The University of Osaka
Institutional 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	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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

三浦　健

目　　次

緒論 ---------- 1

本論 ---------- 6
第一章 新規カルボニル還元酵素 CBR3 の特徴 ---------- 6
第一節 ヒト組織における CBR3 の発現解析 ---------- 6
第二節 hCBR3 の細胞内分布 ---------- 10
第三節 hCBR3 蛋白質の調製と基本的性質 ---------- 13
第一項 hCBR3 および hCBR1 の蛋白質精製 ---------- 13
第二項 hCBR3 および hCBR1 の酵素触媒活性における pH 最適性 ---------- 19
第三項 hCBR3 および hCBR1 の補酵素特異性 ---------- 21
第四節 hCBR3 および hCBR1 のカルボニル還元活性 ---------- 27
第一項 hCBR3 および hCBR1 のテスト基質に対する代謝活性---------- 28
第二項 hCBR3 および hCBR1 の PG に対する代謝活性 ---------- 31
第三項 hCBR3 および hCBR1 のアントラサイクリン系抗がん薬
ドキソルビシンに対する代謝活性 ---------- 33
第五節 小括 ---------- 37
第二章 CBR3 のラット・チャイニーズハムスターオルソログの酵素化学的特徴 ------ 38
第一節 ラットおよびチャイニーズハムスターの CBR3 オルソログ間での
酵素化学的差異 ---------- 38
第二節 ラットおよびチャイニーズハムスターの CBR3 オルソログ間での
ドキソルビシン代謝能の比較 ---------- 42
第三節 小括 ---------- 44
第三章 ヒトにおけるカルボニル還元酵素の比較解析 ---------- 45
第一節 hCBR3 と hCBR1 のアミノ酸配列解析 ---------- 45
第二節 キメラ酵素蛋白質を用いた酵素化学的解析 ---------- 48
第三節 キメラ酵素蛋白質を用いた補酵素結合解析 ---------- 52
第四節 各種阻害薬の阻害活性 ---------- 56
第五節 小括 ---------- 59

総括 ---------- 60

結論 ---------- 64

謝辞 ---------- 65

参考文献 ---------- 66

略字一覧

AMP	adenosine monophosphate
AUC	area under the curve
CBB	coomassie brilliant blue
CBR	carbonyl reductase
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CHCR1	Chinese hamster carbonyl reductase 1 type 1
CHCR2	Chinese hamster carbonyl reductase 1 type 2
CHCR3	Chinese hamster carbonyl reductase 3
CIA	coactivator independent of AF-2 function
CYP	cytochrome P450
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
FCS	fetal calf serum
FRET	förster resonance energy transfer
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GRAVY	grand average of hydropathy
GSH	reduced glutathione
hCBR1	human carbonyl reductase 1
hCBR3	human carbonyl reductase 3
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
HSDL1	hydroxysteroid dehydrogenase like 1
IMAC	immobilized metal affinity chromatography
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
lacI	lac inhibitor
LirC	the C-terminal low-identity region
LirN	the N-terminal low-identity region
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
mCBR1	mouse carbonyl reductase 1
mCBR3	mouse carbonyl reductase 3
MK-STYK	map kinase phosphatase-like protein
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRP	multidrug resistance-associated protein

$NAD(P)^+$	nicotin-amide adenine dinucleotide (phosphate)
NAD(P)H	reduced nicotin-amide adenine dinucleotide (phosphate)
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PGs	prostaglandins
PGA_1	prostaglandin A_1
PGA_1-GS	glutathione-conjugated PGA_1
PGE_2	prostaglandin E_2
pI	isoelectric point
PVDF	polyvinylidene difluoride
rCBR1	rat carbonyl reductase 1
rCBR3	rat carbonyl reductase 3
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
RyR2	ryanodine receptor 2
SDR	short-chain dehydrogenase/reductase
SDS	sodium dodecyl sulfate
SNP	single nucleotide polymorphism
TAE	Tris-acetate-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetra-methyl-ethylenediamine
TIP30	30 kDa HIV-1 TAT-interacting protein
VEGF	vascular endothelial growth factor

緒　　論

生体内における酸化還元酵素

生体は通常、生体内物質や異物に対する化学反応の総体により、恒常性を維持している。選択的な触媒作用を持つ高分子物質を酵素と呼び、主として蛋白質が酵素として機能している。酵素には、基質化合物の官能基をある分子から別の分子へ転移する転移酵素や、加水分解反応を触媒する加水分解酵素など、種々の化学反応を触媒するものが含まれる。このうち、酸化還元酵素は、生体内の酸化還元反応を触媒することによって基質を代謝し、その基質の生理活性の変化によって生理機能を発揮する。酸化還元活性を有する酵素ファミリーの一つに SDR (Short-chain dehydrogenase/reductase)スーパーファミリーが挙げられる。

SDR スーパーファミリー

SDR スーパーファミリーは、NAD(P)(H) (nicotin-amide adenine dinucleotide jkhglhk0y(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(Fig. 1a)。ヒトゲノム DNA 上に 75 種類、その他の動植物を含めると 47,000 種類以上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 [1)]。このスーパーファミリーに属する酵素は、典型的には 200-350 アミノ酸残基で構成され、酵素間でのアミノ酸の一致率は 15-30%程度と低い [2)]。しかし、蛋白質の N 末側に存在する補酵素結合モチーフ(Rossmann fold consensus sequence)や分子中央に存在する活性部位アミノ酸(Catalytic tetrad)が高度に保存されている(Fig.1b) [1, 3)]。ヒト由来の SDR 酵素は、Rossmann fold consensus sequence や Catalytic tetrad の周辺配列の特徴に基づいて、Classical SDR・Extended SDR・Complex SDR・Unassigned SDR・Atypical SDR の 5 つの分類されるが、ほとんどの酵素が Classical SDR・Extended SDR に属する [1, 4)]。

SDR 酵素の典型的な内因性基質は、ステロイドやレチノイドなどの生体内微量活性物質である。ヒトの SDR 酵素のうち少なくとも 24 種は、その欠損によって何らかの病的症状を呈し、病態との関連が示唆されている [4)]。そのため、SDR スーパーファミリーは、生体内の酸化・還元反応を触媒することにより生理的に重要な制御を行なう酵素群であると考えられている。

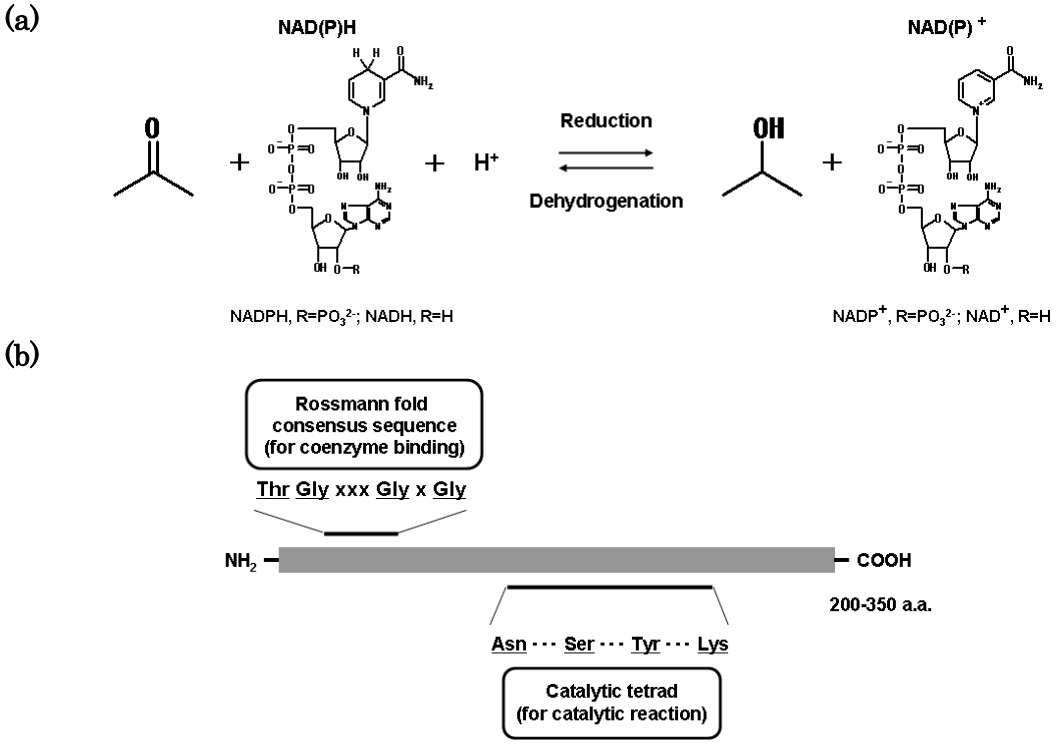


Fig. 1 (a) A typical enzymatic reaction by SDR enzymes. Most SDR enzymes catalyze the reduction/dehydrogenation using NAD(P)(H) as a coenzyme. (b) The primary structure of a typical SDR enzyme. Rossmann fold consensus sequence, which is important for cofactor binding, is conserved in the amino-terminal part of the enzyme. In the center of the molecule, there is highly-conserved "catalytic tetrad" for catalytic reactions.

SDR スーパーファミリーに属する CBR1 (Carbonyl reductase 1)

SDR スーパーファミリーに属する CBR1 は、Classical SDR に分類される NADPH 依存型の単量体還元酵素であり [1]、NADPH を補酵素として内因性生理活性物質や異物・薬物の還元代謝に関与している。特に本酵素は以下に示す機序により、①細胞増殖や血管新生に重要な PGE_2 (プロスタグランジン E_2)[5]の制御や、②アントラサイクリン系抗がん薬を代謝することにより副作用発現に関与 [5-11]することから基礎・臨床の両面から注目され、潜在的な薬物標的分子と考えられている(Fig. 2)。

①CBR1 による PGE_2 制御

PGE_2 はがん細胞の増殖や血管新生に関与していると考えられている [12]。CBR1 は、PGE_2 を不活性化させる還元活性を有しているため、CBR1 の発現量はがんの進展や予後に関連すると予想された。Ismail らは、CBR1 の PGE_2 代謝活性とがんの転移能の関係に着目し、マウスモデルにおいて、CBR1 の発現上昇ががんの転移能の抑制に関連することを示した [13]。

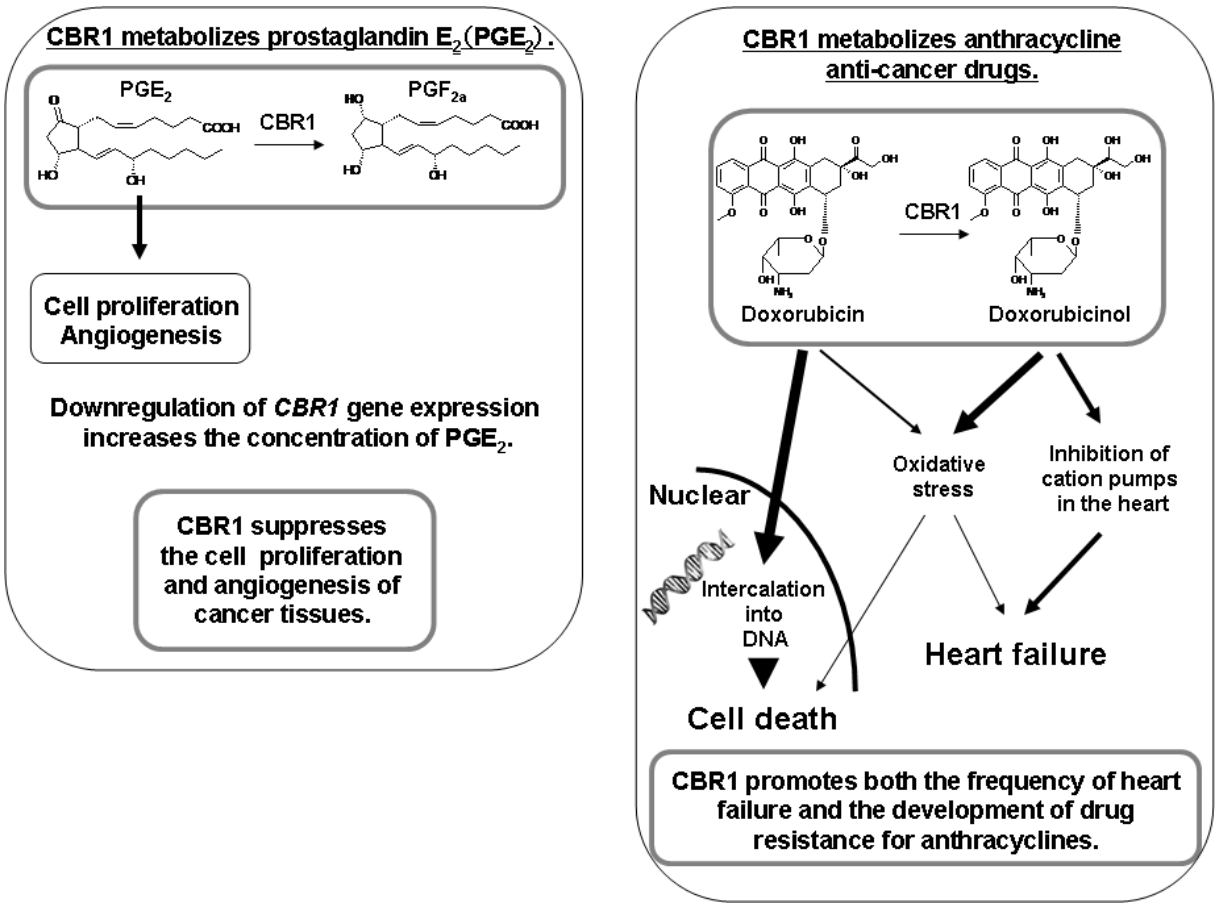


Fig. 2　Multiple functions of CBR1 based on the catalytic activities towards various substrates.

また、上皮性卵巣がんや非小細胞肺がんの患者のがん組織部位における CBR1 の発現が弱い場合、予後不良であることが報告されている [14, 15]。CBR1 の発現減少によって PGE_2 の代謝･不活性化が減少し､がん組織部位における局所の PGE_2 濃度が上昇することにより､VEGF (Vascular endothelial growth factor)の発現が誘導され､血管新生能亢進を引き起こされることがその機序の一つと考えられた [12]。以上より、CBR1 は、PGE_2 代謝を介したがんの制御因子として機能すると考えられる。

②CBR1 によるアントラサイクリン系抗がん剤の代謝

本酵素はアントラサイクリン系抗がん薬の代謝酵素として機能している [6]。アントラサイクリン系抗がん薬は、固形がん・液性がんに広い抗がんスペクトルを有する臨床的に重要な抗がん薬であるが、投与量依存的に致死的な心筋障害を引き起こすことで知られている。この心筋障害の原因の一部は、CBR1 に代謝されて生成されるアントラサイクリン系抗がん薬の代謝産物の心筋への蓄積であると考えられている [9-11, 16]。CBR1 による代謝によって生成されるアルコール体代謝産物は、筋小胞体上に存在し細胞質へ Ca^{++}イオンを放出するリアノジン受容体 2 (RyR2, Ryanodine receptor 2)の発現抑制 [17]や、筋細胞膜上の Na^{+}/K^{+}-ATPase

などの陽イオンポンプに対する阻害作用[18]により、機能的に心不全を誘発する。この心筋障害を回避するために、CBR1 の阻害薬が有用であると考えられており[9, 19]、現在この副作用の予防薬として開発が進められている。

また、アントラサイクリン系抗がん薬の一種であるドキソルビシンを、ヒト乳がん由来 MCF-7 細胞へ処理すると、蛋白質レベルで CBR1 が誘導され、細胞内でのドキソルビシン代謝能が亢進する[20]。さらに、CBR1 の発現上昇がアントラサイクリン系抗がん薬に対する耐性化を促す[21, 22]。以上より、CBR1 選択的な阻害薬は、アントラサイクリン系抗がん薬の副作用である心不全やがん細胞の薬剤耐性化を抑制しつつ、抗がん作用を促進し、この薬物治療の S/N 比を改善すると予想される。

CBR1 に高い相同性を示す新規還元酵素 CBR3 (Carbonyl reductase 3)

Watanabe らは 1998 年に、21 番染色体に存在する *CBR1* 遺伝子の近傍に *CBR1* 遺伝子と高い相同性を示す *CBR3* 遺伝子を同定した[23]。SDR スーパーファミリーの酵素間でのアミノ酸一致率は一般に 15-30%程度と低いが、CBR3 と CBR1 はヒトで 71.8%という高いアミノ酸一致率を示す (Table 1)。最近報告された SDR スーパーファミリー酵素遺伝子の新命名法において、ヒト CBR3 は SDR21C2、ヒト CBR1 は SDR21C1 と名付けられ、両酵素が SDR21C サブファミリーを形成しているとされた[1]。CBR3 は、マウス・ラット・チャイニーズハムスターに高度に保存されたオルソログが存在している (Table 1)。CBR3 の動物種間の高度な保存性は、CBR3 の重要性を示唆すると考えられる。

他の相同性が高い SDR スーパーファミリー内のサブファミリーに関して、例えば SDR7C サブファミリーに属する SDR7C1-SDR7C6 は 35-72%のアミノ酸一致率を示し、すべてレチノール脱水素酵素活性を有し[1]、基質との高い親和性・補酵素特異性などにおいて類似の酵素化学的性質[24]を示す。また、SDR16C subfamily に属する SDR16C1–SDR16C5 においても同様に、アミノ酸配列上 32–63%と比較的高い相同性を示し、同様の反応を触媒することが知られている[1]。CBR3 は、CBR1 との高い相同性から、類似の酵素化学的性質を有する臨床的重要性が高い酵素であることが予想された。しかしながら本研究を開始した当時、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 PG やドキソルビシンへの代謝活性を明らかにすることにより、本酵素の薬学的・臨床的意義を見出すことを目的に、CBR1 との比較解析の中で酵素化学的性質を検討することとした。

酵素の生理的機能は、化学反応の触媒活性を介して発揮される。つまり、酵素の機能解明を目指すには、化学反応の触媒活性を検討することが必須である。そこで、本研究においてヒト CBR3 をクローニングし、ヒト CBR1 と酵素化学的に比較検討した。さらに、モデル動物として、ラット・チャイニーズハムスターの CBR3 オルソログについても、その酵素化学的な特徴について検討した。

Table 1　Identity between CBR3 and CBR1 in humans and rodents

a.a. / n.a.	hCBR3	rCBR3	CHCR3	mCBR3	hCBR1	CHCR1	CHCR2	rCBR1	mCBR1
hCBR3	-	**74.5**	**76.5**	**76.6**	**71.8**	**70.4**	**71.5**	**68.2**	**70.0**
rCBR3	**84.8**	-	**87.0**	**92.4**	**73.2**	**74.0**	**75.8**	**73.2**	**74.3**
CHCR3	**86.6**	**94.2**	-	**86.7**	**73.2**	**74.0**	**75.1**	**71.1**	**73.2**
mCBR3	**85.2**	**97.5**	**93.9**	-	**74.0**	**74.7**	**76.5**	**72.6**	**75.1**
hCBR1	**53.2**	**72.1**	**70.5**	**74.0**	-	**78.7**	**78.8**	**78.2**	**80.6**
CHCR1	**70.1**	**68.5**	**70.3**	**68.7**	**87.7**	-	**95.0**	**81.4**	**83.7**
CHCR2	**70.0**	**68.4**	**70.2**	**68.7**	**89.2**	**95.7**	-	**81.8**	**83.0**
rCBR1	**70.5**	**72.8**	**71.8**	**76.3**	**85.9**	**85.6**	**86.2**	-	**88.9**
mCBR1	**70.7**	**75.8**	**70.2**	**75.6**	**97.7**	**87.7**	**88.4**	**90.3**	-

(%)

The identities between each CBR in nucleotide or amino acid sequences level were shown at the lower left or the higher right in the table, respecitively. hCBR3, human CBR3 (GenBank No. NP_001227.1, NM_001236.3); CHCR3, Chinese hamster CBR3 (GenBank No. BAB62842.1, NP_001230936.1); rCBR3, rat CBR3 (GenBank No. NP_001100580.1, NM_001107110.1); mCBR3, mouse CBR3 (GenBank No. NP_766635.1, NM_173047.3); hCBR1, human CBR1 (GenBank No. NP_001748.1, NM_001757.2); CHCR1, Chinese hamster CBR1 type1 (GenBank No. BAB62840.2, AB043541.3); CHCR2, Chinese hamster CBR1 type2 (GenBank No. BAB62841.1, AB043542); rCBR1, rat CBR1 (GenBank No. NP_062043.1, NM_019170.2); mCBR1, mouse CBR1 (GenBank No. NP_031646.2, NM_007620.2).

本　　論

第一章　新規カルボニル還元酵素 CBR3 の特徴

SDR スーパーファミリーに属する酵素群は、一般に 200-350 アミノ酸残基で構成され、ファミリー内における酵素間のアミノ酸配列上の相同性は 15-30%程度と低く、補酵素結合領域である Rossmann fold consensus sequence や触媒アミノ酸である Catalytic tetrad など、保存領域は限定的である。しかしながら、ヒト CBR3 (hCBR3)とヒト CBR1 (hCBR1)は両方とも 277 アミノ酸残基で構成されており、アミノ酸配列レベルで 71.8%の一致率と良く保存され、それぞれの酵素遺伝子は種間においても保存性が高い(Table 1)。近年明らかにされたそれぞれの酵素蛋白質のX線結晶構造解析によると[25, 26]、これらは構造的に非常に類似している。特に、これらの結晶構造から二次構造のみを抽出すると、両酵素間で二次構造がほぼ一致していることが明らかである (Fig. 3)。

CBR1 の生体内における重要性を考えると、その類似酵素である CBR3 の性質を明らかにすることは重要であるが、これまでに本酵素はほとんど解析されてこなかった。本章では、hCBR3 の組織分布や細胞内分布を明らかにすると共に、大腸菌発現組換え CBR3 を発現・精製し、その酵素化学的性質について検討した。

第一節　ヒト組織における CBR3 の発現解析

実験材料と方法

hCBR3 と hCBR1 の全長クローニング：ヒト fetal brain cDNA (Clontech Co. Ltd., Japan)を鋳型として、以下のプライマーを用いてそれぞれの遺伝子を PCR (Polymerase chain reaction)法により増幅し、pGEM-TEasy ベクターへクローニングした。クローニングされた部位は、ABI PRISM 310 Genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて核酸配列を決定した。これらのプラスミドを、pGEM-hCBR1、pGEM-hCBR3 と名付けた。

hCBR3 (太字下線部はそれぞれの制限酵素認識部位)
hmhCBR3f02(*Nde*I): 5'- acg **cat atg** ccc cgc gct cc -3'
hmhCBR3r02(*Eco*RI): 5'- ta**g aat tc**a gca agc tcc gaa gca gac -3'

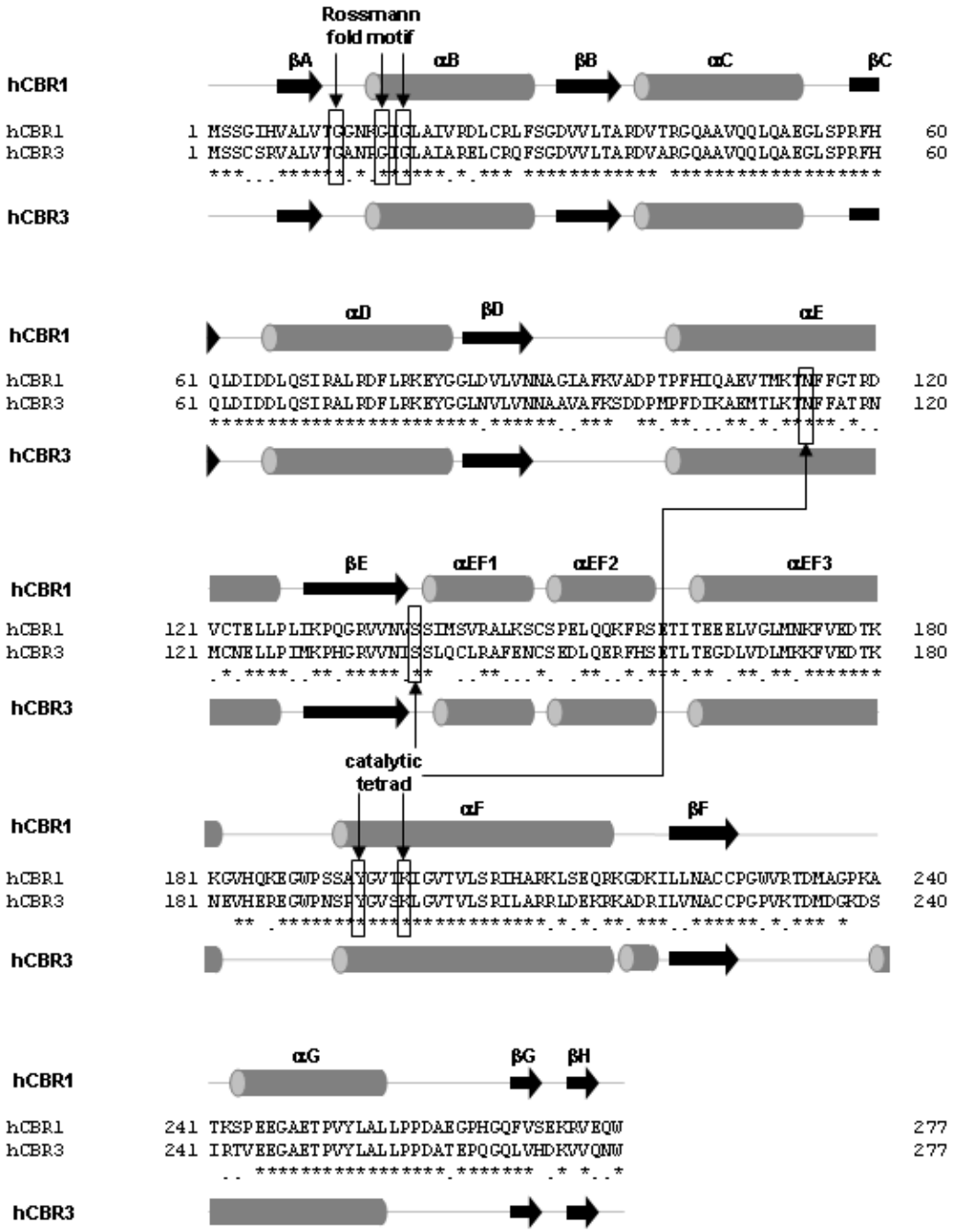


Fig. 3 Amino acid sequences and secondary structures of hCBRs The amino acid sequeces of hCBR3 (GenBank No. NP_001227.1) and hCBR1 (GenBank No. NP_001748.1) were aligned by GENETYX ver. 8 (Genetyx Co. Ltd., Japan). Tubes and arrows indicate α-helices and β-sheets, respectively. These secondary structures are numbered following Hoffmann et al. [2]. The secondary structures of the enzymes are based on the Protein Data Bank, 2HRB (hCBR3) and 1WMA (hCBR1), respectively.

hCBR1(太字下線部はそれぞれの制限酵素認識部位)
hmhCBR1f03(*Nde*I): 5'- cg**c ata tg**t tcc gcg cgc cc -3'
hmhCBR1r02(*Eco*RI): 5'- ac**g aat tc**a gga caa ggt aca aaa tgg ggc -3'

半定量 PCR 法：各種臓器由来のヒト cDNA ライブラリー(Clontech Co. Ltd., Japan)を鋳型に、以下のプライマーを用いて *hCBR3* 遺伝子と *hCBR1* 遺伝子を増幅した。PCR プログラムを以下に示した。*hCBR3* と *hCBR1* は 30 または 35 サイクルの PCR 反応を、*GAPDH* (Glyceraldeyde-3-phosphate dehydrogenase)は 30 サイクルの PCR 反応を行なった。1.5% アガロースゲル/TAE (Tris-acetate-EDTA; 2 M Tris、 1 M 酢酸、50 mM EDTA, pH 8.0)を用いた電気泳動により DNA を分離し、1.0 μg/mL エチジウムブロマイド/TAE によって DNA を染色した。分離した DNA は UV 下で検出した。

hCBR3
hmhCBR3f01: 5'- tat cag tag ttt gca gtg ttt aag g -3'
hmhCBR3r01: 5'- cag tcc tga tgc tgt ctt tcc c -3'

hCBR1
hmhCBR1f01: 5'- ctt cct gcg caa gga gta cgg -3'
hmhCBR1r01: 5'- acc ttc ttc tgg gct ct ggt g -3'

PCR プログラム

94°C	5 分: preheat	
94°C	30 秒: denaturing	PCR サイクル
64°C	30 秒: annealing	PCR サイクル
72°C	30 秒: extension	PCR サイクル
72°C	7 分: additional extension	

結　果

CBR3 と CBR1 の mRNA を RT (Reverse transcription)-PCR によって半定量するに際し、①これらの遺伝子は核酸配列レベルで 77%と高い identity を示すので、それぞれのプライマーセットが選択的に増幅をすること、②増幅効率が同等であるとみなすことができること、が必要である。

プライマーの選択性に関して、10 ng の pGEM-hCBR3 および pGEM-hCBR1 を鋳型にそれぞれのプライマーセットを用いて PCR 法により遺伝子を増幅したところ、hCBR1 の増幅プライマーでは hCBR3 遺伝子は増幅されず、逆もまた増幅されなかった(not shown)。よって、このプライマーセットは相同性の高いこれらの遺伝子を選択的に増幅すると考えられた。

また、増幅効率に関して、同様に 10 ng の pGEM-hCBR1/hCBR3 を鋳型に PCR を行い、10-20 サイクルの増幅産物をアガロースゲル電気泳動によって分離・検出した(Fig. 4)。その結果、それぞれの PCR サイクルにおいてほぼ同量の PCR 産物が得られたことより、増幅効率に関してほぼ同等であると考えられた。つまり、このプライマーセットを用いて、hCBR3 と hCBR1 の半定量が可能であると判断された。

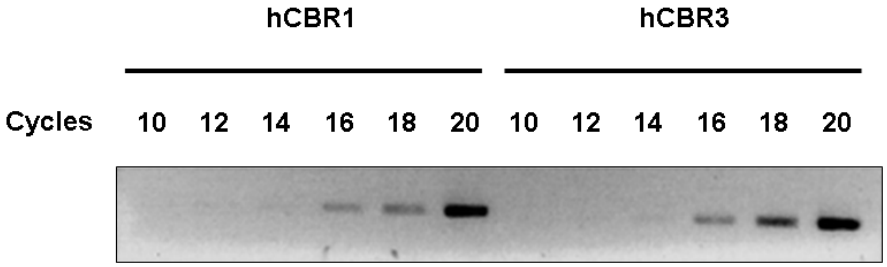


Fig. 4　The efficiency of amplification of hCBRs Ten nanograms of pGEM-hCBR3/hCBR1 were used as a template, respectively. The conditions for amplification are followed by the procedure described in Materials and Methods.

次に、ヒト cDNA ライブラリーを鋳型にそれぞれの遺伝子を 30 または 35 サイクルにて、PCR により増幅した産物を検出した(Fig. 5)。その結果、hCBR3 と hCBR1 は、どちらも普遍的な組織分布を示した。hCBR1 は、特に肝臓・腎臓に強い発現が見られた。一方、hCBR3 は、肝臓・腎臓に比べ、卵巣や膵臓に強い発現が認められた。hCBR3 と hCBR1 の発現量を比較すると、35 サイクル後の hCBR3 の増幅量が、30 サイクル後の hCBR1 の増幅量とほぼ同等であった。hCBR3 と hCBR1 の PCR 増幅効率が同等と判断されることから、hCBR3 は hCBR1 に比べ発現量が低いことが明らかとなった。以上より、hCBR3 の発現様式は発現組織と発現量の両面において hCBR1 とは異なる制御を受けていることが示唆された。

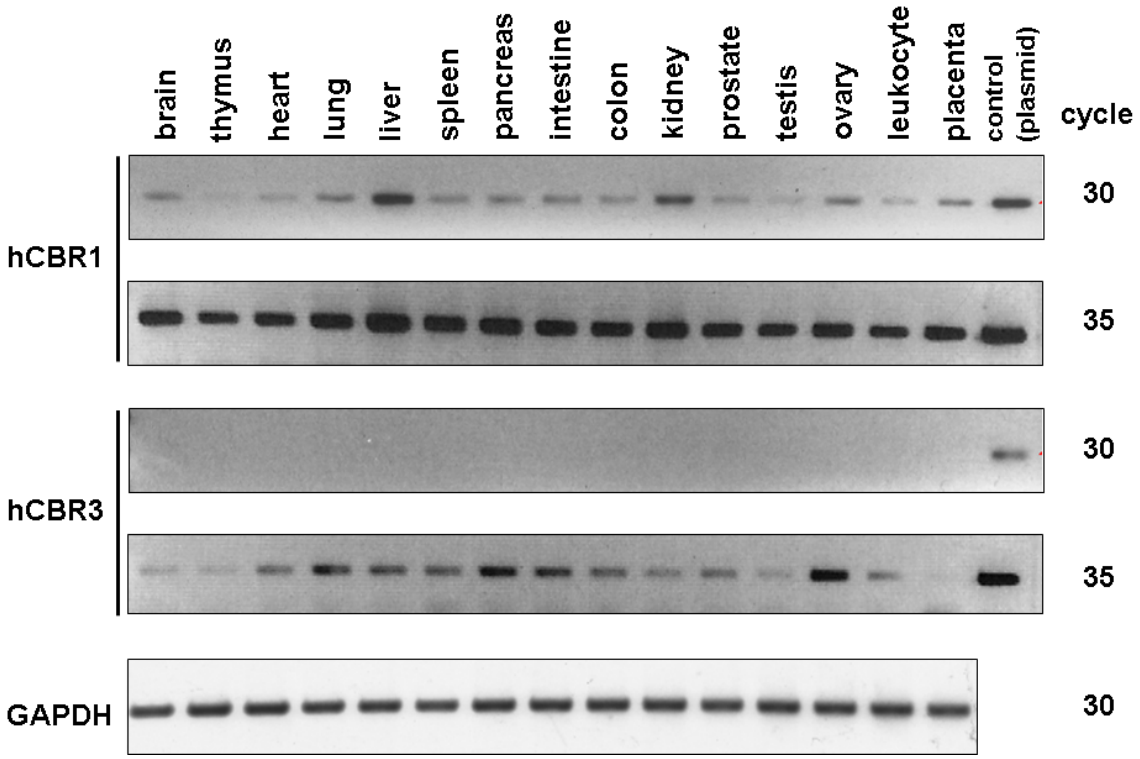


Fig. 5　Tissue distribution of the transcripts of hCBRs The length of the amplified fragments was 334 bp for hCBR3, 332 bp for hCBR1 and 575 bp for GAPDH, respectively.

第二節　hCBR3 の細胞内分布

SDR スーパーファミリーに属する酵素は、細胞質ゾルや核膜上、小胞体膜上、ミトコンドリア膜上など、細胞内で様々な局在を示す。しかし、hCBR3 の細胞内局在性は明らかではなかった。さらに、hCBR1 の細胞内局在性に関して、生体試料からの精製において細胞質画分に CBR1 の活性が見出されることから細胞質もしくは細胞内可溶性画分に局在すると考えられているのみ [5]で、核内外の局在など詳細な解析はされてこなかった。そこで本節では、hCBR3 と共に hCBR1 も細胞内局在性について検討を行なった。

実験材料と方法

プラスミド構築：pGEM-hCBR1/hCBR3 を鋳型に、以下のプライマーを用いた PCR により、*Hind*III と *Eco*RI サイトを保持した酵素遺伝子の cDNA 断片を得た。これらの cDNA 断片を *Hind*III/*Eco*RI 消化後、p3×FLAG-CMV10 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)の *Hind*III/*Eco*RI サイトへ挿入した。構築されたプラスミドでは、CMV (Cytomegaro virus)

プロモーター支配下、N 末に 3 個の FLAG タグが連結された *hCBR1*/*hCBR3* 遺伝子がコードされる。これらのベクターを p3×FLAG-hCBR3、p3×FLAG-hCBR1 と名付けた。

hCBR3 (太字下線部は *Hind*III の認識部位)
mthCBR3f09(*Hind*III): 5'- acg **aag ctt** ccc cgc gct cc -3'
hmhCBR3r02(*Eco*RI): 本章第一節に前述。

hCBR1 (太字下線部は *Hind*III の認識部位)
mthCBR1f15(*Hind*III): 5'- cg**a agc tt**t tcc gcg cgc c-3'
hmhCBR1r02(*Eco*RI): 本章第一節に前述。

細胞培養: ヒト胎生腎臓由来 HEK293 細胞は、10% (v/v) FCS (Fetal calf serum)、0.12% (w/v) $NaHCO_3$、100 U/mL ペニシリン G、100 μg/mL ストレプトマイシンを含んだ DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium)培地で、5% CO_2 存在下 37°C で培養した。細胞の継代は、培地を吸引し 10 mL の PBS (Phosphate-buffered saline; pH7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4, 1 mM KH_2PO_4)で洗浄後、1 mL の 0.25% (w/v)トリプシンを加え 5% CO_2 存在下、37°C で 1 分処理して細胞を培養ディッシュから剥がした。これに FCS を含む DMEM 培地を 9 mL 加えトリプシンを失活させ、適度な細胞数になるよう新しい培養ディッシュ(falcon)に植え継いだ。

DNA トランスフェクション : DNA トランスフェクションの 24 時間前に HEK293 細胞を、蛋白質抽出のためには 35 mm 径培養ディッシュへ 5×10^4 cells/35-mm dish、細胞免疫染色のためには 35 mm 径のμ-dish (ibidi, Nippon Genetics Co., Ltd., Tokyo) へ 1×10^4 cells/35-mm dish をセットアップした。DNA トランスフェクション直前に、ペニシリン G とストレプトマイシンを含有しない DMEM へ培地を交換した。さらに、TransIt LT1 (Mirus BioCorp., Madison, WI, USA) と 1 μg の p3×FLAG-hCBR3/hCBR1 を 2:1 の割合で混和し、脂質-DNA 複合体を作製し、培地へ加えた。その 48 時間後、各種実験へ供した。

蛋白質抽出 : 培養ディッシュから培地を除去後、PBS にて洗浄した。セルスクレーパーで細胞をかき集め、1000×g、10 分間遠心を行い、細胞塊を得た。この細胞塊を 500 μl の 100 mM ナトリウムリン酸緩衝液, pH 6.5 に懸濁し、4°C にてハンディタイプソニケーター (Model W0220 sonicator、Heat System Ultrasonic Inc., Farmingdake, NY, USA)を用いて 90 秒の超音波破砕を行なった。16,000×g、10 分の遠心後の上清を、蛋白質抽出液として用いた。蛋白質の定量は、BSA (Bovine serum albumin)を標準試料とし、Bio-Rad Protein Assay 試薬 (BioRad Laboratories Inc., Richmond, CA, USA)を用いて Bradford 法 [27]によって決定した。

SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)とウエスタンブロッティング：SDS-PAGE のために、厚さ 1 mm、10 cm×10 cm の 12.5% 分離ゲル（370 mM Tris, pH 8.8, 12% (w/v)アクリルアミド-ビス(29:1)、0.1% (w/v) SDS、1% (w/v)過硫酸アンモニウム、0.05% (v/v)TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine))に、3% 濃縮ゲル(476 mM Tris, pH6.8、3% (w/v)アクリルアミド-ビス、0.1% (w/v) SDS、0.15% (w/v)過硫酸アンモニウム、0.05% (v/v)TEMED)を重層して SDS-ポリアクリルアミドゲルを調製した。泳動する蛋白質は、泳動直前に等量の 2×Sample Buffer (10% (w/v) SDS、50% (v/v) Glycerol、25% β-mercaptoethanol、0.005% (w/v) bromophenol blue）を加え、100°C、5 分間、熱処理することにより変性させた。SDS 泳動溶液（25 mM Tris、192 mM Glycine、0.1% (w/v) SDS)中にて泳動を行なった。

SDS-PAGE 後、ブロッティング溶液（25 mM Tris、200 mM Glycine、0.02% (w/v) SDS、20% (v/v) メタノール)を用いたセミブロッティング法(2 mA/cm^2、60 分)により PVDF (Polyvinylidene difluoride)膜へ蛋白質を転写した。転写面を PBS にて洗浄後、Blocking One (nacalai tesque Co. Ltd., Japan)にて 4°C、一晩ブロッキングを行なった。その後、PVDF 膜を PBS-T (PBS containing with 1% (v/v)Tween-20)にて洗浄し、mouse anti-FLAG M2 monoclonal antibody (dilution 1:1000; Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)に引き続き、HRP (Horseradish peroxidase)標識 sheep anti-mouse IgG antibody (dilution 1:10,000 ; GE healthcare, Japan)を処理した。蛋白質は、ECL plus システム（GE healthcare, Japan)と HRP により生じた化学発光をライトキャプチャーII (ATTO, Japan)にて検出した。

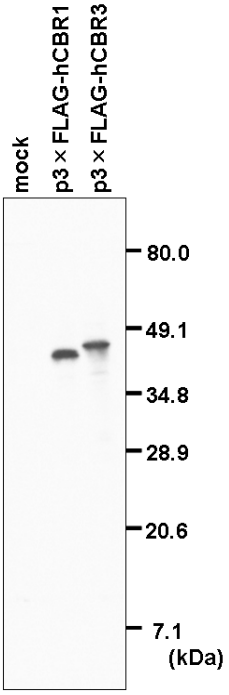
間接蛍光抗体法による細胞免疫染色：DNA トランスフェクションの 48 時間後、HEK293 細胞を PBS で洗浄し、4% (w/v)パラホルムアルデヒド/PBS で、10 分間・室温にて固定した。PBS でよく洗浄した後、0.4% (v/v)Triton-X 100/PBS で、20 分間・室温にて細胞膜の透過処理を行なった。PBS で洗浄後、5% (w/v) Goat serum/PBS で、1 時間・室温にてブロッキングを行なった。その後、PBS で洗浄し、1 次抗体処理（1 時間・室温、mouse anti-FLAG M2 monoclonal antibody, dilution 1:500)に引き続き、2 次抗体処理(1 時間・室温、AlexaFluor™ 488 標識 goat anti-mouse IgG antibody (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA)、dilution 1:2,000)を行なった。二次抗体処理後、PBS でよく洗浄し、風乾した。1 mg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)を含んだ Mounting buffer (20 mM Tris, pH 8.0、20 mM DABCO、90% (v/v)グリセロール)を重層し、核ゲノム DNA を染色した。作製した試料は、LSM510 共焦点レーザースキャン顕微鏡(Carl Zeiss、Oberkochen、Germany)にて、観察した。

結　果

動物細胞へ強制発現させた蛋白質は、しばしば部分分解等を受け、細胞内局在性を変えることがある。そのため、細胞内局在性を検討するためには、強制発現させた蛋白質が大きな

部分分解を受けていないことを検出しなければならない。HEK293 細胞へ導入した p3×FLAG-hCBR3/hCBR1 から強制発現された融合蛋白質が全長を発現していることを検出するために、anti-FLAG 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行なった（Fig. 6)。その結果、いずれの融合蛋白質も western blotting 上で単一のバンドを示し、大きな部分分解を受けていないと判断された。推定アミノ酸配列から算出される分子量に関して、3×FLAG-tagged hCBR3 は 37,307 Da、3×FLAG-tagged hCBR1 は 36,832 Da である。電気泳動における移動度から算出した分子量は、それぞれ 40 kDa、37 kDa であった。3×FLAG-tagged hCBR1 は予想長に検出されたが、3×FLAG-tagged hCBR3 は予想された移動度よりも小さい移動度を示した。この SDS-PAGE 上での奇異な振る舞いについては、本章第三節第一項において検討する。さらに、細胞内局在性に関して、HEK293 細胞に発現させた両蛋白質を間接蛍光抗体法により検出したところ、核内への局在はほとんど見られず、サイトプラズムへの不均一な局在を示した（Fig. 7)。

Fig. 6　Expression of 3×FLAG-tagged hCBR3 and hCBR1 in HEK293 cells Two percent of the cleared lysates of HEK293 cells transfected with FLAG-tagged hCBR3 or hCBR1 expression vector were separated by SDS-PAGE, and detected by western blotting using anti-FLAG M2 monoclonal antibody as a primary antibody.



第三節　hCBR3 蛋白質の調製と基本的性質

第一項　hCBR3 および hCBR1 の蛋白質精製

酵素化学的解析を行うためには、均一な酵素蛋白質が必要である。大量の目的蛋白質を簡便に得ることができる大腸菌発現系、ヒスチジン(His)タグと二価陽イオンの親和性に基づいた IMAC（Immobilized metal affinity chromatography）法により蛋白質を精製し、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより脱塩することによって、均一な蛋白質を得る蛋白質精製系の構築を行なった。

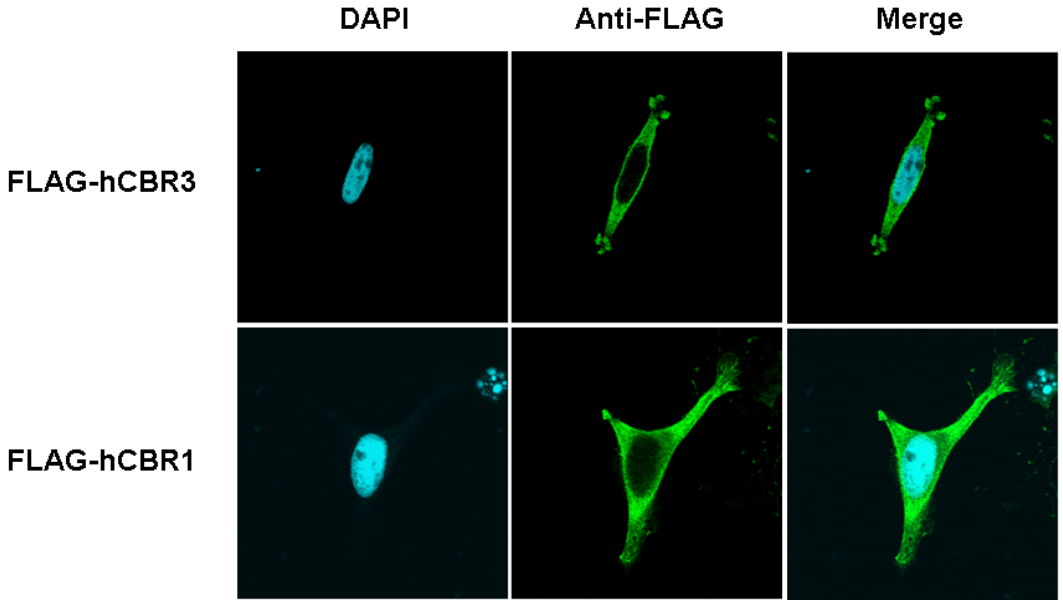


Fig. 7　Cellular localization of 3×FLAG-tagged hCBRs in HEK293 cells FLAG-tagged hCBR3 and hCBR1 expressed in HEK293 cells were stained with anti-FLAG M2 monoclonal antibody. Blue, DAPI; Green, hCBR3 or hCBR1.

実験材料と方法

プラスミド構築:本章第一節で構築された pGEM-hCBR3/hCBR1 を *Nde*I/*Eco*RI で処理した DNA 断片を、N 末 His タグ融合蛋白質の大腸菌発現用ベクターである pET-28a の *Nde*I/*Eco*RI サイトへ挿入した。これらのプラスミドを pET-hCBR1/hCBR3 と名づけた。構築されたプラスミドでは大腸菌細胞内において、T7 プロモーター支配下、N 末に 6 個の His がクラスターを形成した His タグが連結された hCBR3/hCBR1 蛋白質がコードされる。通常培養条件下では、lacI (lac inhibitor)が T7 プロモーター活性を抑制するが、IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranaside)の添加によりこの抑制が解除され、蛋白質の発現が誘導される。

大腸菌による蛋白質発現と蛋白質精製：pET-hCBR3/hCBR1 のそれぞれによって大腸菌株 BL21(DE3)pLysE を形質転換した。それぞれのコロニーを、25 μg/mL カナマイシンを含んだ 5 mL の L (Lauria)-Broth で、37°C、一晩振とう培養した。翌日、5 mL の培養液を 25 μg/mL カナマイシンを含んだ 125 mL の L-Broth へ植え継ぎ、濁度(600 nm)が 0.5-0.8 になるまで振とう培養を行なった。その後、IPTG を終濃度が 0.2 mM となるように加え、さらに 3-4 時間振とう培養を行なった。培養後、8000×g、10 分の遠心で集菌し、20 mM ナトリウムリン酸緩衝液, pH 7.5 に懸濁し、大腸菌を洗浄した。さらに、8000×g、10 分の遠心で集菌し、20 mM ナトリウムリン酸緩衝液, pH 7.5 に懸濁した。大腸菌を第二節に示した方法と同様の

操作で、中量-大量用ソニケーターSONIFIER 250 (Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA)を用いて超音波破砕した。15,000×g、20 分の遠心後の上清を組換え蛋白質発現大腸菌可溶性画分として蛋白質精製へ供した。

蛋白質精製は、His タグと Ni^{++}との親和性に基づく、Ni^{++}アフィニティーカラムクロマトグラフィーによる精製と、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる脱塩の 2 段階により行なった。20 mM ナトリウムリン酸緩衝液, pH 7.5 で平衡化した 1 mL の bed volume の HiTrap chelating affinity column (GE healthcare, Japan)へ、組換え蛋白質発現大腸菌可溶性画分を全量ロードした。その後、10 mL の 20 mM ナトリウムリン酸緩衝液, pH 7.5 と、5 mL の 2.5 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)含有 20 mM ナトリウムリン酸緩衝液, pH 7.5 でカラムを洗浄し、溶出緩衝液 (20 mM ナトリウムリン酸緩衝液, pH7.5、50 mM EDTA、500 mM NaCl)で溶出した。このうち、蛋白質濃度が高い画分を、20 mM ナトリウムリン酸緩衝液, pH 7.5 で平衡化した 10 mL の bed volume の Sephadex G-50 によるゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより、脱塩を行なった。蛋白質は、本章第二節に示した方法により定量した。

<u>SDS-PAGE とウエスタンブロッティング</u>：本章第二節に示した方法と同様に行なった。一次抗体として rabbit anti-rat testis CBR1 ポリクローナル抗体 [28] (dilution 1:4000)、二次抗体として HRP 標識 anti-rabbit IgG antibody (dilution 1:10,000, GE healthcare, Japan)を用い、ECL plus により検出した。

<u>MALDI-TOF² (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) mass spectrometry</u>：5 mg の Sinapinic acid (LaserBioLabs, Cedex, France)に 0.1% (v/v)トリフルオロ酢酸を 300 μL、アセトニトリルを 200 μL 加えて撹拌、溶解し 10 mg/mL のマトリックス溶液を調製した。200 ng/ 10 μL の精製蛋白質を ZipTip C4 (Millipore Co., Milford, MA, USA)を用いて脱塩した。ZipTip に保持した試料は、マトリックス溶液 2 μL を用いて MALDI プレート上に溶出・乾燥させた後、測定に供した。

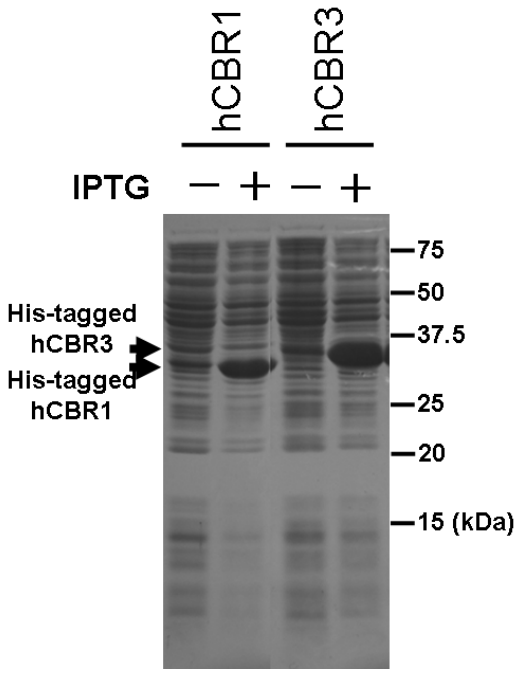
<u>Zeta 電位の測定</u>：0.5 mg/mL の精製蛋白質 3 mL (20 mM ナトリウムリン酸緩衝液, pH7.5)を、Electrophoretic light scattering spectrophotometer（ELS-6000; Otsuka Electronics, Osaka, Japan）へアプライし、測定した。

<u>結　果</u>

IPTG による組換え蛋白質の発現誘導に関して、精製前の可溶性蛋白質溶液を SDS-PAGE にて泳動したところ、IPTG によって大量の蛋白質が予想分子量 (His-tagged hCBR3, 33749 Da; His-tagged hCBR1, 33455 Da)近傍に誘導されていた(Fig. 8)。そこで、IPTG による蛋白質発現誘導を行なった試料を用いて精製を行なった。

hCBR3およびhCBR1蛋白質において、125 mLの大腸菌培養液より、最終的におよそ4 mgの精製蛋白質を再現性よく精製することができた。また、精製度に関して、SDS-PAGE のCBB染色像より、均一な酵素蛋白質が精製されたと判断された(Fig. 9a)。また、これらの蛋白質はウエスタンブロッティングによりanti-rat testis CBR1 ポリクローナル抗体[28]へ反応性を示した(Fig. 9b)。rat CBR1は推定アミノ酸配列上、hCBR3と68.2%、hCBR1と78.2%と相同性が高い(Table 1)。精製された両蛋白質がanti-rat testis CBR1抗体へ交差反応性を示したことから、両蛋白質が確かにhCBRsであることが支持された。

Fig. 8　Bacterial expression of hCBRs protein induced by IPTG The cleared lysates from BL21(DE3)pLys transformed pET-hCBR3 or pET-hCBR1 were separated by SDS-PAGE, and stained by CBB. The induced proteins are indicated by arrows.



これらの精製蛋白質は推定アミノ酸配列から計算された分子量では、294 Daしか離れておらず、SDS－PAGE 上でほぼ同一の移動度を示すと予想されたが、実験的にはhCBR3が計算上の分子量よりも移動度が小さく、hCBR1と明確に分離された(Fig. 9)。また、この現象は、HEK293細胞に強制発現させた3×FLAG-tagged hCBR3と3×FLAG-tagged hCBR1においても観察された(Fig. 6)。

この現象の原因として、細胞内でhCBR3が官能基等の付加を受けている可能性が考えらた。その場合、酵素活性への影響が無視できないため、このSDS-PAGE上での移動度の奇異な振る舞いの原因について検討した。MALDI-TOF[2] mass spectrometryによる分子量測定の結果(Table 2)、精製されたhCBR3の分子量は、アミノ酸配列から計算された理論上の分子量と同一とみなすことができ、官能基等の付加を受けていないと判断された。また、hCBR1の分子量は約129 Da理論上の分子量よりも小さかったが、その原因として大腸菌内における、翻訳開始アミノ酸であるメチオニン残基の脱メチオニン化などが考えられた。結果として、hCBR3およびhCBR1のSDS-PAGE上での明確な移動度の差は、大腸菌内における何らかの官能基の付加によるものではないと考えられた。

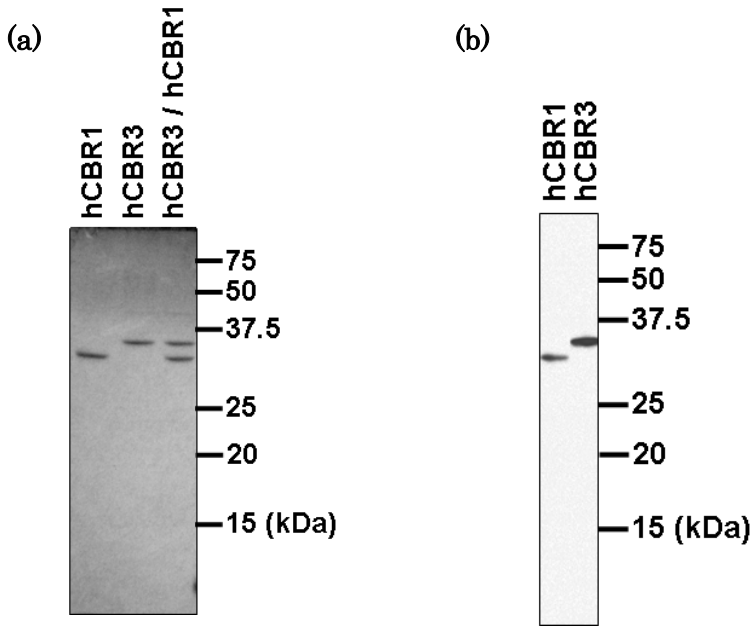


Fig. 9 Purified enzymes on SDS-PAGE (a) Purified enzymes (each 1 μg) were electrophoresed on SDS-polyacrylamide gel, and stained by CBB. Lane 1, His-tagged hCBR1; Lane 2, His-tagged hCBR3; Lane 3, The mixture of the proteins. (b) The proteins (100 ng/Lane) were detected by western blotting using anti-rat testis carbonyl reductase polyclonal antibody[28] as a primary antibody.

Table 2 Theoretical and experimental molecular weights of bacterially expressed hCBRs

	M.W. estimated by SDS-PAGE	Theoretical M.W.	M.W. estimated by MASS
His-tagged hCBR3	35 k	33,749	33,744
His-tagged hCBR1	33 k	33,455	33,326

M.W., molecular weight

SDS-PAGE において、蛋白質は、Dodecyl sulfate ion が結合し陰性の電荷を帯びるため、電圧下で陽極へ移動する。特に、蛋白質の単位分子量当たりの電荷がほぼ同じであるという前提において、蛋白質の SDS-PAGE 上の移動度と分子量が強い相関を示す [29]。通常は、Dodecyl sulfate ion が一定頻度で蛋白質に結合するために、単位分子量当たりの電荷がほぼ同等になると考えられる。

SDS-PAGE において分子量と移動度の乖離をもたらす要因として、GRAVY (grand average of hydropathy) score と等電点(pI)があげられる[29, 30]。GRAVY score は、蛋白質のアミノ酸組成から算出される蛋白質全体の親水性・疎水性に関する指標であり、その値が 0 以上であると疎水性が高いと判断される[31]。Dodecyl sulfate ion は蛋白質の親水性クラスターよりも疎水性クラスターに相互作用しやすいため[32]、SDS-PAGE のサンプル調製において、疎水性が高ければ高い蛋白質ほど蛋白質当たりに結合する Dodecyl sulfate ion は増加すると考えられる。そのため、GRAVY score が高い蛋白質は、SDS-PAGE 中で Dodecyl sulfate ion の陰荷電が大きく、移動度が分子量から予想されたものよりも大きくなる[30]。His-tagged hCBR3 および His-tagged hCBR1 の GRAVY score は、それぞれ−0.367 および−0.277 であり(GRAVY CALCULATOR, http://www.gravy-calculator.de/による算出)、両蛋白質とも疎水性が強いと言えず、この観点からは SDS-PAGE 上の挙動を説明することができなかった。

pI が低い蛋白質は、SDS-PAGE の分離ゲル実験条件下(pH8.4)、陰性に荷電する。そのため、陰性電荷の斥力によって Dodecyl sulfate ion の結合性が低下し、SDS-PAGE 上の移動度が小さくなる、つまり、SDS-PAGE で測定される分子量が実際の分子量よりも大きく算出されることが知られている[29, 30]。His-tagged hCBR3 は、His-tagged hCBR1 に比べ理論上の pI が低く、中性付近では His-tagged hCBR3 が相対的に強い陰性の電荷を示すと予想された（His-tagged hCBR3, pI 6.46; His-tagged hCBR1, pI 8.77; Compute pI/Mw, http://web.expasy.org/compute_pi/による算出）。そこで、His-tagged hCBR3 および His-tagged hCBR1 の表面電価の指標である zeta 電位[33]を測定した。20 mM ナトリウムリン酸緩衝液, pH 7.4 中において、His-tagged hCBR3 は His-tagged hCBR1 に比較し非常に強い陰性度を示す(Table 3)ことから、この SDS-PAGE 上での奇異な振る舞いの原因の一部は、hCBR3 の陰性電荷に基づくものと考えられた。

また、他の動物種の CBR3 オルソログと CBR1 オルソログに関して、GRAVY score が疎水性を示さないことと CBR3 オルソログの pI が CBR1 オルソログの pI に比べて明らかに低い傾向が、ラット、マウス、Chinese hamster において検出された。これらの動物オルソログにおいてもヒト蛋白質と同様に SDS-PAGE で特徴的な挙動を示すことが予想された。

Table 3　Zeta potentials of hCBRs

	Zeta Potential（mV）
His-tagged CBR3	**-55 ± 3.3**
His-tagged CBR1	**-2.4 ± 0.97**

Each value represents the mean ± S.D. obtained from three independent experiments.

第二項　hCBR3 および hCBR1 の酵素触媒活性における pH 最適性

本章第三節第一項において hCBRs の大量調製系を確立し、hCBR3 は hCBR1 に比べ理論上の等電点が酸性側であり、そのため pH が中性付近では zeta 電位が低いことを明らかにした。この物理化学的な違いが、SDS-PAGE 上での両蛋白質の挙動の差につながると考えられる。両蛋白質はこのような性質の違いがあるので、*in vitro* において酵素活性を測定する際、最適実験条件が異なる可能性がある。特にカルボニル還元活性を測定する場合、カルボニル還元反応は H^+の受け渡し反応であるため、H^+の濃度の指標である pH に依存して両蛋白質間で大きな反応条件の差として現れる可能性が考えられた。

hCBR1 は、pH6.5 付近が最適 pH であることが知られている [5]が、hCBR3 については検討されていない。本項では、hCBR3 のカルボニル還元活性測定における pH 最適性を検討した。

実験材料と方法

大腸菌による蛋白質発現と蛋白質精製：本節第一項の方法と同様に行なった。

カルボニル還元活性の測定:pH 4.0—6.0 を 100 mM ナトリウムクエン酸緩衝液にて、pH 5.5—pH 8.0 を 100 mM ナトリウムリン酸緩衝液にて調製し、130 μM NADPH、基質として 1 mM 4-benzoylpyridine を良く混和した。酵素反応は、この溶液に適量の精製蛋白質を加え、開始した。酵素反応は、25°C において行なった。

NADPH は、340 nm に極大吸収を持つ一方、$NADP^+$は 340 nm に吸収を持たない。そのため、上記の反応系において、還元反応が進むと、それに共役してすすむ NADPH から $NADP^+$への変換により、酵素反応溶液の 340 nm での吸収が減少する(Fig. 10)。この 340 nm の吸収の減少に相当するモル数を、NADPH のモル吸光係数 $6.22\times10^3\ M^{-1}\cdot cm^{-1}$、NADH のモル吸光係数 $6.27\times10^3\ M^{-1}\cdot cm^{-1}$から計算し、酵素活性を算出した。それぞれ酵素の酵素活性において最も高い活性を 100%とし、相対活性を求めた。

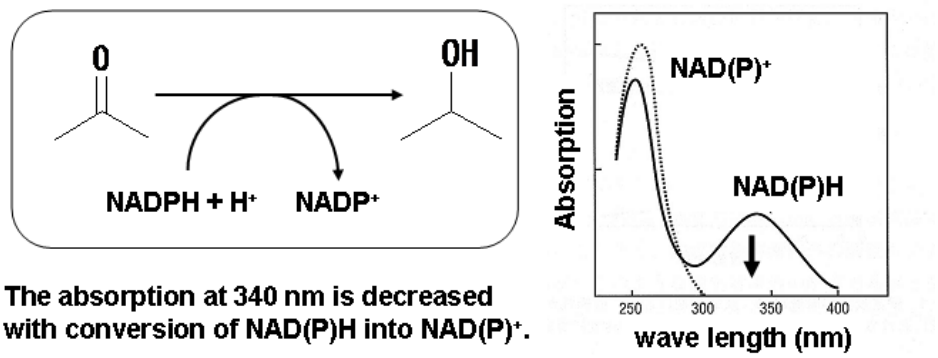


Fig. 10　The measurement of carbonyl reducing activities based on the consumption of NADPH　Carbonyl reducing activities of CBRs are dependent on the decrease of NADPH. Since NADPH, not $NADP^+$, has an absorption at 340 nm, the rate of the decrease of an absorption at 340 nm reflects carbonyl reducing activities.

結　果

CBR3 および CBR1 の pH 最適性についての結果を Fig. 11 に示した。両酵素において pH 最適性はほぼ同様であった。つまり、pH 6.0—pH 6.5 において最も高い酵素活性を示し、弱塩基性条件において酵素活性が顕著に減少する傾向が見られた。以下のカルボニル還元活性の測定の際、pH 6.5 において行なうこととした。

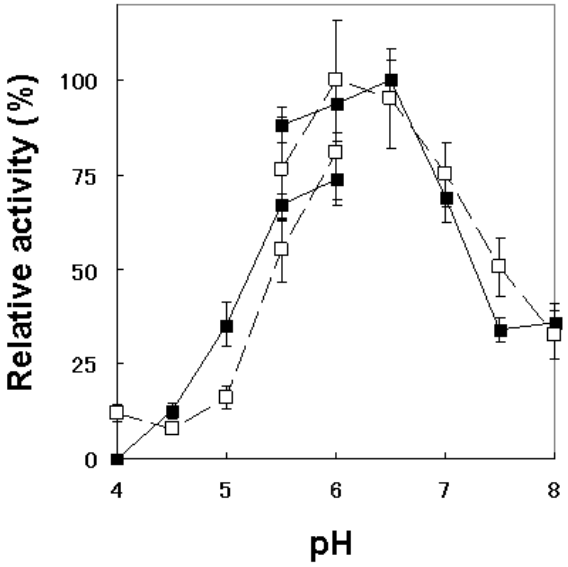


Fig. 11　pH dependency of the enzymatic activities of hCBRs Carbonyl reducing activities of hCBRs are shown as the ratio of reducing activities at optimum pH (hCBR3, pH 6.0 in 100 mM sodium phosphate buffer; hCBR1, pH 6.5 in 100 mM sodium phosphate buffer). The lines at pH4.0—6.0 and at pH 5.5—8.0 were the results of reactions in 100 mM sodium citrate buffer and 100 mM sodium phosphate buffer, respectively. Each value represents the mean ± S.D. obtained from three experiments. □, hCBR3; ■, hCBR1

第三項　hCBR3 および hCBR1 の補酵素特異性

SDR スーパーファミリーに属する還元酵素活性を有する酵素は、NADPH もしくは NADH を補酵素として用いる。hCBR1 は、NADH よりも NADPH を好んで用いることが知られている[5]。本項では、本章第三節第二項において決定した最適 pH において、hCBR3 とコントロールとしての hCBR1 の補酵素特異性について補酵素関連物質の競合実験および解離定数の決定により検討した。

実験材料と方法

大腸菌による蛋白質発現と蛋白質精製：本節第一項の方法と同様に行なった。

カルボニル還元活性の測定：100 mM ナトリウムリン酸緩衝液, pH 6.5、補酵素として 130 μM の NADPH もしくは NADH のいずれかを用いて、本節第二項の方法と同様に行なった。

カルボニル還元活性の補酵素による阻害：100 mM ナトリウムリン酸緩衝液, pH 6.5、補酵素として 130 μM の NADPH を用いて、阻害補酵素として 2'-AMP (Adenosine monophosphate)、5'-AMP、$NADP^+$、NAD^+の存在下、本節第二項の方法と同様に行なった。それぞれの構造を Fig. 12 に示した。

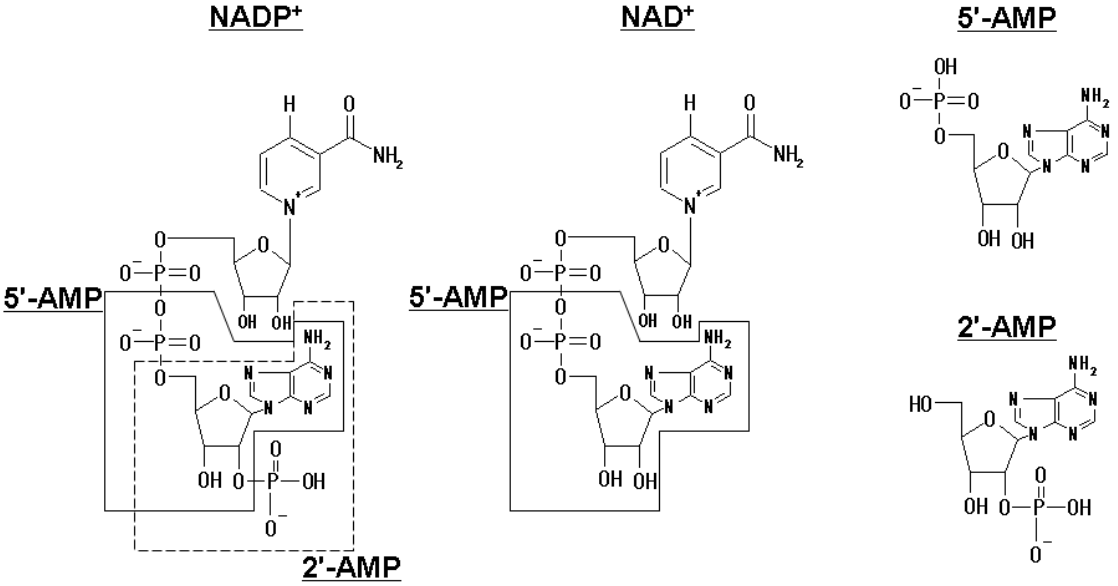


Fig. 12　Structures of coenzyme-related compounds for inhibition of NADPH-linked carbonyl reducing activities Structures of both $NADP^+$ and NAD^+ include that of 5'-AMP.

<u>酵素への補酵素結合の測定（解離定数の測定）</u>：解離定数 K_d 値は、解離反応(1)を前提とした式 (1)で表すことができる。

解離反応（1） CBRs・Coenzyme Complex ⇄ CBRs + Coenzyme

式（1）

$$K_d = \frac{[\mathrm{CBRs}]\cdot[\mathrm{Coenzyme}]}{[\mathrm{CBRs}\cdot\mathrm{Coenzyme\ Complex}]}$$

[CBRs], CBRs 蛋白質濃度; [Coenzyme], 補酵素濃度;
[CBRs・Coenzyme Complex], 酵素補酵素複合体濃度

式 (1)より、K_d 値が小さければ小さいほど、酵素・補酵素複合体濃度が相対的に大きいと想定されるため、酵素と補酵素の親和性が強いと判断される。よって、K_d 値は酵素と補酵素の結合親和性の指標として用いられる。解離反応 (1)のように反応中間体を介さない複合体解離モデルの場合、そのモデルを表現する経験式である Hill equation を用いることができる。Hill equation を、式 (2)に示した。また、式 (2)を直線式へ変換した式 (3)へのプロット (Hill plot)により、本モデルへの回帰が妥当であるかどうかを検討することができる。つまり、回帰が妥当であるならば Hill plot は直線に回帰されるが、妥当でなければ Hill plot は直線に回帰しない。

K_d 値を蛍光消光法により以下の方法にしたがって、算出した。3 mL の 20 ng 精製蛋白質 (100 mM ナトリウムリン酸緩衝液, pH 6.5)を石英セルへ入れ、25°C において分光蛍光光度計 (RF-5300PC, Shimadzu Co. Ltd., Japan)により、励起光 290 nm・蛍光 335 nm にて検出した。それに引き続き、少量の NAD(P)H を加え、蛍光を測定した。この操作を 20—30 回繰り返し、各濃度での蛍光を検出した。補酵素を加えていない時の蛍光強度と、各濃度の補酵素を加えたときの蛍光強度の差を、蛍光の減弱 (delta F)とした。delta F と補酵素濃度の関係を、SigmaPlot kinetic module (Systat Software, Inc., Richmond, CA, USA)を用いて、Hill equation 式 (2)へ非線形回帰し、K_d 値を得た。

式（2）

$$\mathrm{delta\ F} = \frac{[\mathrm{Coenzyme}]^n}{K_d + [\mathrm{Coenzyme}]^n}$$

式（3）

$$\log\left(\frac{\mathrm{delta\ F}}{F_{max.} - \mathrm{delta\ F}}\right) = n \log[\mathrm{Coenzyme}] - n \log K_A$$

n, ヒル係数; K_A, 50%飽和時の補酵素濃度

結　果

hCBR3 に関して、130 μM NADH を補酵素とした時の酵素活性は、NADPH を補酵素としたときの酵素活性に比較し、45 ± 5.2%であった。また、hCBR1 に関しても、NADH を補酵素とした場合、39 ± 3.8%と酵素活性の減少を検出した。よって、CBR3 は補酵素として NADH よりも NADPH を好む酵素であると予想された。

両酵素の NADPH を用いたカルボニル還元活性に対して、5'-AMP および NAD^+は、ほとんど阻害活性を示さなかったが(Fig. 13b, c)、$NADP^+$および 2'-AMP 存在下では、顕著に阻害を受けた(Fig. 13a, d)。5'-AMP 存在下で阻害を受けず 2'-AMP によって顕著な阻害を受けることから、両酵素は NADPH 分子内の 2'位リン酸基と高親和性を示すと考えられる。以上より、hCBR3 は、hCBR1 と同様に NADPH 分子内の 2'位リン酸基と高親和性を示すことにより、NADH よりも NADPH を好むことが示された。

一方 hCBR3 と hCBR1 の各種物質との阻害効果を比較すると、$NADP^+$および 2'-AMP の阻害では、hCBR3 は hCBR1 ほど阻害されておらず(Fig. 13a, d)、hCBR3 は hCBR1 に比べて NADPH への親和性が相対的に低いことが示唆された。

次に、より定量的に酵素と補酵素の親和性を検討するために、蛍光消光法により補酵素の酵素への解離定数 K_d値を測定した。

SDR スーパーファミリーに属する酵素のいくつかは、内在するトリプトファン残基による励起光 290 nm・蛍光 340 nm 付近に極大ピークを持つ蛍光が検出され[34, 35]、hCBR1 においてもこの現象は観察される[36]。hCBR3 においても同様であり(Fig. 14a)、励起光　290 nm の蛍光スペクトルを 300—400 nm で測定したところ、hCBR3 は 329 nm で極大の蛍光が検出された。また同条件において、hCBR1 は 338 nm で極大の蛍光が検出された(Fig. 14a)。この蛍光は、NAD(P)H の 340 nm の極大吸収とほぼ一致する。そのため、NAD(P)H 存在下では、NAD(P)H の酵素への接近によって、共鳴エネルギー移動（FRET, Förster resonance energy transfer）が起こり、トリプトファン残基に由来する蛍光が減弱する[37]、つまり、NAD(P)H が、この蛍光のクエンチャーとして働くと予想される。NAD(P)H の酵素への結合量が増加すれば蛍光が減弱するので、この蛍光の減弱を指標に、酵素と NAD(P)H の親和性を測定することができる(Fig. 14, 蛍光消光法)。

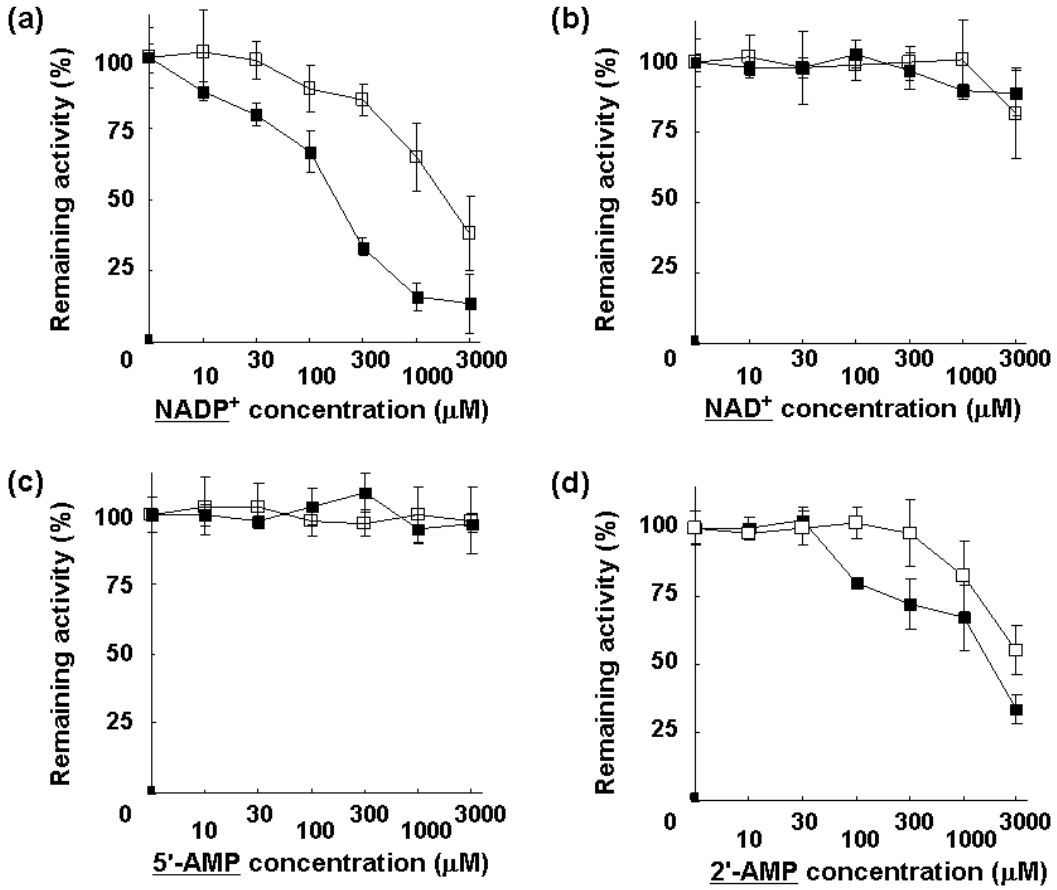


Fig. 13 The effect of coenzymes for NADPH-linked carbonyl reducing activities of hCBR3 and hCBR1 The carbonyl reducing activities were measured under the coexistence of $NADP^+$ (a), NAD^+ (b), 5'-AMP (c), and 2'-AMP (d). The carbonyl reducing activities of each protein without inhibitory coenzymes were supposed to be 100 as a standard. Each value represents the mean ± S.D. obtained from three independent experiments. □, hCBR3; ■, hCBR1.

横軸にNAD(P)Hの添加量、縦軸に減弱した蛍光強度(deltaF)をプロットした結果をFig. 15に示した。両酵素とも、NAD(P)H を添加することによって蛍光強度が減少し、消光反応が検出された(Fig. 14b)。この曲線を Hill equation 式 (2)に非線形回帰した結果、Table 4 に示す K_d値を得た。また、Hill equation 式 (3)により Hill plot を求めたところ、Fig. 16 のように極めて良好な直線性を示し、Hill equation 式 (2)への非線形回帰が妥当であったことが示された。

hCBR1 の NADPH に関する K_d値 1.2 ± 1.1 μM は、Bohren ら [36]が示した値(1.5 ± 0.4 μM)とほぼ同一であり、本実験系が良好に機能していると判断された。NADH の K_d値は、NADPH のそれに比べて、hCBR3 では約 10 倍、hCBR1 では約 40 倍と、明らかに大きい値を示した。つまり、両酵素共に、NADH に比較して NADPH へより高い親和性を有することを明らかに

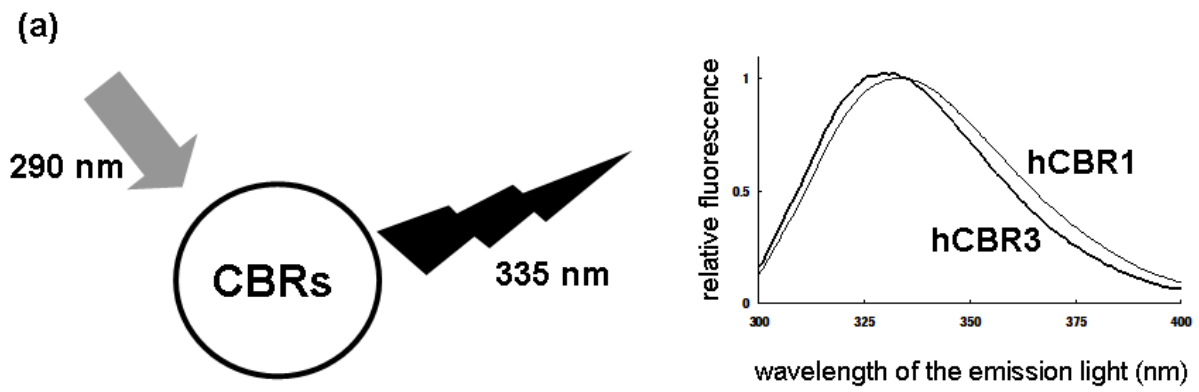
した。Sciotti ら[38]は、hCBR1 の NADPH への高親和性に重要なアミノ酸残基として Lys15、Arg38 を同定した。これらのアミノ酸残基を酸性アミノ酸残基へ置換にすると、NADH への親和性は変わらないものの NADPH への親和性が低下することより、これらのアミノ酸残基は NADPH の 2'位リン酸基との間で静電的に相互作用することにより親和性を高めると考えられている。上記の 2 つのアミノ酸残基は hCBR3 においても保存されており(Fig. 3)、アミノ酸配列からも、hCBR3 の NADPH への高親和性が支持された。また、両酵素の NADPH との K_d値を考えると、hCBR3 は hCBR1 に比べて NADPH に対して、約 6 倍親和性が低いことが明らかとなり(Table 4)、補酵素による阻害実験の結果を支持した(Fig. 13a, d)。K_d値は、325・330・340・345 nm での蛍光量においても算出したが、335 nm で算出した値と本質的に同等であった。

以上より、hCBR3 は hCBR1 と同様に NADPH 分子内の 2'位リン酸基との高親和性により NADPH を好む酵素であり、以降の活性測定には補酵素として NADPH を用いることとした。

Table 4　K_d values of hCBR3 and hCBR1 towards coenzymes.

	K_d for NADPH	K_d for NADH
hCBR3	**7.5 ± 2.3**	**73 ± 8.9**
hCBR1	**1.2 ± 1.1**	**43 ± 5.2**

K_d values were shown as μM. Each value represents the mean ± S.D. obtained from three independent experiments.



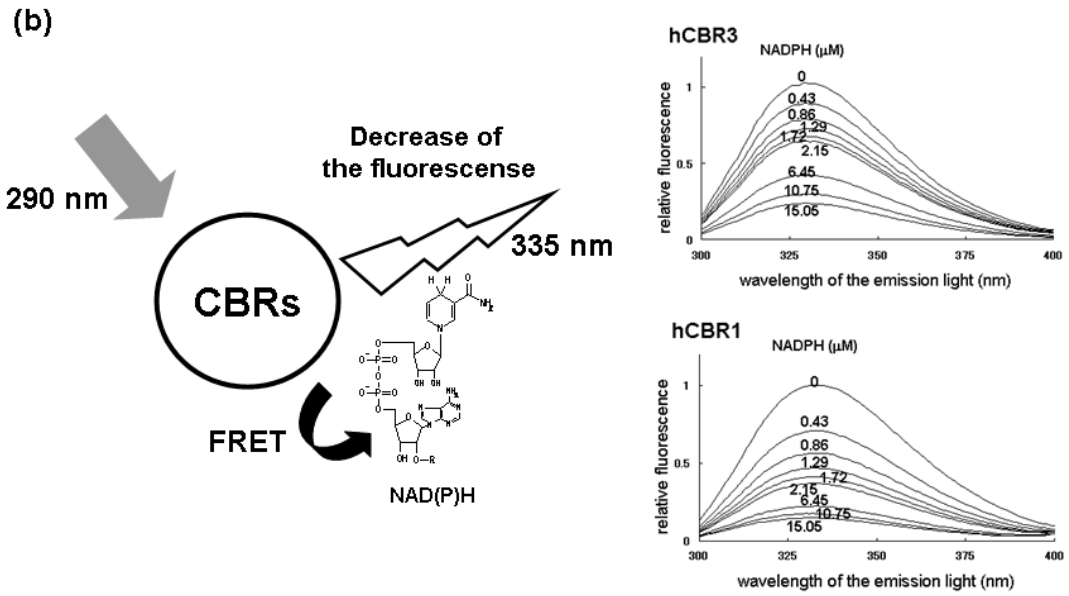


Fig. 14 The principle of the detection of coenzyme-enzyme binding by fluorescence decreasing (a) Fluorescence spectra of hCBR3 and hCBR1 with the excitation at 290 nm are shown. The intensities of fluorescence at 335 nm at each protein were supposed to be 1.0 as a standard in order to observe the differences in the fluorescence peak. Bold line, hCBR3; thin line, hCBR1. (b) Since the binding between them occurs FRET, the fluorescence is decreased when the coenzyme NAD(P)H exists in the enzyme solution.

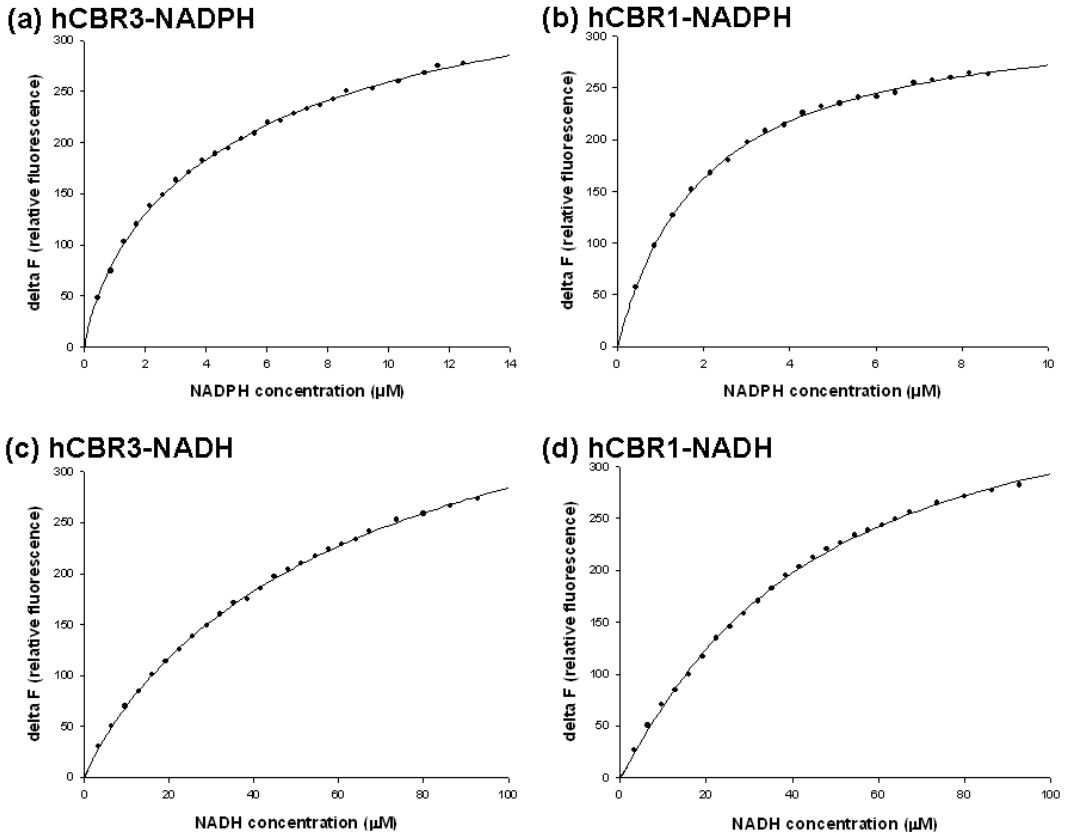


Fig. 15 The decreasing of the fluorescence of the protein excited at 290 nm Typical fitting curves are indicated. The decreases in relative fluorescence (ex. 290 nm/ em.335 nm) of hCBR3 (a, c) and hCBR1 (b, d) fitted to the curves of Hill equation.

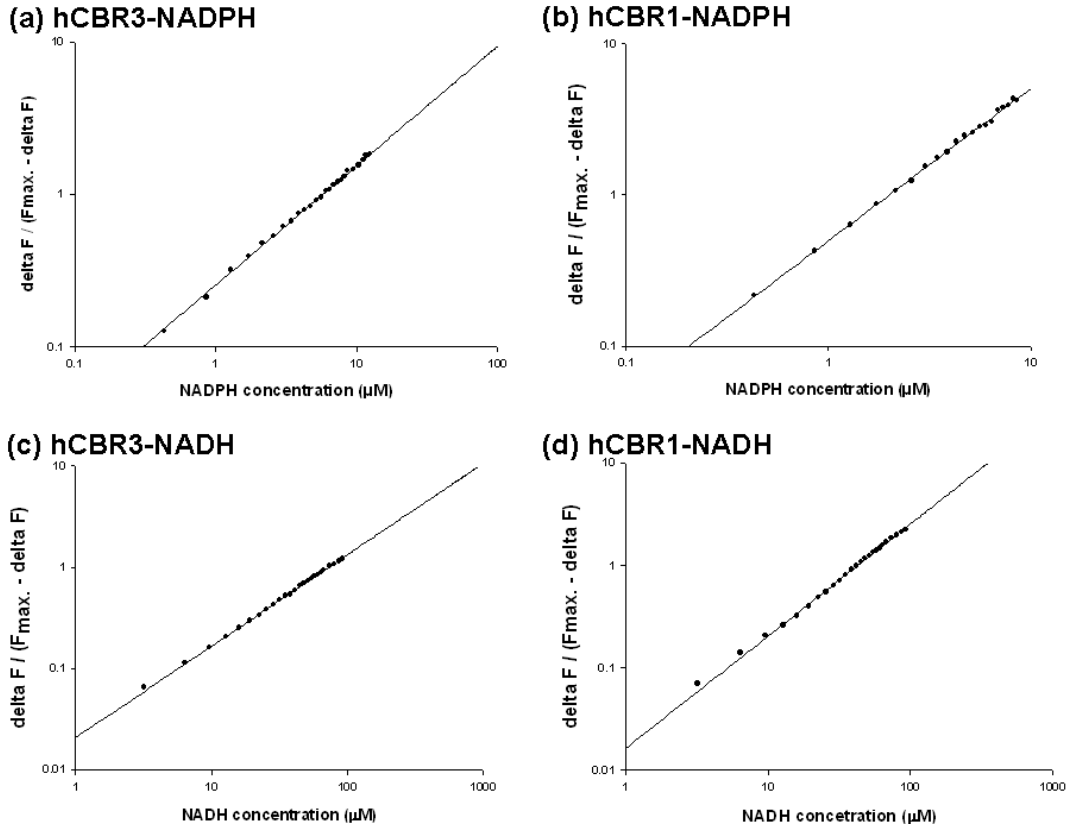


Fig. 16　Linearity of Hill plots The results of Fig. 15 were converted into Hill plots (equation (3)) in order to consider the degree of linear regression.

第四節　hCBR3 および hCBR1 のカルボニル還元活性

SDR スーパーファミリーにおいて、アミノ酸配列に類似性が認められる場合、その酵素化学的性質も類似性が高いことが知られている。例えば、SDR7C subfamily に属する SDR7C1–SDR7C6 は、それぞれのアミノ酸配列において 35–72%と比較的高い相同性を示し、すべてレチノール脱水素酵素活性を有し [1]、基質との高い親和性・補酵素特異性などにおいて類似の酵素化学的性質 [24]を示す。また、SDR16C subfamily に属する SDR16C1–SDR16C5 においても同様に、アミノ酸配列上 32–63%と比較的高い相同性を示し、同様の反応を触媒することが知られている [1]。

hCBR3 は、hCBR1 とアミノ酸配列上 71.8%と高い相同性を示すため(Table 1)、酵素化学的性質も類似の性質を示すものと予想された。本研究においてここまでに、本章第三節第二項・第三項で示したように、*in vitro* 酵素活性測定における最適 pH や補酵素特異性は類似していることを明らかにしたが、一方、本章第三節第一項に示した SDS-PAGE 上における奇異な移動度として表現されるような物理化学的性質など明確に異なる点を示した。

本章第三節において、hCBR3 の大量調製法・精製法、酵素活性測定法における実験条件について決定した。本節では、これらの条件下、hCBR3 と hCBR1 のカルボニル還元活性につ

いて、その差異に注目し検討を行った。

第一項　hCBR3 および hCBR1 のテスト基質に対する代謝活性

カルボニル還元活性を測定する際、通常、テスト基質に対する還元活性を指標として検討することが多い。本項では、カルボニル還元活性のテスト基質として繁用される menadione、4-benzoylpyridine、p-nitrobenzaldehyde を基質として、本章第三節において決定した pH6.5 の緩衝液中、NADPH を補酵素として用いてカルボニル還元活性を測定した。

実験材料と方法

大腸菌による蛋白質発現と蛋白質精製：本章第三節第一項の方法と同様に行なった。

カルボニル還元活性の測定：100 mM ナトリウムリン酸緩衝液, pH 6.5、補酵素として 130 μM の NADPH を用いて、本節第二項の方法と同様に行なった。酵素動力学的解析のためにそれぞれの基質に対して、酵素動力学的パラメーターであるミカエリス定数 K_m 値・触媒回転数 k_{cat} 値・触媒効率 k_{cat}/K_m 値を求めた。以下にその方法を示した。

それぞれの濃度の基質に対するカルボニル還元活性を、単位時間あたりの NADPH による 340 nm の減少量から算出し、基質濃度に対してプロットした。その関係を、SigmaPlot kinetic module を用いて、Michaelis-Menten equation　式 (4)へ非線形回帰し、それぞれの値を得た。Michaelis-Menten equation は、酵素-基質複合体(反応中間体)の形成を経て行われる酵素触媒反応モデルを元にした計算式であり、通常の酵素反応はこの式に従うことが知られている。

K_m 値は、最大反応速度の 50%の速度を示す時の基質濃度を表す。酵素と基質との親和性の指標となり、低ければ低いほど親和性が高いと判断される。k_{cat} 値は、単位時間当たりに 1 つの酵素分子が反応を触媒する最大の反応回数であり、酵素の基質に対する最大反応速度を表す。k_{cat}/K_m 値は、Michaelis-Menten plot のカーブにおいて、原点における接線の傾きであり、この値が大きければ基質が低濃度の時に反応性が高いと考えられ、基質が低濃度の時の反応性の指標となる(Fig. 17)。

式 (4)

$$v = \frac{k_{cat} \cdot [\mathrm{Substrate}]}{K_m + [\mathrm{Substrate}]}$$

v: 単位時間当たりに 1 つの酵素分子が反応を触媒する回数（反応速度）
[Substrate]: 反応液中における基質濃度

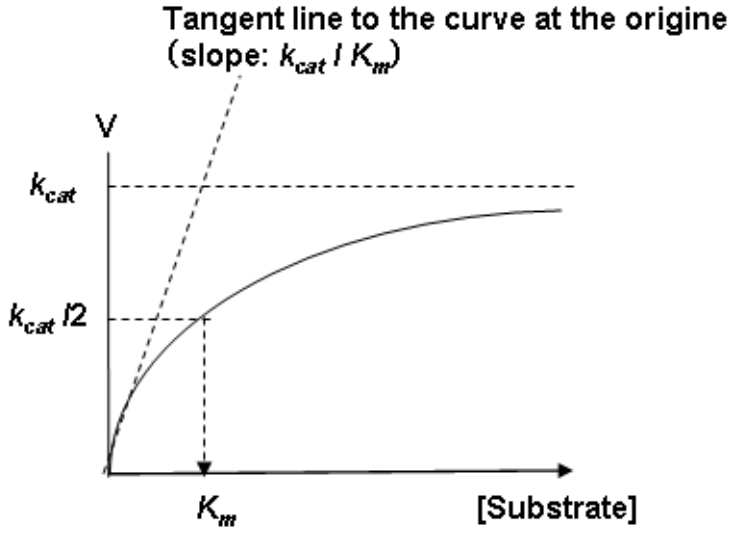


Fig. 17　Michaelis-Menten kinetics The increasing concentration of a substrate enhances the enzymatic reaction. Michaelis constant (K_m value) is the concentration of a substrate at which the rate of the enzymatic reaction is half of k_{cat} value.

<u>哺乳類細胞発現 hCBR3/hCBR1 の活性測定</u>：本章第二節の方法により、HEK293 細胞へ p3×FLAG-hCBR3/hCBR1 をトランスフェクションし、蛋白質を抽出した。100 mm 径培養ディッシュから抽出された蛋白質の 90%を酵素反応に供した。酵素反応は、100 mM ナトリウムリン酸緩衝液, pH 6.5、基質として 1 mM 4-benzoylpyridine、補酵素として 130 μM の NADPH を用いて、本節第二項の方法と同様に触媒反応に共役して起こる NADPH 由来 340 nm の吸収減少を指標として行った。p3×FLAG-CMV10 をトランスフェクションした細胞の蛋白質抽出液による活性をバックグラウンドとし、それぞれの酵素遺伝子をトランスフェクションした細胞の蛋白質抽出液による酵素活性を、バックグラウンド値で引いたものから酵素活性を算出した。酵素蛋白質の発現量は、ウエスタンブロッティング上でほぼ同等であった(Fig. 6)。

<u>結　果</u>

カルボニル還元活性を測定するための一般的なテスト基質である menadione、4-benzoylpyridine、p-nitrobenzaldehyde に対する、精製 hCBR3 および hCBR1 の酵素活性を NADPH の減少量を指標として測定した。測定値を基に算出された酵素活性を Michaelis-Menten equation 式 (4)へ非線形回帰したものを Fig. 18 に示した。また、その回帰から算出した酵素動力学的パラメーターを Table 5 に示した。hCBR3 は hCBR1 に比べて、p-nitrobenzaldehyde に対して低い K_m 値を示したが他の基質では同様の K_m 値であった。一

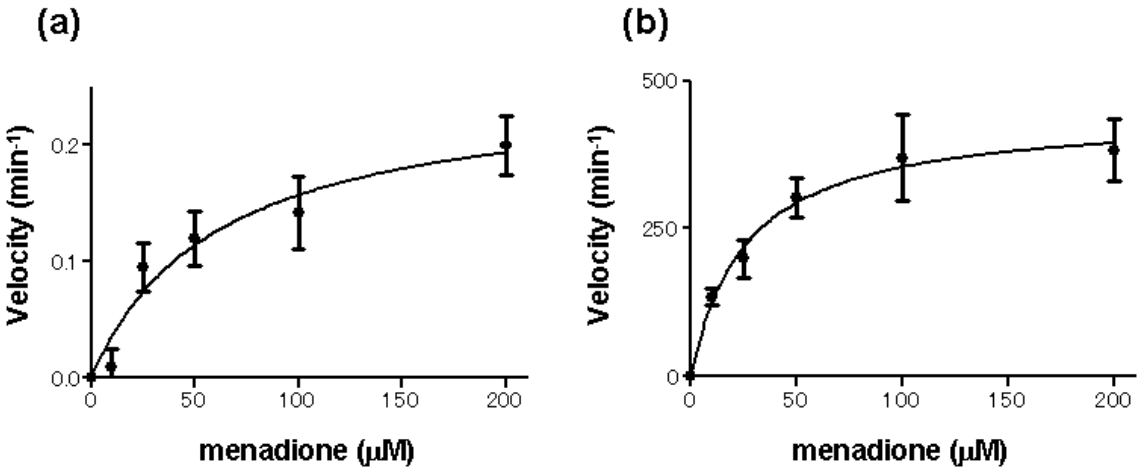
方、k_{cat}値とk_{cat}/K_m値は、100—1000 倍程度低かった。

また、それぞれの酵素蛋白質を強制発現させた HEK293 細胞の蛋白質抽出液の酵素活性は、hCBR3 と hCBR1 がそれぞれ、51 ± 6.2 nmoles・min^{-1}・mg^{-1} と 2.5 ± 0.5 nmoles・min^{-1}・mg^{-1}であり、大腸菌から精製された両酵素の結果は、異なる系において再現された。以上より、hCBR3 は hCBR1 と高いアミノ酸配列上の相同性を示す一方、テスト基質に対するカルボニル還元活性は限定的であることが示された。

Table 5　Kinetic constants of hCBRs towards test substrates

	hCBR3			hCBR1		
	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m (min^{-1}・μM^{-1})	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m (min^{-1}・μM^{-1})
menadione	43 ± 12	0.24 ± 0.023	0.0056	29 ± 2.1	440 ± 10	15
4-benzoylpyridine	300 ± 38	0.70 ± 0.037	0.0023	360 ± 18	400 ± 37	1.1
p-nitorobenzaldehyde	130 ± 30	0.59 ± 0.054	0.0045	1300 ± 320	190 ± 27	0.15

Each value represents the mean ± S.D. obtained from three independent experiments.



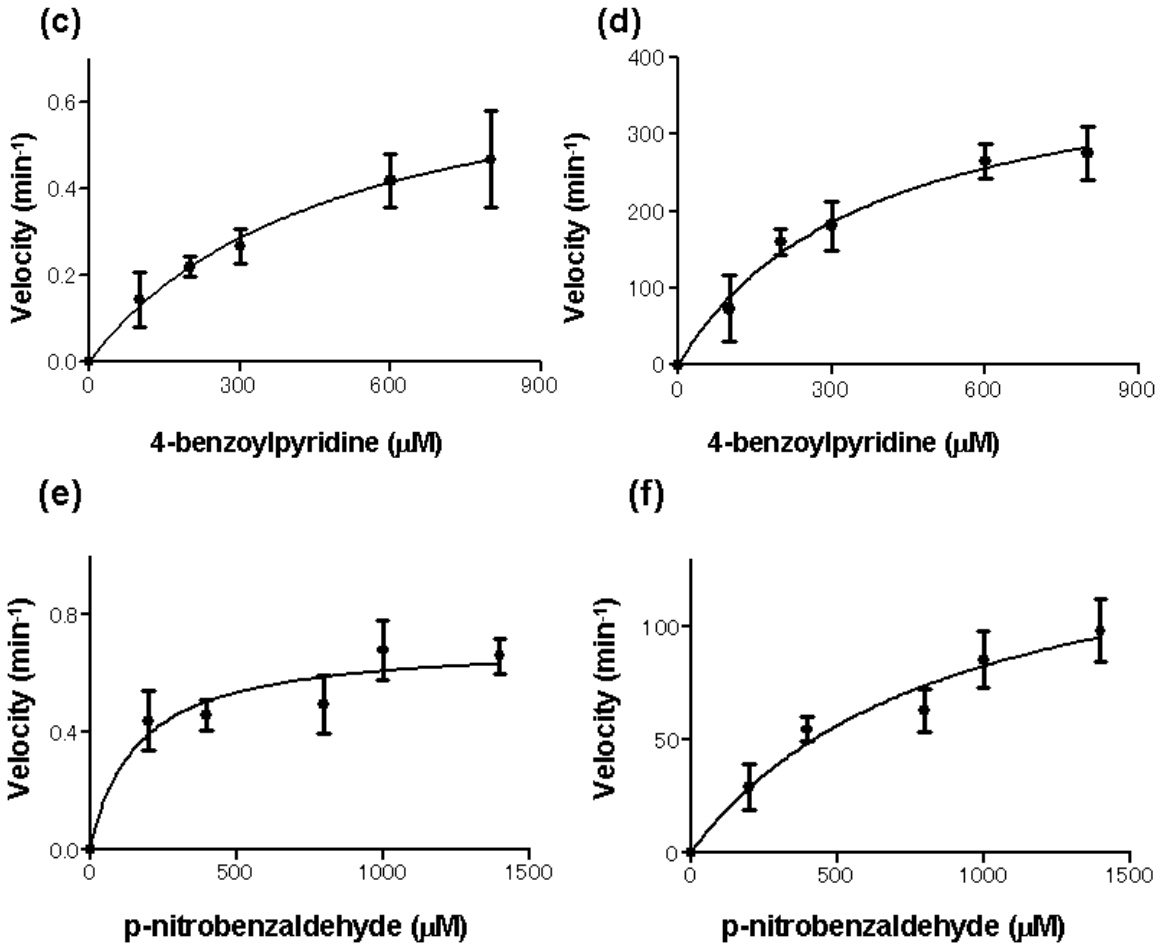


Fig. 18　Michaelis-Menten plot of hCBR3 and hCBR1 towards test substrates
Enzymatic activities of hCBR3 (a, c, e) and hCBR1 (b, d, f) were shown. The rate of the reaction was measured based on the decrease of NADPH absorption at 340 nm. The assay was performed in triplicate. Enzyme activities are reported as mean ± S.D.

第二項　hCBR3 および hCBR1 の PG に対する代謝活性

前項において hCBR3 が hCBR1 に比べ、テスト基質に対するカルボニル還元活性が限定的であることを明らかにした。本項では、CBR1 の内因性基質の一つである PG に対する還元活性を比較・検討した。

CBR1 は同定された当初、PG 9-keto reductase や PG 15-hydroxy dehydrogenase の呼び名で PG 代謝に関与する酵素として知られた酵素であり、pH 中性付近で PG 9-keto reductase 活性を、pH10 付近で PG 15-hydroxy dehydrogenase 活性を発揮する [5]。また、グルタチオン抱合 PGA_1 (PGA_1-GS)を効率的に還元することも知られている [5]。この PGA_1-GS は、MRP1 (Multidrug resistance-associated protein 1)が PGA_1 でなく PGA_1-GS を選択的に細胞外へ排出することより PGA_1 の細胞外への排泄機構に関与していると考えられるが [38]、CBR1 の

PGA_1-GS への還元活性の生理的意義は不明である[5]。hCBR1 は、PG の代謝活性を介してがん組織局所の PGE_2 濃度を制御することにより、がん組織の血管新生能に影響を与え、最終的に患者の予後に影響を与えると報告されている通り[12-15]、hCBR1 にとって PG 代謝を介した生理学的役割は極めて重要である。そこで、CBR1 の重要な基質の 1 つである PG の代謝に関して CBR3 の関連を検討した。

実験材料と方法

大腸菌による蛋白質発現と蛋白質精製：本節第一項の方法と同様に行なった。

カルボニル還元活性の測定：100 mM ナトリウムリン酸緩衝液, pH 6.5、補酵素として 130 μM の NADPH を用いて、本節第二項の方法と同様に行なった。グルタチオン抱合プロスタグランジン (PGs-GSH)は、Wermuth と Iwata らの方法に従って作製した[5, 39]。具体的には、100 mM ナトリウムリン酸緩衝液中で 15 mM の還元型グルタチオン (GSH)と 25 μM の PG を酵素反応の 10 分前に 25°C にて混和・静置し、抱合した。

酸化脱水素活性の測定： CBR1 は、pH10 付近という塩基性条件下において、PG 15-hydroxy dehydrogenase 活性を持ち、一部の PG の 15 位から脱水素することが知られている[5, 39]。プロスタグランジン脱水素活性を測定するために、100 mM Glycine-NaOH 緩衝液, pH 10、補酵素として 130 μM $NADP^+$を用いた[5, 39]。1 mM 4-benzoylpyridine に対する還元活性を 100%とし、脱水素活性を相対活性(%)として算出した。

結　果

CBR1 は、ヒト[5]、ラット[39, 40]、チキン[41]、ウサギ[42]のオルソログにおいて、PGE_2、PGA_1、PGA_1-GS への還元活性を示し、PGA_1-GS への還元活性は PGE_2 への還元活性の数倍であることが報告されている。hCBR1 は、PGE_2、PGA_1 および PGA_1-GS に対して還元活性を示し、また、PGA_1 に対して比較的強い脱水素活性を示した(Table 6)。以上の結果は Wermuth[5]の報告と同様であり、再現性を確認できたことから、グルタチオン抱合に関する系が良好に機能していることが示された。一方、hCBR3 は今回検討したすべての未抱合 PG において反応を検出することはできなかった。また、グルタチオン抱合 PG に対して 3.1%の還元活性を見出した(Table 6)。しかし、4-benzoylpyridine への還元活性について、hCBR3 が hCBR1 に比べて限定的であることを考慮すると、その生理的意義は乏しいと考えられる。以上より、hCBR3 は PG に対して生理的活性を有さないと考えられた。

Table 6　Enzymatic activities of hCBRs towards PGs

Substrate	Concentration (μM)	hCBR3	hCBR1
Reduction			
4-benzoylpyridine	1000	100	100
PGA_1	25	n.d.	0.70 ± 0.11
PGE_2	25	n.d.	1.6 ± 0.34
PGA_1-GS	25 / 15000 (GSH)	3.1 ± 0.57	6.5 ± 0.76
Oxidation			
PGA_1	25	n.d.	25 ± 3.5
PGE_2	25	n.d.	2.7 ± 0.50
PGA_1-GS	25 / 15000 (GSH)	n.d.	-

Reductase/dehydrogenase activities of hCBRs towards PGs are shown as the ratio of reductase activity towards 4-benzoylpyridine. Each value represents the mean ± S.D. obtained from three independent experiments. n.d., no detectable activity; GSH, reduced glutathione; PGA_1-GS, glutathione-conjugated PGA_1.

第三項　hCBR3 および hCBR1 のアントラサイクリン系抗がん薬ドキソルビシンに対する代謝活性

アントラサイクリン系抗がん薬は、乳がんや肺がんなどの多くのがん種に抗がんスペクトルを有する、臨床的に重要な抗がん薬である。しかしながら、本薬剤の代謝産物の一つである C13 位 アルコール代謝産物は心臓へ蓄積することにより、重篤な副作用である心不全を引き起こすと考えられている(Fig. 2)[9–11]。そのため、本薬剤の C13 位アルコール代謝産物への還元代謝経路は、副作用の発現機序を考える上で重要である。

その代謝は、薬物代謝の一般的な経路である CYP 系によらない。ヒトにおいて、アントラサイクリン系抗がん薬の代表的な薬剤であるドキソルビシンに対する主要な代謝酵素の一つとして CBR1 が挙げられる [6]。しかし、他の還元酵素においてもアントラサイクリン系抗がん薬に対して代謝活性を有するものもあり、検討が進められている [43–47]。また、129S6/Sv/Ev マウス由来胚幹細胞より作成された CBR1 のヘテロノックアウトマウス(129 系)を用いた解析により、ドキソルビシンによる心不全発症が抑制されたとの報告があるが [10]、このノックアウトマウスを C57BL/6J 系へバッククロスしたマウスでは上記の結果が再現されなかったとの記載もある [10]。この結果は、マウスの遺伝的背景により CBR1 の関与の度合いが異なることを示している。よって、生体内において CBR1 はドキソルビシン代謝に深く関与しているが、その関与は絶対的なものではなく他酵素の関与も示唆されていた。CBR1 以外のアントラサイクリン系抗がん薬代

謝酵素の候補として、CBR1 に高度に類似した CBR3 が有力視される。そこで本節において、hCBR3 のドキソルビシンに対する代謝活性を検討した。

hCBR1 がドキソルビシンを代謝する際、副作用である心不全の発症に関与する 13 位アルコール代謝産物であるドキソルビシノール(Fig. 19a)以外に、いくつかの代謝産物が生成される [48]。しかしながら、ドキソルビシノール以外の代謝産物は、微量でありかつ臨床的意義について重要性を見出されていない [48]ことから、ドキソルビシノールへの代謝能についてのみ検討した。NADPH の減少を指標とした酵素活性測定では、生成物が複数ある場合にそれぞれの含量を検討することができない。ドキソルビシノールへの代謝のみに焦点をあてるために、生成物を HPLC (High performance liquid chromatography)によって分離・定量した。

実験材料と方法

大腸菌による蛋白質発現と蛋白質精製：本節第一項の方法と同様に行なった。

ドキソルビシンに対するカルボニル還元活性の測定：100 mM ナトリウムリン酸緩衝液, pH 7.4、補酵素として 1 mM の NADPH、および、各種濃度のドキソルビシンを良く混和し、25°C にて 20 分、保温した。続いて、適量の酵素蛋白質を保温した反応溶液に加えた。この時点を酵素反応の開始とし、酵素反応を 25°C にて実施した。以上の条件において、酵素反応時間 5 分・15 分・30 分のドキソルビシノール量を下記に従い測定したところ、時間に対して生成物量が直線性を示したので、30 分以内の反応が酵素活性測定に許容出来ることが示された。よって、酵素反応時間を 15 分とした。酵素反応開始 15 分後、等量の冷アセトニトリルを加えることにより、酵素反応を停止した。停止された酵素反応溶液中の代謝産物を、HPLC によって分離・定量した。

HPLC によるドキソルビシノール（13 位アルコール体代謝産物）の定量： 調製された酵素反応溶液 50 μl を HPLC 解析に供した。ドキソルビシン(Sigma aldrich)とドキソルビシノール (Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Canada)は、励起光 460 nm 時の蛍光 550 nm にて検出を行った。4.5×150 mm の C18 カラムにて、移動相として 21% アセトニトリルを使用したところ、ドキソルビシンは保持時間 7.9 分、ドキソルビシノールは保持時間 15.1 分と、明確に分離した(Fig. 19b)。蛍光検出の定量性について、0.25 pmol−25 pmol の間でドキソルビシノール量と蛍光量に直線性が見られた(R^2=0.9991)ので、この間において定量を行った。

それぞれの濃度のドキソルビシンに対する酵素反応後のドキソルビシノール生成量を測定し、その関係を本章第四節第一項と同様に、SigmaPlot kinetic module を用いて、Michaelis-Menten equation 式 (4)へ非線形回帰し、K_m 値・k_{cat} 値・k_{cat}/K_m 値を得た。酵素非存在条件での試料からはドキソルビシノールが検出されなかったため、検出されたドキソルビシノールは酵素反応によってのみ得られたと判断された。

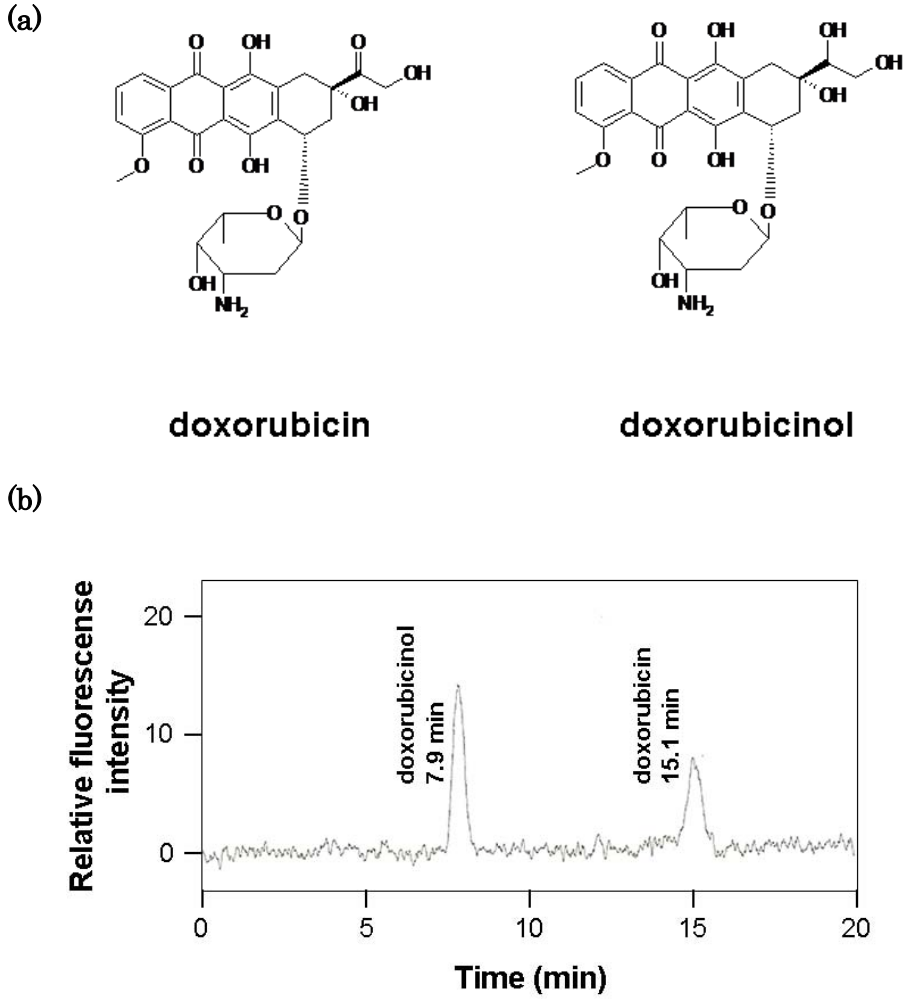


Fig. 19　Properties of doxorubicin and doxorubicinol (a) Structures of doxorubicin and the metabolite, doxorubicinol are shown. (b) Chromatogram of the mixture of doxorubicin and the metabolite, doxorubicinol. Each 0.25 pmol of the compound was loaded on the HPLC.

結　果

反応後得られたドキソルビシノールの生成量を基に算出した酵素反応速度を縦軸に、基質であるドキソルビシンの濃度を横軸にプロットし、Michaelis-Menten equation 式 (4)へ非線形回帰したグラフを Fig. 20 に示した。また、非線形回帰から得られた酵素動力学的パラメーターを Table 7 に示した。hCBR1 のそれぞれの値について、Bains らの報告 [47]と同様の値を示したことから、本実験系は妥当であると考えられた。hCBR3 の K_m 値は、hCBR1 の値とほぼ同等であり、ドキソルビシンとの親和性において同程度であると考えられた。また、k_{cat} 値と k_{cat}/K_m 値についても hCBR3 と hCBR1 ではほぼ同程度であり、ドキソルビシンへの代謝能について、テスト基質や PG に対する活性とは異なり、hCBR3 と hCBR1 では同程度であると考えられた。

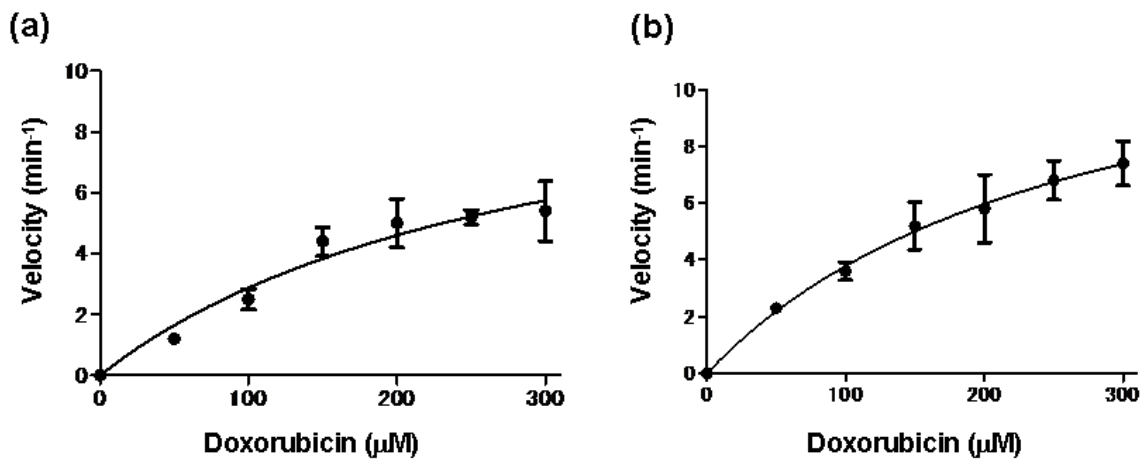


Fig. 20 Michaelis-Menten plot of hCBR3 and hCBR1 towards Doxorubicin Kinetic activities of hCBR3 (a) and hCBR1 (b) were shown. The rate of the reaction was measured based on the production of 13-doxorubicinol that was detected by HPLC-fluorescence. The assay was performed in triplicate. Enzyme activities are reported as mean ± S.D.

Table 7 Kinetic constants of hCBRs towards doxorubicin

	hCBR3			hCBR1		
	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m (min^{-1}・μM^{-1})	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m (min^{-1}・μM^{-1})
Doxorubicin	290 ± 120	12 ± 2.6	0.041	270 ± 80	14 ± 2.4	0.052
REPORTED	-	-	-	270 ± 47[a]	11 ± 1.2[a]	0.040

Each value is based on the results of Fig. 19. Enzymatic activities are reported as mean ± S.D. Reported parameter values for hCBR1 are also given for comparison purposes. [a]Bains et al. [47)]

第五節　小括

本章において、hCBR3 の基本的性質を hCBR1 との比較において検討し、以下の結果を得た。

(1) mRNA 発現に関して、hCBR3 は hCBR1 と同様に幅広い組織分布を示すものの、その発現量は限定的であることを明らかとした。また細胞内局在性に関して、hCBR3 はサイトプラズムへの局在を認めた。大腸菌からの界面活性剤非存在下での蛋白質精製において、hCBR3 は上清に検出された。これらより、hCBR3 のサイトプラズムの可溶性画分への局在を明らかとした。

(2) hCBR3 は SDS-PAGE 上で、推定アミノ酸配列から算出される分子量と比較して約 3kDa 分、移動度が小さかった。これは翻訳後修飾などによるものではなく、hCBR3 の物理化学的性質によるものであると考えられた。

(3) pH 最適性について、hCBR3 は hCBR1 と同様に pH6.5 付近に最適性が見出された。

(4) 補酵素特異性について、hCBR3 は NADPH の 2'位リン酸基への高親和性により、NADH よりも NADPH を好むことを明らかにした。

(5) テスト基質や PG、PG-GS に対する還元活性に関して、hCBR3 は hCBR1 に比べて限定的であった。一方、hCBR1 の基質薬物であるドキソルビシンに対しては、hCBR1 と同程度の酵素活性を有していた。

以上より、hCBR1 の新規類縁酵素である hCBR3 は、アミノ酸配列上 hCBR1 と高い相同性を有するものの、hCBR1 の生体内基質である PG に対してほとんど酵素活性を有していないこと、テスト基質に対するカルボニル還元活性が限定的であることから、hCBR1 とは明確に生理的機能が異なると考えられた。一方、ドキソルビシンへの還元活性は hCBR1 と同等程度であることから、本薬剤の生体内代謝への関与が示唆された。

第二章　CBR3 のラット・チャイニーズハムスターオルソログの酵素化学的特徴

第一章において、hCBR3 の酵素化学的特徴を明らかにし、hCBR3 と hCBR1 の酵素化学的特徴に明確な差異を見出した。hCBR3 がテスト基質に対して k_{cat} 値や k_{cat}/K_m 値が限定的であった一方、ドキソルビシンに対する酵素活性が hCBR1 と同等程度であったことは、酵素機能を考える上で重要な差異であると考えられる。特に、hCBR3 と hCBR1 によるドキソルビシンの代謝産物であるドキソルビシノールは、ドキソルビシンによる心不全との関連が示されており [9-11, 16]、薬物治療に果たす本酵素の役割を考える上で興味深い。

hCBR3 のドキソルビシン誘発性心不全への関与を検討する際、詳細な検討を進めるには倫理的側面からヒト臨床試験では限界がある。そのため、動物モデルを用いた検討が必要になる。しかしながら、hCBR3 や hCBR1 のような異物代謝を担う酵素は異なる動物のオルソログ間において基質に対する触媒活性が異なることがあり [49, 50]、そのためにしばしば動物モデルでの結果とヒト臨床試験の結果に齟齬が生まれ、解析が混乱することがある。よって、動物オルソログの性質を検討することが必須である。そこで、本章では動物モデルとしてラット・チャイニーズハムスターの CBR3 オルソログ（rCBR3, rat CBR3; CHCR3, Chinese hamster CBR3）の酵素化学的特徴を解析し、CBR3 のオルソログ間の比較を行なった。

第一節　ラットおよびチャイニーズハムスターの CBR3 オルソログ間での酵素化学的差異

rCBR3 は、ゲノム配列を基にしたデータベース上の配列は存在していたが、クローニングや酵素化学的解析に関する報告がなかった。そのため、ゲノム配列を基にプライマーを設計・クローニングし、hCBR3 と同様にヒスタグ融合蛋白質として精製を行った。また、CHCR3 は Terada らにより 2001 年に新規にクローニングされた CBR3 オルソログであるが [51, 52]、これまでに酵素化学的解析はほとんど行われてこなかった。両酵素に関して、Michaelis-Menten plot を用いた酵素動力学的解析を行った。

実験材料と方法

rCBR3 および CHCR3 蛋白質発現ベクターの構築：SD（Sprague-Dawley）rat 肝臓由来 cDNA プール（Clontech Laboratories, Inc., CA, USA)から、以下のプライマーを用いて *rCBR3* 遺伝子を増幅した。

太字斜線部は制限酵素の認識部位

mtrCBR3f01(*Bam*HI): 5'- gcc **gga tcc** tgg tcc gtg tgt ccc tct ga-3'

mtrCBR3r01(*Not*I): 5'- gcc **gcg gcc gc**c att cat ctc tca cgc taa cg -3'

増幅された DNA 断片を *Bam*HI/*Not*I によって処理し、pET-28a の *Bam*HI/*Not*I サイトへ挿入したプラスミドを pET-rCBR3 と名付けた。CHCR3 蛋白質発現ベクターは既に構築されていたものを使用した[51]。これらのプラスミドでは、pET-hCBR3/hCBR1 と同様に、T7 プロモーター支配下、N 末に 6 個の His がクラスターを形成した His タグが連結された *rCBR3* 遺伝子および *CHCR3* 遺伝子がコードされる。

大腸菌による蛋白質発現と蛋白質精製：上記のプラスミドを用いて、第一章第三節第一項の方法と同様に行なった。

MALDI-TOF² （Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight） mass spectrometry：精製した蛋白質は、第一章第三節第一項と同様の方法により、分子量を決定した。

カルボニル還元活性の測定：第一章第四節第一項の方法と同様に行なった。

結　果

rCBR3 および CHCR3 を hCBR3 と同様の方法で、大腸菌内にて大量に発現し均一に精製することができた(Fig. 21)。両酵素とも推定アミノ酸配列から計算される分子量は約 34 kDa であるのに対して、SDS-PAGE 上での見かけの分子量は約 36 kDa であった(Table 8)。MALDI-TOF² MASS の結果、rCBR3 の場合、推定アミノ酸配列から計算された分子量と同一であること、CHCR3 の場合、測定値は 130 Da 小さく、翻訳開始アミノ酸残基であるメチオニン残基の脱メチオニン化が考えられた(Table 8)。よって、大腸菌内でのタンパク質に対する官能基付加などの翻訳後修飾は起こっていないと判断された。SDS-PAGE 上の奇異な挙動に関して、His タグ融合 rCBR3 および CHCR3 の GRAVY score は、−0.411 および−0.419 (GRAVY CALCULATOR, http://www.gravy-calculator.de/による算出)であり、極端な疎水性による SDS-PAGE での移動度の変動は考えにくいと判断された。pI は 6.59 (His-tagged rCBR3) および 6.62 (His-tagged CHCR3) であり (Compute pI/Mw, http://web.expasy.org/compute_pi/による算出)、hCBR3 と同様に低 pI による実験条件下での陰性荷電が SDS-PAGE 上での移動度の小ささの原因の一つであると考えられた。つまり、CBR3 の SDS-PAGE 上での移動度の小ささは、動物種によらず普遍的であることが示唆された。

Fig. 21　Purified enzymes on SDS-PAGE

Purified enzymes (each 1 μg) were electrophoresed on SDS-polyacrylamide gel, and stained by CBB.
Lane 1, His-tagged rCBR3; Lane 2, His-tagged CHCR3.

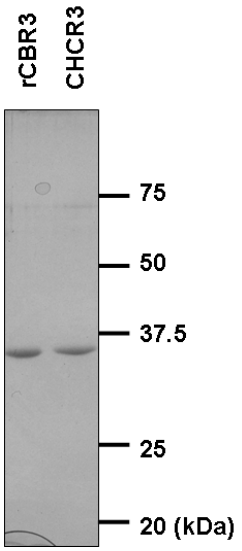
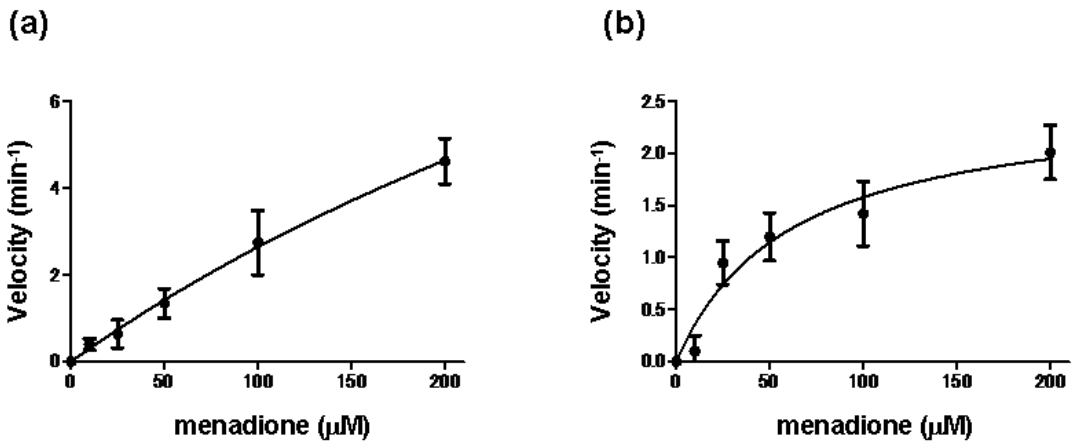


Table 8　Theoretical and experimental molecular weights of animal CBR3s

	M.W. estimated by SDS-PAGE	Theoretical M.W.	M.W. estimated by MASS
His-tagged rCBR3	36 k	34,299	34,293
His-tagged CHCR3	36 k	34,431	34,301

M.W., molecular weight

次に、これらの精製酵素を用い、menadione、4-benzoylpyridine、p-nitrobenzaldehyde に対する酵素活性測定を行った。Michaelis-Menten plot を Fig. 22 に、酵素動力学的パラメーターについて Table 9 に示した。



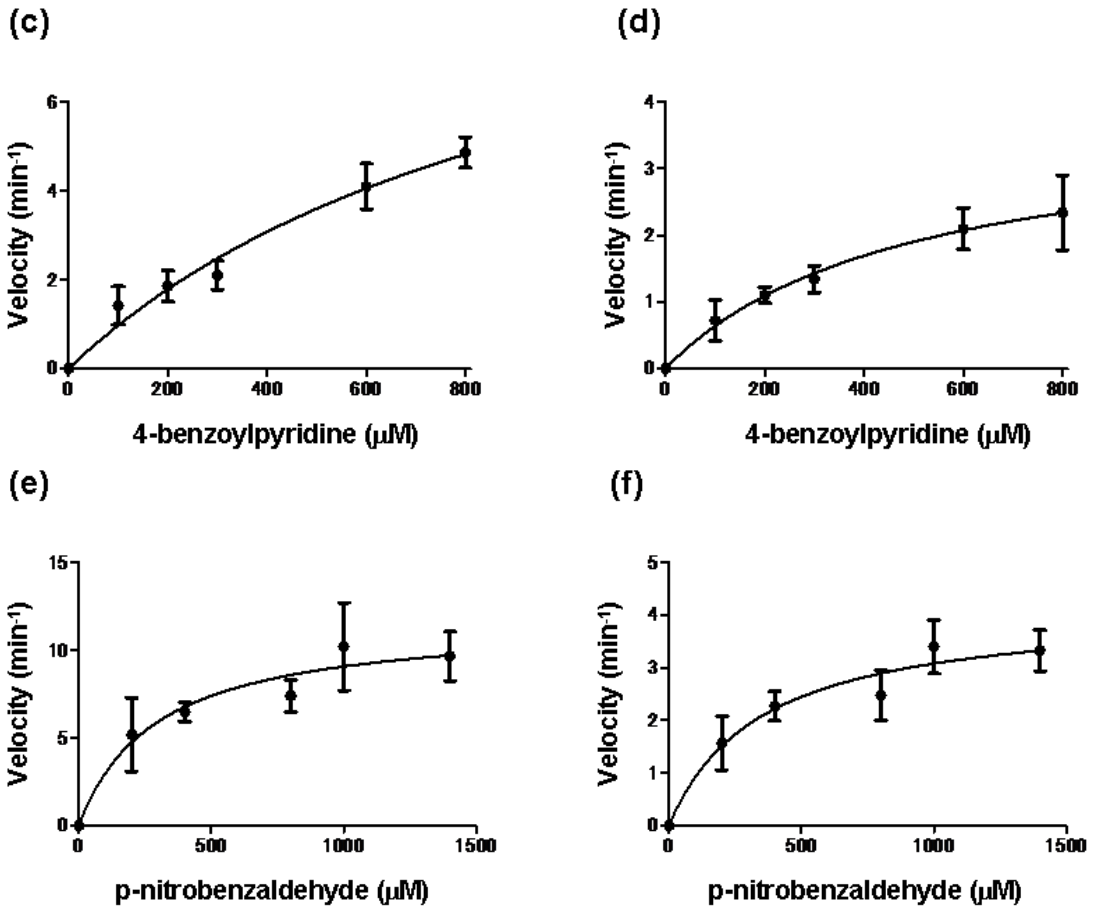


Fig. 22　Michaelis-Menten plot of rCBR3 and CHCR3 towards test substrates Kinetic activities of rCBR3 (a, c, e) and CHCR3 (b, d, f) were shown. The rate of the reaction was measured based on the decrease of NADPH absorption at 340 nm. The assay was performed in triplicate. Enzyme activities are reported as mean ± S.D.

Fig. 22 より、rCBR3 および CHCR3 のテスト基質に対する酵素反応は、Michaelis-Menten equation 式 (4)に対して良く回帰することが示された。そこで、非線形回帰により酵素動力学的パラメーターを得た(Table 9)。テスト基質に対する hCBR3 の酵素活性(Table 5)とそれぞれの動物種での CBR3 の酵素活性(Table 9)を比較すると、rCBR3 および CHCR3 の両方において hCBR3 に比べて K_m 値、k_{cat} 値が高い傾向が見られた。K_m 値の高い傾向は数倍であるが、k_{cat} 値は、テスト基質全てに対して 5.4－75 倍と特に高い傾向が見られた。その結果として、k_{cat}/K_m 値も 2.7－6.7 倍高い値を示した。つまり、テスト基質が高濃度時および低濃度時の両方において、rCBR3 および CHCR3 の酵素活性が hCBR3 に比べ高い傾向であることが示された。全体のアミノ酸配列の相同性について Table 1 に示したように、hCBR3 と rCBR3 および CHCR3 は、74.5%、76.5%であるが、rCBR3 と CHCR3 は 87.0%

と明確に高い。また、mCBR3 も同様に hCBR3 に比べ他のげっ歯類 CBR3 と高い相同性を示す(Table 1; rCBR3 v.s. mCBR3, 92.4%; CHCR3 v.s. mCBR3, 86.7%)ことから、hCBR3 よりも酵素活性が高い傾向にあるのはげっ歯類オルソログ全般に言えることが示唆された。

Table 9　Kinetic constants of CBR3 orthologues towards test substrates

	rCBR3			CHCR3		
	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m (min^{-1}・μM^{-1})	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m (min^{-1}・μM^{-1})
menadione	**580 ± 190**	**18 ± 8.6**	**0.031**	**89 ± 17**	**2.9 ± 0.32**	**0.033**
4-benzoylpyridine	**1500 ±370**	**14 ± 2.6**	**0.0093**	**620 ± 170**	**3.8 ± 0.64**	**0.0061**
p-nitorobenzaldehyde	**340 ±120**	**12 ± 1.4**	**0.035**	**320 ± 120**	**4.1 ± 0.45**	**0.013**

Each value represents the mean ± S.D.obtained from three independent experiments.

第二節　ラットおよびチャイニーズハムスターの CBR3 オルソログ間での ドキソルビシン代謝能の比較

前節において、rCBR3 および CHCR3 が hCBR3 に比べテスト基質に対する還元酵素活性が高い傾向にあることを明らかにした。hCBR3 は、第一章第五節に示したように、hCBR1 と同等程度のドキソルビシンに対する代謝能を持っており、ドキソルビシノールの産生に寄与していることが予想される。そのため、hCBR3 によるドキソルビシンの代謝能は、臨床的に意義のある酵素活性であることが示唆された。

本節において、rCBR3 と CHCR3 のドキソルビシンに対する代謝能を検討することにより、CBR3 のドキソルビシン代謝における動物種差の寄与を検討した。

実験材料と方法

大腸菌による蛋白質発現と蛋白質精製：上記のプラスミドを用いて、第一章第三節第一項の方法と同様に行なった。

ドキソルビシンに対するカルボニル還元活性の測定、および、HPLC によるドキソルビシノールの定量：上記の方法で精製した rCBR および CHCR3 を用いて、第一章第五節の方法と

同様に HPLC によるドキソルビシノールの検出を行った。各濃度のドキソルビシンを基質とした場合に定量されたドキソルビシノール量を指標に酵素速度を算出し、Michaelis-Menten plot を作成した。この結果を基に、Sigma Plot kinteic module を用いた非線形回帰により、K_m 値、k_{cat} 値、k_{cat}/K_m 値を算出した。

結果

rCBR3 および CHCR3 のドキソルビシンに対する酵素活性を、ドキソルビシノールの生成量を基に算出した Michaelis-Menten plot を Fig. 23 に、酵素動力学的パラメーターについて Table 10 に示した。

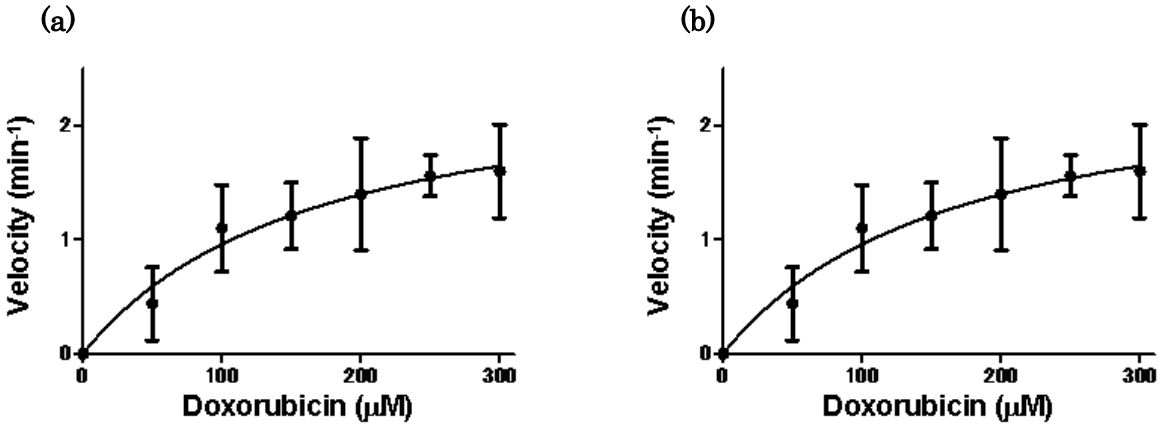


Fig. 23 Michaelis-Menten plot of rCBR3 and CHCR3 towards Doxorubicin Kinetic activities of rCBR3 (a) and CHCR3 (b) were shown. The rate of the reaction was measured based on the production of doxorubicinol that was detected by HPLC-fluorescence. The assay was performed in triplicate. Enzyme activities are reported as mean ± S.D.

Table 10 Kinetic constants of rCBR3 and CHCR3 towards doxorubicin

	rCBR3			CHCR3		
	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m (min^{-1}・μM^{-1})	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m (min^{-1}・μM^{-1})
Doxorubicin	**180 ± 45**	**2.6 ± 0.63**	**0.014**	**81 ± 17**	**2.0 ± 0.38**	**0.012**

Each value represents the mean ± S.D.obtained from three independent experiments.

Fig. 23 より、rCBR3 および CHCR3 のドキソルビシンに対する酵素反応は、Michaelis-Menten equation 式 (4)に対して良く回帰することが示された。そこで、非線形回帰により酵素動力学的パラメーターを得た(Table 10)。K_m 値に関して、いずれの酵素も hCBR3 (Table 7, 290 ± 120 μM)に対して低い値を示したことから、rCBR3 および CHCR3 はドキソルビシンに対する親和性が hCBR3 よりも高いことが示された。また、k_{cat} 値について hCBR3 (Table 7, 12 ± 2.6 min^{-1})に対して、約 50%の値を示したことから、最大反応速度は低いと考えられた。k_{cat}/K_m 値 (Table 7, 0.041 min^{-1}・μM^{-1})は低いことから、ドキソルビシン濃度が K_m 値と比較して低濃度時には、rCBR3 および CHCR3 が低活性を示すことが明らかにされた。

第三節　小括

本章において、モデル実験動物として取り上げられるラットおよびチャイニーズハムスターの CBR3 オルソログに関して、テスト基質およびドキソルビシンに対する酵素活性を測定し、以下の結果を得た。

(1) 新規にクローニングした rCBR3 および CHCR3 のテスト基質に対する酵素活性は、hCBR3 に比べると高い傾向を示した。

(2) ドキソルビシンに対する酵素活性について、rCBR3 および CHCR3 は、hCBR3 に比べ低い傾向にあるものの有意な活性を示した。

第三章　ヒトにおけるカルボニル還元酵素の比較解析

第一章に示したように、hCBR3 と hCBR1 は高い相同性を示しながらも、補酵素 NADPH への親和性やテスト基質に対するカルボニル還元活性に関して大きく異なる酵素化学的性質を示した。また、hCBR3 は hCBR1 と異なり PG への代謝活性を有さないことから、全く異なる生理的意義をもつ酵素であることを示した。一方、ドキソルビシンへの代謝活性は同程度であったことから、hCBR3 のドキソルビシン生体内代謝への関与が示唆された。さらに、第二章において rCBR3 や CHCR3 と hCBR3 との比較解析により、rCBR3 および CHCR3 も hCBR3 と同様にドキソルビシンを代謝しうることを示した。これらは、ドキソルビシン代謝物であるドキソルビシノールの蓄積によって起こると考えられている副作用である心不全[9–11, 16]に対して、動物種に関わらず CBR3 が関与していることを示唆している。

ドキソルビシンによる心不全を予防するための方法の一つとして、ドキソルビシンからドキソルビシノールへの代謝変換の抑制が考えられている[19, 56]。ドキソルビシン誘発性心不全に対する予防薬として開発されてきた monoHER は、CBR1 を阻害することによりドキソルビシノールの蓄積を抑制する機序が明らかにされている[9]。一方、hCBR1 は PGE_2 から $PGF_{2\alpha}$ への代謝・不活性化に重要な酵素であるため、hCBR1 の阻害活性を有する薬剤は PGE_2 の蓄積を介したがん進展作用などの副作用を発現すると推察される。hCBR3 はドキソルビシン代謝能を有するが PG への代謝活性を有さないことから、hCBR3 選択的阻害薬は、上記のような副作用を発現せずドキソルビシンからドキソルビシノールへの代謝変換を抑制できると考えられる。しかしながら、両酵素は推定アミノ酸配列の高い相同性から特異的阻害薬の開発は容易ではないと予想される。

そこで本章では、両酵素それぞれの特異的阻害薬の開発への足がかりとするために、両酵素の酵素化学的性質の差異を生み出す領域の同定を試みた。

第一節　hCBR3 と hCBR1 のアミノ酸配列解析

hCBR3 と hCBR1 で酵素化学的性質の差異を生み出す領域の探索のために、両蛋白質のアミノ酸配列を比較し、局所相同性の低い領域の同定を行った。通常の'Clustal'等を用いた相同性解析では全体の傾向は理解しやすいが、局所の相同性を調べる用途には、不向きである。そこで、Harr plot による二次元グラフィカル相同性解析[54, 55]を行い、局所相同性の低い領域を同定した。

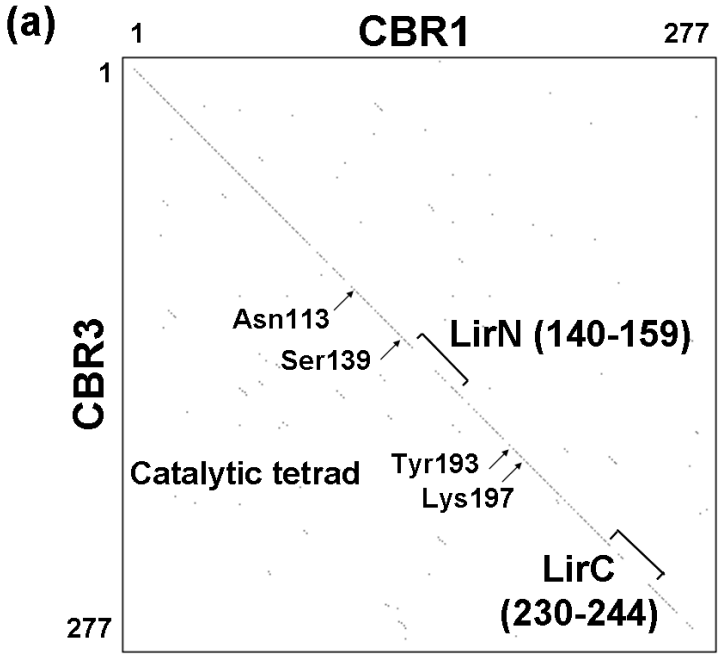
実験材料と方法

Harr-plot 解析：hCBR3（GenBank No. NP_001227.1）と hCBR1（GenBank No. NP_001748.1）のアミノ酸配列を、Harr plot 解析へ供した。Harr plot 解析は、GENETYX

ver. 8 プログラム(GENETYX, Japan)を用いて、unit size to compare を 5、dot plot score を 3 として解析を行った。縦軸に hCBR3 のアミノ酸配列を上から下へ、横軸に hCBR1 のアミノ酸配列を左から右へ整列させ、相同性を解析した。5 アミノ酸残基を 1 単位として、1 単位中に 3 アミノ酸残基以上の相同性が認められた場合にその部位にドットされる。そのため、完全に同一なアミノ酸配列同士は Harr plot において、左上から右下へ向かう直線となる。

結　果

hCBR3 と hCBR1 の Harr plot は、全体として左上から右下へ向かう直線性を示し、全体の相同性が高いことをあらためて示した(Fig. 24a)。しかしながら、アミノ酸配列中央部および C 末側に、直線が不連続な局所相同性の低い領域を見出した。これらの領域を、LirN (The N-terminal low-identity region: 140-159 アミノ酸残基)と LirC (The C-terminal low-identity region: 230-244 アミノ酸残基)と名づけた。LirN は、触媒アミノ酸の 1 つである Ser139 の近傍に位置し、αEF1 とαEF2 の 2 つのα-helix 構造を形成する領域であった(Fig. 3, Fig. 24b, d, e)。また、LirC は、基質結合ループ領域とほぼ一致する領域であった(Fig. 3, Fig. 24c, d, e)。



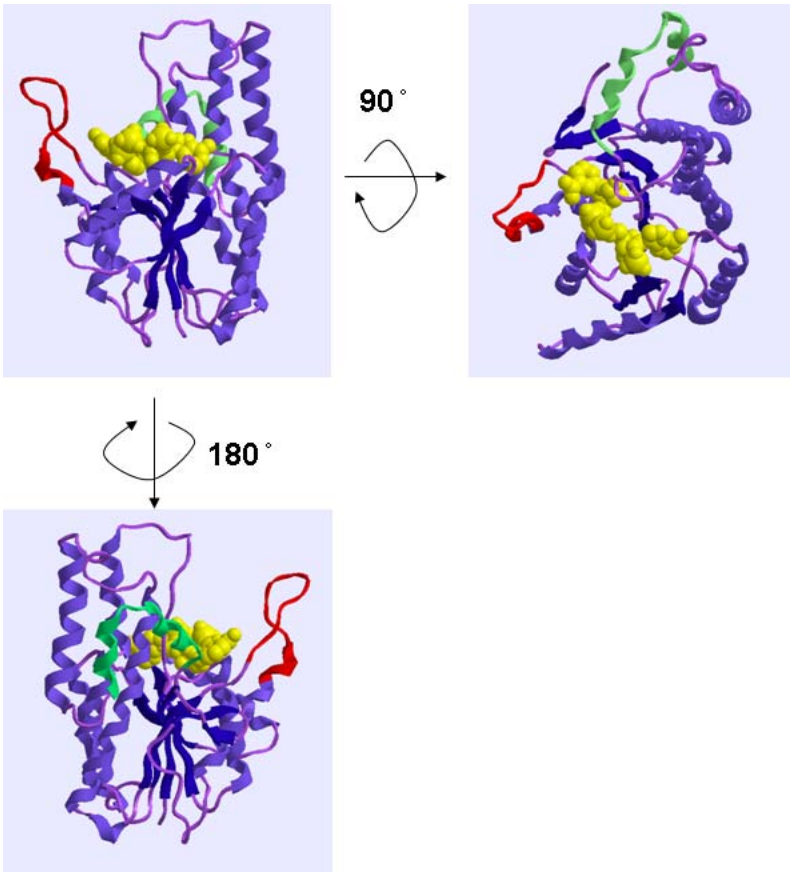
(b)

```
CBR1 140- SIMSVRALKSCSPELQQKFR -159
CBR3 140- SLQCLRAFENCSEDLQERFH -159
          *    *    **  **  *
```

(c)

```
CBR1 230- WVRTDMAGPKATKSP -244
CBR3 230- PVKTDMDGKDSIRTV -244
           * *** *
```

(d)



(e)

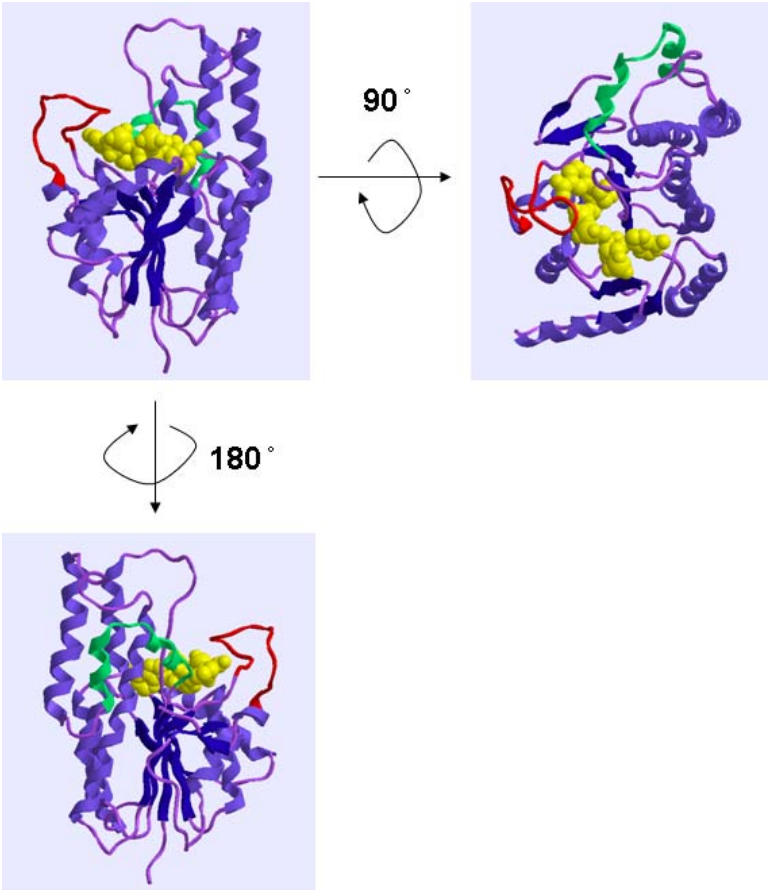


Fig. 24 Identification of the low-identical regions between hCBR3 and hCBR1 (a) Harr-plot analysis for hCBR3 and hCBR1 in their amino acid sequences revealed two low-identical regions between hCBR3 and hCBR1, LirN and LirC. Sequence alignments of LirN (b) and LirC (c) between hCBR3 and hCBR1 were shown, respectively. Structures of hCBR3 (d) and hCBR1 (e) are also shown (hCBR3, Protein Data Bank, 2HRB; hCBR1 Protein Data Bank, 1WMA). $NADP^+$, LirN and LirC are colored by yellow, green and red, respectively.

第二節　キメラ酵素蛋白質を用いた酵素化学的解析

本章前節にて同定された hCBR3 と hCBR1 の局所相同性の低い 2 つの領域は、触媒アミノ酸残基の近傍領域(LirN)と基質結合ループ領域(LirC)であり、どちらの領域も酵素機能に影響を与えうると推察された。これらの領域が、hCBR3 と hCBR1 の酵素機能にどのような影響を与えるのかを、それぞれの領域のキメラ酵素蛋白質を作製しそれらの酵素化学的性質を解析することにより検討した。

実験材料と方法

キメラ酵素蛋白質発現ベクターの構築：LirN および LirC に着目し各種キメラ酵素蛋白質の発現ベクターを構築した。その方法を以下に記載した。また、各種キメラ酵素蛋白質発現ベクターによって発現するキメラ酵素蛋白質を Fig. 25 に示した。

pET-hCBR3 をテンプレートに、以下のプライマーによる PCR を行い、hCBR3 の 1-117 アミノ酸残基に相当する DNA 断片を得た。この DNA 断片を、pET-hCBR1 の *Nde*I-*Kpn*I サイトへ挿入し pET-hCBR3/1 を得た。本ベクターにより発現される酵素蛋白質 hCBR3/1 は、hCBR3 の 1-117 アミノ酸残基と hCBR1 の 118-277 アミノ酸残基のキメラ蛋白質である。

hCBR3（太字下線部は制限酵素の認識部位）
hmhCBR1f03(*Nde*I): 5'- cg**c ata tg**t tcc gcg cgc cc-3'
mthCBR3r03(*Kpn*I): 5'- tcg **ggt acc** aaa aaa att tgt ctt cag tgt ca-3'

pET-hCBR1/3 の構築のために、pET-hCBR3 をテンプレートに、以下のプライマーによる PCR を行い、hCBR3 の 118-277 アミノ酸残基に相当する DNA 断片を得た。この DNA 断片を、pET-hCBR1 の *Kpn*I-*Eco*RI サイトへ挿入し、当該プラスミドを得た。本プラスミドにより発現される酵素蛋白質は、hCBR1 の 1-117 アミノ酸残基と hCBR3 の 118-277 アミノ酸残基のキメラ蛋白質である。

hCBR1（太字下線部は制限酵素の認識部位）
mthCBR3f03(*Kpn*I): 5'- ttt **ggt acc** aga aac atg tgc aac gag tta -3'
hmhCBR3r03(*Eco*RI): 5'- ac**g aat tc**a gga caa ggt aca aaa tgg ggc -3'

pET-hCBR1LirN3、pET-hCBR1LirC3、pET-hCBR3LirC1 の構築には、In-Fusion® PCR cloning kit (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA)を用いた。つまり、PCR で得た挿入領域の DNA 断片と、Inverted tail-to-tail PCR で得たプラスミド部分を含む酵素遺伝子を、In-Fusion®反応 [56]により連結した。これらの DNA 断片を得るために、以下のプライマーを用いた。

pET-hCBR1LirN3
Inverted tail-to-tail PCR (template, pET-hCBR1)
mthCBR1f12: 5'- agt gag acc atc act gag gag gag ctg -3'
mthCBR1r13: 5'- aga tac gtt cac cac tct ccc ttg ggg -3'
Inserted DNA fragment of chimeric region (template, pET-hCBR3)
mthCBR3f07: 5'- gtg gtg aac gta tct agt ttg cag tgt tta gg -3'
mthCBR3r07: 5'- agt gat ggt ctc act gtg gaa cct ttc ctg -3'

pET-hCBR1LirC3

Inverted tail-to-tail PCR (template, pET-hCBR1)

mthCBR1f05: 5'- acc ctg tgt act tgg ccc tt -3'

mthCBR1r06: 5'- gca gca agg cat tca gga gga tc -3'

Inserted DNA fragment of chimeric region (template, pET-hCBR3)

mthCBR3f05: 5'- ctg aat gcc tgc tgc cca gga cca gtg ccg -3'

mthCBR3r05: 5'- caa gta cac agg ggt ctc agc ccc ctg ctc -3'

pET-hCBR3LirC1

Inverted tail-to-tail PCR (template, pET-hCBR3)

mthCBR3f04: 5'- acc cct gtc tac ttg gcc ctc -3'

mthCBR3r04: 5'- gca gca cgc att cac cag aat c -3'

Inserted DNA fragment of chmeric region (template, pET-hCBR1)

mthCBR1f11: 5'- gtg aat gcg tgc tgc cca ggg tgg gtg aga -3'

mthCBRCBR1r12: 5'- caa gta gac agg ggt ctc tgc acc ttc ttc -3'

pET-hCBR1LirN3 により発現される酵素蛋白質は、hCBR1 のアミノ酸残基のうち LirN 領域のみ hCBR3 由来のキメラ酵素蛋白質、pET-hCBR1LirC3 により発現される酵素蛋白質は、hCBR1 のアミノ酸残基のうち LirC 領域のみ hCBR3 由来のキメラ酵素蛋白質、pET-hCBR3LirC1 により発現される酵素蛋白質は、hCBR3 のアミノ酸残基のうち LirC 領域のみ hCBR1 由来のキメラ酵素蛋白質をそれぞれ発現する。

pET-hCBR1LirNC3 は、pET-hCBR1LirN3 の *Nde*I/*Kpn*I 断片を、pET-hCBR1LirC3 の *Nde*I/*Kpn*I サイトへ挿入することにより構築された。本プラスミドにより発現される酵素蛋白質は、hCBR1 のアミノ酸残基のうち LirN 領域および LirC 領域のみ hCBR3 由来のキメラ酵素蛋白質である。

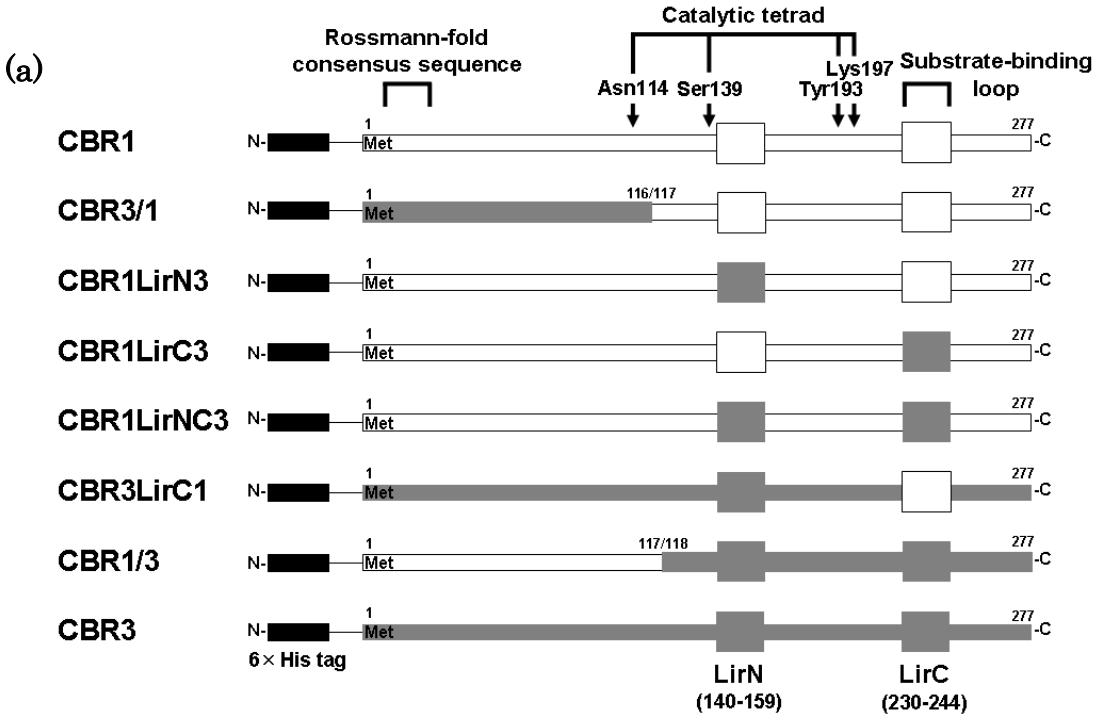
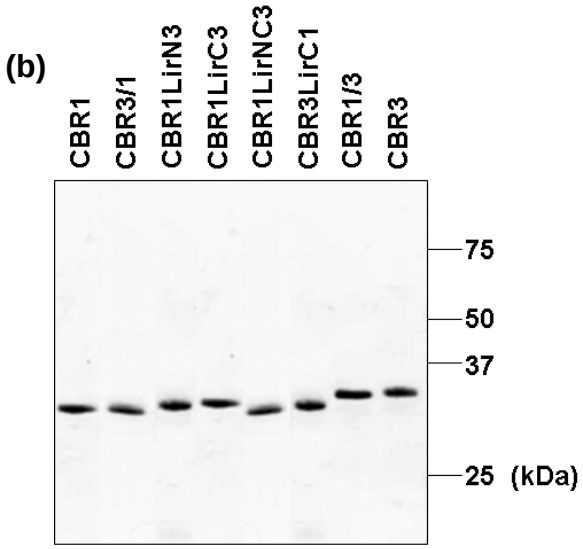


Fig. 25　The structures of chimeric enzymes

(a) The amino acid sequences of hCBR3 and hCBR1 were shown as gray-colored and opened boxes, respectively. Each protein was fused with 6×His tag at N terminus of the protein that is shown as a closed box. (b) Purified enzymes (each 1 μg) were electrophoresed on SDS-polyacrylamide gel, and stained by CBB. Lane 1, His-tagged CBR1; Lane 2, His-tagged CBR3/1; Lane 3, His-tagged CBR1LirN3; Lane 4, His-tagged CBR1LirC3; Lane 5, His-tagged CBR1LirNC3; Lane 6, His-tagged CBR3LirC1; Lane 7, His-tagged CBR1/3; Lane 8, His-tagged CBR3.



大腸菌による蛋白質発現と蛋白質精製：種々のキメラ酵素発現プラスミドについて、第一章第三節第一項の方法と同様に行なった。それぞれのキメラ酵素蛋白質は、SDS-PAGE の CBB 染色像において均一にまで精製された(Fig. 25b)。

カルボニル還元活性の測定：本章第四節第一項の方法と同様に、酵素反応液中の NADPH の 340 nm における吸収減少を指標に解析した。

結　果

テスト基質である menadione (Table 11)と 4-benzoylpyridine (Table 12)に対して、種々のキメラ酵素の酵素化学的性質について検討した。

いずれのキメラ酵素においても同一の基質に対する K_m 値に関して、ほぼ同様の値が得られた。しかし、k_{cat} 値や k_{cat}/K_m 値は、大きく 2 つの種類に分類された。

CBR1LirC3、CBR1LirNC3、CBR1/3 は、CBR3 と同様に限定的な酵素活性を示し、CBR3 様酵素であると判断された。これらのキメラ酵素はすべて、CBR3 に由来する LirC 領域を有していた。一方、CBR3/1、CBR1LirN3、CBR3LirC1 は CBR1 様の酵素化学的性質を示した。これらのキメラ酵素はすべて、CBR1 に由来する LirC 領域を保持していた。

以上より、hCBRs のテスト基質に対する酵素活性は LirC 領域、つまり、基質結合ループ領域のアミノ酸配列に依存していた。すなわち、hCBR3 と hCBR1 のカルボニル還元活性における数 100-1000 倍に至る触媒活性の差異は、主に基質結合ループ領域に依存していることが明らかになった。

Table 11　Kinetic constants of chimeric enzymes towards menadione

			menadione			
	LirN	LirC	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m (min^{-1}・μM^{-1})	each enzyme/CBR3 (k_{cat}/K_m)
CBR1	1	1	29 ± 2.1	440 ±10	24	2400
CBR3/1	1	1	49 ± 9.1	110 ± 13	2.2	370
CBR1LirN3	3	1	34 ± 6.8	41 ± 6.1	1.2	200
CBR1LirC3	1	3	49 ± 7.8	0.079 ± 0.0091	0.0016	0.27
CBR1LirNC3	3	3	42 ± 8.4	0.053 ± 0.0044	0.0013	0.22
CBR3LirC1	3	1	45 ± 15	120 ± 19	2.7	460
CBR1/3	3	3	65 ± 17	0.88 ± 0.13	0.014	2.4
CBR3	3	3	43 ± 12	0.24 ± 0.023	0.0045	1

Each value represents the mean obtained from three independent experiments. Enzyme activities are reported as mean ± S.D.

Table 12　Kinetic constants of chimeric enzymes towards 4-benzoylpyridine

			4-benzoylpyridine			
	LirN	LirC	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m (min^{-1}・μM^{-1})	each enzyme/CBR3 (k_{cat}/K_m)
CBR1	1	1	360 ± 18	400 ± 37	1.1	480
CBR3/1	1	1	400 ± 22	270 ± 22	0.68	300
CBR1LirN3	3	1	380 ± 69	140 ± 13	0.37	160
CBR1LirC3	1	3	470 ± 79	0.37 ± 0.033	0.00079	0.34
CBR1LirNC3	3	3	420 ± 88	0.20 ± 0.033	0.00048	0.21
CBR3LirC1	3	1	450 ± 78	97 ± 19	0.22	96
CBR1/3	3	3	360 ± 71	1.2 ± 0.14	0.0033	1.4
CBR3	3	3	300 ± 38	0.70 ± 0.037	0.0023	1

Each value represents the mean obtained from three independent experiments. Enzyme activities are reported as mean ± S.D.

第三節　キメラ酵素蛋白質を用いた補酵素結合解析

本章前節において LirC 領域、つまり、基質結合ループ領域が hCBR3 および hCBR1 の

それぞれの特徴を示す原因配列であることを明らかにした。hCBR3 および hCBR1 は、補酵素結合においても親和性が異なる。つまり、hCBR3 は hCBR1 に比べて NADPH に対して低親和性を示した(第一章第三節第三項)。本節では LirC 領域が、補酵素 NADPH への親和性に対してどのような影響を与えるのかについて解析した。

実験材料と方法

大腸菌による蛋白質発現と蛋白質精製：種々のキメラ酵素発現プラスミドについて、第一章第三節第一項の方法と同様に行なった。

酵素への補酵素結合の測定（解離定数の測定）：種々のキメラ酵素発現プラスミドについて、第一章第三節第三項の方法と同様に、蛍光消光法により行なった。

結　果

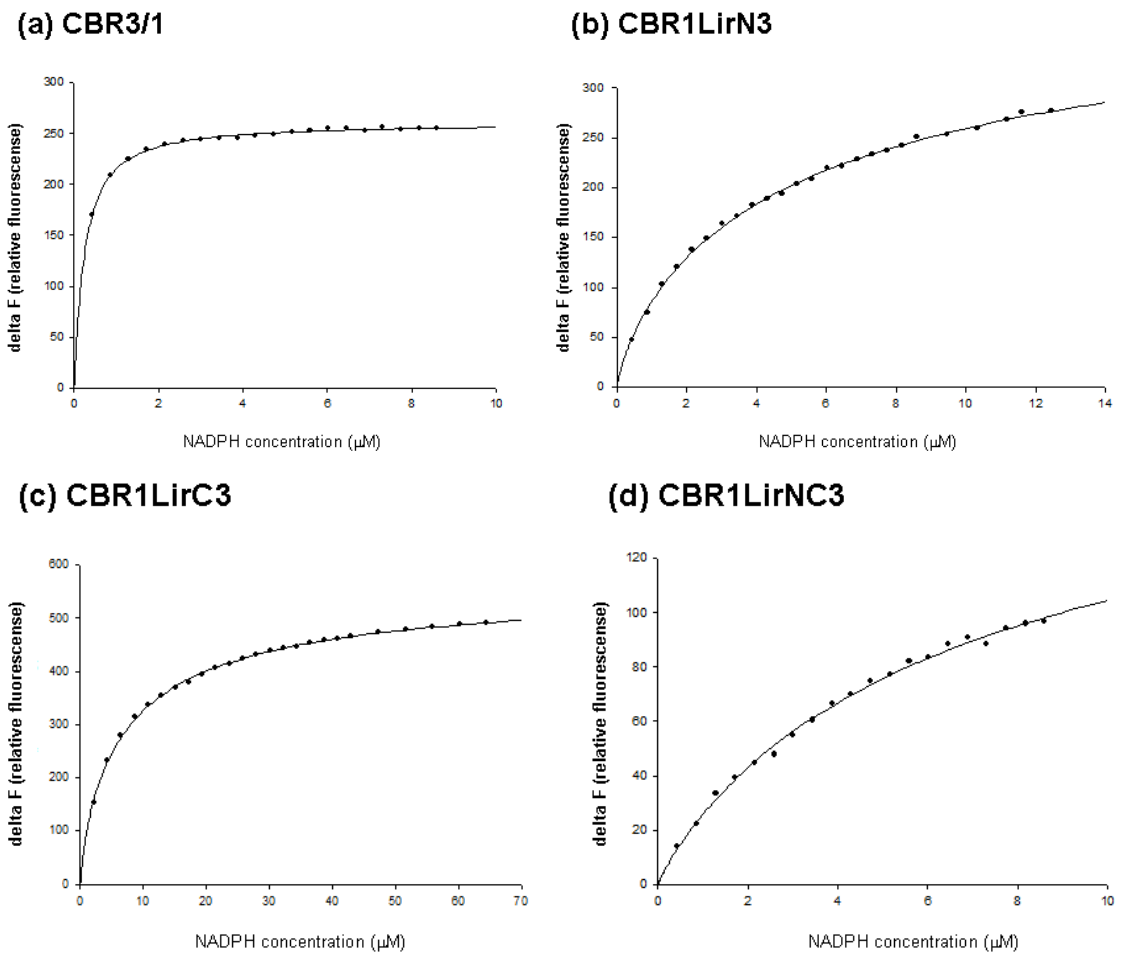
横軸に NADPH の添加量、縦軸に蛍光減弱量（deltaF)をプロットした結果を Fig. 26 に示した。NADPH の添加量に依存して消光反応が検出された。この曲線を Hill equation 式 (2) に非線形回帰した結果、Table 13 に示す K_d 値を得た。また、Hill equation 式 (3)により Hill plot を求めたところ、Fig. 27 のように極めて良好な直線性を示し、Hill equation への非線形回帰が妥当であると考えられた。

hCBR1 由来の LirC 領域を有する CBR3/1、CBR3LirC は、CBR1 の K_d 値と類似の K_d 値を示した。一方、CBR3 由来の LirC 領域を持つ CBR1/3、CBR1LirC3、CBR1LirNC3 は、明らかに hCBR1 の K_d 値に比べ大きく、hCBR3 と同様に NADPH への親和性が低いことが示された。以上より、LirC 領域は、カルボニル還元活性だけではなく補酵素への結合に関しても、CBR3 と CBR1 の性質の差異の原因となっていることを明らかにした。

Table 13 K_d values of chimeric enzymes towards NADPH

	LirN	LirC	NADPH K_d (μM)	each enzyme / CBR3
CBR1	1	1	1.2 ± 1.1	0.16
CBR3/1	1	1	0.21 ± 0.041	0.028
CBR1LirN3	3	1	2.7 ± 0.32	0.36
CBR1LirC3	1	3	7.1 ± 1.7	0.95
CBR1LirNC3	3	3	7.3 ± 1.5	0.97
CBR3LirC1	3	1	0.66 ± 0.10	0.0088
CBR1/3	3	3	21 ± 3.4	2.7
CBR3	3	3	7.5 ± 2.3	1

Each value represents the mean ± S.D. obtained from three independent experiments.



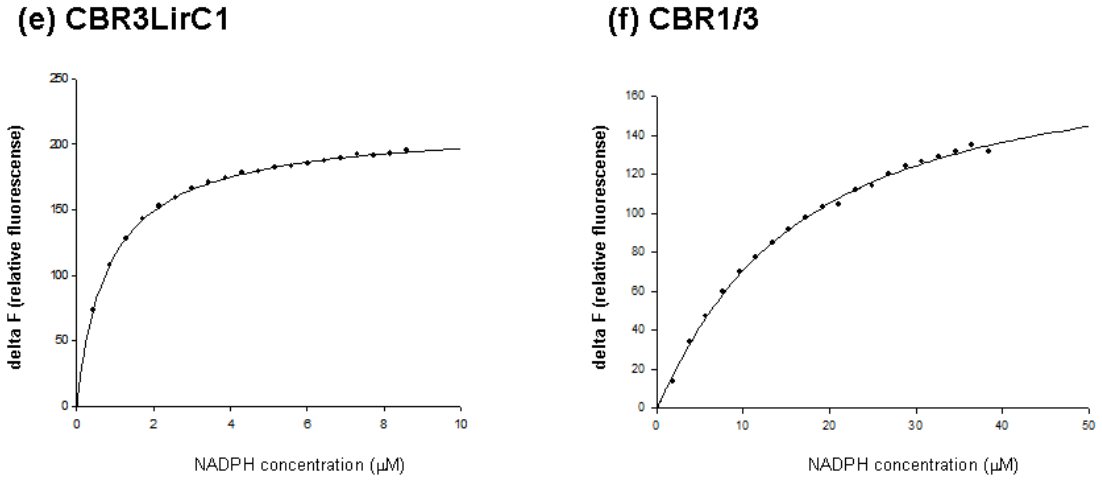
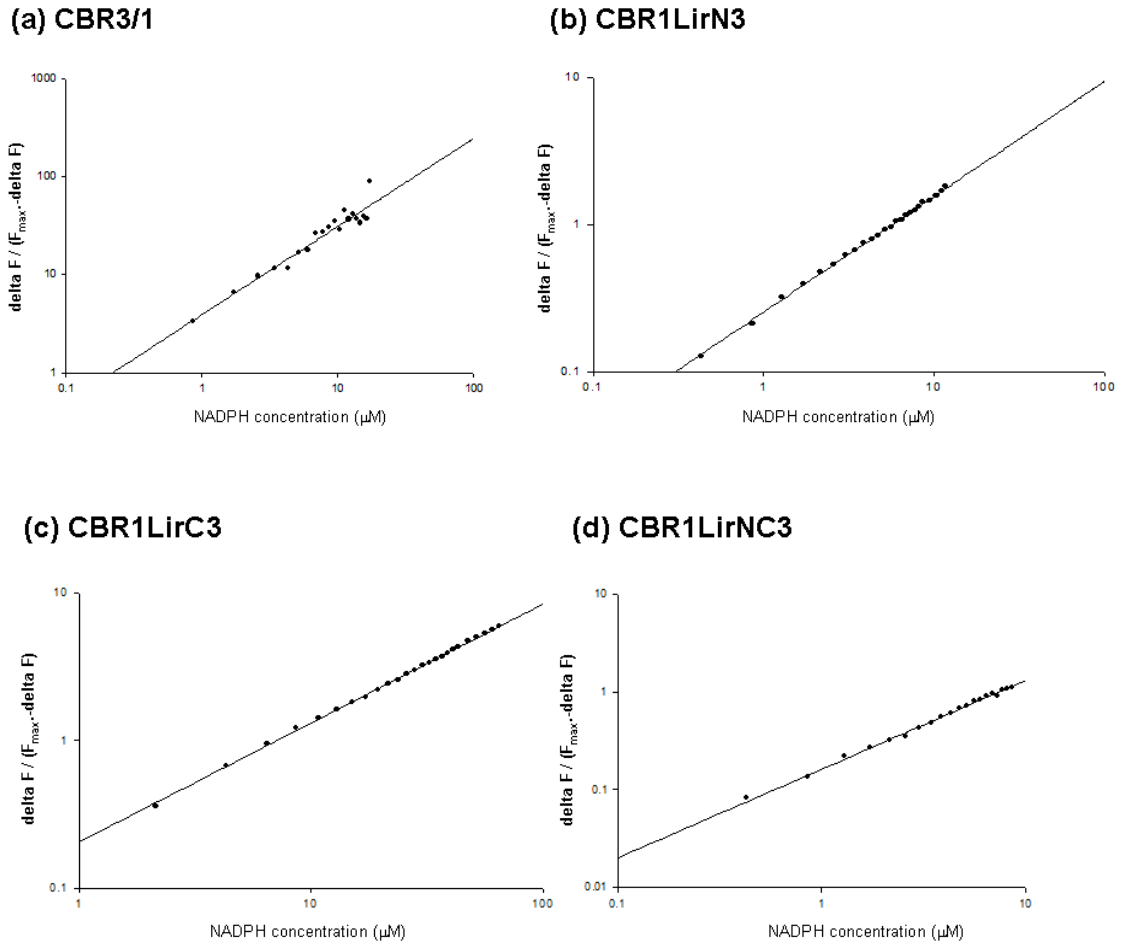


Fig. 26 The decreasing of the fluorescence of the protein excited at 290 nm Typical fitting curves are indicated. The decreases in relative fluorescence (ex. 290 nm/ em. 335 nm) of chimeric enzymes fitted to the curves of Hill equation. The results regarding hCBR3 and hCBR1 are shown in Fig. 15.



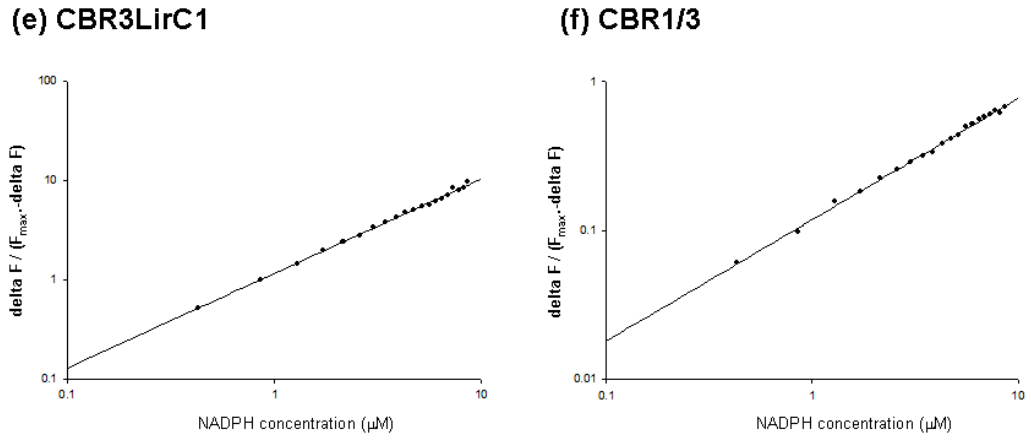


Fig. 27　Linearity of Hill plot The results of Fig. 26 was converted into Hill plot (equation (3)) in order to consider the degree of linear regression. The results regarding hCBR3 and hCBR1 are shown in Fig. 16.

第四節　各種阻害薬の阻害活性

本章前節までに、hCBR3 と hCBR1 の酵素化学的特性の差異の多くが、LirC 領域に由来するものであることを明らかにした。これは、本領域を標的とする阻害薬が CBR3 および CBR1 に対して阻害選択性を発揮しうることを示唆している。

本章で構築した各種酵素の一部は、LirC 領域を中心にキメラ化された酵素群であるため、LirC 領域に関与した CBRs の選択性を有した阻害薬のスクリーニングに有用なツールとなり得る。本節において、両酵素に対して選択性を有する阻害薬を見出すことを目的に、数種の阻害候補薬に関してスクリーニングを行った。

実験材料と方法

大腸菌による蛋白質発現と蛋白質精製：hCBR3、hCBR1、およびキメラ酵素発現プラスミドについて、第一章第三節第一項の方法と同様に行なった。

カルボニル還元活性の測定：本章第四節第一項の方法と同様に、250 μM の menadione を基質とした酵素反応液中の NADPH の 340 nm における吸収減少を指標に解析した。阻害薬は、100 mM ナトリウムリン酸緩衝液, pH7.4 もしくは DMSO に溶解した。DMSO に溶解した場合、酵素反応液に 5% (v/v)以下になるように加えた。DMSO 5% (v/v)存在下で、hCBRs の酵素活性に変化はなかった。

ドキソルビシンに対するカルボニル還元活性の測定、および、HPLC によるドキソルビシノ

ールの定量:第一章第五節の方法と同様にHPLCによるドキソルビシノールの検出を行った。定量されたドキソルビシノール量を指標に酵素反応速度を算出した。

結　果

それぞれの阻害薬の阻害活性を Table 14 に示した。阻害活性を検討した化合物は、Ipriflavone、Ibuprofen、Diclofenac 以外 hCBR1 を阻害することが明らかなものである。hCBR1 は、フラボノイド類により良く阻害されることが明らかにされている[19]。そのため、フラボノイド類の代表的なものとして、Quercetin や Rutin、Ipriflavone を検討した。Quercetin と Rutin は、食品中に含まれるフラボノイドであり、hCBR1 の活性を阻害することが知られている[19]。また Ipriflavone は、本邦において骨粗鬆症に適応を持つ薬剤オステン®として上市されている。Cibacron blue も hCBR1 を効率的に阻害する[5]。Ibuprofen や Diclofenac などの非ステロイド性抗炎症薬はシクロオキシゲナーゼを阻害することにより抗炎症作用を発揮するが、一方、CYP2C9 を阻害することにより他の薬物との薬物動態学的相互作用を引き起こすことが知られている[57]。また、Ethacrynic acid は、ループ利尿薬の一種であり本邦においてエデクリル®として上市されている。近位尿細管の Na^+-K^+-$2Cl^-$-ATPase の阻害活性を介して利尿作用を発揮するが[58]、Phase II 代謝酵素である GST (glutathione-S-transferase)をも阻害することが明らかにされている[59]。

これらの多くは、hCBR3 および hCBR1 に対して同程度の阻害活性を有していた(Table 14)。しかし、Ipriflavone は hCBR1 に対する阻害作用が少なく hCBR3 に対して高い阻害活性を示し、また、Ethacrynic acid は hCBR3 に対する阻害作用が少なく hCBR1 に対する阻害活性が高かった。すなわち、Ipriflavone は hCBR3 選択性が高く、Ethacrynic acid は hCBR1 選択性が高い阻害薬であることが明らかになった。さらに、Ipriflavone は、hCBR3 のみではなく hCBR1LirC3 をもよく阻害し、Ethacrynic acid は hCBR1 および hCBR3LirC1 に対して阻害活性を有すること(Table 14)から、これらの選択的阻害作用は、LirC 領域を介していると考えられた。

さらに Ipriflavone と Ethacrynic acid に関して、hCBR3 および hCBR1 のドキソルビシン代謝における阻害活性を検討したところ(Table 15)、テスト基質に対する阻害と同様に Ipriflavone は hCBR3 選択的に、Ethacrynic acid は hCBR1 選択的に代謝活性を阻害した。

Table 14 Inhibitory effect of compounds for hCBRs activities towards menadione

Inhibitor	Concentration	CBR3	CBR1LirC3	CBR3LirC1	CBR1
-		100	100	100	100
Quercetin	1 μM	61 ± 12	54 ± 6.9	26 ± 4.6	36 ± 5.8
Rutin	1 μM	52 ± 4.6	49 ± 8.4	21 ± 5.7	18 ± 3.9
Ipriflavone	1 μM	10 ± 2.4	12 ± 4.2	89 ± 8.4	93 ± 10
Cibacron blue	5 μM	51 ± 8.4	36 ± 5.7	22 ± 6.8	12 ± 5.2
Ibuprofen	100 μM	68 ± 6.1	75 ± 9.5	84 ± 11	94 ± 9.2
Diclofenac	100 μM	64 ± 5.8	69 ± 4.7	60 ± 9.4	69 ± 8.7
Ethacrynic acid	100 μM	97 ± 7.1	91 ± 6.4	19 ± 8.2	24 ± 6.1

Remaining activities of the enzymes with each inhibitor towards 250 μM menadione are shown as values relative to the enzymatic activities without inhibitors. Each value represents the mean ± S.D. obtained from three independent experiments.

Table 15 Inhibitory effect of compounds for hCBRs towards Doxorubicin

Inhibitor	Concentration	hCBR3	hCBR1
-		100	100
Ipriflavone	1 μM	18 ± 3.6	98 ± 5.7
Ethacrynic acid	100 μM	95 ± 3.4	23 ± 10

Remaining activities of the enzymes with each inhibitor towards 500 μM doxorubicin are shown as values relative to the enzymatic activities without inhibitors. Each value represents the mean ± S.D. obtained from three independent experiments.

第五節　小括

本章において、hCBR3 および hCBR1 のテスト基質に対する還元活性を指標に、それらの酵素化学的性質の差異を生み出す領域を検索し、以下の結果を得た。

(1) 両酵素の Harr plot 解析により、局所的に相同性が低い領域を見出した。その一つは触媒アミノ酸残基の近傍配列 (LirN)、もうひとつは基質結合ループ領域 (LirC)とほぼ合致した。

(2) これらの領域に注目し作成した各種キメラ酵素の酵素動力学的解析により、LirC 領域が hCBR3 と hCBR1 のそれぞれの酵素化学的性質に主に寄与していることを明らかにした。

(3) 阻害薬スクリーニングにより、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見出した。こららの阻害薬は、両酵素の LirC 領域を介して阻害活性を発揮していると考えられた。

多くの SDR 酵素はホモ多量体を形成し機能を発揮する。単量体酵素である hCBR1 において、多量体を形成する SDR 酵素には存在しないαEF1、αEF2、αEF3 の 3 つのα-helix 構造が存在し、hCBR3 もこれらの構造を有する(Fig. 3)。これらの構造は、SDR 酵素が多量体を形成する際に重要なαE とαF の近傍に存在し多量体形成を阻害する [60]。LirN 領域は、このうちαEF1、αEF2 と一致する領域であった(Fig. 3, 24b)。これらの領域は、構造的なかさ高さによって多量体形成を阻害すると考えられているため、それぞれのアミノ酸自体は機能的ではなく、分子進化においてアミノ酸置換が頻繁に起こったことにより両酵素において相同性が低かったと考えられる。

総　　括

CBR3 は SDR スーパーファミリーに属する酵素であり、CBR1 と高い相同性を示す。ヒト SDR スーパーファミリー 75 種類のうち、現在報告されているものだけで 24 種類の酵素が病態に関与していることが知られており、本酵素スーパーファミリーは臨床上重要な酵素ファミリーであると考えられている[1, 4]。CBR1 は、主に以下の点で臨床的重要性が認識されている。

(1) PGE_2 を $PGF_{2\alpha}$ へ変換する PG 9-keto reductase 活性を有しており、生体内において PGE_2 の代謝・不活性化を担う[5]。がん組織での CBR1 の発現量は、局所 PGE_2 濃度の変化による血管新生作用・細胞増殖作用の制御を介して、患者予後に影響を与える[12–15]。

(2) 広汎な抗がんスペクトルを有し臨床的にも繁用されているアントラサイクリン系抗がん薬のうち特にドキソルビシンを良く代謝する。アントラサイクリン系抗がん薬は、用量依存的に副作用として重篤な心不全を発症するが、その原因の一つが代謝産物ドキソルビシノールの蓄積によるものであると考えられている。この副作用を予防するために、hCBR1 の阻害薬の臨床的重要性が認識されている[8-11]。

1998 年、ゲノム DNA 上において hCBR1 遺伝子の近傍に hCBR1 と相同性の高い hCBR3 遺伝子が同定された[23]。SDR スーパーファミリーはアミノ酸配列レベルにおいて、それぞれの酵素の相同性が一般に 15-30%と低いにも関わらず、hCBR3 と hCBR1 は 71.8%と極めて高い相同性を示す。最近報告された SDR スーパーファミリー酵素遺伝子の名前の統一化において、hCBR3 は SDR21C2、hCBR1 は SDR21C1 と名付けられ、両酵素が SDR21C サブファミリーを形成しているとされた。

SDR スーパーファミリー内の相同性が高い他のサブファミリーに関して、SDR7C サブファミリーや SDR16C サブファミリーでは 32-72%程度の相同性を示し、極めて似た酵素化学的性質を示すことが知られている[24]。酵素は酵素反応によって生理的機能を発揮するため、相同性が高い酵素間では生理的機能に関しても類似であることが示唆される。以上より、hCBR3 は hCBR1 との高い相同性から、酵素化学的性質が類似である、臨床的重要性が高い酵素であると予想された。しかしながら本研究を開始した当初、hCBR3 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、hCBR3 の酵素機能解明のために、hCBR3 を hCBR1 との比較解析の中で酵素化学的特性を検討することとした。

細胞内局在性に関して、hCBR3 は hCBR1 と同様にサイトプラズムへの不均一なドット状の局在を示した。界面活性剤の含まれていない条件下において可溶性画分に検出されること(第一章第二節)、また hCBR1 に関してこれまでに臓器細胞質画分にのみ検出されていること

[5]から、細胞質において形成される何らかの蛋白質複合体やアンカー蛋白質との相互作用により、不均一な局在性を示していると考えられる。還元酵素は単体で機能を発揮することができるため、他の蛋白質との相互作用についてこれまで注目されて来なかったが、最近いくつかの SDR 酵素において蛋白質間相互作用が報告されている。TIP30 (30 kDa HIV-1 TAT-interacting protein)は、エストロゲン受容体の coactivator である CIA (Coactivator independent of AF-2 function)や、Importin β、p53 と相互作用することにより Tumor suppressor として機能すると考えられている [61-63]。また、生理的意義は不明だが Hydroxysteroid dehydrogenase like 1 (HSDL1) は、MK-STYX (Map kinase phosphatase-like protein)と直接的に相互作用する [64]。以上の報告は、SDR 酵素が種々の蛋白質と蛋白質間相互作用し、非触媒的な機能を発揮することを示唆している。hCBR3 および hCBR1 もこのような蛋白質間相互作用によりサイトプラズムにおけるドット状の局在を示していると考えている。

大腸菌に発現させた hCBR3 および hCBR1 を SDS-PAGE 上で単一にまで精製し、酵素化学的性質を検討した。補酵素との親和性について解離定数 K_d 値を測定した結果、両酵素とも NADH に比較して NADPH に対して高親和性を示した。また、補酵素の競合阻害実験 (Table 13)では $NADP^+$ と 2'-AMP 共存下で、NADPH による酵素活性が抑制されたことより、hCBR3 は NADPH 分子内の 2'位リン酸基との高親和性により NADPH を好むと考えられた。細胞内において NADPH および NAD^+ は 2 mM 程度の濃度で存在し、逆に $NADP^+$ および NADH は、その数%程度の割合で存在する [65]。Table 13 において、hCBR3 が 3 mM の NAD^+ 存在下においてすら NAD^+ による阻害を受けていないことより、細胞内においても hCBR3 は NAD^+ に阻害されず NADPH を補酵素とした酵素活性を発揮すると考えられた。

NADPH を補酵素として用いたテスト基質に対する酵素活性測定の結果、hCBR3 は hCBR1 に比べて限定的な酵素活性を示した。また、動物オルソログである rCBR3 および CHCR3 においても、hCBR3 に比べやや高いレベルの酵素活性であるものの、hCBR1 と比較すると酵素活性は限定的であった。CBR1 の rat、Chinese hamster オルソログに関して hCBR1 と同程度の酵素活性を有することが明らかにされていることを考えると [28, 66]、rCBR3 および CHCR3 も同動物種の CBR1 に比べてテスト基質に対する酵素活性は限定的であると判断された。そのため、テスト基質に対する酵素活性に関して、CBR3 が CBR1 に比べて酵素活性が低いのは、種を超えた性質であると考えられる。

一方、ドキソルビシンに対する酵素活性は hCBR3 と hCBR1 は同程度であった。また、rCBR3 および CHCR3 は hCBR3 に比べ k_{cat} 値や k_{cat}/K_m 値で 2.9－12 倍低いものの、有意な代謝能を有していた。臨床的にドキソルビシンは、投与プロトコルや併用薬、患者の状態などにより投与量を調整し、その幅は数 10－100 mg/day 程度である。ドキソルビシン 50 mg をヒトに単回注射した場合の血中濃度は、投与直後 1－10 μM 程度であり [67]、その後急速に血中から消失する。その急速な血中からの消失過程では、組織への分布が起こる。ヒト組織中のドキソルビシン濃度は明らかではないが、血中におけるドキソルビシンのうち 20－25%がアルブミンと結合しない遊離型として存在し組織移行に関与していることから、ドキソルビシンによる治療中におけるドキソルビシンの組織濃度は約 2－2.5 μM と見積もられた [68]。

つまり、CBR3 や CBR1 にとって K_m 値よりも極めて低濃度においてドキソルビシンが代謝されると考えられる。そのため、低濃度時の酵素活性の指標である k_{cat}/K_m 値が重要であると判断される。この値において、rCBR3 (Table 10, 0.014 min^{-1}・μM^{-1})および CHCR3 (Table 10, 0.012 min^{-1}・μM^{-1})は、hCBR3 (Table 7, 0.041 min^{-1}・μM^{-1})に比べてそれぞれ 2.9 倍、3.4 倍低い。Loveless ら [69]は、ドキソルビシンの代謝能について動物種由来肝臓細胞質画分での比較解析を行い、ラット肝臓のドキソルビシン代謝能がヒト肝臓のドキソルビシン代謝能に比べて数倍低いことを明らかにしている(human, 0.167×10^{-9} mol^{-1}・min^{-1}・mg protein; rat, 0.0496×10^{-9} mol^{-1}・min^{-1}・mg protein)。この傾向は CBR3 のドキソルビシンへの酵素活性と同様であり、ヒトおよびラット肝臓での CBR3 のドキソルビシン代謝への寄与が示唆される。

また、心臓における hCBR3 蛋白質発現量の推定からも、CBR3 の生体内ドキソルビシン代謝への寄与が示唆される。心臓において、hCBR3 の mRNA 発現量は hCBR1 の mRNA 発現量に比べて 32 倍以下の低さであると推定される (Fig. 5)。一方、肝臓におけるそれは 32 (2^5)倍以上と推定される。Kassner らも本論文と同様に mRNA 発現解析を行った結果、心臓において 5 倍程度、肝臓において 1000 倍程度 [6]、hCBR3 発現量が hCBR1 発現量に比べて低いことを示し、本論文の結果を支持する結論を得ている。一方、33 人のヒト肝臓試料を用いた蛋白質レベルでの絶対定量解析 [70]では、中央値 11.6 倍 (range, 2.46-59.5 倍)の差で hCBR3 蛋白質が hCBR1 蛋白質に比べ少なかったと報告されている。つまり、肝臓において hCBR3 と hCBR1 の mRNA レベルでの差は少なくとも 32 倍以上あるのに対して、蛋白質レベルでは 10 倍程度であった。mRNA と蛋白質での発現量差の違いの原因として、CBRs 蛋白質の細胞内半減期の違いが想定される。つまり、hCBR3 蛋白質が hCBR1 蛋白質の細胞内半減期よりも長いことにより、細胞内において hCBR3 蛋白質が蓄積されると考えられる。CBRs 蛋白質分解制御系が心臓と肝臓において類似ならば、心臓において hCBR3 蛋白質は hCBR1 蛋白質と同等化それ以上の発現量を示すものと推察され、hCBR3 のドキソルビシンによる心不全発症に対する hCBR3 の寄与は一定程度存在するものと考えられる。

最近、薬物動態学的検討や臨床的なアウトプットの解析により、ドキソルビシンによる薬物治療への hCBR3 の一塩基多型 (SNP, single nucleotide polymorphism)の関与が報告されてきている。101 人の東南アジア系乳がん患者を対象としたヒト臨床試験 [71]において、hCBR3 の C4Y (11G>A)の SNP を保持している患者は、①乳がん組織内での hCBR3 の mRNA 発現量が低い、②血中ドキソルビシノール AUC (area under the curve)が減少する、つまりドキソルビシン代謝能が低下している、③25%以上の乳がん組織の退縮が見られた患者数が多く、治療効果が高いことが報告されている。これらの結果から、11G>A により hCBR3 の発現量が低下しドキソルビシンに対する代謝活性が減少し、代謝物であるドキソルビシノールの産生が減少したと考えられる。さらに、小児白血病をアントラサイクリン系抗がん剤で治療し心不全を発症した患者 30 人を対象としたヒト臨床試験 [72]では、CBR3 の V244M (730G>A) の SNP を保持している患者は、ドキソルビシノールの心臓組織内蓄積によると考えられる心不全を起こすリスクが 5–8 倍高く、また、CBR3 V244M のドキソルビシンからドキソルビシノールへの代謝活性が野生型 CBR3 に比べ 2.6 倍高いことも報告されてきている。以上より、

hCBR3 の酵素活性がヒト生体内ドキソルビシン代謝および副作用発現に寄与していることを強く示唆し、本研究で示した hCBR3 の *in vitro* での強いドキソルビシン代謝能を支持するものである。

ドキソルビシン誘発性心不全を予防するための方法として、ドキソルビシンからドキソルビシノールへの代謝を阻害することが有用であることが示唆されている[9, 53]。CBR1 はドキソルビシンの代謝阻害を目指す際の標的分子候補として考えられている[9, 19]。しかしながら、本研究による hCBR3 のドキソルビシン代謝能や上述のヒト臨床試験の結果を考えると、hCBR3 もドキソルビシン代謝阻害の標的酵素として考える必要があった。hCBR3 と hCBR1 は、PGs 代謝に関して大きな違いが存在する。hCBR1 は、PGE_2 を $PGF_{2\alpha}$ へ代謝・不活性化させることができるが、一方、hCBR3 にはその活性は検出されなかった (Table 6)。CBR1 は PGE_2 代謝を介してがん組織における細胞増殖や血管新生に影響を与え、がんの進展を抑制する[12-15]。PGE_2 はがん進展促進作用を有し、また、消化器、循環器、生殖器など様々な臓器へ影響を与えるため、ドキソルビシンからドキソルビシノールへの代謝を抑制することを考える時、hCBR1 阻害薬は PGE_2 の蓄積を介した発がん・転移リスクの上昇を始めとした広汎な副作用リスクがあると予想される。一方、hCBR3 選択的阻害薬は、hCBR3 に PGs 代謝能を見いだせないため、その問題を回避しドキソルビシン誘発性心不全に対して予防効果を発揮することができると考えられる。そこで次に、hCBR3 と hCBR1 のテスト基質への還元活性の明確な差を指標に、それぞれの選択的阻害物質を見出すことを目的に、hCBR3 と hCBR1 の酵素化学的な差異を生み出す領域の同定を試みた。

アミノ酸相同性解析である Harr plot 解析よりアミノ酸配列相同性が低い 2 つの局所領域 (LirN, LirC)を見出した。その部位に注目し構築したキメラ酵素の酵素化学的解析の結果、基質結合ループ領域にほぼ一致する LirC 領域が、それぞれの酵素の差異を生み出す大きな要素であることを明らかにした。また、阻害薬スクリーニングにより Ipriflavone を hCBR3 に選択的な阻害薬として見出し、キメラ酵素を用いた阻害実験によりこの阻害が LirC 領域を介したものであることを強く示唆した。Ipriflavone は既に上市され多くの投与歴をもつ薬剤であるため、ヒトへの安全性が担保されている[73]。今後、ドキソルビシンを投与されている患者における Ipriflavone をはじめとする hCBR3 選択的阻害薬の副作用発現抑制効果が検討されることが望まれる。また、本研究で構築した各種キメラ酵素群は、hCBR3 および hCBR1 の選択的阻害を検討する際に、簡便に標的アミノ酸配列を同定しうるツールとして使用することができた。hCBR3 に関する検討から、ドキソルビシンによる心不全の予防に役立つ薬剤の開発がさらに進むことが期待される。

結　　論

SDR スーパーファミリーに属する、CBR1 に高度な相同性を示す新規還元酵素 CBR3 の酵素化学的解析を行い、以下の結論を得た。

(1) hCBR3 は hCBR1 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 hCBR3 は hCBR1 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。

(2) hCBR3 は、hCBR1 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 hCBR3 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。

(4) hCBR3 と hCBR1 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。さらに、両酵素の LirC 領域を標的とした選択的阻害活性を有する化合物を見出した。

以上より、CBR3 をドキソルビシン誘発性心不全に対する予防薬開発における新規標的分子として同定した。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。

謝　　辞

本研究を進めるにあたり終始あたたかいご指導を賜りました大阪大谷大学薬学部教授、寺田知行先生、大阪大谷大学薬学部准教授、西中徹先生に心から感謝申し上げます。

また、本稿をまとめるにあたり、終始御懇切なるご指導・叱咤激励を賜りました大阪大学大学院薬学研究科教授、水口裕之先生に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究における議論にあたって、貴重なご指導・ご校閲を賜りました大阪大学大学院薬学研究科教授、宇野公之先生、辻川和丈先生、藤尾慈先生に深く感謝申し上げます。

参考文献

1) B. Persson, Y. Kallberg, Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenase/reductases (SDRs), Chem. Biol. Interact. 202 (2013) 111-115.
2) F. Hoffmann, E. Maser, Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily, Drug Metab. Rev. 39 (2007) 87-144.
3) J.E. Bray, B.D. Marsden, U. Oppermann, The human short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily: A bioinformatics summary, Chem. Biol. Interact. 178 (2009) 99-109.
4) Y. Kallberg, U. Oppermann, H. Jörnvall, B. Persson, Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). Coenzyme-based functional assignments in completed genomes, Eur. J. Biochem. 269 (2002) 4409-4417.
5) B. Wermuth, Purification and properties of an NADPH-dependent carbonyl reductase from human brain. Relationship to prostaglandin 9-ketoreductase and xenobiotic ketone reductase, J. Biol. Chem. 256 (1981) 1206-1213.
6) N. Kassner, K. Huse, H.J. Martin, U. Gödtel-Armbrust, A. Metzger, I. Meineke, J. Brockmöller, K. Klein, U.M. Zanger, E. Maser, L. Wonjnowski, Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver, Drug Metab. Disp. 36 (2008) 2113–2120.
7) G.L. Forrest, S. Akman, J. Doroshow, H. Rivera, W.D. Kaplan, Genomic sequence and expression of a cloned human carbonyl reductase gene with daunorubicin reductase activity, Mol. Pharmacol. 40 (1991) 502–507.
8) M.M. Freeland, J. Angulo, A.L. Davis, A.M. Flook, B.L. Garcia, N.A. King, S.K. Mangibin, K.M. Paul, M.E. Prosser, N. Sata, J.L. Bentley, L.E. Olson, Sex differences in improved efficacy of doxorubicin chemotherapy in Cbr1+/- mice, Anticancer Drugs 23 (2012) 584–589.
9) V. Gonzalez-Covarrubias, J.L. Kalabus, J.G. Blanco, Inhibition of polymorphic human carbonyl reductase 1 (CBR1) by the cardioprotectant flavonoid 7-monohydroxyethyl rutoside (monoHER), Pharm. Res. 25 (2008) 1730–1734.
10) L.E. Olson, D. Bedja, S.J. Alvey, A.J. Cardounel, K.L. Gabrielson, R.H. Reeves, Protection from doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice with a null allele of carbonyl reductase 1, Cancer Res. 63 (2003) 6602–6606.
11) G.L. Forrest, B. Gonzalez, W. Tseng, X. Li, J. Mann, Human carbonyl reductase overexpression in the heart advances the development of doxorubicin-induced cardiotoxicity in transgenic mice, Cancer Res. 60 (2000) 5158–5164.

12) Y. Yokoyama, B. Xin, T. Shigeto, M. Umemoto, a. Kasai-Sakamoto, M. Futagami, S. Tsuchida, F. Al-Mulla, and H. Mizunuma, Clofibric acid, a peroxisome proliferator-activated receptor ligand, inhibits growth of human ovarian cancer, Mol. Cancer Ther. 6 (2007) 1379–1386.
13) E. Ismail, F. Al-Mulla, S. Tsuchida, K. Suto, P. Motley, P.R. Harrison, G.D. Birnie, Carbonyl reductase: a novel metastasis-modulating function, Cancer Res. 60 (2000) 1173-1176.
14) M. Umemoto, Y. Yokoyama, S. Sato, S. Tsuchida, F. Al-Mulla, Y. Saito, Carbonyl reductase as a significant predictor of survival and lymph node metastasis in epithelial ovarian cancer, Br. J. Cancer, 85 (2001) 1032-1036.
15) K. Takenaka, E. Ogawa, H. Oyanagi, H. Wada, F. Tanaka, Carbonyl reductase expression and its clinical significance in non-small-cell lung cancer, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 14 (2005) 1972-1975.
16) B.J. Cusack, S.P. Young, J. Driskell, R.D. Olson, Doxorubicin and doxorubicinol pharmacokinetics and tissue concentrations following bolus injection and continuous infusion of doxorubicin in the rabbit, Cancer Chemother. Pharmacol. 21 (1993) 53-58.
17) H.A. Gambliel, B.E. Burke, B.J. Cusack, G.M. Walsh, Y.L. Zhang, P.S. Mushilin, R.D. Olson, Doxorubicin and C-13 deoxydoxorubicin effects on ryanodine receptor gene expression, Biochem. Biophys. Res. Commun, 291 (2002) 433-438.
18) R.J. Boucek Jr., R.D. Olson, D.E. Brenner, E.M. Ogunbunmi, M. Inui, S. Fleischer, The major metabolite of doxorubicin is a potent inhibitor of membrane-associated ion pumps. A correlative study of cardiac muscle with isolated membrane fractions, J. Biol. Chem. 262 (1987) 15851-15856.
19) M. Carlquist, T. Frejd, M.F. Gorwa-Grauslund, Flavonoids as inhibitors of human carbonyl reductase 1, Chem. Biol. Interact. 174 (2008) 98-108.
20) M. Gavelová, J. Hladíková, L. Vildová, R. Novotná, J. Vondrácek, P. Krcmár, M. Machala, L. Skálová, Reduction of doxorubicin and oracin and induction of carbonyl reductase in human breast carcinoma MCF-7 cells, Chem. Biol. Interact. 176 (2008) 9-18.
21) M. Plebuch, M. Soldan, C. Hungerer, L. Koch, E. Maser, Increased resistance of tumor cells to daunorubicin after transfection of cDNAs coding for anthracyclin inactivating enzymes, Cancer Lett. 255 (2007) 49-56.
22) B. Gonzalez, S. Akman, J. Doroshow, H. Rivera, W.D. Kaplan, G.L. Forrest, Protection against daunorubicin cytotoxicity by expression of a cloned human carbonyl reductase, Cancer Res. 55 (1995) 4646-4650.
23) K. Watanabe, C. Sugawara, A. Ono, Y. Fukuzumi, S. Itakura, M. Yamazaki, H. Tashiro, K. Osoegawa, E. Soeda, T. Nomura, Mapping of a novel human carbonyl reductase, CBR3, and ribosomal pseudogenes to human chromosome 21q22.2, Genomics, 52 (1998) 95-100.
24) X. ParéS, J. Farrés, N. Kedishvili, G. Duester, Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism, Cell Mol. Life Sci. 65 (2008)

3963-3949.
25) M. Tanaka, R. Bateman, D. Rauh, E. Vaisberg, S. Ramachandani, C. Zhang, K.C. Hansen, A.L. Burlingame, J.K. Trautman, K.M. Shokat, C.L. Adams, An unbiased cell morphology-based screen for new, biologically active small molecules, PLoS Biol. 3 (2005) e128.
26) E.S. Pilka, F.H. Niesen, W.H. Lee, Y. El-Hawari, J.E. Dunford, G. Kochan, V. Wsol, H.J. Martin, E. Maser, U. Oppermann, Structural basis for substrate specificity in human monomeric carbonyl reductases, PLoS One 4 (2009) e7113.
27) M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254.
28) N. Iwata, N. Inazu, S. Takeo, T. Satoh, Carbonyl reductases from rat testis and cas deferens. Purification, properties and localization, Eur. J. Biochem. 193 (1990) 75-81.
29) J.A. Reynolds, C. Tanford, The gross conformation of protein-dosium dodecyl sulfate complexes, J. Biol. Chem. 245 (1970) 5161-5165.
30) A. Shirai, A. Matsuyama, Y. Yashiroda, A. Hashimoto, Y. Kawamura, R. Arai, Y. Komatsu, S. Horinouchi, M. Yoshida, Global analysis of gel mobility of proteins and its use in target identification, J. Biol. Chem. 283 (2008) 10745-10752.
31) J. Kyte, R.F. Doolittle, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, J. Mol. Biol. 157 (1982) 105-132.
32) N.C. Robinson, C. Tanford, The binding of deoxycholate, Triton X-100, sodium dodecyl sulfate, and phosphatidylcholine vesicles to cytochrome b5, Biochemistry 14 (1975) 369-378.
33) D. Shcharbin, M. Janicka, M. Wasiak, B. Palecz, M. Przybyszewska, M. Zaborski, M. Bryszewska, Serum albumins have five sites for binding of cationic dendrimers, Biochim. Biophys. Acta. 1774 (2007) 946-951.
34) K. Kristan, D. Deluca, J. Adamski, J. Stojan, T.L. Rizner, Dimerization and enzymatic activity of fungal 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase from the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily, BMC Biochem. 16 (2005) 28.
35) S. Ueda, M. Oda, S. Imamura, M. Ohnishi, Transient-phase kinetic studies on the nucleotide binding to 3alpha-hydrosteroid dehydrogenase from Pseudomonas sp. B-0831 using fluorescence stopped-flow procedures, Eur. J. Biochem. 271 (2004) 1774-1780.
36) K.M. Bohren, J.P. von Wartburg, B. Wermuth, Kinetics of carbonyl reductase from human brain, Biochem. J. 244 (1987) 165-171.
37) P.L. Luisi, R. Favilla, Tryptophan fluorescence quenching in horse liver alcohol dehydrogenase, Eur. J. Biochem. 17 (1970) 91-94.
38) R. Evers, N.H.P. Cnubben, J. Wijnholds, L.V. Deemter, P.J.V. Bladeren, P. Borst, Transport of glutathione prostaglandin A conjugates by the multidrug resistance protein 1, FEBS Lett. 419 (1997) 112-116.
39) N. Iwata, I. Inazu, T. Satoh, The purification and properties of NADPH-dependent carbonyl

reductases from rat ovary, J. Biochem. 105 (1989) 556-564.
40) N. Inazu, B. Ruepp, H. Wirth, B. Wermuth, Carbonyl reductase from human testis: purification and comparison with carbonyl reductase from human brain and rat testis, Biochim. Biophys. Acta 1116 (1992) 50-56.
41) L.M. Cagen, J.J. Pisano, The glutathione conjugate of prostaglandin A1 is a better substrate than prostaglandin E for partially purified avian prostaglandin E 9-ketoreductase, Biochim. Biophys. Acta. 573 (1979) 547-551.
42) B.S. Toft, H.S. Hansen, Metabolism of prostaglandin E1 and of glutathione conjugate of prostaglandin A1 (GSH-prostaglandin A1) by prostaglandin 9-ketoreductase from rabbit kidney, Biochim. Biophys. Acta. 574 (1979) 33-38.
43) R.H. Takahashi, O.S. Bains, T.A. Pfeifer, T.A. Grigliatti, R.E. Reid, K.W. Riggs, Aldo-keto reductase 1C2 fails to metabolize doxorubicin and daunorubicin in vitro, Drug Metab. Dispos. 36 (2008) 991-994.
44) O.S. Bains, R.H. Takahashi, T.A. Pfeifer, T.A. Grigliatti, R.E. Reid, K.W. Riggs, Two allelic variants of aldo-keto reductase 1A1 exhibit reduced in vitro metabolism of daunorubicin, Drug Metab. Dispos. 36 (2008) 904-910.
45) R. Novotna, V. Wsol, G. Xiong, E. Maser, Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3, Toxicol. Lett. 181 (2008) 1-6.
46) L. Zhong, H. Shen, C. Huang, H. Jing, D. Cao, AKR1B10 induces cell resistance to daunorubicin and idarubicin by reducing C13 ketonic group, Toxicol. Appl. Pharmacol. 255 (2011) 40-47.
47) O.S. Bains, M.J. Karkling, T.A. Grigliatti, R.E. Reid, K.W. Riggs, Two nonsynonymous single nucleotide polymorphisms of human carbonyl reductase 1 demonstrate reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin, Drug Metab. Dispos. 37 (2009) 1107-1114.
48) A. Slupe, B. Williams, C. Larson, L.M. Lee, T. Primbs, A.J. Bruesch, C. Bjorklund, D.L. Warner, J. Peloguin, S.E. Shadle, H.A. Gambliel, B.J. Cusack, R.D. Olson, H.A. Charlier Jr., Reduction of 13-deoxydoxorubicin and daunorubicinol anthraquinones by human carbonyl reductase, Cardiovasc. Toxicol. 5 (2005) 365-376.
49) Y.L. Lu, Y.Q. He, M. Wang, L. Zhang, L. Yang, Z.T. Wang, G. Ji, Characterization of nuciferine metabolism by P450 enzymes and uridine diphosphate glucuronosyltransferases in liver microsomes from humans and animals, Acta. Pharmacol. Sin. 31 (2010) 1635-1642.
50) R. Shinkyo, T. Sakai, M. Ohta, K. Inouye, Metabolic pathways of dioxin by CYP1A1: species difference between rat and human CYP1A subfamily in the metabolism of dioxins, 409 (2003) 180-187.
51) T. Terada, Y. Sugihara, K. Nakamura, R. Sato, S. Sakuma, Y. Fujimoto, T. Fujita, N. Inazu, M. Maeda, Characterization of multiple Chinese hamster carbonyl reductases, Chem. Biol. Interact. 130-132 (2001) 847-861.
52) T. Terada, Y. Sugihara, K. Nakamura, H. Mizobuchi, M. Maeda, Further characterization of

Chinese hamster carbonyl reductases (CHCRs), Chem. Biol. Interact. 143-144 (2003) 373-381.
53) W. Huang, L. Ding, Q. Huang, H. Hu, S. Liu, X. Yang, X. Hu, Y. Dang, S. Shen, J. Li, X. Ji, S. Jiang, J.O. Liu, L. Yu, Carbonyl reductase 1 as a novel target of (-)-epigallocatechin gallate against hepatocellular carcinoma, Hepatology 52 (2010) 703-714.
54) R. Harr, P. Hagblom, P. Gustafsson, Two-dimensional graphic analysis of DNA sequence homologies, Nucleic Acids Res. 10 (1982) 365-374.
55) R. Staden, An interactive graphics program for comparing and aligning nucleic acid and amino acid sequences, Nucleic Acids Res. 10 (1982) 2951-2961.
56) B. Zhu, G. Cai, E.O. Hall, G.J. Freeman, In-Fusion™ assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations, Biotechniques 43 (2007) 354-359.
57) H. Takahashi, T. Kashima, S. Kimura, N. Murata, T. Takaba, K. Iwade, T. Abe, H. Tainaka, T. Yasumori, H. Echizen, Pharmacokinetic interaction between warfarin and a uricosuric agent, bucolome: application of In vitro approaches to predicting In vivo reduction of (S)-warfarin clearance, Drug. Metab. Dispos. 27 (1999) 1179-1186.
58) J.R. Del Castillo, G. Whittembury, Na^+, K^+ and Cl^- transport in isolated smal intestinal cells from guinea pig. Evidences for the existence of a second Na^+ pump, Biochim. Biophys. Acta. 901 (1987) 209-216.
59) J.C. Somberg, J. Molnar, The pleiotropic effects of ethacrynic acid, Am. J. Ther. 16 (2009) 102-104.
60) D. Ghosh, M. Sawicki, V. Pletnev, M. Erman, S. Ohno, S. Nakajin, W.L. Duax, Porcine carbonyl reductase. Structural basis for a functional monomer in short chain dehydrogenases/reductases, J. Biol. Chem. 276 (2001) 18457-18463.
61) C. Jiang, M. Ito, V. Piening, K. Bruck, R.G. Roeder, H. Xiao, TIP30 interacts with an estrogen receptor alpha-interacting coactivator CIA and regulates c-myc transcription, J. Biol. Chem. 279 (2004) 27781-27789.
62) S.H. Lee, S.K. Ju, T.Y. Lee, S.H. Huh, K.H. Han, TIP30 directly binds p53 tumor suppressor protein in vitro, Mol. Cells 34 (2012) 495-500.
63) F.W. King, E. Shtivelman, Inhibition of nuclear import by the proapoptotic protein CC3, Mol. Cell. Biol. 24 (2004) 7091-7101.
64) M. Meier, J. Tokarz, F. Haller, R. Mindnich, J. Adamski, Human and zebrafish hydroxysteroid dehydrogenase like 1 (HSDL1) proteins are inactive enzymes but conserved among species, Chem. Biol. Interact. 178 (2009) 197-205.
65) L. Tong, S. Lee, J.M. Denu, Hydrolase regulates NAD^+ metabolites and modulates cellular redox, J. Biol. Chem. 284 (2009) 11256-11266.
66) T. Terada, Y. Sugihara, K. Nakamura, R. Sato, N. Inazu, M. Maeda, Cloning and bacterial expression of monomeric short-chain dehydrogenase/reductase (carbonyl reductase) from CHO-K1 cells, Eur. J. Biochem. 267 (2000) 6849-6857.

67) K. Mross, P. Maessen, W.J. van der Vijgh, H. Gall, E. Boven, H.M. Pinedo, Pharmacokinetics and metabolism of epidoxorubicin and doxorubicin in humans, J. Clin. Oncol. 6 (1988) 517-526.
68) R.F. Greene, J.M. Collins, J.F. Jenkins, J.L. Speyer, C.E. Myers, Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol: Implications for the design of in vitro experiments and treatment protocols, Cancer Res. 43 (1983) 3417-3421.
69) H. Loveless, E. Arena, R.L. Felsted, N.R. Bachur, Comparative mammalian metabolism of adriamycin and daunorubicin, Cancer Res. 38 (1978) 593-598.
70) J. Cao, V. Gonzalez-Convarrubias, R.M. Straubinger, H. Wang, X. Duan, H. Yu, J. Qu, J.G. Blanco, A rapid, reproducible, on-the-fly orthogonal array optimization method for targeted protein quantification by LC/MS and its application for accurate and sensitive quantification of carbonyl reductases in human liver, Anal. Chem. 82 (2010) 2680-2689.
71) L. Fan, B.C. Goh, C.I. Sukri, S.E. Lim, S.H. Tan, J.Y. Guo, R. Lim, H.L. Yap, Y.M. Khoo, P.Iau, H.S. Lee, S.C. Lee, Genotype of human carbonyl reductase CBR3 correlates with doxorubicin disposition and toxocity, Pharmacogenet. Genomics 18 (2008) 621-631.
72) J.G. Blanco, W.M. Leisenring, V.M. Gonzalez-Convarrubias, T.I. Kawashima, S.M. Davies, M.V. Relling, L.L. Ronbinson, C.A. Sklar, M. Stovall, S. Bhatia, Genetic polymorphisms in the carbonyl reductase 3 gene CBR3 and the NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene NQO1 in patients who developed anthracycline-related congestive heart failure after childhood cancer, Cancer 112 (2008) 2789-2795.
73) K.A. Head, Ipriflavone: an important bone-building isoflavone, Altern. Med. Rev. 4 (1999) 10-22.