

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790648

研究課題名（和文） 肝傷害防御経路の候補であるチロシン代謝酵素群の網羅的解析

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of the tyrosine metabolic enzymes included in the candidates of liver protection pathways

研究代表者

日吉 峰麗 (HIYOSHI MINEYOSHI)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・学術研究員

研究者番号：30363162

研究成果の概要（和文）：

ラット傷害肝中では、カテコール-Oメチル基転移酵素 (COMT) が、タンパク質レベルにおいてリン酸化型が増加し、脱リン酸化型が減少していた。この結果から、肝機能に本酵素が関連していることが推察された。そこで、日本人一般集団を対象に実施されている日本多施設共同コホート研究のデータを用いて、COMT遺伝子型と肝機能の関連について評価を行った。その結果、COMT遺伝子多型が肝機能の安定化と関連していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

In the damaged rat liver, soluble catechol-O-methyltransferase (COMT) increased as a phosphorylated form and decreased as a dephosphorylated form. This finding raised the possibility that the COMT protein is associated with liver function. To evaluate the association between COMT genotypes and liver function, we used data from the Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort (J-MICC) Study. In this study, we revealed that a COMT polymorphism (rs4680: Val158Met (G/A)) affected liver function.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2011年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学・肝臓学

キーワード：肝傷害、チロシン代謝、D-ドーパクロムトートメラゼ、カテコール-Oメチル基転移酵素

1. 研究開始当初の背景

肝臓は再生能力の高い臓器であり、侵襲の程度により Hepatocyte Growth Factor (HGF) を初めとした様々な mRNA、タンパ

ク質の発現に変動が示される。我々はこれまで、肝傷害時に誘導されるタンパク質レベルでの変動を網羅的に理解することを目的に、ラット四塩化炭素傷害肝のプロテオーム解析を実施してきた。その過程で、HGF の

活性がおよそ 10 倍となる侵襲時に、メラニン生合成に関わる D-ドーパクロムトートメララーゼが、タンパク質レベルでおよそ 12 倍増加することを報告している (Hiyoshi et al., *Toxicology* 2009)。本酵素の増加は、部分肝切除や B 型肝炎ウイルスによっても誘発されることが報告されていることから、四塩化炭素刺激による特異的な応答ではなく、様々な刺激により誘導される肝傷害で、共通の経路が活性化されていることが推察された。

メラニンおよび、D-ドーパクロムトートメララーゼの代謝産物である 5,6-ジハイドロキシインドールには、抗酸化作用があることが報告されている。そのため、本酵素によるメラニン生合成過程の促進は、肝傷害時の酸化的損傷を抑制する防御経路の活性化と推察している。

また、D-ドーパクロムトートメララーゼ以外にも、チロシン代謝に関わる酵素の変動が示されたことから (メラニン生合成はチロシン代謝の一部である)、肝傷害時にはチロシン代謝の流れを制御することが、侵襲からの防御に寄与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

動物実験により獲得されたプロテオームデータを基に、傷害肝中で示されたチロシン代謝の変動を網羅的に理解し、肝機能の恒常性維持に重要な働きをする酵素の探索を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

オスウィスターラットに、四塩化炭素を 2 ml/kg body weight 腹腔内投与し、肝傷害を誘導する。24 時間後に肝臓を摘出し、直ちにタンパク質を抽出する。

(2) プロテオーム解析

抽出したタンパク質を二次元電気泳動により分離する。分離したタンパク質を、質量分析による Peptide mass fingerprinting (PMF) 法、あるいは Tandem mass (MS/MS) 法により同定する。チロシン代謝関連酵素の中で変動の示されたものに着目し、イムノブロットング法から発現レベルの違いを複数のラット肝抽出タンパク質を用いて証明する。

(3) ヒト遺伝子多型と肝機能の関連解析

プロテオーム解析の結果、変動の示されたチロシン代謝関連酵素は肝機能と関連していることが予測される。即ち、それら酵素の

中で、機能 (活性) が不安定となる遺伝子多型を有するヒト集団と、標的遺伝子が野生型であるヒト集団の間には、肝機能に違いが見られることが推察される。

そこで、日本人一般集団を対象に実施されている疫学研究である、日本多施設共同コホート研究 (Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort (J-MICC) Study) のデータを用いて、チロシン代謝関連遺伝子の多型性と肝機能の関連について統計学的解析を実施する。

4. 研究成果

(1) 動物実験・プロテオーム解析

二次元電気泳動により分離した肝抽出タンパク質の内、チロシン代謝に関連のあるカテコール-O-メチル基転移酵素 (COMT) で、リン酸化型が増加し、脱リン酸化型が減少していた。

イムノブロットング法による詳細な解析から、四塩化炭素非投与群 (n=5) と投与群 (n=5) 間における、COMT 全体の検出強度、リン酸化型のみを検出強度、そして脱リン酸化型のみを検出強度を、それぞれ別々に unpaired *t*-test により比較した。その結果、COMT 全体の検出強度は、非投与群 (1.000 ± 0.091) と投与群 (1.001 ± 0.076) で有意差は示されなかった ($P=0.9924$)。しかしながらリン酸化型のみを検出強度は、非投与群 (1.000 ± 0.274) と投与群 (2.106 ± 0.836) で有意差が示された ($P=0.0390$)。一方脱リン酸化型のみを検出強度は、非投与群 (1.000 ± 0.148) と投与群 (0.718 ± 0.463) で有意差が示されなかった ($P=0.2528$)。5 匹の投与群の内、1 匹のみリン酸化型の増加 (脱リン酸化型の減少) の程度が低かったものの、全体としての COMT の総量は、四塩化炭素肝傷害により変化がなく、リン酸化型は増加し、脱リン酸化型は減少する傾向にあることが明らかとなった。

COMT はチロシン代謝においてカテコールアミンの代謝に関与する酵素である。カテコールには抗酸化作用があり、本研究の背景で既に明らかとなっている D-ドーパクロムトートメララーゼの増加と同様、肝傷害時に誘導される酸化ストレスを抑制する為の防御的な修飾 (酵素活性の変動、基質選択性の変化) である可能性が考えられた。

(2) COMT 遺伝子多型と肝機能

上記動物実験から、COMT が肝機能と関連していることが推察された。COMT 遺伝子多型の内、158 番目のアミノ酸がバリンからメチオニンになる rs4680 では、COMT が熱不安定性

となることが報告されている。そこで我々は日本人一般集団を対象に実施されているJ-MICC study のデータを用いて、COMT 遺伝子多型と肝機能の関連について評価を行った。

J-MICC Study は、がんをはじめとする生活習慣病における遺伝子 - 環境相互作用の解明を目的として、2005年に開始された。2008年度から遺伝子多型と生体指標/生活習慣との関連を検討するための横断研究が開始され、体質の解明に向けた取り組みが進められている。

本研究におけるCOMT遺伝子多型と肝機能の関連解明のため、横断研究実施対象者（35-69才）の内、欠損データ、肝がん・肝硬変を有する参加者、多重比較によりALT活性が他の地区よりも有意に高かった（あるいは低かった）2地区を除外した1,808人（男性:838人、女性:970人）の、肝機能（血清ALT活性: 30=< or <30 IU/L）とCOMT 遺伝子型（rs4680:Val158Met (G/A); GG, GA, and AA）の関連を、男女別に、年齢、BMI、飲酒、喫煙、調査地区、常用薬、B・C型肝炎ウイルス感染で調整した多重ロジスティック回帰分析により検討した。その結果、女性において、GG型（野生型）に対するAA型の調整済みオッズ比（95%CI）は、0.34(0.13-0.93)と有意に低値を示した。男性ではGA型とAA型いずれも有意差を示さなかった。男性を年齢階級別に層別化（35-44、45-54、55-69才）し解析を実施したところ、45-54才の集団でGG型に対するGA型の調整済みオッズ比（95%CI）は0.35(0.18-0.71)、AA型の調整済みオッズ比（95%CI）は0.22(0.07-0.72)と有意に低値を示した（Hiyoshi et al., *Gene* 2012）。

(3) まとめ

COMT遺伝子多型を有する日本人一般集団では、血清ALT活性を<30 IU/Lに保ちやすいことが示された。この結果から、COMT遺伝子多型を有することが肝機能を正常に保ちやすくすると考えられた。

今回の研究により、動物モデルを用いた網羅的解析によるアプローチが、ヒトの体質を解明していく上で、標的となる分子を探索する良いシステムであると考えられた。今後さらに詳細な解析を進めることにより、代謝の中で関与するタンパク質の変動を網羅的に評価し、疾患と関わり深い分子の探索に努めていく予定である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計9件）

1. Kamemura, N., Tada, H., Shimojo, N., Morita, Y., Kohno, Y., Ichioka, T., Suzuki, K., Kubota, K., Hiyoshi, M., and Kido, H. Intrauterine sensitization of allergen-specific IgE analyzed by a highly sensitive new allergen microarray. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, (2012)

doi:10.1016/j.jaci.2012.02.023 査読有

2. Uemura, H., Hiyoshi, M., Arisawa, K., Yamaguchi, M., Naito, M., Kawai, S., Hamajima, N., Matsuo, K., Taguchi, N., Takashima, N., Suzuki, S., Hirasada, K., Mikami, H., Ohnaka, K., Yoshikawa, A., Kubo M., and Tanaka, H. Gene variants in PPARGC1A are associated with timing of natural menopause in the general Japanese population. *Maturitas*, 71(4) 369-375 (2012),

doi:10.1016/j.maturitas.2011.12.021

査読有

3. Hiyoshi, M., Uemura, H., Arisawa, K., Nakamoto, M., Hishida, A., Okada, R., Matsuo, K., Kita, Y., Niimura, H., Kuriyama, N., Nanri, H., Ohnaka, K., Suzuki, S., Mikami, H., Kubo, M., Tanaka H., and Hamajima, N. for the J-MICC Study Group. Association between the catechol-O-methyltransferase (rs4680: Val158Met) polymorphism and serum alanine aminotransferase activity, *Gene*, 496(2) 97-102 (2012),

doi:10.1016/j.gene.2012.01.015 査読有

4. Kitayama, A., Arisawa, K., Uemura, H., Hiyoshi, M., Takami, H., Sawachika, F.,

Yamaguchi, M., Nakamoto, M., Hasegawa, M., Tanto, M., Shima, M., Sumiyoshi, Y., Morinaga, K., Kodama, K., Suzuki, T. I., Nagai, M., and Satoh, H. Correlations of fish intake and plasma docosahexaenoic acid levels with each congener of PCDDs/PCDFs/dioxin-like PCBs in blood from the Japanese population,

International Archives of Occupational and Environmental Health, 84(8) 927-935 (2011), doi:10.1007/s00420-011-0618-7 査読有

5. Suzuki, K., Hiyoshi, M., Tada, H., Bando, M., Ichioka, T., Kamemura, N., and Kido, H. Allergen diagnosis microarray with high-density immobilization capacity using diamond-like carbon-coated chips for profiling allergen-specific IgE and other immunoglobulins, Analytica chimica acta., 706(2) 321-327 (2011), doi:10.1016/j.aca.2011.08.034 査読有

6. Takeda, S., Fujimoto, A., Yamauchi, E., Hiyoshi, M., Kido, H., Watanabe, T., Kaibuchi, K., Ohta, T., and Konishi, H. Role of a tyrosine phosphorylation of SMG-9 in binding of SMG-9 to IQGAP and the NMD complex, Biochemical and Biophysical Research Communications, 410(1) 29-33 (2011), doi:10.1016/j.bbrc.2011.05.099 査読有

7. Wakai, K., Hamajima, N., Okada, R., Naito, M., Morita, E., Hishida, A., Kawai, S., Nishio, K., Yin, G., Asai, Y., Matsuo, K., Hosono, S., Ito, H., Watanabe, M., Kawase, T., Suzuki, T., Tajima, K., Tanaka, K., Higaki, Y., Hara, M., Imaizumi, T., Taguchi, N., Nakamura, K., Nanri, H., Sakamoto, T., Horita, M., Shinchi, K., Kita, Y., Turin, T. C., Rumana, N., Matsui,

K., Miura, K., Ueshima, H., Takashima, N., Nakamura, Y., Suzuki, S., Ando, R., Hosono, A., Imaeda, N., Shibata, K., Goto, C., Hattori, N., Fukatsu, M., Yamada, T., Tokudome, S., Takezaki, T., Niimura, H., Hirasada, K., Nakamura, A., Tatebo, M., Ogawa, S., Tsunematsu, N., Chiba, S., Mikami, H., Kono, S., Ohnaka, K., Takayanagi, R., Watanabe, Y., Ozaki, E., Shigeta, M., Kuriyama, N., Yoshikawa, A., Matsui, D., Watanabe, I., Inoue, K., Ozasa, K., Mitani, S., Arisawa, K., Uemura, H., Hiyoshi, M., Takami, H., Yamaguchi, M., Nakamoto, M., Takeda, H., Kubo, M., Tanaka, H. for the J-MICC Study Group. Profile of participants and genotype distributions of 108 polymorphisms in a cross-sectional study of associations of genotypes with lifestyle and clinical factors: a project in the Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort (J-MICC) Study, Journal of Epidemiology, 21(3) 223-235 (2011), doi:10.2188/jea.JE20100139 査読有

8. Arisawa, K., Uemura, H., Hiyoshi, M., Kitayama, A., Takami, H., Sawachika, F., Nishioka, Y., Hasegawa, M., Tanto, M., Satoh, H., Shima, M., Sumiyoshi, Y., Morinaga, K., Kodama, K., Suzuki, T. I., and Nagai, M. Dietary patterns and blood levels of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in 1656 Japanese individuals, Chemosphere, 82(5) 656-662 (2011), doi:10.1016/j.chemosphere.2010.11.008 査読有

9. Uemura, H., Arisawa, K., Hiyoshi, M., Dakeshita, S., Kitayama, A., Takami, H., Sawachika, F., Yamaguchi, M., and Sasai S. Congener-specific body burden levels and possible determinants of polybrominated

diphenyl ethers in the general Japanese population, Chemosphere, 79(7) 706-712 (2010),
doi:10.1016/j.chemosphere.2010.02.050
査読有

[学会発表] (計5件)

1. 日吉峰麗、矢野仁康、木戸博. インフルエンザ感染の重症化促進因子、血管内皮細胞の細胞間接着障害に与えるウイルス感染と解熱剤の障害促進効果の解析. 第84回日本生化学会大会 2011.9.21-24、国立京都国際会館 (京都市)
2. 日吉峰麗、上村浩一、山口美輪、中本真理子、武田英雄、高見栄喜、有澤孝吉、J-MICC Study Group. COMT 遺伝子多型と肝機能 -動物実験と日本多施設共同コホート研究- 第81回日本衛生学会学術総会 2011.3.25-28、昭和大学 (品川区)
3. 上村浩一、日吉峰麗、山口美輪、中本真理子、武田英雄、高見栄喜、北山淳、澤近房和、十田朋也、有澤孝吉. 血管脈派伝播速度と体格指標との関係についての検討 J-MICC Study 徳島地区のデータより. 第56回四国公衆衛生学会・研究発表会 2011.2.4、アルファあなぶきホール (高松市)
4. 上村浩一、日吉峰麗、山口美輪、中本真理子、武田英雄、嵩下賢、高見栄喜、北山淳、澤近房和、十田朋也、有澤孝吉、J-MICC Study Group. ADIPOQ および ADRB3 遺伝子多型が自然閉経年齢に及ぼす影響についての検討. 第21回日本疫学会学術総会 2011.1.22、北海道立道民活動センター かでる 2.7 (札幌市)
5. 上村浩一、日吉峰麗、北山淳、高見栄喜、澤近房和、山口美輪、嵩下賢、有澤孝吉. 日本の一般住民におけるポリ臭素化ジフェニルエーテルの蓄積状況についての検討 第80回日本衛生学会・学術総会 2010.5.9-11、仙台国際センター (仙台市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日吉 峰麗 (HIYOSHI MINEYOSHI)
徳島大学・疾患酵素学研究センター・学術
研究員
研究者番号：30366162

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：