

博士論文

ニオイ成分の鼻腔内代謝における
アルデヒド酸化酵素の寄与

広島大学 大学院医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻

平成 29 年度入学 高岡 尚輝

主指導教員 古武 弥一郎

目次

略語一覧	3
第一章 序論	4
第二章 マウス嗅上皮におけるアルデヒドニオイ成分の酵素的代謝反応	8
第一節 緒言	8
第二節 マウス嗅上皮 9,000g 上清画分を用いたニオイ成分の代謝評価	9
第三節 加熱処理がマウス嗅上皮 S9 のニオイ成分代謝に与える影響の評価	10
第四節 小括	11
第三章 マウス嗅上皮における AOX 発現プロファイルと基質特異性	12
第一節 緒言	12
第二節 マウス嗅上皮における AOX 分子種の mRNA およびタンパク発現評価	13
第三節 AOX2 および AOX3 精製酵素を用いたニオイ成分の代謝評価	14
第四節 小括	16
第四章 AOX2 および AOX3 の特異的阻害剤の探索	17
第一節 緒言	17
第二節 AOX2 および AOX3 精製酵素に対する阻害スクリーニング評価	18
第三節 AOX2 および AOX3 への阻害効果に対する濃度依存性	20
第四節 小括	22
第五章 マウス嗅上皮のアルデヒドニオイ成分の酸化における AOX の寄与	23
第一節 緒言	23
第二節 AOX 阻害剤がマウス嗅上皮のアルデヒドニオイ成分代謝に与える影響	24
第三節 補酵素の添加が嗅上皮のアルデヒドニオイ成分代謝に与える影響	26
小括	27
第六章 考察および総括	28
実験の部	32
引用文献	38
本研究の基礎となる原著論文	44
本論文に関連した学会発表	44
謝辞	45

略語一覽

ALDH: aldehyde dehydrogenase

AOX: aldehyde oxidase

CES: carboxylesterase

CYP: cytochrome P450

EDC: 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide

GST: glutathione-*S*-transferase

4H3MBA: 4-hydroxy-3-methylbenzaldehyde

LC-MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometry

3-NPH: 3-nitrophenylhydrazine

Moco: molybdenum cofactor

OE: olfactory epithelium

OR: olfactory receptor

S9: supernatant fraction obtained from organ homogenate by centrifuging at 9,000 g

UGT: UDP-glucuronosyltransferase

XME: xenobiotic-metabolizing enzyme

第一章 序論

哺乳類の嗅覚系は、数多の揮発性化合物を検出し識別することができる。この化学センサーの機能は、嗅上皮 (olfactory epithelium: OE) にある嗅覚ニューロンで発現する嗅覚受容体 (olfactory receptor: OR) によるニオイ成分の認識に基づいている (Buck & Axel, 1991)。OR は G タンパク質共役型受容体の大きなファミリーを形成しており、例えば、ヒトには 396 種類、マウスには 1130 種類の OR が存在する (Niimura *et al.*, 2014)。この OR ファミリーは、各ニオイ成分に対して複数の受容体で認識するという、組み合わせ的な様式でニオイ成分を識別すると考えられている。すなわち、各 OR は複数のニオイ成分を異なる親和性で認識し、各ニオイ成分は複数の OR を活性化する (Malnic *et al.*, 1999)。ニオイ成分により活性化された OR は、cAMP などのセカンドメッセンジャーを介して嗅覚ニューロンを活性化し、そのシグナルはまず嗅球の糸球体という部位に伝達され、その後より高次の嗅覚中枢へと伝達されることで統合的に処理される (Block, 2018)。このシグナル伝達経路には、一つの嗅覚ニューロンには必ず一種類の OR しか発現せず (一神経細胞一受容体ルール)、また、同一の OR を発現する神経細胞はその軸索を必ず同一の糸球体に投射するという特徴がある (Zou *et al.*, 2009)。そのため、特定のニオイ成分がどのような匂いを呈するのかという臭気の質は、どの種類の OR 組合せを活性化するのかという、OR レパートリーに対するリガンド親和性により決定されると考えられている (Block, 2018)。

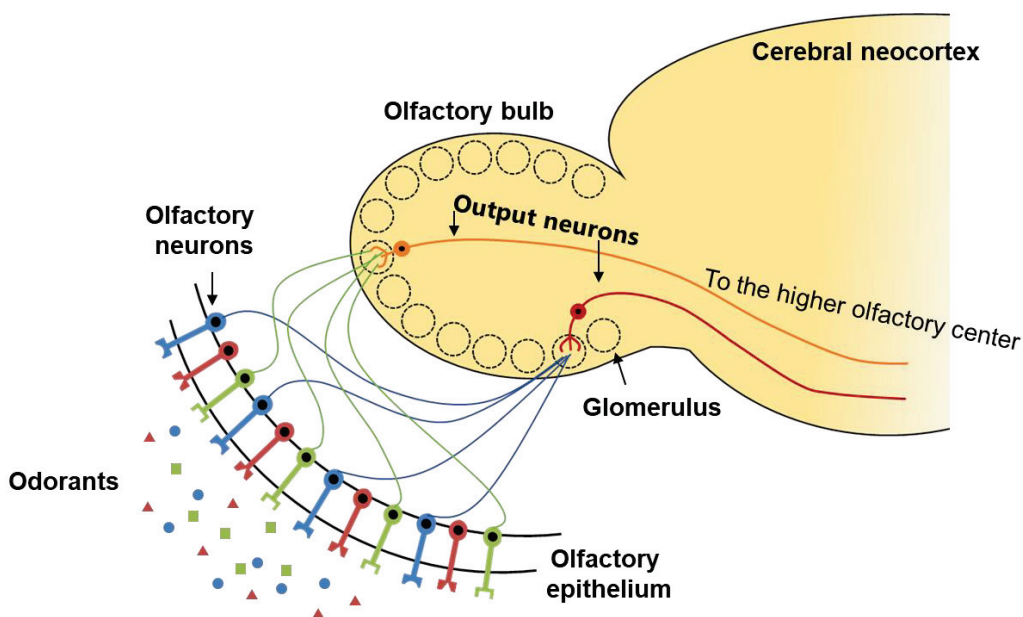


Fig. 1-1 Overall view of odor perception in the olfactory system.

近年、嗅上皮に存在する異物代謝酵素 (xenobiotic-metabolizing enzyme: XME) が、ニオイ成分の代謝を通じて、嗅覚系に関与する可能性を示す証拠が増えつつある (Heydel *et al*, 2019a)。XME は、様々な生体異物と内因性化合物の解毒と排泄を担う一連のタンパク質であり、第 I 相酵素と第 II 相酵素に大別される。第 I 相酵素である cytochrome P450 (P450), aldehyde dehydrogenase (ALDH), carboxylesterase (CES) などは、生体異物をより極性の高い一次代謝物に変換する。その後、第 II 相酵素である UDP-glucuronosyltransferase (UGT) や glutathione-S-transferase (GST) などが、一次代謝物をさらに極性分子 (グルクロン酸やグルタチオン) と抱合させることで、生体異物の水溶性を増加させ、体外への排泄を促進する (Iyanagi, 2007)。1990 年代に Lazard らの研究により、ラットの嗅上皮から嗅上皮特異的に発現する UGT 分子種がクローニングされ、この酵素がニオイ成分に対して基質特異性を有することが報告されて以降 (Lazard *et al*, 1991), いくつかのプロテオミクス解析により、哺乳動物の嗅上皮には一連の XME が発現することが明らかになっている (Table1-1, Debat *et al*, 2007; Hu *et al*, 2014; Kuhlmann *et al*, 2014; Heydel *et al*, 2019a)。また、クマリンや酢酸イソアミルなどの一部のニオイ成分について、マウス嗅上皮におけるタンパク質あたりの代謝活性が、肝臓と同程度であるという報告があるなど、その酵素活性も十分である (Thiebaud *et al*, 2013)。これらの XME によるニオイ成分の代謝はその化学的特性を変化させるため、ニオイ成分と OR との親和性を変化させることで、嗅覚シグナルの終結および調節に関与する可能性がある。

Table 1-1 Major XME expressed in mouse olfactory epithelium.

Class	Gene	Reference
CYP	CYP1a1, CYP1a2, CYP2e1, CYP2a4, CYP2a5, CYP2b19, CYP2c29, CYP2c66, CYP2d12, CYP2j11, CYP2j13, CYP2J9, CYP2s1, CYP3a13, CYP4a10, CYP4a12, CYP4a14, CYP4b1, CYP4f13, CYP4f14, CYP4f15, CYP4f16, CYP4f37, CYP4v3, CYP20a1, CYP27a1, CYP39a1, CYP51a1	Hu <i>et al.</i> , (2014); Kuhlmann <i>et al.</i> , (2014)
ALDH	ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A7, ALDH1L2, ALDH1B1, ALDH2, ALDH3A1, ALDH3A2, ALDH3B1, ALDH4A1, ALDH5A1, ALDH6A1, ALDH7A1, ALDH16A1, ALDH18A1	Kuhlmann <i>et al.</i> , (2014)
GST	GSTA1, GSTA3, GSTA4, GSTK1, GSTM1, GSTM2, GSTM4, GSTM5, GSTO1, GSTT1, GSTT3, GSTZ1	Kuhlmann <i>et al.</i> , (2014)
UGT	UGT2A1, UGT2B1	Kuhlmann <i>et al.</i> , (2014)
CES	CES1d	Kuhlmann <i>et al.</i> , (2014)
AOX	AOX2	Kurosaki <i>et al.</i> , (2004)

XMEs expressed in mouse olfactory epithelium, which have been identified by proteomic analysis, RT-PCR, and Western blotting, are summarized.

一般的に、ニオイ成分は、揮発性、分子量が約 400 Da 以下、極性官能基を 1 つ含む疎水性化合物であることが多く、その極性官能基は、アルデヒド、エステル、フェノール、ケトン、チオールなど多様である (Block, 2018)。その中でも、アルデヒド基はニオイ成分の中で最も多く見られる官能基の一つである。例えば、Dunkel らによる系統解析により、食品の特徴的な風味を決定するニオイ成分 (key food odorant) に選ばれた 226 のニオイ成分のうち、約 15%がアルデヒド官能基を有する化合物であることが報告されている (Table 1-2, Dunkel *et al*, 2014; Tsuzuki, 2019)。また、新生ウサギの授乳行動を促進する 2-methylbut-2-enal など、いくつかの生理的に重要なフェロモン分子にもアルデヒド基を有する化合物が存在する (Schaal *et al*, 2003)。このように、アルデヒド基を有するニオイ成分は数多く存在し生理的に重要であるにも関わらず、これらのニオイ成分の代謝変換を担う酵素については、ほとんど解明されていない。一部、嗅上皮に存在する GST がアルデヒドを抱合することが報告されているが、その基質特異性は α,β -不飽和アルデヒドに限定されており (Heydel *et al*, 2019b)、他の様々なアルデヒド基を有するニオイ成分の代謝酵素は十分に解明されていない。

Table 1-2 Classification of 226 key food odorants based on structural properties.

Class	Number	Class	Number
Ester	33	Terpenoid hydrocarbon	11
Higher aliphatic aldehydes	24	Higher aliphatic alcohols	8
Ketone	21	Aromatic aldehyde	6
Phenol	18	Furanone	6
Thiol	17	Lower alcohol	5
Fatty acid	15	Lower aldehyde	5
Thioether	15	Phenol ether	5
Lactone	13	Ether	3
Pyrazine	11	Others	10
		Total	226

The classification table of 226 key food odorants by Tsuzuki (2019) was partially modified. Odorants with aldehyde group are highlighted in bold.

本研究では、嗅上皮におけるアルデヒド基を有するニオイ成分の代謝を担う可能性がある酵素としてアルデヒド酸化酵素 (aldehyde oxidase: AOX) に着目した。AOX はモリブデン含有水酸化酵素ファミリーに属する酸化還元酵素である。150 kDa の単量体 2 つから成るホモ二量体であり、その活性には、1 分子の molybdenum cofactor (Moco), 2 分子の鉄硫黄クラスター、1 分子の flavin adenine dinucleotide (FAD) が必要である。その酸化反応に伴い、基質から奪われた電子は活性中心のモリブデンから FAD を経て最終的に分子状酸素に渡され、第二生成物として活性酸素種が生成される (Garattini *et al*, 2008; Garattini & Terao, 2012)。哺乳類の AOX 分子種数は、動物種によって異なる。マウスとラットは最も多くの AOX 遺伝子 (Aox1, Aox2, Aox3, Aox4) を持ち、それぞれが酵素的に活性な AOX 分子種をコードしている (Garattini *et al*, 2008; Kurosaki *et al*, 2013)。また、これらの AOX 分子種は組織特異的に発現しており、例えば、AOX2 はマウス嗅上皮に限定的に発現することが知られている (Kurosaki *et al*, 2004)。また、AOX はいくつかのアルデヒドを酸化することが知られており、その中には、benzaldehyde や *n*-octanal などの特徴的な臭気を呈するニオイ成分が含まれている (Sahi *et al*, 2008; Kücükgoze & Leimkühler, 2018)。そのため、AOX2 などの嗅上皮に発現する AOX 分子種はアルデヒド基を有するニオイ成分の酸化代謝に関与する可能性が想定された。

そこで本研究では、マウス嗅上皮におけるアルデヒドニオイ成分の代謝活性、AOX 発現プロファイル、AOX 分子種の基質特異性などの評価を通じて、アルデヒドニオイ成分の代謝変換におけるマウス嗅上皮に発現する AOX の寄与について検討した。

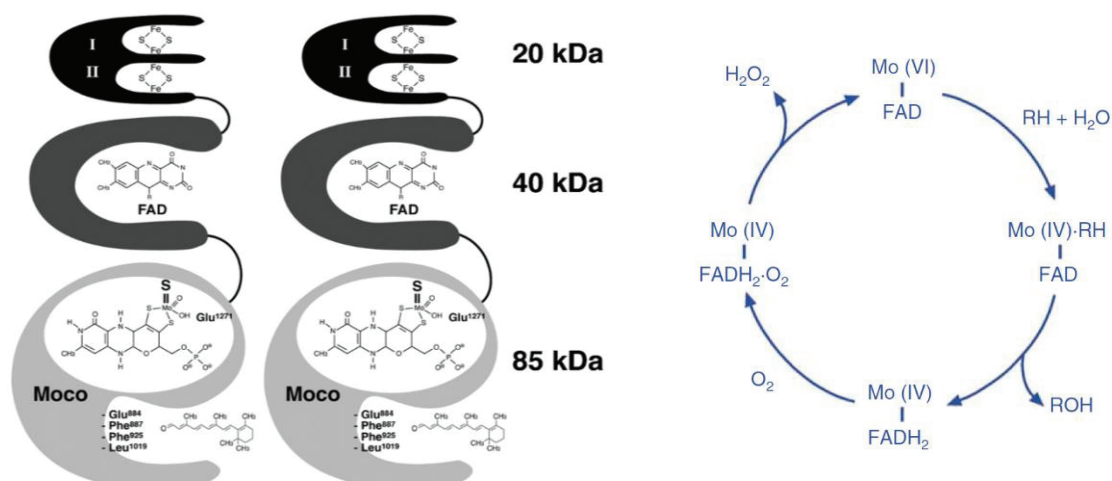


Fig. 1-2 Components of AOX and enzymatic reaction mechanism (Garattini *et al*, 2008; Garattini & Terao, 2012).

第二章 マウス嗅上皮におけるアルデヒドニオイ成分の酵素的代謝反応

第一節 緒言

前述の通り、マウスなどの哺乳動物の嗅上皮がアルデヒド基を有するニオイ成分に対して酸化代謝活性を示すのかは不明である。そこで本章では、マウス嗅上皮がアルデヒド基を有するニオイ成分に対して酸化活性を持つかを検証した。

アルデヒド基を有するニオイ成分は芳香族と脂肪族のものに大別される(Tsuzuki, 2019)。本研究では、いずれも特徴的な臭気を呈する 3 種類の芳香族アルデヒド (benzaldehyde, vanillin, 4M3HBA) と 3 種類の脂肪族アルデヒド (heptanal, *n*-octanal, *trans*-2-octenal) をモデル化合物として選択し、これらが酸化されて生じるカルボン酸代謝物の生成を LC-MS/MS にて定量評価した (Fig.2-1)。

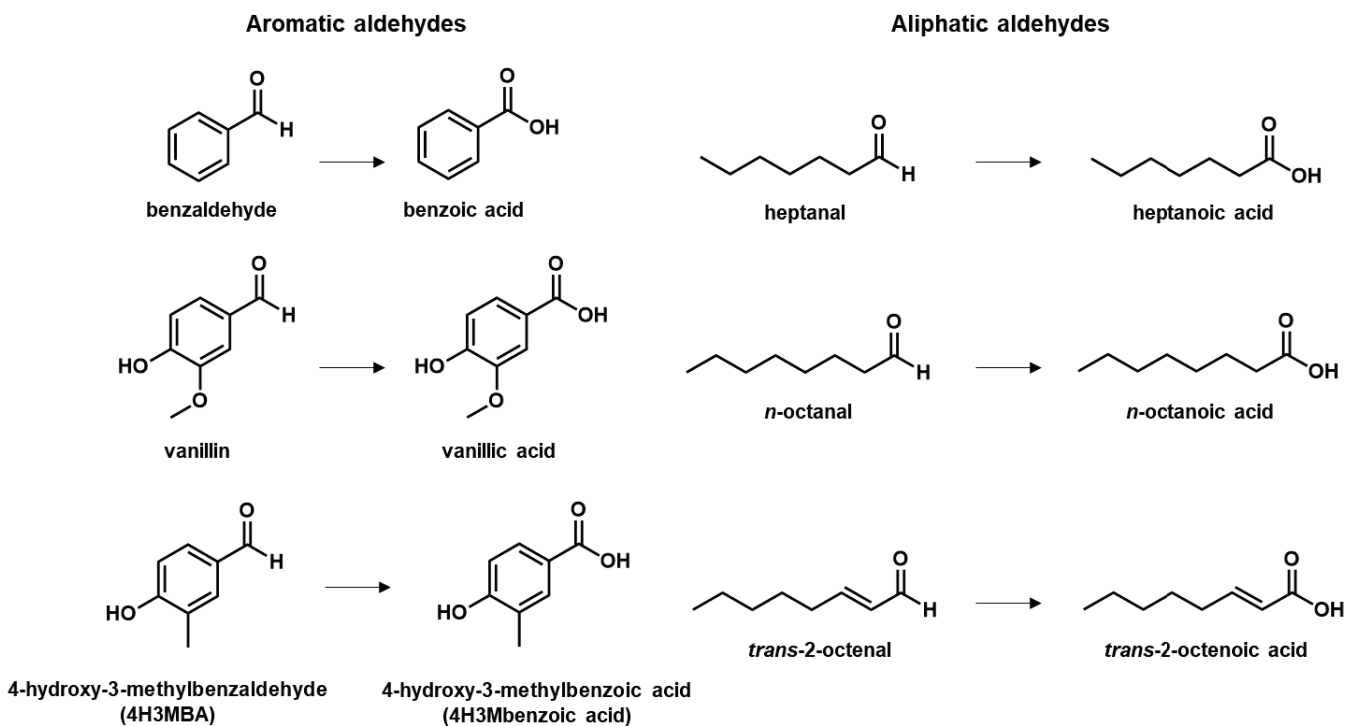


Fig. 2-1 Chemical equation for the oxidation of selected aldehyde odorants by AOX.

第二節 マウス嗅上皮 9,000g 上清画分を用いたニオイ成分の代謝評価

マウス嗅上皮 9,000g 上清 (S9) と 1, 10, 100 μM の benzaldehyde, vanillin, 4M3HBA, heptanal, *n*-octanal, *trans*-2-octenal を反応させた後のカルボン酸代謝物の生成速度を LC-MS/MS により定量評価した (Fig. 2-2)。その結果, 検証した全てのアルデヒドニオイ成分について, カルボン酸代謝物の生成が認められ, その生成速度は濃度依存的に増加した。

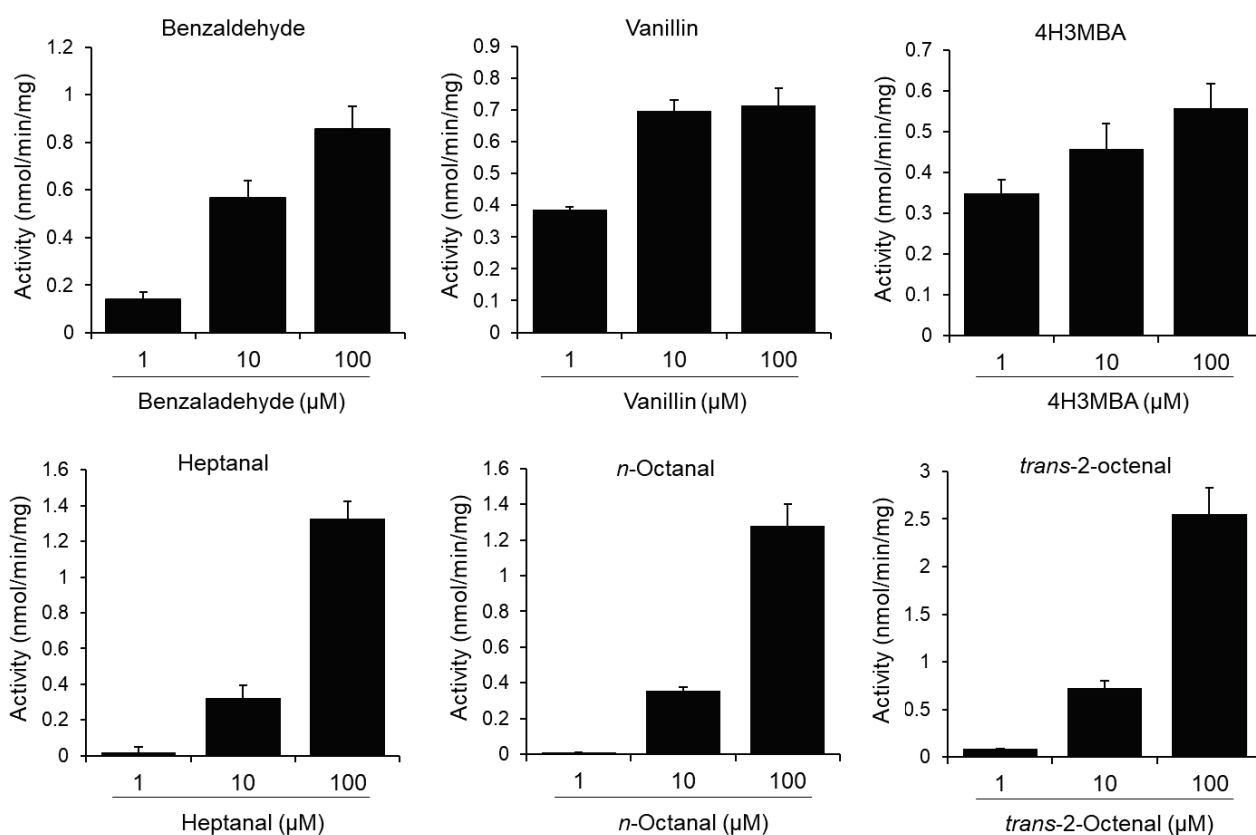


Fig. 2-2 Concentration-dependent oxidation of aldehyde odorants in mouse OE. Aromatic and aliphatic aldehydes (each 1, 10 and 100 μM) were reacted with mouse OE S9 for 2 min. The carboxylic acid metabolites were quantified by LC-MS/MS. Data are means \pm S.D. of three replicates.

第三節 加熱処理がマウス嗅上皮 S9 のニオイ成分代謝に与える影響の評価

次にマウス嗅上皮を 99°Cで加熱処理した際に、マウス嗅上皮におけるアルデヒド基を有するニオイ成分の酸化反応にどのような影響があるのかを評価した (Fig.2-3)。その結果, benzaldehyde, vanillin, 4H3MBAなどの芳香族アルデヒドの酸化活性は, 加熱処理により完全に消失し, heptanal, *n*-octanal, *trans*-2-octenal の酸化反応は, 加熱処理により 70~90%程度抑制された。

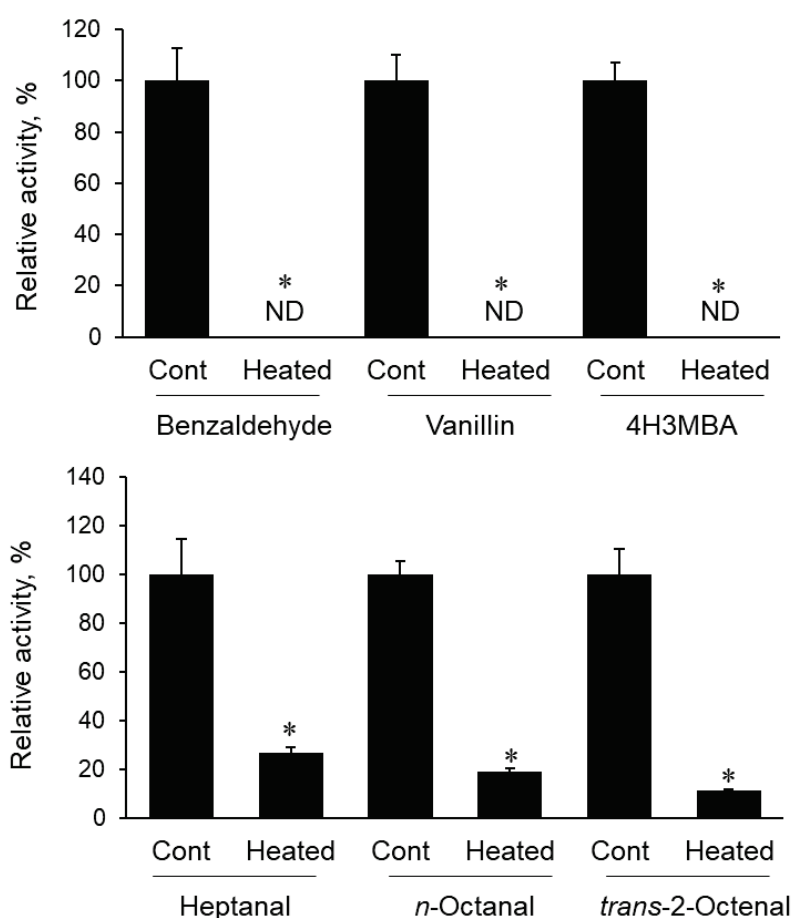


Fig.2-3 Effect of heat treatment on aldehyde oxidation in mouse OE S9. 10 μ M of aromatic and aliphatic aldehydes were reacted with intact or heated mouse OE S9 for 2 min. The carboxylic acid metabolites were quantified by LC-MS/MS. Data are means \pm S.D. of three replicates. * $P < 0.05$ vs. Cont. Cont: intact mouse OE S9, Heated: heat-treated mouse OE S9, ND: not detected.

第四節 小括

本章では、マウス嗅上皮がアルデヒド基を有するニオイ成分に対する酸化活性を評価した。その結果、マウス嗅上皮は、芳香族および脂肪族の幅広いアルデヒドニオイ成分に対する酸化活性を有していることが明らかになった。また、この酸化反応は、99°Cの加熱処理により顕著に抑制されたことから、酵素反応の関与が示唆された。

嗅上皮における、benzaldehyde, vanillin, 4H3MBAなどの芳香族アルデヒドの酸化活性は、その基質濃度依存的に上昇したが、10 μ M 付近の濃度で頭打ちが見られた。一方で、heptanal, *n*-octanal, *trans*-2-octenal に関しては 100 μ M でも活性の頭打ちが見られなかった。この結果から、嗅上皮において上記 6 種類のアルデヒドニオイ成分の酸化代謝に関与する酵素の親和性が、芳香族のものについて高く脂肪族について低いことが考えられる。

Benzaldehyde, vanillin, 4H3MBA などの芳香族アルデヒドの酸化反応は、加熱処理により完全に消失した一方で、heptanal, *n*-octanal, *trans*-2-octenal などの脂肪族アルデヒドの酸化反応は 15~25%程度残存した。一般的にアルデヒドは化学的に酸化されやすいことが知られている。今回認められた 15~25%程度の残存活性は、そのような非酵素的な酸化反応によるものであると考えられる。

第三章 マウス嗅上皮における AOX 発現プロファイルと基質特異性

第一節 緒言

前章では、マウス嗅上皮に幅広いアルデヒドニオイ成分を酸化する酵素活性があることが示された。序論でも述べた通り、マウスの嗅上皮には AOX 分子種の一つである AOX2 が局所的に発現することが知られている (Kurosaki *et al*, 2004)。一方で、その他の AOX 分子種 (AOX1, AOX2, AOX3, AOX4) もまたマウス嗅上皮に発現する可能性がある。そこで本章では、マウス嗅上皮における各 AOX 発現プロファイルを評価し、マウス嗅上皮に発現する AOX 分子種の基質特異性を評価した。

第二節 マウス嗅上皮における AOX 分子種の mRNA およびタンパク発現評価

雌雄マウスの嗅上皮における各 AOX の mRNA 発現を評価した。その結果、マウス嗅上皮において、AOX2 が最も mRNA 発現レベルが高かった一方で、AOX3 の mRNA もまた発現することが確認された。この発現レベルは雌雄マウスで同程度であった (Fig. 3-1A)。次に、これらの AOX 分子種のタンパク発現を western blot により評価した。その結果、AOX2 および AOX3 の両分子種がマウス嗅上皮に発現していることを確認した。両 AOX 分子種のタンパク発現量は雌雄マウス間で同程度であった (Fig. 3-1B)。

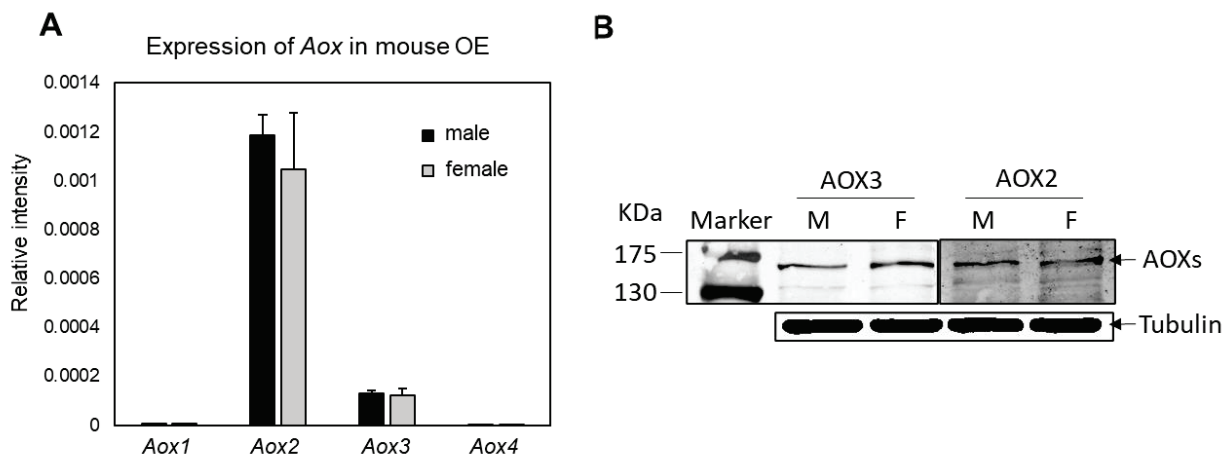
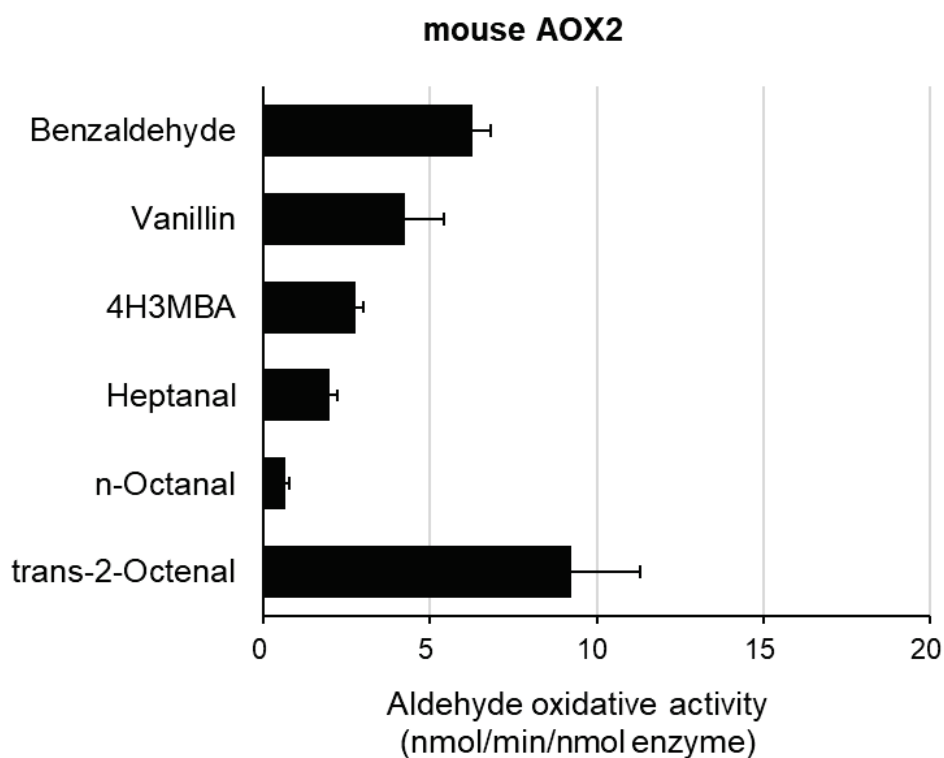


Fig. 3-1 Expression of each AOX isoform in the mouse OE. (A) Relative mRNA expression of AOX1, AOX2, AOX3, and AOX4 in male and female mice OE. (B) Protein expression of AOX2 and AOX3 in male and female mice OE. M: male, F: female.

第三節 AOX2 および AOX3 精製酵素を用いたニオイ成分の代謝評価

次に、mAOX2 および mAOX3 の精製酵素と 6 種類のアルデヒドニオイ成分を反応させた後のカルボン酸代謝物の生成速度を LC-MS/MS により定量評価した。その結果、両 AOX 分子とも、今回検証した全てのアルデヒドについて酸化活性を示した。mAOX2 は *trans*-2-octenal に対して最も高い活性を示し、次いで benzaldehyde, vanillin, 4H3MBA などの芳香族アルデヒドに対して高い活性を示した。mAOX3 は脂肪族アルデヒド (heptanal, *n*-octanal, *trans*-2-octenal) よりも芳香族アルデヒド (benzaldehyde, vanillin, 4H3MBA) に対して顕著に高い活性を示した。



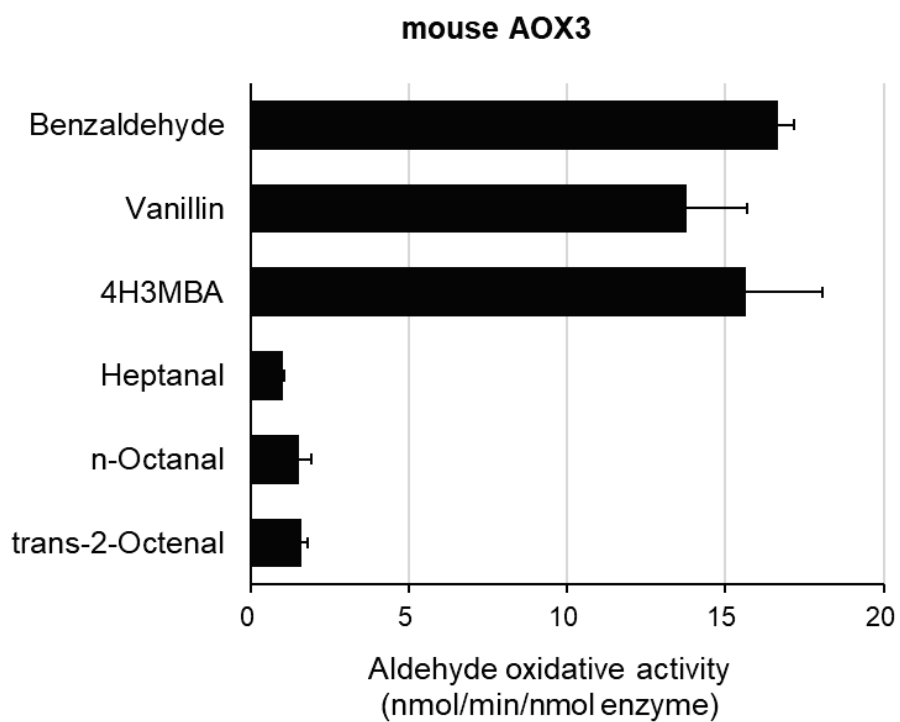


Fig. 3-2 Substrate specificity of mouse AOX2 and AOX3 for aromatic and aliphatic aldehyde-odorants. 10 μ M of aromatic and aliphatic aldehydes were reacted with purified recombinant AOX2 and AOX3 for multiple time points. Data are means \pm S.D. of three replicates.

第四節 小括

本章では、まずマウス嗅上皮に発現する AOX 分子種の評価を行った。その結果、マウス嗅上皮には以前より報告のあった AOX2 に加えて (Kurosaki *et al*, 2004), AOX3 もまた発現することが明らかになった。このデータは、Hecker らによるトランスクリプトーム解析の結果と一致する (Hecker *et al*, 2019)。また、嗅上皮において発現が認められた両分子種について、その発現の程度は雌雄の間で同程度であった。一方で、マウスの肝臓における AOX 発現はテストステロンによる制御を受けているため、性差があり、雄の方が高い AOX 発現と活性を示すことが知られている (Kurosaki *et al*, 1999; Yoshihara & Tatsumi, 1997)。以上より、嗅上皮における AOX2 と AOX3 の発現制御は、肝臓とは異なる分子メカニズムにより制御されていることが示唆される。

また、マウス嗅上皮において発現が認められた AOX2 および AOX3 について、6 種類の芳香族および脂肪族のアルデヒドニオイ成分との反応性を評価した。その結果、AOX2 および AOX3 共に、今回検討した全てのアルデヒドを酸化代謝物に変換することが示された。また、その活性は基質の種類により異なり、例えば、AOX3 は heptanal などの脂肪族アルデヒドよりも benzaldehyde などの芳香族アルデヒドに対して 10 倍以上高い活性を示した。一方で、AOX2 ではそれほどの顕著な差はなかったものの、 α,β -不飽和アルデヒドである *trans*-2-octenal に対して最も活性が高く、次いで芳香族アルデヒド類に対する活性が高いことが示された。

以上の結果は、AOX2 と AOX3 がマウス 嗅上皮に発現しており、これらの酵素が、マウス嗅上皮における芳香族および脂肪族アルデヒドの酵素的な酸化反応に関与する可能性を示唆している。

第四章 AOX2 および AOX3 の特異的阻害剤の探索

第一節 緒言

第三章までの検討により、マウス嗅上皮におけるアルデヒドニオイ成分の酸化代謝には AOX2 および AOX3 が関与する可能性が考えられた。そこで本章では、これらの酵素が上記の酸化反応にどの程度寄与するのかを見積もるため、AOX2 および AOX3 両分子種に対する特異的な阻害剤の探索を試みた。多くの医薬品や食品中成分がヒトやマウスなどの肝臓中 AOX 活性を阻害することが報告されている (Obach *et al*, 2004; Robertson & Bland, 1993; Takaoka *et al*, 2018; Yoshihara & Tatsumi, 1997)。そこで、上記の化合物の中から、肝臓 AOX 活性を強力に阻害することが報告されている 11 種類の候補化合物を選択し (Fig. 4-1)、これらが AOX2 および AOX3 の特異的阻害剤である可能性を検討した。

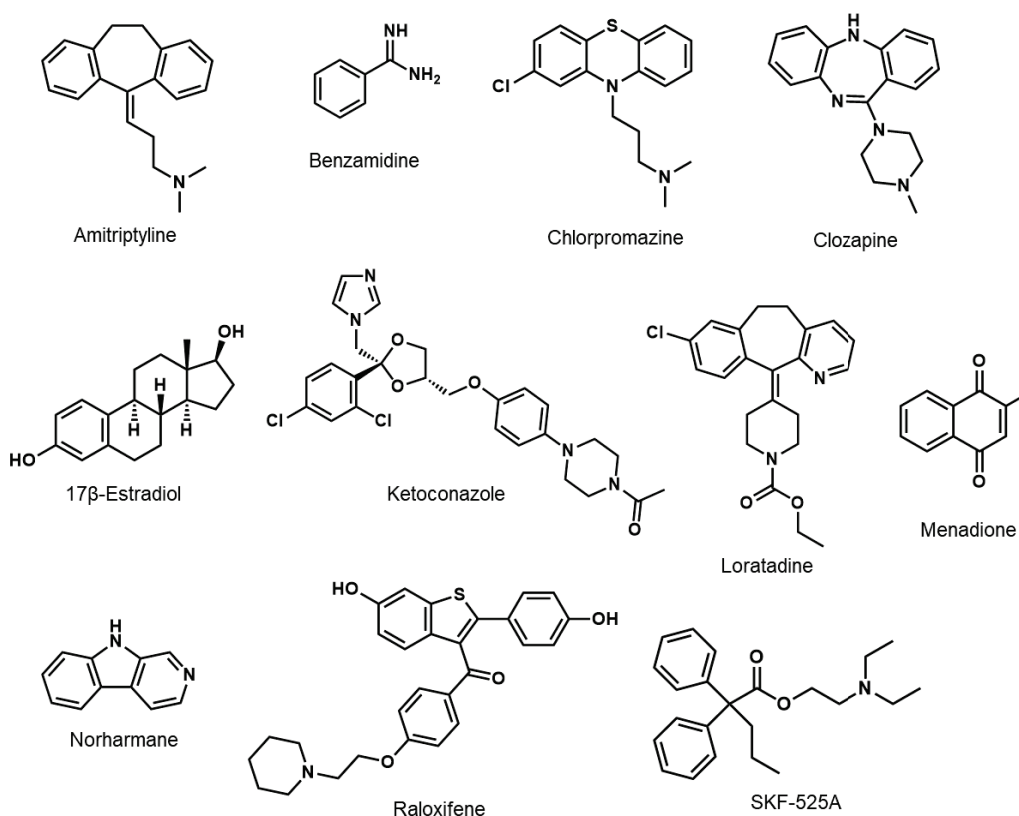
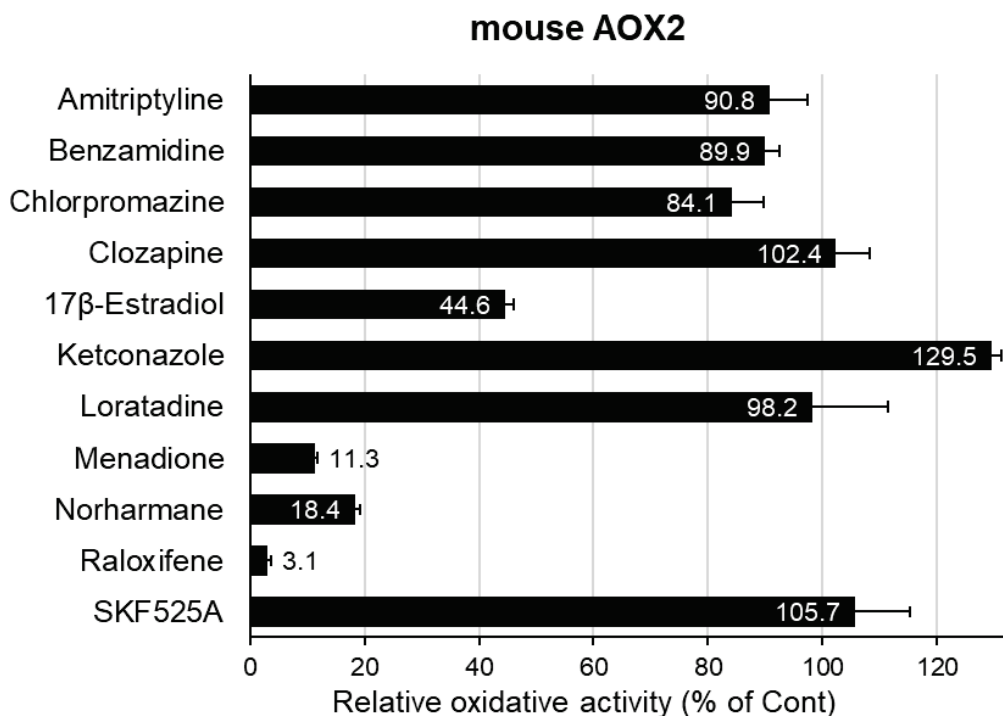


Fig. 4-1 Chemical structures of candidate inhibitors for AOX2 and AOX3.

第二節 AOX2 および AOX3 精製酵素に対する阻害スクリーニング評価

阻害剤の阻害活性はその阻害様式および基質濃度に依存する。例えば、基質濃度が K_m 値よりも高くなればなるほど、競合阻害の場合の阻害活性は低下し、逆に不競合阻害の場合の阻害活性は上昇する。しかしながら、 K_m 値付近の基質濃度を使用することで、このような阻害様式に依存する阻害活性の差を最小化できる。本章における阻害評価で基質として用いた vanillin の添加濃度は、AOX2 は $2 \mu\text{M}$ 、AOX3 は $5 \mu\text{M}$ とした。この濃度は既報の K_m 値と近似する濃度である (Küçükgoze & Leimkühler, 2018)。

まずは、上記の 11 種類の候補化合物の $10 \mu\text{M}$ で用いた際の AOX2 および AOX3 に対する阻害効果を調べた (Fig.4-2)。その結果、AOX2 については、17 β -estradiol, norharmane, menadione, raloxifene がそれぞれ 55.4%, 81.6%, 88.7%, 96.9% の阻害活性を示し、その他の化合物はほとんど阻害活性を示さなかった。一方で AOX3 では、amitriptyline, chlorpromazine, norharmane, menadione, raloxifene がそれぞれ 48.4%, 64.8%, 88.8%, 89.1%, 89.6% の阻害作用を示したが、その他の評価化合物では阻害効果はほとんど認められなかった。



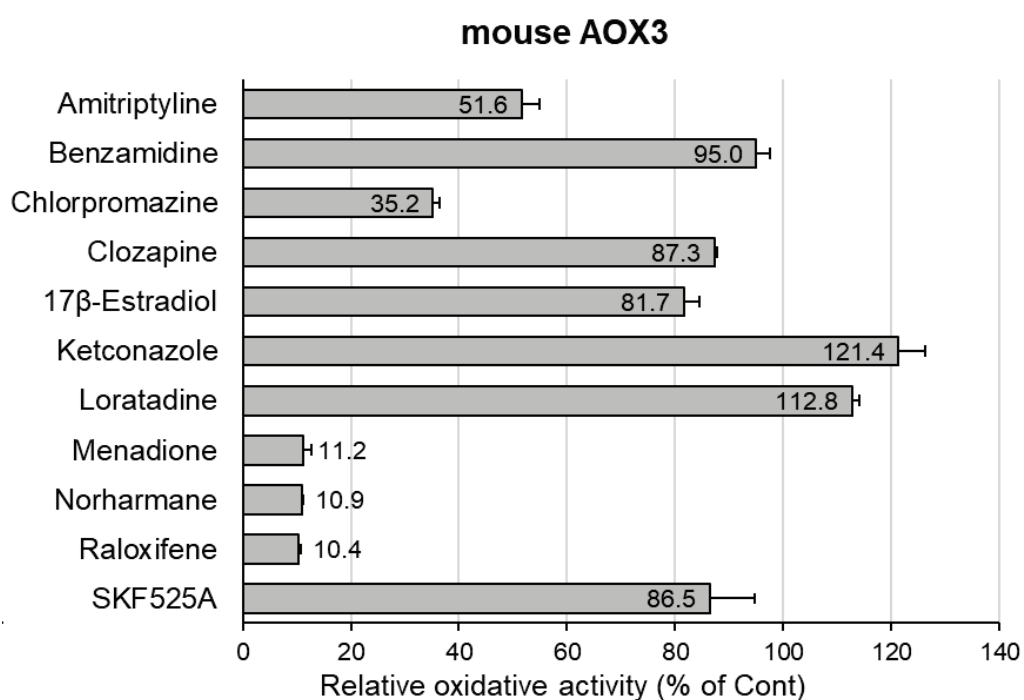
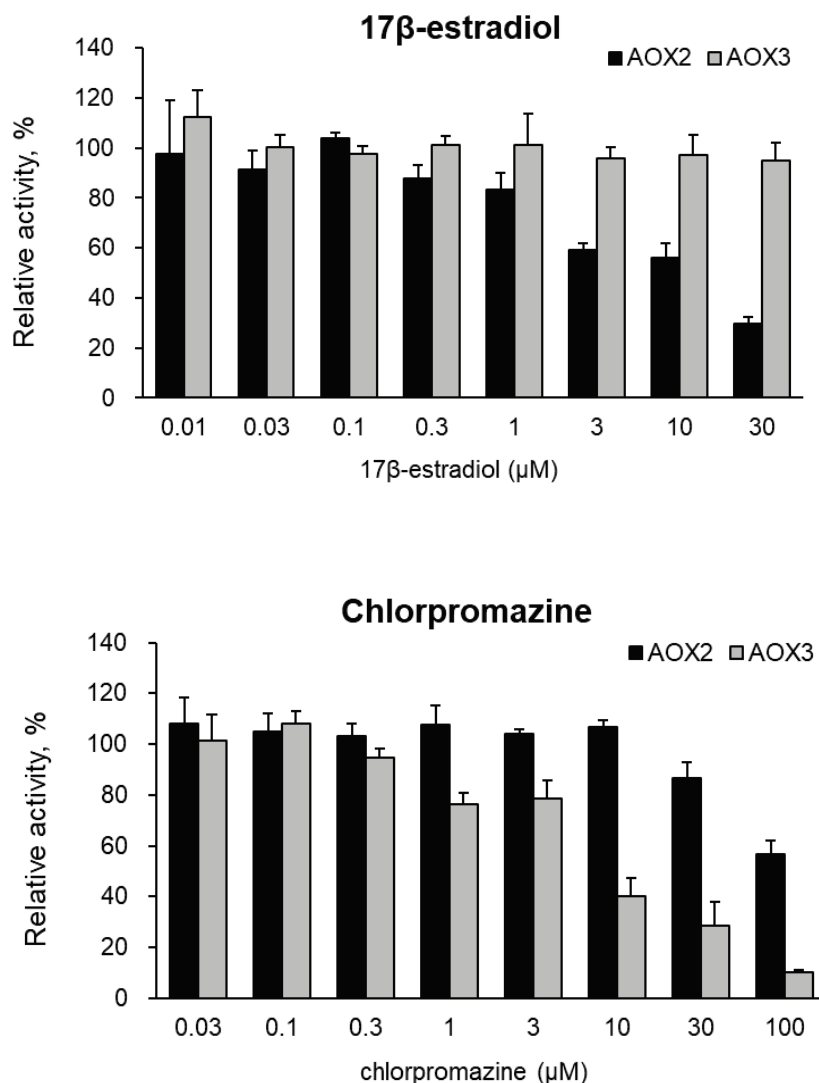


Fig. 4-2 Screening of mAOX2 and mAOX3 inhibitors. Vanillin (2 μ M for mAOX2; 5 μ M for mAOX3) was reacted with recombinant mAOX2 or mAOX3 in the presence of 10 μ M each inhibitor. The incubation times were 50 s and 1 min for AOX2 and AOX3, respectively. The inhibitory effect of each compound was expressed a percent of activity compared to the control. All data are means \pm S.D. of three replicates.

第三節 AOX2 および AOX3 への阻害効果に対する濃度依存性

次に、第二節の検討において、少なくとも1つの AOX 分子種に対して 50%以上の阻害活性を示した chlorpromazine, 17 β -estradiol, menadione, norharmane, raloxifene について、これらの阻害効果における濃度依存性を調べた (Fig. 4-3)。その結果、menadione, norharmane, raloxifene は両分子種を同程度に阻害した。一方で、17 β -estradiol は、AOX2 に対して阻害作用を示したが、AOX3 に対しては使用した最高濃度 (30 μ M) でも阻害作用を示さなかった。逆に、chlorpromazine は 10~30 μ M 付近で mAOX3 に特異的な阻害を示した。



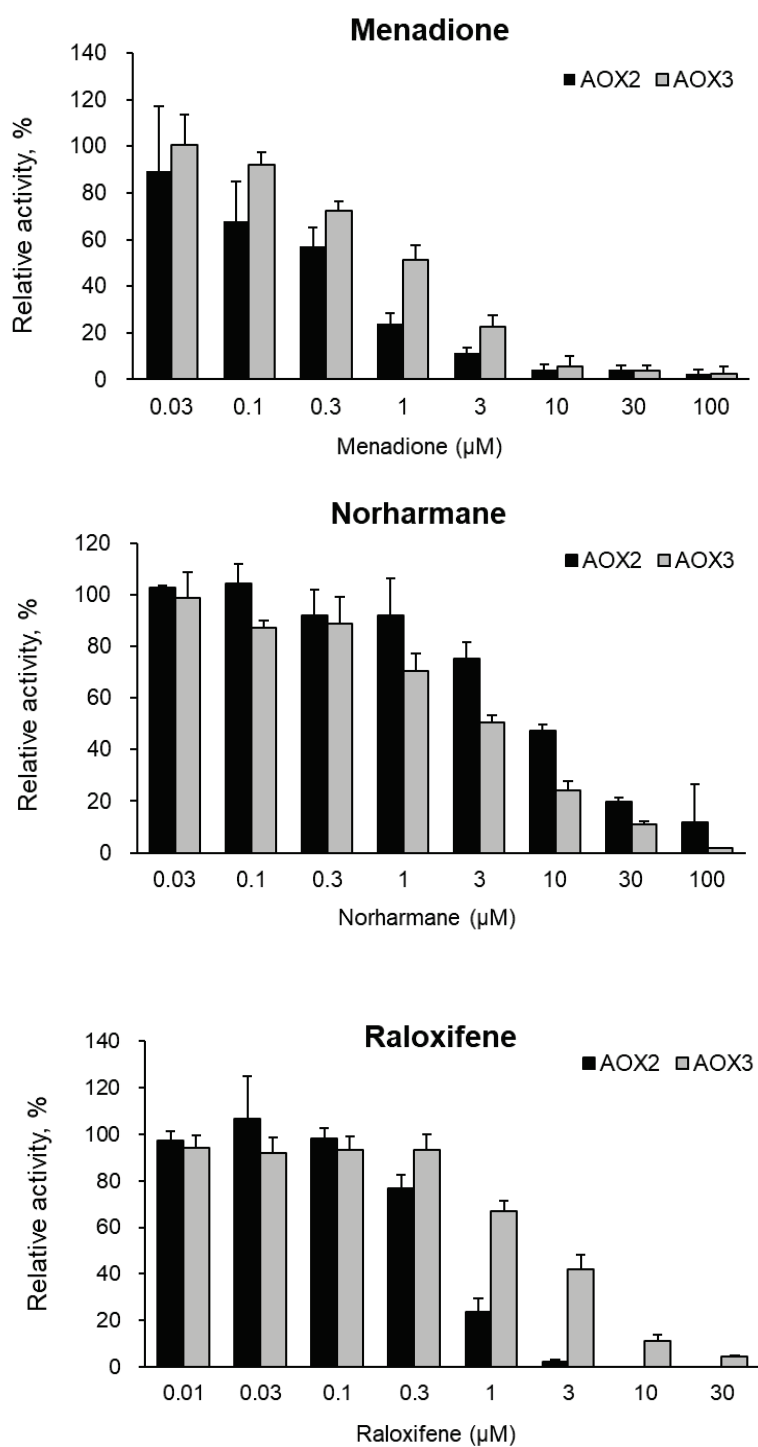


Fig.4-3 Concentration dependence of inhibitory effects on mAOX2 and mAOX3 activities. Vanillin (2 μM for mAOX2; 5 μM for mAOX3) was reacted with recombinant mAOX2 or mAOX3 in the presence of inhibitors. The incubation times were 50 s and 1 min for AOX2 and AOX3, respectively. The inhibitory effect of each compound was expressed as a percent of activity compared to the control. All data are means ± S.D. of three replicates.

第四節 小括

本章では、ヒトやマウスなどの肝臓中 AOX 活性を阻害することが知られている化合物から、11 種類の候補化合物を選択し、これらの mouse AOX2 および mouse AOX3 に対する阻害活性を評価した。その結果、menadione, norharmaline, raloxifene は AOX2 および AOX3 を共に強力に阻害することが示され、また、17 β -estradiol は AOX2 に対して特異的に、chlorpromazine は AOX3 に対して特異的に阻害活性を示すことが明らかになった。

これまでに norharmaline は mouse AOX3 に高い選択性を示すことが報告されていたが (Vila *et al*, 2004; Takaoka *et al*, 2018), 今回の検討により norharmaline は AOX3 だけでなく AOX2 もまた阻害することが示された。この結果は、酵素の阻害剤との結合部位における立体構造が、両 AOX 分子種の間において類似する可能性を示唆している。実際に、*in silico* ホモロジーモデリングに基づいた mouse AOX1, AOX2, AOX3, AOX4 の構造解析より、これらの 4 分子種の間では基質結合ポケットの立体構造には大きな差があるものの、AOX2 と AOX3 の基質結合ポケットは比較的類似していることが報告されている (Cerqueira *et al*, 2015)。

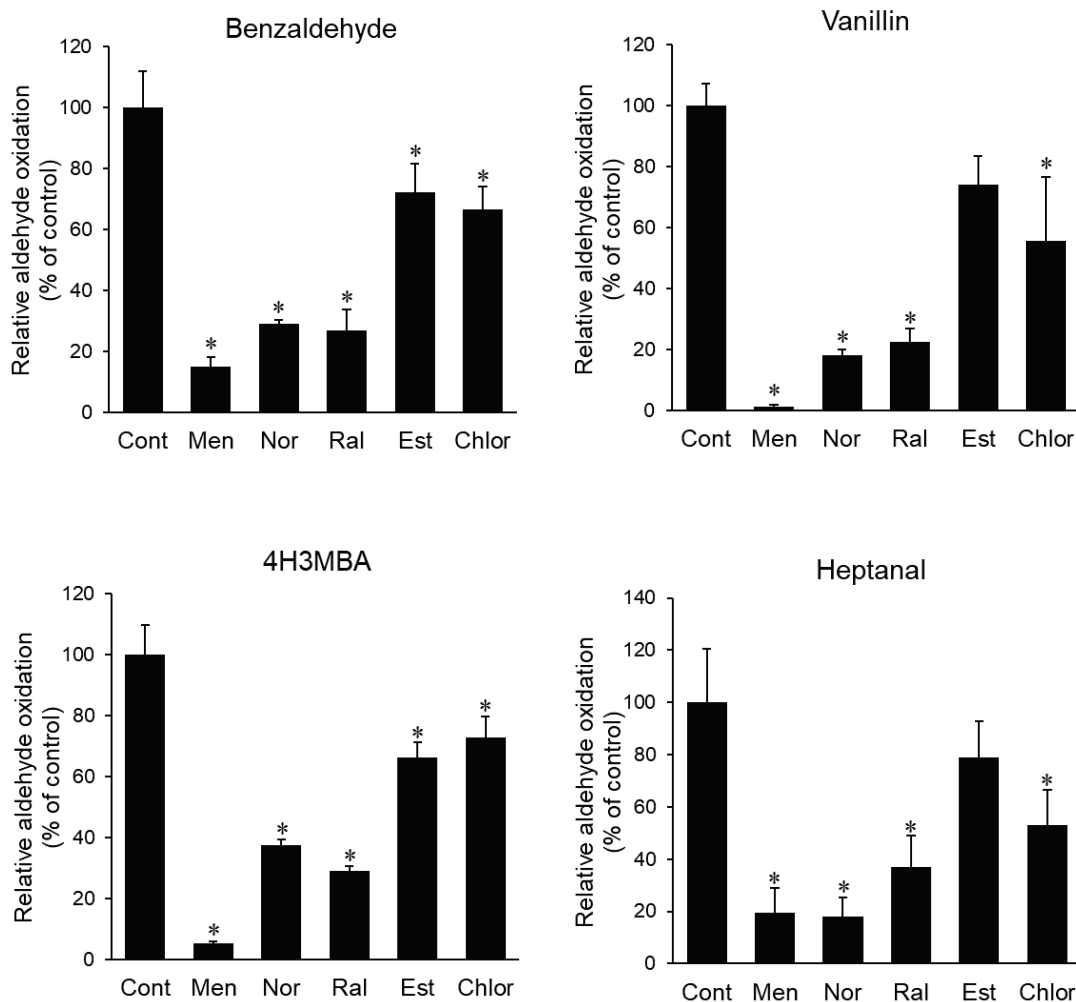
第五章 マウス嗅上皮のアルデヒドニオイ成分の酸化における AOX の寄与

第一節 緒言

第四章において、マウス嗅上皮に発現する AOX2 および AOX3 に対する強力な阻害剤をいくつか見出した。濃度依存的な阻害効果の検討から、10 μ M menadione, norharmane, raloxifene は両 AOX 分子種を阻害し、30 μ M chlorpromazine は AOX3 を特異的に、30 μ M 17 β -estradiol は AOX2 を特異的に阻害することが示された。そこで本章では、上記の各 AOX 分子種に対する阻害効果を決定した阻害剤を使用し、マウス嗅上皮でのアルデヒドニオイ成分の酸化反応への AOX2 と AOX3 の寄与の程度を評価した。

第二節 AOX 阻害剤がマウス嗅上皮のアルデヒドニオイ成分代謝に与える影響

10 μM の menadione, norharmane, raloxifene および 30 μM の chlorpromazine, 17 β -estradiol をマウス嗅上皮 S9 に前処置し, このマウス嗅上皮 S9 と 10 μM の benzaldehyde, vanillin, 4H3MBA, heptanal, *n*-octanal, *trans*-2-octenal の反応により生じるカルボン酸代謝物を LC-MS/MS により定量した (Fig.5-1)。その結果, 10 μM の menadione, norharmane, raloxifene の前処置は, 今回検討した 6 種類の芳香族および脂肪族アルデヒド全ての酸化反応を 75~95%程度抑制した。30 μM の 17 β -estradiol の前処置は, 脂肪族および芳香族アルデヒドの酸化を約 10-30% 抑制した。一方, 30 μM chlorpromazine は, これらのアルデヒドの酸化反応を約 30~60%抑制した。



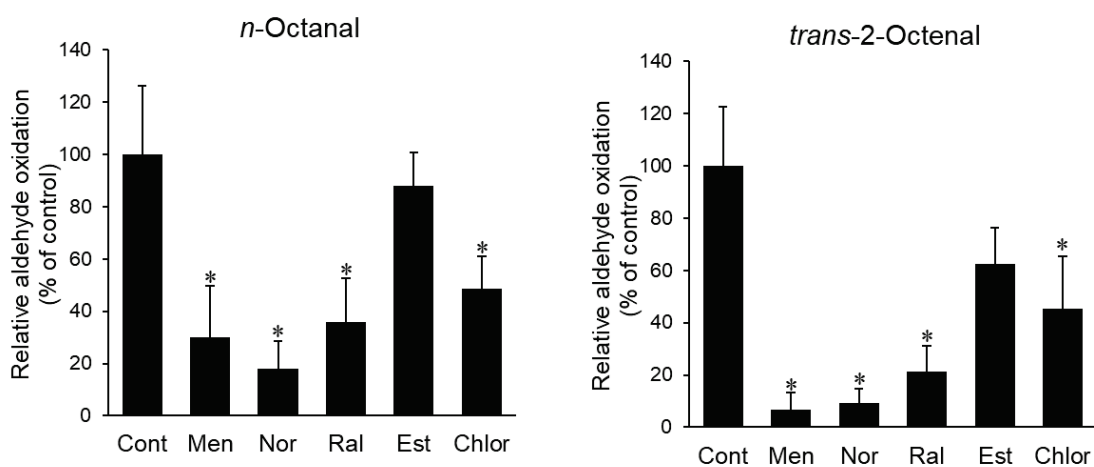


Fig. 5-1 Effects of AOX2 and/or AOX3 inhibitors on the aldehyde oxidation in mouse OE. 10 μ M of aromatic and aliphatic aldehydes were reacted for 2 min with mouse OE S9 in the presence of AOX2 and/or AOX3 inhibitors. Menadione, norharmane, and raloxifene were used at 10 μ M. 17 β -estradiol and chlorpromazine were used at 30 μ M. The inhibitory effect of each compound was expressed a percent of activity compared to the control. All data are means \pm S.D. of three replicates. *P < 0.05 vs. Cont. Men: menadione, Nor: norharmane, Ral: raloxifene, Est: 17 β -estradiol, Chlor: chlorpromazine.

第三節 補酵素の添加が嗅上皮のアルデヒドニオイ成分代謝に与える影響

マウス嗅上皮におけるアルデヒドニオイ成分の酸化代謝に関与するもう一つの酵素として、アルデヒド脱水素酵素 (ALDH) が考えられる。プロテオミクス解析によりその発現量は不明なものマウスの嗅上皮には 16 種類の ALDH 分子種が発現することが確認されている (Kuhlmann *et al*, 2014)。ALDH はその活性に補酵素として NAD^+ または NADP^+ を必要とする (Marchitti *et al*, 2008)。

そこで、マウス嗅上皮 S9 におけるアルデヒドニオイ成分の代謝反応系に、 $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ を添加した際に、カルボン酸代謝物生成がどのように変化するかを LC-MS/MS により定量評価した (Fig.5-2)。その結果、 $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ の添加は benzaldehyde および 4H3MBA の酸化反応を約 2.5 倍増加させた。一方で、vanillin の酸化反応にはほとんど影響を与えなかった。

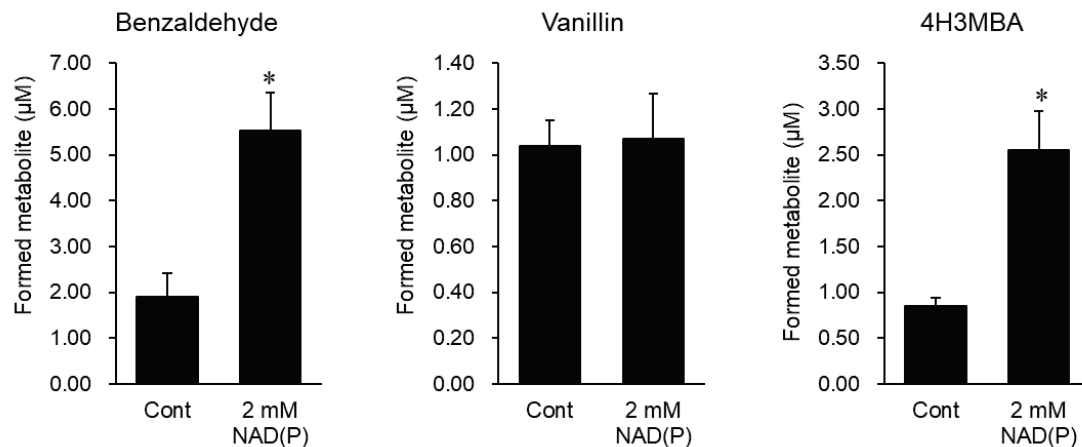


Fig. 5-2 Effects of $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ on the aldehyde oxidation in mouse OE. 10 μM of aromatic and aliphatic aldehydes were incubated for 10 min with mouse OE S9 in the presence of 2 mM NAD^+ and NADP^+ . All data are means \pm S.D. of three replicates. * $P < 0.05$ vs. Cont.

小括

本章では、各 AOX 分子種に対する阻害効果を決定した阻害剤を使用し、マウス嗅上皮でのアルデヒドニオイ成分の酸化反応への AOX2 と AOX3 の寄与の程度を評価した。その結果、AOX2 および AOX3 の両分子種を阻害する 10 μ M menadione, norharmaline, raloxifene は、アルデヒドの種類により基質により程度の差はあるが、芳香族および脂肪族のアルデヒドの酸化反応の大部分を抑制した。この結果から、マウス嗅上皮におけるアルデヒドニオイ成分の酸化反応には AOX が一定以上寄与することが示された。

mouse AOX2 を特異的に阻害する 30 μ M の 17 β -estradiol は、マウス嗅上皮における脂肪族および芳香族アルデヒドの酸化反応を 10~30%程度抑制した。一方、mouse AOX3 を特異的に阻害する 30 μ M chlorpromazine は、これらのアルデヒドの酸化を約 30~60%抑制した。この結果より、マウス嗅上皮におけるアルデヒドニオイ成分の酸化反応には、AOX2 および AOX3 は共に関与するが、AOX3 の寄与の方がやや支配的であることが示唆された。

NAD⁺/NADP⁺がマウス嗅上皮のアルデヒドニオイ成分の酸化代謝に与える影響を評価した。その結果、benzaldehyde と 4H3MBA の酸化反応は、補酵素の添加により増加した一方で、vanillin の酸化反応は補酵素の共添加により全く変化がなかった。このことは、benzaldehyde や 4H3MBA の酸化反応には ALDH が関与する一方で、vanillin の酸化反応には ALDH はほとんど関与しないことが示された。以上より、基質による違いはあるものの、マウス嗅上皮におけるアルデヒドニオイ成分の酸化代謝には ALDH も関与する可能性が示唆された。

第六章 考察および総括

哺乳類において匂いの知覚は重要な役割を果たしている。近年、いくつかの嗅上皮に発現する XME が OR 周辺環境におけるニオイ成分の代謝を通じて、匂いの調節や終息に関与する可能性について議論されている (Heydel *et al*, 2019a, 2013)。本研究では、マウス嗅上皮に発現する XME の一つである AOX が幅広いアルデヒド基を有するニオイ成分をカルボン酸へ酸化することを明らかにした。アルデヒドをカルボン酸に変換する反応はその化合物の親水性を増加させる。また、UGT などのカルボン酸に対する抱合酵素により、生成したカルボン酸の親水性がさらに上昇する可能性もある (Lazard *et al*, 1991)。一般的に、ニオイ成分の親水性が高くなるほど、嗅覚受容体への親和性は低下すると考えられている (Block, 2018)。したがって、嗅上皮に存在する AOX は、OR 周辺環境にあるアルデヒド基を有するニオイ成分の親水性を高めることで、嗅覚シグナルの終結に関与する可能性がある。

一方で、マウス嗅上皮での AOX によるアルデヒドニオイ成分のカルボン酸への代謝は、そのニオイ成分が呈する臭気の質を調節する可能性も想定される。序論でも述べた通り、ニオイ成分の臭気の質は認識される OR のパターンによって決定される (Block, 2018)。アルデヒドとそれに対応するカルボン酸では OR 活性化パターンが異なる。例えば、vanillin はマウス OR である MOR174-4 および MOR224-13 を活性化する一方で (Kajiya *et al*, 2001; Oka *et al*, 2006)、vanillic acid はマウス OR である MOR9-1, MOR15-1 および MOR15-3 を活性化する (Saito *et al*, 2009; Li & Matsunami, 2011)。したがって、AOX による酸化反応が、アルデヒド基を有するニオイ成分が OR に結合する前に生じる場合、その臭気の質そのものが変調される可能性がある。

本研究では、マウス 嗅上皮 S9 において AOX がアルデヒドニオイ成分の酸化に関与していることを明らかにした。以前の研究では、マウス嗅上皮から分泌される鼻粘液中において、アルデヒドニオイ成分が酵素的に酸化されることが報告されている (Nagashima & Touhara, 2010)。しかしながら、その研究では、この鼻粘液中の酸化反応に関与する酵素は同定されていない (Nagashima & Touhara, 2010)。興味深いことに、AOX2 は嗅上皮のなかでも鼻粘液の分泌を担うボーマン腺の腺細胞に高発現することが報告されており (Kurosaki *et al*, 2004)、AOX は嗅上皮の組織中から鼻粘液中に分泌される可能性がある。このようなことを鑑みると、上記の Nagashima および Touhara (2010) により観察された、マウス鼻粘液中で生じるアルデヒドニオイ成分の酵素的酸化にも AOX2 が関与している可能性が考えられる。

マウスに存在する AOX1, AOX2, AOX3, AOX4 の一次アミノ酸配列は約 60%の配列類似性があり, AOX2 と AOX3 の間では約 65%の類似性である (Terao *et al*, 2016b)。また, 利用可能な AOX3 の結晶構造データ (PDB: 3ZYV) に基づくホモロジーモデリングの結果, これらの基質結合領域について 4 分子種の間で一定の違いがあることが報告されている (Cerqueira *et al*, 2015)。特に, AOX2 および AOX3 の比較において, 両分子種の基質結合部位は比較的類似しているが, AOX2 は基質結合部位がより疎水性であると推定されている。本研究により認められた AOX2 および AOX3 の基質特異性や阻害特異性がおおむね類似していたことは, 上記の両分子種における構造類似性に起因すると考えられる。

昆虫では, AOX ホモログが触角に特異的に発現し, 長鎖脂肪酸アルデヒド bombykal などの性フェロモンの分解を通じてフェロモンの知覚に関与することがよく知られている (Choo *et al*, 2013; Rybczynski *et al*, 1989)。そのため, げっ歯類においても特に mAOX2 などの嗅上皮特異的に発現する分子種は, 他の AOX 分子種とは異なる特定のフェロモンなどを認識し, 生殖や外敵に対する防御など重要なプロセスに関わる匂い物質の認識に重要な役割を担う可能性が考えられる。今後, 生理反応を誘発するような天然の mAOX2 特異的基質を哺乳類の行動試験などにより同定する必要がある。

本研究により, マウス嗅上皮に発現する AOX 分子種 (mAOX2 および mAOX3) の阻害剤, chlorpromazine, 17 β -estradiol, menadione, norharmane, raloxifene が見いだされた。特に, menadione は両分子種に対して最も強力な阻害効果を示した。いくつかの先行研究において, XME 阻害剤の使用により匂いの知覚における嗅上皮 XME が果たす役割が明らかにされたことを鑑みると (Heydel *et al*, 2019a; Thiebaud *et al*, 2013; Schilling *et al*, 2010), 本研究で同定された AOX 阻害剤は, 今後, 嗅上皮 AOX が嗅覚系においてどのような生理機能を果たすのかを精査する上で有用な実験ツールになることが期待される。

ヒトの嗅上皮に発現する XME と嗅覚の関連性を示唆する報告もある。例えば, ヒトの嗅上皮にも CYP, ALDH, CES, GST, UGT などの XME が発現するという報告がある (Gervasi *et al*, 1991; Lewis *et al*, 1994; Jedlitschky *et al*, 1999; Zhang *et al*, 2005)。また, ketone 55 という水酸化されることで特徴的なラズベリーの香りを呈する人工香料と, 揮発性で香りのない CYP2A13 阻害剤を共に被験者に嗅がせるにおい嗅ぎ実験を行ったところ, CYP2A13 阻害剤は ketone 55 の特徴的なラズベリーの香りを減少または消失させたという報告がある (Schilling, 2017)。このことは, ヒトにおいても嗅上皮でのニオ

イ成分の代謝が嗅覚に影響を与える可能性を示唆している。一方で、AOX 発現にはマウスとヒトにおいて顕著な種差があり、ヒトでは AOX2, AOX3, AOX4 は全て偽遺伝子化しており、AOX1 のみが活性な遺伝子として発現する (Terao *et al*, 2016b)。そのため、本研究で確認された嗅上皮におけるアルデヒドニオイ成分の酸化反応がヒトの嗅上皮でも生じる可能性を考える場合には、AOX1, ALDH などの関与を考慮に入れる必要がある。

匂いの感じ方には顕著な個人差がある。実際に *n*-octanal などの脂肪族アルデヒドの嗅覚閾値には個人差があることや (Cometto-Muñiz & Abraham, 2010), hexanal を嗅がせた際の糸球体の活性化パターンがマウスの個体間で大きく異なることが光学イメージングにより報告されている (Fried *et al*, 2002)。AOX や ALDH などのアルデヒドを代謝する酵素にはその活性に個人差があることを鑑みると (Chen *et al*, 1991; Al-Salmy, 2001; Fu *et al.*, 2013), このような匂いの感じ方に個人差が生じるメカニズムの一端は、そのニオイ成分の代謝酵素の活性における個人差により説明付けられる可能性がある。

本研究では嗅上皮におけるニオイ成分の代謝に着目したものの、嗅上皮は低分子から高分子までの化合物に対し比較的高い透過性を示すことから、医薬品の投与部位としても利用されている。特に、近年、嗅上皮の神経細胞から脳神経へと直接つながる経路 (nose to brain 経路) を介した中枢疾患治療薬の脳内送達に期待が寄せられている (Pardeshi & Belgamwar, 2013)。AOX は、本研究において着目したアルデヒド化合物以外に、含窒素複素環などの複素環を酸化する幅広い基質特異性を有しているため、医薬品代謝において重要な役割を担うことが知られている (Pryde *et al*, 2010)。このようなことを鑑みると、本研究により示した嗅上皮における AOX による代謝は、マウスとヒトの種差は十分に考慮する必要があるものの、医薬品の鼻腔内投与を考える上で重要な情報となる。

マウス嗅上皮の AOX 活性を阻害した raloxifene, chlorpromazine などは医薬品である。このような医薬品による XME 阻害が嗅上皮で生じた場合には、嗅上皮におけるニオイ成分の代謝活性が低下することで嗅覚系に何らかの影響が生じる可能性が考えられる。実際に、典型的な XME の誘導剤をラットに腹腔内または経口投与した際に、嗅上皮の XME の発現および活性が上昇するという報告があり (Thiebaud *et al*, 2010), 全身に投与された化合物が嗅上皮の異物代謝活性を変化させる可能性は十分にある。そのため、今後、医薬品による嗅上皮の XME の阻害や誘導が嗅覚に与える影響を評価する必要がある。

本研究を通じて、マウス嗅上皮に存在する AOX2 と AOX3 が幅広いアルデヒド基を有するニオイ成分の酸化代謝に関与することを明らかにした。この酸化反応は、ニオイ成分の化学構造を変換するため、嗅覚シグナルの変調や終結を引き起こす可能性がある (Fig.6)。本研究のような嗅上皮に発現する様々な XME とニオイ成分の代謝の関係性についての知見は、ヒトを含む哺乳動物の嗅覚メカニズムを考える上で重要である。

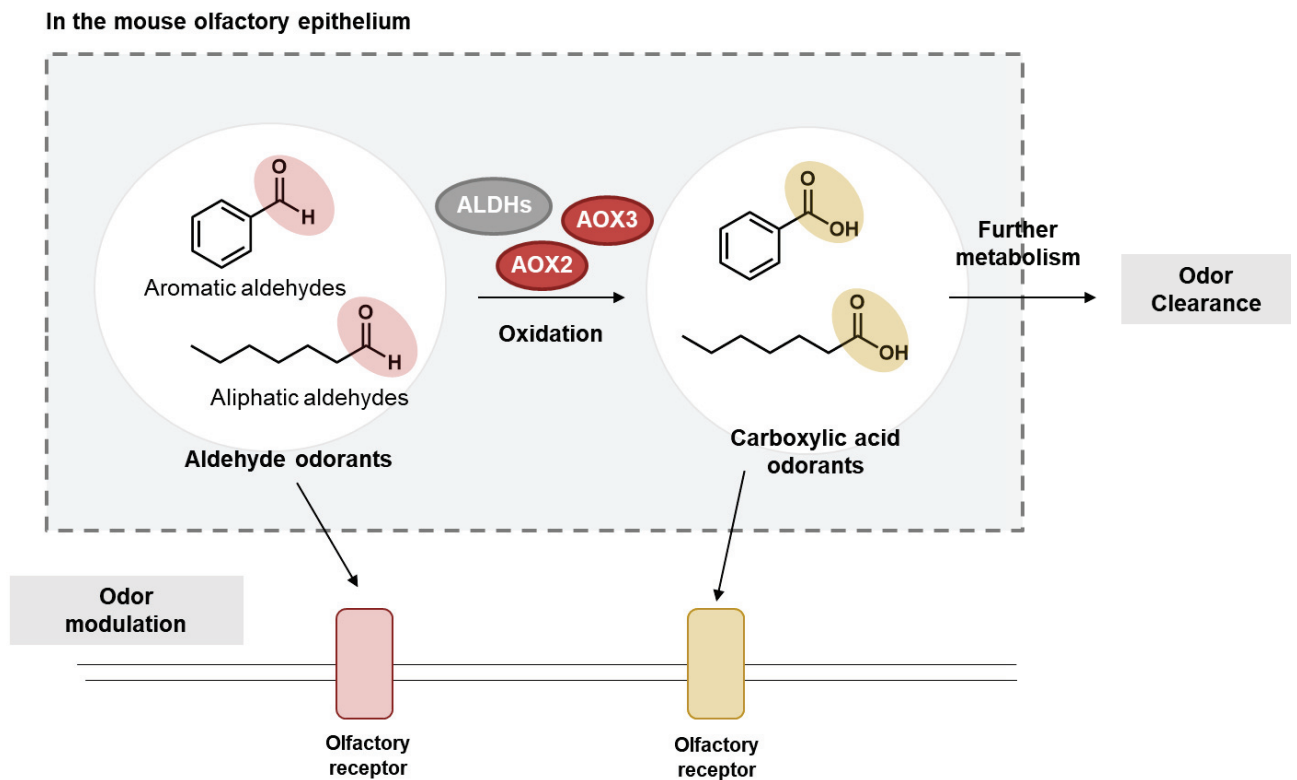


Fig. 6 Graphical summary of finding and implications from this study. The findings revealed through this study are described within the dotted enclosure, and the suggestion are described outside it.

実験の部

【試薬】

代謝試験標準品

Benzaldehyde: 東京化成工業株式会社

Benzoic acid: 東京化成工業株式会社

Vanillin: ナカライテスク株式会社

Vanillic acid: 東京化成工業株式会社

4-Hydroxy-3-methylbenzaldehyde: 東京化成工業株式会社

4-Hydroxy-3-methylbenzoic acid: 東京化成工業株式会社

Heptanal: 東京化成工業株式会社

Heptanoic acid: 東京化成工業株式会社

n-Octanal: 東京化成工業株式会社

n-Octanoic acid: 東京化成工業株式会社

trans-2-Octenal: 東京化成工業株式会社

trans-2-Octenoic acid: 東京化成工業株式会社

AOX 阻害候補化合物

Amitriptyline hydrochloride: 和光純薬工業株式会社

Benzamidine hydrochloride: 東京化成工業株式会社

Clozapine: Sigma-Aldrich

Chlorpromazine hydrochloride: 和光純薬工業株式会社

17 β -Estradiol: Sigma-Aldrich

Ketoconazole: 東京化成工業株式会社

Loratadine: 東京化成工業株式会社

Menadione: Sigma-Aldrich

Norharmane: 和光純薬工業株式会社

Raloxifene hydrochloride: 東京化成工業株式会社

SKF525A: Enzo Life Sciences

LC-MS/MS 分析

Ibuprofen: 東京化成工業株式会社

2-Ethylbutyric acid: 東京化成工業株式会社

3-Nitrophenylhydrazine hydrochloride: 東京化成工業株式会社

1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride: 東京化成工業株式会社

Pyridine: ナカライテスク株式会社

マウス嗅上皮 S9 調製

イソフルラン: 和光純薬工業株式会社

Tris(hydroxymethyl)aminomethane: ナカライテスク株式会社

EDTA・2Na: 同人化学研究所

プロテアーゼ阻害剤カクテル: ナカライテスク株式会社

NAD⁺: ナカライテスク株式会社

NADP⁺: ナカライテスク株式会社

Mouse AOX2・AOX3 精製酵素

Mouse AOX2・AOX3 の組み換え精製酵素はポツダム大学の Dr. Silke Leimkühler らの研究グループからご供与いただいた。上記の酵素は以前の報告に従って調製されたものである (Küçükgoze & Leimkühler, 2018)。

【実験方法】

マウス嗅上皮 S9 の調製

C57BL/6 系統マウスは日本クレアおよび Envigo より購入した。全ての動物実験は、広島大学およびマリオネグリ薬理学研究所の動物倫理委員会に承認を得た動物実験計画に基づいて行われた。

雌雄マウス (9 週齢) はイソフルラン麻酔下において安楽死させた後、直ちに嗅上皮を摘出し液体窒素で凍結させた。5 匹分の嗅上皮を、2 倍量の 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4, 1 mM EDTA, 1%プロテアーゼ阻害剤カクテル含有) 中でホモジナイズした (Micro Smash™, 株式会社トミー精工)。ただし組織 1g は 1mL と仮定した。ホモジネートを遠心分離 (9000g, 4°C, 20 分間) した後の上清を S9 画分とし、これを代謝活性評価に使用した。嗅上皮 S9 のタンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンで作製した検量線を用いてブラッドフォード法により定量した。

Real-time PCR

以前の報告 (Terao *et al*, 2016a) に従い、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いてマウス嗅上皮から total RNA を抽出し、逆転写反応後 Taqman プローブを用いて Real-time PCR を行い、AOX1, AOX2, AOX3, AOX4 の mRNA 発現を評価した。リファレンス遺伝子として 18S ribosomal RNA を用いた。使用した Taqman プローブは以下の通り (AOX1,

Mm01255332_m1; AOX2, Mm01255381_m; AOX3, Mm00508167_m1; AOX4, Mm00508214_m1; 18S ribosomal RNA, Mm03928990_g1) であり, いずれも Thermo Fisher Scientific より購入した。

Western Blot

上記の嗅上皮 S9 を 8% SDS-PAGE で分離し, ニトロセルロース膜に転写後, ウェスタンブロットを行った。5% ウシ血清アルブミン含有 TBS 溶液中に 1,000 倍希釈した抗 AOX2 血清および抗 AOX3 血清 (Kurosaki *et al*, 2004), 抗チューブリン抗体 (ローディングコントロール) を用いて抗体反応を行い検出した。

代謝活性評価

AOX 精製酵素またはマウス嗅上皮 S9 を, 基質および阻害剤の存在下にて, 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 中で, 37°Cにてインキュベートすることで, それぞれの代謝活性を評価した。反応液を 5 分間プレインキュベートした後に, 基質を加えることで反応を開始し, 内部標準を含む methanol または acetonitrile を加えることで反応を停止させた。その後, 遠心分離 (14,000 g, 4°C, 5 分間) した上清を 0.1%ギ酸により希釈または誘導化 (以下に記載) し, LC-MS/MS により定量分析した。また, ALDH の関与を調べるために NAD⁺と NADP⁺を加える場合は, 2 mM NAD⁺と NADP⁺を嗅上皮 S9 のプレインキュベーションの前に添加した。

AOX 阻害活性の評価

各検証化合物は基質を加えて反応を開始する前に反応混合物中で 5 分間プレインキュベーションした。このときの基質は vanillin を使用し, 添加濃度は AOX2 の場合 2 μM, AOX3 の場合 5 μM とした。これらの濃度は両分子種の K_m 値付近であることがすでに報告されている (Küçüköze & Leimkühler, 2018)。阻害剤スクリーニング評価には 10 μM の各化合物を使用し, 濃度依存性の評価には以下の濃度を使用した (chlorpromazine, 0.03~100μM; 17β-estradiol, 0.01~30μM; menadione, 0.001~10μM; norharmane, 0.01~100μM; raloxifene, 0.003~30μM)。検証化合物存在下での相対的な代謝物生成量を相対 AOX 代謝活性として表した。

3-Nitrophenylhydrazine (3-NPH) 誘導化

Dei Cas らによる短鎖脂肪酸の定量分析法の比較により, 3-NPH による誘導体化反応の後に LC-MS/MS 分析を行う方法が, GC/MS などの他の分析機器を使用する定量法よりも, 定量性および操作の簡便さの点から優れていることが報告されている (Dei Cas *et*

al, 2020)。この報告に従い、脂肪酸カルボン酸 (Heptanoic acid, *n*-octanoic acid, *trans*-2-octenoic acid) は、3-NPH 誘導体化した後に LC-MS/MS を用いて定量分析した。代謝反応液を遠心した後の上清を、5 mM 3-NPH, 5 mM EDC, 1.5% pyridine と 30 分間インキュベート (37°C, 遮光) した。誘導化した反応液は 0.1%ギ酸で希釈した後に LC-MS/MS により定量分析した。

LC-MS/MS 分析

上記の反応液の希釈を、高速液体クロマトグラフィー (Exion LC™, AB Sciex) と質量分析計 (Triple Quad 5500+, AB Sciex) を組み合わせた液体クロマトグラフィータンデム質量分析計 (LC-MS/MS) で分析した。全ての分析物と内部標準 (IS) はネガティブモードにおけるエレクトロスプレーイオン化法でイオン化し、多重反応モニタリング (MRM) により検出した。芳香族カルボン酸および脂肪酸カルボン酸-3NPH 誘導体について分析条件の詳細は以下に記載する。全ての定量解析は Analyst®ソフトウェア (AB Sciex) を用いて行った。

○芳香族カルボン酸

LC 条件

カラム	Luna® Omega Polar C18 column (3 µm, 100 mm x 2.1 mm; Phenomenex)
移動相条件	A: 0.1% Formic acid
	B: Methanol
内部標準	Ibuprofen

グラジエント条件

Time (min)	A solution (%)	:	B solution (%)
0.0	90	:	10
1.5	90	:	10
5.0	30	:	70
6.0	30	:	70
6.1	90	:	10
7.0	90	:	10

MRM 条件 (negative mode)

Analyte	Precursor and product ion
Benzoic acid	120.927 / 77.100
Vanillic acid	166.966 / 107.600
4H3Mbenzoic acid	150.976 / 107.000
Ibuprofen (IS)	205.042 / 161.200

○脂肪族カルボン酸-3NPH 誘導体

LC 条件

カラム	Mastro2 C18 column (3 μm, 150 mm x 2.1 mm; Shimadzu GLC)
移動相条件	A: 0.1% Formic acid
	B: Acetonitrile
内部標準	2-Ethylbutyric acid

グラジエント条件

Time (min)	A solution (%)	:	B solution (%)
0.0	60	:	40
2.0	60	:	40
6.0	10	:	90
9.0	10	:	90
9.1	60	:	40
11.0	60	:	40

MRM 条件 (negative mode)

Analyte	Precursor and product ion
Heptanoic acid-3NPH	264.040 / 137.100
<i>n</i> -Octanoic acid-3-NPH	278.033 / 137.000
<i>trans</i> -2-Octenoic acid-3-NPH	276.040 / 137.100
2-Ethylbutyric acid-3-NPH	250.034 / 137.100

統計解析

統計的有意差は Student's *t*-test および one-way ANOVA 後の Tukey's test によって決定された。P < 0.05 を統計的有意とした。

引用文献

- Al-Salmy HS (2001) Individual variation in hepatic aldehyde oxidase activity. *IUBMB Life* **51**: 249–253
- Block E (2018) Molecular Basis of Mammalian Odor Discrimination: A Status Report. *J Agric Food Chem* **66**: 13346–13366
- Buck L & Axel R (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**: 175–187
- Cerqueira NMFSA, Coelho C, Brás NF, Fernandes PA, Garattini E, Terao M, Romão MJ & Ramos MJ (2015) Insights into the structural determinants of substrate specificity and activity in mouse aldehyde oxidases. *J Biol Inorg Chem* **20**: 209–217
- Chen CC, Hwu HG, Yeh EK, Morimoto K & Otsuki S (1991) Aldehyde dehydrogenase deficiency, flush patterns and prevalence of alcoholism: an interethnic comparison. *Acta Med Okayama* **45**: 409–416
- Choo Y-M, Pelletier J, Atungulu E & Leal WS (2013) Identification and characterization of an antennae-specific aldehyde oxidase from the navel orangeworm. *PLoS One* **8**: e67794
- Cometto-Muñiz JE & Abraham MH (2010) Odor detection by humans of lineal aliphatic aldehydes and helional as gauged by dose-response functions. *Chem. Senses* **35**: 289–299
- Debat H, Eloit C, Blon F, Sarazin B, Henry C, Huet J-C, Trotier D & Pernollet J-C (2007) Identification of human olfactory cleft mucus proteins using proteomic analysis. *J Proteome Res* **6**: 1985–1996
- Dei Cas M, Paroni R, Saccardo A, Casagni E, Arnoldi S, Gambaro V, Saresella M, Mario C, La Rosa F, Marventano I, Piancone F, Roda G (2020) A straightforward LC-MS/MS analysis to study serum profile of short and medium chain fatty acids. *Journal of Chromatography B* **1154**: 121982
- Dunkel A, Steinhaus M, Kotthoff M, Nowak B, Krautwurst D, Schieberle P & Hofmann T (2014) Nature's Chemical Signatures in Human Olfaction: A Foodborne Perspective for Future Biotechnology. *Angew Chem Int Ed Engl* **53**: 7124–7143

- Fried HU, Fuss SH & Korsching SI (2002) Selective imaging of presynaptic activity in the mouse olfactory bulb shows concentration and structure dependence of odor responses in identified glomeruli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 3222–3227
- Fu C, Di L, Han X, Soderstrom C, Snyder M, Troutman MD, Obach RS & Zhang H (2013) Aldehyde oxidase 1 (AOX1) in human liver cytosols: quantitative characterization of AOX1 expression level and activity relationship. *Drug Metab. Dispos.* **41**: 1797–1804
- Garattini E, Fratelli M & Terao M (2008) Mammalian aldehyde oxidases: genetics, evolution and biochemistry. *Cell Mol Life Sci* **65**: 1019–1048
- Garattini E & Terao M (2012) The role of aldehyde oxidase in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **8**: 487–503
- Gervasi PG, Longo V, Naldi F, Panattoni G & Ursino F (1991) Xenobiotic-metabolizing enzymes in human respiratory nasal mucosa. *Biochem Pharmacol* **41**: 177–184
- Hecker N, Lächele U, Stuckas H, Giere P & Hiller M (2019) Convergent vomeronasal system reduction in mammals coincides with convergent losses of calcium signalling and odorant-degrading genes. *Mol Ecol* **28**: 3656–3668
- Heydel J-M, Coelho A, Thiebaud N, Legendre A, Bon A-ML, Faure P, Neiers F, Artur Y, Golebiowski J & Briand L (2013) Odorant-binding proteins and xenobiotic metabolizing enzymes: implications in olfactory perireceptor events. *Anat Rec* **296**: 1333–1345
- Heydel J-M, Faure P & Neiers F (2019a) Nasal odorant metabolism: Enzymes, activity and function in olfaction. *Drug Metab Rev* **51**: 224–245
- Heydel J-M, Menetrier F, Belloir C, Canon F, Faure P, Lirussi F, Chavanne E, Saliou J-M, Artur Y, Canivenc-Lavier M-C, Briand L, Neiers F (2019b) Characterization of rat glutathione transferases in olfactory epithelium and mucus. *PLoS One* **14**: e0220259
- Hu J, Sheng L, Li L, Zhou X, Xie F, D'Agostino J, Li Y & Ding X (2014) Essential role of the cytochrome P450 enzyme CYP2A5 in olfactory mucosal toxicity of naphthalene. *Drug Metab Dispos* **42**: 23–27
- Iyanagi T (2007) Molecular mechanism of phase I and phase II drug-metabolizing enzymes: implications for detoxification. *Int Rev Cytol* **260**: 35–112

- Jedlitschky G, Cassidy AJ, Sales M, Pratt N & Burchell B (1999) Cloning and characterization of a novel human olfactory UDP-glucuronosyltransferase. *Biochem J* **340**: 837–843
- Kajiya K, Inaki K, Tanaka M, Haga T, Kataoka H & Touhara K (2001) Molecular Bases of Odor Discrimination: Reconstitution of Olfactory Receptors that Recognize Overlapping Sets of Odorants. *J Neurosci* **21**: 6018–6025
- Kücükgoze G & Leimkühler S (2018) Direct comparison of the four aldehyde oxidase enzymes present in mouse gives insight into their substrate specificities. *PLoS One* **13**: e0191819
- Kuhlmann K, Tschapek A, Wiese H, Eisenacher M, Meyer HE, Hatt HH, Oeljeklaus S & Warscheid B (2014) The Membrane Proteome of Sensory Cilia to the Depth of Olfactory Receptors. *Mol Cell Proteomics* **13**: 1828–1843
- Kurosaki M, Bolis M, Fratelli M, Barzago MM, Pattini L, Perretta G, Terao M & Garattini E (2013) Structure and evolution of vertebrate aldehyde oxidases: from gene duplication to gene suppression. *Cell Mol Life Sci* **70**: 1807–1830
- Kurosaki M, Demontis S, Barzago MM, Garattini E & Terao M (1999) Molecular cloning of the cDNA coding for mouse aldehyde oxidase: tissue distribution and regulation in vivo by testosterone. *Biochem J* **341**: 71–80
- Kurosaki M, Terao M, Barzago MM, Bastone A, Bernardinello D, Salmona M & Garattini E (2004) The Aldehyde Oxidase Gene Cluster in Mice and Rats. Aldehyde oxidase homologue 3, a novel member of the molybdo-flavoenzyme family with selective expression in the olfactory mucosa. *J Biol Chem* **279**: 50482–50498
- Lazard D, Zupko K, Poria Y, Net P, Lazarovits J, Horn S, Khen M & Lancet D (1991) Odorant signal termination by olfactory UDP glucuronosyl transferase. *Nature* **349**: 790–793
- Lewis JL, Nikula KJ, Novak R & Dahl AR (1994) Comparative localization of carboxylesterase in F344 rat, beagle dog, and human nasal tissue. *Anat Rec* **239**: 55–64
- Li YR & Matsunami H (2011) Activation state of the M3 muscarinic acetylcholine receptor modulates mammalian odorant receptor signaling. *Sci Signal* **4**: ra1
- Malnic B, Hirono J, Sato T & Buck LB (1999) Combinatorial Receptor Codes for Odors. *Cell* **96**: 713–723

- Marchitti SA, Brocker C, Stagos D & Vasiliou V (2008) Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**: 697–720
- Nagashima A & Touhara K (2010) Enzymatic conversion of odorants in nasal mucus affects olfactory glomerular activation patterns and odor perception. *J Neurosci* **30**: 16391–16398
- Niimura Y, Matsui A & Touhara K (2014) Extreme expansion of the olfactory receptor gene repertoire in African elephants and evolutionary dynamics of orthologous gene groups in 13 placental mammals. *Genome Res* **24**: 1485–1496
- Obach RS, Huynh P, Allen MC & Beedham C (2004) Human Liver Aldehyde Oxidase: Inhibition by 239 Drugs. *J Clin Pharmacol* **44**: 7–19
- Oka Y, Katada S, Omura M, Suwa M, Yoshihara Y & Touhara K (2006) Odorant Receptor Map in the Mouse Olfactory Bulb: In Vivo Sensitivity and Specificity of Receptor-Defined Glomeruli. *Neuron* **52**: 857–869
- Pardeshi CV & Belgamwar VS (2013) Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood-brain barrier: an excellent platform for brain targeting. *Expert Opin. Drug Deliv.* **10**: 957–972
- Pryde DC, Dalvie D, Hu Q, Jones P, Obach RS & Tran T-D (2010) Aldehyde Oxidase: An Enzyme of Emerging Importance in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **53**: 8441–8460
- Robertson IGC & Bland TJ (1993) Inhibition by SKF-525A of the aldehyde oxidase-mediated metabolism of the experimental antitumour agent acridine carboxamide. *Biochem Pharmacol* **45**: 2159–2162
- Rybczynski R, Reagan J & Lerner MR (1989) A pheromone-degrading aldehyde oxidase in the antennae of the moth *Manduca sexta*. *J Neurosci* **9**: 1341–1353
- Sahi J, Khan KK & Black CB (2008) Aldehyde oxidase activity and inhibition in hepatocytes and cytosolic fraction from mouse, rat, monkey and human. *Drug Metab Lett* **2**: 176–183
- Saito H, Chi Q, Zhuang H, Matsunami H & Mainland JD (2009) Odor coding by a Mammalian receptor repertoire. *Sci Signal* **2**: ra9
- Schaal B, Coureaud G, Langlois D, Giniès C, Sémon E & Perrier G (2003) Chemical and

- behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature* **424**: 68–72
- Schilling B (2017) Nasal Periceptor Processes. In *Springer Handbook of Odor*, Buettner A (ed) pp 73–74. Cham: Springer International Publishing
- Schilling B, Kaiser R, Natsch A & Gautschi M (2010) Investigation of odors in the fragrance industry. *Chemoecology* **20**: 135–147
- Takaoka N, Sanoh S, Okuda K, Kotake Y, Sugahara G, Yanagi A, Ishida Y, Tateno C, Tayama Y, Sugihara K, Kitamura S, Kurosaki M, Terao M, Garattini E, Ohta S (2018) Inhibitory effects of drugs on the metabolic activity of mouse and human aldehyde oxidases and influence on drug–drug interactions. *Biochem Pharmacol* **154**: 28–38
- Terao M, Barzago MM, Kurosaki M, Fratelli M, Bolis M, Borsotti A, Bigini P, Micotti E, Carli M, Invernizzi RW, Bagnati R, Passoni A, Pastorelli R, Brunelli L, Toschi I, Cesari V, Sanoh S, Garattini E (2016a) Mouse aldehyde-oxidase-4 controls diurnal rhythms, fat deposition and locomotor activity. *Sci Rep* **6**: 30343
- Terao M, Romão MJ, Leimkühler S, Bolis M, Fratelli M, Coelho C, Santos-Silva T & Garattini E (2016b) Structure and function of mammalian aldehyde oxidases. *Arch Toxicol* **90**: 753–780
- Thiebaud N, Sigoillot M, Chevalier J, Artur Y, Heydel J-M & Le Bon A-M (2010) Effects of typical inducers on olfactory xenobiotic-metabolizing enzyme, transporter, and transcription factor expression in rats. *Drug Metab Dispos* **38**: 1865–1875
- Thiebaud N, Veloso Da Silva S, Jakob I, Sicard G, Chevalier J, Ménétrier F, Berdeaux O, Artur Y, Heydel J-M & Le Bon A-M (2013) Odorant metabolism catalyzed by olfactory mucosal enzymes influences peripheral olfactory responses in rats. *PLoS One* **8**: e59547
- Tsuzuki S (2019) Higher Straight-Chain Aliphatic Aldehydes: Importance as Odor-Active Volatiles in Human Foods and Issues for Future Research. *J Agric Food Chem* **67**: 4720–4725
- Vila R, Kurosaki M, Barzago MM, Kolek M, Bastone A, Colombo L, Salmons M, Terao M & Garattini E (2004) Regulation and Biochemistry of Mouse Molybdo-flavoenzymes. The DBA/2 mouse is selectively deficient in the expression of aldehyde oxidase homologues 1 and 2 and represents a unique source for the purification and characterization of

aldehyde oxidase. *J Biol Chem* **279**: 8668–8683

Yoshihara S & Tatsumi K (1997) Purification and Characterization of Hepatic Aldehyde Oxidase in Male and Female Mice. *Arch Biochem Biophys* **338**: 29–34

Zhang X, Zhang Q-Y, Liu D, Su T, Weng Y, Ling G, Chen Y, Gu J, Schilling B & Ding X (2005) Expression of cytochrome p450 and other biotransformation genes in fetal and adult human nasal mucosa. *Drug Metab Dispos* **33**: 1423–1428

Zou D-J, Chesler A & Firestein S (2009) How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story? *Nat Rev Neurosci* **10**: 611–618

本研究の基礎となる原著論文

Naoki Takaoka, Seigo Sanoh, Shigeru Ohta, Mariam Esmaeeli, Silke Leimkühler, Mami Kurosaki, Mineko Terao, Enrico Garattini, Yaichiro Kotake: Involvement of aldehyde oxidase in the metabolism of aromatic and aliphatic aldehyde-odorants in the mouse olfactory epithelium. *Arch Biochem Biophys*, 715: 109099, 2022

本論文に関連した学会発表

2020年7月13～20日 (Web開催)

第61回日本生化学会中国・四国支部例会

アルデヒドオキシダーゼの生理機能解明を目指した各分子種の阻害プロファイル評価
○高岡 尚輝, 佐能 正剛, 田山 剛崇, 杉原 数美, 太田 茂, Silke Leimkühler, Mami Kurosaki, Mineko Terao, Enrico Garattini, 古武 弥一郎

2020年12月1日 (1日発表)

第35回日本薬物動態学会年会 (Web開催)

芳香族アルデヒド匂い成分の酸化代謝における嗅上皮アルデヒド酸化酵素の関与
○高岡 尚輝, 佐能 正剛, 太田 茂, Kücükgoze Gökhan, Leimkühler Silke, Kurosaki Mami, Terao Mineko, Garattini Enrico, 古武 弥一郎

第35回日本薬物動態学会年会 優秀口頭発表賞 受賞

2021年9月10～11日 (10日発表)

フォーラム2021 衛生薬学・環境トキシコロジー

嗅上皮アルデヒド酸化酵素による揮発性有機化合物の代謝

○高岡 尚輝, 佐能 正剛, 太田 茂, Esmaeeli Mariam, Leimkühler Silke, Kurosaki Mami, Terao Mineko, Garattini Enrico, 古武 弥一郎

謝辞

本研究を行うにあたり、幅広い見地と経験から御指導、御鞭撻を賜りました、広島大学大学院医系科学研究科 古武 弥一郎教授に心より御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、終始御懇篤なる直接の御指導ならびに多大なるご助言を賜りました、広島大学大学院医系科学研究科 太田 茂教授（現・和歌山県立医科大学教授）、ならびに、佐能 正剛助教（現・和歌山県立医科大学准教授）に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際して格別のご高配を賜りました、広島大学大学院医系科学研究科 熊本 卓哉教授、熊谷 孝則准教授に厚く御礼申し上げます。

学位（博士）取得にあたり審査委員として多くのご助言を賜りました、広島大学大学院医系科学研究科 野村 渉教授、森岡 徳光教授、高橋 陵宇准教授に厚く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり数々のご助言・ご協力を賜りました、マリオネグリ薬理学研究所の Dr. Enrico Garattini, Dr. Mineko Terao, Dr. Mami Kurosaki, ならびに、AOX 精製酵素をご提供いただきましたポツダム大学の Dr. Silke Leimkühler, Dr. Mariam Esmaceli に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、原子・分子の顕微イメージングプラットフォーム事業において、広島大学自然科学研究支援開発センターの島津 LC-MS/MS8050 も使用させていただいた。

本研究の遂行にあたり、特別研究員 DC2 および若手研究者海外挑戦プログラムにおいて、奨学金、研究費、留学渡航費をご支援いただきました日本学術振興会に厚く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、実験環境を整えてくださり、また学生生活を充実したものにしてくださいました生体機能分子動態学研究室の先輩方、後輩の皆様に深く感謝致します。

最後に、学生生活を支え、見守ってくれた家族に心から感謝致します。