



## 論文内容要旨

不飽和脂肪酸の $\beta$ 酸化には、飽和脂肪酸の $\beta$ 酸化に必要な4種類の酵素の他に3-enoyl-CoA isomerase及び3-hydroxyacyl-CoA epimeraseの2種類の酵素が必要であるとされてきた。しかし、近年、偶数位に二重結合をもつ不飽和脂肪酸の $\beta$ 酸化には、2,4-dienoyl-CoA reductaseが必須の酵素であることが示されている。本酵素は、大腸菌から高等生物にいたるまでその存在が知られているが、ラット肝臓においては、ミトコンドリアの他に、ペルオキシゾームにも存在するとされている。しかし、これら両オルガネラにおける本酵素の異同については未だ明らかにされていない。また、ラット肝臓において、本酵素は、クロフィプレートやジエチルヘキシルフタレートなどのペルオキシゾーム増殖剤の投与により、著しく誘導されることが明らかにされている。そこで、著者は、(1)ラット肝臓より本酵素を精製し、それに対する抗体を作製し、この抗体を用いて細胞内局在性の検討を加え、更に、(2)cDNAのクローニングを行い、分子生物学的検討を加えた。

### (1) ラット肝臓2,4-dienoyl-CoA reductaseの細胞内局在性

ラット肝臓ミトコンドリア画分をショ糖密度遠心分画により再分画すると、2,4-dienoyl-CoA reductaseは、ペルオキシゾームよりもミトコンドリアにおいてより高い活性を示した。両画分を用いたウエスタンブロッティングでも、著者が調製した抗体は、ミトコンドリアの蛋白とより強く反応した。クロフィプレート処理ラット肝臓においても同様の結果が得られた。これらの結果は、著者が精製した酵素がミトコンドリア由来のものであること、クロフィプレートによる誘導は主にミトコンドリア由来の本酵素の誘導によることを示し、免疫電顕にて得られた結果<sup>\*)</sup>とよく一致していた。しかし、免疫電顕でも示されたように、イムノブロッティングの結果、本酵素に対する抗体はペルオキシゾームに存在する蛋白とミトコンドリアと同様に反応した。さらに、ペルオキシゾームの2,4-dienoyl-CoA reductase活性もミトコンドリアのそれと同様に完全に免疫沈降することが示された。これらの免疫沈降反応は、cDNAクローンをを用いて発現させた融合蛋白を用いて部分精製を行った抗体を使用していた場合にも全く同様に認められた。

### (2) 2,4-dienoyl-CoA reductaseのcDNAクローニングおよびその解析

cDNAは、ペルオキシゾーム増殖剤であるジエチルヘキシルフタレート投与ラットの肝臓のmRNAより調製し、ベクターとして、 $\lambda$ gt11及び $\lambda$ gt10を用いて単離した。得られた中で最も長いクローンは約1,100bpのcDNAインサートを持ち、1,005bpのオープンリーディングフレームの存在が確認された。これは、331アミノ酸残基よりなる分子量36,000のポリペプチドに相当した。Hybrid Selected Cell-free Translation実験で、本酵素は分子量約36,000のポリペプチドとして

翻訳されることより、全翻訳領域を含むcDNAクローンを得たことが示された。また、精製酵素のN末端アミノ酸配列と、cDNA塩基配列から予想されるアミノ酸配列との比較から、成熟酵素は305アミノ酸残基よりなる分子量約33,000のポリペプチドであることが示された。以上の結果より、本酵素がN末端に分子量約3,000の延長ペプチドを持った前駆体タンパク質として生合成されることが証明された。このN末伸長ペプチドは、多くのミトコンドリアのシグナルペプチドにみられる両親媒性構造をとり得ることが予想された。この事実により、得られたcDNAクローンは、ミトコンドリアの酵素に対するものであることが示唆された。しかし、ペルオキシゾーム酵素は、C末端側にシグナル配列を持つと考えられており、2,4-dienoyl-CoA reductaseの局在化機構は今後の課題である。

ノーザンブロッティングにより、本酵素に対するmRNAの大きさは、約1.2-1.3kbであることが示され、full-lengthに近いcDNAクローンが得られたことになる。また、このmRNAの量は、ペルオキシゾーム増殖剤の投与により著しく増加することが明らかとなった。更に、ラット肝臓のgenomic DNAを用いたサザンブロッティングでは、本酵素にたいする遺伝子は、1コピーであることが示され、1つの遺伝子よりミトコンドリアとペルオキシゾームの両方の酵素がつくられる可能性が示された。

以上の結果により、ミトコンドリアとペルオキシゾームの2,4-dienoyl-CoA reductaseが、免疫学的、遺伝学的に非常に類似した酵素であるが、その大部分は、ミトコンドリアに存在しペルオキシゾーム増殖剤投与による誘導調節を受けていることが判明した。

\*) S. Yokota, A. Hirose and M. Mizugaki; *Histochem. J.* 20, 679-687 (1988)

## 審査結果の要旨

偶数位に二重結合を持つ不飽和脂肪酸の $\beta$ 酸化には、従来提唱されてきた水酸基のエピメリ化を伴う経路のほかに、NADPHを電子供与体とする2,4-dienoyl-CoA reductaseの関与する経路が存在することが報告されている。本酵素は大腸菌から高等動物に至るまで広く存在し、ラット肝臓においてはミトコンドリア (Mt) のほかにペルオキシゾーム (Per) にも存在するとされている。しかし両オルガネラにおける本酵素の異同や性状の詳細は未だ明らかにされていない。

本研究では、まずラット肝臓より本酵素を精製し、これに対するポリクローナル抗体を作製した。この抗体を用いて細胞内局在性について検討を加えた。すなわち、ラット肝臓Mt画分をショ糖密度勾配法により再分画すると、本酵素はPerよりもMtにおいて高い活性を示した。両画分を用いたウェスタンブロットティングでも、この抗体はMt蛋白とより強く反応し、Per増殖剤とされているクロフィブレートで処理した肝臓を用いても同様の結果を得た。これにより、精製した酵素がMt由来のものであること、及びクロフィブレート処理によりMt由来の本酵素が誘導をうけることを確認した。さらに免疫電顕やイムノブロットティングの結果、本酵素に対する抗体はPer蛋白とも反応することを確認しPerの2,4-dienoyl-CoA reductase活性がこの抗体によりMtのそれと同様に完全に免疫沈降することを確認した。

つぎに、本酵素のcDNAのクローニングを行い分子生物学的検討を加えている。なお、cDNAはPer増殖剤投与ラット肝臓のmRNAより調製し、 $\lambda$ gt11及び $\lambda$ gt10をベクターとして用いて単離した。得られた中で最も長いクローンは約1100bpのcDNAインサートを持ち、1005bpのオープンリーディングフレームの存在が確認された。これは331アミノ酸残基よりなる分子量36,000のポリペプチドに相当するが、hybrid selected cell-free translation実験では本酵素が分子量36,000のものとして翻訳されることから全翻訳領域を含むcDNAのクローンが得られたことになる。また成熟酵素は305のアミノ酸残基よりなる分子量33,000のポリペプチドであることを確認したので、本酵素はN末端に分子量約3,000の延長ペプチドを持つ前駆体蛋白として生合成されることを証明した。さらに、ノーザンブロットティング及びサザンブロットティングの結果、本酵素に対する遺伝子は1つであることが判明した。このことや、免疫沈降反応の結果より、1つの遺伝子が両オルガネラに局在する酵素をコードしているものと考えられる。これには、両オルガネラへのターゲッティング機構を検討する際に良い指標となるものである。

以上のように、本論文は、2,4-dienoyl-CoA reductaseに関する数々の新知見を含んでおり、十分学位授与に値するものと考えられる。