

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間： 2007 ~ 2008

課題番号：19790134

研究課題名 (和文) フラビン含有酸素添加酵素の女性性周期に伴う活性の変動

研究課題名 (英文) Interindividual variations of flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) related to menstruation

研究代表者

清水 万紀子 (SHIMIZU MAKIKO)

昭和薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：90307075

研究成果の概要：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酸化的代謝に関わる 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 の個人間およ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。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：FMO3, trimethylaminuria, genetic polymorphism, Japanese, menstruation

## 1. 研究開始当初の背景

薬物代謝酵素フラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO) は生体異物の第一相代謝反応において、チトクローム P450 について重要な役割を果たしている。ヒト成人肝 FMO の主要分子種は FMO3 である。FMO3 はヒト肝に多く存在する CYP3A4 の平均含量の約半分の発現量を示し、発現量が非常に多い酵素である。この FMO3 は、臨床に用いられているオランザピン、ラニチジンなどの含窒素医薬品、シメチジン、スリンダクなどの含硫黄医薬品、ニコチン、あるいは食品由来トリメ

チルアミン等の幅広い化学物質の N-および S-酸化反応を触媒する。FMO3 は従来酵素誘導されにくいと考えられてきたが、ヒト肝のタンパク含量や酵素活性に約数十倍におよぶ大きな個人差が確認されている。FMO3 の機能低下は、トリメチルアミンの酸化的代謝 (無臭化) が不十分であり、汗、尿、呼気などが悪臭を放つトリメチルアミン尿症 (魚臭症候群) の原因とされている。この FMO3 の機能低下の一因として、欧米では遺伝子多型が挙げられる。応募者は、自己申告によりトリメチルアミン尿症が疑われる被験者よ

り日本人特有の *FMO3* 遺伝子変異を見出した (Shimizu et al., Drug Metab Pharmacokinet, 21: 245-247, 2006)。トリメチルアミン尿症の欧米人女性1例において、月経期間中にトリメチルアミンの酸化代謝が低下することが報告されている (Lancet, 348: 1740-1741, 1996)。一方、欧米人女性の妊娠期間中に *in vivo* の *FMO3* 活性の指標としてニコチン N'-酸化酵素活性が上昇することが報告されている (Br J Clin Pharmacol, 60: 224-226, 2005)が情報は少ない。日本人ではトリメチルアミン尿症の女性(2例)において月経直前に *in vivo* の *FMO3* 活性の低下が観察されている (Yamazaki et al., Life Sci, 74: 2739-2747, 2004)が、健常成人女性の情報は無い。

## 2. 研究の目的

生体成分および医薬品の代謝に重要な *FMO3* の日本人の個人差、特に、女性の日間変動の原因として、生体内のホルモンの影響および *FMO3* 遺伝子上流領域の遺伝子多型を解明することを目的に、ヒトを用いた *in vivo* 研究を行う。さらに、5'-上流領域の転写調節を明らかにするため、*in vitro* 研究を行い、*FMO3* の発現に対する女性ホルモンの影響を検討する。また病態時や、典型的な食品・医薬品などの外来異物による *FMO3* の機能修飾についても期間内に明らかにする。

## 3. 研究の方法

体臭を訴える日本人被験者の *FMO3* 代謝効率および *FMO3* 遺伝子の解析から、本疾患の原因となり得る *FMO3* 遺伝子変異の探索、それらの頻度解析および機能解析をおこなうことにより、日本人における *FMO3* 遺伝的多型に伴う質的変動について解析した。さらに、自己申告トリメチルアミン尿症被験者および健常成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。日本人の肝試料を用い、*FMO3* の酵素機能および発現量の個人差について検討を行った。肝 *FMO3* 酵素機能の個人差について、一酸化窒素による翻訳後修飾の検討を行った。また、ヒト肝における *FMO3* mRNA 発現量に着目し、*FMO3* 遺伝子多型および核内転写発現量との関係を検討することにより、ヒト肝 *FMO3* 発現量の変動要因を探索した。

## 4. 研究成果

(1)日本人において見出されたフラビン含有モノオキシゲナーゼ3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。本疾患の原因の一つとして *FMO3* 遺伝子変異に伴う *FMO3* 酵素機能低下が報告され

ている。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* 遺伝子の変異の探索し、変異体 *FMO3* の触媒機能の解析を行った。

自己申告により体臭を訴える日本人被験者365名およ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。*FMO3* 代謝効率は、尿中に排泄されたトリメチルアミンおよ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。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およびArg500Stopが見出された。これらの新規 *FMO3* 遺伝子変異を詳細に解析し *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。これらのハプロタイプのうち野生型、[Glu158Lys; Glu308Gly] および Val257Met は欧米、アジアにおいて共通に見出されるハプロタイプであり、本集団において野生型と共通変異の頻度はそれぞれ約60%および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、野生型および各種変異型 *FMO3* のリコンビナント酵素を複製し、トリメチルアミン N-酸化酵素活性を評価した。その結果、日本人において新たに見出した [Glu158Lys; Thr201Lys; Glu308Gly] および [Val257Met; Met260Val] 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。さらに終止コドンを伴う変異型 *FMO3* は、酸化酵素活性を示さなかった。頻度の高い [Glu158Lys; Glu308Gly] および 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、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一因となり得ることが示唆された。

(2) フラビン含有モノオキシゲナーゼ3の個人間変動の質的および量的要因について

FM03 は臨床に用いられている含窒素および含硫黄医薬品、あるいは環境および食品由来の化学物質の N-および S-酸化反応を触媒する。外来異物などによる FM03 の酵素誘導は報告されていないが、肝における酵素活性および含量には個人差が存在する。そこで、日本人肝における FM03 発現量の個人差を検討した。健常日本人個別肝試料を用いて、FM03 含量、薬物酸化酵素活性および FM03 mRNA 発現量を測定した。日本人肝ミクロゾームの FM03 含量およびベンジダミン N-酸化酵素活性にはそれぞれ約 40 および 30 倍の個人差が認められた。FM03 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 FM03 含量は相関が認められた ( $r^2 = 0.75$ ,  $p < 0.0001$ ,  $n = 16$ , Fig. 4)。ヒト肝 FM03 mRNA 量と FM03 含量にも有意な相関性が認められた ( $r^2 = 0.55$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 16$ )。肝 FM03 発現量の個人差の要因として FM03 遺伝子のコーディングおよび 5'-上流領域の遺伝子変異の影響を検討したが、統計学的に明らかではなかった。FM03 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。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 FM03 遺伝子 5'-上流領域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。ヒト FM03 ハプロタイプのコーディング領域が野生型のハプロタイプに着目すると、ハプロタイプ 1 - 4 に分類された。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。これらの結果から、量的な変動をもたらす要因の一つとして、FM03 の 5'-上流領域の変異が示唆された。さらに、FM03 mRNA 量は、核内転写因子である HNF-4 $\alpha$  および 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かつとも高値を示した。以上のことから、日本人肝における FM03 の量的変動の個人差は、HNF-4 $\alpha$  および 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。女性において、自己申告トリメチルアミン尿症被験者および健常成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、FM03 酵素活性に対するホルモンの影響が推察された。FM03 遺伝子の Arg500Stop 変異をホモ接合体で有していた被験者の尿中トリメチルアミンは、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とおして、FM03 代謝効率が 40% 以下であった。FM03

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 FM03 代謝効率が 40% 以下を示した。一方、健常成人女性では FM03 遺伝子型が野生型ホモ接合体および [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、FM03 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 FM03 代謝活性の個人内変動が推察された。

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 FM03 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酸化的代謝に関わる FM03 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 FM03 遺伝子変異の影響を受けていることが明らかとなった。FM03 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、FM03 の個人間およ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、FM03 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。

## 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 15 件)

- Nagashima, S., Shimizu, M., Yano, H., Murayama, N., Kumai, T., Kobayashi, S., Guengerich, F.P., and Yamazaki, H. Inter-individual variations of flavin-containing monooxygenase 3 in livers from Japanese: correlation with hepatic transcription factors. *Drug Metab. Pharmacokin.*, in press. 査読有
- Okada, Y., Murayama, N., Yanagida, C., Shimizu, M., Guengerich, F.P., and Yamazaki, H. Drug interactions of thalidomide with midazolam and cyclosporine A: heterotropic cooperativity of human cytochrome P450 3A5. *Drug Metab. Dispos.*, 37:18-23, 2009. 査読有
- Suzuki, Y., Tanaka, K., Negishi, D., Shimizu, M., Murayama, N., Hashimoto, T. and Yamazaki, H. Increased distribution of carboplatin, an anti-cancer agent, to rat brains with aid of hyperbaric oxygenation.

Xenobiotica, 38: 1471-1475, 2008. 査読有  
Yamazaki, H., Shimizu, M., Murayama, N., Tanaka, K., Nion, S., and Cecchelli, R. Increased transendothelial permeability of anti-cancer agent carboplatin with aid of hyperbaric oxygenation. Xenobiotica, 38, 1298-1304, 2008. 査読有  
Shimizu, M., Murayama, N., Nagashima, S., Fujieda, M. and Yamazaki, H. Complex mechanism underlying transcriptional control of the haplotyped flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) gene in Japanese: Different regulation between mutations in 5'-upstream distal region and common element in proximal region. Drug Metab. Pharmacokinet., 23: 54-58, 2008. 査読有  
Murayama, N., Minoshima, M., Shimizu, M., Guengerich, F.P., and Yamazaki, H. Involvement of human cytochrome P450 2B6 in the 3- and 4-hydroxylation of the anesthetic agent propofol. Xenobiotica 37: 717-724, 2007. 査読有  
Allerston, C.K., Shimizu, M., Fujieda, M. Shephard, E.A. Yamazaki, H. and Phillips, I.R. Molecular evolution and balancing selection in the flavin-containing monooxygenase 3 gene (FMO3). Pharmacogenet.Genomics, 17: 827-839, 2007. 査読有  
Murayama, N., Imai, N., Nakane, T., Shimizu, M., and Yamazaki, H. Roles of CYP3A4 and CYP2C19 in methylhydroxylated and N-oxidized metabolite formation from voriconazole, a new anti-fungal agent, in human liver microsomes. Biochem.Pharmacol. 73, 2020-2026, 2007. 査読有  
Shimizu, M., Cashman, J.R. and Yamazaki, H.. Transient trimethylaminuria related to menstruation. BMC. Med. Genet. 8: 2, 2007. 査読有  
Shimizu, M., Yano, H., Nagashima, S., Murayama, N., Zhang, J., Cashman, J.R. and Yamazaki, H. Effect of genetic variants of the human flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) on N- and S-oxygenation activities. Drug Metab. Dispos. 35: 328-330. 査読有  
Shimizu, M., Matsumoto, Y., and Yamazaki, H. Effects of propofol analogs on glucuronidation of propofol, an anesthetic drug, by human liver

microsomes. Drug Metab.Lett. 1: 77-79, 2007. 査読有

Shimizu, M., Tomioka, S., Murayama, N., and Yamazaki, H. Missense and Nonsense Mutations of the Flavin-containing Monooxygenase 3 Gene in a Japanese Cohort, Drug Metab.Pharmacokinet. 22: 61-64, 2007. 査読有

Yamazaki, H., Fujita, H., Gunji, T., Zhang, Z., Kamataki, T., Cashman, J.R., Shimizu, M. Stop codon mutations in the flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) gene responsible for trimethylaminuria in a Japanese population. Mol. Genet. Metab. 90: 58-63, 2007. 査読有

Yamazaki H., and Shimizu, M. Genetic polymorphism of the flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) associated with trimethylaminuria (fish odor syndrome): Observations from Japanese patients, Current Drug Metabolism, 8: 487-491, 2007. 査読有

山崎浩史, 清水万紀子, トリメチルアミン尿症(魚臭症候群)に関わる薬物酸化酵素フラビン含有モノオキシゲナーゼ3のゲノム薬理学, 臨床薬理, 40, 55S-56S, 2009. 査読無

〔学会発表〕(計13件)

清水万紀子, 永島里美, 村山典恵, 山崎浩史: 日本人のフラビン含有モノオキシゲナーゼ3(FMO3)ハプロタイプの解析, 日本薬学会第129回年会(京都)平成21年3月

永島里美, 清水万紀子, 村山典恵, 山崎浩史: フラビン含有モノオキシゲナーゼ3変異酵素の医薬品参加酵素活性, 日本薬学会第129回年会(京都)平成21年3月

Makiko Shimizu, Satomi Nagashima, Norie Murayama, Hiroshi Yamazaki: Expression levels and catalytic activities of flavin-containing monooxygenase 3 in Japanese and Caucasian livers, International Society for the Study of Xenobiotics 15th North American Regional Meeting(San Diego)平成20年10月

Makiko Shimizu, Satomi Nagashima, Norie Murayama, Hiroshi Yamazaki: Individual Difference of Flavin-Containing Monooxygenase3 in Human Livers, 23rd JSSX Annual Meeting(kumamoto)平成20年10月

永島里美, 清水万紀子, 矢野裕士, 村山典恵, 山崎浩史: ヒト肝フラビン含有モ

ノオキシゲナーゼ3発現に影響する因子の解析, 医療薬学フォーラム 2008, 第16回クリニカルファーマシーシンポジウム 平成20年7月

清水万紀子、野村里香、小園真里恵、永島里美、村山典恵、山崎浩史：トリメチルアミン尿症が疑われる日本人の対症療法の検討、医療薬学フォーラム2008, 第16回クリニカルファーマシーシンポジウム 平成20年7月

Makiko Shimizu, Norie Murayama, Satomi Nagashima, Masaki Fujieda, and Hiroshi Yamazaki: Analysis of Suppression and activation of the haplotyped flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) Gene Transcriptions in Japanese, 2nd Asia Pacific ISSX Meeting 2008 (Shanghai, China) 平成20年5月

清水万紀子、永島里美、村山典恵、山崎浩史：レポーターアッセイを用いたヒト FMO3 遺伝子の転写調節機構の解析、日本薬学会第127回年会(横浜) 平成20年3月

永島里美、清水万紀子、矢野裕士、村山典恵、山崎浩史：ヒト肝におけるフラビン含有モノオキシゲナーゼ3発現量の個人差の解析、日本薬学会第127回年会(横浜) 平成20年3月

Satomi Nagashima, Makiko Shimizu, Hiroshi Yano, Norie Murayama, and Hiroshi Yamazaki : Catalytic activities of the flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) variants found in Japanese., Pan-Pacific International Partnership Conference on Pharmaceutical and Life Sciences, (Nagoya) 平成20年2月

山崎浩史、清水万紀子、永島里美、村山典恵：薬物代謝酵素フラビン含有モノオキシゲナーゼがもたらすアミン化合物酸化代謝の個人差に関する臨床薬理学研、28回日本臨床薬理学会年会(栃木) 平成19年11月

Makiko Shimizu, Satomi Nagashima, Norie Murayama and Hiroshi Yamazaki : Genetic Polymorphism of the Flavin-Containing Monooxygenase 3 (FMO3) Associated with Trimethylaminuria in a Japanese Cohort, 22nd JSSX/ 8th ISSX meeting (Sendai) 平成19年10月

Satomi Nagashima, Makiko Shimizu, Hiroshi Yano, Norie Murayama, and Hiroshi Yamazaki : Oxygenation Activities of the Flavin-Containing Monooxygenase 3 (FMO3) Variants Found

in Japanese, 22nd JSSX/ 8th ISSX meeting (Sendai) 平成19年10月

〔図書〕(計1件)

山崎浩史、清水万紀子、永島里美、村山典恵、薬物代謝酵素フラビン含有モノオキシゲナーゼがもたらすアミン化合物酸化代謝の個人差に関する研究、「臨床薬理の進歩 No.29」, 臨床薬理研究振興財団、29, 186-191, 2008

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 万紀子 (SHIMIZU MAKIKO)

昭和薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：90307075

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：