S2-15

ウサギ肝可溶性画分ナロキソン還元酵素の精製と性質

○山野 茂, 一瀬文雄, 土岐 智

福岡大学薬学部衛生化学教室

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NALOXONE REDUCTASES FROM CYTOSOL OF RABBIT LIVER

Shigeru YAMANO, Fumio ICHINOSE and Satoshi TOKI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University,
Fukuoka 814-80

【目的】麻薬拮抗薬であるナロキソンは、主に 3 位水酸基のグルクロン酸抱合反応を受けて代謝される。その他に 6 位ケトン基の還元および N-脱アリル化反応を受ける代謝経路がある。In vitro での 6 位ケトン基の還元反応については、広範囲の動物種で研究されており、種々の哺乳動物や鳥類の肝可溶性画分は、NAD(P)H 依存性で 6 α - および/あるいは 6 β -ナロキソールの生成を触媒するナロキソン還元酵素活性を有することが明らかにされている。¹⁻³⁾ 当研究室では、6 α -ナロキソールへの還元反応を触媒するナロキソン還元酵素を、モルモット肝可溶性画分から精製し、この酵素がモルフィン 6 位水酸基の脱水素反応に働くモルフィン 6-脱水素酵素⁴⁾と同一酵素であることを明らかにした。⁵⁾ モルモット以外の動物種でナロキソン還元酵素は精製されていないが、ウサギ肝可溶性画分には、等電点電気泳動の結果から少なくとも 3 種の酵素の存在が考えられている。⁶⁾ 本研究では、ウサギ肝可溶性画分の酵素の精製を試み、性質についても検討した。

【方法】1. 酵素の精製：ウサギ肝可溶性画分を硫酸分画後、Fig.1 に示している種々のクロマトグラフィーを行うことにより 4 種の酵素を精製した。2. 酵素活性

Fig. 1. Flow chart of purification procedure of naloxone reductases.

の測定：反応液は、0.1 M Na phosphate buffer (pH 7.4), 0.167 mM NADPH, 1 mM ナロキソンおよび酵素より成り、全量を 1.5 ml とした。活性は NADPH の消失に基ずく 340 nm の吸光度の減少により求めた。3. 反応生成物の同定：反応液は、飽和 NaHCO_3 水溶液で pH を 8.5 に調整した後、酢酸エチルで抽出し、この抽出液について TLC を行った。展開溶媒として $\text{CHCl}_3/\text{methanol}/28\% \text{NH}_4\text{OH}$ (90:10:4, by vol.) を用い、反応生成物の検出は、ヨウ化白金酸カリウム試液で行った。

【結果】1. 酵素の精製：本酵素活性は、硫安分画後の DEAE-Sepharose カラムクロマトグラフィーの段階で、未吸着部分 (D1) と NaCl 濃度 0.10 M (D2), 0.13 M (D3) および 0.20 M (D4) 付近に溶出する計 4 つのピークに分離した。D1, D2, D3 と D4 には、それぞれ硫安分画の活性の約 37%, 24%, 11% および 30% が認められた。D1, D2, D3 と D4 から、Fig.1 に示しているクロマトグラフィーを行うことにより、4 種の酵素 (NR1, NR2, NR3 および NR4) を、SDS-PAGE で単一バンドを示す標品にまで精製した (Fig.2)。NR1, NR2, NR3 および NR4 の比活性は、それぞれ 31, 38, 87 および 118 milliunits/mg protein で、可溶性画分からそれぞれ約 42, 53, 121 および 164 倍精製されていた。なお、D2 では Blue-Sepharose の段階で、また D3 では Matrex green A の段階で NR2 と NR3 以外の弱い本酵素活性のピークが検出された。また、モルフィン 6-脱水素酵素活性は、DEAE-Sepharose カラムクロマトグラフィーにおいて D2 とほとんど同時に溶出し、Blue-Sepharose の段階でお互いに分離した。2. 反応生成物の同定：可溶性画分は 6α -体および 6β -体の両者を生成するが、Fig.3 に示す TLC の結果から、精製酵素では NR1 のみは 6α -体への、一方 NR2, NR3 および NR4 はいずれも 6β -体への立体特異的な還元反応を触媒することが明らかになった。3. 分子量および等電点：NR1, NR2, NR3 および NR4 の SDS-PAGE で求めた分子量は、それぞれ 37,000, 38,000, 36,000 および 36,000 であり、またゲルろ過で得た値も類似していたことから、4 者はお互いに分子量が近似する単量体であることが明らかになった (Table 1)。NR1, NR2, NR3 および NR4 の等電点は、それぞれ 9.1, 7.0, 6.1 および 5.4 の値を示すことから (Table 1), NR1 は塩基性, NR2 は中性, NR3 と NR4 は弱酸性のタンパク質と考えられる。4. 至適 pH, 補酵素要求性, K_m 値および V_{max} 値：NR1 は pH 8.0 の弱塩基性の条件下で最大の活性を与えたのに対し、NR2, NR3 と NR4 はいずれも pH 6 前後の弱酸性の条件で最大の活性を示した (Table 1)。NADH を補酵素に用いた場合、NR1 と NR2 は、それぞれ NADPH の場合の約 46% と 29%

Fig. 2. SDS-PAGE of purified enzymes.

Fig. 3. TLC analysis of reaction product. a, 6β -naloxol; b, 6α -naloxol; c, naloxone.

Table 1. Property of naloxone reductases

	NR1	NR2	NR3	NR4
Molecular weight				
by SDS-PAGE	37,000	38,000	36,000	36,000
by gel filtration	35,000	35,000	36,000	33,000
Isoelectric point	9.1	7.0	6.1	5.4
Optimum pH	8.0	5.5	6.2	6.1
Km value				
for naloxone (mM)	1.43	1.25	0.13	0.053
for NADPH (μ M)	4.7	43.5	50.0	13.5
Vmax value (milliunits/mg)	67.6	50.6	91.9	120

の活性を示したが、NR3 と NR4 はほとんど活性を示さなかった。ナロキソンに対する Km 値は、NR4 が最低で (Table 1), 4 者の中で最も強い親和性を有している。NR1 と NR2 の Km 値は、NR3 や NR4 の値の 10-25 倍を示すことから (Table 1), 両者に比べて親和性は明らかに低いものと考えられる。Vmax 値を含めて考えると、NR4 が最も有効にナロキソンを基質として利用するものと思われる。5. 基質特異性: Table 2 に各種カルボニル化合物に対する 4 種の酵素の反応性を示している。ナロキソン類似化合物に対して、NR1 はモルフィノンに弱い活性 (ナロキシソンの約 19%) を示したが、他の化合物にはほとんどあるいは全く活性を示さなかった。NR2, NR3 と NR4 は、ナルトレキソン、ジヒドロモルフィノンとモルフィノンにナロキソンと同程度かやや強い活性を示したが、3 位水酸基が修飾されているオキシコドン、ジヒドロコデイノン、コデイノンやエチルモルフィノンに対する反応性は極めて弱いものであった。他のカルボニル化合物に対して、4 種の酵素ともグリセルアルデヒド、p-ニトロベンズアルデヒド、p-ニトロアセトフェノン、フェナントレンキノンに目立って強い活性を示した。また、ステロイド類に対して、NR1 は主に

Table 2. Substrate specificity of naloxone reductases

Substrate	Concentration (mM)	Relative activity (%)			
		NR1	NR2	NR3	NR4
Naloxone	1	100	100	100	100
Naltrexone	1	5	93	143	119
Oxycodone	1	5	7	7	0
Dihydromorphinone	1	5	133	96	125
Dihydrocodeinone	1	0	5	4	0
Morphinone	1	19	111	80	24
Codeinone	1	7	11	26	0
Ethylmorphinone	1	0	9	0	0
Galactose	100	8	17	3	0
DL-Glyceraldehyde	10	448	156	324	148
p-Nitrobenzaldehyde	1	1117	192	346	196
p-Nitroacetophenone	1	293	221	507	156
Phenanthrenequinone	1	4000	614	529	396
5 α -Androstan-17 β -ol-3-one	0.1	21	492	128	0
5 β -Androstan-17 β -ol-3-one	0.1	0	107	139	0
5 α -Androstan-3 α -ol-17-one	0.1	207	176	335	12
5 β -Androstan-3 α -ol-17-one	0.1	4	164	130	32

17 位の, NR2 と NR3 は 3 と 17 両部位の, NR4 は 17 位のオキソ基の還元反応を触媒した. 反応性は, 酵素によってまたステロイドの A 環と B 環の配位の相異によっても異なっていた. 6. 阻害剤の影響: ピラゾールは 1 mM で, いずれの酵素にも影響を及ぼさなかった. バルビタールは 1 mM で, NR1 と NR2 を約 50% 阻害したが, NR3 と NR4 には影響を及ぼさなかった. これらに比べ, ケルセチンは 0.1 mM で, 4 種の酵素を強く阻害した. SH 阻害剤の p-クロル安息香酸は, NR1, NR3 と NR4 を強く阻害したが, NR2 には阻害効果を有していなかった. また, リトコール酸は, 4 種の酵素の強力な阻害剤であることが判明した.

【結論・考察】今回ウサギ肝可溶性画分から精製した 4 種のナロキソン還元酵素は, いずれも低分子量の単量体で, 補酵素として NADPH を主に利用し, ナロキソン 6 位ケトン基の立体特異的な還元反応を触媒した. ナロキソン類似化合物以外にも, グリセルアルデヒド, 芳香族アルデヒド・ケトン, キノンやオキソステロイドに強い活性を示し, 各種カルボニル化合物に反応性を示すことが明らかになった. また, ケルセチンは 4 種の酵素を強力に阻害した. 4 種の酵素間の物理化学的・酵素化学的性質は類似していたが, 等電点, 至適 pH, 補酵素要求性, 各種カルボニル化合物に対する反応性や阻害剤による影響などにいくらか相違が見られた. いずれにせよ, 4 種の酵素とも Wermuth⁷⁾ の分類に従えば, アルド-ケト還元酵素の中のカルボニル還元酵素に属するものと考えられる. また, 4 種の酵素とも薬物代謝酵素として異物代謝ばかりでなく, $3\alpha(\beta)$ - や 17β -ヒドロキシステロイド酸化還元酵素としてアンドロジェン代謝にも生体内で機能しているものと考えられる. 今後, 4 種の酵素間の一次構造の関係および他の研究室で精製されたアルド-ケト還元酵素との異同や構造面での関連性の有無には興味を持たれる. また, アルド-ケト還元酵素は大きなファミリーを形成していることが考えられていることから, シトクローム P-450 の様に, 一次構造に基づく分類や命名法の確立が望まれる.

【ABSTRACT】 Four forms of naloxone reductase (NR1, NR2, NR3 and NR4) have been purified to homogeneous proteins on SDS-PAGE from the cytosolic fraction of rabbit liver. All the isozymes are monomeric proteins with molecular weights of 36,000–38,000. NR3 and NR4 exhibited highly restricted cofactor specificity for NADPH and other two isozymes utilized NADPH as preferred cofactor over NADH. All the isozymes catalyzed stereospecific reduction of naloxone; NR1 formed 6α -naloxol and other three isozymes formed 6β -naloxol. In addition to naloxone, naloxone analogues which have a non-alkylated 3-hydroxyl group such as naltrexone, dihydromorphine and morphine were efficiently reduced by NR2, NR3 and NR4 but were poor or inactive substrates for NR1. Other than naloxone analogues, a variety of carbonyl compounds such as DL-glyceraldehyde, p-nitrobenzaldehyde, p-nitroacetophenone and phenanthrenequinone including oxosteroids were good substrates for all isozymes. Pyrazole and barbital had weak or no inhibitory effects on isozymes but quercetin acted as potent inhibitor. These findings indicate that the present enzymes satisfy most of the physicochemical and biochemical criteria expected as carbonyl reductase.

【REFERENCES】 1) S.H. Pollock, *Life Sci.*, **17**, 465 (1975). 2) S. Roerig et al., *Drug Metab. Dispos.*, **4**, 53 (1976). 3) S. Roerig et al., *Drug Metab. Dispos.*, **5**, 454 (1977). 4) R.L. Felsted et al., *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 1053 (1980). 5) S. Yamano et al., *J. Biol. Chem.*, **260**, 5259 (1985). 6) S. Yamano et al., *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 4321 (1986). 7) B. Wermuth, in *Enzymology of Carbonyl Metabolism 2* (T.G. Flynn and H. Weiner, eds.), p. 209, Alan R. Liss, New York (1985).