

CYP4F サブファミリー (ロイコトリエン B₄ ω 水酸化酵素)

菊田 安至

CYP4F subfamily
(Leukotriene B₄ ω-hydroxylase)

Yasushi KIKUTA

ABSTRACT

Leukotriene B₄ ω-hydroxylation was reported in 1981 immediately after discovery of leukotriene B₄. After that, a large number of investigations about leukotriene B₄ ω-hydroxylase in neutrophils and liver have been presented. The primary structures of the enzymes were clarified by cDNA cloning, and they were found to be novel P450s which belong to the CYP4F subfamily. At present, seventeen members of this subfamily have been discovered by cDNA cloning and by genome projects. Most of them show leukotriene B₄ ω-hydroxylase activity, and catalyze hydroxylation of various substrates including lipoxygenase dependent arachidonate metabolites, prostaglandins, and drugs. They also distribute a variety of tissues such as leukocyte, liver, kidney, seminal vesicles, and brain. Now, CYP4F enzymes are thought to have various functions.

キーワード：ロイコトリエン B₄、ω 水酸化酵素、エイコサノイド、P450、分子多様性。

Keywords: leukotriene B₄, ω-hydroxylase, eicosanoids, P450, and molecule diversity.

1. まえがき

ロイコトリエン B₄ ω 水酸化酵素に関する研究は 20 年にわたり続いてきた(1,2)。最初の 10 年余りの間は細胞やミクロソーム画分を用いた未精製酵素による研究が中心であったが、1993 年にヒト好中球の酵素の cDNA クローニングが行われてからは、組換え酵素や遺伝子解析など多様な手法により研究が進められるようになった(3)。そして現在、数々のゲノムプロジェクトの進行によって、多くのアイソザイムが発見されるようになった。しかし、これらのアイソザイムの性質が詳しく比較されることはこれまでなかった。ロイコトリエン B₄ ω 水酸化酵素はすべて一

群の P450 (CYP4F サブファミリー) に属することから、ここでは、CYP4F サブファミリーの各分子種についてのこれまでの研究の結果をまとめ、その生理的役割を検討した。

2. ヒト好中球のロイコトリエン B₄ ω 水酸化酵素

2. 1 ヒト好中球における発見

ヒト好中球がロイコトリエン B₄ の ω 末端を酸化することは、ロイコトリエン B₄ が発見された翌年の 1981 年にすでに報告されている(1,2)。ヒト末梢血中の好中球をイオノフォア (A23187) で刺激するとロイコトリエン B₄ が放出されてくるが、ω 末端が酸化された 20-ヒドロキシロイコトリエン B₄ や 20-カル

ポキシロイコトリエン B₄も同時に検出される。このような現象は動物の血液では観察されない。ω酸化を受けたロイコトリエン B₄の比率は刺激後の時間の経過に伴って増加し、10分後には50%を超える(4)。また、培地中に添加したロイコトリエン B₄は好中球により半減期約4分でω酸化物に代謝される。ロイコトリエン B₄は、非常に強力な生理活性物質であり、炎症やアレルギー反応の主要なメディエーターの一つである(5)。そして、ω位が酸化されることによりその生理活性は1/10以下に低下することから、このω酸化反応はロイコトリエン B₄の不活性化反応であると考えられる(1)。特にその最初の反応であるロイコトリエン B₄ω水酸化反応は、この不活性化経路にとって最も大切なステップである。この反応を触媒する酵素、ロイコトリエン B₄ω水酸化酵素については、ヒト好中球を用いて詳細な検討が行われ、この酵素がチトクローム P450(P450)の一種であることが、阻害実験などにより明らかとなった(6)。さらに、ウサギの肺や肝臓に発現するプロスタグランジンのω水酸化酵素である CYP4A4 に対する免疫抗体によりこの活性が阻害され、両者が類似の酵素であることが判明した(7)。

2. 2 CYP4F3の性質

我々は、1993年にCYP4A4のcDNAをプローブにヒト好中球のcDNAライブラリーよりロイコトリエン B₄ω水酸化活性を有する酵素のcDNAを単離した(3)。このcDNAには520アミノ酸残基からなる分子量59,805 Daのタンパク質がコードされていた。このタンパク質を発現させた酵母のミクロソーム画分は、449.5nmに吸収極大を持つ還元型一酸化炭素差スペクトルを示し、このタンパク質がP450であることが確認された。このタンパク質の一次構造はCYP4A4をはじめとするCYP4AサブファミリーやCYP4Bサブファミリーの分子種とは31-44%の、ラットの機能未知のP450、CYP4F1とは74%の相同性を示し、この酵素はCYP4F3という分類名が与えられた (Table

1)。酵母内発現させたCYP4F3のSDS-PAGEによる見かけ上の分子量は55kDaで、その吸収スペクトルは低スピン型であった。そして、このCYP4F3は、ロイコトリエン B₄ω水酸化反応を触媒した。このことは、プローブとして用いたCYP4A4やその他のCYP4Aサブファミリーの酵素がこの反応を触媒できない点で大きな違いである。ノーザンブロッティングにより、このP450のmRNAはヒトの好中球にだけ存在し、リンパ球や肝臓、腎臓には見られないことが示された(8)。

2. 3 CYP4F3の酵素活性

酵母を用いて発現させ、それより精製したCYP4F3は、ロイコトリエン B₄のω水酸化反応を触媒するが、その時のKm値は0.7 μMであった(9)。この反応はチトクローム b₅の添加により促進された。CYP4F3は6-*trans*-ロイコトリエン B₄やリポキシン A₄、リポキシン B₄、5-HETE、12-HETEなど種々のアラキドン酸のリポキシゲナーゼ代謝産物に対してもω水酸化反応を示した。この酵素はまた、ロイコトリエン B₄の他に、20-OH-ロイコトリエン B₄や20-oxo-ロイコトリエン B₄のω位の酸化反応を触媒した。しかし、ロイコトリエン B₄以外の基質に対するKm値は比較的高く7-60 μMであった。このことは、CYP4F3がロイコトリエン B₄に比較的特異的な酵素であることを示している。また、これらの結果はヒト好中球を用いた実験の結果とよく一致していて、CYP4F3がヒト末梢血中でロイコトリエン B₄の不活性化を担っていることが示された。

3. ヒト肝臓のロイコトリエン B₄ω水酸化酵素

ヒトの肝臓ミクロソーム画分でロイコトリエン B₄ω水酸化活性が示されたことから、ヒト肝臓のCYP4F分子種のcDNAを単離した(8)。この分子種はCYP4F3と87%の相同性を示し、CYP4F2と命名された。CYP4F2のmRNAはヒトの肝臓と腎臓に見られ、好中球には発現していない。この酵素を発現させた

Table 1. Human CYP4 family. Tissue distribution of human CYP4 enzymes and substrates of purified or recombinant enzymes are shown. Tissues are shown in order of expression levels. Substrates catalyzed with higher activity or lower Km values are indicated in upper place. Blank means it has not been reported. The major products of fatty acids and eicosanoids are ω-hydroxy forms, and substrate with other product is indicated with bracket. Drugs are metabolized to deethylated, demethylated, or hydroxylated products.

	CYP4A11	CYP4B1	CYP4F2	CYP4F3	CYP4F8	CYP4F11	CYP4F12	CYP4F22
Organs	Liver, kidney	Lung, placenta	Liver, kidney	Neutrophil	Seminal vesicles	Liver, kidney, heart, skeletal muscle	Liver, kidney colon, small intestine, heart	
Substrates	Laurate, myristate, arachidonate	Laurate, 2-aminofluorene	6- <i>trans</i> -LTB ₄ , lipoxin A ₄ , 5-HETE, 8-HETE, 12-HETE, LTB ₄ , 7-ethoxycoumarine, <i>p</i> -nitroanisole	LTB ₄ , 20-OH-LTB ₄ , 20-oxo-LTB ₄ , lipoxin A ₄ , lipoxin B ₄ , 12-HETE	Arachidonate (ω-2), PGH ₂ (ω-1 and ω-2)		Arachidonate (ω-2), ebastine, LTB ₄	

酵母のミクロソーム画分はロイコトリエン B₄ ω 水酸化反応を触媒した。この時の Km 値は 45 μM であり、肝臓ミクロソーム画分での結果とよく一致した(10)。この酵素はさらに 6-*trans*-ロイコトリエン B₄ やリポキシシン A₄、5-HETE、8-HETE、12-HETE などアラキドン酸の種々のリポキシゲナーゼ代謝産物に対して ω 水酸化反応を示した。これらの基質に対する Km 値は、40 - 75 μM 程度であった。CYP4F2 は、ラウリン酸やプロスタグランジン等を基質としないが、エトキシマリンや *p*-ニトロアニソールなどの代謝活性を示す点で、CYP4A サブファミリーの酵素と大きく異なっていた。

一方、Powell らはヒトの肝臓から精製された CYP4F2 がアラキドン酸 ω 水酸化活性を示すことを報告している(11)。彼らは、ヒト肝臓の二種類の ω 水酸化酵素である CYP4F2 と CYP4A11 を比較し、両者のアラキドン酸に対する活性値は大きく変わらないが、CYP4F2 の Km 値は 10 倍近く低いこと、CYP4F2 に対する免疫抗体は CYP4A11 に対するものよりもより強く肝臓のアラキドン酸 ω 水酸化反応を阻害することを見出し、ヒト肝臓における 20-HETE の生成には CYP4F2 がより強く関与していることを示した。また、Lasker らは、腎臓の近位尿細管には CYP4F2 と CYP4A11 が多量に発現していて、これら 2 つの P450 が 20-HETE の合成にかかわっていることを示した(12)。

4. CYP4F2 と CYP4F3 の比較

4. 1 活性と構造

CYP4F2 と CYP4F3 との最も大きな違いは臓器分布である。CYP4F2 は肝臓と腎臓に、CYP4F3 は好中球

に特異的にそれぞれ発現している(8)。そして、次に大きな違いは酵素活性である。CYP4F2 と CYP4F3 は概ねアラキドン酸のリポキシゲナーゼ代謝産物を基質とし、その ω 末端を水酸化(酸化)している。しかし、ロイコトリエン B₄ に対する親和性が際立って異なっており、CYP4F2 のロイコトリエン B₄ に対する Km 値は CYP4F3 のものよりも 60 倍以上高い。また、CYP4F2 はリポキシシン B₄ や 20-OH-ロイコトリエン B₄、20-oxo-ロイコトリエン B₄ を基質としない(9,10)。このような違いが生理的にどのように影響するのか明らかでないが、CYP4F3 がロイコトリエン B₄ を活発に不活性化していることは間違いない。

このような二つの P450 の酵素活性の違いは、その構造に起因していると考えられる。CYP4F2 と CYP4F3 の一次構造は全体で 87% の相同性を示すが、一部にきわめて相同性の低い領域(67-115 残基目)が存在する。これ以外のアミノ酸配列は全体で 94% の相同性を示すが、この領域の相同性は 27% である。CYP4F2 と CYP4F3 の一次構造を、脂肪酸を基質とする CYP102 (BM3) の構造と比較すると、基質認識にかかわる領域の一つ(SRS-1)にこの相同性の低い領域は対応している(13)。これ以外の基質認識にかかわる領域に対応する CYP4F2 と CYP4F3 の一次構造は極めて類似しており、大きな差は認められない。このことは、2 つの P450 の活性の違いは 67-115 領域に起因していることを強く示唆している。CYP102 のこの領域は、基質ポケットの入り口付近に位置していて、脂肪酸の α 末端を認識にかかわっている。また、CYP4A サブファミリーの分子種でもこの領域の配列は変異が大きく、基質特異性に深く関わっていることが示されている(14)。

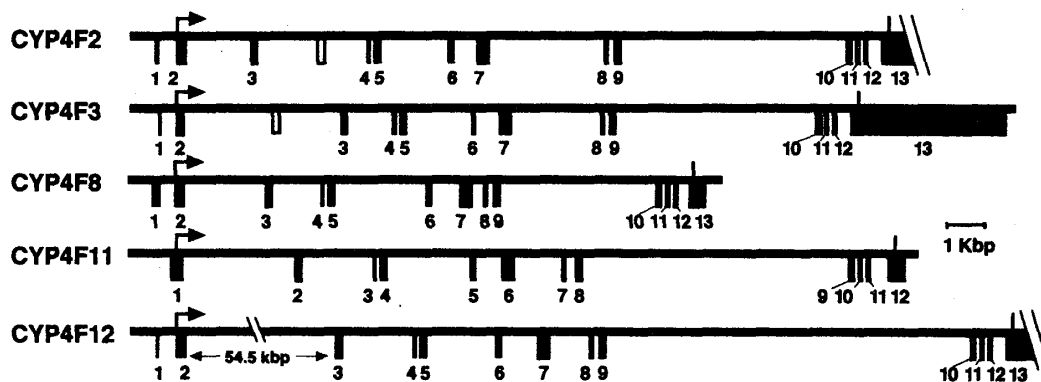


Figure 1. Gene structure of human CYP4F. Solid boxes and numbers represent exons. The open box in intron III of the CYP4F2 gene indicates the sites homologous to exon III of the CYP4F3 gene. The open box in intron II of the CYP4F3 gene indicates the site homologous to exon III of the CYP4F2 gene. Translation Initiation and termination sites are shown by arrows and vertical bars.

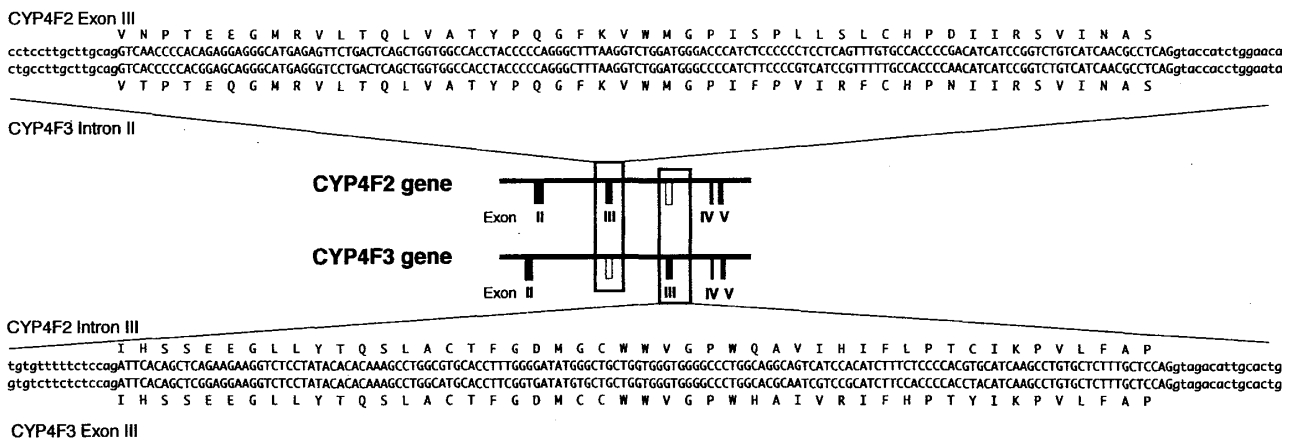


Figure 2. Structure of exon III and exon III-like region of human CYP4F genes. Nucleotide sequence of exon III and exon III-like region in introns of human CYP4F genes, its neighborhoods, and its deduced amino acid sequence are shown. The nucleotides and amino acids of the exon III-like sequence which are identical with those of exon III of the other gene are represented by colored letters.

4. 2 遺伝子構造

ヒトのゲノム DNA クローンを用いた解析により CYP4F2 と CYP4F3 のゲノム構造が明らかとなった (Fig. 1) (15,16)。この二つのヒトの遺伝子は非常に類似した構造を示した。両遺伝子は 1 3 個のエクソンを持ち、そのうちのエクソン II からエクソン XIII の間にオープンリーディングフレームがコードされていた。両遺伝子のエクソン I はともに 49b のリーダー配列をコードしていた。また、両遺伝子のスプライシングサイトはすべて一致した。さらに、転写開始点より上流側の -166b の領域やイントロンでも両遺伝子の間で高い相同性を示した。しかし、-166b より上流側では両遺伝子の間で全く相同性が認められなかったことから、発現の特異性を決定する機構はこの上流側の領域に存在すると考えられた。

ところで、CYP4F2 と CYP4F3 の一次構造で見られた相同性の低い領域 (67-115) は、ちょうど両遺伝子のエクソン III にコードされている。また、エクソン III の位置も二つの遺伝子の間で異なっていることから、エクソン III のスプライシングサイトの変異によりこの相同性の低い領域が出来たと予想される (Fig.1)。そして、面白いことに互いのエクソン III に相当する位置にエクソン III 類似の配列が存在している。すなわち、CYP4F3 遺伝子のイントロン II に CYP4F2 遺伝子のエクソン III に類似の配列が見られ、逆に CYP4F2 遺伝子のイントロン III には CYP4F3 遺伝子のエクソン III に類似の配列が見られる (Fig. 2)。この 145-b からなる二つのエクソン III に類似した配列は GT-AG ルールに従っており、フレームシフトやストップコドンも含まないことから、もしこれらの

配列がスプライシングによりエクソン III として使われたなら、新たな P450 を発現することが出来る。

Christmas らは、CYP4F3 遺伝子からエクソン III が入れ代わって出来た新たな P450 (CYP4F3B) がヒト肝臓で発現していることを RT-PCR 法により示した (17)。また、CYP4F3B の mRNA の転写は、イントロン I の異なる位置より開始されていることも示された。CYP4F3B の一次構造は、CYP4F2 と 93% の高い相同性を持ち、さらに肝臓や腎臓で発現しているが好中球には見られないなど、臓器分布の点でも CYP4F2 に類似していた。また、CYP4F3B の酵素活性も CYP4F2 に似ていて、ロイコトリエン B₄ の水酸化活性を持つが、その Km 値は CYP4F3 と比べて著しく高い。また、CYP4F3 がアラキドン酸に対してほとんど活性を示さないのに対し、CYP4F3B は CYP4F2 と同じくアラキドン酸をよい基質とする。そして彼らは、肝臓では CYP4F3B が CYP4F2 よりも優位に発現していること、腎臓でも CYP4F3B は多量に発現している事を明らかにし、肝臓や腎臓では CYP4F3B が CYP4F2 と同等かあるいはそれ以上の役割を担っている可能性を示した (18)。これらのことは、ヒト肝臓および腎臓における 20-HETE の生成に対する CYP4F3B の強い関与を示している。

5. CYP4F2 と CYP4F3 の誘導

ヒトの体内におけるこれらの P450 の誘導に関してはほとんど何も分かっていない。薬物やサイトカイン、脂質などがヒト体内でこれらの発現にどのように作用するかは全く不明である。一方、培養細胞を用いた実験により、これらの酵素の発現がレチノイン酸またはレチノイン酸により引き起こされた細胞

の分化により影響を受けることが示されている。

ヒト前骨髄性白血病細胞である HL60 を *all-trans*-レチノイン酸で刺激すると、細胞は好中球様に分化するのに伴い、HL60 細胞では見られなかった CYP4F3 の発現が観察できるようになる(19)。この CYP4F3 の発現は NADPH-オキシダーゼ活性の発現パターンと一致している。しかし、CYP4F3 遺伝子の発現調節領域にはレチノイン酸レセプター (PAP α) の認識配列が存在しないことから、この誘導はレチノイン酸の直接作用ではなく、分化に伴う別のシグナルが関与していると考えられる。

ヒト肝臓ガン由来の HepG2 細胞は *6-trans*-ロイコトリエン B $_4$ ω 水酸化活性を示し、さらに CYP4F2 の mRNA も確認できる(16)。ラットやウサギの CYP4A 酵素を強く誘導するクロフィブレードの添加は、HepG2 細胞の *6-trans*-ロイコトリエン B $_4$ ω 水酸化活性に影響しなかった。一方、Zhang らはレチノイン酸の添加により 24 時間目までに HepG2 細胞で CYP4F2 の mRNA が増加することを明らかにした(20)。この現象は *9-cis*-レチノイン酸で強く見られ、*all-trans* 型では弱かった。CYP4F2 遺伝子の転写開始点の上流側およびイントロン I には、レチノイン酸レセプターの認識配列が三ヶ所みられ、これらが発現に関与している可能性が高い。Zhang らはさらに、CYP4F2 遺伝子の転写活性を、HepG2 細胞を使って調べ、やはりレチノイン酸刺激により転写が促進されることを報告している(21)。また、PPAR α のリガンドである Wy14,643 の添加により転写活性は減少し、さらにこのような現象はそれぞれのレセプタータンパク質である RAR α や PPAR α を強制発現させた細胞でより顕著になることから、これらのレセプターが CYP4F2 遺伝子の発現調節に直接関与していることが示された。

6. ヒトのその他の CYP4F サブファミリー

6. 1 精嚢腺の CYP4F8

2001 年 8 月現在で CYP4F サブファミリーに属する P450 分子種は、*pseudogene* や不完全なものを除くと CYP4F2 や CYP4F3 を含めて全部で 17 種見つかっている(Dr. D.R. Nelson's homepage)。このうちの 6 種 (CYP4F2、CYP4F3、CYP4F8、CYP4F11、CYP4F12、CYP4F22) はヒトから分離されている。このことは、CYP4A サブファミリーの酵素が 1 種類 (CYP4A11) しか見つからないことと対照的であり、ヒトでは CYP4A サブファミリーよりも CYP4F サブファミリーのほうが優位であることを示唆している。

これら 6 種のヒトの分子種中で、CYP4F8 は Bylund らによってヒトの精嚢腺から分離されたもので、

CYP4F2 や CYP4F3 とそれぞれ 81%、77% の相同性を示す(22)。酵母で発現させた CYP4F8 はアラキドン酸の ω -2 位の水酸化反応を触媒することができるが、ヒトの精液中に 18-HETE は検出されない(23)。CYP4F8 はプロスタグランジン H $_1$ 、プロスタグランジン H $_2$ およびそれらの誘導体の ω -1 位または ω -2 位水酸化活性を示すが、ロイコトリエン B $_4$ やその他のプロスタグランジンに対してはほとんど活性を示さない。ヒトの精液中には 19-ヒドロキシプロスタグランジン E $_2$ が大量に含まれているが、これは CYP4F8 によりプロスタグランジン H $_2$ の ω -1 位が水酸化された後、異性化されてできると考えられる。

ところで、ヒツジの精嚢腺からも類似の酵素 (CYP4F21) が分離されているが、この酵素はプロスタグランジン H $_2$ の誘導体やプロスタグランジン E $_2$ の ω 水酸化活性を有しており、ヒツジ精液中に含まれる 20 ヒドロキシプロスタグランジン E $_1$ や 20 ヒドロキシプロスタグランジン E $_2$ の合成に関与していると考えられる(24)。

6. 2 その他の CYP4F サブファミリー

CYP4F2 に加えて、ヒトの肝臓には少なくとも 2 種類の CYP4F 分子種 (CYP4F11 と CYP4F12) が発現している(25-27)。

この内、CYP4F11 は CYP4F2 や CYP4F3、CYP4F8 とそれぞれ 80%、82%、79% の一次構造の相同性を示す。CYP4F11 は主に肝臓で発現しているが、その他に腎臓や心臓、骨格筋にも見られる(25)。しかし、その酵素学的な性質は不明である。

CYP4F12 の一次構造はその他のヒトの分子種と約 80% の相同性を示し、肝臓の他に腎臓や大腸、小腸、心臓などでも発現が確認された(26,27)。Bylund らは、酵母に発現させた CYP4F12 が、アラキドン酸の ω -2 水酸化反応やプロスタグランジン H $_2$ の安定的アナログである U51605 の ω 位または ω -1 位、 ω -2 位の水酸化反応を触媒することを報告した(26)。一方、Hashizume らは CYP4F12 がロイコトリエン B $_4$ とアラキドン酸に対して弱い ω 水酸化活性を示すとともに、薬物であるエバスチンの水酸化反応も触媒することを報告している(27)。

ところで、ヒトのゲノムプロジェクトにより CYP4F22 が発見されているが、これに関する詳しい検討は行われていない。

7. ヒト CYP4F サブファミリー遺伝子クラスター

ヒトの CYP4F サブファミリーのうち、CYP4F2 と CYP4F3、CYP4F8、CYP4F11、CYP4F12 のゲノム上での位置が判明しており、これらはすべて 19 番染色体の短腕側の 19p13.1-2 の位置に存在し、大きな遺伝

子クラスターを形成している (Fig. 3) (15,17,23,25,26)。19番染色体上にはCYP2AとCYP2Bのサブファミリーからなる遺伝子クラスターが長腕側の19q13に存在している(28,29)。一方、ヒトの他のCYP4ファミリー分子種(CYP4A11とCYP4B1)は共に1番染色体上にコードされている(30,31)。一方、ヒトのCYP4Fサブファミリーの遺伝子構造はよく似ており(Fig. 1)、それぞれのスプライシングサイトもほぼ保持されている。これらのことから、ヒトCYP4Fサブファミリーの分子種は19番染色体上でコピーが繰り返されることで、構造が類似しているが、多様な機能をもつ分子種を生み出してきたと考えられる。

8. 動物および魚類のCYP4Fサブファミリー

8. 1 一次構造の比較

6種類のヒトCYP4Fサブファミリーの他に、ラッ

トから4種類(CYP4F1, CYP4F4, CYP4F5, CYP4F6)、マウスから5種類(CYP4F13, CYP4F14, CYP4F15, CYP4F16, CYP4F18)、ヒツジから1種類(CYP4F21)、スズキから1種類(CYP4F7)のCYP4Fサブファミリーの分子種が発見されている(Dr. D.R. Nelson's homepage)。これら全部で17種のP450を一次構造上の相同性で分類すると、同じジーンクラスターを形成しているヒトの5つの分子種(CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12)は同じグループに分類される。一方、動物の分子種では、マウスとラットの間で5つのグループ(CYP4F1とCYP4F14, CYP4F4とCYP4F15, CYP4F5とCYP4F16, CYP4F6とCYP4F13, それにCYP4F18のみ)に分けられる。これらは、それぞれマウスとラットの分子種の組み合わせになることから、両種の共通の祖先に、すでにこれらの分子種が存在していたことを示唆している。一方、ヒツジおよびスズキの分子種はいずれの分子種ともグループを形成しない。

8. 2 ラットのCYP4F1

ラット肝臓ミクロソーム画分には高いKm値(42 μ M)でロイコトリエンB₄の酸化反応を触媒する酵素が存在することは以前から知られていた(32)。Sumimotoらはこの酵素の活性が一酸化炭素やCYP4A4に対する免疫抗体によって阻害されること、さらにプロスタグランジンA₁により競争的に阻害されることを示した(33)。また、ラット肝臓のこの活性はフェノバルビタールやメチルコラントレン、クロフィブレートなどのP450誘導剤では誘導されず、さらにリポポリサッカライドやカゼイン、四塩化炭素などの催炎症物質の投与でも増加せず、ヒトの酵素と同様に誘導機構は不明である(未発表データ)。

ChenとHardwickは、2-アセチルアミノフルオレンの投与によって生じたラット肝腫瘍細胞から、CYP4F1と命名された機能未知の新規P450を見出した(34)。CYP4F1のmRNAはいくつものラット肝腫瘍細胞や正常なラット肝細胞に発現しており、さらに新生仔ラット肝臓にも見られた。肝臓におけるCYP4F1の発現は絶食処置では変化せず、クロフィブレート処置によりわずかに減少した。そして、我々はCYP4F1もまたロイコトリエンB₄の酸化酵素であることを示した(35)。酵母内で発現させたCYP4F1タンパク質はロイコトリエンB₄をはじめとするさまざまなリポキシングナーゼ代謝産物に対する ω 酸化活性を示したが、ラウリン酸やリポキシンB₄は代謝しなかった。このうち、ロイコトリエンB₄に対する反応のKm値は134 μ Mと高く、その活性値も比較的低い(2.56 nmol/min/nmol P450)。CYP4F1はむしろ6-*trans*-ロイコトリエンB₄やリポキシンA₄

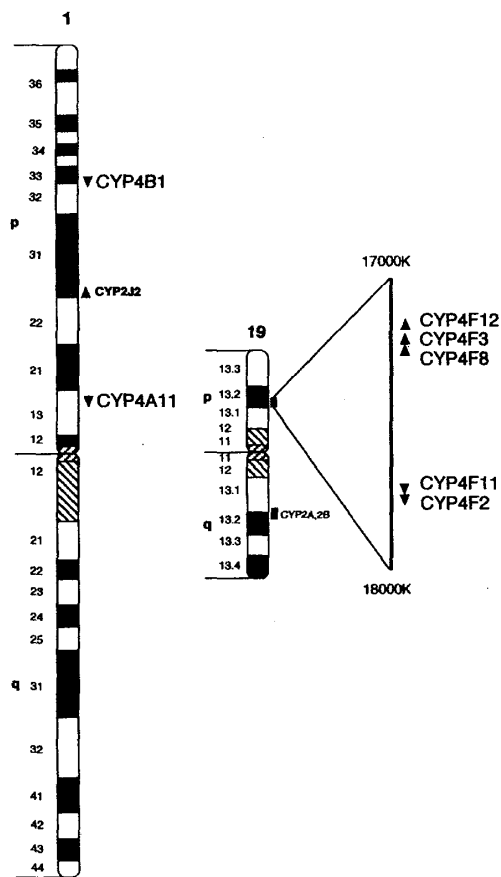


Figure 3. Chromosomal localization of the CYP4 families. Locations and directions of the human CYP4 family genes found in the NCBI human genome database are shown by arrow heads on ideograms of G-banding pattern of human chromosome 1 and 19. The region containing CYP4 genes are magnified by fifty times. The location of the CYP2J2 gene on chromosome 1 and the CYP2A and CYP2B gene cluster on chromosome 19 are also shown. Genes other than P450 are not indicated.

5-HETE、8-HETE の ω 水酸化活性を活発に触媒したが、その中でも 8-HETE は最良の基質であった ($K_m=18.6 \mu M$ 、 $V_{max}=15.5 \text{ nmol/min/nmol P450}$)。このような CYP4F1 の酵素学的性質はヒト肝臓の CYP4F2 の性質とよく一致したが、CYP4F1 は CYP4F2 と違ってプロスタグランジン A_1 に対して ω 水酸化活性を示した。

8. 3 マウスの CYP4F14

マウス肝臓のミクロソーム画分は、CYP4F サブファミリーの代表的基質である 6-*trans*-ロイコトリエン B_4 に対する弱い ω 水酸化活性を有するが、この活性はマウスをクロフィブレートで処置してもほとんど変化しない(36)。このことは、マウスの肝臓には低いレベルながら CYP4F サブファミリーに属する P450 分子種が発現していることを示している。一方、マウスの腎臓では 6-*trans*-ロイコトリエン B_4 に対する活性は検出できない。

マウス肝臓には、CYP4F1 と 95%の相同性を示す酵素、CYP4F14 が発現していることが判明している。CYP4F14 は、一次構造だけでなく酵素活性も CYP4F1 に極めてよく似ていて、CYP4F14 を発現させた酵母のミクロソーム画分は、ロイコトリエン B_4 の他に 6-*trans*-ロイコトリエン B_4 やリポキシシン A_4 、プロスタグランジン A_1 、5-HETE、8-HETE、12-HETE、15-HETE など多くの基質の ω 水酸化反応を触媒できる(36)。また、リポキシシン B_4 やラウリン酸に対して活性を示さない点も CYP4F1 と同じであった。一方、CYP4F14 の mRNA は肝臓で発現していて、脳でもわずかに検出されたが、腎臓には見られなかった。ラットの CYP4F 分子種も脳で発現しており(37)、脳における CYP4F の発現はラットやマウスで共通して見られる性質である。

CYP4F14 の遺伝子上には、2つの転写開始点が存在し、2種類のエクソン I がある(36)。上流側の転写開始点から転写された mRNA のリーダー配列は CYP4F1 や CYP4F2 のリーダー配列と相同性が認められる。肝臓では、下流側の転写開始点から転写された mRNA が上流側より転写されたものよりも約 2 倍多く発現している。また、脳でも両方の転写開始点から転写された mRNA が見られる。マウスをクロフィブレートで処置した場合、肝臓ではすべて型の mRNA の発現量が約 1/2 に低下する。このような 2 種類の転写開始点を持つ遺伝子は、臓器特異的あるいは誘導に特異的な転写開始点の使い分けが行われている例があるが、CYP4F14 についてはそのような現象は見つかっていない。

8. 4 ラット脳の CYP4F

ラットの CYP4F1 とマウスの CYP4F14 は一構造上

同じグループに分類されるが、ラットにはさらに 3 種類の CYP4F 分子種が存在している。Kawashima らは、ラットの脳に発現する P450 分子種の解析を行い、3 種類の新規 CYP4F 分子種 (CYP4F4、CYP4F5、CYP4F6) を報告した(37)。一方で、CYP4A 分子種のラットの脳における発現は確認できなかった。これら 3 種の CYP4F 分子種の一次構造は、CYP4F1 と 71-80%の相同性を示し、すべて肝臓や腎臓でも多量に発現している。また、クロフィブレート処置によりこれらの分子種の肝臓における発現量は減少する。大腸菌に発現させた CYP4F4 酵素はロイコトリエン B_4 の他に 6-*trans*-ロイコトリエン B_4 、プロスタグランジン A_1 、プロスタグランジン E_1 に対して ω 水酸化活性を示し、同じく CYP4F5 はロイコトリエン B_4 に対して弱い ω 水酸化活性を示す(38)。一方、COS 細胞で発現させた CYP4F6 はイミプラミン 10-水酸化活性を示す(39)。

8. 5 その他のマウスの CYP4F

マウスの CYP4F15 と CYP4F16 は、一次構造がラットの CYP4F4 と CYP4F5 にそれぞれ 90%以上の相同性を示し、ともに肝臓で強く発現しているが、これらの酵素活性は明らかになっていない。Cui らは、CYP4F15 と CYP4F16 の発現について検討し、次のように報告している(40)。CYP4F15 の mRNA は肝臓のほかにも脳でも弱く発現している他、腎臓や肺にもわずかに認められる。CYP4F16 の mRNA は、腎臓や心臓、脳、脾臓、肺に発現しており、この二つの分子種は臓器分布の点で少し差がみられる。マウスをリポポリサッカライドやクロフィブレートで処置すると、肝臓や腎臓における CYP4F15 と CYP4F16 の mRNA レベルが低下する傾向を示した。このような効果は PPAR α を発現していないマウスでは弱まることから、マウスの CYP4F の発現は PPAR α を介する経路によっても制御されていることが示された。

マウスの CYP4F13 および CYP4F18 については、cDNA が分離されているだけで、詳細は不明である。

8. 6 魚類の CYP4F

魚類からは、スズキの腎臓で CYP4F7 が見つかった(41)。この P450 は他の哺乳類の CYP4F サブファミリーと 48-55%の一次構造の相同性を示す。CYP4F7 の酵素学的性質はまだ不明であるが、その発現は腎臓特異的である。

9. CYP4A サブファミリーとの比較

脂肪酸やエイコサノイドの ω 水酸化酵素のほとんどは CYP4A または CYP4F サブファミリーに分類されるが、この二つのサブファミリーを比較するといくつかの相違点が見られる。一つめは、基質に関する

るもので、CYP4A サブファミリーの酵素はラウリン酸やアラキドン酸などの脂肪酸やいくつかのプロスタグランジンの ω または $\omega-1$ 水酸化反応を触媒し、ロイコトリエン B₄や HETE などのアラキドン酸のリポキシゲナーゼ代謝産物や薬物に対しては全く活性を示さない(42)。それに対して CYP4F サブファミリーはより多くの基質を代謝することができ、アラキドン酸やそのリポキシゲナーゼ代謝産物、プロスタグランジンを基質とする。さらに、いくつかの分子種はエトキシマリンや *p*-ニトロアニソール、イミプラミンなどの薬物の代謝活性を示す。しかし、これらの中でどの基質が生理的に意義をもつのかは不明である。二つめの相違点は、誘導に関するもので、CYP4A サブファミリーの分子種のいくつかは妊娠やペルオキシゾーム増強剤の投与により強い誘導を受けるのに対し(42)、CYP4F サブファミリーの分子種の誘導は不明であり、少なくともペルオキシゾーム増強剤の投与ではむしろ発現が阻害される傾向にある。三つめは、臓器分布で、CYP4A サブファミリーの酵素は肝臓や肺、さらに水やイオンの輸送にかかわる臓器、たとえば腎臓や小腸、大腸、耳下腺などに発現している(42,43)。一方、CYP4F のサブファミリーの分子種は主に肝臓や腎臓に発現しているが、精嚢腺または好中球に特異的に発現するもの、小腸にも発現するもの、さらに脳や心臓、骨格筋などで発現するものがあり、その臓器分布は多様である。特に、脳で発現が確認されている分子種が多く見られ、脳の機能との関連に興味をもたれている。このような CYP4A と CYP4F の二つのサブファミリーの違いは ω 水酸化酵素の多様性も意味している。

10. CYP4F サブファミリーの生理的役割

CYP4F サブファミリーが多くの臓器に発現し、様々な基質を代謝することが明らかになってきたが、このことは CYP4F サブファミリーの分子種が多様な生理的役割を担っていることを示唆している。現在、CYP4F サブファミリーの機能として明らかなのは、好中球や肝臓でのロイコトリエン B₄をはじめとするエイコサノイドの不活性化と、精液に含まれる ω または $\omega-1$ ヒドロキシプロスタグランジンの類の合成、それに腎臓における 20-HETE の合成である(3,23,21)。これらは CYP4F サブファミリーの主要な働きであることは間違いないが、これだけでは脳やその他の臓器における発現を十分に説明できないし、薬物も含む幅広い基質特異性の意義も解からない。現在考えられている可能性は、①ロイコトリエン B₄だけでなく種々の HETE やリポキシンなどが脳や心臓などに何らかの作用を示すので、それを直接不活性化する

ための機能、②新たな生理機能を持つエイコサノイドを合成する機能で、20-HETE やその他の代謝産物が脳などで作用するのかもしれない。ただし、CYP4F サブファミリーの酵素によるアラキドン酸のエポキシ化反応は報告されていない。③いくつかの肝外臓器における薬物代謝機能も考えられ、脳などでは薬物代謝の主要な機能を担っているのかもしれない。ところで、CYP4F サブファミリーでは顕著な誘導性が確認されていない。レチノイン酸による培養細胞での CYP4F2 や CYP4F3 の誘導例が示されているだけである。CYP4F サブファミリーの分子種が恒常的に発現していて、ほとんど変動しないとすると、CYP4F 分子種は日常的な細胞機能に関与しているのかもしれない。いずれにしても、CYP4F サブファミリーの機能を解明するためには、どのような基質が実際に代謝されるのか、それらの基質または代謝産物が各臓器にどのような作用を示すのかを明らかにしていく必要がある。

90年代から華々しく行われてきた様々なゲノムプロジェクトの成果が蓄積され、遺伝子情報へのアクセスが信じられないぐらい容易になってきた。その結果、多数の CYP4F 分子種の存在が明らかとなったが、それらの性質や生理機能を解明する試みはまだ不十分である。これらを解明するが CYP4F サブファミリーに関するポストゲノム時代の課題である

11. 参考文献

- HANSON, G., LINDGREN, J. A., DAHLEN, S. E., HEDQVIST, P., and SAMUELSSON, B. (1981). *FEBS Lett.* **130**, 107-112.
- JUBIZ, W., RADMARK, O., MALMSTEN, C., HANSSON, G., LINDGREN, J. A., PALMBLAD, J., UDEN, AM., and SAMUELSSON, B. (1982). *J. Biol. Chem.* **257**, 6106-6110.
- KIKUTA, Y., KUSUNOSE, E., ENDO, K., YAMAMOTO, S., SOGAWA, K., FUJII-KURIYAMA, Y., and KUSUNOSE, M. (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 9376-9380.
- SHAK, S., and GOLDSTEIN, I. M. (1984). *J. Biol. Chem.* **259**, 10181-10187.
- FORD-HUTCHINSON, A. W., BRAY, M. A., DOIG, M. V., SHIPLEY, M. E., and SMITH, M. J. (1980). *Nature* **286**, 264-265.
- SUMIMOTO, H., TAKESHIGE, K., and MINAKAMI, S. (1988). *Eur. J. Biochem.* **172**, 315-324.
- SUMIMOTO, H., KIKUTA, Y., KUSUNOSE, E., KUSUNOSE, M., and MINAKAMI, S. (1990). *Biochem. Int.* **20**, 381-387.
- KIKUTA, Y., KUSUNOSE, E., KONDO, T., YAMAMOTO, S., KINOSHITA, H., and KUSUNOSE, M. (1994). *FEBS Lett.* **348**, 70-74.
- KIKUTA, Y., KUSUNOSE, E., SUMIMOTO, H., MIZUKAMI, Y., TAKESHIGE, K., SAKAKI, T., YABUSAKI, Y., and KUSUNOSE, M. (1998). *Arch. Biochem. Biophys.* **355**, 201-205.

10. KIKUTA, Y., KUSUNOSE, E., and KUSUNOSE, M. (2000). *J. Biochem.* **127**, 1047-1052.
11. POWELL, P. K., WOLF, I., JIN, R., and LASKER, J. M. (1998). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **285**, 1327-1336.
12. LASKER, J. M., CHEN, W. B., WOLF, I., BLOSWICK, B. P., WILSON, P. D., and POWELL, P. K. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 4118-4126.
13. RAVICHANDRAN, K. G., BODDUPALLI, S. S., HASERMANN, C. A., PETERSON, J. A., and DEISENHOFER, J. (1993). *Science* **261**, 731-736.
14. LOUGHRAN, P. A., ROMAN, L. J., AITKEN, A. E., MILLER, R. T., and MASTERS, B.S. (2000). *Biochemistry* **39**, 15110-15120.
15. KIKUTA, Y., KATO, M., YAMASHITA, Y., MIYAUCHI, Y., TANAKA, K., KAMATAKI, N., and KUSUNOSE, M. (1998). *DNA Cell Biol.* **17**, 221-230.
16. KIKUTA, Y., MIYAUCHI, Y., KUSUNOSE, E., and KUSUNOSE, M. (1999). *DNA Cell Biol.* **18**, 723-730.
17. CHRISTMAS, P., URSINO, S. R., FOX, J. W., and SOBERMAN, R. J. (1999). *J. Biol. Chem.* **274**, 21191-21199.
18. CHRISTMAS, P., JONES, J. P., PATTEN, C.J., ROCK, D., ZHENG, Y., CHENG, S. M., WEBER, B. M., CARLESSO, N., SCADDEN, D. T., RETTIE, A. E., and SOBERMAN, R. J. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, in press.
19. MIZUKAMI, Y., SUMIMOTO, H., and TAKESHIGE, K. (1994). *Seikagaku (in Japanese)* **66**, 659.
20. ZHANG, X., and HARDWICK, J. P. (2000). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 864-871.
21. ZHANG, X., CHEN, L., and HARDWICK, J. P. (2000). *Arch. Biochem. Biophys.* **378**, 364-376.
22. BYLUND, J., FINNSTROM, N., and OLIW, E. H. (1999). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 169-174.
23. BYLUND, J., HIDESTRAND, M., INGELMAN-SUNDBERG, M., and OLIW, E. H. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 21844-21849.
24. BYLUND, J., and OLIW, E. H. (2001). *Arch. Biochem. Biophys.* **389**, 123-129.
25. CUI, X., NELSON, D. R., and STROBEL, H. W. (2000). *Genomics* **68**, 161-166.
26. BYLUND, J., BYLUND, M., and OLIW, E. H. (2001). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 892-7.
27. HASHIZUME, T., IMAOKA, S., HIROI, T., TERAUCHI, Y., FUJII, T., MIYAZAKI, H., KAMATAKI, T., and FUNAE, Y. (2001). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 1135-1141.
28. MILES, J. S., SPURR, N. K., GOUGH, A. C., JOWETT, T., McLAREN, A. W., BROOK, J. D., and WOLF, C. R. (1988). *Nucleic Acids Res.* **16**, 5783-5795.
29. BALE, A. E., MITCHELL, A. L., GONZALEZ, F. J., and McBRIDE, O. W. (1991). *Genomics* **10**, 284-286.
30. NHAMBURO, P. T., GONZALEZ, F. J., McBRIDE, O. W., GELBOIN, H. V., and KIMURA, S. (1989). *Biochemistry* **28**, 8060-8066.
31. NELSON, D. R., KOYMANS, L., KAMATAKI, T., STEGEMAN, J. J., FEYEREISEN, R., WAXMAN, D. J., WATERMAN, M. R., GOTOH, O., COON, M. J., ESTABROOK, R. W., GUNASALUS, I. C., and NEBERT, D. W. (1996). *Pharmacogenetics* **6**, 1-42.
32. ROMANO, M., ECKARDT, R. D., BENDER, P. E., LEONARD, T. B., STRAUB, K. M., AND NEWTON, J. F. (1987). *J. Biol. Chem.*, **262**, 1590-1595.
33. SUMIMOTO, H., KUSUNOSE, E., GOTOH, Y., KUSUNOSE, M., and MINAKAMI, S. (1990). *J. Biochem.* **108**, 215-221.
34. CHEN, L., and HARDWICK, J. P. (1993). *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 18-23.
35. KIKUTA, Y., KUSUNOSE, E., ITO, Y., MIZUKAMI, Y., and KUSUNOSE, M. (1999). *Arch. Biochem. Biophys.*, **369**, 193-196.
36. KIKUTA, Y., KASYU, H., KUSUNOSE, E., and KUSUNOSE, M. (2000). *Arch. Biochem. Biophys.* **383**, 225-32.
37. KAWASHIMA, H., and STROBEL, H. W. (1995). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**, 1137-1144.
38. KAWASHIMA, H., KUSUNOSE, E., THOMPSON, C. M., and STROBEL, H. W. (1997). *Arch. Biochem. Biophys.* **347**, 148-154.
39. KAWASHIMA, H., SEQUERIA, D. J., NELSON, D. R., and STROBEL, H. W. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**, 28176-28180.
40. CUI, X., KAWASHIMA, H., BARCLAY, T. B., PETERS, J. M., GONZALEZ, F. J., MORGAN, E. T., and STROBEL, H. W. (2001). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**, 542-550.
41. SABOURAULT, C., AMICHOT, M., PAURON, D., BERGE, J. B., LAFAURIE, M., and GIRARD, J. P. (1999). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **258**, 155-161.
42. KUSUNOSE, M., KIKUTA, Y., KUSUNOSE, E., MATSUBARA, S., YOKOTANI, N., KUBOTA, I., SOGAWA, K., and FUJII-KURIYAMA, Y. (1989). *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* **19**, 343-346.
43. KIKUTA, Y., KUSUNOSE, E., and KUSUNOSE, M. (2001). *Biochem. Pharmacol.* **62**, 249-254.