

## ペルオキシソームに局在する 4 量体カルボニル還元酵素の構造と機能

今村 順茂

## Structure and Function of Peroxisomal Tetrameric Carbonyl Reductase

Yorishige IMAMURA

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,  
5-1 Oe-honmachi, Kumamoto City 862-0973, Japan*

(Received July 2, 2008; Accepted August 20, 2008; Published online August 28, 2008)

In this paper, the structure and function of a new tetrameric carbonyl reductase (TCR) is reviewed. TCRs were purified from rabbit and pig heart, using 4-benzoylpyridine as a substrate. Partial peptide sequencing and cDNA cloning of rabbit and pig TCRs revealed that both enzymes belonged to the short-chain dehydrogenase/reductase family and that their subunits consisted of 260 amino acid residues. Rabbit and pig TCRs catalyzed the reduction of alkyl phenyl ketones,  $\alpha$ -dicarbonyl compounds, quinones and retinals. Both enzymes were potently inhibited by flavonoids and fatty acids. 9,10-Phenanthrenequinone, which is efficiently reduced by rabbit and pig TCRs, mediated the formation of superoxide radical through its redox cycling in pig heart. The C-terminal sequences of rabbit and pig TCRs comprised a type 1 peroxisomal targeting signal (PTS1) Ser-Arg-Leu, suggesting that the enzymes are localized in the peroxisome. In fact, pig TCR was targeted into the peroxisomal matrix, in the case of transfection of HeLa cells with vectors expressing the enzyme. However, when the recombinant pig TCR was directly introduced into HeLa cells, the enzyme was not targeted into the peroxisomal matrix. The crystal structure of recombinant pig TCR demonstrated that the C-terminal PTS1 of each subunit of the enzyme was buried in the interior of the tetrameric molecule. These findings indicate that pig TCR is imported into the peroxisome as a monomer and then forms an active tetramer within this organelle.

**Key words**—tetrameric carbonyl reductase; peroxisomal localization; crystal structure; short-chain dehydrogenase/reductase family

## 1. はじめに

カルボニル還元酵素 (EC 1.1.1.184) は、アルデヒド類やケトン類を還元する酵素であり、薬学領域ではアセトヘキサミド、ダウノルビシン及びハロペリドールなどのケトン基を有する薬物をアルコール代謝物へ変換する薬物代謝酵素として知られている。<sup>1-4)</sup> 本酵素は、一次構造に基づいて short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) スーパーファミリーに分類される。<sup>4-6)</sup> 代表的なカルボニル還元酵素は、肝臓、脳及び腎臓などの各種臓器の細胞質に存在する NADPH 依存性の単量体酵素 (CBR1) である。<sup>4-7)</sup> その他、哺乳類 (マウス、モルモット、ブタ) の肺ミトコンドリアに局在する 4 量体酵素 (CBR2)<sup>4,8)</sup> 及び CBR1 とは異なる単量体酵素 (CBR3)<sup>9-11)</sup> などのカルボニル還元酵素が単離精製

されており、それらの特性が明らかにされている。最近 CBR3 は、その遺伝的多型がアントラサイクリン系抗がん薬による心毒性発現の個人差に密接な関連性を持つことから注目されている。<sup>12-14)</sup>

さらに筆者らは、前述したカルボニル還元酵素とは異なる 4 量体のカルボニル還元酵素 (tetrameric carbonyl reductase, TCR) を、基質として 4-benzoylpyridine (4-BP) を用いて、ウサギやブタの心臓の可溶性画分から精製することに成功した。<sup>15,16)</sup> しかしその後の研究において、本酵素は細胞質に存在する酵素ではなく、細胞内小器官の 1 つであるペルオキシソームに局在する酵素であることが明らかになった。<sup>16)</sup> ペルオキシソームは、極長鎖脂肪酸の  $\beta$  酸化、プラスマローゲンと呼ばれるエーテルリン脂質及び胆汁酸の生合成などの代謝機能を有しており、そのマトリックスにはカタラーゼなど多くの酵素が含まれている。ペルオキシソームは、ミトコンドリアと異なって独自の DNA を持たないため、こ

これらの酵素は細胞質に存在するリボソームで合成されペルオキシソームに輸送されたものである。ペルオキシソームへの酵素の輸送には、type 1 peroxisomal targeting signal (PTS1) と type 2 peroxisomal targeting signal (PTS2) の2つの輸送シグナルが関与している。<sup>17,18)</sup> 筆者らがウサギやブタの心臓から精製した TCR のサブユニットには、アミノ酸配列の C 末端に3個のアミノ酸から構成される輸送シグナル (PTS1) が認められた。<sup>16)</sup> したがってウサギ及びブタ心臓の TCR は、PTS1 に基づく局在化システムによってペルオキシソームへ輸送されるものと考えられる。しかし TCR のような多量体酵素のペルオキシソームへの輸送機構については、まだ多くの不明な点が残されている。<sup>19)</sup>

本稿では、筆者らがウサギやブタの心臓から新規な TCR を精製することに成功した経緯や、その酵素化学的な特性を述べるとともに、ペルオキシソームへの TCR の輸送機構について、最近の研究成果を中心に概説する。

## 2. TCR の精製

筆者らは20年以上も前に、アセトヘキサミドを基質として用いて、ウサギの心臓の可溶性画分が肝臓や腎臓の可溶性画分よりも高いカルボニル還元酵素活性を示すことを指摘した。<sup>20)</sup> しかしその後も、カルボニル還元酵素が心臓に存在することを明らかにした研究報告は見当たらない。そこで Fig. 1 に示すアセトヘキサミドと 4-BP を基質として用いて、ウサギの心臓の可溶性画分からカルボニル還元酵素を精製し、それらの特性を調べた。<sup>15,21)</sup> 興味深いことに、アセトヘキサミドを基質として精製した酵素と 4-BP を基質として精製した酵素は、いずれも4量体であるが、互いに異なる酵素であることが判明した。すなわちアセトヘキサミドを基質として精製した酵素は、主にアセトヘキサミドとその誘導体の還元反応を触媒するのに対して、<sup>21,22)</sup> 4-BP を基質として精製した酵素 (すなわち TCR) は、アセトヘキサミドを還元する能力を持たないものの、多くのカルボニル化合物やキノン類の還元反応を触媒し、幅広い基質特異性を示した。<sup>15,23)</sup> さらにブタ心臓の可溶性画分から 4-BP を基質としてカルボニル還元酵素を精製した。本精製酵素もまた4量体であり、カルボニル化合物やキノン類の還元反応を触媒することが確かめられた。<sup>16)</sup> 以上のように、ウサ

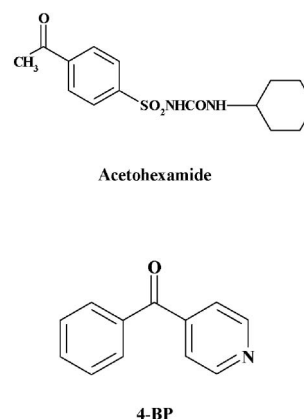


Fig. 1. Chemical Structures of Acetohexamide and 4-BP

ギの心臓からだけでなくブタの心臓からも、同様な性質の TCR が 4-BP を基質として精製されたことから、本酵素がなんらかの生理的役割を担っていることが予想された。

## 3. TCR の一次構造

筆者らがウサギ心臓から精製した TCR は、Furukawa らによりウサギ肝臓から精製された NADP<sup>+</sup> 依存性レチノール脱水素酵素とサブユニットの分子量や臓器分布において類似性が認められた。<sup>24)</sup> そこで本精製酵素 (ウサギ心臓 TCR) をリシルエンドペプチダーゼで加水分解し、得られた6個のペプチドのアミノ酸配列を決定した。これらのペプチドのアミノ酸配列はいずれも、ウサギ NADP<sup>+</sup> 依存性レチノール脱水素酵素の cDNA (accession number: AB045133) から推定されたアミノ酸配列 (260 アミノ酸残基) と完全に一致した。<sup>16)</sup> したがってウサギ心臓の TCR は、ウサギ肝臓の NADP<sup>+</sup> 依存性レチノール脱水素酵素と同一の酵素であることが分った。さらにブタ心臓 TCR を臭化シアンで分解し得られた3個の内部ペプチドと N 末端ペプチドのアミノ酸配列は、ブタ心臓 TCR の cDNA (accession number: AB062757) から推定されたアミノ酸配列 (260 アミノ酸残基) と完全に一致することを確認した。<sup>16)</sup>

ウサギ及びブタ心臓 TCR の推定アミノ酸配列を Fig. 2 に示す。両酵素のアミノ酸配列は、CBR1, CBR2 及び CBR3 などのカルボニル還元酵素のアミノ酸配列と相同性が低いことが分った。しかし両酵素のアミノ酸配列には、SDR ファミリー酵素に高度に保存されている触媒活性に必要な Tyr-XXX-

Rabbit	MASSGVTRRDPLANKVAIVT <sup>**</sup> ASTD <sup>*</sup> GI <sup>*</sup> GLAIARRLAQDGAHVIVSSRKQONVDRVAALQA <sup>60</sup>
Pig	MASTGVERRKPLENKVALVT <sup>**</sup> ASTD <sup>*</sup> GI <sup>*</sup> GLAIARRLAQDGAHVIVSSRKQONVDRVATLQGG
Rabbit	EGLSVTGTVCHVGKAE <sup>**</sup> DRERL <sup>*</sup> VATALNLHGGIDILVSNAAVNPFFGKLM <sup>*</sup> DVTEEVWDKIL <sup>120</sup>
Pig	EGLSVTGTVCHVGKAE <sup>**</sup> DRERL <sup>*</sup> VATALNLHGGIDILVSNAAVNPFFGKLM <sup>*</sup> DVTEEVWDKIL
Rabbit	DINVKAMALMTKAVVPEMEKRG <sup>**</sup> GGSVVIVAS <sup>*</sup> IAAFNPFSGLGPY <sup>*</sup> NVSKTALVGLTKNLAL <sup>180</sup>
Pig	HVNVKATVLMTKAVVPEMEKRG <sup>**</sup> GSVIVSSV <sup>*</sup> GAYHPFNLGPY <sup>*</sup> NVSKTALLGLTKNLAV
Rabbit	ELAAQNIRVNCLAPGLIKTFSKALWEDKAGEENIQKLRIRRLGKPEECAGIVSFLQSE <sup>240</sup>
Pig	ELAPRNIRVNCLAPGLIKTNFSQVLMWDKARKEYM <sup>*</sup> KESLRIRRLGNPEDCAGIVSFLQSE
Rabbit	DASYIDGETVVVAGGAPSRL <sup>***</sup> <sup>260</sup>
Pig	DASYIDGETVVVGGGTASRL <sup>***</sup>

Fig. 2. Deduced Amino Acid Sequences of Rabbit and Pig Heart TCRs

Asterisks show the consensus sequences in pyridine nucleotide (coenzyme) binding region (Thr-20, Ala-21, Gly-25, Gly-27) and active site (Ser-151, Tyr-164, Lys-168), and the residues in PTS1 (Ser-258, Arg-259, Leu-260).

Lysモチーフ (Xは任意のアミノ酸) と、その Tyr 残基より 13 残基 N 末端側に Ser 残基の存在が確認された。また SDR ファミリー酵素のピリジンヌクレオチド (補酵素) 結合領域のコンセンサス配列である Thr-Gly-XXX-Gly-X-Gly モチーフが Thr-Ala-XXX-Gly-X-Gly として認められた。<sup>25)</sup> したがって、ウサギ及びブタ心臓の TCR は SDR ファミリーに属する酵素であることが明らかになった。さらに両酵素の C 末端には、ペルオキシソーム輸送シグナル (PTS1) とみなされるアミノ酸配列 Ser-Arg-Leu (SRL) の存在が確認された。なお PTS1 として最もよく知られているアミノ酸配列は Ser-Lys-Leu (SKL) であるが、SRL 及び Ser-His-Leu (SHL) なども PTS1 として機能することが指摘されている。<sup>17,18,26)</sup>

#### 4. TCR の特性

**4-1. 臓器分布と細胞内局在性** ウサギ及びブタの各種臓器における TCR の発現量をウエスタンブロット分析により比較検討した。その結果、TCR は心臓だけでなく腎臓や肝臓においても発現していることが明らかになった。<sup>16)</sup>

前述したように、ウサギ及びブタ心臓の TCR の C 末端には、ペルオキシソーム輸送シグナル

(PTS1) とみなされる SRL 配列が存在する。そこでブタ心臓 TCR の発現ベクターを HeLa 細胞に導入し免疫蛍光法によりその細胞内局在性を調べた。その結果、本酵素はペルオキシソームに局在することが確かめられた。<sup>16)</sup> ウサギ及びブタ心臓の TCR がペルオキシソーム酵素であるのにも係わらず可溶性画分から精製された理由としては、ペルオキシソームの一重膜がホモジナイズ操作によって破壊され本酵素が漏出したためと考えられる。同様な例として Yoshihara ら<sup>27)</sup> は、可溶性酵素としてみなされていたラット NADP<sup>+</sup> 依存性 isocitrate dehydrogenase がペルオキシソームに局在する酵素であることを、最近の報告で明らかにしている。

**4-2. 基質特異性と阻害剤感受性** ウサギ及びブタ心臓の TCR は、多くの芳香族アルデヒド類、芳香族ケトン類、 $\alpha$ -ジカルボニル化合物及びキノン類の還元反応を触媒し、幅広い基質特異性を示した。<sup>15,16,23)</sup> カルボニル還元酵素の中で 4 量体酵素である CBR2 は、NADPH のみならず NADH を補酵素として利用できるが<sup>8,28)</sup> ウサギ及びブタ心臓の TCR は、補酵素として NADPH を特異的に要求した。<sup>16)</sup> 興味深いことにウサギ及びブタ心臓の TCR は、内因性基質である all-trans レチナールを効率的に還元する能力を有することが分った。<sup>16)</sup> このように両酵素は all-trans レチナールから all-trans レチノールへの還元反応を触媒することから、細胞分化の誘導に関与する all-trans レチノイン酸の生合成を制御している可能性がある。<sup>29)</sup> しかしペルオキシソームに局在するウサギ及びブタ心臓 TCR の生理的な役割については、さらの今後の詳細な検討が必要である。

カルボニル還元酵素の阻害剤としては、フラボノイド類がよく知られている。そこで、ウサギ心臓の TCR に及ぼすフラボノイド類の影響を調べた。本酵素は他のカルボニル還元酵素と同様に、kaempferol や quercetin などのフラボノイド類によって強く阻害されることが確かめられた。<sup>23)</sup> ところで 4 量体カルボニル還元酵素 (CBR2) は、リノレン酸やアラキドン酸のような不飽和脂肪酸によって活性化されることが報告されている。<sup>30)</sup> しかしウサギ及びブタ心臓の TCR は、不飽和脂肪酸やミリスチン酸などの飽和脂肪酸によって逆に阻害されることが判明した。<sup>16,31)</sup>

**4-3. 立体選択的還元反応** ヒトや実験動物の肝臓や腎臓に存在する単量体のカルボニル還元酵素 (CBR1) は、ケトン基を有する多くの薬物や化合物を立体選択的に還元することが報告されている。<sup>32-34</sup> そこでブタ心臓 TCR が、本酵素の精製に際し基質として用いた 4-BP を立体選択的に還元するかどうか検討した。その結果、ブタ心臓 TCR は 4-BP をアルコール代謝物 *S*(-)- $\alpha$ -phenyl-4-pyridylmethanol に立体選択的に還元することが確認された (Fig. 3)。<sup>35</sup>

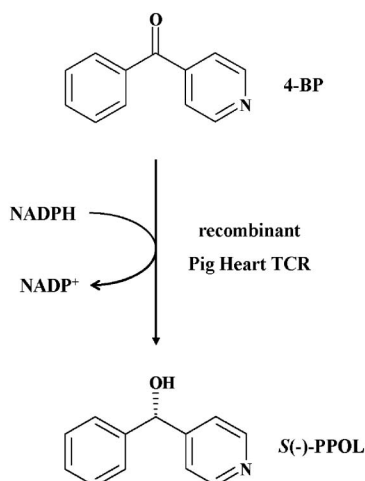


Fig. 3. Stereoselective Reduction of 4-BP to *S*(-)- $\alpha$ -Phenyl-4-pyridylmethanol [*S*(-)-PPOL] by Recombinant Pig Heart TCR

**4-4. スーパーオキシドラジカル生成への関与**  
 ブタ心臓 TCR は、ディーゼル排気ガス微粒子に含まれるキノン類の 1 つである 9,10-phenanthrenequinone (9,10-PQ) を効率的に 2 電子還元する。<sup>16</sup> さらにブタ心臓の可溶性画分を用いた実験結果から、TCR により 2 電子還元された 9,10-PQ は、Fig. 4 に示すように、レドックスサイクルを介してスーパーオキシドラジカルを生成することが判明した。<sup>36,37</sup> このようにしてレドックスサイクルを介して生成されたスーパーオキシドラジカルは、心臓に対して有害な作用を引き起こす可能性がある。<sup>38</sup> なおキノン類の 2 電子還元を触媒する酵素としては DT-ジアホラーゼがよく知られている。しかし DT-ジアホラーゼは、ブタ心臓の可溶性画分と 9,10-PQ の反応系において、レドックスサイクルを介するスーパーオキシドラジカルの生成に関与しないことが確かめられた。<sup>39</sup>

### 5. TCR の選別輸送

細胞内小器官の 1 つであるペルオキシソームのマトリックスには、カタラーゼや脂肪酸  $\beta$ -酸化系酵素アシル-CoA オキシダーゼなどの多くの酵素が含まれている。これまで述べてきたように、ウサギやブタ心臓の TCR もまたペルオキシソームに局在する酵素である。最近、このようなペルオキシソーム酵素の選別輸送に関する研究が活発に行われている。

#### 5-1. ペルオキシソーム酵素とその受容体

ペルオキシソーム酵素の選別輸送に関与するシグナル

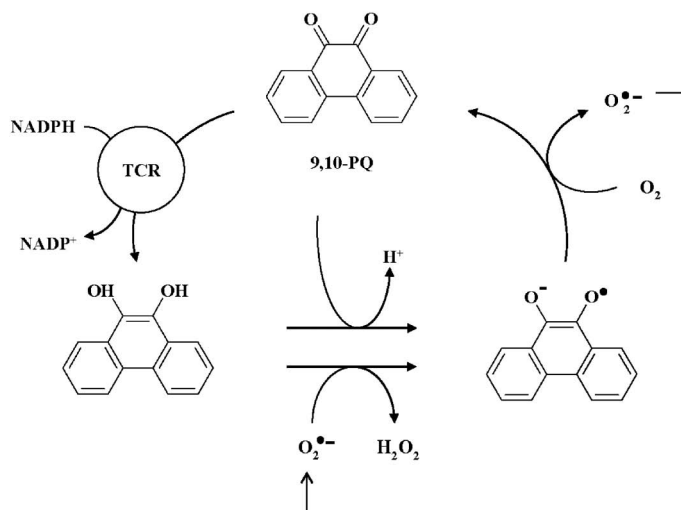


Fig. 4. Proposed Model of Superoxide Radical Formation during Redox Cycling of 9,10-Phenanthrenequinone (9,10-PQ) in Pig Heart<sup>28</sup>

としては、PTS1 と PTS2 の 2 つが同定されているが、多くのペルオキシソーム酵素はウサギ及びブタ心臓の TCR と同様に PTS1 型である。PTS1 型酵素は、その受容体である peroxin protein 5 (Pex5p) に結合してペルオキシソームへ運ばれ、<sup>40,41)</sup> ついで Pex14p, Pex13p 及び RING (really interesting new gene) フィンガーペルオキシシン (Pex2p, Pex10p, Pex12p) から構成される膜透過装置を経てペルオキシソームへ局在化される。<sup>42)</sup> Pex5p は細胞質とペルオキシソームマトリックス間のシャトル受容体と考えられており、その詳細なリサイクル機構が明らかにされつつある。<sup>43,44)</sup>

**5-2. ペルオキシソーム輸送シグナル** ペルオキシソーム輸送シグナル PTS1 のアミノ酸配列としては、SKL が最もよく知られている。しかし、ウサギ及びブタ心臓 TCR の C 末端に存在するアミノ酸配列は SRL である。そこでブタ心臓 TCR の SRL 配列を、SLL 及び SL (トリペプチド 2 番目の塩基性残基を除去) 配列に置換した TCR の発現ベクターを HeLa 細胞に導入し発現させ、TCR の特異抗体を用いた免疫蛍光法により細胞内局在性を調べた。その結果、これらの TCR 置換体は細胞質に留まり、ペルオキシソームへ輸送されなかった。<sup>45)</sup> したがって TCR の細胞質からペルオキシソームへの輸送は、PTS1 として機能する SRL 配列に基づくことが確認された。

ある種の PTS1 型酵素は、多量体として細胞質からペルオキシソームへ輸送されることが知られている。<sup>19)</sup> しかしながら筆者らの研究において、組み換え型ブタ心臓 TCR を直接 HeLa 細胞内に導入 (introduction) した場合は、ベクターを導入して細胞内で発現させた場合と異なって、ペルオキシソームへ輸送されなかった。<sup>45)</sup> これらの実験結果から、ブタ心臓 TCR においては、C 末端の SRL 配列が 4 量体構造の内部に埋没しており、その受容体である Pex5p に認識されないことが推察された。

**5-3. 結晶構造解析** ペルオキシソーム酵素であるブタ心臓 TCR の輸送機構をさらに明らかにするために、組み換え型ブタ心臓 TCR の結晶構造解析を試みた。<sup>45,46)</sup> まず酵素 (組み換え型ブタ心臓 TCR) と補酵素 (NADPH) の 2 成分複合体を結晶化することに成功した。<sup>46)</sup> そこで次に 2 成分複合体の結晶構造を解析したところ、4 個のサブユニット

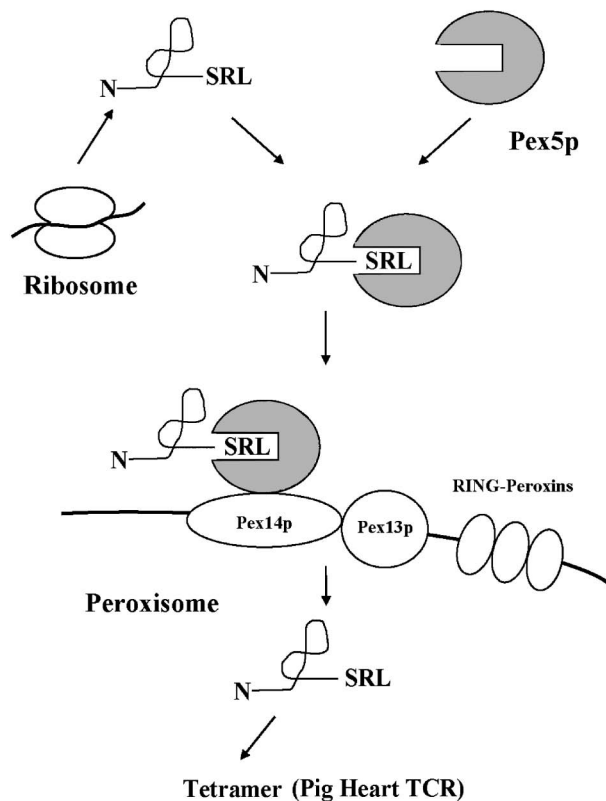


Fig. 5. Import of Pig Heart TCR into Peroxisome as Its Monomer

N: N-terminal. The monomeric molecules form an active tetramer in the peroxisome.

の C 末端に存在する SRL 配列は、いずれも 4 量体構造の内部に埋没しており、ペルオキシソーム輸送シグナル (PTS1) として、その受容体である Pex5p に認識されないことが明らかになった。<sup>45)</sup> 一方、ブタ心臓 TCR の単量体構造においては、C 末端の SRL 配列が構造表面に露出していることが確かめられた。<sup>45)</sup> したがってブタ心臓 TCR は、Fig. 5 に示すように、C 末端の SRL 配列が Pex5p と結合できる単量体としてペルオキシソームへ輸送され、ペルオキシソームのマトリックス内で酵素活性を示す 4 量体を形成することが、結晶構造解析の結果に基づいて実証された。

## 6. おわりに

本稿では、ウサギ及びブタの心臓に存在する 4 量体カルボニル還元酵素 (TCR) の構造と機能について概説した。さらに TCR は、細胞内小器官であるペルオキシソームに局在する酵素であることを明らかにするとともに、本酵素の細胞質からペルオキシソームへの輸送機構について、現在までに得られ

た知見を述べた。

ウサギ及びブタ心臓の TCR は、ヒトの peroxisomal short-chain dehydrogenase,<sup>47)</sup> マウスの NADPH 依存性レチナル還元酵素,<sup>48)</sup> イヌ肝臓の多量体カルボニル還元酵素,<sup>49,50)</sup> 及びラット心臓に存在するカルボニル還元酵素<sup>51)</sup> とアミノ酸配列において高い相同性 (>80%) を示した。さらにこれらの酵素はいずれも、C 末端に PTS1 とみなされるアミノ酸配列の存在が確認され TCR の ortholog であることが判明した。しかし、これらの酵素における PTS1 のアミノ酸配列は SRL 又は SHL であり、最もよく知られている SKL に該当するものは見い出せなかった。これらの酵素の C 末端アミノ酸配列が SKL の場合は、酵素活性を示す 4 量体構造が不安定であることから、恐らく分子進化の過程でこのアミノ酸配列が選択されなかったものと考えられる。<sup>45,52)</sup>

最近、ヒトの peroxisomal short-chain dehydrogenase (ペルオキシソーム 2,4-dienoyl-CoA reductase, accession number: AF044127)<sup>47)</sup> は、ヒト遺伝子命名委員会 (Human Gene Nomenclature Committee) によって dehydrogenase/reductase (SDR family) member 4 (DHRS4) と命名された。しかしヒト DHRS4 の酵素化学的な特性については、まだほとんど検討されていない。そこで筆者らはヒト DHRS4 の酵素化学的な特性について詳細な検討を試み、いくつかの興味深い知見を得ている。<sup>53)</sup> さらに選択的スプライシングに基づく 2 種類のヒト DHRS4 変異体の存在が確認されている。<sup>47)</sup> ヒト DHRS4 変異体の発現量と発がんやがんの転移との関係を明らかにすることは、今後の重要な研究課題である。<sup>54)</sup>

**謝辞** 本稿で紹介した研究成果は、小田切優樹教授 (熊本大学大学院医学薬学研究部)、原 明教授 (岐阜薬科大学)、秋田弘幸教授 (東邦大薬学部)、田中信忠准教授 (昭和大学薬学部)、中村和郎教授 (昭和大学薬学部)、中山 仁教授 (熊本大学大学院医学薬学研究部)、國安明彦准教授 (熊本大学大学院医学薬学研究部) 及び島田秀昭准教授 (熊本大学教育学部) の諸先生との共同研究によって得られたものである。ご協力頂いた先生方に深謝致します。

## REFERENCES

- 1) Forrest G. L., Gonzalez B., *Chem. Biol. Interact.*, **129**, 21–40 (2000).
- 2) Oppermann U. C., Maser E., *Toxicology*, **144**, 71–81 (2000).
- 3) Rosemond M. J. C., Walsh J. S., *Drug Metab. Rev.*, **36**, 335–361 (2004).
- 4) Matsunaga T., Shintani S., Hara A., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**, 1–18 (2006).
- 5) Oppermann U., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **47**, 293–322 (2007).
- 6) Hoffmann F., Maser E., *Drug Metab. Rev.*, **39**, 87–144 (2007).
- 7) Wermuth B., Bohren K.M., Heinemann G., von Wartburg J. P., Gabbay K. H., *J. Biol. Chem.*, **263**, 16185–16188 (1988).
- 8) Nakayama T., Yashiro K., Inoue Y., Matsuura K., Ichikawa H., Hara A., Sawada H., *Biochim. Biophys. Acta*, **882**, 220–227 (1986).
- 9) Watanabe K., Sugawara C., Ono A., Fukuzumi Y., Itakura S., Yamazaki M., Tashiro H., Osoegawa K., Soeda E., Nomura T., *Genomics*, **52**, 95–100 (1998).
- 10) Terada T., Sugihara Y., Nakamura K., Mizobuchi H., Maeda M., *Chem. Biol. Interact.*, **143–144**, 373–381 (2003).
- 11) Miura T., Nishinaka T., Terada T., *Mol. Cell. Biochem.*, **315**, 113–121 (2008).
- 12) Lakhman S. S., Ghosh D., Blanco J. G., *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 254–257 (2005).
- 13) Fan L., Goh B. C., Wong C. I., Sukri N., Lim S. E., Tan S.H., Guo J. Y., Lim R., Yap H. L., Khoo Y. M., Iau P., Lee H. S., Lee S.C., *Pharmacogenet. Genomics*, **18**, 623–631 (2008).
- 14) Blanco J. G., Leisenring W. M., Gonzalez-Covarrubias V. M., Kawashima T. I., Davies S. M., Relling M. V., Robison L. L., Sklar C. A., Stovall M., Bhatia S., *Cancer*, **112**, 2789–2795 (2008).
- 15) Imamura Y., Migita T., Otagiri M., Choshi T., Hibino S., *J. Biochem.*, **125**, 41–47 (1999).
- 16) Usami N., Ishikura S., Abe H., Nagano M., Uebuchi M., Kuniyasu A., Otagiri M., Nakayama H., Imamura Y., Hara A., *Chem. Biol. Interact.*, **143–144**, 353–361 (2003).

- 17) Gould S. J., Keller G. -A., Hosken N., Wilkinson J., Subramani S., *J. Cell Biol.*, **108**, 1657–1664 (1989).
- 18) Swinkels B. W., Gould S. J., Bodnar A. G., Rachubinski R. A., Subramani S., *EMBO J.*, **10**, 3255–3262 (1991).
- 19) Léon S., Goodman J. M., Subramani S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1763**, 1552–1564 (2006).
- 20) Imamura Y., Kojima Y., Otagiri M., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **9**, 110–111 (1986).
- 21) Imamura Y., Ryu A., Koga T., Higuchi T., Otagiri M., Nozawa M., Akita H., *J. Biochem.*, **119**, 648–652 (1996).
- 22) Imamura Y., Koga T., Migita T., Ryu A., Otagiri M., Nozawa M., Akita H., *J. Biochem.*, **121**, 705–710 (1997).
- 23) Imamura Y., Migita T., Uriu Y., Otagiri M., Okawara T., *J. Biochem.*, **127**, 653–658 (2000).
- 24) Furukawa A., Ohnishi T., Tomita S., Miyatake A., Ichikawa Y., *Seikagaku*, **72**, 869 (2000).
- 25) Jörnvall H., Persson B., Krook M., Atrian S., Gonzalez-Duarte R., Jeffert J., Ghosh D., *Biochemistry*, **34**, 6003–6013 (1995).
- 26) Amery L., Brees C., Baes M., Setoyama C., Miura R., Mannaerts G. P., Van Veldhoven P. P., *Biochem. J.*, **336**, 367–371 (1998).
- 27) Yoshihara T., Hamamoto T., Munakata R., Tajiri R., Ohsumi M., Yokota S., *J. Histochem. Cytochem.*, **49**, 1123–1131 (2001).
- 28) Oritani H., Deyashiki Y., Nakayama T., Hara A., Sawada H., Matsuura K., Bunai Y., Ohya I., *Arch. Biochem. Biophys.*, **292**, 539–547 (1992).
- 29) Napoli J. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **1440**, 139–162 (1999).
- 30) Hara A., Oritani H., Deyashiki Y., Nakayama T., Sawada H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **292**, 548–554 (1992).
- 31) Imamura Y., Migita T., Anraku M., Otagiri M., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 731–733 (1999).
- 32) Imamura Y., Kojima Y., Higuchi T., Akita H., Oishi T., Otagiri M., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **12**, 731–735 (1989).
- 33) Dow J., Berg C., *Chirality*, **7**, 342–348 (1995).
- 34) Kobana K., Watanabe K., Kimura T., Matsunaga T., Kondo S., Yamamoto I., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 917–921 (2000).
- 35) Shimada H., Fujiki S., Oginuma M., Asakawa M., Okawara T., Kato K., Yamamoto S., Akita H., Hara A., Imamura Y., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **23**, 29–35 (2003).
- 36) Shimada H., Oginuma M., Hara A., Imamura Y., *Chem. Res. Toxicol.*, **17**, 1145–1150 (2004).
- 37) Taguchi K., Fujii S., Yamano S., Cho A.K., Kamisuki S., Nakai Y., Sugawara F., Froines J.R., Kumagai Y., *Free Radic. Biol. Med.*, **43**, 789–799 (2007).
- 38) Minami M., Endo T., Hamaue N., Hirafuji M., Mori Y., Hayashi H., Sagai M., Suzuki A. K., *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **105**, 67–76 (1999).
- 39) Oginuma M., Shimada H., Imamura Y., *Chem. Biol. Interact.*, **155**, 148–154 (2005).
- 40) Dodt G., Braverman N., Wong C. S., Moser A., Moser H. W., Watkins P., Valle D., Gould S. J., *Nat. Genet.*, **9**, 115–125 (1995).
- 41) Otera H., Harano T., Honsho M., Ghaedi K., Mukai S., Tanaka A., Kawai A., Shimizu N., Fujiki Y., *J. Biol. Chem.*, **275**, 21703–21714 (2000).
- 42) Otera H., Setoguchi K., Hamasaki M., Kumashiro T., Shimizu N., Fujiki Y., *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 1639–1655 (2002).
- 43) Dammai V., Subramani S., *Cell*, **105**, 187–196 (2001).
- 44) Thoms S., Erdmann R., *Biochim. Biophys. Acta*, **1763**, 1620–1628 (2006).
- 45) Tanaka N., Aoki K., Ishikura S., Nagano M., Imamura Y., Hara A., Nakamura K. T., *Structure*, **16**, 388–397 (2008).
- 46) Aoki K., Tanaka N., Ishikura S., Araki N., Imamura Y., Hara A., Nakamura K. T., *Acta Crystallogr.*, **F62**, 1037–1040 (2006).
- 47) Fransen M., Van Veldhoven P. P., Subramani S., *Biochem. J.*, **340**, 561–568 (1999).
- 48) Lei Z., Chen W., Zhang M., Napoli J. L., *Biochemistry*, **42**, 4190–4196 (2003).
- 49) Hara A., Nakayama T., Deyashiki Y., Kariya K., Sawada H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **244**, 238–247 (1986).
- 50) Endo S., Matsunaga T., Nagano M., Abe H., Ishikura S., Imamura Y., Hara A., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1787–1791 (2007).

- 
- 51) Shimada H., Imaishi K., Hirashima T., Kitano T., Ishikura S., Hara A., Imamura Y., *Life Sci.*, **80**, 554–558 (2007).
- 52) Baker M. E., Subramani S., *Structure*, **16**, 331–332 (2008).
- 53) Matsunaga T., Endo S., Maeda S., Ishikura S., Tajima K., Tanaka N., Nakamura K. T., Imamura Y., Hara A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **477**, 339–347 (2008).
- 54) Song X.-H., Liang B., Liu G.-F., Li R., Xie J.-P., Du K., Huang D.-Y., *Int. J. Cancer*, **120**, 1618–1626 (2007).