

ヘキソバルビタール代謝研究の新たな展開：立体選択的代謝，グルタチオン抱合反応関与の新代謝経路並びに 3- ハイドロキシヘキソバルビタール脱水素酵素

竹之下玲子,^{*,1)} 土岐 智

New Aspects of Hexobarbital Metabolism: Stereoselective Metabolism, New Metabolic Pathway via GSH Conjugation, and 3-Hydroxyhexobarbital Dehydrogenases

Reiko TAKENOSHITA^{*,1)} and Satoshi TOKI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

(Received August 23, 2004)

Hexobarbital, a short-acting hypnotic, is metabolized to 3'-hydroxyhexobarbital by cytochrome P450, and then to 3'-oxohexobarbital by liver cytosolic dehydrogenase. New methods of separation for hexobarbital and its metabolites by TLC have been developed and applied to study the metabolism of hexobarbital enantiomers and stereoselective metabolism of hexobarbital. (+)-Hexobarbital preferentially was transformed into β -3'-hydroxyhexobarbital and the (-)-enantiomer preferentially transformed into α -3'-hydroxyhexobarbital by rat liver microsomes. Glucuronidation and dehydrogenation of 3'-hydroxyhexobarbital were also stereoselective and the S-configuration at the 3'-position was preferred. α -3'-Hydroxyhexobarbital from (-)-hexobarbital and the β -isomer from (+)-hexobarbital were shown to be preferentially conjugated with glucuronic acid in rabbit urine, and to be preferentially dehydrogenated to form 3'-oxohexobarbital by rabbit and guinea pig 3-hydroxyhexobarbital dehydrogenases. A new metabolic pathway of hexobarbital was found in which 3'-oxohexobarbital reacts with glutathione to form 1,5-dimethylbarbituric acid and a cyclohexenone-glutathione adduct, a novel metabolite. 1,5-Dimethylbarbituric acid was excreted into the urine and the cyclohexenone-glutathione adduct into the bile of rats dosed with hexobarbital. 3-Hydroxyhexobarbital dehydrogenases that dehydrogenate 3-hydroxyhexobarbital into 3'-oxohexobarbital were purified from the liver cytosol of rabbits, guinea pigs, goats, rats, mice, hamsters, and humans and characterized. These enzymes were monomeric proteins and had molecular weights of about 34500—42000, and used NAD⁺ and NADP⁺ as cofactors, except for the human enzyme that had a molecular weight of about 58000 and used NAD⁺ alone. Each enzyme exhibited its own characteristics. Substrate specificity demonstrated that 3-hydroxyhexobarbital dehydrogenases dehydrogenate not only α,β -unsaturated cyclic and acyclic secondary alcohols but also some 17 β -, 3 α -hydroxysteroids or both, except for the human enzyme. The amino acid sequence of the hamster enzyme indicated that it belongs to the aldo-keto reductase superfamily and hydroxysteroid dehydrogenase subfamily.

Key words—hexobarbital; 3-hydroxyhexobarbital dehydrogenase; stereoselective metabolism; glutathione conjugation; hydroxysteroid dehydrogenase; aldo-keto reductase

はじめに

Hexobarbital (HB) は第二次世界大戦後の日本で睡眠薬として繁用され、自殺に使用されるなど裁判化学的にも問題になった薬である。故塚元久雄先生は薬物鑑定において、母化合物が検出されなくてもその代謝物を尿中に同定できれば有用であろうとの洞察の基に、HB 代謝研究を開始された。当時は

薬物代謝研究の黎明期であった。HB 投与ウサギの尿中代謝物の同定、ウサギ肝のスライス、ホモジェネート、ミクロソーム画分、可溶性画分などを用いて HB の代謝経路、反応機構の解明が精力的になされた。²⁻⁸⁾ HB の尿中代謝物としては、3'-hydroxyhexobarbital (OH-HB)、3'-oxohexobarbital (Oxo-HB)、脱メチル同族体、バルビツール環の開裂生成物などが報告されている。

HB はまず、肝の膜画分ミクロゾーム (cytochrome P450) と NADPH 並びに酸素の存在下 3'位が酸化を受けて OH-HB となり、さらに肝の可溶性画分に

福岡大学薬学部 (〒814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1)
e-mail: takreiko@jcom.home.ne.jp

*本総説は、平成 15 年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

存在する dehydrogenase により OxoHB に脱水素され、これが HB の主代謝経路となっている (Fig. 1). ここでは、1962 年の当研究室開設以降取り組んできた HB 代謝、並びに肝可溶性画分中の 3-hydroxyhexobarbital dehydrogenase⁷⁾ について、既に退職されている宮野和子博士、影浦恵智子博士並びに大学院生諸氏の成果も含め概要を述べることにする。

1. Hexobarbital の代謝

1-1. Hexobarbital の光学異性体の立体選択的代謝 この研究開始当時、HB は光学異性体間で薬理的にも生物化学的にも違いがあり、ラットでは (+)-HB の方が (-)-HB より麻酔作用が強く、代謝も早いことが明らかにされていた。^{9,10)} Cytochrome P450 は薬物代謝酵素の名で呼ばれ本体は不明で、実験はホモジェネートやミクロソーム画分を用いて行われた。それまでの HB の代謝の定量的研究は、主として減少した HB の量によって行われていた。当教室では HB と 7 つの代謝物、3'-hydroxynorhexobarbital (OH-NHB), 3'-oxonorhexobarbital (Oxo-NHB), α -3'-hydroxyhexobarbital (α OH-HB), β -3'-hydroxyhexobarbital (β OH-HB), Oxo-HB, norhexobarbital (NHB), 並びに ureide を TLC で分離する系を開発し、各々の代謝物を直接定量する方法を使って (+)-HB, (-)-HB 並びに (\pm)-HB のラット肝ミクロソームによる代謝を詳細に検討した。¹¹⁾ 上記 8 種の化合物は、chloroform/acetone/methanol/concentrated aq. NH₃ (40 : 20 : 6 : 1, v/v)

(solvent 1) で分離後、さらに、chloroform/acetone (2 : 1, v/v) (solvent 2) で展開するとききれいに分離した (Fig. 2). Control 並びに phenobarbital 処理ラット肝ミクロソームによる光学異性体の代謝結果を Table 1 に示す。Control ラットでは、(+)-HB の方が (-)-HB よりも 1.5 倍早く代謝され、

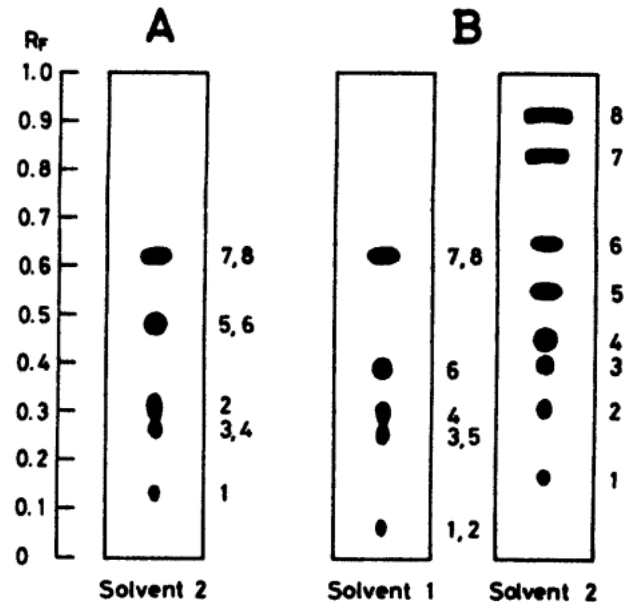


Fig. 2. Thin-Layer Chromatograms of Hexobarbital and its Metabolites

In A, chloroform/acetone (2 : 1, v/v) (solvent 2) was used; in B, all samples were developed with chloroform/acetone/methanol/concentrated aq. NH₃ (40 : 20 : 6 : 1, v/v) (solvent 1) at first, then with solvent 2. 1: OH-NHB, 2: Oxo-NHB, 3: α OH-HB, 4: β OH-HB, 5: Oxo-HB, 6: NHB, 7: HB, 8: ureide.

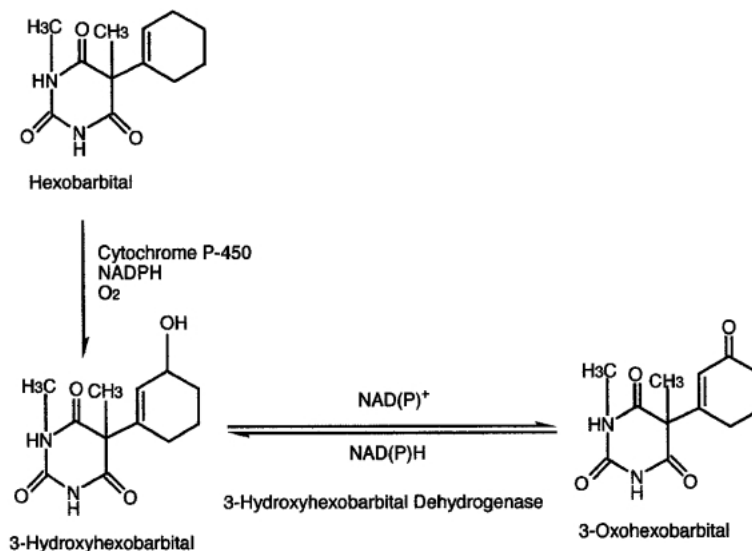


Fig. 1. Main Metabolic Pathway of Hexobarbital

Table 1. Microsomal Metabolism of (+)-, (-)-, and (±)-Hexobarbital in Liver of Control (C) and Phenobarbital-treated (PB) Rats

Metabolite	(+) -HB			(-) -HB			(±) -HB		
	C	PB	(PB/C)	C	PB	(PB/C)	C	PB	(PB/C)
	n mol/mg protein/min								
Oxo-HB	0.19	0.29	(1.5)	0.15	0.35	(2.3)	0.26	0.58	(2.3)
αOH-HB	1.46	6.68	(4.6)	4.60	7.96	(1.7)	3.47	7.65	(2.2)
βOH-HB	6.71	10.88	(1.6)	0.80	4.32	(5.4)	3.90	6.80	(1.7)
Total	8.36	17.85	(2.1)	5.55	12.63	(2.3)	7.63	15.03	(2.0)
α/β	1/4.6	1/1.6		5.8/1	1.8/1		1/1.2	1.1/1	

Incubation mixture contained MgCl₂ (25 μmol), EDTA (0.6 μmol), NADPH (36 μmol), NADH (6 μmol), substrate 12 μmol, for (+)- and (-)-HB; 24 μmol for (±)-HB, microsomal suspension (equivalent to 0.33 g of liver), and 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, to make a total volume of 6 ml and was incubated for 20 min at 37°C.

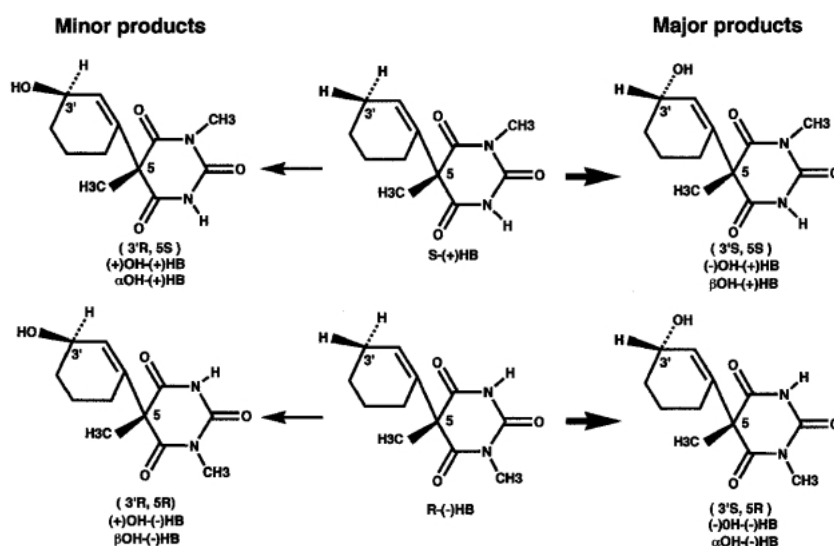


Fig. 3. Absolute Configuration of Four Hydroxylated Products Obtained from Microsomal Metabolism of Hexobarbital Enantiomers in Control Rat Liver

hydroxyl 体の生成はラセミ体である(±)-HB では α- 及び β-hydroxyl 体の生成量にほとんど差は見られないが、(+)-HB からは β 体が 4.6 倍、逆に(-)-HB からは α 体が 5.8 倍多く生成した (Fig. 3)。一方、phenobarbital 処理ラットでは、酵素活性の上昇とともに control では少量の生成だった(+)-HB からの α 体生成、(-)-HB からの β 体生成がそれぞれ 4.6 倍、5.4 倍と増加し、control ラットで主生成物であったそれぞれからの両 hydroxyl 体の生成量は 1.6—1.7 倍にとどまり、phenobarbital 前処理により立体選択性は見かけ上低下した。一方、3-methylcholanthrene 前処理は効果がなかった。さらに、HB 光学異性体からの α- 及び β-hydroxyl 体の生成に及ぼす SKF-525A の阻害効果にも明らかな差異が認められ、従来提唱されていた HB 光学

異性体のそれぞれに特異的な代謝酵素があるのではないかという考えは否定され、水酸化反応には複数の P450 が関与していることが証明された。

1-2. Hydroxyhexobarbital 光学異性体代謝における Glucuronide の立体選択的生成 ラセミ体 HB を投与したウサギ尿からの αOH-HB のグルクロナイド単離の成功¹²⁾を基に、単離法をさらに改良し、TLC による α-, βOH-HB の分離系を用いて HB 光学異性体投与のウサギ尿からグルクロナイド生成を定量的に検討した。¹³⁾ ウサギ尿からの OH-HB グルクロナイドの単離精製には Amberlite XAD-2, silica gel, Dowex 50W-X8 などの新たな分離担体を用い、定量実験では Amberlite XAD-2 カラム処理後の試料を abalon entrails 又は *E. coli* (type 1) の β-glucuronidase で加水分解し、α-, βOH-HB

それぞれの総 OH-HB 量を測定し、非抱合の α - β OH-HB 量を差引く方法で抱合体を定量した (Table 2). (+)-HB 及び (-)-HB を投与した場合の 24 時間尿中の α - 及び β OH-HB 異性体のグルクロナイド総排出量はいずれも投与量の約 30% であるが、OH-HB 光学異性体のグルクロン酸抱合反応も選択

的で、3'位の *S*-configuration の光学異性体が好んで抱合され、(-)-HB では α OH-HB [(-)OH-(-)HB] の方が、(+)-HB では β OH-HB [(-)OH-(+)HB] の方がグルクロナイドを形成し易いことが判明した。Phenobarbital 前処理ウサギを用いた場合もその傾向は変わらなかった。

Table 2. Metabolites in the Urine of Normal Rabbits Administered with (-)-, (+)-, and (\pm)-Hexobarbitals

Metabolite	(-)-HB	(+) -HB	(\pm)-HB
Glucuronides			
α OH-HB	24.4	11.2	11.1
β OH-HB	3.8	21.4	10.3
Unconjugated			
α OH-HB	9.3	20.3	16.7
β OH-HB	13.4	15.1	15.7
Oxo-HB	23.1	7.9	18.7
OH-NHB	4.1	0.8	2.7
Oxo-NHB	3.3	0.5	1.9
Total of conjugated	28.2	32.6	21.4
Total of unconjugated	53.2	44.6	55.7
Total	81.4	77.2	77.1

Data for each HB administration are means derived from three rabbits. No detectable amounts of unchanged HB's or of NHB from HB's were excreted in 24-h urine.

1-3. Glutathione 関与の Hexobarbital の新たな代謝経路 ラットにおいて HB の各種代謝物の生成量を合わせても投与量の半量しか説明できないことから、未知の水溶性代謝物の存在が予想された。Glutathione (GSH) は、肝臓のような組織に高濃度に存在し強い求核性を有し、各種の求電子性の化合物と付加体をつくる。 α, β -不飽和カルボニル基を持つ化合物もこのような反応性を示すことから、Oxo-HB についても GSH 付加体の生成が予想された。そこで Oxo-HB と GSH を生理的条件下で反応させ、Oxo-HB-GSH 付加体の検出を試みたが予想される化合物を得ることができなかった。反応を UV スペクトルで追跡することにより、経時的に変化していることが判った (Fig. 4)。直接の付加体ではなく、バルビツール酸核の 5 位と cyclohexene 環の 1' 位の間で C-C 結合が開裂して生成したと思われる dimethylbarbituric acid (DMBA) と cyclo-

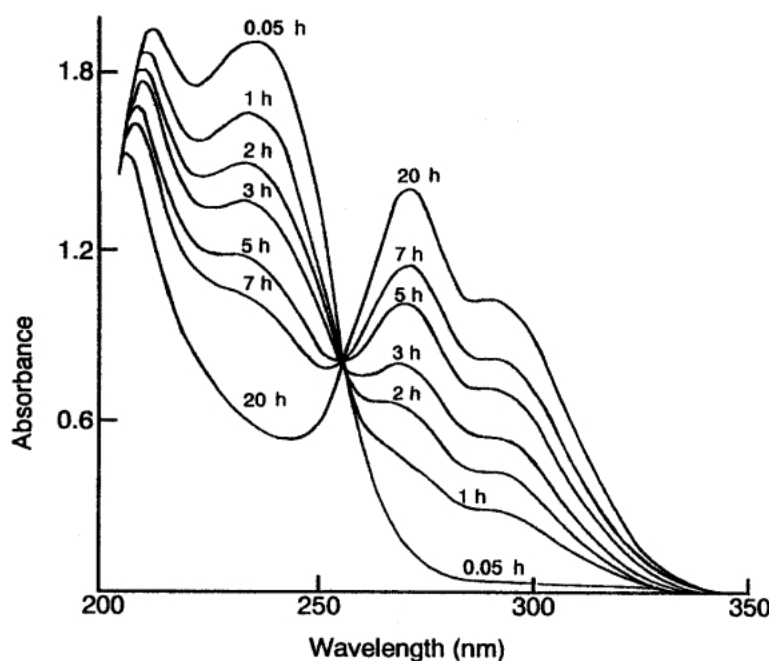


Fig. 4. Time-dependent Change of UV Spectra of a Reaction Mixture of 3'-Oxo-hexobarbital and Glutathione

The reaction mixture (3 ml) containing Oxo-HB (5 mM) and GSH (10 mM) in 0.1 M Na phosphate buffer, pH 7.4, was incubated at 37°C. An aliquot (50 μ l) of the reaction mixture was diluted with 50 mM borate buffer, pH 10, (2.95 ml), and the UV spectrum was measured at 0.05, 1, 2, 3, 5, 7, and 20 h after the reaction was started by mixing the contents.

hexenone-GSH 付加体 (cyclohexenone-SG) が検出された。そこで、実際に *in vivo* でそのような反応が起こっているかを、ラットへの HB 投与実験により検討した。尿から DMBA の排出が確認され、一方胆汁から、Fig. 5 に示すように全く新しい代謝物 cyclohexenone-SG が排泄されることが判明した。¹⁴⁾ Dimethylbarbituric acid の生成については、Vermeulen らが epoxide-diol pathway を提唱していたが、¹⁵⁾ われわれは新たな生成経路として GSH 関与の経路を証明した (Fig. 6)。また DMBA の生成において本経路が epoxide-diol pathway よりも寄与の大きいことを HB, Oxo-HB, epoxyhexobarbital を投与した場合の DMBA の生成量により証明した (Table 3)。なお、cyclohexenone-SG がさらに変化した cyclohexenone-*N*-acetylcysteine が尿中に、cyclohexenone-cysteinylglycine その他含硫化合物が胆汁中に排出されることも証明された (Takenoshita R., Nakamura T., Toki S., unpublished work)。さらに、同族化合物 cyclobarbital の代謝物 3'-oxocyclobarbital (Oxo-CB) と GSH の反応についても同様の実験を行い、ethylbarbituric acid と cyclohexenone-SG が生成することを確認した。Cyclobarbital の異性体で cyclohexene 環の二重結合を β, γ 位に有する Δ^2 -cyclobarbital の代謝についても同様の実験

を行った。この場合開裂反応は起きず、4'-oxo- Δ^2 -cyclobarbital の GSH 付加体そのものが検出された (Matsuo T., Takenoshita R., Toki S., unpublished work)。このような事実から、Oxo-HB, Oxo-CB で起きた C-C 開裂反応は α, β -不飽和カルボニル基への GSH 付加反応の可逆性とバルビツール酸核 5 位の反応性に起因するものと思われる。

2. 3-Hydroxyhexobarbital Dehydrogenase

われわれは HB の hydroxyl 体から oxo 体への脱水素反応を触媒する酵素が HB を投与しない動物の肝可溶性画分に存在することから、どのような酵素がこの反応を触媒しているのか、この酵素は本来どのような役割を担っているものなのかに興味を持ち、この酵素の精製を開始した。当時はちょうど、酵素やタンパク質精製のためのクロマトグラフィー担体が次々開発され、利用が可能になった時代であった。これらを用い、動物種を代えて肝可溶性画分より本精製を精製し、その性質を比較することにした。

2-1. 各種動物における 3-Hydroxyhexobarbital Dehydrogenase の組織分布 ウサギ、モルモット、イヌ、マウス、ラットの肝、腎、副腎、肺の 9000×g 上清を用い α OH-HB からの Ox-HB の生成量を測定した。¹⁶⁾ Figure 7 に示すように、いずれの

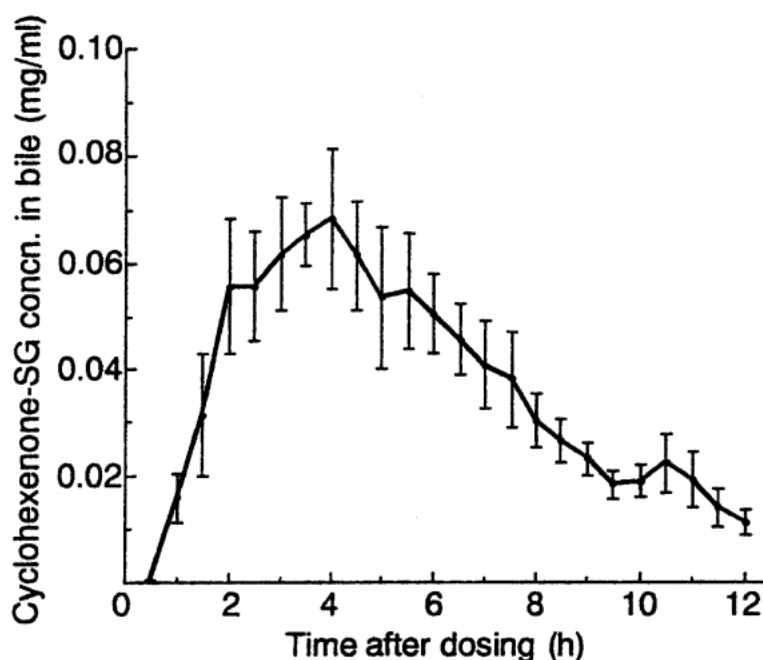


Fig. 5. Excretion Profile of Cyclohexenone-glutathione Adduct in Bile of Rats Dosed with Hexobarbital

A single dose of HB (80 mg) was administered S.C. to five rats which had their bile ducts cannulated. Bile was collected every 30 min. Results are means \pm S.E.

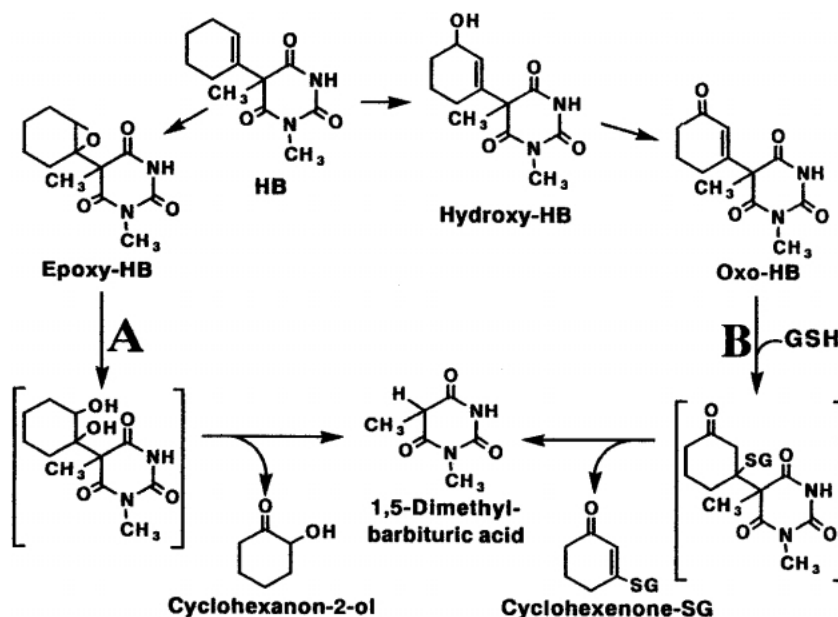


Fig. 6. Formation of 1,5-Dimethylbarbituric Acid and Cyclohexenone-glutathione Adduct in the Metabolism of Hexobarbital

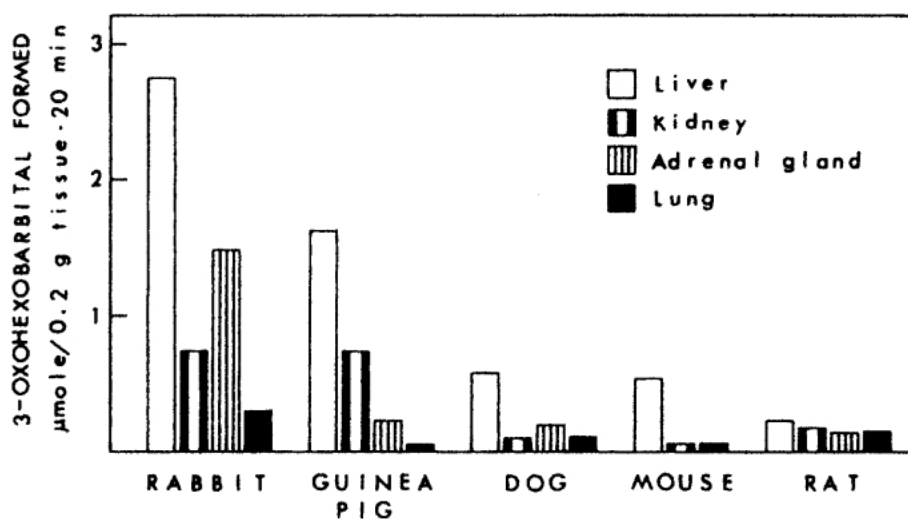


Fig. 7. Tissue Distribution of 3-Hydroxyhexobarbital Dehydrogenases among Various Animals

Reaction mixture contained 9000×g supernatant fraction (equivalent to 0.2 g tissue), α -3-hydroxyhexobarbital (6 μ mol), NAD (6 μ mol), and 0.1M glycine-NaCl-NaOH buffer, pH 9.5 (2.9 ml) in a total volume of 6 ml. Incubation was carried out for 20 min at 37°C.

Table 3. Excretion of 1,5-Dimethylbarbituric Acid in 24-h Urine of Rats Given Hexobarbital, 3'-Oxohexobarbital, or 1',2'-Epoxyhexobarbital

Compound	Dose mg/kg	Yield of
		1,5-dimethylbarbituric acid %/dose
Hexobarbital	80	13.4±3.1
3'-Oxohexobarbital	80	14.5±2.8
1',2'-Epoxyhexobarbital	80	4.7±0.7

Results are expressed as means±S.D. ($n=5-6$).

組織にも酵素活性は検出され、いずれの動物種でも肝が最も活性が高く、その強さはウサギ、モルモット、イヌ、マウス、ラットの順であった。ウサギ、モルモットでは腎にも比較的高い活性が見られ、ウサギでは副腎も特に高い活性を示した。肝が最も高い活性を示したことから、3-hydroxyhexobarbital dehydrogenase の酵素源として肝臓を用いることにした。

2-2. 3-Hydroxyhexobarbital Dehydrogenase の精製と物理化学的、酵素化学的性質 電気泳動的に

Table 4. Properties of Liver 3-Hydroxyhexobarbital Dehydrogenases of Rabbit, Guinea Pig, Goat, Mouse, Hamster, and Human

Property	Rabbit	Guinea pig	Goat	Rat	Mouse	Hamster 1	Hamster 2	Human
Molecular weight								
by SDS electrophoresis	42000	39000	42000	36000	34500	37000	37000	58000
by gel filtration	33000	31000	34000	30000	26500	35000	35000	60000
Isoelectric point	7.0	8.3	6.7	6.4	8.2	8.1	8.6	9.4
Cofactor	NAD>NADP	NAD<NADP	NAD=NADP	NAD<NADP	NAD<NADP	NAD<NADP	NAD<NADP	NAD
Optimal pH								
with NAD ⁺	9.5	8.7	9.4	8.0	8.0	8.5	8.3	8.7
with NADP ⁺	10.3	8.9	10.7	8.2	8.5	8.5	8.5	
with NADH	6.2	6.0	5.3	— ^{a)}	— ^{a)}	6.1	6.5	6.7
with NADPH	5.5	6.0	4.5	6.0	— ^{a)}	6.1	6.1	
Km (mM)								
for 3-hydroxyhexobarbital								
with NAD ⁺	0.53	2.0	2.2	17	0.85	1.32	0.98	0.40
with NADP ⁺	0.40	5.3	3.3	26	0.61	0.63	0.65	
for NAD ⁺	1.9	0.55	0.17	2.5	0.22	0.22	1.1	0.24
for NADP ⁺	0.022	0.021	0.040	0.01	0.005	0.011	0.009	
Vmax (units/mg)								
with NAD ⁺	10.6	4.5	3.3	0.29	0.36	0.22	0.37	0.59
with NADP ⁺	3.0	31.9	3.3	1.01	0.31	0.22	0.99	
Vmax/Km								
with NAD ⁺	20.0	2.25	1.5	0.02	0.42	0.17	0.35	1.5
with NADP ⁺	7.5	6.0	1.0	0.04	0.51	0.36	1.53	

^{a)} not determined.

均一な精製酵素の物理化学的並びに酵素化学的性質を Table 4 に示す。なお、ハムスターでは精製段階で活性が3つのピーク (G1—G3) に分かれ、そのうち NAD, NADP の両方を利用するもの (G2, G3) を精製した。G1 は NAD 特異的で morphine をも基質にすることから morphine 6-dehydrogenase として戸高らにより精製され、17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD) の一種で, aldo-keto reductase (AKR) superfamily¹⁷⁾ に属することが明らかにされた。¹⁸⁾ ヒトの酵素は極めて不安定で、またラットの酵素は活性が低くいずれも精製に難渋した。ヒト以外の酵素は補酵素として NAD, NADP の両方を利用するが、ヒトの酵素は NAD 特異的であった。いずれの酵素も単量体であるが、分子量はヒト以外の酵素が 34500—42000 (SDS-electrophoresis) であるのに対し、ヒトの酵素は 58000 であった。等電点はウサギ,¹⁹⁾ ヤギ,²⁰⁾ ラット²¹⁾ では 6.4—7.0 で酸性タンパク質であるのに対し、モルモット,¹⁶⁾ マウス,²²⁾ ハムスター²³⁾ の酵素は 8.1—8.6 の弱塩基性、ヒト²⁴⁾ 由来のものは 9.4 のかなり強い塩基性を示した。ウサギ、ヤギでは、NAD 使用時 (9.5 付

近) と NADP 使用時 (10.5 付近) で脱水素反応時の至適 pH が明らかに異なるが、ヒト以外のその他の動物種ではいずれも弱塩基性 (8.0—8.9) で両補酵素間で至適 pH に差が見られなかった。一方、還元反応時の至適 pH はいずれも弱酸性で、ウサギとヤギでは NADH 使用時と NADPH 使用時で異なるが、モルモット、ハムスターではあまり差がない。 α OH-HB を基質にした場合の補酵素の Km 値は、いずれの酵素も NADP の方が 1—2 桁 NAD よりも小さい。 α OH-HB の Km 値はウサギ、マウス、ハムスター、ヒトの酵素では 0.5 mM 付近、モルモット、ヤギの酵素では 3—5 mM に対し、活性の極めて低いラットでは 26 mM と高い値を示した。Vmax/Km 値を動物種間で比較すると、活性の高いウサギと活性の極めて低いラットでは 500 倍の開きがあることになる。また、ウサギ及びヤギの酵素は、NADP が結合した状態で存在し、hydroxylapatite クロマトグラフィーや電気泳動中にその一部が解離し、アポ酵素になることが判明した。²⁵⁾ モルモットやラットの酵素では、補酵素として NAD を用いた場合、リン酸イオンの存在により活性化の現象が見

Table 5. Substrate Specificity of Liver 3-Hydroxyhexobarbital Dehydrogenase of Rabbit, Guinea Pig, Goat, Rat, Mouse, Hamster, and Human

Substrate	Relative activity (%) ^{a)}							
	Rabbit	Guinea pig	Goat	Rat	Mouse	Hamster 1	Hamster 2	Human
α -3-Hydroxyhexobarbital	100 ^{b)}	100 ^{c)}	100 ^{c)}	100 ^{c)}	100 ^{c)}	100 ^{c)}	100 ^{c)}	100 ^{b)}
β -3-Hydroxyhexobarbital	38	28	291	88	10	9	3	43
Hydroxynorhexobarbital	3	3	285	56	10	5	5	32
3-Hydroxycyclobarbital	43	n.d.	243	91	17	3	3	8
2-Cyclohexen-1-ol	25	9	—	1340	500	2020	582	10
1-Indanol	259	15	298	683	433	242	150	193
1-Tetralol	261	27	280	117	236	281	478	n.d.
1-Acenaphthenol	257	70	1370	2070	585	6510	7760	18
Styrylmethylcarbinol	158	7	127	148	12	—	—	223
β -Ionol	248	9	957	582	752	25	11	65
Cinnamyl alcohol	2	—	—	14	n.d.	n.d.	5	297
Benzyl alcohol	n.d.	—	—	7	2	2	n.d.	80
Crotonyl alcohol	n.d.	—	—	—	n.d.	4	n.d.	270
<i>trans</i> -1,2-Dihydro-1,2-benzenediol	—	—	—	198	158	22	17	—
Androsterone	2	n.d.	n.d.	103000	n.d.	n.d.	11	n.d.
5 β -Androstane-3 α ,17 β -diol	70	345	5530	162000	13900	120	165	n.d.
5 α -Androstan-17 β -ol-3-one	8	237	33	n.d.	2280	6	9	n.d.
Testosterone	3	235	7	n.d.	3040	50	53	n.d.
Estradiol	n.d.	n.d.	9	n.d.	1090	4	n.d.	n.d.

^{a)} The activity was assayed under optimal pH conditions for α -3-hydroxyhexobarbital as substrate. ^{b)} and ^{c)} NAD⁺ and NADP⁺ were used as cofactors, respectively. n.d.: not detectable, —: not determined.

られた。^{16,21)}

2-3. 3-Hydroxyhexobarbital Dehydrogenases の基質特異性 各実験動物並びにヒトの酵素の基質特異性の比較を Table 5 に示す。各酵素における α OH-HB を基質とした場合の活性を 100 とした相対的な値として表わしている。異なる動物種間の活性の比較はできないが、各酵素の基質特異性の特徴が判る。同一化合物を基質とする酵素が動物種によりこのようにそれぞれ特徴的な基質特異性像を持っていることは実験結果によって始めて知ることができた。

ウサギ—本酵素研究の最初に取り組んだもので、当初基質特異性の低い alcohol dehydrogenase (ADH) の関与も予想されたが、エタノールは精製酵素の基質とはならず、また精製過程で ADH は別の画分にあることが判明した。⁸⁾ OH-HB では β 体は α 体の 38%, *N* 位の methyl 基を欠く nor 体では 3% に活性が低下し、hydroxyl 基の配位、*N* 位の methyl 基の重要性が伺える。 α, β -不飽和脂環状の二級アルコール基を有する 1-indanol, 1-tetralol, 1-acenaphthenol は α OH-HB の 2.5 倍、脂環の二重結合と共役した

α, β -不飽和鎖状二級アルコール基を有す β -ionol, styrylmethylcarbinol も高い活性を示した。¹⁹⁾ ウサギ肝可溶性画分には数種の indanol dehydrogenase が存在するが、その中で最も活性の強い酵素が本酵素と一致し、混合基質法や *p*-chloromercuribenzoate (PCBM) に対する *K*_i 値、NAD (P) に対する *K*_m 値の類似性から同一酵素が α OH-HB と 1-indanol の脱水素に関与していると結論づけた。²⁶⁾ Cinnamyl alcohol, benzyl alcohol, crotonyl alcohol 等の一級アルコールは基質にならなかった。Hydroxysteroid 類について種々検討したが、その中で、5 β -androstane-3 α , 17 β -diol のみが α OH-HB の 70% の活性を示した。この場合の反応生成物は 17 位の oxo 体であることから、17 β -HSD の一種と思われる。なお、後述するようにモルモットの酵素は testosterone 17 β -dehydrogenase と同一酵素であることが証明されたので、ウサギの本酵素と testosterone 17 β -dehydrogenase の関係をクロマトグラフィーで調べたところ、異なる画分に溶出し、ウサギの本酵素は testosterone 17 β -dehydrogenase とは別種であることが確認された。²⁷⁾

モルモット—OH-HB 関連の化合物はウサギと類似の活性を示すが、ウサギと違って α,β -不飽和脂環状あるいは鎖状の二級アルコール基を有する 1-indanol や β -ionol 等は弱い活性しか示さず、1-acenaphthenol が 70%であった。一方、testosterone や dihydrotestosterone といった 17β -hydroxysteroid 類に極めて高い活性が見られた。¹⁶⁾ モルモットの本酵素と testosterone 17β -dehydrogenase との同一性は、 α OH-HB と testosterone を基質にした以下のような詳細な検討により証明された。²⁸⁾ Joshi らの方法²⁹⁾に従って部分精製した testosterone 17β -dehydrogenase による hydroxyhexobarbital の代謝並びに本酵素による testosterone の代謝を代謝物で確認する方法、酵素精製段階における両酵素間の活性比の比較、熱安定性、リン酸イオンの活性化効果の比較、阻害剤 PCMB に対する K_i 値の比較、混合基質法による代謝生成物量の比較などが行われた。なお Joshi らの方法によるモルモット肝からの testosterone 17β -dehydrogenase の部分精製の過程で 3-hydroxyhexobarbital dehydrogenase 活性を有しない新しいタイプの 17β -HSD を発見した。そこでこの酵素を精製し本酵素との比較を行った。両酵素は補酵素要求性、至適 pH、リン酸イオンの影響、分子量等に差は見られないが、ステロイド類の基質特異性では本酵素が steroid A/B 環の *trans* 配位に対し、新しいタイプの 17β -HSD では *cis* 配位のものにより高い活性が見られた。³⁰⁾

ヤギー-NADP 結合型で物理化学的性質がウサギの酵素に類似性が高く、強弱はあるが α,β -不飽和脂環状並びに鎖状の二級アルコール基を有する化合物に高い活性を示し、さらに hydroxysteroid 類のなかで、 5β -androstane- 3α , 17β -diol に極めて強い活性が認められた。その他の 17β -hydroxysteroid 類も基質になるが testosterone や estradiol には極めて低い活性が認められたにすぎない。Steroid の A/B 環の配位は *trans* よりも *cis* 配位の方が高い活性を示した。また OH-HB の α 体に比べ β 体の方が約 3 倍の高い活性を示す点でウサギの酵素と異なっていた。²⁰⁾

ラット—他種の酵素に比べ α OH-HB に対する K_m 値が 5—65 倍と際立って大きい。2-cyclohexen-1-ol, 1-acenaphthenol などにも高い活性を示すが、最も特徴的なことは androsterone や 5β -androstane- 3α ,

17β -diol, その他の C_{19} , C_{21} , C_{24} の 3α -hydroxysteroid 類をよい基質とすることである。本酵素と 3α -hydroxysteroid dehydrogenase (3α -HSD) が酵素精製時のクロマトグラフィーにおける溶出パターンで一致し、各精製段階における両酵素活性比が一定値を示すことから同一酵素であることが強く示唆され、また本酵素反応が 5α -androstane-3,17-dione により拮抗型の強い阻害を示し α OH-HB と 3α -hydroxysteroid は同じ部位に結合することが明らかになった。Steroid の A/B 環の配位については *cis* 型の方が活性が高い。²¹⁾ なお、ラット肝 3α -HSD はステロイドホルモンの代謝、³¹⁾ 胆汁酸の生合成³²⁾のほか、hydroxyprostaglandin 類の代謝³³⁾など生理的に重要な反応に参与するのみならず、各種異物の代謝に広く関与し、特に dihydrodiol 類をも脱水素することは、多環芳香族炭化水素の dihydrodiol 体を酸化し、変異原性の本体と考えられる diol epoxide の生成を抑える発がん抑制作用との関連で注目されている。³⁴⁾

マウス—本酵素は他の酵素同様異物アルコール体を基質とするが、testosterone を含む C_{19} 17β -hydroxysteroid や estradiol に強い活性を示す点に特徴がある。A/B 環 *cis* 配位のもが *trans* 配位のものより活性が高い。本酵素は、 17β -HSD と同一酵素であることは、testosterone 並びに α OH-HB を基質にした場合の活性の各精製段階における溶出パターンや活性比、熱安定性比較実験などから証明されている。²²⁾ 17β -HSD であるモルモットの酵素とは異物アルコール体に対する活性や estradiol に対する活性が強い点で異なっている。

ハムスター—酵素 1 (G2) 並びに、酵素 2 (G3) の両酵素は極めて類似の基質特異性を示す。他の酵素同様異物アルコール体を基質とし、2-cyclohexen-1-ol, 1-acenaphthenol に特に高い活性が見られるほか、両者とも 17β -並びに 3α -hydroxysteroid 類を基質とする点で他種の酵素と異なる。 17β -hydroxysteroid の場合、A/B 環の配位は *trans* より *cis* 配位の方が高い活性を示す。 3α -hydroxysteroid の場合も、*trans* 配位では androsterone に見られるように酵素 2 では 10%程度、特に酵素 1 では活性が検出できない。しかし、Table 5 には記載されていないが、*cis* 配位では glycolithocholic acid, glycochenodeoxycholic acid, chenodeoxycholic acid など、胆汁

酸やその抱合体に対して酵素 1 で α OH-HB の 30% 前後, 酵素 2 では 30—330% の活性を示した.²³⁾

ヒト—基質になる化合物が限られている。環状アルコールの中では、他の実験動物種の酵素でよい基質となる 1-acenaphthenol でも弱い活性しか認められず、1-tetralol や cyclohexanol に活性は認められなかった。ただ 1-indanol は α OH-HB の約 2 倍の活性を示した。一方、 α,β -不飽和結合を有する鎖状一級アルコールである cinnamyl alcohol, crotonyl alcohol は α OH-HB の約 3 倍の活性を示し、Km 値 (10 μ M, 25 μ M), Vmax 値 (2.2, 1.7 unit/mg) から親和性、反応性ともに最も優れた基質であることが判明した。 α,β -不飽和鎖状の二級アルコール基を有する styrylmethylcarbinol にも 2 倍以上の活性が見られたが、その二重結合が飽和された 4-phenyl-2-butanol は全く活性を示さなかった。生体内基質を探すために、C₁₉, C₂₁ の hydroxysteroid 類, prostaglandin 類, sphingosine, vitamin A alcohol, 胆汁酸類などを検討したが高い活性を示すものは見当たらず、ただ progesterone の代謝産物の 1 つである 5 α -pregnan-3 β -ol-20-one に約 30% 程度の活性が見られたにすぎなかった。²⁴⁾ 本酵素が一級アルコールを基質にしたことから、アルコール類に広範囲に作用する ADH との比較を行った。日本人に多い atypical type の精製した ADH と本酵素について、共通する基質である cinnamyl alcohol, crotonylalcohol, styrylmethylcarbinol の Km 値, Vmax 値を比較した。Km 値は本酵素の方が小さく親和性は強いが、Vmax 値は ADH の方が大きく、これらの化合物が

大量に存在する場合は ADH が処理に当たると思われる (Kawahara S., Toki S., unpublished work).

2-4. 3-Hydroxyhexobarbital 光学異性体に対するウサギ及びモルモット酵素の立体選択的脱水素反応 通常用いる α -及び β OH-HB はラセミ体である。OH-HB の 4 種の光学異性体について、ウサギ及びモルモット酵素の基質特異性を調べた。³⁵⁾ Table 6 に示す通り、ウサギ及びモルモット酵素はいずれの場合も、(+)HB, (-)HB に関わらず 3'-hydroxyl 基が S 配位のもの、つまり α OH-HB では (-)OH (-)HB, β OH-HB では (-)OH (+)HB, が好んで脱水素され、4 異性体の中で (-)OH (-)HB が最もよい基質であることが Km 値, Vmax 値からも裏付けられた。一方、(+)OH (+)HB 並びに (+)OH (-)HB は極めて低い活性しか示さず親和性が低いことが判明した。これは hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) が hydroxysteroid 類の hydroxyl 基の α, β の配位を厳密に識別していることと符合する。

2-5. 3-Hydroxyhexobarbital と Hydroxysteroid 類に対する Km 値, Vmax 値の比較 実験動物の 3-hydroxyhexobarbital dehydrogenases が hydroxysteroid 類を基質とすることが判明したので、異物である α OH-HB と生体内基質と考えられる hydroxysteroid についてそれぞれの酵素で Km, Vmax 値を比較してみた。測定条件は α OH-HB 使用時の至適 pH で行っているが、ラットでは両基質の至適 pH, マウスでは pH 7.4 で測定した結果を Table 7 に示した。 α OH-HB の Km 値はラットを除き、

Table 6. Relative Activities and Kinetic Constants for Rabbit and Guinea Pig Liver 3-Hydroxyhexobarbital Dehydrogenases

Designation	Isomer	Configurational assignment	Rabbit				Guinea pig			
			pH 9.5		pH 7.4		pH 8.9		pH 7.4	
			Relative activity ^{a)}	Relative activity ^{a)}	Km ^{b)}	Vmax ^{b)}	Relative activity ^{a)}	Relative activity ^{a)}	Km ^{b)}	Vmax ^{b)}
			%	%	mM	μ mol/min/mg protein	%	%	mM	μ mol/min/mg protein
α	(-)OH (-)HB	(3'S, 5R)	100	15.3	0.011	2.5	100	36.8	2.0	5.9
	(+)OH (+)HB	(3'R, 5S)	3.4	5.3	c)	c)	0.4	0.1	c)	c)
	Racemate		82.7		0.022	2.2	57.5	22.2	4.0	4.8
β	(+)OH (-)HB	(3'R, 5R)	1.7	3.1	c)	c)	0.4	0.2	c)	c)
	(-)OH (+)HB	(3'S, 5S)	54.5	9.3	0.026	1.3	16.9	5.3	5.6	1.4
	Racemate		21.6		0.031	1.0	9.8	3.2	5.6	0.9

a) Substrate (1 mM) was employed for measurement. The relative activity is always referred to (-)OH (-)HB at pH 9.5 and 8.9 for rabbit and guinea pig enzymes, respectively. b) Apparent Km and Vmax values were calculated from plots of 1/v vs 1/S. c) Activities were too small to estimate.

Table 7. Kinetic Constants of 3-Hydroxyhexobarbital Dehydrogenases for α -3-Hydroxyhexobarbital and Hydroxysteroids

Origin	Substrate	Cofactor	pH	Km	Vmax	Vmax/Km
				mM	units/mg	
Rabbit	α -3-Hydroxyhexobarbital	NAD ⁺	9.5	0.53	10.6	20
	5 β -Androstane-3 α , 17 β -diol	NAD ⁺	9.5	0.077	0.6	7.8
Guinea pig	α -3-Hydroxyhexobarbital	NADP ⁺	8.9	5.3	0.81 ^{a)}	0.15
	Testosterone	NADP ⁺	8.9	0.14	0.12 ^{a)}	0.86
Goat	α -3-Hydroxyhexobarbital	NADP ⁺	10.7	3.3	3.3	1.0
	β -3-Hydroxyhexobarbital	NADP ⁺	10.7	0.61	4.2	6.9
	5 β -Androstane-3 α , 17 β -diol	NADP ⁺	10.7	0.0071	1.2	170
Rat	α -3-Hydroxyhexobarbital	NADP ⁺	8.1	14	1.06	0.076
	Androsterone	NADP ⁺	10.0	0.0054	14.2	2600
Mouse	α -3-Hydroxyhexobarbital	NADP ⁺	7.4	0.47	0.23	0.49
	Testosterone	NADP ⁺	7.4	0.013	0.69	53
Hamster 1	α -3-Hydroxyhexobarbital	NADP ⁺	8.5	0.63	0.22	0.35
	Testosterone	NADP ⁺	8.5	0.069	0.17	2.5
	Glycolithocholic acid	NADP ⁺	8.5	0.041	0.046	1.1
Hamster 2	α -3-Hydroxyhexobarbital	NADP ⁺	8.5	0.65	0.99	1.5
	Testosterone	NADP ⁺	8.5	0.051	0.19	3.7
	Glycolithocholic acid	NADP ⁺	8.5	0.025	0.061	2.4

a) (μ mol/min/ml).

10^{-4} — 10^{-3} M のオーダーであるのに対し, hydroxysteroid のそれはモルモットにおける testosterone は 10^{-4} M のオーダーであるが, 他の場合には化合物が違って 10^{-6} — 10^{-5} M のオーダーで α OH-HB の場合の 1/7—1/140, ラットでは 1/2600 といずれの酵素も hydroxysteroid に対し高い親和性を持っていることが判明した. Vmax 値はラット, マウスで hydroxysteroid が高いが他の動物の酵素はむしろ α OH-HB の方が高い値を示している. これは α , β -不飽和の hydroxyl 基という α OH-HB の構造上の特徴も関係しているのではないかと思われる. Vmax / Km で比較すると, 3-hydroxyhexobarbital dehydrogenase 活性が最も高いウサギでは α OH-HB の方が 5 β -androstane-3 α , 17 β -diol よりも効率よく脱水素されることを示している. しかし他の動物種では程度に差はあるが, hydroxysteroid 類の方が Vmax/Km は高く, 特に 3-hydroxyhexobarbital dehydrogenase 活性が低いラットの場合は 3 万倍以上の差がある. これらの結果は生体内基質である hydroxysteroid 類はごく低い濃度でも酵素反応を受けるのに対し, α OH-HB は高い濃度の場合に素早く代謝されることを示している.

2-6. 3-Hydroxyhexobarbital Dehydrogenase の逆反応 Oxo-HB の還元反応はいずれの酵素でも進

Table 8. Kinetic Constants of Mouse Liver 3-Hydroxyhexobarbital Dehydrogenase for Carbonyl Compounds

Substrate	Km	Vmax	Vmax/Km
	mM	units/mg	
DL-Glyceraldehyde	1.8	0.15	0.08
3-Oxohexobarbital	0.20	0.01	0.06
Cyclohexanone	0.017	0.18	11
<i>p</i> -Nitroacetophenone	0.020	0.15	7.4
<i>p</i> -Nitrobenzaldehyde	0.011	0.12	11
9,10-Phenanthrenequinone	0.0006	0.49	890
4-Androstene-3,17-dione	0.011	0.10	9.2
5 α -Androstan-3 α -ol-17-one	0.008	0.13	16
5 β -Androstan-3 α -ol-17-one	0.005	0.34	67

Enzyme activity was assayed in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 at 25°C. NADPH (0.4 mM) was used as cofactor.

行するが, 至適 pH 条件で脱水素反応の数分の一から数十分の一程度である. これは Oxo-HB の還元を受けるカルボニル基が二重結合と共役しているという構造上の理由も関係しているであろう. 各酵素と関連する steroid のケトン体が還元されるばかりでなく, ある種のアルデヒド類, ケトン類, キノン類もかなり効率よく還元されることがラット,²¹⁾ マウス,²²⁾ ハムスター²³⁾ の酵素について明らかになっている. Table 8 に 17 β -HSD 活性を有するマウスの本酵素の例を示す. Km 値が 10^{-6} — 10^{-5} M のオー

ダーで親和性が高いことが伺える。また、ハムスターの酵素では、脱水素反応から予測される通り17位のみならず、3位の oxosteroid も還元される。

2-7. Hamster 3-Hydroxyhexobarbital Dehydrogenase 1 (G2) の一次構造 ハムスター酵素1 (G2)、並びに酵素2 (G3) について、ブロムシアンあるいはプロテアーゼ処理で得られたペプチド断片のアミノ酸配列分析を行い、それぞれ41, 44%の一次構造が判明した。そこで、ハムスター肝の mRNA より合成した cDNA を鋳型に、本酵素1 (G2) の部分アミノ酸配列を基に作成した primer を用いて rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法により DNA fragment を得、DNA 配列分析を行った。推定される全アミノ酸配列は本酵素1 (G2) のペプチドより得た部分アミノ酸配列によく一致した。構成アミノ酸 323 個、分子量 37245 のタンパク質で、構成アミノ酸から推定される等電点は 8.07 で、本酵素のうち酵素2 (G3) ではなく、酵素1 (G2) のものに一致した。^{23,36} その全アミノ酸配列とホモロジー検索の結果を Fig. 8 に示す。ハムスター肝 3-hydroxyhexobarbital dehydrogenase 1 (G2) は、マウス肝 estradiol 17 β -dehydrogenase (A-specific)³⁷ に対し 84.5% の最も高い相同性を示し、ヒト肝 3 α -HSD type 1, 2, 3,³⁸⁻⁴¹ ヒト肝 20 α -HSD,⁴² ウサギ卵巣 20 α -HSD⁴³ と 75—77%, ラット肝 3 α -HSD⁴⁴ と 69% の相同性を示し、AKR superfamily のうち、hydroxysteroid dehydrogenase subfamily (AKR 1C)⁴⁵ に属することが判明した。その一次構造を機能との関連で hydroxysteroid dehydrogenase subfamily に属する酵素と比較すると、触媒活性中心を構成する Asp50, Tyr55, Lys84, His117 が一致し、補酵素結合部位とされる 11 個のアミノ酸残基, Tyr24, Ser166, Asn167, Gln190, Tyr216, Lys270, Ser271, Phe272, Arg276, Glu279, Asn280 についてはマウス肝 17 β -HSD, ウサギ卵巣 20 α -HSD, ラット卵巣 20 α -HSD と一致し、ヒト肝 3 α -HSD type 1 とはそのうち 10 残基、ヒト肝 3 α -HSD type 2,3 並びにヒト肝 20 α -HSD とは 9 残基、ラット肝 3 α -HSD とは 8 残基が一致する。したがって、本酵素は X 線結晶解析で (α/β)₈ バレル構造が推定されるヒト胎盤 aldose reductase⁴⁶ やラット肝 3 α -HSD⁴⁷ と類似の構造を有し、AKR superfamily と同様のメカニズムで触媒機能を果たしているものと推測され

る。

おわりに

異物アルコール体である hydroxyhexobarbital の脱水素反応を触媒する酵素の研究を通して、同一異物の代謝に関与する酵素はかならずしも同じではなく動物種によって異なることが明らかとなった。動物それぞれが本来備え持っている酵素は多彩であり、その中で、その異物に合うものが代謝に当たるものと考えられる。同時に hydroxysteroid 類についてラットとヒト以外の動物種ではそれぞれ特異性は異なるが 17 β -hydroxysteroid 類を基質とする点で共通していることは、17 β -HSD の多様性を示すものであろう。また、ハムスターの酵素は 17 β -hydroxysteroid のみならず、3 α -hydroxysteroid も基質とする。ハムスターの酵素1 (G2) の recombinant 酵素を用いた予備的実験結果だが、20 α -hydroxysteroid 類も基質とする。ヒトの 3 α -HSD に関する recombinant を用いた研究によれば、同一酵素が 3 α -hydroxysteroid のみならず、17 β -hydroxysteroid, さらに 20 α -hydroxysteroid 類を基質とする。⁴⁸ その他にも複数部位や配位の hydroxyl 基の脱水素反応を触媒する HSD があることを考え合わせると、HSD 類には基質結合部位に多様な化合物を基質として受け入れる構造上の共通の特徴があるように思われる。アルデヒド、糖、ケトン、キノン、ハイドロキシステロイドなどのカルボニル化合物の酸化還元に関しては、関与する酵素の基質特異性が重複しており、基質特異性だけから酵素を特定することはできない。また、HSD 類には、同じ化合物の脱水素反応を触媒するにも関わらず、AKR superfamily とは一次構造上相同性のない short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily に属する酵素群が知られている。^{49,50} この意味でこれまで検討されてきた個々の HSD についても一次構造とともに基質特異性についてもより詳しい検討が必要と思われる。AKR superfamily に属する HSD の一次構造と基質特異性の関係については、変化に富んだ配列を示す C 端ループが重要視され種々の変異体を用いて検討されているが、いまひとつはつきりしないと思われる。一次構造だけから単純には予測できない高次構造が基質特異性を決めており、X 線結晶構造解析や NMR 解析など最新の研究手段により、一次構造と高次構造の関係が詳細に検討され

hams.3HHBD 1 (G2)	1 mnskqqtvrslsdghvlpvlfgfyatsevptkvteatkiaidagfrhidsasmyqneee	60
mous.17 β -HSD (AKR1C6)	1 .d.....fi.i.....pq....s.a.....k.	60
hum.3 α -HSD 2 (AKR1C3)	1 .d...c.k.n...fm.....pp...rs.al.v..l..e.....hl.n...q	60
hum.3 α -HSD 3 (AKR1C2)	1 .d.y.c.k.n...fm.....pa....s.al..v..l..e...h....hv.n...q	60
hum.3 α -HSD 1 (AKR1C4)	1 .dp.y.r.e.n...fm.....pp...rnrav.v..l..e.....yl.n...q	60
hum.20 α -HSD (AKR1C1)	1 .d.y.c.k.n...fm.....pa....s.al...l..e.....hl.n...q	60
rab.20 α -HSD (AKR1C5)	1 .dp.f.r.a....fi.....pe....s.am.....yf.k..k.	60
rat.3 α -HSD (AKR1C9)	1 .d.islr.a.n.nfi.....tvpek.a.de.ik.....n....f...yl.ev...	60
	61 vglairskiedgtvcredifyttklwctfhhpelvpfcleqslkklqldydlylhfp	120
	61a.....s.v....r....rv.....q.....	120
	61a.s.....s...s...r...rpa..n...a.....s...	120
	61a.s.....s...sns.r...rpa..r...n.....v	120
	61a.s.....s.....fq.qm.qpa..s.....l...	120
	61a.s.....s...ns.r...rpa..r...n.....v	120
	61a.....s.....r...rps..d..n.....i...t	120
	61 ..q.....s...s...r...rt...kt..st.....i....	120
	121 slkpgenyfpkdngkfydtvdlcatweameckdvgltksigvsnfnrrqlemilnkp	180
	121 am.....l...e...l...a..i.d.....a..a.....k..k..	180
	121els.t.e...v.f.i...t.....a..a.....	180
	121 .v...evi...e...ilf.....a..a.....h.l.....	180
	121 a....tpl...e...v.f....s...v....a..a.....c.....	180
	121 .v...evi...e...ilf.....v....a..a.....	180
	121 a...veii.t.eh..a.f...i.....a..a.....	180
	121 a.q..dif..r.eh..llfe...i.d.....a..a.....c....r....	180
	181 glkhkpvncqvechpylnqkklmdfckskdivlvaysalgshrekawvdqnlpillddpv	240
	181 ..y.....g.l...r.....q...ss.v...n..	240
	181 ..y.....f.rs.l.....q.d.r...p.s.v.e...	240
	181 ..y.....f.r.l.....ep...p.s.v.e...	240
	181 ..y.....s.l.....h...tq.h.l...p.s.v.e...	240
	181 ..y.....f.r.l.....ep...p.s.v.e...	240
	181 ..y.....g.le....g.....pe...sa.v.e..l	240
	181 ..y.....l...s.ml.y....i..s.ct...s.d.t...ks.v.....	240
	241 ldsmakkykrtpalialryqlargivvlaksftekrikenmqvfefqltsgdmkiiddln	300
	241 .g.....n.....v.....s.....e...vl...	300
	241 .cal...h.....v.....yn.q..rq.v.....ae...a.g.d	300
	241 .cal...h.....v.....yn.q..rq.v.....ee..a.g..	300
	241 .cal...h.....v.....yn.q..r..i.....e...vl.g..	300
	241 .cal...h.....v.....yn.q..rq.v.....ee..a.g..	300
	241 igal...hqq.....i.....p.e...v..s...	300
	241 .cai....q...v.....v.p.ir..na....lt.....a.e...al.g..	300
	301 kniryiachefkdhpgfypsdey	323
	301sgss.....d..w...	323
	301 r.lh.fnsds.as..ny.y....	323
	301 r.v..ltldi.agp.ny.....	323
	301 r.y..vmdflm...dy.....	323
	301 r.v..ltldi.agp.ny.....	323
	301 r.f..vtadfaig..ny.....	323
	301 r.f..nnaky.d..nh..t...	322

Fig. 8. Comparison of Amino Acid Sequence of Hamster Liver 3-Hydroxyhexobarbital Dehydrogenase 1 (G2) with Those of Members of Hydroxysteroid Dehydrogenase Subfamily of Aldo-Keto Reductase Superfamily

Identical residues are enumerated with dots.

いずれ明らかになるであろう。⁵¹⁾

3-Hydroxyhexobarbital dehydrogenase は hydroxysteroid 類を生体内基質とすることが明らかとなったが、その他の異物アルコール体脱水素酵素である indanol dehydrogenase, dihydrodiol dehydrogenase, morphine 6-dehydrogenase などとも HSD と関連づけられており、⁵²⁾ HSD 類は異物代謝でも重要な役割を果たしていることが明らかになった。われわれの研究は異物アルコール体脱水素反応の面からこれに光を当てたことになろう。このような HSD 類の幅広い基質特異性は異物代謝酵素である cytochrome P450 の酵素群を連想させるものである。

REFERENCES AND NOTES

- 1) Present address: 1-23-10 Ikimatsudai, Nishiku, Fukuoka 819-0044, Japan.
- 2) Tsukamoto H., Yoshimura H., *Chem. Pharm. Bull.*, **3**, 397-398 (1955).
- 3) Tsukamoto H., Yoshimura H., Toki S., *Chem. Pharm. Bull.*, **4**, 364-367 (1956).
- 4) Tsukamoto H., Yoshimura H., Toki S., *Chem. Pharm. Bull.*, **4**, 368-371 (1956).
- 5) Yoshimura H., *Chem. Pharm. Bull.*, **5**, 561-564 (1957).
- 6) Toki S., Toki K., Tsukamoto H., *Chem. Pharm. Bull.*, **10**, 708-714 (1962).
- 7) Toki K., Toki S., Tsukamoto H., *J. Biochem. (Tokyo)*, **53**, 43-49 (1963).
- 8) Toki K., Tsukamoto H., *J. Biochem. (Tokyo)*, **55**, 142-147 (1964).
- 9) Furner R. L., MacCarthy J. S., Stitzel R. E., Anders M. W., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **169**, 153-158 (1969).
- 10) Büch H., Knabe J., Buzello W., Rummel W., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **175**, 709-716 (1970).
- 11) Miyano K., Fujii Y., Toki S., *Drug Metab. Dispos.*, **8**, 104-109 (1980).
- 12) Toki S., Takenouchi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **13**, 606-609 (1965).
- 13) Miyano K., Ota T., Toki S., *Drug Metab. Dispos.*, **9**, 60-64 (1981).
- 14) Takenoshita R., Nakamura T., Toki S., *Xenobiotica*, **23**, 925-934 (1993).
- 15) Vermeulen N. P. E., Bakker B. H., Schultink J., Van der Gen A., Breimer D. D., *Xenobiotica*, **9**, 289-299 (1979).
- 16) Kageura E., Toki S., *J. Biol. Chem.*, **250**, 5015-5019 (1975).
- 17) Jez M. J., Flynn T. G., Penning T. M., *Biochem. Pharmacol.*, **54**, 639-647 (1997).
- 18) Todaka T., Yamano S., Toki S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **374**, 189-197 (2000).
- 19) Takenoshita R., Toki S., *J. Biol. Chem.*, **249**, 5428-5429 (1974).
- 20) Toki S., Kawahara S., Kageura E., Abstracts of papers, Sixth Symposium on Drug Metabolism and Action, 1974, pp. 22-25.
- 21) Takenoshita R., Toki S., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **8**, s-159 (1985).
- 22) Takenoshita R., Naitoh K., Toki S., "Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 2," eds., by Weiner H., Flynn T. G., Alan R. Liss, Inc., 1989, pp. 279-291.
- 23) Takenoshita R., Nomura Y., Toki S. (in preparation).
- 24) Kawahara S., Toki S., Abstracts of papers, Ninth Symposium on Drug Metabolism and Action, 1977, pp. 73-76.
- 25) Toki S., Takenoshita R., "Proceedings of the 4th Symposium on Drug Metabolism and Action," ed. by Ozawa H., 1973, pp. 58-68.
- 26) Takenoshita R., Toki S., *Xenobiotica*, **7**, 383-391 (1977).
- 27) Takenoshita R., Toki S., *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 989-993 (1978).
- 28) Kageura E., Toki S., *Biochem. Biophys. Acta*, **341**, 172-177 (1974).
- 29) Joshi S. G., Duncan E. L., Engel L. L., *Steroids*, **1**, 508-527 (1963).
- 30) Kageura E., Toki S., *Biochem. J.*, **163**, 401-407 (1977).
- 31) Hoff H. G., Schriefers H., *Hoppe-Zeiler's Z. Physiol. Chem.*, **354**, 507-513 (1973).
- 32) Stolz A., Takigawa H., Sugiyama Y., Kuhlenskamp J., Kaplowitz N., *J. Clin. Invest.*, **79**, 427-434 (1987).
- 33) Penning T. M., Sharp R. B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **148**, 646-652 (1987).
- 34) Glatt H. R., Vogel K., Bentley P., Oesch F., *Nature*, **277**, 319-320 (1979).
- 35) Miyano K., Toki S., *Drug Metab. Dispos.*, **8**, 111-114 (1980).
- 36) Takenoshita R., Nomura Y., Toki S., *Chemico-Biological Interactions*, **130-132**, 863

- 870 (2001).
- 37) Deyashiki Y., Ohshima K., Nakanishi M., Sato K., Matsuura K., Hara A., *J. Biol. Chem.*, **270**, 10461-10467 (1995).
- 38) Hara A., Matsuura K., Tamada Y., Sato K., Miyabe Y., Deyashiki Y., Ishida N., *Biochem. J.*, **313**, 373-376 (1996).
- 39) Khanna M., Qin K.-N., Wang R. W., Cheng K. C., *J. Biol. Chem.*, **270**, 20162-20168 (1995).
- 40) Winter C. J., Molowa D. T., Guzelian P. S., *Biochemistry*, **29**, 1080-1087 (1990).
- 41) Deyashiki Y., Ogasawara A., Nakagawa T., Nakanishi M., Miyabe Y., Sato K., Hara A., *Biochem. J.*, **299**, 545-552 (1994).
- 42) Stolz A., Hammond L., Lou H., Takigawa H., Ronk M., Shively J. E., *J. Biol. Chem.*, **268**, 10448-10457 (1993).
- 43) Lacy W. R., Washenick K. J., Cook R. G., Dunbar B. S., *Mol. Endocrinol.*, **7**, 58-66 (1993).
- 44) Pawlowski J. E., Huizinga M., Penning T. M., *J. Biol. Chem.*, **266**, 8820-8825 (1991).
- 45) Jez M. J., Flynn T. G., Penning T. M., *Biochem. Pharmacol.*, **54**, 639-647 (1997).
- 46) Wilson D. K., Bohren K. M., Gabbay K. H., Quioco F. A., *Science*, **257**, 81-84 (1992).
- 47) Hoog S. S., Pawlowski J. E., Alzari P. M., Penning T. M., Lewis M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 2517-2521 (1994).
- 48) Penning T. M., Burczynski M. E., Jez J. M., Hung C. F., Lin H. K., Ma H., Moore M., Palackal N., Ratnam K., *Biochem. J.*, **351**, 67-77 (2000).
- 49) Jörnvall H., Person B., Krook M., Atrian S., González-Duarte R., Jeffrey J., Ghosh D., *Biochemistry*, **34**, 6005-6013 (1995).
- 50) Jez J. M., Bennett M. J., Schlegel B. P., Lewis M., Penning T. M., *Biochem. J.*, **326**, 625-636 (1997).
- 51) Penning T. M., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **69**, 211-225 (1999).
- 52) Takenoshita R., Toki S., "Sinseikagaku jikkenkouza 5 Seitaisanka · Yakubututaisha," eds. by Kato R., Kagawa Y., Ozawa T., Wada H., Tokyokagakudojin, 1992, pp. 269-276.