

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 30 日現在

機関番号：32666  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2012～2014  
 課題番号：24590393  
 研究課題名(和文) XOR変異マウスを用いたスーパーオキシドが個体に及ぼす長期的、全身的影響の検証  
  
 研究課題名(英文) Systemic and long term analysis of O2- hyperproduction mice  
  
 研究代表者  
 岡本 研 (Okamoto, Ken)  
  
 日本医科大学・医学部・准教授  
  
 研究者番号：60267143  
  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：心肺停止状態を模倣した重度の全脳虚血再灌流モデルマウスの脳神経細胞ダメージをキサンチン酸化還元酵素阻害剤が軽減させ得るか評価した。キサンチン酸化還元酵素阻害剤は阻害機構の異なるアロプリノールとフェブキソスタットを用いて比較した。マウス両総頸動脈および脳底動脈を14分間閉塞させた後に血液再灌流し、4日後に海馬 CA1、CA2 領域の残存神経細胞数を計測したところ、未手術群と比較して顕著な神経細胞の減少を確認できた。しかしアロプリノールとフェブキソスタット共に海馬神経細胞の脱落を抑える事はできなかった。また、XORによる活性酸素生成の分子機構を解析し、それについての原著論文、総説の発表を行った。

研究成果の概要(英文)：Xanthine oxidoreductase (XOR) inhibitors are reported to protect tissues from damage caused by reactive oxygen species (ROS) by inhibiting its production through XOR inhibition. We analyzed the effects of inhibitors in decreasing global severe cerebral I/R damage in mice. Mice were divided into three groups: a placebo group, an allopurinol group, and a febuxostat group. Each group was performed pathological examination on the CA1 and CA2 regions of the hippocampus 4 days after I/R surgery, which revealed that the number of neuronal cells decreased in the 14-min occlusion model in both regions but the drugs administered to prevent this damage were not effective. One of the reasons for the less effectiveness of XOR inhibitors to control severe whole brain ischemia in mouse model is due to the low levels of expression of XOR in the mouse brain. We analyzed molecular mechanism of ROS production by XOR using C-terminal deleted mutant, and published the result as an original article.

研究分野：生化学

キーワード：キサンチン酸化還元酵素 活性酸素 虚血再灌流障害 抗痛風薬 全脳虚血 キサンチン酸化酵素 キサンチン脱水素酵素

## 1. 研究開始当初の背景

キサンチン酸化還元酵素 (XOR) は分子量 30 万の巨大蛋白質であり、モノマーあたり 1 個のモリブドプテリン、2 個の [2Fe-2S]、1 個の FAD を補酵素にもつ。体内はプリン分解系路の最終 2 段階を触媒し、ヒポキサンチンの 2 位炭素原子を水酸化してキサンチンに、さらにキサンチンを水酸化して尿酸に代謝する。生成物である尿酸が体内に蓄積した場合に痛風、高尿酸血症を発症することがあるため、XOR 阻害剤は抗高尿酸血症薬、抗痛風薬として医学的に重要な化合物である。申請者は XOR の構造生物学的研究を行ってきた。また、新規に開発された阻害剤数種類と従来から痛風治療に使われているアロプリノールについて、阻害機構を酵素学的、分光学的、構造生物学的アプローチから研究してきた。

XOR は通常の組織では電子の受容体として NAD<sup>+</sup>を用いるキサンチン脱水素酵素 (XDH) として存在するが、障害された組織や乳汁中では酸素分子を電子の受容体として、O<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を産生するキサンチン酸化酵素 (XO) へと変換することが知られている。このとき生じる活性酸素が虚血再灌流障害、慢性心疾患、糖尿病を始めとする様々な病態の原因となるという数多くの報告がある。申請者を含む研究グループは変異酵素の酵素学的、構造生物学的解析により、脱水素酵素から酸化酵素への活性変換の分子機構を決定した。その結果によると、変換は分子内ジスルフィド結合の形成により可逆的に、ドメイン間リンカーの切断により不可逆的に引き起こされる。リンカーの位置の移動は FAD 近傍に存在するカチオン - 相互作用によるアミノ酸クラスターを開裂させ、FAD 近傍の構造変化を引き起こす。その結果、NAD<sup>+</sup>が結合するチャンネルは消失し、かわりに酸素分子のゲートが作られる (図 1 右)。このクラスター

を構成するアミノ酸 W335 を変異させたウシ、ラット酵素では脱水素酵素、酸化酵素の活性変換はおこらず、常に XO 活性を示した(1)。さらに一連の研究の過程で、FAD 周囲のアミノ酸残基が基質結合ポケットの形成だけでなく、FAD の酸素分子に対する反応性を制御していることが判明した。野生型 XO では H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 優位に生成され、O<sub>2</sub><sup>-</sup> は 15 ~ 20% 程度しか産生されないのに対し、FAD のイソアロキサジン環とスタックする F336 をロイシンに変異させた場合、O<sub>2</sub><sup>-</sup> が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の 6 倍程度優位に産生される事が判明した。

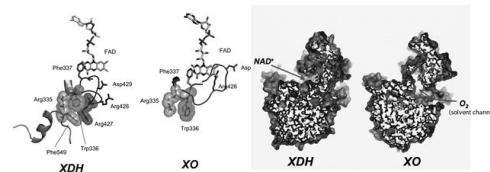


図 1 左 ; XDH、XO の FAD 近傍のアミノ酸クラスターの変化 右 ; XDH、XO での FAD 近傍溶媒チャンネルの変化

## 2. 研究の目的

O<sub>2</sub><sup>-</sup>超産生マウスを用い、以下の点に焦点を絞り研究をすすめた。O<sub>2</sub><sup>-</sup>に特異的なストレス状態での長期的、全身的影響を観察し、応答機構の生化学的手法での解明につなげる。新規 XOR 阻害剤の O<sub>2</sub><sup>-</sup>により発症する疾患、病態に対する防護作用を検証する。

活性酸素の病的意義を探る研究は数多くなされているが、多くの実験系において生成される活性酸素種は一様ではない。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と O<sub>2</sub><sup>-</sup>はそれぞれ、化学的反応性、生体における生成系、消去系が異なり、区別して研究を行う必要がある。本研究においては変異酵素 (W338A/F339L) が生成する活性酸素種は O<sub>2</sub><sup>-</sup>がほとんどであり、O<sub>2</sub><sup>-</sup>の影響を特異的に観察できる。また、遺伝子改変マウスを作成したことで、長期的、全身的影響の網羅的観察が可能となった。活性酸素を生成する試薬の投与では困難である寿

命、生殖・授乳、老化、慢性疾患、発がん  
に与える長期的影響の観察を行うことがで  
きる。

### 3. 研究の方法

活性酸素超産生マウスは5代に渡る継代  
を行ない、成長曲線、寿命を始めとして、  
肉眼的なフェノタイプを観察する。さらに  
遺伝子改変マウスに負荷（運動、高プリン  
食、臓器の動脈結紮と再灌流）を与える、  
あるいは消去系を抑制する(SODの阻害剤  
やRNAi)ことで、結果がさらに明確にな  
ることを期待している。虚血再灌流障害を  
始めとする病態の検証を行う場合、XORの  
阻害剤投与の有無を比較することで、XOR  
由来の活性酸素の影響を議論できる。この  
ような状況で用いられてきた阻害剤はアロ  
プリノールであった。しかしアロプリノール  
の性質から、XOR由来の活性酸素の影響  
の評価には問題があるため、XOR阻害剤フ  
ェブゾスタット、トピロキソスタットを用  
いた。これら阻害剤はアロプリノールの持  
つ実験試薬としての欠点を持っていない  
(2)。両化合物はすでに痛風治療薬とし  
て認可を受け、臨床で使用されているので、  
酸化ストレスに対する防護効果が確認され  
た際には、速やかな臨床へのフィードバッ  
クが期待できる。現在はマウス慢性腎不全  
モデル、全脳虚血モデルを作成し、マウス  
にストレスを加える事で、活性酸素過剰産  
生マウスのプリン代謝物の変動、抗痛風剤  
投与による影響、組織病理学的解析、メタ  
ボローム解析による代謝産物の網羅的変動  
追跡を行ない、活性酸素過剰産生の影響を  
観察する。

野生型 XOR をノックアウトし、 $O_2$ 超  
産生変異酵素(W338A/F339L)によって置  
換されたトランスジェニックマウス  
(wt-knockout / mutant-knockin  
(XO-01))について、誕生するマウスの数、  
性差、発育曲線、寿命、形態の変化等を観

察していく。動物の飼育と管理は連携研究  
者である草野が行う。正常マウスとの間に  
何らかの差が認められた場合、適宜サクリ  
ファイスし、各臓器での XOR 発現量の差、  
酸化ストレスマーカーと考えられている酵  
素群、抗酸化作用に働く転写因子 NF- $\kappa$ B  
の発現量を RT-PCR により臓器ごとに観察  
する。

虚血再灌流障害は XOR 由来の活性酸素  
が原因であるとする多くの報告がある。モ  
デルとして、腎、脳の栄養動脈の阻血を行  
い、輸入動脈を結紮し、適当な虚血時間  
後に開放、再灌流状態とした。脳の場合  
は頸動脈、椎骨動脈ともに、顕微鏡的手術  
によるクリッピングにて阻血する。手術操  
作は連携研究者である草野と脳神経外科医、  
腎臓内科医でもある本学大学院生たちが行  
った。 $O_2$ 消去系を抑制するため SOD1 ノ  
ックアウトマウスとの掛け合わせを行っ  
ており、系統の確立を目指す。

### 4. 研究の成果

本申請において、申請者らのグループは  
天然型 XOR をノックアウトし、代わりに  
スーパーオキシド超産生変異酵素  
(W338A/F339L、上記したラット酵素にお  
ける W335A/F336L に相当)によって置換  
されたトランスジェニックマウスを完成さ  
せた。変異酵素遺伝子を持つホモのマウス  
は腎不全を起こすことなく生存でき、プリ  
ン排泄経路が正常に働いていることが確認  
された。さらに繁殖も可能であることを確  
認している。遺伝子改変マウスの臓器ご  
との XOR の mRNA 量のパターンは野生  
型と同様であった。正常マウス肝ホモジ  
ュネートにおける XOR 活性は XDH/XO 比  
が 11 と、XHD 優位を示したのに対し、  
変異ホモマウスでは XO 活性が 100% であ  
った。肝より精製した酵素における代謝回  
転中の  $O_2$  産生量は野生型酵素の 4 倍であ  
った。これ

らの結果から、適正に O<sub>2</sub> 超産生ノックインマウスが当初の設計通りに発現している事が確認されている。長期飼育による表現型の差が明らかでない場合もありうるので、代謝的負荷または病的ストレスを掛ける事によって、それぞれの系に於ける差異を検討した。XOR の基質となるプリン(イノシン)をゾンデ投与にて負荷することにより、XOR による O<sub>2</sub> 産生量を増加させ、変化を観察した。現在イノシンとフェブリクの併用による代謝変動と抗酸化ストレス応答を観察している。

マウス全脳虚血モデルにおいて、酸化ストレスを受けた結果として生じるニトロシルチロシン化したタンパク質の検出を抗体を用いた手法により検出し、定量した。また過酸化脂質の指標として 4 HNE の検出を行い、全脳虚血後再灌流をおこなったマウスで上記酸化ストレスマーカーが経時的に増加し、96 時間でピークに達することが確認できた(論文投稿中)。またアロプリノール投与群と非投与群との間で、海馬 CA1 領域の神経細胞脱落数に変化が認められた(4)。

申請者は長年にわたり XOR 阻害剤の阻害機構を酵素学的、構造生物学的に研究してきた。この一連の研究結果から、40 年にわたり臨床的に使用されている XOR 阻害剤アロプリノールと昨年から我が国の臨床で使用されはじめた新世代の XOR 阻害剤フェブキシスタットでは性質に大きな差がある事がわかった。アロプリノール、およびその水酸化物オキシプリノールは基質であるヒポキサンチン、キサンチンの異性体である(図 2)。アロプリノールを活性酸素防護目的で使用する場合、以下の点で問題がある。オキシプリノールは活性中心のモリブデン原子と反応中間体類似体を形成し阻害を及ぼすが、酵素の酸化に伴い解離する(生体内での半減期約 2,3 時間)。

プリン体に構造が類似しているため、他の核酸代謝酵素の阻害剤や基質となる。アロプリノール、オキシプリノールは HGPRTase や、orotate phosphoribosyltransferase の基質となりヌクレオチド、ヌクレシド誘導体を生成し、これらの化合物が種々のプリン、ピリミジン代謝酵素を阻害する(2, 3, 5)。さらにプリンサルベージ回路の律速となる PRPP を消費するので、同代謝経路を阻害し、組織障害を促進する可能性がある。アロプリノール自体が強力なラジカルスカベンジャーとして作用する。一方プリン骨格を持たないフェブキシスタット(図 2)はアロプリノールより強力な XOR 阻害作用を持つ上に、酵素が分解されるまで、安定して結合する。他の核酸代謝酵素への影響は報告されていない。ラジカルスカベンジャー作用がない、など利点が多い。全脳虚血再灌流マウスに対して、アロプリノール、フェブリク投与により改善が認められた。組織保護作用はアロプリノールの方が強く、尿酸値低下作用は両阻害剤とも大きな差がないことと合わせて考えると、アロプリノールの化学構造が持つラジカルスカベンジャーとしての性質が影響を与えていると考えられた。これらの成果は論文としてまとめられ、現在投稿中である。

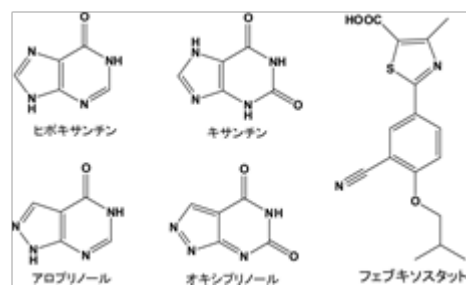


図 2 左上段; XOR の天然基質(ヒポキサンチン、キサンチン)、左下段; その異性体である阻害剤(アロプリノール、オキシプリノール)、右; 新規阻害剤フェブキシスタット

また XOR による活性酸素産生機構と、活性酸素産生型への構造変化の機構を解析し、XOR の C 末端が D/O 変換を制御していることを解明し、論文を出版した(1)

#### 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5件)

FEBS J. 2015 Mar 26. doi: 10.1111/febs.13277. [Epub ahead of print] The C-terminal peptide plays a role in the formation of an intermediate form during the transition between xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase.

Nishino T1, Okamoto K, Kawaguchi Y, Matsumura T, Eger BT, Pai EF, Nishino T. J Biol Inorg Chem. 2015 Mar;20(2):195-207. doi: 10.1007/s00775-014-1210-x. Epub 2014 Dec 12.

Mechanistic insights into xanthine oxidoreductase from development studies of candidate drugs to treat hyperuricemia and gout.

Nishino T1, Okamoto K.

Neurol Med Chir (Tokyo). 2015;55(1):77-85. doi: 10.2176/nmc.0a.2013-0307. Epub 2014 Dec 20.

Evaluation of neuronal protective effects of xanthine oxidoreductase inhibitors on severe whole-brain ischemia in mouse model and analysis of xanthine oxidoreductase activity in the mouse brain.

Suzuki G1, Okamoto K, Kusano T, Matsuda Y, Fuse A, Yokota H.

Nishino T, Okamoto K, Eger B T, Pai E F (分担): The xanthine oxidoreductase enzyme family: xanthine dehydrogenase, xanthine oxidase, and aldehyde oxidase. Hand book of flavoproteins Volume 2 (Hille R, Miller S M, Palfey B editors) p103-124, de Gruyter, Germany, 2013

[学会発表](計5件)

19. 岡本研, 菊地浩人, 藤崎弘士, 古田忠臣, 西野武士: 抗痛風薬フェブキソスタットとキサンチン酸化還元酵素との相互作用の解析. 第85回日本生化学会大会, 福岡, 2012.12

20. 鈴木剛, 布施明, 横田裕行, 松村智裕, 岡本研, 草野輝男, 内藤善哉, 石渡俊行, 松田陽子, 西野武士: 3 vessel occlusion model を用いたマウスの脳虚血再還流障害の解析. 第27回日本 Shock 学会総会, 東京, 2012.5

21. 鈴木剛, 布施明, 横田裕行, 松村智裕, 岡本研, 草野輝男, 内藤善哉, 石渡俊行, 松田陽子, 西野武士: 脳虚血再灌流障害におけるキサンチン酸化還元酵素阻害薬の神経細胞保護効果の検討. 第71回日本脳神

経外科学会学術総会, 大阪, 2012.10

22. 鈴木剛, 布施明, 横田裕行, 松村智裕, 岡本研, 草野輝男, 内藤善哉, 石渡俊行, 松田陽子, 西野武士: キサンチン酸化還元阻害薬と 3-vessel occlusion model を用いたマウスの脳虚血再灌流障害の解析. 第40回日本救急医学会総会, 京都, 2012.11

19. Okamoto K, Kikuchi H, Fujisaki H, Furuta T, Leimkühler S, Nishino T: Molecular Dynamics and Free Energy Analysis of Xanthine Oxidoreductase-Ligand Interactions. 2013 Molybdenum & Tungsten Enzymes Conference, Sintra, Portugal, 2013.7

[図書](計1件)

Okamoto K, Kondo S, Nishino T. (分担): A new-generation uric acid production inhibitor: Febuxostat. Analogue-based Drug Discovery III from IUPAC (International union of pure and applied chemistry) (Fischer J, Ganellin CR, Rotella DP editors) p356-367. Wiley-VCH, Germany, 2012

[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:

出願年月日:

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

岡本 研 ( OKAMOTO, Ken )

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 60267143

##### (2) 研究分担者

草野 輝男 ( KUSANO, Teruo )

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号: 30434129

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：