S1-01

カンナビノイド-11-ヒドロキシエステルを基質とする
マウス肝ミクロゾーム中の新規エステラーゼの精製と性質

北陸大・薬 ○渡辺和人、萱野勇一郎、松永民秀、
山本郁男
中村学園大 吉村英敏

Purification and Characterization of a Novel Esterase
That Hydrolyzes Cannabinoid-11-hydroxyesters from
Mouse Hepatic Microsomes

○ Kazuhito WATANABE, Yuichiro KAYANO, Tamihide
MATSUNAGA, Ikuo YAMAMOTO and Hidetoshi YOSHIMURA *

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku
University, Kanazawa 920-11 and *Nakamura
Gakuen College, Fukuoka 814-01

【目的】動物肝ミクロゾーム (Ms) 中には種々のエステル、アミド等を加水分解するエステラーゼが存在する [1]。これらのエステラーゼは薬物の解毒あるいは代謝的活性化の他、内因性物質であるステロイドや脂質エステル類の代謝に関与することが知られている [2]。しかしながら、これらエステラーゼの生理的意義については不明の点が多い。演者らの研究室では大麻成分カンナビノイドの代謝研究において [3]、カンナビノイド-11-ヒドロキシエステルを水解するエステラーゼがマウス肝 Ms に存在することを見出し、この酵素がこれまで報告されているカルボキシエステラーゼ (CEase) とは異なる分子種であることを明らかにしたので、その精製、性質等について検討した。

【実験方法】ddN 系マウス、SD系ラット、Hartley 系モルモット (以上いずれも 8 週令)、New Zealand 白色種ウサギ (2-3 kg)、ニホンザル (2-6 才) いずれも雌雄を用いた。肝 Ms は常法により調製した。酵素の精製は Ms をコール酸で可溶化後、 ω -アミノオクチルセファロース 4B、DEAE-5PW, CM- セファデックス C-50、ヒドロキシアパタイト等のカラムクロマトグラフィーを組合せて行った。精製には SDS-PAGE 及びエステラーゼ活性を指標として用いた。精製酵素の抗体はウサギに免疫して作成した。ブタ肝臓の CEase は Sigma 社から購入した。酵素活性の測定は主に 11-acetoxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (11-OAc- Δ^8 -THC) 及び p-nitrophenyl-acetate (PNPA) を基質として用い、その他各種カンナビノイドのアセテート、1-naphthylacetate (1-NPA)、2-acetylaminofluorene (2-AAF) を用いて測定した。

【結果・考察】1. マウス肝 Ms より酵素の精製 マウス肝 Ms をコール酸で可溶

化後、 ω -アミノオクチルセファロース 4B カラムに付した。0.4% コール酸を含む 100 mM のリン酸緩衝液でカラムを洗浄したところ、既報の CEase は素通り及び洗浄画分に溶出された。次に 0.2% エマルゲン 911 (Em911) を含む緩衝液により、さらにエステラーゼ活性画分が溶出された。活性画分を集め、DEAE-5PW、CM- セファデックス C-50、ヒドロキシアパタイト等のカラムクロマトグラフィーにより、11-OAc- Δ^8 -THC 及び PNPA

の水解活性と SDS-PAGE による追跡から単一タンパクを得た。本酵素の分子量 46.5 Kd は従来の CEase の 57-70 Kd [4,5] とは異なるものであることから、我々はこの精製酵素を ES46.5K と命名した。また、N-末端アミノ

酸配列を調べたところ、これまで報告されている CEase アイソザイムとは全く異なるものであった (Table I)。しかしながら、Probst ら [6] がヒト肝より精製した 2-AAF の脱アセチル化を触媒する酵素 (AAF-DAC) とは分子量及び N-末端アミノ酸配列の類似性が認められた。

2. ES46.5K の触媒活性

Table II に ES46.5K の触媒活性を示す。11-hydroxy- Δ^8 -THC の 3 種のアセチル誘導体については部位特異的に水解し、11 位のアセチル基のみ水解され、1 位のフェノール性水酸

基のアセテートは全く水解されなかった。同様に、 Δ^8 -THC、 Δ^9 -THC 及び cannabinol (CBD) のフェノール性水酸基のアセテートは水解されなかった。一方、cannabinol (CBN) のアセテートについては、11-OAc- Δ^8 -THC の 100 分の 1 程度の活性が認められた。これらの相違は ES46.5K の活性部位とカンナビノイドの構造に起因するものと思われる。その他、ES46.5K は PNPA、1-NPA 及び 2-AAF 等も良い基質とすることが明らかとなった。

3. ES46.5K の触媒活性に及ぼす各種阻害剤の影響 ES46.5K の活性はセリン酵素の強力な阻害剤 diisopropylfluorophosphate (DFP) により強く阻害を受ける他、sodium dodecyl sulfate (SDS)、sodium deoxycholate (DOC-Na)、phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) 等により阻害されることが明らかとなった (Table III)。

Table I N-Terminal Amino Acid Sequences of ES46.5K and Other Microsomal Esterases

	5	10	15	20
ES56.4K	G K T I S L L I S V V L V A Y Y L Y I			
AAF-DAC [6]	G M (K) S L Y (L) (L) I V G I (L) I (A) (Y) (Y) I (Y) T			9/19
RL1 [5]	D P S X P P V V D T (V) K G K V L G K (Y) V			2/19
RB1 [5]	H P S X P P V V N X (V) K G K V L G K (Y) V			2/19
MK1 [5]	G P S S P P V V D D (V) K G K V L G K (Y) V			2/19
Rat(cDNA) [7]	H P S S P P V V D T T K G K V L G K (Y) V			1/19
Rabbit [8]	H P S A P P V V D T (V) K G K V L G K (Y) V			2/19

Table II Catalytic Activities of ES46.5K

Substrates	Activity	Substrates	Activity ^{a)}
11-OAc- Δ^8 -THC	27.1	1-Ac- Δ^9 -THC	0
1-Ac-11-OH- Δ^8 -THC	0	2',6'-Dac-CBD	0
1,11-Dac-11-OH- Δ^8 -THC		1-Ac-CBN	0.2
1-deacetylation	0	PNPA	119.1
11-deacetylation	9.6	1-NPA	121.7
11-OAc- Δ^9 -THC	4.5	2-AAF	0.52
1-Ac- Δ^8 -THC	0		

^{a)} $\mu\text{mol/min/mg protein}$

一方、CEase に特異性の高い bis-p-nitrophenylphosphate (BNPP) による阻害はそれほど強くはなかった。さらに、Em911 の添加により PNPA を基質とした場合は、逆に活性化が見られた。これらの一部 CEase とは異なるものであった。そこで、ブタ肝由来の CEase との比較を、PNPA を基質として DOC-Na 及び Em911 の影響を検討したところ、ES46.5K

の活性は Em911 の添加により 40-50% の活性の上昇が見られたが、CEase は逆に 50-60% の活性低下が認められた。また、DOC-Na の添加では ES46.5K の活性は濃度依存的に阻害され、0.2% 以上の濃度では殆ど活性が認められなくなるのに対して、CEase の阻害は 0.2-

0.3% の濃度でも 20-30% 程度であり、それぞれ相違が見られた。

4. ES46.5K の種差 ES46.5K に対する抗体を用いて各種実験動物の肝 Ms タンパクを Western Blotting により検索した (データ省略)。ES46.5K は ddN 系マウスには雌雄を問わず存在するが、ラット、モルモット及びサル肝 Ms 中には免疫交差性を示すタンパクは認められなかった。一方、ウサギでは雌雄共に 48Kd 付近に交差性を示すタンパクが確認された。マウスについては、ddN 系のみならず ddY、ICR、C57BL/6、DBA/2、C3H 等の系統の肝 Ms 中にも ES46.5K に相当するタンパクの存在が認められた。また、1-NPA を基質とする PAGE- 活性染色法により検討したところ、ES-46.5K は行った条件下では泳動されず原点にとどまった (Fig. 1)。各種実験動物肝 Ms についても同様に検討した結果、マウスには ES46.5K に相当する活性が原点に認められたが、ラット及びモルモットについては ES46.5K に相当する活性は認められなかった (Fig. 1)。

Table III Effects of Various Inhibitors on Enzyme Activity of ES46.5K

Inhibitors	mM	PNPA	11-OAc- Δ^5 -THC	Inhibitors	mM	PNPA	11-OAc- Δ^5 -THC
DFP	0.01	9 ^{a)}	0	NaF	0.1	92	89
	0.1	0	0		1.0	91	68
PMSF	0.1	84	84	DOC-Na	0.1	80	71
	1.0	51	32		1.0	33	42
BNPP	0.1	92	83	IACNH ₂	0.1	103	—
	1.0	68	53		1.0	84	—
SDS	0.1	41	10	KCN	1.0	97	81
	1.0	0	0		5.0	86	74
Em911	0.1 ^{b)}	146	89	DTNB	1.0	70	69
	0.2	158	99				

^{a)} % of control ^{b)} % added
 DFP(diisopropylfluorophosphate); PMSF(phenylmethylsulfonyl-fluoride); BNPP(bis-p-nitrophenylphosphate); SDS(sodium dodecyl-sulfate); DOC-Na(sodium deoxycholate); IACNH₂(Iodoacetamide); DTNB(5,5'-dithio-bis-[2-nitrobenzoate])

Fig. 1
 Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Hepatic Microsomal Esterases (Stained for esterase activity)
 1, female guinea pig; 2, male guinea pig; 3, female rat; 4, male rat; 5, female mouse; 6, male mouse; 7, ES46.5K

【結論】 ddN 系雄マウス肝 Ms より 11-OAc- Δ^8 -THC を効率良く水解するエステラーゼ活性を有するタンパク (ES46.5K) を精製した。ES46.5K は分子量、N-末端アミノ酸配列、各種阻害剤の影響等が従来知られている CEase とは異なるものであり、新しいタイプの膜結合型エステラーゼと考えられる。本酵素はマウスに特異的に存在することを明らかにした。

ABSTRACT

A novel membrane-bound esterase was purified from hepatic microsomes of male ddN mice using ω -aminooctyl Sepharose-4B, DEAE-5PW, CM-Sephadex C-50 and/or hydroxylapatite column chromatographies. The purified enzyme (ES46.5K) showed a single band on a sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel with a minimum molecular weight of 46.5 Kd. The N-terminal amino acid sequence of the enzyme had no homology to those of known carboxylesterases. ES46.5K exhibited esterase activities toward 11-acetoxy derivatives of tetrahydrocannabinol (THC), whereas the enzyme did not hydrolyze phenolic acetates of cannabinoids (Δ^8 -THC, Δ^9 -THC and cannabidiol) except for 1-acetyl-cannabinol. ES 46.5K also possessed esterase activity toward p-nitrophenylacetate, 1-naphthylacetate and 2-acetylaminofluorene. Emulgen 911 and deoxycholate affected differently on the esterase activity of ES46.5K and carboxylesterase purified from porcine liver. Immuno-reactive protein to antibody against ES46.5K was present in hepatic microsomes from mice and rabbits, but not those from rats, guinea pigs and monkeys.

The present study demonstrates that mouse hepatic microsomes contain a novel type of esterase having molecular weight of 46.5 Kd and high catalytic activity toward 11-hydroxy-esters of cannabinoids.

REFERENCES

1. E. Heymann, in "Enzymatic Basis of Detoxication" (W.B. Jakoby, ed.), Vol. II, pp. 291-323, Academic Press, New York (1980).
2. T. Satoh, in "Reviews in Biochemical Toxicology" (E. Hodgson, J.R. Bend and R.M. Philpot eds.), Vol. 8, pp. 155-181, Elsevier, New York (1987).
3. K. Watanabe, S. Narimatsu, I. Yamamoto and H. Yoshimura, J. Biol. Chem., 266, 2709 (1991).
4. R. Mentlein, A. Ronai, M. Robbi, E. Heymann and O.v. Deimling, Biochim. Biophys. Acta, 913, 27 (1987).
5. M. Hosokawa, T. Maki and T. Satoh, Arch. Biochem. Biophys., 277, 219 (1990).
6. M.R. Probst, P. Jenö and U.A. Meyer, Biochem. Biophys. Res. Commun., 177, 453 (1991).
7. R.M. Long, H. Satoh, B.M. Martin, S. Kimura, F.J. Gonzalez and L.R. Pohl, Biochem. Biophys. Res. Commun., 156, 866 (1988).
8. J. Ozols, J. Biol. Chem., 262, 15316 (1987).