

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

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

目 次

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
lacl	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
PGA1-GS	glutathione-conjugated PGA1
PGE ₂	prostaglandin E ₂
pl	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.

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

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 PGE₂(プロスタグランジン E₂)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 PGE2 制御

PGE₂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、PGE₂ 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 PGE₂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 PGE2の代 謝・不活性化が減少し、がん組織部位における局所の PGE2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、PGE2 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⁶⁰。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, 160}。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。

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

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。

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	-

Table 1 Identity between CBR3 and CBR1 in humans and rodents

(%)

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 ^{25,260}、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

<u>hCBR3 と hCBR1 の全長クローニング</u>: 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 <u>cat atg</u> ccc cgc gct cc -3' hmhCBR3r02(*Eco*RI): 5'- ta<u>g aat tc</u>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<u>c ata tg</u>t tcc gcg cgc cc -3' hmhCBR1r02(*Eco*RI): 5'- ac<u>g aat tc</u>a gga caa ggt aca aaa tgg ggc -3'

<u>半定量 PCR 法</u>: 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
- 64°C 30 秒: annealing

72°C 30 秒: extension

72°C 7分: additional extension

結果

PCR サイクル

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

<u>プラスミド構築</u>: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 <u>aag ctt</u> 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<u>a agc tt</u>t tcc gcg cgc c-3' hmhCBR1r02(*Eco*RI): 本章第一節に前述。

<u>細胞培養</u>:ヒト胎生腎臓由来 HEK293 細胞は、10% (v/v) FCS (Fetal calf serum)、0.12% (w/v) NaHCO₃、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% CO₂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 Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄)で洗浄後、1 mL の 0.25% (w/v)トリプシンを加え 5% CO₂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 5×10⁴ 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 1×10⁴ 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。

<u>SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)とウエスタンブロ</u>

<u>ッティング</u>: SDS-PAGE のために、厚さ1mm、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/cm²、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。

<u>間接蛍光抗体法による細胞免疫染色</u>: 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、AlexaFluorTM 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。

<u>結 果</u>

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

<u>プラスミド構築</u>:本章第一節で構築された pGEM-hCBR3/hCBR1 を *Ndel/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 *Ndel/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。

<u>大腸菌による蛋白質発現と蛋白質精製</u>: 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。

MALDI-TOF² (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) mass spectrometry: 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) ヘアプライし、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-TOF² 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 μ g) 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 antibody²⁸⁾ as a primary antibody.

Table 2 Theoretical and experimental molecular weights of

	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。

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

Table 3 Zeta potentials of hCBRs

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。

<u>カルボニル還元活性の測定</u>: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 6.22×10³ M⁻¹·cm⁻¹、NADH のモル 吸光係数 6.27×10³ M⁻¹·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.

<u>結 果</u>

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 \pm S.D. obtained from three experiments. \Box , 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。

<u>実験材料と方法</u>

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。

<u>カルボニル還元活性の測定</u>: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。

<u>カルボニル還元活性の補酵素による阻害</u>: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、NAD+、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.

酵素への補酵素結合の測定(解離定数の測定):解離定数 Ka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) $\kappa_d = \frac{[CBRs] \cdot [Coenzyme]}{[CBRs \cdot Coenzyme Complex]}$

[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、*Ka*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、*Ka*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) delta F = $\frac{[Coenzyme]^n}{\kappa_d + [Coenzyme]^n}$

式 (3)
$$\log \left(\frac{\text{delta F}}{F_{max} - \text{delta F}} \right) = n \log [\text{Coenzyme}] - n \log K_A$$

n, ヒル係数; KA, 50% 飽和時の補酵素濃度

<u>結 果</u>

hCBR3 に関して、130 μ M 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*a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 \pm S.D. obtained from three independent experiments. \Box , hCBR3; \blacksquare , 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 $1.2 \pm 1.1 \mu$ M は、Bohren ら³⁶⁾が示した値($1.5 \pm 0.4 \mu$ M) 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.

	<i>K</i> _d for NADPH	<i>K</i> _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 μ M. 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。

<u>カルボニル還元活性の測定</u>:100 mM ナトリウムリン酸緩衝液, pH 6.5、補酵素として 130 μ M 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。 $k_{cad}K_m$ 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)

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

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.

哺乳類細胞発現 hCBR3/hCBR1 の活性測定: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)。

結果

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、kcat値と kcat/Km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。

	hCBR3			hCBR1		
	<i>K_m</i> (μΜ)	<i>k_{cat}</i> (min⁻¹)	k _{cal} /K _m (min ⁻¹ ∙ μM ⁻¹)	<i>K_m</i> (μM)	<i>k_{cat}</i> (min⁻¹)	k _{cat} /K _m (min⁻¹∙ μM⁻¹)
manadiana	43 ±	0.24 ±	0.0056	29 ±	440 ±	15
menacione	12	0.023		2.1	10	15
1 honzovlnyvidino	300 ±	0.70 ±	0.0023	360 ±	400 ±	
4-benzoyipynaine	38	0.037		18	37	1.1
n niterahannaldahuda	130 ±	0.59 ±	0.0045	1300 ±	190 ±	0.45
p-nitoropenzaidenyde	30	0.054	0.0045	320	27	0.15

Table 5 Kinetic constants of hCBRs towards test substrates

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 PGA₁ (PGA₁-GS)を効率的に還元することも知られている⁵⁾。この PGA₁-GS は、MRP1 (Multidrug resistance-associated protein 1)が PGA₁でなく PGA₁-GS を選択的に細胞外へ排 出することより PGA₁ 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 PGA1-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 PGE2 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。

<u>カルボニル還元活性の測定</u>: 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。

<u>酸化脱水素活性の測定</u>: 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、PGE₂、PGA₁、 PGA₁-GS への還元活性を示し、PGA₁-GS への還元活性は PGE₂への還元活性の数倍である ことが報告されている。hCBR1 は、PGE₂、PGA₁および PGA₁-GS に対して還元活性を示し、 また、PGA₁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 Wermuth⁵⁾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。

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.	-

Table 6 Enzymatic activities of hCBRs towards PGs

Reductase/dehydrogenase activities of hCBRs towards PGs are shown as the ratio of reductase activity towards 4-benzoylpyridine. Each value represents the mean \pm S.D. obtained from three independent experiments. n.d., no detectable activity; GSH, reduced glutathione; PGA₁-GS, glutathione-conjugated PGA₁.

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。

<u>ドキソルビシンに対するカルボニル還元活性の測定</u>: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。

<u>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</u>: 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(R²=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・ $k_{cad}K_m$ 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。 (a) OH OH OH ОН OH 'nн Ö άн ĠН ŃН, doxorubicin doxorubicinol (b) Relative fluorescense 20 doxorubicinol doxorubicin intensity 15.1 min 7.9 min 10 0 10

5

0

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.

Time (min)

15

20

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 Km 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、kcat 値と kcad Km 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.

		hCBR3		hCBR1			
-	<i>K_m</i> (μΜ)	<i>k_{cat}</i> (min ⁻¹)	<i>k_{cat}/K_m</i> (min ⁻¹ ∙ μM ⁻¹)	<i>K_m</i> (μM)	k _{cat} (min ⁻¹)	<i>k_{cat}/K_m</i> (min⁻¹∙ μM⁻¹)	
Doxorubicin	290 ± 120	12 ± 2.6	0.041	270 ± 80	14 ± 2.4	0.052	
REPORTED	-	-	-	270 ± 47 ^a	11 ± 1.2ª	0.040	

Table 7	Kinetic consta	nts of hCBRs	towards	doxorubici
Table 7	Kinetic consta	nts of hCBRs	towards	doxorubici

Each value is based on the results of Fig. 19. Enzymatic activities are reported as mean \pm S.D. Reported parameter values for hCBR1 are also given for comparison purposes. ^aBains 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 *kcat* 値や *kcad Km* 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。

<u>実験材料と方法</u>

<u>rCBR3</u> 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 tcc gtg tgt ccc tct ga-3' mtrCBR3r01(*Not*I): 5'- gcc gcg gcc gc att cat ctc tca cgc taa cg -3' 増幅された DNA 断片を BamHI/Notl によって処理し、pET-28a の BamHI/Notl 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。

<u>MALDI-TOF²</u> (<u>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight</u>) <u>mass</u> <u>spectrometry</u>: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。

<u>結 果</u>

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34kDa 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130Da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 6.62 (His-tagged CHCR3) であり (Compute rCBR3) お よ び 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。





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 \pm 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、 $k_{cad}K_m$ 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。

	rCBR3			CHCR3			
	<i>K_m</i> (μΜ)	<i>k_{cat}</i> (min⁻¹)	<i>k_{cat}/K_m</i> (min⁻¹∙μM⁻¹)	<i>K_m</i> (μΜ)	<i>k_{cat}</i> (min⁻¹)	<i>k_{cat}/K_m</i> (min⁻¹∙μM⁻¹)	
monodiono	580 ±	18 ±	0.024	89 ±	2.9 ±	0.033	
menadione	190	8.6	0.031	17	0.32		
1 honzovlavridino	1500	14 ±	0.0002	620 ±	3.8 ±	0.0004	
4-benzoyipyndine	±370	2.6	0.0093	170	0.64	0.0061	
n niterekenneldekude	340	12 ±	0.025	320 ±	4.1 ±	0.042	
p-nitorobenzaldehyde	±120	1.4	0.035	120	0.45	0.013	

Table 9 Kinetic constants of CBR3 orthologues towards test substrates

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 に比ベ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。

<u>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</u> <u>ールの定量</u>: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。

<u>結果</u>

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			
	<i>K_m</i> (μΜ)	<i>k_{cat}</i> (min⁻¹)	<i>k_{cal}/K_m</i> (min ⁻¹ ∙μM ⁻¹)	<i>K_m</i> (μΜ)	<i>k_{cat}</i> (min⁻¹)	<i>k_{cat}/K_m</i> (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 μ M)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。 $k_{cad}K_m$ 値 (Table 7, 0.041 min⁻¹ · μ M⁻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 PGE2 から PGF2a 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 PGE2 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。

<u>実験材料と方法</u>

<u>Harr-plot 解析</u>: 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-	WVE	RTDM	AGPKZ	ATKSP	-244
CBR3	230-	PVF	KTDM	OGKDS	SIRTV	-244
		*	***	*		

(d)





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

<u>キメラ酵素蛋白質発現ベクターの構築</u>: 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 *Ndel-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(*NdeI*): 5'- cgc ata tgt 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 *KpnI-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 *Ndel/Kpn*I 断片を、pET-hCBR1LirC3 の *Ndel/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 μ g) 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。

<u>結 果</u>

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_{cad} 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。

			menadione						
	LirN	LirC	<i>K_m</i> (μΜ)	k _{cat} (min ⁻¹)	<i>k_{cal}/K_m</i> (min⁻¹∙μM⁻¹)	each enzyme/CBR3 <i>(k_{cat}/K_m)</i>			
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			

Table 11 Kinetic constants of chimeric enzymes towards menadione

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

			4-benzoylpyridine							
	LirN	LirC	<i>K_m</i> (μΜ)	k _{cat} (min ⁻¹)	<i>k_{cat}/K_m</i> (min ⁻¹ ∙μM ⁻¹)	each enzyme/CBR3 <i>(k_{cat}/K_m)</i>				
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				

 Table 12
 Kinetic constants of chimeric enzymes towards 4-benzoylpyridine

Each value represents the mean obtained from three independent experiments. Enzyme activities are reported as mean \pm 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 Ka値と類似の Ka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 Ka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。

			NADPH	
	LirN	LirC	<i>K_d</i> (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

 Table 13
 K_d values of chimeric enzymes towards NADPH

Each value represents the mean \pm 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。

<u>実験材料と方法</u>

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。

<u>カルボニル還元活性の測定</u>: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

<u>ールの定量</u>: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。

<u>結 果</u>

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。

Inhibitor	Concentration	CBR3	CBR1LirC3	CBR3LirC1	CBR1
-		100	100	100	100
Quercetin	1 μ Μ	61 ± 12	54 ± 6.9	26 ± 4.6	36 ± 5.8
Rutin	1 μ Μ	52 ± 4.6	49 ± 8.4	21 ± 5.7	18 ± 3.9
Ipriflavone	1 μ Μ	10 ± 2.4	12 ± 4.2	89 ± 8.4	93 ± 10
Cibacron blue	5 μ Μ	51 ± 8.4	36 ± 5.7	22 ± 6.8	12 ± 5.2
Ibuprofen	100 μ Μ	68 ± 6.1	75 ± 9.5	84 ± 11	94 ± 9.2
Diclofenac	100 μ Μ	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

 Table 14
 Inhibitory effect of compounds for hCBRs activities towards menadione

Remaining activities of the enzymes with each inhibitor towards 250 μ M 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	Inhibitor	y effect of	f compounds	for hCBRs	towards	Doxorubicin
----------	-----------	-------------	-------------	-----------	---------	-------------

Inhibitor	Concentration	hCBR3	hCBR1
-		100	100
Ipriflavone	1 μ Μ	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 μ M 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 α EF1、 α EF2、 α EF3 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 α E と α F 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 α EF1、 α EF2 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) PGE₂を PGF_{2α}へ変換する PG 9-keto reductase 活性を有しており、生体内において PGE₂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 PGE₂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 ⁹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*_{cad} *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 $k_{cad} K_m$ 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· μ M⁻¹)および CHCR3 (Table 10, 0.012 min⁻¹· μ M⁻¹)は、hCBR3 (Table 7, 0.041 min⁻¹· μ M⁻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 (25)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 [®]、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 蛋白質に比ベ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、CBR3V244M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、PGE2を PGF2a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 PGE2 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。PGE₂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 PGE₂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 PGE2 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 PGE2 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.
- F. Hoffmann, E. Maser, Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily, Drug Metab. Rev. 39 (2007) 87-144.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.