

機関番号：32624

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790160

研究課題名(和文) 薬物酸化酵素の個人間および個人内変動に影響を及ぼす転写調節機構の解明

研究課題名(英文) Inter-individual variations of flavin-containing monooxygenase 3 levels associated with multiple regulation factors

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(和文)：

ヒト肝に発現するフラビン含有モノオキシゲナーゼ 3 (FMO3) は、含窒素、含硫黄医薬品、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。これらトリメチルアミン等の酸化的代謝に関わる FMO3 の個人間変動は複数の核内調節因子などの制御を受けていることが推察された。

研究成果の概要(英文)：

The flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) catalyzes the oxygenation of a wide variety of compounds containing sulfur or nitrogen atoms. FMO3 plays a role in processing some drugs, addictive chemical nicotine and diet-derived trimethylamine. Inter-individual variations of FMO3 are suggested to be co-regulated by trans-acting factors of *FMO3* gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

1. 研究開始当初の背景

ヒト肝に発現するフラビン含有モノオキシゲナーゼ 3(FMO3)は、含窒素、含硫黄医薬品、食品由来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 酵素機能の低下が原因となる疾患であるトリメチルアミン尿症に関する以下の研究を行ってきた。すなわち、日本人の自己申告トリメチルアミン尿症被験者 164 名の *FMO3* 遺伝子のコーディング領域の解析を行い、日本人特有の新規遺伝子変異を 8 種を見出し(Yamazaki and Shimizu, Current Drug Metabolism, 2007)、

日本人 22 名の *FMO3* 遺伝子の 5'-上流-3.4 kbp 領域に少なくともハプロタイプが 7 種存在することを進化論的解析から報告した (Allerston, Shimizu et al., Pharmacogenet. Genomics, 2007)。また、*FMO3* 遺伝子 5'-上流領域の変異が転写活性に影響を与えることおよび転写活性に関与する推定領域の一部を報告した (Shimizu et al., Drug Metab Pharmacokinet, 2008)。さらに、成人女性の表現型として、月経期間前後にトリメチルアミンの酸化的代謝が低下する個人内変動 (Shimizu, et al., BMC Med Genet,

2007) を明らかにしたが、その機構は明らかではない。一方で、欧米においても *FMO3* 遺伝子 5'-上流領域の変異および転写調節因子に関する報告 (Mol Pharmacol, 68:383-392, 2005, Biochem Pharmacol, 76:268-278, 2008)があるが、遺伝子変異の種類および頻度は日本人および欧米人では大きく異なり、着目した転写調節因子も異なっている。このように多様な個人間および個人内変動を示す *FMO3* の発現調節については研究が端緒についたばかりである。

2. 研究の目的

FMO3 の個人間および個人内変動の原因として、*FMO3* 遺伝子の転写調節機構を明らかにし、次いで表現型の変動に対処する方策を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

FMO3 タンパクの発現を調節する *FMO3* 遺伝子の発現調節領域の検討を行うため、日本人の肝試料を用い、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。

FMO3 発現量の低下あるいは機能不全の表現型の代表例は、尿中に未変化体のトリメチルアミンが大量に排泄されるトリメチルアミン尿症であることから、食品に含まれる総トリメチルアミン含量に着目し、食後尿中トリメチルアミン排泄率を健常人で検討した。

4. 研究成果

FMO3 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 *FMO3* 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 *FMO3* 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、*FMO3* 含量、薬物酸化酵素活性および *FMO3* mRNA 発現量を測定した。日本人肝ミクロゾームの *FMO3* 含量および *FMO3* の典型的基質である抗炎症薬ベンジダミン *N*-酸化酵素活性には約 30 - 40 倍の個人差が認められた。ベンジダミン *N*-酸化酵素活性と免疫学的に定量した *FMO3* 含量およびヒト肝 *FMO3* mRNA 量と *FMO3* 含量にも有意な相関が認められた。

次いで肝 *FMO3* 発現量の個人差の要因として *FMO3* 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。*FMO3* 遺伝子型はハプロタイプに基づき、ハプロタイプ 1 - 3 およびその他のハプロタ

イプの野生型ホモ接合体、ヘテロ接合体および変異型ホモ接合体に分類した。本研究で用いたサンプルの *FMO3* 発現量と *FMO3* 遺伝子型は統計学的に相関が認められなかった。さらに、欧米人で報告されている *FMO3* mRNA の選択的スプライシングについて検討した結果、本サンプルでは、選択的スプライシングは認められなかった。*FMO3* mRNA 量と核内転写因子である HNF-4 α および NF-YA mRNA 量との相関を調べた。そこで *FMO3* mRNA 量は、HNF-4 α 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ももっとも高値を示した。以上のことから、日本人肝における *FMO3* の量的変動の個人差は、HNF-4 α 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。

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。トリメチルアミン尿症患者は、一般的に食品由来のトリメチルアミン摂取を制限することにより、体臭に対処している。各種食品摂取後のトリメチルアミン尿中排泄量に関するイギリス人の報告があるが、日本人向け食品の情報は十分ではない。海産の魚はトリメチルアミンの前駆体として、トリメチルアミン *N*-酸化体を多く含むことが報告されている。そこで、日本人トリメチルアミン尿症患者の緩和療法となる食材を検討した。食品に含まれる総トリメチルアミン含量に着目し、食後尿中トリメチルアミン排泄率を検討した。対象とした食品は白米、カツオ、マグロおよびタラとした。これらの食品 200 g に含まれる総トリメチルアミン含量は白米に比較して海産の魚において高かった。3 種の魚に含まれる総トリメチルアミン含量はカツオに比較して、マグロおよびタラで 10 倍および 60 倍と大きな差が認められた。

引き続き、健常成人ボランティアに魚 200 g およびコントロールである白米 200 g を摂取させ、食後 8 時間の尿を蓄尿し、その尿中総トリメチルアミン量を測定した。尿中に排泄されるトリメチルアミン量は、摂取したトリメチルアミン量に伴い増加した。トリメチルアミン排泄率を比較した結果、カツオは約 90% であるのに対し、マグロおよびタラにおけるトリメチルアミン排泄率は約 40% であった。これらの結果から、高負荷食品であるマグロおよびタラをトリメチルアミン尿症患者が摂取した場合、摂取後 8 時間では体内に残存する未変化体トリメチルアミンによる特有の体臭が引き起こされる可能性が推察された。

以上、本研究によりトリメチルアミンの酸化的代謝に関わる *FMO3* の個人間変動は複

数の核内調節因子などの制御を受けていることがはじめて推察された。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ためには、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 6 件)

- ① 山崎浩史、清水万紀子、特異な体臭と代謝物分析：トリメチルアミン尿症を例として、*ぶんせき*, 430, 2010, 510-512. 査読有
- ② Taku Nagano, Makiko Shimizu, Kazuma Kiyotani, Tetsuya Kamataki, Ryohji Takano, Norie Murayama, Fumiaki Shono and Hiroshi Yamazaki, Biomonitoring of urinary cotinine concentrations associated with plasma levels of nicotine metabolites after daily cigarette smoking in a male Japanese population. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 7, 2010, 2953-2964. 査読有
- ③ Hiroshi Yamazaki, Kana Horiuchi, Ryohji Takano, Taku Nagano, Makiko Shimizu, Masato Kitajima, Norie Murayama and Fumiaki Shono, Human blood concentrations of cotinine, a biomonitoring marker for tobacco smoke, extrapolated from nicotine metabolism in rats and humans and physiologically based pharmacokinetic modeling. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 7, 2010, 3406-3421. 査読有
- ④ Makiko Shimizu, Marie Kozono, Norie Murayama, Hiroshi Yamazaki, Bonitos with low content of malodorous trimethylamine as palliative care for self-reported Japanese trimethylaminuria subjects. *Drug Metab Pharmacokinet.* 24, 2009, 549-552. 査読有
- ⑤ Makiko Shimizu, Individual Differences of Drug-metabolizing Enzymes as Determinants for the Metabolic Fate of Chemicals —A Study of Trimethylamine and Flavin-containing Monooxygenase 3— *Yakugaku Zasshi*, 129, 2009, 1351-1356. 査読有
- ⑥ Satomi Nagashima, Makiko Shimizu, Hiroshi Yano, Norie Murayama, Toshio Kumai, Shinichi Kobayashi,

Fred P. Guengerich, and Hiroshi Yamazaki, Inter-individual variations of flavin-containing monooxygenase 3 in livers from Japanese: correlation with hepatic transcription factors. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 24, 2009, 218-225. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 清水万紀子、小林由布子、佐藤 歩、徳元久乃、沼尾恵里、小園真里恵、村山典恵、山崎浩史：日本人トリメチルアミン尿症の大規模実態調査、日本薬学会第 131 回年会 (要旨集上にて発表) 平成 23 年 3 月 5 日
- ② 永野 卓、清水万紀子、清谷一馬、鎌滝哲也、松本史彦、村山典恵、山崎浩史：日本人喫煙者の生体内ニコチン代謝物濃度の個人差、日本薬学会第 131 回年会 (要旨集上にて発表) 平成 23 年 3 月 5 日
- ③ 清水万紀子、小園真里恵、村山典恵、J. Steven Leeder、山崎浩史：成長に伴う酸素添加酵素フラビン含有モノオキシゲナーゼの個人内・個人間変動、第 31 回日本臨床薬理学会年会 (京都) 平成 22 年 12 月 2 日
- ④ 小園真里恵、清水万紀子、村山典恵、山崎浩史：成長に伴うフラビン含有モノオキシゲナーゼ 3 代謝効率の変化、第 54 回日本薬学会関東支部大会 (東京) 平成 22 年 10 月 2 日
- ⑤ 永野 卓、清水万紀子、村山典恵、山崎浩史：喫煙者血中濃度領域でのニコチン酸化的代謝に関与する薬物代謝酵素、第 54 回日本薬学会関東支部大会 (東京) 平成 22 年 10 月 2 日
- ⑥ Makiko Shimizu, Marie Kozono, Norie Murayama and Hiroshi Yamazaki: Bonitos as palliative care for Japanese trimethylaminuria subjects, 25th JSSX Annual Meeting (埼玉) 平成 22 年 10 月 7 日
- ⑦ 清水万紀子、青木悠佳、井萱翔、池田恵理奈、白石有紗、林祥子、村山典恵、山崎浩史：日本人ボランティアにおけるフラビン含有モノオキシゲナーゼ 3 の解析、日本薬学会第 130 回年会 (岡山) 平成 22 年 3 月 30 日
- ⑧ 小園真里恵、清水万紀子、村山典恵、山崎浩史：トリメチルアミン代謝に影響するフラビン含有モノオキシゲナーゼ 3 含量の変化、日本薬学会第 130 回年会 (岡山) 平成 22 年 3 月 29 日
- ⑨ 永野卓、清水万紀子、堀内佳奈、村山典恵、庄野文章、山崎浩史：タバコ煙曝露量予測のための日本人喫煙者バイオモニタリング、日本薬学会第 130 回年会

(岡山) 平成 22 年 3 月 29 日

- ⑩ Makiko Shimizu, Charles K. Allerston, Marie Kozono, Norie Murayama, Ian R. Phillips and Hiroshi Yamazaki: Flavin-containing monooxygenase 3 (*FMO3*) haplotypes in a Japanese population, 24th JSSX Annual Meeting (京都) 平成 21 年 11 月 27 日
- ⑪ 青木悠佳, 清水万紀子, 小園真里恵, 村山典恵, 山崎浩史: 日本人におけるトリメチルアミン尿症の一因となるフラビン含有モノオキシゲナーゼ 3 の遺伝子変異の研究、第 53 回日本薬学会関東支部大会 (埼玉) 平成 21 年 10 月 3 日

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

なし

(3) 連携研究者

なし