カルボキシルエステラーゼの分子多様性と種差

細川 正清

Multiplicity and Species Differences of Carboxylesterase Isozymes in Mammals and Humans

Masakiyo HOSOKAWA

*Laboratory of Biochemical Pharmacology and Toxicology,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba*

Summary: Liver microsomal carboxylesterases (E.C. 3.1.1.1) function in the hydrolysis of a wide variety of endogenous and xenobiotic compounds, and play an important role in drug and lipid metabolism in many mammalian species. Multiple isozymes of liver microsomal carboxylesterases exist in various animal species, and the enzyme is involved in the metabolic activation of ester- and amide-type prodrugs. In the present study, twenty-seven carboxylesterase isozymes were purified to electrophoretic homogeneity from liver microsomes of ten mammalian species and humans, and their physical, enzymological and immunological properties were compared with each other. And also we tried to compare the primary structure of carboxylesterase isozymes in various animal species and humans using cDNA cloning and analysis. The carboxylesterase isozymes from various species examined here showed considerable similarities in physicochemical and immunochemical properties, but not similar in substrate specificity. The deduced amino acid sequence of the clone possessed many structural characteristics that are highly conserved among rat RL1, RH1, RHlec, RS1, RS2, mouse ML1, MH1, MS1, guinea pig GP, beagle dog D1 and human HU1, including active site sequence (GESAGG, NKQEXG, GDHXD), and four cysteines that may be involved in the specific disulfide bond. It is well known that proteins that are retained in the endoplasmic reticulum (ER) lumen contain the retention signal at their carboxy-terminal of the tetrapeptide (KDEL-COOH). The seven carboxylesterase clones (RL1, RH1, RHlec, MH1, GP, D1 and HU1) also contained an ER-retention signal of carboxylesterase (HXEL), and three clones (RS1, RS2, MS1) did not contain this peptide. When clone was expressed in COS7 and V79 cells, the plasmid-coded protein was retained. The cells expressing carboxylesterase is very high activity towards xenobiotic ester and amide. Site-specific mutation of the three amino acid residues of catalytic triad (Ser203 to Thr203, Glu335 to Ala 335, or His 448 to Ala448) greatly reduced the carboxylesterase activity. In conclusion, liver microsomal carboxylesterase in mammals and humans are closely involved in drug and lipid metabolism in the endoplasmic reticulum, and it is noteworthy that the isozymes from various species examined here showed considerable similarities in amino acid sequences, but not similar in substrate specificity. These reasons may be due to the variances of substrate binding site.

Key words: Carboxylesterase, Serin hydrolase, cDNA cloning, Species differences, Molecular evolution, Individual differences, Nomenclature, Classification

はじめに

近年、バイオアベイラビリティの改善や副作用の軽減を目的に多くのプロドラッグが合成され、臨床で使用されている。これらのプロドラッグの中で、エステルおよびアミド型プロドラッグの代謝活性化の過程においてもっとも重要な役割を果たしている酵素が、カルボキシルエステラーゼ (CES) である。本酵素は、活性中心

にセリン残基を有するセリン水解酵素のスーパーファミリーに属しており、エステル、アミドやチオエステル結合を含む化合物を効率よく加水分解することから、上述したプロドラッグのみならず多くの医薬品、殺虫剤、環境化学物質や食品添加物等の生体外異物の解毒や代謝活性化に関与していることが明らかになっている¹⁻⁷⁾。また、本酵素は生体内の長鎖アシル化合物の代謝にも関与していることから、生体外異物のみならず生体内の脂質

代謝においても重要な役割を果たしているものと考えられている。著者は大学院の博士課程で CES と出会ってから今日に至るまで、本酵素の分子構造、機能的役割、分子進化および発現調節機構に着目して研究を続けてきた。本稿では、著者のこれまで行ってきた研究を中心に、CES の分子多様性と哺乳動物種属間の差異について述べるとともに、最近我々の研究室で得られた、ヒト CES の発現調節機構の個人差に関しても紙面の許すかぎり紹介したい。

カルボキシルエステラーゼが触媒する酵素反応

CES は、カルボン酸のエステルを水解する酵素として EC3.1.1.1 の番号が付けられており、カルボキシルエステルの加水分解反応を触媒する酵素として知られている。しかしながら、本酵素の触媒する反応は、カルボキシルエステル結合にかぎらず、アミド結合やチオエステル結合にいたるまで多岐にわたっており、このことが本酵素の生体内での役割の解明を困難にする原因の一つにもなっている¹⁻⁸⁾。本酵素の触媒する反応は、酵素のセリン残基の-OH と基質のアシル基がアシル-酵素複合体を形成し、最初の生成物が離れた後、第 2 の基質である H₂O にアシル基を転移する典型的なピンポン bi-bi 機構で加水分解を触媒しているものと考えられている (Fig. 1)。一般的にこのようなピンポン bi-bi 機構の場

合、酵素の反応速度式は複雑になるが、CES の場合は 2 番目の基質が反応液に含まれている H₂O であることから近似的に単基質の場合と同様に Michaelis-Menten の式に当てはめることが可能である。また、本酵素の基質特異性はカルボキシル基に隣接した原子 (O, N もしくは S) により特異性が決定するとはかぎらず、むしろ Fig. 1 に示したような R, R' や R'' の構造に依存することが、これまでに精製された多くの CES で証明されている¹⁻⁸⁾。

一般的には、酵素の触媒反応の特徴の一つとして特異性が高いことがあげられており、「酵素」とは特異的な活性化能を持つことにより触媒として働く性質を有するタンパク質であると定義されている⁹⁾。しかしながら興味深いことに、今日薬物代謝酵素に分類されている酵素の多くが CES と同様に広い基質特異性を示しており、特異的な活性化能という酵素の定義からは大きくはずれている。このことは、薬物 (異物) 代謝酵素自体が他の生体内の物質代謝を触媒する酵素とは異なり、進化の初期の時点で外来性の異物 (食物あるいは食物と同時に生体内に取り込まれる物質) を代謝する酵素として分化し、独自の分子進化を遂げてきた結果であるものと考えられる。

カルボキシルエステラーゼの組織内分布

CES は、哺乳動物のほとんどすべての組織に存在し、

Fig. 1 The catalytic mechanism of carboxylesterases

Fig. 2 Immunoblot analysis and immunostaining of human liver and brain tissues with anti-HU1 antibody
(A) Immunoblot analysis M; membrane fraction, C; cytosol, S; standard
(B) Immunostaining

肝においてもっとも高い水解活性を有しており、腎尿細管、小腸の上皮細胞、血液、精巣、脂肪組織や中枢神経系にも発現している^{10,11)}。ヒトにおいてもCESは、肝をはじめとして様々な臓器で見いだされている^{12,13)}。しかしながら、これらの加水分解酵素すべてがCESであると証明された訳ではないので、それぞれの組織に発現する加水分解酵素についての詳細な検討が必要である。また最近、千葉大学医学部との共同研究の結果、ヒト脳において肝臓と諸性質のきわめて類似したエステラーゼの存在を確認し¹²⁾、肝臓と類似のCESが中枢神経系においても発現していることを見いだした。さらにエステラーゼの特異抗体を用いた免疫組織科学的手法により、この酵素が主に脳毛細血管内皮細胞に局在していることも初めて明らかにした(**Fig. 2**)。一般的に脳毛細血管内皮細胞が血液脳関門の働きをしていることが知られていることから、CESが薬物の脳移行性に重要な働きをしている可能性が考えられ、ヒト肝と脳ではそれぞれ異なった役割を果たしているものと考えられた。現在、このヒト脳CESについてはcDNAクローニングを行っており、約1.6 Kbpのヒト脳CESをコードするものと考えられるクローンを得ているので、今後さらに脳における役割を明らかにしたい。

カルボキシルエステラーゼの基質特異性と種差

エステルやアミド型薬物の生体内動態を考慮してCESの種差を考える場合、個々の組織に発現する酵素の特性を考える必要がある。しかしながら、各組織に発現するCESを含めて種差を考えることは問題を複雑にさせることになるため、哺乳動物種を通じて発現量の高い肝CESの種差について、CESに比較的特異性が高く

構造の異なる4種の基質を用いて検討した(**Fig. 3**)³⁾。ここではエステル型基質として*p*-nitrophenylacetateおよびmalathion、アミド型基質としてbutanilcaineおよびisocarboxazidを用いたが、いずれの場合にも著しい種差が認められ、少なくとも肝ミクロソーム画分においてはCES活性に種差が存在することが明らかとなった。また、用いた基質により種差が異なるという興味深い結果が得られたことから、哺乳動物種間で質的または量的に異なるCESアイソザイムの存在する可能性が示唆された。

つぎにこれら10種の哺乳動物およびヒト肝ミクロソーム画分を用いて、ラットから精製した3種のCESアイソザイム(RL1, RL2, RH1)の特異抗体との免疫交叉性をWestern blot法によって調べたところ、ラットの3種のアイソザイム間で明らかな差異が認められた^{2,3)}。すなわち、抗RL1抗体を用いた場合にはラットの他にマウス、ハムスター、モルモットにバンドが認められたが、抗RL2抗体では分子量6万付近でラットのみ染色バンドがみられた。しかしながら抗RH1抗体を用いたところ、すべての動物種で分子量6万前後の部分に染色バンドが認められことから、ラット抗RH1抗体と免疫交叉性を示し、サブユニット分子量の等しいタンパクが他の哺乳動物種の肝ミクロソーム画分にも存在することが明らかとなった。そこで、用いた哺乳動物種およびヒト肝ミクロソーム画分よりCESの精製を行ったところ、10種の哺乳動物およびヒト肝ミクロソーム画分から26種のCESの精製に成功した^{2,3,14,15)}。**Table II**に示したように、これらのCESアイソザイムは分子量は類似しているが(57–64 kDa)、等電点については、大きな差異が認められたことから構成するアミノ酸残基の違いが示唆された。また、ほとんどのアイソザ

Fig. 3 1: Comparison of liver microsomal carboxylesterase activity in various mammals and humans

Fig. 3 2: Comparison of liver microsomal carboxylesterase activity in various mammals and humans

イムが ConA アフィニティーカラムに吸着し、 α -メチルマンノシドで溶出されることから、肝ミクロソームに局在する CES アイソザイムは、アスパラギン結合のハイマンノース型糖鎖を持つ可能性が示唆された。さら

に、これらの CES の N-末端アミノ酸配列を気相型プロテインシーケンサーを用いて調べたところ、カニクイザルから得られた CES MK2 を除いて、高い相同性が認められた^{3,14}。また、これらのアイソザイムの免疫

Table I Comparison of the physical properties of carboxylesterase isozymes

Species	Trivial name	Subunit (M.W.)	pI	ConA-Affinity
Rat	RH1	58KDa	6.0	+
	RL1	61KDa	6.5	+
	RL2	61KDa	5.5	+
	RL3	61KDa	5.0	+
	RL4	60KDa	4.6	—
	RHlec	58KDa	6.0	+
	RLlec	60KDa	4.7	—
Mouse	MH1	60KDa	5.8	+
	ML1	59KDa	5.9	+
	ML2	60KDa	5.1	+
	ML3	60KDa	4.7	—
Hamster	H1	58KDa	5.7	+
	HL1	58KDa	6.0	+
Guinea Pig	GPH1	57KDa	5.3	+
	GPL1	64KDa	5.9	+
	GPL2	61KDa	5.6	+
Rabbit	RB1	62KDa	5.5	+
	RB2	60KDa	4.7	+
Dog	D1	60KDa	5.0	+
Pig	P1	58K-62KDa	5.2-5.4	+
Cow	B1	59KDa	6.0	+
Monkey				
Cynomolgus	MK1	60KDa	5.5	+
	MK2	63KDa	4.7	+
Rhesus	RMK1	60KDa	5.6	+
	RMK2	63KDa	4.7	+
Human	HU1	61KDa	5.6	+
	HU2	61KDa	5.4	+
	HU3	61KDa	4.3	+

交叉性についてウエスタンブロット法を用いて調べたところ、ラット以外の動物種ではカニクイザル MK2, アカゲザル RMK2 を除いてすべて RH1 と免疫交叉性を示し、これらの染色バンドはすべて肝ミクロソーム画分で認められたものと移動度が一致したことから、ミクロソーム画分で RH1 と交叉性を示したタンパクは CES であることが証明された^{3,13)}。次に **Table II** に示したように、これらの CES アイソザイムの基質特異性を調べたところ、アイソザイム間で著しい差異が認められただけでなく基質間でも大きな差がみられた。また、これらの精製酵素を用いて、プロドラッグとして現在用いられている CPT-11 の水解活性および発癌プロモーターとして知られているフォロボールエステルである TPA の水解活性を調べたところ、哺乳動物種間で大きな差異がみられた¹⁴⁻¹⁶⁾。CPT-11 は肝ミクロソーム画分の CES の加水分解により活性代謝物である SN-38 に代謝活性化されるので、これらの CES アイソザイム間での差異が代謝の種差に関与している可能性も示唆された。

また、発癌プロモーターの TPA の水解活性に関しては、これまで用いた基質の中で特異性をもっとも高いことから、本酵素の基質特異性を解明するために有用であるものと考えられた。

このように肝 CES 活性には大きな種差が認められたが、これら CES アイソザイムの分子量、N-末端アミノ酸配列や免疫交叉性に関しては大きな違いは認められなかったことから、基質特異性に関与する領域の解明が必要と考えられる。

カルボキシルエステラーゼの誘導の種差

これまで実験小動物を含めた肝 CES の制御機構の研究から、本酵素は性ホルモン^{2,17)}、副腎皮質ホルモン¹⁸⁾、脳下垂体ホルモン¹⁹⁾などによりアイソザイム間で異なった制御を受けていることが明らかとなってきた。さらに CES は、フェノバルビタール^{2,20,21)}をはじめ、多くの化合物により酵素誘導をうけるが^{21,22)}、最近では、ペルオキシソーム増殖剤による誘導も明らかになった²³⁻²⁵⁾。しかしながらこれらの CES 誘導には、種差が存在しており、フェノバルビタールやペルオキシソーム増殖薬を用いた場合、哺乳動物種間で大きな差異が認められた²⁴⁾。この中で、ペルオキシソーム増殖薬として用いたプラスチック可塑剤である di (2-ethylhexyl) phthalate は、環境化学物質としてヒトの生活環境に多く用いられているので、ヒトでの誘導の有無を含めて今後さらに詳細な検討が必要であると考えられる。

さらにラット肝においては、部分肝摘出法を用いた前癌病変作製時に、前癌病変の進行に伴って CES のアイソザイム間で異なった量的な変動が認められたことから、発癌過程においても何らかの形で本酵素が制御されている可能性も考えられ、さらに本酵素の変動が発癌過程に影響を及ぼす可能性も示唆された¹⁶⁾。

しかしながらこれらの検討は CES 含量の変動を調べたものであり、転写、翻訳機構を含めた制御機構のメカニズムを解明したものではない。今後は CES のゲノム遺伝子の構造を解明し、5' 上流域を含めた転写調節領域および転写調節因子を明らかにすることにより、本酵素の発現調節機構の種差を解明する必要があるものと考えられる。

カルボキシルエステラーゼの構造の比較

近年、分子生物学の発展に伴い薬物代謝酵素に関して酵素をコードする遺伝子の cDNA クローニングが行われてきている。CES に関しても、Takagi ら²⁶⁾により 1988 年にラット肝 CES の cDNA クローニングに成功して以来、徐々にではあるが着実に cDNA クローニングに成功しつつある²⁷⁻⁴⁰⁾。酵素の遺伝子クローニング

Table II Catalytic activity of the highly purified carboxylesterase isozymes from liver microsomes of various mammalian species and humans

Species	Isozyme	Specific activity (μmoles/mg prot./min)				
		PNPA	MALA	BUTA	ISOC	Pal-CoA
Rat	RH1	44.8	0.011	3.44	0.268	0.009
	RL1	76.4	0.201	<0.005	<0.001	0.686
	RL2	4.16	<0.002	<0.005	0.263	<0.001
	RL4	64.9	N.D.	<0.005	0.229	0.109
	RLlec	2.12	N.D.	0.107	0.158	0.019
	RHlec	227	N.D.	3.046	0.067	0.002
Mouse	MH1	62.6	0.583	55.0	6.29	0.078
	ML1	80.9	<0.002	17.2	0.088	0.051
	ML2	6.27	0.160	4.69	0.053	0.010
	ML3	187	0.160	6.25	0.281	0.396
Hamster	H1	100	0.131	23.5	0.03	0.069
Guinea Pig	GPH1	98.9	1.13	2.24	3.18	0.031
	GPL1	288	0.982	3.70	17.7	0.214
	GPL2	50.5	<0.002	<0.005	0.294	0.025
Rabbit	RB1	126	1.22	22.4	0.153	0.018
Dog	D1	112	0.118	33.6	0.060	0.044
Pig	P1	327	2.13	111	0.333	0.089
Cow	B1	90.9	0.084	2.71	0.039	<0.001
Monkey	MK1	79.4	0.992	0.618	0.198	0.036
(Cynomolgus)	MK2	26.4	0.647	<0.005	2.07	0.140
Monkey	RMK1	73.0	N.D.	3.04	0.178	0.307
(Rhesus)	RMK2	2.54	N.D.	<0.005	0.006	0.097
Human	HU1	5.84	0.467	0.483	0.010	0.025
	HU2	3.48	0.673	0.427	0.003	0.028
	HU3	1.23		0.44	7.33	0.093

Carboxylesterase isozymes were purified from rat (RL1, RL2, RH1), mouse (MH1, ML1, ML2, ML3), hamster (H1), guinea pig (GPL1, GPL2, GPH1), rabbit (RB1), beagle dog (D1), pig (P1), cow (B1), cynomolgus monkey (MK1, MK2), rhesus monkey and Human (HU1, HU2, HU3) PNPA, p-nitrophenylacetate hydrolase; MALA, malathion hydrolase; BUTA, butanilcaine hydrolase; ISOC, isocarboxazid hydrolase; Pal-CoA, palmitoyl-CoA hydrolase.
N.D., Not determined

を行うことにより、特に CES のように研究人口が少ない酵素においては迅速で正確な情報の入手が可能となることから、CES の分類や、反応機構の解明の研究において有用であることが考えられる。

そこで我々の研究室を含めてこれまでに報告されている CES の塩基配列から推定されるアミノ酸配列を比較した。その結果、Table III に示したように、CES の配列に関しては Cygler⁴¹⁾ の提唱したセリン水解酵素のスーパーファミリーにおいて catalytic triad を形成しているものと考えられる Ser203, Glu336, His450 近傍やジスルフィド結合に関与すると考えられる Cys 近傍のアミノ酸配列、さらに oxyanion hole loop を形成すると考えられている Gly₁₂₄-Gly₁₂₅ 近傍の配列においては高度に保存されていることが明らかとなった。また、C-末端アミノ酸配列についてもラット E1 (Sec) および RS1 マウス ES-N および MS1 を除くアイソザイムは、全て小胞体膜に KDEL レセプターを介して結合しうる

配列である HXEL (His-Xxx-Glu-Leu-COOH) を有することから、これらの CES アイソザイムは小胞体膜に KDEL レセプターを介して結合している可能性が強く示唆され、この配列を持たない CES は肝臓から血中に分泌される分泌型の CES である可能性が示された。さらに、Asn-X-Ser/Thr の配列として知られているアスパラギン型の糖鎖結合可能な配列について調べたところ、もっとも N-末端に近いアスパラギン Asn61 は、ハムスター AT-51 を除いてマウスからヒトに至るまで保存されていたが、C-末端に近いアスパラギン Asn 472 については、ハムスター AT-51、ビーグル犬 D1 およびヒト HU1 では認められなかった。この結果は CES の糖鎖結合可能部位に関しても種差が存在することを示しており、今後、糖鎖の結合部位と基質特異性の関係について詳細な検討が必要であると考えられる。一方、すでに報告されているヒト CES のゲノム解析の結果³⁹⁾に当てはめてエクソン部位を推定したところ、Fig. 4 に示

Table III Comparison of the conserved motifs in carboxylesterase isozymes

Trivial name	Cys (98)	Gly-Gly (123-124)	Ser (203)	Glu (335)	His (448)	C-terminal
HU1	SEDCLYLNIYTP	IHGGGLMVGAAS	GESAGGE	GINKQEFQWL	VIGDHGDEL	EHIEL
hCE	SEDCLYLNIYTP	IHGGGLMVGAAS	GESAGGE	GINKQEFQWL	VIGDHGDEL	EHIEL
hCEv	SEDCLYLNIYTP	IHGGGLMVGAAS	GESAGGE	GINKQEFQWL	VIGDHGDEL	EHIEL
Macrophage	SEDCLYLNIYTP	IHGGGLMVGAAS	GESAGGE	GINKQEFQWL	VIGDHGDEL	EHIEL
pI 6.1	SEDCLYLNVTYP	IHGGGLVVGAST	GESAGGF	GINKQEFQWI	VIGDHGDEL	KHVEL
MH1	SEDCLYLNIYTP	IHGGGLVVGAST	GESAGGF	GINKQEFQWI	VIGDHGDEI	EHVEL
RH1	SEDCLYLNVTYP	IHGGGLVVGAST	GESAGGF	GINKQEFQWI	VIGDHGDEL	KHVEL
Dog D1	SEDCLYLNIYTP	IHGGGLVVGAST	GESAGGE	GINKQEFQWL	VVGDHGDEL	EHVEL
Rabbit1	SEDCLYLNIYTP	IHGGGLMVVGAST	GESAGGQ	GINQEFQWI	VIGDHGDEI	EHIEL
ES3 (Egasin)	SEDCLYLNIYTP	IHGGGLVLGGAST	GESAGGE	GINKQEFQWI	VVGDHGDEI	GHTEL
Egasyn	SEDCLYLNIYTP	IHGGGLVLGGAST	GESAGGE	GINKQEFQWI	VVGDHGDEI	EHTEL
RL1	SEDCLYLNIYTP	IHGGGLTQGGAST	GESAGGF	GINKQECQWL	VVGDHADDDV	HHNEL
ML1	—	—	GESAGGY	GINKQECQWL	VVGDHADDDV	YHNEL
Hydrolase C	SEDCLYLNIYTP	IHGGGLTQGGAST	GESAGGF	GINKQECQWL	VVGDHADDDV	HHNEL
Hydrolase B	SEDCLYLNIYTP	IHGGGLTQGGAST	GESAGGF	GINKQECQWL	VVGDHADDDL	HHNEL
Duck	SEDCLYLNVTYP	IHGGGLVSGPASS	GESAGGV	GVNNCEFGWI	VKADHADEI	KHTDL
E1 (Sec)	SEDCLYLNIYSP	IHGGGLIIGASP	GESAGGV	GFNKQEFQWI	VQGDHGDEI	EHTHT
Es-N	SEDCLYLNIYSP	IHGGGLVIGGRSP	GESAGGI	GFNKQEFQWI	VEGDHGDEI	EHTHK
RS1	SEDCLYLNIYSP	IHGGGLIIGASP	GESAGGV	GFNKQEFQWI	VQGDHGDEI	EHTHT
MS1	SEDCLYLNIYSP	IHGGGLVIGGRSP	GESAGGI	GFNKQEFQWI	VEGDHGDEI	EHTHK
Rabbit2	SEDCLYLNIYSP	IHGGGLTMGMASM	GESAGGT	GINNDEYQWI	VRADHGDEV	KHTEL
AT51	SEDCLYLNIYTP	IHGGALVMGMASM	GVSAGGT	GVDSDECGWG	VRADHGHDV	KHSEL
ES-male	SEDCLTLNIYSP	IHGGSLRVGSSTS	GNSAGGN	GVTNHEFGWL	AFV-FGGP	VPEEL
46.5kDa	KFNILVRVYVP	IHGGWCVG-SAA	GDSAGGN	DVRAAPLAD		LKENL

したように CES は14のエクソンから構成されており、CES アイソザイムのエクソン1はシグナルペプチドをコードしている可能性が示された。また、エクソンの2から7および12から14にはきわめて高い相同性がみられ、この領域が種を通じて高度に保存されて他の相同性が低い領域が基質特性の差異に関与している可能性が考えられた。また興味深いことに、ラットおよびマウスの分泌型 CES である E1, RS1, ES-N, MS1 および肝小胞体膜結合型であるハムスターの AT-51³⁷⁾、ウサギの Rabbit 2⁴²⁾ においてはエクソン8の部分欠損していたことから、このエクソン部位が CES の進化の過程で欠損し、分泌型と肝小胞体膜結合型に分化してきたのではないかと考えられる。

さらに、これらの cDNA を哺乳動物細胞である COS7 cell に導入発現させて諸性質を検討したところ、精製 CES の基質特異性とよく一致した。また、これらの発現タンパクについて Western blot 法により免疫交叉性を調べたところ、それぞれの特異抗体にのみ交叉性を示した。しかしながら COS7 cell での発現は一過性であるので、薬物代謝の予測系や代謝活性化の試験に用いるには stable な発現系が必要であるものと考えられる。そこで V79 cell に CES 遺伝子を導入し G418 で選択したところ、高いエステラーゼ活性を示す細胞を得ること

ができ、さらに Km 値や阻害剤を用いた検討においても精製酵素と一致したことから、これらの stable な CES 発現細胞を薬物代謝試験や毒性試験に用いることが可能となった。

また部位特異的変異の導入により活性中心を調べたところ、catalytic triad を構成しているものと考えられる Ser203, Glu336, His450 いずれの部位に関しても、変異導入でアミノ酸残基を置換することにより著しく活性が低下したことから、このアミノ酸残基が CES の catalytic triad を構成しているものと考えられた。

一方、CES の哺乳動物細胞発現系の作製に成功したので、基質結合部位を調べるために特異性の異なるラット肝 CES アイソザイム RH1 および RL1 を用いてキメラ酵素を作製し、基質結合領域の解明を試みた。両アイソザイムの塩基配列から推定されたアミノ酸配列の差異を検討したところ、Glu334 より C-末端側の領域に差異が認められたため、Glu334 より N-末端側と C-末端側を用いたキメラ酵素を作製した。2種類のキメラ酵素をコードする cDNA RH1 Glu-334 RL1 (RH1 E334 RL1) および RL1 Glu-334 RH1 (RL1 E334 RH1) を哺乳動物細胞に発現させたところ、RH1 E334 RL1 は RL1 と同程度の Palmitoyl-CoA 水解活性を示したのに対し、RL1 E334 RH1 では Palmitoyl-CoA 水解活性は著しく低下

Fig. 4 Diagrammatic comparison of deduced amino acid sequences of rat, mouse, hamster and human carboxylesterase isozymes. Each trivial names is listed in Table IV

Fig. 5 Comparison of palmitoyl-CoA hydrolase activities between chimera carboxylesterase cDNA and wild type carboxylesterase cDNA expressed in COS7 cell

した (Fig. 5). この結果から, CES RL1 の Pal-CoA に対する特異性は334位のグルタミン酸よりC-末端側のアミノ酸配列に依存することが示され, この領域に基質結合部位が存在する可能性が強く示唆された. 今後, さらにこの領域に存在すると考えられる基質結合部位について詳細に検討する必要があると考えられる.

構造的特性に基づいたカルボキシルエステラーゼの分類

CES の分類に関しては1983年にWalkerとMacness⁴³⁾が分類を試み, またMentleinら⁴⁾によってもEC 3.1.99.1からEC 3.1.99.3までの分類が提唱されている. しかしながらこれらの分類はすべてCESのcDNAクローニングが行われる前の分類で, 本酵素に対する情報の欠除からかなり偏ったものになっている. そこで, 我々は*Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*²⁾の中で, CESの新しい分類法について提唱した. この分類はTable IVに示したように, ヒトHU1との相同性に基づいてCESをCES1からCES4までの4つのファミリーに分類したものであるが, 興味深いことにFig. 6に示した分子進化の系統樹の結果と驚くほど良く一致しており, この方法によりCESの分類は可能であると考えられる. この中でもCES1Bファミリーは生体内基質である長鎖アシルCoAの水解に特異性が高く, またCES1A3は小胞体膜に存在するアクセサリタンパクであるエガシンとして β -グルクロニダーゼに結合することが明らかとなっている. さらにCES1Cファミリーはすべて分泌型のCESであることなど, 明確にCESの特性の差異で分類されている. また, CES2ファミリーに関する情報は少なかったが, 最近ヒト肝からhCE2がクローニングされ⁴⁴⁾, また同時にヒト小腸からほぼ同じ配列のHSICE⁴⁵⁾がクローニングされたこと

から, これらのCESアイソザイムは肝と小腸の両方に発現している可能性が示された. 著者の研究室においても, 哺乳動物およびヒト腸管には等電点の低いCESアイソザイムが発現していることを見いだしているが, これらのアイソザイムはCES2ファミリーに属しているものと考えられる. また, ラット以外の哺乳動物では肝と小腸に常在型として発現しているのに対し, ラット肝では誘導型であり, ペルオキシソーム増殖薬, グルココルチコイドやフェノバルビタール投与により初めて発現が認められるCESアイソザイムである²⁵⁾. Table Iに示したアイソザイムの中で, CES2ファミリーに属すると考えられるアイソザイムはラットRL4, RLlec, マウスML3, ウサギRB2, カニクイザルMK2, アカゲザルRMK2およびヒトHU3で, PAGE-エステラーゼ活性染色法により確認したところいずれのアイソザイムも小腸に発現しているCESと移動度が一致した. しかしながら, ファミリー内においても相同性と基質特異性が一致しない場合もあることから, 今後, さらに各ファミリーごとの特異基質の探索や, 新しくクローニングされたCESを加えることにより, 分類を着実に進めていきたい.

ヒトカルボキシルエステラーゼの個人差

これまでCESの哺乳動物種間での差異について多くの紙面をさいてきたが, 実際に医薬品を開発する過程で, 実験動物のデータをもとにヒトに外挿する場合と同様に困難な問題はヒトにおける個人差の問題である. そこで実際にヒト肝のCESについて, 個人差も含めて詳細な検討を行った. まず, 29個体のヒト肝よりミクロゾーム画分を調製し, 8種類のエステルおよびアミド結合を有する基質を用いてエステラーゼ活性を調べたところ, 個体間で著しい差異が認められた¹³⁾. 個体間での差異

Table IV Classification and nomenclature for the carboxylesterases

Enzyme name	Gene symbol	Trivial name	Species	Homology
Carboxylesterase	CES 1A1	HU1	Human	100.0
		hCE	Human	99.8
		Human CE	Human	99.7
		CE	Human	99.7
		Macro-phage	Human	99.6
		hCEv	Human	99.5
	CES 1A2	D1	Dog	78.0
		Rabbit 1	Rabbit	77.6
		MH1	Mouse	77.6
		pI 6.1	Rat	77.1
		Hydrolase A	Rat	77.1
		RH1	Rat	77.1
	CES 1A3	Egasyn	Mouse	75.5
		ES3 (Egasyn)	Rat	74.6
		ES4	Rat	67.8
	CES1B	Hydrolase C	Rat	67.1
		Hydrolase B	Rat	66.7
		RL1	Rat	65.7
		ML1	Mouse	63.0
	CES1C	E1(sec)	Rat	69.2
		Rat CE	Rat	69.2
		Hydrolase S	Rat	69.2
		RS1	Rat	68.6
		Es-N	Mouse	64.9
		MS1	Mouse	64.9
	CES2	HCE2	Human	47.0
		HSiCE	Human	47.0
		Rabbit 2	Rabbit	46.7
		AT-51	Hamster	45.5
	CES3	ES-male	Mouse	39.8
	CES4	46.5kDa	Human	31.3

は基質により異なっていたが、最大値と最小値を比較したところ8倍から40倍もの差異が得られた。また、実際に臨床で用いられているプロドラッグとして抗癌剤であるCPT-11水解活性について同様の検討を行ったところ、他の基質と同様な著しい個体差が認められた。このような個体間の変動については、1) 遺伝多型によるアイソザイムの欠損、2) 個体間でのアイソザイムの発現量の違い、3) 剖検材料を用いているので死後経過時間の差異、4) 性差や年齢などの要因、5) 死因および投与された薬物の違い、などが考えられるので、これらの点を考慮してさらに詳細な検討を行った。我々はこれまでヒト肝ミクロゾーム画分より3種のエステラーゼアイソザイム (HU1, HU2, HU3) を精製し諸性質につ

Fig. 6 Phylogenetic tree of the carboxylesterase superfamily. Each trivial names appears in Table 3

いて比較検討してきたので、これらのアイソザイムの性質の差異に基づいて遺伝多型を調べたところ、用いた29個体の間では明確なアイソザイムの欠損は認められなかった¹³⁾。さらに、エステラーゼの発現量の差異を調べる目的でヒト肝ミクロゾームのアイソザイム含量を抗HU1抗体を用いたWestern blot法により調べたところ、**Fig. 7**に示したように酵素含量の著しい差異が認められた。このHU1抗体はHU1, HU2の両アイソザイムに交叉性を示すことから、エステラーゼ活性の個体間での差異はエステラーゼの発現量の違いに基づいている可能性が考えられた。また、この29個体のヒト肝は剖検で得られたサンプルを用いているので、死後経過時間に伴いエステラーゼの失活や分解が考えられた。そこで死後経過時間とエステラーゼ活性の相関について検討したところ、死後経過時間とエステラーゼ活性には明確な相関関係は認められなかった。さらに性別による違いについても調べたところ、いずれの基質を用いた場合でも性差は認められなかった。また年齢についても検討したところ、年齢とエステラーゼ活性の間に関しても相関関係は認められなかった。一方、これら29個体について死因とエステラーゼ活性の間の相関を検討したところ、特にアルコール性肝障害で死亡した場合にはエステラーゼ活性が低下する傾向を示したが、他の死因との間には明確な関係は認められなかった。以上のことから、ヒト肝ミクロゾーム画分のエステラーゼ活性の個体間での差異の主要な原因はCESの発現量に基づく可能性が示唆された。

Fig. 7 Immunoblot analysis of carboxylesterase HU1 contents in various human liver microsomes

Fig. 8 Structure of the transcriptional regulatory element of human liver carboxylesterase gene

そこで、ヒト肝 CES アイソザイム HU1 cDNA を元に作製したプローブを用いてヒトゲノム DNA ライブラリーよりスクリーニングを行い、ヒト CES ゲノム DNA クローン H2A を得た。さらにこの H2A の塩基配列を解析したところ、CES の Exon1 および 5' 上流のシス領域と考えられる配列を含んでいることが明らかとなった。そこで約 1 kb 上流までの塩基配列について解析したところ、Sp1 を含む多くの転写因子の結合配列の存在が明らかとなり、この領域が転写調節領域である可能性が示唆された (Fig. 8)。さらに 115 名の健常人ボランティアの末梢血より抽出したゲノム DNA を材料に用いてヒト CES の Exon1 の上流約 1 kb の部分を PCR-SSCP 法を用いて検討した。その結果、遺伝子の一次構造に差異が認められ、さらに塩基配列の解析を行ったところ個人差が確認された。特に 5' 上流の転写因子結合部位に差異が認められたことから、この領域の遺伝子多型が CES 発現量の個人差に関与している可能性が示唆された。以上の結果より、ヒト CES 遺伝子のシス領域と考えられる 5' 上流領域に遺伝子多型の存在が確認されたので、この領域の差異が CES 発現量の個人差の原

因である可能性が考えられ、ヒト肝 CES の発現量の個人差の一部はこの領域の遺伝子多型が原因となっていることが示唆された。

おわりに

近年、様々なエステルおよびアミド型のプロドラッグの開発に伴い哺乳動物およびヒトの CES の種差が問題になってきている。著者は、実験動物のデータへのヒトへの外挿という観点から研究を始めたが、いつの間にか酵素精製から cDNA クローニング、さらにはゲノム DNA のクローニングまで手を広げてきた。しかしながら CES においてはいまだにヒトのモデルとなる実験動物は見つかっておらず、分子構造が明らかとなればなるほどヒトと実験動物の種差は大きくなっており、実験動物から得られたデータのヒトへの外挿を困難にしている。また最後に述べたように、薬物の薬効や生体内動態を考慮した場合、ヒトにおいては CES の発現量の個人差が大きな問題となっているので、ヒト末梢血から得られたゲノムの解析により発現量を推定する方法を近いうちに確立したい。さらに、本稿でも少し触れたが CES の基質結合部位に関してもさらに詳細な検討を行い、特に CES の基質結合領域の分子進化を通して本酵素の機能的役割を解明していきたい。

謝 辞 本研究は千葉大学薬学部薬物学研究室での研究テーマに端を発し、その後、東京薬科大学第 1 薬理学教室、臨床生化学教室在职時に研究を発展させ、さらに千葉大学薬学部薬物学研究室に戻ってから飛躍的に発展させたものです。この間、千葉大学薬学部→東京薬科大学薬学部→千葉大学薬学部と 3 回にわたり研究の機会とご指導を賜りました元千葉大学教授佐藤

哲男先生(現昭和大学薬学部客員教授, 霊長類機能研究所所長)に厚く御礼申し上げますとともに, 千葉大学薬学部薬物学研究室において本研究の機会を賜りました故北川晴雄教授, ならびにベルオキシソームの世界に触れさせていただき研究の機会と助言を賜りました東京薬科大学薬学部教授須賀哲弥先生, また, 臨床の点から新しい研究の世界を広げてくださり研究の機会と助言を賜りました千葉大学薬学部教授千葉 寛先生に厚く御礼申し上げます。さらに, 紙面の都合により名前を省略させていただきますが, 本研究の遂行にあたり, 共同研究者として研究の発展に多大なる貢献をいただきました東京薬科大学第1薬理学教室, 臨床生化学教室および千葉大学薬学部薬物学研究室の大学院生, 4年生の皆様にご心より感謝いたします。

文 献

- 1) Satoh, T. and Hosokawa, M: The mammalian carboxylesterases: From molecules to functions. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**: 257-288, 1998.
- 2) Hosokawa M, Maki T, Satoh T: Multiplicity and regulation of hepatic microsomal carboxylesterases in rats. *Mol Pharmacol.* **31**: 579-84, 1987.
- 3) Hosokawa M, Maki T, Satoh T: Characterization of molecular species of liver microsomal carboxylesterases of several animal species and humans. *Arch Biochem Biophys.* **277**: 219-27, 1990.
- 4) Mentlein R, Suttrop M, Heymann E: Specificity of purified monoacylglycerol lipase, palmitoyl-CoA hydrolase, palmitoyl-carnitine hydrolase, and nonspecific carboxylesterase from rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys.* **228**: 230-46, 1984.
- 5) Satoh T: Role of carboxylesterases in xenobiotic metabolism. *Reviews in Biochemical Toxicology*, in Bend JR, Hodgson E, Philpot RM (eds), 155-81, 1987. New York: Elsevier.
- 6) 細川正清: 哺乳動物およびヒト肝 CES の機能的役割の差異. *薬物動態* **5**: 185-195, 1990.
- 7) Takayama H, Watanabe A, Hosokawa M, Chiba K, Satoh T, Aimi N: Synthesis of new class of camptothecin derivatives, the long-chain fatty acid esters of 10-hydroxycamptothecin, as a potent prodrug candidate, and their *in vitro* metabolic conversion by carboxylesterases. *Bioorg. Medicinal Chem. Letter* **8**: 415-418, 1998.
- 8) Kusano K, Seko T, Tanaka S, Shikata Y, Ando T, Ida S, Hosokawa M, Satoh T, Yuzuriha T and Horie T: Purification and characterization of monkey liver amidohydrolases and its relationship to a metabolic polymorphism of E6123, a platelet activating factor receptor antagonist. *Drug. Metab. Dispos.*, **24**: 1186-1191, 1996.
- 9) Dixon M. Webb, EC: *Enzymes*, 3rd edition, Academic Press, New York, 1979.
- 10) Ishihara, K, Hosokawa, M. Satoh T: Tissue specific distribution of carboxylesterase isozymes in rat. *J. Toxicol.Sci.*, (suppl.), **12**: 389, 1987.
- 11) Yamada T, Kawaguchi N, Hosokawa M, Satoh T: Localization of an isoform of carboxylesterase in rat brain differs from that in human brain. *Brain Res.* **674**: 175-9, 1995.
- 12) Yamada T, Hosokawa M, Satoh T, Moroo I, Takahashi M, Akatsu H, Yamamoto T: Immunohistochemistry with an antibody to human liver carboxylesterase in human brain tissues. *Brain Res.* **658**: 163-7, 1994.
- 13) Hosokawa M, Endo Y, Fujisawa M, Hara S, Iwata N, Satoh Y, Satoh T: Interindividual variation in carboxylesterase levels in human liver microsomes. *Drug. Metab. Dispos.* **23**: 1022-1027, 1995.
- 14) Satoh T, Hosokawa M: Molecular aspects of carboxylesterase isoforms in comparison with other esterases. *Toxicology Letters.* **82**: 439-445, 1995.
- 15) Satoh T, Hosokawa M, Atsumi R, Suzuki W, Hakusui H, Nagai E: Metabolic activation of CPT-11, 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin, a novel antitumor agent, by c arboxylesterase. *Biol Pharm Bull.* **17**: 662-4, 1994.
- 16) Maki T, Hosokawa M, Satoh T, Sato K: Changes in carboxylesterase isoenzymes of rat liver microsomes during hepatocarcinogenesis. *Jpn J Cancer Res.* **82**: 800-6, 1991.
- 17) Hosokawa M, Satoh T, Ohkawara S, Ohmori S, Igarashi T, et al: Gonadal hormone-induced changes in hepatic microsomal carboxylesterase in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* **46**: 245-58, 1984.
- 18) Hosokawa M, Satoh T, Ohkawara S, Ohmori S, Igarashi T, et al: Effects of adrenalectomy on gonadal hormone-induced changes in hepatic microsomal carboxylesterase activities in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* **47**: 285-8, 1985.
- 19) Hosokawa M, Satoh T: Effects of hypophysectomy and pituitary hormones on hepatic microsomal c arboxylesterase isozymes in male rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* **62**: 279-88, 1988.
- 20) Hosokawa M, Suga T, Satoh T: Differences in the regulation of carboxylesterase isozymes in rat liver microsomes. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **370**: 983-984, 1989.
- 21) Hosokawa M, Maki T, Satoh T: Differences in the induction of carboxylesterase isozymes in rat liver microsomes by xenobiotics. *Biochem Pharmacol.* **37**: 2708-11, 1988.
- 22) Hosokawa M, Hattori K, Satoh T: Differential responses of rat hepatic microsomal carboxylesterase isozymes to glucocorticoids and pregnenolone 16 alpha-carbonitrile. *Biochem Pharmacol.* **45**: 2317-22, 1993.
- 23) Hosokawa M, Satoh T: Differences in the induction of carboxylesterase isozymes in rat liver microsomes by perfluorinated fatty acids. *Xenobiotica.* **23**: 1125-33, 1993.
- 24) Hosokawa M, Hirata K, Nakata F, Suga T, Satoh T: Species differences in the induction of hepatic microsomal carboxylesterases caused by dietary exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate, a peroxisome proliferator. *Drug Metab Dispos.* **22**: 889-94, 1994.
- 25) Derbel M, Hosokawa M, Satoh T: Differences in the induction of carboxylesterase RL4 in rat liver microsomes by various perfluorinated fatty acids, metabolically inert derivatives of fatty acids. *Biol. Pharm. Bull.* **19**: 765-67, 1996.
- 26) Takagi Y, Morohashi K, Kawabata S, Go M, Omura T: Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA of microsomal carboxylesterase E1 of rat liver. *J Biochem.* **104**: 801-6, 1988.
- 27) Long RM, Satoh H, Martin BM, Kimura S, Gonzalez FJ, Pohl LR: Rat liver carboxylesterase: cDNA cloning, sequencing, and evidence for a multigene family. *Biochem Biophys Res Commun.* **156**: 866-73, 1988.

- 28) Yan B, Yang D, Brady M, Parkinson A: Rat kidney carboxylesterase. Cloning, sequencing, cellular localization, and relationship to rat liver hydrolase. *J Biol Chem.* **269**: 29688-96, 1994.
- 29) Yan B, Yang D, Brady M, Parkinson A: Rat testicular carboxylesterase: Cloning, cellular localization, and relationship to liver hydrolase A. *Arch Biochem Biophys.* **316**: 899-908, 1995.
- 30) Yan B, Yang D, Bullock P, Parkinson A: Rat serum carboxylesterase. Cloning, expression, regulation, and evidence of secretion from liver. *J Biol Chem.* **270**: 19128-34, 1995.
- 31) Robbi M, Beaufay H, Octave JN: Nucleotide sequence of cDNA coding for rat liver pI 6.1 esterase (ES-10), a carboxylesterase located in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Biochem J.* **269**: 451-8, 1995.
- 32) Robbi M, Beaufay H: Cloning and sequencing of rat liver carboxylesterase ES-3 (egasyn). *Biochem Biophys Res Commun.* **203**: 1404-11, 1994.
- 33) Robbi M, Van Schaftingen E, Beaufay H: Cloning and sequencing of rat liver carboxylesterase ES-4 (microsomal palmitoyl-CoA hydrolase). *Biochem J.* **313**: 821-6, 1996.
- 34) Ovnicek M, Tepperman K, Medda S, Elliott RW, Stephenson DA, *et al*: Characterization of a murine cDNA encoding a member of the carboxylesterase multigene family. *Genomics.* **9**: 344-54, 1991.
- 35) Ovnicek M, Swank RT, Fletcher C, Zhen L, Novak EK, *et al*: Characterization and functional expression of a cDNA encoding egasyn (esterase-22): the endoplasmic reticulum-targeting protein of beta-glucuronidase. *Genomics.* **11**: 956-67, 1991.
- 36) Aida K, Moore R, Negishi M: Cloning and nucleotide sequence of a novel, male-predominant carboxylesterase in mouse liver. *Biochim Biophys Acta.* **1174**: 72-4, 1993.
- 37) Sone T, Isobe M, Takabatake E, Wang CY: Cloning and sequence analysis of a hamster liver cDNA encoding a novel putative carboxylesterase. *Biochim Biophys Acta.* **1207**: 138-42, 1994.
- 38) Kroetz DL, McBride OW, Gonzalez FJ: Glycosylation-dependent activity of baculovirus-expressed human liver carboxylesterases: cDNA cloning and characterization of two highly similar enzyme forms. *Biochemistry.* **32**: 11606-17, 1993.
- 39) Shibata F, Takagi Y, Kitajima M, Kuroda T, Omura T: Molecular cloning and characterization of a human carboxylesterase gene. *Genomics.* **17**: 76-82, 1993.
- 40) 細川正清, 鈴木香代子, 千葉 寛, 佐藤哲男: アシル COA 水解放性を触媒するビーグル犬肝カルボキシルエステラーゼの cDNA クローニング. *生化学* **68**: 886, 1996.
- 41) Cygler M, Schrag JD, Sussman JL, Harel M, Silman I, Gentry MK, Doctor BP: Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related protein. *Protein Science.* **2**: 366-382, 1993.
- 42) Ozols J: Isolation, properties, and the complete amino acid sequence of a second form of 60-kDa glycoprotein esterase. *J. Biol. Chem.* **264**: 12533-12545, 1989.
- 43) Walker CH, Mackness MI: Esterases: Problems of identification and classification. *Biochem. Pharmacol.* **32**: 3265-69, 1963.
- 44) Pindel EV, Kedishvili NY, Abraham TL, Brzezinski MR, Zhang J, Dean RA, Bostron WF: Purification and cloning of a broad substrate specificity human liver carboxylesterase that catalyzes the hydrolysis of cocaine and heroin. *J. Biol. Chem.*, **272**: 14769-14775 (1997).
- 45) Schwer H, Langmann T, Daig R, Becker A, Aslanidis C, Schmitz G: Molecular cloning and characterization of a novel putative carboxylesterase, present in human intestine and liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **233**: 117-120 (1997).