

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19890180  
 研究課題名（和文） カルボニル化合物代謝酵素の網羅的解析によるカルボニルストレス防御系の解明  
 研究課題名（英文） Elucidation of defense mechanism against carbonyl stress by reductases for carbonyl compounds  
 研究代表者  
 遠藤 智史（ENDO SATOSHI）  
 岐阜薬科大学 薬学部・助手  
 研究者番号：60433207

研究成果の概要：本研究では、カルボニルストレス防御機構の一つとして反応性カルボニル化合物を減少させる酵素系に着目し、AKR1C15、カルボニル還元酵素 4 などのカルボニル化合物還元代謝酵素の性状を明らかにした。その結果、これら酵素は反応性アルデヒドをただ効率よく代謝するだけでなく、これら化合物によって発現誘導されることで、さらに効果的に生体を防御していることが明らかとなった。またこれら酵素における基質特異性はオーバーラップするものの、局在性、触媒活性や発現誘導機構は異なり、細胞小器官別の酸化ストレスに起因する疾病の予防または治療における標的タンパクとなりえる可能性も示唆された。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,140,000	0	1,140,000
2008 年度	1,140,000	342,000	1,482,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,280,000	342,000	2,622,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：カルボニル還元酵素、アルドーケト還元酵素、カルボニルストレス

## 1. 研究開始当初の背景

様々なカルボニル化合物は中間代謝や酸化的ストレスの早期段階で生成し、このうち脂質過酸化に由来するアルデヒドや糖・アミノ酸代謝に由来する  $\alpha$ -ジカルボニル化合物は生体成分のタンパクやDNAとの反応性が高い。近年、これ

らカルボニル化合物による生体成分の修飾が糖尿病合併症、動脈硬化や老化の一因として注目され、反応性カルボニル化合物による生体への影響はカルボニルストレスと呼ばれている。カルボニルストレスの主たる誘因は糖尿病や酸化ストレスであり、糖尿病発症機構、酸化ストレス過程および活性酸素生成防御系に関する多くの研

究があるのに対して、反応性カルボニル化合物を消去する代謝系に関する研究は少ない。また、食品や環境から体内に摂取された異物カルボニル化合物から活性酸素が生成される場合や有機溶媒の代謝から2,5-ヘキサジオン等の毒性カルボニル化合物が産生することも知られているが、その解毒系についてはほとんど研究されていない。したがって、有害なカルボニル化合物を減少させる酵素系を明らかにすることは、老化現象や生活習慣病などの慢性疾患の予防・治療法の一つにつながり、医学的にも毒性学的にも重要である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、既知の7種の酵素に加えて、ゲノム解析により判明した類似酵素遺伝子を含めて、カルボニル化合物還元代謝酵素の網羅的解析によりカルボニルストレスに対する防御系を明らかにすることである。単に酵素の触媒特性の比較だけでなく、ストレス負荷によるこれらの酵素の発現量の変動を観察することにより、各組織に特有なカルボニルストレスに対する防御システムを明らかにできると考えられる。

## 3. 研究の方法

### H19年度

#### (1) 酵素の特性解析

酵素の単離と性状解析:機能未知なアルドース還元酵素の類似酵素3種(AKR1B13, AKR1B14, rat1B10)及び新規なカルボニル還元酵素類似酵素(CBR4)のcDNAから各リコンビナント酵素を大腸菌の系で発現し、均一に精製した。その分子量、補酵素及び基質に対する特異性、阻害剤感受性などの酵素学的性状を調査した。

構造と機能の相関研究:AKRファミリーでは、60%以上の相同性の酵素はほぼ同じ高次構造であるとされているが、基質特異性を規定する残基

の役割は依然不明である。基質特異性が異なるRAKa、RAKb、RAKdの3種の酵素は相互に>94%の相同性があり、それらのコンピューター高次構造モデルから推測される基質特異性決定残基では3アミノ酸だけが異なる。したがって、この3アミノ酸をこれらの酵素間で相互に交換し、基質特異性の変化を調べ、基質認識機構を明らかにした。

#### (2) 有害なカルボニル化合物に対する反応性の比較分析

カルボニル化合物還元酵素7種を用いて、脂質過酸化やグリケーションで生成するカルボニル化合物に対する反応性を、pH 7.4、37℃で速度定数を測定比較した。

#### (3) 培養細胞を用いた機能分析

RAKcは、血管内皮細胞に高発現し、試験管内ではレチノイドとイソプレノイド類を効率よく代謝する。市販のラット由来血管内皮細胞で本酵素の発現を確認後、ファルネソール添加後の還元代謝物(ファルネソール)をTLC分析により同定した。

#### (4) 組織分布

14週齢の雌雄ラットの組織(大脳、小脳、肺、心臓、肝、胃、腎、副腎、小腸、大腸、精巣、卵巣)からトータルRNAを抽出し、各酵素cDNAに対する特異的プライマーを用いて、RT-PCR法により発現を検討した。また、Western blot法での確認のために、AKR1B13、CBR4のポリクローナル抗体をウサギを用いて作製した。

重要な生理的役割が予測されるRAKcについては、特異抗体を用いて免疫組織化学的に分析し、各組織における酵素の発現細胞を明らかにした。CBR4についてはウシ血管内皮細胞に置ける過剰発現系を構築し、遠心操作による細胞下分画を行い、Western blot法を用いて、その発現画分を同定した。

### H20年度

#### (1) 加齢による酵素の変動

加齢の影響については、生後1週、4週、2ヶ月、6ヶ月、10ヶ月の雌雄ラットについてRT-PCRでその発現量の変動を調べた。

#### (2) 培養細胞における発現変動

前年度の結果を踏まえて、各酵素が発現しているラット血管内皮細胞 (YPEN-1)、ラット腎上皮細胞 (NRK) およびラット大動脈より初代培養した線維芽細胞を選択し、各組織とその対応組織由来の細胞において、RT-PCRにより各酵素の mRNA 発現レベルがどのように類似または異なるかを調べた。また、過酸化水素、細胞内活性酸素生成化合物 (オルトキノン類、マイトマイシンCなどの抗癌剤) の添加による各酵素の発現変動をRT-PCRとWestern blot法で調べ、比較した。また、類似酵素が線維芽細胞成長因子 (FGF-1, 2) やステロイド (5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, 17 $\beta$ -estradiol) によって発現誘導されることからこれらの化合物についても同様の検討を行った。

#### (3) ヒトの対応酵素の性状解析

前年度及び上記の検討から抗酸化酵素として重要と判断されるラットの酵素について、その一次構造と基質特異性が類似するヒトの酵素を選択し、その酵素のcDNAを単離、リコンビナント酵素を精製した。そしてこれらのヒトの酵素が、ラットの酵素と同様に有害なカルボニル化合物を効率良く還元するかどうかを調べた。また基質となる $\alpha$ -キノン類の毒性発現への関与はMTT法により評価し、その原因となる活性酸素由来アポトーシスはDNAラダー及びカスパーゼ活性化を指標とした。

### 4. 研究成果

カルボニルストレスに対する生体防御システムの一つとして反応性カルボニル化合物を減少させる酵素系に着目し、カルボニル化合物還元代謝酵素の網羅的解析を行った。

(1) アルドース還元酵素 (AR) 類似酵素遺伝子のリコンビナント酵素の発現と精製、基質特異性および阻害剤感受性の比較

AR 類似酵素 3 種 (AKR1B14、rat1B10、AKR1B13) の cDNA から各リコンビナント酵素を大腸菌の系で発現し、均一に精製した。AKR1B13 は NADPH を補酵素とし、アルデヒド類を幅広く還元し、また、9,10-フェナンスレンキノンが高い触媒効率で還元した。また、AR 阻害剤に阻害され、ゾボレスタットの IC<sub>50</sub> 値は 25nM と最も強い阻害を示した。これらの性質は AKR1B13 と 95% の相同性を示す AKR1B8 のものと類似した。一方、R1B7 と R1B10 はアルデヒド類やカルボニル化合物をほとんど還元しなかった。

#### (2) ラット還元酵素の構造機能相関

3 $\beta$ -HSD である RAKb は <sup>24</sup>Tyr を 3 / 17 / 20 HSD である RAKd の相当する残基 Ser に置換することで、3 $\beta$ -HSD 活性が上昇し、17 $\beta$ -HSD、20 $\beta$ -HSD 活性は低下した。<sup>24</sup>Tyr に加えて <sup>128</sup>Asp、<sup>129</sup>Phe を RAKd の対応する残基に置換すると、ほぼ RAKd と同じステロイド選択性を示した。また、RAKb の <sup>128</sup>Asp、<sup>129</sup>Phe に加えて 137Ser を 17 $\beta$ -HSD である TBER1 の対応する残基に置換したところ TBER1 とほぼ同様の選択性を示した。結果、ステロイド選択性には 24 番目の残基が重要で、補足的に 128、129 番目の残基が関与していることが示唆された。

#### (3) ラット還元酵素の組織分布分析

14 週齢ラットの各組織 (脳、肺、心臓、胃、肝臓、腎臓、副腎、小腸、大腸、精巣/卵巣) について RT-PCR により各還元酵素の発現を検討した。AKR1B14 は雄では副腎特異的に発現し、雌では副腎に加えて肝臓でも発現を確認した。その他の酵素においては臓器間での発現に差がみられるもののほぼ全ての組織において発現が確認された。また、加齢における影響を検討したが、明確な差は見られなかった。

#### (4) 培養細胞における発現誘導

AKR1B13 は線維芽細胞成長因子 (FGF) 誘導

性の AKR1B8 と 95% の相同性を示す。そこで、ラット前立腺上皮細胞、腎臓上皮細胞を用いて、FGF-1、FGF-2、ステロイドによる発現誘導を検討してみたが、発現誘導は確認できなかった。その他全ての還元酵素においても同様の検討を実施したが、これら全てにおいて発現誘導は見られなかった。一方、AKR1B13 は数  $\mu$ M の過酸化水素や 1,4-naphthoquinone (1,4-NQ) で優位にその発現は上昇した。また、RAKc は 4-hydroxynonenal や過酸化水素によって、AR はマイトマイシン C や 1,4-NQ によって発現上昇が確認された。

#### (5) 新規ヒトカルボニル還元酵素 (CBR4) の性状解析

ヒト CBR4 をウシ血管内皮細胞 (BAEC) で過剰発現させ、その粗抽出液を遠心操作によって分画した。CBR4 のポリクローナル抗体はウサギを用いて精製し、ウエスタンブロットに用いた。その結果、CBR4 は N 末端の移行シグナルの切断を行わずにミトコンドリアに局在することを明らかにした。また、大腸菌による発現系を確立させ、各種カラムクロマトグラフィーを用いて単一に精製し、酵素学的性質を明らかにした。その結果、本酵素はアルデヒドやケトンを代謝せず、*o*-、*p*-キノンのみを還元し、キノ還元酵素であることが判明した。さらに 9,10-phenanthrenequinone (9,10-PQ) 還元時には、スーパーオキシドが産生され、CBR4 過剰発現細胞においてはアポトーシスがより強まったことから、これら *o*-キノンの毒性発現に關与する可能性も示唆された。

#### (6) ペルオキシソーム局在型 DHRS4 の性状解析

ペルオキシソーム局在性酵素である DHRS4 は、芳香族ケトンに加え、9,10-PQ などの  $\alpha$ -ジカルボニル化合物を還元した。しかし、CBR4 とは異なり、過剰発現細胞における 9,10-PQ 毒性に変化はみられなかった。これはペルオキシソームに存在するカタラーゼやスーパーオキシド

ジスムターゼの活性酸素除去効果が原因と考えられた。

以上より、これら還元酵素は反応性カルボニル化合物の解毒において、ただ強力な還元能を発揮するだけでなく、カルボニル化合物によって発現を誘導されることで、さらに効果的に生体を防御していることが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 6 件)

Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Hiroaki Mamiya, Akira Hara, Yukio Kitade, Kazuo Tajima, Ossama El-Kabbani, Characterization of a rat NADPH-dependent aldo-keto reductase (AKR1B13) induced by oxidative stress, Chem. Biol. Interact., 176, 151-157, 2009, 査読有

Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Yukio Kitade, Satoshi Ohno, Kazuo Tajima, Ossama El-Kabbani and Akira Hara, Human carbonyl reductase 4 is a mitochondrial NADPH-dependent quinone reductase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 377, 1326-1330, 2008, 査読有  
Toshiyuki Matsunaga, Satoshi Endo, Satoshi Maeda, Shuhei Ishikura, Kazuo Tajima, Nobutada Tanaka, Kazuo T Nakamura, Yorishige Imamura, and Akira Hara, Characterization of human DHRS4: An inducible short-chain dehydrogenase/reductase enzyme with 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity., Arch. Biochem. Biophys., 477, 339-347, 2008, 査読有

Satoshi Endo, Masaharu Sanai, Kenji Horie, Toshiyuki Matsunaga, Syuhei Ishikura, Kazuo Tajima, Ossama El-Kabbani, and Akira Hara, Characterization of rat and mouse NAD<sup>+</sup>-dependent

3 $\alpha$ /17 $\beta$ /20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenases and identification of substrate specificity determinants by site-directed mutagenesis., Arch. Biochem. Biophys., 467, 76-86, 2007, 査読有  
Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Kenji Horie, Kazuo Tajima, Yasuo Bunai, Vincenzo Carbone, Ossama El-Kabbani, Akira Hara., Enzymatic characteristics of an aldo-keto reductase family protein (AKR1C15) and its localization in rat tissues., Arch. Biochem. Biophys., 465, 136-147, 2007, 査読有  
Masaharu Sanai, Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Shuhei Ishikura, Kazuo Tajima, Ossama El-Kabbani and Akira Hara, Rat NAD<sup>+</sup>-dependent 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C17): A member of the aldo-keto reductase family highly expressed in kidney cytosol., Arch. Biochem. Biophys., 464, 122-129, 2007, 査読有

[学会発表] (計 3 件)

前田 哲志、遠藤 智史、松永 俊之、原明、田中 信忠、中村 和郎、田島 和男、ヒトの誘導性 SDR ファミリータンパク質 (DHRS4) の性状、第 72 回日本生化学会中部支部例会、2008, 05, 24, 岐阜  
Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Hiroaki Mamiya, Akira Hara, Kazuo Tajima, Yukio Kitade, Ossama El-Kabbani, Characterization of a rat aldo-keto reductase (AKR1B13) up-regulated by oxidative stress, ENZYMOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY OF CARBONYL METABOLISM FOURTEENTH INTERNATIONAL MEETING, 2008, 07, 11 KRANJSKA GORA, SLOVENIA JULY.  
Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Kazuo Tajima, and Akira Hara, Identification of substrate specificity determinants of rodent NAD<sup>+</sup>-dependent 3 $\alpha$ /17 $\beta$ /20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenases by site-directed mutagenesis, 第 80 回 日本生化学会大会 第 30 回 日本分子生物学会年会 合同大会, 2007, 12, 11, 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 智史 (ENDO SATOSHI)  
岐阜薬科大学・薬学部・助手

60433207

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし