

総 説

アルデヒドオキシダーゼの薬物代謝酵素学的諸性質

田中 頼久, 伊藤 邦郎

Properties of Aldehyde Oxidase as a Drug-metabolizing Enzyme

Yorihisa TANAKA and Kunio ITOH

(Received November 20, 2009)

はじめに

アルデヒドオキシダーゼ(AO)は生物界に普遍的に存在し, 各種アルデヒド類を対応するカルボン酸に変換する反応を触媒するが, その生理的役割については今でも確たる定説はほとんどない状況にある. AOはむしろ薬物代謝酵素としての役割の観点から研究されてきた. すなわち, 本酵素はモノアミン酸化酵素(MAO)による酸化的脱アミノ化あるいはシトクロム P450 (CYP) によるアルキル側鎖の酸化反応等で生じる化学的に活性な種々のアルデヒド中間体の解毒に関わることに加え, 含窒素複素環化合物を酸化しラクタム環を生成する反応にも関わる. このようなことから, AO という命名は不適切との指摘がなされている. 細胞質(サイトゾール)に局在する AO は電子伝達系を内在しておりピリジヌクレオチド等の補酵素を必要とせず, 酸化反応は求核的に進行し, 基質に導入される酸素原子は最終的に水分子に由来する. 一方, 小胞体(ミクロソーム)に局在する CYP は補酵素に NADPH を必要とし親電子の攻撃により分子状酸素原子を薬物に導入し水酸化する. このように AO は CYP と, 細胞内局在性, 基質特異性, 反応機構, 補酵素要求性など種々の性質が異なり, 薬物代謝において相補の関係にあるとされている. AO で代謝される医薬品の絶対数は CYP に比べると格段に少なく, それが AO 研究の発展を阻んできた感がある. しかし, 含窒素複素環構造を有する医薬品あるいは核酸誘導体医薬品の代謝に, AO が重要な役割を果たす例が少なからず知られている. 加えて, AO には誘導や阻害を含め顕著な種差, ラットにおける大きな系統差, いくつかのラット系統における著しい個体差など薬物代謝学的に興味ある現象が多数報告されている.¹⁻⁸⁾ これらはいずれも現象論的記述に留まっていたことから, 著者らはそれらの分子生物学的機

構解明を目指し研究を進めてきた. 今までに得られた新規な知見をまとめ, また今後の展開に触れてみたいと思う.

I. AO の構造, 分子種及び酸化反応機構

1) 構造及び反応機構

モリブデンを含有する酵素群には, キサンチン酸化酵素ファミリー, 亜硫酸酸化酵素ファミリー及び DMSO 還元酵素ファミリーが知られており, AO (EC 1.2.3.1) はキサンチン酸化酵素(XO)や一酸化炭素脱水素酵素と共にキサンチン酸化酵素ファミリーに属する.¹⁾ AO はモノマーの分子量が約 150 kDa から成るホモダイマーであり, 各モノマーは2つの異なる 2Fe-2S クラスターを含む約 20 kDa の N-末ドメイン, FAD 結合部位を含む約 40 kDa の中心ドメイン及び molybdenum cofactor (MoCo) 結合部位と基質結合部位を含む約 85 kDa の C-末ドメインの3つの部分が2つのヒンジで連結した構造をしている (Fig. 1).⁷⁾ 補欠分子族の MoCo は molybdopterin として存在する. 基質の水酸化は MoCo サイトで Mo-OH の求核的攻撃を介して行われ, 同時にモリブデンは Mo(VI) から Mo(IV) に還元される. Mo(IV) は Fe-S クラスターへの急速な電子転送, ついで FAD への電子転送により Mo(VI) に再酸化される. 最後のステップで, FAD から分子状酸素に電子が転送され, 過酸化水素やスーパーオキシドアニオン等の活性酸素分子種が生じるとされている. Fe-S クラスターは電子の流路回路としてばかりでなく, FAD センターに電子を供給する電子貯留部位としても作用する. AO は酸化反応に加え, 抗けいれん薬ゾニサミド,⁹⁾ 抗精神病薬ジブラシドン^{10,11)} 等の還元的開環反応も触媒することが報告されている.

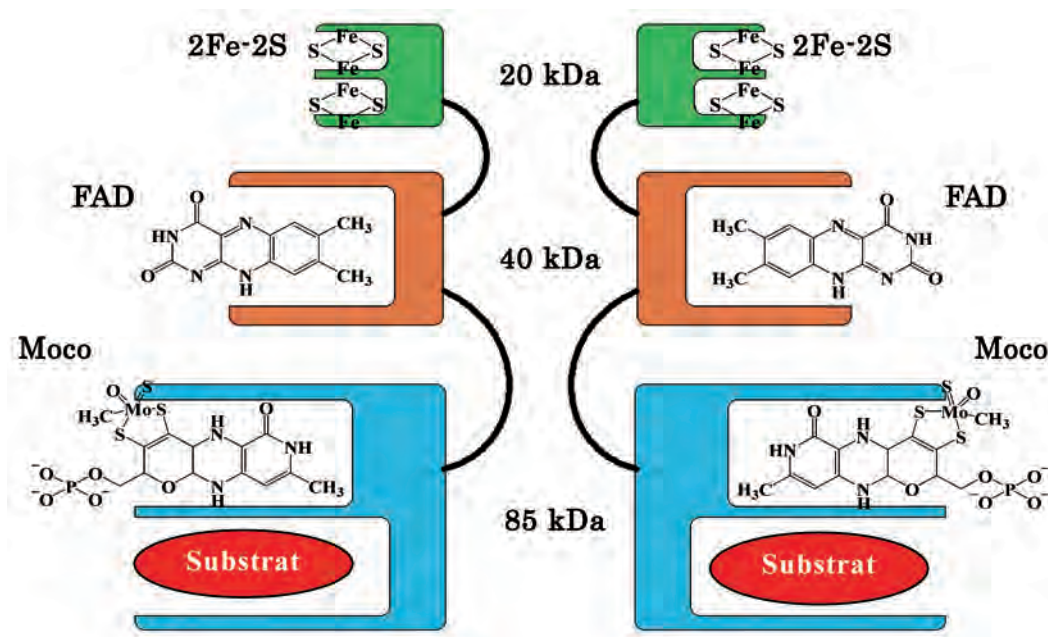


Fig. 1. Domain composition of a prototypical molybdo-flavoenzyme
(Garattini E. *et al.*, *Biochem. J.*, **372**, 15–32 (2003) より一部改変)

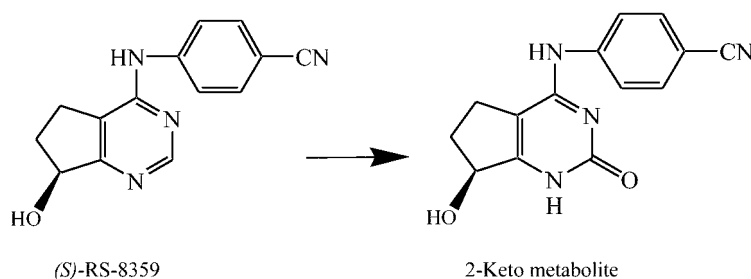


Fig. 2. Chemical structures of (S)-RS-8359 and 2-keto metabolite produced by AO

2) 分子種

最近, AO と高い塩基配列相同性を示すホモログ AOH1, AOH2 及び AOH3 の存在がラットやマウスで報告され,^{12–14)} キサンチン酸化酵素ファミリーの数が増えつつある. そのため, 従来の AO は AOX1 と呼ばれ始めている.⁷⁾ AOH1 は肝臓に存在し AOX1 と類似の基質特異性を有するが, ほとんどのすべての基質に対する反応性は AOX1 の方が高い. しかし, AOH2 は AOX1 が未熟な出生直後に既に発現していることから, また AOH2 はハーダー氏腺や食道上皮細胞組織等に, AOH3 は嗅覚粘膜に局在しており, それぞれ何らかの生理的役割を担っているのではと関心が寄せられている.

II. AO 活性の種差

1) RS-8359 の立体選択的体内動態の種差

RS-8359 は 1 個の不斉中心を有する可逆的 A 型モノアミン酸化酵素阻害剤で抗うつ薬として開発が進められた (Fig. 2).^{15,16)} R 体は S 体の約 120 倍強い阻害活性を示し, ラセミ体として各種動物に経口投与後の血漿中濃度時間推移は, いずれの動物においても S 体の方が R 体より速やかに消失し, 血中濃度時間曲線下面積 (AUC) の R/S 比は, マウスで 3.8, ラットで 2.6, イヌで 31, サルで 238, ヒトでは S 体は検出限界以下であった (Fig. 3).^{17,18)} これは S 体が速やかに代謝されるため, 関わる酵素はマウスでは CYP, ラットでは CYP と AO, イヌでは UDP-グルクロン酸転移酵素, 並びにサル及びヒトでは AO と動

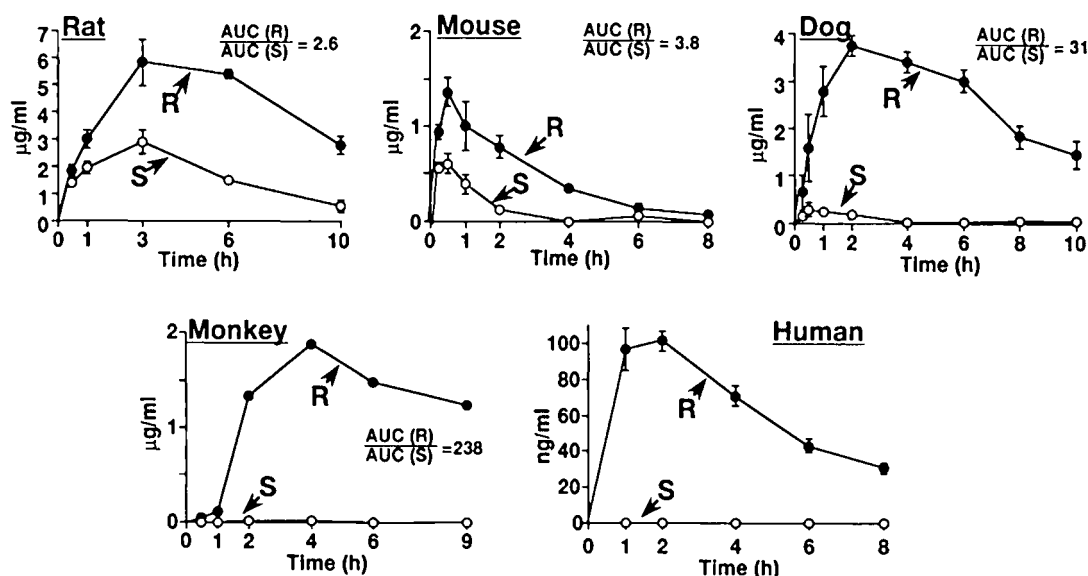


Fig. 3. Plasma levels of RS-8359 enantiomers after oral administration of *rac*-RS-8359 to rats, mice, dogs, monkeys, and humans

Table 1. 2-Oxidation activity of RS-8359 enantiomers by liver cytosolic fractions from several animal species

Species	(S)-enantiomer			(R)-enantiomer
	<i>K_m</i> (μ M)	<i>V_{max}</i> (pmol/min/mg)	<i>V_{max}/K_m</i> (μ l/min/mg)	Activity (pmol/min/mg)
Mouse	206 \pm 33	77 \pm 23	0.38 \pm 0.10	N.D. ^a
Rat	220 \pm 70	209 \pm 19	0.95 \pm 0.30	N.D.
Guinea pig	22 \pm 7	116 \pm 49	5.3 \pm 1.7	25 \pm 8
Rabbit	589 \pm 47	366 \pm 105	0.62 \pm 0.16	N.D.
Monkey	218 \pm 65	16520 \pm 4810	75.8 \pm 18.7	116 \pm 35
Human	45 \pm 5	3157 \pm 676	70.2 \pm 14.0	88 \pm 21
Dog	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

^a Not detected. Data are presented as the mean \pm S.E. of four animals.

物種ごとにさまざまであった。なお、RS-8359 から 2-ケト体の生成に関わる酵素は、①活性が肝サイトゾールに局在すること、②補酵素としてピリジヌクレオチド等を要求しないこと、③キサンチン酸化酵素の阻害剤であるアロプリノールでは阻害されないが、AO の阻害剤であるメナジオンやクロルプロマジンで強く阻害されること、④精製酵素はモノマーの分子量が約 150 kDa のホモダイマーであること、⑤精製酵素の吸収スペクトルにおいて A280/A450 が 5.1 である、ことなどから AO と同定された。¹⁹⁾ AO はアルデヒド類のほか、含窒素複素環化合物をも良好な基質とするが、RS-8359 はピリミジン骨格を有する化合物であることを考えると、その代謝に AO が関与することは十分に想定されるものである。

2) AO 活性の種差

シンコナルカロイド及び RS-8359 を基質にしたときの AO 活性を、代表的な実験動物 6 種及びヒトの肝サイトゾールを用い比較検討した結果を Table 1 に示す。²⁰⁾ RS-8359 の S 体はいずれの動物肝でも代謝されたが、その活性には大きな種差が認められ、最も高いサルと最も低いマウスの間には約 200 倍の差が認められた。また、イヌでは (S)-RS-8359 酸化活性は検出限界以下であった。一方、R 体を基質にしたとき、マウス、ラット、ウサギ及びイヌでは全く活性が認められず、活性を示すモルモット、サル及びヒトにおいても S 体に比べ非常に低かった。(S)-RS-8359 に対するヒトの *V_{max}* 値はサルほど大きくないが *K_m* 値が小さいため固有クリ

アランス (V_{\max}/K_m) はサル同様、他動物より 1～2 オーダー大きい値を示した。これは、ヒト及びサルにおいて (S)-RS-8359 は AO による代謝産物の 2-ケト体及びそのグルクロン酸抱合体として尿中に速やかに排泄されるというデータと一致する。¹⁷⁾

AO 活性に大きな種差が存在することは、強心剤カルバゼラン,²¹⁾ 超短時間型睡眠薬ザレプロン,²²⁾ 抗リウマチ薬メトトレキサート,^{23,24)} 抗ウイルス薬ファミシクロビル²⁵⁾ 等を始めとし多くの医薬品で報告されている。一般にサル及びヒトで高く、ウサギ、ラット、マウスは中程度であるがイヌでは欠損している。著者らの RS-8359 酸化活性の結果も、既報告とほぼ同傾向であった。

ラット AO 活性を、キニーネ、キニジン、シンコニジン、シンコニン、エピキニジン及びエピキニーネの 6 種のシンコナアルカロイドを用い比較検討した (Table 2).²⁰⁾ その結果、AO の基質になるには 9 位が *R* 配置をとる必要性が示された。これは、RS-8359 の 2 位水酸基が *S* 配置及びシンコナアルカロイドの 9 位の水酸基が *R* 配置のとき、立体障害が小さいことによるものと推察された。また、シンコナアルカロイド類の酸化反応は他動物に比べウサギが異常に高い活性を示すという特徴が認められた (Fig. 4).¹⁹⁾ ヒトやサルなどの霊長類が高い AO 活性を持つという従来いわれている一般性は、基質によっては種差の順序が逆転することがあるので注意が必要である。

Table 2. Kinetic parameters of cinchona alkaloid 2'-oxidation by rat liver cytosol

Cinchona alkaloids	Configuration	K_m (μM)	V_{\max} (pmol/min/mg)	V_{\max}/K_m ($\mu l/min/mg$)
6-OCH ₃				
Quinine	(8 <i>S</i> , 9 <i>R</i>)	102 ± 15	1680 ± 267	16.8 ± 2.4
Quinidine	(8 <i>R</i> , 9 <i>S</i>)	18 ± 2	25 ± 2	1.5 ± 0.23
Epiquinidine	(8 <i>R</i> , 9 <i>R</i>)	131 ± 32	1639 ± 183	12.6 ± 2.3
Epiquinine	(8 <i>S</i> , 9 <i>S</i>)	70 ± 5	142 ± 9	2.0 ± 0.14
6-H				
Cinchonidine	(8 <i>S</i> , 9 <i>R</i>)	55 ± 19	1035 ± 86	17.3 ± 2.5
Cinchonine	(8 <i>R</i> , 9 <i>S</i>)	18 ± 3	124 ± 14	6.0 ± 1.0

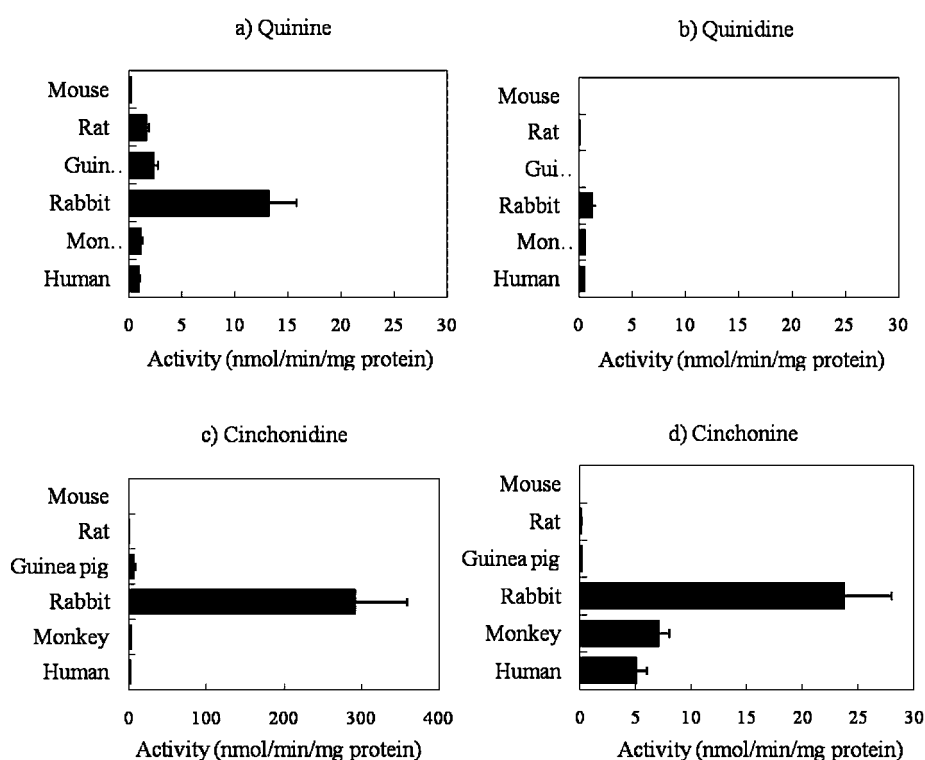


Fig. 4. 2'-Oxidation activity of cinchona alkaloids in several animal species

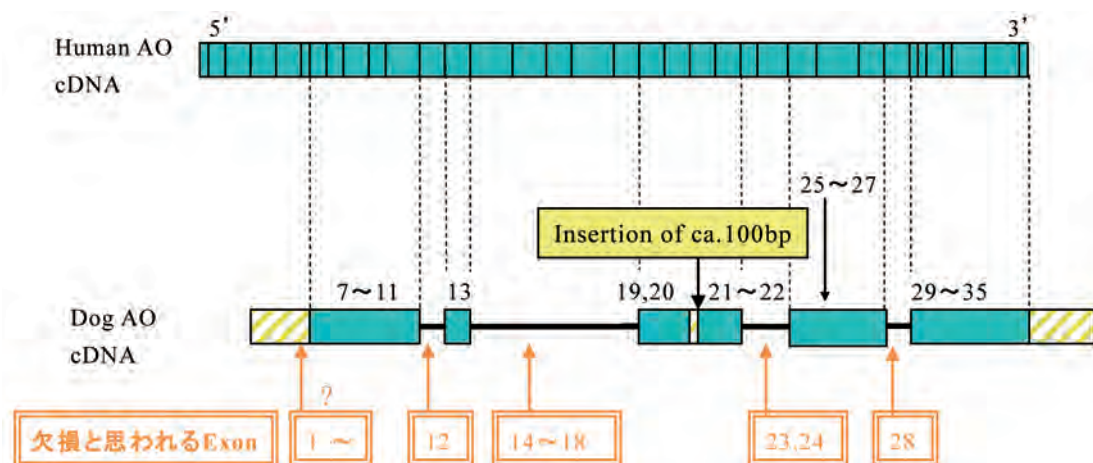


Fig. 5. Comparison of nucleotide sequences of AO cDNA between human and dog

3) イヌにおける AO 活性欠損の機構

実験動物として汎用されるイヌが AO 活性を欠損していることはよく知られていたが、理由は不明であった。イヌ肝サイトゾールの SDS-PAGE/Western blot 解析でバンドがほとんど検出されないことから、AO をコードする遺伝子に問題がありタンパク質が合成されないのではないかと想定された。データベース上に既に報告されている各種動物の塩基配列の中で相同性の高い領域に degenerate primer を作製し、degenerate PCR 法、5'-RACE 法及び 3'-RACE 法を用いて、イヌ AO cDNA をクローニングし、塩基配列を決定した。報告されているイヌ AO ゲノム情報との比較から、cDNA エキソン 1, 2, 23 の欠損はゲノムでの欠損により、また cDNA エキソン 3~6, 12, 14~18, 24, 28 の欠損はスプライシングエラーによることが示された。cDNA エキソン 20 と 21 の間に挿入されている約 100 bp はスプライシングを受けるべき配列が、イントロンとして認識されず残ってしまったものと考えられた (Fig. 5, 日本薬学会第 126 年会)。エキソンの欠損及びイントロンの一部挿入が原因となり、イヌでは正常な AO タンパク質が作られないことが判明した。

4) SDM によるサル AO のウサギ型への変換

AO には顕著な種差が存在するが、既に述べたように基質により種差の順序が変動することがある。例えば、サルとウサギに焦点を当ててみると、シンコニジン²⁰⁾やメトトレキサート²⁴⁾ではウサギの活性がサルより 2 オーダー近く高いが、(S)-RS-8359²⁰⁾やゾニサミド²⁶⁾を基質にした場合、サルがウサギよ

り数倍高い活性を示す。特異的に大きな活性を示す基質及び動物は、酵素の種々の性質を検討する良好なプローブになり得ると考えられる。そこで、分子生物学的手法を用いサル AO にウサギに匹敵する異常に高いシンコニジン酸化活性を持たせることを試みた。²⁷⁾ まず、制限酵素処理と組み換えによりサルとウサギ AO の間でキメラ cDNA を調製し大腸菌に発現させ、高い活性の原因となる領域を絞り込んだところ、ウサギ AO の N993 から A1088 部分が活性発現に必須であることが分かった。ついで、site-directed mutagenesis (SDM) 法によりサル AO 変異体を調製し検討したところ、最終的にサル AO の 1085 番目のバリンをアラニンに置換すると高いシンコニジン酸化活性が得られることが判明した (Table 3)。逆に、ウサギ AO の相当するアミノ酸である 1081 番目をアラニンからバリンに置換すると活性は完全に消失した (Table 3)。一方、キメラ酵素及び変異酵素はいずれも (S)-RS-8359 酸化活性を有していた。

AO に比べ XO の研究の歴史は長く、AO の種々の性質の解明は、少なからず XO の成果を参考になされてきた。XO の活性部位は X 線構造解析により、表面から 10~15 Å 内部に埋め込まれており、基質は多数の疎水性アミノ酸残基から成る漏斗状のトンネルを通して到達するという構造が提唱されている。^{28,29)} これを鋳型とし AO を SWISS-MODEL で解析すると、^{30,31)} ウサギ AO の Ala1081 はトンネルの入り口近くに位置していると予測された。アラニンとバリンの違いはメチル基とイソプロピル基の差にしか過ぎないが、これがシンコニジンのよう

Table 3. Kinetic parameters for oxidation activity of cinchonidine and (S)-RS-8359 by mutant proteins of monkey and rabbit AOX1

Mutants	Cinchonidine			(S)-RS-8359		
	K_m (μM)	V_{max} (nmol/min/mg protein)	V_{max}/K_m ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg protein}$)	K_m (μM)	V_{max} (nmol/min/mg protein)	V_{max}/K_m ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg protein}$)
Monkey AOX1 ^a						
11 (A1083T)	N.D.	N.D.	N.D.	20.7 ± 1.23	3.06 ± 0.516	147 ± 16.1
12 (V1085A)	12.0 ± 2.44	124 ± 6.07	10700 ± 2520	131 ± 3.61	11.3 ± 1.22	86.3 ± 8.60
Rabbit AOX1 ^b						
13 (A1081V)	N.D.	N.D.	N.D.	35.2 ± 1.26	7.23 ± 0.974	205 ± 20.4

^a Respective alanine at position 1083 and valine at position 1085 of monkey AOX1 were substituted by threonine and alanine, which are sequences of rabbit AOX1.

^b Alanine at position 1081 of rabbit AOX1, which corresponds to position 1085 of monkey AOX1, was substituted by valine or glycine. N.D.: Activities were not detected and parameters were not calculated. Each value is the mean \pm S.D. for three separate experiments independently expressed in *E. coli*.

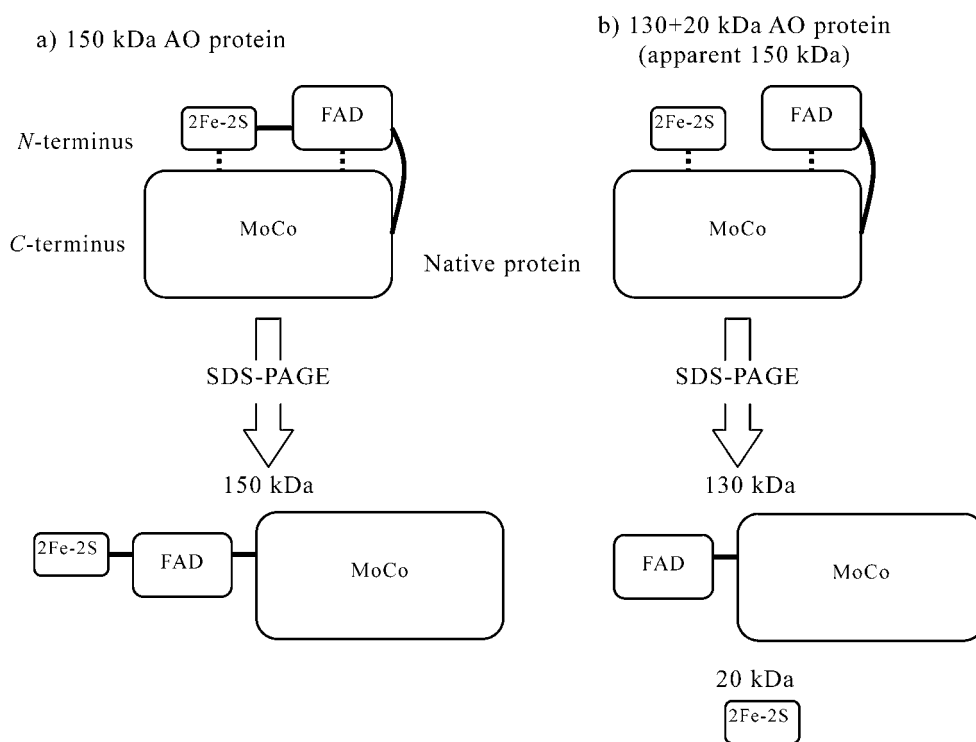


Fig. 6. Formation hypothesis of 130 kDa component from 150 kDa component through bond cleavage between 2Fe-2S and FAD domains in monkey AO

に嵩高い基質の通過を強く抑制していることが示唆された。ウサギ AO の A1081V 変異体はもはやシンコニジンを基質にできないこと、並びに Spartan'06 を用い計算したシンコニジンの体積が 316 \AA^3 であるのに対し、平面構造を取りあまり嵩高くない (S)-RS-8359 (251 \AA^3) ではこのような現象は見られないことから、メチル基による結合部位への接近妨害は十分にあり得るものと考えられる。ちなみに、同様のメチル基の付加による反応速度の低下効果について、アルデヒド脱水素酵素 3 (ALDH3) の

スレオニン残基をセリンに置換した T186S 変異体で報告されている。³²⁾

このように、シンコニジンの酸化活性は基質結合部位に通じるトンネル部分に存在する一アミノ酸置換により劇的に変化し、嵩高い基質分子において見られる著しく大きな種差の原因になっていることが明らかになった。しかし、比較的容易にトンネルを通り活性部位に到達できる低分子基質や平面構造を持つ分子は、この限りではないと推察される。これについては、更にデータの蓄積が必要と考える。

5) 130 kDa タンパク質の種差

Sugihara らはサル肝サイトゾール中には 150 kDa に加え 130 kDa の AO が存在することを, SDS-PAGE/Western blot 解析で示している.³³⁾ 130 kDa 成分はヒトにおいても検出され, 霊長類の高い AO 活性に寄与している可能性が考えられたので, 種差の原因究明の一環として 130 kDa の性質を種々調べた.³⁴⁾ N-及び C-末に His タグを付けたサル AO を大腸菌に発現させ, サル抗 AO 抗体並びに His タグ抗体の 2 種類の抗体で免疫染色したところ, 130 kDa タンパク質は 2Fe-2S ドメインが外れて生成することが分った. さらに, 130 kDa タンパク質はエドマン分解により, Fig. 6 に示すように 2Fe-2S ドメインと FAD ドメイン間のヒンジ部分の 188Leu と 189Pro の間で開裂して生成することが明らかになった. 188Leu/189Pro 配列はサル及びヒト AO には存在するが, ラットやマウスでは見られず開裂は起こらないと考えられ, 130 kDa の存否の種差と一致した. この開裂により 2Fe-2S が失われることから当然予想され, 事実発現タンパク質を用いて確認されたが, 130 kDa を含む AO に酵素活性は認めら

れなかった. 130 kDa タンパク質は AO 活性に特徴的な大きな種差の原因にはなっていないことが明らかになった.

6) 基質阻害及び二相性の種差

Obach らは, ヒト肝サイトゾールを用いた AO 活性に関する実験で, 化合物によっては基質阻害が現れることを報告している.³⁵⁾ (S)-RS-8359 の 2-ケト体生成反応においてもラットで基質阻害が認められたが, サルでは観察されなかった. この差が, AO タンパク質のどのドメインの影響によるのかを明らかにするため, 2Fe-2S/FAD ドメイン (20 kDa + 40 kDa) と MoCo ドメイン (85 kDa) を交互に入れ替えたキメラ酵素を作製し, (S)-RS-8359 を基質に速度論解析を行った. ラット野生型及びサル/ラットキメラ AO で見られた基質阻害は, サル野生型及びラット/サルキメラ AO では見られなかった (Fig. 7). さらに, サル野生型及びラット/サルキメラ AO で見られた Eadie-Hofstee プロットにおける二相性が, ラット野生型及びサル/ラットキメラ AO では認められなかった (Fig. 8). 発現タンパク質を用い

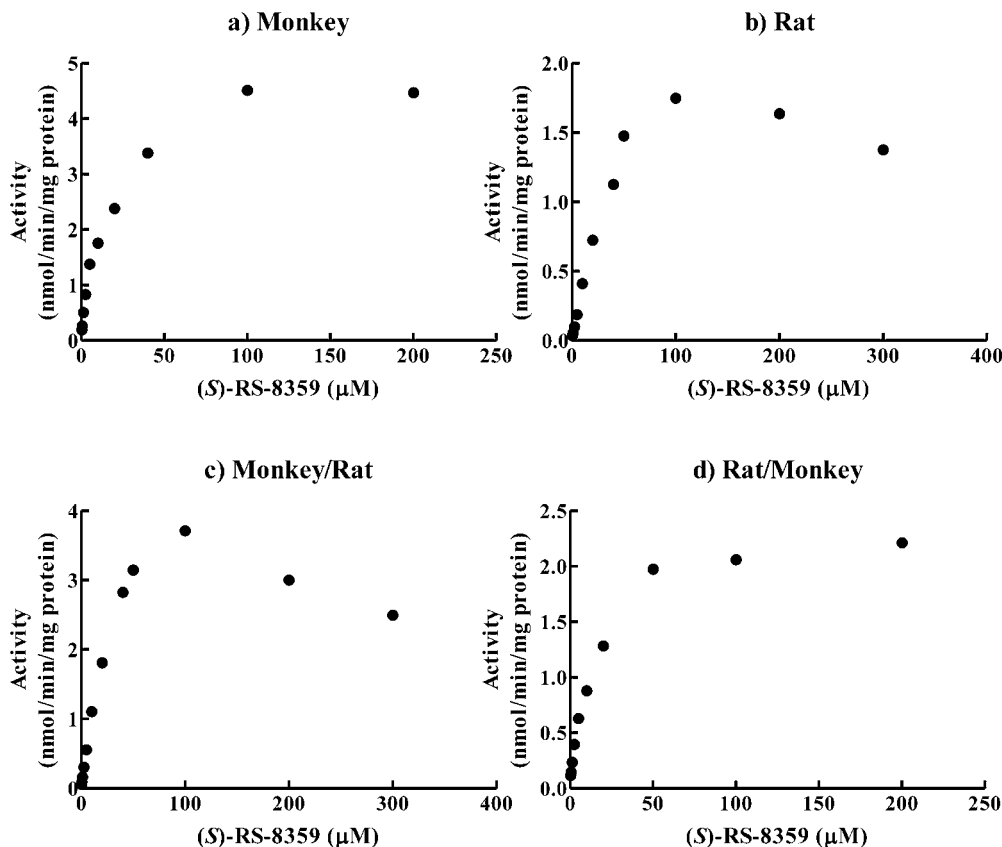


Fig. 7. Typical Michaelis-Menten plots for AO-catalyzed 2-oxidation of (S)-RS-8359 by AOs of monkey (a), rat (b), chimeric monkey/rat (c), and chimeric rat/monkey (d) expressed in *E. coli*

ていることから、二相性が現れたのは夾雑する別酵素の関与ではなく、2つの基質結合部位の存在によることが示唆された。これに関し、Taylor らは AO による N-methylquinolinium の部位選択的酸化反応を詳細に解析し、2つの基質結合部位の存在の可能性を報告している。³⁶⁾ また、 V_{max} 値については、サル野生型 AO がラット/サルキメラ AO より、ま

たサル/ラットキメラ AO がラット野生型 AO より約2倍大きい値を示した。以上より、MoCo ドメインが主に基質阻害及び二相等の質的な性質に関わるのに対して、2Fe-2S/FAD ドメインは反応速度に影響を及ぼしていることが示唆された。ラットに比べサルの方が効率良い電子伝達系を有し、種差の一因となっている可能性がある。

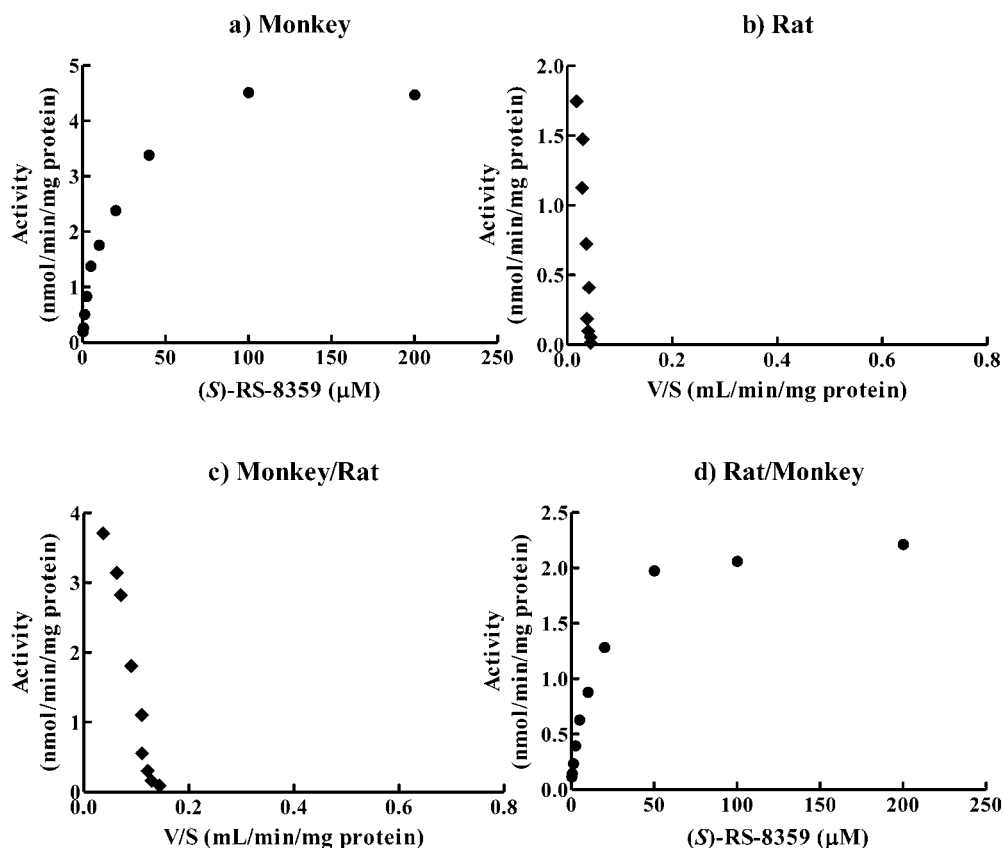


Fig. 8. Typical Eadie-Hofstee plots for AO-catalyzed 2-oxidation of (S)-RS-8359 by AOs of monkey (a), rat (b), chimeric monkey/rat (c), and chimeric rat/monkey (d) expressed in *E. coli*

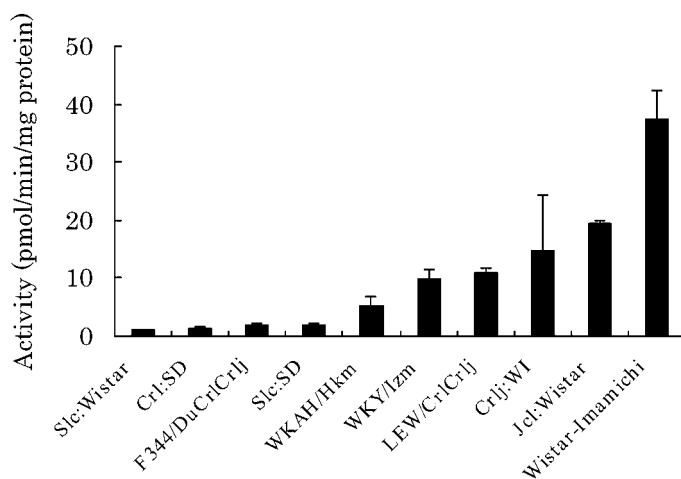


Fig. 9. 2-Oxidation activity of (S)-RS-8359 catalyzed by AO in liver cytosol from 10 strain rats

Ⅲ. AO 活性のラット系統差

10 系統のラット肝サイトゾールの (S)-RS-8359 酸化活性を調べたところ, Fig. 9 に示すように, やや幅があるものの高活性群と低活性群の 2 群に分かれ, 最も高活性の Wistar-Imamichi 系と最も低活性の Slc:Wistar 系の間で約 40 倍もの大きな差が認められた. Wistar 系 6 系統 (Wistar-Imamichi, CrIj:Wistar, Jcl:Wistar, WKAH/Hkm, WKY/Izm, Slc:Wistar) の中で, Slc:Wistar が例外的に著しく低い活性を示した. AO はダイマーとして活性を現すことから発現タンパク質を native-PAGE/Western blotting 法で解析した. その結果, 活性を有する系統は 300 kDa に濃いバンドを示したが, 活性の低い系統群の 300 kDa バンドは薄くモノマーの分子量である 150 kDa に濃いバンドが認められた. ただし, 高活性群に属するものの大きなバラつきを示す CrIj:WI では 300 kDa とともに 150 kDa に濃いバンドが検出さ

れた (Fig.10). AO 活性とモノマー発現量との間に相関は全く認められなかったが ($R^2=0.076$), ダイマー発現量との間には良好な相関が観察された ($R^2=0.72$). これらの結果から, AO 活性のラット系統差の原因は, 触媒活性を有するダイマーの形成不全にあることが明らかになった.³⁷⁾

ラット AO モノマーは 3999 塩基, 1333 アミノ酸から構成される. 各系統のラット AO ゲノム全塩基配列を比較したところ, アミノ酸置換を伴う塩基変異が 377G>A (110Gly-Ser) と 2604C>T (852Ala-Val) の 2 カ所に確認された (Table 4, Table 5). 高活性群はいずれも (377G, 2604C) 配列を有していたが, 一方低活性群は複雑な塩基配列を示した. すなわち, 塩基 2604 は T に固定されていたが, 塩基 377 は Slc:Wistar 及び F344/DuCrIj 系では A であるのに対し, Slc:SD 及び CrIj:SD 系では G, G/A 及び A の 3 グループに分かれた. Native-PAGE/Western

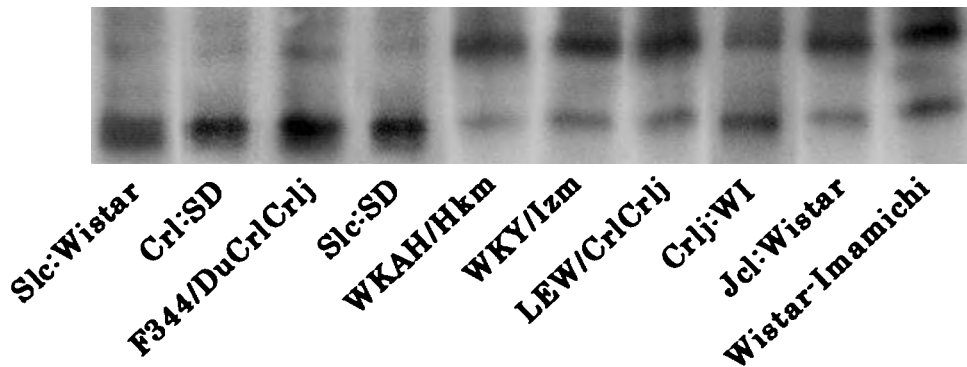


Fig. 10. Native-PAGE/Western blot analysis of AO protein in liver cytosol from 10 strain rats

Table 4. Nucleotide substitutions of AO genomic DNA in seven rat strains

Nucleotide Position	Rat Strains						
	Low AO Activity		High AO Activity				
	Slc:Wistar	F344/DuCrIj	WKAH/Hkm	WKY/Izm	LEW/CrIj	Jcl:Wistar	Wistar-Imamichi
377	A	A	G	G	G	G	G
2604	T	T	C	C	C	C	C

Table 5. Nucleotide substitutions of AO genomic DNA in CrIj:SD and Slc:SD rat strains

Nucleotide Position	Rat Strains					
	Slc:SD			CrIj:SD		
	Group 1 (2)	Group 2 (6)	Group 3 (5)	Group 1 (3)	Group 2 (5)	Group 3 (6)
377	G	G/A	A	G	G/A	A
2604	T	T	T	T	T	T

Both CrIj:SD and Slc:SD strains belong to the low AO activity group. The number in each group is indicated in parenthesis.

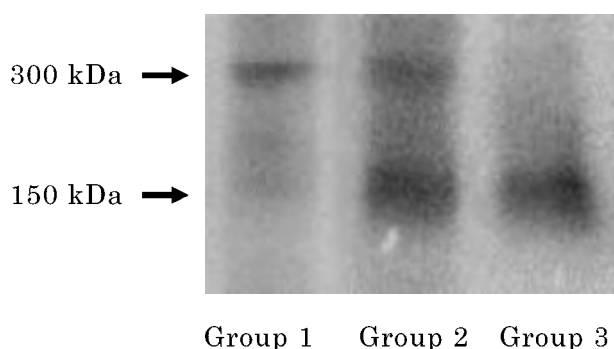


Fig. 11. Native-PAGE/Western blot analysis of AO protein in liver cytosols of CrI:SD strain rats

blot 解析で, (377G, 2604T) 配列を有する高活性群の AO タンパク質はダイマーであるが, (377A, 2604T) 配列を持つ低活性群の AO はモノマーであることが示された (Fig.11). Slc:SD 及び CrI:SD はもともと低活性群に属する系統であるが, 詳細に分析すると活性は有意に (377G, 2604T) > (377G/A, 2604T) > (377A, 2604T) の順であった (Fig.12). 従って, AO 活性のラット系統差は, 377G>A 一塩基変異に由来する 110Gly-Ser のアミノ酸置換により, 活性を持つダイマーが形成されなくなり起こることが明らかになった.³⁸⁾ AO 活性のラットあるいはマウス系統差はヒト母集団における個体差を反映する可能性があるという意見もあり,⁷⁾ Beedham ら⁵⁾ 及び Kitamura ら³⁹⁾ によって報告された AO 活性のラット系統差の原因が, 本実験で明らかになった機構と同じなのか興味を持たれる. なお, 不斉性を持たないグリシンから不斉なセリンへの置換によりなぜダイマーが生成しなくなるのかについては, 今後の詳細な検討を待たねばならない.

ところで, Tayama らは, F344/DuCrj 系ラット由来の膀胱がんはほかの F344 系及び Slc:Wistar 系の皮下で生育するが, Slc:Wistar 系以外の Wistar 系では生育しないこと, 並びに F344/DuCrj 系あるいは F344/NSlc と Slc:Wistar 系との間では皮膚移植が可能であるが, Slc:Wistar 系以外の Wistar 系との間では拒絶反応が起こることから, Wistar:Slc 系ラット

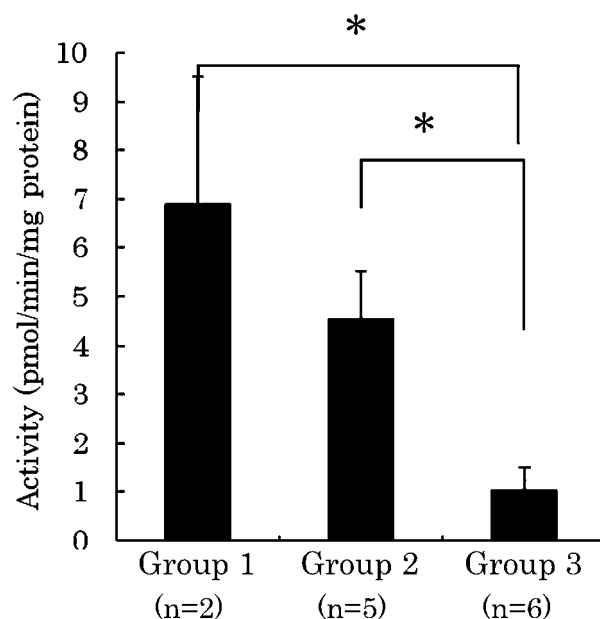


Fig. 12. AO-catalyzed 2-oxidation activity of (S)-RS-8359 in liver cytosols of CrI:SD strain rats
 $p < 0.05$; significantly different between the groups.

は F344 系ラットと遺伝的に区別できないと報告している.⁴⁰⁾ 著者らの検討で, Slc:Wistar 系ラットの AO 活性は F344/DuCrI:CrIj と同程度に低く, また塩基 377 及び 2604 においても同じ配列を有しているという結果は, Tayama らの説を AO という薬物代謝酵素の遺伝子解析から支持するものと考えられる.

Ⅳ. AO 活性のラット個体差

AO 活性のラット系統差を検討する過程で, ドンリュウ系ラットにおいては, AO 活性が雌雄ラットともに, 低活性群 (PM, poor metabolizer), 高活性群 (EM, extensive metabolizer) 及び超高活性群 (UM, ultrarapid metabolizer) の 3 群に分かれ, おおよそ 5:5:1 の頻度で出現するという現象が認められた (Fig.13).⁴¹⁾ PM 群と EM 群の間に雄で約 40 倍, 雌で約 20 倍の活性の差が存在し, PM 群及び EM 群から精製した酵素の等電点はそれぞれ 6.2 及び 5.0 と異なっていた. AO タンパク質発現量を native-PAGE/Western blotting 法で解析すると, UM 群では 300 kDa に, EM 群では 150 kDa と 300 kDa の両方に及び PM 群では 150 kDa にバンドが検出された. 各群の 377 及び 2604 の塩基配列は UM 群ではホモ接合 (377G/G, 2604C/C), EM 群ではヘテロ接合 (377G/A, 2604C/T) 並びに PM 群ではホモ接合 (377A/A, 2604T/T) であった. このように, ドンリュウ系ラットの AO 活性に見られる個

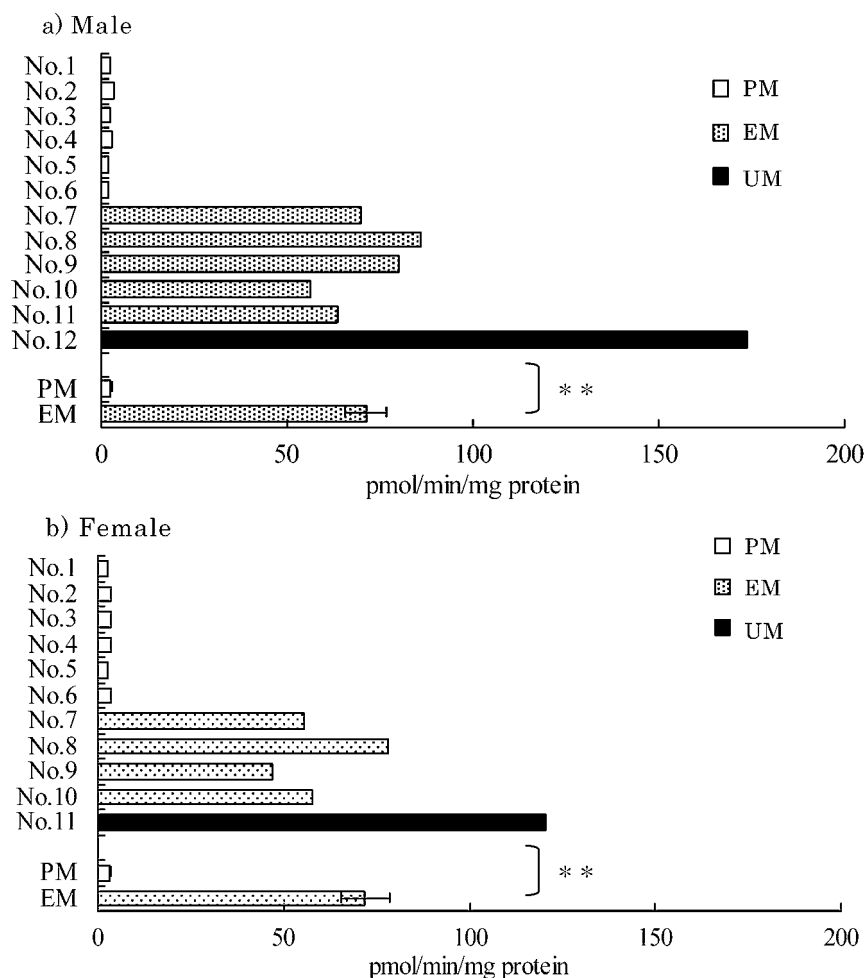


Fig. 13. Individual and mean data of 2-oxidation activity of (S)-RS-8359 by AO in 12 male and 11 female Donryu rats $p < 0.005$; significantly different between PM and EM rats.

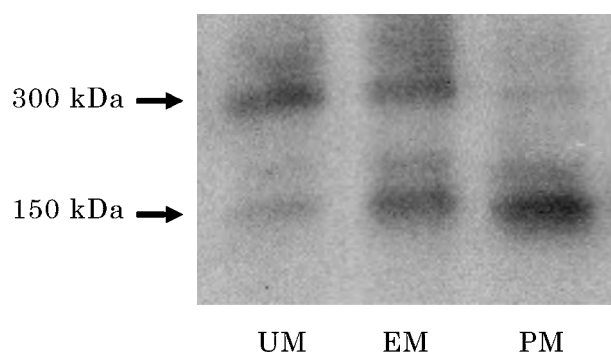


Fig. 14. Native-PAGE/Western blot analysis of AO protein in liver cytosols of Donryu strain rats

体差は、ラット系統差と同じく 377G>A 一塩基多型に基づくダイマー形成不全によることが判明した (Fig.14). なお, mRNA 発現量に差はほとんど認められなかった.

ブリーダーから購入したドンリュウ系ラットにおける AO 活性フェノタイプの頻度は、雌雄ともに

ほぼ UM : EM : PM = 1 : 5 : 5 であり, UM 群の比率が極めて低かった. これがどのような要因によるのかを探るため交配実験を実施した. ⁴²⁾ヘテロ接合 (377G/A, 2604C/T) を持つ EM 群同士の交配を行ったところ, F1 においては UM : EM : PM = 0.6 : 1.5 : 5 であったのが, F2 において概ね UM : EM : PM = 1 : 2 : 1 に集約した. ホモ接合 [UM (377G, 2604C), PM (377A, 2604T)] 同士の交配による F2 では, UM 群からは UM 群のみ及び PM 群からは PM 群のみが生まれた. また, ジェノタイプは完全にフェノタイプと一致した. これらの結果から, ドンリュウ系ラットにおける AO の遺伝様式はメンデルの法則に従うことが判明した. ブリーダーから入手した個体になぜ UM 群が少ないのか理由は明らかではないが, 本実験から少なくとも出生率が低い, あるいは何らかの生理的異常により生育率が低い, などの理由によるものではないことが分った.

Table 6. Effect of selenium deficiency on AOX1 activity toward vanillin and (S)-RS-8359

Substrate	Group	Km (μ M)	Vmax (pmol/min/mg protein)	Vmax/Km (μ l/min/mg protein)
Vanillin	Control	14.0 \pm 1.39	62.8 \pm 14.1	4.35 \pm 0.67
	Se deficient	15.8 \pm 1.68	215 \pm 18.6**	13.7 \pm 0.69*
(S)-RS-8359	Control	34.1 \pm 7.57	7.38 \pm 1.77	1.91 \pm 0.69
	Se deficient	40.7 \pm 8.80	13.8 \pm 2.05*	3.39 \pm 1.24

The values are the mean \pm S.E. of five or six animals. * p <0.05, and ** p <0.01; significantly different from the control group value.

V. 生理機能との関わり — Se 欠乏の影響

Se 欠乏が各種酸化還元酵素及び薬物代謝酵素に及ぼす影響については、グルタチオンペルオキシダーゼは著減するが、グルタチオン-S 転移酵素、UDP-グルクロン酸転移酵素、DT-ジアホラーゼ、エポキシドヒドロラーゼ等の解毒系酵素活性は増大することが知られている。^{43,44)} 一方、同じ解毒酵素でも CYP はほとんど影響を受けないとされている。⁴³⁾ レチナールの酸化には AO が関わり、その活性は Zn 欠乏により増大することが報告されているものの、^{45,46)} Se 欠乏が AO に及ぼす影響についてはいまだ報告がなく、生理的変動の観点からラットで検討した。⁴⁷⁾ その結果、バニリン及び (S)-RS-8359 の酸化活性は Se 欠乏により有意に 2~3 倍上昇した (Table 6)。しかし、AO タンパク質量が約 2 倍増大していたものの、mRNA 量はむしろ低下した。AO タンパク質の発現は、転写及び翻訳過程あるいは翻訳後の種々のイベントにより複雑に制御され、mRNA 量とタンパク質発現量は必ずしも一致しない場合が多々あることが報告されている。²⁹⁾ Se 欠乏により生じた酸化的ストレスが、⁴⁸⁾ 何らかの機構により AO タンパク質を活性化あるいは安定化し活性を増大した可能性が推察された。病態による AO 活性の変動に関する報告はほとんどなく、生理的機能解明の観点から特に酸化的ストレスと AO 活性の変動の関係の解明は今後の検討課題と考える。

おわりに

AO の生体内基質としてレチナール、ピリドキサル、ニコチンアミド等が挙げられているが、それらは ALDH 等のほかの酵素でも代謝され、AO のみの基質になる生理活性物質は現時点ではいまだ明らかになっていない。従って生理的役割についても定かなことは分かっていない。イヌは遺伝子に異常があるため AO タンパク質を合成できず、いわば天然のノックアウト動物と見なせるが、少なくとも

外見上は何ら生育に障害があるようには見えない。AO は生命の維持に必須の過程に関わっていないか、あるいは関わっていても ALDH や AO ホモログのような酵素が補償的に働いているのかもしれない。しかし、最近 AOX1 がコレステロール輸送担体の ABCA1 と複合体を形成するタンパク質として同定され、リン脂質やコレステロールの細胞内動態に関わることが示された。⁴⁹⁾ また、AOX1 の上昇は脂肪肝と関連しており、アディポネクチンにより抑制されることが報告されている。^{50,51)} このように、AO は単独ではなくほかの機能性タンパク質と協同して生理的役割を果たしている可能性が示唆され、今後の研究の発展が期待される。

一方、新規医薬開発候補品の代謝に AO が大きく寄与する場合、AO 活性は顕著な種差を示すことから、体内動態試験や安全性試験で用いる動物の選択には注意すべきである。特にラットで前臨床試験を実施する際は、系統を慎重に選択することが望まれる。また、大動物には通常イヌが汎用されるが、ヒト体内動態の予測の観点からサルの使用が極めて有用と考える。一般にヒトは高い AO 活性を有するので、肝初回通過効果を回避するため、候補化合物を AO で代謝されないようにデザインする工夫も必要と考える。さらに、ヒトにおける AO 遺伝子多型についての情報は極めて少なく、医薬品の適正使用を図るため今後の重要な課題の一つといえる。

REFERENCES

- 1) Hille R., *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 360–367 (2002).
- 2) Beedham C., *Drug Metab. Rev.*, **16**, 119–156 (1985).
- 3) Beedham C., *Prog. Med. Chem.*, **24**, 85–121 (1987).
- 4) Beedham C., Molybdenum hydroxylases. In *Metabolism of Xenobiotics*. Gorrod JW, Oeschlager H, Caldwell J eds, Taylor & Francis, London and New York, pp. 51–58 (1998).

- 5) Beedham C., Molybdenum hydroxylase. In: Ioannides C., editor. Enzyme systems that metabolise drug and other xenobiotics. London: Wiley. pp 147–187 (2002).
- 6) Kitamura S., Sugihara K., Ohta S., *Drug Metab. Pharmacokin.*, **21**, 83–98 (2006).
- 7) Garattini E., Fratelli M., Terao M., *Cell Mol. Life Sci.*, **65**, 1019–1048 (2008).
- 8) Schumann S., Terao M., Garattini E., Saggu M., Lenzian F., Hildebrandt P., Leimkühler S., *PLoS One*, **4**, 1–9 (2009).
- 9) Sugihara K., Kitamura S., Tatsumi K., *Drug Metab. Dispos.*, **24**, 199–202 (1996).
- 10) Prakash C., Kamel A., Gummerus J., Wilner K., *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 863–875 (1997).
- 11) Beedham C., Miceli J. J., Obach S., *J. Clin. Psychopharm.*, **23**, 229–232 (2003).
- 12) Terao M., Kurosaki M., Saltini G., Demontis S., Marini M., Salmona M., Garattini E., *J. Biol. Chem.*, **275**, 30690–30700 (2000).
- 13) Terao M., Kurosaki M., Marini M., Vanoni G., Bonetto V., Bastone A., Federico C., Saccone S., Fanelli R., Salmona M., Garattini E., *J. Biol. Chem.*, **276**, 46347–46363 (2001).
- 14) Kurosaki M., Terao M., Barzago M. M., Bastone A., Bernardinello D., Salmona M., Garattini E., *J. Biol. Chem.*, **279**, 50482–50498 (2004).
- 15) Yokoyama T., Karube T., Iwata N., *J. Pharm. Pharmacol.*, **41**, 32–36 (1989).
- 16) Miura H., Naoi M., Nakahara D., Ohta T., Nagatsu T., *J. Neural Transm.*, **94**, 175–187 (1993).
- 17) Takasaki W., Yamamura M., Nozaki A., Nitani T., Sasahara K., Itoh K., Tanaka Y., *Chirality*, **17**, 135–141 (2005).
- 18) Takasaki W., Yamamura M., Shigehara E., Suzuki Y., Tonohiro T., Hara T., Tanaka Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 498–503 (1999).
- 19) Itoh K., Yamamura M., Muramatsu S., Hoshino K., Masubuchi A., Sasaki T., Tanaka Y., *Xenobiotica*, **35**, 561–573 (2005).
- 20) Itoh K., Yamamura M., Takasaki W., Sasaki T., Masubuchi A., Tanaka Y., *Biopharm. Drug Dispos.*, **27**, 133–139 (2006).
- 21) Beedham C., Bruce S.E., Critchley D.J., Al-Tayib Y., Rance D.J., *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, **12**, 307–310 (1987).
- 22) Chaudhary I., DeMaio W., Kantrowitz J., *Pharm. Res.*, **11**, 319 (1994).
- 23) Jordan C. G. M., Rashidi M. R., Laljee H., Clarke S. E., Brown J. E., Beedham C., *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**, 411–418 (1999).
- 24) Kitamura S., Sugihara K., Nakatani K., Ohta S., O'Hara T., Nimomiya S., Green C. E., Tyson C. A., *IUBMB Life*, **48**, 607–611 (1999).
- 25) Rashidi M. R., Smith J. A., Clarke S. E., Beedham C., *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 805–813 (1997).
- 26) Kitamura S., Nakatani K., Ohashi K., Sugihara K., Hosokawa R., Akagawa Y., Ohta S., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 856–859 (2001).
- 27) Fukiya K., Itoh K., Yamaguchi S., Kishiba A., Adachi M., Watanabe N., Tanaka Y., *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 302–307 (2010).
- 28) Truglio J. J., Theis K., Leimkuhler S., Rappa R., Rajagopalan K. V., Kisker C., *Structure*, **10**, 115–125 (2002).
- 29) Garattini E., Mendel R., Romano M. J., Wright R., Terao M., *Biochem. J.*, **372**, 15–32 (2003).
- 30) Guex N., Peitsch M. C., *Electrophoresis*, **18**, 2714–2723 (1997).
- 31) Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schweder T., *Bioinform.*, **22**, 195–201 (2006).
- 32) Ho K. K., Mukhopadhyay A., Li Y. F., Mukhopadhyay S., Weiner H., *Biochem. Pharmacol.*, **76**, 690–696 (2008).
- 33) Sugihara K., Katsuma Y., Kitamura S., Ohta S., Fujitani M., Shintani H., *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, **126**, 53–60 (2000).
- 34) Asakawa T., Itoh K., Adachi M., Hoshino K., Watanabe N., Tanaka Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 380–385 (2008).
- 35) Obach R. S., Huynh P., Allen M. C., Beedham C., *J. Clin. Pharmacol.*, **44**, 7–19 (2004).
- 36) Taylor S. M., Beedham C., Stell J. G. P., *Biochem. J.*, **220**, 67–74 (1984).
- 37) Itoh K., Maruyama H., Adachi M., Hoshino K., Watanabe N., Tanaka Y., *Xenobiotica*, **37**, 709–716 (2007).
- 38) Itoh K., Maruyama H., Adachi M., Hoshino K., Watanabe N., Tanaka Y., *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 1860–1864 (2007).
- 39) Kitamura S., Nakatani K., Sugihara K., Ohta S., *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Pharmacol. Toxicol.*

- Endocrinol.*, **122**, 331–336 (1999).
- 40) Tayama K., Fujita T., Hiraga K., *Jikken Dobutsu*, **35**, 65–76 (1986).
- 41) Itoh K., Masubuchi A., Sasaki T., Adachi M., Watanabe N., Nagata K., Yamazoe Y., Hiratsuka M., Mizugaki M., Tanaka Y., *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 734–739 (2007).
- 42) Adachi M., Itoh K., Abe H., Tanaka Y., *Xenobiotica*, **38**, 98–105 (2008).
- 43) Reiter R., Wendel A., *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 1923–1928 (1984).
- 44) Olsson U., Lungren B., Segura-Aguilar J., Messing-Eriksson A., Andersson K., Becedas L., De Pierre J. W., *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **63**, 31–37 (1993).
- 45) Sundaresa R. P., Cope F. O., Smith J. C., *J. Nutr.*, **107**, 2189–2197 (1977).
- 46) Boron B., Hupert J., Barch D. H., Fox C. C., Friedman H., Layde T. J., Mobarhan S., *J. Nutr.*, **118**, 995–1001 (1988).
- 47) Itoh K., Adachi M., Sato J., Shouji K., Fukiya K., Fujii K., Tanaka Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 190–194 (2009).
- 48) Toyoda H., Himeno S., Imura N., *Biochim. Biophys. Acta*, **1008**, 301–308 (1989).
- 49) Sigrüener A., Buechler C., Orso E., Hartmann A., Wild P. J., Terracciano L., Roncalli M., Bornstein S. R., Schmitz G., *Horm. Metab. Res.*, **39**, 781–789 (2007).
- 50) Neumeier M., Weigert J., Schaffer A., Weiss T.S., Schmidl C., Buttner R., Bollheimer C., Aslanidis C., Scholmerich J., Buechler C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **350**, 731–735 (2006).
- 51) Weigert J., Neumeier M., Bauer S., Mages W., Schnitzbauer A. A., Obed A., Groschl B., Hartmann A., Schaffler A., Aslanidis C., Scholmerich J., Buechler C., *FEBS Lett.*, **582**, 2965–2972 (2008).