

Aldehyde Oxidase の機能解析—個体差・系統差を中心として—

伊藤 邦郎

Individual and Strain Difference of Aldehyde Oxidase in Rat

Kunio ITOH

Department of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Tohoku Pharmaceutical University,
4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan

(Received May 29, 2009)

Together with xanthine oxidase, aldehyde oxidase (AO) is a major member of a relatively small family of molybdenum hydroxylases. Both enzymes are homodimers with a subunit molecular weight of about 150 kDa and exhibit catalytic activity only as a dimer. An AO subunit contains a molybdopterine cofactor, an FAD and two different 2Fe-2S redox centers. The enzyme catalyzes oxidation of a wide range of endogenous and exogenous aldehydes and *N*-heterocyclic aromatic compounds. *N*-heterocycle-containing drugs such as methotrexate, 6-mercaptopurine, cinchona alkaloids and famciclovir are oxidized by this enzyme. Marked species differences have been well documented for the AO-catalyzed metabolism of drugs including methotrexate and famciclovir. In addition, a large rat strain variation has also been demonstrated in the oxidation activity of benzaldehyde and methotrexate. Marked differences in species, large differences in rat strains and individual differences in AO activities in some rat strains have been reported. However, little has been elucidated about any related molecular biological mechanisms. We examined the mechanism of individual variations and strain difference of rat AO using the technology of molecular biology. Our recent studies regarding the inter- and intra-difference of AO activities in rats are described.

Key words—aldehyde oxidase; individual difference; strain difference; dimer formation; polymorphism

1. はじめに

Aldehyde Oxidase (AO: EC 1.2.3.1) は補欠分子に molybdenum-pterin cofactor (MoCo) を有しており, xanthine oxidase (EC 1.17.3.2)/xanthine dehydrogenase (EC 1.17.1.4) と同様に molybdo-flavo-enzyme 群に分類されている.¹⁻³⁾ AO はサイトソル画分に存在し, ミクロソーム画分に局在するシトクロム P450 とともに, 生体内における薬物代謝酵素として重要な役割を果たしていると考えられている. その構造は 150 kDa のサブユニットからなる 300 kDa の二量体を形成しており, 1つのサブユニットは N 末端から 2Fe-2S クラスタを含むドメイン, FAD を含むドメイン, MoCo を含むドメインから構成されている.

近年, AO はアルデヒドを有する化合物のみならず, 含窒素複素環化合物の代謝に関与していることが報告され始め, 睡眠鎮痛剤のザレプロン, 抗マラリア薬のシンコナルカロイド, 抗ウイルス薬であるペンシクロビルのプロドラックである 6-デオキシペンシクロビルなどが基質となること, 内因性物質として, レチナルアルデヒドやニコチンアデニンジヌクレオチド (NAD) の代謝物である *N*-メチルニコチンアミドなども基質となることが報告されている.^{4,5)} しかしながらその機能については十分に明らかになってはいないのが現状である. また, AO においては著しい活性の種差が知られており, 一般にヒトやサルなどの霊長類で高く, ラットやマウスなどのげっ歯類では低く, イヌにおいてはその活性は欠損しているというように大きく異なっている.⁶⁻¹⁰⁾ また, 同一種内でもラットにおいて活性の程度が異なるという系統間差が,¹¹⁻¹³⁾ さらに, Wistar 系ラットや SD 系ラットにおける個体差が報告されている.^{14,15)} しかしながらその要因は明らか

東北薬科大学薬物動態学教室 (〒981-8558 仙台市青葉区小松島 4-4-1)

e-mail: itoh-k@tohoku-pharm.ac.jp

本総説は, 平成 20 年度日本薬学会東北支部奨励賞 (医療薬学部門) の受賞を記念して記述したものである.

にされてはいなかった。そこで筆者らは、ヒトにおける AO の個体間変動などを解明する研究の一環として、ラットにおける AO 活性の個体差及び系統間差の要因を明らかにするべく検討を行い、要因の 1 つが AO 遺伝子上の一塩基変異であることを明らかとした。今回その研究成果について紹介する。

2. Donryu 系ラットにおける AO 活性の個体差

ラット AO 活性の個体差を明らかにするために、当教室において個体間差の存在が示唆されていた Donryu 系ラット肝サイトソルでの活性の比較を行った。AO 活性の測定には、A タイプモノアミンオキシダーゼ (MAO-A) の阻害活性を有する RS-8359 を用いた。¹⁶⁾ その結果、高活性群と低活性群の 2 群にほぼ 1 : 1 の比率で明確に分かれることが示された。¹⁷⁾ 以下低活性群を poor metabolizer (PM)、高活性群を extensive metabolizer (EM)、高活性群の中でも特に活性の高い個体を ultrarapid metabolizer (UM) とした (Fig. 1)。

Lineweaver-Burk プロットから求めた速度論的パラメーターを比較したところ、 K_m 値には有意な差は認められなかったが、 V_{max} は高活性群と低活性群間で約 20 倍の差が確認された (Table 1)。

このことから AO 活性の個体差は、酵素自体の性質の変化ではなく、AO タンパク発現量の違いに起因するのではないかと推察された。そこで引き続き、Real-Time PCR による mRNA 量の測定、及び SDS-PAGE/Western blot 解析によるタンパク質発現量の測定を行った。しかしながらその結果は予想に反して、AO タンパク質発現量は EM 群では PM 群に比べやや高い程度であり、mRNA 発現量では明確な差は確認されなかった。

3. ラット AO 遺伝子解析

ラット AO 活性の個体差がかなりずしもタンパク質発現量によるものではないという結果が得られたことから、AO タンパク質自身が変化している可能性を考慮し、ラット AO cDNA 解析を行った。既に GenBank に登録されていた SD 系ラット肝 AO cDNA 情報と Donryu 系ラット肝から単離した AO cDNA の塩基配列を比較したところ、2 ヶ所でアミノ酸置換を伴う塩基変異を見出した。UM では 377 塩基が G/G、2604 番目の塩基が C/C、EM

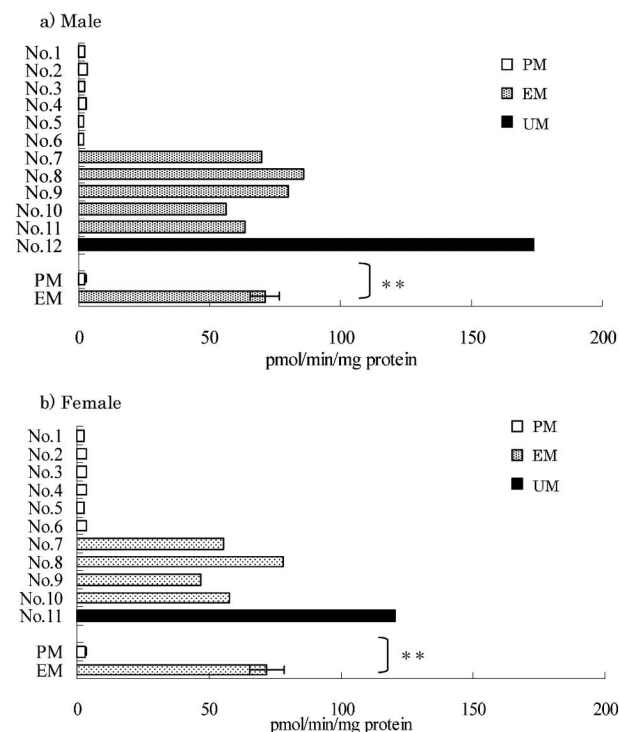


Fig. 1. Individual and Mean Data of 2-oxidation Activity of the (S)-enantiomer of RS-8359 by Aldehyde Oxidase in 12 Male and 11 Female Donryu Rats

Table 1. Kinetic Parameters for the 2-oxidation Activity of the (S)-enantiomer of RS-8359 by Low and High Activity Group of Donryu Strain Rats

Gender	Group	K_m (μM)	V_{max} (pmol/min/mg protein)	V_{max}/K_m (ml/min/mg protein)
Male	UM (1)	90.0	333	3.70
	PM (6)	87.0 ± 5.63	5.1 ± 0.23	0.067 ± 0.004
	EM (5)	$53.9 \pm 6.81^*$	$125.0 \pm 6.67^{**}$	$2.40 \pm 0.184^{**}$
Female	UM (1)	86.7	222	2.56
	PM (6)	100.3 ± 15.5	6.7 ± 0.75	0.07 ± 0.005
	EM (4)	79.0 ± 6.07	$105.9 \pm 15.1^{**}$	$1.34 \pm 0.094^{**}$

Each value represents the mean \pm S.E. of four to six rats. The figures in parentheses indicate the number of rats studied. * $p < 0.01$, ** $p < 0.0001$ compared with the low activity group.

Table 2. Nucleotide Differences in the AO cDNA between the UM, EM and PM Groups of Donryu Rats and between Donryu and Sprague-Dawley Rats

Nucleotide No. in male SD ^{a)}	SD ^{a)} male	SD ^{b)} female	Donryu male		
			UM (1)	EM (5)	PM (6)
133	A	G	A	A/G	G
377	A	A	G (Gly)	G/A (Gly/Ser)	A (Ser)
405	C	G	G	G	G
408	G	T	T	T	T
1679	T	C	C	C	C
1759	T	T	C	C	C
1994	A	G	G	G	G
2563	G	A	A	A	A
2604	T	T	C (Ala)	C/T (Ala/Val)	T (Val)
2783	C	C	A	A	A
2872	T	C	C	C	C
2935	A	A	A	A/G	G
3739	G	A	A	A	A
3875	C	T	T	T	T
3993	G	C	C	C	C

The nucleotide sequences of Donryu rats were numbered with the reference to those of male SD rats (Wright *et al.*, 1998). The number of rats for the analysis of nucleotide sequences is shown in the parentheses. Nucleotide substitutions accompanying amino acid changes are written in bold letters. The cDNA sequences in male and female Donryu rats were identical and differed in only ten positions when compared to male and female SD rats. a) GenBank accession number; AF110478. b) GenBank accession number; AF110477.

では 377 塩基が G/A, 2604 番目の塩基が C/T, PM ではでは 377 塩基が A/A, 2604 番目の塩基が T/T であった (Table 2).¹⁷⁾

今回明らかとなった 377 番目及び 2604 番目の 2 ヶ所のアミノ酸置換を伴う塩基変異が AO 活性に関与するのか, 関与するとしたら 2 ヶ所とも変異することが条件になるのか不明であった. そこでこの点を明らかにするために, UM (377G, 2604C), PM (377A, 2604T) に加え 1 ヶ所ずつ変異を有するようにラット AO cDNA を組換え, Mut-1 (377G, 2604T), Mut-2 (377A, 2604C) を作製し, 大腸菌発現系により AO タンパク質を発現させた. 大腸菌発現 AO タンパク質を用いた活性測定の結果より, その程度は UM > Mut-1 > Mut-2 ≒ PM となり, AO 活性に最も影響している箇所は 377 番目の塩基の G から C への変異であることが示唆された (Fig. 2).¹⁸⁾

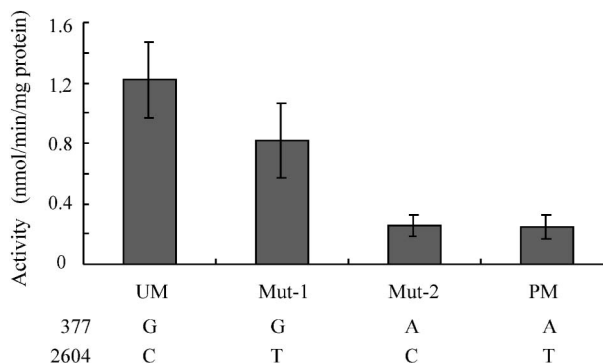


Fig. 2. 2-Oxidation Activity of (S)-RS-8359 by Recombinant AO Protein Expressed in *E. coli* M15 (pREP4)

Nucleotide sequence at 377 and 2604 are G and C in group UM, G and T in group Mut-1, A and C in group Mut-2, and A and T in group PM, respectively. * $p < 0.01$ compared with UM group.

4. ラット AO 遺伝子多型の遺伝頻度¹⁹⁾

AO 活性の個体差の検討で用いたラットは Charles River 社から購入したものだが, EM の個体が UM と PM のヘテロであるとすれば, その割合はメンデルの法則に従えば 1 : 2 : 1 となり, UM と PM は同程度存在するものと予想された. しかしながら Fig. 1 で示したように UM の個体は 23 匹中 2 匹のみであった. AO 活性の高い個体が全体の 1 割程度であったことから, AO 活性が高い個体はなんらかの影響を受け, 生まれ難いあるいは成長が遅れるなどの現象が起こり, ブリーダーからの出荷時に除かれているのではないかと推測された. そこで交配実験を行った. まず購入した雌雄 Donryu 系ラットから採血し, ゲノム DNA を調製した. これを元に 2 ヶ所の遺伝子多型の当該箇所である 377, 2604 番目の塩基を解析し, UM, EM, PM と分類した. 得られた EM 同士を交配することにより UM, EM, PM それぞれの F1 個体を得, 引き続き UM 同士, EM 同士, PM 同士を交配させその F2 個体を得た. 生まれた個体については AO 遺伝子の 2 箇所の変異該当部位を解析することにより分類した. なお, 遺伝子解析後肝サイトソルを調製し, 活性測定を行うことで遺伝子型と表現型が一致していることを確認した. その結果, 予想に反し UM 同士のペアではほかのペアと同程度の個体数が生まれ, さらに EM 同士のペアでは UM : EM : PM の割合は約 1 : 2 : 1 となった. このことから AO 活性が高いことで成長過程になんらかの影響が出るのではないかとこの予想は否定されたが, 出荷時に UM の

個体が著しく少ない原因は明らかにはならなかった。

5. ラットにおける AO 活性の系統間差

AO 活性についてはラットにおいて個体間差のみならず著しい系統間差も存在する。しかしながらその要因については明らかにされていない。そこで系統差の要因を、1) AO タンパク質発現量の差、2) 個体差で明らかになったアミノ酸置換を伴う遺伝子変異によるもの、の2つの可能性を念頭に置き実験を行った。

まず、10 系統のラットにおいて、RS-8359 を基質とし、活性測定を行った。その結果、ラット系統間で著しい AO 活性の差があることが示された (Fig. 3)。さらに、AO タンパク質の発現量に差があるのではないかと考え、抗ラット AO 抗体を用いた SDS-PAGE/Western blot 解析により発現タンパク質量を比較した。活性と発現量の相関をみたところ、Donryu 系ラットの個体差の場合と同様に、相関傾向にはあるものの、有意ではなかった。AO は生体内では 300 kDa のホモダイマーとして存在していることから、ダイマーの形成程度に違いがあるのではないかと推測し、SDS-PAGE ではなく Native-PAGE による Western blot 解析を行った。その結果、高活性の系統では 300 kDa のホモダイマーの位置に、低活性の系統では 150 kDa のモノマーの位置に AO タンパク質が存在することが明らかとなった (Fig. 4)。

さらに 300 kDa の位置にある AO タンパク質の量と活性の相関をみたところ、相関係数 $R^2=0.72$

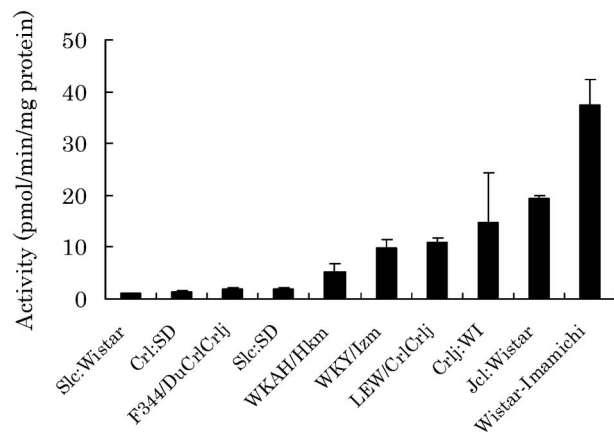


Fig. 3. 2-Oxidation Activity of (S)-RS-8359 Catalyzed by AO in Liver Cytosol from Ten Strain Rats
Each bar represents the mean \pm S.E. of three rats.

と明らかな相関が確認された。このことから、AO 活性におけるラット系統差の要因は AO 二量体形成の程度であることが明らかとなった。²⁰⁾

6. AO 二量体形成と遺伝子多型

Donryu 系ラットにおける AO 活性の個体差の原因がアミノ酸置換を伴う 2 ヶ所の塩基変異であること、ラット系統間差の要因が AO 二量体形成能の違いによることを明らかとしてきた。そこで Donryu 系ラットの UM, EM, PM 群の個体について改めて Native-PAGE / Western blot 解析を行ったところ、各系統において形成される AO タンパク質構造が UM 群では二量体、EM 群では二量体と単量体、PM 群では単量体であることが示された。二量体形成量の差はこの 2 ヶ所のアミノ酸置換を伴う塩基変異、377G > A (Gly¹¹⁰Ser) と 2604C > T (Ala⁸⁵²Val) が原因であることが示された。そこで、各系統ラットのゲノム DNA の当該塩基配列を解析した。その結果、主に単量体として存在した SLC: Wistar, F344: DuCrjCrlj においては 377 が A (Ser), 2604 が T (Val) であるのに対し、二量体が多く存在し、比較的活性の高い WKAH /Hkm, WKY/Izm, LEW/CrlCrlj, Crlj: WI, Jcl: Wistar 及び Wistar-Imamichi では 377 が G (Gly), 2604 が C (Ala) であった (Table 3)。Charles River の Crlj: Wistar については Donryu 系ラットの UM, EM, PM と同様のパターンを示し、遺伝子多型に基づく個体差の存在が示された。一方、SD 系ラットについては 2 社 (Charles River 及び SLC) から購入したラットにおいて 2604 を調べたすべての個体で T (Val) であったが、377 番目の塩基に着目すると A (Ser), A/G (Ser/Gly), G (Gly) の個体が存在した。活性の高い順にグループ 1 から 3 に群分けし活性との関連をみてみると、活性の高いグ

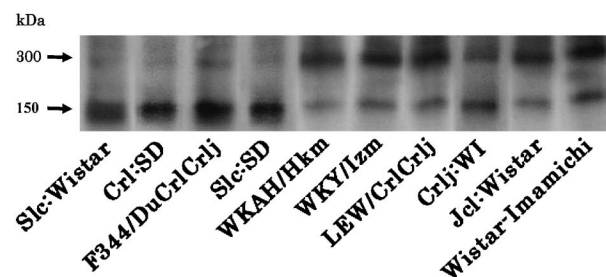


Fig. 4. Native-PAGE/Western Blot Analysis of AO Protein in Liver Cytosol from Ten Strain Rats

Table 3. Nucleotide Substitutions of AO Genomic DNA in Seven Rat Strains

Nucleotide position	Rat strains						
	Low AO activity		High AO activity				
	Slc: Wistar	F344/DuCrjCrlj	WKAH/Hkm	WKY/Izm	LEW/CrjCrlj	Jcl: Wistar	Wistar-Imamichi
377	A	A	G	G	G	G	G
2604	T	T	C	C	C	C	C

Table 4. Nucleotide Substitutions of AO Genomic DNA in Crj : SD and Slc : SD Rat Strains

Nucleotide position	Rat strains					
	Slc : SD			Crj : 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 Crj : SD and Slc : SD strains belong to the low AO activity group. The figures in parentheses indicate the number in each group.

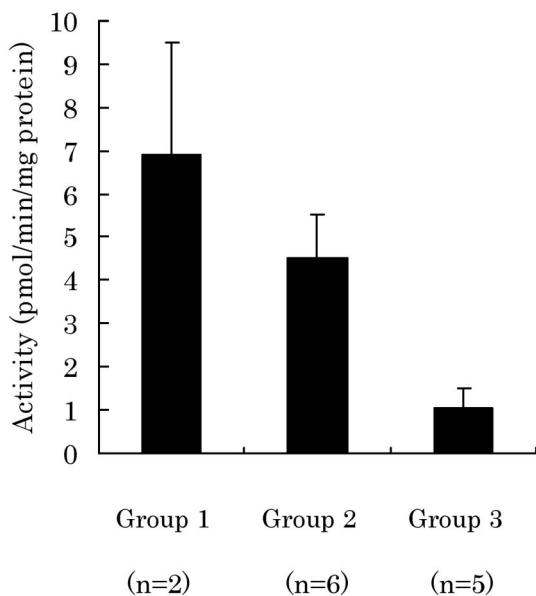


Fig. 5. AO-catalyzed 2-oxidation Activity of (S)-RS-8359 in Liver Cytosols of Crj:SD Strain Rats

グループ 1 は 377 が G (Gly) であり、活性の低いグループ 3 は A (Ser) そして中間の活性を有するグループ 2 は G/A (Gly/Ser) とヘテロであった (Fig. 5 and Table 4). さらに, Native-PAGE/Western blot 解析を行ったところ, 377 が G (Gly) の活性の高いグループ 1 の個体は 300 kDa の位置に二量体として, 377 が A (Ser) の活性の低いグループ 3

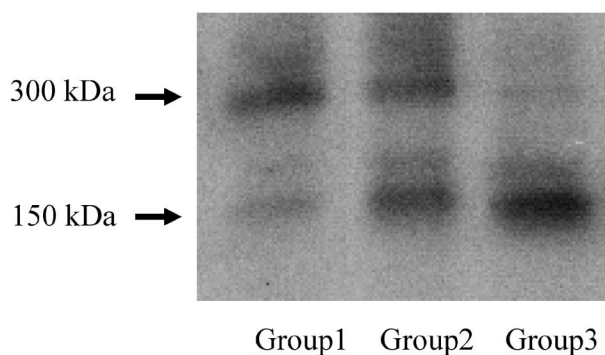


Fig. 6. Native-PAGE/Western Blot Analysis of AO Protein in Liver Cytosols of Crj:SD Strain Rats

は 150 kDa の位置に, その中間の活性を有した 377 がヘテロのグループ 2 の個体は 300 kDa と 150 kDa の両方に AO タンパク質が存在していた (Fig. 6).²¹⁾

これらのことから, AO 活性のラット系統差及び個体差の要因は AO 遺伝子上のアミノ酸置換を伴う 2 ヶ所の塩基変異であり, アミノ酸置換が起こることにより生体内において二量体で活性を有する AO タンパク質が二量体を形成できず, 結果として活性低下をもたらすことが明らかとなった. さらに AO 発現系を用いた結果及び SD 系ラットのデータから二量体形成には 377 番目の塩基がコードする 110 残基目のアミノ酸が重要であることが明らかと

なった。110番目のアミノ酸が不斉性を持たないグリシンから光学活性なセリンに変わることによりなぜ二量体形成が阻害されるのかについては今後の検討課題と考える。

7. おわりに

以上、筆者らが行ってきたラットにおけるAO活性の個体差及び系統間差について紹介させて頂いた。今回の結果から、AOが主に代謝に係わるような薬物についてラットを実験動物として用いる場合、選択した系統によっては異なる結果を導き出すことが予想された。このことから、どの系統のラットを選択するかは慎重に行わなければならない。また、AOには著しい種差が存在する。医薬品開発を含めAOが関与する化合物を用いた検討を行う際には動物種を選択も重要なポイントになると考える。

薬物代謝の主要臓器である肝臓において中心的役割を担っている酵素はチトクロームP450であるが、AOもまた様々な薬物を代謝することが知られている。今のところヒトにおいて明確な個体差についての報告はないが、個体差を示唆する報告はいくつかなされている。^{22,23)}今回得られた知見を端緒に今後、懸案であるAOの著しい種差あるいはヒト個体差の要因などの薬物動態学的な特徴を解明していくことで、本酵素で代謝される医薬品の適正使用に役立つ知見が得られていくのではないかと期待する。

謝辞 本研究は、東北薬科大学薬物動態学教室において行われたものであり、終始ご指導ご鞭撻を頂きました田中頼久教授を始め教室の皆様にご心よりお礼申し上げます。また、本研究を進めるにあたりご指導、アドバイス頂いた東北大学大学院薬学研究科薬物動態学分野・山添康教授、東北薬科大学環境衛生学教室・永田清教授、第一三共(株)分析代謝研究所・渡邊伸明先生に深謝いたします。

REFERENCES

- 1) Beedham C., *Drug Metab. Rev.*, **16**, 119–156 (1985).
- 2) Beedham C., *Prog. Med. Chem.*, **24**, 85–121 (1987).
- 3) Beedham C., *Pharm. World Sci.*, **19**, 255–263 (1997).
- 4) Beedham C., “Molybdenum Hydroxylase, in *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*,” ed. by Ioannides C., John Wiley, New York, 2002, pp 147–187.
- 5) Kitamura S., Sugihara K., Ohta S., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**, 83–98 (2006).
- 6) Kawashima K., Hosoi K., Naruke T., Shiba T., Kitamura M., Watabe T., *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 422–428 (1999).
- 7) Jordan C. G. M., Rashidi M. R., Laljee H., Clarke S. E., Brown J. E., Beedham C., *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**, 411–418 (1999).
- 8) Kitamura S., Sugihara K., Nakatani K., Ohta S., Oh-Hara T., Nimomiya S., Green C. E., Tyson C. A., *IUBMB Life*, **48**, 607–611 (1999).
- 9) Rashidi M. R., Smith J. A., Clarke S. E., Beedham C., *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 805–813 (1997).
- 10) Itoh K., Yamamura M., Takasaki W., Sasaki T., Masubuchi A., Tanaka Y., *Biopharm. Drug Dispos.*, **27**, 1133–139 (2006).
- 11) Sugihara K., Kitamura S., Tatsumi K., *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **37**, 861–869 (1995).
- 12) Kitamura S., Nakatani K., Sugihara K., Ohta S., *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, **122**, 331–336 (1999).
- 13) Sasaki T., Masubuchi A., Yamamura M., Watanabe N., Hiratsuka M., Mizugaki M., Itoh K., Tanaka Y., *Biopharm. Drug Dispos.*, **27**, 247–255 (2006).
- 14) Gluecksohn-Waelsch S., Greengard P., Quinn G. P., Teicher L. S., *J. Biol. Chem.*, **242**, 1271–1273 (1967).
- 15) Beedham C., “Molybdenum Hydroxylases, in *Metabolism of Xenobiotics*,” eds by Gorrod J. W., Oeschlager H., Caldwell J., Taylor & Francis, London, 1998, pp. 51–58.
- 16) Itoh K., Yamamura M., Muramatsu S., Hoshino K., Masubuchi A., Sasaki T., Tanaka, Y., *Xenobiotica*, **35**, 561–573 (2005).
- 17) 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).
- 18) Adachi M., Itoh K., Masubuchi A., Watanabe N., Tanaka Y., *J. Biochem. Mol. Biol.*, **40**, 1021–1027 (2007).
- 19) Adachi M., Itoh K., Abe H., Tanaka Y., *Xenobiotica*, **38**, 98–105 (2008).

-
- 20) Itoh K., Maruyama H., Adachi M., Hoshino K., Watanabe N., Tanaka Y., *Xenobiotica*, **37**, 709–716 (2007).
- 21) Itoh K., Maruyama H., Adachi M., Hoshino K., Watanabe N., Tanaka Y., *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 1860–1864 (2007).
- 22) Rodrigues A. D., *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 197–200 (1994).
- 23) Al-Salmy F. S., *IUBMB Life*, **51**, 249–53 (2001).