

氏名・(本籍)	いし 石	い 井	こう 康	いち 一
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	理博第	915	号	
学位授与年月日	昭和60年3月26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	東北大学大学院理学研究科 (博士課程) 化学専攻			
学位論文題目	Studies on Polyprenyltransferases of pig Liver Mitochondria and <i>Paracoccus denitrificans</i> (ブタ肝臓ミトコンドリアおよび <i>Paracoccus denitrificans</i> のポリプレニルトランスフェラーゼに関する研究)			
論文審査委員	(主査) 教授 小倉 協三      教授 田宮 信雄 教授 高瀬 嘉平			

## 論 文 目 次

### INTRODUCTION

#### Chapter I Prenyltransferases of Animal Liver Mitochondria

Section 1. Prenyltransferase activities of Guinea Pig Liver Mitochondria

Section 2. Decaprenyl Pyrophosphate Synthetase of Mitochondria from Pig Liver

#### Chapter II Prenyltransferases of *Paracoccus denitrificans*

Section 1. Prenyltransferase Activities of *Paracoccus denitrificans*

Section 2. *E*-Decaprenyl Pyrophosphate Synthetase

Section 3. *Z*-Nonaprenyl Pyrophosphate Synthetase

Section 4. Farnesyl Pyrophosphate Synthetase

Section 5. Total Discussion

SUMMARY

REFERENCES

ACKNOWLEDGMENT

# 論文内容要旨

## 序論

多様な構造と機能を有するイソプレノイド化合物は、すべてイソペンテニルピロリン酸 (IPP, C<sub>5</sub>) とアリル性プレニルピロリン酸との縮合反応により生ずるプレニルピロリン酸を経て生合成される。この C<sub>5</sub> 単位ごとの鎖延長反応の触媒機能を持つ酵素を総称してプレニルトランスフェラーゼと呼ぶ。プレニルトランスフェラーゼは生成物のプレニルピロリン酸の鎖長と立体化学により三種類に大別できる。一つは短鎖プレニルトランスフェラーゼで、ジメチルアリルピロリン酸 (DMAPP, C<sub>5</sub>) を縮合開始基質とし、ゲラニルピロリン酸 (GPP, C<sub>10</sub>)、*E,E*-ファルネシルピロリン酸 (*E,E*-FPP, C<sub>15</sub>) あるいは全 *E*-ゲラニルゲラニルピロリン酸 (全 *E*-GGPP, C<sub>20</sub>) を生成する酵素が知られている。生成物のプレニルピロリン酸は、テルペノイド、ステロイド、カロチノイド等の前駆体であると共に、以下の二種類の酵素の縮合開始基質ともなる。より長鎖のプレニルピロリン酸を生成する酵素には、*E*-縮合を行う酵素と *Z*-縮合を行う酵素があり、各々 *E*-ポリプレニルトランスフェラーゼと *Z*-ポリプレニルトランスフェラーゼと呼ばれる。生成物の全 *E*-ポリプレニルピロリン酸はプレニルキノン側鎖として機能し、*Z,E*-混合-ポリプレニルピロリン酸は、糖担体脂質の前駆体である。プレニルキノンは電子伝達系の、また糖担体脂質は糖蛋白質や細菌細胞壁の生合成における必須因子として、重要な化合物である。ポリプレニルトランスフェラーゼに関しては、その生成物の重要性にも拘わらず、未だに不明な点が多く残されている。特に、高等動物のポリプレニル化合物の生合成に関しては、その細胞内分布も含めて、ほとんど解明されていない。また、ユビキノンを持つグラム陰性細菌のプレニルトランスフェラーゼは分離されておらず、メナキノンを持つグラム陽性細菌のそれとの比較に興味を持たれている。さらに、ヒトのプレニルキノンでもあるユビキノ-10 の側鎖の生合成に関与するデカプレニルピロリン酸 (C<sub>50</sub>PP) 合成酵素は未だに分離されていない。そこで、C<sub>50</sub>PP 合成酵素の分離、および諸性質の検討、さらに先に述べた点の解明を目的として、ユビキノ-10 を持つブタ肝臓ミトコンドリアとグラム陰性菌 *Paracoccus denitrificans* を用いて研究を行った。この細菌は、ユビキノ-10 を持つだけでなく、その他の電子伝達系の構成が、ミトコンドリアのそれと極めて類似しており、ミトコンドリアの起源との関連から興味を持たれている。

## 第1章 動物肝臓ミトコンドリアのプレニルトランスフェラーゼ

### 第1節 モルモット肝臓ミトコンドリアのプレニルトランスフェラーゼ活性

ミトコンドリアのポリプレニルトランスフェラーゼ活性は非常に弱いことが予想された。そこで、ユビキノ-10 を持つモルモットの新鮮な肝臓から調整したミトコンドリアを用いて C<sub>50</sub>PP 合成活性を追求した。その結果、共存する FPP 合成酵素と IPP 異性化酵素の活性に比べ著しく低いながらも、C<sub>50</sub>PP 合成酵素活性を見出した。さらに、これらの酵素はミトコンドリア

を低張液中で凍結融解処理することにより可溶化された。

## 第2節 ブタ肝臓ミトコンドリアのデカプレニルピロリン酸合成酵素

前節で得た知見を基にしてブタ肝臓を用いてミトコンドリアの C<sub>50</sub>PP 合成酵素の分離と精製を試みた。ミトコンドリアから可溶化した画分の 0—50% 硫酸画分に対して、セファデックス G-100、ハイドロキシアパタイトおよび DEAE セルロースのカラムクロマトグラフィーを行なった。その結果、FPP 合成酵素、GGPP 合成酵素、そして新しい酵素である C<sub>50</sub>PP 合成酵素を部分精製することができた。C<sub>50</sub>PP 合成酵素と GGPP 合成酵素の活性は、FPP 合成酵素活性に比べて著しく低かった。この C<sub>50</sub>PP 合成酵素は DMAPP を縮合開始基質とせず、*E,E*-FPP に対し最も高い触媒活性を示した。また、同酵素の至適 pH は 6.8—7.3 であった。活性発現に Mg<sup>2+</sup> を必要とするが、界面活性剤は阻害的に働いた。本酵素は C<sub>15</sub> から C<sub>50</sub> までの鎖延長反応を行ない、ユビキノン-10 側鎖を供給すると考えられる (Figure 1)。

## 第2章 *Paracoccus denitrificans* のプレニルトランスフェラーゼ

### 第1節 *Paracoccus denitrificans* のプレニルトランスフェラーゼ活性

超音波処理後の菌体懸濁液を 95,500g 遠心により、上清画分と沈澱画分に分離し、両画分のプレニルトランスフェラーゼ活性を測定した。アリル性基質として DMAPP と *E,E*-FPP を用いたいずれの場合にも、反応溶液中のトリトン X-100 の有無に拘らず、大部分の酵素活性は上清画分に見い出された。酵素反応生成物を分析したところ、*E,E*-C<sub>15</sub> と *Z,E*-混合-C<sub>45</sub> のプレニル化合物が生成していた。トリトン X-100 存在下での酵素反応では、これらに加え、全-*E*-C<sub>50</sub> と *Z,E*-混合-C<sub>50</sub> から C<sub>40</sub> のプレニル化合物が生成した。そこで、上清画分を用いて各生成物を与えるプレニルトランスフェラーゼの分離精製を試みた。

### 第2節 *E*-デカプレニルピロリン酸合成酵素

上清画分を 0—60% 硫酸画分後、DEAE セルロース、ハイドロキシアパタイト、セファデックス G-100 のカラムクロマトグラフィーを行なうことにより、ポリプレニルトランスフェラーゼを分離精製した。同酵素による反応生成物は、全-*E*-C<sub>50</sub>PP であることを TLC, HPLC, および質量分析により確認した。DMAPP は基質とならず、GPP, *E,E*-FPP, 全-*E*-GGPP は高い反応性を示した。中でも *E,E*-FPP に対する  $K_m$  値は 0.06  $\mu$ M であり、GPP (5.0  $\mu$ M) や全-*E*-GGPP (2.9  $\mu$ M) に対するそれらより著しく低かった。この結果は、本酵素の真の基質が *E,E*-FPP であることを示している。また、この *E*-C<sub>50</sub>PP 合成酵素は、活性発現に Mg<sup>2+</sup> とトリトン X-100 を必須とし、K<sup>+</sup> や NH<sub>4</sub><sup>+</sup> などの一価カチオンは酵素活性を上昇させた。本酵素の分子量は約 60,000、至適 pH は 7.3 であった。

### 第3節 Z-ノナプレニルピロリン酸合成酵素

0-60%硫酸画分のハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーを、20%グリセロールを含む溶出液を用いて3回行なうことにより、Z-ポリプレニルトランスフェラーゼを他のプレニルトランスフェラーゼから分離した。本酵素はIPPのE,E-FPPへの連続したZ-縮合の触媒活性を有し、生成物の最大鎖長はC<sub>45</sub>であることが明らかとなった。そこで、この新しい酵素をZ-ノナプレニルピロリン酸(Z-C<sub>45</sub>PP)合成酵素と命名した。種々のアリル性基質に対する触媒活性を調べたところ、E,E-FPP、Z,E,E-GGPP、Z,Z,E,E-ペンタプレニルピロリン酸(C<sub>25</sub>PP)は、高い反応性を示した。活性発現にはMg<sup>2+</sup>あるいはMn<sup>2+</sup>と、トリトンX-100の添加を必要とした。酵素反応生成物の鎖長分布は、反応溶液中のMg<sup>2+</sup>とトリトンX-100濃度により著しく変化した。しかし、試みたいかなる反応条件でも生成物の最大鎖長はC<sub>45</sub>を越えなかった。また、0.01%のトリトンX-100濃度で行った酵素反応と、菌体からの粗抽出液を酵素として用い、界面活性剤を加えずに行なった酵素反応では、Z,E-混合-C<sub>45</sub>PPがほとんど唯一の生成物であった。これらの結果は、菌体内での酵素反応生成物がZ,E-混合C<sub>45</sub>PPであるこのを示唆している。一価カチオンやSH試薬の添加は酵素活性にほとんど影響を与えなかった。

### 第4節 ファルネシルピロリン酸合成酵素

FPP合成酵素をハイドロキシアパタイト、DEAEセルロース、セファデックスG-100のカラムクロマトグラフィーにより分離精製した。本酵素は、IPPとDMAPPあるいはGPPからのE,E-FPPの生合成反応の触媒活性を有していた。DMAPPとGPPに対するK<sub>m</sub>値はいずれも3μMであった。酵素活性の発現には、Mg<sup>2+</sup>を必要としたが、界面活性剤、一価カチオン、SH試薬は酵素活性にあまり影響しなかった。また、本酵素の至適pHは7.8-8.5、分子量は約48,000であった。

### 第5節 総合考察

*P. denitrificans* から分離した三種類のプレニルトランスフェラーゼの相互関係と生理的役割について考察し、さらに他の細菌から分離されているプレニルトランスフェラーゼと比較検討した。

E-C<sub>50</sub>PP合成酵素は、ユビキノン-10側鎖を供給していると考えられる。他の細菌の糖担体脂質として知られているZ,E-混合-C<sub>55</sub>プレニル化合物の合成能が本細菌には欠けているため、Z,E-混合-C<sub>45</sub>プレニル化合物が本細菌の細胞壁生合成に関与していると思われる。Z-C<sub>45</sub>PP合成酵素はこの糖担体脂質を供給する役割を担っている。FPP合成酵素は、先の二種類の酵素に縮合開始基質を供給していると考えられる(Figure 2)。本細菌のプレニルトランスフェラーゼには、他の細菌のそれらに見られなかったいくつかの特徴がある。中でも、E-C<sub>50</sub>PP合成酵素が膜結合性酵素としての性質を示したことと、Z-ポリプレニルトランスフェラーゼの生成物がZ,E-混合-C<sub>45</sub>PPであることは、興味深い点である。

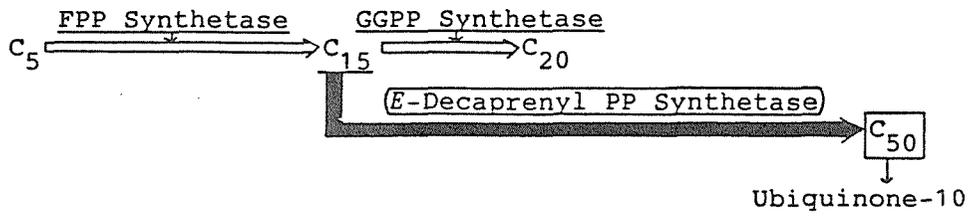


Figure 1. Prenyltransferase system of pig liver mitochondria.

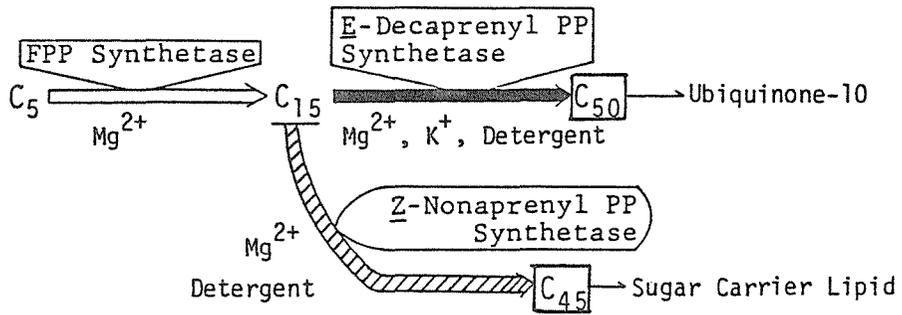


Figure 2. Prenyltransferase system of *Paracoccus denitrificans*.

## 論文審査の結果の要旨

本論文は高等動物ミトコンドリアと細菌の一種である *Paracoccus denitrificans* のポリプレニルトランスフェラーゼの研究に関するものである。

イソプレノイドの生合成における鎖延長の触媒となる酵素はプレニルトランスフェラーゼと呼ばれ、10種類近くのもの知られているが、高等動物にとって重要なイソプレノイドであるユビキノン-10の全トランス-デカプレニル鎖の合成を司る酵素は未だ分離されていなかった。著者はこの点に着目して、ユビキノン-10の合成能をもつモルモットおよびブタ肝臓のミトコンドリアを材料として、この酵素の探索、分離を試みた。その結果、*E*-デカプレニルピロリン酸合成酵素の分離にはじめて成功した。この酵素は活性が弱く、不安定であるため、分離は困難であったが、種々の条件を工夫して、これを部分的に精製し、諸性質を明らかにすることができた。

著者はまた特殊な細菌、*Paracoccus denitrificans* がユビキノン-10の合成能をもつことに着目して、この細菌のプレニルトランスフェラーゼ類を研究し、*E*-デカプレニルピロリン酸合成酵素を分離、精製した。著者はこの酵素の基質特異性を詳細に調べ、この酵素反応のプライマーとなる最短鎖基質はゲラニルピロリン酸であるが、細胞内での真のプライマーはファルネシルピロリン酸であることなどを示したほか、この酵素は他の細菌から得られているポリプレニルトランスフェラーゼとは異なり、活性発現に界面活性剤が必要であることなどの諸性質を明らかにした。また、著者はこの特殊な細菌から新しい機能をもつプレニルトランスフェラーゼを見いだした。この酵素は *E*-ファルネシルピロリン酸をプライマーとして6分子のイソペンテニルピロリン酸をシス型に縮合させて、 $C_{45}$  の *Z,E*-混合型の生成物を与えるものであることを証明し、これを *Z*-ノナプレニルピロリン酸合成酵素と命名した。

さらに、著者は同細菌から分離したファルネシルピロリン酸合成酵素を含めた3種類のプレニルトランスフェラーゼについて、反応の立体化学や生成物の鎖長に及ぼす反応条件の影響なども研究した。

最後に、これら3つの酵素からなる *P. denitrificans* のイソプレノイド鎖延長系を枯草菌のそれと比較して、この鎖延長系の特殊性を論じ、また動物ミトコンドリアのそれとも比較した。

これらの研究成果はイソプレノイド生合成に関する重要な知見を加えるものであり、著者が自立して研究活動を行なうに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。

よって石井康一提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。