ジヒドロジオール脱水素酵素活性の高感度蛍光測定

宮部芳之,^a 松浦一也,^b 中山俊裕,^b 出屋敷喜宏,^b
大谷 勲,^c 原 明*^b

岐阜県立多治見病院薬剤部,^a 岐阜薬科大学,^b 岐阜大学医学部^c

A Sensitive Fluorometric Assay for Dihydrodiol Dehydrogenase

Yoshiyuki MIYABE,^a Kazuya MATSUURA,^b Toshihiro NAKAYAMA,^b

Yoshihiro DEYASHIKI,^b Isao OHYA^c and Akira HARA*^b

Gifu Prefectural Tajimi Hospital,^a 5-161-1 Maebata-cho, Tajimi, Gifu 507, Japan,
Biochemistry Laboratory, Gifu Pharmaceutical University,^b 5-6-1 Mitabora-higashi,
Gifu 502, Japan and Department of Legal Medicine, Gifu University
School of Medicine,^c 40 Tsukasa-machi, Gifu 500, Japan

(Received November 5, 1996)

Dihydrodiol dehydrogenase (DD) oxidizes naphthalene dihydrodiol to 1,2-dihydroxynaphthalene, which is immediately autoxidized to 1,2-naphthoquinone. Here we established a fluorometric assay for the enzyme, which is based on the conversion of 1,2-naphthoquinone to fluorescent compounds by reacting with ethylenediamine. The formed fluorescent compounds were synthetically identified as 6-(2-aminoethylamino)benzo[*f*]quinoxaline and 2,6- or 3,6-bis(2-aminoethylamino)benzo[*f*]quinoxaline, which showed the same fluorescence at 550 nm at an excitation wavelength of 420 nm. This method provides a 9000-fold increase in sensitivity over a currently available assay which measures the change in the absorbance of a cofactor, NADPH. Since this simple and sensitive method allowed many samples to be assayed simultaneously, we applied it to the analysis of multiple forms of DD, separated by an anion-exchange chromatography, from six human liver specimens.

Key words—dihydrodiol dehydrogenase; fluorometric assay; 1,2-naphthoquinone; 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase; aldehyde reductase

緒 言

生体内において benzo[*a*]pyrene や benz[*a*]anthracene などの多環状芳香族炭化水素は、シトクロム P450 及びエポキシドヒドロラーゼにより代謝活性化を受け、*trans*-ジヒドロジオール体を経て発癌物質であるジオールエポキシド体に変換される。NADP⁺-依存性のジヒドロジオール脱水素酵素 (DD; EC 1. 3.1.20) は、この発癌性代謝物の前駆体である *trans*-ジヒドロジオール体をカテコール体に酸化し、発癌性多環状芳香族炭化水素の解毒に関与していると考えられている。^{1,2)} 一方、本酵素はナフタレン白内障の発症に関与することも示唆されている。³⁾

DD は種々の哺乳動物組織の可溶性画分から精製されている。⁴⁻¹⁰⁾ ヒト肝においては4種 (DD1—DD4) の DD 多型が単離され、このうち、マイナー酵素である DD3 はアルデヒド還元酵素 (ALR) と同定されている。¹⁰⁾ DD1, DD2, 及び DD4 は、20 α - または 3 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性を示し、^{10, 11)} これらの酵素の一次構造解析の結果から、^{12, 13)} それぞれヒト

結腸癌細胞 (HT-29) のタンパク質,¹⁴⁾ ヒト肝の胆汁酸結合タンパク質,¹⁵⁾ ヒト肝のクロルデコン還元酵素¹⁶⁾と同一であることが明らかにされている。DD1, DD2 及び DD4 は、プロスタグランジン D₂ 及び臨床で使用されている薬物ケトン類も還元するが、各多型間ではこれらの基質に対する特異性が異なる。^{17, 18)} ヒト肝における DD 活性には個体差があり,¹⁹⁾ また DD の精製においてヒト肝試料により DD1, DD2 及び DD4 の活性比が異なることが示唆されている。^{11, 19)} したがって、DD1, DD2 及び DD4 の発現量の個体差の有無を明らかにすることは、ステロイド、プロスタグランジンなどの生体内成分及び異物の代謝だけでなく、薬物の薬効や副作用の発現の観点から重要である。

ヒト肝の DD 活性は他の哺乳動物の肝に比べて低いため、従来用いられてきた分光学的方法では、少量の肝試料の DD 活性を正確かつ迅速に測定し、また DD 多型の個体差を分析することは困難である。DD による naphthalene dihydrodiol の酸化で生成する 1,2-dihydroxynaphthalene は速やかに自動酸化されて 1,2-naphthoquinone になる。カテコールアミンの蛍光定量法の 1 つとして、自動酸化により生じる o-quinone を ethylenediamine と反応させ蛍光誘導体化する方法が報告されている。²⁰⁾ 本研究では、1,2-naphthoquinone を ethylenediamine と反応させることにより定量的に蛍光物質に変換できることを認め、その蛍光物質の構造を決定するとともに、これを応用して高感度な DD 活性測定法を確立した。さらに本活性測定法を用いてヒト肝における DD 多型の個体差についても検討した。

実 験 の 部

1. 実験材料 ヒト肝は法医剖検例で死後 24 時間以内に摘出し、肉眼的に正常組織と判断されたものを用時まで -85°C に冷凍保存し実験に使用した。Naphthalene dihydrodiol は、Platt and Oesch の方法,²¹⁾ 1,2-naphthoquinone は Fieser の方法²²⁾により合成した。NADP(H) はオリエンタル酵母より、Sephadex G-100, Q-Sepharose Fast Flow は、Pharmacia Biotech より購入した。96 穴プレートは Sumilon Elisa Plate MS-8496F を用いた。その他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

2. 分析機器 融点は柳本微量融点測定装置にて測定し、未補正值である。¹H-NMR 及び ¹³C-NMR は日本電子 JNM-EX400 型 (¹H: 400 MHz, ¹³C: 100 MHz) にて測定した。IR スペクトルは Perkin Elmer 1600 FTIR を用いて KBr 法で測定した。

Mass スペクトル及び High Mass スペクトルは、日本電子 JMS-SX102A を用いてイオン化電位 70 eV にて測定した。蛍光スペクトルは Hitachi F3000 にて測定した。

3. 酵素活性の分光学的測定法 DD 活性及び ALR 活性は、以下の反応系における NADPH の生成及び減少速度を 340 nm で分光学的に測定した。DD 活性の反応系は、0.1 M グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 10.0), 0.25 mM NADP⁺, 1.8 mM naphthalene dihydrodiol 及び適量の酵素を添加し全量を 2.0 ml とした。ALR 活性の反応系は、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0), 80 μM NADPH, 10 mM D-glucuronate 及び適量の酵素を添加し全量を 2.0 ml とした。測定値は基質を加えない反応系における NADPH の生成又は減少量を減じて得た。酵素活性 1 unit は 25°C において 1 分間に 1 μmol の NADPH を生成あるいは酸化する酵素量とした。

4. 酵素の精製とヒト肝硫酸アンモニウム画分の調製 レコンビナント DD4 (rDD4) は Deyashiki らの方法²³⁾により大腸菌内で発現、精製した。ヒト肝抽出液の硫酸アンモニウム画分 (35%—70%飽和) は Hara らの方法¹⁰⁾に従って調製した。

5. タンパク質量の測定 タンパク質量はウシ血清アルブミンを標準タンパク質とし

Bradford の方法²⁴⁾により定量した。カラムからの溶出液のタンパク質濃度は 280 nm の吸光度より測定した。

6. 1,2-Naphthoquinone の蛍光誘導体化による酵素活性測定法 蛍光誘導体化法による DD 活性の測定には, naphthalene dihydrodiol の脱水素反応により生成する 1,2-naphthoquinone を ethylenediamine と反応させ蛍光誘導体化することにより行った。本測定法の検討においては, 酵素反応は分光学的測定法で用いた同じ組成の反応液 (全量 1.0 ml) で行った。反応開始 10 分後に 6 N HCl 160 μ l を加えることにより反応停止し, 直ちに ethylenediamine 160 μ l を加えてよく攪拌した。この混合液を 96 穴プレートに分注 (120 μ l/ウェル) し, 50°C, 30 分間インキュベートした。さらに, 各ウェル内の表面張力を減少させて蛍光のバラツキを防ぐ目的でメタノールを 50 μ l 加えた後, Cytofluor 2350 (Millipore) で励起側 430 $\pm$ 20 nm, 蛍光側 550 $\pm$ 30 nm のフィルターを用いて測定した。なお, 酵素を加えない反応系を盲検として同様に測定した。標準液として, 0—5 μ M までの 1,2-naphthoquinone 水溶液を用時調製し, 同様に操作した。

タイムコースの実験では, 上記の反応系を全量 3.0 ml にして行った。酵素添加により反応開始から 30 分後まで経時的に反応液 (0.3 ml) を取り出し, あらかじめ 6 N HCl 50 μ l を入れたエッペンドルフチューブに注ぎ反応を止め, ethylenediamine 50 μ l を加えてよく攪拌した。上記と同様 96 穴プレートに分注, 誘導体化反応後, 同様にその蛍光を測定した。

7. ヒト肝の DD 多型の分析 ヒト肝 (約 2 g) を 4 倍量の 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA, 0.14 M KCl を含む緩衝液でホモジナイズし, ホモジネートを 105000 $\times g$ 1 時間遠心分離した。その上清画分を 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM 2-mercaptoethanol (2-ME), 0.5 mM EDTA, 0.15 M NaCl を含む緩衝液で平衡化した Sephadex G-100 カラム (2.6 $\times$ 100 cm) に添加した。同緩衝液で溶出した活性画分を集め, YM-10 膜 (Amicon) を用いて限外ろ過濃縮後, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM 2 ME, 0.5 mM EDTA, 20% glycerol を含む緩衝液 (緩衝液 A) に対して一夜透析した。透析した酵素液を FPLC 装置 (Pharmacia Biotech) を用いて Q-Sepharose カラムクロマトグラフィーを行った。酵素液をカラム (1.0 $\times$ 10 cm) に添加し, DD1 が未吸着画分に溶出するまで平衡化に用いた緩衝液 A で洗浄後, 0 から 70 mM までの NaCl 直線濃度勾配により, DD2, DD3, DD4 を分離溶出した。各フラクション液 (2 ml) から 10 μ l ずつ 96 穴プレートのウェルに分注し, 25°C に加温した 0.1 M グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 10.0), 0.25 mM NADP⁺, 及び 1.8 mM naphthalene dihydrodiol から成る基質混合液 100 μ l を添加して酵素反応を行った。25°C にて 5 分間反応後, 6 N HCl と ethylenediamine をそれぞれ 20 μ l 加え, 50°C, 30 分間蛍光誘導体化した。反応後, 各ウェルにメタノール 50 μ l ずつ加え Cytofluor 2350 にて蛍光強度を測定した。ブランクには補酵素を含まない基質緩衝液を使用して同様に反応したものを使用した。酵素活性 1 unit は 25°C において 1 分間に 1 μ mol の 1,2-naphthoquinone を生成する酵素量とした。

8. HPLC 分析 酵素反応液 (全量 1.0 ml) に ethylenediamine を加えて蛍光誘導体化反応後, 等量のアセトニトリルを加え 10000 $\times g$ 10 分間遠心して除タンパクした。その遠心上清の一定量を HPLC にて分析した。使用した機器及び条件は次のとおりである。日本分光 LC 800 を用い, カラムとして Nova Pak C₁₈ (3.9 $\times$ 150 mm, Millipore) を使用した。移動相は A 液 (0.1% トリフルオロ酢酸水溶液) と B 液 (0.05% トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル溶液) を用い, 流速 1.0 ml/min, カラム温度 40°C に設定した。グラジエントプログラムは B 液の濃度 0% (0 分) $\rightarrow$ 80% (20 分) $\rightarrow$ 80% (25 分) $\rightarrow$ 100% (30 分) である。溶出液は 254 nm でモニター後, 250 μ l ずつ分画し, 蛍光強度を測定した。

Fig. 1. Excitation (a) and Emission (b) Spectra of 1,2-Naphthoquinone Derivatives

The fluorescence spectra were measured 15 min after reaction of authentic 1,2-naphthoquinone (—) and 1,2-naphthoquinone enzymatically formed (----) with ethylenediamine.

Fig. 2. Reverse-phase HPLC of Derivatives of 1,2-Naphthoquinone Formed in the Reaction Mixtures without (a) or with rDD4 (b and c)

The elutions of the products and naphthalene dihydrodiol (retention time 18.5 min) were monitored at 254 nm (a and b) and by measuring the fluorescence at 550 nm (excited at 420 nm) (c).

9. 1,2-Naphthoquinone 蛍光誘導体の合成 酵素反応で生成する 1,2-naphthoquinone の蛍光誘導体は 2 種 (化合物 **1** と **2**) 生成した. そこで, 1,2-naphthoquinone 1.0 g をメタノール 300 ml に溶解し, 化合物 **1** の合成においては ethylenediamine を 30 ml, 化合物 **2** の合成においては 3 ml を添加し, 50°C 30 分間反応させた. 反応液に水 100 ml を加え酢酸エチル (100 ml×3 回) で抽出した. TLC [Kiesel gel 60F 254 (Merck): クロロホルム/メタノール=3/1 (v/v)] 分析により, 蛍光化合物 ($R_f=0.02$) の多くは水層に存在し, 酢酸エチル層には非極性の副生成物が抽出除去されていることを確認した. この水層に塩酸を加えて pH 6.5 とし, 減圧下に蒸発乾固後, 残査を Wakogel C-100 カラムクロマトグラフィー (1.8×10 cm) で精製した. 溶出溶媒は, 化合物 **1** においてはクロロホルム/メタノール=9/1 (v/v), 化合物 **2** についてはクロロホルム/メタノール=97/3 (v/v) を用いた. さらに, 両蛍光化合物画分を TLC [エタノール/*n*-ブタノール/10%酢酸アンモニウム水溶液=2/5/3 (v/v/v)] により精製した. 化合物 **1** と化合物 **2** の R_f 値は, それぞれ 0.26 と 0.33 であった. メタノール-クロロホルム混合液より再結晶し, 針状晶として, 化合物 **1** 0.9 g (収率 48%), 及び化合物 **2** 0.6 g (収率 40%) が得られた.

Table 1. Physical and Spectral Data of Compounds **1** and **2**

Compound	mp (°C)	Formula	MS, M^+ (m/z) (Calcd)	IR (KBr) (cm^{-1})	$^1\text{H-NMR}$ δ (DMSO- d_6)	$^{13}\text{C-NMR}$ δ (DMSO- d_6)
1	145 (dec.)	$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_6$	296.1768 (296.1749)	3362 1598 1543 1345	3.14 (2H, t, $J=5.9$ Hz)	38.0 (t)
					3.19 (2H, t, $J=5.9$ Hz)	38.4 (t)
					3.56 (2H, m)	38.8 (t)
					3.75 (2H, m)	41.5 (t)
					6.2—8.6 (4H, br s)	100.9 (d)
					6.4 (1H, br s)	122.7 (d)
					6.7 (1H, s)	124.8 (d)
					7.61 (1H, t, $J=5.9$ Hz)	126.7 (s)
					7.66 (2H, m)	126.7 (d)
					8.28 (1H, s)	127.7 (d)
					8.41 (1H, dd, $J=3.4, 5.9$ Hz)	130.4 (s)
					9.03 (1H, dd, $J=3.4, 5.9$ Hz)	133.0 (s)
						136.3 (s)
						137.4 (d)
						141.9 (s)
						150.9 (s)
2	250 (dec.)	$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_4$	238.1218 (238.1241)	3362 1598 1543 1345	3.09 (2H, t, $J=5.4$ Hz)	37.8 (t)
					3.53 (2H, m)	42.3 (t)
					6.22 (2H, br s)	98.0 (d)
					6.72 (1H, s)	122.3 (d)
					7.16 (1H, t, $J=5.4$ Hz)	124.3 (d)
					7.74 (2H, m)	126.2 (s)
					8.44 (1H, m)	127.7 (d)
					8.52 (1H, d, $J=2.0$ Hz)	128.5 (d)
					8.66 (1H, d, $J=2.0$ Hz)	130.7 (s)
					9.04 (1H, dd, $J=2.9, 6.9$ Hz)	135.7 (s)
						138.6 (d)
						144.8 (d)
						144.9 (s)
						145.7 (s)

結 果

1. 1,2-Naphthoquinone の蛍光誘導体の蛍光スペクトル

1,2-Naphthoquinone の標品に ethylenediamine を添加後、経時的に蛍光スペクトルを測定した。その反応液の励起スペクトルの励起極大は 420 nm (Fig. 1a) に、蛍光スペクトルの蛍光極大は 550 nm (Fig. 1b) に認められた。また、NADP⁺ 存在下、naphthalene dihydrodiol と rDD4 を 10 分間インキュベートした反応液に 6 N HCl を加えて反応を停止した後、ethylenediamine を添加し蛍光誘導体化した。この蛍光スペクトルは 1,2-naphthoquinone 標品を蛍光誘導体化したものと一致した。なお、ethylenediamine 添加後 15 分までは蛍光強度は上昇したが、以降は一定となった。

2. 蛍光誘導体の同定

rDD4 を用いた酵素反応生成物を蛍光誘導体化後、除タンパクし HPLC 分析を行った結果、酵素を加えなかった対照の反応系 (Fig. 2a) と比較すると、酵素反応生成物に由来する ethylenediamine 誘導体 3 種 (保持時間: 14.7, 16.8, 18.8 min) が検出された (Fig. 2b)。これらの誘導体のうち保持時間 16.8 min と 18.8 min の誘導体の溶出に一致して蛍光 (励起波長 420 nm, 蛍光波長 550 nm) が認められた (Fig. 2c)。両誘導体をそれぞれ、化合物 1、化合物 2 とした。別に 1,2-naphthoquinone 標品と ethylenediamine を反応させた場合にも化合物 1 及び化合物 2 と同一の HPLC における保持時間及び蛍光を示す物質が生成し、両化合物を結晶として得た。化合物 1 と化合物 2 の機器分析結果 (Table 1) から、化合物 2 は、1,2-naphthoquinone の 1,2 位及び 4 位に ethylenediamine が付加した 6-(2-aminoethylamino)benzo[f]quinoxaline であり、化合物 1 は化合物 2 の構造にもう 1 分子 ethylenediamine が付加した化合物であることが判明した (Fig. 3)。合成した化合物 1 及び 2 のモル当たりの蛍光強度 (励起波長 420 nm, 蛍光波長 550 nm) を比較したところ、化合物 1 は化合物 2 の

Fig. 3. The Structures of Compounds 1 and 2

Fig. 4. Standard Curves of 1,2-Naphthoquinone

Concentrations of 1,2-naphthoquinone; (a) 0 to 5.5 nmol and (b) 0 to 60 pmol.

Fig. 5. Correlation between the Formation of 1,2-Naphthoquinone, and the Amounts of rDD4 (a) and Ammonium Sulfate Fraction of Human Liver (b)

Varying amounts of rDD4 or ammonium sulfate fraction of human liver were incubated with naphthalene dihydrodiol for 10 min before the derivation with ethylenediamine.

約 1.1 倍の蛍光強度を示した。

3. 1,2-Naphthoquinone の蛍光誘導体化に基づく DD 活性の測定

1,2-Naphthoquinone に ethylenediamine を添加した検量線では、蛍光強度は 1,2-naphthoquinone として 5 nmol まで直線的に増加し (Fig. 4a; 回帰直線式及び相関係数 $y = 1020x + 19$, $r = 0.998$), 3.4 pmol までの 1,2-naphthoquinone の定量が可能であった (Fig. 4b; $y = 12.3x + 13$, $r = 0.999$).

酵素源として rDD4 及びヒト肝の硫酸アンモニウム画分を用いて、酵素反応により生成する 1,2-naphthoquinone を本蛍光誘導体化法で測定した。Fig. 5 に示すように、いずれの酵素標品においても 1,2-naphthoquinone 生成量は酵素量に比例した (a; $y = 1.87x + 0.01$, $r = 0.991$, b; $y = 0.048x + 0.028$, $r = 0.999$).

rDD4 による naphthalene dihydrodiol の酸化

反応のタイムコースは、1,2-naphthoquinone 生成に基づく本蛍光誘導体化法では 30 分の反応時間まで直線性を示した (Fig. 6)。本蛍光誘導体化法と従来の NADPH の生成をモニターする分光学的方法を比較すると、反応後 10 分までは 1,2-naphthoquinone 及び NADPH の生成量はほぼ一致していた。しかし、10 分以降では、NADPH 生成速度はみかけ上減少したのに対し、1,2-naphthoquinone 生成速度は 30 分まで一定であった。

4. 蛍光測定法によるヒト肝の DD 多型の分析

6 例のヒト肝 (各約 2 g) から調製したホモジネート上清を Sephadex G-100 でゲルろ過後、そ

Fig. 6. Time Course of the 1,2-Naphthoquinone Formation (■), and NADPH Formation (▲) by rDD4

The reaction mixture contained 1.8 mM naphthalene dihydrodiol, 0.25 mM NADP^+ , and rDD4 (3.4 μg). NADPH formation was monitored by the absorbance at 340 nm and 1,2-naphthoquinone was determined by the derivation with ethylenediamine.

Fig. 7. Elution Patterns of Multiple Forms of DD in Six Human Livers on Q-Sepharose Chromatography
The fractions were analyzed for proteins (----) and activities of DD (□) and ALR (▲). Sex: F, female; M, male

の DD 活性画分を Q-Sepharose クロマトグラフィーにより分離した (Fig. 7). DD3 は ALR であり,¹⁰⁾ 本来の ALR 活性に比べ DD 活性が低いので, DD3 の溶出は ALR による D-glucuronate 還元活性の測定により確認した. 6 例とも ALR 活性ピークが観察され, マイナーな型である DD3 に関しては大きな個体差は認められなかった. 一方, その他の 3 種の DD 多型の活性比には著しい個体差が検出された. DD1, DD2 及び DD4 がともに存在する典型的な 2 例 (A, B) に対し, DD2 活性の低い 2 例 (C, E), DD4 活性の低い 1 例 (D), 及び DD1 と DD4 活性がともに低い 1 例 (F) が認められた. なお, 溶出した 6 例において DD1, DD2, DD4 の各アイソザイムについては, それぞれの特徴である 20 α -又は 3 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性^{10, 11)}を認めた.

考 察

本研究で確立した DD 活性の高感度測定法は, naphthalene dihydrodiol の酸化によって生じる 1,2-naphthoquinone を ethylenediamine と反応させて蛍光誘導体を形成させ, 定量する方法である. 本法は, カテコールアミンの定量法である *o*-quinone の蛍光誘導体化法²⁰⁾を応用したものであるが, 1,2-naphthoquinone も速やかに ethylenediamine と反応して蛍光物質を形成すること, 及びその蛍光物質の構造を明らかにした. その構造は, カテコールアミン由来の *o*-quinone と ethylenediamine の反応により生成する蛍光物質の推定構造, 2,3-dihydro-3-hydroxy-1-methylpyrrolo-4,5-g-quinoxaline,²⁰⁾ と類似しているもので, 1,2-naphthoquinone はカテコールアミン由来の *o*-quinone について報告されている反応機構²⁵⁾と同様に ethylenediamine と反応し, さらに, 生成した quinoxaline 環の 6 位に 2-aminoethylamino 基が付加したものと考えられる. 蛍光物質として 2-aminoethylamino 基の導入数が異なる 2 種を同定したが, その合成法で示したように, 1,2-naphthoquinone 量に対する ethylenediamine 量が多いと化合物 1 が生成しやすくなると考えられた. 化合物 1 及び 2 とともにモル当たりの蛍光強度はほぼ同じなので, 両者の生成比が異なっても蛍光定量には影響がない.

本蛍光測定法の定量限界は 1,2-naphthoquinone 量として 3.4 pmol であった. これに対して NADPH のモル吸光度係数から算出される分光学的な DD 活性測定法の検出限界は 1 nmol/min である. また, 酵素反応のタイムコースにおいて, NADPH は不安定であるため, その生成量は反応時間に対して直線的に増加しなかったが, 1,2-naphthoquinone 生成はほぼ直線的であった. 酵素反応時間を延長することによって, 蛍光測定法では 30 分間で生成する 1,2-naphthoquinone 3.4 pmol を検出可能である. したがって, 本法は 1 分間当たり 0.11 pmol の 1,2-naphthoquinone を検出可能であるので, 従来の分光学的 DD 活性測定法より約 9000 倍高感度である. Ivins and Penning²⁶⁾ は, *S*-adenosyl[methyl-³H]methionine と catechol *O*-methyltransferase を共存させて, DD による benzene dihydrodiol の酸化により生じる catechol を定量するラジオケミカルな DD 活性測定法を確立し, その検出限界は catechol として 5 pmol と報告している. 本研究の DD 活性測定法はこのラジオケミカルな測定法とほぼ同等に高感度である. また, 生成物の抽出操作と高価なアイソトープ試薬を必要とするラジオケミカルな測定法に比べ, 本蛍光測定法は操作の簡便性, 迅速性及び安価である点, benzene dihydrodiol より低い K_m と高い V_{max} を示す^{10, 11)} naphthalene dihydrodiol を基質に用いる点において, 今までに報告のない利点がある. さらに, 96 穴プレートを用いて酵素反応と蛍光誘導体化を行うことができるので, 本法はカラムクロマトグラフィーなどにより分画される多量の試料の短時間測定には極めて有用と考えられる.

ヒト肝6例を分析した結果, 分析に使用した肝試料により DD1, DD2 及び DD4 の存在比には著しい相違を認めた. ヒトの臓器の場合には死後の経過時間や測定までの臓器の保存期間などの因子も考慮しなければならない. しかし, DD3 である ALR 活性は, 肝 (E) を除くと, 活性値の個体差は2倍以内であったのに対し, 他の DD 多型の活性に著しい差が認められた. この結果は, 恐らく, DD1, DD2 及び DD4 の肝細胞内における発現量に個体差があることを示唆する. 最近, DD1 と DD4 のゲノム遺伝子の発現調節領域が明らかにされ,^{27, 28)} また DD2 に相当する結腸癌細胞のタンパク質 (H-37) はエタクリン酸や抗酸化剤で誘導されると報告されている.¹⁴⁾ 一方, DD1, DD2 及び DD4 とアミノ酸配列上 85% 以上一致する 3 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の cDNA がさらに3種単離されている.²⁹⁾ また, DD4 と同一であるクロルデコン還元酵素 cDNA の解析から pseudogene が存在することも示唆されている.¹⁶⁾ このような肝における DD1, DD2 及び DD4 の存在比の個体差が各遺伝子の誘導の違いに由来するのか, または遺伝的多型の存在によるのかは今後の研究を待たねばならない. 本研究で確立した高感度な DD 活性の蛍光測定法は, 培養細胞株を用いた DD 各多型の誘導の解析, ならびに肝やその他の DD 多型の発現量の個体差を明らかにする研究に有用な手段となると考える.

謝辞 本研究の一部は文部省科学研究費を受けて行った.

引用文献

- 1) Glatt H. R., Cooper C. S., Grover P. L., Sims P., Bentley P., Merdes M., Waechter F., Vogel K., Guenther T. M., Oesch F., *Science*, **215**, 1507 (1982).
- 2) Smithgall T. E., Harvey R. G., Penning T. M., *J. Biol. Chem.*, **261**, 6184 (1986).
- 3) Vogel K., Bentley P., Platt K. L., Oesch F., *J. Biol. Chem.*, **255**, 9621 (1980).
- 4) Wörner W., Oesch F., *FEBS Lett.*, **170**, 263 (1984).
- 5) Bolcsak L. E., Nerland D. E., *J. Biol. Chem.*, **258**, 7252 (1983).
- 6) Sawada H., Hara A., Nakayama T., Nakagawa M., Inoue Y., Hasebe K., Zhang Y. P., *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 453 (1988).
- 7) Sawada H., Hara A., Nakagawa M., Tsukada F., Ohmura M., Matsuura K., *Int. J. Biochem.*, **21**, 367 (1987).
- 8) Hara A., Hasebe K., Hayashibara M., Matsuura K., Nakayama T., Sawada H., *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 4005 (1986).
- 9) Hara A., Kariya K., Nakamura M., Nakayama T., Sawada H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **249**, 255 (1986).
- 10) Hara A., Taniguchi H., Nakayama T., Sawada H., *J. Biochem.*, **108**, 250 (1990).
- 11) Deyashiki Y., Taniguchi H., Amano T., Nakayama T., Hara A., Sawada H., *Biochem. J.*, **282**, 741 (1992).
- 12) Deyashiki Y., Ogasawara A., Nakayama T., Nakanishi M., Miyabe Y., Sato K., Hara A., *Biochem. J.*, **545**, 299 (1994).
- 13) Hara A., Matsuura K., Tamada Y., Sato K., Miyabe Y., Deyashiki Y., Ishida N., *Biochem. J.*, **313**, 373 (1996).
- 14) Ciaccio P. J., Jaiswal A. K., Tew K. D., *J. Biol. Chem.*, **269**, 15558 (1994).
- 15) Stolz A., Hammond L., Lou H., Takikawa H., Ronk M., Schively J. E., *J. Biol. Chem.*, **268**,

- 10448 (1993).
- 16) Winters C. J., Molowa D. T., Guzelian P. S., *Biochemistry*, **29**, 1080 (1990).
 - 17) Ohara H., Nakayama T., Deyashiki Y., Hara A., Miyabe Y., Tsukada F., *Biochim. Biophys. Acta*, **1215**, 59 (1994).
 - 18) Ohara H., Miyabe Y., Deyashiki Y., Matsuura K., Hara A., *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 221 (1995).
 - 19) Penning T. M., Sharp R. B., *Carcinogenesis*, **11**, 1203 (1990).
 - 20) Weil-Malherbe H., Bone A. D., *Biochem. J.*, **51**, 311 (1952).
 - 21) Platt K. L., Oesch F., *J. Org. Chem.*, **48**, 265 (1983).
 - 22) Fieser L. F., "Organic Syntheses," Coll. vol. 2, eds. by Blatt A. H., John Wiley and Sons, New York, 1966, p. 430.
 - 23) Deyashiki Y., Tamada Y., Miyabe Y., Nakanishi M., Matsuura K., Hara A., *J. Biochem.*, **118**, 285 (1995).
 - 24) Bradford M. M., *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
 - 25) Harley-Mason J., Laird A. H., *Tetrahedron*, **7**, 70 (1959).
 - 26) Ivins J. K., Penning T. M., *Cancer Res.*, **47**, 680 (1987).
 - 27) Lou H., Hammond L., Sharma V., Sparkes R. S., Lusi A. J., Stolz A., *J. Biol. Chem.*, **269**, 8416 (1994).
 - 28) Khanna M., Qin K.-N., Wang R. W., Cheng K.-C., *J. Biol. Chem.*, **270**, 20162 (1995).
 - 29) Qin K.-N., New M. I., Cheng K.-C., *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **46**, 673 (1993).