

カルボニル化合物還元酵素の比較酵素学

澤田英夫¹⁾, 原 明¹⁾, 中山俊裕¹⁾, 中川 誠¹⁾

岐薬紀要 (1986) 35 : 14-27

要約: 異物カルボニル化合物は生体内でアルコール体に還元されるが, この還元反応には複数の酵素が関与する。ここでは, これらの還元酵素を *aldehyde reductase* と *carbonyl reductase* に分類し, 著者らの最近の研究を中心に, その酵素化学的特性を比較して論議した。

索引用語: 酵素学, アルデヒド還元酵素, カルボニル還元酵素 (文 100)

Comparative Enzymology of Reductases for Carbonyl Compounds

HIDEO SAWADA¹⁾, AKIRA HARA¹⁾, TOSHIHIRO NAKAYAMA¹⁾,
AND MAKOTO NAKAGAWA¹⁾*Ann. Proc. Gifu Pharm. Univ.* (1986) 35 : 14-27

Abstract : Several xenobiotic carbonyl compounds are reduced to corresponding alcohols *in vivo*, but the multiple enzymes are responsible for the reduction. We have classified the reductases into aldehyde reductase and carbonyl reductase, and compiled a list of enzymological characteristics of the reductases from nonmammalian and mammalian tissues, adding the current studies carried out in the authour's laboratory, with brief discussion of some of the entries.

Keyphrases : enzymology, aldehyde reductase, carbonyl reductase (Ref 100)

はじめに

チトクロム P-450 の関与しない薬物酸化還元酵素系である *carbonyl reductase* は, ヒトはじめ各種動物の諸臓器から分離精製されている。本酵素は主として細胞質可溶性画分に存在し, NADPH を補酵素として必要とし, 分子量 30000-80000 の単量体及びオリゴマー構造を有し, その分子多形が存在する。

本酵素は初め, 薬物のケトン類の還元を行うことから *metryapon*, *oxisuran*, *bunolol*, *dihydromorphine*,

1) 岐阜薬科大学生化学教室
岐阜市三田洞東 5 丁目 6-1
1) Department of Biochemistry,
Gifu Pharmaceutical University
6-1, Mitahora-higashi 5 chome, Gifu 502

Received March 1, 1986
The Annual Proceedings of Gifu Pharmaceutical University,
ISSN 0434-0094, CODEN : GYDKA 9

warfarin, daunorubicin, acetohexamide などの薬物名を付した還元酵素として命名された。また，生体内因性物質 prostaglandin，および水酸化ステロイドを還元する酵素として 9-ketoprostaglandin reductase， α -および β -hydroxysteroid dehydrogenase が関与していることが報告され，その基質特異性，阻害剤の作用および免疫化学的性状などから，同一酵素が生体異物および生体内因性カルボニル化合物の代謝に関与していることが明らかにされてきた。

カルボニル化合物の代謝に関与する酸化還元酵素は，その酵素化学的特性から次の4種に分類されている。すなわち，alcohol : NAD⁺ oxidoreductase (alcohol dehydrogenase, EC 1.1.1.1), alcohol : NADP⁺ oxidoreductase (aldehyde reductase, high-K_m aldehyde reductase EC 1.1.1.2), alditol : NADP⁺ oxidoreductase (aldose reductase, low-K_m aldehyde reductase, EC 1.1.1.21) および carbonyl reductase (ketone reductase, aldo-

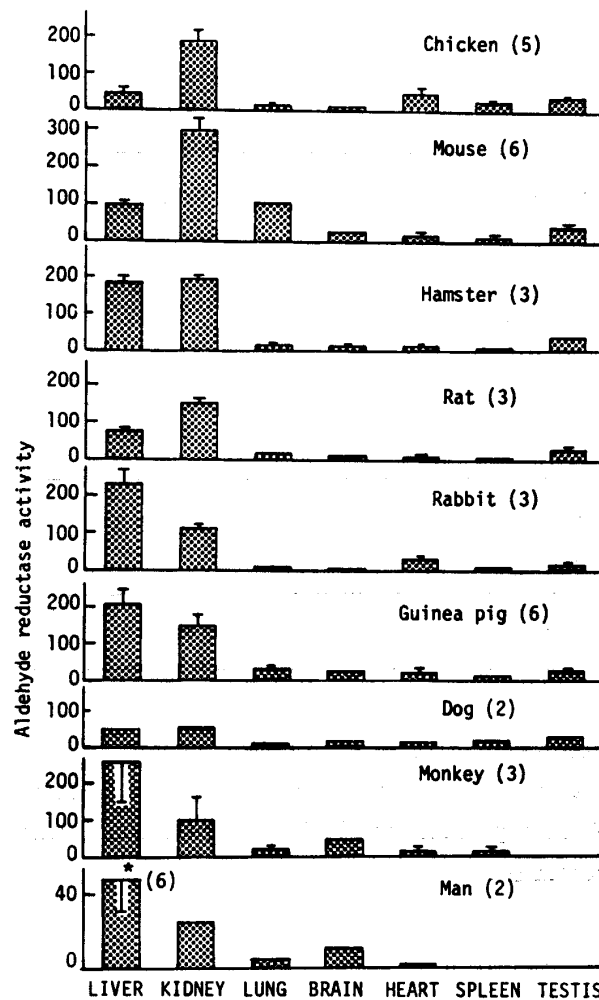


Fig. 1. Tissue distribution of soluble aldehyde reductase in man and animals. Activity was assayed with 80 μ M NADPH and 1 mM pyridine-4-aldehyde at pH 6.0, and is expressed as units/g of protein \pm SD from the assay with animals and specimens indicated in parentheses. One unit of the activity is the amount of enzyme that catalyzes the oxidation of 1 μ mol of NADPH/min at 25°C.

keto reductase) のうち、とくに本稿では、carbonyl reductase と aldehyde reductase についてそのタンパク質化学および酵素化学的性状ならびにその生理的役割について言及し、哺乳動物、鳥類に存在する本酵素の比較生化学を中心に紹介する。

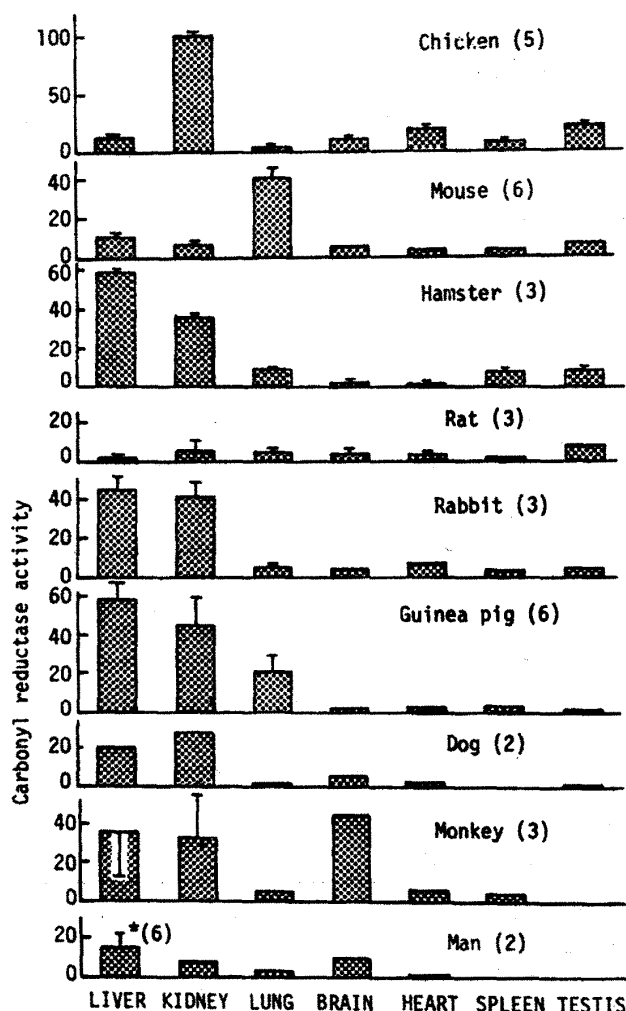


Fig. 2. Tissue distribution of soluble carbonyl reductase.

The activity was assayed with $80 \mu\text{M}$ NADPH and 1 mM 4-benzoylpyridine at pH 6.0, and represents units/g of protein \pm SD.

1. カルボニル化合物還元酵素の一般的性質

カルボニル化合物の還元代謝に関与する酵素は、基質特異性の違いに基づいて、aldehyde reductase と carbonyl reductase に分類される。Aldehyde reductase は、糖アルデヒドを含む脂肪族および芳香族アルデヒド類を相当するアルコール体還元する反応を触媒するのに対し、carbonyl reductase は、糖以外のアルデヒドおよびケトン類も還元するより低い基質特異性を示す。Aldehyde reductase は、さらに、アルデヒド類に対する親和性の低い high- K_m 型と高い親和性の low- K_m 型の酵素種として存在する。Carbonyl reductase は、以前に xenobiotic ketone reductase¹⁾, aromatic aldehyde ketone reductase^{2,3)}, ketone reductase⁴⁾ と呼ばれていた酵素の総称名⁵⁾として用いられている。

1) 組織分布

Aldehyde reductase および carbonyl reductase 活性は哺乳動物のいくつかの臓器に認められている^{4,6)}。Aldehyde reductase は哺乳動物だけでなく、鳥類や両性類の腎臓ならびに昆虫類と酵母にも存在する⁷⁾。Fig. 1 には、著者らが行った8種の哺乳動物およびニワトリ各種組織における可溶性 aldehyde reductase 活性を pyridine-4-aldehyde を基質として測定した結果をまとめた。本酵素活性は測定したすべての臓器で検出され、ニワトリ、マウスおよびラットでは腎に、他の動物およびヒトでは肝と腎に高い活性を認めた。同様な分布は、D-glucuronate と glyceraldehyde を基質として用いた場合にも報告されている⁸⁾。一方、carbonyl reductase 活性はこれらの動物種では肝で比較的高いが、ニワトリは腎、マウスとモルモットは肺、サルとヒトは脳に高く、種により本酵素の組織分布が異なる (Fig. 2)。

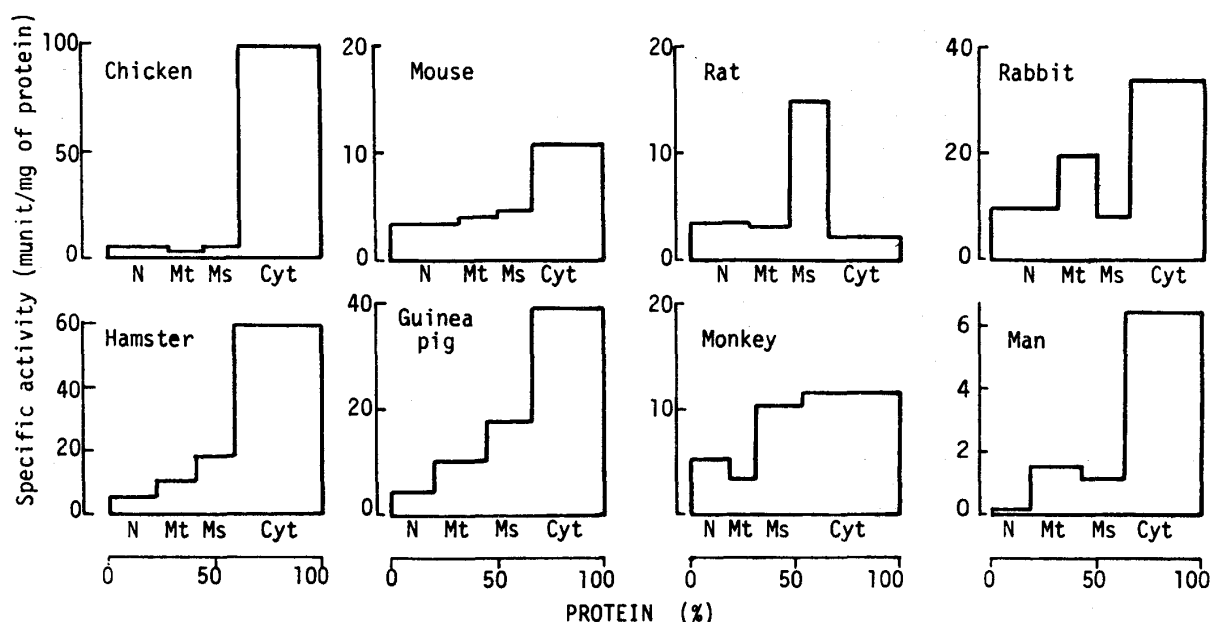


Fig. 3. Intracellular distribution of carbonyl reductase in mammalian livers and chicken kidney. The mean specific activities of the fractions are plotted against the percentage of total protein in each fraction. N=nuclear fraction, Mt=mitochondrial fraction, Ms=microsomal fraction, Cyt=cytosolic fraction.

2) 細胞内局在性

哺乳動物組織の aldehyde reductase は主として細胞質に局在する⁴⁾が、顆粒画分にも弱い活性が検出され、ニワトリ肝ミトコンドリアから2種の aldehyde reductase が精製されている⁹⁾。また、薬物ケトン類の還元酵素活性はミトコンドリアおよびミクロソーム画分に検出されている^{4,10,11)}。Carbonyl reductase の肝細胞内局在について調べた結果、ニワトリを除く他の哺乳動物では本酵素活性は可溶性画分だけでなく、両顆粒画分に比較的高い比活性で認められた (Fig. 3)。これら顆粒画分の酵素は膜結合酵素で界面活性剤により可溶化される。

3) 精製および多様性

Aldehyde reductase は carbonyl reductase より早期に発見され、また、白内障などの疾病との関連¹²⁾が認められていることから、ヒトおよび動物の水晶体および他の組織から精製されている (TABLE I)。本酵素の精製に

TABLE I. Aldehyde reductases purified from various species

Species	Tissue	Enzyme form	Molecular weight	Subunit number (Mol. wt.)	pI	Stereo-chemistry of NADPH	Reference
Man	Brain	High-Km	36.2K	1	5.3	A	16
		Low-Km*	38K	1	5.9	A	16,17
	Liver	High-Km*	36.2K	1	5.3	A	18,19
		Low-Km*	72K	2 (42K, 35K)	8.25	—	18
	Placenta	High-Km*	32.5K	1	5.76	—	20
		Low-Km*	74K	2 (32.5K, 39K)	5.76	—	20
		Low-Km*	39K	1	5.75	A	21,22,23
	Erythrocyte	High-Km*	32.5K	1	5.06	—	24
		Low-Km*	32.5K	1	5.47	—	24
Monkey	Brain	High-Km	74K	—	—	—	25
	Liver	High-Km*	36K	1	5.0	A	26,27
Cow	Brain	High-Km*	29K	1	6.18	—	28
		Low-Km	30K	1	4.88	—	28,29
	Liver	High-Km*	40K	1	6.5	—	30
		Low-Km	61K	2 (30.5K)	8.25	—	31
	Kidney	High-Km	33.5K	1	—	—	32
		Low-Km	34.7K	1	—	—	32
	Heart	High-Km	34K	1	6.1	—	33
	Lens	Low-Km	37K	1	4.85	—	34
Pig	Brain	High-Km	40.2K	1	5.8	—	35,36
		Low-Km	43K	1	—	—	36
	Liver	High-Km*	34K	1	5.8	A	37
		High-Km	35K	1	6.8	A	37
	Kidney	High-Km*	36.7K	1	6.9	A	38,39
	Muscle	Low-Km*	43K	1	—	—	40
Rabbit	Liver	High-Km	32K	1	6.0	A	42,43
		Low-Km*	40.2K	1	—	—	44
	Muscle	Low-Km*	41.5K	1	—	A	44,45
		High-Km*	37K	1	—	—	46
		Low-Km	37K	1	—	—	46
	Lens	High-Km*	37K	1	—	—	46
Guinea Pig	Liver	High-Km	36.5K	1	6.0	A	27,47,48
	Lung	High-Km	36.5K	1	—	—	49
Hamster	Liver	High-Km	39K	1	5.8	A	50
Rat	Brain	High-Km*	36.3K	1	—	—	51
	Liver	High-Km*	39.8K	1	6.3	—	52
	Kidney	High-Km*	34K	1	—	A	7,53
	Lens	Low-Km	37K	1	4.75	—	13
Mouse	Liver	High-Km	35K	1	—	—	54,55
Chicken	Kidney	High-Km	39K	1	7.4, 7.6	A	7,53,56
		Low-Km	39K	1	7.1	A	56
Frog	Kidney	High-Km*	38K	1	—	—	7,53
Fruit-fly		High-Km*	34K	1	—	A	7,53
Yeast		High-Km*	33K	1	—	A	7,53
		Low-Km	61K	2 (38K, 23K)	—	—	57

*The amino acid composition of the enzyme is examined.

は、硫酸アンモニウム分画法、ゲル濾過、イオン交換およびヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーなどの一般的方法の他に、本酵素が NADPH を補酵素とするので NADP^+ 、ADP およびトリアジン色素を固定化した担体を用いたアフィニティクロマトグラフィーが有力な精製手段となっている。また、水晶体の low-Km aldehyde reductase

TABLE II. Carbonyl reductases purified from various species

Species	Tissue	Locali- zation	Molecular weight	Subunit number (Mol. wt.)	Multiform number** (pI)	Stereo- chemistry of NADPH	Refer- ence
Man	Brain Liver	Cytosol	32K*	1	3 (7.0, 7.9, 8.5)	B	5
		Cytosol	31K	1	3 (7.9, 8.3, 8.9)	B	27, 61
Monkey	Liver	Cytosol	80K	—	6-7	—	26, 55
			32.5K	1	3 (8-9)	B	26, 27, 55
Cow	Kidney	Cytosol	56K	—	—	—	32
			26.5K	—	3 (—)	—	32
Pig	Brain Kidney	Cytosol	35K	1	—	—	36
		Cytosol	ca 30K	1	1 (4.8)	—	62
Dog	Liver	Cytosol	92K	2 (24K)	1 (9.3)	B	63
Rabbit	Liver	Cytosol	78K	3 (26K, 24K)	—	B	42, 55
			38K	1	1 (6.9)	B	42, 55
			29K	1	1 (5.8)	A	42, 55
	Kidney	Cytosol	—	—	—	B	3, 4
Guinea pig	Liver	Cytosol	36K	1	1 (9.0)	A	27, 47, 48
			34K	1	1 (8.1)	A	27, 47, 48
	Liver	Microsomes	115K	4 (32K)	1 (7.0)	—	64, 65
			34K	1	1 (7.8)	—	64
	Lung	Cytosol	86K*	4 (23K)	1 (9.8)	B	27, 49
Hamster	Liver	Cytosol	92K*	4 (23.5K)	1 (6.0)	B	50, 66
			29K	—	6 (5.0-8.3)	—	50
Rat	Liver	Cytosol	35K*	1	7 (5.2-6.1)	A	27, 67, 68 69
Mouse	Liver	Cytosol	29K	1	1 (8.7)	A	55
	Lung	Cytosol	90K*	4 (24K)	1 (8.7)	B	70
Chicken	Kidney	Cytosol	29.5K*	1	2 (7.9, 8.4)	B	27, 71

*The amino acid composition of the enzyme is examined.

**The number of multiforms is detected on isoelectric focusing, except that bovine kidney enzyme is analyzed by electrophoresis.

は、特異的阻害剤をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーにより精製されている¹³⁾。本酵素の精製において留意しなければならない点は、酵素活性測定のために用いる基質の選択である。Aldehyde reductase の基質である多くのアルデヒド類は、また、carbonyl reductase によっても還元されるので、このような基質を用いた場合には1つの臓器から複数の aldehyde reductase を検出することになる。例えば、ヒト脳には、初め4種の aldehyde reductase¹⁴⁾が存在するとされていたが、その後、それらは high-Km と low-Km aldehyde reductase¹⁵⁾, carbonyl reductase⁵⁾ および succinic semialdehyde reductase¹⁵⁾ と同定された。現在では、high-Km aldehyde reductase 活性の測定の特異基質として D-glucuronate, low-Km aldehyde reductase 活性の測定には glyceraldehyde が適しているとされている。

ヒトおよび動物の多くの組織には high-Km と low-Km の2種の aldehyde reductase が存在する。さらに、ヒト胎盤^{20~23)} から、研究者により異なる分子量の low-Km aldehyde reductase が精製されている。高分子量の本酵素は低分子量酵素と他のタンパク質の会合体と考えられている⁵⁸⁾。ウサギ筋肉⁴⁴⁾ の low-Km 型酵素ならびにブタ肝³⁷⁾ とニワトリ腎⁵⁶⁾ の high-Km 型酵素は、それぞれ2種の類似の分子量の多形を示す。また、遺伝学的観点から

aldehyde reductase の研究が行われている⁵⁹⁾ が、ブタ腎の酵素では抽出、精製の過程で人工的な酵素亜型が出現すると報告されている⁶⁰⁾ ので、本酵素の多形がアイソザイムであるかまたは合成後プロセッシングにより生じるものかを今後明らかにしなければならない。

TABLE II に示すように、carbonyl reductase はヒトおよび種々の動物から精製されているが、対象臓器は aldehyde reductase に比べ少ない。本酵素活性は芳香族ケトンを経質に用いれば特異的に測定でき、aldehyde reductase と同様の手段により精製されている。本酵素は多くの動物組織で分子量または等電点の異なる数種の多形として存在するので、これらの多形の分離には、等電点電気泳動およびクロマトフォーカシングが有効である。一方、細胞顆粒の carbonyl reductase の精製は、モルモット肝ミクロソームの酵素の報告^{64,65)} だけであるが、界面活性剤による可溶化後、可溶化酵素の会合を防ぐために精製に用いる緩衝液に界面活性剤を添加する必要がある。

ヒトおよび動物の脳、肝、腎 carbonyl reductase は多様性を示し、サル²⁶⁾、ウシ³²⁾、ウサギ⁴²⁾、およびハムスター⁵⁰⁾ 肝では、分子量および触媒能が異なる2種の酵素が分離され、また多くの組織の低分子量酵素は charge heterogeneity を示す。この多形は、アミノ酸組成で類似するばかりでなく、他の性状も一致する^{61,71)} ので、恐らくタンパク質合成のプロセッシングにより生じたものと考えられる。

2. 免疫化学的性状

動物組織の high-Km と low-Km aldehyde reductase は免疫化学的に異なる^{16,17,26,28,72,73)} が、ブタ肝から精製された2種の high-Km aldehyde reductase³⁷⁾ を除き、同種の異なる組織から単離した high-Km 酵素間または low-Km 酵素間では交叉反応を示す。異種動物間ではいずれの酵素も免疫化学的には異なる³⁷⁾ が、近縁な種属間、サルとヒト²⁶⁾ およびモルモットとマウス⁵⁵⁾ の肝 high-Km aldehyde reductase ならびにウサギとラットの筋肉 low-Km aldehyde reductase⁴⁴⁾ では、交叉反応が認められている。また、微量補体結合法による鳥類および昆虫類の high-Km 型酵素の分析結果から、両動物類においても進化にともなう本酵素のアミノ酸配列の大きな変化が指摘されている⁷⁴⁾。

Carbonyl reductase は aldehyde reductase とは免疫化学的に異なる^{17,26,47,49,56,70,73)}。本酵素の多形間または動物間での免疫化学的研究は少ないが、ニワトリ腎⁷¹⁾ およびモルモット肝⁷⁵⁾ の可溶性 carbonyl reductase の多形間ならびにモルモットとマウスの肺 carbonyl reductase⁷⁰⁾ 間には免疫化学的類似性が観察されているのに対し、モルモット肝ミクロソームの2種の酵素⁶⁵⁾ およびモルモットの肝と肺の酵素^{70,75)} は全く交叉反応を示さない。

3. 基質特異性

1) High-Km aldehyde reductase

哺乳動物^{4,6,18)} および鳥類^{7,56)} における各種臓器由来の high-Km aldehyde reductase の基質はいずれも類似しており、4-nitrobenzaldehyde, pyridine-3-aldehyde をはじめとする芳香族アルデヒド類と D-glucuronate などのウロン酸を 10^{-3} M の Km 値で強く還元する。これらに対し、脂肪族アルデヒド類は基質として利用されにくい。glyceraldehyde および laurylaldehyde は、芳香族アルデヒド類と同程度によく還元される。この他に、グリオキサル誘導体や 2,3-butanedione をはじめとする隣接ジケトン類もよく還元されることが報告されている^{56,66)}。しかし、芳香族、脂肪族および脂環式ケトン類やキノン類は全く基質として利用されない。また、ヒト¹⁾、ウサギ⁴³⁾ およびラット肝⁷⁶⁾ の high-Km aldehyde reductase は、抗腫瘍性抗生物質 daunorubicin を至適 pH 8.5 で還元することが報告されている。

生体内における役割を明らかにする目的で、種々の生体アルデヒドに対する基質特異性について報告されているが、本酵素は L-ascorbic acid の生合成に D-glucuronate を還元する点で関与すると考えられている⁷⁷⁾。この

他，D-xylulose を経てペントースリン酸回路への関与がモルモットおよびヒトでは提唱されている⁷⁸⁾。また，脳の酵素については，phenylethylamine および indoleamine 誘導体の酸化的脱アミノ化により生ずる α -ヒドロキシル基を有する生体アルデヒドを相当するアルコール体へと還元することが報告されている^{18,79)}。その他，ラット脳⁵¹⁾では succinic semialdehyde の還元を行い，また最近，Vayer *et al.*⁸⁰⁾ は本酵素が γ -hydroxybutyric acid から succinic semialdehyde への変換を行っていることを γ -aminobutyric acid⁵⁾の生成から明らかにした。

2) Low-K_m aldehyde reductase

Low-K_m aldehyde reductase の基質特異性は high-K_m aldehyde reductase とよく類似しているが，その芳香族アルデヒドに対する K_m 値が一般に $10^{-4}\text{M} \sim 10^{-5}\text{M}$ と低い点で区別されている。また，high-K_m aldehyde reductase がウロン酸をよく還元するのに対し，本酵素はこれをほとんど還元せず，D-glucose, D-xylose などのアルドース類をよく還元する^{13,32)}。水晶体中の本酵素活性は高く，D-glucose の還元により，糖尿病患者では高濃度の sorbitol が生成するため，水晶体中の浸透圧が増し，白内障の起因となることが示唆され，水晶体由来の本酵素の報告は多い。また，哺乳動物脳由来の酵素⁷⁹⁾は high-K_m aldehyde reductase と同様に，生体アミン由来のア

TABLE III. Substrate specificity for steroids of carbonyl reductases

Steroid	Rabbit liver				Guinea pig liver				Mouse			
	pI 6.9		pI 5.8		pI 9.0		pI 8.1		liver		lung	
	K _m (μM)	V _{max} (U/mg)	K _m (μM)	V _{max} (U/mg)	K _m (μM)	V _{max} (U/mg)	K _m (μM)	V _{max} (U/mg)	K _m (μM)	V _{max} (U/mg)	K _m (μM)	V _{max} (U/mg)
Reduction												
Testosterone	—	(3)	220	5.1	—	(3)	—	(1)	—	(0)	—	(0)
5 α -Androstan- 17 β -ol-3-one	80	1.0	61	16.1	65	0.08	41	3.5	—	(0)	13	13.2
5 β -Androstan- 17 β -ol-3-one	53	0.6	83	4.2	—	(1)	—	(1)	17	1.9	—	(2)
5 α -Androstan- 3 α -ol-17-one	—	(2)	—	(2)	—	(<1)	—	(15)	6	0.9	—	(2)
5 α -Androstan- 3 β -ol-17-one	—	(7)	—	(1)	—	(5)	—	(10)	2	1.8	—	(1)
5 β -Androstan- 3 α -ol-17-one	29	0.4	—	(0)	23	0.29	10	13.5	7	1.0	—	(0)
5 β -Androstan- 3 β -ol-17-one	—	(0)	—	(0)	—	(17)	—	(14)	—	—	—	(0)
4-Androstene- 3,17-dione	—	(2)	130	3.2	—	(20)	—	(7)	2	0.4	—	(0)
5 α -Androstane- 3,17-dione	59	2.5	32	15.2	23	0.05	—	(5)	2	0.4	—	(11)
5 β -Androstane- 3,17-dione	37	1.1	210	3.8	19	0.03	14	2.4	4	2.0	—	(21)
Oxidation												
Testosterone	—	(6)	—	(3)	31	0.98	100	2.3	20	3.6	—	(2)
5 α -Androstan- 17 β -ol-3-one	—	(6)	—	(1)	20	0.18	130	3.2	6.5	3.5	—	(0)
5 β -Androstan- 17 β -ol-3-one	170	0.2	—	(0)	20	5.88	18	0.6	8.5	0.6	—	(0)
5 α -Androstan- 3 α -ol-17-one	—	(3)	380	4.8	—	(<1)	—	(<1)	—	(0)	—	(0)
5 α -Androstan- 3 β -ol-17-one	150	6.7	100	0.3	—	(<1)	—	(<1)	—	(0)	—	(0)
5 β -Androstan- 3 α -ol-17-one	130	0.5	—	(0)	—	(0)	—	(0)	—	—	—	(0)
5 β -Androstan- 3 β -ol-17-one	—	(2)	—	(0)	—	(0)	—	(0)	—	—	—	(0)

The value in parenthesis is the activity with 0.06 mM substrate relative to the reductase activity with pyridine-4-aldehyde.

ルデヒド類および succinic semialdehyde を還元することが報告されている。最近, Wermuth *et al.*¹⁷⁾ は, ヒト脳 low-*K_m* aldehyde reductase が high-*K_m* aldehyde reductase と共に 10^{-6} M 以下の低い *K_m* 値で isocorticosteroid の 21 位のアルデヒドを還元し, corticosteroids の代謝に関与することを示唆した。

3) Carbonyl reductase

Carbonyl reductase は high-および low-*K_m* aldehyde reductase よりさらに広範な基質特異性を示し, 芳香族アルデヒド類のみならず芳香族ケトンおよびキノン類をもよく還元することで特徴づけられている^{26,27,47-50,55,67-71)}。これらの酵素はまた, 2,3-butanedione および phenylglyoxal などの隣接ジケトン類も還元し, 特にハムスター肝の高分子量酵素⁵⁰⁾ は高い活性を示すが, ウロン酸, アルドース類は全く還元せず, 脂肪族アルデヒドおよびケトン類をほとんど還元しない。しかし, モルモット⁴⁹⁾ およびマウス肺⁷⁰⁾ の酵素は, acetaldehyde および acetone を芳香族アルデヒドおよびケトン類と同程度に還元し, 他の動物組織の酵素とは異なっている。また, ウサギ肝⁴³⁾ の carbonyl reductase が pH 6.0 の至適 pH で daunorubicin をも還元することが報告されており, その至適 pH が異なることで high-*K_m* aldehyde reductase とは区別されている。

最近, 本酵素の生理的役割が注目され, 種々の生理的基質について検討されている。ヒト脳⁵⁾ の酵素は 10^{-8} M の *K_m* 値で 9-ketoprostaglandin を還元した。また, TABLE III に示すようにラット⁶⁹⁾, モルモット⁴⁸⁾ およびウサギ肝⁴²⁾ の低分子量酵素およびマウス肝および肺⁷⁰⁾ の酵素は 3-あるいは 17-ケトステロイドを低い *K_m* 値で強く還元することが報告されており, このことから, carbonyl reductase がステロイド代謝に関与することが示唆された。しかし, ヒト肝⁶¹⁾ および脳⁵⁾, サル²⁶⁾ およびイヌ肝⁶³⁾ 由来の酵素はケトステロイド還元活性はほとんど示さず, 種属により異なることが示された。

種々の芳香族アルデヒドおよびケトン類の還元体であるアルコール類を基質とした脱水素酵素活性は, いずれの種属由来の酵素でもほとんど進行せず, 本酵素が high-*K_m* aldehyde reductase や low-*K_m* aldehyde reductase と同様にその反応平衡が還元に傾いているものと思われる。しかし, TABLE III に示すようにモルモット⁴⁸⁾ およびウサギ⁴⁷⁾ の低分子量酵素は各々 17-ヒドロキシステロイドおよび 3-ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性を有し, また, その *K_m* 値も低く酸化還元のいずれにも作用することが明らかにされた。

4. 補酵素要求性

High-*K_m* aldehyde reductase はいずれの種属および臓器由来の酵素でも NADH よりも NADPH を補酵素として利用し, その *K_m* 値は 10^{-6} ~ 10^{-5} M と低く, 高い親和性を示している。この酵素の NADH 依存性活性は弱く, NADPH を用いた場合の約 10% 以下である。一方, 多くの low-*K_m* aldehyde reductase は high-*K_m* aldehyde reductase に比較して高い NADH 依存性活性を示し, その反応速度は NADPH を補酵素とした場合の 10~50% 程度を示す^{13,31,32)}。

低分子量の carbonyl reductase はいずれも NADPH 依存性であり, NADH 依存性活性はほとんど示さないが, 高分子量酵素のうちサル²⁶⁾ およびハムスター肝⁶⁶⁾, マウス肺⁷⁰⁾ の酵素は各々 30, 73 および 25% の NADH 依存性活性を示す。また, モルモット肺⁴⁹⁾ の酵素は NADH を補酵素とした場合に, NADPH 依存性活性の 2.5 倍の反応速度を示すが, NADH に対する親和性は NADPH より 10 倍低く, 生体内では NADH を補酵素として利用する可能性は低いものと思われる。

各酵素の還元反応における NADPH の水素転移の立体特異性が pro 4*S*-および pro 4*R*-(4-³H) NADPH を用いて検討されている⁷⁾。TABLE I に示すように high-*K_m* aldehyde reductase と low-*K_m* aldehyde reductase はいずれの種においても A 特異性 (pro 4*R* 水素特異性) を示したが, carbonyl reductase は種属, 臓器さらに多

形により異なる特異性を示す (TABLE II)。すなわち，ウサギ (pI 5.8)，モルモット，ラットおよびマウス肝の低分子量酵素はA特異性であるのに対し，他の *carbonyl reductase* はB特異性 (pro 4S 水素特異性) を示す。前者の酵素はいずれも高いヒドロキシステロイド脱水素酵素活性を有している点でもB特異酵素と異なっているが，このような立体特異性の違いは，これらの酵素が互いに進化においてその起原を異にする酵素であることを強く示唆する。

5. 阻 害 剤

1) High-Km aldehyde reductase

肝，腎，脳をはじめとして，いずれの臓器あるいは種属由来の酵素も，*barbital* および *phenobarbital* などのバルビツール酸類により特異的に阻害される。ウシ脳⁸¹⁾ では，種々の誘導体についてその阻害率の差異が検討されている。また，*diphenylhydantoin*，*benzodiazepine* などの抗痙攣薬により阻害されることが報告されている⁸²⁾ が，その作用発現機構と本酵素との関連については未だ明らかではない。また，*valproic acid* も *high-Km aldehyde reductase* を強く阻害する⁸²⁾。その他，銅，水銀などの重金属，*p-chloromercuribenzoate* などの SH 阻害剤および *quercitrin* などのフラボノイドによっても阻害されるが，*pyrazole*，*disulfiram* では全く阻害されず，*alcohol dehydrogenase* および *aldehyde dehydrogenase* と区別されている。

2) Low-Km aldehyde reductase

Low-Km aldehyde reductase は糖尿病性白内障を誘発する *key enzyme* と考えられている¹²⁾ ことから，その治療のために多くの *low-Km aldehyde reductase* 阻害剤について研究がなされている。ジカルボン酸⁸³⁾，種々のフラボノイド⁸⁴⁾ および *chromone*，*Alrestatin* や *sorbinil*⁸⁵⁾ など数多くのヘテロ環化合物について報告されている。これらの化合物は，*low-Km aldehyde reductase* を非拮抗的に阻害する。また，これらの阻害剤はいずれも *high-Km aldehyde reductase* を阻害するためにこれらの阻害剤に対する検討のみでは両酵素の区別は不可能であるが，*low-Km aldehyde reductase* はバルビツール酸類および *valproic acid* ではほとんど阻害されないことで区別される。一方，本酵素は比較的高濃度 (10–100 mM) の硫酸リチウムなどの硫酸イオンにより，1.5–2倍に活性化される^{32,56)}。

3) Carbonyl reductase

本酵素も *high-Km aldehyde reductase*，*low-Km aldehyde reductase* と同様にフラボノイドにより阻害されるが，種々の *carbonyl reductase* に多様性があるため，本酵素の共通な特異的阻害剤は見出されておらず，種属および臓器により異なった阻害剤感受性を示している。しかし，バルビツール酸類では阻害されず，この点で *high-Km aldehyde reductase* と区別されている。

6. 反応機構

Aldehyde reductase と *carbonyl reductase* は NADPH の水素をカルボニル基に転移し，NADP⁺ とアルコール体を生成する 2 基質 2 産物反応である。この反応において，酵素に対する NADPH と基質の結合順序および 2 生成物の解離順序により反応機構が決定される。Cleland⁸⁶⁾ による反応機構の命名法に従えば，2 基質がすべて酵素に結合後生成物が遊離される *sequential* 機構において，結合と遊離の順序が決まっている *Ordered Bi Bi* というの順でもよい *Random Bi Bi* の 2 種の機構がある。

1) High-Km aldehyde reductase

ウシ脳⁸⁷⁾ の酵素は *Random Bi Bi* 機構であるが，ブタ腎⁸⁸⁾，ラット脳⁸⁹⁾，ウサギ肝⁹⁰⁾，ヒト肝⁹¹⁾，およびウシ腎⁹²⁾ の酵素は，NADPH が最初に結合し，生成した酵素-NADPH 複合体にアルデヒド基質が結合する *Ordered*

Bi Bi 機構である。しかし、生成物遊離過程において、ラット脳、ヒト肝およびブタ腎⁹³⁾の酵素は Random 機構に従うとされ、ウシ腎の酵素は異性化過程を含む Di-iso Ordered Bi Bi 機構であり、このような反応機構の相違は用いる基質に基因する場合もある⁹⁴⁾。

2) Low-*K_m* aldehyde reductase

ラット水晶体⁹⁵⁾の酵素は Random 機構に従うが、ヒト脳¹⁷⁾、ブタ脳⁹⁶⁾、ウシ脳⁹⁷⁾および酵母⁹⁸⁾の酵素では Ordered Bi Bi 機構である。

3) Carbonyl reductase

3種のウサギ肝の酵素は、Ordered Bi Bi 機構⁹⁰⁾に、イヌ肝の酵素は Di-iso Ordered Bi Bi 機構⁶³⁾に従うことが明らかにされているにすぎず、前述のように動物種により異なる性状の酵素が精製されているので、今後さらにこれらの酵素の反応機構に関する比較研究が必要である。

Aldehyde reductase および carbonyl reductase の酵素活性に関与する解離基の種類、反応中間体の構造、酵素-基質複合体の遷移状態に関する知見は少なく、ヒト肝⁹⁹⁾およびブタ腎¹⁰⁰⁾の high-*K_m* aldehyde reductase においてヒスチジンとリジンが活性中心の解離基として同定されている。

おわりに

カルボニル化合物は医薬品はじめ食品、香料、農薬および工業薬品として用いられているほか、自然界に広く分布している。生体内因性のカルボニル化合物は、多くの生物の中間代謝産物として存在する。すなわち、動植物中に長鎖脂肪族アルデヒド、 α -ケトアルデヒドとして、また、生体カテコールアミン、tryptamine, serotonin の酸化的脱アミノ化、不飽和脂肪酸の過酸化、ステロイドホルモンの代謝、視興奮機構によるレチノール酸化などにより反応性の高いカルボニル化合物を生成する。

これら生体異物および生体内生成カルボニル化合物の代謝に関与するカルボニル還元酵素は、生体内において活性代謝物質のスカベンジャーとしての作用や糖代謝と関連を有するほか、ステロイドホルモン、プロスタグランジンおよび神経伝達物質の代謝に関与し、生体代謝過程において、それぞれの組織器官において特徴的な生理的役割を果たしている。本酵素は、また、生体に普遍的に存在することから、細胞の構成酵素として細胞の正常な生理機能を保つ役割を有し生体防御機構の観点からも重要な酵素と考えられる。

今後、本酵素の分子多様性の発現機序を明らかにし、また、その反応機構とタンパク構造との関連を分子レベルで解明するとともに、タンパク質および核酸など生体成分に対して反応性が高く、毒性を有するカルボニル化合物の解毒酵素としての毒性生化学面からのアプローチも興味ある課題と考える。

引用文献

- 1) N. K. Ahmed, R. L. Felsted and N. R. Bachur, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **209**, 12 (1979).
- 2) H. W. Culp and R. E. McMahon, *J. Biol. Chem.*, **243**, 848 (1968).
- 3) H. Sawada and A. Hara, *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 1039 (1978).
- 4) R. L. Felsted and N. R. Bachur, *Drug Metab. Rev.*, **11**, 1 (1980).
- 5) B. Wermuth, *J. Biol. Chem.*, **256**, 1206 (1981).
- 6) W. F. Bosron and R. L. Prairie, *Arch. Biochem. Biophys.*, **154**, 166 (1973).
- 7) W. S. Davidson, D. J. Walton and T. G. Flynn, *Comp. Biochem. Physiol.*, **60B**, 309 (1978).
- 8) H. B. Markus, M. Raducha and H. Harris, *Biochem. Med.*, **29**, 31 (1983).

- 9) T. Kohno, S. Hosomi and T. Mizoguchi, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3118 (1984).
- 10) H. Sawada and A. Hara, *Drug Metab. Dispos.*, **6**, 205 (1978).
- 11) K. C. Leibman, *Xenobiotica*, **1**, 97 (1971).
- 12) J. H. Kinoshita, P. Kador and M. Datiles, *J. Am. Med. Ass.*, **246**, 257 (1981).
- 13) S. M. Conrad and C. C. Doughty, *Biochim. Biophys. Acta*, **708**, 348 (1982).
- 14) M. M. Ris and J.-P. von Wartburg, *Eur. J. Biochem.*, **37**, 69 (1973).
- 15) P. L. Hoffman, B. Wermuth and J.-P. von Wartburg, *J. Neurochem.*, **35**, 354 (1980).
- 16) J.-P. von Wartburg and B. Wermuth, *Methods Enzymol.*, **85**, 506 (1980).
- 17) B. Wermuth, H. Bürgisser, K. Bohren and J.-P. von Wartburg, *Eur. J. Biochem.*, **127**, 279 (1982).
- 18) B. Wermuth, J. D. B. Münch and J.-P. von Wartburg, *J. Biol. Chem.*, **252**, 3821 (1977).
- 19) J. M. Petrash and S. K. Srivastava, *Biochim. Biophys. Acta*, **707**, 105 (1982).
- 20) B. Das and S. K. Srivastava, *Biochim. Biophys. Acta*, **840**, 324 (1985).
- 21) R. S. Clements and A. I. Winegrab, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 1473 (1972).
- 22) H. B. Feldman, P. A. Szczepanik, P. Havre, R. J. M. Corral, L. C. Yu, H. M. Rodman, B. A. Rosner, P. D. Klein and B. R. Landau, *Biochim. Biophys. Acta*, **480**, 14 (1977).
- 23) M. E. Maragoudakis, J. Wasvary, H. Hankin and P. Gargiulo, *Mol. Pharmacol.*, **25**, 425 (1984).
- 24) B. Das and S. K. Srivastava, *Arch. Biochem. Biophys.*, **238**, 670 (1985).
- 25) R. L. Bonaugh and V. G. Erwin, *J. Neurochem.*, **21**, 809 (1973).
- 26) 澤田英夫，原 明，中山俊裕，中川 誠，八代耕児，*薬学雑誌*, **104**, 74 (1984).
- 27) T. Nakayama, A. Hara, K. Kariya and H. Sawada, *J. Biochem.*, **98**, 1131 (1985).
- 28) R. F. Dons and C. C. Doughty, *Biochim. Biophys. Acta*, **452**, 1 (1976).
- 29) C. M. Ryle, T. G. Dowling and K. F. Tipton, *Biochim. Biophys. Acta*, **791**, 155 (1984).
- 30) T. Terada, T. Kohno, T. Samejima, S. Hosomi, T. Mizoguchi and K. Uehara, *J. Biochem.*, **97**, 79 (1985).
- 31) M. A. Attwood and C. C. Doughty, *Biochim. Biophys. Acta*, **370**, 358 (1974).
- 32) A. K. Daly and T. J. Mantle, *Biochem. J.*, **205**, 373 (1982).
- 33) J. C. Kawalek and J. R. Gilbertson, *Arch. Biochem. Biophys.*, **173**, 649 (1976).
- 34) C. M. Sheaff and C. C. Doughty, *J. Biol. Chem.*, **251**, 2696 (1976).
- 35) A. J. Turner and K. F. Tipton, *Eur. J. Biochem.*, **30**, 361 (1972).
- 36) J. A. Cromlish and T. G. Flynn, *J. Neurochem.*, **44**, 1477 (1985).
- 37) G. Branlant and J.-F. Biellmann, *Eur. J. Biochem.*, **105**, 611 (1980).
- 38) T. G. Flynn, J. A. Cromlish and W. S. Davidson, *Methods Enzymol.*, **85**, 501 (1982).
- 39) F. F. Morpeth and F. M. Dickinson, *Biochem. J.*, **191**, 619 (1980).
- 40) J. A. Cromlish and T. G. Flynn, *J. Biol. Chem.*, **258**, 3583 (1983).
- 41) G. Branlant, *Eur. J. Biochem.*, **129**, 99 (1982).
- 42) H. Sawada, A. Hara, T. Nakayama and F. Kato, *J. Biochem.*, **87**, 1153 (1980).
- 43) R. L. Felsted, D. R. Richter, D. M. Johnes and N. R. Bachur, *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 1503 (1980).

- 44) J. A. Cromlish and T. G. Flynn, *J. Biol. Chem.*, **258**, 3416 (1983).
- 45) D. J. Walton, *Biochemistry*, **12**, 3472 (1973).
- 46) T. Tanimoto, H. Fukuda and J. Kawamura, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2395 (1983).
- 47) H. Sawada, A. Hara, F. Kato and T. Nakayama, *J. Biochem.*, **86**, 871 (1979).
- 48) H. Sawada, A. Hara, M. Hayashibara and T. Nakayama, *J. Biochem.*, **86**, 883 (1979).
- 49) T. Nakayama, A. Hara and H. Sawada, *Arch. Biochem. Biophys.*, **217**, 564 (1982).
- 50) A. Hara, K. Seiriki, T. Nakayama and H. Sawada, "Enzymology of Carbonyl Metabolism 2 : Aldehyde Dehydrogenase, Aldo-Keto Reductase and Alcohol Dehydrogenase," ed. by T. G. Flynn and H. Weiner Academic Press, New York, (1985). p. 291.
- 51) A. J. Rivett, I. L. Smith and K. F. Tipton, *Biochem. J.*, **197**, 143 (1981).
- 52) R. L. Felsted, M. Gee and N. R. Bachur, *J. Biol. Chem.*, **249**, 3672 (1974).
- 53) W. S. Davidson and T. G. Flynn, *J. Mol. Evol.*, **14**, 251 (1979).
- 54) D. R. P. Tulsiani and O. Touster, *J. Biol. Chem.*, **252**, 2545 (1977).
- 55) 澤田英夫, 原 明, 中山俊裕, 未発表.
- 56) A. Hara, Y. Deyashiki, T. Nakayama and H. Sawada. *Eur. J. Biochem.*, **133**, 207 (1983).
- 57) G. H. Sheys and C. C. Doughty, *Biochim. Biophys. Acta*, **235**, 414 (1971).
- 58) S. K. Srivastava, B. Das, G. A. Hair, R. W. Gracy, S. Awasthi, N. H. Ansari and J. M. Petrash, *Biochim. Biophys. Acta*, **840**, 334 (1985).
- 59) P. B. Mather and R. S. Holmes, *Biochem. Genet.*, **23**, 483 (1985).
- 60) J. A. Cromlish and T. G. Flynn, *Biochem. J.*, **209**, 597 (1983).
- 61) T. Nakayama, A. Hara, K. Yashiro and H. Sawada, *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 107 (1985).
- 62) D. G.-B. Chang and H.-H. Tai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 898 (1981).
- 63) A. Hara, T. Nakayama, Y. Deyashiki, K. Kariya and H. Sawada, *Arch. Biochem. Biophys.*, **244**, 238 (1986).
- 64) H. Sawada, A. Hara, M. Hayashibara, T. Nakayama, S. Usui and T. Saeki, *J. Biochem.*, **90**, 1077 (1981).
- 65) S. Usui, A. Hara, T. Nakayama and H. Sawada, *Biochem. J.*, **223**, 697 (1984).
- 66) H. Sawada, A. Hara, T. Nakayama and K. Seiriki, *J. Biochem.*, **98**, 1349 (1985).
- 67) K. Vogel, P. Bentley, K.-L. Platt and F. Oesch, *J. Biol. Chem.*, **255**, 9621 (1980).
- 68) T. M. Penning, I. Mukharji, S. Barrows and P. Talalay, *Biochem. J.*, **222**, 601 (1984).
- 69) M. Ikeda, H. Hattori and S. Ohmori, *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 3957 (1984).
- 70) T. Nakayama, K. Yashiro, Y. Inoue, K. Matsuura, H. Ichikawa, A. Hara and H. Sawada, *Biochim. Biophys. Acta*, in press (1986).
- 71) A. Hara, Y. Deyashiki, M. Nakagawa, T. Nakayama and H. Sawada, *J. Biochem.*, **92**, 1753 (1982).
- 72) S. K. Srivastava, N. H. Ansari, G. A. Hair and B. Das, *Biochim. Biophys. Acta*, **800**, 220 (1984).
- 73) H.-P. Wirth and B. Wermuth, *FEBS Lett.*, **187**, 280 (1985).
- 74) W. S. Davidson and T. G. Flynn, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **132**, 23 (1979).
- 75) H. Sawada, A. Hara, M. Hayashibara, T. Nakayama and S. Usui, *Biochim. Biophys. Acta*, **799**, 322 (1984).

- 76) R. L. Felsted, D. R. Richter and N. R. Bachur, *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 1117 (1977).
- 77) C. C. Reddy, J. S. Swan and G. A. Hamilton, *J. Biol. Chem.*, **256**, 8510 (1981).
- 78) J. J. Burns, "Metabolic Pathways," vol. 1, 3rd ed. D. M. Greenberg, Academic Press, New York (1967). p.341.
- 79) A. J. Turner, J. A. Illingworth and K. F. Tipton, *Biochem. J.*, **144**, 353 (1974).
- 80) P. Vayer, M. Schmitt, J.-J. Bourguignon, P. Mandel and M. Maitre, *FEBS Lett.*, **190**, 55 (1985).
- 81) V. G. Erwin and R. A. Deitrich, *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 2615 (1973).
- 82) M. Javors and V. G. Erwin, *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 1703 (1980).
- 83) S. D. Varma and J. H. Kinoshita, *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 2505 (1976).
- 84) P. F. Kador, J. H. Kinoshita, W. H. Tung and L. T. Chylack, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, **19**, 980 (1980).
- 85) M. M. O'Brien, P. J. Schofield and M. R. Edwards, *J. Neurochem.*, **39**, 810 (1982).
- 86) W. W. Cleland, *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104 (1963).
- 87) R. L. Bronaugh and V. G. Erwin, *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 1457 (1972).
- 88) W. S. Davidson and T. G. Flynn, *Biochem. J.*, **177**, 595 (1979).
- 89) A. J. Rivett and K. F. Tipton, *Eur. J. Biochem.*, **118**, 635 (1981).
- 90) H. Sawada, A. Hara, T. Nakayama and M. Hayashibara, *J. Biochem.*, **92**, 185 (1982).
- 91) B. Wermuth, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **132**, 189 (1979).
- 92) A. K. Daly and T. J. Mantle, *Biochem. J.*, **205**, 381 (1982).
- 93) F. F. Morpeth and F. M. Dickinson, *Biochem. J.*, **193**, 485 (1981).
- 94) A. Magnien and G. Branlant, *Eur. J. Biochem.*, **131**, 375 (1983).
- 95) C. C. Doughty and S. M. Conrad, *Biochim. Biophys. Acta*, **708**, 358 (1982).
- 96) R. A. Boghosian and E. T. McGuinness, *Int. J. Biochem.*, **13**, 909 (1981).
- 97) C. M. Ryle and K. F. Tipton, *Biochem. J.*, **227**, 621 (1985).
- 98) G. H. Sheys and C. C. Doughty, *Biochim. Biophys. Acta*, **242**, 523 (1971).
- 99) B. Wermuth, A. Forster and J.-P. von Wartburg, *Experientia*, **36**, 735 (1980).
- 100) T. G. Flynn, D. Ferguson and W. S. Davidson, "Function and Regulation of Monoamine Enzymes : Basic and Clinical Aspects," eds. by E. Usdin, H. Weiner and M. B. H. Youdim, MacMillan Publishers Ltd., London, (1981). p. 601.