

## 線虫 II 型チオラーゼの構造と機能\*

前掲 元宏

広島大学大学院生物圏科学研究科

### Structure and function of type-II thiolase from the nematode *Caenorhabditis elegans*

Motohiro MAEBUCHI

*Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University,  
Higashi-Hiroshima 739-8521, Japan*

#### 要 旨

#### 第 1 章 序 論

漿中のリポタンパク質群とは異なり、細胞質内にあつて脂質と結合し、これらを移送または運搬する低分子量のタンパク質群が存在する。ステロール運搬タンパク質-2 (SCP2) はその一つであり、試験管内でリン脂質やステロール類の移送を促進する可溶性因子として見出された。当初は細胞質のタンパク質と信じられていたが、後にその大部分はペルオキシソームのマトリクスに局在することが判明した。哺乳類のペルオキシソームには、SCP2 とは別に、完全なSCP2 配列をC-末端にもつタンパク質 (SCPx) も存在する。SCPxのN-末側約400残基は3-オキソアシル-CoAチオラーゼの活性をもつ。一方、最近までSCP2は哺乳類、鳥類および*Candida*属酵母にしか知られていなかったため、ペルオキシソームに局在するSCP2の普遍的な役割を理解するために、他種生物のSCP2が探索された。その過程で、線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の部分的cDNAの中にSCPxに類似の配列をコードするものが見出された。しかし、この配列から推定されるタンパク質のC-末端には、SCP2様の配列が認められなかった。本研究の目的は、このタンパク質をコードする完全なcDNAを単離し、この線虫タンパク質の構造と機能を明らかにすることである。

#### 第 2 章 線虫SCPx類似タンパク質の特徴

線虫のSCPx類似タンパク質をコードする完全長cDNAを単離した結果、このタンパク質の分子量が44kDaと計算されたので、これをP-44と名付けた。P-44のC-末端には確かにSCP2相当配列が存

---

広島大学総合科学部紀要IV理系編、第26巻 (2000)

\*広島大学審査学位論文

口頭発表日：2000年2月8日、学位取得日：2000年3月8日

在しない。P-44の遺伝子がSCP 2配列をコードするエクソンを含み、別途のスプライシングによって、SCP 2配列を含むタンパク質が発現される可能性は、mRNAのノザン法による解析とゲノムDNAの解析とによって排除された。P-44のアミノ酸配列は、SCP 2部分をもたない従来型のチオラーゼよりも、SCP<sub>x</sub>のチオラーゼ部分に対してはるかに高い類似性(57%)を示した。配列の点では、SCP<sub>x</sub>とP-44は第2のチオラーゼ群を形成する。P-44のN-末端に6残基のヒスチジンを付加した組換え型P-44の遺伝子を作製し、これを大腸菌内で発現させ、精製した。組換え型P-44は、炭素数8から16の間の3-オキソアシル-CoAに対して明瞭なチオラーゼ活性を示した。その反応様式は既知の全てのチオラーゼと同様に、ピンポン・パイパイ機構であった。P-44のアセチル-CoAによる阻害様式は、SCP<sub>x</sub>の場合と同じく、CoAに関しては拮抗的、3-オキソアシル-CoAに関しては非拮抗的であった。従来型の酵素は3-オキソアシル-CoAに関して拮抗的に阻害されるので、SCP<sub>x</sub>とP-44は反応様式の点でも、従来型チオラーゼとは異なる第2の群を形成していることになる。そこでSCP<sub>x</sub>とP-44とを、II型チオラーゼとしてまとめることを提案した。

### 第3章 II型チオラーゼの作用

ペルオキシソームにはミトコンドリアのものとは異なる $\beta$ -酸化系が存在する。しかしそこで働くチオラーゼは別に知られているので、II型チオラーゼの役割は他にあるはずである。ところで、胆汁酸合成におけるステロール側鎖酸化の切断は肝臓ペルオキシソームで行われる。この反応は $\beta$ -酸化に似ているが、ステロール側鎖の $\alpha$ -位の炭素にメチル基があるため、いかなる従来型(I型)チオラーゼを用いても、その最終段階を試験管内で再現することはできなかった。ところが、チオラーゼ反応に先立つ2段階の反応を触媒するD-3-ヒドロキシアシル-CoA脱水/脱水素2機能酵素とその本来の基質であるエノイル型中間体のCoA誘導体の存在下に、P-44を働かせると、胆汁酸の主要な2成分であるコール酸とケノデオキシコール酸がそれぞれの前駆体から生成した。SCP<sub>x</sub>も類似の系でこれらの胆汁酸の生成を触媒した。また両酵素は、2-メチル-3-オキソ-ヘキサデカノイル-CoAにも作用した。本研究に前後する他グループの研究によって、SCP<sub>x</sub>が $\alpha$ -位にメチル基をもつプリスタン酸の分解に必要であることが示された。以上のことより、I型チオラーゼは直鎖脂肪酸の分解に関与し、II型チオラーゼは $\alpha$ -位にメチル側鎖をもつさまざまな基質の切断に関与する、と結論した。

### 第4章 線虫 II型チオラーゼの発現様式

肝細胞ペルオキシソームでは胆汁酸の合成やプリスタン酸の分解が行われている。しかし、線虫がこれらの代謝経路をもつかどうかは、まだ明らかにされていない。また、P-44の局在部位も不明である。そこで、P-44の生理的役割を推測する手がかりを得るために、P-44の時間的・空間的発現様式の解明を試みた。まず、線虫の各発生段階を胚、幼生の段階L1からL4まで、幼若成虫、および抱卵成虫に分け、P-44をウエスタン法で、そのmRNAをノザン法で解析した。その結果、P-44は幼生の段階で強く発現していることが明らかになった。次に、線虫個体内でのP-44とそのmRNAの分布を免疫染色と*in situ*ハイブリダイゼーションで調べた結果、主な発現部位は腸細胞であることが判明した。また、細胞内顆粒の分画と免疫電子顕微鏡観察とによって、P-44はSCP<sub>x</sub>と同様、ペルオキシソームのマトリクスに局在することが明らかになった。さらに、薬剤によるP-44の発現誘導を試みた。ラット肝臓ペルオキシソームの強力な誘導剤として知られる、クロフィブレートとWy14643とを比べたところ、 $\alpha$ -位にメチル側鎖をもつクロフィブレートは顕著にP-44の発現を誘導したが、

側鎖をもたないWy14643は僅かな誘導しか示さなかった。

## 第5章 総合考察

線虫の胚発生の過程では、卵に貯えられている脂肪をエネルギー源および糖新生の材料として利用するから、脂肪酸の $\beta$ -酸化が活発である。しかし孵化後には細菌を摂食し、これをエネルギー源および糖源とするので、脂肪酸の $\beta$ -酸化系やグリオキシル酸経路の活性が速やかに低下する。P-44は、孵化後の幼生段階で発現が上昇するので、これが脂肪酸の $\beta$ -酸化に関与している可能性は極めて低い。クロフィブレートによる発現誘導の結果も、P-44がSCPxと同様に、生体内では直鎖の脂肪酸でなく、 $\alpha$ -位にメチル側鎖をもつ脂肪族化合物の代謝に関与している可能性を示唆している。器官組織の分化の程度が低い線虫は独立した肝臓をもたず、腸細胞が肝細胞の働きを兼ねている。従って腸細胞のペルオキシソームに認められたP-44は、局在部位の点でもSCPxと本質的な違いがない。これらを総合的に判断して、その本来の基質は不明であるにせよ、P-44はSCPxと類似の役割を果たしていることを推定した。