

氏名（本籍） 後藤 貴章

学位の種類 博士（薬学）

学位記番号 薬博第 256 号

学位授与年月日 平成 11 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 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）薬学専攻

学位論文題目 胆汁酸生合成における β 酸化機構に関する分析化学的研究

論文審査委員 (主査)
教授 後藤 順一 教授 安齋 順一
教授 大島 吉輝

論文内容要旨

緒言

胆汁酸の生合成、代謝は、各種肝胆道疾患と関連して重要視され、それらの機構を明らかにすることは病因を解明し、病態を解析するうえで重要とされる。胆汁酸生合成の最終ステップである肝ペルオキシソーム画分におけるC27胆汁酸の側鎖切断反応は、Zellweger 症候群、新生児型 adrenoleukodystrophy など、小児における先天性疾患との関連から注目されている。そればかりか、本化合物のC17側鎖構造は生体内異性化反応でよく知られているイブプロフェン (Ibu) など2-アシルプロピオン酸系抗炎症薬の部分構造とよく一致し、このため立体化学をも含めた本機構の解明が望まれている。しかしながら、C27胆汁酸の25位立体異性体ならびにその生合成中間体の物理化学的性質が酷似し、しかも酵素反応では微量にしか生成しないため、それらを測定することが困難であり、未だその機構解明には至っていない。そこで、安定同位元素標識基質を調製し、これを用いるトレーサー法と、立体異性体の相互分離に有利な液体クロマトグラフィー (LC) あるいはガスクロマトグラフィー (GC) と、マスペクトロメトリー (MS) とを組み合わせたハイファネーテッド測定法を用い、C27胆汁酸の側鎖切断反応の機構解明に着手した。

1. C27胆汁酸の β 酸化における24, 25位水素の脱離機構

3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-5 β -cholestan-26-oic acid (THCA) は CoA チオエステルに誘導された後、ペルオキシソームのアシル CoA オキシダーゼによって24, 25位の脱水素反応を受け 3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-5 β -cholest-24-en-26-oic acid (Δ^{24} -THCA) へと変換される。THCA には化学的に25R体と25S体二種の立体異性体が存在し、いずれからも (24E)- Δ^{24} -THCA を生成するが、その水素脱離機構の解明には至っていない。

一方、脂肪酸の脱水素反応では、重水素標識基質を用いて機構解明が試みられており、*anti*-elimination で水素脱離の進行することが明らかにされている。そこで、重水素標識体の有用性に着目し、まず基質として24, 25位に立体特異的に重水素を導入した THCA を合成した。コール酸より数工程で製した (24E)- Δ^{24} -THCA を重水素化ジイミドを用いる還元反応に付し (24R, 25R)- および (24S, 25S)-[24, 25- 2 H $_2$]-THCA を調製した。ついで、これらを基質とし、ラット肝軽ミトコンドリア画分とインキュベート後、胆汁酸をペンタフルオロベンジル (PFB) エステル-ジメチルエチルシリル (DMES) エーテルに誘導し、[M-PFB] $^-$ をモニタリングイオンとする GC/SIM にて生成する Δ^{24} 体の重水素保持率を測定した。その結果、25R体では5%、一方、25S体では92%の24位重水素が保持されており、いずれも pro-R の水素が立体特異的に脱離していることが判明した。このことから、THCA の24, 25位脱水素反応において、25R体は *syn*-elimination で、他方、25S体は脂肪酸の場合と同様 *anti*-elimination で反応が進行し、両異性体間で水素脱離機構の異なることが明らかとなった。

2. C27胆汁酸の25位異性化反応

THCA の17位アルキル側鎖と部分構造の類似する 2-アシルプロピオン酸系抗炎症薬では、その CoA チオエステルが生体内でキラル変換することが知られている。一方、THCA から Δ^{24} 体への変換では、CoA チオエステルが酵素反応の基質分子となる。このため前述の24, 25位水素脱離機構の相違が、中間体として生成する THCA CoA チオエステルの異性化に起因することが推測された。そこで、GC/MS と LC/MS とを組み合わせてラット肝ペルオキシソーム画分における THCA の異性化反応に検討を加えた。

まず、基質として (25*R*)-および (25*S*)-THCA CoA チオエステルを混合酸無水物法により合成した。本化合物は分子内に解離能に優れる複数のリン酸基を持っており、分子構造を反映する特徴的なイオン生成が期待されるエレクトロスプレーイオン化 (ESI)-MS 分析に付した。その結果、ドリフト電圧を -30 V に設定する時、 m/z 599 に $[M-2H]^{2-}$ が、一方、 -90 V では m/z 1198 に分子量に相当する一価イオン $[M-H]^-$ が相対強度の強いイオンピークとして認められ、その構造がよく支持された。

ついで、(25*R*)-または (25*S*)-THCA CoA チオエステルを用い異性化反応に検討を加えた。すなわち、 $15 \mu\text{M}$ FAD 存在下 100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) 中、 $100 \mu\text{g}$ のラット肝ペルオキシソーム画分とインキュベートし、経時的に反応液の一部をとり、これに内標準物質として $[3, 7, 12-^{18}\text{O}_3]$ コール酸を加え、アルカリ加水分解後、塩酸酸性下酢酸エチルエステルで胆汁酸を抽出した。その一部を PFB エステル-DMES エーテルに誘導し、GC/SIM 分析に付し、 Δ^{24} -THCA の生成量を測定するとともに、他の一部を $[M-H]^-$ をモニタリングイオンとする LC/大気圧化学イオン化 (APCI)-SIM 分析に付し、残存する (25*R*)-ならびに (25*S*)-THCA 量を測定した。その結果、いずれの異性体においても Δ^{24} -THCA の生成は反応開始30分まで直線的に増大し、異性体間の変換速度に明確な差は認められなかった。これに対して、異性体比は反応開始5分後にはほぼ 1 : 1 に変化しており、いずれの基質においても異性化が素早く進行していることが判った。因みに、本異性化反応の速度は酵素蛋白量に依存して増大し、加熱処理条件では異性化は全く認められなかった。ついで本異性化の様相を詳細に検討すべく、限定したペルオキシソーム画分を用いて経時変化を追跡した。その結果、反応開始直後より異性化が認められ、30分までにほぼ平衡に達し、しかも、その比がわずかながら *R* 体に片寄った傾向を示した。以上の結果、(25*R*)-および (25*S*)-THCA CoA チオエステルは、いずれもがペルオキシソーム画分において酵素的に異性化されることが判明した。

本異性化の様相は、すでに報告されている Ibu CoA チオエステルの異性化と酷似しており、これらの異性化反応が同一の酵素によって触媒されていることも推測された。そこで、THCA CoA チオエステルの異性化反応に対する Ibu CoA チオエステルの影響を吟味した。すなわち、各種濃度の (*R*)-または (*S*)-Ibu CoA チオエステル存在下、(25*R*)-あるいは (25*S*)-THCA CoA チオエステルを先と同一条件下、ペルオキシソーム画分とインキュベートし、25位立体異性体比を測定した。その結果、(25*R*)-および (25*S*)-THCA CoA チオエステルいずれにおいても、Ibu CoA チオエステル濃度の増大とともに異性化が抑制され、モル比20のとき65~75%の阻害率に達した。さらに、モル比30の (*R*)-または (*S*)-Ibu CoA チオエステルを添加し Δ^{24} -THCA の生成量を測定したところ、25*R* 体からの Δ^{24} -THCA の生成が25*S* 体

に比し約 1/10 に低下した。この結果、THCA CoA チオエステルの 24, 25 位脱水素反応では 25S 体がアシル CoA オキシダーゼの基質となることが示唆された。

3. C27 胆汁酸 24, 25 位脱水素反応における基質選択性

脱水素反応の基質選択性を精緻に解析するには異性化酵素の混入していないアシル CoA オキシダーゼが必須となる。そこでまず、既報に準じアシル CoA オキシダーゼを精製した。得られた精製酵素は比活性が軽ミトコンドリア画分の約 130 倍高い価を示すとともに、異性化酵素活性がきわめて低く、脱水素反応の基質選択性を明らかにする上で酵素源として十分使用しうるものであった。ひきつづき本酵素を用い、¹⁸O 標識 THCA CoA チオエステルと非標識体の 1 : 1 混合物を用いるトレーサー法と LC/MS とを組み合わせ、アシル CoA オキシダーゼの基質選択性に検討を加えた。すなわち、(25R)-THCA CoA チオエステルと (25S)-[3, 7, 12-¹⁸O₃]-THCA CoA チオエステルをそれぞれ単独、あるいは 1 : 1 に混合後、精製酵素とインキュベートし、 Δ^{24} 体の生成量を LC/APCI-MS にて経時的に測定した。その結果、いずれの基質を用いても 25S 体からの Δ^{24} 体の生成が時間とともに増大し、25R 体からの Δ^{24} -THCA の生成は認められなかった。また、標識体と非標識体の関係を逆にした場合も同様の結果が得られた。以上の結果、THCA CoA チオエステルの 24, 25 位脱水素反応では、25S 体が基質となることが判明した。

結 語

本研究において、1) THCA CoA チオエステルの 24, 25 位脱水素反応では、24 pro-R の水素が立体選択的に脱離して (24E)- Δ^{24} -THCA CoA チオエステルを生成する、2) THCA CoA チオエステルがペルオキシソーム画分において 25R および 25S 体いずれもが酵素的に異性化反応を受ける、さらに 3) アシル CoA オキシダーゼは 25S 体に基質選択性を示すことを明らかにした。これらの結果は、25 位立体異性化が胆汁酸生成においてきわめて重要な反応であることを示したものであり、胆汁酸生成機構に新たな知見を加えることができた。

審査結果の要旨

胆汁酸生合成の最終ステップである $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -trihydroxy- 5β -cholestan-26-oic acid (THCA) の側鎖切断反応は、肝ペルオキシソーム画分の β -酸化系酵素により営まれている。本研究は、25位に不斉中心を持つ THCA より一次胆汁酸であるコール酸生合成過程における立体化学に検討を加え、以下の新しい事実を明らかにしたものである。

まず、側鎖切断の初発反応であるアシル CoA オキシダーゼによる脱水素反応時の24位の水素脱離機構の様相に吟味を加えた。シス付加で反応の進行するジイミド還元により24, 25位に選択的に重水素を導入した25*R*- および25*S*-THCA を合成した。次いで、これを基質として用い、反応生成物である Δ^{24} -THCA 中の重水素の保持率を負イオン検出 GC/NICI-MS にて測定し、いずれの基質からも *pro-R* の水素が立体特異的に脱離され、25*R* 体では *syn*-elimination で、また25*S* 体では *anti*-elimination で反応の進行することを証明した。

すでに THCA の側鎖と類似の構造を持つ 2-アシルプロピオン酸系抗炎症薬では、酵素的に異性化されることが知られており、脱水素機構の違いは、こうした異性化の結果とも考えられる。そこで、25*R*- および25*S*-THCA CoA チオエステルを新たに調製するとともに、キラル分離と選択的検出に優れる LC/APCI-MS を用いた高感度測定システムを構築して、ラット肝ペルオキシソーム画分における THCA CoA チオエステルの異性化反応に検討を加え、25*R* 体、25*S* 体いずれもが極めて早く酵素的に異性化されることを実証した。

引き続き、2-アシルプロピオン酸系抗炎症薬イブプロフェン (Ibu) CoA チオエステルを調製し、THCA の異性化に対する影響を精査した。その結果、Ibu CoA チオエステルの添加量の増大に伴って THCA CoA チオエステルの異性化の割合の減少することが判明した。そこで、30倍モル量の Ibu CoA チオエステルを共存させ、異性化反応を抑制させた条件下で、25*R*- および25*S*-THCA をペルオキシソームとインキュベートし、 Δ^{24} -THCA への変換量を測定したところ、25*R* 体からの変換量のみが大きく減少することが判った。このことは、25*S*-THCA がアシル CoA オキシダーゼの特異的基質であることを示唆している。

そこで、ステロイド核上 3, 7, 12位に重酸素を標識した25*R*, 25*S*-THCA を合成し、これらをそれぞれ非標識の25位異性体と 1 : 1 に混合後、エピメラーゼ活性を除いた精製酵素とインキュベートし、 Δ^{24} -THCA の生成量を LC/APCI-MS にて経時的に測定し、25*S* 体からのみ Δ^{24} 体の生成することを明らかにした。

以上、本研究はこれまで明らかにされていなかった胆汁酸生合成過程における側鎖切断反応の立体化学に吟味を加え、コレステロールより生成した25*R*-THCA が CoA チオエステルに変換された後、酵素的に25*S* 体に異性化され、これがペルオキシソーム画分のアシル CoA オキシダーゼの基質となって24*E* 型の Δ^{24} -THCA に誘導されることを初めて証明したものであり、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。