

学位論文題名

フラビン含有モノオキシゲナーゼの毒性学的機能の
解析をめざして：分子生物学的アプローチ

学位論文内容の要旨

フラビン含有モノオキシゲナーゼ (flavin-containing monooxygenase 以下 FMO) は広い基質特異性を有する薬物酸化酵素であり、NADPH-依存的に主として含窒素、含硫黄、含燐化合物を代謝する。窒素、硫黄を含む薬物は数多く存在しイミプラミンやクロルプロマジンも本酵素の基質となることが知られている。また、FMO の関与する遺伝的疾患として、多量のトリメチルアミンが体内に蓄積され、呼気中に排泄される fish odor syndrome が報告されており、FMO は生体内で重要な役割を担う酵素として位置付けられている。

本研究を始めた時点ではブタ肝、ウサギ肝そしてウサギ肺の FMO の cDNA が報告されているのみであった。実験動物として繁用されているラットやマウスからはその cDNA は単離されていなかった。そこで本酵素の機能を明らかにするためにラット、マウス FMO cDNA を単離した。さらに酵母を用いた発現系を構築し、FMO によるパーキンソン病様症状誘発物質の代謝について検討した。

7 週齢雄性 SD 系ラット肝、および 7 週齢雄性 C57BL/6 マウス肝より RNA を調製し、これをもとにそれぞれラット肝およびマウス肝 cDNA ライブラリーを作製し、抗ラット FMO 抗体を用いたイムノスクリーニングにより得られた cDNA 断片をプローブとしてスクリーニングを行った。その結果、ラット肝 cDNA ライブラリーから完全長クローン RFMO1 を単離した。マウス肝 cDNA ライブラリーからは完全長クローンは得られなかった。しかし、開始コドンを含むクローン MF19 と終止コドンを含むクローン MF9 を連結することにより完全長クローン MFMO1 とした。RFMO1、MFMO1 とともにブタ FMO1、ウサギ FMO1 と 82% 以上の高い相同性を示し、FMO1 ファミリーに属することが示された。

本研究を開始した後、ヒト肝、ブタ肝、ウサギ肝そしてモルモット肺から FMO の cDNA が単離され、FMO が複数の分子種からなる酵素であることが明らかにされた。そこでラットにおいて対応する分子種の単離を行った。まず、報告された cDNA の塩基配列をもとに PCR 法によりモルモット FMO2、ヒト FMO3、FMO4 そしてウサギ FMO5 の cDNA 断片を単離した。FMO2 は肺に多く存在する分子種であることからモルモット FMO2 cDNA をプローブとしてラット肺 cDNA ライブラリーから、そしてヒト FMO3、FMO4 そしてウサギ FMO5 cDNA をプローブとしてラット肝 cDNA ライブラリーからスクリーニングを行っ

た。その結果、ウサギ FMO5 cDNA をプローブとして完全長クローン RFMO5 を単離した。またヒト FMO3 cDNA をプローブとしてラット FMO3 cDNA 断片を3個を単離し、それらを連結することにより完全長クローン RFMO3 とした。さらに FMO2 については翻訳領域を一部含む約1200bp の cDNA 断片を単離した。ヒト FMO4 cDNA をプローブとしたスクリーニングでは陽性クローンは得られなかった。このことから FMO4 についてはラット肝においてその含量が極めて低いのではないかと考えられた。以上の結果から、ラットにおいて FMO1、FMO2、FMO3、FMO5 ファミリーに属する分子種が存在することを明らかとした。

次に、ラットおよびマウスの各組織における RFMO1、MFMO1 mRNA の発現をノーザンブロット分析により検討した。その結果、RFMO1 は主に肺、肝臓、腎臓に発現しており、わずかではあるが心臓、脳にも発現していた。また、MFMO1 も主に肺、肝臓、腎臓に発現しており、わずかではあるが心臓、精巣、脳にも発現していた。本研究により初めて、RNA レベルで脳に FMO が発現していることを明らかとした。

単離した RFMO1、MFMO1 のコードする蛋白質を得るために、酵母を用いた発現系の構築を行った。RFMO1 は無リン酸状態で誘導される酸性フォスファターゼプロモーター (PHO5) をもつ発現ベクター pAM82 に組み込み、組換え発現プラスミド pAMFMO を、MFMO1 は発現ベクター pAAH5 に組み込み、組換え発現プラスミド pMF5 を作製した。各組換え発現プラスミドを酢酸リチウム法により酵母 AH22 株に導入し形質転換酵母を得た。

抗ラット FMO 抗体を用いたウエスタンブロット分析および FMO の基質として知られるチオベンズアミドとチオウレアを用い FMO 発現酵母マイクロゾームの活性測定を行った。その結果、pAMFMO、pMF5 導入酵母マイクロゾームにおいて、FMO 蛋白質が発現しており、高い代謝酵素活性が認められ、FMO としての機能を有していることを確認した。

パーキンソン病は老化に伴い多発する運動障害を主症状とする脳の変性疾患である。その原因はいまだ特定されていない。その原因の一つに MPTP 様の神経毒が関与しているという説がある。FMO が脳内に発現していることから、神経毒という点に着目し、パーキンソン病様症状誘発物質である 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)、脳内物質でありパーキンソン病様症状誘発物質である tetrahydroisoquinoline (TIQ)、N-methyl-TIQ、1-benzyl-TIQ、脳内物質でありパーキンソン病の発症を防御する可能性のある 1-methyl-TIQ が FMO の基質となるかどうか検討した。その結果、上記5種類の化合物は FMO の基質となることが明らかとなった。また、TIQ、N-methyl-TIQ、1-benzyl-TIQ、1-methyl-TIQ を用い K_m 値を測定したところ N-methyl 体が最も親和性が高いことが示された。さらにマウス FMO1 発現酵母マイクロゾームによる実験では TIQ を基質としたときの K_m 値が $435 \mu\text{M}$ でありラット ($32.0 \mu\text{M}$) とは異なる値を示し、ラット FMO1 のほうがマウス FMO1 に比べ TIQ に対する親和性が高いことが明らかとなった。このことはラット FMO1 のほうがマウス FMO1 より TIQ を基質としやすい (解毒に行きやすい) ということであり、ラットよりも、マウス特に C57BL/6 系マウスが神経毒に対する感受性が高いため一般にパーキンソン病の実験動物として用いられることと対応しており、ラットとマウスの神経毒に対する感受性の差が FMO の神経毒に対する親和性の違いによるものではないかと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鎌 滝 哲 也
副 査 教 授 野 村 靖 幸
副 査 助 教 授 横 井 毅
副 査 助 教 授 徳 光 幸 子

学位論文題名

フラビン含有モノオキシゲナーゼの毒性学的機能の 解析をめざして：分子生物学的アプローチ

申請者はフラビン含有モノオキシゲナーゼ（以下FMO）の毒性学的な機能を明らかにすることを究極的な目的とし、先ずラットおよびマウス FMO cDNA を単離した。得られたcDNAクローンをプローブとしてノーザンブロット分析を行った結果、FMOが脳内にも存在することを見いだした。そこでFMOが神経毒性物質の代謝にどのように関わるかを調べるため、FMO cDNA を酵母内に導入してFMO酵素を酵母に発現させ、発現酵素が外来性のあるいは生理的に存在するパーキンソン病様症状誘発物質を基質として代謝することを明らかにした。本研究では分子生物学的あるいは遺伝子工学的な方法論を駆使し、従来知られていなかったFMOの新しい毒性学的な機能を明らかにした点でユニークである。以下に詳述するようにきわめて優れた研究成果であると評価される。

1) ラットおよびマウスFMO cDNAのクローニング

ラットやマウスは代表的な実験動物であるが、興味あることにはこれらの動物種のFMOに関してはほとんど研究されていない。そこでラットおよびマウス FMO cDNA の単離を行い、ラットから3種（FMO1、FMO3、FMO5）を、マウスからFMO1 cDNA を単離し、各分子種の一次構造を明らかにした。これまでの例では同一ファミリーに属する分子種間の相同性は85%前後であったが、ラットFMO1とマウスFMO1の比較では94%という高い相同性を示した。またラットFMO3とウサギFMO3の相同性は84%であるのに対し、ラットFMO3とヒトFMO3の比較では76%の相同性しか認められなかった。FMOの分類は”同一ファミリーでは80%以上の相同性が認められる”

と定義されていたが、この結果から75%以上の相同性が認められれば同一ファミリーに属しているといえるのではないかと考えられる。またモルモット FMO2 をプローブとしたスクリーニングによりラット肺 cDNA ライブラリーから翻訳領域の一部を含むクローンが単離されていることから、ラットにおいても FMO2 ファミリーに属する FMO が存在することが示唆された。ヒト FMO4 をプローブとしたラット肝 cDNA ライブラリーからのスクリーニングによって対応する FMO4 の cDNA クローンは単離することができなかった。このことは、今回用いた cDNA ライブラリーにラット FMO4 cDNA がほとんど含まれていなかった、すなわちラットにおいて FMO4 の発現量が極めて低いのではないかと考えられる。

明らかにされた FMO の一次構造を細菌の FMO (機能的にはまったく異なる) と比較しても、両者間で類似性はほとんど認められなかった。薬物酸化酵素として FMO よりも詳しく研究されている、チトクローム P450 の場合は、その原型と思われる分子種が下等生物にも存在することが知られているので、この点と対比させると、哺乳動物 FMO が進化論的に最近出現した酵素である可能性がある。さらにノーザンブロット分析により、FMO1 がラット、マウスにおいて主に肺、肝臓、腎臓に発現していることを見いだした。この結果はブタ、ウサギの結果に対応するものであり、動物種に拘わらず肺、肝臓、腎臓が FMO の主に存在する臓器であることを示している。さらに本研究によりわずかではあるがラットの心臓と脳においても、またマウスの心臓、精巣そして脳においても発現していることを明らかにした。脳内に FMO が存在することから、その生理的意義を明らかにしていくことは極めて重要であると考えられる。

2) FMO cDNA の酵母内発現系の構築と発現酵素の性質

単離したラット FMO1、マウス FMO1 cDNA クローンが確かに FMO 蛋白をコードするものか否かを確認すると同時に、どのような活性を有するのかを明らかにするために酵母での発現系の構築を行った。酵母に導入された cDNA により酵母内に外来 FMO が発現し、ラット FMO1、マウス FMO1 が酵素活性を有する FMO であることが示された。また、肝 FMO のアクチベーターとして働く *n*-オクチルアミン、並びに、阻害剤として働く α -ナフチルチオウレアに対し、酵母内で発現させた FMO も肝臓内に存在する FMO と同様の挙動を示すことが確認された。このことから酵母を用いた発現系は FMO の発現系に適していると考えられる。

3) 酵母内に発現させた FMO による神経毒性物質の代謝

FMO を発現する酵母のマイクロゾームを用い、パーキンソン病様症状誘発物質である 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)、脳内物質でありパーキンソン病様症状誘発物質である tetrahydroisoquinoline (TIQ)、N-methyl-TIQ、1-benzyl-TIQ、さらにパーキンソン病の発症を防御する可能性

のある 1-methyl-TIQ の代謝について検討した。これら全ての物質が FMO の基質となり、特に N-methyl-TIQ が最も親和性が高いことが明らかとなった。TIQ の毒性発現メカニズムは脳内の N-methyltransferase により N-位がメチル化されその後、モノアミンオキシダーゼ B (MAOB) によりイソキノリウムイオンとなりドパミン作動性神経に取り込まれ毒性を現すことによると考えられている。FMO が N-methyl-TIQ に対し最も親和性が高く、代謝物としてそのオキシド体を生じることは毒性発現を予防、つまり解毒として作用していることを示唆するものである。

また、ラット FMO1 とマウス FMO1 の TIQ に対する Km 値を測定したところマウス>ラットとなった。一般にパーキンソン病の実験動物としてはラットではなくマウス、主に C57BL/6 系マウスが用いられる。C57BL/6 系マウスにおいて神経毒性物質に対して感受性が高いためと考えられている。今回の結果と照らし合わせると、この神経毒に対する感受性が FMO 活性の違いによるものではないかと考えられる。仮に、神経毒に対する感受性が実験動物種間あるいは系統間での FMO 活性の違いによるものであるとすれば、パーキンソン病の治療薬の開発における実験動物の選択は慎重に行わなければならない。

FMO は食物中に含まれるホスファチジルコリンなどが腸内細菌によって分解されて生ずるトリメチルアミンを N-酸化し、体外に排泄させる酵素ではないかと考えられ注目されてきた。本研究では酵母に発現した FMO がトリメチルアミンを酸化することも証明した。白人やタイ人ではトリメチルアミン酸化酵素の遺伝的な欠損者がおり、彼らは呼気からトリメチルアミンを排出しその悪臭の故に社会から疎外され、犯罪を起こすなど社会問題を起こしている。本研究を基盤にして将来 FMO 酵素欠損者の遺伝子治療が可能になることが期待される。

以上、本研究では FMO の cDNA クローニング、cDNA を用いた酵母における発現系の構築、発現酵素による神経毒性物質の代謝と一連の先端的な研究成果が得られた。分子毒性学的見地から極めて高度な研究と評価される。本論文「フラビン含有モノオキシゲナーゼの毒性学的機能の解析をめざして：分子生物学的アプローチ」に含まれる研究成果は薬学における基礎および応用のいずれにおいても優れており博士（薬学）の学位を受けるに充分値するものと認めた。