

哺乳動物のジヒドロジオール脱水素酵素

—多様性および異物と生体内物質代謝における役割について—

澤田英夫^{a)}, 原 明^{a)}, 中山俊裕^{a)}, 出屋敷喜宏^{a)}, 篠田道夫^{a)}

岐阜薬紀要 (1991) 40 : 18-31

要約 : 近年, ジヒドロジオール脱水素酵素は発癌性芳香族炭化水素の解毒酵素として注目されてきた。一方, 本酵素はナフタレンやベンゼンの代謝的活性化に関与していると考えられている。本酵素は哺乳動物組織に広く分布するが, 多くの組織で多型として存在し, 単離された酵素の性質は動物種または組織によって異なる。本稿では, 哺乳動物組織におけるジヒドロジオール脱水素酵素の多様性および異物と生体内物質代謝における役割について述べる。

索引用語 : ジヒドロジオール脱水素酵素, 多様性, 組織分布, ヒドロキシステロイド脱水素酵素, アルデヒド還元酵素, アルドース還元酵素, カルボニル還元酵素, イndanol脱水素酵素, 解毒, 代謝的活性化, 発癌性多環状炭化水素, ナフタレン白内障, ベンゼン毒性, 薬物代謝 (文101)

Mammalian Dihydrodiol Dehydrogenase. Its Multiplicity and Roles in the Metabolism of Xenobiotic and Endogenous Compounds

HIDEO SAWADA^{a)}, AKIRA HARA^{a)}, TOSHIHIRO NAKAYAMA^{a)},
YOSHIHIRO DEYASHIKI^{a)}, MICHIO SHINODA^{a)}

Ann. Proc. Gifu Pharm. Univ. (1991) 40 : 18-31

Abstract : Dihydrodiol dehydrogenase has recently attracted attention as an inactivating enzyme of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. The enzyme is thought to be involved in the metabolic activation of naphthalene and benzene. It is ubiquitously distributed in mammalian tissues where it is in various forms. There are marked species or tissue differences in the features of this enzyme. This review directs attention to the various forms of dihydrodiol dehydrogenase in mammalian tissues and its roles in the metabolism of xenobiotics and endogenous compounds.

Keyphrases : dihydrodiol dehydrogenase, multiplicity, tissue distribution, hydroxysteroid dehydrogenase, aldehyde reductase, aldose reductase, carbonyl reductase, indanol dehydrogenase, detoxication, metabolic activation, carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon, naphthalene cataract, benzene toxicity, drug metabolism (Ref 101)

a) 岐阜薬科大学生化学教室
岐阜市三田洞東5丁目6-1

a) Department of Biochemistry,
Gifu Pharmaceutical University,
6-1, Mitahora-higashi 5 chome, Gifu 502

Received February 28, 1991
The Annual proceedings of Gifu
Pharmaceutical University,
ISSN 0434-0094, CODEN : GYDKA 9

はじめに Dihydrodiol dehydrogenase (DD) は芳香族炭化水素のジヒドロジオール誘導体をカテコール体に酸化するピリジンスクロオチド要求性の脱水素酵素の常用名である。本酵素は、1959年にウサギ肝臓とバクテリア (*Aerobacter aerogenes*) の抽出液を用いた cyclohexane 誘導体の芳香族化酵素の研究において、*trans*-1,2-dihydroxy-3,5-cyclohexene (benzene dihydrodiol) を不可逆的に catechol に酸化する酵素として発見された。¹⁾ その反応では水素供与体は基質の CH-CH 基でありその水素原子が補酵素 NADP⁺ に転移すると考えられたので、本酵素は系統名 *trans*-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol : NADP⁺ oxidoreductase (EC 1.3.1.20) として分類されている。

この DD の発見以後約20年間、本酵素は単に薬物代謝酵素の1種としてみられ、benzene dihydrodiol 以外にいくつかの芳香族炭化水素の *trans*-ジヒドロジオール体^{2,3)} も動物肝臓のホモジネートにより酸化されることが報告されているに過ぎなかった。しかし、1979年、DD が Ames 試験における benzo (a) pyrene の変異原性を顕著に減弱させることが明らかにされ、⁴⁾ 本酵素は発癌性多環状芳香族炭化水素の解毒酵素として注目されるに至った。一方、benzene の毒性研究の進展にともない、骨髄に強い毒性を示す代謝物 *trans, trans*-mucondialdehyde⁵⁾ の生成経路に DD が関与し、また naphthalene 白内障の発症⁶⁾ においても本酵素が、直接、最終毒性代謝物を生成すると考えられている。このような薬物代謝および毒性学的観点から、近年種々の哺乳動物組織の DD が精製され研究されている。

DD は多くの哺乳動物組織の細胞質で複数の酵素多型として存在し、その多型の数と性状は動物種または同一動物の組織間によって異なる。精製された酵素の多くは脂環式アルコール類の酸化およびカルボニル化合物の還元を触媒するので、DD は、ジヒドロジオールのどちらかの CH-OH 基から水素原子を補酵素に転移する、いわゆるアルコール脱水素酵素群 (EC 1.1.1.●) に属する酵素であると示唆されている。^{7,8)} 事実、動物組織の DD 多型のいくつかはステロイドや糖などの生体内のアルコールやカルボニル化合物を酸化還元する酵素と同一であることが明らかになってきた。DD の多様性、種差、組織特異性に関する研究の進展は、体内に取り込まれた芳香族炭化水素の解毒・毒性発現機構および薬物代謝と生体内物質の中間代謝との関連性の解明に結び付くものと期待される。

本稿では、哺乳動物組織における DD の多様性と酵素化学的性質について、まず肝臓、次に肝臓以外の臓器の順でまとめ、また本酵素の生理的役割と薬物代謝における意義について述べる。

1. 肝臓の dihydrodiol dehydrogenase

ラット 動物肝臓の DD のうち、ラット肝臓の酵素が最初に均一に精製され、その性質も比較的詳細に研究されている。1980年、Vogel ら⁷⁾ は、肝細胞質から単離した分子量 35,000 の単量体酵素が NADP⁺ および NAD⁺ を補酵素として脂環式アルコールである acenaphthenol や 3 α -ヒドロキシステロイド類を酸化し、逆反応では 3-ケトステロイド類を還元することから、3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD, EC 1.1.1.213) との類似性を指摘した。その後、DD, 3 α -HSD および 3 α -HSD と類似性が示唆されていた carbonyl reductase (EC 1.1.1.184)⁹⁻¹¹⁾ の3種の酵素活性の同時精製¹²⁾ 等電点分析¹³⁾ および精製酵素の基質特異性の解析¹²⁻¹⁴⁾ により、肝臓ではこれら3種の酵素が同一酵素であることが証明され、生理的にはステロイドホルモンや胆汁酸^{10,11,15)} の代謝に関わる 3 α -HSD が異物のアルコールやジヒドロジオール類の酸化とカルボニル化合物の還元を触媒する広い基質特異性を示すことが明らかになった。多くの研究者によって^{10,13,16,17)} 肝細胞質の 3 α -HSD および DD には等電点の異なるいくつかの分子種があると報告されているが、免疫化学的研究¹⁸⁾ ではこの酵素多型が人工的な産物であると示唆されている。ラット肝臓の DD 活性は雄より雌に高く、¹⁹⁾ 3 α -HSD の性差²⁰⁾ と一致する。このように、ラット肝臓に

における DD 活性の大部分がこの組織に多量に存在する細胞質 3 α -HSD によるものであるが、後述の他の動物の場合と同様に、ラットの肝細胞質から精製した aldehyde reductase (EC 1.1.1.2) も弱い DD 活性を示し、²¹⁾ またミクロソームにも 3 α -HSD 活性のない DD が存在することも報告されている。²²⁾

ラット肝細胞質の 3 α -HSD は 1 つの NADPH 結合部位をもち、⁷⁾ その活性中心にはシステイン残基が存在し、²³⁾ 本酵素反応は速度論的に ordered bi bi 機構に従う。²⁴⁾ さらに、3 つのユニークな特性が報告されている。第一は、本酵素が prostaglandin の 9, 11 または 15 位の水酸基を可逆的に酸化することである。²⁵⁾ その活性は低いが、肝臓における prostaglandin の代謝に本酵素が関与すると示唆されている。第二は、本酵素が種々の抗炎症剤により強く阻害されることであり、^{12, 26)} 抗炎症剤の投与は本酵素を阻害することによって細胞内のグルココルチコイド濃度の上昇を招くと考えられている。²⁷⁾ 一方、本酵素の阻害率はこれらの薬剤の標的酵素 cyclooxygenase の阻害率ならびにヒトにおける常用量と高い相関があるので、^{26, 28)} 本酵素に対する阻害度の分析は簡便で迅速な抗炎症剤のスクリーニング法として有用であるとされている。第三は、3 α -HSD が肝細胞質の胆汁酸結合タンパク質の 1 種 (Y' binder) と同一であり、¹⁷⁾ 本酵素は肝細胞内から胆管側への胆汁酸の細胞内輸送にも機能していると考えられている。²⁹⁾

モルモット肝細胞質から 8 種の DD 多型 (分子量 28,000~34,000) が精製されている。³⁰⁾ このうち、7 種は NADP⁺-依存性 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD, EC 1.1.1.64) 多型、³¹⁾ 1 種は aldehyde reductase であることが酵素化学的、免疫化学的分析から明らかにされた。7 種の 17 β -HSD は、構造、免疫化学的性質およびステロイド基質に対する特異性の差異から、5 β -アンドロスタン類に高い反応性を示すグループと 5 α -アンドロスタン類を基質とするグループの 2 つのアイソザイムに分類されている。^{30, 32)} 前者は後者より benzene dihydrodiol に対する反応性が高い。さらに、これらの 17 β -HSD アイソザイムはいずれも脂環式アルコール類の酸化とカルボニル化合物の還元を触媒するので、モルモット肝細胞質の carbonyl reductase³³⁾ と同一酵素である。また、17 β -HSD アイソザイムは非ステロイド性抗炎症剤と合成エストロゲンにより阻害される。³⁴⁾ 一方、DD 多型のマイナー酵素である aldehyde reductase は酸化反応ではジヒドロジオール体に特異的であるが、その酸化活性は本来の基質であるアルデヒド類の還元活性よりかなり低い。したがって、肝臓の DD 活性の大部分は 17 β -HSD によると考えられている。

マウス肝細胞質から 4 種の DD 多型が単離され、主酵素型とマイナー酵素型の 1 種は分子量 30,000 と 34,000 の単量体であるが、他のマイナー酵素型は分子量 64,000 の二量体と報告されている。³⁵⁾ 単量体の主酵素とマイナー酵素は、それぞれモルモットの酵素と類似の 17 β -HSD と aldehyde reductase と同定されたが、³⁶⁾ 二量体酵素の本体は明らかでなく、マウスの系統によりかなり性質が異なるようである。その後、等電点、基質に対する親和性および阻害剤感受性の異なる 3 種の 17 β -HSD が分離精製されたが、³⁷⁾ これらは反応機構においては差異がなく、速度論的に ordered bi bi 機構に従い、補酵素 NADPH の 4-pro-R⁻水素原子をステロイド基質の α -面に転移する。³⁸⁾ 別に、マウス肝細胞質から分子量 34,000 単量体 3 α -HSD が精製されている。本酵素は、NADP⁺ と NAD⁺ を補酵素とするラット肝臓の 3 α -HSD とほぼ同じステロイドやカルボニル化合物に対する特異性、反応機構、抗炎症剤に対する感受性を示すが、NADP⁺ に特異的で、脂環式アルコール類や benzene dihydrodiol の酸化活性は低い。³⁹⁾ したがって、マウス肝細胞質の DD の多様性は 17 β -HSD, aldehyde reductase, 3 α -HSD の他、生理的基質が不明な 2 種の dehydrogenase から構成され、このうち量的にも反応性の点からも 17 β -HSD がこの組織におけるジヒドロジオール酸化代謝の主要酵素と考えられる。

ウサギ肝細胞質から acenaphthenol などの脂環式アルコールを酸化する 7 種の単量体脱水素酵素 (分子量 30,000~37,000) が精製されている。⁴⁰⁾ これらの酵素はいずれも DD 活性を示し、さらに生理的基質としてヒドロ

キシステロイド類を低い Km 値で可逆的に酸化する。ステロイド基質およびカルボニル化合物に対する特異性の差異から、5種の酵素型は 17 β -HSD, 他の2種は carbonyl reductase 活性を示す 3 α -HSD と 3(17) β -hydroxysteroid dehydrogenase (EC 1.1.1.209) と考えられている。この結果は、この組織には分子量 35,000 前後の複数の 17 β -HSD 多型が存在すること、⁴¹⁾ ならびに carbonyl reductase が 3 α -HSD と 3(17) β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性を示す⁴²⁾ という報告と一致する。また、ウサギ肝臓から精製した aldehyde reductase も弱い DD 活性を示し、²¹⁾ さらにこれらの単量体 DD 多型に加えて分子量 110,000 と 60,000 の 17 β -または 17 α -hydroxysteroid dehydrogenase 活性を有するオリゴマー酵素が存在する⁴³⁾ とされ、ウサギ肝臓における DD の多様性は他の動物より複雑である。この多様性の成因を明らかにするため、最近タンパク質化学的研究⁴⁴⁾ も行われている。

ハムスター 肝細胞質から5種の分子量約 35,000 の DD多型が精製されている。⁴⁵⁾ このうち、2種は酵素化学的、免疫化学的性状からマウス肝臓の酵素と類似の NADP⁺-依存性 3 α -HSD と aldehyde reductase と同定されたが、塩基性のマイナー酵素の2種は強い NADPH-依存性 carbonyl reductase 活性を示し、残りの1種は NADP⁺ より NAD⁺ をより良い補酵素として 3 α -ヒドロキシステロイド類だけでなく、17 β -ヒドロキシステロイド類も可逆的に酸化する。この NAD⁺-依存性酵素は、構造⁴⁶⁾ および速度論的な反応機構⁴⁷⁾ においても NADP⁺-依存性 3 α -HSD と異なり、ステロイド核上の異なる部位に結合した水酸基の酸化還元を触媒する多機能な 3 α (17 β)-hydroxysteroid dehydrogenase であることが明らかにされた。

ウシ 肝細胞質から3種の分子量約 35,000の DD 多型が分離され、このうち2種は 3 α -HSD と aldehyde reductase と考えられているが、もう1種の酵素型は benzene dihydrodiol に特異的であると報告されている。⁴⁸⁾

ブタ この動物肝臓には高分子量 65,000の DD が aldehyde reductase を含む3種の低分子量酵素(分子量約 32,000) よりも多量に存在する。⁴⁹⁾ 精製された高分子量酵素は二量体タンパク質で、酸化反応においては補酵素 NADP⁺ および基質ジヒドロジオール体に特異的であるが、還元反応では α -ジケトン類と数種のアルデヒドを還元する。本酵素は最適 pH 7.5 において methylglyoxal を低い Km 値で還元するので、細胞内では解糖およびアセトンとスレオニン代謝から生成する比較的毒性の高い methylglyoxal の除去に関与していると示唆されている。

サル 4種の DD 多型が精製され、酵素化学的性質から3種類に分類される。⁵⁰⁾ いずれも分子量約 35,000 の単量体で最もマイナーな酵素種は aldehyde reductase と同定され、1種はラット肝臓の酵素と類似の NADP⁺ と NAD⁺ を補酵素とする 3 α -HSD, 他の1種は、脂環式アルコール類を強く酸化するので、indanol dehydrogenase と考えられた。このサル肝に特異な indanol dehydrogenase によるアルコールの酸化反応は速度論的に ordered bi bi 機構に従い、その補酵素への水素転移の立体特異性では A-特異的であり、疎水性の芳香族化合物や合成ステロイドは本酵素の強い拮抗阻害剤となる。⁵¹⁾ その後、本酵素はステロイドのうち胆汁酸や 5 β -プレグナン類の 3 α -または 20 α -水酸基を可逆的に酸化し、かつこれらのステロイド基質に対して高い親和性を示すことから、生理的には胆汁酸やグルココルチコイドの代謝において機能する bifunctional な新しい酵素 3(20) α -hydroxysteroid dehydrogenase であることが明らかにされた。⁵²⁾

ヒト ヒト肝臓の DD 活性には大きな個人差がみられ、それは人種、性別、病歴とも相関しない。⁵³⁾ 最近、4種類の単量体酵素(分子量 36,000~39,000) が高度に精製された。⁵⁴⁾ これらの酵素種のうち、3種は、サル肝臓の酵素多型と同様に、aldehyde reductase, 3 α -HSD および 3(20) α -hydroxysteroid dehydrogenase であり、霊長類間では DD の多様性にかかなりの類似性が認められる。しかし、ヒト肝臓のもう1種の酵素は、強い indanol dehydrogenase 活性を示す点で 3(20) α -hydroxysteroid dehydrogenase と似ているが、20 α -ヒドロキシステロイド類を

酸化せず、アンドロスタン類の 3 α -水酸基だけを弱く酸化する。そのアンドロゲンに対する K_m は μM オーダーであるので、本酵素型はヒトに特異な 3 α -HSD アイソザイムと考えられている。これらの酵素の構造上の差異、ステロイド代謝における機能分担、およびヒト肝臓における DD 多型とその活性の個人差との関連性に関する今後の研究が期待される。なお、これらの 3 α -ヒドロキシステロイド類を酸化する 3 種の DD は、ステロイド特異性、最適 pH、等電点において、胆汁酸 3-ケト基の還元を特異的に触媒するヒト肝 3 α -HSD (分子量約 32,000)⁵⁵⁾ と異なる。また、ラット肝臓の Y' binder と類似の分子量 (36,000) をもつ胆汁酸結合タンパク質がヒト肝臓から精製されている。このタンパク質は、ラットの場合¹⁷⁾ と異なり、DD 活性を保持しているにも拘わらず 3 α -HSD 活性を示さないことが報告されている。⁵⁶⁾ しかし、この胆汁酸結合タンパク質の DD 活性は脂環式アルコールの acenaphthenol を基質として測定されているので、真のジヒドロジオール酸化活性を示すかどうか不明である。今後、DD として精製された 4 種の酵素と胆汁酸結合タンパク質との関連性を明らかにすることが重要である。

2. 肝臓以外の組織の dihydrodiol dehydrogenase

各種動物で DD 活性の組織分布が調べられ、また肝臓以外の諸臓器からも本酵素が精製されている。次に、各種動物における DD の分布と性質について述べる。

ラット 基質 benzene dihydrodiol 酸化活性の測定法により DD の組織分布が異なることが報告されている。NADPH の生成速度による分光学的測定では、⁵⁷⁾ 肝臓が最も高い比活性を示し、肝臓の 1/5 以下の活性が精巣 > 肺 = 副腎 > 脳の順で検出されているのに対して、生成物 catechol を放射化学的に測定した場合には、⁵⁸⁾ 肝臓と肺は同程度の活性を示し、以下心臓 > 小腸 > 精巣 > 精巣上体 > 前立腺 > 脾臓の順である。肝臓では DD が抗炎症剤感受性の 3 α -HSD と同一であることから、種々の組織の 3 α -HSD について研究されている。脳から精製された 3 α -HSD⁵⁹⁾ は多くの点で肝臓の酵素と類似しているが、carbonyl reductase 活性を示さない点で異なる。また、抗炎症剤により阻害される 3 α -HSD 活性は種々の組織に存在する⁶⁰⁾ が、肝臓の抗 3 α -HSD 抗体と反応するタンパク質は上記の組織のうち肺、小腸、精巣にしか検出されない¹⁸⁾ ので、組織により免疫化学的に異なる 3 α -HSD が存在するのかもしれない。さらに、3 α -HSD 特異阻害剤による各組織抽出液の DD 活性の阻害実験⁵⁸⁾ からも、肝臓と小腸以外の臓器には 3 α -HSD と異なる DD が存在すると示唆されている。水晶体から精製された DD はアルドースを還元する aldose reductase (EC 1.1.1.21) であることが明らかにされている。⁶¹⁾

モルモット ほとんどすべての臓器に DD 活性が検出され、腎臓と精巣は肝臓に次いで高い比活性を示す。³⁰⁾ 精巣から 4 種の DD 多型が分離され、そのうちマイナー酵素型の 1 種は免疫化学的に aldehyde reductase と同定され、主酵素型 2 種が均一に精製されている。⁶²⁾ 両精製酵素は分子量 32,000 と 34,000 の単量体であるが、肝臓のいずれの酵素とも異なり 17 β -HSD 活性を示さない。酵素化学的性質から、1 種は aldose reductase と同定されたが、他の 1 種は酸化反応においては benzene dihydrodiol に特異的であり、逆反応ではいくつかのカルボニル化合物を弱く還元するが、その生理的基質は不明である。著者ら²¹⁾ は、腎臓の DD 多型に関する予備的研究において、4 種の酵素多型を精製した。主酵素型は肝臓の酵素と同じ 17 β -HSD³¹⁾ であり、他の 3 種の酵素型は精巣の酵素多型と同様に、aldose reductase, aldehyde reductase および benzene dihydrodiol に特異的な酵素であった。また、水晶体では aldose reductase が主要な DD とされている。⁶¹⁾

マウス 腎臓には、肝臓とほぼ同等の高い DD 活性が存在するが、肝臓で DD の主酵素型である 17 β -HSD の活性はほとんど検出されない。⁶³⁾ 腎臓から 4 種の DD 多型が精製され、このうち 2 種は免疫化学的にも肝臓に存在する NADP⁺-依存性 3 α -HSD と aldehyde reductase と同定された。しかし、残りの 2 種は NADP⁺, NAD⁺ いず

れも補酵素として *trans*-および *cis*-benzene dihydrodiol を酸化する点で他の動物組織の酵素と異なる。さらに、この両酵素型は 10^{-7} ~ 10^{-6} M の低い *K_m* で 3 α -および17 α -ヒドロキシステロイド類を可逆的に酸化するので、生理的にはステロイドの代謝において 3(17) α -hydroxysteroid dehydrogenase (EC 1.1.1.209) として機能していると考えられている。⁶³⁾ また、水晶体には分子量65,000と34,000の2種の DD が存在し、このうち量の多い低分子量酵素は aldose reductase と考えられている。⁹¹⁾

ウサギ 肺、腎臓、脾臓、筋肉、脳などの DD 活性は肝臓の1/10以下と低く、ゲルろ過分析では分子量約35,000の酵素が認められている。これに対して、水晶体に湿重量当りの比活性で肝臓の約2/3に相当する高い本酵素活性が検出され、その活性の大部分がこの組織にのみ認めらる高分子量酵素(65,000)によるものであり、低分子量酵素含量は少ない。⁶¹⁾ 水晶体から精製された高分子量酵素はブタ肝臓の酵素と酵素化学的、免疫化学的に類似した二量体 DD であり、低分子量酵素は aldose reductase と同定されている。このように、ウサギでは水晶体と他の組織の DD には著しい相違がある。

ブタ ウサギと同様に、DD 活性は肝臓に次いで水晶体に高く、以下腎臓>脾臓>脳>筋肉>肺の順である。⁴⁹⁾ ゲルろ過分析において、肺を除く組織では肝臓の二量体酵素と同じ高分子量酵素が主酵素型であり、低分子量(32,000)酵素の含量は少ない。各組織から精製した主酵素はすべて肝臓の二量体酵素と免疫化学的にも同一である。^{49,61)} このように、ブタの場合には、二量体酵素がほとんどすべての組織に分布する点で他の動物と大きな違いがある。しかし、低分子量酵素は組織により異なり、水晶体⁶⁴⁾と筋肉⁴⁹⁾ではともに aldose reductase であるとされているのに対して、腎臓⁴⁹⁾から精製した低分子量酵素は aldehyde reductase である。

サル ニホンザル、カニクイザル、アカゲザルの3系統においても、腎臓に肝臓やその他の臓器より極めて高い DD 活性が存在することが特徴である。^{61,65,66)} 腎臓には、aldehyde reductase に一致する低分子量酵素もわずかに存在するが、分子量65,000のホモダイマーの DD が極めて多い。⁶⁵⁾ この二量体酵素は酵素化学的にも免疫化学的にもブタ組織の二量体酵素と類似している。⁴⁹⁾ 本酵素は腎臓以外の組織には認められず、腎臓では皮質の近位および遠位尿細管、髄質ではヘンレ係蹄に局在する。⁶⁶⁾ しかし、本酵素の生理的基質は明らかでない。

ヒト 肝臓以外に肺⁵³⁾と腎臓²¹⁾の DD 活性が測定されている。これらの臓器の DD 活性においても個人差が大きいが、肝臓に比べ著しく低く、腎臓と肺の比活性はそれぞれ肝臓の1/10および1/1000である。著者ら²¹⁾は、腎臓から DD 精製を試み、腎臓では肝臓のような多型は認められず、ほとんどの DD 活性が aldehyde reductase によるものであることを明らかにした。このことは、サル腎臓では二量体酵素が多量に存在すること^{65,66)}と対照的であり、霊長類においても組織により DD の性質に大きな種差があることを示している。

3. 薬物代謝における dihydrodiol dehydrogenase の役割

(1) 発癌性多環状芳香族炭化水素の解毒

多環状芳香族炭化水素はヒトおよび各種実験動物に対して強い発癌性を示す環境汚染物質であり、生体内で代謝的活性化を受ける。最終発癌物質 (ultimate carcinogen) は飽和ベンゾ環の角部に湾領域 (bay region) の一部を形成する反応性の高い *trans*-ジヒドロジオールエポキシド代謝物である。例えば、benzo (a) pyrene⁶⁷⁾ は cytochrome P-450-mixed function oxidase系による最初のエポキシ化をうけ、生じた benzo (a) pyrene 7,8-oxide は epoxide hydrolase により benzo (a) pyrene-7,8-dihydrodiol に変えられる。次に再び cytochrome P-450 によりこの *trans*-ジヒドロジオール体の9と10位がエポキシ化され、最も強い発癌性を示す (+)-anti-benzo (a)-pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide を生成する (Fig. 1)。多環状芳香族炭化水素による化学発癌の発現には、標的細胞

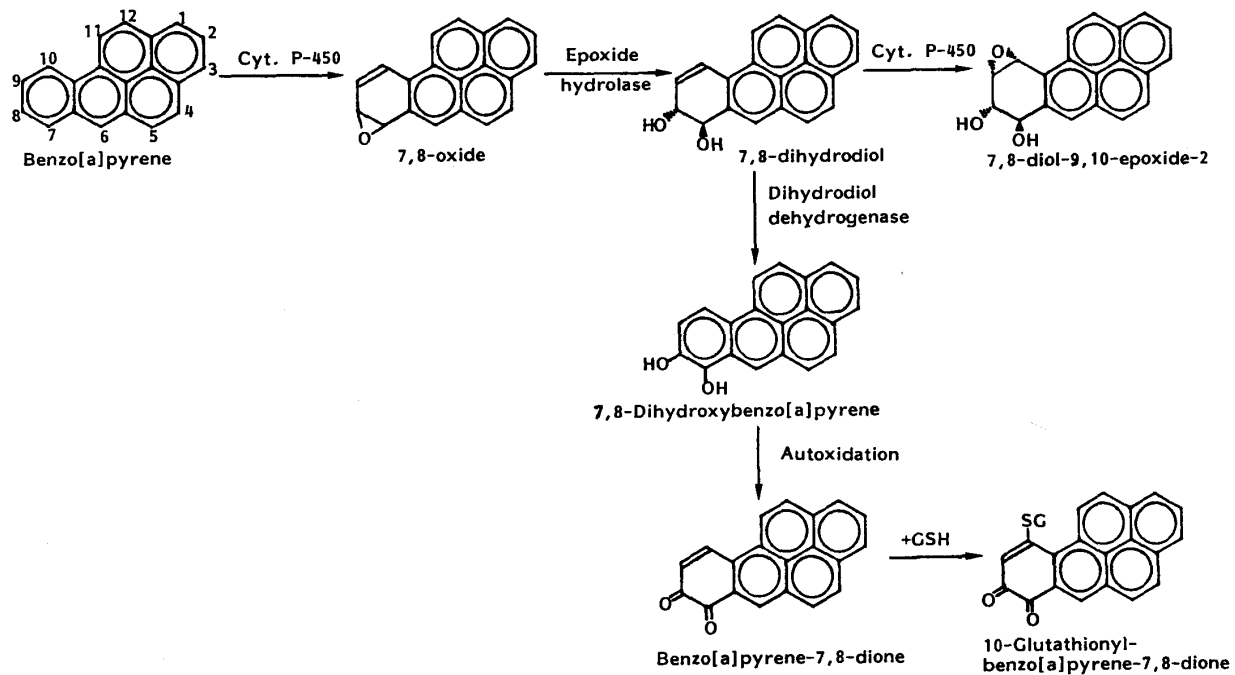


Fig. 1 Metabolic activation of benzo (a) pyrene and potential pathway of proximate carcinogen metabolism initiated by dihydrodiol dehydrogenase.

の最終発癌代謝物と DNA との付加体の性質，修復の程度などに加え，多環状芳香族炭化水素の代謝的活性化に関わる酵素と不活性化経路の酵素のバランスも重要な因子となる。

DD が多環状芳香族炭化水素の不活性化酵素であることは，最初，ラット肝臓から精製された酵素が Ames 試験における benzo (a) pyrene⁴⁾ と benz (a) anthracene-8,9-diol-10,11-epoxide⁶⁸⁾ の変異原性を減少させる発見から示唆された。すなわち，DD は多環状芳香族炭化水素の中間発癌代謝物である *trans*-ジヒドロジオール体を反応性の低い代謝物に酸化することにより，これらの発癌性化合物の解毒酵素として機能すると考えられた。この仮説は，ラット肝臓の精製酵素が 7,12-dimethylbenz (a) anthracene, benz (a) anthracene, benzo (a) pyrene, 5-methylchrysene, chrysene などの *trans*-ジヒドロジオール中間発癌物質を酸化すること^{69,70)} により証明された。また，DD による酸化生成物は benzene dihydrodiol の場合には安定な catechol であるが，他の芳香族炭化水素の *trans*-ジヒドロジオール体の場合には酸化により生じたカテコール体は自動酸化により反応性の高い *ortho*-キノン体に変換される。^{18,71)} このキノン体は細胞内のグルタチオンなどの親核性物質と反応し，^{8,72)} 排泄されやすい水溶性の代謝物に変えられる。このような経路により，DD は発癌性多環状芳香族炭化水素の解毒に重要な役割を果たす。DD の研究において，種々の動物組織から精製された酵素は基質特異性の異なる hydroxysteroid dehydrogenase, aldehyde reductase, aldose reductase などの多様な酵素であることが明らかになってきた。しかし，発癌性多環状芳香族炭化水素の *trans*-ジヒドロジオール体に対する特異性や速度論的反応定数はラット肝臓の 3 α -HSD⁶⁹⁻⁷¹⁾ 以外の酵素では測定されていない。また，ウサギ肝臓の DD 多型間⁴³⁾ ではモデル基質の benzene dihydrodiol と benz (a) anthracene-3,4-diol の酸化率にかなりの相違があることが示されている。今後，発癌性多環状芳香族炭化水素の解毒における DD の役割を明確にするためには，一つの組織の DD 多型ならびに組織に特異な酵素の多環状芳香族炭化水素の *trans*-ジヒドロジオール体に対する反応性を比較する必要がある。

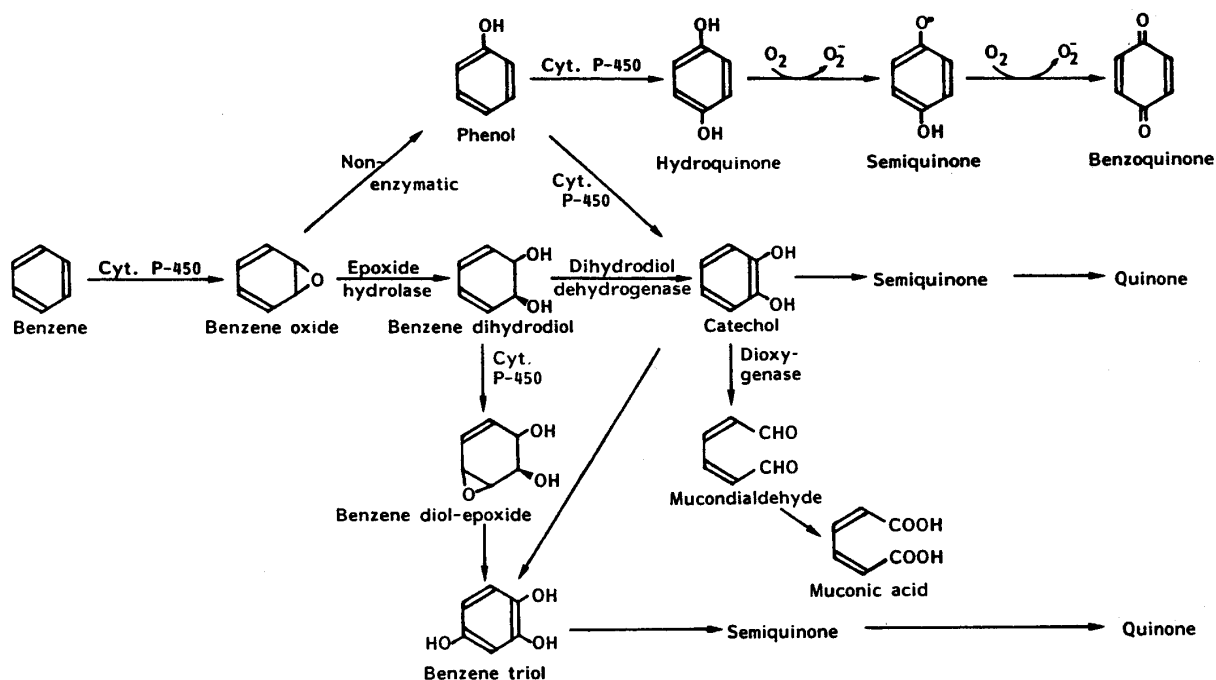


Fig. 2 Metabolic activation pathway of benzene.

(2) Benzene の代謝的活性化と解毒

Benzene の慢性中毒で最も重大な毒性は造血組織の損傷である。特に、骨髄に対する毒性が特徴的であり、貧血や白血球・血小板の減少をきたす。Benzene の主な代謝経路⁷³⁾は、Fig. 2 に示すように、まず cytochrome P-450 により benzene oxide に酸化され、このエポキシドは非酵素的転位により phenol を生成後、hydroquinone または catechol に代謝される。また、benzene oxide は酵素反応により benzene dihydrodiol を経て catechol に代謝される。このうち、benzene の最終毒性代謝物は hydroquinone または catechol から誘導されるキノンまたはセミキノン体とされている。最近、ミクロソーム酵素による catechol の開裂により生じる *trans, trans*-mucondialdehyde⁷⁴⁾ も骨髄に対して強い毒性を示すこと⁵⁾が報告されている。したがって、DD は benzene dihydrodiol を酸化することによって中間毒性代謝物 catechol を生成するので、benzene の血液毒性の発現に関与すると考えられている。⁷⁵⁾

一方、benzene 蒸気にさらされているヒトでは疫学的に骨髄性白血病の発生率が高く、benzene は実験動物においても白血病やリンパ腫を誘発させる発癌性もあることが知られている。⁷⁶⁾ その最終発癌代謝物は現在明らかでない

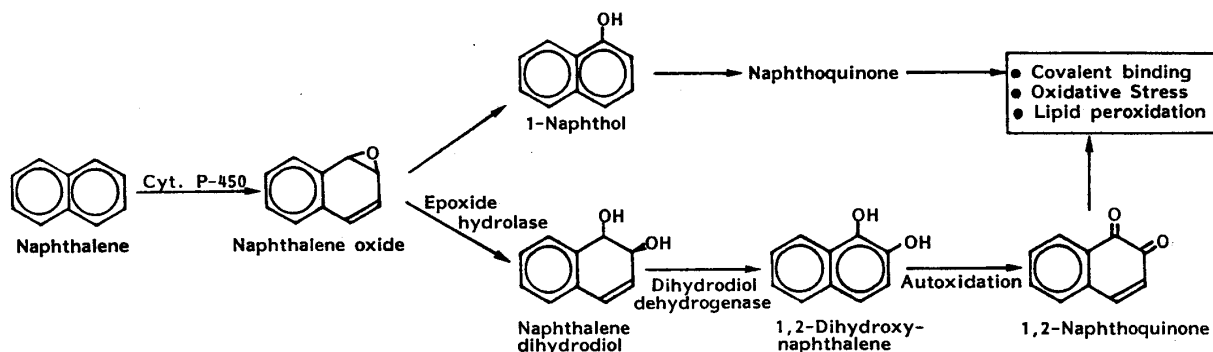


Fig. 3 Potential relationship between naphthalene biotransformation and cytotoxicity.

が、benzene dihydrodiol がさらに酸化されて生成する benzene-1,2-diol-3,4-oxide が変異原性⁷⁷⁾ および新生マウス肺に対して腫瘍形成能⁷⁸⁾が高いとされている。この benzene の代謝的活性化に対しては、逆に DD は前駆体 benzene dihydrodiol⁷⁵⁾を catechol に代謝するので、解毒酵素として作用していると示唆されている。

(3) Naphthalene 白内障

Naphthalene のヒトに対する毒性として白内障と溶血性貧血^{79,80)}が知られている。この薬物の投与により、ウサギ^{6,81)} マウス⁸²⁾ ラット^{6,83)} に白内障が惹起され、さらにマウスに特異的であるが、肺気管支の上皮細胞の壊死⁸⁴⁾と腎臓の近位尿細管に障害⁸⁵⁾が起きる。マウスにおける選択的な肺と腎臓の障害は組織内の naphthalene から naphthalene oxide への代謝速度およびこの反応性の代謝物のグルタチオン抱合による解毒速度に依存していると考えられている。^{86,87)}

白内障の成因となる naphthalene の代謝については、動物により異なる代謝的活性化経路が考えられている。ウサギでは、水晶体以外の組織で生成し血流を介して水晶体に運ばれてきた naphthalene dihydrodiol が DD により不安定な 1,2-dihydroxynaphthalene に酸化される。このカテコール体は直ちに自動酸化され H_2O_2 と 1,2-naphthoquinone を生じる (Fig. 3)。このキノンが水晶体成分と共有結合し、また H_2O_2 およびキノンから生じるフリーラジカルによる酸化的ストレスと脂質過酸化により障害が引き起こされるとされている。^{6,88)} ウサギの水晶体には他の組織と異なる性質の二量体 DD が高濃度に存在すること⁶¹⁾もこの仮説を支持する。一方、マウスとラットでは水晶体内の DD 活性が低い^{61,89)}ので、ウサギの場合と違う毒性発現機構が考えられている。ラットに naphthalene を投与した場合には、有色動物の方がアルビノ系より白内障を発生しやすいので、虹彩の tyrosinase が 1,2-naphthoquinone の生成に関与するとされ、^{6,83)} マウスでは 1-naphthol の酸化により生じる 1,4-naphthoquinone またはその反応性の中間体が最終毒性代謝物であることが示唆されている。⁸²⁾ しかし、aldose reductase 阻害剤である AL-1576 の投与はラットにおける naphthalene 白内障の発症を防ぐことが報告されている。⁹⁰⁾ この動物の水晶体の DD は aldose reductase である⁶¹⁾ので、aldose reductase が 1,2-naphthoquinone の生成に関与する可能性も排除できない。

(4) その他の薬物の代謝

哺乳動物組織から精製された単量体 DD の多くは、aldehyde reductase と aldose reductase を除いて、ステロイドに対する特異性の異なる hydroxysteroid dehydrogenase である。これらの酵素は共通して、異物の脂環式アルコール類をステロイド基質と同等かもしくはより強く酸化するので、体内に取り入れられた脂環式アルコール化合物は恐らくこれらの脱水素酵素によって酸化代謝されると考えられる。しかし、生成物のケトン体は元のアルコール体より体外に排泄されにくくなり、逆に毒性を惹起させることになるかもしれない。環境汚染物質の indan はミクロソームの酵素により 1-indanol に酸化される。⁹¹⁾ 1-Indanol が酸化されて生じる 1-indanone は催奇性を示す。⁹²⁾

一方、動物組織の DD は、ウシ肝臓の 1 種の酵素を除いて、いずれも異物カルボニル化合物の還元活性を示す。薬物カルボニル化合物の還元代謝に関わる主要な酵素は aldehyde reductase, aldose reductase, carbonyl reductase である。^{93,94,95)} cDNA 塩基配列の解析に基づく一次構造の比較では、aldehyde reductase と aldose reductase は 65% の相同性があり、⁹⁶⁾ 活性部位の一部のアミノ酸配列も同一である⁹⁷⁾のに対して、両酵素と carbonyl reductase との間ではほとんど相同性が認められない。⁹⁸⁾ 多くの動物組織の aldehyde reductase と aldose reductase がともに DD 活性を示すことも両酵素の活性中心の構造の類似性を示唆する。しかし、これらの酵素以外の DD はステロイド基質に対する特異性または構造においても共通性がない。ラット、モルモット、マウス、ウ

サギ肝臓においては 3α -HSD や 17β -HSD が *carbonyl reductase* と同一酵素であるが，サルとヒト肝臓の DD の性質は以前に著者ら^{99,100)} が報告した *carbonyl reductase* と異なる。その他の動物組織の DD の研究で見い出された二量体 DD (ブタ組織，サル腎臓，ウサギ水晶体)， $3(17)\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase (マウス腎臓)， NAD^+ -依存性 $3\alpha(17\beta)$ -hydroxysteroid dehydrogenase (ハムスター肝臓) は，今までの *carbonyl reductase* の研究では見い出されていない酵素である。これらの DD 活性をもつ酵素がその組織で *carbonyl reductase* そのものであるかは今後明らかにしていかなければならないが，哺乳動物組織の DD の多様性と各酵素型が多機能性は動物種または組織によって様々な酵素種が薬物カルボニル化合物の還元代謝に関与していることを示唆する。

おわりに 薬物代謝酵素として知られている *cytochrome P-450*, *epoxide hydrolase* や抱合酵素は，体内に取り入れられる多種多様な構造の化合物に対処するために，基質特異性が低く，また基質特異性の若干異なる複数の分子種として存在する。本稿で示してきたように，哺乳動物組織の DD も多様性を示すが，その多様性は，*cytochrome P-450* のような一酵素種の分子多様性でなく，様々な酵素種が DD 活性を示すことによるものである。すなわち，生理的基質が明らかでない DD もあるが，その多型は *aldehyde reductase*, *aldose reductase* およびステロイドに対する特異性が違う 3α -， 17β -， $3(17)\alpha$ -， $3(17)\beta$ -， $3(20)\alpha$ -， $3\alpha(17\beta)$ -hydroxysteroid dehydrogenase である。このように，既知の酵素と同一であることが証明され，また本来の生理的基質が同定された現在，これらの酵素を DD と呼ぶのは適当でないかもしれない。しかし，これらの酵素は異物のジヒドロジオール誘導体や脂環式アルコール類を酸化し，種々のカルボニル化合物を還元するので，薬物代謝酵素としての役割も重要である。Jakoby and Ziegler¹⁰¹⁾ は，微生物は環境に存在する毒性物質を利用するが，動物は体内に取り入れられる外来性の有毒物質を排泄する方法によって環境に適応するように進化してきたと述べている。すなわち，動物体内では解毒酵素は代謝という手段によって毒性物質を除去または薬理的に不活性化するために発現されている。*Aldehyde reductase* と *aldose reductase* は，特定の生理的基質が明らかでないので，広い意味で，体内で排泄すべき代謝物や異物のカルボニル化合物を還元する解毒酵素であろう。また，*hydroxysteroid dehydrogenase* の場合には，進化の過程で動物種によって異なるステロイド特異性を示す酵素が異物に対する生体の防御機構の一つとして DD 作用を獲得するに至ったと考えられる。

多くの *hydroxysteroid dehydrogenase* はステロイド核の水酸基の位置および立体配位に対して厳格な選択性を示す。一方，本稿で紹介したヒドロキシステロイド脱水素酵素は異物に対して DD 活性だけでなく *carbonyl reductase* および *indanol dehydrogenase* 活性も示す。また，動物種によってステロイド基質に対する選択性の異なる *hydroxysteroid dehydrogenase* がこれらの薬物代謝酵素活性を示したり，酵素作用と異なる胆汁酸結合作用も発揮する。今後，分子生物学的手法を用いた構造・機能相関の解析により，この酵素学のおよび比較生化学的にも興味ある特性を明らかにしていかなければならない。

引用文献

- 1) P. K. Ayengar, O. Hayaishi, M. Nakajima, and I. Tomida, *Biochim. Biophys. Acta*, **33**, 111 (1959).
- 2) D. M. Jerina, H. Ziffer, and W. Daly, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1056 (1970).
- 3) J. Booth and P. Sims, *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 979 (1976).
- 4) H. R. Glatt, K. Vogel, P. Bentley, and F. Oesch, *Nature*, **277**, 319 (1979).
- 5) G. Witz, G. S. Rao, and B. D. Goldstein, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **80**, 511 (1985).

- 6) R. van Heyningen, *Exp. Eye Res.*, **28**, 435 (1979).
- 7) K. Vogel, P. Bently, K. L. Platt, and F. Oesch, *J. Biol. Chem.*, **255**, 9621 (1980).
- 8) T. E. Smithgall, R. G. Harvey, and T. M. Penning, *J. Biol. Chem.*, **263**, 1814 (1988).
- 9) R. Pietruszko and F. -F. Chen, *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 2721 (1976).
- 10) M. Ikeda, M. Ezaki, S. Koheguchi, and S. Ohmori, *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 1931 (1981).
- 11) M. Ikeda, S. Hayakawa, M. Ezaki, and S. Ohmori, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **362**, 511 (1981).
- 12) T. M. Penning, I. Mukharji, S. Barrows, and P. Talalay, *Biochem. J.*, **222**, 601 (1984).
- 13) W. Wörner and F. Oesch, *FEBS Lett.*, **170**, 263 (1984).
- 14) J. A. Boutin, *Biochim. Biophys. Acta*, **870**, 463 (1986).
- 15) E. Usui and K. Okuda, *Biochim. Biophys. Acta*, **877**, 158 (1986).
- 16) E. Doman and S. S. Koide, *Biochim. Biophys. Acta*, **128**, 209 (1966).
- 17) A. Stolz, H. Takikawa, Y. Sugiyama, J. Kuhlenkamp, and N. Kaplowitz, *J. Clin. Invest.*, **79**, 427 (1987).
- 18) T. E. Smithgall and T. M. Penning, *Biochem. J.*, **254**, 715 (1988).
- 19) T. E. Smithgall and T. M. Penning, *Cancer Res.*, **45**, 4946 (1985).
- 20) H. Schriefers, R. Ghraf, H. -G. Hoff, and H. Ockenfels, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**, 1363 (1971).
- 21) 澤田英夫, 原 明, 中山俊裕, 未発表.
- 22) J. A. Boutin, M. Shikita, and P. Talalay, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **135**, 795 (1986).
- 23) T. M. Penning, K. E. Carlson, and R. B. Sharp, *Biochem. J.*, **245**, 269 (1987).
- 24) J. W. Ricigliano and T. M. Penning, *Biochem. J.*, **269**, 749 (1990).
- 25) T. M. Penning and R. B. Sharp, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **148**, 646 (1987).
- 26) T. M. Penning and P. Talalay, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 4504 (1983).
- 27) T. M. Penning, *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 4203 (1986).
- 28) T. M. Penning, *J. Pharm. Sci.*, **74**, 651 (1985).
- 29) 杉山雄一, 滝川 一, 蛋白質核酸酵素, **35**, 941 (1990).
- 30) A. Hara, K. Hasebe, M. Hayashibara, K. Matsuura, T. Nakayama, and H. Sawada, *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 4005 (1986).
- 31) A. Hara, H. Hayashibara, T. Nakayama, K. Hasebe, S. Usui, and H. Sawada, *Biochem. J.*, **225**, 177 (1984).
- 32) T. Nakayama, A. Hara, K. Kariya, K. Hasebe, Y. Inoue, K. Matsuura, and H. Sawada, "Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism. Aldehyde Dehydrogenase, Aldo-Keto Reductase, and Alcohol Dehydrogenase," ed. by H. Weiner and T. G. Flynn, Alan R. Liss, New York, 1987, p. 415.
- 33) K. Hasebe, A. Hara, T. Nakayama, M. Hayashibara, Y. Inoue, and H. Sawada, *Enzyme*, **37**, 109 (1987).
- 34) H. Sawada, A. Hara, M. Hayashibara, T. Nakayama, and S. Usui, *Biochim. Biophys. Acta*, **799**, 322

- (1984).
- 35) L. E. Bolcsak and D. E. Nerland, *J. Biol. Chem.*, **258**, 7252 (1983).
 - 36) H. Sawada, A. Hara, T. Nakayama, M. Nakagawa, Y. Inoue, K. Hasebe, and Y. -P. Zhang, *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 453 (1988).
 - 37) A. Hara, Y. Inoue, H. Tanabe, M. Nakagawa, T. Nakayama, and H. Sawada, *Life Sci. Adv. Biochem.*, **7**, 121 (1988).
 - 38) A. Hara, T. Nakayama, M. Nakagawa, Y. Inoue, H. Tanabe, and H. Sawada. *J. Biochem.*, **102**, 1585 (1987).
 - 39) A. Hara, Y. Inoue, M. Nakagawa, F. Naganeo, and H. Sawada, *J. Biochem.*, **103**, 1027 (1988).
 - 40) A. Hara, K. Kariya, M. Nakamura, T. Nakayama, and H. Sawada, *Arch. Biochem. Biophys.*, **249**, 225 (1986).
 - 41) G. R. Antoun, I. Brglez, and D. G. Williamson, *Biochem. J.*, **225**, 383 (1985).
 - 42) H. Sawada, A. Hara, T. Nakayama, and F. Kato, *J. Biochem.*, **87**, 1153 (1980).
 - 43) J. Klein, W. Wörner, H. Thomas, and F. Oesch. *J. Biol. Chem.*, in press.
 - 44) C. Gauss, J. Klein, K. Post, D. Suckan, K. Schneider, H. Thomas, F. Oesch, and M. Przybylski, *Environ. Health Perspect.*, **88**, 57 (1990).
 - 45) H. Sawada, A. Hara, M. Nakagawa, F. Tsukada, M. Ohmura, and K. Matsuura, *Int. J. Biochem.*, **21**, 367 (1989).
 - 46) M. Ohmura, A. Hara, M. Nakagawa, and H. Sawada, *Biochem. J.*, **266**, 583 (1990).
 - 47) H. Sawada, A. Hara, M. Ohmura, T. Nakayama, and Y. Deyashiki, *J. Biochem.*, **109**, 770 (1991).
 - 48) T. Nishioka, T. Terada, T. Umemura, H. Nanjo, T. Kizuno, and T. Nishihara, "Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 3," ed by H. Weiner, B. Wermuth, and D. W. Crabb, Plenum Publishing, New York, 1991, p. 165.
 - 49) T. Nakayama, H. Sawada, A. Hara, Y. Deyashiki, T. Kanazu, M. Shinoda, K. Matsuura, Y. Bunai, and I. Ohya, "Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 3," ed by H. Weiner, B. Wermuth, and D. W. Crabb, Plenum Publishing, New York, 1991, p. 187.
 - 50) M. Nakagawa, T. Harada, A. Hara, T. Nakayama, and H. Sawada, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2852 (1989).
 - 51) A. Hara, K. Mouri, M. Nakagawa, M. Nakamura, T. Nakayama, K. Matsuura, and H. Sawada, *J. Biochem.*, **106**, 126 (1989).
 - 52) A. Hara, M. Nakagawa, H. Taniguchi and H. Sawada, *J. Biochem.*, **106**, 900 (1989).
 - 53) T. M. Penning and, R. B. Sharp, *Carcinogenesis*, **7**, 1203 (1990).
 - 54) A. Hara, H. Taniguchi, T. Nakayama, and H. Sawada, *J. Biochem.*, **108**, 250 (1990).
 - 55) K. Kudo, Y. Amuro, T. Hada, and K. Higashino, *Biochim. Biophys. Acta*, **1046**, 12 (1990).
 - 56) H. Takikawa, A. Stolz, Y. Sugiyama, H. Yoshida, M. Yamanaka, and Kaplowitz, *J. Biol. Chem.*, **265**, 2132 (1990).
 - 57) K. Vogel, K. -L. Platt, P. Petrovic, A. Seidel, and F. Oesch, *Arch. Toxicol. Suppl.*, **5**, 360 (1982).

- 58) J. K. Ivins and T. M. Penning, *Cancer Res.*, **47**, 680 (1987).
- 59) T. M. Penning, R. B. Robert, and N. R. Krieger, *J. Biol. Chem.*, **260**, 15266 (1985).
- 60) T. E. Smithgall and T. M. Penning, *Biochem. Pharmacol.* **34**, 831 (1985).
- 61) A. Hara, T. Nakayama, T. Harada, T. Kanazu, M. Shinoda, Y. Deyashiki, and H. Sawada, *Biochem. J.*, **275**, 113 (1991).
- 62) K. Matsuura, A. Hara, T. Nakayama, M. Nakagawa, and H. Sawada, *Biochim. Biophys. Acta*, **912**, 270 (1987).
- 63) M. Nakagawa, F. Tsukada, T. Nakayama, K. Matsuura, A. Hara, and H. Sawada, *J. Biochem.*, **106**, 633 (1989).
- 64) A. Hara, T. Harada, M. Nakagawa, K. Matsuura, T. Nakayama, and H. Sawada, *Biochem. J.*, **264**, 403 (1989).
- 65) A. Hara, K. Mouri, and H. Sawada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **145**, 1260 (1987).
- 66) M. Nakagawa, K. Matsuura, A. Hara, H. Sawada, Y. Bunai, and I. Ohya, *J. Biochem.*, **106**, 1104 (1989).
- 67) D. R. Thakker, H. Yagi, W. Levin, A. W. Wood, A. H. Conny, and D. M. Jerina, "Bioactivation of Foreign Compounds," ed. by M. W. Anders, Academic Press, New York, 1985, p. 177.
- 68) H. R. Glatt, C. S. Cooper, P. L. Grover, P. Sims, P. Bentley, M. Merdes, F. Waechter, K. Vogel, T. M. Guenther, and F. Oesch, *Science*, **215**, 1507 (1982).
- 69) T. E. Smithgall, R. G. Harvey, and T. M. Penning, *J. Biol. Chem.*, **261**, 6184 (1986).
- 70) T. E. Smithgall, R. G. Harvey, and T. M. Penning, *Cancer Res.*, **48**, 1227 (1988).
- 71) J. Klein, K. Post, H. Thomas, W. Wörner, F. Setiabudi, H. Frank, F. Oesch, and K. L. Platt, *Chem.-Biol. Interact.*, **76**, 211 (1990).
- 72) V. S. Murty and T. M. Penning, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **30**, 863 (1988).
- 73) G. F. Kalf, G. B. Post, and R. Snyder, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **27**, 399 (1987).
- 74) L. Latriano, B. D. Goldstein, and G. Witz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 8356 (1986).
- 75) R. E. Billings, *Drug Metab. Dispos.*, **13**, 287 (1985).
- 76) M. Aksoy, "Benzene Carcinogenicity," CRC Press, Boca Raton, 1988.
- 77) H. R. Glatt, R. Padykula, G. A. Berchtold, G. Ludewig, K. L. Platt, J. Klein, and F. Oesch, *Environ. Health Perspect.* **82**, 81 (1989).
- 78) W. F. Busby, J. -S. Wang, E. K. Stevens, R. E. Padykula, R. A. Aleksejczk, and G. A. Berchtold, *Carcinogenesis*, **11**, 1473 (1990).
- 79) G. Ghetti and L. Mariani, *Med. Lav.*, **47**, 533 (1956).
- 80) E. Gidron and J. Leurer, *Lancet*, **1956**, 228.
- 81) V. Rossa and H. Pau, *Graef's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **226**, 291 (1988).
- 83) P. G. Wells, B. Wilson, and B. M. Lubek, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **99**, 466 (1989).
- 83) H. R. Koch, K. Döldi, and O. Hockwin, *Doc. Ophthalmol. Proc. Ser.*, **8**, 293 (1976).
- 84) D. Mahvi, H. Bank, R. Harley, *Am. J. Pathol.*, **86**, 559 (1977).

- 85) K. A. F. O'Brien, L. L. Smith, and G. M. Cohen, *Chem.-Biol. Interact.*, **55**, 109 (1985).
- 86) A. R. Buckpitt, N. Castagnoli, S. D. Nelson, and L. S. Bahnson, *Drug Metab. Dispos.*, **15**, 491 (1987).
- 87) K. A. F. O'Brien, C. Suverkropp, S. Kanekal, C. G. Plopper, and A. R. Buckpitt, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **99**, 487 (1989).
- 88) R. van Heyningen and A. Pirie, *Biochem. J.*, **102**, 842 (1967).
- 89) R. van Heyningen, *Exp. Eye Res.*, **9**, 49 (1970).
- 90) O. Hockwin, A. Wegener, D. R. Sisk, B. Dohrman, and M. Kruse, *Lens Res.*, **2**, 321 (1984).
- 91) R. E. Billings, H. R. Sullivan, and R. E. McMahon, *Biochemistry*, **9**, 1256 (1970).
- 92) A. G. Braun and S. L. Weinreb, *Teratology*, **27**, 33A (1983).
- 93) 澤田英夫，原 明，中山俊裕，中川 誠，*岐薬紀要*, **35**, 14 (1986).
- 94) T. G. Flynn, *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 2705 (1982).
- 95) B. Wermuth, *Prog. Clin. Biol. Res.*, **174**, 209 (1985).
- 96) K. M. Bohren, B. Bullock, B. Wermuth, and K. H. Gabbay, *J. Biol. Chem.*, **264**, 9547 (1989).
- 97) N. A. Morjama, C. Lyons, and T. G. Flynn, *J. Biol. Chem.*, **264**, 2912 (1989).
- 98) B. Wermuth, K. M. Bohren, G. Heinemann, and J. -P. von Wartburg, *J. Biol. Chem.*, **263**, 16185 (1988).
- 99) 澤田英夫，原 明，中山俊裕，中川 誠，*八代耕児*，*薬学雑誌*, **104**, 74 (1984).
- 100) T. Nakayama, A. Hara, K. Yashiro, and H. Sawada, *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 107 (1985).
- 101) W. B. Jakoby and D. M. Ziegler, *J. Biol. Chem.*, **265**, 20715 (1990).