

氏名(本籍)	木村千春
学位の種類	薬学博士
学位記番号	薬博第 167 号
学位授与年月日	昭和62年 3月25日
学位授与の要件	学位規則第5号第1項該当
研究科専門課程	東北大学大学院薬学研究科 (博士課程)製薬化学専攻

学位論文題目	Purification and Characterization of 2,4,-Dienoyl-CoA Reductases (2,4-ジエノイル-CoAレダクターゼの 精製とその性状の解明)
--------	---

(主査)  
論文審査員 教授 山中 宏 教授 鈴木 康 男  
教授 野 副 重 男

## 論 文 内 容 要 旨

リノール酸など必須脂肪酸と呼ばれる天然不飽和脂肪酸はカルボキシル基から数えて偶数位にZ-配置の二重結合を持っている。これらの不飽和脂肪酸が生体内で $\beta$ -酸化を受けて分解されると(Z)-2-enoyl-CoAが中間に生じ、さらにこれが(R)-3-hydroxyacyl-CoA (D-(-))に移行すると考えられている。後者の3-ヒドロキシ体は3-hydroxyacyl-CoA epimeraseの作用を受けて、飽和酸 $\beta$ -酸化中間体である(S)-3-hydroxyacyl-CoA (L-(+))に変換されて、以後通常の $\beta$ -酸化系でacetyl-CoAまで分解されると言われている(Stoffel, W., *Naturwissenschaften*, 53, 621 (1966))。しかし近年Kunauらは牛肝臓ミトコンドリアにNADPHを補酵素とする新還元酵素2,4-dienoyl-CoA reductaseが存在することを見出し、この還元酵素が関与する新規な代謝経路を提唱して、従来の代謝経路の存在に否定的な見解を示した(Kunau, W.-H. & Dommes, P., *Eur. J. Biochem*, 91, 533 (1978))。本還元酵素活性は動物組織のみならず大腸菌などの微生物にも見出され、本酵素の関与する新たな代謝経路が生物界に普遍的に分布することが示唆された。

そこで著者は、不飽和脂肪酸代謝に関する研究の一環としてこの新規な還元酵素2,4-dienoyl-CoA reductaseの性状を解明すべく、微生物および動物肝より本酵素を精製しそれらの性質を明らかにした。

リノール酸などの不飽和脂肪酸を添加した培地で大腸菌を培養すると本酵素が顕著に誘導されることが既に明らかにされていた。そこでリノール酸(0.3%(w/w))を添加した肉エキス液体培地で好氣的に振盪培養した大腸菌(*E. coli* B)を対数増殖期後期に集菌して酵素源とした。予備実験により本酵素は高濃度のクエン酸を含む緩衝液中で加熱処理に対しても安定であることが見出されたので、この特徴を利用した。まず超音波処理により*E. coli* B菌体を破壊し、遠心操作(105,000 $\times$ g, 60分間)で得た上清を酵素粗抽出液とした。これにクエン酸-リン酸カリウムを加えて終濃度0.7M (pH5.5)となし、50 $^{\circ}$ Cで10分間の加熱処理を行った。変性タンパク質を遠心により除き、上清を透析後DEAE-Sepharose CL-6Bカラムに付した。次いでSephacryl S-200 Superfineを用いたゲル濾過、最後にMätrex gel red Aカラムにより精製した。

精製酵素標品はSDS-PAGE上単一のバンドを示し、またPharmacia fast protein liquid chromatographyにおいて単一のピークを与え、酵素活性も同画分に回収された。酵素粗抽出液より5%の回収率で135倍精製された酵素標品はsorboyl-CoAを基質とした時の比活性が3.5  $\mu$ mol/min/mg proteinであった(*J. Biochem.*, 92, 1671 (1982))。本酵素の分子量はSephacryl S-200を用いたゲル濾過で50,000、またSDS-PAGEで72,000であった。したがって

本酵素は単量体で酵素活性を発現すると考えられる。酵素標品の紫外-可視部吸収スペクトルにおいて365および448nmに吸収極大を示すことから、フラビンを補欠分子として持つことが判明した。本酵素を家兎に免疫して得た特異抗体は精製酵素標品と単一の沈降線を形成し、酵素粗抽出液とも上記沈降線と融合した一本の沈降線を与えた。このことより精製標品は免疫化学的にも均一であることが明らかになった。さらに大腸菌の本酵素と牛肝臓の同酵素（文献に準じて精製した）とは免疫化学的に異なることが判明した。

酵素反応の生成物を同定するため、(Z)-4-decenoyl-CoAにacyl-CoA oxidaseを作用させて得た(2E, 4Z)-2,4-decadienoyl-CoAを基質としNADPHの存在下精製酵素標品とインキュベーションした。CoAエステルをアルカリ加水分解後、脂肪酸を抽出しメチルエステルとした後GC(10%DEGS)で分析した結果、methyl (E)-2-decenoateが検出された。したがって大腸菌の2,4-dienoyl-CoA reductaseはNADPHを補酵素とし2,4-dienoyl-CoAを還元し(E)-2-enoyl-CoAを生成する反応を触媒することが明らかになった。

さらに本還元酵素が触媒する反応の立体特異性および反応機構を解明する目的で、NADPHの4位を立体選択的に重水素標識した補酵素および反応溶液中からの反応生成物への重水素の取込みを調べた。近年、不飽和脂肪酸をN-acylpyrrolidine誘導体としそのマススペクトルの開裂パターンより二重結合や重水素の位置が決定できることが見出されたので、このN-acylpyrrolidine誘導体のGC-MS分析を応用した。すなわち(2E, 4E)-2,4-decadienoyl-CoAを4R-または4S-[4-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]NADPHとH<sub>2</sub>Oの存在下大腸菌より精製した2,4-dienoyl-CoA reductaseとインキュベーション後、生成物をN-acylpyrrolidine誘導体に導きGC-MSで分析した。その結果、いずれの重水素標識NADPHからも生成物である(E)-2-decenoateへの重水素の取込みは全く認められなかった。一方、重水中で非標識NADPHを用いて同様の酵素反応を行ったところ、生成物である(E)-2-decenoateの4位と5位に重水素が1個ずつ、合わせて2個取込まれたことが判明した。大腸菌由来の本還元酵素がフラビン酵素であることを考慮すると、NADPHの4位水素は本酵素の補欠分子であるフラビンに転移し、その水素は基質へ移される前に反応溶液中の重水素と急速な変換反応を起こしたものと推定される(*J. Biochem.*, **94**, 409 (1983))。

一方牛肝臓ミトコンドリアの2,4-dienoyl-CoA reductase（文献に準じて精製した）は大腸菌の同酵素とは異なり、2,4-dienoyl-CoAを還元して3-enoyl-CoAを生成する反応を触媒することが判明した。また重水素標識NADPHおよび重水からの生成物への重水素の取込みについて、上記と同様にN-acylpyrrolidine誘導体のGC-MS分析により検討した結果、4R-[4-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]NADPHの重水素は生成物に取込まれなかったが、4S-[4-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]NADPHの重水素が生成物である3-不飽和体の5位に取込まれたことが判明した。また反応溶液中の重水素が3-不

飽和体の2位に取込まれたことを確認した。したがって牛肝臓の2,4-dienoyl-CoA reductaseはNADPHの*pro*-4S水素を立体特異的に利用し, 2,4-dienoyl-CoAの共役ジェン構造に対する水素の1,4-付加反応を触媒することが明らかとなった(*J. Biochem.*, **95**, 311 (1984))。なお牛肝臓由来の同酵素活性は(*Z*)-3-decenoyl-CoAよりも(*E*)-3-decenoyl-CoAにより強く拮抗的に阻害されることから(Ki値:  $5.7 \mu\text{M}$ ), 生成物の3位二重結合の立体配置は*E*であると推定された。また大腸菌由来の同酵素が触媒する反応において, 4*R*-[4- $^2\text{H}_1$ ]NADPHは反応速度に影響を与えなかったものの, 4*S*-[4- $^2\text{H}_1$ ]NADPHは非標識NADPHに比べ約60%の反応速度の減少を引き起こした。これは大腸菌の同酵素もNADPHの*pro*-4S水素を特異的に利用することを示唆している。

ラット肝ペルオキシゾームにも脂肪酸の $\beta$ -酸化能が局在することが発見されて以来, このオルガネラの生理的役割が見直されている。2,4-dienoyl-CoA reductaseが動物肝臓のミトコンドリアのみならずペルオキシゾームにも存在することが最近報告された(Dommes, V., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **256**, 8259 (1981))。そこで著者はペルオキシゾームにおける不飽酸代謝に興味を抱き, ラット肝ペルオキシゾームの同還元酵素の精製を行い, その性質を明らかにした。まずラット肝ペルオキシゾームの2,4-dienoyl-CoA reductaseは0.01Mリン酸カリウム(pH7.0)中でphosphocelluloseカラムに吸着されるが, ミトコンドリアのそれは同カラムに吸着されないことが判明した。これにより全肝臓抽出液から出発してペルオキシゾームの同還元酵素とミトコンドリアのそれを分離することが可能となった。0.3% clofibrate含有飼料を3週間与えたWistar系雄性ラット(12週令, 体重240-260g)の肝臓を凍結融解後, 5mM 2-mercaptoethanolを含む0.01Mリン酸カリウム(pH7.0)を加えホモジナイズし遠心して得た上清を酵素源とし, 以上順次phosphocellulose, Mätrex gel red Aおよび2',5'ADP-Sepharose 4Bカラムクロマトグラフィーによりperoxisomeの2,4-dienoyl-CoA reductaseを精製した。

本精製酵素標品はSDS-PAGEで分子量33,000の単一のバンドを示し, Sephacryl S-300 Superfineを用いたゲル濾過では分子量120,000を示した。したがって本酵素は4量体としてその活性を発現すると考えられる。種々の炭素鎖長の(*2E,4E*)-2,4-dienoyl-CoAを用いて本酵素の基質特異性を調べたところ, (*2E,4E*)-2,4-decadienoyl-CoAに対して最も高い比活性を示した( $23.5 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ )。(*2E,4E*)-2,4-hexadienoyl-CoA, (*2E,4E*)-2,4-octadienoyl-CoAおよびNADPHに対するKm値はそれぞれ15.4, 15.8および32.0  $\mu\text{M}$ であった。低い基質濃度で酵素活性が飽和に達するため2,4-decadienoyl-CoAや2,4-hexadecadienoyl-CoAに対するKm値は求められない程低かった。これらはリノール酸やアラキドン酸の $\beta$ -酸化中間体と類似構造を持つので, 本酵素の $\beta$ -酸化系への関与が示唆された(*J. Biochem.*, **96**, 1463 (1984))。なお部分精製したラット肝ミトコンドリアの同還元酵素の分子量はゲル濾過

で250,000と推定された。また同酵素(2*E*,4*E*)-2,4-octadienoyl-CoAに対し最も高い活性を現わした。これらの性質は前述のペルオキシゾーム由来の酵素の性状と異なるものであった。さらにclofibrate投与によりペルオキシゾームとミトコンドリアの同酵素は顕著に誘導され、その誘導の程度は両酵素ともほぼ同じ(約15倍)であることが明らかとなった。また対照ラット肝においてもペルオキシゾームの同酵素の活性がミトコンドリアのそれを約4倍上回っていた。これはラット肝ペルオキシゾームの2,4-dienoyl-CoA reductaseの寄与が大きいことを示唆している。

以上、著者は微生物および動物肝臓より2,4-dienoyl-CoA reductaseを精製し、その性状、とりわけ本酵素が触媒する反応の機構、を解明した。これにより本酵素が微生物から高等動物に至る生物界に広く分布することが確実となった。これまで定説となっていたStoffelらの提唱した3-hydroxyacyl-CoA epimeraseの関与する代謝経路の存在に否定的で、この2,4-dienoyl-CoA reductaseの関与する新代謝経路を支持する報告が最近あいついで出された。今後、不飽和脂肪酸の代謝地図上での両経路の軽重について議論されねばならない余地を残すと思われる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

これまで、リノール酸などの必須不飽和脂肪酸は (Z)-2-enoyl-CoA → (R)-3-hydroxyacyl-CoA → (S)-3-hydroxyacyl-CoA を経て飽和脂肪酸の β-酸化系に入り代謝分解される (Stoffelの説) と考えられていた。しかし最近、牛肝ミトコンドリア中から新たに2,4-dienoyl-CoA reductaseが見出されるに及び、不飽和脂肪酸の代謝に別の経路が存在することが提唱され、従来の定説に疑問が投げかけられつつある。

論文提出者の研究は、この生化学上の基本問題に正面から取組み、新旧2つの代謝経路の正否を判断するための確実な実験的根拠を築くことを目的とするものである。

研究はまず大腸菌中に dienoyl-CoA reductase が存在するか否かの検討から始まっている。周到な予備実験を経て大腸菌から本酵素を単離精製することに成功し、その性状を解明した。単離された reductase は電気泳動的にも免疫化学的にも単一であり、牛肝より単離された酵素とは免疫化学的に異なっているものの、2,4-dienoyl-CoA を還元する能力を持つと確認されている。従って、2,4-dienoyl-CoA reductase は微生物から高等動物に広く分布するという提出者の結論は合理的である。

次に研究は酵素反応の生成物の同定および還元反応の立体化学に進んでいる。この中で用いられた手法は有機化学的に厳密かつ妥当なものである。例えば脂肪酸のピロリジンアミドを質量スペクトルで分析し二重結合の位置や重水素標識部位を決定する方法は近年有機分析として開発されたものであるが、この方法を巧みに取り入れ酵素反応の立体化学的経路を含め、その機構を解析しているのが、以下に示す提出者に疑問の余地はない。「大腸菌由来の dienoyl-CoA reductase の場合は補酵素 NADPH の 4 位水素がまず本酵素の補欠分子であるフラビンに転位し、それが基質の還元に使われるのに対し、牛肝由来の reductase はフラビンを必要とせず、2,4-dienoyl-CoA の共役二重結合を 1,4 付加型に還元する。」

この知見は今後この領域の研究に対し、一般的な指標となる重要なものと考えられる。

従来、脂肪酸の代謝で重要視されていたオルガネラはミトコンドリアであるが、ペルオキシゾームの役割も見直され始めている。この流れに対応し、論文提出者は牛肝ペルオキシゾームについて検討し、そこからも別種の 2,4-dienoyl-CoA reductase を精製単離するとともにその性状を解明することに成功している。これにより脂肪酸代謝におけるペルオキシゾームの重要性がはっきり認識されたことになる。

以上述べたように、論文提出者は 2,4-dienoyl-CoA reductase の生物界における分布の一般性を示すと共に、還元反応の機構を解明し、これまで定説とされていた Stoffel の考え方を否定する見解に有力な論拠を与える結果を得た。実験手法も正確で技術的水準も高く、従って本論文は学位論文として水準を越えた立派な内容を持つものと判断する。