

新規な 4 量体カルボニル還元酵素 (DHRS4) に及ぼす 各種植物成分の影響

島田 秀昭・井上 貴裕・今村 順茂*

Effects of Various Natural Plant Components on a New Tetrameric Carbonyl Reductase (DHRS4)

Hideaki SHIMADA, Takahiro INOUE and Yorishige IMAMURA*

(Received October 1, 2012)

The inhibitory effects of various plant components on the reduction of 4-benzoylpyridine (4-BP) were examined, using the cytosolic fraction of pig heart as the enzyme reaction system of a new tetrameric carbonyl reductase. Among 41 plant components tested, several flavonoids and naphthoquinones exhibited significant inhibitions against the reduction of 4-BP, even though anthocyanins were poor inhibitors.

Key words: carbonyl reductase, 4-benzoylpyridine, plant component, inhibitory effect

緒 言

我々の生活環境中には、アルデヒド基やケトン基を有する様々な化合物が存在する。このようなアルデヒド基やケトン基を有する化合物（カルボニル化合物）は、生体内でタンパク質や核酸と不可逆的に結合し、毒性発現を引き起こすことが指摘されている^{1,2)}。しかし生体内には、カルボニル化合物の毒性発現を防御するための一つの手段として、カルボニル還元酵素（酵素番号：EC 1.1.1.184）と呼ばれる NADPH 依存性の酵素が存在する³⁻⁷⁾。すなわち、有害なカルボニル化合物は、生体内においてカルボニル還元酵素により還元反応を受け、アルコール代謝物となり、そのまま、あるいは更に抱合反応を受けた後、速やかに体外に排出される⁸⁻¹⁰⁾。その結果として、生体はカルボニル化合物の毒性から免れることになる。

一般に、カルボニル還元酵素は、分子量 30,000 - 35,000 の単量体の酵素 (CBR1) であり、種々のケトンおよびアルデヒド類を還元する能力を有することが知られている³⁾。しかし最近、ブタ心臓可溶性画分から 4-Benzoylpyridine (4-BP) を基質として単離・精製されたカルボニル還元酵素（ブタ心臓カルボニル還元酵素：DHRS4）¹¹⁾ は新規な 4 量体のカルボニル還元酵素であり、種々のカルボニル化合物やキノン類を還元する能力を有するとともに、生体内基質としてピ

タミン A の中間体である all-trans レチナールの還元反応を触媒するなど、生体にとって重要な役割を担っていることが指摘されている。

フラボノイド類は、植物成分として野菜、果物および緑茶などに広く存在している色素の総称である。フラボノイド類は植物の色彩を豊かにしているのみでなく、紫外線や病原性微生物などの傷害から身を守るために植物が備えている生体防御機構の一つであると考えられており、植物が自然環境の中で生存するための重要な戦略の一端を担っている¹²⁾。最近、フラボノイド類が多種多様な生理機能を有することが明らかになり、健康食品成分として注目されるようになってきた。本化合物は、動脈硬化、癌、心臓病、糖尿病などの生活習慣病の原因因子であるスーパーオキシドラジカルやヒドロキシラジカルなどの活性酸素種を消去することが実験的に証明されている¹³⁾。しかし、フラボノイド類はその有効性や有用性が注目されているものの、生体内に存在する種々の酵素や輸送担体（トランスポーター）に影響を及ぼすことも報告されており¹⁴⁻²⁰⁾、その生体影響についてはまだ不明な点が多い。

そこで本研究では、フラボノイド類を含む各種植物成分の生体への影響を調べる目的で、DHRS4 に対する各種植物成分の阻害効果を、基質として 4-BP を、酵素試料としてブタ心臓の可溶性画分を用いて検討した。

*日本薬科大学

実験方法

1. 試薬

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), glucose-6-phosphate (G6P), β -NADPH, β -NADP⁺, menadione, plumbagin, tannic acid, curcumin, glycyrrhizic acid, 4-BP は和光純薬社製のものを使用した。All-*trans* retinal, retinol, retinoic acid, kaempferol, myricetin, morin, taxifolin, daidzein, (-)-EGCG は Sigma 社製のものを使用した。Juglone, galangin, chrysin, apigenin, naringenin, (-)-epicatechin は ALDRICH 社製のものを使用した。Lawson は Sigma-ALDRICH 社製のものを使用した。Fisetin, quercitrin は東京化成工業株式会社製のものを使用した。(+)Catechin, genistin, rutin は金城順英博士(福岡大学薬学部)より恵与されたものを使用した。Kaempferol 3,4'-dimethyl ether, quercetin 3-*O*-glucoside, cyanidin, cyanidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-rhamnoglucoside, pelargonidin, delphinidin, malvidin, rubrocinerarin, chalcone, aurone, des-*O*-methylicariin, *t*-stilbene, steroid saponin, ellagic acid は吉玉國二郎博士(熊本大学理学部)より恵与されたものを使用した。その他の試薬はすべて試薬特級のものを使用した。

2. ブタ心臓可溶性画分(酵素溶液)の調製

ブタ心臓の組織を細片後, 3 倍量の 0.15 M KCl を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) を加え, ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。得られた組織のホモジネートを 105,000 x g で 60 分間超遠心分離し, 得られた上澄み液を可溶性画分とした。

3. 阻害実験

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4), NADPH 生成系 (50 μ M NADP⁺, 1.25 mM G6P, 1.25 mM MgCl₂, 0.05 U/ml G6PDH), 0.1 または 0.2 mM 4-BP, 酵素溶液および各種植物成分からなる反応溶液を 37°C で 10 分間インキュベートし, 100°C の熱湯中で酵素を失活させることにより反応を停止した。反応溶液を 3,500 rpm で 10 分間遠心分離した後, クロマトディスク (0.45 μ m) でろ過したものを HPLC 用試料とした。生成した 4-BP 還元体は HPLC 法により以下の条件で測定した。カラム, TOSOH ODS-80TS (0.46 cm x 18 cm); 温度, 室温; 移動相, 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0); メタノール = 4.5:5.5 (v/v), 流速, 0.5 mL/min; 波長, 340 nm。

結果

ブタ心臓可溶性画分における 4-BP の還元反応に対

する各種植物成分の阻害効果を比較した。今回検討した 41 種類の化合物を Fig. 1 に示す。各種植物成分 (50 μ M) を酵素反応溶液に加え, 阻害率を比較した。その結果, これらの化合物の中で Kaempferol (阻害率: 42.7 \pm 3.6%) および Menadione (48.5 \pm 1.2%) が強い阻害を示し, Apigenin (30.6 \pm 3.0%), Daidzein (28.4 \pm 2.8%), Plumbagin (38.3 \pm 0.5%), Juglone (31.8 \pm 1.9%) および Aurone (30.6 \pm 2.1%) など他の化合物も阻害効果が認められたが, いずれも阻害の程度は弱いことが明らかとなった (Fig. 2)。

そこで次に, 各種植物成分の濃度を 100 μ M に上げて同様に実験を行った。その結果, Kaempferol (62.6 \pm 3.2%) が最も強い阻害を示し, 次いで Fisetin (43.6 \pm 3.3%), Daidzein (42.3 \pm 2.1%), Pelargonidin (41.1 \pm 0.5%), Galangin (37.3 \pm 4.7%), および Naringenin (37.1 \pm 3.5%) などのフラボノイド類において濃度依存的な阻害率の増加が認められた (Fig. 3)。一方, Menadione (46.2 \pm 0.7%), Juglone (36.5 \pm 2.4%) および Plumbagin (38.5 \pm 1.1%) などのナフトキノン類においては 50 μ M の場合と比較して濃度依存的な阻害率の増加は見られなかった (Fig. 3)。また, DHRS4 の基質として知られている all-*trans* レチナールはいずれの濃度においてもほとんど阻害を示さなかった (Fig. 3)。

考察

4-BP はブタ心臓可溶性画分において主に DHRS4 によって還元されることが指摘されている。そこで本研究では, DHRS4 の酵素反応系としてブタ心臓可溶性画分を用いて, 4-BP の還元反応に対する各種植物成分の阻害効果を検討した。その結果, 41 種類の植物成分の中で, フラボノイド類の一つである Kaempferol が最も強い阻害効果を示した。また, Fisetin や Daidzein などのフラボノイド類や, Menadione のようなナフトキノン類にも阻害効果が認められたが, 単量体のカルボニル還元酵素 (CBR1) に対するフラボノイド類の阻害効果と比較して¹⁸⁾, 全般的に阻害の程度は弱いことがわかった。さらに, 26 種類のフラボノイド類による阻害効果の構造-活性相関を調べたが, 明確な知見は得られなかった。

以上の結果から, Kaempferol と Menadione のようなある種のフラボノイド類とナフトキノン類は, ブタ心臓可溶性画分に存在する DHRS4 に対して阻害効果を示すことがわかった。しかし本研究において, ブタ心臓可溶性画分に存在する DHRS4 に対してこれらのフラボノイド類やナフトキノン類以外に顕著な阻害効果を示す植物成分を見いだすことができなかった。

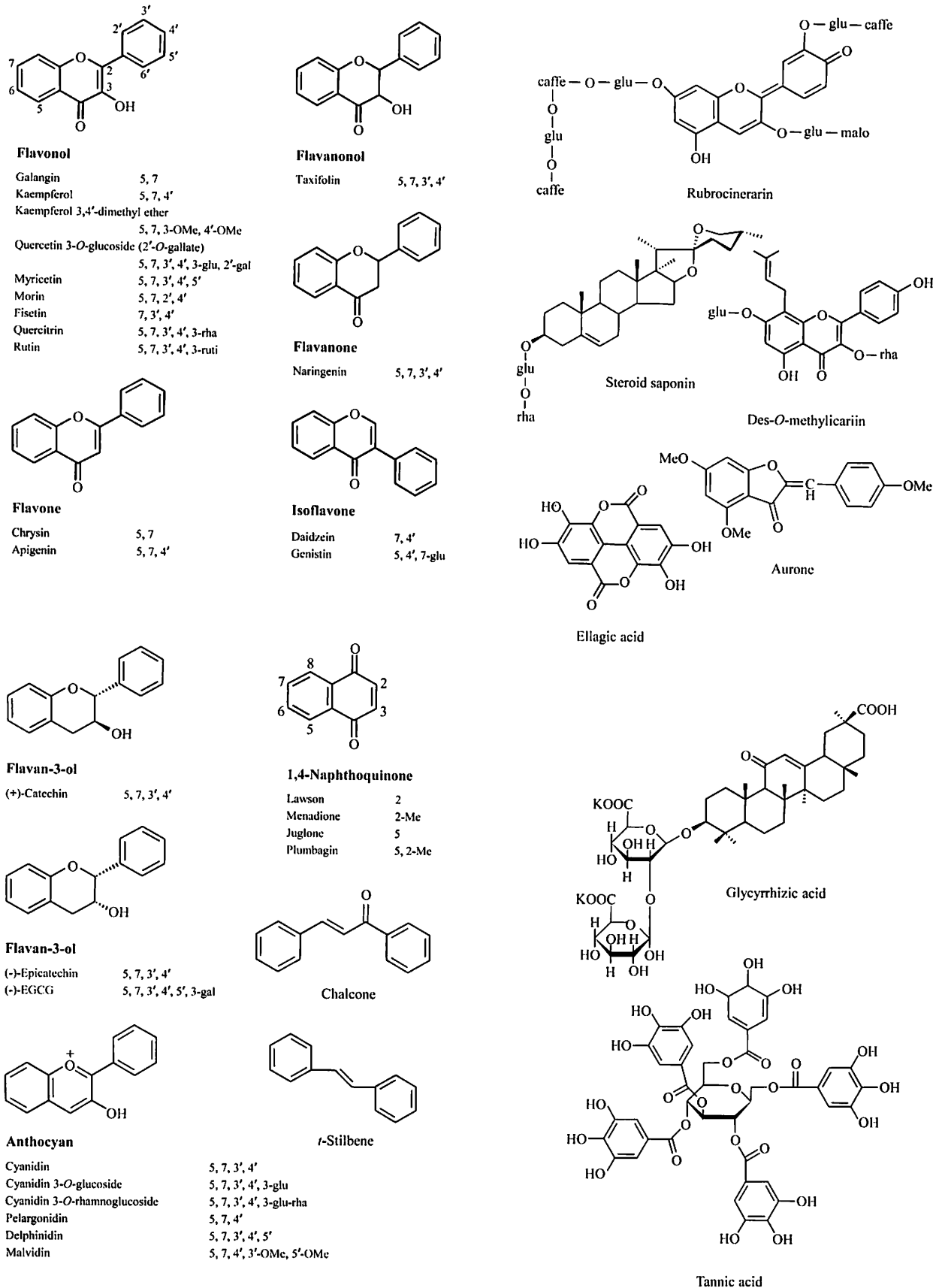


Fig. 1. Chemical Structures of Plant Components

The numbers are hydroxylation pattern. (-)-EGCG, (-)-epigallocatechin-3-gallate. rha, rhamnosyl; ruti, rutinoyl; glu, glucosyl; gal, galloyl; Me, methyl; caffe, caffeic acid; malo, malonic acid.

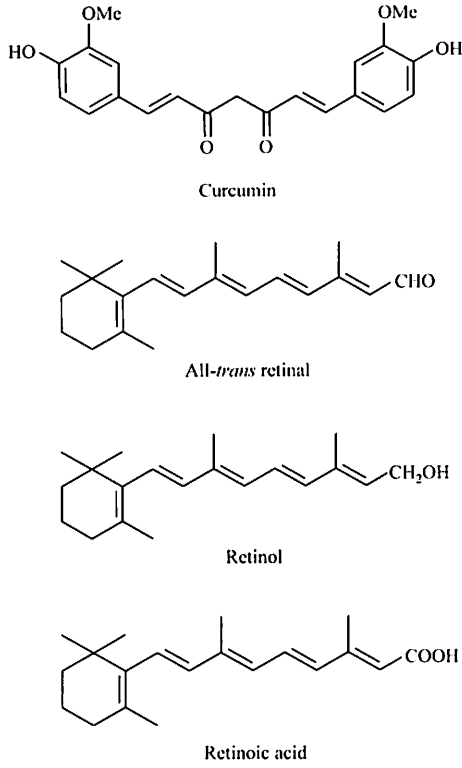


Fig. 1. - Continued

Me, methyl.

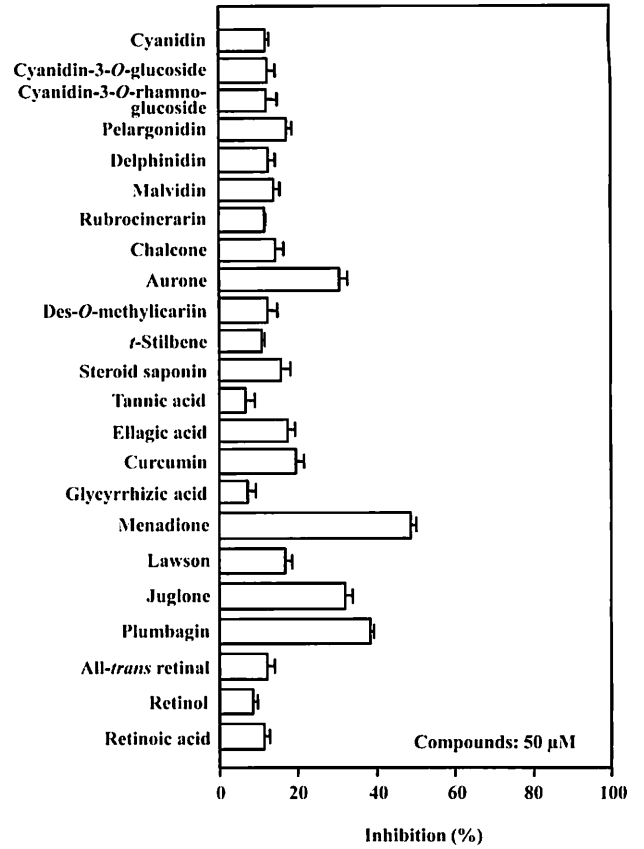


Fig. 2. - Continued

The concentration of plant components was 50 μM. Each bar represent the mean ± S.D. of three to six experiments.

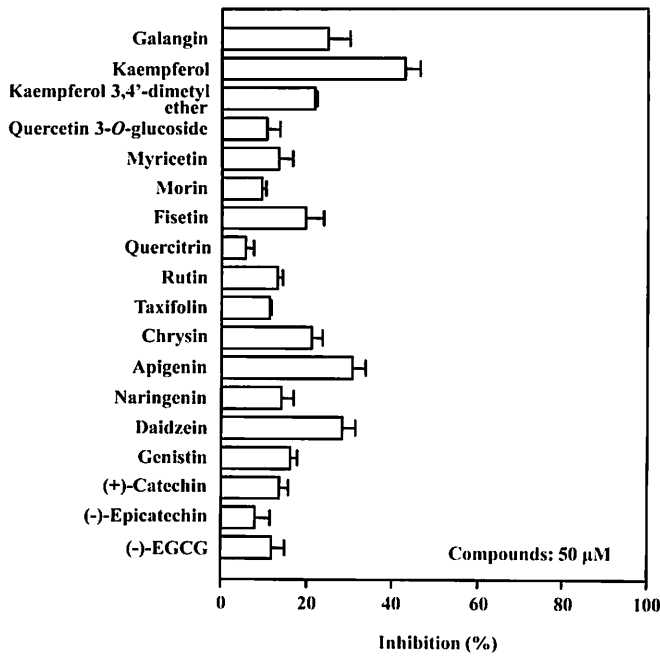


Fig. 2. Effects of Plant Components on the Reduction of 4-BP in Pig Heart Cytosol

The concentration of plant components was 50 μM. Each bar represent the mean ± S.D. of three to six experiments.

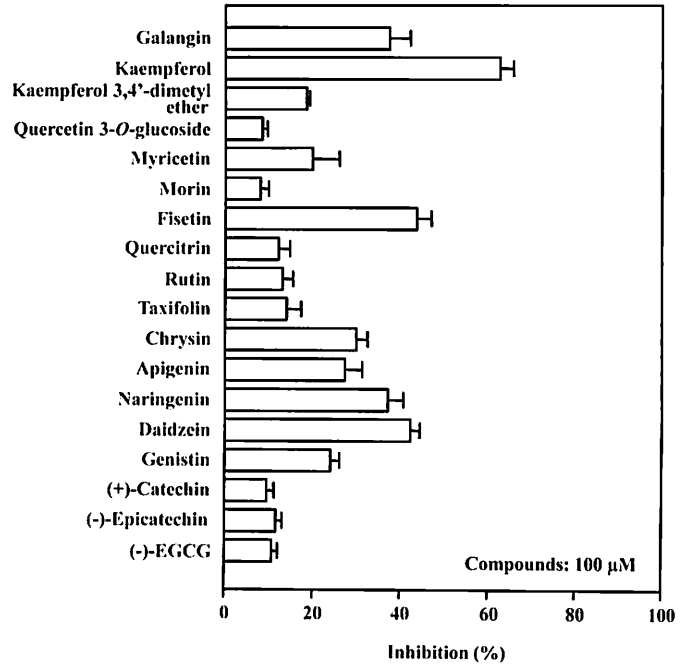


Fig. 3. Effects of Plant Components on the Reduction of 4-BP in Pig Heart Cytosol

The concentration of plant components was 100 μM. Each bar represent the mean ± S.D. of three to six experiments.

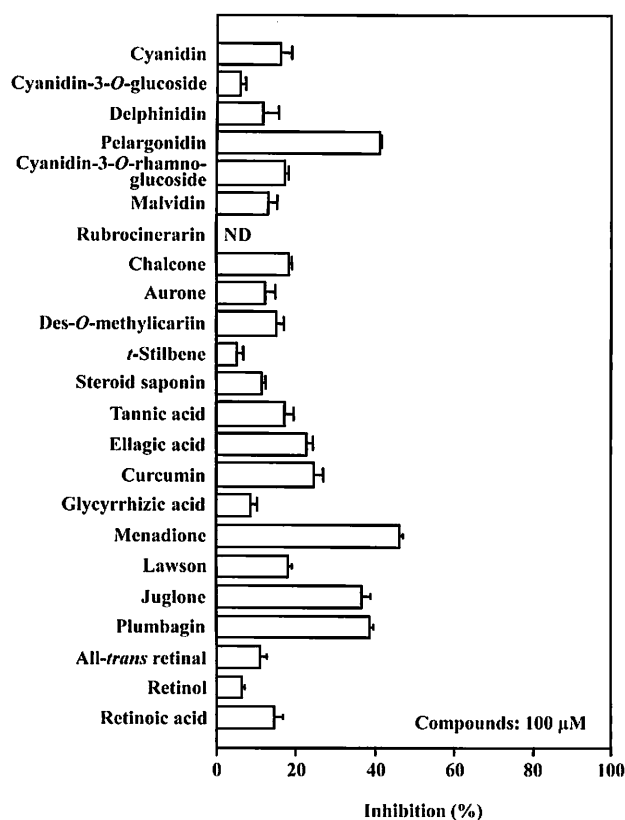


Fig. 3. - Continued

The concentration of plant components was 100 μ M. Each bar represent the mean \pm S.D. of three to six experiments. ND, not detected.

References

- Peterson, C.M., Nguyen, L.B., 1985. Clinical implications of acetaldehyde adducts with hemoglobin. *Prog. Clin. Biol. Res.* 183, 19-30.
- Ellis, E.M., Hayes, J.D., 1995. Substrate specificity of an aflatoxin-metabolizing aldehyde reductase. *J. Biochem.* 312, 535-41.
- Forrest, G.L., Gonzalez, B., 2000. Carbonyl reductase. *Chem. Biol. Interact.* 129, 21-40.
- Rosemond, M.J.C., Walsh, J.S., 2004. Human carbonyl reduction pathways and strategy for their study in vitro. *Drug Metab. Rev.* 36, 335-361.
- Matsunaga, T., Shintani, S., Hara, A., 2006. Multiplicity of mammalian reductases for xenobiotic carbonyl compounds. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21, 1-18.
- Oppermann, U., 2007. Carbonyl reductase: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinine-reducing enzymes and their role in physiology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 293-322.
- Hoffmann, F., Maser, E., 2007. Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metab. Rev.* 39, 87-144.
- Inaba, T., Kovacs, J., 1989. Haloperidol reductase in human and guinea pig liver. *Drug Metab. Dispos.* 17, 330-3.
- Hermans, J.J., Thijssen, H.H., 1989. The in vitro ketone reduction of warfarin and analogues. Substrate stereoselectivity, product stereoselectivity and species differences. *Biochem. Pharmacol.* 38, 3365-70.
- Breyer-Praff, U., Nill, K., 2000. High-affinity stereoselective reduction of the enantiomers of ketotifen and of ketonic nortriptyline metabolites by aldo-keto reductases from human liver. *Biochem. Pharmacol.* 59, 249-60.
- Usami, N., Ishikura, S., Abe, H., Nagano, M., Uebuchi, M., Kuniyasu, A., Otagiri, M., Nakayama, H., Imamura, Y., Hara, A., 2003. Cloning expression and tissue distribution of a tetrameric form of pig carbonyl reductase. *Chem. Biol. Interact.* 143-144, 353-361.
- 吉川敏一編, フラボノイドの医学, 講談社, 1998.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem. Soc. Trans.* 24, 790-795.
- Zhang, K., Das, N.P., 1994. Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione S-transferases. *Biochem. Pharmacol.* 47, 2063-2068.
- van Acker, S.A.B.E., van den Berg, D.-J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., van der Vijgh, W.J.F., Bast, A., 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 331-342.
- Middleton, E. Jr., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52, 673-751.
- Shimada, H., Uchida, M., Okawara, T., Abe, S.-I., Imamura, Y., 2005. Inhibitory effects of flavonoids on the reduction of progesterone to 20 α -hydroxyprogesterone in rat liver. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 93, 73-79.
- Huang, W., Ding, L., Huang, Q., Hu, H., Liu, S., Yang, X., Hu, X., Dang, Y., Shen, S., Li, J., Ji, X., Jiang, S., Liu, J.O., Yu, L., 2010. Carbonyl reductase 1 as a novel target of (-)-epigallocatechin gallate against hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 52, 703-714.
- Zhang, S., Morris, M.E., 2003. Effects of the flavonoids biochanin A, morin, phloretin, and silymarin on P-glycoprotein-mediated transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 1258-1267.
- Morris, M.E., Zhang, S., 2006. Flavonoid-drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sci.* 78, 2116-2130.