow.

V826M

本研究における V826M バリアントの 5-FU 還元活性の CL_{int} は、野生型の 36%にまで低下した。V826 もドメイン IV に属し[4Fe-4S]クラスターと基質ポケットの間に位置している。V826 は Y830 と疎水性相互作用を形成しているが、M826 への置換によって A818 と新たな疎水性相互作用を形成する。この変化により[4Fe-4S]クラスターからの FAD への電子の授受への影響や、基質ポケット自体の構造変化に寄与すると示唆された。

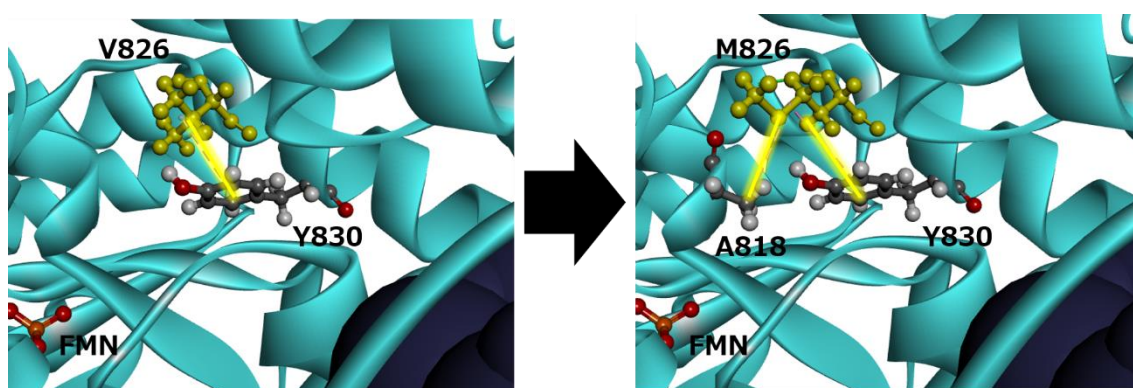


Fig. 27. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and V826M (right panel). The residues V826 and M826 are shown in yellow.

N893S

Offer らによる HEK293T/c17 細胞を用いた *in vitro* の酵素活性測定の報告では、N893S バリアントは野生型と比較し 75%に活性が低下している[66]。本研究における N893S バリアントの 5-FU 還元活性の CL_{int} は、野生型の 66%に低下し、先行研究と類似した結果が得られた。N893 はドメイン V に属し、R896 と水素結合を形成しているが、S893 への置換によりこの相互作用が消失する。また、この領域は二量体形成時に相互作用する領域と考えられ、S893 への置換により二量体形成が妨げられることが考えられた。

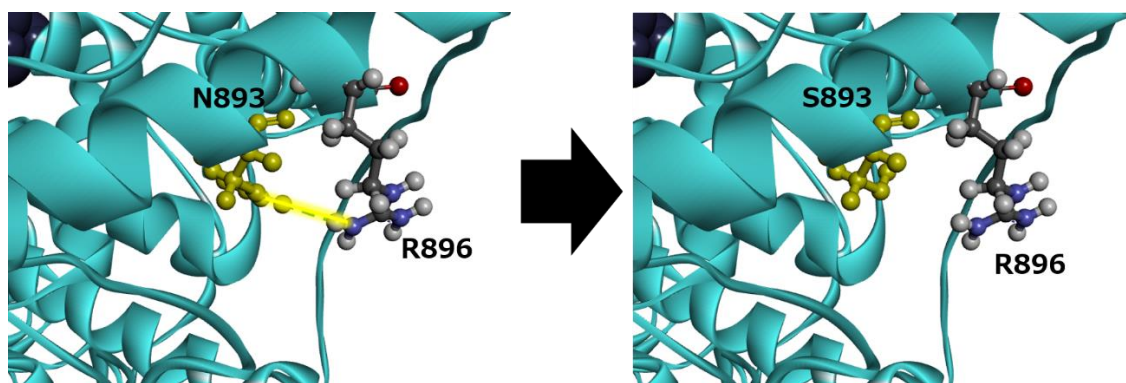


Fig. 28. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and N893S (right panel). The residues N893 and S893 are shown in yellow.

G926V

本研究における G926V バリエントの 5-FU 還元活性については、完全に消失することが明らかとなった。G926 はドメイン V に属するが、基質ポケットが存在するドメイン IV の近傍に位置する。V926 への置換によって L929 との疎水性相互作用が形成される。また、Blue native-PAGE 後のイムノブロットの結果より、G926V バリエントのバンドは検出されていないことから、この領域は二量体化に関与する可能性が考えられる。基質ポケット近傍の立体構造変化と二量体形成の障害が酵素活性の消失につながったと考えられた。

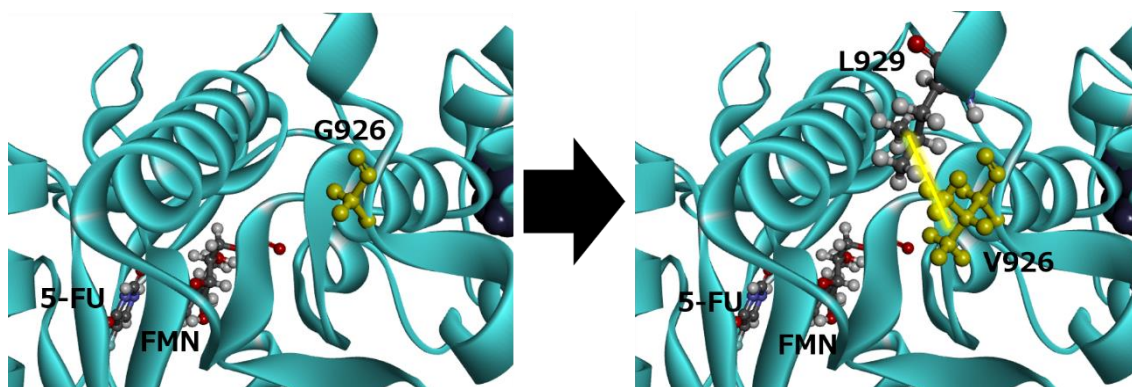


Fig. 29. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DPD wild-type (left panel) and G926V (right panel). The residues G926 and V926 are shown in yellow.

第二章 21 種の DHP バリエーションの機能変化解析と分子メカニズムの解明

第一節 序論

DHP はピリミジン異化代謝経路の二段階目の加水分解反応を触媒する酵素であり、*DPYS* 遺伝子にコードされている。*DPYS* 遺伝子は第 8 番染色体上に存在し、1560 bp の Open-reading frame からなる[74]。DHP は主に肝臓及び腎臓に発現し、細胞内では可溶性画分に存在している。生体内基質であるジヒドロウラシル (UH₂) や 5-FU の一次代謝物であるフルオロジヒドロウラシル (FUH₂) の加水分解反応を触媒する[25, 31]。

遺伝的な DHP 欠損症は、DPD 欠損症同様に常染色体劣性遺伝形式をとるとされている。現在までに 31 例の DHP 欠損症例が報告されており[75-80]、臨床症状として痙攣、精神発達障害、小頭症、自閉症から無症状までと個人差が大きい点も DPD 欠損症と類似している[75, 79, 81-83]。特に無症状の場合、FP 剤による抗がん剤治療開始後に重篤な副作用が発現することによって、DHP 欠損症が発見される場合があり、薬物療法前に副作用の発現リスクを予測することは、DPD 欠損症と同様に極めて重要である[76, 84]。

当研究室の先行研究において、直腸がんの術後アジュバント療法として 5-FU のプロドラッグであるカペシタビン内服中に、致死的な骨髄抑制などの副作用が発現した症例を報告している[85]。この患者の *DPYS* 遺伝子解析の結果、DHP 酵素機能が低下または消失する 1001A>G (Q334R) と 1393C>T (R465X) のコンパウンドヘテロ接合体が同定され、これがカペシタビンによる重篤副作用の発現に繋がったと考えられた。また、Nakajima らは 1001A>G (Q334R) とスプライシング異常による Exon 8 のスキッピングを起こす 1443+5G>A のコンパウンドヘテロ接合体である DHP 欠損症の中国人患者を報告している[86]。このように、アジア人集団においては、DPD 欠損症よりも DHP 欠損症の報告が多い。特に、1001A>G (Q334R) については、これまでに白人種や黒人種での報告はなく、アジア人種でのみで同定されている。したがって、日本人集団においては、*DPYD* 遺伝子多型だけでなく *DPYS* 遺伝子多型も FP 剤による

副作用発現を予測するゲノムマーカーの 1 つになり得ると考えられる。

現在までに 21 種の *DPYS* 遺伝子多型が報告されているが、酵素機能変化の程度や FP 剤による副作用発現との関連はほとんど明らかにされていない (Table 5) [23, 74, 80, 82, 83, 86-88]。本章では、現在までに報告されている 21 種の *DPYS* 遺伝子多型に由来する DHP バリエーションについて、*in vitro* 解析系を用いて酵素タンパク質の機能変化を網羅的に解析し、その分子メカニズムを明らかにすることで、FP 剤の副作用発現を予測する研究基盤の構築を行った。

Table 5. Non-synonymous *DPYS* variants

dbSNP rsID	Location	Nucleotide change	Amino acid substitution	Effect
rs199618701	Exon 1	17G>A	R6Q	Unknown
rs57732538	Exon 1	19C>G	L7V	Reduced
rs572241599	Exon 1	48C>G	N16K	Unknown
—	Exon 1	203C>G	T68R	Reduced
rs370718225	Exon 1	209T>C	M70T	No activity
—	Exon 1	242A>G	D81G	No activity
—	Exon 2	349T>C	W117R	Unknown
rs36027551	Exon 3	541C>T	R181W	No effect
—	Exon 5	833G>A	G278D	No activity
rs200913682	Exon 5	905G>A	R302Q	Reduced
rs121964923	Exon 6	1001A>G	Q334R	Reduced
rs530911437	Exon 6	1010T>C	L337P	No activity
rs201457190	Exon 6	1027A>G	T343A	Reduced
rs121964924	Exon 6	1078T>C	W360R	No activity
rs138282507	Exon 6	1090G>A	V364M	No activity
rs201258823	Exon 7	1137C>A	S379R	Reduced
rs267606774	Exon 7	1235G>T	R412M	No activity
rs267606773	Exon 8	1303G>A	G435R	Reduced
rs201280871	Exon 8	1393C>T	R465X	No activity
rs61758444	Exon 8	1423C>T	R475X	Reduced
rs142574766	Exon 9	1468C>T	R490C	Reduced

第二節 DPYS バリエント発現プラスミドの作製

2-1. DPYS cDNA のクローニング

Human Liver cDNA Library を鋳型として DPYS cDNA を特異的に PCR 増幅した。用いたプライマー配列は Table 6 に示した。得られた PCR 産物をアガロース電気泳動・EtBr 染色し、UV 照射によりバンドサイズ (1560bp) を確認した (Fig. 30)。次に、PCR 産物をカラム精製し、クローニング用ベクター (pENTR/D-TOPO) にライゲーション後、コンピテントセル (TOP10) にトランスフォーメーションしてカナマイシン含有 LB 寒天プレート下で培養した。得られた大腸菌コロニー中のプラスミド DNA の塩基配列をサンガーシーケンス法により確認し、野生型 DPYS cDNA のクローンを得た。

Table 6. Primers used for DPYS cDNA cloning.

Primer name	Sequence (5′-3′)
Forward primer	CACCATGGCGGCGCCCTCG
Reverse primer	TCAGGGGTGGGCCTGTTTCCTG

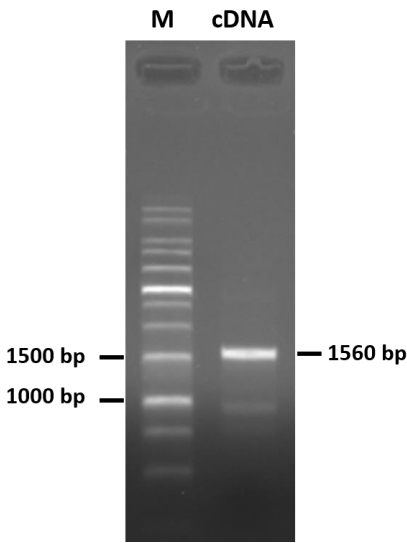


Fig. 30. Agarose gel electrophoresis of the PCR amplicon of DPYS cDNA.

The amplification size of DPYS cDNA resulted in 1560 bp.

M: DNA marker, cDNA: DPYS amplicon.

2-2. DHP バリエント発現エントリークローンの作製

野生型 *DPYS* の cDNA 配列が挿入されたエントリークローンを鋳型として、21 種類の DHP バリエント発現エントリークローンを作製した。それぞれの塩基置換の導入は、Table 7 に示したプライマーセットを用いて Site-directed mutagenesis (SDM) 法により行った。得られた PCR 産物は、鋳型 DNA を *DpnI* により選択的に消化後、コンピテントセル (XL10-Gold) にトランスフォーメーションしてカナマイシン含有培地下で培養した。それぞれのエントリークローンに対してサンガーシーケンス法により塩基置換の導入を確認した (Fig. 31)。

2-3. DHP バリエント発現クローンの作製

得られた発現エントリークローンは、Gateway システム (Life Technologies) を利用した LR 組み換え反応により、哺乳動物細胞発現ベクターである pcDNA3.4 に乗せ換えた。反応産物をコンピテントセル (TOP10) にトランスフォーメーションし、アンピシリン含有培地下で培養した。部位特異的組み換え反応によって生成した DHP バリエント発現クローンは、サンガーシーケンス法により *DPYS* cDNA の両末端からベクターの配列にかけての塩基配列を確認し、エントリーベクターから発現ベクターへ組み換えられていることを確認した。

Table 7. Primers used for the site-directed mutagenesis.

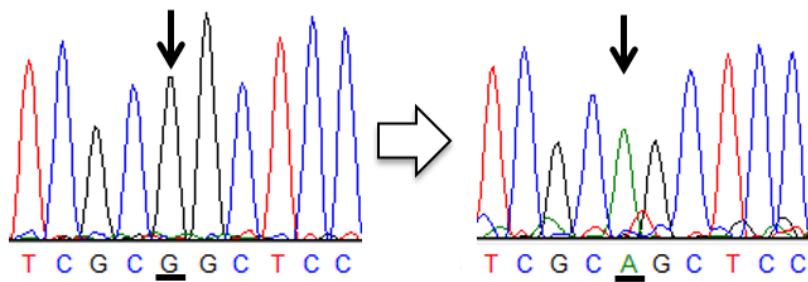
Primer	Amino acid	Nucleotide change	Forward primer (5′–3′)	Reverse primer (5′–3′)
No.	change			
P1	R6Q	17G>A	GGCGCCCTCGC <u>A</u> GCTCCTGATCC	GGATCAGGAGC <u>T</u> GCGAGGGCGCC
P2	L7V	19C>G	CGCCCTCGCGGG <u>T</u> CCTGATCCGC	GCGGATCAGGA <u>C</u> CCGCGAGGGCG
P3	N16K	48C>G	GGTCGCGTGGTCA <u>A</u> GGATGACTTCTCGGA	TCCGAGAAGTCATC <u>C</u> TTGACCACGCGACC
P4	T68R	203C>G	GGAGGCATCGACACACACAG <u>G</u> CACATGCAG	CTGCATGTGC <u>C</u> TGTGTGTGTCGATGCCTCC
P5	M70T	209T>C	ATCGACACACACACGCACAC <u>G</u> GCAGTTCCCC	GGGGAAGTGC <u>G</u> TGTGCGTGTGTGTGTCGAT
P6	D81G	242A>G	TCGCGGTCCATCG <u>G</u> CGACTTCCACCAG	CTGGTGGAAGTCG <u>C</u> CGATGGACCGCGA
P7	W117R	349T>C	GCCTTCGAGACC <u>C</u> GGCGAAGCTGGG	CCCAGCTTCGCC <u>G</u> GGTCTCGAAGGC

P8	R181W	541C>T	GAGCTGTACGAAGCCTTCTCT <u>T</u> GGTGCAAGGAA	TTCCTTGCACCA <u>A</u> AGAGAAGGCTTCGTACAGCTC
P9	G278D	833G>A	ATAGCAGCCAGTCTTG <u>A</u> CACAGATGGCACTCAC	GTGAGTGCCATCTGTG <u>T</u> CAAGACTGGCTGCTAT
P10	R302Q	905G>A	GGGTCCACCTTTGC <u>A</u> ACCAGACCCCTCAA	TTGAGGGGTCTGGT <u>T</u> GCAAAGGTGGACCC
P11	Q334R	1001A>G	CACTTTCAACACCTGCC <u>G</u> AAAGCTCTTGGGAAGG	CCTTCCCAAGAGCTTTCC <u>G</u> GCAGGTGTTGAAAGTG
P12	L337P	1010T>C	CACCTGCCAGAAAGCTC <u>T</u> TGGGAAGGATGATTTTA	TAAAATCATCCTTCCCAG <u>G</u> GAGCTTTCTGGCAGGTG
P13	T343A	1027A>G	AAGCTCTTGGGAAGGATGATTTT <u>G</u> CCAAGATCCCCA	TGGGGATCTTGG <u>C</u> AAAATCATCCTTCCCAAGAGCTT
P14	W360R	1078T>C	TGAAGATCGGATGTCCGTAATACGG <u>G</u> AAAAAGGCG	CGCCTTTTTT <u>C</u> CGTATTACGGACATCCGATCTTCA
P15	V364M	1090G>A	CCGTAATATGGGAAAAAGGC <u>A</u> TGCATAGTGGTAAAAT	ATCCATTTTACCACTATGCA <u>T</u> GCCTTTTTTCCCATATTAC
			GGAT	GG
P16	S379R	1137C>A	CAGATTTGTGGCAGTTACCAGA <u>A</u> CAAATGCAGCCAA	AAAAATTTTGGCTGCATTTGT <u>T</u> CTGGTAACTGCCACA

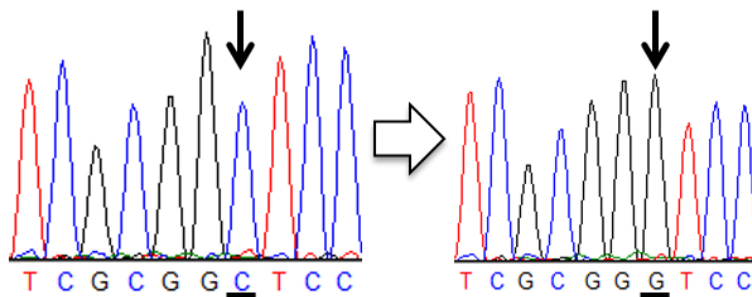
			AATTTTT	AATCTG
P17	R412M	1235G>T	TTGGGACCCAAAAGGCACAA <u>T</u> GACTATCTCAGCAA	TTGCTGAGATAGTC <u>A</u> TTGTGCCTTTTGGGTCCCAA
P18	G435R	1303G>A	GCATGGTTTGCCAC <u>A</u> GGGTGCCCCTTGTG	CACAAGGGGCACCC <u>T</u> GTGGCAAACCATGC
P19	R465X	1393C>T	CAGGAGATGGGAAGTTTATTCCT <u>T</u> GAAAACCATTTGC	AATATATTCAGCAAATGGTTTTCA <u>A</u> AGGAATAAACTTCC
			TGAATATATT	CATCTCCTG
P20	R475X	1423C>T	ACCATTTGCTGAATATATTTACAAA <u>T</u> GAATAAAGCAGC	CCGGTCTCGCTGCTTTATTC <u>A</u> TTTGTAATATATTCAGC
			GAGACCGG	AAATGGT
P21	R490C	1468C>T	CCTACCCCTGTGGAG <u>T</u> GTGCACCCTATAAGG	CCTTATAGGGTGCAC <u>A</u> CTCCACAGGGGTAGG

The under-lined sequence in the primer indicates the position of the nucleotide change positions.

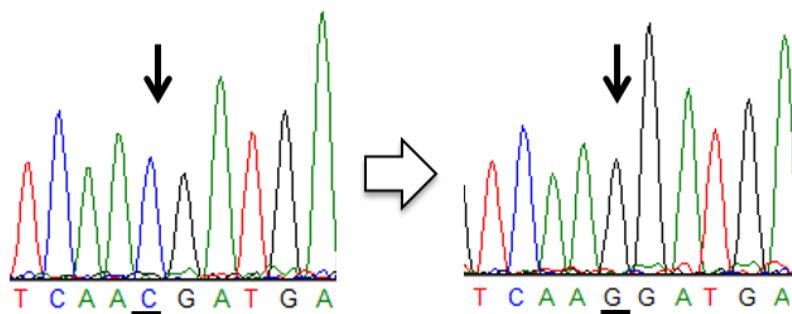
DPYS wild-type \Rightarrow *DPYS* R6Q
17G>A, R6Q



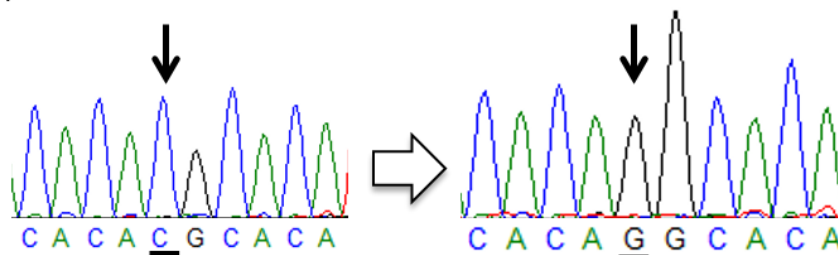
DPYS wild-type \Rightarrow *DPYS* L7V
19C>G, L7V



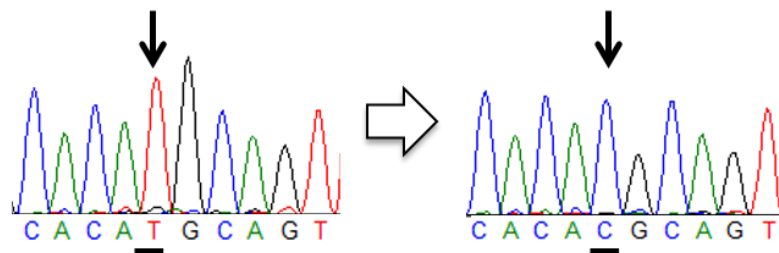
DPYS wild-type \Rightarrow *DPYS* N16K
48C>G, N16K



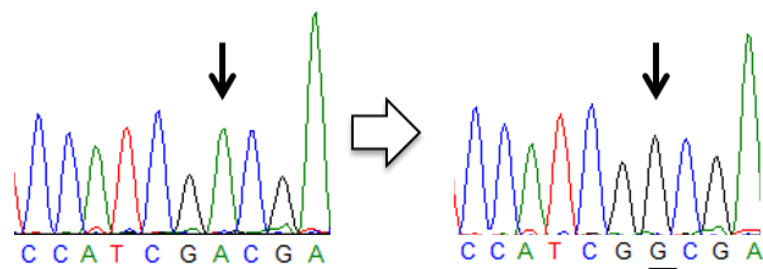
DPYS wild-type \Rightarrow *DPYS* T68R
203C>G, T68R



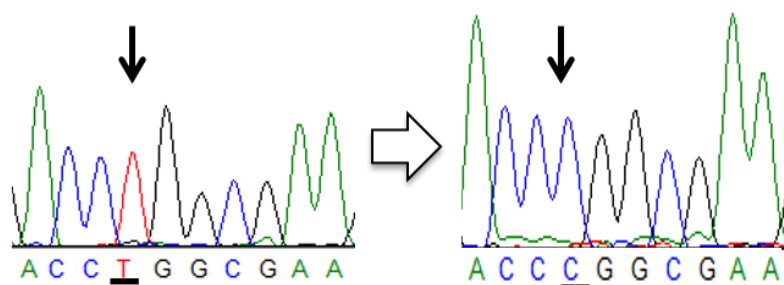
DPYS wild-type \Rightarrow *DPYS* M70T
209T>C, M70T



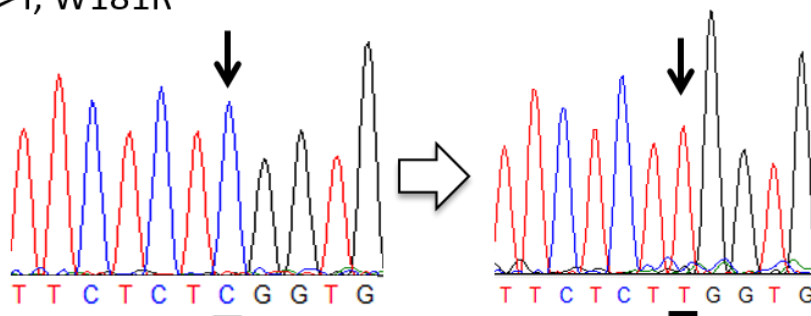
DPYS wild-type \Rightarrow *DPYS* D81G
242A>G, D81G



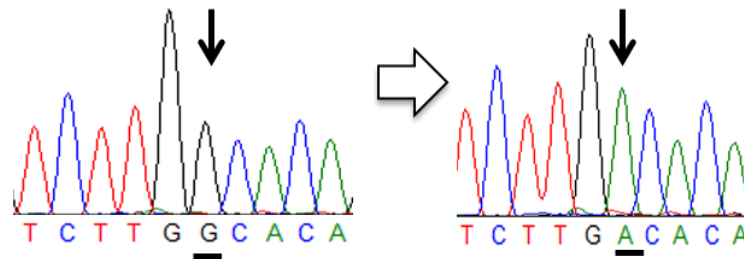
DPYS wild-type \Rightarrow *DPYS* W117R
349T>C, W117R



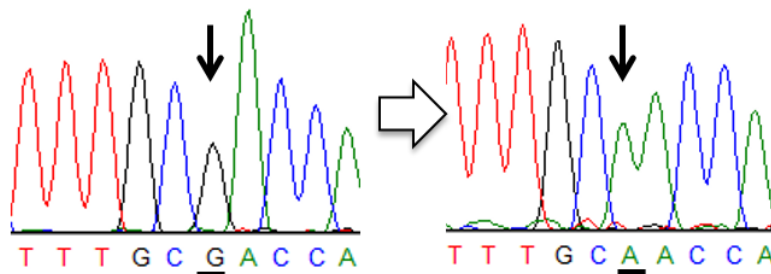
DPYS wild-type \Rightarrow *DPYS* W181R
541C>T, W181R



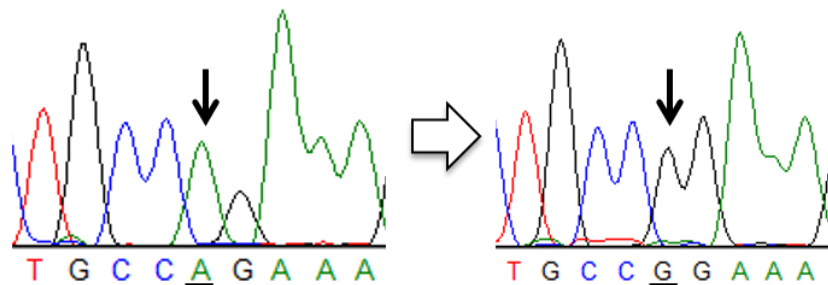
DPYS wild-type \Rightarrow *DPYS* G278D
833G>A, G278D



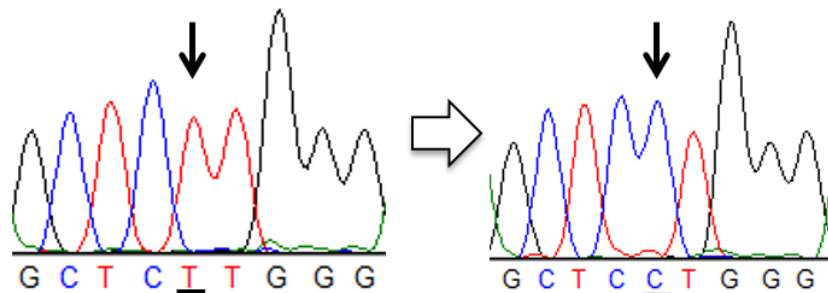
DPYS wild-type \Rightarrow *DPYS* R302Q
905G>A, R302Q



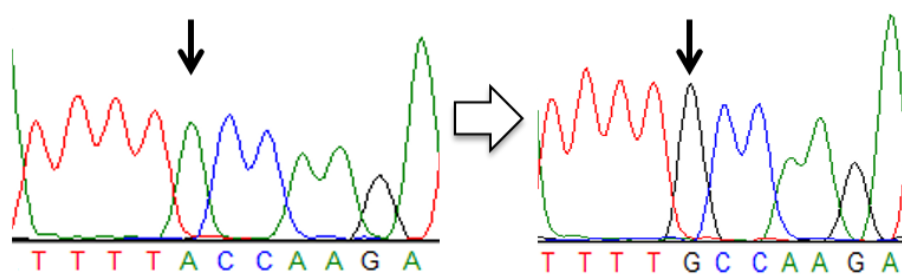
DPYS wild-type \Rightarrow *DPYS* Q334R
1001A>G, Q334R



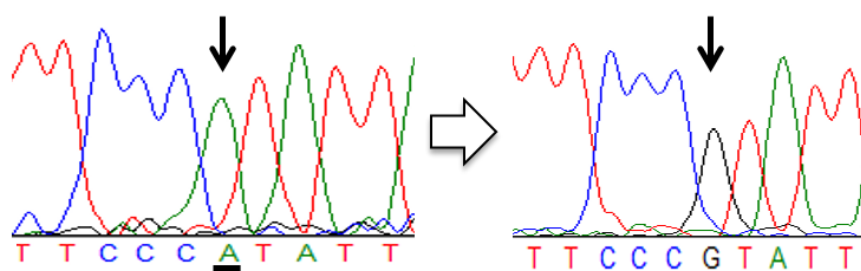
DPYS wild-type \Rightarrow *DPYS* L337P
1010T>C, L337P



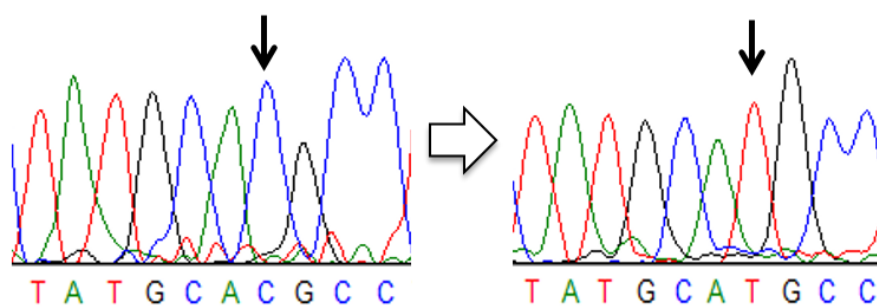
DPYS wild-type \Rightarrow DPYS T343A
1027A>G, T343A



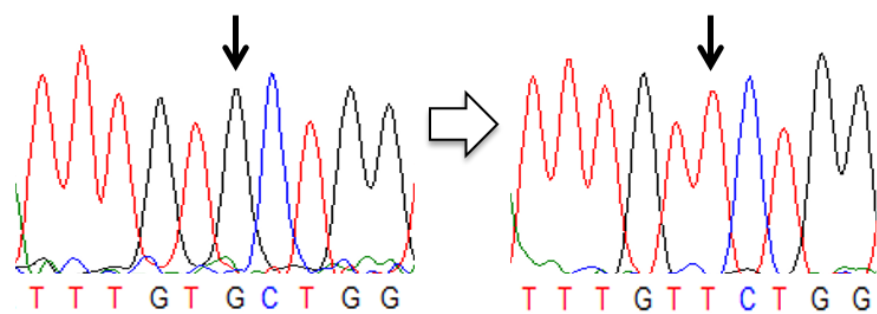
DPYS wild-type \Rightarrow DPYS W360R
1078T>C (Antisense A>G), W360R



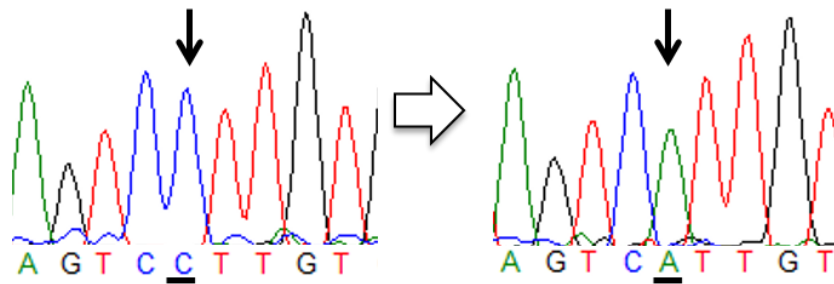
DPYS wild-type \Rightarrow DPYS V364M
1090G>A (Antisense C>T), V364M



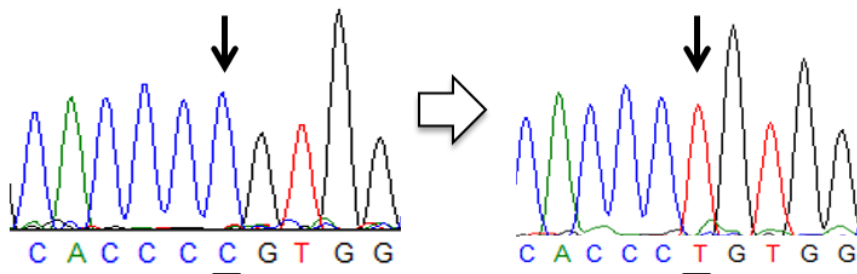
DPYS wild-type \Rightarrow DPYS S379R
1037C>A (Antisense G>T), S379R



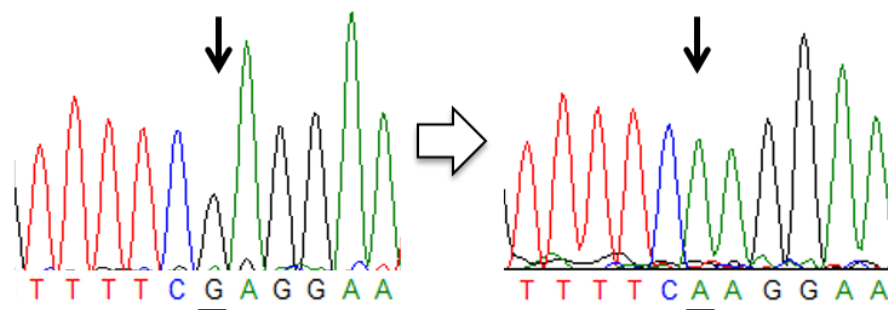
DPYS wild-type \Rightarrow *DPYS* R412M
1235G>T (Antisense C>A), R412M



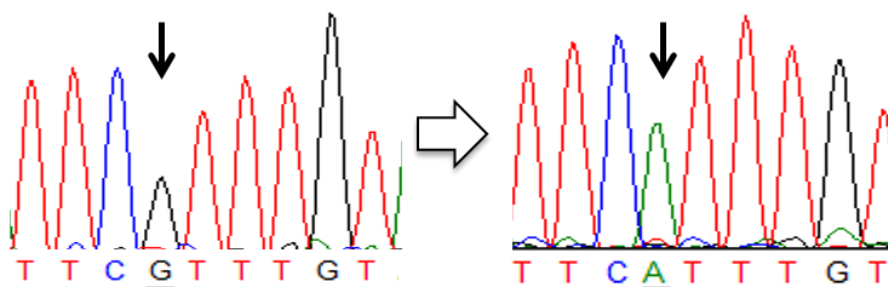
DPYS wild-type \Rightarrow *DPYS* G435R
1303G>A (Antisense C>T), G435R



DPYS wild-type \Rightarrow *DPYS* R465X
1393C>T (Antisense G>A), R465X



DPYS wild-type \Rightarrow *DPYS* R475X
1423C>T (Antisense G>A), R475X



DPYS wild-type \Rightarrow *DPYS* R490C
 1468C>T (Antisense G>A), R490C

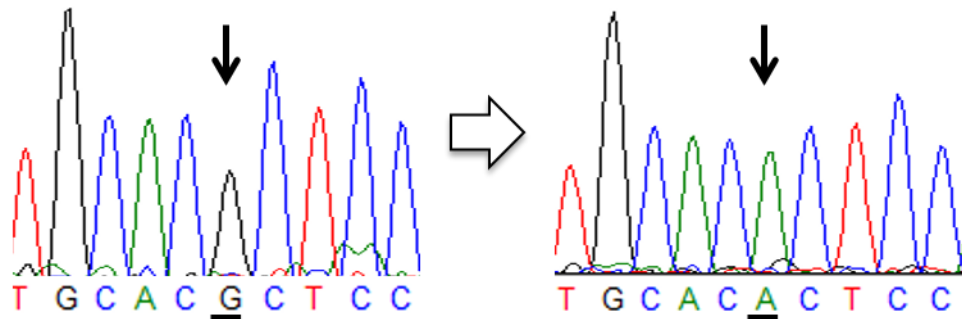


Fig. 31. Nucleotide changes of *DPYS* cDNA by site-directed mutagenesis.

Arrows indicate the position of the nucleotide change positions.

第三節 ヒト胎児腎臓由来 293FT 細胞株を用いた DHP バリエントの発現

293FT 細胞中に野生型及びバリエント DHP を一過性に発現させた。70%以上コンフルエントの状態となった細胞に、リポフェクション法で野生型及びバリエント DHP 発現プラスミド DNA を導入し 24 時間培養した。なお、トランスフェクション効率補正のため、pCMV6-*lacZ* 発現プラスミドを同時に導入して β -galactosidase を共発現させた。回収した細胞から、遠心分離法により S9 画分を調製した。DHP の発現は、抗ヒト DHP ポリクローナル抗体を用いたイムノブロット法により確認した。その結果、発現させた全ての DHP バリエントにおいて、DHP の分子量である 54 kDa 付近に抗ヒト DHP 抗体と特異的に反応するタンパク質が検出された (Fig. 32A)。R465X 及び R475X については、塩基置換により終止コドンが発生するために、合成途中でタンパク質翻訳が停止して低分子量側にバンドが検出された。また、*DPYS* cDNA 発現ベクターを導入していない 293FT 細胞の S9 画分において、抗ヒト DHP 抗体と反応するタンパク質は認められなかった。全ての DHP 含有 S9 画分及びコントロール S9 画分において、内在性コントロールとして用いた GAPDH の発現量は同程度であった。なお、His-tag 融合精製 DHP タンパク質 1 μ g のときの発光強度を 1 Unit として、Unit 換算することで DHP の発現量とした (Fig. 32B)。N16K、M70T、W117R、Q334R、T343A、W360R、S379R、G435R、R465X 及び R490C の 10 種の DHP バリエントについては有意に発現量が低下した。

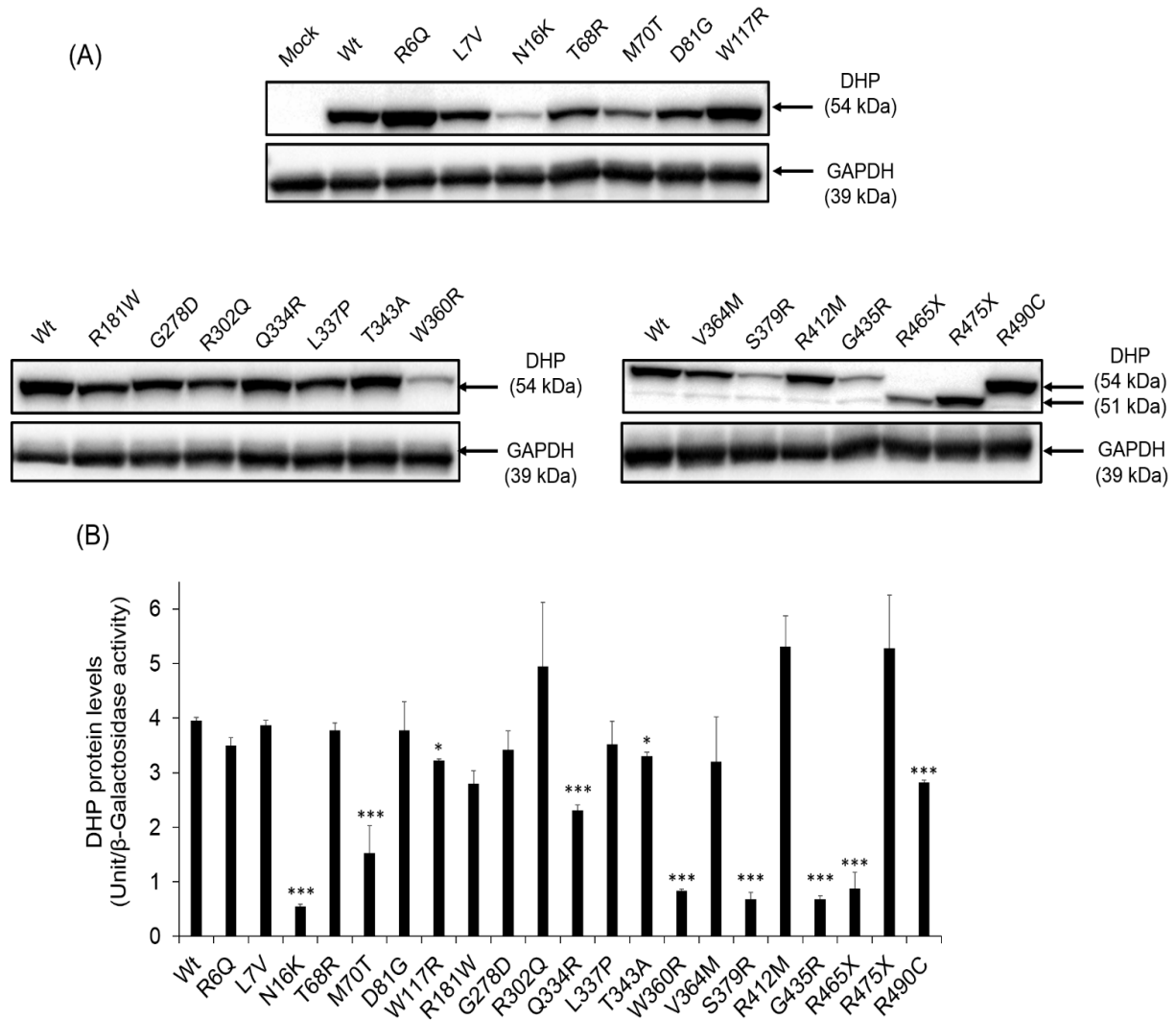


Fig. 32. Expression levels of wild-type and variant DHP proteins. (A) DHP protein levels were determined through SDS-PAGE and immunoblotting analysis. (B) DHP expression levels were normalized relative to β -galactosidase activity in 293FT cells. Bars represent means \pm SD of three independent assays. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.005$ compared to wild-type DHP.

第四節 UH₂を用いた DHP バリエント酵素の機能評価

野生型及び各 DHP バリエント酵素を発現させた 293FT 細胞の S9 画分 10 µg に対して、0.3～300 µM の UH₂ を加えて 37°C で 10 分間代謝反応を行った。生成物である bUPA を LC-MS/MS で定量し、各 DHP バリエントの酵素反応速度論的パラメータを算出した。なお、UH₂ 加水分解反応の V_{max} 、及び固有クリアランス CL_{int} はイムノプロット法により換算した DHP Unit により補正した。

野生型を含め、R6Q、L7V、W117R、R181W、Q334R、T343A、V364M 及び R412M の 8 種の DHP バリエントで、Michaelis-Menten の式に従うキネティックカーブが得られた (Fig. 33)。各バリエントの UH₂ 加水分解反応の酵素反応速度論的パラメータを Table 8 に示した。W117R、Q334R、T343A、V364M 及び R412M の 5 種の DHP バリエントで CL_{int} が有意に低下した。N16K、T68R、M70T、D81G、G278D、R302Q、L337P、W360R、S379R、G435R、R465X、R475X 及び R490C のバリエント DHP において、酵素活性の消失が認められた。

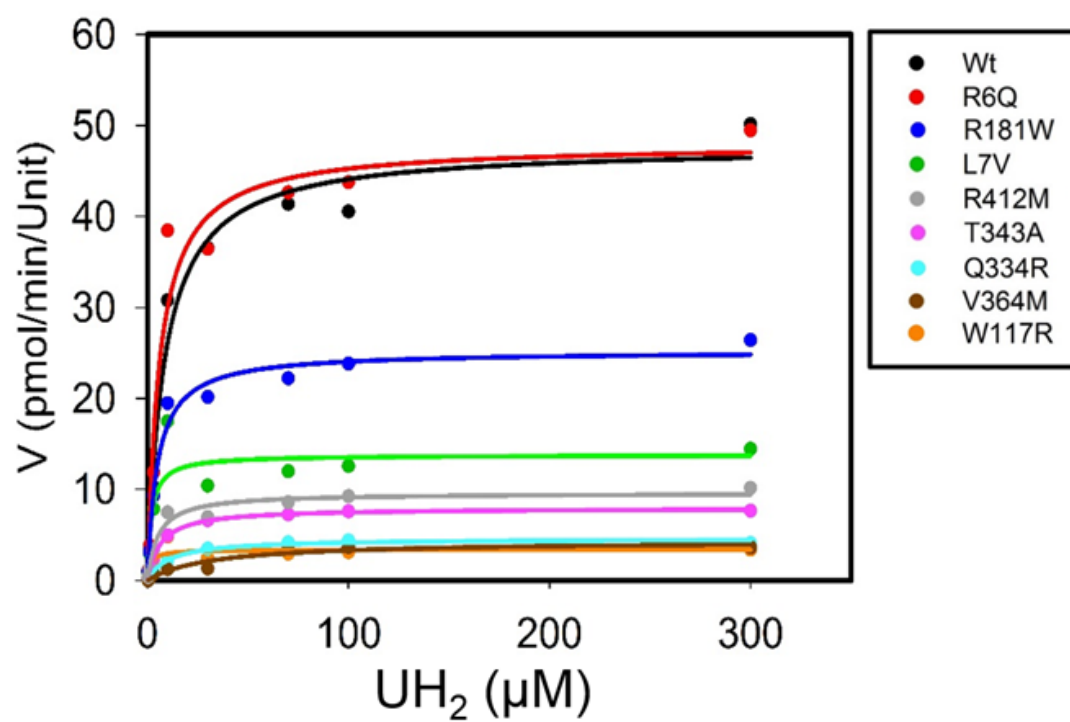


Fig. 33. Michaelis-Menten curves of DHP variants. The kinetic parameters K_m , V_{max} , and intrinsic clearance of UH_2 hydrolytic ring opening were determined.

Table 8. Kinetic parameters of DHP variant mediated UH₂ metabolism

Variants	K_m (μM)	V_{max} (pmol/min/Unit)	CL_{int} (V_{max}/K_m)(μL/min/Unit)	% of Wild-type CL_{int}
Wild type	9.75 ± 0.58	46.33 ± 2.24	4.76 ± 0.28	100.00
R6Q	9.60 ± 0.41	48.18 ± 0.59	5.02 ± 0.16	138.25
L7V	2.40 ± 0.19 **	12.30 ± 0.44 **	5.14 ± 0.26	121.45
W117R	1.80 ± 0.14 **	2.99 ± 0.06 **	1.66 ± 0.10 **	38.32
R181W	5.49 ± 0.21 *	24.38 ± 1.12 **	4.45 ± 0.27	90.11
Q334R	13.65 ± 1.77	4.99 ± 0.16 **	0.37 ± 0.04 **	7.42
T343A	6.92 ± 0.45 *	8.06 ± 0.13 **	1.17 ± 0.06 **	21.40
V364M	4.92 ± 0.29 *	1.54 ± 0.09 ***	0.31 ± 0.02 **	5.41
R412M	6.29 ± 1.23	9.29 ± 0.02 **	1.51 ± 0.26 ***	32.59

These data represent the mean ± SD of three independently performed catalytic assays.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.005$ compared to wild-type DHP.

The kinetic parameters of N16K, T68R, M70T, D81G, G278D, R302Q, L337P, W360R, S379R, G435R, R465X, R475X, and R490C could not be determined because the enzymatic activity was not detected at the highest substrate concentration assayed (300 μM UH₂).

第五節 FUH₂を用いた DHP バリエント酵素の機能評価

野生型及び各 DHP バリエント酵素を発現させた 293FT 細胞の S9 画分 10 µg に対して、0.3～300 µM の FUH₂を加えて 37°C で 10 分間代謝反応を行った。生成物である bUPA を LC-MS/MS で定量し、各 DHP バリエントの酵素反応速度論的パラメータを算出した。なお、FUH₂加水分解反応の V_{max} 、及び固有クリアランス CL_{int} はイムノブロット法により換算した DHP Unit により補正した。

UH₂加水分解反応と同様に、野生型を含め、R6Q、L7V、W117R、R181W、Q334R、T343A、V364M 及び R412M の 8 種の DHP バリエントで、Michaelis-Menten の式に従うキネティックカーブが得られた (Fig. 34)。各バリエントの FUH₂加水分解反応の酵素反応速度論的パラメータを Table 9 に示した。W117R、Q334R、T343A、V364M 及び R412M の 5 種の DHP バリエントで CL_{int} が有意に低下した。N16K、T68R、M70T、D81G、G278D、R302Q、L337P、W360R、S379R、G435R、R465X、R475X 及び R490C では酵素活性の消失が認められた。

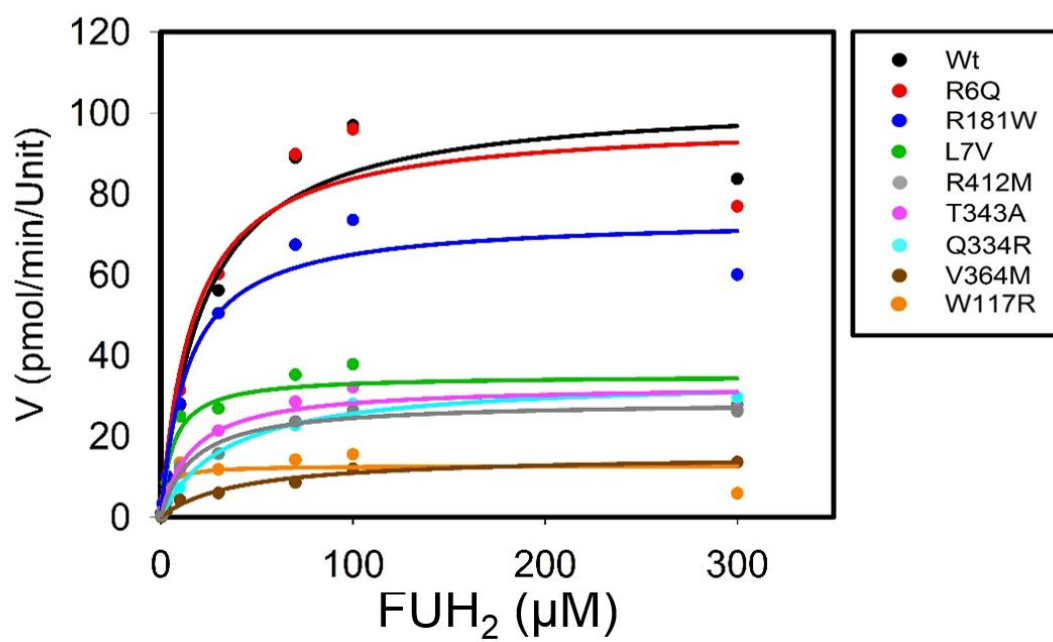


Fig. 34. Michaelis-Menten curves of DHP variants. The kinetic parameters K_m , V_{max} , and intrinsic clearance of FUH_2 hydrolytic ring opening were determined.

Table 9. Kinetic parameters of DHP variant mediated FUH₂ metabolism

Variants	K_m (μM)	V_{max} (pmol/min/Unit)	CL_{int} (V_{max}/K_m)(μL/min/Unit)	% of Wild-type CL_{int}
Wild type	21.61 ± 1.85	103.81 ± 4.61	4.82 ± 0.21	100.00
R6Q	17.09 ± 2.63 *	98.16 ± 6.92	5.80 ± 0.53 *	120.36
L7V	6.27 ± 0.10 *	35.01 ± 0.12 *	5.59 ± 0.09	116.04
W117R	7.57 ± 1.04 *	15.91 ± 0.28 **	2.13 ± 0.27 ***	44.14
R181W	14.08 ± 1.53	74.15 ± 2.92 *	5.29 ± 0.37	109.93
Q334R	35.57 ± 3.40	34.47 ± 1.28 **	0.97 ± 0.06 ***	20.19
T343A	15.93 ± 2.62	32.67 ± 1.41 **	2.08 ± 0.26 ***	43.16
V364M	42.11 ± 11.73	15.54 ± 1.67 **	0.38 ± 0.09 ***	7.99
R412M	16.59 ± 0.59	28.59 ± 0.95 **	1.74 ± 0.07 ***	35.80

These data represent the mean ± SD of three independently performed catalytic assays.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.005$ compared to wild-type DHP.

The kinetic parameters of N16K, T68R, M70T, D81G, G278D, R302Q, L337P, W360R, S379R, G435R, R465X, R475X, and R490C could not be determined because the enzymatic activity was not detected at the highest substrate concentration assayed (300 μM FUH₂).

第六節 Blue native-PAGE による DHP 多量体形成の確認

発現 DHP タンパク質を含む S9 画分と Blue native-PAGE 用 sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 7.4、40% glycerol) 及び 10% G-250 を混合し、5-20% グラジエントポリアクリルアミドゲルを用いてタンパク質非変性状態での電気泳動を行った。泳動後の DHP タンパク質は、抗ヒト DHP ポリクローナル抗体を用いたイムノブロット法により確認した。その結果、 CL_{int} が野生型と同程度のバリエント (R6Q、L7V 及び R181W) においては明瞭な多量体形成が確認された。一方で、 CL_{int} が 20% 以下に低下 (Q334R 及び V364M) または活性が消失 (N16K、T68R、M70T、D81G、G278D、R302Q、L337P、W360R、S379R、G435R、R465X、R475X 及び R490C) するバリエントでは単量体と考えられるバンド強度の増強、あるいはレーン上のバンドが消失した。 CL_{int} が 20-80% のバリエント (W117R、T343A 及び R412M) においては、多量体と単量体の両方のバンドが認められた。

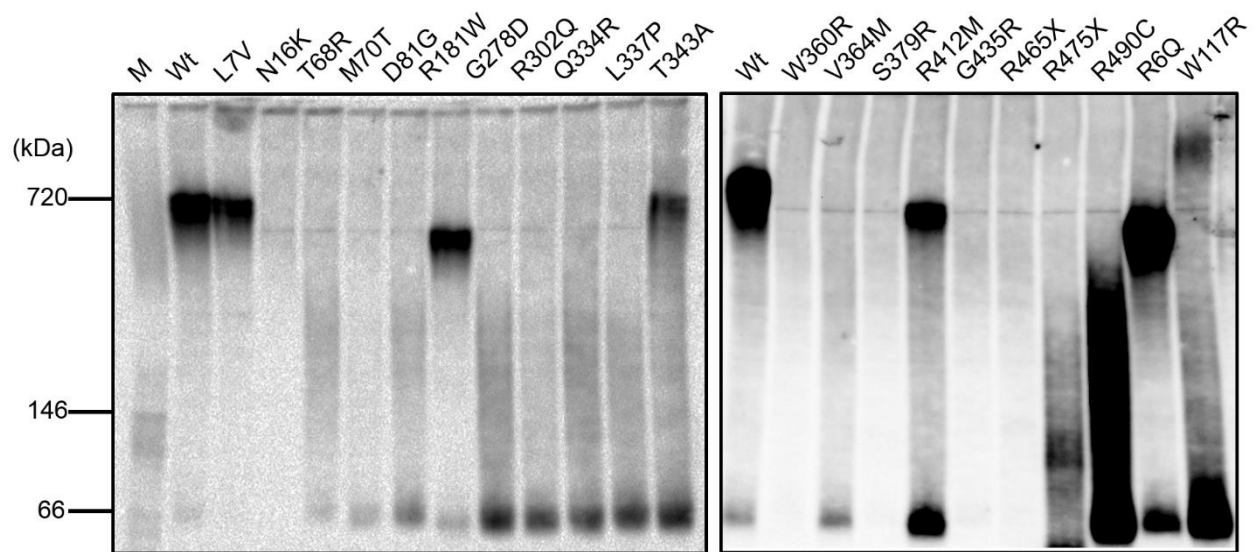


Fig. 35. Blue native PAGE and immunoblotting analysis showing immunoreactive DHP variant proteins. Blue native PAGE was performed using Tris-glycine buffer and 5%–20% polyacrylamide gels; 9 μ g of S-9 fractions of DHP variant proteins was loaded into each lane in triplicate. DHP variants were detected using polyclonal antibodies against human DHP.

第七節 DHP バリエントの安定性の検討

293FT 細胞内中の発現 DHP タンパク質の安定性が酵素活性に与える影響を検討するため、トランスフェクション 24 時間後にタンパク質翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドを添加し、24 時間及び 48 時間後の DHP 発現量を SDS-PAGE 後のイムノブロットで確認した (Fig. 36)。なお、それぞれのバンド強度を定量した結果を Fig. 37 に示した。各バリエントのシクロヘキシミド添加時 (0 hr) の発現量を 100% とし、各時間における残存量パーセントとして示した。野生型を含め R6Q、L7V、D81G、W117R、R181W、R302Q、Q334R、L337P、T343A、V364M、R412M 及び R490C の DHP バリエントでは発現量がほとんど一定であったのに対し、N16K、T68R、M70T、G278D、W360R、S379R、G435R、R465X 及び R475X の 9 種の DHP バリエントで発現量が時間経過により減少していることが明らかとなった。

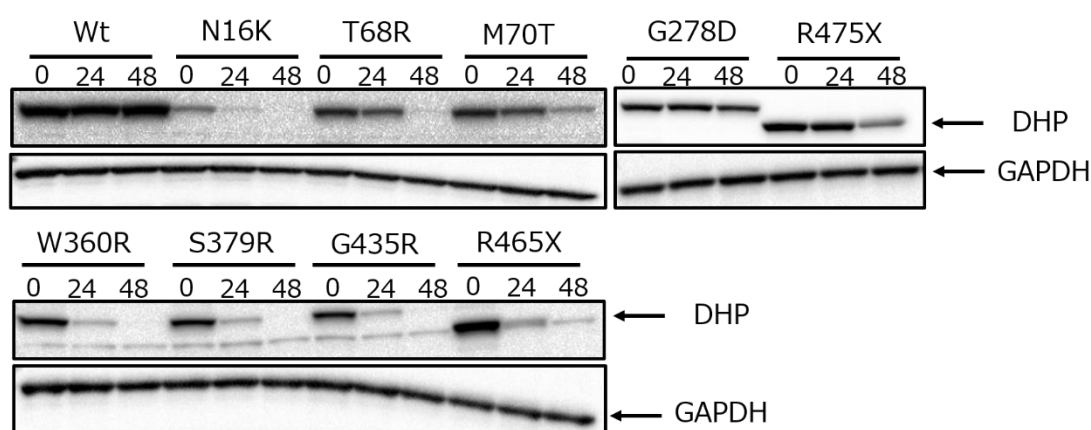


Fig. 36. SDS-PAGE and immunoblotting analysis after cycloheximide treatment: 293FT cells were transfected with *DPYS* variants and then incubated with 50 µg/mL cycloheximide for 24–48 h.

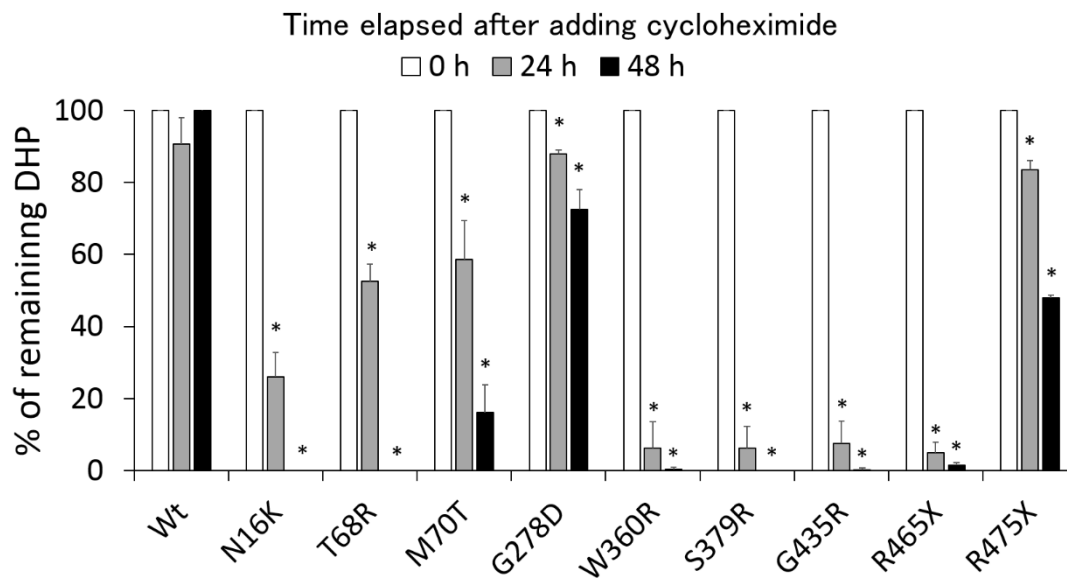


Fig. 37. DHP expression levels after cycloheximide treatment: 293FT cells were transfected with *DPYS* variants and then incubated with 50 μ g/mL cycloheximide for 24–48 h. DHP protein levels were determined through SDS-PAGE and immunoblotting analysis. Bars represent the mean \pm SD of three independent assays. * $P < 0.05$ compared to 0 h for each variant.

第八節 DHP の分解に対するオートファジー系の関与

一般的にタンパク質の分解は、非特異的なオートファジー系による分解とユビキチン化を特異的な指標としたプロテアソーム系の 2 つの経路が存在する[89-92]。野生型と比較してタンパク質の分解が亢進していた DHP バリエントの分解経路を特定するため、まず始めにオートファジー系の関与の有無を検討した。N16K、T68R、M70T、G278D、W360R、S379R、G435R、R465X 及び R475X の 9 種の DHP バリエントについて、発現ベクターのトランスフェクション 24 時間後に隔離膜成長阻害剤である 3-メチルアデニンまたはリソソーム阻害剤である塩化アンモニウムを添加し、24 時間後の DHP バリエント発現量を SDS-PAGE 後のイムノブロットで確認した (Fig. 38)。試薬無添加の時の発現量を 100%として、DHP 発現の変化を Fig. 39 に示した。その結果、野生型を含むすべてのバリエントで発現量が増加しており、オートファジー系による分解は DHP バリエント特異的ではないことが認められた。

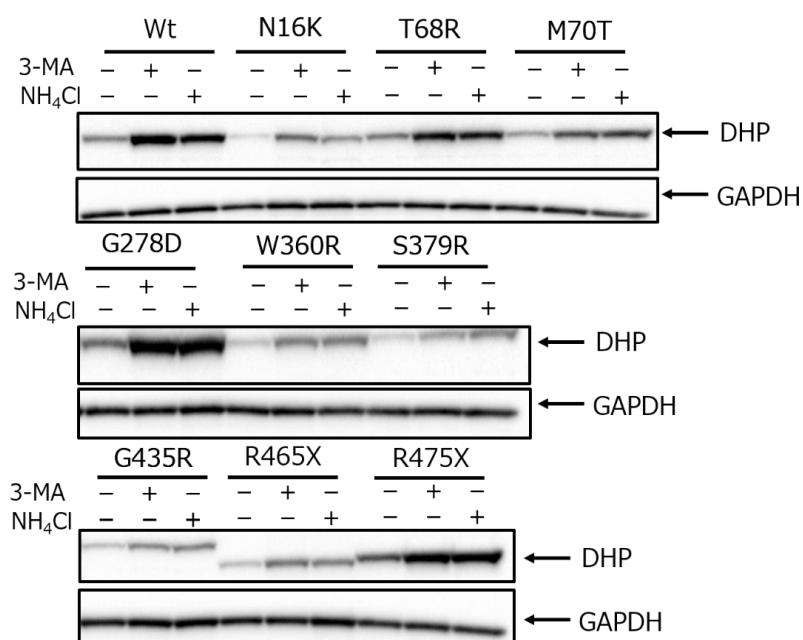


Fig. 38. SDS-PAGE and immunoblotting analysis after 3-MA or NH₄Cl treatment.

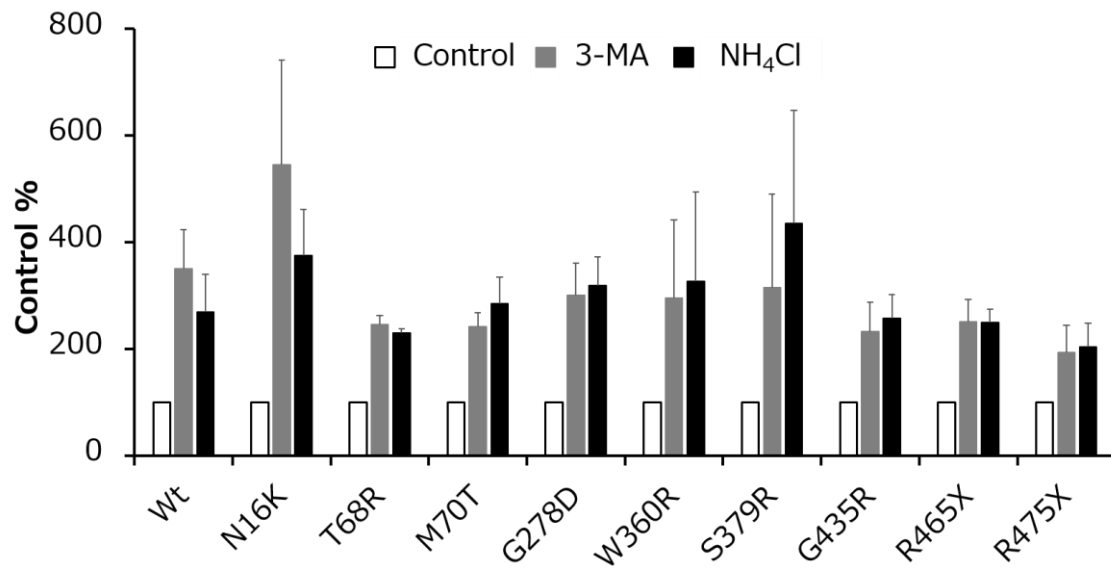


Fig. 39. DHP expression levels after 3-MA or NH₄Cl treatment: 293FT cells were transfected with *DPYS* variants and then incubated with 3-MA or NH₄Cl for 24 h. DHP protein levels were determined through SDS-PAGE and immunoblotting analysis. Bars represent the mean \pm SD of three independent assays.

第九節 DHP の分解に対するプロテアソーム系の関与

DHP バリエーションにおいてはオートファジー系のタンパク質分解への寄与が低いことが推測されたため、もう一方のプロテアソームによる DHP タンパク質分解の関与を検討した。N16K、T68R、M70T、G278D、W360R、S379R、G435R、R465X 及び R475X の 9 種の DHP バリエーションについて、トランスフェクション 24 時間後にプロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブを添加し、24 時間後の発現量を SDS-PAGE 後のイムノブロットティングにより確認した (Fig. 40A)。ボルテゾミブ添加直後の各 DHP バリエーション発現量をコントロールとして、添加 24 時間後の DHP 発現の変化を Fig. 40B に示した。その結果、野生型を除くいずれの DHP バリエーションにおいても有意な発現量の増加が認められた。

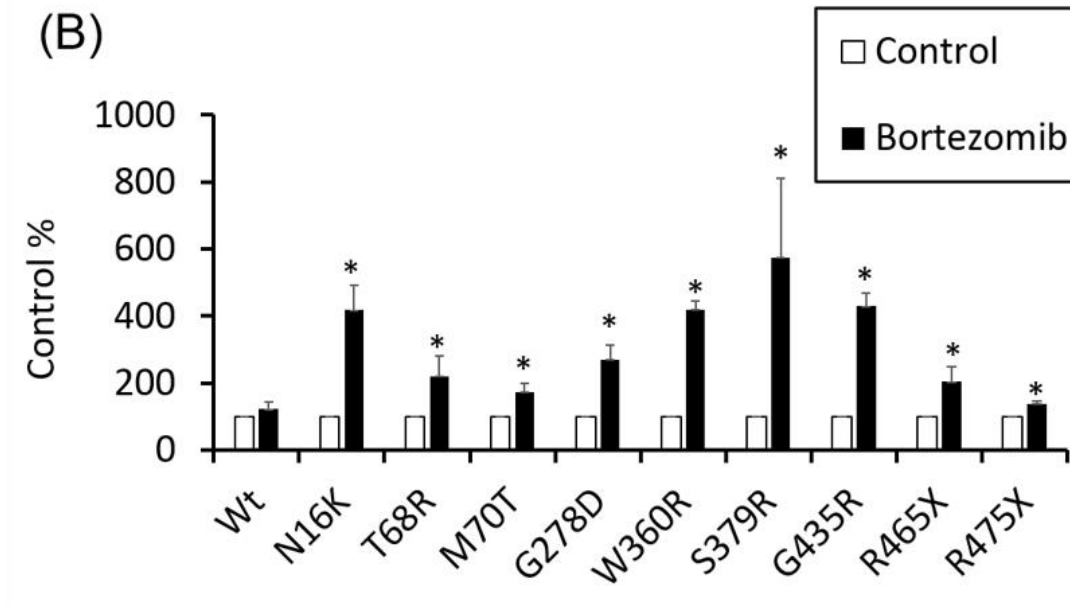
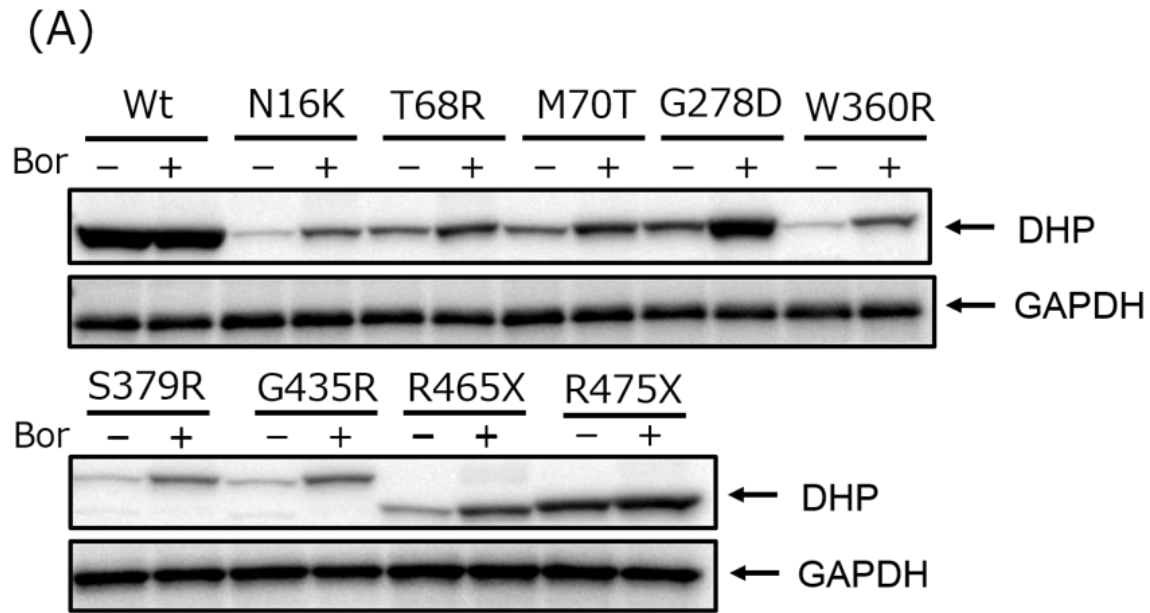


Fig. 40. DHP expression levels after proteasome inhibition. After transfection with *DPYS* variants, 293FT cells were incubated with 0.5 μ M bortezomib for 24 h. (A) DHP protein levels determined through SDS-PAGE and immunoblotting analysis. (B) Quantification of DHP protein levels. Bars represent the mean \pm SD of three independent assays. * $P < 0.05$ compared to control.

第十節 考察

本章では、これまでに報告されている 21 種の *DPYS* 遺伝子多型に由来する DHP バリエントについて、*in vitro* 解析系を構築して酵素タンパク質の網羅的な機能変化を解析した。その結果、野生型と比較して、5 種の DHP バリエント (W117R、Q334R、T343A、V364M 及び R412M) において活性が低下し、13 種の DHP バリエント (N16K、T68R、M70T、D81G、G278D、R302Q、L337P、W360R、S379R、G435R、R465X、R475X 及び R490C) において活性が消失することが明らかとなった。また、UH₂ と FUH₂ の二種類の基質に対する各 DHP バリエントの CL_{int} 値に関して相関解析を行ったところ、有意な相関性が認められ ($r^2 = 0.947$ 、 $P < 0.001$)、基質特異性は認められなかった (Fig. 41)。両基質の大きさや形状はほとんど変わらないため、DHP の加水分解においては、FUH₂ のフッ素原子の影響はほとんどないと考えられた。

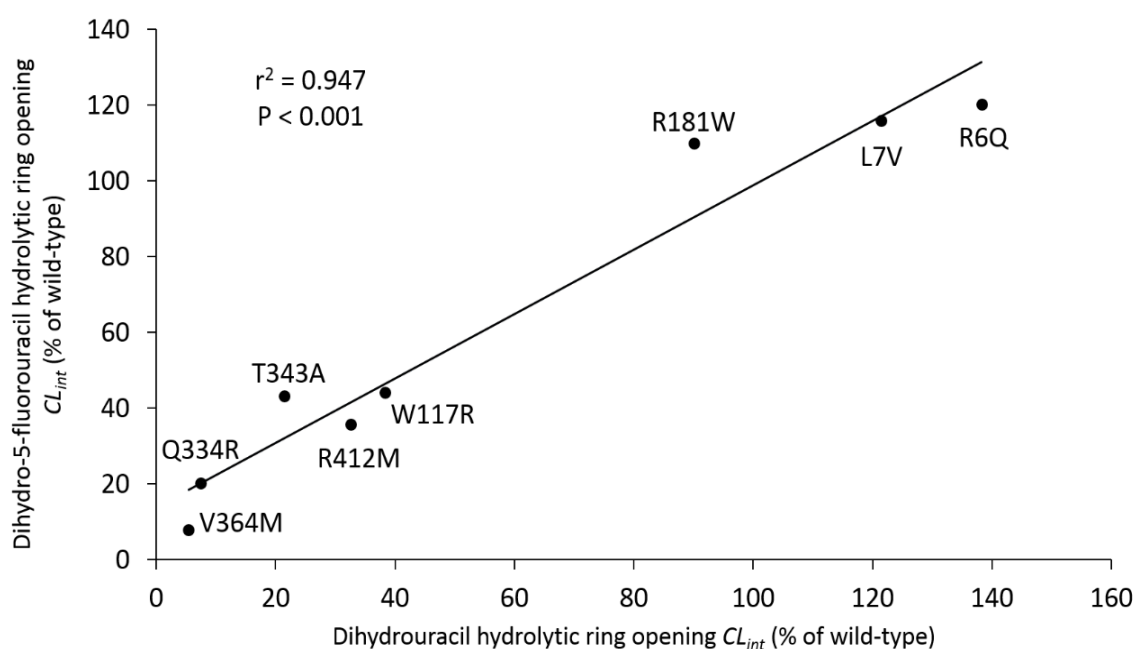


Fig. 41. Correlation between CL_{int} ratios calculated for DHP variants relative to the wild type, with regard to hydrolytic ring opening of UH₂ and FUH₂. The CL_{int} ratios for the hydrolytic ring opening of FUH₂ and UH₂ are plotted on the horizontal and vertical axes, respectively.

シクロヘキシミドの添加によりタンパク質の翻訳を阻害した場合、293FT 細胞中に発現させた 8 種の DHP バリエント (N16K、T68R、M70T、G278D、W360R、S379R、G435R、R465X 及び R475X) で経時的な発現量の減少が認められた。また、その発現量の減少はプロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブの添加により回復することから、DHP の細胞内におけるタンパク質分解は、オートファジー系ではなくプロテアソーム系によって制御されていることを見出した。このことから、DHP バリエントの酵素活性が消失するメカニズムの 1 つとして、アミノ酸置換により DHP のフォールディングが変化することによりユビキチン化を受け、プロテアソームにより DHP バリエント特異的に分解されていることが考えられた。

これまでの報告から DHP は四量体を形成すると考えられている[93-95]。Hsieh らはミドリフグ DHP の結晶構造を明らかにし、DHP の活性には多量体の形成が重要であるとしている[96]。ヒト DHP 単量体の構造を Fig. 42 に示した。DHP は TIM バレル構造を形成する (α/β)₈ ドメイン (メジャードメイン) と β シート構造のマイナードメイン及び尾のように長く伸びた C 末端からなる[97]。TIM バレル構造は 8 つの α ヘリックスと 8 つの平行 β シートからなるタンパク質フォールドであり、疎水性コアを形成し触媒作用を示すドメインである[98]。分子内の H67、H69、H192、H248 の 4 つのヒスチジン残基と D326 及び K159 の 6 つのアミノ酸残基に対し、2 つの Zn^{2+} イオンが配位し活性中心を構成している[94, 96, 99-102]。また、その近傍に P73-R78 と M162-M169 が 2 つのダイナミックループを形成して基質ポケットの蓋の役割を果たしている。酵素反応においては、基質がポケットに入ると、それぞれのダイナミックループ上に存在する F74 と Y164 と基質との疎水性相互作用によりポケットの蓋が閉じる。次に、加水分解反応が進行して基質の環構造が開裂すると、疎水性相互作用が消失してダイナミックループが開く。その際に、もう一方の単量体の C 末端と P73-R78 が作るループ構造が相互作用することで蓋が開くと考えられている[103-106]。したがって、この分子メカニズムより、DHP が酵素活性を発揮するには少なくとも二量体形成が必須であると考えられている。

本研究では、タンパク質非変性状態で行う Blue native-PAGE による解析系を構築し、電気泳動後のイムノブロットニングにより、アミノ酸置換が DHP 多量体形成に与える影響を検討し

た。その結果、720 kDa 付近に多量体と推測されるバンドと 66 kDa 付近に単量体と推測されるバンドが検出された。これまでに DHP は 4 量体を形成すると考えられてきたが[93]、720 kDa 付近の多量体は DHP の分子量から推計すると 10 量体以上となる。Blue native-PAGE は系に添加する CBB の濃度やタンパク質の立体的なコンフォメーションの影響を大きく受けるため、この結果から一概に正確な分子量を求めることはできない。しかし、多量体形成が認められた DHP バリエントでは、野生型 DHP に近い酵素活性が認められており、各バリエントの Blue native-PAGE のバンドパターンと CL_{int} 値の間には密接な関連性が認められた。以上の結果より、DHP の酵素活性には多量体の形成が極めて重要であることが明らかとなった。

9 種の DHP バリエント (D81G、W117R、R302Q、Q334R、L337P、T343A、V364M、R412M 及び R490C) では酵素活性が低下または消失していたが、プロテアソームによるタンパク質分解の亢進は認められなかった。したがって、これらのバリエントでは、導入されたアミノ酸置換により活性中心や多量体形成能が変化して、DHP 活性の低下または消失が生じたと考えられた。そこで、ヒト DHP の X 線回折結晶構造に対して FUH₂ をドッキング後、各アミノ酸置換を導入した 3D シミュレーションモデルにより、FUH₂ に対する各 DHP バリエントの代謝活性変化を構造化学的に考察した。

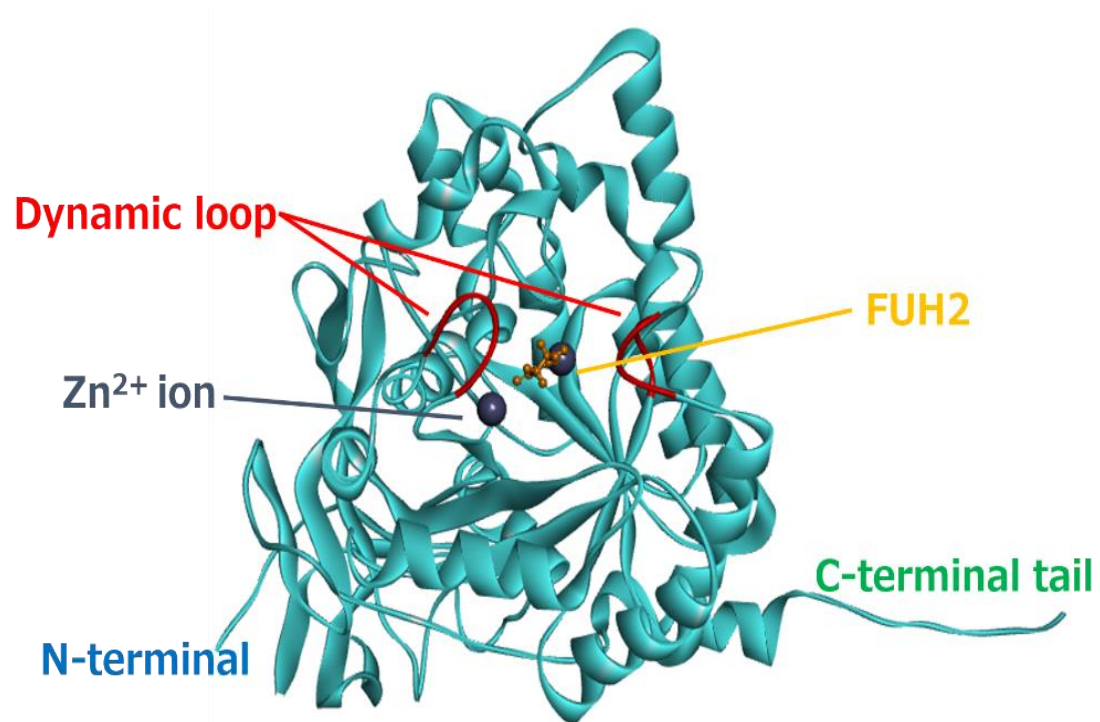


Fig. 42. Diagram showing overall structure of human DHP, FUH₂, and Zn²⁺. FUH₂ is colored orange, two dynamic loops are colored red, Zn²⁺ ions are shown as gray spheres.

D81G

D81G バリエントはいずれの基質においても活性の消失が認められた。D81 は P73-R78 が形成するダイナミックループの根元に位置している。野生型では D81 の側鎖が N327、T329、Q421 と水素結合を形成しており活性中心を形成している。G81 へのアミノ酸置換によってこれらの水素結合が消失することで、活性中心やダイナミックループの構造に歪みが生じ、ループの開閉の自由度に影響していると考えられる。また、野生型では 74F と 164Y 間に疎水性相互作用が形成されており、これが FUH₂ をポケットに固定する役割を果たしていると考えられるが、G81 の場合、この相互作用も消失していたことから酵素活性が消失したと考えられた。

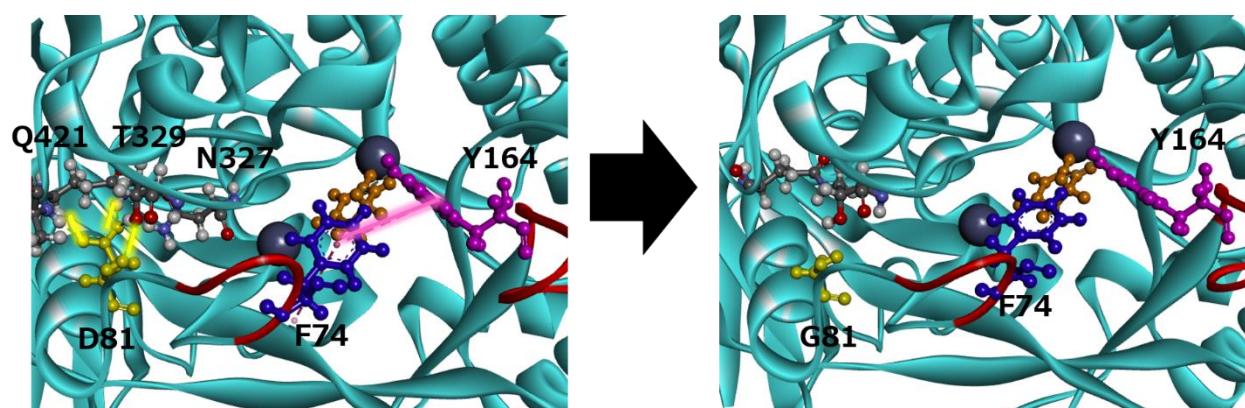


Fig. 43. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DHP wild-type (left panel) and D81G (right panel).

The residues D81 and G81 are shown in yellow.

W117R

W117R バリエントは UH₂ 代謝の CL_{int} は野生型の 38%、FUH₂ 代謝の CL_{int} は野生型の 44% に低下した。野生型において、W117 は活性中心の下部に位置し、D100 との水素結合を介し、T68 及び H69 と相互作用している。H69 は基質ポケットを構成するアミノ酸であり、FUH₂ と直接水素結合している。R117 に置換された場合、D100 との水素結合に加え、静電相互作用が

生じる。その結果、D100 と T68 及び H69 との相互作用が変化し、活性中心の立体的コンフォメーションが変化したことで、活性が低下したと考えられた。

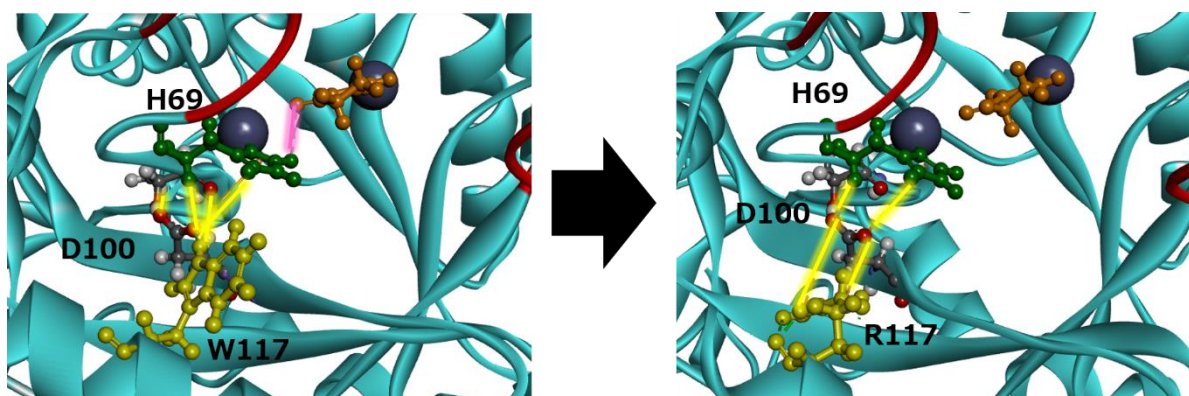


Fig. 44. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DHP wild-type (left panel) and W117R (right panel). The residues W117 and R117 are shown in yellow.

R302Q

R302Q バリエントはいずれの基質においても活性の消失が認められた。野生型において R302 は R221 との水素結合を介し、Y164 及び E194 と相互作用している。さらに、E194 は基質である FUH₂ と静電相互作用を形成している。Q302 に置換されると、R221 との水素結合が消失し、その結果、ポケットの蓋の役割を担う Y164 や FUH₂ と相互作用する E194 のコンフォメーションの変化により、活性が消失したと考えられた。

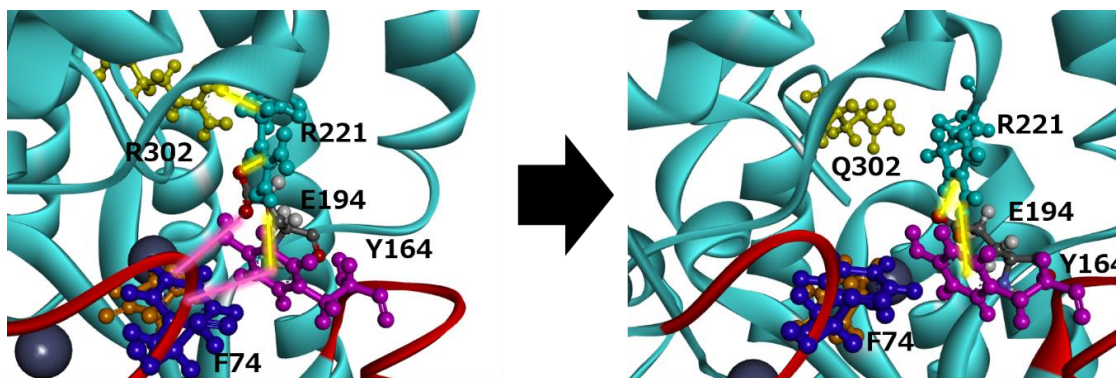


Fig. 45. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DHP wild-type (left panel) and R302Q (right panel). The residues R302 and Q302 are shown in yellow.

Q334R

Q334R バリエントは UH_2 代謝の CL_{int} は野生型の 7%、 FUH_2 代謝の CL_{int} は野生型の 20% に低下した。野生型において Q334 は活性中心の上部に位置し、ダイナミックループに存在する S77 及び R78 と水素結合を形成しているが、R334 への置換によって M75 及び R78 との水素結合が形成される。この相互作用の変化により S77 の側鎖の向きが変化するため、結果的にダイナミックループ近傍のコンフォメーションが変化することで、ダイナミックループの開閉に影響し、活性が低下したと考えられた。

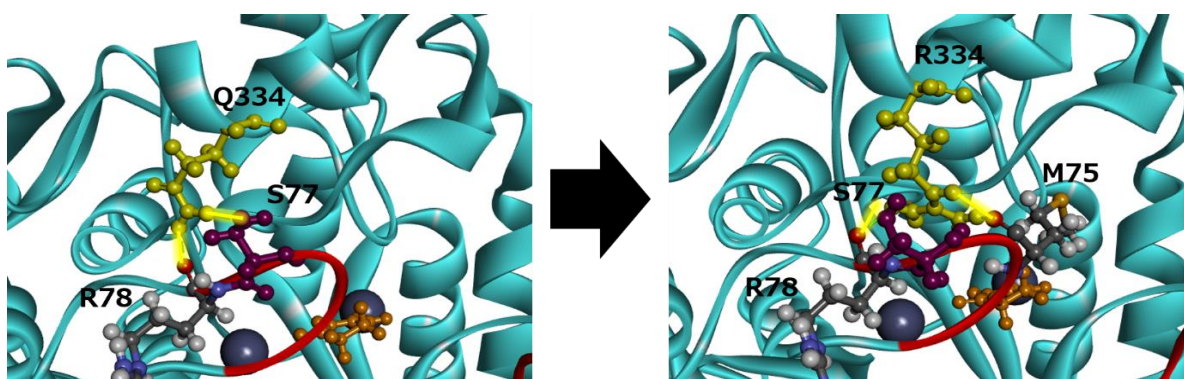


Fig. 46. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DHP wild-type (left panel) and Q334R (right panel). The residues Q334 and R334 are shown in yellow.

L337P

L337P バリアントはいずれの基質においても活性の消失が認められた。野生型において L337 は活性中心の上部に位置し、Q334 との水素結合を介し、ダイナミックループ上の S77、R78 と相互作用している。P337 に置換されると、Q334 に加えて C333 とも水素結合を形成する。そのため、ダイナミックループ構造に変化が生じ、F74 と Y164 間の疎水性相互作用も消失する結果、活性が消失したと考えられた。

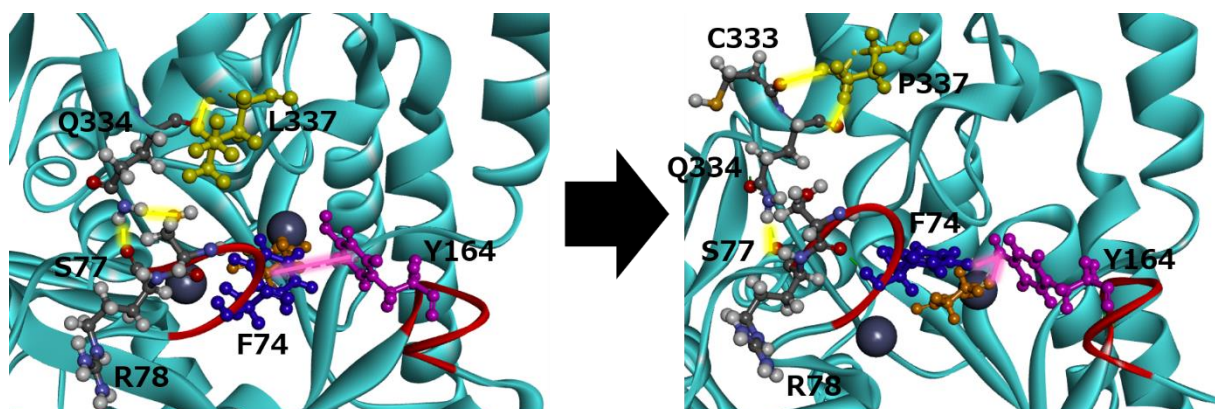


Fig. 47. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DHP wild-type (left panel) and L337P (right panel). The residues L337 and P337 are shown in yellow.

T343A

T343A バリアントは UH_2 代謝の CL_{int} は野生型の 21%、 FUH_2 代謝の CL_{int} は野生型の 43% に低下した。T343 は活性中心の上部に位置し D341 と水素結合を形成する。A343 に置換された場合でも D341 との水素結合は形成しており、この近傍の大きな変化は見られなかった。しかし、A343 において、ダイナミックループ上の F74 が C328 と新たな水素結合を形成しており、その結果ダイナミックループの構造や自由度に影響し、活性が低下したと考えられた。

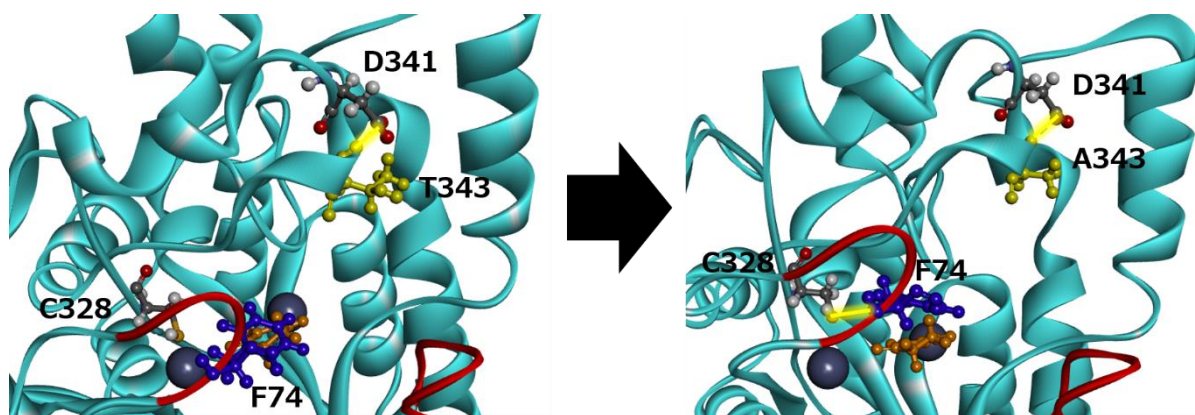


Fig. 48. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DHP wild-type (left panel) and T343A (right panel). The residues T343 and A343 are shown in yellow.

V364M

V364M バリエントは UH_2 代謝の CL_{int} は野生型の 5%、 FUH_2 代謝の CL_{int} は野生型の 8%に低下した。野生型において V364 は活性中心の裏側に位置しており、W360 と疎水性相互作用している。さらに W360 は W406 及び P408 とも疎水性相互作用を形成している。M364 への置換により W360 との間で Pi-sulfur 相互作用が形成され、W406 及び P408 との相互作用に変化が生じ、距離が近くなる。この位置は二量体同士の相互作用により、四量体を形成するのに関与する領域と考えられ、この構造的歪みが四量体形成を妨げる結果、活性が低下したと考えられた。

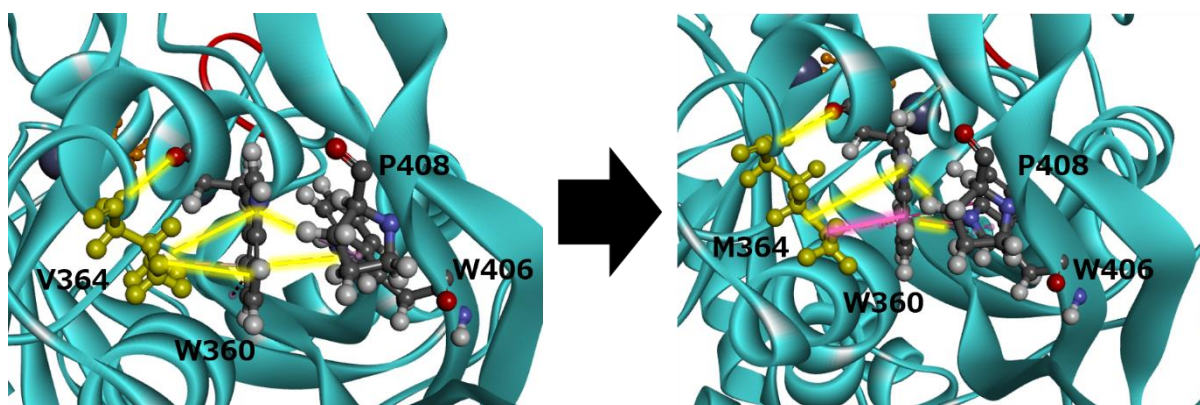


Fig. 49. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DHP wild-type (left panel) and V364M (right panel). The residues V364 and M364 are shown in yellow.

R412M

R412M バリエントは UH_2 代謝の CL_{int} は野生型の 33%、 FUH_2 代謝の CL_{int} は野生型の 36% に低下した。R412 は E353 及び D354 と静電相互作用しており、E353 は H420 を介し、Q85 と水素結合を形成している。この Q85 は P73-R78 の作るダイナミックループ近傍のヘリックスに位置している。M412 への置換により、E353 及び D354 との静電相互作用が消失し、これらを介した相互作用の変化により、ダイナミックループの構造が変化していることが推測される。その結果、F74 と Y164 の間の疎水性相互作用も消失し、これが酵素活性低下に繋がったと考えられた。

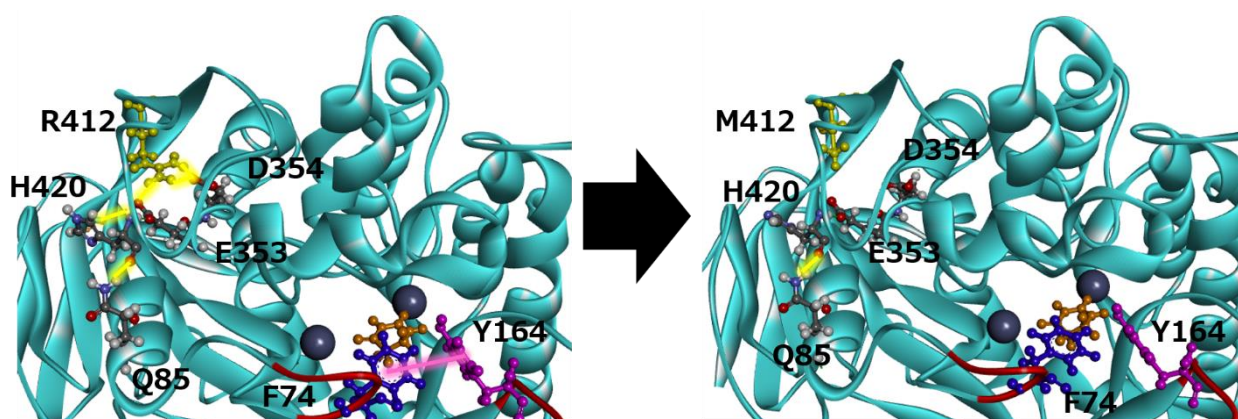


Fig. 50. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DHP wild-type (left panel) and R412M (right panel). The residues R412 and M412 are shown in yellow.

R490C

R490C バリエントはいずれの基質においても活性の消失が認められた。R490 は C 末端上に位置している。C490 へ置換された場合でも活性中心やダイナミックループの構造上の大きな変化は認められなかった。しかし、R490 の電荷が C490 への置換に伴い消失するため、酵素活性に必要な二量体形成の際にダイナミックループと C 末端の相互作用に影響を及ぼし、酵素活性が消失したと考えられた。

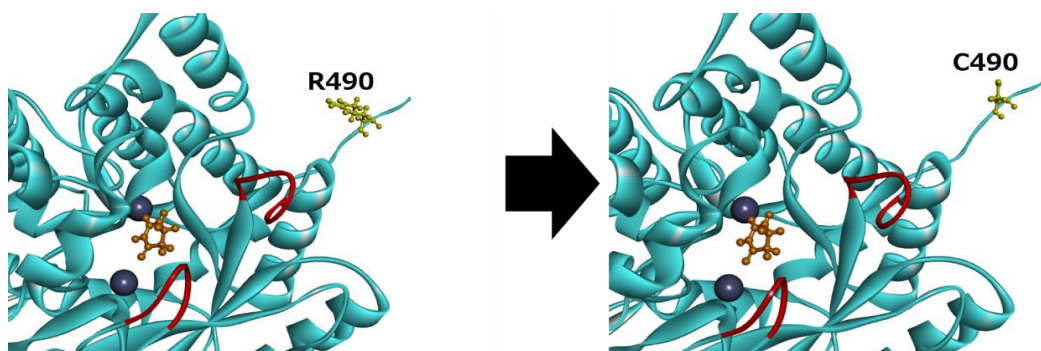


Fig. 51. Diagrams showing a fragment of the crystal structures of DHP wild-type (left panel) and R490C (right panel). The residues R490 and C490 are shown in yellow.

総括

がん化学療法において、重篤な副作用発現は治療の中断や患者死亡につながる大きな問題である[107-109]。FP 剤は様々な固形がん治療に用いられているが、投与患者の約 30%に重篤な副作用が生じる[51, 110-112]。その原因の 1 つとして、FP 剤の代謝酵素である DPD 及び DHP の遺伝的な機能低下が挙げられる[113]。白人種においては、いくつかの *DPYD* 遺伝子多型が FP 剤の副作用予測マーカーとして有用であるとの報告があるが[11, 114]、日本人集団で有用なマーカーは未だ同定されていない。本研究では、日本人集団における FP 剤による副作用発現の予測マーカー同定に繋がるような DPD 及び DHP 機能解析系の研究基盤の構築を目的とした。

第一章では、日本人集団を対象とした大規模全ゲノム解析で同定された 21 種の *DPYD* 遺伝子多型に由来する DPD バリエントの機能解析とそのメカニズム解明を行った。5-FU を基質とした場合に、G926V DPD バリエントでは活性が消失し、T298M、V313L、V335M、A380V、V434L、V515I、R592W、T768K、H807R 及び V826M の 10 種の DPD バリエントでは活性が低下することが明らかとなった。また、293FT 細胞内中に発現させた DPD の酵素機能には、補因子である FAD、FMN、鉄及び硫黄原子の配位や二量体形成が重要な役割を果たすことを明らかにした。

第二章では、これまでに報告されている 21 種の *DPYS* 遺伝子多型に由来する DHP バリエントについて、その機能変化とその分子メカニズムの解明を行った。DHP においては、基質として用いた UH_2 及び FUH_2 の CL_{int} 値に有意な相関性が認められ、W117R、Q334R、T343A、V364M 及び R412M の 5 種の DHP バリエントでは活性低下し、N16K、T68R、M70T、D81G、G278D、R302Q、L337P、W360R、S379R、G435R、R465X、R475X 及び R490C の 13 種の DHP バリエントでは活性が消失することが明らかになった。また、活性低下や消失のメカニズムとして、DHP の多量体形成能の低下や活性中心周囲の構造変化の重要性が認められ、さらにユビキチン化を介したプロテアソーム系による DHP バリエントの分解が酵素活性に大きな影響を与えていることが明らかになった。

本研究の結果より、特定の *DPYD* 及び *DPYS* 遺伝子多型で酵素機能が低下するバリエントを有する患者では FP 剤投与により副作用が発現することが示唆された。現在、FP 剤代謝酵素の遺伝子多型と副作用発現の関連性についての研究が進み、米国の研究者らが中心となつて設立された Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) やドイツの DPWG において、薬物代謝酵素の遺伝子多型と薬物治療の個人差に関するエビデンスが蓄積されている[57-60, 67]。特に *DPYD* に関しては、遺伝子型－表現型予測に基づき Activity Score が定義され、遺伝型別の薬剤投与量調節ガイドラインが発表されている[115]。今後は本研究の DPD 機能解析系を用いて、4 種のリスクバリエントを含め、既報のバリエントの網羅的機能解析を行い、薬剤投与量調節ガイドラインと比較しながら Activity Score 化することで、*DPYD* 遺伝子多型に基づく投与量設計のアルゴリズムが構築できると考えられる。

本研究により構築した研究基盤により、新規に同定された多型の機能変化も同様の手法で容易に解析することが可能となった。2018 年 1 月現在、東北大学・東北メディカル・メガバンク機構による日本人集団 3,554 人の全ゲノム解析データが公開されており

(<https://ijgvd.megabank.tohoku.ac.jp/>)、新たなアミノ酸置換を伴う 20 種の *DPYD* バリエント及び 12 種の *DPYS* バリエントが同定されている。今回の解析結果を踏まえ、日本人集団に存在する遺伝子多型における酵素活性への影響をさらに詳細かつ網羅的に解析することで、FP 剤代謝酵素の活性発現に重要なドメインやアミノ酸残基に関する情報が蓄積され、今後さらに新規バリエントが同定された場合にも *in silico* 解析により酵素活性を予測することが可能になると考えられた。本研究の成果は、患者の遺伝的背景を考慮することで従来よりも安全かつ効果的な薬物治療の実施や患者個々に最適ながん化学療法の選択をする個別化薬物療法の展開に大きく寄与すると考えられた。

実験材料

1. 研究にあたっての倫理的配慮

本研究は、ヘルシンキ宣言及び本邦における「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した。また、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会で承認された課題名「フッ化ピリミジン系抗がん薬の投与を受けたがん患者におけるピリミジン分解酵素の遺伝子解析」に従って行われた。

2. リファレンス配列

DPYD 及び *DPYS* cDNA のリファレンス配列には、GenBank の NM_000110.3、NM_001385.2 をそれぞれ用いた。

3. アレルの表記

DPYD アレルの表記は、*DPYD* アレル命名ガイドライン[116]の表記に従った。

4. X 線結晶構造解析モデル

DPD の X 線回折結晶構造モデルとして、Protein Data Bank の 1H7W を用いた。

DHP の X 線回折結晶構造モデルとして、Protein Data Bank の 2VR2 を用いた。

5. 統計解析

統計学的解析には、IBM SPSS Statistics Ver. 22.0 (IBM, NY, U.S.A.) を用いた。各 DPD 又は DHP バリエントの酵素活性の比較において、Shapiro-Wilk 検定により正規性の検定を行った。正規分布に従ったバリエントについては Levene 検定により等分散性の検定を行った。等分散性が仮定されたバリエントについては一元配置分散分析を行った後の Dunnett T 法を用い、その他のバリエントについては Dunnett T3 法を用いた。正規分布に従わないバリエントについては

Kruskal-Wallis の検定法を用いて野生型 DPD 又は DHP と各 DPD 又は DHP バリエントの酵素活性を比較した。統計学的有意水準は* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.005$ とした。

6. 試薬及び材料

本研究を実行するにあたり、以下の試薬及び材料を使用した。

100 bp DNA Ladder One	Watson
1 kb DNA Ladder One	Nippon Genetics
2×AmpliTaq Gold PCR Master Mix	Thermo Fisher scientific
2×KAPA HiFi Hot Start Ready Mix	Nippon Genetics
2-Mercaptoethanol	Nacalai Tesque
2-Propanol	Nacalai Tesque
2.5 mM dNTP	Takara
293FT Cell Line	Thermo Fisher scientific
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	Nacalai Tesque
5-Fluorodihydropyrimidine-2,4-dione	Toronto Research Chemicals
5-Fluorouracil	Nacalai Tesque
50× modified Tris Acetate EDTA (TAE) buffer	Millipore
5,6-Dihydrouracil	HYDRUS CHEMICAL
6× Loading Buffer Orange G	Nippon Gene
Acetonitrile	Sigma-Aldrich
Agarose	Nacalai Tesque
Ammonium iron (III) citrate	Nacalai Tesque
Antibiotic Antimycotic Mixed Stock Solution	Nacalai Tesque
Anti-6×His tag (ab9108)	Abcam

Anti-GAPDH (G9545)	Sigma-Aldrich
Anti-human DHP (ab205039)	Abcam
Anti-human DPD (ABC451)	Millipore
Bacto Tryptone	Corning
Bacto Yeast Extract	Corning
β -galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis buffer	Promega
BCA Protein Assay Reagent Kit	Thermo Fisher scientific
Blocking One	Nacalai Tesque
Bortezomib	Selleck chemicals
β -Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced (β -NADPH)	Oriental Yeast
Carbamoyl-b-Ala-OH (bUPA)	Bachem
Cycloheximide	Nacalai Tesque
Dithiothreitol	Nacalai Tesque
Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM)	Nacalai Tesque
e-PAGEL 10%	ATTO
e-PAGEL 5-20%	ATTO
Ethidium bromide (EtBr)	Nacalai Tesque
di-sodium Dihydrogen Ethylenediamine -tetraacetate Dihydrate (EDTA)	Nacalai Tesque
Fast Media Amp Agar	InvivoGen
Fast Media Amp TB	InvivoGen
Fast Media Kan Agar	InvivoGen
Fetal bovine serum (FBS)	Biowest

Flavin adenine dinucleotide (FAD)	Nacalai Tesque
Flavin mono nucleotide (FMN)	Nacalai Tesque
Formic acid	Wako
G-250	Thermo Fisher scientific
Gateway LR Clonase II enzyme mix	Thermo Fisher scientific
Glycerol	Nacalai Tesque
Glycine	Nacalai Tesque
Goat anti-rabbit IgG-HRP (sc-2054)	Santa Cruz Biotechnology
HisLink Spin Protein Purification System	Promega
Human Liver cDNA Library	TaKaRa
Kanamycin solution	Sigma-Aldrich
MagicMark XP Western Protein Standard	Thermo Fisher scientific
Magnesium chloride hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Nacalai Tesque
Methanol	Nacalai Tesque
N-Carbamoyl-2-fluoro- β -alanine	Toronto Research Chemicals
NativeMark Unstained Protein Standard	Thermo Fisher scientific
Novex sharp Pre-stained protein standard	Thermo Fisher scientific
NucleoBond Xtra Maxi EF	Macherey-Nagel
One Shot TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	Thermo Fisher scientific
Opti-MEM I Reduced-serum medium	Thermo Fisher scientific
pENTR/D-TOPO Cloning Kit	Thermo Fisher scientific
pcDNA-DEST40 Vector	Invitrogen
pcDNA3.4-TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Life Technologies
Phosphate-buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich
Polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulins/HRP	Dako Cytomation

Polyethylenimine Max reagent	Polysciences
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)	Nacalai Tesque
Potassium Chloride (KCl)	Nacalai Tesque
Potassium Dihydrogenphosphate (KH ₂ PO ₄)	Nacalai Tesque
Potassium Hydroxide (KOH)	Nacalai Tesque
Protease Inhibitor Cocktail	Nacalai Tesque
Pyronin Y	Sigma-Aldrich
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
Quick-CBB PLUS	Wako
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
S.O.C. Medium	Thermo Fisher scientific
Sodium Chloride (NaCl)	Nacalai Tesque
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Nacalai Tesque
Sodium sulfide pentahydrate (Na ₂ S • 5H ₂ O)	Wako
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher scientific
Trans-Blot Turbo Transfer Pack	Bio-Rad
TransFectin Lipid Reagent	Bio-Rad
Tris Buffered Saline (10×) (pH 7.4)	Nacalai Tesque
Tris-EDTA buffer (TE)	Sigma-Aldrich
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Nacalai Tesque
Trypsin	Nacalai Tesque
Uracil	Wako
Uracil- ¹⁵ N ₂	Santa Cruz Biotechnology
Ultrapool 150 Human Liver Cytosol	Corning
XL1-Blue Supercompetent Cells	Agilent Technologies

その他の試薬類は、すべて市販特級品を使用した。

また、PCR プライマーは株式会社ファスマックに合成を依頼した。精製グレードは逆相カラ
ム精製とした。

7. 使用機器・カラム

DNA 増幅装置: T100 Thermal Cycler (Bio-Rad)

アガロースゲル電気泳動装置: Mupid-2 plus (Mupid)

アガロースゲル撮影装置: WSE-5200 プリントグラフ 2M (ATTO)

吸光度測定器: Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific)

超音波ホモジナイザー: ULTRASONIC HOMOGENIZER Smurt NR-50M

(マイクロテック・ニチオン)

SDS-PAGE 電気泳動槽: ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 (ATTO)

イムノブロット転写装置: Trans Blot Turbo (Bio-Rad)

パワーサプライ: Electrophoresis Power Supply EPS 301 (GE Healthcare)

化学発光検出装置: ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad)

遠心濃縮装置 (エタノール沈殿用) : MicroVac (TOMY)

遠心濃縮装置 (MS 試料調製用) : EYELA Centrifugal evaporator CVE-3100 (東京理科器械)

LC-MS/MS 分離装置: Prominence (SHIMADZU)

LC-MS/MS 検出器: API 5000 LC/MS/MS system (AB SCIEX)

LC-MS/MS ラインフィルター: ラインフィルターボックス (小) (SHISEIDO)

LC-MS/MS 分離カラム (DPD 機能解析用) : CAPCELL PAK ADME S3

(2.1 × 150 mm, 3 μm i.d.; SHISEIDO)

LC-MS/MS 分離カラム (DHP 機能解析用) : Scherzo SM-C18 (2.0 × 100 mm, 3 μm i.d.; Imtakt)

LC-MS/MS 解析用ソフト: Analyst 1.5 (AB Biosystems)

統計解析ソフト: IBM SPSS Statistics Ver. 22.0 (IBM)

3D モデリングソフト: Discovery Studio 4.5 Client (BIOVIA)

8. プライマー配列

8-1. pENTR vector シークエンス用プライマー

M13F30: 5'-AGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTC-3'

M13R30: 5'-AATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATG-3'

8-2. *DPYD* シークエンス用プライマー

DPYD_Seq_F1: 5'-CTGATCTTTGTGTAGGTGGATGC-3'

DPYD_Seq_F2: 5'-GGACCAGGGGTTTTATACATCC-3'

DPYD_Seq_F3: 5'-GGCTAACACTACAGTGGAATCGG-3'

DPYD_Seq_F4: 5'-GAACATCTGCCGCTGGGTAG-3'

DPYD_Seq_LR_FP: 5'-CAAGAGTCGTGTGCTTGATGTC-3'

DPYD_Seq_LR_RP: 5'-GTGGTAAATGCTACATGACCTG-3'

8-3. *DPYS* シークエンス用プライマー

DPYS_Seq_F1: 5'-CCAAAGTTTGCTGCGACTACAGC-3'

DPYS_Seq_LR_FP: 5'-TGTCACGGCAGGAGATGGGAAG-3'

DPYS_Seq_LR_RP: 5'-TGTGTGTGTCGATGCCTCCG-3'

8-4. His-tag 融合 DHP 作製 SDM 用プライマー

DPYS_1558G_SDM_FP: 5'-CAGGCCCAACCCCGAAAGGGTGGGC-3'

DPYS_1558G_SDM_RP: 5'-GCCCACCCTTTCCGGGGTGGGCCTG-3'

実験方法

第一章関連実験

1. DPD バリエント発現エントリークローンの作製

1-1. SDM 法による塩基置換の導入

SDM 法には QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit を用いた。当研究室の先行研究において作製した野生型 *DPYD* 挿入エントリークローン (pENTR/D-TOPO) 1.0 μ L (5.0 ng/ μ L)、10 \times QuikChange Lightning Buffer 2.0 μ L、50 ng/ μ L フォワード及びリバースプライマー (Table 2) を各 1.0 μ L、QuikChange XL dNTP mix 0.4 μ L、QuikSolution reagent 0.6 μ L、QuikChange Lightning Enzyme 0.4 μ L を混合し、滅菌精製水で全量 20.4 μ L となるよう反応液を調製した。調製した反応液は 95°C で 2 分間処理した後、95°C で 20 秒間、60°C で 10 秒間、68°C で 3 分間の反応を 18 サイクル行い、68°C で 5 分間処理した。得られた PCR 産物は EtBr を含む 1% アガロースゲルを用いて 100 V、25 分間の電気泳動後、UV 照射により検出した。

1-2. *DpnI* を用いた制限酵素処理

特異的増幅が確認された PCR 産物に対し、鋳型 DNA を消化するため *DpnI* を用いて制限酵素処理を行った。処理は PCR 産物に制限酵素 *DpnI* を 0.8 μ L 加え、37°C で 5 分間インキュベートした。

1-3. 塩基置換導入 *DPYD* エントリークローンのトランスフォーメーション

コンピテントセル (XL10-Gold) 18 μ L に XL10-Gold β -Mercaptoethanol mix 0.8 μ L を添加後、氷上で 2 分間インキュベートし、制限酵素処理した PCR 産物 0.5 μ L を加え 30 分間氷上に静置した。その後 42°C で 30 秒間の加熱処理によりトランスフォーメーションを行った。S.O.C. Medium 125 μ L を添加し 37°C、200 rpm で 1 時間振盪培養した。その後培養液 7 μ L に S.O.C.

Medium 49 μL を加えて希釈し、40 μL をカナマイシン含有 LB 寒天プレートにスプレッドし、37°C で 16 時間培養した。

1-4. 液体培養及びプラスミド精製

単一のコロニーを選択し、カナマイシン含有液体培地 2.0 mL に移植して 37°C、250 rpm で 16 時間振盪培養した。プラスミド精製には QIAamp Spin Miniprep Kit を使用し、添付のマニュアルに従って精製を行った。

1-5. 塩基置換導入 *DPYD* エントリークローンのシーケンス解析による確認

前述 (1-4) の精製したプラスミドのシーケンス解析は株式会社ファスマックに委託した。シーケンスプライマーとしては M13F30、DPYD_Seq_F1、DPYD_Seq_F2、DPYD_Seq_F3、DPYD_Seq_F4、M13R30 (実験材料 8. プライマー配列) を用い、PCR エラーの有無の確認のため、全 *DPYD* の cDNA 塩基配列の確認を行った。シーケンス解析により、塩基置換の導入とエラーのないことが確認された野生型及びバリエントプラスミドをそれぞれのエントリークローンとした。

2. 哺乳類細胞発現用ベクターへの *DPYD* の挿入

2-1. LR 組み換え反応

DPYD エントリークローン 75 ng と当研究室で作製した Gateway system 化した pcDNA3.4 75 ng を混合し、TE Buffer (pH 8.0) を加えて反応液を全量 4.0 μL とした。次に Gateway LR Clonase II Enzyme Mix 1.0 μL を加え、25°C で 1 時間インキュベートした後、Proteinase K Solution 0.5 μL を加え、37°C で 10 分間インキュベートした。反応液 0.5 μL をコンピテントセル (TOP10) 25 μL に加え、30 分間氷上で静置した後、42°C、30 秒間の加熱処理によりトランスフォーメーションを行った。氷上で 2 分間静置し、S.O.C. Medium 225 μL を加えて 37°C、200 rpm で 1 時間

振盪培養した。培養液 200 μ L をアンピシリン含有寒天プレートにスプレッドし、37°C で 16 時間培養した。

2-2. 液体培養及びプラスミド精製

単一のコロニーを選択してアンピシリン含有培地 2.0 mL に移植し、37°C、250 rpm で 16 時間振盪培養した。プラスミド精製には QIAprep Spin Miniprep Kit を使用し、添付のマニュアルに従って精製を行った。

2-3. シークエンス解析

前述の方法（1-5）と同様にシークエンス解析を行った。シークエンスプライマーとしては DPYD_Seq_LR_FP 及び DPYD_Seq_LR_RP（実験材料 8. プライマー配列）を使用し、LR 組み換え反応による Gateway system 化 pcDNA3.4 ベクターへの挿入及び鋳型としたエントリークローンのコンタミネーションの有無を確認した。シークエンス解析により、挿入が確認されコンタミネーションの無かったプラスミドを発現クローンとした。

3. 野生型及びバリエント DPD 発現プラスミドの大量回収

3-1. 野生型及びバリエント DPD 発現プラスミドの大量精製

野生型及びバリエント DPD 発現プラスミドを導入した大腸菌のグリセロールストックをアンピシリン含有液体培地 1.0 mL に移植後、アンピシリン含有 LB 寒天培地に 20 μ L スプレッドし、37°C で 16 時間培養した。得られたコロニーより単一のものを選択し、アンピシリン含有液体培地 2.0 mL に移植後、37°C、250 rpm で 8 時間振盪培養した。その後、培養液をアンピシリン含有液体培地 100 mL に加え、37°C、250 rpm で 16 時間振盪培養した。プラスミド精製には NucleoBond Xtra Maxi EF を使用し、添付のマニュアルに従って精製を行った。

3-2. エタノール沈殿

大量精製後のプラスミド DNA 溶液 250 μL に 25 μL の 3 M 酢酸ナトリウム水溶液及び 99.5% エタノール 625 μL を添加し、十分に転倒混和して室温で 2 分間インキュベーションした後、18,000 $\times g$ 、4°C で 10 分間遠心分離した。上清を除去した後、70% エタノール 1 mL を添加し、18,000 $\times g$ 、4°C で 2 分間遠心分離した。同様の操作を再度行い、上清を除去した後、ペレットを真空で 10 分間乾燥させ、滅菌精製水 250 μL に再溶解した。

4. DPD のヒト胎児腎臓由来 293FT 細胞発現系の構築

4-1. 293FT 細胞の前培養

100 mm のシャーレ（10 mL の培地）に対して 2.0×10^6 個の 293FT 細胞を播種し、5% CO_2 下、37°C で 24 時間培養した。培地は抗生物質・抗真菌剤含有及び 10% Fetal bovine serum (FBS) 含有の Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM) を用いた。

4-2. 発現プラスミドの 293FT 細胞へのトランスフェクション

DPD 発現プラスミド 7 μg 、当研究室で作製した pCMV6-lacZ プラスミド 1 μg 及び Polyethylenimine Max reagent 20 μL をそれぞれ Opti-MEM I Reduced-serum Medium と混合し、全量を 1.5 mL に調製した。これらの溶液を混合後、室温で 30 分間インキュベートした。前述の 100 mm シャーレの液体培地中に 3 mL ずつ添加後、穏やかに振盪し、5% CO_2 インキュベーター内で 6 時間培養した。

4-3. DPD 補因子の添加

100 mm シャーレの液体培地中に Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM) で溶解した Sodium sulfide、Ammonium ferric citrate、Flavin adenine dinucleotide (FAD)、Flavin mono nucleotide (FMN) をそれぞれ終濃度が 10 μM になるように添加した後、穏やかに振盪し、5% CO_2 イン

キュベーター内で 42 時間培養した。

4-4. 293FT 細胞の回収及び可溶性画分の調製

100 mm シャーレの培地を吸引除去し、滅菌済みの Phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄した後、予冷したソニケーションバッファー (10 mM Tris-HCl pH 7.4、1 mM EDTA、10% glycerol) 3 mL で細胞を遠沈管に回収し、室温で 1,500 rpm、5 分間の遠心分離を行った。上清を除去し、沈殿をソニケーションバッファー 1 mL で再懸濁後、ソニケーション (1 秒間パルスを 60 回) により細胞を破壊した。9,000×g、4°C で 20 分間遠心分離を行い、その上清を 105,000×g、4°C で 1 時間遠心分離した。得られた上清を回収して、これを DPD タンパク質を含む可溶性画分とした。タンパク質の定量は BCA Protein Assay Kit を用いて行った。検量線には 0.25–1.5 mg/mL となるように希釈した bovine serum albumin を用いた。

5. β -galactosidase 活性測定によるトランスフェクション効率の算出

5-1. β -galactosidase 活性の測定

β -galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer を用いて行った。発現 DPD タンパク質を含む可溶性画分 (1 mg/mL) 2 μ L を 1× Reporter Lysis Buffer 23 μ L と混合し、2× Assay Buffer 25 μ L を加え 37°C で 30 分間インキュベーションした。1 M 炭酸ナトリウム水溶液 75 μ L を添加して反応を停止し、室温で 2 分間静置した後、420 nm における吸光度を測定した。3 回分の測定を行い、野生型 DPD に対する各 DPD バリエーションにおける吸光度の比をとり、平均値をトランスフェクション効率として表した。

6. SDS-PAGE／イムノブロット法による発現タンパク質の確認

6-1. SDS-PAGE

発現 DPD タンパク質を含む可溶性画分と 2× sample buffer (500 mM Tris-HCl pH 6.8、4% SDS、12% 2-Mercaptoethanol、20% glycerol、Pyronin Y 適量) を等量混合し、濃度が 1 mg/mL になるように調製後、100°C で 5 分間加熱変性処理した。また、野生型 DPD タンパク質を含む可溶性画分を 0.25-1.5 µg になるように調製後、同様に処理し、検量線作製用サンプルとした。分子量マーカーとして MagicMark XP Western Protein Standard と Novex sharp Pre-stained protein standard を混合して使用した。各サンプルを 10% ポリアクリルアミドゲル (e-PAGEL) に 10 µL/Lane でアプライした後、20 mA で 1 時間 20 分間の電気泳動を行った。泳動用緩衝液には Sodium dodecyl sulfate (SDS) buffer を使用した。なお SDS buffer は Tris 1.5 g、グリシン 7.2 g 及び SDS 0.5 g を精製水に溶解し、全量を 500 mL とした。

6-2. イムノブロッティング

イムノブロッティングは Trans-Blot Turbo Transfer Pack を使用し、添付のマニュアルに従い行った。その後 Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜を Tris-buffered saline (TBS、pH 7.4、0.05% Tween 20) で表裏 5 分間ずつ振盪洗浄し、Blocking One を用いて室温で 30 分間ブロッキングを行った。

6-3. 1 次抗体反応

分子量マーカーを参考に PVDF 膜をおよそ 90 kDa と 60 kDa の位置で切断した。5% Blocking One-TBS 5.0 mL に抗 DPD 抗体を 2.5 µL 混合し、DPD タンパク質を検出するための 1 次抗体液とした。また、5% Blocking One-TBS に抗 GAPDH 抗体 1.0 µL を混合し、GAPDH を検出するための 1 次抗体液とした。50 mL 遠沈管に 1 次抗体液を添加後、PVDF 膜を入れて密閉し、室温で 1 時間回転混和した。なお、抗体反応終了後は TBS を用いて室温で 5 分間の PVDF 膜洗浄を 3 回行った。

6-4. 2 次抗体反応

5% Blocking One-TBS 5.0 mL に Horseradish peroxidase 標識した Polyclonal Goat Anti-rabbit Immunoglobulins (Dako Cytomation) を 1.0 μ L 混合し、DPD タンパクを検出するための 2 次抗体液とした。また、5% Blocking One-TBS 5.0 mL に Horseradish peroxidase 標識した Polyclonal Goat Anti-rabbit Immunoglobulins (Santa Cruz Biotechnology) を 0.5 μ L 混合し、GAPDH を検出するための 2 次抗体液とした。1 次抗体反応と同様に抗体反応及び洗浄を行った。

6-5. 発光反応

SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate を用いて行った。キット中の SuperSignal West Dura Luminol/Enhancer Solution 及び SuperSignal West Dura Stable Peroxide Buffer を等量混合し反応液とした。PVDF 膜に反応液を添加し 5 分間室温でインキュベーションした後、化学発光の発光強度を ChemiDoc XRS+ で測定した。野生型 DPD 10 μ g の発光強度を 1 DPD Unit と定義し、各 DPD バリエーションの発現量を検量線より Unit に換算した。

7. Blue native-PAGE／イムノブロット法による二量体 DPD の検出

7-1. Blue native-PAGE

発現 DPD タンパク質を含む可溶性画分と Blue native-PAGE 用 sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 7.4、40% glycerol) 及び 10% G-250 を混合し、濃度が 1 mg/mL になるように調製し、Blue native-PAGE 用のサンプルとした。分子量マーカーとして NativeMark Unstained Protein Standard を使用した。各サンプルを 5-20%ポリアクリルアミドゲル (e-PAGEL) に 3 μ L/Lane でアプライした後、20 mA で 2 時間 30 分間の電気泳動を行った。泳動用緩衝液には Blue native-PAGE 用泳動 buffer を使用した。なお buffer は Tris 1.5 g 及びグリシン 7.2 g を精製水に溶解し、全量を 500 mL とした。

7-2. マーカーの CBB 染色及びゲルの SDS 処理

泳動終了後、マーカーを分離したレーンを切り出し、Quick-CBB PLUS 中で 1 時間振盪した。その後、精製水中でゲルを振盪洗浄し、余剰な CBB の脱色を行った。サンプルを分離したレーンについては泳動後に SDS Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4、150 mM グリシン、0.1% SDS) 中で 10 分間振盪洗浄を行った。

7-3. イムノブロッティング

イムノブロッティングは Trans-Blot Turbo Transfer Pack を使用し、添付のマニュアルに従い行った。その後 Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜の CBB をメタノールで脱色させた後、Tris-buffered saline (TBS、pH 7.4、0.05% Tween 20) で表裏 5 分間ずつ振盪洗浄し、Blocking One を用いて室温で 30 分間ブロッキングを行った。

7-4. 1 次抗体反応

5% Blocking One-TBS 5.0 mL に抗 DPD 抗体を 2.5 μ L 混合し、DPD タンパク質を検出するための 1 次抗体液とした。また、5% Blocking One-TBS に抗 GAPDH 抗体 1.0 μ L を混合し、GAPDH を検出するための 1 次抗体液とした。50 mL 遠沈管に 1 次抗体液を添加後、PVDF 膜を入れて密閉し、室温で 1 時間回転混和した。なお、抗体反応終了後は TBS を用いて室温で 5 分間の PVDF 膜洗浄を 3 回行った。

7-5. 2 次抗体反応

5% Blocking One-TBS 5.0 mL に Horseradish peroxidase 標識した Polyclonal Goat Anti-rabbit Immunoglobulins (Dako Cytomation) を 1.0 μ L 混合し、DPD タンパクを検出するための 2 次抗体液とした。また、5% Blocking One-TBS 5.0 mL に Horseradish peroxidase 標識した Polyclonal Goat Anti-rabbit Immunoglobulins (Santa Cruz Biotechnology) を 0.5 μ L 混合し、GAPDH を検出するための 2 次抗体液とした。1 次抗体反応と同様に抗体反応及び洗浄を行った。

7-6. 発光反応

SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate を用いて行った。キット中の SuperSignal West Dura Luminol/Enhancer Solution 及び SuperSignal West Dura Stable Peroxide Buffer を等量混合し反応液とした。PVDF 膜に反応液を添加し 5 分間室温でインキュベーションした後、化学発光の発光強度を ChemiDoc XRS+ で測定した。

8. DPD の U 及び 5-FU 還元活性に対する測定

8-1. 検量線の作製

UH₂ または FUH₂ の標準物質を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) で 150 µM になるように希釈した後、更に濃度が 75 µM、37.5 µM、15 µM、7.5 µM、3.75 µM、1.5 µM、0.75 µM 及び 0.375 µM となるように順次希釈した。検量線作製時に、DPD を含まない 293FT 細胞由来の可溶性画分 50 µg、50 mM 塩化マグネシウム 7.5 µL、10 mM Dithiothreitol (DTT) 15 µL、2.0 mM NADPH 15 µL を加え、50 mM リン酸カリウム緩衝液で全量 150 µL、終濃度 0.025–10 µM となるように調製した。次に内標準物質として 2.0 µM の U-¹⁵N₂ を含有した氷冷アセトニトリルを 150 µL 添加した。4°C、14,000 ×g、5 分間の遠心分離を行い、除タンパク後の上清 150 µL を 40°C、1 時間減圧遠心し蒸発乾固した。残渣を 0.1% (v/v) ギ酸水溶液 75 µL に再溶解して LC-MS/MS で分析する検量線試料とした。

8-2. サンプルの調製

リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) で U または 5-FU を濃度が 300 µM となるように希釈した後、更に濃度が 150 µM、75 µM、30 µM、15 µM、7.5 µM、3.0 µM 及び 1.5 µM となるように順次希釈した。代謝反応サンプルの調製時に、各発現タンパク質の可溶性画分 50 µg、50 mM 塩化マグネシウム 7.5 µL、10 mM Dithiothreitol (DTT) 15 µL、2.0 mM NADPH 15 µL を加え、50 mM リン酸カリウム緩衝液で全量 140 µL となるよう調製した。反応は 37°C で 3 分間のプレイ

ンキュベートを行った反応系に各濃度の U または 5-FU を 10 μ L 添加することで開始し、37°C で 30 分間インキュベートした。次に氷冷アセトニトリル (2.0 μ M U-¹⁵N₂ 含有) 150 μ L を添加し、反応を停止した。4°C、14,000 \times g で 5 分間遠心分離を行い、上清 150 μ L を 40°C、1 時間減圧遠心して蒸発乾固した後、残渣を 0.1% (v/v) ギ酸水溶液 75 μ L に再溶解し LC-MS/MS 用試料とした。また、反応系に添加した可溶性画分タンパク量は 0–50 μ g、反応時間は 0–30 分の範囲において直線性が得られた。

8-3. LC-MS/MS 解析

基質である U 及び 5-FU を各発現 DPD バリエーションにより代謝させ、生成した UH₂ または FUH₂ を LC-MS/MS で分析した。分析は 0.1% (v/v) ギ酸水溶液を移動相として使用し、流速 200 μ L/min で分離した。MS では electro-spray ionization 法を用いてイオン化を行い、positive ion mode で検出した。multiple reaction monitoring モードにより各化合物に特異的なイオンを検出し、定量を行った。なお分離カラムには CAPCELL PAK ADME S3 (2.1 \times 150 mm、3 μ m) を使い、カラム温度は 8°C、サンプル温度を 4°C とし、サンプル注入量は 5 μ L とした。MS のパラメータは TEM: 700、ISV: 5000、CAD: 4、CUR: 10、GS1: 80、GS2: 80、EP: 10 とした。クロマトグラム上のピーク面積をデータ解析ソフトにより算出し、各化合物と内標準物質 U-¹⁵N₂ の面積比を用いる内部標準法により解析した。

9. X 線回折結晶構造による解析

ヒトの DPD と 93% のアミノ酸相同性を示すブタの DPD (1H7W) をテンプレートとして、SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) を用いてヒト DPD のホモロジーモデルを作製した。CDOCKER を用いて基質として 5-FU をドッキングさせ、Discovery Studio 4.5 Client により各バリエーションのアミノ酸置換を導入し、酵素活性の変化に対する考察を行った。

第二章関連実験

1. ヒト *DPYS* cDNA のクローニング

1-1. PCR による *DPYS* cDNA の増幅

Human Liver cDNA Library を TE buffer (pH8.0) で 20 倍希釈し、これを鋳型 DNA として特異的に PCR 増幅を行った。2×KAPA HiFi Hot Start Ready Mix 10 μ L、10 μ M の *DPYS* クローニング フォワードプライマー及びリバープライマー (Table 6) を各 1.0 μ L、鋳型 DNA 1.0 μ L を混合し、滅菌精製水で全量 20.0 μ L となるように反応液を調製した。反応温度条件は、95°C で 3 分間処理後、98°C で 20 秒、60°C で 15 秒、72°C で 1 分 30 秒間のサイクルを 25 サイクル行い、72°C で 1 分 30 秒間処理した。PCR 産物の確認は EtBr を含む 1.0% アガロースゲルを用いて 100 V で 25 分間の電気泳動後、UV 照射によって行った。

1-2. PCR 産物の精製

PCR 産物は FastGene Gel/PCR Extraction Kit を使用して、添付のマニュアルに従い精製を行った。なお、カラムからの溶出には GP3 Elution Buffer 20 μ L を使用し、精製 PCR 産物を回収した。

1-3. PCR 産物のライゲーション及びトランスフォーメーション

クローニングベクター (pENTR/D-TOPO) 0.5 μ L を用い、精製した PCR 産物 2.0 μ L 及び Salt solution 0.5 μ L を加え、室温で 5 分間インキュベートし、ライゲーションを行った。次に、ライゲーション反応液 1.0 μ L をコンピテントセル (TOP10) 25 μ L に加え、30 分間氷上で静置し、42°C で 30 秒間の加熱処理によりトランスフォーメーションを行った。これに S.O.C. Medium を 125 μ L 添加し、37°C、200 rpm で 1 時間振盪培養した。その後、培養液を 200 μ L、カナマイシン含有 LB 寒天培地にスプレッドし、37°C で 16 時間培養した。

1-4. 液体培養及びプラスミド精製

単一のコロニーを選択し、カナマイシン含有液体培地 2.0 mL に移植して 37°C、250 rpm で 16 時間振盪培養した。プラスミド精製には QIAamp Spin Miniprep Kit を使用し、添付のマニュアルに従って精製を行った。

1-5. *DPYS* エントリークローンのシーケンス解析による確認

前述 (1-4) の精製したプラスミドのシーケンス解析は株式会社ファスマックに委託した。シーケンスプライマーとしては M13F30、*DPYS*_Seq_F1、M13R30 (実験材料 8. プライマー配列) を用い、PCR エラーの有無の確認のため、全 *DPYS* の cDNA 塩基配列の確認を行った。シーケンス解析により、塩基置換の導入とエラーのないことが確認された野生型プラスミドをエントリークローンとした。

2. DHP バリエーション発現エントリークローンの作製

2-1. SDM 法による塩基置換の導入

SDM 法には QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit を用いた。前述 (1-5) の作製した野生型 *DPYS* 挿入エントリークローン (pENTR/D-TOPO) 2.0 μ L (5.0 ng/ μ L)、10 \times QuikChange Lightning Buffer 2.0 μ L、50 ng/ μ L フォワード及びリバースプライマー (Table 7) を各 1.0 μ L、QuikChange XL dNTP mix 0.4 μ L、QuikSolution reagent 0.6 μ L、QuikChange Lightning Enzyme 0.4 μ L を混合し、滅菌精製水で全量 20.4 μ L となるよう反応液を調製した。調製した反応液は 95°C で 2 分間処理した後、95°C で 20 秒間、60°C で 10 秒間、68°C で 3 分間の反応を 18 サイクル行い、68°C で 5 分間処理した。得られた PCR 産物は EtBr を含む 1% アガロースゲルを用いて 100 V、25 分間の電気泳動後、UV 照射により検出した。

2-2. *DpnI* を用いた制限酵素処理

特異的増幅が確認された PCR 産物に対し、鋳型 DNA を消化するため *DpnI* を用いて制限酵素処理を行った。処理は PCR 産物に制限酵素 *DpnI* を 0.8 μL 加え、37°C で 5 分間インキュベートした。

2-3. 塩基置換導入 *DPYS* エントリークローンのトランスフォーメーション

コンピテントセル (XL10-Gold) 18 μL に XL10-Gold β -Mercaptoethanol mix 0.8 μL を添加後、氷上で 2 分間インキュベートし、制限酵素処理した PCR 産物 0.5 μL を加え 30 分間氷上に静置した。その後 42°C で 30 秒間の加熱処理によりトランスフォーメーションを行った。S.O.C. Medium 125 μL を添加し 37°C、200 rpm で 1 時間振盪培養した。その後培養液 7 μL に S.O.C. Medium 49 μL を加えて希釈し、40 μL をカナマイシン含有 LB 寒天プレートにスプレッドし、37°C で 16 時間培養した。

2-4. 液体培養及びプラスミド精製

単一のコロニーを選択し、カナマイシン含有液体培地 2.0 mL に移植して 37°C、250 rpm で 16 時間振盪培養した。プラスミド精製には QIAamp Spin Miniprep Kit を使用し、添付のマニュアルに従って精製を行った。

2-5. 塩基置換導入 *DPYS* エントリークローンのシーケンス解析による確認

前述 (2-4) の精製したプラスミドのシーケンス解析は株式会社ファスマックに委託した。シーケンスプライマーとしては M13F30、*DPYS*_Seq_F1、M13R30 (実験材料 8. プライマー配列) を用い、PCR エラーの有無の確認のため、全 *DPYS* の cDNA 塩基配列の確認を行った。シーケンス解析により、塩基置換の導入とエラーのないことが確認された野生型及びバリエーションプラスミドをそれぞれのエントリークローンとした。

3. 哺乳類細胞発現用ベクターへの DPYS の挿入

3-1. LR 組み換え反応

DPYS エントリークローン 75 ng と当研究室で作製した Gateway system 化した pcDNA3.4 75 ng を混合し、TE Buffer (pH 8.0) を加えて反応液を全量 4.0 μ L とした。次に Gateway LR Clonase II Enzyme Mix 1.0 μ L を加え、25°C で 1 時間インキュベートした後、Proteinase K Solution 0.5 μ L を加え、37°C で 10 分間インキュベートした。反応液 0.5 μ L をコンピテントセル (TOP10) 25 μ L に加え、30 分間氷上で静置した後、42°C、30 秒間の加熱処理によりトランスフォーメーションを行った。氷上で 2 分間静置し、S.O.C. Medium 225 μ L を加えて 37°C、200 rpm で 1 時間振盪培養した。培養液 200 μ L をアンピシリン含有寒天プレートにスプレッドし、37°C で 16 時間培養した。

3-2. 液体培養及びプラスミド精製

単一のコロニーを選択してアンピシリン含有培地 2.0 mL に移植し、37°C、250 rpm で 16 時間振盪培養した。プラスミド精製には QIAprep Spin Miniprep Kit を使用し、添付のマニュアルに従って精製を行った。

3-3. シークエンス解析

前述の方法 (1-5) と同様にシークエンス解析を行った。シークエンスプライマーとしては DPYS_Seq_LR_FP 及び DPYS_Seq_LR_RP (実験材料 8. プライマー配列) を使用し、LR 組み換え反応による Gateway system 化 pcDNA3.4 ベクターへの挿入及び鑄型としたエントリークロンのコンタミネーションの有無を確認した。シークエンス解析により、挿入が確認されコンタミネーションの無かったプラスミドを発現クローンとした。

4. His-tag 融合野生型 DHP 発現エントリークロンの作製

4-1. SDM 法による塩基置換の導入

SDM 法には QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit を用いた。前述 (1-5) の作製した野生型 *DPYS* 挿入エントリークローン (pENTR/D-TOPO) 2.0 μ L (5.0 ng/ μ L)、10 \times QuikChange Lightning Buffer 2.0 μ L、50 ng/ μ L DPYS_1558G_SDM_FP 及び DPYS_1558G_SDM_RP (実験材料 8. プライマー配列) を各 1.0 μ L、QuikChange XL dNTP mix 0.4 μ L、QuikSolution reagent 0.6 μ L、QuikChange Lightning Enzyme 0.4 μ L を混合し、滅菌精製水で全量 20.4 μ L となるよう反応液を調製した。調製した反応液は 95°C で 2 分間処理した後、95°C で 20 秒間、60°C で 10 秒間、68°C で 3 分間の反応を 18 サイクル行い、68°C で 5 分間処理した。得られた PCR 産物は EtBr を含む 1% アガロースゲルを用いて 100 V、25 分間の電気泳動後、UV 照射により検出した。

4-2. *DpnI* を用いた制限酵素処理

特異的増幅が確認された PCR 産物に対し、鋳型 DNA を消化するため *DpnI* を用いて制限酵素処理を行った。処理は PCR 産物に制限酵素 *DpnI* を 0.8 μ L 加え、37°C で 5 分間インキュベートした。

4-3. 塩基置換導入 *DPYS* エントリークローンのトランスフォーメーション

コンピテントセル (XL10-Gold) 18 μ L に XL10-Gold β -Mercaptoethanol mix 0.8 μ L を添加後、氷上で 2 分間インキュベートし、制限酵素処理した PCR 産物 0.5 μ L を加え 30 分間氷上に静置した。その後 42°C で 30 秒間の加熱処理によりトランスフォーメーションを行った。S.O.C. Medium 125 μ L を添加し 37°C、200 rpm で 1 時間振盪培養した。その後培養液 7 μ L に S.O.C. Medium 49 μ L を加えて希釈し、40 μ L をカナマイシン含有 LB 寒天プレートにスプレッドし、37°C で 16 時間培養した。

4-4. 液体培養及びプラスミド精製

単一のコロニーを選択し、カナマイシン含有液体培地 2.0 mL に移植して 37°C、250 rpm で 16 時間振盪培養した。プラスミド精製には QIAamp Spin Miniprep Kit を使用し、添付のマニュアルに従って精製を行った。

4-5. 塩基置換導入 *DPYS* エントリークローンのシークエンス解析による確認

前述 (4-4) の精製したプラスミドのシークエンス解析は株式会社ファスマックに委託した。シークエンスプライマーとしては M13F30、DPYD_Seq_F1、M13R30 (実験材料 8. プライマー配列) を用い、PCR エラーの有無の確認のため、全 *DPYD* の cDNA 塩基配列の確認を行った。シークエンス解析により、塩基置換の導入とエラーのないことが確認された野生型及びバリエーションプラスミドをそれぞれのエントリークローンとした。

4. His-tag 融合野生型 *DHP* 哺乳類動物細胞発現ベクターの作製

4-1. LR 組み換え反応

His-tag 融合野生型 *DPYS* エントリークローン 75 ng と哺乳動物細胞発現ベクター (pcDNA-DEST40) 75 ng を混合し、TE Buffer (pH 8.0) を加えて反応液を全量 4.0 μ L とした。次に Gateway LR Clonase II Enzyme Mix 1.0 μ L を加え、25°C で 1 時間インキュベートした後、Proteinase K Solution 0.5 μ L を加え、37°C で 10 分間インキュベートした。反応液 0.5 μ L をコンピテントセル (TOP10) 25 μ L に加え、30 分間氷上で静置した後、42°C、30 秒間の加熱処理によりトランスフォーメーションを行った。氷上で 2 分間静置し、S.O.C. Medium 225 μ L を加えて 37°C、200 rpm で 1 時間振盪培養した。培養液 200 μ L をアンピシリン含有寒天プレートにスプレッドし、37°C で 16 時間培養した。

4-2. 液体培養及びプラスミド精製

単一のコロニーを選択してアンピシリン含有培地 2.0 mL に移植し、37°C、250 rpm で 16 時間

振盪培養した。プラスミド精製には QIAprep Spin Miniprep Kit を使用し、添付のマニュアルに従って精製を行った。

4-3. シークエンス解析

前述の方法（1-5）と同様にシークエンス解析を行った。シークエンスプライマーとしては DPYS_Seq_LR_FP 及び DPYS_Seq_LR_RP（実験材料 8. プライマー配列）を使用し、LR 組み換え反応による pcDNA-DEST40 ベクターへの挿入及び鑄型としたエントリークローンのコンタミネーションの有無を確認した。シークエンス解析により、挿入が確認されコンタミネーションの無かったプラスミドを発現クローンとした。

5. 野生型及びバリエント DHP 発現プラスミドの大量回収

5-1. 野生型及びバリエント DHP 発現プラスミドの大量精製

野生型及びバリエント DHP 発現プラスミドを導入した大腸菌のグリセロールストックをアンピシリン含有液体培地 1.0 mL に移植後、アンピシリン含有 LB 寒天培地に 20 μ L スプレッドし、37°C で 16 時間培養した。得られたコロニーより単一のものを選択し、アンピシリン含有液体培地 2.0 mL に移植後、37°C、250 rpm で 8 時間振盪培養した。その後、培養液をアンピシリン含有液体培地 100 mL に加え、37°C、250 rpm で 16 時間振盪培養した。プラスミド精製には NucleoBond Xtra Maxi EF を使用し、添付のマニュアルに従って精製を行った。

5-2. エタノール沈殿

大量精製後のプラスミド DNA 溶液 250 μ L に 25 μ L の 3 M 酢酸ナトリウム水溶液及び 99.5% エタノール 625 μ L を添加し、十分に転倒混和して室温で 2 分間インキュベーションした後、18,000 \times g、4°C で 10 分間遠心分離した。上清を除去した後、70% エタノール 1 mL を添加し、18,000 \times g、4°C で 2 分間遠心分離した。同様の操作を再度行い、上清を除去した後、ペレット

を真空で 10 分間乾燥させ、滅菌精製水 250 μ L に再溶解した。

6. DHP のヒト胎児腎臓由来細胞株 (293FT 細胞) 発現系の構築

6-1. 293FT 細胞の前培養

100 mm のシャーレ (10 mL の培地) に対して 2.0×10^6 個の 293FT 細胞を播種し、5% CO₂ 下、37°C で 24 時間培養した。培地は抗生物質・抗真菌剤含有及び 10% Fetal bovine serum (FBS) 含有の Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM) を用いた。

6-2. 発現プラスミドの 293FT 細胞へのトランスフェクション

DHP 発現プラスミド 5 μ g、当研究室で作製した pCMV6-*lacZ* プラスミド 1 μ g 及び TransFectin Lipid Reagent 15 μ L をそれぞれ Opti-MEM I Reduced-serum Medium と混合し、全量を 1.5 mL に調製した。これらの溶液を混合後、室温で 20 分間インキュベートした。前述の 100 mm シャーレの液体培地中に 3 mL ずつ添加後、穏やかに振盪し、5% CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した。

6-3. 293FT 細胞の回収及び S9 画分の調製

100 mm シャーレの培地を吸引除去し、滅菌済みの Phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄した後、予冷したソニケーションバッファー (10 mM Tris-HCl pH 7.4、1 mM EDTA、10% glycerol) 3 mL で細胞を遠沈管に回収し、室温で 1,500 rpm、5 分間の遠心分離を行った。上清を除去し、沈殿をソニケーションバッファー 1 mL で再懸濁後、ソニケーション (1 秒間パルス を 60 回) により細胞を破壊した。9,000 $\times g$ 、4°C で 20 分間遠心分離を行い、その上清をを DHP タンパク質を含む S9 画分とした。タンパク質の定量は BCA Protein Assay Kit を用いて行った。検量線には 0.25–1.5 mg/mL となるように希釈した bovine serum albumin を用いた。

7. His-tag 融合 DHP タンパク質の発現及び精製

7-1. 293FT 細胞の前培養

前述（6-1）と同様に 293FT 細胞の前培養を行った。

7-2. 発現プラスミドの 293FT 細胞へのトランスフェクション

前述（6-2）と同様に His-tag 融合 DHP 発現プラスミド 5 µg、当研究室で作製した pCMV6-lacZ プラスミド 1 µg 及び TransFectin Lipid Reagent 15 µL をそれぞれ Opti-MEM I Reduced-serum Medium と混合し、全量を 1.5 mL に調製した。これらの溶液を混合後、室温で 20 分間インキュベートした。前述の 100 mm シャーレの液体培地中に 3 mL ずつ添加後、穏やかに振盪し、5% CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した。

7-3. 293FT 細胞の回収及び S9 画分の調製

前述（6-3）と同様に S9 画分を調製した。

7.4. HisLink Protein Purification System を用いた His-tag 融合 DHP の精製

7-3 で得られた S9 画分 700 µL に対し、FastBreak Reagent 64.2 µL と DNase I solution 5.8 µL の混合液 70 µL とレジン 75 µL を加えピペッティングにより混和し、室温にて 30 分間回転混和した。次に混和後の溶液をスピncラムに移し、14,000 rpm で 5 秒間室温にて遠心した。その後、Binding/Wash Buffer 500 µL を加え、14,000 rpm で 5 秒間室温にて遠心し、再度同じ操作を行った。スピncラムを新しいマイクロチューブに寄せ換え、Elution Buffer 200 µL を加え、ピペッティングによりレジンを再懸濁し 3 分間放置後、14,000 rpm で 1 分間室温にて遠心を行い溶出した。精製したタンパク質溶液は Amicon Ultra-4 を用い、ソニケーションバッファーへのバッファー交換を行った。タンパク質の定量は BCA Protein Assay Kit を用いて行った。

8. β -galactosidase 活性測定によるトランスフェクション効率の算出

8-1. β -galactosidase 活性の測定

β -galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer を用いて行った。発現 DHP タンパク質を含む S9 画分 (1 mg/mL) 5 μ L を 1 \times Reporter Lysis Buffer 20 μ L と混合し、2 \times Assay Buffer 25 μ L を加え 37°C で 30 分間インキュベーションした。1 M 炭酸ナトリウム水溶液 75 μ L を添加して反応を停止し、室温で 2 分間静置した後、420 nm における吸光度を測定した。3 回分の測定を行い、野生型 DHP に対する各 DHP バリエーションにおける吸光度の比をとり、平均値をトランスフェクション効率として表した。

9. SDS-PAGE／イムノブロット法による発現タンパク質の確認

9-1. SDS-PAGE

発現 DHP タンパク質を含む S9 画分と 2 \times sample buffer (500 mM Tris-HCl pH 6.8、4% SDS、12% 2-Mercaptoethanol、20% glycerol、Pyronin Y 適量) を等量混合し、濃度が 1 mg/mL になるように調製後、100°C で 5 分間加熱変性処理した。また、His タグ融合 DHP タンパク質を 0.25-1.5 μ g になるように調製後、同様に処理し、検量線作製用サンプルとした。分子量マーカーとして MagicMark XP Western Protein Standard と Novex sharp Pre-stained protein standard を混合して使用した。各サンプルを 10% ポリアクリルアミドゲル (e-PAGEL) に 10 μ L/Lane でアプライした後、20 mA で 1 時間 20 分間の電気泳動を行った。泳動用緩衝液には Sodium dodecyl sulfate (SDS) buffer を使用した。なお SDS buffer は Tris 1.5 g、グリシン 7.2 g 及び SDS 0.5 g を精製水に溶解し、全量を 500 mL とした。

9-2. イムノブロッティング

イムノブロッティングは Trans-Blot Turbo Transfer Pack を使用し、添付のマニュアルに従い行

った。その後 Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜を Tris-buffered saline (TBS、pH 7.4、0.05% Tween 20) で表裏 5 分間ずつ振盪洗浄し、Blocking One を用いて室温で 30 分間ブロッキングを行った。

9-3. 1 次抗体反応

分子量マーカーを参考に PVDF 膜をおよそ 60 kDa と 40 kDa の位置で切断した。5% Blocking One-TBS 5.0 mL に抗 DHP 抗体を 2.5 μ L 混合し、DHP タンパク質を検出するための 1 次抗体液とした。また、5% Blocking One-TBS に抗 GAPDH 抗体 1.0 μ L を混合し、GAPDH を検出するための 1 次抗体液とした。50 mL 遠沈管に 1 次抗体液を添加後、PVDF 膜を入れて密閉し、室温で 1 時間回転混和した。なお、抗体反応終了後は TBS を用いて室温で 5 分間の PVDF 膜洗浄を 3 回行った。

9-4. 2 次抗体反応

5% Blocking One-TBS 5.0 mL に Horseradish peroxidase 標識した Polyclonal Goat Anti-rabbit Immunoglobulins (Dako Cytomation) を 1.0 μ L 混合し、DHP タンパクを検出するための 2 次抗体液とした。また、5% Blocking One-TBS 5.0 mL に Horseradish peroxidase 標識した Polyclonal Goat Anti-rabbit Immunoglobulins (Santa Cruz Biotechnology) を 0.5 μ L 混合し、GAPDH を検出するための 2 次抗体液とした。1 次抗体反応と同様に抗体反応及び洗浄を行った。

9-5. 発光反応

SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate を用いて行った。キット中の SuperSignal West Dura Luminol/Enhancer Solution 及び SuperSignal West Dura Stable Peroxide Buffer を等量混合し反応液とした。PVDF 膜に反応液を添加し 5 分間室温でインキュベーションした後、化学発光の発光強度を ChemiDoc XRS+ で測定した。His-tag 融合 DHP 1 μ g の発光強度を 1 DHP Unit と定義し、各 DHP バリエーションの発現量を検量線より Unit に換算した。

10. Blue native-PAGE／イムノブロット法による多量体 DHP の検出

10-1. Blue native-PAGE

発現 DHP タンパク質を含む S9 画分と Blue native-PAGE 用 sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 7.4, 40% glycerol) 及び 10% G-250 を混合し、濃度が 1 mg/mL になるように調製し、Blue native-PAGE 用のサンプルとした。分子量マーカーとして NativeMark Unstained Protein Standard を使用した。各サンプルを 5-20% グラジエントポリアクリルアミドゲル (e-PAGEL) に 3 μ L/Lane でアプライした後、20 mA で 2 時間 30 分間の電気泳動を行った。泳動用緩衝液には Blue native-PAGE 用泳動 buffer を使用した。なお buffer は Tris 1.5 g 及びグリシン 7.2 g を精製水に溶解し、全量を 500 mL とした。

10-2. マーカーの CBB 染色、ゲルの SDS 処理

泳動終了後、マーカーを分離したレーンを切り出し、Quick-CBB PLUS 中で 1 時間振盪した。その後、精製水中でゲルを振盪洗浄し、余剰な CBB の脱色を行った。サンプルを分離したレーンについては泳動後に SDS Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM グリシン、0.1% SDS) 中で 10 分間振盪洗浄を行った。

10-3. イムノブロッティング

イムノブロッティングは Trans-Blot Turbo Transfer Pack を使用し、添付のマニュアルに従った。その後 Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜の CBB をメタノールで脱色させた後、Tris-buffered saline (TBS, pH 7.4, 0.05% Tween 20) で表裏 5 分間ずつ振盪洗浄し、Blocking One を用いて室温で 30 分間ブロッキングを行った。

10-4. 1 次抗体反応

5% Blocking One-TBS 5.0 mL に抗 DHP 抗体を 2.5 μ L 混合し、DHP タンパク質を検出するた

めの 1 次抗体液とした。また、5% Blocking One-TBS に抗 GAPDH 抗体 1.0 μL を混合し、GAPDH を検出するための 1 次抗体液とした。50 mL 遠沈管に 1 次抗体液を添加後、PVDF 膜を入れて密閉し、室温で 1 時間回転混和した。なお、抗体反応終了後は TBS を用いて室温で 5 分間の PVDF 膜洗浄を 3 回行った。

10-5. 2 次抗体反応

5% Blocking One-TBS 5.0 mL に Horseradish peroxidase 標識した Polyclonal Goat Anti-rabbit Immunoglobulins (Dako Cytomation) を 1.0 μL 混合し、DHP タンパクを検出するための 2 次抗体液とした。また、5% Blocking One-TBS 5.0 mL に Horseradish peroxidase 標識した Polyclonal Goat Anti-rabbit Immunoglobulins (Santa Cruz Biotechnology) を 0.5 μL 混合し、GAPDH を検出するための 2 次抗体液とした。1 次抗体反応と同様に抗体反応及び洗浄を行った。

10-6. 発光反応

SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate を用いて行った。キット中の SuperSignal West Dura Luminol/Enhancer Solution 及び SuperSignal West Dura Stable Peroxide Buffer を等量混合し反応液とした。PVDF 膜に反応液を添加し 5 分間室温でインキュベーションした後、化学発光の発光強度を ChemiDoc XRS+ で測定した。

11. DHP の UH_2 及び FUH_2 加水分解活性に対する測定

11-1. 検量線の作製

bUPA または FUPA の標準物質を 20 mM HEPES (pH 7.4) で 450 μM になるように希釈した後、更に濃度が 150 μM 、105 μM 、45 μM 、15 μM 、4.5 μM 及び 1.5 μM となるように順次希釈した。検量線作製時に、DHP を含まない 293FT 細胞由来の S9 画分 10 μg 、10 mM Dithiothreitol (DTT) 15 μL を加え、20 mM HEPES で全量 150 μL 、終濃度 0.1–30 μM となるように調製した。

次に内標準物質として 1.0 μM の FUPA または 10 μM の bUPA を含有した氷冷アセトニトリルを 150 μL 添加した。4°C、14,000 $\times g$ 、5 分間の遠心分離を行い、除タンパク後の上清 150 μL を 40°C、1 時間減圧遠心し蒸発乾固した。残渣を 0.1% (v/v) ギ酸水溶液 75 μL に再溶解して LC-MS/MS で分析する検量線試料とした。

11-2. サンプルの調製

HEPES (pH 7.4) で UH_2 及び FUH_2 を濃度が 4.5 mM となるように希釈した後、更に濃度が 1.5 mM、1.05 mM、450 μM 、150 μM 、45 μM 、15 μM 及び 4.5 μM となるように順次希釈した。代謝反応サンプルの調製時に、各発現タンパク質の S9 画分 10 μg 、10 mM Dithiothreitol (DTT) 15 μL を加え、20 mM HEPES で全量 140 μL となるよう調製した。反応は 37°C で 3 分間のプレインキュベートを行った反応系に各濃度の UH_2 または FUH_2 を 10 μL 添加することで開始し、37°C で 10 分間インキュベートした。次に氷冷アセトニトリル (1.0 μM FUPA または 10 μM bUPA 含有) 150 μL を添加し、反応を停止した。4°C、14,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離を行い、上清 150 μL を 40°C、1 時間減圧遠心して蒸発乾固した後、残渣を 0.1% (v/v) ギ酸水溶液 75 μL に再溶解し LC-MS/MS 用試料とした。また、反応系に添加した S9 画分タンパク量は 0–10 μg 、反応時間は 0–10 分の範囲において直線性が得られた。

11-3. LC-MS/MS 解析

基質である UH_2 または FUH_2 を各発現 DHP バリエーションにより代謝させ、生成した bUPA または FUPA を LC-MS/MS で分析した。分析は 0.1% (v/v) ギ酸水溶液を移動相として使用し、流速 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ で分離した。MS では electro-spray ionization 法を用いてイオン化を行い、positive ion mode で検出した。multiple reaction monitoring モードにより各化合物に特異的なイオンを検出し、定量を行った。なお分離カラムには Scherzo SM-C18 (2.0 \times 100 mm、3 μm) を用い、カラム温度は 8°C、サンプル温度を 4°C とし、サンプル注入量は 5 μL とした。MS のパラメータは TEM: 700、ISV: 5000、CAD: 4、CUR: 10、GS1: 80、GS2: 80、EP: 10 とした。クロマトグラ

ム上のピーク面積をデータ解析ソフトにより算出し、各化合物と内標準物質 $U\text{-}^{15}\text{N}_2$ の面積比を用いる内部標準法により解析した。

12. シクロヘキシミド添加による DHP バリエント安定性の検討

前述 (6-1、6-2) と同様に DHP バリエントのトランスフェクションを行った。トランスフェクション 24 時間後に終濃度 $50\text{ }\mu\text{L/mL}$ となるようにシクロヘキシミドを添加し、0、24 及び 48 時間後の細胞を回収し、6-3 同様に S9 画分を調製した。得られた S9 画分を用いて、DHP 発現量をイムノブロット法により定量した。

13. 3-メチルアデニン及び NH_4Cl 添加によるオートファジー系関与の検討

前述 (6-1、6-2) と同様に DHP バリエントのトランスフェクションを行った。トランスフェクション 24 時間後に終濃度 1 mM 及び 5 mM となるように 3-メチルアデニン及び NH_4Cl をそれぞれ添加し、24 時間後の細胞を回収し、6-3 同様に S9 画分を調製した。得られた S9 画分を用いて、DHP 発現量をイムノブロット法により定量した。

14. ボルテゾミブ添加によるプロテアソーム系関与の検討

前述 (6-1、6-2) と同様に DHP バリエントのトランスフェクションを行った。トランスフェクション 24 時間後に終濃度 $0.5\text{ }\mu\text{M}$ となるようにボルテゾミブを添加し、24 時間後の細胞を回収し、6-3 同様に S9 画分を調製した。得られた S9 画分を用いて、DHP 発現量をイムノブロット法により定量した。

15. X 線回折結晶構造による解析

3D モデリングソフトを用い、各 DHP バリエントの活性変化に対する考察を行った。モデルは、Protein Data Bank の 2VR2 を用いた。2VR2 の DHP に基質である FUH_2 をドッキングさせ、塩基置換挿入後、構造最適化を行った。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野教授 平澤典保先生ならびに御校閲賜りました同がん化学療法薬学分野教授 富岡佳久先生、同臨床薬学分野准教授 高橋信行先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、終始懇切丁寧な御指導、御鞭撻ならびにご助言を頂きました東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野准教授 平塚真弘先生に深く御礼申し上げます。また終始温かい御指導、御助言を頂きました同分野准教授 守屋孝洋先生、同分野助教 水野夏実先生ならびに同分野助手 瀬川良佑先生に謹んで感謝の意を申し上げます。

本研究における LC-MS/MS を用いた代謝物測定において、多大なる御協力、御指導を賜りました東北大学病院薬剤部教授 眞野成康先生、同分野准教授 山口浩明先生ならびに同分野助教 前川正充先生に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、3次元構造モデリングについて御指導くださいました名城大学薬学部生物物理化学研究室教授 小田彰史先生に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、終始御親切な御助言及び御協力をいただきました東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野博士課程四年 浅川三喜氏、畑山昴大氏、齋藤雄大氏に感謝の意を表します。また、多くの有益なる御助言を頂きました同分野博士課程二年 渡邊卓嗣氏、Evelyn Marie Gutierrez 氏、同分野博士課程一年 公文代將希氏ならびに同分野六年 菊地葵氏をはじめとする生活習慣病治療薬学分野の皆様にも深く感謝致します。

また、本研究に御協力頂きました同分野五年 伊藤暁生氏、中西悠悦氏、同分野四年 成田
瑤子氏ならびに同分野三年 斉藤悠氏に心より感謝と御礼申し上げます。

最後に、これまで終始支え見守ってくださった家族、友人に心より感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Y. Okuma, Y. Hosomi, S. Miyamoto, M. Shibuya, T. Okamura, T. Hishima, Correlation between S-1 treatment outcome and expression of biomarkers for refractory thymic carcinoma, *BMC cancer* 16 (2016) 156.
- [2] H. Ide, E. Kikuchi, M. Hasegawa, S. Hattori, Y. Yasumizu, A. Miyajima, M. Oya, Therapeutic enhancement of S-1 with CPT-11 through down-regulation of thymidylate synthase in bladder cancer, *Cancer medicine* 2(4) (2013) 488-95.
- [3] L. Kilic, C. Ordu, I. Yildiz, F. Sen, S. Keskin, R. Ciftci, K.N. Pilanci, Current adjuvant treatment modalities for gastric cancer: From history to the future, *World journal of gastrointestinal oncology* 8(5) (2016) 439-49.
- [4] A.S. Lucas, B.H. O'Neil, R.M. Goldberg, A decade of advances in cytotoxic chemotherapy for metastatic colorectal cancer, *Clin Colorectal Cancer* 10(4) (2011) 238-44.
- [5] T. Yokota, N. Ando, H. Igaki, M. Shinoda, K. Kato, J. Mizusawa, H. Katayama, K. Nakamura, H. Fukuda, Y. Kitagawa, Prognostic Factors in Patients Receiving Neoadjuvant 5-Fluorouracil plus Cisplatin for Advanced Esophageal Cancer (JCOG9907), *Oncology* 89(3) (2015) 143-51.
- [6] A. Tsuburaya, N. Sugimoto, H. Imamura, K. Nishikawa, H. Imamoto, T. Tsujinaka, T. Esaki, Y. Horita, Y. Kimura, T. Fujiya, O. Takayama, R. Oono, H. Yabusaki, M. Taguri, S. Morita, Y. Yamada, P. Tan, M. Ninomiya, H. Furukawa, M. Sasako, Molecular Biomarker Study in a Randomised Phase III Trial of Irinotecan Plus S-1 versus S-1 for Advanced Gastric Cancer (GC0301/TOP-002), *Clinical oncology* 28(8) (2016) e45-51.
- [7] Y.S. Yap, L.L. Kwok, N. Syn, W.Y. Chay, J.W.K. Chia, C.K. Tham, N.S. Wong, S.K. Lo, R.A. Dent, S. Tan, Z.Y. Mok, K.X. Koh, H.C. Toh, W.H. Koo, M. Loh, R.C.H. Ng, S.P. Choo, R.C.T. Soong, Predictors of Hand-Foot Syndrome and Pyridoxine for Prevention of Capecitabine-Induced Hand-Foot Syndrome: A Randomized Clinical Trial, *JAMA oncology* 3(11) (2017)

1538-1545.

- [8] P. Kishi, C.J. Price, Life-Threatening Reaction with Topical 5-Fluorouracil, *Drug safety - case reports* 5(1) (2018) 4.
- [9] M. Lamberti, S. Porto, S. Zappavigna, E. Addeo, M. Marra, N. Miraglia, N. Sannolo, D. Vanacore, P. Stiuso, M. Caraglia, A mechanistic study on the cardiotoxicity of 5-fluorouracil in vitro and clinical and occupational perspectives, *Toxicology letters* 227(3) (2014) 151-6.
- [10] Y.A. Kim, H.C. Chung, H.J. Choi, S.Y. Rha, J.S. Seong, H.C. Jeung, Intermediate dose 5-fluorouracil-induced encephalopathy, *Japanese journal of clinical oncology* 36(1) (2006) 55-9.
- [11] K.E. Caudle, C.F. Thorn, T.E. Klein, J.J. Swen, H.L. McLeod, R.B. Diasio, M. Schwab, Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing, *Clinical pharmacology and therapeutics* 94(6) (2013) 640-5.
- [12] P. Piedbois, P. Rougier, M. Buyse, J. Pignon, L. Ryan, R. Hansen, B. Zee, B. Weirnerman, J. Pater, C. Leichman, J. Macdonald, J. Benedetti, J. Lokich, J. Fryer, G. Brufman, R. Isacson, A. Laplanche, E. Levy, Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 16(1) (1998) 301-8.
- [13] 厚生労働省 平成 26 年度患者調査 推計患者数
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/14/dl/05.pdf>
- [14] S.W. Lam, H.J. Guchelaar, E. Boven, The role of pharmacogenetics in capecitabine efficacy and toxicity, *Cancer treatment reviews* 50 (2016) 9-22.
- [15] T. Kunicka, P. Prochazka, I. Krus, P. Bendova, M. Protivova, S. Susova, V. Hlavac, V. Liska, P. Novak, M. Schneiderova, P. Pitule, J. Bruha, O. Vycital, P. Vodicka, P. Soucek, Molecular profile of 5-fluorouracil pathway genes in colorectal carcinoma, *BMC cancer* 16(1) (2016) 795.
- [16] J.Y. Kim, E. Shin, J.W. Kim, H.S. Lee, D.W. Lee, S.H. Kim, J.O. Lee, Y.J. Kim, J.H. Kim,

- S.M. Bang, S.H. Ahn, D.J. Park, J.S. Lee, J.S. Lee, H.H. Kim, K.W. Lee, Impact of intratumoral expression levels of fluoropyrimidine-metabolizing enzymes on treatment outcomes of adjuvant S-1 therapy in gastric cancer, *PloS one* 10(3) (2015) e0120324.
- [17] G.C. Daher, B.E. Harris, R.B. Diasio, Metabolism of pyrimidine analogues and their nucleosides, *Pharmacology & therapeutics* 48(2) (1990) 189-222.
- [18] D.J. Porter, J.A. Harrington, M.R. Almond, G.T. Lowen, T. Spector, (R)-5-fluoro-5,6-dihydrouracil: kinetics of oxidation by dihydropyrimidine dehydrogenase and hydrolysis by dihydropyrimidine aminohydrolase, *Biochemical pharmacology* 48(4) (1994) 775-9.
- [19] M. Kikugawa, M. Kaneko, S. Fujimoto-Sakata, M. Maeda, K. Kawasaki, T. Takagi, N. Tamaki, Purification, characterization and inhibition of dihydropyrimidinase from rat liver, *European journal of biochemistry* 219(1-2) (1994) 393-9.
- [20] K.D. Schnackerz, D. Dobritzsch, Y. Lindqvist, P.F. Cook, Dihydropyrimidine dehydrogenase: a flavoprotein with four iron-sulfur clusters, *Biochimica et biophysica acta* 1701(1-2) (2004) 61-74.
- [21] U. Amstutz, S. Farese, S. Aebi, C.R. Largiader, Dihydropyrimidine dehydrogenase gene variation and severe 5-fluorouracil toxicity: a haplotype assessment, *Pharmacogenomics* 10(6) (2009) 931-44.
- [22] A.B.P. van Kuilenburg, J. Haasjes, D.J. Richel, L. Zoetekouw, H. Van Lenthe, R.A. De Abreu, J.G. Maring, P. Vreken, A.H. van Gennip, Clinical Implications of Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) Deficiency in Patients with Severe 5-Fluorouracil-associated Toxicity: Identification of New Mutations in the DPD Gene, *Clinical Cancer Research* 6(12) (2000) 4705.
- [23] A.B.P. van Kuilenburg, R. Meinsma, B.A. Zonnenberg, L. Zoetekouw, F. Baas, K. Matsuda, N. Tamaki, A.H. van Gennip, Dihydropyrimidinase Deficiency and Severe 5-Fluorouracil Toxicity, *Clinical Cancer Research* 9(12) (2003) 4363.

- [24] A. Botticelli, M. Borro, C.E. Onesti, L. Strigari, G. Gentile, B. Cerbelli, A. Romiti, M. Occhipinti, C. Sebastiani, L. Lionetto, L. Marchetti, M. Simmaco, P. Marchetti, F. Mazzuca, Degradation Rate of 5-Fluorouracil in Metastatic Colorectal Cancer: A New Predictive Outcome Biomarker?, *PloS one* 11(9) (2016) e0163105.
- [25] T. Shiotani, G. Weber, Purification and properties of dihydrothymine dehydrogenase from rat liver, *Journal of Biological Chemistry* 256(1) (1981) 219-224.
- [26] T. Spector, S. Cao, Y.M. Rustum, J.A. Harrington, D.J. Porter, Attenuation of the antitumor activity of 5-fluorouracil by (R)-5-fluoro-5,6-dihydrouracil, *Cancer research* 55(6) (1995) 1239-41.
- [27] U. Amstutz, T.K. Froehlich, C.R. Largiadèr, Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity, *Pharmacogenomics* 12(9) (2011) 1321- 1336.
- [28] J. Sistonen, C. Smith, Y.-K. Fu, C.R. Largiadèr, A new DPYD genotyping assay for improving the safety of 5-fluorouracil therapy, *Clinica Chimica Acta* 414 (2012) 109-111.
- [29] M. Nagasaki, J. Yasuda, F. Katsuoka, N. Nariai, K. Kojima, Y. Kawai, Y. Yamaguchi-Kabata, J. Yokozawa, I. Danjoh, S. Saito, Y. Sato, T. Mimori, K. Tsuda, R. Saito, X. Pan, S. Nishikawa, S. Ito, Y. Kuroki, O. Tanabe, N. Fuse, S. Kuriyama, H. Kiyomoto, A. Hozawa, N. Minegishi, J. Douglas Engel, K. Kinoshita, S. Kure, N. Yaegashi, M.J.R.P.P. To, M. Yamamoto, Rare variant discovery by deep whole-genome sequencing of 1,070 Japanese individuals, *Nature communications* 6 (2015) 8018.
- [30] Z.H. Lu, R. Zhang, R.B. Diasio, Purification and characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase from human liver, *The Journal of biological chemistry* 267(24) (1992) 17102-9.
- [31] A.B. van Kuilenburg, H. van Lenthe, A.H. van Gennip, Activity of pyrimidine degradation enzymes in normal tissues, *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* 25(9-11) (2006) 1211-4.
- [32] S. Balasubramaniam, J.A. Duley, J. Christodoulou, Inborn errors of pyrimidine metabolism:

- clinical update and therapy, *Journal of inherited metabolic disease* 37(5) (2014) 687-98.
- [33] N.A. Al-Sanna'a, A.B. Van Kuilenburg, T.M. Atrak, M.A. Abdul-Jabbar, A.H. Van Gennip, Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency presenting at birth, *Journal of inherited metabolic disease* 28(5) (2005) 793-6.
- [34] A.B. van Kuilenburg, Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil, *European journal of cancer* 40(7) (2004) 939-50.
- [35] A.B.P. van Kuilenburg, Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil, *European journal of cancer* 40(7) (2004) 939-950.
- [36] A. Sahu, A. Ramaswamy, V. Ostwal, Dihydro pyrimidine dehydrogenase deficiency in patients treated with capecitabine based regimens: a tertiary care centre experience, *Journal of gastrointestinal oncology* 7(3) (2016) 380-6.
- [37] H. Mounier-Boutoille, M. Boisdron-Celle, E. Cauchin, J.P. Galmiche, A. Morel, E. Gamelin, T. Matysiak-Budnik, Lethal outcome of 5-fluorouracil infusion in a patient with a total DPD deficiency and a double DPYD and UTG1A1 gene mutation, *British journal of clinical pharmacology* 70(2) (2010) 280-3.
- [38] D. Meulendijks, A. Cats, J.H. Beijnen, J.H. Schellens, Improving safety of fluoropyrimidine chemotherapy by individualizing treatment based on dihydropyrimidine dehydrogenase activity - Ready for clinical practice?, *Cancer treatment reviews* 50 (2016) 23-34.
- [39] B.C. Chen, R. Mohd Rawi, R. Meinsma, J. Meijer, R.C. Hennekam, A.B. van Kuilenburg, Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in two malaysian siblings with abnormal MRI findings, *Molecular syndromology* 5(6) (2014) 299-303.
- [40] H. Ezzeldin, R. Diasio, Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency, a Pharmacogenetic Syndrome Associated with Potentially Life-Threatening Toxicity Following 5-Fluorouracil Administration, *Clinical Colorectal Cancer* 4(3) (2004) 181-189.
- [41] S.N. Iyer, R.S. Singhal, M.R. Hegde, A. Ankala, Genetic variation in dihydropyrimidine

- dehydrogenase (DPYD) gene in a healthy adult Indian population, *Annals of human biology* 42(1) (2015) 97-100.
- [42] A.B. van Kuilenburg, J. Meijer, D. Maurer, D. Dobritzsch, R. Meinsma, M. Los, L.C. Knegt, L. Zoetekouw, R.L. Jansen, V. Dezentje, L.H. van Huis-Tanja, R.J. van Kampen, J.M. Hertz, R.C. Hennekam, Severe fluoropyrimidine toxicity due to novel and rare DPYD missense mutations, deletion and genomic amplification affecting DPD activity and mRNA splicing, *Biochimica et biophysica acta* 1863(3) (2017) 721-730.
- [43] C.E. Vaudo, B. Gil, K. Galuski, C. Zarwan, F.W. Nugent, Early-Onset 5-Fluorouracil Toxicity in a Patient Negative for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Mutations: The Clinical Course of Reversal with Uridine Triacetate, *Pharmacotherapy* 36(11) (2016) e178-e182.
- [44] F. Thomas, I. Hennebelle, C. Delmas, I. Lochon, C. Dhelens, C. Garnier Tixidre, A. Bonadona, N. Penel, A. Goncalves, J.P. Delord, C. Toulas, E. Chatelut, Genotyping of a family with a novel deleterious DPYD mutation supports the pretherapeutic screening of DPD deficiency with dihydrouracil/uracil ratio, *Clinical pharmacology and therapeutics* 99(2) (2016) 235-42.
- [45] L.M. Henricks, E.J.M. Siemerink, H. Rosing, J. Meijer, S.M.I. Goorden, A.M. Polstra, L. Zoetekouw, A. Cats, J.H.M. Schellens, A.B.P. van Kuilenburg, Capecitabine-based treatment of a patient with a novel DPYD genotype and complete dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency, *International journal of cancer* 142(2) (2018) 424-430.
- [46] Q. Li, Y. Liu, H.M. Zhang, Y.P. Huang, T.Y. Wang, D.S. Li, H.Z. Sun, Influence of DPYD Genetic Polymorphisms on 5-Fluorouracil Toxicities in Patients with Colorectal Cancer: A Meta-Analysis, *Gastroenterology research and practice* 2014 (2014) 827989.
- [47] H.W. Leung, A.L. Chan, Association and prediction of severe 5-fluorouracil toxicity with dihydropyrimidine dehydrogenase gene polymorphisms: A meta-analysis, *Biomedical reports* 3(6) (2015) 879-883.
- [48] E. Gross, C. Meul, S. Raab, C. Propping, S. Avril, M. Aubele, A. Gkazepis, T. Schuster, N.

- Grebenchtchikov, M. Schmitt, M. Kiechle, J. Meijer, R. Vijzelaar, A. Meindl, A.B. van Kuilenburg, Somatic copy number changes in DPYD are associated with lower risk of recurrence in triple-negative breast cancers, *British journal of cancer* 109(9) (2013) 2347-55.
- [49] M. Del Re, A. Michelucci, A. Di Leo, M. Cantore, R. Bordonaro, P. Simi, R. Danesi, Discovery of novel mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene associated with toxicity of fluoropyrimidines and viewpoint on preemptive pharmacogenetic screening in patients, *The EPMA journal* 6(1) (2015) 17.
- [50] L. Edwards, R. Gupta, F.V. Filipp, Hypermutation of DPYD Deregulates Pyrimidine Metabolism and Promotes Malignant Progression, *Molecular cancer research : MCR* 14(2) (2016) 196-206.
- [51] T.K. Froehlich, U. Amstutz, S. Aebi, M. Joerger, C.R. Largiader, Clinical importance of risk variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene for the prediction of early-onset fluoropyrimidine toxicity, *International journal of cancer* 136(3) (2015) 730-9.
- [52] D. Meulendijks, L.M. Henricks, G.S. Sonke, M.J. Deenen, T.K. Froehlich, U. Amstutz, C.R. Largiader, B.A. Jennings, A.M. Marinaki, J.D. Sanderson, Z. Kleibl, P. Kleiblova, M. Schwab, U.M. Zanger, C. Palles, I. Tomlinson, E. Gross, A.B. van Kuilenburg, C.J. Punt, M. Koopman, J.H. Beijnen, A. Cats, J.H. Schellens, Clinical relevance of DPYD variants c.1679T>G, c.1236G>A/HapB3, and c.1601G>A as predictors of severe fluoropyrimidine-associated toxicity: a systematic review and meta-analysis of individual patient data, *The Lancet. Oncology* 16(16) (2015) 1639-50.
- [53] A.M. Lee, Q. Shi, S.R. Alberts, D.J. Sargent, F.A. Sinicrope, J.L. Berenberg, A. Grothey, B. Polite, E. Chan, S. Gill, M.S. Kahlenberg, S.G. Nair, A.F. Shields, R.M. Goldberg, R.B. Diasio, Association between DPYD c.1129-5923 C>G/hapB3 and severe toxicity to 5-fluorouracil-based chemotherapy in stage III colon cancer patients: NCCTG N0147 (Alliance), *Pharmacogenetics and genomics* 26(3) (2016) 133-7.

- [54] D. Meulendijks, L.M. Henricks, A.B. van Kuilenburg, B.A. Jacobs, A. Aliev, L. Rozeman, J. Meijer, J.H. Beijnen, H. de Graaf, A. Cats, J.H. Schellens, Patients homozygous for DPYD c.1129-5923C>G/haplotype B3 have partial DPD deficiency and require a dose reduction when treated with fluoropyrimidines, *Cancer chemotherapy and pharmacology* 78(4) (2016) 875-80.
- [55] M. Al-Khateeb, A. Awidi, K. Al-Hadidi, A. Battah, Low Incidence of the DPD IVS14+1G>A Polymorphism in Jordanian Breast and Colorectal Cancer patients, *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 18(6) (2017) 1651-1654.
- [56] M.J. Deenen, D. Meulendijks, A. Cats, M.K. Sechterberger, J.L. Severens, H. Boot, P.H. Smits, H. Rosing, C.M. Mandigers, M. Soesan, J.H. Beijnen, J.H. Schellens, Upfront Genotyping of DPYD*2A to Individualize Fluoropyrimidine Therapy: A Safety and Cost Analysis, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 34(3) (2016) 227-34.
- [57] L. Dean, Fluorouracil Therapy and DPYD Genotype, in: V. Pratt, H. McLeod, L. Dean, A. Malheiro, W. Rubinstein (Eds.), *Medical Genetics Summaries*, National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD), 2012.
- [58] L. Dean, Capecitabine Therapy and DPYD Genotype, in: V. Pratt, H. McLeod, L. Dean, A. Malheiro, W. Rubinstein (Eds.), *Medical Genetics Summaries*, National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD), 2012.
- [59] L.M. Henricks, F.L. Opdam, J.H. Beijnen, A. Cats, J.H.M. Schellens, DPYD genotype-guided dose individualization to improve patient safety of fluoropyrimidine therapy: call for a drug label update, *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 28(12) (2017) 2915-2922.
- [60] U. Amstutz, L.M. Henricks, S.M. Offer, J. Barbarino, J.H.M. Schellens, J.J. Swen, T.E. Klein, H.L. McLeod, K.E. Caudle, R.B. Diasio, M. Schwab, Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Dihydropyrimidine Dehydrogenase

- Genotype and Fluoropyrimidine Dosing: 2017 Update, *Clinical pharmacology and therapeutics* 103(2) (2018) 210-216.
- [61] K. Maekawa, M. Saeki, Y. Saito, S. Ozawa, K. Kurose, N. Kaniwa, M. Kawamoto, N. Kamatani, K. Kato, T. Hamaguchi, Y. Yamada, K. Shirao, Y. Shimada, M. Muto, T. Doi, A. Ohtsu, T. Yoshida, Y. Matsumura, N. Saijo, J. Sawada, Genetic variations and haplotype structures of the DPYD gene encoding dihydropyrimidine dehydrogenase in Japanese and their ethnic differences, *Journal of human genetics* 52(10) (2007) 804-19.
- [62] D. Dobritzsch, S. Ricagno, G. Schneider, K.D. Schnackerz, Y. Lindqvist, Crystal structure of the productive ternary complex of dihydropyrimidine dehydrogenase with NADPH and 5-iodouracil. Implications for mechanism of inhibition and electron transfer, *The Journal of biological chemistry* 277(15) (2002) 13155-66.
- [63] D. Dobritzsch, G. Schneider, K.D. Schnackerz, Y. Lindqvist, Crystal structure of dihydropyrimidine dehydrogenase, a major determinant of the pharmacokinetics of the anti-cancer drug 5-fluorouracil, *The EMBO journal* 20(4) (2001) 650-60.
- [64] L.K. Mattison, M.R. Johnson, R.B. Diasio, A comparative analysis of translated dihydropyrimidine dehydrogenase cDNA; conservation of functional domains and relevance to genetic polymorphisms, *Pharmacogenetics* 12(2) (2002) 133-44.
- [65] B. Lohkamp, N. Voevodskaya, Y. Lindqvist, D. Dobritzsch, Insights into the mechanism of dihydropyrimidine dehydrogenase from site-directed mutagenesis targeting the active site loop and redox cofactor coordination, *Biochimica et biophysica acta* 1804(12) (2010) 2198-206.
- [66] S.M. Offer, C.C. Fossum, N.J. Wegner, A.J. Stuflesser, G.L. Butterfield, R.B. Diasio, Comparative functional analysis of DPYD variants of potential clinical relevance to dihydropyrimidine dehydrogenase activity, *Cancer research* 74(9) (2014) 2545-54.
- [67] PharmGKB, DPWG guideline for fluorouracil and DPYD.
<https://www.pharmgkb.org/guideline/PA166104963>

- [68] J.G. Shin, H.S. Cheong, J.Y. Kim, L.H. Kim, C.S. Han, J.O. Kim, H.D. Kim, Y.H. Kim, M.W. Chung, S.Y. Han, H.D. Shin, Screening of dihydropyrimidine dehydrogenase genetic variants by direct sequencing in different ethnic groups, *Journal of Korean medical science* 28(8) (2013) 1129-33.
- [69] A. Kuilenburg, J. Meijer, M.W.T. Tanck, D. Dobritzsch, L. Zoetekouw, L.L. Dekkers, J. Roelofsen, R. Meinsma, M. Wymenga, W. Kulik, B. Buchel, R.C.M. Hennekam, C.R. Largiader, Phenotypic and clinical implications of variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene, *Biochimica et biophysica acta* 1862(4) (2016) 754-762.
- [70] S.M. Offer, N.J. Wegner, C. Fossum, K. Wang, R.B. Diasio, Phenotypic profiling of DPYD variations relevant to 5-fluorouracil sensitivity using real-time cellular analysis and in vitro measurement of enzyme activity, *Cancer research* 73(6) (2013) 1958-68.
- [71] M.J. Deenen, J. Tol, A.M. Burylo, V.D. Doodeman, A. de Boer, A. Vincent, H.J. Guchelaar, P.H. Smits, J.H. Beijnen, C.J. Punt, J.H. Schellens, A. Cats, Relationship between single nucleotide polymorphisms and haplotypes in DPYD and toxicity and efficacy of capecitabine in advanced colorectal cancer, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17(10) (2011) 3455-68.
- [72] Z. Kleibl, J. Fidlerova, P. Kleiblova, S. Kormunda, M. Bilek, K. Bouskova, J. Sevcik, J. Novotny, Influence of dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) coding sequence variants on the development of fluoropyrimidine-related toxicity in patients with high-grade toxicity and patients with excellent tolerance of fluoropyrimidine-based chemotherapy, *Neoplasma* 56(4) (2009) 303-16.
- [73] K. Ogura, T. Ohnuma, Y. Minamide, A. Mizuno, T. Nishiyama, S. Nagashima, M. Kanamaru, A. Hiratsuka, T. Watabe, T. Uematsu, Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in 150 healthy Japanese volunteers and identification of novel mutations, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11(14) (2005) 5104-11.

- [74] N. Hamajima, M. Kouwaki, P. Vreken, K. Matsuda, S. Sumi, M. Imaeda, S. Ohba, K. Kidouchi, M. Nonaka, M. Sasaki, N. Tamaki, Y. Endo, R. De Abreu, J. Rotteveel, A. van Kuilenburg, A. van Gennip, H. Togari, Y. Wada, Dihydropyrimidinase Deficiency: Structural Organization, Chromosomal Localization, and Mutation Analysis of the Human Dihydropyrimidinase Gene, *The American Journal of Human Genetics* 63(3) (1998) 717-726.
- [75] M. Duran, P. Rovers, P.K. de Bree, C.H. Schreuder, H. Beukenhorst, L. Dorland, R. Berger, Dihydropyrimidinuria: a new inborn error of pyrimidine metabolism, *Journal of inherited metabolic disease* 14(3) (1991) 367-370.
- [76] K. Hayashi, K. Kidouchi, S. Sumi, M. Mizokami, E. Orito, K. Kumada, R. Ueda, Y. Wada, Possible prediction of adverse reactions to pyrimidine chemotherapy from urinary pyrimidine levels and a case of asymptomatic adult dihydropyrimidinuria, *Clinical Cancer Research* 2(12) (1996) 1937.
- [77] S. Sumi, M. Imaeda, K. Kidouchi, S. Ohba, N. Hamajima, K. Kodama, H. Togari, Y. Wada, Population and family studies of dihydropyrimidinuria: prevalence, inheritance mode, and risk of fluorouracil toxicity, *American journal of medical genetics* 78(4) (1998) 336-40.
- [78] A.H. van Gennip, N.G. Abeling, A.E. Stroomer, H. van Lenthe, H.D. Bakker, Clinical and biochemical findings in six patients with pyrimidine degradation defects, *Journal of inherited metabolic disease* 17(1) (1994) 130-2.
- [79] A.H. van Gennip, R.A. de Abreu, H. van Lenthe, J. Bakkeren, J. Rotteveel, P. Vreken, A.B.P. van Kuilenburg, Dihydropyrimidinase deficiency: Confirmation of the enzyme defect in dihydropyrimidinuria, *Journal of inherited metabolic disease* 20(3) (1997) 339-342.
- [80] A.B. van Kuilenburg, D. Dobritzsch, J. Meijer, R. Meinsma, J.F. Benoist, B. Assmann, S. Schubert, G.F. Hoffmann, M. Duran, M.C. de Vries, G. Kurlermann, F.J. Eyskens, L. Greed, J.O. Sass, K.O. Schwab, A.C. Sewell, J. Walter, A. Hahn, L. Zoetekouw, A. Ribes, S. Lind, R.C. Hennekam, Dihydropyrimidinase deficiency: Phenotype, genotype and structural

- consequences in 17 patients, *Biochimica et biophysica acta* 1802(7-8) (2010) 639-48.
- [81] S. Ohba, K. Kidouchi, S. Sumi, M. Imaeda, N. Takeda, H. Yoshizumi, A. Tatematsu, K. Kodama, K. Yamanaka, M. Kobayashi, et al., Dihydropyrimidinuria: the first case in Japan, *Advances in experimental medicine and biology* 370 (1994) 383-6.
- [82] A.B. van Kuilenburg, J. Meijer, D. Dobritzsch, R. Meinsma, M. Duran, B. Lohkamp, L. Zoetekouw, N.G. Abeling, H.L. van Tinteren, A.M. Bosch, Clinical, biochemical and genetic findings in two siblings with a dihydropyrimidinase deficiency, *Molecular genetics and metabolism* 91(2) (2007) 157-64.
- [83] C.W. Yeung, M.M. Yau, C.K. Ma, T.S. Siu, S. Tam, C.W. Lam, Diagnosis of dihydropyrimidinase deficiency in a Chinese boy with dihydropyrimidinuria, *Hong Kong medical journal = Xianggang yi xue za zhi* 19(3) (2013) 272-5.
- [84] J. Fidlerova, P. Kleiblova, M. Bilek, S. Kormunda, Z. Formankova, J. Novotny, Z. Kleibl, Contribution of dihydropyrimidinase gene alterations to the development of serious toxicity in fluoropyrimidine-treated cancer patients, *Cancer chemotherapy and pharmacology* 65(4) (2010) 661-9.
- [85] M. Hiratsuka, H. Yamashita, F. Akai, H. Hosono, E. Hishinuma, N. Hirasawa, T. Mori, Genetic polymorphisms of dihydropyrimidinase in a Japanese patient with capecitabine-induced toxicity, *PloS one* 10(4) (2015) e0124818.
- [86] Y. Nakajima, J. Meijer, C. Zhang, X. Wang, T. Kondo, T. Ito, D. Dobritzsch, A.B. Van Kuilenburg, Altered Pre-mRNA Splicing Caused by a Novel Intronic Mutation c.1443+5G>A in the Dihydropyrimidinase (DPYS) Gene, *International journal of molecular sciences* 17(1) (2016).
- [87] F. Akai, H. Hosono, N. Hirasawa, M. Hiratsuka, Novel single nucleotide polymorphisms of the dihydropyrimidinase gene (DPYS) in Japanese individuals, *Drug metabolism and pharmacokinetics* 30(1) (2015) 127-9.

- [88] H.R. Thomas, H.H. Ezzeldin, V. Guarcello, L.K. Mattison, B.L. Fridley, R.B. Diasio, Genetic regulation of dihydropyrimidinase and its possible implication in altered uracil catabolism, *Pharmacogenetics and genomics* 17(11) (2007) 973-87.
- [89] H. Nakagawa, Y. Toyoda, K. Wakabayashi-Nakao, H. Tamaki, M. Osumi, T. Ishikawa, Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of ABC transporters: a new aspect of genetic polymorphisms and clinical impacts, *Journal of pharmaceutical sciences* 100(9) (2011) 3602-19.
- [90] Q. Feng, S. Vannaprasaht, Y. Peng, S. Angsuthum, Y. Avihingsanon, V.C. Yee, W. Tassaneeyakul, R.M. Weinshilboum, Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: functional characterization of a novel rapidly degraded variant allozyme, *Biochemical pharmacology* 79(7) (2010) 1053-61.
- [91] F. Li, L. Wang, R.J. Burgess, R.M. Weinshilboum, Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: autophagy as a mechanism for variant allozyme degradation, *Pharmacogenetics and genomics* 18(12) (2008) 1083-94.
- [92] L. Wang, T.V. Nguyen, R.W. McLaughlin, L.A. Sikkink, M. Ramirez-Alvarado, R.M. Weinshilboum, Human thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allozyme misfolding and aggresome formation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(26) (2005) 9394-9.
- [93] K.P. Brooks, E.A. Jones, B.D. Kim, E.G. Sander, Bovine liver dihydropyrimidine amidohydrolase: purification, properties, and characterization as a zinc metalloenzyme, *Archives of biochemistry and biophysics* 226(2) (1983) 469-83.
- [94] B. Lohkamp, B. Andersen, J. Piskur, D. Dobritsch, The crystal structures of dihydropyrimidinases reaffirm the close relationship between cyclic amidohydrolases and explain their substrate specificity, *The Journal of biological chemistry* 281(19) (2006) 13762-76.

- [95] C.T. Tzeng, Y.H. Huang, C.Y. Huang, Crystal structure of dihydropyrimidinase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: Insights into the molecular basis of formation of a dimer, *Biochemical and biophysical research communications* 478(3) (2016) 1449-55.
- [96] Y.C. Hsieh, M.C. Chen, C.C. Hsu, S.I. Chan, Y.S. Yang, C.J. Chen, Crystal structures of vertebrate dihydropyrimidinase and complexes from *Tetraodon nigroviridis* with lysine carbamylation: metal and structural requirements for post-translational modification and function, *The Journal of biological chemistry* 288(42) (2013) 30645-58.
- [97] G.J. Kim, H.S. Kim, C-terminal regions of D-hydantoinases are nonessential for catalysis, but affect the oligomeric structure, *Biochemical and biophysical research communications* 243(1) (1998) 96-100.
- [98] N. Nagano, C.A. Orengo, J.M. Thornton, One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions, *Journal of molecular biology* 321(5) (2002) 741-65.
- [99] C.Y. Huang, C.C. Hsu, M.C. Chen, Y.S. Yang, Effect of metal binding and posttranslational lysine carboxylation on the activity of recombinant hydantoinase, *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 14(1) (2009) 111-21.
- [100] S. Martinez-Rodriguez, J.A. Encinar, E. Hurtado-Gomez, J. Prieto, J.M. Clemente-Jimenez, F.J. Las Heras-Vazquez, F. Rodriguez-Vico, J.L. Neira, Metal-triggered changes in the stability and secondary structure of a tetrameric dihydropyrimidinase: a biophysical characterization, *Biophysical chemistry* 139(1) (2009) 42-52.
- [101] S. Martinez-Rodriguez, A.I. Martinez-Gomez, J.M. Clemente-Jimenez, F. Rodriguez-Vico, J.M. Garcia-Ruiz, F.J. Las Heras-Vazquez, J.A. Gavira, Structure of dihydropyrimidinase from *Sinorhizobium meliloti* CECT4114: new features in an amidohydrolase family member, *Journal of structural biology* 169(2) (2010) 200-8.

- [102] T. Nakai, T. Hasegawa, E. Yamashita, M. Yamamoto, T. Kumasaka, T. Ueki, H. Nanba, Y. Ikenaka, S. Takahashi, M. Sato, T. Tsukihara, Crystal structure of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase with a novel catalytic framework common to amidohydrolases, *Structure* (London, England : 1993) 8(7) (2000) 729-37.
- [103] L. Niu, X. Zhang, Y. Shi, J. Yuan, Subunit dissociation and stability alteration of D hydantoinase deleted at the terminal amino acid residue, *Biotechnology letters* 29(2) (2007) 303-8.
- [104] J. Abendroth, K. Niefind, D. Schomburg, X-ray structure of a dihydropyrimidinase from *Thermus* sp. at 1.3 Å resolution, *Journal of molecular biology* 320(1) (2002) 143-56.
- [105] Z. Gojkovic, L. Rislund, B. Andersen, M.P. Sandrini, P.F. Cook, K.D. Schnackerz, J. Piskur, Dihydropyrimidine amidohydrolases and dihydroorotases share the same origin and several enzymatic properties, *Nucleic acids research* 31(6) (2003) 1683-92.
- [106] G.J. Kim, H.S. Kim, Identification of the structural similarity in the functionally related amidohydrolases acting on the cyclic amide ring, *The Biochemical journal* 330 (Pt 1) (1998) 295-302.
- [107] A. Paci, G. Veal, C. Bardin, D. Leveque, N. Widmer, J. Beijnen, A. Astier, E. Chatelut, Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part 1--cytotoxics, *European journal of cancer* 50(12) (2014) 2010-9.
- [108] X. Pan, C. Wang, F. Wang, P. Li, Z. Hu, Y. Shan, J. Zhang, Development of 5-Fluorouracil Derivatives as Anticancer Agents, *Current Medicinal Chemistry* 18(29) (2011) 4538-4556.
- [109] D. Bertholee, J.G. Maring, A.B. van Kuilenburg, Genotypes Affecting the Pharmacokinetics of Anticancer Drugs, *Clinical pharmacokinetics* (2016).
- [110] M.L. Rothenberg, N.J. Meropol, E.A. Poplin, E.V. Cutsem, S. Wadler, Mortality Associated With Irinotecan Plus Bolus Fluorouracil/Leucovorin: Summary Findings of an Independent Panel, *Journal of Clinical Oncology* 19(18) (2001) 3801-3807.

- [111] L.B. Saltz, D. Niedzwiecki, D. Hollis, R.M. Goldberg, A. Hantel, J.P. Thomas, A.L. Fields, R.J. Mayer, Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25(23) (2007) 3456-61.
- [112] C. Twelves , A. Wong , M.P. Nowacki , M. Abt , H.I. Burris , A. Carrato , J. Cassidy , A. Cervantes , J. Fagerberg , V. Georgoulas , F. Hussein , D. Jodrell , P. Koralewski , H. Kröning , J. Maroun , N. Marschner , J. McKendrick , M. Pawlicki , R. Rosso , J. Schüller , J.-F. Seitz , B. Stabuc , J. Tujakowski , G. Van Hazel , J. Zaluski , W. Scheithauer Capecitabine as Adjuvant Treatment for Stage III Colon Cancer, *New England Journal of Medicine* 352(26) (2005) 2696-2704.
- [113] M. Roberto, A. Romiti, A. Botticelli, F. Mazzuca, L. Lionetto, G. Gentile, I. Paris, R. Falcone, M. Bassanelli, F.R. Di Pietro, C.E. Onesti, E. Anselmi, S. Macrini, M. Simmaco, P. Marchetti, Evaluation of 5-fluorouracil degradation rate and Pharmacogenetic profiling to predict toxicity following adjuvant Capecitabine, *European journal of clinical pharmacology* 73(2) (2017) 157-164.
- [114] C.A. Lunenburg, L.M. Henricks, H.J. Guchelaar, J.J. Swen, M.J. Deenen, J.H. Schellens, H. Gelderblom, Prospective DPYD genotyping to reduce the risk of fluoropyrimidine-induced severe toxicity: Ready for prime time, *European journal of cancer* 54 (2016) 40-8.
- [115] L.M. Henricks, C.A. Lunenburg, D. Meulendijks, H. Gelderblom, A. Cats, J.J. Swen, J.H. Schellens, H.J. Guchelaar, Translating DPYD genotype into DPD phenotype: using the DPYD gene activity score, *Pharmacogenomics* 16(11) (2015) 1277-86.
- [116] H.L. McLeod, E.S. Collie-Duguid, P. Vreken, M.R. Johnson, X. Wei, A. Sapone, R.B. Diasio, P. Fernandez-Salguero, A.B. van Kuilenberg, A.H. van Gennip, F.J. Gonzalez, Nomenclature for human DPYD alleles, *Pharmacogenetics* 8(6) (1998) 455-9.

発表論文

1. Functional characterization of 21 allelic variants of dihydropyrimidinase. Eiji Hishinuma, Fumika Akai, Yoko Narita, Masamitsu Maekawa, Hiroaki Yamaguchi, Nariyasu Mano, Akifumi Oda, Noriyasu Hirasawa, Masahiro Hiratsuka, *Biochemical Pharmacology*, 143, 118-128, 2017.