

氏 名(本籍)	はげ 鈴 木 ひろ 裕 ゆき 行
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	農 博 第 3 9 5 号
学位授与年月日	平 成 元 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 食糧化学専攻
学 位 論 文 題 目	ラット脂肪酸活性化酵素の分子生物学的 研究：構造，機能および発現調節
論 文 審 査 委 員 (主 査)	
	教授 木村 修一
	教授 安元 健
	教授 目黒 熙
	助教授 山本 徳男

# 論文内容要旨

## 序 論

脂肪酸活性化酵素 (Long-chain acyl-CoA synthetase, EC 6. 2. 1. 3) は, ATP と  $Mg^{2+}$  の存在下で, 長鎖脂肪酸とコエンザイム A からアシル CoA の生成を触媒する酵素で (Fig. 1), 1953 年に Kornberg and Pricer により発見され, その後, Berg によりその反応機構が解析された。約 4 半世紀を経て, Tanaka らにより初めてラット肝臓のミトコンドリアおよびマイクロソームの脂肪酸活性化酵素が純化され, その性質が明らかにされた。

生合成された内因性脂肪酸も食事由来の外因性脂肪酸も本酵素により活性化されない限り利用することはできない。アシル CoA は脂質代謝における重要な中間体であって,  $\beta$ -酸化系で分解されエネルギーの産生に, また, トリグリセリドやリン脂質の合成, 蛋白質やコレステロールのアシル化, 脂肪酸生合成の feed back inhibition など様々な代謝系で利用される。脂肪酸代謝の初発反応を触媒する脂肪酸活性化酵素は代謝調節の重要な段階に位置している。

ラット肝脂肪酸活性化酵素はミトコンドリア, ペルオキシゾームおよびマイクロソームの 3 つのオルガネラに存在する多局在性蛋白質である。しかも, それぞれのオルガネラに存在する酵素はいずれも同一の分子量 (約 76, 000) で, 酵素化学的にも, 蛋白質化学的にも全く同一であることが明らかにされている。このように, 3 つのオルガネラに輸送される蛋白質は我々の知る限り他に類を見ず, 脂肪酸活性化酵素は細胞内蛋白質輸送機構を研究する上でも大変ユニークな系である。

本研究は代謝調節的にも, 細胞生物学的にも重要な脂肪酸活性化酵素の構造, 機能および発現調節機構を明らかにする目的としている。

# 本 論

## 第1章 ラット脂肪酸活性化酵素の構造

脂肪酸活性化酵素の細胞内多局在性と発現調節機構を分子生物学的に研究するためには脂肪酸活性化酵素の cDNA クローニングと構造解析が不可欠である。本研究では最初に、ラットの脂肪酸活性化酵素の cDNA をクローニングしてその塩基配列より脂肪酸活性化酵素の構造を決定した。

### 第1節 ラット脂肪酸活性化酵素の cDNA クローニングと塩基配列決定

Fig. 2 にラット脂肪酸活性化酵素の cDNA クローニングの strategy を示した。ラット肝臓より純化された脂肪酸活性化酵素をリジンエンドペプチダーゼにより限定分解し、気相アミノ酸シーケンサーにより部分アミノ酸配列を決定した。アミノ酸配列から予想される 17mer のオリゴヌクレオチドをプローブとして Okayama-Berg 法により調製したラット肝臓の cDNA ライブラリーをスクリーニングした。

単離された cDNA クローンの中で完全長のインサート (3.8kb) を持つクロンの制限酵素地図を作製した (Fig. 3)。エキソヌクレアーゼⅢを用いたキロシーケンス法により全塩基配列を決定した。その結果、開始コドン ATG(+1~3) から 2097 塩基、699 残基のアミノ酸からなる単一のオープンリーディングフレームが得られた。このアミノ酸配列はアミノ酸シーケンサーにより決定された部分アミノ酸配列を完全に含んでいる。アミノ酸配列から計算された分子量 (78, 177), アミノ酸組成は精製酵素の解析結果とほぼ一致する (Table. 1)。

### 第2節 脂肪酸活性化酵素の構造解析

脂肪酸活性化酵素は ATP とコエンザイム A が基質である。構造の既に知られている、他の ATP 結合蛋白およびコエンザイム A 結合蛋白とのホモロジー解析を行なった。

adenylate kinase の ATP 結合部位は、X線結晶解析および NMR 解析により 3つの Segment から構成される事が知られている。すなわち、1) そのコンフォメーション変化により基質との反応性の調節に関与すると考えられる Gly rich で柔軟なループ構造の "Segment 1", 2) ATP の  $\beta$ ないし  $\gamma$  のリン酸基と直接反応する Lys とアデニン・リボース部分の入り込むポケットの形成に関与する 2個の疎水性アミノ酸の存在する  $\alpha$ -ヘリックス構造の "Segment 2", 3) 疎水性アミノ酸が連続し、3リン酸-Mg<sup>2+</sup>と結合する Asp で終わる parallel  $\beta$ -pleated sheet 構造の

”Segment 3”より構築されている。脂肪酸活性化酵素のアミノ酸配列を adenylate kinase のアミノ酸配列と比較した結果、これら ATP 結合部位を形成する3つの Segment と特徴の類似した領域(505-513残基, 518-522残基および599-604残基)が見つけた (Fig. 4)。この領域が脂肪酸活性化酵素のATP結合部位であると考えられる。

citrate synthase のX線結晶解析によりアセチル CoA のアデニンと結合する, ”adenine recognition loop” の存在が明らかにされている。この領域の周辺のアミノ酸配列は他の CoA 結合酵素にも保存されており, これらの酵素の CoA 結合部位であることが示唆される。脂肪酸活性化酵素には該当する領域が2カ所存在する(174-186残基と365-377残基)。この2カ所のどちらか一方または両方が基質のコエンザイムAならびに反応生成物のアシル CoA の結合部位であると考えられる。

脂肪酸活性化酵素はミトコンドリア外膜, 小胞体膜およびペルオキシゾーム膜に存在する酵素であり, 膜貫通ドメインの存在は当然予想される。LDLレセプターやHMG-CoAレダクターゼなどの膜蛋白質の膜貫通ドメインは疎水性アミノ酸約22残基からなる $\alpha$ -ヘリックスである。脂肪酸活性化酵素のHydropathy profile (Fig. 5)から疎水性領域が3カ所見つけられた。脂肪酸活性化酵素の二次構造をNishikawaらのJoint法に基づいてコンピューター解析により予測した (Fig. 4)。この結果から, 最もN末側の疎水性領域中の318残基から337残基にかけて22残基よりなる $\alpha$ -ヘリックスの存在が同定された。この $\alpha$ -ヘリックスに隣接して, 膜脂質の極性基と相互作用する親水性アミノ酸であるGlu, Asp (314, 315残基)およびHis, Lys (338, 341残基)が存在する。これらの結果は膜貫通ドメインに共通して見られる特徴であり, この領域が脂肪酸活性化酵素の膜貫通ドメインである可能性が高い。

### 第3節 蛋白質輸送に関するシグナル配列の解析

脂肪酸活性化酵素はミトコンドリア, ペルオキシゾームおよびマイクロゾームの3オルガネラに分布する酵素である。真核細胞において, 細胞内蛋白質輸送機構は小胞体に輸送される蛋白質についてはかなり詳細な研究がある。蛋白質のN末端に疎水性アミノ酸の局在した約20数残基のシグナル配列が存在し, リボゾーム上での翻訳過程でその配列がsignal recognition particle (SRP)に認識され複合体を形成する。この複合体が小胞体膜表面上のSRPレセプターと特異的に結合することにより特異的な蛋白質の小胞体膜透過が行なわれる。cytochrome c oxidase や citrate synthase などのミトコンドリアに輸送される蛋白質には, N末に塩基性アミノ酸が多く現われ両親媒性の $\alpha$ -ヘリックス構造をとるプレ配列が存在し, この配列が輸送シグナルであることが確認されている。SV40 large T-antigen などの核蛋白質も塩基性アミノ酸に富むシグナル配列によって認識され輸送されている。ペルオキシゾームに局在する luciferase はC末端にシグナ

ル配列が存在する。

脂肪酸活性化酵素のアミノ酸配列中には典型的な小胞体型やミトコンドリア型のシグナル配列を見つけることはできなかった。独立に単離された完全長の脂肪酸活性化酵素 cDNA クローン 5 つについて N 末端および C 末端のアミノ酸配列を決定したが、違いは見つけられなかった。N 末、C 末以外にシグナル配列が存在する可能性が残されているが、脂肪酸活性化酵素の各オルガネラへの輸送は特異的シグナル配列によって決定されていないとも考えられる。この事は *in vitro* の翻訳系で合成された脂肪酸活性化酵素が精製標品と分子量が同一であることから支持される。

## 第 2 章 ラット脂肪酸活性化酵素の発現調節機構

### 第 1 節 脂肪酸活性化酵素 mRNA 発現の臓器特異性

脂肪酸活性化酵素はそれぞれの臓器の脂肪酸代謝に重要な役割を担っている。mRNA のレベルで脂肪酸活性化酵素発現の臓器特異性を調べる目的でラットの心臓、肝臓、肺、脳、小腸および副睾丸周囲脂肪組織より RNA を抽出して、ノーザン・ブロットィング解析を行なった。結果は Fig. 6 に示すように心臓、肝臓、および副睾丸周囲脂肪組織に脂肪酸活性化酵素 mRNA は強く発現しており、脳、肺、小腸での発現はわずかに認められた。心臓は主として脂肪酸の  $\beta$ -酸化により心収縮に必要なエネルギーを産生している。脂肪組織は脂質を蓄積する組織で主としてトリグリセリドの合成と分解が活発に行なわれている。肝臓は脂肪酸の  $\beta$ -酸化、脂質合成、脂質の分泌と輸送が行なわれる臓器である。これらの結果は、各臓器の脂質代謝の特徴を反映している。

### 第 2 節 脂肪酸活性化酵素 mRNA 発現の調節

外因性ないし内因性の基質脂肪酸により脂肪酸活性化酵素が誘導され得るかを転写レベルで明らかにするため以下の食餌条件を課したラット肝臓の mRNA の量を調べた。

ラット (Wistar 系, ♂, 8WK) を 48 時間絶食させた後、無脂肪食、ないし 20% 脂肪食を 72 時間再食させ、肝臓から RNA を抽出してノーザン・ブロットィング解析を行なった。結果は Fig. 7 に示したように対照群、絶食群と比較して、無脂肪食、高脂肪食再食群ともに脂肪酸活性化酵素 mRNA の顕著な発現の増加が見られた。この結果は、脂肪酸生合成による内因性の脂肪酸および食餌由来の外因性の脂肪酸が脂肪酸活性化酵素遺伝子の転写を誘導していることを示している。絶食後の無脂肪食と高脂肪食の投与により、ラットの肝臓は脂肪肝を呈していた。これは脂肪酸活性化酵素誘導により生成された大量のアシル CoA からのトリグリセリドの合成が急激に上昇

した結果である。本実験より脂肪酸活性化酵素が脂肪酸により up regulation されていることが示された。

### 第3章 総合的考察

本研究では細胞内蛋白質輸送と脂質代謝において重要な脂肪酸活性化酵素の構造、機能および発現調節が明らかにされた。

本研究によりクローニングされた脂肪酸活性化酵素 cDNA の塩基配列から得られた脂肪酸活性化酵素のアミノ酸配列中には、これまでに知られる小胞体、ミトコンドリアおよびペルオキシゾームに輸送される蛋白質に存在する古典的シグナル配列は発見できなかった。*in vitro* 翻訳系で合成された脂肪酸活性化酵素と精製された脂肪酸活性化酵素の分子量が同一であることを考え合わせると、少なくともこれまでに知られるタイプのシグナル配列は存在せずオルガネラ膜透過後のプロセッシングも受けない可能性が強い。

脂肪酸活性化酵素は、臓器の脂質代謝を大きく変動させる食餌条件下では、明らかに調節制御されていることが転写レベルで示された。肝臓では脂肪酸活性化酵素の発現調節により脂質代謝が調節されていると考えられる。

現代病として問題にされるリポ蛋白異常による動脈硬化、肥満、心筋機能の異常それにアルコール性脂肪肝などに脂肪酸活性化酵素遺伝子の調節制御が関係が深いことは充分考えられる。従って、脂肪酸活性化酵素遺伝子の発現調節因子の研究がこれらの病態の研究上重要な意義をもつ。本研究でその因子の一つとして食事が挙げられた。種々の病態と栄養との関係は従来の栄養学的見地から様々な研究がなされているが、今までに大きな伸展が得られていない。本研究は分子生物学的手法による新たな栄養学の可能性を提示したものと言えよう。

## 結 論

- (1) ラット脂肪酸活性化酵素の全一次構造が決定された。
- (2) 脂肪酸活性化酵素のアミノ酸配列中には小胞体蛋白質やミトコンドリア・マトリクス蛋白質中に存在する特異的なシグナル配列に類似する配列は見つけられなかった。
- (3) 脂肪酸活性化酵素 mRNA は、脂質代謝の活発な肝臓、心臓および副睾丸周囲脂肪組織において多く発現していることが示された。
- (4) 脂肪酸活性化酵素遺伝子発現の調節により肝臓の脂質代謝が制御されていることが明らかにされた。

The long-chain acyl-CoA synthetase  
EC 6.2.1.3

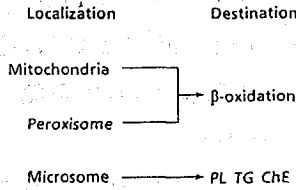
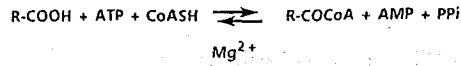


Fig.1 Function and localization of the long-chain acyl-CoA synthetase

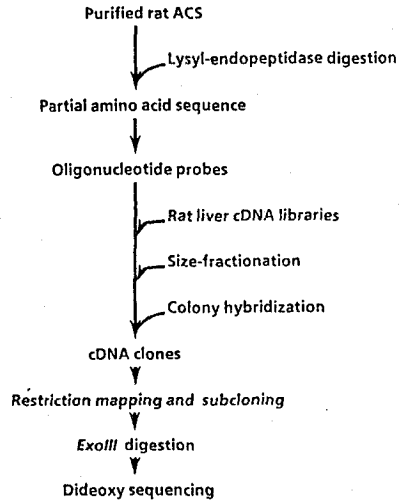


Fig.2 cDNA cloning strategy for rat acyl-CoA synthetase

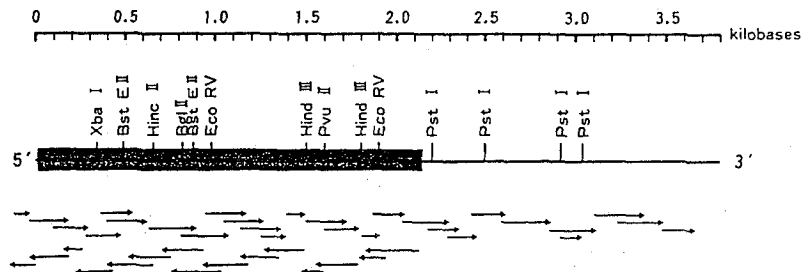


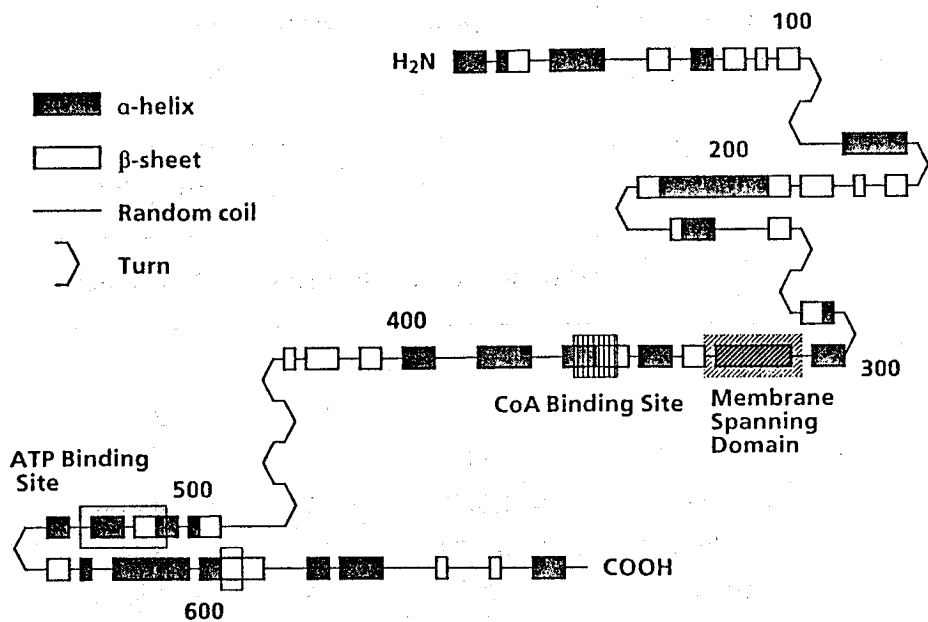
Fig.3 Restriction endonuclease map and sequencing strategy for the rat acyl-CoA synthetase cDNA



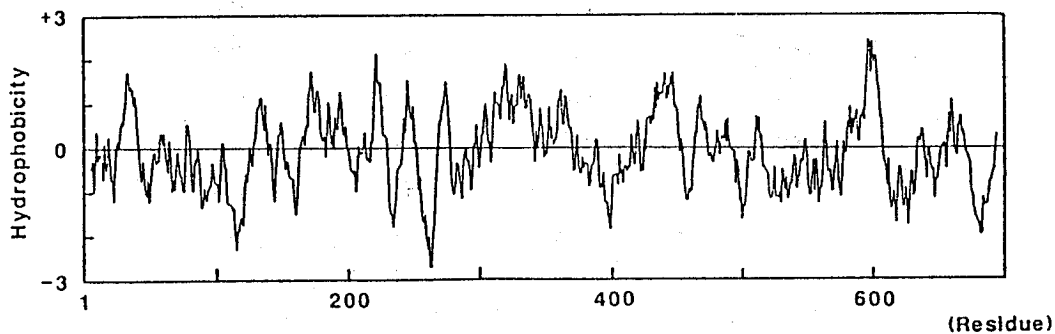
**Table 1 Amino acid,composition of rat acyl-CoA synthetase**

Amino acid	Protein analysis*		
	cDNA sequence	Microsome	Mitochondria
	<i>% mol</i>		
Ala	7.58	7.3	7.4
Cys	2.58	-	-
Asp/Asn	5.29/3.58	9.3	9.4
Glu/Gln	6.58/3.72	13.5	13.0
Phe	4.86	4.5	4.8
Gly	7.58	9.8	9.4
His	1.43	1.8	1.5
Ile	7.01	5.6	5.9
Lys	7.01	6.5	6.3
Leu	9.87	9.4	10.2
Met	2.58	2.2	2.3
Pro	5.15	4.0	4.6
Arg	4.58	4.6	4.5
Ser	4.58	6.9	6.0
Thr	5.29	5.3	5.5
Val	6.87	6.1	6.9
Trp	1.29	-	-
Tyr	3.15	3.2	2.0

\* : Tanaka et al.(1979)



**Fig.4 Predicted secondary structure of the acyl-CoA synthetase**



**Fig.5 Hydropathy profile of rat acyl-CoA synthetase**

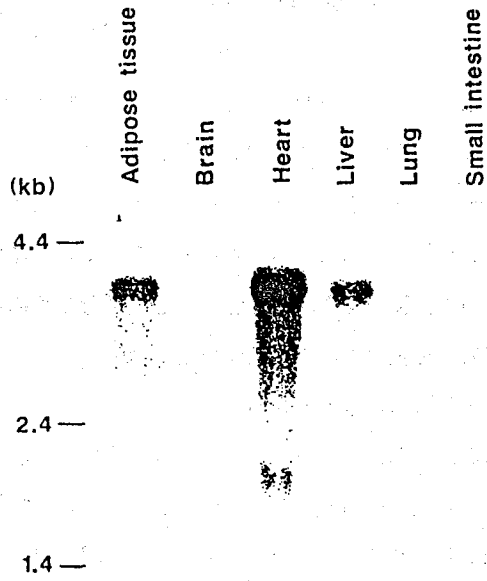


Fig.6 Hybridization of  $^{32}\text{P}$ -labeled ACS cDNA to total RNA from rat tissues

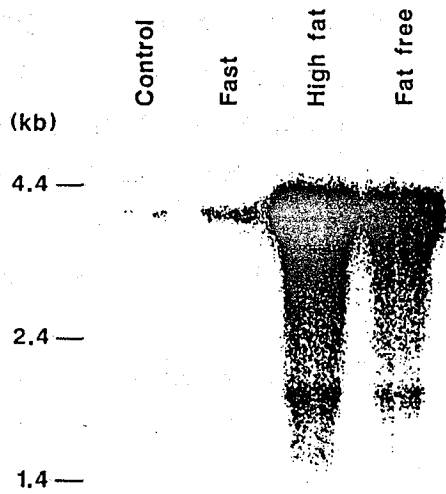


Fig.7 Hybridization of  $^{32}\text{P}$ -labeled ACS cDNA to liver total RNA from high fat or fat free diet refed rat

## 審査結果の要旨

脂肪酸活性化酵素は長鎖脂肪酸とコエンザイム A (CoA) からアシル CoA の生成を触媒する酵素であるが、アシル CoA は脂質代謝における重要な中間体である。すなわち、 $\beta$ -酸化系で脂肪酸を分解してエネルギーを産生するにも、トリグリセリドやリン脂質の合成、さらにはたんぱく質やコレステロールのアシル化反応にも関与するなど、その働きは多様である。したがって脂肪酸活性化酵素はこれら脂肪酸代謝の初発反応を触媒する重要な位置にある酵素といえる。

本研究は、本酵素の構造と機能およびその発現機構を明らかにし、この分子生物学的手法を用いて栄養学的なアプローチを試みたものである。

本研究ではまず、本酵素の cDNA クローニングにより、その塩基配列からアミノ酸の全一次構造を決定した。本酵素は ATP と CoA が基質であるので、構造の既知に知られている他の ATP 結合たんぱく質、あるいは CoA 結合たんぱく質とのホモロジー解析により ATP 結合部位、CoA 結合部位さらには本酵素の膜貫通ドメイン部位などを推定するなどの構造解析を行った。またラットの脂肪酸活性化酵素はミトコンドリア、ペルオキシゾームおよびマイクロゾームの 3 つのオルガネラに存在しており、それらは酵素化学的にもたんぱく質化学的にも全く同一であることから、細胞内たんぱく質輸送機構を解明する上でユニークな系と考えられるので、それに関与するシグナル配列の解析を行ったが、これまで知られているようなシグナル配列は見出すことができず、細胞内たんぱく質輸送機構に新たな問題点を提供した。次いで、この酵素の発現調節機構について検討した。すなわち mRNA のレベルでの本酵素発現の臓器特異性をみると、心臓、肝臓、副腎丸、周脂肪組織に強く発現しており、 $\beta$ -酸化、脂質の合成、分泌、輸送などの反映が想定された。さらに、絶食、無脂肪食、高脂肪食などの食餌条件下での mRNA レベルの検討から、食事由来の外因性の脂肪酸が本酵素遺伝子の転写を誘導していること、つまり mRNA レベルで調節制御されていることが明らかにされた。

以上のように分子生物学レベルの手法を栄養学研究に導入したことは栄養学研究に新しい可能性を与えたものである。よって農学博士の学位を授与する充分の資格があると判定した。