

氏名	今井博之
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	総研大甲第23号
学位授与の日付	平成4年 3月16日
学位授与の要件	生命科学研究科 分子生物機構論専攻 学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	The Biochemical study of acyl-(acyl-carrier- protein) hydrolase from cotyledons of <u>Cucurbita</u> <u>moschata</u> Duch.
論文審査委員	主査 教授 村田紀夫 教授 藤田善彦 教授 西村幹夫 助教授 林 秀則 助教授 岡田清孝

論文内容の要旨

I. 序

高等植物において、アシルー [アシルキャリアプロテイン (ACP)] ハイドロラーゼ (AH) はプラスチドのストロマに存在し、アシルー ACP を加水分解して脂肪酸と ACP を遊離させる酵素である。本酵素は高等植物の脂肪酸生合成反応における脂肪酸の鎖長調節を司ると考えられている。

高等植物において、アシルー ACP はプラスチドで合成されるが、グリセロ脂質の生合成はプラスチドと小胞体で行われる。小胞体でグリセロ脂質を生合成するためには、プラスチドからの脂肪酸の供給が不可欠である。AH の触媒する反応はプラスチドから小胞体への脂肪酸輸送過程の初発反応であるので、AH が小胞体への脂肪酸輸送量を律速すると考えられている。しかもこの酵素はプラスチドにおいてアシルトランスフェラーゼ (AT) と基質を競合するので、小胞体とプラスチドの脂質合成系の間脂肪酸の分配は、両酵素の競争的相互作用によって支配されるという考えが提唱されている。この考えを検証するためには、AH と AT の遺伝子の単離が不可欠であろう。

高等植物のアシルー ACP ハイドロラーゼの研究は、主として登熟種子や油脂生産組織を用いて行われている。これらの細胞では、脂肪酸合成能が高く AH 活性も高いためである。植物種子の中には、ラウリン酸のような中鎖脂肪酸を主成分とする油脂 [トリアシルグリセロール (TG)] を含むものが知られている。Pollard らは、ラウリン酸の含量が高いカリホルニアベイの種子からラウロイルー ACP に対して特異的な AH を精製している。これは、AH の基質特異性が TG の脂肪酸組成を制御することを示唆している。

高等植物のグリセロ脂質生合成機構における AH の役割を明らかにすためには、AH 遺伝子の単離が不可欠である。本研究では、AH を精製し生化学的解析を行って遺伝子単離の足がかりをつくることを目的とした。AH 研究は植物

種子で行われているので、本研究では葉を材料として用いた。また、カボチャの子葉から A T が精製されているので、カボチャ子葉から A H を精製した。具体的には、次のことをおこなった。(1) 等電点電気泳動法によりカボチャ葉緑体における A H イソ型を調べた。(2) A H をカボチャ子葉より精製し基質特異性を調べた。(3) 精製酵素の部分一次構造を決定した。

II. 結果と考察

A H のイソ型

カボチャ子葉のクロロプラストを単離し、そのストロマ画分を調製した。これを等電点電気泳動に供して、等電点 (pI) の異なる A H のイソ型を分離した。オレオイル-ACP を基質とした場合、4.5、5.3 および 7.8 の少なくとも 3 つの活性ピークを認めた (それぞれ A H 1、A H 2 および A H 3 と略す)。この結果から、pI の異なる少なくとも 3 つのイソ型がカボチャ子葉のクロロプラストのストロマに存在することが示唆された。

ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより A H 1、A H 2 および A H 3 の分子質量はそれぞれ 51 kDa、51 kDa、 および 57 kDa と推定した。

A H のこれら 3 つの活性についてそれぞれの pH 依存性を調べた。pH 6.2 から pH 10.2 の範囲でオレオイル-ACP を基質として各イソ型の活性を測定したところ、A H 1 および A H 2 は pH 9.8 で最大の活性を示した。A H 3 は pH の増加につれて活性も増加したが、最大活性を示さなかった。

A H の精製

カボチャ子葉より A H 1 を精製した。カボチャ子葉を破砕し、A H の活性画分を 5% PEG 6,000 の遠心上清 (可溶性タンパク質画分) に回収した。この画分に PEG 6,000 を加えて 30% とすると A H は沈澱物中に回収された。この画分を pH 7.4 の緩衝液で平衡化した DEAE-カラムに供した後、カラムを pH 5.5 の緩衝液で平衡化して A H 2 および A H 3 の回収を試みた。しかしこの画分に A H 2 および A H 3 の活性は認められなかった。したがって A H 2 および A H 3 はここまでの精製段階で失活したことが示唆された。A H 1 を pH 5.5 の緩衝液を用い 0-100 mM NaCl の勾配で溶出させた。A H 活性は 10-40 mM NaCl で溶出した。Sephacryl S-200 HR を用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィー

において、A H 活性は単一のピークとして溶出された。ACP-アフィニティカラムクロマトグラフィーにおいて、吸着タンパクを 0-1.0 M NaCl の勾配で溶出したとき、カラムに吸着しているタンパク質の大部分は 0.05-0.2 M NaCl で溶出された。そして、0.3-0.6 M NaCl で A H 活性が溶出された。Mono-P 等電点電気泳動カラムクロマトグラフィーにおいて、A H 活性は pH 4.8 で単一ピークとして溶出された。従って、精製した A H は A H 1 であることがわかった。この操作によって A H 1 をホモジネートに対して 2.5% の収率で 90,000-倍に精製した。

A H 1 ポリペプチドの同定とアミノ末端アミノ酸配列

TSKgel G3000SW ゲルろ過カラムクロマトグラフィーおよび SDS-PAGE の結果から、A H 1 を分子質量 33 kDa のサブユニットからなる二量体であると推定した。精製した A H 1 のアミノ末端アミノ酸配列を決定した。

A H 1 のアシル基質選択性

Mono-P 等電点電気泳動カラムクロマトグラフィーにおける活性画分を用いて、A H 1 のアシル基質選択性を調べた。長鎖脂肪酸を基質とした場合、A H 1 はモノ不飽和脂肪酸（オレオイル-ACP）に対して非常に高い反応性を示したが、飽和脂肪酸（パルミトイル-ACP およびステアロイル-ACP）も基質として利用することが示された。しかし、A H 1 は中鎖脂肪酸であるラウロイル-ACP をほとんど利用しなかった。したがって、A H 1 は長鎖脂肪酸を選択的に利用する A H であることがわかった。

論文の審査結果の要旨

高等植物のアシル（アシルキャリアプロテイン）ハイドロラーゼ(AH)は葉緑体に局在し、細胞内の脂質代謝を制御する酵素である。すなわち、この酵素は葉緑体で合成される脂肪酸をアシルキャリアプロテインから合成させ、ERにおける脂質合成に向かわせる役割を担っている。この点で、葉緑体内の脂質の合成を司るグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼと脂肪酸の利用に関して競合する関係にある。

今井博之は先ずカボチャ子葉は少なくとも3種のAHのイソ型が存在することを明らかにした。次に種々のクロマトグラフィーを組み合わせ、イソ型の一つ、AH1を約10万倍にまで精製して単一標品を得ることに成功した。精製標品の生化学的ならびに化学的性質を調べ、この酵素は33 kDaのサブユニットからなる二量体であること、およびこの酵素はオレオイル-ACPに最も高い選択性を示すことを明らかにした。

この研究の特徴は、(1) 存在量の少ない酵素を10万倍にまで精製して単一標品としたこと、(2) 他の研究グループは出発材料として登熟種子を用いているのに対して、ここでは子葉を用いたこと、(3) 世界で最初にこの酵素を精製したこと、である。なお、この研究内容に関する論文は既に *Plant Molecular Biology* 誌に採択されている。

以上の内容により、審査委員会は当博士論文に対して合格の判定を下した。