

機関番号：32666
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2008～2010
課題番号：20590317
研究課題名(和文) スーパーオキシド超産生型 XOR 変異酵素ノックインマウスを用いた病態生化学的研究
研究課題名(英文) Phasogenesis study of XOR mutant knock-in mouse.

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

研究成果の概要(和文)：

本課題により、XOR スーパーオキシド超産生型ノックアウトマウス、脱水素酵素型に活性がロックし、酸化酵素型への変換がおこらない変異酵素の設計、作成、繁殖が完了した。スーパーオキシド超産生型ノックアウトマウスについては肝臓より変異酵素を精製し、スーパーオキシド超産生が起こっていることを確認した。現在はそれぞれの遺伝子改変マウスのフェノタイプを観察している。また臓器の病理組織の異常を検索している。

研究成果の概要(英文)：

We designed and constructed O₂⁻ hyperproduction XOR mutant knocked-in mouse which and dehydrogenase-type locked mutant knocked-in mouse. We propagated the starins. We purified mutant XOR from the knocked-in mutant mouse liver and confirmed the hyper production of superoxide anion. We are observing the phenotypes of the mutans and surveying pathological findings of organs.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|------------|------------|
| 2008年度 | 1,800,000円 | 540,000円 | 2,340,000円 |
| 2009年度 | 1,400,000円 | 420,000円 | 1,820,000円 |
| 2010年度 | 500,000円 | 150,000円 | 650,000円 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000円 | 1,110,000円 | 4,810,000円 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学・スーパーオキシド

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

キサンチン脱水素酵素は様々な病態で、酸素を基質とし、スーパーオキシドアニオンを産生するキサンチン酸化酵素に変換することがわかっている。しかし、その病的意義は諸説あるものの不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は常に酸化酵素活性を持ち、スーパーオキシドアニオンを特異的に産生する XOR 変異酵素を設計、作成し、ノックインマウスを作製し、解析することで、様々な病態、疾患における XOR の寄与を明らかにすることである。

3. 研究の方法

キサンチン脱水素酵素は、通常の生理的条件下ではNAD⁺を電子受容体とする脱水素酵素型(XDH型)として存在する。しかし哺乳類酵素ではCys535/Cys992, Cys1316/Cys1324のカップルがS-S結合を作る事で可逆的に酸素を電子受容体とする酸化酵素型(XO型)に変換し、活性酸素を生成する。変換機構上のスイッチ部分のアミノ酸Trp335,酸化還元電位を決定しているPhe336の2つのアミノ酸に変異をかけた常時酸化酵素型酵素(W335A/F336L)作成し、本変異酵素を置換したトランスジェニックマウス(XO-01)を作成する。

4. 研究成果

当初作成したトランスジェニックマウスは,Neo(+)-(XO-01)であったため、Cre-recombinaseマウスとmatingさせ、更に野生型マウスとmatingさせCricrecombinaseを除去し,Neo(-)マウスを得た。現在Neo(-)XO-01(+/-)を得ている。来年度はホモを作成する。またS-S結合を作らないように変異をかけたC535A/C992R/C1324S変異酵素は,XDH型として発現し,精製過程を経てもXDH型のままとどまる。このトランスジェニックマウス(xdh-02(+/+))マウスも対象実験用,および乳汁分泌機能検索用に今年度完成に向け実験を企画したが,ES細胞導入に困難を来たし,来年度に持ち越している,今年度は動物の準備に終始したが,今後はスーパーオキシド超産生トランスジェニックマウスを使って,寿命観察,発現酵素のスーパーオキシドの産生量の測定,各臓器由来の病理組織標本を作成し,蛍光抗体法等を駆使し発現部位を追跡する

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6件)

① Matsumoto K, Okamoto K, Ashizawa N, Nishino T. FYX-051: a novel and potent hybrid-type inhibitor of xanthine oxidoreductase. J Pharmacol Exp Ther. 2011 Jan;336(1):95-103.

② Okamoto K, Kawaguchi Y, Eger BT, Pai EF, Nishino T. Crystal Structures of

Urate Bound Form of Xanthine
Oxidoreductase: Substrate Orientation and
Structure of the Key Reaction
Intermediate. J Am Chem Soc. 2010 Nov 15.

- ③ Okamoto K, Nishino T. [Structure and mechanism of molybdenum hydroxylase]. [Article in Japanese]Seikagaku. 2008 Jun;80(6):531-9.
- ④ Okamoto K, Eger BT, Nishino T, Pai EF, Nishino T. Mechanism of inhibition of xanthine oxidoreductase by allopurinol: crystal structure of reduced bovine milk xanthine oxidoreductase bound with oxipurinol. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2008 Jun;27(6):888-93.
- ⑤ Nishino T, Okamoto K, Eger BT, Pai EF, Nishino T. Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. FEBS J. 2008 Jul;275(13):3278-89. Epub 2008 May 30.
- ⑥ Okamoto K, Nishino T. Crystal structures of mammalian xanthine oxidoreductase bound with various inhibitors: allopurinol, febuxostat, and FYX-051. J Nippon Med Sch. 2008 Feb;75(1):2-3.

[学会発表] (計6件)

主だったものを抜粋して記す

- ① Ken Okamoto, Yuko Kawaguchi, Teruo Kusano, Tomohiro Matsumura 1, Koji

Matsumoto, Takeshi Nishino 2011年
14th International Symposium on Purine
and Pyrimidine Metabolism in Man
Reaction mechanism and substrate
binding mode of xanthine
oxidoreductase.

- ② 西野 朋子 岡本 研、川口 裕子 キサンチン酸化還元酵素の基質結合様式と基質活性化機構 2009年 日本生化学会
- ③ 西野 朋子 岡本 研、川口 裕子 キサンチン脱水素酵素から酸化酵素に変換する際の遷移状態における構造変 2009年 蛋白質科学会
- ④ 松本浩二 岡本研 新規キサンチン酸化還元酵素阻害剤FYX-051の酵素学的、構造学的解析 2009年 日本生化学会
- ⑤ 岡本研 結晶構造から見たキサンチン酸化還元酵素阻害剤の阻害機構の解明 2008年 日本痛風核酸代謝学会学会賞受賞講演
- ⑥ 岡本研 キサンチン酸化還元酵素の基質結合様式と反応機構 キサンチン脱水素酵素/酸化酵素の変換における二量体構造の非 2008年 日本生化学会

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

松村 智裕 (MATSUMURA TOMOHIRO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：20297930

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：