

氏 名 林 潤

学位（専攻分野） 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第410号

学位授与の日付 平成11年3月24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 高等植物における脂肪酸 β 酸化系酵素の細胞生物学的研究

論文審査委員 主 査 教 授 村田 紀夫
教 授 西村 幹夫
教 授 堀内 嵩
助 教 授 森 仁志（名古屋大学）

論文内容の要旨

カボチャなどの脂肪性種子において、発芽したばかりの光合成能を持たない黄化子葉は、細胞内のリピッドボディに蓄えられた貯蔵脂肪を糖に変えることによって生長のためのエネルギー及び炭素源としている。この変換を触媒するものがマイクロボディに存在する脂肪酸 β 酸化系とグリオキシル酸サイクルの諸酵素である。高等植物において、この β 酸化系酵素のうち acyl-CoA oxidase は長鎖、中鎖、短鎖の鎖長特異性の異なる 3 種類のアイソザイムを持つことが報告されている。しかし、これまでの報告は生化学的な解析のみであり、分子の実体が明らかにされていなかった。事実、acyl-CoA oxidase の高次構造は多様であり、ラット肝の acyl-CoA oxidase は同一タンパク質が全長と特定部位が切断されて生じた 2 種類のサブユニットにより構成されている。

ミトコンドリアとマイクロボディにおいて脂肪酸 β 酸化が行われる動物とは異なり、高等植物の場合、ミトコンドリアにおける β 酸化活性が非常に低く、脂肪酸 β 酸化の存在にはまだ議論の余地はある。そのため、高等植物では主にマイクロボディで脂肪酸を代謝していると考えられており、マイクロボディの脂肪酸代謝システムは非常に重要である。マイクロボディの脂肪酸 β 酸化系の諸酵素のうち、基質特異性のある acyl-CoA oxidase は β 酸化系のスパイラルに入るための初発酵素である。現在まで、脂肪酸 β 酸化系を構成する他の酵素についての知見はあるが、acyl-CoA oxidase に関してはその解析が進んでいない。そこで、彼は acyl-CoA oxidase の分子の実体を明らかにするため cDNA クローニングを試みた。

第 1 章でカボチャの cDNA ライブラリーより高等植物で初めて acyl-CoA oxidase の cDNA を単離、同定した (*J. Biol. Chem.* 273: 8301-8307)。その解析の結果、このタンパク質はマイクロボディへのターゲティングシグナルとして N 末端に延長配列をもつことが判明した。動物の acyl-CoA oxidase は全て C 末端にターゲティングシグナルをもつ形で合成されるので、機能の同一な acyl-CoA oxidase が植物と動物において輸送シグナルを異にすることが判明した。また、発現パターンが同じ β 酸化系酵素の thiolase と同様の挙動を示すことより β 酸化系の諸酵素が同じ機構で制御されている可能性が示唆された。また、この acyl-CoA oxidase の基質特異性を解析したところ長鎖、中鎖のアシル CoA に特異的な長鎖特異的 acyl-CoA oxidase であることが明らかとなった。

次に第 2 章では、現在知られている分子量 60,000-70,000 の acyl-CoA oxidase より計算分子量が小さい 47,000 の acyl-CoA oxidase と推測されるタンパク質について解析を行った。バキュロウイルス発現システムを使用して、活性を保ったまま発現させて精製を行った。精製タンパク質の解析から、C8 以下の短鎖アシル CoA に基質特異性をもつ、高等真核生物で初めて分子の実体が報告される短鎖特異的 acyl-CoA oxidase であることを明かにした (*J. Biol. Chem.* accepted)。動物では短鎖アシル CoA はミトコンドリアに輸送されて代謝されるため、短鎖特異的 acyl-CoA oxidase は存在しない。このことは、短鎖長のアシル CoA がミトコンドリアに輸送され ATP 生成に利用される動物細胞と異なり、植物細胞では脂肪酸がマイクロボディ内で完全に分解されてアセチル CoA になり、糖新生の基質として利用されていることを示している。

これら長鎖、短鎖 acyl-CoA oxidase の解析により、高等植物における acyl-CoA oxidase

の炭素鎖長特異性がタンパク質自身に由来するものであり、高等植物のミクロボディβ酸化系には、長鎖、短鎖の基質特異性の異なる2種類の acyl-CoA oxidase が存在していることが明らかになった。このことにより、ミクロボディ内で脂肪酸が長鎖から短鎖まで完全に代謝されていることが分子レベルで初めて明らかにされた。

論文の審査結果の要旨

脂肪性種子において、発芽したばかりの光合成能を持たない黄化子葉は、細胞内のリポッドボディに蓄えられた貯蔵脂肪を分解し、糖に変えることによって生長のためのエネルギー及び炭素源としている。貯蔵脂肪は脂肪酸に変換された後に、マイクロボディに存在する脂肪酸 β 酸化系により分解される。申請者は、脂肪酸 β 酸化系の初発酵素である acyl-CoA oxidase の分子の実体と基質特異性を明らかにするため、acyl-CoA oxidase の cDNA クローニングとその構造解析を行った。その結果、単離した cDNA にコードされるタンパク質はマイクロボディに局在する acyl-CoA oxidase であり、長鎖から中鎖のアシル CoA を特異的に基質とすることが明らかになった。生化学的な解析結果より、高等植物では、脂肪酸は長鎖から短鎖まで完全にマイクロボディで代謝していると考えられている。単離した長鎖 acyl-CoA oxidase は、長鎖、中鎖アシル CoA のみを基質としていることから、高等植物のマイクロボディには短鎖アシル CoA に特異的な acyl-CoA oxidase が存在していることが推測された。そこで、この acyl-CoA oxidase と相同性をもつ分子量 47,000 の acyl-CoA oxidase と推測されるタンパク質について解析を行った。バキュロウイルス発現システムを用いて、このタンパク質を活性のある状態で発現させ、完全精製を行った。精製タンパク質の解析から、このタンパク質は短鎖アシル CoA に基質特異性をもつ、高等真核生物で初めて分子の実体が報告される短鎖 acyl-CoA oxidase であることを明らかにした。

動物では、短鎖アシル CoA はミトコンドリアに輸送されて acyl-CoA dehydrogenase により代謝されるため、短鎖 acyl-CoA oxidase は存在しない。このことは、短鎖長のアシル CoA がミトコンドリアに輸送され、ATP 生成に利用されている動物と異なり、高等植物では脂肪酸がマイクロボディ内で完全に分解されてアセチル CoA になり、糖新生の基質として利用されていることを示している。本研究の結果は、高等植物の脂質分解の制御を解明する上で、重要な知見を提供するものである。この研究成果は 2 編の国際誌に投稿されており、1 編は既に J. Biol. Chem. 誌に掲載されている。

本研究は、高等植物の β 酸化系には、長鎖、短鎖の基質特異性の異なる 2 種類の acyl-CoA oxidase がマイクロボディ内に局在し、マイクロボディ内で脂肪酸が長鎖から短鎖まで完全に分解されていることを分子レベルで初めて明らかにしたもので、学位論文として十分な内容をもつと判定した。

また、審査委員会は、専門領域及び関連領域に関する口述試験を行った。その結果、審査委員は一致して、林潤君が行った研究内容、林君の専門分野の知識とその理解に関して、博士の課程修了および学位取得の要件を十分に満たすものと判定した。

更に、英語に関しては既に数編の英文原著論文を発表しており、それらの論文から判断して博士として十分であると判断した。