

が分泌されるとの今までの想定以上に尿酸分泌が行われていることを示している。

おわりに

現在、痛風、高尿酸血症は生活習慣病の一つとして認知され、高尿酸血症は人間ドック受診男性の二十数%と高頻度に認められる。最近、尿酸を輸送するトランスポーターの知見が急速に集積されている。今後これらのトランスポーターの SNP の情報から、生活習慣の影響が強い場合や遺伝的要素が強い場合等が症例毎に解析され、テーラーメイド医療につながるが大いに期待される。効性、副反応のモニタリングが必要とされる。

文 献

- 1) Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, *et al.* Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 2002;417:447-52.
- 2) Matsuo H, Takada T, Ichida K, *et al.* Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: a function-based genetic analysis in a Japanese population. *Sci Transl Med* 2009;1:5ra11.
- 3) Woodward OM, Kottgen A, Coresh J, Boerwinkle E, Guggino WB, Kottgen M. Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:10338-42.
- 4) Urano W, Taniguchi A, Anzai N, *et al.* Sodium-dependent phosphate cotransporter type 1 sequence polymorphisms in male patients with gout. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1232-4.
- 5) van der Harst P, Bakker SJ, de Boer RA, *et al.* Replication of the five novel loci for uric acid concentrations and potential mediating mechanisms. *Hum Mol Genet* 2010;19:387-95.
- 6) Ichida K, Hosoyamada M, Hisatome I, *et al.* Clinical and molecular analysis of patients with renal hypouricemia in Japan-influence of URAT1 gene on urinary urate excretion. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:164-73.
- 7) 石川 勲. 運動後急性腎不全 (ALPE). 金沢: 金沢医科大学出版局; 2006.
- 8) Anzai N, Ichida K, Jutabha P, *et al.* Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter URATv1 (SLC2A9) in humans. *J Biol Chem* 2008;283:26834-8.
- 9) Matsuo H, Chiba T, Nagamori S, *et al.* Mutations in glucose transporter 9 gene SLC2A9 cause renal hypouricemia. *Am J Hum Genet* 2008;83:744-51.
- 10) Ichida K, Hosoyamada M, Kamatani N, *et al.* Age and origin of the G774A mutation in SLC22A12 causing renal hypouricemia in Japanese. *Clin Genet* 2008;74:243-51.
- 11) Li S, Sanna S, Maschio A, *et al.* The GLUT9 Gene Is Associated with Serum Uric Acid Levels in Sardinia and Chianti Cohorts. *PLoS Genet* 2007;3:e194.
- 12) Dinour D, Gray NK, Campbell S, *et al.* Homozygous SLC2A9 mutations cause severe renal hypouricemia. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:64-72.
- 13) Stiburkova B, Ichida K, Sebesta I. Novel homozygous insertion in SLC2A9 gene caused renal hypouricemia. *Mol Genet Metab* 2011;102:430-5.

第 84 回日本胃癌学会学術集会

開催年月日 : 2012年2月8日(水) ~ 10日(金)
 代表者 : 辻仲 利政
 (国立病院機構大阪医療センター外科部長)
 開催地 : 大阪市北区
 会場 : 大阪国際会議場
 (グランキューブ大阪)
 事務局連絡先 : 国立病院機構大阪医療センター外科
 TEL : 06-6942-1331
 FAX : 06-6946-5660

常設事務局 URL : <http://www.jgca.jp/>
 開催案内 URL :
<http://www2.convention.co.jp/84jgca/index.html>
 備考 :
 テーマ : 「変革 (innovation), 連携 (cooperation), 発信 (transmission)」
 〈問合せ先〉日本コンベンションサービス神戸支店
 TEL : 078-303-1101
 FAX : 078-303-3760
 E-mail : 84jgca@convention.co.jp

キサンチン酸化酵素と臓器障害

▶ *Role of xanthine oxidase in organ injury*

市田公美 (東京薬科大学病態生理学教室)

キサンチンオキシドレダクターゼ (xanthine oxidoreductase ; XOR : EC1.17.1.4) は、ヒトにおけるプリン代謝の最終段階に働き、ヒポキサンチンからキサンチン、キサンチンから尿酸への反応を触媒する酵素である。ヒトでは肝臓、十二指腸、母乳などを中心に多くの組織に発現しており、血管内皮細胞にも発現していることが確認されている。通常、生体内においてXORはキサンチンデヒドロゲナーゼ (xanthine dehydrogenase ; XDH) として存在しているが、ある種の病態などにおいてはキサンチン酸化酵素 (キサンチンオキシダーゼ) (xanthine oxidase ; XO : EC1.17.3.2) へと変換される。XDHはキサンチンあるいはヒポキサンチンを酸化する際の電子受容体としてニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD^+) を利用するが、XOは酸素分子 (O_2) を電子受容体とし、活性酸素種 (reactive oxygen species ; ROS) であるスーパーオキシド (O_2^-) または過酸化水素 (H_2O_2) を生成する (図1)。現在、ROSは生体内においてシグナル伝達やマクロファージの殺菌作用などに関与し、生体内において一定の役割を担っており、それが破綻をきたし、過剰となった場合に組織障害を引き起こすと考えられるようになってきた (図2)。XORもXDHとXOの変換をとおして、いくつかの役割を担っている可能性が指摘されているが、依然として詳細は不明である。生体内において、XORが傷害性に働く例として、虚血性疾患や血管内皮機能障害において、XOの産生する活性酸素が、これらの病態成立に関与していることが示唆されている。

本稿では、生体内におけるXOと臓器障害の関係についての知見を中心に述べる。

XORの構造とD/O変換

XORは1,333のアミノ酸からなり分子量約15万のサブユニットのホモダイマーとして存在する¹⁾。XORの1つのサブユニットは、N末端から20kD、

40kD、と85kDの3つのドメインで構成され、それぞれのドメインに2つのフェレドキシンタイプの非ヘム鉄、1つのフラビンアデニンジヌクレオチド(flavin adenine dinucleotide ; FAD)および1つのモリブドプテリンを補欠分子族と

もっている。ヒポキサンチンからキサンチンまたはキサンチンから尿酸への酸化反応で生じた電子は、基質の結合部位で反応中心でもあるモリブドプテリンから分子内電子伝達により最終的にFADへ渡り、FADから電子受

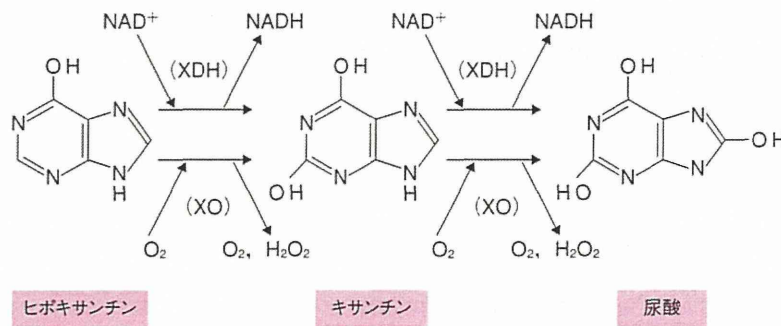


図1 キサンチンデヒドロゲナーゼ、キサンチンオキシダーゼによる代謝

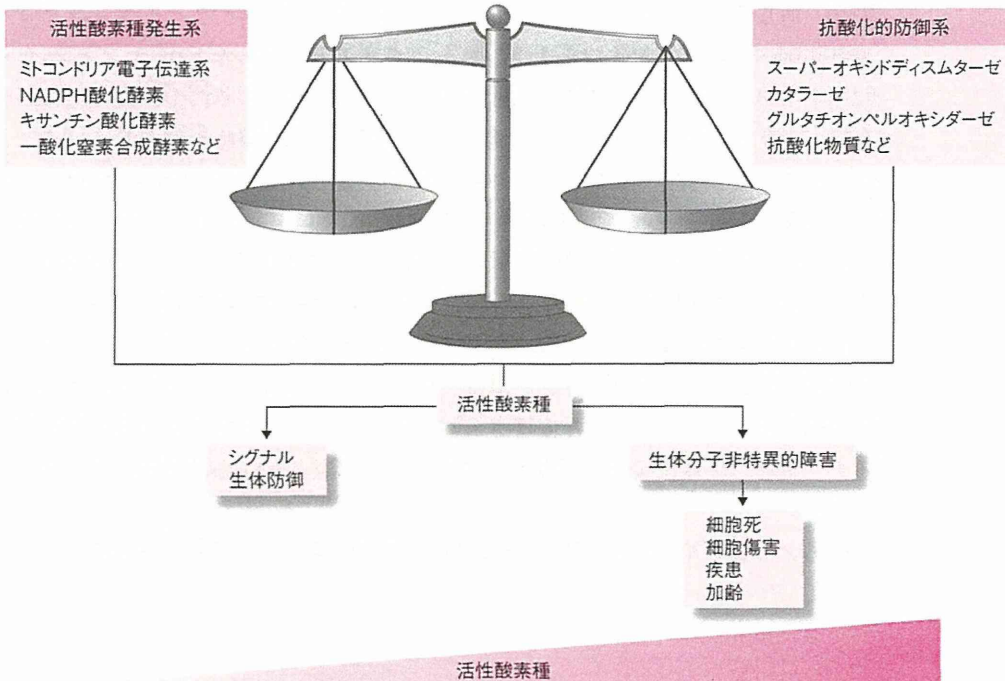


図2 活性酸素種的作用

容体(NAD⁺, またはO₂)へ渡される。

生体内で存在する酵素の形態としてはXDHであり, XDHを精製するとその過程においてXDHとXOの変換(D/O変換)が起こる。XDHからXOへの変換には, 還元薬の添加によりXOからXDHへもどすことができる可逆的な変換と, プロテアーゼの限定分解による非可逆的な変換がある。D/O変換は, ラットのCys535(ヒトではCys536)とCys992(ヒトではCys993)およびCys1316(ヒトでも同じ)とCys1324(ヒトでも同じ)の間にジスルフィド結合が形成されると起こるが, ジスルフィド結合の還元によりXDHにもどる²⁾。また, プロテアーゼによりフラビンドメインとモリブデンドメイン間のリンカーが切断されてもD/O変換は起こるが, この場合はXOからXDHにはもどらない。

XOとROS

ROSは, 非常に不安定で強い酸化力を示す寿命の短い酸素種であり, O₂⁻, H₂O₂, ·OH⁻が代表的であり, 広義には一酸化窒素を始めとする活性窒素なども含まれる。ヒトの生体内において, ROSはミトコンドリア電子伝達系, NADPHオキシダーゼ, XO, 不対内皮型一酸化窒素合成酵素(endothelial nitric oxide synthase: eNOS)やアラキドン酸代謝経路などの反応によって発生する。このROSに対する防御システムとして, スーパーオキシドデスム

ターゼ(superoxide dismutase: SOD), グルタチオンペルオキシダーゼ(glutathione peroxidase: GPx)やビタミンCなどのフリーラジカル捕捉型抗酸化物などがROSから生体を保護している。これらの防御システムを活用したうえで, 生体ではROSをシグナルとして, または免疫の重要な分子として利用している。

例えば, 炎症時に好中球のNADPHオキシダーゼを中心にROSが産生され, 殺菌などの異物排除に重要な役割を担っている。また, 最近では, 制御されていないと考えられていたミトコンドリアからのROS産生も制御され, 腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor α : TNF α)による炎症反応の収束に働くなどのいくつかの役割を担っていることが明らかになってきている^{3,4)}。しかし, 何らかの原因により, ROSの生成と防御のバランスが破綻をきたし酸化ストレスが増加すると, 動脈硬化, 発癌, 老化などに関連する疾患の発症や増悪をきたしやすくなる。

虚血再灌流におけるXO

虚血時には, XDHは蛋白質分解酵素により不可逆的にXOへと変換される。一方で, 虚血によりミトコンドリアのアデノシン三リン酸(adenosine triphosphate: ATP)合成が停止すると, ATPが分解され, アデノシン一リン酸(adenosine monophosphate: AMP)が増加し, さらに分解されヒポ

キサンチンが増加する。その後, 血流が再開されると再灌流時にもたらされる酸素の供給とXOの作用によりO₂⁻やH₂O₂が生成され, これにより障害が惹起される(図3)⁵⁾。虚血再灌流により生成したO₂⁻は, さらにNOと反応し, 反応活性の著しく高いペルオキシナイトライトONOO⁻が生成される。また, XOがフェリチンから鉄の遊離を促進し, H₂O₂と反応しヒドロキシルラジカル(HO·)を生成する。これらの結果, 生成されたROSによっても障害が惹起される⁶⁾。さらに, pHが6.5に低下した場合, XORがNADPHオキシダーゼ活性を示し, O₂⁻を産生し虚血再灌流障害に働くことも指摘されている⁷⁾。虚血再灌流による組織障害が, XDH阻害薬であるアロプリノールや, XDHからXOへの変換を引き起こす機序の1つである蛋白分解酵素の阻害薬により改善するとの報告などから, 心筋梗塞や脳梗塞などの多くの虚血性疾患の病態に, これらの機序が関与していることが推定されている^{8,9)}。

高血圧と血管疾患

高血圧発症にレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系や交感神経などの多くの因子が関与している。これらのなかで, 実験動物を用いた種々の実験により酸化ストレスが血圧上昇に関与していることが示されている¹⁰⁾。XORが血管内皮細胞に発現していることから, XOもROSの発生源として

考えられている。血管においてXORがROSを産生するためには、D/O変換が起こる必要がある。このD/O変換やXOR発現が、NADPHオキシダーゼなどにより産生されるROSとカルシウムにより促進されることが報告されている¹¹⁾。また、肝細胞中のXORは、肝細胞の代謝に伴い循環血液中にXOとしてリークし、血管の内膜表面の硫酸化グリコサミノグリカンに結合してROSを産生する¹²⁾。

動物実験では、高血圧自然発症ラットのXO活性をタンゲステンなどにより阻害することにより、血管内皮機能と血圧が正常化することなどが報告されている¹³⁾。ヒトにおける酸化ストレスと高血圧の関係は十分に証明されていないが、高血圧患者は血漿H₂O₂産生が血圧正常者よりも有意に増加していることが示されている。また、XORのポリモルフィズムが血圧と関連することが報告されている¹⁴⁾。このように、高血圧発症の一部にROSが関与することが徐々に示されている¹⁵⁾。

酸化ストレスによる高血圧発症の機序として、アンジオテンシンⅡがNADPHオキシダーゼ活性化をとおして、ROSを増加させることが報告されている。また、ROSがNOを失活させ、内皮依存性の血管弛緩反応を抑制し、血圧を上昇させる。さらに、ROSがmitogen-activated protein kinases (MAPK)などの刺激をとおし、血管内皮障害、血管拡張の減少や血管収縮、さらに血管のリモデリングを引き起こし、血圧上昇をきたす機序も考えられ

ている(図4)¹⁶⁾。

脂質異常症においても、XOが血管内皮機能低下の原因と関係していることが示されている。脂質異常症ラビットの大動脈のリング状標本において、アロプリノールやヘパリンが活性酸素を減少させることや、血管内皮依存性の血管平滑筋弛緩作用を改善させることが示されている¹⁷⁾。また、脂質異常症患者においても、オキシプリノールが血管内皮依存性の血管平滑筋弛緩作用を改善したことが報告されているが、一方で相反する報告もされている。

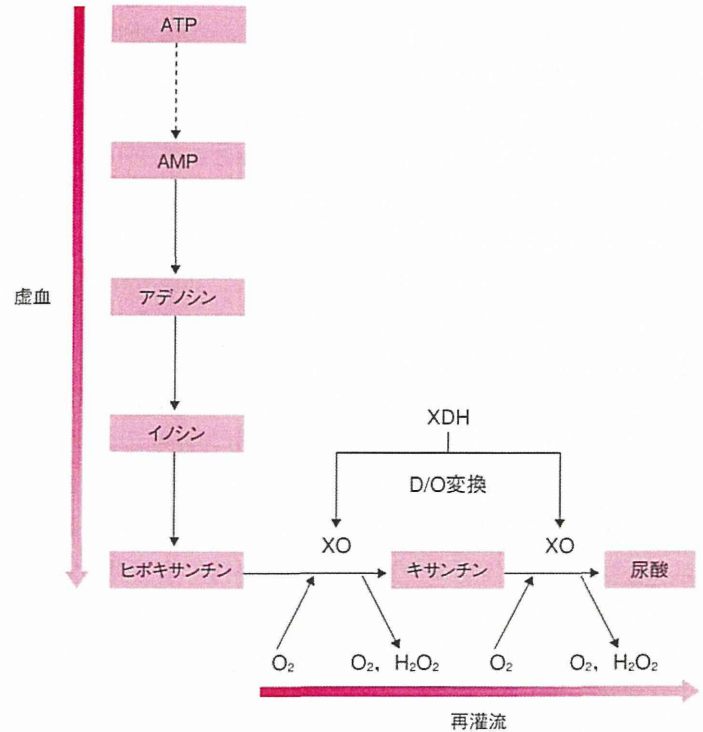


図3 虚血再灌流のメカニズム

心疾患

心筋梗塞、心房細動、肺高血圧症、左室肥大や心不全などの心疾患において、ROSが病態の増悪に関与していることが報告されている。これらの心疾患における主要なROS発生源は、XO、NADPHオキシダーゼ、eNOSやミトコンドリア電子伝達系などである。多くの動物実験において、心疾患の組織障害がアロプリノールなどのXOR阻害薬投与により改善することから、病態へのXOの関与が推定されている。

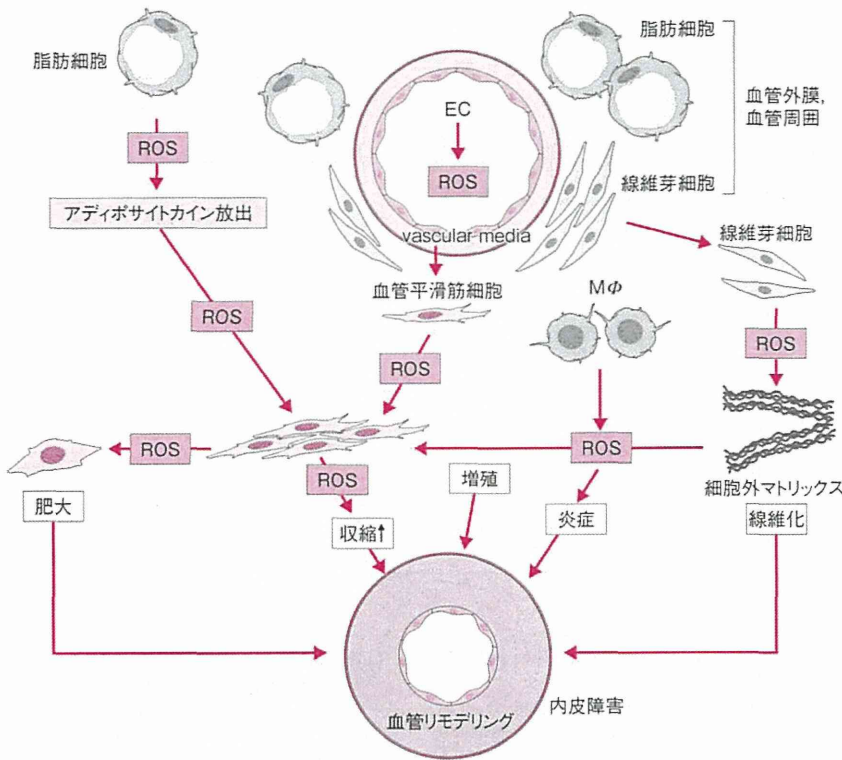


図4 高血圧における血管変化への酸化還元反応の関与(文献16より引用)

血管平滑筋、内皮細胞、外膜繊維芽細胞および外膜脂肪細胞を含む血管壁のすべての種類の細胞はROSを産生する。マクロファージとT細胞もまたROSを産生し、血管由来のROS産生増加をきたし、血管平滑筋細胞の増殖と肥大、血管収縮増強、内皮細胞障害、炎症、細胞外マトリックス沈着と繊維化の増加を引き起こす。これらの過程は、高血圧の根底にある血管変化である内皮と血管の機能の障害と構造のリモデリングの一因となる。

EC：血管内皮細胞
vascular media：血管中膜
Mφ：マクロファージ

心筋梗塞において、虚血再灌流が起こり、心筋障害形成にROSが重要な働きをしている。ラットの冠動脈結紮の実験において、アロプリノール投与により、梗塞巣が著しく減少している¹⁸⁾。ヒトにおいても、急性心筋梗塞患者の血清ヒポキサンチンや血清キサンチン濃度が上昇していることが報告

され、XORの関与が示唆された¹⁹⁾。さらに、冠動脈バイパス手術前のアロプリノール投与の有用性につき、無作為2重盲検法比較対照試験により検討され、48時間以内に心筋収縮力増強作用をもつ薬や機械的循環補助装置の必要性をアロプリノールが有意に低下させた²⁰⁾。しかし、ヒトにおいては、心筋

梗塞におけるアロプリノールの有用性およびXOの関与を示唆する報告がある一方で、アロプリノールの有用性を示唆しないデータもあり、見解が一致していない²¹⁾。

心不全においては、心筋リモデリングとよばれる心筋の構築・機能変化が起こり、さらに心筋障害や心ポンプ機能低下が悪化し、悪循環が形成されている。心筋リモデリングと心不全の形成、進展においてROSが働いている。心不全において、ミトコンドリア電子伝達系の機能低下をきたし、電子リークを引き起こし、ROSの増加、さらにミトコンドリアDNA障害を起こすという悪循環が形成されている。XOに関しては、ラットの心臓を用いた実験において、心不全の進行と心筋中のXO活性の上昇に相関があり、その上昇した活性が心臓への酸化ストレスを増加させていると報告されている²²⁾。ヒトにおいても、拡張型心筋症患者の心筋中のXDH/XOが増加していることや、高用量のアロプリノール継続投与により死亡率の改善が認められたとの報告がある²³⁾。一方で心不全患者に対するオキシプリノールの第Ⅱ相試験において有用性を示せなかった。

最後に

前述の疾患以外にも肺疾患や脳血管系疾患において、XOがROS発生源としてかかわっていることが、動物実験により立証されている。しかし、ヒト

においては、必ずしも同様な結果が得られていない。この原因の1つとして、種によりXORの活性や分布に差があることが考えられる。また、血管内皮細胞において、NADPHオキシダーゼ

の活性化がXDHからXOへの変換の増加を誘導するなど、ROS発生源が相互に作用しているため、明確にXOによる作用だけを抽出することができないこともある。ROSが関与している多くの

疾患において、XOが一定以上の役割を果たしているのは確かであるが、ヒトにおける病態について、さらなる検討が必要である。

文献

- 1) Ichida K, Amaya Y, Noda K, et al: Cloning of the cDNA encoding human xanthine dehydrogenase (oxidase): structural analysis of the protein and chromosomal location of the gene. *Gene* 133: 279-284, 1993.
- 2) Nishino T, Okamoto K, Eger BT, et al: Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS J* 275: 3278-3289, 2008.
- 3) Rowlands DJ, Islam MN, Das SR, et al: Activation of TNFR1 ectodomain shedding by mitochondrial Ca^{2+} determines the severity of inflammation in mouse lung microvessels. *J Clin Invest* 121: 1986-1999, 2011.
- 4) Widlansky ME, Gutterman DD: Regulation of endothelial function by mitochondrial reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal* 15: 1517-1530, 2011.
- 5) McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163, 1985.
- 6) Godber BL, Doel JJ, Durgan J, et al: A new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase. *FEBS Lett* 475: 93-96, 2000.
- 7) Sanders SA, Eisenthal R, Harrison R: NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase--generation of superoxide anion. *Eur J Biochem* 245: 541-548, 1997.
- 8) Zweier JL, Talukder MA: The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 70: 181-190, 2006.
- 9) Agarwal A, Banerjee A, Banerjee UC: Xanthine oxidoreductase: a journey from purine metabolism to cardiovascular excitation-contraction coupling. *Crit Rev Biotechnol* 31: 264-280, 2011.
- 10) Viel EC, Benkirane K, Javeshghani D, et al: Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H281-288, 2008.
- 11) McNally JS, Saxena A, Cai H, et al: Regulation of xanthine oxidoreductase protein expression by hydrogen peroxide and calcium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1623-1628, 2005.
- 12) Radi R, Rubbo H, Bush K, et al: Xanthine oxidase binding to glycosaminoglycans: kinetics and superoxide dismutase interactions of immobilized xanthine oxidase-heparin complexes. *Arch Biochem Biophys* 339: 125-135, 1997.
- 13) Suzuki H, DeLano FA, Parks DA, et al: Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4754-4759, 1998.
- 14) Chaves FJ, Corella D, Blesa S, et al: Xanthine oxidoreductase polymorphisms: influence in blood pressure and oxidative stress levels. *Pharmacogenet Genomics* 17: 589-596, 2007.
- 15) Lacy F, O'Connor DT, Schmid-Schonbein GW: Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens* 16: 291-303, 1998.
- 16) Montezano AC, Touyz RM: Molecular mechanisms of hypertension--reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. *Can J Cardiol* 28: 288-295, 2012.
- 17) White CR, Darley-Usmar V, Berrington WR, et al: Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8745-8749, 1996.
- 18) Montor SG, Thoolen MJ, Mackin WM, et al: Effect of azapropazone and allopurinol on myocardial infarct size in rats. *Eur J Pharmacol* 140: 203-207, 1987.
- 19) Kock R, Delvoux B, Sigmund M, et al: A comparative study of the concentrations of hypoxanthine, xanthine, uric acid and allantoin in the peripheral blood of normals and patients with acute myocardial infarction and other ischaemic diseases. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 32: 837-842, 1994.
- 20) Johnson WD, Kayser KL, Brenowitz JB, et al: A randomized controlled trial of allopurinol in coronary bypass surgery. *Am Heart J* 121: 20-24, 1991.
- 21) Parmley LF, Mufti AG, Downey JM: Allopurinol therapy of ischemic heart disease with infarct extension. *Can J Cardiol* 8: 280-286, 1992.
- 22) Ferdinandy P, Panas D, Schulz R: Peroxynitrite contributes to spontaneous loss of cardiac efficiency in isolated working rat hearts. *Am J Physiol* 276: H1861-1867, 1999.
- 23) Struthers AD, Donnan PT, Lindsay P, et al: Effect of allopurinol on mortality and hospitalisations in chronic heart failure: a retrospective cohort study. *Heart* 87: 229-234, 2002.

低尿酸血症の臨床的取り扱い

市田 公美

ポイント

- ★無症状で、臨床検査所見に異常を認めない低尿酸血症は、ほとんどが腎性低尿酸血症である。
- ★腎性低尿酸血症は、合併症として尿路結石と運動後急性腎不全を認めることがある。
- ★日本人の腎性低尿酸血症の多くは、URAT1をコードしている遺伝子 *SLC22A12* の変異による。
- ★運動後急性腎不全は、運動の数時間後から出現する腰背部痛を主徴とする。
- ★運動後急性腎不全では、腎障害に伴い血清尿酸値は正常になり、通常低尿酸血症を確認することができない。

尿酸は、プリン体の最終代謝産物であり、主に腎臓から尿中へ排泄される。血清尿酸値は、尿酸への代謝量(産生量)と腎臓を中心とした排泄能のバランスにより規定されている。低尿酸血症は、尿酸の産生量が少ないか、腎臓での尿酸の排泄量が多いことにより起こる。従来は、低尿酸血症は、直接的な症状を認めないことから特に関心は払われていなかった。しかし、最近の健康診断の普及により、低尿酸血症を指摘されての医療機関への受診者が増加し、その取り扱いに戸惑うことが多くなっている。低尿酸血症をきたす疾患のなかで、無症状であり、臨床検査所見に異常を認めないのは、キサンチン

【表 1】低尿酸血症の成因

- | |
|--|
| A. 尿酸産生低下型低尿酸血症 |
| 1. 特発性尿酸産生低下型低尿酸血症 |
| 2. キサンチン尿症(タイプ I, タイプ II) |
| 3. モリブデンコファクター欠損症 |
| 4. purine nucleoside phosphorylase(PNP)欠損症 |
| 5. PRPP synthetase 活性低下症 |
| 6. 重症肝障害 |
| 7. 薬物(アロプリノールなど) |
| 8. るいそう |
| B. 尿酸排泄亢進型低尿酸血症 |
| 1. 腎性低尿酸血症 |
| 2. Wilson 病 |
| 3. Fanconi 症候群 |
| 4. SIADH |
| 5. 悪性腫瘍 |
| 6. 糖尿病 |
| 7. 薬物(ベンズプロマロン, プロベネシド, スルフィンピラゾンなど) |
| 8. 妊娠 |
| 9. 難治性下痢 |

尿症と腎性低尿酸血症である(表 1)。キサンチン尿症は稀な疾患であり、日本では腎性低尿酸血症がこれらの低尿酸血症のほとんどを占めている。本稿では、腎性低尿酸血症とその合併症である運動後急性腎不全について概説する。

腎性低尿酸血症

腎性低尿酸血症は、尿細管障害を認めないにもかかわらず、腎臓における尿酸再吸収の低下または分泌の亢進により尿酸排泄が亢進し、低尿酸血症を示す疾患である。低尿酸血症に関し

での明確な基準はないが、血清尿酸値 2 mg/dl 以下を低尿酸血症としている報告が多い。2 次性低尿酸血症を除外すると、日本では無症状の低尿酸血症のほとんどが腎性低尿酸血症である。腎性低尿酸血症は多くの場合、血清尿酸値 1 mg/dl 以下の著しい低尿酸血症を呈し、常染色体劣性遺伝形式をとることが多い。低尿酸血症自体による臨床症状は特に認めない。

日本人に多い理由

腎性低尿酸血症は、近位尿細管において尿酸の再吸収に働く中心的な尿酸トランスポーターで管腔側膜に発現している URAT1 と、血管側膜の GLUT9/URATv1 の欠損により、尿酸排泄が亢進することで起こる。日本人の腎性低尿酸血症の 80~90% に URAT1 をコードしている遺伝子 *SLC22A12* の変異が認められる。腎性低尿酸血症は日本人に著しく多く、その特徴は遺伝子 *SLC22A12* において W258Stop となる変異 G774A が、*SLC22A12* の遺伝子変異の 80% 近くを占めていることである¹⁾。GLUT9/URATv1 の欠損により腎性低尿酸血症を引き起こすことが報告されたのは、比較的最近である²⁾。GLUT9/URATv1 欠損による腎性低尿酸血症の血清尿酸値は、URAT1 欠損の場合とほぼ同程度である。GLUT9/URATv1 欠損による腎性低尿酸血症の報告は世界的にもまだ数例であるが合併症として運動後急性腎不全が報告されており、現時点において GLUT9/URATv1 欠損と URAT1 欠損による腎性低尿酸血症の臨床上の差異はほとんどないと思われる³⁾。

合併症

合併症として、尿路結石と運動後急性腎不全が多く、尿路結石は腎性低尿酸血症患者の 7~10% 程度に、運動後急性腎不全は腎性低尿酸血

症患者の 10% 近くに疑わしい症状の経験または既往を認める¹⁾。

尿路結石の合併が多い原因として、腎臓における尿酸排泄効率の上昇により、相対的に尿酸の腎外排泄が減少し、結果的に尿中尿酸排泄量が増加しているためと考えられる。尿への尿酸の溶解度は高くないため、尿中尿酸排泄量の増加の程度は軽度であるにもかかわらず、尿路結石の発症率が著しく増加していると思われる。

運動後急性腎不全

運動後に発症する急性腎不全は、横紋筋融解症が有名であり、実際、ほとんどが横紋筋融解症である。運動後急性腎不全は、横紋筋融解症とは異なる疾患であり、稀に血清尿酸値に異常を認めない健常者にも発症することがあるが、腎性低尿酸血症に合併して発症することがほとんどである。運動後急性腎不全は、運動の数時間後から出現する腰背部痛を主徴とし、腎機能は 1 週間~1 カ月程度で回復することが多い、比較的前後の良い疾患である。

症状と鑑別

運動後急性腎不全の症状は、比較的強い腰背部痛のほか、嘔気、嘔吐や乏尿も認め、運動直後ではなく数時間後に現れることが多く、横紋筋融解症にみられるような筋肉痛や筋脱力が症状の主体となることは少ない。また、腰背部痛が強いため、尿路結石との鑑別が必要となることがある。臨床検査においては、運動後急性腎不全では血清クレアチンキナーゼ(CK)や血清ミオグロビンの上昇を認めないか、認めたとしても軽度である。

一方、横紋筋融解症では、血清 CK や血清ミオグロビンの著しい上昇が特徴であり、血清 CK は 2~12 時間以内に上昇を認め、1~3 日で

ピークとなる。横紋筋融解症の診断のための血清CK値は、1,000 IU/l以上または正常値上限の5倍以上といわれている。しかし、入院時に血清CK値15,000~20,000 IU/l以下であれば急性腎不全発症の危険性は少なく、血清CK値が著しく高くないにもかかわらず発症する場合は、脱水やアシドーシスなどの合併があることが多い。したがって、合併症を認めず、血清CK値がそれほど高くないにもかかわらず急性腎不全の発症を認める場合には、運動後急性腎不全が強く疑われることになる。しかし、急性腎不全に伴い血清尿酸値は正常になり、低尿酸血症は通常確認できない。この場合、血清クレアチニン値の上昇に比して血清尿酸値の上昇が明確でなければ、運動後急性腎不全を強く疑うことができる。さらに、腎機能の回復に伴い血清尿酸値の低下を認めるため、血清尿酸値の推移も診断の一助になる。また、横紋筋融解症でも、血清CK値の測定時期によっては十分な上昇を確認できない場合があるので、横紋筋融解症との鑑別が必要な場合、運動後12時間以降の血清CK値が参考になる。

画像検査の特徴としては、造影剤を使用した場合、翌日の再検査(delayed CT, MRIや超音波)により造影剤の残存が認められ、信号強度やエコー強度がまだらな楔形になることが知られ、診断の一助になる³⁾。この所見は、尿路結石が疑われて画像検査が行われたことから発見されたものである。

発症機序と再発予防指導

運動後急性腎不全は、運動により必ず起こるわけではなく、短時間であっても激しい運動が運動後急性腎不全を誘発しやすいと考えられている。また、脱水やNSAID内服などの何らかの促進因子が加わったときに発症すると考えられているが、まだ十分に明らかになっていな

い³⁾。運動後急性腎不全は再発を認めることが多いので、運動強度に関する指導が必要である⁴⁾。また、ヘテロ接合型のURAT1の欠損でも、時に運動後急性腎不全を認めることがあるので、注意が必要である¹⁾。

発症機序としては、前述の画像検査から、腎臓の血管攣縮が原因であると推定されている。運動により活性酸素が増加し、腎臓の弓状動脈・葉間動脈が攣縮を起こし虚血状態になり、再還流時に活性酸素による虚血再還流障害をきたすためであると考えられている。また、腎性低尿酸血症に運動後急性腎不全を合併しやすい理由は、活性酸素のスカベンジャーである尿酸が少ないためであると推定されている。

おわりに

低尿酸血症に関して多くの知見が集積され、日本人に腎性低尿酸血症が多く、合併症も存在することが明らかになった。したがって、日本では低尿酸血症に注意を払い、日本人に合わせた医療を行う必要がある。健診で無症状の低尿酸血症を認めたときには、腎性低尿酸血症またはキサンチン尿症の確定診断を行い、腎性低尿酸血症では合併症の予防のために飲水を十分行うよう指導し、激しい運動の制限や定期的な検査が必要となる。

文献

- 1) Ichida K, et al : Clinical and molecular analysis of patients with renal hypouricemia in Japan-influence of URAT1 gene on urinary urate excretion. J Am Soc Nephrol 15 : 164-173, 2004
- 2) Dinour D, et al : Homozygous SLC2A9 mutations cause severe renal hypouricemia. J Am Soc Nephrol 21 : 64-72, 2010
- 3) 石川 勲 : 運動後急性腎不全(ALPE), 金沢医科大学出版局, 2006
- 4) Ohta T, et al : Exercise-induced acute renal failure associated with renal hypouricaemia : Results of a questionnaire-based survey in Japan. Nephrol Dial Transplant 19 : 1447-1453, 2004

酵素のクローニングと欠損症

市田 公美

東京薬科大学病態生理学教室
教授

天谷 吉宏

新潟大学大学院医学総合研究科
口腔生化学分野 准教授

西野 武士

東京大学大学院農学生命科学研究科
特任教授/日本医科大学 名誉教授

はじめに

牛乳を含む哺乳類の臓器から“キサンチン酸化酵素”として抽出精製されていた酵素は、1960年代終わりになって、実は哺乳類以外の生物と同様、本来はキサンチン“脱水素酵素”であることが明らかになった。“キサンチン酸化酵素”を抽出精製する際に、プロテアーゼによる部分切断、あるいはシステイン残基の酸化により酵素分子内にS-S結合が起り、“脱水素酵素”から“酸化酵素”に変換(D-O変換)されたものを精製していたことが明らかになったのである。すなわち、キサンチン酸化酵素は一種のアーチファクト酵素であることが判明した。キサンチン酸化酵素は酸素を基質にするが、脱水素酵素はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(nicotinamide adenine dinucleotide: NAD)を基質とするものである。しかし、生体内で酵素が酸化酵素として作動する可能性も否定できないため、哺乳類の酵素についてのみ、まとめて「キサンチン酸化還元酵素」と呼ぶことにした。さらにその後、本酵素の分子内電子伝達の性質を含めた反応中心の反応機構も詳細が明らかになってきた。機能面が明らかになってきたのに対し構造に関する知見は乏しく、機能と構造の関係を明らかにすることが強く求められていた。さらに、症

例は少ないものの、本酵素の欠損症であるキサンチン尿症の症例も集まりつつあった。これらの問題を解決するためにキサンチン脱水素酵素のcDNAクローニングと一次構造解析を1980年前半から開始した。

I キサンチン酸化還元酵素の一次構造

ラットキサンチン酸化還元酵素のcDNAクローンは、当初、抗ラット肝キサンチン酸化還元酵素抗体を用いた免疫スクリーニングにより単離された。その後、本酵素mRNAの全長をカバーするcDNAクローンが得られ、塩基配列の解析からラット酵素の全一次構造が明らかになった¹⁾。ラットのキサンチン脱水素型の酵素はトリプシン処理によって、20kDa(20K)、40kDa(40K)、85kDa(85K)の3個の断片を生じるとともに酸化酵素型へと不可逆的に変換する。各断片のN末端アミノ酸配列分析から、Lys184とLys552の2カ所で切断されていることがわかった(図1)。脱水素酵素型から酸化酵素型への可逆的な変換に関与する3個のシステイン残基は、フルオロ-2,4-ジニトロベンゼン(fluoro-2,4-dinitrobenzene: FDNB)を高いpH(pH8.5)で反応させることにより同定された。ニワトリの脱水素酵素は酸化酵素に変換しないが、これら3個のシス

テイン残基のうちC末端側の2個に対応するもの(Cys992, Cys1325)が他のアミノ酸に置換されていた²⁾。

20K断片のドメインはシステイン残基周囲のアミノ酸配列の相同性やモチーフ解析から、2個の2Fe/2S型非ヘム鉄の結合部位と推定された。ウシミルク酵素やニワトリ酵素の蛋白質化学的解析から得られた知見も含めて、NAD親和標識剤として使われるアデニンヌクレオチドをもつ補酵素の類似体であるフルオロスルホニルベンゾイルアデノシン(5'-p-fluorosulfonylbenzoyladenine : FSBA)で標識される40K断片のドメインは、脱水素酵素の電子受容体であるNADの結合部位、中性付近のpH(pH7.8)で生成物である尿酸の解離に影響を及ぼすFDNBで標識される2つのリジン残基の存在する85K断片のドメインには近傍にモリブデ

ンコファクターが結合すると推定した。この推定は現在ではX線構造解析から正しかったことが確認されている。

キサントシン脱水素酵素の一次構造や遺伝子の解析にはショウジョウバエの遺伝学も大きな役割を果たした。ショウジョウバエではキサントシン脱水素酵素活性の欠損に2つの独立した遺伝子座、*rosy*(ry)と*maroon-like*(ma-l)が関与していることが古くから知られていた³⁾⁴⁾。ショウジョウバエの酵素はキサントシンやヒポキサントシンのほかに、2-アミノ-4-ヒドロキシプテリジンを基質として眼の色素の前駆体であるイソキサントプテリンを生成するため、欠損すると変異の名称の通り、眼の色が暗赤色あるいは茶色に変化し、変異をもつ個体の単離が容易である。

1987年にはキサントシン脱水素酵素遺伝子をコードす

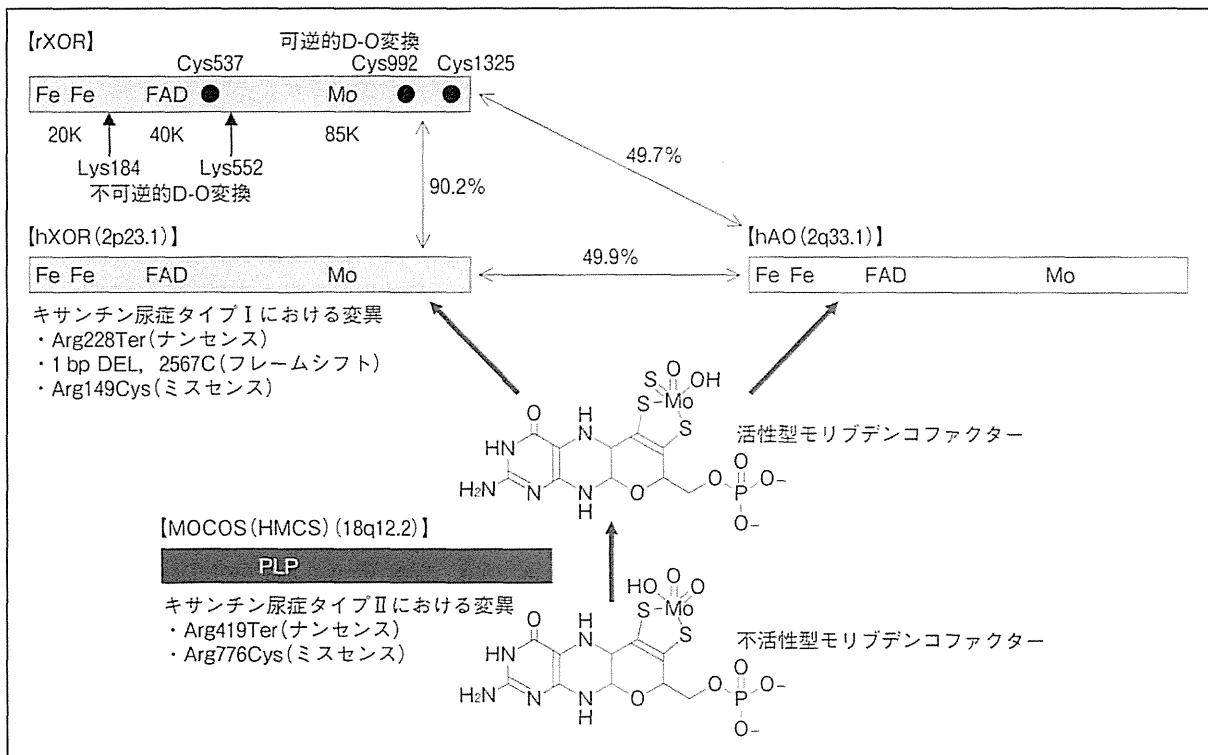


図1. キサントシン酸化還元酵素の相同性と硫化酵素によるモリブデンコファクターの活性化

rXOR: ラットキサントシン酸化還元酵素, hXOR: ヒトキサントシン酸化還元酵素, hAO: ヒトアルデヒド酸化酵素, Fe: 非ヘム鉄結合領域, FAD: フラビンアデニンヌクレオチド結合領域, Mo: モリブデンコファクター結合領域, MOCOS: ヒトモリブデンコファクター硫化酵素, PLP: ピリドキサルリン5'-酸結合領域

るry遺伝子座の遺伝子およびcDNAの構造が報告されており、ラット酵素とは全長にわたって52%の相同性があった⁵⁾。ショウジョウバエの脱水素酵素は酸化酵素に変換しないが、ラット酵素で可逆的な酸化酵素への変換に関与することが示された3個のシステイン残基に対応する部位はすべてほかのアミノ酸に置換されていた。また、非ヘム鉄の結合する20Kドメインの相同性は66%と高いのに対し、脱水素酵素の電子受容体であるNADが相互作用するフラビンアデニンジヌクレオチド(flavin adenine dinucleotide : FAD)ドメインの相同性は44%と低かった。

II 2つ報告されたヒトキサンチン脱水素酵素

後述するキサンチン尿症の解明のため、ヒトのcDNAクローンは、ラットcDNAとのクロスハイブリダイゼーションにより単離された⁶⁾。ヒト酵素の一次構造は全長にわたってラット酵素と90%の相同性があり、脱水素酵素から酸化酵素への可逆および不可逆の変換に関わる残基はすべて完全に保存されていた。活性変換の機構は哺乳類で保存されているものと考えられる。遺伝子は2p23.1に存在し、36個のエクソンからなる大きな遺伝子であることが分かった^{7,8)}。

同年、われわれの発表後しばらくして、異なる配列のヒトのキサンチン脱水素酵素cDNAの塩基配列が米国科学アカデミー紀要(PNAS)に、われわれの報告に対して多くの批判を添えて報告された⁹⁾。このcDNAのコードする蛋白質は、ラット酵素との相同性は49.7%と低く、非ヘム鉄やモリブデンコファクターの結合が推定される部位の近傍の配列はよく保存されていたが、FADの結合に関与すると考えられるFSBA修飾部位近傍の配列に高い相同性は認められなかった。また、可逆的な酸化酵素への変換に関わる3個のシステイン残基に対応する部位はすべてほかのアミノ酸に置換されていた。われわれはキサンチン脱水素酵素のものではないと確信していたが、まもなく、ウサギの酵素を用いた実験により、このcDNAはアルデヒド酸化酵素をコードしているものであることが証明され

た¹⁰⁾。論文名は『ヒトのキサンチン脱水素酵素/酸化酵素』であったが、実はアルデヒド酸化酵素であったのである。実はこの酵素はキサンチン酸化還元酵素とは、共通の補酵素をもつ、よく似た酵素である。キサンチン酸化還元酵素はアルデヒド酸化する活性があるが、一方でアルデヒド酸化酵素にはプリンを酸化する能力はない。また、脱水素酵素から酸化酵素に変換することはなく、基本的に酸化酵素である。

アルデヒド酸化酵素は、生体内基質としてレチナール、ピリドキサル、ニコチンアミドなどを酸化すると同時に、生体異物の酸化に関与し、多くの薬物の代謝過程に働いている。最近ではアルデヒド酸化酵素が脂肪組織に多く発現し、脂肪細胞の分化や脂質代謝に関与していること、また、以前にも増して抗癌剤などの代謝への関与が報告されている^{11)~14)}。現時点では、アルデヒド酸化酵素のみの基質になる生理活性物質は明らかになっていない。

分子進化の解析では、アルデヒド酸化酵素を祖先として基質特異性を変化させてキサンチン脱水素酵素に進化した後、遺伝子重複を起こし、一方はそのままキサンチン脱水素酵素として、もう一方は再びアルデヒド酸化酵素に戻ったらしい。アルデヒド酸化酵素遺伝子は2q33.1に存在する。遺伝子重複の後、位置が離れるとともに生理的役割も異なる酵素として進化したものと思われる¹⁵⁾。

III モリブデンコファクター硫化酵素

モリブデンコファクターは、プテリン誘導体にモリブデンが配位したものである。他のプテリン化合物と同様にグアノシンを前駆体とする。哺乳類では、このモリブデンコファクターを補酵素として必要とする酵素として、キサンチン脱水素酵素とアルデヒド酸化酵素以外に亜硫酸酸化酵素が知られている。最近、mitochondrial amidoxime reducing component (mARC)も活性の発現にモリブデンコファクターが必要なことが示された¹⁶⁾。これらの酵素のうち、活性に必要な硫黄原子を活性中心にもつものはキサンチン脱

水素酵素とアルデヒド酸化酵素のみである。この硫黄原子はシアン化物(CN)イオン処理により外れ、酵素は不活性化する。天然の酵素でもある一定量の硫黄原子をもたない酵素(不活性型)が存在することは酵素の精製の項で述べ、またその精製法については前号でも述べた。後述するキサンチン尿症タイプIIでは、キサンチン脱水素酵素とアルデヒド酸化酵素以外のモリブデンコファクターを必要とする酵素にはCNイオン処理による活性低下を認めない。すなわち硫黄原子が存在しないことから、2酵素に共通するモリブデン原子に必要な硫黄原子を、酵素的に付加する酵素蛋白質が存在することが予想され、キサンチン尿症タイプIIはその欠損と推定され¹⁷⁾、後述するようにわれわれにより証明された。

ショウジョウバエでは前述の*ma-1*遺伝子の変異により、キサンチン脱水素酵素、アルデヒド酸化酵素およびピリドキサル酸化酵素が失活する。この変異を相補する遺伝子を単離し、cDNAの塩基配列を決定することにより、モリブデンコファクターに硫黄原子を転移するモリブデンコファクター硫化酵素の構造が明らかになった¹⁸⁾。補酵素であるピリドキサルリン酸の結合部位と硫黄原子の転移に関与するシステイン残基の近傍はモリブデンコファクターに硫黄原子を転移する酵素のみならず、非ヘム鉄に硫黄原子を転移する大腸菌の*nifs*遺伝子産物のファミリーとも強く保存されていた。一方、明瞭なモリブデンコファクターとの結合部位は見出されなかった。硫黄原子の転移は酵素にモリブデンコファクターが結合した後に起こるものと推定される。事実、*ma-1*変異をもつショウジョウバエから抽出した活性のないキサンチン脱水素酵素は、亜ジチオン酸ナトリウムと硫化ナトリウムにより、非酵素的に硫化して活性型に転換できる¹⁹⁾。

Expression sequence tag(EST)を利用して哺乳類などのモリブデンコファクター硫黄添加酵素遺伝子も相次いで明らかにされた^{20) - 22)}。ヒト酵素はショウジョウバエ*ma-1*遺伝子産物と約30%の相同性をもつこと、その遺伝子は18q12.2に存在し、15個のエクソンをもつことなどが明らかになった。後述のキサンチン

尿症タイプIIはこの遺伝子上に変異をもつことも同時に明らかになり、キサンチン酸化酵素の活性発現に必要な活性型モリブデンコファクターの合成に必要な酵素が同定された。

IV キサンチン尿症

キサンチン尿症は1954年に初めて報告され、今までに100例以上が報告されているが、比較的稀な疾患である²³⁾。キサンチン酸化還元酵素活性の欠損により尿酸産生量(尿酸への代謝)が著しく低下すると同時に、ヒポキサンチンからキサンチンへ代謝されないため、血清および尿中ヒポキサンチンが増加する。多くの場合30mg/日以下の著しい尿中尿酸排泄量低下と血清尿酸値1mg/dL以下の低尿酸血症を認める。一方、血清オキシプリン(ヒポキサンチン+キサンチン)濃度の0.1~1.0mg/dLへの上昇と、さらにキサンチンを主にしたオキシプリン尿中排泄量の著しい増加60~560mg/日(キサンチン:70~90%)を認める。ヒポキサンチンはヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼにより基質として利用されるため、ある程度以上は増加しない。また、本疾患におけるキサンチンはグアニンの代謝によって生じたものと考えられている。

キサンチン尿症は、キサンチン酸化還元酵素単独欠損のタイプIとアルデヒド酸化酵素も欠損しているタイプIIが存在する。タイプIとタイプIIは臨床症状、臨床検査所見がほとんど同じことから、1990年前後まで異なる2つのタイプがあることは認識されていなかった。しかし、ピラジナマイドから5-ヒドロキシピラジナマイドへの代謝や、アロプリノールからオキシプリノールへの代謝ができる症例とできない症例が存在することから、サブタイプの存在が指摘された²⁴⁾。その後まもなく、代謝できないタイプはアルデヒド酸化酵素も欠損していることが明らかになった²⁵⁾。サブタイプまで解析した報告が多くないことから、それぞれのタイプの比率の詳細は明らかでないが、タイプ分けした報告ではタイプIの報告数の方が

多い。

日本における症例の多くはタイプ I、タイプ II ともに無症状であるが、時として尿中オキシプリン排泄量増加によるキサントニン結石を中心とした尿路結石を認めることがある。一方、地中海沿岸部や中東などにおける症例報告では尿路結石の合併が多い。この尿路結石の合併が多い原因として、同地域における食事や気候などの差異が影響していることが推測されているが、詳細は不明である。

タイプ I とタイプ II の鑑別はアロプリノール負荷試験、酵素活性測定、遺伝子解析により行うことが可能であるが、アロプリノール負荷試験が最も簡便である。アロプリノールはキサントニン酸化還元酵素あるいはアルデヒド酸化酵素によりオキシプリノールへ酸化されるので、アロプリノールを投与しオキシプリノールに代謝されなければ、キサントニン酸化還元酵素およびアルデヒド酸化酵素両方の欠損症、すなわちタイプ II であり、オキシプリノールへ代謝されればタイプ I と診断できる。具体的には、アロプリノールを投与し、数時間後に血中または尿中オキシプリノールが確認されればタイプ I である。

キサントニン尿症は常染色体劣性遺伝形式をとり、タイプ I はショウジョウバエの *ry* 変異に相当する。これまでにキサントニン酸化還元酵素のナンセンス変異 (Arg228Ter)、フレームシフト変異 (1bp DEL, 2567C) およびミスセンス変異 (Arg149Cys) が報告されている。ウシミルク酵素の立体構造²⁶⁾に当てはめると、Arg149 は非ヘム鉄に配位する 2 個のシステイン残基に挟まれている。これらのシステイン残基の存在するループ (145~153) のアミノ酸配列はアルデヒド酸化酵素を含むキサントニン酸化還元酵素のファミリーできわめてよく保存されており、酵素活性の発現にきわめて重要な構造の 1 つと考えられる²⁷⁾。

タイプ II はショウジョウバエの *ma-1* 変異に相当する。これまでにヒトモリブデンコファクター硫化酵素のナンセンス変異 (Arg419Ter) とミスセンス変異 (Arg776Cys) が報告されている。Arg776 は前述のピリドキサル結合部位や硫黄原子転移反応に参与する

システイン残基からは一次構造上離れており、大腸菌の *nifs* 遺伝子産物など、この硫黄原子転移酵素ファミリーのうち、非ヘム鉄の合成に関与するグループには存在しない領域であることから、酵素反応そのものに関与するものではなさそうである。一方、Arg776 近傍の配列はショウジョウバエの *ma-1* 遺伝子産物と比較して、かなりよく保存されている。モリブデンコファクター硫化酵素の標的となるキサントニン酸化還元酵素などとの相互作用に必要なのかもしれない。

タイプ II において、キサントニン酸化還元酵素欠損によるものではなく、アルデヒド酸化酵素の欠損に起因すると思われる明らかな臨床症状および一般臨床検査は報告されていない。アルデヒド酸化酵素の基質特異性がキサントニン酸化還元酵素など、他の酵素と一部重複していることが、アルデヒド酸化酵素欠損による固有の所見を認めない理由と考えられている。アルデヒド酸化酵素は生体異物の酸化に関与し、多くの薬物の代謝過程に働いている。したがって、生体異物に曝露されない環境下では、身体的にも臨床検査上も異常を認めにくいことも、アルデヒド酸化酵素の固有の所見が明らかでないことに関係しているかもしれない。ヒトにおけるアルデヒド酸化酵素の生体内意義の詳細は明らかにされていないが、今後、さらに生体におけるアルデヒド酸化酵素の機能が明らかになると、タイプ II はタイプ I と明確に区別し、特定の薬物の投与量や併用に関して注意が必要になるかもしれない。

キサントニン尿症患者に対する薬物治療は基本的に必要ないが、キサントニンの尿への溶解度は低いので、尿路結石やそれに伴う腎機能低下を予防するため、飲水により尿量を増やすよう患者に指導する。日本における尿路結石の合併率は高くないが、海外においては高率に尿路結石の合併を認めるため、定期的な尿潜血反応検査や腹部超音波検査が必要である。また、酸性尿の場合は尿のアルカリ化を行う。しかしながら、尿へのキサントニンの溶解度は酸性尿の改善により上昇するものの、尿酸の場合に比較すると軽度であり、高尿酸尿症の結石予防時のような効果は期待できない。尿路結石のある場合や著しいオキシプリン排泄量増加が原

因と思われる腎機能低下を認めるような症例には、食事療法として低プリン食を指導する。

なお、ウシのキサンチン尿症タイプⅡは尿路結石を高頻度に認め、腎不全に至ることが多い。また、カイコは、幼虫の皮膚の真皮に尿酸結晶を多くもち、それにより皮膚が不透明になっているが、キサンチン尿症のカイコでは両タイプとも皮膚が透明となり、生殖能力を失う²⁸⁾²⁹⁾。このカイコの弱体化は、尿酸による酸化作用の喪失が関与していると推定され、キサンチン酸化還元酵素の注入により回復する。

おわりに

キサンチン酸化還元酵素の全一次構造が明らかになることにより、多くの蛋白質化学的解析の結果と合わせて、本酵素の構造と機能の関連を解明する突破口を開くことができた。得られたcDNAにより、酵素の大量発現系の構築や人工変異酵素の解析への道が開けた。遺伝子の構造も明らかになるとともに、分子進化的側面からの解析も多く行われている。キサンチン尿症についてもキサンチン酸化還元酵素が原因となるタイプⅠに加えて、タイプⅡ型の原因となるモリブドプテリンに硫黄原子を転移する酵素の遺伝子も同定された。なお、キサンチン尿症のタイプⅠ、タイプⅡとも、ときに認められるキサンチン結石以外、特に重症な症状は報告されていない。したがって、キサンチン酸化還元酵素を阻害することにより効果を発現する尿酸産生抑制薬は、阻害剤そのものの化学物質としての副作用(たとえば肝毒性やアレルギーなど)は別として、原理的な副作用は少ないと推測される。しかし、欠損症そのものの症例数は、結論を見出すほど多くはない。

本稿では触れることができなかったが、キサンチン酸化還元酵素のもつもう1つの問題は、本来は脱水素酵素である本酵素が、多くの疾患環境下において酸化酵素に変換され、活性酸素を産生することにより臓器障害に関与していると考えられているが、一方ではその関与は著しく少ないとの考えも存在している点である。キサンチン尿症は、この酵素が欠損していることから、多くのキサンチン尿症を解析することにより、

疾病罹患時の生体内におけるキサンチン酸化酵素の働きが明らかにできる可能性があり、今後の臨床データの集積が期待される。

文献

- 1) Amaya Y, Yamazaki K, Sato M, et al : Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type : Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin. *J Biol Chem* **265** : 14170-14175, 1990
- 2) Sato A, Nishino T, Noda K, et al : The structure of chicken liver xanthine dehydrogenase : cDNA cloning and the domain structure. *J Biol Chem* **270** : 2818-2826, 1995
- 3) Forrest HS, Hanly EW, Lagowski JM : Biochemical differences between the mutants Rosy-2 and maroon-like of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **46** : 1455-1463, 1961
- 4) Keller EC Jr, Glassman E : Xanthine Dehydrogenase : Differences in Activity among *Drosophila* Strains. *Science* **143** : 40-41, 1964
- 5) Keith TP, Riley MA, Kreitman M, et al : Sequence of the structural gene for xanthine dehydrogenase (rosy locus) in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **116** : 67-73, 1987
- 6) Ichida K, Amaya Y, Noda K, et al : Cloning of the cDNA encoding human xanthine dehydrogenase (oxidase) : Structural analysis of the protein and chromosomal location of the gene. *Gene* **133** : 279-284, 1993
- 7) Minoshima S, Wang Y, Ichida K, et al : Mapping of the gene for human xanthine dehydrogenase (oxidase) (XDH) to band p 23 of chromosome 2. *Cytogenet Cell Genet* **68** : 52-53, 1995
- 8) Xu P, Huecksteadt TP, Hoidal JR : Molecular cloning and characterization of the human xanthine dehydrogenase gene (XDH). *Genomics* **34** : 173-180, 1996
- 9) Wright RM, Vaitaitis GM, Wilson CM, et al : cDNA cloning, characterization, and tissue-specific expression of human xanthine dehydrogenase /

- xanthine oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** : 10690-10694, 1993
- 10) Turner NA, Doyle WA, Ventom AM, et al : Properties of rabbit liver aldehyde oxidase and the relationship of the enzyme to xanthine oxidase and dehydrogenase. *Eur J Biochem* **232** : 646-657, 1995
 - 11) Neumeier M, Weigert J, Schaffler A, et al : Aldehyde oxidase 1 is highly abundant in hepatic steatosis and is downregulated by adiponectin and fenofibric acid in hepatocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **350** : 731-735, 2006
 - 12) Weigert J, Neumeier M, Bauer S, et al : Small-interference RNA-mediated knock-down of aldehyde oxidase 1 in 3T 3-L1 cells impairs adipogenesis and adiponectin release. *FEBS Lett* **582** : 2965-2972, 2008
 - 13) Linton A, Kang P, Ornelas M, et al : Systematic structure modifications of imidazo [1,2-a] pyrimidine to reduce metabolism mediated by aldehyde oxidase (AO). *J Med Chem* **54** : 7705-7712, 2011
 - 14) Garattini E, Terao M : Increasing recognition of the importance of aldehyde oxidase in drug development and discovery. *Drug Metab Rev* **43** : 374-386, 2011
 - 15) Rodriguez-Trelles F, Tarrío R, Ayala FJ : Convergent neofunctionalization by positive Darwinian selection after ancient recurrent duplications of the xanthine dehydrogenase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** : 13413-13417, 2003
 - 16) Havemeyer A, Bittner F, Wollers S, et al : Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J Biol Chem* **281** : 34796-34802, 2006
 - 17) Simmonds H, Reiter S, Nishino T : Hereditary xanthinuria. *in* The metabolic and molecular bases of inherited disease (7th ed.). ed by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al. New York, McGraw-Hill, 1781-1797, 1995
 - 18) Amrani L, Primus J, Glatigny A, et al : Comparison of the sequences of the *Aspergillus nidulans* hxB and *Drosophila melanogaster* ma-l genes with nifS from *Azotobacter vinelandii* suggests a mechanism for the insertion of the terminal sulphur atom in the molybdopterin cofactor. *Mol Microbiol* **38** : 114-125, 2000
 - 19) Wahl RC, Warner CK, Finnerty V, et al : *Drosophila melanogaster* ma-l mutants are defective in the sulfuration of desulfo Mo hydroxylases. *J Biol Chem* **257** : 3958-3962, 1982
 - 20) Watanabe T, Ihara N, Itoh T, et al : Deletion mutation in *Drosophila* ma-l homologous : Putative molybdopterin cofactor sulfurase gene is associated with bovine xanthinuria type II. *J Biol Chem* **275** : 21789-21792, 2000
 - 21) Ichida K, Matsumura T, Sakuma R, et al : Mutation of human molybdenum cofactor sulfurase gene is responsible for classical xanthinuria type II. *Biochem Biophys Res Commun* **282** : 1194-1200, 2001
 - 22) Komoto N, Sezutsu H, Yukuhiro K, et al : Mutations of the silkworm molybdenum cofactor sulfurase gene. *og. cause translucent larval skin. Insect Biochem Mol Biol* **33** : 417-427, 2003
 - 23) Dent CE, Philpot GR : Xanthinuria, an inborn error (or deviation) of metabolism. *Lancet* **266** : 182-185, 1954
 - 24) Yamamoto T, Higashino K, Kono N, et al : Metabolism of pyrazinamide and allopurinol in hereditary xanthine oxidase deficiency. *Clin Chim Acta* **180** : 169-175, 1989
 - 25) Reiter S, Simmonds HA, Zollner N, et al : Demonstration of a combined deficiency of xanthine oxidase and aldehyde oxidase in xanthinuric patients not forming oxipurinol. *Clin Chim Acta* **187** : 221-234, 1990
 - 26) Enroth C, Eger BT, Okamoto K, et al : Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase : Structure-based mechanism of conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** : 10723-10728, 2000
 - 27) Ichida K, Amaya Y, Kamatani N, et al : Identification of two mutations in human xanthine dehydrogenase gene responsible for classical type I xanthinuria. *J Clin Invest* **99** : 2391-2397, 1997
 - 28) Yasukochi Y, Kanda T, Tamura T : Cloning of two *Bombyx* homologues of the *Drosophila* rosy gene and their relationship to larval translucent skin colour mutants. *Genet Res* **71** : 11-19, 1998
 - 29) 河本夏雄 : カイコ突然変異体を用いた尿酸代謝機構研究. *蛋白質核酸酵素* **49** : 2198-2205, 2004

キサンチン尿症の遺伝子異常

Mutations in xanthinuria

東京薬科大学病態生理学教室 教授

Kimiyoshi Ichida 市田 公美

Key Words

キサンチン尿症,
キサンチン脱水素酵素,
モリブデン補酵素硫化酵素,
アルデヒド酸化酵素

Summary

キサンチン酸化還元酵素は、プリン代謝の最後の2つの反応であるヒポキサンチンからキサンチンへ、そしてキサンチンからの尿酸への反応を触媒する。キサンチン尿症は、キサンチン酸化還元酵素の欠損症であり、血清尿酸値1.0mg/dL以下の著しい低尿酸血症と尿中キサンチン排泄量の増加を認める。キサンチン尿症には、キサンチン酸化還元酵素の単独欠損であるタイプIとアルデヒド酸化酵素も欠損しているタイプIIがある。これらのタイプは、アロプリノール負荷試験か遺伝子解析により決定される。タイプIはキサンチン酸化還元酵素遺伝子の異常であり、タイプIIはモリブデン補酵素に硫黄を付加する反応を触媒するモリブデン補酵素硫化酵素の遺伝子異常である。キサンチン酸化還元酵素遺伝子の同定、キサンチン尿症タイプIとタイプIIの責任遺伝子の同定が日本人により行われた。また、キサンチン尿症の遺伝子変異についても、日本から多く報告されている。

はじめに

キサンチン酸化還元酵素(xanthine oxidoreductase : XOR)(EC 1. 1. 3. 22)は、プリン代謝の最後の2つの反応、すなわちヒポキサンチンからキサンチンへ、そしてキサンチンからの尿酸への反応を触媒する(図1)。XORは、抽出生成の過程でキサンチン酸化酵素(xanthine oxidase)に変換されやすいため、以前はキサンチン酸化酵素として知られていた。しかし、現在では生体内において、通常キサンチン脱水素酵素(xanthine dehydrogenase)として存在していることが明らかになっている。キサンチン尿症は、XORの欠損症であり、血清尿酸値1.0mg/dL以下の著しい低尿酸血症とXORの基質であるキサンチンの尿中排泄量の増加を認める。そのため、キサンチン尿症と呼ばれ、キサンチン結石を認めることがある。1800年代に、すでにキサンチン結石は報告されていたが、キサンチン尿症としては1954年にDentらがキサンチン酸化酵素の欠損症の可能性を含め、代謝異常症として初めて報告した¹⁾。現在までに100例以上が報告されているが、稀な疾患である。XOR遺伝子の同定、XORの立体構造

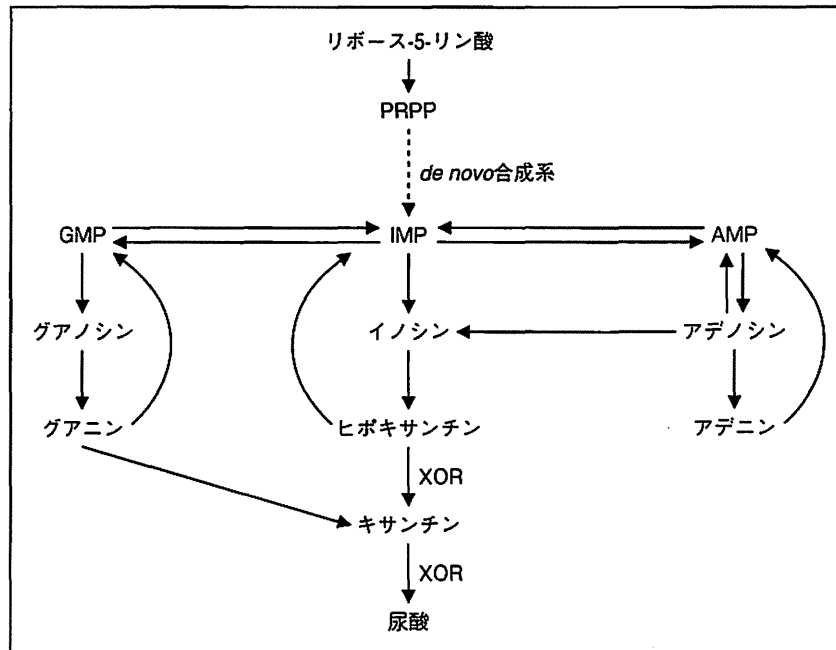


図1. プリン代謝

AMP: アデノシン-リン酸, IMP: イノシン酸, GMP: グアノシン-リン酸,
PRPP: ホスホリボシルピロリン酸

の解明, そしてキサンチン尿症タイプIとタイプIIの責任遺伝子の同定が日本人により行われた。本稿では, 今までのキサンチン尿症の病態解明の流れと現在までに報告されている遺伝子変異について概説する。

頻度

キサンチン尿症の頻度の詳細は不明であるが, 英国において約69,000人の調査により1人を発見したことから, この頻度がよく用いられている²⁾。一方で, XOR活性には個人差があり, 健常者の10~20%と高頻度に活性低下を認めることが報告されている³⁾⁴⁾。Kudoらによる96人の日本人における一塩基多型(SNP)と既知のSNPの検討では, 活性を喪失するSNPや機能低下をきたすSNPはあるものの, 高頻度に認められる活性低下の機序を説明するには至っていない⁵⁾。

分類

Wattsらによりキサンチン尿症がXORの欠損症であることが報告されてから1970年代にかけ, アロプリノールをオキシプリノールに代謝できるキサンチン尿症と代謝できないキサンチン尿症の存在が明らかになった^{6)~9)}。アルデヒド酸化酵素(aldehyde oxidase: AO)(EC 1. 2. 3. 1)も, XORと同様にアロプリノールからオキシプリノールへの反応を触媒することが報告されていたことから, AOの欠損の有無がこの代謝の違いに関与している可能性が指摘されていたが詳細は不明であった。1989年になりYamamotoらは自験例を用い, 少なくとも2つのタイプが存在することを示した¹⁰⁾。つづいて, Reiterらが, アロプリノールをオキシプリノールに代謝できるキサンチン尿症はXORの単独欠損であり, 代謝できないキサンチン尿症はXORとAOの両酵素の欠損であることを示した¹¹⁾。現在では, 前者をタイプI, 後者をタイプIIと呼んでいる。

タイプIとタイプIIは臨床症状、臨床検査所見がほとんど同じことから、アロプリノール負荷試験または、遺伝子解析を行わないとタイプを決定することはできない¹²⁾。

3 キサンチン尿症において欠損する酵素

XORについては他稿にて詳細に述べられるので、概略にとどめる。XORは、150kDaのサブユニットからなるホモ二量体として存在し、そのサブユニットは3つのドメインから構成されている。N末端側から順に、それぞれのドメインには、2個の[2Fe-2S]型の鉄硫黄中心、フラビンアデニンジヌクレオチド(flavin adenine dinucleotide : FAD)とモリブデン補酵素の1つが酸化還元中心として存在し、それぞれのドメインは60アミノ酸前後のリンカーにより連結されている(図2)。

AOも、XORと同じファミリーに属し、150kDaのサブユニットからなるホモ二量体として存在し、そのサブユニットのドメイン構成もXORと同様である。AOは、生体内基質としてレチナール、ピリドキサル、

ニコチンアミドなどを酸化すると同時に、生体異物の酸化に関与し、多くの薬物の代謝過程に働いている。タイプIIにおいて、AOの欠損に起因する明らかな臨床症状および一般臨床検査は報告されていない。AOの基質特異性がXORなどの他の酵素と一部重複していることが、AO欠損による固有の所見を認めない理由と考えられている。ヒトにおけるAOの存在意義の詳細は明らかにされていないが、最近では、抗癌剤などの代謝におけるAOの重要性が報告されている¹³⁾¹⁴⁾。また、AOが脂肪組織に多く発現し、脂肪細胞の分化や脂質代謝に関与していることも報告されている¹⁵⁾¹⁶⁾。今後、さらに生体におけるAOの機能が明らかになると、タイプIIはタイプIと明確に区別し、特定の薬物の投与量や併用に関して注意が必要になるかもしれない。

4 病因

1. キサンチン尿症タイプI

ラットのcDNAが同定されたことに続いて、われわれ

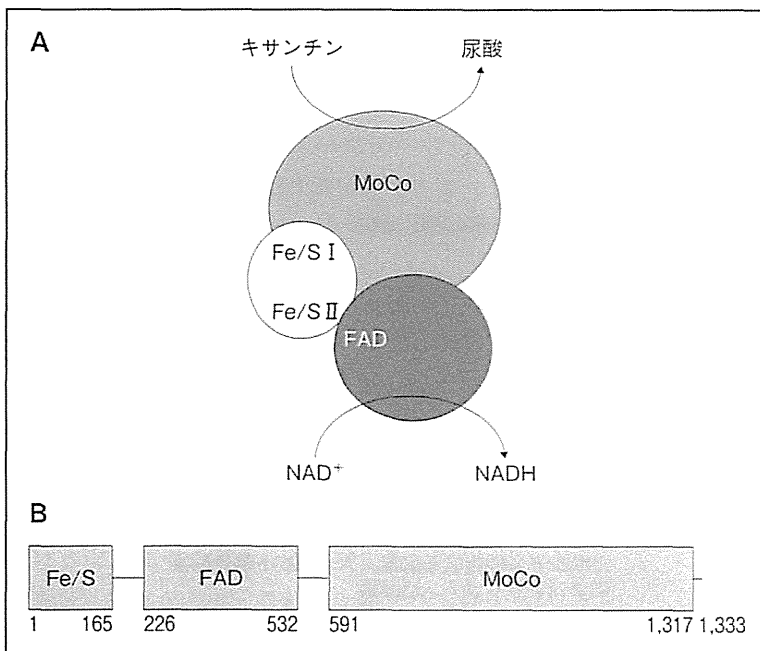


図2. XORの構造と反応部位

A: XORのモノマー内の反応部位。

MoCo: モリブデン補酵素(モリブドプテリンにモリブデンが配位したものであり、これをモリブドプテリンという場合もある)。Fe/S I・Fe/S II: 鉄硫黄中心(この2つの差異は、本文参照)。NAD: ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

B: XORの一次構造と各ドメインボックスはドメインを、直線はリンカー部分を表す。