

化学物質の生体内運命に影響を及ぼす薬物代謝酵素の個人差
—トリメチルアミンとフラビン含有酸素添加酵素に着目して—

清水万紀子

**Individual Differences of Drug-metabolizing Enzymes as Determinants
for the Metabolic Fate of Chemicals —A Study of Trimethylamine
and Flavin-containing Monooxygenase 3—**

Makiko SHIMIZU

*Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Showa Pharmaceutical University,
3-3165 Higashi-tamagawa Gakuen, Machida, Tokyo 194-8543, Japan*

(Received May 31, 2009)

Individual differences of drug-metabolizing enzymes are important determinants for the metabolic fate of chemicals. This article focuses on polymorphic human flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) and dietary-derived trimethylamine. Malodorous trimethylamine is generally converted to odorless trimethylamine *N*-oxide by liver microsomal FMO3. Trimethylaminuria is caused by functional disorder of FMO3. In this study mutations of the *FMO3* gene were examined in self-reported Japanese trimethylaminuria subjects that showed low FMO3 metabolic capacity in urine tests. Nine novel polymorphisms in the *FMO3* gene were discovered in self-reported Japanese volunteers. Functional analyses of recombinant FMO3 proteins suggested that these *FMO3* gene mutations were one of the causal factors for decreased FMO3 function resulting in trimethylaminuria. Inter-individual variations of FMO3-mediated microsomal oxygenation activities, levels of FMO3 protein and FMO3 mRNA, and its modification in liver microsomes from Japanese samples were observed. Both genetic polymorphisms in the 5'-upstream of the *FMO3* gene and some hormonal changes related to menstruation may be causal factors for inter- and/or intra- individual expression levels of FMO3. To assess the palliative cares, it was found that absorbed levels of trimethylamine *in vivo* would be possibly controlled by selection of precursor foods like fish containing a variety of trimethylamine amounts. These lines of evidence suggest that individual differences of FMO3 are important determinants for the metabolic fate of dietary-derived trimethylamine.

Key words—flavin-containing monooxygenase 3; trimethylamine; trimethylaminuria; genetic polymorphism; Japanese

1. はじめに

生体内に吸収された医薬品を始めとする外来化学物質は、肝臓の薬物代謝酵素群によって代謝され、水溶性を増した代謝物として体外に排泄される。これらの生体の薬物代謝能には多様な個人差が存在することが知られている。この個人差は、主に薬物代謝酵素が遺伝的因子や環境的因子によって様々な影響を受けることにより生ずる。薬物代謝能の個人差は、薬物血中濃度、効果及び毒性発現の個人差の要

因になることから、化学物質の生体内運命を理解する上で、これらを明らかにすることは重要である。

薬物酸化酵素の1つであるフラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO) は、第I相薬物代謝酵素に属する一酸素添加酵素である。FMOは、NADPH依存的に窒素原子、硫黄原子及び他の求核ヘテロ原子を含む薬物、農薬及び生体内物質などの酸化を触媒し、これらを極性の高い代謝物として生体内から排泄する解毒機構を担っている。¹⁾ ヒトにおいて、FMO1-5の分子種が報告されており、成人肝では、FMO3が主要な分子種である。^{2,3)} FMO3は、532アミノ酸からなる分子量約65000の酵素である。FMO3の代表的基質は食品由来のトリメチルアミンであり、その代謝機能の低活性に伴いトリメチル

昭和薬科大学薬物動態学研究室 (〒194-8543 東京都町田市東玉川学園 3-3165)

e-mail: shimizu@ac.shoyaku.ac.jp

本総説は、平成20年度日本薬学会関東支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

アミン尿症と呼ばれる表現型が知られている。ヒト肝 FMO3 には個人差が報告されているが,³⁾ その要因の詳細は明らかになっていない。

本稿では、化学物質としてトリメチルアミンに、薬物代謝酵素として FMO3 に着目し、その個人差に影響を及ぼす要因について整理して述べる。

2. 日本人において見い出された FMO3 遺伝子変異の機能解析

FMO3 の機能低下による表現型の代表例は、食物由来成分であるトリメチルアミンの代謝機能不全を伴うトリメチルアミン尿症である。⁴⁻⁶⁾ 本疾患の原因の 1 つとして FMO3 遺伝子変異に伴う FMO3 酵素機能低下が報告されている。^{7,8)} 本研究では、体臭を訴える日本人被験者の尿中トリメチルアミンを分析し、さらにトリメチルアミン尿症の原因となる FMO3 遺伝子の変異を探索し、変異体 FMO3 の触媒機能の解析を行った。⁹⁻¹⁴⁾

自己申告により体臭を訴える日本人被験者 365 名 (Fig. 1) 及び健常成人ボランティア 66 名の尿中トリメチルアミン排泄量を測定し、FMO3 代謝効率を算出した。¹⁵⁾ FMO3 代謝効率は、尿中に排泄されたトリメチルアミン及びトリメチルアミン N-酸化体の総量に対するトリメチルアミン N-酸化体量の割合で示した被験者の FMO3 機能の指標である。健常成人の FMO3 代謝効率は、いずれも 95% 以上

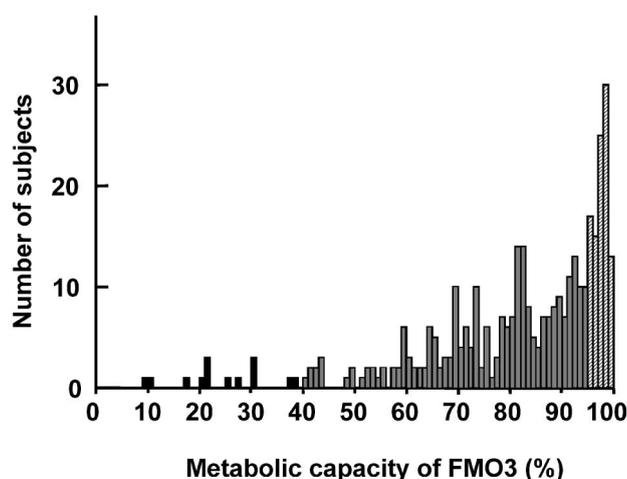


Fig. 1. Urinary Trimethylamine Excretion by Daily Food Intake in Japanese Volunteers Who Suffered from Self-reported Malodor

FMO3 metabolic capacity (<40%, filled bars; 40–95%, shaded; and >95%, hatched) was shown by the ratio of trimethylamine N-oxide to trimethylamine in urines (% of trimethylamine N-oxide/trimethylamine and trimethylamine N-oxide).

を示した。それに対して、自己申告被験者の FMO3 代謝効率は幅広い分布が認められた (Fig. 1)。欧米での深刻なトリメチルアミン尿症の判断基準である 40% 以下の被験者の割合は日本人において約 4% であった。これらの被験者では、尿中のトリメチルアミン未変化体濃度が $10 \mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$ 以上であった。さらに、これらの被験者の FMO3 遺伝子型の解析を行った結果、9 種類の新規 FMO3 遺伝子の一塩基多型、すなわち、Pro70Leu, Asn114Ser, Cys197Stop, Thr201Lys, Arg205Cys, Met260Val, Trp388Stop, Gln470Stop 及び Arg500Stop が見い出された。これらの新規 FMO3 遺伝子変異を家系解析により詳細に解析し、既知の 3 種の一塩基多型をあわせて FMO3 遺伝子のハプロタイプを明らかにした。自己申告日本人被験者 365 名の FMO3 遺伝子ハプロタイプは野生型を含め、13 種類に分類された (Fig. 2)。これらのハプロタイプのうち野生型、[Glu158Lys; Glu308Gly] 及び Val257Met は欧米、アジアにおいて共通に見い出されるハプロタイプである。本集団において野生型と [Glu158Lys; Glu308Gly] 及び Val257Met の頻度はそれぞれ約 60% 及び 10–20% であった。一方、9 種類の新規 FMO3 遺伝子一塩基多型を含むハプロタイプはいずれも 4% 以下と低い頻度であった。

これら変異の酵素活性への影響を検討するため、大腸菌発現系を用いて、野生型及び各種変異型 FMO3 のリコンビナント酵素を作製し、トリメチルアミン N-酸化酵素活性を評価した (Fig. 3)。その結果、日本人において新たに見出した [Glu158Lys; Thr201Lys; Glu308Gly] 及び [Val257Met; Met260Val]

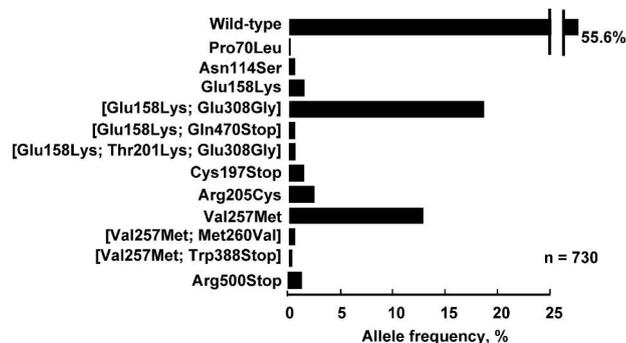


Fig. 2. Allele Frequency of Mutations of FMO3 Gene in Japanese Cohort

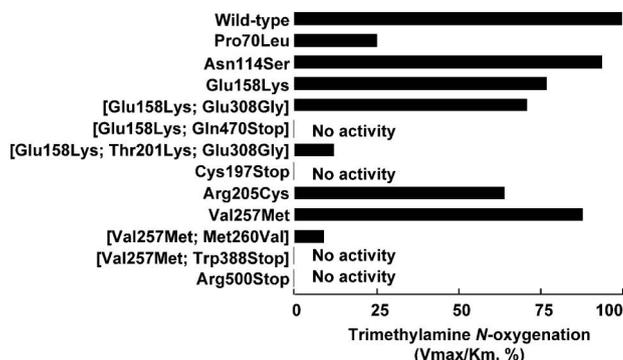


Fig. 3. Trimethylamine *N*-oxygenation Activities of Recombinant FMO3

The *N*-oxygenation of trimethylamine (0–500 μM) activity by FMO3 expressed in *E. coli* membranes was determined by gas chromatography. Data were expressed as % of V_{max}/K_m value for control (wild type). Kinetic parameters were calculated by nonlinear regression analysis

変異体は、酵素機能の指標となる V_{max}/K_m 値が野生型の約 10% に低下した。さらに終止コドンに伴う変異型 FMO3 は、酸化酵素活性を示さなかった。頻度の高い [Glu158Lys; Glu308Gly] 及び Val257Met の酸化酵素活性は野生型の 70–80% の活性を示した。これらのことから、一連の研究を通じて日本人特有の新規 FMO3 遺伝子変異は、それらの頻度は低いものの、トリメチルアミン尿症の原因遺伝因子となり得ることが示唆された。

3. FMO3 の個人間変動の質的及び量的要因について

FMO3 は臨床に用いられている含窒素及び含硫黄医薬品、あるいは環境及び食品由来の化学物質の *N*-及び *S*-酸化反応を触媒する。¹⁶⁾ 外来異物などによる FMO3 の酵素誘導は報告されていないが、肝における酵素活性及び含量には個人差が存在する。^{3,17)} そこで、日本人肝における FMO3 発現量の個人差を検討した。¹⁸⁾ 健常日本人個別肝試料を用いて、FMO3 含量、薬物酸化酵素活性及び FMO3 mRNA 発現量を測定した (Fig. 4)。日本人肝ミクロゾームの FMO3 含量及びベンジダミン *N*-酸化酵素活性にはそれぞれ約 40 倍及び 30 倍の個人差が認められた。FMO3 の典型的基質であるベンジダミン *N*-酸化酵素活性と免疫学的に定量した FMO3 含量は相関が認められた [$r^2=0.75$, $p<0.0001$, $n=16$, Fig. 4(A)]. ヒト肝 FMO3 mRNA 量と FMO3 含量にも有意な相関性が認められた [$r^2=0.55$, $p<0.001$, $n=16$, Fig. 4(B)]. 肝 FMO3 発現量の個人

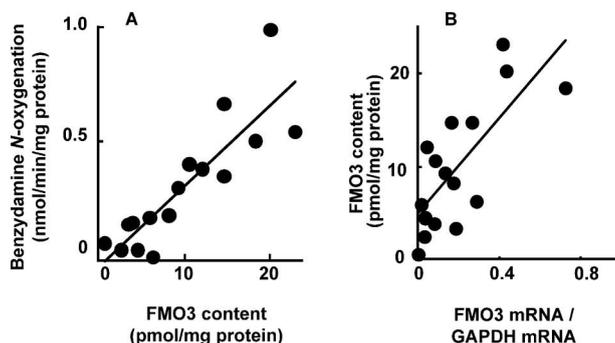


Fig. 4. Correlations Between Benzylamine *N*-oxygenation Activities and FMO3 Contents (A) and Expression Levels of FMO3 Protein and of FMO3 mRNA (B) in Individual Human Livers

The expression levels of FMO3 mRNA was normalized to the amount of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA.

差の要因として FMO3 遺伝子のコーディング及び 5′-上流領域の遺伝子変異の影響を検討したが、調べた範囲においては統計的に明らかではなかった。FMO3 酵素活性に影響を与える要因として一酸化窒素による *S*-ニトロソ化修飾が報告されている。¹⁹⁾ 本研究において使用した 16 検体の日本人肝ミクロゾームでは少なくとも 3 検体において、ニトロソ化修飾の可能性が示唆されたが、その影響は限られており、個人間変動における寄与は小さいと推察された。

量的変動に影響を及ぼすことが予想される FMO3 遺伝子 5′-上流領域の遺伝子変異のハプロタイプ解析を行った (Fig. 5)。自己申告にて体臭を訴える日本人集団の FMO3 遺伝子 5′-上流領域のハプロタイプは、野生型を含め、ハプロタイプ 1–4 に分類された。これらの転写活性についてレポーターアッセイを用いて解析した。²⁰⁾ ハプロタイプ 1 に比較してハプロタイプ 2–4 は低いルシフェラーゼ活性を示した (Fig. 6)。これらの結果から、量的な変動をもたらす要因の 1 つとして、FMO3 の 5′-上流領域の変異が示唆された。さらに、FMO3 mRNA 量は、核内転写因子である HNF-4α 及び NF-YA mRNA 量との間にそれぞれ有意な相関関係が認められ、両因子を含めた共相関係数が最も高値を示した。¹⁸⁾ 以上のことから、日本人肝における FMO3 の量的変動の個人差は、HNF-4α 及び NF-YA 発現量の個人差が一因であり、両因子が協調的に関与していることが示唆された。

自己申告トリメチルアミン尿症被験者及び健常成

Haplotype	Nucleotide position												E R V E				Frequency n = 204																	
	5	4	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2		K	C	M	G													
1	5	4	3	3	3	3	2	2	2	2	2	1	1	1	2	G	T	T	G	C	A	C	T	T	C	T	G	G	C	G	A	0.377		
2	1	6	7	6	5	5	5	9	8	6	5	1	5	5	8	1	C	-	-	A	-	G	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	0.015
3	0	0	8	0	4	4	4	6	5	5	4	7	1	5	2	4	C	C	C	-	-	G	T	C	C	G	A	C	-	-	-	-	0.176	
4	9	0	8	6	9	8	4	2	4	0	3	7	6	4	8	4	C	-	-	-	T	G	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	0.020
5													7	9	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	0.020	
6																	C	-	-	-	T	G	-	-	-	G	-	-	A	-	-	G	0.196	
7																	C	-	-	A	-	G	-	-	-	G	-	-	-	A	-	-	0.196	

Fig. 5. *FMO3* Haplotypes and Their Estimated Frequencies in Japanese
 Haplotypes and their estimated frequencies in the self-reported trimethylaminuria group. The nucleotide positions of single nucleotide polymorphisms are given relative to the A of the ATG translational initiation codon. Bases identical to the haplotype 1 sequence are indicated by a dash.

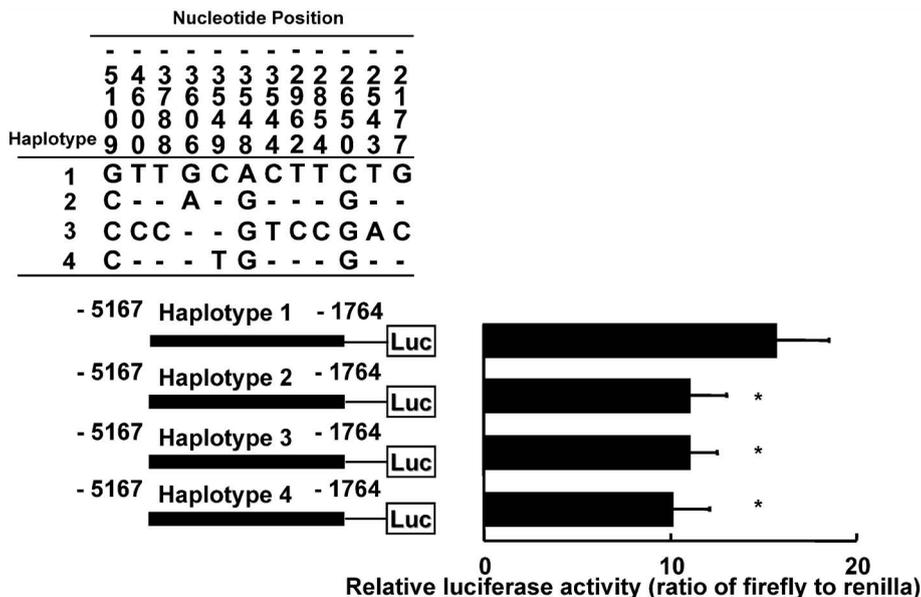


Fig. 6. Transcriptional Activities of the 5'-flanking Region of the Human *FMO3* Haplotypes
 Relative luciferase activities (ratio of firefly to renilla) of p*FMO3*/−5167 to −1764 (the transcriptional initiation site) reporter plasmids prepared from the *FMO3* haplotypes 1, 2, 3, and 4 were determined. Assay was carried out in triplicate determinations. Data and bar are mean and S.D. **p*<0.01, significantly different from the control (wild-type) analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnet's multiple comparison tests.

人女性の尿中トリメチルアミン排泄と月経周期との関連を調べた結果、*FMO3* 酵素活性に対するホルモンの影響が推察された。²¹⁾ *FMO3* 遺伝子の Arg500Stop 変異をホモ接合体で有していた被験者の尿に着目するすると、排泄された総トリメチルアミンに対して、トリメチルアミンが主要部分を占め、約 4 ヶ月間の観察期間を通して、*FMO3* 代謝効率が 40% 以下であった。*FMO3* 遺伝子型が

[Glu158Lys; Glu308Gly] 変異のホモ接合体の被験者では月経期間前後で *FMO3* 代謝効率が 40% 以下を示した。一方、健常成人女性では *FMO3* 遺伝子型が野生型ホモ接合体及び [Glu158Lys; Glu308Gly] 変異のヘテロ接合体であったが、月経期間前後において、*FMO3* 代謝効率が最大約 60% まで低下する現象が認められた。これらの結果から、女性特有のホルモンバランスによる *FMO3* 代謝活性の個

Table 1. Urinary Excretions of Total Trimethylamine from Food (200 g) Following Human Ingestion

	Control	Bonito	Tuna	Cod
Ingested (μmol total trimethylamine/200 g)	8	225(100)	2500(100)	14000(100)
Excreted (μmol total trimethylamine/8 h)	72	267	1150	5450
Corrected excretion (μmol total trimethylamine/8 h)	0	196(87)	1070(43)	5380(38)

Data are mean from $n=2-6$. Numbers in parentheses indicate % of total trimethylamine contents ingested.

人内変動が推察された。

4. 食品中トリメチルアミンの生体内運命

トリメチルアミン尿症患者は、一般的に食品由来のトリメチルアミン摂取を制限することにより、体臭に対処している。各種食品摂取後のトリメチルアミン尿中排泄量に関するイギリス人の報告²²⁾があるが、日本人向け食品の情報には十分ではない。海産の魚はトリメチルアミンの前駆体として、トリメチルアミン *N*-酸化体を多く含むことが報告されている。²³⁾そこで、日本人トリメチルアミン尿症患者の緩和療法となる食材を検討した。¹⁵⁾

食品中に含まれる総トリメチルアミン含量に着目し、食後尿中トリメチルアミン排泄率を検討した (Table 1)。対象とした食品は白米、カツオ、マグロ及びタラとした。これらの食品 200 g に含まれる総トリメチルアミン含量は白米に比較して海産の魚において高かった。3種の魚に含まれる総トリメチルアミン含量はカツオに比較して、マグロ及びタラで 10 倍及び 60 倍と大きな差が認められた。健康成人ボランティアに魚 200 g 及びコントロールである白米 200 g を摂取させ、食後 8 時間の尿を蓄尿し、その尿中総トリメチルアミン量を測定した。尿中に排泄されるトリメチルアミン量は、摂取したトリメチルアミン量に伴い増加した。トリメチルアミン排泄率を比較した結果、カツオは約 90% であるのに対し、マグロ及びタラにおけるトリメチルアミン排泄率は約 40% であった。これらの結果から、マグロ及びタラをトリメチルアミン尿症患者が摂取した場合、摂取後 8 時間では体内に残存する未変化体トリメチルアミンによる特有の体臭が引き起こされる可能性が推察された。

5. おわりに

本稿では、化学物質の生体内運命を理解する上で重要な薬物代謝酵素として FMO3 を、化学物質と

してトリメチルアミンを取り上げ、その個人差に影響を及ぼす要因についてまとめた。トリメチルアミンの生体への吸収量は、その前駆体となる食品由来の負荷をコントロールすることで可能であることが推察された。さらにトリメチルアミンの酸化的代謝に係わる FMO3 の個人間変動は量的には核内調節因子などの制御を受け、質的には FMO3 遺伝子変異の影響を受けていることが明らかとなった。FMO3 の個人内変動の要因としては女性ホルモンなどによる量的変化の可能性が推察された。すなわち、FMO3 の個人間及び個人内変動が化学物質トリメチルアミンの生体内運命を規定していた。

以上のように、トリメチルアミンを化学物質の例とし、FMO3 による酸化的代謝の個人差を詳細に調べた。多様な医薬品や環境化学物質等の外来化学物質の生体内運命を理解する上では、種々の薬物代謝酵素のさらなる量的・質的変動の解明が重要である。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、ご指導頂きました昭和薬科大学薬物動態学研究室山崎浩史教授に深謝いたします。

REFERENCES

- 1) Cashman J. R., Zhang J., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **46**, 65-100 (2006).
- 2) Zhang J., Cashman J. R., *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 19-26 (2006).
- 3) Koukouritaki S. B., Simpson P., Yeung C. K., Rettie A. E., Hines R. N., *Pediatr. Res.*, **51**, 236-243 (2002).
- 4) Zschocke J., Kohlmüller D., Quak E., Meissner T., Hoffmann G. F., Mayatepek E., *Lancet*, **354**, 834-835 (1999).
- 5) Mitchell S. C., *Lancet*, **354**, 2164-2165

- (1999).
- 6) Mitchell S. C., Smith R. L., *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 517–521 (2001).
 - 7) Cashman J. R., Zhang, J., *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 1043–1052 (2002).
 - 8) Hernandez D., Addou S., Lee D., Orengo C., Shephard E. A., Phillips I. R., *Hum. Mutat.*, **22**, 209–213 (2003).
 - 9) Shimizu M., Fujita H., Aoyama T., Yamazaki H., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**, 245–247 (2006).
 - 10) Shimizu M., Tomioka S., Murayama N., Yamazaki H., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **22**, 61–64 (2007).
 - 11) Yamazaki H., Fujita H., Gunji T., Zhang J., Kamataki T., Cashman J. R., Shimizu M., *Mol. Genet. Metab.*, **90**, 58–63 (2007).
 - 12) Shimizu M., Yano H., Nagashima S., Murayama N., Zhang J., Cashman J. R., Yamazaki H., *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 328–330 (2007).
 - 13) Yamazaki H., Shimizu M., *Curr. Drug Metab.*, **8**, 487–491 (2007).
 - 14) Allerston C. K., Shimizu M., Fujieda M., Shephard E. A., Yamazaki H., Phillips I. R., *Pharmacogenet. Genomics*, **17**, 827–839 (2007).
 - 15) Shimizu M., Kozono M., Murayama N., Yamazaki H., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, (in press).
 - 16) Krueger S. K., Williams D. E., *Pharmacol. Ther.*, **106**, 357–387 (2005).
 - 17) Overby L. H., Carver G. C., Philpot R. M., *Chem. Biol. Interact.*, **106**, 29–45 (1997).
 - 18) Nagashima S., Shimizu M., Yano H., Murayama N., Kumai T., Kobayashi S., Guengerich F. P., Yamazaki H., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **24**, 218–225 (2009).
 - 19) Ryu S.-D., Yi H.-G., Cha Y.-N., Kang J.-H., Kang J.-S., Jeon Y.-C., Park H.-K., Yu T.-M., Lee J.-N., Park C.-S., *Life Sciences*, **75**, 2559–2572 (2004).
 - 20) Shimizu M., Murayama N., Nagashima S., Fujieda M., Yamazaki H., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **23**, 54–58 (2008).
 - 21) Shimizu M., Cashman J. R., Yamazaki H., *BMC. Med. Genet.*, **8**, 2 (2007)
 - 22) Zhang A. Q., Mitchell S. C., Smith R. L., *Food Chem. Toxicol.*, **37**, 515–520 (1999).
 - 23) Zeisel S. H., DaCosta K. A., *Cancer Res.*, **46**, 6136–6138 (1986).