Osaka University Knowledge Archive

Title	ウシ肝臓可溶性画分における新規なジヒドロジオール脱水素酵素の存在とその特異性について
Author(s)	南條, 寛文
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39105
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【7】

氏　　名	南　條　寛　文（なん じょう ひろ ふみ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学 位 記 番 号	第　11845　号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用薬学専攻
学 位 論 文 名	**ウシ肝臓可溶性画分における新規なジヒドロジオール脱水素酵素の存在とその特異性について**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　西原　　力 （副査） 教　授　馬場　明道　　教　授　前田　正知　　教　授　溝口　　正

論 文 内 容 の 要 旨

多環式芳香族炭化水素（PAH）は環境中に広く存在する汚染物質で，化学発癌の原因物質としてもよく知られている。一般に，PAHは細胞内で代謝活性化され，変異原性，発癌性あるいは細胞毒性を示す，代表的なPAHであるbenzo［a］pyreneは*trans*-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide体に変換されるとDNAをアルキル化する強力な発癌物質（ultimate carcinogen）となることが知られている。この活性化代謝経路に対して，ジヒドロジオール脱水素酵素（dihydrodiol dehydrogenase:DD;EC.1.3.1.20）はPAH代謝不活性化経路に関与する酵素としてPAHの中間代謝産物である*trans*-dihydrodiol体をキノン体に変換する酵素として見いだされた。DDは種々の哺乳類の肝臓を中心に精製とその諸性質の検討が試みられているが，種差や多様性が複雑に絡み，DDに関する統一的な定義を見いだすまでには至っておらず，個々の研究者の判断に委ねられているのが現状である。本研究では，DDに関する酵素化学的およびタンパク質化学的情報を得る目的でウシ肝臓を材料に採り上げ，DDの精製ならびにその諸性質の検討を行った。

ウシ肝臓DDは可溶性画分に3種類の分子多形（DD1，DD2，DD3）として存在していることを確認し，それぞれをSDS-PAGE上均一にまで精製することに成功した。いずれの酵素も分子量はおよそ35,000の単量体であった。基質特異性ならびに阻害剤感受性より，DD1が3α-ヒドロキシステロイド脱水素酵素（3α-HSD），DD2はhigh-*K*m形アルデヒド還元酵素と同一であることを明らかにした。一方，DD3は*trans*-dihydrodiol体あるいは(S)-(+)-1-indanolなどの生体外異物に対して特異的であり，しかもPAH *trans*-dihydrodiol体のモデル化合物であるベンゼンジヒドロジオールを基質とした反応速度の解析より，ウシ肝臓中における*trans*-dihydrodiol体のキノン体への代謝においてDD3が最も大きく寄与していることが示唆された。既知のDDはDD1やDD2と同様に，*trans*-dihydrodiol体にのみ活性を有するのではなく必ず生体内物質（アルデヒドやステロイドなど）を基質とすることから，酵素の有する本来の生理機能に付随してDD活性があるものとされてきた。したがって，これらの点からDD3は解毒代謝を中心的な役割とする新規な酵素であることが推察された。

DDの機能解明において新規性を有するDD3の特徴を探ることは非常に重要であると考えられた。そこで，本研究はDD3に焦点を置いて展開し，既知酵素との異同を明らかにした。第一にDD3は酵素反応機構（Orderd Bi Bi機構）や胆汁酸に対する酵素活性から，胆汁酸結合タンパク質として機能していないことを示した。第二に，免疫化学的交叉性やステロイドによる阻害から，DD3はタンパク質構造上はラット肝臓DD（3α-HSD）と類似している

ことを示唆した。さらに，DD 3 の重要な性質の 1 つして，システイン修飾試薬による活性の低下と補酵素である $NADP^+$ による活性低下からの保護を明らかにした。この性質はラット肝臓 DD でも確認され，両酵素の性質上の大きな共通点であると考えられた。また，ピルビン酸キナーゼやグルタチオン S-トランスフェラーゼ π などはチオール／ジスルフィド交換反応を介して活性変動を受ける代表的な酵素として *in vitro* においてその詳細が報告されているが，これらを考慮に入れると DD 3 ならびにラット肝臓 DD がシステイン残基を介して活性変動することも十分に考えられた。

DD 3 の部分アミノ酸配列は，ホモロジー検索からラット肝臓 DD をはじめ，ヒト胆汁酸結合タンパク質（ヒト肝臓 DD），プロスタグランジン F 合成酵素およびアルドース還元酵素などの aldo-keto 還元酵素群に属する酵素と高い相同性を示した。したがって，DD 3 は基質特異性においてかなり特異的な酵素であるが，一次構造の上で aldo-keto 還元酵素群に属することが示唆された。このことは，ウシ肝臓 cDNA ライブラリーから DD 3 をクローニングした結果より得られた全一次配列からも明確になった。すなわち，DD 3 も含めて，一般に各臓器において DD として機能している酵素の多くが aldo-keto 還元酵素群に属することが推察された。

基質特異性が異なる多くの酵素が構造的に 1 つのファミリーを形成していることは非常に興味深く，活性部位の構造にどのような異同があるのか注目されるところである。本研究では DD 3 のシステイン修飾試薬による活性低下と $NADP^+$ による保護効果に着目し，DD 3 の活性に影響を与えるシステイン残基の同定を行った。この活性に影響を与えるシステイン残基を含む近傍の配列は aldo-keto 還元酵素群の全てにわたり高い相同性を示している部分の 1 つに相当した。ラット肝臓 DD の 3 次構造（α 8／β 8 barrel）との比較などから，この部位は補酵素の結合に大きな影響を持つ重要な部位である可能性が示唆された。さらに，このシステイン残基は aldo-keto 還元酵素群間で保存されており，aldo-keto 還元酵素群の酵素の活性変動に重要である可能性も考えられ，今まで未知であった新たなシステイン残基の役割を推察することができた。

以上のことより，ウシ肝臓可溶性画分より精製された DD 3 の新規性およびその特異性を明らかにした。

論文審査の結果の要旨

南條君は，発癌性を有する多環式芳香族炭化水素（PAH）の解毒代謝に重要な役割を演じているジヒドロジオール脱水素酵素（DD）をウシ肝臓可溶性画分より精製し，3 種の分子多形を確認した。そして，酵素化学的，蛋白質化学的検討結果から，そのうちの 1 種（DD 3）が aldo-keto 還元酵素に属するが，既知の DD とは異なる新規な酵素であり，特に PAH 等の代謝に重要であることを示した。また，その反応機構を明らかにすると共に DD 3 の活性変動に関与するシステインの同定にも成功した。

これらの成果は学術的にも高く評価され，博士（薬学）の学位請求論文として，充分価値あるものと認められる。