OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Short-chain dehydrogenase/reductase superfamily に属する新規還元酵素CBR3 の酵素化学的性質
Author(s)	三浦, 健
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34388
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

〔　題　　名　〕Short-chain dehydrogenase/reductase superfamilyに属する新規還元酵素CBR3の酵素化学的性質

学位申請者　　三浦　健

Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamilyは、主にNAD(P)(H) (nicotin-amide adenine dinucleotide (phosphate))を補酵素として用いる酸化・還元酵素ファミリーであり、脱水素・水素付加反応を触媒する。ヒトでは75種類もの遺伝子が見出されている巨大な酵素ファミリーである。酵素間でのアミノ酸配列相同性は15-30%と低い。

SDR酵素の一つであるカルボニル還元酵素1 (CBR1, Carbonyl reductase 1)は、NADPHを補酵素とする還元酵素である。アントラサイクリン系抗がん薬(ANT)の代謝によって本剤の副作用である心不全の原因代謝産物を産生したり、プロスタグランジン(PG)E_2の代謝・不活性化を介してがんの進展や患者予後に関連するため、CBR1はがん領域において特に注目されている。近年、ヒトゲノムDNA上においてCBR1と高いアミノ酸配列相同性を示すカルボニル還元酵素3 (CBR3, Carbonyl reductase 3)遺伝子が同定された。その高い相同性からCBR3もCBR1と同様に臨床的重要性の高い酵素であると予想されたが、CBR3に関する報告はほとんど存在しなかった。そこで本研究において、CBR3の酵素機能解明のために、CBR1との比較解析の中でCBR3の酵素化学的特性を検討した。

両蛋白質に関してHisタグ融合蛋白質として大腸菌内に発現させ、Ni-NTA (Nickel-nitrilotriacetic acid)アフィニティクロマトグラフィーにより、SDS-PAGE後のCBB染色像において均一にまで精製することができた。しかし、SDS-PAGE上でのhCBR3の移動度は予想分子量に比べて顕著に小さく、大腸菌内での翻訳後修飾が疑われた。マススペクトロメトリーによる分子量測定の結果、精製したhCBR3蛋白質の分子量は予想分子量と同一であり、また、表面電荷測定の結果、強い陰性荷電を示したことから、hCBR3の移動度の小ささは、翻訳後修飾によるものではなく蛋白質の強い陰性荷電によるものであると推察された。以上より、精製された両蛋白質は酵素化学的解析に供することができると判断し、以下、本法により得られた蛋白質試料を用いて酵素化学的解析を行った。

pH最適性について、両酵素ともpH 6.5周辺に最適性を見出した。またhCBR3は、親和性測定と競合阻害実験によって補酵素としてNADHよりもNADPHを好むことを明らかにした。よって、上記の最適条件において酵素活性を測定することとした。

カルボニル還元活性の一般的なテスト基質であるmenadione、4-benzoylpyridine、p-nitrobenzaldehydeに対する両酵素の酵素活性を測定した。基質と酵素の親和性の指標となるK_m値について、両酵素は概ね同程度の値を示した。一方、最大反応速度の指標となるk_{cat}値および低濃度基質時の反応速度の指標となるk_{cat}/K_m値に関して、いずれのテスト基質に対してもhCBR3はhCBR1に比べて100-1000倍低かった。それぞれの酵素遺伝子を強制発現させたHEK293細胞抽出液においても同様であり、哺乳類細胞発現系で上記の結果が再現された。また、hCBR1の内因性基質であるPGE_2に対するhCBR3の酵素活性も極めて限定的であり、生理的意義の伴わない反応であると考えられた。以上の結果より、hCBR3はhCBR1とは明確に生理的機能が異なると考えられた。一方、代表的なANTであるドキソルビシン(DOX)に対する酵素活性を、副作用である心不全の原因物質である代謝産物ドキソルビシノールの定量により測定したところ、hCBR3はhCBR1とほぼ同様の酵素活性を示した。すなわち、K_m値やk_{cat}値はほぼ同様であった。

異物代謝に関わる酵素群は、動物種によって基質特異性が異なることがある。そこで、ラット・チャイニーズハムスターのCBR3をクローニングし酵素化学的解析を行った。その結果、両酵素ともテスト基質・DOXに対する反応性は、hCBR3とほぼ同様であることを見出した。つまり、hCBR3とhCBR1の酵素化学的差異は、動物種を超えて保存されていることが示唆された。

hCBR1阻害薬はANT代謝の阻害を介してANT誘発性心不全に対して予防効果を有するが、一方、PGE_2代謝阻害を介してがん進展促進作用を示すことが予想される。しかし本研究の結果から、hCBR3阻害薬はPGE_2代謝への影響が極めて小さくANT代謝を阻害するため、がん進展促進作用を示さず副作用発症を予防することが期待される。そこで、hCBR3とhCBR1における局所非相同領域の同定・特性解析を行った。本領域を標的とした阻害薬は、両酵素の選択的阻害薬になりう

ると考えられる。Harr plot解析の結果、LirN (The N-terminal low-identity region)、および、基質結合ループ領域と一致するLirC (The C-terminal low-identity region)の2つの局所非相同領域を同定した。これらの領域に着目した種々のキメラ酵素を構築し、テスト基質への酵素活性を指標に酵素化学的解析を行った結果、hCBR3とhCBR1はLirCに依存した酵素活性を示すことを見出した。また、IpriflavoneをhCBR3選択的阻害薬として、Ethacrynic acidをhCBR1選択的阻害薬として同定し、上記キメラ酵素を用いた解析によりこれらの薬剤がLirCを介して阻害活性を発揮することを見出した。

本研究で見出した選択的阻害薬は既に上市されている薬剤であるため、ヒトへの安全性が担保されている。今後、DOX投与患者におけるIpriflavoneを始めとするCBR3選択的阻害薬の心不全抑制効果が検討されることが望まれる。また、本研究で構築したキメラ酵素群は、両酵素の阻害薬の標的配列を簡便に同定しうるツールとして、阻害薬探索において有用であると考えられた。CBR3に関する検討から、DOXによる心不全の予防に役立つ薬剤が開発されることが期待される。

(2585字)

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　三浦　健　）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授	水口　裕之
	副 査　教授	辻川　和丈
	副 査　教授	宇野　公之
	副 査　教授	藤尾　慈

論文審査の結果の要旨

ヒトにおいて75種の遺伝子で構成されるShort-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamilyは、それぞれが様々な生理的活性を有し、臨床的に重要性の高い酵素群である。SDR酵素群に属するCBR3 (Carbonyl reductase 3)は、CBR1 (Carbonyl reductase 1)との相同性が非常に高い新規酵素である。CBR1は、PGE_2に対する代謝・不活性化を介したがんの進展抑制因子として、また、アントラサイクリン系抗がん薬の代謝酵素として働き、薬学的重要性の高い酵素として知られている。特にアントラサイクリン系抗がん薬の副作用である心不全は、本酵素による代謝産物が有力な原因物質であることが知られている。一方、CBR3に関する解析はほとんど行われてきていなかった。本研究では、CBR3の酵素化学的性質をCBR1との比較の中で解析することにより、新規酵素であるCBR3の役割の解明を試み、以下の結果を得た。

1. ヒトCBR3はヒトCBR1と同様にNADPHを補酵素とする還元酵素活性を示すことを明らかにした。テスト基質への還元活性においてヒトCBR3はヒトCBR1に比べて限定的であるものの、アントラサイクリン系抗がん薬であるドキソルビシンへの活性は同程度であることを見出した。また、ドキソルビシン代謝における代謝産物は、ドキソルビシン誘発性心不全の原因物質として考えられているドキソルビシノールであった。
2. CBR3は、CBR1の内因性基質であるPGE_2に反応性を示さないことから、両酵素の生理的役割は明確に異なることを明らかにした。
3. げっ歯類CBR3はヒトCBR3と比べ、多少の異同はあるもののドキソルビシンへの有意な活性を示すことを明らかにした。つまり、動物種を問わずCBR3がドキソルビシン代謝酵素として機能していることが示唆された。
4. ヒトCBR3とヒトCBR1の酵素化学的性質をもたらすアミノ酸領域を探索し、LirN (The N-terminal low-identity region)とLirC (The C-terminal low-identity region)と名づけた2つの局所的非相同領域を同定した。これらの領域に注目した酵素動力学的解析により、ヒトCBR3とヒトCBR1の酵素化学的差異は、LirC領域に起因することを明らかにした。
5. LirC領域を標的とする、CBR3とCBR1のそれぞれに選択的阻害活性を示す化合物を見出した。

以上、本研究よりCBR3を新規ドキソルビシン代謝酵素として同定した。ドキソルビシンの本酵素による代謝産物は、ドキソルビシン誘発性心不全の原因物質として考えられている。よって、CBR3に対する選択的阻害薬はその心不全の予防薬として機能しうる。ドキソルビシンの新規代謝経路の発見により、CBR1阻害薬のPGE_2蓄積を介する潜在的危険性を回避した、新機序ドキソルビシン誘発性心不全予防薬の開発が期待される。

よって、上記の研究成果は、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものと考えられる。